

# 博士論文

STAT3 二量体化阻害薬による抗腫瘍免疫応答の誘導

Induction of anti-tumor immune response by a STAT3  
dimerization inhibitor

本論文は、静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府 博士論文である。

2023 年 9 月

September 2023

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府

薬科学専攻 博士後期課程

創薬探索センター

高橋 寛行

Hiroyuki Takahashi

略語一覽

7-AAD	7-amino-actinomycin D
BSA	bovine serum albumin
CAR	chimeric antigen receptor
CAR-T	chimeric antigen receptor-T-cell
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FITC	fluorescein isothiocyanate
IL	interleukin
IL-6RA	interleukin 6 receptor A
JAK	Janus kinase
L-Gln	L-glutamine
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
MFI	mean fluorescent intensity
MHC	major histocompatibility complex
MICA	MHC class I chain-related gene A
MMP	matrix metalloproteinases
NKG2D	natural killer group 2, member D
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	phosphate-buffered saline with Tween™ 20
PD-1	programmed death-1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PFA	paraformaldehyde
PVDF	poly vinylidene difluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Src homology 2
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAM	tumor-associated macrophage
TGF-β	transforming growth factor β

VEGF	vascular endothelial growth factor
pSTAT3	phospho-signal transducer and activator of transcription 3

# 目次

序論 .....	1
本論 .....	6
第1章 同種移植モデルにおける YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果.....	6
1-1 実験材料及び実験方法.....	7
1-1-1 実験材料 .....	7
1-1-1-1 試薬.....	7
1-1-1-2 細胞.....	7
1-1-1-3 動物.....	7
1-1-2 実験方法.....	8
1-1-2-1 がん細胞の培養.....	8
1-1-2-2 リン酸化 STAT3 の核内移行評価.....	8
1-1-2-3 STAT3 及びリン酸化 STAT3 の免疫ブロット.....	9
1-1-2-4 細胞周期解析.....	10
1-1-2-5 アポトーシスの誘導.....	10
1-1-2-6 腫瘍増殖の阻害.....	11
1-2 実験結果.....	13
1-2-1 YHO-1701 のマウス STAT3 に対する阻害作用.....	13
1-2-1-1 マウス STAT3 の核内移行評価.....	13
1-2-1-2 マウス STAT3 のリン酸化評価.....	15
1-2-1-3 マウスがん細胞株に対する細胞増殖阻害.....	16
1-2-1-4 マウスがん細胞株の細胞周期への影響.....	17
1-2-1-5 マウスがん細胞株へのアポトーシス誘導能.....	18
1-2-2 マウスがん細胞移植マウスモデルにおける抗 PD-1 抗体との併用効果.....	19
1-2-3 免疫チェックポイント阻害療法不応性モデルにおける YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果.....	23
1-3 考察.....	24
第2章 YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の機序.....	26
2-1 実験材料及び実験方法.....	27
2-1-1 実験材料 .....	27
2-1-1-1 試薬.....	27
2-1-1-2 細胞.....	27
2-1-1-3 動物.....	27
2-1-2 実験方法.....	27
2-1-2-1 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルの作成.....	27
2-1-2-2 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルにおける併用効果.....	28
2-1-2-3 正常及び免疫不全マウスにおける YHO-1701 の効果比較.....	29
2-1-2-4 腫瘍内のリン酸化 STAT3 の検出.....	29

2-1-2-5	T細胞活性抑制 CT26 モデルの作成	30
2-1-2-6	T細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の抗腫瘍効果の評価	31
2-1-2-7	NK細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の抗腫瘍効果の評価	31
2-1-2-8	YHO-1701 のマウス NK細胞活性抑制の阻害	32
2-1-2-9	YHO-1701 による CT26 細胞の MHC クラス I 分子の発現抑制	33
2-2	実験結果	35
2-2-1	抗 PD-1 抗体との併用効果に対する NK 細胞の寄与	35
2-2-2	YHO-1701 の腫瘍内 STAT3 のリン酸化阻害作用	37
2-2-3	正常及び免疫不全マウスにおける YHO-1701 の効果比較	39
2-2-4	T細胞活性減少 CT26 モデルにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果	41
2-2-5	NK細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果	44
2-2-6	YHO-1701 によるマウス NK細胞活性抑制の阻害	45
2-2-7	YHO-1701 による CT26 細胞の MHC クラス I 分子の発現抑制	46
2-3	考察	47
第3章	YHO-1701 のヒト免疫細胞に対する作用	50
3-1	実験材料及び実験方法	51
3-1-1	実験材料	51
3-1-1-1	試薬	51
3-1-1-2	細胞	51
3-1-2	実験方法	52
3-1-2-1	細胞の培養	52
3-1-2-2	ヒト NK細胞株のヒトがん細胞株に対する細胞傷害活性の評価	52
3-1-2-3	YHO-1701 曝露後の MICA 発現量の測定	54
3-1-2-4	YHO-1701 曝露後のヒト樹状細胞成熟化の誘導	54
3-1-3	実験結果	56
3-1-3-1	ヒトがん細胞株及びヒト NK細胞株を用いた YHO-1701 による細胞傷害活性の向上作用	56
3-1-3-2	YHO-1701 のヒトがん細胞における NK細胞活性化分子の発現量に及ぼす作用	57
3-1-3-3	YHO-1701 のヒト樹状細胞成熟化に対する作用	58
3-2	考察	60
総括及び結論		61
謝辞		64
参考文献		65

## 序論

シグナル伝達兼転写活性化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3: STAT3) は転写因子であり、受容体に結合したヤヌスキナーゼ (Janus kinase: JAK) によってサイトカインや成長因子に応答してリン酸化され、ホモ二量体又はヘテロ二量体を形成し、細胞核へ移行して転写活性化因子として作用する [1]。リン酸化された STAT3 は、Src ホモロジー-2 (Src homology 2: SH2) ドメインとリン酸化チロシンとの結合を介して二量体化することが知られている [2]。STAT3 は悪性腫瘍において活性化し、腫瘍の増殖、がん細胞の生存に関連する *BIRC5*、*c-Myc* 及び *Bcl-2* 等の遺伝子、腫瘍の血管新生に関連する血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) ファミリー遺伝子群、腫瘍浸潤に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMP) ファミリー遺伝子群等の発がん、がんの増殖、転移及び浸潤等に関連する遺伝子の転写を促進することが報告されており、がん治療の有望な標的の一つとして知られている [3, 4, 5]。創薬探索センターでは、新しいがん治療薬の創製を目的として、STAT3 の SH2 ドメインに結合し、リン酸化 STAT3 の二量体化を阻害する低分子化合物をスクリーニングし、一連の化合物群を得た [6, 7]。YHO-1701 はこれらを基礎として、STAT3 二量体化阻害活性及び薬剤としての特性を向上させるために改良された経口投与可能な低分子化合物であり [8]、これまでにヒトがん細胞に対する *in vitro* における細胞増殖抑作用、アポトーシス誘導作用、細胞周期阻害作用、*in vivo* 異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制効果及び分子標的薬を中心とした抗悪性腫瘍薬との併用効果が認められている [8, 9, 10]。

