

Title	EGFR-TKIによる抗腫瘍免疫作用増強を介した新しい治療法の開発
Sub Title	Enhancement of anti-tumor immune responses by EGFR-TKIs (EGFR- tyrosin kinase inhibitors)
Author	谷口, 智憲(Yaguchi, Tomonori)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
Abstract	<p>非小細胞肺癌における, EGFR特異的チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)を用いた抗腫瘍免疫応答増強を検討した。EGFR変異を持つ非小細胞肺癌は, 免疫抑制性分子を産生し, 樹状細胞(DC)を抑制するが, EGFR-TKIを癌細胞に作用させると, その機能は回復した。さらにEGFR-TKIは, 直接DCに作用し機能を増強させることも分かった。担癌マウスでは, EGFR-TKI投与は, 腫瘍抗原特異的T細胞応答を増強し, 免疫療法の効果を増強させた。EGFR-TKIはがん細胞からの免疫抑制性分子の産生を抑制する事, 免疫担当細胞に直接機能増強作用を及ぼす事の二点で, 抗腫瘍免疫応答を増強すると考えられた。</p> <p>In this study, we evaluated the enhancement of anti-tumor immune responses by EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) in non-small cell lung carcinoma cell (NSCLC). Human NSCLC with mutated EGFR produced immunosuppressive cytokines and suppressed human DC function, which were restored by EGFR-TKI pretreatment of NSCLC. EGFR-TKI directly enhanced human DC function in an EGFR-independent manner. Moreover, in vivo administration of EGFR-TKI augmented tumor antigen-specific T cell induction and enhanced anti-tumor effects of immunotherapies. These results indicate that EGFR-TKIs may have an activity to enhance antitumor immune responses for NSCLC by targeting both cancer cells and DC, and combined use of EGFR-TKIs may augment the therapeutic effects of current immunotherapies.</p>
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2013 ~ 2014 課題番号 : 25830122 研究分野 : 腫瘍免疫学
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25830122seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830122

研究課題名(和文) EGFR-TKIによる抗腫瘍免疫作用増強を介した新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Enhancement of anti-tumor immune responses by EGFR-TKIs (EGFR- tyrosin kinase inhibitors)

研究代表者

谷口 智憲 (Yaguchi, Tomonori)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40424163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌における、EGFR特異的チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)を用いた抗腫瘍免疫応答増強を検討した。EGFR変異を持つ非小細胞肺癌は、免疫抑制性分子を産生し、樹状細胞(DC)を抑制するが、EGFR-TKIを癌細胞に作用させると、その機能は回復した。さらにEGFR-TKIは、直接DCに作用し機能を増強させることも分かった。担癌マウスでは、EGFR-TKI投与は、腫瘍抗原特異的T細胞応答を増強し、免疫療法の効果を増強させた。EGFR-TKIはがん細胞からの免疫抑制性分子の産生を抑制する事、免疫担当細胞に直接機能増強作用を及ぼす事の二点で、抗腫瘍免疫応答を増強すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the enhancement of anti-tumor immune responses by EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) in non-small cell lung carcinoma cell (NSCLC). Human NSCLC with mutated EGFR produced immunosuppressive cytokines and suppressed human DC function, which were restored by EGFR-TKI pretreatment of NSCLC. EGFR-TKI directly enhanced human DC function in an EGFR-independent manner. Moreover, in vivo administration of EGFR-TKI augmented tumor antigen-specific T cell induction and enhanced anti-tumor effects of immunotherapies. These results indicate that EGFR-TKIs may have an activity to enhance antitumor immune responses for NSCLC by targeting both cancer cells and DC, and combined use of EGFR-TKIs may augment the therapeutic effects of current immunotherapies.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫療法 肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌治療において、化学療法や分子標的薬の開発は目覚ましい進歩を遂げているが、これらは治療開始時の臨床効果は良好でも、高率に薬剤耐性が見られてしまい、新規治療法の実用化が望まれる。近年、様々なヒト腫瘍抗原が同定され、がん免疫療法は科学的根拠に基づいた治療が可能となった。その結果、免疫療法が最も奏功する悪性黒色腫では、腫瘍抗原特異的 T 細胞を投与する養子免疫療法で、劇的な臨床効果(奏功率 72%)が報告されている(Dudley et al. J Clin Oncol 2008)。肺癌でも多数の臨床試験が行われ、例えば、非小細胞肺癌での、術後の癌抗原(MAGE-A3)ワクチンでは、第二相臨床試験で高い再発予防効果(27%)が得られ、現在、大規模第三相試験が進行中である。このように、免疫療法が肺癌でも有効である可能性が、最近明らかになっているが、前記の養子免疫療法は、高度な設備が必要で施設が限られ、比較的簡単な、がんワクチンは、臨床効果はいまだ十分でなく、改良が必要である。

