

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591156

研究課題名(和文) 肺癌分子標的治療における新たな効果予測因子、治療ターゲットの探索

研究課題名(英文) Search of the effect predictive factor in molecules target therapy for lung cancer

## 研究代表者

吉澤 弘久 (YOSHIZAWA, Hirohisa)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：50282984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：感受性EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌患者でEGFR-TKIによる初回治療例を対象として、各種免疫学的パラメーターについて測定した。腫瘍退縮時にはCD4+CD25+Foxp3+Regulatory T細胞の末梢血中の出現頻度が低下する傾向を認めた。MDSCsの解析、各種液性因子では一定の傾向は認めなかった。本研究を推進中にEGFR-TKIに対する腫瘍の抵抗性獲得のメカニズムにCD4+CD25+Foxp3+Regulatory T細胞がかかわること、その背景にDDX3Xの関与を明らかとしてPLoS One, 2014, 9(10): p. e111019に報告した。

研究成果の概要(英文)：Several immunologic parameters in patients with positive EGFR-mutation NSCLC during initial EGFR-TKI treatment were measured. The tendency that decreased frequency in the peripheral blood of the CD4+CD25+Foxp3+Regulatory T cell during tumor regression was found. In contrast, analysis of MDSCs or various humoral factors showed no particular tendency. During the series of experiments, we found that DDX3X expression and CD4+CD25+Foxp3+Regulatory T cell affecting acquisition of resistancy to TKI.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Lung cancer EGFR-TKI MDSCs Predictive factor

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、EGFR-TKI に関しては感受性 EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌に対するゲフィチニブと標準化学療法と比較 相試験で、ゲフィチニブが著しく無増悪生存期間を延長させること、ゲフィチニブの使用のタイミングや投与量と予後の関連について報告した。化学療法による肺腫瘍量の減少時に末梢血中 regulatory T 細胞比率が大きく変化することや化学療法の宿主に与える免疫偏向について示している。

### 2. 研究の目的

日本人の非小細胞肺癌において、上皮成長因子受容体(EGFR) 遺伝子変異がある患者は変異のない患者よりも、チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)が極めて高い効果を示す。この急激な腫瘍量の変化、腫瘍破壊産物の腫瘍外放出により担癌宿主内の抗腫瘍免疫応答に発生する免疫学的変化は、従来の化学療法や手術療法とは大きく異なる。治療そのものが免疫学的に直接影響を与えないため、この研究ではこれまでに無い pure な系において、多くの免疫学的パラメータの個々の担癌宿主における経時的変化を精確に把握できる。また腫瘍量の減少時と腫瘍再増大時におきる変化を比較し、その差を明らかにすれば、腫瘍増大を促進する因子や抑制する因子に関する検討が可能となる。この研究では、各種細胞性免疫やサイトカインに加え、特に血中の Myeloid-derived suppressor cells(MDSCs)にも注目し、このダイナミックで特異的な免疫学的変化を詳細に解明、EGFR-TKI の効果予測因子や予後因子を新たな側面から検討し、さらには新たな抗体療法や免疫療法のターゲットを探索するのがこの研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1)感受性 EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌患者で EGFR-TKI による初回治療例を対象として、治療開始前、最大効果時、再増大時の3点において、以下の免疫学的パラメータについて末梢血を採血し測定する。各因子測定の変動等を考慮し、100例において解析する。

液性免疫(各種サイトカイン)、細胞性免疫、免疫担当細胞の解析、各種免疫担当細胞の機能解析、Myeloid-derived suppressor cells(MDSCs)の単離、機能解析。

(2)上記パラメータと各患者における臨床効果との比較検討

治療前後における各種パラメータの変動について、最大治療効果、無増悪生存期間、全生存期間と各種パラメータの相関 上記に関連する効果予測、予後予測因子の選択、免疫抑制性因子克服の戦略検討

