

悪性リンパ腫の腫瘍細胞不均一性と免疫回避環境を単一細胞レベルで解明

血液がんの一つである T 濾胞ヘルパー細胞リンパ腫では、同じ患者内でもがん細胞一つひとつは非常に不均一であり、遺伝子・染色体異常の蓄積によりがん細胞の進化が促進されること、がん細胞と周囲の免疫細胞が協調して免疫回避環境を作ることによって治療抵抗性に寄与していることを明らかにしました。

T 濾胞ヘルパー細胞リンパ腫 (TFH リンパ腫) は血液がんの一亜群ですが、標準的な治療が確立されておらず、予後は不良です。治療が困難な原因の一つとして、患者間・内のがん細胞のばらつき (腫瘍細胞不均一性) により、細胞ごとに治療への反応性が異なり、治療が効きにくいがん細胞が生き残り増殖することが考えられています。また、がん組織において、がん細胞と周囲の免疫細胞が相互作用し、がん細胞の生存に有利な環境 (がん-免疫微小環境) を作り出すことも、治療抵抗性を獲得する一因と考えられます。しかし、TFH リンパ腫において、これらの解明は不十分でした。本研究では、単一細胞レベルの遺伝子発現・変異解析および空間解析技術を用いて、TFH リンパ腫のがん細胞と免疫細胞を包括的に分析し、がん細胞の特徴と免疫微小環境の全体像を解明しました。

その結果、TFH リンパ腫のがん細胞が、これまで考えられていたよりずっと顕著な腫瘍細胞不均一性を示すこと、遺伝子変異やコピー数変異の蓄積によりがん細胞のクローン進化が促進され、TFH 細胞類似性や細胞増殖形質が高まること、がん細胞と免疫細胞の相互作用により免疫回避型環境が形成され、治療抵抗性獲得に寄与することが明らかになりました。さらに、TFH リンパ腫に特異的に発現する新たなマーカー分子として、PLS3 を同定しました。

本研究結果は、免疫細胞やがん細胞とのネットワークを標的とした新たな治療法の開発へつなぐとともに、TFH リンパ腫以外の希少がんにおける治療開発戦略への応用が期待されます。

研究代表者

筑波大学医学医療系

坂田 (柳元) 麻実子 教授

研究の背景

T 濾胞ヘルパー (T follicular helper, TFH) 細胞リンパ腫 (TFH リンパ腫) は、血液がんである悪性リンパ腫の一亜型で、がん細胞は TFH 細胞^{注1} という免疫細胞に類似した特徴を示すことが知られています。また、本研究グループはこれまでに、TFH リンパ腫の 50~70%で見られる疾患特異的な遺伝子変異として *RHOAG17V* 変異^{注2} を同定しています (Sakata-Yanagimoto M, *Nat Genet*, 2014)。さらに、複数のグループからの報告により、TFH リンパ腫では、5 番染色体の増幅というコピー数変異^{注3} が高頻度に認められることが分かっています。TFH リンパ腫は、悪性リンパ腫で標準的に使用される抗がん剤治療にしばしば抵抗性を示し、予後は不良です。しかしながら、このような治療抵抗性獲得のメカニズムは、まだ十分に解明されていません。

近年、がんが進行する過程で、同じ患者のがん細胞にもばらつき (腫瘍細胞不均一性^{注4}) が生じ、治療が効きにくいがん細胞が生き残り増殖することで、治療抵抗性を獲得することが分かっています。さらに、さまざまながんにおいて、がん細胞が周囲の免疫細胞と相互作用することで、がん細胞に有利な環境 (がん-免疫微小環境^{注5}) を作り出し、がんの進行や治療抵抗性に寄与することが知られています。

そこで今回、遺伝子発現パターンを一細胞ごとに検出するシングルセル RNA シークエンス (シングルセルシークエンス)^{注6} を用いて、TFH リンパ腫患者のがん細胞と免疫細胞を解析することで、TFH リンパ腫における腫瘍細胞不均一性の解明と、がん-免疫微小環境の特徴付けに取り組みました。さらに、イメージングマスサイトメトリーによる空間解析^{注7} 技術を用いて、実際のがん組織での細胞同士の相互作用を明らかにしました。

