

令和6年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

令和7年5月27日提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知 光 殿

報告者氏名： 日比野 沙奈

研究課題： ストレスタンパク質を発現するヒト腫瘍内T細胞集団の特性解明と新規治療戦略への展開

研究期間： 自 令和6年7月30日
至 令和7年3月31日

研究指導者：氏名 西川 博嘉

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) 期間中の研究について

1) 要旨

免疫チェックポイント阻害療法 (Immune checkpoint blockade: ICB)をはじめとしたがん免疫療法の臨床効果は、未だ満足のいくものであるとは言い難い。ICB に対する治療抵抗性を克服するためには、治療応答の本態となるエフェクターT細胞が腫瘍局所においてどのように機能制御されているか、分子レベルで理解することが喫緊の課題である。本研究では、パブリックデータの再解析から ICB に対する治療抵抗性への寄与が示唆された、ストレス関連タンパク質 X (以下分子 X とする)の高発現を特徴とする新規腫瘍内 T 細胞集団に着目した。ヒト T 細胞における分子 X の役割は未知であったが、本研究より ①分子 X が T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR)下流のシグナル伝達や TCR の avidity に依存した発現制御を受けること、②分子 X を高発現する T 細胞集団が、B 細胞との相互作用を介して腫瘍内三次リンパ組織(tertiary lymphoid structures; TLS)における免疫応答に関与していること、が明らかになった。これらの知見はいずれも、この新規 T 細胞サブセットが何らかのユニークな免疫学的特性を有することを裏付けるものである。今後は、このサブセットの更なる特性解明を通して、分子 X を軸とした新たな T 細胞機能制御機構や ICB の治療抵抗性メカニズムの一端を明らかにし、ICB の治療効果を高める新規治療戦略の開発へとつなげていきたい。

2) 序

ICB の近年の躍進は、従来のがん治療にパラダイムシフトをもたらしたが、その効果は一部のがん種・患者に限定的であり、全体の奏効率は 20~30%程度にとどまっているのが現状である。がん免疫療法のさらなるブレイクスルーを実現するためには、ICB に対する治療抵抗性の背景にある分子機序の解明や、それに基づく新規治療戦略の確立が喫緊の課題と言える。

ICB 下の免疫応答の本態解明には、治療応答の主体となる腫瘍浸潤リンパ球(TIL) の機能的な heterogeneity を理解することが非常に重要である。我々は、各種ヒト固形腫瘍組織の single-cell RNA- sequencing (scRNA-seq)の公開データの再解析から、従来の定型的な免疫表現型分類に当てはまらない、ストレス関連タンパク質 X 遺伝子 (以下分子 X とする)の高発現を特徴とする新規腫瘍内 T 細胞集団を同定した。興味深いことに、TIL における分子 X の発現レベルは、ICB の非奏効群で、特に治療後に顕著に上昇していることが確認されており、このサブセットは“適切に活性化されていない、十分な抗腫瘍活性を持たない T 細胞集団”として ICB への治療抵抗性に寄与している可能性が示唆される。

分子 X を発現する腫瘍内 T 細胞集団の存在についてはその他研究グループの報告からも示唆されているが、いずれも遺伝子データセットの解析に基づいたユニークな T 細胞集団の特定にとどまっている。分子 X のようなストレス誘導性分子を発現する T 細胞集団は、実験過程で生じる artifact と捉えられ解析から除外されるケースが多かったことや、分子 X と典型的な T 細胞機能マーカー・疲弊関連分子の発現パターンが部分的にしか一致しないことから、これまでは解析対象として注目されることがなかったのだと推測され、その免疫学的意義の解明には未だ踏み込まれていない。

上記を踏まえ、本研究では、これまで見落とされていた、T 細胞ではまだ機能未知である分子 X に着目することで、既知の免疫チェックポイント機構とは異なる新しい T 細胞の機能抑制メカニズムを明らかにし、新規治療戦略の確立へと繋げることを目標として設定した。

