

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07319

研究課題名(和文) 化学療法による免疫逃避能獲得機構の解明と薬剤耐性がんに対する新規治療戦略への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of chemotherapy-induced immunosuppressive proteins expressions in esophageal cancer cells.

研究代表者

植松 美影(濱田美影)(Mika, Hamada-Uematsu)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90769449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道がん培養細胞に抗がん剤を添加することで免疫逃避因子であるPD-L1, PD-L2, MFG-E8の発現亢進を認めた。PD-L1, MFG-E8のプロモーター内で、抗がん剤に応答する転写因子結合領域を特定した。また転写因子Yの発現が低下した食道がん細胞では、PD-L1 mRNAの抗がん剤刺激による発現亢進が抑制され、MFG-E8 mRNAの発現が増強された。さらに、転写因子YがPD-L1やMFG-E8のプロモーターに結合していることを確認した。以上より、食道がん細胞において、抗がん剤刺激によるPD-L1やMFG-E8の発現誘導には転写因子Yが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤刺激によるPD-L1, MFG-E8の発現亢進に転写因子Yが関与するという結果は新規の知見である。また本研究課題の核心をなす学術的問いである「がん細胞は、抗がん剤に対する総合的防御機構の構成要素として免疫逃避能を有しているのか？」に対し、「転写因子Yを介した総合的防御機構に免疫逃避能も含まれる」という解を得た。がん組織での転写因子Yの発現量により化学療法後の免疫逃避因子の発現パターンが推察でき、化学免疫併用療法の効果予測や治療法選択の一助になることが示唆された。さらに転写因子Yをターゲットとした薬剤と免疫療法の併用等、がん細胞の総合的防御機構に着目した新規治療戦略に発展できると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify mechanisms which regulate immunosuppressive proteins expressions in response to chemotherapy. We found PD-L1, PD-L2 and MFG-E8 were induced by chemotherapeutic agents treatment in the human esophageal cancer cell line TE-11 and the breast cancer cell line MDA-MB-231 using flow cytometry and real time RT-PCR. Moreover, Promoter assay with site-directed mutagenesis, chromatin immunoprecipitation assay, and knockdown experiment using siRNA revealed that chemotherapeutic agents induced PD-L1 and MFG-E8 expressions via transcriptional factor Y in TE-11. These results indicate that transcriptional factor Y is primarily responsible for the chemotherapeutic agent-induced immunosuppressive protein regulation in esophageal cancer cells.

研究分野：腫瘍診断、治療学

キーワード：がん免疫療法 免疫チェックポイント PD-L1 MFG-E8

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法とは、非自己を認識し排除する免疫機構を活用し、患者自身の持つ免疫機構ががん細胞を攻撃することを促す治療法である。がん免疫療法で主要な役割を担うT細胞は、チェックポイントと呼ばれる細胞表面分子でその細胞を攻撃するか否かを決定する。がん細胞の免疫逃避機構である抑制系チェックポイントを解除する免疫チェックポイント阻害剤 (Immune check-point inhibitors: ICPI) により、がん細胞へのT細胞の攻撃を促すことが可能となった。ICPI 療法の大きな課題として、抗腫瘍効果が認められないがん種や患者が多いことが挙げられ、ICPI の治療効果をより高める併用療法や ICPI 治療前に効果予測が可能なバイオマーカーの開発が求められている。

これまで、化学療法を受けた食道がん患者において、免疫逃避因子である programmed death 1 ligand (PD-L1)や milk fat globule EGF factor-8 (MFG-E8)の高発現例が多く、これら因子の発現と治療予後に有意な負の相関があり、腫瘍に浸潤したT細胞数が低いことを報告した。抗がん剤による PD-L1 の発現誘導に関しては、一部の抗がん剤やがん種において NFkB や PI3K による経路が関わっていることが示唆されているが、直接的に発現を制御している経路に関する統一見解はない。MFG-E8 に関して、抗がん剤による発現誘導機構について検討されていないのが現状である。また、がん細胞は抗がん剤によるダメージを受けた際に、薬剤耐性や DNA 損傷修復能など様々な防御機構を発現させることが知られているが、それら防御機構と免疫逃避能の関係性については明らかになっていない。そこで、「がん細胞は、抗がん剤に対する総合的防御機構の構成要素として免疫逃避能を有しているのか？」を本研究課題の核心をなす学問的問いとした。

