

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861239

研究課題名(和文) ROR1を標的とした肺癌の免疫治療に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 as immunotherapeutic targets for lung adenocarcinoma

研究代表者

林 諭史 (HAYASHI, SATOSHI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10463754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の新たな治療法として発展している免疫治療において、標的となるヘルパーT細胞癌抗原としてROR1(Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1)に着目し研究した。ROR1とEGFRの発現には正の相関がみられた。ROR1は多くの癌腫で発現しており、また正常細胞には発現が見られないことから、癌免疫治療の有用な標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) is highly expressed in LC and since the expression of molecules in normal tissue is significantly lower as compared to tumor cells, these proteins are considered as potential tumor-associated antigens (TAAs) for developing T-cell based immunotherapy.

研究分野：肺癌

キーワード：ROR1 肺癌 免疫療法

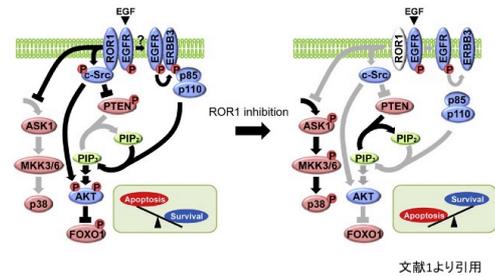
1. 研究開始当初の背景

(1) 癌による死亡者数は増加の一途であり、国民の3人に1人が癌死する時代に突入した。中でも肺癌は悪性腫瘍の死因で第一位を占めており、肺癌治療成績の向上が社会全体へ果たす役割は大きい。肺癌は進行期で発見されるものが多く、手術適応となる癌は一部しかない。近年、肺癌のうち8割を占める非小細胞癌において、EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子など、肺癌増殖の鍵となる遺伝子変異の存在が証明され、各々変異を有する肺癌に対して、特異的阻害薬である種々の分子標的薬が開発されてきた。これにより、外科切除でも治療成績が向上しにくい難治肺癌、再発・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、未だその効果は限定的である。

(2) 近年、難治・再発癌の治療法の一つに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。化学療法や放射線治療との併用で、一部の患者群で原発・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ている。癌ペプチドワクチン療法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。

(3) 本研究では、肺腺癌に発現しているEGFRと協調して働くROR1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。EGFRは非小細胞肺癌の40-70%をはじめ、様々の固形癌に発現しており、既にEGFR選択的チロシンキナーゼ阻害薬(Gefitinib, Erlotinib)が臨床応用されている。ROR1は1992年に同定された膜受容体型偽チロシンキナーゼである<sup>1)</sup>。ROR1は癌細胞株の75%に発現がみられ、ROR1を抑制することで腫瘍増殖が抑制されると報告されている<sup>2)</sup>。ROR1はEGFRを介したシグナル伝達系であるPI3K-AKTとp38の良好なバランスを維持するとされ、ROR1をノックダウンすることで、Gefitinib抵抗性の肺腺癌に対しても、良好な抗腫瘍効果が得られたとの報告もなされている<sup>3)</sup>。従って、肺腺癌治療において、EGFRのみならずROR1をブロックすることで、より良好な治療効果が得られると考えられる(右上図)。

図 ROR1キナーゼ依存経路では、c-Srcを介しAKTが活性化される(左)。ROR1をブロックすることで、細胞膜上でのEGFR-ERBB3相互作用が無くなり、AKTを介したシグナル伝達経路が抑制される(右)。



文献1より引用

これまで受容体チロシンキナーゼについて、HER-2を標的としたT細胞エピトープペプチドやEGFRを標的としたキラーT細胞エピトープペプチドの報告は散見されるものの、ROR1を標的としたヘルパーT細胞エピトープペプチドの報告はなく、有効性が確立され始めているWT-1に代表される癌ペプチドワクチン療法の新たな標的ペプチドとして有用と思われる。

(4) 申請者はGefitinibなどのEGFR阻害剤を、EGFRが高発現している肺癌細胞株に添加する事で、エピトープペプチドの提示に必須であるMHC分子の発現が増強するというpreliminaryな知見を有している(未発表)。本研究では、ROR1を標的とした免疫療法と、既知の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

肺癌の新たな治療法として発展している免疫治療において、標的となる癌抗原としてROR1(Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1)に着目する。ROR1は膜受容体型偽チロシンキナーゼであり、これを標的とした新たなヘルパーエピトープペプチドの同定を行う。そのペプチドを用いて樹立したTリンパ球の抗腫瘍効果を明らかにすると同時に、ROR1を標的とした免疫療法と上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とした分子標的薬の融合を目指した研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株および手術材料から、ROR1, EGFRの発現を検討し、予後との関連を調べる。

(2) ROR1に対する新たなpromiscuous Tヘルパーエピトープペプチドを同定する。ペプチド特異的T細胞が、癌幹細胞を認識出来るかどうか明らかにする。

(3) 分子標的薬による免疫の賦活化と、その抗原プロセッシングの動態変化を観察する。

(4) 変異ペプチドやリン酸化抗原ペプチドに

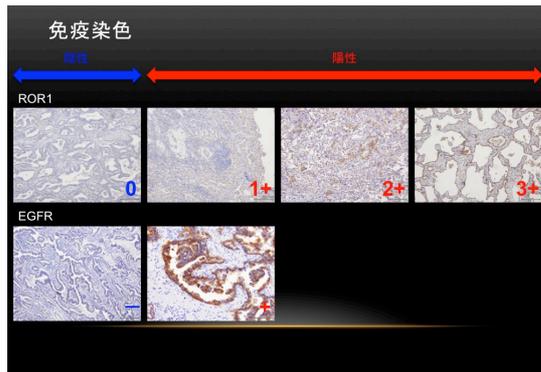
反応性を示す T 細胞を樹立する。

(4)テトラマーアッセイ法を用いて、癌患者末梢血中に存在するペプチド特異的 T 細胞の動態および頻度を明らかにし、臨床応用に最適な ROR1 ペプチドを同定する。

#### 4. 研究成果

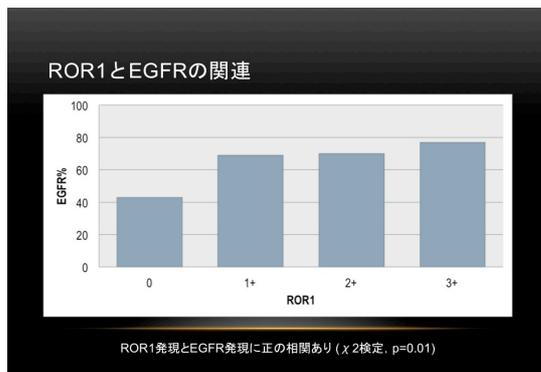
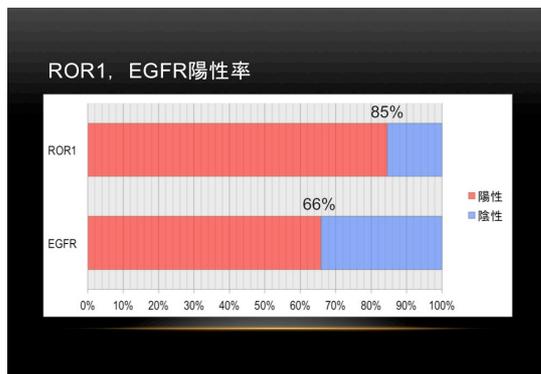
##### (1) ROR1, EGFR 免疫染色の評価

ROR1 と EGFR の免疫染色を行った。ROR1 は免疫染色を行い、染色強度を 0~3+で評価し、1+以上を陽性とした。EGFR 染色は癌細胞膜に染色が見られたものを陽性とし、臨床病理学的因子との関連を検討した。



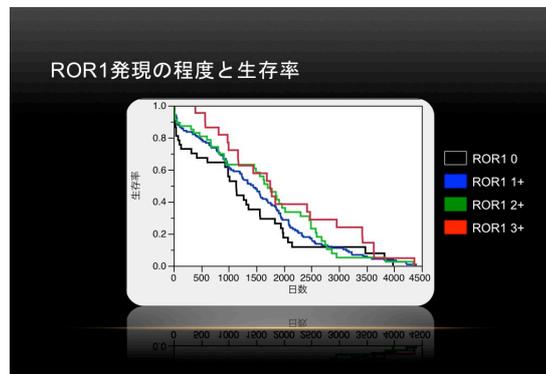
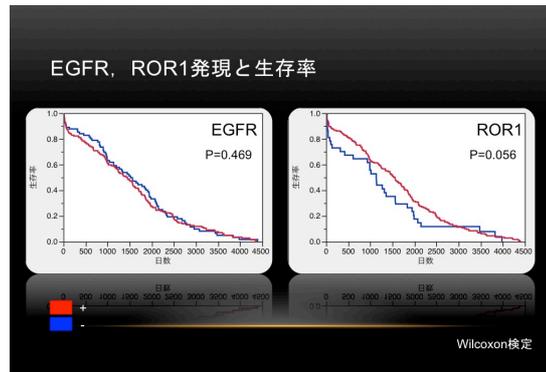
##### (2) ROR1, EGFR 陽性率

ROR1 は 88%, EGFR は 81%, EGFR(L858R 変異) は 23%, EGFR(E746-A750) は 21%で陽性であった。ROR1 発現は染色強度を 0(発現無し), 1+, 2+, 3+(強発現)に分類し検討したところ、これらの染色強度と EGFR 発現に正の相関がみられた。



##### (3) ROR1, EGFR 発現と生存率

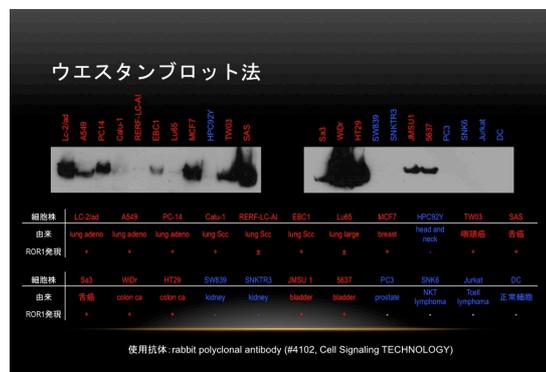
EGFR は生存率に関与していなかった。ROR1 では、陽性の方が陰性に比べ生存率が良好であった。ROR1 発現が強い程生存率が高い傾向にあった。



なお、性別、喫煙歴、病期といった臨床学的因子と ROR1 は関連していなかった。

##### (4) ウェスタンブロット法

各種癌細胞株での ROR1 発現をウェスタンブロット法で検討したところ、ROR1 は肺腺癌のみでなく、肺扁平上皮癌、肺大細胞癌、乳癌、咽頭癌、舌癌、結腸癌、膀胱癌での発現を確認できた。腎癌、前立腺癌、NKT lymphoma、正常細胞では発現していなかった。



##### (5) Multiple tumor tissue array

正常組織で ROR1 が発現しているか検討したところ、正常組織では ROR1 の発現はみられず、ROR1 を標的にしても自己免疫疾患を引き起こす可能性は低いと考えられた。

