

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16973

研究課題名(和文)膵臓がんにおける腫瘍抗原発現制御機序に関するPD-L1の関与

研究課題名(英文) Analyzing the mechanism that PD-L1 regulate the expression of tumor antigen in pancreatic cancer

研究代表者

カン シン (Kan, Shin)

東京慈恵会医科大学・医学部・研究補助員

研究者番号：90706186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くのヒト膵臓がん細胞株とヒト膵臓がん腹水由来のがん細胞株に、免疫抑制分子(PD-L1)の発現と腫瘍抗原Xの発現に逆相関がみられることを見出した。そこで、本研究は、PD-L1の下流で腫瘍抗原Xの発現を制御する機序を明らかにすることを目的とした。その結果、高発現させたPD-L1の下流で、ユビキチン・プロテアソーム系が腫瘍抗原Xの蛋白質の分解を促進す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

本研究から、PD-L1の高発現により、ユビキチン・プロテアソーム系が活性化し、腫瘍抗原Xの蛋白質の分解を促進することを明らかにした。今後、腫瘍抗原特異的T細胞に対する抗腫瘍効果の影響を検討する。これらの解析により、既存の免疫逃避機構「PD-L1とPD-1を介した抗腫瘍免疫細胞に対する免疫抑制」に加え、「PD-L1を高発現したがん細胞が腫瘍抗原Xの蛋白質分解を促進し、抗腫瘍免疫から逃避する」という、新たな知見を得ることができる。

研究成果の概要(英文)：Recently, I found that the expression of immunosuppressive molecule (PD-L1) showed a negative correlation with that of tumor antigen X in human pancreatic cancer cell lines and primary cancer cell lines. Therefore, the aim of this study was to elucidate the mechanism that PD-L1 regulate the expression of tumor antigen X. I found that the ubiquitin-proteasome system promoted protein degradation of the tumor antigen X downstream of highly expressed PD-L1.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：PD-L1 腫瘍抗原 免疫逃避機構 膵臓がん 蛋白質分解機構

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント分子 Programmed cell death Ligand 1 (PD-L1)と PD-1 を標的とした抗体治療は、一部のがんに対し劇的な治療効果を示し大きな注目を浴びた。一方、膵臓がんに対する免疫チェックポイント阻害薬の治療成績は乏しく(N Engl J Med 2012, Ann Oncol 2014)、その原因を解明することが急務である。申請者らは、膵臓がん患者の切除標本を用いて免疫染色を行い、がん局所への CD8 T 細胞の浸潤が低いこと (Cancer Invest 2019)、制御性 T 細胞等の免疫抑制細胞の集積が認められること(BMC Cancer 2021)を報告してきた。これらが膵臓がんに対する免疫チェックポイント阻害薬抵抗性の要因の一つであるが、膵臓がんにおいて PD-L1 が高頻度に発現しており (Cancer Invest 2019)、他のメカニズムも関与していると考えた。

事実、申請者らはヒト膵臓がん細胞株やヒト膵臓がん初代細胞株の PD-L1 の発現を調べたところ、発現の低い細胞株から高い細胞株に分かれていることがわかった。さらに、ある種の腫瘍抗原 X の発現を調べると、膵臓がん細胞株において PD-L1 と腫瘍抗原 X の発現に逆相関が見られた。この結果を受け、PD-L1 を発現する膵臓がん細胞は、PD-L1 下流である種の腫瘍抗原の発現を低下させ、最終的に抗腫瘍免疫から逃避する機序が存在すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PD-L1 の下流で腫瘍抗原 X の発現を制御する機序を明らかにするため、PD-L1 の高発現により、オートファジーやユビキチン・プロテアソーム系(蛋白質分解機構)が活性化し、腫瘍抗原 X の蛋白質の分解を促進するかを検証する。

3. 研究の方法

- ① PD-L1 を安定に高発現する膵臓がん細胞株(PD-L1-PANC-1)の樹立と腫瘍抗原の発現の評価
  - (a) 膵臓がん細胞株から mRNA を精製し、逆転写反応により cDNA を合成し、PD-L1 CDS 領域について PCR を用い増幅し、EcoRI-XbaI サイト pcDNA3.1+Neo 発現ベクターに挿入し、クローニングした。これを PD-L1 低発現・腫瘍抗原 X 高発現の PANC-1 細胞にエレクトロポレーションを用いトランスフェクションした。培養 48 時間後に G418 を加え、PD-L1 を発現するネオマイシン耐性細胞を得た。得られた細胞を、限界希釈法により 1 細胞ずつ 96 well に播種・培養しスケールアップした。培養により増幅させた細胞の PD-L1 の発現を PE で標識された PD-L1 抗体で反応させ flow cytometry で評価し、その中で PD-L1 を 90%以上発現する細胞を、PD-L1-PANC-1 として選別・ストックし、今後の解析に用いた。
  - (b) PANC-1 細胞と上記作製した PD-L1-PANC-1 細胞における腫瘍抗原 X の遺伝子と蛋白質の発現を qPCR あるいは immunoblot で評価した。
- ② PD-L1-PANC-1 における蛋白質分解機構による腫瘍抗原 X 蛋白質の分解
  - (a) 腫瘍抗原 X の蛋白質の半減期を解析するために、PD-L1-PANC-1 細胞とコントロールの PANC-1 細胞に、蛋白質合成阻害薬シクロヘキシミドで処理後、経時的に細胞抽出液を調整した。その後、immunoblot で腫瘍抗原 X の蛋白質の発現低下を比較定量した。

(b) PD-L1-PANC-1 細胞と PANC-1 細胞に、シクロヘキシミドとオートファジー阻害薬クロロキンを処理し、培養 24 時間後に細胞抽出液を調整した。その後、immunoblot により腫瘍抗原 X の蛋白質の蓄積がみられるか、オートファジーによる分解の関与を検証した。また、蛋白質分解機構の別の経路としてプロテアソーム阻害薬 MG132 を加え、同様の解析でユビキチン・プロテアソーム系による分解の関与があるかを検証した。

#### 4. 研究成果

- ① PD-L1 を安定的に高発現する膵臓がん細胞株(PD-L1-PANC-1)の樹立と腫瘍抗原の発現の評価  
PANC-1 細胞に PD-L1 を安定的に高発現させた PD-L1-PANC-1 細胞を樹立し、PD-L1 と腫瘍抗原 X の遺伝子あるいは蛋白質の発現を評価したところ、PD-L1 の高発現により、下表の通り腫瘍抗原の遺伝子と蛋白質発現が低下した。

細胞株	PD-L1	腫瘍抗原 X
PANC-1	低発現	高発現
PD-L1-PANC-1	高発現	低発現

- ② PD-L1-PANC-1 における蛋白質分解機構による腫瘍抗原 X 蛋白質の分解

PD-L1-PANC-1 細胞あるいは、コントロールの PANC-1 細胞にシクロヘキシミドを加えたところ、両者とも細胞内の腫瘍抗原 X の蛋白質は消失していくが、PD-L1-PANC-1 細胞の方が PANC-1 細胞と比べ、細胞内の腫瘍抗原 X の蛋白質の消失が速く、分解速度が速いことが示された。

次に、シクロヘキシミドに加え、オートファジーあるいはユビキチン・プロテアソーム系の経路をクロロキンあるいは MG132 で阻害したところ、PD-L1-PANC-1 細胞や PANC-1 細胞において、シクロヘキシミド単独処理群と比べ、細胞数に変化を認めなかった。また、PANC-1 細胞においてクロロキンあるいは MG132 を加えても、シクロヘキシミド単独処理群と比べ、腫瘍抗原 X の蛋白質の蓄積に変化を認めなかった。一方、PD-L1-PANC-1 細胞において MG132 を加えたとき、シクロヘキシミド単独処理群と比べ、腫瘍抗原 X の蛋白質の蓄積が認められた。これらの結果から、PD-L1 の高発現により、下流でユビキチン・プロテアソーム系を介して、腫瘍抗原 X が分解されることが明らかになった。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shigeo Koido, Sankichi Horiuchi, Shin Kan, Tsuuse Bito, Zensho Ito, Kan Uchiyama, Masayuki Saruta, Nobuhiro Sato, Toshifumi Ohkusa	4. 巻 12
2. 論文標題 The stimulatory effect of fusobacteria on dendritic cells under aerobic or anaerobic conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-14934-z	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 -

1. 著者名 Kiryu Sachie, Ito Zensho, Suka Machi, Bito Tsuuse, Kan Shin, Uchiyama Kan, Saruta Masayuki, Hata Taigo, Takano Yuki, Fujioka Shuichi, Misawa Takeyuki, Yamauchi Takashi, Yanagisawa Hiroyuki, Sato Nobuhiro, Ohkusa Toshifumi, Sugiyama Haruo, Koido Shigeo	4. 巻 21
2. 論文標題 Prognostic value of immune factors in the tumor microenvironment of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-08911-4	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 -

1. 著者名 Shin Kan, Tsuuse Bito, Masamori Shimabuku, Junichi Taguchi, Toshifumi Ohkusa, Shigetaka Shimodaira, Haruo Sugiyama, Shigeo Koido	4. 巻 57
2. 論文標題 Impact of mature dendritic cells pulsed with a novel WT1 helper peptide on the induction of HLA-A2-restricted WT1-reactive CD8+ T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1047-1056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5110	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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