

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791150

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫誘導におけるSTAT3とヒストンアセチル化機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation and anti-tumor mechanisms of STAT3 in tumor bearing mouse model

研究代表者

小野田 正志 (Onoda, Tadashi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：10582562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞に代表される抗原提示細胞の抗腫瘍誘導について、STAT3欠損モデルを用いた抗腫瘍効果を、抗原提示細胞のエピジェネティック制御の点から分子レベルで解析した。本研究では、野生型担癌マウスに、STAT3欠損マウスから作成した骨髄由来樹状細胞を輸注すると、有意な抗腫瘍効果が得られることを示し、STAT3欠損モデルでは、HDAC7を介するヒストンアセチル化が関与している可能性を証明した。HDAC7と抗腫瘍サイトカイン産生メカニズムの可能性と他のHDACとの関わり、HDAC阻害薬を用いた治療応用の可能性について、次期研究で詳細な検討を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulation via STAT3 and HDACs in bone marrow derived dendritic cells potentially enhances anti-tumor effect. In this study, we demonstrated the STAT3-HDAC7 axis had a key role and induces tumor elimination in tumor bearing mouse model. The STAT3 deficient dendritic cells revealed enhanced expression of MHC class II, CD80, 86, 40 and IL-12, IL-6, IL-10 expression. In this model, STAT3 bound HDAC7 promoter and probably regulates cytokine expression. Thus, HDACs uniquely regulate tumor growth with STAT3. And the therapeutic application of HDACi should be elucidated in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学・小児腫瘍学

キーワード：抗腫瘍免疫 樹状細胞療法 STAT3 エピジェネティックス HDAC

## 1. 研究開始当初の背景

小児難治性、再発性腫瘍の治療成績は、近年の新規薬剤、分子標的薬の開発、移植治療の進歩に伴い、徐々に改善しつつある。しかし、合併症、治療の長期化等、抱える問題点は多く、成績も十分とはいえない。

樹状細胞療法は、腫瘍特異抗原と樹状細胞を用いたワクチン療法で、樹状細胞の抗腫瘍免疫誘導能を利用した新たながん治療戦略の一つである。

細胞内情報伝達分子 STAT3 は、様々なサイトカインの産生を調節し、免疫細胞の分化・増殖のみならず、腫瘍細胞の増殖にも深く関与する。

また、免疫細胞、腫瘍細胞の増殖や機能発現には、ヒストンアセチル化、メチル化等のエピジェネティックな制御が不可欠である。不適切なエピジェネティック制御は転写調節を障害し、腫瘍の増殖、自己免疫疾患の発生に深く関与する。

本研究では、抗腫瘍免疫における STAT3 のエピジェネティックな制御に着目し、STAT3 やヒストンアセチル化酵素(HDAC)による抗原提示細胞の抗腫瘍免疫活性化機構について解明を試みる。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞におけるヒストンアセチル化に関して、HDAC 阻害薬が血液悪性疾患の治療に用いられ、腫瘍細胞増殖を抑制する有効な治療薬として一定の成果をあげつつある。

一方、抗原提示細胞におけるヒストンアセチル化の系統的な報告は少ない。Villagra らが一部の HDACs でサイトカインの産生調節を行っていることを報告したが、未解明な点が多い[1]。

抗腫瘍免疫の観点での STAT3 の役割はさらに興味深い。これまで我々は、STAT3 欠損マウスの骨髄由来樹状細胞が、非常に高い腫瘍縮小効果と抗腫瘍活性を示す事実を確認し

た。

以上から、抗腫瘍免疫において、STAT3 がエピジェネティックな制御を介して、HDAC によるサイトカイン産生調節を行っている可能性があることを推察した。

そこで、本研究では、STAT3 欠損樹状細胞を用いた樹状細胞ワクチンが、高い抗腫瘍効果を有することを示し、STAT3 が、どのように HDAC によるサイトカイン産生調節を制御しているかを証明した。

[1] Villagra, A and Sotomayor, EM., *Nat Immunol* 2009. 10: 92-100.

