

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16301

研究課題名(和文)新規がん遺伝子G9aによる腫瘍免疫制御機構の解明と治療標的としての応用

研究課題名(英文)Elucidation of tumor immune regulatory mechanism by histone methyltransferase G9a and its application as a therapeutic target

研究代表者

加藤 真一郎(Kato, Shinichiro)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：40751417

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):免疫チェックポイント阻害剤(Immune Checkpoint Blockade:ICB)は、その劇的な治療効果から現代がん治療に革新をもたらしたが、奏効率は限定的である。本研究課題では、我々が見出してきたがん遺伝子「ヒストンメチル化酵素G9a」に着目し、がん細胞の形質変化そのものだけでなく、G9aが腫瘍内の抗腫瘍免疫系に及ぼす影響についても検討を行うことで、免疫回避機構を介した腫瘍悪性化機構の一端を明らかにした。これらの成果に基づき、G9aによる発がんおよび腫瘍免疫制御機構を統合的に理解し、治療標的分子としてのG9aの可能性を提示することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、さまざまながん種においてICB単剤もしくは多剤併用による臨床試験が進められていることから、ICBを代表とするがん免疫療法に対する期待の高さが伺える。ところが、実際にその恩恵は一部のがん種、がん患者に限定されており、治療抵抗性・耐性化の分子基盤の解明が社会的にも強く求められている。本研究成果により、がん細胞のエピゲノムランドスケープが腫瘍免疫環境に影響を及ぼすという学術的新規性に加えて、特定のがん細胞における免疫回避およびICB抵抗性がG9aにより制御されることが明らかにされたことから、治療抵抗性の克服に向けた重要な知見が提供された。

研究成果の概要(英文):Immune Checkpoint Blockade(ICB) has revolutionized cancer therapy with its extraordinary therapeutic effects, but the response rate is limited except for some patients with certain cancer harboring high mutation burdens. Here, we focused on an oncogene called histone methyltransferase G9a, which we have discovered in cutaneous melanoma, and investigated the role of G9a not only in the malignant transformation but also in the anti-tumor immune system in tumors to comprehensively figure out the mechanism of tumor malignant development via immune evasion. We have provided a mechanistic insight into tumorigenesis and tumor immune regulation by G9a and its potential as a therapeutic target in combination with or without ICB in melanoma and other tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は長い歴史を持つが、CTLA-4 や PD-1 等の免疫応答を負に調節する免疫チェックポイント分子の発見と、それに引き続く免疫チェックポイント阻害剤 (Immune Checkpoint Blockade: ICB) の開発・成功により近年大きな発展を遂げた。ところが、同じ治療を受けた同じがん種の患者でも、ICB による臨床効果が得られる症例と全く得られない症例が存在する。例えば、悪性黒色腫 (メラノーマ) はこうした ICB 治療により近年劇的に治療成績が向上した (5 年生存率: 46%) 代表的ながん種の 1 つであるが、一定の患者では ICB 抵抗性に直接関与しうるような明らかな遺伝子変異 (e.g., *B2M*) がなく、ゲノム・遺伝子異常の枠組みだけでは説明が困難な治療抵抗性メカニズムが示唆されている。したがって、がん細胞の表現型やその背後にあるエピゲノム制御機構がどのようにがん免疫療法の治療効果を決定づけるのか、を明らかにすることでがん免疫療法に対する治療抵抗性の理解、次世代がん免疫療法に資する研究開発の加速化が期待される。

これまでの研究代表者の研究成果から、悪性黒色腫を始め複数の固形腫瘍においてヒストンメチル化酵素 G9a のコピー数および発現量の亢進が認められ、WNT シグナルを介した発がん・悪性化進展が助長されることが示唆されてきた。近年、WNT/ β -catenin に代表されるがん遺伝子や下流のシグナルが腫瘍免疫を抑制することによって発がんを促進していることが報告されており、Cell-Autonomous と Non-Cell-Autonomous な機能の両方が発がんのプロセスに必要であると考えられている。つまり、G9a の高発現・活性化に伴うエピジェネティックランドスケープの制御異常および転写制御およびネットワークの変化が、がん細胞自身の直接的な形質転換に加えて、腫瘍内免疫細胞にも間接的に働きかけることで、がんの発症や悪性化進展が相乗的に促されると考えられる。つまり、G9a によるエピジェネティックランドスケープの全容解明と、がん組織を構成するがん細胞と免疫細胞、双方の包括的理解が必要不可欠である。

