

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08755

研究課題名（和文）抗EGFR抗体は大腸癌をHot tumorに変えることができるか

研究課題名（英文）Can Anti-EGFR Antibodies Turn Colorectal Cancer into Hot Tumors?

研究代表者

友近 忍（Tomochika, Shinobu）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30403679

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）：転移性大腸癌（mCRC）患者には、抗EGFRまたは抗VEGFモノクローナル抗体（mAb）を併用した化学療法が広く行われている。本研究では、抗EGFRまたは抗VEGF mAb投与前後のPBMCと癌組織のTCRのクローン特異的CDR3配列の存在比率を網羅的に解析した。本研究によって、抗EGFR mAbが抗VEGF mAbよりもT細胞浸潤を誘導または促進することが示唆された。TCR解析では、抗VEGF mAb投与群では抗EGFR投与群よりも特定のT細胞がクローン性に富んでいることが示された。また、腫瘍浸潤T細胞とPBMC間のT細胞クローン型の差は、抗VEGF群では抗EGFR群よりも有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗EGFR療法と比較して抗VEGF療法では、癌特異的T細胞浸潤が誘導される可能性が示唆された。本研究からの知見は、mCRCに対するさらなる併用療法を支持する情報を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of anti-EGFR or anti-VEGF monoclonal antibodies (mAb) on T-cell infiltration and T-cell receptor (TCR) repertoire variation in CRC liver metastases. T-cell infiltrations were approximately 83% (5/6) and 50% (2/4), following treatment with anti-EGFR or anti-VEGF mAb, respectively. TCR repertoire analysis revealed higher clonality and lower diversity of TCR alpha and beta (TRA and TRB) in the anti-VEGF mAb group than that in the anti-EGFR group mAb. Furthermore, the percentage of the common TCR clones between infiltrating T cells and T cells in peripheral blood was significantly lower in the anti-VEGF mAb group compared to that in the anti-EGFR mAb group. In conclusion, the population of T cells infiltrating liver metastases in the anti-VEGF mAb group differed from that in the anti-EGFR mAb group.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、癌免疫療法の進歩は著しく、抗 PD-1/PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が多くの癌種で臨床導入されたが、大腸癌の多くは ICI の効果が得られにくい “Cold tumor” (CD8 陽性 T 細胞の浸潤が少ない) や抑制性免疫が強い “Dark tumor” である。一方、MSI-high 大腸癌は “Hot tumor” が多く、ICI の抗腫瘍効果も高い。すなわち MSS 大腸癌でも Hot tumor へ変化させる薬剤を併用することにより ICI の効果が高まる可能性がある。我々は、大腸癌肝転移の切除標本を用いて、術前化学療法の影響を病理学的に検討した結果、Cetuximab (Cmab) 使用群では化学療法単独群に比較して癌局所に CD8 陽性 T 細胞の著明な浸潤を認め、Cmab 投与により Hot tumor が誘導される可能性が示唆された。本研究では化学療法前後の大腸癌肝転移巢の病理学的解析、並びに、次世代シーケンサーを用いた PBMC と腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の TCR レパートア解析により、治療前後の PBMC と TIL の TCR レパートアがどのように変化するかを観察して、Cmab がどのような免疫細胞を癌局所に誘導しているかを検証する。

2. 研究の目的

転移性大腸癌 (mCRC) 患者には、抗 EGFR または抗 VEGF モノクローナル抗体 (mAb) を併用した化学療法が広く行われている。本研究の目的は、抗 EGFR または抗 VEGF mAb 投与前後の PBMC と癌組織の TCR のクローン特異的 CDR3 配列の存在比率を網羅的に解析し、レパートリーの多様性 (TCR レパートア) を測定し、腫瘍特異的 T 細胞の増殖が認められるか検討し、抗 EGFR または抗 VEGF mAb により末梢血の腫瘍抗原認識 T 細胞が腫瘍局所に浸潤しているかを示すことである。

