

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09032

研究課題名(和文) MUC1-Cを標的とした転移性大腸癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の適応拡大

研究課題名(英文) Development of immune checkpoint therapy for metastatic colorectal cancer by targeting MUC1-C

研究代表者

平木 将之(Hiraki, Masayuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80621036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに乳癌や肺癌で高発現するMUC1を標的とすることにより、腫瘍内のPD-L1発現を抑制し、マウスの皮下腫瘍に細胞死を誘導することを報告した。そこで本研究では同じくMUC1が高発現する大腸癌においても同様のメカニズムが存在するかについて検討を行なった。その結果、大腸癌細胞株においてもMUC1ノックダウンによってPD-L1発現が低下することが明らかとなった。また大腸癌細胞株SK-CO1を用いてMUC1ノックダウンによる遺伝子変化を網羅的に解析し、PD-L1発現低下に関与する分子群を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は様々な癌種に適応が拡大されており、成果を挙げているが、転移性大腸癌においては適応が全体の約4%であるMSI-Highのサブタイプに限られるなど、未だ治療効果は広くは期待できないのが現状であり、適応拡大に繋がる研究が望まれている。本研究成果は我々がこれまで明らかにしてきた乳癌や肺癌のみならず、大腸癌においてもMUC1分子を標的とすることによって、抗PD-L1抗体による治療効果を改善させることができる可能性を示唆するものであり、学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint inhibitors are used for many types of cancers, including colorectal cancer. However, the anti-PD-1 therapy for metastatic colorectal cancer is limited to the MSI-High subtype, which accounts for about 4% of all cases. Therefore, further study is required to expand the application of immune checkpoint inhibitors. It is known that MUC1 is highly expressed in breast and lung cancers, and we previously reported that knockdown of MUC1 suppressed PD-L1 expression and induced cell death in subcutaneous xenograft model. In this study, we investigated whether a similar mechanism exists in colorectal cancer which also highly expresses MUC1. We found that MUC1 knockdown decreased PD-L1 expression in colorectal cancer cell lines. When SK-CO1 cells were treated with MUC1-siRNA, targeted molecules of PD-L1 were revealed through IPA comprehensive analysis.

研究分野：消化器外科、腫瘍生物学

キーワード：MUC1 PD-L1 大腸癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制に大きく関与する programmed cell death protein 1 (PD-1), programmed cell death protein ligand 1(PD-L1), cytotoxic lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)などを標的とした免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用が進んでいる。しかし、腫瘍による差はあるものの抗 PD-1 抗体薬の奏効率は10~30%前後と決して高いものではない。特に、大腸癌においては、ミスマッチ修復機構の欠損 (deficient mismatch repair:dMMR) やマイクロサテライト不安定性が高い (MSI-H) サブタイプの腫瘍に対してのみその効果が認められるとされているが、その割合は転移性大腸癌の約4%にすぎない。近年、大腸癌は日本人女性の死亡原因で1位、全体では2位となっており、有効な治療法の開発が望まれている。そこで、大腸癌における PD-1、PD-L1 経路阻害薬の適応拡大のためには、これらの免疫チェックポイント阻害剤への感受性を高めることが重要な検討課題となる。

2. 研究の目的

Mucin1 (MUC1) は、乳癌、大腸癌をはじめとする様々な癌腫で過剰発現しており、癌タンパクとして機能する。我々はこれまでに乳癌や肺癌で高発現する MUC1 を標的とすることにより、腫瘍内の PD-L1 発現を抑制し、CD8+ T cell 活性を増加させ、MUC1 過剰発現乳癌細胞を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいて細胞死を誘導することを報告した。そこで大腸癌においても過剰発現する MUC1 を標的として、抗 PD-L1 抗体による治療効果を改善させることができないかと考えた。本研究の目的は大腸癌における MUC1-PD-L1 経路が存在するのか、存在するとすればどのようなメカニズムによるのか、MUC1 阻害により抗 PD-L1 抗体の効果増強がみられるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 乳癌細胞 MCF7, MDA-MB468 をポジコンとして、ウェスタンブロット法により大腸癌細胞株での MUC1 発現状況を検討する。
- (2) siRNA を2種類設計し、乳癌細胞 MCF7 と SK-CO-1 に作用させ、MUC1 をノックダウンさせた時の PD-L1 の発現レベルを検討する。
- (3) PD-L1 発現を亢進させることが知られている IFN γ /STAT1/IRF1 経路と MUC1 タンパク発現との関連について検討する。
- (4) MUC1 siRNA 投与後の遺伝子発現の変化についても RNA-sequencing によって分析し、PD-L1 抑制のメカニズムを bioinformatics の手法から明らかにする。

