

研究報告書  
令和4年度：A課題

2024年5月1日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 慶應義塾大学医学部

住所 東京都新宿区信濃町35

研究者氏名 紅林 泰

(研究課題)

免疫応答の発達・疲弊過程の時空間的变化を反映した腫瘍免疫微小環境の分類と  
患者層別化への応用

---

令和5年3月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 1. 背景および目的

肝細胞癌を含む様々な癌腫における免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) とその併用療法の実臨床化に伴い、患者層別化を目的とした腫瘍免疫微小環境の網羅的解析が盛んに行われている。近年の single cell RNAseq の解析から、腫瘍に浸潤するリンパ球は TCF1 陽性の naïve-like T 細胞から活性化 T 細胞を経て、免疫チェックポイント分子と CXCL13 高発現に特徴付けられる疲弊状態に至ることが明らかにされたものの、T 細胞が naïve-like な形質から活性化して疲弊化に至る時間軸に対して、各活性化・疲弊状態にあるリンパ球の空間的な分布は不明である。また、組織病理学的に認められる免疫応答の成熟度 (T 細胞集簇やリンパ濾胞の成熟度、リンパ形質細胞浸潤の出現など) との関係も不明である。いずれも抗腫瘍免疫応答の発達・疲弊過程の時空間的变化の全体像の理解や、ICI 療法の効果並びに不応メカニズムを理解する上で重要な課題である。上記を踏まえて、本研究では、各活性化・疲弊状態にある T 細胞の形質を代表するマーカーを用いて多重免疫染色を行うことで、その空間的分布ならびに、組織病理学的な免疫応答の成熟度との関係を明らかにすることを目的とした。また、腫瘍の遺伝子発現パターンならびにドライバー遺伝子変異と比較することで、腫瘍の生物学的特性との比較を試みた。

## 2. 方法および結果

### (1) 異なる活性化・疲弊形質を示す T 細胞の空間的分布の解明

CD8 T 細胞について、TCF1<sup>+</sup> stem-like T (Tsl) 細胞、granzyme A<sup>+</sup> effector-exhausted T (Teff-ex) 細胞、granzyme K<sup>+</sup> pre-exhausted T (Tpre-ex) 細胞、CXCL13<sup>+</sup> exhausted T (Tex) 細胞をそれぞれ定義し、CD4 T 細胞について、TCF1<sup>+</sup> stem-like T (Tsl) 細胞、granzyme A<sup>+</sup> effector T (Teff) 細胞、CXCL13<sup>+</sup> T (T<sub>CXCL13</sub>) 細胞、Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) 細胞をそれぞれ定義した。肝細胞切除検体の FFPE 標本を用いて、蛍光多重免疫染色法を用いて各形質を示す T 細胞の分布を検討した所、CD4 Tsl 細胞ならびに CD8 Tsl 細胞のいずれも、3 次リンパ構造 (TLS) の T 細胞領域 (TLS-T) ならびに、TLS の未熟な構造と考えられる T 細胞の集簇 (T cell aggregate, TA) に有意に多くみられた。TLS-T、TA のいずれも DC-LAMP 陽性樹状細胞が認められ、Tsl 細胞は低値ながら Ki-67 陽性を示すことから、TLS-T と TA は、Tsl 細胞が抗原提示を受け、自己増殖し、腫瘍内に浸潤していく活性化 T 細胞を供給する場と考えられた。一方で、Tsl 細胞以外の effector, exhausted T 細胞はいずれも TLS や TA の外方、すなわち腫瘍胞巣内に多く認められた。

### (2) CXCL13<sup>+</sup> CD4 T (T<sub>CXCL13</sub>) 細胞の形質の解明

これまでに報告された single cell RNAseq の研究では、CXCL13 陽性 CD4 T 細胞は follicular helper T (Tfh) 細胞として分類されていることが多かったものの、実際にその空間的分布をみると、主に TLS-T や TA の外側で、リンパ形質細胞浸潤とともに認められることが判った。再び蛍光多重免疫染色を用いて検討した所、TLS や TA で見られる CXCL13 陽性 CD4 T 細胞は BCL6(+), CXCR5(+), PD1(+) であり Tfh 細胞と考えられたが、リンパ形質細胞浸潤とともにリンパ濾胞外に認められる CD4 T<sub>CXCL13</sub> 細胞は、BCL6(-), CXCR5(-), PD1(+) であり、いわゆる peripheral helper T (Tph) 細胞に近い形質を有していると考えられた。また、RT-PCR 法により、CD4 T<sub>CXCL13</sub> 細胞が多くリンパ形質細胞浸潤を認める腫瘍では、IL-21 の発現が高く、CD4 T<sub>CXCL13</sub> 細胞から産生された IL-21 が CD8 T 細胞の活性化に寄与している可能性が考えられた。

