

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23901

研究課題名(和文)肉腫における増殖・生存シグナルによる抗腫瘍免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文)Immune suppressive mechanism by growth and survival signaling in sarcoma

研究代表者

磯山 翔 (ISOYAMA, Sho)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・研究員

研究者番号：10843394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肉腫の増殖・生存シグナルによる抗腫瘍免疫抑制機構を分子レベルで解明することを目的とする。ユーイング肉腫に着目し、活性化しているIGF1Rとその下流のPI3K、MEKおよびWNT、JAKシグナルによる免疫関連遺伝子の発現制御を介した免疫逃避機構について網羅的遺伝子発現解析を進めた。その結果、各シグナルの阻害によって免疫関連の遺伝子セットが有意に発現変動していることが明らかとなった。さらに、その遺伝子セットの中に抗腫瘍免疫を抑制するある種のケモカインや抗原提示関連分子が含まれていることが分かった。今後、肉腫と免疫細胞の相互作用について、in vivo同系マウスモデルを用いて検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮性のがんにおいて、増殖・生存シグナルは、がんの増殖だけでなく免疫関連遺伝子の発現制御による免疫抑制性の腫瘍内微小環境の成立に寄与していることが知られている。しかし、肉腫においては増殖・生存シグナルが腫瘍内の免疫抑制に寄与しているかどうかは不明である。本研究で、ユーイング肉腫における増殖・生存シグナルが抗腫瘍免疫に関連するいくつかの分子の発現の少なくとも一部を制御していることが明らかとなった。今後、それらの免疫関連遺伝子の発現と抗腫瘍免疫の抑制の関連を明らかにすることで、肉腫の増殖・生存シグナル因子が新たな免疫療法の分子標的候補となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the immune suppressive molecular mechanism by growth and survival signaling in sarcoma. We focused on Ewing's sarcoma and conducted comprehensive gene expression analysis to investigate the mechanism of immune suppression through the regulation of immune-related gene expression by the activated IGF1R, PI3K, MEK, WNT, and JAK signaling. Inhibition of each signal resulted in significant changes in the expression of immune-related gene sets. In addition, some chemokines that involved in suppression of anti-tumor immunity and antigen presentation-related molecules were included in the gene sets. The interaction between Ewing's sarcoma cells and immune cells will be investigated using a syngeneic mouse model.

研究分野：腫瘍治療学 腫瘍生物学

キーワード：肉腫 抗腫瘍免疫 増殖・生存シグナル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では絶えず遺伝子変異をもった異常な細胞が出現しているものの、免疫系がそれらの細胞を異物として排除することで、がんの発症を防いでいる。したがって、臨床で認められるがんは、そのような免疫からの攻撃の対象とならない免疫原性の低いものが選択されていることや、腫瘍内に積極的に免疫を抑制する環境をつくり上げることで、抗腫瘍免疫から逃避している。腫瘍内の抗腫瘍免疫抑制機構としては、T細胞の免疫チェックポイント機構や抗原性の高いがん抗原の消失、制御性T細胞(Treg)などの免疫抑制性細胞の腫瘍内集積などが知られている。このような免疫抑制性の腫瘍内微小環境の成立には、がん細胞の増殖・生存シグナルが寄与していることが報告されている。例えば、がん細胞のWnt/カテニンシグナルの活性化は、抗原提示細胞の浸潤を誘導するケモカインの発現を抑制し、それに伴いエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞の誘導を抑制することが報告されている(S. Spranger et al., Nature 2015)。

肉腫は、上皮に発生する癌腫と異なり、骨や脂肪、筋肉などの軟部組織に発生する悪性腫瘍である。肉腫においても、癌腫と同様に、腫瘍による免疫チェックポイント分子のリガンドの発現や、Tregの腫瘍内の数と予後不良との間の有意な相関が認められており(Y. Que et al., J Cancer 2017)、腫瘍内の微小環境においてがん細胞による免疫抑制機構が働いている可能性が考えられる。また、それらの免疫抑制機構を標的としたがん免疫療法の肉腫における効果は、臨床におけるさらなる検討が必要とされているが、肉腫のサブタイプによって効果が得られる可能性が報告されている(HA Tawbi et al., Lancet Oncol 2017)。さらに、肉腫ではサブタイプによって、Wnt/カテニンやIGF1Rシグナル、その下流のPI3K、RAS/RAFシグナルなどが活性化し、がん化に重要な役割を果たしていることも報告されている(Y. Sun et al., Oncogene 2006)。しかし、癌腫と同様に、肉腫においても、増殖・生存に関わる細胞内シグナル伝達経路が、細胞のがん化や増殖のみならず抗腫瘍免疫の抑制に寄与しているかどうかは不明である。

