

膠芽腫の空間的遺伝子発現解析による TLS の同定と新規免疫療法の開発

愛知県がんセンター

腫瘍免疫制御 TR 分野 リサーチレジデント 水田 亮

愛知県がんセンター

腫瘍免疫制御 TR 分野 任意研修生 岡本貴成

岡山大学

脳神経外科 助教 大谷理浩

愛知県がんセンター

腫瘍免疫制御 TR 分野 分野長 松下博和

1. 研究の背景・目的

膠芽腫は依然として中枢神経系腫瘍の中で最も悪性度の高い腫瘍の一つであり、病態の解明とそれに基づく新たな治療戦略の開発は急務である。

近年、腫瘍内において B 細胞を中心に T 細胞や樹状細胞等の複数の細胞で構成される三次リンパ様構造(TLS)が注目されており、その存在が予後良好因子となることが様々ながん種で報告されている。レーザーマイクロダイセクションによるメラノーマ TLS の BCR レパトア解析では、クローナル増殖およびクローン選択、体細胞突然変異、クラススイッチを認めており、TLS 内の B 細胞において、抗原特異的抗体反応の誘導が示唆されている(Cipponi et al, Cancer Res 2012)。しかし、膠芽腫における TLS の存在とそれを構成する B 細胞の性質についてはこれまで詳しく解析されていない。

TLS に存在する B 細胞の性質(クローナル増殖およびクローン選択、体細胞突然変異、クラススイッチ等)を明らかにするためには空間解析が必須である。本研究は、空間解析によって膠芽腫における TLS の存在とそれを構成する B 細胞の性質を明らかにし、将来、B 細胞を膠芽腫の治療戦略に役立てることを目的とする。TLS 内でクローナル増殖している B 細胞受容体(BCR)を同定し、さらにその BCR の腫瘍特異性が確認できれば、抗体療法や CAR-T 細胞療法の開発に繋げることが可能となる。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 膠芽腫検体の収集

腫瘍検体を収集し、免疫染色やフローサイトメトリーで TLS 形成や腫瘍浸潤 B 細胞 (TIL-B) を評価した。その中で、良好な TLS を形成し、比較的 TIL-B の豊富な症例を選択した。

(2) 空間トランスクリプトーム解析による TLS の同定

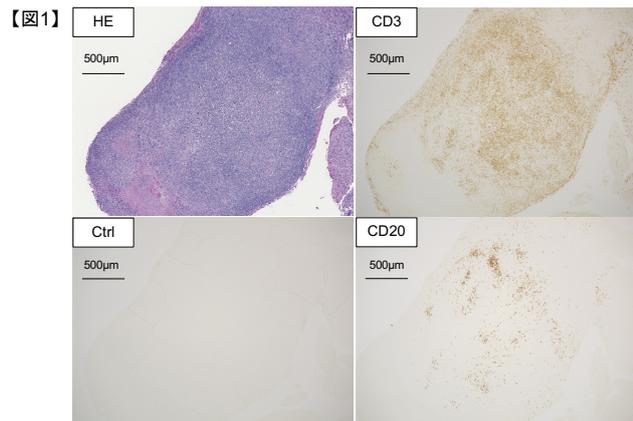
(1)で選択した症例に対して FFPE 検体を用いた Visium による網羅的な空間トランスクリプトーム解析を実施し、TLS を同定した。TLS とその周辺領域における遺伝子発現の違いを解析し、免疫染色で同定した TLS の存在が Visium による遺伝子解析でも裏付けられることを確認した。また、成熟 TLS のマーカーである CD21、TLS を構成する高内皮細静脈や成熟樹状細胞の他、濾胞性ヘルパーT 細胞や、それから産生される CXCL13 などの遺伝子発現を確認した。

※当該研究に関しては愛知県がんセンター倫理審査委員会で既に承認済である(許可番号：2022-0-114)。

3. 研究結果

(1) 膠芽腫検体の収集

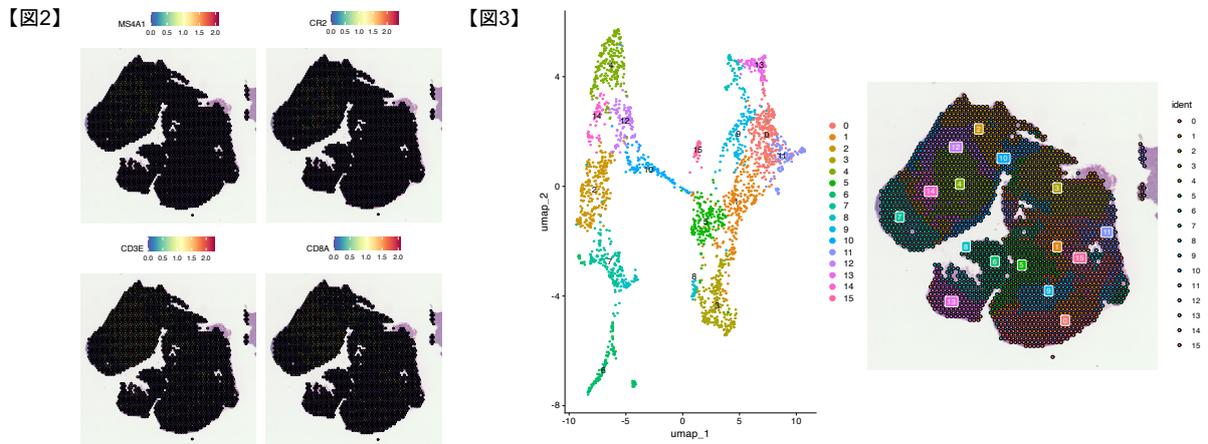
54 例の膠芽腫検体を収集し、免疫染色で評価したところ、4 例 (7.4%) で TLS の形成を認めた (図 1：代表例)。TLS を認める症例は、そうでない症例と比較して、フローサイトメトリーで T 細胞および B 細胞の浸潤が多かった。