2. 研究の目的

我々の予備的知見に基づき、本研究課題では、がんの発症および悪性化進展に重要なエピゲノム制御因子としてヒストンメチル化酵素 G9a に着目し、これら分子基盤の包括的解明を目指す。特に、がん細胞の形質変化そのものだけではなく、G9a が腫瘍内の抗腫瘍免疫系に及ぼす影響についても検討を行い、免疫回避機構を介した腫瘍悪性化への関与を明らかにする。がん細胞と免疫細胞の 2 つの視点から、G9a による発がんおよび腫瘍免疫制御機構を統合的に理解し、G9a を標的とした新規治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

上記背景およびこれまでの研究成果をもとに、(1) G9a と腫瘍免疫応答性の相関解析 (2) 悪性黒色腫および他癌腫のがん細胞の G9a が腫瘍内免疫細胞に及ぼす質、量的な影響および (3) そのメカニズムを明らかにする。また、(4) G9a 阻害剤と ICB の併用効果を *in vivo* モデルにおいて検証する。

(1) G9a と腫瘍免疫応答性の相関解析

G9a と腫瘍免疫との関連性を検証するため、臨床データを用いて、G9a の発現量と腫瘍内免疫細胞の相関性および ICB への感受性を解析する。さらに、これら解析結果の実験的検証に向けて、13 種類のマウスがん細胞株を用いて、G9a の発現量と ICB (抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体) への感受性を評価することで、純系マウスを用いた実験モデルとして適切な細胞株を選定する。

(2) G9a が腫瘍内免疫細胞に及ぼす質、量的な影響

(1) にて解析したマウスがん細胞株のうち、G9a の発現レベルが高く、免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示す細胞株を用いて、ドキシサイクリン誘導性に G9a をノックアウト可能な細胞実験系を確立する。G9a ノックアウトもしくは G9a 阻害剤を用いて、*in vitro* および *in vivo* における腫瘍増殖能の変化を比較検討することで、免疫系を介した腫瘍増殖能への関与を検証する。また、G9a 阻害による免疫細胞の量的変化を蛍光免疫染色によって評価する。

(3) G9a が腫瘍内免疫細胞を制御するメカニズム

G9a はヒストン H3 の 9 番目のリシンをモノメチル化、メチル化 (H3K9me1/2) することによって、転写を正負に制御しているため、直接的もしくは間接的にこれらの遺伝子群を制御し、腫瘍内の免疫微小環境に影響を及ぼすと考えられる。G9a による遺伝子発現制御機構を明らかにするために、(1) および (2) で確立したマウスがん細胞実験系を用いて、RNA-seq、G9a ChIP-seq、H3K9me2 ChIP-seq を行う。

