学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	河野 通久

学 位 論 文 題 目

Immunomodulation via FGFR inhibition augments FGFR1 targeting
T-cell based antitumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma
(FGFR阻害による免疫修飾は頭頸部扁平上皮癌に対する
FGFR1標的T細胞抗腫瘍免疫療法を強化する)

共 著 者 名

小松田浩樹、山木英聖、熊井琢美、林隆介、脇坂理紗、長門利純、大栗敬幸、小坂朱、
大原賢三、岸部幹、高原幹、片田彰博、林達哉、小林博也、原渕保明

Oncoimmunology
2022 Jan 3;11(1):2021619.

研 究 目 的

頭頸部癌は世界で6番目に多い癌腫であり、進行した頭頸部癌患者の50%以上が再発・転移をきたしその多くは根治治療が困難となる。頭頸部癌を含む多くの癌腫で承認された免疫チェックポイント阻害薬は、自己の免疫を利用することで治療困難であった腫瘍を根治できる革新的な治療法である。しかしその奏功率は2割以下であり恩恵を受けている患者は少ないため、新たながん免疫療法の治療戦略の確立が急務である。我々は標的としてFGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor; 線維芽細胞増殖因子受容体)に着目した。

FGFRは4回膜貫通型チロシンキナーゼでありFGFR1-4の4種類から構成されている。FGF等のリガンドと結合することにより活性化され、MAPK、PI3K、JAK/STATなど様々なシグナル伝達を介して血管新生や創傷治癒などに関与している。そのシグナル伝達異常は悪性腫瘍の発生、増殖、分化に関連しており、多くの悪性腫瘍においてFGFRの過剰発現が認められる。近年いくつかの固形癌においてFGFRのチロシンキナーゼ阻害剤が国内承認された。頭頸部癌においてはFGFR1の過剰発現が患者組織の70-80%に認められるとの報告があり特に予後の悪いHPV陰性癌における予後不良因子の一つであることが明らかになっている[1]が、FGFR阻害剤の有効性は明らかではない。さらにFGFRの抗腫瘍免疫への影響や免疫療法の標的としての有効性についても明らかではない。そこで我々は、頭頸部癌細胞株を用いてFGFR阻害剤の抗腫瘍免疫増強効果と新規治療であるがんワクチンの標的としてFGFRが有用であるかを検討した。

材　料　・　方　法

1．マウスモデルを用いたFGFR阻害剤の免疫増強効果の検討

FGFR陽性マウス頭頸部癌細胞株MOC1[(2)]を移植したC57BL/6マウスに、FGFR阻害剤と抗PD1抗体を投与しFGFR阻害剤の免疫チェックポイント阻害剤への抗腫瘍効果の増強を腫瘍成長曲線で確認した。腫瘍内リンパ球をフローサイトメトリーで、腫瘍細胞を免疫組織化学染色で解析した。

2．FGFR阻害剤の免疫賦活効果の機序の解明

ウエスタンブロット法でFGFR陽性を確認した頭頸部癌細胞を *in vitro* でFGFR阻害剤処理をし、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)の変化をフローサイトメトリーで評価した。FGFRの下流のどのシグナル経路が影響を与えるかをそれぞれの阻害剤やsiRNAによる処理を同様の方法で行い解析した。

3．がんワクチンの標的となるFGFRペプチドエピトープの同定と、健常人末梢血を用いたFGFR1反応性T細胞の誘導

FGFR1の全アミノ酸配列からHLA(MHC)クラスⅡ分子と結合能が高い配列をデータベースとアルゴリズム解析にて同定、候補となるエピトープペプチドを合成した。健常人末梢血から分離したCD4陽性T細胞を、ペプチドを抗原提示させた抗原提示細胞により刺激することで、FGFR1特異的T細胞を誘導した。誘導したFGFR1特異的T細胞とMHCが一致する腫瘍細胞株とを共培養し、反応性をELISAで評価した。

4．頭頸部癌患者末梢血中におけるFGFR1ペプチド反応性T細胞の存在の評価

頭頸部癌患者の末梢血単核球と同定したFGFR1ペプチドを共培養し上清のIFNγ産生をELISAで評価することで、担癌患者の末梢血中におけるFGFR1反応性T細胞の存在を検討した。

5．FGFR阻害剤とFGFR標的がん免疫療法の併用効果の検討

FGFR阻害剤処理をした頭頸部癌細胞株とFGFR1特異的T細胞を共培養することで、FGFR阻害剤処理の抗腫瘍免疫の増強を評価した。

成　　績

1. C57BL/6JマウスにFGFR陽性マウス頭頸部癌細胞株MOC1を移植し抗PD1抗体とFGFR阻害剤の併用効果を検討したところ、抗腫瘍効果の増強を認めた。FGFR阻害剤投与により腫瘍内リンパ球内のCD8T細胞、CD4T細胞が増加し、免疫組織化学染色で腫瘍のMHC クラスⅠ、クラスⅡ分子の発現が上昇した。
2. 多くのヒト頭頸部癌細胞株がFGFR1を発現していた。これらをFGFR阻害剤で処理をしたところ、HLA(MHC)クラスⅠ、クラスⅡ分子が上昇した。 MHCクラスⅡ分子の上昇はCIITA (classⅡ transactivator)の発現増強によるものであった。さらに原因となるシグナル経路について検討したところ、PI3KやSTAT3の経路ではなくMAPKシグナル伝達の阻害が関与していた。