4. 研究成果

(1) 先行研究にて MUC1 をよく発現していることがわかっている乳癌細胞株 MCF7, MDA-MB468 をポジコンとして、大腸癌細胞株における MUC1 発現を検討した。その結果、大腸癌細胞株では SW620, SK-CO-1, Colo205 が MUC1 をよく発現し、HT29 と SW480 は低発現であった (図 1, 2)。

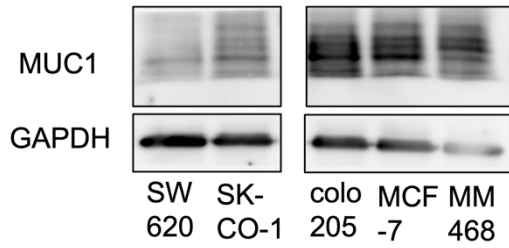


図1. 大腸癌細胞株におけるMUC1発現の検討
SW620, SK-CO-1, Colo205がMUC1をよく発現していた。

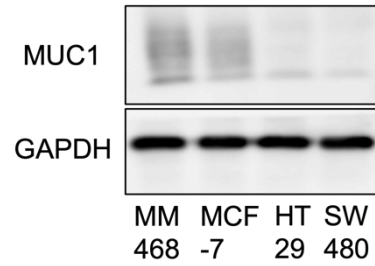


図2. 大腸癌細胞株におけるMUC1発現の検討
HT29とSW480はMUC1低発現であった。

(2) MUC1に対するsiRNAを2種類設計し、乳癌細胞MCF7とSK-CO-1に作用させ、MUC1をノックダウンさせた時のPD-L1の発現レベルを検討した。siRNA濃度は10, 30, 50nMに、時間は24, 48, 72時間に条件をふってウエスタンブロットとqRT-PCRで検討した。その結果、siRNA濃度50nM、48時間の条件が最適であり、乳癌、大腸癌ともにMUC1とPD-L1との間に相関があることが分かった。すなわち大腸癌細胞株においても乳癌細胞株同様にMUC1ノックダウンによってPD-L1発現が低下することを見出した(図3)。

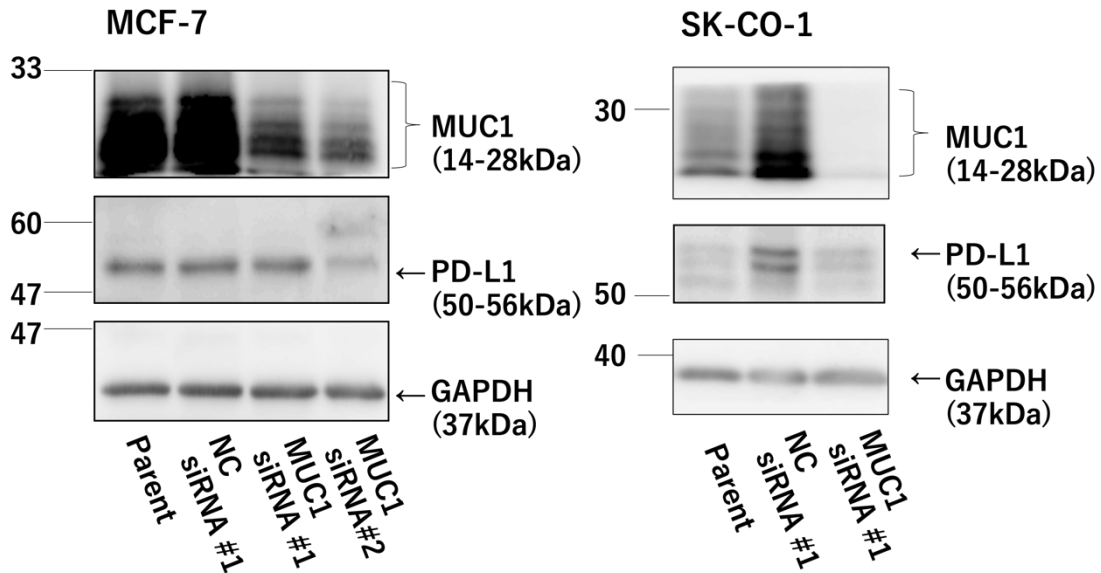


図3. MUC1ノックダウンによるPD-L1発現への影響
MUC1ノックダウンによって乳癌細胞株、大腸癌細胞株においてPD-L1発現が低下することが明らかとなった。

