

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：85501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10696

研究課題名(和文) 胸部悪性腫瘍におけるEGF familyシグナルを介した免疫逃避調整機構の解明

研究課題名(英文) Immunescape mechanisms of thoracic malignancy via EGFR signaling

研究代表者

沖田 理貴 (Okita, Riki)

独立行政法人国立病院機構山口宇部医療センター(臨床研究部)・その他部局等・呼吸器外科医長

研究者番号：90467762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌におけるNK細胞活性化受容体NKG2Dや免疫抑制分子PD-1に対するリガンドの発現制御機構を中心に研究を行なった。非小細胞肺癌切除検体において、PD-L1発現量とEGFR、HER発現量との相関関係を明らかにし、*in vitro*実験系ではEGFRシグナルとHER2シグナルによるPD-L1発現制御機構は異なることを示した。また、非小細胞肺癌臨床検体を用いて、術前化学療法は組織内のPD-L1発現を上昇、NKG2Dリガンド発現を低下させる症例が多いことを示した。さらに、非小細胞肺癌91例の各種NKG2Dリガンドの発現をクラスター分類し、予後不良なカテゴリーを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害剤の効果は限定的であり、効果予測因子や耐性機序の解明が急務である。本研究は、免疫チェックポイント研究の主役であるPD-L1および、現時点で治療標的として臨床応用されていないNK細胞に関連した免疫関連分子NKG2Dリガンドそれぞれの発現に、EGFRシグナルや各種抗がん剤が与える影響を明らかにした。さらに臨床検体(手術標本)における免疫関連分子の発現と臨床病理学的因子、予後との関連を明らかにした。本研究は、学術面では非小細胞肺癌の免疫逃避機構について新たな知見を加え、社会的には手術症例における新たな予後因子の提唱につながった。

研究成果の概要(英文)：Our study focused on the regulation mechanism of the expression of ligands for NKG2D and PD-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC). The correlation between expression level of PD-L1 and those of EGFR or HER2 was clarified in resected NSCLC. Moreover, we showed regulation mechanism of PD-L1 via EGFR and HER2 signals *in vitro*. In addition, we showed that induction chemotherapy increased expression of PD-L1 in tumor tissues while it decreased expression of NKG2D ligand in cases of NSCLC. Furthermore, the expression pattern of NKG2D ligands was clustered in 91 cases of NSCLC, and we found a novel category with a poor prognosis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：非小細胞肺癌 免疫逃避 NK細胞 NKG2Dリガンド PD-L1 免疫チェックポイント EGFR HER2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞の宿主免疫逃避機構

腫瘍細胞の宿主免疫逃避機構は癌の進展要因のひとつと考えられる。抗腫瘍免疫における効果細胞としては、自然免疫の担い手 NK 細胞と獲得免疫を司る T 細胞があり、NK 細胞の抗腫瘍効果は NKG2D-NKG2D リガンド結合等の活性化シグナルと KIR-MHC class I 結合による不活化シグナルのバランスにより決定される。腫瘍細胞における NKG2D リガンドの発現増強は、NK 細胞による腫瘍細胞の排除を促す。T 細胞においては、CTLA-4 や PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤が開発され、臨床試験で悪性黒色腫、非小細胞肺癌に対して、既存の化学療法の効果を凌駕した。現在様々な T 細胞の免疫チェックポイント分子を標的とした薬剤の開発が進んでいるが、NK 細胞に関連した免疫チェックポイント分子の研究は遅れている。NK 細胞免疫に関連する、腫瘍細胞上の NK 細胞活性化リガンド、不活化リガンドの発現調整機構の解明は、既存の免疫チェックポイント阻害剤の耐性克服に役立つ可能性がある。

(2) EGF family シグナルと免疫逃避機構

EGF family シグナルと免疫逃避の関連について、応募者はこれまでに、乳癌や悪性黒色腫細胞株における HER2 シグナルと MHC クラス I 分子発現との関連、乳癌細胞株における HER2/HER3 シグナルを介した MICA/B 発現調整機構、ならびに非小細胞肺癌細胞株における EGFR/PI3K/AKT/microRNA-20a 経路を介した MICA/B 発現制御について、明らかにしてきた。EGF family シグナルを介した NK 細胞に関連する免疫調整分子の発現調整機構の研究は独創性に富むとともに、細胞内シグナル阻害剤による免疫チェックポイント阻害療法の開発につながりうる。

2. 研究の目的

本研究では、胸部悪性腫瘍における EGF family シグナルを介した、NKG2D リガンド MICA/B、ULBP ならびに免疫チェックポイント分子 PD-L1、MHC class I 分子の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。本研究成果は、胸部悪性腫瘍に対する細胞内シグナル阻害剤を使用した新たな免疫チェックポイント阻害剤の開発や免疫チェックポイント阻害剤の耐性機序の克服につながりうる。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌細胞株における EGF シグナルと HER2 シグナル、それぞれが腫瘍細胞上の PD-L1 発現に与える影響について、フローサイトメトリー法を用いて解析した。

(2) 非小細胞肺癌手術症例の腫瘍組織検体を用いて、免疫組織化学的反応法により EGFR、HER2、PD-L1 の発現量を評価し、相関関係について解析した。

(3) 術前導入化学療法を施行された非小細胞肺癌症例について、化学療法前後の腫瘍組織標本における NKG2D リガンド、PD-L1、MHC class I の発現を、免疫組織化学的反応法で評価した。

(4) 非小細胞肺癌細胞株にシスプラチンを複数回曝露させ、NKG2D リガンドと PD-L1 の発現への影響をフローサイトメトリー法で、また NK 細胞傷害活性について LDH 放出試験で、解析した。

(5) 非小細胞肺癌切除標本における、免疫組織化学的反応法を用いた NKG2D リガンド MICA/B、ULBP1、ULBP2/5/6、ULBP3、ULBP4 の発現量を評価し、クラスター分類を行ったうえで予後を解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の使用については研究当時の所属先である川崎医科大学倫理委員会において、認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺癌細胞株 PC-9 において、siRNA 法による EGFR 遺伝子発現抑制は PD-L1 発現に影響を与えないが、HER2 遺伝子発現抑制は PD-L1 発現を低下させた。一方、EGF 刺激は PD-L1 発現を増強させるが、EGFR 遺伝子発現抑制でこの効果は消失した一方、HER2 遺伝子発現抑制ではこの効果は阻害できなかった。恒常的な PD-L1 発現と EGF により誘導される PD-L1 発現で、EGFR と HER2 はそれぞれ異なる役割を有することが示された。

(2) 非小細胞肺癌手術症例 91 例について、腫瘍組織の PD-L1 発現と予後との関係について解析し、PD-L1 発現量に対して、EGFR 発現量は正の相関、一方 HER2 発現量は負の相関を示すこと(図 1)

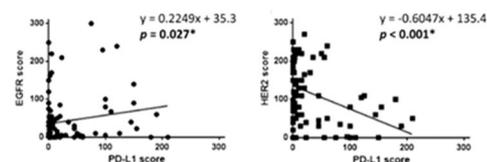


図1. 非小細胞肺癌手術症例91例におけるPD-L1とEGFRあるいはHER2発現量との関係。

ならびに PD-L1 高発現群は予後不良であることを示した。

(3) 非小細胞肺癌患者において、術前化学療法は腫瘍組織の NKG2D リガンド発現を減弱、PD-L1 発現を増強させることを見出した。これにより、化学療法後に残存する腫瘍組織は、免疫逃避に有利な特徴を示すことが明らかとなった。

(4) 非小細胞肺癌細胞株にシスプラチンを繰り返し曝露させると、NKG2D リガンド、PD-L1 いずれも発現が増強した。NK 細胞傷害活性はシスプラチン曝露により増強した。臨床検体を用いた検討(3)と *in vitro* 実験系での検討で、異なる結果が導かれた。このことは臨床検体における残存腫瘍は抗がん剤での一時的な抗腫瘍免疫増強の後、免疫逃避能力を獲得したものと考察した。