(2) 空間トランスクリプトーム解析による TLS の同定

Visium 解析で、B 細胞のマーカーである CD20 遺伝子 (*MS4A1*)、成熟した TLS のマーカーである CD21 遺伝子 (*CR2*) の発現を確認し、免疫染色で認めた TLS は成熟状態にあることが分かった (図 2)。また、その近傍には *CD3E* および *CD8A* 遺伝子も豊富に発現しており、免疫染色の結果に合致していた。TLS 形成初期から重要になる高内皮細静脈および成熟樹状細胞の遺伝子 (*NTAN1*, *LAMP3*) は TLS 部以外にも広く発現しており、濾胞性ヘルパーT 細胞のマーカーとなる *PDCD1* および *CXCR5* と、それから産生される *CXCL13* は TLS 部でとくに高発現していた。さらに、UMAP

クラスタリングを行ったところ、TLSの存在する Cluster 4や Cluster 12では、*CCL19*、*CR2*、*CXCL13*、*MS4A1*などの TLS 関連遺伝子や、*JCHAIN*、*IGHA1*、*IGKC*、*IGLC1*などの免疫グロブリン関連遺伝子の発現が上昇していた（図3）。



4. 考察

実施した Visium 解析により、切片上には比較的大きな成熟した TLS が形成されていることが確認できたが、これまでにヒトの膠芽腫で報告されている TLS は他がん種と比較してサイズの小さなものばかりである。近年、様々な下流解析ツールが登場しており、それらを駆使して今回の Visium データを解析することで、膠芽腫における TLS のさらなる理解に繋がるものと考えられる。

また、膠芽腫において CD20 の発現上昇により予後が改善することが報告されている一方で、他がん種のように TLS の有無自体と生存率との相関は示されていない。免疫治療に良好に反応するがん種と膠芽腫との違いが何なのか、さらには同じように見える TLS でもがん種によって予後に直結させない抑制的な因子が存在しているのかどうか、腫瘍形成とそれに対抗する抗腫瘍免疫の両サイドから解析を行うことで膠芽腫のより詳細なメカニズム解明を目指す。

当初、研究を計画していた TLS レーザーマクロダイセクションによる BCR レパトア解析、TIL-B のシングルセル解析、及び BCR の腫瘍特異性の検討についてはまだ実施できていないが、TLS を認める症例で、TLS に存在する B 細胞についてこれらを実施し、B 細胞を膠芽腫の治療戦略に役立てることができるか検討していく予定である。

5. 文献

(1-7)

1. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*. 2019;178(4):835-49 e21.
2. van Hooren L, Vaccaro A, Ramachandran M, Vazaios K, Libard S, van de Walle T, et al. Agonistic CD40 therapy induces tertiary lymphoid structures but impairs responses to checkpoint blockade in glioma. *Nat Commun*. 2021;12(1):4127.
3. Meylan M, Petitprez F, Becht E, Bougouin A, Pupier G, Calvez A, et al. Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*. 2022;55(3):527-41 e5.
4. Fridman WH, Meylan M, Petitprez F, Sun CM, Italiano A, Sautes-Fridman C. B cells and tertiary lymphoid structures as determinants of tumour immune contexture and clinical outcome. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(7):441-57.
5. Ravi VM, Will P, Kueckelhaus J, Sun N, Joseph K, Salie H, et al. Spatially resolved multi-omics deciphers bidirectional tumor-host interdependence in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2022;40(6):639-55 e13.
6. Ren Y, Huang Z, Zhou L, Xiao P, Song J, He P, et al. Spatial transcriptomics reveals niche-specific enrichment and vulnerabilities of radial glial stem-like cells in malignant gliomas. *Nat Commun*. 2023;14(1):1028.
7. Fridman WH, Meylan M, Pupier G, Calvez A, Hernandez I, Sautes-Fridman C. Tertiary lymphoid structures and B cells: An intratumoral immunity cycle. *Immunity*. 2023;56(10):2254-69.

6. 論文発表

日本脳神経外科学会第82回学術総会 2023年10月25日～10月27日