

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士(医学)	氏名	原  瀨  翔  平
<b>学  位  論  文  題  目</b>			
Intratumoral STING activations overcome negative impact of cisplatin on antitumor immunity by inflaming tumor microenvironment in squamous cell carcinoma (扁平上皮癌に対するシスプラチンとSTING活性化療法の併用に関する研究)			
<b>共  著  者  名</b>			
小坂朱, 矢島優己, 永田真莉乃, 林隆介, 熊井琢美, 大原賢三, 長門利純 及川賢輔, 大原みずほ, 原瀨保明, 大栗敬幸, 小林博也			
Biochemical and Biophysical Research Communications 2019 Nov 23. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.11.107.			
<b>研  究  目  的</b>			
<p>頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)に対する新しい治療法として癌免疫療法が注目されている。しかし、単用による治療では十分な効果が得られていないことから[引用文献1]、現在の癌免疫療法に関する臨床治験および基礎研究では、単用療法からシスプラチンなどを用いた化学療法との併用療法が中心的な研究課題になっている。そして化学療法と癌免疫療法を効果的に併用するためには、化学療法が及ぼす癌免疫学的な影響を考慮しなければならないが、それに関する前臨床的な研究は不足している。</p> <p>STING: Stimulator of interferon genesは様々なウイルスに対する生体防御機構に重要な役割を果たす小胞体局在膜蛋白質であり、核酸を認識して活性化することでI型インターフェロン(IFN)の産生を誘導し、免疫応答を促進する。これまでの我々の癌免疫研究において、STINGアゴニストであるcGAMPを腫瘍内投与することで局所の炎症反応を惹起し、抗腫瘍免疫応答を強く活性化できることを明らかにしている。</p> <p>今回我々はシスプラチン療法の癌免疫学的な影響を解析し、その結果を元にシスプラチンとSTING活性化療法の併用における有効性とメカニズムを、マウスの扁平上皮癌(SCC)細胞株を移植したマウスモデルを用いて検討した。</p>			
<b>材  料  ・  方  法</b>			
<p>1. ヒトリンパ球を用いたシスプラチンを用いた化学療法の癌免疫学的な影響の解析</p> <p>健康人および2018年から2019年の間に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で診療を行った新規HNSCC患者12例の血液検体を用いて、シスプラチンがリンパ球活性化に及ぼす影響およびシスプラチンを用いた化学療法後の末梢血リンパ球の活性化能を解析した。ヒト末梢血を用いた研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号16040)。</p>			

2. マウスSCCモデルを用いたシスプラチン単用療法の癌免疫学的な影響の解析
 

2種類のマウスSCC細胞株(mSCC1, mSCC2)をそれぞれ移植したBALB/cマウスにシスプラチンを腹腔内投与し、所属リンパ節および腫瘍組織の免疫細胞動態への影響をフローサイトメトリーにて解析した。
3. マウスSCCモデルに対するシスプラチンとSTING活性化療法の併用効果の検討
 

上記マウスモデルにシスプラチンの腹腔内投与およびcGAMPの腫瘍内投与の併用療法を施行し、所属リンパ節および腫瘍組織内の免疫細胞動態の変化をフローサイトメトリーにて解析した。さらに併用療法の有効性を継時的な腫瘍径の計測によって検討した。
4. 併用療法施行によるケモカイン産生の変化およびその関連性の評価
 

mSCC1マウスモデルにシスプラチンの腹腔内投与およびcGAMPの腫瘍内投与を行い、腫瘍組織内のCxc19, Cxc110の遺伝子発現量をリアルタイムPCR法にて評価した。また所属リンパ節中のキラーT細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)のケモカイン受容体であるCXCR3の発現をフローサイトメトリー法で解析した。ケモカイン産生亢進と併用療法の治療効果との関連を検討するため、mSCC1マウスモデルの併用療法群に対しCXCR3経路の反応を阻害する抗体(抗CXCR3抗体)を用いた際の抗腫瘍効果を継時的な腫瘍径の計測によって検討した。

## 成 績

1. 抗CD3抗体を用いてヒトリンパ球を刺激した結果、シスプラチン存在下で培養したリンパ球における分裂細胞数および培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度が、シスプラチン非存在下と比較して低下した。
 

また、健常人およびHNSCC患者の末梢血から単核細胞を回収して解析した結果、化学療法後のHNSCC患者検体において血液1mLあたりの細胞数が低下していた。しかし、リンパ球のIFN- $\gamma$ 産生量を指標とした抗CD3抗体の50%有効濃度(EC<sub>50</sub>)は、化学療法後のHNSCC患者検体においても低下を認めず、リンパ球の活性化能の維持が示唆された。
2. コントロール群とシスプラチン単用療法群のマウスSCCモデルの所属リンパ節を解析した結果、シスプラチン単用療法群において総細胞数が低下していた。また、活性化した樹状細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の割合も減少していた。回収したリンパ節細胞を抗CD3抗体にて刺激した結果、両群間の培養上清中に含まれるIFN- $\gamma$ 濃度に差は認められなかった。腫瘍浸潤白血球(TIL)におけるCD8<sup>+</sup>T細胞の割合は、シスプラチン単用療法群において減少していた。
3. マウスSCCモデルの所属リンパ節を解析した結果、シスプラチンとcGAMPの併用療法群におけるリンパ節中の全細胞、単球・マクロファージ、およびCD8<sup>+</sup>T細胞の細胞数が、コントロール群およびシスプラチン単用療法群と比較して有意に増加していた。また、TILを解析した結果、併用療法群において活性化単球・マクロファージの割合が増加し、骨髄由来抑制性細胞の割合が減少していた。さらに腫瘍増殖抑制効果を評価した結果、併用療法群が最も高い腫瘍増殖抑制効果を示した。
4. 併用療法群における腫瘍組織内のCxc19およびCxc110の発現量は、コントロール群および

