HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EGFR阻害により誘導されるEGFR変異陽性肺癌の腫瘍微小環境における自然免疫シグナル伝達経路の変化 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	椎谷, 研彦
Description	配架番号：2904
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16412号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95404
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHIIYA_Akihiko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　椎谷　研彦

学 位 論 文 題 名

EGFR 阻害により誘導される EGFR 変異陽性肺癌の腫瘍微小環境における自然免疫シグナル伝達経路の変化 (EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancer cells perturbs innate immune signaling pathways in the tumor microenvironment)

【背景と目的】肺癌による死亡は本邦がん死亡原因で最多である。次世代シーケンサーの登場によって肺癌発生の原因となる遺伝子異常が明らかになり、遺伝子異常を標的とした治療が肺癌患者の生命予後を改善してきた。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異は東アジアにおける非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer: NSCLC) 症例の 30–50%に認められる。EGFR 変異陽性 NSCLC に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR tyrosine kinase inhibitor: EGFR-TKI) は殺細胞性抗がん剤と比して全生存期間の延長を示す標準治療薬である。しかしその優れた治療効果にも関わらず、大多数は最終的に再発するため、治療耐性機構の解明が課題である。これまでの研究で、EGFR-TKI 治療耐性を来した患者の約半数で、原因となる後天性の遺伝子変異、増幅、融合が明らかとされてきた。しかし、残り約半数の患者における治療耐性の原因は解明されていない。

我々は以前、EGFR-TKI 開始直後から治療耐性を示す患者（一次耐性）と治療効果を認める患者の治療前腫瘍環境を免疫組織化学染色で比較し、前者で単位面積あたりの腫瘍浸潤 T 細胞数が低下していることを報告した。これは、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における EGFR-TKI 抵抗性の一因として免疫逃避が関与する可能性を示唆する。また、EGFR-TKI により腫瘍細胞が I 型インターフェロン (IFN) を産生し、この I 型 IFN が signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) を活性化することで、腫瘍細胞が EGFR-TKI 耐性を獲得することが明らかとされている。こうした背景は、従来知られている後天的耐性遺伝子の獲得による治療耐性とは別に、免疫逃避を介した耐性機序が存在する可能性を強く示唆する。そこで本研究では、EGFR-TKI により EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞が誘導する内因性または外因性因子の免疫逃避への関わりに着目し、検証を行った。

【材料と方法】内因性因子を検討した当科先行研究において、EGFR-TKI 処理で EGFR 変異陽性 NSCLC の CD24 発現が増加することが示されていた。そのため、その再現性を EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株 (PC9、HCC827、H1975)、EGFR 野生型細胞株 (A549、RERF-LC-Ad1、H522) を用い in vitro で検証した。検証には、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR) およびフローサイトメトリー (flow cytometry: FCM) を使用した。In vivo での再現性に関しては、EGFR-TKI または化学療法による治療を受けた患者の治療前・治療後組織検体における腫瘍細胞 CD24 発現を免疫組織化学染色により解析した。CD24 の治療標的としての検証を目的として、EGFR-TKI 処理により CD24 発現が増加した細胞株とヒト末梢血由来分化マクロファージを抗 CD24 抗体存在下で共培養し、抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular phagocytosis: ADCP) を FCM で解析した。

次に、EGFR-TKI 処理後の細胞培養上清と EGFR-TKI 治療前後の患者血液検体からセルフリーDNA (cell free deoxyribonucleic acid: cfDNA) を抽出した。この腫瘍由来 cfDNA が腫瘍微小環境を変化させる外因性因子であることを検証する目的で、stimulator of interferon gene (STING)-knockout THP-1 単球を用いて、腫瘍由来 cfDNA が誘導する自然免疫応答の解析を行った。

【結果】In vitro で、EGFR-TKI 処理によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株の自然免疫チェックポイント CD24 発現が増加した。In vivo で、EGFR 変異陽性 NSCLC 患者 6 人中 5 人で EGFR-TKI 治療後の腫瘍細胞 CD24 発現が増加したが、化学療法群 3 名では CD24 発現量の変化は認めなかった。CD24 はマクロファージ上に発現する sialic acid binding Ig like lectin 10 (Siglec-10) と結合して腫瘍貪食を抑制する。先行研究で、ヒト卵巣がんおよび乳がんにおいて、抗 CD24 抗体を用いた CD24–Siglec-10 結合の遮断が腫瘍貪食を促進することが示されている。NSCLC でも同様のアプローチが有効か検討した。まず、様々

