

令和元年6月14日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16420

研究課題名(和文)放射線治療後DNA損傷応答による腫瘍細胞PD-L1発現誘導の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of PD-L1 upregulation in cancer cells after DNA double-strand break repair pathway following irradiation

研究代表者

佐藤 浩央 (Sato, Hiro)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：90750571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：X線照射や化学療法剤処理により、DNA損傷シグナル依存的な腫瘍細胞のPD-L1発現誘導を認めた。さらに、Ku80またはBRCA2のノックダウン細胞に対するX線照射後にも、Chk1を介したPD-L1発現誘導が亢進することを明らかにした。以上から、X線照射後のPD-L1発現誘導には、Chk1の活性化を含むDNA損傷に対する一連の反応が重要であることが明らかになった。加えて、DNA二重鎖切断によるPD-L1発現誘導にもSTAT1/3-IRF1経路が関与していることを明らかにした。以上の結果より、DNA損傷応答が腫瘍細胞のPD-L1発現調節に関わるメカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、腫瘍細胞のPD-L1発現に影響するDNA修復関連遺伝子を明らかにしたことで、患者一人ひとりのDNA修復関連遺伝子の変異状況の評価により、放射線治療や化学療法と抗PD-1/PD-L1抗体を併用した場合の効果予測が可能となり、患者の個人レベルでの治療効果の改善に貢献できると考えている。さらに、抗PD-1抗体の医療費は高額であることから、放射線治療と抗PD-1抗体治療併用の症例毎の有効性の予測は、医療費における経済的メリットにも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA damage signal-dependent PD-L1 induction was observed after X-ray irradiation and chemotherapeutic agent treatment. In addition, DNA damage signal-dependent PD-L1 expression was enhanced via Chk1 activation in Ku80 or BRCA2 knockdown cancer cells. These data revealed that Chk1 activation is important for PD-L1 induction after DNA damage. Furthermore, the STAT1 / 3-IRF1 pathway is also involved in the induction of PD-L1 expression by DNA double strand breaks.

Taken together, the mechanism by which the DNA damage response is involved in the regulation of PD-L1 expression in tumor cells was elucidated.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 免疫チェックポイント DNA二本鎖切断

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臨床において、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 (Programmed death 1) 抗体、抗 PD-L1 (Programmed death ligand-1) 抗体の有効性が明らかになってきた。リンパ球表面の PD-1 が腫瘍細胞やリンパ球に発現する PD-L1 と結合すると、リンパ球が不活化され、抗腫瘍免疫が抑制される。しかし、抗 PD-1/PD-L1 抗体により両者の結合を阻害すると、リンパ球の不活化が解除され、抗腫瘍効果を発揮する。これまでの報告にて、進行性悪性黒色腫、扁平非小細胞肺癌、腎癌などで、従来の治療法と比較して有意に高い治療効果が報告されてきた。しかし一方で、30%程度の症例では Progressive Disease (PD) であり、また治療開始から3か月程度までの期間では一部の患者群で病気が進行するなど、課題も明らかになった。そのような背景から、治療効果改善のため放射線治療との併用が注目され、両者併用の有効性を示す早期の臨床試験やケースレポートが複数報告された。両者の併用による有効性の根拠として、放射線照射が腫瘍細胞の PD-L1 発現を誘導すること、そしてその発現誘導メカニズムは、放射線腫瘍照射部位へのリンパ球浸潤による炎症性サイトカイン放出によって生じることが報告されている。一方で、従来放射線治療による殺細胞効果の中心と考えられてきた腫瘍細胞の DNA 二重鎖切断と、PD-L1 発現誘導をつなぐメカニズムは未解明であった。これまでに我々は、*in vitro* の実験にて、1) 腫瘍細胞の PD-L1 発現が放射線照射により誘導されること、2) DNA 損傷シグナルとしてはたらく ATM に対し、阻害剤をもちいて DNA 損傷応答阻害状態とすると、X 線照射後の PD-L1 発現が低下すること、3) siRNA をもちいて DNA 修復遺伝子をノックダウンすると、X 線照射後の PD-L1 発現が増加することを確認していた。DNA 修復遺伝子に関しては、非相同末端結合 (NHEJ: Non-homologous end joining) および相同組み換え (HR: Homologous Recombination) においてそれぞれはたらく ku80 または BRCA2 のノックダウンによって PD-L1 発現が増加することを見つけていたため、臨床への応用を考慮し、マウスモデルでの再現性の確認が重要と考えた。しかしマウスモデルへの移行の前に、DNA 損傷応答から PD-L1 誘導までのより詳細なメカニズム解明が重要と考え、その研究を進めた。

### 2. 研究の目的

放射線治療と抗 PD-1/PD-L1 抗体併用の有効性の基礎的裏付けとして、放射線照射により生じる炎症反応を介した腫瘍細胞の PD-L1 発現誘導が考えられていた。腫瘍細胞の PD-L1 発現率が抗 PD-1/PD-L1 抗体の治療効果予測マーカーとなりうると考えられていたことから、放射線治療が細胞の PD-L1 発現を誘導し、その誘導された PD-L1 発現が抗 PD-1/PD-L1 抗体治療の有効性を高める、というメカニズムが想定された。

しかしこれまで、放射線照射による殺細胞効果の中心である DNA 損傷と、PD-1/PD-L1 経路を繋ぐ分子機構は明らかにされていなかった。そこで我々は、放射線治療と抗 PD-1/PD-L1 抗体治療の併用を推進するにあたり、有効性を裏付ける基礎的データの確立が必要と考え、PD-L1 発現調節における DNA 損傷とその修復経路の解明を目指し本研究を開始した。

### 3. 研究の方法

複数のヒト腫瘍細胞株を用いて、X 線照射および化学療法剤処理後の腫瘍細胞の PD-L1 発現を、Western blot、Real-time PCR、Flow cytometry および蛍光免疫染色法にて解析した。

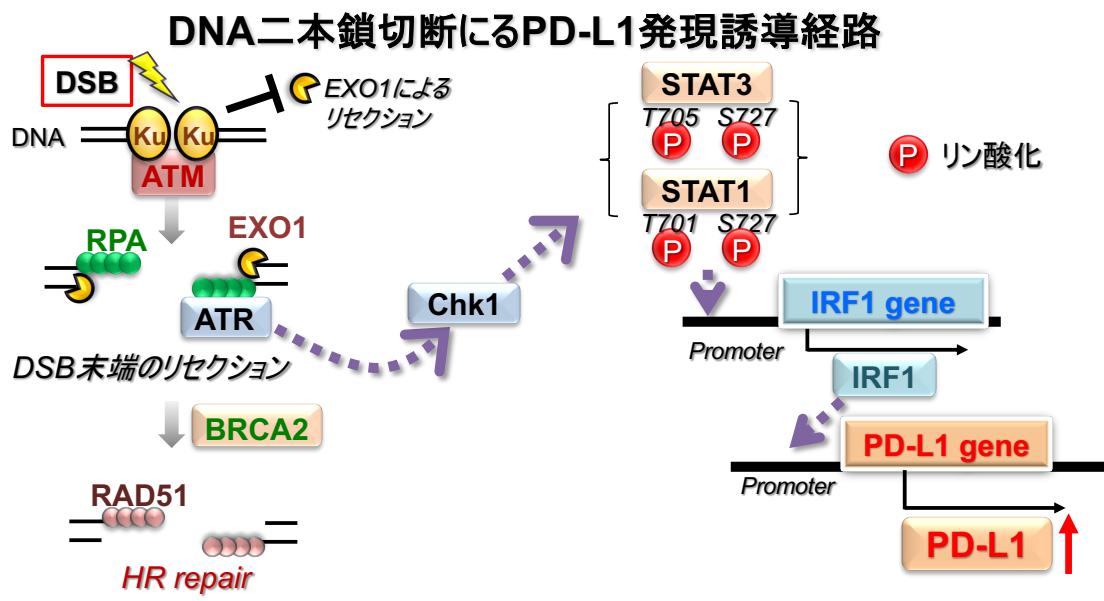
- (1) DNA 二重鎖切断修復関連因子の影響を解析するため、DNA 損傷シグナルである ATM、ATR、Chk1 の阻害剤をもちいて、PD-L1 発現に与える変化を評価した。
- (2) DNA 修復関連因子 (39 種) の siRNA ライブラリーをもちいて、ノックダウン細胞に対する放射線照射後、PD-L1 発現の変化を Western blot にて評価した。
- (3) DNA 損傷応答により誘導される PD-L1 発現において、既知の PD-L1 発現誘導経路である STAT-IRF1 経路が関与するか検討した。

### 4. 研究成果

X 線照射、さらに etoposide や camptothecin といった化学療法剤処理により、DNA 損傷シグナルである ATM/ATR/Chk1 依存的に、腫瘍細胞の PD-L1 発現誘導を認めた。次に X 線照射後の PD-L1 発現誘導に影響する DNA 修復関連因子を検出するため、siRNA ライブラリーをもちいてノックダウンスクリーニングを行った結果、そのうち Ku80、BRCA2、PALB2 のノックダウンによって、X 線照射後の PD-L1 発現誘導が亢進した。その中で、DNA 二本鎖切断修復の二つの経路、NHEJ と HR において特に重要な役割を担う、Ku80、BRCA2 の二つに着目した。重要なことに、このいずれのノックダウン細胞でも、Chk1 阻害剤により X 線照射後の PD-L1 発現誘導が抑制された。Ku80 欠損細胞では、DSB において DNA エクソヌクレアーゼである EXO1 による DSB 末端の削り込みが亢進することで、DNA 一本鎖部位において Chk1 の活性化が亢進し、PD-L1 発現誘導が亢進した。また BRCA2 欠損細胞では、DNA 一本鎖部位において RPA から RAD51 への置き換えが阻害されることで HR の進行が阻害され、Chk1 が持続的に活性化されることで PD-L1 発現誘導が亢進した。このことから、X 線照射後の PD-L1 発現誘導には、DNA 二重鎖切断そのものではなく、Chk1 の活性化を含む DNA 損傷に対する一連の反応が重要であることが明らかになった。さらに、STAT1/3-IRF1 経路の関与についても解析した結果、X 線照射により、STAT1/3 の活性化と IRF1 の発現誘導を認めた。また IRF1 をノックダウンすると、X 線照射後の PD-L1 発現誘導が抑制された。このことから、DNA 二重鎖切断による PD-L1 発現誘導にも STAT1/3-IRF1 経路が関与して

いることが示された。

以上の結果より、1) ATM/ATR/Chk1 といった DNA 損傷シグナル依存的に PD-L1 発現が誘導されること、2) Ku80 や BRCA2 といった DNA 修復関連タンパク欠損が、Chk1 の活性化を介して PD-L1 発現を亢進すること、3) DNA 損傷により誘導される PD-L1 発現誘導は、従来知られていた STAT1/3-IRF1 経路を介していることを、世界で初めて解明した (下図)。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Maxim Shevtsov, Hiro Sato, Gabriele Multhoff, Atsushi Shibata, *Novel Approaches to Improve the Efficacy of Immuno-Radiotherapy*, *Frontiers in Oncology*, Mar 19;9:156, 2019. (IF: 4.416) doi: 10.3389/fonc.2019.00156. (査読あり)
2. Yoshihiko Hagiwara, Hiro Sato, Tiara Bunga Mayang Permata, Atsuko Niimi, Motohiro Yamauchi, Takahiro Oike, Takashi Nakano, Atsushi Shibata, *Analysis of programmed death-ligand 1 expression in primary normal human dermal fibroblasts after DNA damage*. *Human Immunology*, Aug;79(8):627-631, 2018. (IF: 1.994) doi: 10.1016/j.humimm.2018.05.008. (査読あり)
3. Hiro Sato, Atsuko Niimi, Takaaki Yasuhara, Tiara Bunga Mayang Permata, Yoshihiko Hagiwara, Mayu Isono, Endang Nuryadi, Ryota Sekine, Takahiro Oike, Sangeeta Kakoti, Yuya Yoshimoto, Kathryn D. Held, Yoshiyuki Suzuki, Koji Kono, Kiyoshi Miyagawa, Takashi Nakano, Atsushi Shibata, *DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells*, *Nature Communications*, Nov 24;8(1):1751, 2017. (IF: 12.353) doi: 10.1038/s41467-017-01883-9. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. 佐藤浩央 DNA 二重鎖切断修復経路による腫瘍細胞の PD-L1 発現制御メカニズムの解明 日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会, 京都市 2018 年 10 月 (受賞講演)
2. Hiro Sato, Takashi Nakano, Atsushi Shibata, 他 15 名 Molecular mechanism of PD-L1 upregulation in cancer cells after DNA double-strand break repair pathway following irradiation. The 3rd Meeting of Federation of Asian Organizations for Radiation Oncology (FARO). インドネシア 2018 年 8 月
3. 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史 他 9 名 放射線誘発 DNA 損傷によって誘導される腫瘍細胞の PD-L1 発現制御機構 第 56 回 JASTRO 生物部会 東京都 2018 年 7 月
4. Hiro Sato, Takashi Nakano, Atsushi Shibata, 他 6 名 Molecular mechanism of PD-L1 upregulation in cancer cells after irradiation. PTCOG57. 米国 2018 年 5 月
5. 佐藤浩央 放射線により誘導される腫瘍細胞上 PD-L1 発現に関する分子機構の解明. 第 9 回 日本放射線外科学会学術集会. 川崎市 2018 年 1 月 (要望演題)

6. 佐藤浩央 放射線射線により誘導される腫瘍細胞上 PD-L1 発現に関する分子機構の解明. 日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会. 大阪市 2017 年 11 月 (要望演題)
7. Hiro Sato, Takashi Nakano, Atsushi Shibata 他 12 名 Molecular mechanism of PD-L1 upregulation in cancer cells after X-ray irradiation. ASTRO's 59<sup>th</sup> Annual Meeting. 米国 2017 年 9 月

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学 プレスリリース

<https://www.med.gunma-u.ac.jp/cms/wp-content/uploads/2017/12/20171220-press.pdf>

QLife Pro 医療ニュース

<http://www.qlifepro.com/news/20171222/pd-l1-expression-of-cancer-cells.html>

## 6. 研究組織

研究分担者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。