

日本人女性に多い難治性卵巣明細胞腺癌に対する革新的癌免疫療法の開発

Development of innovative cancer immunotherapy for refractory ovarian clear cell adenocarcinoma particularly common in Japanese women

大阪大谷大学薬学部 薬物治療学講座 講師 小堀 宅郎

要約

本邦における卵巣癌の罹患率及び死亡率は年々増加し、特に思春期・若年成人世代から急増する。卵巣癌の組織型の中でも日本人において発症頻度の高い明細胞腺癌は、既存の化学療法抵抗性で極めて予後不良である。卵巣明細胞腺癌に対する新たな治療法として、Programmed death-1 (PD-1) /PD-ligand 1 (PD-L1) 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害療法への期待が高まる一方、その奏効率は決して高くない。このことから、PD-1/PD-L1 経路を阻害する新規治療標的の探索が切望されている。ERM と総称される Ezrin、Radixin 及び Moesin は、特定の細胞膜タンパク質と細胞内のアクチン骨格とを連結し、足場としてそれらの細胞膜局在に寄与している。本研究では、日本人女性由来の卵巣明細胞腺癌細胞株を用い、PD-L1 の細胞膜局在調節における ERM の役割を検討するとともに、卵巣癌患者 3,431 名のマイクロアレイデータを収録するデータベース CSIOVDB を用い、各遺伝子の発現レベルを組織型及び国際産科婦人科連合による国際進行期分類別に解析した。細胞免疫蛍光二重染色並びに免疫共沈降実験の結果、PD-L1 と ERM はいずれも細胞膜領域に分布して共局在し、タンパク質間相互作用を形成した。また、siRNA により ERM 各々の発現を抑制すると、Moesin の発現抑制細胞においてのみ、対照群と比較して PD-L1 の細胞膜発現量が有意に低下した。さらに、CSIOVDB を用いた癌臨床検体のデータベース解析の結果、Moesin の発現レベルは他の卵巣癌の組織型と比較して明細胞腺癌において有意に上昇した。加えて、Moesin 並びに PD-L1 の発現レベルは、卵巣癌のステージ依存的に上昇した。以上の結果、Moesin は卵巣明細胞腺癌において過剰発現し、PD-L1 の細胞膜発現調節を担う足場として機能する可能性が示された。

緒言

卵巣癌は早期発見が難しく、婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良であるため、本邦における罹患数・死亡数は増加の一途を辿っている。さらに、年齢階級別にみた卵巣癌の罹患率・死亡率は15歳～39歳の思春期・若年成人 (AYA) 世代から急増するため、社会的・医療経済学的にも重要な課題となっている。卵巣癌は漿液性、類内膜、粘液性及び明細胞の主に4つの組織型に分類される。その中でも明細胞腺癌の発症頻度は、欧米諸国と比較して日本人女性で約3-4倍ほど高く、白金製剤を主体とする既存の化学療法に対して抵抗性で極めて予後不良である。また、子宮内膜あるいはそれに類似した組織が本来存在する子宮内腔以外の部位で異所性に発生・増殖する子宮内膜症は、AYA 世代を含む生殖可能年齢の女

性に頻発する良性疾患である。特に卵巣内にみられる子宮内膜症性嚢胞 (チョコレート嚢胞) は、卵巣明細胞腺癌の前癌病変として知られている。このことから、本邦における特に AYA 世代女性の健康、生活の質向上のためには、卵巣明細胞腺癌に対する新規治療戦略の構築が喫緊の課題となっている。

癌細胞膜に幅広く分布する免疫チェックポイント分子の Programmed death ligand-1 (PD-L1) や T 細胞表面の PD-1 等を標的とする免疫チェックポイント阻害薬は、新世代癌免疫療法のさきがけとして、多くの進行・再発癌の治療に革命をもたらしている。近年、既存の化学療法抵抗性あるいは進行性・再発性の卵巣明細胞腺癌患者を対象として、抗 PD-1 抗体のニボルマブ、ペムプロリズマブあるいは抗 PD-L1 抗体のアベルマブを投与した臨床試験が実施されて

いる。しかしながら、それらの奏効率は10~15%程度にとどまっている¹。このことから、既存の免疫チェックポイント阻害薬と作用機序の異なる新たな治療標的分子の探索が切望されている。

