

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20946

研究課題名（和文）上咽頭癌におけるエクソソームへのPD-L1分泌を介した抗PD-1抗体耐性機構

研究課題名（英文）Explication of resistance to PD-1 blockade on nasopharyngeal carcinoma through the mechanism of protein sorting to exosomes

研究代表者

小林 英士（Kobayashi, Eiji）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00632530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：既の上咽頭癌モデルにおけるエクソソームへのタンパク輸送への関与が報告されているUCH-L1およびそのファルネシル化に着目した。ファルネシル基転移酵素阻害剤である、FTI-277ならびにTipifarnibも用いた解析を行った。Tipifarnibは近年頭頸部癌領域において抗腫瘍効果が報告されている。これらのファルネシル基転移酵素阻害剤によりエクソソームの分泌が抑制されること、ならびにPD-L1の発現を抑制する可能性があることが示された。これらの結果により、ファルネシル化がエクソソームの形成機構、特にPD-L1陽性エクソソームの形成機構に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の浸潤・転移には、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞が関わる細胞間情報伝達機構が重要な役割を果たしていることが分かってきた。近年抗PD-1抗体製剤が、上咽頭癌を含む頭頸部癌において承認されたが、その奏効率は期待を下回っている。他の癌種において薬剤耐性機構へのエクソソームへの関与が報告されており、上咽頭においても同様に、その薬剤耐性機構に、エクソソームが関与していることが予想される。本研究によって、上咽頭癌におけるエクソソームへのタンパク分泌機構の解明につながった。抗PD-1抗体製剤耐性の機序の解明ならびにその回避を通じた臨床応用・新規創薬につながる社会的意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：I focused on UCH-L1 and its farnesylation, which are reported to play roles in protein sorting to exosomes on nasopharyngeal carcinoma (NPC) models. I evaluated molecular effects of farnesyltransferase inhibitors, FTI-277 and Tipifarnib, to NPC cells. It is reported recently that Tipifarnib has anti-tumor effect against head and neck carcinomas. I have shown that these farnesyltransferase inhibitors suppress release of exosomes by NPC cells, and suppress expression of PD-L1 by NPC cells. These results suggests that protein farnesylation plays some roles on formation and release of exosomes, especially on formation of PD-L1 positive exosomes.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：上咽頭癌 エクソソーム PD-L1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌は高転移性の悪性腫瘍であり、進行例はしばしば治療に難渋する。ほとんどの上咽頭癌は Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染が原因であり、EBV の主要な癌タンパクである latent membrane protein1 (LMP1) が発癌のトリガーである。

一方、エクソソームと呼ばれる 30-100 nm 大の細胞外小胞を介した細胞間情報伝達機構が、癌の浸潤・転移に重要であることが近年分かってきた。これまで代表研究者およびその所属研究室では、上咽頭癌細胞モデルを用いて LMP1 がエクソソームに分泌されること、LMP1 陽性細胞由来のエクソソームが転移・浸潤能を誘導すること、さらに ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) というタンパクがエクソソームへの LMP1 の分泌に関わることを明らかにした。すなわち、エクソソームと分泌されたタンパクが腫瘍微小環境の構築を介し、上咽頭癌の高い転移能を誘導する。しかし、その臨床的な意義については未解明である。

PD-L1 およびその受容体である PD-1 は、2018 年に本庶佑博士がノーベル賞を受賞し、脚光を浴びた。近年、抗 PD-1 抗体製剤が上咽頭癌を含む頭頸部癌に対して承認され、これまでと全く異なる新規の作用機序を持つ薬剤として注目された。しかし、その奏効率は 20% 程度と期待されたほどは高くない。前立腺癌や悪性黒色腫において、PD-L1 陽性エクソソームが抗 PD-1 抗体製剤耐性のバイオマーカーであることが報告された。上咽頭癌においても同様に、PD-L1 陽性エクソソームが、抗 PD-1 抗体製剤耐性を誘導する重要な因子であることが強く示唆される。これまでに代表研究者およびその所属研究室において、LMP1 のエクソソームへの分泌には UCH-L1 は C 末端のファルネシル化が関与することを報告している。PD-L1 も LMP1 と同様に膜タンパクであり、そのエクソソームへの分泌のメカニズムには LMP1 と類似した機構が関与していることが推測される。実際に肺癌領域における研究において、PD-L1 発現が UCH-L1 によって誘導されることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、上咽頭癌における抗 PD-1 抗体製剤の耐性機序の解明を目指した研究である。頭頸部癌に対して抗 PD-1 抗体製剤が承認され、特に遠隔転移を伴う進行例に対する効果が期待されたが、上咽頭癌に対する効果は期待を下回っている。そこで本研究においては、上咽頭癌における PD-L1 のエクソソームへの分泌機構の解明、および PD-L1 陽性エクソソームの抗 PD-1 抗体製剤耐性への関与を明らかにすることを目的とした。その上で、PD-L1 のエクソソームへの分泌機構を阻害する事で、治療抵抗性上咽頭癌の抗 PD-1 抗体製剤への感受性を回復させることも期待できるものと考えた。代表研究者らはこれまでに、UCH-L1 と呼ばれるタンパクの C 末端のファルネシル化が、エクソソームへの LMP1 分泌に関与していることを報告した。PD-L1 も LMP1 と同様に膜タンパクであり、そのエクソソームへの分泌機構は類似しているものと推測される。

