

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390306

研究課題名（和文）悪性黒色腫に対する新たな治療法開発の基礎研究

研究課題名（英文）Novel therapeutic approach to melanoma-bearing hosts with protein-transduction technology

研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA SHINJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10114505

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫に対して、導入効率がよくかつ副反応の低い（R9-PTD）タンパク質細胞内導入法を用いた新規治療法の基礎研究を行った。この方法は、既存の癌免疫療法と併用することで抗腫瘍効果を高めるため、新たな治療法として臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Protein-transduction domains (PTDs) are short stretches of cationic amino acids that enable peptides, proteins, oligonucleotides, and other reagents to efficiently enter multiple cell types. Therefore, PTDs offer unique therapeutic opportunities for the treatment of many diseases, including malignant melanoma. Intratumoral injections of R9-antigens and R9-containing STAT3 inhibitors can reduce tumor growth in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：悪性黒色腫、腫瘍ワクチン、分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

皮膚は免疫器官でもあるため、ワクチン治療、分子標的治療における格好の臓器でもある。このため、過去皮膚を治療の場とする様々な手技、手段が検討され施行されてきた。現在までのところ、in vivoにおいて皮膚構成細胞内に目的物質を導入させる手段としては、一般的に gene gun や virus を carrier とする cDNA 導入方法が行われている。これら cDNA を用いる方法で目的遺伝子を発現させる方法は、長期間安定して発現する利点を有する反面、厳密な発現量の制御が難しく、宿主遺伝子内への組み込みの危険性を常に有している。またウイルスを用いる

方法は、キャリアー物質に対する生体反応、形質転換、感染などの問題により臨床使用が非常に制限されているのが現状である。従ってヒトに臨床応用する場合には、これらの問題を回避する新たな導入手段が必要となる。我々は、以前より ex vivo にてタンパク質を細胞内に導入させる手段として protein transduction domain (PTD) を用い、その解析を行ってきた。PTD は陽性に帯電した polypeptide で、その配列のほとんどがウイルス (HIV, Herpes など) に由来している。またこれを含有了 fusion protein は、陰性帯電しているほぼ全ての細胞膜に素早く結合し、endocytosis ないし

macropinocytosis として細胞内に取り込まれ、一部が vesicle より漏出することで細胞質内に導入される。この導入効率も極めて高く、曝露数分後より導入が始まり、濃度を 4-6 時間保てばほぼ 100% の細胞内に安全に導入が可能となることも大きな特徴である。この特性を利用し、過去我々は ex vivo にて目的タンパク質を細胞質内に発現させることに成功している。また、PTD 含有融合タンパク質を皮内に直接接種すると、長時間に渡り接種部位に残留する。これらの結果は、PTD 含有 fusion protein を in vivo 接種することで皮膚構成細胞内に目的タンパク (酵素) を直接導入できることを示唆している。タンパク質 (酵素) を直接接種することで皮膚細胞内に導入する方法であれば、理論上 replication, 遺伝子内への組み込みの心配はない。また、皮膚局注による導入は容易であり、発現量は接種濃度、回数により能動的に調節が可能となる。現在、外科的切除以外に有効な治療法のない悪性黒色腫に対し、新規治療法が待たれている。

2. 研究の目的

これらの基礎実験の結果より、我々は (polyarginine; R9) PTD の持つ生物学的特性を利用し、PTD 含有 fusion protein を皮膚に直接接種し抗原、あるいは阻害物質を接種組織・細胞内に導入することにより、悪性黒色腫に対する新規治療に応用してするための基礎研究を行ない、動物実験で効果を検討した。この際、抗原を導入する方法と、免疫抑制に関わる STAT3 を阻害する分子標的薬による抗腫瘍効果の両者について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) in vivo における rR9 融合タンパクの接種部への導入効率の検討

接種部位への rR9 融合タンパクの細胞内導入の有無、またその効率を検討するため、rR9-GFP, rR9-OVA を作製、精製しマウス皮内接種した場合の経時的変化をその蛍光輝度で解析すると共に、特殊抗体 (MHC class I: OVA epitope complex を認識する) を用いて組織切片を染色し、どの組織内に導入されるかを検討した。

(2) rR9 融合タンパクを皮内接種した際に誘導される免疫反応の解析

rR9-GFP (低免疫原性外来抗原), rR9-OVA (高免疫原性) を naïve mice の皮内に接種した場合に認められる免疫反応について、浸潤細胞、接種部位のタンパクレベルでの cytokine profile の解析を行った。

