

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15616

研究課題名（和文）3'-UTR異常によって破綻するPD-L1の転写後調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Novel mechanism of post-transcriptional regulation of PD-L1 through 3'-UTR.

研究代表者

木暮 泰寛 (Kogure, Yasunori)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40782389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、様々な癌腫においてPD-L1が3'-UTR欠損により発現亢進するメカニズムを明らかにするために、RNA結合タンパクによるPD-L1の発現制御に着目して実験を行った。PD-L1 3'-UTRのうち、実際にPD-L1発現を制御する機能的部位を同定し、またその部位に結合するRNA結合タンパクを網羅的に解析した。これらの機能的部位に結合するRNA結合タンパクの一部は、実際にPD-L1の発現を負に制御していた。今後、詳細な分子メカニズムの検討を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によりPD-L1の3'-UTRを介した転写後発現制御の詳細が明らかになり、実際に、PD-L1 3'-UTRに結合して発現を負に制御するRNA結合タンパクが複数存在していることが示された。PD-L1の新たな発現制御の仕組みが明らかになり、更にはこれらのRNA結合タンパクが創薬の標的となる可能性、あるいはPD-L1 3'-UTRの配列自体が新たな治療標的になりうる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism by which PD-L1 is activated by disruption of PD-L1 3'-UTR has not been clarified. To this end, we focused on the regulation of PD-L1 expression by RNA-binding proteins. We have identified the functional segments within PD-L1 3'-UTR that actually regulate PD-L1 expression, and also, the RNA-binding proteins that bind to those segments were comprehensively analyzed by mass spectrometry. Some of the RNA-binding proteins that bind to these functional segments negatively affect the expression of PD-L1 expression. We are planning to investigate the molecular mechanism of these RNA binding proteins in detail.

研究分野：分子腫瘍学

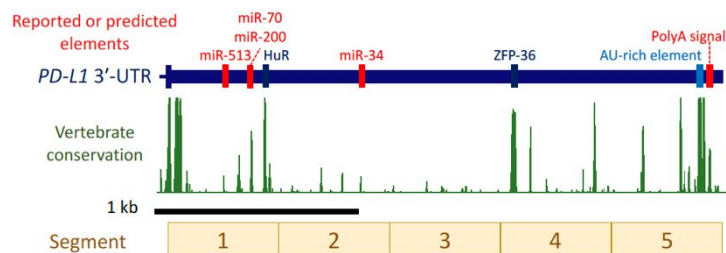
キーワード：RNA結合タンパク 転写後制御 PD-L1

1. 研究開始当初の背景

Programmed death-ligand 1 (PD-L1) (Dong et al., 1999)は膜タンパクであり、活性化 T 細胞の programmed death 1 (PD-1)レセプターへシグナルを伝達し、活性化 T 細胞の活動を抑制して免疫寛容を誘導する。昨今、PD-1/PD-L1 axis と腫瘍免疫の役割が脚光を浴びている。種々の癌腫において PD-1 阻害薬 nivolumab が奏功して長期生存例が得られたと相次いで報告され、本邦でも実臨床に導入されている (Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2015; Weber et al., 2015)。

最近、当研究室において、Kataoka らは成人 T 細胞白血病 (ATLL) の包括的なゲノミクス解析を行った (Kataoka et al., 2015)。その過程で、彼らは ATLL においては *PD-L1* の 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) の全域が高頻度に欠失していることを見出した。更に、同様のゲノム異常は ATLL のみならずあらゆる腫瘍の数%に観察されること、そしてこの異常により *PD-L1* の mRNA レベルでの発現亢進が観察されることが示された (Kataoka et al., 2016)。また、3'-UTR の欠失した mRNA は半減期が延長することも示され、何らかの転写後制御を受けていることが示唆された。*PD-L1* の転写後制御という点においては、miR-34 の報告があったが、その効果は限定的で、ATLL で確認されたような *PD-L1* の過剰発現を説明できなかった (Wang et al., 2015)。

一般に mRNA の 3'-UTR には microRNA (miR) の他に種々の RNA binding protein (RBP) が結合し、転写後調節に寄与していることが知られている (Gerstberger et al., 2014; Lukong et al., 2008)。*PD-L1* においては、3'-UTR の既知の機能ドメインとして、miR-513, 370, 200, 34 の結合ドメインが存在すること、またその他の RBP に関与するドメインである HuR (mRNA の安定化) ZFP36 (分解促進) の結合ドメインや AU-rich Element (分解促進) が存在することが知られていた。



2. 研究の目的

上述の通り、がん細胞における *PD-L1* mRNA の 3'-UTR 欠損は universal かつ recurrent なゲノム異常であり、またこの異常により *PD-L1* 発現が亢進する。しかし、*PD-L1* の発現調節において 3'-UTR が果たす詳細な分子生物学的なメカニズムは不明であった。mRNA の転写後調節において種々の RBP が重要な役割を担っていることを踏まえ、「*PD-L1* はその 3'-UTR と RBP の相互作用によって転写後調節を受けており、そのため 3'-UTR の欠損が *PD-L1* の異常な高発現を引き起こすのではないかと考え、本研究では *PD-L1* 3'-UTR に結合し、転写を負に制御する RBP を網羅的に同定することを目標とした。

我々は、CRISPR ライブラリや mass spectrometry のような新規技術を応用することで、*PD-L1* の転写後制御において重要な RBP を unbiased かつ網羅的に探索することを考えた。

本研究の成果により *PD-L1* の 3'-UTR による制御異常が新たな治療標的になりうる可能性、あるいは RBP が創薬の標的タンパクとなる可能性があると考えられた。3'-UTR の配列自体をターゲットにした *PD-L1* の制御が可能となれば、新たなクラスの治療法が開発されることが期待された。

3. 研究の方法

(1) *PD-L1* mRNA の 3'-UTR のうち、PD-L1 タンパクの発現量と関連の強いドメインの同定

我々はまず、PD-L1 3'-UTR のうち、転写後調節に影響を与うるドメインの有無を確かめるため、2 種類の実験を行う。3'-UTR 配列の deletion mutant を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、3'-UTR の特定の Segment がルシフェラーゼタンパク発現量を制御するか検討する。最近 Canver らが報告した、ゲノム上のエンハンサー領域を CRISPR/Cas9 gRNA tiling library を用いて網羅的に欠損させる手法を適応し PD-L1 3'-UTR に存在する全ての PAM 配列に対して設計された gRNA library をレンチウイルスにより細胞株に導入・発現させ、3'-UTR を様々に部分欠失したクローンを大量に得る (Canver et al., 2015)。これらの細胞表面に発現した PD-L1 タンパクを FACS で評価し、PD-L1 高発現のものをセルソーターで分離する。次世代シーケンサーにて分離された細胞を評価し、PD-L1 高発現と相関する gRNA を同定する。

これらの手法を組合せることにより 3'-UTR の転写後調節に重要なドメインを最も網羅的に評価することができると考えた。

(2) PD-L1 3'-UTR 結合タンパクの同定

上記の実験により同定された、PD-L1 の転写後調節に重要な 3'-UTR の一部に結合するタンパクを unbiased に同定することを試みる。そのために、標的の mRNA と Flag タンパクを化学的に結合させた RNA-Flag と細胞抽出液とを反応させ抗 Flag 抗体による pull-down で標的の RBP を濃縮し、mass spectrometry で解析する(iSRIM 法、Adachi and Natsume, 2015; Adachi et al., 2014; Aoki et al., 2013)。

(3) 特定の RBP の機能評価

以上に同定された PD-L1 3'-UTR の機能的 Segment に結合するタンパクのそれぞれについて、siRNA によるノックダウン実験や CRISPR/Cas9 によるノックアウト実験を行い、PD-L1 に対する発現制御の有無を確認する。

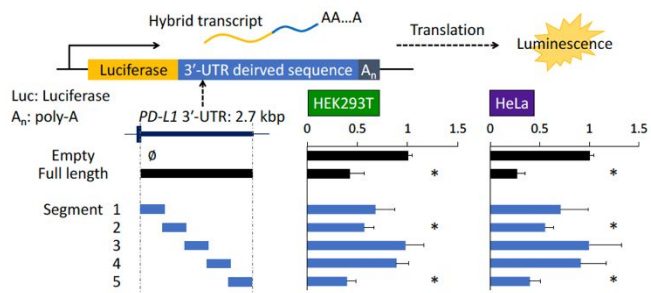
4. 研究成果

(1) PD-L1 mRNA の 3'-UTR のうち、PD-L1 タンパクの発現量と関連の強いドメインの同定

レポーターアッセイ及び CRISPR/Cas9 tilling screening ライブラリーの 2 つを用いて検討した。

について、様々な deletion mutant を用いて、500 bp 程度の範囲で転写後制御に重要な 3'-UTR の Segment を検討した。HEK293T, HeLa, Jurkat, T2 といった種々の組織由来の細胞株を用いた検討で、PD-L1 の 3'-UTR 全長及び、その一部分である Segment 2 及び Segment 5 の 2 つに PD-L1 を負に制御する機能があることが判明し、3'-UTR による PD-L1 の制御が組織によらず一般的な現象であることが示唆された。

一方、 について、PD-L1 3'-UTR の tilling screening を実施した。しかし単一の gRNA が細胞に導入できる数塩基規模の deletion による発現変化は、3'-UTR 全体の欠失による PD-L1 発現量亢進に比べて小さいことが分かった。そのためライブラリーの効果を精密に検出するのが困難であり、この系での評価は難しかった。

