腫瘍微小環境における
濾胞性ヘルパー様 CD4 陽性 T 細胞の本態解明

冨樫　庸介

臨床薬理の進歩 2026 別刷
公益財団法人臨床薬理研究振興財団

腫瘍微小環境における濾胞性ヘルパー様 CD4 陽性 T 細胞の本態解明

Elucidation of follicular helper–like CD4^{+} T cells in the tumor microenvironment

冨樫　庸介*1

Key words：腫瘍免疫、PD-1、濾胞性ヘルパー様 CD4 陽性 T 細胞、疲弊 T 細胞、3 次リンパ様構造

要　　旨

目的　免疫チェックポイント阻害薬（ICI）の奏効に関わる腫瘍内免疫応答の新たな要素として、濾胞性ヘルパー様 CD4 陽性 T 細胞（TFH）の本態と機能的多様性を解明することを目的とした。

方法　患者腫瘍検体のシングルセル RNA/TCR シークエンスおよび空間解析、マウス腫瘍モデル、機能的アッセイを組み合わせ、TFH の分化動態と抗腫瘍機能を解析した。

結果　CD8 陽性 T 細胞（特に疲弊 T 細胞）が分泌する CXCL13 が TFH および B 細胞の腫瘍内浸潤と 3 次リンパ様構造（TLS）形成を誘導し、CD8 陽性 T 細胞のメモリー様分化と ICI の持続効果に寄与した。脳転移では骨髄系細胞由来 BAFF/APRIL が同経路を活性化し、抗 CTLA-4 抗体併用効果を増強した。さらに、TFH には自己再生能をもつ Progenitor 型と細胞傷害性を示す Terminal 型の二層が存在し、後者は LAG-3 を高発現して PD-1/LAG-3 二重阻害に反応した。

結論　TFH-B 細胞 - 疲弊 T 細胞ネットワークおよび TLS 形成が ICI の長期奏効に寄与し、TFH の二層構造は新たな治療標的となる可能性を示した。

はじめに

抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体に代表されるがん免疫療法、すなわち免疫チェックポイント阻害薬（immune checkpoint inhibitors：ICI）は、その有効性が証明され、さまざまながん種で臨床応用が進んでいる。しかし、奏効率はいまだ十分とはいえず、抗腫瘍免疫応答の本態解明が求められている[1]。抗腫瘍免疫応答の主役は CD8 陽性 T 細胞とされてきた一方で、CD4 陽性 T 細胞の役割は十分に理解されていない。我々はこれまでに、CD4 陽性制御性 T 細胞が ICI 耐性や急激な病勢増悪に関与すること[2〜4]、また MHC クラス Ⅱ（MHC-Ⅱ）発現腫瘍では CD4 陽性 T 細胞が細胞傷害性を発揮し（細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞）、抗腫瘍免疫応答において重要な役割を果たすことを報告してきた[5]（**図 1A**）。しかし、その分化機構や機能的多様性については依然として不明な点が多い。

我々はこれまでに、患者由来腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocytes：TIL）およびがん細胞を生きた状態で単離し、シングルセル RNA シークエンス（scRNA-seq）および TCR シークエンス（scTCR-seq）を実施した。その解析により、腫瘍を直接攻撃する CD8 陽性 T 細胞を同定し、これらが PD-1 高発現を特徴とする「疲弊（exhaustion）」表現型を示すことを明らかにした[2,6,7]（**図 1B**）。さらに、疲弊 CD8 陽性 T 細胞（Tex）は CXCL13 を高発現し、その受容体 CXCR5 を発現する濾胞性

*1 Togashi Yosuke　　岡山大学学術研究院医歯薬学域　腫瘍微小環境学分野

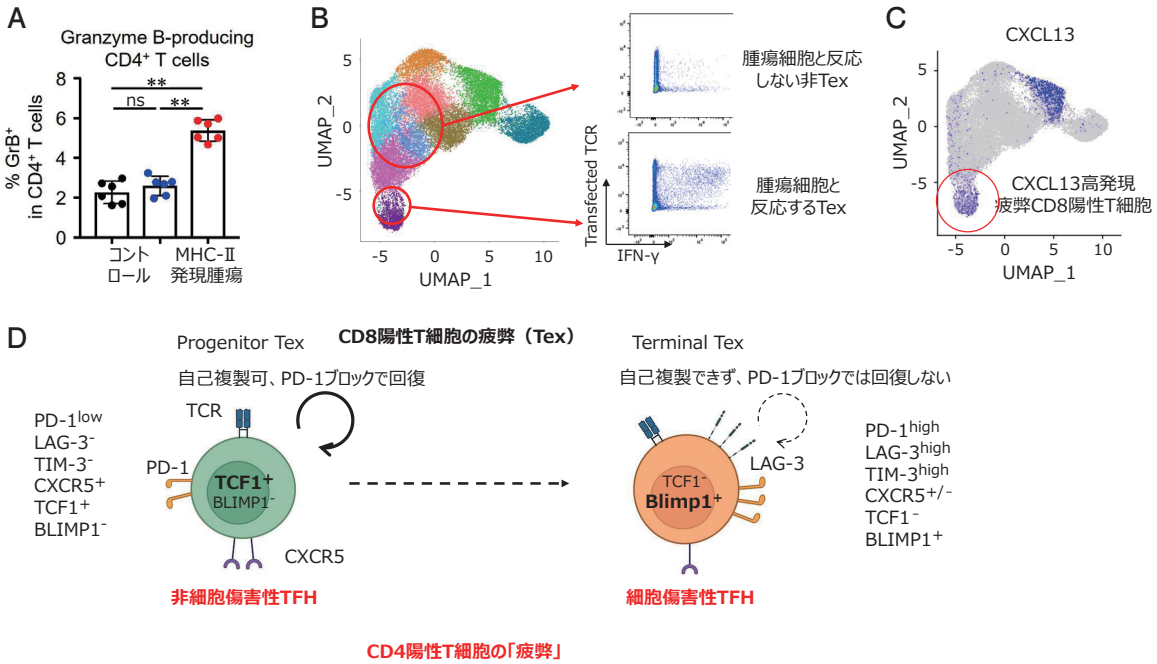


図 1　本研究の基礎となったデータ

A　細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞　MHC-Ⅱが発現した腫瘍では腫瘍浸潤 CD4 陽性 T 細胞でのグランザイム B（GrB）の発現が高かった。マウス 6 匹で行い、二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、** は $p < 0.01$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

B　Tex の腫瘍細胞への反応性　TIL のシングルセルシーケンスについて、遺伝子発現でクラスタリングを行い、それぞれのクラスターから TCR を抽出し、腫瘍細胞との反応性を検討したところ、Tex クラスターの TCR のみが反応した。

C　CXCL13 の発現分布　シングルセルシーケンスにおいて Tex クラスターは CXCL13 が高発現していた。

D　Tex の分化構造　一般的に Tex は自己再生能を持ち長期応答を可能にする幹細胞様 の「Progenitor Tex」と、最終的な終末分化型の「Terminal Tex」という二層構造が存在することが知られている。前者は PD-1 陽性 TIM-3 陰性 CXCR5 陽性 TCF1 陽性 BLIMP1 陰性で PD-1 ブロック単独に対して反応する。一方で後者は PD-1 強陽性 TIM-3 陽性 CXCR5 陰性 TCF1 陰性 BLIMP1 陽性で PD-1 ブロック単独への反応性は示さず、抗腫瘍免疫応答には前者が特に重要とされている。

ヘルパー様 CD4 陽性 T 細胞（T follicular helper-like CD4+ T cells：TFH）や B 細胞を腫瘍局所に引き寄せる可能性を見出している（**図 1C**）。

Tex には自己再生能を有して長期応答を担う幹細胞様の「Progenitor Tex」と、最終的な終末分化型である「Terminal Tex」という二層構造が存在する[8]（**図 1D**）。前者は PD-1 陽性・TIM-3 陰性・CXCR5 陽性・TCF1 陽性・BLIMP1 陰性であり、PD-1 ブロック単独療法に反応する。一方、後者は PD-1 強陽性・TIM-3 陽性・CXCR5 陰性・TCF1 陰性・BLIMP1 陽性であり、PD-1 単独ブロックには反応しない。前者が抗腫瘍免疫応答により重要とされ、CXCL13 高発現も報告されている。CXCL13 で誘導される CXCR5 陽性 TFH は BCL6 を主要転写因子とし、PD-1 高発現と IL-21 産生を特徴として B 細胞応答を制御する。しかし近年、腫瘍内に存在する TFH 細胞が単なる B 細胞の補助にとどまらず、腫瘍免疫応答そのものに深く関わることが明らかになってきた[9]。そこで、この TFH について詳細に解析し、Tex との関係も含めて抗腫瘍免疫応答での役割を明らかにする目的で本研究を行った。

方　法

本研究では、臨床検体解析、シングルセルオミクス、空間トランスクリプトミクス、マウス腫瘍モデルを組み合わせ、TFH 細胞の抗腫瘍免疫における役割を多角的に解析した。以下に各手法を簡単にまとめた。

患者腫瘍検体の取得と解析

4 例のメラノーマ腫瘍組織から腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocytes：TIL）を単離し、これらを用いて 10x Genomics プラットフォームによる scRNA-seq および scTCR-seq を実施した。データ解析には CellRanger および Seurat を用いてクラスタリングを行い、細胞集団の同定と特徴付けを行った。

さらに、CosMx を用いて同一患者由来腫瘍切片の空間的解析を行い、腫瘍内における Tex、TFH、B 細胞などの局在を同定し、その空間的関係を評価した。また、肺癌 104 例を免疫染色により CD20 および CD21 を可視化し、3 次リンパ様構造（tertiary lymphoid structure：TLS）形成の有無を確認した。

本研究は施設内倫理審査委員会（IRB）の承認を得て（承認番号：2107-030、1906-033、2507-070）実施し、すべての患者からヘルシンキ宣言に基づき文書による同意を取得した上で解析を行った。

RNA velocity および分化系列解析

scRNA-seq データを用い、scVelo を利用して RNA velocity 解析を行い、細胞の分化トラジェクトリーを推定した。さらに、latent time 解析により細胞系列の時間的推移を再構築し、TFH の分化動態を評価した。

マウス腫瘍モデル

マウス腫瘍モデルとして、MC-38 などの腫瘍細胞を用いた皮下移植モデルおよび頭蓋内移植モデルを構築した。腫瘍モデルに対し、抗 CD8 抗体または抗 CXCL13 抗体を投与し、TIL 構成の変化を解析した。治療群には抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体を投与し、腫瘍増殖抑制効果および免疫応答を評価した。頭蓋内腫瘍の増殖は IVIS イメージングシステムを用いて評価した。さらに、MHC-Ⅱ陽性の OVA 発現腫瘍細胞を用い、OVA 特異的 TCR を CD4 陽性 T 細胞に導入した OT-Ⅱ マウス由来の TFH 細胞を移入し、抗腫瘍効果を検討した。また、TFH ノックアウトマウス（$Bcl6^{fl/fl}Cd4^{Cre}$）および CD8 陽性 T 細胞特異的 CXCL13 ノックアウトマウス（$Cxcl13^{fl/fl}Cd8^{Cre}$）を用い、それぞれの遺伝子改変が抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響を解析した。

TIL はフローサイトメトリーで免疫表現型を解析した。

すべての動物実験は、所属機関の動物実験倫理規程に従って実施した。

機能的アッセイ

TFH 由来 TCR を導入した Jurkat 細胞を作製し、MHC-Ⅱ陽性腫瘍細胞に対する反応性を NFAT ルシフェラーゼアッセイで評価した。さらに、転写因子をウイルスベクターにより強制発現またはノックダウンし、細胞傷害能の変化をフローサイトメトリーで検討した。

公共データ解析

公開されているデータベース（NCBI BioProject：PRJEB23709）を用いて CXCL13 の遺伝子発現と抗 PD-1 抗体の治療効果の相関を解析した。

統計解析

連続変数の 2 群間比較を要するデータには Student's t 検定（両側検定）を用いた。データが正規分布しない場合や分散が不均一な場合には Mann-Whitney U 検定を適用した。3 群以上についてはマウスの腫瘍曲線は一元配置分散分析（one-way ANOVA）を用い、事後検定として Bonferroni 補正

の多重比較検定を実施した。連続変数については二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。生存解析では Kaplan–Meier 法を用い、生存曲線の差の検定には log-rank 検定を実施した。いずれの解析においても有意水準は両側 $p < 0.05$ とし、統計解析は GraphPad Prism、R を主に使用した。

