

2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	卵巣明細胞腺癌に対する 自然免疫チェックポイント阻害療法の開発
キーワード	① 卵巣明細胞腺癌、② 自然免疫チェックポイント、③ 細胞内足場タンパク質

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	コボリ タクロウ 小堀 宅郎
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	大阪大谷大学 薬学部 臨床薬剤学講座・助教
現在の所属先・職位等	大阪大谷大学 薬学部 薬物治療学講座・講師
プロフィール	2009 年 東北薬科大学 薬学部 衛生薬学科 卒業、薬剤師免許取得 2014 年 神戸学院大学大学院 食品薬品総合科学研究科 修了 博士（薬学）取得 2014 年 近畿大学 医学部 薬理学教室 助教 2020 年より大阪大谷大学 薬学部に勤務 細胞内足場タンパク質 Ezrin、Radixin、Moesin (ERM) の未知なる はたらき（魅力）に惹かれ、学生時代から研究を継続しています。現 在は ERM を標的とした新しい癌免疫チェックポイント阻害療法の開 発を目指した研究に従事しています。

1. 研究の概要

癌細胞表面の Programmed death ligand-1 (PD-L1) および 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、癌免疫療法のさきがけとして進行性・再発性のさまざまながん症例に対して優れた臨床効果をもたらしている（図1）。多岐に渡る癌種に対する免疫チェックポイント阻害薬の適応拡大が加速している一方、卵巣癌に対する奏効率は極めて低いため、これらの患者・家族はがん免疫療法による恩恵を十分に受けられていない。このことから、既存薬が主に標的とする PD-1/PD-L1 経路に依存しない新たな治療標的分子の発見が切望されている。

自然免疫チェックポイント分子の CD47 は、卵巣癌の細胞膜上において過剰発現し、患者生存率の低下に関与している。CD47 はマクロファージ (MΦ) 上の受容体との結合を介して don't eat me シグナルを発することで、MΦ による癌細胞に対する貪食活性を抑制している（図2）。しかしな

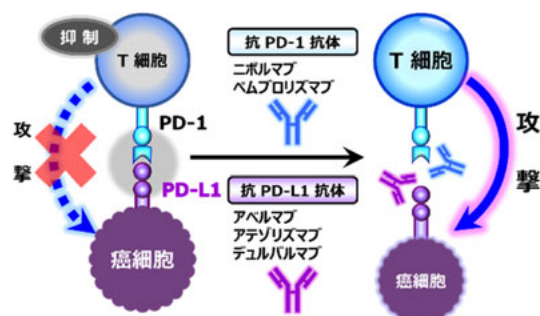


図1 PD-1/PD-L1 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害薬の概要

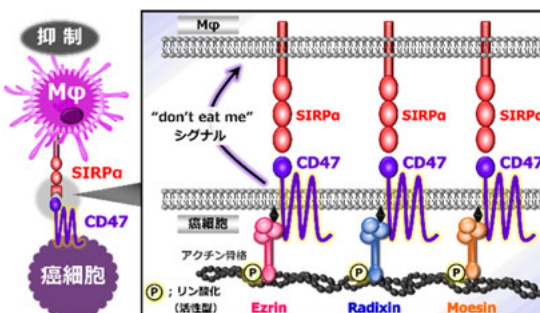


図2 自然免疫チェックポイント機構の概要と卵巣明細胞腺癌における Ezrin、Radixin、Moesin を介した CD47 の細胞膜発現・機能の調節

がら、癌細胞膜上における CD47 の発現調節機構はほとんど解明されていない。

ERM タンパク質と総称される Ezrin、Radixin、Moesin は、細胞内のアクチン骨格と一部の細胞膜分子を連結し、それらの細胞膜における発現・機能を調節する“足場”の役割を果たしている。しかしながら、免疫チェックポイント分子の発現・機能調節機構において、その“足場”に着目した研究は前例がない。本研究では、特に我が国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着目し、CD47 の細胞膜発現・機能調節に果たす Ezrin、Radixin、Moesin の関与を解明するとともに（図 2）、自然免疫チェックポイント阻害療法開発のための新たな治療標的分子としての Ezrin、Radixin、Moesin の有用性を検討する。