研究内容と成果

本研究では、14 人の TFH リンパ腫患者のリンパ節由来リンパ腫検体 (9 検体) と末梢血検体 (16 検体) を用いて、シングルセルシークエンスを実行し、TFH リンパ腫のがん細胞と免疫細胞の包括的な解析を行いました (図 1)。また、同じ検体から抽出した DNA を用いて、遺伝子およびコピー数変異解析を行うとともに、これらの解析で検出された変異をシングルセルシークエンスデータで再解析し、単一細胞レベルでの変異の分布を調べました。さらに、TFH リンパ腫組織 10 検体を用いた空間解析により、がん細胞と周囲の免疫細胞との距離を計測し、互いに距離が近く、相互作用している細胞ペアを抽出しました。なお、正常コントロール^{注8} として、リンパ節転移陰性の固形がん患者のリンパ節 7 検体と、公開データベースからダウンロードした健常人の正常末梢血 5 検体のシングルセルシークエンスデータを使用しました。

がん細胞のシングルセルシークエンス解析では、がん細胞が、それぞれ異なった遺伝子発現パターンを持つ 5 つの分画に分けられ、同じ患者由来のがん細胞でも非常に不均一であることが分かりました (図 2)。また、単一細胞レベルでの遺伝子異常の解析では、遺伝子変異やコピー数変異、特に *RHOAG17V* 変異と 5 番染色体の増幅を持つがん細胞は、TFH 細胞との類似性が高く、細胞増殖も盛んなことが明らかになりました。さらに、正常コントロールとの比較により、TFH リンパ腫のがん細胞のみに特徴的に発現している遺伝子 (腫瘍マーカー^{注9}) として新たに *Plastin 3 (PLS3)*^{注10} を同定し、TFH リンパ腫組織のフローサイトメトリー解析^{注11} および免疫組織化学染色でも PLS3 ががん細胞表面に発現していることを確認しました (図 3)。

次に、免疫細胞のシングルセルシークエンス解析により、TFH リンパ腫患者のリンパ節では、機能不全 CD8 陽性 T 細胞、制御性 T 細胞、免疫抑制性樹状細胞・マクロファージ、疲弊 B・NK 細胞といった免疫逃避^{注12} に関連する免疫細胞分画が増加しており、特に再発・難治性の患者でその傾向が強いことが

分かりました。さらに、これらのデータ解析および空間解析により、がん細胞と免疫逃避関連細胞が相互作用していることが判明しました（図4）。

これらの結果から、TFH リンパ腫では、①がん細胞が顕著な不均一性を示すこと、②*RHOA*G17V 変異や5番染色体の増幅といった遺伝子異常の蓄積により、TFH 細胞類似性および細胞増殖形質が促進されること、③がん細胞と免疫細胞との相互作用により、免疫回避型のがん—免疫微小環境が形成され、治療抵抗性に寄与していること、が明らかになりました。また、TFH リンパ腫の新たな腫瘍マーカーが同定されました。

今後の展開

TFH リンパ腫を含む標準治療の存在しない希少がんへの治療戦略として、疾患特異的な腫瘍進展メカニズムを同定し、これを阻害することは効率的と考えられます。本研究により、これまで知られていなかったTFH リンパ腫の免疫微小環境の全体像およびがん細胞との相互作用が明らかになり、免疫細胞やがん細胞とのネットワークを標的とした新たな治療法の開発につながることを期待されます。

本研究グループでは、シングルセルシーケンスや空間解析といったデータ解析技術を用いた、がん微小環境の包括的な解明と臨床への応用を目指しており、この手法はTFH リンパ腫以外の造血器腫瘍やさまざまな固形がんへの応用が期待されます。