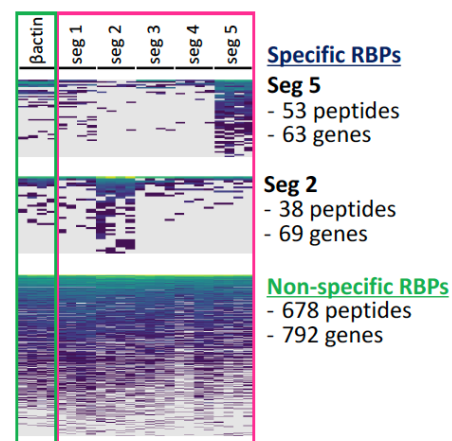


(2) PD-L1 3'-UTR 結合タンパクの同定

(1) で得られた結果を採用して次のステップに進むことにした。RBP を mass spectrometry で網羅的に解析する iSRIM(in vitro specificity based RNA regulatory protein identification method)法を実施し、mRNA と RBP の結合を直接的かつ unbiased に評価した。具体的には、PD-L1 3'-UTR をレポーターアッセイと同様に 5 つの Segment に分割し、β-actin の 3'-UTR をコントロールとして加えた 6 つの RNA 断片に結合している RBP を評価した。

iSRIM を実施したところ、合計で 1,239 遺伝子に対応する 963 のペプチド分子が RNA 結合タンパクの候補として同定された。まずは確認のために、1~5 の全ての Segment に対して non-specific に結合している RBP (non-specific RBPs) を抽出したところ、792 遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は各 Segment に加えて β-actin の 3'-UTR にも結合していることから、これらが non-specific であることが示唆された。

次に、レポーターアッセイの結果と iSRIM 法を組み合わせ、PD-L1 の発現と有意に相関する 3'-UTR segment (Segment 2, 5) に特異的に結合していた RBP (Specific RBPs) を抽出した(それぞれ 63, 69 遺伝子)。これらの RBP は対照的に β-actin 3'-UTR への結合が少なく、部位特異的な作用を示すタンパクが濃縮できていることを示唆した。また、これらの RBP の gene ontology 解析を行うと、RNA 結合タンパクに関連する gene ontology が enrich すること、特に 3'末端に位置する Segment 5 には、その中でも 3'-UTR 結合タンパクの gene ontology が enrich することが判明し、解析の妥当性を示唆した。以上より、iSRIM により PD-L1 3'-UTR に結合する機能的 RBP 候補を絞り込むことができた。



(3) RBP の機能評価

siRNA による PD-L1 3'-UTR 結合 RBP の機能評価

これらの候補 RBP の機能を確認するために、siRNA と 293T 細胞株を用いて、候補遺伝子それぞれをノックダウンし、*PD-L1* mRNA 発現を RQ-PCR にて評価した。各候補遺伝子のノックダウンにより、*PD-L1* の mRNA 発現量は上昇・低下するものがそれぞれ認められ、RBP による転写後調節の存在を示唆した。

PD-L1 を負に制御する RBP のうち、上位に *AGO2* 遺伝子が同定された。*AGO2* は RNA 干渉のメカニズムにおける最も重要な遺伝子の一つであり、microRNA が *PD-L1* の転写後調節を行っているとする既報とも合致し、このスクリーニングが正しく行われていることを示唆していた。以上より、スクリーニングの結果として、*PD-L1* の mRNA を負に制御している RBP の候補として、*AGO2* を含むいくつかの遺伝子を更に抽出できた。

CRISPR/Cas9 システムを用いた PD-L1 3'-UTR 結合 RBP の機能確認

これらの候補 RBP の上位のうちの一つ (*GeneX*) について、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウトを用いて *PD-L1* の発現変化を確認した。細胞株において *GeneX* をノックアウトすると、*PD-L1* のタンパクレベルでの発現上昇認められた。したがって、実際に *GeneX* が *PD-L1* の発現を実際に制御していることが確認された。

今後、*GeneX* 等の候補遺伝子について、*PD-L1* 発現に関与する分子メカニズムの詳細の解析や *in vivo* モデルにおける免疫環境への作用を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yasunori Kogure, Keisuke Kataoka, Yosaku Watatani, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Masahiro Nakagawa, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Novel mechanism of post-transcriptional regulation of PD-L1 expression by 3'-UTR binding proteins. / 3'-UTR結合タンパクによるPD-L1発現の転写後調節機構の解明
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunori Kogure, Keisuke Kataoka, Shungo Adachi, Yosaku Watatani, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Masahiro Nakagawa, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, Seishi Ogawa,
2. 発表標題 Novel mechanism of post-transcriptional regulation of PD-L1 expression by 3'-UTR binding proteins. / 3'-UTR結合タンパクによるPD-L1発現の転写後調節機構の解明
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunori Kogure, Keisuke Kataoka, Shungo Adachi, Yosaku Watatani, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Masahiro Nakagawa, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume and Seishi Ogawa
2. 発表標題 Novel Mechanism of Post-Transcriptional Regulation of PD-L1 Expression By 3'-UTR Binding Proteins
3. 学会等名 the 59th ASH Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017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
研究協力者	夏目 徹 (Natsme Tohru)		