2. 研究の動機、目的

卵巣癌は早期発見が難しく、最も治療困難な婦人科腫瘍の一つであり、我が国における罹患数・死亡数は今後も増加の一途を辿ると推計されている。また卵巣癌の罹患率・死亡率は、未婚者、妊娠希望者、子育て中の母親を含む 15 歳～39 歳の思春期・若年成人（AYA）世代から急増する（図 3）。このため、社会的・医療経済学的にも大きな課題となっている。さらに、外科手術をはじめとした化学療法、放射線療法等の“癌治療”は妊孕性に障害をもたらすため、妊娠を希望する AYA 世代にとって大きな障壁とされている。特に卵巣癌の組織型の中でも欧米諸国と比較して日本人女性に多い明細胞腺癌は、化学療法抵抗性で極めて予後不良である。このことから、卵巣明細胞腺癌に対する新規治療戦略の構築が急務となっている。

免疫チェックポイント阻害薬は、進行性・再発性の様々な癌症例に優れた臨床効果をもたらしている一方、卵巣癌に対する奏効率は約 6～15% と極めて低い。このことから、既存薬が主に標的とする PD-1/PD-L1 経路に依存しない新たな治療標的の発見が切望されている。

マクロファージ（MΦ）チェックポイント阻害療法は、癌細胞を貪食・排除する MΦ を利用した次世代の癌免疫療法として注目されている。多くの癌細胞表面に高発現する CD47 と MΦ 上に存在する Signal regulatory protein α （SIRP α ）が結合すると、癌細胞は“don't eat me”シグナルを発することで MΦ による貪食作用を回避している（図 2）。

申請者は最近、婦人科癌を中心にさまざまな癌細胞株を用いた検討を行い、細胞内足場タンパク質である ERM が、CD47 と同様に免疫グロブリンスーパーファミリーに属する PD-L1 と細胞内のアクチン骨格を連結し、足場として PD-L1 の細胞表面局在調節に寄与することを報告している。そこで本研究では、次世代の自然免疫チェックポイント阻害療法開発のための新規治療標的としての ERM の有用性を検討する目的で、日本人女性由来の卵巣明細胞腺癌細胞株を用い、CD47 の細胞膜局在・機能調節における ERM の関与について解析した（図 2）。

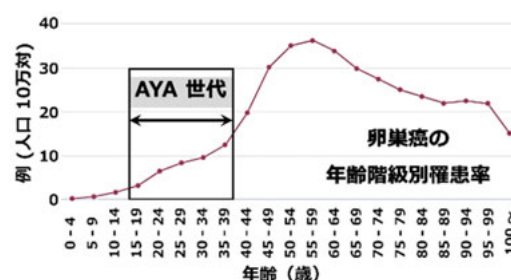


図 3 年齢階級別にみた我が国における卵巣癌の罹患率

3. 研究の結果

(1) 卵巣明細胞腺癌における CD47 と ERM の細胞内共局在性

ヒト卵巣明細胞腺癌由来の RMG-V 細胞における CD47 と ERM の細胞内共局在性を免疫蛍光二重染色により観察したところ、CD47（緑色）は Ezrin、Radixin および Moesin（赤色）と細胞膜領域において共局在性を示した（図 4）。

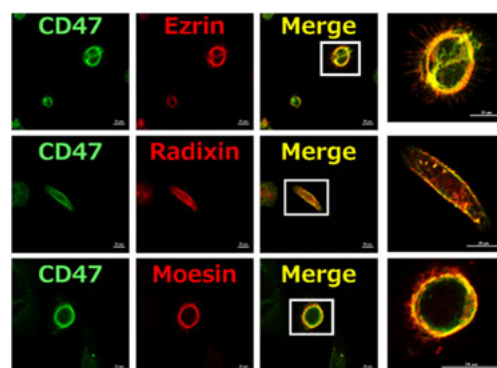


図 4 RMG-V 細胞における CD47 と ERM の細胞膜領域での共局在

(2) 卵巣明細胞腺癌細胞における ERM の発現抑制が CD47 の細胞膜発現量と MΦ チェックポイント機能へ及ぼす影響

RMG-V 細胞への ERM 各々に対する低分子干渉 RNA (siRNA) の処置は、対照群と比較してそれぞれの標的 mRNA 発現量を約 95% 低下させた。本条件下、Moesin の発現抑制は CD47 の mRNA 発現量に影響を及ぼすことなく、細胞膜における CD47 の発現量を対照群と比較して有意に低下させた。一方、Ezrin あるいは Radixin の発現抑制は、CD47 の mRNA および細胞膜発現量へ影響を及ぼさなかった。さらに、siRNA 処置後の RMG-V 細胞を生細胞染色色素である Calcein にて蛍光標識し、ヒト MΦ 様細胞株の U937 細胞と共培養した。その後、フローサイトメトリーにてヒト MΦ の指標となる細胞表面マーカーの CD11b 陽性細胞に占める CD11b 陽性且つ Calcein 陽性細胞の比率を算出することで、癌細胞に対する MΦ の貪食活性として評価した。その結果、RMG-V 細胞における Moesin の発現抑制は、U937 細胞による癌細胞貪食活性を有意に上昇させた。これらの結果から、RMG-V 細胞において Moesin は、CD47 の細胞膜発現と MΦ チェックポイント機能を翻訳後修飾的に調節している可能性が示された。

(3) ヒト卵巣明細胞腺癌細胞における Moesin と CD47 のタンパク質間相互作用

RMG-V 細胞から調製した全細胞溶解液に抗 Moesin 抗体を添加して免疫沈降後、ウェスタンブロットにてタンパク質発現を確認したところ、Moesin および CD47 のバンドが検出された。このことは、Moesin と CD47 間におけるタンパク質間相互作用の存在を示していた。

(4) 卵巣癌の組織型別にみた CD47 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 CD47 と ERM の遺伝子発現レベルについて、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、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 つの組織型別に解析した。その結果、CD47、Ezrin、Radixin の遺伝子発現レベルは、明細胞癌と他の組織型の間で顕著な変化はみられなかった。一方、Moesin の遺伝子発現レベルは、卵巣癌の他の組織型と比較して明細胞癌において有意に上昇した (図 5)。

本研究により得られた以上の知見をまとめると、卵巣明細胞腺癌において過剰発現する Moesin が、CD47 の主要な足場タンパク質としてはたらき、細胞膜での発現・機能調節に寄与している可能性が考えられた。

以上の研究成果を中心に以下の論文として公表し、本研究奨励金による支援を受けた旨、謝辞に明記した。

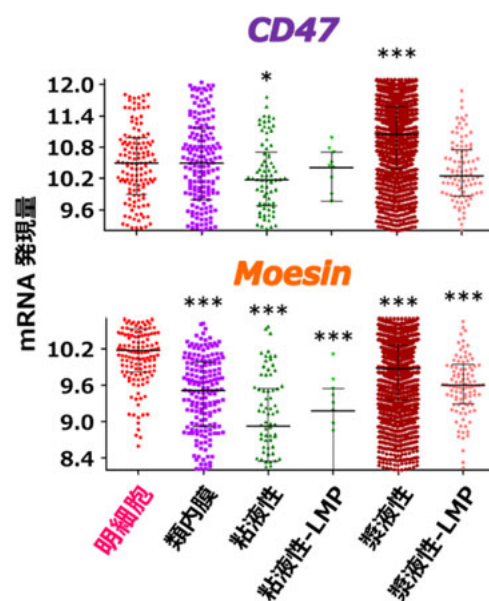


図 5 組織型別にみた卵巣癌患者の腫瘍組織中 CD47 と Moesin の遺伝子発現解析

LMP; 低異型度

*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs. 明細胞

1. **Takuro Kobori**, Mikiko Sugimoto, Takuya Ito, Kikuko Hotta.

Involvement of intracellular scaffold proteins in the expression of immune checkpoint molecule PD-L1 and prognosis in patients with glioblastoma.

Journal of AYA Oncology Alliance, in press (査読有)

2. Yui Ito[†], **Takuro Kobori**[†], Yoko Urashima, Takuya Ito, Kikuko Hotta, Tokio Obata.

Moesin affects the plasma membrane expression and the immune checkpoint function of CD47 in human ovarian clear cell carcinoma.

Journal of Reproductive Immunology, 161: 104185 (2024) (査読有) [†]Equal contribution.

3. **Takuro Kobori**, Yui Ito, Rina Doukuni, Yoko Urashima, Takuya Ito, Tokio Obata.

Radixin modulates the plasma membrane localization of CD47 in human uterine cervical adenocarcinoma cells.

Journal of Reproductive Immunology, 158, 103982 (2023) (査読有)

4. **Takuro Kobori**, Yui Ito, Yuka Sawada, Yoko Urashima, Takuya Ito, Tokio Obata.

Cellular membrane localization of innate immune checkpoint molecule CD47 is regulated by radixin in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

Biomedicines, 11 (4): 1117 (2023) (査読有)

4. 研究者としてのこれからの展望

私の研究における最終的な目標・夢は、「細胞内の足場タンパク質 ERM を介した免疫チェックポイント分子の細胞膜局在・機能制御」という新たな治療概念を導入し、アンメット・メディカルニーズの高い悪性腫瘍に対する革新的な癌免疫療法の開発に貢献することです。今後は卵巣明細胞腺癌のみならず、治療法の進展に乏しい小児脳腫瘍への研究展開も視野に入れ、意欲ある薬学生たちと一緒に研究を推進していきたいと考えています。研究を進める中で、将来的に ERM の発現・活性を調節する酵素などの“druggable”な因子を発見・同定することができれば、既存の抗体医薬品では狙えない細胞内のターゲットに対する低分子化合物あるいは siRNA やアンチセンス核酸を含む核酸医薬などの新たな創薬モダリティの開発に発展する可能性もあると夢を持っています。加えて、既存薬あるいは開発中止となった医薬品・化合物を新規の治療薬として実用化に繋げるドラッグ・リポジショニングの実現も大いに期待できると考えています。「癌細胞の“内側”から攻める」という新たな概念にもとづく夢のあるユニークな新規免疫チェックポイント阻害療法の提案・構築を目指し、これからも大好きな研究を楽しむ気持ちを忘れずに進めていきます。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究の遂行にご支援を賜りました日本私立学校振興・共済事業団の関係者ならびにご寄付頂いた皆様に心より感謝申し上げます。本奨励金によるご支援のもとで多くの研究成果を得ることができ、4 報の原著論文として公表することができました。その原著論文のうち 1 報の筆頭著者は、研究協力者である大阪大谷大学 薬学部 5 年生（研究実施当時）の伊藤 優衣さんです（写真 1）。本奨励金のご支援によって、学部生ながら実験の計画・遂行・まとめ、原著論文の執筆・投稿に加え、日本薬学会第 144 年会（横浜市）にて口頭発表（写真 2）を行うなど、極めて貴重な経験ができました。このように本奨励金は、次世代を担う若手研究者の育成にも大いに活用できたものと考えています。次世代を担う若手研究者へのご支援に対しまして、重ねて厚く御礼申し上げます。今後も本研究をさらに発展させるとともに、研究成果の発信を継続することで、卵巣癌による死亡数の減少、治療成績の向上による女性の社会復帰促進に加え、妊娠・出産を希望する AYA 世代の卵巣癌患者さんに光明をもたらすことが目標です。研究成果を社会へ広く還元できるよう、引き続き研究に精進して参ります。

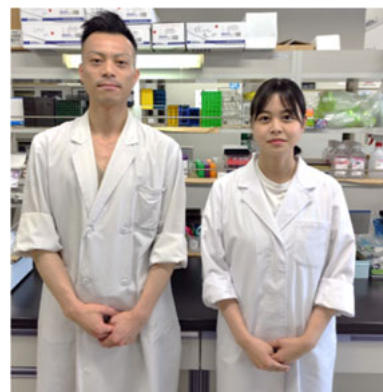


写真 1 実験開始前の申請者と研究協力者（実験室にて）



写真 2 日本薬学会 第 144 年会への参加・発表