

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09237

研究課題名(和文) EGFRシグナルによる抗腫瘍免疫回避機構の解明と治療戦略への展開

研究課題名(英文) Immune escape mediated by the EGFR-derived signal: From Mechanism to Therapy

研究代表者

前門戸 任 (Mamondo, Makoto)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40344676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗PD-L1およびPD-1等を標的とした免疫チェックポイント阻害薬はEGFR-TKIと併用効果を示す。そこで、EGFRシグナルが誘導する免疫制御について解析した。マウス肺癌細胞株LLCを用いて免疫チェックポイント分子を解析したところ、LAG-3、B7-H3は陰性であったがPD-L1が陽性であった。CRISPR/Cas9法を用いてPD-L1ノックアウト細胞を樹立した。C57BL/6マウスに同種移植したが、TILの浸潤は不十分であった。そこでCTIIAを癌細胞に発現させたところ、抗原提示能を誘導することに成功した。肺癌治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint inhibitors targeting PD-L1 and PD-1 often show synergistic effects on NSCLCs. To elucidate the role of EGFR-mediated signal on lung tumor immunology, LLC cells were examined for the immune modulator expression. Although LAG-3 and B7-H3 expression was negative, a fair amount of PD-L1 was detected. We then established PD-L1 knockout cells and implanted into syngeneic mice, but TIL infiltration was relatively low. To increase TIL infiltration we introduced CTIIA, and succeeded in MHC up-regulation.

研究分野：呼吸器腫瘍学

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国の肺癌死亡者数は年 5 万人を超え、化学療法に抵抗性を示す固形腫瘍の代表である。上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)はEGFR変異を有するNSCLCに著効を示す。申請者は、ゲフィチニブと標準化学療法との第 Ⅲ 相比較試験において、ゲフィチニブが有意に無増悪生存期間を延長することを見出し、EGFR 遺伝子変異が EGFR-TKI の効果予測因子であることを報告した。肺癌患者の治療法選択に大きな影響を与える画期的な成果である。しかし、EGFR 変異を有するにもかかわらず 25-30%の症例ではEGFR-TKIが奏効しない(自然耐性)。また著効例においても獲得耐性を生じ再燃する(獲得耐性)。耐性の原因は、

EGFR の 2 次的遺伝子変異 (T790M)、HGF/c-Met の増幅と活性化、 ErbB2 の活性化、 アポトーシス誘導分子の遺伝子多型等であるが、機序の解析は未だ不十分とであり、分子生物学的エビデンスに基づく新規治療法の開発が急務となっている。

(2) 最近になって、抗腫瘍免疫による癌治療が注目を浴びている。肺癌をはじめとする腫瘍細胞上には、抑制性レセプター (PD-L1, B7-1 等)が発現誘導される。これらの抑制性分子はCD8+細胞傷害性T細胞に対して強力な抑制性シグナルを送ることで、抗腫瘍免疫による攻撃を回避していると考えられる。実際にPD-L1とPD-1(PD-L1に対するT細胞上の共刺激受容体)間、およびB7-1とCTLA-4(B7-1に対するT細胞上の共刺激受容体)間の相互作用を阻害するモノクローナル抗体投与を行うことで、NSCLCに劇的な効果を生むことが報告された。興味深いことに抗PD-L1抗体をEGFR-TKIと併用すると、明らかな併用効果が認められる(ASCO 2014)。この事実は、EGFR-TKI効果が不十分な肺癌症例に対して、抗腫瘍免疫の増強、

特に免疫チェックポイント制御の打破が極めて有効なアプローチであることを強く示唆している。

(3) EGFR-TKI と PD-(L)1 の併用による治療効果は、この療法が薬剤耐性肺癌の有効な克服法であることを示している。しかし、実際の個体における免疫学的な事象、特に腫瘍細胞の傷害に関わる細胞傷害性リンパ球と腫瘍細胞の相互作用など、重要な基本事項で依然不明な点が多い。抗腫瘍免疫に関する理解をさらに発展させ、治療法に至るレベルにまで開発を進めるためには、生体におけるEGFR-TKIと免疫系の相乗効果に関する具体的なエビデンスが必要である。実際に、EGFRがTKIと細胞傷害性T細胞(CTL)が肺癌細胞を攻撃する際の生物学的応答はほとんど解析されていない。

2. 研究の目的

(1) EGFR シグナルによって、肺癌細胞が免疫学的逃避を果たすとのことを明らかにすることを目的とする。細胞レベルの解析に加えて肺がんモデルマウスを用いた個体レベルのCTL応答を調べることで、EGFRシグナルが免疫を改変する仕組みを解明する。

(2)具体的に以下の3点を目的と定める。

Syngeneic マウス肺癌担癌モデルを用いて、腫瘍内にリクルートされる細胞傷害性T細胞(CTL)を捕捉し、EGFRシグナルによる免疫応答を解析する。

Syngeneic マウス担癌モデルを用いて、EGFR-TKI 治療後にリクルートされるT細胞を捕捉する。さらに免疫関連分子の発現変動と制御される遺伝子の同定を行う。

