

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03724

研究課題名(和文) DGK / を標的とした消化器がんに対する次世代免疫療法の開発研究

研究課題名(英文) Study of next-generation immunotherapy for digestive system cancer targeting DGK alpha/zeta

研究代表者

武富 紹信 (Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：DGK 阻害は肝細胞がんの細胞増殖抑制とT細胞活性化を介する抗腫瘍免疫賦活の二重の抗腫瘍効果でマウス肝がんモデルにおける腫瘍増殖を抑制し、PD-1/PD-L1阻害との併用によって相乗的な抗腫瘍効果を発揮するメカニズムを解明した。さらに、DGK 遺伝子欠損マウスの肝がんモデルにおいては、T細胞だけでなくNK細胞・樹状細胞もエフェクター細胞として抗腫瘍活性が増強されており、DGK 阻害が複数の免疫担当細胞を標的として抗腫瘍免疫を活性化するメカニズムを解明し、新規がん免疫療法の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、DGKが新規がん治療標的として、がん細胞増殖だけでなく抗腫瘍免疫に作用して、がんを制御することを明らかにした。この結果はDGK / の制御が新規がん治療として有望である科学的エビデンスを示した。さらに免疫チェックポイント阻害治療のような既存治療との併用治療に適合性があり、臨床応用において既存治療で効果が不十分な腫瘍に対する新たな治療戦略を提供する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the mechanism by which DGK inhibition suppresses tumor growth in a mouse model of hepatocellular carcinoma through its dual antitumor effects of suppressing cancer cell growth and stimulating antitumor immunity via T cell activation, and exerts synergistic antitumor effects when combined with PD-1/PD-L1 inhibition. Furthermore, in the liver cancer model of DGK -deficient mice, antitumor activity was enhanced not only by T cells but also by NK cells and dendritic cells as effector cells, elucidating the mechanism by which DGK inhibition activates antitumor immunity by targeting multiple immune cells and revealing the possibility of novel cancer immunotherapy. This finding may lead to the development of a novel cancer immunotherapy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：消化器がん 肝細胞がん DGK がん免疫療法 T細胞 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦での疾患別死亡者数第一位は 1981 年以降悪性新生物である。近年、がんに関する様々な分子の同定や機能の解明が進められ、より精度・感度の高い診断法や分子標的薬を使用し、有効な治療法が発展してきているものの全ての患者救済には未だ至ってはいない。従って、がんの完全な制御には未知なる腫瘍形成メカニズムの解明に加え、標準治療の枠を超えたがん治療法の確立が必要である。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、ジアシルグリセロール (DG) をホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素であり、この両者はともに細胞内情報伝達物質として機能する。これまで哺乳動物において 10 種類のアイソザイムが同定されており、DGK は膜脂質情報伝達タンパクとして様々な機能が報告されている。我々はこれまでに、DGK の中で I 型アイソザイムに分類される DGK (alpha) の機能に注目した研究を展開し、DGK が肝細胞がん (HCC) において MAP キナーゼ経路を活性化することを確認し、HCC の増殖や生存などを調節する上流因子であることを明らかにした (Takeishi K, Taketomi A, et al. *J Hepatol* 52:77-83, 2012)。また DGK に関して、メラノーマ細胞のアポトーシス促進分子を阻害すること (Yanagisawa K, et al. *Biochim Biophys Acta* 1771:462-74, 2007)、T 細胞の受容体刺激を減弱し不応答 (Anergy) を誘導することが報告されている (Zha Y, et al. *Nat Immunol* 7:1166-73, 2006)。

一方、DGK (zeta) は と比較するとまだ解明されていない点が多いが、刺激された Jurkat T 細胞において DGK の過剰発現株が Ras/ERK シグナルの下流である AP1 転写因子の発現減少を示す (Zhong XP, et al. *J Biol Chem* 277:31089-98, 2002)。DGK 遺伝子欠損 (KO) 状態において高濃度の TGF- β 、PGE₂、アデノシンによる IFN- γ 産生を抑制する効果を減弱させる (Riese MJ, et al. *Cancer Res* 73:3566-77, 2013)。PKC/PDK-1 を介した活性化機構 (Ávila-Flores A, et al. *Immunol Cell Biol* 95:549-563, 2017) などの、T 細胞に関する機能が報告がされている。

しかし、担がん生体内で DGK と がどのように役割分担されているかは不明であり、これらの機能を解明することは、既存の免疫チェックポイント阻害剤とは違った機序のがん免疫療法を創出することにつながることで期待され、今までにない新規がん免疫療法を構築する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、下記の研究目的を掲げる。

