

甲第1549号



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Cisplatin-induced HSF1-HSP90 axis enhances the expression of functional PD-L1 in oral squamous cell carcinoma シスプラチンはHSF1およびHSP90を介して口腔扁平上皮癌の細胞表面におけるPD-L1発現を誘導する
Author(s) 著者	笹谷, 聖
Degree number 学位記番号	甲第3187号
Degree name 学位の種別	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2023-03-31
Original Article 原著論文	Cancer Med. 2022 Oct 6
Doc URL	
DOI	10.1002/cam4.5310. Epub ahead of print.
Resource Version	Author Edition

## 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第1549号	氏 名	笹谷 聖
論文題名 Cisplatin-induced HSF1-HSP90 axis enhances the expression of functional PD-L1 in oral squamous cell carcinoma (シスプラチンは HSF1 および HSP90 を介して口腔扁平上皮癌の細胞表面における PD-L1 発現を誘導する)			
研究目的 再発または遠隔転移を有する頭頸部癌に対して免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体が適応承認されている。抗 PD-1 抗体は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 機能を抑制する PD-L1/PD-1 シグナルを抑制する点に原理があり、シスプラチンなどの殺細胞性化学療法薬との併用療法も実施されている。化学療法が癌細胞上の PD-L1 発現を誘導することは近年の研究で徐々に明らかになりつつあるが、これまでシスプラチンが口腔扁平上皮癌細胞上の PD-L1 発現に与える影響については明らかにされていなかった。抗 PD-1 抗体の奏効率を向上させるために、シスプラチンによる細胞ストレスが口腔扁平上皮癌細胞上の PD-L1 発現に及ぼす影響とその誘導機構について解析することを目的とした。			
研究方法 ・口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 をシスプラチン 10 $\mu$ M 存在下で 24 時間培養し、PD-L1 の発現を免疫蛍光染色、フローサイトメーター、定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロットにて解析した。口腔扁平上皮癌細胞株 HSC4 でも同様の検討を行った。 ・シスプラチンによる細胞ストレスが PD-L1 発現に関与していると考え、癌細胞で高発現しているとされる熱ショック転写因子 1 (HSF1) および分子シャペロンでもある熱ショックタンパク質 (HSP) に着目し、シスプラチンによる HSF1 のリン酸化と、HSP ファミリー (HSP27、HSP70、HSP90) の発現についてウエスタンブロットで検討した。 ・免疫沈降法により PD-L1 に結合する HSP90 を検出し、ウエスタンブロットで解析した。 ・HSF1 の Ser326 擬似脱リン酸化株を作製し、細胞表面の PD-L1 の発現をフローサイトメーターで解析した。 ・HSF1 を shRNA でノックダウンし、シスプラチンによる PD-L1 発現についてフローサイトメーター、定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロットにて検討を行った。 ・HSP27 を siRNA でノックダウンし、シスプラチンによる PD-L1 の発現についてフローサイトメーターで検討した。			

- ・2種類のHSP90阻害薬(17-AAGおよびTAS-116)とシスプラチン併用によるPD-L1発現への影響についてフローサイトメーターで検討した。
- ・ネオアンチゲンをコードする遺伝子AP2S1の安定発現株を樹立し、そのAP2S1特異的なCTL(AKF9-CTL)およびT細胞受容体遺伝子改変T細胞(AKF9-TCR-T)をCD3/28マグネットビーズで刺激しPD-1を強制発現させた。AP2S1安定発現株をシスプラチン刺激し、抗PD-1抗体であるニボルマブを反応させたAKF9との反応を、IFN $\gamma$ エリスポットアッセイにより検討した。

#### 研究成績

- ・シスプラチンによりHSC2細胞表面のPD-L1発現が有意に亢進することを見出した。これは口腔扁平上皮癌細胞株HSC4でも同様の結果となった。一方で、定量的リアルタイムPCR、ウェスタンブロットにおいてmRNAおよび総タンパクレベルは変化しなかった。また、シスプラチンによりHSC2細胞表面のPD-L2発現は誘導されなかった。
- ・シスプラチンはSer326でHSF1をリン酸化させ、HSP27およびHSP90を誘導した。
- ・免疫沈降法において、PD-L1とHSP90の直接結合が確認された。
- ・HSP27のノックダウンでは、シスプラチンによるHSC2細胞表面のPD-L1の発現亢進は打ち消されなかった。
- ・HSF1のノックダウンおよびHSP90阻害で、シスプラチンによるHSC2細胞表面のPD-L1の発現亢進が部分的に打ち消された。
- ・PD-1低発現のAKF9-CTLおよびAKF9-TCR-TではAP2S1安定発現株に対するシスプラチン処理の有無によってIFN $\gamma$ エリスポットアッセイにおけるIFN $\gamma$ 産生細胞数の差はなかったが、PD-1高発現のAKF9-CTLおよびAKF9-TCR-Tではシスプラチン処理したAP2S1安定発現株に対するIFN $\gamma$ 産生細胞数が減少した。更に、シスプラチン処理したAP2S1安定発現株とニボルマブで阻害したPD-1高発現のAKF9-TCR-Tの間では、減少したIFN $\gamma$ 産生細胞数が増加する結果となった。

#### 考察

シスプラチンにより細胞表面のPD-L1が増加していた一方で、mRNAおよび総タンパクレベルは変化しなかったことから、転写後の機序、特に細胞表面への分布等が関与していると考えられた。HSF1のSer326での擬似脱リン酸化株であるSer326Aにおいて細胞表面のPD-L1発現が減少していたことから、HSF1のSer326でのリン酸化が少なくとも部分的にPD-L1の発現に関与していると言える。また、HSF1のノックダウンやHSP90阻害が細胞表面のPD-L1の発現を抑制することが明らかになったが、それらの阻害により抗原提示自体に影響を及ぼす可能性があり、単純に阻害するのみでは抗腫瘍効果を増強させるには至らず、治療に応用するには今後更なる検討が必要である。以上より、シスプラチンがもたらす細胞ストレスがHSF1のSer326でのリン酸化とその下流のHSP90を誘導し、HSP90が

PD-L1 と直接結合して細胞表面の PD-L1 発現が亢進すると考えられた。本研究結果から、シスプラチンと抗 PD-1 抗体の併用の時期等を最適化することで抗腫瘍効果を増強させることが可能であると考えられ、化学療法と免疫療法の複合療法が口腔癌治療に有効である可能性が示唆された。

#### 結論

シスプラチンによる細胞ストレスが HSF1 の活性化と HSP90 の誘導を促し、口腔扁平上皮癌細胞表面における PD-L1 発現を誘導し、CTL を抑制することで免疫逃避に関わっている可能性が明らかになった。

## 論文審査の要旨及び担当者

令和4年12月5日提出

(令和5年3月31日授与)

報告番号	甲第 1549 号	氏 名	笹谷 聖
論文審査 担 当 者	主査 宮崎 晃亘	副査 鳥越 俊彦	
	副査 高野 賢一	委員 一宮 慎吾	

論文題名	Cisplatin-induced HSF1-HSP90 axis enhances the expression of functional PD-L1 in oral squamous cell carcinoma (シスプラチンは HSF1 および HSP90 を介して口腔扁平上皮癌の細胞表面における PD-L1 発現を誘導する)
結果の要旨	<p>本研究はシスプラチンが癌細胞膜上の PD-L1 発現に及ぼす影響とその発現機構について、HSF1/HSP90 に着目し、細胞ストレス応答という独自の観点から解析したものである。シスプラチンによる細胞ストレスが HSF1 の活性化と HSP90 の誘導を促し、HSP90 が PD-L1 と直接結合して口腔扁平上皮癌細胞表面の PD-L1 発現を亢進させることを明らかにした。本研究成果は、実臨床でさらに効果的な抗癌剤と抗 PD-1 抗体併用の治療法開発に繋がるものであり、今後の口腔癌の治療成績向上が期待できるものと考えられる。24 の質疑応答を経て、博士(医学)の学位授与に値すると審査委員全員から評価をいただいた。</p>