

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11293

研究課題名(和文)ゲノム編集を用いた免疫寛容誘導分子IDOとPD-L1を標的とする卵巣癌新規治療開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for ovarian cancer targeting immune tolerance-inducing molecules, PD-L1 and IDO, using genome editing technique

研究代表者

井籠 一彦 (INO, KAZUHIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60303640

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)：本研究ではゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いて卵巣癌において免疫寛容誘導分子PD-L1およびIDOを欠損させ、その標的治療の有用性について検討した。CRISPR/Cas9を用いてマウス卵巣癌細胞株ID8のPD-L1欠損細胞株(PD-L1-KO ID8)を樹立した。PD-L1-KO ID8移植マウスはControlマウスと比較し生存期間が延長し播種腫瘍重量は減少した。PD-L1-KO移植マウスにおいて腫瘍内CD8+ T細胞、NK細胞は増加し、腫瘍内のIFN-、TNF-、IL-2、IL-12a、CXCL9・10の発現は増加した。IDO欠損の効果についてはさらに研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の有する免疫回避機構を克服するため、宿主T細胞側のPD-1でなく腫瘍細胞側に発現するIDOやPD-L1の標的治療の有用性を詳細に検討した研究は乏しい。本研究においては、これらの免疫寛容誘導分子を従来のsh-RNAによるノックダウンではなく、CRISPR/Cas9によるゲノム編集により完全にノックアウトさせる方法を試みた点は学術的意義がある。本研究が卵巣癌における腫瘍微小環境内免疫寛容システムのさらなる解明を促進し、将来、アデノ随伴ウイルス等を用いてin vivoで癌自身の免疫寛容分子を特異的にブロックする遺伝子治療開発への基盤構築に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on two immune tolerance-inducing molecules, Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), and their targeting therapy in ovarian cancer. PD-L1 was genetically disrupted in the murine ovarian cancer cell ID8 using CRISPR/Cas9-mediated genome editing. PD-L1 knockout (KO) and control ovarian cancer cells were intraperitoneally inoculated into mice. Survival time was significantly longer in the PD-L1-KO ID8-inoculated group, and tumor weight was significantly lower in the PD-L1-KO ID8 group. Intratumoral CD8+ T cells and NK cells were significantly increased in the PD-L1-KO ID8 group. The intratumoral mRNA expression of IFN-, TNF-, IL-2, IL-12a, CXCL9/10 was significantly stronger in the PD-L1-KO ID8 groups. These results indicated that CRISPR/Cas9-mediated PD-L1 disruption promotes anti-tumor immunity, thereby suppressing ovarian cancer progression. Further studies are needed to evaluate the effects of targeting therapy for IDO.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：免疫寛容 ゲノム編集 卵巣癌 PD-L1 IDO 免疫療法 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う進行症例であり、そのような進行症例に対する治療は腫瘍減量手術と化学療法が主となるが長期予後は不良である。固形癌が増殖進展するためには、宿主の免疫監視から逃避する免疫寛容の獲得が必要であり、このシステムの存在が従来の免疫療法の効果が不十分な原因と考えられている。

(2) 近年、免疫チェックポイント分子のひとつである Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)/ Programmed cell death 1 (PD-1) 経路が腫瘍免疫寛容にとって重要な要素であることが明らかとなり、これらをターゲットとする抗体療法が脚光を浴びている。また我々はトリプトファン代謝酵素の1つである Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) が婦人科癌の腫瘍免疫抑制に関与する可能性をこれまで発表してきた。しかし卵巣癌進展における腫瘍自身の発現する PD-L1 や IDO の機能的役割は十分に解明されておらず、その標的治療効果を実証した報告はない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では新たなゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて PD-L1 および IDO の遺伝子欠損マウス卵巣癌細胞株を作製し、卵巣癌腹膜播種モデルを用いて卵巣癌進展における腫瘍細胞上の PD-L1 および IDO の機能的役割を解明する。

(2) さらに上記モデルにおいて、ゲノム編集による PD-L1 および IDO の遺伝子ノックアウトが卵巣癌の標的治療として有効かどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) PD-L1 と IDO の遺伝子組み換えマウス卵巣癌細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて、PD-L1 遺伝子改変細胞作製用ベクターをマウス卵巣癌細胞株 ID8 に導入し、PD-L1 欠損細胞株 (PD-L1-KO ID8) を樹立した。同時に control vector を導入した細胞株 (Control ID8) を樹立し、蛋白レベルでの PD-L1 の発現の有無を確認した。また IDO 遺伝子ノックアウトについては、ノックアウト効果が十分な細胞が確立したとはいえ、今後も研究を継続することとした。以下の *in vivo* 実験は、PD-L1 ノックアウト細胞を用いて行った。