結　果

まず、CD8 陽性 T 細胞が産生する CXCL13 の影響を評価するため、皮下に腫瘍を移植したマウスモデルを用い、抗 CD8 抗体で CD8 陽性 T 細胞を除去、または抗 CXCL13 抗体で CXCL13 を中和した。その結果、いずれの操作においても腫瘍内の TFH 浸潤が顕著に減少し、CD8 陽性 T 細胞由来 CXCL13 が TFH 誘導に寄与していることが示唆された。さらに、Cxcl13$^{fl/fl}$Cd8^{Cre} マウスを用いた解析により、TFH および相互作用する B 細胞の腫瘍内浸潤がいずれも減少した（**図 2A**）。このマウスに腫瘍を移植し抗 PD-L1 抗体による治療を行ったところ、腫瘍増殖が促進し、ICI 耐性傾向が認め

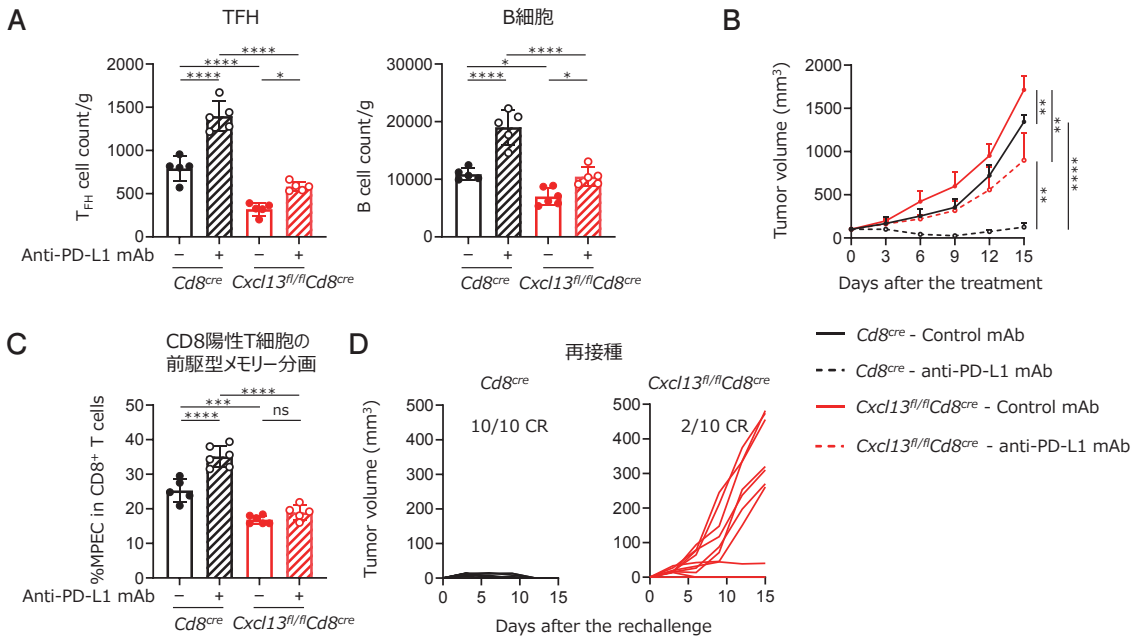


図 2　CD8 陽性 T 細胞特異的 CXCL13 ノックアウトマウスにおける抗腫瘍効果

A　TFH および B 細胞の浸潤　コントロールと *Cxcl13*$^{fl/fl}$*Cd8*^{cre} マウスに腫瘍を移植して TIL を解析した。後者では TFH および B 細胞浸潤が減って、抗 PD-L1 抗体による浸潤増加も見られなかった。マウス 5 匹で行い二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、* は $p < 0.05$、**** は $p < 0.0001$ である。

B　腫瘍増殖曲線　A と同じモデルで腫瘍サイズのデータを比較したところ、*Cxcl13*$^{fl/fl}$*Cd8*^{cre} マウスでは腫瘍増殖が速く、抗 PD-L1 抗体も耐性化した。マウス 5 匹で行い、一元配置分散分析（one-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均＋標準誤差で表現し、** は $p < 0.01$、**** は $p < 0.0001$ である。

C　CD8 陽性 T 細胞の前駆型メモリー分画　A と同じモデルで TIL を解析した。*Cxcl13*$^{fl/fl}$*Cd8*^{cre} マウスでは CD127 陽性 KLRG1 陰性 CD 8 陽性 T 細胞（MPEC）の分画が減少し、抗 PD-L1 抗体でも増えなかった。マウス 5 匹で行い、二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、*** は $p < 0.001$、**** は $p < 0.0001$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

D　再接種実験　一度腫瘍が抗 PD-L1 抗体治療で消えたマウスだけを集めて再度同じ腫瘍を 1 か月以上経過したのちに接種したところ、コントロールでは全例で拒絶されたが（CR）、*Cxcl13*$^{fl/fl}$*Cd8*^{cre} マウスでは 8 割再生着した。

られた（**図 2B**）。

TFH および B 細胞の浸潤データから、腫瘍局所における TLS の関与が示唆された。臨床検体を用いて TLS 形成を検討したところ、特に抗 PD-1 抗体治療後の病理組織では、B 細胞が集積した TLS 構造が顕著に認められた。そこで、CosMx による空間的 1 細胞解析を同検体で行ったところ、TLS 内部に Tex が存在しており、これらは CXCL13 高発現かつ Progenitor Tex 様のメモリー関連遺伝子の高発現が認められた（**図 3A**）。そこで TLS での TFH や B 細胞との相互作用が Tex のメモリー様の特徴に重要と考え[10,11]、$Cxcl13^{fl/fl}Cd8^{Cre}$ マウスの TIL 解析を行ったところ、抗 PD-L1 抗体による TFH や B 細胞の増加はキャンセルされ、CD8 陽性 T 細胞のメモリー分画も低下し、治療反応も見られなかった（**図 2A、2C**）。さらに、同マウスに抗 PD-L1 抗体治療を行い、1 か月後に腫瘍を再接種したところ、コントロールマウスでは全例腫瘍が拒絶されたのに対し、ノックアウトマウスでは腫瘍生着が有意に増加した（**図 2D**）。同様の傾向は TFH ノックアウトマウス（$Bcl6^{fl/fl}Cd4^{Cre}$）でも観察された。さらに、抗 PD-1 抗体による術前治療後に切除された肺癌検体において、CD20 および CD21 染色で評価した TLS の成熟度は、無治療例や化学放射線療法後の症例と比較して有意に高かった（**図 3B**）。以上から、Tex が分泌する CXCL13 が TFH や B 細胞を引き寄せて、TLS を形成し、Tex と相互作用することでメモリー様分化が誘導され Progenitor Tex として ICI の長期奏効に寄与することが示唆された（論文投稿中）。