Ezrin、Radixin及びMoesinは、ERMと総称される細胞内の足場タンパク質である。ERMは、ヒト上皮増殖因子受容体2型並びに抗癌剤耐性に関連する薬物トランスポーター等をはじめ、特定の細胞膜タンパク質と細胞内のアクチン骨格とをクロスリンクし、それらの細胞膜局在を調節する“足場”の役割を果たしている。興味深いことに、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するPD-L1は、その細胞内領域にERM結合モチーフを有している。そこで本研究では、日本人女性由来の卵巣明細胞腺癌細胞株を用い、PD-L1の細胞膜局在調節におけるERMの関与について解析するとともに、卵巣癌患者のマイクロアレイデータを収録するCSIOVDBデータベースを用い、卵巣癌患者の腫瘍組織におけるPD-L1とERMの遺伝子発現量を組織型及びステージ別に解析した。

方法

1. 細胞培養

実験材料として、日本人女性由来の卵巣明細胞腺癌細胞株であるOVTOKO細胞及びRMG-V細胞を用いた。

2. PD-L1とERMの細胞内共局在性及び遺伝子・タンパク質発現量の解析

OVTOKO細胞及びRMG-V細胞におけるPD-L1とERMの細胞内共局在性は、蛍光抗体法による細胞免疫蛍光二重染色後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。また、各細胞よりtotal RNAあるいは細胞溶解液を調製後、real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)法、ウエスタンブロット法により各種遺伝子の相対的mRNA発現量及びタンパク質発現量を測定した。

3. small interfering (si) RNAを用いたERMの発現抑制

24ウェルプレートへOVTOKO細胞を播種し、一晚培養して接着させた。トランスフェクション試薬のLipofectamine RNAiMAXを用いてsiRNA（最終濃度5 nM）を細胞内へ導入し、3日間持続培養した。なお、無処置、トランスフェクション試薬のみ、陰性対

照siRNA処置群は、各々Untreated、Lipofectamine、non-targeting control (NC)と表記した。

4. 免疫共沈降法

OVTOKO細胞の溶解液に抗PD-L1抗体あるいは陰性対照IgG抗体を添加して免疫沈降後、溶出物中におけるERMのタンパク質発現をウエスタンブロット法にて解析した。

5. フローサイトメトリー法

siRNA処置3日後のOVTOKO細胞をウェルから剥離後、アロフィコシアニン (APC) 標識-抗PD-L1抗体とインキュベートした。その後、フローサイトメーターにて細胞表面のPD-L1発現量を測定した。

6. 卵巣癌患者の腫瘍組織中PD-L1及びERM発現レベルの解析

卵巣癌患者3,431名のマイクロアレイデータを収録するデータベースCSIOVDBを用い、腫瘍組織中の各遺伝子発現レベルについて、明細胞、類内膜、粘液性、低異型度粘液性、漿液性、低異型度漿液性の6つの組織型並びに国際産科婦人科連合 (FIGO) による国際進行期分類別に解析した。

結果

1. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株におけるPD-L1とERMの発現並びに細胞内共局在性

OVTOKO細胞及びRMG-V細胞において、ERMとPD-L1はいずれもmRNAとタンパク質レベルで十分量の発現が認められた。さらに、PD-L1（緑色）はEzrin、Radixin及びMoesin（赤色）と細胞膜領域において共局在性を示した（図1A-B）²。以降、2つの細胞株を用いて解析を進めた結果、同様のデータが得られたため、今回はOVTOKO細胞における結果についてのみ記述する。

2. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株におけるPD-L1とERMのタンパク質間相互作用

OVTOKO細胞から調製した細胞溶解液に抗PD-L1抗体を添加して免疫共沈降を行ったところ、溶出物中においてERMのすべてのバンドが検出された（図2）²。

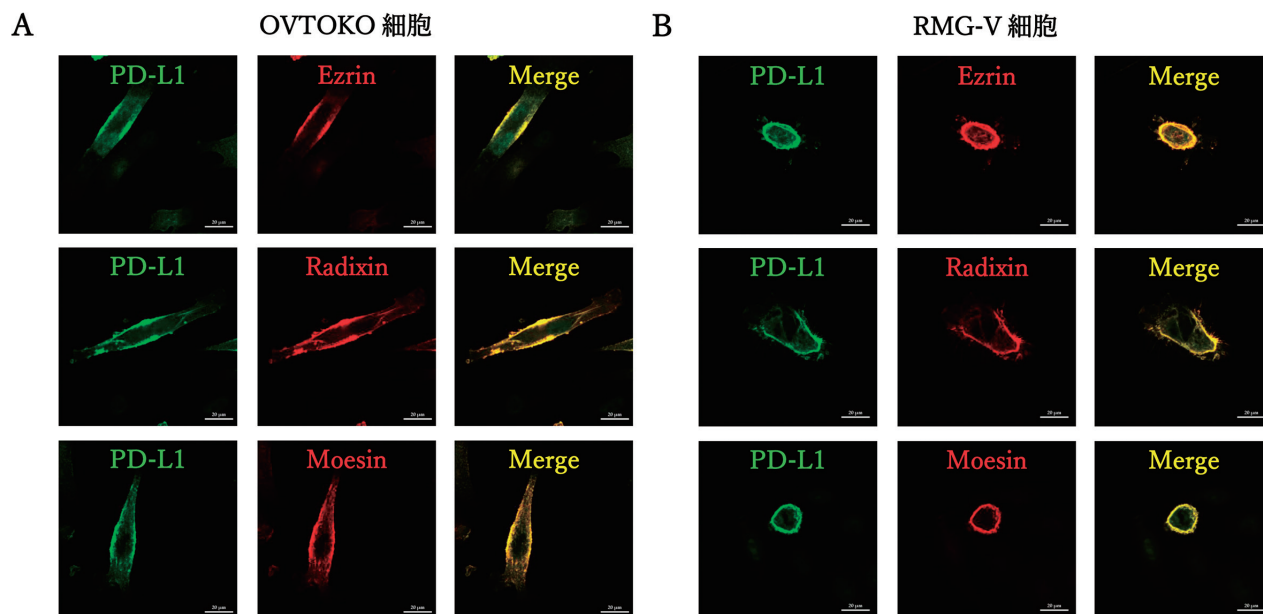


図1. OVTKO細胞及びRMG-V細胞におけるPD-L1とERMの細胞内共局在性
 (A)OVTKO細胞、(B)RMG-V細胞におけるPD-L1(緑色)とEzrin、Radixin及びMoesin(赤色)の細胞免疫蛍光二重染色画像。スケールバーは20 μmを表す。(文献2から引用・改変)

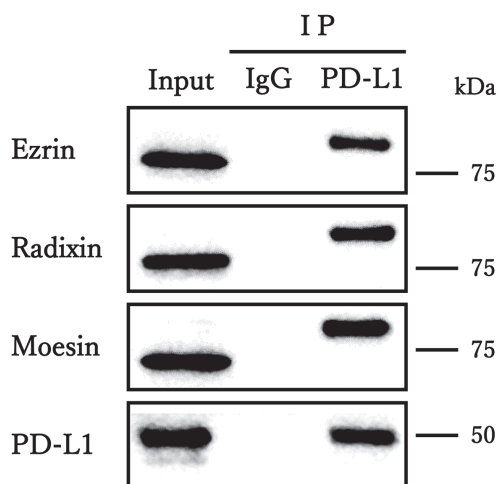


図2. PD-L1とERMのタンパク質間相互作用

ウエスタンブロット法により測定した各タンパク質のバンド。InputはOVTKO細胞の溶解液、IgGは陰性対照抗体による免疫沈降(IP)後の溶出物、PD-L1は抗PD-L1抗体によるIP後の溶出物をそれぞれ表す。パネル横の数値は分子量(kDa)を示す。(文献2から引用・改変)

3. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株におけるERMの発現抑制がPD-L1のmRNA並びに細胞膜発現量へ及ぼす影響

OVTKO細胞へのERMに対するsiRNAの処置は、対照群と比較して各々の標的mRNA発現量を約95%低下させた。本条件下、EzrinあるいはRadixinの発現抑制によって、PD-L1のmRNA及び細胞膜発現量はわずかに減少した(図3A-C)²。興味深いことに、Moesinの発現抑制はPD-L1のmRNA発現量に

影響を及ぼすことなく、対照群と比較してPD-L1の細胞膜発現量を有意に低下させた(図3A-C)²。

4. 卵巣癌の組織型並びにFIGOによる国際進行期分類にみたPD-L1とERMの遺伝子発現解析

最後に、卵巣癌患者の腫瘍組織におけるPD-L1とERMの遺伝子発現レベルについて、卵巣癌の組織型並びにFIGOによる国際進行期分類に解析した。興味深いことに、Moesinの発現レベルは、他の卵巣

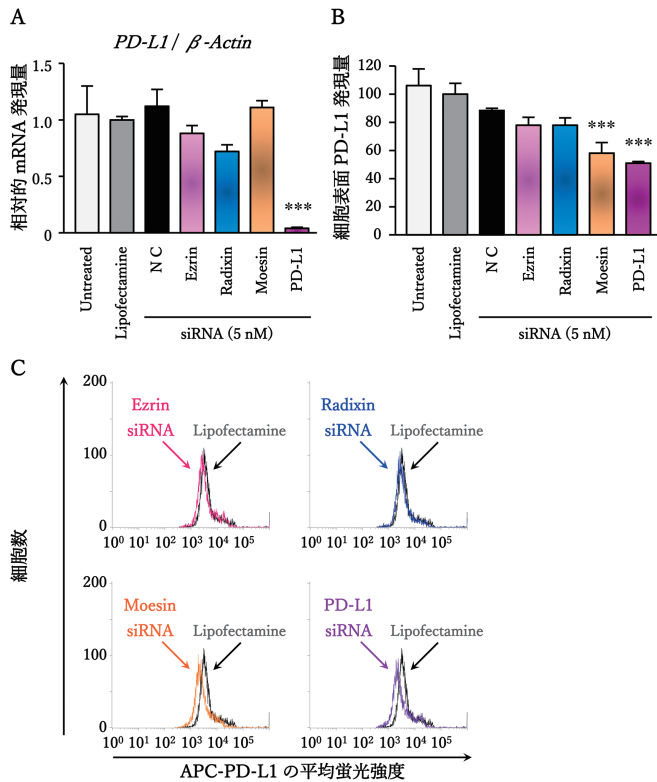


図3. MoesinはOVTKO細胞におけるPD-L1の細胞表面局在を調節する

(A) Lipofectamine処置群におけるPD-L1の転写産物由来の蛍光強度をβ-Actinの転写産物由来の蛍光強度で除した値を1.00としたときの各群における相対値を示す。データは平均値±標準誤差(SEM)で表している。n=3、*** $p < 0.001$ はLipofectamine処置群に対する有意差を表す。(B) フローサイトメトリーにより測定したLipofectamine処置群におけるOVTKO細胞表面PD-L1の発現量を100%としたときの各群の相対値を示す。データは平均値±SEMで表している。n=3、*** $p < 0.001$ はLipofectamine処置群に対する有意差を示す。(C) Ezrin、Radixin、Moesin及びPD-L1各々に対するsiRNA処置群とLipofectamine処置群における細胞表面PD-L1の平均蛍光強度を重ね合わせたフローサイトメトリーのヒストグラムを表す。(文献2から引用・改変)

癌の組織型と比較して明細胞腺癌において有意に上昇した(図4A)³。加えて、Moesin並びにPD-L1の発現レベルは、卵巣癌のステージ依存的に上昇した(図4B)³。対照的に、FIGOステージII-IVの卵巣癌患者におけるEzrinの発現レベルは、同ステージIと比較して有意に低下した(図4B)³。

考察

卵巣明細胞腺癌患者由来の細胞株並びに腫瘍組織において、PD-L1及びEzrinが高発現することが知られている。特にPD-L1は卵巣明細胞腺癌患者の腫瘍組織で過剰発現し、進行期や再発率との相関性を示すことに加え、PD-L1高発現患者において無増悪生存期間や全生存期間が短縮すると報告されている。さらに、卵巣明細胞腺癌の前病変となる子宮内膜症

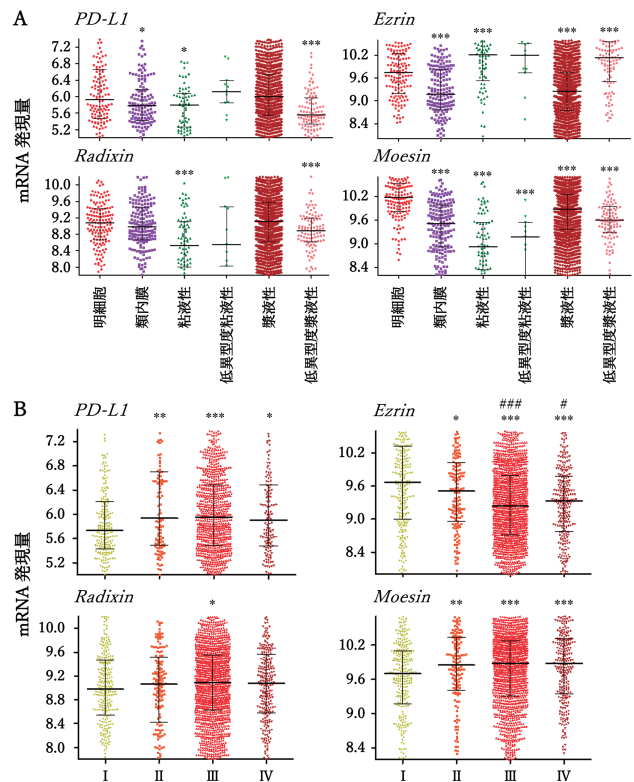


図4. 卵巣癌患者の腫瘍組織におけるPD-L1とERMの遺伝子発現解析

卵巣癌患者の腫瘍組織におけるPD-L1とERMの遺伝子発現レベルを(A) 明細胞、類内膜、粘液性、低異型度粘液性、漿液性、高異型度漿液性の6つの組織型並びに(B) 国際産科婦人科連合(FIGO)による国際進行期分類別に解析した。(A) データは中央値±四分位で表し、データ点を描くジッタープロットを重ねて描いた。*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ は明細胞腺癌に対する有意差を示す。(B) *** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ はステージI、### $p < 0.001$ 、# $p < 0.05$ はステージIIに対する有意差を示す。(文献3から引用・改変)

患者の病変組織及びそこから単離した子宮内膜間質細胞において、Ezrin並びにMoesinが過剰発現することに加え、Ezrinが子宮内膜間質細胞にみられる遊走活性の促進に関与することも示されている。これらの先行研究と一致して、OVTKO及びRMG-V細胞において、PD-L1とEzrinの遺伝子・タンパク質レベルでの発現が認められた。さらに今回の解析の結果、卵巣明細胞腺癌においてRadixinとMoesinがいずれも遺伝子・タンパク質レベルで発現することを明らかにした^{2,3}。次に、PD-L1とERMの細胞内共局在性及びタンパク質間相互作用を評価したところ、PD-L1とERMの細胞膜領域における共局在性(図1)とタンパク質間相互作用(図2)が観察された²。これまでに著者らは、卵巣及び子宮由来の腺癌細胞ではEzrin、子宮頸部扁平上皮癌細胞ではMoesinが、

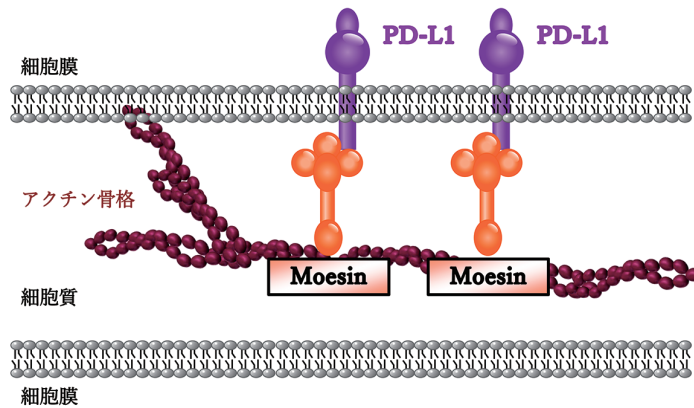


図5. 卵巣明細胞腺癌におけるPD-L1の細胞表面局在に寄与する
 主要な足場としてはたらくMoesinの概念図
 (文献2から引用・改変)

各々ドミナントに発現し、PD-L1の細胞膜局在調節を担う主要な足場として機能することを報告している⁴。一方Meng F.らは、ヒト乳癌由来のMDA-MB-231細胞を用いてPD-L1の細胞膜局在・機能調節に関与する因子を網羅的に探索した結果、MoesinがPD-L1のタンパク質分解機構を負に制御することにより、翻訳後修飾的にPD-L1の細胞膜局在・機能調節に寄与することを見出した⁵。そこで、Ezrin並びにMoesinが同程度に高発現するOVTOKO細胞を用い、PD-L1の発現調節機構におけるERMの関与を解析した。その結果、siRNAによるMoesinの発現抑制は、PD-L1の遺伝子発現量に影響することなく、その細胞膜発現量を低下させた(図3)²。興味深いことに、卵巣癌患者の腫瘍組織における各遺伝子の発現解析を実施したところ、Moesinの発現レベルは他の卵巣癌の組織型と比較して明細胞腺癌において著明に上昇した(図4A)³。さらに、Moesin並びにPD-L1の発現レベルは、卵巣癌のステージ依存的に上昇した(図4B)³。これらの知見をまとめると、卵巣明細胞腺癌において、ERMの中でもドミナントに存在するMoesinが、翻訳後修飾因子としてPD-L1の細胞膜局在調節に寄与している可能性が考えられた(図5)^{2,3}。

本研究を継続・発展させることで、卵巣明細胞腺癌においてPD-L1のドミナントな足場としてはたらくMoesinを新たな治療標的として、例えばsiRNA等の核酸医薬を含む次世代の創薬モダリティを用い、“免疫チェックポイント分子の足元を狙う”という新たな治療概念に基づく新規免疫チェックポイント阻害療法の開発に繋げていきたい。これによって、特に本邦においてアンメット・メディカルニーズの

極めて高い卵巣明細胞腺癌に対する癌免疫療法の治療成績向上による死亡数減少、社会復帰促進に加え、妊娠・出産を希望するリプロダクティブ・エイジの女性における妊孕性の低下・喪失の回避に貢献したい。

謝 辞

本研究助成金の受給確定後に所属講座の異動があり、研究遂行のために必要な実験機器や試薬類を新たに購入する必要性が生じました。このため、本研究助成金によるご支援がなければ、研究を滞りなく実施するための環境整備が極めて困難であったと予想されます。本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人 神澤医学研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Le Saux O, Ray-Coquard I, Labidi-Galy SI. Challenges for immunotherapy for the treatment of platinum resistant ovarian cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021; 77: 127-143
2. Kobori T, Ito Y, Urashima Y et al. Modulation of immune checkpoint molecule PD-L1 expression via scaffold proteins in the ovarian clear cell carcinoma common in Japanese women. *J AYA Oncol Alliance.* 2024; 4: in press.
3. Ito Y, Kobori T, Urashima Y et al. Moesin affects the plasma membrane expression and the immune checkpoint function of CD47 in human ovarian clear cell carcinoma. *J Reprod Immunol.* 2024; 161: 104185.
4. Kobori T. New insights into immunotherapy for gynecological cancer. *J Clin Med.* 2022; 11: 4198.
5. Meng F, Su Y, Xu B. Rho-associated protein kinase-dependent moesin phosphorylation is required for PD-L1 stabilization in

Abstract

The morbidity and mortality in ovarian cancer has been increasing yearly in Japan and are dramatically increasing among Adolescent and Young Adult. Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is a pathological type of ovarian cancer with remarkably high incidence rate in Japan and has an extremely poor prognosis due to resistant to conventional chemotherapy. While immune checkpoint blockade therapy targeting Programmed death-1 (PD-1)/PD-ligand 1 (PD-L1) axis have emerged as promising option for OCCC, this mode of treatment is effective in only a subset of patients. Therefore, there is an urgent need to develop novel therapeutic strategy to inhibit PD-1/PD-L1 axis. The family of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) contribute to the plasma membrane localization of certain transmembrane proteins by crosslinking them with actin cytoskeleton as scaffold proteins. Here, we examined role of ERM in the plasma membrane localization of PD-L1 using the cell lines derived from Japanese OCCC patients and analyzed the gene expressions of interests in different histological subtypes and clinical stages using the CSIOVDB, a transcriptomic microarray database containing data from 3,431 human ovarian cancers. Immunofluorescence and immunoprecipitation analysis revealed that PD-L1 colocalized and interacted with all three ERM in the plasma membrane. Gene silencing of Moesin but not others significantly reduced the PD-L1 plasma membrane expressions. Interestingly, clinical database analysis showed that Moesin expressions in OCCC was higher than those in other histological subtypes, and that PD-L1 and Moesin expressions were increased with the clinical stages. In conclusion, Moesin overexpressed in OCCC may be a predominant scaffold protein responsible for PD-L1.