

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591445

研究課題名（和文） 悪性黒色腫シグナル伝達異常による免疫療法抵抗性の解明と克服法の開発

研究課題名（英文） Elucidation of the resistance mechanisms of immunotherapy by the abnormal signal transduction in melanoma and development of methods to overcome it

研究代表者

桜井 敏晴 (SAKURAI TOSHIHARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20101933

研究成果の概要（和文）：我々は、癌細胞で恒常的に活性化しているシグナル伝達経路が、免疫抑制性因子の産生を制御しているという仮説のもと、キナーゼ siRNA ライブラリーとヒト樹状細胞を用いた機能的スクリーニング法により、7つの新規候補キナーゼを同定した。その内 SKT24 は、ヒト悪性黒色腫細胞株及び組織でそのリン酸化が著しく亢進しており、ヒト悪性黒色腫細胞株の IL-10, TGF- $\beta$ , CCL2 の産生抑制を介して免疫抑制機構を成立させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have attempted to identify new signaling molecules which trigger multiple immunosuppressive and tumor promoting cytokines and chemokines. By screening dendritic cell (DC) suppressing activity of culture supernatants from the human melanoma cell line treated with human kinase siRNA library, we found 7 kinases. One of them, Serine/Threonine kinase 24 (STK24), was found to induce production of IL10, TGF- $\beta$ , and CCL2 by human melanoma cells. Phosphorylated STK24 was increased in various human melanoma cell lines and melanoma tissue. These results indicate that activated STK24 in cancer cells is involved in the generation of tumor promoting and immunosuppressive tumor microenvironment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学、悪性黒色腫、免疫抑制、免疫療法、シグナル伝達異常、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、同定されたヒト癌抗原を用いて、各種癌免疫療法の開発と臨床研究が行われてきたが、患者体内で抗腫瘍免疫を誘導する能動免疫法、いわゆる癌ワクチン法では、未だ期待されたほどの治療効果は得られていない。一方、体外で培養し、癌抗原によって活性化した T 細胞を多量投与する養子免疫療法

では、多発性の転移をもつ進行悪性黒色腫患者に対して、標準 RECIST 基準で 70%以上の治療効果が報告された。また最近では、抗腫瘍 T 細胞受容体を導入して作製した抗腫瘍 T 細胞を用いた養子免疫療法において、肉腫などの様々な癌種に対しても高い治療効果が期待できることが報告され、免疫細胞を用いた癌免疫治療法が注目されている。

しかし、現在の養子免疫療法は手間と副作用も伴うため、理想的な治療法とはいえ、今後、さらなる免疫制御法の開発が期待されている。既に海外においては、GSK 社による肺癌ワクチンの第 III 相臨床試験が開始されており、能動免疫法の改良は、癌免疫治療において重要な研究領域となっている。我々は、能動免疫法で十分な効果が得られない主な原因が、癌細胞による免疫抑制であると考え、癌細胞が産生する免疫抑制性分子の産生機構や、T 細胞及び樹状細胞などの免疫細胞に及ぼす影響について解明してきた。

癌細胞による免疫抑制性分子 (IL-10 や TGF- $\beta$  等) の産生は腫瘍免疫抑制の重要な一原因だが、その産生機構の詳細は不明であった。我々は、多くの癌が複数の免疫抑制性分子を共通に産生している背景には、共通の産生機構が存在していると仮定し、多くの癌で共通に活性化しているシグナル伝達経路の関与を解析した。その結果、悪性黒色腫において、変異型 BRAF により恒常的に活性化した MAPK シグナル伝達経路が、IL-10, IL-6, VEGF 等の免疫抑制性サイトカインの産生を誘導し、樹状細胞の成熟化を阻害していることを見出した。これらのシグナル伝達経路の抑制は、複数の免疫抑制性分子の発現を同時に制御する作用を持つことから、個々の抑制性分子を制御する治療法に優る可能性を持つ。今後、新しい癌の免疫制御技術として、これらのシグナル伝達分子に対する分子標的療法が開発される可能性があるが、これらのシグナル経路のみで癌の免疫抑制機構を全て説明することは困難であり、より詳細かつ包括的に腫瘍免疫抑制に関連する新規癌シグナル伝達経路を検索する必要がある。

## 2. 研究の目的

癌細胞による免疫抑制機構は、癌の免疫療法において重大な障害であり、その克服は癌免疫療法を成功に導く上で重要な課題である。しかし、その詳細な分子機構、特に癌細胞に由来する様々な免疫抑制性因子の産生機構の多くは解明されていない。我々は、癌細胞で恒常的に活性化しているシグナル伝達経路の一部が、免疫抑制性因子の産生を制御しているという仮説のもと、機能的スクリーニング法により、腫瘍による免疫抑制の克服を目的とした新規分子標的探索を試みた。

## 3. 研究の方法

ヒト悪性黒色腫細胞の培養上清中には、ヒト単球由来樹状細胞 (MoDC) の TLR4 シグナルを抑制し、IL-12 などのサイトカイン産生を強力に抑制するエフェクター分子が含まれている。そこで本研究では、癌細胞が発現する免疫抑制性エフェクター分子の産生機構を解明する目的で、シグナル伝達経路を標的

とする siRNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニング法を以下のように試行し、新規標的分子を同定し、機能解析を行った。

(1) ヒトのキナーゼを網羅的に阻害する 800 種類の siRNA ライブラリーを悪性黒色腫細胞株 A375 に作用させた時に、その培養上清中に産生される樹状細胞活性化抑制因子の変動を、LPS 刺激後に樹状細胞 (DC) から産生される IL-12 を測定することにより間接的に判定し、IL-12 産生抑制を有意に回復した siRNA を陽性とした。

(2) 更に、陽性キナーゼの発現を抑制する shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製し、恒常的に標的分子の発現を抑制した悪性黒色腫細胞株を樹立し、種々の免疫抑制性分子の産生の変動、細胞増殖・浸潤能に対する影響を評価した。

(3) 同定した候補分子の 1 つである STK24 については、各種癌細胞株・悪性黒色腫組織における活性化状態を正常細胞・組織と比較検討及び、nude mice を用いた移植実験により、担癌生体における STK24 と癌の悪性度や免疫抑制との関連について評価を試み、新規分子標的としての意義について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) キナーゼ siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによる候補分子の同定

ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 に 800 種類のヒトキナーゼを阻害する siRNA を個別に作用させた後、培養上清を回収した。ヒト末梢血単核球より誘導した DC に、回収した上清を添加し一晩静置後、LPS 刺激後に産生されてくる IL-12 を定量し、コントロール A375 の培養上清添加時と比較して、有意に IL-12 産生が上昇 (回復) した siRNA を陽性と判定した。その結果、最終的に 7 種類の陽性キナーゼ siRNA を得た。

### (2) STK24 は CCL2 や IL-10 の産生を介して DC の機能を抑制する

7 種類の候補キナーゼの内の一は、MAPKK である Serine/Threonine Kinase 24 (STK24) を標的としていた。STK24 の機能を詳細に解析する目的で、shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製して、安定した STK24 発現抑制株を作製した。コントロールとして、哺乳類細胞で内在性に発現を認めない蛍光シフェラーゼを標的とする shRNA (GL3B) 発現レンチウイルスベクターを用いた。

スクリーニングに用いた A375 を含む 4 種類の悪性黒色腫細胞株 (624mel, 888mel, 928mel) に STK24 shRNA レンチウイルスベクターを感染させたところ、STK24 の発現抑制に伴い、その培養上清で前処理した DC から産生される IL-12 量が回復したことから、STK24 は各種悪性黒色腫細胞による DC の機能抑制

に関連している可能性が示唆された。

次に、ヒト悪性黒色腫細胞株が産生する免疫抑制分子(IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  等)と STK24 との関連を調べるために、A375 及び 624mel において STK24 を恒常的に発現抑制し、Bio-plex (Bio Rad Inc.)を用いて、癌細胞が産生する液性因子の網羅的な解析を試みた。その結果、A375 及び 624mel において STK24 は、IL-10 や CCL2(MCP-1)の産生に関連していることが示唆されたので、上述の4種類の細胞株において、IL-10 及び CCL2 の産生量を ELISA で再度測定したところ、IL-10 は4種類すべてで、CCL2 は3種類の細胞株(888mel は CCL2 を産生せず)において、STK24 の発現抑制により産生低下が認められた。我々は、中和抗体を用いた実験により、IL-10 及び CCL2 が悪性黒色腫による DC の活性抑制に重要なエフェクターである事を確認しているため、STK24 による樹状細胞活性抑制にはこれら2種類の因子の産生が重要である可能性が示唆された。

### (3) STK24 はヒト悪性黒色腫細胞株の細胞増殖と浸潤能を制御する

これまでに STK24 の下流分子として、serine/threonine kinase である ERK、NDR (nuclear Dbf2-related) kinase 及び PTP-PEST (PEST-type Protein-Tyrosine phosphatase)の3種類が報告されている。NDR は、細胞周期の進行や細胞の形態に関連しており、ERK は多くの癌で活性化している増殖・浸潤などに関連するシグナルである。STK24 の下流で ERK と NDR が活性化されることから、STK24 は癌の増殖・浸潤能などの悪性形質にも関連している可能性が考えられる。そこで、STK24 の発現阻害が、悪性黒色腫細胞株の細胞増殖・浸潤能に与える影響について検討した。STK24 の発現阻害により、624mel を除く3種類の悪性黒色腫細胞株において、僅かであるが増殖抑制効果を認めた。また、Matrigel chamber を用いた浸潤能の検討では、A375 においてのみ弱い浸潤能の低下を認めた。以上の結果より、STK24 シグナルは、一部の悪性黒色腫細胞の細胞増殖や浸潤能にも影響している可能性が示唆された。

### (4) STK24 は多種類のヒト癌細胞株及びヒト悪性黒色腫組織で活性化を認める

STK24 は多くの正常組織で発現しており、特に癌で発現が上昇しているという報告はない。従って、STK24 が癌の免疫抑制機構を克服する分子標的となるためには、STK24 の活性化が、正常細胞・組織と比較して癌細胞・組織で強く起きていることを証明する必要がある。そこで、各種ヒト癌細胞株(悪性黒色腫細胞株8株、大腸癌株4株、肺癌細胞株4株、腎細胞癌株3株、膵臓癌株3株、乳癌

細胞株1株)と、正常細胞(線維芽細胞、293T、T細胞、単球)よりタンパクを抽出し、Phos-tagを加えた SDS-PAGE と western blot により STK24 のリン酸化レベルを比較した。正常細胞と比較して、多くの癌細胞株において STK24 の非リン酸化バンドに対するリン酸化バンドのシグナル比の上昇を認めたことから、STK24 の活性化が、多くの癌細胞株で生じていることが示唆された。

同様に、ヒト悪性黒色腫の組織検体(信州大学医学部皮膚科より提供)においても、正常組織と比較して STK24 のリン酸化レベルの上昇が8検体中5検体で見られた。以上より、STK24 は多くのヒト癌細胞・組織において活性化されているシグナル伝達分子である可能性が示唆され、癌に選択性を持った分子標的となりうると考えられた。

### (5) 担がんマウス生体における癌細胞 STK24 の機能解析

これまでの解析により、STK24 はヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 や CCL2 の産生制御により宿主の免疫応答を抑制すること、STK24 はヒト悪性黒色腫細胞株を含む多くのヒト癌細胞株及び組織においてリン酸化が上昇していることが示され、STK24 が新規分子標的になりうる可能性が示唆された。そこで、STK24 が新規分子標的になりうるかを、マウスモデルを用いて検証した。

ヒト IL-10 や CCL2 はマウスの DC やマクロファージ等に交叉反応することが知られている。IL-10 は癌微小環境において免疫抑制性 DC を誘導し、活性化 T 細胞の機能や増殖を抑制すること、CCL2 は腫瘍局所へのマクロファージや CD31+血管内皮細胞の遊走を誘導し、腫瘍の転移や増殖促進することが既に報告されている。そこで担癌マウス生体において、STK24 の発現抑制が癌微小環境におけるがん免疫抑制や腫瘍の悪性度にとどのような影響をもたらすかを、ヌードマウスを用いて解析を試みた。具体的には、shRNA 発現 HIV ベクターを用いて恒常的に STK24 を発現抑制した A375 ないし、コントロール shRNA(GL3B) を感染した A375 をヌードマウスに移植し、継続的に腫瘍径の測定を行った。STK24 による担がんマウス生体での免疫抑制活性については移植後13日目に、STK24 によるがん微小環境に与える影響については移植後26日目に、それぞれマウスを解剖し、解析を試みた。

### STK24 の発現抑制により腫瘍浸潤 DC の機能は回復し T 細胞の増殖を促進する

*in vitro*での機能解析において、STK24 の発現抑制により複数の免疫抑制分子の産生低下を介して DC の機能が回復することを示してきた。そこで、担がんマウス生体におい

ても同様に、STK24 の発現抑制により DC の機能が回復するか否かについて検討を行った。具体的には A375 移植後 13 日目に、腫瘍組織、センチネルリンパ節及び脾臓を摘出し、CD11c+ DC を単離し、LPS 刺激後のサイトカイン産生能及び T 細胞の活性化に与える影響について比較検討を行った。

LPS 刺激後に DC から産生される免疫抑制性サイトカイン IL-10 は、STK24 を発現抑制した群において、有意に低下した。一方で、炎症性サイトカインであり Th1 誘導を促進する TNF- $\alpha$  の産生は、逆に STK24 を発現抑制した群において上昇が認められた。次に、コントロールマウス群の脾臓から CD90.2+ T 細胞を単離し、各群由来の DC との同種リンパ球混合反応を行ったところ、STK24 の発現抑制群由来の方で、有意な T 細胞の増殖がみられた。STK24 の発現抑制により、癌細胞由来の免疫抑制性サイトカインの低下が誘導され、がん微小環境下における DC の免疫抑制活性が低下したことで、T 細胞の増殖能が回復したと推測される。

#### STK24 は CCL2 の産生を介して腫瘍浸潤マクロファージを増加させ腫瘍の増殖を促進する

腫瘍組織は癌細胞の他に、マクロファージや T 細胞をはじめとした免疫細胞、線維芽細胞や間葉系幹細胞などの間質組織などが集積し、癌間質と呼ばれる微小環境を構成している。特に腫瘍内浸潤したマクロファージは、癌局所において Arginase や iNOs などを産生し免疫応答を抑制するだけでなく、腫瘍の増殖や転移を促進することが既に報告されている。腫瘍が産生する CCL2 は腫瘍内にマクロファージを浸潤させる強力なケモカインであることが知られており、中和抗体を用いた実験において、腫瘍内浸潤したマクロファージを抑制し腫瘍の増殖が低下することが報告されている。STK24 は悪性黒色腫細胞株の CCL2 の産生を制御している分子であるため、癌微小環境に作用し、腫瘍の増殖に影響を与える可能性が推測されるため、継続的な腫瘍径の測定及び、腫瘍内浸潤したマクロファージの細胞数について比較検討を行った。移植後 25 日目の腫瘍径を比較したところ、STK24 をノックダウンした群において、コントロール群 (GL3B) よりも有意な腫瘍径の差を認めたため、移植後 26 日目において、各群より腫瘍の摘出を行い、腫瘍内浸潤しているマクロファージの細胞数について比較を試みた。その結果、STK24 ノックダウン群においては、マクロファージの浸潤が低下していることを認めた。

以上のことより、STK24 の発現抑制に伴い、癌細胞が産生する IL-10 や CCL2 などの免疫

抑制性のサイトカインやケモカインの産生が低下することや、これら液性因子は DC やマクロファージの機能を抑制していることを見出した。また、担がんマウスモデルを用いての STK24 の機能解析において STK24 は、IL-10 等の免疫抑制分子の産生を介して腫瘍内浸潤している DC の免疫抑制の誘導及び、CCL2 の産生を介した腫瘍局所へのマクロファージの浸潤促進と腫瘍の増殖促進を誘導していることも見出した。CCL2 の産生経路については NF- $\kappa$ B が関連していることが報告されているが、NF- $\kappa$ B は免疫細胞を含め正常な細胞において重要なシグナルであるため、治療標的に不向きである。しかし、STK24 は癌組織において活性が特異的に上昇していることを見出しており、副作用の少ない薬剤の開発につながる可能性がある。

今後は、残りの候補分子に關しても同様に悪性黒色腫における病態形成とその免疫抑制機構との関連性などを解析していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Iwata K, Jihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, Miyagishi M, Takeda K, Kawakami Y. Enhanced Cancer Immunotherapy Using STAT3-Depleted Dendritic cells with High Th1-Inducing Ability and Resistance to Cancer Cell-Derived Inhibitory Factors. The Journal of Immunology. 2011 Vol.187, No.1, pp27-36, 査読有

Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata K, Jihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. Int J Hematol. 2011, Vol.93, No.3, pp294-300, 査読有

川村直、谷口智恵、桜井敏晴、河上裕、癌微小環境における PD-L1/PD-1 による免疫抑制病態とその是正、臨床免疫・アレルギー科、2011 Vol.56, No.1, pp1-6 査読有

Goto Y, Koyanagi K, Narita N, Kawakami Y, Takata M, Uchiyama A, Nguyen L, Nguyen T, Morton DL, Hoon D. Aberrant Fatty Acid-Binding Protein 7 Gene Expression In Cutaneous Malignant Melanoma. 2010, Vol.130, No.1, pp221-229, 査読有

Tsukamoto N, Okada S, Onami Y, Sasaki Y, Umezawa K, Kawakami Y. Impairment of pDC for IFN production by the ligand

for immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7) expressed on human cancer cells. Clin Cancer Res. 2009, Vol.15, No.18, pp5733-43, 査読有  
Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during EMT of cancer cell. Cancer Cell. 2009, Vol.16, No.3, pp195-206, 査読有  
河上裕、住本秀敏、工藤千恵、塚本信夫、桜井敏晴、植田良、谷口智憲、川村直、梶原知子、腫瘍免疫制御機構とその克服、最新医学、2009、Vol.64、No.11、pp94(2428)-99(2433)、査読無

〔学会発表〕(計10件)

Kawakami Y, Tsukamoto N, その他、Enhanced metastasis through immunosuppressive cancer microenvironment and its control by targeting signaling molecules. 第70回日本癌学会総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場、名古屋

Kawamura N, Kawakami Y, その他、Roles of STAT3 in dendritic cells in cancer induced immunosuppression and its control for effective immunotherapy. 第70回日本癌学会総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場、名古屋

Kawase Y, Sakurai T, Fujita T, Kawakami Y, その他、Poor responses to dendritic cell immunotherapy in patients with high serum cytokines related to chronic inflammation. 第70回日本癌学会総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場、名古屋

Yaguchi T, Kawakami Y, その他、Histatin-1 enhances metastatic and immunosuppressive activity of human malignant melanoma. 第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場、名古屋

河上裕、塚本信夫、その他、がん免疫逃避機構とその制御。第15回日本がん免疫学会総会、2011年7月1日、大阪府・千里ライフサイエンスセンター、大阪

谷口智憲、河上裕、その他、悪性黒色腫に異所性に発現する Histatin-1 は細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる。第15回日本がん免疫学会総会、2011年6月30日、大阪府・千里ライフサイエンスセンター、大阪

川村直、河上裕、その他、がん微小環境免疫抑制病態における樹状細胞STAT3の意義とその制御。第15回日本

がん免疫学会総会、2011年6月30日、大阪府・千里ライフサイエンスセンター、大阪

Yutaka Kawakami, Nobuo Tsukamoto, Tomonobu Fujita, Toshiharu Sakurai, Tomonori Yaguchi、Possible improvement of cancer immunotherapy based on the analyses of anti-tumor immune responses in human. 金沢国際がん生物学シンポジウム、2010年8月29日、KKRホテル金沢、金沢

谷口智憲、桜井敏晴、塚本信夫、藤田知信、河上裕、悪性黒色腫および樹状細胞でのWnt/ $\beta$ -cateninシグナル亢進はがん微小環境での免疫抑制に關与する。第14回日本がん免疫学会総会、2010年7月23日、KKRホテル熊本、熊本

河上裕、悪性黒色腫に対する免疫応答と免疫療法-最近の進歩-、第22回日本色素細胞学会総会、2009年12月5日、電気ビル、福岡

〔図書〕(計1件)

河上裕、シーエムシー出版、がん関連微小環境における免疫抑制とその制御、バイオテクノロジーシリーズがん免疫療法-実用化へのチャレンジ-Cancer Immunotherapy; Challenge to Practical Use 2010 pp158-168

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井敏晴 (SAKURAI TOSHIHARU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20101933

(2) 研究分担者

藤田知信 (FUJITA TOMONOBU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20199334

塚本信夫 (TSUKAMOTO NOBUO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20407117

河上裕 (KAWAKAMI YUTAKA)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：50161287

(3) 研究協力者

川村直 (KAWAMURA NAOSHI)  
慶應義塾大学・医学部・大学院博士課程  
研究者番号：30570246