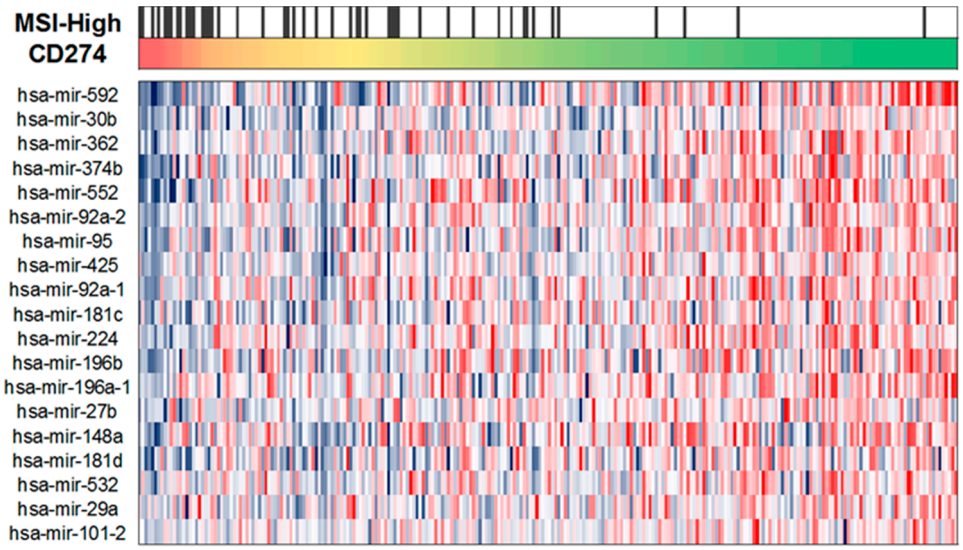
191　マイクロRNAを用いた大腸癌免疫療法の個別化戦略	岡山　洋和

【目的】大腸癌の約 15%はミスマッチ修復機構欠損（dMMR）・マイクロサテライト不安定性（MSI-H）を示し、高い免疫原性と免疫細胞浸潤を伴うが、癌細胞表面の PD-L1、免疫細胞上の PD-1 などの免疫チェックポイント分子高発現により、T 細胞応答は抑制されている。dMMR／MSI-H 大腸癌に対しては、PD-1／PDL1 を標的とした免疫療法が高い奏効率を示す。癌細胞 PD-L1 の詳細な発現制御機構は十分に解明されていない。本研究は、dMMR／MSI-H 大腸癌における免疫抑制的微小環境下で、PD-L1 発現制御に関連するマイクロ RNA を同定し検証することを目的とする。

【方法】TCGA から得た 260 例の RNA シークエンスによる網羅的マイクロ RNA 発現データ、および複数のマイクロ RNA 標的予測アルゴリズムを組み合わせることで、PD-L1 を標的とするマイクロ RNA を抽出する。候補マイクロ RNA、miR-148a-3p を HCT116 および SW837 の 2 つの細胞株に過剰発現させ、細胞機能とともに miR-148a-3p 過剰発現に伴う PD-L1 発現変化を qRT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで評価する。癌細胞と T 細胞の共培養モデルを用いて、miR-148a-3p 過剰発現による T 細胞アポトーシスを評価する。

【結果】網羅的解析を用いて、PD-L1 発現と逆相関し、かつ dMMR／MSI-H 大腸癌で発現低下しているマイクロ RNA 候補のなかから、PD-L1 mRNA の 3’ UTR を標的とし得るマイクロ RNA として miR-148a-3p を同定した。大腸癌細胞株に miR-148a-3p を過剰発現させることで、細胞増殖能やコロニー形成能の低下やアポトーシスの増加を認め、miR-148a-3p の癌抑制的機能が確認された。HCT116 および SW837 の 2 つの細胞株において、miR-148a-3p 過剰発現により、mRNA・タンパク・細胞表面レベルでそれぞれ PD-L1 発現が抑制されることを確認した。さらに miR-148a-3p 過剰発現は、IFN-γ投与下に誘導された癌細胞表面 PD-L1 発現をより強力に抑制した。大腸癌細胞株と T 細胞の共培養モデルを用いることで、癌細胞における miR-148a-3p 過剰発現が T 細胞に対する細胞障害性を低下させることを見出した。

