

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07171

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害時に働く第二のがん免疫回避機構の同定

研究課題名(英文) Identification of the secondary mechanism for immune evasion in cancer at the immune checkpoint inhibition

研究代表者

弓本 佳苗 (Kanae, Yumimoto)

九州大学・生体防御医学研究所・特別研究員

研究者番号：30596838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1/PD-L1経路「感受性がん」と「抵抗性がん」を比較し、違いを明らかにすることで第2の免疫チェックポイント回避経路を描出することを試みた。経脾移植実験系においてB16F1細胞はPD-1/PD-L1経路「感受性がん」、B16F10細胞は「抵抗性がん」のモデルとして用いることができることを発見した。PD-L1欠損B16F1細胞に変異導入を行い、PD-1/PD-L1経路「抵抗性がん」に変化させた後、変異原解析やRNAseq解析をおこなった。さらにヒトの免疫チェックポイント「感受性」「抵抗性」患者との比較をおこない、計24の分子をがん免疫からの第二の回避機構のマスター因子候補として推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫チェックポイント阻害剤の明確な治療効果が示され、国内でも悪性黒色腫や非小細胞肺がんが承認されるなど、ますます注目を集めている。しかし、多くのがんにおいて奏効率は10%～30%程度であり、さらなる向上が求められている。同時に、抗体医薬を用いた治療はその高額な薬価が社会問題になっており、治療が有効な患者を選択するためのバイオマーカーの発見が必要とされている。本研究は、併用療法の最適化および新規バイオマーカー発見といった免疫チェックポイント阻害療法の拡充プロセスへ必須であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to compare between "susceptible" and "resistant" cancers for the inhibition of PD-1/PD-L1 pathway, and attempted to describe a second immune checkpoint avoidance pathway by elucidating the differences. We found that we can use B16F1 and B16F10 melanoma cells as a model of "susceptible" and "resistant" cancers for the inhibition of PD-1/PD-L1 pathway when transplanted via spleen. Mutagenesis and RNAseq analysis were performed after mutagenesis of PD-L1-deficient B16F1 cells, which were transformed to the PD-1/PD-L1 pathway "resistant cancer". By comparing the results from mouse with those of human immune checkpoint-sensitive and resistant patients, a total of 24 molecules were deduced as candidate master factors for the second avoidance mechanism from cancer immunity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：免疫チェックポイント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

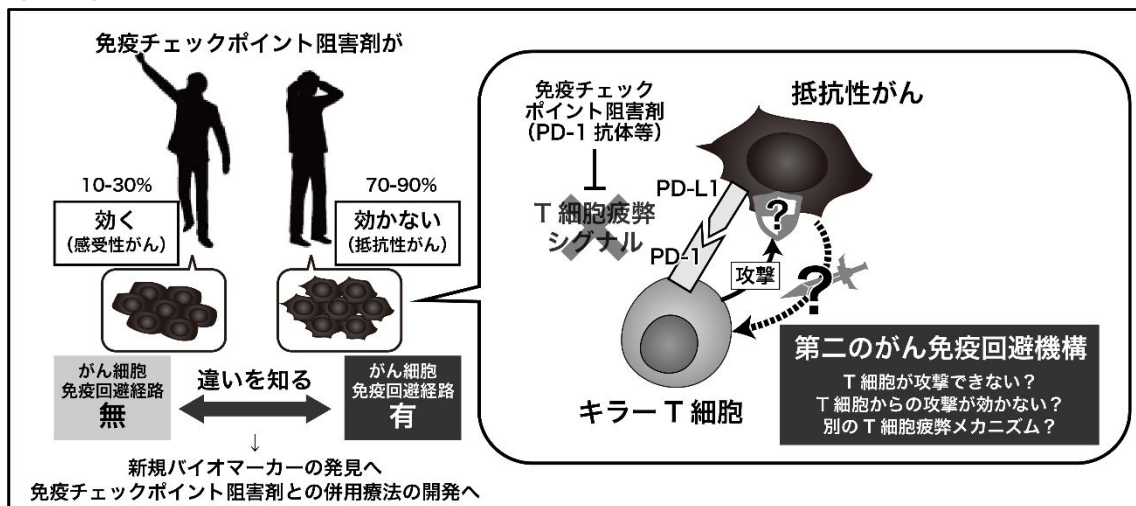
1. 研究開始当初の背景

近年、PD-1 抗体に代表されるような免疫チェックポイント阻害剤の明確な治療効果が示され、国内でも悪性黒色腫や非小細胞肺癌で承認されるなど、ますます注目を集めている。しかし、多くのがんにおいて奏効率は 10% ~ 30% 程度 [Herbst et al., 2013] であり、さらなる向上が求められている。他の免疫療法や化学療法との併用が「場当たりに」考案・検討されているものの、強烈な副作用を伴う例が少なくなく、劇的な改善を示した例は未だ知られていない。

同時に、抗体医薬を用いた治療はその高額な薬価が社会問題になっており、治療が有効な患者を選択するためのバイオマーカーの発見が必要とされている。免疫チェックポイント阻害剤に対してはこれまでに、腫瘍細胞の PD-L1 発現量 [Topalian et al., 2012]、がん細胞のゲノム変異量 [Snyder et al., 2014]、免疫細胞の腫瘍内浸潤量 [Tumeh et al., 2015] 等が検討されているものの、いずれも有効な選択はできず、より明瞭なバイオマーカーの発見が求められている。

PD-1 抗体はがん細胞や免疫担当細胞上の PD-1 リガンド (PD-L1) の発現がないと当然効かないが、PD-L1 を発現するがん細胞であっても約半数には効かないことがわかっている [Herbst et al., 2014]。これは PD-1/PD-L1 経路に「抵抗性がん」の存在、即ち PD-1/PD-L1 経路を阻害してもなお機能する第二のがん免疫回避機構の存在を示唆しているものの、その本質が何であるかはわかっていなかった (図 1)。

(図 1) 本研究の背景



2. 研究の目的

本研究では PD-1/PD-L1 経路「感受性がん」と様々な PD-1/PD-L1 経路「抵抗性がん」を比較し、両者の違いを明らかにすることで、免疫チェックポイント回避経路を描出することを目標とした。具体的には、PD-1/PD-L1 経路「感受性がん」と「抵抗性がん」のマウスモデルと順遺伝学を組み合わせ、PD-L1 発現がん細胞株が PD-1/PD-L1 経路抵抗性を獲得する分子機構の同定を目標とした。

3. 研究の方法

B16F1 細胞の PD-L1 欠損株にメタンサルホン酸エチル (EMS) を用いた変異原処理をおこなった。変異獲得がん細胞をマウスに移植し、抵抗性を獲得した細胞の変異遺伝子を探索し、抵抗性の原因遺伝子を同定した。また、RNAseq により、変異導入の結果どのような経路が変動したかを解析した。

4. 研究成果

(1) PD-1/PD-L1 経路「感受性がん」と「抵抗性がん」のマウスモデルの発見

B16 細胞は C57BL/6 マウス由来の悪性黒色腫細胞株であり、その亜株として低転移性の B16F1 細胞と高転移性の B16F10 細胞が知られている。両細胞とも他の培養細胞株と比較して PD-L1 を高発現していた。CRISPR/Cas9 を用いて両細胞の PD-L1 欠損株を作製し、皮下移植、尾静脈移植、経脾移植実験をおこなったところ、B16F1 細胞の経脾移植実験において PD-L1 欠損株は肝臓への転移が全く見られなかったのに対して、B16F10 細胞の PD-L1 欠損株は、(転移の減少傾向は見られたものの)完全に転移が抑制されることはなかった。他の 2 種の移植系ではいずれも PD-L1 欠損株において腫瘍の増殖は阻害されたが、完全に抑制されることはなかった。つまり、経脾移植実験系において B16F1 細胞は PD-1/PD-L1 経路「感受性がん」、B16F10 細胞は PD-1/PD-L1 経路「抵抗性がん」のモデルとして用いることができ、このモデルを用いてがん免疫からの第二の回避機構の探索が可能であると考えた。

