

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591913

研究課題名(和文) 突然変異遺伝子を標的とした新規免疫療法の開発：KRASおよびEGFRでの解析

研究課題名(英文) Development of Novel Cancer Immunotherapy Targeting Mutated Genes: Identification of Antigen Epitopes Derived from the Mutated KRAS and EGFR Genes.

研究代表者

笹田 哲朗 (SASADA, Tetsuro)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70293967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、細胞癌化の原因である変異遺伝子を標的とした個別化治療の開発が期待されている。特に、変異遺伝子は免疫系から“非自己”として認識されるため、免疫治療における格好の標的分子と思われる。本研究では、肺癌に高頻度に認められる上皮成長因子受容体(EGFR)のゲフィチニブ耐性変異(T790M)由来の抗原エピートープを2種、大腸癌に高頻度に認められる変異型KRAS(G12V)由来の抗原エピートープを1種同定した。本研究成果は、これらの変異遺伝子を有する難治性癌患者に対する新規免疫療法を提供するとともに、“変異遺伝子を標的とした個別化免疫治療”の発展に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Personalized cancer treatments targeting oncogenic mutated genes are currently developing. Since mutated genes are recognized as foreign by the host immune system, they might be an appropriate target for cancer immunotherapy. In the current study, we have identified two antigen epitopes derived from the epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation, which is known to cause resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer, and one antigen epitope derived from the KRAS (G12V) mutation, which is frequently detected in colorectal cancer. Our results could provide a novel immunotherapeutic approach for treatment against refractory advanced cancer patients with these mutations, and might lead to development of "personalized immunotherapy targeting mutated genes".

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：免疫療法 突然変異遺伝子 T細胞エピートープ ペプチドワクチン 上皮成長因子受容体(EGFR) KRAS

1. 研究開始当初の背景

癌免疫療法は外科療法、化学療法、放射線療法に次ぐ、新世代癌治療法として注目を浴びてきた。現在まで国内外の多くの研究グループにより、癌抗原に対する特異的免疫の誘導を目指す癌ワクチンの臨床試験が試みられてきたが、その治療効果は癌種や患者によって限定的で、治療抵抗性獲得の問題もあり、残念ながら第4の癌治療法として公認されるには至っていない (Sasada T, et al, Eur J Cancer, 2010)。研究代表者はハーバード大学 Dana-Farber Cancer Institute, Cancer Vaccine Center において免疫モニタリング部門の責任者として、多数の癌ワクチン臨床試験に携わってきた (Zhang W, Sasada T, et al, Clin Cancer Res, 2010; Ho V, Sasada T, et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009) が、十分な臨床効果を得られなかった。特に、突然変異のない自己抗原を標的とした癌ワクチン療法では、ワクチン抗原に対する低い免疫反応 (負の選択による high avidity な T 細胞レパトアの欠落が原因と思われる) 癌細胞でのワクチン抗原喪失による免疫監視機構からの逃避、などの問題がしばしば観察された。この経験から、(1) 免疫系からは“非自己”として認識されるために強力な特異的 T 細胞反応を誘導する、(2) 癌細胞でのワクチン抗原喪失による免疫監視機構からの逃避が起こりにくい、などの特性を期待できる、癌悪性化に關与する突然変異遺伝子を標的とした免疫療法に着目した。

最近の分子生物学の急速な発展に伴い、腫瘍発生の原因となる遺伝子変化も各個人のレベルで比較的容易に解析することが可能となった。それに伴い突然変異遺伝子の機能を制御する分子標的治療薬を用いた個別化治療が臨床医学分野では一般化されつつあるが、突然変異遺伝子を標的とした免疫療法に関しては十分に検討されてきたとは言い難い。今後、“Proof of Concept”として“突然変異遺伝子を標的とした免疫療法”の有効性を示唆する情報の蓄積が望まれる。

2. 研究の目的

手術、抗癌剤、放射線療法をはじめとする集学的治療法の進歩により、進行癌患者の予後も徐々に改善しているが、さらなる予後改善のためにはこれらの標準治療抵抗性腫瘍に対する新たな治療手段の開発が望まれている。たとえば、EGFR 遺伝子にゲフィチニブ耐性変異 (T790M) を持つ肺癌患者や抗 EGFR 抗体 (セツキシマブ、パニツムマブ) 治療の適応がない変異型 KRAS を有する大腸癌患者は治療に難渋することも多く、免疫療法の良い適応となるものと思われる。

本研究では、難治性進行肺癌、大腸癌患者に対して新規免疫治療法が提供できるように、変異型 EGFR、変異型 KRAS 由来で、HLA-A2 (日本人の 30%に陽性) HLA-A24 (日本人の 60%に陽性) HLA-A11 (日本人の 18%に陽性)

に拘束性の CTL 抗原エピートープの同定を試みた。

3. 研究の方法

変異型 EGFR、変異型 KRAS 由来で、HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11 に拘束性の CTL 抗原エピートープを以下の手順で同定した。

(1) EGFR のゲフィチニブ耐性変異 (T790M)、KRAS の Codon12 および Codon13 の 7 種の突然変異 (G12V、G12R、G12D、G12C、G12A、G12S、G13D) のアミノ酸配列からモチーフ検索プログラムを用いて、変異配列を含み、かつ、日本人に多い HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11 に結合すると予測されるペプチド (9mer, 10mer) を選択した。

(2) 合成ペプチドの各 HLA 分子への結合能を HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11 を強制発現した細胞株を用いて確認した。

(3) HLA-A2、HLA-A24、HLA-A11 陽性の健常者由来の末梢血 T 細胞を、各 HLA への結合能が確認された合成ペプチドの存在下に培養し、各ペプチドに特異的な CTL 株を誘導、樹立した。さらに、樹立した CTL 株を用いて各種癌細胞株を標的とした機能解析 (サイトカイン産生、⁵¹Cr 遊離試験) を行い、CTL 抗原エピートープを決定した。

(4) 癌患者における遺伝子変異の有無 (末梢血中の遊離 DNA を用いて digital PCR 法にて検出) と同定された CTL 抗原エピートープに対する末梢血 T 細胞の特異的免疫反応との相関を検討した。

4. 研究成果

(1) EGFR T790M 由来抗原エピートープの同定

モチーフ検索プログラム (NetMHC 3.2, BIMAS) を用いて、EGFR T790M の変異配列を含み、HLA-A2 あるいは HLA-A24 への結合が予測されるペプチドを 9 種選択した (表 1)。なお、HLA-A11 への結合が予測されるペプチドは存在しなかった。

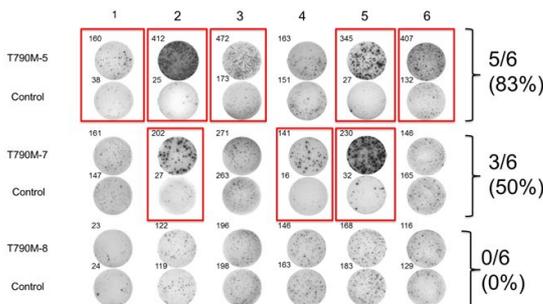
HLA-A2 あるいは HLA-A24 を強制発現した細胞株を用いて、上記で選択した各ペプチドの HLA 分子への結合能を確認したところ、T790M-5, T790M-7, T790M-8 の 3 種のペプチドが HLA-A2 に結合することが確認された。一方、HLA-A24 への結合が予測されたペプチドの HLA-A24 への結合は実験的には確認できなかった (表 1)。

表 1: EGFR T790M の変異配列を含み、HLA への結合が予測されるペプチド

ペプチド名	アミノ酸配列	NetMHC 3.2 ANN IC50 (nM)	BIMAS Score	HLA 結合能
HLA-A2 結合ペプチド				
T790M-1	VQLIMQLMPF	3705	0.109	-
T790M-2	QLIMQLMPFG	4054	0.943	-
T790M-3	LIMQLMPFGC	837	24.921	-
T790M-4	IMQLMPFGCL	925	6.478	-
T790M-5	MQLMPFGCLL	977	51.770	+
T790M-6	LTSTVQLIMQL	4187	-	-
T790M-7	LIMQLMPFGCL	530	-	+
T790M-8	IMQLMPFGCLL	118	-	+
HLA-A24 結合ペプチド				
T790M-9	TVQLIM QLMPF	118	-	-

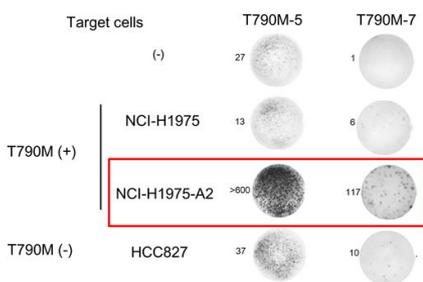
上記の 3 種の HLA-A2 結合ペプチド (T790M-5, T790M-7, T790M-8) の存在下に、HLA-A2 陽性の健常者の末梢血単核球 (PBMC) を 14 日間培養したのち、ペプチド特異的にサイトカイン (IFN γ) を分泌する T 細胞を ELISpot 法により解析した。T790M-5 では 6 人中 5 人 (83%) に、T790M-7 では 6 人中 3 人 (50%) にペプチド特異的な T 細胞株の誘導が可能であったが、T790M-8 ではペプチド特異的な T 細胞株の誘導を認めなかった (図 1)。

図 1: 健常者における EGFR T790M 由来ペプチドの免疫原性



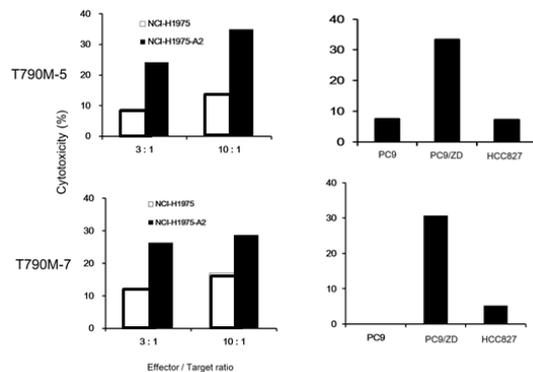
さらに、T790M-5, T790M-7 にて誘導されたペプチド特異的な T 細胞株を肺癌細胞株 NCI-H1975 (EGFR T790M 陽性・HLA-A2 陰性)、NCI-H1975-A2 (NCI-H1975 に HLA-A2 を遺伝子導入したもの)、HCC827 (EGFR T790M 陰性・HLA-A2 陰性) を標的細胞として共培養し、癌細胞株に反応してサイトカイン (IFN γ) を分泌する T 細胞を ELISpot 法により解析した。T790M-5, T790M-7 にて誘導されたペプチド特異的な T 細胞株は NCI-H1975 には反応を示さないものの NCI-H1975-A2 には著しい反応を示した。また、HCC827 には反応を示さなかった (図 2)。

図 2: EGFR T790M 由来ペプチドに特異的な T 細胞の肺癌細胞株への反応性 (ELISpot)



また、T790M-5, T790M-7 ペプチドの存在下で誘導した抗原特異的な T 細胞株の各種癌細胞株に対する細胞傷害活性を ^{51}Cr 遊離法により検討した。T790M-5, T790M-7 で刺激誘導した T 細胞株は NCI-H1975 に比較し NCI-H1975-A2 に対して強い細胞傷害活性を示した (図 3 左)。さらに、PC9 (EGFR T790M 陰性・HLA-A2 陽性)、HCC827 (EGFR T790M 陰性・HLA-A2 陰性) には細胞傷害活性は示さないものの、PC9/ZD (EGFR T790M 陽性・HLA-A2 陽性) には強い細胞傷害活性を示した (図 3 右)。

図 3: EGFR T790M 由来ペプチドに特異的な T 細胞の肺癌細胞株に対する細胞傷害活性



以上の結果より、HLA-A2 結合ペプチド T790M-5, T790M-7 は癌細胞表面に HLA-A2 分子と結合して発現、提示される真の抗原エピトープであると推測された。

HLA-A2 陽性の非小細胞肺癌患者 22 人の PBMC を用いて、T790M-5, T790M-7 に対する免疫反応と T790M 変異の有無との関連を検討した。T790M-5 あるいは T790M-7 に対して免疫反応を示さない患者 15 人中 9 人 (60%) が T790M 変異を有したが、免疫反応を示す患者では 7 人中 1 人 (14%) のみが T790M 変異を有していた。この結果からは、これらの抗原エピトープに対する免疫反応が T790M 変異の誘導を抑制している可能性が示唆された。

本研究により、EGFR 遺伝子のゲフィチニブ耐性変異 (T790M) 由来で HLA-A2 拘束性の新規抗原エピトープとして、2 種のペプチド (T790M-5, T790M-7) を同定した。これらのペプチドを用いた免疫療法を実施することにより、ゲフィチニブ治療後に EGFR 耐性変異 (T790M) を獲得した難治性肺癌患者に対して新たな治療手段を提供できるものと期待される。また、ゲフィチニブ耐性変異 (T790M) に特異的な T 細胞の消失により免疫監視機構が破綻し、T790M 変異を有する癌細胞の出現が可能となった可能性が示唆されたため、本研究で同定した抗原エピトープを用いた免疫療法をゲフィチニブ治療中の肺癌患者に対して実施し免疫監視機構を維持することができれば、EGFR 耐性変異 (T790M) 出現を予防できる可能性も期待できる。

(2) 変異型 KRAS 由来抗原エピトープの同定

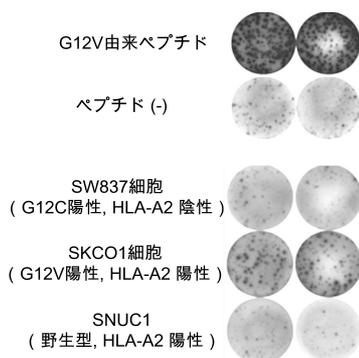
モチーフ検索プログラム (NetMHC 3.2, BIMAS) を用いて、変異型 KRAS (G12V, G12R, G12D, G12C, G12A, G12S, G13D) の変異配列を含み、HLA-A2, HLA-A24, HLA-A11 への結合が予測されるペプチドを選択した。

HLA-A2, HLA-A24, HLA-A11 を強制発現した細胞株を用いて、上記にて選択した各ペプチドの HLA 分子への結合能を確認したところ、それぞれ 5 種、2 種、8 種のペプチドが HLA-A2, HLA-A24, HLA-A11 に結合することが確認された。

上記にて各 HLA への結合が確認されたペプチドの存在下に、各 HLA 陽性の健常者の PBMC を 14 日間培養したのち、ペプチド特異的にサイトカイン (IFN γ) を分泌する T 細胞を ELISpot 法により解析した。HLA-A2 結合ペプチドのうち、G12V、G12A、G12C 配列を含むペプチドを用いると、それぞれ 9 人中 3 人 (33%)、9 人中 2 人 (22%)、9 人中 1 人 (11%) においてペプチド特異的な T 細胞株の誘導が可能であった。しかしながら、HLA-A24 および HLA-A11 結合ペプチドではペプチド特異的な T 細胞株の誘導はできなかった。

G12V、G12A、G12C 配列を含む HLA-A2 結合ペプチドを用いて誘導された抗原特異的な T 細胞株が、それぞれの変異型 (G12V、G12A、G12C) 陽性で、かつ、HLA-A2 を発現した大腸癌細胞株に反応するかを IFN γ ELISpot 法により解析した。G12V 配列を含むペプチドに特異的な T 細胞株は G12V 陽性、かつ、HLA-A2 を発現した大腸癌細胞株 (SKCO1) に反応してサイトカイン (IFN γ) を分泌したが、G12V 陰性の大腸癌細胞株 (SW837 および SNUC1) には反応しなかった (図 4)。一方、G12A 配列あるいは G12C 配列を含む抗原エピートープに特異的な T 細胞株はそれぞれの変異陽性で、かつ、HLA-A2 を発現した大腸癌細胞株に反応しなかった (データ未掲載)。以上の結果から、G12V 配列を含む HLA-A2 結合ペプチドは、癌細胞表面に HLA-A2 分子と結合して発現、提示される真の抗原エピートープと考えられたが、G12A 配列あるいは G12C 配列を含む HLA-A2 結合ペプチドは癌細胞表面に発現、提示されていないものと示唆された。

図4: KRAS G12V 由来ペプチドに特異的な T 細胞の大腸癌細胞株への反応性



本研究により同定された G12V 配列を含む HLA-A2 結合ペプチドをワクチン抗原として用いることにより、G12V 変異を有する難治性進行癌患者に対して新たな免疫療法を提供できるものと期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 5 件)

Kawano K, Tsuda N, Matsueda S, Sasada

T, Watanabe N, Ushijima K, Yamaguchi T, Yokomine M, Itoh K, Yamada A, Kamura T. Feasibility study of personalized peptide vaccination for recurrent ovarian cancer patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014, in press. (査読有)

Sasada T, Yamada A, Noguchi M, Itoh K. Personalized peptide vaccine for treatment of advanced cancer. *Curr Med Chem.*, 2014 Feb 5. [Epub ahead of print]. (査読有)

Azuma K, Komatsu N, Hattori S, Matsueda S, Kawahara A, Sasada T, Itoh K, Hoshino T. Humoral Immune Responses to EGFR-derived Peptides Predict Progression-free and Overall Survival of Non-small Cell Lung Cancer Patients Receiving Gefitinib. *PLoS One*. 2014;9(1): e86667. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone. 0086667. eCollection 2014.

Yamada T, Azuma K, Muta E, Kim J, Sugawara S, Zhang GL, Matsueda S, Kasama-Kawaguchi Y, Yamashita Y, Yamashita T, Nishio K, Itoh K, Hoshino T, Sasada T. EGFR T790M Mutation as a Possible Target for Immunotherapy; Identification of HLA-A*0201-Restricted T Cell Epitopes Derived from the EGFR T790M Mutation. *PLoS One*. 2013;8(11):e78389. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0078389. eCollection 2013.

Noguchi M, Sasada T, Itoh K. Personalized peptide vaccination: a new approach for advanced cancer as therapeutic cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother*. 62:919-29, 2013. (査読有)

Noguchi M, Moriya F, Suekane S, Ohnishi R, Matsueda S, Sasada T, Yamada A and Itoh K. A phase II trial of personalized peptide vaccination in castration-resistant prostate cancer patients: Prolongation of prostate-specific antigen doubling time. *BMC Cancer*. 2013;13:613. (査読有)
DOI: 10.1186/1471-2407-13-613.

Takahashi R, Yoshitomi M, Yutani S, Shirahama T, Noguchi M, Yamada A, Itoh K, Sasada T. Current status of immunotherapy for the treatment of biliary tract cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(5) :1069-1072. (査読有)

Yutani S, Komatsu N, Yoshitomi M, Matsueda S, Yonemoto K, Mine T, Noguchi M, Ishihara Y, Yamada A, Itoh K, Sasada T. A phase II study of a personalized peptide vaccination for chemotherapy-resistant advanced pancreatic cancer patients.

Oncol Rep. 2013;30(3):1094-100. (査読有)
Takahashi R, Ishibashi Y, Hiraoka K, Matsueda S, Kawano K, Kawahara A, Kage M, Ohshima K, Yamanaka R, Shichijo S, Shirouzu K, Itoh K, Sasada T. Phase II study of personalized peptide vaccination for refractory bone and soft tissue sarcoma patients. Cancer Sci. 2013;104(10):1285-94. (査読有)
Yutani S, Komatsu N, Matsueda S, Yoshitomi M, Shirahama T, Yamada A, Itoh K, Sasada T. Juzentaihoto Failed to Augment Antigen-Specific Immunity but Prevented Deterioration of Patients' Conditions in Advanced Pancreatic Cancer under Personalized Peptide Vaccine. Evid-Based Compl Alt. 2013;Article ID 981717. (査読有)
DOI: 10.1155/2013/981717.
Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K: The next generation of peptide vaccines for advanced cancer. Cancer Sci. 2013;104(1):15-21. (査読有)
Komatsu K, Matsueda S, Tashiro K, Ioji T, Shichijo S, Noguchi M, Yamada A, Doi A, Suekane S, Moriya F, Matsuoka K, Kuhara S, Itoh K, Sasada T. Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination. Cancer. 2012;118(12):3208-21. (査読有)
Yoshiyama K, Terazaki Y, Satoko Matsueda S, Shichijo S, Noguchi M, Yamada A, Mine T, Ioji T, Itoh K, Shirouzu K, Sasada T, Takamori S. Personalized peptide vaccination in patients with refractory non-small cell lung cancer. Int J Oncol. 2012;40:1492-500. (査読有)
Yoshitomi M, Yutani S, Matsueda S, Ioji T, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K, Sasada T, Kinoshita H. Personalized peptide vaccination for advanced biliary tract cancer: IL-6, nutritional status, and pre-existing antigen-specific immunity as possible biomarkers for patient prognosis. Exp Ther Med. 2012;3(3):463-469. (査読有)
Noguchi M, Moriya F, Suekane S, Arai G, Yoshihara K, Ioji T, Matsueda S, Sasada T, Yamada A, Itoh K. Phase II study of personalized peptide vaccination in patients with castration-resistant prostate cancer evaluating progression status with or without prior docetaxel-based chemotherapy. Prostate. 2012;72(8):834-45. (査読有)
Terazaki Y, Yoshiyama K, Matsueda S, Watanabe N, Kawahara A, Naito Y, Suekane S, Komatsu N, Ioji T, Yamada A, Mine T, Terasaki M, Itoh K, Takamori S, Sasada T.

Immunological Evaluation of Personalized Peptide Vaccination in Refractory Small Cell Lung Cancer. Cancer Sci. 2012;103(4):638-44. (査読有)

Sasada T, Noguchi M, Yamada A, Itoh K. Personalized peptide vaccination: a novel immunotherapeutic approach for advanced cancer. Hum Vaccin Immunother. 2012;8(9):1309 -1313. (査読有)

Noguchi M, Mine T, Komatsu N, Suekane S, Moriya F, Matsuoka K, Yutani Y, Shichijo S, Yamada A, Toh U, Kawano K, Azuma K, Uemura H, Okuno K, Matsumoto K, Yanagimoto H, Yamanaka R, Oka M, Todo S, Sasada T, Itoh K. Assessment of immunological biomarkers in patients with advanced cancer treated by personalized peptide vaccination. Cancer Biol Ther. 2011;10:1266-79. (査読有)

〔学会発表〕(計24件)

Sasada T, et al. EGFR T790M mutation as a novel target for immunotherapy against EGFR-TKI-resistant non-small cell lung cancer. 28th Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer (SITC). 2013年11月8日. National Harbor, MD, USA.

Yamada T, Sasada T, et al. EGFR T790M-derived T Cell Epitopes as a Target for Immunotherapy against EGFR-TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月5日. 横浜市.

Yamada T, Sasada T, et al. EGFR T790M Mutation as a Novel Target for Immunotherapy against EGFR-TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. 第17回日本がん免疫学会総会. 2013年7月5日. 宇部市.

〔図書〕(計1件)

Komatsu N, Matsueda S, Noguchi M, Yamada A, Itoh K, Sasada T. Personalized peptide vaccine as a novel immunotherapy against advanced cancer. In Giese M ed. Molecular Vaccines - From Prophylaxis to Therapy. pp361-369, Springer-Verlag Wien, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 上皮成長因子受容体のT790M点突然変異配列に由来する抗原ペプチド
発明者: 笹田哲朗、中面哲也、大藤和也
権利者: 久留米大学、国立がんセンター
種類: 国際特許出願
番号: PCT/JP2013/071499
出願年月日: 2013年8月8日
国内外の別: 国外

名称: 上皮成長因子受容体のT790M点突

然変異配列に由来する抗原ペプチド
発明者：笹田哲朗
権利者：久留米大学
種類：国内特許出願
番号：特願 2012-177631
出願年月日：2012 年 8 月 10 日
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笹田 哲朗 (SASADA, Tetsuro)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号： 7 0 2 9 3 9 6 7