

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03521

研究課題名(和文) KRAS/LKB1変異型肺がんが示す免疫チェックポイント阻害薬治療耐性の克服

研究課題名(英文) Overcoming resistance to immune checkpoint inhibitors in KRAS-LKB1 mutant lung cancer.

研究代表者

北嶋 俊輔 (KITAJIMA, Shunsuke)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・研究員

研究者番号：90566465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに研究代表者は、免疫チェックポイント阻害薬抵抗性を示すKRAS-LKB1変異(KL)型非小細胞肺がん(NSCLC)において、細胞質内DNAセンサーであるSTINGの不活性化が免疫原性低下に寄与することを明らかにした。そこで本研究では、薬剤スクリーニングによりSTING経路を活性化する薬剤を探索し、紡錘体チェックポイントキナーゼMPS1に対する阻害薬が、KL型NSCLCに対して微小核形成を介してSTING経路を効率的に活性化することを見出した。またKL型NSCLCマウスモデルにおいて、MPS1阻害剤の奏功にはSTING依存的なCD8陽性T細胞の腫瘍内遊走が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内における肺癌の死亡率は男性で第1位、女性で第2位となっており、年間7万人以上の人々が肺がんで亡くなっている。免疫チェックポイント阻害薬(ICI)は、がん治療に革命をもたらし、現在の肺がん薬物治療の根幹を成しているが、一部のがん患者にしか奏功しない。ICI治療抵抗性を示す代表的ながん種であるKRAS-LKB1変異型非小細胞肺がんをモデルとして、がん組織の免疫原性が低下する分子機序を理解し、その成果に基づきICI治療抵抗性の克服を目指す。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that KRAS-LKB1 mutant (KL) non-small cell lung cancer (NSCLC), which is resistant to immune checkpoint inhibitors, shows marked silencing of STING, an adaptor protein that links cytoplasmic dsDNA accumulation to activation of downstream innate immune signaling. STING downstream cytokines are key molecules for T-cell recruitment into the tumor microenvironment (TME), and indeed, infiltration of T-cells into the TME is significantly lower in KL-type NSCLC. Through an unbiased screen of cytotoxic chemotherapies or targeted DNA-damaging agents for their ability to induce STING activation, we identified MPS1 inhibitor as an optimal agent to prime the STING pathway in KL cells via micronuclei creation. We also found that STING-dependent infiltration of CD8-positive T cells following treatment with MPS1 inhibitor was required for long-term efficacy to MPS1 inhibitor in a syngeneic murine KL-type NSCLC model.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：非小細胞肺がん KRAS STING STK11 LKB1

### 1. 研究開始当初の背景

KRAS 遺伝子変異は、非小細胞肺癌 (NSCLC) において頻りに観察されるドライバー変異である。KRAS 変異型 NSCLC は、免疫チェックポイント阻害薬の奏効と正に相関する遺伝子変異数が比較的多いことから、KRAS 変異型 NSCLC 患者を対象として、PD-1 阻害薬を用いた臨床試験が近年実施されてきた。その結果、KRAS 変異型 NSCLC 患者の 1/3 を占めるサブクラスの 1 つである KRAS;LKB1 変異 (KL) 型 NSCLC がその他のサブクラスと比較して、免疫原性が低く、PD-1 阻害薬に対して治療抵抗性を示すことが報告された (図 1)。これまでに研究代表者は、細胞株や臨床検体を用いた遺伝子発現解析等を通じて、KL 型 NSCLC において、細胞質内二本鎖 (ds) DNA センサーである STING の発現が LKB1 変異依存的に抑制されていることを明らかにした (図 2)。実際に KL 型 NSCLC から生じた腫瘍組織では、STING 経路の不活性化に伴う CXCL10 分泌低下により、腫瘍領域内への細胞傷害性 T 細胞の浸潤率が減少することから、LKB1 変異による STING の発現抑制が、KL 型 NSCLC における免疫原性低下に直接寄与することが示唆された。

