

令和元年5月15日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16884

研究課題名(和文) 癌特異的翻訳後修飾を受けたp53を標的とした頭頸部扁平上皮癌の免疫治療

研究課題名(英文) Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor-reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

大原 賢三 (Ohara, Kenzo)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的に翻訳後修飾されたリン酸化p53を特異的に認識するヘルパーT細胞クローンの樹立に成功した。これらのクローンは頭頸部扁平上皮癌の代表的な治療薬剤であるシスプラチンを添加することによりその腫瘍認識能、細胞傷害活性が増強した。リン酸化p53ヘルパーエピトープペプチドに反応性を有する前駆細胞の存在を担癌患者の末梢血中に確認することができた。以上のことより頭頸部扁平上皮癌の治療の選択肢の一つとして、ヘルパーペプチドワクチン療法を有用性を示唆する研究成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。今回、我々が注目を集めた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。

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、副作用が少ない。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は、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。

研究成果の概要(英文)：Aberrant phosphorylation of cellular proteins is a hallmark of malignant transformation, the expression of the phosphorylated epitope could be an ideal antigen to combat cancer without damaging normal tissues. In response to DNA damage, p53 is phosphorylated at multiple sites. Here, we identified phosphorylated peptide epitopes from p53 that could elicit effective T helper responses. These epitope peptides induced T helper responses against tumor cells expressing the phosphorylated p53 protein. Moreover, chemotherapeutic agents augmented the responses of such CD4 T cells via upregulation of phosphorylated p53. The lymphocytes specific for the phosphorylated p53 peptide epitopes were observed in the head and neck squamous cell cancer (HNSCC) patients. These results reveal that a combination of phosphorylated p53 peptides and chemotherapy could be a novel immunologic approach to treat HNSCC patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：p53 悪性腫瘍 頭頸部外科

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

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。今回我々は、免疫療法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。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

(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

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

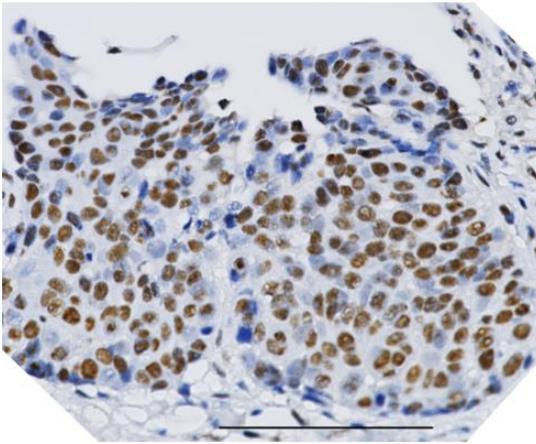
るT細胞分画の検出

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）。

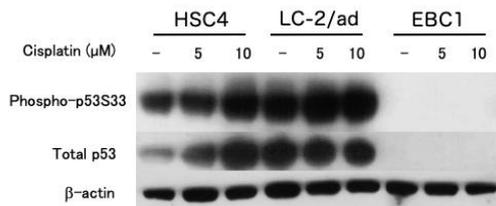
4. 研究成果

(1)2010-2014 年の 24 名の新規中咽頭癌患者の臨床検体において、免疫組織化学で解析するとリン酸化 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。



リン酸化 p53 免疫組織化学 中咽頭癌 T2N0M0 bar:100 μm

(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。

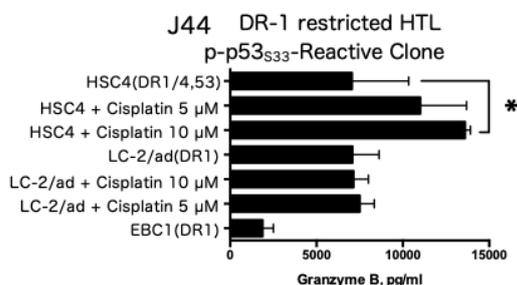


さらに、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株をヌードマウスに移植したゼノグラフトモデルにおいて、シスプラチン投与により腫瘍細胞のリン酸化 p53 タンパクの発現増強がみられた。

(3)過去に報告されている p53 ヘルパーエピートープペプチドの配列を参考に、リン酸化 p53 エピー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。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor- reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma Kenzo Ohara, Takayuki Ohkuri, Takumi Kumai, Toshihiro Nagato, Yui Nozaki, Kei Ishibashi, Akemi Kosaka, Marino Nagata, Shohei Harabuchi, Mizuho Ohara, Kensuke Oikawa, Naoko Aoki, Yasuaki Harabuchi, Esteban Celis & Hiroya Kobayashi. *Oncoimmunology*, 2018 査読有り
DOI:10.1080/2162402X.2018.1466771.

[学会発表] (計 8 件)

1. 翻訳後修飾を受けたリン酸化p53ペプチド特異的T細胞の抗腫瘍効果の解析 大原賢三, 平田 結, 長門利純, 熊井琢美, 小林博也, 原渕保明 第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2017年
2. 翻訳後修飾を受けたリン酸化p53ペプチド特異的ヘルパーT細胞による抗腫瘍効果の解析 大原賢三, 平田 結, 長門利純, 熊井琢美, 大栗敬幸, 小坂 朱, 永田真莉乃, 青木直子, 及川賢輔, 小林博也 第106回日本病理学会総会 2017年
3. Induction of tumor-reactive T helper-cell responses by phospho-peptide epitopes from tumor protein p53 大原賢三, 野崎 結, 熊井琢美, 長門利純, 原渕翔平, 永田真莉乃, 大栗敬幸, 小坂 朱, 及川賢輔, 青木直子, 原渕保明, 小林博也 第76回日本癌学会
4. 翻訳後修飾を受けたリン酸化p53を標的としたペプチドワクチン療法の検討 大原賢三, 野崎結, 熊井琢美, 長門利純, 原渕翔平, 小林博也, 原渕保明日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2018年

5. リン酸化抗原を標的としたヘルパーペプチドワクチン療法の基礎的解析 大原賢三, 大原みずほ, 長門利純, 大栗敬幸, 小坂朱, 永田真莉乃, 青木直子, 及川賢輔, 小林博也 日本病理学会 2018年
6. リン酸化抗原を特異的に認識するT細胞の抗腫瘍効果の解析 大原賢三, 大原みずほ, 長門利純, 大栗敬幸, 小坂朱, 林隆介, 原潤翔平, 永田真莉乃, 及川賢輔, 青木直子, 小林博也 北海道病理談話会 2018年
7. ストレス存在下に翻訳後修飾を受けた免疫原性を有するp53を標的としたヘルパーペプチドワクチン療法の解析 大原賢三, 小林博也 臨床ストレス応答学会 2018年
8. Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor-reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma Kenzo Ohara, Takumi Kumai, Toshihiro Nagato, Takayuki Ohkuri, Yui Nozaki, Mizuho Ohara, Nobuyuki Bandoh, Tatsuya Hayashi, Yasuaki Harabuchi, Hiroya Kobayashi American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018年

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。