

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16126

研究課題名（和文）ドライバー遺伝子変異陽性肺癌に抗腫瘍免疫を惹起する新たな癌免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy against driver-oncogene-positive lung cancer

研究代表者

堀尾 大介（Horio, Daisuke）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40815635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌に対する小分子阻害薬は高い奏効率期待できるが、drug-tolerant persisters（DTPs）と呼ばれる細胞集団が存在し、必ず再増悪する。一方、DTPsは少数のため、これに対し抗腫瘍免疫を惹起できれば、「根治」も可能と考える。ドライバー癌遺伝子陽性肺癌細胞において、チロシンキナーゼ阻害薬が免疫チェックポイント分子Galectin-9の発現が強く誘導する事を見出した。ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌では、癌抗原の少なさから、獲得免疫が働きにくい、Galectin-9の制御で自然免疫による抗腫瘍免疫が活性化し、DTPsを根絶できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在actionable driver oncogeneとして肺癌においては、9種類が報告されている。本研究では特に頻度の高いEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌とALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌を念頭に実験を行ったが、これらの症例は肺癌の60%を占める肺腺癌の半数以上を占め、肺癌全体の治療成績の向上のためにはこれらの症例の予後のさらなる改善は不可欠である。

特異的小分子阻害薬は極めて有効だが、根治する事は不可能で、一旦薬剤が奏功していても転移再発は不可避である。本研究で自然免疫系を利用した抗腫瘍免疫を誘導できれば、小分子阻害薬の持続的な効果延長が期待でき、予後の改善に繋がると期待される。

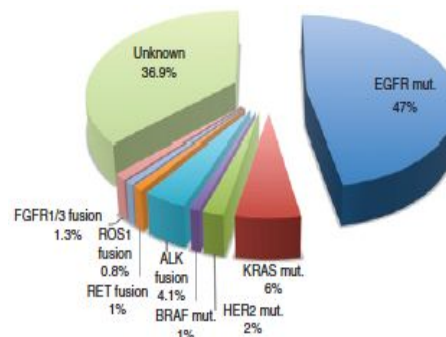
研究成果の概要（英文）：Small molecule inhibitors against driver-oncogene positive-lung cancer are expected to exert dramatic antitumor effect. However, a few cells called drug-tolerant persisters (DTPs) are intrinsically resistant to them and develop recurrence. In contrast to the difficulty of elimination of these DTPs, they are numerically small. Therefore, once effective antitumor immunity can be induced to them, radical cure of the driver-oncogene positive-lung cancer would be possible. We found that specific tyrosine kinase inhibitor strongly induced the expression of Galectin-9, one of immune checkpoint molecules, in lung cancer cells. Although adaptive immunity is said to be less effective due to the lack of neoantigens in driver-oncogene positive-lung cancer, activation of innate immunity by regulating Galectin-9 is a promising way to cure by eliminating DTPs.

研究分野：難治性胸部悪性腫瘍

キーワード：ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌 小分子阻害薬 免疫チェックポイント分子 Drug tolerant persisters

1. 研究開始当初の背景

現在の肺癌診療において小分子阻害剤の標的となるドライバー遺伝子変異には、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子、ROS-1 融合遺伝子、BRAF 遺伝子変異、MET 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異、HER2 遺伝子変異、NTRK1 遺伝子変異、RET 遺伝子変異がある。特に EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌 (EGFR mutation positive non-small cell lung cancer: EGFR M+ NSCLC) 症例は肺癌の 60% を占める肺腺癌の約半数を占め (図 1, Wang R et al. Clin Cancer Res. 2014.) 肺癌全体の治療成績の向上のためにもこれらの症例の予後のさらなる改善は不可欠である。EGFR M+



NSCLC に対する EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) は、第 3 世代までの EGFR-TKI が使用可能で、高い奏効率を示すが、平均約 1~1.5 年の経過で耐性化し再発してしまう。再発時は主に細胞障害性抗癌剤が 2 次治療以降に用いられ、ICI として実臨床で汎用されている抗 Programmed cell death-1 (PD-1) 抗体については、少なくとも単剤では有用性が示されていない (Borghaei H et al. N Engl J Med. 2015.)。一方で、ICI の治療効果予測の biomarker とされる PD-ligand 1 (PD-L1) の発現は EGFR シグナルに依存し (Akbay EA et al. Cancer Discov. 2013.) EGFR M+ NSCLC 症例でも PD-L1 発現の高い症例は確かに存在する (Azuma K et al. Ann Oncol. 2014.)。この事は、PD-L1 の発現のみでは EGFR M+ NSCLC 症例における ICI の効果を予測できない事を示唆している。癌変異抗原 (Neoantigen) の代替マーカーとされる腫瘍遺伝子変異量 (Tumor mutation burden: TMB) が EGFR M+ NSCLC では低い事が示唆されており (Offin M et al. Clin Cancer Res. 2019.) ICI の効果が発揮されにくい理由の一つと考えられる。放射線治療は TMB レベルの増加を惹起し、ICI の効果を改善する可能性があるが (Formenti SC et al. Nat Med. 2018.) 特に EGFR-TKI 使用前後での胸部への放射線照射は重篤な肺臓炎のリスクがあり、安易には行えない。

