主論文の要旨

Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells

（肺がん細胞株における基質硬度による PD-L1 発現の制御）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
病態内科学講座　呼吸器内科学分野
（指導：長谷川 好規　教授）
宮沢 亜矢子

【緒言】

PD-L1 は、肺がんを含むがん細胞の免疫逃避機構において重要な役割を果たしている。また、固形がんである肺がんの特徴として「硬い」という機械特性がある。この特性は、肺がん組織を構成する細胞外基質が硬いことに由来する。細胞には、接着する基質硬度を感知し応答する機構があり、基質硬度により、細胞の運動能、増殖能、遺伝子発現や細胞分化が制御される。がん関連線維芽細胞を含む硬いがん組織では、増殖能が高い細胞への分化や上皮間葉転換の誘導が知られており、基質硬度はがんの進行に寄与すると考えられている。しかしながら、がん細胞における基質硬度の PD-L1 発現への影響については不明である。このため本研究では、肺がん細胞株を用いて基質硬度と PD-L1 発現の関連性について検討した。

【方法】

PD-L1 を強発現するヒト肺腺がん細胞株 HCC827 を、正常肺組織と同程度の硬さ(2kPa)の polyacrylamide hydrogel(ゲル)と肺がん組織を模した硬さ(25kPa)のゲル、plastic dish、及び非足場依存状態で培養し、基質硬度が PD-L1 発現へ与える影響を検討した。細胞形態と増殖能は、位相差顕微鏡での観察と WST-1 法による定量化で評価した。また、Western blot 法と蛍光免疫染色法を用いて、PD-L1 発現を評価した。PD-L1 の siRNA を導入し、PD-L1 の細胞増殖への影響を検討した。

【結果】

肺がん細胞株を硬い基質(25kPa ゲルと plastic dish)と軟らかい基質(2kPa)で培養したところ、軟らかい基質では硬い基質と比較して Western blot 法と蛍光免疫染色法における PD-L1 発現が有意に低下した(Fig. 1A-C)。非足場依存状態で培養した細胞もまた、PD-L1 蛋白発現が減少した(Fig. 1D, E)。蛍光免疫染色法では、基質硬度が増加するに伴い actin stress fiber 形成能が増加した(Fig. 1C)。IFN-γ を添加すると、硬い基質、軟らかい基質、非足場依存状態のいずれの培養条件下にても、PD-L1 の蛋白発現は増加した。位相差顕微鏡における観察では、基質硬度が増加すると細胞増殖能が増加した。また、軟らかい 2kPa のゲルで培養した細胞に IFN- γ を添加したところ、細胞増殖は逆に抑制された(Fig. 2)。次に PD-L1 が硬い基質で細胞増殖に関与するかを調べるため、PD-L1 の siRNA を細胞に導入した(Fig. 3A)。PD-L1 の siRNA を導入した細胞ではコロニー形成能が低下し、WST-1 法においても細胞増殖能が有意に低下した(Fig. 3B-E)。しかし、actin stress fiber 形成は PD-L1 の siRNA を導入しても抑制されなかった(Fig. 3C)。このため、actin 骨格が基質の硬さにより誘導される PD-L1 発現のメカニズムにどのように関与するかを調べるため、actin 重合阻害剤である cytochalasin D を plastic dish で培養した細胞に添加した。Cytochalasin D を添加した細胞では、Western blot 法と蛍光免疫染色法において actin 重合が阻害され、PD-L1 蛋白発現が有意に低下した(Fig. 4)。

【考察】

HCC827 肺がん細胞株を用いた本研究から得られた知見は、次の 4 点である。(1)軟らかい基質、及び、非足場依存状態においては、硬い基質と比較して PD-L1 の蛋白発現が低下した。(2)基質硬度の増加に伴い、actin stress fiber 形成の増加を伴う細胞増殖能が亢進した。(3)PD-L1 の siRNA を細胞に導入すると、actin stress fiber 形成を抑制せずに細胞増殖が低下した。(4) Cytochalasin D を添加すると actin 重合が阻害され、PD-L1 の蛋白発現が低下した。本研究により、腫瘍微小環境の因子の一つである基質硬度が、がん細胞における PD-L1 の発現制御に関与することが初めて明らかとなった。

本研究において、HCC827 細胞株を軟らかい 2kPa のゲル上で培養すると、PD-L1 の蛋白発現が有意に低下した。また、非足場依存状態においても PD-L1 の蛋白発現が低下した。これらの結果より、PD-L1 の発現には、細胞が基質に接着することが必要であると推測された。また、軟らかい基質、及び、非足場依存状態下で培養した細胞や硬い基質上で定常的な PD-L1 蛋白の発現を認めない細胞株に IFN-γ を添加すると、PD-L1 の蛋白発現が増加した。以上より、PD-L1 の発現制御には細胞接着や mechanical cue とは独立した他のメカニズムの存在が示唆される。

一方、actin 骨格は細胞の主要なメカノセンサーであり、メカノトランスダクションを制御する因子として知られる。本研究においては、HCC827 細胞を 2kPa ゲルで培養すると F-actin の形成が低下した。さらに、硬い基質上で培養した細胞に actin 重合阻害剤である cytochalasin D を添加すると、actin 重合の阻害に加えて PD-L1 の発現が低下した。現在、PD-L1 の発現制御メカニズムとして、MAPK、AKT など様々な経路の関与が知られているが、本研究結果により、肺がん細胞株における硬い基質により誘導される PD-L1 発現には、actin 重合も関与していると考えられる。

近年、肺がんにおけるがんの微小環境と PD-L1 発現の関連性が報告されている。組織学的に solid type の腫瘍と unsolid type の腫瘍を比較すると、PD-L1 の発現は solid type で多いと報告されている。また、I 期の肺腺癌において invasive type と non-invasive type を比較すると、PD-L1 発現は invasive type で多いと報告されている。以上からも、基質の硬さは IFN-γ などの他の因子と同様に、PD-L1 発現に寄与していると考えられる。

本研究において、軟らかい基質での培養や PD-L1 の siRNA を肺がん細胞株に導入することで、コロニー形成能や細胞の増殖能が制御されることも明らかとなった。これらから、PD-L1 は基質硬度による細胞増殖のメカニズムに部分的に関与する可能性があると推測される。また、IFN-γ は強力に PD-L1 を誘導する因子であるが、2kPa のゲルで培養した細胞に IFN-γ を添加したところ、HCC827 細胞の増殖は抑制された。PD-L1 は、ある種のがん細胞に定常的に発現することが良く知られているが、HCC827 細胞の増殖制御に関しては PD-L1 非依存性経路が存在し、PD-L1 の発現調節や細胞増殖においての PD-L1 の役割は、細胞の種類や刺激に依存することが示唆された。

【結語】

肺がん細胞株 HCC827 において、基質硬度は actin stress fiber 形成を介して PD-L1 発現を制御する。がん微小環境である基質硬度が肺がん細胞の PD-L1 発現を増強することで、腫瘍の免疫逃避や増殖につながるという肺がん進行の機序が示唆された。