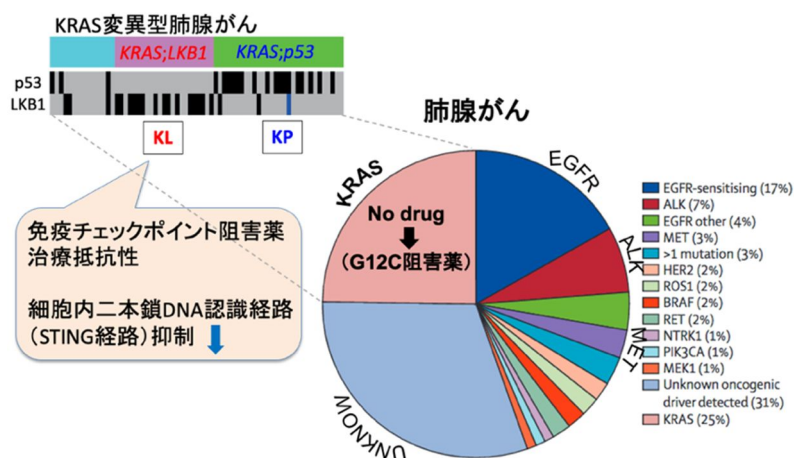


図 1. 遺伝子変異による非小細胞肺癌の分類 (Hirsch et.al. Lancet 2017, Skoulidis et.al. Cancer Discovery 2015 を改訂)

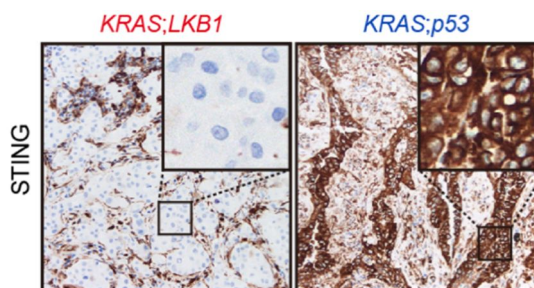


図 2. ヒト KRAS 変異型 NSCLC 検体における STING 発現

### 2. 研究の目的

これらの研究成果から、KL 型 NSCLC において STING 経路の再活性化が、免疫チェックポイント阻害薬に対する抵抗性を克服するための治療戦略として有効であると考えた。そこで本研究では、KL 型 NSCLC に対する新規治療法開発のための基盤研究として、まず KL 型 NSCLC に対して CXCL10 の分泌亢進を指標として STING 経路を効率的に活性化する薬剤の探索を行った (図 3)。また、候補薬剤の中から、KL 型 NSCLC 細胞株に対して「(1)細胞内在性 STING アゴニストである 2'3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) の産生亢進、(2)STING の発現亢進」を誘導する薬剤に特に着目した。候補薬剤が STING 経路を活性化する分子機序の解明を目指すとともに、これまでに研究代表者が開発した KL 型 NSCLC マウスモデルなどを用いて候補薬剤が KL 型 NSCLC に対する STING 依存的な治療効果を示すことが出来るか検討した。

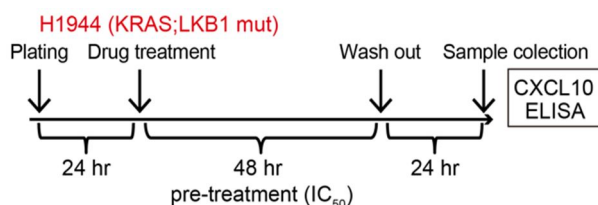


図 3. STING 経路を活性化する薬剤の探索

### 3. 研究の方法

KL 型 NSCLC に対して STING 経路の活性化を介して治療効果を示す薬剤の探索

薬剤スクリーニングには、KL 型 NSCLC 細胞 H1944 株を用いた。H1944 株は、STING の発現が低いものの細胞質内 DNA センサーとしての機能は維持しており、cGAMP の細胞内蓄積量に従って STING 経路依存的に CXCL10 が誘導される。H1944 株を各薬剤の IC<sub>50</sub> 濃度で 48 時間処理した後に、通常培地に交換、翌日上清を回収し、STING 経路の活性化マーカーとして CXCL10 の分泌量を ELISA で測定する (図 3)。次に、抽出された候補薬剤を用いて、薬剤濃度依存的な細胞内 cGAMP 濃度変化あるいは STING 発現量の変化、STING 下流サイトカインの分泌変化等を解析した。

シンジェニックマウスモデルを用いたがん細胞-免疫細胞相互作用の解析

申請者が確立した免疫チェックポイント阻害薬治療抵抗性を示す「KL 型 NSCLC シンジェニック

マウスモデル」を用いて、薬剤投与に伴う STING 経路の活性化あるいは免疫細胞の腫瘍領域への遊走亢進などが奏功に与える影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### MPS1 阻害薬による STING 経路の活性化

