

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07452

研究課題名(和文) 上皮間葉転換関連分子を標的とする次世代型癌免疫療法の確立へ向けた基盤研究

研究課題名(英文) Epithelial mesenchymal transition (EMT)-associated proteins as potent immunotherapeutic target for cancer immunotherapy

研究代表者

小林 博也 (Kobayashi, Hiroya)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍が転移能を獲得する際の特徴の1つとして上皮間葉転換EMTが知られており、ビメンチンはEMTのバイオマーカーとして実臨床で用いられている。さらに、腫瘍が浸潤する際の前線 invasion frontにおける細胞ストレスはビメンチンをリン酸化する。我々はリン酸化ビメンチン特異的な抗腫瘍効果を持つCD4陽性T細胞のクローン化に成功した。健康成人末梢血単核球から樹立されたT細胞はリン酸化エピトープペプチドのみに反応し、野生型配列のペプチドには反応しなかった。また大腸癌患者末梢血を用いリン酸化ビメンチンエピトープペプチドで刺激すると、末梢血内にペプチドに反応性を有する前駆細胞の存在が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発転移癌の克服に向けたEMT関連分子特異的T細胞の活性化を基軸とした革新的次世代型癌ワクチン療法を確立するために、EMT関連分子であるビメンチンにおけるT細胞認識抗原ペプチドを探索しそれらの臨床学的有効性について明らかにするとともに大腸癌患者におけるリン酸化ビメンチンに対する免疫応答性について明らかにした。癌が全身の諸臓器に多数再発転移している患者群では、既存の治療効果が乏しいことから、再発転移癌に対する有効かつ革新的な免疫療法の標的にEMT関連分子の一つであるビメンチンが、有望な癌抗原ペプチドワクチンの候補になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：During metastasis, cancer cells often obtain unique characteristics such as epithelial-mesenchymal transition (EMT). Vimentin is one of the biomarkers that contributes to EMT by changing cell shape and motility. Since abnormal phosphorylation is a hallmark of malignancy, targeting phosphorylated vimentin is a feasible approach for the treatment of metastatic tumors. Here, we showed that the expression of phosphorylated vimentin was upregulated in metastatic sites of Colorectal cancer (CRC). The novel phosphorylated helper peptide epitopes from vimentin could elicit sufficient T cell response. Notably, precursor lymphocytes which specifically reacted to these phosphorylated vimentin-derived peptides were detected in CRC patients. These results suggested that immunotherapy targeting phosphorylated vimentin could be a novel therapeutic agent for metastatic CRC patients.

研究分野：免疫学

キーワード：HLA ペプチド T-cell ビメンチン リン酸化 EMT 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2014年度に文部科学省・厚生労働省・経済産業省によって策定された新たな「がん研究戦略」では8つの研究分野が取り組むべき分野として挙げられている。その中の『ライフステージやがんの特性に着目した重点研究領域』には、『転移癌』が難治性癌の一つとして日本発の治療法の開発を目指して強力に推進する研究対象であると言及されている。申請者は、癌の転移に関係する EMT 関連分子である Twist1 がメラノーマ患者において免疫系の標的対象として認識されることを明らかにしている(未発表)。また、正常細胞に発現されるタンパク質であっても、癌特異的翻訳後修飾されたアミノ酸配列は高い免疫原性を有することを明らかにし、予備的検討において、EMT 関連分子であるビメンチンがリン酸化修飾を受けることで免疫原性を増し、T 細胞に特異的に認識されることを確認した。

つまり、「EMT 関連分子は癌患者の免疫系の標的になる」かつ「癌特異的翻訳後修飾を受けたタンパク質は抗原性が高い」という知見を得たことから、『再発転移癌で高発現している EMT 関連分子やその翻訳後修飾部位を標的とした癌免疫治療は癌の再発転移の予防及び、再発転移癌の増殖を効果的に抑制できるのではないか?』という本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

癌細胞が転移能を獲得する機構の一つとして EMT が知られており、原発癌組織内の癌細胞が TGF- β の刺激を受けることにより EMT 関連転写因子の発現が誘導され、細胞間接着の低下を伴う運動能の獲得により多臓器への転移浸潤が生じる。さらに、癌幹細胞(CSC)にも EMT 関連分子が高発現し、その悪性能の保持に関わっている。