(3) IFN γ 刺激は大腸癌細胞株SK-CO-1においてもSTAT1, IRF1, PD-L1の発現を誘導した。この系とMUC1を起点とするPD-L1発現制御との関連を調べるためにMUC1 siRNAによるノックダウンによってIFN γ 刺激によるSTAT1, IRF1, PD-L1の発現誘導がどのように影響を受けるのかについて検討した。その結果、大腸癌細胞株においてはMUC1ノックダウンによって、STAT1, IRF1, PD-L1いずれの発現も低下しなかった(図4)。この結果より、大腸癌細胞株においてはIFN γ -STAT1-IRF1-PD-L1経路とMUC1-PD-L1経路は別経路として存在する可能性が示唆された。

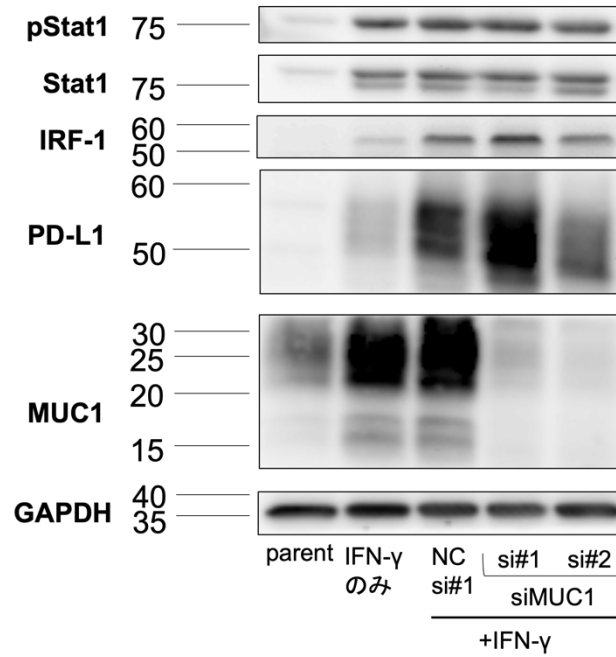


図 4. IFN γ -STAT1-IRF1-PD-L1 経路における MUC1 の関連
 IFN γ 刺激によって大腸癌細胞株 SK-CO-1 においても STAT1, IRF1, PD-L1 の発現は誘導されたが、MUC1 ノックダウンは STAT1, IRF1, PD-L1 の発現上昇に影響を与えなかった。

(4) 最後に大腸癌細胞株 SK-CO-1 に MUC1 siRNA を投与し、44 時間後に RNA を回収し、RNA-seq に提出した。IPA (Ingenuity Pathway Analysis) の結果、図 5 のように PD-L1 (CD274) の標的遺伝子として多彩な分子群が浮かび上がった。

CD274

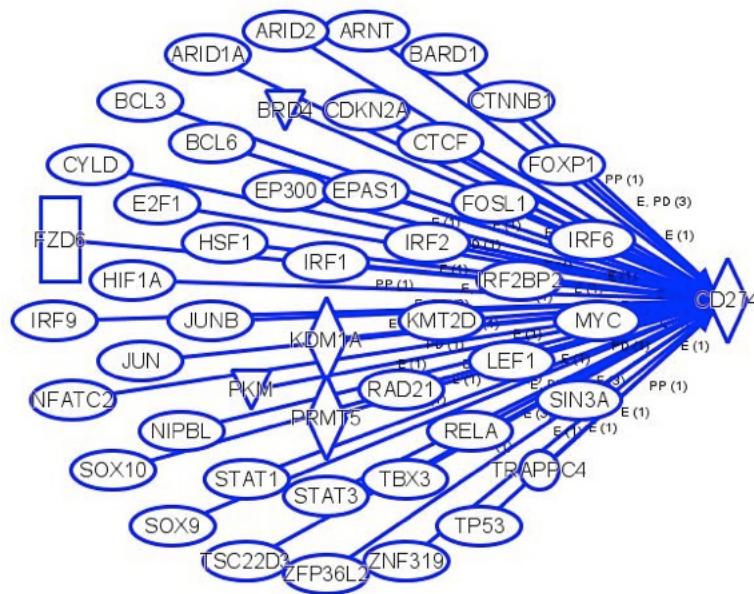


図 5. MUC1 ノックダウンによって変化する PD-L1 関連分子群
 大腸癌細胞株 SK-CO-1 に siMUC1 を投与し、RNA-seq に提出した結果を解析すると PD-L1 に関連する多彩な標的候補分子が浮かび上がってきた。

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
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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