dMMR/MSI-H 大腸癌において、PD-L1 を制御する候補マイクロ RNA の抽出



191. マイクロ RNA を用いた大腸癌免疫療法の個別化戦略

岡山　洋和

福島県立医科大学 医学部 消化管外科学講座

Key words：マイクロ RNA，免疫チェックポイント，大腸癌，免疫療法

緒　言

大腸癌の約 15%はミスマッチ修復機構欠損（deficient DNA mismatch repair：dMMR）・マイクロサテライト不安定性（microsatellite instability-High：MSI-H）を示し、極めて多数の遺伝子変異を有することに伴い多くの mutation associated neoantigen が産生される。このため dMMR/MSI-H 腫瘍は高い免疫原性を示し、CD8 陽性 CTL や Th1 細胞といった免疫細胞が多数誘導される。一方で、dMMR/MSI-H 腫瘍では、癌細胞表面の PD-L1（programmed death ligand-1）、免疫細胞上の PD-1（programmed death-1）などの免疫チェックポイント分子高発現により、T 細胞免疫応答は抑制されている。近年、種々の癌において、免疫チェックポイント機構である PD-1／PD-L1 シグナルを標的とした免疫療法が確立しつつある。特に大腸癌においては、dMMR／MSI-H 症例に対して、PD-1／PDL1 阻害剤が高い奏効率を示すことが報告されてきた［1，2］。2017 年に米国 FDA が、dMMR／MSI-H 症例に対し、抗 PD-1 抗体である pembrolizumab および nivolumab を迅速承認したことで、免疫療法の臨床的意義がさらに重要なものとなった。なお本邦でも、2019 年に dMMR／MSI-H 症例に対する pembrolizumab が保険収載となっている。癌細胞 PD-L1 はインターフェロンγ（IFN-γ）などのサイトカイン等により転写誘導され、翻訳後に種々の修飾を受けるが、その詳細な発現制御機構は十分に解明されていない［3］。

マイクロ RNA はゲノム上にコードされる 20～25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、タンパク質には翻訳されず、その標的 mRNA の 3’非翻訳領域（3’UTR）に不完全な相補性をもって結合し、標的 mRNA の不安定化およびタンパクへの翻訳抑制を起こす。したがって種々の生物学的プロセスにおいて、マイクロ RNA は標的遺伝子機能を抑制的に制御することで発癌や癌の進展に重要な役割を担うことが知られている。癌診療においては、癌の診断、予後バイオマーカーや治療反応予測因子、さらに薬剤としての有用性が報告されている［4］。

免疫機構の調整に関わるマイクロ RNA の存在も知られるようになり、特に近年では、PD-L1 を制御する複数のマイクロ RNA が報告されている。例えば、非小細胞肺癌においては miR-200 や miR-34 が癌細胞の PD-L1 発現を抑制的に制御することが報告された［5，6］。

われわれは、大腸癌の約 15%を占める dMMR／MSI-H 腫瘍において、PD-L1 の制御機構に関与しているマイクロ RNA の存在に着目した。なお本研究成果は、2019 年に Molecular Cancer Research 誌に発表した［7］。

方法および結果

1.　RNA シークエンス・マイクロアレイデータ解析による候補マイクロ RNA の同定と検証

TCGA（The Cancer Genome Atlas）大腸癌データから得た 260 例の RNA シークエンスによる網羅的なマイクロ RNA 発現データを用いて、PD-L1 発現（CD274 遺伝子）と有意に逆相関し（$P < 0.05$）、かつ dMMR／MSI-H 大腸癌において有意に発現低下している（$P < 0.05$）マイクロ RNA 候補を抽出した（図 1）。得られた 19 の候補マイクロ RNA について、複数のマイクロ RNA 標的予測プログラムを用いることで、PD-L1 mRNA の 3’UTR 配列を標的とし得るマイクロ RNA として miR-148a-3p を同定した。さらに 148 例の大腸癌マイクロアレイデータ解析により、PD-L1 高発現症例において miR-148a-3p は有意に発現低下していることを確認した（$P < 0.01$）。

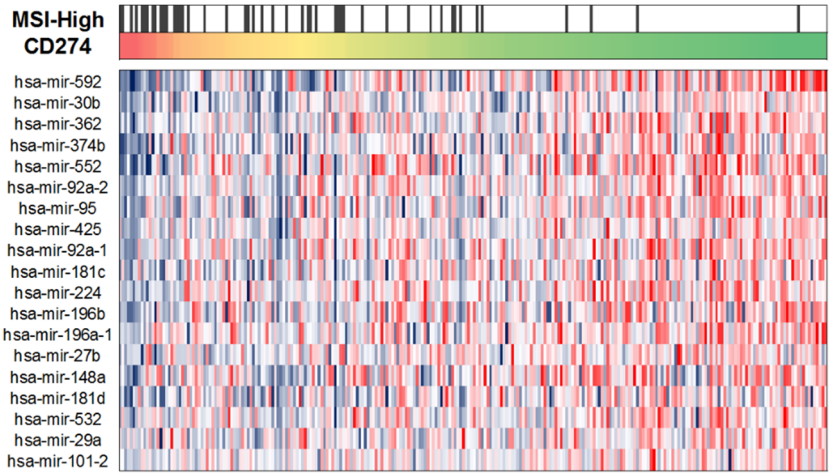


図 1. PD-L1 を制御する候補マイクロ RNA の抽出

TCGA データ（RNA シークエンス）を用いて、PD-L1 発現と有意に逆相関し（$P<0.05$）、かつ MSI-H 腫瘍で有意に発現低下している（$P<0.05$）、19 の候補マイクロ RNA を抽出した。マイクロ RNA 発現と PD-L1（CD274 遺伝子）についてヒートマップを示す。

2. 大腸癌培養細胞を用いた機能解析、PD-L1 発現制御の検証

代表的な大腸癌細胞株である HCT116 および SW837 を用いて実験を行った。これら細胞株に miR-148a-3p を過剰発現させることで、細胞増殖能やコロニー形成能の低下やアポトーシスの増加を認め、miR-148a-3p の既知の癌抑制的機能が確認された。

miR-148a-3p 過剰発現による癌細胞における PD-L1 発現を qRT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで評価し、mRNA、タンパク、細胞表面といずれのレベルにおいても PD-L1 発現が抑制されることを確認した（図 2）。さらに miR-148a-3p 過剰発現は、IFN-γ投与下に誘導された癌細胞表面 PD-L1 発現をより強力に抑制した。

