

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290050

研究課題名(和文) 腫瘍内免疫制御を介した分子標的療法耐性誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Immune-mediated mechanisms of resistance to molecular targeting therapy against NSCLC

研究代表者

地主 将久 (Jinushi, Masahisa)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：40318085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺非小細胞癌の自然発癌モデル、ヒト検体を活用して肺非小細胞がんにおけるEGFR-TKIの治療抵抗性に寄与する免疫制御因子を検索したところ、肺腺癌においてM2マクロファージ、MDSCなど免疫抑制系ミエロイド細胞の分化・活性にかかわるシグナル群とEGFR-TKIの治療応答抑制、T790Mなど治療抵抗性遺伝子変異出現率が正の相関を示すことが判明した。さらに、肺非小細胞癌自然発がんモデルに対するCSF-1阻害剤投与により、EGFR-TKIによる効果は相乗的に増強することを解明した。一方PD-1など免疫チェックポイント経路は変化はなかった。肺腺癌における免疫制御経路を同定したうえで重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：As immune-mediated factors which are critical to reduce sensitivity and/or trigger resistance to EGF-TKI against NSCLC through the analysis of novel spontaneous NSCLC models and clinical samples, we identified signaling pathways related to differentiation and activation of M2 macrophages and MDSC, two major immunosuppressive myeloid cells, as important factor to predict low sensitivity and emergence of resistant-associated mutation (T790M) to EGF-TKI against lung adenocarcinoma. Moreover, the combination of CSF1 inhibitors and EGF

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 肺腺癌 ミエロイド細胞 PD-1 EGFR-TKI 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

近年の多剤化学療法や分子標的治療剤開発などの進歩により、手術不能進行再発癌の治療成績は改善傾向にあるが、現状では完全治癒や長期生存延長を達成するには限界がある。その成因のひとつとして、多様な遺伝子変異に彩られた腫瘍細胞の根絶には、腫瘍細胞自体を標的とする制がん法の奏効性が低率であることを挙げることができる。一方で、腫瘍内の微小環境形成に関わる血管内皮細胞、ストローマ細胞などによる非腫瘍細胞群による発がん活性、治療抵抗性誘導の重要性が明らかになってきている背景より、腫瘍細胞周囲の微小環境の制御と腫瘍細胞自体を標的とすることで、従来にはない抗腫瘍戦略の構築が可能となつてきている。事実、Toll-like receptor (TLR)-4 や HMGB-1 など自然免疫シグナル活性を介した免疫応答活性がオキサロプラチンなど一部の化学療法による治療応答率の改善に寄与することが同定されている (Apetoh L. Nat Med, 2007; Ghiringhelli L. Nat. Med., 2009)。

その一方、抗がん療法の主流となりつつある分子標的療法の抗腫瘍機序として、内因性免疫応答修飾が重要な役割を果たしているという報告がなされている。たとえば、BRAF キナーゼ阻害剤による治療応答を規定する因子として CD8 陽性 T 細胞による免疫制御の重要性が明らかとされている (Knight DA, JCI, 2013)。さらに、BRAF 活性変異 (BRAF-V600E) は Stat-3 活性化を介して IL-10, IL-6, VEGF-A など免疫抑制に寄与するサイトカイン産生を制御するということが知られている (Sumimoto H, JEM, 2006)。以上より総合して、分子標的療法は腫瘍内の宿主免疫応答活性を惹起することで、抗腫瘍効果を発揮できる能力を潜在的に有するといえる。さらに、分子標的療法による治療耐性発現には、内因性宿主免疫応答を負に調節する分子機構の誘導活性が寄与することで、長期的かつ有効な抗腫瘍反応を妨げている可能性が想定できる。しかしながら、分子標的療法による治療応答制御にかかわる免疫関連因子やその分子経路の詳細は不明である。

以上の背景や問題点を踏まえ、ヒト発がん自然史の経過に近似した動物モデルやヒト癌検体を対象にして、特定の分子標的剤への抗腫瘍応答の抵抗性発現に寄与する「免疫制御因子」のスクリーニングや詳細な機能的意義を解析、解明する。以上の検討を通して、臨床応用されている分子標的剤の治療効果改善を目指す点でより臨床への橋渡しが容易であり、かつ腫瘍内に特異的な宿主免疫機能を利用する点で、斬新な診断、治療ツールの同定、開発を可能ならしめる Proof of concept (POC) の創出を最終目標に設定して研究を展

開する。

2. 研究の目的

EGFR-TKI 治療抵抗性と相関して免疫応答制御を發揮する因子を検証するため、以下の実験を遂行する。まず EGF 阻害剤抵抗性遺伝子発現肺がん細胞により特異的に誘導されるミエロイド細胞由来の「免疫制御因子」を選別する。さらに、EGFR-TKI 感受性・抵抗性マウス肺癌モデルにおける腫瘍内ミエロイド細胞における「免疫制御因子」の発現プロファイル、自然免疫応答や抗原特異的免疫応答、および癌幹細胞など高腫瘍原性細胞活性、誘導の有無などを比較検証する。また、「免疫制御因子」遺伝子欠損マウスや阻害抗体を用いて、特に EGFR-TKI の治療応答に及ぼすインパクトについて検証する。さらに、肺非小細胞癌患者検体を対象に、「免疫制御因子」とその下流因子が治療抵抗性、生存率に与える影響を解析する。以上より、ヒト癌において特定の分子標的剤治療応答性に宿主免疫応答修飾が果たす意義を明らかとする。

3. 研究の方法

EGFR-TKI 治療抵抗性と相関して免疫応答制御を發揮する因子を検証するため、以下の実験を遂行する。まず EGF 阻害剤抵抗性遺伝子発現肺がん細胞により特異的に誘導されるミエロイド細胞由来の「免疫制御因子」を選別する。さらに、EGFR-TKI 感受性・抵抗性マウス肺癌モデルにおける腫瘍内ミエロイド細胞における「免疫制御因子」の発現プロファイル、自然免疫応答や抗原特異的免疫応答、および癌幹細胞など高腫瘍原性細胞活性、誘導の有無などを比較検証する。また、「免疫制御因子」遺伝子欠損マウスや阻害抗体を用いて、特に EGFR-TKI の治療応答に及ぼすインパクトについて検証する。さらに、肺非小細胞癌患者検体を対象に、「免疫制御因子」とその下流因子が治療抵抗性、生存率に与える影響を解析する。以上より、ヒト癌において特定の分子標的剤治療応答性に宿主免疫応答修飾が果たす意義を明らかとする。

4. 研究成果

EGF 阻害剤応答性を規定する遺伝子変異として、特に重要であるエクソン 20 番目点変異 (L858R)、および T790M 変異は EGFR キナーゼドメインにおこり、各々 EGFR-TKI 感受性と抵抗性に関与する遺伝子変異である (Sequist LV and Lynch TJ, Ann Rev Med, 2008)。この EGFR 変異ベクターを導入されたヒト肺がん株 A549 (EGFR 野生型)、ならびに HCC827 (EGFR-TKI 感受性変異 746-750)、H1975 (EGFR-TKI 抵抗変異 T790M) を対象に、この EGFR 阻害感受性株と抵抗株と共培養したヒトマクロファージ細胞株 M-CSF 刺激 THP-1 を対象として、T790M-A549 により

