

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06157・19K21268

研究課題名(和文) DNA損傷下におけるPD-L1の生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of PD-L1 functions under genotoxic condition

研究代表者

仁平 直江 (NIHIRA, NAOE)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40589470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内において癌細胞は免疫寛容能を獲得することで、免疫系による排除機構から回避する。PD-L1は多くの癌細胞で高発現が見られ、T細胞やマクロファージに発現するPD-1に対するリガンドとして、これらの免疫細胞の不活化や増殖抑制を促すことで免疫寛容を引き起こす。これまでにPD-L1の核内移行が報告されているが、その分子機構は明らかとなっていない。本研究の遂行によって、我々はPD-L1がクラスリンやアダプチン分子、インポーチンなどの分子との結合を介して核内へと移行することを明らかにした。また、PD-L1のアセチル化によってPD-L1の核内移行が制御されていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、我々はPD-L1の脱アセチル化が核内移行の制御因子との結合を促し、核内移行を引き起こすことを明らかにした。そして、脱アセチル化酵素阻害剤を細胞に処理すると核内移行が抑制されることを明らかにした。マウスを用いた解析では、脱アセチル化酵素阻害剤を抗PD-1治療薬と共に投与することで、抗PD-1治療薬による抗腫瘍効果が認められた。こ

研究成果の概要(英文)：Almost tumor cells are eliminated by the immune system, including T lymphocytes and natural killer cells. However, many types of tumor cells acquire the immune tolerance by inhibiting T-cell activation and functions. To this end, PD-L1 is identified to function as a ligand for PD-1, which is the receptor of the immunoglobulin superfamily expressing on the cell surface of T-cells. Translocation of PD-L1 into the nucleus from plasma membrane have been reported, however, the regulatory mechanisms for it remain largely unclear. In this project, we clarified the molecular basis for nuclear translocation of PD-L1. Furthermore, we found that the nuclear translocation is regulated by PD-L1 acetylation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：PD-L1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において癌細胞は免疫寛容能を獲得することで、免疫系による排除機構から回避する。PD-L1 は多くの癌細胞で高発現が見られ、T 細胞やマクロファージに発現する PD-1 に対するリガンドとして、これらの免疫細胞の不活化や増殖抑制を促すことで免疫寛容を引き起こす。これまでに DNA 損傷刺激による PD-L1 の発現上昇や核内移行が報告されているが、PD-L1 の核内移行の分子制御機構や核内での生理機能は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、培養細胞を用いた分子生物学・生化学的実験手法により、PD-L1 の核内移行制御機構と核内での生理機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

核内に移行した PD-L1 がどのようにアポトーシス誘導の抑制に関与しているかを明らかにする為に、DNA 損傷刺激下において特異的に PD-L1 と結合する分子を質量分析解析により同定する。同定された分子については、培養細胞を用いた会合実験を行った。

また、我々は PD-L1 と結合する核内移行制御分子として、Importin ファミリー蛋白をはじめとするいくつかの核内以降制御因子をすでに同定している。そこで、この結果を確認するために、培養細胞を用いた会合実験を行い、これらの候補分子と PD-L1 の結合が DNA 損傷によって増強するかどうかについて検討した。また、細胞膜上に発現する PD-L1 がどのように細胞内へ移行するかを明らかにする為に、新規制御因子を同定する為に質量分析解析を行った。

更に、DNA 損傷下における核内での PD-L1 の機能を明らかにするための手掛かりを得る為に、RNA シーケンス解析を行い、PD-L1 の欠失によって発現の変化が見られる遺伝子を同定した。

4. 研究成果

質量分析による解析より、新規 PD-L1 会合分子として、DNA 損傷修復に関与する DNA-PKcs・FANCI や DNA 損傷部位のセンサー分子として働く ATR・ATM などを同定した。また、PD-L1 の細胞内輸送・局在を制御する分子として、エンドサイトーシスに関わるクラスリンやアダプチン分子、細胞内蛋白輸送を促す分子としていくつかの細胞骨格蛋白を同定した(表 1)。また、すでに会合蛋白として同定している核内以降制御因子 Importin ファミリー蛋白も本解析で検出された。

細胞内局在制御分子	エンドサイトーシス	アダプチン分子	AP1B1, AP2B1
		その他	CLH1, HIP1R
	細胞骨格蛋白	ケラチン分子	KRT1, KRT2, KRT6A, KRT8
			KRT9, KRT10, KRT14, KRT16, KRT18
		その他	VIM
	核内以降制御分子	インポーチン分子	IPOA1, KPNB1, IPO11, IPO13
			IPO4, IPO5, IPO7, IPO8, IPO9
トランスポーチン分子		TNPO1, TNPO2, TNPO3	
DNA 損傷修復関連分子	DNA 損傷修復	DNA-PKcs, FANCI	
	DNA 損傷センサー	ATM, ATR	

表 1 質量分析解析によって同定された PD-L1 会合分子の一覧

また、培養細胞を用いた会合実験により、PD-L1 は細胞内ドメインを介してクラスリンやアダプチン分子と結合し、細胞膜上からエンドサイトーシスによって細胞内へと移行することが明らかとなった。そして、細胞内へ移行した PD-L1 はインポーチンなどの分子との結合を介して核内へと局在を変えることが明らかとなった。一方で、我々は PD-L1 の細胞内ドメインのリジン残基が p300 によるアセチル化と HDAC2 による脱アセチル化を受けることを見出していたことから、これらの細胞局在制御分子と PD-L1 の結合がアセチル化によって制御されているのではないかと仮説を立て、さらに解析を進めた。そして、HDAC2 による PD-L1 の脱アセチル化が PD-L1 の核内移行の制御因子との結合を可能とし核内移行を促すことを明らかにした (図 1)。