変異型EGFRによる発がんモデルマウスを用いて、上記の解析を施行する。EGFR-TKIとコラボレーションする真に効果的な免疫制御分子を同定する。以上の解析

により、本研究では EGFR シグナルを切り口とした肺癌免疫逃避機構のバイオロジーを展開し、新しい治療法開発の基盤構築に挑む。

3. 研究の方法

(1) EGFR シグナルによる免疫関連分子発現プロファイルの解析：マウス C57/BL6 由来の Lewis Lung Carcinoma(LLC)は EGFR を発現する。この細胞に対して CRISPR/Cas9 法によって PD-L1 を欠損させる (LLC/PD-L1KO) 細胞増殖および EGFR シグナルに対する挙動について、細胞生物学的な解析を加える。一方、PD-L1 が EGFR シグナルに与える影響について細胞レベルで評価する。

(2) in vivo Syngeneic EGFR 担癌モデルマウスを用いた細胞傷害性 T 細胞の捕捉と評価：LLC を C57/BL6 マウスに皮下移植、腫瘍内に集簇する免疫系細胞を解析する。EGFR シグナルとの関連を調べる。

(3) 変異型 EGFR 発がんモデルマウスを用いた、EGFR-TKI 治療後に肺癌組織にリクルートされる T 細胞の解析：EGFR-TKI とコラボレーションする真に効果的な免疫制御分子の同定：EGFR 陽性肺癌を (自然) 発症するモデルマウスを利用する。個体にドライバー変異によって自然発症した腫瘍に対して EGFR-TKI を投与し、投与前後の TIL を比較する

4. 研究成果

(1) EGFR シグナルによる免疫関連分子発現プロファイルの解析：EGFR 陽性マウス肺癌細胞株 LLC を用いて免疫チェックポイント分子の解析を行った。FACS 解析の結果、LAG-3, B7-H3 は陰性であったが PD-L1 のみが陽性であった。CRISPR/Cas9 法を用いて PD-L1 の遺伝子ノックアウトを行った。ウエスタンブロット法および FACS 法による解析を行い、PD-L1 欠損細胞株を 3 クローン樹立すること成功した。これ

ら細胞株を Syngeneic 系統である C57/B6 系統マウスに皮下移植し腫瘍の増大を観察中である。一方、野生型 LLC 細胞を同一系統マウスに皮下移植し形成される腫瘍を摘出し、単一細胞化処理を施した後で FACS 解析した。MDSC および好中球の浸潤が認められたが、TIL としての CD8 陽性 T 細胞、および制御性 T 細胞 (Treg) の浸潤は極めて少数であった。LLC 細胞はネオアンチゲンが少ないため免疫サーベイランスを受けにくい腫瘍を形成するものと考えられた。LLC に Ova ペプチドを発現させるなどの方法で改変するとともに、他のマウス肺癌細胞株についても解析を加える必要があると考えられた。

(2) がん抗原の抗原提示において、プロセスされたネオアンチゲン断片は MHC class I に提示される。抗原提示を効率的に上昇させることができれば、抗腫瘍免疫に寄与する可能性が高い。そこで自然免疫系転写因子 CIITA ファミリー分子を発現させることで、細胞表面への抗原提示能を改善することに挑んだ。CIITA 遺伝子を単離しタグを付加した後にレンチウイルスベクターに組み込み、癌細胞に導入した。その結果、MHC クラス I および II が、発現することが分かった。効果的な免疫応答を誘導につながる可能性があるものと考えられた。

(3) 抗腫瘍免疫を in vivo で解析するため、新規 EGFR 発がん系モデルマウスの構築を行った。ドキシサイクリンにて変異 EGFR を発現誘導したところ、両肺野に多発性の肺腺癌が発生した。このモデルマウスは肺癌研究の有望な解析ツールとなるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M,

Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. Cancer Cell. 2018 Mar 12;33(3):355-367.

Watanabe K, Fukuhara T, Tsukita Y, Morita M, Suzuki A, Tanaka N, Terasaki H, Nukiwa T, Maemondo M. EGFR Mutation Analysis of Circulating Tumor DNA Using an Improved PNA-LNA PCR Clamp Method. Can Respir J. 2016;2016:5297329.

Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Sato I, Chiba N, Watanabe T, Shima H. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. Cancer Lett. 2015 365(2):223-8.

Inoue A, Sugawara S, Maemondo M, Mori Y, Oizumi S, Harada M, Taima K, Morikawa N, Ishida T, Kinoshita I, Watanabe H, Suzuki T, Nakagawa T, Saito R, Nukiwa T. Randomized phase II trial comparing amrubicin with re-challenge of platinum doublet in patients with sensitive-relapsed small-cell lung cancer: North Japan Lung Cancer Study Group trial 0702. Lung Cancer. 2015 Jul;89(1):61-5.

〔学会発表〕(計1件)

渡邊 香奈、突田 容子、盛田 麻美、鈴木 綾、寺崎 浩司、前門戸 任。
高感度 EGFR 遺伝子変異解析を用いた非小細胞肺癌血漿中循環 DNA の測定。

第55回日本呼吸器学会学術総会 2015年4月17日 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前門戸 任 (MAEMONDO, Makoto)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40344676

(2) 研究分担者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号: 60280872