

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860941

研究課題名(和文) STAT3阻害剤(ヒト型rR9-GRIM19タンパク)を用いた抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) Analysis of antitumor effect against human melanoma by using STAT3 inhibitor (human-rR9-GRIM19)

研究代表者

岡本 崇 (OKAMOTO, Takashi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30402043

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)：担癌宿主において癌局所でのSTAT3の活性化が癌の進展に深く関与していることが多数報告されている。過去、我々はSTAT3阻害効果のあるGRIM-19タンパクとR9-PTD(タンパク細胞内導入ツール)の融合タンパクrR9-GRIM19を作成し、マウスの腫瘍株を用い、in vitro、in vivoにおいて強力な抗腫瘍効果を得ることに成功した。本研究では、ヒト型rR9-GRIM19タンパクを作成し、様々なヒト癌細胞株に対するヒト型rR9-GRIM19タンパクの抗腫瘍効果を検討した。

研究成果の概要(英文)：Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is common in many human and murine cancer cells, and its activation leads to cellular transformation. STAT3 pathway inhibitors have been reported to suppress cancer growth. Previously, We generated an R9-PTD-containing GRIM-19 fusion protein (rR9-GRIM19) and successfully induced overexpression in the cytoplasm of cancer cells. In murine model, rR9-GRIM19 suppressed cell growth in vitro and in vivo. In this research we generated human-rR9-GRIM19 protein and analyze the antitumor effect of this protein against human melanoma cell line.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：腫瘍免疫 STAT3 GRIM-19

1. 研究開始当初の背景

【STAT3 と癌】

現在、癌の治療法としては、主に外科的治療、化学療法、放射線治療、免疫療法が行なわれている。近年、基礎研究の発展により癌化の機序が解明されてくるにつれ、分子レベルで癌を抑制する薬剤による治療（分子標的療法）が臨床応用されるようになった。癌化は様々なシグナル伝達系の持続活性化、癌抑制遺伝子の異常の結果として誘導されるが、その中でも STAT3 の持続的活性化（リン酸化）は広く知られており、様々な癌組織、癌細胞株において STAT3 の恒常的リン酸化の報告がなされている（図1）。

STAT3 はリン酸化すると二量体を形成し核内の転写因子に結合することで下流遺伝子の転写が誘導される。この下流には細胞増殖作用、抗アポトーシス作用、血管増生作用のシグナルがあり癌化に深く関わっている。また、最近の報告では癌細胞の STAT3 持続活性は、癌微小環境における免疫抑制誘導にも関係していることが明らかとなってきた。リン酸化 STAT3 の発現は癌細胞のみでなく癌局所の immature DC や iTreg にも発現し、CTL の活性阻害を誘導することで腫瘍免疫の抑制を引き起こすことが知られている（図2）。このため STAT3 を分子標的としこのため STAT3 を分子標的とし、これを阻害する薬剤、STAT3-dominant negative 分子、siRNA による癌治療の試みが近年多数報告されるようになってきている。しかしながら、STAT3 は癌細胞のみならず、EGF, IL-6 受容体からの刺激により一時的な活性化を受け、正常細胞の増殖、免疫、炎症反応にも関係しているため、STAT3 阻害薬を全身投与する場合、重篤な副作用や、過剰濃度の使用による正常細胞への毒性が懸念されている。

Tumor Type	Activated STAT
Breast Cancer	Stat1, Stat3, Stat5, Stat6
Multiple myeloma	Stat1, Stat3
Head and neck cancer	Stat1, Stat3
Acute lymphocytic leukemia (ALL)	Stat1, Stat5
Chronic lymphocytic leukemia (CLL)	Stat1, Stat3, Stat5
Acute myelogenous leukemia (AML)	Stat1, Stat3, Stat5
Chronic myelogenous leukemia (CML)	Stat1, Stat3, Stat5
Lymphoma	Stat3
Lung cancer	Stat1, Stat3
Renal cell carcinoma	Stat3
Prostate carcinoma	Stat3
Melanoma	Stat3
Pancreatic adenocarcinoma	Stat3
Ovarian carcinoma	Stat3

図1

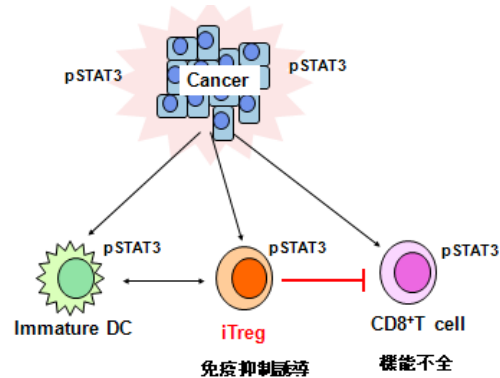


図2

【新規分子 GRIM-19 (STAT3 阻害剤) と rR9-GRIM19 の作製】

最近、STAT3 阻害効果をもつ分子として GRIM-19 という新規分子が同定、報告された。また、GRIM-19 分子はミトコンドリアの構成タンパクであることも報告されているため GRIM-19 タンパクの正常細胞への毒性は低いと考えられる。我々はマウスの系で、この GRIM-19 分子に着目し、R9-PTD (protein-transduction domain) との融合タンパク rR9-GRIM19 を作成した。R9-PTD は in vitro (図3), in vivo において目的とするタンパクを、癌細胞を始めとする様々な細胞内に導入できる優れた方法であるため、我々はこれを抗原導入の手段として用い、その有効性を報告してきた。また、

癌組織内に R9-PTD 含有タンパクを接種すると、接種部位である癌細胞内に目的タンパクを導入できうることを証明した。

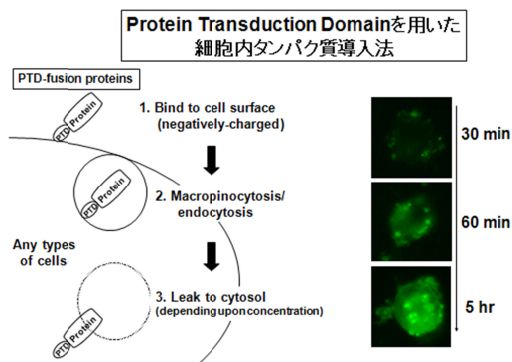


図3 rR9-GFPの細胞内導入

【rR9-GRIM19による抗腫瘍効果(マウス)】

最近我々は、rR9-GRIM19タンパクを用いて様々なマウスの腫瘍細胞株を用い *in vitro*, *in vivo* において抗腫瘍効果を検討したところ、STAT3 活性が認められる腫瘍株に対して、rR9-GRIM19は腫瘍細胞内、もしくは腫瘍組織微小環境においてSTAT3の転写を阻害し、強力な抗腫瘍効果をもたらすことを発見した(図4)。逆にSTAT3の活性が認められない腫瘍株では抗腫瘍効果は認められなかった。

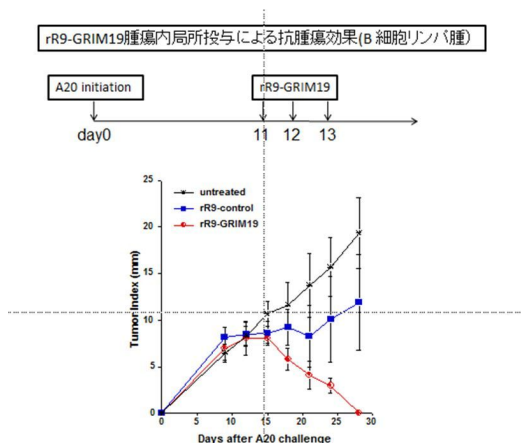


図4 rR9-GRIM19による抗腫瘍効果(腫瘍内投与)

2. 研究の目的

担癌宿主において癌局所でのSTAT3の活性化が癌の進展に深く関与していることが多数報告されている。また癌局所での活性化STAT3(pSTAT3)は、腫瘍微小環境の免疫細胞に作用し、免疫抑制を誘導させることが知られている。過去、我々はSTAT3阻害効果のあるGRIM-19タンパクとR9-PTD(タンパク細胞内導入ツール)の融合タンパクrR9-GRIM19を作成し、マウスの腫瘍株を用い、*in vitro*、*in vivo*において強力な抗腫瘍効果を得ることに成功した(文献1)。本研究ではヒト型rR9-GRIM19タンパクを作成し、様々なヒト癌細胞株に対するヒト型rR9-GRIM19タンパクの抗腫瘍効果を検討し、STAT3経路を阻害する新しい分子標的治療を確立することを目標としている。

3. 研究の方法

(1)STAT3阻害効果のあるヒト型GRIM-19タンパクとR9-PTD(蛋白細胞内導入ツール)の融合タンパク**rR9-GRIM19(ヒト型)タンパク**を作製、精製する。

(2)様々なヒト癌細胞株においてSTAT3の活性化(pSTAT3)を検討する。(Western blotting)

(3)様々なヒト癌細胞株においてrR9-GRIM19(ヒト型)によるSTAT3阻害効果について検討する。(Luciferase assay, Quantitative real-time PCR; STAT3下流遺伝子の発現)

(4)様々なヒト癌細胞株を用い、*in vitro*においてrR9-GRIM19(ヒト型)による抗腫瘍効果を検討する。

担癌マウス(ヒト化マウス)の腫瘍塊内にrR9-GRIM19(ヒト型)を接種した場合の*in vivo*での抗腫瘍効果を検討する。(腫瘍環境、リンパ節における免疫細胞の検討)

4 . 研究成果

平成 25 年度にはヒト型 GRIM-19 タンパクと R9-PTD (細胞内蛋白導入ツール) の融合タンパク rR9-GRIM19 (ヒト型) タンパクを作製、精製した。(プラズミドを作製し、プラズミドをトランスフェクションさせた大腸菌を増殖させ蛋白精製を行った)

平成 26 年度にはヒト悪性黒色腫の細胞株を 10 種類ピックアップし、STAT3 の活性化 (pSTAT3) について Western blot 法を用いて検討した。pSTAT3 の高発現している細胞株と発現のない細胞株をさらにピックアップし、rR9-GRIM19 (ヒト型) タンパクの in vitro における抗腫瘍効果 (細胞増殖) について検討したが、両者に大きな違いが認められなかった。また、pSTAT3 が高発現する細胞株に in vitro において rR9-GRIM19 (ヒト型) 投与後の STAT3 下流遺伝子の発現レベルについて qPCR を用いて検討したが、想定できる遺伝子の発現レベルの低下は認められなかった。ヒトの細胞株、ヒトのタンパクを用いてさまざまな実験を行ったが、rR9-GRIM19 (ヒト型) の抗腫瘍効果を言う点では、期待できる結果を得る事はできなかった。

5 . 主な発表論文等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 崇 (OKAMOTO, Takashi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号:30402043