また、STAT3 は細胞の生存、分化、炎症に関与する遺伝子の発現を制御する転写因子でもあり、がん細胞や腫瘍微小環境内の免疫細胞などの細胞で、サイトカインや成長因子により過剰に活性化される。過剰に活性化された STAT3 は、腫瘍における免疫回避、血管新生、薬剤耐性などを促進することが知られている [11, 12, 13, 14]。例えば、STAT3 はがん細胞や免疫細胞において、サイトカインであるインターロイキン (interleukin: IL) -6、IL-10、成長因子であるトランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ : TGF- $\beta$ )、VEGF-A 等により活性化することが知られている [12, 13]。また、がん細胞においては、がん遺伝子の変異やエピジェネティックな変化によっても活性化されることも知られている [13]。

STAT3 の活性化は、がん細胞とともに免疫系細胞 (ナチュラルキラー細胞、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞、好中球など)、血管系細胞、線維芽細胞などの様々な細胞が作り出す腫瘍微小環境における免疫細胞の機能や表現型に影響を与える [11, 12] (図 1)。また、STAT3 は免疫細胞による炎症性シグナルの産生や感知を抑制することで、その抗腫瘍活性を低下させることがある [11]。更に、STAT3 はプログラム細胞死リガンド 1 (programmed death-ligand 1: PD-L1) などの免疫チェックポイント分子の発現を誘導することで、T 細胞の活性化を阻害することが報告されている [15]。したがって、STAT3 は

腫瘍微小環境内でがん細胞と免疫細胞との相互作用を仲介する重要な因子であり、がん免疫療法における治療標的となることが示唆されている [11, 13]。

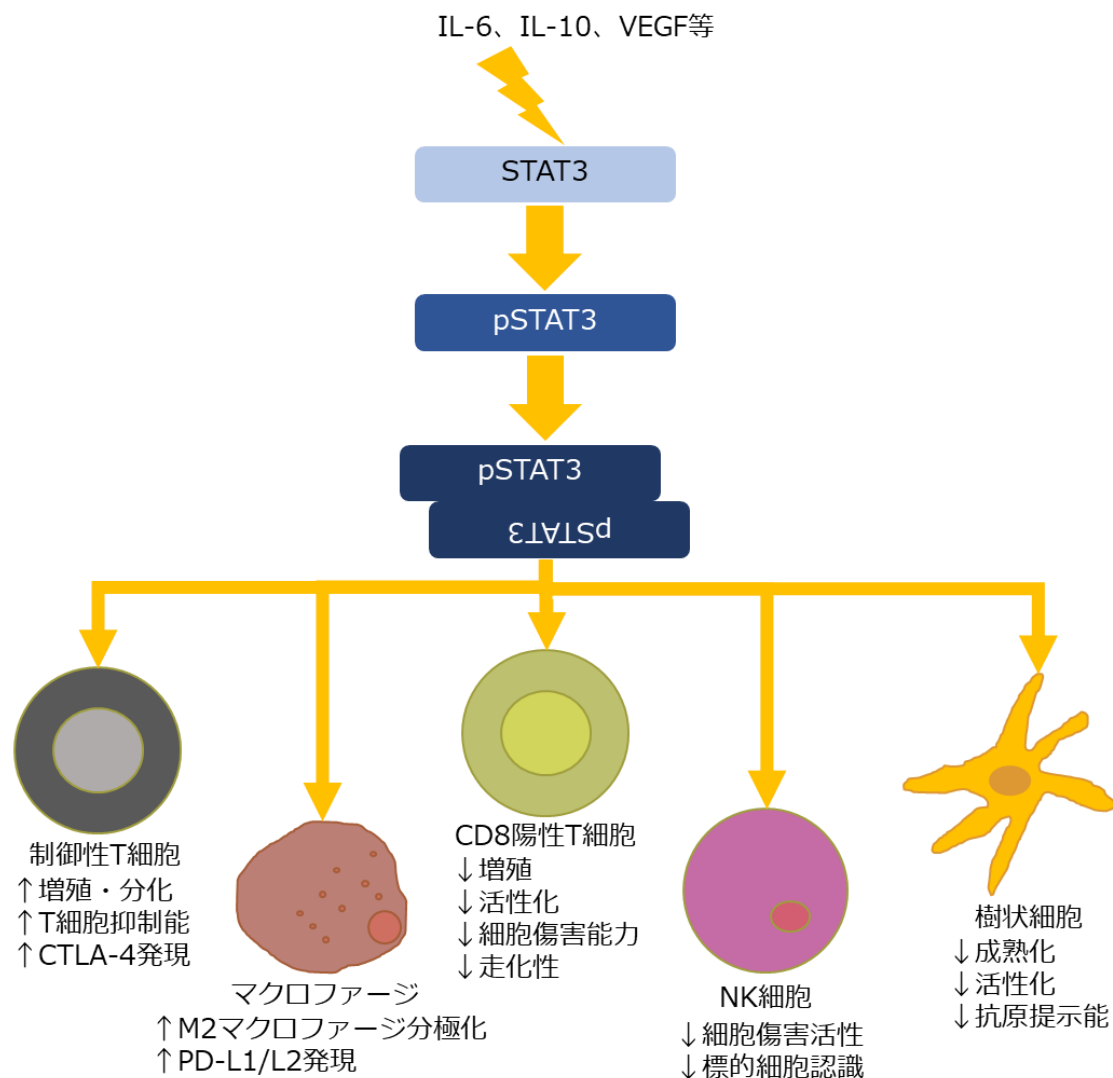


図 1 主な免疫細胞における STAT3 シグナルの影響

サイトカインや成長因子等のシグナルは受容体を介して STAT3 をリン酸化し、リン酸化された STAT3 は二量体化し、転写因子として各種免疫細胞に対して影響を及ぼす。図中記述中の矢印は、上向きが向上させる影響を、下向きが低下させる影響を示す。

がん免疫療法は T 細胞などの免疫細胞の抗腫瘍活性を高め、又はその機能の抑制機構、すなわち免疫チェックポイントを遮断することでがん細胞に対抗する [16, 17, 18]。しかし、すべてのがん患者で十分な有効性が認められることはなく、一部の患者は耐性や副作用を発現することがある。これは、それぞれの患者の腫瘍微小環境が同質ではないという

ことに加え、同じ患者の腫瘍内でも、腫瘍の進展に伴って腫瘍微小環境が変化するためであると考えられている [16, 18, 19]。従って、がん免疫療法における薬剤の投与タイミングは、治療効果に影響を与え得ると推測される。

腫瘍微小環境を理解し、それを標的とすることは、がんの診断、治療及び予後を改善するための大きな課題と機会である。腫瘍微小環境を構成する細胞の種類や量、分泌された生理活性物質の濃度等の特徴を分析することは、免疫療法や他の治療への反応を予測するバイオマーカーを同定することにつながる。また、薬剤や他の介入によって腫瘍微小環境に影響を与えることは、がん免疫療法の有効性や安全性を高めたり、耐性を克服したりすることができると考えられる。

がん免疫療法は免疫系を利用してがん細胞を攻撃する治療法の総称であり、主に次のようなものが挙げられる [20, 21, 22]。がん治療ワクチンは、患者体内でがん細胞に特異的な免疫反応を誘導するために、がん抗原や免疫増強剤等を投与する。また、サイトカイン療法は細胞から分泌されるサイトカインのうち、免疫系の活性化に重要な分子を投与してがん細胞に対する免疫反応を強化する。一方、キメラ抗原受容体 T (chimeric antigen receptor-T-cell: CAR-T) 細胞療法は、体外で患者の T 細胞にがん細胞に結合するキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) を導入し、がん細胞を認識して細胞傷害活性を発揮する能力を高めて投与する。また、抗体療法は、がん細胞の表面に存在する分子や、がん細胞の増殖や生存に関与する分子に結合する抗体を投与し、がん細胞を直接攻撃したり、免疫細胞の活性を調節したりする。免疫細胞療法は、患者やドナーから採取した免疫細胞 (T 細胞やナチュラルキラー細胞など) を培養して増殖させ、がん細胞に対する活性を向上させた後、患者に投与する。広範な悪性腫瘍の標準療法として確立されている免疫チェックポイント阻害剤は、近年その発展が著しく、T 細胞の活性化や増殖を制御する免疫チェックポイントに関与する分子に結合する抗体を用い、T 細胞の細胞傷害活性抑制を解除し、腫瘍免疫の抗腫瘍効果を高める。がん免疫療法は、単独で行われる場合もあれば、他の治療法 (化学療法や放射線療法など) と併用される場合もあり、様々な種類のがんに対して有効性が示されているが、奏効率や有害事象発現率には個人差がある [20, 23]。

免疫チェックポイント阻害剤には、次のような種類がある [24]。細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4: CTLA-4) 阻害剤は、T 細胞の活性化を抑制する役割を果たしている免疫チェックポイント分子である CTLA-4 に結合する抗体であり、CTLA-4 の機能を阻害し、T 細胞の活性化を促進する。CTLA-4 阻害剤の例としては、イピリムマブがある。イピリムマブは、進行性の悪性黒色腫等に対して承認されている。次に、プログラム細胞死 1 (programmed death-1: PD-1) 阻害剤は、T 細胞の増殖や機能を抑制する役割を果たしている免疫チェックポイント分子である PD-1 に結合する抗体であり、PD-1 の機能を阻害し、T 細胞の増殖や機能を回復させる。PD-1 阻害剤の例としては、ニボルマブやペムブロリズマブがある。ニボルマブやペムブロリズマブは、悪性黒色腫や非小細胞肺癌等に対して承認されている。また、PD-L1 阻害剤は、がん細



胞や正常細胞の表面に存在し、PD-1 と結合することで T 細胞の機能を抑制する免疫チェックポイント分子である PD-L1 に結合する抗体であり、PD-L1 の機能を阻害し、T 細胞の機能抑制を解除する。PD-L1 阻害剤の例としては、アテゾリズマブやアベルマブがある。アテゾリズマブやアベルマブは、非小細胞肺癌や膀胱がん等に対して承認されている。

今日、免疫チェックポイント阻害剤はがん治療において革新的な効果を示している一方、いくつかの限界も報告されている [25, 26, 27]。免疫チェックポイント阻害剤は、がん細胞と免疫細胞との相互作用を標的としているため、がん細胞が免疫細胞に認識されやすいほど効果が高いと考えられている。しかし、一部のがん腫は、免疫細胞から隠避したり、抑制したりする能力が高く、免疫チェックポイント阻害剤に対して反応性が低いと考えられ、例えば、膵臓がんや前立腺がん等は、免疫チェックポイント阻害剤に対する奏功率が低いことが報告されている [25]。また、免疫チェックポイント阻害剤の治療初期に効果が認められた場合でも、長期的には耐性が発現することが報告されている [25, 27]。耐性の発現には、様々なメカニズムが関与していると考えられている。

安全性の面において免疫チェックポイント阻害剤は、T 細胞の抑制を解除することで、正常組織に対する自己免疫反応を引き起こすことがある。この反応により生じる好ましくない所見は免疫関連有害事象と呼ばれ、皮膚や消化器系などの臓器に影響を及ぼすことがあり、重篤な場合は死亡することもある。

これらの限界を克服するため、更なる基礎研究や臨床試験が求められている。例えば、新しい免疫チェックポイントや他の免疫調節分子を標的とする薬剤の開発、他の治療法との組み合わせ効果の検証や、反応性又は耐性の予測因子やバイオマーカーの探索などが挙げられる [25, 26, 27]。

また、これまでに多数の免疫チェックポイント阻害剤が臨床開発されているが、その臨床試験成績から、免疫チェックポイント阻害療法に不応性の患者集団や有効性が期待できないがん腫があることが明らかとなっており、それらを解決する新規治療法が求められている [28, 29, 30]。例えば、抗 CTLA-4 抗体イピリムマブと抗 PD-1 抗体ニボルマブとの併用療法は、悪性黒色腫を始めとする複数のがん種で承認されている。また、免疫チェックポイント分子の一つであるリンパ球活性化遺伝子 3 (lymphocyte-activation gene 3: LAG-3) を標的とする抗 LAG-3/CD223 抗体 relatlimab は、抗 PD-1 抗体であるニボルマブとの併用療法で米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration: FDA) に承認されている [31]。これらの事例は免疫チェックポイント阻害剤同士の併用療法であるが、その他の事例として、免疫チェックポイント阻害療法とそれ以外の抗悪性腫瘍との併用療法の開発も行われている。一例として、抗 PD-1 抗体ペムブロリズマブとマルチキナーゼ阻害剤レゴラフェニブとの併用療法を検証する臨床試験が実施されている [32]。

STAT3 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法については、STAT3 の発現を特異的に抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドと抗 PD-1 抗体との併用療法が、マウスがん細胞を用いた同種移植マウスモデルにおいて有効であったことが報告されている

[33]。本研究においては、STAT3 二量体化阻害作用を有する低分子薬による免疫チェックポイント阻害剤の効果増強作用の評価と併用効果の機序の探索を目的に、マウスがん細胞を用いた同種移植マウスモデルを用いた腫瘍増殖抑制効果と腫瘍免疫を担う各種リンパ球の寄与を評価する実験に加え、各種リンパ球及びがん細胞に対する直接的作用を評価する実験を中心として、STAT3 二量体化阻害薬による抗腫瘍免疫応答の増強について検証した。

## 本論

### 第 1 章 同種移植モデルにおける YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果

YHO-1701 と免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体との併用効果を評価するためには、併用効果の直接的作用機序が明らかとなっていない現状を考慮すると、免疫微小環境が構成されている条件において試験を行う必要があると考えられる。そこで、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を評価することができるマウスモデルが候補となる [34, 35, 36, 37]。一方、YHO-1701 はヒトのリン酸化 STAT3 の SH2 ドメインに結合して二量体化を阻害することを目的に設計され、その効果が検証されているが [8]、マウスの STAT3 を阻害するかどうか確認されていない。これらのことから、マウスモデルを用いて抗 PD-1 抗体との併用効果を評価するのに先立ち、マウス大腸がん細胞 CT26 を用いてマウス STAT3 に対する YHO-1701 の阻害作用を検討した。また、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与タイミングにより抗腫瘍効果が異なる可能性を考慮し、抗 PD-1 抗体の投与時期を中心として、YHO-1701 の前投与、同時投与及び後投与の 3 つの投与タイミングを比較検討した。

