

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	奥田 賢
主 論 文 題 名 : ヒト由来細胞株を用いた DNA 損傷誘発免疫応答メカニズムの解明				
(内容の要旨) 放射線治療 (Radiotherapy : RT) は、免疫・炎症応答を調節する。放射線照射 (Ionizing Radiation : IR) によって誘導される最も重篤な DNA 損傷である DNA2 本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) を起点として核外へ放出された核酸は、I 型 IFN 産生を介して免疫・炎症関連遺伝子の転写を促進し、免疫活性化に寄与することが報告されている。しかし過剰な炎症遺伝子の活性化は、RT 後の副作用をもたらす可能性がある。 悪性新生物 (がん) は、40 年以上にわたり、日本の死因順位 1 位の疾患である。がん治療は、2014 年の免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の承認を皮切りに、手術、放射線療法、化学療法に免疫療法を加えた 4 本柱へ大きく進展した。ICI は一部の固形がんを対象に適応がある一方で、単剤での治療効果は限定的である。近年の研究より、放射線療法や化学療法によってがん細胞に誘導された DNA 損傷が、殺細胞効果だけでなく多様な免疫応答を誘発することが明らかになり、既存の化学放射線と ICI を併用した臨床試験が多様ながん種で進行中である。しかし、免疫応答は組織やがんの種類によって多様であり、併用による十分な治療効果が得られない免疫抑制型腫瘍が存在する。 そこで本研究では、IR による DNA 損傷誘導後の多様な細胞応答解析を行うことで、DNA 損傷を誘導する治療法の個別化医療の開発に向けたメカニズムの解明を目指した。 本研究は以下の 3 章で構成される。 第 1 章 : 放射線治療時に生じる予期せぬ重篤な副作用発生メカニズムの解析 近年の RT では、腫瘍を的確に狙った高線量照射が可能となっている。しかしながら、正常組織への被曝リスクが低下した治療条件下でも、遺伝的要因により一部の患者では、予期せぬ重篤な副作用が発生する。そこで本研究では、RT 後の過剰な炎症反応発生のメカニズムについて解析した。 食道炎による嚥下障害から RT を中止した患者由来の皮膚繊維芽細胞 (Radiation-Sensitive Fibroblasts : RS-Fs) と、2 種類の正常患者由来の皮膚繊維芽細胞を用いて、IR 後における、微小核形成、G2/M チェックポイント停止、DNA 損傷および修復シグナル、炎症関連遺伝子発現について、包括的な解析を行った。				

RS-Fsにおいて、IR後の顕著な微小核形成が認められた。またRS-Fsでは、IR後早期のG2/Mチェックポイント停止を回避し、未修復のDSBを有したまま分裂した細胞の割合が有意に上昇した。さらに、DSB末端の削り込みとATR-Chk1経路の活性化が、RS-Fsにおいて減弱していた。細胞質核酸の放出を介して自然免疫応答を活性化させる微小核の形成増大と一致して、炎症関連遺伝子の発現が、RS-FsにおいてIR後に増大傾向を示した。

本研究は1症例の解析に基づいているが、DSB末端切除の減少とATR-Chk1経路の活性化によるG2/Mチェックポイント停止の減弱が、RT後の炎症応答を悪化させることを示唆している。したがって、G2/Mチェックポイント停止に寄与する遺伝子が、RT後の予期せぬ重篤な副作用を予測する指標になる可能性がある。

第2章：患者由来胆道がんオルガノイドにおける放射線照射後のDNA修復機構および包括的な遺伝子発現解析

胆道がんは、胆管がん、胆嚢がん、十二指腸乳頭がんを含むがんの総称であり、非常に予後が悪いことが特徴である。現状、第一選択薬のICIと化学療法の併用は、唯一根治が期待できる外科的切除を可能にするための腫瘍縮小を目的として使用される。薬物治療効果を高めるには、DNA損傷後の細胞応答の理解が不可欠だが、3次元腫瘍モデルにおいては未だ十分に理解されていない。そこで本研究では、患者由来胆道がんオルガノイドを用いたIR後のDNA損傷応答を解析した。

DNA損傷を誘導する治療法への応答を評価するため、IR後の細胞応答を評価した。患者由来胆道がんオルガノイドは、本学薬物治療学講座の齋藤義正教授よりご提供いただいた。DNA修復および遺伝子発現について、10 GyのX線照射後の免疫蛍光染色および次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析によって統合的に調査した。

X線照射により、上皮構造の肥厚および内腔構造の均一性の低下など、顕著な形態変化が認められた。さらにRNA-seq解析より、X線照射が細胞外マトリックス関連遺伝子の発現を上昇させることが明らかになった。DNA損傷応答解析では、非相同末端結合が主要なDSB修復経路であることが示された。さらにX線照射は、I型IFN産生に寄与するcGAS/STING、RIG-I/MDA-5、JAK/STATのような免疫関連遺伝子の発現を有意に上昇させ、IR後の免疫活性化の可能性を示した。

本研究は1症例の解析に基づいているが、DNA損傷応答が腫瘍構造を変化させ、細胞外マトリックスや免疫関連遺伝子を含む多様な遺伝子発現を調節することを明らかにした。患者間の多様性を反映した情報基盤による本研究の再評価は、胆道がん免疫療法における個別化医療戦略の確立に寄与すると期待される。

第3章：DNA 損傷が惹起する新規免疫治療標的因子の探索とその発現調節機構の研究

第2章で得られた RNA-seq データ解析より、IR 後の発現変動レベルの最も高い免疫抑制分子として、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) が同定された。CEACAM1 は、細胞間相互作用を介した T 細胞疲弊を誘導し、腫瘍免疫を負に制御する共抑制分子として知られる。本研究では、CEACAM1 の DNA 損傷応答依存的な発現制御機構を解析することで、化学放射線による免疫抑制効果について新たな知見を導出することを目的とした。

6 種類のヒトがん細胞株を使用し、X 線照射後の CEACAM1 の mRNA、タンパク質の発現変化、さらに DNA 損傷シグナルへの依存性について、ウェスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR により網羅的に解析した。

X 線照射後 48 時間から 96 時間にかけて、CEACAM1 のタンパク質発現増大が認められた。X 線照射または DNA 損傷誘導化学療法剤（エトポシド、カンプトテシン）処理後 96 時間において、mRNA レベルでも有意な発現増大が認められた。さらに我々の先行研究で報告した、免疫抑制分子 Programmed cell Death Ligand 1 (PD-L1) と同様に DNA 損傷シグナルの ATM/ATR/Chk1 経路に依存する一部の細胞株では、ATM、ATR、Chk1 それぞれの阻害剤添加により、CEACAM1 のタンパク質発現が減弱した。

本研究により、CEACAM1 が DNA 損傷を介した転写翻訳レベルでの発現制御を受け、その一部は DNA 損傷シグナルに依存することが示された。CEACAM1 は、化学放射線による DNA 損傷シグナルに応答する免疫抑制分子として、ICI と化学放射線併用療法の最適化に寄与するバイオマーカーとなる可能性がある。

【主論文に関する原著論文】

・ Oike T#, **Okuda K#**, Haruna S, Shibata A, Hayashi R, Isono M, Tateno K, Kubo N, Uchiyama A, Motegi SI, Ohno T, Uchihara Y, Kato Y, Shibata A. Exacerbated Inflammatory Gene Expression After Impaired G2/M-Checkpoint Arrest in Fibroblasts Derived From a Patient Exhibiting Severe Adverse Effects. *Adv Radiat Oncol*. 9(8):101530. 2024. #Co-first

【参考論文】

・ **Okuda K**, Haruna S, Muramatsu T, Tateno K, Isono M, Miyazaki K, Oike T, Okami H, Yokobori T, Suzuki K, Otsuka K, Takahashi A, Saito Y, and Shibata A. Comprehensive analysis of DNA repair, morphological remodeling and immune-gene expression in patient-derived biliary tract carcinoma organoids following ionizing radiation. *Med Mol Morphol*. 2026. Accepted