

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2022

課題番号：22K20798

研究課題名（和文）免疫チェックポイント制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of immune checkpoint regulatory mechanisms and development of novel therapies

研究代表者

神巻 千聡（KAMIMAKI, Chisato）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：80965715

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒトPBMCにゲムシタビンと対照としてTIM3発現に影響を与えない抗癌剤を添加し、RNA-seqデータを取得した(2022年未発表)。このデータから抗癌剤によって異なる発現を示した遺伝子を検討し、miR-1254やJUN等いくつかの遺伝子、ncRNAをピックアップした。特にJUNはPBMCに抗癌剤添加したとき、ウェスタンブロッティングにおいて蛋白質発現が異なることを確認し、その変化についてTIM3発現との関連をJUN inhibitorを添加したフローサイトメトリーで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は癌による死亡者数で最多であり、治療成績の向上が求められている。肺癌の薬物療法は、免疫チェックポイント阻害薬（ICI）が標準治療となったが、ICI耐性への対応という課題が発生した。免疫チェックポイントにはPD-1以外にもLAG3、TIM3、TIGIT等複数存在しており、本研究ではTIM3に着目して肺癌で使用される殺細胞性抗癌剤の種類によってこのTIM3発現に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We added gemcitabine and a control anticancer drug that did not affect TIM3 expression to human PBMCs and obtained RNA-seq data (unpublished in 2022). From this data, we examined genes that were differentially expressed by the anticancer drugs and picked up several genes and ncRNAs, including miR-1254 and JUN. In particular, JUN was found to be differentially expressed by Western blotting when PBMCs were treated with anti-cancer drugs, and the relationship between the protein expression and TIM3 expression was confirmed by flow cytometry with JUN inhibitor.

研究分野：肺癌

キーワード：免疫チェックポイント

1 . 研究開始当初の背景

肺癌は癌による死亡者数で最多であり、治療成績の向上が求められている。近年、肺癌の薬物療法は劇的な変化を遂げ、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が標準治療となった。現在では、禁忌のないドライバー遺伝子変異陰性の肺癌患者の大半が、殺細胞性抗癌剤との併用療法も含め ICI 治療を行っている。ICI の成功は免疫チェックポイントが腫瘍免疫で極めて重要であることを示したが、同時に ICI 耐性への対応という課題を突き付けた。免疫チェックポイントには PD-1 以外にも LAG3、TIM3、TIGIT 等複数存在し、ICI 耐性に関わっている。これら複数の免疫チェックポイントの発現機序の解明は新規治療の標的となる可能性や、ICI 治療の治療効果を予測するバイオマーカーになる可能性があり、極めて重要な課題と考えられた。また、殺細胞性抗癌剤の併用療法が一般的になるにつれ、併用する抗癌剤の種類によって治療効果が異なることが報告されるようになった。¹ このことから、一部の殺細胞性抗癌剤には免疫調節作用がある可能性が示唆されている。

2 . 研究の目的

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) に免疫チェックポイントの発現を誘導し、肺癌治療で使われる抗癌剤がこの免疫チェックポイントに与える影響を明らかにする。これらを通じて各免疫チェックポイント分子の制御機構を明らかにし、それらを標的とした新規治療開発につながる基盤データの確立を目標とする。

3 . 研究の方法

(1) ヒト PBMC の調製

健常者より末梢血 20ml を採取し、密度勾配遠心分離により PBMC を分離した。熱不活性化 10% ウシ胎児血清 (FBS) および 1% ペニシリン / ストレプトマイシンを補充した RPMI-1640 培地を用いて、最終細胞濃度を 1×10^6 細胞 / ml に調整し、フィトヘマグルチニン (PHA) と共に、5% CO₂ を含む加湿インキュベーター内において 37℃ で培養した。

(2) フローサイトメトリーによる免疫チェックポイントの検出

健常者から分離した PBMC を EGFR-TKI/殺細胞性抗癌剤とともに 37℃ でインキュベートした。24 時間後、Phytohemagglutinin-L (PHA、eBioscienceTM) を添加し、さらに 48 時間インキュベートした。その後、PBMC を、T 細胞及び共抑制因子などの細胞外マーカーを用いて 4℃ において 30 分間染色した。死細胞は、7AAD (Biolegend) を用いて同定した。データは、FACSCantoTMII (BD Biosciences) を用いて取得し、FlowJo (Tree Star, Inc.) を用いて解析した。

(3) RNA-seq について

RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて培養細胞から抽出し、その品質を評価した。RNA-seq は GeneNex 社で実施した。TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリーを調製し、Illumina NovaSeq 6000 プラットフォームでシーケンスし、150 bp ペアエンドリードを生成した。シーケンス後、生リードを処理して低品質塩基とアダプターを除去し、参照ゲノムにマッピングした。遺伝子発現レベルは、DESeq2 を用いて定量化および正規化した。微量発現遺伝子 (DEG) は、偽発見率 (FDR) 調整 p 値カットオフ 0.05、log₂ fold change 閾値 | 1 | で同定した。結果は R パッケージを用いて可視化した。

(4) Western-blotting

PBMC から蛋白質を抽出し 30μg/lane に調整、SDS-PAGE 電気泳動後、セミドライ型転写装置 (BIO Rad) により、PVDF 膜に転写した。転写膜をブロッキングバッファーに浸し、1 時間室温で振盪にてブロッキング後、希釈した抗 JUN 抗体に浸し、4℃ で一晩インキュベートした。転写膜を振盪洗浄後、200 倍希釈した二次抗体にて 1 時間室温で静置し、キット説明書に従い反応バンドの検出を行った。

4 . 研究成果

(1) ヒト PBMC 上免疫チェックポイント発現に対する抗癌剤の影響

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を用いて、PHA 刺激に対する T 細胞の免疫チェックポイント発現の解析を行った。PHA は T 細胞において、プログラム細胞死蛋白質 1 (PD-1)、リンパ球活性化遺伝子 3(LAG3)、細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有 3 (TIM3)の発現の促進を認めた。これらの PHA による免疫チェックポイント発現促進は一様ではなく、また、肺癌で用いられる抗癌剤が特定の免疫チェックポイントを特異的に抑制することを認めた。ゲムシタピンとイリノテカン存在下では、他の殺細胞性抗癌剤と比較して TIM3 の発現が有意に減少した。

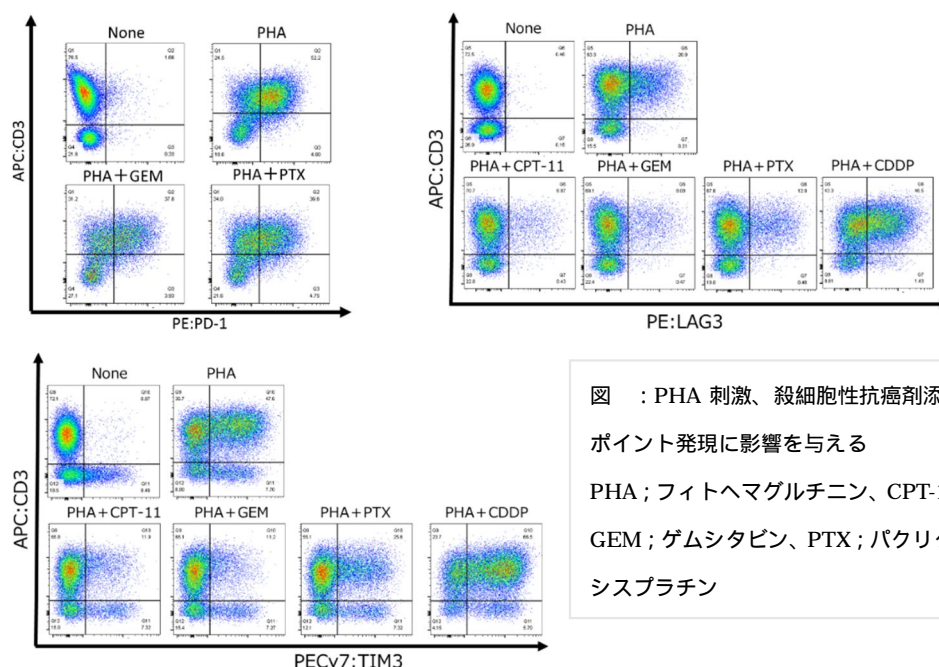


図 : PHA 刺激、殺細胞性抗癌剤添加は免疫チェックポイント発現に影響を与える

PHA ; フィトヘマグルチニン、CPT-11 ; イリノテカン、GEM ; ゲムシタピン、PTX ; パクリタキセル、CDDP ; シスプラチン

(2) GEM、PTX を添加した際のヒト PBMC の RNA-Seq について

ヒト PBMC の免疫チェックポイント発現に対する抗癌剤の検討結果を受けて、次にゲムシタピン、パクリタキセルそれぞれの TIM3 発現に対する影響を検討した。PBMC をゲムシタピンまたはパクリタキセルを添加して培養し、その遺伝子発現プロファイルを RNA-seq で解析した。ゲムシタピン投与群とパクリタキセル投与群の間で、発現量の異なる遺伝子について、ボルケーノプロットを作成し、可視化した。解析の結果、合計 150 個の異なる発現遺伝子が同定され、パクリタキセル投与群と比較して、ゲムシタピン投与群では 143 個の遺伝子が発現を上昇させ、7 個の遺伝子が発現を下降させた。

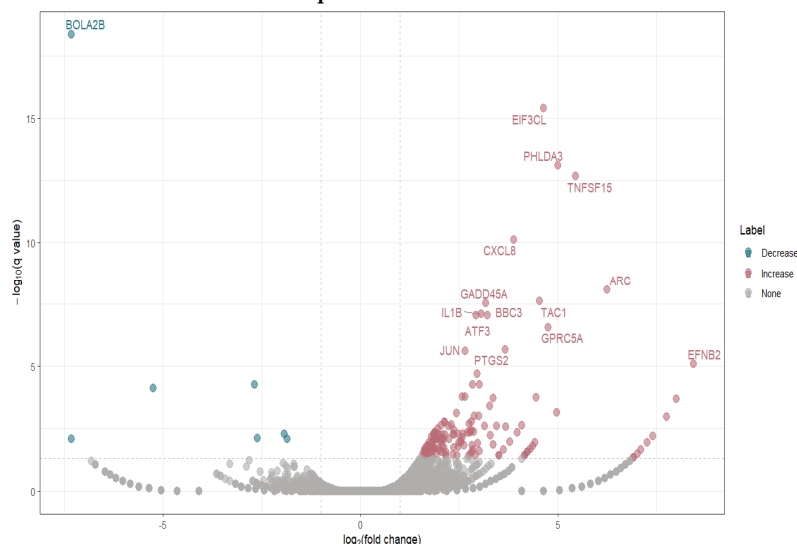


図 : パクリタキセル投与群(PTX)に対するゲムシタピン投与群(GEM)の遺伝子発現の変化

この異なる発現遺伝子の中で、転写制御因子である JUN に着目した。JUN は Fos と転写制御因子複合体を形成し、TP53 や EGFR 等下流の遺伝子発現制御を介して調節に関与する。² RNA-Seq の際と同様に、ヒト PBMC をゲムシタピンまたはパクリタキセルを添加して PHA で刺激し、蛋白質を抽出、JUN について Western blotting を行ったところ、各殺細胞性抗癌剤投与により発現に違いがみられた。その変化について、TIM3 発現との関連を JUN inhibitor を添加したフローサイトメトリーで確認したが、一貫性が乏しく今後の検討課題とした。

1. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. Cancer Cell 2015;28:690-714.
2. 静岡県立静岡がんセンター. JCGA データベース (<https://www.jcga-scc.jp/>).

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

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