参考図

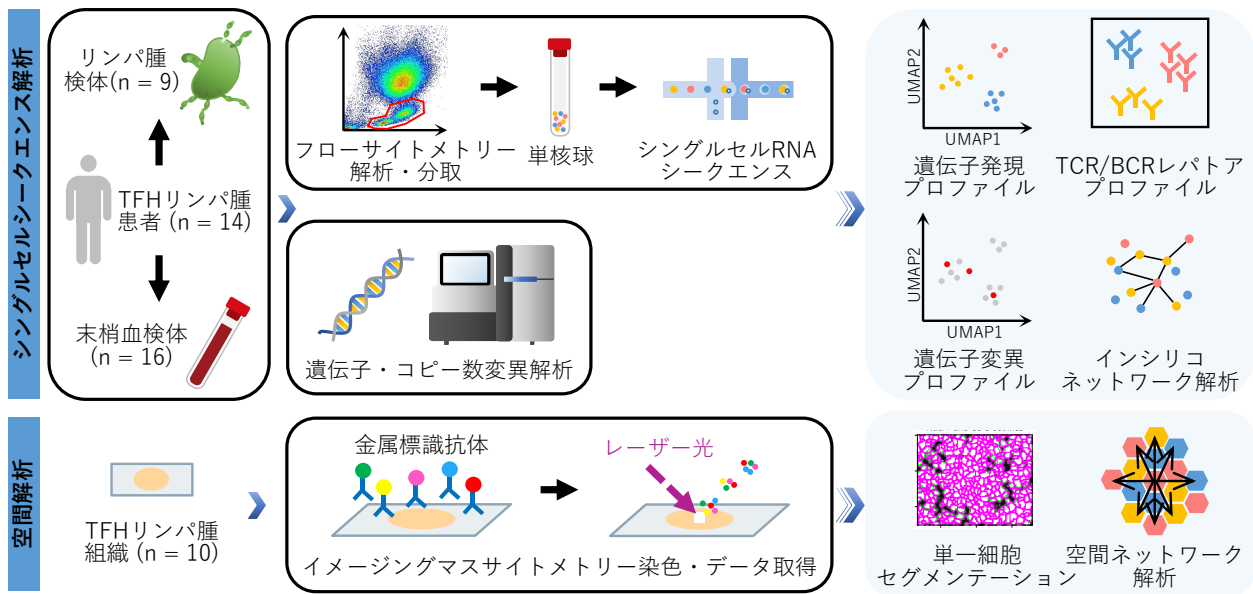


図1 本研究の概要図

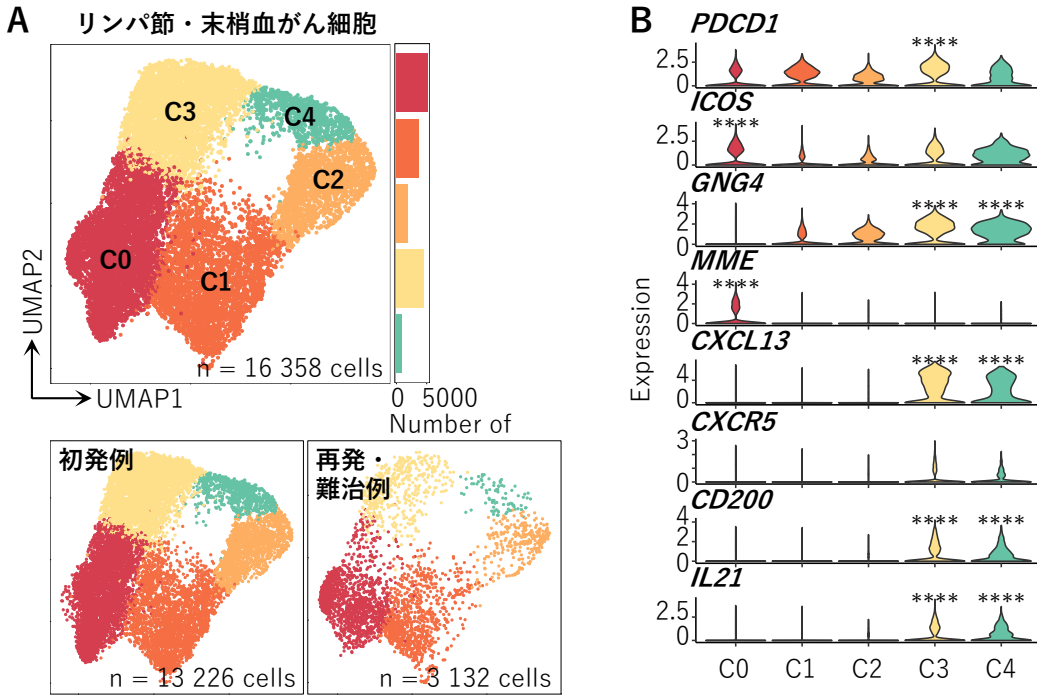


図2 がん細胞のシングルセルシーケンス解析 (A:本研究で同定されたTFHリンパ腫がん細胞の5分画; C0~C4、B:TFH細胞に特徴的な遺伝子の分画ごとの発現パターンの違い)

