

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07582

研究課題名（和文）放射線誘導免疫応答におけるnon-coding RNA pathwayの解析

研究課題名（英文）Impact of non-coding RNA pathways in radiation-induced immune response

研究代表者

影山 俊一郎（Kageyama, Shun-ichiro）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：60644979

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）：本研究では肺非小細胞癌株A549を用いて、放射線が誘導する免疫応答のメカニズムを調べた。その結果、放射線照射によりトランスポゾンが活性化し、RIG-I pathwayを介したインターフェロン応答が免疫応答を誘導することを明らかにした。さらに、放射線治療中の食道癌組織を用いたscRNA seqによりこれらのRNA sensor依存的な免疫応答ががん組織内でも活性化しており、免疫応答に関与することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療、免疫チェックポイント阻害薬等の免疫治療は多くのがん種で適応になる治療であり、放射線治療と免疫チェックポイントを併用する治療も大きく期待されている治療であるため、放射線治療による免疫応答を理解し、最適な併用免疫治療を確立することは重要である。今回この放射線誘導免疫応答は少なくとも肺非小細胞癌、食道扁平上皮癌ではRNA sensor RIG-I依存的に誘導され、放射線によるトランスポゾンの活性化を介して誘導されることを明らかにした。本研究結果は放射線生物学的に重要な発見であり、より最適な免疫治療併用放射線治療の確立やバイオマーカー確立につながる知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanisms of radiation-induced immune responses using the non-small cell lung cancer cell line A549. Our results revealed that radiation exposure activates transposons, which in turn induce an interferon response via the RIG-I pathway, thereby triggering an immune response. Additionally, scRNA-seq analysis of esophageal cancer tissues during radiation therapy showed that these RNA sensor-dependent immune responses are also activated within the cancer tissues, confirming their involvement in the immune response.

研究分野：放射線生物学

キーワード：肺非小細胞癌 がん免疫応答 RNA sensor pathway 1細胞解析 食道癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは 2018 - 2020 年度基盤研究 C 採択課題 (18K07740) として食道癌細胞株 KYSE450, 肺非小細胞癌細胞株 A549 細胞株、さらに食道癌患者の放射線治療前後の癌組織検体を用いて (IRB 2018-101) 放射線照射による免疫応答プロファイルとその制御機構についての研究を行ってきた。その結果、放射線照射後細胞質 DNA を認識する cGAS-STING pathway を起点とした Type I インターフェロン依存的、IRF 遺伝子依存的に免疫応答が誘導されることを明らかにした (Kageyama *et al.* Cancer Sci. 2022)。一方同研究内で細胞株、癌組織の トランスクリプトーム解析から癌細胞内で放射線照射により RNA ウイルスに対する免疫応答シグナルが強く活性化されていることを見出している。この起点となる遺伝子である RIG-I のノックアウト細胞株を用いた解析では、KYSE450, A549 いずれも放射線照射による免疫応答が大幅に低下し、放射線照射による免疫応答にこの pathway が必須であることが明らかになった (Kageyama *et al.* Commun Biol. 2023)。

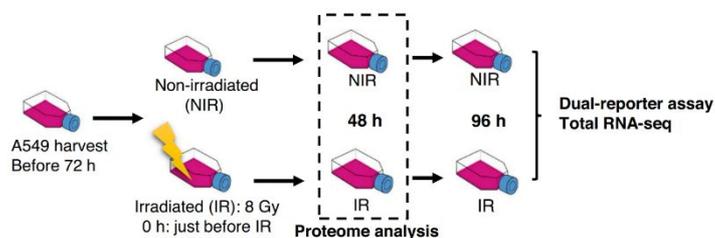
これは 放射線照射による細胞応答、遺伝子発現応答が、古くから知られた DNA 損傷のみではなく、RNA 損傷による断片化 RNA にも依存して惹起されることを示す結果 であり、申請者らはこの放射線照射による RNA 誘導免疫応答の解明を目的として本研究課題を立案した。

### 2. 研究の目的

我々の先行研究では一部の癌細胞株では RNA sensor 依存的な放射線誘導免疫応答が支配的に作用することを明らかにしている。また、癌細胞株における放射線誘導免疫応答が DNA sensor 依存的に行われるものと、RNA sensor 依存的に行われるものに分かれることは 2020 年に報告された (Feng *et al.* EMBO J. 2020)。DNA sensor pathway は二重差切断 (DSB) または小核形成をリガンドとし、cGAS-STING 経路を介した IFN 応答により生じることが明らかとなっている。一方で RNA sensor pathway についてはそのリガンド、Pathway について不明な点が多く、特にリガンドを直接照射した研究は存在しておらず、我々はこの RNA sensor 依存的な免疫応答のリガンドや pathway を分子レベルで明らかにすることを目的にして研究を行った