## 1-1 実験材料及び実験方法

### 1-1-1 実験材料

#### 1-1-1-1 試薬

- RPMI-1640 培地 (富士フイルム和光純薬)
- ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific)
- ジメチルスルホキシド (富士フイルム和光純薬)
- メチルセルロース 400 (富士フイルム和光純薬)
- YHO-1701 (創薬探索センター又は株式会社ヤクルト本社で合成)
- マウス IL-6 (BioLegend)
- Recombinant Mouse IL-6R alpha (aa 20-357) Protein (R&D systems)
- 正常ヤギ血清 (Vector Laboratories)
- 抗マウス STAT3(124H6)マウスモノクローナル抗体(Cell Signaling Technologies)
- Alexa Fluor 488™標識抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 ((Invitrogen)
- VECTASHIELD™ Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- RIPA Buffer (10 ×) (Cell Signaling Technology)
- 抗マウスリン酸化 STAT3 (Tyr705) (D3A7) マウスモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technologies)
- 抗マウス  $\alpha$ -チューブリン抗体 (abcam)
- ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (Global Life Sciences Solutions)
- イソフルラン (富士フイルム和光純薬)
- GoInVivo™ Purified anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody (BioLegend)
- RNase (Sigma-Aldrich)
- Cellstain PI Solution (同仁化学研究所)
- Alexa Fluor™ 488 Annexin V (Thermo Fisher Scientific)

#### 1-1-1-2 細胞

- マウス大腸がん細胞株 CT26 (American Type Culture Collection)
- マウス線維芽細胞腫細胞株 CMS5a (三重大学大学院医学系研究科 珠玖洋教授より分与)

#### 1-1-1-3 動物

- BALB/cCrSlc 雌性マウス (日本エスエルシー株式会社)

## 1-1-2 実験方法

### 1-1-2-1 がん細胞の培養

RPMI-1640 培地（以下、培養培地）に終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清（fetal bovine serum: FBS）及び 0.3 g/L L-グルタミン（L-glutamine: L-Gln）を加え、100 U/mL ペニシリン及び 100 mg/L ストレプトマイシンを添加し培養培地を調製した。凍結保存マウス大腸がん細胞株 CT26 を 37°C の湯浴にて融解し、培養培地に細胞を懸濁し、190 × g、室温で 3 分間遠心分離した後、上清を除去し、培養培地で再懸濁して培養容器に播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置して、約 80% コンフルエントになるまで培養した。

増殖培地を吸引除去し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's phosphate-buffered saline: D-PBS）（-）（8.1 mM リン酸水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素カリウム、2.7 mM 塩化カリウム、137 mM 塩化ナトリウム）にて洗浄した後、0.25% トリプシン／エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA）溶液を加え、8 割程度の細胞が培養容器の底から剥離するまで、様子を見ながら静置した。培養培地を加えて懸濁し、190 × g、室温で 3 分間遠心分離して上清を除去し、培養培地で再懸濁した細胞を、細胞密度が約 0.7–2.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> になるように播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置し、約 80% コンフルエントになるまで培養し、目的の細胞数が得られるまで継代培養を行った。

### 1-1-2-2 リン酸化 STAT3 の核内移行評価

CT26 細胞を培養培地 100 μL あたり 3 × 10<sup>3</sup> 細胞となるように懸濁液を調製し、96 穴プレートに 100 μL ずつ播種して CO<sub>2</sub> インキュベータ中で一晩培養した。

その後、上清を除去して 0.5% FBS 含有培養培地 80 μL を添加し、更に終濃度の 10 倍濃度の被験物質の 5% ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide: DMSO）及び 0.5% FBS 含有培養培地 10 μL を添加して CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 1 時間静置した。そこへ 0.3 μg/mL IL-6 / 0.3 μg/mL Recombinant Mouse IL-6R alpha (aa 20-357) Protein（interleukin 6 receptor A: IL-6RA）溶液 10 μL を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で更に 30 分間静置して STAT3 のリン酸化を誘導した。

その後、上清を除去して 37°C に加温した D-PBS（-）100 μL で洗浄し、3% パラホルムアルデヒド（paraformaldehyde: PFA）/ 2% スクロース溶液 50 μL を添加後室温で 10 分間静置して細胞を固定した。

その後、上清を除去して Tween™ 20 含有 PBS（phosphate-buffered saline with Tween™ 20: PBS-T）（8.1 mM リン酸水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素カリウム、2.7 mM 塩化カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、0.05w/v% Tween™ 20、pH 7.4）50 μL で 3 回洗浄し、100 mM グリシン含有 PBS 50 μL を添加して室温で 20 分間静置し、上清を除去して PBS-T 50 μL で 3 回洗浄し、氷冷した 100% メチルアルコール 100 μL を添加後 -20°C で 10 分間静置して透過処理を行った。

その後、上清を除去して PBS-T 100  $\mu$ L で 3 回洗浄し、0.3 % TritonX-100 含有 PBS 40  $\mu$ L で 5 % に希釈した正常ヤギ血清を添加後室温で 1 時間静置してブロッキングした後、上清を除去して PBS-T 40  $\mu$ L で 3 回洗浄し、40  $\mu$ L の 1 次抗体溶液 (1 % ウシ血清アルブミン [bovine serum albumin: BSA] 及び 0.3 % TritonX-100 含有 PBS で 1400 倍希釈した抗マウス STAT3 マウスモノクローナル抗体) を添加し、4°C で一晩静置した。その後、上清を除去して PBS-T 40  $\mu$ L で 3 回洗浄し、40  $\mu$ L の 2 次抗体溶液 (1 % BSA 及び 0.3 % TritonX-100 含有 PBS で 1,000 倍希釈した Alexa Fluor™ 488 標識抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体) を添加後室温で 1 時間静置して STAT3 を染色した。

その後、上清を除去して PBS-T 40  $\mu$ L で 3 回洗浄し、3 % PFA 含有 PBS 40  $\mu$ L を添加後室温で 10 分間静置した後、上清を除去して Tween™ 20 含有トリス緩衝生理食塩水 (150 mM 塩化ナトリウム、50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン、0.05 w/v % Tween™ 20、pH 7.6) 40  $\mu$ L で 3 回洗浄し、VECTASHIELD™ Mounting Medium with DAPI を 10 % 含有する PBS 40  $\mu$ L を添加後室温で 30 分間静置して核を染色した。

これを Cellomics ArrayScan™ VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。

### 1-1-2-3 STAT3 及びリン酸化 STAT3 のイムノプロット

10 % FBS、0.3 g/L L-Gln、100 U/mL ペニシリン及び 100 mg/L ストレプトマイシンを添加した培養培地 100  $\mu$ L あたり  $1 \times 10^4$  細胞となるように CT26 細胞の懸濁液を調製し、96 穴プレートに 100  $\mu$ L ずつ播種して CO<sub>2</sub> インキュベータ中で一晩培養した。

その後、上清を除去して培養培地 90  $\mu$ L を添加し、更に終濃度の 10 倍濃度の被験物質の 5 % DMSO 及び 0.5 % FBS 含有培養培地 10  $\mu$ L を添加して CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 24 時間静置した。

その後、上清を除去して氷冷した PBS 100  $\mu$ L で 1 回洗浄し、Milli-Q 水で 10 倍希釈した RIPA Buffer (10 ×) (20 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン [pH 7.5]、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸、1 % NP-40、1 % デオキシコール酸ナトリウム、2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、1 mM グリセロール 2-リン酸、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1  $\mu$ g/ml ロイペプチン) 15  $\mu$ L を添加し、セルスクレイパー (スクラッチアッセイ用) を用いて細胞を回収し、4 穴分をまとめて 20,400 × g、4°C で 10 分間遠心分離して上清を回収した。

その後、上清を 4 – 20 % のグラジエント SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) で分離し、ポリフッ化ビニリデン (poly vinylidene difluoride: PVDF) 膜に転写し、スキムミルクでブロッキングし、1 次抗体 (抗マウス STAT3 抗体、抗マウスリン酸化 STAT3 抗体 [Tyr705] 又は抗マウス  $\alpha$ -チューブリン抗体) を添加してインキュベート後洗浄し、2 次抗体を添加

してインキュベート後洗浄した。

その後、PVDF 膜の標的タンパク質を ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて検出し、検出されたバンドの標的タンパク質量を画像解析ソフトウェア Multi Gauge ver. 3.2 (富士フイルム) を用いて定量した。

#### 1-1-2-4 細胞周期解析

10 cm dish に培養培地 9 mL 及び CT26 細胞懸濁液 ( $50 \times 10^4$  cells/mL) 1 mL を分注し、CO<sub>2</sub> インキュベータ (37°C、5 % CO<sub>2</sub>) 中で 24 時間静置した。その後、培養上清を除去し、YHO-1701 を終濃度 0.44、1.33 又は 3.93  $\mu$ M となるように添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で更に 48 時間静置した。培養上清を除去し、PBS で洗浄した後、トリプシン処理により細胞を剥離させ、280 × g、室温で 5 分間遠心分離した後、2 % FBS 含有 PBS に懸濁した。

10<sup>6</sup> cells をチューブに分注し、280 × g、室温で 5 分間遠心分離した後、10<sup>6</sup> cells/mL となるよう氷冷した 70 % エタノールを添加して氷中に 30 分間静置した。細胞懸濁液を V 底プレートに 100  $\mu$ L/well で分注して 410 × g、4°C で 2 分間遠心分離し、上清を除去後、2 % FBS 含有 PBS で 3 回洗浄した。100  $\mu$ L の 0.25 mg/mL RNase を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータ (37°C、5 % CO<sub>2</sub>) 中で 30 分間静置した。その後、1mg/mL Cellstain PI Solution を 5  $\mu$ L/well で添加し、氷中で 20 分間静置した。そこへ 2 % FBS 含有 PBS 100  $\mu$ L を添加し、セルストレイナーを通して、BD FACSCanto™ II (BD Bioscience) を用いて測定した。細胞周期プロファイルは BD FlowJo™ software (BD Bioscience) で解析した。

#### 1-1-2-5 アポトーシスの誘導

##### 1-1-2-5-1 アポトーシス誘導能の測定

1-1-2-4 と同様に CT26 細胞に YHO-1701 を曝露し、Cellstain PI Solution に変えて Alexa Fluor™ 488 Annexin V を用いて細胞を染色し、同様に BD FACSCanto™ II (BD Bioscience) を用いて測定した。

##### 1-1-2-5-2 統計解析

測定結果は対照群に対する Dunnett 検定により、5 % 有意水準で仮説検定した。

## 1-1-2-6 腫瘍増殖の阻害

### 1-1-2-6-1 動物の入手及び飼育

6 週齢の BALB/cCrSlc 雌性マウスを供給元から入手し、がん細胞移植までの一週間を馴化期間としてプラスチックケージにて飼育した。動物実験計画は動物実験委員会の承認を得て（承認番号 186319）、動物は静岡県立大学動物実験規程を順守して取り扱った。

### 1-1-2-6-2 移植細胞の調製

移植する細胞を約 80 %コンフルエントに培養した後、培地を除去し、D-PBS (-) で 1 回洗浄した。0.25 % trypsin/EDTA 溶液を加え、細胞が培養容器の底から剥離するまで、様子を見ながら静置した。培養培地を加えて懸濁し、 $280 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 5 分間遠心分離して上清を除去して沈殿を軽くタッピングし、氷冷した RPMI-1640 培地を加えて細胞を懸濁した。これを 3 回繰り返す、セルストレイナー (Falcon  $40 \mu\text{m}$ ) を通して塊になっている細胞を除去し、懸濁液の一部をトリパンプルーと混合して細胞数を計測した。

細胞懸濁液から  $4.0 \times 10^7$  細胞を含む容量を遠沈管に採取し、 $280 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 5 分間遠心分離して上清を吸引除去し、細胞ペレットを氷冷した RPMI-1640 培地で  $1.0 \times 10^6$  cells/ $100 \mu\text{L}$  の細胞濃度になるように懸濁した（以下、細胞懸濁液）。

### 1-1-2-6-3 がん細胞の移植

馴化したマウスを移植前日に刈毛した。刈毛翌日、イソフルランの吸入麻酔にて全身麻酔した後、保定して 29G の 1 mL 針付注射器を用いて左右両側の背部皮下に細胞懸濁液  $100 \mu\text{L}$  ( $1.0 \times 10^6$  cells) を注入した。

### 1-1-2-6-4 腫瘍径の測定及び腫瘍体積の算出

全個体の腫瘍塊の長径及びそれに直交する短径をノギスで測り、以下の計算式にて推定腫瘍体積を求めた。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径}^2 \times 0.5$$

腫瘍体積の単位は  $\text{mm}^3$ 、長径及び短径の単位は mm とし、長径及び短径は小数点以下 2 桁まで計測し、腫瘍体積は小数点以下 1 桁まで算出した。

また、両側の腫瘍体積を平均して各個体の腫瘍体積とした。

### 1-1-2-6-5 群分け

マウスにがん細胞を移植した後、5 日目に腫瘍径を測定し、各群の平均腫瘍径測定値がほぼ等しくなるように、CT26 移植マウスモデルを用いた実験においては 7 つの群に各群 9 匹ずつ割り付け（表 1）、CMS5a 移植マウスモデルを用いた実験においては 4 つの群に各群 10 匹ずつ割り付けた（表 2）。



表 1 CT26 移植マウスモデルを用いた実験での群一覧

群名称	略称
溶媒投与対照群	対照群
抗 PD-1 抗体投与群	αPD-1
YHO-1701 (5~9 日目) 投与群	YHO-1701 A
YHO-1701 (12~16 日目) 投与群	YHO-1701 B
YHO-1701 (19~23 日目) 投与群	YHO-1701 C
YHO-1701 (前投与) / 抗 PD-1 抗体併用投与群	Combo A
YHO-1701 (同時投与) / 抗 PD-1 抗体併用投与群	Combo B
YHO-1701 (後投与) / 抗 PD-1 抗体併用投与群	Combo C

表 2 CMS5a 移植マウスモデルを用いた実験での群一覧

群名称	略称
溶媒投与対照群	対照群
抗 PD-1 抗体投与群	αPD-1
YHO-1701 投与群	YHO-1701
YHO-1701 (同時投与) / 抗 PD-1 抗体併用投与群	併用群

#### 1-1-2-6-6 投与液の調製

##### 1-1-2-6-6-1 YHO-1701 投与液

YHO-1701 を秤取りし磁性乳鉢に入れ、乳棒で均一な粉末状にした後、0.5 w/v %メチルセルロース 400 溶液（以下、メチルセルロース溶液）を少量ずつ徐々に加えながら乳棒で良く練り、メチルセルロース溶液を加えて 4 mg/mL になるよう希釈した。これを滅菌処理済み遠沈管に入れ、YHO-1701 投与液とした。

##### 1-1-2-6-6-2 抗 PD-1 抗体投与液

GoInVivo™ Purified anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody に PBS を加えて 250 µg/mL となるように希釈した。これを抗マウス PD-1 抗体（以下、抗 PD-1 抗体）投与液とした。

