

腫瘍局所の抗原特異的 T 細胞に類似した疲弊化 T 細胞モデルの作製

申請者: 愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 連携大学院生 篠原 周一

共同研究者: 愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 分野長 松下 博和

ユニット長 村岡 大輔

1. 研究の背景・目的

がん細胞を排除する免疫応答には、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が中心的な役割を担っており、がん細胞に発現するがん抗原を認識し細胞傷害活性を示す。CTL は様々な分化段階にある細胞群から成り立っており、比較的未分化なものから活性化しているもの、さらに疲弊が進んだ状態のものまで様々である。近年、腫瘍局所においては、疲弊状態にある細胞群 (Tex: T exhausted) に、がん抗原に特異的な T 細胞が高頻度でみられることが報告されている [1]。しかし、持続的な抗原暴露により T 細胞は機能不全・疲弊状態に陥っており、がん細胞を排除できなくなっており、結果としてがんは免疫監視をすり抜けてしまう。我々はこの疲弊化 T 細胞に注目し、疲弊が可逆的な“progenitor exhausted”の状態にある T 細胞 (Tpex: T progenitor exhausted) と、不可逆的な“terminal exhausted”の状態の T 細胞 (Tex) の違いを明らかにすることが重要と考えた。現在のところ、T 細胞の疲弊については代謝が関与していることが指摘され、さらにエピジェネティックな変化が重要と考えられている。

T 細胞疲弊の解明において、我々のグループがこれまでに同定した肺癌における T 細胞受容体 (T cell receptor :TCR) -抗原ペアを活用して、腫瘍局所の抗原特異的 T 細胞に類似した二つの疲弊化 T 細胞モデル (“terminal exhausted” T 細胞と “progenitor exhausted” T 細胞) を *in vitro* で作製し、さらに疲弊化の予防と解除するような治療戦略に結び付けることを目的とする。

2. 研究の対象ならびに方法

愛知県がんセンター呼吸器外科で手術を行った非小細胞肺癌患者の中で、腫瘍組織(浸

潤リンパ球を含む)と DNA, RNA を採取し、抗原特異的な CD8⁺T 細胞とネオアンチゲンのペアを同定できた 3 例を対象とした(施設研究倫理審査番号: 2018-2-20)。まず、シングルセル解析の結果から、同定した腫瘍抗原に特異的な T 細胞において、Tex と Tpex に特徴的な遺伝子の発現を調べ、そして抗原特異的 T 細胞ごとの分化段階、機能についてシングルセル解析データを用いて検討した。次に、我々が同定した抗原特異的な TCR の親和性について検討した。それぞれの抗原エピトープペプチドを自己の B 細胞由来抗原提示細胞 (B-APC) にロードして、目的の TCR 遺伝子をレトロウイルスで導入した Jurkat 細胞 (安定 Jurkat-TCR 細胞)を刺激し、NFAT レポータールシフェラーゼアッセイで評価した。さらに、TCR の親和性と、抗原特異的 T 細胞の分化段階、機能の相関性を検討した。

3. 研究結果

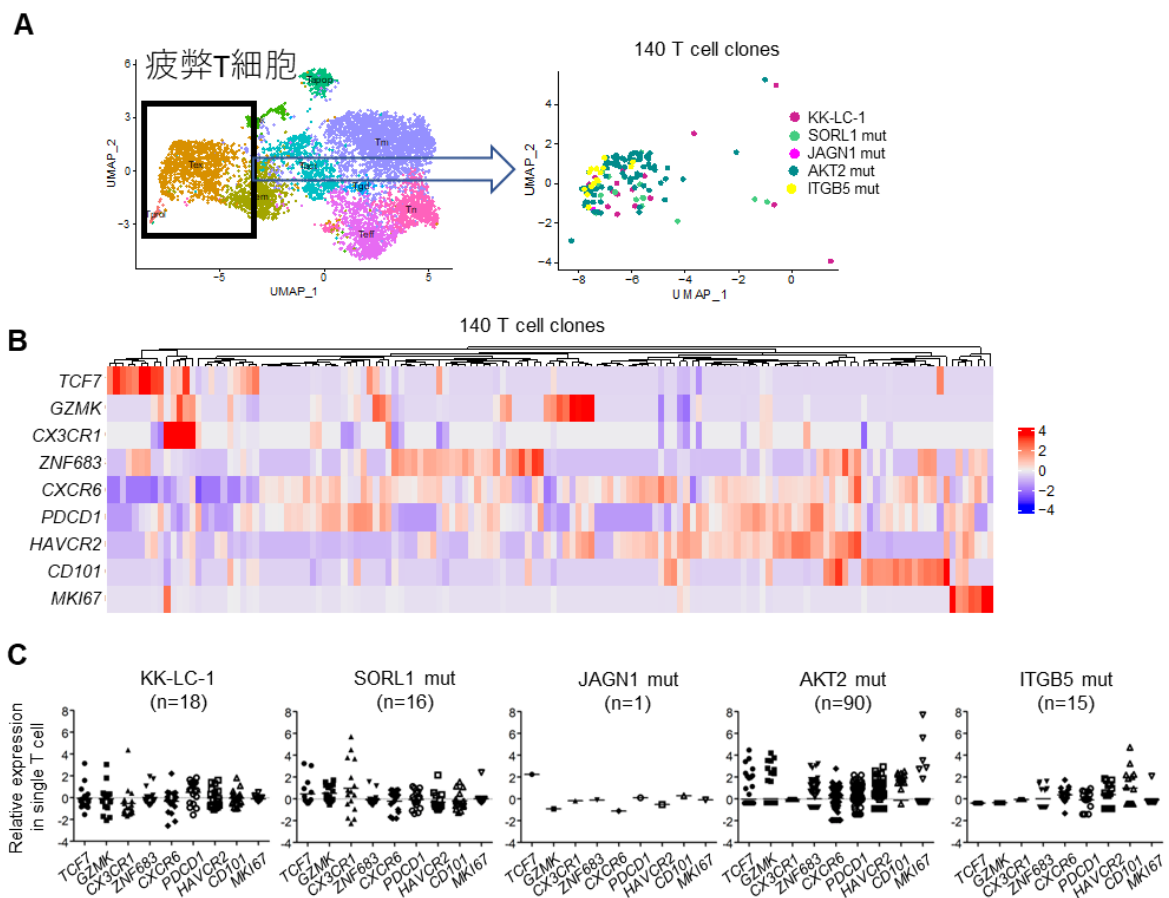
肺癌 3 例の腫瘍浸潤 CD8⁺T 細胞シングルセル解析 (CD8T scRNA/TCR-seq) を行い、疲弊 T 細胞集団から、5 つの腫瘍抗原 (KK-LC-1、変異 SORL1、変異 JAGN1、変異 AKT2 及び変異 ITGB5) とそれらに特異的な 9 種の TCR クロノタイプ (T 細胞クローン: n=140) を同定した。腫瘍抗原特異的 T 細胞の分化段階を調べるために、140 個の抗原特異的 T 細胞クローンを再クラスタリングした (図 1A)。マウス慢性感染モデルでは、ウイルス特異的 T 細胞は、Tpex (PD-1⁺TCF1⁺T 細胞) から移行型 (CX3CR1⁺PD1⁺T 細胞) を経て Tex (CD101⁺PD-1⁺Tim-3⁺T 細胞) へと分化することが明らかになった [2]。また、ヒトがんの腫瘍浸潤リンパ球においては、2 つの移行型 (GZMK⁺T 細胞及び ZNF683⁺ CXCR6⁺T 細胞) が報告された [3, 4]。分化状態を明らかにするため、140 個の T 細胞におけるそれらの遺伝子発現を調べた (図 1B,C)。階層クラスタリングの結果、*TCF7*、*GZMK*、*CX3CR1*、*ZNF683*、*CD101* などの各分化マーカーの遺伝子発現は、他の遺伝子発現と相互排他的であるが、一部の遺伝子発現は個々の T 細胞クローンで重複していた (図 1B)。

