

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08399

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント・タンパク質PD-L1を分子標的とした新規免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of New immunotherapy targetting immune check protein, PD-L1

研究代表者

谷田 諭史 (Tanida, Satoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：30528782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：programmed death-ligand(PD-L)1は、がん細胞膜蛋白であり、この分子の細胞外ドメインを標的とした抗体療法が固形がんに臨床応用されて始めている。しかし、PD-L1の細胞膜への発現を抑制する化合物は、未だなく、PD-L1の細胞膜発現機序の探索は、がん治療戦略を考えるうえで極めて重要である。最近我々は、Cullin3(CUL3) E3ユビキチンリガーゼ複合体に結合するBTB結合蛋白(BTBP)が ANKFY1であることを発見し、CUL3-ANKFY1 E3ユビキチンリガーゼ複合体が結合する基質Rab5をユビキチン化することで、PD-L1の発現を制御している事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CUL3-ANKFY1 E3ユビキチンリガーゼ複合体の基質の探索研究やAlphascreen systemを用いた ANKFY1-基質結合阻害薬の探索スクリーニングは、これまでにない全く新しい取り組みであり、国内外での報告はない。また、得られた阻害薬によりPD-L1細胞膜輸送を抑制し細胞膜上の発現を減らすことができれば、自己免疫疾患の治療薬につながる可能性もある。本研究で得られた成果は世界をリードするものであり、今後さらなる展開が期待される分野である。

研究成果の概要(英文)：The mechanism on trafficking of programmed death-ligand(PD-L)1 into cell membrane remains unknown. We discover that BTB binding protein associated with Cullin3(CUL3) E3 ubiquitination ligase is ANKFY1, and that site-specific monoubiquitination of Rab5 by CUL3-ANKFY1 complex regulates the trafficking of PD-L1 into cell membrane.

研究分野：消化器内科

キーワード：PD-L1 Cullin3 E3ユビキチンリガーゼ 細胞内輸送メカニズム

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、T細胞による免疫の攻撃を無力化させ、回避することにより、がん免疫反応に抵抗することができる。がん細胞膜蛋白質 programmed death-ligand (PD-L) 1は、T細胞膜に発現する programmed death (PD) 1と結合することにより、細胞傷害性T細胞の細胞傷害作用を抑制させ、「がんの免疫逃避機構」を誘導する。最近、この両者の結合を阻害する抗 PD-L1 抗体薬が登場し、皮膚メルケル細胞がんや非小細胞肺癌といった固形がんに対して有効性を発揮し、臨床応用され始めている。しかしこの治療法は、制御性 T細胞の機能まで抑制することから、自己免疫様疾患を誘導する危険性ははらむ諸刃の剣である。また、抗体治療は、抗製剤抗体の発現による効果減弱することも知られている。これらは、抗 PD-L1 抗体薬がもつ問題点であり、克服することが我々に課された最重要課題である。また、切除不能な進行・再発の消化器がん罹患患者数も非常に多い。これらの問題点を克服するためには、消化器がん細胞での PD-L1 蛋白質の発現メカニズムを明らかにすることが必要不可欠である。

PD-L1の細胞膜発現メカニズムは、どのようなものなのか？さらに、低分子化合物による PD-L1の細胞膜発現を抑制することは可能なのか？そこを明らかにしたい。

申請者らは、この問いに答えるため、これまでに ZnF-BTB 蛋白質の一つである BAZF が、BTB ドメインを介して CUL3 と複合体を形成し、CUL3 E3 ユビキチンリガーゼとして機能することを見出してきた (*Blood* 2012, *Angiogenesis*. 2013)。

図1に示す様に、CUL3はBTB結合蛋白質(BTBP)をリンカーとして結合し、これに基質を結合させる。すなわち、CUL3はBTBPを組み替えることで幅広く基質を認識し、これをユビキチン化し、分解や機能変換等の制御に深く関わるプラットフォームタンパク質である。この CUL3 システムは、angiogenesis に重要な役割を果たす膜蛋白インテグリンβ1の細胞膜への輸送を制御する。これにかかわる

BTBPが、ANKFY1であることを発見した (*Biology open* 2017)。ヒト BTBP 遺伝子は183種が報告されている。これまでに申請者らが PD-L1 蛋白質発現を抑制する BTBP に関して得ている知見は、データベース検索から既に取得した各種消化器がん細胞での BTBP 遺伝子発現情報を基に BTBP 遺伝子を絞り込み、siRNA スクリーニングし、さらに CUL3 ノックダウンと同等に PD-L1 細胞膜発現を抑制する BTBP を網羅的に調査した結果、PD-L1の細胞内膜輸送を制御する CUL3 パートナーBTBPは、ANKFY1であったことを新たに見出している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CUL3-ANKFY1 E3 ユビキチンリガーゼの基質は、細胞内輸送関連分子 (SNX, Rab など)の小胞体での合成後細胞膜上の発現までの移動経路(trafficking)に関与している(図2)と仮説を立て、①CUL3-ANKFY1 E3 ユビキチンリガーゼの基質の探索、②CUL3-ANKFY1 複合体が PD-L1 の発

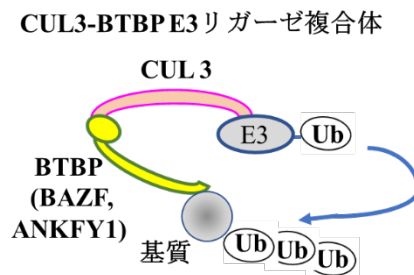


図1:BTBPは、ヒト遺伝子で183種が報告されている。

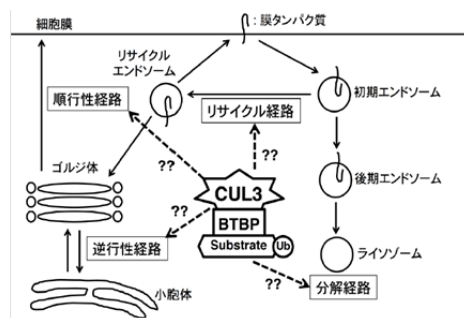


図2 CUL3は膜蛋白質の細胞内膜輸送を制御する(仮説)

現に関与する生体機能を解析することで、ヒト消化器がん細胞ではこれまで全く明らかにされていない CUL3 依存的ながん免疫制御機能を分子レベルで解明することである。

### 3. 研究の方法

#### **PD-L1 の細胞内膜輸送を制御する CUL3-ANKFY1 の基質探索**

CUL3-ANKFY1 の基質の同定は、本申請課題の最重要課題である。各種培養消化器がん細胞株において、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ変異体(Ascorbate Peroxidase 2, APEX2) (*Nature Methods* 2015)を用いた生細胞での in vivo ビオチン標識法を行う。具体的には APEX2 遺伝子を、目的とする ANKFY1 遺伝子に融合し、APEX2-ANKFY1 遺伝子を作成する、これをがん細胞株に一過性に発現させる。発現が確認できた細胞に Biotin-phenol を添加することで、これが APEX2 により活性化され、APEX2-ANKFY1 蛋白質に結合する蛋白質を標識する。この標識法は、APEX2 蛋白質の 300nm 内近傍の蛋白質のみをビオチン標識でき、標識蛋白質は、細胞を可溶化後、ストレプトアビジンビーズで回収、質量分析により蛋白質を同定する。

