

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830111

研究課題名(和文) poly-G ODNを用いた新規抗腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-cancer immune therapy using the synthetic oligonucleotide containing poly-G motif

研究代表者

小林 信明 (Kobayashi, Nobuaki)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・講師

研究者番号：60468155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らのグループはpoly-G ODNが腫瘍マウスモデルにおいて抗腫瘍免疫効果を有することを以前に報告した。本研究では、肺癌患者の末梢血または悪性胸水から単離されたヒト単核細胞を用いて、ヒトにおけるpoly-G ODNの免疫賦活作用を検証した。poly-G ODNはヒト検体においてもT細胞増殖およびIFN- $\gamma$ の産生を増強したが、その作用機序は単球におけるSTAT1のリン酸化を促進することでM1マクロファージへの分化を誘導するものであった。同定されたpoly-G ODNによる全く新しい機序を介した肺癌の新規抗癌免疫療法を確立するため、さらなる研究が進行中である。

研究成果の概要(英文)：Synthetic oligonucleotides (ODN) containing specific sequences have an immunomodulatory effect. We previously reported that a novel poly-G ODN has an anti-tumor immune effect in a tumor-bearing murine model. Here, we identified poly-G ODN-induced T cell proliferation and production of interferon-gamma through the enhancement of monocyte maturation in human mononuclear cells isolated from the peripheral blood or from the malignant pleural effusion of lung cancer patients. Poly-G ODN also induces the maturation of human monocytes into M1 macrophages through the phosphorylation of STAT1. This mechanism of poly-G ODN in humans is unique from that reported previously in mice for some ODNs containing three guanosines at the 3' tail. Further studies are ongoing to establish a novel anti-cancer immunotherapy for lung cancer with poly-G ODN.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：poly G ODN 合成オリゴヌクレオチド 抗癌免疫療法 M1マクロファージ 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

特定の配列を含む合成オリグヌクレオチド(ODN)は免疫修飾作用を持つ。TLR9のアゴニストである CpG モチーフを含む CpG ODN は B 細胞や樹状細胞に存在する TLR9 に結合することで免疫賦活作用を示す。CpG ODN には配列の特徴により、Type K ODN (B class CpG) T や Type D ODN(A class CpG)、inhibitory ODN などが存在する。Type K ODN (B class CpG)は、その強力な B 細胞刺激作用から早くから臨床応用に向けた研究がされており、肺癌免疫療法としても Phase III 試験まで施行されたが、OS と PFS を共に上乗せ効果を示せず終了した。我々のグループは種々の CpG ODN による腫瘍免疫作用を検討する中で、マウスの大腸癌細胞株を用いた腫瘍モデルにおいて、Type D ODN が腫瘍抗原特異的な免疫活性を惹起することで、腫瘍増殖を抑制する合成 ODN を同定した。この免疫賦活作用は、3'末端の複数の Guanosine 配列すなわち poly-G 配列によるものであり、T 細胞に直接作用し IL-2 産生を促すことを発見した。Poly-G ODN による抗腫瘍作用としては腫瘍細胞間の細胞接着の阻害による機序もマウスモデルで指摘されているが、免疫賦活作用を介したヒト肺癌における抗腫瘍免疫効果は不明であり、新たな免疫療法につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

特定の配列の合成 ODN は免疫賦活効果があることが示されているが、肺癌をはじめとした悪性腫瘍に対する臨床応用では、マウスとヒトの種による違いや、同種の個体内においても癌微小環境における免疫環境が全身と異なることなどより、実際の臨床検体を用いた免疫賦活効果の評価が必須である。本研究では、各種合成 ODN、特に 15mer の Guanosine 配列を有する poly-G ODN の試験管内での免疫賦活効果について、臨床検体を用いて評価すること、将来的な poly-G ODN を用いた癌免疫療法の開発を目指して、その作用機序などの基礎データを収集することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は多施設共同の前向き観察研究とした。臨床検体としては、肺癌症例および健常者より血液を採取、また採取可能な症例では胸水を採取して免疫細胞を分離した。

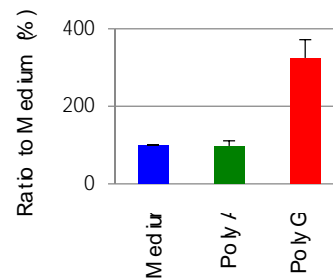
Poly-G ODN を含む合成 ODN の試験管内での免疫賦活作用(proliferation assay、サイトカイン産生)などを flow cytometry を用いて評価した。また、poly-G ODN の免疫賦活作用の機序を同定するために、western blotting による細胞内シグナルの解析、各免疫細胞における細胞表面マーカーを flow cytometry により解析した。

## 4. 研究成果

### poly-G ODN は PBMC および胸水中の免疫細胞における T 細胞増殖および intracellular IFN- $\gamma$ 産生を増強した。

健常者または肺癌患者の末梢血から PBMC を単離した。進行肺癌患者の胸水からも単核細胞を抽出した。これらの細胞を ODN と共培養し、細胞増殖アッセイを行った。健常者(図1)、肺癌 PBMC、肺癌胸水いずれにおいても、poly-G ODN による有意に免疫細胞増殖を誘導した。

図1



poly-G ODN による刺激の後、BD Fastimmune 細胞内サイトカイン検出キット (Becton、Dickinson and Company、BD Biosciences、CA、USA) によって細胞内 IFN- $\gamma$  産生を評価した。細胞内 IFN- $\gamma$  も肺癌症例の PBMC、胸水検体ともに poly-G ODN 刺激により有意に増強された。

### poly-G ODN のヒトにおける免疫賦活効果は、マウスと異なる

poly-G ODN がマウスと同様にヒトにおける IL-2 の産生を増強するかどうかを調べるために、肺癌患者由来の PBMC を CD3 抗体または ODN で培養し、ヒト IL-2 を ELISA または ELISpot によって検出したが、いずれにおいても IL-2 の産生を増強しなかった。

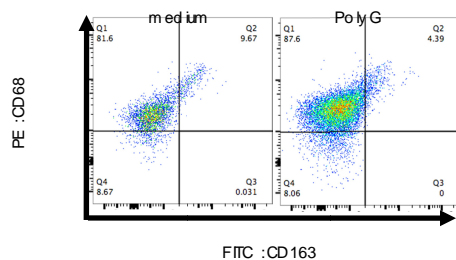
続いて、ヒトにおける poly-G ODN の作用点を明らかにするために、PBMC より CD3 +細胞のみを抽出して、細胞内 IFN- $\gamma$  を測定したが産生の増強は認められなかった。よって、poly-G ODN のヒトにおける作用はマウスにおける機序と異なる

る可能性が示唆された。

### poly-G ODN ODN は、STAT1 のリン酸化を増強することで単球の分化を促進する

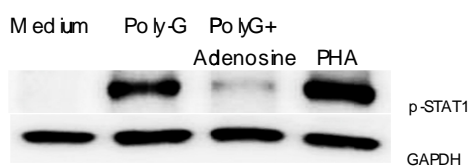
poly-G ODN が単球の分化に及ぼす影響を調べるために、癌患者由来の PBMC を poly-G ODN ODN またはコントロールの poly-A ODN 等と共培養を行った。培養後、CD14、CD68、CD86、および CD163 の細胞表面抗原をそれぞれの抗体を用いて FACS により検出、M1 / M2 マクロファージへの分化を解析した。poly-G ODN により有意に M1 マクロファージが増加した(図2)。

図2



JAK / STAT 経路における STAT1 のリン酸化は、単球の成熟および分化に中心的な役割を果たす。STAT1 のリン酸化に及ぼす poly-G ODN ODN の効果を、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットングの両方によって調べた。poly-G ODN により STAT1 のリン酸化が、コントロール ODN に比して有意に増強することを確認した(図3)。

図3



以上のデータより、ヒトにおいて poly-G ODN は単球における stat1 のリン酸化促進を誘導し、M1 マクロファージへの分化を促進すること、ヒト肺癌臨床検体においても免疫賦活効果を有することが示された。今後は、腫瘍抗原特異性の高い抗癌免疫療法としていく事を目標として、更なる研究を継続していく。

### 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 0 件)

論文投稿準備中

[学会発表](計 2 件)

Poly G oligonucleotide enhances anti-tumor immune response among the patients with primary lung cancer  
Nobuaki Kobayashi, Yuji Shibata, Masaki Yamamoto, Takashi Sato, Masaharu Shinkai, Harumi Koizumi, Kenichi Takahashi, Makoto Kudo, Hidekazu Shirota, Takeshi Kaneko  
American Association for Cancer Research annual meeting 2017, Washington D.C.

poly G ODN のヒトにおける抗腫瘍免疫反応の検討

柴田祐司、小林信明、小泉晴美、高橋健一、新海正晴、金子猛  
第 57 回日本肺癌学会、福岡

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 信明 (KOBAYASHI, Nobuaki)  
横浜市立大学附属市民総合医療センター・呼吸器病センター・講師  
研究者番号：60468155

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

柴田 裕司 (SHIBATA, Yuji)  
横浜市立大学大学院医学研究科・呼吸器病学  
教室・非常勤診療医

新海 正晴 (SHINKAI, Masaharu)  
横浜市立大学大学院医学研究科・呼吸器病学  
教室・准教授

工藤 誠 (KUDO, Makoto)  
横浜市立大学附属市民総合医療センター・呼  
吸器病センター・准教授

金子 猛 (KANEKO, Takeshi)  
横浜市立大学大学院医学研究科・呼吸器病学  
教室・教授

城田 英和 (SHIROTA, Hidekazu)  
東北大学大学院医学研究科・腫瘍内科学教  
室・講師