### 2. 研究の目的

現在、癌腫において抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体といった免疫チェックポイント阻害薬が目覚ましい効果を示し、幅広い種類の癌で有効性が示されている。肉腫においては現在臨床において検討中ではあるが、サブタイプによっては免疫チェックポイント阻害薬の効果が認められる可能性が報告されている。一方で、免疫チェックポイント阻害薬は投与された患者の20-30%程度でしか効果が認められず、免疫チェックポイント阻害薬耐性の患者に対する併用療法の開発が進められている。

本研究では、肉腫に対する新たな免疫療法を開発することを最終目標とし、肉腫における増殖・生存シグナルと免疫抑制性の腫瘍微小環境の形成の関連について、分子レベルで解明することを目的とした。肉腫の免疫抑制性の腫瘍微小環境と肉腫細胞内の増殖・生存シグナルの関連が明らかになることで、肉腫における免疫チェックポイント阻害薬との併用治療において、どの増殖シグナル阻害薬との併用が有効かを示す指標となり、肉腫の新たな治療法の開発にも貢献できると期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒトユーイング肉腫細胞株および公益財団法人がん研究会の中村卓郎博士らが構築したマウスユーイング肉腫モデル細胞株(M. Tanaka, T Nakamura et al., JCI 2014)を用いて、活性化されていることが報告されているIGF1Rとその下流のPI3K、MEKシグナルによる免疫関連遺伝子の発現制御を介した免疫逃避機構について検討した。また、血液がんや癌腫において、抗腫瘍免疫の抑制への関与が報告されているWNT、JAKシグナルについても検討を行った。

まず、ヒトユーイング肉腫細胞株RD-ES、A673およびマウスのユーイング肉腫モデル細胞株(mES1、mES2)を用いて、IGF1R、PI3K、MEK、WNT、JAKシグナル阻害剤の増殖に対する作用をスルフォラダミンB(SRB)アッセイにて検討した。次に、それらのユーイング肉腫細胞株にIGF1R、PI3K、MEK、WNT、JAKシグナルの阻害剤を処理したサンプルからRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。RNA-seqのデータから、免疫関連シグナルの変化についてGSEA(Gene Set Enrichment analysis)解析により検討した。また、ケモカインや抗原提示関連分子、免疫チェックポイント分子のリガンドなどの抗腫瘍免疫に関連する遺伝子の発現変化について、各シグナル阻害剤処理による変化を検討した。さらに、PI3Kシグナルについては、骨肉腫、滑膜肉腫細胞株を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を上記と同様に行った。

### 4. 研究成果

マウスおよびヒトユーイング肉腫細胞株におけるIGF1R、PI3K、MEK、JAK、WNTシグナル阻害剤の増殖に対する効果を検討した。その結果、IGFR阻害剤、PI3K阻害剤はマウスおよびヒトのユーイング肉腫細胞株に高い増殖抑制効果を示した一方、WNT、JAKシグナル阻害剤の増殖に対する効果は限定的であった。また、MEK阻害剤はマウスのユーイング肉腫細胞株で効果を示したが、ヒトの細胞株への増殖への効果は弱かった(図1)。

次に、マウスおよびヒトユーイング肉腫細胞株に IGF1R、PI3K、MEK、JAK、WNT シグナル阻害剤を処理したサンプルの遺伝子発現解析を実施した。GSEA 解析により各種阻害剤によってどのような遺伝子セットが発現変動しているのかを検討したところ、IGF1R 阻害剤を処理したマウスおよびヒトのユーイング肉腫細胞株では、IFN $\gamma$  や IFN $\beta$ 、TNF を処理した際に変動する遺伝子セットが有意に発現変動していることが分かった(図2)。また、PI3K 阻害剤や JAK、WNT シグナルの阻害剤でも、複数のユーイング肉腫細胞株で IFN $\gamma$  や IFN $\beta$ 、TNF のシグナルに関連した遺伝子セットが有意に発現変動していた。しかし、MEK 阻害剤では今回用いたいずれのユーイング肉腫細胞株でもそれらの遺伝子セットの発現変動は認められなかった。このことから、ユーイング肉腫において IGF1R、PI3K、JAK、WNT シグナルは IFN $\gamma$  や IFN $\beta$ 、TNF などによって発現変動する免疫関連遺伝子の発現を調節していることが示唆された。

