

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07132

研究課題名（和文）がん微小環境におけるEphA2/ephrin-A1を介した免疫回避の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of EphA2/ephrin-A1-mediated immune escape in the tumor microenvironment

研究代表者

家口 勝昭 (Ieguchi, Katsuaki)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・講師

研究者番号：90586348

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）：本研究では免疫チェックポイント分子PD-L1の発現調節におけるEphA2およびephrin-A1の機能解析を行った。膜型ephrin-A1によって誘導されるPD-L1の発現調節はEphA2非依存性であったが、分泌型ephrin-A1刺激ではEphA2依存性にPD-L1の発現を亢進した。ephrin-A1刺激によってPD-L1のmRNAの発現レベルおよび細胞膜におけるPD-L1発現において変化は観察されなかったことからEphA2/ephrin-A1はPD-L1の発現を転写レベルで調節しているのではなく、翻訳後修飾を調節しに関与することでPD-L1の安定化や分解を調節していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において免疫チェックポイント阻害薬はがん種横断的に大きな成功を納めてきた。一方でその効果は限定的で治療耐性等の問題点の改善が重要となる。そのためには作用機序の異なる治療方法の開発が必要である。本研究結果はEphA2/ephrin-A1が翻訳後修飾を調節することでPD-L1の発現を調節していることを示唆しており、申請者がこれまでに明らかにしてきたEphA2/ephrin-A1による肺転移の分子機構を考えると、EphA2/ephrin-A1の阻害薬では免疫チェックポイント阻害薬との併用により、より良い治療成績を得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the function of EphA2 and ephrin-A1 in the regulation of the expression of PD-L1, an immune checkpoint molecule. The regulation of PD-L1 expression induced by membrane-anchored ephrin-A1 was in an EphA2-independent manner, whereas stimulation with secreted ephrin-A1 enhanced PD-L1 expression in an EphA2-dependent manner. Since no changes were observed in the mRNA expression levels of PD-L1 and its expression on the cell membrane following ephrin-A1 stimulation, the data suggest that EphA2/ephrin-A1 does not regulate PD-L1 expression at the transcriptional level but rather is involved in the regulation of post-translational modifications, thereby stabilizing or degrading PD-L1.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Eph ephrin PD-L1

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床検体を用いた発現解析から EphA2 と ephrin-A1 はがんの悪性度や予後不良と強い相関を示すこと、さらに転移や血管新生との関与も報告されているが詳細な分子機構は不明な点が多い (Cancer Sci, 2019, 110(3):841-848)。最近では PD-L1 の発現調節や T 細胞の Migration に EphA2/ephrin-A1 が関与していることを示唆する研究結果もあるがその点についても詳細は不明である。これまでに Eph/ephrin に対する分子標的薬は多数開発されてきたが、現時点では臨床で使用されている分子標的薬は存在しない。EphA2 受容体が隣り合った細胞に発現したりガンドの ephrin-A1 と細胞間隙で結合することによって ephrin-A1 発現細胞側に Reverse signal、EphA2 発現細胞側に Forward signal と呼ばれる細胞内シグナルを伝達する。また、申請者が発見した ephrin-A1 の切断酵素である ADAM12 が ephrin-A1 を細胞膜から切り離すと分泌型となり、内分泌的に EphA2 を活性化することもできる。さらに、細胞間隙で存在する EphA2/ephrin-A1 複合体に対して分泌型 ephrin-A1 は競合的に結合し EphA2/ephrin-A1 複合体を崩壊させ EphA2 を活性化する。結合相手を失った ephrin-A1 の Reverse signal は不活化される(図1)。この

ように、複雑な活性調節機構を有しているが既存研究では生理的背景を無視した簡便な実験手法が用いられている。この点が実際の機能解明を妨げている問題点であり、分子標的薬開発に成功しない理由の一つだと申請者は考えている。

