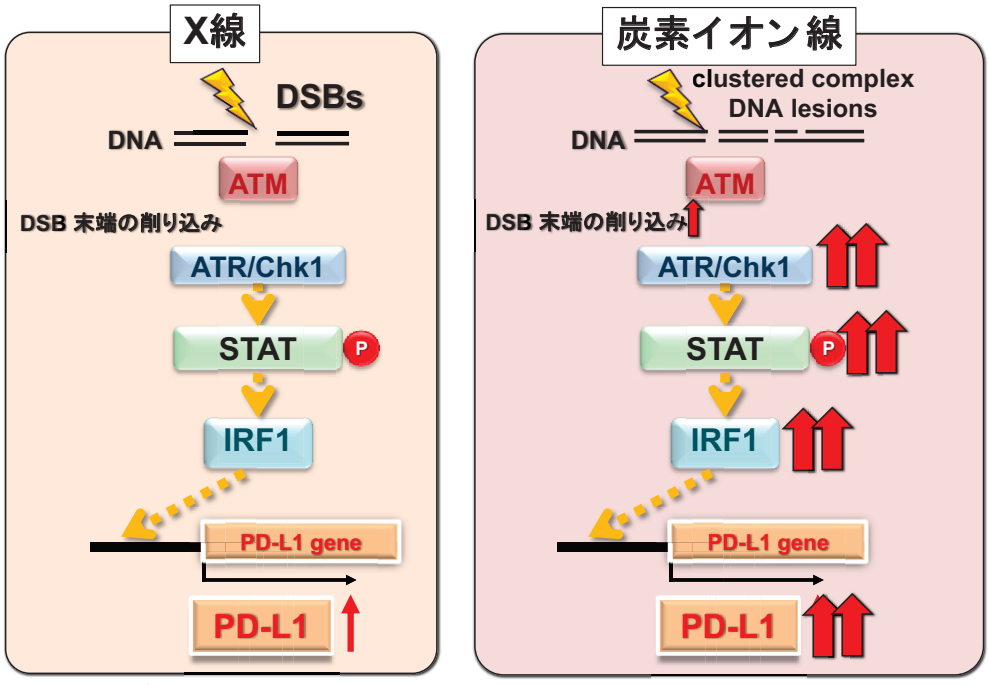
137　がん免疫応答を制御するDNA修復応答の解明	佐藤　浩央

【目的】免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1／PD-L1 抗体治療は、新たながん治療の柱として世界的に大きな注目を集めている。しかし抗 PD-1／PD-L1 抗体単独では、高い有効性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、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。さらに複数の臨床試験から、抗 PD-1／PD-L1 抗体は、PD-L1 発現率が高い腫瘍に対し特に有効であることが報告されている。これまでの研究から、放射線治療が腫瘍細胞の PD-L1 発現を誘導することが明らかにされてきた。一方で、その詳細な分子機構の解明は不十分であった。我々はこれまでに、放射線（X 線）照射を受けたがん細胞における DNA 二本鎖切断（double-strand break：DSB）後の DNA 修復シグナル応答に着目し、DNA 損傷依存的な PD-L1 発現制御機構を報告した。そこで本研究では、X 線に加え、重粒子線照射による DNA 損傷応答に着目し、重粒子線照射後に誘発されるがん細胞膜表面上の PD-L1 発現調節機構の解明を目指した。

【方法】ヒト腫瘍細胞株である U2OS、MCF-7、HCT116 を用いて、炭素イオン線照射後の PD-L1 発現を解析した。炭素イオン線照射は、群馬大学重粒子線医学研究センターにて行った。PD-L1 発現における DNA 損傷シグナル（ATR、Chk1）の関与に着目し、それぞれの阻害剤を、炭素イオン線および X 線照射の 30 分前に投与した。PD-L1 発現レベルは Western blot、Flow cytometry、リアルタイム PCR にて解析した。

【結果】本研究の結果から、炭素イオン線照射後に PD-L1 発現が誘導されることが明らかになった。またこの PD-L1 発現は、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を解明した。炭素イオン線照射では X 線よりも複雑な DNA 損傷が誘導されるため、同経路は強く活性化され、それによって、X 線よりも高度に PD-L1 発現が誘導されると考えられた。

炭素イオン線照射後の PD-L1 発現制御経路モデル



H Sato, et al. Nat commun. 2017

137. がん免疫応答を制御するDNA修復応答の解明

佐藤　浩央

群馬大学 重粒子線医学研究センター 医学生物学部門

Key words：腫瘍免疫，放射線治療，重粒子線治療，PD-L1，DNA損傷シグナル

緒　言

免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1／PD-L1抗体は、新たながん治療の柱として大きな注目を集めている。しかし抗PD-1／PD-L1抗体単独では、高い有効性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、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、現在世界中で数多くの臨床試験が進行中である。その背景として、これまでに、放射線治療が抗腫瘍免疫を活性化すること、腫瘍細胞のPD-L1発現を誘導すること、さらに腫瘍移植マウスにおいて放射線治療と抗PD-1／PD-L1抗体の併用が、それぞれの単独治療と比較し高い治療効果を発揮することなどが明らかになっている［1，2］。また複数の臨床試験から、抗PD-1／PD-L1抗体は、PD-L1発現率が高い腫瘍に対して特に有効であると考えられている［3］。以上から、抗PD-1／PD-L1抗体と放射線治療の併用療法を最適化する上で、放射線治療によるPD-L1発現制御機構の解明は重要な課題である。

多くの前臨床モデルの研究により、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、その分子機構の解明は不十分であった。我々はこれまでに、放射線（X線）照射を受けたがん細胞におけるDNA二本鎖切断（double-strand break：DSB）後のDNA修復シグナル応答に着目し、DNA損傷依存的なPD-L1発現制御メカニズムを報告した［4］。そこで本研究では、近年の保険適用の拡大など、徐々に臨床における重要性を増している重粒子線照射に着目し、重粒子線照射後のDNA損傷に誘発されるがん細胞膜表面上のPD-L1発現調節機構の解明を目指した。本研究の達成は、重粒子線治療後の腫瘍において抗PD-1／PD-L1抗体治療がどのように効果を発揮するかを理解することに繋がり、ひいては治療前効果予測の発展や重粒子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がん治療戦略の提案にも貢献できると考えている。

方　法

1.　重粒子線（炭素イオン線）照射によるPD-L1発現制御機構の解明

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。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。対照群のX線照射は100 kVp、20 mA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。PD-L1発現におけるDNA損傷シグナルの関与を明らかにするため、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。PD-L1発現量はWestern blot、Flow cytometry、リアルタイムPCRにて解析した。

さらに、超高解像度顕微鏡を用いて、炭素イオン線照射後のPD-L1発現の三次元的分布を解析した。

結　果

1. 炭素イオン線照射による PD-L1 発現誘導

炭素イオン線照射により、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 PD-L1 発現が誘導された（図 1）。この PD-L1 発現誘導レベルは、同線量の X 線と比較すると有意に高かった。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 に依存して亢進した。さらに超高解像度顕微鏡による細胞膜表面の PD-L1 発現の三次元的分布の解析では、PD-L1 スポット数は、X 線照射後と比較し炭素イオン線照射後で有意に上昇していた（図 2）。一方で、PD-L1 スポットの体積には、両者において有意差を認めなかった。

