

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21553

研究課題名（和文）がん免疫療法への応用を目指したがん細胞特異的なSTINGアゴニスト輸送体の同定

研究課題名（英文）Identification of STING agonist transporter in cancer cells by utilizing a lineage barcoding system

研究代表者

北嶋 俊輔（KITAJIMA, Shunsuke）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・研究員

研究者番号：90566465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：STINGアゴニストは、がん細胞に作用し抗腫瘍免疫を活性化するが、細胞内への取り込み機序には不明な点が多い。本研究では、単一細胞レベルで細胞を追跡できる発現バーコードを用いて、STINGアゴニストに対する反応性の有無を基準とした遺伝子発現解析を行い、新規STINGアゴニスト輸送体の同定を試みた。細胞を標識したバーコード情報とSTINGアゴニスト処理前後の遺伝子発現情報を同時に読み取ることで、STINGアゴニストに対する感受性が高い細胞群と低い細胞群に分類することが出来る。今後は、がん細胞株を用いて、本研究で抽出されたSTINGアゴニスト感受性を制御する候補遺伝子の機能解析を行う計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬はがん治療に革命をもたらしたが、一部のがん患者にしか奏功しない。しかし、抗ウイルス応答を活性化させるSTINGアゴニストをがん細胞内に効率的に導入することで、免疫細胞のがんに対する免疫応答を誘導することができる。STINGアゴニストががん細胞内に取り込まれる分子機構は未解明な点が多く、それらを解き明かし制御することで、免疫チェックポイント阻害薬に対する治療抵抗性の克服を目指す。

研究成果の概要（英文）：Although STING activation in cancer cells drives antitumor immunity, stimulation of cancer cell-intrinsic STING signaling by STING agonist is limited due to low cell-membrane permeability. In this study, we attempted to identify a novel transporter/regulator of STING agonist by utilizing a lineage barcoding system which can compare the gene expression profile at the single cell level between before and after treatment of STING agonist. We can classify the cells into a cell group showing high sensitivity and low sensitivity, and extract the gene candidates related with the sensitivity to STING agonist. In the future, we will analyze the candidate genes whether they can directly regulate the sensitivity to STING agonist in cancer cells by using in vitro model.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：cGAMP STING STINGアゴニスト

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス応答において中心的な役割を担う分子の1つであるcGASは、細胞質内に蓄積した二本鎖(ds)DNAに直接結合し、ATPおよびGTPを基質として、下流因子であるSTINGを活性化する2'3'cGAMPを産生する。これら2'3'cGAMPに代表されるSTINGアゴニスト(cGAMP誘導体)は、免疫細胞に対して、抗ウイルス応答経路を活性化することで抗腫瘍効果を発揮する(図1)。一方で研究代表者は、がん細胞におけるSTINGの発現量と免疫チェックポイント阻害薬の奏功が正に相関し、がん細胞自身を標的としたSTING経路活性化が治療戦略として有効であることを報告した。そこで、がん細胞に対してSTINGアゴニスト処理によるSTING経路活性化を試みた結果、2'3'cGAMPの

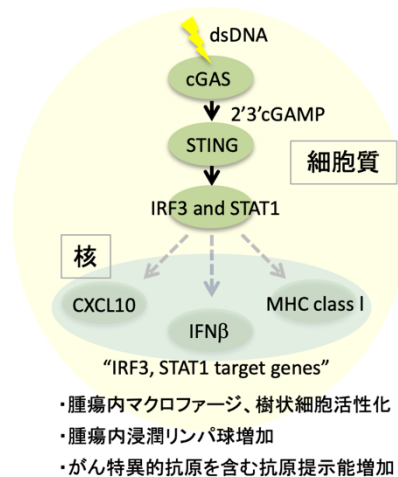


図1. STING経路活性化によるがん細胞の免疫原性亢進

細胞内への取り込み様式が免疫細胞とがん細胞で大きく異なることを明らかにした。例えば、免疫細胞においてSLC19A1が2'3'cGAMP膜輸送体として機能することが近年報告されたが、がん細胞においては同様の機能は全く見られない。SLC19A1を欠損させたマクロファージ様細胞では、2'3'cGAMP投与によるSTING経路の活性化が弱まるが、SLC19A1を欠損させた非小細胞肺癌細胞は、同じくSLC19A1を膜輸送体とする葉酸代謝拮抗薬メトトレキサートに対して完全に抵抗性を獲得する一方で、2'3'cGAMP投与に対する反応性は低下しない。また、マクロファージ様細胞は、2'3'cGAMPに加えて細菌由来の3'3'cGAMPやcyclic-di-AMPなど広範な環状ジヌクレオチドに対しても同程度反応するのに対して、非小細胞肺癌細胞は2'3'cGAMPに対して特異的に高い反応性を示す。細胞内で産生された2'3'cGAMPが細胞外に分泌されることが近年明らかになったことから、感染防御とは別の目的で非免疫担当細胞が異なる2'3'cGAMP膜輸送体を発現している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

細胞質内dsDNAセンサーSTING経路の活性化により、下流遺伝子であるMHCクラスIや細胞傷害性T細胞を誘引するケモカインCXCL10の発現が上昇する。そのため、がん細胞におけるSTING経路の抑制は、がん特異的抗原提示能の低下や腫瘍組織浸潤リンパ球の減少につながり、免疫チェックポイント阻害薬に対する治療抵抗性に寄与する。そこで、がん細胞自身を標的としたSTING経路活性化が、がん免疫療法抵抗性を克服するための治療戦略として有効であると考え、がん細胞に対してSTINGアゴニスト投与を試みた。その結果、内在性STINGアゴニストである環状ジヌクレオチド2'3'cGAMPの感受性が、同じがん細胞株内であっても単一細胞ごとに大きく異なり、ヘテロ不均一性を示すことを明らかにした。そこで本研究では、2'3'cGAMPに対する反応性の有無を基準とした単一細胞解析を行い、これまでに見つかっていない、がん細胞において2'3'cGAMP感受性を制御する新規因子を同定することで、がん免疫療法治療抵抗性を克服するための基盤研究を達成することを目的とする。

3. 研究の方法

① 単一細胞解析に使用するための細胞株の選定および2'3'cGAMP処理条件の検討

本研究に使用する細胞株として、これまで研究代表者が試したヒトがん細胞株の中で、2'3'cGAMPの処理前後におけるSTING標的遺伝子群の発現差異が大きいKRAS:LKB1変異型ヒト非小細胞肺癌細胞株を用いる。人工的な2'3'cGAMPラベル化により膜輸送体への結合能が変化する可

能性を排除するため、細胞刺激には未標識の2'3'cGAMPを用いる。

② 単一細胞解析用バーコードライブラリーを用いた細胞標識

単一細胞ごとに異なる RNA 型発現バーコードあるいは DNA 型バーコードにより H1944 株を標識し、バーコード化がん細胞株を作製する。RNA 型発現バーコードライブラリーは研究分担者が保持するカスタムデザイン版を、DNA 型バーコードライブラリーは Novartis 社の ClonTracer を使用する。発現バーコードライブラリーレンチウイルスを Multiplicity of infection 0.1 で感染させ、単一細胞ごとに 1 万種類の異なる発現バーコードで細胞を標識する。

③ 2'3'cGAMP 処理前後での単一細胞レベルでの遺伝子発現変動解析

2'3'cGAMP 未処理あるいは処理したバーコード化済がん細胞株を用いて、10xGenomics を用いた単一細胞 RNA シークエンスにより、バーコード情報と遺伝子発現プロファイルを同時に読み取る。10xGenomics データはパイプライン Cell Ranger にて解析し、tSNE もしくは SPADE により可視化することによって 2'3'cGAMP 処理前後による遺伝子発現変化を単一細胞レベルで捉える。