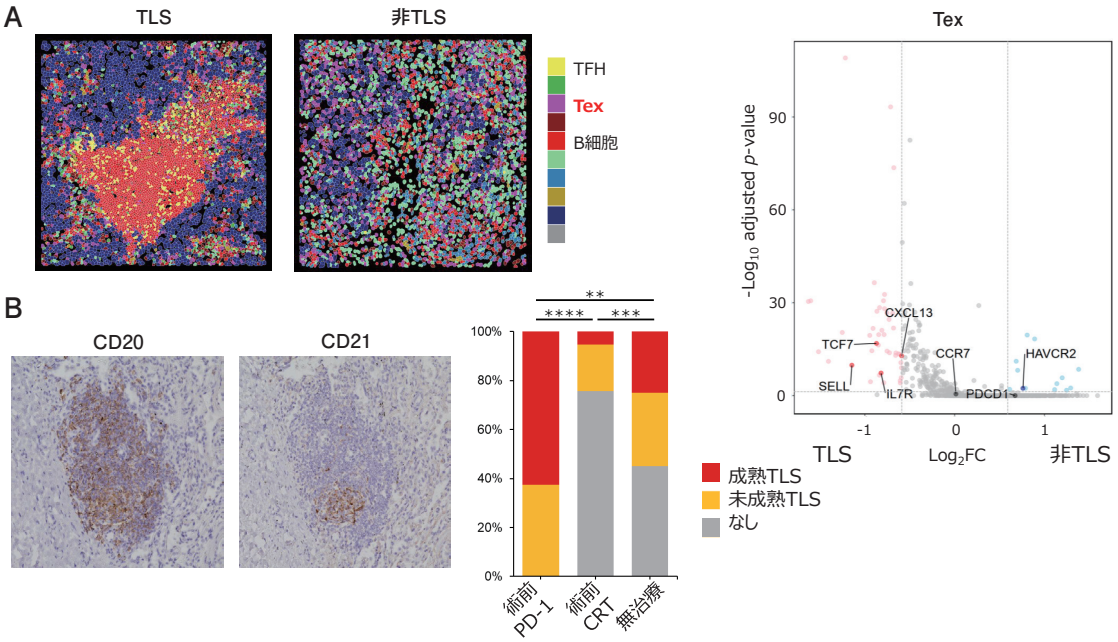


図 3　臨床検体の TLS 解析

A　TLS 領域と非 TLS 領域の Tex の遺伝子発現比較　TLS 部分と非 TLS 部分に関して CosMx による 1 細胞空間解析を行った。TLS 部分にも Tex が存在しており、特に遺伝子発現解析を比較すると TLS では CXCL13 を高発現し、メモリー関連遺伝子（TCF7 や IL7R など）を高発現していた。

B　肺癌の手術検体の免疫染色による TLS 評価　TLS を評価する目的で肺癌の手術検体を CD20 と CD21 で免疫染色を行った。CD20 陽性 CD21 陰性を未成熟、CD20 陽性 CD21 陽性を成熟 TLS と定義し評価したところ、術前に抗 PD-1 抗体を使用した症例では明らかに成熟 TLS が増え、逆に化学放射線療法を術前に受けた症例では成熟 TLS が減っている傾向があった。** は $p < 0.01$、*** は $p < 0.001$、**** は $p < 0.0001$ である。

TLS に注目する中で、肺癌の脳転移腫瘍組織についても TFH 浸潤と TLS 形成が観察された（**図 4A**）。そこで、頭蓋内に移植した腫瘍モデルで TIL を解析したところ、TFH 浸潤や B 細胞浸潤が皮下腫瘍よりも有意に多かった（**図 4B**）。そして、脳に浸潤した TFH は皮下に比較して CTLA-4 を高発現していたが（**図 4B**）、CTLA-4 高発現の制御性 T 細胞に関しては皮下のほうが浸潤が多かった。脳転移へは抗 CTLA-4 抗体の上乗せ効果が高いことが報告されていたため[12]、この頭蓋内移植モデルで抗 CTLA-4 抗体の効果の関係を検討したところ、抗 PD-1 抗体単剤よりも抗 CTLA-4 抗体を併用したほうが治療効果も高く、浸潤 TFH も活性化した（**図 4C**）。そして、TFH ノックアウトマウスでは脳転移モデルでの抗 CTLA-4 抗体の上乗せ効果がキャンセルされた（**図 4C**）。