##### 1-1-2-6-6-3 薬剤投与

下表の通り、投与スケジュールに従い薬剤を 1 日 1 回投与した（表 3 及び表 4）。

表 3 CT26 モデルを用いた実験での投与量、投与スケジュール及び投与方法

群略称	投与薬剤	投与量	投与日 (移植後)	投与方法
αPD-1	抗 PD-1 抗体	50 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与
YHO-1701 A	YHO-1701	40 mg/kg	5～9 日目	強制経口投与
YHO-1701 B	YHO-1701	40 mg/kg	12～16 日目	強制経口投与
YHO-1701 C	YHO-1701	40 mg/kg	19～23 日目	強制経口投与
Combo A	YHO-1701	40 mg/kg	5～9 日目	強制経口投与
	抗 PD-1 抗体	50 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与
Combo B	YHO-1701	40 mg/kg	12～16 日目	強制経口投与
	抗 PD-1 抗体	50 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与
Combo C	YHO-1701	40 mg/kg	19～23 日目	強制経口投与
	抗 PD-1 抗体	50 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与

表 4 CMS5a モデルを用いた実験での投与量、投与スケジュール及び投与方法

群略称	投与薬剤	投与量	投与日 (移植後)	投与方法
αPD-1	抗 PD-1 抗体	200 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与
YHO-1701	YHO-1701	40 mg/kg	5～9 日目	強制経口投与
併用群	YHO-1701	40 mg/kg	5～9 日目	強制経口投与
	抗 PD-1 抗体	200 μg	12、14、16 日目	腹腔内投与

#### 1-1-2-6-7 抗腫瘍効果の評価

移植後 5、7、9、12、14、16、19、21、23、27、29 及び 33 日目に、1-1-2-6-4 に示す方法に従って各群のマウスの腫瘍径を計測し、腫瘍体積を算出した。

#### 1-1-2-6-8 統計解析

各群で算出した腫瘍体積について、αPD-1 群の腫瘍体積に対する Dunnett の検定により、5%有意水準で仮説検定した。

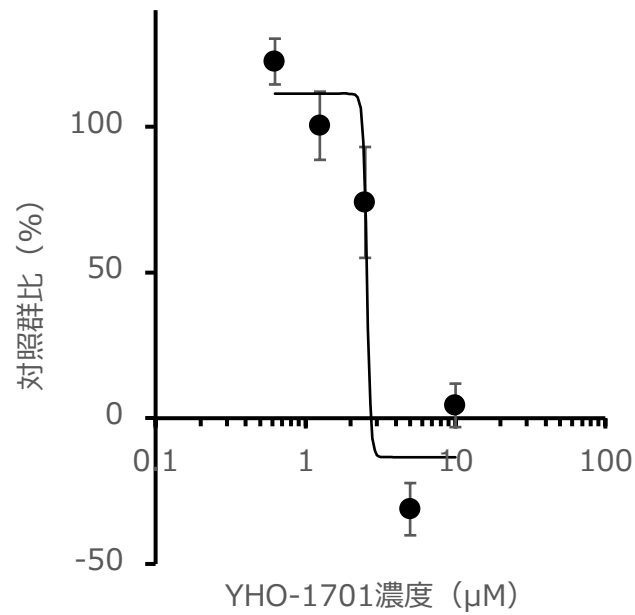
### 1-2 実験結果

#### 1-2-1 YHO-1701 のマウス STAT3 に対する阻害作用

##### 1-2-1-1 マウス STAT3 の核内移行評価

マウス大腸がん細胞株 CT26 を用いて、YHO-1701 の STAT3 の核内移行阻害作用、STAT3 リン酸化阻害作用、細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用及び細胞周期に対する作用を評価した。

STAT3 の核内移行について、濃度依存的な阻害作用が認められた (図 2)。



**図 2 CT26 細胞における YHO-1701 による STAT3 の核内移行評価**

CT26 細胞を YHO-1701 (0.625–20 μM) を添加して 1 時間培養後 IL-6/IL-6RA 30 ng/mL を加えて 30 分間刺激した。核内の STAT3 量は蛍光免疫染色法を用いて定量した。結果は溶媒対照の測定値に対する、各濃度の YHO-1701 添加時の測定値の比 (対照群比) を百分率の平均値±標準誤差を示す (n = 3)。

### 1-2-1-2 マウス STAT3 のリン酸化評価

YHO-1701 はリン酸化 STAT3 の二量体化阻害薬として設計されているが、ヒトがん細胞株において、細胞株により異なるものの、STAT3 のリン酸化を阻害する作用が認められている [8]。本研究において主に用いる CT26 細胞株における YHO-1701 の STAT3 リン酸化阻害作用について、濃度依存的な 705 番目のチロシン残基のリン酸化阻害作用が認められた (図 3)。

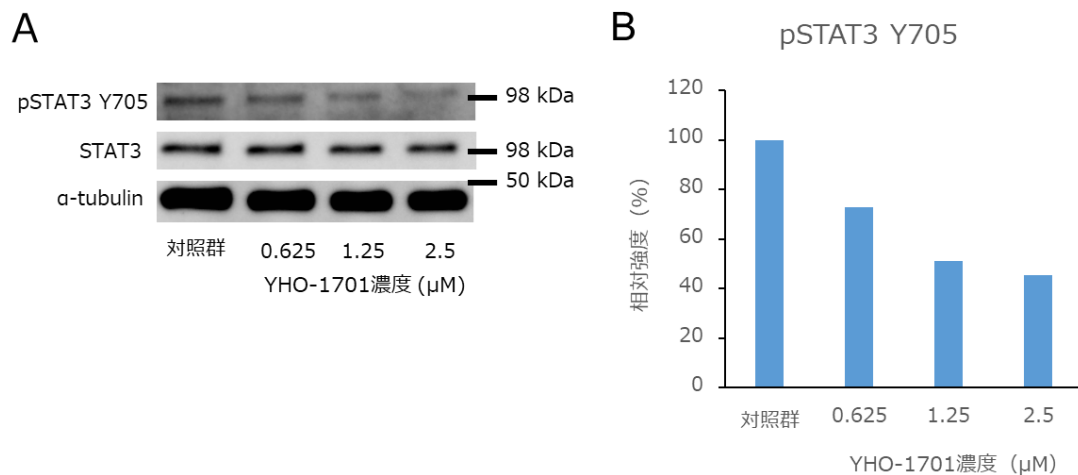


図 3 CT26 細胞における YHO-1701 による STAT3 リン酸化評価

- A. CT26 細胞に YHO-1701 (0.625, 1.25 及び 2.5 μM) を加え 24 時間培養後の細胞抽出液を、Y705 リン酸化 STAT3 (phospho-signal transducer and activator of transcription 3: pSTAT3) 抗体及び抗 STAT3 抗体を用いた免疫ブロットを行った (n = 2、2 回繰り返して実施した実験結果の代表的な結果を示した)。
- B. 免疫ブロットの結果のデンストメトリー解析結果を、溶媒対照の染色強度を 100 % とした棒グラフで示す。

### 1-2-1-3 マウスがん細胞株に対する細胞増殖阻害

YHO-1701 の CT26 細胞に対する *in vitro* における細胞増殖抑制効果について、時間依存的及び濃度依存的な細胞増殖抑制作用が認められた (図 4)。また、これらの結果から各条件における 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した (表 5)。

