

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17215

研究課題名(和文)ゾレドロン酸併用 T細胞免疫治療のバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Biomarker of immunotherapy using zoledronate-expanded gamma-delta T cell

研究代表者

泉 大樹 (Izumi, Hiroki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：80813485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：V 9V 2T細胞による腫瘍細胞の障害活性は、添加するゾレドロン酸濃度依存的、エフェクター細胞/ターゲット細胞比依存的により増強した。ゾレドロン酸はメバロン酸経路の酵素であるHMGR発現を上昇させ、IPP蓄積及びV 9V 2Tによる細胞障害活性増強に影響していると考えられた。EGFR阻害剤も同様にメバロン酸経路の酵素(HMGR, FDPS)発現を上昇させた。しかし、EGFRノックダウンはZOLによるV 9V 2T細胞の腫瘍細胞障害活性増強へ影響せず、EGFR遺伝子変異含め、特定のドライバー遺伝子とZOLによるV 9V 2T細胞の腫瘍細胞障害活性増強の関連性は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

V 9V 2T細胞による腫瘍細胞の障害活性は、特定のドライバー遺伝子で特に有効であるという結果は見いだせなかったが、ドライバー遺伝子陰性の細胞株と比較して遜色ない細胞障害活性を認めており、ドライバー遺伝子陽性例に対しても効果が期待できる免疫治療の一つであると考えられる。V 9V 2T細胞を用いた免疫治療の安全性・有効性をドライバー遺伝子陽性例を含む肺癌で検証していくことで、既存の免疫治療(免疫チェックポイント阻害剤)で効果が得られないドライバー遺伝子陽性の肺癌患者にも免疫治療の恩恵が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expanded V 9V 2T cells demonstrate tumor cytotoxicity, which was enhanced by ZOL concentrations and Effector/ Target cell ratio. Zoledronate upregulate the expression of HMGR, one of enzyme in mevalonate pathway, as well as FPP synthase inhibition, resulting in enhancement of V 9V 2T cell-mediated cytotoxicity. In addition, erlotinib, an EGFR inhibitor also upregulate the expression of HMGR and FDPS. However, the knockdown of EGFR does not demonstrate synergistic enhancement of V 9V 2T-mediated cytotoxicity in combination with zoledronate. There seems not to be relationships between types of oncogenic drivers and ZOL-induced V 9V 2T cell mediated cytotoxicity. It still remains to be clarified which factor is predictive biomarker of V 9V 2T-utilizing immunotherapy.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 ドライバー遺伝子 免疫治療 T細胞

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤によるがん免疫治療は様々ながん腫でその効果が認められているが、大多数の患者には無効であることが問題となっている。中でも肺癌において EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子などのドライバー遺伝子の存在は負の効果予測因子とされ、これらのドライバー遺伝子を有する患者層に対するがん免疫治療の効果向上のためには新たな免疫治療の開発を含めたアプローチが必要である。T 細胞は HLA 非拘束性に抗腫瘍活性を示すことから免疫治療への応用が期待されている。T 細胞を体外で選択的に増殖させ、体内に輸注する治療法 (T 細胞免疫治療) は肺癌を含め第 1 相臨床試験で検証されており、免疫チェックポイント阻害剤同様に一部の患者で効果を認めるものの、バイオマーカーが特定されておらず、その同定が臨床応用に向けた喫緊の課題である。

T 細胞のうち主に抗腫瘍作用を担うサブタイプである V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞は、メバロン酸の中間代謝産物である IPP などの非蛋白抗原によって活性化される。右図に示すようにゾレドロン酸 (ZOL) などの BP 製剤は FPP 合成酵素阻害により細胞内に IPP が蓄積させるため、V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞を選択的に増幅・活性化する。申請者は非小細胞肺癌患者において BP 製剤投与後の