様々な臨床試験の解析から、免疫療法の臨床効果が十分でない原因の一つは、免疫抑制的な腫瘍微小環境が引き起こす腫瘍免疫回避であると考えられている。実際に、T 細胞の免疫抑制状態を解除する目的で、抗 CTLA-4 抗体や、抗 PD-1 抗体が開発され、前者は、悪性黒色腫で予後の延長を認め、2011 年、米国 FDA で承認された。後者についても第一相臨床試験で、非小細胞肺癌を含めた様々な癌で臨床効果(約 20%の complete or partial responses)を認めた(Topalian et al. N Engl J Med 2012)。このように、腫瘍免疫回避の解除で、実際に顕著な臨床効果を得られることが、実証されつつある。

申請者は、これまで、この腫瘍免疫回避のメカニズムとその克服法について研究をしてきた。具体的には、がん遺伝子 β -catenin や、STAT3、MAPK シグナル活性化による、がん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生を報告してきた(Yaguchi et al. J. Immunol 2012, Sumimoto et al. J Exp Med 2006)。具体的には、がん細胞は、増殖などに関与する癌シグナル伝達分子の活性化によって、異所性に様々な免疫抑制分子を産生し、腫瘍免疫回避を誘導する可能性を、提唱してきた。興味深いことに、これらのシグナル伝達経路のいくつかは、抑制性の免疫細胞においても、その抑制活性を担う重要なシグナルとなっている(Reviewed in Yaguchi et al. Int J Hematol. 2011)。例えば、がん微小環境中の DC は STAT3 が亢進しており、そのために、機能が抑制されている。以上より、このような癌シグナル分子を標的とした治療は、がん細胞自身と免疫細胞の二つを標的とすることで、より効果的に免疫抑制を解除できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、非小細胞肺癌における、上皮成長因子受容体(EGFR)活性化による免疫抑制作用の解析と、EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)によるその解除の検討、及び、EGFR-TKI の免疫細胞に対する、直接の機能増強作用の解析を目的とする。EGFR-TKI が肺癌細胞と免疫細胞の両方を標的とし、抗腫瘍免疫応答を増強させるという新しい作用を実証し、EGFR-TKI と免疫療法の併用による、新しい治療法の実用化を目指す。また、EGFR-TKI を免疫の増強剤として使う意味では、EGFR-TKI の適応を非小細胞肺癌に限ることなく、様々ながんにおける免疫療法で併用できる可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ヒト非小細胞肺癌のサイトカイン産生の評価

ヒト非小細胞肺癌を EGFR-TKI 存在下で 24 時間培養し、培養上清を回収、ELISA 法で各種サイトカインを測定した。

(2) ヒト樹状細胞の作製

健常人の末梢血より CD14 陽性細胞を分離し、GM-CSF と IL-4 を加え、5-6 日培養し樹状細胞に分化させた。この培養期間に、肺癌細胞株の培養上清や、EGFR-TKI を加えた。作製した樹状細胞に LPS を加え、18 時間後に産生される IL12 や IL10 の量を ELISA で測定した。また、別個体の健常人の末梢血から分離した CD3 陽性 T 細胞と 3 日間共培養し、産生される IFN- γ の量で樹状細胞の T 細胞刺激能を評価した。

(3) マウスモデル

近交系マウスに、同系マウス腫瘍株を皮下移植し、EGFR-TKI を連日経口投与した。約 20 日後に、所属リンパ節から、細胞を取り出し、腫瘍抗原の MHC class I エピトープペプチドで 5 日間刺激した。その後、T 細胞を分離し、エピトープペプチドをパルスした脾細胞と 24 時間共培養し、IFN- γ の産生を測定した。治療モデルでは、免疫療法との併用を行った。3 日ごとに腫瘍体積を計測した。

4. 研究成果

(1) EGFR シグナルの亢進は、非小細胞肺癌の免疫抑制分子産生に関与する

EGFR 変異を持つ非小細胞肺癌細胞株は、免

疫抑制性サイトカインを産生し、その産生は EGFR-TKI によって阻害された。EGFR 変異のない細胞株では、変化は見られなかった。PTEN 欠失による耐性細胞株においては、EGFR-TKI によりサイトカイン産生の一部が抑制された。以上より、EGFR シグナルの亢進は、非小細胞肺癌の増殖だけでなく、免疫抑制作用にも関与する可能性が示唆された。

(2)EGFR シグナルが亢進した非小細胞肺癌は樹状細胞の機能を抑制し、それは、EGFR-TKI で回復する。

EGFR シグナルが亢進している非小細胞肺癌細胞株の培養上清を含む培地で樹状細胞 (DC) を培養すると、LPS 刺激時に産生される IL12 が低下し、IL10 が上昇し、T 細胞刺激能が低下するため、抑制性の樹状細胞に変化していることが示唆された。このとき、EGFR-TKI を作用させた細胞株の培養上清を用いると、樹状細胞の機能が回復した (図 1)。以上より、非小細胞肺癌における EGFR の亢進は、免疫抑制性分子の産生を介して、樹状細胞を抑制していること、そしてその機能は EGFR-TKI で回復する可能性が示唆された。

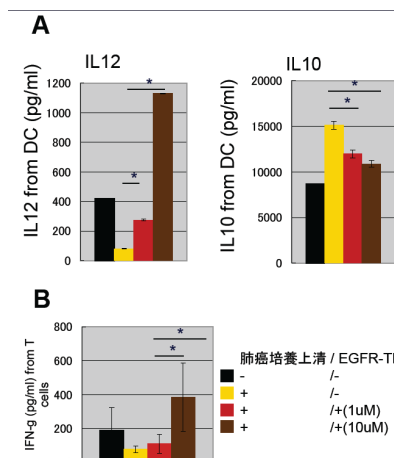
(3) EGFR-TKI はカインース A 依存的に樹状細胞の機能を亢進させる。

次に、EGFR-TKI の樹状細胞に対する直接作用を評価した。ヒト単球由来樹状細胞に EGFR-TKI を作用させると、T 細胞刺激能が亢進した (図 2)。樹状細胞は EGFR を発現していないので、その作用機序を調べるために、リン酸化タンパクアレイを用いて、解析したところ、いくつかのカインースのリン酸化が、EGFR-TKI によって樹状細胞で亢進していた。そのうちのひとつであるカインース A に対する阻害薬は、上述の EGFR-TKI による樹状細胞の機能亢進を打ち消した。以上より、EGFR-TKI はカインース A 依存的に樹状細胞の機能を亢進させる事が示唆された。

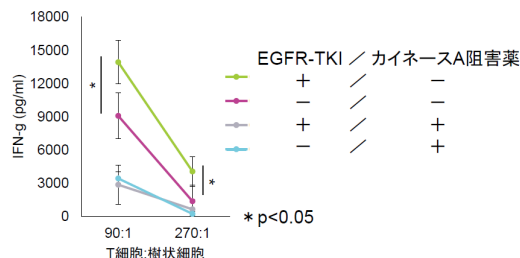
(4)EGFR-TKI は腫瘍抗原特異的 T 細胞応答を増強させる

次に、EGFR-TKI の *in vivo* における抗腫瘍免疫応答に対する作用を検討した。野生型 EGFR を発現するマウス癌細胞株を用いた担癌マウスモデルでは、腫瘍抗原特異的な T 細胞応答が EGFR-TKI 投与によって増強した。さらに、免疫療法に EGFR-TKI を併用すると、免疫療法の抗腫瘍効果が増強された。以上の結果より、EGFR-TKI は非小細胞肺癌に対して、腫瘍細胞からの免疫抑制性分子の産生を抑制すること、DC などの免疫担当細胞に直接機

能増強作用を及ぼすことの二点で、抗腫瘍免疫応答を増強すると考えられた。



(図 1)非小細胞肺癌は樹状細胞の機能を抑制し、それは、EGFR-TKI で回復する。(A)ヒト単球由来樹状細胞に、EGFR-TKI で処理した、もしくは、していない非小細胞肺癌の培養上清を加えて、培養し、LPS で成熟化させ、産生されるサイトカイン量を測定した。(B)LPS で成熟化させた樹状細胞を、別の個体由来の T 細胞と三日間共培養し、産生される IFN- γ を測定した。



