

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14893

研究課題名（和文）がん免疫の活性化を伴う新規プログラム細胞死機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of novel programmed cell death pathway which induces antitumor immune activation

研究代表者

鍛代 悠一（Kitai, Yuichi）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90756165

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）：これまでに申請者は抗がん剤であるトポテカンががん免疫を活性化させる内在性分子（DAMPs）のがん細胞からの放出を伴う細胞死を誘導することを明らかにしていた。本研究ではこの細胞死機構の解明を行い、トポテカンによるDAMPsの放出はトポテカンの既知の標的であるTOP1には依存せず、新規標的であるリボソームタンパクRPLXを阻害することで誘導されることが判明した。さらにRPLXのノックダウンはがん細胞からのDAMPsの放出を促進することでがん免疫の活性化を促進し、担がんマウスモデルにおいて抗PD-1抗体による腫瘍抑制効果を増強した。本研究はがん免疫を活性化させる新規標的分子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究より、抗がん剤であるトポテカンは既知の標的であるトポイソメラーゼI以外にも未知の標的が存在することが示唆されていたが、その詳細は不明であった。本研究ではトポテカンの新規標的タンパクを明らかにし、このタンパクを阻害することでがん免疫療法の改良につながることを解明した。今後はこの新規標的タンパクを特異的に阻害する化合物の作成とその評価に取り組むことで、既存のがん免疫療法の治療効果を改善することに挑戦していきたい。

研究成果の概要（英文）：Damage-associated molecular patterns (DAMPs) contribute to antitumor immunity during cancer chemotherapy. We previously demonstrated that topotecan (TPT), a topoisomerase I inhibitor, induces DAMP secretion from cancer cells, which activates STING-mediated antitumor immune responses. However, how TPT induces DAMP secretion in cancer cells is yet to be elucidated. Here, we identified RPLX, a 60S ribosomal protein, as a novel TPT target and showed that TPT inhibited pre-ribosomal subunit formation via its binding to RPLX, resulting in the induction of DAMP-mediated antitumor immune activation independent of TOP1. RPLX knockdown induced DAMP secretion and increased the CTL population but decreased the Treg population in a B16-F10 murine melanoma model, which sensitized B16-F10 tumors against PD-1 blockade. Our study identified a novel TPT target protein and showed that ribosomal stress is a trigger of DAMP secretion, which contributes to antitumor immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 がん免疫 DAMPs

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤はがん細胞の細胞死を誘導し、増殖を抑制することでがんの進行を防ぐが、抗がん剤ががん細胞を殺す際にはプログラム細胞死と呼ばれる細胞の自殺機構が必須であることが知られている。例えば代表的な抗がん剤であるシスプラチンやエトポシドは細胞の DNA 複製を阻害することで、プログラム細胞死の 1 種であるアポトーシスを誘導し、がん細胞の細胞死を促進する。このアポトーシスにはカスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素の活性化が必要であり、カスパーゼを活性化させる薬剤には腫瘍の成長を抑制する効果があることが報告されている (Kotschy et. al., Nature, 2016)。またカスパーゼではなく、RIPK 依存的なプログラム細胞死であるネクロトーシスはがん細胞からの核タンパク質 HMGB1 および ATP の放出を介して免疫細胞の活性化を誘導するため、がん免疫を促進することが知られている。このようにカスパーゼや RIPK などの細胞死を実行する分子およびその制御因子は抗がん剤の薬理標的として有用であるため、プログラム細胞死のメカニズムの解明は創薬にも貢献できると考えられる。

