

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791145

研究課題名(和文) 担癌宿主におけるSTAT3阻害剤(GRIM-19)を用いた抗腫瘍効果の研究

研究課題名(英文) Analysis for the anti-tumor effect of STAT3 inhibitor (rR9-GRIM19) against tumor-bearing host

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：進行期担癌宿主では、健常者で誘導されるべき免疫反応が誘導されない。この原因の一つである癌細胞のSTAT3持続活性化を、我々が開発した癌微小環境局所で活性化STAT3阻害する新規分子標的薬(rR9-GRIM19)による治療法と、各種がん免疫療法と組み合わせる事で得られる抗腫瘍相乗効果について検討を行った。B16メラノーマ担癌マウスにおいてはrR9-GRIM19の腫瘍塊内接種に加え、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)：Crosstalk between cancer cells and immune cells in established cancer microenvironment leads to the restriction of immune responses via phosphorylated STAT3 (pSTAT3). To inhibit STAT3-mediated signaling cascades in cancer microenvironment, we generated rR9-GRIM19 fusion proteins. 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 (as our Th1/Tc1-inducible adjuvant) 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-g production occurred in COG-treated B16-bearing. our results indicate that strong antitumor effects could be elicited when the cancer microenvironment was simultaneously exposed with STAT3 inhibitor and STAT1 activator (Tc1/Th1-inducible adjuvants).

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：皮膚科学 皮膚腫瘍学

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 産生に關与する事で癌の進展を促進させる。また、癌細胞の STAT3 活性は担癌宿主における癌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 阻害薬の併用が有効である。しかしながら、既存の STAT3 阻害薬を全身投与すると致死的な副作用を誘導しうるため、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いる。

(2) 全ての正常細胞内に存在する GRIM-19 分子 (MW; 19kDa) は、活性化/リン酸化 STAT3 (pSTAT3) に結合し STAT3 を介する転写機能を阻害することが知られている。我々はこのマウス GRIM-19 分子に Poly-arginine protein-transduction domain (R9-PTD) を融合させたりコンビナントタンパク質を作製した。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 のシグナルをブロックすることが可能となる。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増殖を抑制し、細胞死を誘導することを確認した。特に、A20 細胞株 (マウス B 細胞リンパ腫; pSTAT3 強発現) では、rR9-GRIM19 投与により細胞死 (in vitro) と、A20 担癌マウスにおける完全拒絶 (in vivo) を認めた (腫瘍内接種)。しかしながら、B16 細胞株 (マウス悪性黒色腫; pSTAT3 弱発現) 担癌マウスに rR9-GRIM19 を腫瘍内接種しても有意な抗腫瘍効果を確認するものの、完全拒絶には至らなかった。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

rR9-GRIM19 の B16 腫瘍内接種と、 CpG, rR9-OVA (OVA-specific Th1/ Tc1-inducer with IFN-gamma 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 細胞の解析を行う。

4. 研究成果

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

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 産生の著明な低下を認めた。また、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、naïve 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。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。(図 1)

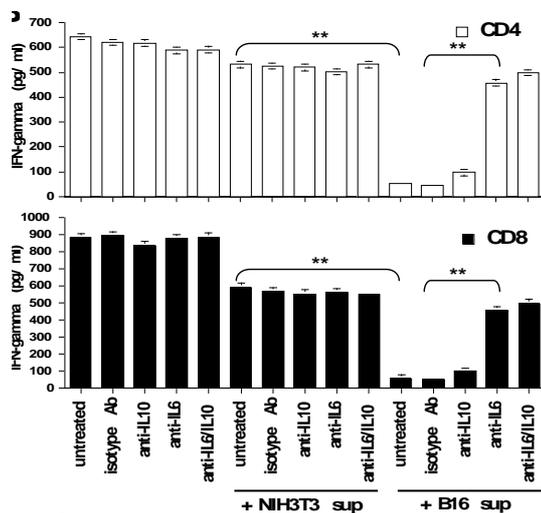


図 1 T 細胞の IFN-gamma 産生量

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<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 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。

## (2) B16 担癌マウスに対する抗腫瘍効果の検討

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。一方、過去我々は naïve 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<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 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 2)

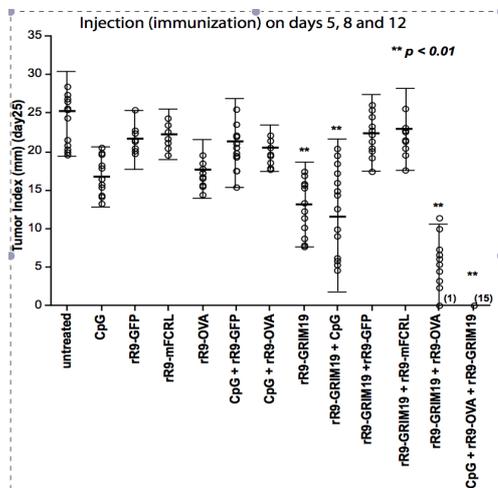


図 2 B16 担癌マウス治療後の腫瘍計の比較

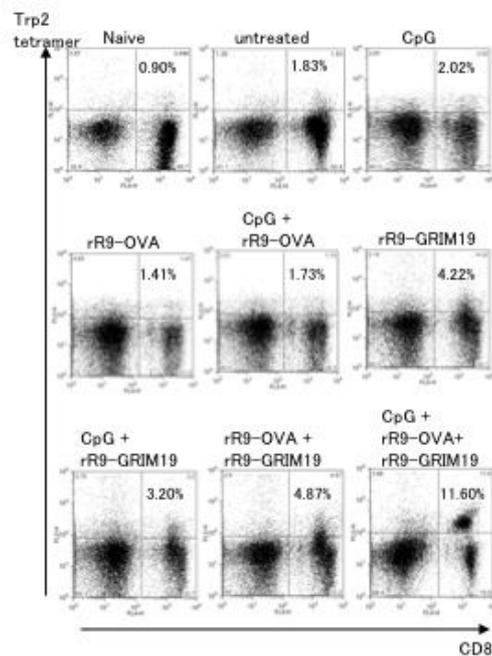


図 3 各種治療における B16 特異的のテトラマー陽性細胞の検討

この際、所属リンパ節の CD8<sup>+</sup>T 細胞は、PMA + ionomycin 刺激で IFN-gamma を産生する事、B16 腫瘍塊内に CD8<sup>+</sup> T 細胞が浸潤している事、また COG therapy は、予め CD8<sup>+</sup>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。(図 3)

これらの結果は、CpG+rR9-OVA 接種が IFN-gamma 産生型 CD8<sup>+</sup>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。

## < 考察 >

今回の結果は、腫瘍局所にて STAT3 シグナルを阻害することが、抗腫瘍免疫に重要であることを示している。特に、癌免疫療法単独での抗腫瘍効果が低かった場合に、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) が適当ではないかと思われる。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

Fumie Hanawa et al. Complete B16 melanoma regression with Trp-2-specific CTL expansion is elicited by intratumoral injections of a novel STAT3 inhibitor (rR9-GRIM19) plus Tc1/Th1 inducers without melanoma specific immunotherapy (The 42<sup>nd</sup> Annual Meetings of the European Society for Dermatological Research, Italy, 2012.9.19-9.22)

Fumie Hanawa et al. 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, 2012.12.9-12.11 沖縄)

Fumie Hanawa et al. IL-6 and IL-10 secreted from B16 melanoma cells initiate the differentiation of CD4+/CD8+ T cells in cancer microenvironment (International Investigative Dermatology, 2013.5.8-5.11 Edinburgh)

Fumie Hanawa et al. IL-6 produced from B16 melanoma cells activates STAT3 in all CD4+ and CD8+ T cells with suppressing the IFN-g producing potential (第 17 回日本がん免疫学会総会, 2013.7.3-7.5 宇部)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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