

学位論文の要旨

学位の種類	博士(医学)	氏名	石橋 佳
学位論文題目			
Epigenetic modification augments the immunogenicity of human leukocyte antigen G serving as a tumor antigen for T cell-based immunotherapy (HLA-Gを免疫標的抗原としたDNAメチル化阻害薬併用の抗腫瘍免疫応答増強に関する研究)			
共著者名			
熊井琢美, 大栗敬幸, 小坂朱, 長門利純, 平田結, 大原賢三, 及川賢輔, 青木直子, 秋山直子, 佐渡正敏, 北田正博, 原渕保明, Esteban Celis, 小林博也			
Oncoimmunology 2016 Mar 30;5(6):e1169356. doi: 10.1080/2162402X.2016.1169356. eCollection 掲載			
研究目的			
<p>近年癌の治療戦略において、癌の免疫逃避システムの解除が治療成績向上への鍵となりことが認識されている。また、各種免疫チェックポイント阻害薬の登場で、癌治療における免疫系の重要性も注目されている。</p> <p>HLA-G分子は免疫抑制作用を持つ非古典的MHC class I抗原の一つでDNAのメチル化によって発現が制御されている(1)。HLA-Gは胎盤の栄養膜細胞に発現し胎児を母体の免疫系から保護する役割を担っていると考えられているが(2)、成人の正常組織には殆ど発現を認めない。一方で、多くの癌腫でHLA-Gの発現、増強が確認されており、癌の免疫逃避システムの一翼を担っていると考えられ、一部の癌腫ではHLA-Gの発現と予後との関連も報告されている(3)。</p> <p>そこで、HLA-G分子を標的としたペプチドワクチン療法の可能性について検討を行うため、HLA-G分子におけるエピトープペプチドを同定し、誘導されたCD4陽性T細胞の機能解析を行うとともに、DNAメチル化阻害薬との併用効果について検討を行った。</p>			
材料・方法			
1. 乳癌患者におけるHLA-Gの発現と予後の検討			
2007年に旭川医科大学病院乳腺疾患センターで手術を行った浸潤性乳管癌患者101名の手術検体を用いて、免疫組織化学染色によってHLA-Gの発現の評価を行い、HLA-Gの発現強度と全生存率・無再発生存率の関係を検討した。			

2. 各種細胞株におけるHLA-Gの発現と、DNAメチル化阻害薬による発現増強効果の検討
各種ヒト悪性腫瘍株におけるHLA-Gの発現およびDNAメチル化阻害薬（5-aza-2'-deoxycytidine）による発現量の変化をWesternBlot法によって評価した。
3. ヒト末梢血を用いたHLA-Gペプチド特異的CD4陽性T細胞の誘導
健康人末梢血からCD4陽性T細胞を分離し、コンピューターアルゴリズムで得られたHLA-DR抗原分子へ親和性をもつと予想されるHLA-Gペプチドを用いてCD4陽性T細胞を刺激し、ペプチドに特異的な反応性を示すCD4陽性T細胞クローンを樹立した。
4. HLA-G陽性腫瘍に対するHLA-Gペプチド特異的CD4陽性T細胞の反応性の評価
HLA-G陽性腫瘍に対するCD4陽性T細胞の反応性を評価するために、3)で誘導したT細胞クローンの①HLA-DRを発現させたHLA-G陽性腫瘍株、②HLA-G陽性腫瘍溶解物を貪食させた樹状細胞に対する反応性を上清中のT細胞から放出されるサイトカインを測定することで評価した。
5. 誘導されたCD4陽性T細胞の腫瘍に対する細胞障害活性の評価
CD4陽性T細胞とHLA-G陽性腫瘍株を共培養させ、上清中のLDHを定量することで腫瘍細胞に対する細胞障害活性を評価した。
6. 担癌患者の末梢血におけるHLA-Gペプチドに対する反応性CD4陽性細胞の評価
乳癌担癌患者末梢血からPBMCを分離し、HLA-Gペプチドで刺激し、担癌患者末梢血におけるHLA-G反応性T細胞の存在を評価した。

手術検体の免疫染色および担癌患者末梢血患者の評価は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った（承認番号14029および15131）

成 績

1. 101名の浸潤性乳管癌患者のHLA-G発現強度と全生存率および無再発生存率を検討した結果、HLA-G強発現群で有意に全生存率および無再発生存率ともに予後不良の結果となった。また、HLA-Gの発現は乳癌における比較的予後良好な因子であるホルモンレセプターと逆相関の関係にあった。
2. ヒト悪性腫瘍株でのHLA-G発現は、IFN- γ で処理することで多くの腫瘍株で誘導され、その発現はDNAメチル化阻害薬である5-aza-2'-dioxycytidine(5AZA)処理で有意に増強した。
3. コンピュータアルゴリズム解析の結果、HLA-DR抗原分子と高親和性が期待されるペプチドHLA-G₂₆₋₄₀で健康人末梢血から得たT細胞を刺激し、複数のペプチド特異的CD4陽性T細胞クローンを樹立した。これらのT細胞クローンのペプチドに対する反応性は抗DR抗体によって抑制され、HLA-DR拘束性に反応性を示すことが確認された。
4. 樹立したHLA-G₂₆₋₄₀ペプチド特異的CD4陽性T細胞クローンは、HLA-G陽性腫瘍から調整した可溶性lysateを貪食させた樹状細胞を認識した。そして、HLA-Gを発現する腫瘍細胞を直接認識し、HLA-DR拘束性に反応性を示した。さらに、それらの反応性は腫瘍細胞をDNAメチル化阻害薬である5AZAで処理することで増強し得た。

5. 樹立したHLA-G₂₆₋₄₀ペプチド特異的CD4陽性T細胞クローンはHLA-Gを発現する腫瘍に対してヘルパー活性だけでなく、直接的な細胞障害活性を示し、この反応性も5AZA処理によって増強し得た。
6. 乳癌および肺癌患者末梢血をHLA-G₂₆₋₄₀ペプチドで刺激することでペプチド特異的な反応が確認され、担癌患者末梢血において、HLA-Gペプチドに反応するT細胞分画が末梢血に存在することが示された。

考 案

近年、悪性腫瘍の治療において悪性腫瘍の免疫逃避機構の克服が重要であることが認識されつつある。特に免疫チェックポイント阻害薬は一部の癌患者に対して著しい効果を挙げ、悪性腫瘍の治療において、免疫系が果たす役割の重要性が認識されてきた。

非特異的MHC class I分子の一つであるHLA-Gは成人の正常組織には殆ど発現がなく、主に胎盤の栄養膜細胞に発現していることが知られており、NK細胞や細胞障害性キラーT細胞、CD4ヘルパーT細胞の活性を抑制することで、胎児を母体の免疫系から保護する役割を担っているといわれている。一方で多くの癌種でHLA-Gの発現が報告されており、癌細胞におけるHLA-Gの発現がその免疫逃避システムに関与していると考えられている。実際に胃癌や腎細胞癌ではHLA-Gの発現が予後不良因子として報告されており、本研究でも浸潤性乳管癌患者のうち38%がHLA-Gを強発現しており、HLA-G強発現群で有意に予後不良であった。以上より、HLA-Gは正常組織に殆ど発現を認めず、複数の癌種において予後不良因子として報告されていることから、HLA-Gは悪性腫瘍に対する、特に予後不良な患者群における免疫ワクチン療法の標的分子として有用であると考えられた。

HLA-Gを標的としたペプチドワクチン療法において、HLA-Gは正常組織には殆ど発現していないとはいえ、自己抗原であるので免疫寛容を受けている可能性もあり、その免疫原性が問題となる。本研究では健常人末梢血からHLA-Gペプチドに対する複数のCD4陽性T細胞クローンを樹立できたことや、担癌患者における末梢血におけるHLA-Gペプチドに対する特異的な反応がみられたことから、HLA-Gは特異的な免疫反応を惹起するだけの抗原性をもち、HLA-Gを標的とした免疫ワクチン療法の実現可能性が示された。

また、誘導されたHLA-Gペプチド特異的T細胞クローンは、HLA-G陽性腫瘍に対して特異的なヘルパー活性を示すだけでなく、腫瘍細胞に対する直接的な細胞障害活性も有していた。このことから、本研究で誘導されたHLA-Gペプチドに対する特異的T細胞クローンは、十分な抗腫瘍免疫活性を有するものと考えられた。

さらに、HLA-GはDNAのメチル化によってその発現が制御されていると言われており、本研究でもDNAメチル化阻害薬である5AZAの投与によってHLA-Gの発現量が増すことが確認された。5AZAによってHLA-G発現を増強させた腫瘍細胞は、HLA-G特異的なT細胞による反応性を増強し、さらに強い免疫活性を誘導した。このことから、HLA-Gを標的としたペプチドワクチン療法とDNAメチル化阻害薬の併用療法は新しい治療法として有用である可能性が示された。





引用文献

1. Wastowski IJ, Simoes RT, Yaghi L et al. (2013) Human leukocyte antigen-G is frequently expressed in glioblastoma and may be induced in vitro by combined 5-aza-2'-deoxycytidine and interferon-gamma treatments: results from a multicentric study. *Am. J. Pathol.* 182: 540-52. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.021
2. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ (1995) Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *The Journal of Immunology.* 154: 3771-8.
3. Guerra N, Lacombe M-JT, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P (2001) Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res.* 61: 6838-45.

参考文献

1. Kumai T, Ishibashi K, Oikawa K et al. (2014) Induction of tumor-reactive T helper responses by a posttranslational modified epitope from tumor protein p53. *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 469-78. doi: 10.1007/s00262-014-1533-z

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	石橋 佳
審査委員長 大崎能伸 			
審査委員 原 渕保明 			
審査委員 東 徳良 			
審査委員 山本明美 			
学 位 論 文 題 目			
<p>Epigenetic modification augments the immunogenicity of human leukocyte antigen G serving as a tumor antigen for T cell-based immunotherapy.</p>			
<p>学位論文提出者は、免疫抑制に関与する HLA-G に着目して、癌細胞で発現することの免疫学的な意義を検討した。HLA-G は胎盤の栄養膜細胞に発現して、胎児を母体の免疫系から保護すると考えられているが、成人の正常組織にはほとんど発現しない。しかし、多くの癌腫で HLA-G の発現が見られ、癌の免疫系からの逃避に関わると考えられている。</p> <p>ヒト悪性腫瘍細胞株での検討では、IFN-γ の処理により多くの培養株で HLA-G の発現が誘導され、その発現は DNA メチル化阻害薬の 5AZA によって増強し、DNA メチル化によって発現が抑制されていることを示した。HLA-G 由来のペプチドのスクリーニングの結果ペプチド 26-40 からペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立し、</p>			

この細胞は HLA-DR 拘束性に反応することを示した。

この T 細胞クローンは、HLA-G 陽性腫瘍の可溶化溶解産物を貪食させた樹状細胞、HLA-G を発現する腫瘍細胞を認識した。これらの反応は HLA-DR 拘束性であることを示した。また、この反応は DNA メチル化阻害薬の 5AZA によって増強した。さらに、この T 細胞は HLA-G を発現する腫瘍細胞に対して細胞障害性を示した。

臨床での検討では、乳癌患者、肺癌患者の末梢血を HLA-G 由来のペプチド 26-40 で刺激すると、ペプチド特異的な反応が見られ、これらの患者に HLA-G に反応する T 細胞が存在することを示した。さらに 101 名の乳癌切除例での免疫組織学的な検討では、腫瘍組織に HLA-G を発現する患者の生存期間が有意に短いことを示した。

これらの研究結果により論文提出者は、癌細胞が患者の免疫監視機構から逃避する HLA-G を発現し、その発言が DNA メチル化によって抑制されていることを示したばかりではなく、HLA-G に反応する T 細胞が癌患者に存在することから、HLA-G 由来のペプチドが癌抗原としての役割を持つことを示した。

本研究の結果は、癌の治療に癌細胞が免疫から逃避する機能が想定される HLA-G に対する細胞性免疫を応用するという独創的な治療の可能性に対して科学的な根拠を示すもので、学術論文としての価値が高く、また、論文提出者は研究者としての知識と素養が十分であると判断され、医学博士論文にふさわしいと判断した。