

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15076

研究課題名(和文) 分子標的治療薬および化学療法薬が肺癌の免疫微小環境に与える影響

研究課題名(英文) Interaction of target therapy and tumor immune microenvironment

研究代表者

齊藤 涼子 (Saito, Ryoko)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30733349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は肺癌におけるepidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)耐性獲得後の免疫療法治療効果予測因子の同定である。EGFR-TKI耐性獲得前後の腫瘍内免疫微小環境の変化についてのヒト肺癌組織、培養細胞株を用いた網羅的検討の結果、EGFR-TKI耐性獲得後にmyocyte enhancer factor 2Cの上昇を介したmiR-1の発現増加により腫瘍内リンパ球遊走が抑制され得ることが明らかとなった。miR-1の、EGFR-TKI耐性獲得後の免疫療法の治療効果予測因子としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR-TKI耐性獲得後にmiR-1が上昇している症例ではICIの治療効果は乏しいものの臨床予後は良好である可能性が高く、化学療法を含めたICI以外の治療を積極的に進めるマーカーとなり得ると考えられた。今回の結果を踏まえ、今後ヒト血清・ヒト組織におけるmiR-1発現の変化が有用となれば、現行の病理組織に基づく治療効果予測のheterogeneityによる問題点を補填することが可能となるであろう。以上より、我々の研究成果はEGFR-TKI耐性獲得肺癌患者の治療選択および治療戦略の発展に、今後多大なる貢献を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The status of the tumor immune microenvironment (TIME), including lymphocyte infiltration, has been well known to provide predictive markers for the efficacy of immunotherapy. We evaluated the correlation between epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistance and TIME, before and after acquiring EGFR-TKI resistance, in lung adenocarcinoma, and further explored this by in vitro studies.

As a result, infiltration levels of T cells were significantly decreased after development of EGFR-TKI resistance, and it was revealed that miR-1 was increased through myocyte enhancer factor 2C (Mef2C) upregulation, and miR-1 significantly inhibited cytokines causing inhibition of monocyte migration.

These results indicate that the Mef2C-miR-1 pathway changed the TIME, following development of EGFR-TKI resistance, and miR-1 could be a clinically useful marker to predict therapeutic efficacy of immunotherapy in lung adenocarcinoma patients with EGFR-TKI resistance.

研究分野：人体病理学

キーワード：EGFR-TKI 腫瘍内免疫微小環境 miR-1 治療効果予測因子 免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌領域では免疫チェックポイント分子阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor : ICI) が予後の改善に大きく貢献している。我々は、病理組織学的検討から Epidermal Growth Factor Receptor -tyrosin kinase inhibitor (EGFR-TKI) 使用前後で肺腫瘍内リンパ球の subpopulation が変動すること、当研究室で樹立した EGFR-TKI 長期暴露肺腺癌培養細胞株ではリンパ球の分化に作用し得るサイトカインおよび miRNA が非暴露株に比し有意に変動していることを見出した。EGFR-TKI などの治療薬が免疫微小環境に及ぼす影響について網羅的に検討された報告は未だ無く、この点を明らかにするため以下の手法で検討を行った。1. EGFR-TKI の長期暴露肺癌培養細胞株を用いたアレイ解析を含めた miRNA 発現の網羅的検討。2. これらの細胞株を用いた miRNA およびその周辺因子の発現解析。3. ヒト組織を用いた臨床的意義の検討。本研究では、二次以降の治療という観点から免疫チェックポイント分子阻害剤の治療効果予測因子を見出し肺癌治療戦略に新知見をもたらすことを目指した。

### 2. 研究の目的

肺癌は日本、世界共に癌死の原因第一位を占めている。進行期非小細胞肺癌ではドライバー遺伝子の有無や programmed death- ligand 1 (PD-L1) の発現率によって一次治療薬が選択される。特に腺癌では EGFR 遺伝子変異の割合が高くこれらの症例には分子標的治療薬である EGFR-TKI が奏功するが、1~2年以内に薬剤耐性化を来することが問題となっている。ICI も EGFR-TKI 耐性獲得後の選択肢となるが、EGFR 遺伝子変異陽性患者に対しての効果は乏しいとされる。PD-L1 の発現率が ICI の治療効果予測因子とされているが実際の効果と乖離することも多く、より明確な治療効果予測因子の確立が求められており、腫瘍内免疫微小環境 (tumor immune microenvironment : TIME), 特に腫瘍内リンパ球の多寡がその一つとして注目されている。そこで我々は、EGFR-TKI の耐性獲得後の TIME の変化が ICI の治療効果へ影響を与えると考え、EGFR-TKI 耐性症例における ICI の新規治療効果予測因子を見出すことを目的に、miRNA に着目し研究を進めた。

### 3. 研究の方法

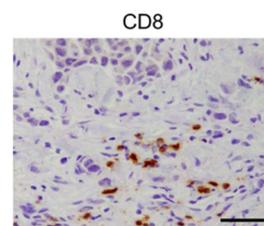
- (1) 抗体 : CD3, CD4, CD8, Foxp3, Mef2C に対する抗体を使用した。
- (2) 免疫組織化学 : 仙台厚生病院, 東北大学病院, 宮城県立がんセンターで EGFR 遺伝子変異陽性肺癌と診断され、なおかつ EGFR-TKI 治療後に耐性となり、治療前と耐性獲得後で病理検体が採取された 21 症例の病理組織標本を用いて検討を行った。
- (3) 細胞培養 : ヒト肺腺癌由来培養細胞として PC9 を用いた。さらに、当教室で樹立した PC9/6m (コントロール株), PC9/ER (Erlotinib 耐性株, T790M 変異陽性), H1975 (T790M 変異陽性) を用いた。細胞培養は 10% fetal bovine serum を含む RPMI-1640 培地を用いて、37℃, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で行った。
- (4) アレイ解析 : miRNA PCR アレイ, サイトカインアレイを行い、EGFR-TKI 耐性株と非耐性株での比較を行った。
- (5) miRNA トランスフェクション : miR-1 のトランスフェクションを行った。
- (6) 定量 RT-PCR : ヒト肺癌組織および培養細胞より miRNA または RNA を抽出し、cDNA へ変換した後、RT-PCR を施行した。
- (7) 単核球遊走試験 : 正常ドナー由来末梢血単核球細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC) を 24 ウェルプレートの上部インサートに添加し、下部ウェル内に条件培地を添加し、下部ウェルへ遊走した PBMC 数を測定した。
- (8) 血清 miR-1 測定 : 仙台厚生病院で EGFR 遺伝子変異陽性肺癌と診断された 10 例と EGFR-TKI にて加療を行い耐性となった 13 例を対象とし、血清中の miR-1 濃度を測定した。
- (9) 細胞増殖試験 : WST-8 アッセイにより生細胞数の測定を行った。
- (10) 予後解析 : オンラインプログラムの Kaplan-Meier プロットを用い検討した。
- (11) 統計解析 : JMP 12.2.0 (SAS Institute, 東京, 日本) を使用し、p 値が 0.05 未満を有意とした。
- (12) 倫理委員会 : ヒト組織を用いた研究計画は、東北大学, 仙台厚生病院および宮城県立がんセ

ンターの倫理委員会より承認を受けた。(承認番号: 2019-1-555 [東北大学], 29-16 [仙台厚生病院], 2018-25-1 [宮城県立がんセンター])

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト肺癌組織における EGFR-TKI 耐性前後での腫瘍周囲の微小環境の変化

ヒト組織を用いた検討から、EGFR-TKI 使用前に CD8 陽性 T 細胞の割合が高い症例では、腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞が減少する可能性が示された (図 1: Bar 50 μm)。 (図 1)



##### (2) 肺癌細胞における EGFR-TKI 耐性前後での miR-1 の変動及び腫瘍内免疫微小環境への関与

ヒト肺癌培養細胞株を用いた EGFR-TKI 耐性獲得前後の比較において、miRNA PCR アレイによる網羅的検討により、miR-1 が有意に増加していることが明らかとなった(表 1)。