(5) 非小細胞肺癌 91 例について、NKG2D リガンド MICA/B ならびに ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3, ULBP4 の発現量を評価した。ULBP 分子はいずれも単独で予後予測因子とはならなかったが、クラスター分類により(図2)、特定の Kategorie で全生存期間が不良であることを見出した(図3)。

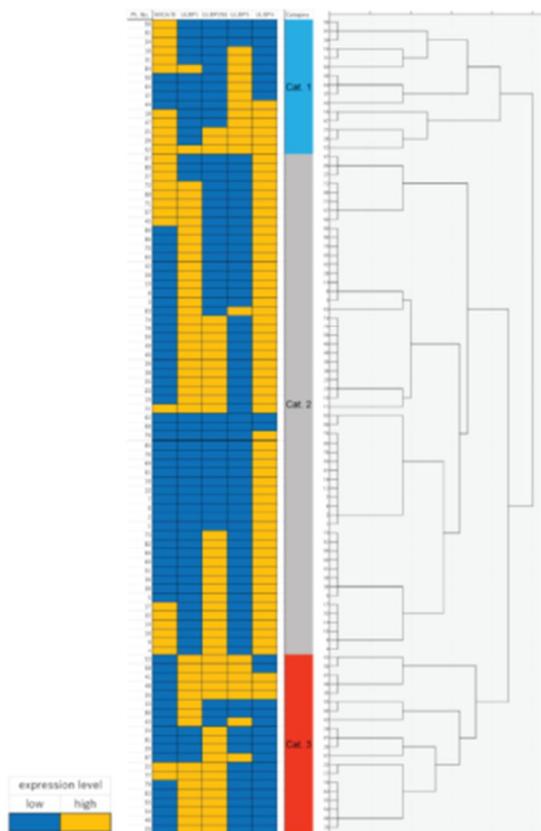


図2. 非小細胞肺癌切除例91例における NKG2D リガンド発現解析のヒートマップとクラスターマップ。

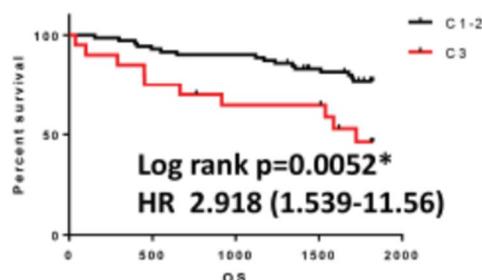


図3. カテゴリー3はカテゴリー1,2と比較して、全生存期間において予後不良である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okita Riki, Maeda Ai, Shimizu Katsuhiko, Nojima Yuji, Saisho Shinsuke, Nakata Masao	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinicopathological relevance of tumor expression of NK group 2 member D ligands in resected non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 6805 ~ 6815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okita Riki, Maeda Ai, Shimizu Katsuhiko, Nojima Yuji, Saisho Shinsuke, Nakata Masao	4. 巻 42
2. 論文標題 Effect of platinum-based chemotherapy on the expression of natural killer group 2 member D ligands, programmed cell death 1 ligand 1 and HLA class I in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 839 ~ 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Katsuhiko, Okita Riki, Saisho Shinsuke, Maeda Ai, Nojima Yuji, Nakata Masao	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Comparative study of the PD-L1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte between surgically resected and matched re-biopsy specimens in recurrent non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutics and Clinical Risk Management	6. 最初と最後の頁 605 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/TCRM.S189320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okita Riki, Shimizu Katsuhiko, Nakata Masao	4. 巻 10
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition-induced metastasis could be a bait for natural killer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 S3143 ~ S3146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2018.08.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SHIMIZU KATSUHIKO, OKITA RIKI, SAISHO SHINSUKE, MAEDA AI, NOJIMA YUJI, NAKATA MASAO	4. 巻 38
2. 論文標題 Impact of COX2 Inhibitor for Regulation of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4637 ~ 4644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okita Riki, Maeda Ai, Shimizu Katsuhiko, Nojima Yuji, Saisho Shinsuke, Nakata Masao	4. 巻 66
2. 論文標題 PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 865 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-017-1986-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Katsuhiko, Okita Riki, Saisho Shinsuke, Maeda Ai, Nojima Yuji, Nakata Masao	4. 巻 14
