

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山木 英聖
<p>学位論文題目</p> <p>Brachyury-targeted immunotherapy combined with gemcitabine against head and neck cancer</p> <p>(頭頸部癌における Brachyury 標的免疫療法と Gemcitabine の併用療法に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>河野通久、脇坂理紗、小松田浩樹、熊井琢美、林 隆介、佐藤遼介、長門利純、 大栗敬幸、小坂 朱、大原賢三、岸部 幹、高原 幹、林 達哉、小林博也、片田彰博</p> <p>掲載雑誌</p> <p>Cancer Immunology, Immunotherapy</p> <p>DOI:10.1007/s00262-023-03460-0</p> <p>はじめに</p> <p>癌ペプチドワクチン療法は、腫瘍が発現している抗原タンパクから MHC クラス I や MHC クラス II に提示されるエピトープを同定し、そのエピトープペプチドをワクチンとして用いる治療法である。CD8 陽性ヘルパーT 細胞 (CTL) だけでなく、CD4 陽性ヘルパーT 細胞 (HTL) も癌を直接殺傷できることが明らかになっている¹⁾。また、頭頸部癌は多くの腫瘍抗原を有しており、癌ペプチドワクチン療法が腫瘍特異的な治療として期待される。</p> <p>Brachyury は、T-box 遺伝子ファミリーに属する転写因子で、脊索動物の胚発生において脊索の分化や中胚葉の後方形成に関与している。Brachyury は主に胎生期で発現し、精巣と甲状腺を除くほとんどの成熟細胞では発現していない。最近の研究により Brachyury は、肺癌、乳癌、直腸癌、口腔癌などの悪性腫瘍で発現することが分かってきた。したがって、Brachyury は、自己免疫のリスクを軽減しつつ、特異的に抗腫瘍性 T 細胞を誘導できるがん精巣抗原であると考えられる。Brachyury 特異的 CD8 陽性キラーT 細胞 (CTL) を誘導するエピトープは同定されているが、Brachyury 特異的に CD4 陽性ヘルパーT 細胞 (HTL) を誘導するエピトープがあるか、また口腔癌以外の頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) で</p>			

Brachyury が発現しているかを検討した研究はない。

最近の研究では、免疫アジュバントやペプチド配列、投与経路、投与プロトコルの工夫によって、ペプチドワクチンの効果増強が示唆されている²⁾。免疫活性を有する化学療法は、速やかな臨床導入を目指した理想的な免疫アジュバントである。Gemcitabine (GEM) は細胞性免疫に害を与えることなく免疫調節効果をきたすことが示されており、ペプチドワクチンにおける有望な免疫アジュバントとなり得る。

本研究では、HNSCC を対象として Brachyury の発現を確認した。また、新規に同定した Brachyury エピトープペプチドを用いて Brachyury 反応性 HTL を誘導し、その機能解析を行なった。さらに、Brachyury 反応性 HTL の前駆 T 細胞が HNSCC 患者に存在するか確認し、免疫アジュバントとしての GEM の有効性を検討した。

材 料 ・ 方 法

1. HNSCC 細胞株における Brachyury の発現の検討

2010 年～2019 年に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で治療を行った中咽頭癌患者 52 例の生検・手術材料を用いて、Brachyury の発現を免疫組織化学染色により評価した。

2. 健常人末梢血を用いた Brachyury 反応性 HTL の誘導と HLA-DR 拘束性の検討

Brachyury の全アミノ酸配列から HLA クラス II 分子への結合能が高い配列をコンピュータアルゴリズム解析にて同定・精製した。健常人末梢血から CD4 陽性 T 細胞を分離し、樹状細胞や末梢血単核球 (PBMC) を抗原提示細胞としてエピトープペプチドで複数回刺激することで、ペプチドに特異的に反応する HTL を樹立した。Brachyury 反応性 HTL とペプチド提示した PBMC を共培養し、HTL から上清中に産生されるサイトカイン量を測定することで、HTL のペプチド反応性を評価した。また、Brachyury 反応性 HTL とペプチドを提示した単一のヒト HLA-DR を発現するマウス線維芽細胞 (L-cell) を共培養し、HTL から上清中に産生されるサイトカイン量 (IFN- γ) を測定することで、拘束性を担う HLA-DR 分子を同定した。

3. Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株に対する Brachyury 反応性 HTL の反応性の検討

Brachyury 反応性 HTL と Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株を共培養し、HTL から上清中に産生されるサイトカイン量 (IFN- γ) を測定することで、HTL の腫瘍細胞株に対する反応性を評価した。

4. Brachyury 反応性 HTL の細胞傷害活性の検討

Brachyury 反応性 HTL と Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株を共培養し、腫瘍細胞を直接傷害するサイトカインである Granzyme B の上清中の産生量を測定した。さらに、フローサイトメーターを用

いて、Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株を CFSE でラベリングした後、Brachyury 反応性 HTL と共培養し、7-AAD で死細胞を染色して、HTL の腫瘍傷害活性を評価した。

5. HNSCC 患者末梢血中 Brachyury ペプチド反応性 T 細胞の存在評価

HNSCC 患者から分離した PBMC を用いて Brachyury ペプチドに対する反応性を検討し、担癌患者末梢血中における Brachyury 反応性 T 細胞の存在を評価した。

6. 免疫アジュバントとしての GEM の効果検討

Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株に GEM を添加し、MHC クラス I、MHC クラス II (HLA-DR)、Brachyury、PD-L1 の発現を評価した。Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株を GEM で処理後に、Brachyury 反応性 HTL と共培養し、抗 PD-1 抗体の添加の有無で上清中のサイトカイン (IFN- γ 、Granzyme B) の産生量を評価した。GEM が HNSCC 細胞株に対して免疫原性細胞死 (ICG: Immunogenic cell death) が起こっているか、培養上清中の HMGB1 (high mobility group box 1)、ATP の産生量を測定した。また、マウス由来 HNSCC 細胞株 (MOC1) を C57BL/6 マウスに移植し、GEM ± 抗 PD-1 抗体で腫瘍増殖が抑制されるかを評価した。

生検・手術材料の免疫組織化学染色および担癌患者末梢血中の Brachyury 反応性 T 細胞の検出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 16217 及び 20001)。

成績

- 2010 年から 2019 年に当科で治療を行なった 52 例の新規中咽頭癌患者において、手術・生検検体を免疫組織化学的に調べたところ、Brachyury は 67.3% (35/52 例) で高発現であった。
- Brachyury₁₈₉₋₂₀₃ と Brachyury₂₅₈₋₂₇₂ の 2 つのエピトープペプチドを同定・精製した。これらのペプチドで健常人末梢血から分離された CD4 陽性 T 細胞を複数回刺激し、Brachyury 反応性 HTL クローンを樹立した。Brachyury₁₈₉₋₂₀₃ は HLA-DR53 を発現する L-cell に、Brachyury₂₅₈₋₂₇₂ は HLA-DR4 を発現する L-cell に反応したことから、それぞれ HLA-DR53 拘束性、HLA-DR4 拘束性であった。
- Brachyury 反応性 HTL クローンは、共培養した Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株を認識し、IFN- γ を産生した。Brachyury 反応性 HTL クローンは腫瘍細胞に発現している Brachyury を特異的に認識し反応することが示された。

