

がん免疫治療を制御する新規DNA修復因子の探索

国立大学法人群馬大学 重粒子線医学推進機構

重粒子線医学研究センター

佐藤 浩央

【研究目的】

抗PD-1/PD-L1抗体治療は、がん組織における免疫抑制反応を阻害することで免疫機構を高める薬剤（免疫チェックポイント阻害剤）であり、現在最も注目されているがん治療法の一つである。抗PD-1/PD-L1抗体では、腫瘍細胞膜表面上に提示されるPD-L1と、リンパ球膜上のPD-1の結合を阻害することで、リンパ球の活性を高め、がん細胞の排除を促す。これまでの臨床試験の結果から、抗PD-1/PD-L1抗体は新たながん治療の柱として世界的に大きな注目を集め一方で、その単独治療で高い効果が得られるのは一部の患者に限られることも明らかになってきた。そのため、現在では、放射線治療や化学療法といった従来のがん治療との併用による効果の増感が期待される。

これまでの研究から、放射線治療による抗腫瘍効果は抗PD-1/PD-L1抗体との併用により増強されることが報告してきた。また、in vivoマウス腫瘍移植実験系において、放射線治療と抗PD-1/PD-L1抗体併用による抗腫瘍効果の向上は、放射線により誘導されたがん細胞のPD-L1発現に依存している可能性が示された（Dovedi et al., Cancer Research, 2014）。しかし、これまでの数多くの前臨床モデル研究により放射線照射後にPD-1/PD-L1経路が活性化されることは明らかになりつつある一方で、その分子機構はほとんど解明されていなかった。申請者はこれまでに、X線照射を受けたがん細胞がDNA損傷・修復シグナル依存的にPD-L1発現を高めることを世界で初めて発見・報告している（Sato et al., Nature Communication, 2017）。そこで本研究では、重粒子線（炭素イオン線）照射後のDNA損傷・修復シグナルに着目し、そのPD-L1発現制御への関与の解明を目指した。さらに本研究では、超高解像度顕微鏡をもじいて細胞表面の空間的分布の可視化を目指した。

がん細胞内における重粒子線照射後のPD-L1発現調節機構を理解することで、今後先進的治療戦略として期待される、炭素イオン線重粒子線治療と抗PD-1/PD-L1抗体治療併用時の治療効果増感方法の提案に加え、治療前効果予測の発展にも貢献できると考え、本研究を遂行した。

【研究方法】

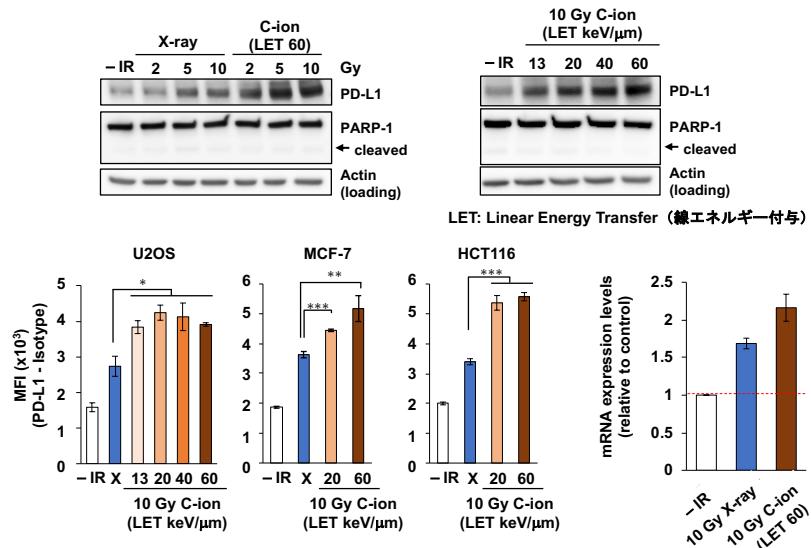
がん細胞株として、ヒト骨肉腫細胞株（U2OS）、ヒト乳癌細胞株（MCF-7）ヒト大腸癌細胞株（HCT116）を使用した。細胞株は理化学研究所およびATCCより入手し、10%ウシ胎児血清含有EMEM培地にて培養した。X線照射は100kVp, 20mAにて行い、銅またはアルミニウムフィルターを用いた。線量率は0.5 Gy/分であった。炭素イオン線照射は、群馬大学重粒子線医学センターにて、エネルギー290 MeV/nのモノピーク照射（線エネルギー付与; LETを、それぞれ13, 20, 40, 60に設定）にて行った。PD-L1発現におけるDNA損傷・修復シグナルの関与を明らかにするため、DNA損傷・修復因子であるATR, Chk1に着目し、ATR阻害剤（VE821; Axon Medchem）、Chk1阻害剤（MK8776; AdooQ Bioscience）を、炭素イオン線およびX線照射の30分前に投与した。照射から48時間後、Western blotおよびFlow cytometry、リアルタイムPCRにてPD-L1解析を行った。