T 細胞の活性化と関わる急性期反応 (Acute phase reaction; APR) を認めた患者は予後良好であることを後ろ向きおよび前向き観察研究において見出した (Izumi et al. Mol Clin Oncol. 2017, Izumi et al. Lung Cancer. 2018)。また APR に関与する因子として EGFR 遺伝子変異が挙げられることを示した (Izumi et al. Lung Cancer 2018)。その機序としてメバロン酸の代謝産物である FPP や GGPP は Ras 蛋白など低分子 G 蛋白質の膜局在化機能に必須であり、Ras 蛋白質の活性ががんの発生・増殖・生存に強く関わる肺癌細胞においては ZOL による IPP の蓄積および T 細胞の活性化が生じやすいと推察している。これらのことから申請者は、以下の仮説を立てた。

ドライバー遺伝子の有無、遺伝子別により BP 製剤により誘導される T 細胞の殺細胞効果および抗腫瘍効果が異なり、T 細胞免疫治療におけるバイオマーカーとなる。その機序としてドライバー遺伝子の有無、遺伝子別によりメバロン酸経路に関わる分子の発現・活性、および BP 製剤投与後の癌細胞内に蓄積する IPP の多寡が異なる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、T 細胞免疫治療において、BP 製剤併用により誘導される抗腫瘍効果がドライバー遺伝子の有無、遺伝子別で異なるかどうかを評価し、T 細胞免疫治療におけるドライバー遺伝子のバイオマーカーとしての意義を検証することである。

T 細胞免疫治療は有望な免疫治療の一つであるが、臨床応用にはバイオマーカーの同定が喫緊の課題である。申請者が行った先行研究では、EGFR 遺伝子変異の存在が ZOL 投与による

T 細胞の活性化と関連している可能性が示唆されている。これはドライバー遺伝子の有無が ZOL による T 細胞の活性化のバイオマーカーとなる可能性を示した初めての報告であり、当研究によりドライバー遺伝子の存在が T 細胞免疫治療におけるバイオマーカーとしての意義が検証されれば、がん免疫療法の個別化に寄与すると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による殺細胞効果がドライバー遺伝子により異なるかを検証する。

in vitro での V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による殺細胞効果の比較

非小細胞肺癌細胞株のうち、EGFR 遺伝子変異陽性、KRAS 遺伝子変異陽性、および既知のドライバー遺伝子がいずれも陰性を用いる。ヒト PBMC から ZOL を用いて選択的に増幅させた V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞と非小細胞肺癌細胞株を共培養する。V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞によるがん細胞の殺細胞効果は LDH release assay にて評価した。V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による細胞障害活性、および ZOL の併用効果はドライバー遺伝子別に比較をする。

また、siRNA を用いた EGFR のノックダウンまたは薬理的に EGFR を阻害することで、ドライバー遺伝子の有無・活性が V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による殺細胞性効果に与える影響を検証する。ドライバー遺伝子の種類により V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による細胞障害活性が異なる場合は、加えてドライバー遺伝子陰性肺癌細胞株に、レンチウイルスを用いて変異・融合遺伝子またはコントロールとして GFP 遺伝子を導入することでドライバー遺伝子の有無が V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による殺細胞性効果に与える影響を裏付け検証する。

in vivo での V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞による抗腫瘍効果の比較

マウスを含めげっ歯類にはヒトにおける V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞にあたるサブセットが存在しない。よってヒト化免疫再構築マウスモデルを用いる。免疫不全 NSG マウスを用いて上記の非小細胞肺癌株を皮下に異種移植し、腫瘍を形成した後に健常人ドナーより採取したヒト PBMC を生着させる。こマウスモデルに対して ex vivo で増殖させた V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞の輸注および in vivo での ZOL 投与を行う。V $\beta$ 9V $\alpha$ 2T 細胞の輸注療法に対する ZOL の追加効果を評価し、これらの治療効果をドライバー遺伝子の有無で比較する。

