

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17794

研究課題名（和文）メラノーマ細胞のT細胞抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of acquired resistance for T cell based immunotherapy

研究代表者

大沼 毅紘（Onuma, Takehiro）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80793116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは過去に抗PD-1抗体治療が無効になる代表的な機序としてMHC class I消失を報告した。今回はそれ以外の機序を独自の実験系にて探索した。MHC class Iを強制発現したメラノーマ細胞を試験管内でメラノーマ反応性T細胞と共培養し、生き残ったメラノーマ細胞の特徴を解析した。その結果、メラノーマ細胞に発現されるいくつかの治療抵抗性に関与する分子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体の治療抵抗性機序でよく知られているのはT細胞の目印となるMHC class Iの消失であるが、それ以外は不明である。そこで我々は、MHC class I消失以外のT細胞抵抗機序を誘導できる独自の試験管内実験系を構築し、それを用いてT細胞抵抗性に関わる未知の分子を検索した。その結果、メラノーマ細胞表面に誘導されるT細胞抵抗性に関与する分子を複数発見した。この結果は、これらの分子のメラノーマ細胞における発現をチェックすることで抗PD-1抗体を開始、継続、中止するための臨床判断に役立てられる可能性や、これらの分子を阻害することでT細胞抵抗性を克服できる可能性を示すと考えている。

研究成果の概要（英文）：Previously, we reported MHC class I loss as a mechanism of resistance for anti-PD-1 therapy. In this research, we explored other mechanisms using our own in vitro experimental system. We co-cultured MHC class I over expressing-melanoma cells and melanoma reactive T cells, and then analyzed characteristics of residual viable melanoma cells. Eventually, we have identified some molecules expressed on melanoma cells that might mediate resistance for T cell based-immunotherapies.

研究分野：皮膚科学 メラノーマ

キーワード：メラノーマ 抗PD-1抗体 治療抵抗性 MHC class I消失 腫瘍浸潤リンパ球 免疫チェックポイント阻害剤

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体は進行期メラノーマ患者の予後を大きく変えたが、初めから効かない例や最初は効いていたが途中で効かなくなる例もある。そのメカニズムの多くは不明であり、その説明が治療抵抗性克服のためには重要である。代表者はこれまでの研究において、同一個体内で抗 PD-1 抗体投与によって縮小した転移性メラノーマ病巣と増大した転移性病巣をそれぞれ生検し、比較解析した。その結果、増大病巣ではメラノーマ細胞の MHC class I 消失が起きていること、一方、抗腫瘍効果を担っていたと思われる腫瘍特異的浸潤 T 細胞の腫瘍反応性は問題が無いこと、が明らかとなった。この結果は、自己腫瘍に対して T 細胞反応が持続する結果、腫瘍細胞に T 細胞反応を回避するような変化が起こることを示している。現在、抗 PD-1 抗体投与によって腫瘍に起こる変化としては今の所 MHC class I 消失が知られているが、それ以外の機序の多くはまだは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、抗 PD-1 抗体治療後に MHC class I を消失した病巣より樹立したメラノーマ細胞株(HSmeI)と原因遺伝子 B2M を正常化させて MHC class I を復活させた細胞株(HS-B2M meI)、それを強く認識する腫瘍浸潤 T 細胞株(HS TIL)を用いて、MHC class I 消失以外の新たな治療抵抗性メカニズムを探索することを目的とする。

本研究は抗 PD-1 抗体治療における、治療前の適格性判断、および治療中の治療抵抗性克服や治療の限界の判断をどうするか、という最重要課題の一つを解決するための重要な知見を与える。

3. 研究の方法

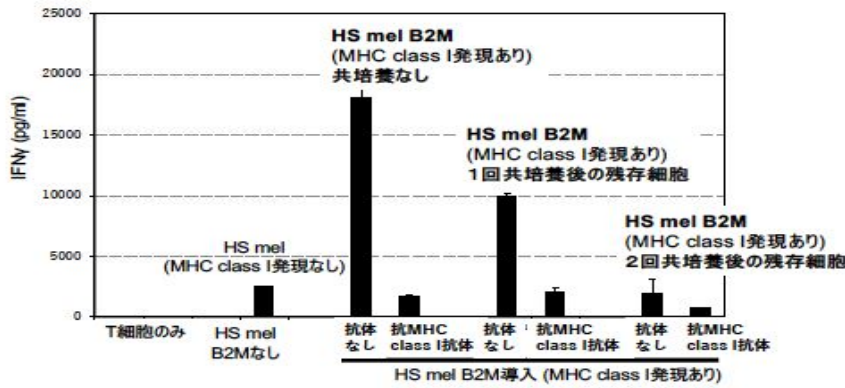
In vitro で HS meI と HS TIL を 48 時間共培養しても腫瘍細胞は MHC class I がいないため拒絶や増殖抑制を受けないが、HS-B2M meI と HS TIL を 48 時間共培養すると、腫瘍細胞のほとんどは死滅する。一部の残存細胞を増殖させて再び HS TIL と共培養すると、共培養前と比較して HS TIL による認識が有意に低下した(図 1)。さらに 2 回目の共培養を行い、一部の残存細胞を増殖させて回収した。