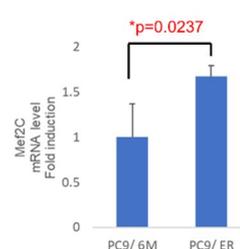
ヒト肺癌組織および血清検体を用いた EGFR-TKI 治療獲得前後の検討では miR-1 の発現に統計学的な有意差は認められなかったが、症例数が少なくさらなる検討を要する。

一方、miR-1 の誘導因子として知られる myocyte enhancer factor 2C (Mef2C)については、EGFR-TKI 耐性獲得後の細胞では獲得前の細胞と比較し有意に Mef2C の発現が上昇していること、EGFR-TKI 耐性獲得後に CD8 低下を認めたヒト肺癌組織においてもその傾向を示す事が明らかとなり、EGFR-TKI 耐性獲得後に Mef2C を介して miR-1 発現が上昇する可能性が示された(図 2)。

(表 1: miRNA PCR アレイ結果)

miRNA	PC9/ER (fold change 対PC9/6m)	p値
Let-7b	2.01	0.01995
miR-1	8.42	0.00014
miR-140	5.15	0.00054
miR-142	6.13	0.00375
miR-143	2.85	0.04118
miR-146a	8.09	<0.0001
miR-152	3.02	0.00034

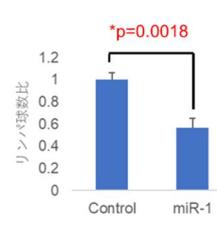
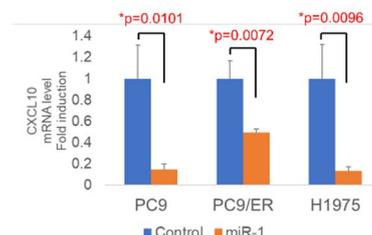
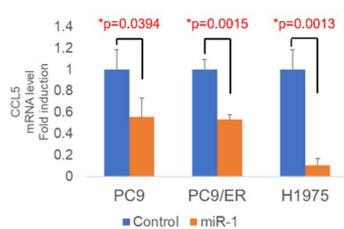
(図 2)



さらに、細胞株への miR-1 トランスフェクションによって、C-C Motif Chemokine Ligand 5, C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 などのリンパ球遊走に關与するサイトカインが有意に減少し (図 3)、機能解析でも単核球の遊走を有意に抑制することが示された(図 4)。

(図 3)

(図 4)



##### (3) ヒト肺癌組織における miR-1 の細胞増殖・予後との関連性

miR-1 が EGFR 遺伝子変異陽性ヒト肺癌細胞株の増殖能を抑制することが明らかとなった。さらに、public database を用いた予後解析では、腫瘍組織における miR-1 の高発現は予後良好因子であることが確認された。

##### (4) 結論

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では EGFR-TKI 耐性獲得により Mef2 上昇を介して miR-1 が増加し、CCL5, CXCL10 などのサイトカイン発現の低下によって CD8 陽性 T 細胞などの単核球遊走能低下を来す可能性が示唆された。したがって、EGFR-TKI 耐性獲得後の miR-1 上昇は ICI 治療効果不良のマーカーとなり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Masayuki, Saito Ryoko, Miki Yasuhiro, Nanamiya Ren, Inoue Chihiro, Abe Jiro, Sato Ikuro, Okada Yoshinori, Sasano Hironobu	4. 巻 10
2. 論文標題 The correlation of p22phox and chemosensitivity in EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1119-1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26637	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 Saito Ryoko, Miki Yasuhiro, Abe Takuto, Miyauchi Eisaku, Abe Jiro, Nanamiya Ren, Inoue Chihiro, Sato Ikuro, Sasano Hironobu	4. 巻 -
2. 論文標題 11 hydroxysteroid dehydrogenase 1: a new marker for predicting response to immune-checkpoint blockade therapy in non-small-cell lung carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0837-3	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川名 祥子
2. 発表標題 EGFR-TKI耐性と腫瘍内組織免疫微小環境との相互作用についての検討
3. 学会等名 日本肺癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川名 祥子
2. 発表標題 miR - 1過剰発現を介したEGFR - TKI耐性と腫瘍免疫微小環境との相互作用についての検討
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----