

令和元年6月10日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18388

研究課題名(和文)がん関連シグナル・ゲノム異常ががん免疫に与える影響の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Gene alterations and anti-tumor immunity

研究代表者

富樫 庸介 (Togashi, Yosuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：80758326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異癌は免疫療法の効果が低いことが知られている。そこで臨床検体を解析したところEGFR野生型肺癌でCD8陽性T細胞の浸潤が多い傾向にあったが、EGFR遺伝子変異肺癌ではCD8陽性T細胞の浸潤が少ないにも関わらず、制御性T細胞(Treg)浸潤が多かった。細胞株とマウスの検証ではEGFRシグナルによりこの免疫状態が作られ、EGFR阻害剤を使用することで免疫状態が改善し抗PD-1抗体の効果が増強された。さらに胃癌のコホートでTreg浸潤に関わる因子を探索したところ、特徴的なSignatureを見出し現在検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの遺伝子異常、特に従来は細胞の増殖や生存に深く関わりとされてきたようなドライバー遺伝子異常が、積極的にがんの周囲の免疫状態をコントロールして、がんにとって有利な環境を作り出していることが明らかとなった。これらの遺伝子異常を標的にするような薬剤とがん免疫療法を併用することで、今までは効果があまりなかった症例に対しても効果を発揮できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated immunological phenotypes in tumor microenvironment (TME) of EGFR-mutated lung adenocarcinomas, to which cancer immunotherapy is largely ineffective. While EGFR-mutated lung adenocarcinomas had non-inflamed tumor microenvironment, CD4+ effector regulatory T cells (Tregs), that are highly infiltrated. The EGFR signal plays an important role in this unique tumor microenvironment and an EGFR signal inhibitor improved the immune status, and combination with immunotherapy provided better anti-tumor effects compared with either of single treatment. Furthermore, we investigated gene signature related to Treg-infiltration, showing a specific gene signature. We further analyze this relationship.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん免疫 ゲノム異常 非小細胞肺癌 体細胞変異数 EGFR遺伝子変異 胃癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1/PD-L1 抗体を中心としたがん免疫療法はメラノーマや非小細胞肺癌に対して有効性が証明されたが、無効な症例も存在し、重篤な副作用もあり、かつ高額な薬でもあるため、効果予測バイオマーカーやより効果を高める治療法の開発が急務となっている。バイオマーカー候補として PD-L1 の発現、浸潤 T 細胞、腫瘍の体細胞変異数などが報告されているが一定の見解は得られていない。

腫瘍ゲノムが免疫に与える影響としてはアミノ酸置換を伴うような体細胞変異が注目されている。即ちアミノ酸置換を伴う変異は非自己として認識され免疫反応を誘導しやすいとされており（ネオ抗原）、実際に体細胞変異数と T 細胞関連遺伝子の発現との相関も報告されている。非小細胞肺癌の TCGA のデータベース解析では免疫療法の効果が低いとされる EGFR 遺伝子変異症例では体細胞変異数が明らかに少なかったが、一方で体細胞変異数が多くても T 細胞関連遺伝子の発現が低い症例も存在した。過去の報告でメラノーマに対するがん免疫療法耐性に  $\beta$  カテニンシグナルが関わるということが報告されており、EGFR 遺伝子変異と  $\beta$  カテニンの関係を過去に報告しているが、TCGA のデータを用いてメラノーマ同様の傾向が存在するかを検証したが、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌では同様の傾向は見られなかった。

## 2. 研究の目的

EGFR を含めたがん関連シグナル・ゲノム異常ががん免疫に与える影響を解明し、がん免疫療法の有効性の向上や効果予測バイオマーカー同定を目指して本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

生きた腫瘍浸潤リンパ球の免疫チェックポイント分子なども含む免疫学的表現型をマルチカラー flow-cytometry や CyTOF を用いて詳細に解析し EGFR 遺伝子変異を含む遺伝子異常や体細胞変異数との関係を明らかにした。得られたデータについては細胞株やマウスといった実験系でも検証した。