#### **CUL3-ANKFY1 の基質欠失時の PD-L1 の細胞内膜輸送阻害効果の検証**

PD-L1 蛋白質輸送システムのイメージング解析による PD-L1 蛋白局在の確認

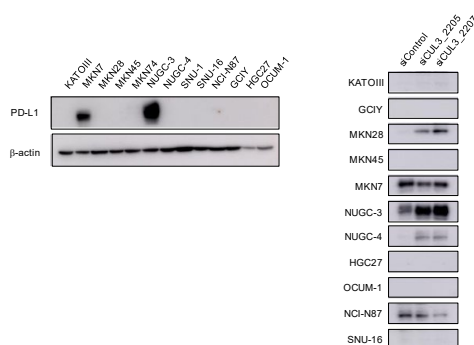
各種細胞株に CUL3 siRNA や ANKFY1 siRNA オリゴまたは、コントロールオリゴ (Thermo Fisher Scientific)をトランスフェクション施し、CUL3 や ANKFY1 欠失させたあと、95%エタノール、30 分間(-20℃)固定し、そのあとアセトン(-20℃)1 分常温でインキュベーションしたあと、蛍光標識した PD-L1 抗体(abcam) 4℃で処置した後、37℃で細胞膜から細胞内への輸送系を Confocal microscope にて観察、写真撮影する。また、細胞内に取り込ませた蛍光標識 PD-L1 抗体で処置した後、細胞内から細胞膜へのリサイクル経路も併せて PD-L1 蛋白の動的变化を観察する。

### 4. 研究成果

①各種胃癌細胞株(KATOIII, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, NUGC-3, NUGC-4, SNU-1, SNU-16, NCI-N87, GCIY, HGC27, OCUM-1) における PD-L1 発現レベルを確認し、PD-L1 の細胞内膜輸送実験に適する細胞株を決定する。また、CUL3siRNA で PD-L1 発現レベルが変化する細胞株を検索した。

右図のように MKN7, NUGC-3 細胞株では、constitutive に PD-L1 が発現されている。さらに NUGC-3 細胞株では、CUL3siRNA で PD-L1 発現レベルが大きく変化することを確認できた。

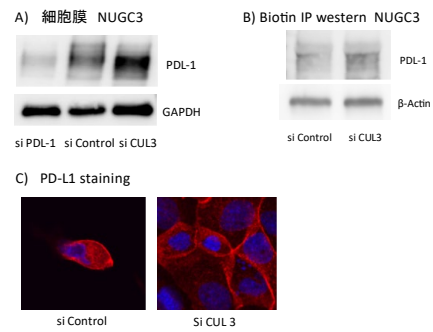
PD-L1 expression in stomach carcinoma cell lines



以降の実験は、NUGC-3 細胞株で行うこととした。

②次に、NUGC-3 細胞株において、CUL3 siRNA 前処置時細胞核、細胞質、細胞膜のどの部位に PD-L1 発現が多くなるかを whole cell fraction ウェスタン解析したところ細胞核、細胞質、細胞膜各部位で発現増加し、Biotin 処置後 IP ウェスタン解析、細胞免疫染

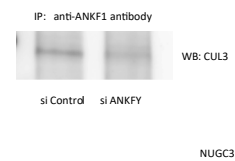
色では、CUL3siRNA 前処置により、細胞膜の PD-L1 発現が増強されることが確認できた。つまり、CUL3 を欠失させると、PD-L1 発現が増加し、細胞膜に移行することが明らかになった。



③次に、NUGC-3 細胞株において、PD-L1 siRNA 前処置により細胞質、細胞膜での PD-L1 発現が完全に欠失されることを細胞免疫染色で確認した。

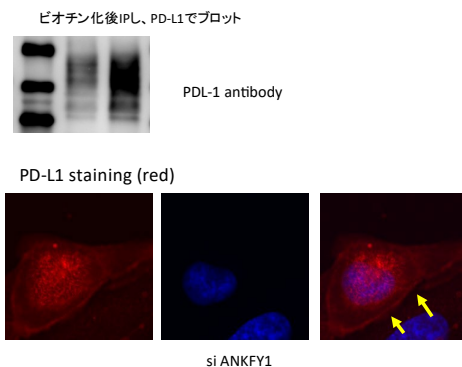
④次に NUGC-3 細胞株において、CUL3 と ANKFY1 の結合を抗 ANKFY1 抗体で免疫沈降し、CUL3 ウェスタン解析した。CUL3 と ANKFY1 の結合を確認できた。

