

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791735

研究課題名(和文) ErbBファミリーを標的とした頭頸部癌の免疫治療に向けた基盤研究

研究課題名(英文) HER family targeted immunotherapy against head and neck squamous cancer

研究代表者

熊井 琢美 (KUMAI, Takumi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00596306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は頭頸部癌における癌ペプチドワクチン療法の基盤確立を目的として行われた。頭頸部癌に高発現している癌蛋白であるEGFRに着目し、EGFRのアミノ酸配列より有効な抗腫瘍免疫を惹起できるエピトープ配列を複数同定した。これらのエピトープペプチドは健常人および癌患者において、直接癌を殺傷できる抗原特異的なCD4T細胞を誘導した。免疫治療の効果を向上するため、現行の診療で適応されているEGFR阻害薬とのコンビネーションセラピーを提唱した。EGFR阻害薬は腫瘍のMHC発現増加を介して免疫応答を増強した。以上より、本研究で同定したペプチドとEGFR阻害薬の併用は、頭頸部癌に対する有望な戦略と期待される。

研究成果の概要(英文)：T-cell-based immunotherapy has been proposed as a promising therapeutic approach to improve the clinical outcome for head and neck carcinoma (HNSCC).

In this study, we determined novel promiscuous EGFR epitopes that induced CD4 T-cell responses to HNSCC. The peptide-reactive CD4 T cells were capable of directly killing HNSCC cells. T cells reactive with the peptide could be detected in HNSCC patients. EGFR-reactive CD4 T cells were also able to recognise several peptide analogues derived from HER-2, HER-3 and c-Met. Finally, we examined the effects of EGFR inhibitors on CD4 T cell tumour reactivity. Treatment of tumour cells with the EGFR inhibitors enhanced tumour recognition by CD4 T cells presumably due to the upregulation of HLA-DR expression on the HNSCC cells.

These observations should facilitate the translation of T-cell-based immunotherapy into the clinic for the treatment of HNSCC and provide a rational basis for EGFR inhibition, immune-targeted combination therapy.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 腫瘍免疫 ペプチドワクチン療法 EGFR c-Met ヘルパーT細胞 EGFR阻害薬 HLA

1. 研究開始当初の背景

(1) ① 頭頸部扁平上皮癌(頭頸部癌)は抗癌剤や放射線の進歩に関わらず依然として完治が困難な悪性疾患であり、新たな治療戦略の確立が喫緊の課題である。免疫療法は手術や抗癌剤、放射線療法、そして分子標的薬に次ぐ治療法として注目されており、前立腺癌や悪性黒色腫ではその一部が既に臨床応用されている。頭頸部癌では免疫療法に应用可能な基礎的知見が不足しているため、臨床応用に向けたエビデンスの確立が不可欠である。

② ペプチドワクチン療法は腫瘍抗原の中から主要組織適合遺伝子複合体-T細胞受容体を介してCD4もしくはCD8陽性T細胞を刺激するエピトープペプチドを選択的に抗原として用いる癌免疫治療である。これまで多くのCD8エピトープがペプチドワクチンの標的として応用されてきたが、著しい臨床効果は認められなかった。近年、CD4陽性T細胞がCD8陽性T細胞へのヘルパー機能のみならず直接的な抗腫瘍効果を有することが明らかとなってきており、臨床実地でもCD4エピトープを用いたペプチドワクチン療法が著効を示すことが報告されている⁽¹⁾。これまで同定されてきた頭頸部癌由来のエピトープはその大半がCD8エピトープであり、頭頸部癌におけるCD4エピトープの同定が望まれる。

(2) 分子生物学の飛躍的な進歩に伴い、腫瘍がその生存や遠隔転移に利用している分子や転写因子が数多く同定され、それらの阻害薬の長期的な臨床成績が蓄積され始めている。同時に、これらの分子標的薬とその他の治療法との併用の是非が基礎研究における新たな焦点となってきた。ある種の分子標的薬はそれぞれの分子特有のメカニズムを介して免疫療法との相乗効果が望まれる(例: BRAF阻害薬は抑制型T細胞を阻害することで免疫療法のアジュバントと成り得る)。上皮成長因子受容体(EGFR)阻害薬は頭頸部癌で臨床応用された初めての分子標的薬であり、その免疫療法のアジュバントとしての可能性は未だ解明されていない。