癌細胞では、その遺伝子変異によって異常な活性を獲得したリン酸基及びアセチル基、糖などの転移酵素により、正常細胞では起こりえないような翻訳後修飾機構が展開された結果として生じる癌特異的新生修飾エピートープペプチドも存在する。タンパク質に付加されたリン酸基やアセチル基などは、そのタンパク質が細胞内で分解され、細胞表面の HLA 分子に抗原提示される際にもペプチド上に保持されており、T 細胞の抗原認識に影響を与えている。つまり、癌細胞の HLA 分子には、正常細胞では生じ得ないエピジェネティックな翻訳後修飾を受けたタンパク質由来の新生修飾エピートープペプチドが提示されている。

遠隔転移病変を有する大腸癌患者の5年生存率は依然として20%程度と低い。腫瘍が転移能を獲得する際の特徴の一つとして上皮間葉転換 EMT が知られており、ビメンチンは EMT のバイオマーカーとして実臨床で用いられている。さらに、腫瘍が浸潤する際の前線 invasion front における細胞ストレスはビメンチンをリン酸化する。

本研究では、癌の悪性能の指標となりうる EMT 関連分子の一つであるビメンチンが、癌免疫応答を惹起しうる強力な抗原タンパク分子となりうるか、そしてこれら分子に内含されたリン酸化修飾抗原ペプチドが次世代の癌免疫治療をリードするワクチンになりうるか問いたい。

3. 研究の方法

(1) リン酸化 EMT 関連新生抗原エピートープペプチドの免疫学的有効性評価

リン酸化ビメンチンペプチド特異的 T 細胞を誘導し、癌細胞株を特異的に認識し殺傷するかを *in vitro* 培養系を用いて明らかにし、そのサイトカイン産生パターンや HLA 分子拘束性を明らかにする。

(2) 癌患者 T 細胞系におけるビメンチン分子に対する免疫学的有用性評価

同定されたリン酸化ビメンチン抗原ペプチドに対して癌患者生体内において有効な免疫応答が起きているかを検討するために、癌患者末梢血リンパ球を用いてビメンチン分子に対する抗体価並びにヘルパー、キラー T 細胞応答を ELISA 及び ELISPOT 法によって定量する。

(3) 癌組織検体の原発巣と転移巣におけるリン酸化ビメンチン蛋白発現の病理学的解析

再発転移癌においてビメンチンおよびリン酸化ビメンチン蛋白の発現程度を、同一癌患者の原発巣及び再発転移巣の病理組織検体を用いた免疫組織染色によって、発現の有無などを明らかにし、臨床予後との相関を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 免疫原性を有しそうなビメンチンエピートープペプチドの選択と同定

癌の上皮間葉転換 (EMT) に重要とされるビメンチンに着目して、アルゴリズム解析や過去の報告をもとに、HLA クラス II 分子に結合可能で T 細胞応答を惹起しそうなペプチド配列を探索し合成した。またリン酸化に代表されるような翻訳後修飾部位があるかどうかに着目し、野生型ペプチドと共にリン酸化ペプチドも合成した。

複数の健康成人ボランティアから末梢血 T 細胞と樹状細胞を分離しペプチドで刺激共培養したところ、ビメンチンペプチド p28-49 と p63-90 の配列で有効なヘルパー T 細胞反応を誘導することが可能であった。更にこれらのビメンチンペプチドにおいて、リン酸化された翻訳後修飾を有する配列 (S32, S72/S83、いずれもセリンがリン酸化) を用いても強力な T 細胞応答を惹起

することに成功した。T細胞は、ペプチド濃度依存性に TH1 サイトカインであるインターフェロン を旺盛に産生した。またこれらの反応性は抗 HLA クラス II 抗体で抑制されるとともに、マウス L 細胞に HLA クラス II 分子を発現させた抗原提示細胞によって反応が起きることから、HLA クラス II 分子を介して惹起されるヘルパーT細胞反応であることが確認された。提示 HLA クラス II 抗原は、DR53 や DR14 など複数存在し、同定したビメンチンエピトープペプチドは promiscuous であることが示唆された。

(2) リン酸化ビメンチンの各種癌細胞株での発現

各種培養癌細胞株において、野生型ビメンチンとリン酸化ビメンチンタンパク質が発現しているかどうかを特異的抗体を用いたウエスタンブロットで検出を試みたところ、大腸癌、腎癌、肺癌、頭頸部扁平上皮癌、およびT細胞リンパ腫細胞株の一部に発現がみられた。