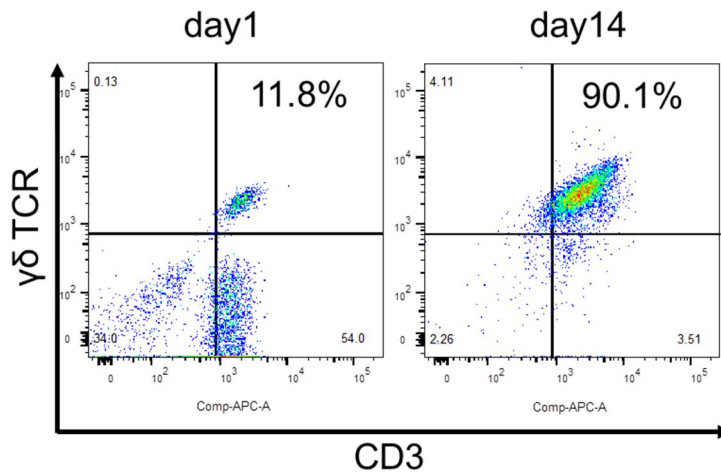
(2) V 9V 2T 細胞の活性化に関わる分子の発現がドライバー遺伝子の有無、遺伝子別により異なるかを検証する。

上記細胞株におけるメバロン酸経路の活性、および V 9V 2T 細胞の活性化抗原の発現を評価する。メバロン酸経路の活性の評価には HMGCR、FDPS の mRNA および蛋白質の発現量をそれぞれ qRT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて比較する。V 9V 2T 細胞の活性化抗原の発現は、培養上清中および細胞内の IPP、および細胞表面の MICA、ICAM-1(CD56)、NKG2D リガンド (ULBP2 - 6) をそれぞれマスマスペクトロメトリー、フローサイトメトリー法を用いて評価する。またこれらの項目について、ゾレドロン酸処理前後での変化量・変化率をドライバー遺伝子別に評価する。

#### 4. 研究成果

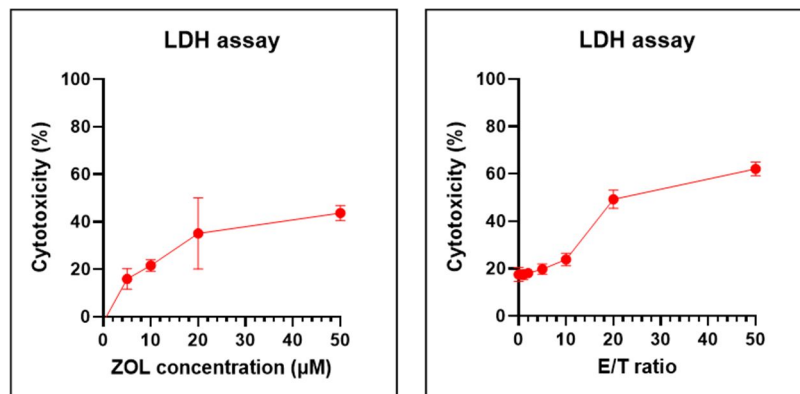
まず、IL-2 (day1-14) およびゾレドロン酸 : ZOL(day1) 刺激により in vitro で末梢血単核球から V 9V 2T 細胞を選択的に増幅し、増幅した V 9V 2T 細胞を、磁気ビーズを用いて回収した。末梢血単核球中の CD3 陽性細胞から V 9V 2T 細胞を約 10% 90%まで選択的に回収できることを確認した (図 1)。

