

免疫チェックポイント分子の 中皮腫細胞増殖への関与と作用機序の解明

愛知県がんセンター研究所
分子腫瘍学分野 リサーチレジデント 井田 梨沙

1. 研究の背景・目的

中皮腫は、アスベスト吸入を主な原因とする極めて難治性の腫瘍であり、曝露から約30年の潜伏期を経て発症することから、すでに輸入や使用が禁止されている先進諸国においても、患者が増大し続けている。中皮腫では、活性型のドライバー遺伝子変異が極めて少なく、既存のキナーゼ阻害剤などの分子標的薬がほとんど奏効しないため、現在でもシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が標準となっている。近年、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の有効性が報告され奏効率は大きく改善されたが、奏効率は20-30%と限定的である。PD-L1は中皮腫における発現量が少ないことが知られており、PD-L1標的抗体の効果が限定されている可能性が考えられる。

VISTA（V-domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation）は、PD-L1と同じB7ファミリーに属する膜タンパク質で、細胞外の構造はPD-L1と高い相同性を持つ。The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースを用いた解析では、種々の悪性腫瘍の中でも中皮腫細胞においてVISTAが最も高発現を示していることが明らかになってきた（文献1）。さらに、多くの腫瘍組織におけるVISTAの発現は、腫瘍細胞自体ではなく免疫細胞での発現によるものであったが、中皮腫では腫瘍細胞自体に発現していることが明らかになっている（文献2）。しかし、腫瘍細胞に発現するVISTAの細胞内機能や役割についてはほとんど報告がなく未解明である。申請者らが中皮腫細胞においてVISTA発現を抑制したところ、予想外に細胞の増殖が抑制された。そこで本研究では、VISTAの中皮腫細胞における機能について明らかにし、中皮腫治療標的として有用であるかどうかを明らかにすることを目指した。

2. 方法

培養細胞株

VISTA 発現が高い中皮腫細胞として Y-MESO-27, Y-MESO-28, NCI-H2052, ACC-MESO-1 細胞株を、発現が低い細胞として Y-MESO-14, NCI-H2373 細胞株を使用し、コントロールとして正常不死化中皮細胞 MeT-5A 株を用いた。VISTA 遺伝子の発現抑制のため、shRNA を pLKO.1-puro ベクターにクローニングし、中皮腫細胞株に導入した。さらに、Y-MESO-27, NCI-H2052, MeT-5A を用いドキシサイクリン誘導性 shRNA 発現細胞株を作製した。また、Y-MESO-14, NCI-H2373 細胞株を用いて、N 末端側に GFP タグを付加した VISTA の過剰発現を誘導する細胞株を作製した。

マウス異種移植実験

Y-MESO-27 細胞に Tet-ON shVISTA を導入した細胞株を培養し、 6×10^6 細胞を BALB/c nu/nu マウスの皮下に移植した。腫瘍の大きさが均等になるようにドキシサイクリン投与群と非投与群とに分け、週 1 回の腫瘍径測定を継続した。

増殖抑制効果の評価

培養細胞の増殖は、IncuCyte S3 生細胞イメージング解析システムを用いて経時的な変化を解析した。

シグナル解析

VISTA の下流で増殖に関与するシグナルを評価するため、ノックダウン細胞および過剰発現を誘導した細胞の抽出液を用いて、ウエスタンブロットにより解析をおこなった。AKT 阻害剤は MK-2206 を使用し、細胞播種から 24 時間後に 1, 5, 7.5, 10 μ M の各濃度で添加し、24 時間後の細胞生存を IncuCyte S3 生細胞イメージング解析システムで解析した。

3. 結果

VISTA の中皮腫細胞増殖への関与を評価するため、VISTA 発現の高い細胞に shVISTA

を導入し細胞生存率を解析したところ、Y-MESO-27, ACC-MESO-1, NCI-H2052 細胞株において、コントロール shRNA と比較して細胞増殖が顕著に抑制された。Tet-ON shVISTA を導入した Y-MESO-27 および NCI-H2052 細胞株においても、ドキシサイクリン添加時に有意に増殖が阻害された。一方で、正常不死化中皮細胞 Met-5A 細胞株においては、ドキシサイクリン添加後も増殖能への影響はみとめられな

