

研究報告書
令和2年度：A課題

2022年4月12日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 群馬大学 未来先端研究機構
内分泌代謝・シグナル学研究部門

住所 群馬県前橋市昭和町三丁目 39-22

研究者氏名 柴田 淳史

(研究課題)

DNA 損傷シグナルが惹起するゲノム変異非依存的ネオアンチゲン発生機構の解明と
治療応用

令和3年 3月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究背景と目的】

免疫チェックポイント治療はがん治療の新たな主軸となりつつあるが、単剤では十分な治療効果が得られないケースが多く存在することから、治療効果増進のための適切な治療パートナー探索が必要となっている。治療パートナー候補の検討のため、既存の化学療法剤・放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤を併用する臨床試験が世界各国で数多く行われている。しかしながら、その治療効果を支持する学術的エビデンスは未だ乏しい。例えば化学療法剤・放射線治療は、がん細胞のDNAに損傷を与えて殺細胞効果を発揮するが、どのような患者に、またどのようなタイミングで免疫チェックポイント阻害剤を併用すべきかどうか、その分子生物学的知見は未だ少ない。このような背景から、我々は免疫チェックポイント阻害剤の効能に影響を及ぼす因子である、がん細胞膜表面上の免疫制御系リガンドの発現調節機構を研究してきた。以前我々は、放射線や化学療法剤ががん細胞膜表面上のPD-L1発現を高めることを見出し発表した。一方で免疫活性化を制御するHLA Class Iは、腫瘍免疫バランスを制御する最も重要な因子にも関わらず、DNA損傷シグナルとの関連性がほとんど明らかにされていない。DNA損傷シグナルとHLA Class I発現調節を繋ぐ研究は2006年にまで遡り、放射線照射後の細胞では細胞膜表面上のHLA Class I提示が上昇することが報告されているのみである (J. of Exp. Med., 2006, 引用回数826)。そこで本研究では、DNA損傷によって引き起こされるHLA Class I提示の分子機構について詳細な解析を行った。

【方法】

正常細胞としてRPE細胞およびヒト線維芽細胞である1BRを用い、また癌細胞としてHeLa、MCF7、HCT116細胞を用いて、DNA損傷後のHLA Class I発現解析を行った。DNA損傷は主にX線照射によって誘導した。DNA損傷誘導後、48時間の時点で細胞膜表面上のHLA Class I発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。また、DNA損傷誘導後に活性化されるパイオニア翻訳およびNMD機構を解析するため、X線照射後24時間の時点でtotal RNAを回収し、RNA-seqによって得られたデータについて、NMD isoformの発現量を解析した。

【結果】

DNA損傷を誘発する化学療法剤 (エトポシド、カンプトテシン) またはX線照射後、細胞膜表面上のHLA発現を解析した結果、正常細胞およびがん細胞株のいずれにおいても細胞膜表面上のHLA発現上昇が認められた。これらはATR阻害剤、AKT阻害剤、mTORC1阻害剤によって抑制されたことから、これらのキナーゼを介した経路がHLA発現上昇に必要であることが明らかになった。HLAによって提示される抗原の源が、Pioneer Round of Translation (PRT) 依存性であるかどうかを検討するため、PRTを開始するキャッピング因子であるCBP20をロックダウンした結果、DNA損傷によって誘導されるHLAの提示が顕著に抑制された。また、翻訳を活性化するp70-S6Kのリン酸化がDNA損傷によって誘導され、そのリン酸化はATR、AKT、mTORC1依存性であることが認められた。これらの結果から、DNA損傷がPRTを活性化させ、未成熟終始コドンに至るまでに合成されるポリペプチドが免疫プロテアソームによって分解され、HLAによって提示されることが示唆された。最後に、未成熟終始コドンまで合成されたポリペプチドのHLA結合性および免疫原性についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、HLAに結合する可能性が示された176個のペプチドのうち、83個の47.2%のペプチドにおいてT細胞を活性化する可能性があることが示された。

【考察】

放射線照射や化学療法剤によってHLA Class Iが細胞膜表面上に提示されることはこれまで知られていたが、その分子機構は明らかにされていなかった。特に、HLA Class Iによって提示される抗原がどのような反応機序を経て産生されるかは全く不明であった。本研究により、DNA損傷依存的にATR-AKT-mTORC1が活性化され、その下流で翻訳活性化因子のp70-

S6Kがリン酸化されていることが明らかになった。翻訳が開始される際、mRNAに未成熟終始コドンが存在しない場合にはそのままmRNAはsteady state of translationに移行する。一方で、mRNAに未成熟終始コドンが存在する場合は、mRNAの品質管理機構である Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) によってmRNAは分解される。その際、途中まで合成されたポリペプチドはプロテアソームによって分解される。本研究において、DNA損傷が誘導するHLAの提示には免疫プロテアソームの構成因子であるPSMG8/9/10が必要であることを示した。未成熟終始コドンまで合成されたポリペプチドがどのようにして免疫プロテアソームによって分解されるかは未だ具体的な分子機構は明らかになっていないが、今後の研究によって明らかになるだろう。また、今回の研究では未成熟終始コドンまで合成されたポリペプチドがHLAによって結合するのか、免疫原性を示すかどうかについて、バイオインフォマティクス解析により予測した。今後はこれらのペプチドがヒト生体において実際に抗原性を示すかどうかについての研究が必要である。

【発表論文】

Yuki Uchihara, Tiara Bunga Mayang Permata, Hiro Sato, Reika Kawabata-Iwakawa, Sayako Katada, Wenchao Gu, Sangeeta Kakoti, Motohiro Yamauchi, Reona Kato, Soehartati Gondhowiardjo, Naoki Hosen, Takaaki Yasuhara and **Atsushi Shibata***
DNA Damage Promotes HLA Class I Presentation by Stimulating a Pioneer Round of Translation Associated Antigen Production

Molecular Cell, accepted

*Corresponding author

【謝辞】これらの研究は公益財団法人がん研究振興財団のご支援によって遂行できました。心より御礼申し上げます。