



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16412
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95946
Type	doctoral thesis
File Information	SHIYA_Akihiko.pdf



学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

椎谷研彦

Akihiko Shiiya

学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

椎谷研彦

Akihiko Shiiya

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	3
略語表	7
緒言	10
実験方法	12
結果	23
考察	47
総括および結論	50
謝辞	51
利益相反	52
引用文献	53

発表論文目録および学会発表目録

本研究成果の一部は以下の論文として受理された。

Akihiko Shiiya, Takuro Noguchi, Utano Tomaru, Shin Ariga, Yuta Takashima, Yoshihito Ohhara, Jun Taguchi, Satoshi Takeuchi, Yasushi Shimizu, Ichiro Kinoshita, Tomonobu Koizumi, Yoshihiro Matsuno, Naofumi Shinagawa, Jun Sakakibara-Konishi, Hirotoshi Dosaka-Akita

Title: EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancer cells perturbs innate immune signaling pathways in the tumor microenvironment.

Cancer Science, 114: 1270–1283, 2023

本研究成果の一部は以下の学会に発表した。

1 椎谷研彦、野口卓郎、有賀伸、大原克仁、清水康、木下一郎、秋田弘俊

題名 Cell-free DNA from EGFR-mutated lung cancer cells treated with EGFR-TKIs engages in innate immune signaling pathways

第 80 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2021 年 9 月 30 日から 10 月 2 日

2 椎谷研彦、野口卓郎、有賀伸、大原克仁、清水康、木下一郎、秋田弘俊

題名 EGFR-mutant NSCLC cells upregulate the expression of inhibitory immune checkpoint CD24 under EGFR-TKI treatment

第 81 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2022 年 9 月 29 日から 10 月 2 日

3 椎谷研彦、野口卓郎、外丸詩野、有賀伸、高島雄太、品川尚文、木下一郎、松野吉宏、榊原純、秋田弘俊

題名 Examination of CD24 expression in EGFR-mutant lung cancer

第 112 回日本病理学会総会、下関市生涯学習プラザ、2023 年 4 月 13 日から 15 日

4 Akihiko Shiiya, Takuro Noguchi, Utano Tomaru, Shin Ariga, Yuta Takashima, Yoshihito Ohhara, Jun Taguchi, Satoshi Takeuchi, Yasushi Shimizu, Ichiro Kinoshita, Tomonobu Koizumi, Yoshihiro Matsuno, Naofumi Shinagawa, Jun Sakakibara-Konishi, Hirotoshi Dosaka-Akita

Title: EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancer triggers the innate immune response associated with tumor immune escape

The AACR Annual Meeting 114th, Orange County Convention Center, Orlando City, 14–19 April 2023.

要旨

【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 における骨髓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。

略語表

ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis
adj.P.Val	adjusted p-value
AF	Alexa Fluor
APC	allophycocyanin
ARMS	amplification refractory mutation system
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosine triphosphate
CA19-9	cancer antigen 19-9
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cfDNA	cell-free deoxyribonucleic acid
CEA	carcinoembryonic antigen
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXCL	C-X-C motif ligand
Cy	cyanine
$\Delta\Delta Ct$	delta delta threshold cycles
DMSO	dimethyl sulfoxide
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
E19DEL	exon 19 deletion
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallizable
FC	fold change

FCM	flow cytometry
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC-A	forward scatter area
FSC-H	forward scatter height
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
gMFI	geometric mean fluorescence intensity
IFN	interferon
IL	interleukin
IRF	interferon regulatory factor
ISG	interferon-stimulated gene
ISRE	interferon-stimulated response elements minimal promoter
JAK1	Janus kinase 1
JCRB	Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank
L858R	leucine-to-arginine substitution at amino acid position 858
LPS	lipopolysaccharide
MACS	magnetic activated cell sorting
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
ns	not significant
NSCLC	non-small cell lung cancer
OD	optical density
One-way ANOVA	One-way analysis of variance
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PE	phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	peridinin-chlorophyll-protein complex conjugate-cyanine 5.5

PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PNA-LNA PCR	peptide nucleic acid-locked nucleic acid locked nucleic acid polymerase chain reaction
PSG	penicillin-streptomycin-L-glutamine
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Rag1	recombination activating gene 1
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
RLU	relative light unit
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEAP	secreted embryonic alkaline phosphatase
SEM	standard error of mean
Siglec	sialic acid binding Ig like lectin
SSC	side scatter
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
STING	stimulator of interferon genes
T790M	threonine-to-methionine substitution at amino acid position 790
TBK1	tank-binding kinase 1
TGF- β	transforming growth factor beta
TKI	tyrosine kinase inhibitor

緒言

肺癌による死亡は本邦の 2022 年がん死亡原因で最多である（国立研究開発法人国立がん研究センター、2024）。肺癌の組織型分類では非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer: NSCLC）が全体の約 80%を占める（Sharma et al, 2007）。2000 年代初頭、次世代シーケンサーの登場（Margulies et al, 2005）によって肺癌発生の原因となる遺伝子異常を網羅的に解析することが可能となった。中でも頻度の高い上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGFR）遺伝子変異は東アジア NSCLC 症例の 30–50%に認められることが報告された（Sharma et al, 2007）。EGFR 変異はエクソン 18 から 24 でコードされるチロシンキナーゼドメインの内、主にエクソン 18 から 21 のアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate: ATP）結合部位で発生する（Kosaka et al, 2004）。第一世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR tyrosine kinase inhibitor: EGFR-TKI）は EGFR の ATP 結合部位に競合的に結合し（Wakeling et al, 2002）、従来の殺細胞性抗がん剤と比較して優れた生存効果をもたらすが、大多数の患者は耐性を獲得する（Maemondo et al, 2010; Rosell et al, 2012）。ゲノム解析によって第一世代 EGFR-TKI の主な耐性メカニズムである T790M（threonine-to-methionine substitution at amino acid position 790）変異の獲得が明らかとなった（Kobayashi et al, 2005; Pao et al, 2005）。第二世代 EGFR-TKI は T790M 変異陽性症例に有効性を示さなかったが、第三世代 EGFR-TKI オシメルチニブは T790M 変異症例の全生存期間を延長し、現在の未治療 EGFR 変異陽性進行 NSCLC に対する標準治療薬である（Ramalingam et al, 2020）。しかし、ほとんどの患者はオシメルチニブに対しても耐性を獲得する。ゲノム解析により、耐性を獲得したおよそ半数の症例で後天性の遺伝子変異、増幅、融合などの耐性メカニズムが明らかになったが、残り半数の耐性メカニズムはまだ解明されていなかった（Leonetti et al, 2019）。これらの背景から、遺伝子変異、増幅、融合などのゲノム異常に依存しない新規の耐性メカニズムを明らかにすることを目的とした。

我々は以前、EGFR-TKI 開始 3 ヶ月以内に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て、前者では腫瘍浸潤 T 細胞の単位面積あたりの数が低下していることを報告した（Takashima et al, 2018）。*Egfr del19* マウスから樹立された肺癌細胞株を用いた担癌モデルで、recombination activating gene 1 (*Rag1*) 欠損マウスではオシメルチニブの治療効果が消失する（Kleczko et al, 2023）。これらの報告は EGFR 変異陽性細胞の T 細胞免疫逃避が EGFR-TKI 耐性の一因となることを示唆する。また、マウスモデルでは、EGFR-

TKI を programmed cell death protein 1 (PD-1) 阻害薬や cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4) 阻害薬と併用することで抗腫瘍効果が上乘せされることが知られている (Fu et al, 2024; Sugiyama et al, 2020)。しかし、ヒトでは PD-1 または programmed cell death ligand 1 (PD-L1) 阻害薬と EGFR-TKI の同時・逐次投与は間質性肺疾患などの重篤な有害事象のリスクが非常に高い (Oxnard et al, 2020; Schoenfeld et al, 2019)。つまり EGFR-TKI と T 細胞活性を目的とした免疫チェックポイント阻害薬併用療法の有用性が実験的には示されるものの、この併用療法のヒトへの応用は安全性の観点から実現性が乏しい。それでは、獲得免疫系を直接の標的とせず、自然免疫系を標的とした EGFR-TKI 耐性克服の可能性は想定されるであろうか。近年、EGFR-TKI により腫瘍細胞が産生する I 型インターフェロン (interferon: IFN) が、自己分泌性に signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) を活性化し、治療耐性に寄与することが報告された (Gong et al, 2020)。これは、EGFR-TKI 治療耐性に自然免疫系が関与することを示唆する。本研究では、EGFR-TKI が自然免疫系を変化させて治療耐性を誘導することを仮説とし、EGFR-TKI によって EGFR 変異陽性 NSCLC 腫瘍細胞内で変化する分子発現 (内因性因子) と、腫瘍細胞周囲免疫応答を修飾する分子 (外因性因子) について検証した。

実験方法

1) 細胞培養および解析用の細胞処理

細胞培養液は以下を用いた（表 1）。

表 1 本研究で使用した細胞培養液の組成

最終濃度は、それぞれ添加した試薬の細胞培養液中の濃度のこと。表に示された細胞株および試薬の正式名称と販売元を以下に示す。Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco, 11875093) ; ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS、ニチレイ、175012) ; ペニシリン–ストレプトマイシン–L-グルタミン溶液 (× 100) (penicillin-streptomycin-L-glutamine: PSG、富士フィルム和光純薬株式会社、161-23201) ; RPMI 1640 Medium, HEPES (Gibco, 2240089) ; THP-1 (JCRB0112) ; THP1-Dual (InvivoGen, thpd-nfis) ; stimulator of interferon genes (STING)-knockout THP1-Dual (InvivoGen, thpd-kostg)。

培養細胞	培地	添加した試薬	最終濃度
肺癌細胞株	RPMI 1640 Medium	FBS PSG (× 100)	10% × 1
ヒト末梢血単球由来マクロファージ THP-1 THP1-Dual STING-knockout THP1-Dual	RPMI 1640 Medium, HEPES	FBS PSG (× 100)	10% × 1

細胞の凍結保存液は最終濃度 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) に調製した細胞培養液を用いた。フローサイトメトリー (flowcytometry: FCM) に用いる fluorescence-activated cell sorting (FACS) 緩衝液はリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS (-)、富士フィルム和光純薬株式会社、166-23555) に FBS を加えて最終濃度 2% に調製した。Magnetic-activated cell sorting (MACS) 法による細胞分離に用いる MACS 緩衝液は PBS (-) に FBS と ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を加えてそれぞれ最終濃度 2%、2mM に調製した。

全ての細胞は 37°C に加温した 5% CO₂ 加湿インキュベータ内で培養した。肺癌細胞株を継代、凍結保存または実験に使用する時は、PBS (-) で洗浄し、インキュベータ内で 3–5 分間 0.25% トリプシン–EDTA (Gibco, 25200056) 処理した。細胞培養液で 5 倍希釈し、ピペッティングで細胞を回収した。200 × g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を除いた後に再度細胞培養液で懸濁し、200 × g、4°C で 5 分間遠心分離

した。上清を除いて細胞を回収した。細胞を凍結保存する時は、 $1-2 \times 10^6$ 個の細胞を凍結保存液に懸濁し、バイセル（日本フリーザー株式会社）に収納し、 -80°C で 48 時間凍結した後に液体窒素で保存した。

ヒト末梢血由来分化マクロファージまたは THP-1 由来マクロファージを解析に使用する時は、氷冷保存 PBS (-) で 3 回洗浄した後、最終濃度 2.5–5 mM EDTA に調製した PBS (-) を加え、氷上で 30–60 分静置した。ピペティングで細胞を剥離し、細胞培養液を含むチューブに回収して $300 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。

2) 細胞株

EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株 PC9、HCC827、H1975 および EGFR 野生型細胞株 A549、H522、RERF-LC-Ad1 は、European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)、American Type Culture Collection (ATCC)、および Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB) から入手した（表 2）。

表 2 本研究で使用した NSCLC 細胞株

E19DEL: exon 19 deletion; L858R: leucine-to-arginine substitution at amino acid position 858。

細胞株	EGFR変異	組織型	供給元
PC9	E19DEL	腺癌	ECACC
HCC827	E19DEL	腺癌	ATCC
H1975	L858R/T790M	腺癌	ATCC
A549	–	腺癌	JCRB
H522	–	腺癌	ATCC
RERF-LC-Ad1	–	腺癌	JCRB

3) マイコプラズマ汚染の解析

細胞株を凍結保存してバンクを作成する毎に MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-701) と MycoAlert Assay Control Set (Lonza, LT07-518) を用いて細胞株のマイコプラズマ汚染を解析した。解析時はすべての検体と試薬は室温で使用した。解析の前に少なくとも 48 時間培養した細胞から 2 ml の培養上清を回収し、 $200 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清 100 μl を解析に使用した。MycoAlert reagent 100 μl を添加した 5 分後に、積算 1 秒に設定した GloMax ルミノメーター (Promega) で発光を測定した（測定値 A）。次に、MycoAlert substrate 100 μl を添加

して 10 分後に再度発光を測定した（測定値 B）。測定値 B と測定値 A の比率を用いて以下の基準でマイコプラズマ感染を判定した。比率 0.9 未満：マイコプラズマ感染陰性、比率 1.2 超：マイコプラズマ感染陽性。

4) EGFR-TKI またはパクリタキセルによる細胞増殖阻害実験

EGFR 変異陽性または EGFR 野生型 NSCLC 細胞株を、20 nM オシメルチニブ（Cayman Chemical, 16237）、200 nM ゲフィチニブ（富士フィルム和光純薬株式会社、184475-35-2）、400 nM アファチニブ（Selleck, S1011）（いずれも最終濃度）または本文中に記載された濃度の殺細胞性抗がん剤パクリタキセル（Cayman Chemical, 10461）を加えた細胞培養液で 72 時間培養した。細胞数はトリパンブルー（Sigma-Aldrich, T8154）と血球計算盤（AS ONE, 03-405-1）を用いて計測した。セルフリーデオキシリボ核酸（cell-free deoxyribonucleic acid: cfDNA）濃度測定用に培養液を $200 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を -80°C で保存した。それぞれ 3 つの technical replicate を作成し、統計学的評価を行った。

5) リボ核酸（ribonucleic acid: RNA）の抽出と定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR）

回収したセルペレットから培養液をピペッティングで出来る限り取り除き、液体窒素で急冷した後に -80°C で保存した。保存したセルペレットは 7 日以内に Qiagen RNeasy Mini Kit（Qiagen, 74104）を用いて RNA を抽出した。Nanodrop（Thermo Fisher Scientific）を用いて抽出した RNA の核酸濃度を測定し、260 nm/280 nm の吸光度比が 2.0 以上であることを確認した。1000 ng の RNA から PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ、6210A）を用いた逆転写反応によって相補的 DNA（complementary DNA: cDNA）を合成した。

cDNA 産物と SYBR Green PCR Master Mix and SYBR Green RT-PCR Reagents Kit（Applied Biosystems, 4309155）を用いて qRT-PCR を行った。*CD24* を特異的に認識するプライマー（forward primer 5'-CTCCTACCCACGCAGATTTATTC-3,' reverse primer 5'-AGAGTGAGACCACGAAGAGAC-3'）と *GAPDH* を特異的に認識するプライマー（forward primer 5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3,' reverse primer 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGA-3'）を用いた。*CD24* の相対的な遺伝子発現量は *GAPDH* を内在性コントロールに置き、delta delta threshold cycles ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 法で算出した。

6) ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell: PBMC）の分離

EDTA 入り採血管に 20 ml の末梢血を回収し、 $400 \times g$ 、室温で 10 分間遠心分離した。上層の血漿成分を回収し、cfDNA 濃度測定用に -80°C で保存した。下層の血球成分を 20 ml の室温 RPMI 1640 Medium, HEPES と混合し総量 40 ml とした。この混合液 20 ml ずつを、それぞれ 10 ml の Ficoll-Paque plus（GE HealthCare Life Sciences, 17-1440）の上に混ざらないように静かに重層した。遠心機の加速、減速を最小に設定して $400 \times g$ 、室温で 40 分間遠心分離し、中間層から PBMC を回収し、 $400 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を除いた後に細胞数を計測し 1.5×10^7 細胞あたり 1 ml のバンバンカー（日本ジェネティクス株式会社、CS-04-001）で懸濁した。バイセルに収納し、 -80°C で 48 時間凍結した後に液体窒素で保存した。

7) ヒト末梢血由来分化マクロファージの分化

PBMC 1×10^7 個あたり 80 μl の MACS 緩衝液で懸濁し、20 μl の CD14 MicroBeads（Miltenyi Biotec, 130-050-201）を加えた。 4°C で 15 分静置した後に 1–2 ml の MACS 緩衝液で洗浄し、 $300 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を除いた後、500 μl の MACS 緩衝液で懸濁し、MACS LS Column（Miltenyi Biotec, 130-042-401）を用いたポジティブセレクション法で CD14 陽性単球を分離した。この時全細胞に占める CD14 陽性細胞の割合は allophycocyanin-cyanine 7 (APC-Cy7) 標識抗 CD14 モノクローナル抗体（Biolegend, clone: 63D3）またはアイソタイプコントロール抗体（Biolegend, clone: MOPC-21）を用いて FCM で確認した（「結果」図 9 を参照）。CD14 陽性単球は細胞培養液で 3.5×10^5 細胞/ml の濃度に希釈し、24 穴プレートの 1 穴あたりに 1 ml ずつ播種した。表 3 に記載したサイトカインを加え、7–10 日間培養した。