2. 研究の目的

本研究は、化学療法によって誘起される免疫逃避能機構を解明することにより、抗がん剤不応性難治性がんに対する新規治療戦略へ応用することを目的とした。化学療法により免疫逃避能を獲得するがん細胞の特徴を捉えることは、併用療法開始前に効果予測が可能なバイオマーカーの同定に、免疫逃避能獲得機構の解明は化学免疫併用療法への応用や、がん細胞の防御機構の元を絶つ新規治療法の開発に発展することができ、効果的ながん治療を目指すうえで大変重要であると考えられる。

3. 研究の方法

(1)がん細胞における抗がん剤処理による免疫逃避因子発現亢進の確認

化学療法を受けた食道がん摘出組織で見られた PD-L1 や MFG-E8 の発現上昇は、がん細胞に直接働きかけたものか、それとも周囲の免疫細胞等を介したもののかを明らかにするため、ヒト食道がん由来 TE 細胞を用いて検討した。化学療法で使用された5種類の抗がん剤をそれぞれ TE 細胞に処理し、PD-L1, MFG-E8 mRNA 発現量を real time RT-PCR にて、タンパク質発現量を flow cytometry にて測定した。また、抗がん剤刺激による免疫逃避因子の発現亢進は他のがん種でもみられるのかを検討するために、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞を用いて同様の解析をおこなった。さらに *in vivo*での検討に向けて、複数種のマウスがん細胞に抗がん剤を添加して PD-L1, MFG-E8 の発現解析を行い、マウスに移植する培養細胞の選別をおこなった。

(2)抗がん剤刺激による免疫逃避因子発現制御機構の解明

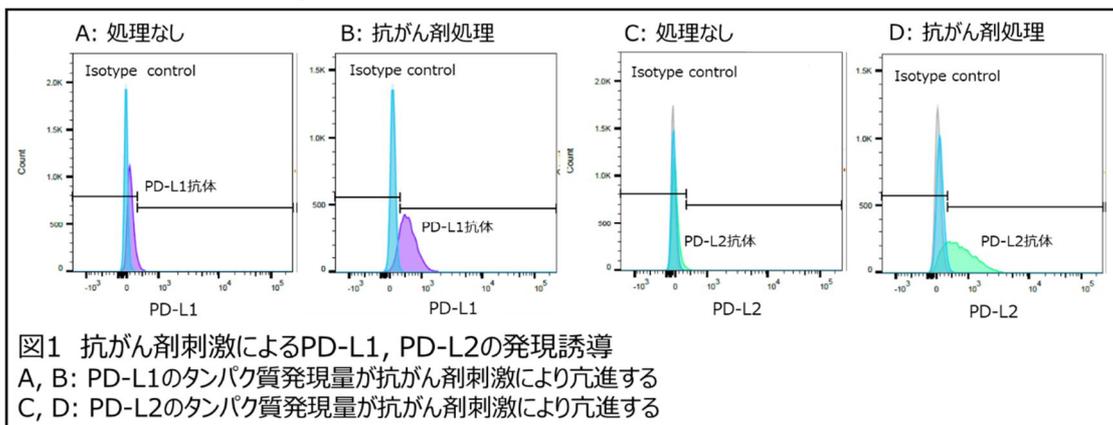
PD-L1, MFG-E8 のプロモーター上で抗がん剤刺激により転写活性が亢進する領域を特定するために、ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に PD-L1, MFG-E8 のプロモーターを組み込んだベクターを作成し、プロモーターアッセイをおこなった。さらに、プロモーター上に変異を入れることで、それぞれの発現亢進に重要なプロモーター領域に結合する転写因子候補を推定した。次に、候補転写因子の siRNA を食道がん由来細胞にそれぞれ導入し、抗がん剤添加後に RNA を回収することで、転写因子の発現低下が PD-L1, MFG-E8 の発現亢進を抑制するのかが否かについて real time RT-PCR で確認をおこなった。この siRNA の実験により転写因子 Y の関与が示唆されたため、実際に転写因子 Y が PD-L1 や MFG-E8 のプロモーター領域に結合しているのかが否かを Chip assay により確認した。また、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベース上の扁平上皮がんサンプルの RNA シーケンスデータの解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) ヒト食道がん由来 TE 細胞に抗がん剤を添加した結果、PD-L1, PD-L2, MFG-E8 の mRNA およびタンパク質発現が亢進した (図 1)。このことより、抗がん剤は直接がん細胞を刺激して免疫逃避因子の発現を誘導することがわかった。また、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞でも、抗がん剤処理により PD-L1, PD-L2, MFG-E8 の mRNA およびタンパク質発現上昇がみられた。以上の結果より、抗がん剤による免疫逃避因子の発現亢進は、乳がん細胞でも起こることが確認された。さらに Flow cytometry 解析により、PD-L1 と PD-L2 が協調的に発現亢進していること、PD-L1 と

