

学位論文の要旨

学位の種類	博士（医学）	氏名	林 隆介
学位論文題目			
Expression of placenta-specific 1 and its potential for eliciting anti-tumor helper T-cell responses in head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮癌におけるPLAC1の発現および PLAC1特異的ヘルパーT細胞の抗腫瘍効果に関する研究)			
共著者名			
長門利純、熊井琢美、大原賢三、大原みずほ、大栗敬幸、野崎 結、原渕翔平、 小坂 朱、永田真莉乃、矢島優己、安田俊輔、及川賢輔、河野通久、岸部 幹、 高原 幹、片田彰博、林 達哉、Esteban Celis、原渕保明、小林博也			
OncoImmunology, in press DOI: 10.1080/2162402X.2020.1856545			
研究目的			
<p>癌に対するペプチドワクチン療法において、CD8陽性細胞傷害性T細胞（CTL）が癌細胞を直接殺傷することは広く認識されているが、CD4陽性ヘルパーT細胞（HTL）も癌細胞上のMHCクラスII分子と癌抗原ペプチドの複合体を認識し、癌細胞を直接殺傷することが明らかとなってきた¹。そのため、MHCクラスII分子に提示される癌抗原のエピトープを同定し、そのエピトープペプチドを用いて誘導されたHTLを解析することは、ペプチドワクチン療法を発展させる上で重要である。</p> <p>今回我々は、ペプチドワクチン療法の標的抗原として癌精巣抗原であるPlacenta-specific 1（PLAC1）に着目した。PLAC1は正常細胞ではほぼ胎盤にしか発現しておらず、栄養膜細胞の増殖・分化に関わることで胎盤形成に重要な役割を担っている²。一方、乳癌や肺癌など複数の癌でPLAC1の発現が報告されており、PLAC1由来のCTLエピトープを同定した研究も散見されることから有用な癌抗原として注目されている³。しかし、頭頸部扁平上皮癌におけるPLAC1の発現は検索されておらず、HTLエピトープも同定されていない。</p> <p>本研究では、頭頸部扁平上皮癌におけるPLAC1の発現を調べるとともに、PLAC1由来のHTLエピトープを同定し、エピトープペプチドにより誘導したHTLのHLA拘束性や抗腫瘍効果を検討した。</p>			
材料・方法			
<p>1. 中咽頭癌患者および頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるPLAC1の発現の検討</p> <p>2007～2019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59例の生検・手術材料を用いて、PLAC1およびHLA-DRの発現を免疫組織化学染色により評価</p>			

した。また、頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるPLAC1の発現をWestern blotにより評価した。

2. 健常人末梢血を用いたPLAC1特異的HTLの誘導

PLAC1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し、候補エピトープペプチドを合成した。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。

3. PLAC1特異的HTLのHLA-DR拘束性の検討

PLAC1特異的HTLとペプチドをパルスした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、その反応が抗HLA-DR抗体によって抑制されるか検討した。さらに、PLAC1特異的HTLとペプチドをパルスした単一の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を測定することで、拘束性を担うHLA-DR分子を同定した。

4. PLAC1陽性腫瘍細胞株に対するPLAC1特異的HTLの反応性の検討

PLAC1特異的HTLとPLAC1陽性腫瘍細胞株を共培養し、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。

5. PLAC1特異的HTLの細胞傷害活性の検討

PLAC1特異的HTLとPLAC1陽性腫瘍細胞株を共培養し、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、PLAC1特異的HTLのPLAC1陽性腫瘍細胞株に対する腫瘍傷害活性を評価した。

6. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血中PLAC1ペプチド反応性T細胞の存在評価

頭頸部扁平上皮癌患者から分離したPBMCを用いてPLAC1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PLAC1反応性T細胞の存在を評価した。

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PLAC1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15005および16040）。

成 績

1. 生検・手術材料を用いた免疫組織化学染色の結果、中咽頭癌患者の74.5%（44/59）でPLAC1の高発現を認めた。また、HLA-DR分子は28.8%（17/59）で高発現を認めた。さらに、本研究で使用した4種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株すべてにおいてPLAC1蛋白の発現を認めた。
2. コンピューターアルゴリズム解析の結果からHTLエピトープ候補としてPLAC1₃₁₋₅₀を選び、ペプチドを作成した。3人の健常人末梢血から分離されたCD4陽性T細胞をこのエピトープペプチドで刺激し、3種類のPLAC1特異的HTLを樹立した。
3. PLAC1特異的HTLのペプチドに対する反応は、抗HLA-DR抗体によって抑制されたことから、HLA-DR分子拘束性であることが示された。また、樹立したPLAC1特異的HTLのうち2種類はHLA-DR15発現L-cellを、1種類はHLA-DR53発現L-cellを認識してサイトカインを産生したこと