KK-LC-1、変異 SORL1、変異 JAGN1 および変異 AKT2 特異的 T 細胞において、一部の T 細胞クローンは、*TCF7* を発現したが、変異 ITGB5 特異的 T 細胞では発現しなかった (図 1C)。移行型の T 細胞マーカー *CX3CR1* 遺伝子に関しては、KK-LC-1 および変異 SORL1 特異的 T 細胞で発現したが (図 1C)、変異 AKT2 または変異 ITGB5 特異的では発現しなかった。代わりに、*GZMK*、*ZNF683* および *MKI67* は、いくつかの変異型 AKT2 特異的 T 細胞において高発現した。終末マーカー *CD101* を有する T 細胞クローンは、変

異型 ITGB5 特異的 T 細胞において頻繁に観察された。これらの結果から、各腫瘍抗原特異的 T 細胞間で分化の偏りが存在することが示唆された。

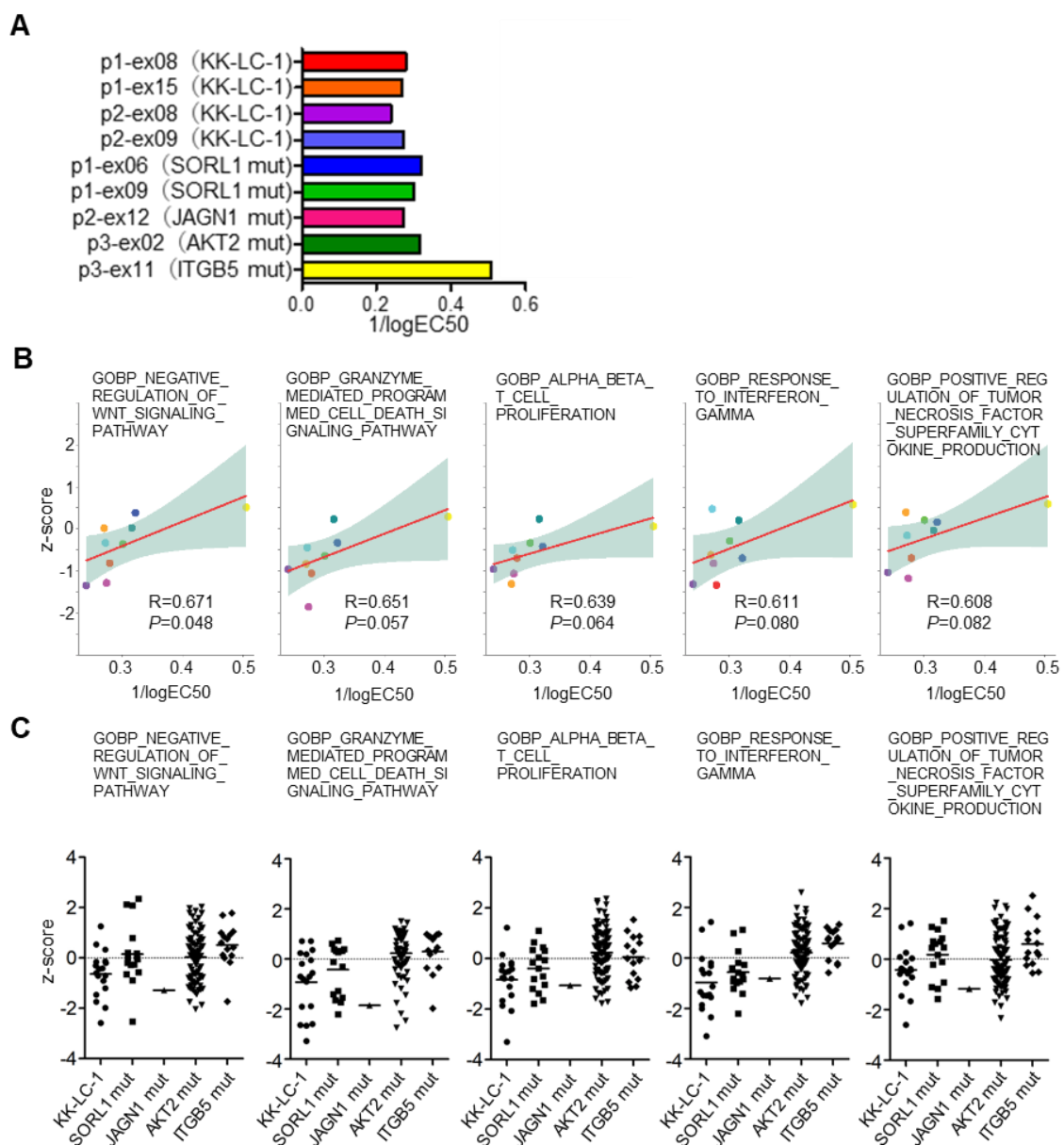
次に、TCR の親和性を、それぞれの抗原エピートープペプチドを自己 B-APC にロードして、目的の TCR 遺伝子をレトロウイルスで導入した安定 Jurkat-TCR 細胞を刺激し、NFAT レポータールシフェラーゼアッセイにより評価した (各 TCR クロノタイプの TCR シグナル強度を logEC50 の逆数(1/logEC50)として表した) (図 2A)。特に、変異型 ITGB5 に特異的な Jurkat-TCR 細胞が最も高い機能活性を示した。より親和性の高い TCR クロンは、終末分化疲弊 T 細胞に分化することが知られている。したがって、変異型 ITGB5 特異的 T 細胞は *CD101* を発現しており、終末分化疲弊 T 細胞に分化している可能性がある。

図 1



次に、9つのTCRクロノタイプにおける *in vitro* での TCR シグナル伝達と *in vivo* での T 細胞の性質の関連性を調べた(図 2B)。TCR シグナル強度は、陰性の WNT シグナル伝達経路(ピアソン相関($r=0.671$ 、 $p=0.048$))、グランザイム媒介プログラム細胞死シグナル伝達($r=0.651$ 、 $p=0.057$)、T 細胞増殖($r=0.639$ 、 $p=0.064$)、インターフェロンガンマに対する応答($r=0.611$ 、 $p=0.080$)、および腫瘍壊死因子スーパーファミリーサイトカイン産生($r=0.608$ 、 $p=0.082$)と関連していた。これらの遺伝子シグネチャにおいて、それぞ

図 2



れのネオアンチゲン特異的 T 細胞の z スコアは様々であったが、Jurkat-TCR 細胞が最も高い機能活性を示した変異型 ITGB5 特異的 T 細胞はこれらの遺伝子発現が高かった(図 2C)。

4. 考察

本研究で、肺癌に浸潤する腫瘍抗原特異的 CD8⁺T 細胞の中でも、*TCF1* を発現する T_{pex} や、*CX3CR1* や *ZKF683* を発現する移行型 T 細胞、*CD101* を発現する T_{ex} が存在することがわかった。そして、抗原の違いにより、それらのマーカー遺伝子の発現が異なり、分化状態に偏りが存在した (Komuro, Shinohara et al, submitted)。今後は、TCR-抗原ペアの同定症例を増やし、肺癌に浸潤する疲弊化 T 細胞について、抗原の違いによる T_{pex}、移行型、T_{ex} への分化の偏りの違いとそのメカニズムを明らかにしていく予定である。

最後になりますが、本助成により貴重な研究の機会をいただき、ご評価いただきました審査員の先生方、またサポートいただきました事務局の方々に、深く感謝申し上げます。

5. 参考論文

1. Caushi JX, Zhang J, Ji Z et al. Transcriptional programs of neoantigen-specific TIL in anti-PD-1-treated lung cancers. *Nature* 2021; 596: 126-132.
2. Hudson WH, Gensheimer J, Hashimoto M et al. Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1(+) Stem-like CD8(+) T Cells during Chronic Infection. *Immunity* 2019; 51: 1043-1058 e1044.
3. Guo X, Zhang Y, Zheng L et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med* 2018; 24: 978-985.
4. Zheng L, Qin S, Si W et al. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science* 2021; 374: abe6474.