

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501297

研究課題名(和文) 制御性T細胞がEGFR阻害剤の耐性獲得機序に関連しているか

研究課題名(英文) Are regulatory T cells related with resistance to Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors?

研究代表者

渡邊 浩一郎 (WATANABE, Koichiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00468000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：2012年10月1日UMINへ「上皮成長因子受容体(EGFR)阻害薬の耐性獲得に対して制御性T細胞が及ぼす影響」(受付番号：R000010551)として登録を行った。皮膚及び血液検体の免疫組織学的検索の解析から、EGFR阻害薬投与後の皮疹の出現に伴い、制御性T細胞マーカーであるFOXP3およびCTLA-4陽性細胞の真皮への浸潤が経時的に増加していることを確認した。皮膚のmRNAレベルでも制御性T細胞のマーカーであるCTLA-4の発現が亢進していることが証明された。同時に測定した炎症性サイトカインや炎症抑制サイトカインは個体差が大きく一定した傾向をみることができなかった。

研究成果の概要(英文)：Our clinical study "The effect of regulatory T cells on resistance mechanism following the treatment with epidermal growth factor receptor inhibitors" was registered on University hospital Medical Information Network in Oct 1st 2012. Infiltration of regulatory T cells expressing FOXP3 and CTLA-4 into epidermis was observed in immunohistochemistry analysis. The Levels of CTLA-4 mRNA was upregulated depending on time in epidermis and circulating lymphocytes. However, it is difficult to enable proper aberration correction of inflammatory and regulatory cytokines from epidermis and circulating lymphocytes in the limited samples. The careful observation during the extended period would be needed in the further numbers of samples.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：獲得耐性 上皮成長因子受容体阻害薬 薬剤性皮膚障害 ざ瘡様皮疹 CTLA-4 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

a) 癌遺伝子から見た EGFR 阻害薬の一次耐性、二次耐性

上皮成長因子受容体(EGFR)は、チロシンキナーゼ型受容体であり、上皮系、間葉系、神経系起源の多様な細胞で見られる。EGFR に遺伝子増幅や遺伝子変異、構造変化が起きると、発癌、および癌の増殖、浸潤、転移などに関与するようになるため、EGFR を標的とした抗がん剤の開発が行われている。多くの研究が、EGFR 遺伝子の変異、EGFR 下流シグナル異常が EGFR を標的とする治療に対する奏効率の予測に利用できる可能性を示してきた。

EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌の多く(70-80%程度)で、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブやエルロチニブがその腫瘍縮小効果を示すことがいくつかの後ろ向き研究で指摘され、さらに、前向き試験でもこれらの患者の75%程度でEGFR チロシンキナーゼ阻害剤が腫瘍縮小効果を示すことが確認された(J Clin Oncol 2006;24:1-6, Br J Cancer 2006;95:998-1004)。一方で、肺腺癌の25-30%はこれらの薬剤に自然耐性を示す。また、奏効症例においてもその大半が1年程度で獲得耐性を生じ再燃する。EGFR の T790M second mutation や MET 増幅が、獲得耐性のそれぞれ 50%および 20%に関与することが知られているが、残りの30%の症例の耐性機序および自然耐性の機序は不明である(Mol Cancer Ther 2008;7:874-9, Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:20932-7)。

大腸癌腫瘍サンプル1022検体を用いた解析において、KRAS、BRAF、NRAS、PIK3CA 遺伝子の変異が抗 EGFR 抗体である cetuximab や panitumumab の臨床効果に影響することが De Roock らによって示された(Lancet Oncol 2010;11:753-62)。しかしながら、大腸癌のうち約半数を占める変異を有さない wild type の症例での獲得耐性克服のための知見は明らかになっていない。

b) 抗腫瘍性免疫から見た耐性獲得

Treg は、活性化 T 細胞の働きを抑制することで、生体の免疫系を負に調節している。Treg は、抗腫瘍免疫の抑制にも関与することが知られており、最近最も注目されている細胞集団のひとつである。細胞傷害性 T リンパ球関連抗原(CTLA)-4 は Treg の表面に恒常的に発現し、T 細胞の活性を抑制す

る。我々は、炎症起因大腸癌マウスモデルにおいて、CTLA-4 を特異的抗体にて阻害することにより Treg の機能を抑制し、炎症、発癌を促進することを証明した(Watanabe et al. Infect Immun 2008;76(12):5834-42)。その他にも、慢性持続性感染により胃癌の initiator となる胃での *Helicobacter pylori* 感染において Treg がホメオスターシス維持に重要な働きを持っていることを報告した(Watanabe et al. Clin Exp Immunol 2004;135:29-34, Watanabe et al. Microbiol Immunol 2002;46:441-7, Carcinogenesis 2007;28:2614-23)