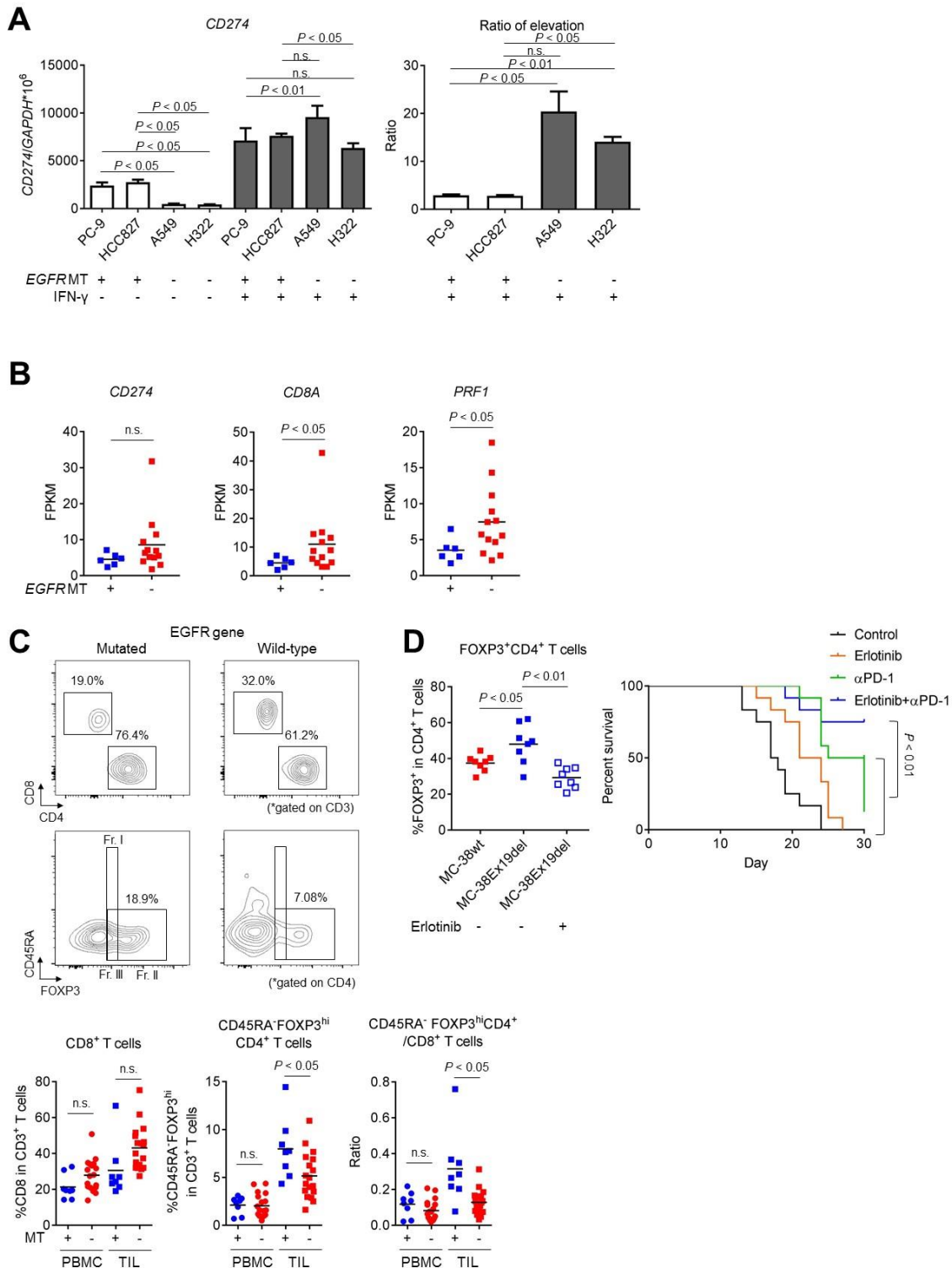
## 4. 研究成果

過去の報告では EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞株では PD-L1 の発現が高いことが指摘されているが (Azuma K, et al. Ann Oncol 2014, Chen N, et al. J Thorac Oncol 2015)、臨床的に抗 PD-1/PD-L1 抗体の効果は低いことが報告されている (Gainor JF, et al. Clin Cancer Res 2016)。この矛盾に関して、EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞株と野生型細胞株とで比較したところ、確かに PD-L1 の発現は過去の報告同様に変異株で高い傾向にあったが、腫瘍局所の免疫環境に重要な IFN- $\gamma$  で刺激したところ、初期の 50 倍程度まで上昇し、無刺激の状態での差は打ち消され、むしろ上昇率については野生型株のほうが有意に高かった (図 1A)。我々の臨床検体の検討でも肺癌の遺伝子発現解析では EGFR 遺伝子変異をもつ肺腺癌は野生型の肺腺癌に比較して CD8A や PRF1 といった免疫応答に関わる遺伝子発現が低い傾向にあった (図 1B)。公共データベースである TCGA でも同じ傾向が観察された。

