

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460430

研究課題名(和文) EGFRを標的とした難治性癌の免疫分子標的治療への融合に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Assessment of T-cell based immunotherapy targeting EGFR with immune-molecular targeted combination therapy for treatment of refractory cancer.

研究代表者

小林 博也 (KOBAYASHI, Hiroya)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRとそのHERファミリーに属するHER3ならびに、これらに高度の相同性を有するc-Metのアミノ酸配列からエピトープペプチドを合成し、強力な腫瘍反応性ヘルパーT細胞応答を惹起しうるか検討したところ、固形癌ならびに鼻性NK/T細胞リンパ腫に対してサイトカインを分泌し傷害活性を有するヘルパーT細胞を誘導できた。これらの反応は複数のHLA-DR分子によるpromiscuousな応答であった。EGFR、c-MetおよびHER3キナーゼ阻害薬は、抗原提示細胞のHLA分子の発現を上昇させ、T細胞の反応性を有意に増強した。分子標的薬と癌免疫治療の相乗効果に関する理論的根拠に成り得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the capacity of predicted CD4 T-cell peptide epitopes from HER family to induce anti-tumor immune responses. Among several predicted peptide epitopes, EGFR875-889 elicited CD4 T cell responses that were restricted by several HLA-DR alleles, indicating that the peptide functions as a promiscuous T cell epitope. The CD4 T cells were capable of directly recognizing and killed HNSCC or lymphoma cells expressing antigens. Finally, we examined whether an EGFR tyrosine kinase inhibitor would affect CD4 T cell tumor reactivity. Treatment of tumor cells with the EGFR inhibitors enhanced tumor recognition by EGFR875-889 reactive T cells presumably due to the up-regulation of HLA-DR expression in the tumor cells. The results demonstrate the utility of EGFR inhibitors as immune modulators. These observations may facilitate the translation of T-cell based immunotherapy into the clinic for the treatment of malignancies and rational explanation for immune-targeted combination therapy.

研究分野：病理学

キーワード：腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

癌による死亡者数は年々増加し、国民の3人に1人が癌で死亡する時代に突入した。癌治療における基本選択はまず、外科手術による“癌の減量”であり、固形癌治療には最も望ましい選択肢であると考えられる。近年開発されてきた分子標的薬などにより、外科的切除でも治療成績が向上しにくい頭頸部癌、肺癌などの難治癌や再発・全身転移症例においても、予後の改善が見られるようになったが、その効果は限定的である。このため難治、再発癌の治療法の一つに近年免疫治療が注目され、欧米や本邦で癌抗原ペプチドを用いたペプチドワクチン療法の開発が進められてきた。最近、化学療法や放射線治療との併用で、一部の患者群において原発、転移巣の縮小や血清腫瘍マーカー値の低下等その有用性が認識され、QOLの改善した症例も報告されはじめた。癌ペプチドワクチン治療は副作用のほとんどない、体に優しい新たな癌治療法で、今後の発展が期待されている治療分野の一つである。

本研究では、難治性固形癌に強く発現し、その発現の増強が不良な予後に直結するEGFR(HER)ファミリー分子を標的として、有効な癌ペプチドワクチンとなりうるT細胞エピトープペプチドの同定を行う。ゲフィチニブなどのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の副作用として、皮膚炎や間質性肺炎などがあるが、特に皮膚炎を起こした患者群において、起こさない群より予後が良いとの報告がある。EGFRに対する分子標的薬が免疫系に及ぼす影響を明らかにし、免疫治療と分子標的薬とが相乗効果をもたらすような、臨床応用の可能性に向けた基盤的研究を行う。

### 2. 研究の目的

難治癌の新たな治療法として、免疫治療と分子標的薬を相互に組み合わせる combination therapy が近年話題となっている。その標的分子としてEGFRファミリー分子に着目した。

ヒトの免疫系でEGFRを認識するCD4ヘルパーT細胞の報告は未だなく、癌ペプチドワクチンと成りうる新たなヘルパーエピトープペプチドの同定を行うことは重要な研究課題である。そしてゲフィチニブ等のチロシンキナーゼ阻害剤やそれらに対する抗体が、腫瘍細胞のHLA抗原分子の発現を増強しうるかどうかを明らかにし、EGFRファミリー分子を標的とした免疫治療、分子標的治療の融合と相乗効果を目指した研究基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