3) 実験方法

In vitro T 細胞培養

ヒト末梢血より Ficoll 法により末梢血単核細胞 (PBMC) を回収したのち、EasySep Human CD3 Positive Selection Kit (STEMCELL Technology) により CD3 陽性 T 細胞分画を抽出した。T 細胞は Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 と IL-2 の存在下で活性化・増殖させた。また、抗原特異的 T 細胞の誘導実験については、HLA-A の遺伝子型が*0201 の健康人 PBMC (CTL 社より購入) を、HLA-A*0201 拘束性のサイトメガロウイルス(CMV)もしくはインフルエンザウイルス由来ペプチドにより刺激し、2 週間の培養を実施した。

フローサイトメトリ解析

【表紙】

フローサイトメトリ解析に供するサンプル（ヒト TIL 検体・*in vitro* 培養 T 細胞）は、BD Pharmingen™ Human BD Fc Block で処理後、各種細胞表面分子に対する抗体で染色した。細胞内・核内分子を検出する場合は、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞の固定および透過処置を行なったのち、目的分子に対する抗体で染色した。抗原特異的 T 細胞は T-Select MHC Tetramer (MBL)により検出した。フローサイトメトリ解析は BD FACSymphony™A5 (BD Biosciences)により実施した。

遺伝子データセット解析

NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ならびに T cell Map(<https://singlecell.mdanders.on.org/TCM/>)より既報論文の scRNA-seq データセットを取得したのち、Seurat v5 (<https://satijalab.org/seurat/>)を用いて一連の解析を実施した。本研究で利用したデータセットの詳細を以下に示す。

- ・ GSE173351; ヒト非小細胞性肺癌浸潤 T 細胞 (Caushi *et al. Nature* 2021)
- ・ GSE148071; ヒト非小細胞性肺癌組織 (Wu *et al. Nat Commun.* 2021)
- ・ GSE288199; ヒト頭頸部扁平上皮がん浸潤 T 細胞 (Li *et al. Cancer Cell.* 2025)
- ・ Pan-cancer single-cell T cell atlas; 計 16 がん種 (Chu *et al. Nat Med.* 2023)

共焦点顕微鏡観察

In vitro 培養ヒト T 細胞を、抗 CD3 ならびに抗分子 X 抗体で染色後、抗 CD45 抗体でコーティングしたガラスボトムディッシュに播種した。37°C で 30 分間インキュベートして細胞を接着させたのち、パラホルムアルデヒドで固定し、FITC がコンジュゲートされたコレラトキシン B サブユニット (Merck Millipore) で標識した。細胞は DAPI 入り封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI) により核染色を実施したのち、共焦点顕微鏡 Zeiss LSM800 によりイメージングを行なった。