④ 2'3'cGAMP 輸送体およびシグナル制御因子の候補遺伝子を抽出

これまでに研究代表者が作成した、様々な STING 標的遺伝子を含む Gene set 「STING SIGNATUR」あるいは The Molecular Signatures Database (Broad Institute) に登録されている 「ISHIKAWA_STING_SIGNALING」を用いて、2'3'cGAMP 処理前後におけるエンリッチメントスコアの変動を計算し、単一細胞レベルで 2'3'cGAMP に対する反応性の高低による順位付けを行う。次に、刺激前における発現量が反応性と正に相関する遺伝子群を抽出する。解析で得られた遺伝子群の中から、Solute Carrier (SLC) 遺伝子群など膜貫通型タンパク質を中心に候補を決定する。

⑤ CRISPR/Cas9 系を用いた候補遺伝子の機能評価

CRISPR-Cas9 系を用いてそれぞれの候補遺伝子の欠損細胞を作製し、細胞外 2'3'cGAMP に対する反応性を検討する。STING 活性化マーカーとして CXCL10 の分泌亢進を ELISA により測定する。コントロール実験として、トランスフェクションによる 2'3'cGAMP 導入を実施し、候補遺伝子が膜輸送体を介した 2'3'cGAMP 取り込み特異的に作用するか否かを検討する。

4. 研究成果

本研究では、まず初めにバーコード標識を利用した単一細胞解析に使用するための細胞株の選定と 2'3'cGAMP 処理条件の検討を行った。これまでの研究代表者の研究成果から、ヒトがん細胞株の中で、KRAS および LKB1 に変異を有するヒト KL 型非小細胞肺癌ん株は、細胞外に投与された 2'3'cGAMP に対して比較的高い感受性を示すことが明らかになっていた。そこで、H1944、H647、H1355、H2122 などのヒト KL 型肺癌ん細胞株を 50ug/ml 2'3'cGAMP で刺激したところ、H1944 細胞が 2'3'cGAMP に対して最も高感受性を示すことを明らかにした。次に、実際に単一細胞解析を実施する際の 2'3'cGAMP の投与条件を検討した。H1944 細胞を様々な濃度の 2'3'cGAMP で刺激し、STING 下流因子である

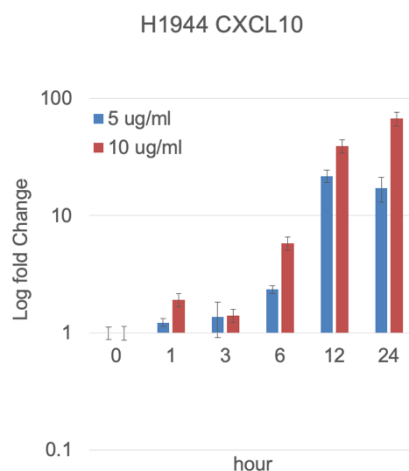


図 2. 2'3'cGAMP 刺激による CXCL10 の発現誘導 (qRT-PCR 解析)

CXCL10 の発現を qRT-PCR により評価した結果、2'3'cGAMP が 5ug/ml 以上の濃度において、薬剤投与後 6 時間前後で CXCL10 の発現が誘導されることが明らかになった (図 2)。一方で、2'3'cGAMP で刺激した際の CXCL10 の分泌誘導の程度が、細胞株内でヘテロ性を示すかどうかを細胞内フローサイトメ

