

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	熊井 琢美
<p>学位論文題目</p> <p>EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy (邦題: EGFR阻害薬はHERファミリー特異的T細胞の抗腫瘍効果を増強する)</p> <p>共著者名</p> <p>松田佳也, 及川賢輔, 青木直子, 木村昭治, 原渕保明, Esteban Celis, 小林博也</p> <p>掲載雑誌</p> <p>British Journal of Cancer</p> <p>Advance online publication: 17 September, bjc.2013.577, 2013</p>			
<p>I. 研究目的</p> <p>癌治療の一環として発展してきた免疫治療において、これまで重要視されてきたCD8陽性細胞障害型T細胞 (CTL)のみならず、近年CD4陽性ヘルパーT細胞 (HTL)がCTLの産生や維持、直接の腫瘍傷害性に重要であるという認識が一般的となってきた。HTLは腫瘍細胞や抗原提示細胞上のMHCクラスII分子と結合した抗原ペプチドを認識するため、HTLを誘導可能なMHCクラスII分子結合可能腫瘍関連抗原エピトープを同定しそのエピトープペプチドを用いてエフェクターヘルパーT細胞を誘導できれば、ペプチドワクチンやT細胞移入療法の基礎的知見として有用である。</p> <p>既にWT-1やsurvivinなど複数の腫瘍抗原を標的とした癌ワクチンが臨床研究の場で応用されているがその効果は限定的である。その理由の一つとして腫瘍細胞表面でのMHC Class IやClass IIの発現低下によるT細胞からの逃避などが考えられている。癌ワクチンが著効を示さないその他の理由として、抑制性T細胞サブセットやMyeloid derived suppressor cell、PD-L1、CTLA-4などの腫瘍免疫を抑制する負のシグナルがあげられ、有効な免疫反応を惹起する新たな腫瘍抗原の探索やアジュバントの工夫が喫緊の課題である。</p> <p>本研究では、癌ワクチンの標的蛋白としてHER family蛋白の一つであり頭頸部扁平上皮癌に高発現して浸潤能や転移能に関わっているとされるEpidermal growth factor receptor (EGFR)に着目した。EGFRのアミノ酸配列から複数のHLA-DR分子に結合可能なエピトープをアルゴリズム解析により同定し、候補ペプチドを用いてEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンを樹立し、同時に頭頸部扁平上皮癌患者由来の末梢血単核球(PBMC)からの候補エピトープペプチド</p>			

によるヘルパー1型(Th1)サイトカインの産生を評価した。また、樹立したEGFR特異的HTLクローンを用いて、腫瘍への反応性をサイトカイン産生能や腫瘍傷害活性で評価した。

次に、樹立したEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンがEGFRと相同性を有するその他のHER family蛋白やc-Met蛋白を発現している腫瘍にも反応しうるかどうかを検討した。最後に、EGFR阻害薬 (ErlotinibやCetuximab)で腫瘍細胞を前処置する事による腫瘍表面上のMHC Class II分子の発現を増強しうるかを検討し、EGFR阻害薬の併用によりEGFR特異的ヘルパーT細胞クロンの反応性が亢進するかを検討した。

II. 材料・方法

1. 患者検体

健常人4名及び2012年に旭川医大耳鼻咽喉科・頭頸部外科で頭頸部扁平上皮癌と診断された5名の患者検体を用いた。全検体はインフォームドコンセントを得た後、治療前に採取された。

2. 細胞株

細胞株は頭頸部扁平上皮癌由来のHo-1-u-1、HSC-2、HSC-3、HSC-4、Sa-3、HPC-92Y、CA9-22、SAS、乳癌由来のMCF-7、T細胞性白血病由来のJurkat、Bリンパ芽球様細胞株(LCL)および単一のヒトHLA-DRを発現させたマウス線維芽細胞(L-cell)を用いた。

3. HTLエピートープの同定

コンピュータによるアルゴリズム解析(SYFPEITI)を用いて、EGFRのアミノ酸配列のうちscoreが22以上のアミノ酸配列をHTLエピートープとして同定し、ペプチドを合成した。同時に、同定したEGFRエピートープと相同性の高いHER-2、HER-3、c-Met由来のペプチドを合成した。

4. EGFR特異的ヘルパーT細胞クロンの樹立

健常ドナーよりPBMCを採取し、CD14陽性細胞を分離してIL4及びGM-CSFを用いて樹状細胞を誘導した。その樹状細胞にペプチドをパルスして抗原提示細胞としてCD4陽性T細胞を刺激し、ペプチド特異的HTLを樹立後、更にクローン化した。樹立したT細胞クロンのペプチド特異性は、放射線照射(40Gy)を行った同ドナーのPBMCを抗原提示細胞として、EGFRペプチドもしくはEGFRと相同性のあるHER familyやc-Met由来ペプチドへの反応性をELISA法によるIFN- γ 産生能で評価し、その反応が抗HLA-DR抗体によって抑制されるかを検討した。また、L-cellを抗原提示細胞として用いる事でクロンのHLA-DR拘束性を評価した。