(3) リン酸化ビメンチンペプチド特異的ヘルパーT細胞の naturally processed antigen の認識

リン酸化ビメンチンペプチド反応性ヘルパーT細胞が、実際の腫瘍細胞に反応するかどうか検討した。事前にこれらのリン酸化ビメンチン抗原蛋白質が腫瘍細胞に発現しているかどうかをウエスタンブロットで検討したところ、大腸癌細胞株(SW839)や肺癌細胞株(Calu1, Lu65)に認められたため、これらを標的腫瘍細胞とし、樹立されたヘルパーT細胞が直接認識し、各種サイトカインを放出可能か検討した。リン酸化特異的ヘルパーT細胞クローンは、リン酸化ビメンチン陽性の腫瘍細胞株を直接認識し、GM-CSF やインターフェロン などを放出した。更に細胞傷害活性を持つサイトカインであるグランザイム B を産生した。さらに、これらの反応は抗 HLA クラス II 抗体により有意に抑制された。

樹状細胞(DC)は生体内で壊死やアポトーシスに陥った腫瘍細胞を貪食し、癌抗原ペプチドをT細胞に提示することが知られている。腫瘍細胞ライセートをパルスした DC を抗原提示細胞として、リン酸化ビメンチンペプチド特異的ヘルパーT細胞と共培養すると、T細胞は反応しインターフェロン を産生したが、これらの反応は抗 HLA クラス II 抗体により有意に抑制された。

今回同定したリン酸化ビメンチン配列抗原ペプチドは、直接的な腫瘍細胞表面上の MHC クラス II 抗原分子および抗原提示細胞内でプロセスされて提示される間接的な認識機構が存在することが示された。

(4) 大腸癌組織でのリン酸化ビメンチンの発現

2011年-2015年の間に当院消化器外科で原発巣と転移巣の両方の切除手術を行った患者検体(n=22)において、リン酸化ビメンチンの免疫染色を施行したところ原発巣では68%(15/22)、転移巣では91%(20/22)で陽性であり、正常の大腸組織には陰性であった。この結果からリン酸化ビメンチンをがん免疫療法の標的として使用する有用性が示唆された。

さらに、原発巣と転移巣の患者検体において HLA-DR の免疫染色を施行したところ、原発巣では45%(10/22)、転移巣では27%(6/22)で陽性であり、実臨床においてもヘルパーT細胞が腫瘍退縮に関与しうる対象となる患者数が一定以上存在することが示唆された。

(5) 大腸癌患者末梢血中のリン酸化ビメンチン反応性T細胞の存在

大腸癌患者6例の末梢血を用いリン酸化ビメンチンエピトープペプチドで刺激すると、末梢血内にリン酸化エピトープペプチドに反応性を有する前駆細胞の存在が確認され、これらの反応性は抗 HLA クラス II 抗体により抑制された。

以上より、我々が同定したリン酸化ビメンチンヘルパーエピトープペプチドが生体内で抗原特異的なヘルパーT細胞を誘導し、これらは腫瘍拒絶に関与する可能性があり、リン酸化ビメンチンが新たな免疫治療の標的分子となる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Ohara M, Ohara K, Kumai T, Ohkuri T, Nagato T, Hirata-Nozaki Y, Kosaka A, Nagata M, Hayashi R, Harabuchi S, Yajima Y, Oikawa K, Harabuchi Y, Sumi Y, Furukawa H, Kobayashi H. Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Jun;69(6):989-999. doi: 10.1007/s00262-020-02524-9. Epub 2020 Feb 21. PMID:32086539.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohara M, Ohara K, Kumai T, Ohkuri T, Nagato T, Hirata-Nozaki Y, Kosaka A, Nagata M, Hayashi R, Harabuchi S, Yajima Y, Oikawa K, Harabuchi Y, Sumi Y, Furukawa H, Kobayashi H.	4. 巻 69
2. 論文標題 Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 989-999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02524-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大原賢三、熊井琢美、長門利純、林 隆介、矢島優己、大栗敬幸、小林博也。
2. 発表標題 リン酸化ビメンチンを標的抗原とした転移性大腸癌に対する免疫療法
3. 学会等名 第24回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大原賢三、大原みずほ、長門利純、大栗敬幸、小坂朱、林隆介、永田真莉乃、原淵翔平、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 リン酸化ビメンチンを標的とした免疫療法の基礎的解析
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------