

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07944

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対するCDK4/6阻害薬による抗腫瘍免疫誘導の基礎検討

研究課題名(英文) Basic study of anti-tumor immunity induction by CDK4 / 6 inhibitor for hepatocellular carcinoma

研究代表者

中尾 一彦 (NAKAO, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00264218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌細胞株 HuH-7にCDK4/6阻害薬を添加することでG1 arrest、RB蛋白の脱リン酸化、E2Fの活性低下が誘導された。PLC/PRF/5ではG1 arrestの程度は弱く、RB蛋白の脱リン酸化、E2Fの活性低下も軽度であった。また、HuH-7においてCDK4/6阻害薬添加により IFN γ の産生が確認され、PKR mRNAの発現上昇が確認された。HuH-7にCDK4/6阻害薬をすることで細胞表面のMHC class I / -2MGとPDL-1の発現上昇が認められた。マウス肝癌細胞を同系マウス皮下へ移植し腫瘍形成後、CDK4/6阻害薬を投与したところ、腫瘍増殖抑制が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDK4/6阻害薬は肝癌細胞に対して直接的抗腫瘍効果を示すことが確認された。また、CDK4/6阻害薬は肝癌細胞が宿主の免疫系細胞に標的として認識されやすくする作用を持つことが示唆された。本研究は、対象を乳癌から肝細胞癌に替えただけの検証的な研究ではあるが、CDK4/6阻害薬が乳癌同様、肝癌に於いても抗腫瘍免疫増強効果を持つ可能性が示唆された意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Addition of a CDK4 / 6 inhibitor to the human liver cancer cell line HuH-7 induced G1 arrest, dephosphorylation of RB protein, and decreased E2F activity. In PLC / PRF / 5, the degree of G1 arrest was weak, and dephosphorylation of RB protein and decrease in E2F activity were also mild. In HuH-7, the production of IFN γ was confirmed by the addition of a CDK4 / 6 inhibitor, and the expression of PKR mRNA was confirmed to be increased. When HuH-7 was treated with a CDK4 / 6 inhibitor, the expression of MHC class I / -2 MG and PDL-1 on the cell surface was increased. When mouse hepatocellular carcinoma cells were subcutaneously transplanted into allogeneic mice to form a tumor, and then a CDK4 / 6 inhibitor was administered, tumor growth suppression was observed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 CDK4/6阻害薬 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

乳癌治療薬であるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6阻害薬(palbociclib, abemaciclib)の抗腫瘍機序は、RB(レチノブラストーマ遺伝子蛋白)のリン酸化阻害による癌細胞のG1細胞周期停止と考えられている。近年、マウス乳癌モデルにおいて、CDK4/6阻害剤が内在性レトロウイルスエレメント発現を活性化し二本鎖RNAの細胞内レベルを上昇させ、その結果、III型インターフェロンが誘導され腫瘍抗原提示が増強されること、並びに健常マウスにおいて、CDK4/6阻害薬が制御性T細胞の増殖を抑制することが報告された。さらに、CDK4/6阻害剤と免疫チェックポイント阻害薬との併用で、担癌マウスに強力な抗腫瘍免疫が誘導され、乳癌細胞が消失することが報告された。