図 1. ZOL+IL-2 による V 9V 2T 細胞の選択的増幅



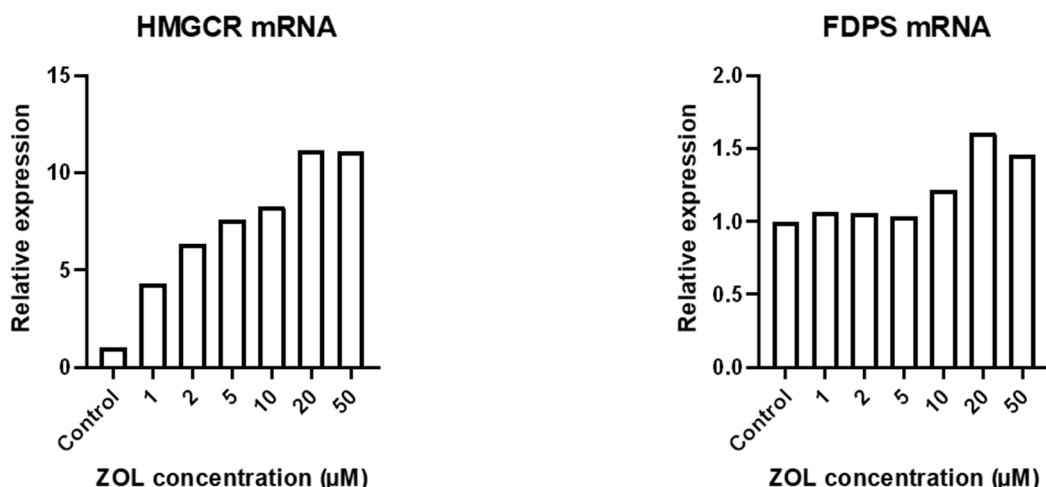
次に、増幅した V 9V 2T 細胞と EGFR 変異 (エクソン 19 欠失) 陽性細胞株 PC9 を ZOL 存在下で共培養し、V 9V 2T 細胞による細胞障害活性を評価した。V 9V 2T 細胞は ZOL 濃度依存的、またエフェクター/ターゲット細胞比 (effector/target ratio: E/T ratio) 依存的に細胞障害活性を示した (図 2)。

図 2. ZOL 濃度および E/T 比と V 9V 2T 細胞による細胞障害活性



次に、PC9 細胞に ZOL を添加することで、ZOL によるメバロン酸経路の酵素 (HMG-CoA レダクターゼ [HMGCR]、FPP 合成酵素 [FDPS]) の転写レベルへの影響を評価した。ZOL を 24 時間添加することで、濃度依存的に HMGCR の発現が上昇するのに対して、FDPS の発現は有意な変化を認めなかった (図 3)。

図 3. ZOL によるメバロン酸経路の酵素発現の変化



また ZOL 添加による V 9V 2T 細胞の細胞障害活性の亢進は、スタチンの添加によりキャンセルされた (図 4)。  
 既報とこれらの現象をまとめると、ZOL は FPP 合成酵素活性の阻害を介して、HMG-CoA の発現上昇をもたらす、細胞内に IPP 蓄積させ、V 9V 2T 細胞の活性化・細胞障害活性の亢進をもたらすことが示唆された (図 5)。

図 4. スタチンによる ZOL 誘導性 V 9V 2T 細胞障害活性の減弱

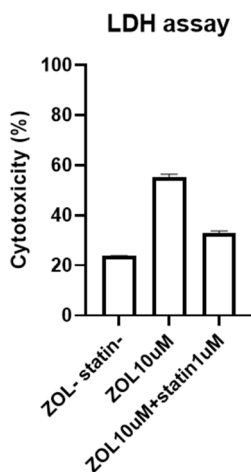
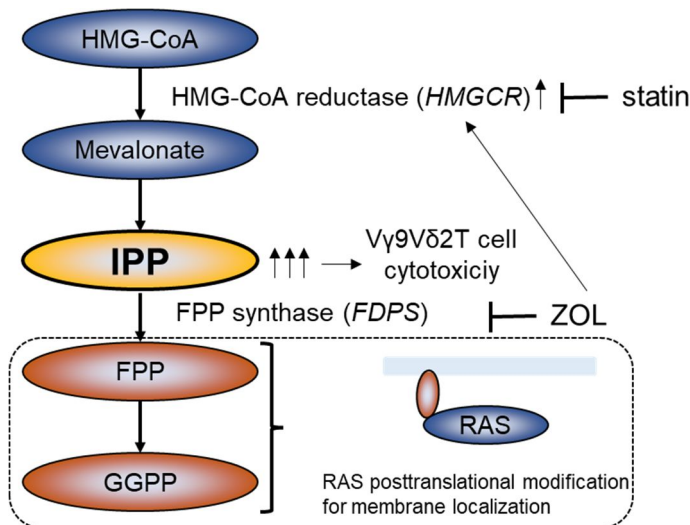
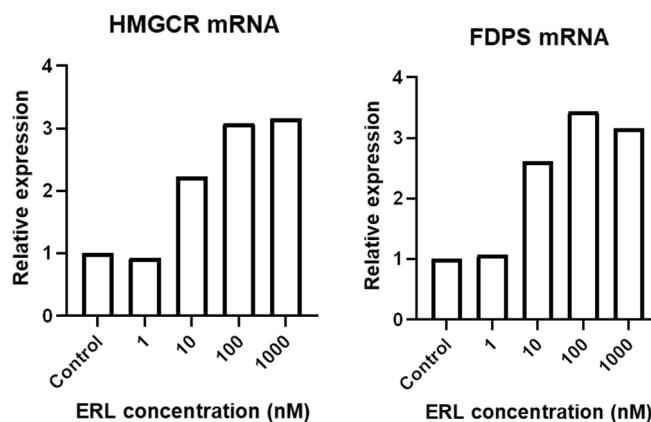


図 5. メバロン酸経路と ZOL、V 9V 2T 細胞



続いて、EGFR 経路がメバロン酸経路への影響を検証した。  
 PC9 細胞に EGFR キナーゼ阻害薬であるエルロチニブを添加すると、HMGCR、FDPS いずれも発現上昇を認めた (図 6)。

図 6EGFR 阻害剤によるメバロン酸経路の酵素発現の変化

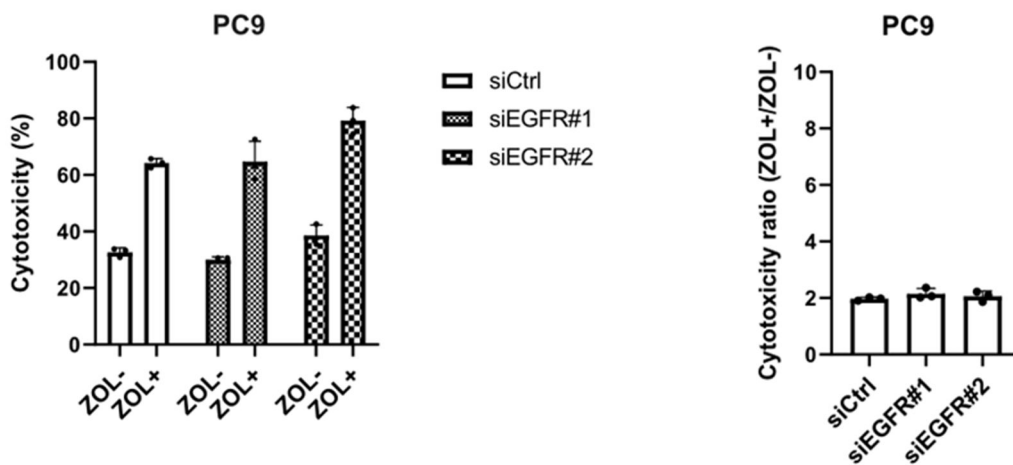


これは、EGFR シグナルの下流に RAS 蛋白が関与することから、EGFR シグナルが何らかの形でメバロン酸経路を活性化しているという当初の仮説に反する結果となった。一方で、EGFR 阻害薬がメバロン酸経路の酵素の発現を上昇させるのであれば、ZOL と併用することでより強力に IPP 蓄積および V 9V 2T 細胞の細胞障害活性を引き出すことができる可能性があると考えられ、さらに EGFR 阻害薬が、V 9V 2T 細胞による細胞障害活性へ与える影響を ZOL 添付の有無で評価した。