### 4. 研究成果

感受性EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌患者でEGFR-TKIによる初回治療例を対象として、治療開始前、最大効果時、再増大時の3点において、免疫学的パラメータについて測定した。液性免疫:IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、VEGF、GM-CSF、TGF- $\beta$ についてELISAのアッセイ系の確立とvalidation、これまでに報告してきた方法での測定値安定性の確認、細胞性免疫:CD4+T細胞、CD8+T細胞、Regulatory T細胞(CD4+ CD25+ Foxp3+)、NK細胞、NKT細胞、T細胞比率をフローサイトメトリーにより検討するための抗体の選定と測定値安定性の確認を行った。In vitroにおける各種サイトカインにたいする反応性の検討や特にNKT細胞では  $\alpha$ -galactosyl-ceramide( GalCer)等に対する反応性や機能解析を検討した。本研究では感受性EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌患者でEGFR-TKIによる初回治療例を対象として、治療開始前、最大効果時、再増大時の3点において、免疫学的パラメータについて測定した。液性免疫:IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、VEGF、GM-CSF、TGF- $\beta$ についてELISAのアッセイ系での測定値安定性の確認、細胞性免疫:CD4+T細胞、CD8+T細胞、Regulatory T細胞(CD4+ CD25+ Foxp3+)、NK細胞、NKT細胞、T細胞比率をフローサイトメトリーで検討した。腫瘍退縮時にはCD4+ CD25+ Foxp3+Regulatory T細胞の末梢血中の出現頻度が低下する傾向を認めた。Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)の解析ではマグネチックビーズを用い、Gr<sup>1</sup>highLy<sup>6G</sup>+ Gr<sup>1</sup>dimLy<sup>6G</sup>-群、さらにGr<sup>1</sup>dimLy<sup>6G</sup>-細胞群はLy-6Cの発現によりGr<sup>1</sup>dimLy<sup>6G</sup>highLy<sup>6G</sup>-、Gr<sup>1</sup>dimLy<sup>6G</sup>lowLy<sup>6G</sup>-群に単離後、それぞれの細胞群のT細胞増殖能やRegulatory T細胞への影響を検討したが、一定の傾向は認めなかった。各種液性因子については一定の傾向を認めなかった。本研究を推進中にEGFR-TKIに対する腫瘍の抵抗性獲得のメカニズムCD4+CD25+Foxp3+Regulatory T細胞がかかわること、その背景にDDX3Xの関与を明らかにし、その背景にPLoS One, 2014. 9(10): p. e111019に報告した。

### 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9件)

Sugawara, S., Yoshizawa, H., et al., (12人中5番目)Randomized phase II study of concurrent versus sequential alternating gefitinib and chemotherapy in previously untreated non-small cell lung cancer with sensitive EGFR mutations: NEJ005/TCOG0902. Ann Oncol, 査読あり, 2015, In press.

Fukuhara, T., Yoshizawa, H., et al.,

(12人中6番目) Factors associated with a poor response to gefitinib in the NEJ002 study: Smoking and the L858R mutation. Lung Cancer, 査読あり, 88(2), 2015, p. 181-6.

Nozaki, K., Yoshizawa, H., et al., (10人中9番目) DDX3X induces primary EGFR-TKI resistance based on intratumor heterogeneity in lung cancer cells harboring EGFR-activating mutations. PLoS One, 査読あり, 9(10), 2014, p. e111019.

Koshio, J., Yoshizawa, H., et al., (10人中9番目) DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is an immunogenic target of cancer stem cells. Cancer Immunol Immunother, 査読あり, 62(10), 2013, p. 1619-28.

Ishikawa, D., Yoshizawa, H., et al., (10人中9番目) mTOR Inhibitors Control the Growth of EGFR Mutant Lung Cancer Even after Acquiring Resistance by HGF. PLoS one, 査読あり, 8(5), 2013, p. e62104 1-8.

Oizumi, S., Yoshizawa, H., et al., (12人中6番目) Quality of Life with Gefitinib in Patients with EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Quality of Life Analysis of North East Japan Study Group 002 Trial. Oncologist, 査読あり, 17(6), 2012, p. 863-70.

Inoue, A., Yoshizawa, H., et al., (12人中7番目) Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). Ann Oncol, 査読あり, 24(1), 2012, p. 54-9.

Ichikawa, K., Yoshizawa, H., et al., (10人中9番目) Epitope diversification driven by non-tumor epitope-specific Th1 and Th17 mediates potent antitumor reactivity. Vaccine, 査読あり, 30(43), 2012, p. 6190-7.

Baba, J., Yoshizawa, H., et al., (10人中8番目) Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. Blood, 査読あり,

120(12), 2012, p. 2417-27.

〔学会発表〕(計 3 件)

Nozaki K, Kagamu H, Yoshizawa H. et al. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked plays an oncogenic roles to induce cancer stem cell-like properties, 2012 ESMO Congress, 2012年9月28日、ウィーン、オーストリア

Watanabe S, Yoshizawa H. et al. Gefitinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) with minor EGFR mutations: A retrospective study from the North East Japan Study Group (NEJ), 2012 ESMO Congress, 2012年9月28日、ウィーン、オーストリア

Oizumi S, Yoshizawa H. et al. Randomized phase II study of concurrent gefitinib plus chemotherapy versus alteration of gefitinib and chemotherapy in previously untreated non small cell lung cancer with sensitive EGFR- mutations: NEJ 005/TCOG 0902, 2012 ESMO Congress, 2012年9月29日、ウィーン、オーストリア

〔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:  
出願年月日:  
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  
吉澤 弘久 (Yoshizawa, Hirohisa)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  
研究者番号：50282984

(2)研究分担者

渡部 聡 (Watanabe, Satoshi)  
新潟大学・医歯学総合病院・特任助教  
研究者番号：50529740

研究分担者

中田 光 (Nakata, Koh)  
新潟大学・医歯学総合病院・教授  
研究者番号：80207802

(3)連携研究者

なし