

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07191

研究課題名(和文)新規STING結合タンパク質による抗腫瘍免疫システムの獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the acquisition of anti-tumor immunity by novel STING interacting proteins in cancer

研究代表者

佐藤 精一 (Sato, Seiichi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：60459724

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)：代表者が従事してきたがん特性に関わるシグナルならびに、適応免疫系を制御する自然免疫シグナルの研究を基盤としてがん治療へ活かすことを考えた。臨床においては腫瘍が見つかった場合はすでに免疫細胞からの攻撃回避が成立した状態になっているが、がん細胞がどのようにして、免疫細胞からの攻撃を回避しているか、そのメカニズムは十分に分かっていない。どのようにがん細胞は腫瘍免疫を抑制しているのか？ この問題に対する1つの答えの手がかりとして、代表者らはSTINGと新規会合するタンパク質を同定した。この分子は、がん細胞で発現が更新し、STINGを抑制し、抗腫瘍免疫に寄与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床においては腫瘍が見つかった場合はすでに免疫細胞からの攻撃回避が成立した状態になっているが、がん細胞がどのようにして、免疫細胞からの攻撃を回避しているか、そのメカニズムは十分に分かっていない。どのようにがん細胞は腫瘍免疫を抑制しているのか？ この問題に対する1つの答えの手がかりとして、代表者らはSTINGと新規会合するタンパク質を同定した。この分子は、がん細胞で発現が更新し、STINGを抑制し、抗腫瘍免疫に寄与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Based on the previous study elucidating the signaling pathways of properties of cancer and innate immune response, we hypothesize whether our previous effort can extend in tumor therapy. It is unknown how cancer cells acquire anti-tumor immunity. In this study, we identified some STING interacting proteins, we demonstrated that STING is a client protein of Hsp90beta, in particular stabilization of STING protein is crucial for efficient innate immune response, and ANT2 is a negative regulator of STING pathway.

研究分野：腫瘍免疫応答

キーワード：自然免疫応答 STING インターフェロン 腫瘍 がん細胞 腫瘍抑制 核酸 パターン認識受容体

## 1. 研究開始当初の背景

生命の進化は紫外線が届かない深海で行われてきたと言われるほど DNA 損傷を引き起こす因子はヒトにとって有害である。遺伝子変異はがん化の原因の一つになっており、がん細胞の変異の大半は DNA 複製時のエラーであることが今年報告された(Tomasetti *et al.*, *Science*, **355**, 1330-1334, 2017)。生体防御として DNA 変異を修復する機構が存在する一方で、DNA 損傷や複製エラーによる変異を起こした細胞を排除する免疫系の仕組みが備わっている。その免疫細胞による変異細胞排除の仕組みが破綻するとがん化が一気に加速する。

最近の分子生物学の進歩に伴い、がん細胞の増殖、運動、浸潤や転移、生存の機序が明らかとなりつつある。がん生物学的特性に関連した遺伝子やタンパク質を標的とした分子標的治療薬が開発されてきた。がんの三大治療である手術や化学療法、放射線治療の他、第4の治療法として免疫療法があり、特に近年適応免疫系における免疫チェックポイント阻害剤が新たな選択肢として加わったが、有効な症例は限られており、複合的ながん免疫療法としてのアプローチが望まれている。今回、代表者が従事してきたがん特性に関わるシグナルならびに、適応免疫系を制御する自然免疫シグナルの研究を基盤としてがん治療へ活かすことを考えた。臨床においては腫瘍が見つかった場合はすでに免疫細胞からの攻撃回避が成立した状態になっているが、がん細胞がどのようにして、免疫細胞からの攻撃を回避しているか、そのメカニズムは十分に分かっていない。どのようにがん細胞は腫瘍免疫を抑制しているのか？—この問題に対する1つの答えの手がかりとして、代表者らは STING と新規会合するタンパク質を同定した。