なサイトカインで刺激した末梢血由来分化マクロファージの Siglec-10 発現を解析すると、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、interleukin-10 (IL-10) および transforming growth factor beta (TGF-β) で分化させたマクロファージは細胞表面に Siglec-10 を発現したが、IL-4 で分化させたマクロファージは Siglec-10 を発現しなかった。この結果は過去の報告と対照的であり、NSCLC における骨髄系細胞の多様性を考慮すると、NSCLC では Siglec-10 発現が一部のマクロファージサブセットに限定されることが示唆された。これを踏まえ、Siglec-10 発現陰性マクロファージにおいても CD24 を標的とした治療効果が得られるか検討するため、抗 CD24 抗体を用いた ADCP 解析を行った。その結果、EGFR-TKI 処理した EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞が、Siglec-10 発現陰性マクロファージによって抗 CD24 抗体依存性に貪食されることが確認された。以上より、EGFR-TKI 治療により腫瘍細胞に発現する内因性因子 CD24 は、Siglec-10 発現に依存せず ADCP を介して治療標的となることが明らかになった。

EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞を EGFR-TKI 処理すると、殺細胞性抗がん剤のパクリタキセル処理と比較して培養上清中の cfDNA 濃度が増加した。二本鎖 DNA (double-stranded DNA: dsDNA) は、細胞内に取り込まれると cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-STING 経路を介して免疫応答を誘導する。このことから、dsDNA である cfDNA が免疫応答の誘導を介し、腫瘍微小環境を免疫抑制的に変化させることを仮説とした。まず、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞から放出された cfDNA が、STING 経路依存性に THP-1（ヒト単球由来細胞株）の interferon regulatory factor (IRF) を活性化することを示した。この IRF 活性化が免疫抑制的な腫瘍微小環境の変化を引き起こすか検証するため、I 型 IFN が免疫細胞に及ぼす作用を解析した。抗腫瘍免疫応答には T 細胞とその産生する IFN-γが不可欠であり、マクロファージは IFN-γによって T 細胞の遊走に必要なケモカイン (CXCL9、CXCL10) を腫瘍微小環境に放出する。この知見をふまえ、cfDNA によって誘導された I 型 IFN がこうしたケモカインの産生を阻害するか検証した。THP-1 由来マクロファージを cfDNA または IFN-αで前処理すると、IFN-γ刺激による CXCL9 産生が阻害された。EGFR-TKI によって放出される腫瘍由来 cfDNA が、IRF 経路を活性化して CXCL9 産生を阻害することで、免疫抑制的な腫瘍微小環境を形成する外因性因子であることが示された。

以上の結果は cfDNA や I 型 IFN が EGFR-TKI 耐性に関与すること、腫瘍微小環境における cfDNA 動態のより詳細な解析が必要であることを示唆する。しかし、生体内において腫瘍環境 cfDNA 濃度や動態を直接解析することは技術的に困難である。そのため、末梢血中の cfDNA 濃度を測定することで腫瘍微小環境中の cfDNA 濃度を間接的に解析可能か、患者検体を用いて検証した。In vitro の結果と対照的に、EGFR-TKI 治療が奏効した患者では治療後に血中 cfDNA 濃度が低下した。末梢循環系と腫瘍微小環境において cfDNA の調節メカニズムが異なることが示唆された。腫瘍縮小に伴って血中 cfDNA 濃度が低下したことから、末梢血 cfDNA は EGFR-TKI 治療効果を予測するバイオマーカーとして有用な可能性がある。

【考察】EGFR-TKI 治療によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞で誘導される内因性因子の検討から、EGFR-TKI 治療が腫瘍細胞の自然免疫チェックポイント CD24 発現を増加させ、マクロファージの Siglec-10 発現に依存せず ADCP の治療標的となることを示した。特にトラスツズマブ・デルクステカンのような抗体薬物複合体の著明な抗腫瘍効果を考慮すると、CD24 を標的とした抗体治療は EGFR-TKI 耐性を克服する可能性がある。

死滅する EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞から放出された cfDNA が、I 型 IFN 産生経路を活性化し、マクロファージの CXCL9 産生を阻害する外因性因子であることを示した。CXCL9 は腫瘍微小環境へのエフェクターT 細胞動員に必要なケモカインのため、CXCL9 産生阻害によってエフェクターT 細胞の腫瘍環境への誘導が抑制されることが、免疫抑制的な腫瘍微小環境を形成し、EGFR-TKI 治療耐性を惹起するメカニズムの一つである可能性がある。患者末梢血検体の解析によって末梢循環系と腫瘍微小環境で異なる cfDNA 調節メカニズムの存在が示唆されたため、今後は生体内腫瘍環境で、cfDNA が誘導する I 型 IFN の EGFR-TKI 耐性への寄与を検証する。

【結論】EGFR-TKI 治療が誘導する EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における内因性および外因性因子が、免疫逃避的な腫瘍微小環境を形成する。これらの因子を標的とした新規治療は EGFR-TKI 耐性の克服に繋がる可能性がある。