

学位論文の要旨

学位の種類	博士（医学）	氏名	矢島 優己
学位論文題目			
A tumor metastasis-associated molecule TWIST1 is a favorable target for cancer immunotherapy due to its immunogenicity (TWIST1特異的ヘルパーT細胞の活性化を応用したがん免疫療法に関する研究)			
共著者名			
小坂 朱、石橋 佳、安田 俊輔、小松田 浩樹、長門 利純、及川 賢輔 北田 正博、竹川 政範、熊井 琢美、大原 賢三、大栗 敬幸、小林 博也			
Cancer Science, 2022, in press DOI:10.1111/cas.15429			
研究目的			
<p>免疫チェックポイント阻害剤（ICI）が著明な抗腫瘍効果を示すことからがん研究において免疫療法が注目されている。有効ながん免疫療法の開発には免疫系が腫瘍細胞を効率良く攻撃できるようながん抗原の選択が重要である。2002年Dunnらが提唱した「がん免疫編集理論」では、生体には免疫監視機構が備わっているため、がん発生初期では免疫原性の高い腫瘍細胞は排除されるが、免疫原性が低い腫瘍細胞が生き延びた結果としてがんが進行すると提唱されている。また、がんの進行に伴い免疫抑制細胞が増加したがん組織は免疫抑制環境になるとされている。以上から、我々はがん進行期に免疫抑制環境下で増殖してくる腫瘍細胞には免疫原性の高い抗原が発現されているのではないかと考え、主に進行期で生じるがん転移に関連する分子の中に免疫原性が高い抗原が含まれているのではないかと仮定した。そこで、がん転移関連分子の中でも様々ながん種で発現が報告されているTWIST1に着目し、同定したTWIST1由来抗原部位を用い乳癌患者におけるTWIST1特異的CD4陽性ヘルパーT細胞（HTL）の割合を健常成人と比較検討するとともに、TWIST1抗原を用いたワクチン治療のT細胞活性化能をヒト化マウスを用いて評価した。</p>			
材料・方法			
<p>1. ヒト末梢血を用いたTWIST1特異的HTLの誘導およびHLA-DR拘束性の検証</p> <p>TWIST1のアミノ酸配列からHLAクラスII分子への結合能が高い配列を3種類のアルゴリズム解析を用いて同定し、エピトープ候補ペプチドを合成した。健常成人の末梢血から分離したHTLをペプチドパルスした樹状細胞や末梢血単核細胞（PBMC）により刺激し、TWIST1特異的HTLを誘導した。誘導したHTLとペプチドパルスしたPBMCを24時間共培養し、培養上清中のIFN-γ量をEnzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）で測定することで、HTLのペプチドに対する反応性を評価した。また、その反応が抗HLAクラスII（HLA-DR）抗体および抗HLAクラスI抗体により、抑制されるか検証した。さらにTWIST1特異的HTLと</p>			

抗原提示能を有するHLA-DR発現マウス線維芽細胞（L-細胞）を共培養し、培養上清中のIFN- γ を測定することで、HLA-DRの拘束性を検証した。

2. ヒト腫瘍細胞株に対するTWIST1特異的HTLの反応性とHLA-DR拘束性の検証

ヒト腫瘍細胞株（HSC-4、5637、HSC-3、SAS、Sa-3、Jurkat）のTWIST1遺伝子発現を定量的リアルタイムPCRで解析した。そして、TWIST1特異的HTLをHLA-DRが適合する腫瘍細胞株と抗HLA-DR抗体存在下で24時間共培養し、培養上清中のIFN- γ またはGM-CSF量をELISAで測定した。

3. 乳癌患者末梢血中のTWIST1特異的HTLの反応性とHLA-DR拘束性の検証

乳癌患者9名の検体を用いて、TWIST1の発現を免疫組織化学染色により評価した。TWIST1陽性乳癌患者より採取した末梢血からPBMCおよびHTLを分離し、TWIST1ペプチド存在下で7日間PBMCによるHTLの刺激を行い、IFN- γ 産生細胞数をenzyme-linked immunospot (ELISPOT) assayを用いて測定した。また、乳癌患者6名および健常者5名のPBMCを7日間TWIST1ペプチドで刺激し、ELISAを用いてIFN- γ 量を測定することでペプチド特異的T細胞応答を解析した。さらに、乳癌患者、健常者各々2名のPBMCをTWIST1ペプチドで刺激し、抗HLAクラスII抗体および抗HLAクラスI抗体を用いて、HLA拘束性を検証した。