### STING の自然免疫系 (感染や腫瘍免疫) における機能

RNA ウイルス(インフルエンザ、HCV 等)や一部の DNA ウイルス(HBV 等)感染に対する自然免疫系においては、RIG-I を始めとする細胞内 RNA センサーがウイルス RNA やゲノム複製中間体の RNA を認識し自然免疫応答を誘導する(Sato *et al.*, *Immunity*, **42**, 123-132, 2015)。一方で、主な DNA ウイルス (HIV や HSV 等)感染、細菌(*Listeria*)感染において DNA センサーはウイルス由来の外来 DNA を認識し、STING(Stimulator of interferon genes; DNA に対する自然免疫応答に関与するアダプタータンパク質)を介し下流の TBK1 や転写因子 IRF-3 によりインターフェロン(IFN)を誘導し生体防御応答を引き起こすと考えられている(Ishikawa *et al.*, *Nature*, **461**, 788-791, 2009)。近年、DNA センサー(cGAS や DAI, IFI16 など)が同定されているがウイルス DNA に対する自然免疫応答の制御はまだ不明な点が残されている(Barber, *Trends Immunol.*, **35**, 88-93, 2014)。がんは自己組織の一部であるため非自己である微生物感染時に生じる自然免疫活性化を誘導する微生物由来分子パターン(MAMPs; microbe-associated molecular patterns)は基本的に存在し得ないことが考えられているが、代表者らによる先行研究により、MAMPs がない状態でもがん細胞は各種阻害剤(HDAC 阻害等)により IFN を誘導することが明らかとなっていることからがん細胞の内因性因子による自然免疫賦活化は可能であることがわかった。古くからがん細胞においては、サイトゾル DNA が存在することが知られていたがその生理的意義は分かっていなかった。近年、がん細胞並びに、樹状細胞を始めとする免疫細胞において、がん細胞由来の DNA を認識する経路において、STING が腫瘍免疫を活性化することが明らかとなった(Ho *et al.*, *Immunity*, **44**, 1177-1189, 2016; Woo *et al.*, *Immunity*, **41**, 830-842, 2014)。

### ANT-2 の機能：抗アポトーシス因子であるが自然免疫との関連は未知である

Adenine nucleotide translocase-2 (ANT-2)は細胞内ミトコンドリア膜に局在し ADP や ATP をミトコンドリア内外に輸送するタンパク質である(Chevrollier *et al.*, *B.B.A.*, **1807**, 562-567, 2011)。先行研究の Database 解析により、ANT-2 は複数のがん細胞で過剰発現されていることがわかっている(Bras *et al.*, *Cancer. Res*, **66**, 9143-9152, 2006; Oncomine data)。また ANT-2 は、同一細胞由来のがん幹細胞(CSC)とがん細胞を比較した際、がん細胞での発現が CSC に比べ 10 倍程度向上していることがわかった(unpublished data)。以上よりがん化の過程で ANT-2 の発現が亢進したことが明らかとなっているが発現を制御する仕組みは十分に分かっていない。ANT-2 の阻害は、抗がん剤によるがん細胞の感受性を高めることが報告されているため(Bras *et al.*, *Cancer. Res*, **66**, 9143-9152, 2006)、ANT-2 はがん治療において標的分子になりうると考えられているが、腫瘍免疫を始めとする「免疫」における機能は不明である。

## 2. 研究の目的

先行研究により見出した STING 会合分子である ANT-2 等の、がん細胞の持つ抗腫瘍免疫能におけるの寄与やその機序を探り、ひいてはその仕組みを利用した形で、ANT-2 等を始めとするがん促進遺伝子による腫瘍免疫制御という視点から、がん標的治療分野において新たな基盤を創り出すことを目指す。

## 3. 研究の方法

\* 細胞レベルでの検討: DNAウイルス感染を用いた研究結果に基づき、ヒト及びマウスの様々な種類のがん細胞を準備し、がん細胞由来の細胞質 DNA により活性化される自然免疫応答が、ANT-2 により抑制されることを比較検討する。ANT-2 等 STING 結合タンパク質を siRNA によりノックダウン、CRISPR-Cas9 を使用してノックアウトした場合の IFN 誘導の解析を行う。すでに代表者はマウスメラノーマ細胞において ANT-2 を KO させると、またヒト前立腺がん細胞である DU145 において ANT-2 をノックダウンさせると、コントロールと比較し IFN が誘導されていることを見出し、特定のがん細胞においてこの現象が普遍的であることを検証した。

\* マウスレベルでの検討: ANT-2 による STING シグナル抑制による抗腫瘍免疫について B16 メラノーマがん細胞での KO 細胞を作成して、マウスの担がんモデルや移植モデルを用いて実際に *in vivo* において腫瘍退縮を来し、それが適応免疫の誘導も介するものであるかについて検討した。

#### 4 . 研究成果

本研究を基盤にし、得られた研究成果を下記に示した。

- STING と会合する新規タンパク質として、Hsp90 を同定した。RNA 自然免疫経路のアダプタータンパク質 MAVS/IPS-1 とは異なり、STING のタンパク質安定性は高く、その安定性は Hsp90 の中でも Hsp90 $\beta$  が contribution していることが明らかになった。さらに、Hsp90 の阻害剤や、Hsp90  $\beta$  に対する siRNA により、STING がタンパク質レベルで減少し、非感染状態の STING の安定化に関与しており、さらに、HSV-1、リステリア等の自然免疫応答を正に制御していることが明らかになった (Sato et al., Cell. Immunol., 356, 101322)。
- STING と会合する新規タンパク質として、ANT-2 を同定した。ANT-2 に対する siRNA によるノックダウン実験ならびに、CRISPR-Cas9 による KO により、ANT-2 は STING 経路を負に制御していることを示唆する結果を得た。またこの遺伝子は DNA 損傷で誘導され、さらにはがん細胞で発現が亢進されていることがわかり、マウスの系を使用して ANT-2 による STING シグナル抑制による抗腫瘍免疫について B16 メラノーマを用いて解析したところ、ANT-2 では腫瘍抑制が認められた。以上より ANT-2 は腫瘍免疫を負に制御しているタンパク質であることを示唆する結果を得た (論文投稿準備中)。今回、腫瘍に多く発現している ANT-2 を標的とし、がん細胞選択的な新規の自然免疫抑制経路を解明することで、よりがん細胞に特化した形での局所腫瘍免疫活性化が可能になると考えている。がん選択的な治療に新たな概念を導入し、革新的ながん治療戦略の開発につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato Seiichi, Li Kai, Sakurai Nozomi, Hashizume Mei, Baidya Sunanda, Nonaka Hirota, Noguchi Koki, Ishikawa Kozo, Obuse Chikashi, Takaoka Akinori	4. 巻 356
2. 論文標題 Regulation of an adaptor protein STING by Hsp90 to enhance innate immune responses against microbial infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104188 ~ 104188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2020.104188	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 Yamada Taisho, Sato Seiichi, Sotoyama Yuki, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Yamauchi Hajime, Sasaki Michihito, Takaoka Akinori	4. 巻 in press
2. 論文標題 RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00942-0	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 Suzuki Hiraku, Ohshima Noriyasu, Tatei Kazuaki, Taniguchi Tomoyo, Sato Seiichi, Izumi Takashi	4. 巻 524
2. 論文標題 The role of autonomously secreted PGE2 and its autocrine/paracrine effect on bone matrix mineralization at the different stages of differentiating MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 929 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.120	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 Suzuki Hiraku, Tatei Kazuaki, Ohshima Noriyasu, Sato Seiichi, Izumi Takashi	4. 巻 514
2. 論文標題 Regulation of MC3T3-E1 differentiation by actin cytoskeleton through lipid mediators reflecting the cell differentiation stage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 393 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.093	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 Mishra Richa, Bhattacharya Sanjana, Rawat Bhupendra Singh, Kumar Ashish, Kumar Akhilesh, Niraj Kavita, Chande Ajit, Gandhi Puneet, Khetan Dheeraj, Aggarwal Amita, Sato Seiichi, Tailor Prafullakumar, Takaoka Akinori, Kumar Himanshu	4. 巻 23
2. 論文標題 MicroRNA-30e-5p has an Integrated Role in the Regulation of the Innate Immune Response during Virus Infection and Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101322 ~ 101322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101322	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 該当する

1. 著者名 Hashizume Mei, Aoki Koki, Ohno Shigeaki, Kitaichi Nobuyoshi, Yawata Nobuyo, Gonzalez Gabriel, Nonaka Hirotaka, Sato Seiichi, Takaoka Akinori	4. 巻 31
2. 論文標題 Disinfectant potential in inactivation of epidemic keratoconjunctivitis-related adenoviruses by potassium peroxymonosulfate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 379 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1120672119891408	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 橋爪 芽衣, 青木 功喜, 八幡 信代, Gabriel Gonzalez, 石田 晋, 大野 重昭, 佐藤 精一, 高岡 晃教, 北市 伸義	4. 巻 75
2. 論文標題 臨床報告 アデノウイルス角結膜炎迅速診断キットの検出感度の比較検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 442 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1410213955	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤精一、高岡晃教
2. 発表標題 Genotoxicなストレスに対する自然免疫応答に対する新規抑制因子の同定
3. 学会等名 第84回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------