

学位論文の要旨

学位の種類	博士(医学)	氏名	大原 賢三
学位論文題目			
Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor-reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma (リン酸化p53を標的とした頭頸部扁平上皮癌に対する 腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答に関する研究)			
共著者名			
大栗敬幸, 熊井琢美, 長門利純, 野崎結, 石橋佳, 小坂朱, 永田真莉乃, 原淵翔平, 大原みずほ, 及川賢輔, 青木直子, 原淵保明, Esteban Celis, 小林博也			
Oncoimmunology, 2018, in press DOI: 10.1080/2162402X.2018.1466771.			
研究目的			
<p>免疫療法は第四の治療法として近年様々な悪性腫瘍治療の臨床で著明な効果をあげている。今回我々は、その標的抗原としてがん抑制遺伝子p53に着目した。p53はヒトがんで最も高頻度に遺伝子変異が報告されており、その変異によって新たな癌特異的抗原になり得ると考えられている。癌細胞の増殖に重要なエピジェネティックな修飾であるリン酸化、アセチル化抗原タンパク質から生成される癌抗原ペプチドは、強力な抗原性を発揮する新生エピトープペプチド(neoepitope-peptide)となりえ、有望な癌ワクチン候補となる可能性が大きい。</p> <p>本研究では頭頸部扁平上皮癌を対象とし、エピジェネティックな翻訳後修飾を受けたリン酸化p53エピトープペプチドを同定し、ペプチド抗原特異的CD4陽性T細胞の機能解析を行うとともに、頭頸部扁平上皮癌治療の代表的な薬剤であるシスプラチンとの併用が抗腫瘍免疫反応性を増強しうるか検討した。</p>			
材料・方法			
1. 中咽頭癌患者におけるリン酸化p53の発現の検討			
2010年から2014年の間に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で治療を行った新規中咽頭癌患者24名の検体を用いて、リン酸化p53の発現を免疫組織化学染色によって評価し、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染の有無、臨床病期、全生存率などとの関係を検討した。			

2. 各種細胞株、ヒト頭頸部扁平上皮癌ゼノグラフトモデルにおけるリン酸化p53の発現とシスプラチンによる発現量変化の検討

各種ヒト悪性腫瘍細胞株や、ヌードマウス(BALB/c^{nu/nu})にヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を移植したゼノグラフトモデルにおけるリン酸化p53の発現、およびシスプラチン添加によるリン酸化p53発現量の変化をウエスタンブロット法と免疫組織化学染色によって評価した。

3. ヒト末梢血を用いたリン酸化p53ペプチド特異的CD4陽性T細胞の誘導

過去に報告されているエピトープペプチドを参考にして合成したHLA-DR抗原分子へ親和性を有すると予想されるリン酸化p53ペプチドを用いて健康人末梢血由来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. リン酸化p53陽性腫瘍細胞に対するリン酸化p53特異的CD4陽性T細胞の反応性の検討

リン酸化p53陽性腫瘍細胞に対するリン酸化p53ペプチド抗原特異的CD4陽性T細胞の反応性を評価するために、誘導されたT細胞クローンをリン酸化p53陽性腫瘍細胞株と共培養し、その反応性を上清中のT細胞から放出されるサイトカインを定量することで評価した。また上清中のGranzyme Bを定量することにより腫瘍細胞に対する細胞障害活性を検討した。

5. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血における、リン酸化p53ペプチドに反応性を有するT細胞分画の検出

頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離後リン酸化p53ペプチドで刺激し、担癌患者末梢血におけるリン酸化p53反応性T細胞分画の存在を評価した。

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16040)。

成 績

1. 2010-2014年の24名の新規中咽頭癌患者において、リン酸化p53は約半数(13/24例、54%)で陽性であった。リン酸化p53の発現とHPV感染の有無、臨床病期、全生存率との間に相関はみられなかった。

2. ヒト悪性腫瘍株でのリン酸化p53の発現は、頭頸部扁平上皮癌細胞株を含む種々の細胞株で観察された。またその発現量はシスプラチン処理で上昇した。さらに、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株をヌードマウスに移植したゼノグラフトモデルにおいて、シスプラチン投与により腫瘍細胞のリン酸化p53タンパクの発現増強がみられた。

3. 過去に報告されているp53ヘルパーエピトープペプチドの配列を参考に、リン酸化p53エピトープペプチドを合成した。そのペプチドを用いて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示された。

4. 樹立したリン酸化p53ペプチド特異的CD4陽性T細胞クローンをリン酸化p53陽性腫瘍細胞と共

培養すると、リン酸化p53を発現する腫瘍細胞を直接認識し、HLA-DR拘束性にサイトカインを産生した。さらに、それらの反応はウエスタンブロット法や免疫組織化学染色における結果に一致して、シスプラチン処理により増強した。また、腫瘍を直接傷害するサイトカインであるGranzyme Bの産生も確認された。

5. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から分離したPBMCをリン酸化p53ペプチドで刺激することで、ペプチド特異的な反応が認められた。これにより、頭頸部扁平上皮癌患者末梢血中にも、リン酸化p53ペプチドに反応するT細胞分画が存在することが示された。

考 案

頭頸部癌は6番目に多い癌であり、全癌の約5%を占める。近年の治療方法の進歩にも関わらず、頭頸部扁平上皮癌の全生存率は数十年大きく変化していない。患者の多くが進行期で初診することがその一因とされている。2017年には本邦においても他の癌腫と同様に、免疫チェックポイント阻害薬が、再発または遠隔転移を有する頭頸部扁平上皮癌に適応され、免疫系が悪性腫瘍の治療に果たす重要性がますます認識されている。

今回、我々が着目したp53は以前より腫瘍関連抗原として免疫治療の標的とされてきた。さらにリン酸化は悪性化の指標とされており、リン酸化p53を標的とすることによりさらなる腫瘍選択性が期待される。本研究で対象とした新規中咽頭癌24症例のうち13例(54%)で免疫組織化学染色においてリン酸化p53の発現が確認された。臨床病期や予後などとの相関は得られなかったが、半数以上に陽性であったため治療の標的抗原分子とする妥当性が得られた。

がん抑制遺伝子と知られているp53は、定常状態ではその発現量は非常に低く維持されており、腫瘍組織では変異p53が多く発現している。さらに、その変異p53の多くはリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けている。そして、ヒトの免疫系はこの翻訳後修飾を受けたp53を特異的に認識できることを、ヘルパーT細胞応答性で評価した。T細胞をベースとした免疫療法はその多くが細胞傷害性T細胞に着目している。しかし、ヘルパーT細胞は細胞傷害性T細胞の産生や維持に重要であるだけでなく、ヘルパーT細胞自体が細胞傷害活性を持つことが知られており、実際我々が誘導したヘルパーT細胞も抗原特異的にグランザイムBを産生した。さらに、今回我々が報告したヘルパーT細胞エピトープには過去に報告されているキラエピトープの配列も含んでおり、このペプチドは細胞傷害性T細胞も誘導できる可能性がある。

DNA傷害作用をもつシスプラチンによりリン酸化p53の発現が上昇することが過去に報告されている。本研究でも、腫瘍細胞株においてシスプラチン処理によりリン酸化p53の発現が上昇し、ゼノグラフトモデルにおいてもシスプラチン投与によりリン酸化p53の発現が上昇した。そして、そのリン酸化p53の発現上昇に一致して、誘導したヘルパーT細胞のサイトカイン産生が有意に増加し、腫瘍を直接傷害するGranzyme Bの産生も増加した。シスプラチンは頭頸部扁平上皮癌治療の第一選択抗腫瘍薬であり、そのシスプラチンをアジュバントとして使用できる可能性が本研究によって示された。

悪性腫瘍に対するペプチドワクチン療法は、免疫チェックポイント阻害薬などに比較すると安価であり、副作用が少なく、臨床応用が比較的容易である。また、実際の頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中に本研究で使用したペプチドに反応する前駆T細胞が存在することも確認された。現在、実臨床で使用されているシスプラチンとリン酸化p53を標的としたペプチドワクチン療法の併用療法は、頭頸部扁平上皮癌治療において早期に臨床応用が可能な治療法と成り得ることが示唆された。





引 用 文 献

1. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England journal of medicine* 2016.
2. Andersen MH, Bonfill JE, Neisig A, Arsequell G, Sondergaard I, Valencia G, et al. Phosphorylated peptides can be transported by TAP molecules, presented by class I MHC molecules, and recognized by phosphopeptide-specific CTL. *Journal of immunology* 1999; 163:3812-8.
3. Ito D, Albers A, Zhao YX, Visus C, Appella E, Whiteside TL, et al. The wild-type sequence (wt) p53(25-35) peptide induces HLA-DR7 and HLA-DR11-restricted CD4+ Th cells capable of enhancing the ex vivo expansion and function of anti-wt p53(264-272) peptide CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006; 177:6795-803.

参 考 论 文

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	大原 賢三
審査委員長 <u>大崎能伸</u> 			
審査委員 <u>谷野美智枝</u> 			
審査委員 _____ 			
審査委員 <u>島本悦彦</u> 			
学 位 論 文 題 目			
<p>Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor-reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma.</p> <p>(リン酸化p53を標的とした頭頸部扁平上皮癌に対する腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答に関する研究)</p>			
<p>論文提出者は、頭頸部癌での腫瘍特異的な免疫応答について基礎的な検討を行った。頭頸部悪性腫瘍では腫瘍抑制遺伝子の p53 が蓄積することに着目し、リン酸化された p53 タンパクが腫瘍特異的な抗原として提示され、これに反応する末梢血単核細胞が頭頸部癌患者に存在するかを検討した。</p> <p>免疫染色による検討では、p53 タンパクは頭頸部扁平上皮癌検体の75%に陽性であった。リン酸化 p53 は、S33 (p-p53S33)が 54%、S37 (p-p53S37)が 42%で陽性だった。42%が両者に陽性だった。S33 と S37 がリン酸化された p53(p-p53S33-S37)を用いた検討では、健常ドナーから分離された CD-4 陽性 T 細胞は p-p53S33 と p-p53S33-S37 を認識したが、リン酸化されないワイルドタイプ p53 と p-p53S37 に対す</p>			

る反応は弱かった。p-p53S33 と p-p53S37 を用いた検討では、健常ドナーから p-p53S33 と p-p53S37 を認識する T 細胞を分離できたが、ワイルドタイプの p53 は認識されなかった。次に、論文提出者は化学療法が p53 タンパクのリン酸化を増強することを示した。リン酸化 p53 を認識する T 細胞とリン酸化 p53 をもつ腫瘍細胞を反応させるとインターフェロン γ を産生したことから、これらの腫瘍細胞は CD-4 陽性細胞が認識する p53 ペプチドを抗原として提示することが示された。また、これらの抗原として提示されるリン酸化 p53 ペプチドは化学療法剤の使用後に増加することが示された。さらに頭頸部癌患者から分離した末梢血単核細胞からはリン酸化 p53 に反応する細胞を見出すことができたが、健常人からは検出できなかった。

以上の検討から、論文提出者はリン酸化 p53 ペプチド、特に p-p53S33 と p-p53S33-S37 が頭頸部癌のワクチンとして用いられ、さらに、化学療法との併用で効果を高める可能性を示した。

本論文は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た。以上より、本論文は医学博士論文にふさわしいと判断した。