### 3. 研究の方法

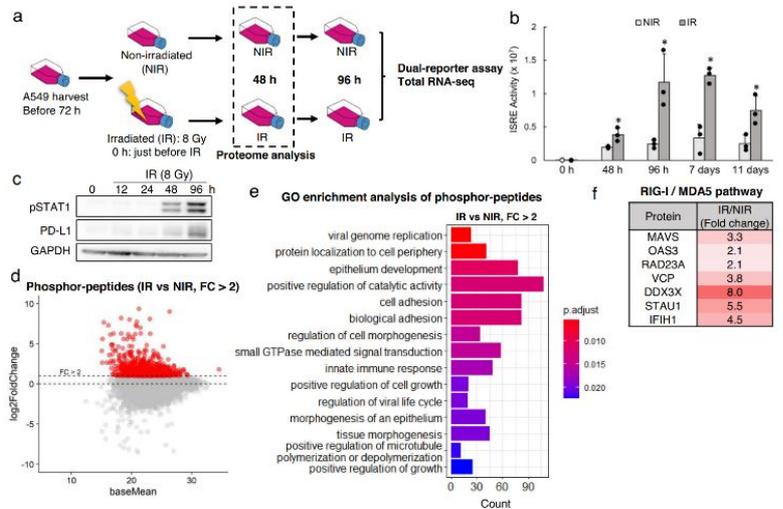
我々はこれまでの研究で A549 細胞株に IRF, NFkB プロモーター下流にそれぞれレポート遺伝子を組み込んだ A549-dual 細胞株を用いて放射線誘導免疫応答の解析を行ってきた (Kageyama *et al.* Br J Cancer. 2022)。本研究でも同細胞株を用いて 8Gy/1fr での放射線誘導免疫応答に焦点を当てた研究を行った (右図)。



#### 4. 研究成果

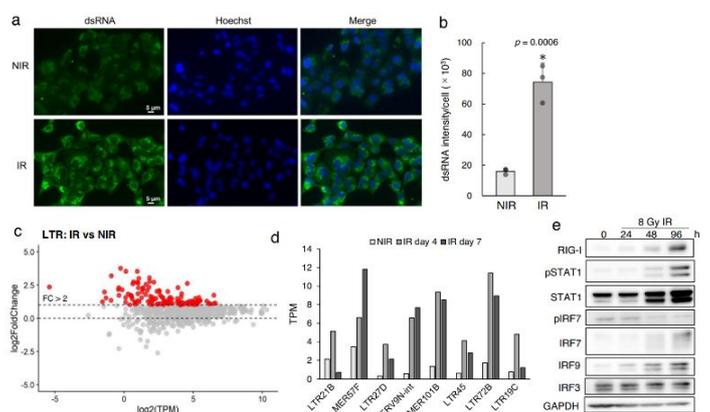
##### (1) マススペクトルによるプロテオーム解析と放射線免疫応答の上流 pathway の探索

A549 では照射後 48 時間で免疫応答が始まるため(右図 bc)、このタイムポイントでリン酸化タンパクを標的としたマススペクトル解析を行い、放射線により誘導される Pathway のスクリーニングを行った。放射線後に増加するリン酸化タンパクで enrich された pathway には viral reaction に関与するものが多く含まれ、特に MAVS を介した RNA sensor pathway の活性化が強く認められた(右図 ef)。一方で DNA sensor pathway 関連遺伝子の活性化は抑えられており、A549 では RNA sensor dominant なメカニズムの関与が示唆された。

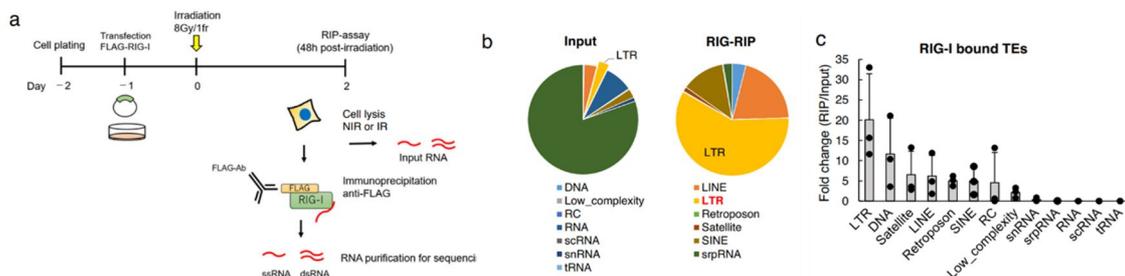


##### (2) 免疫染色、WTS による RNA pathway の解析

マススペクトル結果を元に dsRNA の免疫染色、Whole transcriptome 解析を行い、放射線が細胞内に誘導する RNA を同定した。放射線照射後 A549 中の dsRNA は 3 時間後には増加しており(右図 ab)、ポリ A 以外の転写物を含む WTS 解析の結果、主にトランスポゾンのうち ERV-LTR に属する転写産物が増加していた(右図 cd)。また、ウイルス RNA に対する免疫応答も活性化することを確認した(右図 e)。



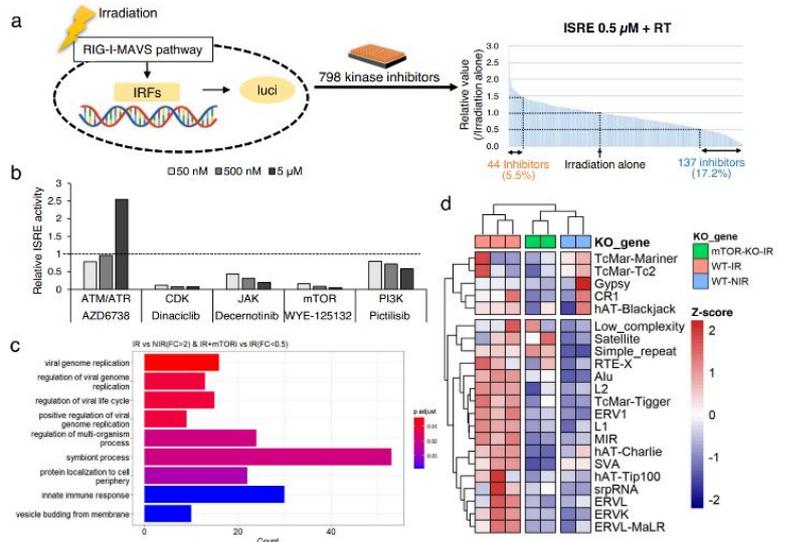
##### (3) RNA 免疫沈降法 (RIP-seq) による RNA sensor リガンドの同定



RIG-I を介した RNA sensor pathway のリガンドの同定を行った。FLAG-RIG-I の強制発現と抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降、WTS により RIG-I 結合 RNA を同定した(上図 a)。その結果、RIG-I 結合 RNA 分画にはトランスポゾン (TE) 構成因子である LTR が有意に濃縮され(上図 bc)、放射線誘導 RNA sensor pathway は主に LTR によって引き起こされることが示された。

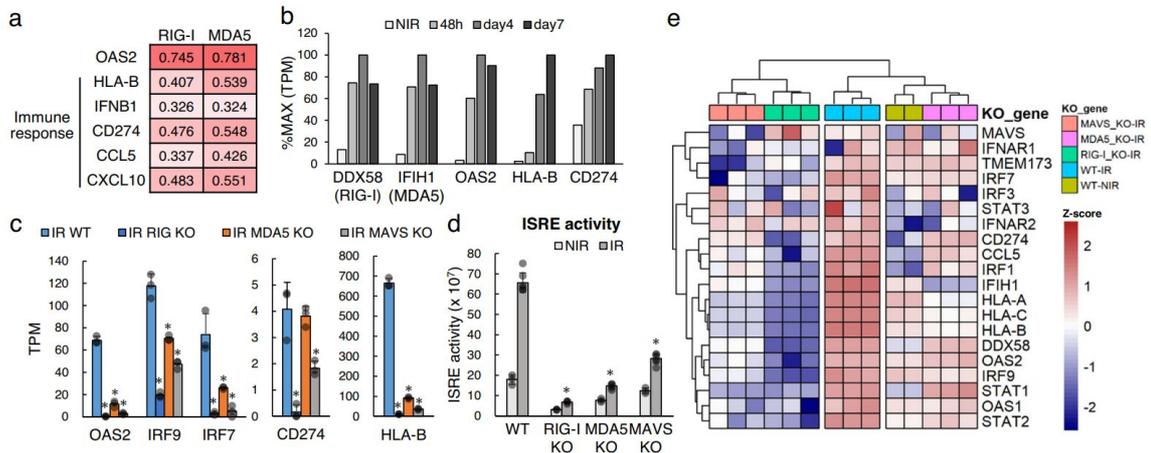
#### (4) Kinase inhibitor library を用いた RNA sensor pathway の考察