一方で TIL の解析では EGFR 野生型肺癌で CD8 陽性 T 細胞の浸潤が多い傾向にあったが、EGFR 遺伝子変異肺癌の TIL 解析では CD8 陽性 T 細胞の浸潤が少ないにも関わらず、制御性 T 細胞 (Treg) 浸潤が多く腫瘍そのものが引き寄せるような Treg 浸潤の存在が考えられた (図 1C)。そこで細胞株を用いて EGFR シグナルによるケモカインの変化をマイクロアレイで解析したところ、EGFR シグナルにより Treg を引き寄せるケモカインである CCL22 が上昇することを見出した。逆に CD8 陽性 T 細胞を引き寄せる CXCL10 が EGFR シグナルにより低下していた。これら

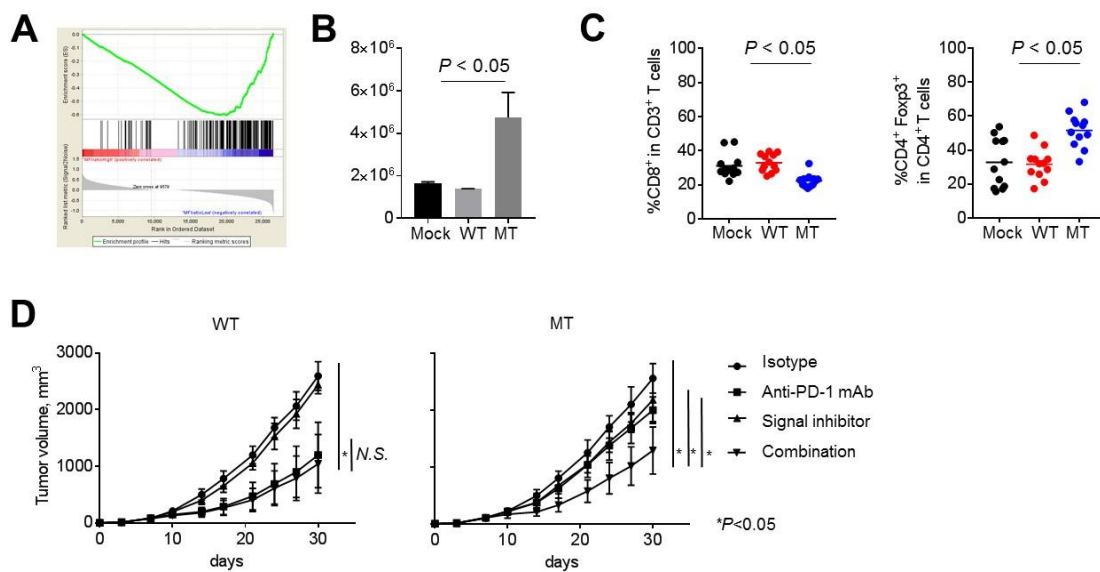
に関わる転写因子として cJun/AP-1 が EGFR シグナルで上昇することで CCL22 が上昇しており、逆に IRF-1 が EGFR シグナルで抑制されることで CXCL10 が低下することを明らかにした。IRF-1 は PD-L1 の上昇にも重要な転写因子であり (Garcia-Diaz A, et al. Cell Rep 2017)、EGFR シグナルで抑制されることは、前述の PD-L1 の上昇率が変異型細胞株で低いことと矛盾しない結果であった。さらにマウスの細胞株でも EGFR 遺伝子変異を導入して解析したところ、遺伝子変異導入株では Treg が有意に浸潤しており、EGFR 阻害剤を使用することで Treg 浸潤が減少し、抗 PD-1 抗体の効果が増強された (図 1D)。これらは実臨床でも EGFR 遺伝子変異を有する肺癌では抗 PD-1/PD-L1 抗体の感受性が低いことと矛盾しない結果であり、EGFR 阻害剤による治療の可能性が見出された。