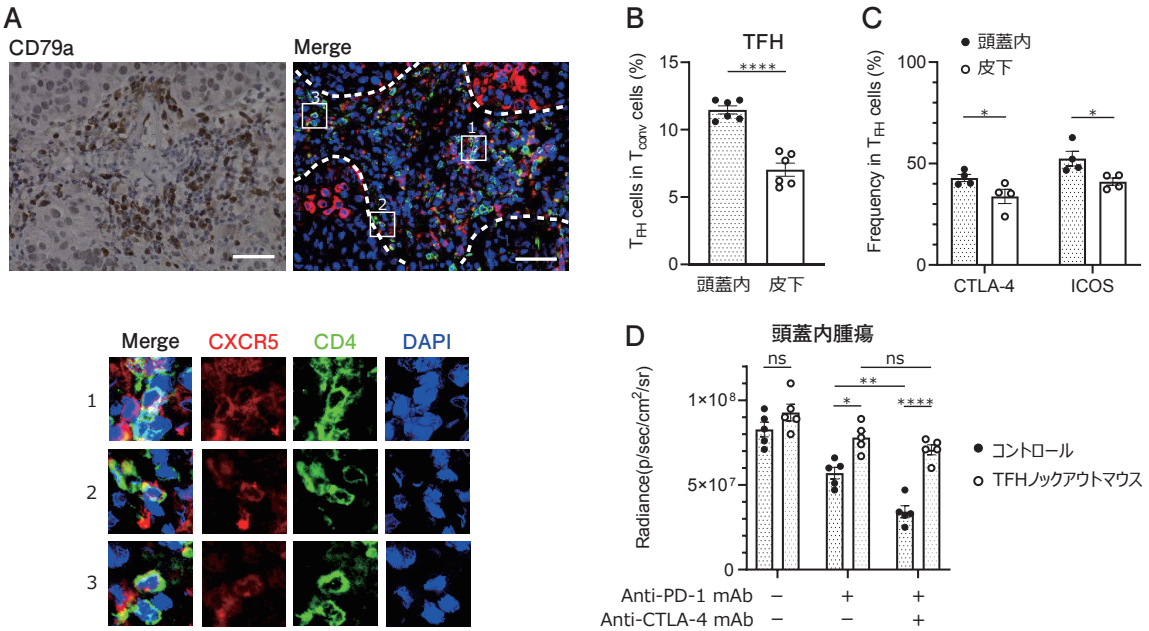


図 4　脳転移症例の TFH 浸潤と抗腫瘍効果

A　肺癌脳転移手術検体の免疫染色　肺癌脳転移手術検体の B 細胞を評価する目的で CD79a で染色し TLS 領域を確認し、さらに CXCR5 と CD4 で多重染色し TFH を評価したところ確かに TFH 浸潤が見られた。

B　頭蓋内移植モデルでの TFH 浸潤　頭蓋内と皮下に腫瘍を移植し、TIL を解析したところ頭蓋内腫瘍のほうで TFH 浸潤が多かった。6 匹のマウスで実験を行い、Student's t 検定（両側検定）で解析した。平均±標準誤差で表現し、**** は $p < 0.0001$ である。

C　頭蓋内移植モデルでに腫瘍浸潤 TFH の CTLA-4 および ICOS 発現　B と同じモデル解析したところ頭蓋内腫瘍のほうが TFH の CTLA-4 や ICOS 発現が高かった。4 匹のマウスで実験を行い、Student's t 検定（両側検定）で解析した。平均±標準誤差で表現し、* は $p < 0.05$ である。

D　頭蓋内腫瘍への ICI の効果と TFH の影響　コントロールもしくは TFH ノックアウトマウスで頭蓋内に腫瘍を移植し、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を投与した。IVIS で評価した結果、抗 CTLA-4 抗体上乗せ効果がコントロールでは観察されたが、TFH ノックアウトマウスでは抗 CTLA-4 抗体の上乗せ効果が消失した。マウス 5 匹で行い二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、* は $p < 0.05$、** は $p < 0.01$、**** は $p < 0.0001$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

次に頭蓋内腫瘍モデルで TFH 浸潤や B 細胞浸潤に寄与する因子について、頭蓋内特有の骨髄系細胞浸潤が多いところに着目した。頭蓋内腫瘍に豊富に存在する骨髄系細胞は B 細胞浸潤、TLS 形成に寄与する BAFF/APRIL を高発現していたため（**図 5A**）、これらをブロックする TACI-Fc を使用したところ B 細胞・TFH 浸潤は減少し、抗 CTLA-4 抗体の上乗せ効果もキャンセルされた（**図 5B、5C**）。以上から頭蓋内腫瘍には骨髄系細胞が豊富に存在することで BAFF/APRIL が産生され TFH や B 細胞浸潤、TLS 形成が促され、抗 CTLA-4 抗体の感受性に寄与していることが示唆された[13]。

また患者由来 TIL のシングルセルシークエンスから TFH に注目して再クラスタリングを行ったところ、グランザイム / パーフォリン高発現で細胞傷害性を有するクラスターが存在していた（**図 6A**）。同一患者由来ペアのがん細胞が MHC-Ⅱを発現していたため、この集団が細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞である可能性があった。そこで、細胞傷害性 TFH クラスターから TCR を抽出し、MHC-Ⅱ発現腫瘍との反応性を NFAT ルシフェラーゼアッセイで検討したところ、コントロールに比較して反応性を有することが明らかになった（**図 6B**）。また RNA velocity 解析により、分化トラジェクトリーを推定し、Latent time 解析を用いて細胞系列の時間的推移を再構築したところ、TFH の集団は他の

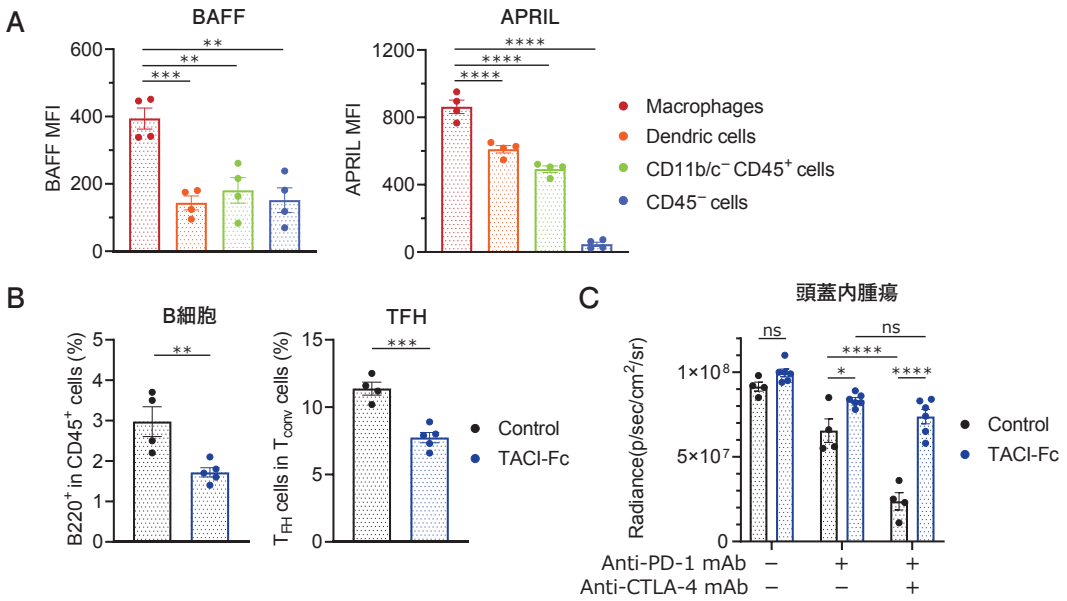


図 5　頭蓋内腫瘍モデルへの BAFF/APRIL の影響

A　頭蓋内腫瘍浸潤細胞の BAFF/APRIL の発現　頭蓋内に腫瘍を移植して TIL を解析した。BAFF および APRIL ともにマクロファージで最も発現が高かった。マウス 4 匹で行い、二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、** は $p < 0.01$、*** は $p < 0.001$、**** は $p < 0.0001$ である。

