

令和5年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

令和6年 4月30日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 鎌田 諒

研究課題：がんの本態解明に関する研究
(テーマ) 染色体不安定性を介した免疫応答機構解明と免疫チェックポイント阻害剤併用療法
法の確立

研究期間： 自 令和5年 4月 1日
至 令和6年 3月 31日

研究指導者：氏名 大橋 紹宏

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) 期間中の研究について

【要旨】

抗 PD-1 抗体に代表される免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) の登場によりがんの治療体系は大きく前進した。現在まで ICIs は、肺がんやメラノーマなど幅広い難治性がん種に対し標準治療として使用されている。その一方で、免疫原性の低い Cold Tumor と呼ばれる ICI に低感受性を示す腫瘍が 80%以上存在していることも知られている。これら大多数の Cold Tumor に対し、がんの免疫応答を高めながら ICI 高感受性に変換する (Cold to Hot Tumor) 新規併用療法の開発が大きく期待されている。申請者は、がん細胞の大きな特徴である「染色体不安定性」と「染色体不安定性が惹起する免疫反応機構」に着目し、多角的なアプローチで研究を展開している。その中で、染色体分配制御において中心的な役割を担うキネシンモータータンパク Centromere-associated protein-E (CENP-E)の阻害化合物を用いながら、CENP-E 阻害による染色体不安定性がどのようにがん細胞内の炎症反応を惹起するのか、さらにこれらの細胞内炎症反応がどのように周囲のがん微小環境 (TME) 免疫反応に働きかけるのかについて、精力的に研究を進めている。当ラボではこれまでに、(1) 低分子化合物による CENP-E の活性阻害はがん細胞の染色体不安定性を効率的に誘導し、(2)細胞周期 M 期進行の遅延や小核形成を引き起こすこと、(3) 細胞質内 DNA センサー cGAS (cGAS-STING 経路) を介した自然免疫応答 (I 型インターフェロン応答) を強く活性化することを見出している。本研究では、cGAS-STING 経路活性化をレポーター系によって検出し、サイトカインやケモカインの産生を測定した。さらに、CENP-E 阻害による免疫賦活化作用・抗腫瘍増殖効果に関与する細胞内シグナル経路を特定するため、キナーゼ阻害剤ライブラリー (1,396 化合物) を用いた大規模併用スクリーニング試験を行った。その結果、CENP-E 阻害による自然免疫応答には PI3K/Akt/mTOR 経路が重要であるという新たな知見を得た。本研究の成果と、これまでの予備データをさらに展開させながら、CENP-E 活性阻害による染色体不安定性を介した自然免疫惹起機構を分子レベルで解明するに加え、「CENP-E 阻害剤は Cold Tumor (ICI 低感受性)から Hot Tumor (ICI 高感受性)への転換を行い、ICI の薬効を高める」という臨床応用を見据えた ICI 新規治療戦略の立案も目指していきたい。

【序】

抗 PD-1 抗体などに代表される ICI 治療は、がんの治療体系に大きなパラダイムシフトを起こし、現在まで肺がんやメラノーマなど幅広い難治性がん種に対し標準治療として使用されている。しかしながら、Cold Tumor と呼ばれる ICI 治療に抵抗性を示す免疫原性の低い腫瘍が約 80%以上存在しており、ICI 治療においても未だアンメットメディカルニーズは高い状態である。ICI に対する治療抵抗性を克服するために、腫瘍環境の免疫応答を高める新規併用療法の開発が大きく期待されている。近年、がん細胞の染色体不安定性が cGAS-STING 経路を介した自然免疫経路を活性化する分子メカニズムが報告され、染色体不安定性の ICI 感受性へ及ぼす影響が注目されている。これまでに当グループでは染色体分配制御モータータンパクである CENP-E を低分子化合物で活性阻害を行うと、がん細胞に対し染色体不安定性を強く誘導し、M 期ストレスや複製ストレス、タンパク毒性ストレスなど、細胞生存の根幹にかかわる多くの細胞内ストレス反応を引き起こすことを報告した (Ohashi et al., *Nat Commun.* 2015)。さらに、CENP-E 阻害剤処理細胞は有糸分裂時の染色体の分配制御機構が著しく損なわれ、M 期進行の遅延や染色体の不均等分配、多核・小核形成など染色体不安定性に起因する様々な表現型が顕著に観察されることを見出している。つまり、CENP-E 阻害剤による染色体不安定性の促進が、細胞内炎症反応を惹起し、免疫原性の低い Cold Tumor に対しても ICI の治療効果を高めることが期待できる。

本研究計画では、CENP-E 阻害による染色体不安定性の誘導が自然免疫経路、特に自然免疫経路で中心的な役割をになう cGAS-STING 経路を活性化すること、さらに染色体不安定性を介した自然免疫経路の活性化が ICI の治療効果を高めること、を前臨床モデルで実験的に証明することを目的としている。また、大規模キナーゼ阻害剤ライブラリを用いた併用スクリーニング試験も実施し、CENP-E 阻害による染色体不安定性の誘導がどのようなシグナル経路を介して細胞内炎症反応を惹起するのかを明らかにしたい。

【実験方法】

細胞株

肺腺がん細胞株 A549 と A549-Dual™ Cells (InvivoGen 社, #a549d-nfis)は DMEM (Wako, #041-30081), 10% FBS, 100 U/mL Penicillin-Streptomycin(Gibco 社, #15140148)を用いて 37°C, 5% CO₂ インキュベータ内で培養した。

細胞生存率解析

96 well plate に細胞播種後、化合物を 72 時間処理し 4%-パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (ナカライテスク社, #09154-85)を用いて細胞を固定した。固定した細胞を 0.2 %クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich 社, #V5265)を用いて染色し、染色された細胞を 33%酢酸溶液で溶解した。溶解液をマルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular devices 社, SpectraMax Paradigm)により 590nm の比色酵素測定/定量を行い、細胞の生存率を解析した。

Dual reporter アッセイ

96 well plate に A549-Dual™ Cells を 5,000 細胞/well で播種し、化合物を 72 時間刺激した。細胞培養上清を回収した後、分泌型ルシフェラーゼ活性とアルカリホスファターゼ (AP) 活性を測定した。

ルシフェラーゼ活性；

QUANTI-Luc (InvivoGen 社, #rep-q1c) を添加し、細胞培養上清で生成された光シグナルを、すぐにマルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular devices 社, SpectraMax Paradigm)を用いて発光測定/定量した。

AP (SEAP) activity ；

QUANTI-Blue 溶液 (InvivoGen 社, #rep-qbs) を添加し、細胞培養上清を 37°C で 2 時間インキュベートした後、マルチモードマイクロプレートリーダーで 650nm の比色酵素測定/定量を行った。

RNA 抽出/調整と TaqMan 定量 PCR

CENP-E 阻害剤を 72 時間処理した後、細胞培養上清を除去し PBS (gibco 社, #14190250)を用いて細胞を洗浄する。0.25% Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich 社, #T4049)を用いた細胞回収を行い、DMEM 10%FBS を用いた反応停止後、遠心処理(300g x 5min)によって細胞ペレットを回収する。回収した細胞ペレットを RNeasy Miniprep kit (Qiagen) を用いて全 RNA の抽出を行った。cDNA 合成は SuperScript VILO Master Mix (invitrogen 社, #11755250)を用いた。

Real-Time PCR は TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社,

#4366072)および TaqMan プローブを各サンプルと混合し、7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher 社)を用いて Ct 値を測定した。遺伝子発現は比較 Ct 法を用いて算出した。TaqMan プローブのプロダクト ID は、human GAPDH (Hs9999905_m1) , human IL6 (Hs00174131_m1), human, CXCL10 (Hs00171042_m1), human IL-1b (Hs01555410_m1), human IFNb (Hs00277188_s1)

化合物ライブラリー

キナーゼ阻害剤で構成された化合物ライブラリー(全 1,396 化合物)を用いた。96 well plate に A549-Dual™ Cells を 5,000 細胞/well で播種し、単剤処理群(CENP-E 阻害剤処理細胞または、化合物ライブラリー処理細胞)と、併用処理群(CENP-E 阻害剤処理および化合物ライブラリー)に分け、72 時間の薬剤処理を行った。各ウェルの細胞培養上清を回収した後、ルシフェラーゼ活性を QUANTI-Luc を用いたレポーターアッセイ系にて測定した。各ウェルの細胞生存率はクリスタルバイオレット法を用いて測定した。測定はマルチモードマイクロプレートリーダーを用いて発光測定/定量または比色酵素測定/定量した。

【結果・考察】

当研究グループではこれまでの先行研究で、染色体分配制御モータータンパクである CENP-E を低分子化合物で活性阻害を行うと、有糸分裂期(M 期)の染色体の分配制御機構が著しく損なわれ、M 期進行の遅延や染色体の不均衡分配、多核・小核形成など染色体不安定性に起因する様々な表現型が顕著に観察されることを明らかにした。

さらに、CENP-E 阻害剤処理後の RNA-seq 解析および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析の結果、“細胞質 DNA 認識経路”をはじめとした自然免疫惹起経路に関連する Hallmarks が CENP-E 阻害剤処理によって有意にエンリッチしていることを見出している。そこで、細胞質 DNA 認識経路である cGAS-STING 下流の IRF (interferon regulatory factor)や NF- κ B のレポーター導入細胞を用いて、CENP-E 阻害剤処理によるレポーター活性を測定した。A549-Dual™ 細胞は分泌型ルシフェラーゼをコードする Lucia ルシフェラーゼ遺伝子を 5 つのインターフェロン(IFN)- stimulated response elements と結合した ISG54 minimal promoter 制御下で発現している。さらに、NF- κ B の 5 つの結合部位と融合した IFN- β minimal promoter の制御下で SEAP (分泌型胚性アルカリホスファターゼ) レポーター遺伝子を発現している。すなわち、A549-Dual™ 細胞は Lucia ルシフェラーゼの検出により IRF 経路を、SEAP 活性の検出により NF- κ B 経路を同時に評価することができる。A549-Dual™ 細胞へ CENP-E 阻害剤を処理すると時間依存的に IRF-Lucia および NF- κ B-SEAP の活性が増加した(Fig.1)。この結果は、CENP-E 阻害剤が cGAS-STING 下流の IRF および NF- κ B の両経路の活性を誘導していることを示唆している。

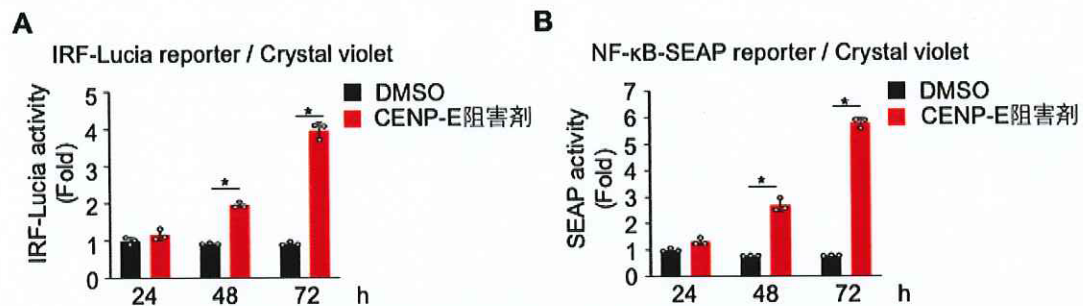


Fig.1. CENP-E阻害剤はIRF活性およびNF- κ B活性を誘導する

A549 dual reporter細胞にCENP-E阻害剤を図示した時間にて処理を行った。

A. IRF-Lucia 測定結果

B. NF- κ B-SEAP 測定結果

いずれもCrystal violet染色にてノーマライズした。

(means \pm SD, n = 3). Differences were considered significant at p < 0.01 (*).

今後、cGAS-STING 経路に関連した分子の活性をウェスタンブロット法などを用いて確認する他、ノックアウト細胞などを作製して、自然免疫応答惹起経路の特定を進める予定である。

上記のレポーター細胞を用いた実験から、cGAS-STING 経路をはじめとした自然免疫応答が惹起されている可能性を見出した。そこで、下流のサイトカイン産生について mRNA レベルを測定した。A549 細胞に CENP-E 阻害剤を 72 時間処理すると IL-6 mRNA, CXCL10 mRNA, IL-1b mRNA, IFN β mRNA などの炎症性サイトカインおよびケモカインが上昇した (Fig.2)

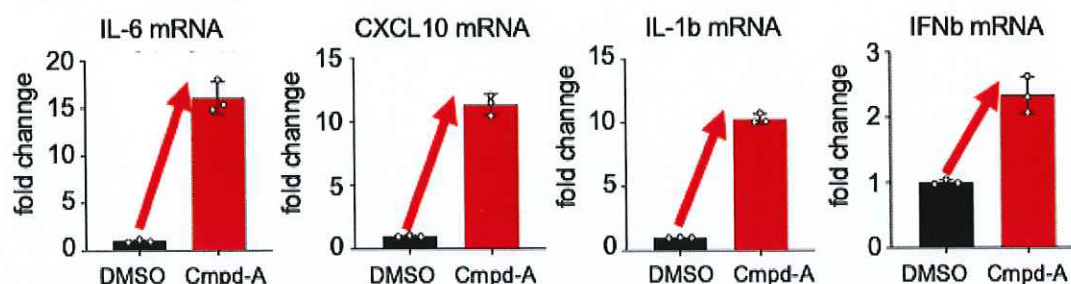


Fig.2. CENP-E阻害剤はサイトカインおよびケモカインmRNAレベルを上昇する
A549 細胞にCENP-E阻害剤を72時間処理した後、mRNAレベルを測定した。
GAPDHにてノーマライズした。(means \pm SD, n = 3).

これまでのデータから CENP-E 阻害剤処理細胞は IRF や NF- κ B などの経路を介して炎症性サイトカインおよびケモカインレベルを上昇していることが示唆された、細胞培養上清中へのサイトカイン放出や、がん微小環境に存在する免疫細胞への作用について、CENP-E 阻害剤有無の条件下、ヒト末梢血単核球(PBMC)や T 細胞を用いた浸潤アッセイを行う予定である。

CENP-E の活性を低分子化合物で阻害すると、有糸分裂期(M 期)の染色体の分配制御機構が著しく損なわれ、M 期進行の遅延や染色体の不均衡分配を引き起こす。多くの細胞は M 期において SAC (Spindle assembly checkpoint)機構によってアポトーシスへと導かれる (mitotic cell death)が、SAC 不全細胞は M 期での細胞周期停止から逸脱(mitotic slippage)することを当ラボで明らかにしている。CENP-E 阻害剤処理後の mitotic slippage は生存細胞へ染色体不安定性を促進し、多核・小核形成による細胞内炎症反応を惹起する。

CENP-E 阻害による免疫賦活化作用・抗腫瘍増殖効果に関与する細胞内シグナル経路を特定するため、キナーゼ阻害剤で構成される 1,396 化合物を用いたスクリーニングを実施した。

A549-Dual™ 細胞へ CENP-E 阻害剤単剤または化合物ライブラリー各化合物単剤処理、CENP-E 阻害剤と化合物ライブラリー併用処理を 72 時間行った(Fig.3A)。

CENP-E 阻害剤処理による IRF-Lucia の活性上昇率を"1"とした際に、IRF-Lucia 活性を 0.5 倍に低下したライブラリー内化合物を抽出した。その結果、CENP-E 阻害剤処理による IRF-Lucia 活性を低下する 61 種の候補化合物を同定した(Fig.3B)。

61 種の候補化合物について、作用機序となるターゲット pathway を集計すると PI3K/Akt/mTOR (43%)、MAPK (16%)、Cell cycle (11%)、JAK/STAT (5%)、NF- κ B (4%)、その他 (代謝や血管新生など; 21%)となった(Fig.3C)。

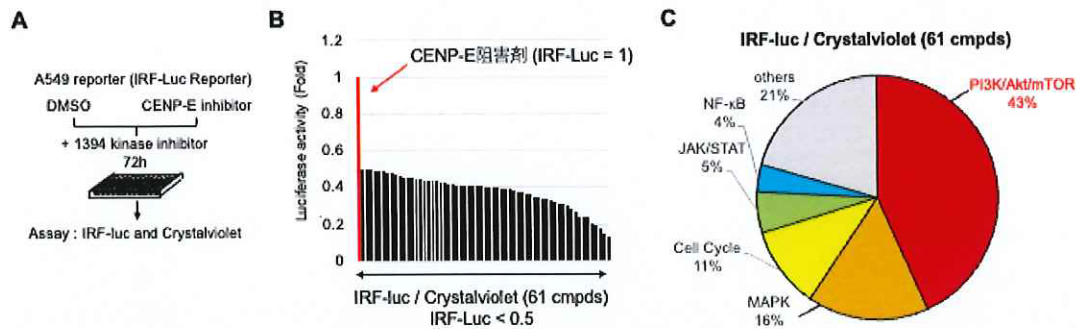


Fig.3. CENP-E阻害剤はPI3K/Akt/mTORシグナルを介してIRFレベルを上昇する

A. A549 dual reporter細胞にCENP-E阻害剤単剤または1,394個の各化合物と同時添加、72時間処理後、IRF-Lucia測定およびクリスタルバイオレット染色を行った。

B. CENP-E阻害剤によるIRF-Lucia上昇率を"1"として、1,394個の各化合物によって0.5倍になった61化合物を抽出した。

C. Bの結果から化合物が標的にしているpathwayを集計した。

さらに、IRF-Lucia 活性を特に低下する 10 化合物の内、6 化合物が PI3K/Akt/mTOR をターゲット pathway としていた。

すなわち、CENP-E 阻害剤処理による IRF-Lucia レベルの増加は PI3K/Akt/mTOR を介している可能性を示唆した。

今後は PI3K/Akt/mTOR の各阻害剤との併用効果、並びに関連分子を特定し、CENP-E 阻害剤処理による免疫応答惹起機構の解明に繋げる。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究成果により、CENP-E 阻害剤は染色体の分配制御機構を著しく破綻し、M 期進行の遅延や染色体の不均衡分配、多核・小核形成など染色体不安定性を誘導した後、免疫賦活化作用・抗腫瘍増殖効果を示すことが明らかになった。

さらに、CENP-E 阻害剤処理によって IRF や NF- κ B といった細胞内シグナルを介した免疫応答が惹起され、PI3K/Akt/mTOR pathway が関与していることを明らかにした。

これらの結果は本課題の「染色体不安定性を介した免疫応答機構解明と免疫チェックポイント阻害剤併用療法の確立」を強くサポートするものとなった。

今後はがん微小環境に存在する免疫細胞への作用について、CENP-E 阻害剤有無の条件下、ヒト末梢血単核球(PBMC)や T 細胞を用いた浸潤アッセイ。患者検体から樹立した ex vivo モデルやオルガノイドを用いた免疫組織化学染色 (IHC)、一細胞解析(scRNA-seq)、サイトカイン多項目同時定量を行う。これらの予備データをさらに展開させながら、CENP-E 活性阻害による染色体不安定性を介した自然免疫惹起機構を分子レベルで解明するに加え、「CENP-E 阻害剤は Cold Tumor (ICI 低感受性)から Hot Tumor (ICI 高感受性)への転換を行い、ICI の薬効を高める」という臨床応用を見据えた ICI 新規治療戦略の立案も目指していきたい

【2】提出期限

令和 6 年 4 月 30 日までに提出すること

(注意)

上記研究成果報告書は、研究指導者の承認を得て、公益財団法人がん研究振興財団宛郵送にて提出して下さい。

[報告書送付先]

〒104-0031

東京都中央区京橋 2-8-8 新京橋ビル 5 階

公益財団法人がん研究振興財団 HOPE 事業事務局

Tel: 03-6228-7297