表 3 ヒト末梢血由来分化マクロファージの培養プロトコル

Day 0 に 1 ml の細胞培養液にそれぞれのサイトカインを添加して培養開始した。表に点を示したタイミングで、500 μl の培養液を吸引除去後に 500 μl の培養液とサイトカインを加えた。アスタリスクを記した日に FCM で表面マーカーの発現を解析した。表に示されたサイトカインの正式名称と培養液中の濃度を以下に示す。マクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor: M-CSF, Miltenyi Biotec, 130-096-491): 50 ng/ml; 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF, Miltenyi Biotec, 130-095-372): 50 ng/ml;

トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- β 1: TGF- β 、富士フィルム和光純薬株式会社、209-16544): 50 ng/ml; インターロイキン-10 (interleukin-10: IL-10, Miltenyi Biotec, 130-093-948): 50 ng/ml; IL-4 (Miltenyi Biotec, 130-093-915): 20 ng/ml; リポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS、富士フィルム和光純薬株式会社、129-05461): 100 ng/ml, IFN- γ (富士フィルム和光純薬株式会社、093-05631): 50 ng/ml。

マクロファージ	サイトカイン	Day 0	3	4	6	7	9	10
GM-CSF	GM-CSF	●	●		●	*		
GM-CSF/IFN- γ /LPS	GM-CSF	●	●		●	*		
	IFN- γ				●			
	LPS				●			
M-CSF	M-CSF	●	●		●	*		
M-CSF/IL-4	M-CSF	●	●		●	*		
	IL-4				●			
M-CSF/IL-10/TGF- β	M-CSF	●		●		●	●	*
	IL-10			●		●	●	
	TGF- β			●		●	●	
M-CSF/IL-4/IL-10/TGF- β	M-CSF	●		●		●	●	*
	IL-4			●		●	●	
	IL-10			●		●	●	
	TGF- β			●		●	●	

8) 抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular phagocytosis: ADCP)

標的腫瘍細胞を、蛍光標識を目的として 150 nM カルセイン-AM (富士フィルム和光純薬株式会社、349-07201) を用いて氷上で 20 分染色した。細胞培養液で二度洗浄し、上清を除いて 1×10^6 細胞/ml の濃度に懸濁し最終濃度 20 μ g/ml の抗 CD24 モノクローナル抗体 (GeneTex, clone: SN3) またはアイソタイプコントロール抗体 (Sigma-Aldrich, clone: MOPC-21) を添加した。末梢血由来分化マクロファージを回収して 5×10^5 細胞/1 ml の濃度で懸濁した。オートクレーブで滅菌した 1.5 ml O-リングレススクリーキャップチューブ (WATSON 深江化成グループ、1394-150-c) 内に 1×10^5 個の標的細胞と 5×10^4 個の末梢血由来分化マクロファージを総量 200 μ l の培養液として調製し、 $100 \times g$ で 1 分間遠心後、CO₂ インキュベータ内で 9 時間培養した。その際通気性を担保する目的でチューブの蓋を緩めた。実験系に応じて ADCP を阻害する目的で、最終濃度 5 μ M となるようにサイトカラシン D (Sigma-Aldrich, C8273) を添加した (Schulz et al, 2019)。

9) cfDNA の抽出と THP-1 細胞株を用いた実験

細胞培養上清と患者血漿から MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, A29319) を用いて cfDNA を抽出した。cfDNA の濃度は Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Q33231) を用いて測定した。

自然免疫シグナル伝達経路の活性評価は、THP-1、THP1-Dual、STING-knockout THP1-Dual 細胞株を用いた。THP-1 細胞株は急性単球性白血病患者の末梢血単球成分から樹立された。THP1-Dual は、THP-1 細胞の interferon-stimulated response elements (ISRE) と結合した interferon-stimulated gene (ISG) 54 minimal promoter の制御下に分泌型ルシフェラーゼレポーター遺伝子である Lucia 遺伝子が導入されている。また、IFN- β minimal promoter と結合した nuclear factor kappa B (NF- κ B) の制御下に分泌型アルカリホスファターゼ (secreted embryonic alkaline phosphatase: SEAP) レポーター遺伝子が導入されている。これらの遺伝子導入によって、レポーター活性を測定することで interferon regulatory factor (IRF) と NF- κ B の活性を評価することが出来る。導入遺伝子を維持する目的で、一回の継代おきに Blasticidin (InvivoGen, ant-bl-1) と Zeocin (InvivoGen, ant-zn-1) の選択抗生剤をそれぞれ最終濃度 10 μ g/ml、100 μ g/ml で培養液に加えた。解析の 24 時間前からはこれらの選択抗生剤は培養液に加えずに培養した。微生物汚染による自然免疫系の活性化を最小限に防ぐため、Normocin (InvivoGen, ant-nr-1) を最終濃度 50 μ g/ml で細胞培養液に添加した。

レポーター解析では、 1×10^5 個の THP1-Dual または STING-knockout THP1-Dual 細胞株を細胞培養液で希釈して平底 96 穴プレートに播種し、以下のいずれかを加えて 24 時間培養した (各濃度は培養液中の濃度)：リポフェクタミン 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000001) で処理した 50 ng/ml cfDNA、陽性対照として 500 ng/ml LPS または 10,000 U/ml IFN- α 2a (Miltenyi Biotec, 130-093-873)、陰性対照としてリポフェクタミンまたは無添加。リポフェクタミンは DNA を細胞内にトランスフェクションするために用いられる試薬である。IRF 活性は、培養上清にルシフェラーゼ活性測定試薬である QUANTI-Luc (Invivogen, rep-qlc1) を加え、直ちに GloMax ルミノメーターで測定した。NF- κ B 活性は、培養上清にアルカリホスファターゼ活性測定試薬である QUANTI-Blue Solution (InvivoGen, rep-qbsl) を常温で加えて 6 時間培養し、655 nm に設定した iMark マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で測定した。

C-X-C motif ligand 9/10 (CXCL9/10) 発現阻害解析では、 3×10^5 個の THP-1 細胞を細胞培養液で希釈して 24 穴プレートに播種し、最終濃度 150 nM の phorbol 12-

myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, P8139) を添加した培養液で 24 時間培養した。その後以下のいずれかを添加して 24 時間培養した (各濃度は培養液中の濃度) : 1 µg/ml Poly (dA:dT)/リポフェクタミン、100 ng/ml PC9 cfDNA/リポフェクタミン、20,000 U/ml IFN-α2a、またはネガティブコントロールとしてリポフェクタミン。その後、最終濃度 100 ng/ml の IFN-γを加えてさらに 24 時間培養した。この時、シグナル伝達タンパク質やサイトカイン、ケモカインを細胞内に留まらせるための試薬として、モネンシン (BD Biosciences, 554724) を添加した。

10) FCM

全ての細胞は 4°C で 30 分間、遮光して染色した。免疫細胞の染色前は、Human TruStain FcX (Biolegend, 422302) を 1/50 の濃度に調製して細胞を懸濁し、10 分間 4°C で静置した。これによって fragment crystallizable (Fc) 受容体への非特異的な抗体の結合を防ぎ、非特異的標識を最小限にした (Fc ブロック)。染色後、細胞を FACS 緩衝液で二度洗浄し、FACS 緩衝液で再懸濁して FCM 解析に用いた。

死細胞染色には、Zombie Aqua Fixable Viability Kit (Biolegend, 400612) と Po-Pro-1 (Invitrogen, P3581) を用いた。Zombie Aqua は最終濃度 1/200 に調製して抗体染色時に用いた。Po-Pro-1 は最終濃度 1/2000 に調製して抗体染色後に用いた。

免疫チェックポイントの細胞表面発現は、表 4 に示した抗体を用いて解析した。

表 4 FCM による免疫チェックポイントの細胞表面発現解析に用いた抗体
標的欄に記載の無い抗体は、アイソタイプコントロールとして用いた。濃度は、染色に用いた濃度のこと。PE: phycoerythrin。

標的	標識	クローン	販売元	カタログ番号	濃度	アイソタイプ
CD24	PE	ML5	Biolegend	311106	1:200	Mouse IgG2a, κ
CD47	PE	CC2C6	Biolegend	323108	1:200	Mouse IgG1, κ
PD-L1	PE	MIH3	Biolegend	374512	1:200	Mouse IgG1, κ
—	PE	MOPC-21	Biolegend	400114	1:200	Mouse IgG1, κ
—	PE	MOPC-173	Biolegend	400244	1:200	Mouse IgG2a, κ
CD24	AF647	SN3	Santa Cruz	sc-19585	1:200	Mouse IgG1, κ
CD24	—	Polyclonal	Proteintech	10600-1-AP	1:50	Rabbit IgG

1 細胞あたりに結合する CD24 抗体の PE 分子数を QuantiBRITE Beads (BD Biosciences, 340495) を用いて測定した。このキットにはそれぞれ異なる数の PE 分子が結合した 4 種類のビーズが含まれており、それぞれの種類のビーズの geometric

mean fluorescence intensity (gMFI) と共に $\log_{10}$ スケールで線形回帰分析のグラフを描くことが出来る (図 1)。目的の細胞集団の PE gMFI をこの回帰式に当てはめることで、1 細胞あたりの PE 分子数を算出できる。同じ抗体を用いる限り、抗体に対する PE 分子の比率は実験間で一定であるため、1 細胞あたりに結合する抗体数、つまり細胞に発現する受容体数を独立した実験間で比較することができる。

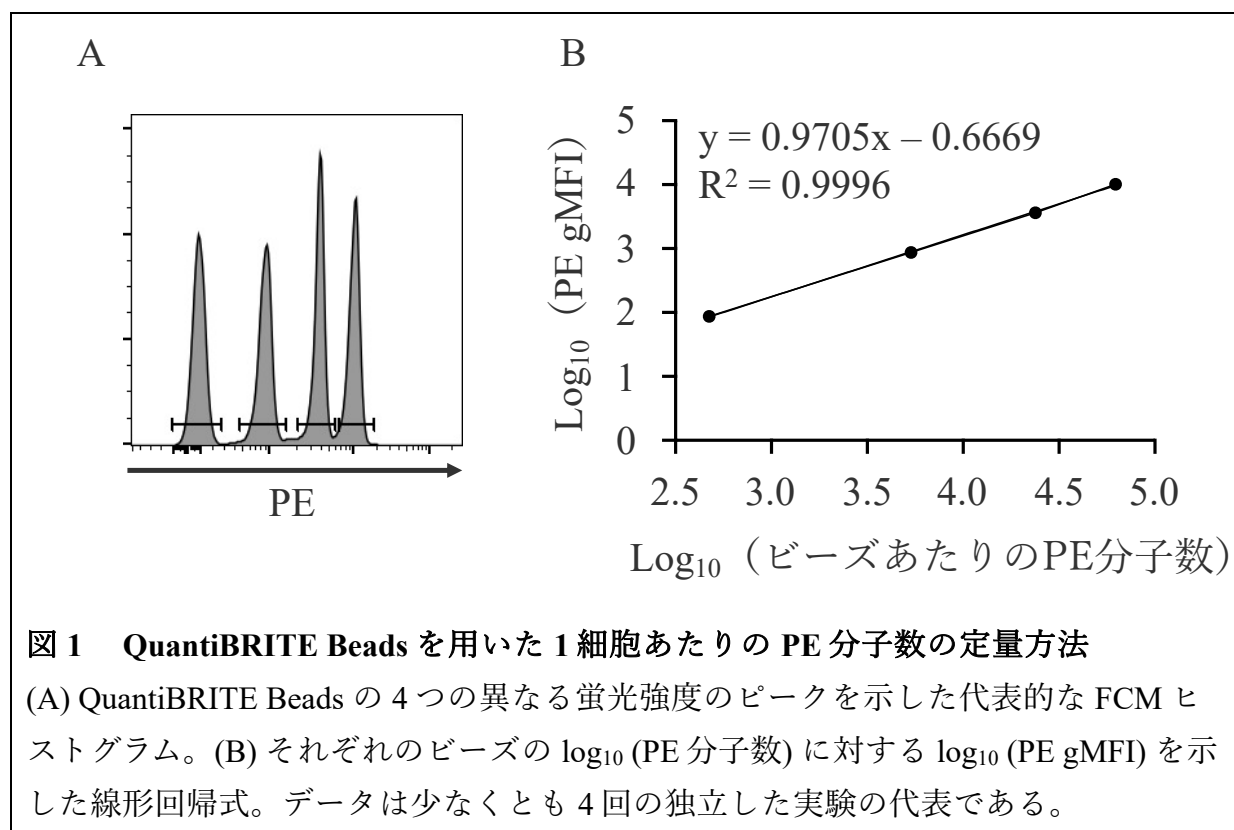


図 1 QuantiBRITE Beads を用いた 1 細胞あたりの PE 分子数の定量方法

(A) QuantiBRITE Beads の 4 つの異なる蛍光強度のピークを示した代表的な FCM ヒストグラム。(B) それぞれのビーズの $\log_{10}$ (PE 分子数) に対する $\log_{10}$ (PE gMFI) を示した線形回帰式。データは少なくとも 4 回の独立した実験の代表である。

ヒト末梢血由来分化マクロファージの細胞表面マーカーを表 5 に示したモノクローナル抗体を用いて解析した。

表 5 ヒト末梢血由来分化マクロファージ細胞表面マーカーの FCM 解析に用いたモノクローナル抗体

標的欄に記載の無い抗体は、アイソタイプコントロールとして用いた。濃度は、Fc ブロック後の最終的な染色濃度のこと。FITC: fluorescein isothiocyanate; PerCP-Cy5.5: peridinin-chlorophyll-protein complex conjugate-cy5.5.

標的	標識	クローン	販売元	カタログ番号	濃度	アイソタイプ
CD47	FITC	CC2C6	Biolegend	323106	1:200	Mouse IgG1, κ
CD80	FITC	2D10	Biolegend	305206	1:200	Mouse IgG1, κ
–	FITC	MOPC-21	Biolegend	400110	1:200	Mouse IgG1, κ
PD-L1	PE	MIH3	Biolegend	374512	1:200	Mouse IgG1, κ
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	Biolegend	101228	1:200	Rat IgG2b, κ
–	PE	MOPC-21	Biolegend	400114	1:200	Mouse IgG1, κ
CD11b	APC	M1/70	Biolegend	101212	1:200	Rat IgG2b, κ
CD163	APC	GHI/61	Biolegend	333609	1:200	Mouse IgG1, κ
Siglec-10	APC	5G6	Biolegend	347606	1:200	Mouse IgG1, κ
–	APC	MOPC-21	Biolegend	400142	1:200	Mouse IgG1, κ
CD14	APC-Cy7	63D3	Biolegend	367107	1:200	Mouse IgG1, κ
–	APC-Cy7	MOPC-21	Biolegend	400128	1:200	Mouse IgG1, κ

PMA で分化させた THP-1 由来マクロファージは表 6 に示したモノクローナル抗体で解析した。抗 CD11b 抗体と Zombie Aqua による細胞表面染色の後、FACS 緩衝液で細胞を二度洗浄した。その後 BD Cytofix Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD Golgistop (BD Biosciences, 554715) を用いて CXCL9 と CXCL10 の細胞内染色を行った。キットを用いて細胞を三度洗浄した後に、FACS 緩衝液で再懸濁して FCM を行った。

表 6 THP1 由来マクロファージの FCM 解析に用いたモノクローナル抗体

標的欄に記載の無い抗体は、アイソタイプコントロールとして用いた。濃度は、Fc ブロック後の最終的な染色濃度のこと。

標的	標識	クローン	販売元	カタログ番号	濃度	アイソタイプ
CXCL9	PE	J1015E10	Biolegend	357903	1:50	Mouse IgG2a, κ
CXCL10	PE	J034D6	Biolegend	519503	1:100	Mouse IgG2a, κ
–	PE	MOPC-173	Biolegend	400244	1:200	Mouse IgG2a, κ
CD11b	APC	M1/70	Biolegend	101212	1:200	Rat IgG2b, κ
–	APC	RTK4530	Biolegend	400612	1:200	Rat IgG2b, κ

全ての検体は BD FACS Canto II (BD Biosciences) と FlowJo (BD Biosciences) を用いて解析した。

11) 臨床検体

NSCLC 患者 9 人の組織検体を免疫組織化学染色で解析した。腫瘍細胞の EGFR 変異は peptide nucleic acid-locked nucleic acid locked nucleic acid polymerase chain reaction (PNA-LNA PCR) clamp method または Scorpion amplification refractory mutation system (ARMS) method を用いて確認した。また、EGFR 変異陽性 NSCLC 患者 4 人の血漿を用いて末梢血中の cfDNA 濃度を測定した。EGFR-TKI 治療効果判定は RECIST ガイドラインに準拠して行った。患者背景は表 8 ならびに表 9 に示した。本研究参加患者全員から文書によるインフォームド・コンセントを得た。本研究プロトコルは北海道大学病院（プロトコル番号: 019-0261、019-0468、020-0346）および信州大学医学部附属病院（protocol code: 611）の倫理審査委員会の承認を得て、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。

12) 免疫組織化学染色

ホルマリン固定した組織を 4 μ m 切り出し、キシレンと蒸留水で段階的に希釈したアルコールを用いて脱パラフィンした後に、VENTANA BenchMark ULTRA（Roche Diagnostics）を用いて免疫染色を行った。抗 CD24 抗体（Thermo Fisher Scientific、クローン：SN3）を用いて CD24 発現を測定した。腫瘍細胞における CD24 発現スコアは、1 スライドあたりの陽性細胞率（0-100%）と、染色強度（陰性、弱陽性、中等度陽性、強陽性）を用いて評価した。単核球や好中球などの炎症細胞はしばしば中等度の CD24 発現強度を示す。このことを利用し、20%超の腫瘍細胞が炎症細胞より強い染色強度を示す場合はスコア 3、20%超の腫瘍細胞が中等度陽性もしくは 20%未満の腫瘍細胞が強陽性を示す場合にスコア 2、スコア 2 より低い発現を示す場合にはスコア 1、発現が全く見られない場合にはスコア 0 と判断した（図 2）。判定者は患者背景、治療歴情報から隔離された状態で CD24 発現強度の判定を行った。

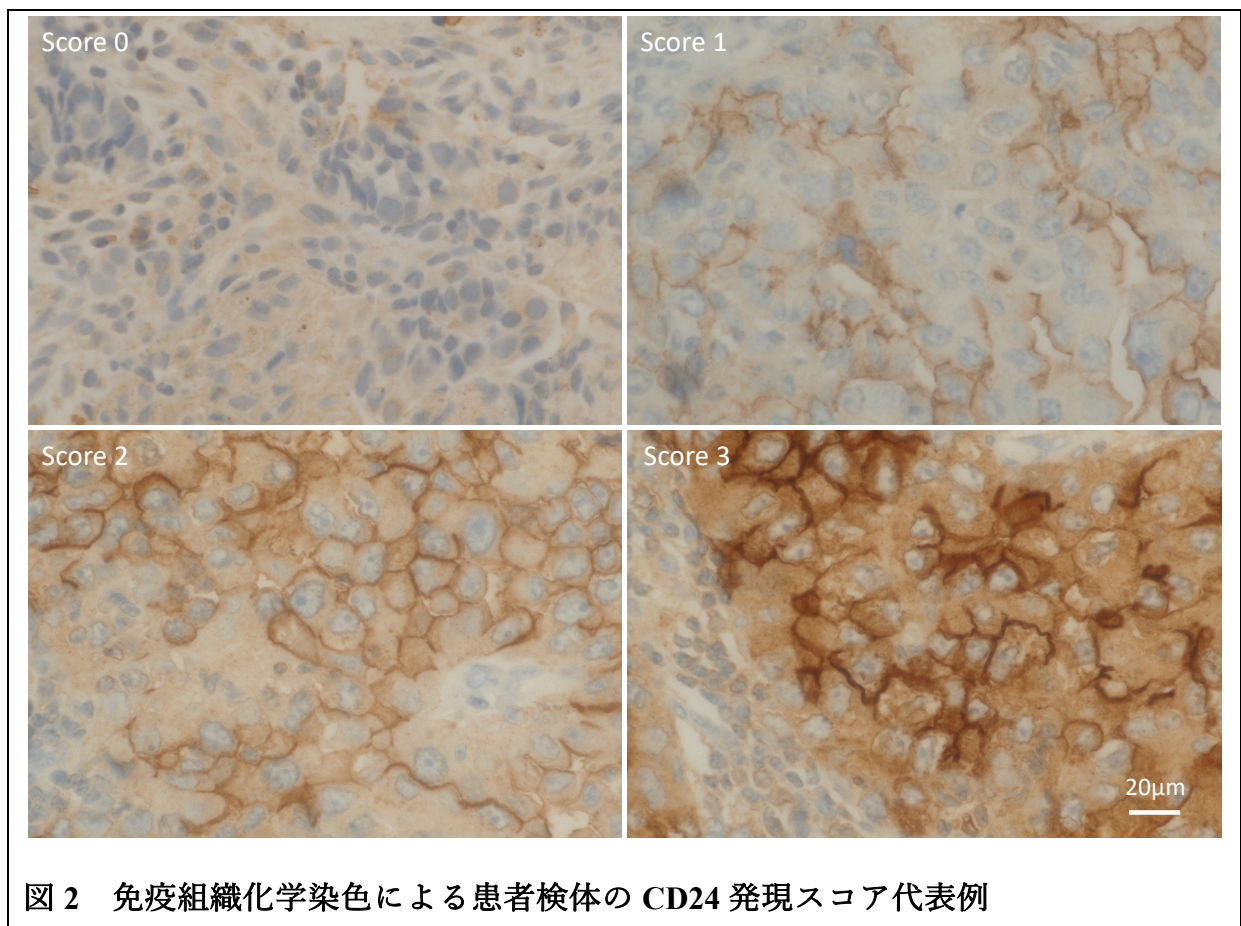


図 2 免疫組織化学染色による患者検体の CD24 発現スコア代表例

13) 統計学的解析

統計学的解析は Prism (GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。2 群間の比較解析は Welch の t 検定を用いた。多重比較は Welch の t 検定と Benjamini、Krieger、Yekutieli らによる two-stage step-up 法を用いた。図 14B では、一元配置分散分析 (One-way analysis of variance: One-way ANOVA) と Dunnett の検定を用いて 3 群間の比較解析を行った。図 19B では、One-way ANOVA を用いた。P 値は < 0.05 、調整 p 値 (q 値) は < 0.01 をもって統計学的有意差の有無を判断した。

14) 公共データベースを用いた遺伝子発現解析

NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) から正規化されたマイクロアレイデータを取得した。R の Bioconductor limma パッケージを使用して遺伝子発現量の差を解析した。細胞表面に発現する分子をスクリーニングするため、Cell Surface Protein Atlas 14 に登録された遺伝子、または cluster of differentiation に属する遺伝子を解析した。データは ggplot2 を使用してボルケーノプロットで図示した。

結果

EGFR-TKI 処理は EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株の CD24 発現を増加させる

EGFR-TKI 耐性を誘導する細胞内因性の免疫逃避メカニズムの検討において、公共データセットを用いた当科先行研究で、EGFR-TKI 処理によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞の CD24 発現が増加することが示されていた（図 3）。

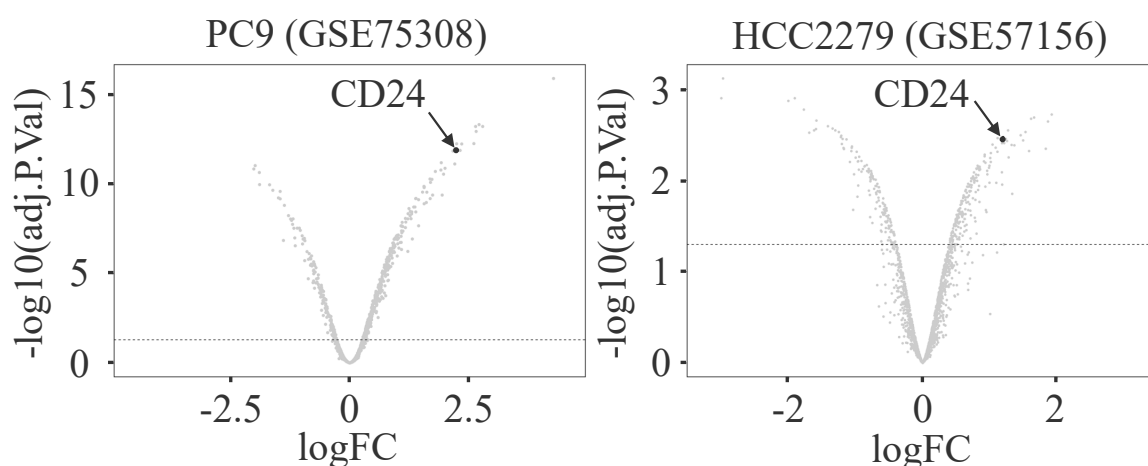
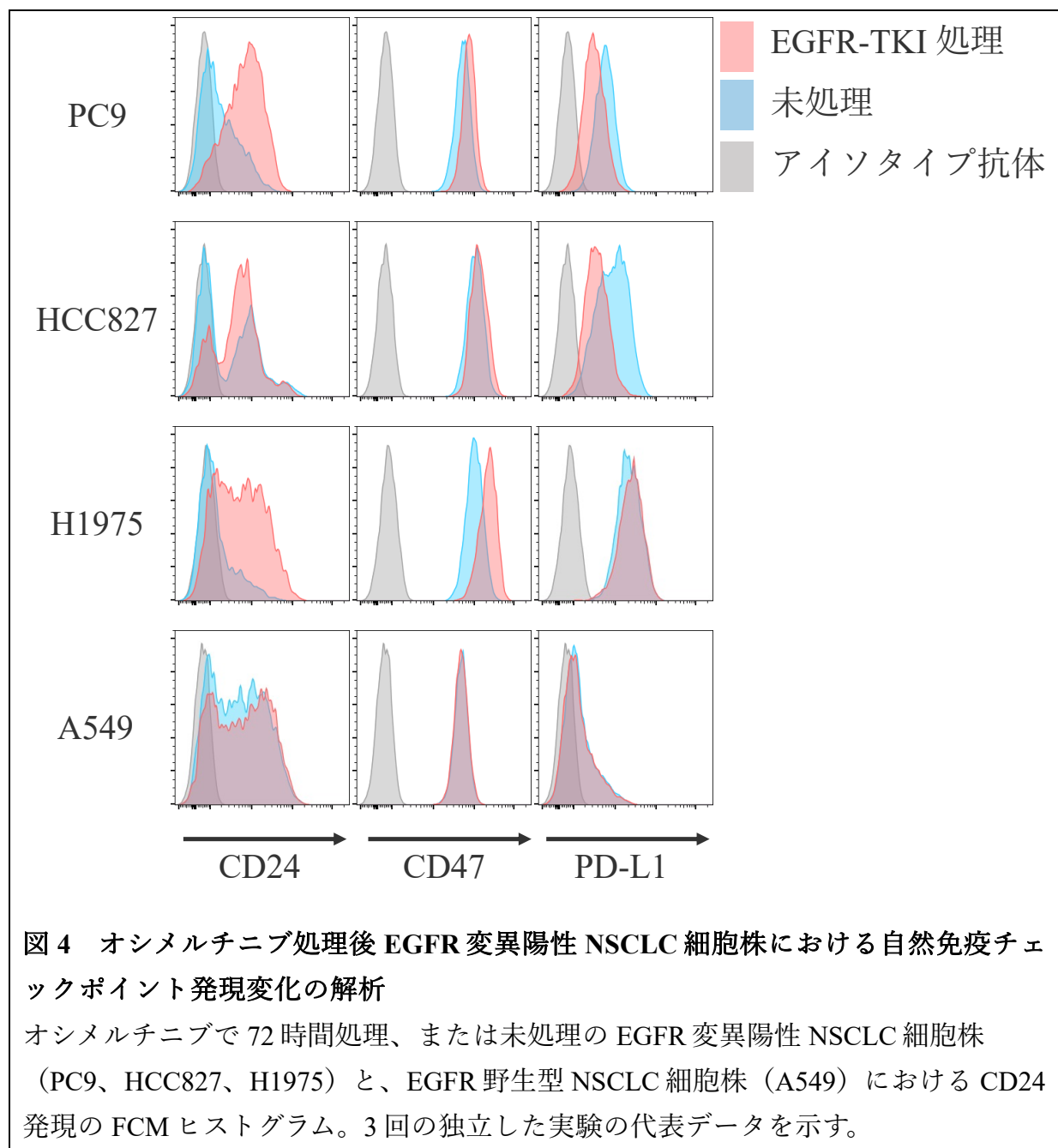


図 3 当科先行研究：EGFR 変異陽性細胞株で EGFR-TKI 処理によって変動する遺伝子発現のスクリーニング

EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株の PC9（左）、HCC2279（右）を EGFR-TKI（それぞれゲフィチニブ、エルロチニブ）で処理し、遺伝子発現を解析したマイクロアレイの公共データセット（左: GSE75308; 右: GSE57156）。未処理と EGFR-TKI 処理で変動した遺伝子発現をボルケーノプロットで示した。FC: fold change; adj.P.Val: adjusted p-value.

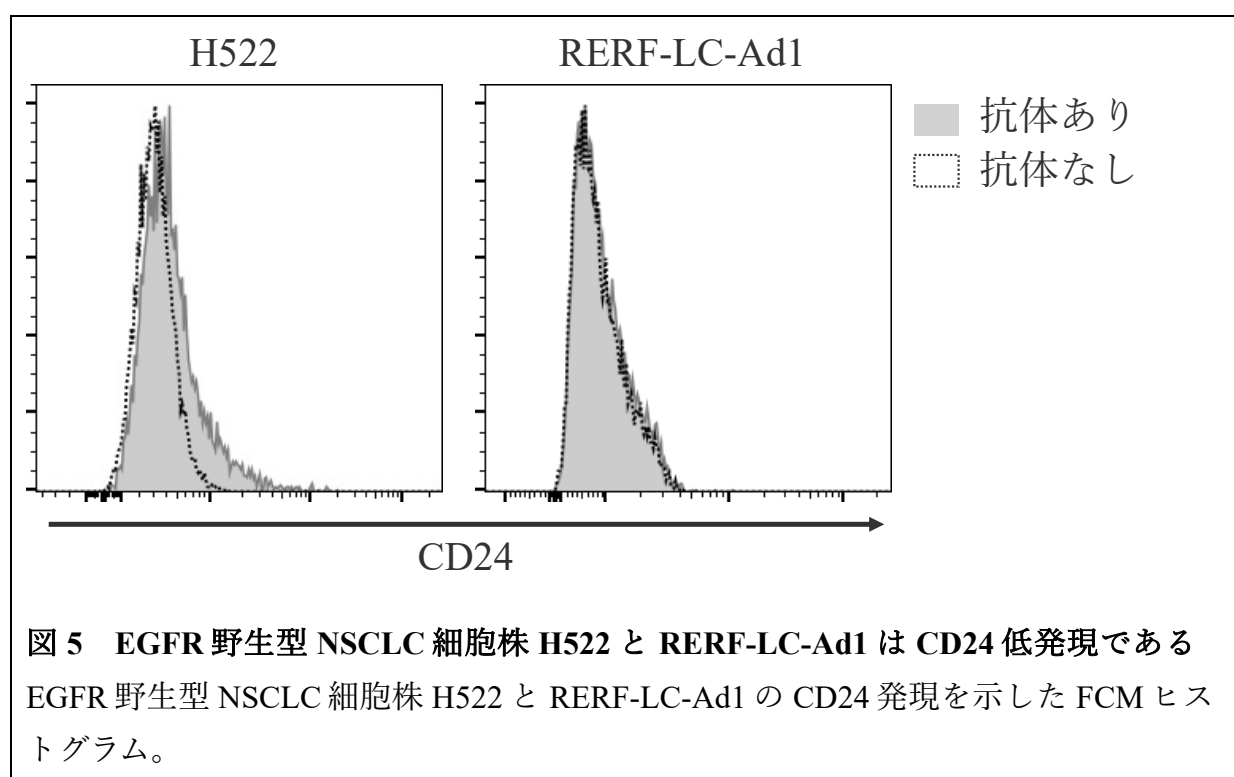
CD24 は免疫応答を負に制御し（Chen et al, 2009）、NSCLC 予後不良と関連すること（Kristiansen et al, 2003a）が知られており、EGFR-TKI による CD24 発現が治療耐性に関与している可能性が考えられた。まずは再現性の検証のため、in vitro で EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株を EGFR-TKI 処理し、CD24 を含む自然免疫チェックポイント（Barkal et al, 2019; Gordon et al, 2017; Jaiswal et al, 2009）の発現変化を解析した。細胞株は北海道大学腫瘍内科学教室で保有していた EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株

PC9、HCC827、H1975 と EGFR 野生型 NSCLC 細胞株 A549 を用いた。H1975 は T790M 変異を持ち（表 2）、第一世代および第二世代 EGFR-TKI に耐性を示すため（Kobayashi et al, 2005; Pao et al, 2005）、本実験では第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブを使用した（図 4）。



CD47 発現は、オシメルチニブ処理の有無で変化しなかった。PD-L1 発現変化は細胞株間で一貫性のある結果が得られなかった。オシメルチニブ処理した全ての EGFR

変異陽性細胞で CD24 発現が増加し、EGFR 野生型の A549 細胞では CD24 発現変化は認めなかった。この結果から、当科先行研究（図 3）と再現性を持って、EGFR-TKI 処理で EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における CD24 発現が増加することが示唆された。しかし、今回の実験で用いた A549 細胞はベースライン（オシメルチニブ未処理）で CD24 高発現細胞集団が混在しており、EGFR 野生型細胞におけるオシメルチニブ処理の影響を過小評価する可能性があった。そのため A549 を解析から除外してオシメルチニブ処理の影響を再検証した。A549 に代わる新たな陰性対照を探す目的で EGFR 野生型細胞株の CD24 発現を評価し、CD24 低発現 NSCLC 細胞株 H522 と RERF-LC-Ad1 を見出した（図 5）。



EGFR 変異陽性細胞株の HCC827 細胞もベースラインで CD24 高発現集団が混在していたことから解析から除外した。ベースライン CD24 低発現の EGFR 変異陽性細胞株（PC9、H1975）と EGFR 野生型細胞株（H522、RERF-LC-Ad1）、合計 4 種類の細胞株を用いてオシメルチニブ処理による CD24 発現変化を再度検証した。結果、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株で CD24 発現が増加し、EGFR 野生型 NSCLC 細胞株では増加しないことが翻訳産物レベル（タンパク質）（図 6A、B）と転写産物レベル（messenger RNA: mRNA）（図 6C）の両方で示された。

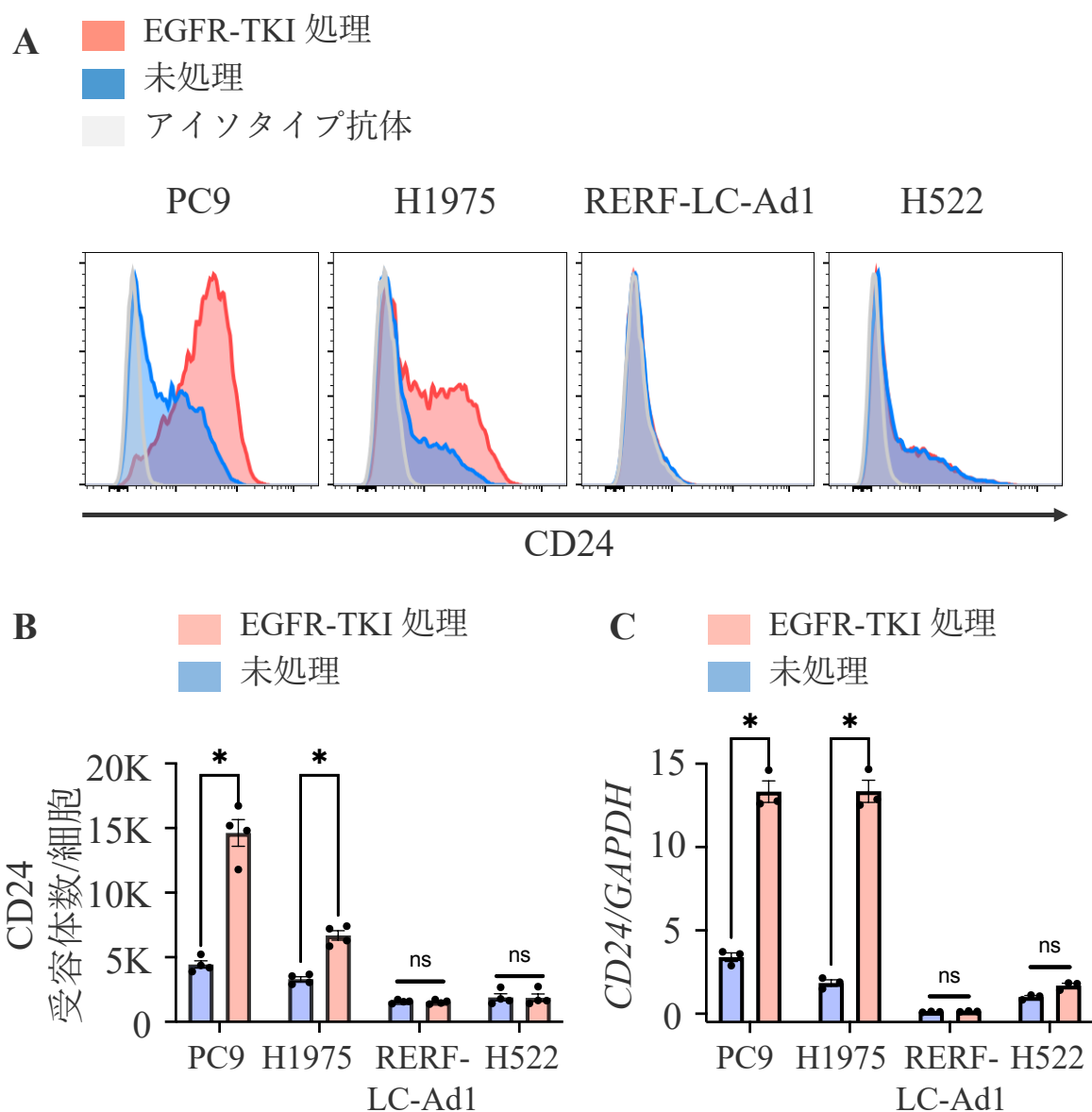


図6 オシメルチニブ処理によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株 CD24 発現が翻訳産物レベル、転写産物レベル両方で増加する

NSCLC 細胞株を *in vitro* で 72 時間オシメルチニブ処理し、CD24 発現を評価した。(A) FCM のヒストグラム。4 回の独立した実験の代表例を示す。(B) 1 細胞あたりに発現する CD24 受容体数の比較。4 つの独立した実験の平均 ± 標準誤差 (standard error of mean: SEM) を示す。一細胞あたりに発現する CD24 受容体数の計算方法は「実験方法 (10)」を参照。(C) qRT-PCR を用いて求めた CD24 翻訳産物レベルの発現。2 回の独立した実験から、technical replicate を平均 ± SEM で示す (n = 3)。* $q < 0.01$, ns: not significant。

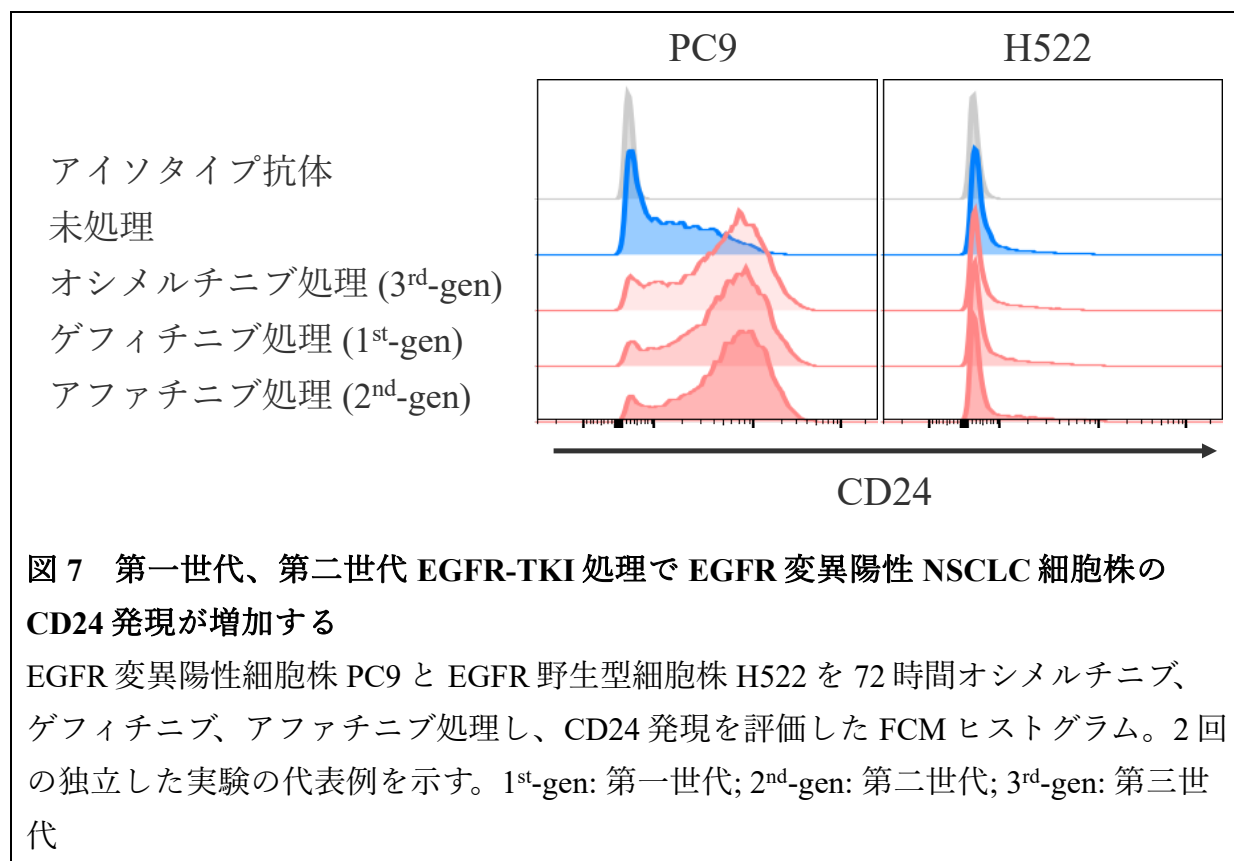
これら 4 つの NSCLC 細胞株がマイコプラズマ汚染されていないことを確認した (表 7)。

表 7 NSCLC 細胞株のマイコプラズマ汚染解析結果

詳細な実験方法は、「実験方法 (3)」の項目を参照。

	細胞株	Reading A	Reading B	B/A	コンタミネーション
実験1					
	陰性対照	10751	1098	0.102130034	
	H522	6368	2985	0.46875	陰性
	陽性対照	5253	600707	114.3550352	
実験2					
	陰性対照	22543	3664	0.162533824	
	H1975	6643	2733	0.411410507	陰性
	RERF-LC-Ad1	5905	2476	0.419305673	陰性
	陽性対照	3215	173050	53.82581649	
実験3					
	陰性対照	6072	480	0.079051383	
	PC9	4117	1474	0.35802769	陰性
	陽性対照	2964	199272	67.23076923	

次に、CD24 発現誘導が第三世代 EGFR-TKI (オシメルチニブ) 特有か、EGFR-TKI で共通して見られるかを検証するため、PC9 と H522 を第一世代 (ゲフィチニブ) および第二世代 (アファチニブ) の EGFR-TKI で処理した。オシメルチニブを用いた実験結果と同様に、PC9 で CD24 発現が増加し H522 では変化しなかった (図 7)。



これらの結果から、EGFR 下流のシグナル伝達経路の阻害が、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における CD24 発現増加を誘導することが示された。

EGFR-TKI 治療は EGFR 変異陽性 NSCLC 患者腫瘍細胞 CD24 発現を増加させる

次に EGFR 変異陽性 NSCLC 患者 6 人のゲフィチニブまたはエルロチニブ治療前後の検体と、EGFR 野生型 NSCLC 患者 3 人の殺細胞性抗がん剤治療前後の検体を免疫組織化学染色で解析した (表 8)。EGFR 変異陽性 NSCLC 患者の治療後検体のいずれから、EGFR-TKI 耐性を獲得する T790M 遺伝子変異は検出されなかった。In vitro での結果と同様に、EGFR 変異陽性患者 6 例中 5 例において、腫瘍細胞の CD24 発現は EGFR-TKI 治療後に増加していた。一方、殺細胞性抗がん剤による治療を受けた EGFR 野生型患者では、CD24 発現は変化しなかった (図 8)。

表 8 EGFR-TKI または殺細胞性抗がん剤治療を受けた患者の臨床的特徴

現在喫煙者は過去 1 ヶ月以内に喫煙歴がある患者を示す。治療前検体、治療後検体

はそれぞれ治療前後の検体採取部位を示す。

患者	年齢	性別	喫煙歴	PS	組織型	EGFR 変異	治療前検体	治療後検体
患者1	85	女	なし	1	腺癌	L858R	胸水	胸水
患者2	74	女	なし	0	腺癌	L858R	リンパ節	肺
患者3	51	女	あり	3	NSCLC	E19DEL	肺	リンパ節
患者4	64	男	現在喫煙者	1	腺癌	L858R	肺	肺
患者5	50	女	現在喫煙者	1	腺癌	E19DEL	肺	胸水
患者6	66	女	なし	2	腺癌	E19DEL	胸水	胸水
患者7	72	女	なし	0	腺癌	None	肺	肺
患者8	72	男	現在喫煙者	0	腺癌	None	肺	肺
患者9	68	女	あり	1	腺癌	None	リンパ節	リンパ節

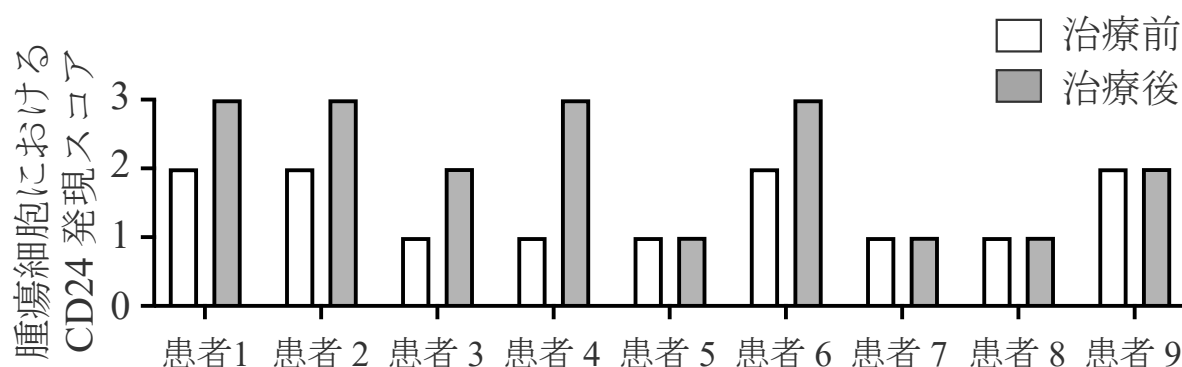


図8 EGFR-TKI 治療は NSCLC 患者腫瘍細胞 CD24 発現を増加させる

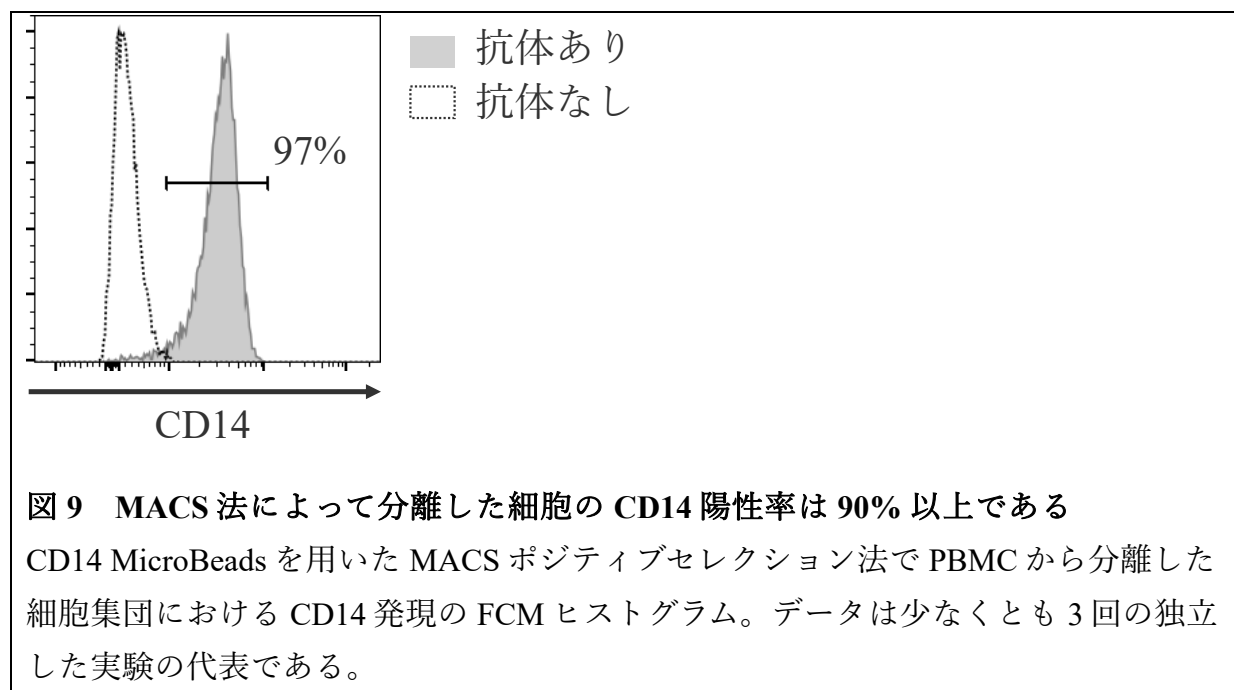
NSCLC 患者腫瘍細胞の EGFR-TKI または殺細胞性抗がん剤治療前後の CD24 発現スコアを示す。CD24 発現スコアの算出方法は「実験方法 (12)」欄を参照。

この結果から、生体内でも EGFR シグナル伝達経路の阻害が EGFR 変異陽性 NSCLC の CD24 発現を誘導することが示された。

EGFR-TKI 治療で誘導される腫瘍細胞発現 CD24 は抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular phagocytosis: ADCP) を介した治療標的となる

CD24 はヒトでは sialic acid binding Ig like lectin 10 (Siglec-10)、マウスでは Siglec-F との結合を介して免疫応答を負に制御する (Chen et al, 2009)。乳がんおよび卵巣がんでは、CD24-Siglec-10 の結合をモノクローナル抗体で遮断するとマクロファージによる CD24 発現腫瘍の貪食作用が増強し、抗腫瘍免疫応答が促進される (Barkal

et al, 2019)。EGFR-TKI 治療で腫瘍細胞に CD24 発現が誘導されることから、NSCLC でも同様に抗 CD24 抗体が CD24–Siglec-10 結合を遮断して腫瘍貪食作用を増強し、抗腫瘍免疫応答を増強するか検証した。まずは Siglec-10 発現マクロファージを誘導するため、PBMC から CD14 陽性単球を MACS 法で分離した（図 9）。



分離した CD14 陽性単球からマクロファージを異なる培地条件下で分化させ、これらのマクロファージにおける Siglec-10 の発現を評価した。M-CSF、TGF- β 、IL-10 で分化させたマクロファージは Siglec-10 を発現したが、他のサイトカインで分化させたマクロファージは発現しなかった（図 10）。

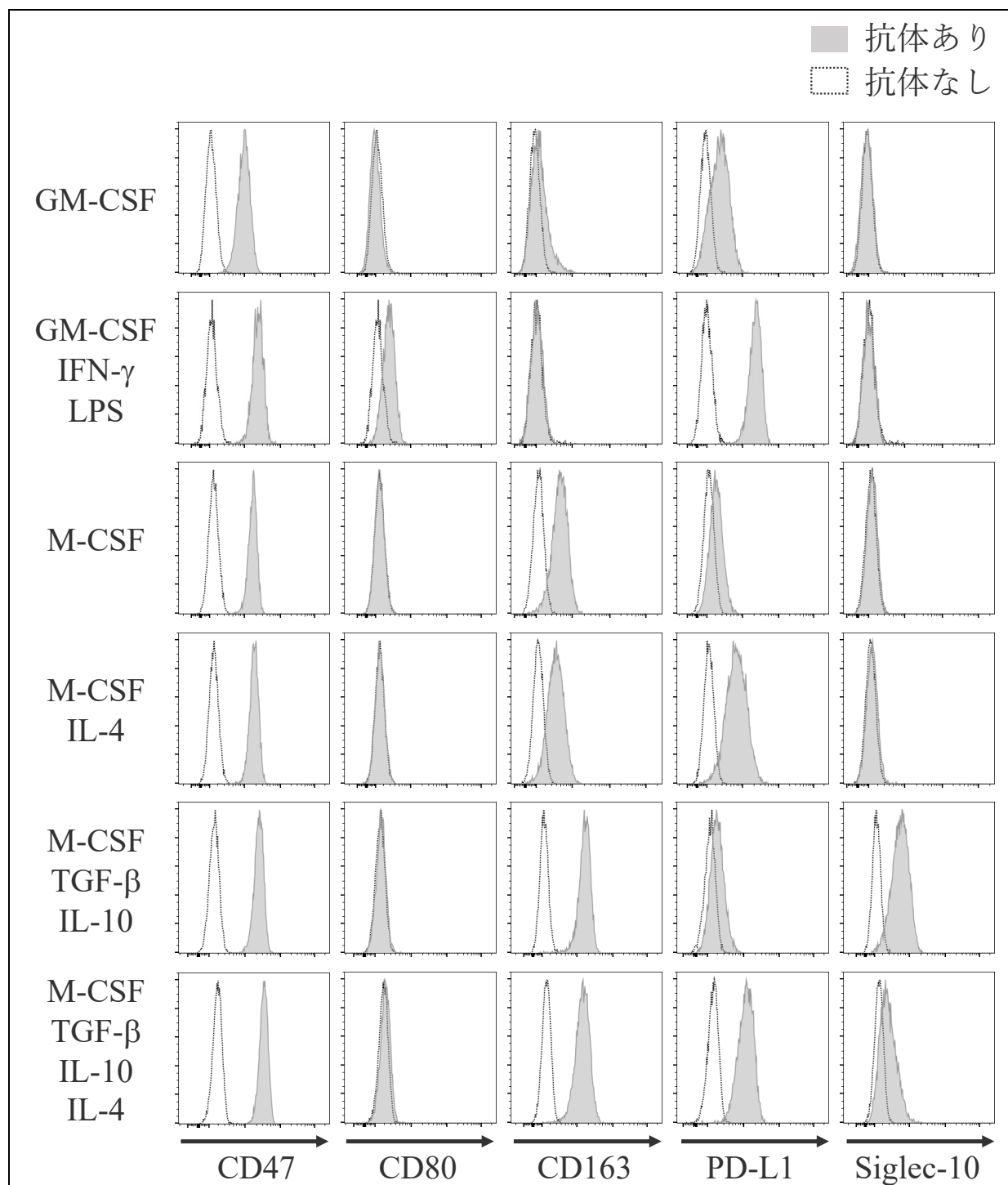
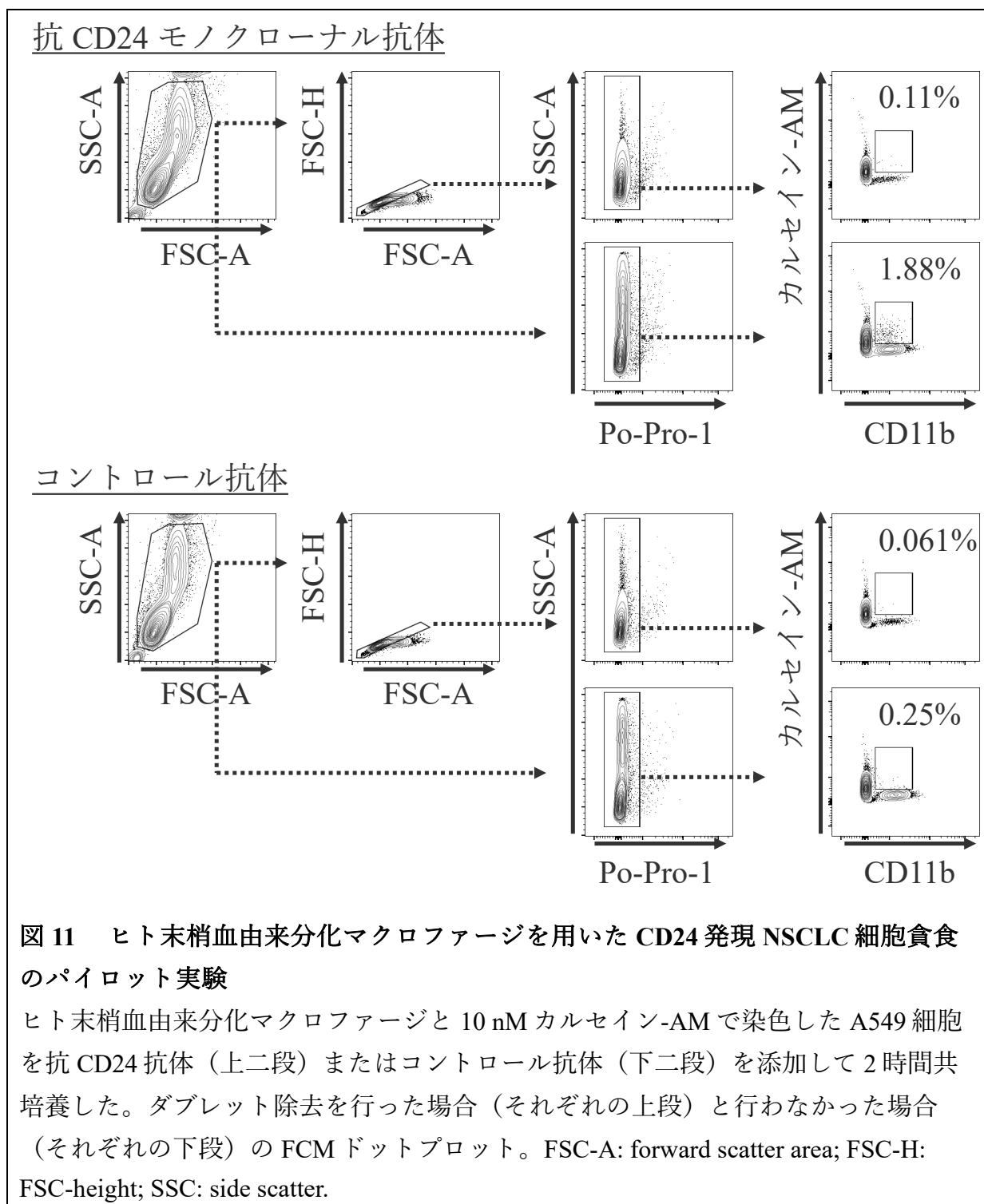


図 10 M-CSF、TGF- β 、IL-10 で分化させたヒト末梢血由来分化マクロファージは Siglec-10 を発現する

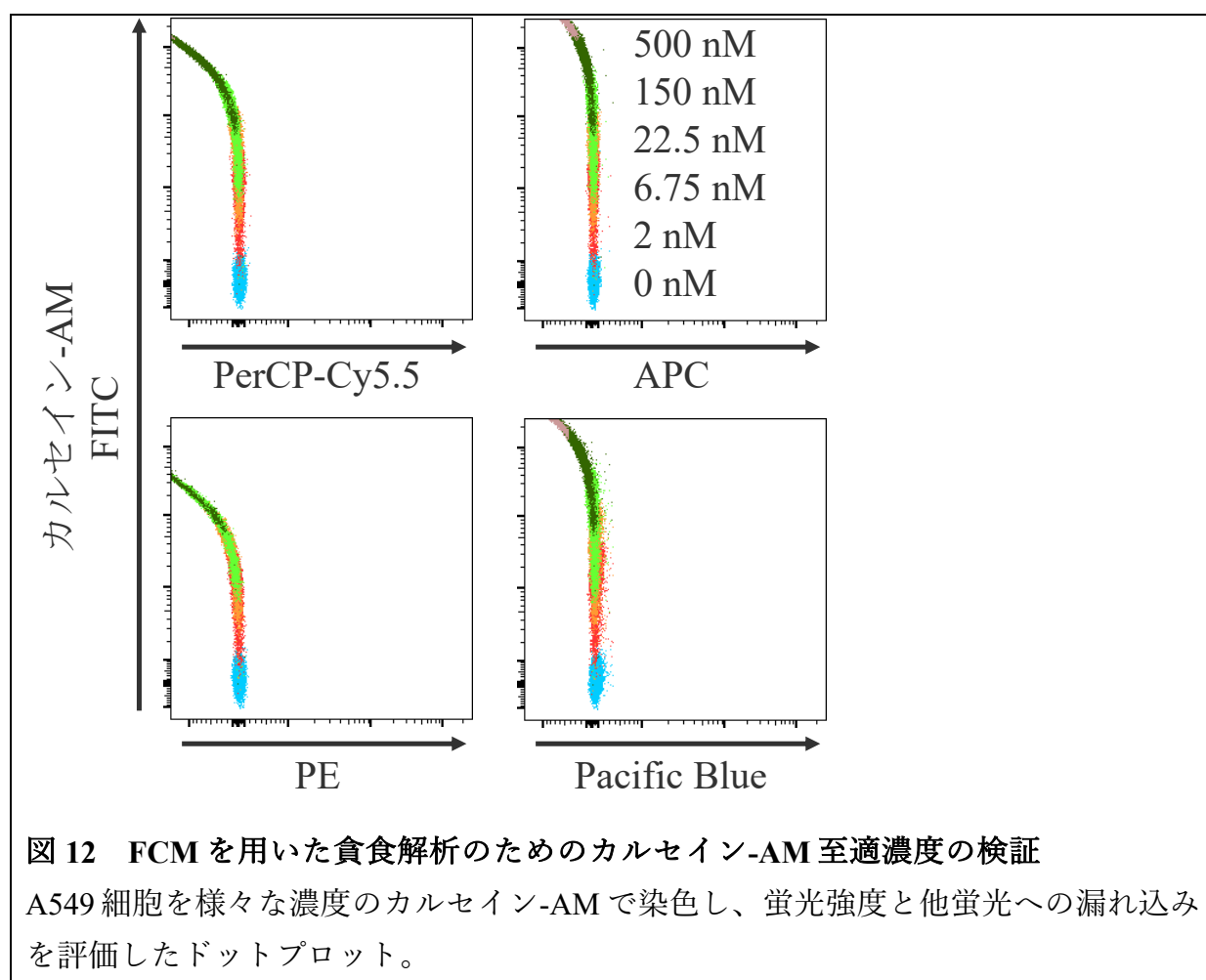
様々なサイトカインで分化させたヒト末梢血由来分化マクロファージにおける Siglec-10 の発現を示した FCM ヒストグラム。詳細な培養プロトコルは「実験方法 (7)」を参照。データは 3 人の健常ドナーの末梢血を用いた少なくとも 3 回の独立した実験の代表例である。

興味深い点は、既報とは異なり (Barkal et al, 2019)、IL-4 で分化させたマクロファージが Siglec-10 を発現しなかったことである。IL-4 によるシグナル伝達が行われていない可能性を除外するために、ヒトマクロファージで IL-4 によって発現が誘導される (Zhang et al, 2024)、PD-L1 の発現を解析した (図 10)。IL-4 刺激で PD-L1 の発現が誘導されたことから、IL-4 シグナル伝達の欠損によって Siglec-10 が誘導されなかった可能性は低い。また、検体ドナーの個体差が影響している可能性を排除するため、異なる 3 人の健常人の PBMC からマクロファージを分化させたが、再現性をもって Siglec-10 は誘導されなかった。IL-4 が Siglec-10 を誘導しない原因は本研究では明確に同定できなかったが、in vitro の末梢血由来分化マクロファージ誘導系では、Siglec-10 の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。さらに、NSCLC における骨髓系細胞集団の可塑性 (Zilionis et al, 2019) を考慮すると、腫瘍関連マクロファージの一部のみが Siglec-10 を発現している可能性がある。よって、CD24-Siglec-10 結合の遮断のみを治療の目的とした場合、NSCLC では抗 CD24 抗体の治療効果が十分に発揮できない可能性があった。そこで、Siglec-10 発現陰性マクロファージが抗 CD24 抗体を介して NSCLC 細胞を貪食するか検証した。マクロファージを CD24 発現細胞株の A549 と共培養し、抗 CD24 抗体が Fc-Fc 受容体結合を介した ADCP (Nimmerjahn et al, 2007) を誘導するか、パイロット実験を行った (図 11)。



抗 CD24 抗体を添加して培養すると、全生細胞中 1.88% の細胞が CD11b とカルセイン-AM の両マーカー陽性（図 11、二段目）で、コントロール抗体を添加した場合、両マーカー陽性細胞の割合は 0.25% だった（図 11、四段目）。この結果から抗 CD24 抗体依存性にマクロファージが腫瘍細胞を認識し接着することが分かった。ダブレット除去を行うと抗 CD24 抗体を添加した細胞の CD11b とカルセイン-AM の両マー

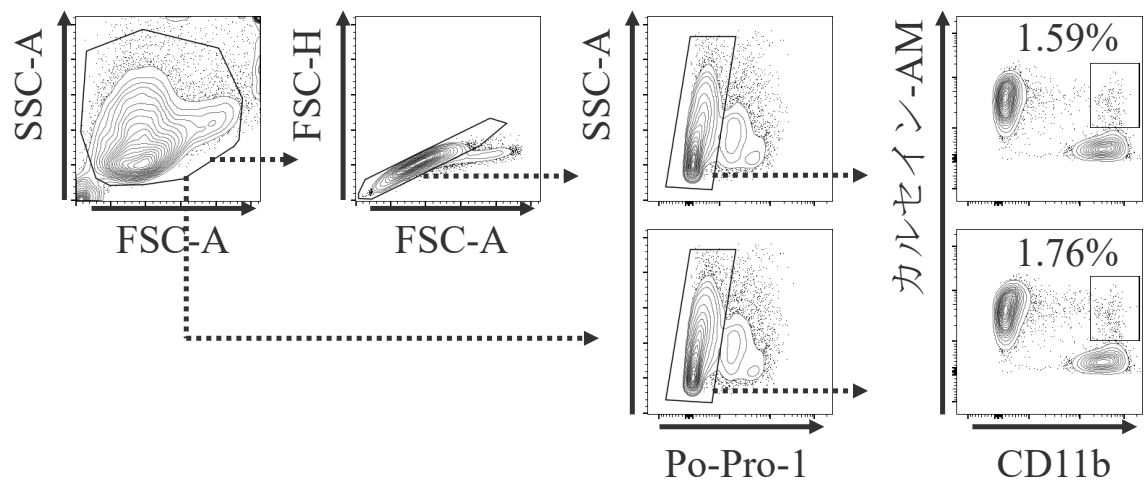
カー陽性率は 0.11%だった（図 11、一段目）。FCM による貪食解析の特徴を考慮すると、マクロファージが腫瘍細胞表面に接着しているが、腫瘍細胞をマクロファージの内部に取り込んでいない（腫瘍細胞を貪食していない）ことを示唆している。よって、続く実験では、細胞貪食を引き起こすために、共培養時間を延長した。また、カルセイン-AM と CD11b（PerCP-Cy5.5 標識）の蛍光強度が比較的弱く、陽性細胞群が正確に評価できない可能性が考えられたため、カルセイン-AM の濃度調整を行い、抗 CD11b 抗体を PerCP-Cy5.5 標識から APC 標識に変更することで、相対的に蛍光強度を高め、かつ蛍光の漏れ込みを最小限にした（図 12）。



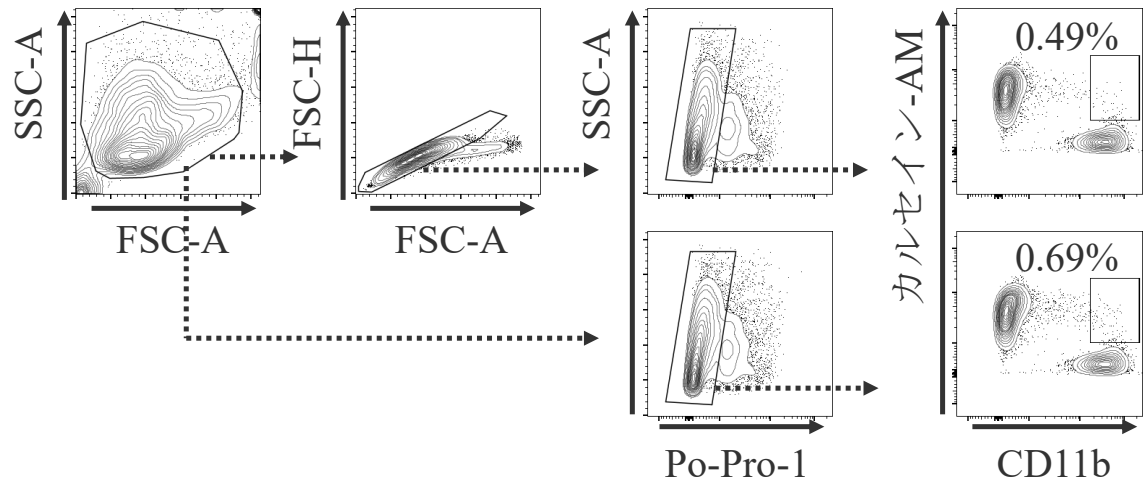
さらに、EGFR-TKI 治療後の NSCLC における抗 CD24 抗体の治療効果をより正確に評価するために、EGFR 野生型細胞株の A549 に代わり、EGFR 変異陽性細胞株の PC9 を用いた（図 13）。

6 h

抗 CD24 モノクローナル抗体

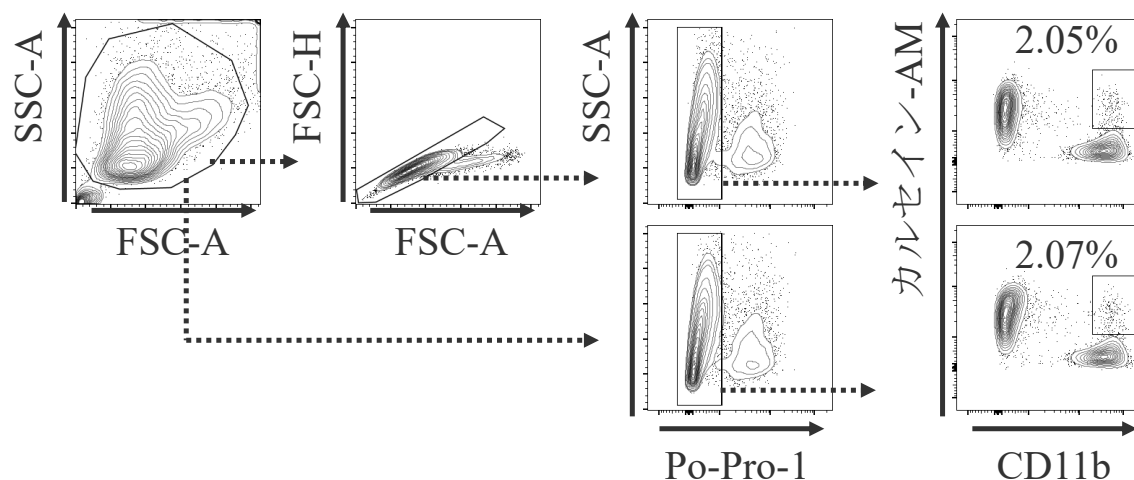


アイソタイプ抗体



9 h

抗 CD24 モノクローナル抗体



アイソタイプ抗体

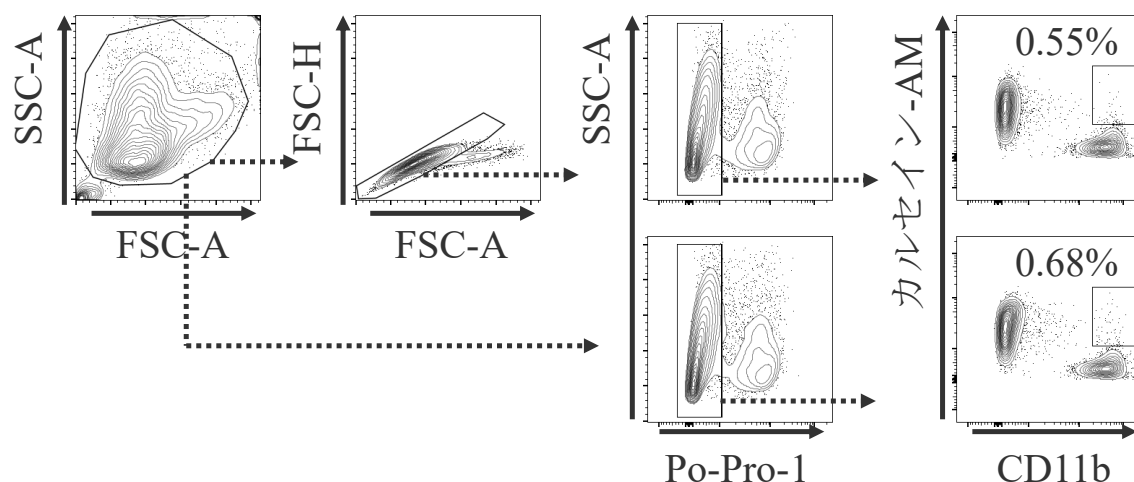


図 13 ヒト末梢血由来分化マクロファージを用いた CD24 発現 EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞貪食の検証

M-CSF マクロファージをオシメルチニブ処理後に 50 nM カルセイン-AM で染色した PC9 と抗 CD24 抗体を添加して 6-9 時間共培養した。ダブレット除去を行った場合（それぞれの上段）と行わなかった場合（それぞれの下段）のドットプロット。

結果、コントロール抗体を添加して培養すると全生細胞の内 0.68% が CD11b・カルセイン-AM 両マーカー陽性だったのに対し（図 13 下、四段目）、抗 CD24 抗体を添加して培養すると同細胞集団は全生細胞の 2.07% であり（図 13 下、二段目）、ダブレット除去後も全生細胞の 2.05% だった（図 13 下、一段目）。Siglec-10 発現陰性マクロファージは、9 時間の培養で抗 CD24 抗体依存性に PC9 を貪食することが示唆

された。さらに、CD11b とカルセイン-AM の両マーカー陽性集団がマクロファージによる腫瘍細胞の貪食を反映していることを確認するために、マクロファージの貪食を阻害する試薬として知られるサイトカラシン D (Schulz et al, 2019) を用いて同様の解析を行った (図 14)。

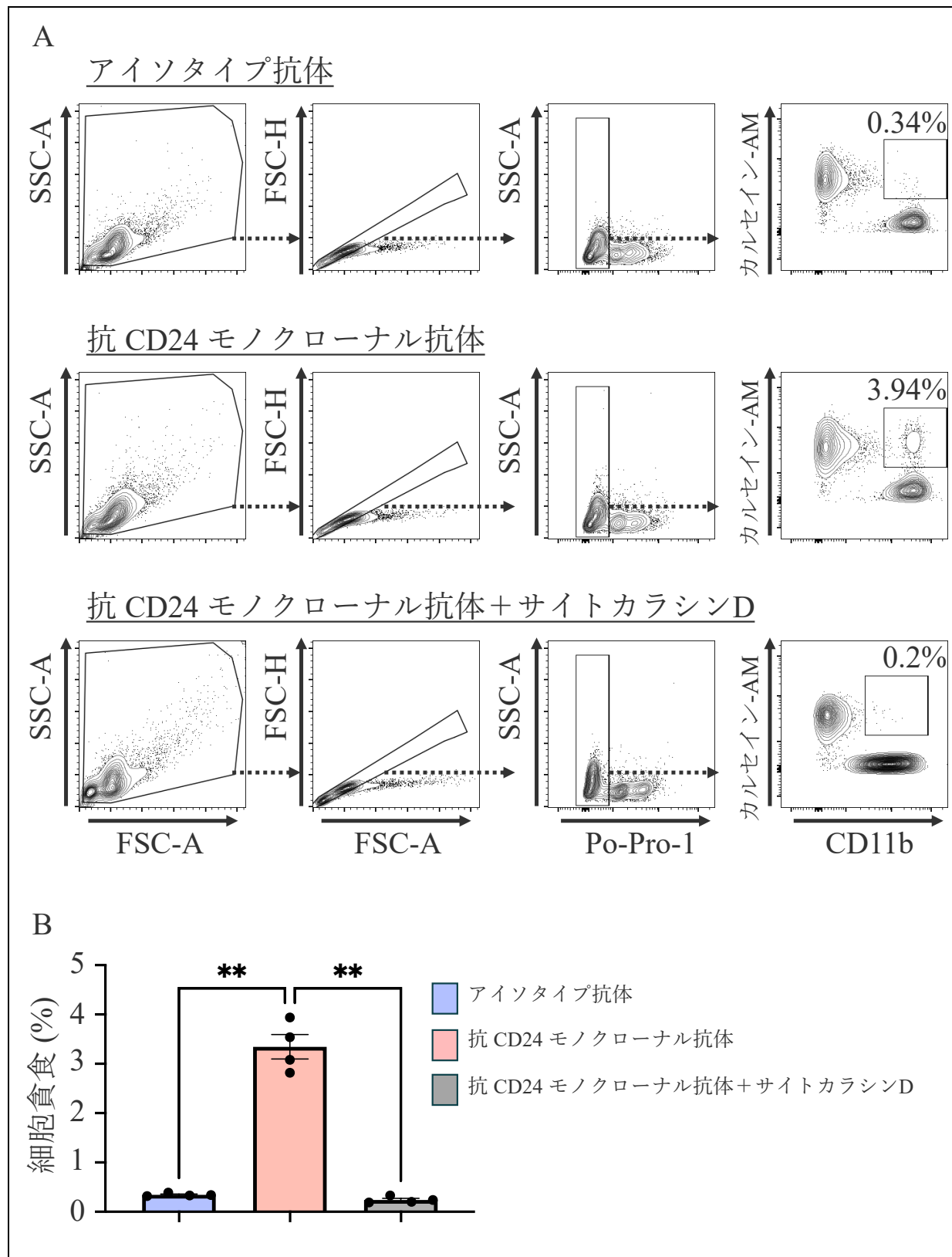


図 14 EGFR-TKI によって誘導される CD24 は ADCP の標的となる

M-CSF マクロファージをオシメルチニブ処理後に 150 nM カルセイン-AM で染色した PC9 と抗 CD24 抗体を添加して 9 時間共培養した。(A) ドットプロットの代表例。少なくとも 2 回の独立した実験から示す。(B) 全マクロファージに占める腫瘍貪食マクロファージの割合。少なくとも 2 回の実験から technical replicate を平均 $\pm$ SEM で示す。** $p < 0.01$ 。

抗 CD24 抗体を添加して培養すると全生細胞中の CD11b/カルセイン-AM 両マーカー陽性細胞集団は 3.94% だったが (図 14A、中段)、サイトカラシン D を用いると同細胞集団は 0.2% とほぼ消失した (図 14A、下段)。このことから、同細胞集団はマクロファージがカルセイン-AM 陽性 PC9 を貪食した細胞集団を反映していることが分かった。そして、抗 CD24 抗体を添加して培養すると、コントロール抗体を用いた場合と比較して有意に細胞貪食率が増加した (図 14B)。これらの結果から、EGFR-TKI 治療で EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞に内因性に発現する CD24 は、マクロファージ Siglec-10 発現に依存せず、ADCP による治療標的となることが示された。

EGFR-TKI は EGFR 変異陽性細胞から cfDNA 放出を促進し、STING 経路依存性に I 型 IFN 産生経路を活性化する

ここまでは、EGFR-TKI が誘導する EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞の内因性免疫逃避機構に焦点を当ててきた。次に、EGFR-TKI 治療によって腫瘍細胞が放出する、腫瘍微小環境を外因性に修飾する分子に注目する。cfDNA は近年、リキッドバイオプシーとしてがんの診断や予後解析などに用いられており (Cescon et al, 2020)、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死によって放出される (Hu et al, 2021)。この知見から、EGFR-TKI による治療が EGFR 変異陽性 NSCLC の細胞死を誘導し、cfDNA が放出されることで、免疫抑制的な腫瘍微小環境を形成する仮説を立てた。この仮説を検証するために EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞をオシメルチニブで処理し、培養上清中の cfDNA 濃度を測定した。その結果、オシメルチニブ処理後、培養上清中の cfDNA の放出が増加した。(図 15)。

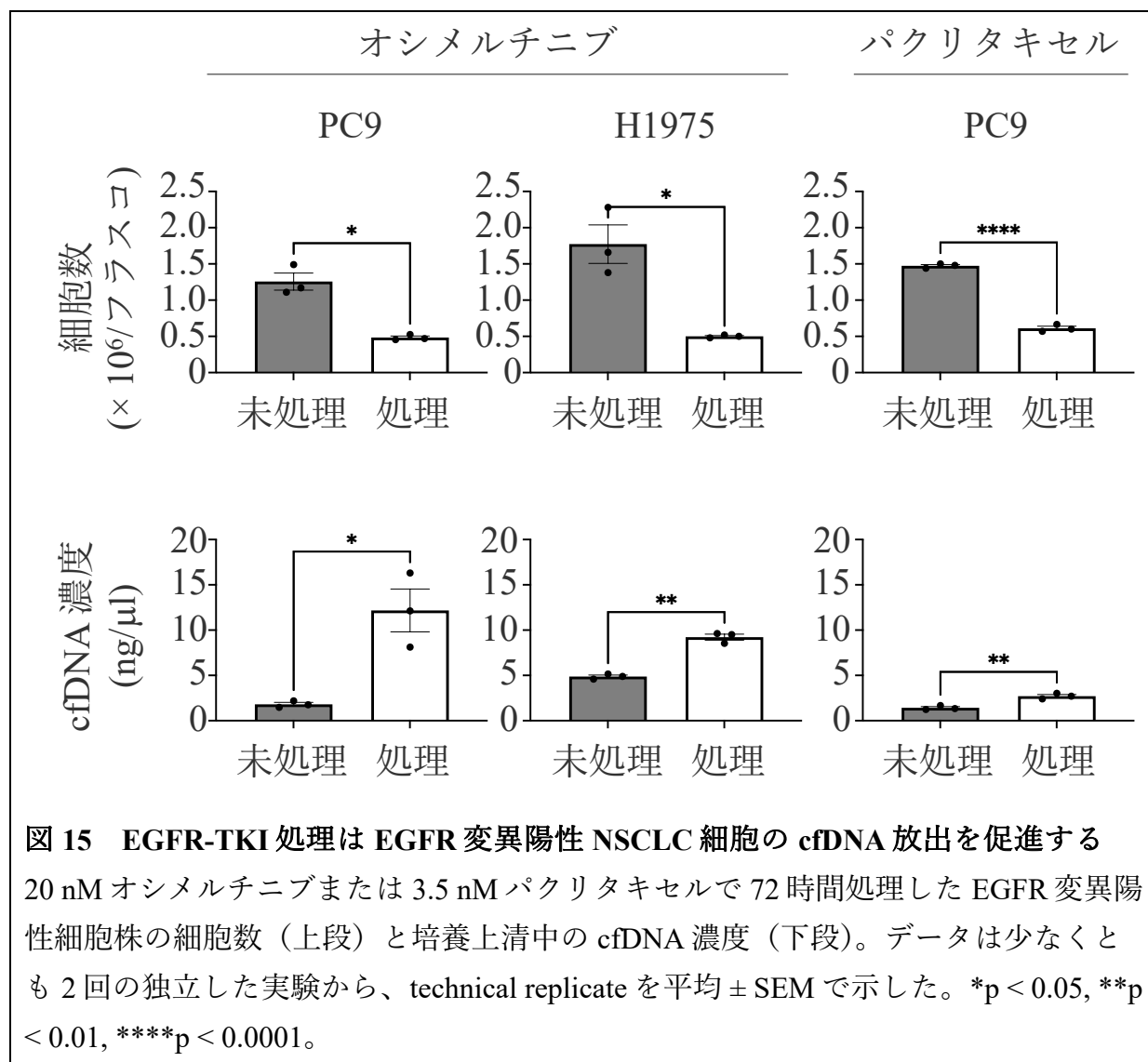


図 15 EGFR-TKI 処理は EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞の cfDNA 放出を促進する
 20 nM オシメルチニブまたは 3.5 nM パクリタキセルで 72 時間処理した EGFR 変異陽性細胞株の細胞数（上段）と培養上清中の cfDNA 濃度（下段）。データは少なくとも 2 回の独立した実験から、technical replicate を平均 ± SEM で示した。*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001。

cfDNA 放出が EGFR-TKI 処理特有の現象か、細胞増殖阻害共通の現象か検証するために、殺細胞性抗がん剤であるパクリタキセルを対照として使用した。オシメルチニブと同程度に細胞増殖を阻害するパクリタキセルの至適濃度について事前に検討を行った後（図 16）、オシメルチニブと同様に細胞を処理し、培養上清中の cfDNA 濃度を比較した。結果、オシメルチニブとパクリタキセルいずれも細胞増殖を同程度に阻害したが、パクリタキセル処理後の cfDNA 濃度はオシメルチニブ処理後と比較して低かった（図 15）。

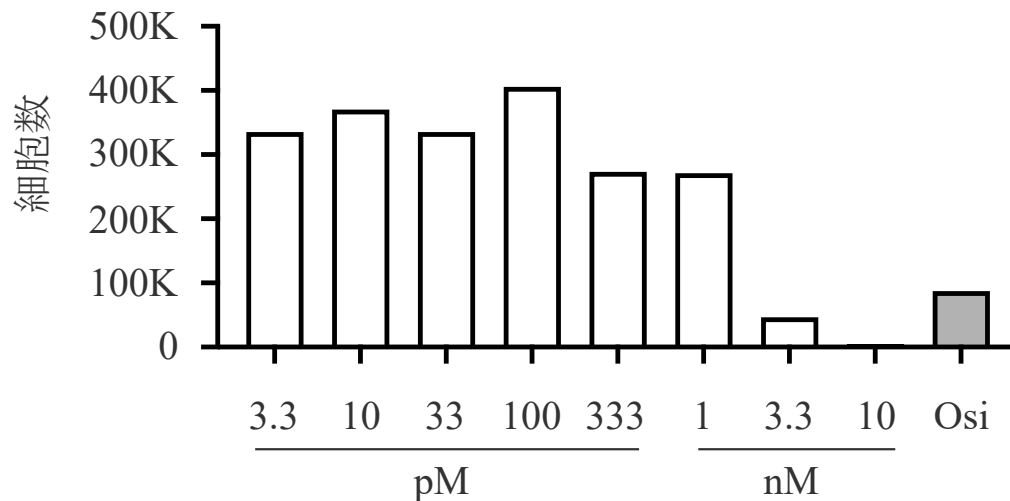


図 16 PC9 処理に用いるパクリタキセルの至適濃度の検証

様々な濃度のパクリタキセルまたは 20 nM のオシメルチニブで 72 時間処理した PC9 の細胞数を示す。Osi: 20 nM オシメルチニブ。

パクリタキセル処理した細胞の培養上清中で cfDNA 濃度が比較的低かった原因として、パクリタキセルが cfDNA の抽出を阻害した可能性を考慮した。この可能性を検証するために、培養上清にパクリタキセルを添加した状態で cfDNA を抽出した。パクリタキセルの存在下でも cfDNA は抽出され、この可能性は否定された (図 17)。

