

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591613

研究課題名(和文)メラノーマ担癌宿主に対する有効な免疫治療法を確立するための基礎研究

研究課題名(英文)Analyses for the establishment of the effective immunotherapy to melanoma-bearing hosts

研究代表者

柴垣 直孝 (SHIBAGAKI, Naotaka)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：40262662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞のSTAT3持続活性化を、我々が開発した癌微小環境局所で阻害する新規分子標的薬(rR9-GRIM19)による治療法と、各種免疫療法との抗腫瘍相乗効果について検討を行った。in vitro でB16メラノーマ株がtype I/II interferonとrR9-GRIM19の両曝露でのみ細胞増殖抑制と細胞死を来す事を確認した。一方、in vivo においてはrR9-GRIM19に加え、CpG, rR9-OVA (Th1/Tc1-inducers) を共接種した場合のみB16腫瘍塊の完全拒絶と共に、IFN-gamma産生型B16-specific CTLの誘導を認めることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We revealed that STAT3-restricted cytokines, especially IL-6 from B16 melanoma cells suppressed IFN-gamma-production in both CD4+ and CD8+ T-cells. In culture, IL-6 from B16 cells was reduced by pretreatment with rR9-GRIM19. In vivo, although intratumoral injections of rR9-GRIM19 elicited anti-B16 effects with frequencies of IL-6-producing T-cell phenotypes, complete B16 regression was not observed. To elicit complete B16 regression, we investigated the antitumor effects of combination immunotherapies with rR9-GRIM19. rR9-GRIM19 elicited enhanced antitumor effects when combined either with rR9-OVA or CpG-ODN, but only the combination of CpG-ODN, rR9-OVA, and rR9-GRIM19 (COG therapy) elicited complete B16 tumor regression. Interestingly, melanoma-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) expansion with IFN production occurred in COG-treated B16-bearing. We finally confirmed that rIFN exposure could significantly enhance rR9-GRIM19-treated anti-B16 melanoma effects in vitro and in vivo.

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：腫瘍免疫 悪性黒色腫 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行期皮膚癌では癌細胞の STAT3 が恒常的に活性化しており、細胞増殖、抗アポトーシス、細胞遊走、血管新生、IL-6/ IL-10 産生に関与する事で癌の進展を促進させる。一方、STAT3 は STAT1 の natural antagonist であり GAS motif (interferon-gamma activated sequence) を介する遺伝子転写を強力に競合阻害するため、STAT1 を活性化する type I/II IFN 曝露による直接の癌細胞死を抑制する。即ち癌細胞の STAT3 活性は担癌宿主におけるがん免疫療法の抗腫瘍効果抑制の主な要因となっている。従って、進行期の癌治療において強力な抗腫瘍効果を誘導させるには STAT3 阻害薬の併用/全処置は今後必須となる。しかしながら、STAT3 signal は正常細胞でも(再生/創傷治癒などに) 利用されている分子であり、既存の STAT3 阻害薬を全身投与すると致死的な副反応を誘導しうるため、癌局所でのみ作用する分子標的薬/投与法の開発が待たれてきた。

(2) 接種局所に作用する STAT3 特異的分子標的阻害薬の開発 ; rR9-GRIM19

全ての正常細胞内に存在する GRIM19 分子 (MW; 19kDa) は、活性化/リン酸化 STAT3 (pSTAT3) のみに結合し STAT3 を介する転写機能を阻害するいわば STAT3 natural antagonist である。我々はこのマウス GRIM19 分子に Poly-arginine protein-tansduction domain (R9-PTD) を融合させたりコンビナントタンパク質を作製/大量精製した。この rR9-GRIM19 融合タンパクは効率よく細胞質内に大量に導入されるため、STAT3 転写阻害薬 (STAT3 signaling inhibitor) としての働きを有することを確認した。過去我々は、各種マウス癌細胞株を用いて、rR9-GRIM19 の in vitro/ in vivo における抗腫瘍効果の検討を行った。その結果、rR9-GRIM19 は pSTAT3 が発現する癌細胞株のみに増殖抑制/細胞死誘導効果を認めることを確認した。特に、A20 細胞株 (murine B cell

