

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15097

研究課題名（和文）胃癌における炎症・免疫関連分子PD-L1及びNLRP3の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of inflammation / immunity-related molecules in gastric cancer

研究代表者

西東 瑠璃（SAITO, RURI）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・客員研究員

研究者番号：70805358

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）：胃癌と炎症・免疫関連分子について以下2つの研究を行った。
PD-L1がEBV関連胃癌で高率に発現しており、その約1/3がPD-L1遺伝子の増幅によるものと判明した。微小環境との相互作用との関係や3' UTRの発現低下・欠失に伴う変化に着目して、INF がPD-L1発現を増強させること、PD-L1発現例の一部で3' UTRの異常を有する可能性があることが明らかになった。
NLRP3がびまん型胃癌で予後不良と相関しており、NLRP3発現が細胞遊走と正の相関関係にあることを解明した。NLRP3はインフラマソーム非依存的に遊走能を亢進させること、その経路にS100A8が関わっ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

炎症・免疫関連分子であるPD-L1とNLRP3はそれぞれEBV関連胃癌とゲノム安定型(びまん型)胃癌において癌の進展に重要な役割を果たしていることが本研究で明らかになった。EBV関連胃癌において、PD-L1は治療標的として有望な分子であり、さらなるPD-L1発現機序の解明は特異的で効果の高い治療法の確立に寄与すると考えられる。またNLRP3を阻害することで、胃癌の進展を抑制することができる可能性がある。その他の炎症・免疫関連分子も胃癌の分子生物学的サブタイプごとにその発現意義が異なる可能性が示唆され、分子生物学的サブタイプ別に研究を進める必要性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The following two studies were conducted on gastric cancer and inflammation / immunity-related molecules.

1. PD-L1 expression in tumor cells is a frequent characteristic of EBV associated gastric cancer (EBVaGC) and correlates with poor prognosis. Gene amplification of PD-L1 is an important mechanism of PD-L1 expression in EBVaGC. We conducted research on the microenvironment and 3'UTR to elucidate other mechanisms.

2. NLRP3 promotes cancer cell migration via inflammasome-independent pathway including upregulation of S100A8, and contributes to the poor prognosis of diffuse-type gastric cancer.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：PD-L1 EBV関連胃癌 NLRP3 インフラマソーム びまん型胃癌 遊走

1. 研究開始当初の背景

胃癌の進展過程における炎症・免疫関連分子の役割を胃癌の特徴的なサブタイプごとに解明することが重要であると考え、免疫チェックポイント分子の **PD-L1** と炎症制御で重要な役割を担うインフラソームの構成分子のひとつの **NLRP3** に着目して免疫組織化学的検索及び臨床病理学的解析を行った。さらに **Fluorescence in situ hybridization** による **PD-L1** 遺伝子増幅の検討、胃癌培養細胞株を用いて **NLRP3** 発現が細胞に及ぼす影響の検討も行った。これらの検討によって以下の結果を得た。

① **EBV** 関連胃癌の **PD-L1** 発現は高率で、予後不良と相関していた。また腫瘍細胞の **PD-L1** 発現は間質免疫細胞の **CD8** 発現と相関していた。さらに **EBV** 関連胃癌の **11.4%** に **PD-L1** の遺伝子増幅が確認され、これらは免疫組織学的に **PD-L1** 強陽性であった。同一腫瘍内でも免疫組織化学的に **PD-L1** 強陽性領域のみで遺伝子増幅が認められ、遺伝子増幅は腫瘍内の一部のクローンのみで生じていることが明らかになった。(Saito R et al. *Mod Pathol*. 2017;30(3):427-439.)

② **NLRP3** 発現はサブタイプに関わらず認められるが、その臨床病理学的意義は異なり、びまん型胃癌のみで **NLRP3** 発現は予後不良との相関していた。また胃癌培養細胞株を用いた実験で **NLRP3** 発現が細胞遊走と正の相関関係にあることが明らかになった。

2. 研究の目的

これまでの研究で、**PD-L1** は **EBV** 関連胃癌、**NLRP3** はびまん型胃癌において癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかになった。**EBV** 関連胃癌の **PD-L1** 発現経路として遺伝子増幅の存在を確認したが、その他の経路については微小環境からの誘導が関与している可能性を示したものの解明には至っていない。そこで **EBV** 関連胃癌の遺伝子増幅以外の **PD-L1** 発現経路を解明する。**EBV** 関連胃癌の **PD-L1** 発現経路を詳細に解明することは、**EBV** 関連胃癌に限らず、リンパ球浸潤の目立つ癌やウイルス感染に伴う癌の治療法開発の糸口となる可能性があると考えられる。また **NLRP3** がびまん型胃癌で癌の進展に重要な役割を果たしていることから、胃癌の中でも予後不良で有効な治療が未確立なびまん型胃癌の新規治療法開発につながる可能性を考え、**NLRP3** の細胞遊走亢進機序解明に向けて研究を行うこととした。

3. 研究の方法

リンパ球浸潤との関わりがあるサイトカインにまず注目し、**EBV** 関連胃癌培養細胞株 (**SNU719, YCCEL1**) を培養し、各種サイトカイン (**IL-1 β , IL-6, INF γ , TNF α , TGF β) を添加後に回収したタンパクを用いて **Western blotting** を行い **PD-L1** 発現変化を調べる。また **EBV** 関連胃癌培養細胞株と非 **EBV** 関連胃癌細胞株 (**AGS, MKN74, NUGC3**) でのサイトカインへの反応性の違いについても比較する。さらに **PD-L1** 発現とともに変化する分子を同定し、**inhibitor** の導入によってその分子が **PD-L1** 発現に関わっていることを確認する。既報から関連が窺われる 3'UTR の異常に関して、先行研究で **PD-L1** 発現が確認されている症例について **FFPE** 標本から **RNA** を抽出し、**RT-PCR** を行い 3'UTR の欠失(相対的減少)の有無を調べる。この際、別の研究(Kakiuchi M et al. *Nat Genet*;46(6):583-587, 2014.) にて遺伝子発現解析(**RNA-seq**)を行った症例に対しても同様に **RT-PCR** を行い、判断の参考とする。**

胃癌培養細胞株 (**NUGC3**) に **NLRP3** のインフラソーム形成阻害薬 **MCC950** (Coll RC et al. *Nature Medicine*. 2015;21(3):248-255.) を導入して遊走能の変化を調べ (**transwell assay**)、**NUGC3** による胃癌細胞の遊走亢進がインフラマソーム形成に依存しているか否か検討する。併せて **MCC950** を導入した際の増殖変化も調べ (**growth assay**)、**MCC950** の細胞毒性強度の参考とする。

胃癌培養細胞株 (**NUGC3, MKN7**) に **NLRP3 siRNA** を導入してマイクロアレイによる **mRNA** 発現解析を行い、**NLRP3** 発現変化によって発現が変化した遺伝子を抽出する。さらに解析結果から見出された着目すべき分子に関して胃癌培養細胞株 (**NUGC3, MKN7**) を用いた実験を行い、**NLRP3** や細胞遊走との関係を確認する。

4. 研究成果

胃癌と炎症・免疫関連分子についての臨床病理組織学的な検討に引き続いてその機序を解明するために、以下2つの研究を行った。

① 免疫チェックポイント分子の **PD-L1** が **EBV** 関連胃癌で高率に発現しており、その約 **1/3** が **PD-L1** 遺伝子の増幅によるものと判明した。約 **2/3** は機序が解明されていないため、

微小環境との相互作用との関係や 3'UTR の発現低下・欠失に伴う変化に着目して実験を行った。その結果、 $\text{INF}\gamma$ が胃癌培養細胞株の **PD-L1** 発現を増強させること、**PD-L1** 発現例の一部で 3'UTR の異常を有する可能性があることが明らかになった。

②インフラマソームの構成分子のひとつの **NLRP3** がびまん型胃癌で予後不良と相関しており、**NLRP3** 発現が細胞遊走と正の相関関係にあることを解明した。その機序は明らかにするため実験を行い、**NLRP3** はインフラマソーム非依存的に遊走能を亢進させること、その経路に **S100A8** が関わっていることが明らかになった。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------