

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06890

研究課題名（和文）PVRが担う細胞接着機能と癌免疫逃避機能の統合的理解

研究課題名（英文）Integrated understanding of cell adhesion and cancer immune evasion of PVR

研究代表者

村田 雅樹（Murata, Masaki）

札幌医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10404592

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）：Poliovirus receptor (PVR)は、上皮細胞では細胞接着分子として、免疫細胞では免疫チェックポイント分子として機能するタンパク質である。本研究では、頭頸部がんの切除材料でPVRの免疫組織化学を、頭頸部がんの細胞株を用いてPVR欠損株を樹立し、それを用いてPVR発現回復株を作製した。これらの解析で、PVR高発現群は予後不良であり、PVR依存性に細胞株の悪性化能が変化することが明らかになった。細胞株を用いたマルチオミクス解析により、PVRがc-Mycの発現を調節している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PVRは、上皮細胞の細胞接着、TIGITと免疫チェックポイントを形成する、という2つの機能を有する分子である。本研究では、がん細胞で異常発現し、2つの細胞機能を併せ持つユニークな分子PVRの、細胞接着とがん免疫チェックポイントの関連、クロストークの解明を目指して検討を行った。マルチオミクス解析により、癌悪性化、がん免疫逃避のいずれにも寄与するc-MycがPVRにより調節されている可能性を初めて見出した。この成果は、がん細胞でがん免疫逃避に寄与するPD-L1とは異なる機序をPVRが有することを示している。PVRを標的とした治療は、がん免疫逃避に加え悪性化能を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Poliovirus receptor (PVR/NECL5) is a unique protein that acts as a cell adhesion molecule in epithelial cells and as an immune checkpoint molecule in immune cells. In this study, immunohistochemistry of PVR was performed on excised head and neck cancer materials, and PVR knockout cell lines were established using head and neck cancer cell lines, which were then used to establish PVR expression restoration lines. Analysis of resected specimens revealed a poor prognosis in the high PVR-expressing group. Investigation using cell lines revealed that the malignant potential of the cell lines was altered in PVR-dependent manner. Furthermore, a multi-omics analysis using cell lines revealed for the first time that PVR may regulate c-Myc expression. Our results suggest that the aberrant expression of PVR in cancer is involved in c-Myc-mediated malignant transformation potential and cancer immune escape.

研究分野：人体病理学

キーワード：PVR 頭頸部がん 扁平上皮癌 発現欠損株 癌悪性化 マルチオミクス解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がん免疫逃避を阻害し抗腫瘍効果を発揮する、免疫チェックポイント阻害薬(抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体など) のがん治療への有効性が証明され、がん免疫療法が、がんに対する第 4 の治療法として確立した。現在、がん免疫逃避に介入する新たなストラテジーやがん免疫療法のターゲット分子が同定され、臨床利用へ向けて多くの研究が行われている。なかでも、T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains (TIGIT) - Poliovirus receptor (PVR/NECL5)免疫チェックポイント経路は、新たながん免疫療法の有望な標的候補である。がん細胞の一部では、高発現する PVR が、免疫逃避に関与している。すでに、抗 TIGIT 抗体の非小細胞肺癌患者への投与(第 2 相試験)が終了し、現在は第 3 相試験(SKYSCRAPER 試験)に加え、複数のがん腫に対する多数の第 2 相・第 1 相試験が行われている。

PVR(NECL5)は、上皮細胞では細胞間接着分子 Nectin ファミリーの一員として機能している。Nectin ファミリーは、Cadherin ファミリーとともに、アドヘレンス結合を形成・維持している。近年、PVR を含めた Nectin ファミリーの各種がんでの高発現と悪性化への関与が報告された。がん細胞に PVR を高発現させると、細胞接着性を増す一方、増殖能・浸潤能・転移能が促進することが明らかとなっている。申請者は、子宮頸部腺癌におけるタイト結合分子 JAM-A の発現解析の過程で、JAM-A が PVR と相互作用し、その発現を調節すること、PVR の高発現が予後不良に強く関連することを見出した (Cancer Science, 2020)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞接着とがん免疫チェックポイントという 2 つの細胞機能を併せ持つユニークな分子 PVR の、がん免疫と細胞間接着の関連、クロストークの解明を目指す。これらの機能を統合的に解析し、今まで注目されてこなかった、がん細胞における細胞接着と免疫チェックポイントのクロストークを明らかにする。

3. 研究の方法

・PVR 発現の免疫組織化学

札幌医科大学附属病院で切除された頭頸部がん症例に対して、抗 PVR 抗体を用いた免疫組織化学を行い、陽性強度・染色範囲をスコア化して評価した。得られた染色スコアと腫瘍細胞の分化度、免疫細胞の多寡・種類などを含め臨床病理学的因子との相関について解析した。

