

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10791

研究課題名(和文) 肺がんにおけるNEDD8を介したPD-L1発現制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of NEDD8-mediated regulation of PD-L1 in lung cancer

研究代表者

佐野 由文 (Yoshifumi, Sano)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60322228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の発症および進展の分子メカニズムは未だ明らかではなく、高い有効性を示す薬物根治療法は存在しない。最近我々は、ユビキチン様タンパク質の一つであるNEDD8に着目し、NEDD8が織りなす翻訳後修飾活性がProgrammed Cell Death Ligand 1(PD-L1)の発現制御に必須であることを見出した。本研究ではそのNEDD8化活性によるPD-L1発現制御に分子メカニズムを解析した。その結果、他の癌種とは異なる肺癌細胞特有のメカニズムを介してNEDD8化がPD-L1の発現を制御しており、その中に肺癌細胞内エネルギー代謝が重要な役割を担っている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1/PD-L1を標的とする癌免疫チェックポイント阻害療法の登場は癌克服を可能にしつつある。しかし肺癌においては、その薬剤効果は限定的であり、免疫チェックポイント阻害療法の効率化は喫緊の研究課題である。本研究は、免疫チェックポイント阻害療法の有効性をさらに向上させるために、我々が見出した新しいPD-L1の発現制御機構に着目した研究成果であり、得られた結果は今後肺癌に対する免疫チェックポイント阻害療法の効率化に応用できるものである。

研究成果の概要(英文)：Molecular and cellular mechanism underlying cancer progression and carcinogenesis in lung remains unknown. Recent our studies unveiled that neddylation activity negatively regulates programmed cell death ligand 1 mRNA expression which is responsible for defense of cancer cells against immune attacks. In the current study, we aimed to clarify the molecular mechanism of NEDD8-mediated regulation of PD-L1 expression. We found activation of intracellular energy metabolism is essential for regulation of NEDD8-PD-L1 signaling in lung cancer cells. Our data will contribute to establishment of effective anti-cancer therapy targeting PD-L1.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 NEDD8 翻訳後修飾 PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、他の多くの癌種の中でも死亡率が極めて高いことが知られているが、未だに高い有効性を示す薬物根治療法は存在しない。最近、免疫チェックポイント阻害薬の登場により、一部の肺癌患者に高い有効性が認められつつあるが、未だその効果は限定的である (*Cancer J. Jan/Feb 2018;24(1):15-19.*)。免疫チェックポイント阻害薬は Programmed cell Death 1 (PD1) およびそのリガンド (PD-L1) との相互作用を阻害することで T 細胞による肺癌細胞への攻撃活性を向上させる効果があると言われており、その治療効果は肺癌細胞における PD-L1 の発現量と相関性があるとの報告がある。従って、肺癌細胞が T 細胞の攻撃から自身を防御するために PD-L1 を発現亢進させる分子メカニズムを解明することは、新しい肺癌根治療法樹立にとって重要な基礎研究課題である。

2. 研究の目的

最近我々は、NEDD8 化酵素活性が肺癌細胞内 PD-L1 の発現量を規定する律速因子であることを見出した。本研究課題では、NEDD8 化酵素活性依存的な PD-L1 の発現制御機構を明らかにすることを旨とし、免疫チェックポイント阻害療法の更なる効率化を目指すこととした。

3. 研究の方法

NEDD8 修飾の標的基質タンパク質を探索するため、RNA 干渉法を用いたスクリーニングを実施した。また、標的タンパク質の細胞内局在性については免疫蛍光染色法を用いて解析した。肺癌細胞株の増殖活性については WST-1 アッセイ法にて評価した。また、NEDD8 活性化阻害による肺癌細胞内シグナル伝達の変化については次世代シーケンサーを用いて解析した。さらに見出した細胞内シグナルを阻害する薬剤については化合物ライブラリーを用いて抽出し、PD-L1 の発現を制御できる新たな化合物を探索した。

4. 研究成果

PD-L1 の発現を制御する標的タンパク質の探索

複数の肺腺癌細胞株および扁平上皮癌細胞株に対して NEDD8 化阻害薬で処理し、WST-1 アッセイにて細胞増殖活性を調べたところ、NEDD8 化阻害により多くの肺癌細胞株の増殖活性が、コントロール (DMSO 添加) 群に比べて低下していた。この結果から、NEDD8 化阻害が肺癌細胞増殖抑制としての治療効果が有効である可能性が示された。

肺腺癌細胞株に対して、NEDD8 化阻害剤を処理すると、24 時間以内に PD-L1 の発現量が著しく亢進した (図 1)。一般的に NEDD8 はユビキチン同様に標的基質タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合を介して修飾される。しかし、どのような分子が標的となっているかについては未だ不明である。NEDD8 は Cullin family タンパク質を主に標的としていることが知られていることから、PD-L1 の発現量を規定する責任タンパク質に特定の Cullin タンパク質が関係するものと考えた。そこで、HCC827 肺腺癌細胞株用いた Cullin family siRNA ライブラリーを細胞内にトランスフェクションし、各細胞における PD-L1 の発現量を規定する Cullin タンパク質の同定を試みた。その結果、各々の Cullin タンパク質の発現抑制効率は非常に高かったものの、PD-L1 の発現量とコントロール群との間に有意な差はなかった。

近年、肺癌以外の脳腫瘍において低酸素応答に関わるタンパク質が PD-L1 の発現亢進に関与することが報告された (*J Cancer Sci Ther. 2018;10(8):190-197.*) (図 2)。この低酸素応答タンパク質は Cullin family タンパク質の中でも Cullin-2 によって分解されることがよく知られており、NEDD8 阻害剤処理によって Cullin-2 が不活性化された際に肺癌細胞株においても高発現することが確認できた。しかし、HCC827 細胞株において、Cullin-2 発現抑制によって PD-L1 の発現量にコントロール群と比べて有意な差を認めないことから、NEDD8 化酵素依存的な PD-L1 発現制御メカニズムは癌種によって大きく異なることが強く示唆され、肺癌特異的な PD-L1 発現制御機構の解明が必須であることがわかった。

次に、HCC827 細胞株において NEDD8 化阻害による細胞内遺伝子発現ダイナミック変化を

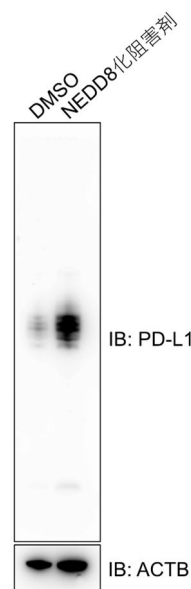


図 1. 酸 DMSO 添加、NEDD8 化阻害剤添加 HCC827 細胞株に対する PD-L1 および ACTB の発現解析結果

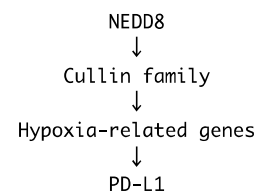


図 2. グリオーマ細胞において提唱された PD-L1 発現制御機構

明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果以下のことが明らかとなった。

1. NEDD8 化活性は PD-L1 のみならず、他に様々な T 細胞不活性化リガンドの発現制御を担うことがわかった。
2. PD-L1 の発現制御のマスター制御シグナルであることが知られる STAT シグナル経路 (*Cell Rep.* 2017 May 9;19(6):1189-1201.) は NEDD8 化抑制によってその活性化レベルに変動が認められなかったことから、肺癌細胞自身が産生するサイトカインのオートクラインシステムが、NEDD8 化阻害依存的な PD-L1 の発現亢進に必須である可能性は低いことが明らかとなった。
3. 上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子の変化は PD-L1 の発現と相関するとの報告があるが (*Oncimmunology.* 2018 Feb 1;7(5):e1423170.) その律速因子である ZEB ファミリータンパク質などについては NEDD8 化阻害剤添加の有無で有意な発現差を認めなかった。
4. 変動の認められた遺伝子セットを対象にシグナルパスウェイ解析を行ったところ細胞内エネルギー代謝に関連する遺伝子群が抽出され、このシグナル経路が NEDD8-PD-L1 経路の上流に位置する可能性が示唆された。

細胞内エネルギー代謝シグナルを阻害する薬剤ライブラリーを用いて PD-L1 の発現を制御する因子を探索したところ、特定の化合物を同定することに成功した。これらの化合物には、NEDD8 化阻害依存的に PD-L1 の発現を亢進させる表現型をレスキューする活性があることから、肺癌細胞における NEDD8-PD-L1 シグナル経路に当該シグナルが最も重要であることが分かってきた。現在その詳細な分子メカニズムの解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Hiroto Nakaoka, Mikio Okazaki, Hisayuki Shigematsu, Hironori Izutani, Yoshifumi Sano
2. 発表標題 Expression Analysis of Programmed Death-Ligand(PD-L)1 in Large Cell Neuroendocrine Carcinoma
3. 学会等名 IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、岡崎幹生、重松久之、杉本龍士郎、泉谷裕則、佐野由文
2. 発表標題 肺癌におけるPD-L1の発現制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、藻利優、岡崎幹生、重松久之、泉谷裕則、佐野由文
2. 発表標題 高悪性度神経内分泌肺腫瘍におけるPD-L1の発現解析
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、藻利優、坂尾伸彦、岡崎幹生、重松久之、東山繁樹、佐野由文、泉谷裕則
2. 発表標題 肺癌におけるHeparin-binding Epidermal Growth factor (HB-EGF) の解析
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂上倫久、藻莉優、坂尾伸彦、岡崎幹生、重松久之、東山繁樹、佐野由文、泉谷裕則
2. 発表標題 肺癌細胞におけるProgrammed Death-Ligand1(PD-L1)の細胞内タンパク質代謝機序の解明
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡裕智、坂上倫久、藻莉優、坂尾伸彦、岡崎幹生、重松久之、倉田美恵、東山繁樹、佐野由文、泉谷裕則
2. 発表標題 肺がん組織におけるProgrammed Death-Ligand 1 (PD-L1) の発現とその制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第34回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、藻莉優、坂尾伸彦、岡崎幹生、重松久之、佐野由文、泉谷裕則
2. 発表標題 外科的切除した肺癌組織を用いたHeparin Binding EGF Like Growth Factor (HB-EGF)の解析
3. 学会等名 第34回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛媛大学医学部 心臓血管・呼吸器外科HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/ 愛媛大学医学部 心臓血管・呼吸器外科HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/ 愛媛大学大学院 医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科 https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/</p>

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	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員) (16301)	
研究分担者	重松 久之 (Shigematsu Hisayuki) (00645111)	愛媛大学・医学部附属病院・准教授 (16301)	
研究分担者	岡崎 幹生 (Okazaki Mikio) (50467750)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	中岡 裕智 (Hirotomo Nakaoka) (30795464)	愛媛大学・医学部・技術員 (16301)	

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