### (3) 肝細胞癌外科切除後の予後との関連

上記の結果から、肝細胞癌の免疫微小環境を再分類し、IL/TA(-) : T 細胞浸潤が低く TA/TLS の形成が見られないもの、IL/TA(+) : T 細胞浸潤が低いが TA 形成が見られるもの、IM/TLS(-) : 中等度の T 細胞浸潤を認めるが TLS 形成の無いもの、IM/TLS(+) : TLS 形成を認めるが、IH/LP で

ないもの、IH/LP：高度のリンパ形質細胞浸潤を認め、CD4 T<sub>cxcl13</sub>細胞浸潤を伴うもの、とした。すると、外科切除後の予後はIL/TA(-) < IL/TA(+), IM/TLS(-), IM/TLS(+)< IH/LPの順に不良であり、抗腫瘍免疫応答の強さが術後の予後を規定する重要な因子であることが確認された。

#### (4) 進行期肝細胞癌の免疫微小環境の検討と分子生物学的所見との比較

我々は以前、進行期肝細胞癌の複合免疫療法導入前の腫瘍生検検体を用いて、その免疫微小環境について探索的な検討を行なった (Hepatol Res. 2023;53(10):1008)。このコホートを拡張して、免疫微小環境と複合免疫療法の治療効果との関係について再検討した所、TAの形成を認める、あるいは中等度のT細胞浸潤を認める群で、かつ、Treg/CD8 T細胞比率が低い場合に、複合免疫療法の治療効果が良いことが明らかとなった。また、進行期肝細胞癌の分子生物学的特性には不明な点が多いため、コホートからランダムに5検体を選び whole exome sequencing 解析を行ったが、5例中4例にCTNNB1変異を認め、CTNNB1変異は進行期肝細胞癌においても重要なドライバー遺伝子変異であると考えられた。ただし、これらのCTNNB1変異型進行期肝細胞癌では、組織学的所見(低分化型が多い)や免疫微小環境において、外科切除検体における報告よりも多様性が見られることから、進行期肝細胞癌では、CTNNB1変異に加えて他の遺伝子変異等が重なることで外科切除検体とは異なる性質を呈しているものと考えられた。

### 3. 考察および展望

本研究により、単に網羅的な解析に留まらない、腫瘍免疫学、病理学的に意義のある腫瘍免疫微小環境の分類法を示すことができたと考ええる。各形質を示すリンパ球は、それぞれ特定の免疫応答の機能単位(TA, TLS, リンパ形質細胞浸潤など)において認められることから、これらの機能単位の分布を形態学的に評価することが重要と考えられた。今後は、本研究の成果を基にして複合免疫療法の治療効果予測により有用な腫瘍免疫微小環境の分類を確立することが期待されるとともに、患者層別化ならびに最適医療への貢献が期待される。また、進行期肝細胞癌において、遺伝子変異解析をはじめとした分子生物学的所見と免疫微小環境を対比することで、不明な点の多い進行期肝細胞癌の病態の理解が進むと考えられる。

### 4. 本研究により得られた成果

- (1) <学会発表> 肝細胞癌における抗腫瘍免疫応答の形質・空間的全体像の解明  
紅林 泰、第113回日本病理学会総会(名古屋) 2024年3月28日
- (2) <学会発表> 腫瘍内脂肪化とグルタミン合成酵素発現は進行肝細胞癌に対する複合免疫療法の治療効果予測因子である  
紅林 泰、第59回日本肝癌研究会(大阪) 2023年7月27日
- (3) <学会発表> 肝細胞癌における免疫微小環境の発達・疲弊過程の時空間的解析と原発巣・転移巣間多様性  
紅林 泰、第59回日本肝癌研究会(大阪) 2023年7月27日
- (4) <学会発表(海外)> Classification of Immune and Immunovascular Tumor Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma through Detailed Histopathological Analysis  
Yutaka Kurebayashi, 14th Joint Meeting of the British Division of the International Academy of Pathology and the Pathological Society of Great Britain and Ireland (Liverpool Pathology 2023) (Liverpool, UK) 2023年6月27日

・ また、本研究により得られた成果は、現在、国際誌に投稿中である。