- (1) DGK / の腫瘍微小環境における機能的差異を解明する。
- (2) DGK / 制御によって腫瘍増殖を抑制する宿主免疫メカニズムを解明する。
- (3) 担がん生体における DGK / 制御による腫瘍増殖抑制を実証する。
- (4) 臨床検体における DGK / および下流・関連分子の発現とがんの病態について検討する。

3. 研究の方法

(1) 担がんモデルマウスの作出と評価

野生型 (WT)、DGK α KO と DGK KO マウスを用いて、各マウスの担がんモデルを作成し、抗腫瘍免疫に関連するエフェクター細胞の表現型について評価する。担がんモデルとして、蛍光タンパク mCherry を遺伝子導入したマウス肝がん細胞株 Hepa1-6 を用いて、がん細胞をマウス脾臓に注射して肝腫瘍を形成する肝がんモデルを作成する。in vivo イメージングシステム (IVIS) を用いて肝臓における蛍光量について評価することで腫瘍量を比較する。コラゲナーゼ処理によって担がん肝臓から細胞を単離して細胞表面マーカーをフローサイトメトリー (FCM) で解析することで、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) についてポピュレーションを評価する。さらに、肝組織を HE 染色および各種免疫組織化学染色 (IHC) によって、腫瘍面積や TIL 分布について評価する。ここから見出された標的細胞や液性因子について、担がんモデルにおいて抗体・試薬による細胞除去やブロッキングによって表現型の変動を解析する。

(2) 肝がんモデルにおける DGK 阻害の抗腫瘍効果とメカニズムの解析

WT マウスの肝がんモデルを用いて、DGK α 阻害剤 (DGKAI) を投与して IVIS および組織 HE 染色による腫瘍量を比較して抗腫瘍効果を検証し、FCM および IHC によって免疫応答メカニズムを解析する。in vitro 培養系において、がん細胞、T 細胞、樹状細胞 (DC) に DGKAI を投与して細胞増殖、サイトカイン産生能、表面分子発現について解析する。さらに、肝がんモデルの肝組織において IHC によって PD-L1 発現を評価し、抗 PD-L1 抗体と DGKAI の併用投与による抗腫瘍効果を検証する。

(3) DGK KO マウス肝がんモデルにおける抗腫瘍免疫メカニズムの解析

WT および DGK ζ KO マウスの肝がんモデルを比較することで、DGK 制御による宿主免疫に対する効果とメカニズムについて検討する。肝がんモデルの肝臓における TIL について FCM 解析で詳細に解析することで、DGK 制御による標的細胞を同定し、標的細胞および関連液性

因子について抗体・試薬による細胞除去やブロッキングによってその作用メカニズムについて検証する。

(4) がん組織における DGK α/ζ 発現の病理組織学的評価と病態の関連性についての解析

手術切除検体を用いて、DGK α/ζ について IHC を施行する。がん組織における DGK タンパク発現レベルを評価し、臨床背景・予後との関連について解析し、がん治療を最適化する新たなバイオマーカーにつながる標的となり得るか検証する。

4. 研究成果

(1) DGK α 阻害による抗腫瘍効果のメカニズム

肝がんモデルにおける DGKAI 投与は 14 日目時点の肝腫瘍増殖を抑制しており、DGKAI 投与群の生存率が延長することが実証された。IHC において腫瘍中には T 細胞、DC の浸潤が増加しており、CD8+TIL の IFN- γ 産生細胞の割合が増加していた。in vitro における検討では、ヒト肝がん細胞株 HLF および Hepa1-6 の細胞増殖は DGKAI によって抑制された。ヒト PBMC およびマウス脾臓細胞を用いて抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体によって T 細胞に刺激を加えたうえで DGKAI を投与すると、ERK の JNK のリン酸化が亢進して、IL-2 の産生が亢進した。マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)と OVA 特異的 T 細胞の共培養系においても DGKAI 投与によって OVA 抗原刺激に対する IL-2、IFN- γ 、Granzyme B の産生が増加した。BMDC 単独の培養系において DGKAI を投与しても細胞表面分子発現に変化は見られなかった。肝がんモデルに抗 CD4 および抗 CD8 抗体を投与し CD4+T 細胞および CD8+T 細胞を除去すると、抗 CD8 抗体投与群において DGKAI による腫瘍増殖抑制効果が減弱した。また、肝がんモデルの DGKAI 投与群では IHC にて腫瘍中の PD-L1 発現が亢進していた。Hepa1-6 の培養系に DGKAI を投与しても PD-L1 発現は変化しなかったが、リコンビナント IFN- γ を投与すると PD-L1 発現が亢進した。肝がんモデルに対して DGKAI と抗 PD-L1 抗体を併用投与すると相乗的な抗腫瘍効果を示すことがわかった。