(4) G9a 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果

G9a 阻害剤 UNC0642 と抗 PD-1 抗体の併用が、*in vivo* におけるがん細胞の増殖能、マウスの長期的生存率に及ぼす影響を検証する。

4. 研究成果

(1) G9a と腫瘍免疫応答性の相関解析

ヒト悪性黒色腫における我々の解析から、G9a および H3K9me2 を高発現する悪性黒色腫細胞は、G9a に高い依存性を示すことを明らかにしている (Kato S et al, *Cancer Discovery*, 2020, PMID: 32269030)。The Cancer Genome Atlas (TCGA) の悪性黒色腫患者データセットを用いて、『G9a/EHMT2 の遺伝子コピー数および発現量』と『腫瘍内に浸潤する細胞傷害性 T 細胞のシグネチャー』の相関性を解析したところ、両者には優位な負の相関性が存在することが明らかになった。さらに、G9a 発現量と ICB (抗 PD-1 抗体: Hugo W et al, *Cell*, 2016; Riaz N et al, *Cell*, 2017、抗 CTLA-4 抗体: Van Allen EM et al, *Science*, 2015) への感受性を解析した結果、G9a を高発現する悪性黒色腫患者は、G9a 低発現患者に比べて ICB の治療効果が著しく低いことが示された (抗 PD-1 抗体: $p=0.061$ 、抗 CTLA-4 抗体: $p=0.0445$ by logrank test)。以上のことから、悪性黒色腫において G9a とがん免疫応答性 (特に、CD8⁺T 細胞を介した抗腫瘍免疫) との臨床的関連性が示唆された。さらに、他癌腫の TCGA データセット (肺癌、大腸癌、神経膠腫、膵癌、肉腫) においても G9a/EHMT2 と CD8A の遺伝子発現量にも優位な負の相関性を認めていることから、G9a によるがん免疫応答制御はがん種を越えて保存されている可能性も考えられた。

続いて、これらの臨床的知見における因果関係の検証に向けて、ICB への感受性が異なる 13 種類のマウスがん細胞株を用いて、G9a と H3K9me2 の発現レベルをウェスタンブロットで検証した。これらのマウスがん細胞株における G9a 発現量と抗 PD-1 抗体への感受性の相関性を解析したところ、G9a 低発現がん細胞株 (B16-F10、D4M、D4M-UV2、D4M-UV3、MC38、GL261) に比べて、G9a 高発現がん細胞株 (B16、B16-F1、LLC、4T1、EMT6) は抗 PD-1 抗体に抵抗性を示すことが明らかになった ($p=0.0126$ by Fisher's exact test)。以上のことから、臨床データ及びマウスがん細胞株において、G9a 発現量と ICB 感受性の間には一貫した相関性が認められたと言える。そこで以降の実験では、抗 PD-1 抗体抵抗性を持つ G9a 高発現がん細胞株 B16-F1、LLC、EMT6 に加えて、実験的なコントロールとして抗 PD-1 抗体抵抗性を持つ G9a 低発現がん細胞株 CT26 を中心的に用いることとした。

(2) G9a が腫瘍内免疫細胞に及ぼす質、量的な影響

G9a が腫瘍免疫系に及ぼす影響を検証するために、B16-F1、LLC、EMT6 及び CT26 において、ドキシサイクリン誘導性に Cas9 を発現する細胞株を樹立した。特に、pXPR_011 を用いた EGFP レポーターアッセイにより、Cas9 の活性が高いシングルクローンを複数取得することに成功し、ドキシサイクリン誘導性に G9a をノックアウト可能な細胞実験系を構築した。

さらに G9a ノックアウト及び G9a 阻害剤 UNC0642 を用いて、*in vitro*、*in vivo* 増殖能に及ぼす影響を評価したところ、これら 4 つの細胞株においては *in vitro*、*in vivo* 細胞増殖に有意な影響を及ぼさないことが明らかになった。しかしながら、UNC0642 投与によって、B16-F1 及び LLC 腫瘍内の H3K9me2 低下に伴って浸潤する CD8⁺T 細胞数が増加することから、G9a がいわゆる「cold」な腫瘍微小環境を形成することが示唆された。またゼブラフィッシュ悪性黒色腫モデル (Caufman CK et al, *Science*, 2016) に機能獲得型 G9a を遺伝子導入すると、悪性黒色腫の発生が促進させることに加えて (Kato S et al, *Cancer Discovery*, 2020)、腫瘍組織内における *cd8a*、*gzma*、*prfl.1* などの細胞傷害性 T 細胞関連遺伝子の発現が低下することも明らかになった。これらのことから、G9a は発がん初期の免疫逃避のみならず、その後は免疫寛容に寄与する可能性が推察された。したがって、G9a 阻害剤にて腫瘍微小環境の改善しておくことで、ICB による抗腫瘍免疫応答 (=免疫監視の再起動) による治療効果が期待される。