・PVR のがん悪性化能への関与

頭頸部がんの中でも口腔扁平上皮がんの細胞株に対して、CRISPR-Cas9 システムを用いて PVR 発現欠損株を樹立した。PVR 発現欠損株に対して、FLAG タグ PVR 発現ベクターを導入し、FLAG-PVR 安定発現回復株を樹立した。野性株と発現欠損株、発現回復株を用いて、細胞増殖能や遊走能、浸潤能、ゼノグラフトモデルを用いた造腫瘍能などを解析した。

・マルチオミクス解析

がん細胞株について、野性株、PVR 欠損株を用いて、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行った。トランスクリプトーム解析については、得られたデータについてエンリッチメント解析を、プロテオーム解析については Gene ontology 解析を行った。

4. 研究成果

頭頸部がんの切除材料に対して、抗 PVR 抗体を用いた免疫組織化学を行った。PVR は正常な縦走扁平上皮では弱い発現が見られた。頭頸部がんでは、PVR が高発現している症例が確認された(図 1)。がん組織での PVR の発現は、細胞膜と細胞質に局在していた。予後解析を行ったところ、PVR を高発現している症例群では、有意に予後不良となった(図 1)。このことから、PVR の高発現が悪性化に関与している可能性が示唆された。

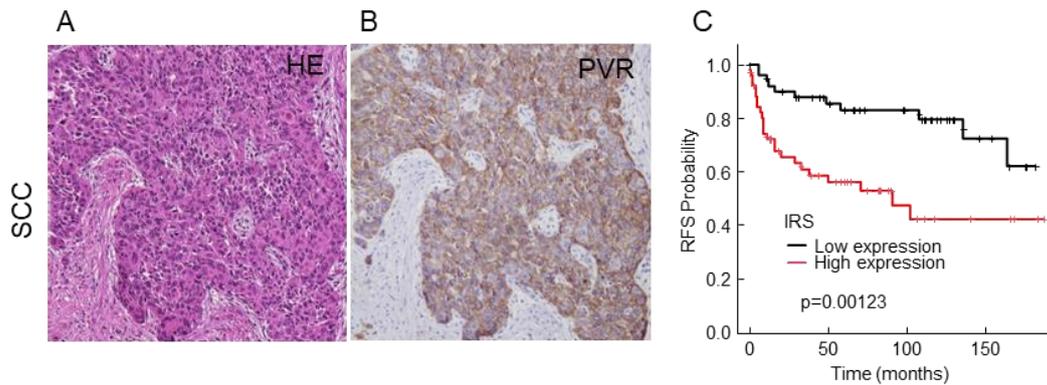


図1. 頭頸部がんにおけるPVRの発現と予後との関連. 頭頸部がん症例ではPVRが高発現する症例が確認される(A, B). PVRが高発現している症例では有意に予後不良となる(C).

PVR の発現ががん細胞に与える影響を明らかにするために、頭頸部がん細胞株を用いた解析を行うこととした。CRISPR-Cas9 を用いて PVR 発現欠損株を複数樹立した(図 2)。野性株と PVR 発現欠損株を用いて解析したところ、PVR 発現欠損株では細胞増殖能が著しく抑制されていた。また、遊走能、浸潤能も有意に抑制された(図 2、未発表データ)。

PVR 発現欠損株に FLAG タグした PVR 発現ベクターを導入し、FLAG-PVR 安定発現回復株を樹立した(図 3)。PVR 発現欠損株と PVR 発現回復株を用いて解析したところ、PVR 発現回復株で、増殖能は有意に増加した。また、遊走能、浸潤能も有意に増加した(図 3、未発表データ)。以上の結果から、頭頸部がん細胞株では、PVR 依存性に悪性化能が変化することが明らかとなった。

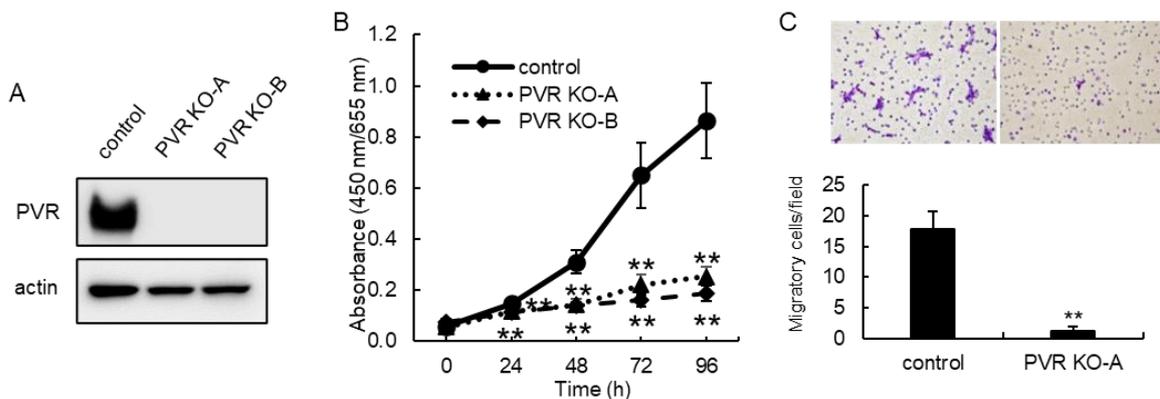


図2. 頭頸部がん細胞株を用いてPVR欠損株を複数樹立した(A). PVR欠損株では細胞増殖能、遊走能が著しく抑制された(B,C).