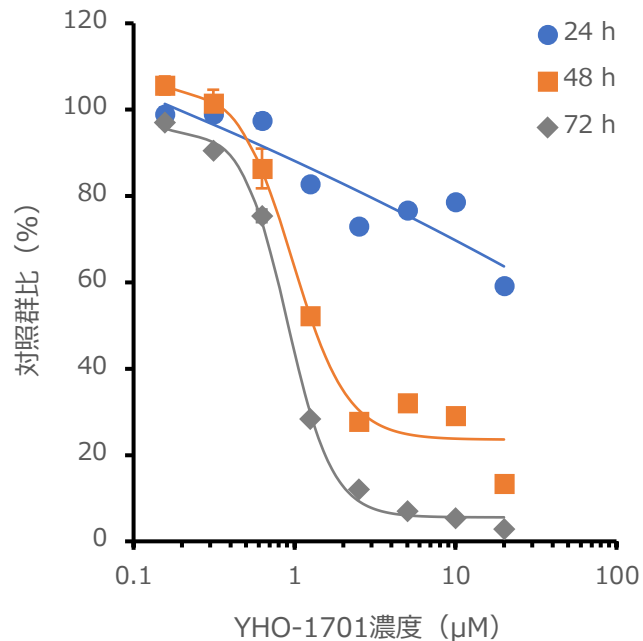


図 4 CT26 細胞に対する YHO-1701 の細胞増殖阻害作用

CT26 細胞を YHO-1701 (0.156–20 μM) を添加して 24、48 又は 72 時間培養し、生細胞数を WST-8 法により計測した。結果は対照群に対する比の百分率の平均値±標準誤差で示す (n = 3)。

表 5 各曝露時間における YHO-1701 の IC<sub>50</sub>

YHO-1701 曝露時間	YHO-1701 IC <sub>50</sub> (μM)
24 時間	>20
48 時間	1.31
72 時間	0.94

#### 1-2-1-4 マウスがん細胞株の細胞周期への影響

YHO-1701 が CT26 細胞の培養における細胞周期に与える影響について、フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。その結果、濃度依存的な sub-G1 期集団の増加が認められた (図 5)。

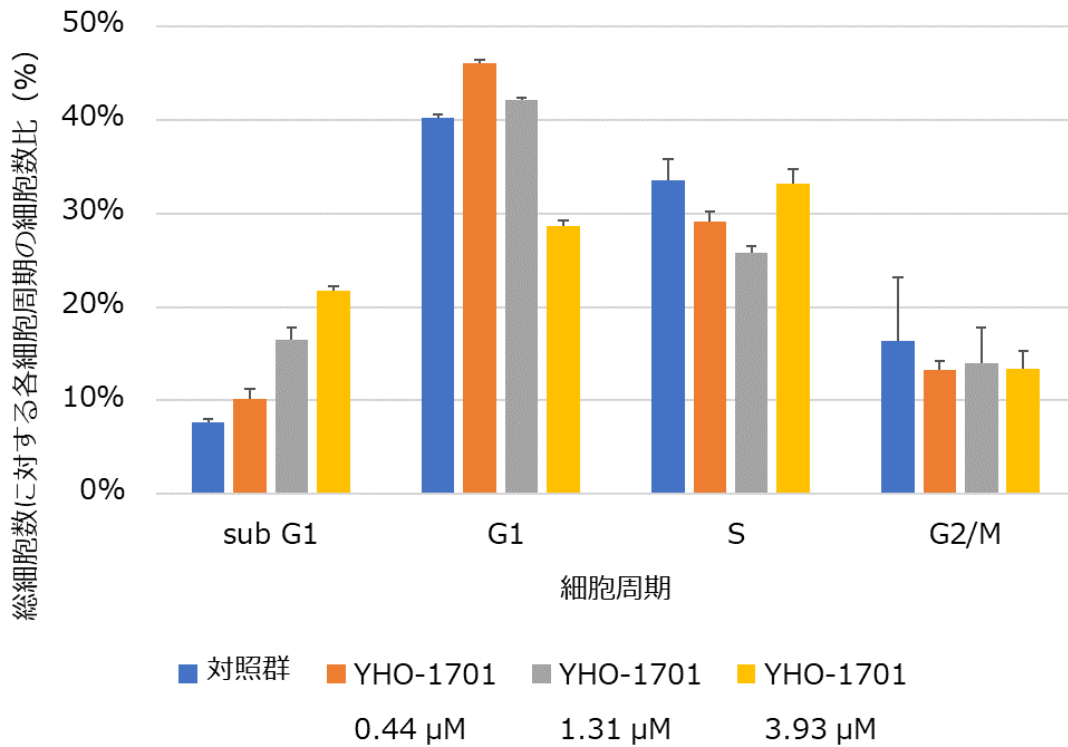


図 5 CT26 細胞の細胞周期に対する YHO-1701 の作用

CT26 細胞に YHO-1701 (0.44、1.33 及び 3.93 μM ; それぞれ 1/3、1 及び 3 × IC<sub>50</sub> に相当) を添加して 48 時間培養し、フローサイトメトリー法により細胞周期を解析した。結果は総細胞数に対する各細胞周期にある細胞数の比を百分率の平均値±標準誤差で示す (n = 3)。

### 1-2-1-5 マウスがん細胞株へのアポトーシス誘導能

細胞周期解析の結果、YHO-1701 は濃度依存的に sub-G1 期集団を増加させたことから、CT26 細胞に対するアポトーシス誘導能を評価した。その結果、早期アポトーシス細胞集団については減少させる傾向が認められたが、後期アポトーシス細胞集団については高濃度における増加が認められた (図 6)。

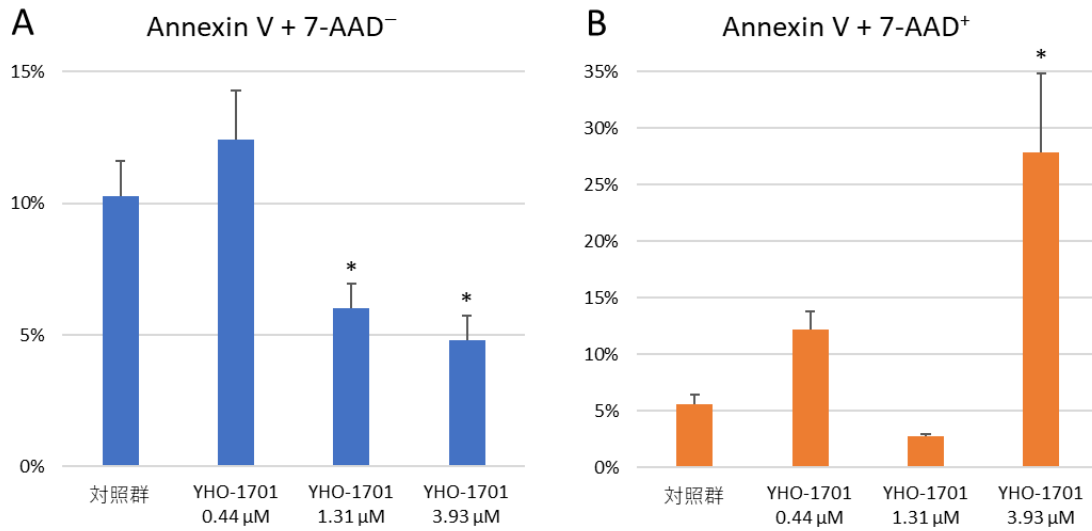


図 6 CT26 細胞に対する YHO-1701 のアポトーシス誘導作用

- A. 初期アポトーシス誘導作用：CT26 細胞に YHO-1701 (0.44、1.33 及び 3.93 μM；それぞれ 1/3、1 及び 3 × IC<sub>50</sub> に相当) を添加して 48 時間培養後、Annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) と 7-アミノアクチノマイシン D (7-amino-actinomycin D: 7-AAD) で染色してフローサイトメトリー法により annexin V のみ陽性となったアポトーシス細胞を計測した。結果は全細胞数に対するアポトーシス細胞の百分率の平均値±標準誤差で示す (n = 3)。\* は対照群に対する Dunnett 検定の結果 p < 0.05 であったことを示す。
- B. 後期アポトーシス誘導作用：A と同様の操作を行い、フローサイトメトリー法により annexin V 及び 7-AAD の両方が陽性となったアポトーシス細胞を計測した。結果は全細胞数に対するアポトーシス細胞の百分率の平均値±標準誤差で示す (n = 3)。\* は対照群に対する Dunnett 検定の結果 p < 0.05 であったことを示す。