(2) 変異導入による「抵抗性がん」の獲得

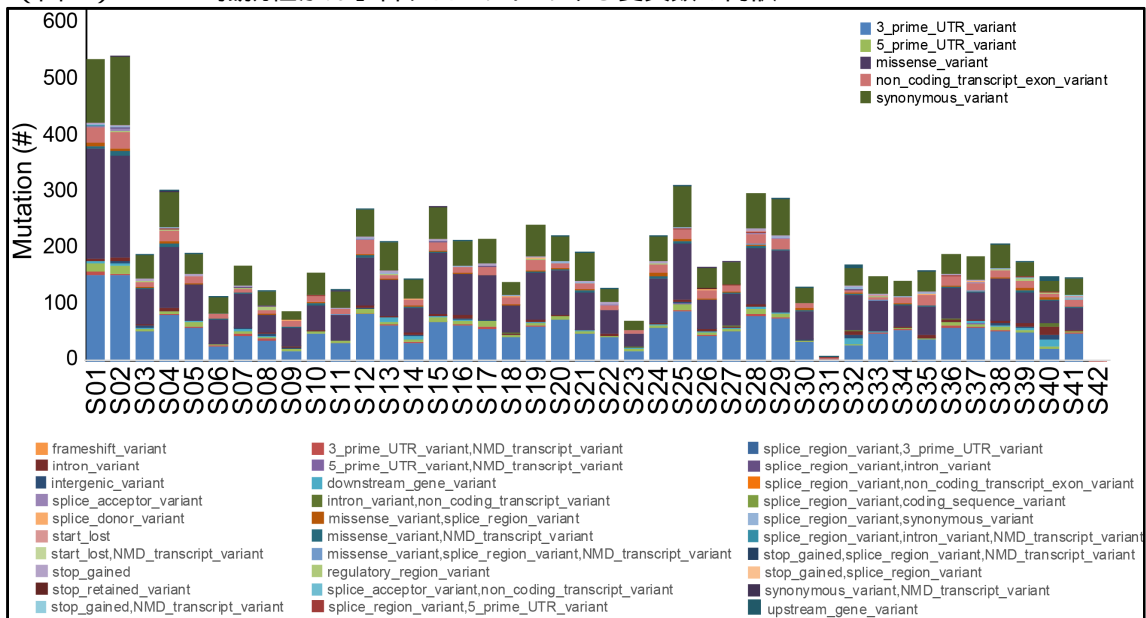
蛍光タンパク質 tdTomato を発現させた B16F1 細胞を EMS で処理し、細胞に変異を導

入した。この変異細胞をマウスに移植し、肝臓に転移した細胞を回収・RPMI 培地で培養した。回収した細胞を再度マウスに移植して、本当に転移能を獲得したかを確認したところ、ほぼすべての取得したクローンで、転移能が獲得された。これらの転移能が獲得された細胞を「抵抗性がん」に変化したとみなし、獲得した 169 クローンのうち 42 クローンについて RNAseq をおこなって RNA 上の変異箇所や RNA 量の変動を確認した。加えて、「抵抗性がん」の第二のモデルとして、B16F10 の RNAseq の解析も併せておこなった。

(3) 導入変異の解析

取得した各クローン細胞で RNA 上に観察された EMS 由来の変異について解析を行った。その結果、42 クローン細胞で平均 197 個の EMS 由来変異を確認した(図 2)。特に変異が濃縮されている遺伝子や分子経路は確認できなかった。

(図 2) B16F1 「抵抗性がん」各クローンにおける変異数の内訳



(4) RNA 発現変動量の解析

取得した各クローン細胞について、RNAseq 解析を行い、RNA の発現変動についてコントロール細胞と比較した。それぞれの細胞について、GSEA 解析によりどのような遺伝子群が変化しているかについての解析を行った。なお、用いたジーンセットは GSEA にデフォルトで準備されているものに加えて、特に転写因子に着目し、ChIPatlas (<https://chip-atlas.org/>) のデータベースより、登録されている各転写因子に対して独自に作成したジーンセットも用いた。さらに IPA (Ingenuity® Pathway Analysis) ソフトウェア中の upstream analysis を用いて上流因子の解析も行い、それぞれのデータを統合した。

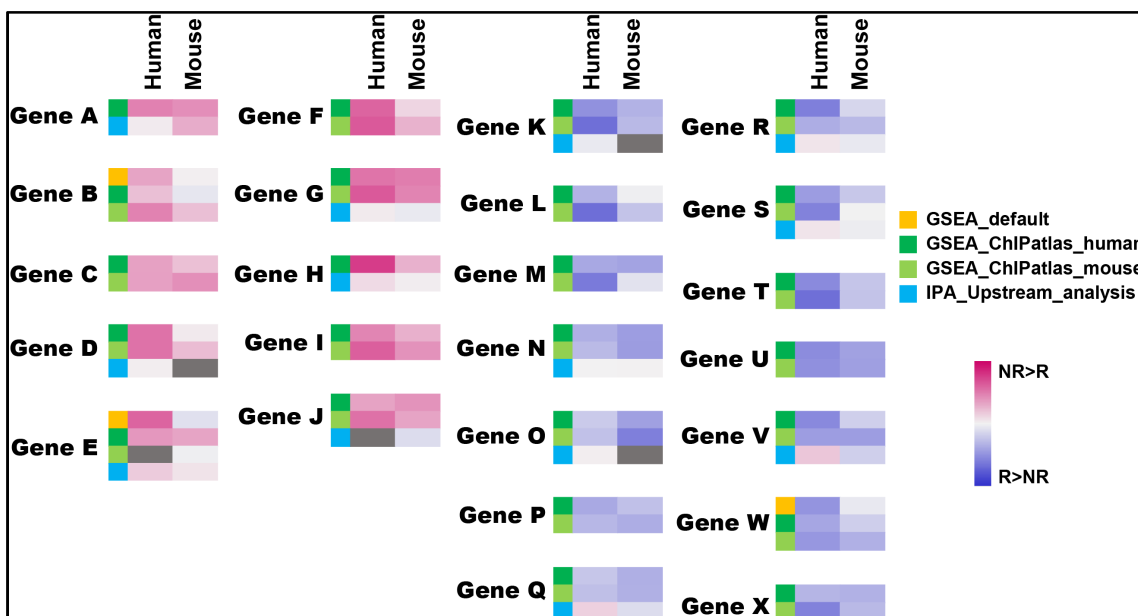
(5) ヒト公共データベースを用いた RNA 発現変動量の解析

免疫チェックポイント阻害剤を用いた治験は世界中で進んでおり、それに伴って阻害剤への感受性・抵抗性がんのプロファイルデータも充実してきている。上記で発見された変異分子群が実際にヒト患者でも変化しているのかを確認し、ヒトでの治療応用が可能かを確認するため、Hugo et al., 2016 にて発表されたデータ (responder=13, non-responder=14) についても、(4) で述べた解析と同様の解析をおこなった。

(6) マウスとヒトのデータ統合によるがん免疫からの第二の回避機構の推定

(4)と(5)のデータを統合し、4 種のデータ解析 (GSEA-default, GSEA-ChIPatlas_Human, GSEA-ChIPatlas_mouse, IPA upstream analysis) 計 20373 種の上流因子について解析を行った。この中で、(4)と(5)で同様の傾向にある上流因子、かつ複数のデータ解析で同じ傾向を示した上流因子を、がん免疫からの第二の回避機構のマスター因子候補として推定した(図 3)。

(図 3) がん免疫からの第二の回避機構のマスター因子候補



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanae Yumimoto, Shigeaki Sugiyama, Koshi Mimori, Keiichi I. Nakayama	4. 巻 110
2. 論文標題 Potentials of C C motif chemokine 2-C C chemokine receptor type 2 blockers including propagermanium as anticancer agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14075	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 Kanae Yumimoto, Keiichi I. Nakayama	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	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) 10.1016/j.semcancer.2020.02.017	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 Sugiyama S, Yumimoto K, Inoue I, Nakayama KI	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 SCFFbxw7 ubiquitylates KLF7 for degradation in a manner dependent on GSK-3-mediated phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 GENE CELLS	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12680	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 Nakayama S, Yumimoto K, Kawamura A, Nakayama KI.	4. 巻 293(15)
2. 論文標題 Degradation of the endoplasmic reticulum-anchored transcription factor MyRF by the ubiquitin ligase SCFFbxw7 in a manner dependent on the kinase GSK-3.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 5705-5714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.RA117.000741.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 弓本 佳苗、中山 敬一
2. 発表標題 がん細胞が抗PD-1/PD-L1免疫治療を免れるための分子経路の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弓本 佳苗、中山 敬一
2. 発表標題 がん細胞が免疫チェックポイント阻害を免れる分子経路のゲノムワイドスクリーニング
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 弓本 佳苗、中山 敬一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 ユビキチン・プロテアソーム系（UPS）とがん治療戦略	

1. 著者名 杉山 成明、弓本 佳苗、中山 敬一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 305
3. 書名 がん転移学（上）がんの浸潤と転移のメカニズム	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----