

「POMCによる免疫チェックポイント分子 PD-L1 の制御機構の解明」
神戸大学大学院医学研究科 先進代謝疾患治療開発学 坂東 弘教

1 研究の背景と目的

免疫チェックポイント分子は過剰な免疫反応を抑制する分子群である。癌細胞は PD-L1(Programmed death-ligand 1)を発現し、免疫系からの障害を回避することで増殖を促進する。この障害回避機構を阻害する薬剤として、免疫チェックポイント阻害薬(ICI; 商品名オプジーボなど)が近年広く用いられるようになってきた。しかしながら、ICI 使用時の有害事象として ICI 関連下

垂体炎(主に副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)単独欠損症)が臨床上大きな問題となっている。我々は、下垂体の自己免疫性疾患の発症機序の一部に、腫瘍に対する自己免疫が関与している『傍腫瘍症候群』として発症するという新たな機序を提唱した。この疾患概念は『傍腫瘍症候群関連自己免疫性下垂体炎』という疾患として確立しつつあり、種々の国際的な総説に取り上げられる他、として報告をしてきた(Bando H, et al. *Pituitary*. 2018;21:480-489.、Bando H, et al. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2021 [Online ahead of print.]). 近年ではこの概念を発展させた種々の症例報告がなされつつある。我々はこの疾患概念を更に発展し、ICI 関連下垂体炎が腫瘍内に異所性発現している POMC (Pro-opiomelanocortin) に対する自己免疫の惹起によって発症する可能性を見出した(Kanie K, et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70:3669-3677.)。

POMC は下垂体において、ACTH の前駆物質であることが知られており、POMC のプロセッシングによって ACTH が産生される。この ACTH が副腎皮質に作用することによってコルチゾールなどの副腎皮質ステロイドの産生が行われる。POMC の機能喪失型変異は先天的な副腎不全の原因であることが知られている。下垂体での POMC の発現に加え、POMC は多くの癌腫で発現していることが古くから知られている。一部の腫瘍では POMC の過剰発現が原因となり、神経内分泌腫瘍の病態の一つとして、異所性 ACTH 産生腫瘍としてホルモンの過剰状態、クッシング症候群を引き起こす事が知られている。しかし、大半の腫瘍では ACTH の過剰産生が惹起されるわけではない。そのため、種々の腫瘍細胞における POMC の異所性発現の意義は不明であった。しかしながら、POMC 高発現群は低発現群と比較し予後不良であることが知られており、腫瘍の増殖や腫瘍免疫などへの意義が存在すると考えられてきた。

我々は POMC が悪性腫瘍での免疫チェックポイント機構(特に PD-L1 の発現)への関与をしており、POMC の異所性発現が腫瘍免疫に対して負の働きをもっているという仮説を立てた。そこで、本研究では POMC の PD-L1 発現への意義について明らかにすることを目的に検討を行った。

もし、この仮説が正しければ、POMC が腫瘍免疫療法の新たなターゲット分子になり得る可能性がある。また、これまで明らかではなかった、POMC の悪性腫瘍での異所性発現の意義を明らかにすることに繋がるものと考えた。

本研究の概要

【背景】

1. POMC(ACTH前駆体)は悪性腫瘍で異所性発現がみられる。
2. POMC発現悪性腫瘍は一般に予後不良である。
3. 免疫チェックポイント阻害薬(ICI)関連下垂体炎症例はPOMCに対する自己免疫が機序である。

【仮説】

POMCが免疫チェックポイント機構の制御に関与している?

【目的】

POMCの悪性腫瘍での免疫チェックポイント機構(PD-L1の発現)への関与を検討する

**免疫チェックポイントをターゲットとした新たな創薬
ICI関連下垂体炎発症予測・予防**

2 研究方法・研究内容

本研究では下記の3種類の内容について各々研究を行った。

A. 腫瘍細胞内での POMC の PD-L1 制御の可能性

ICIが治療適応となる癌腫は幅広く用いられている。組織・癌腫・組織型によって POMC と PD-L1 の発現に差異が認められる可能性があり、肺・腎細胞癌を対象組織として検討を行った。

今回はヒト肺癌細胞株(A549)、小細胞癌(NCI-H146)を用いた。肺癌でも癌腫により差異がみられる可能性があり、本研究では肺癌細胞として、これら2種類の細胞株での検討を行った。また、肺腫瘍細胞株以外に腎細胞の代表としての HEK293T、A498、Caki-1 細胞も併せて同様に検討した。

これらの細胞に対し、POMC の哺乳細胞発現プラスミドを用いて POMC を強制発現し、realtime PCR を用いて PD-L1 の発現量を評価した。また、Western blotting を用い、蛋白レベルでの発現量の変化について評価した。

一方、逆に PD-L1 が POMC の発現量を制御し、異所性発現の原因である可能性も考えられた。そのため、PD-L1 の発現プラスミドを併せて作成し、同プラスミドを上述の細胞株に強制発現することで、PD-L1 が POMC の発現量の制御を行っている可能性についても検討した。

B. 腫瘍細胞における POMC の細胞増殖への関連性

次に、PD-L1 などの免疫チェックポイント分子以外の腫瘍増殖に関する変化を来す可能性について明らかにする目的で、上述の細胞に POMC ならびに PD-L1 を強制発現した後の細胞増殖の差異について、48,72 時間後の細胞数、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) アッセイ、ならびに細胞形態の変化について検討を行った。

C. 肺癌細胞における POMC の発現 (公共データベースを用いた検討)

上述のように、POMC は腫瘍の予後との関連性が推察されている。しかし、明確な結果を示した論文が無いのが現状である。そこで、近年細胞株・組織での遺伝子発現に関する種々のデータベースが作成されている。今回、cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用い、POMC の発現と組織系との関連、予後などについて検討した。

3 研究成果

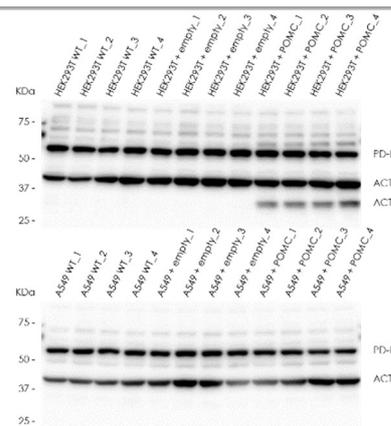
A. 腫瘍細胞内での POMC の PD-L1 制御の可能性

上述の各種細胞株に対し、POMC を強制発現した。24 時間後、48 時間後に mRNA を抽出し、real time PCR を行った。いずれの細胞においても POMC の強制発現は PD-L1 の発現量の上昇を認めなかった。一方、PD-L1 の強制発現を行った場合にも POMC の発現量の上昇は認められなかった。これらの結果からは、POMC と PD-L1 は遺伝子発現レベルでの制御はお互いに行わないことが推測された。(表は 24 時間でのデータ)

Cell Line	Vector	n	Relative expression level (vs. empty vector)	
			PD-L1	POMC
A549	POMC	3	0.77±0.17	
	PD-L1	4		Undetermined
H146	POMC	4	0.83±0.24	
	PD-L1	4		1.01±0.47
A498	POMC	4	0.90±0.11	
	PD-L1	3		Undetermined
Caki	POMC	1	1.11	
	PD-L1	1		Undetermined
HEK293T	POMC	3	0.82±0.12	
	PD-L1	2		1.62±0.66

また、蛋白の安定性に関与している可能性を考え、POMC 強制発現後の PD-L1 について Western Blotting を用いて検討した。しかし、蛋白レベルにおいても PD-L1 の発現量に変化は認められなかった(図は HEK293T ならびに A549 細胞における、48 時間強制発現後の Western Blotting の結果)。すなわち、POMC は PD-L1 の蛋白安定性へも関与はしていないものと推測された。

A549(非小細胞肺癌細胞株) or HEK293TにおけるPOMC遺伝子導入時のPD-L1蛋白発現



これらの結果から、今回の我々の実験の条件下では、POMC と PD-L1 との間に明らかな発現量の制御機構への関連性を見出すことが出来なかった。

B. 腫瘍細胞における POMC の細胞増殖への関連性

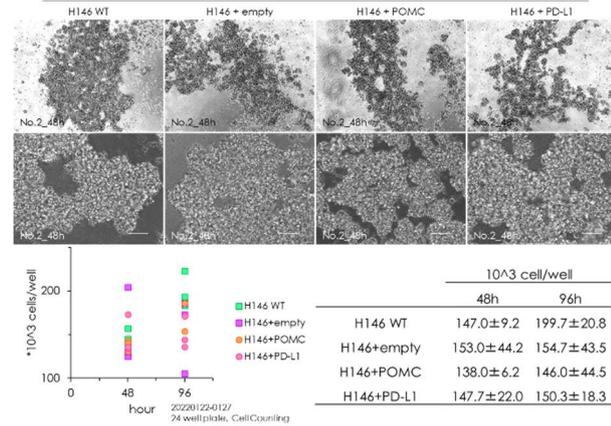
明らかな POMC と PD-L1 との関連性が認められなかったため、POMC が PD-L1 以外の要素で腫瘍細胞における細胞増殖への関連性がある可能性を考慮し検討を行った(H146 細胞を用いた検討を提示)。

