

学位論文題名

# Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides immunogenic for HLA-A2<sup>+</sup> cancer patients

(HLA-A2陽性癌患者において免疫原性を有する  
上皮成長因子受容体 (EGFR) 由来ペプチドの同定)

## 学位論文内容の要旨

【背景、目的】上皮成長因子受容体 (EGFR) は多くの上皮性悪性腫瘍において重要な役割を果たしている。近年 EGFR を標的分子として、それを過剰発現する上皮性腫瘍に対し、チロシンキナーゼ阻害剤やモノクローナル抗体が臨床応用され、肺非小細胞癌においては ZD1839 (Iressa) が良好な成績をおさめていることが報告されている。また CTLs (Cytotoxic T Lymphocytes) により認識される腫瘍抗原の解析がメラノーマを中心に近年急速に進展しつつあり、メラノーマ抗原由来のペプチドを用いた癌免疫療法の臨床試験において、一部の症例で HLA 拘束性 CTL の増加と腫瘍の縮小がみられている。しかし癌特異的免疫療法の分野では EGFR を標的分子とした報告は少ない。癌ペプチドワクチン療法の臨床試験を通じて non-mutated proliferation 関連蛋白由来のいくつかの CTL 誘導可能なペプチドがペプチド特異的液性免疫反応を惹起すること、およびその特異的液性免疫反応が予後と関連することが判明した。加えて細胞性、液性免疫両者を誘導するより免疫原性の高いペプチドの存在が示唆されている。本研究は、HLA-A2 癌患者において HLA-class I 拘束性腫瘍特異的細胞性および液性免疫を誘導しうる臨床応用可能な EGFR 由来ペプチドを同定することを目的とした。

【検体、方法】EGFR 蛋白アミノ酸配列より、HLA-A2 分子に高親和性を示すことが予想される 9-10 アミノ酸からなるペプチドを文献的に予測し、29 種類のペプチドを合成した。これらのペプチドに対し、肺非小細胞癌患者 20 例と健常人 11 例の血清を用い各ペプチド特異的 IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。ペプチド特異性および EGFR 蛋白への反応性を確認するため、各ペプチドおよび EGFR 蛋白で血清を 3 回吸着させたのち抗体価を測定する吸収試験を行った。特異的抗ペプチド IgG 抗体の直接的な細胞増殖抑制作用を検討するため、抗ペプチド抗体陽性の患者血清をいくつかの濃度で添加した培地でヒト肺癌腺癌細胞株 11-18 を 72 時間培養し、増殖曲線を作成して対照と比較した。抗体依存性細胞障害活性を検討するため、特異的抗ペプチド抗体の存在する血清の存在下に EGFR 由来ペプチドを pre-load した HLA-A2 陽性 T-B ハイブリドーマ細胞株 T2 への健常人末梢血単核球の細胞障害活性をクロム遊離試験で対照と比較した。肺非小細胞癌患者末梢血単核球から、これらのペプチドによる in-vitro 刺激により、腫瘍細胞傷害性 CTL を誘導できるかを IFN- $\gamma$  産生試験、クロム遊離試験で検索した。IFN- $\gamma$  産生試験は肺癌患者末梢血単核球を 14 日間 IL-2 存在下で培養し、Day1, 4, 7, 10 の 4 回ペプチドを 100  $\mu$ M の濃度で反復刺激した後、ペプチドを負荷した T2 細胞に対する IFN- $\gamma$  産生量を ELISA 法にて測定した。上清中 IFN- $\gamma$  濃度 100pg/ml 以上を陽性と判定した。クロム遊離試験は標的細胞として 11-18 (HLA-A2/24、ヒ

ト肺腺癌株、EGFR<sup>+</sup>）、QG56 (HLA -A26、ヒト肺扁平上皮癌株、EGFR<sup>+</sup>)、SKOV3 (HLA -A3/28、ヒト卵巣癌株、EGFR<sup>+</sup>)、SKOV3-A2 (HLA-A2-transfected SKOV3)、PHA-blastoid T 細胞を用いた。さらに、末梢血単核球から誘導された細胞傷害性 CTL のペプチド特異性および HLA 拘束性を証明するため、cold target による競合抑制試験および抗 HLA 分子抗体による抑制試験を施行した。