さらに、超高解像度顕微鏡（OMX）を用いて、照射後のPD-L1発現の三次元的分布を解析した。

【結果】

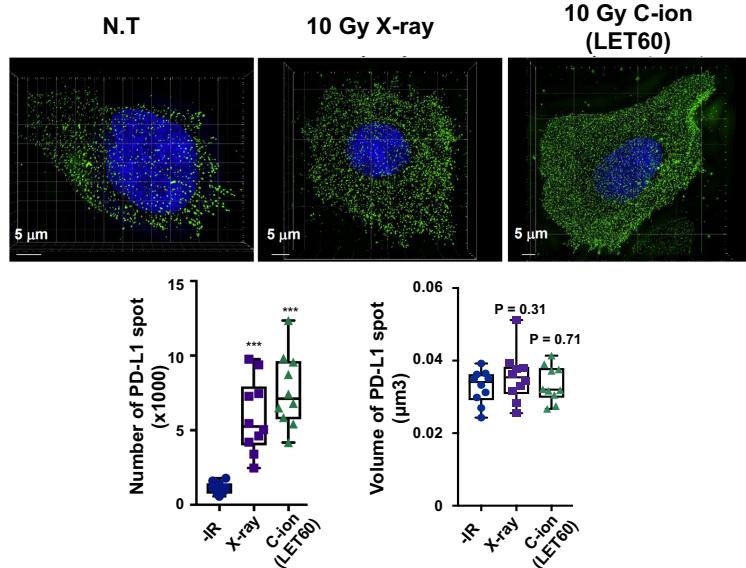
炭素イオン線照射後とX線照射後のPD-L1発現レベルを比較したところ、細胞膜表面レベル、タンパクレベル、mRNAレベル全てにおいて、炭素イオン線照射後の方がより高度にPD-L1発現を誘導した。さらに、炭素イオン線10 Gy照射によるPD-L1発現レベルは、LET依存性の発現亢進を示した（図1）。

図 1. 炭素イオン線はX線よりも高度にPD-L1発現を促す



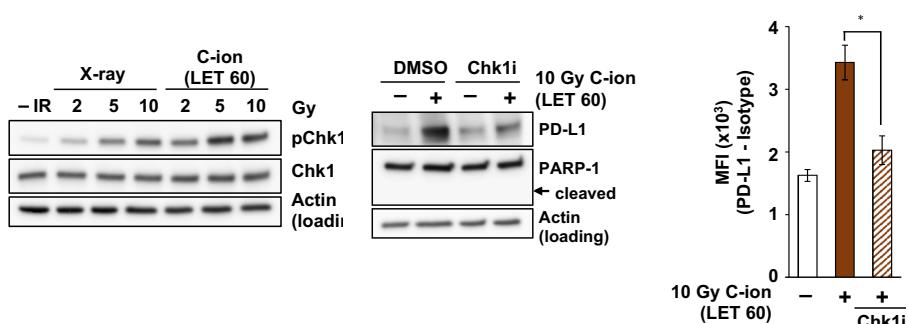
さらに、炭素イオン線およびX線照射後のPD-L1タンパクの三次元的分布の解析したところ、細胞膜表面のPD-L1発現数は、X線と比較し炭素イオン線の方がより高度に誘導されていた。一方で、PD-L1染色領域の体積は、炭素イオン線とX線いずれにおいても有意差を認めなかった（図 2）。

図 2. 炭素イオン線はより高度に細胞膜表面のPD-L1発現を促す



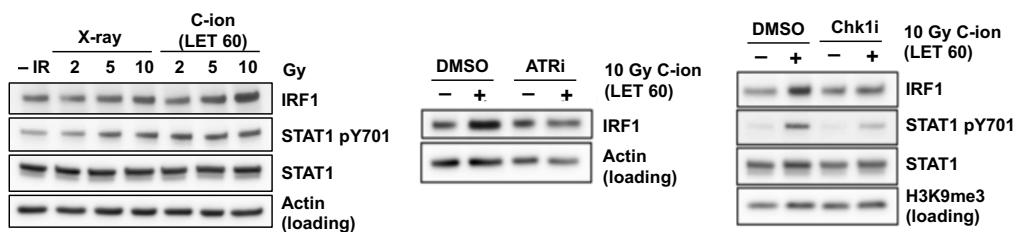
次に、X線での先行研究にてPD-L1発現誘導に関与していた、DNA損傷シグナルChk1に着目した。炭素イオン線およびX線照射後のChk1リン酸化レベルを比較したところ、炭素イオン線照射後の方がより高度にリン酸化を認めた。さらに、Chk1阻害剤を加えることで、炭素イオン線照射後のPD-L1発現誘導は有意に抑制された（図 3）。

図 3. 炭素イオン線照射によるPD-L1発現誘導はATM/ATR/Chk1依存的DNA損傷シグナルを介する



また、同じくX線での先行研究から、DNA損傷シグナルの下流でPD-L1発現誘導を制御することが明らかになっているSTAT1/3 – IRF1経路に着目した。その結果、炭素イオン線照射後も同様にSTAT1/3のリン酸化とIRF1発現の亢進を認め、さらにこの経路は、ATRまたはChk1阻害により抑制された（図4）。

図4. 炭素イオン線照射はSTAT1/3-IRF1経路を活性化させPD-L1発現を誘導する



【考察・まとめ】

本研究の結果から、炭素イオン線照射によるPD-L1発現誘導も、X線と同様、ATR/Chk1といったDNA損傷シグナルと、その下流でのSTAT-IRF1経路を介して制御されることが明らかになった。しかし、同じ経路ではあるが、炭素イオン線照射ではX線よりもDNA損傷能が高いため、この経路の活性化が強く、それによって、より高度にPD-L1発現が誘導されると考えられた。DNA損傷シグナルは炭素イオン線治療と抗PD-1/PD-L1抗体治療併用時の治療効果増感のための標的の一つとして期待でき、さらにこれらのPD-L1発現制御経路に変異を持つがん患者では、より抗PD-1/PD-L1抗体が有効である可能性が示唆された。

本研究結果は、炭素イオン線治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用という、新たなるがん治療戦略の妥当性を支持するものである。

現在本結果の論文投稿準備を進めており、さらに、重粒子線照射後のHLA class Iなど他の免疫関連分子の発現制御機構の解明を目指し研究を進めている。

【発表論文】

期間内の論文投稿なし