(3) G9a が腫瘍内免疫細胞を制御するメカニズム

G9a が腫瘍免疫系を制御する分子基盤の解明に向けて、マウス悪性黒色腫細胞化ぶ B16-F1 にて G9a 阻害剤処理後に RNA-seq を行ったところ、免疫応答関連遺伝子や炎症関連遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった (e.g., GO:0060337~type I interferon signaling pathway、GO:0002504~antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II、GO:0019882~antigen processing and presentation、GO:0060333~interferon-gamma-mediated signaling pathway、GO:0051092~positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity、GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway)。さらに、これら遺伝子の発現制御が G9a 及び H3K9 メチル化によって直接制御されるかどうかを検証する目的で、G9a ChIP-seq 及び H3K9me2 ChIP-seq を行ったところ、STAT1、STAT2 のような JAK-STAT 経路の重要なメディエーターのみならず、CXCL1、CXCL3、CXCL11 などのケモカイン遺伝子のプロモーター領域に G9a 及び H3K9me2 ピークが存在することが明らかになった。また、RNA-seq の結果と統合すると、これらの免疫関連遺伝子は G9a 阻害剤によって発現誘導されることから、G9a が H3K9me2 を介して発現抑制しているものと考えられた。したがって、G9a は WNT シグナルを介した間接的な腫瘍免疫抑制機構だけではなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御によって腫瘍免疫

系を制御するという直接的な分子機構を有する可能性が見出された。以上のことから、G9aによるエピジェネティックランドスケープと腫瘍免疫調節機構の全容解明に向けて確かな進捗を遂げたと言える。

(4) G9a 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果

G9a 阻害剤 UNC0642 と抗 PD-1 抗体の併用効果を検証するため、まずマウス悪性黒色腫細胞 D4M-UV3 を *in vivo* モデルとした併用実験を行った。D4M-UV3 は、紫外線照射依存的な遺伝子変異 (ネオアンチゲン) 導入により高い免疫原性を示すが、ICB に対する感受性は限定的であることから (Lo JA et al, *Sci. Transl. Med.*, 2021)、G9a 阻害剤併用による上乗せ効果を検討する上で適切なモデルと思われた。その結果、D4M-UV3 のような免疫原性の高いマウスがん細胞モデルにおいては、G9a 阻害剤単体でも一定の抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。興味深いことに、こうした D4M-UV3 モデルにおける G9a 阻害剤の抗腫瘍効果は、ヌードマウスでは失われたことから、T 細胞などの獲得免疫系を介したものであることが示唆された。さらに、同モデルにおいて抗 PD-1 抗体を併用したところ、相乗的な治療効果がもたらされることが示された。具体的には、G9a 阻害剤もしくは抗 PD-1 抗体単剤は、それぞれ 20-30% 程度頻度で complete regression を誘導するのに対し、これらを併用することで約 80% のマウスで complete regression に導かれる。これらの結果は、G9a 阻害剤と ICB の併用療法の可能性を支持するものであるが、B16-F1、LLC、EMT6、CT26 のように免疫原性が低く、ICB 抵抗性を示すがん細胞株を用いて同様の実験を、今後も継続的に進めていく必要がある。

以上の研究成果から、本研究では G9a による抗腫瘍免疫応答の抑制機構の一端を解き明かし、G9a 阻害剤と ICB との併用療法が有効である可能性を提示したと言える。今後、さらなるエピゲノム統合解析によって、G9a による腫瘍免疫応答制御の本態と共に詳細な分子機構の解明が期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato S, Weng QY, Insko ML, Chen KY, Muralidhar S, Pozniak J, Diaz JMS, Drier Y, Nguyen N, Lo JA, van Rooijen E, Kemeny LV, Zhan Y, Feng Y, Silkworth W, Powell CT, Liau BB, Xiong Y, Jin J, Newton-Bishop J, Zon LI, Bernstein BE, Fisher DE	4. 巻 10
2. 論文標題 Gain-of-Function Genetic Alterations of G9a Drive Oncogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 980 ~ 997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-19-0532	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tianyu Chen, Shinichiro Kato, Kunihiko Hinohara, Hiroyoshi Nishikawa
2. 発表標題 The role of histone methyltransferase G9a in tumor microenvironment and its potential as a target of tumor immunotherapy
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichiro Kato, Kunihiko Hinohara
2. 発表標題 Druggable dependency on histone demethylase LSD1 in undifferentiated melanoma
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021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
---------	---------