

【要約】

PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer

(胃癌における PD-L1 発現と可溶性 PD-L1 分泌についての検討)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：加藤直也教授)

今井 雄史

概要

腫瘍細胞での PD-L1 発現は、胃癌を含むさまざまな癌の抗腫瘍免疫からの逃避に重要な役割を果たす。この研究では、細胞内 PD-L1 発現だけでなく、胃癌細胞株 (MKN1、MKN74、KATO III、OCUM-1) の膜型 PD-L1 発現も調査した。さらに、胃癌細胞株の上清と胃癌患者の血清の両方の可溶性 PD-L1 (sPD-L1) レベルも、酵素免疫測定法 (ELISA) によって測定された。IFN- γ 処理により、MKN74 細胞を除く胃癌細胞株で PD-L1 の細胞質発現が用量依存的に増加したが、TNF- α 処理と PD-L1 発現の増強との間に関係性は認めなかった。これらと一致して、フローサイトメトリー分析でも用量依存的に IFN- γ 処理により膜型 PD-L1 発現も増加したことを示した。それらのうち、顕著な sPD-L1 産生は OCUM-1 の培養上清でのみ観察された。sPD-L1 の血清レベルは、胃癌患者、特に健常者と比較してステージ IV の患者で有意に増加した。結論として、IFN- γ 処理は、胃癌細胞株における細胞内および膜型 PD-L1 発現を同時に増強した。sPD-L1 は、胃癌細胞株の上清だけでなく、胃癌患者の血清でも検出された。PD-L1 発現の調節とその可溶型の産生の両方の根底にあるメカニズムのさらなる分析が必要である。

導入

PD-1 と PD-L1 は、腫瘍における重要な免疫チェックポイントであり、PD-1 / PD-L1 経路が適応免疫回避機構として機能することが知られている。免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) による PD-1 / PD-L1 経路の遮断は、胃癌を含むさまざまな癌にすでに臨床的に適用されている。PD-L1 は腫瘍細胞、腫瘍関連マクロファージ、および T リンパ球の表面に発現し、その発現は IFN- γ や TNF- α などのサイトカインによって誘導される。最近の報告では、sPD-L1 が腫瘍患者の血液から検出されたことが報告されている。しかし、そのメカニズムは完全には解明されていない。この研究では、サイトカイン処理前の胃癌細胞株とサイトカイン処理後の胃癌細胞株の PD-L1 および sPD-L1 分泌の発現について検討した。その後、ELISA を実施して、胃癌患者血清の sPD-L1 を調べた。

結果

・ TNF- α および IFN- γ で処理した胃癌細胞株での PD-L1 発現

サイトカイン誘発性 PD-L1 発現を調べるために、最初に胃癌細胞株 (MKN1、MKN74、KATO III、OCUM-1 細胞) で定量 RT-PCR 分析を実施した。これらの細胞を 1、10、100 ng / mL の TNF- α と 1、10、100 ng / mL の IFN- γ で 24 時間処理した。さまざまな濃度での TNF- α 処理と PD-L1 の mRNA 発現のアップレギュレーションとの間に関係性は認めなかった。対照的に、IFN- γ 処理は、MKN74 細胞を除く胃癌細胞株で PD-L1 mRNA 発現を用量依存的に増加させた。これらの結果と一致して、免疫細胞化学分析により、IFN- γ で処理した MKN1、KATO III、および OCUM-1 細胞における PD-L1 発現の増強が実

証された。

- ・フローサイトメトリーによる膜型 PD-L1 の定量化

0、1、10、100 ng / mL の IFN- γ で 24 時間処理した胃癌細胞株をフローサイトメトリー分析にかけた。MKN1、KATO III、および OCUM-1 細胞は、MKN74 細胞ではなく、IFN- γ 治療での膜型 PD-L1 発現の増加を用量依存的に示した。

- ・胃癌細胞株の培養上清における sPD-L1 の検出

膜型 PD-L1 発現と sPD-L1 産生の関係を調べるために、胃癌細胞株の培養上清中の sPD-L1 を測定するための ELISA を実施した。sPD-L1 は、IFN- γ 処理をしなかった胃癌細胞株の培養上清では検出できなかった。OCUM-1 細胞は IFN- γ 治療に応じて時間依存的に sPD-L1 を産生した。

- ・胃癌患者の血清 PD-L1 濃度の測定

胃癌患者の血清 PD-L1 濃度を測定するために ELISA を実施した。胃癌患者の血清 PD-L1 は、健常人の血清 PD-L1 よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。健常人および胃癌患者の PD-L1 の中央値は、それぞれ 27.4 および 33.8 pg / mL であった。Stage の進行で血清 PD-L1 レベルを比較したところ、IV 期の胃癌患者の血清 PD-L1 は、I 期、II 期、または III 期の患者よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。

討論

正常組織では、PD-1 / PD-L1 の結合により過剰な免疫応答が防止され、免疫寛容の誘導により組織が損傷から保護される。PD-L1 の発現は癌の発生と進行に密接に関連している。

PD-L1 の異常な発現と制御されていない PD-L1 / PD-1 シグナルの両方が、さまざまな癌で観察される。以前の免疫組織化学分析では、胃癌組織の約 40% で PD-L1 発現が検出され、予後不良との相関が示された。PD-L1 の発現は、炎症性シグナル、発癌性シグナル、遺伝的および後成的変化によって調節されている。さらに、PD-L1 陽性のがん細胞と腫瘍内浸潤リンパ球の共存は、胃癌患者の予後不良と関連していることが報告されている。

IFN、TNF、IL などの炎症性サイトカインは、主に腫瘍内浸潤リンパ球から放出され、さまざまな細胞タイプの癌細胞の PD-L1 発現を上方制御している。これらの所見と一致して、IFN- γ 処理により、MKN74 細胞を除く胃癌細胞株で PD-L1 発現が有意に増加した。続いて、我々は、膜型 PD-L1 発現の増加が IFN- γ 処理により誘発される PD-L1 の上方制御を伴うかどうかを調べた。フローサイトメトリー分析により、IFN- γ 処理が用量依存的に膜型 PD-L1 発現を誘導することが明らかになった。

最近の研究では、sPD-L1 がヒト血清サンプルだけでなく、PD-L1 発現細胞株の培養上清でも検出されることが実証された。したがって、本研究では ELISA を使用して胃癌細胞株

の上清中の sPD-L1 を検出した。IFN- γ で処理した 3 つの細胞株では、細胞内および膜型 PD-L1 の両方が上方制御されていたが、sPD-L1 の産生は OCUM-1 細胞でのみ観察された。これには、MMP の一部、もしくは、膜貫通ドメインを欠くスプライシングバリエントが関係している可能性がある。胃癌細胞での sPD-L1 産生のメカニズムを解明するには、さらなる研究が必要である。

sPD-L1 は、さまざまな癌の予後バイオマーカーとしても利用されている。sPD-L1 は阻害剤として機能し、肺癌における ICI の効果を弱めることが報告されている。また、多くの研究により、sPD-L1 高値が胃癌を含む多くの種類のがんの予後不良と密接に関連していることが示されている。これらの報告と一致して、ELISA の結果は、ステージ IV の患者の血清中の sPD-L1 値がステージ I-III の患者よりも有意に高かったことを示した。

結論として、我々の研究は、IFN- γ 処理が胃癌細胞株の一部で細胞内および膜型 PD-L1 発現を同時に増強することを示した。sPD-L1 は胃癌患者の血清でも検出されました。胃癌に対する新規治療アプローチを開発するには、PD-L1 発現の調節とその可溶性の産生の両方のメカニズムのさらなる研究が必要である。