

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07337

研究課題名(和文)炎症性微小環境適応機構を標的とした抗腫瘍効果の統合的検討

研究課題名(英文)Targeting of LUBAC-dependent inflammatory adaptation for the cancer therapy

研究代表者

佐々木 克博(SASAKI, Katsuhiko)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70739862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症環境を有する癌では、ユビキチンリガーゼLUBACが作り出す直鎖状ユビキチン鎖が炎症応答の増進と炎症性細胞死からの保護に重要な役割を担うと考えられる。実際にLUBAC機能を消失させたメラノーマ癌では腫瘍進展速度が著明に低下する。本研究では、癌が持つLUBAC依存的な炎症適応機構を標的とした際に認められる抗腫瘍メカニズムの詳細解明を目指した。研究成果から、癌免疫作用に対する脆弱性の亢進に加えて、癌細胞自身の炎症環境による自滅効果も期待できることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体を用いる癌免疫療法に近年注目が集まっているが、8割近くの癌では単剤投与による治療効果が期待できないことが分かっており、免疫耐性機構の解明を目指す基礎的研究の実施や、化学療法などとの併用療法による適応癌種の拡大が検討されている。そういった現状のなか、本研究ではLUBAC依存的な癌内炎症寛容機構を消失させることで、癌の免疫感受性が亢進することを証明しており、癌免疫療法を改善する新たな治療標的の一つを提唱した。さらに、正常組織に影響を及ぼすことなく、炎症環境を利用することで癌の自滅を図る新規癌治療戦略に繋がることが期待され、本研究の成果は今後の癌治療において重要なインパクトを与える。

研究成果の概要(英文)：The linear ubiquitination, which is catalyzed by the specific E3 ligase LUBAC, enables optimal inflammatory responses and prevention of inflammatory cell death. Its protective function acts even in several pathogenic tissues including cancers. Indeed, we observed that LUBAC deficiency in melanoma cells substantially declined the tumor development in vivo. The goal of this project is to reveal the underlying mechanism of the anti-tumorigenic effects upon targeting of LUBAC-mediated inflammatory adaptation. Our research demonstrated that LUBAC deficiency induces higher vulnerability to cancer immunity and other cancer-elicited inflammatory environments.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン LUBAC 直鎖状ユビキチン鎖 癌 細胞死 炎症 免疫 炎症寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 癌は慢性炎症環境を有する。癌内に分泌された炎症因子は、炎症性微小環境の形成に関与し、腫瘍の進展・悪性を促進する。一方で、これら炎症因子の中にはデスリガンドとして機能するものも多く、その細胞死誘導能が癌に与える影響はほとんど解明されていない。
- (2) ユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC (炎症システムと関連が深い特殊な直鎖状ユビキチン鎖修飾を担う唯一の酵素)は、炎症関連シグナルである NF- κ B 経路を活性化させると同時に、炎症性サイトカインにより誘導される細胞死実行シグナルのブレーキ役としても中心的な役割を担う。
- (3) 腫瘍内での LUBAC の機能は、腫瘍特性の一つである炎症性微小環境への適応性 (炎症因子に対する細胞死を回避し、かつ炎症環境を維持する) の獲得に必須である。LUBAC の機能低下が癌の明らかな腫瘍進展抑制を引き起こすことを我々は見出している。

2. 研究の目的

- (1) ユビキチンリガーゼ LUBAC および直鎖状ユビキチン鎖の細胞死抑制能を利用した炎症寛容機構に着目し、当該寛容機構の破綻により達成される抗腫瘍効果を評価し、そのメカニズムを探索する。

