215　癌細胞に高発現するARF6によるPD-L1動態制御に関する研究	佐邊　壽孝

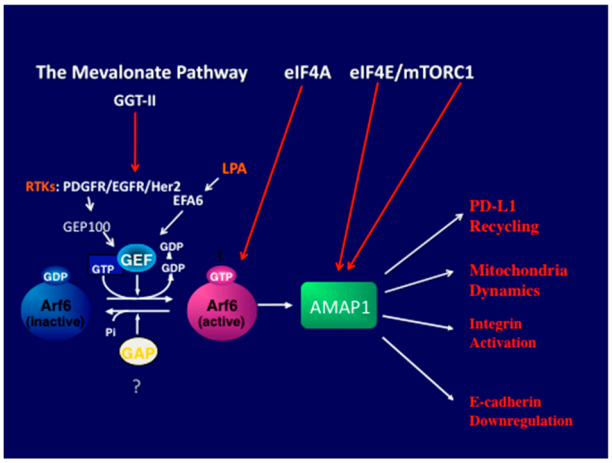
【目的】免疫チェックポイント阻害剤を用いた癌免疫療法が注目されている。これまで癌細胞における PD-L1 発現誘導に関しては相当な研究がある。一方、チェックポイント作動には、癌細胞、免疫細胞間の『免疫シナプス』形成が必要である。機能的シナプスは初期衝突部に存在する PD-1／PD-L1 間の結合だけで形成されるのでなく、接触部への PD-1／PD-L1 集積、形質膜や細胞骨格などの構造的リモデリングが必要である。免疫シナプス形成やその際の PD-1 動態に関してはある程度研究が進んでいるが、癌細胞における PD-L1 動態やその制御機構に関しては十分には解明されていない。また、免疫チェックポイント阻害剤の多くは、PD-1 や PD-L1 などに対する抗体であるが、このような抗体治療法の障害として細胞表面蛋白質に結合した抗体が、エンドサイトーシスされ分解されてしまうことも知られている。このような幾つかの観点から、癌細胞における PD-L1 動態制御の理解は、その発現制御と共に今後の癌免疫学発展における重要課題である。

私達はこれまでに癌の浸潤転移・治療抵抗性を駆動する低分子量 G 蛋白質 ARF6 とその下流シグナル因子 AMAP1 を軸とするシグナル経路を見出し、詳しく研究してきた。本経路はチロシンキナーゼ型増殖因子受容体や三両体 G 蛋白質受容体によって活性化され、癌細胞に対する増殖因子やリゾフォスファチジン酸などの様々な刺激と悪性度進展とをつなぐものである。ARF6 や AMAP1 を始めとする本経路構成因子群は、乳癌、腎癌（腎明細胞癌）、膵癌（膵管癌）、肺癌（肺腺癌、小細胞肺癌）、頭頸部癌、悪性黒色腫に認められ、それらの異常な高発現は患者悪性予後と高い統計的有意差を示す。本 ARF6 経路が浸潤転移や放射線・薬剤抵抗性を促進することは既に報告したが、最近、PD-L1 ダイナミックスも制御することを見出した。本研究はその分子詳細の解明を行い、ARF6 経路が駆動する癌免疫回避の分子実態を明らかにすることを目的とする。

【方法】ARF6 経路による PD-L1 ダイナミックス制御の分子的詳細を解析した。その為、まず ARF6、AMAP1 が癌細胞に異常高発現し活性化されることの分子機構を解析し、同定された因子群が PD-L1 ダイナミックスや免疫回避に関連するかを調べた。ヒト膵管癌細胞、マウス膵管癌モデル細胞、および、マウス個体実験を併用し、多角的多面的に解析した。