Association of ANKFY1 with CUL3

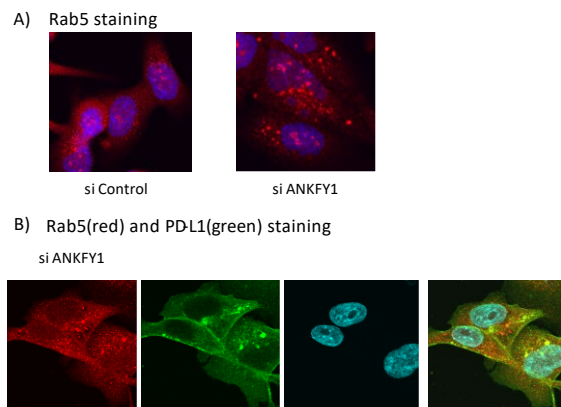


⑤次に、NUGC-3 細胞株において、ANKFY1 siRNA にて ANKFY1 欠失させ Biotin 処置後 IP ウェスタン解析により PD-L1 発現は、細胞膜に増強されていることを確認し、細胞免疫染色でも細胞核、細胞膜に強発現していることを確認した。

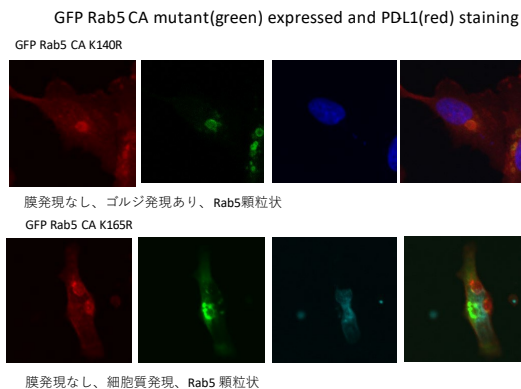
ANKFY1 siRNA Biotin immunoprecipitation PD-L1 blot



⑥次にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ変異体(Ascorbate Peroxidase 2, APEX2) (*Nature Methods* 2015)を用いた生細胞での in vivo ビオチン標識法にて CUL3-ANKFY1 E3 ユビキチンリガーゼの基質が、Rab5 であることを見出した。さらに、ANKFY1 siRNA にて ANKFY1 欠失させ、細胞免疫二重染色で Rab5 および PD-L1 の発現を確認した。Rab5 は、細胞質に凝集しドット状に凝集した。PD-L1 も凝集しドット状に存在し Rab5 と共局在していることが明らかになった。PD-L1 の細胞膜発現は抑制しなかった。



⑦CUL3-ANKFY1 E3 ユビキチンリガーゼの基質 Rab5 は、上記の図 1 で示したようにモノユビキチン化されると Rab5 は蛋白機能低下することが明らかになっている(eLife. 2017;6:e29154)。そこで Rab5 のモノユビキチン化部位(K140、K165)に変異を入れ、ユビキチン化を阻害する Rab5 CA(強発現) 遺伝子の変異体 K140R、K165R プラスミドを作成し、遺伝子導入し細胞免疫二重染色で Rab5 および PD-L1 の発現を確認した。Rab5 K140R、K165R の変異体遺伝子導入により、Rab5 は細胞質内に凝集し、PD-L1 の細胞内移行は阻害され、細胞膜での発現は抑制され認めなかった。



**結果のまとめ:**Rab5のモノユビキチン化部位(K140、K165)に変異を入れ、CUL3-ANKFY1 E3 ユビキチンリガーゼによる Rab5 のユビキチン化が抑制されると、Rab5 は細胞質内に凝集し塊として存在した。そして、PD-L1 の細胞内移行は阻害され、PD-L1 の細胞膜での発現は抑制された。

**結論:** CUL3-ANKFY1-Rab5 複合体は、CUL3 E3 ユビキチンリガーゼによる Rab5 のモノユビキチン化を介して PD-L1 の細胞内移行、細胞膜発現を調節し重要な役割を果たす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0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	前川 大志  (Maekawa Masashi)  (10771917)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師    (32612)	

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