

令和5年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	網羅的スクリーニングによる PD-L1 制御因子の同定とその機能解析	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部 生化学教室 岡田 斉 共同研究者：河津正人（千葉県がんセンター）	

1. 研究目的・内容

免疫チェックポイント阻害薬は、現在、非常に有効ながん治療法の一つとなっている。しかしながら、臨床的に、その治療効果は限定的であり (Topalian et al., *Cancer Cell*, 2015)、様々な要因によりネガティブな影響を受けることが報告されている (Chen and Mellman, *Immunity*, 2013)。従って、がん免疫療法を、より汎用性の高い治療法として発展させるためには、腫瘍免疫反応をより効果的に誘導する手法を開発することが必須である。これまでの様々な併用療法の研究から、腫瘍免疫の活性化には IFN γ シグナルの増強が非常に重要であることが明らかとなっている (Minn AJ and Wherry EJ, *Cell*, 2016)。IFN γ は免疫系を賦活化する一方、腫瘍細胞膜表面の PD-L1 の発現を誘導する事で、腫瘍免疫を抑制性にも制御する。従って、IFN γ シグナルの増強と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用療法により、腫瘍免疫がより活性化される事が期待される。しかしながら、IFN γ で処理しても腫瘍細胞膜表面の PD-L1 の発現が十分に誘導されない、あるいは糖鎖付加により PD-L1 が抗 PD-L1 抗体により認識されなくなるなどの理由から、IFN γ シグナルの活性化と抗 PD-1/ PD-L1 抗体の併用療法が、必ずしも期待される腫瘍免疫増強効果を誘導しない場合もある。本研究では、Crispr-Cas9 sgRNA ライブラリー (Wang T et al., *Science* 2015) を使用した網羅的スクリーニング法を用いて、IFN γ シグナルの増強と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用療法の効果を高めるための新規標的分子を同定し、医学分野への応用を目的とした基盤研究を行う。

2. 研究経過及び成果

【研究経過】

1. ヒト単球由来における IFN γ -PD-L1 シグナル経路の網羅的スクリーニング

昨年度、パイロットスタディーを行い樹立した網羅的ヒト全ゲノム gRNA ライブラリーの調整条件、導入条件に基づき、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞に gRNA ライブラリーを 2 つのプール（プール A、プール B）に分けて導入し、それぞれのプールを恒常的に発現している細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、昨年度に樹立した実験条件に基づき、IFN γ 処理後に THP-1 細胞表面に発現誘導される PD-L1 を指標として、IFN γ -PD-L1 シグナル経路を制御する遺伝子の網羅的探索を行った。探索の結果、その不活性化により IFN γ シグナル- PD-L1 経路を抑制する因子として PD-L1、STAT1 などが同定された。一方、不活性化により IFN γ シグナル- PD-L1 経路を促進する遺伝子としては、STAT の抑制因子である SOCS1、IFN γ シグナルの抑制遺伝子である IRF2 などが同定された。また、大変興味深いことに、PD-L1 の発現を負に制御する遺伝子として、糖化に関わる酵素が同定された。PD-L1 抗体による PD-L1 の検出効率には PD-L1 の糖化が抑制的に機能し、実際に抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果にも影響を与えたとの報告が為されており、スクリーニングで同定された糖化酵素の活性制御が、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果制御に影響を与える可能性が示唆された。

2. 個別の標的に対する確認実験

スクリーニングで得られた標的遺伝子に対する個別の gRNA を導入した THP-1 細胞を作成し、これらの細胞に対して、IFN γ -PD-L1 シグナルが影響を受けることを確認した。今後、重要な遺伝子に関して更なる追加確認実験を行う予定である。特に、これまで IFN γ シグナル- PD-L1 経路との強い関連が報告されていない新規の遺伝子（エピジェネティクス制御、転写制御、糖鎖修飾制御などの機能を有する遺伝子）に着目して確認を行う。また、機能に特化したサブライブラリーによるスクリーニングを計画している。更に、標的候補遺伝子に対する gRNA あるいは shRNA を、複数の異なるがん種のマウス細胞に導入し、スクリーニングで同定された PD-L1 発現制御遺伝子の機能がヒト、マウス間で保存されていることを確認する。

3. マウスがん細胞株の樹立とその解析

THP-1 細胞スクリーニングでスコアの高い上位の遺伝子を選択し、マウス gRNA を個別に設計した。ゲノム編集効率の高い gRNA 配列を選択する目的で、複数の gRNA をデザインし、それぞれの gRNA オリゴヌクレオチドを Cas9, U6 プロモーター、薬剤選択マーカーを持つレンチウイルスベクターに組み込み、レンチウイルスを作成した。これらの gRNA 導入実験に先立ち、GFP を発現するレンチウイルスベクターを用いてレンチウイルス粒子を作成し、マウス癌細胞に導入し、導入実験条件を確立した。既知の制御因子である、SOCS1、IRF2 についてはマウス癌細胞でも表現系が再現された。今後、スクリーニングで同定された他の遺伝子に対する個別の gRNA をマウスがん細胞に導入後、標的候補遺伝子を不活化したマウス腫瘍を用いたシンジェニックマウスモデルを作成し、IFN γ シグナル- PD-L1 経路の制御を個体レベルで確認し、さらに、既存の免疫チェックポイント阻害薬との機能的協調関係についても確認することを予定している。

【研究成果】

本研究計画で樹立した網羅的ヒト全ゲノム gRNA ライブラリーとそのスクリーニング手法を応用した研究に関して、第 96 回 日本生化学大会（10 月 31 日～11 月 2 日、福岡国際会議場）において次の 3 つの研究発表を行なった。① THP-1 細胞を用いた IFN γ シグナルによる PD-L1 の発現誘導制御因子の網羅的スクリーニング、② 骨髄系腫瘍の腫瘍抑制因子の網羅的スクリーニングによる同定とその解析、③ 膵がんの薬剤反応性制御因子に対する網羅的スクリーニングで得られた標的に関する研究（昨年度論文発表済み）の継続研究で、薬剤耐性膵癌の新規治療標的の開発について。③の、膵がんの薬剤抵抗性を克服する新規標的探索に関する研究成果は、トップ 10% ジャーナルである Cell Death & Disease に掲載された。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後の研究計画

- ① 樹立済みの SOCS1、IRF2 に加えて、他の標的遺伝子に対するマウスカウンターパートに対する gRNA を導入したマウスがん細胞を用いて、実際に IFN γ シグナルによる PD-L1 の発現誘導について解析を行う。
- ② ①で樹立したマウスがん細胞を用いてマウス癌移植モデルを作成し、コントロールのがん細胞と比較した癌増殖の違いを検討する。
- ③ ②で得られた基礎データに基づき、抗 PD-L1 抗体の投与時期および腫瘍採取時期を設定し、個体レベルでの免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性を検討し、IFN γ -PD-L1 シグナルを制御することで、免疫チェックポイント阻害薬の抗主要効果を制御可能であるか個体レベルでの検討を行う。
- ④ CD8 T 細胞に対する新規反応性制御因子に対するスクリーニングを行う。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Cell Death and Disease	論文	2024年2月12日
第70回日本生化学大会	ポスター発表	2023年10月31日
第70回日本生化学大会	ポスター発表	2023年10月31日
第70回日本生化学大会	ポスター発表	2023年11月1日