2. 論文標題 Urinary levels of prostaglandin E2 are positively correlated with intratumoral infiltration of Foxp3+ regulatory T cells in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 1615 ~ 1620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu K, Okita R, Saisho S, Maeda A, Nojima Y, Nakata M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prognostic value of Cox-2 and PD-L1 expression and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes in resected lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Manag Res	6. 最初と最後の頁 741-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Okita Riki, Shimizu Katsuhiko, Nojima Yuji, Saisho Shinsuke, Nakata Masao
2. 発表標題 JAK STAT inhibitor overcomes interferon g reduced, NK cell mediated cytotoxicity in non small cell lung cancer cells
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖田理貴、前田 愛、清水克彦、野島雄史、最相晋輔、中田昌男
2. 発表標題 Decreased expression of ULBP4 without loss of MHC class I is an independent poor prognostic factor in resected NSCLC
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖田理貴、清水克彦、野島雄史、最相晋輔、中田昌男
2. 発表標題 非小細胞肺癌細胞における抗リウマチ薬TofacitinibのPD-L1発現抑制効果
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖田理貴、前田 愛、野島雄史、最相晋輔、清水克彦、中田昌男
2. 発表標題 シスプラチン併用導入化学療法が非小細胞肺癌における PD-L1発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第34回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okita R, Maeda A, Yukawa T, Shimizu K, Nojima Y, Saisho S, Nakata M.
2. 発表標題 Survival of non-small cell lung cancer patients predicted from expression of PD-L1, HLA class I and MICA/B on tumor cells
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖田理貴, 前田 愛, 清水克彦, 野島雄史, 最相晋輔, 中田昌男
2. 発表標題 非小細胞肺癌切除例におけるNKG2DリガンドULBP1-6の発現と臨床病理学的因子との関連性の検討
3. 学会等名 第70回日本胸部外科学会定期学術集 会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okita R, Maeda A, Shimizu K, Nojima Y, Saisho S, Nakata M.
2. 発表標題 Relationship between PD-L1 expression and EGFR/HER2 signaling in non-small-cell lung cancer
3. 学会等名 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖田理貴、清水克彦、野島雄史、最相晋輔、中田昌男
2. 発表標題 非小細胞肺癌切除検体におけるPD-L1とMICA/Bの発現解析
3. 学会等名 第15回日本免疫治療学研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖田理貴, 野島雄史, 前田 愛, 最相晋輔, 清水克彦, 中田昌男
2. 発表標題 PD-L1 expression predicts poor prognosis and is correlated with EGFR status in patients with non-small-cell lung cancer
3. 学会等名 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Okita R, Nojima Y, Maeda A, Saisho S, Shimizu K, Nakata M
2. 発表標題 Repeated exposure to cisplatin enhances NK cell-mediated cytotoxicity via up-regulation of NKG2D ligands in non-small cell lung cancer cells
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 沖田理貴, 中田昌男
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるPD-L1発現とHER2シグナルとの関連性の検討
3. 学会等名 第29回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

病院HP内、呼吸器外科医師 沖田 理貴 研究紹介 http://www.yamaguchi-hosp.jp/ Rolf Kiessling's Group, Karolinska Institutet https://ki.se/en/onkpat/rolf-kiesslings-group 川崎医科大学 呼吸器外科学 研究紹介 http://www.kawasaki-m.ac.jp/gts/07-01.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中田 昌男 (Nakata Masao) (30368641)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究 協力者	Kiessling Rolf (Kiessling Rolf)		
研究 協力者	Seliger Barbara (Seliger Barbara)		