B　B 細胞および TFH 浸潤への BAFF/APRIL の影響　A と同様のモデルで TACI-Fc を使用して TIL を解析した。B 細胞も TFH 浸潤も TACI-Fc で低下した。4-5 匹のマウスで実験を行い、Student's t 検定（両側検定）で解析した。平均±標準誤差で表現し、** は $p < 0.01$、*** は $p < 0.001$ である。

C　頭蓋内腫瘍への ICI の効果と BAFF/APRIL の影響　野生型マウスの頭蓋内に腫瘍を移植し、TACI-Fc を使用して抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を投与し、IVIS を使って腫瘍を評価した。TACI-Fc 投与群で抗 CTLA-4 抗体の上乗せ効果が消失した。マウス 4-6 匹で行い二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、* は $p < 0.05$、**** は $p < 0.0001$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

CD4 陽性 T 細胞集団と異なる分化系譜に存在し、非細胞傷害性分画→細胞傷害性分画への分化が存在する可能性が示唆された（**図 6C**）。実際にこの 2 つの分画は TCR も共通性が高かった（**図 6D**）。TFH に実際の細胞傷害性を評価する目的で、SCID に OVA 発現 MHC-Ⅱ陽性腫瘍を移植して OT-Ⅱマウス由来の TFH 細胞を移入したところ、抗腫瘍効果が観察された。

この 2 つの分画をより詳細に解析するために遺伝子発現の比較を行った。非細胞傷害性集団は TCF1 高発現・BLIMP1 低発現の Progenitor 様の表現型を呈し、いわゆる古典的な TFH と思われ、細胞傷害性集団は TCF1 低発現・BLIMP1 高発現の Terminal 様の表現型を呈していた（**図 7A**）。この関係性は Tex における Progenitor と、最終的に細胞傷害活性を発揮する Terminal の二層構造に近いことが想定された（**図 1D**）[8]。細胞傷害性 TFH は LAG-3 を高発現していたため（**図 7A**）、LAG-3 陰性 / 陽性でソートして実験を行ったところ、LAG-3 陰性の非細胞傷害性 TFH は陽性の TFH に比較して細胞分裂が盛んで自己再生能を有していた（**図 7B**）。さらに TCF1 の強制発現や BLIMP1 のノックダウンで TFH の細胞傷害性が減弱した（**図 7C**）。非細胞傷害性 TFH は PD-1 ブロックに反応性を示したが、細胞傷害性 TFH は反応性を示さず、PD-1 と LAG-3 のダブルブロックに反応した（**図 7D**）。また公共データベースで CXCL13 の発現が高い場合には、抗 PD-1 抗体の予後が良好

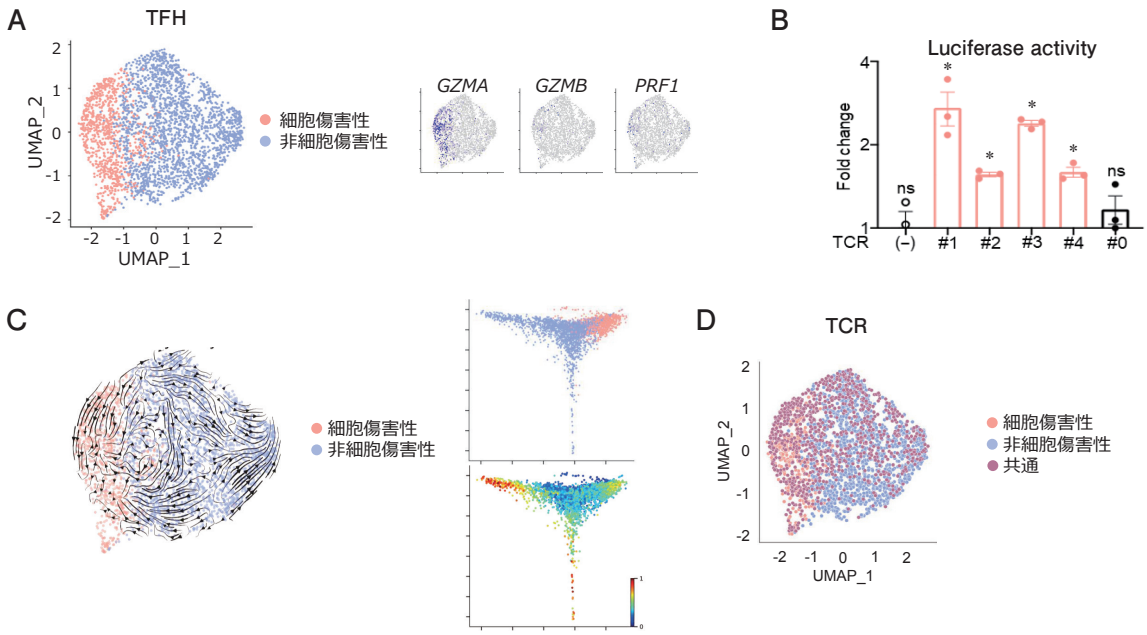


図 6　細胞傷害性 TFH と非細胞傷害性 TFH の解析

A　TFH のサブクラスター　TIL のシングルセルシークエンスから TFH だけを抽出し、さらにサブクラスターに分けると、グランザイム（GZMA や GZMB）やパーフォリン（PRF1）が高発現の細胞傷害性が強い集団と細胞傷害性が弱い集団に分かれた。

B　TFH 由来 TCR の腫瘍細胞への反応性　細胞傷害性 TFH 由来の TCR を NFAT ルシフェラーゼ活性を評価できる Jurkat 細胞に導入し、同一患者由来の MHC-Ⅱ発現腫瘍細胞と反応性検討したところ、ルシフェラーゼ活性が上昇した。3 回実験を行い、Student's t 検定（両側検定）で解析した。平均±標準誤差で表現し、*は $p < 0.05$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