かった。さらに、Y-MESO-27 Tet-ON shVISTA 細胞株を用いて、colony formation assay および spheroid colony assay をおこない、ドキシサイクリン添加時に細胞増殖が阻害されることを確認した。そこで、Y-MESO-27 Tet-ON shVISTA 細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、ドキシサイクリン投与群では腫瘍増殖が有意に抑制されることが示された(図1)。腫瘍摘出後に測定した腫瘍重量の比較からも同様の結果が得られた。また、Ki-67 免疫染色においては、Dox (-)群では陽性細胞が多数観察されたのに対し、Dox (+) 群では陽性細胞はほとんど認められなかった。VISTA を過剰発現させた細胞株 (Y-MESO-14 および NCI-H2373 細胞株) において増殖能への影響を検証した。コントロールベクター導入細胞と比較して、VISTA 導入細胞では有意に細胞増殖が亢進した。

関連するシグナル経路を解明するため、ウェスタンブロット法により生存・増殖関連タンパク質のシグナルを評価したところ、AKT の活性化を示す S473 のリン酸化が、VISTA ノックダウンが誘導された Y-MESO-27 細胞では抑制され、VISTA 発現が誘導された Y-MESO-14 細胞では促進されていた(図 2a, 2b)。また、Y-MESO-27 細胞株は、AKT

阻害剤の添加により細胞増殖が顕著に抑制されたことから、生存・増殖の一部を AKT シグナル経路に依存していると考えられた。現在、詳細なメカニズムの解明を目指して遺伝子発現解析を進めている。ノックダウン細胞および過剰発現細胞から RNA を回収し、次世代シーケンスにより RNA 配列を同定した。現在これらの解析を行っており、VISTA に強く関連する遺伝子群の抽出とその機能解析を行う予定である。

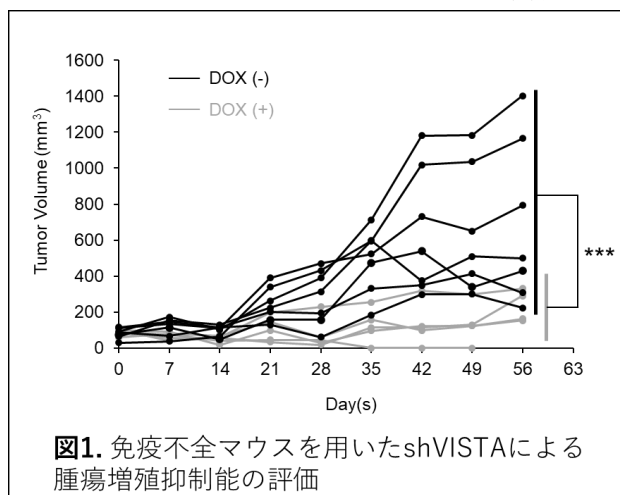


図1. 免疫不全マウスを用いたshVISTAによる腫瘍増殖抑制能の評価

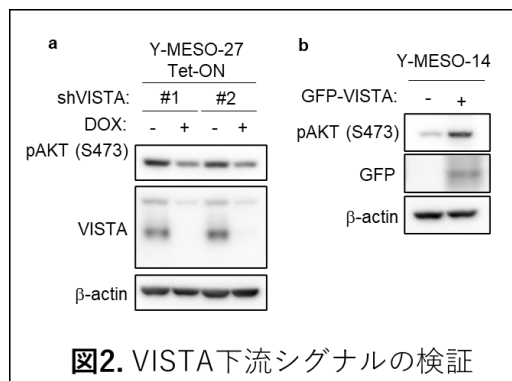


図2. VISTA下流シグナルの検証

4. 考察

本研究では、中皮腫で高発現している免疫チェックポイント分子 VISTA のノックダウンが細胞増殖を抑制することから、VISTA の増殖への関与を検証し、メカニズムの一端を解明することを目指した。中皮腫細胞株を用いた複数の方法で VISTA ノックダウンにより中皮腫細胞の増殖が抑制されることを確認し、ヌードマウスへの異種移植実験においても同様に shVISTA による腫瘍増殖抑制効果を確認した。過剰発現系を用いた実験でも、VISTA タンパク質の中皮腫細胞の生存・増殖への関与を示唆する結果を得た。一方で正常不死化中皮細胞においては VISTA ノックダウンによる影響がみとめられないことから、VISTA は腫瘍細胞特異的に細胞増殖に関与している可能性が考えられ、治療標的として有効であることが期待される。今後、腫瘍抑制効果の高い VISTA 標的治療薬開発につなげることを目指し、VISTA による細胞生存・増殖制御に関与する分子機構について詳細に明らかにする計画である。

5. 文献

1. Hmeljak J., Sekido Y., Ladanyi M. et al., Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov.*, 8(12):1548-1565, 2018
2. Muller S, Victoria LW, Sauter JL. et al., V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation (VISTA), a potentially targetable immune checkpoint molecule, is highly expressed in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol.*, 33(2):303-311, 2020