KL 型 NSCLC 細胞株を用いて、非小細胞肺癌患者に実際に使用されている既存の抗がん剤や DNA 修復経路や有糸分裂を標的とした分子標的薬を中心に STING 経路を活性化する薬剤を抽出するためのスクリーニングを行った。スクリーニングに使用した KL 型 NSCLC 細胞株としては、細胞内二本鎖 DNA に反応してセカンドメッセンジャー cGAMP を産生して STING を活性化する酵素 cGAS を正常に発現する H1944 株および cGAS を欠損する H2122 株を用いた。その結果、Spindle assembly checkpoint の制御因子である MPS1 に対する阻害薬が Micronuclei 形成の誘導を伴って cGAS 依存的に STING 経路を活性化することを見出した(図4)。ウエスタンブロットや、PCR、ELISA などの生化学的手法により、実際に MPS1 阻害薬が、STING 依存的に 1 型インターフェロンや免疫細胞を誘引する種々のサイトカインの分泌を活性化することを明らかにした。

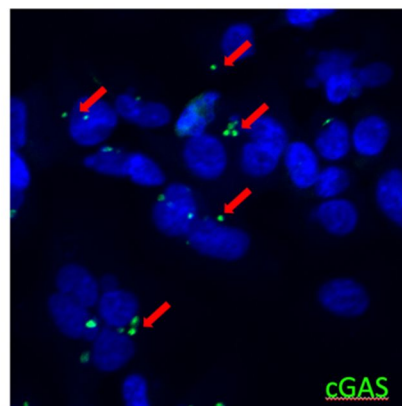


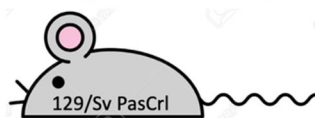
図4. MPS1 阻害による微小核形成および cGAS 活性化

##### 生体内で STING 経路を誘導するための MPS1 阻害剤投与最適条件の決定

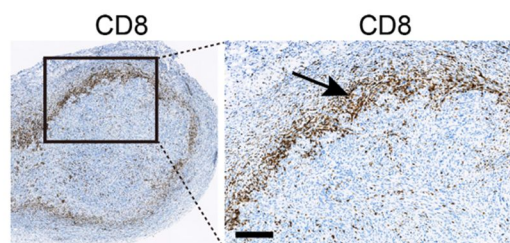
マウスモデルを用いて MPS1 阻害剤投与による、がん細胞における STING 活性化が抗腫瘍免疫を介して治療効果を示すことを検証するため、同系マウスモデルに移植可能な KL 型 NSCLC 細胞を作製した。具体的には、研究

##### Syngeneic murine KL model

393P-KL  
(KRAS<sup>G12D/+</sup>;p53<sup>R172HΔg</sup>+Cas9/Lkb1sg)



- STING Low
- Resistance to anti-PD-L1 therapy



“Cold” tumor microenvironment

図5. 抗腫瘍免疫を解析可能な KL 型 NSCLC マウスモデル。腫瘍辺縁部に CD8 陽性 T 細胞が集積し、免疫チェックポイント阻害薬に治療抵抗性を示す典型的な免疫微小環境(Cold tumor microenvironment)を示す。

代表者らが所有していた同系マウスモデルに移植可能な Kras 変異型肺癌細胞株 LLC1、Lacun3、CMT64、CMT167、393P を用いて、CRISPR/Cas9 系によりそれぞれ Lkb1 欠損細胞を作製した。その結果、DNMT 依存的な STING 発現抑制といったヒト KL 型 NSCLC で頻りに観察される特徴を最も明確に共有していた 393P 細胞由来マウス KL 型 NSCLC を、in vivo における治療実験に使用するモデルとして決定した(図5)。次に、393P 細胞由来 KL 型 NSCLC 細胞を同系マウスに移植し、生体内において MPS1 阻害剤 BAY-1217389 および、KL 型 NSCLC に対して STING の発現を誘導する Decitabine の薬剤投与条件を薬力学試験により検討した。その結果、体重減少などの顕著な副作用無しに STING 経路を活性化する BAY-1217389 (5mg/kg BID for 2days) および Decitabine (0.5mg/kg QD for 7days) の薬剤投与条件を決定した。

### マウスモデルを用いた MPS1 阻害剤投与による抗腫瘍免疫活性化の評価

上述した薬力学試験の結果に基づき決定した Decitabine および BAY-1217389 の投与条件を用いて、Vehicle、Decitabine 単剤、BAY-1217389 単剤 および Decitabine+BAY-1217389 併用という 4 条件で比較検討をしたところ、単剤群でも一定の治療効果が観察されたが、特に 2 剤併用群において、ほとんどの個体で治療開始から 2 ヶ月以上、再増殖無しに腫瘍抑制効果が維持された(図 6)。治療開始初期に Decitabine は合計 7 日間、BAY-1217389 は合計 4 日間投与したのみであり、その後は薬剤投与無しに長期的な奏功を達成することから、抗腫瘍免疫の関連が示唆された。実際に、本マウスモデルの未治療群では、腫瘍辺縁部に CD8 陽性 T 細胞が集積することがわかったが、併用群では CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤の比率が上昇すること、さらには中和抗体による CD8 陽性 T 細胞除去により治療効果が顕著に抑制されることから、これらの治療効果の少なくとも一部は抗腫瘍免疫の活性化を介していることが明らかになった。

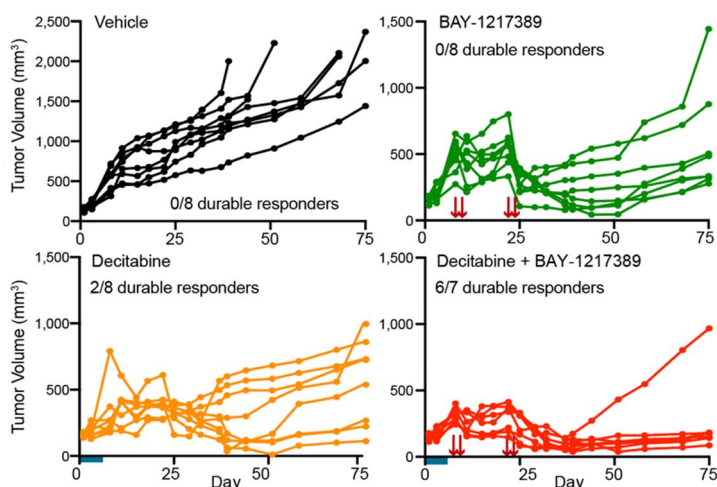


図 6. KL 型 NSCLC マウスモデルを用いた Decitabine および MPS1 阻害剤 (BAY-1217389) の併用療法の実施。赤矢印: MPS1 阻害剤投与。青線: Decitabine 投与期間。

### MPS1 阻害剤と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法

中和抗体を用いた免疫細胞除去実験等の実験結果から、MPS1 阻害剤投与が免疫細胞依存的に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。そこで実際に、MPS1 阻害剤投与による腫瘍微小環境内への浸潤リンパ球の量や質、免疫担当細胞の種類などをフローサイトメトリー解析や免疫染色により解析した。それらの結果、MPS1 阻害剤投与に伴い腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞の亢進や Foxp3 陽性制御性 T 細胞の減少が観察された。また、免疫チェックポイント治療不応答モデルである KL 型 NSCLC マウスモデルを用いて、MPS1 阻害剤と抗 PD1 抗体の併用投与を実施した。その結果、MPS1 阻害剤との併用により免疫チェックポイント阻害薬への治療感受性が上昇することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T.Tani, S.Kitajima, EB.Conway, EH.Knelson, and DA. Barbie	4. 巻 -
2. 論文標題 KRAS G12C inhibition and innate immune targeting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Therapeutic Targets	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14728222.2021.1902991	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 該当する

1. 著者名 M.Campisi, SK.Sundararaman, SE.Shelton, EH.Knelson, E.Ivanova, I.Canadas, R.Yoshida, T.Osaki, SW.Lee, TC.Thai, S.Han, BP.Piel, S.Gilhooley, CP.Pawletz, V.Chiono, RD.Kamm, S.Kitajima, and DA. Barbie	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor-derived cGAMP regulates activation of the vasculature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in immunology	6. 最初と最後の頁 2090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.02090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitajima S, Tani T, Springer BF, Campisi M, Osaki T, Haratani K, Chen M, Knelson EH, Mahadevan NR, Ritter J, Yoshida R, Kohler J, Ogino A, Nozawa RS, Sundararaman SK, Thai TC, Homme M, Piel B, Kivlehan S, Obua BN, Purcell C, Yajima M, Barbie TU, Lizotte PH, J&#228;nne PA, Pawletz CP, Gokhale PC, Barbie DA	4. 巻 40
2. 論文標題 MPS1 inhibition primes immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 1128-1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ccell.2022.08.015	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4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北嶋俊輔
2. 発表標題 1.Novel strategy for priming immunogenicity of KRAS;LKB1 mutant lung cancer through MPS1 inhibition
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋俊輔
2. 発表標題 2. 紡錘体チェックポイントキナーゼMPS1によるSTING経路の制御機構解明とがん免疫療法への応用
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋俊輔
2. 発表標題 1. Novel strategy for priming immunogenicity of KRAS;LKB1 mutant lung cancer through MPS1 inhibition
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋俊輔
2. 発表標題 MPS1阻害剤を用いたKRAS/LKB1変異型肺がんが示す免疫チェックポイント阻害薬
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020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

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			
米国	Dana-Farber Cancer Institute			