### (2) マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける腫瘍進展の比較

PD-L1-KO ID8 および Control ID8 を C57BL/6 マウスに腹腔内移植し、播種腫瘍の重量、腹水量と生存期間を比較検討した。

### (3) 腫瘍浸潤リンパ球のプロファイリングとサイトカイン・ケモカイン発現の比較

マウスより摘出した播種腫瘍組織の免疫組織化学染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球数を PD-L1-KO ID8 移植マウスと Control ID8 移植マウスで比較した。また蛍光二重免疫染色を行い腫瘍内のマクロファージのサブセット (M1/M2) を比較した。さらに腫瘍組織から mRNA を抽出し、各種サイトカインおよびケモカインの発現を比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) PD-L1 遺伝子ノックアウトマウス卵巣癌細胞の確立

ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いて PD-L1-KO ID8 においてタンパクレベルでの PD-L1

の発現欠損を確認した。また PD-L1 遺伝子の標的領域において両アレルでの遺伝子変異を認めた。

#### (2) マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける PD-L1 ノックアウトの効果

PD-L1-KO ID8 移植マウスは Control ID8 移植マウスと比較して、生存期間は有意に延長し、さらに、PD-L1-KO ID8 移植マウスにおいて腹腔内移植後 70 日目の播種腫瘍重量・腹水量は Control ID8 移植マウスと比べて有意に減少していた。

#### (3) PD-L1 ノックアウトの腫瘍内浸潤リンパ球およびサイトカイン・ケモカイン発現への効果

PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍内に浸潤する CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞および NK 細胞の数は有意に増加し、一方で制御性 T 細胞(Treg)の数は有意に減少した。また PD-L1-KO ID8 移植マウスの腫瘍内では M2 マクロファージと比べて M1 マクロファージが有意に増加していた。さらに PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍内の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12a、CXCL9、CXCL10 の mRNA 発現は有意に増加し、IL-10、CXCL1、CXCL2 の mRNA の発現は有意に減少した。

#### (4) 研究結果の総括

CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集技術を用いて、腫瘍細胞上の PD-L1 遺伝子を完全に欠損させることで、腫瘍微小環境内において CD8<sup>+</sup> T 細胞、NK 細胞、M1 マクロファージが増加し、さらに種々のサイトカイン・ケモカインが調節されることで抗腫瘍免疫が促進され、その結果として卵巣癌の腫瘍進展が抑制されることが示された。これらの結果は PD-L1 遺伝子を標的とする治療が卵巣癌の新たな治療戦略となり得る可能性を示した。今後、もう 1 つの標的免疫寛容分子である IDO のノックアウトによる抗腫瘍効果の検証については、さらに研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yahata T, Mizoguchi M, Kimura A, Orimo T, Toujima S, Kuninaka Y, Nosaka M, Ishida Y, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Hemmi H, Iwahashi N, Noguchi T, Kaisho T, Kondo T, Ino K	4. 巻 110
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1279-1292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iwahashi N, Sakai K, Noguchi T, Yahata T, Toujima S, Nishio K, Ino K	4. 巻 16
2. 論文標題 A comprehensive gene mutation analysis of liquid biopsy samples from patients with metastatic colorectal cancer to the ovary: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 6431-6436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.9467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niimi K, Yamamoto E, Nishino K, Fujiwara S, Ino K, Kikkawa F	4. 巻 21
2. 論文標題 Spontaneous regression of gestational trophoblastic neoplasia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecol Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 98-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gore.2017.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ino K, Yahata T, Horiuchi Y, Yagi S	4. 巻 1
2. 論文標題 Usefulness of the primary tumor SUVmax on preoperative FDG-PET/CT as a prognostic indicator for patients with gynecologic cancers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Obstet Gynecol Infertility	6. 最初と最後の頁 1008、1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwahashi N, Sakai K, Noguchi T, Yahata T, Matsukawa H, Toujima S, Nishio K, Ino K	4. 巻 9
2. 論文標題 Liquid biopsy-based comprehensive gene mutation profiling for gynecological cancer using CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10426、1 - 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47030-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tamaki Yahata, Naoyuki Iwahashi, Mika Mizoguchi, Saori Toujima, Tsuneyasu Kaisho, Toshikazu Kondo, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tumor cells promote antitumor immunity and suppress ovarian cancer progression in a mouse model
3. 学会等名 The 17th BIENNIAL MEETING OF THE INTERNATIONAL GYNECOLOGIC CANCER SOCIETY (IGCS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamaki Yahata, Naoyuki Iwahashi, Mika Mizoguchi, Madoka Yamamoto, Noriyuki, Sasaki, Michihisa Shiro, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing and efficient PD-L1 disruption on tumor cells promote antitumor immunity and suppress ovarian cancer progression in a mouse model
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 (仙台)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yahata T, Mizoguchi M, Ino K et al.
2. 発表標題 PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tumor cells promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression in a mouse model
3. 学会等名 The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO) (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	近藤 稔和  (KONDO TOSHIKAZU)  (70251923)	和歌山県立医科大学・医学部・教授    (24701)	
研究 分担者	馬淵 泰士  (MABUCHI YASUSHI)  (80382357)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	