

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16328

研究課題名(和文) IL-17制御と免疫チェックポイント阻害のシナジー効果による新規癌免疫療法

研究課題名(英文) Novel cancer immunotherapy with synergistic effects of IL-17 suppression and immune checkpoint inhibition

研究代表者

早田 啓治 (Hayata, Keiji)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90637654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス消化器癌皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍局所のIL-17とSTAT3を同時に抑制することで相乗的な腫瘍増殖抑制効果を認めた。がん微小環境においてIL-17抑制とSTAT3抑制は腫瘍浸潤Th1細胞は増加し、免疫チェックポイント発現を低下させることが明らかとなった。以上、がん微小環境におけるIL-17/STAT3 pathwayは新規の分子標的の一つとなり得ることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境における慢性炎症はIL-17/STAT3 pathwayを介して腫瘍浸潤免疫担当細胞の免疫チェックポイント発現を活性化し、腫瘍の増殖が促進されると考えられる。本研究ではがん微小環境におけるIL-17/STAT3 pathway制御し、慢性炎症を解除することで、相乗的な腫瘍増殖抑制効果を得た。さらに今後、免疫チェックポイント阻害剤を併用することでより強力に免疫逃避機構を解除すれば、さらなる効果増強が得られ、治療抵抗性難治性消化器癌の治療が革新的に進歩する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the subcutaneous tumor model of gastrointestinal cancer in mice, a synergistic tumor growth inhibitory effect was observed by simultaneously suppressing IL-17 and STAT3 at the tumor site. It was revealed that IL-17 suppression and STAT3 suppression increase tumor infiltrating Th1 cells and decrease immune checkpoint expression in the cancer microenvironment. Therefore, it was found that the IL-17 / STAT3 pathway in the cancer microenvironment can be one of the new molecular targets.

研究分野：消化器外科

キーワード：IL-17 STAT-3 免疫チェックポイント分子 がん微小環境 分子標的療法 免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

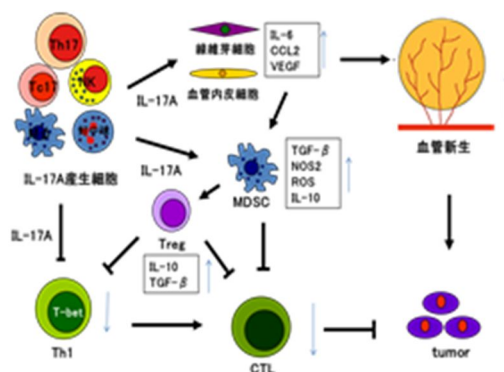
1. 難治性消化器癌の治療戦略

食道癌、スキルス胃癌、膵臓癌などの難治性消化器癌では手術、化学療法、放射線療法の3大療法を超えるような画期的な癌治療法の開発が必要であり、免疫療法は第4の治療法として期待され、臨床応用がされてきている。我々は、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)を増強させ、抗腫瘍効果を図る癌特異的ワクチン療法の開発を行い、報告してきた(Katsuda, Hayata et al. Int J Oncol 2011, Miyazawa, Hayata et al. Cancer Lett 2011)。しかし、これまでの研究ではがん微小環境での免疫抑制メカニズムのために十分な効果を発揮するには至らなかったことが明らかとなってきた。つまり、効率的なCTLの誘導に加えて、がん微小環境での免疫逃避機構や免疫抑制メカニズムをいかに制御するかというパラダイムシフトが必要である。

