

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10036

研究課題名(和文) 小児がんにおける抗PD1抗体の臨床応用に向けた腫瘍免疫メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of tumor immunity mechanism for clinical application of anti-PD1 antibody in childhood cancer

研究代表者

土屋 邦彦 (Tsuchiya, Kunihiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90381938

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)：予後不良であるPAX3-FOX01陽性横紋筋肉腫細胞をモデルとして、どのように免疫系の攻撃を小児がん細胞が回避しているかの検討を行った。PAX3-FOX01遺伝子は胞巣型横紋筋肉腫に特徴的に発現している融合遺伝子である。本遺伝子は、細胞表面のPD-L1という遺伝子の発現を高めることにより、免疫担当細胞の攻撃を回避していることが、本研究において示唆された。我々は、PD-L1遺伝子の発現を低下させる薬剤も同定しており、これらの薬剤と免疫療法の併用により、免疫療法の効果を高められ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

小児がん治療においては、すでに化学療法、外科療法、放射線療法は最大限に強化されており、新しい治療法である免疫療法の導入による治療成績の改善が期待されている。白血病ではCAR-T細胞療法といった有望な免疫療法が行われているが、小児固形腫瘍においては有効な免疫療法はいまだに存在しない。本研究結果により同定された薬剤と、免疫療法を併用することにより、免疫療法の効果を増強し、小児固形腫瘍の予後の改善に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined how childhood cancer cells evades the attack of immune system using PAX3-FOX01 positive rhabdomyosarcoma cells as a model. The PAX3-FOX01 gene is a fusion gene that is characteristically expressed in alveolar rhabdomyosarcoma with poor prognosis. It was suggested that this gene evades the attack of immune system by enhancing the expression of a gene called PD-L1. We have also identified agents that reduce the expression of the PD-L1 gene, suggesting that the combined use of these agents and immunotherapy may enhance the effects of immunotherapy.

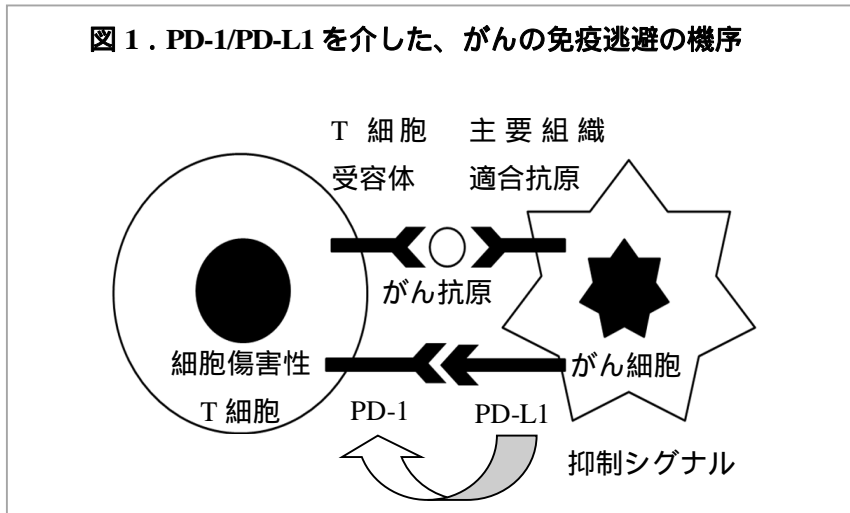
研究分野：小児腫瘍学

キーワード：横紋筋肉腫 PD-L1 免疫療法 PAX3-FOX01 B7-H3

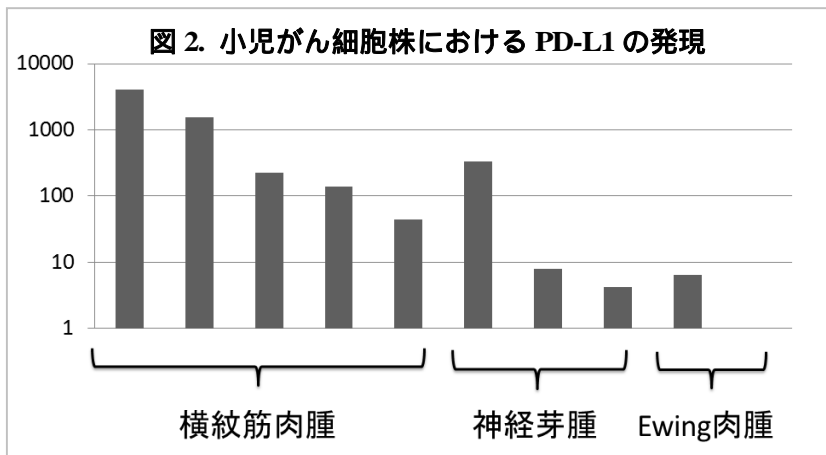
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第四の治療法として免疫療法が注目されている。PD-1 分子は細胞傷害性 T 細胞に発現し、がん細胞表面に発現するリガンドである PD-L1 と結合することで抑制性のシグナルを伝達し、細胞傷害性 T 細胞に抑制的に働く。すなわち、がん細胞は PD-1/PD-L1 経路という免疫チェックポイント機構を利用することで、腫瘍免疫監視機構に対応して逃避するメカニズムを獲得していると考えられる (図 1)。



実際、悪性黒色腫や腎細胞癌といった成人のがんにおいて、PD-1/PD-L1 経路を阻害する抗 PD-1 抗体を用いることにより、腫瘍免疫を増強することによる有効性が示されている (Topalian SL, et al. N Engl J Med. 2012)。我々は小児がん細胞株を用いて、PD-L1 の発現の検討を行った。小児がん細胞株の中では、横紋筋肉腫、神経芽腫、Ewing 肉腫の順で PD-L1 の高発現を認めた (図 2、EWS-AK 細胞株の発現を 1 として mRNA レベルの発現をリアルタイム PCR で定量した)。



横紋筋肉腫細胞株において、PD-L1 の高発現を認めたことより、横紋筋肉腫は免疫チェックポイント分子を介する腫瘍免疫逃避により抗腫瘍免疫を免れている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫における免疫チェックポイントを介した免疫逃避メカニズム横紋筋肉腫を中心に、小児がんにおける PD-L1 を介した腫瘍免疫の免疫逃避の証明を行い、これらの基礎検討を基盤に、腫瘍免疫逃避を抑制する治療法を臨床応用することを最終目標としている。

3. 研究の方法

PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫細胞株である Rh30、RM2、Rh3、Rh28/L-PAM を用いた。インターフェロン (IFN-) や PAX3-FOXO1 ノックダウンによる PD-L1 の発現変化を定量的リアルタイム PCR 法とフローサイトメトリー法により定量した。IFN- による PD-L1 の発現誘導の機序について、MAPK、PI3K、JAK 経路のリン酸化をウエスタンブロットングにより検証した。MEK 阻害剤の U0126 や JAK 阻害剤のルクソリチニブを用いて、これらの経路が IFN- による PD-L1

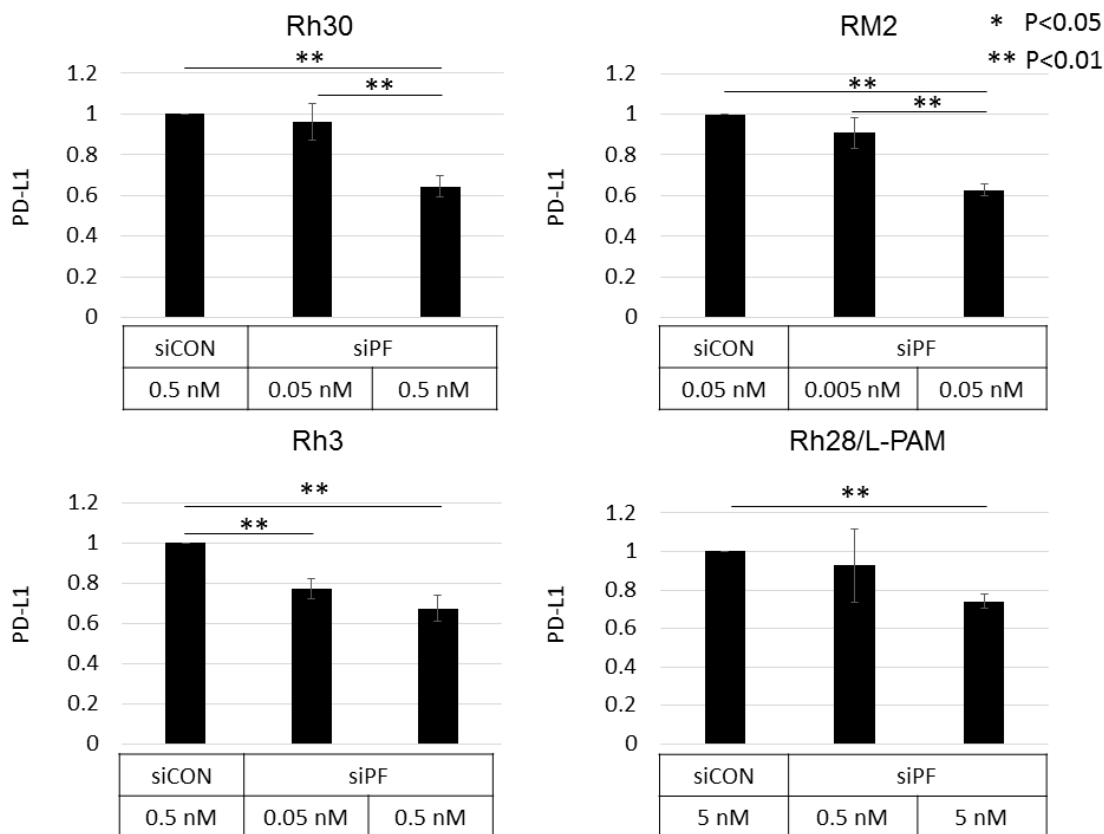
の発現誘導に関与しているかを検証した。

4. 研究成果

まず、*PAX3-FOXO1* 陽性横紋筋肉腫細胞株における IFN- γ による PD-L1 発現の誘導について、検討した。100ng/ml の IFN- γ 処理により、細胞表面の PD-L1 発現は Rh30、RM2、Rh3、Rh28/L-PAM 細胞株において、それぞれ 4.37、7.41、7.01、4.85 倍増加した。

次に、*PAX3-FOXO1* ノックダウンに伴う IFN- γ による PD-L1 発現の誘導の変化について検討した。各細胞株において、IFN- γ により誘導される細胞表面の PD-L1 の発現をフローサイトメトリーにより定量したところ、ネガティブコントロール siRNA 処理時と比較して、*PAX3-FOXO1* ノックダウンにより PD-L1 発現は有意に低下した (図 3)。

図 3. *PAX3-FOXO1* ノックダウンによる細胞表面 PD-L1 発現の変化
siPF (*PAX3-FOXO1* に対する siRNA) siCON (ネガティブコントロール siRNA)
ネガティブコントロール siRNA 処理時の PD-L1 発現を 1 とした。



PAX3-FOXO1 ノックダウンによる PD-L1 の発現低下の機序を明らかにするために、*PAX3-FOXO1* ノックダウンがどのシグナル伝達経路に影響を及ぼすかについて検討した。Rh30、RM2、Rh3 の三つの細胞株では、ERK のリン酸化が減弱しており、Rh28/L-PAM 細胞株においては、STAT3 のリン酸化が減弱していた。

IFN- γ による PD-L1 発現誘導の機序について、MAPK 経路と JAK/STAT 経路の関与が考えられたため、MEK 阻害剤 U0126 と JAK 阻害剤ルクソリチニブを用いて、PD-L1 発現を定量した。U0126 は Rh30、RM2、Rh3 の三つの細胞株において、ルクソリチニブは Rh28/L-PAM 細胞株において PD-L1 発現の誘導を阻害した。

また、*PAX3-FOXO1* 陽性横紋筋肉腫細胞株 3 細胞株 (Rh30、Rh28、Rh41) を用いて、*PAX3-FOXO1* ノックダウン後に、免疫チェックポイント分子の発現をリアルタイム PCR 法、フローサイトメトリー法で検討した。腫瘍表面に発現し、腫瘍免疫逃避に関わる免疫チェックポイント分子として、PD-L2、CD155、Galectin-9、HVEM、B7-H3、B7-H4、ICOSL、CD80、CD86 の発現を検討した。3 細胞株に共通して発現の低下する免疫チェックポイント分子として、B7-H3 があることが分かった。B7-H3 の発現はリアルタイム PCR 法でもフローサイトメトリー法でも低下していることが分かり、mRNA レベル、蛋白レベルで発現が低下していることが分かった。B7-H3 は腫瘍免疫逃避に関与することが示唆されており、その機能解析により新たな知見が得られることが示唆された。

以上より、*PAX3-FOXO1* 融合遺伝子は、*PAX3-FOXO1* 陽性横紋筋肉腫細胞において、PD-L1 や B7-H3 を介した免疫逃避に関与していることを明らかにした。PD-L1 の発現の制御には、MAPK、JAK/STAT 経路が関与しており、これらの阻害剤と免疫療法の併用により、免疫逃避の影響を最小限にして免疫療法を行える可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

宮地 充. *PAX3-FOXO1* 融合遺伝子陽性横紋筋肉腫における PD-1 経路阻害の意義. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2016 年 12 月 15 日~17 日. 東京

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 細井 創

ローマ字氏名: Hajime Hosoi

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20238744

研究分担者氏名: 家原 知子

ローマ字氏名: Tomoko Iehara

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20285266

研究分担者氏名: 菊地 顕

ローマ字氏名: Ken Kikuchi

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 特任助教

研究者番号(8桁): 40453104

研究分担者氏名: 柳生 茂希

ローマ字氏名: Shigeki Yagyū

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 10572547

研究分担者氏名: 宮地 充

ローマ字氏名: Mitsuru Miyachi

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40584938

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。