

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16827

研究課題名(和文)がん患者末梢血浮遊DNAの全身性炎症反応への役割の解明

研究課題名(英文)The role of blood cell-free DNA in cancer patients in systemic inflammation

研究代表者

野口 卓郎(Noguchi, Takuro)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：40814554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1)EGFR(Epidermal growth factor receptor:上皮成長因子受容体)変異陽性非小細胞肺癌がEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)治療下でセルフリーDNA(cfDNA)の放出を促進し、免疫細胞のI型インターフェロンシグナル経路をStimulator of interferon genes(STING)依存性に活性化することを明らかとした。2)EGFR変異陽性非小細胞肺癌がEGFR-TKI治療下で抑制性免疫チェックポイントCD24を誘導することを細胞株、およびヒト検体を用いて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR変異陽性肺癌に対するEGFR阻害薬は高い治療効果を認めるが、時間の経過とともにほとんどが耐性を獲得することが知られており、その耐性機序の理解と克服が課題である。本研究では、免疫学的観点から、この課題への研究を進めた。その結果、EGFR阻害薬によって誘導される免疫逃避機構関連因子を同定した。今後この経路を標的とした新規治療薬の開発により、EGFR変異陽性肺癌の治療成績の向上につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1)EGFR(Epidermal growth factor receptor)-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) cells accelerated the release of cell-free DNA upon EGFR inhibition, which activated the type I interferon signaling pathway in immune cells in a Stimulator of interferon genes(STING)-dependent manner.

2)EGFR-mutated NSCLC cells upregulated an inhibitory immune checkpoint CD24 when treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors, in cell lines and patient samples.

研究分野：固形がんに対する腫瘍免疫応答

キーワード：腫瘍免疫学 肺癌 EGFR阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん患者においては腫瘍由来 DNA が全身性に循環している。この応用例として、末梢血中の腫瘍由来 DNA を、次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析するリキッドバイオプシーは、より低侵襲ながん診断法として注目されている。腫瘍由来 DNA はこうした診断学的側面を持つ一方で、免疫学的には、DNA 自体の性質として免疫応答を惹起する炎症誘発因子としての側面を持つと考えられる。例えば、私たちの免疫は、ウイルス DNA を認識して、適切な免疫応答を誘導し、ウイルス排除を行う。しかし、何らかの理由で過小または過剰な免疫応答が誘導されると、ウイルス排除は行われず、宿主への脅威となる。近年、がんの進行抑制、排除にも免疫が重要であることが明らかとなってきた。そのため、がん患者において慢性的に存在する腫瘍由来 DNA が担う抗腫瘍免疫応答への制御機構を解明することが、腫瘍免疫学の課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、がん患者の腫瘍が放出する腫瘍由来 DNA の免疫制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) がん患者末梢血における浮遊 DNA (cfDNA: cell-free DNA) 濃度を測定し、既報の再現性を確認すると共に、cfDNA 抽出技術を確立した。

(2) レポーター細胞株を用いた腫瘍由来 DNA 解析実験系を用いて、免疫シグナル伝達経路への寄与を検討した。

(3) 上記(2)で確立した実験系を用いて、腫瘍由来 DNA 以外の抗腫瘍免疫応答における免疫制御分子を解析した。

4. 研究成果

(1) 臓器横断的にがん患者 14 人から 22 末梢血液検体を得た。cfDNA を抽出し、濃度を定量した。転移性肺癌患者においては、cfDNA 濃度中央値 10.3ng/mL であった。進行肉腫患者においては、cfDNA 濃度中央値 6.2 ng/mL であった。その他がん患者においては、cfDNA 濃度中央値 4.8 ng/mL であった。次に、次世代シーケンサー (Thermo Fisher Scientific 社 IonPGM Ion318Chip) を用いて粘液線維肉腫症例における cfDNA (20ng) のバリエーション解析を行った。検出感度 0.13% 条件下で、0.36% のアリル頻度の TP53 遺伝子変異を検出した。

(2) 腫瘍由来 DNA の解析を目的として、EGFR 変異陽性肺癌細胞株を用いた実験系を確立した。EGFR 阻害薬投与により培養上清中の cfDNA 濃度の上昇を認めた (図 1)。次に、IRF 経路および NF- κ B 経路のレポーター分子を発現する THP-1-Dual 単球細胞株、Stimulator of interferon genes (STING) 欠損 THP-1-Dual 単球細胞株 (InvivoGen) を用いて、EGFR 阻害薬により放出された cfDNA と自然免疫系シグナルの関連性を評価した。その結果、腫瘍由来 cfDNA はいずれの経路も STING 依存性に活性化することが明らかとなった (図 2)。EGFR 変異陽性肺癌は EGFR 阻害薬耐性を I 型インターフェロンを介して獲得することが知られており、EGFR 阻害薬により放出される腫瘍由来 cfDNA がその耐性機序の一因である可能性が示唆された。

(3) 上記実験系を進めていく過程で、EGFR 変異陽性肺癌の別の免疫逃避機構として EGFR 阻害薬による免疫抑制性分子 CD24 の発現誘導が公共データベースを用いたマイクロアレイ解析で示唆された (GSE75308、GSE57156) (図 3)。次に、CD24 発現誘導をフローサイトメトリー法を用いて解析したところ、EGFR 変異陽性肺癌細胞株で細胞表面 CD24 発現レベルの上昇を認めた (図 4)。細胞株レベルで認めた観察事項の汎用性を確認するため、EGFR 阻害薬治療を受けた EGFR 変異陽性肺癌患者 5 人の治療前、治療後の腫瘍組織検体を用いて CD24 発現の変化を免疫組織化学法を用いて評価した。その結果 5 人中 4 人で腫瘍細胞が発現する CD24 の上昇を認めた。対照群として設定した、殺細胞性抗がん薬で治療された 3 人では、全てにおいて治療前後における腫瘍 CD24 発現の変化を認めなかった。この結果、EGFR 変異陽性肺癌の EGFR 阻害薬耐性機構として CD24 を介した免疫逃避機構が関与している可能性が示唆された。

図 1

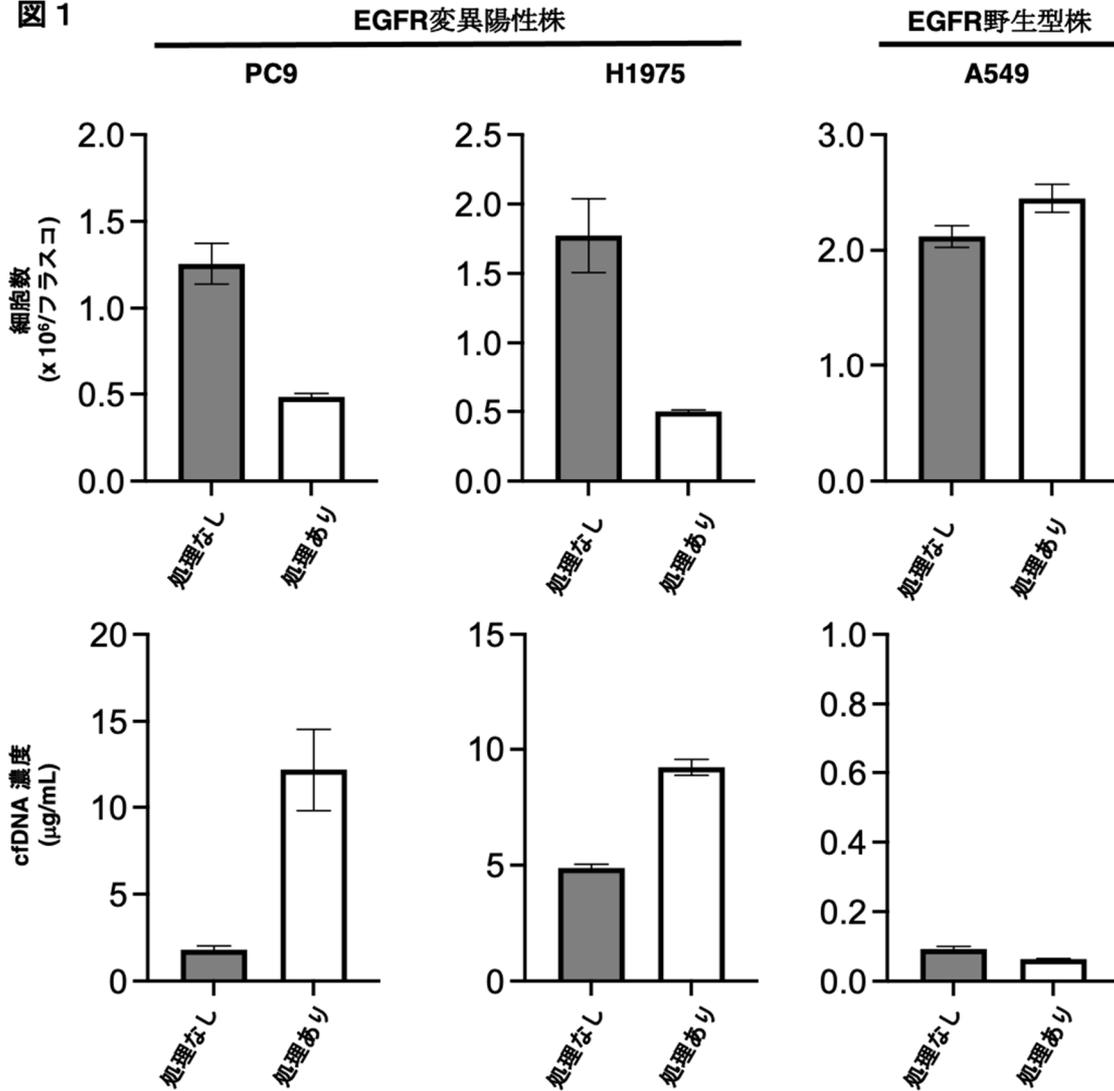


図 1 : EGFR 変異陽性非小細胞肺癌細胞株 PC9、H1975 および EGFR 野生型非小細胞肺癌細胞株 A549 を EGFR 阻害薬 (オシメルチニブ) で 72 時間処理した。培養に用いた T25 フラスコ内の細胞数 (上段) 培養上清中の cfDNA 濃度 (下段) を計測した。

図 2

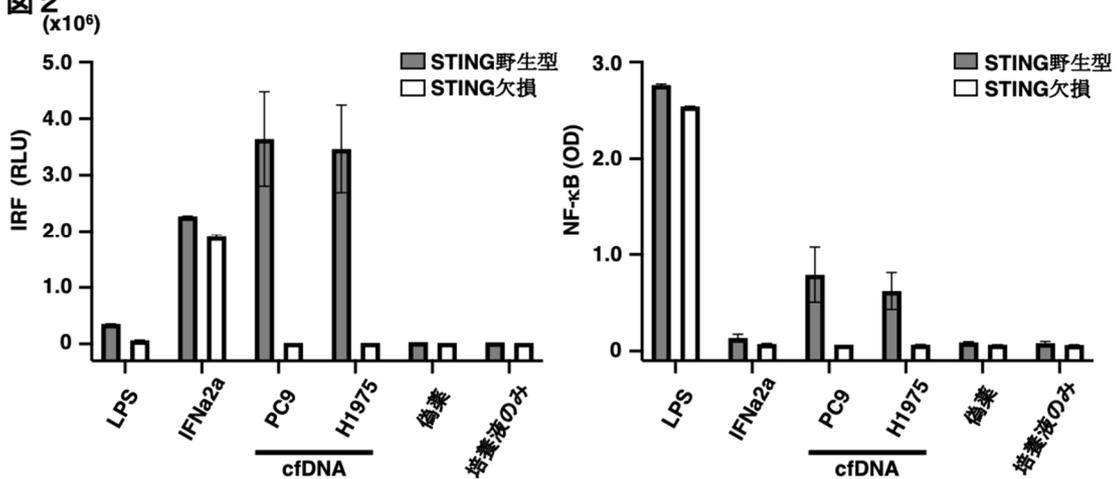


図 2 : STING 野生型、STING 欠損 THP-1-Dual 単球細胞株と EGFR 変異陽性非小細胞肺癌細胞株由来 cfDNA を 6-24 時間共培養した。cfDNA は共培養前にリポフェクタミン処理した。LPS=リポポリリサッカライド、IFN α 2a=インターフェロン α 2a、偽薬=リポフェクタミンのみ。