PC9 細胞を用いて、si-EGFR による EGFR ノックダウンを行い、V 9V 2T 細胞と共培養したのちに V 9V 2T 細胞による細胞障害活性を評価した。

EGFR ノックダウンを行った PC9 に対する V 9V 2T 細胞による細胞障害活性は、si-control と比較して変化はなく、ZOL による影響にも変化は認めなかった (図 7)。

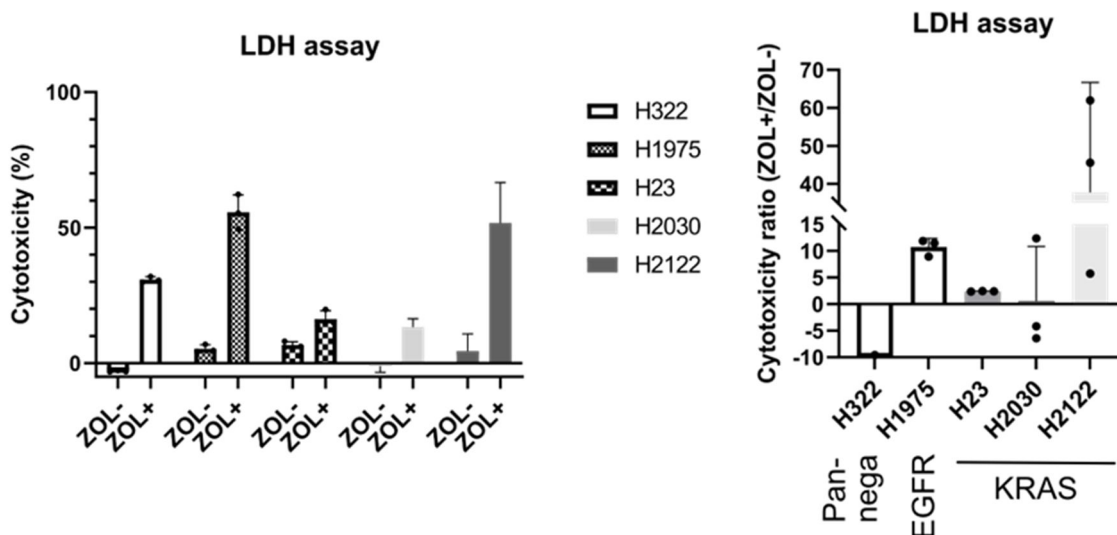
図 7. EGFR ノックダウンが与える V 9V 2T 細胞の細胞障害活性への影響



最後に、ZOL 添加による V 9V 2T 細胞による細胞障害活性の増強効果を異なる細胞株で比較検証した。細胞株はドライバー遺伝子陰性 (H322) EGFR 変異陽性 (H1975、PC9) KRAS 変異陽性 (H23、H2030、H2122) を使用した。

ZOL 添加による細胞障害活性の増強効果とドライバー遺伝子の明らかな関連は認めなかった。H2122 細胞では、ZOL 添加により細胞障害活性が約 40 倍まで亢進を認めたが、他の KRAS 変異陽性細胞株では ZOL 添加により細胞障害活性の亢進が認められないものもあり、一定の傾向は認めなかった (図 8)。

図 8. ドライバー遺伝子別の ZOL 添加による細胞障害活性の増強効果



結論：ZOL 添加による V 9V 2T 細胞障害活性の増強は、メバロン酸経路の FPP 合成酵素活性の阻害および HMGCR 発現上昇の結果による IPP 蓄積を介しており、EGFR 阻害剤も同様にメバロン酸経路の酵素 (HMGCR、FDPS) の発現レベル上昇を認めた。しかしながら、ZOL + EGFR 阻害薬は V 9V 2T 細胞障害活性の増強に関して相乗的な作用は示さず、ドライバー遺伝子の種類により一定の傾向は示さず、現時点では V 9V 2T 細胞を用いた免疫治療のバイオマーカーは同定できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------