4. Brachyury 陽性 HNSCC 細胞株と共培養した Brachyury 反応性 HTL クローンから、Granzyme B が産生され、高い細胞傷害活性を有することが示された。HTL クローンの細胞傷害活性を評価すると、HLA-DR が一致する腫瘍細胞株のみで細胞傷害活性を示した。
5. HNSCC 患者末梢血から分離した PBMC を Brachyury ペプチドで複数回刺激したところ、8 例中 5 例 (62.5%) において IFN- γ の産生が認められた。以上より、HNSCC 患者の末梢血中に Brachyury ペプチド反応性を有する T 細胞分画が存在することが示された。
6. HNSCC 細胞株に GEM を添加すると、MHC クラス I、HLA-DR、Brachyury、PD-L1 の発現が亢進した。腫瘍細胞株を GEM で処理した後、HTL クローンと共培養すると、IFN- γ 、Granzyme B 共に産生が増加した。GEM 処理で PD-L1 の発現は亢進し、抗 PD-1 抗体を追加するとさらにサイトカイン産生が増加した。GEM 処理により HNSCC 細胞株上清中の HMGB1、ATP 産生が増加したことから、HNSCC 細胞株において免疫原性細胞死が生じていることが示された。MOC1 を移植した C57BL/6 マウスに GEM を腹腔内投与すると腫瘍が縮小し、抗 PD-1 抗体を併用すると腫瘍はさらに縮小した。以上のことから、GEM は *in vitro*、*in vivo* においても免疫アジュバントとして有用な可能性が示唆された。

考察

本研究では、ペプチドワクチンの標的抗原としての Brachyury の有用性、および GEM と免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の組み合わせが有望な免疫アジュバントであることを明らかにした。Brachyury はがん幹細胞様マーカー、上皮間葉転換、腫瘍転移や化学療法・放射線療法の抵抗性と関連しており、Brachyury 高発現する悪性腫瘍は予後不良である。したがって、Brachyury を標的とした新規治療法の開発は有益と考えられる。HNSCC 患者の大半で Brachyury が発現していることから、Brachyury を標的とした免疫療法は多くの患者に適用できることが示された。

ICI は、T 細胞浸潤を特徴とする免疫学的に「hot」な腫瘍に対して有効であるため、「cold」から「hot」に変換できるアプローチを組み合わせることは合理的である。T 細胞は腫瘍の MHC 上の抗原を認識して腫瘍組織に浸潤するため、腫瘍における MHC 発現の増強は治療標的として有望である。したがって、本研究で示されたように、GEM による MHC 発現の増加は ICI との相乗効果をもたらす可能性がある。

HNSCC における GEM の免疫調節効果を検討した研究はごくわずかである。他の悪性腫瘍では、GEM による T 細胞の活性化、樹状細胞およびその抗原提示能の増加、制御性 T 細胞 (Treg) および骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の抑制が示唆されている。また、GEM は抗原提示細胞の遊走や活性化を促進する損傷関連分子パターン (DAMPs) を腫瘍細胞から遊離させる可能性がある。本研究では、GEM によって HNSCC 細胞から免疫を賦活化させる ATP と HMGB1 が誘導されることを確認した。抗腫瘍 HTLs の機能を増強するために、MHC 発現の亢進、DAMPs の放出、あるいはその両方が必要なのか、さらなる研究が必要である。

結論

抗原特異的 HTL を介して直接抗腫瘍活性を誘発しうる Brachyury の新規ヘルパーエピトープを同定した。Brachyury の発現は HNSCC 患者の大部分に認められ、ペプチドワクチンの有望なターゲットである可能性がある。さらに、GEM により MHC クラス I および MHC クラス II の発現が上昇し、T 細胞による腫瘍認識が増強した。ICI を併用すると GEM による抗腫瘍 T 細胞活性がさらに上昇することを、*in vitro* およびマウス HNSCC モデルで確認した。GEM と ICI の併用は、Brachyury 由来新規エピトープを用いた HTL 標的ペプチドワクチンと組み合わせるのに好ましい免疫アジュバントであると思われた。

引用文献

- 1) Melssen M, Slingluff CL Jr, et al. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2017;47:85-92.
- 2) Kumai T, Yamaki H, Kono M, Hayashi R, Wakisaka R, Komatsuda H. Antitumor Peptide-Based Vaccine in the Limelight. *Vaccines (Basel).* 2022;10(1):70.

参考文献

- 1) Kono M, Yamaki H, Kumai T, et al. Immunomodulation via FGFR inhibition augments FGFR1 targeting T-cell based antitumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2022;11(1)
- 2) Hayashi R, Nagato T, Kumai T, et al. Expression of placenta-specific 1 and its potential for eliciting anti-tumor helper T-cell responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2020;10(1)