以上の実験結果から、DGK 阻害は がん細胞に対する直接的増殖抑制効果と T 細胞活性化を介する抗腫瘍免疫賦活効果の 2 重の抗腫瘍効果を示すことが証明された。この抗腫瘍効果における宿主免疫応答として、CD8+T 細胞が主要な抗腫瘍エフェクター細胞であり、腫瘍微小環境 (TME) において IFN- γ および Granzyme B の産生が亢進することで細胞傷害活性が高まると考えられる。また DGK 阻害は TME における DC の浸潤も増加するが、直接的な細胞機能に対する影響は明らかでなく、宿主免疫に対する DGK 阻害の効果は T 細胞の活性化が主体と考えられる。また、DGKAI によって T 細胞が活性化することで TME における IFN- γ レベルが高まると、がん細胞の逃避機構として PD-L1 の発現が亢進するため、DGK 阻害と PD-L1 阻害の併用治療は強力な抗腫瘍効果が期待できる。実臨床において、TIL が少ない、もしくは免疫チェックポイント分子発現が亢進するような、免疫チェックポイント阻害治療の効果が乏しいと考えられる腫瘍に対しても、DGK 阻害によって TME の免疫環境を改善させる可能性があり、DGK 阻害剤はがん免疫療法における新しい標的分子として期待できる。

(2) DGK ζ KO マウスの抗腫瘍免疫応答のメカニズム

KO マウスを用いた肝がんモデルにおいては、DGK KO マウスにおいて、がん細胞は肝臓に生着するものの早期 (7 日目) の時点から排除されていくため、KO マウス肝がんモデルについては 7 日目時点までを解析した。DGK KO 肝がんモデルの肝臓においては 7 日目時点で WT マウスと腫瘍量に差がなく、FCM 解析では TIL における CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、NK 細胞、DC の比率に差がなかったが、14 日目時点では腫瘍量が有意に少なかった。DGK KO 肝がんモデルは 7 日目時点で腫瘍量が少なく、CD4+T 細胞、NK 細胞、DC の割合が増加しており、IHC では腫瘍内の DC 浸潤の増加が観察された。BMDC の培養系において LPS で刺激すると DGK KO-BMDC では細胞表面の MHC class II、CD80/86 の発現が亢進した。BMDC と OVA 抗原特異的 T 細胞の共培養系では IFN- γ 産生が亢進した。DGK KO 肝がんモデルにおいてクロドロン酸リポソームを投与すると腫瘍の DC 浸潤が低下し、腫瘍量が増加した。また、抗 NK1.1 抗体および抗 CD8 抗体によって NK 細胞と CD8+T 細胞を除去すると、抗 NK1.1 抗体投与群では 7 日目時点の腫瘍量が増加するが、14 日目時点ではコントロール群と同程度に腫瘍が排除された。抗 NK1.1 抗体 + 抗 CD8 抗体併用投与群では 7 日目と 14 日目時点でいずれも腫瘍量が増加したが、組織中の DC 浸潤には変化がなかった。

以上の実験結果から、(1)の結果も加味すると DGK KO による抗腫瘍免疫の変化は T 細胞の活性化を維持することでがん細胞を排除すると考えられる。一方で、DGK 阻害の抗腫瘍免疫制御は複数の免疫担当細胞が標的と考えられ、これまでに報告される T 細胞や NK 細胞の殺細胞活性の増強効果以外にも DC の活性化にも関与している可能性が示唆された。DGK KO の DC においては T 細胞に対する抗原提示能が亢進すると考えられ、肝がんモデルの DC が除去されると腫瘍が増加するため、DC の機能は DGK KO の抗腫瘍免疫において重要な役割を担うと考えられる。また、DGK KO 肝がんモデルにおいては NK 細胞が早期から強力なエフェクター細胞として機能しているが、NK 細胞を除去しても CD8+T 細胞をエフェクター細胞として腫瘍排除能が維持されることから DC を介して CD8+T 細胞の殺細胞活性を活性化していると考えられる。DGK 阻害剤は発見されておらず、KO マウスによる表現型を解析したが、DGK