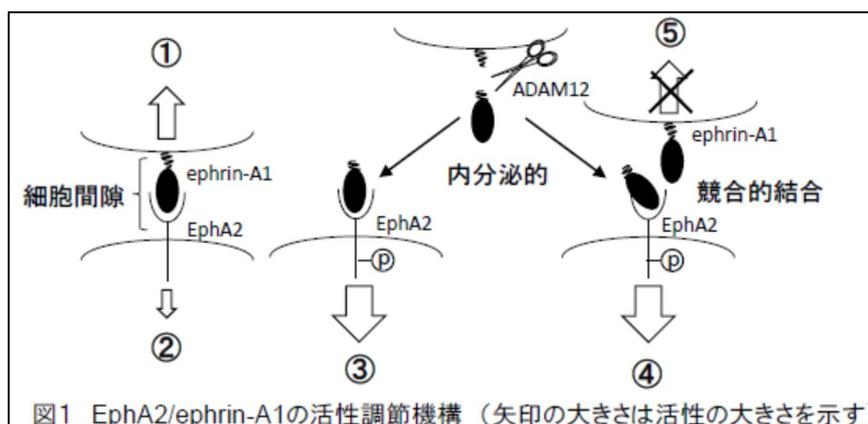


図1 EphA2/ephrin-A1の活性調節機構 (矢印の大きさは活性の大きさを示す)

(2) 抗 PD-1/PD-L1 抗体を代表とする免疫チェックポイント阻害薬の開発により、一部のがん患者において腫瘍が消失し寛解するなど、夢の治療薬として注目を集めている。その一方で免疫チェックポイント阻害薬が比較的効果を示すがんとして非小細胞肺がんが挙げられるが、その奏効率は約 30%程度である。免疫チェックポイント阻害薬単剤で奏効が認められない患者では、既存の抗がん剤との併用により治療成績の向上が認められるが、最近の報告ではその効果も限定的である。しかし、免疫チェックポイント阻害薬ががん治療において有効な治療戦略であることには間違いなく、免疫チェックポイント阻害薬の作用点であるがん微小環境における細胞障害性 T 細胞からの攻撃回避を解除する治療戦略の確率が緊喫の課題である。

2. 研究の目的

本研究では EphA2/ephrin-A1 の複雑で複数存在する活性調節機構に着目し、がん微小環境において EphA2/ephrin-A1 のそれぞれの活性化様式が何を調節しているのかを明らかにする。特に EphA2/ephrin-A1 を介した免疫回避の分子機構を明らかにし、細胞障害性 T 細胞に対する感受性を上げ、免疫チェックポイント阻害薬の奏効率を改善することを本研究の最終的な目的とする。

3. 研究の方法

ヒト乳がん細胞の MDA-MB-231 細胞や BT474 細胞などの細胞培養時の播種密度を図 2 に示すように変え、細胞同士の接着による PD-L1 の発現量をウェスタンブロットまたは定量 PCR 法により検討する。また、EphA2 の発現の有無によって PD-L1 の発現量が変わるかどうか、CRISPR/Cas9 システムを用いて EphA2 の発現をノックアウトし PD-L1 の発現亢進における EphA2 の機能を明らかにする。さらに、Kinase dead 変異体 EphA2 K642M 安定発現細胞株、ephrin-A1 の切断酵素である ADAM12 不応性 ephrin-A1 変異体安定発現細胞株(分泌型を産生しない) 分泌型 ephrin-A1 安定発現細胞株を作製し、これらの細胞を用いて PD-L1 の発現における影響をウェスタンブロットおよびフローサイトメーターで検討する。EphA2/ephrin-A1 による PD-L1 の発現調節が確認できた場合には、

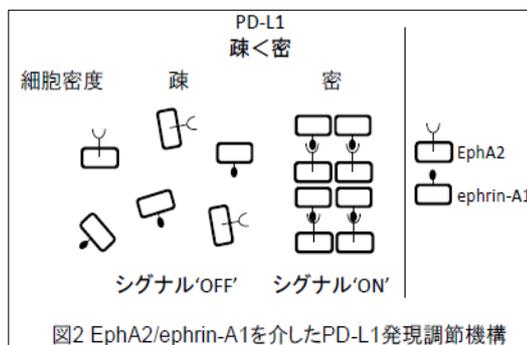


図2 EphA2/ephrin-A1を介したPD-L1発現調節機構

EphA2 または ephrin-A1 の発現を改変した E0771 細胞、4T1 細胞をそれぞれ C57BL/6 マウスまたは Balb/c マウスに移植し、抗 PD-1/PD-L1 抗体に対する効果を検討する。以上の実験で得られた知見ががん患者の腫瘍組織においても同様にみられるか、腫瘍組織から total RNA を抽出し、qPCR で EphA2, ephrin-A1, ADAM12, PD-L1 の発現量を検討する。

#### 4. 研究成果

ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を播種する細胞数を変えて低密度下または高密度下で 6 well プレート上で培養を行いウェスタンブロットにより PD-L1 の発現量を検討した。その結果、 $1 \times 10^5$  cells/well の播種密度では細胞同士の接着はほとんど観察されず、また、PD-L1 の発現もほとんど見られなかった。一方で、 $2.5 \times 10^5$  cells/well 以上の播種密度ではほとんどの細胞で細胞同士の接着が観察され、低密度培養下における PD-L1 の発現量と比較して顕著に亢進していた。一方で、 $2.5 \times 10^5$  cells/well 以上の播種密度では PD-L1 の発現亢進が観察されなかったことから、細胞間接着が PD-L1 の発現亢進に関与していることが示唆された。さらに、EphA2 ノックアウト細胞においても細胞間接着と PD-L1 の発現亢進が観察されたことから、EphA2 は細胞間接着が調節する PD-L1 の発現亢進に関与しないことが明らかとなった(図 3)。次に細胞間接着が起きている高密度が培養下において分泌型 ephrin-A1 で刺激したところ、刺激後 60 分から徐々に PD-L1 の発現が亢進した。EphA2 ノックアウト細胞では分泌型 ephrin-A1 刺激による PD-L1 の発現亢進が観察されなかったことから、分泌型 ephrin-A1 刺激による PD-L1 の発現亢進は EphA2 依存性であることが明らかとなった。さらに、EphA2 ノックアウト細胞では分泌型 ephrin-A1 の刺激の有無に関係なく野生型の細胞と比較して PD-L1 の発現が顕著に亢進していた(図 3)。次に、分泌型 ephrin-A1 で刺激した MDA-MB-231 細胞における PD-L1 の mRNA 発現を定量 PCR にて解析した結果、mRNA レベルでの変化は見られなかった。以上の結果から、分泌型 ephrin-A1 刺激依存性の PD-L1 の発現亢進は PD-L1 の生合成を亢進させているのではなく、翻訳後修飾を調節することでユビキチン・プロテアソーム系またはリソソームの分解やりサイクルに関与していることが示唆された。そこで、PD-L1 のユビキチン・プロテアソーム系での分解に関与している GSK3 $\beta$  の活性化を検討したところ、分泌型 ephrin-A1 の刺激に反応して GSK3 $\beta$  が不活化されていることが明らかとなった。PD-L1 は N 型糖鎖修飾が外れると GSK3 $\beta$  によってユビキチン化が促進される。以上の結果より、今後 Eph2/ephrin-A1 を介した糖鎖修飾およびそれに付随したユビキチン・プロテアソーム系による分解に着目し機能解析を行うとともに、マウスでも同様の現象がみられるか明らかにしていく。マウスでも同様の PD-L1 の発現調節機構が存在した場合は、EphA2 の阻害剤や ephrin-A1 の中和抗体と免疫チェックポイント阻害薬の併用による相乗効果の検討を行っていく予定である。

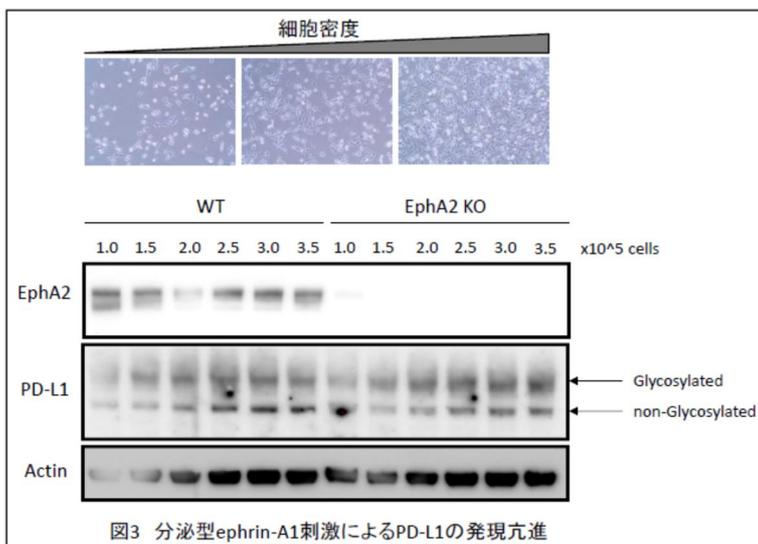


図3 分泌型ephrin-A1刺激によるPD-L1の発現亢進

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 2件）

1. 著者名 Ieguchi Katsuaki, Funakoshi Masabumi, Mishima Taishi, Takizawa Kohtaro, Omori Tsutomu, Nakamura Fumio, Watanabe Makoto, Tsuji Mayumi, Kiuchi Yuji, Kobayashi Shinichi, Tsunoda Takuya, Maru Yoshiro, Wada Satoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 The Sympathetic Nervous System Contributes to the Establishment of Pre-Metastatic Pulmonary Microenvironments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10652 ~ 10652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810652	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 Ohkuma Ryotaro, Ieguchi Katsuaki, Watanabe Makoto, Takayanagi Daisuke, Goshima Tsubasa, Onoue Rie, Hamada Kazuyuki, Kubota Yutaro, Horiike Atsushi, Ishiguro Tomoyuki, Hirasawa Yuya, Ariizumi Hirotsugu, Tsurutani Junji, Yoshimura Kiyoshi, Tsuji Mayumi, Kiuchi Yuji, Kobayashi Shinichi, Tsunoda Takuya, Wada Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased Plasma Soluble PD-1 Concentration Correlates with Disease Progression in Patients with Cancer Treated with Anti-PD-1 Antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1929 ~ 1929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9121929	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 Ieguchi Katsuaki, Maru Yoshiro	4. 巻 1270
2. 論文標題 Eph/Ephrin Signaling in the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 45 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-47189-7_3	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 家口勝昭、丸義朗、和田聡
2. 発表標題 肺転移モデルを用いたEphA2/ephrin-A1の機能解
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋田乃綾、家口勝昭、大西伸幸、渡邊真、大熊遼太郎、鈴木梨沙子、辻まゆみ、木内祐二、角田卓也、内田直樹、小林真一、和田聡
2. 発表標題 腫瘍浸潤リンパ球におけるNDRG1の機能解析
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家口勝昭、大西伸幸、渡邊真、大熊遼太郎、鈴木梨沙子、辻まゆみ、木内祐二、角田卓也、内田直樹、小林真一、和田聡
2. 発表標題 Development of a novel cancer diagnostic method targeting glycosylation on specific molecules
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家口勝昭、大西伸幸、五嶋翼、大熊遼太郎、鈴木梨沙子、角田卓也、和田聡
2. 発表標題 Eph/ephrinシステムを介したPD-L1の発現調節機構
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五嶋翼、和田聡、家口勝昭、高柳大輔、渡邊真、尾上りえ、大熊遼太郎、堀池篤、濱田和幸、久保田祐太郎、鶴井敏光、鈴木理沙子、入口菜々、石黒智之、平澤優弥、有泉裕嗣、吉村清、小林真一、中原さおり、藤代準、角田卓也
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカーの探索及び新規治療薬の開発に向けて
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西伸幸, 家口勝昭, 高柳大輔, 渡邊真, 五嶋翼, 大熊遼太郎, 鈴木梨沙子, 角田卓也, 和田聡
2. 発表標題 In vivoエレクトロポレーションを用いたマウス膠芽腫モデルの構築
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 家口 勝昭, 大熊 遼太郎, 辻 まゆみ, 木内 祐二, 角田 卓也, 小林 真一, 和田 聡
2. 発表標題 転移前微小環境形成における交感神経の機能解析
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大熊 遼太郎, 家口 勝昭, 渡邊 真, 尾上 りえ, 濱田 和幸, 石黒 智之, 平澤 優弥, 有泉 裕嗣, 久保田 祐太郎, 堀池 篤, 鶴谷 純司, 吉村 清, 小林 真一, 角田 卓也, 和田 聡.
2. 発表標題 抗PD-1抗体薬を投与されたがん患者の末梢血における可溶性PD-1、PD-L1分子の臨床的意義
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家口 勝昭, 丸 義朗, 角田 卓也, 和田 聡
2. 発表標題 ADAM12によって切断されたephrin-A1の機能解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大熊 遼太郎, 久保田 祐太郎, 堀池 篤, 鶴井 敏光, 鈴木 理沙子, 入口 菜々, 石黒 智之, 平澤 優弥, 有泉 裕嗣, 家口 勝昭, 高柳 大輔, 鶴谷 純司, 吉村 清, 角田 卓也, 和田 聡
2. 発表標題 Stage II膵臓癌における予後因子としての好酸球数、好酸球リンパ球比に関する検討
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	和田 聡  (Satoshi Wada)  (30420102)	昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・教授    (32622)	

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