(3) セツキシマブは頭頸部癌で臨床応用されている抗EGFR阻害抗体であり、その作用機序として、EGFRの阻害効果に加えてFc領域を介した抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)があげられる。しかし、頭頸部癌の高いEGFR発現に反してEGFR阻害薬の奏功率は満足できる水準に達していない。その理由として、腫瘍生得的な薬剤耐性や治療後に生じる薬剤耐性が考えられるが、これまでの報告の多くはEGFRを阻害した際に上昇するHER-2やc-Metに代表される腫瘍内シグナルの代替経路に集中している。抗体製剤の作用機序の一部としてADCCや補体依存性細胞傷害活性が考えられる一方で、免疫学的側面における腫瘍のセツキシマブ耐性機序は未だ解明され

ていない。

2. 研究の目的

(1) ① 我々はこれまでコンピュータアルゴリズムを用いて様々な癌腫で複数のCD4エピトープを同定してきた⁽²⁾。同アルゴリズムを用いて、頭頸部癌の腫瘍タンパクとして注目されているEGFRから抗腫瘍効果を惹起可能なCD4エピトープを探索する。

② EGFRはHERファミリーの一員であり、その他のHERファミリータンパクやc-Metと高い相同性を有している。EGFRタンパクから同定したCD4エピトープとその他のHERファミリーやc-Metとの交差反応性を検索する。

(2) ① EGFR阻害薬の免疫療法のアジュバントとしての可能性を、腫瘍上の免疫関連分子の発現を中心に解明する。

② 腫瘍のEGFR阻害薬への耐性機序を、腫瘍由来の液性因子や細胞表面上の免疫関連分子を中心に解明する。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌で高発現している腫瘍抗原を同定するため、頭頸部癌腫瘍細胞株のEGFRもしくはc-Metの発現フローサイトメトリー法で解析した。また、頭頸部癌ホルマリン固定組織におけるc-Metの発現を免疫組織染色で検討し、c-Metのリガンドである肝細胞増殖因子(HGF)の患者血中における発現をELISA法にて解析した。

(2) 複数のコンピュータアルゴリズム(IMMUNE EPITOPE DATABASE、SYFPEITHI、BIMAS)を用いて、EGFRタンパク及びc-Metタンパクのアミノ酸配列の中から複数の日本人に代表的なHLA-DR(DR4やDR9、DR15など)に結合可能なエピトープを同定し、同ペプチド(純度90%以上)を合成した。

(3) ① 同定したエピトープペプチドを用いて抗原特異的なCD4ヘルパーT細胞株を樹立した。まず、健常成人由来の末梢血より磁気ビーズを用いてCD14陽性細胞を分離し、GM-CSFとIL-4を加えて培養することで単球由来樹状細胞を誘導した。次に、末梢血より磁気ビーズを用いてCD4陽性ヘルパーT細胞を分離し、エピトープペプチドを提示させた樹状細胞およびリコンビナントIL-2と共培養を行った。その後、放射線照射末梢血単核球を抗原提示細胞としてペプチド刺激を1-3サイクル繰り返し、限外希釈法により抗原特異的なT細胞株を選択した。T細胞株の抗原反応性は、ペプチドをパルスした放射線照射末梢血単核球との共培養上清中のサイトカイン(IL-4、IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて確認した。

② 誘導したT細胞株のHLA-DR拘束性を確かめるため、ペプチドをパルスした放射線照射末梢血単核球との共培養に抗HLA-DR抗体

(L243)を添加し、上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて確認した。各T細胞株の拘束HLA-DR分子を確定するため、単一のHLA-DRを発現させたマウス線維芽細胞株(L-DR4、L-DR9、L-DR15、L-DR53)もしくはリンパ芽球様細胞株(HLA-DR12/12ドナー由来)を抗原提示細胞としてペプチドをT細胞株に提示させ、上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて測定した。

③ 樹立したEGFRもしくはc-Met特異的CD4陽性ヘルパーT細胞株が誘導に用いたエピトープと相溶性が高いその他のタンパク(HER-2、HER-3、c-Met)由来のエピトープにも反応可能か確かめるため、これらのエピトープペプチドをパルスした射線照射末梢血単核球とT細胞株を共培養し、上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて測定した。

