

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462189

研究課題名(和文) EGF family 受容体を介した非小細胞肺癌の自然・獲得免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) Immunescape from innate/adoptive antitumor immunity via EGF family receptor in non-small cell lung cancer

研究代表者

沖田 理貴 (Okita, Riki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90467762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGF受容体と腫瘍細胞の免疫逃避機構に関連して以下の知見を見出した。EGF受容体はPI3K-KTシグナル依存性にmiR20aを介してNK細胞活性化受容体NKG2DのリガンドであるMICA/Bの発現を制御し、非小細胞肺癌に対するNK細胞傷害活性に影響を及ぼす。MICA/B強発現は非小細胞肺癌手術例において、独立した予後両行予測因子である。悪性胸膜中皮腫細胞株において、EGFR/HER2チロシンキナーゼ阻害剤lapatinibはHER2発現量を増加させ、NK細胞共培養下に、抗HER2抗体薬による抗体依存性細胞傷害活性を増強させる。

研究成果の概要(英文)：We reported following findings. 1: EGFR/PI3K-AKT signaling regulates the expression of NKG2D ligands MICA/B via miR20a, resulted in enhanced NK cell-mediated cytotoxicity against non-small cell lung cancer cells. 2: Overexpression of MICA/B is independent improved prognostic factor for patients with non-small cell lung cancer. 3: EGFR/HER2 dual tyrosine kinase inhibitor lapatinib upregulates HER2, resulted in enhanced antibody dependent cellular cytotoxicity with NK cells in malignant mesothelioma cell lines.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：腫瘍免疫 非小細胞肺癌 悪性胸膜中皮腫 NK細胞 EGFR HER2 NKG2Dリガンド NK細胞傷害活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞の宿主免疫逃避機構

癌の進展、薬剤耐性の要因のひとつに腫瘍細胞の宿主免疫逃避機構がある。抗腫瘍免疫は大きく自然免疫と獲得免疫に分類され、前者ではNK細胞、後者では抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)がリンパ球における主な担い手である。NK細胞による腫瘍排除では、NK細胞活性化受容体NKG2DとNKG2Dリガンドとの結合による活性化シグナルとNK細胞不活化受容体KIRとそのリガンドMHC class Iとの結合によるNK細胞不活化シグナルとのバランスが重要とされ、これにより標的細胞を攻撃するか否かが決定される¹⁾。一方、抗原特異的CTLは癌特異的抗原を認識する際にMHC class I発現を必要とする。このように、腫瘍細胞には免疫細胞に認識される様々な分子が発現している。

(2) がん標的としてのEGF family 受容体

EGF family 受容体(EGFR, HER2, HER3, HER4)は腫瘍細胞特異的に発現し、その増殖、進展に関与することから、がん治療における標的分子として研究がすすめてきた。近年EGFR(非小細胞肺癌、大腸癌、頭頸部癌)、HER2(乳癌、胃癌)を標的とした治療薬が臨床応用され^{2, 3)}、HER3標的薬剤も臨床応用に向けて開発が進みつつある。しかし、EGF family 受容体を介したシグナルの、抗腫瘍免疫への影響については未解明な点が多い。

(3) 近年、HER2が細胞傷害性CTLによる獲得免疫からの逃避に関与することが国外のグループより報告され⁴⁾、EGFRシグナルと抗腫瘍免疫に関する研究が注目されつつある。応募者も前任地のカロリンスカ研究所で、HER2を強制発現させた乳癌、メラノーマ細胞株ではMHC class Iの発現が減弱し、抗原特異的CTLにより認識されにくくなる、すなわち獲得免疫から逃避することを、共同研究者として報告した⁵⁾。さらにHER2/HER3シグナルが乳癌細胞株においてNKG2DリガンドMICA/Bの発現を増加させる結果、NK細胞傷害活性を増強させること、つまりHER2/HER3シグナルが乳癌細胞の自然免疫からの逃避に関与することを示した⁶⁾。これらの知見より、EGFRシグナルは腫瘍細胞において免疫細胞に認識される各種分子の発現に関わると考えられ、EGF familyシグナルを介したNKG2Dリガンドをはじめとする各種免疫認識分子の発現機構の解明は、非小細胞肺癌におけるEGFR標的薬の耐性機序の解明やシグナル阻害剤による抗腫瘍免疫作用の増強へ応用できるのではないかと、この考えに至った。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌細胞がEGF family 受容体を介して、NK細胞活性化受容体NKG2DのリガンドとNK細胞不活化受容体KIRのリガンドかつ抗原特異的CTLによる抗原認識

に必要なMHC class I分子、双方の発現制御を行い、自然・獲得免疫の双方から巧妙に逃避する、との仮説を非小細胞肺癌細胞株及び臨床検体を用いて証明する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株におけるEGF familyシグナルのNKG2Dリガンド発現とNK細胞傷害活性に及ぼす影響の解析

EGFRシグナルの活性化/不活性化がNKG2Dリガンド発現に及ぼす影響：非小細胞肺癌細胞株をEGFRリガンドEGFあるいはEGFRシグナル阻害剤で処理し、MICA/B、ULBPといったNKG2DリガンドとMHC class I発現をフローサイトメトリー法により解析する。

EGFRシグナルがNK細胞による細胞傷害活性に与える影響の検討：非小細胞肺癌細胞株をEGF familyシグナル阻害剤で処理後、NK細胞と共培養し、NK細胞による細胞傷害活性をLDH放出試験と抗CD107a抗体を用いたフローサイトメトリー法で検討する。

(2) 肺癌臨床検体由来の腫瘍細胞を用いたNKG2Dリガンド発現解析

切除標本からの生きた腫瘍細胞の採取
非小細胞肺癌新鮮切除標本より組織片を採取し、単細胞化したうえで、各種EGF familyリガンドやシグナル阻害剤で処理する。フローサイトメトリー法によりEpCAM陽性分画を腫瘍細胞とし、この分画中のNKG2Dリガンドの発現を解析する。

採取した腫瘍細胞に対するNK細胞の細胞傷害活性の解析：腫瘍細胞を同一患者血液から分離したNK細胞と共培養し、NK細胞傷害活性を、抗CD107a抗体を用いたフローサイトメトリー法で解析する。

(3) 特異的CTLと腫瘍細胞との共培養によるCTLの細胞傷害活性の解析：抗原特異的CD8+T細胞を用いてHLAの一致する患者由来腫瘍細胞あるいは癌細胞株との共培養による細胞傷害活性の評価に用いる。

(4) 肺癌切除標本を用いた、免疫組織化学的反応検査を用いたNKG2Dリガンド発現と臨床病理学的因子との関連性の解析

肺切除を受けた非小細胞肺癌症例の組織標本を用いて、免疫組織学的反応により、腫瘍発現MICA/B、ULBP発現を評価する。

(5) 臨床情報(癌の進行度、無再発生存期間、全生存期間、等)との関連性の評価

実験(1)-(4)で得られた結果間、ならびに臨床情報との関連性の評価を行う。

(倫理面への配慮)

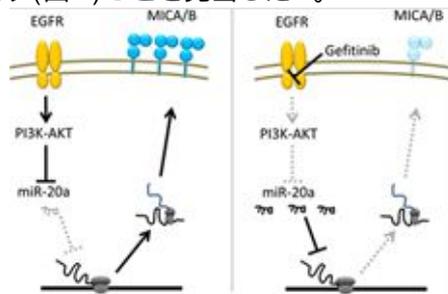
臨床検体(肺組織、末梢血)の使用については川崎医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺癌細胞株においてEGFRチロシンキナーゼ阻害剤によるEGFRシグナル阻害はNKG2Dリガンド発現量を減らし、NK細胞

胞傷害活性をも減弱させる

細胞株を用いた検討では、EGFR チロシンキナーゼにより NKG2D リガンドの発現が低下することが明らかになり、詳細な検討から、EGFR/PI3K-AKT/miR-20a 経路が NKG2D リガンド発現を制御し、NK 細胞傷害活性に影響を及ぼす(図 1)ことを見出した⁷⁾。



Okita R, et al. PLoS One 2015.

図 1. NKG2D リガンド発現制御メカニズム

(2) 肺癌臨床検体由来の腫瘍細胞を用いた NKG2D リガンド発現解析

(3) 特異的 CTL と腫瘍細胞との共培養による CTL の細胞傷害活性の解析

(2)(3)の実験系では、いずれも非小細胞肺癌新鮮切除標本より組織片を採取し、単細胞化したうえで、各種 EGF family リガンドやシグナル阻害剤で処理する計画であった。しかし、標本摘出からの生きた腫瘍細胞の採取を 8 例に試みたが、いずれも単細胞化させるために組織をメスで細かく刻む過程での物理的ストレスや単細胞化のためのトリプシン-EDTA、あるいは回収率改善を目指して EDTA 単剤に使用薬剤を変更してはみたものの、結合繊維溶解に必要な処理過程での化学的ストレスが細胞の活性を非常に弱めてしまい、機能解析に必要なだけの活性が保たれた腫瘍細胞を必要数確保することが困難を極め、実験(2)、(3)については不成功に終わった。代替法として、癌性胸水の採取を試みたが、これも機能解析に必要な細胞数の確保が困難であり、機能解析に使用できたのは悪性胸膜中皮腫の 1 例のみであった。よって、臨床検体については、ホルマリン切片での評価を行うこととした。

