

氏名・(本籍)	やま だ てっ べい 山 田 哲 平 (福岡県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
報告番号	甲第1553号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)		
学位論文題目	EGFR T790M Mutation as a Possible Target for Immunotherapy; Identification of HLA-A*0201-Restricted T Cell Epitopes Derived from the EGFR T790M Mutation (EGFR T790M変異を標的とした新規免疫療法の開発: EGFR T790M変異由来のHLA-A*0201拘束性T細胞抗原の同定)		
論文審査委員	(主 査)	福岡大学	教 授 山 下 裕 一
	(副 査)	福岡大学	教 授 白 澤 専 二
		福岡大学	教 授 宮 本 新 吾
		福岡大学	講 師 田 中 俊 裕

内 容 の 要 旨

【背景と目的】

肺癌は最も悪性度の高い腫瘍の1つであるが、近年治療戦略に大きな進歩を認めている。特に、ゲフィチニブ(イレッサ)やエルロチニブ(タルセバ)のようなEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療は非小細胞肺癌の患者に高い治療効果を示してきた。しかしながら、そのほとんどの腫瘍はEGFRチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性を獲得し、その約半数にEGFR遺伝子のゲフィチニブ耐性点突然変異T790Mが関与するとされ、現在のところ、この変異を持つ患者には有効な治療オプションがないのが現実である。

また、昨今はたくさんの腫瘍関連抗原の同定により免疫治療の分野でも劇的な進歩を認め、腫瘍関連抗原を使用したがんワクチンを含め多数のがん免疫療法の臨床試験が行われている。しかし、それらのほとんどが野生型の自己抗原を用いたがんワクチンであり、免疫寛容により免疫原性が低く、免疫逃避が起りやすいなどの理由から有効性を示せていない。変異遺伝子由来の抗原は免疫系からは非自己と認識されるため免疫原性が高く、免疫逃避が起りにくいため、変異遺伝子由来の抗原ペプチドは免疫治療の格好の標的となりうると考えられる。今回我々は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬耐性患者に対する新規免疫療法を開発するため、EGFR T790M変異由来のMHC class I拘束性T細胞抗原の同定を行った。

【対象と方法】

EGFR T790M変異配列における MHC class I 結合ペプチドを複数のサーバーにて予測し、HLA-A2 拘束性のペプチド (T790M-5 : MQLMPFGCLL, T790M-7 : LIMQLMPFGCL) を用意した。HLA-A2 陽性健常人の末梢血単核球を *in vitro* で同ペプチドを用いて繰り返し刺激し共培養を行うことで各ペプチド特異的にインターフェロン γ を産生する T 細胞株を樹立できるかを評価した。また、樹立した細胞株が非小細胞肺癌細胞株に MHC class I 拘束性に特異的な反応を示すかも評価を行った。次に、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤にて治療中の HLA-A2 陽性非小細胞肺癌患者の末梢血単核球を実際に用いて同様な方法で *in vitro* で共培養を行うことで各ペプチド特異的にインターフェロン γ を産生する T 細胞株を樹立できるかを評価を行った。

【結果】

HLA-A2 陽性の健常人において、T790M-5 の刺激では 6 人中 5 人 (83%) に、T790M-7 の刺激では 6 人中 3 人 (50%) に、各ペプチド特異的にインターフェロン γ を産生する T 細胞株を樹立することができた。今回樹立した EGFR T790M 由来ペプチドに特異的な T 細胞株は、HLA-A2 と T790M 変異を持つ非小細胞肺癌細胞株へ MHC class I 拘束性に特異的な反応を示した。興味深いことに、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤にて治療中の HLA-A2 陽性非小細胞肺癌患者において、T790M-5 もしくは T790M-7 に抗原特異的な免疫反応を認めた 7 人中 1 人 (14%) のみに EGFR-T790M 変異を認め、T790M-5 および T790M-7 に抗原特異的な免疫反応を認めなかった 15 人中 9 人 (60%) に EGFR T790M 変異を認め、HLA-A2 陽性非小細胞肺癌患者における EGFR T790M 由来ペプチドに対する免疫反応と EGFR T790M 変異の存在は有意に負の相関関係を示した ($p = 0.0449$)。

【考察】

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤にて治療中の非小細胞肺癌患者において、T790M 由来ペプチドに対する免疫反応が存在すれば、T790M 耐性変異の誘導 (薬剤耐性誘導) を抑制することが示唆された。さらに、我々が同定した 2 種の抗原ペプチド (T790M-5 : MQLMPFGCLL, T790M-7 : LIMQLMPFGCL) は EGFR T790M 点突然変異を有する非小細胞肺癌患者に対する免疫治療の抗原ペプチド (ワクチン抗原) として使用可能で、特に、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬治療中の非小細胞肺癌患者において、薬剤耐性誘導を予防するための抗原ペプチド (ワクチン抗原) として期待される。

審査の結果の要旨

変異遺伝子由来の抗原は免疫系からは非自己と認識されるため免疫原性が高く免疫逃避が起こりにくいため、変異遺伝子由来の抗原ペプチドは免疫治療の格好の標的となりうると考えられる。