EGFRのアミノ酸配列から、複数のHLA-DR分子に結合可能性が高い配列EGFR<sub>875-889</sub>ペプチドを合成した。更に、このペプチドと非常に相同性の高いペプチドを、HER3,c-Metから選択合成した。

ペプチドに反応するCD4ヘルパーT細胞を健常成人末梢血から誘導し、腫瘍細胞株への反応、傷害活性をELISAで定量した。

チロシンキナーゼ阻害薬で、腫瘍細胞を処理し、細胞表面上のHLA分子が増強されるかを確認し、腫瘍に対するT細胞の反応性が増強されるかどうか検討した。更に、オートファジー阻害薬の効果や腫瘍から放出される抑制性因子が反応性に与える影響を検討した。

頭頸部癌患者末梢血中のこれら腫瘍抗原ペプチドに対するT細胞の反応性を、TH1サイトカインの産生量をもとに定量した。

### 4. 研究成果

EGFR<sub>875-889</sub>ペプチドは、複数のHLA-DR分子拘束性にヘルパーT細胞を誘導し、腫瘍由来のEGFRタンパク抗原を認識したので、このエピトープペプチドは癌ワクチンペプチドとして有用な promiscuous epitope であると考えられた。EGFR<sub>875-889</sub>エピトープと高い相同性を有するアミノ酸配列がその他のHER familyであるHER-2やHER-3、c-Metに存在する事から、EGFR特異的ヘルパーT

細胞と相同性を有する HER-2、HER-3 または c-Met 由来ペプチドで刺激したところ、一部の T 細胞は HER-2 や HER-3、c-Met ペプチドを認識しサイトカイン産生をした。また T 細胞と HER-2、HER-3 または c-Met 陽性腫瘍細胞を共培養したところ、EGFR 特異的ヘルパー T 細胞はこれらの腫瘍を直接認識できる事が明らかとなった。

HER ファミリー分子に対するチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)で腫瘍を処置したところ、腫瘍細胞表面上の HLA-DR 分子の発現増強を認めた。次に、TKI で前処置した腫瘍と特異的ヘルパー T 細胞を共培養したところ、TKI 未処置群に比べサイトカイン産生能及び腫瘍傷害活性が上昇した事から、TKI が癌免疫治療の有効なアジュバントとなる可能性が示唆された。

TKI が腫瘍抗原特異的ヘルパー T 細胞の抗腫瘍効果を増強するアジュバントとして、普遍的に機能するか検討を進めたところ、ある種の細胞株（歯肉扁平上皮癌細胞株 Sa3）においては、TKI が腫瘍の MHC 分子の発現を上昇させるにも関わらず、ヘルパー T 細胞の免疫応答をむしろ低下させることが判明した。TKI は、腫瘍細胞内のトータルの EGFR タンパク量を減少させることはなく、また腫瘍細胞表面上の共刺激分子（CD80,CD86）や免疫チェックポイントシグナル分子（PD-L1）の発現に影響を及ぼさなかったため、T 細胞への抗原提示の低下が免疫応答源弱の要因ではないと考えられた。そのメカニズムの一因として腫瘍からのサイトカイン分泌に着目したところ、腫瘍からの TGF-β やプロスタグランジン E2 の発現が TKI によって増強し、さらにこの増強したサイトカイン分泌によって T 細胞の免疫応答が減弱するものと考えられた。この TKI 阻害薬による抗腫瘍免疫への負の制御は COX-2 阻害薬や TGF-β 阻害薬および抗体の添加により解除可能な事より、EGFR TKI 阻害薬と、これら

の抑制性サイトカイン分泌阻害薬や抗体の併用が癌免疫治療のアジュバントとして有効であると考えられた。

c-Met およびそのリガンドである HGF は、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫組織および、その細胞株に発現しており、c-Met TKI の添加でその増殖が抑制された。EGFR<sup>875-889</sup> に高い相同性を有する c-Met<sup>1244-1258</sup> ペプチドは、promiscuous に反応するヘルパー T 細胞を惹起し、c-Met を発現するリンパ腫細胞株を認識し、傷害した。また c-Met TKI はリンパ腫細胞の増殖を抑制し、更に TGF-β の産生を抑制することで、ヘルパー T 細胞の腫瘍への反応性を増強した。

抗原提示細胞内のオートファジーが、c-Met 特異的ヘルパー T 細胞の抗原認識に影響を及ぼすか検討したところ、オートファジー阻害薬(3-MA,17-DMAG)で処理された腫瘍に対する反応性は減弱し、逆にオートファジー亢進薬バルプロ酸処理によって反応性は増強した。