3. 研究の方法

化学療法と抗 EGFR (n=6) または抗 VEGF (n=4) モノクローナル抗体の併用療法を受けた 10 人の mCRC 患者を対象とした。治療前後の肝転移の生検または手術標本を用いて、CD3 および CD8 の免疫組織化学染色により T 細胞浸潤を調べた。TCR レパートリー解析は、治療後に CD3+ T 細胞浸潤を認めた検体を用いて行った。

4. 研究成果

患者の情報と治療効果を表 1 に示す。10 人の患者は mAb 治療により 2 群に分けられた。抗 EGFR mAb 群では、3 例が部分奏効 (PR, 50%)、3 例が病勢安定 (SD, 50%) であった。抗 VEGF mAb 群では、3 例が PR (75%)、1 例が SD (25%) であった。抗 EGFR 群、抗 VEGF 群それぞれ 67% (#43、#48、#49、#55)、50% (#47、#54) が手術可能な状態になった。全生存期間は抗 EGFR 群で 40.1 ± 14.4 カ月、抗 VEGF 群で 31.3 ± 12.3 カ月であった。

表 1. Patient 's clinical information.

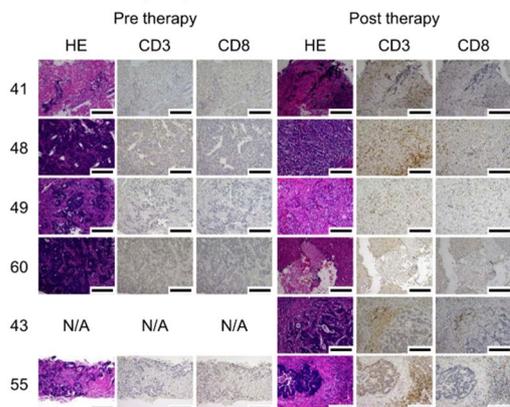
ID	Sex	Age	Antibody* (Course)	Regimen	Response	Surgery**	OS
41	M	81	C/PmAb (12)	IRIS	PR	No	8.7
48	F	70	CmAb (3)	XELOX	SD	Yes	28.2
49	M	44	CmAb (9)	XELOX	PR	Yes	63.2
60	F	74	CmAb (8)	mFOLFOX6	PR	No	46.5
43	M	67	PmAb (5)	XELOX	SD	Yes	53.6
55	M	73	PmAb (5)	XEROX	SD	Yes	40.3
42	F	78	BmAb (16)	XEROX	PR	No	37.1
47	F	83	BmAb (9)	XEROX	PR	Yes	32.6
51	M	74	BmAb (4)	XEROX	SD	No	6.7
54	F	68	BmAb (5)	XEROX	PR	Yes	54.8

*, anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (mAb) (cetuximab, CmAb; panitumumab, PmAb) or anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) mAb (bevacizumab, BmAb) were treated. **, after combined chemotherapy with mAb, surgery was performed (Yes) or not (No). For patients who did not undergo surgery, patients' liver metastatic tumor biopsy were collected after the therapy. PR, partial response. SD, stable disease. OS, overall survival time (month) of patients after treatment.

腫瘍部位への T 細胞浸潤に対する併用療法の効果を調べるため、臨床治療前後に採取した患者の肝転移標本について CD3 および CD8 免疫組織化学染色を行った。抗 EGFR 群では、83% の患者 (患者 41、48、49、43、55) が治療後に CD3+ と CD8+ の両方の T 細胞浸潤を示した (図 1A)。抗 VEGF 群では、50% の患者 (患者 47 と 54) が CD3+ T 細胞浸潤を示し、25% の患者 (患者 47) が CD8+ T 細胞浸潤を示した (図 1B)。治療前後の比較では、CD8+ T 細胞浸潤は抗 EGFR 群で有意に増加したが (P = 0.015)、抗 VEGF 群では T 細胞浸潤に差はなかった (表 2)。これらの結果は、