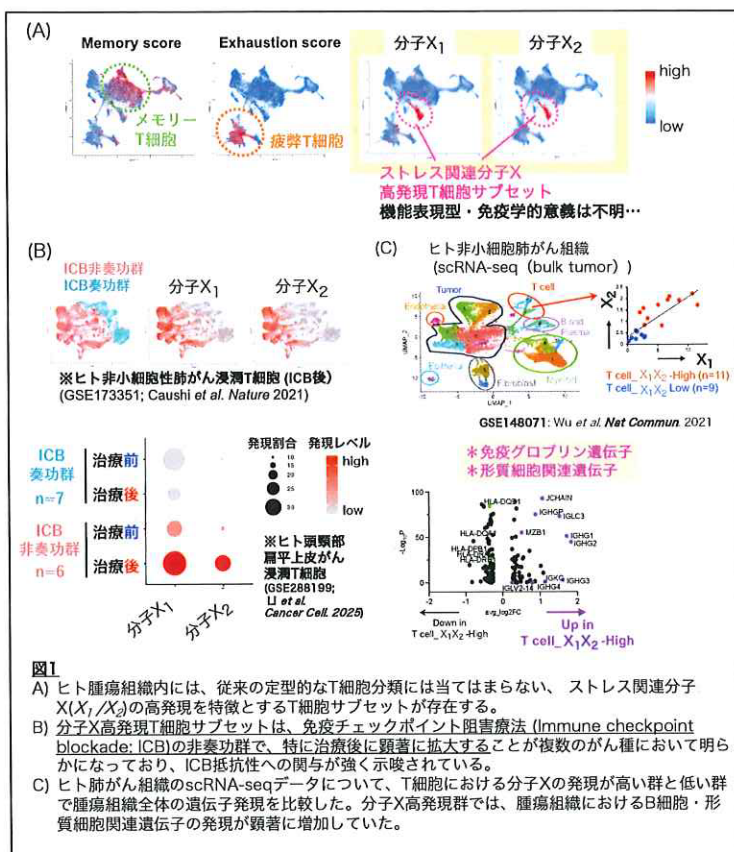
組織多重蛍光免疫染色

国立がん研究センター東病院にて取得された肺癌病理組織より、組織マイクロアレイを作製した。各種がん細胞・免疫細胞マーカー約 50~60 分子に対する抗体、ならびに細胞内分子 X と細胞表面分子 X をそれぞれ特異的に認識可能な抗体 2 種類から構成されるパネルに基づいた、PhenoCycler (CODEX)システムによる多重蛍光免疫染色を行った。

4) 結果

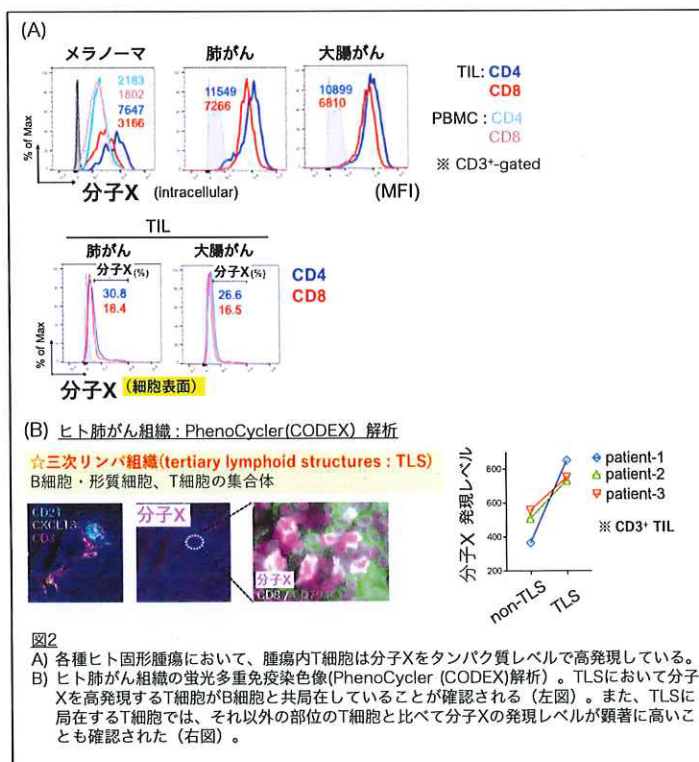
1. ICB 抵抗性と関連する、新規腫瘍内 T 細胞集団の同定

各種ヒト固形腫瘍組織の single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq)の公開データの再解析を実施した。疲弊 T 細胞 (Tex) やメモリー T 細胞 (T_{Mem}) といった従来の免疫表現型分類に当てはまらない新しい腫瘍内 T 細胞サブセットとして、ストレス関連タンパク質 X (以下分子 X) 遺伝子の高発現を特徴とする T 細胞集団が特定された (図 1-A)。興味深いことに、TIL における分子 X の発現レベルは、ICB の非奏功群で、特に治療後に顕著に上昇していることが確認された (図 1-B)。また、ヒト肺癌組織の scRNA-seq データを用いて、T 細胞における分子 X の発現が高い群と低い群での腫瘍組織全体の遺伝子発現の比較を実施した。分子 X 高発現群では、腫瘍組織における B 細胞・形質細胞関連遺伝子の発現が顕著に増加していた (図 1-C)。