## 3. 研究の方法

1) STAT3 欠損樹状細胞を用いた抗腫瘍効果肉眼的に評価が可能な、細胞表面に OVA を強制発現したメラノーマ細胞株(B16-OVA)を選択し、C57/B6 マウスに皮下注射し、腫瘍径をモニターした。Day7 に OVA, LPS で刺激した照射骨髄由来樹状細胞(野生型, STAT3 欠損)をマウスに輸注し、引き続き腫瘍径をモニターした。

2) 成熟骨髄由来樹状細胞の表面マーカー解析、及び、STAT3 欠損骨髄由来樹状細胞におけるサイトカイン産生能、抗腫瘍免疫能の評価

Inaba ら[2]の方法を用いて、骨髄由来樹状細胞を作成した。さらに、LPS, CpG で刺激し、成熟樹状細胞を得、フローサイトメトリーで表面マーカー解析を行った。また、サイトカイン産生を ELISA 法で検討した。

3) STAT3 欠損骨髄由来樹状細胞における HDAC の発現解析

STAT3 欠損骨髄由来樹状細胞における HDAC の発現を RT-PCR 法, Westernblot 法で検討した

4) HDAC7 のプロモータ解析

マクロファージ細胞株(Raw264.7 細胞)を用い、ChIP assay を行った。

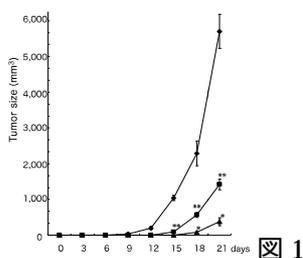
4) STAT3 knock down マクロファージ細胞株の樹立

本研究の整合性を検討するため、STAT3 shRNA を用いた STAT3 shRNA knock down マクロファージ細胞株を樹立し、Western blot 法で確認した。

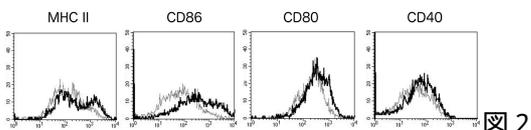
[2] Inaba, K. and Steinman, RM., *J Exp Med* 1992. 176: 1693-1702.

#### 4. 研究成果

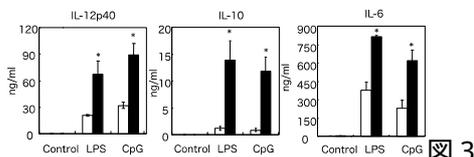
LPS, OVA で刺激した骨髄由来樹状細胞を輸注すると、STAT3 欠損骨髄由来樹状細胞を輸注したマウスで、野生型骨髄由来樹状細胞を輸注したマウスに比し、有意に腫瘍径は縮小した ( PBS, WT, STAT3KO)(図 1).



輸注した骨髄由来樹状細胞の表面マーカーの発現を解析すると、STAT3 欠損骨髄由来樹状細胞では、野生型に比し、MHC classII, CD86, CD80, CD40 の発現が亢進していた (野生型, STAT3KO)(図 2).

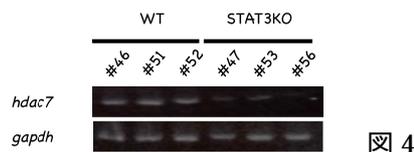


さらに、サイトカイン産生能を比較すると、IL-12, IL-10, IL-6 いずれの産生も増加していた (野生型, STAT3KO)(図 3).

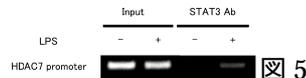


次に、STAT3 欠損樹状細胞における関係分子の発現を RT-PCR で検討した。STAT3 欠損樹状細胞では、野生型に比し HDAC7 の発現

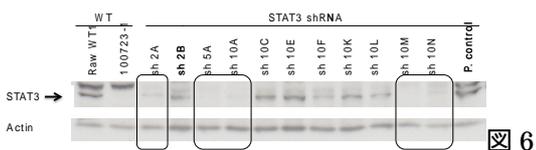
は低下していた(図 4)。また、HDAC9 に有意な差はみられず、HDAC11 で発現は亢進していた。同様に、Western blot 法で検証すると同様の所見がみられた。



ChIP 法を用いてプロモータ解析を行うと、HDAC7 のプロモータ領域に STAT3 の結合が確認された (図 5)。STAT3 が HDAC7 の発現調節をし、サイトカインの産生調節をしている可能性が示唆された。



詳細な検討のため、抗原提示細胞として、マクロファージ細胞株 (Raw264.7) の STAT3 を shRNA で Knock down した細胞株を樹立した (図 6).



STAT3 欠損樹状細胞と同様に検証をすすめ、サイトカインプロファイルの検討を行っている。今後 STAT3 knock down マクロファージ細胞株に HDAC7 をトランスフェクトし、レスキューされるかを検討し、仮説の検証を行う。最終的に、HDAC 阻害薬、STAT3 阻害薬を用いて樹状細胞を作成し、腫瘍除去能を STAT3 欠損モデルと *in vivo* で比較検討する。

HDAC7 と抗腫瘍サイトカイン産生メカニズムと他の HDAC との関わり、HDAC 阻害薬を用いた治療の可能性について、次期研究で詳細な検討を進める予定である。

#### 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5件)

(1) Onoda T, Kanno M, Meguro T, Sato H, Takahashi N, Kawakami T, Mitsui T, Hayasaka K. Successful treatment of acute myeloid leukaemia in a patient with ataxia telangiectasia. *European journal of haematology*, 2013.(査読有)

(2) Araki A, Nara H, Rahman M, Onoda T, Li J, Juliana FM, Jin L, Murata K, Takeda Y, Asao H. Role of interleukin-21 isoform in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. *Cytokine*; 62(2): 262-271, 2013. (査読有)

(3) Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T, Asao H. Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*; 420(3): 628-634, 2012.(査読有)

(4) Takahashi N, Kawakami T, Sato H, Onoda T, Kanno M, Mitsui T, Hayasaka K. Successful treatment with sorafenib for primary refractory acute monoblastic leukemia with FLT3-ITD. *Rinsho ketsueki The Japanese journal of clinical hematology*; 53(11): 1932-1936, 2012.(査読有)

(5) Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Juliana FM, Tanaka N, Asao H. WSB-1, a novel IL-21 receptor binding molecule, enhances the maturation of IL-21 receptor. *Cellular immunology*; 269(1): 54-59, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

(1) 小野田正志, 佐藤裕子, 高橋憲幸, 目

黒亨, 簡野美弥子, 三井哲夫, 早坂清. 新生児期に著明な肝脾腫大を呈した自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)の1女児例. 第4回東北小児感染免疫研究会. ホテル法華クラブ仙台. 仙台. 2014.2.22.

(2) 目黒亨, 中村和幸, 佐藤裕子, 簡野美弥子, 小野田正志, 高橋憲幸, 川上貴子, 三井哲夫, 加藤光広, 早坂清. 重症先天性好中球減少症の経過中, 5歳時急性脳症を契機に退行を認め神経発達障害が顕在化したHAX1を変異を有する女児. 第55回日本小児血液・がん学会. ヒルトン福岡シーホーク. 福岡. 2013.12.1

(3) 目黒亨, 簡野美弥子, 高橋憲幸, 小野田正志, 佐藤裕子, 三井哲夫, 早坂清. 多血球系異形成を伴う不応性血球減少症(RCMD)への骨髓移植前後にCD55/59陰性血球の推移を測定した14歳女児. 第25回山形造血器疾患研究会. 山形医学交流会館. 山形. 2013.11.23

(4) 目黒亨, 簡野美弥子, 高橋憲幸, 小野田正志, 佐藤裕子, 三井哲夫, 早坂清. CD55/59陰性血球の推移を骨髓移植前後に測定したRCMD14歳女児例. 第63回東北小児白血病研究会. 第一会館. 秋田. 2013.10.19

(5) 簡野美弥子, 小野田正志, 目黒亨, 高橋憲幸, 佐藤裕子, 川上貴子, 仙道大, 三井哲夫, 早坂清. 難治性免疫性血小板減少症6例の検討. 第94回日本小児科学会山形地方会. 山形医学交流会館. 山形. 2013.5.12

(6) 目黒亨, 簡野美弥子, 小野田正志, 佐藤裕子, 高橋憲幸, 三井哲夫, 早坂清. 骨原発前駆B細胞リンパ芽球性リンパ腫の11歳男児. 第62回東北小児白血病研究会. 仙台サンプラザホテル. 仙台. 2013.4.6.

(7) 小野田正志, 簡野美弥子, 目黒亨, 佐藤裕子, 高橋憲幸, 三井哲夫, 早坂清. 急性骨髄性白血病を合併した毛細血管拡張性失調症の1例. 第54回日本小児血液・がん

学会. パシフィコ横浜. 横浜. 2012.12.1

(8) 目黒亨, 簡野美弥子, 小野田正志, 佐藤裕子, 高橋憲幸, 三井哲夫, 早坂清. 慢性再発性多発骨髄炎(CRMO)と診断後, Ph+ALLが明らかとなった6歳女児. 第23回山形造血器疾患研究会. 山形国際ホテル. 山形. 2012.11.3

(9) 目黒亨, 簡野美弥子, 小野田正志, 佐藤裕子, 高橋憲幸, 三井哲夫, 早坂清. CRMO(慢性再発性多発骨髄炎)と診断後, Ph1ALLがあきらかとなった6歳女児. 第61回東北小児白血病研究会. 青森県物産館 アスパム. 青森. 2012.10.13

(10) 佐藤裕子, 川上貴子, 高橋憲幸, 小野田正志, 簡野美弥子, 三井哲夫, 早坂清. 初発時に上気道狭窄症状を呈した小児悪性腫瘍例. 第91回日本小児科学会山形地方会. 山形大学医学部. 山形. 2011.12.4

(11) 高橋憲幸, 川上貴子, 杉山恵一郎, 佐藤裕子, 小野田正志, 簡野美弥子, 三井哲夫, 早坂清. ソラフェニブにより寛解状態を維持している FLT3-ITD 陽性急性骨髄性白血病の6歳男児. 第53回日本小児血液・がん学会. 前橋商工会議所. 前橋. 2011.11.27

(12) 簡野美弥子, 小野田正志, 川上貴子, 高橋憲幸, 佐藤裕子, 三井哲夫, 早坂清. Eltrombopagを試みた慢性特発性血小板減少性紫斑病の4歳女児. 第53回日本小児血液・がん学会. 前橋商工会議所. 前橋. 2011.11.26

(13) 簡野美弥子, 川上貴子, 目黒亨, 小野田正志, 高橋憲幸, 佐藤裕子, 三井哲夫, 早坂清: 免疫抑制治療不応性で非血縁骨髄移植を行った再生不良性貧血の2例. 第59回東北小児白血病研究会. 山形テルサ. 山形. 2011.10.8

(14) 簡野美弥子, 川上貴子, 目黒亨, 小野田正志, 高橋憲幸, 佐藤裕子, 三井哲夫, 早坂清: 非血縁骨髄移植後にEBウイルスの再活性化を認めた再生不良性貧血の2例. 第21回

山形造血器疾患研究会. 山形. 2011.10.22

(15) Onoda.T, Emura T, Ohta H, Kato N, Ohizumi H, Hill DA, Hayasaka K, Sadahiro M. Fetal Lung Interstitial Tumor (FLIT): A Case in Japanese Newborn Boy. International Surgical Week 2011. Pacifico Yokohama. Yokohama. 2011.8.30

(16) 佐藤裕子, 川上貴子, 高橋憲幸, 小野田正志, 簡野美弥子, 三井哲夫, 早坂清: プロスタグランジン F2 膀胱内注入療法が有効と考えられた同種移植後出血性膀胱炎の男児. 第58回東北小児病血病研究会. ホテル JAL シティ仙台. 仙台. 2011.6.4

(17) 小野田正志, 太田寛, 簡野美弥子, 川上貴子, 高橋憲幸, 早川裕子, 加藤哲子, 江村隆起, 三井哲夫, 大泉弘幸, 早坂清. Fetal Lung Interstitial Tumor と診断した新生児肺腫瘍の男児例. 第33回東北小児がん研究会. ホテル JAL シティ仙台. 仙台. 2011.4.5

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野田 正志 (Onoda Tadashi)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 10582562