5. EGFR特異的ヘルパーT細胞クローンによる腫瘍への反応性

樹立したクローンとHLA-DRおよびEGFRまたはHER-2、HER-3、c-Metを発現している腫瘍を48時間共培養し、上清中のIFN- γ をELISA法にて定量した。また腫瘍に対するクロンの障害活性はLDHを標的としたCyto Tox96 (Promega社)を用いて評価した。一部の腫瘍ではクローンとの共培養の48時間前に腫瘍培養液にエルロチニブもしくはセツキシマブを添加した。

6. 頭頸部癌患者末梢血中のペプチドへの反応性

頭頸部癌患者よりPBMCを採取し1週間ペプチドと共培養後、放射線照射(40Gy)したPBMCを抗

原提示細胞としてペプチドによる再刺激を更に1週間行い、上清中のIFN- γ 及びGM-CSFをELISA法にて測定した。

7. 統計学的解析

2因子間の検討にはMann-Whitney U検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

III. 結果

1. EGFRエピトープペプチドによるEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンの樹立

アルゴリズム解析で得られたEGFRペプチドを用いて、複数の健常ドナー由来のPBMCよりEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンを誘導した。樹立したクローンはペプチドの濃度依存的にサイトカインを産生し、この反応がペプチド特異的でありかつ抗HLA-DR抗体で抑制された事からこのクローンはEGFRペプチドをHLA-DR拘束性に認識している事が明らかとなった。また、L-cellを抗原提示細胞として樹立した複数のクローンがどのHLA-DRに拘束性があるか検討したところ、HLA-DR15やHLA-DR53等の複数のHLA-DR拘束性のクローンを誘導できた事から、このEGFRペプチドはpromiscuousなエピトープと考えられた。

2. EGFR特異的ヘルパーT細胞クローンによる腫瘍への反応性

樹立したクローンと腫瘍を共培養した結果、クローンはEGFR及びHLA-DR拘束性に腫瘍を認識してサイトカインを放出した。また、LDHを用いたcytotoxic assayにより、このクローンは直接腫瘍細胞を傷害可能な事が明らかとなった。

3. EGFRエピトープペプチドのHER familyやc-Met発現腫瘍に対する汎用性

今回同定したEGFR由来のエピトープと高い相同性を持つ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細胞クローンをHER-2、HER-3またはc-Met由来ペプチドで刺激したところ、一部のクローンでHER-2やHER-3、c-Metに対するサイトカイン産生を認めた。またクローンと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細胞クローンはこれらの腫瘍を直接認識できる事が明らかとなった。

4. EGFR阻害薬の免疫治療におけるアジュバントとしての有用性

EGFR阻害薬(エルロチニブもしくはセツキシマブ)で腫瘍を処置したところ、一部の腫瘍で細胞表面上のHLA-DR分子の発現増強を認めた。次に、EGFR阻害薬で前処置した腫瘍とEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンを共培養したところ、EGFR阻害薬未処置群に比べサイトカイン産生能及びクローンによる腫瘍傷害活性が上昇した事から、EGFR阻害薬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。

IV. 考案

今回同定したEGFR由来エピトープは、頭頸部癌患者においても有効な抗腫瘍効果を備えたヘルパーT細胞を惹起可能なエピトープである事が明らかとなった。近年、キラーT細胞に加えてヘルパーT細胞が抗腫瘍免疫に重要である事が明らかとなっており、腫瘍抗原からヘルパーT細胞エピトープを同定する事が癌ワクチンの開発に重視されてきている(1)(2)。本研

究で樹立したEGFR特異的ヘルパーT細胞クローンはその他のHER familyであるHER-2やHER-3、c-Met陽性腫瘍にも反応しうる事から、このEGFRペプチドはEGFRのみならずHER-2やHER-3、c-Met陽性腫瘍にもがんワクチンとして適応可能と考えられる。

近年、EGFRシグナルとHLA分子の発現性との関連が指摘されており(3)、腫瘍細胞をEGFR阻害薬で処置した結果、一部の腫瘍でHLA-DR分子発現の増強と、ヘルパーT細胞の腫瘍に対する傷害活性の上昇を認めた。近年、放射線療法や低用量シクロホスファミドに代表される化学療法も癌免疫治療の効果を増強する事が解明されてきており、今後の癌治療は手術、化学放射線治療、分子標的治療、免疫治療によるcombination therapyが主体となると考えられる。本研究で得られた基礎的知見は今後の分子標的薬と癌免疫治療の併用及び相乗効果に関する理論的根拠に成り得ると考えられた。