C　RNA velocity 解析　TFH クラスターに関して RNA velocity 解析を行ったところ、非細胞傷害性 TFH から細胞傷害性 TFH への分化経路が推定された。

D　TCR の共通性　TFH のサブクラスター同士で共通する TCR が多く見られた。

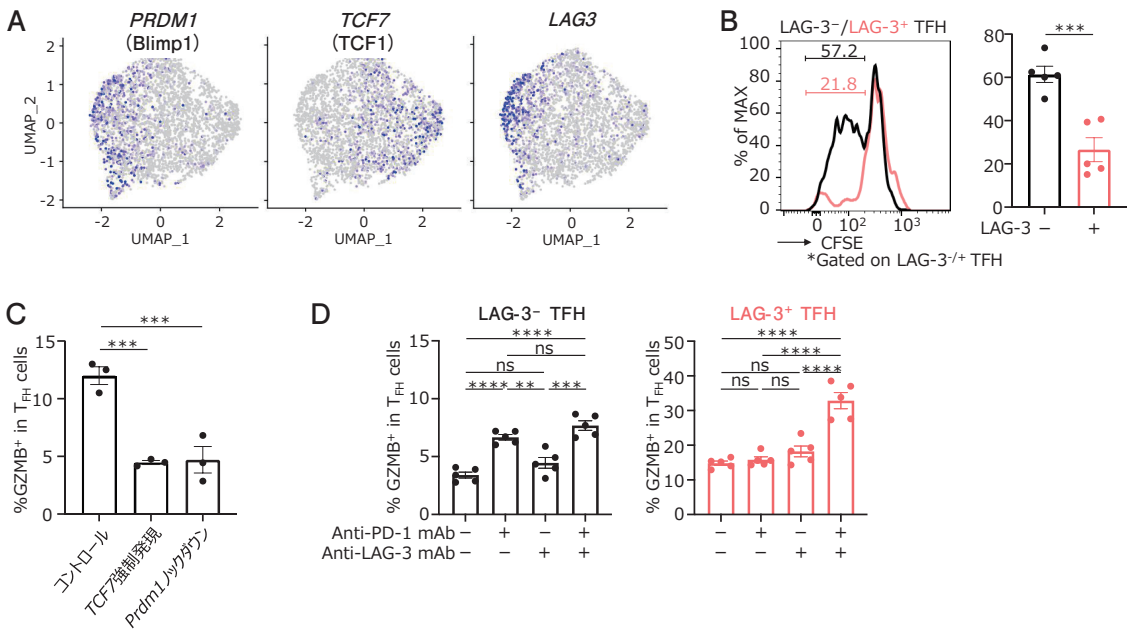


図 7　細胞傷害性 TFH の特徴

A　特徴的遺伝子発現　シングルセルシークエンスから細胞傷害性 TFH では PRDM1 が高発現、TCF7 が低発現、LAG3 が高発現していた。

B　細胞分裂　マウス TIL から LAG-3 陰性非細胞傷害性 TFH と LAG-3 陽性細胞傷害性 TFH をソートし、CFSE で細胞分裂を評価したところ、細胞傷害性 TFH で細胞分裂が低下していた。マウス 5 匹で行い、連続変数の 2 群間比較を要するデータには Student's t 検定（両側検定）を用いた。平均±標準誤差で表現し、*** は $p < 0.001$ である。

C　転写因子による TFH の細胞傷害性の変化　マウス TFH にウイルスベクターを用いて TCF7 を強制発現もしくは PRDM1 をノックダウンしたところ細胞傷害性が低下した。3 回の実験を行い、二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、*** は $p < 0.001$ である。

D　ICI による活性化　B と同様の系を用いて抗 PD-1 抗体 / 抗 LAG-3 抗体を用いて細胞傷害性を評価した。LAG-3 陰性非細胞傷害性 TFH は抗 PD-1 抗体だけでも細胞傷害性が活性化したが、LAG-3 陰性細胞傷害性 TFH は抗 LAG-3 抗体を併用しないと活性化しなかった。マウス 5 匹で行い、二元配置分散分析（two-way ANOVA）を用いて、事後検定として Bonferroni 補正の多重比較検定を実施した。平均±標準誤差で表現し、** は $p < 0.01$、*** は $p < 0.001$、**** は $p < 0.0001$、ns は $p \geqq 0.05$ である。

であった。以上から、本研究で見出した TFH は Tex における Progenitor と、終末分化した Terminal の二層構造に近く、LAG-3 陽性であることからも細胞傷害性 TFH が抗 LAG-3 抗体の標的になる可能性が示唆された[14]。

考　察

本研究では、腫瘍免疫応答における CXCL13 産生 CD8 陽性 T 細胞と TFH、および B 細胞の相互作用に注目し、その仕組みと臨床的意義を明らかにした。特に、CXCL13 を介した TLS の形成が抗 PD-1 抗体を中心とした ICI 治療の持続的奏効に深く関与することを示した点が重要である。まず、マウスモデルにおいて CD8 陽性 T 細胞を除去、あるいは CXCL13 をブロックすると、腫瘍内の TFH 浸潤および B 細胞浸潤が著しく減少したことから、CD8 陽性 T 細胞由来 CXCL13 がこれらの浸潤を誘導する因子であることが明らかとなった。さらに、$Cxcl13^{fl/fl}Cd8^{Cre}$ マウスを用いた解析では、TFH や B 細胞の浸潤が抑制されるだけでなく、腫瘍が増大し、抗 PD-1 抗体による腫瘍抑制効果

や長期持続免疫も大きく低下した。このことは、CXCL13 が単にケモカインとして細胞浸潤を促すだけにとどまらず、TFH や B 細胞との相互作用からの抗腫瘍免疫応答の質的強化、特にメモリー様 Tex の分化を促す役割を果たすことを示唆するものである。実際、ヒト臨床検体を用いた 1 細胞空間解析では、TLS 内において CXCL13 高発現の Tex 細胞が TFH や B 細胞と密接に相互作用し、メモリー関連遺伝子（IL7R、TCF7、SELL など）の高発現を示していた。このことから、TLS は単なるリンパ球集積場ではなく、Tex がメモリー様表現型を維持･獲得する「教育の場」として機能し、長期的な ICI 効果に寄与すると考えられる（投稿中）。

