

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15503

研究課題名（和文）EGFR遺伝子変異陽性肺がんにおけるアデノシン経路を活用した免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of Immunotherapy Utilizing the Adenosine Pathway in EGFR-Mutant Lung Cancer

研究代表者

吉田 遼平（Yoshida, Ryohei）

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：40792883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR遺伝子変異陽性肺がん（EGFR肺がん）におけるICIs抵抗性の原因解明としてアデノシン経路に含まれるCD26の重要性が判明した。EGFR肺がん細胞株HCC2279において、CD26の発現が低い細胞（CD26-Low）はSTINGの発現が高く、これが免疫応答を促進する可能性を示唆している。さらに、CD26-Low細胞でSTINGをノックアウトするとCD26の発現が顕著に上昇し、cGAS-STING経路がCD26の発現を抑制的に制御することが示された。これにより、EGFR肺がんにおけるCD26発現の抑制が新たな免疫療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、EGFR肺がんにおけるICIs抵抗性のメカニズム解明に寄与し、特にCD26とcGAS-STING経路の関与を示した点で学術的に重要である。これにより、CD26の発現を低下させることで免疫応答を高める新たな治療戦略が提案できる。また、EGFR遺伝子変異陽性肺がん患者に対する治療の選択肢が増えることで、治療効果の向上と副作用の軽減が期待され、社会的意義も大きい。これらの知見は、今後の新規免疫療法の開発に向けた基盤となる。

研究成果の概要（英文）：The significance of CD26, part of the adenosine pathway, has been identified in the context of Immune checkpoint inhibitor (ICI) resistance in EGFR-mutant lung cancer (EGFR lung cancer). In the EGFR lung cancer cell line HCC2279, cells with low CD26 expression (CD26-Low) exhibited high STING expression, suggesting a potential enhancement of immune response. Furthermore, knocking out STING in CD26-Low cells led to a significant increase in CD26 expression, indicating that the cGAS-STING pathway negatively regulates CD26 expression. These findings suggest that suppressing CD26 expression in EGFR lung cancer could lead to the development of new immunotherapies.

研究分野：肺がん

キーワード：EGFR肺がん アデノシン経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異は肺腺癌における主要なドライバー変異であり、肺腺癌の約半数を占める。この遺伝子変異を持つ肺がんには、分子標的薬である EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) が高い治療効果を示す。しかし、EGFR-TKI は治療を続けるうちに必ず耐性が生じる問題があり、耐性化した EGFR 遺伝子変異陽性肺がんへの後次治療の開発が急務である。

2018 年には免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) ががん治療に導入され、一部の肺がん患者で有効性が報告された。しかし、EGFR 遺伝子変異陽性肺がんには ICI が効かないことが明らかになり、また ICI と EGFR-TKI の併用は副作用を増強することが報告された (Gainor et al. Clin Cancer Res 2016/Oshima et al. JAMA Oncol 2018) 近年の研究により、EGFR 遺伝子変異陽性肺がんではアデノシン経路の CD73 が高発現し、その結果として ICI への治療抵抗性が生じている可能性が示唆されている (Le et al. J Thorac Oncol 2021)。しかし、EGFR 遺伝子変異陽性肺がんにおいて、CD73 を含むアデノシン経路の制御機構については明らかにされていない。

2. 研究の目的

2018 年に進行期非小細胞肺がんに対して ICI が保険適用となったが、EGFR 肺がん患者には ICI が効果を示さないことが知られている。最近の研究により、EGFR 肺がんにおける ICI 抵抗性の原因として、アデノシン経路との関連が報告されており、この経路は免疫療法の新たな治療標的として期待されている。しかし、アデノシン経路の制御機構は未だ解明されていない。本研究では、EGFR 肺がんにおけるアデノシン経路の制御機構を解明し、EGFR-TKI に耐性を獲得した患者群に対する新規治療法を開発を目的とする。

3. 研究の方法

細胞株

EGFR 肺がん細胞株として、H1650、H3255、H1975、H820、HCC827、HCC827GR6、PC9、HCC2935、HCC2279、HCC4006 を用いた。これらの細胞株は、RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Cat.#11875-119)、10% FBS、および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを用いて 37℃、5% CO₂ 環境下で培養した。

CRISPR/Cas9 システム

CRISPR interference のターゲット配列は、sgRNA デザイナー (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>) を使用して設計した。Gecko ライブラリー-v2 からの非標的 sgRNA をスクランブル sgRNA として使用した。

3 × 10⁶ 個の HEK293T 細胞を 60mm ディッシュに播種し、X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, Cat.# 06366236001) を使用して、レンチウイルススペースの発現ベクター 1 μg、pCMV-dR8.91 1 μg、および pCMV-VSV-G 1 μg を共にトランスフェクションした。48 時間のインキュベーション後、レンチウイルス粒子を含む培地を収集し、0.45 μm フィルターで濾過し、Lenti-X Concentrator (Clontech, Cat.# 631231) を使用して濃縮した。

統計解析

統計的有意性は、対応のない両側性の Student's t 検定、一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey の事後検定、または二元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey の事後検定を用いて評価した。p 値が 0.05 未満の場合、有意と見なした。有意性を示すためのアスタリスクは以下のように対応する：*p<0.05、**p<0.005。列は平均値 ± 標準偏差 (S.D.) を表す。一元または二元配置分散分析 (ANOVA) と事後検定においては、関心のあるペアにのみアスタリスクを表示した。全ての統計解析には GraphPad Prism7 を使用した。

