

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861576

研究課題名(和文) 口腔癌におけるMDSCをターゲットにした分子標的薬の研究

研究課題名(英文) A study of targeting therapy for MDSC in oral cancer.

## 研究代表者

佐藤 有紀(立石有紀)(SATO, Yuki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：60573277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス口腔癌細胞株：SCC-7を用いたが、マウスへの腫瘍移植が安定して得られなかったため、4T1 breast cancer 細胞株を用いてpre-studyを行った。4T1腫瘍移植マウスからMDSCを抽出し、IL13Ra2の発現を観察した。脾臓より、MDSC：CD11b(+)/Gr-1(+))をsortingで抽出し、FACSにて解析したところ、CD11b(-)/Gr-1(-))に比べ、IL13Ra2が高発現していることが分かった。IL-13Ra2をターゲットにした分子標的薬によってMDSCに対しての殺細胞効果を観察できた。腫瘍のみならず、MDSCをターゲットにした治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：At first, we used 4T1 breast cancer mouse model, because mouse oral squamous cell cancer cells, SCC-7 was not able to established the tumor in mice. We observed expression of IL-13Ra2 in MDSCs isolated from 4T1 tumor moice. MDSCs, CD11b(+)/Gr-1(+)) sorted from mice splenocytes were highly expressing IL13Ra2 compared to CD11b(-)/Gr-1(-)) cells by FACS analysis. Then, we found that IL13-PE, targeting for IL-13Ra2, could directly kill MDSCs. It was suggested that targeting therapy for IL13Ra2 may be useful to eliminate not only tumor, but also MDSCs.

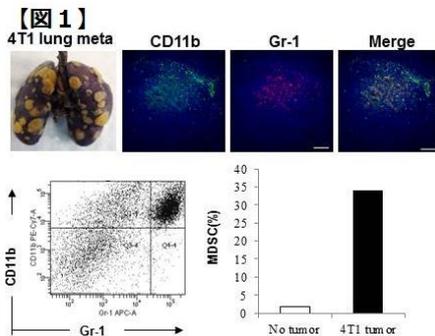
研究分野：癌免疫学

キーワード：口腔癌 分子標的薬 MDSC

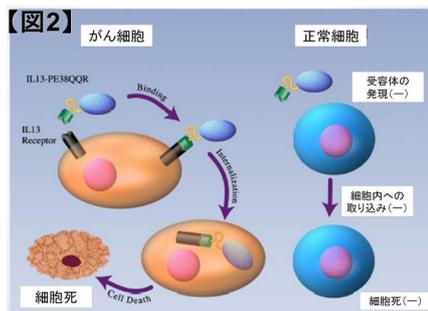
1. 研究開始当初の背景

**骨髄由来免疫抑制細胞 MDSC(Myeloid-Derived Suppressor Cells)**

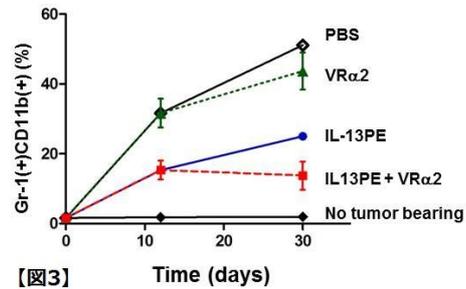
は、未熟な骨髄細胞でがん組織やリンパ節、末梢血中に見いだされる免疫抑制細胞で免疫療法の効果を阻害する因子として注目されている。また感染や外傷によっても誘導されるため、癌の進展における炎症の関与においても重要な存在である。これらの動態を検討するために種々の癌患者末梢血の MDSC を測定した研究も散見される。我々はこれまでにマウス由来の乳癌細胞株 (4T1 breast carcinoma) ならびに肉腫細胞株 (MCA304 sarcoma) を用いて、それらを移植したマウスの脾臓ならびに腫瘍内における MDSC の経時的变化を観察し、腫瘍の増大および転移に比例して MDSC の増加を認めた【図 1】。



また近年我々はインターロイキン 13 (IL-13) と緑膿菌外毒素 (PE) の 2 つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた分子標的薬である IL13-PE38 (以下 IL13-PE) を開発し、その標的効果について研究を行ってきた。IL-13 の受容体の一つである IL-13Rα2 は悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫に高発現することが報告されているが、ほとんどの正常組織には認められない。最近我々は口腔扁平上皮癌においても、この IL-13Rα2 が高発現していることを見出し、報告している (Kioi M et al, Int J Cancer, 2009)。IL13-PE は、IL-13Rα2 を高発現する癌細胞に高い親和性で結合し、細胞内に取り込まれた後、たんぱく合成を阻害することで細胞死を引き起こす。正常細胞は IL-13Rα2 受容体を発現していないため IL13-PE は結合せず細胞毒性は見られない【図 2】。



ごく最近の知見で、4T1 腫瘍移植マウスモデルにおいて MDSC が IL13Rα2 を発現していることが判明し、IL13-PE が癌のみならず、MDSC を殺戮している結果が観察された (Nakashima H et al, J Immunol, 2011) 【図 3】。



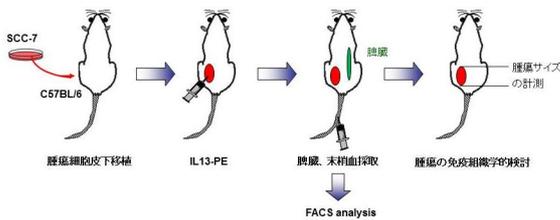
つまり IL13-PE が免疫抑制を起こしている MDSC を枯渇することで腫瘍免疫を活性化作用を有することを見出した。癌細胞は TGF-β などの免疫抑制分子の産生や制御性 T 細胞 (Treg) などの免疫抑制性細胞の誘導により免疫抑制環境を構築されるが、その改善法として、TGF-β や Treg, PD-1/PD-L1 や IDO などの除去・阻害法の開発が進められている。Treg の抑制活性阻害や T 細胞活性化ネガティブフィードバック機構阻害による抗腫瘍 T 細胞応答の増強を起こす抗 CTLA4 抗体、癌細胞上の PD-L1 に対する阻害抗体の臨床試験では抗腫瘍効果が認められ、抗 CTLA4 抗体 (Ipilimumab) は 2011 年に FDA に承認されている。しかしこれまでに分子標的薬により直接的に MDSC をターゲットにした報告はなく、非常に画期的な治療法であると同時に、副作用が少ないことから早期の臨床応用が期待できる。これは 口腔癌に対する従来の治療法のデメリットを極力回避し、低侵襲かつより安全で、患者の QOL 向上が期待される新たな治療法の確立となり得る。

2. 研究の目的

進行口腔癌に対して手術・放射線・化学療法を 3 つを組み合わせ治療を行っても、予後は依然満足いくものとなっていない。第 4 の治療法として免疫治療が期待されたが、いまだ標準治療になりえていないのが現状である。近年、癌は宿主の免疫を抑制的に制御し、免疫系による排除から逃れやすい環境を構築していることが示唆されている。特に MDSC がリンパ球機能の抑制に関わっていることが報告されてきている (Nat Rev Immunol. 2009, 9:162-74)。MDSC を制御する事は、癌免疫療法の手助けとなると考えられ、今回我々は分子標的薬 (Immunotoxin) を用いて、癌のみならず MDSC をターゲットにした治療法の開発を目指し、トランスレーショナル研究を行う。

### 3. 研究の方法

In vitro においてマウス由来細胞株である SCC-7(Oral cancer)、4T1(Breast cancer)の IL13R $\alpha$ 2 の発現レベルと IL13-PE の抗腫瘍効果を検討する。(B) In vivo において、SCC-7、4T1 を C57BL/6 マウスの皮下に腫瘍を移植、あるいは静脈投与にて肺転移モデルを作成し、経時的な腫瘍のサイズ、肺結節の数を計測し、それに伴う脾臓、末梢血、腫瘍内の MDSC の変化について観察を行う。上記結果を参考に、IL13-PE の投与タイミングを検討する。(C) SCC-7、4T1 の移植マウスに IL13-PE を投与(腫瘍内および腹腔内)し、経時的な腫瘍のサイズの変化と、脾臓、末梢血、腫瘍内の MDSC の変化について観察を行う。マウス MDSC は、Gr-1(+), CD11b(+) をマーカーとして、FACS analysis ならびに免疫組織学的検討を行う。(D) 採取した脾臓から MDSC を sorting し、IL13R $\alpha$ 2 の発現と IL13-PE による cytotoxic assay を行い、IL13-PE の MDSC に対する直接的な殺滅効果について検討する。【図 4】



【図 4】

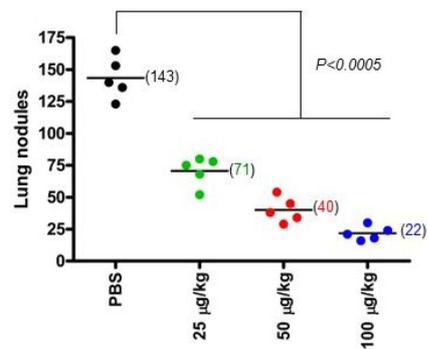
### 4. 研究成果

マウス口腔癌細胞株である SCC-7 を用いて実験を進めたが、マウスへの腫瘍細胞の移植が安定して生着しないこともあったため、比較的多くの MDSC が発現し解析可能な 4T1 の腫瘍移植マウスにおいて実験を進めた。MDSC のカルチャーおよび解析方法について条件検討を行った。

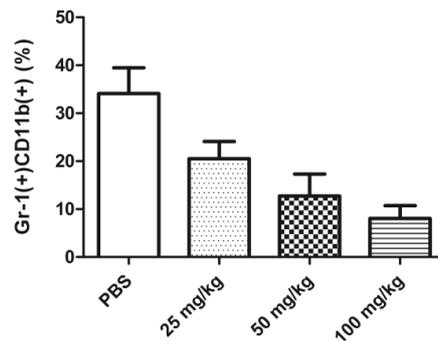
4T1 を静脈から投与し、肺転移をきたしたマウスに対して、IL-13R $\alpha$ 2 をターゲットにした分子標的薬 IL13-PE をそれぞれの濃度 (PBS control, 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg) で腹腔内投与し、肺結節の数をカウントした。

【図 5 : 濃度依存的に肺結節の数は減少を認め、IL13-PE の腫瘍に対する治療効果が観察できた。】

【図 5】

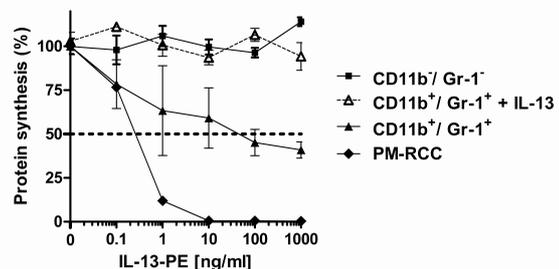


4T1 腫瘍移植 (肺転移) マウスに対して、IL13-PE をそれぞれの濃度 (PBS control, 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg) で腹腔内投与し、それぞれの群でのマウスの脾臓細胞から CD11b(+), Gr-1(+) の細胞の数を FACS にて検討したところ、濃度依存的に MDSC の数は減少を認めた。つまり IL13-PE により MDSC の殺滅効果が示唆された。【図 6】



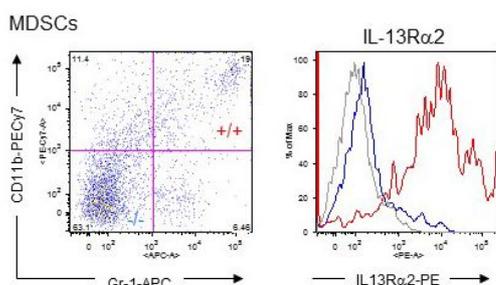
【図 6】

4T1 腫瘍移植 (肺転移) マウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞から sorting して得られた MDSC (CD11b(+), Gr-1(+)), (CD11b(-), Gr-1(-)) に対して、IL13-PE による Cytotoxic assay を施行した。結果、CD11b(+), Gr-1(+) の細胞に対して IL13-PE が濃度依存的に殺細胞効果を観察できた。一方、CD11b(-), Gr-1(-) に対しては IL13-PE の殺細胞効果は認められなかった。【図 7】



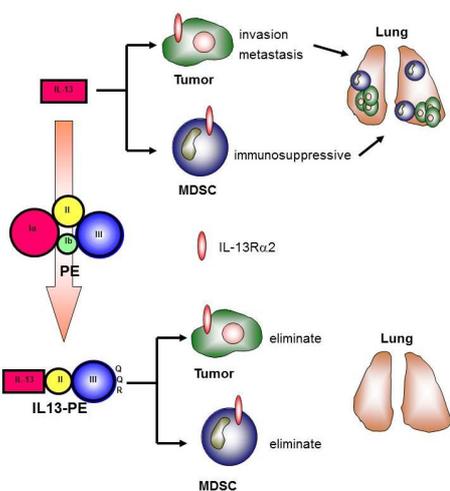
【図 7】

4T1 mouse model から MDSC を抽出し、IL13R $\alpha$ 2 の発現を観察した。脾臓細胞の中から、MDSC:CD11b(+)Gr-1(+)の細胞を sorting にて抽出し、FACS analysis にて解析したところ、CD11b(-)Gr-1(-)と比較して、CD11b(+)Gr-1(+)で IL13R $\alpha$ 2 が高発現していることが分かった。【図 8】



【図 8】

腫瘍のみならず、骨髄由来免疫抑制細胞 MDSC をターゲットにした治療法の可能性が示唆された。【図 9】



【図 9】

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 中島 英行, 來生 知, 佐藤 有紀, 光藤 健司, 藤内 祝. マウス頭頸部自然発生腫瘍に対する分子標的薬を用いた治療法の開発: 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大

会, 2015, Jan 29-30, 奈良県新公会堂、奈良県奈良市

〔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〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 有紀 (SATO, Yuki)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号: 60573277

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし