

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21235

研究課題名(和文) 免疫チェックポイントPD-1/PD-L1の阻害剤スクリーニング

研究課題名(英文) Screening of small molecule compounds that inhibits interaction between PD-1 and PD-L1

研究代表者

松下 洋輔 (MATSUSHITA, Yosuke)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・助教

研究者番号：70634450

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)：PD-1/PD-L1を阻害する免疫チェックポイント阻害剤は、近年、多くの癌種適応が認められ、新たながん治療法として注目されているが、抗体医薬品という特性から、薬価の高騰が問題視されはじめている。本研究ではより安価で同等の作用を有する低分子化合物の探索を目的として研究を推進した。はじめに、GPGPUを用いたインシリコスクリーニングで化合物を絞り込み、続いて、エフェクター細胞の腫瘍活性を定量できるアッセイ系を樹立し、スクリーニングを実施した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, immune checkpoint inhibitors that inhibit PD-1 / PD-L1 interaction have been approved as many cancer types and attracted attention as a new cancer therapy, but due to the characteristics of antibody, soaring drug prices Has begun to be seen as a problem. In this research, we promoted research aimed at searching for cheaper and lower molecular weight compounds with equivalent effect. Firstly, we narrowed down compounds by in silico screening using GPGPU, then established assay systems capable of quantifying the tumor activity of effector cells, and screened.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：化合物スクリーニング 免疫チェックポイント阻害剤

1. 研究開始当初の背景

がんは正常細胞から発生し、免疫系の攻撃を避けながら徐々に成長し個体の生命を脅かす。このがん化の過程では遺伝子変異やタンパク質発現変化により、様々ながん抗原の発現が誘導されるが、免疫システムはこの癌抗原を認識することでがん細胞を排除しようとする。しかし近年このがん細胞と免疫システムの相互作用メカニズムの解明が進み、がん組織が抑制性共シグナルを伝達する免疫チェックポイント分子を巧みに利用して免疫抑制環境を誘導し、免疫監視機構から逃避している特性が明らかになってきた。

がん抗原に対する免疫応答の主役である T 細胞の活性化や抗原応答性は副刺激シグナル、すなわち刺激性及び抑制性シグナルのバランスにより決定される。抑制性共シグナル分子は自己に対する不応答性の維持や免疫反応の終息のために必須であり、免疫応答の恒常性を監視する機構でもあることから免疫チェックポイント分子と言われるが、がん細胞はこのチェックポイント分子を巧みに利用し、生体内の免疫から逃れている。この免疫チェックポイントを標的として開発されたものが免疫チェックポイント阻害剤である。この阻害剤はがん細胞の免疫からの逃避機構を遮断することで、免疫系のがん排除作用を復活させるものである。

近年抗 PD-1 (Programmed cell death-1) 抗体が上市され、悪性黒色腫をはじめとした様々ながんで注目を集めており、これまでのがん治療の概念を覆す存在になりつつある。しかしながら、抗体医薬品の多くは輸入に頼っており、また高価であることから日本の医療財政の圧迫の一因となっている現状を鑑みると、日本発のより安価で同等の作用を有する医薬品の開発は、医療的・経済的に急務であることは明白である。

2. 研究の目的

T 細胞は抗原提示細胞上に発現するペプチド/主要組織適合性抗原複合体を認識するが、その際、正あるいは負の副刺激分子による制御を受ける。負の制御分子には PD-1/PD-L1 系などのリガンド/受容体が知られている。がん細胞やウイルス感染細胞は PD-L1 分子を発現すると、エフェクター細胞上の PD-1 分子と結合し、その細胞障害能を著しく低下させる。抗 PD-1 抗体は悪性黒色腫をはじめ、非小細胞性肺癌、腎癌など多くの癌種に適応が承認されてきているが、抗体治療は従来の化学療法剤を用いた治療と比較し、莫大な費用がかかるため、医療経済の波状を来しかねない。本研究では、効率的な抗がん剤開発に繋がる PD-1/PD-L1 相互作用を遮断する低分子化合物の探索を目的とした。

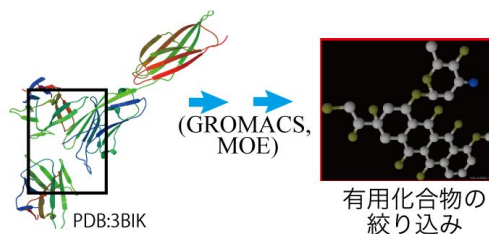
3. 研究の方法

PD-1/PD-L1 相互作用を阻害し、エフェクター細胞の細胞傷害能を賦活化する低分子化合物を探索するため、in silico screening によりアッセイ化合物の絞り込みを行った。続いて、細胞障害能を評価するためのアッセイ系の構築を行い、絞り込んだ化合物の活性を評価した。

4. 研究成果

(1) GPGPU システムを用いたインシリコスクリーニング

GPU (Graphics processing Unit) は PC において画像処理を担う部品の一つで、ビデオメモリと接続し、グラフィックに特化したプロセッサが多く集まった構造を持っている。CPU (Central Processing Unit) と比較すると機能は限定されているが、大量のデータを複数のプロセッサで並列かつ同時に処理できる利点がある。GPGPU は PC でスムーズに画像処理を行えるように性能が向上した GPU の演算能力を汎用計算に用いる技術のことであり、NVIDIA 社から C 言語をベースとした CUDA (Compute Unified Device Architecture) が開発されたことにより、急速に応用されてきている。本研究では GPGPU を使い、一次スクリーニングとして公的ライブラリー上にある化合物のインシリコスクリーニングを実施し、探索化合物の絞り込みを行った。具体的なプロトコールとして、PD-1/PD-L1 の結晶構造情報を PDB (Protein Data Bank) から取得し (PNAS, 2008, PDB: 3BIK)、これを基として GROMACS ソフトウェアを用いて分子動力学シミュレーションを行った。その後、MOE (Molecular Operating Environment) を用いて化合物とのドッキングから阻害活性を予測し、378 個の化合物を選択した (図



1)。
図 1. PD-1/PD-L1 結晶構造解析情報を用いたインシリコスクリーニングの概略図

(2) PD-1 高発現ヒト T 細胞の培養・精製:

抗腫瘍活性をもつ免疫細胞には T 細胞や NK 細胞などがあるが、本研究では T 細胞を用いた。一般的に、末梢血単核球から高活性の T 細胞を高純度に精製することは困難であるが、研究代表社が平成 27 年度まで所属していた長崎大学創薬研究教育センターでは、この培養系を確立している (Cancer Immunol Immunother, 2013, Vol 62, 677-687)。具体的には、健康人末梢血単核球

をフィコールを用いて濃度勾配遠心法により精製し、ピスホスホン酸誘導体で刺激し、IL-2 を添加して 型 T 細胞の増殖・活性化を行う。7 日から 10 日間培養後、 型 T 細胞の純度と PD-1 の発現をフローサイトメトリーで確認した。その結果、CD3 陽性細胞の内 90%以上が 型 T 細胞として、高純度に精製できていることがあきらかになった。一方、PD-1 の発現は培養 3 日後をピークに発現量が徐々に低下していくが、低下の程度には個人差が認められたため、今後のアッセイに用いるために、 型 T 細胞が高純度で、かつ PD-1 の発現も 20%以上認められたケースをフローサイトメトリーで確認し、今後の化合物スクリーニングに用いるエフェクター細胞のストックとした。

(3) CD107a を指標とした 型 T 細胞のがん細胞傷害活性評価法の確立：

上記の活性化型 型 T 細胞と PD-L1 を高発現させたパーキットリンパ腫細胞株 (Daudi_PD-L1+) を共培養し、そこに化合物を作用させることで、PD-1/PD-L1 の阻害効果を検討できる系を構築する。傷害活性を測定する方法として、脱顆粒のマーカーである CD107a の発現をフローサイトメータで定量化することで評価する。これは NK 細胞によるがん細胞傷害活性を測定する方法として、すでに報告されている (Leukemia, 2005, 19, 835-840) もので、PD-1/PD-L1 阻害による 型 T 細胞による傷害活性を評価することに応用できると考えた (図 2)。具体的なプロトコールとして、標的となるがん細胞 (Daudi or Daudi_PD-L1+) をプレートに播種し、DMSO に希釈した低分子化合物を作用させる。ポジティブコントロールには抗 PD-L1 抗体を用いた。その後別に用意したエフェクター細胞である 型 T 細胞を作用させ、続いて蛍光標識された CD107a 抗体を添加し、37 度で 2 時間インキュベートし、さらに T 細胞マーカーで染色し、フローサイトメータで測定した。