2. ヒト腫瘍組織内における、分子X 高発現 T細胞サブセットの存在

1. の遺伝子発現データセットの解析より見出された知見を検証するため、肺癌・大腸がん・悪性黒色腫患者の TIL ならび病理組織検体を用いた解析を実施した。TIL 検体のフローサイトメトリ解析により、分子Xをタンパク質レベルで高発現する細胞集団が検出され、その発現レベルは末梢血中T細胞に比べて顕著に高いことが確認された (図2-A)。また、分子Xを発現するT細胞集団は、腫瘍内の三次リンパ組織(tertiary lymphoid structures; TLS)に選択的に蓄積しており、B細胞と共局在する形で存在していた (図2-B)。加えて、TLSに局在するT細胞における分子Xの発現レベルは、腫瘍内の他の部位に存在するT細胞に比べて顕著に高いことが確認された (図2-B)。



3. TCR シグナルによる分子 X の発現制御

健康人 PBMC より単離した CD3 陽性 T 細胞について、抗 CD3/28 beads による 2 日毎の繰り返し刺激を実施し、各種 T 細胞疲弊関連分子 (PD-1, Tim-3, Entpd1 (CD39)) ならびに分子 X の発現動態を検討した。分子 X は TCR 下流のシグナル伝達により発現誘導され、そのタイムコースが既知の TCR 応答性の疲弊関連分子とは異なることが確認された (図 3-A,B)。

さらに、ペプチド刺激・テトラマー染色による抗原特異的 T 細胞の誘導・検出実験を実施した。PD-1 のような抗原刺激の強度に応じて発現誘導される分子は、テトラマー染色の強度が高い分画 (Tet-High) で高発現していた。一方、細胞表面における分子 X の発現は、テトラマー染色陽性でも染色強度の低い分画 (Tet-Low) で顕著に高発現が見られた (図 3-C)。