(3) rR9-mFCRL (A20, B16 細胞株に発現する腫瘍関連抗原; 自己抗原), rR9-GRIM19 (全ての細胞のミトコンドリアに発現し、活性型

STAT3 と選択的に結合する自己タンパク) を naïve mice の皮内に接種した際の皮膚の解析 これら自己タンパクを含有する rR9 融合タンパクを皮内接種した皮膚組織像を検討する。

(4) 担癌宿主の腫瘍局所に rR9 融合タンパクを直接接種した場合に認められる抗腫瘍効果の検討

OVA を発現する EG, 7 癌細胞株、B16 悪性黒色腫細胞株、A20 癌細胞株をマウス皮内に接種し腫瘍塊を形成したところで各種 rR9 融合タンパクを腫瘍塊内に接種しその抗腫瘍効果を比較検討する。

(5) 抗腫瘍効果の高かった群における T 細胞の解析

各種 rR9 融合タンパクを B16 メラノーマ腫瘍塊内に接種した際に抗腫瘍効果の最も高かった群の所属リンパ節、脾臓の T 細胞、特に CD4+ T 細胞の subset を解析する。

4. 研究成果

(1) in vivo における rR9 融合タンパクの接種部への導入効率の検討

rR9-GFP を naïve mice の腹部皮内に接種すると rGFP と比較した場合、長時間に渡り接種部位に停滞することが確認された (図 1)。

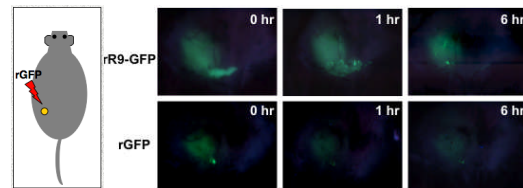


図 1

また、rR9-OVA を naïve mice の腹部皮内に接種し、その皮膚切片を 25.D1.16 抗体で組織染色を行ったところ、rR9-OVA は接種した真皮の膠原繊維、血管内皮に導入された (図 2)。

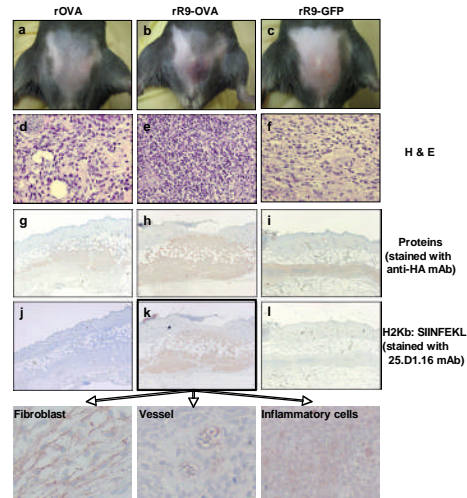


図 2

また、B16 細胞をマウス皮内に接種し腫瘍塊を形成した部位に rR9-OVA を接種した場合にも、接種した腫瘍細胞内に rR9-OVA は導入されることが確認された。

(2) rR9 融合タンパクを皮内接種した際に誘導される免疫反応の解析
rR9-GFP (低免疫原性外来抗原), rR9-OVA (高免疫原性) を naïve mice の皮内に接種した際の浸潤細胞を検討したところ、rR9-GFP 接種部位にはわずかな好中球とリンパ球を認めたのに対し、rR9-OVA 接種部位には超密な好中球、リンパ球、組織球の浸潤を認めた。一方、同部皮膚組織を用いた接種部位のタンパクレベルでの cytokine profile の解析を行ったところ、G-CSF, GM-CSF の発現の他 proinflammatory cytokine (TNF alpha, IL-1) と IFN-gamma の強い発現を認めた (図 3)。