④今回同定したEGFRエピトープが、健常人のみならず頭頸部癌患者にも抗原特異的なT細胞群を惹起できるか確かめるため、患者末梢血単核球をEGFRエピトープペプチドで2サイクル刺激し、上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて測定した。2サイクル目の抗原提示細胞には放射線照射した患者末梢血単核球を用いた。

(4)① 樹立したT細胞株の腫瘍への応答性を確認するため、T細胞株と頭頸部癌細胞株もしくは腫瘍ライセートを提示させた樹状細胞を共培養し、上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて測定した。

② 樹立したT細胞株の腫瘍障害活性を確認するため、T細胞株と頭頸部癌細胞株を共培養し、培養上清中のLDH値(色素法)を元に細胞傷害活性を解析するサイトトキシックアッセイを行った。

(5)① EGFR阻害薬(セツキシマブ、エルロチニブ)の添加の有無による頭頸部癌細胞表面のHLA-DR分子、CD80、CD86、PD-L1の変化をフローサイトメトリー法で、頭頸部癌細胞中のEGFR、HSP-70、HSP-90の発現の変化をウエスタンブロット法で、培養上清中のサイトカイン(TGF- β 、プロスタグランジンE2)の変化をELISA法を用いて検討した。

② 頭頸部癌細胞株をEGFR阻害薬処置群と未処置群に分け、それぞれT細胞株と共培養して上清中のサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF)をELISA法にて測定することで、EGFR阻害薬のアジュバントとしての有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 頭頸部癌に高発現している腫瘍タンパクを同定するため、頭頸部癌細胞株の細胞膜上におけるEGFRおよびc-Metタンパクの発現をフローサイトメーター法で解析した。その結果、EGFRとc-Metはともに多くの頭頸部癌細胞株の細胞膜上に高発現していた。頭頸部癌組織におけるEGFRの発現は広く知られ

ているが、c-Metの発現はあまり明らかとなっていない。そのため、頭頸部癌組織にもEGFRやc-Metが発現しているか確認するため、頭頸部癌組織ホルマリン固定切片を用いて免疫組織染色を行ったところ、患者組織においても癌細胞膜上でのEGFRとc-Metの発現を確認した(図1)。また、c-MetのリガンドであるHGFの発現は健常ドナーに比べて頭頸部癌患者の血清中で優位に増加していたことから、頭頸部癌では細胞増殖や薬剤耐性メカニズムに関連するHGF/c-Metシグナリングが亢進していることが示唆された。

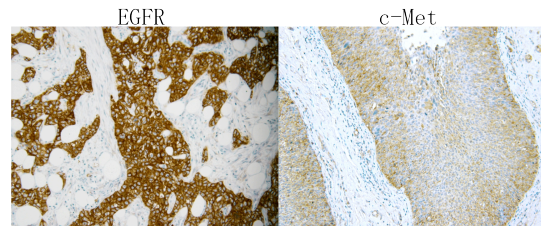


図1 頭頸部癌免疫染色例

(2) EGFRおよびc-Metタンパクを標的とした頭頸部癌の癌免疫療法を開発するため、それぞれのアミノ酸配列からコンピュータアルゴリズムを用いて複数のHLA-DRに結合可能なエピトープを複数同定した(EGFR85-99、EGFR875-889、EGFR1136-1150、c-Met278-292、c-Met817-831、c-Met1244-1258)。これらのエピトープペプチドが実際に免疫原性を有しているか確認するため、健常ドナー由来の末梢血単核球を同ペプチドで刺激し、ペプチド反応性CD4ヘルパー細胞株(HTL)を樹立した。HTLは複数のドナーより樹立可能であり、ペプチドの濃度依存性にサイトカインを分泌した(図2)。これらのHTLはIFN- γ やGM-CSFといったTh1サイトカインを産生したが、IL-4に代表されるTh2サイトカイン産生は認められなかったため、本検討で同定したエピトープは抗腫瘍効果をもたらすTh1型サイトカインを誘導可能なエピトープと考えられた。