CTLA-4 完全ヒトモノクローナル抗体である ipilimumab は Treg に発現する CTLA-4 による抑制シグナルを特異的に遮断し、細胞傷害性細胞の活性化状態を維持し抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。最近、Hodi らによって、ipilimumab が既に他の治療を受けている転移性メラノーマ患者の全生存期間を改善することが示された(N Engl J Med 2010;363(8):711-23)。

c) EGFR 阻害薬と炎症性皮疹

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤や EGFR 抗体使用時には、ほぼ全ての症例にそれら薬剤に関連した皮疹が投与初期より生じる(Nat Rev Cancer 2006;6:803-12)。EGFR は、皮膚、毛包、爪の増殖や分化に関与していると言われており、活性化 EGFR が著しく減少すると角化異常が起こり、毛包の炎症、皮膚の乾燥、皮膚炎および爪囲炎が生じることが知られている。(Nat Rev Cancer 2006;6:803-12)。これら EGFR シグナル阻害剤投与を契機に生じた皮疹には、CD45RO⁺T 細胞やそれに引き続いて好中球などの炎症細胞が多く観察される。多くの皮膚症状はステロイドやシクロスポリンによる局所的な抗炎症治療により軽快する。また、皮疹は、投与から1~2週間の比較的早期に出現し、自然に、もしくは、皮膚の局所治療に反応し軽快する傾向が見られる。興味深いことに非小細胞肺癌に対するエルロチニブによる生存期間の延長を証明した BR.21 試験において比較的早期より生じる皮疹が重症なほど予後のよい傾向が見られた(Clin Cancer Res 2007;13:3913-21)。

このことから、皮疹は局所の EGFR 阻害により誘発された炎症性免疫反応が主体であると考えられ、とくに早期の免疫反応がその後も維持される腫瘍効果に相関していると推測される(図1)。

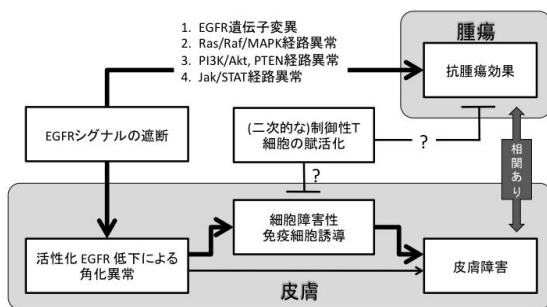


図1 EGFR阻害薬投与における抗腫瘍効果、皮膚障害、制御性T細胞の関係

CD45RO⁺細胞の中には、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregが存在することが解っており、皮膚局所ではCD45RO⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregが、EGFRシグナル阻害剤投与を契機に誘導されていると考えられる。そのため、局所に出現したTregの免疫制御作用により皮疹は自然と軽快し、それらの細胞がゆっくりと全身で増殖することで、抗腫瘍効果を減じる原因となるのではないかと推測している。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR阻害薬による皮膚でのEGFRシグナルの変化が直接抗腫瘍効果と相関していることを明らかにし、循環血液中のTregと皮内に見られるTregの耐性獲得との関連を探り、耐性獲得後のipilimumabを含めた免疫関連治療の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

切除不能・再発肺癌および大腸癌患者のうち、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬もしくはEGFR抗体を使用する患者を対象とする。2年間で20症例の登録を予定している。

治療前、治療開始1週間後、1カ月後、耐性獲得時（増悪時）に血液検体を採取する。血中FOXP3⁺Treg, CTLA-4⁺Tregの割合、FOXP3 mRNA, CTLA-4 mRNA発現率と奏効率（腫瘍の縮小の割合）、再発までの期間、生存期間との相関を検証する。

治療前、治療開始1週間後、耐性獲得時（増悪時）に上背部皮膚を採取する。皮膚科医による皮疹の評価、皮膚組織検体でのEGFR下流シグナル阻害の程度、皮膚へ浸潤するFOXP3⁺Treg, CTLA-4⁺Tregの割合、皮膚でのFOXP3 mRNA, CTLA-4 mRNA発現率と奏効率（腫瘍の縮小の割合）、再発までの期間、生存期間との相関を検証

する。

4. 研究成果

a) 胃癌患者の胃粘膜における制御性T細胞出現と予後との関連

大分大学附属病院にて2004年12月から2007年5月までの胃癌手術症例29例を対象に、レトロスペクティブに再発までの期間、病期、属性等の臨床背景を調査した。症例ごとにMizukamiらの報告(Br J Cancer 2008)に準じてTregの特異的マーカーであるFoxp3の免疫組織染色を行い、Foxp3陽性細胞数およびその分布を評価した。Foxp3陽性細胞数は、中央値(48.2/1視野)を基準にHi, Loの2群に分けた。Lo群でRelapse free survival (RFS)が短い傾向が示唆されるも統計学的有意差は認めなかった。Diffuse type(全体に均一にFoxp3陽性細胞が存在する)、Peri-tumor type(がんと正常組織の境界に多く存在する)、Follicular type(リンパ濾胞に多く存在する)により、臨床経過に差異があることが分かった。Follicular patternで、有意にRFSが短縮を認めた(p<0.05)。

b) UMINへの臨床試験登録

2012年9月4日大分大学病院病院IRBへ「上皮成長因子受容体阻害薬の耐性獲得に対して制御性T細胞が及ぼす影響に関する研究」として申請し承認を得た。2012年10月1日UMINへ「上皮成長因子受容体阻害薬の耐性獲得に対して制御性T細胞が及ぼす影響」(受付番号: R000010551)として登録を行った。

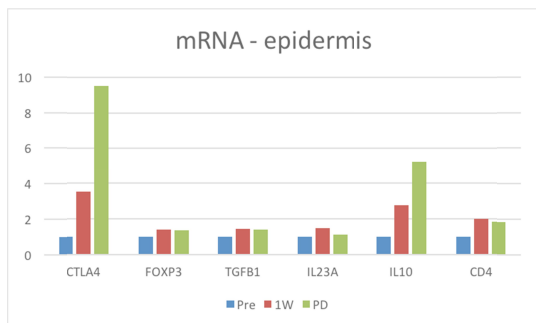
c) 免疫組織学的検討による制御性T細胞の真皮への浸潤

皮膚及び血液検体の免疫組織学的検索の解析から、研究開始時の予想通り制御性T細胞マーカーであるFOXP3陽性細胞の真皮への浸潤が経時的に増加していることを確認した。

d) mRNAレベルでのCTLA-4およびFOXP3発現亢進

血液および皮膚検体を用いて、CTLA-4、FOXP3、TGF-β1、IL-23A、IL-10、IL-17、CD4を比較C_T法測定した。発現量を比較するため、内因性コントロールにて補正を行った。

現在までに9名が登録している。しかしながら、そのうち5例は治療を継続中であり、経時的な同一個体での検討も困難な状



態である。現在までに、解析できた4名の中間解析におけるデータを以下に示す。治療開始前を基準に mRNA レベルの相対値を表した。

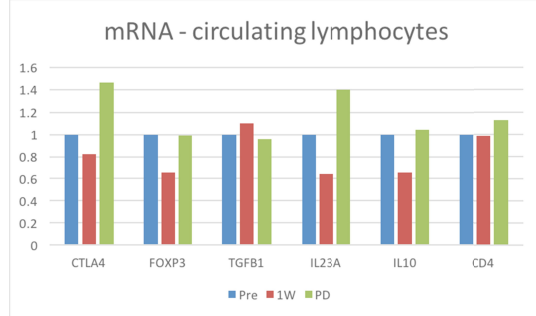
免疫組織学的検討と一致するように、EGFR 阻害薬投与後より、CTLA-4 および FOXP 3 の発現の上昇を認めた。CTLA-4 は FOXP3 に比してその傾向は顕著であった。皮膚検体と血液検体を比較した場合、皮膚検体においては、CTLA-4 の発現が EGFR 阻害薬投与前と比較し、病状増悪時には約 10 倍に上昇したのに対し、血液検体の場合は 1.4 倍程度の発現上昇にとどまった。これは、局所の炎症レベルを反映したものと思われる。これまでの報告と同様約 1~2 週間後に EGFR 関連皮疹の出現を認めたが、症例によっては、1 週間後には一時的に CTLA-4 および FOXP 3 の発現が減少する症例が認められた。血中リンパ球の mRNA レベルは、CTLA-4 および FOXP3 とともに一時的に減少を認めた。今後の予後との関連を追跡する必要がある。しかしながら、現在、まだ治療を継続している症例も多く、現時点で予後との関連については言及するのは適当ではないと考える。

e) mRNA レベルでのサイトカインレベルの検討

個人差はあるものの制御性 T 細胞マーカーである CTLA-4 の治療経過に伴う上昇とともに IL-10 の上昇を確認した。しかしながら、IL-23、TGF β は個体差が大きくまた発現量も低値であった。検体数も少ないため明らかな傾向を指摘することはできていない。IL-17 については、測定不能であり、プローブ、プライマーの組み合わせを再度検討中である。今後、症例数を十分に確保する必要があると考える。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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 (該当なし)

6. 研究組織

(1)研究代表者
渡邊 浩一郎 (WATANABE Koichiro)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00468000

(2)研究分担者
白尾 国昭 (SHIRAO Kuniaki)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：10467996

波多野 豊 (HATANO Yutaka)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：80336263

大津 智 (OOTSU, Satoshi)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：80437920

森永 亮太郎 (MORINAGA, Ryotaro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50411640

平島 詳典 (HIIRASHIMA, Yoshinori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60418837

久松 靖史 (HISAMATSU, Yasushi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00609670

西川 和男 (NISHIKAWA, Kazuo)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：70636399

河野 桜 (KAWANO, Sakura)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：40548137

(3)連携研究者
特になし。