シスプラチン単用療法群と比較して有意に増加した。

CXCL9やCXCL10はT細胞上に発現されるCXCR3と結合してT細胞を炎症局所へと遊走させる。CXCR3はケモカインと結合後、一時的に細胞内に取り込まれることから、T細胞表面上のCXCR3の発現量を解析することによって、T細胞がCXCL9およびCXCL10の刺激を受け取ったかどうかを判断することができる[引用文献2]。本研究においても腫瘍内における*Cxcl9*および*Cxcl10*の発現量と相反するように、cGAMP単用療法群および併用療法群のCD8<sup>+</sup>T細胞上のCXCR3の発現量がコントロール群およびシスプラチン単用療法群と比較して低下していた。

また、cGAMPを腫瘍内投与する前日に抗CXCR3抗体を腹腔内投与した結果、併用療法による腫瘍増殖抑制効果が認められなくなった。

## 考 案

近年の報告では、シスプラチンを用いた化学療法によって、MHC class I発現の増加、エフェクターT細胞の機能増強、免疫抑制細胞の減少などの効果が得られることから、シスプラチンは癌免疫療法にポジティブな影響をもたらすと言われている[引用文献3]。しかしながら本研究結果において、シスプラチン存在下ではリンパ球の活性化が直接的に阻害されることが示された。そのためシスプラチンが血中に残存しているときに癌免疫療法を併用してリンパ球を活性化することは非効率であると思われる。だが同時に、シスプラチン療法後のHNSCC患者において、末梢血中の免疫細胞数が減少していてもリンパ球そのものの活性化能は失われていないことも示された。これらのことより、シスプラチン療法の終了後に癌免疫療法の導入を行えば、シスプラチンによる上記のポジティブな影響を残しつつリンパ球に対する阻害作用を回避でき、かつ癌免疫療法により免疫環境も改善され、相乗的な抗腫瘍効果が得られると我々は考案した。

本研究では、シスプラチン療法に併用する癌免疫療法としてSTING活性化療法を選択した。我々の事前研究において、cGAMPの腫瘍内投与が活性化マクロファージを腫瘍組織内に誘導し、炎症反応の惹起による扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を示した[参考文献1]。シスプラチン療法によって活性化能を維持しつつも細胞数を減少させたリンパ球に対して、STING活性化療法の導入が癌免疫学的な状態の改善に寄与すると我々は考案した。また、シスプラチンにより傷害された癌細胞から癌抗原が多く放出されるため、STING活性化療法の単用と比べて強い抗腫瘍免疫応答が得られることも期待された。以上の仮説に基づいて我々はシスプラチンとSTING活性化療法の併用の、SCCに対する有効性を検討した。

マウスSCCモデルを用いた実験ではシスプラチン腹腔内投与後に所属リンパ節内の活性化抗原提示細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞、そして腫瘍組織内のCD8<sup>+</sup>T細胞の減少が認められたことから、生体内が免疫学的に疲弊していることが示された。しかし、その時期にSTING活性化療法を導入することでリンパ節および腫瘍組織における活性化CD8<sup>+</sup>T細胞や活性化マクロファージなどの抗腫瘍免疫細胞が増加し、それぞれの単用療法群よりも併用療法群においてより高い腫瘍増殖抑制効果を示した。この相乗的な抗腫瘍効果は抗CXCR3抗体で認められなくなったことから、cGAMP投与による腫瘍組織のCXCL9およびCXCL10と

いったケモカイン産生の増加、およびそれに伴うCD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍内浸潤の促進が寄与しているものと思われる。

## 結 論

本研究にてシスプラチンを用いた化学療法における、癌免疫学的にポジティブな影響とネガティブな影響が明らかとなった。STING活性化療法を併用することによって、シスプラチン単用療法のネガティブな影響を相殺し相乗的な抗腫瘍効果が得られた。当研究成果は将来的な扁平上皮癌患者治療予後の改善に寄与するものと思われる。

## 引 用 文 献

- [1] K. Spielbauer, L. Cunningham, N. Schmitt, PD-1 Inhibition Minimally Affects Cisplatin-Induced Toxicities in a Murine Model, *Otolaryngol Head Neck Surg* 159 (2018) 343-346. 10.1177/0194599818767621.
- [2] A. Meiser, A. Mueller, E.L. Wise, E.M. McDonagh, S.J. Petit, N. Saran, P.C. Clark, T.J. Williams, J.E. Pease, The Chemokine Receptor CXCR3 Is Degraded following Internalization and Is Replenished at the Cell Surface by De Novo Synthesis of Receptor, *The Journal of Immunology* 180 (2008) 6713-6724. 10.4049/jimmunol.180.10.6713.
- [3] A.R. de Biasi, J. Villena-Vargas, P.S. Adusumilli, Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence, *Clin Cancer Res* 20 (2014) 5384-5391. 10.1158/1078-0432.CCR-14-1298.

## 参 考 論 文

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