(図 2)EGFR-TKI は、カインース A 依存的に樹状細胞の機能を亢進させる。ヒト単球由来樹状細胞を、EGFR-TKI とカインース A 阻害薬を加えて、培養し、LPS で成熟化させ、別の個体由来の T 細胞と三日間共培養し、産生される IFN- γ を測定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 10 件)

- 谷口智恵, 河上裕:がんの免疫逃避機構と分子標的薬を用いた免疫応答の制御、産科と婦人科 査読無 81 巻 2014 年 157-163
- 河上裕 川村直 ポピバノバ・ポリヤナ

中村謙太 早川妙香 谷口智憲:がん免疫における免疫チェックポイント機構の意義とその制御によるがん治療、がん分子標的治療 査読無 12 巻 2014 年 15-22

3. Nakamura S, Yaguchi T, Kawamura N, Kobayashi A, Sakurai T, Higuchi H, Takaishi H, Hibi T, Kawakami Y.: TGF- β 1 in Tumor Microenvironments Induces Immunosuppression in the Tumors and Sentinel Lymph Nodes and Promotes Tumor Progression. J Immunother 査読有 37 巻 2014 年 10.1097/CJI.000000000000011
4. Kawamura N, Udagawa M, Fujita T, Sakurai T, Yaguchi T, Kawakami Y.: Intratumoral Injection of BCG-CWS-Pretreated Dendritic Cells Following Tumor Cryoablation. Methods Mol Biol. 査読有 1139 巻 2014 年 145-53 10.1007/978-1-4939-0345-0_13
5. 谷口智憲, 河上裕: 化学療法・分子標的薬による免疫応答増強、医学のあゆみ 査読無 244 巻 2013 年 817-823
6. 谷口智憲, 里見良輔, 西尾浩, 杉山重里, 大村学, 中村謙太, 川村直, 小林明日香, 河上裕: 化学療法・分子標的薬による抗腫瘍免疫応答の制御、実験医学 査読無 31 巻 2013 年 1938 - 1944
7. 谷口智憲, 川村直, 中村謙太, 河上裕: 悪性黒色腫における PI3K/AKT 経路の役割、日本臨床 査読無 71 巻 suppl 4 2013 年 139 - 143
8. 谷口智憲, 里見良輔, 川村直, 河上裕: 抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体による免疫療法、日本臨床 査読無 71 巻 suppl 6 2013 年 253 - 257
9. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Park J, Kamijuku H, Tsujikawa T, Kawamura N. : Cancer-induced immunosuppressive cascades and their reversal by molecular-targeted therapy. Ann N Y Acad Sci. 査読有 1284 巻 2013 年 80-86 10.1111/nyas.12094
10. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Tsujikawa T, Park JH,

Popivanova BK, Miyazaki J, Kawamura N. : Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therap. Front Oncol. 査読有 3 巻 2013 年 136 10.3389/fonc.2013.00136

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yaguchi T, Satomi R, Kobayashi A, Morii K, Kawakami Y. EGFR-TKIs (EGFR-tyrosin kinase inhibitors) enhance anti-tumor immune responses by acting on both non-small cell lung carcinoma cells and immune cells 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10 日 ~ 2014 年 12 月 12 日 京都府 京都市 京都国際会議場
2. Yaguchi T, Satomi R, Kobayashi A, Soejima K, Betsuyaku T, Kawakami Y. EGFR-TKIs (EGFR-tyrosin kinase inhibitors) enhance anti-tumor immune responses in an EGFR independent manner 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 03 日 ~ 2013 年 10 月 05 日 神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜
3. 里見良輔, 谷口智憲, 小林 明日香, 副島研造, 別役智子, 河上裕 EGFR-TKIs (EGFR-tyrosin kinase inhibitors) は非小細胞肺癌と免疫担当細胞の両者に作用し抗腫瘍免疫応答を増強させる. 第 17 回 日本がん免疫学会総会 2013 年 07 月 03 日 ~ 2013 年 07 月 05 日 山口県 宇部市 ANA クラウンプラザホテル宇部

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 智憲 (Yaguchi Tomonori)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 4 0 4 2 4 1 6 3