から、それぞれHLA-DR15およびDR53拘束性であることが示された。

4. PLAC1特異的HTLは、共培養したPLAC1陽性腫瘍細胞株を直接認識し、HLA-DR拘束性にサイトカインを産生した。以上より、PLAC1₃₁₋₅₀ペプチドは腫瘍細胞内で自然にプロセッシングされてHLA-DRに提示されるヘルパーエпитープを含んでいることが示された。
5. PLAC1特異的HTLは、PLAC1陽性腫瘍細胞株との共培養系でgranzyme Bを産生し、HLA-DR拘束性に直接腫瘍細胞株を殺傷したことから、高い細胞傷害活性を有することが示された。
6. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から分離したPBMCをPLAC1ペプチドで刺激したところ、12例中7例においてペプチド特異的サイトカイン産生が認められた。以上より、頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中にPLAC1₃₁₋₅₀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。

考 案

渉猟し得た範囲内で頭頸部扁平上皮癌におけるPLAC1の発現を調べた報告はない。本研究において、PLAC1が中咽頭癌患者の74.5%で高発現しているとともに、頭頸部扁平上皮癌細胞株でも発現していることが明らかとなった。このことは、頭頸部扁平上皮癌においてPLAC1が癌免疫療法の標的となり得ることを示唆している。また、中咽頭癌患者の28.8%でHLAクラスII分子の1つであるHLA-DRが高発現していることも明らかとなり、癌細胞上に発現するHLA-DR分子にPLAC1ペプチドが提示されている可能性が示唆される。

本研究で同定したPLAC1のヘルパーエпитープおよびエпитープペプチドで誘導したHTLは複数の特徴を有していた。1つ目は、PLAC1₃₁₋₅₀ペプチドによりHLA-DR15とDR53拘束性のHTLが誘導されたことであり、このペプチドは2つ以上のHLA-DR分子に提示されるpromiscuousなエпитープを含んでいると考えられる。2つ目は、PLAC1特異的HTLがgranzyme Bを産生するとともに、HLA-DR拘束性に直接PLAC1陽性腫瘍細胞株を殺傷したことであり、CTLの分化や増殖を補助するヘルパー機能のみならず、腫瘍傷害活性も有する多機能なHTLである可能性を示している。3つ目は、PLAC1₃₁₋₅₀ペプチドが過去に報告されているCTLエпитープ配列を含んでいたことである³。このことは、PLAC1₃₁₋₅₀ペプチドの使用により、PLAC1特異的HTLとCTLを同時に誘導できる可能性を示唆している。

頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から分離したPBMCをPLAC1₃₁₋₅₀ペプチドで刺激したところ、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。PLAC1陽性頭頸部扁平上皮癌患者に対し、このペプチドを用いたワクチンで体内に存在するPLAC1特異的HTLを効率よく誘導・増殖・活性化することができれば、有効な治療法になることが期待される。

結 論

頭頸部扁平上皮癌においてPLAC1の発現を認めた。また、PLAC1特異的HTLを誘導可能な複数のHLA-DR分子に提示されるpromiscuousヘルパーエпитープを同定した。PLAC1特異的HTLはgranzyme Bを産生し、HLA-DR拘束性に頭頸部扁平上皮癌細胞株を直接傷害した。さらに、頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中にPLAC1ペプチドに反応する前駆T細胞が存在することが確認された。以上より、頭頸部扁平上皮癌に対してPLAC1がペプチドワクチン療法の標的となる可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1 . Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS et al. (2010) Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207:637-650.
- 2 . Cocchia M, Huber R, Pantano S, Chen EY, Ma P, Forabosco A, Ko MS, Schlessinger D (2000) PLAC1, an Xq26 gene with placenta-specific expression. *Genomics* 68(3):305-312.
- 3 . Liu F, Zhang H, Shen D, Wang S, Ye Y, Chen H, Pang X, Song Q, He P (2014) Identification of two new HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from colorectal carcinoma-associated antigen PLAC1/CP1. *J Gastroenterol* 49:419-426.

参 考 论 文

- 1 . Ohara M, Ohara K, Kumai T, Ohkuri T, Nagato T, Hirata-Nozaki Y, Kosaka A, Nagata M, Hayashi R, Harabuchi S, et al. Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(6):989-999. doi: 10.1007/s00262-020-02524-9.