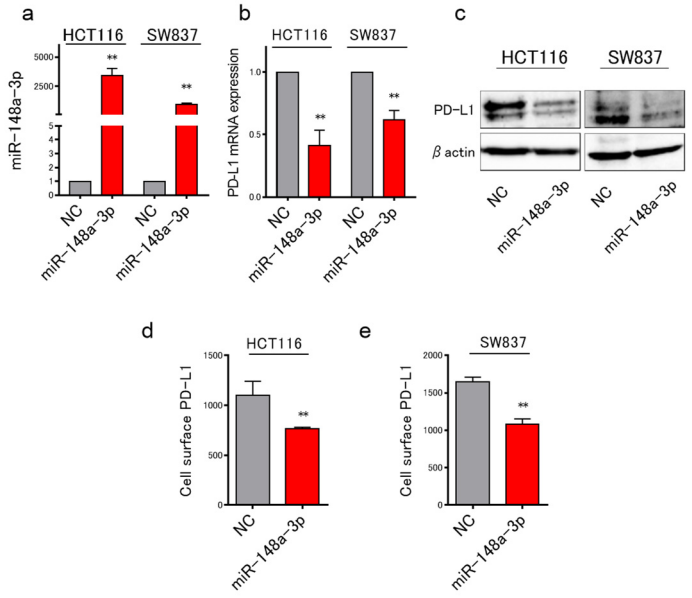


図 2. 大腸癌細胞株 HCT116、SW837 を用いた、マイクロ RNA 過剰発現による PD-L1 発現抑制

a） miR-148a-3p 過剰発現を qRT-PCR により確認。

b） miR-148a-3p 過剰発現により、PD-L1 mRNA 発現が抑制される（qRT-PCR）。

c） miR-148a-3p 過剰発現により、PD-L1 タンパク発現が抑制される（ウエスタンブロット）。

d、e) miR-148a-3p 過剰発現により細胞表面の PD-L1 発現が抑制される（フローサイトメトリー）。

**$P<0.01$、統計処理は、unpaired t-test で実施した。

3. 大腸癌細胞、T 細胞共培養モデル

大腸癌細胞株とヒト PBMC 由来の T 細胞の共培養モデルを用いて、癌細胞における miR-148a-3p 過剰発現と T 細胞に対する細胞障害性を検討した。T 細胞はインターロイキン 2（IL-2）添加下で培養し、大腸癌細胞株は IFN-γ処理とともに miR-148a-3p を過剰発現させ、これらを共培養のうえでフローサイトメトリーをもちいて T 細胞アポトーシスを評価した。

miR-148a-3p 過剰発現により、PD-L1 発現が低下し、T 細胞アポトーシスは抑制された。大腸癌において miR-148a-3p は、PD-L1 発現を制御することで、腫瘍微小環境における免疫応答を調整している可能性が示された。

考　察

大腸癌において、癌抑制的マイクロ RNA である miR-148a-3p は、癌細胞表面の免疫チェックポイント分子 PD-L1 発現を制御することで、腫瘍微小環境における免疫応答を調整していることが示された。本研究により、大腸癌、特に dMMR／MSI-H 腫瘍において、miR-148a-3p の発現低下が PD-L1 高発現さらに腫瘍微小環境の免疫抑制機構に関与していることが示され、癌免疫療法の新たなバイオマーカーや治療標的としての miR-148a-3p の可能性を示唆するものである。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご協力・ご指導をいただきました、福島県立医科大学消化管外科学講座の芦澤舞先生をはじめ、河野浩二教授、三村耕作先生、福島県立医科大学肝胆膵移植外科学講座の石亀輝英先生に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA et al: Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. Lancet Oncol 2017, 18(9):1182-1191. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30422-9
2) Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D et al: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med 2015, 372(26):2509-2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596
3) Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD: Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. Ann Oncol 2016, 27(3):409-416. DOI: 10.1093/annonc/mdv615
4) Rupaimoole R, Slack FJ: MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov 2017, 16(3):203-222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246
5) Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y, Araujo L, Carbone DP, Shilo K, Giri DK et al: PDL1 Regulation by p53 via miR-34. J Natl Cancer Inst 2016, 108(1). DOI: 10.1093/jnci/djv303
6) Noman MZ, Janji B, Abdou A, Hasmim M, Terry S, Tan TZ, Mami-Chouaib F, Thiery JP, Chouaib S: The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. Oncoimmunology 2017, 6(1):e1263412. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1263412
7) Ashizawa M, Okayama H, Ishigame T, Thar Min AK, Saito K, Ujiie D, Murakami Y, Kikuchi T, Nakayama Y, Noda M et al: miRNA-148a-3p Regulates Immunosuppression in DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer by Targeting PD-L1. Mol Cancer Res 2019. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0831