MFG-E8 は独立して発現亢進していることを示唆する結果を得た。以上のことより、抗がん剤により免疫逃避能を獲得したがん細胞の特徴の一端をとらえることができた。

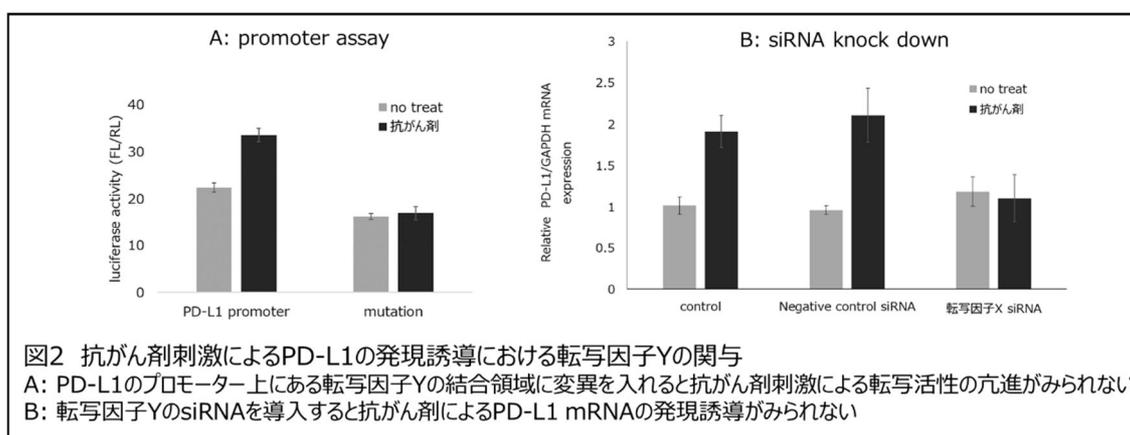
マウス由来がん細胞株を用いた検討では、結腸がん由来 MC38 細胞や乳がん由来 4T1 細胞において抗がん剤刺激により PD-L1, MFG-E8 の発現は上昇したものの、ヒト由来がん細胞株と比べ変化は小さいものだった。



(2)PD-L1 および MFG-E8 のプロモーターアッセイをおこない、抗がん剤刺激に应答する領域を 50 塩基以下の範囲まで絞り込んだ。次にいくつかの転写因子結合モチーフに変異を導入したプロモーターベクターを作成してアッセイすることで、関与する転写因子を推定した(図 2A)。ここで得られた転写因子結合モチーフは、同じファミリーに属する複数の転写因子が共通して結合するものであったため、このファミリーに属する転写因子の siRNA を導入した際の PD-L1, MFG-E8 の mRNA 発現に与える影響を検討した。その結果、転写因子 Y の siRNA を導入した食道がん細胞では PD-L1 mRNA の抗がん剤刺激による発現亢進が抑制され、MFG-E8 mRNA の発現が増強された(図 2B)。次に Chip assay により、転写因子 Y が PD-L1 や MFG-E8 の特定したプロモーター領域に結合していることを確認した。以上のことより、食道がん細胞に抗がん剤刺激がはいると、転写因子 Y が PD-L1 や MFG-E8 のプロモーターに結合することで発現を制御していることが示唆された。

