

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	大原 みずほ
<p>学位論文題目</p> <p>Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer</p> <p>(リン酸化ビメンチンを標的とした大腸癌に対する腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>大原 賢三、熊井 琢美、大栗 敬幸、長門 利純、野崎 結、小坂 朱、永田 真莉乃、林 隆介、原渕 翔平、矢島 優己、及川 賢輔、原渕 保明、角 泰雄、古川 博之、小林 博也</p> <p>Cancer Immunology, Immunotherapy (2020)69:989-999 <a href="https://doi.org/10.1007/s00262-020-02524-9">https://doi.org/10.1007/s00262-020-02524-9</a></p> <p>研究目的</p> <p>遠隔転移を有する大腸癌の5年生存率は依然として改善されておらず、約20%と低いままである。腫瘍細胞は転移の過程で上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition:EMT)などの特徴を獲得し、細胞の形態と運動能を変化させるEMTのマーカーの1つとしてビメンチンが実臨床で用いられている。</p> <p>今回我々はEMTのマーカーであるビメンチン、特にリン酸化されたビメンチンを標的抗原として、転移を有する大腸癌に対する免疫療法の基礎的解析を行ったので報告する。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 転移を有した大腸癌患者におけるリン酸化ビメンチンの発現の検討

2011年から2015年の間に旭川医科大学消化器外科で原発巣と、転移巣に対する手術を行った大腸癌患者22名の検体を用いて、リン酸化ビメンチンの発現を免疫組織化学染色によって評価し、臨床病期、全生存率などとの関係を検討した。

### 2. 悪性腫瘍細胞株でのリン酸化ビメンチンの発現の有無

我々はビメンチンの中でも、リン酸化されたビメンチンに着目した。大腸癌細胞株 (SW480、SW620)、肺扁平上皮癌細胞株 (Calu-1)、HLA-DRを発現していないT細胞リンパ腫細胞株 (Jurkat)、歯肉癌細胞株 (Sa-3)、肺大細胞癌細胞株 (Lu65)、腎細胞癌細胞株 (SW839) を用いて、これらの悪性腫瘍細胞株におけるリン酸化ビメンチンの発現を調べた。

### 3. ヒト末梢血を用いたリン酸化ビメンチンペプチド特異的CD4陽性T細胞の誘導

健常成人ドナーから末梢血単核球を分離し、自己の樹状細胞にリン酸化ビメンチンペプチドを提示させ共培養した。さらに自己抗原提示細胞に複数回リン酸化ビメンチンペプチドを提示させ共培養し、ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を樹立した。またその特異性をペプチドと共培養した際に放出されるTh1サイトカインであるIFN $\gamma$ を測定することによって確認し、さらにはヒトHLA-DRを発現しているマウスL-cellと共培養することによりHLA-DR拘束性を確認した。(引用文献1)

### 4. リン酸化ビメンチン陽性悪性腫瘍細胞株に対するリン酸化ビメンチン特異的CD4陽性T細胞の反応性の検討

リン酸化ビメンチン陽性悪性腫瘍細胞株に対するリン酸化ビメンチン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ビメンチン陽性悪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. 大腸癌患者末梢血における、リン酸化ビメンチンペプチドに反応性を有するT細胞分画の検出

大腸癌患者末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離後リン酸化ビメンチンペプチドで刺激し、担癌患者末梢血におけるリン酸化ビメンチン反応性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)。

## 成 績

### 1. 大腸癌検体におけるリン酸化ビメンチンの発現

過去に報告されているビメンチン特異的ヘルパーT細胞エピトープを参考とし、その中

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	大原 みずほ
<p>学位論文題目</p> <p>Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer</p> <p>(リン酸化ビメンチンを標的とした大腸癌に対する腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>大原 賢三、熊井 琢美、大栗 敬幸、長門 利純、野崎 結、小坂 朱、永田 真莉乃、林 隆介、原渕 翔平、矢島 優己、及川 賢輔、原渕 保明、角 泰雄、古川 博之、小林 博也</p> <p>Cancer Immunology, Immunotherapy (2020) 69:989-999 <a href="https://doi.org/10.1007/s00262-020-02524-9">https://doi.org/10.1007/s00262-020-02524-9</a></p> <p>研究目的</p> <p>遠隔転移を有する大腸癌の5年生存率は依然として改善されておらず、約20%と低いままである。腫瘍細胞は転移の過程で上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition:EMT)などの特徴を獲得し、細胞の形態と運動能を変化させるEMTのマーカーの1つとしてビメンチンが実臨床で用いられている。</p> <p>今回我々はEMTのマーカーであるビメンチン、特にリン酸化されたビメンチンを標的抗原として、転移を有する大腸癌に対する免疫療法の基礎的解析を行ったので報告する。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 転移を有した大腸癌患者におけるリン酸化ビメンチンの発現の検討