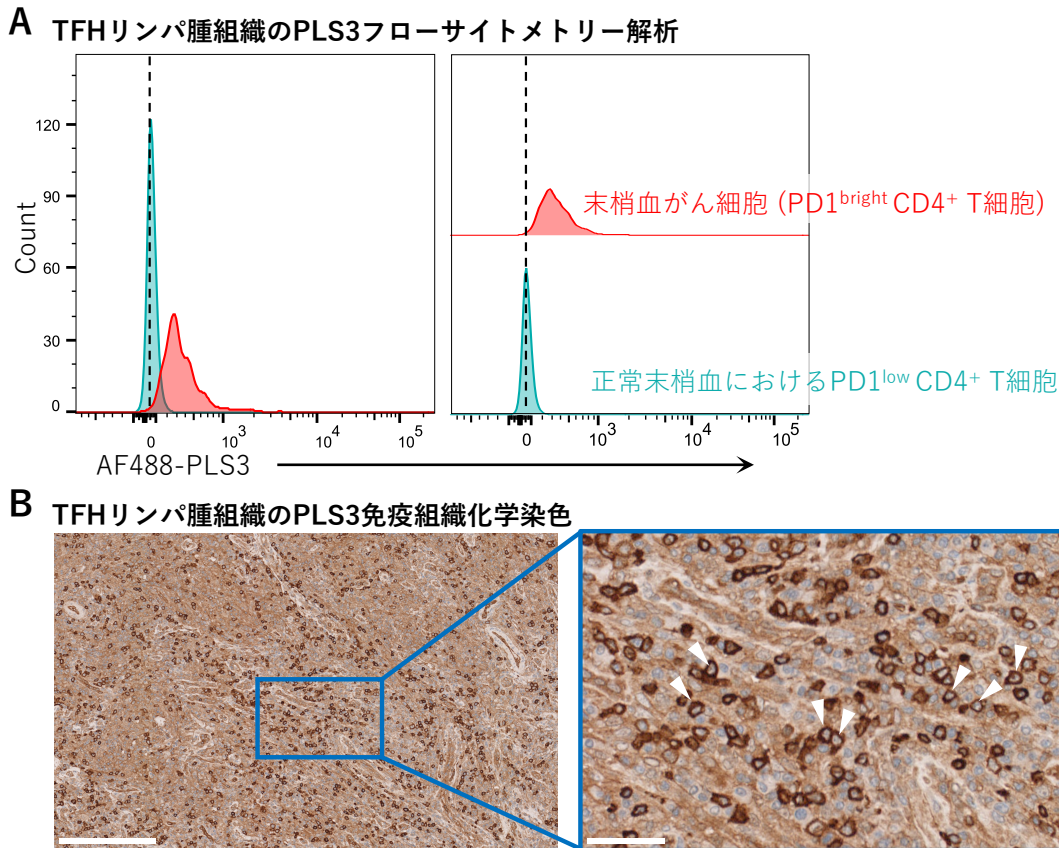


図3 新たな腫瘍マーカーの同定 (A:末梢血がん細胞と正常CD4陽性細胞におけるPLS3のフローサイトメトリー解析。B:TFHリンパ腫組織のPLS3の免疫組織化学染色。白色矢印:PLS3陽性がん細胞。スケールバー:左250μm、右50μm)