まとめると本研究の目的は、「上咽頭癌における抗 PD-1 抗体製剤耐性の機序には、PD-L1 エクソソームが重要な役割を果たしているものと考えた。PD-L1 のエクソソームへの分泌機構を解明し、その阻害をすることは、抗 PD-1 抗体製剤への感受性を回復させる。」という仮説を検証することである。

このように、本研究は基礎的な探究のみならず、実臨床への応用も視野に入れたトランスレーショナルリサーチである。

3. 研究の方法

主に上咽頭癌細胞株を用いて研究を行った。具体的には、上咽頭癌細胞株である HK-1、C666-1 を主に用いた。加えて、上咽頭癌上皮細胞株である NP69 およびその LMP1 安定発現株である NP69-LMP1 を用いた。さらには、一部実験においてはヒト胎児の腎由来の細胞株である HEK293 に LMP1 を強制発現させた細胞株および EBV ゲノムを導入した、HEK293-EBV を用いた。

エクソソームの回収には超遠心法に加えて、本学免疫学華山教授が開発した PS アフィニティー法を原理とするエクソソーム抽出キットを用いた。また、培養中のエクソソーム定量には、エクソソームのマーカータンパクである CD63 と CD9 によるサンドイッチ ELISA 法を用いたエクソソーム定量キットを用いた。

ファルネシル化の解析においては、以前の研究で用いたファルネシル基転移酵素阻害剤である FTI-277 を用いた。加えて、頭頸部癌領域において抗腫瘍効果が報告されている Tipifarnib を用いた解析も行った。Tipifarnib は H-RAS 変異陽性の頭頸部癌領域において、基礎的な報告のみならず、第二相試験において実患者における有効性が報告されている。これらのファルネシル基転移酵素阻害剤の対照群としては、溶媒である DMSO を用いた。

さらに、治療前後に採取した上咽頭癌の臨床患者検体を用いて、患者血清中の PD-L1 陽性エクソソームの定量を行った。この定量は、2 通りの方法で行った。1 通り目の方法は、前述の PS アフィニティー法によるエクソソーム回収の後、ELISA 法を用いて PD-L1 の定量を行うものである。2 通り目の方法は、PD-L1 とエクソソームマーカーである CD9 の、それぞれに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を用いて、エクソソームを分離・回収することなく血清中から直接検出する方法である。

4 . 研究成果

まず、EBV の主要な癌タンパクである LMP1 と、PD-L1 の関連を評価した。上咽頭上皮細胞株において、LMP1 の強制発現により、細胞内の PD-L1 発現が誘導されることが示された。さらには、それぞれの細胞株からエクソソームを回収して解析したところ、エクソソームへの PD-L1 分泌が誘導されることが示された。(図 1)

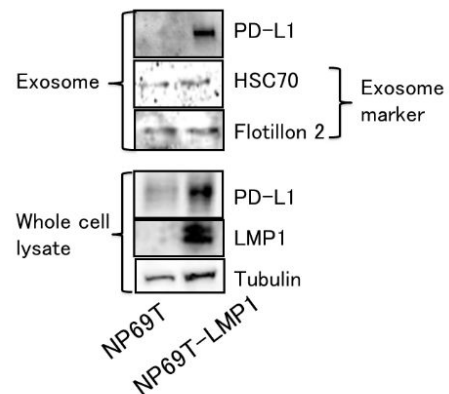


図1: LMP1強制発現細胞株における PD-L1発現およびエクソソームへのPD-L1分泌

続いて、ファルネシル基転移酵素阻害剤による、エクソソームの分泌への影響を評価した。上咽頭癌細胞株を用い、培養液に FTI-277 および Tipifarnib を添加した。その後に培養液中のエクソソームを、ELISA 法を用いて定量した。結果は図 2 に示したとおり、対照群と比較して、ファルネシル基転移酵素阻害剤である FTI-277 および Tipifarnib を添加した群において、培養液中へのエクソソーム分泌が抑制されることが示された。このことから、タンパクのファルネシル化が、エクソソームの分泌に関与することが示唆された。

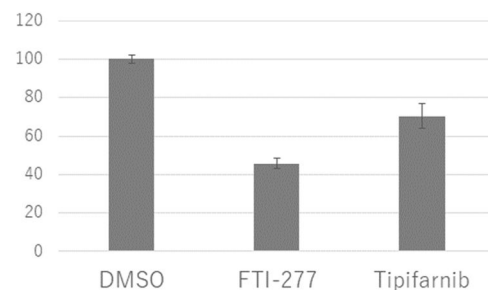


図2: 培養液中へのエクソソーム分泌量 (縦軸:%)

加えて、ファルネシル化が PD-L1 の発現の発現に影響を与える可能性について評価した。上咽頭癌細胞株を用いて、培養液中にファルネシル基転移酵素阻害剤を添加し、細胞ライセートを回収した。ウェスタンブロットにより、PD-L1 発現を解析したところ、FTI-277 および Tipifarnib を添加したものは、PD-L1 発現が抑制されることが示された。(図 3)この結果から、タンパクのファルネシル化が細胞の PD-L1 発現にも影響を与えることが示唆された。

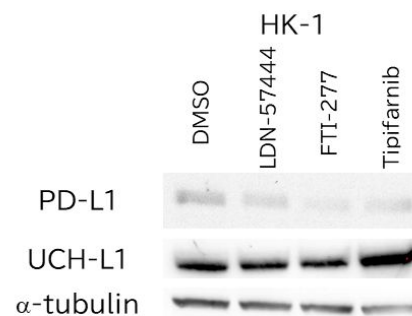


図3: 上咽頭癌細胞株における、PD-L1発現

さらに、上咽頭癌の臨床患者血清を用いて、PD-L1 陽性エクソソームの回収・定量を行った。33 例の臨床患者血清と用いて検討を行ったところ、1. の PS アフィニティー法にてエクソソーム回収後に ELISA 法で PD-L1 を定量する方法では 5 例で PD-L1 陽性エクソソームが検出された。一方、2. の抗 PD-L1 抗体と抗 CD9 抗体のサンドイッチ ELISA 法を用いた方法では、8 例で検出された。一方で Health Donor 由来の検体ではいずれの方法でも検出されず、今回検出された PD-L1 陽性エクソソームは腫瘍特異的な要因を反映しているものと考えられた。PD-L1 陽性エクソソームの検出率はいずれの方法でも低く、定量的な解析は困難であった。しかし、治療前に陰性であったが治療後に陽性化した症例において、治療後比較的早期に遠隔転移再発を来たす症例が散見された。さらに、治療前に陽性であったが治療後に陰性化した症例では、初回治療後に腫瘍が遺残したものの、抗 PD-1 抗体製剤による長期奏効が得られていた。これらの結果から、上咽頭癌においても PD-L1 陽性エクソソームが抗 PD-1 抗体製剤耐性のバイオマーカーとなることが示唆された。

上記の結果から、タンパクのファルネシル化がエクソソームの形成・分泌機構、ならびに PD-L1 発現に関与していることが示唆された。さらに、上咽頭癌においても PD-L1 陽性エクソソームがバイオマーカーとなることが示唆された。本研究により、上咽頭癌におけるエクソソームへのタンパク分泌機構の解明の一助となったものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kondo Satoru, Okuno Yusuke, Murata Takayuki, Dochi Hiroto, Wakisaka Naohiro, Mizokami Harue, Moriyama Kita Makiko, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Komori Takeshi, Hirai Nobuyuki, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Kimura Hiroshi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 113
2. 論文標題 EBV genome variations enhance clinicopathological features of nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2446 ~ 2456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/CAS.15381	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 Dochi Hiroto, (中11名), Kobayashi Eiji, (中11名), Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 113
2. 論文標題 Estrogen induces the expression of EBV lytic protein ZEBRA, a marker of poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2862 ~ 2877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/CAS.15440	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Eiji, Kondo Satoru, Dochi Hiroto, Moriyama-Kita Makiko, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Protein Farnesylation on Nasopharyngeal Carcinoma, Molecular Background and Its Potential as a Therapeutic Target	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2826 ~ 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/CANCERS14122826	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 遠藤一平、小林英士、平井信行、小森岳、中西庸介、近藤悟、吉崎智一	4. 巻 131
2. 論文標題 頭頸部癌に対する化学放射線療法症例における全身性炎症反応と サルコペニア評価の意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金沢大学十全医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 32 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林英士、吉崎智一
2. 発表標題 当科におけるNivolumabの使用成績および腫瘍免疫に関連した予後因子の検討
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiji Kobayashi, Satoru Kondo, Christopher B Whitehurst, Tomokazu Yoshizaki, Joseph S Pagano, Julia Shakelford
2. 発表標題 C-Terminal Farnesylation of UCH-L1 Plays a Role in Transport of Epstein-Barr Virus Primary Oncoprotein LMP1 to Exosomes
3. 学会等名 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated disease (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林英士、近藤悟、吉崎智一
2. 発表標題 当科における甲状腺分化癌の術後再発期間についての検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林英士、杉本寿史、吉崎智一
2. 発表標題 外側側頭骨切除術施行時の前方視野確保における、万能開口器の有用性
3. 学会等名 第22回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiji Kobayashi, Satoru Kondo, Hisashi Sugimoto, Tomokazu Yoshizaki
2. 発表標題 Clinical outcomes of Nivolumab its prognostic factors related to tumor immunity in head and neck malignancies
3. 学会等名 18th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery (JKJM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林英士、吉崎智一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 分子標的薬が適応となる耳鼻咽喉科疾患	

〔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
---------	---------