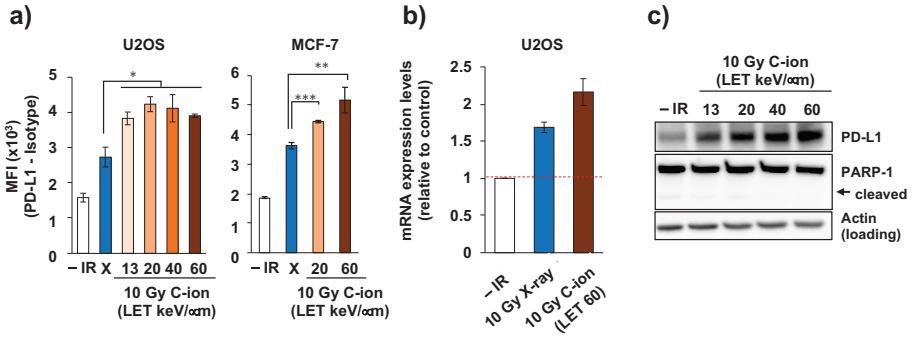


図 1. 炭素イオン線照射により PD-L1 発現が誘導される

ヒト腫瘍細胞株対する炭素イオン線照射は、同じ線量の X 線と比較し、より高度に PD-L1 発現を誘導した。いずれの解析も、炭素イオン線照射から 48 時間後に行なった。

a）Flow cytometry の結果。

b）リアルタイム PCR の結果。

c）Western blot の結果。

統計検定は、Graphpad Prism 7.0 により t-test を用いて行った（*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001）。MFI：median fluorescence intensity（MFI：PD-L1 – isotype）。

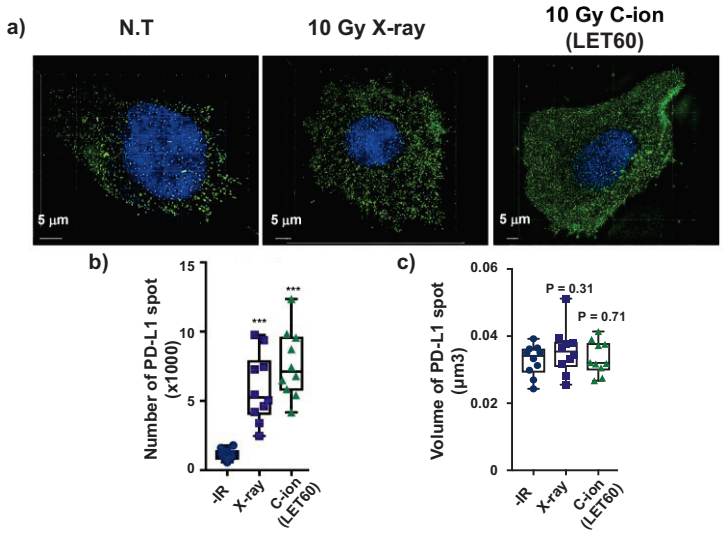


図 2. 放射線照射により誘導される PD-L1 の空間的分布

a）超高解像度顕微鏡で撮影した代表的画像。

b）炭素イオン線照射後は、X 線照射後よりも有意に PD-L1 スポット数が高かった。

c）PD-L1 スポットあたりの体積は、炭素イオン線照射でも X 線照射でも有意差がなかった。

統計検定は、Graphpad Prism 7.0 により t-test を用いて行った（*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001）。

2. DNA 損傷シグナルによる、炭素イオン線照射後の PD-L1 発現制御

先行研究にて X 線照射後の PD-L1 発現誘導への関与が明らかになっていた、DNA 損傷シグナルに着目した。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）。Chk1 の上流にあたる ATR 阻害剤を加えても、同様に炭素イオン線照射後の PD-L1 発現誘導は抑制された。

さらに、DNA 損傷シグナルの下流の PD-L1 発現制御機構として、従来 PD-L1 発現誘導経路として知られている、STAT-IRF1 経路の関与も解析した。その結果、炭素イオン線照射後には STAT1/3 のリン酸化亢進、および IRF1 発現の亢進を認めた（図 4）。

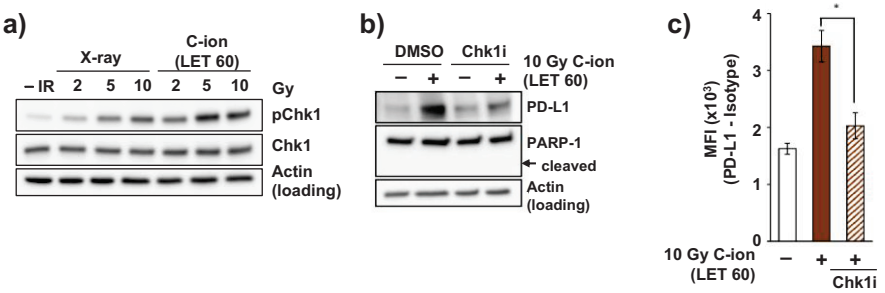


図 3. 炭素イオン線照射後の PD-L1 発現誘導は DNA 損傷シグナルにより制御される

a）同じ線量での比較では、炭素イオン線照射後の方が有意に Chk1 リン酸化の誘導を認めた。

b, c）Chk1 阻害剤により炭素イオン線照射後の PD-L1 発現誘導が抑制された。

統計検定は、Graphpad Prism 7.0 により t-test を用いて行った（*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001）。

