

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09357

研究課題名(和文) 胃癌細胞におけるPD-L1タンパク質膜輸送システムの解明と免疫療法への応用

研究課題名(英文) Membrane trafficking system of PD-L1 in gastric cancer cells and its application to immunotherapy

研究代表者

城 卓志 (Joh, Takashi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・名誉教授

研究者番号：30231369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では胃癌を対象に、CUL3-BTBPのPD-L1細胞内輸送制御の機序を検証した。CUL3もしくはBTBPのknockdownによるPD-L1発現、細胞内局在の変化が確認されたが、その影響は両者で異なり、マイクロアレイを用いた検証では、CUL3とBTBPが結合し、ユビキチンリガーゼとしてPD-L1の発現や局在を制御していることを示す結果は得られなかった。これまでの検証から、PD-L1の細胞内輸送をコントロールしているBTBPを確認しているため、今後は、このBTBPに着目し、PD-L1タンパク質輸送制御メカニズムの解明をすすめる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PD-L1を標的とした免疫チェックポイント阻害剤が開発され、胃癌への効果は限定的で改善の余地は大きい。既存のPD-L1抗体薬とは異なる作用機序を持つ薬剤の開発が望まれるが、そのためには、胃癌におけるPD-L1発現や細胞内輸送制御の機序を解明することが必要である。本研究では、想定していたCUL3-BTBP軸によるPD-L1発現および細胞内輸送制御は確認できなかったが、BTBP単独でPD-L1発現および細胞内輸送制御に關与していることを示唆する知見を得ることができた。本研究の成果は、さらに研究を推進することで、新たな免疫チェックポイント阻害剤の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanism of PD-L1 intracellular transport regulation by CUL3-BTBP in gastric cancer. Knockdown of CUL3 or BTBP caused changes in PD-L1 expression and subcellular localization; however, the effects differed between the two molecules. Microarray analysis demonstrated that CUL3 and BTBP do not function together as ubiquitin ligases to control the intracellular transport of PD-L1. We identified a BTBP that controls intracellular transport of PD-L1. Therefore, we are focusing on BTBP to elucidate the mechanism by which it regulates the intracellular transport of PD-L1.

研究分野：消化器内科

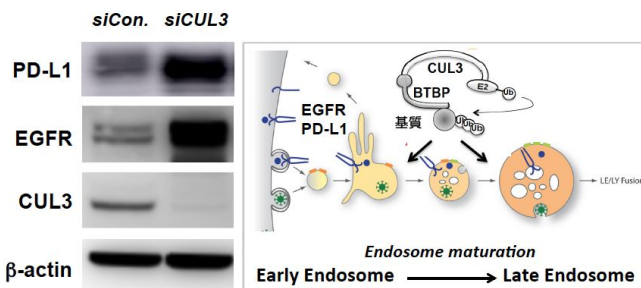
キーワード：胃癌 Cullin3 PD-L1/PD-1 ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、T細胞の働きを抑制することにより、免疫細胞による攻撃から逃れている。がん細胞膜蛋白質 programmed death-ligand (PD-L) 1 と T細胞膜に発現する programmed death (PD) 1 との結合が、T細胞の細胞傷害作用を抑制することにより、がんの免疫逃避機序に重要な役割を果たす。最近、この両者の結合を阻害する PD-L1 抗体薬が登場し、非小細胞肺癌や胃癌、大腸癌といった固形がんに有効性を発揮し、臨床応用され始めている。しかしこの治療法は、制御性 T細胞の機能まで抑制することから、自己免疫様疾患を誘導する危険性ははらむ諸刃の剣である。しかし、がん細胞や細胞傷害性 T細胞での PD-L1 蛋白質産生の制御機能に新たな側面を見出せば、中和抗体を用いない PD-L1 の制御が可能となると考えられる。

我々は、これまでに、ZnF-BTB 蛋白質の一つである BAZF が、BTB ドメインを介して Cullin3(CUL3)と複合体を形成し、CUL3 型 E3 コピキチンリガーゼとして機能することを見出してきた。CUL3 は BTB ドメインタンパク質(BTBP)を基質認識のリンカーとして用いる。すなわち、CUL3 は BTBP を組み替えることで幅広く基質を認識し、これをユビキチン化し、分解や機能変換等の制御に深く関わるプラットフォームタンパク質である。我々は、胃癌細胞において、CUL3 が細胞増殖因子 EGF の受容体(EGFR)のみならず、PD-L1 等の細胞膜蛋白質産生を膜蛋白質輸送の側面から制御することを新たに見出している。図に示す様に、siRNA によって CUL3 を一過性にノックダウンさせると、EGFR や PD-L1 の細胞膜上での発現が顕著に増強される。さらに、これらの PD-L1 タンパク質量を制御する BTBP を、siRNA を用いてスクリーニングし、いくつかの候補分子を同定した。



2. 研究の目的

本研究では胃癌を対象に、CUL3-BTBP の PD-L1 タンパク質輸送制御に関与する機序を検証し、がん免疫の誘導、活性化のメカニズムを明らかにすることを目的としている。また、胃癌に対する新たな免疫治療の開発の足がりとなる成果を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株を用いた PD-L1 発現への CUL3 の関与についての検証

胃癌細胞株を用い、PD-L1 の発現を Western blot を用いて検証する。これにより同定された PD-L1 発現胃癌細胞株を用い、siRNA により CUL3 を knockdown し、PD-L1 発現の変化について検証する。

(2) CUL3 による PD-L1 の細胞内局在の制御についての検証

(1)の実験により同定した、CUL3 発現と PD-L1 発現に関連があると認められた胃癌細胞株を用いて、CUL3 の knockdown による PD-L1 の細胞内局在の変化を、蛍光免疫染色を用いて検証する。さらに、PD-L1 の発現変化をもたらす CUL3 のパートナーとなる BTBP の探索を、183 種類の BTBP の siRNA を用いて網羅的に探索する。

(3) BTBP による PD-L1 の発現制御メカニズムの検証

PD-L1 の発現制御における CUL3 のパートナーとなりうる BTBP の網羅的な探索により明らかとなった BTBP を、siRNA を用いて knockdown し、PD-L1 の発現変化、局在変化を検証する。また、マイクロアレイを用いて、BTBP および CUL3 の knockdown による遺伝子発現に変化について網羅的に検証した。

(4) CUL3/BTBP 軸による PD-L1 の発現制御メカニズムの検証

ライブイメージング法を用い、胃癌細胞株 NCI-N87, NUGC-4 の PD-L1 の細胞内輸送の制御経路を検証する。この実験では、BTBP を siRNA により knockdown した胃癌細胞を用いることで、BTBP の PD-L1 の細胞内輸送への関与を明らかとする。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株を用いた PD-L1 発現への CUL3 の関与についての検証

胃癌細胞株 13 種 (KATOIII, MKN', MKN28, MKN45, MKN7, NUGC-3, NUGC-4, SUN-1, SUN-16, NCI-

N87, GC1Y, HGC27, OCUM-1)を用い、PD-L1 蛋白の発現を Western blot により解析した。MKN7, NUGC-3 で PD-L1 の強い発現を確認できた。次に、これらの 13 種類の胃癌細胞株を用い、CUL3 knockdown により PD-L1 の発現が増大するかについて検証した。CUL3 knockdown には 2 種類の siRNA を用いた。PD-L1 が強く発現している NUGC-3 では CUL3 knockdown により、PD-L1 の発現がさらに増強した。さらに、MKN28, NUGC-4 では、PD-L1 の発現はほとんどみられなかったが、CUL3 knockdown により PD-L1 が発現した。一方、NCI-N87 では、CUL3 knockdown により PD-L1 の発現が低下した。残りの胃癌細胞株については、CUL3 knockdown により PD-L1 発現に変化は認めなかった。なお、これらの実験は 2 種類の siRNA を用いて検討しており、2 種の siRNA で結果が一致していることが確認できた。

(2) CUL3 による PD-L1 の細胞内局在の制御についての検証

CUL3 発現と、PD-L1 発現に関連を認めた細胞株、NUGC-3、MKN28、NUGC-4、NCI-N87 を用いて検証をすすめた。まず CUL3 siRNA を用い PD-L1 の細胞内局在がどのように変化するかについて、蛍光免疫染色を用いて検討した。NCI-N87 では CUL3 knockdown により細胞膜に存在していた PD-L1 が消失していた。NUGC-4 では CUL3 knockdown により細胞膜での PD-L1 の発現が惹起された。一方で、細胞の形態については明らかな変化は認められなかった。次に、PD-L1 の発現制御における CUL3 のパートナーとなる BTBP の探索を行った。183 種の BTBP に対する siRNA を用い、網羅的に検討したところ、PD-L1 の発現制御への関与が推測される複数種の BTBP を同定した。

(3) BTBP による PD-L1 の発現制御メカニズムの検証

PD-L1 の発現制御における CUL3 のパートナーとなる BTBP の網羅的な探索により明らかとなった PD-L1 の発現制御への関与が予測される複数種の BTBP の siRNA を用いて、胃癌細胞株への影響を検討した。これらの BTBP の knockdown により PD-L1 の発現変化のパターンは、CUL3 の knockdown とは異なり、また、その一方で、CUL3 knockdown ではみられなかった細胞増殖能や細胞運動能の抑制が誘導された。なお、細胞増殖能や細胞運動能への BTBP knockdown の影響は、細胞株特性が認められた。さらに、CUL3 knockdown と BTBP knockdown での細胞に与える影響が異なる原因について研究をすすめた。CUL3 および BTBP の knockdown による mRNA の発現変化についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、CUL3 と BTBP の knockdown では、異なる遺伝子発現パターンが確認され、CUL3 および BTBP は結合し作用するものの、PD-L1 の発現を含む細胞制御において各々が単独で異なる作用を有していることが明らかとなった。

(4) CUL3/BTBP 軸による PD-L1 の発現制御メカニズムの検証

胃癌細胞株 NCI-N87, NUGC-4 の BTBP を siRNA により knockdown し、ライブイメージング法で PD-L1 の細胞内輸送の制御経路を検証したが、両細胞ともに BTBP が直接的に PD-L1 の細胞内輸送経路に作用していることを示すデータは得られなかった。CUL3 ユビキチンリガーゼによる PD-L1 の発現コントロールについては、PD-L1 の転写因子、PD-L1 のプロモーター領域のメチル化反応などを検証したが、そのメカニズムについては同定に至らなかった。また、PD-L1 の細胞内局在制御のメカニズムについても、明らかにすることはできなかったが、PD-L1 と結合し細胞内蛋白輸送をコントロールしている BTBP を確認しているため、今後は、このシステムの PD-L1 の細胞内局在への関与を検証し、PD-L1 タンパク質輸送制御への BTBP の関与する機序の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sakaue T, Sakakibara I, Uesugi T, Fujisaki A, Nakashiro KI, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, Higashiyama S	4. 巻 7
2. 論文標題 The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 42845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep42845	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 Sakaue T, Fujisaki A, Nakayama H, Maekawa M, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Izutani H, Higashiyama S	4. 巻 108
2. 論文標題 Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 208-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13133.	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 Maekawa M, Tanigawa K, Sakaue T, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Watanabe Y, Taguchi T, Higashiyama S	4. 巻 6
2. 論文標題 Cullin-3 and its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin beta1 in endothelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 1707-1719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.029579	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
研究 分 担 者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki) (60202272)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	久保田 英嗣 (Kubota Eiji) (30405188)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 (23903)	
研究分担者	日吉 裕美 (Hiyoshi Hiromi) (10406530)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教 (23903)	

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