3. 次にFGFRが免疫療法の標的として有用であるかどうかを検討した。データベースとアルゴリズム解析により$FGFR1_{305-319}$をがんワクチンの標的となる候補エピトープペプチドとして選定した。同定したエピトープペプチドを用いて3人の健常人末梢血からFGFR反応性T細胞を樹立した。これらは抗HLR抗体によりHLA-DR拘束性を確認した。単独のHLA-DRを持つ細胞との反応からHLA-DR4拘束性T細胞が2種類、HLA-DR53拘束性T細胞が1種類であることが示された。これらをHLAが合致するFGFR陽性ヒト頭頸部癌細胞と共培養するとIFNγやGranzyme Bなどの抗腫瘍サイトカインを放出し殺傷能を示した。
4. 同定した抗原エピトープと6名の頭頸部癌患者の末梢血単核球を培養するとIFNγの放出が認められたため、担癌患者の末梢血中に$FGFR1_{305-319}$ペプチド反応性T細胞前駆細胞が存在することが示された。
5. 最後にFGFR阻害剤処理したヒト頭頸部癌細胞とFGFR反応性T細胞を共培養したところ、抗原提示能の上昇によりFGFR反応性T細胞の抗腫瘍反応が増強したことをサイトカインの産生と殺傷力の上昇により示された。

考　　案

免疫療法の治療標的としてFGFRの二つの側面「①がん免疫療法の効果を上げる」「②がんワクチンの標的」を発見した。分子標的薬はその機序や抵抗性細胞の産生を考えるとそれだけで腫瘍を根絶することは難しい。そこで免疫療法との組み合わせが有望である。FGFR阻害剤により一部の腫瘍細胞が死ぬと抗原が散布され、FGFR阻害剤で抗原提示能が増強した抗原提示細胞に腫瘍抗原が提示されることにより、多くの抗腫瘍T細胞が誘導され残存している腫瘍を攻撃できる。この効果は既存の治療法である免疫チェックポイント阻害剤との併用効果も期待できる。

治療用がんワクチンは現在世界で注目されている新規がん免疫療法の一つである。特に癌のみで発現するネオアンチゲンを標的としたがんペプチドワクチンは臨床試験で著明な抗腫瘍効果を認めている[3]。ネオアンチゲンは正常組織には発現しておらず抗原性が強い理想的な標的である一方、個々人で異なるため個人ごとに同定する必要があり、コスト面や施設の問題により広く使用できない。そこで我々はネオアンチゲンではなくFGFRのような正常組織にも発現しているが癌で高発現している標的に注目している。臨床で用いるにはその抗原性の弱さが懸念されるが、多くの患者に発現しており安価で汎用性が高いため、その抗原性の弱さを克服できた際には革新的な治療法になることが期待できる。本研究で誘導したCD4T細胞はCD8T細胞を補助するヘルパー機能のみならず直接殺傷能力も示した。さらにこのペプチドは複数のHLA拘束性T細胞を誘導でき、CD8T細胞を誘導できるエピトープ配列も含んでいるので、強力な抗腫瘍T細胞応答を誘導できることが示唆される。加えて担癌患者の末梢血にFGFR1ペプチド反応性T細胞が存在したことは、このワクチンの臨床での有効性のさらなる証拠となり得る。

結　　論

FGFR阻害剤が腫瘍のMHCを上昇させ免疫賦活効果があることを示した。FGFR1反応性CD4T細胞を誘導できるペプチドエピトープを同定し、誘導されたT細胞はHLAが一致する腫瘍に対し抗腫瘍効果を示した。このペプチドは頭頸部癌患者の末梢血T細胞と反応性を示した。FGFR1反応性T細胞とFGFR阻害剤は併用効果を認めた。以上より、FGFRが頭頸部癌に対するがん免疫療法における新規標的となる可能性を示した。

引　用　文　献

1. Koole K, et al. FGFR1 is a potential prognostic biomarker and therapeutic target in head and neck. Squamous Cell Carcinoma Clin Cancer Res. 2016.
2. Kono M, et al. The mouse oral carcinoma (MOC) model: A 10-year retrospective on model devel opment and head and neck cancer investigations. Oral oncology. 2022.
3. Awad MM. Personalized neoantigen vaccine NEO-PV-01 with chemotherapy and anti-PD-1 as first -line treatment for non-squamous non-small cell lung cancer. Cancer cell. 2022

参　考　論　文

1. Kono M, Kumai T, Hayashi R, et al. Interruption of MDM2 signaling augments MDM2-targeted T cell-based antitumor immunotherapy through antigen-presenting machinery. Cancer, Immunology, Immunotherapy: https://doi.org/10.1007/s00262-021-02940-5. 2021 April 18.

2. Kono M, Yamaki H, Komatsuda H, et al. IL-2 complex recovers steroid-induced inhibition in immunochemotherapy for head and neck cancer. Translational Oncology 2022 Apr;18;

別紙

学 位 論 文 提 出 者 一 覧

令和６年９月期分

No.	論文提出者	学　位　論　文　題　目	関連講座等 (指導教員・紹介教員)	備　考
1	河野（こうの）　通久（みちひさ）	Immunomodulation via FGFR inhibition augments FGFR1 targeting T-cell based antitumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma （FGFR阻害による免疫修飾は頭頸部扁平上皮癌に対するFGFR1標的T細胞抗腫瘍免疫療法を強化する）	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座 髙原 幹	論文博士