

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19071

研究課題名(和文) COX-2選択的阻害剤とType I IFNシグナルとの併用による癌免疫療法

研究課題名(英文) Cancer immunotherapy by combining the selective COX-2 inhibitor and type I IFN signaling

研究代表者

小坂 朱 (KOSAKA, Akemi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40561030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、COX-2選択的阻害薬のcelecoxibによる免疫抑制細胞の不活化と2'3'-cGAMPを用いたtype I IFN誘導の効果を組み合わせることにより、効果的で簡便な抗腫瘍効果を誘導する治療法の開発とその機序解明を目的とした。複数の担がんマウスモデルを用いて併用治療による効果的な抗腫瘍効果をもたらす治療方法の検討を行い、無治療群および各単独治療群と比べて併用治療群でより高い腫瘍増殖抑制能を誘導する治療条件を見出した。この併用治療による抗腫瘍効果はCD8陽性T細胞やマクロファージには依存的ではないこと、またtype I IFN経路以外のシグナル経路が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim for this study is to development of an efficient and convenient cancer immunotherapy and to elucidate the mechanism when combining the selective COX-2 inhibitor celecoxib and the type I IFN inducer 2'3'-cGAMP. We used different mouse tumor models to determine the treatment regimen of celecoxib and 2'3'-cGAMP. The combination therapy showed a significant antitumor effect on tumor growth in mice compared to control and monotherapy with celecoxib or 2'3'-cGAMP. The antitumor effect of the combination therapy was not dependent on CD8+ T-cells and macrophages, and it was suggested that the type I IFN signaling pathway may not be involved in the antitumor responses of the combination therapy.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：COX-2阻害薬 STINGアゴニスト

1. 研究開始当初の背景

近年、小胞体に局在する STING (stimulator of interferon genes) が細胞質の DNA センサータンパク質としての機能を持ち、type I IFN シグナルを介したウイルスおよび細菌感染に対する自然免疫応答の誘導に重要であることが明らかになった。また type I IFN は抗腫瘍免疫にも関与しており、type I IFN シグナルの欠損によりメラノーマ (悪性黒色腫) や悪性軟部腫瘍など多様な種類のがんで、腫瘍の形成が促進されることが報告されている。申請者らは以前、STING による type I IFN シグナルと抗腫瘍効果の関係に着目し、マウス脳腫瘍モデルを用いてがん微小環境に存在するゲノム DNA が STING を介して type I IFN 産生を誘導すること、および STING アゴニストの投与により抗腫瘍免疫が誘導されることを見出した。

一方、がん微小環境では免疫抑制細胞が誘導されて抗腫瘍免疫応答の回避となる一因になっており、免疫抑制細胞である TAM (tumor-associated macrophages: 腫瘍関連マクロファージ) や MDSC (myeloid-derived suppressor cells: 骨髄由来抑制細胞) の存在率と、がんの進行度や予後に相関関係があることが報告されている。申請者らはマウス乳がん細胞株移植による脳転移モデルを用いて、COX-2 選択的阻害薬である celecoxib の投与によって脳への MDSC の集積を抑制すること、それにともない脳転移も抑制することを報告した。さらに、申請者らは celecoxib と抗原提示細胞を活性化させる抗 CD40 抗体を併用することにより、マウス脳腫瘍モデルにおいて T 細胞を介した抗腫瘍免疫を誘導することを見出した。この研究結果より、がん微小環境における免疫抑制細胞の制御と同時に、免疫反応を活性化させる各々 2 つのシグナルが効果的な抗腫瘍免疫の誘導に重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

前述の背景より、本研究では COX-2 選択的阻害薬である celecoxib による免疫抑制細胞の不活化とともに、STING アゴニストである 2' 3' -cGAMP を用いた type I IFN 誘導の効果を組み合わせることによって、より効果的で簡便な抗腫瘍効果をもたらす治療方法の開発とその機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法による効果的な抗腫瘍効果をもたらす治療方法の開発: はじめに、高転移性の乳がん細胞株である 4T1 細胞を移植した担がんマウスモデルを作製し、celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法に最適な投与量およびスケジュールについて検討を行う。マウスを 4 群 (コントロール群、celecoxib 単独治療群、2' 3' -cGAMP 単独治療群、celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用治療群) に分け、移植し

た腫瘍が細胞塊を形成した後、celecoxib の経口 (混餌) 投与および 2' 3' -cGAMP の腫瘍内投与を行う。その後、経時的に移植した腫瘍径を測定し、その大きさを指標として抗腫瘍効果の検討を行う。なお、初回の投与量およびスケジュールは、申請者らがこれまでに行った研究結果 (Cancer Immunol Res 2014, Cancer Immunol Immunother 2014) を参考にする。初回の各治療群における抗腫瘍効果の結果をもとにして、celecoxib または 2' 3' -cGAMP の投与量や投与回数を変更することにより、治療条件の最適化を行う。さらに、マウス 4T1 細胞移植モデルにおいて治療方法を決定したのちに、同治療条件を用いて大腸がん細胞株 CT26 細胞や他のがん細胞株を移植した担がんマウスモデルにおける併用治療の抗腫瘍効果を確認し、汎用性があることの確認を行う。

(2) celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法による TAM (腫瘍関連マクロファージ) や MDSC (骨髄由来抑制細胞) の解析: 4T1 細胞を移植した担がんマウスに (1) で決定した治療スケジュールに沿って各治療を行った後、腫瘍浸潤リンパ球を回収して細胞染色を行い、フローサイトメトリーを用いて TAM や MDSC、T 細胞などの割合や表現型を無治療群・各単独治療群および併用治療群で比較検討する。

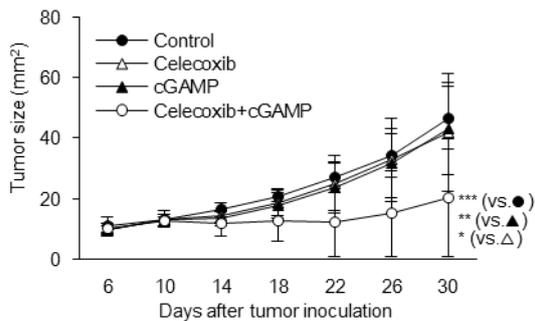
(3) celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法により誘導される抗腫瘍効果に関与する免疫細胞群の同定とその機序解明: これまでの研究結果より、併用療法による抗腫瘍効果の担当細胞群としてマクロファージまたは CD8 陽性 T 細胞の関与が予想される。そこで、4T1 細胞を移植した担がんマウスを用いてリポソーム封入クロドロネート投与によるマクロファージの枯渇、または、抗 CD8 抗体投与による CD8 陽性 T 細胞の枯渇を行った後に併用治療を行い、腫瘍径を指標とした抗腫瘍効果を検討する。併用治療による担当細胞群が同定された後に、抗腫瘍効果の機序解明を行う。

4. 研究成果

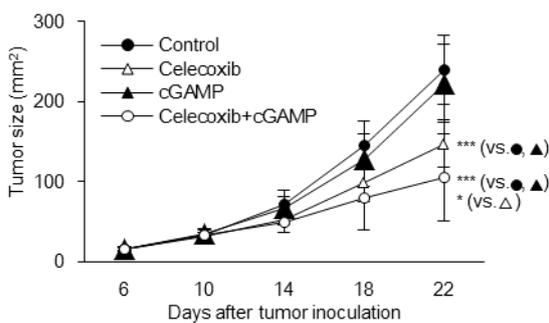
(1) 担がんマウスモデルを用いた celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法に最適な投与量およびスケジュールの決定: がん微小環境では免疫抑制細胞が抗腫瘍免疫応答を抑制しているため、celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法のスケジュールを決定するにあたり、免疫抑制細胞の不活化に関与する celecoxib を先に投与した後に、抗腫瘍免疫を活性化させる 2' 3' -cGAMP を投与するのが効果的であると考えた。はじめに、4T1 細胞を移植した担がんマウスモデルを用いて celecoxib と 2' 3' -cGAMP の投与量の検討を重ね、各々について最適な条件を見出した。4T1 細胞を移植してから 6 日後より celecoxib の経口 (混餌) 投与を開始し、その 4 日後に

2' 3' -cGAMP の腫瘍内投与を行ったところ、無治療であるコントロール群と比べて各単独治療群では抗腫瘍効果が見られず、併用治療群のみに有意な腫瘍増殖の抑制効果が確認された(図1)。次に、確立した治療条件を用いてマウス大腸がん細胞株 CT26 細胞を移植した担がんマウスモデルにおいて同様に検討したところ、コントロール群と比べて2' 3' -cGAMP 単独治療群では抗腫瘍効果が見られなかったのに対し、celecoxib 単独治療群では腫瘍増殖の抑制効果が確認された。しかし、2' 3' -cGAMP を併用することによって、より高い抗腫瘍効果が見られた(図2)。4T1 乳がん細胞株およびCT26 大腸がん細胞株は、BALB/c マウス由来の細胞株である。そこで、他のマウス系統であるC57BL/6 マウス由来のE0771 乳がん細胞株を用いた担がんマウスモデルにおいて同様に検討を行った。その結果、コントロール群と比べて celecoxib 単独治療群および2' 3' -cGAMP 単独治療群においても抗腫瘍効果が誘導されることが示されたが、2つの併用治療によってより効果的に腫瘍増殖を抑制することが明らかとなった(図3)。以上の結果より、マウスがん細胞株間で各単独治療による抗腫瘍効果に違いは見られるが、いずれのがん細胞株においても celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法によってより高い抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。また、異なるマウスの系統でも同様の効果が誘導されたことより、celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法は汎用性の高い治療方法であることが示唆された。

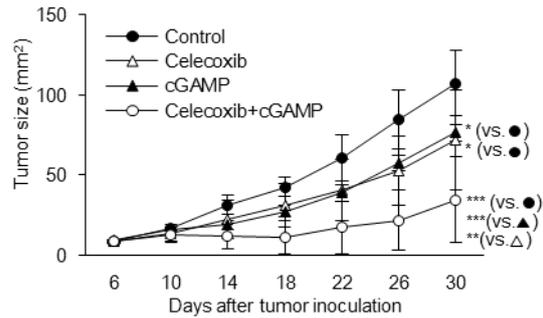
(図1)



(図2)



(図3)



(2) TAM (腫瘍関連マクロファージ) や MDSC (骨髄由来抑制細胞) における変化とその機能解析: 4T1 細胞を移植した担がんマウスモデルを作製して無治療・各単独治療または併用治療を行った後に腫瘍組織を回収して腫瘍浸潤リンパ球を分離し、CD11b 陽性細胞における Ly-6C や Ly-6G, F4/80, Gr-1 の発現により TAM や MDSC の存在率を測定した。その結果を各治療群間で比較したところ、併用治療群において治療効果と相関する有意な変化は確認されなかった。また、共刺激分子や PD-L1 などの発現量にも各治療群間で違いは見られなかった。さらに、腫瘍浸潤リンパ球中における T 細胞の割合も各治療群間で違いは見られなかった。表現型は同じでも質的な変化が起こっている可能性があるため、今後は各治療群の腫瘍浸潤リンパ球からそれぞれ TAM や MDSC をセルソーターを用いて単離し、機能に関する遺伝子発現の比較検討などを行う予定である。

(3) celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法で誘導される抗腫瘍効果に關する免疫細胞群の同定: 4T1 細胞を移植した担がんマウスを作製し、リボソーム封入クロドロネートを腹腔内投与して生体内からマクロファージを枯渇させた後に celecoxib と2' 3' -cGAMP による併用療法を行ったところ、無治療のコントロール群と比べて有意な抗腫瘍効果が確認された。この結果より、併用療法による抗腫瘍効果の担当細胞群としてマクロファージは関与していないことが示唆された。同様に、抗 CD8 抗体投与による CD8 陽性 T 細胞の枯渇を行った後に celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法を行ったが、コントロール群と比べて有意な腫瘍増殖の抑制効果が確認された。さらに、抗 ASGM1 抗体投与による NK (ナチュラルキラー) 細胞の枯渇を行った後に併用療法を行なったところ、同様に celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法による抗腫瘍効果への影響は見られなかった。以上の結果より、celecoxib と2' 3' -cGAMP の併用療法により誘導される抗腫瘍効果は、マクロファージや CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞に依存していることが示唆された。抗腫瘍免疫応答を担っている主な免疫細胞

群の関与が併用療法においては見られなかったため、次に 2' 3' -cGAMP により誘導される type I IFN の受容体を阻害して celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用治療を行った。その結果、無治療のコントロール群と比べて有意な腫瘍増殖の抑制効果が確認されたことより、STING を介した type I IFN 経路以外のシグナル経路が celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法による抗腫瘍効果に関与している可能性が示唆された。今後、より詳細な機序解明のために、高度免疫不全マウスを用いた免疫細胞の関与の有無についての検討や、celecoxib と 2' 3' -cGAMP の併用療法による抗腫瘍効果誘導に関与するシグナル経路の解明を行う予定である。

(4) 研究協力者
なし

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 1 件)

- ① Ohkuri T, Kosaka A, Ishibashi K, Kumai T, Hirata Y, Ohara K, Nagato T, Oikawa K, Aoki N, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(6):705-716. 査読あり
doi: 10.1007/s00262-017-1975-1.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

旭川医科大学・病理学講座 (免疫病理分野)
ホームページ
http://www.asahikawa-med.ac.jp/index.php?f=facilities_guide+kiso_meneki

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小坂 朱 (KOSAKA, Akemi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40561030

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし