

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)

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

大原 賢三

(大原賢三, 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)

研究目的

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。

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鍵となる代表的な薬剤であるシスプラチンとの併用効果が抗腫瘍免疫反応性を増強しうるかについて検討を行った。

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リン酸化 p53 の発現の評価を行いし、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もつ有すると予想されるリン酸化 p53 ペプチドを用いて健常人末梢血由来 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評価

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、3. で誘導した誘導された 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の末梢血における、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確認観察された。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常人末梢血から得た 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。

考察

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きている。

今回、我々が注目着目した 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対象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ー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処理によりリン酸化 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 key drug 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