【結果】EGFR 由来 HLA-A2 拘束性ペプチド 29 種類において、肺非小細胞癌患者 20 例の血清中に特異的 IgG 抗体が存在するかを ELISA 法にて検討した。その結果、EGFR<sub>110-118</sub>、EGFR<sub>479-488</sub>、EGFR<sub>599-607</sub>、EGFR<sub>729-738</sub>、EGFR<sub>765-776</sub>、EGFR<sub>1138-1147</sub> の 6 種類のペプチドが肺非小細胞癌患者末梢血血清の 20~65% に特異的 IgG 抗体が存在することがわかった。これらの抗ペプチド抗体は HLA-A2 陽性患者のみならず陰性患者にも認められ、HLA 拘束性は認められなかった。EGFR<sub>110-118</sub>、EGFR<sub>479-488</sub>、EGFR<sub>729-738</sub>、EGFR<sub>852-861</sub>、and EGF-R<sub>1138-1147</sub> のペプチド抗体についてペプチド吸収試験をおこなった。各ペプチドにて吸収した血清が有意な抗体価の低下を認め、ペプチド特異性を確認した。EGFR 蛋白で吸収を行ったが、有意な抗体価の低下はなく、EGFR 母蛋白への反応性は認められなかった。これらのペプチドが癌患者に投与された場合、ペプチド特異的 CTL を誘導できるかを検討するため、CTL 誘導試験を *in vitro* で施行した。IFN- $\gamma$  産生試験では EGFR<sub>479-488</sub> ペプチドと EGFR<sub>1359-1368</sub> ペプチドでそれぞれ 30%、60% の肺非小細胞癌患者末梢血単核球においてペプチド特異的 CTL を誘導した。またこれらの EGFR ペプチド特異的 CTL はクロム遊離試験において、HLA-A2 陽性、EGFR 陽性癌細胞株を強く傷害した。一方、これらの CTL は、EGFR 陰性の正常血球細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。さらに、この細胞傷害性は、EGFR ペプチドをパルスした cold target により抑制されたことから、EGFR ペプチド特異的であることが証明された。

【考察】29 種類の EGFR 由来ペプチドのうち 479-488 と 1138-1147 の位置に由来する 2 種類のペプチドが肺非小細胞癌患者の 30% および 60% の症例において液性免疫、細胞性免疫両方で反応した。これらのペプチドは健常人では液性免疫は認められるが細胞性免疫反応が認められるのはまれであった。いくつかのペプチドでは健常人でも細胞性免疫反応を惹起したが、これは EGFR が腫瘍細胞のみでなく血球系を除く正常細胞でも広く発現していることの反映であると考えられる。

EGFR はヒト上皮由来悪性腫瘍に高率に過剰発現が報告され、多くの EGFR を標的とした臨床試験が行われている。本研究は、EGFR が腫瘍抗原として HLA-A2 拘束性腫瘍特異的 CTL 株に認識されることを示した。また、EGFR 蛋白由来の 2 種のペプチドは、HLA-A2 陽性癌患者の末梢血から腫瘍傷害性 CTL を誘導可能であることが証明された。これらの結果は、EGFR 由来ペプチドが抗腫瘍ワクチンとして HLA-A2 陽性癌患者の免疫療法に応用可能であるという根拠を示している。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 西 村 孝 司

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

### Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides immunogenic for HLA-A2<sup>+</sup> cancer patients

(HLA-A2陽性癌患者において免疫原性を有する  
上皮成長因子受容体 (EGFR) 由来ペプチドの同定)