(4) 患者手術検体(ホルマリン切片)を用いた免疫組織化学反応検査による NKG2D リガンド発現についての検討

これまでに NKG2D リガンド(MICA/B、ULBP-2/5/6)について非小細胞肺癌切除例 91 例の組織検体を用いて、免疫組織化学反応検査でそれぞれの発現を評価した。それぞれ強陽性率は、MICA/B 31%、ULBP-2/5/6 46%であった。予後との関連性については、術後無再発生存期間において、MICA/B 強発現は予後良好予測因子であった($p=0.037$, log-rank test)が、ULBP-2/5/6 については発現の強弱で予後に差は認められなかった。また、非小細胞肺癌においてシスプラチンはキードラッグであるが、非小細胞肺癌細胞株を用いた検討で、MICA/B の発現がシスプラチンにより

増え、NK 細胞傷害活性が増強することを、細胞株を用いて明らかにした⁸⁾。

(5) 悪性胸膜中皮腫細胞株における EGFR/HER2 阻害剤の抗 HER2 抗体依存性細胞傷害活性増強効果

EGFR,HER2 を阻害する実験の過程で、EGFR/HER2 dual チロシンキナーゼ lapatinib が HER2 発現を増強させることを見出した。この現象を応用し、抗 HER2 抗体製剤の効果増強がおきることを確認、この効果が他の EGFR チロシンキナーゼ Gefitinib や Afatinib では認められないことも確認し、報告した⁹⁾。

以上、本研究課題において、EGF family 受容体を標的とした薬剤は抗腫瘍免疫に様々な仕組みで影響を与えることが明らかとなった。今後も非小細胞肺癌の EGF family 受容体を含む各種細胞内シグナルを介した免疫逃避機構の解明を進め、再発・進行非小細胞肺癌に対する治療耐性克服や新規癌免疫療法の開発を目指す。

<引用文献>

Ljunggren HG, et al Nat Rev Immunol 2007.

Mitsudomi T, et al. Lancet Oncol 2010.

Slamon DJ, et al. N Engl J Med 2001.

Herrmann F, et al. Cancer Res 2004.

Mimura K, et al. Int J Cancer 2011.

Okita R, et al. J Immunol 2012.

Okita R, et al. PlosOne 2015.

Okita R, et al. Cancer Immunol Immunother 2016.

Okita R, et al. Oncol Rep 2015.

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 3 件)

Okita R, Yukawa T, Nojima Y, Maeda A, Saisho S, Shimizu K, Nakata M. MHC class I chain-related molecule A and B expression is upregulated by cisplatin and associated with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Immunol Immunother 65: 499-509, 2016. (査読: 有)

doi: 10.1007/s00262-016-1814-9

Okita R, Wolf D, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Saisho S, Shimizu K, Yamaguchi Y, Oka M, Nakayama E, Lundqvist A, Kiessling R, Seliger B, Nakata M. Contrasting effects of the cytotoxic anticancer drug gemcitabine and the EGFR

tyrosine kinase inhibitor gefitinib on NK cell-mediated cytotoxicity via regulation of NKG2D ligand in non-small cell lung cancer cells. PLoS One 10 e0139809, 2015. (査読：有)

doi:10.1371/journal.pone.0139809.

Okita R, Shimizu K, Nojima Y, Yukawa T, Maeda A, Saisho S, Nakata M. Lapatinib enhances trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity via upregulation of HER2 in malignant mesothelioma cells. Oncol Rep 34: 2864-70, 2015. (査読：有)

doi: 10.3892/or.2015.4314

〔学会発表〕(計 9 件)

沖田 理貴、他、非小細胞肺癌切除例における NKG2D リガンド MICA/B, ULBP2/5/6 発現と臨床病理学的因子との関連性の検討、第 116 回日本外科学会学術集会、2016.4.16, 大阪府大阪市、リーガロイヤルホテル大阪。

Okita R, et al. Overexpression of NK cell-activating ligand MICA/B correlates with superior outcomes and might be a therapeutic target for chem-immunotherapy in non-small-cell lung cancer. ESMO ASIA 2015, 2015.12.19, Singapore (Singapore).

Okita R, et al. Lapatinib enhances trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by upregulating HER2 in malignant pleural mesothelioma cells. ESMO 2015, 2015.9.28, Vienna (Austria).

沖田理貴、他。Cytotoxic drugs and EGFR tyrosine kinase inhibitor effect on NK cell cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cells. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2014.7.18, 福岡県福岡市、福岡国際センター。

Okita R, et al. EGFR signaling effects on NK cell-mediated cytotoxicity via NKG2D ligands-NKG2D interaction in non-small cell lung cancer cells. 15th World conference on lung cancer, 2013.10.30, Sydney (Australia).

他、4 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者、研究分担者所属施設:

川崎医科大学呼吸器外科学

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/gts/index.html>

研究協力者所属施設:

カロリンスカ研究所 Rolf Kiessling ラボ

<http://ki.se/en/onkpat/rolf-kiesslings-group>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 理貴 (OKITA Riki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90467762

(2) 研究分担者

中田 昌男 (NAKATA Masao)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30368641

(3) 連携研究者

なし

研究協力者

Kiessling Rolf

カロリンスカ研究所・教授