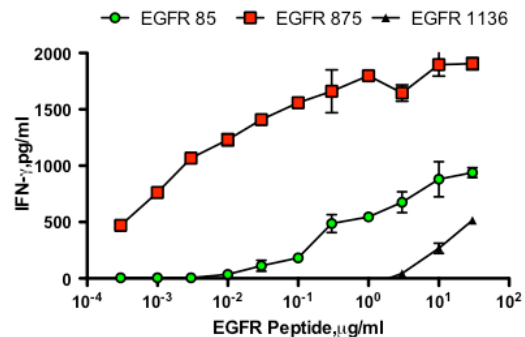


図2 EGFR特異的HTLによるIFN- γ 産生

(3)① EGFRもしくはc-MetペプチドがHLA-DRを介してHTLを刺激しているか解析するため、抗HLA-DR抗体を培養系に添加したところ、HTLによるサイトカイン産生は著明

に抑制された。よって、これらのペプチドは HLA-DR 拘束性に HTL を刺激していることが明らかとなった。

② 今回同定した EGFR 由来もしくは c-Met 由来エピトープをペプチドワクチン療法として応用する場合、ペプチドが複数の患者に応用可能な、つまり複数の HLA-DR に結合可能なことが求められる。同定したペプチドの汎用性を確認するため、単一のヒト HLA-DR を発現させたマウス線維芽細胞もしくはリンパ芽球様細胞株を抗原提示細胞としてペプチドを提示させ、HTL への刺激能を検討した。その結果、我々が樹立した HTL は HLA-DR4 や 15、53 といった複数の HLA-DR 拘束性を有していた。よって、これらのエピトープは多くの患者に応用可能なペプチドワクチンに成り得ると考えられた。

HTL	ドナーの HLA-DR	拘束分子
TKG8	DR9/12	HLA-DR53
HK22	DR4/9	HLA-DR4
S11	DR4/15	HLA-DR15
S22	DR4/15	HLA-DR53
M8	DR9/13	HLA-DR53

表 1 HTL の HLA-DR 拘束性

(4)① 樹立した HTL がペプチドのみならず腫瘍を直接認識できるか確認するため、HTL と HLA-DR 型が一致した頭頸部癌細胞株を共培養し、上清中のサイトカインを測定した。その結果、HTL は抗原および HLA-DR 拘束性に直接腫瘍を認識して IFN- γ を分泌しており、この反応は抗 HLA-DR 抗体によって抑制されたため、HTL は HLA-DR を介して腫瘍を直接認識していると考えられた。

② 樹状細胞による腫瘍やタンパクの捕捉と抗原提示は T 細胞のプライミングに重要な要素である。今回同定したペプチドが樹状細胞内の抗原提示機構によって自然に提示されるエピトープか確認するため、樹状細胞に凍結法で作製した腫瘍ライセートを提示させ、HTL の反応性を解析した。その結果、HTL は樹状細胞に反応してサイトカインを分泌したことより、今回同定したエピトープは樹状細胞の抗原提示機構により自然にプロセス・提示されるエピトープと考えられた。

③ 近年、CD4T 細胞は CD8T 細胞に対するヘルパー機能のみならず、腫瘍への直接傷害活性を有していることが明らかとなってきた。樹立した HTL が腫瘍を直接認識するのみならず、腫瘍への傷害活性をも備えているか検討するため、HTL と腫瘍との共培養系を用いた LDH 測定によるサイトトキシックアッセイを行った。その結果、HTL は腫瘍への直接傷害活性を有していることが明らかとなったため(図 3)、本ペプチドは頭頸部癌に対するペプチドワクチンとして有用であると考えられた。

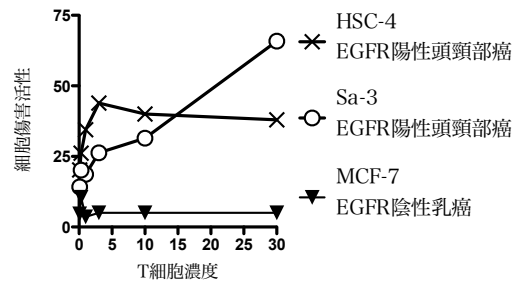


図 3 HTL による腫瘍の細胞傷害活性

(5) 次に、本ペプチドが健常人のみならず、頭頸部癌患者でも有効に免疫反応を惹起可能か確認するため、患者末梢血単核球をペプチド刺激しサイトカイン産生を解析した。その結果、ペプチドは Th1 サイトカインのみを誘導し、Th2 サイトカインや抑制型 T 細胞サイトカインの産生は認められなかったため、本ペプチドは頭頸部癌におけるペプチドワクチンとして有用であると考えられた。

(6)① 近年の癌治療における大きな飛躍の一つとして、分子標的薬の開発が挙げられる。本邦の頭頸部癌診療においても、EGFR 阻害薬が導入され、現在治療エビデンスが蓄積されている。EGFR シグナリングは CIITA 遺伝子発現の抑制に伴い MHC の発現を抑制する可能性が示唆されているため⁽³⁾、免疫療法と EGFR 阻害薬の併用は相乗効果が期待される。そこで我々は、EGFR 阻害薬の有無による頭頸部癌細胞株上の HLA-DR 発現の変化を検討した。その結果、複数の頭頸部癌細胞株で HLA-DR 発現が上昇することが明らかとなった。

② 次に、EGFR 阻害薬が実際に T 細胞による腫瘍免疫応答を増強させるか確認するため、EGFR 阻害薬で前処置した腫瘍と HTL を共培養し、サイトカイン産生と細胞傷害活性を測定した。その結果、実験に用いた 75% の細胞株でサイトカイン産生および細胞傷害活性が上昇しており(図 4)、EGFR 阻害薬は T 細胞による抗腫瘍応答を増強することが考えられた。

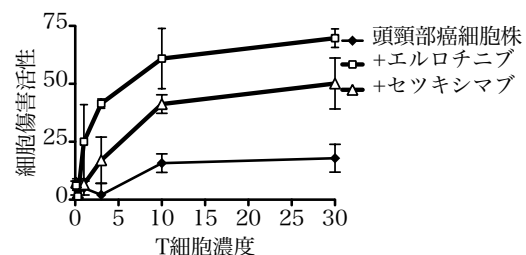


図 4 EGFR 阻害薬による抗腫瘍効果の増強

(7)① 前述の実験系により、EGFR 阻害薬が強力な免疫アジュバントに成り得ることが示唆された。その一方で、本検討で用いた頭頸部癌のうち EGFR 阻害によって HLA-DR の発現

が増加するにも関わらず、HTL の免疫応答が減弱する頭頸部癌細胞株(Sa-3)を認めた。その原因を探るべく、Sa-3 由来のサイトカインに着目したところ、EGFR 阻害によって免疫抑制サイトカインである TGF- β やプロスタグランジン E2 の産生が増大することが明らかとなった。

② Sa-3 由来の免疫抑制サイトカインが実際に HTL の免疫応答を減弱させているか確認するため、Sa-3 と HTL、EGFR 阻害薬の共培養系に抗 TGF- β 阻害抗体もしくは COX-2 阻害薬を添加したところ、減弱していた HTL の応答が改善したため、一部の腫瘍では EGFR 阻害薬による免疫抑制サイトカインの誘導が T 細胞応答の減弱に関わっており、EGFR 阻害薬をアジュバントとして使用する場合、抗 TGF- β 阻害抗体や COX-2 阻害薬の併用が更なる抗腫瘍効果の向上につながると考えられた。さらに、セツキシマブの作用機序の一つとして NK 細胞などを介した免疫応答が考えられているため、これらの免疫抑制サイトカインの産生は EGFR 阻害薬の耐性機序にも関与していることが推察された。

(8) EGFR 阻害薬の耐性機序の一つとして、HER-2 や HER-3、c-Met などのその他のシグナリングが相補的に働くことが考えられている。実際に、頭頸部癌細胞株を EGFR 阻害薬で処理した場合、HER-3 の発現が上昇することを確認した。また、EGFR 欠損変異やエピトープ変異といった変異株にも対応するためには、EGFR のみならずその他の主要なシグナリングを同時に標的とすることが望ましい。HER ファミリーや c-Met タンパク内には、本検討で我々が同定した EGFR エピトープと高い相同性を有するアミノ酸配列が存在する(表 2)。そのため、EGFR エピトープペプチドで誘導した HTL が相同性が高いその他のタンパク由来のペプチドにも反応可能か、各ペプチドを提示させた末梢血単核球と HTL の共培養系で確認した。その結果、EGFR 反応性 HTL は HER-2、HER-3、そして c-Met 由来ペプチドにも反応出来ることが明らかとなった。

腫瘍抗原	アミノ酸番号	アミノ酸配列
EGFR	875-889	KVPIKWMAL <u>ES</u> ILHR
HER-2	883-897	KVPIKWMAL <u>ES</u> ILRR
HER-3	872-886	K <u>T</u> PIKWMAL <u>ES</u> I <u>H</u> FG
c-Met	1244-1258	KLP <u>V</u> KWMAL <u>ES</u> L <u>Q</u> TQ

表 2 EGFR とアナログエピトープ配列

以上の結果より、本検討で同定した EGFR もしくは c-Met ペプチドは HER ファミリーや c-Met を発現している頭頸部癌に対するペプチドワクチンとして有効であることが期待され、さらに EGFR 阻害薬、COX 阻害薬もしくは抗 TGF- β 阻害抗体との併用によるコンビネーションセラピーがより強力な抗腫瘍免疫

を惹起することが示唆された。

<引用文献>

- ① Eric Tran, Simon Turcotte, Alena Gros、他、Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer、Science、2 巻、2014、p. 70-85
- ② Takumi Kumai、Kei Ishibashi、Kensuke Oikawa、他、Induction of tumor-reactive T helper responses by a posttranslational modified epitope from tumor protein p53、Cancer Immunology Immunotherapy、63 巻、5 号、2014、p. 469-478
- ③ Brian Pollack、Bishu Sapkota1、Todd V. Cartee1、Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Augments the Expression of MHC Class I and II Genes、Clinical Cancer Research、17 巻、2011、p. 4400-4413

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 4 件)

- ① Takumi Kumai、Yoshinari Matsuda、Takayuki Ohkuri、他、c-Met is a novel tumor associated antigen for T-cell based immunotherapy against NK/T cell lymphoma、OncoImmunology、査読有、4 巻、2 号、2015、p. 1-10
DOI: 10.4161/2162402X.2014.976077
- ② Takumi Kumai、Kensuke Oikawa、Naoko Aoki、他、Tumor-derived TGF- β and prostaglandin E2 attenuate anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma treated with EGFR inhibitor、Journal of Translational Medicine、査読有、12 巻、2014、p. 1-9
DOI: 10.1186/s12967-014-0265-3
- ③ 熊井 琢美、長門 利純、高原 幹、他ヘルパー T 細胞と免疫アジュバントを用いた頭頸部癌免疫治療の開発、耳鼻咽喉科免疫アレルギー、査読有、32 巻、3 号、2014、p. 185-190
DOI: 10.5648/jjiao.32.185
- ④ Takumi Kumai、Yoshinari Matsuda、Kensuke Oikawa、他、EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy、British Journal of Cancer、査読有、577 巻、2013、p. 1-12
DOI: 10.1038/bjc.2013.577

[学会発表] (計 5 件)

- ① 熊井 琢美、c-Met 及びオートファジー

を標的としたヘルパー T 細胞による癌免疫治療の確立、日本病理学会総会、2014年4月25日、広島市

- ② 熊井 琢美、Autophagy regulates c-Met specific helper T cells anti-tumor responses in vitro、日本癌学会学術総会、2013年10月3日、横浜市
- ③ 熊井 琢美、EGFR 反応性 CD4 陽性ヘルパーT細胞クローンの樹立及びEGFR 阻害薬のアジュバントとしての有用性、日本耳鼻咽喉科学会、2013年5月15日、札幌市
- ④ Takumi Kumai、EGFR inhibition augments anti-tumor immune responses by HER family-specific human CD4 helper T cells in vitro、American Association for Cancer Research Annual Meeting、2013年4月6日、Washington D.C.
- ⑤ 熊井 琢美、腫瘍免疫におけるアジュバントとしてのEGFR 阻害薬の有用性、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2013年2月7日、倉敷市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊井 琢美 (KUMAI, Takumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：00596306

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし

(4) 研究協力者

特になし