4. 乳癌患者由来TWIST1特異的HTLの反応性の評価

乳癌患者3名由来のPBMCを7日間TWIST1ペプチドで刺激し、培養上清中のIL-5、TNF α 、IFN- γ 、Granzyme B量をELISAで測定した。

5. in vivoにおけるTWIST1ペプチドを用いたワクチン治療のT細胞活性化能の評価

HLA-DR1トランスジェニックマウスにTWIST1ペプチドとcGAMPを0日目と7日目に皮内投与し、10日目に所属リンパ節を回収した。リンパ節細胞をTWIST1ペプチド、抗CD4抗体、抗CD8抗体存在下で24時間単独培養、HLA-DR1およびHLA-DR9を発現するTWIST1ペプチドパルスしたL-細胞と24時間共培養し、IFN- γ 産生細胞数をELISPOT assayを用いて測定した。さらにTWIST1ペプチドワクチン投与と同時に抗PD-L1抗体を腹腔内投与し、IFN- γ 産生細胞数をELISPOT assayを用いて測定し、T細胞免疫応答を評価した。

免疫組織化学染色および患者末梢血を使用した解析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. TWIST1由来抗原部位の候補となる配列としてTWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチドを同定し合成した。健常成人末梢血から分離したHTLをTWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチドで刺激し、3種のTWIST1特異的HTL（TW-1、TW-2、TW-3）を誘導した。これら3種のHTLはペプチド濃度依存的なIFN- γ 産生を示した。各HTLのTWIST1ペプチド特異的な反応は抗HLA-DR抗体によって抑制されたため、HLA-DR拘束性であることが示唆された。また、TW-1はL-DR1、TW-2はL-DR15、TW-3はL-DR53に対してペプチド特異的にIFN- γ を産生したことから、それぞれHLA-DR1、HLA-DR15、HLA-DR53拘束性であることが示唆された。

2. ヒト腫瘍細胞株6種すべてにおいてTWIST1遺伝子発現が見られた。TWIST1特異的HTL (TW-1、TW-2、TW-3) はそれぞれHLA-DRに適合した腫瘍細胞株に対して、IFN- γ またはGM-CSFを産生し、HLA-DR拘束性を示した。
3. TWIST1陽性患者由来のTWIST1特異的HTLはペプチド刺激によりHLA-DR拘束性にIFN- γ を産生した。乳癌患者6名由来のHTLはTWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチド特異的にIFN- γ を産生した。乳癌患者2名由来のHTLを用いたHLA拘束性の検証ではHLA-DR拘束性を示した。
4. 乳癌患者3名由来のHTLはTWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチド刺激によりIFN- γ のみならず、TNF α 、Granzyme Bも産生していることからHTLのサブセットの中で高い細胞傷害活性を有するTh1細胞であることが示唆された。
5. HLA-DR1トランスジェニックマウスにおけるTWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチド特異的なT細胞応答はL-DR1細胞でのみ認められ、抗CD4抗体で抑制されたことからHTLによるHLA-DR1拘束性反応であることが示された。TWIST1ペプチドワクチンと抗PD-L1抗体の併用により、TWIST1特異的HTLの誘導が有意に増加した。