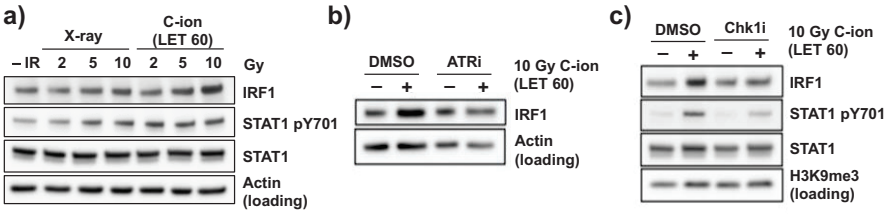


図 4. 炭素イオン線照射後の PD-L1 発現誘導は STAT-IRF1 経路を介する

a） 同じ線量での比較では、炭素イオン線照射後の方が有意に IRF1 発現および STAT1 リン酸化の誘導を認めた。

b, c） ATR、Chk1 阻害剤により炭素イオン線照射後の IRF1 発現が抑制された。

考　察

本研究の結果から、炭素イオン線照射による PD-L1 発現誘導は、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。しかし炭素イオン線照射後の方が PD-L1 発現レベルは有意に高かった。その理由としては、同じ経路ではあるが、炭素イオン線照射では X 線よりも複雑な DNA 損傷が誘導されるため、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 発現制御系に変異を持つがん患者では、重粒子線治療と抗 PD-1／PD-L1 抗体の併用治療がより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、新たながん治療戦略の妥当性を支持するものである。

共同研究者・謝辞

本研究は、群馬大学未来先端研究機構の柴田淳史講師との共同研究によって行われた。

文　献

1） Liufu Deng, Hua Liang, Byron Burnette, Michael Beckett, Thomas Darga, Ralph R Weichselbaum, Yang-Xin Fu. Irradiation and anti-PD-L1 Treatment Synergistically Promote Antitumor Immunity in Mice. J Clin Invest. 2014 Feb;124(2):687-95. PMID: 24382348 doi: 10.1172/JCI67313. Epub 2014 Jan 2.

2） Simon J Dovedi, Amy L Adlard, Grazyna Lipowska-Bhalla, Conor McKenna, Sherrie Jones, Eleanor J Cheadle, Ian J Stratford, Edmund Poon, Michelle Morrow, Ross Stewart, Hazel Jones, Robert W Wilkinson, Jamie Honeychurch, Tim M Illidge. Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. Cancer Res. 2014 Oct 1;74(19):5458-68. PMID: 25274032 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1258.

3） Suzanne L Topalian, Janis M Taube, Robert A Anders, Drew M Pardoll. Mechanism-driven Biomarkers to Guide Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. Nat Rev Cancer. 2016 May;16(5):275-87. PMID: 27079802 doi: 10.1038/nrc.2016.36.

4） Hiro Sato, Atsuko Niimi, Takaaki Yasuhara, Tiara Bunga Mayang Permata, Yoshihiko Hagiwara, Mayu Isono , Endang Nuryadi, Ryota Sekine, Takahiro Oike, Sangeeta Kakoti, Yuya Yoshimoto, Kathryn D Held, Yoshiyuki Suzuki, Koji Kono, Kiyoshi Miyagawa, Takashi Nakano, Atsushi Shibata. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Regulates PD-L1 Expression in Cancer Cells. Nat Commun. 2017 Nov 24;8(1):1751. PMID: 29170499 doi: 10.1038/s41467-017-01883-9.