HER3<sup>872-886</sup> 特異的ヘルパー T 細胞は、HER3 を発現する頭頸部扁平上皮癌細胞株を認識し、これらを傷害した。さらに pan-HER ファミリー TKI(Dacomitinib)は、腫瘍細胞の HLA クラス II 分子の発現を上昇させることで、HER3 特異的ヘルパー T 細胞の腫瘍反応性を有意に増強させた。

これらの結果は、HER 分子 TKI、c-Met TKI、更にオートファジー亢進薬などの分子標的薬の併用が癌免疫治療のアジュバントとして有効であることを示すものであると考えられた。

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 7 件)

1: Kumai T, Kobayashi H, Harabuchi Y. Novel targets for natural killer/T-cell lymphoma immunotherapy. Immunotherapy. 2016

Jan;8(1):45-55. doi:10.2217/imt.15.103. 査読有

2: Kumai T, Ohkuri T, Nagato T, Matsuda Y, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Celis E, Harabuchi Y, Kobayashi H. Targeting HER-3 to elicit antitumor helper T cells against head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2015 Nov 5;5:16280. doi: 10.1038/srep16280. 査読有

3: Kumai T, Matsuda Y, Ohkuri T, Oikawa K, Ishibashi K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. c-Met is a novel tumor associated antigen for T-cell based immunotherapy against NK/T cell lymphoma. *Oncoimmunology*. 2015 Mar 6;4(2):e976077. eCollection 2015 Feb. PubMed PMID: 25949874; 査読有

4: Kumai T, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Kobayashi H. Assessment of the change in cetuximab-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of natural killer cells by steroid. *Head Neck*. 2016 Mar;38(3):410-6. doi:10.1002/hed.23906. 査読有

5: Kumai T, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. Tumor-derived TGF- $\beta$  and prostaglandin E2 attenuate anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma treated with EGFR inhibitor. *J Transl Med*. 2014 Sep 21;12:265. doi: 10.1186/s12967-014-0265-3. 査読有

6: Kumai T, Ishibashi K, Oikawa K, Matsuda Y, Aoki N, Kimura S, Hayashi S, Kitada M, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. Induction of tumor-reactive T helper responses by a posttranslational modified epitope from tumor protein p53. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 May;63(5):469-78. doi:10.1007/s00262-014-1533-z. 査読有

7: Kumai T, Matsuda Y, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H.

EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy. *Br J Cancer*. 2013 Oct 15;109(8):2155-66. doi:10.1038/bjc.2013.577. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 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 熊井琢美、小林博也、原淵保明、第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013 年 2 月 7-9 日、倉敷
2. EGFR inhibition augments anti-tumor immune responses by HER family-specific human CD4 helper T cells in vitro. Kumai, T., Harabuchi, Y., Kobayashi, H., American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2013 年 4 月 6-10 日、Washington DC, USA
3. 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、熊井琢美、小林博也、原淵保明、第 114 回日本耳鼻咽喉科学会、2013 年 5 月 15-18 日、札幌
4. 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、熊井琢美、青木直子、木村昭治、小林博也、第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日、札幌
5. Autophagy regulates c-Met specific helper T cells anti-tumor responses in vitro、熊井琢美、松田佳也、及川賢輔、原淵保明、小林博也、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日 横浜
6. 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、熊井琢美、小林博也、原淵保

明、第32回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2014.2.6 (徳島)

7. 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、熊井琢美、及川賢輔、青木直子、木村昭治、小林博也、第103回日本病理学会総会、2014.4.25 (広島)
8. EGFR 阻害薬によって腫瘍から放出される抑制性サイトカインは抗腫瘍免疫を低下させうる 熊井琢美、大栗敬幸、石橋佳、及川賢輔、青木直子、小林博也 第104回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2(名古屋)
9. EGFR 阻害薬による抗腫瘍免疫への影響について 熊井琢美、大栗敬幸、小坂朱、長門利純、石橋佳、大原賢三、平田結、及川賢輔、原淵保明、小林博也 第74回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10(名古屋)
10. セツキシマブの抗体依存性細胞障害活性に対するステロイドの影響 長門利純、熊井琢美、平田結、大原賢三、石橋佳、大栗敬幸、小坂朱、及川賢輔、小林博也、原淵保明 第74回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10(名古屋)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 博也 (KOBAYASHI Hiroya)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867