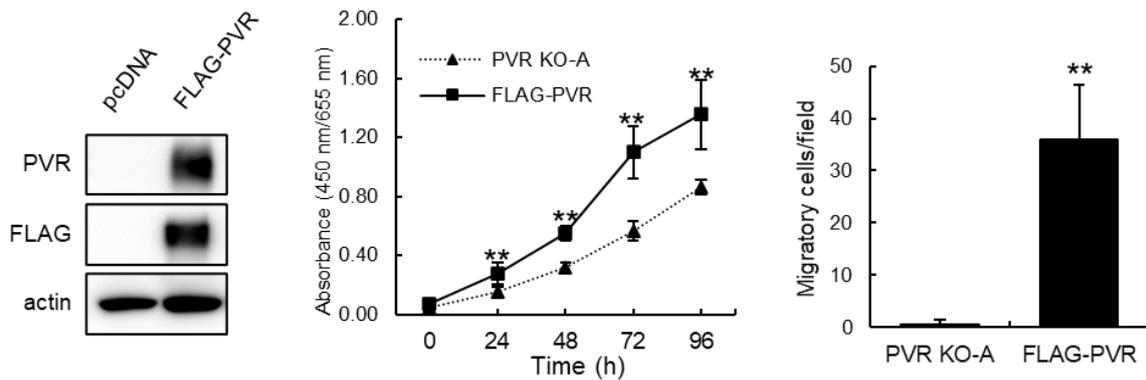


図3. PVR欠損株からFLAG-PVR安定発現回復株を樹立した(A). PVR発現回復株では細胞増殖能、遊走能が有意に増加した (B,C).

次に、PVRの発現変化が関与する mRNA 群、タンパク質群、を明らかにするため、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行った。その結果、PVRの欠損により c-Myc の下流の遺伝子群が有意に変動していることが明らかとなった(未発表データ)。また、PVR欠損株にPVRを導入し安定発現する株を樹立し、野生株・欠損株・回復株で解析したところ、c-Mycの発現、リン酸化状態がPVR依存的に変化することが初めて確認された。

PVRは、①上皮細胞の細胞接着、②TIGITと免疫チェックポイントを形成する、という2つの機能を有するユニークな分子である。本研究では、がん細胞で異常発現し、2つの細胞機能を併せ持つユニークな分子PVRの、細胞接着とがん免疫チェックポイントの関連、クロストークの解明を目指して検討を行った。マルチオミクス解析により、癌悪性化、がん免疫逃避のいずれにも寄与する c-Myc がPVRにより調節されている可能性を初めて見出した。この成果は、がん細胞でがん免疫逃避に寄与するPD-L1とは異なる機序をPVRが有することを示している。PVRを標的とした治療は、がん免疫逃避に加え悪性化能を抑制する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Ito Yui, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Murakami Taro, Akimoto Taishi, Kyuno Daisuke, Kawata Yuka, Shano Kodai, Kirisawa Kurara, Ota Masaki, Aoyama Tomoyuki, Murata Masaki, Sugimoto Kotaro, Chiba Hideki, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto	4. 巻 113
2. 論文標題 Aberrant expression of claudin 6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Taro, Takasawa Akira, Moriki Asako, Igaki Yusuke, Ikeda Hiroshi, Murase Kazuyuki, Takada Kohichi, Magara Kazufumi, Aoyama Tomoyuki, Ono Yusuke, Kyuno Daisuke, Takasawa Kumi, Murata Masaki, Osanai Makoto	4. 巻 479
2. 論文標題 A systemic apolipoprotein A-IV-associated amyloidosis confirmed by proteome analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03073-x	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井佐和、高澤啓、永井美佐、仲盛優菜、小野佑輔、真柄和史、及能大輔、高澤久美、村田雅樹、小山内誠
2. 発表標題 舌扁平上皮癌におけるPVR発現とその意義
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Murakami, Akira Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Kumi Takasawa, Masaki Murata, Makoto Osanai
2. 発表標題 Aberrant expression of JAM-A contributes to the malignancy of cervical adenocarcinoma via PVR/CD155
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井 佐和, 高澤 啓, 永井 美佐, 小野 佑輔, 真柄 和史, 青山 智志, 及能 大輔, 高澤 久美, 村田 雅樹, 小山内 誠
2. 発表標題 舌扁平上皮がんで異常高発現するPVR1はがん悪性化に寄与する
3. 学会等名 第112回日本病理学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	高澤 啓 (Takasawa Akira) (00593021)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究分担者	廣橋 良彦 (Hirohashi Yoshihiko) (30516901)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

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