阻害は T 細胞だけでなく NK 細胞、DC を活性化させることで抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

(3) 原発性肝がんにおける DGK 発現と病態の関連性について

これまでに HCC においてがん細胞の増殖に関連する予後因子として報告してきた(Takeishi K, Taketomi A, et al. J Hepatol 52:77-83, 2012)。原発性肝がんとして HCC の次いで肝内胆管癌(ICC)の頻度が高く、原発性肝がんは HCC と ICC がほぼ全体を占めている。当教室における過去の手術症例から ICC の 69 症例について IHC により病理組織における DGK / 発現を評価した。がん細胞における DGK 発現と予後に相関は見られなかったが、がん細胞において DGK 高発現の症例では、全生存期間と無再発生存期間 (RFS) が不良であり、多変量解析でも DGK 高発現が RFS において独立した予後不良因子であった。DGK 高発現となる症例では組織における Ki-67 発現細胞数も増加しており、ICC においても DGK はがん細胞の増殖に関連する治療標的分子と考えられる。一方で、連続切片を用いた TIL における DGK 発現の評価も試みたが、今回使用した症例では、CD4 や CD8 など各種の TIL 関連マーカーが陽性となる細胞が少なく、評価が困難であった。新たに HCC 265 症例で Tissue Microarray を作成し、DGK および CD4、CD8 の IHC を試みたが、一部で CD4・CD8 陽性領域で DGK 陽性となるが、陽性判定できる症例が少なかったため、これも評価が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada Naoki, Sugiyama Ko, Shichi Shunsuke, Shirai Yasuhito, Goto Kaoru, Sakane Fumio, Kitamura Hidemitsu, Taketomi Akinobu	4. 巻 71
2. 論文標題 Combination therapy for hepatocellular carcinoma with diacylglycerol kinase alpha inhibition and anti-programmed cell death-1 ligand blockade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 889 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03041-z	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志智 俊介, 北村 秀光, 杉山 昂, 木村 沙織, 岡田 尚樹, 武富 紹信
2. 発表標題 DGK 欠損マウスにおける抗腫瘍免疫の増強
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山 昂, 北村 秀光, 志智 俊介, 木村 沙織, 岡田 尚樹, 武富 紹信
2. 発表標題 消化器がんにおける新規治療標的Diacylglycerol kinase alphaの阻害と抗がん剤治療との併用療法に関する研究
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志智 俊介, 北村 秀光, 杉山 昂, 岡田 尚樹, 木村 沙織, 武富 紹信
2. 発表標題 肝がんマウスモデルにおいてDiacylglycerol Kinase 阻害は免疫チェックポイント阻害治療による抗腫瘍効果を増強させる
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山 昂, 北村 秀光, 志智 俊介, 岡田 尚樹, 武富 紹信
2. 発表標題 消化器がんに対する新規治療標的Diacylglycerol kinase 阻害と制癌剤投与併用効果の検証
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志智 俊介, 北村 秀光, 杉山 昂, 岡田 尚樹, 武富 紹信
2. 発表標題 DGK の阻害は肝がんモデルマウスの抗腫瘍免疫状態を亢進する
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山 昂, 北村 秀光, 志智 俊介, 岡田 尚樹, 武富 紹信
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase alpha阻害は抗がん剤投与による抗腫瘍効果を増強する
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志智 俊介, 岡田 尚樹, 杉山 昂, 北村 秀光, 武富 紹信
2. 発表標題 肝がんモデルを用いたDiacylglycerol Kinase 阻害による抗腫瘍エフェクター細胞の活性化機序解明
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田尚樹、武富紹信、杉山昂、北村秀光、坂根郁夫
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase 阻害による腫瘍免疫を介した肝がん治療効果の検討
3. 学会等名 第 119 回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Okada, Akinobu Taketomi, Ko sugiyama, Hidemitsu Kitamura
2. 発表標題 Inhibition of diacylglycerol kinase alpha activates anti-tumor effector T cells in tumor-bearing host
3. 学会等名 第 38 回 札幌国際がんシンポジウム
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
研究分担者	坂根 郁夫 (Sakane Fumio) (10183815)	千葉大学・大学院理学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	北村 秀光 (Kitamura Hidemitsu) (40360531)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101)	
研究分担者	深井 原 (Fukai Moto) (60374344)	北海道大学・医学研究院・特任講師 (10101)	

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