抗 EGFR mAb が抗 VEGF mAb よりも T 細胞浸潤を誘導または促進する可能性を示唆している。

A. anti-EGFR group



B. anti-VEGF group

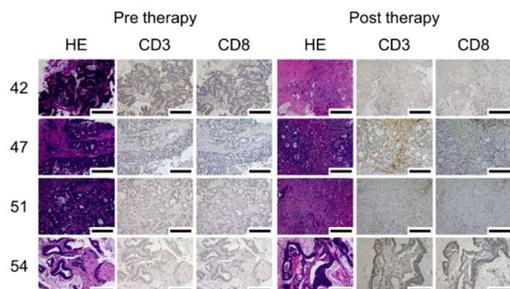


図 1. Immunohistochemistry of CD3 and CD8 using liver metastatic tissues.

表 2. Frequencies of tumor-infiltrating T cells in liver metastatic site.

	CD3			CD8		
	High	Low	<i>P</i> *	High	Low	<i>P</i> *
anti-EGFR group						
pre-treatment	1	4	0.080	0	5	0.015
post-treatment	5	1		5	1	
anti-VEGF group						
pre-treatment	3	1	1.000	1	3	1.000
post-treatment	2	2		1	3	

*, *P* values of Fisher's exact test.

抗 EGFR mAb 療法後に CD8+ T 細胞浸潤が有意に増加したことは、我々の以前の報告と一致している。また、抗 EGFR 抗体 IgG1 が CD8+ T 細胞上の CD16 に結合することによって CD8+ T 細胞が浸潤することも報告されている。さらに、抗 EGFR 抗体 IgG1 との結合によって活性化された NK 細胞は、腫瘍抗原の放出や樹状細胞などの他の免疫細胞とのサイトカインを介したクロストークを引き起こし、CD8+ T 細胞をプライム化することができる。腫瘍 T 細胞浸潤に対する抗 EGFR mAb の高い活性は、以前の臨床試験で抗 VEGF mAb よりも高い臨床効果率を示した一因と考えられる。

腫瘍浸潤 T 細胞の状態を調べるために、CD3+T 細胞の浸潤が高い治療後腫瘍サンプルを用いて TCR レポートリー解析を行った。TCR 配列のリードを記録することにより、治療後の腫瘍サンプルにおけるトップ 10 配列の総頻度と TCR 多様性を解析した。抗 EGFR 群では、トップ 10 の頻度の割合は TRA で 35.6 ± 9.9 、TRB で 24.4 ± 6.5 であった (図 2A, B)。抗 VEGF 群では、上位 10 位の頻度の割合は TRA で 92.4 ± 2.4 、TRB で 64.7 ± 3.1 であり、抗 EGFR 群よりはるかに高かった (図 2) 一方、抗 EGFR 群の TCR 多様性は TRA で 74.2 ± 55.7 、TRB で 96.9 ± 34.9 であった。抗 VEGF mAb 群では、TCR 多様性は TRA で 6.4 ± 0.5 、TRB で 16.3 ± 2.2 であり、抗 EGFR 群よりはるかに低かった。

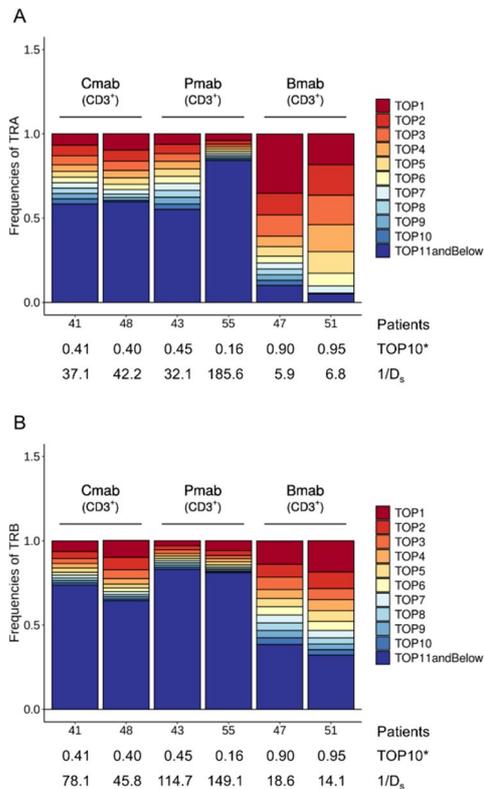


図2. TCR clonality and diversity of tumor-infiltrating T cells.

化学療法や免疫療法後の腫瘍浸潤リンパ球の状態は、mCRC 患者における治療効果と関連している。T 細胞亜集団の構成に加えて、腫瘍抗原の TCR 認識は、適応的がん免疫応答の調節の主要な決定因子である。TRA と TRB の多様性が増加し、腫瘍抗原特異的 T 細胞が生成されることは、患者の将来の予後にとって重要である。抗体投与や免疫療法後、TCR 多様性は一時的に増加し、数週間続いた後、徐々に減少する。しかし、腫瘍抗原特異的 TCR 発現 T 細胞のクローナリティは高いレベルにある。T 細胞浸潤の結果とは異なり、TCR 解析では、抗 VEGF mAb 投与群では抗 EGFR 投与群よりも TCR 配列のトップ 10 が高いことから示されるように、特定の T 細胞がクローン性に富んでいることが示された。これらの TCR を発現している T 細胞は腫瘍特異的抗原認識に関連している可能性があり、抗 VEGF mAb と免疫チェックポイント阻害剤の併用による抗癌剤治療が有用であることを示唆している。

PBMC 中の T 細胞と共通の TCR を持つ腫瘍中の T 細胞の頻度を推定するために、腫瘍浸潤 T 細胞と PBMC 中の TRA と TRB の配列を比較した (表 3)。腫瘍浸潤 T 細胞と PBMC 間の TRA と TRB の共通クローン型の頻度 (抗 VEGF 群では TRA が 45%、TRB が 30%) は、抗 EGFR 群 (TRA が 75%、TRB が 70%) に比べて有意に低かった。抗 VEGF 群の腫瘍浸潤 T 細胞は、抗 EGFR 群と比較して、循環 T 細胞とはより区別されているようであった。

表 3. TCR sequences in tumor-infiltrating T cells and T cells in PBMCs.

	Identical TCR sequences in TILs and PBMCs			
	present	absent	(% of present)	<i>P</i> value*
TRA				
anti-EGFR group	30	10	(75.0)	0.043
anti-VEGF group	9	11	(45.0)	
TRB				
anti-EGFR group	28	12	(70.0)	0.005
anti-VEGF group	6	14	(30.0)	

*, *P* values of Fisher's exact test.

本研究では、腫瘍浸潤 T 細胞と PBMC 間の T 細胞クローン型の差は、抗 VEGF 群では抗 EGFR 群よりも有意に高かった。腫瘍浸潤 T 細胞の新しいクローン型は腫瘍特異的 T 細胞である可能性

がある。このことは、免疫チェックポイント阻害薬と抗 VEGF mAB の併用療法の有用性を支持するかもしれない。本研究ではサンプル数が少なく、免疫学的に TCR にのみ焦点が当てられているため、さらなる検証研究が必要である。

結論として、抗 EGFR 療法と比較して、抗 VEGF 療法では癌特異的 T 細胞浸潤が誘導される可能性が示唆された。これらの知見は、mCRC に対するさらなる併用療法を支持する情報を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Furuya Kei, Nakajima Masao, Tsunedomi Ryouichi, Nakagami Yuki, Xu Ming, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tomochika Shinobu, Maeda Noriko, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 High serum proteinase-3 levels predict poor progression-free survival and lower efficacy of bevacizumab in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-024-11924-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 ZHENG HUANYU, TSUNEDOMI RYOUICHI, XU MING, ZHANG YING, KISHI HIROKO, KOBAYASHI SEI, TOMOCHIKA SHINOBU, NAKAJIMA MASAO, MATSUI HIROTO, TOKUMITSU YUKIO, SHINDO YOSHITARO, IIDA MICHIHISA, IOKA TATSUYA, NAGANO HIROAKI	4. 巻 44
2. 論文標題 Effect of Paxillin Expression and Phosphorylation on Colorectal Cancer Prognosis and Metastasis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 511 ~ 520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16839	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamamoto Tsunenori, Tsunedomi Ryouichi, Nakajima Masao, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Xu Ming, Nakagami Yuki, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Tanabe Tsuyoshi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Kiyota Akifumi, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 IL-6 Levels Correlate with Prognosis and Immunosuppressive Stromal Cells in Patients with Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5267 ~ 5277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-023-13527-y	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 XU MING、TSUNEDOMI RYOUICHI、KIYOTANI KAZUMA、TOMOCHIKA SHINOBU、FURUYA KEI、NAKAJIMA MASAO、MATSUI HIROTO、TOKUMITSU YUKIO、SHINDO YOSHITARO、YOSHIDA SHIN、IIDA MICHIHISA、SUZUKI NOBUAKI、TAKEDA SHIGERU、IOKA TATSUYA、HAZAMA SHOICHI、NAGANO HIROAKI	4. 巻 43
2. 論文標題 Anti-VEGF and Anti-EGFR Antibody Therapy on T-Cell Infiltration and TCR Variation in Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 613 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16197	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 CHIDIMATSU HIKARI、TSUNEDOMI RYOUICHI、NAKAGAMI YUKI、XU MING、NAKAJIMA MASAO、NAKASHIMA-NAKASUGA CHIYO、TOMOCHIKA SHINOBU、et al	4. 巻 43
2. 論文標題 Serum CCL7 Is a Novel Prognostic Biomarker of Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16139	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakagami Yuki、Hazama Shoichi、Suzuki Nobuaki、Yoshida Shin、Tomochika Shinobu、et al	4. 巻 22
2. 論文標題 CD4 and FOXP3 as predictive markers for the recurrence of T3/T4a stage II colorectal cancer: applying a novel discrete Bayes decision rule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10181-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka Yuko、Sasai Mai、Suehiro Yutaka、Hashimoto Shinichi、Goto Atsushi、Yamamoto Naoki、Suzuki Nobuaki、Higaki Shingo、Fujii Ikuei、Suzuki Chieko、Matsumoto Toshihiko、Hoshida Tomomi、Koga Michiko、Tsumumi Takeya、Lim Lay A、Matsubara Yasuo、Tomochika Shinobu、Yoshida Shin、Hazama Shoichi、et al	4. 巻 59
2. 論文標題 Comparison of two primer-probe sets of Fusobacterium nucleatum using droplet digital polymerase chain reaction for the detection of colorectal neoplasia from faecal samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 396 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00045632221115559	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tomochika Shinobu, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Fujii Toshiyuki, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Laparoscopic Sutureless Rectopexy Using a Fixation Device for Complete Rectal Prolapse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques	6. 最初と最後の頁 608 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLE.0000000000000960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 恒富亮一、清谷一馬、徐明、友近忍、中島正夫、松井洋人、新藤芳太郎、徳光幸生、渡邊裕策、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 抗VEGF抗体・抗EGFR抗体治療後の大腸がん肝転移巣におけるT細胞浸潤とTCRレパトア
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徐明、恒富亮一、清谷一馬、友近忍、中島正夫、松井洋人、徳光幸生、新藤芳太郎、吉田晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、碓彰一、永野浩昭
2. 発表標題 転移性大腸癌におけるT細胞浸潤およびTCR変動に対する抗VEGF
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	恒富 亮一 (Tsunedomi Ryouichi) (10420514)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	裕 彰一 (Hazama Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	
研究分担者	鈴木 伸明 (Suzuki Nobuaki) (50526910)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	吉田 晋 (Yoshida Shin) (60554805)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	削除：2023年3月31日

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