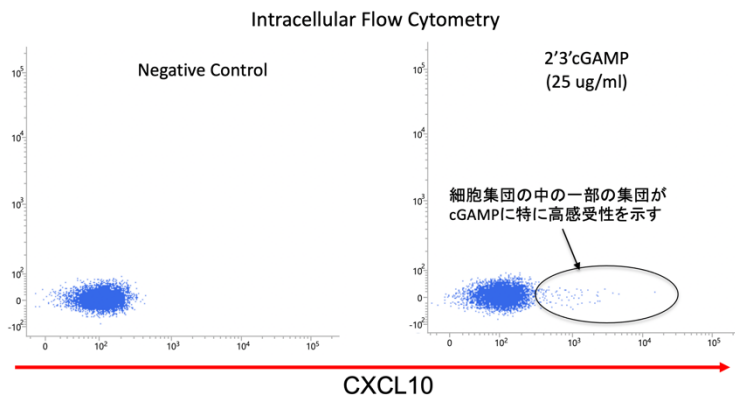


図 3. 2'3'cGAMP 刺激に対する不均一な下流シグナル活性化

トリーにより解析した。その結果、25ug/ml 2'3'cGAMP で H1944 細胞を刺激した際に、CXCL10 の分泌が細胞集団内で不均一に誘導されることを明らかにした (図 3)。これらの結果から、H1944 細胞株では細胞集団の中に 2'3'cGAMP への感受性が異なる細胞群が混在している可能性が示唆された。

次に、単一細胞解析に適したバーコードで標識するために、LARRY (Lineage and RNA recovery) を用いて H1944 細胞をバーコード化した (図 4)。実際には、H1944 株に対して MOI:0.1 にて発現バーコードライブラリを導入し、その後、バーコード化細胞のマーカとなる GFP 陽性細胞をフローサイトメ

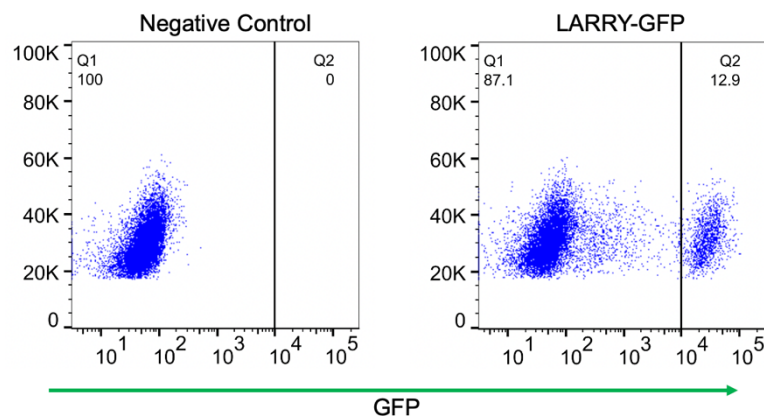


図 4. H1944 細胞のバーコード化

トリーで選別することで LARRY バーコード化済み H1944 細胞を樹立した。これにより、2'3'cGAMP 刺激前後での遺伝子変化を単一細胞レベルで追跡することが可能になった。そこで、上記に記載した条件検討の結果から、実際に LARRY バーコード化済み H1944 細胞を 10ug/ml あるいは 25ug/ml 2'3'cGAMP で 6 時間処理し、10xGenomics を用いた単一細胞 RNA シークエンスを行った。バーコード情報と遺伝子発現プロファイルを同時に読み取ることで、2'3'cGAMP 処理前後による遺伝子発現変化を単一細胞レベルで解析し、KL 型肺がん細胞株で STING 下流因子として作用している CXCL10 や IFN β など下流遺伝子の発現変動レベルを元に 2'3'cGAMP に対する感受性が比較的高い細胞群と低い細胞群に階層的に分類した。現在は、2'3'cGAMP 刺激前後における発現量が、STING 下流因子の変動率を基準として計算した 2'3'cGAMP 反応性と相関する遺伝子群の抽出を試みている。今後は、抽出されてきた候補遺伝子の中から、特に膜貫通型タンパク質などの 2'3'cGAMP 受容体として作用する可能性のある因子、さらには過去の文献から細胞内外で STING 経路制御タンパク質として作用する可能性のある因子の機能を探る。具体的には、CRISPR-Cas9 系を用いて H1944 細胞株において候補遺伝子の欠損細胞を作製した後に細胞外 2'3'cGAMP に対する反応性を評価する予定である。

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	日野原 邦彦 (HINOHARA Kunihiko) (50549467)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授 (13901)	

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