

令和元年6月28日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15735

研究課題名(和文) The development of the efficacious anti-tumor DC therapies using TGF-beta antagonists

研究課題名(英文) The development of the efficacious anti-tumor DC therapies using TGF-beta antagonists

研究代表者

尹 晶煥 (Yoon, Jeong-Hwan)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：30748885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$ による樹状細胞分化制御機序：正常細胞では恒常的に発現しているTGF- $\beta$  I型受容体(ALK5)によりリン酸化される受容体Smadの内、Smad3の発現抑制が古典的樹状細胞(cDC)分化に必須である一方、Smad3の発現維持が形質細胞様樹状細胞(pDC)分化を誘導することとその分子機序を明らかにした。TGF- $\beta$ 阻害薬の全身投与量依存性抗腫瘍効果とTGF- $\beta$ 阻害薬を用いた樹状細胞ワクチン開発：ALK5阻害薬は高用量投与時には寧ろ腫瘍の進行と転移を促進することをマウスB16黒色腫モデルで明らかにした。試験管内でTGF- $\beta$ 阻害薬処理した樹状細胞はマウスB16黒色腫モデルで有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する免疫が弱められないようにする免疫チェックポイント阻害薬が有効ながん免疫療法として保険診療で処方できるようになりましたが、副作用や効果が無い場合があります。一方で、がんに対する免疫を強める樹状細胞を用いたがんワクチン療法も開発段階にありますが、治療効果は未確定です。TGF- $\beta$ というサイトカインはがんに対する免疫が弱めるので、抑えるとがんに対する免疫を強め、免疫チェックポイント阻害薬の効果を高めることが報告されていますが、全身投与では副作用の可能性もあります。本研究成果は従来の樹状細胞ワクチンより簡単な方法で治療効果が高く副作用が少ないがん免疫療法の開発につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms how TGF- $\beta$  regulates differentiation and maturation of dendritic cell (DC) subsets: Signaling molecules of TGF- $\beta$ , Smads are usually ubiquitously expressed in normal cells. However, I have found that selective repression of one of the R-Smads: Smad3 directs conventional DC (cDC), whereas its maintenance directs plasmacytoid DC (pDC) differentiation. I have also clarified the mechanisms how Smad3 is repressed or maintained for cDC and pDC differentiation.

The mechanisms how systemic TGF- $\beta$  antagonists exert dose-dependent divergent effects on tumor immunity: I have found that the treatment with high-dose activin receptor-like kinase (ALK)5 inhibitor exacerbated the murine B16 melanoma model by accelerating the Smad-mediated TGF- $\beta$  signaling via blocking the negative feedback loop.

DC-based anti-tumor immunotherapies using TGF- $\beta$  antagonists: I have found that the transfer of ALK5 inhibitor-treated DCs is efficacious against the murine B16 melanoma model.

研究分野：immunology

キーワード：dendritic cell TGF- $\beta$  Smad

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん微小環境においては、多様な機序によってがんに対して免疫監視を行っている各種免疫細胞の働きが抑制され抗腫瘍免疫逃避が誘導されている。近年開発された免疫チェックポイント阻害薬は抗腫瘍免疫療法の効果を飛躍的に高めたが、副作用や無効例の問題が未解決である。

がん微小環境において産生活性化されるTransforming growth factor (TGF)- $\beta$  は、強力な免疫抑制作用を有し抗腫瘍免疫逃避を誘導する為、TGF- $\beta$  の中和抗体や拮抗薬が開発されてきた。我々も先行研究において、可溶性TGF- $\beta$  II型受容体:Fc融合タンパク(Mamura M and Wakefield LM et al, Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. J Clin Invest 109: 1607-1615, 2002)やTGF- $\beta$  I型受容体(ALK5)阻害薬の全身投与(Yoon JH et al, Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. EMBO Mol Med. 11:1720-1739, 2013)が、細胞障害性CD8<sup>+</sup>T細胞を活性化することにより抗腫瘍効果を発揮することを報告したが、TGF- $\beta$  拮抗阻害薬の臨床応用については未だ治験の段階を越えることができていない。

一方、がんに対する獲得免疫を誘導する樹状細胞ワクチン療法も長年開発段階にあるが、未だ臨床的に有為な有効性を認めるに至っていない。

### 2. 研究の目的

(1) TGF- $\beta$  による樹状細胞分化制御機構解明

(2) がん微小環境における TGF- $\beta$  による樹状細胞活性化制御分子機構を解明し、TGF- $\beta$  阻害薬全身投与と生体外で TGF- $\beta$  阻害薬処理した樹状細胞の抗腫瘍効果を比較検討することにより、副作用が少なく抗腫瘍効果の高い樹状細胞免疫療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) FTL3L または GM-CSF+IL-4 で分化誘導した骨髄由来樹状細胞(BMDC)を用いて、TGF- $\beta$  と TGF- $\beta$  I型受容体(ALK5)拮抗薬(EW7197, LY2157299)が樹状細胞の分化活性化に及ぼす作用をフローサイトメトリー、免疫細胞染色、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって検討する。ALK5によってC末端がリン酸化され TGF- $\beta$  細胞内信号を伝達する TGF- $\beta$  受容体 Smad:Smad2 と Smad3 を介した樹状細胞分化制御機序を Smad 遺伝子欠損マウスや Smad のリン酸化部位や結合部位変異体を用いて解明する。

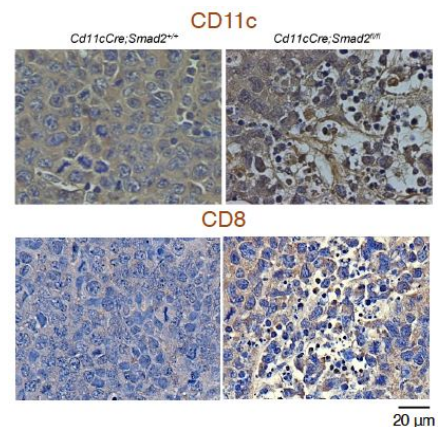
(2) Smad 欠損マウスを用いてマウス B16F1 黒色腫と EL4 リンパ腫モデル実験を行う。GFP で標識した B16F1 または EL4 細胞株を皮膚に接種し腫瘍の増大を計測し、所属リンパ節と腫瘍浸潤免疫細胞の解析をフローサイトメトリー、免疫組織細胞染色、RT-PCR によって行う。上記腫瘍モデルを用いて ALK5 拮抗薬全身投与と ALK5 拮抗薬処理樹状細胞療法の抗腫瘍効果を比較し、抗腫瘍効果メカニズムの相違を検討する。

### 4. 研究成果

(1) Smad2とSmad3は正常細胞において恒常的に発現しているが、Smad3の発現が古典的樹状細胞(cDC)において特異的に抑制されている一方、形質細胞様樹状細胞(pDC)がSmad3欠損マウスにおいて欠損していることを発見した。その為、当初研究計画を一部変更し、Smad3の発現によるcDCとpDCの分化制御機序について研究を行ない、Smad3発現抑制がcDC分化に必須である一方、Smad3発現維持がpDC分化に必須であることを明らかにし、現在論文投稿改訂中である。本研究発表は、

The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Societyにおいて Kishimoto Travel Awardを受賞した(下記学会発表参照)。

(2) 腫瘍免疫においては cDC が重要な役割を果たしているが、TGF- $\beta$  は Smad2 を介して活性化を抑制することを明らかにした。樹状細胞特異的 Smad2 欠損マウスにおいて、マウス B16F1 黒色腫と EL4 リンパ腫モデルの進行転移は有意に抑制された。樹状細胞特異的 Smad2 欠損マウスに接種された腫瘍には対照群には観察されない樹状細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤が認められた。腫瘍を移入された樹状細胞特異的 Smad2 欠損マウスにおいて、所属リンパ節から分離した樹状細胞では副刺激分子や IL-12、IL-15 等細胞性免疫を活性化するサイトカインの発現が亢進し、腫瘍浸潤 CD8<sup>+</sup>T 細胞や所属リンパ節 CD8<sup>+</sup>T 細胞の腫瘍特異的細胞障害活性が亢進していた。



TGF- $\beta$  阻害薬を全身投与した場合、投与量によってはむしろマウス B16F1 黒色腫の進行と転移を促進してしまうことを見出した。一方、ALK5 拮抗薬処理樹状細胞はマウス B16F1 黒色腫と EL4 リンパ腫モデルに対して安定した高い抗腫瘍効果を発揮した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Jin Soo Han, Seok Hee Park, Michael Weinstein, Susumu Nakae, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Mizuko Mamura, Repression of SMAD3 by STAT3 and c-Ski Is Essential for Conventional Dendritic Cell Differentiation, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai, Japan, 12/14/2017

Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Katsuko Sudo, Seok Hee Park, Michael Weinstein, Sungmi Park, Jae-Han Jeon, Susumu Nakae, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Masahiko Kuroda, Keiji Miyazawa, Mitsuyasu Kato, Mizuko Mamura, Repression of SMAD3 by STAT3 and c-Ski Is Essential for Conventional Dendritic Cell Differentiation, The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa, Japan, 11/1/2017

Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Katsuko Sudo, Masakatsu Takanashi, Jin Soo Han, Seok Hee Park, Michael Weinstein, Susumu Nakae, Tadashi Yamashita, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Takayuki Sumida, Masahiko Kuroda, Keiji Miyazawa, Mitsuyasu Kato, Mizuko Mamura, Selection of Smad2 for TGF- $\beta$  to suppress dendritic cells by STAT3/c-Ski-induced repression of Smad3, The American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017, Washington DC, USA, 4/4/2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

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

取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当無し

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：真村 瑞子

ローマ字氏名：MAMURA Mizuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。