3. 研究の方法

- (1) 正常組織と比較して、直鎖状ユビキチン鎖修飾系が癌内で活性化していることを明らかにするため、高親和性直鎖状ユビキチン鎖抗体を作製し、癌組織に対する免疫染色を実施、解析する。
- (2) 既に研究代表者は、野生型および LUBAC 機能低下を示すメラノーマ癌細胞の腫瘍形成能を同一マウス皮下環境で評価する *in vivo* survival assay を確立している。この解析手法を用いて、なぜ LUBAC の機能低下により腫瘍進展が抑制されるのか、そのメカニズムを明らかにする。Crispr-Cas9 法を用いて LUBAC 構成因子と同時にサイトカイン TNF, IFN- γ , IFN- α/β それぞれの受容体もしくはその一部を欠損させた癌細胞を作成し、同解析に用いる。
- (3) (2) で明らかとした進展抑制を促すサイトカインの供給源 (組織・細胞) を明らかにするため、免疫不全マウスや各種サイトカイン欠損マウスを癌細胞移植実験に使用する。
- (4) 癌内の上記サイトカインの産生および遺伝子発現を組織染色および RNA-scope を用いて解析する。
- (5) 腫瘍免疫に対する応答性を観察するため、腫瘍抗原としてオボアルブミン (OVA) を発現させた癌細胞と OVA-MHC クラス I を認識し活性化する OT-1 CD8⁺T 細胞の共培養を実施する。LUBAC 機能低下による癌細胞死への影響を観察する。
- (6) 腫瘍免疫に対する応答性を *in vivo* で観察するため、免疫不全マウスへの単独皮下移植実験を行い、腫瘍径の測定を行う。また、抗 PD-1 抗体投与による免疫賦活化時、抗体投与による CD8T 細胞や NK 細胞 depletion 時の影響を観察する。いずれも LUBAC 機能低下による影響を観察する。
- (7) LUBAC 機能が低下した壊死消失癌を用いて、免疫染色に加え、メタボローム解析や RNA-Seq によるオミックス解析を実施する。

4. 研究成果

- (1) 免疫染色を可能とする直鎖状ユビキチン鎖抗体 clone 1E3 を改良した 1E3.v2 抗体を作製した。この抗体を用いて、マウス同種移植モデルで作成した各種腫瘍組織、ヒト癌組織アレイでの直鎖状ユビキチン鎖を検出したところ、無数の輝点を観察できた。これは正常組織では認められず、腫瘍において選択的に検出された。また、壊死組織を含む癌の生体標本を入手

し、同様の免疫染色を行なったところ、直鎖状ユビキチン鎖の形成が癌の生存組織と癌内壊死領域の境界部分で特に亢進していることが明らかとなった。

- (2) 研究の方法 3-(2)を実施し、LUBAC 消失メラノーマ癌の腫瘍形成能が低下する原因を探索したところ、TNF や IFN- β の部分的関与を検出した一方、癌内で賛成される IFN- γ が最も強く腫瘍進展抑制に寄与することを見出した。さらに培養条件下、これらのサイトカインで上記メラノーマ細胞を処理すると、複数サイトカインの同時投与で癌細胞死が劇的に促進することが明らかとなった。直鎖状ユビキチン鎖形成によって複数の炎症性サイトカインによる相乗的細胞死誘導から癌が保護されていることを明らかにした。
- (3) 研究の方法 3-(2)や腫瘍の ELISA 解析から、癌細胞自身が産生する IFN- γ が、LUBAC 消失メラノーマ癌の進展抑制に関与していることが明らかとなった。IFN- γ に対する免疫組織染色や、RNA-Scope を用いて腫瘍組織内での IFN- γ メッセンジャーRNA の局在解析を実施すると、特に癌生存組織と壊死領域との境界に存在する癌細胞や壊死領域へ死にゆく癌細胞が IFN- γ を産生していることが示唆された。詳細なメカニズムは未解明ではあるが、LUBAC により生成された直鎖状ユビキチン鎖が壊死環境からの細胞死刺激に対して抵抗性を付与していることが予想された。
- (4) 研究の方法 3-(5)を実施したところ、各 LUBAC 構成因子を欠損したメラノーマ細胞では、細胞障害性 T 細胞依存的な細胞死が明らかに亢進した。一方で、TNF や IFN- γ 受容体を同時に欠損させたメラノーマ細胞で同様の実験を行なったところ、認められた細胞死亢進はほぼ野生型細胞と同程度まで消失した。以上の結果から、活性化 T 細胞から分泌された TNF や IFN- γ によって、LUBAC 機能消失癌の細胞死が直接誘導されることを見出した。
- (5) (4)で認められた LUBAC 機能消失癌の免疫脆弱性を *in vivo* で評価するため、研究の方法 3-(6)を実施した。T 細胞を持たない RAG2 マウスや NSG 超免疫不全マウスに移植した LUBAC 消失癌では、明らかに腫瘍形成速度が亢進した。さらにマウスに depletion 抗体を投与し、マウスの CD8T 細胞や NK 細胞を減少させた際にも、同様に腫瘍形成速度が亢進した。以上の結果から、腫瘍免疫による進展抑圧の存在が強く示唆された。
- (6) 逆に、腫瘍免疫効果を活性化させるために抗 PD-1 抗体を用いた。野生型マウスを用いた同種癌細胞移植実験で LUBAC 消失癌の進展を長期的 (~2 ヶ月程)に観察すると、細胞死逃避により腫瘍化してくる LUBAC 消失癌の腫瘍サイズが、抗 PD-1 抗体投与によって抑えられた。以上の結果は、LUBAC 消失が癌免疫療法の賦活化効果に繋がることを示唆した。
- (7) NSG 免疫不全マウスに移植した LUBAC 消失メラノーマ癌では、免疫細胞からの影響がほとんど無いにも関わらず、いまだ野生型の腫瘍と比べて腫瘍形成速度が遅かった。この癌では、進行性癌で通常認められる壊死組織が大幅に消失していた(実験的壊死消失癌の作成)。癌内では貪食性マクロファージが増加しており、壊死構築の種となる癌内の僅かな死細胞が早急に駆逐されるためであると考えられた。
- (8) 研究の方法 3-(7)から、壊死消失癌の大規模な癌構造のリモデリングが癌代謝シフトを引き起こし、ミトコンドリア主体の代謝経路の利用を促すことを見出した。糖代謝の低下に加え、副次経路であるペントースリン酸回路(核酸合成経路)の低下にも繋がっており、免疫染色で認められた Ki67 増殖マーカー染色性の低下と合致する結果を得た。最後に RNA-Seq による遺伝子発現解析の結果から、LUBAC 消失癌において、IFN 応答性亢進や抗原提示機能の亢進を認めており、LUBAC 機能を消失させることで、(炎症細胞死に対する脆弱性に加え、)癌が持つ内因性の免疫感受性をも上昇させることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sakamoto Yusuke, Sasaki Katsuhiko, Omatsu Mayuki, Hamada Kensuke, Nakanishi Yuki, Itatani Yoshiro, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Seno Hiroshi, Iwai Kazuhiro	4. 巻 259
2. 論文標題 Differential involvement of LUBAC mediated linear ubiquitination in intestinal epithelial cells and macrophages during intestinal inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 304 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6042	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 Jimbo Koji, Hattori Ayuna, Koide Shuhei, Ito Takahiro, Sasaki Katsuhiko, Iwai Kazuhiro, Nannya Yasuhito, Iwama Atsushi, Tojo Arinobu, Konuma Takaaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Genetic deletion and pharmacologic inhibition of E3 ubiquitin ligase HOIP impairs the propagation of myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01750-7	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 Sasaki Katsuhiko, Iwai Kazuhiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of linear ubiquitination in inflammatory responses and tissue homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 19 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac047	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 Shinkawa Yutaka, Imami Koshi, Fuseya Yasuhiro, Sasaki Katsuhiko, Ohmura Koichiro, Ishihama Yasushi, Morinobu Akio, Iwai Kazuhiro	4. 巻 596
2. 論文標題 ABIN1 is a signal induced autophagy receptor that attenuates NF B activation by recognizing linear ubiquitin chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14323	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木克博、早水慶恵、岩井一宏
2. 発表標題 癌進展を加速させる炎症駆動型直鎖状ユビキチン修飾機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木克博
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン鎖翻訳後修飾に基づいた炎症環境適応機構
3. 学会等名 がん研究会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木克博
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン鎖シグナルが創り出す病的・恒常的炎症環境
3. 学会等名 第95回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

〔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
---------	---------