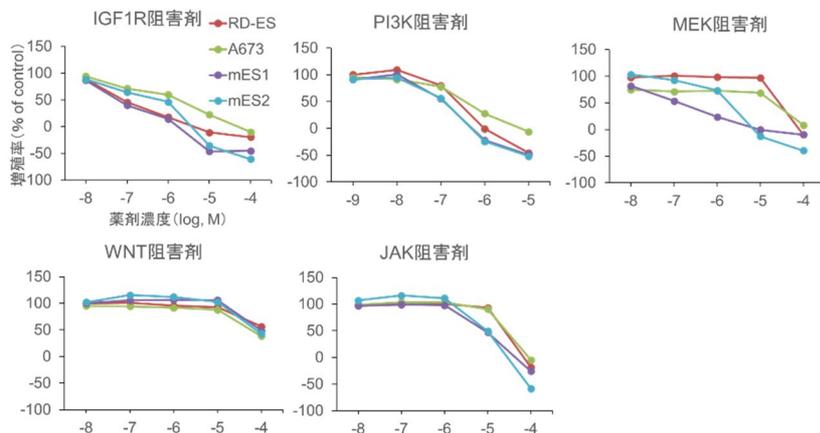


図1. マウスおよびヒトユーイング肉腫細胞株に対する増殖・生存シグナル阻害剤の抗腫瘍効果

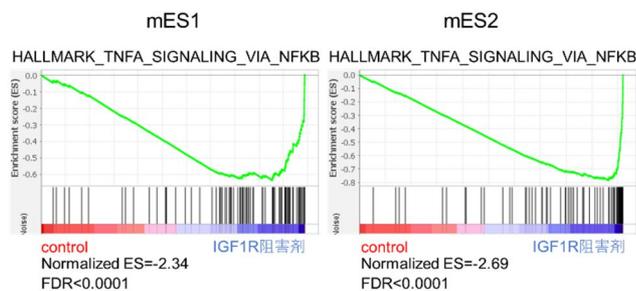


図2. IGF1R 阻害剤をマウスユーイング肉腫細胞株に処理したサンプルのGSEA解析結果の一部

メラノーマや肺癌などでは、WNT や MEK/ERK シグナルによって T 細胞や樹状細胞の遊走に関わるケモカインや抗原提示分子 (MHC) の発現が制御され、抗腫瘍免疫の抑制に寄与していることが報告されている (S. Spranger et al., Nature 2015, AJ. Neuwelt et. al., JITC 2020)。そこで、ユーイング肉腫における増殖・生存シグナルの阻害によるケモカインや抗原提示分子といった抗腫瘍免疫に関連した遺伝子の発現変動について検討した。その結果、CD8 $^+$ T 細胞や樹状細胞の遊走に関わることが知られるケモカインや抗原提示分子、抗原のプロセッシングに関わる分子が、IGF1R や PI3K、MEK 阻害剤処理によって発現誘導されていることが分かった。

PI3K シグナルについて、骨肉腫、滑膜肉腫の細胞株を用いて同様に検討したところ、GSEA 解析によってこれらのサブタイプの細胞株においても PI3K シグナルの阻害によって免疫に関連した遺伝子セットが発現変動していることが分かった。また、ユーイング肉腫と同様に抗腫瘍免疫の活性化に寄与していることが予想される CD8 $^+$ T 細胞や樹状細胞の遊走に関わるケモカインや抗原提示分子が発現誘導されていることが示された。

以上のことから、ユーイング肉腫における IGF1R、PI3K、MEK シグナルは、ユーイング肉腫の増殖・生存だけでなく、一部の免疫に関連した遺伝子の発現も制御していることが示唆された。また、JAK、WNT シグナルはユーイング肉腫の増殖にはほとんど寄与していないと考えられたが、一部の免疫に関連した遺伝子の発現を制御しているものと考えられた。また、肉腫の増殖・生存シグナルによる免疫抑制機構に寄与する候補因子を複数見出した。PI3K 阻害剤は、肉腫の腫瘍内の T 細胞にも作用して抗腫瘍免疫を抑制する制御性 T 細胞を抑制し、抗 PD-1 抗体との併用効果を示すことを *in vivo* 同系マウスモデルで明らかにしている (論文投稿中)。このことから、増殖・生存シグナルの阻害剤は肉腫細胞だけでなく、宿主の T 細胞にも作用することが予想される。今後、*in vivo* 同系マウスモデルなどを用いて肉腫細胞の増殖・生存シグナルの阻害による免疫関連遺伝子の発現変動と抗腫瘍免疫の抑制の関連を明らかにするとともに免疫細胞における各シグナルの機能も明らかにすることで、肉腫における新たな免疫療法開発の基礎データとなると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 PI3K阻害剤ZSTK474の肉腫細胞に対する細胞死誘導作用の解析
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉城尚美、礪山翔、旦慎吾
2. 発表標題 pan-PI3K阻害剤ZSTK474の滑膜肉腫に対するアポトーシス誘導機構の解析
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 PI3K阻害剤ZSTK474の染色体転座陽性肉腫に対する細胞死誘導作用の解析
3. 学会等名 第79回 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礪山翔、生田目奈知、玉城尚美、吉澤雄也、岡村睦美、西村由美子、山崎佳波、矢口信一、旦慎吾
2. 発表標題 肉腫細胞パネルを用いたPI3K阻害剤ZSTK474の抗がん効果の検討
3. 学会等名 2019年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------