申請者はこれまでに細胞死とがん免疫との関連についての研究を行っており、抗がん剤の 1 種であるトポテカンが上述のアポトーシスなどとは異なる未知のプログラム細胞死を誘導することを発見した (Kitai et. al., Journal of Immunology, 2017)。この未知のプログラム細胞死はアポトーシスやネクロトーシスでは見られない免疫を賦活化させる DNA 内包エクソソームのがん細胞からの放出を誘導する。そしてこの DNA 内包エクソソームは樹状細胞の STING 依存的な自然免疫シグナルを活性化することで細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を介したがん免疫を促進する。そのためトポテカンは未知の細胞死を誘導することで STING 依存的ながん免疫応答を活性化することが明らかとなった。先行研究より、トポテカンはシスプラチンなどと同様に DNA 複製を阻害することでがん細胞の増殖を抑制することが知られているが、トポテカンによる細胞死はカスパーゼや RIPK などに依存しないため、既知のプログラム細胞死とは異なる経路により実行されていると考えられる。しかし、トポテカン誘導性細胞死がどのような機構により実行されるかはまったく不明である。そこで申請者はこの未知の細胞死の誘導に關与する遺伝子を同定することでがん免疫の活性化を伴う新規細胞死機構の解明ができると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではトポテカン誘導性細胞死における細胞死関連遺伝子を同定し、その細胞死機構を明らかにするとともに、同定した遺伝子の活性化が細胞死とそれに伴うがん免疫の誘導を介して腫瘍の成長を阻害するかを担がんマウスモデルを用いて評価する。

3. 研究の方法

(1) Topoisomerase I (TOP1) のトポテカン依存的な細胞死への寄与の検証

ヒト乳がん細胞である MCF7 細胞に Cas-CRISPR system を用いて TOP1 へのフレームシフト変異を導入し、TOP1 ノックアウト (KO) 細胞を作成した。野生型と TOP1 KO MCF7 細胞にトポテカン処理を行った後に Annexin V/PI 染色とフローサイトメトリー解析を行うことでトポテカンによる細胞死が TOP1 依存的であるかを検証した。

(2) 新規トポテカン標的タンパクのスクリーニング

トポテカンは TOP1 依存的な経路と非依存的な経路の両方で細胞死を誘導していることが示唆されたため、新規トポテカン標的タンパクのスクリーニングを行い、TOP1 非依存的なトポテカン細胞死のメカニズムの解明を試みた。スクリーニング方法としてはトポテカン結合ピーズを作成し、細胞抽出液と混合してトポテカン結合タンパクをプルダウンした後にプロテオーム解析を行った。

(3) 新規トポテカン標的タンパクの細胞死と DAMPs 産生への寄与の検証

トポテカンの新規標的タンパクとして同定した RPLX を MCF7 細胞でノックダウンおよび過剰発現させ、トポテカンによる細胞死と DAMPs 産生に RPLX が關与するかを検証した。

(4) 担がんマウスモデルにおける RPLX の阻害によるがん免疫の活性化の検証

RPLX をノックダウンした B16-F10 細胞をマウスに同系移植し、PD-1 抗体を投与した後に腫瘍の体積の測定と腫瘍浸潤リンパ球のフローサイトメトリー解析を行うことで、RPLX 阻害によるがん細胞からの DAMPs 産生が腫瘍微小環境に与える影響とがん免疫の活性化について検証した。

4. 研究成果

(1) トポテカンは TOP1 非依存的に DAMPs 産生を誘導する

既知のトポテカンの標的タンパクである TOP1 がトポテカンによる DAMPs 産生に關与しているか

を検証するため、Cas-CRISPR system を用いて TOP1 にフレームシフト変異を誘導した MCF7 細胞を作成し、トポテカンによる DAMPs 産生を評価した。その結果、野生型と TOP1 欠損 MCF7 細胞において、トポテカンによる DAMPs 産生に有意な差はなかった。またトポテカンによる TOP1 阻害は p53 依存的な DNA ダメージ応答を誘導することが知られているが、MCF7 細胞において p53 を siRNA によりノックダウンした条件においてもトポテカンによる DAMPs 産生に有意な差はなかった。さらに低濃度(0.5 μM)でトポテカン処理を行った場合はトポテカンによる細胞死は TOP1 依存性であるが、高濃度(10 μM)では野生型と TOP1 欠損 MCF7 細胞におけるトポテカンによる細胞死に有意な差はなかった。これらの結果からトポテカンは TOP1 依存的な経路と TOP1 非依存的な経路で細胞死を誘導すること、さらにトポテカンによる DAMPs 産生には TOP1 非依存的な経路が関与していることが示唆された。