研究開始 2 年目の時点で放射線が誘導する RNA 依存的免疫は国内外のグループで複数報告されていたが、そのリガンドについては定まっておらず、またリガンドとなる RNA が誘導する上流 pathway はほとんど報告がなかった。そのため我々はこの上流を同定する目的で 798 の Kinase inhibitor を用いたスクリーニングを行った。IRF プロモーターに LUC を組み込んだレポーター細胞 (A549-dual) を用いてスクリーニングを行った (下図 a)。免疫応答を活性化することが報告されている ATR 阻害剤を positive control、CDK 阻害薬を negative control として評価し、mTOR 阻害剤が特に強く免疫応答を抑制することを確認した。mTOR ノックアウト細胞を作成し、マスペクトル、RNA seq で評価した結果ウイルス応答シグナル、多くのトランスポゾン RNA の放射線による誘導が抑制され、mTOR pathway が放射線による RNA sensor pathway の上流に位置することを確認した (右図 cd)。



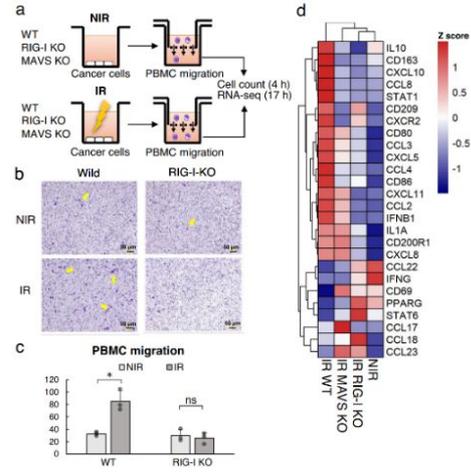
#### (5) ノックアウト細胞株による RIG-I pathway の機能解析

放射線誘導免疫応答における RIG-I pathway の機能について解析した。まず、TCGA のソースデータからヒト肺癌組織内の免疫応答と RNA sensor 遺伝子 RIG-I, MDA-5 の発現相関を確認した (下図 a)。また、A549 中でも RIG-I, MDA5 は放射線照射後早期に誘導されることが明らかとなった (下図 b)。この RIG-I, MDA5 とその下流遺伝子 MAVS をノックアウトした A549 細胞株を樹立した結果、OAS, CD274 等の遺伝子、レポーター応答、は顕著に低下し、これらの RNA sensor pathway は放射線誘導免疫応答において必須の機能を有していることが明らかとなった (下図 cde)。



## (6) PBMC migration assay

ここまでの解析で RIG-I pathway が放射線誘導免疫応答において IRF の活性及びその下流遺伝子発現に必須であることが明らかになった。次に細胞株を用いてこの pathway による周囲の免疫細胞への影響を確認した。放射線照射を行った A549 に対するヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の migration を評価した (右図 a)。その結果、野生型では放射線照射後 PBMC migration を有意に誘導するのに対して、RIG-I ノックアウト細胞はこの誘導を示さなかった (右図 bc)。また PBMC 中の遺伝子発現においても RNA sensor 遺伝子のノックアウトによりその免疫活性化が失われていた (右図 d)。