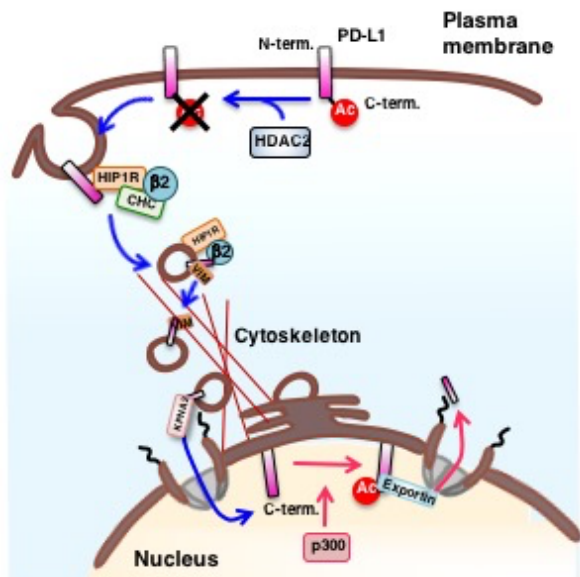


図 1 PD-L1 の核内以降のモデル

更に、細胞分画法による解析により、HDAC2 阻害剤の添加によって PD-L1 の核内移行が抑制されることを明らかにした。また、マウスを用いた解析では、HDAC2 阻害剤を抗 PD-1 治療薬と共に投与することで、抗 PD-1 治療薬による抗腫瘍効果が認められた。このことから、PD-L1 の脱アセチル化酵素の阻害剤は抗 PD-1 治療薬との併用療法に有効であることが示唆された (図 2)。

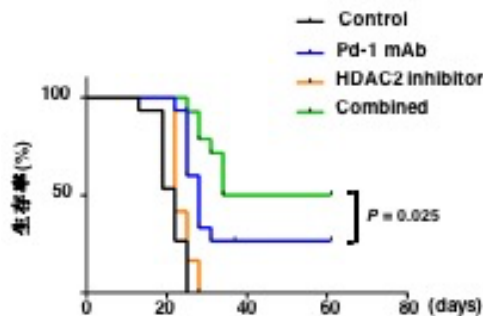


図 2 HDAC 阻害剤は抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果を促進させる

6-8 週齢の C57BL/6 マウス (メス) に MC38 細胞を皮下移植したのち、抗 PD-1 抗体、もしくは HDAC 阻害剤、またはその両方を投与し、マウスの生存率を算出した。

最後に、核内での PD-L1 の機能を明らかにする為に、PD-L1 ノックアウト細胞を用いて、PD-L1 の存在の有無によって発現が変動する遺伝子群の探索を試みた。その結果、免疫応答に関与する遺伝子群、NF- $\kappa$ B パスウェイ関連遺伝子、インターフェロン $\beta$ パスウェイ関連遺伝子などの免疫応答に関与する遺伝子群が PD-L1 による発現誘導を受けることが明らかとなった (図 3)。また、培養細胞を用いた実験下において、PD-L1 自身が DNA への結合能を持つことが明らかとなったことから、PD-L1 は核内において直接、これらの遺伝子群の発現制御に関わっていることが示唆された。

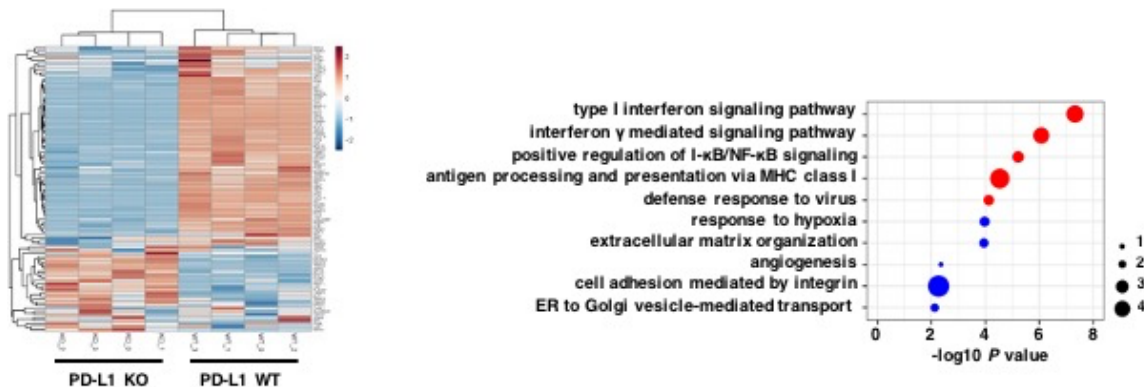


図 3 PD-L1 は免疫応答に関与する遺伝子群の発現制御に関与する

MDA-MB-231 細胞 (内在性 PD-L1 あり) と PD-L1 ノックダウン MDA-MB-231 細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行った。

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