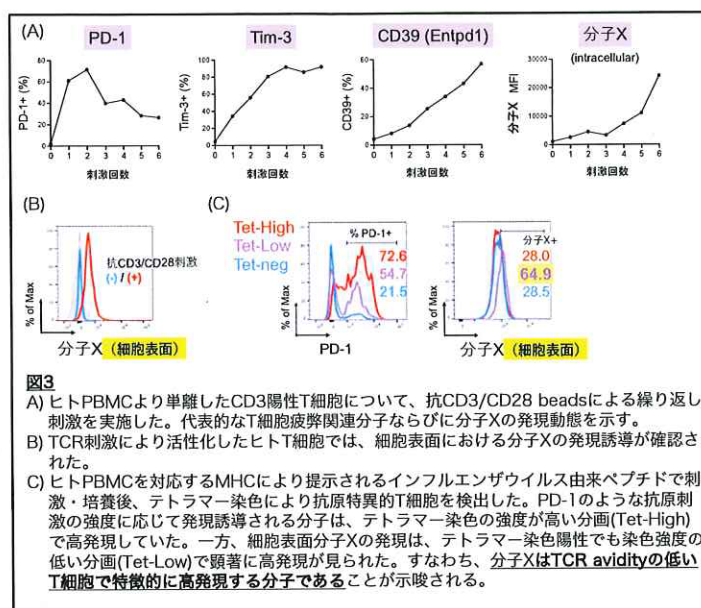


図3

A) ヒト PBMC より単離した CD3 陽性 T 細胞について、抗 CD3/CD28 beads による繰り返し刺激を実施した。代表的な T 細胞疲弊関連分子ならびに分子 X の発現動態を示す。
B) TCR 刺激により活性化したヒト T 細胞では、細胞表面における分子 X の発現誘導が確認された。
C) ヒト PBMC を対応する MHC により提示されるインフルエンザウイルス由来ペプチドで刺激・培養後、テトラマー染色により抗原特異的 T 細胞を検出した。PD-1 のような抗原刺激の強度に応じて発現誘導される分子は、テトラマー染色の強度が高い分画 (Tet-High) で高発現していた。一方、細胞表面分子 X の発現は、テトラマー染色陽性でも染色強度の低い分画 (Tet-Low) で顕著に高発現が見られた。すなわち、分子 X は TCR avidity の低い T 細胞で特異的に高発現する分子であることが示唆される。

4. T 細胞膜上の脂質ラフト領域における、分子 X の発現局在

共焦点顕微鏡を用いたイメージング解析により、T 細胞表面における分子 X の発現分布を検討した。抗 CD3/28 beads により繰り返し刺激を受けたヒト T 細胞では、コレラトキシン B により染色される細胞膜上の脂質ラフト領域における分子 X の発現分布が確認された。

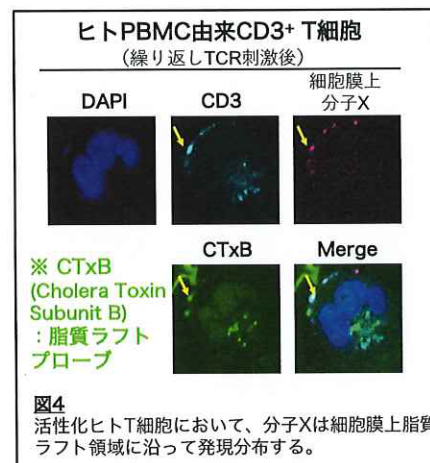


図4

活性化ヒト T 細胞において、分子 X は細胞膜上脂質ラフト領域に沿って発現分布する。

5) 考察

パブリックデータの再解析から、分子 X を高発現する腫瘍内 T 細胞集団は、ICB の非奏功群において、特に治療後に顕著に拡大するサブセットであることが複数のがん種において確認された。この新規 T 細胞サブセットは“適切に活性化されていない、十分な抗腫瘍活性を持たない T 細胞集団”として ICB への治療抵抗性に寄与している可能性が示唆される。また、ヒト T 細胞における分子 X の役割については現時点で報告はないが、本研究より ①分子 X が T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) 下流のシグナル伝達や TCR の avidity に依存した発現制御を受けること、②分子 X 高発現 T 細胞は、B 細胞との相互作用を介して TLS における免疫応答に関与していること、が示唆された。これらの知見は、分子 X と TCR の機能連関の可能性や、この T 細胞集団が抗腫瘍免疫応答において特徴的な機能を有することを裏付けるものである。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

パブリックデータを用いた解析から、分子 X は幅広い種類の固形がんにおいて ICB の治療抵抗性との関連が示唆されており、標的とした創薬に成功した場合極めて大きな臨床的・社会的意義をもたらすことが期待される。今後は今回の研究成果をさらに発展させ、分子 X を標的とした新規がん薬物治療戦略の開発へ向けた proof of concept (POC) の取得を目指す。本研究では、分子 X 高発現 T 細胞集団について、ICB 後に顕著に拡大するサブセットであることや TCR avi

dity との関連を明らかにできた。これらの知見を踏まえ、今後は、ICB 前後での TCR レパトアパターンや、抗原特異性・TCR avidity を指標に、この新規 T 細胞サブセットについて更なる免疫学的表現型の解明を進めていきたい。また、腫瘍内の特定部位での局在を示唆するデータを踏まえ、局在部位や特定免疫細胞との相互作用といった空間的視点からもその特性をより詳細に明らかにしていきたい。