さらに、ヒト乳がん細胞株では、転写因子 Y の siRNA を導入しても PD-L1, MFG-E8 の発現に影響がみられなかったことより、乳がん細胞でみられた抗がん剤刺激による免疫逃避因子の発現制御には転写因子 Y は関与しておらず、食道がん細胞とは別の機構により制御されていることが考えられた。

マウス由来の細胞における抗がん剤による PD-L1, MFG-E8 の発現変化が小さかったことから、担癌マウスモデルを用いた検討を中止し、The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータベース上の RNA シーケンスデータの解析をおこなった。食道がんを含む扁平上皮がんのデータセットを解析した結果、PD-L1 高発現群では転写因子 Y の発現も高く、MFG-E8 高発現群では転写因子 Y の発現が低いということが確かめられた。この結果は、siRNA を用いた実験結果と同様の傾向であり、転写因子 Y の発現量によって PD-L1, MFG-E8 の発現パターンが判別できると考えられた。今後は CRISPR Cas9 による転写因子 Y ノックアウト細胞を作製し、さらなる解析を進める予定である。



本研究の結果より、化学療法により食道がん細胞における免疫逃避因子の発現が上昇し、それには転写因子 Y が関与していることが明らかになった。抗がん剤刺激による PD-L1, MFG-E8 の発現亢進に転写因子 Y が関与しているという報告はなく、新規の知見である。また転写因子 Y は、がん細胞における増殖、生存、浸潤、薬物耐性経路の発現を制御していることが知られており、がん細胞の転写因子 Y を介した総合的防御機構の構成要素として免疫逃避能も含まれていると考えられた。

これらの知見から、治療前のがん組織での転写因子 γ の発現を測定することで、化学療法後の免疫逃避因子の発現パターンが推察でき、化学免疫併用療法の効果予測や治療法選択の一助になることが示唆された。さらに転写因子 γ をターゲットとした薬剤と免疫療法の併用等、がん細胞の総合的防御機構に着目した新規治療戦略に発展していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hitomi Ikeda, Hiroaki Uchida, Yu Okubo, Tomoko Shibata, Yasuhiko Sasaki, Takuma Suzuki, Mika Hamada -Uematsu, Ryota Hamasaki, Kosaku Okuda, Miki Yamaguchi, Masaki Kojima, Masato Tanaka, Hirofumi Hamada, Hideaki Tahara	4. 巻 95
2. 論文標題 Antibody Screening System Using a Herpes Simplex Virus (HSV)-Based Probe To Identify a Novel Target for Receptor-Retargeted Oncolytic HSVs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01766-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01766-20	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 Kanemura Takashi, Miyata Hiroshi, Makino Tomoki, Tanaka Koji, Sugimura Keiji, Hamada-Uematsu Mika, Mizote Yu, Uchida Hiroaki, Miyazaki Yasuhiro, Takahashi Tsuyoshi, Kurokawa Yukinori, Yamasaki Makoto, Wada Hisashi, Nakajima Kiyokazu, Takiguchi Shuji, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Tahara Hideaki	4. 巻 109
2. 論文標題 Immunoregulatory influence of abundant MFG-E8 expression by esophageal cancer treated with chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3393 ~ 3402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13785	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 Suzuki Takuma, Uchida Hiroaki, Shibata Tomoko, Sasaki Yasuhiko, Ikeda Hitomi, Hamada-Uematsu Mika, Hamasaki Ryota, Okuda Kosaku, Yanagi Shigeru, Tahara Hideaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Potent anti-tumor effects of receptor-retargeted syncytial oncolytic herpes simplex virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 265 ~ 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2021.08.002	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1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
研究 分担者	田原 秀晃 (Taharah Hideaki) (70322071)	東京大学・医科学研究所・特任教授 (12601)	
研究 分担者	内田 宏昭 (Uchida Hiroaki) (20401250)	東京大学・医科学研究所・特任准教授 (12601)	

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
---------	---------