この 2 回共培養後の耐性獲得 HS-B2M meI と共培養前の HS-B2M meI の遺伝子発現プロファイルを DNA chip にて比較した。その結果、T 細胞による腫瘍細胞の認識に関与する可能性がある表面分子を複数、同定することができた。その一つ分子 A について、耐性獲得 HS-B2M meI に強制発現を行うことで HS TIL による認識に変化が出るかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) HS meI は抗 PD-1 抗体治療に治療抵抗性となった再発病変より作成した細胞株である。B2M 遺伝子変異により MHC-class I を消失しているため、自己腫瘍浸潤 T 細胞株(HS-TIL)からは認識されない。HS meI に正常 B2M 遺伝子を導入すると(HS-B2M meI)、HS-TIL からの認識は回復する。HS-B2M meI と HS-TIL を 48 時間共培養すると大部分の腫瘍細胞は死滅するが一部の細胞は残存する。残存細胞は元の HS-B2M meI と比較して、HS-TIL からの認識が減弱していた。この HS-B2M meI と HS-TIL の共培養をもう一度繰り返した後の残存細胞では、さらに HS-TIL による認識が減弱していた(図 1)。以上より、共培養を 2 回繰り返して得られた残存腫瘍細胞には MHC class I 以外の T 細胞耐性機序が誘導されたと考えられた。

図1 HS-TILとHS-B2M melの共培養を繰り返し、TILへの抵抗性を誘導した

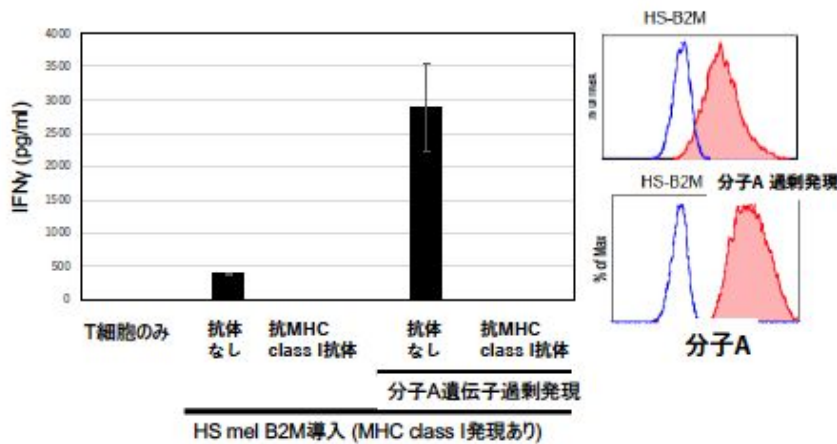


(2) 次に共培養前と2回共培養後のHS-B2M melそれぞれからmRNA抽出を行い、DNA Chip解析によって遺伝子発現プロファイルの比較を行った。共培養後に増加している遺伝子はT細胞への抵抗性に関与する分子、減少している遺伝子はTILの活性化に必要な分子と予想できる。

2者で発現が2倍以上異なる遺伝子群の中で、免疫反応に関与する表面分子に焦点を絞り、発現が上昇した分子と下降した分子、それぞれ3つずつをピックアップした。

(3) ピックアップした候補分子の一つ、分子Aは共培養によってHS-B2M mel上の発現が低下する分子であり、TILの活性化に必要な分子と考えられる。確認するために、分子Aを2回共培養後の認識が減弱したHS-B2M melに強制発現させたところ、TILによる認識は回復した(図2)。

図2 治療抵抗性を獲得したメラノーマ細胞株に分子Aを過剰発現させるとTILによる認識が改善された



今後は分子Aを含む候補分子すべてについて、強制発現やCRISPR-Cas9 KOを用いた発現操作、ブロッキング抗体存在下、などの条件下に共培養実験を行い、T細胞抵抗性に関する影響の大きさを評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takashi Inozume, Tomonori Yaguchi, Ryo Ariyasu, Yosuke Togashi, Takehiro Onuma, Akiko Honobe, Hiroyoshi Nishikawa, Yutaka Kawakami, Tatsuyoshi Kawamura	4. 巻 139
2. 論文標題 Analysis of the Tumor Reactivity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Metastatic Melanoma Lesion that Lost Major Histocompatibility Complex Class I Expression after Anti-PD-1 Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1490-1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.01.007	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 -

1. 著者名 Honobe Akiko, Sakai Kazuko, Togashi Yosuke, Ohnuma Takehiro, Kawamura Tatsuyoshi, Nishio Kazuto, Inozume Takashi	4. 巻 100
2. 論文標題 Heterogeneity in congenital melanocytic nevi contributes to multicentric melanomagenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 217 ~ 219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.09.004	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪爪隆史, 富樫庸介, 有安亮, 谷口智恵, 大沼毅紘, 河上裕, 西川博嘉
2. 発表標題 抗PD-1抗体が著効した進行期メラノーマ におけるTILの機能解析
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume, Tomonori Yaguchi, Ryo Ariyasu, Yosuke Togashi, Takehiro Ohnuma, Akiko Honobe, Hiroyoshi Nishikawa, Yutaka Kawakami, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Analysis of the tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes in a metastatic melanoma lesion that lost MHC class I expression after anti-PD-1 therapy
3. 学会等名 The 77 the annual meeting of Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume, Ryo Ariyasu, Yosuke Togashi, Tomonori Yaguchi, Takehiro Ohnuma, Hiroyoshi Nishikawa, Yutaka Kawakami, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Identification and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes that may mediate anti-tumor response by nivolumab
3. 学会等名 The 44 the annual meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume, Akiko Honobe, Kazuko Sakai, Yosuke Togashi, Takehiro Ohnuma, Tatsuyoshi Kawamura, Kazuto Nishio
2. 発表標題 Heterogeneity in congenital melanocytic nevi contributes to muliticentric melanomagenesis
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shusuke Kawashima, Takashi Inozume, Masahito Kawazu, Etsuko Tanji, Akiko Honobe, Takehiro Ohnuma, Tatsuyoshi Kawamura, Hiroyuki Matsue, Yosuke Togashi
2. 発表標題 TIGIT/CD155 axis mediates resistance to immunotherapies in inflamed tumors
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 皮膚科学 HP https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/

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
研究協力者	猪爪 隆史 (INOZUME TAKASHI)		

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