本論文は、初めて EGFR T790M 変異由来の MHC class I 拘束性 T 細胞抗原を 2 種同定することができ、同抗原は EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性変異 T790M を有する非小細胞肺癌患者に対する免疫治療の抗原ペプチド (ワクチン抗原) として使用可能であり、特に、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬治療中の非小細胞肺癌患者において、薬剤耐性誘導を予防するための抗原ペプチド (ワクチン抗原) として期待されることを証明したものである。

1. 斬新さ

現在までに、K-ras変異やEGFR Variant IIIなどの変異遺伝子由来のワクチン抗原に関する報告は認められるが、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性変異 T790M 由来の MHC class I 拘束性 T細胞抗原の同定を行った報告は初めてである。(特許広告番号: WO2014024965 A1)。

2. 重要性

今回同定された2種の抗原ペプチド (T790M-5: MQLMPFGCLL, T790M-7: LIMQLMPFGCL) は EGFR T790M点突然変異を有する非小細胞肺癌患者に対する免疫治療の抗原ペプチド (ワクチン抗原) として使用可能で、特に、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬治療中の非小細胞肺癌患者において、薬剤耐性誘導を予防するための抗原ペプチド (ワクチン抗原) として期待される。

近年、Immuno check point 阻害剤に関して世界中の注目が集まる中、併用薬としては免疫原性の高いワクチン抗原が最も重要視されており、今回同定された2種の抗原ペプチドは Immuno check point 阻害剤との併用薬としても期待される。

3. 研究方法の正確性

本研究では確立された方法を用いて、HLA 結合ペプチドの選択を行い、抗原特異的免疫原性や細胞傷害性を確認している。また、 χ^2 検定で、HLA-A2 陽性非小細胞肺癌患者における EGFR T790M 由来ペプチドに対する免疫反応と EGFR T790M 変異の存在は有意に負の相関関係を示している。

4. 表現の明確性

本論文は、EGFR T790M 薬剤耐性変異を持つ患者には現時点で有効な治療オプションがないという最大の問題点に対して、斬新で画期的な新規免疫療法の開発で予後改善を目指すという臨床に即した目的を明確に表現している。また、論文構成においても、必要十分な実験方法と明確に導き出された結果により、目的に即した考察展開ができており、表現は明確である。

5. 主な質疑応答

Q1: ペプチドワクチンに関する基本的な機序に関する質問ですが、体外から投与したペプチドがどのように MHC Class I に乗るのか？

A1: 体外から投与されたペプチドの MHC Class I への affinity が高い場合には、細胞表面の MHC Class I にもともと乗っているペプチドと入れ替わる形で MHC Class I に乗ると考えられています。

Q2: 今回実験に使用した数種類の EGFR T790M 変異由来ペプチドは MHC class I のどの pocket にどのように提示され、またどのように T細胞レセプターに認識されるのか？

A2: HLA-A2 拘束性のペプチドはアンカー部位 (一般的には N 末端から 2 番目のアミノ酸と C 末端のアミノ酸が相当) を介して MHC class I の pocket に結合します。そのアンカー部位以外のアミノ酸が MHC class I の pocket から外に露出される形となり、T細胞レセプターに認識されると考えられています。

Q3: HLA-A*0201 での免疫原性を調べたとのことであるが、その他の HLA-A2 subtype との交差反応は調べたか？

A3: 今回の実験では調べていないが、これまでの報告からも HLA-A*0201 に結合する多くのペプチドは他の HLA-A2 subtype にも交差反応を示すと報告されています。なお、今回報告したペプチドに関しては HLA-A*0201 以外の HLA-A2 subtype (HLA-A*0206 および HLA-A*0207) への交差反応を調べている際中です。

Q4：HLA A2の日本人での割合は？

A4：40%程度です。

Q5：今回の論文における患者さんのHLAは調べているのか？

A5：PBMCを抗HLA-A2抗体で染色したのちフローサイトメトリーで解析することによりHLAの血清型を確認しています。論文における患者さん全員が血清型でHLA-A2を持つことは確認しているが、HLA-A2 subtype（アレル型（4桁））までは調べていません。

Q6：癌細胞ではMHC Class Iの発現は減少していると言われていたが？

A6：癌細胞における免疫逃避のメカニズムの一つとしてMHC Class Iの発現減少（喪失）がしばしば報告されており（肺癌では約30%の患者でMHC Class Iの発現減少（喪失）を認めると報告されている）、CTLを介した免疫療法の臨床効果が得られない原因の一つと言われています。従って、そうしたMHC Class Iの発現減少（喪失）を認める患者に対してCTL以外の免疫細胞（NK細胞やgdT細胞など）を介した免疫療法の開発が望まれています。

Q7：今回の実験に用いたHLA A2結合ペプチドはどうやって合成したのか？

A7：Thermo Fisher Scientific GmbH社が人工的に合成したものを購入し使用しました。

Q8：今回の実験に使用したT790M由来ペプチドのアミノ酸配列をどうやって決めたのか？

A8：多数あるT790M由来ペプチド（アミノ酸配列）の中から2種のサーバー（BIMASおよびNetMHC 3.2）を使用してHLA-A2に結合すると予想されるペプチドを選択しました。