加えて、脳転移モデルにおいては皮下腫瘍よりも顕著な TFH および B 細胞浸潤が観察された。ここでは、腫瘍局所に豊富に存在する骨髄系細胞が BAFF や APRIL を産生し、TFH や B 細胞の活性化を促すことが示された。さらに、TFH が CTLA-4 を高発現していたことから、抗 PD-1 抗体単独に比べ、抗 CTLA-4 抗体との併用がより強力な抗腫瘍効果を示し、その効果は TFH の存在に依存していた。TACI-Fc による BAFF/APRIL シグナル遮断が TLS 形成と ICI 併用効果を消失させたことは、骨髄系細胞によるサイトカインネットワークが脳特異的な腫瘍免疫環境を形成し、ICI 治療感受性に寄与することを裏付け[12]、今後のバイオマーカーや新たな治療開発につながる可能性がある[13]。

さらに、シングルセルシーケンスから TFH 集団の中に細胞傷害性を有するサブセットが存在することが示された。この細胞群は MHC-Ⅱを発現する腫瘍細胞を直接攻撃可能であり、従来の「ヘルパー細胞」としての枠組みを超えた抗腫瘍エフェクターとしての役割を担う可能性がある。興味深いことに、この細胞傷害性 TFH は BLIMP1 高発現・TCF1 低発現の CD8 陽性 T 細胞で言える終末分化した Terminal Tex に近い特徴があり、一方で自己再生能を有する非細胞傷害性 TFH は BLIMP1 低発現・TCF1 高発現という Progenitor Tex に近い表現型を呈していた（**図 1D**）。この二層構造からも、言わば CD4 陽性 T 細胞の疲弊に近い概念として、腫瘍免疫における TFH の新たな視点を提示するものである。また、細胞傷害性の Terminal TFH は LAG-3 高発現を特徴とし、PD-1 単独ブロックには反応しないが、PD-1 と LAG-3 のダブルブロックにより反応性を示した点も重要である。これは、TFH を含む多様な T 細胞サブセットが ICI 治療抵抗性の一因となり得ること、また LAG-3 阻害薬の臨床応用において TFH が新たな標的細胞となる可能性を示唆している[14]。

以上から、CD8 陽性 T 細胞由来 CXCL13 が TFH および B 細胞を腫瘍内に誘導し、TLS 形成を通じて Tex のメモリー様分化を促進することが ICI 治療の持続効果を支えるメカニズムであることが明らかになった。また、脳転移においては骨髄系細胞が BAFF/APRIL を介して同様の経路を強化し、抗 CTLA-4 抗体併用効果を引き出すことが示された。さらに、TFH 自身が Progenitor と Terminal の二層に分かれ、前者は自己再生能を維持しつつ、後者は直接的な細胞傷害活性を発揮するという分化の構造が存在する。この概念は、CD4 陽性 T 細胞の疲弊に近い概念としてがん免疫療法の最適化に向けて TFH を新たな治療標的として位置付ける可能性を持つ。これらは、(1) TLS の成熟度を治療効果予測のバイオマーカーとしての確立、(2) CXCL13-CRXR5 軸や BAFF/APRIL シグナルを標的とする新規治療戦略を開発、(3) Progenitor/Terminal TFH の動態を制御して長期免疫応答を強化する治療法、に今後つながる可能性がある。これらの知見は、腫瘍免疫学における TFH 研究を次の段階へと押し上げ、ICI 治療の長期的な有効性向上に資するものである。

追　記

本研究は *Cancer Res* 誌と *Cell Rep* 誌に発表し[13,14]、現在もう 1 編投稿中である。

謝　辞

研究費をサポートいただいた臨床薬理研究振興財団に深く感謝申し上げます。また、研究室のメンバーや検体を提供してくださった患者さん、そのご家族、臨床の先生方にも深く感謝申し上げます。

利益相反

当該研究に関して直接関与する企業等の利益相反はない。

文　献

1) Nagasaki J, Ishino T, Togashi Y. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Sci* 2022; **113**: 3303-12.

2) Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, et al. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol* 2020; **21**: 1346-58.

3) Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, et al. PD-1^{+} regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**: 9999-10008.

4) Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; **16**: 356-71.

5) Nagasaki J, Togashi Y, Sugawara T, Itami M, Yamauchi N, Yuda J, et al. The critical role of CD4^{+} T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classic Hodgkin lymphoma. *Blood Adv* 2020; **4**: 4069-82.

6) Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, et al. PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. *Cell Rep* 2022; **38**: 110331.

7) Naoi Y, Morinaga T, Nagasaki J, Ariyasu R, Ueda Y, Yamashita K, et al. CD106 in tumor-specific exhausted CD8^{+} T cells mediates immunosuppression by inhibiting TCR signaling. *Cancer Res* 2024; **84**: 2109-22.

8) Baessler A, Vignali DAA. T cell exhaustion. *Annu Rev Immunol* 2024; **42**: 179-206.

9) Crotty S. T follicular helper cell biology: A decade of discovery and diseases. *Immunity* 2019; **50**: 1132-48.

10) Manes C, Moreno MG, Cimons J, D'Antonio MA, Brunetti TM, Harbell MG, et al. B cells shape naive CD8^{+} T cell programming. *J Clin Invest* 2025; **135**: e190106.

11) de Goër de Herve MG, Abdoh M, Jaafoura S, Durali D, Taoufik Y. Follicular CD4 T cells tutor CD8 early memory precursors: An initiatory journey to the frontier of B cell territory. *iScience* 2019; **20**: 100-9.

12) Tsuchiya-Kawano Y, Shiraishi Y, Tanaka K, Tachihara M, Saito R, Okamoto T, et al. Nivolumab plus ipilimumab with chemotherapy for non-small cell lung cancer with untreated brain metastases: A multicenter single-arm phase 2 trial (NIke, LOGiK 2004). *Eur J Cancer* 2024; **212**: 115052.

13) Ninomiya T, Kemmotsu N, Mukohara F, Magari M, Miyamoto A, Ueda Y, et al. Myeloid cells induce infiltration and activation of B cells and CD4^{+} T follicular helper cells to sensitize brain metastases to combination immunotherapy. *Cancer Res* 2025; **85**: 1082-96.

14) Zhou W, Kawashima S, Ishino T, Kawase K, Ueda Y, Yamashita K, et al. Stem-like progenitor and terminally differentiated T_{FH}-like CD4^{+} T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Rep* 2024; **43**: 113797.