図 3

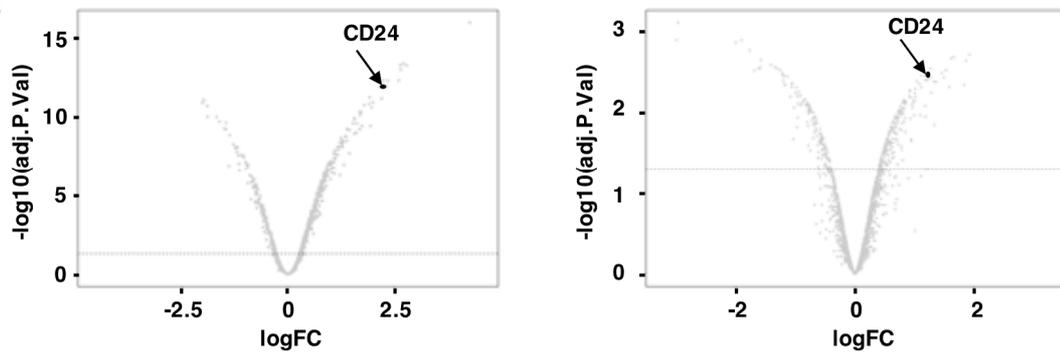


図 3 : 左 GSE75308。EGFR 変異陽性非小細胞肺癌細胞株 PC9 を EGFR 阻害薬(ゲフィチニブ)処理。右 GSE57156。EGFR 変異陽性非小細胞肺癌細胞株 HCC2279 を EGFR 阻害薬(エルロチニブ)処理。

図 4

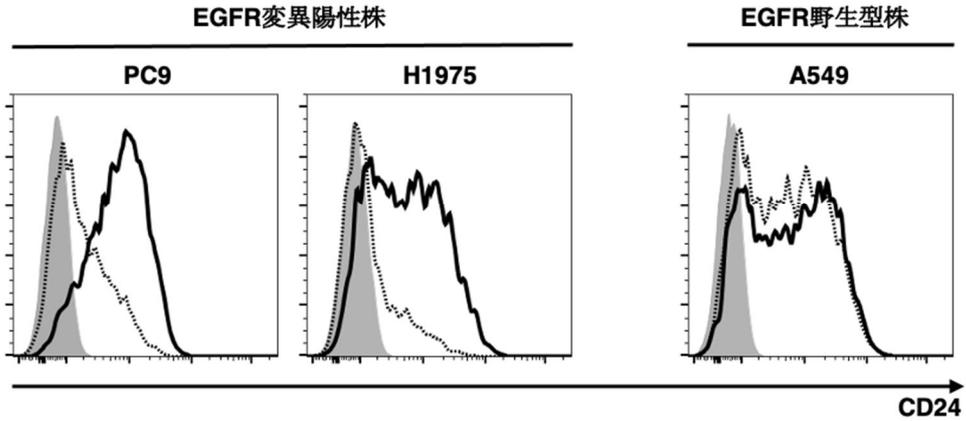


図 4 : EGFR 変異陽性非小細胞肺癌細胞株 PC9、H1975 および EGFR 野生型非小細胞肺癌細胞株 A549 を EGFR 阻害薬 (オシメルチニブ) で 72 時間処理した。細胞表面の CD24 発現をフローサイトメトリー法で解析した。灰色=アイソタイプコントロール。灰色点線=EGFR 阻害薬なし。太実線=EGFR 阻害薬あり。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	Takuro Noguchi, Akihiko Shiiya, Shin Ariga, Yoshihito Ohhara, Yasushi Shimizu, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Akita
2. 発表標題	CD24, an immunosuppressive immune checkpoint, is up-regulated in EGFR-mutated non-small lung cancer cell lines upon EGFR-TKI treatment.
3. 学会等名	The 39th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Akihiko Shiiya, Takuro Noguchi, Shin Ariga, Yoshihito Ohhara, Yasushi Shimizu, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Akita
2. 発表標題	Cell-free DNA from EGFR-mutated lung cancer cells treated with EGFR-TKIs engages in innate immune signaling pathways
3. 学会等名	The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Takuro Noguchi, Akihiko Shiiya, Shin Ariga, Tomohiro Goda, Yoshihito Ohhara, Jun Taguchi, Satoshi Takeuchi, Yasushi Shimizu, Ichiro Kinoshita, Hirotooshi Akita
2. 発表標題	EGFR-mutated lung cancer cells accelerate the release of cfDNA activating innate immune pathways upon EGFR-TKI treatment
3. 学会等名	2022 the Japanese Society of Medical Oncology Annual Meeting
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Noguchi T, Miyagawa M, Sekiguchi N, Gomi D, Fukushima T, Ozawa T, Kobayashi T, Taniguchi S, Koizumi T.
2. 発表標題	A single institute analysis of cell-free DNA concentrations in plasma of patients with various cancer types.
3. 学会等名	The 17th Annual Meeting of JSMO
4. 発表年	2019年

〔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
---------	---------