4. 研究成果

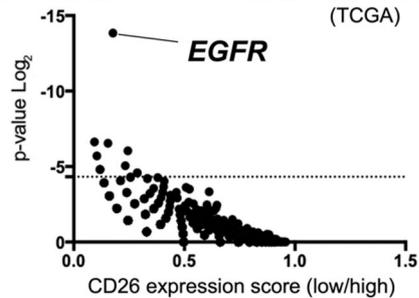
当初、EGFR 肺がんにおいて ICIs 抵抗性の原因解明としてアデノシン経路の CD73 の制御機構に着目し研究を進めてきた。しかし研究を進める過程で、CD26 がアデノシン経路の重要な構成分子であることから、新たな研究の着想に至った。

EGFR 遺伝子変異陽性肺がんにおけるアデノシン経路の制御機構を研究する過程で CD26 分子に着目した。CD26 は 110kDa の糖蛋白であり、Adenosine deaminase(ADA)の結合蛋白として細胞外アデノシンの抑制作用を妨げることで免疫調節作用を有することが報告されている。

EGFR 肺がんでは CD26 発現低下が免疫応答を誘導する

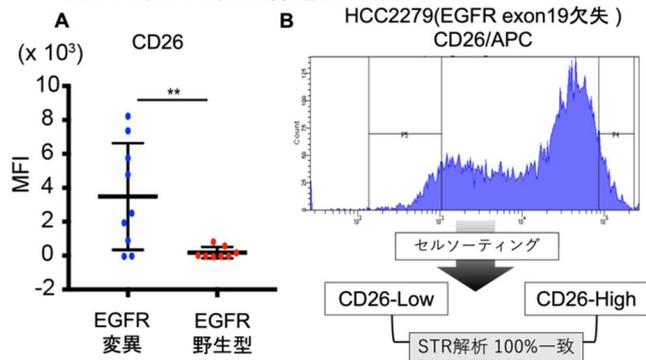
はじめにがんゲノムデータベース(TCGA)を活用し、CD26 の高発現群を対象を限定し、遺伝子変異解析を行ったところ、CD26 の高発現と EGFR 遺伝子変異との関連性を強く示唆する結果を得た(図1)。肺がん細胞株を用いた検証でも同様の結果を確認した(図2A)。EGFR 肺がん細胞株をスクリーニングする過程で偶発的に、**CD26 が 2 峰性に発現する細胞株 HCC2279 を同定した**。同株に対して高発現群(CD26-High)、低発現群(CD26-Low)でセルソーティングを行い、STR 解析により細胞認証を確認した(図2B)。次いで、2つの細胞株に対して RNA シーケンス解析を行ったところ、CD26-High 群と比較し CD26-Low 群で interferon gamma/interferon alpha/inflammatory といった免疫原性を HOT tumor に誘導するシグナル経路が観察され、HCC2279 細胞株データからは、CD26 の発現を低下させることが免疫療法にとって有利に働く可能性が示された。

図1: 肺腺がんのCD26発現と遺伝子変異 (TCGA)



CD26高発現(上位25%)している検体で高頻度に観察される遺伝子変異を解析した

図2: 肺がん細胞株を用いた検証



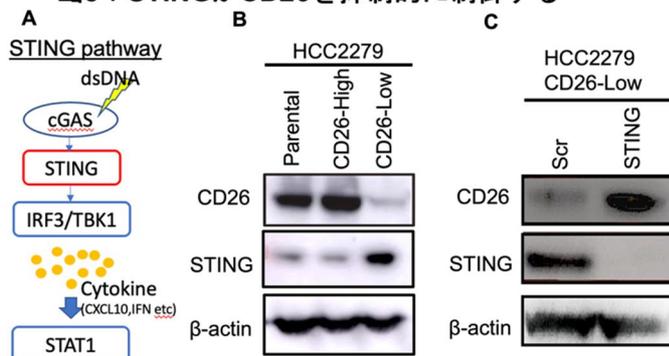
cGAS-STING 経路が CD26 発現制御に関与する

本研究の目的の一つにアデノシン経路のマスター制御因子の解明があるが、研究過程で CD26 の発現調節につながる画期的な知見を得た。

背景として、ICIs の治療効果には二本鎖 DNA の認識経路である cGAS-STING 経路が重要な役割を担うことが知られている(Kwon, *Cancer Discov* 2020)。小胞体に局在する STING は二本鎖 DNA のセンサー機能を有し、下流のシグナルを介して炎症性サイトカインを分泌する(図3A)。申請者らも、KRAS 肺がんの ICIs が奏功しないサブタイプでは STING の発現抑制が影響していることを明らかにしている (Kitajima and Yoshida., *Cancer Discov* 2019)。

EGFR 肺がん細胞株を用いた検証により、HCC2279 の CD26-Low が CD26-High より STING の発現が高いことが明らかになった(図3B)。次に CD26-Low 細胞株を用いて、STING をノックアウトしたところ、コントロール株と比較して CD26 の顕著な発現上昇を確認した(図3C)。以上より cGAS-STING 経路が CD26 の発現を抑

図3: STINGがCD26を抑制的に制御する



制的に制御することが示唆され、EGFR 肺がんにおける CD26 発現の抑制が新規免疫治療法の開発につながるという仮説を裏付ける重要なデータとなった。

上記の2つの予備的データをもとに、さらなる詳細な ICIs 耐性機構の制御因子の解明に迫り、EGFR 肺がんにおける新規免疫療法の開発に向けた基盤研究の構築が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|