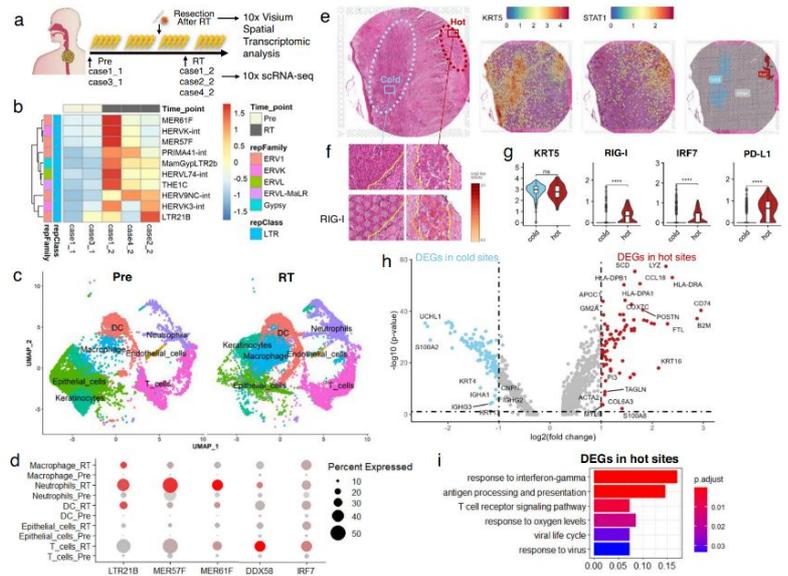


## (7) 放射線治療後食道癌患者組織を用いた RNA sensor pathway 解析

最後にこれまで細胞株で確認した RIG-I、RNA sensor 依存的な免疫応答が患者がん組織中で誘導されることを確認した。我々は IRB 承認のもと食道癌患者の治療前後検体を用いた scRNA seq 解析、空間トランスクリプトーム解析を行っており、この検体を用いて放射線照射後のがん組織でトランスポゾン、RIG-I 依存的な免疫応答の確認を行った。

scRNA seq 解析検体は治療前 2 例、治療中 3 例の解析を行い、治療後に多くの種類のトランス

ポゾン RNA が誘導されることを確認した。(右図 ab)。UMAP により各細胞クラスターを分離した解析ではトランスポゾン RNA である LTR21B や DDX58 (RIG-I) は各細胞クラスターで誘導されていた。放射線照射後検体を用いた空間トランスクリプトーム VISIUM による解析では同一検体で免疫応答が活性化される Hot 部位と免疫応答が抑制される Cold 部位に分かれることが確認でき、ウイルス応答 pathway が Hot に固有のシグナルであることを確認した (右図 efhi)。



このように我々は放射線誘導免疫応答を細胞株を用いてそのメカニズムを明らかにした。特にリガンドの同定とその上流 pathway の同定は新規性の高い報告であり、さらにこれらの pathway が放射線治療中のヒト組織内で誘導されることを明らかにした放射線生物学において意義の大きい成果を示すことができ、これらの成果は2023年に Communication Biology 誌、Science Advances 誌に研究代表者である影山が責任著者としてそれぞれ掲載、発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 J. Du, S.I. Kageyama*, H. R. Yamashita, H. Hirata, Y. Hakozaiki, M. OkumuraHirata, A. Motegi, H. Hojo, M. Nakamura, Y. Hirano, H. Sunakawa, T. Minamide, D. Kotani, T. Yano, T. Kojima, A. Ohashi, K. Tsuchihara, T. Akimoto,	4. 巻 113
2. 論文標題 Impacts of the STING-IFNAR1-STAT1-IRF1 pathway on the cellular immune reaction induced by fractionated irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1352-1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15297.	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 -

1. 著者名 M. Okumura, J. Du, S.I. Kageyama*, R. Yamashita, Y. Hakozaiki, A. Motegi, H. Hojo, M. Nakamura, Y. Hirano, Y. Okuma, H. Okuma, K. Tsuchihara, and T. Akimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Comprehensive screening for drugs that modify radiation-induced immune responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01688-0.	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 -

1. 著者名 J. Du, S.I. Kageyama, H. Hirata, A. Motegi, M. Nakamura, Y. Hirano, M. Okumura, R. Yamashita, K. Tsuchihara, H. Hojo, R. Hirayama, T. Akimoto	4. 巻 585
2. 論文標題 Comparative analysis of the immune responses in cancer cells irradiated with X-ray, proton and carbon-ion beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Junyan Du, Shun-Ichiro Kageyama et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Transposable elements potentiate radiotherapy-induced cellular immune reactions via RIG-I-mediated virus-sensing pathways	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communication Biology	6. 最初と最後の頁 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05080-x.	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 -

1. 著者名 Hidenari Hirata , Shun-Ichiro Kageyama et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 The Evolving Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Under Chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4926-4938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-0653.	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 -

1. 著者名 Shun-Ichiro Kageyama, Junyan Du, Syuzo Kaneko, Ryuji Hamamoto, Shigeo Yamaguchi, Riu Yamashita, Masayuki Okumura, Atsushi Motegi, Hidehiro Hojo, Masaki Nakamura, Katsuya Tsuchihara, Tetsuo Akimoto	4. 巻 155
2. 論文標題 Identification of the mutation signature of the cancer genome caused by irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiotherapy and oncology	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2020.10.020. Epub 2020 Oct 17.	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大吉秀和
2. 発表標題 1細胞解析を用いた放射線治療による食道癌患者組織での免疫学的変化の経時的解析
3. 学会等名 放射線腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大吉秀和
2. 発表標題 時空間解析による放射線治療による食道がん患者組織での免疫環境変化の解析
3. 学会等名 日本がん治療学会
4. 発表年 2023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
---------	---------