lymphoma ; pSTAT3 強発現) では、rR9-GRIM19 単独の曝露により細胞死 (in vitro) と、A20 担癌マウスにおける完全拒絶 (in vivo) を認めた。しかしながら、B16 担癌マウスに rR9-GRIM19 単独接種しても有意な抗腫瘍効果を認めるものの、完全拒絶には至らなかったという経緯がある。

2. 研究の目的

In vitro において細胞増殖/細胞死を誘導する条件を検討した後、B16 担癌マウスを用いて、rR9-GRIM19 腫瘍内接種と共に行う事で強力な抗腫瘍相乗効果を来す治療法の組み合わせを検討することとした。さらに、B16 腫瘍塊を完全拒絶する治療法の組み合わせを同定する。

3. 研究の方法

(1) in vitro における B16 細胞株の細胞死誘導の条件

type I interferon (IFN-beta), type II interferon (IFN-gamma); STAT1 activators rR9-GRIM19 ; STAT3 signal inhibitor の単独、併用曝露における B16 細胞株の細胞増殖抑制/細胞死誘導の解析

(2) in vivo における B16 担癌マウスの完全拒絶の条件

rR9-GRIM19 B16 腫瘍内接種と、rIFN-beta, IFN-gamma, Trp2-peptide, CpG, rR9-OVA (OVA-specific Th1/ Tc1-inducer with IFN- γ production) との組み合わせによる抗腫瘍効果の検討、ならびに腫瘍局所、所属リンパ節 T 細胞の解析

4. 研究成果

(1) B16 メラノーマ細胞株に対する in vitro での rR9-GRIM19 曝露による影響

まず我々は、rR9-GRIM19 単独曝露 (即ち培養液中添加) が in vitro において B16 メラノーマ細胞株 (pSTAT3 中等度発現) に対し、

細胞増殖抑制作用, 軽度のアポトーシス作用, B16細胞株から産生されるIL-6抑制作用を誘導することを確認した。

一方、メラノーマ細胞をはじめとする癌細胞は、IFN-beta/-gamma (100~1000U/ml)曝露により、STAT1を介して細胞増殖抑制/アポトーシス誘導作用を有するとされている。しかし我々は、in vitroでIFN-beta/IFN-gamma/rR9-GRIM19単独曝露のB16細胞株に対する抗腫瘍効果が低いことを確認した。ところが、IFN-beta/IFN-gammaとrR9-GRIM19にて48時間以上共曝露すると、annexin V, caspase 3陽性となりB16細胞株の4割以上がアポトーシス/細胞死を来す。また、IFN-beta/IFN-gammaとrR9-GRIM19にて48時間以上共曝露すると生存細胞数は1割以下まで減少することを確認した(図1)。

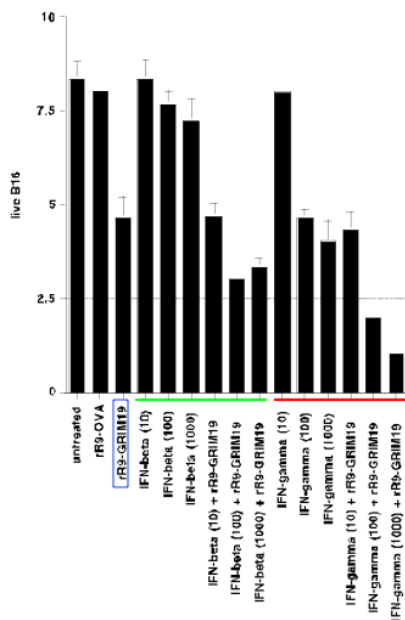


図1

一方、STAT3の活性化を認めないNIH3T3細胞では、このようなアポトーシス誘導の増強は確認されなかった。

以上の結果は、B16癌微小環境においてIFNの曝露に加え、rR9-GRIM19を局注すると強力な抗腫瘍効果を発揮しうることが示唆されている。

(2) B16担癌マウス所属リンパ節内CD8+ T細胞の cytokine profile の解析

無治療のB16担癌マウスの所属リンパ節内CD4/CD8+ T細胞をin vitroでPMA+ionomycinで刺激した際の cytokine profileを解析したところ、IFN-gamma産生能は著しく阻害されていると同時に、(STAT3依存性サイトカインである)IL-6/IL-10産生能を獲得していることが確認された。また、naiveマウスより分離したCD8+ T細胞をB16-cultured supernatantsにて12時間培養するとIFN-gamma産生能は著しく阻害されることが確認された(図2)。

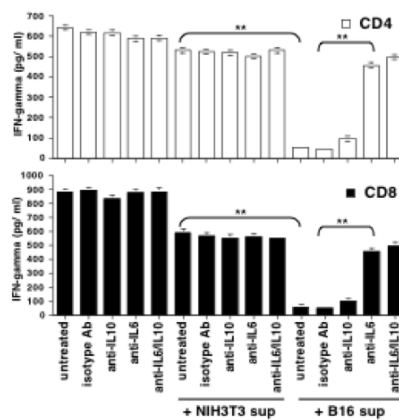


図2

しかしこのIFN-gamma産生抑制作用はrR9-GRIM19、又はIL-6中和抗体の添加で回復した。

これらの結果は、B16細胞が産生する(STAT3下流分子である)IL-6を介して、微小環境に存在するCD4/CD8+ T細胞が修飾され、IFN-gamma産生能(Tc1への分化)が強力に阻害されることを示唆している。更に、rR9-GRIM19を腫瘍塊に局注すると癌細胞だけでなく、領域に存在する免疫細胞(抗原提示細胞、リンパ球など)のSTAT3-signaling cascadeをも阻害することで抗腫瘍効果を発揮することを示唆している。

(3) B16担癌マウスに対するin vivoでの抗腫瘍効果の検討

B16担癌マウスの腫瘍塊にrR9-GRIM19

を単独で局注すると有意な抗腫瘍効果を認めるが、完全拒絶は認めない。また、この所属リンパ節の CD8+ T 細胞の cytokine profile を解析しても、依然 IFN-gamma 産生能は回復していなかった。

一方、過去我々は naive マウスの皮内に(免疫原性の非常に高い) rR9-OVA を接種すると接種部の IFN-gamma 産生が著しく亢進すると共に、OVA-specific CD4+/CD8+ T 細胞が誘導されること、また rR9-OVA を pSTAT3 を発現しない腫瘍塊内に接種すると強力な抗腫瘍効果を発揮することも報告してきた。そこで、B16 担癌マウスにおいて B16 腫瘍塊を完全拒絶させる様々な治療の組み合わせを検討した結果、B16 腫瘍塊に CpG (Th1-adjuvant), rR9-OVA, rR9-GRIM19 (COG therapy)の3者を接種すると B16 腫瘍塊が完全拒絶されることを確認した(図3)。

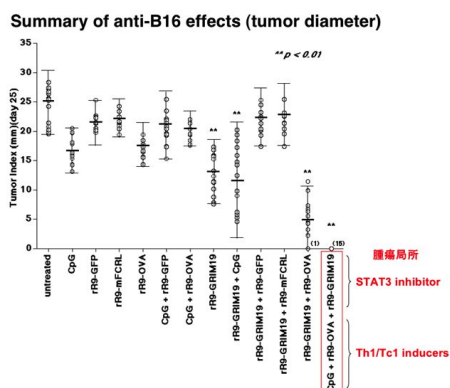


図3

この際、所属リンパ節の CD8+T 細胞は、PMA + ionomycin 刺激で IFN-gamma を産生する事、B16 腫瘍塊内に CD8+ T 細胞が浸潤している事、また COG therapy は、予め CD8+T 細胞を除去することで、著しい抗腫瘍効果の減弱を認める事を確認した。更に、B16 担癌マウスに COG therapy を施行すると、B16-specific 獲得免疫 (Trp2-specific CTL 数の増加を Trp2-epitope tetramer 染色にて確認)が誘導されることも明らかとした。

これらの結果は、CpG+rR9-OVA 接種が IFN-gamma 産生型 CD8+T 細胞を誘導し癌

局所での IFN-gamma 産生の source となり、rR9-GRIM19 曝露との相乗効果で強力な抗腫瘍効果を発揮するようになることを示唆している。

(4) rR9-GRIM19 による rIFN を B16 腫瘍塊に直接接種した場合の抗腫瘍増強効果

これまでの結果を踏まえ、B16 腫瘍塊に直接 rR9-GRIM19 とリコンビナント IFN を共接種すると、はたして完全拒絶をきたしうるかを検討することにした。IFN は rInterferon-beta (1000 U/mouse), rInterferon-gamma (1000 U/ml) を使用した。接種方法は、B16 (2x10⁵/mouse) 皮内移植 3 日後(黒色結節を形成)より、連日 3 日間 (day 3, 4, 5) 腫瘍内接種とした。

その結果、rIFN-beta, rIFN-gamma、rR9-GRIM19 単独接種群では、in vitro での効果と同様に僅かな抗腫瘍効果を認めるに過ぎなかったのに対し、rIFN-beta/rIFN-gamma と rR9-GRIM19 共接種群では B16 腫瘍塊部の潰瘍を伴う完全拒絶を認めた。しかし、IFN-beta + rR9-GRIM19 接種群では完全拒絶が継続されたのに対し、IFN-gamma + rR9-GRIM19 接種群では day 14 より潰瘍辺縁部からの B16 肉眼的再発(黒色結節)を認める様になった。

一方、rIFN-beta + rR9-GRIM19 接種群の完全拒絶マウス day 30 に再び B16 の再移植を試みたが、残念ながら memory 効果は誘導されておらず、B16 腫瘍塊は生着した。また、rIFN-beta + rR9-GRIM19 接種群の完全拒絶マウスの所属リンパ節を解析した結果、B16 melanoma-specific CTL (Trp2-specific tetramer 陽性細胞)の増加は認められなかった。

以上の結果は、rIFN + rR9-GRIM19 直接腫瘍内接種による完全拒絶の機序は、直接癌細胞を傷害する強力な抗腫瘍効果誘導によるもので、副次的に強力な癌特異的獲得免疫能は誘導されないことを示唆している。

(5) 考察

今回の結果は、今後の癌治療の方向性を明確に示している。即ち、どのような癌治療においても局所 STAT3 阻害療法は、癌細胞死を増強させるため必須となるであろう。特に、がん免疫療法単独での抗腫瘍効果が低かった原因の一つが明らかとなった現在、既存の癌治療法に rR9-GRIM19 併用を試みる価値はあるものと思われる。しかしながら、我々の結果では、癌抗原ペプチドとの併用療法では、併用効果が確認できなかった。

一方、免疫原性の高い外来抗原 (rR9-OVA) との併用では、強力な抗腫瘍効果と共に Ag/epitope-expansion により melanoma-specific CD8+T cell の増加が確認された。従って、癌免疫療法を行う場合、原発巣の治療に対しては抗腫瘍効果と癌特異的免疫誘導の両者を来す治療法の組み合わせ (COG therapy) を、一方転移巣に対しては抗腫瘍効果を誘導するより簡便な治療法 (rIFN-beta + rR9-GRIM19) が適当ではないかと思われる。

今後は、マウスモデルからヒトモデルに移行し、ヒト型 rR9-GRIM19 を作成/精製し、ヒトメラノーマ株を用いて同様の抗腫瘍効果が誘導されるかを検証する。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (3件)

柴垣直孝 腫瘍免疫療法のトピックス Skin Cancer 査読無、26巻 2012、267-273.

柴垣直孝、島田真路 Protein-transduction domain を用いた抗原性の増強 臨床免疫アレルギー科 査読無、55巻 2011、255-261.

NAOTAKA SHIBAGAKI Novel Immunotherapeutic approaches to skin cancer treatments using protein transduction technology Journal of Dermatological Science 査読有、61巻

2011 153-161. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.12.003

[学会発表] (11件)

柴垣直孝 最新の皮膚医学研究 ; STAT3 に対する新規分子標的阻害薬の開発とその抗腫瘍効果の解析 第112回日本皮膚科学会総会 学術大会 平成25年6月26日 横浜市

柴垣直孝 IL-6 produced from B16 melanoma cells activates STAT3 in all CD4+ and CD8+ T cells with suppressing the IFN-gamma-producing potential. 第17回日本がん免疫学会総会 平成25年7月4日 宇部市

Naotaka Shibagaki Complete B16 melanoma regression with melanoma-specific CTL expansion is elicited simply by intratumoral injections of rR9-GRIM19 plus Th1/Tc1-inducible adjuvants. 8th World Congress of Melanoma (World melanoma 2013) 平成25年7月17-20日 ドイツ ハンブルグ

柴垣直孝 がん微小環境における免疫抑制状態の機序 第29回皮膚悪性腫瘍学会総会 平成25年8月9日 甲府市

柴垣直孝 A20 tumor regression by rR9-GRIM19 is elicited via T cell conversion of IL-10 into IL-17/IFN-gamma-producing phenotypes. 第16回日本がん免疫学会総会 平成24年7月26-28日 札幌市

柴垣直孝 Complete cutaneous B-cell lymphoma regression following intratumoral injections of a novel STAT3-inhibitor (rR9-GRIM19) alone is elicited via rapid CD8+ and CD4+ T cell conversion of IL-10-producing into

IL-17/IFN-gamma-producing phenotypes. 第42回ヨーロッパ研究皮膚科学会総会 平成24年9月19日—22日 イタリア ベニス
柴垣直孝 B cell lymphoma regression following intratumoral injections of a novel STAT3-inhibitor (rR9-GRIM19) alone is elicited via both CD8+ and CD4+ T cell conversion of IL-10-producing into IL-17/IFN-gamma-producing phenotypes. 第41回日本免疫学会総会 平成24年12月7日 神戸市
花輪書絵、柴垣直孝 A20 tumor regression by rR9-GRIM19 is elicited via both CD8+ and CD4+ T cell conversion of IL-10 into IL-17/IFN-gamma-producing phenotypes. 第37回日本研究皮膚科学会総会 平成24年12月8日 那覇市
柴垣直孝 腫瘍免疫療法のトピック—治療効果を向上させるためには— 第27回日本皮膚悪性腫瘍学会総会 平成23年6月4日 新宿
Naotaka Shibagaki Complete A20-tumor rejection by intratumoral injections of a novel STAT3-inhibitor (rR9-GRIM19) alone is elicited via rapid CD8+ and CD4+ T cell conversion of IL-10-producing into IL-17/IFN-gamma-producing phenotypes. 第15回日本がん免疫学会総会 平成23年6月30日 大阪市
花輪書絵、柴垣直孝 CTL-mediated complete B16-melanoma rejection was elicited only by the combination therapy with STAT3-inhibitor plus Th1-inducer stimulations. 第36回日本研究皮膚科学会総会 平成23年12月9日 京都市

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplayInfo.Scholar/0/7FB51F55041ACE1A.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴垣 直孝 (SHIABAGKI, Naotaka)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：40262662

(2) 研究分担者

猪爪 隆史 (INOZUME, Takashi)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80334853

花輪 書絵 (HANAWA, Fumie)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80535592