

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09625

研究課題名(和文) 鼻副鼻腔原発の粘膜型悪性黒色腫の免疫ゲノム解析および重粒子線の影響解明

研究課題名(英文) Analysis of the immuno-genome and the effects of heavy ion therapy on mucosal melanoma of the nasal cavity and paranasal sinuses

研究代表者

花澤 豊行 (Hanazawa, Toyoyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90272327

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)：腫瘍細胞表面に発現したMHC-I上に提示された抗原をCD8陽性T細胞が認識することで腫瘍細胞は殺傷される。重粒子線治療によりMHC-Iの発現が上昇することが知られていたが、細胞株の中にはIFNシグナルに依存せずにMHC-Iの発現が上昇するものが存在した。IFNシグナルが欠落すると免疫チェックポイント阻害薬(ICI)に抵抗性を示すようになると考えられてきたが、このようなIFNシグナル非依存的にMHC-I発現が見られる場合には、ICIが有効であった。さらにPI3K/Aktシグナルとその下流のNF- κ Bシグナルが、IFNシグナルの代替経路としてMHC-Iの発現を上昇させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍免疫応答におけるMHC-Iの発現の重要性とそれに関わるシグナルについて詳細に検討したことで、MHC-Iを上昇させ得る重粒子線治療とICIの併用療法など、新規治療開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells are eliminated mainly by CD8+ T cells recognizing antigens presented on major histocompatibility complex class I (MHC-I). Since heavy ion therapy is reported to increase the MHC-I expression, we analyzed the signaling pathways involved in MHC-I expression. Although the IFN signaling pathway is essential for MHC-I expression in previous reports, some cancer cells have high MHC-I expression independently of the IFN signaling pathway. It has been generally thought that IFN signaling pathway defects result in resistance to immune checkpoint inhibitors (ICIs). However, ICIs exhibit efficacy against the high MHC-I-expressing tumors despite defects in IFN signaling pathways. Moreover, the CRISPR screening showed that the PI3K/Akt signaling pathway and its downstream NF- κ B signaling pathway could increase MHC-I expression.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 粘膜型悪性黒色腫 インターフェロン 主要組織適合抗原複合体クラスI(MHC-I) 重粒子線治療

様式 C - 19、F - 19 - 1(共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部に生じる粘膜型悪性黒色腫は、主に鼻副鼻腔粘膜に発生し、皮膚型悪性黒色腫の5年生存率は70%~80%だが、鼻副鼻腔原発粘膜型悪性黒色腫はおよそ30%と極めて予後不良の疾患である。治療の主体は、腫瘍の拡大切除と術後放射線療法であるが、ダカルバジンを中心とした全身的な化学療法の効果はあまり期待できない^(1, 2)。申請者らの施設では重粒子線治療や陽子線治療に手術を組み合わせることで、極めて良好な局所制御率を示しているが、遠隔転移での再発が問題となり、如何に遠隔転移を含む病巣を制御できるかが本疾患の大きな課題である。ICI である抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体が登場し期待は大きかったが、粘膜型悪性黒色腫に対する奏効率は単剤では10%~20%、併用で40%弱と報告され、十分な効果が得られておらず⁽³⁾、本疾患に対しての新たな治療開発が急務と考えている。

腫瘍細胞は、主に細胞表面に発現した MHC-I 上に提示された抗原を CD8 陽性 T 細胞が認識することで殺傷される^(4, 5, 6)。MHC-I の発現には IFN シグナルが重要とされ⁽⁸⁾、重粒子線治療も MHC-I の発現を上昇させるということが知られているが⁽⁷⁾、詳細は不明である。

2. 研究の目的

申請者らが樹立した患者由来悪性黒色腫細胞株およびマウスモデルを使用して、MHC-I の発現に関わるシグナルについて解析し、その結果を元に、MHC-I を上昇させ得る重粒子線治療と ICI の併用療法といった新たな治療開発に繋げることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 申請者らが樹立した患者由来悪性黒色腫細胞株の MHC-I の発現をフローサイトメトリーで確認し、IFN 刺激の有無で比較した。

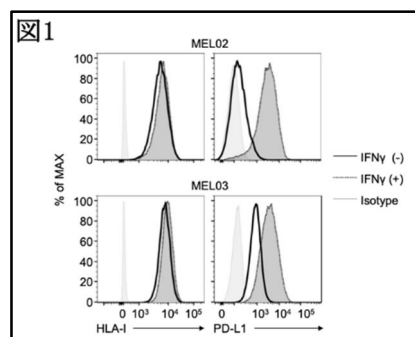
(2) マウスモデルを使用して、(1)と同様に MHC-I の発現をフローサイトメトリーで確認し、IFN 刺激の有無で比較した。この結果を元に MHC-I の発現の違いが ICI の効果に影響を与えるかを調べるために、CRISPR/Cas9 システムで JAK を欠損させた細胞株を作製し、ICI の効果を検証した。

(3) IFN シグナルに依存せずに MHC-I の発現を上昇させる分子を探索する目的で CRISPR スクリーニングを行なった。さらに、その分子がどういったシグナル伝達経路で MHC-I の発現に関わっているかをウエスタンブロットなどで確認した。

(4) 重粒子線治療を受けた患者も含め粘膜型悪性黒色のサンプルを回収し解析を行う。

4. 研究成果

(1) まず、申請者らが樹立した患者由来悪性黒色腫細胞株の MHC-I の発現をフローサイトメトリーで確認したところ、2細胞株とも IFN の刺激の有無に関わらず、MHC-I が高発現していた(図1)⁽⁹⁾。既報では IFN シグナルが重要とされていたが、IFN シグナルに依存せずに MHC-I の発現が上昇している腫瘍細胞がいることが示唆された。



(2)(1)で示された知見をさらに検証するために、マウスモデルを使用することとした。複数のマウスの細胞株を検証したところ、(1)で使用した患者由来悪性黒色腫細胞株と同様に IFN シグナルに依存せずに MHC-I を高発現している細胞株(EMT6、CT26)と、MHC-I の発現が IFN シグナルに依存している細胞株(MC-38、B16F10)が存在していることを見出した(図 2A)

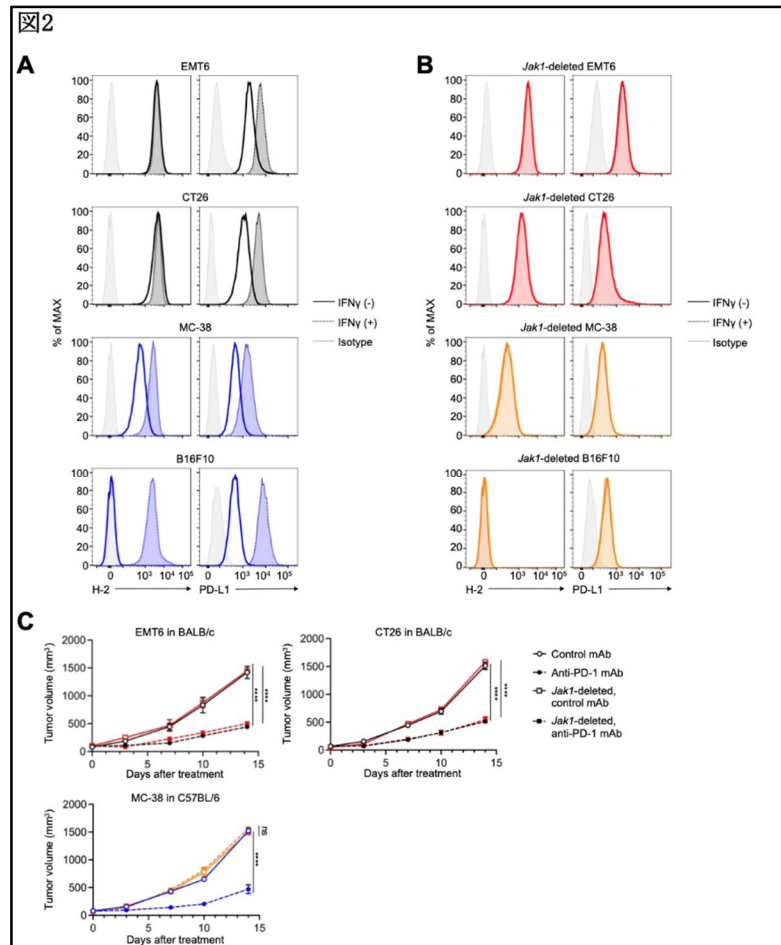
(9)。次に、この MHC-I の発現の違いが、抗腫瘍免疫応答にどのような影響を与えるかを検証するために、

CRISPR/Cas9 システムによって JAK を欠損させ、IFN シグナルに欠陥がある細胞株を作製した。IFN シグナルに依存せずに MHC-I を高発現している EMT6 と CT26 では JAK 欠損株でも MHC-I は高発現のままであった(図 2B)

(9)。一方で、MHC-I の発現が IFN シグナルに依存している MC-38 と B16F10 では JAK 欠損

株では MHC-I が低発現であった(図 2B)(9)。一般的には IFN シグナルに欠落が生じると ICI に対して抵抗性を示すようになる(10, 11)と考えられてきたが、IFN シグナルに依存せずに MHC-I が発現している EMT6 と CT26 では、JAK を欠損させても ICI は有効であったが、MHC-I の発現が IFN シグナルに依存していた MC-38 では、JAK を欠損させることで既報通り抵抗性を示すようになった(図 2C)(9, 10, 11)。これらの結果からは、抗腫瘍免疫応答において MHC-I が高発現していることが重要であることが示唆された。

(3)次に、IFN シグナルに依存せずに MHC-I の発現を上昇させている分子が何かを探索する目的で、CRISPR スクリーニングを行なった。GNG4 という分子が PI3K/Akt シグナルおよび NF- κ B シグナルによって、MHC-I の発現を高めているということがわかり、IFN シグナルの代替経路として MHC-I の発現を上昇させる可能性を示した(図 3A、3B、3C)(9)。



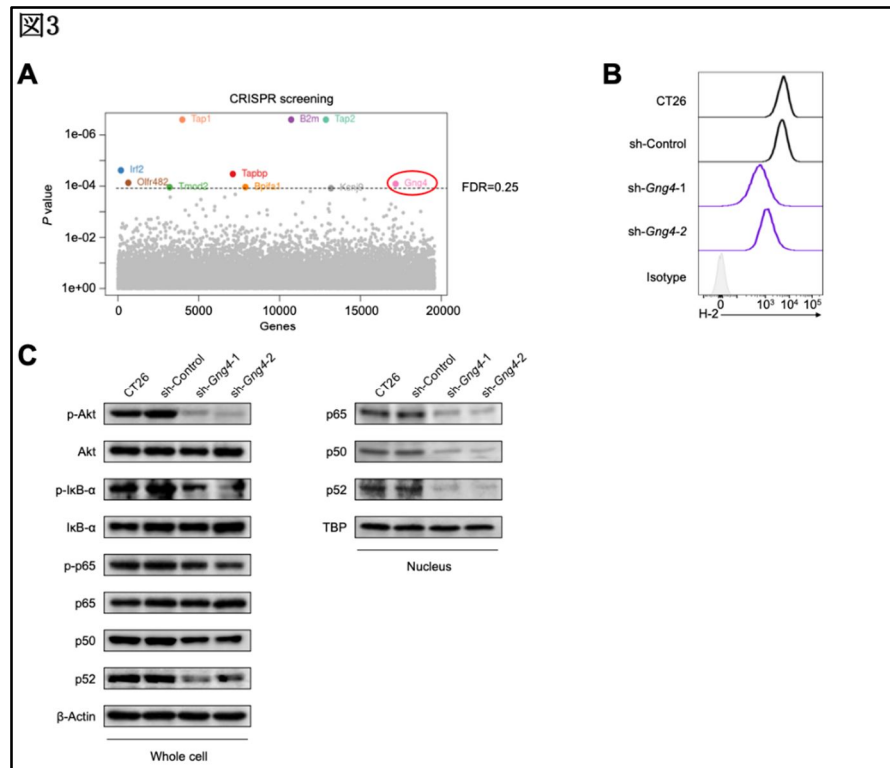
(4) 粘膜型悪性黒色腫は稀な疾患のため、本研究期間で4例からサンプルを採取することができ、そのうちの1例は再発時に重粒子線治療を受けていた。今後さらにサンプルを集め検証をすすめる。

以上、抗腫瘍免疫応答においてMHC-Iが高発現

していることの重要性を検証した。今後MHC-Iを上昇させ得る重粒子線治療でこれらの経路を重点的に調べ、ICIとの併用療法として有用であるかを検証していく。

<引用文献>

1. Ascierto PA, et, al. Crit Rev Oncol Hematol 2017
2. Fujisawa Y, et, al. Cancer Medicine 2019
3. D' Angelo SP, et al. J Clin Oncol 2017
4. Kawazu M, et, al. Gastroenterology 2022
5. Inozume T, et, al. J Invest Dermatol 2019
6. Gettinger S, et, al. Cancer Discov 2017
7. Helm A, et, al. Int J part Ther 2018
8. Martini M, et, al. Vaccine 2010
9. Kawase K, et, al. Cancer Immunology Research 2023
10. Zaretsky JM, et, al: N Engl J Med 2016
11. Shin DS, et, al: Cancer Discov 2017



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 1件）

1. 著者名 Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, Kawazu M, Ueno T, Irie T, Tanji E, Morinaga T, Honobe A, Ohnuma T, Yoshino M, Iwata T, Kawase K, Sasaki K, Hanazawa T, Kochin V, Kawamura T, Matsue H, Hino M, Mano H, Suzuki Y, Nishikawa H, Togashi Y.	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 110331-110331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110331.	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 川瀬勝隆、越塚慶一、米田理葉、山崎一樹、米倉修二、花澤豊行	4. 巻 47
2. 論文標題 ニボルマブを使用した再発・転移性頭頸部癌44例の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 284-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kawase Katsushige, Kawashima Shusuke, Nagasaki Joji, Inozume Takashi, Tanji Etsuko, Kawazu Masahito, Hanazawa Toyoyuki, Togashi Yosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 High Expression of MHC Class I Overcomes Cancer Immunotherapy Resistance Due to IFN Signaling Pathway Defects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 895 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-22-0815	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川瀬勝隆、越塚慶一、米田理葉、山崎一樹、米倉修二、花澤豊行
2. 発表標題 ニボルマブを使用した再発・転移性頭頸部癌44例の検討
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawase K, Kawashima S, Nagasaki J, Inozume T, Kawazu M, Hanazawa T, Togashi Y.
2. 発表標題 Increasing MHC class I expression is crucial for antitumor immunity among IFN signaling pathways.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kawase K, Kawashima S, Nagasaki J, Inozume T, Yamamoto H, Kawazu M, Hanazawa T, Togashi Y.
2. 発表標題 High major histocompatibility complex class I expression overcomes cancer immunotherapy resistance due to interferon gamma signaling pathway defects.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	猪爪 隆史 (Inotsume Takashi) (80334853)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究 分担者	富樫 庸介 (Togashi Yosuke) (80758326)	千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ 細胞治療開発研究部・客員研究員 (82504)	

	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 協力者	川瀬 勝隆 (Kawase Katsushige)	千葉大学・大学院医学研究院・医員 (12501)	

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