その結果 型 T 細胞と標的となる癌細胞 (Daudi) を共培養すると、 型 T 細胞上の CD107a の発現上昇を認めたが、Daudi_PD-L1+ との共培養では顕著に発現が減少した。この PD-L1 高発現がん細胞との共培養に抗 PD-L1 抗体を作用させた群では CD107a の発現が回復した。以上より、CD107a の発現量を指標とした本アッセイは PD-1/PD-L1 の相互作用を定量的に評価できることが示された。

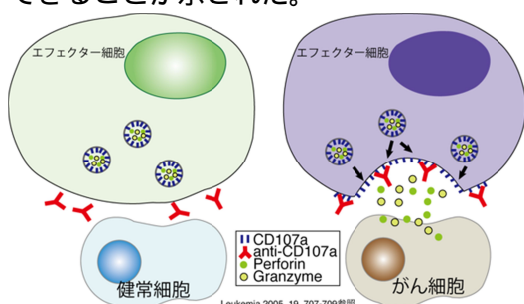


図 2. CD107a を指標としたエフェクター細胞の細胞傷害活性評価の概略図

(4) PD-1/PD-L1 相互作用を阻害する低分子化合物の探索：

これまでに、 型 T 細胞上の CD107a の発現を増加させる化合物は PD-1/PD-L1 の相互作用を阻害することで、がん細胞の免疫監視機構からの回避を抑制するとともに、T 細胞のキラー活性を回復させ、結果的にがん細胞が傷害されることを示した。そこで GPGPU を用いたインシリコスクリーニングで公的ライブラリーから絞り込んだ化合物 378 個について、PD-1/PD-L1 相互作用の阻害活性を測定した。化合物の最終濃度は 10 μ M とし、コントロールとして DMSO (最終濃度 1%) を用いた。データ解析では活性値を PD-L1 低発現の Daudi 細胞と共培養した時の CD107a の発現率を 100% とし、PD-L1 高発現 Daudi 細胞と化合物を加えた際に、CD107a の発現率がより高くなるものをヒット化合物とした。

その結果、378 個の化合物の内、100 個の化合物が PD-L1 低発現の Daudi 細胞と 型 T 細胞を共培養した際に発現する CD107a の発現量と比較して増加が認められた。中でも CD107a の発現を 150% 以上増加させた化合物を 4 個見出した。しかしながら、これらの化合物の再現性を検討したところ、CD107a の発現は認めるものの、再現よく顕著な増加を見出すことは困難であった。近年、PD-L1 に結合して 2 量体を形成させ、PD-1 との結合部位を阻害する低分子化合物の探索も試みられ、その結果 BMS-200 が見出されているので (PDB: 5j89, Oncotarget, 2016, 7, 30323-35)、本構造情報と今回得られた CD107a 発現誘導化合物との分子動力学シミュレーションを行い、よりよい化合物が見出されていくことが期待される。

まとめ

1 GPGPU システムを用いたインシリコスクリーニング：

従来の CPU でのドッキングシミュレーションと比較し、短時間で化合物の絞り込みが出来る系を確立した。

2 CD107a を指標とした 型 T 細胞のがん細胞傷害活性評価法の確立：

従来の相互作用阻害薬の探索では結合阻害に焦点が当てられ、その後の機能解析でドロップアウトすることも多かったが、本研究では最初の wet スクリーニングから結合阻害によるエフェクター細胞の活性回復を指標としたアッセイ系を樹立することに成功した。

3 PD-1/PD-L1 相互作用を阻害する低分子化合物の探索：

樹立したアッセイ系を用い、スクリーニン

グを実施した。1st スクリーニングで有用な化合物を見出したが、再現性が十分に得られなかった。近年、低分子化合物によるPD-1/PD-L1 阻害物質の探索も一定の成果を上げており、今後はこれらの情報も組み合わせ、有望な化合物の探索につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) Yoshimaru T, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, Katagiri T Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumour activity for breast cancer therapeutics
Sci Rep. 2017 May 12;7(1):1821 (査読有)
doi: 10.1038/s41598-017-01951-6.

(2) 松下洋輔、吉丸哲郎、片桐豊雅
包括的ゲノム解析を通じた乳がんの発症・進展機構解明の現状と展望
乳癌学 -最新の診断と治療- 2017 75 巻 増刊号 3 155-160 (査読無)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 洋輔 (MATSUSHITA, Yosuke)
徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)
・助教
研究者番号: 70634450