考 案

ネオアンチゲンはランダムな遺伝子変異によって新たに出現する完全な非自己抗原であるため、免疫原性が非常に高くがん免疫療法の有効なターゲットとして注目されている。しかしながら、近年、ネオアンチゲんワクチンは、ネオアンチゲん特異的T細胞を効率的に誘導できるものの、ICIの併用なくしては有意な抗腫瘍効果を示さないと報告された¹。本研究で着目したTWIST1は、その発現パターンから腫瘍関連抗原 (TAA) に分類され、正常細胞でも低発現している可能性がある。しかし、発現量が低い細胞は免疫学的に無視されることが予想されることから、TWIST1₁₄₀₋₁₆₂ペプチドワクチンにより特異的HTLが誘導されたとしても正常細胞を傷害する可能性は低いと考えられる。また、ヒト化マウスを用いた検討で抗PD-L1抗体の併用によってTWIST1特異的HTLが有意に増加したことから、TAAペプチドワクチンでもICIとの併用が抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆された。ネオアンチゲンは患者個々人で異なることから、それと同等の効果を示すTAAペプチドワクチンが開発されれば費用対効果の改善が期待できる。また、TWIST1は上皮間葉転換によるがんの転移に関与するだけでなく²、化学療法に対する抵抗性にも関与することが示されていることから³、化学療法抵抗性を示すがん患者に対して、TWIST1をターゲットとしたがん免疫療法が有効な代替療法となり得ると考えられる。

結 論

本研究では、TWIST1がTWIST1特異的HTLを有意に活性化するペプチド配列TWIST1₁₄₀₋₁₆₂を持ち、免疫原性が高いことからがん免疫療法の標的抗原として有用であるが示唆された。また、ペプチド単独よりもICIと併用した方が、TWIST1特異的HTLの有意な増加が見られ、抗腫瘍効果の増強への寄与が期待される。

引 用 文 献

1. Salvatori E, Lione L, Compagnone M, et al. Neoantigen cancer vaccine augments anti-CTLA-4 efficacy. *Npj Vaccines*. 2022;7(1):1–10. DOI:10.1038/s41541-022-00433-9
2. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–1428. DOI:10.1172/JCI39104
3. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang L-H. Twist Transcriptionally Upregulates AKT2 in Breast Cancer Cells Leading to Increased Migration, Invasion, and Resistance to Paclitaxel. *Cancer Res*. 2007;67(5):1979–1987. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-1479

参 考 论 文

1. 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):1856545. DOI:10.1080/2162402X.2020.1856545

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	矢島 優己
		審査委員長	谷野 美智枝 
		審査委員	東 信良 
		審査委員	林 利彦 
学位論文題目			
<p>A tumor metastasis-associated molecule TWIST1 is a favorable target for cancer immunotherapy due to its immunogenicity (TWIST1 特異的ヘルパーT細胞の活性化を応用したがん免疫療法に関する研究) Cancer Science. 2022. DOI: 10.1111/cas.15429</p>			
<p>腫瘍関連抗原の一つである TWIST1 を標的としたペプチドワクチン療法に関する研究であり、TWIST1 を特異的に認識するヘルパーT細胞(HTL)を誘導し得るエピトープペプチドを同定し、その腫瘍応答性について検討したものである。</p> <p>まず、アルゴリズム解析により TWIST1₁₄₀₋₁₆₂ のエピトープペプチドを合成した。このペプチドを用いて、健常成人末梢血から TWIST1 特異的 HTL クローンが誘導された。誘導された HTL クローンは共培養した TWIST1 陽性腫瘍細胞株を認識し IFN-γ、GM-CSF を産生したことから、腫瘍細胞に発現している TWIST1 を特異的に認識し反応することが示された。</p> <p>乳癌患者由来の HTL はペプチド特異的に IFN-γ を産生したことから乳癌患者の末梢血中には TWIST1 特異的 HTL が多く存在する可能性が示唆された。乳癌患者由来の HTL は、TWIST1 ペプチド刺激により TNFα や Granzyme B を産生していたことから、細胞傷害活性を有する Th1 細胞であることがわかった。特定の DR トランスジェニックマウスにおける TWIST1 ペプチド特異的な T 細胞応答の検証では、ヘルパーT細胞による HLA-DR 拘束性反応であることがわかった。TWIST1 ペプチドと抗 PD-L1 抗体の併用によるペプチド特異的な T 細胞応答の増強も確認された。</p> <p>以上の結果から、TWIST1 が特異的 HTL を有意に活性化するペプチド配列を持ち、がん免疫療法の有用な標的抗原となり得ることが示唆された。</p> <p>本論文の内容は独創的で、データ解析も十分なされていた。論文提出者は、各審査委員の試問において当該論文および関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。また本論文は国際的学術雑誌である Cancer Science 誌に公表済みである。</p> <p>以上より本審査委員会は、本論文が博士(医学)の学位に値するものと判断した。</p>			