ドライバー遺伝子変異陽性肺癌症例においては、小分子阻害剤に抵抗性を示し再発する事を前提に考える必要がある。

2. 研究の目的

ドライバー遺伝子変異・転座陽性の肺癌に対しては、その特異的阻害薬が極めて有効であるが、一旦奏効しても完全寛解に到ることはなく、一部に drug-tolerant persisters (DTPs) と呼ばれる細胞集団が存在し (図 2, Mikubo M et al. J Thorac Oncol. 2021.) やがては必ず再増殖する。しかしながら、これらの DTPs は数的には少数であるため、仮にこれら DTPs に対する有効な抗腫瘍免疫を惹起できるのであれば、「根治」を目指す事も可能と考える。

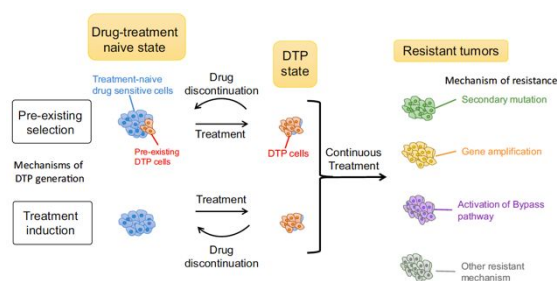


図 2 薬剤抵抗性を示す DTPs

本研究の目的はドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌の DTPs に対し抗腫瘍免疫を誘導し、治癒を目指すと共に、小分子阻害薬の効果持続期間を延長させるのが目的である。

3. 研究の方法

➤ 材料

(1) 細胞

ヒト EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞 HCC827, PC-9, ヒト ALK 融合遺伝子変異陽性細胞 H2228, H3122 については、ATCC より購入し、いずれも 10%胎児牛血清を含む RPMI11640 培地を用いて、5% CO₂, 37°C に設定したインキュベーター内で培養維持した。

(2) 試薬および抗体

抗ヒト Galectin-9 抗体、抗 phospho YAP (Ser127) 抗体は Cell Signaling Technology (CST) 社より、抗 YAP/TAZ 抗体は Santa Cruz 社より、in vitro で使用した Osimertinib および Alectinib はいずれも Selleckchem 社より購入した。

➤ 方法

(1) 細胞増殖 assay

HCC827, PC-9, H2228, H3122 細胞を 96 穴プレートの各 well に 5000 個ずつ播種し、0~10μM の各濃度に調整した Osimertinib および Alectinib に 72 時間曝露した後、Cell counting Kit-8 で生細胞を発色させ、その吸光度を測定し定量化した。

(2) Quantitative real-time PCR

Total RNA Miniprep Kit (NEW ENGLAND Biolabs 社) を用いて、培養細胞より Total RNA

を抽出し、SYBR Green (Applied Biosystems 社) を用いて、定量的 PCR 法で、mRNA の発現を比較した。

(3) CRISPR/Cas9 による knockout (KO) 細胞の樹立

sgRNA を含む Lentivirus plasmid を大腸菌に導入し、Ampicillin 存在下に培養し、plasmid を精製抽出した。この plasmid を HEK293 細胞に導入し、培養上清中の Lentivirus を回収し、これを H827 細胞に感染させ、目的遺伝子 (本研究では YAP) の KO を行った。

4. 研究成果

< 結果 >

(1) ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌細胞においては DTPs が存在する。

申請者はまず EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞および ALK 融合遺伝子陽性を、それぞれに特異的な阻害薬 Osimertinib と Alectinib に 72 時間暴露した。結果、どれ程高濃度の薬剤に暴露しても 10% 程度の細胞は必ず薬剤に抵抗性で生存する事が分かった (図 3)。実臨床において、これら薬剤抵抗性の DTPs が必ず転移再発してしまう為、これらを除く事が、長期的な治療成績に関与すると考えられた。

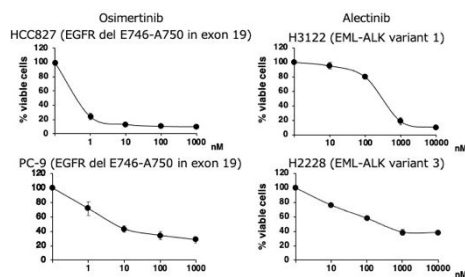


図 3 DTPs は TKI に抵抗性を示す

(2) 特異的 Tyrosine kinase inhibitor (TKI) は Galectin-9 の発現を誘導する。

次に、DTPs に対して、自然免疫系の抗腫瘍免疫を誘導するのに標的となりうる免疫チェックポイント分子を調べる事とした。HCC827 および H2228 をそれぞれの特異的 TKI である Osimertinib と Alectinib で 24 時間刺激した所、ほぼ全ての免疫チェックポイント蛋白の発現が上昇していたが、特に Galectin-9 の発現が強く誘導されていた (図 4)。

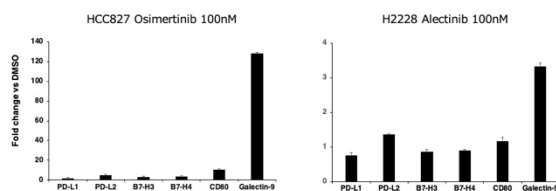


図 4 TKI は Galectin-9 の発現を誘導

(3) TKI は転写共役因子 YAP/TAZ の核移行が促し、Galectin-9 の発現が誘導される。

Galectin-9 の promoter 配列を EPD site で検索し、PROMO にて promoter 配列に結合する転写因子を調べた所、YY1 が一つの候補転写因子となり得ると考えられた。申請者らは同時に、HCC827 細胞において、転写共役因子 YAP/TAZ が EGFR-TKI の刺激により核内に移行する事も見出していたが (図 5 左) CRISPR/Cas9 で YAP を KO すると、Galectin-9 の誘導が抑えられることも今回明らかとなった (図 5 右)。以上から、YAP/TAZ の核内移行を抑えれば、Galectin-9 の発現が抑えられ、TKI 抵抗性の DTPs に対しても、自然免疫担当細胞による抗腫瘍免疫が誘導できる可能性があると考えられた。

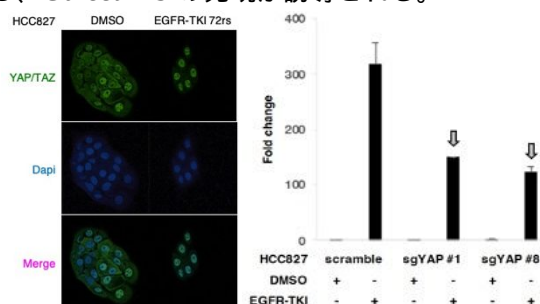


図 5 TKI は YAP/TAZ の核移行を促し、Gal-9 を誘導

< 考察 >

これまでの実験により、TKI によって YAP/TAZ の核内移行が起こり、これによって DTPs が自然免疫系の攻撃から回避している可能性が考えられた。現在、Galectin-9 の KO 細胞の樹立を試みており、樹立でき次第、in vivo の実験に進める予定である。In vivo の実験で、Galectin-9 の KO により TKI 抵抗性が克服されるか、あるいは TKI の効果が持続されるかを確認する予定である。また、同時に兵庫医科大学倫理委員会の承認を得た実験計画書に基づき (管理番号 202112-041) 臨床検体の収集も行っており、ドライバー癌遺伝子陽性肺癌において Galectin-9 の発現と予後が逆相関しないか検証する。これらの実験で得られる preclinical なデータを将来的には実臨床に活かしたいと考えているが、現時点では、YAP/TAZ の特異的阻害薬は存在しない。ただ、CDK7 阻害薬は YAP/TAZ の核移行を妨げる効果もあると報告されており (Cho YS et al. Genes Dev. 2020.) かつ多癌腫では既に抗腫瘍薬としての効果を検証する第 Ⅲ 相試験まで行われている。申請者らは、CDK7 阻害薬と EGFR-TKI の併用効果も今後検証する予定だが、あくまで Galectin-9 の誘導を抑えるための CDK7 阻害薬の併用であり、投与必要量も少なく済むと考えている。

以上から、YAP/TAZ を介した Galectin-9 の制御は、自然免疫系を活性化させ、ドライバー癌遺伝子陽性肺癌の DTPs を eliminate し、これらの肺癌の「根治」につながる可能性があると考えられた (図 6)。

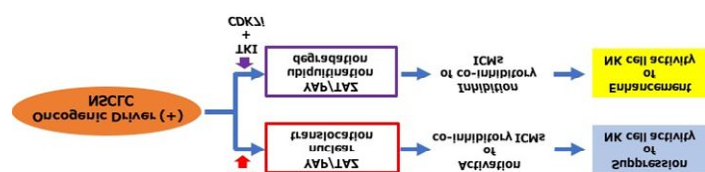


図 6 YAP/TAZ の制御による Galectin-9 の抑制と自然免疫

5 . 主な発表論文等

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

1 . 著者名 Tada Akio, Minami Toshiyuki, Kitai Hidemi, Higashiguchi Yoko, Tokuda Mayuko, Higashiyama Tomoki, Negi Yoshiki, Horio Daisuke, Nakajima Yasuhiro, Otsuki Taiichiro, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Nakamura Akifumi, Kitajima Kazuhiro, Ohmuraya Masaki, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi	4 . 巻 180
2 . 論文標題 Combination therapy with anti-programmed cell death 1 antibody plus angiokinase inhibitor exerts synergistic antitumor effect against malignant mesothelioma via tumor microenvironment modulation	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Lung Cancer	6 . 最初と最後の頁 107219 ~ 107219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2023.107219	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Akio Tada
2 . 発表標題 Combination therapy with anti-PD-1 antibody plus angiokinase inhibitor exerts synergistic antitumor effect against malignant mesothelioma via tumor microenvironment modulation
3 . 学会等名 ESMO Asia（国際学会）
4 . 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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