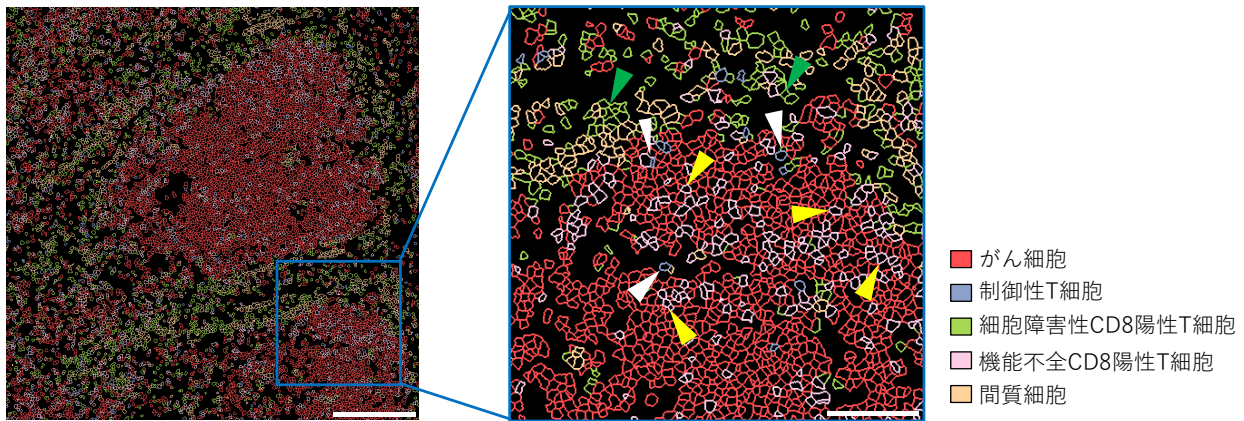


図4 空間ネットワーク解析（白色矢印：制御性 T 細胞、黄色矢印：機能不全 CD8 陽性 T 細胞、緑色矢印：細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞）

機能不全 CD8 陽性 T 細胞や制御性 T 細胞は、がん細胞と互いに隣接し相互作用が盛んな一方、細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞はがん細胞と離れて位置し、相互作用が乏しいと考えられた。

用語解説

注1) T 濾胞ヘルパー (T follicular helper, TFH) 細胞

リンパ球であるヘルパー T 細胞の一種。免疫関連臓器であるリンパ節に主に存在し、周囲の細胞と相互作用することで、免疫応答に必須である B 細胞の成熟や増殖を助ける。

注2) *RHOA* G17V 変異

RHOA 遺伝子でコードされる *RHOA* タンパクの 17 番目のグリシンがヴァリンに置換される変異。*VAV1* タンパクと結合することで TFH リンパ腫の発症に寄与すると考えられる (Fujisawa M, *Leukemia*, 2018)。

注3) コピー数変異

染色体上のある領域のコピー数（通常は 2 コピー）が増加あるいは減少する変異。

注4) 腫瘍細胞不均一性

腫瘍細胞 (= がん細胞) の患者間および患者内のばらつき。細胞ごとに異なる治療反応性を示すため、治療が効きにくいがん細胞が生き残り増殖し、治療抵抗性の獲得に寄与すると考えられる。

注5) がん-免疫微小環境

がん組織において、がん細胞と周囲の免疫細胞により構成されるがん特異的な局所的免疫環境。間質細胞などの非血液細胞も含めて腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) とも呼ばれる。

注6) シングルセル RNA シークエンス

次世代シーケンサーを用いて、一つひとつの細胞が個々に保持しているメッセンジャー RNA の発現量を網羅的に調べる方法。近年急速に進歩している先端的解析技術。

注7) イメージングマスサイトメトリーによる空間解析

金属同位体で標識された抗体を用いて多重免疫化学染色した組織を、レーザー光で気化させた際にイオン化される金属同位体を定量化して読み取り、タンパク発現量と組織上での位置情報を同時に解析する技術。単一細胞レベルでの検出が可能で、蛋白発現パターンにより細胞の種類を決定し、位置情報を用いて細胞同士の距離を測定・解析することで、相互作用を起こしている細胞分画を同定する。