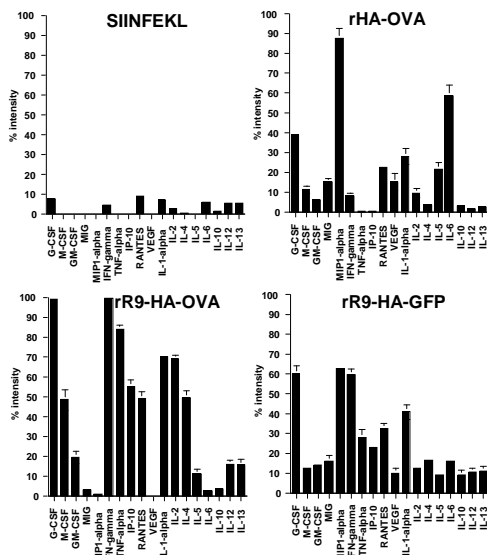


図 3

(3) rR9-mFCRL (A20, B16 細胞株に発現する腫瘍関連抗原; 自己抗原), rR9-GRIM19 (全ての細胞のミトコンドリアに発現し、活性化 STAT3 と選択的に結合する自己タンパク) を naïve mice の皮内に接種した際の皮膚の解析 rR9-mFCRLrR9-GRIM19 を naïve mice の皮内に接種しても浸潤する炎症細胞はわずかであり、接種したマウスは長期にわたり顕著な副反応を示さなかった。このことは、免疫原性のない rR9 融合タンパクを局所投与しても重大な副反応をきたすこと無く臨床応用が可能であることを示唆する。

(4) 担癌宿主の腫瘍局所に rR9 融合タンパクを直接接種した場合に認められる抗腫瘍効果の検討

EG. 7, A20, B16 担癌マウスの腫瘍塊に様々な rR9 融合タンパクを接種した際に認められる

抗腫瘍効果を検討した結果を示す (図 4 ; days 3, 5 に接種後 day 20 の状態を示す)。

Group	B16-free mice	Tumor sizes (mm)
Untreated	0/ 30	29.36 ± 5.72
CpG	0/ 5	18.54 ± 1.82
rOVA	0/ 10	29.26 ± 2.68
rR9-GFP	0/ 15	22.37 ± 6.42
rR9-mFCRL	0/ 10	21.24 ± 4.75
rR9-OVA	7/ 14 (50%)	5.37 ± 8.94
rR9-LACK	4/ 10 (40%)	5.96 ± 9.43
rR9-GRIM19	0/ 5	13.76 ± 3.56

Group	A20-free mice	Tumor sizes (mm)
Untreated	0/ 21	16.84 ± 2.34
rR9-GFP	0/ 8	13.51 ± 5.48
rR9-mFCRL	1/ 8 (12.5%)	10.98 ± 6.47
rR9-OVA	1/ 8 (12.5%)	12.64 ± 5.39
rR9-LACK	2/ 11 (18.1%)	8.63 ± 5.23
rR9-GRIM19	15/ 21 (71.4%)	3.77 ± 5.41

Group	EG.7-free mice	Tumor sizes (mm)
Untreated	0/ 25	20.00 ± 2.86
rOVA	5/ 19 (26.3%)	8.90 ± 6.94
rR9-GFP	2/ 20 (10%)	15.33 ± 8.67
rR9-mFCRL	0/ 10	16.58 ± 3.97
rR9-OVA	19/ 25 (76%)	2.78 ± 5.16
rR9-LACK	6/ 10 (60%)	5.97 ± 8.42
rR9-GRIM19	0/ 10	15.94 ± 4.45

図 4

B16 腫瘍に対する腫瘍縮小効果は、免疫原性の高い rR9-OVA, rR9-LACK で最も高く、次いで STAT3 inhibitor である rR9-GRIM19 で確認された。

A20 腫瘍に対する腫瘍縮小効果は、免疫原性の高い rR9-OVA, rR9-LACK でなく、rR9-GRIM19 で最も高く完全拒絶を認めた。EG. 7 腫瘍に対する腫瘍縮小効果は、rR9-OVA, rR9-LACK で高く、rR9-GRIM19 では認められなかった。

そこで、B16, A20, EG. 7 の活性化 (リン酸化) STAT3 の発現を Western Blot 法で解析したところ、A20 では強発現、B16 では低発現、EG. 7 では無発現であった (図 5)。

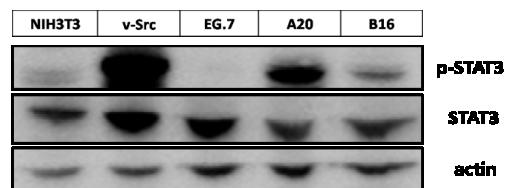


図 5

これらの発現と、rR9-GRIM19 による抗腫瘍効

果には値よい相関を認めた。

(5) 抗腫瘍効果の高かった群における T 細胞の解析

B16 担癌マウスの腫瘍塊に rR9-OVA を接種すると抗腫瘍効果を認めるが、これは CD8+細胞を除去すると認められなくなる。また、拒絶したマウスの所属リンパ節には、CTL assay 法により Trp2 epitope, B16 を認識する CTL の存在が確認された。

一方、rR9-OVA 接種群の中で B16 を完全拒絶した個々のマウスと、縮小はしたものの再び増大するようになったマウスの個々の所属リンパ節の CD4+T cell の subset の解析を FoxP3 抗体 (Treg marker) と抗 Tim3 抗体 (Th1 marker) を用いて試みた。その結果、Tim3/FoxP3 ratio は抗腫瘍効果と有意に相関していた (図 6)。

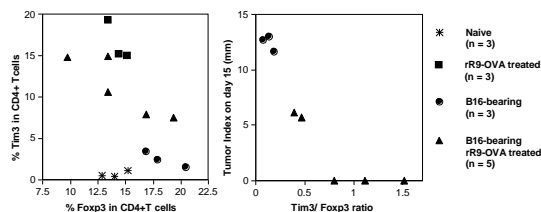


図 6

同様の Tim3/ FoxP3 ratio は A20 担癌マウスに rR9-GRIM19 を接種した際完全拒絶するマウスの所属リンパ節を解析した場合にも有意に相関していた。

従って、これらの結果は、担癌状態において有効な抗腫瘍効果を誘導させるには、Th1 を誘導させると共に Treg を抑制させる治療を行う必要があることを示唆している。

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 6 件)

- ① 柴垣直孝、島田眞路、Protein-transduction domain を用いた抗原性の増強、臨床免疫アレルギー科、査読無、55巻 2011, 255-261.
- ② N Shibagaki, T Okamoto, H Mitsui, T Inozume, M Kanzaki, S Shimada, Novel immunotherapeutic approaches to skin cancer treatments using protein transduction technology, Journal of Dermatological Science, 査読有、61, 2011, 153-161.
- ③ M Kanzaki, T Okamoto, H Mitsui, N Shibagaki, S Shimada, A novel immunotherapeutic approach to melanoma-bearing mice hosts with

protein-transduction domain containing immunogenic foreign antigens, Journal of Dermatological Science, 査読有、60, 2010, 84-94.

- ④ T Okamoto, T Inozume, H Mitsui, M Kanzaki, K Harada, N Shibagaki, S Shimada, Overexpression of GRIM-19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth, Molecular Cancer Therapeutics, 査読有、9, 2010, 2333-2343.
- ⑤ H Mitsui, T Okamoto, M Kanzaki, T Inozume, N Shibagaki, S Shimada, Intradermal injections of polyarginin-containing immunogenic antigens preferentially elicit Tc1 and Th1 activation and antitumor immunity, British Journal of Dermatology, 査読有、2010, 162, 29-41.
- ⑥ 柴垣直孝、抗原ペプチドの樹状細胞への遺伝子導入法と免疫原性、臨床免疫アレルギー科、査読無、2009, 51, 586-594.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 柴垣直孝、癌免疫療法の特ピックスと展望、第 74 回日本皮膚科学会東京支部学会、2011 年 2 月 12 日 (東京)
- ② 岡本崇、柴垣直孝、島田眞路、Intratumoral injections of a novel STAT3 inhibitor (R9-GRIM19) enhance antitumor effects combined with cancer immunotherapy in melanoma-bearing mice, 第 35 回日本研究皮膚科学会、2010 年 12 月 4 日 (和歌山)
- ③ 柴垣直孝、腫瘍免疫療法の新たな展望、第 109 回日本皮膚科学会総会、2010 年 4 月 17 日 (大阪)
- ④ N Shibagaki, Overexpression of GRIM19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth, World Congress of Inflammation 2009, 2009 年 7 月 8 日 (東京)
- ⑤ N Shibagaki, A novel immunotherapeutic approach to cancer-bearing host with protein-transduction domain-containing immunogenic foreign antigens, International Investigative Dermatology 2008, 2008 年 5 月 17 日 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Dis pInfo.Scholar/0/7FB51F55041ACE1A.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA SHINJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10114505

(2) 研究分担者

柴垣 直孝 (SHIABAGKI NAOTAKA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：40262662

川村 龍吉 (KAWAMURA TATSUYOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70262657

原田 和俊 (HARADA KAZUTOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324197

(3) 連携研究者

なし