上述の細胞に対し、POMC ならびに PD-L1 を強制発現し、48, 72 時間後の細胞数を測定した。しかしながら、細胞数について明らかな差は認められなかった。また、細胞の形態についても明らかな変化は認められなかった。

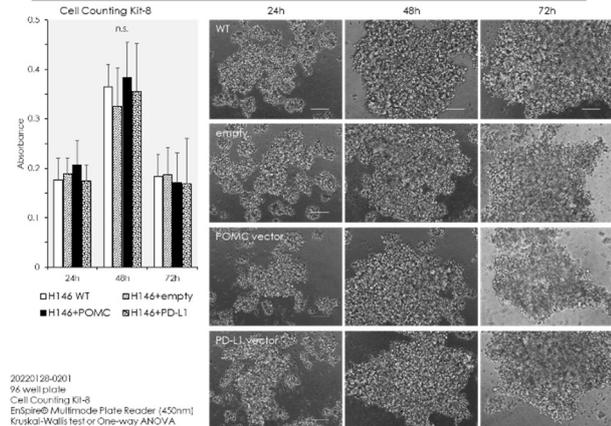
同様に、細胞増殖について CCK-8 アッセイを用いて検討を行ったが、CCK-8 アッセイでも差異を認めず、POMC ならびに PD-L1 は種々の腫瘍細胞の細胞増殖ならびに細胞の形態へ明らかな変化を来さなかった。

A, B の結果から、われわれの実験条件において、POMC は免疫チェックポイント分子への明らかな関連は来さず、細胞増殖への直接的な関与は否定的と考えられた。

H146(小細胞肺癌細胞株)のPOMC, PD-L1遺伝子導入時の細胞形態, 増殖 1



H146(小細胞肺癌細胞株)のPOMC, PD-L1遺伝子導入時の細胞形態, 増殖 2



C. 肺癌細胞における POMC の発現 (公共データベースを用いた検討)

これまで POMC の発現が肺癌などの悪性腫瘍の予後に関係しているという報告がなされていたが、少数の検討にとどまっていた。また、上述の A, B で明らかな細胞株への変化が見られなかったため、公共データベースを用いた検討を行った。少なくとも肺癌においては病期との明らかな関連性は否定的であった。

また、予後については POMC 高発現例でやや不良である傾向にはあるようであるが、統計学的に優位ではなかった。しかしながら、同検討についてはサンプルサイズが十分ではないため、サンプル数を増やしたデータでの検討が望ましいと思われる。また、肺癌の組織型により POMC の発現量も異なっており、組織型毎に分けて予後を評価することができれば、より POMC の予後への影響について明らかにし得る可能性があるが、それは今後の検討課題である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

今回の検討では POMC が直接 PD-L1 を含めた免疫チェックポイント分子への制御への関与を示すことはできず、POMC の腫瘍細胞における異所性発現の意義については現時点では不明である。

近年下垂体の転写因子が種々の腫瘍細胞に異所性発現していることが報告されている。一部の転写因子においてはその意義が明らかになりつつあり、細胞増殖・転移・浸潤性の促進作用や腫瘍内微小環境の変化に伴う免疫の回避機構などに働く事が知られている。本研究では免疫チェックポイント分子へ影響を検討したが、今後浸潤性や腫瘍内微小環境の変化などの POMC の意義について、検討を進めたいと考える。

少なくとも本来発現すべき組織ではないところに POMC が異所性発現をしていることから、何らかの合目的な意義が存在するものと考えられる。この意義を明らかにすることが出来れば、腫瘍内の POMC を制御することによる新たな腫瘍治療のターゲット分子となる。既に POMC に対する核酸医薬の治療応用を内分泌疾患に対して検討している研究グループも多数存在することから、同薬を抗腫瘍薬として応用しうる。加えて、ICI 投与前に腫瘍における POMC の発現の多寡を評価することで ICI 関連下垂体炎の発症を予測、予防を見込んだ腫瘍治療の提唱に繋がるものと考えられる。

腫瘍内での POMC の異所性発現の意義についてはいまだ明らかには出来ておりませんが、本研究助成を端緒に、今後の研究を進展させていただきます。この場をお借りし、感謝を申し上げます。