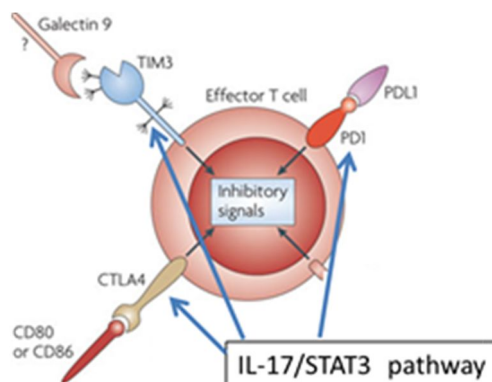
2. IL-17 とがん微小環境

がん治療抵抗性の主な原因となるがん幹細胞、腫瘍免疫逃避機構、血管新生などの維持、増殖はがん微小環境における慢性炎症環境が原因となることは明らかであるが、特定の分子は同定されていない。IL-17は炎症性腸疾患や関節リウマチなどの自己免疫疾患で注目されてきた慢性炎症のキーサイトカインである(J Exp Med 2009)。我々はヒト胃癌腫瘍組織においてIL-17発現量では新生血管増生やリンパ転移に關与することを解明した(Iida, Hayata et al, Oncol Rep 2011)。

さらに申請者はマウス大腸癌細胞株皮下腫瘍モデルにおいてがん微小環境でのIL-17制御することで新生血管抑制とともに腫瘍局所での免疫抑制細胞(制御性T細胞 Treg, 骨髄由来免疫抑制性細胞 MDSC)の抑制を誘導し、抗腫瘍免疫の増強させることを解明した(Hayata et al. PLoS One 2013)。一方、免疫抑制細胞のほかに、がん微小環境の免疫抑制メカニズムとして免疫チェックポイントと呼ばれる免疫抑制性共シグナル分子を活性化することで、CTLなど免疫細胞の活性を抑制するメカニズムが存在するが、これらとIL-17の関連についての報告はこれまでにほとんどなく、IL-17が免疫チェックポイント



分子に及ぼす影響については全く理解されていない。重要な免疫チェックポイント分子としては抗原提示細胞や癌細胞に発現するPD-L1、PD-L2をリガンドとしてT細胞の活性化を抑制するPD-1(programmed death-1)、同様に抗原提示細胞に発現するCD80やCD86分子をリガンドとしてT細胞の活性化を抑制するCTLA-4(Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4)、多くの癌細胞、Tregなどから分泌されるガレクチン9をリガンドとしてリンパ球のアポトーシスを誘導するTIM-3(T cell immunoglobulin and mucin domain 3)があり、一部臨床応用もなされている(J Clin Oncol 2010, N Engl J med 2010, J Exp Med 2010)。



これらの免疫チェックポイント分子は炎症により

活性化するため、慢性炎症のキーサイトカインである IL-17 がこれらの分子発現に重要な役割を担っている可能性は十分に考えられる。がん微小環境における IL-17 を介した免疫逃避機構や免疫抑制メカニズムを解明にすることで、将来的な治療抵抗性の打破の一助となる。

3. IL-17/STAT3 pathway 制御と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法

IL-17 制御による腫瘍増殖抑制効果は認められたものの腫瘍縮小や根絶には至らなかったため、より強力な抗腫瘍効果を得るためには他の治療との併用が必須である。シグナル伝達分子・転写因子である Signal transducer and activator of transcription 3(STAT3)は固形癌において増殖・転移・血管新生などに重要な役割を果たしているが、IL-17 はこの STAT3 を活性化する(J Exp Med 2009)。IL-17 と STAT3 を同時に制御することで相乗的な効果が期待でき、これにより、がん微小環境での慢性炎症状態が解除されれば、免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD-1 抗体、抗 CTCA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体)との併用療法において、さらに強力な抗腫瘍効果が期待できる。

2. 研究の目的

がん微小環境での慢性炎症のキーサイトカインである IL-17 が免疫チェックポイントとどのように関連しているかを解明し、さらに臨床応用への発展を考え、IL-17/STAT3 制御と免疫チェックポイント阻害剤とのシナジー効果により強力な抗腫瘍効果をもった癌免疫療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1. Ad-IL-17 siRNA 腫瘍内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制による免疫担当細胞における免疫チェックポイント分子の発現の検討