さらに、実際にHLA-A2に結合するかどうかをHLA-A2を発現した細胞株を用いたbinding assayで確認したのち、免疫原性を調べる実験に使用しました。

Q9：Table2で免疫原性がなくT790M変異を持つ人、9人/15人（60%）の患者にはこのワクチンは効かないということか？

A9：In vitroのassay系で特異的T細胞の誘導がみられない（免疫原性がない）患者にも、ペプチドをワクチンとして用いることにより特異的T細胞を誘導できれば、治療効果がみられるものと期待しています。

Q10：Table2でEGFR-TKIに感受性のあるグループにT790M変異を持つ患者が2名いるのは何故か？

A10：EGFR-TKIに感受性なし、感受性ありの判断はCT画像上の評価でPDであるか否かであり、同T790M変異を持つ患者2名は血液sampleを頂いた時点ではEGFR-TKIに感受性ありと判断しました。T790M変異を持つ患者の腫瘍にもT790M変異を持つ部分と持たない部分が存在し、T790M変異を持たない部分にEGFR-TKIの効果がありPDにはならなかったのではないかと考えています。なお、後にPDに至った可能性があるが経過は追っていません。

Q11：通常は変異の有無は生検組織などで確認すると思うが、何故血漿中で行ったのか？

また、それはよく行われているのか？信頼性はあるのか？

A11：今回は、EGFR-TKIにて治療中もしくは治療後の患者を対象としたため、その時点で新たに組織を同患者から得ることは困難なため、患者血漿から分離したcell-free DNAを用いてPCR測定を行い代用しました。昨今、研究段階ではありますが、手術（生検）適応のない患者においても侵襲の少ない方法で診断を可能とするために、末梢血中のcell-free DNAを用いてmutationの有無を確認しようとする論文も増えてきています。変異陽性と出たものは変異陽性として評価可能であると思いますが、変異陰性と出たものの中には本来は陽性のもの（偽陰性）が存在する可能性は

あると考えています。

Q12：PCR でプライマーは何を使用したのか？存在する T790M 変異のアミノ酸配列まで調べたのか？

A12：Applied Biosystems 社の Taqman Mutation Detection Reference Assays, 用のプライマーを購入して使用したが、プライマーの配列は非公開であるため不明です。なお、T790M 変異のアミノ酸配列は調べていません。

Q13：Immuno check point があるためのがんワクチンは効かないと思うが、どういう Strategy で今後の癌ワクチンは進むべきと考えますか？

A13：現在、Immuno check point 阻害剤が臨床応用され、その臨床効果が科学的に証明されつつありますが、もともと癌特異的な免疫細胞（T細胞）を認める患者にのみ臨床効果を認めることが判明しています。ただし、癌特異的な免疫細胞（T細胞）のない患者にもがんワクチンなどの免疫療法により特異的免疫細胞（T細胞）を誘導することができれば、Immuno check point 阻害剤の臨床効果が期待できるようになると考えられています。従って、今後はがんワクチンと Immuno check point 阻害剤などの免疫調整薬との併用が主流となると推察されます。

Q14：がんワクチン単独とがんワクチンと抗PD-1 抗体の併用で効果に差がないという論文があるが？

A14：がんワクチンと immuno check point 阻害剤（抗PD-1 抗体など）との併用で治療効果が向上するという動物モデルでの報告はありますが、ヒトでの臨床研究としてがんワクチンと抗PD-1 抗体との併用効果を科学的に評価した報告はないと思います。

Q15：変異遺伝子を標的としたり、予防したりするペプチドワクチンとのことであるが、T790M 耐性変異のような遺伝子変異が起こる過程に免疫が関与している事を想像できないのだが？

A15：遺伝子変異は一般的には免疫原性が高いために、遺伝子変異の生じたほとんどの正常細胞（あるいは癌細胞）は免疫系による攻撃を受け死滅すると考えられています（immune surveillance theory）。しかし、宿主の免疫系の変化（何らかの免疫抑制が生じた場合など）や免疫原性の弱い遺伝子変異が生じた場合には免疫系によるコントロールが不十分となりがんが発生すると考えられています（immune escape）。従って、免疫原性の弱い遺伝子変異がより選択的ながん細胞に発現している可能性も指摘されています。

Q16：HLA-A2 以外にも効果は期待できるのか？

A16：今回同定したペプチドは HLA-A2 拘束性ですので他の HLA 型には効果が期待できないと推察されます。なお、他の HLA 型に拘束性のペプチドが同定できれば HLA-A2 以外にも効果は期待できると考え、現在検討中です。

Q17：T790M 耐性変異を持つ患者は国内にどのくらいいるのか？

A17：非小細胞肺癌の国内での年間罹患者数は約 10 万人ですが、そのうち約 20% は EGFR T790M 変異陽性であると考えられることから、患者数は国内で約 2 万人程度と推定されます。

以上の内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確性および質疑応答の対応を踏まえ、主査および副査による審査の結果、本論文は学位論文に値すると評価された。