【結果】膵癌ドライバー変異である KRAS 癌遺伝子産物が ARF6 と AMAP1 の蛋白質異常発現の原因であり、一方、同じくドライバー変異である TP53 癌遺伝子産物が ARF6 の活性化促進因子であった。その際、蛋白質異常発現は mRNA 翻訳因子 eIF4A／4E の活性促進を介するものであり、ARF6 は膵癌危険因子として知られている血小板由来増殖因子（PDGF）の受容体によって活性化され、活性化にはメバロン酸経路、特に、geranylgeranyl transferase-Ⅱ（GGT-Ⅱ）が必須であった。これらはいずれも PD-L1 動態制御に関与した。動物実験も行い、本 ARF6-AMAP1 経路は癌免疫回避の根幹経路であることを明らかにした。

癌細胞に発現する PD-L1 の動態制御とその阻害における分子標的群



215. 癌細胞に高発現する ARF6 による PD-L1 動態制御に関する研究

佐邊　壽孝

*北海道大学 大学院医学研究科 生化学講座 分子生物学分野

Key words：ARF6，cancer immune evasion，mevalonate pathway，mRNA translation，PD-L1

緒　言

免疫チェックポイント阻害剤を用いた癌免疫療法が注目されている。癌細胞が PD-L1 など免疫チェックポイント因子を細胞表面に発現することが、免疫系による監視や排除を障害する。癌的 PD-L1 発現に関する研究は進んでおり、インターフェロン ガンマ等のサイトカイン刺激、高発現した MYC による転写促進、PD-L1 mRNA 構造異常などが報告されている。一方、免疫チェックポイントの作動には、癌細胞・免疫細胞間の『免疫シナプス』形成が必要である。その際、癌細胞と免疫細胞との初期衝突部に存在する PD-1／PD-L1 間の結合だけで機能的シナプスが形成されるのでなく、接触部への PD-1／PD-L1 集積を始め形質膜や細胞骨格を含めた構造的リモデリングが必要である。一般に、このような構造リモデリングや細胞表面蛋白質集積には細胞内輸送が深く関与する。シナプス形成に関し、これまで主に T 細胞受容体（TCR）に着目したシナプス形成機序が研究されてきた。免疫細胞側から見た免疫シナプス形成や PD-1 動態に関しても多くの研究があるが、癌細胞における PD-L1 動態やその制御機構に関しては未だ十分に解明されていない。免疫チェックポイント阻害剤の多くは、PD-1 や PD-L1 などに対する抗体である。一方、このような抗体治療法の障害として、細胞表面において標的蛋白質に結合した抗体が、積極的にエンドサイトーシスされ分解されることも知られている。このような幾つかの観点から、癌細胞における PD-L1 動態制御の理解は、その発現制御と共に今後の癌免疫学発展における重要課題である。

私達はこれまで細胞運動性や癌の浸潤転移、並びに、悪性度を駆動するシグナル伝達と創出ゲノム状態に関して研究してきた［1〜10］。その成果として、癌の浸潤転移・治療抵抗性を駆動する低分子量 G 蛋白質 ARF6 とその下流シグナル因子 AMAP1 を軸とするシグナル経路を発見した。本 ARF6 経路は一連のチロシンキナーゼ型増殖因子受容体（RTKs）や三両体 G 蛋白質受容体（GPCRs）によって活性化され、増殖因子やリゾフォスファチジン酸（LPA）などの様々な刺激と悪性度進展とをつなぐものである［5，7］。ARF6 や AMAP1 を始めとする本経路構成因子群は、乳癌、腎癌（腎明細胞癌）、膵癌（膵管癌）、肺癌（肺腺癌、小細胞肺癌）、頭頸部癌、悪性黒色腫に認められ、それらの異常な高発現は患者悪性予後と高い統計的有意差を示す［2，3，5，7］。また、本 ARF6 経路はインテグリンとカドヘリンの動態制御を担い細胞の浸潤転移を駆動することを見出していたが［6，8］、癌の放射線抵抗性や薬剤抵抗性にも深く関係すること、その際、本経路はミトコンドリアの順行輸送を促進するものであり、浸潤性癌細胞においてミトコンドリア由来酸化的障害を著しく低減すること、このことが放射線抵抗性や薬剤抵抗性に根本的であることを分子詳細と共に明らかにした［9］。

今回、さらに研究を進めた結果、本経路は癌免疫回避に根幹的であることを見出した。膵癌を主な研究対象とし、膵癌ドライバー変異が ARF6 と AMAP1 が異常高発現させ活性化を促進すること、膵癌危険因子である血小板由来増殖因子（PDGF）が ARF6 を活性化し浸潤、転移だけでなく PD-L1 動態も制御すること、その際、mRNA 翻訳やメバロン酸代謝活性の亢進が必須であることを明らかにした［10］。

*現在の所属：北海道大学 大学院医学研究院 生化学分野 分子生物学教室

方法および結果

1. ARF6-AMAP1 経路 は PD-L1 リサイクリングを促進する

ARF6-AMAP1 経路はインテグリンやカドヘリンなど細胞表面受容体の動態制御に関わる［6, 8］ことから、PD-L1 の動態にも関与するのはないかと仮説を立てた。調べた結果、培養された膵癌細胞 MIAPaCa-2 において、PD-L1 は主に細胞辺縁部のアクチンに富む形質膜構造に局在すること、一方、ARF6、もしくは AMAP1 を siRNA 法で発現阻害した細胞では、PD-L1 のそのような局在性は失われ、形質膜全体に分散することを見出した（図 1 左）。ARF6-AMAP1 経路はインテグリンの細胞内部から細胞表面へリサイクリングを促進する［6］。同様な解析を行った結果、本経路は PD-L1 のリサイクリングを促進すること（図 1 右）、このことが細胞表面での局在性に関係することを見出した。リサイクリングだけではなく、siRNA 法による ARF6 や AMAP1 の発現抑制は PD-L1 細胞表面量を有意に低下させた。一方、AMAP1 の結合相手の一つであり E-カドヘリン動態に関わる EPB41L5 はこのリサイクリングには関与しなかった（図 1、右）。一般に、蛋白質リサイクリングには RAB-GTPases が関与する。siRNA 法によるスクリーニングを行ない、関与する RAB も同定した［10］。現在、AMAP1 と PD-L1 を繋ぐ蛋白質同定を進めている。

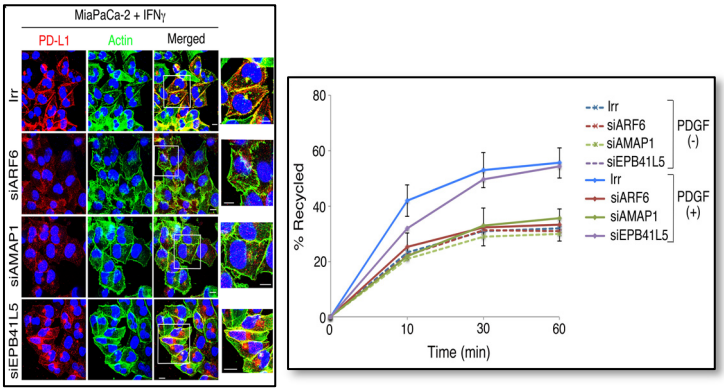


図 1. ARF6-AMAP1 経路による PD-L1 細胞表面動態制御

（左） ARF6、AMAP1、EPB41L5 に対する siRNA で処理した MIAPaCa-2 細胞、並びに、コントロール siRNA 処理細胞（Irr）の細胞表面 PD-L1 を抗 PD-L1 抗体染色した。アクチンは phalloidin で染色した。

（右） ここに示した siRNA で処理した MIAPaCa-2 細胞を用い PDGF を刺激因子とする PD-L1 リサイクリンを測定した。

2. TP53/KRAS 変異が ARF6-AMAP1 経路を高発現させ活性化する

上記の結果は、ARF6-AMAP1 経路 は、浸潤転移の亢進やミトコンドリア・ダイナミック促進による治療抵抗性付与だけでなく、癌免疫回避にも関連する可能性を示唆する。さらに研究を進める基盤として、次に、癌細胞における ARF6 と AMAP1 の高発現や活性化の基盤となる分子機構を解析した。膵管癌には 4 つの代表的遺伝子変異（*KRAS*、*TP53*、*CDKN2*、*SMAD4*）が存在する。その中で、KRAS 変異は mRNA 翻訳に関与する RNA helicase である eIF4A を活性化し ARF6 mRNA 翻訳を促進すること、また同時に、mRNA 翻訳に関与する Cap 結合蛋白質である eIF4E を活性化し AMAP1 mRNA 翻訳を促進することを見出し、各過程に関与する因子群の詳細も明らかにした（図 2）。一方、TP53 変異は PDGF 受容体を介する ARF6 活性化過程を促進した。以前に乳癌細胞を用い、TP53 変異によるメバロン酸経路活性化は geranylgerany-transferase Ⅱ（GGT-Ⅱ）を介して RAB11b のプレニル化を促進すること、そのことにより、RAB11b による ARF6 の形質膜輸送が促進されること、従って、メバロン酸経路活性、GGT-Ⅱ、RAB11b が ARF6 活性に必須であることを明らかにしている［8］。同様のことは膵管癌にも当てはまった（図 2）。乳癌の場合、上皮性増殖因子（EGF）がその受容体（EGFR）を介して ARF6 を活性化した。膵管癌の場合、PDGF がその受容体（PDGFR）を介し ARF6 を活性することを明らかにした（図 2）。以上のことは、MIAPaCa-2 などヒト膵管癌細胞だけでなく、膵管癌マウスモデル細胞 KPC でも解析し、一般性を十分に検証している［10］。

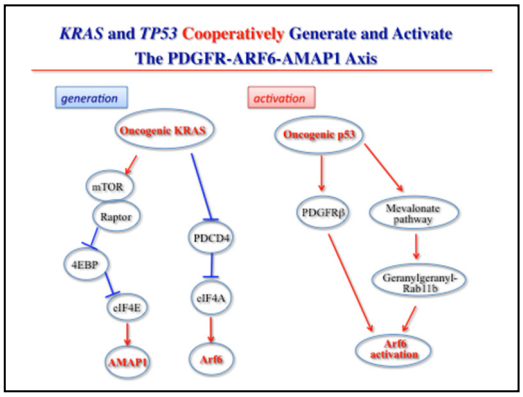


図 2. ARF6-AMAP1 経路は KRAS/TP53 遺伝子変異の標的である

KRAS は eIF4A／4E 依存的 mRNA 翻訳活性を促進し、ARF6 と AMAP1 の蛋白質発現亢進に寄与する。TP53 はメバロン酸経路酵素群と PDGFR の遺伝子発現を亢進し、PDGF による ARF6 活性化の原因となる。

3. TP53／KRAS 変異、メバロン酸経路、mTOR、eIF4A／4E は全て PD-L1 動態制御に関与する

上までの研究の結果、ARF6 経路の成り立ちと活性化に、TP53 と KRAS の変異、メバロン酸代謝経路、並びに、eIF4A／4E を軸とする mRNA 翻訳機構が関わることが明らかになった。次に、上記と同じように形質膜上での PD-L1 局在性に関する解析を行い、これら各々に対する薬剤や siRNA による阻害が PD-L1 動態を抑制できることを明らかにした［10］。

4. ARF6-AMAP1 経路は癌免疫回避に根幹的である

最後に動物モデル実験を行った。KPC マウスは TP53 と KRAS に変異を持ち、ヒト膵管癌に対する代表的動物モデルである。まず、KPC 細胞は ARF6 経路因子群を高発現し、浸潤転移に用いることを明らかにした。続いて、KPC 細胞、並びに、AMAP1 発現を shRNA 法で抑制した KPC 細胞を用い、それぞれの *in vitro* における増殖、同型野生型マウス、並びに、nude mice に移植した際の腫瘍形成能を測定した。その結果、AMAP1 抑制は *in vitro* 増殖や nude mouse での腫瘍形成能には影響しないが、同型野生マウスにおける腫瘍増殖を著しく阻害した（図 3）。このことは、AMAP1 が癌免疫回避に根幹的であることを証拠立てるものである［10］。なお、shRNA による ARF6 長期阻害は用いた膵癌細胞の生存性に有意に悪影響を及ぼしたため、今回の解析には供しなかった。

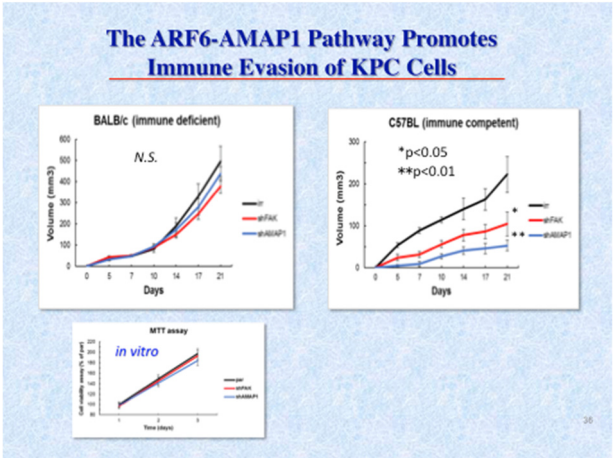


図 3. ARF6-AMAP1 経路は癌免疫回避を駆動する

AMAP1 を shRNA 法にて発現抑制した KPC 細胞とコントロール shRNA で処理した KPC 細胞を用い、*in vitro* による増殖（下）、ヌードマウスにおける腫瘍形成能（上左）、同型野生型マウスにおける腫瘍形成能（上右）を測定した。

考　察

私共は、様々な癌細胞に高頻度で異常高発現し、悪性度を駆動するARF6-AMAP1経路を見出している。膵管癌では主なドライバー変異を4つに絞り込むことができ、そのゲノム像は他の癌種に比べ比較的明確である。本研究では膵癌を対象として、ドライバー変異と本ARF6経路の成り立ちの関連性を調べた。その結果、KRAS癌遺伝子産物がeIF4A／4E依存的mRNA翻訳活性を促進しARF6とAMAP1の蛋白質発現亢進の原因となること、一方、TP53癌遺伝子産物がメバロン酸経路活性を促進しARF6の活性化を促進すること、その際、活性化因子は膵癌危険因子PDGFであることを明らかにした。これらの結果は、膵癌におけるKRAS／TP53ドライバー変異の主標的はARF6-AMAP1経路であることを示している。膵癌は初期診断において、既に局所浸潤や転移が進行して場合が多い。KRAS変異とTP53変異とが相まって膵癌転移を引き起こすことは動物実験で示されていたが、今回の結果は、その分子実態を明らかにしたものと評価される。さらに、本ARF6経路はPD-L1動態制御にも関与することを見出し、動物実験によって本経路が癌免疫回避に根幹的であることを証拠立てた。KRAS／TP53変異、並びに、eIF4A／4E依存的mRNA翻訳やメバロン酸経路がPD-L1動態に関与することも明らかにした。PD-L1動態制御そのものが癌免疫回避に根幹的であるのか、ARF6経路阻害によるPD-L1動態低下はどの程度免疫シナプス機能に影響を及ぼすのか、免疫回避にはARF6-AMAP1経路が駆動する他の事象も関与するのかに関して、現在、解析を進めている。

ここ数年の研究から、癌的遺伝子変異の主な標的は代謝リプログラムであることが明確になった。一方、プラチナ製剤のような抗がん剤であっても十分な治療効果を発揮する為には免疫が欠かせないことも示されている。ゲノム医学・医療が進む中、ゲノム変異の結果として実際に悪性度を駆動する分子装置の実態は、多くの場合、殆ど解明されていない。このような分子装置やシグナル経路の同定なくして、有効な創薬、並びに、precision medicineに必要なバイオマーカーの同定は困難である。私達の研究成果は、膵癌ドライバー変異の主標的がARF6-AMAP1経路であること、その際、ドライバー変異はeIF4A／4E、mTORC1、メバロン酸経路を直接の標的とすることを明らかにした。従って、KRAS／TP53変異を有する膵管癌において、mRNA翻訳と脂質代謝の亢進が癌悪性度進展の根幹であると捉えることができる。eIF4A／4E、mTORC1、メバロン酸経路のいずれの活性化には、細胞内ATP（i.e.、ATP／AMP比）やacetyl-CoAの産生上昇が必須である。従って、これらの知見は、膵癌の発癌や悪性度進展の臨床像をよく説明し、その分子的・栄養学的基盤を提示する。今回得られた知見は、今後の癌研究、特に、癌免疫研究とその治療応用に大きく寄与するものと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院生化学分野分子生物学研究室の橋本あり、橋本茂（現所属：大阪大学免疫学フロンティア研究センター）、同医学研究院外科学研究室の平野聡、古川聖太郎、蔦保暁生、旭川医大の水上裕輔, 京都大学の児玉裕三（現所属：神戸大学大学院医学研究科）、西川義浩である。

文　献

1） Sabe H*. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. J Biochem. 2003 Oct;134(4):485-9. PMID: 14607973

2） Hashimoto S, et al., and Sabe H*. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 27;101(17):6647-52. Epub 2004 Apr 15. PMID: 15087504 PMCID: PMC404099 DOI: 10.1073/pnas.0401753101

3） Onodera Y, et al., and Sabe H*. Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. EMBO J. 2005 Mar 9;24(5):963-73. Epub 2005 Feb 17. PMID: 15719014 PMCID: PMC554134 DOI: 10.1038/sj.emboj.7600588

4) Mazaki Y, et al., and Sabe H*. Neutrophil direction sensing and superoxide production linked by the GTPase-activating protein GIT2. Nat Immunol. 2006 Jul;7(7):724-31. Epub 2006 May 21. PMID: 16715100 DOI: 10.1038/ni1349

5) Morishige M, et al., and Sabe H*. GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. Nat Cell Biol. 2008 Jan;10(1):85-92. Epub 2007 Dec 16. PMID: 18084281 DOI: 10.1038/ncb1672

6) Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Norman JC, Shirato H, Hashimoto S, Sabe H*. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. J Cell Biol. 2012 Jun 25;197(7):983-96. PMID: 22734003 PMCID: PMC3384417 DOI: 10.1083/jcb.201201065

7) Hashimoto S, et al., and Sabe H*. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. Nat Commun. 2016 Feb 8;7:10656. PMID: 26854204 PMCID: PMC4748122 DOI: 10.1038/ncomms10656

8) Hashimoto A, at al., and Sabe H*. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. J Cell Biol. 2016 Apr 11;213(1):81-95. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27044891 PMCID: PMC4828690 DOI: 10.1083/jcb.201510002

9) Onodera Y*, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H*. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. Nat Commun. 2018 Jul 11;9(1):2682. PMID: 29992963 PMCID: PMC6041267 DOI: 10.1038/s41467-018-05087-7

10) Hashimoto S, Furukawa S, Hashimoto A, Tsutaho A, Fukao A, Sakamura Y, Parajuli G, Onodera Y, Otsuka Y, Handa H, Oikawa T, Hata S, Nishikawa Y, Mizukami Y, Kodama Y, Murakami M, Fujiwara T, Hirano S, Sabe H*. ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Aug 27;116(35):17450-17459. PMID: 31399545 PMCID: PMC6717289 DOI: 10.1073/pnas.1901765116

*corresponding author