

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06265

研究課題名(和文)自然免疫シグナルの新経路を介したがん細胞選択的な細胞死誘導の分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of cancer specific cell death induction via novel innate immune signaling

研究代表者

高岡 晃教(Takaoka, Akinori)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30323611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により細胞質RNAセンサーであるRIG-Iを介する、新しい経路を見出した。この経路はこれまで報告されていたアダプター分子を介するサイトカイン応答等を誘導する基本経路とは異なり、正常細胞へは影響を与えずがん細胞選択的に細胞死を引き起こすものであった。興味深いことに、この正常細胞とがん細胞の応答性の違いは、ある特定のキナーゼ分子の細胞内における局在の違いであることもわかった。がん細胞選択性のメカニズムの詳細を明らかにし、新たな切り口から自然免疫シグナルを用いた直接的ながん細胞の選択的破壊と腫瘍免疫賦活化を狙ったデュアルな効果が期待されるがん治療薬の創出へ結びつく可能性が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において自然免疫療法は、従来の抗癌剤と比べ副作用が少ない利点で期待されている。自然免疫系賦活化(核酸刺激)によって、様々な癌細胞が死滅することが報告されている。しかし、がん細胞の細胞死が一般的に知られる癌細胞内のインターフェロン(interferon; IFN)の作用に依存する説には見解が分かれていた。我々は、核酸によってIFNを誘導するシグナル経路とは異なる新しいがん細胞を死滅させるシグナル経路を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have been working on the study of innate signaling via pattern recognition mediated receptor for antiviral responses. In this study, we identified a novel innate signaling pathway via cytosolic RNA sensor RIG-I that activates cell death in cancer cells but not normal cells. This novel pathway is different from conventional pathway via MAVS/IPS-1 mediated IFN inducing pathway. Importantly, localization of a kinase protein is not only nucleus but also cytosol in cancer cells while the localization of this is only nucleus in normal cells. RIG-I in cancer cells activate this kinase and activates apoptosis in cancer cells. Based on our finding that a kinase is localized in cytosol of cancer cells, we propose a novel strategy to modulate ectopic protein for cancer therapy for cancer cells' death.

研究分野：分子免疫学

キーワード：自然免疫応答 RIG-I インターフェロン がん細胞 細胞死 新規キナーゼ 細胞内局在 シグナル伝達

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで自然免疫応答、特にインターフェロン (IFN) の発現誘導を引き起こすシグナル経路についての研究、中でもウイルス感染時の自然免疫応答の活性化誘導に重要なパターン認識受容体である細胞質核酸センサーを介する感染防御の分子機構について研究を推進してきた。一方で、近年多くのがん患者が存在する中、がんに対する治療については、現在十分なものがなく、近年の適応免疫系でのチェックポイントを制御することによる癌免疫治療法は注目されているも、必ずしも効果が期待できない局面もでてきている。一方、強力な適応免疫系の活性化を誘導するには、微生物由来の分子によって発動する自然免疫系の活性化が必須である。しかし、がんは微生物では無く自己由来であるため、基本的に自然免疫を強力に活性化することは起こらないと考えられる。そこで私どもが取り組んできた自然免疫核酸センサーのシグナルを敢えて活性化させることによる腫瘍抑制の可能性について考えた。一方で、自然免疫による腫瘍抑制には免疫系を介する間接的な作用と腫瘍に対する直接的な作用が考えられるが、本研究では、後者に着目した。これに関連する類似研究としてはリポ多糖類やpoly(I:C)などを投与することで膜貫通型のToll様受容体 (TLRs) を介した腫瘍抑制効果が報告されている。しかし、通常TLRsは免疫細胞で発現しており、またがんについては一部のがんのみでTLRsの発現がみとめられている。そこで、我々がこれまで主体的に行ってきた細胞質に存在する核酸センサー中でもRIG-I (retinoic acid-inducible gene-1)に着目した。なぜならば、これらのセンサー分子はほとんど全ての細胞に発現しているからである。これは腫瘍特異性という観点からは一見、不利であることが予想されたが、驚くべきことに、調べた範囲では、正常細胞には誘導せず、がん細胞においてのみ、細胞死を誘導するという事実を見出した。予備実験の結果、さらに興味深いことは、これまで知られていたRIG-I下流経路ではないことを示唆する結果が得られている。また正常細胞とがん細胞での応答性の違いはある特定の分子の細胞内における異所性局在による可能性を示唆する結果が得られた。したがって、これまでがん細胞へのターゲティングの基本が、がん細胞において正常細胞よりも比較的発現レベルや活性が異なる分子に着目したものであったが、本研究を遂行させることにより、分子空間制御の差異にフォーカスさせたユニークなアプローチで、がん選択性の高い治療戦略を展開できると考えている。ひいては、このような挑戦的な研究を推進・開拓させ、将来的には、免疫系の賦活化を介した間接的な作用を組み入れ、より高次元の複合的ながん治療の実現へ結びつけていくことを目指したい。

2. 研究の目的

自然免疫系における、特に核酸認識センサーおよびそのシグナルに関する、これまでの研究の流れの中で、細胞質RNAセンサーであるRIG-I (retinoic acid-inducible gene-1)依存性で、がん細胞選択的 (正常細胞では誘導されない) に細胞死を引き起こす、全く新しい経路を見出しつつある。独自に見出した発見に基づいて、まず、このRIG-Iを介する新経路の解明を行い、なぜがん細胞選択性を持ち得るのか分子機構を明らかにすることを目指す。この点については、ある特定の分子ががん細胞内において異所性に局在することを示唆する結果を得ており、このような分子の細胞内の空間的制御の違いに着目した新しいがん標的の戦略を開拓するための挑戦的な研究を推進したいと考えている。さらには、この新たな切り口から自然免疫シグナルを用いた直接的ながん細胞の破壊と腫瘍免疫賦活化を狙ったデュアルな効果が期待されるがん治療薬の創出へとつなぐ基盤的研究を推進することを目的とした。

3. 研究の方法

In vitroやin vivo、がん細胞株やマウスの系を使用して、Crispr、新規分子の同定、並びにFACSを使用して、RIG-Iを介した、新規自然免疫応答を介したがん細胞細胞死のシグナルを同定した。

4. 研究成果

(1) RIG-Iシグナルによるがん細胞選択的な細胞死の確認：ヒト及びマウスの様々な種類のがん細胞と不死化していない細胞を準備し、RIG-Iのリガンドを用いて細胞死誘導について解析した。コントロールとして既知の抗がん剤やX線照射による細胞死を比較検討した。程度に差はあったがほぼ調べた約100種類のがん細胞株の細胞死が、RIG-Iのリガンドによって誘導された。

(2) RIG-Iシグナルによる腫瘍選択的な細胞死についてマウスのモデル (CT26細胞株を用いたマウス-肝転移大腸がんモデルやB16メラノーマ移植マウスモデルなど)を複数用いて実際にin vivoにおいて正常細胞には細胞死を誘導することなく、がん組織選択的に細胞死が引き起こされることを、組織の蛍光染色やCell sortingによる解析を行うことで証明する。さらにin vivoにおける細胞死誘導に関与する標的遺伝子の検索を試みる。

マウスモデル (CT26細胞株を用いたマウス-肝転移大腸がんモデルやB16メラノーマ移植マウスモデル)にて、3pRNA-MENDを静注投与した。組織の蛍光染色による解析の結果、正常肝細胞の細胞死はみとめず、がん細胞特異的に細胞死が誘導されました。一方、比較対象とした抗がん剤 (ドキシソルピシン)投与は、がん細胞のみならず、正常肝細胞の細胞死を誘導した。

(3) 3pRNA による RIG-I シグナルの活性化が、実際に腫瘍に対する適応免疫の誘導に寄与しているかについて以下の方法を用いて検討する。

(i) 再移植によるメモリーT細胞による抗腫瘍効果を検証する。

(ii) 抗 CD8 抗体を用いて、キラーT細胞依存的な抗腫瘍効果を証明する 等。

上記マウスモデルを使用して、(i)再移植によるメモリーT細胞による抗腫瘍効果を検証した。その結果、3pRNA を投与したマウスに、腫瘍を再移植すると、腫瘍の形成がみとめられなかった。このことから 3pRNA はメモリーT細胞を活性化していることが間接的に示されており、(ii) また、CT-26 皮内移植モデルを使用し、抗 CD8 抗体を用いて、キラーT細胞依存的な抗腫瘍効果を検討しました。その結果、抗 CD8 抗体により腫瘍形成が促進されたことから、3pRNA はがん細胞直接的な細胞死のみならず、適応免疫系の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。

(4) RIG-Iシグナルによる細胞死誘導機構の解明：まず、既知のRIG - I 下流の経路であるIPS-1/MAVS アダプター分子をはじめ、IRFs(IFN-regulatory factors)やNF- B 経路との関連性について検討した。さらにRIG-I 欠損細胞を用いた各種変異体戻し実験などの解析を進め、RIG-I 依存的な細胞死誘導を引き起こす新経路の詳細を明らかにした。(RIG-I の主要な既存の下流経路には依存していない(IPS-1/MAVS にも非依存性)という結果が得られた。RIG - I の新規下流経路の解析については、MAVSへのシグナルを活性化しないRIG-Iの変異体と相互作用するタンパク質の同定を質量分析を用いた会合分子検索を行い、細胞死の誘導に関わる候補分子の同定を行った。CRISPR-Cas9システムを用いて遺伝子欠損細胞を作製して解析した結果、がん細胞における3pRNA刺激によるp53の15番目セリン残基のリン酸化は新規分子に依存していることが示された。正常細胞では、新規分子が核のみに存在しており、一方、がん細胞では、新規分子が核のみならず、細胞質にも存在していることが、免疫抗体法による細胞染色と細胞分画の解析で示されました。3pRNAは、RIG-Iを活性化し、その後、がん細胞において細胞質で出現する新規分子のリン酸化を誘導することで、がん細胞に特異性をもって、細胞死誘導を引き起こしていることが示唆された。この結果をもとに、がん細胞の細胞質の新規分子の活性化を選択的に誘導するウイルスを同定するなど、創薬応用に向けた基盤的研究を展開したと考えております。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Takaoka Akinori, Yamada Taisho	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulation of signaling mediated by nucleic acid sensors for innate interferon-mediated responses during viral infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 477 ~ 488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz034	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 -

〔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
連携研究者	佐藤 精一 (Sato Seiichi) (60459724)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師 (10101)	