

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09179

研究課題名（和文）肺癌における新規PD-L1発現調節機構とその免疫回避としての役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a Novel Mechanism Regulating PD-L1 Expression in Lung Cancer and Its Role in Immune Evasion

研究代表者

佐野 由文（Sano, Yoshifumi）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60322228

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）：免疫チェックポイント阻害薬の治療効果と肺がん組織におけるPD-L1の発現量には正の相関があり、肺癌細胞におけるPD-L1の発現制御機構が注目されている。本研究では、NEDD8阻害剤であるMLN4924を用いて、PD-L1発現制御を司るNEDD8修飾依存的に活性化されるPD-L1転写因子を同定し、肺癌細胞におけるPD-L1の新規発現制御メカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。その結果、MLN4924は肺癌細胞における解糖系を亢進させ、従来報告されているインターフェロン依存的なPD-L1発現亢進カスケードとは異なる新規のシグナルを介してPD-L1の発現制御を担うことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた研究成果は、癌免疫チェックポイント阻害療法で最も重要な肺癌細胞におけるPD-L1の発現制御メカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後の肺がん治療にとって重要なエビデンスとなる。PD-L1の発現量を自在に制御できる手法が開発できると、癌免疫チェックポイント阻害剤を用いた肺がん治療の効率向上が期待でき、今後の臨床研究に大きくつながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There is a positive correlation between the therapeutic effect of immune checkpoint inhibitors and the expression level of PD-L1 in lung cancer tissues. Unveiling the mechanism regulating PD-L1 expression in lung cancer cells is crucial for establishing effective therapeutic methods. In this study, we used MLN4924, a NEDD8 modification inhibitor, to identify PD-L1 transcription factors activated in a NEDD8 modification-dependent manner, which regulate PD-L1 expression. As a result, we found that MLN4924 enhances glycolysis in lung cancer cells and regulates PD-L1 expression through a novel signaling pathway distinct from the previously reported interferon-dependent PD-L1 expression enhancement cascade.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺がん 癌免疫チェックポイント阻害剤 PD-L1 NEDD8

1. 研究開始当初の背景

肺癌細胞に対する治療法の一つとして、免疫チェックポイント阻害剤オプジーボが臨床で用いられる。オプジーボは、とりわけ非小細胞肺癌 (NSCLC) などのがん治療に効果を発揮することが知られる。その作用機序は下記の通りである。免疫チェックポイント阻害剤は T 細胞に発現する PD-1 (Programmed Death-1) 受容体を標的として結合することで、がん細胞に発現する PD-1 リガンドである PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) および PD-L2 との結合を特異的に阻害する。通常、肺癌細胞に発現する PD-L1 は、T 細胞に発現する PD-1 と結合すると、T 細胞の機能を抑制するため、オプジーボはその結合を阻害することで T 細胞を再び活性化させて免疫応答を強化し、抗癌効果を発揮すると言われている。これまでの免疫チェックポイント阻害薬を用いた臨床研究では、オプジーボ治療効果と PD-L1 の組織発現量が相関するとの報告があり、肺癌細胞における PD-L1 の発現制御メカニズムが注目されている。本研究では、PD-L1 発現制御を司る NEDD8 修飾依存的に活性化する PD-L1 転写因子とその詳細な分子機序の解明を目指すとともに、腫瘍の免疫回避機構における NEDD8 活性の役割を明らかにすることを目的として研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、NEDD8 を基軸とする PD-1/PD-L1 シグナルバランススイッチを解明し、肺癌の免疫回避機構における NEDD8 シグナルの臨床学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

実験には、肺癌細胞株 HC827 を中心にその他 20 種類の肺癌細胞株 (ATCC 社製) を用いて実験した。それぞれの細胞は、10% ウシ胎血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wako 社製) にて CO₂ インキュベーター内にて培養・維持した。なお、本研究で用いた NEDD8 化阻害剤は BostonBiochem 社製の MLN4924 を用いた。PD-L1 のタンパク質発現量については、Western blotting 解析 (Image Quant LAS4010) によって定量解析した。さらに PD-L1 の mRNA レベルについてはリアルタイム PCR 法を用いて定量化した。さらに、ルシフェラーゼプロモーターアッセイによって、PD-L1 のプロモーター活性を測定した (GloMax-96 Microplate Luminometer (Promega 社製))。また、解糖系代謝を定量するために Agilent Technologies 社製の細胞外フラックスアナライザーを用いて評価し、グルコースの細胞内取り込み阻害については Phloretin (CAYMAN 社製) を用いて評価した。免疫組織化学染色については 3,3'-diaminobenzidine 法を用いて評価した。

4. 研究成果

がん細胞における PD-L1 発現制御機構の NEDD8 化の役割

腫瘍における PD-L1 の発現量が高い患者においては免疫チェックポイント阻害剤の治療有効性が高いが、PD-L1 の発現量が低い、もしくは発現していない患者では治療有効性が低いことが報告されており (N Engl J Med 2015 Oct 22;373(17):1627-39.) PD-L1 発現量とがん免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療効果には正の相関があることが分かっている。これまで我々は NEDD8 化阻害剤として知られる MLN4924 が肺癌細胞株において PD-L1 の発現を mRNA レベルで亢進させることを突き止めてきた。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。最初に我々は、PD-L1 の発現量を規定する NEDD8 化下流の責任シグナルを特定するために、MLN4924 処理した肺腺癌細胞株である HCC827 で機能亢進するシグナルカスケードを調べたところ、MLN4924 処理によって HCC827 細胞の解糖系代謝の亢進が起こることを発見した。MLN4924 処理に伴う解糖系の代謝亢進はすでに他の細胞株で報告されているが (JCI Insight. 2019 Feb 21;4(4):e121582.) 我々は肺癌細胞株においても同様に MLN4924 処理により解糖系が亢進することを発見した。すなわち、MLN4924 処理に伴って発現亢進する PD-L1 の制御メカニズムには糖代謝が深く関与しており、糖代謝制御タンパク質の関与が強く示唆された。実際、MLN4924 処理に伴う糖代謝の亢進に対して Phloretin を用いて阻害すると、PD-L1 の発現亢進がレスキューされた。現在は、糖代謝異常と PD-L1 の発現レベルとの相関性について肺癌臨床検体を用いた解析を進めている。

MLN4924 処理に伴う PD-L1 発現亢進に関わる中心的制御因子

MLN4924 は NEDD8 Activating Enzyme E1 Subunit 1 (NAE1) の阻害剤として開発された薬剤である (Nature. 2009 Apr 9;458(7239):732-6.)。そこで、NAE1 を発現抑制することで PD-L1 の発現亢進がレスキューされることを確認するために、NAE1 に対する siRNA を用いて解析したところ、MLN4924 依存的な PD-L1 の発現亢進は、NAE1 の発現枯渇によってレスキューされなかった。つまり、MLN4924 依存的な PD-L1 の発現亢進は、標的タンパク質の NEDD8 化による制御ではなく MLN4924 の薬剤単独による PD-L1 転写制御機構である可能性が強く示唆された。

MLN4924 依存的な PD-L1 転写制御メカニズムの解析

これまでの実験から MLN4924 は糖代謝を亢進させ、さらに NAE1 を介さない新規経路を通じて PD-L1 の転写活性を亢進させることが示唆された。そこで我々はこの仮説を証明するために、ルシフェラーゼプロモーターアッセイを実施し、PD-L1 のプロモーター活性が MLN4924 によって制御されることを検証した。従来、PD-L1 は IFN- γ によって発現誘導されることがわかっているため、当該分子を positive control として用いて PD-L1 に対するルシフェラーゼプロモーターアッセイを実施した。本プロモーターアッセイには、PD-L1 の転写活性を担うプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子からなるコンストラクトを用いて評価した。その結果、PD-L1 のプロモーター活性は IFN- γ によって強く誘導されたが、MLN4924 に対しては強い誘導活性を示さなかった。つまり、MLN4924 に対する PD-L1 発現応答性の亢進は、従来報告されている IFN- γ 依存的な経路ではなく、これまで知られていない新しい経路を介して PD-L1 の mRNA レベルを制御している可能性が高いことがわかった。

PD-L1 が発現亢進する肺癌種の探索

MLN4924 は HCC827 肺腺癌細胞株において MLN4924 の発現レベルを亢進させる活性を有する。この MLN4924 による PD-L1 の発現亢進は、HCC827 に限定されず、幅広い肺癌種で認められることを確認するために、20 種類の肺癌細胞株を用いて解析を実施した (肺腺癌細胞株、扁平上皮系肺癌細胞株など)。その結果、MLN4924 依存的な PD-L1 の発現亢進は解析したほぼ全てのがん細胞で観察された。これらの細胞種には TP53 や EGFR に対する様々なドライバー変異を有することがわかっているが、変異種類に依存せず、MLN4924 は共通して PD-L1 の発現を亢進させる活性があることがわかった。現在は、これらの癌種の中から MLN4924 による PD-L1 の発現亢進が糖代謝依存的であるかについて検討を重ねている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 坂尾伸彦、坂上倫久、藻利優、桐山洋介、大谷真二、岡崎幹生、豊岡伸一、佐野由文
2. 発表標題 タンパク質翻訳後修飾を介した肺癌細胞PD-L1の新たな発現制御機構
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 医学部 心臓血管呼吸器外科学HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/
--

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	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師（特定教員） (16301)	
研究分担者	岡崎 幹生 (Okazaki Mikio) (50467750)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	

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