2011年から2015年の間に旭川医科大学消化器外科で原発巣と、転移巣に対する手術を行った大腸癌患者22名の検体を用いて、リン酸化ビメンチンの発現を免疫組織化学染色によって評価し、臨床病期、全生存率などとの関係を検討した。

### 2. 悪性腫瘍細胞株でのリン酸化ビメンチンの発現の有無

我々はビメンチンの中でも、リン酸化されたビメンチンに着目した。大腸癌細胞株 (SW480、SW620)、肺扁平上皮癌細胞株 (Ca1u-1)、HLA-DRを発現していないT細胞リンパ腫細胞株 (Jurkat)、骨肉癌細胞株 (Sa-3)、肺大細胞癌細胞株 (Lu65)、腎細胞癌細胞株 (SW839) を用いて、これらの悪性腫瘍細胞株におけるリン酸化ビメンチンの発現を調べた。

### 3. ヒト末梢血を用いたリン酸化ビメンチンペプチド特異的CD4陽性T細胞の誘導

健常成人ドナーから末梢血単核球を分離し、自己の樹状細胞にリン酸化ビメンチンペプチドを提示させ共培養した。さらに自己抗原提示細胞に複数回リン酸化ビメンチンペプチドを提示させ共培養し、ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を樹立した。またその特異性をペプチドと共培養した際に放出されるTh1サイトカインであるIFN $\gamma$ を測定することによって確認し、さらにはヒトHLA-DRを発現しているマウスL-cellと共培養することによりHLA-DR拘束性を確認した。(引用文献1)

### 4. リン酸化ビメンチン陽性悪性腫瘍細胞株に対するリン酸化ビメンチン特異的CD4陽性T細胞の反応性の検討

リン酸化ビメンチン陽性悪性腫瘍細胞株に対するリン酸化ビメンチン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ビメンチン陽性悪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. 大腸癌患者末梢血における、リン酸化ビメンチンペプチドに反応性を有するT細胞分画の検出

大腸癌患者末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離後リン酸化ビメンチンペプチドで刺激し、担癌患者末梢血におけるリン酸化ビメンチン反応性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)。

## 成 績

### 1. 大腸癌検体におけるリン酸化ビメンチンの発現

過去に報告されているビメンチン特異的ヘルパーT細胞エピトープを参考とし、その中

でも39番目と72番目のセリンのリン酸化に着目した。(引用文献2)原発巣では39番目のセリンが55%、72番目のセリンが65%と、過半数の症例でリン酸化されていた。転移巣では同様に68%、91%がリン酸化されており、転移巣においてよりリン酸化率が高い傾向があり、免疫療法の標的抗原として適していることが示唆された。

## 2. 悪性腫瘍細胞株でのリン酸化ビメンチンの発現の有無

悪性腫瘍株でのリン酸化ビメンチンの発現は、大腸癌細胞株を含む種々の細胞株で観察された。また、いくつかの腫瘍細胞株ではリン酸化ビメンチンの発現量はドキシソルビシン処理で上昇した。

## 3. リン酸化ビメンチン特異的ヘルパーT細胞の誘導

過去に報告されているビメンチン特異的ヘルパーT細胞エピトープペプチドの配列を参考にリン酸化ビメンチン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細胞クローンはペプチドと共培養すると濃度依存性にIFN- $\gamma$ を産生し、その産生は抗HLA-DR抗体を用いることにより抑制され、HLA-DR拘束性であることが確認された。

## 4. CD4陽性T細胞クローンと腫瘍細胞株との反応

樹立したリン酸化ビメンチン特異的CD4陽性T細胞をリン酸化ビメンチン陽性腫瘍細胞(SW839、Calu-1)と共培養したところ、Th1サイトカインを産生し、その反応は抗HLA-DR抗体を用いることにより抑制された。ドキシソルビシンを用いることにより腫瘍細胞におけるリン酸化ビメンチンの発現が増強することがウエスタンブロット法によって確認され、それに一致してサイトカインの量も有意差を持って上昇した。さらに腫瘍を直接障害するサイトカインであるGranzyme Bの産生も確認することができた。

## 5. 大腸癌患者末梢血中のリン酸化ビメンチンペプチドに反応するT細胞

実際の大腸癌患者末梢血中に今回の標的であるリン酸化ビメンチン特異的細胞が存在することが確認できた。得られる血液量が限られているためHLA-DR拘束性等の詳細な検討はできなかったが、患者PBMCの中にリン酸化ビメンチンペプチドと共培養することによりIFN $\gamma$ を産生する細胞が存在した。

## 考 案

大腸癌は世界中で3番目に罹患率の多い癌であり、癌関連死亡数が3番目に多い癌腫でもある。異常なタンパク質のリン酸化は悪性化の指標と言われている。今回我々はリン酸化ビメンチンペプチドの大腸癌に対するペプチドワクチン療法としての有用性について報告した。癌免疫療法においてキラーT細胞が腫瘍細胞を直接傷害することは知られているが、ペプチド反応性ヘルパーT細胞が、細胞を直接傷害するサイトカインであるグランザイムBを放出するなど、ヘルパーT細胞もペプチドワクチン療法において重要な役割を担っている。(参考論文1)

ビメンチンは細胞骨格を形成する中間径フィラメントであり、上皮間葉転換EMTのマーカーのひとつである。転移を有する大腸癌において、原発巣では半数以上、転移巣では70%以

51

上の症例でリン酸化ビメンチンの発現が認められた。さらに、大腸癌患者の末梢血中にリン酸化ビメンチンを認識するリンパ球を認めたことから、リン酸化ビメンチンを標的としたペプチドワクチン療法の転移を有する大腸癌患者免疫療法への有用性が示唆された。

## 結 論

今回我々は新規リン酸化ビメンチン特異的ヘルパーT細胞エピトープを発見し、抗原特異的なヘルパーT細胞の反応を確認した。

ドキソルビシンはリン酸化ビメンチンの発現を上昇させることによりアジュバントとしての有効性が示唆された。

リン酸化ビメンチンは腫瘍細胞に選択的に発現しているため、我々のペプチドワクチン療法は遠隔転移を有する大腸癌患者の治療法としての有効性が示唆された。

リン酸化ビメンチンは免疫原性を有し、癌免疫療法への有用性が示唆された。




### 引 用 文 献

1. Kumai T, Ishibashi K, Oikawa K et al (2014) Induction of tumor-reactive T helper responses by a posttranslational modified epitope from tumor protein p53. *Cancer Immunol Immunother* 63:469– 478. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1533-z>
2. Brentville VA, Metheringham RL, Gunn B, Symonds P, Daniels I, Gijon M, Cook K, Xue W, Durrant LG (2016) Citrullinated vimentin presented on MHC-II in tumor cells is target for CD4L T-cell-mediated antitumor immunity. *Can Res* 76:548–560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-1085>

### 参 考 论 文

1. Ohara K, Ohkuri T, Kumai T et al (2018) Targeting phosphorylated p53 to elicit tumor-reactive T helper responses against head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 7:e1466771. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1466771>

## 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	大原 みずほ
審査委員長 東 信良 			
審査委員 藤谷 幹浩 			
審査委員 竹川 政範 			
学 位 論 文 題 目			
Phosphorylated vimentin as an immunotherapeutic target against metastatic colorectal cancer (リン酸化ビメンチンを標的とした大腸癌に対する腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答に関する研究) 掲載雑誌: Cancer Immunology, Immunotherapy (2020)69:989-999			
<p>大腸癌は罹患率・癌関連死亡率ともに高い癌であるが、遠隔転移を有する症例の生存率は依然として低い。悪性腫瘍細胞における異常なタンパク質のリン酸化は悪性化の指標である。本論文は、上皮間葉転換(EMT)のマーカーの一つであるビメンチンに着目してリン酸化ビメンチンを標的としたペプチドワクチン療法の有用性を検討したものである。転移を有する大腸癌の手術検体において、原発巣では半数以上、転移巣ではさらに多数の症例でリン酸化ビメンチンの発現が認められたが、正常組織においてはリン酸化ビメンチンは発現しておらず、免疫原性の高い標的であると考えられた。</p> <p>リン酸化ビメンチン特異的ヘルパーT細胞エピトープを発見し、抗原特異的なヘルパーT細胞の反応についての解析では、ペプチド反応性ヘルパーT細胞が IFN<math>\gamma</math> や GM-CSF といったサイトカインだけでなく、腫瘍細胞を直接傷害するサイトカインであるグランザイム B を放出するなど、ペプチドワクチン療法において重要な役割を担っていることが明らかになった。また、ドキソルビシン投与によりリン酸化ビメンチンの発現を上昇させることでアジュバントとしての有効性が示唆された。</p> <p>さらに、大腸癌患者からの採血において、末梢血中にリン酸化ビメンチンを認識するリンパ球を認めており、リン酸化ビメンチンを標的としたペプチドワクチン療法の有用性が期待されるものであった。</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、各審査委員の諮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 Immunology, Immunotherapy 誌に印刷公表済みである。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>			