(2) 60S リボソームタンパク RPLX は新規トポテカン標的である

トポテカンによる TOP1 非依存的な経路を介した細胞死と DAMPs 産生のメカニズムを解明するため、トポテカン新規標的のスクリーニングを行った。その結果、60S リボソームタンパクである RPLX をトポテカンの新規標的タンパクとして同定した(図1)。この RPLX がトポテカンによる DAMPs 産生および細胞死に関与するかを検証するため、トポテカンに結合しない RPLX の変異体を MCF7 細胞で過剰発現させ、トポテカンによる細胞死と DAMPs 産生を評価した。その結果、RPLX 変異体の発現によりトポテカンによる細胞死と DAMPs 産生は有意に減少した。また RPLX のノックダウンは DAMPs 産生を誘導した。これらの結果から、トポテカンは新規標的である RPLX に結合してその機能を阻害することで、DAMPs 産生を誘導することが示唆された。

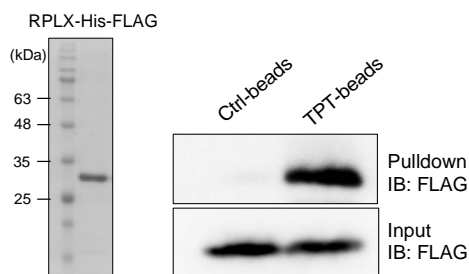


図1 (左) 組み替え RPLX タンパクの CBB 染色
(右) TPT-beads による RPLX-His-FLAG のプルダウン

(3) RPLX の阻害はがん微小環境の変化およびがん免疫の活性化を誘導する

RPLX に対する shRNA を発現する B16-F10 細胞を C57BL/6 マウスに同系移植し、腫瘍の成長および腫瘍浸潤リンパ球の FACS による解析を行った。その結果、RPLX ノックダウンにより腫瘍内の活性化 CD8 陽性 T 細胞の割合は増加し、制御性 T 細胞の割合は低下した。さらに対照の B16-F10 腫瘍は PD-1 抗体に対して抵抗性を示したが、RPLX をノックダウンした B16-F10 腫瘍は PD-1 抗体に感受性を示し、腫瘍の成長が大きく減弱した(図2)。これらの結果から RPLX の阻害は DAMPs 産生の誘導を介して腫瘍微小環境を変化させるとともに、PD-1 抗体に代表されるがん免疫療法の効果を改善させることが示唆された。

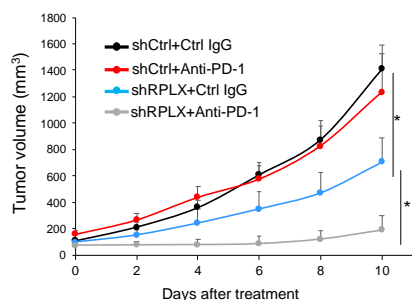


図2. shRPLX 発現 B16-F10 細胞の腫瘍成長
B16-F10 細胞を移植 11 日後から PD-1 抗体を 2 回腹腔注にて投与した(Day 0, 6)

本研究では抗がん剤であるトポテカンの新規標的を同定するとともに、リボソームタンパクの阻害によるリボソームストレスが DAMPs 産生を誘導するトリガーとなること、さらにそれによるがん免疫の活性化が誘導されることを明らかにした。これらの結果を発展させ、今後は TOP1 を阻害せずに RPLX を特異的に阻害する化合物を開発することでがん免疫療法の治療効果の向上に貢献できると考えられる。

引用文献

Kitai et al., (2017) DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J Immunol.* 198, 1649-1659.

Kotschy et. al., (2016) The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477-482.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitai Yuichi, Ishiura Marie, Saitoh Kodai, Matsumoto Naoki, Owashi Kimiya, Yamada Shunsuke, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 33
2. 論文標題 CD47 promotes T-cell lymphoma metastasis by up-regulating AKAP13-mediated RhoA activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab002	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yamada S., Kitai Y., Matsuda T.
2. 発表標題 RPLA, 60S ribosomal protein, is a novel topotecan target protein that correlates with DAMPs secretion and antitumor immune activation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
---------	---------