図 1



さらに胃癌のコホートを用いて TIL のデータと遺伝子発現解析データを用いて、GSEA といった解析手法で Treg 浸潤に関わる因子を探したところ、特徴的な Signature を見出している (図 2A)。みつかった Signature に関わるような胃癌の代表的な遺伝子異常を胃癌細胞株に強制発現しマイクロアレイ解析を行ったところ、代謝に関わる遺伝子発現の変化を同定した (図 2B)。そこで、遺伝子異常に伴うような代謝産物の変化が Treg 浸潤・活性化に与える影響を探索する目的で、マウスの細胞株でも同様に強制発現し、腫瘍組織での代謝産物の濃度や Treg の浸潤を解析したところ、強制発現株では CD8 陽性 T 細胞の浸潤が減少し、さらに代謝産物に伴い Treg 浸潤も増加していた (図 2C)。この強制発現した細胞株は in vivo で抗 PD-1 抗体耐性であったが、代謝産物に関わるシグナルを阻害することで耐性を解除することもできた (図 2D)。現在この遺伝子異常と代謝産物の関係を解析中である。

図 2



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Tanegashima T, Togashi Y (corresponding author), Azuma K, Kawahara A, Ideguchi Ko, Sugiyama D, Kinoshita F, Akiba J, Kashiwagi E, Takeuchi A, Irie T, Tatsugami K, Hoshino T, Eto M, Nishikawa H. Immune suppression by PD-L2 against spontaneous and treatment-related antitumor immunity. **Clin Cancer Res** in press.
2. Kamada T, Togashi Y (equally contribution), Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, Sato E, Fukuoka S, Tada Y, Tanaka A, Kawazoe A, Kinoshita T, Shitara K, Sakaguchi S, Nishikawa H. : PD-1<sup>+</sup> regulatory T cells are activated by PD-1 blockade and contribute to hyperprogression of cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 11: 9999-1009, 2019.
3. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Treg cells in cancer immunosuppression - Implications for anticancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol** 16: 356-371, 2019.
4. Inozume T, Yaguchi T, Ariyasu R, Togashi Y, Ohnuma T, Honobe A, Nishikawa H, Kawakami Y, Kawamura T. Analysis of the tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes in a metastatic melanoma lesion that lost MHC class I expression after anti-PD-1 therapy. **J Invest Dermatol** in press
5. Watanabe S, Hayashi H, Haratani K, Shimizu S, Tanizaki J, Sakai K, Kawakami H, Yonesaka K, Tsurutani J, Togashi Y, Nishio K, Ito A, Nakagawa K. Mutational

activation of the EGFR down-regulates MHC class I expression via the ERK in non-small cell lung cancer. **Cancer Sci** 110: 52-60, 2019

