

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19467

研究課題名（和文）がん免疫療法への応用を目指したcGAS依存的微小核ダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Dynamics of micronuclei regulated by the cytosolic DNA sensor cGAS

研究代表者

北嶋 俊輔（KITAJIMA, Shunsuke）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・研究員

研究者番号：90566465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに研究代表者は、紡錘体形成阻害により誘導される微小核が細胞質内の異所性DNAとしてcGASに認識されることで抗ウイルス応答/抗腫瘍免疫経路を誘導することを明らかにした。さらに本研究では、微小核出現時に、これまでに報告されていない機能不明なcGASのリン酸化が出現することを見出した。またPhostag技術を用いて、様々な実験条件下でのリン酸化cGASの誘導効率を解析し、新規リン酸化が最も効率よく検出できる培養条件の設定、タンパク回収条件の設定、リン酸化部位同定のための免疫沈降に使用するタグなどを決定した。今後、リン酸化プロテオームによりリン酸化部位を特定しその機能を解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞において染色体不分離に伴い発生する微小核は核膜の修復能力が低く、内包する染色体が細胞質に露出することで、cGAS依存的に抗腫瘍免疫を誘導する。微小核の一部はその後消失することが知られているが、その制御機構はほとんど解明されていない。本研究では、研究代表者らが見出した微小核誘導時に出現する機能不明なcGASのリン酸化が、cGASによる微小核の認識および分解に寄与するという仮説のもと、新規リン酸化部位を特定し、微小核とcGASとの相互作用やその下流シグナルである抗ウイルス応答/抗腫瘍免疫経路への影響を解明することで、自己DNA依存的な免疫応答機構に関する新たな知見を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated that micronuclei induced by inhibition of spindle assembly checkpoint (SAC) are recognized by cGAS as ectopic DNA in the cytoplasm, thereby triggering antiviral response and anti-tumor immune pathways. In this study, we found that a novel and functionally unknown phosphorylation in the cGAS protein was induced during the induction of micronuclei following SAC inhibition. By utilizing Phostag technology to analyze cGAS phosphorylation under various conditions, we optimized cell culture conditions to efficiently induce this novel cGAS phosphorylation. Additionally, we established optimal conditions for cell lysate preparation and identified suitable tags for immunoprecipitation to concentrate and identify phosphorylation sites on the cGAS protein. Next, we plan to identify these phosphorylation sites using phosphoproteomics and analyze their impact on anti-tumor immune pathways.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：cGAS 新規リン酸化

1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者は、免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示す KRAS;LKB1 変異 (KL) 型非小細胞肺癌 (NSCLC) において、cGAS-STING 経路が抑制されていることを明らかにした。cGAS-STING 経路の不活性化に伴いがん細胞の抗原提示能や細胞傷害性 T 細胞の腫瘍内浸潤が減少することから、cGAS-STING 経路の再活性化が KL 型 NSCLC の免疫チェックポイント阻害剤抵抗性を克服するための戦略として有効であると考えた。そこで、すでに Phase I trial を含め臨床での使用実績がある既存薬を用いた薬剤スクリーニングを実施し、紡錘体形成チェックポイントのマスターレギュレーターである Monopolar Spindle 1 (MPS1) の阻害剤が、染色体不分離に伴う微小核形成を介して効率的に cGAS-STING 経路を活性化することを明らかにした。実際に、マウス KL 型肺癌モデルにおいて、中和抗体による CD8 陽性 T 細胞除去により、MPS1 阻害剤投与による治療効果が顕著に減弱することから、少なくとも抗腫瘍効果の一部は抗腫瘍免疫の活性化を介していることを明らかにした。

これらの研究成果から、薬剤投与により効率的に抗腫瘍免疫を活性化させるためには、微小核の形成および分解の分子機構を理解することが重要であると考えた。特に、微小核の分解機構はこれまでにほとんど解明されていない。上記の MPS1 阻害剤を用いた治療法は、微小核を蓄積した細胞が異常細胞として cGAS 依存的に免疫細胞から排除される現象を基盤としており、細胞質内での微小核の分解を抑制することで、さらに効率的に抗腫瘍免疫を活性化できると考えた。一方で、これまで cGAS の翻訳後修飾に関してほとんど解明されていなかったが、近年、アセチル化やリン酸化が cGAS の細胞内局在や活性を制御することが報告された。そこで細胞質内に出現した微小核に cGAS が集積し、様々なタンパク質と複合体を形成し下流シグナルを活性化、あるいは微小核の分解を促進する動的な過程において、cGAS の翻訳後修飾が関与するという仮説を立て、多角的に解析した結果、微小核を誘導した際に特異的に出現する機能不明な新規リン酸化の亢進を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが見出した微小核誘導時に出現する機能不明な cGAS のリン酸化が、cGAS による微小核の認識および分解に寄与するという仮説のもと、リン酸化部位の特定と責任キナーゼの同定を目指す。また、研究代表者はこれまでに、微小核の蓄積により cGAS 依存的に周囲の免疫細胞が活性化されることを見出しており、cGAS の新規リン酸化が微小核の動態および抗腫瘍免疫に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) cGAS の新規リン酸化を効率的に誘導する実験条件の確立
標的とする cGAS のリン酸化部位をリン酸化プロテオームで同定するため、使用するがん細胞株の選定および効率的な免疫沈降 (IP) の実施のためのタグ付き cGAS を導入した細胞株の作製、また微小核誘導時に出現する cGAS のリン酸化が最も効率よく検出できる MPS1 阻害剤の処理条件などを最適化する。

(2) 微小核形成に伴い出現する cGAS リン酸化部位の同定
C 末端を特定のタグで標識した cGAS を発現する細胞株を樹立し、紡錘体チェックポイントキナーゼ MPS1 阻害剤を投与して微小核を誘導した細胞からタンパク質を抽出する。タグを認識する抗体を用いた免疫沈降により cGAS を濃縮した後に、リン酸化プロテオミクスにより cGAS のリン酸化部位を特定する。

(3) In vitro モデルを用いた cGAS リン酸化の機能評価
これまでに研究代表者は、cGAS の C 末端を EGFP で標識し、かつ生細胞イメージングプローブである SiR-DNA により DNA を標識することで、微小核の出現と消失、cGAS の微小核への集積をライブイメージで観察する系を確立した。上記①②の研究で特定したリン酸化部位のアミノ酸変異型 cGAS 存在下で、微小核の形成や cGAS の動態がどのように変動するか解析する。また並行して、cGAS 下流因子である CXCL10 の分泌や TBK1、STAT1 の活性を測定することで、新規リン酸化が微小核形成時の cGAS の活性化に与える影響を解析する。

4. 研究成果

まず初めに標的とする cGAS のリン酸化部位をリン酸化プロテオームで同定するため、使用するがん細胞株の選定および効率的な免疫沈降 (IP) の実施のためのタグ付き cGAS を導入した細胞株の作製、また微小核誘導時に出現する cGAS のリン酸化が最も効率よく検出できる MPS1 阻害剤の処理条件などを最適化した。

(1) リン酸化 cGAS タンパク質を IP により濃縮するために、Flag タグ付き cGAS を導入して Flag 抗体により IP する方法および内在性 cGAS を cGAS 抗体により IP する方法を検討した。前者の場合、十分量の cGAS を回収することができるが、多くの細胞株では外因性の Flag-cGAS を非常に強く発現する一方で、全体の Flag-cGAS に対するリン酸化 Flag-cGAS の比率が極めて低いことが明らかになった。一方で、後者の場合は、内因性 cGAS の発現量の低さ、IP 用抗体としての cGAS 抗体の不安定性が問題となった。そこで、まず cGAS 依存的な細胞死を起こしやすく外因性の cGAS を高発現しないことをこれまでに報告していた細胞株 NCI-H1944 を用いて、EGFP-Flag タグ付き cGAS を導入し、EGFP のシグナルを標識として一定レベル発現する細胞のみを FACS により濃縮した。これらの細胞株を H1944 EGFP-Flag-cGAS low 株として培養安定化させ、IP 用に大量の細胞数を調整することでこれらの問題を解決した。

(2) MPS1 阻害剤として CFI-402257、BAY-1217389 などの薬剤を、H1944 EGFP-Flag-cGAS low 株に対して異なる濃度で作用させて cGAS のリン酸化レベルを Phostag ゲルで解析した。その結果、100nM BAY-1217389 で 48 時間処理し、薬剤を除去したのちに 72 時間通常培地で培養した条件において、微小核の形成および標的とする cGAS のリン酸化が著しく上昇することを明らかにした。また一方で MPS1 阻害剤処理により誘導される微小核の数は、薬剤除去後 24 時間をピークに徐々に減少することから、微小核の減少と cGAS の新規リン酸化の亢進が逆相関の傾向を示すことが明らかになった。

次に H1944 EGFP-Flag-cGAS low 株を用いて、Flag 抗体を用いた免疫沈降により cGAS タンパク質を濃縮した後、リン酸化プロテオームによりリン酸化部位の特定を目指した。一方で、リン酸化部位を同定するためには、一定量以上の cGAS タンパク質を免疫沈降法により回収することが必須である。現時点で、免疫沈降およびゲル電気泳動後に抽出した cGAS タンパク質の量では、技術的に信頼性の高いリン酸化プロテオームの結果を得ることができなかった。そこで、現在、免疫沈降後のタンパク質溶出液から抗体を分離させ cGAS のみを溶出する実験的手法を確立し、収量を上げることを目指している。今後、リン酸化プロテオームによりリン酸化部位を特定し、特定したリン酸化部位のアミノ酸変異型 cGAS を作製し、細胞に導入する予定である。これにより、標的とする cGAS のリン酸化が微小核の形成や cGAS の動態、さらにその下流シグナルである抗ウイルス応答/抗腫瘍免疫経路にどのような影響を与えるかを解析する予定である。

これまで報告されていない cGAS の新規リン酸化の機能を、同様にほとんど解明されていない微小核の認識・分解機構と関連させて解明を目指す挑戦的な課題である。これまでに、核膜が消失する M 期に自己 DNA への反応を防ぐため、N 末端のリン酸化により cGAS の機能が抑制されることが報告されている。しかし、MPS1 阻害剤はむしろ M 期停止からの離脱を強く誘導することから (図 2)、MPS1 阻害剤により誘導される cGAS リン酸化は、M 期停止に伴う既報のリン酸化とは異なると考えられる。実際に、Phostag 解析によるリン酸化パターンも M 期停止時とは異なる。研究代表者のこれまでの研究から、cGAS および微小核の制御機構解明は新規がん免疫療法の開発にもつながることから、生物学的意義に加えて臨床的意義も大きい。挑戦的課題であるがゆえ、現在もリン酸化部位の同定および機能解明に関して研究継続中であるが、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた責任キナーゼの同定などを将来的な目標として定めており、これらの成果から cGAS の活性を正・負に制御する新たな因子を発見できる可能性がある。



図 1. Phos-tag を用いた cGAS リン酸化の検出

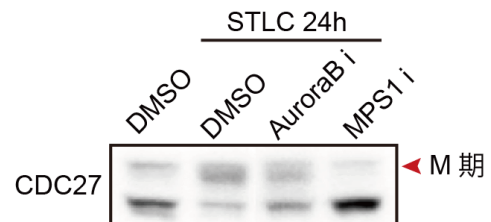


図 2. STLC 処理による M 期停止誘導。STLC 存在下で MPS1 阻害剤を添加すると、1h 以内に M 期停止から脱出する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nobunari Sasaki, Mizuki Homme, Shunsuke Kitajima	4. 巻 114(10)
2. 論文標題 Targeting the loss of cGAS/STING signaling in cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3806-3815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15913	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 北嶋 俊輔
2. 発表標題 Priming the immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer through STING activation
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北嶋 俊輔
2. 発表標題 Priming the immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer through STING activation
3. 学会等名 第61回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北嶋 俊輔
2. 発表標題 シンジェニックマウスモデルを用いたKRAS-STK11変異型肺がんの特徴的な免疫抑制性微小環境の解析
3. 学会等名 第64回日本肺癌学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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