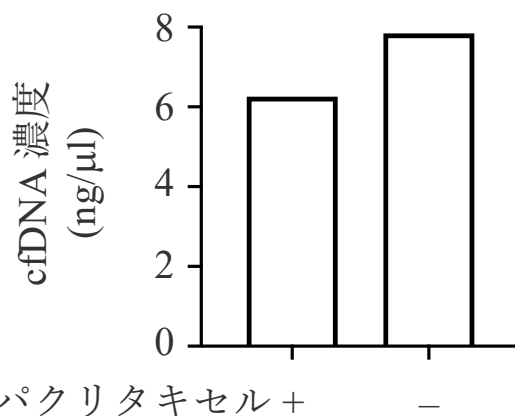
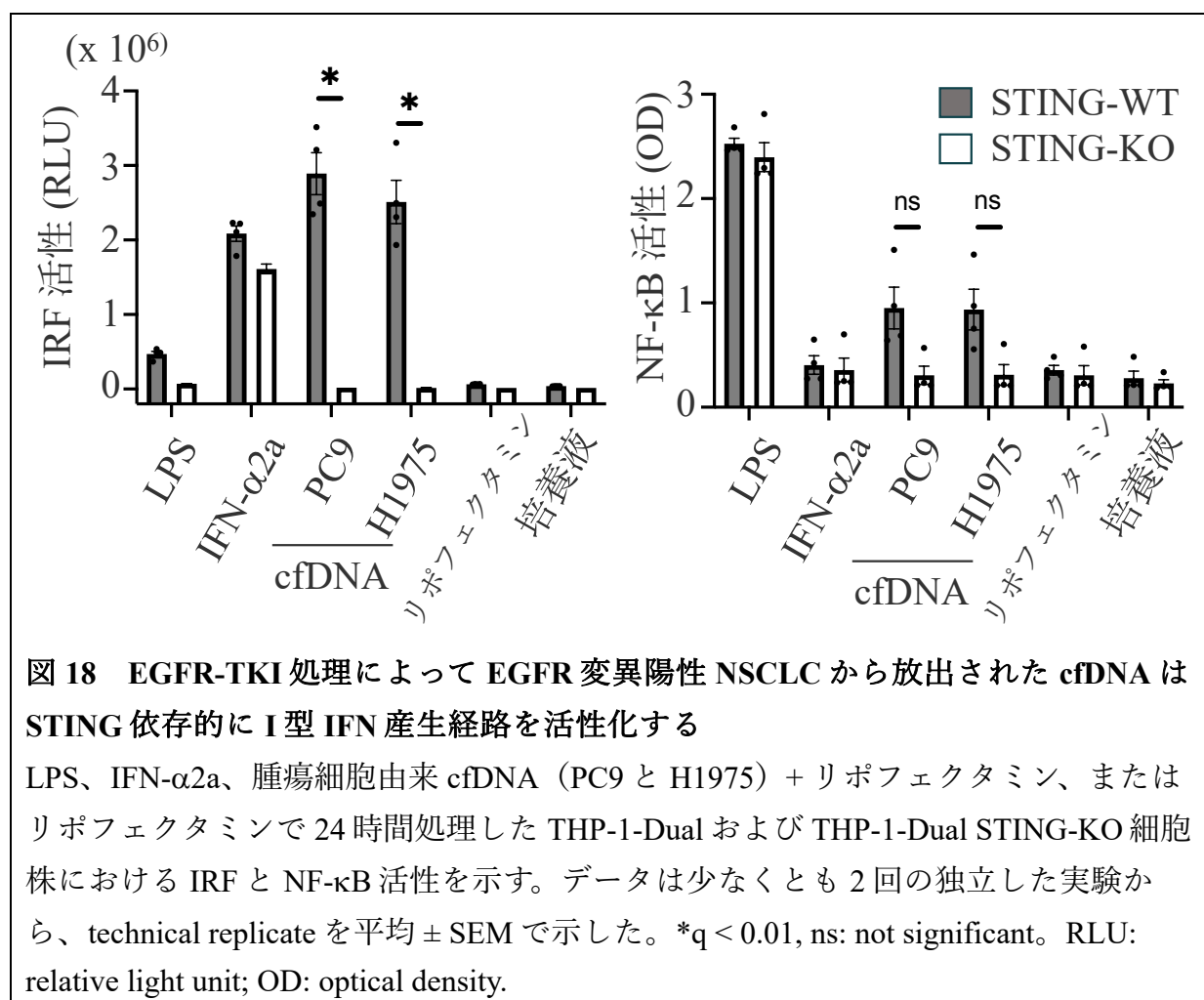


図 17 培養上清にパクリタキセルを添加後も cfDNA は抽出される

オシメルチニブで処理した PC9 の培養上清にパクリタキセルを添加、または添加せずに cfDNA を抽出し、測定した cfDNA 濃度。

よって、EGFR-TKI 処理は、パクリタキセル処理より多くの cfDNA を腫瘍細胞から放出させることが示された。次に、EGFR-TKI によって放出される cfDNA が腫瘍微小環境を免疫抑制的に変化させる可能性を検証した。

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引き起こす (Dvorkin et al, 2024; Woo et al, 2014)。そこで、dsDNA である cfDNA が免疫応答を引き起こすことを仮説とし、cfDNA を THP-1 単球細胞株にトランスフェクションし、自然免疫シグナル伝達経路の活性を評価した。EGFR-TKI 処理によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞から放出される cfDNA が、THP-1 単球細胞株において STING 依存性に IRF 経路を有意に活性化することが示された (図 18)。



これらのことから、EGFR-TKI によって腫瘍細胞から放出される cfDNA が近傍の免疫細胞に作用し、I 型 IFN 産生経路を活性化することが示唆された。

EGFR-TKI によって EGFR 変異陽性細胞から放出される cfDNA は CXCL9 産生を阻害する

さらに、腫瘍細胞由来の cfDNA と、cfDNA によって誘導される I 型 IFN が免疫逃避に関与するか調べた。抗腫瘍免疫応答には、T 細胞と T 細胞が産生する IFN- γ が不可欠である (Dighe et al, 1994; Shankaran et al, 2001)。IFN- γ がマクロファージに作用することで産生される CXCL9/10 は T 細胞をさらに腫瘍環境へ誘導し、抗腫瘍免疫応答を活性化する (House et al, 2020)。我々は、cfDNA や I 型 IFN が IFN- γ による CXCL9/10 の誘導を阻害し、免疫逃避的な腫瘍微小環境に変化させるという仮説を立てた。この仮説を実証するため、THP-1 由来マクロファージを cfDNA または IFN- α 2a で前処理し、その後 IFN- γ で刺激した (図 19)。

性マクロファージの割合。データは3回の独立した実験による平均値 ± SEM で示した。****p < 0.01**。赤：染色、青：アイソタイプ抗体。

未処理のマクロファージは IFN- γ 刺激で CXCL9 を発現したのに対し、cfDNA、IFN- α で前処理したマクロファージは CXCL9 を発現しなかった。CXCL10 発現は、cfDNA、IFN- α で前処理しても変化しなかった。この結果から、EGFR-TKI によって死滅する腫瘍細胞由来の cfDNA は、外因性に免疫細胞の I 型 IFN 産生経路を活性化し、マクロファージの CXCL9 産生を阻害することが示された。

オシメルチニブ奏効後の患者末梢血 cfDNA 濃度は低下する

われわれの *in vitro* での実験結果は、EGFR-TKI によって腫瘍増殖が抑制されると cfDNA の放出が促進されること、cfDNA は I 型 IFN を介して CXCL9 産生を阻害し、免疫逃避的な腫瘍微小環境を形成することを示唆している。しかしながら、腫瘍微小環境における cfDNA の濃度や動態を直接解析することは技術的に困難である。近年末梢血のがん細胞由来 cfDNA 解析が、腫瘍微小環境の解析と比較して患者侵襲が小さく、繰り返し測定可能であるなどの利点から、がん患者の診断や予後の予測に広く用いられている (Cescon et al, 2020; Mok et al, 2015; Schøler et al, 2017)。我々は、末梢血中の cfDNA 濃度を測定することで間接的に腫瘍微小環境の cfDNA 濃度解析が可能か検証した。オシメルチニブに対して奏効を示した EGFR 変異陽性 NSCLC 患者 4 人を解析した結果 (表 9)、治療奏効患者では、4 人中 4 人で血中 cfDNA 濃度が治療後に減少した (図 20)。これは、*in vitro* でオシメルチニブ処理後の cfDNA 濃度が増加したことと対照的であり、腫瘍微小環境と末梢循環系で異なる cfDNA 調節メカニズムが存在する可能性が示唆された。本研究において、全患者で末梢血 cfDNA 濃度が腫瘍縮小と相関して低下していることから、末梢血 cfDNA 濃度は病勢を反映する腫瘍マーカーとして役割を持つ可能性が考えられる。特に、carcinoembryonic antigen (CEA) や cancer antigen 19-9 (CA19-9) などの腫瘍マーカーが病勢を反映せず、末梢血で測定可能な腫瘍マーカーが存在しない患者群で有用となることが期待される。

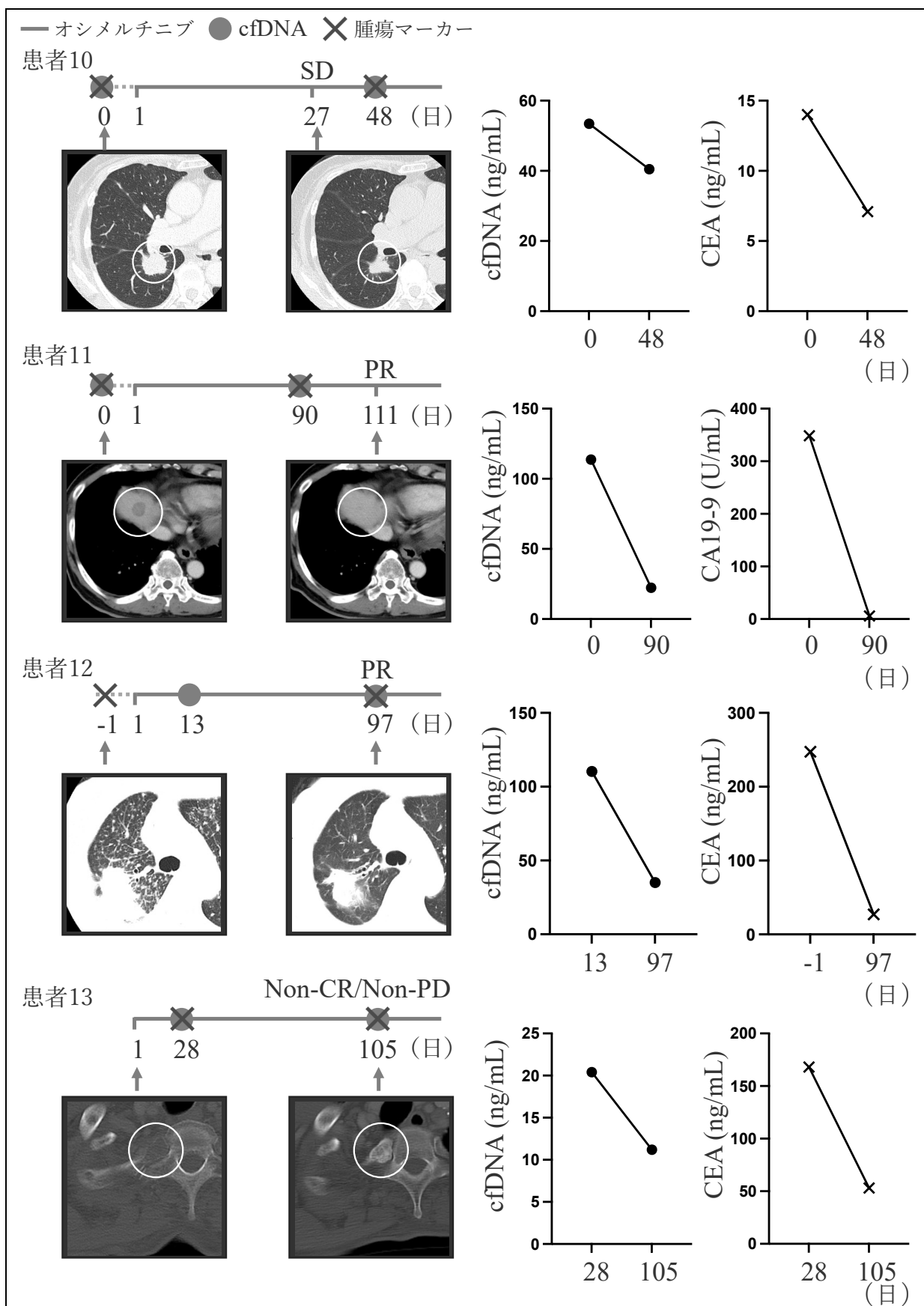


図 20 オシメルチニブ奏効後の患者末梢血 cfDNA 濃度は低下する

EGFR 変異陽性 NSCLC 患者のオシメルチニブ一次治療（1 日目から開始）前後の標的病変（左）と cfDNA 濃度、腫瘍マーカー（右）を示す。

表 9 オシメルチニブ治療を受けた患者の臨床的な特徴

前治療は EGFR-TKI 治療前に行った治療を示す。

患者	年齢	性別	喫煙歴	PS	組織型	EGFR 変異	癌の状態	前治療
患者10	79	女性	なし	0	腺癌	E19DEL	転移	なし
患者11	71	男性	あり	1	腺癌	L858R	転移再発	放射線化学療法
患者12	74	女性	なし	0	腺癌	E19DEL	転移	なし
患者13	82	男性	あり	0	腺癌	L861Q	転移再発	外科的切除

考察

本研究では、EGFR-TKI 治療が EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞の CD24 発現を誘導することを明らかにした。CD24 の発現は、NSCLC を含むいくつかの固形腫瘍で予後不良と関連する (Kristiansen et al, 2003a; Kristiansen et al, 2003b; Nakamura et al, 2017)。乳がんおよび卵巣がんで CD24 が予後不良に寄与するメカニズムの一つとして、CD24 はマクロファージに発現する Siglec-10 と結合することで貪食を抑制する「Don't eat me signal」として機能する (Barkal et al, 2019)。この研究では CD24 または Siglec-10 の遺伝子欠損、あるいは抗 CD24 または抗 Siglec-10 モノクローナル抗体による治療は、CD24-Siglec-10 結合の遮断を介して、CD24 を発現するさまざまな腫瘍細胞の貪食を促進することが示されている。しかしながら我々の研究結果は、NSCLC において Siglec-10 を発現するマクロファージは、腫瘍関連マクロファージの一部であることを示唆した。よって、CD24-Siglec-10 結合の遮断のみを治療の目的とした場合、NSCLC では抗 CD24 抗体の治療効果が十分に発揮できない可能性があった。そこで、Siglec-10 発現陰性マクロファージが抗 CD24 抗体を介して抗腫瘍効果を発揮するか検証し、Siglec-10 発現陰性マクロファージが EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞に対して ADCP を発揮することを示した。トラスツズマブ・デルクスステカンのような抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) の優れた治療効果を考慮すると (Modi et al, 2022; Shitara et al, 2020)、CD24 を標的とした ADC などの抗体治療が EGFR-TKI 耐性を克服するための有効な戦略となる可能性がある。しかし、CD24 はさまざまな正常細胞にも発現している (Fang et al, 2010)。そのため、EGFR を標的とした抗体治療のセツキシマブなどと同様に (Van et al, 2009; Vermorken et al, 2008)、CD24 単独を標的とした抗体治療には標的外毒性に対する懸念がある。そこで、これらの標的外毒性を軽減する治療戦略として、例えばアミバンタマブのような二重特異性抗体 (Cho et al, 2024; Passaro et al, 2024; Zhou et al, 2023) や、dual-receptor T-cell platform (Dao et al, 2024; Xu et al, 2018) などのように CD24 と EGFR の両方を同時に標的とすることが考えられる。こうした治療の有効性を検証するためにはさらなる研究が必要である。

また、EGFR-TKI 処理が死滅する腫瘍細胞から cfDNA 放出を促進し、STING 経路依存性に IRF を活性化することを示した。I 型 IFN は抗腫瘍 T 細胞応答を活性化する上で極めて重要である (Diamond et al, 2011; Hildner et al, 2008)。しかし、慢性ウイルス感染モデルにおいて I 型 IFN は免疫応答を減弱させる (Teijaro et al, 2013; Wilson et al, 2013)。近年マウス担癌モデルで、腫瘍の IFNAR ± IFNGR を欠損すると