6. Tada Y, Togashi Y (equally contribution), Kotani D, Kuwata T, Sato E, Kawazoe A, Doi T, Wada H, Nishikawa H, Shitara K. Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/ activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. **J Immunother Cancer** 6: 106, 2018.
7. Kawazoe A, Shitara K, Kuboki Y, Bando H, Kojima T, Yoshino T, Ohtsu A, Ochiai A, Togashi Y, Nishikawa H, Doi T, Kuwata T. Clinicopathological features of 22C3 PD-L1 expression with mismatch repair, Epstein-Barr virus status, and cancer genome alterations in metastatic gastric cancer. **Gastric Cancer** 22: 69-76, 2019.
8. Togashi Y and Nishikawa H. Suppression from beyond the grave. **Nat Immunol** 18: 1285-6, 2017.
9. Togashi Y and Nishikawa H. Regulatory T cells: molecular and cellular basis for immunoregulation. **Curr Top Microbiol Immunol** 410: 3-27, 2017.
10. Banno E, Togashi Y, de Velasco MA, Mizukami T, Nakamura Y, Terashima M, Sakai K, Fujita Y, Kamata K, Kitano M, Kudo M, Nishio K. Clinical significance of Akt2 in advanced pancreatic cancer treated with erlotinib. **Int J Oncol.** 50: 2049-58, 2017.
11. Haratani K, Hayashi H, Tanaka T, Kaneda H, Togashi Y, Sakai K, Hayashi K, Tomida S, Chiba Y, Yonesaka K, Nonagase Y, Takahama T, Tanizaki J, Tanaka K, Yoshida T, Tanimura K, Takeda M, Yoshioka H, Ishida T, Mitsudomi T, Nishio K, Nakagawa K. Tumor Immune Microenvironment and Nivolumab Efficacy in *EGFR4* Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Based on T790M Status after Disease Progression During EGFR-TKI Treatment. **Ann Oncol** 28: 1532-9, 2017.
12. Chiba M, Togashi Y, Bannno E, Kobayashi Y, Nakamura Y, Hayashi H, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Mitsudomi T, Nishio K. Efficacy of irreversible EGFR-TKIs for the uncommon secondary resistant EGFR mutations L747S, D761Y, and T854A. **BMC Cancer** 17: 281, 2017.
13. Kobayashi Y, Azuma K, Nagai H, Kim YH, Togashi Y, Sesumi Y, Chiba M, Shimoji M, Sato K, Tomizawa K, Takemoto T, Nishio K, Mitsudomi T. Characterization of EGFR T790M, L792F, and C797S mutations as mechanisms of acquired resistance to afatinib in lung cancer. **Mol Cancer Ther** 16: 357-364, 2017.

[学会発表] (計 10 件)

1. Kumagai S, Togashi Y, Shitara K, Kinoshita T, Tsuchihara K, Nishikawa H. The association of genomic features and immunosuppression in gastric cancer. **AACR Annual Meeting 2019.**
2. Kamada T, Togashi Y, Ohue Y, Nishikawa H. The secondary immune selection is the dominant mechanism for acquired resistance against adoptive cell therapy. **AACR Annual Meeting 2019.**
3. Togashi Y. Translational Research for Predictive Biomarkers in Cancer Immunotherapy. **第 77 回日本癌学会学術総会 2018.**
4. Togashi Y. Translational research of cancer immunology in gastric cancer. **第 90 回胃癌学会総会 2018.**
5. Togashi Y. Innate control of antitumor immunity by cancer cells. **The 33th Nagoya International Cancer Treatment Symposium 2018.**
6. Togashi Y. Control of immune suppressive cells for effective cancer therapy. **24<sup>th</sup> Asian Pacific Cancer Conference 2017.**

7. Tsuge A, **Togashi Y**, Nishikawa H. Immunotherapy targeting effector Treg cells via heat shock protein 90. **第 47 回日本免疫学会学術集会 2018.**
8. **Togashi Y**, Kamada T, Sasaki A, Nakamura Y, Fukuoka S, Tada Y, Kawazoe A, Shitara K, Nishikawa H. Clinicopathological, Genomic and Immunological Features of Hyperprogressive Disease during PD-1 blockade in Gastric Cancer Patients. **ASCO Annual Meeting 2018.**
9. **Togashi Y**, Kotani D, Tada Y, Kawazoe A, Doi T, Nishikawa H, Shitara K. Immunological Impact of Ramucirumab on Tumor Microenvironment in Advanced Gastric Cancer. **ASCO-SITC 2018.**
10. Bannno E, **Togashi Y**, Nakamura Y, Chiba M, Kobayashi Y, Hayashi H, Tanizaki J, Terashima M, Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Mitsudomi T, Nishio K. Sensitivities to various EGFR-TKIs of uncommon EGFR mutations L861Q and S768I: What is the optimal EGFR-TKI ? **第 77 回日本癌学会学術総会 2017.**

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：免疫チェックポイント阻害剤効果判定バイオマーカー

発明者：西川博嘉、富樫庸介、大山行也、吉田隆雄、竹田和彦、幸田健一

権利者：国立がん研究センター、小野薬品工業株式会社

種類：方法の発明

番号：2018-189370

出願年：平成 30 年 5 月 31 日

国内外の別： 国内外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：坪井正博

ローマ字氏名：Tsuboi Masahiro

研究協力者氏名：設楽紘平

ローマ字氏名：Shitara Kohei

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。