近年、上皮成長因子受容体 (以下、EGFR) に対する分子標的治療薬が臨床応用されている。また腫瘍抗原の解析が近年急速に進歩しつつあり、癌免疫療法の臨床試験が進んでいる。しかし癌特異的免疫療法の分野では EGFR を標的分子とした報告は少ない。本研究は、HLA-A2 癌患者において HLA-class I 拘束性腫瘍特異的細胞性および液性免疫を誘導しうる臨床応用可能な EGFR 由来ペプチドを同定することを目的とした。EGFR 蛋白アミノ酸配列より、HLA-A2 分子に高親和性を示すことが予想される 9-10 アミノ酸からなるペプチドを文献的に予測し、29 種類のペプチドを合成した。これらのペプチドに対し、肺非小細胞癌患者血清中の各ペプチド特異的 IgG 抗体を ELISA 法にて測定し、特異的抗体が存在する 11 種類のペプチドを同定した。このうち高率に患者血清中に抗体が存在する 5 種類のペプチドがに対し肺非小細胞癌患者末梢血へのペプチド刺激による CTL 誘導試験を *in vitro* で施行した。EGFR 479-488 ペプチドと EGFR 1138-1147 ペプチドで、それぞれ 30%、60%の肺非小細胞癌患者末梢血単核球においてペプチド特異的 CTL を誘導した。この EGFR ペプチド特異的 CTL はクロム遊離試験において、HLA-A2 陽性癌細胞株を強く傷害した。一方、HLA-A2 陰性細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。さらに、HLA 拘束性、CD8 依存性およびペプチド特異性を検討するため抗 HLA-class I 分子抗体・抗 CD8 抗体による抑制試験および cold target による競合抑制試験を施行した。誘導された CTL の細胞傷害活性は抗 HLA-class I 分子抗体・抗 CD8 抗体添加により抑制されたこと、さらに EGFR ペプチドをパルスした cold target により抑制されたことから、HLA-class I 拘束性、CD8 陽性 T 細胞依存性かつ EGFR ペプチド特異的であることが証明された。これらの結果より EGFR 蛋白由来の 2 種のペプチドは、HLA-A2

陽性癌患者の末梢血においてペプチド特異的液性かつ細胞性免疫の両者を誘導可能であることを示した。

公開発表後、副査の西村教授より 1)抗ペプチド抗体の誘導機序、2)生体内での抗腫瘍作用効果についての質問があった。それに対して、1)臨床試験において class I 拘束性ペプチド刺激においてそのペプチドに反応する class II 拘束性 CD4 陽性 T 細胞が誘導できることより、epitope-spreading が起こっている可能性がある。(Harada. J Immunology(172)2004)、2)誘導される IgG は IgG1 と G2 が主であり、本研究では ADCC を認めていないことから生体内で ADCC 以外の CD4T 細胞を介する CTL への相互作用が想定される。(Harada. J Immunology(178)2005) 等の回答があった。藤堂教授からは、1)免疫療法の耐性獲得機序、2)癌免疫療法の今後の展望についての質問があった。それに対して、1)HLA 分子の欠失や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞による免疫抑制などの機序が考えられること、2)現段階では免疫療法は奏率が低い、より免疫原性の高い新規癌抗原の同定、腫瘍による免疫抑制の解除等による免疫監視機構からの逸脱の制御、CD4T 細胞や抗原提示細胞への操作等でより強力な抗腫瘍作用を誘導できれば標準的治療となりうる可能性がある、等の回答がなされた。また主査の秋田教授より、1)EGFR 遺伝子増幅・過剰発現腫瘍に対する、生体内での EGFR への特異的細胞性・液性免疫反応の増強の有無、2)抗 EGFR 抗体との併用療法など今後の EGFR ペプチドワクチン療法の臨床応用への展望について質問があった。1)肺癌だけでなく高率に EGFR を過剰発現している大腸癌、前立腺癌患者でも EGFR ペプチド投与により液性、細胞性免疫誘導を認め、EGFR 過剰発現腫瘍において特異的細胞性・液性免疫反応の増強が起こっていると考えられること、2)血中抗ペプチド抗体が新たな免疫療法の効果判定指標となりえること、ペプチドワクチン療法と抗 EGFR 抗体療法の併用は EGFR 過剰発現腫瘍に対する免疫反応が増強する可能性があり、さらに基礎的解析を進める必要がある等の回答がなされた。本論文は、EGFR 由来ペプチドが癌特異的抗原として同定された世界で初めての報告であり EGFR を過剰に発現している上皮性腫瘍の癌特異的免疫療法への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。