抗 CTLA4 抗体の治療効果が改善し、抗 IFNAR1 抗体または Janus kinase 1 (JAK1) 阻害薬が抗 PD-L1/抗 CTLA-4 抗体併用療法の治療効果を改善することが示された (Benci et al, 2016; Mathew et al, 2024)。同グループはさらに、初めの 6 週間抗 PD-1 抗体に腫瘍縮小が見られなかった NSCLC 患者で、JAK1 阻害剤の併用後に腫瘍縮小が見られることを報告した (Mathew et al, 2024)。この結果は、腫瘍細胞における I 型 IFN 経路の阻害が抗 PD-1 抗体の治療感受性を改善したことを示している。EGFR-TKI においても、腫瘍細胞の I 型 IFN 経路の活性化が耐性に関与し、抗 IFNAR1 抗体の併用が EGFR-TKI の治療効果を改善する (Gong et al, 2020)。この研究では、EGFR-TKI によって retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-tank-binding kinase 1 (TBK1)-IRF3 経路を介して「腫瘍細胞から」I 型 IFN が分泌され、自己分泌性に腫瘍細胞の I 型 IFN 経路を活性化し、治療耐性化するメカニズムが示されている。我々のデータは、EGFR-TKI によって腫瘍細胞から放出される cfDNA を介して、I 型 IFN 産生を誘導する cGAS-STING-TBK1-IRF3 経路が「免疫細胞で」活性化されることを示した。これは、傍分泌性に腫瘍細胞の I 型 IFN 経路を活性化し、EGFR-TKI 耐性を誘導する新しいメカニズムを示唆するものである。

また、cfDNA および I 型 IFN が、IFN- γ で刺激されたマクロファージの CXCL9 産生を阻害することを示した。CXCL9 は腫瘍微小環境へのエフェクター T 細胞の動員に必要なケモカインである (House et al, 2020)。EGFR-TKI 治療による腫瘍増殖抑制効果には獲得免疫が必要であるため (Kleczko et al, 2023)、EGFR-TKI 処理によって死滅する腫瘍細胞が放出する cfDNA が I 型 IFN の産生を誘導し、CXCL9 産生を阻害することが EGFR-TKI 治療耐性メカニズムの一つとして考えられる。

我々のヒト検体を用いた解析では、ヒト末梢血における cfDNA 濃度は EGFR-TKI 治療奏効例で低下していた。EGFR-TKI は *in vitro* では腫瘍細胞からの cfDNA 放出を促進したため、末梢循環系と腫瘍局所で cfDNA の調節メカニズムが異なることが示唆される。本研究は *in vitro* での実験データが主であり、こうした腫瘍微小環境の自然免疫応答調節メカニズムについて、生体内でさらなる解析が必要である。今後の研究展開として、マウスモデルやヒト検体を用いた腫瘍微小環境の解析について次に述べる。

EGFR 変異陽性 NSCLC のマウスモデルとして、ヒト EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株の免疫不全マウスへの皮下移植モデル (Wakeling et al, 2002) が用いられている。ヒト肺癌細胞株を用いるため EGFR-TKI 治療の腫瘍細胞への影響が評価しやすいが、正常な宿主免疫応答下で治療の影響が解析できない。この点、ヒト EGFR 遺伝子変異を導入したマウス細胞株の皮下移植モデル (Sugiyama et al, 2020) では正常な

宿主免疫応答が保持される。しかし、後天的に分子生物学的手法を用いて EGFR 遺伝子変異を導入するため、腫瘍細胞の発生が EGFR 変異に依存しておらず、EGFR-TKI 治療の腫瘍増殖抑制効果を完全に再現できない可能性がある。近年ではマウス *Egfr del19* と *Trp53* 遺伝子の肺選択的な欠損によって腫瘍を形成し、同種マウス肺に移植するモデルで、オシメルチニブ治療が *Rag1* 依存性（獲得免疫依存性）に腫瘍増殖を抑制することが示されている（Kleczkl et al, 2023）。ドライバー遺伝子変異である *Egfr* と *Trp53* を先天的に導入して腫瘍を形成しているため腫瘍細胞のパッセンジャー変異が少なく、腫瘍のネオアンチゲン特異的な抗腫瘍免疫応答が弱い可能性はあるが、正常な宿主免疫応答下で EGFR-TKI 治療の影響を解析するモデルとして適するかもしれない。こうしたマウスモデルを応用し、*Tmem173* 欠損マウス、*Ifnar1* 欠損マウス、および *Ifnar1* 欠損腫瘍細胞を用いることで、cfDNA や I 型 IFN が腫瘍微小環境に与える影響と EGFR-TKI 治療耐性との関連性を明らかにすることが期待される。また近年、免疫チェックポイント阻害薬の術前補助療法の前後で患者検体を解析する手法が積極的に用いられている（Hu et al, 2023; Luoma et al, 2022; Yang et al, 2024）。追加の侵襲なしに免疫チェックポイント治療前後の患者検体を解析できることが大きな利点である。EGFR-TKI を用いたネオアジュバント治療についても臨床試験が行われており（Blakely et al, 2024）、同様の研究アプローチで EGFR-TKI 治療前後の患者腫瘍微小環境を解析可能と考えられる。

本研究は、EGFR-TKI 治療が自然免疫チェックポイント分子 CD24 発現を誘導すること（内因性因子）、EGFR-TKI により死細胞から放出される cfDNA によって I 型 IFN 産生経路が活性化し CXCL9 産生を阻害すること（外因性因子）で、免疫抑制的な腫瘍微小環境を形成することを新たに示した。これは、EGFR-TKI 治療耐性を克服する、自然免疫系を標的とした新たな治療戦略を提唱するものである。

総括および結論

1 本研究によって以下の知見が得られた。

- ・ EGFR-TKI 治療により *in vitro* と *in vivo* 両方で EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における自然免疫チェックポイント CD24 の発現が増加する。
- ・ EGFR-TKI 治療を受けた EGFR 変異陽性 NSCLC に発現する CD24 はマクロファージ Siglec-10 発現に依存せず抗体治療の標的となる。
- ・ 死滅する EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞から放出される cfDNA は I 型 IFN 産生経路を活性化し、CXCL9 産生を阻害する。

2 新知見の意義

EGFR-TKI 治療は、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞における自然免疫チェックポイント CD24 発現を内因性に増加させる。また、腫瘍細胞から cfDNA 放出を促進して外因性に免疫細胞を刺激し、I 型 IFN を介して CXCL9 産生を抑制する。本研究では、こうした EGFR-TKI 治療で誘導される免疫逃避が、治療耐性に寄与する可能性を示した。こうした新知見は、本邦 NSCLC の 50% を占める EGFR 変異陽性肺癌における EGFR-TKI 耐性を克服する新規治療に繋がり、国民健康福祉を改善する可能性を秘める。

3 今後の研究展開

EGFR-TKI 治療によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞に発現する CD24 が抗体治療の標的となることを示したが、CD24 は正常細胞にも発現していることから、CD24 単独を標的とした治療は標的外毒性が懸念される。こうした標的外毒性を軽減し抗腫瘍効果を高める治療戦略として、CD24/EGFR を同時に標的とする二重特異性抗体や dual-receptor T-cell platform の開発が期待される。また、EGFR-TKI 治療によって EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞から放出される cfDNA や I 型 IFN が、EGFR-TKI 治療耐性を引き起こす可能性を示した。今後は、これらの阻害療法の有効性について生体内で検証を行う必要がある。今回明らかにした知見を元に、自然免疫を標的とした治療戦略を通じて、EGFR-TKI 耐性を克服する新規治療を開発する。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた北海道大学大学院医学研究院 腫瘍内科学教室 秋田弘俊前教授、北海道大学病院 がん遺伝子診断部 木下一郎教授、北海道大学大学院医学研究院 呼吸器内科学教室 今野哲教授に深く感謝いたします。

本研究のみならず、大学院での研究活動全般に直接ご指導を頂きました北海道大学大学院医学研究院 腫瘍内科学教室 野口卓郎先生に心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、数々のご協力、ご支援をいただきました北海道大学大学院医学研究院 腫瘍内科学教室 清水康先生、竹内啓先生、天野虎次先生、田口純先生、大原克仁先生、有賀伸先生、合田智宏先生、奎里花先生、技術補助員の小宮幸子さん、大西啓子さんに感謝いたします。

本研究に多大な貢献をしてくださった共同執筆者の北海道大学病院 病理診断科 松野吉宏先生、外丸詩野先生、北海道大学大学院医学研究院 呼吸器内科学教室 榊原純先生、品川尚文先生、高島雄太先生、信州大学医学部 血液・腫瘍内科学教室 小泉知展先生に感謝いたします。

最後に、本研究に快くご協力いただいた患者の皆様に心より感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, Kowarsky M, Barkal SA, Zaro BW, Krishnan V, Hatakeyama J, Dorigo O, Barkal LJ, et al (2019) CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature* 572: 392–396
- Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, Cucolo L, Lee DSM, Pauken KE, Huang AC, et al (2016) Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 167: 1540-1554.e12
- Blakely CM, Urisman A, Gubens MA, Mulvey CK, Allen GM, Shiboski SC, Rotow JK, Chakrabarti T, Kerr DL, Aredo JV, et al (2024) Neoadjuvant osimertinib for the treatment of stage I-IIIa epidermal growth factor receptor-mutated non-small cell lung cancer: A phase II multicenter study. *J Clin Oncol* 42: 3105–3114
- Cescon DW, Bratman SV, Chan SM and Siu LL (2020) Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer* 1: 276–290
- Chen GY, Tang J, Zheng P and Liu Y (2009) CD24 and siglec-10 selectively repress tissue damage - Induced immune responses. *Science* 323: 1722–1725
- Cho BC, Lu S, Felip E, Spira AI, Girard N, Lee J-S, Lee S-H, Ostapenko Y, Danchaivijitr P, Liu B, et al (2024) Amivantamab plus lazertinib in previously untreated EGFR-mutated advanced NSCLC. *N Engl J Med*
- Dao T, Xiong G, Mun SS, Meyerberg J, Korontsvit T, Xiang J, Cui Z, Chang AY, Jarvis C, Cai W, et al (2024) A dual-receptor T-cell platform with Ab-TCR and costimulatory receptor achieves specificity and potency against AML. *Blood* 143: 507–521
- Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, Lee H, Arthur CD, White JM, Kalinke U, et al (2011) Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208: 1989–2003
- Dighe AS, Richards E, Old LJ and Schreiber RD (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* 1: 447–456
- Dvorkin S, Cambier S, Volkman HE and Stetson DB (2024) New frontiers in the cGAS-STING intracellular DNA-sensing pathway. *Immunity* 57: 718–730
- Fang X, Zheng P, Tang J and Liu Y (2010) CD24: From A to Z. *Cell Mol Immunol* 7: 100–103
- Fu M, Zhao J, Zhang L, Sheng Z, Li X, Qiu F, Feng Y, You M, Xu H, Zhang J, et al (2024) Overcoming tyrosine kinase inhibitor resistance in lung cancer brain metastasis with CTLA4 blockade. *Cancer Cell*

Gong K, Guo G, Panchani N, Bender ME, Gerber DE, Minna JD, Fattah F, Gao B, Peyton M, Kernstine K, et al (2020) EGFR inhibition triggers an adaptive response by co-opting antiviral signaling pathways in lung cancer. *Nat Cancer* 1: 394–409

Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, Gupta R, Tsai JM, Sinha R, Corey D, et al (2017) PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545: 495–499

Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, et al (2008) Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322: 1097–1100

House IG, Savas P, Lai J, Chen AXY, Oliver AJ, Teo ZL, Todd KL, Henderson MA, Giuffrida L, Petley EV, et al (2020) Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade. *Clin Cancer Res* 26: 487–504

Hu J, Zhang L, Xia H, Yan Y, Zhu X, Sun F, Sun L, Li S, Li D, Wang J, et al (2023) Tumor microenvironment remodeling after neoadjuvant immunotherapy in non-small cell lung cancer revealed by single-cell RNA sequencing. *Genome Med* 15: 14

Hu Z, Chen H, Long Y, Li P and Gu Y (2021) The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol* 157: 103166

Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N and Weissman IL (2009) CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138: 271–285

Kleczo EK, Le AT, Hinz TK, Nguyen TT, Navarro A, Hu C-J, Selman AM, Clambey ET, Merrick DT, Lu S, et al (2023) Novel EGFR-mutant mouse models of lung adenocarcinoma reveal adaptive immunity requirement for durable osimertinib response. *Cancer Lett* 556: 216062

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG and Halmos B (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352: 786–792

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T and Mitsudomi T (2004) Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications

Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M and Petersen I (2003a) CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 88: 231–236

Kristiansen G, Winzer K, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, et al (2003b) CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 4906–4913

- Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E and Tiseo M (2019) Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 121: 725–737
- Luoma AM, Suo S, Wang Y, Gunasti L, Porter CBM, Nabils N, Tadros J, Ferretti AP, Liao S, Gurer C, et al (2022) Tissue-resident memory and circulating T cells are early responders to pre-surgical cancer immunotherapy. *Cell*
- Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, et al (2010) Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362: 2380–2388
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, et al (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380
- Mathew D, Marmarelis ME, Foley C, Bauml JM, Ye D, Ghinnagow R, Ngiow SF, Klapholz M, Jun S, Zhang Z, et al (2024) Combined JAK inhibition and PD-1 immunotherapy for non-small cell lung cancer patients. *Science* 384: eadf1329
- Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, et al (2022) Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *N Engl J Med* 387: 9–20
- Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, Ladrera G, Thongprasert S, Srimuninnimit V, Liao M, et al (2015) Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy. *Clin Cancer Res* 21: 3196–3203
- Nakamura K, Terai Y, Tanabe A, Ono YJ, Hayashi M, Maeda K, Fujiwara S, Ashihara K, Nakamura M, Tanaka Y, et al (2017) CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncol Rep* 37: 3189–3200
- Nimmerjahn F and Ravetch JV (2007) Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 19: 239–245
- Oxnard GR, Yang JC-H, Yu H, Kim S-W, Saka H, Horn L, Goto K, Ohe Y, Mann H, Thress KS, et al (2020) TATTON: a multi-arm, phase Ib trial of osimertinib combined with selumetinib, savolitinib, or durvalumab in EGFR-mutant lung cancer. *Ann Oncol* 31: 507–516
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG and Varmus H (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2: e73
- Passaro A, Wang J, Wang Y, Lee S-H, Melosky B, Shih J-Y, Wang J, Azuma K, Juan-Vidal O, Cobo M, et al (2024) Amivantamab plus chemotherapy with and without lazertinib in EGFR-

mutant advanced NSCLC after disease progression on osimertinib: primary results from the phase III MARIPOSA-2 study. *Ann Oncol* 35: 77–90

Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, Zhou C, Reungwetwattana T, Cheng Y, Chewaskulyong B, et al (2020) Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med* 382: 41–50

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, et al (2012) Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13: 239–246

Schoenfeld AJ, Arbour KC, Rizvi H, Iqbal AN, Gadgeel SM, Girshman J, Kris MG, Riely GJ, Yu HA and Hellmann MD (2019) Severe immune-related adverse events are common with sequential PD-(L)1 blockade and osimertinib. *Ann Oncol* 30: 839–844

Schøler LV, Reinert T, Ørntoft M-BW, Kassentoft CG, Árnadóttir SS, Vang S, Nordentoft I, Knudsen M, Lamy P, Andreassen D, et al (2017) Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 23: 5437–5445

Schulz D, Severin Y, Zanotelli VRT and Bodenmiller B (2019) In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep* 9: 1925

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107–1111

Sharma SV, Bell DW, Settleman J and Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 169–181

Shitara K, Bang Y-J, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu M-H, Sakai D, Chung H-C, Kawakami H, Yabusaki H, Lee J, et al (2020) Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. *N Engl J Med*

Sugiyama E, Togashi Y, Takeuchi Y, Shinya S, Tada Y, Kataoka K, Tane K, Sato E, Ishii G, Goto K, et al (2020) Blockade of EGFR improves responsiveness to PD-1 blockade in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Sci Immunol* 5: eaav3937

Takashima Y, Sakakibara-Konishi J, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Ohhara Y, Oizumi S, Hida Y, Kaga K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al (2018) Clinicopathologic Features and Immune Microenvironment of Non-Small-cell Lung Cancer With Primary Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin Lung Cancer* 19: 352-359.e1

Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, Schreiber RD, de la Torre JC and Oldstone MBA (2013) Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340: 207–211

Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, et al (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360: 1408–1417

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckí A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H-R, Cupissol D, et al (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359: 1116–1127

Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ and Gibson KH (2002) ZD1839 (Iressa): An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Factor Signaling with Potential for Cancer Therapy. *Cancer Res* 62: 5749–5754

Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow BJ, Karp CL and Brooks DG (2013) Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340: 202–207

Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MYK, Duggan R, Wang Y, Barber GN, Fitzgerald KA, et al (2014) STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 41: 830–842

Xu Y, Yang Z, Horan LH, Zhang P, Liu L, Zimdahl B, Green S, Lu J, Morales JF, Barrett DM, et al (2018) A novel antibody-TCR (AbTCR) platform combines Fab-based antigen recognition with gamma/delta-TCR signaling to facilitate T-cell cytotoxicity with low cytokine release. *Cell Discov* 4: 62

Yang Z, Tian H, Chen X, Li B, Bai G, Cai Q, Xu J, Guo W, Wang S, Peng Y, et al (2024) Single-cell sequencing reveals immune features of treatment response to neoadjuvant immunochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 15: 9097

Zhang J, Dong Y, Yu S, Hu K, Zhang L, Xiong M, Liu M, Sun X, Li S, Yuan Y, et al (2024) IL-4/IL-4R axis signaling drives resistance to immunotherapy by inducing the upregulation of Fcγ receptor IIB in M2 macrophages. *Cell Death Dis* 15: 500

Zhou C, Tang K-J, Cho BC, Liu B, Paz-Ares L, Cheng S, Kitazono S, Thiagarajan M, Goldman JW, Sabari JK, et al (2023) Amivantamab plus chemotherapy in NSCLC with EGFR Exon 20 insertions. *N Engl J Med* 389: 2039–2051

Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, Savova V, Zemmour D, Saatcioglu HD, Krishnan I, Maroni G, Meyerovitz CV, Kerwin CM, et al (2019) Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50: 1317-1334.e10

国立研究開発法人国立がん研究センター (2024) 最新がん統計。がん情報サービス。 https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html (2024年11月13日参照)