注8) 正常コントロール

健常人または正常と考えられる組織から採取された検体。がん組織などと比較することで、正常との

違いを明確にするために用いられる。

注9) 腫瘍マーカー

腫瘍細胞 (=がん細胞) で特徴的に発現される分子。ある疾患のがん細胞のみで発現される (より特異度の高い) 分子を同定することで、その疾患のより正確な診断に役立つことが期待される。

注10) *PLS3* (*plastin 3*, *T-plastin*)

PLS3 遺伝子によってコードされる *PLS3* 蛋白は、アクチン束化蛋白質の一種であり、通常、線維芽細胞や内皮細胞などで発現がみられるが、正常の血液細胞には発現がみられない。

注11) フローサイトメトリー解析

蛍光抗体で染色した細胞が含まれる混濁液を一系列になるように流路に流し、レーザー光により蛍光強度を測定することで、細胞の発現する蛋白質を解析したり、特定の細胞を分取 (ソーティング) する技術。

注12) 免疫逃避・免疫回避

異物を除去するための免疫監視システムから逃れること。がん組織においては、キラーT細胞など攻撃の要となる細胞の機能をがん細胞自身の作用で不活化させたり、免疫抑制機能を持つ細胞を活性化させて、免疫システムの攻撃から逃れようとするがんの生存戦略の一つ。

研究資金

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的がん医療実用化研究事業 (領域 1)、AMED ムーンショット型研究開発事業、日本学術振興会科学研究費助成事業、エーザイ株式会社、日本白血病研究基金、先進医薬研究振興財団、SGH 財団、安田記念医学財団、第一三共生命科学研究振興財団、小林がん学術振興会、小林財団、化学及血清療法研究所からの支援を受け、東京大学、九州大学、東海大学、亀田総合病院、虎の門病院との共同研究として行われました。

掲載論文

【題名】 Tumor heterogeneity and immune-evasive T follicular cell lymphoma phenotypes at single-cell resolution.

(単一細胞解像度での T 濾胞性細胞リンパ腫の腫瘍不均一性と免疫回避性表現型)

【著者名】 須摩桜子¹, 末原泰人¹, 藤澤学^{2,3}, 安部佳亮², 服部圭一郎^{1,2}, 槇島健一¹, 坂本竜弘^{1,2}, 澤文⁴, 坂東裕子⁴, 梶大介⁵, 杉尾健志⁶, 加藤光次⁷, 赤司浩一⁷, 末永孝生⁸, Joaquim Carreras⁹, 中村直哉⁹, 鈴木絢子¹⁰, 鈴木穰¹⁰, 伊藤憲¹¹, 椎葉洋之¹², 千葉滋^{1,2}, 坂田 (柳元) 麻実子^{1,2,13}

1 国立大学法人筑波大学附属病院 血液内科

2 国立大学法人筑波大学医学医療系 血液内科

3 Centre for Lymphoid Cancer, BC Cancer

4 国立大学法人筑波大学附属病院 乳腺・甲状腺・内分泌外科

5 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科

6 Department of Medicine, Division of Oncology, Stanford University

7 国立大学法人九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学

8 医療法人鉄蕉会亀田総合病院 血液・腫瘍内科

9 学校法人東海大学医学部 病理診断学

10 国立大学法人東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

11 エーザイ株式会社 オンコロジービジネスユニット

12 エーザイ株式会社 メディカル本部 オンコロジー部

13 国立大学法人筑波大学トランスポーター医学研究センター 先端血液腫瘍学

【掲載誌】 *Leukemia*

【掲載日】 2023年11月27日

【DOI】 10.1038/s41375-023-02093-7

問合わせ先

【研究に関すること】

坂田（柳元）麻実子（さかた やなぎもと まみこ）

筑波大学 医学医療系血液内科／トランスポーター医学研究センター先端血液腫瘍学 教授

URL: <http://www.ketsunai.com>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp