

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20758

研究課題名（和文）新規抵抗性経路の網羅的同定と解除による免疫治療抵抗性癌の克服と、分子機序の解明

研究課題名（英文）Overcoming immunotherapy-resistant cancers by comprehensively screening sensitizing pathways

研究代表者

伊藤 能永 (Ito, Yoshinaga)

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：60614013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、T細胞によるMHC-I欠損抵抗性がん細胞の殺傷を可能にするような新しい分子経路がないか、ゲノムワイドCRISPRスクリーニングを用いて探索した。オートファジーとTNFシグナル経路を標的として見出した。Rnf31遺伝子（TNFシグナル経路）とAtg5遺伝子（オートファジー関連遺伝子）を不活化すると、MHC-I欠損がん細胞がT細胞由来サイトカインに対して感受性化しアポトーシスによって死滅することが分かった。その分子機序として、オートファジーを阻害することで、サイトカインによる腫瘍細胞のアポトーシス誘導が増強されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、治療抵抗性の原因の一つである腫瘍の不均一性に着目し、そこに含まれる抵抗性がん細胞のTNFシグナル経路とオートファジーを標的として不活性化することが、新たな治療戦略となりうることを示した。例えば、免疫チェックポイント阻害剤による治療を行う際に両経路に対する薬剤を併用すれば、MHC-I欠損がん細胞の増加による治療抵抗性がんの出現を抑えることができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Tumor heterogeneity is a major barrier to cancer therapy, including immunotherapy. Activated T cells can efficiently kill tumor cells following recognition of MHC class I (MHC-I)-bound peptides, but this selection pressure favors outgrowth of MHC-I-deficient tumor cells. We performed a genome-scale screen to discover alternative pathways for T cell-mediated killing of MHC-deficient tumor cells. Autophagy and TNF signaling emerged as top pathways, and inactivation of Rnf31 (TNF signaling) and Atg5 (autophagy) sensitized MHC-deficient tumor cells to apoptosis by T cell-derived cytokines. Mechanistic studies demonstrated that inhibition of autophagy amplified proapoptotic effects of cytokines in tumor cells. Antigens from apoptotic MHC-I-deficient tumor cells were efficiently cross-presented by dendritic cells, resulting in heightened tumor infiltration by IFN- γ - and TNF- α -producing T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫療法抵抗性癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織には、単一患者由来のものであっても、遺伝的、あるいは非遺伝的な違いを有する多様ながん細胞が含まれています(腫瘍の不均一性)。このことは、治療に対する抵抗性の主な原因の一つです。すなわち、遺伝的不安定性などにより生み出された多様ながん細胞を含むがん組織に対して治療を行うと、多くの場合治療が強力な選択圧となって抵抗性がん細胞の割合が増加し、がん組織内で大半を占めるようになります。

T細胞は腫瘍を殺傷する機能を持ち、がん免疫療法では中心的な役割を担います。T細胞は、がん細胞表面上のMHC-I分子によって提示されたがんペプチドを認識してT細胞受容体を活性化し、パーフォリンやグランザイムを含む細胞殺傷顆粒をがん細胞に向けて放出することでがん細胞を殺傷します。T細胞による腫瘍殺傷は、がん組織に対しては強力な選択圧として作用し、その結果MHC-I発現を低下あるいは失ったがん細胞の増加を引き起こします。実際さまざまながんでMHC-Iの消失が報告されています。細胞殺傷性CD8 T細胞の、T細胞受容体を介した腫瘍細胞の認識はMHC-I分子に依存しているため、このようなMHC-I欠損がん細胞はT細胞には検知されません。このようにMHC-I欠損がんはT細胞による免疫反応を逃れる代表的な抵抗性がんです。

2. 研究の目的

本研究では、MHC-I欠損がん細胞を活性化T細胞の標的に変えうるような分子標的を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の方法

感受性がん細胞と抵抗性がん細胞が混在したがん組織のモデルとして、T細胞標的抗原であるOVAを発現したがん細胞と、MHC-I欠損がん細胞の共培養系を用意しました。MHC-I欠損がん細胞(Cas9タンパクを強制発現)にゲノムワイドのガイドRNAライブラリーを導入しておき、OVA特異的活性化T細胞を共培養系に加えました。その結果、T細胞標的抗原OVA発現がん細胞はOVA特異的T細胞によって認識されパーフォリンやグランザイムにより殺傷されます。T細胞は周囲に大量のサイトカイン(IFN γ やTNF α)を放出し、周囲に炎症環境を作り出します。周囲に存在するMHC-I欠損がん細胞はT細胞には認識されませんが、炎症環境に対する感受性の違いによって数が増減します。このようなゲノムワイドCRISPRスクリーニングによって、MHC-I欠損がん細胞の抵抗性に関連する遺伝子を明らかにしました。その結果、TNFシグナル経路とオートファジーにそれぞれ関わる遺伝子が見つかりました。

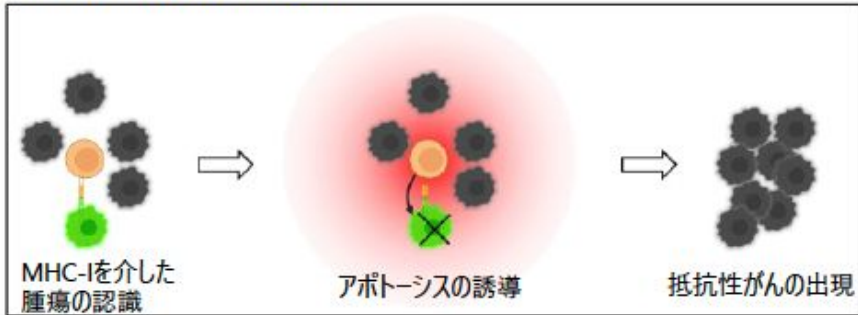
実際にRnf31遺伝子(TNFシグナル経路)とAtg5遺伝子(オートファジー関連遺伝子)を遺伝子ノックアウトにより不活化すると、MHC-I欠損がん細胞がT細胞由来サイトカイン(IFN γ とTNF α)に対して感受性化しアポトーシスによって死滅することを見出しました(図)。次にその分子機序の解明を試みました。オートファジーは、アポトーシスの機能分子であるCaspase 8を分解していました。そのためオートファジーを阻害することで、腫瘍細胞内でサイトカインによるアポトーシス誘導が増強されることが分かりました。またRNF31分子は、TNFシグナルを受けた細胞が生きるか、アポトーシスで死ぬかを決定するスイッチとして機能してすることが分かっています。実際にRnf31を失活させるとMHC-I欠損がん細胞はTNFシグナルによってCaspase 8依存性の細胞死を起こしました。またRnf31遺伝子とAtg5遺伝子の両者を欠損させると、Caspase 8の増加による相乗的なアポトーシス誘導効果があることを明らかにしました。このようにしてアポトーシスに陥ったMHC-I欠損がん細胞は、樹状細胞によってT細胞に対して効率よく交差提示され腫瘍に特異的なT細胞を活性化、結果として腫瘍に浸潤するIFN γ あるいはTNF α 産生T細胞数を増加させることが分かりました。

4. 研究成果

このように、抵抗性がん細胞内のTNFシグナル経路とオートファジーを不活性化することで、T細胞由来のIFN γ やTNF α によるMHC-I欠損がん細胞のアポトーシス誘導、アポトーシス細胞のクロスプレゼンテーション増強、IFN γ +TNF α 産生T細胞のさらなる腫瘍浸潤という、フィードバックループが形成されることが分かりました。さらにマウスモデルを用いて、TNFシグナル経路とオートファジー双方を薬物あるいは遺伝子操作により阻害することで、MHC-I欠損がん細胞を有するがんをコントロールできることを明らかにしました。



免疫療法抵抗性がんの出現過程



T細胞サイトカインに対して感受性化し抵抗性がんをコントロールする

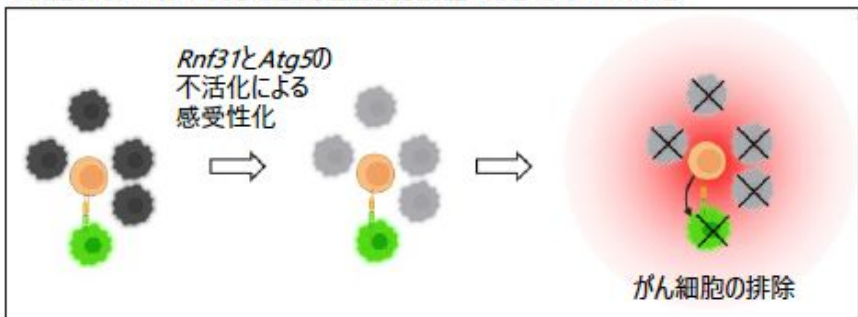


図: T細胞サイトカインに対して感受性化し抵抗性がんを制御する

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinaga Ito, Deng Pan, Wubing Zhang, Xixi Zhang, Tiffany Y Juan, Jason W Pyrdol, Oleksandr Kyrysyuk, John G Doench, X Shirley Liu, Kai W Wucherpennig	4. 巻 -
2. 論文標題 Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-secreted Cytokines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 -
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤能永
2. 発表標題 Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-secreted Cytokines
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤能永
2. 発表標題 Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-secreted Cytokines
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-02-24-6>
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/post-3875/>

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		
米国	Dana-Farber Cancer Institute	Harvard Medical School	Broad Institute