マウス大腸癌細胞株 MC38、CT26 5×10^5 細胞を C57BL/6 マウス、BALB/c マウスに腫瘍内投与する。Day5, 8, 11 に Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU、Ad-SNC 1×10^9 PFU、PBS を腫瘍内投与する、Day14 に腫瘍組織、脾臓を採取し、免疫担当細胞を分離する。分離した免疫担当細胞を FACS にて評価する。GoigiPlug 存在下で PMA (10 ng/ml) ionomycin (500 ng/ml) で 5 時間刺激し 細胞回収後、PE anti-TIM3 Ab、PE anti-CTLA-4 Ab、PE anti-PD1 Ab、PerCP-Cy5.5 anti-CD4Ab、FITC anti-CD8Ab で細胞表面染色した後、FITC anti-IFN γ Ab、PE anti-IL-4Ab を用いて細胞内染色を行う。Treg 細胞は PE anti-FOXP3 Ab で細胞内染色を行う。

2. STAT3 siRNA の合成と STAT3 siRNA 発現 adenovirus vector の作製と Ad-STAT3 siRNA を腫瘍局所 STAT3 発現抑制による腫瘍増殖抑制効果の検討

STAT3 に対する siRNA 設計を行い pcPURmU6cassette に 2 種類構築する。抑制効果の良いほうのプラスミッドよりコスミドベクターを作製し、COS-TPC 法にて STAT3 siRNA 発現 adenovirus vector(Ad-STAT3 siRNA)を作製する。In vivo 実験用に Vivapure AdenoPACK100 を使用し、精製、濃縮し、 1×10^{11} PFU/ml 以上の Ad-STAT3 siRNA を得る。

1. のモデルと同様に、Ad-STAT3 siRNA 1×10^9 PFU、Ad-SNC 1×10^9 PFU、PBS を腫瘍内に投与し(各群 n=7) 腫瘍増殖抑制効果を検討する。Day14 に腫瘍を切除し、ウエスタンブロットングにて腫瘍局所における STAT3 の産生抑制を検討する。Day14 に腫瘍組織、脾臓を採取し、免疫担当細胞を分離し、免疫チェックポイント分子の発現を FACS で評価する。これらの結果と上記 Ad-IL-17 siRNA での結果とを比較検討する。

3. Ad-IL-17 siRNA、Ad-STAT3 siRNA を用いたがん微小環境における IL-17/STAT3 発現抑制および免疫チェックポイント阻害剤との併用による腫瘍増殖抑制効果と副作用の検討と免疫環境の変化と抗腫瘍免疫に及ぼす影響の検討

1. のモデルと同様に、Day5, 8, 11 に Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU、Ad-STAT3 siRNA 1×10^9 PFU、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 TIM-3 抗体を腫瘍内投与または静脈内投与する。Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU または Ad-STAT3 siRNA を投与のみ、免疫チェックポイント阻害剤のみ(各群 n=7) の群とそれぞれの併用群で経時的な腫瘍径を計測し、腫瘍増殖抑制効果を比較検討す

る。また同時にマウスの体重、体温、血液検査を経時的に測定し、副作用を比較検討する。Day14に腫瘍組織、脾臓を採取し、免疫担当細胞を分離し、FACSにてTh1/Th2バランス、Treg細胞、MDCSの変化を評価する。また同様に免疫担当細胞を分離し、autoMACSを使用しCD5+細胞を分離し、細胞単核球を分離し、脾細胞をin vitroにてX線照射(75Gy)で非働化したMC38、CT26細胞と3日間混合培養したのち、autoMACSでCD8+細胞を分離し、MC38、CT26細胞をtargetとした4時間Cr-release assayにてCTL活性を評価する。

4. 研究成果

1. Ad-IL-17 siRNA 腫瘍内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制による免疫担当細胞における免疫チェックポイント分子の発現の検討

マウス大腸癌細胞株 MC38、CT26 細胞株を C57BL/6 マウス、BALB/c マウスに腫瘍内投与する。Day5, 8, 11 に Ad-IL-17 siRNA、Ad-SNC(コントロール1)、PBS(コントロール)を腫瘍内投与する、Day14 に腫瘍組織を採取し、免疫担当細胞を分離し、FACS にて評価した。GoigiPlug 存在下で PMA, ionomycin で 5 時間刺激し細胞回収後、PE anti-TIM3 Ab、PE anti-CTLA-4 Ab、PE anti-PD1 Ab、PerCP-Cy5.5 anti-CD4Ab、FITC anti-CD8Ab で細胞表面染色した後、FITC anti-IFN γ Ab、PE anti-IL-4Ab を用いて細胞内染色を行った。Treg 細胞は PE anti-FOXP3 Ab で細胞内染色を行った。結果として Ad-IL-17 siRNA 投与群では腫瘍浸潤 Th1 細胞の増加と Treg 細胞の減少を認め、腫瘍浸潤 CD8 細胞の増加を認め、immune checkpoint の発現が減少する傾向を認めた。

2. STAT3 siRNA の合成と STAT3 siRNA 発現 adenovirus vector の作製と Ad-STAT3 siRNA を腫瘍局所 STAT3 発現抑制による腫瘍増殖抑制効果の検討

STAT3 に対する siRNA 設計を行い pcPURmU6cassette に 2 種類構築する。抑制効果の良いほうのプラスミッドよりコスミドベクターを作製し、COS-TPC 法にて STAT3siRNA 発現 adenovirus vector(Ad-STAT3 siRNA)を作製した。In vivo 実験用に Vivapure AdenoPACK100 を使用し、精製、濃縮し、 1×10^{11} PFU/ml 以上の Ad-STAT3siRNA を得た。マウス大腸癌細胞株 MC38、CT26 細胞株を C57BL/6 マウス、BALB/c マウスに腫瘍内投与し、皮下腫瘍モデルを作成した。Day5, 8, 11 に、Ad-STAT3 siRNA、Ad-SNC 1×10^9 PFU (コントロール1)、PBS (コントロール2) を腫瘍内に投与し、腫瘍増殖抑制効果を検討し、Ad-STAT3 siRNA 群で腫瘍増殖を抑制することを確認した。また、Day14 に腫瘍を切除し、ウエスタンブロッティングで腫瘍局所における STAT3 のタンパク発現が抑制できていることを確認した。また、同様のモデルと同様に、Ad-STAT3 siRNA、Ad-SNC、PBS を腫瘍内に投与し、Day14 に腫瘍組織、脾臓を採取し、免疫担当細胞を分離し、免疫チェックポイント分子の発現を FACS で評価した。結果として Ad-STAT3 siRNA 投与群では IL-17siRNA 投与群と同様に腫瘍浸潤 Th1 細胞の増加と immune checkpoint の発現が減少する傾向を認めたが、IL-17siRNA 群とは逆に Treg 細胞は増加を認めた。

3. Ad-IL-17 siRNA、Ad-STAT3 siRNA を用いたがん微小環境における IL-17/STAT3 発現抑制および免疫チェックポイント阻害剤との併用による腫瘍増殖抑制効果と副作用の検討と免疫環境の変化と抗腫瘍免疫に及ぼす影響の検討

同様の皮下腫瘍モデルにおいて、Ad-IL-17 siRNA、Ad-STAT3 siRNA の同時と投与により、それぞれ単独投与群と比較してより強い腫瘍増殖抑制効果を認めた。免疫チェックポイント阻害剤との併用療法については時間的問題から検討できていない。

以上より、マウス消化器癌皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍局所の IL-17 と STAT3 を同時に抑制することで相乗的な腫瘍増殖抑制効果を認めた。がん微小環境における IL-17 の抑制と STAT3 の抑制は腫瘍浸潤 Th1 細胞を増加させ、免疫チェックポイント発現を低下させることが明らか

となった。以上、がん微小環境における IL-17/STAT3 pathway は新規の分子標的の一つとなり得ることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------