

主論文の要旨

Blockade of EGFR improves responsiveness to PD-1 blockade in *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対する
EGFR 阻害剤と PD-1 阻害剤の併用療法による
抗腫瘍効果増強に関する基礎的検討

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子細胞免疫学分野

(指導：西川 博嘉 教授)

杉山 栄里

【緒言】

非小細胞肺癌の大部分を占める肺腺癌では、約 40-50%程度で EGFR 遺伝子変異が認められる。EGFR 遺伝子変異は、EGFR 経路を恒常的に活性化させることで発がんに寄与するドライバー遺伝子変異であり、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を用いると劇的な抗腫瘍効果が得られ、実臨床で広く使用されている。

一方、近年肺癌に対する新たな治療法として、抗 PD-1/PD-L1 抗体等を用いた免疫療法の有効性が示されているが、残念ながら EGFR 遺伝子変異陽性肺癌（以下、EGFR 陽性肺癌）に対しては、免疫療法の効果が乏しいことが報告されており、今回その免疫学的背景の解明を行った。

【結果】

はじめに、肺癌切除検体 17 例（EGFR 陽性：6 例、陰性：11 例）を用いて Exome 解析を行い、体細胞変異数について検討した。体細胞変異は後天的に獲得した腫瘍部における遺伝子変異であるため、これらの遺伝子変異を含む遺伝子情報を基に作成されたタンパクは、免疫システムから“非自己（neo-antigens）”として認識される。従って、体細胞変異数が多いがん細胞に対しては確率的に免疫誘導が起こりやすく、免疫療法が効きやすい可能性が示唆されている。EGFR 陽性例では、陰性例と比較し、体細胞変異が有意に少なく、TCGA のデータベースによる解析でも同様の傾向であり（図 1）、免疫療法が奏効しにくい要因の一つとして考えられた。

次に、肺癌切除検体 18 例（EGFR 陽性：6 例、陰性：12 例）を用いて RNA-seq 解析を行い、EGFR 陽性肺癌の免疫に関連する遺伝子発現について検討した。PD-1 のリガンドである PD-L1（*CD274*）の高発現例では、T 細胞活性の抑制により腫瘍増殖が促進されることから、PD-L1 は抗 PD-1/PD-L1 抗体の効果予測因子となることが知られているため、EGFR 遺伝子変異の有無による PD-L1 の発現の相違について検討した。EGFR 陽性例では陰性例と比較しやや低い傾向であったが、有意な差は認めなかった。一方で、抗腫瘍免疫応答の攻撃の要となる CD8⁺T 細胞（*CD8A*）や、腫瘍攻撃の際に分泌されるサイトカインであるパーフォリン（*PRF1*）の発現が EGFR 陽性肺癌で低いことが明らかとなった（図 2）。また、クラスタリング解析の結果、EGFR 陽性肺癌では T 細胞関連マーカーの発現が低く、多くの免疫細胞が局所に集簇するような炎症性の腫瘍ではなく、非炎症性の特徴を示す免疫応答の乏しい肺癌であることが示唆された（図 2）。

そこで、肺癌切除検体 18 例（EGFR 陽性：6 例、陰性：12 例）を用いて、実際に腫瘍内の CD8⁺ T 細胞および免疫抑制性に機能する FOXP3⁺ T 細胞（Regulatory T cells: Tregs）の浸潤の程度を免疫染色で評価した。EGFR 陽性例では、陰性例と比較し Tregs/ CD8⁺ T 細胞の比率が高かった。PD-L1 については、RNA-seq の解析と同様に、有意な差は認められなかった（図 3）。

さらに、肺癌切除 26 例（EGFR 陽性：7 例、陰性：19 例）より抽出した腫瘍浸潤リンパ球（Tumor infiltrating lymphocyte: TIL）を、フローサイトメトリーおよび

CyTOF を用いて解析すると、免疫染色の結果と同様に、EGFR 陽性例では CD3⁺ T 細胞中の CD8⁺ T 細胞の割合が低い傾向にあった。一方で、CD45RA⁺FOXP3^{high}CD4⁺ Tregs (活性型 Tregs) の割合は、比較的高頻度であった。尚、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) については、有意な差は認められなかった (図 4)。以上より、EGFR 陽性肺癌は、免疫抑制性の腫瘍環境 (CD8⁺ T 細胞の浸潤が少ないにも関わらず、Tregs の浸潤が多い) を持つことが、実際浸潤しているリンパ球の解析からも示唆された。しかし、通常は免疫応答が亢進することに対するネガティブフィードバックとして Tregs が局所へ遊走すると考えられるため、CD8⁺ T 細胞の浸潤が少ないにも関わらず、Tregs の浸潤が多い点について従来の概念と矛盾していると考えられた。よって、CD8⁺ T 細胞が少ないにも関わらず Tregs が集まっているという特徴的な腫瘍環境を誘導している要因について考察し、免疫細胞の遊走を誘導するケモカインに注目した。

腫瘍が分泌するケモカインが EGFR シグナルと関連している可能性を考慮し、EGFR 陽性肺癌の細胞株 (PC9, HCC827)、および陰性の細胞株 (H322) を用いて、EGFR 経路を Erlotinib あるいは EGF を用いて阻害あるいは活性化し、マイクロアレイで発現解析を行った。ケモカインの発現変化を確認したところ、Tregs の遊走を誘導するケモカインの一つである CCL22 が、EGFR シグナルの活性化とともに上昇し、EGFR シグナルの阻害により低下することがいずれの細胞株においても確認された。検証実験として同細胞株を用いて qPCR と ELISA 解析を行ったが、同様の結果が得られた。一方、CD8⁺ T 細胞を誘導する CXCL10 については CCL22 と逆の傾向を示し、EGFR シグナルが活性化すると低下し、EGFR シグナルの阻害により上昇することが確認された (図 5)。以上より、これらのケモカイン環境の変化が EGFR 陽性肺癌の免疫抑制性環境の構築に寄与している可能性が考えられた。

上記のケモカイン発現の制御機構を解明するため、各ケモカインの上流の転写因子に注目し、EGFR シグナルとの関係性を調査した。マイクロアレイ解析を見直すと、CCL22 の転写因子の一つである JUN の発現が CCL22 と同様の動きをしており、Western blot および qPCR でも同様の結果であった。また、CXCL10 の転写因子の一つである IRF1 の発現が CXCL10 と同様であった (図 6)。そこで、転写因子とケモカインとの関係を確認するため、JUN をノックダウンすると CCL22 の発現が低下し、一方 IRF1 をノックダウンすると CXCL10 の発現が低下することが確認された (図 7)。以上より、JUN が CCL22 の発現を制御し、IRF1 が CXCL10 の発現を制御していることが示唆された。さらに、これらの転写因子は EGFR シグナルの活性化により JUN は上昇、IRF1 は低下することが確認された。

以上を踏まえ、EGFR 遺伝子変異 (exon 19 del) を挿入したマウス細胞株 MC-38 をマウス (C57BL/6J) に移植し Erlotinib を投与すると、TIL 内の Tregs の割合が低下し、CD8⁺ T 細胞の割合が上昇する傾向が認められた (図 8)。さらに、Erlotinib、抗 PD-1 抗体、その両方をマウスに投与すると、併用群で最も腫瘍増殖が抑制され、生存期間の延長を認めた (図 9)。

【考察】

EGFR 陽性肺癌に免疫療法が奏効しない要因として、体細胞変異数が少ないこと、および免疫抑制性の腫瘍環境であることが挙げられ、EGFR 陽性肺癌では腫瘍細胞が分泌するケモカインを介して、免疫抑制性の環境を作り上げていることが明らかになった。具体的には、IRF1 を介した CXCL10 を低下させることにより CD8⁺ T 細胞の浸潤を減少させ、JUN を介した CCL22 を上昇させることにより Tregs を増加させると考えられた。

一般的に、腫瘍部に浸潤している Tregs は、がん局所の炎症を抑制するために集積すると考えられていた。しかし、EGFR 陽性肺癌では、がん局所に強い炎症が認められるわけではないが、EGFR シグナルの活性化により腫瘍細胞自身が分泌するケモカインによりがん局所に誘導された Treg が存在した。これは、がん免疫での Tregs のがん局所への新たな誘導機序であると考えられた。このような免疫抑制性の腫瘍環境を打破するためには、EGFR シグナル活性を阻害した上で免疫療法を行うと治療の有効性が向上することが示唆され、今後の肺癌の新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

【結論】

EGFR 陽性肺癌では CD8⁺T 細胞の浸潤が少なく、Tregs の浸潤が多いという特徴的な腫瘍環境が認められ、この現象は腫瘍細胞の EGFR シグナルの活性化により誘導されていることが示され、EGFR 遺伝子変異は、腫瘍細胞の生存・増殖の他に、腫瘍細胞の免疫逃避機構においても重要な役割を担っていることが明らかとなった。