CDK4/6阻害薬が肝細胞癌に対しても同様の免疫系賦活を介した抗腫瘍効果を示すのではないかと考え、本研究を計画した。

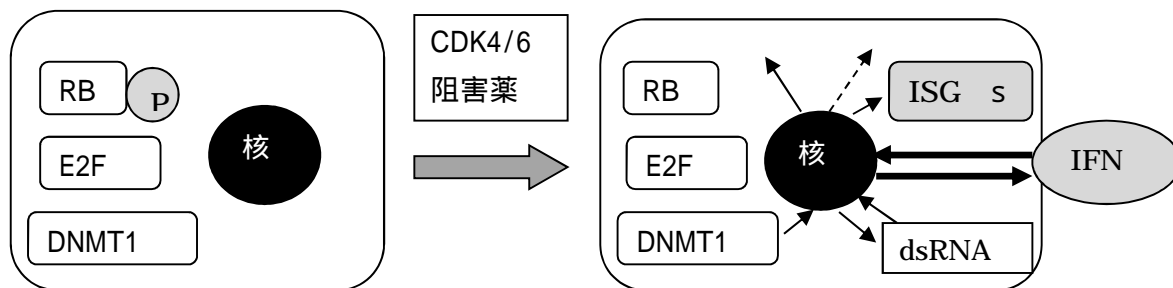
2. 研究の目的

遺伝子変異等により免疫原性が高まった癌は、免疫チェックポイント阻害薬に感受性を示すことが報告されている。本研究の目的は、CDK4/6阻害薬が肝細胞癌の免疫原性ならびに宿主の抗腫瘍免疫を高め得るかを証明することにある。本研究の結果、抗PD1抗体にCDK4/6阻害薬を併用することで、肝癌に対するより強力な抗腫瘍免疫反応が惹起され、肝癌を退縮させることを証明できれば、臨床応用に向けての意義は大きいと考える。肝細胞癌はRB遺伝子変異の頻度が比較的低くCDK4/6阻害薬の効果が期待される固形癌の一つである。これまで、肝細胞癌に対しては、免疫不全マウスへの肝細胞癌xenograftモデルを用いたCDK4/6阻害薬の抗腫瘍効果の研究は散見されるが、肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫活性に関する研究の報告は無い。本研究では、CDK4/6阻害剤が、肝癌細胞並びに肝癌担癌マウスに対しても、乳癌モデルと同様に抗腫瘍免疫を惹起しうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト肝癌細胞株として、RB遺伝子が正常のHuH-7、RB遺伝子が欠失変異しているHep3B、RB遺伝子は正常であるがCDK4/6阻害薬に抵抗性と報告のあるPLC/PRF/5を用いた。マウス肝癌細胞株としてC57BL/6Jマウス由来の肝癌細胞株で同マウスに腫瘍形成可能なHep-55を用いた。これらの培養細胞にCDK4/6阻害薬(palbociclib, abemaciclib)を添加し、細胞増殖抑制(G1 arrest)、RB蛋白の脱リン酸化、E2Fの活性低下、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)1遺伝子発現低下の有無を確認後、Type III IFN(IFN γ)の誘導をreal time PCR並びにELISAを用いて定量的に調べた。同時に肝癌細胞内のIFN誘導遺伝子(ISGs)の発現をreal time PCRで確認した。

次に、CDK4/6阻害薬を添加後の肝癌細胞表面のMHC class I/2MG発現、並びにPDL-1,2発現の変化をFlow cytometryで調べた。ヒト培養肝癌細胞に於いては、CDK4/6阻害薬がCDK4/6を介さない機序で抗腫瘍活性を示すという報告もあることから、RB遺伝子異常とCDK4/6阻害薬に対する増殖抑制の感受性、IFN産生量、並びにMHC class I/2MGの発現変化との関係も合わせて検討した。上記方法について図に示した。



次に、免疫系が正常な C57BL/6J マウスに対して、CDK4/6 阻害薬を投与後、脾臓並びにリンパ節よりリンパ球を単離し、T リンパ球中の CD8 細胞、CD4+CD25⁻細胞、CD4+CD25⁺細胞、Foxp3 陽性細胞数、細胞比率の変化を Flow cytometry を用いて定量的に検討した。

また、Hep-55 細胞を C57BL/6J マウス皮下へ移植し腫瘍形成後、CDK4/6 阻害薬、抗 PD1 抗体単独（実験準備中）ならびに併用治療を行い、腫瘍の増殖、退縮に与える影響を腫瘍径の計測ならびに観察終了時の摘出腫瘍重量計測で抗腫瘍効果を検討した。

4 . 研究成果

ヒト肝癌細胞株として、RB 遺伝子が正常の HuH-7、RB 遺伝子が欠失変異している Hep3B、RB 遺伝子は正常であるが CDK4/6 阻害薬に抵抗性と報告のある PLC/PRF/5 を用いた。これらの培養細胞に CDK4/6 阻害薬を添加し、細胞増殖抑制、RB 蛋白の脱リン酸化、E2F の活性低下、DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)1 遺伝子発現低下の有無を確認した。HuH-7 細胞において、CDK4/6 阻害薬添加により G1 arrest、RB 蛋白の脱リン酸化、E2F の活性低下、DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)1 遺伝子発現低下が確認された。陰性コントロールである Hep3B 細胞では、RB 遺伝子が欠失しているにも関わらず CDK4/6 阻害薬添加により G1 arrest を認めた。しかし、RB 蛋白の脱リン酸化、E2F の活性低下は確認されなかった。PLC/PRF/5 細胞では、HuH-7 細胞に比して G1 arrest の程度は弱く、RB 蛋白の脱リン酸化、E2F の活性低下、DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)1 遺伝子発現低下も軽度であった。

HuH-7 細胞において、CDK4/6 阻害薬添加による Type III IFN(IFN)の誘導を real time PCR 並びに ELISA を用いて定量的に計測した結果、IFN の産生が確認された。同じく real time PCR で HuH-7 細胞内の IFN 誘導遺伝子 (ISGs) の発現を確認したところ、PKR mRNA の上昇が認められた。HuH-7 細胞に CDK4/6 阻害薬を添加し、肝癌細胞表面の MHC class I/ -2MG 発現を Flow cytometry で確認したところ、軽度の発現上昇ながら有意な変化を認めた。PDL-1 発現変化については HuH-7 細胞に於いて、CDK4/6 阻害薬の添加により PDL-1 発現の上昇が認められたが、条件によっては変化がないことから、再検討を行っている。一方、Hep3B 細胞では IFN 誘導、PKR mRNA の上昇を認めなかった。

C57BL/6J マウスに対して、CDK4/6 阻害薬を投与後、脾臓よりリンパ球を単離し、T リンパ球中の CD8 細胞、CD4+CD25⁻細胞、CD4+CD25⁺細胞、Foxp3 陽性細胞数、細胞比率の変化を検討したが、非投与群と比較して T リンパ球の比率に有意な変化は認められなかった。

プレリミナリーな in vivo 実験として、C57BL/6J マウス由来肝癌細胞 Hep-55 を少数の同系マウス皮下へ移植し腫瘍形成後、CDK4/6 阻害薬を投与したところ、腫瘍増殖抑制が認められた。腫瘍周囲のリンパ球浸潤の増加も認められた。今後、マウス数を増やし CDK4/6 阻害薬による抗腫瘍効果、ならびに 抗 PD1 抗体単独ならびに併用治療効果について検討を行う予定である。

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	玉田 陽子 (TAMADA Yoko) (70393460)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

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