V. 結論

1. 複数のHLA-DR分子拘束性に有効な抗腫瘍効果を惹起しうるEGFR由来のpromiscuousなヘルパーT細胞エピトープを同定した。
2. 同定したエピトープはEGFR発現腫瘍のみならず、HER-2やHER-3、c-Met発現腫瘍にも適用可能な癌ワクチンに成り得ると考えられた。
3. EGFR阻害薬は癌免疫治療において、有効なアジュバントとなる事が示唆された。

VI. 引用文献

1. Kobayashi, H., Wood, M., Song, Y., Appella, E. & Celis, E. Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for the HER2/neu tumor antigen. *Cancer Research* 60, 5228-5236, 2000.
2. Kobayashi, H. & Celis, E. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells. *Current opinion in immunology* 20, 221-227, 2008.
3. Pollack, B. P., Sapkota, B. & Cartee, T. V. Epidermal growth factor receptor inhibition augments the expression of MHC class I and II genes. *Clinical cancer research*. 17, 4400-4413, 2011.




VII. 参考論文

1. Kobayashi H*, Kumai T*, Hayashi S, Matsuda Y, Aoki N, Sato K, Kimura S, Celis E. (*equally contributed), A naturally processed HLA-DR-bound peptide from the IL-9 receptor alpha of HTLV-1-transformed T cells serves as a T helper epitope., *Cancer Immunology Immunotherapy* 61(12):2215-25, 2012
2. Hayashi S, Kumai T, Matsuda Y, Aoki N, Sato K, Kimura S, Kitada M, Tateno M, Celis E, Kobayashi H., Six-transmembrane epithelial antigen

of the prostate and enhancer of zeste homolog 2 as immunotherapeutic targets for lung cancer., Journal of Translational Medicine 5;9:191, 2011

3. 熊井琢美, 岸部 幹, 吉田沙絵子, 長門利純, 片山昭公, 林 達哉, 畑山尚生, 原渕保明. 喉頭浮腫を伴った流行性耳下腺炎の4例, 耳鼻咽喉臨床, 105巻3号 Page277-284, 2012.
4. 熊井琢美, 高原 幹, 吉田沙絵子, 長門利純, 林 達哉, 原渕保明. 分子標的薬が奏功した腎癌鼻副鼻腔転移例, 耳鼻咽喉臨床, 106巻5号 Page423-429, 2013.
5. 熊井琢美, 原渕保明. 【検査結果をどう読むか】 細菌ウイルス検査 EBウイルス抗体. JOHNS 29, 1415-1419, 2013.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	熊井 琢美
<p>審査委員長 大崎 能伸 </p> <p>審査委員 小林 博也 </p> <p>審査委員 鳥本 悦宏 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy</p> <p>EGFR 阻害剤は HER ファミリー特異的 T 細胞の抗腫瘍効果を増強する</p>			

本学位論文の申請者は、頭頸部扁平上皮癌の免疫療法の可能性を模索する目的で、頭頸部扁平上皮癌に強く発現している EGFR が抗原性と細胞障害活性の標的になる可能性を検討した。その結果、頭頸部扁平上皮癌に強く発現している EGFR の HLA-DR 結合ペプチドが CD4 陽性 T 細胞を刺激し、Th1 サイトカインの分泌や CD4 陽性細胞自身による細胞障害活性を誘導することを明らかにした。さらに、この CD4 陽性 T 細胞を介した抗腫瘍活性は、EGFR からのシグナル阻害による HLA-DR の発現増加を介して増強されることも明らかにした。これらの結果は、将来的な EGFR 由来ペプチドを用いた免疫療法の可能性を示す。

頭頸部扁平上皮癌に対しては、外科療法、化学療法、放射線療法など集学的な治療が行われているが、その治療成績は十分とは言えず、ペプチドワクチンを利用した免疫療法からのアプローチは新たな治療手段となりえることから臨床的に大変評価できるものと考ええる。この研究成果は Br J Cancer に掲載されている。

本研究は患者由来の単核球を *in vitro* で APC とペプチドで刺激したクローン細胞を用いた検討で、患者の体内には、EGFR 由来ペプチド-HLA-DR 複合体は多量に存在すると考えられ、このような条件下で実際に癌由来の EGFR ペプチドに対する免疫が誘導されるかどうかは明らかではない。また、一般に抗腫瘍細胞障害活性の主体は CD8 陽性 T 細胞が担っていると考えられており、本研究で示されている EGFR ペプチドで誘導される CD4 陽性 T 細胞による細胞障害が、抗腫瘍免疫においてどの程度の役割を担うかについては、さらに検討が重要と考えられる。

論文提出者は、研究成果を最新の関連情報を含めて、背景・目的・方法・結果・討論を適切にプレゼンテーションできていた。また、関連する周辺に関する質問に対しても丁寧に受け答えしていた。さらに、上述した本研究における限界についても理解し、今後の研究の方向性についても考慮した対応ができていた。

以上より、本研究は、医学博士の授与に値するものと考ええる。