THP-1 で発現誘導され、かつ L858R-A549 で抑制される共通の遺伝子群をスクリーニングしたところ、25 個の遺伝子がヒットした。さらに、H1975 細胞株で強発現する遺伝子と比較検証することで、以下の 4 遺伝子を同定できた：B7-H4, GM-CSF, IDO-2, SLC5A13。B7-H4 は代表的な免疫チェックポイント分子である PD-L1 を含む B7 superfamily のひとつである。GM-CSF は抗原提示細胞の他、免疫抑制細胞である MDSC 分化、活性に重要な役割を果たしており、膵がん組織においては主要な腫瘍促進性因子としての役割が注目されている。IDO-2 については IDO-1 とともに、Tryptophan 代謝制御を介して腫瘍活性に貢献することが知られている。さらに SLC5A13 はがん細胞におけるグルタミン代謝の一翼を担うことにより、発がん制御に貢献していることが明らかになってきている。申請者はそのうち、B7-H4 と GM-CSF に焦点を絞り、その腫瘍免疫に果たす役割について検証を進めた。

A549, T790M-A549, L853R-A549 の 2 細胞株と健常者由来の CD14 陽性単球を Trans-well を介して培養することで、CD14+単球のマクロファージへの分化能、さらに CD14+単球由来上清刺激を受けた A549 の *in vitro* invasion 活性、増殖能、Taxol 処理による細胞死誘導能の検証を行った。T790M-A549 は 100% の確率で CD69 陽性マクロファージへの分化を促進するのに対して、A549, L853R-A549 刺激では 90% が CD14 陽性 CD69 陰性単球であった。さらに、T790M-A549 刺激マクロファージは、A549 の *invasive activity* や増殖能を優位に増強させ、かつ Taxol による細胞死を抑制した。興味深いことに、T790M-A549 によるマクロファージ分化、および腫瘍活性の付与は抗 GM-CSF 中和抗体にて著明に抑制された。さらに、肺腺癌の他に、グリオーマ幹細胞から産生される GM-CSF が、CD11c 陽性マクロファージ分化に寄与すること、この CD11c 陽性マクロファージによる *in vivo* グリオーマ増殖が促進されることを証明した。以上より、EGFR-TKI 抵抗性がん細胞は GM-CSF 産生を促進することで、発がん活性の一端を担っていることが示唆された。一方、抗 B7-H4 抗体、IDO-1/2 阻害剤はマクロファージ誘導能や腫瘍活性に直接的な影響を及ぼさなかった。なお B7-H4 による制御性 T 細胞への関与は認められなかった。

次に T790M-A549、L853R-A549 および A549 による刺激を受けた単球を対象に、T ヘルパー細胞分化誘導能、細胞障害性 T 細胞活性について検証した。興味深いことに、L853R-A549 はもっとも効率的に Th1 細胞や GZM B+細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞の誘導に寄与していたが、T790M-A549 による naïve T 細胞からの Th 誘導、細胞障害活性を有する Cd8 陽性 T 細胞の誘導率はもっとも低率であった。さらに、抗 B7-H4 中和抗体により、T790M-A549 による Th1、細胞障害性 CD8 陽

性 T 細胞への誘導能を増強させた。それに対して、GM-CSF 中和や IDO-1/2 阻害はこれら T 細胞分化活性修飾能に影響を及ぼさなかった。

以上より、T790M 遺伝子変異は EGFR-TKI に対する薬剤感受性を抑制するのみでなく、下記の免疫修飾作用を有することを明らかにした。

- A. GM-CSF 産生を介して腫瘍促進性マクロファージ分化に寄与すること
- B. B7-H4 発現増強を介し、抗腫瘍活性を有する T 細胞分化を抑制すること

以上を介して、肺腺癌の免疫学的微小環境を負に制御するうえでの重要な役割を果たすことを明らかにした。

次に、Gefitinib や Erlotinib による治療を受けた肺非小細胞癌患者を対象に、GM-CSF、B7-H4 発現が治療応答性や予後を反映しているか、検討を行った。具体的には EGFR-TKI による分子標的治療投与を受ける前後での肺小細胞癌の腫瘍組織および血清サンプル全 20 例(うち T790M 変異 12 例)を対象とし、RT-PCR にて GM-CSF と B7-H4 定量化を行った。その結果、T790M 変異前と比較して変異後での GM-CSF と B7-H4 発現の有意な増強を認めた (GM-CSF: $p=0.008$, B7-H4: $p=0.037$)。一方野生方あるいは L853R など感受性変異群では有意な変化を認めなかった。以上より、EGFR-TKI 治療抵抗性と免疫学的微小環境の変化の相関性は、ヒト臨床検体においても認められることが明らかになった。今後検体数を増やして結果のバリデーションを行っていく予定である。

本研究機関では当初計画していたマウスでの *in vivo* での検証が行えなかったため、別途検証していく計画としている。

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 9 件)

1. Akbay EA, Koyama S, Liu Y, Dries R, Bufe LE, Silkes M, Alam MM, Magee DM, Jones R, Jinushi M, Kulkarni M, Carretero J, Wang X, Warner-Hatten T, Cavanaugh JD, Osa A, Kumanogoh A, Freeman GJ, Awad MM, Christiani DC, Bueno R, Hammerman PS, Dranoff G, Wong KK.
Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression Through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade.

- J Thorac Oncol.** 2017 May 5. pii: S1556-0864(17)30350-7. 査読あり
2. Goto K, Annan DA, Morita T, Li W, Muroyama R, Matsubara Y, Ito S, Nakagawa R, Tanoue Y, Jinushi M, Kato N. Novel chemoimmunotherapeutic strategy for hepatocellular carcinoma based on a genome-wide association study. **Sci Rep.** 6:e38407, 2016. 査読あり
 3. Xu Z, Shioda S, Jinushi M, Kawakami Y, Ohtaki H, Wang S, Zhao X, Liu Y, Zhou D, Guo Y. Role of the autonomic nervous system in the tumor micro-environment and its therapeutic potential. **Curr Pharm Des.** In press. 査読なし
 4. Horlad H, Ohnishi K, Ma C, Fujiwara Y, Niino D, Ohshima K, Jinushi M, Matsuoka M, Takeya M, Komohara Y. TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. **Oncol Lett.** 12(2):1519-1524, 2016. 査読あり
 5. Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, Taga T. Induction of protumoral CD11c(high) macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. **Genes Cells.** 21:241-251, 2016. 査読あり
 6. Tan Y, AlKhamees B, Jia D, Li L, Couture JF, Figeys D, Jinushi M*, Wang L*. MFG-E8 Is Critical for Embryonic Stem Cell-Mediated T Cell Immunomodulation. **Stem Cell Reports.** 2015 Nov 10;5(5):741-52. 査読あり
 7. Komohara Y, Morita T, Annan DA, Hasita H, Ohnishi K, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Suzu S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Akashi K, Takeya M, Jinushi M*. The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear renal cell carcinomas. **Cancer Immunol Res** 3: 999-1007, 2015. 査読あり
 8. Jinushi M*, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: creating a new path from bench to bedside. **BBA Reviews on Cancer** 1855: 123-130, 2015. 査読あり
 9. Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, Jinushi M, Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K. Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. **Cancer Medicine**, doi: 10.1002/cam4.309, 2014. 査読あり
- [学会発表](計 2 件)
1. Jinushi M. Role of AMPK in macrophages in immune tolerance. FASEB Science Research Conference “AMPK: Biological action and therapeutic perspectives” 2014 September 28-October 3, Lucca, Italy.
 2. Jinushi M. Interaction between cancer cells and myeloid cells regulates therapeutic responses to chemotherapy. The 2nd International Symposium of RCCH. 2014 June 20, Seoul, South Korea.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：Tumor-specific immune stimulator (腫瘍特異的免疫増強剤)

発明者：地主将久、八木田秀雄、秋葉久弥

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：P2014-089806

出願年月日：12/12/2014

国内外の別：国内

名称：Antitumor agents (抗がん剤)

発明者：地主将久、田原秀晃

権利者：東京大学

種類：特許

番号：WO/2008/043018 (国際出願番号：

PCT/US2007/080446)

出願年月日：06/02/2008

国内外の別：国内・国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

地主 将久 (JINUSHI, Masahisa)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：40318085:

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()