### 1-2-2 マウスがん細胞移植マウスモデルにおける抗 PD-1 抗体との併用効果

前述の実験結果から、YHO-1701 はヒト STAT3 に対する作用と同様にマウス STAT3 に対しても阻害作用が示された。そのため CT26 細胞を用いた同系移植マウスモデルを用いて YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を評価する実験を行った。投与量については YHO-1701 及び抗 PD-1 抗体についてそれぞれ単独で統計学的に有意な腫瘍増殖抑制作用を示さない用量を、予備実験を実施して確認し、それぞれ 1 投与当たり 40 mg/kg 及び 50 µg と設定した。また、両剤の投与タイミングが腫瘍増殖抑制作用に与える影響について、3 つの投与スケジュールを設定して比較検討した (図 7)。

群名	がん細胞移植後の日数																						
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
αPD-1								P		P		P											
YHO-1701 A	Y	Y	Y	Y	Y																		
YHO-1701 B								Y	Y	Y	Y	Y											
YHO-1701 C																	Y	Y	Y	Y	Y		
Combo A	Y	Y	Y	Y	Y			P		P		P											
Combo B								P/Y	Y	P/Y	Y	P/Y											
Combo C								P		P		P					Y	Y	Y	Y	Y		

P: 抗 PD-1 抗体投与、Y: YHO-1701 投与

#### 図 7 各投与群の名称と投与スケジュール

各投与群における両剤の投与スケジュールを示す。群名の αPD-1 は抗 PD-1 抗体単独投与群、YHO-1701 A は αPD-1 群の抗 PD-1 抗体投与時期を基準として YHO-1701 単独前投与群、YHO-1701 B は YHO-1701 単独同時期投与群、YHO-1701 C は YHO-1701 単独後投与群、Combo A は YHO-1701 前投与後抗 PD-1 抗体投与群、Combo B は YHO-1701 ・抗 PD-1 抗体併用同時期投与群、Combo C は抗 PD-1 抗体投与後 YHO-1701 後投与群をそれぞれ示す。

その結果、YHO-1701 を前投与した後に抗 PD-1 抗体を投与したスケジュール (Combo A) においてのみ、統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果が認められ、YHO-1701 単独投与及び抗 PD-1 抗体単独投与においては有意な腫瘍増殖抑制効果が認められなかったことから、当該マウスモデルにおいて YHO-1701 と抗 PD-1 抗体の併用効果が示された (図 8 及び表 6)。また、YHO-1701 単独投与の各投与タイミング (Combo A、B 及び C) の間に腫瘍増殖抑制効果の違いは認められなかった。なお、本実験における対照群及び各抗 PD-1 抗体併用投与群のマウス個体毎の腫瘍増殖曲線を確認したところ、各群においてある程度のばらつきは認められるものの、評価に影響を及ぼす極端な外れ値を示す個体が存在しないことが確認された (図 9)。



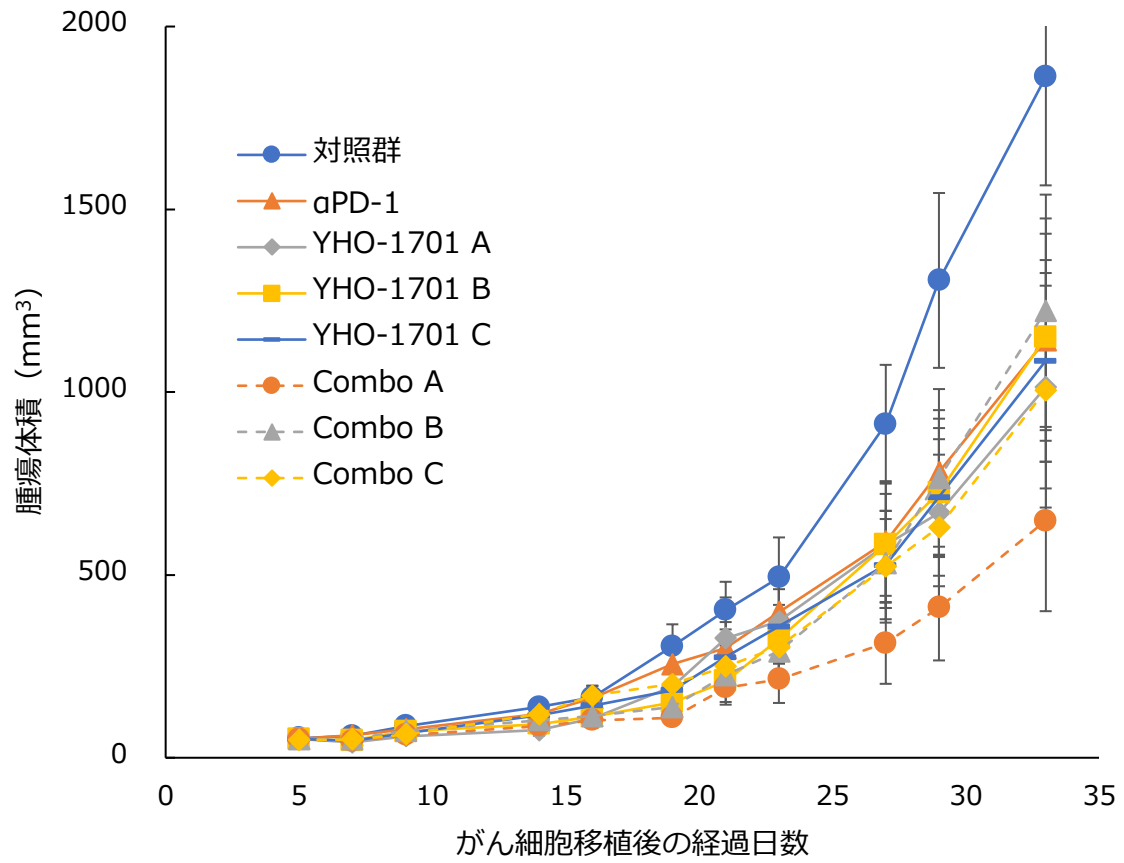


図 8 CT26 モデルにおける YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果

各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値±標準誤差で示す (n = 7 - 9)。対照群に対する各時点での腫瘍体積の検定結果は表 6 に示す。

表 6 対照群と各投与群間の Dunnett 検定の結果

比較群名	がん細胞移植後経過日数											
	5	7	9	12	14	16	19	21	23	27	29	33
αPD-1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
YHO-1701 A	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
YHO-1701 B	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
YHO-1701 C	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Combo A	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	*	*	*
Combo B	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
Combo C	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS : 有意差なし、\* :  $p < 0.05$

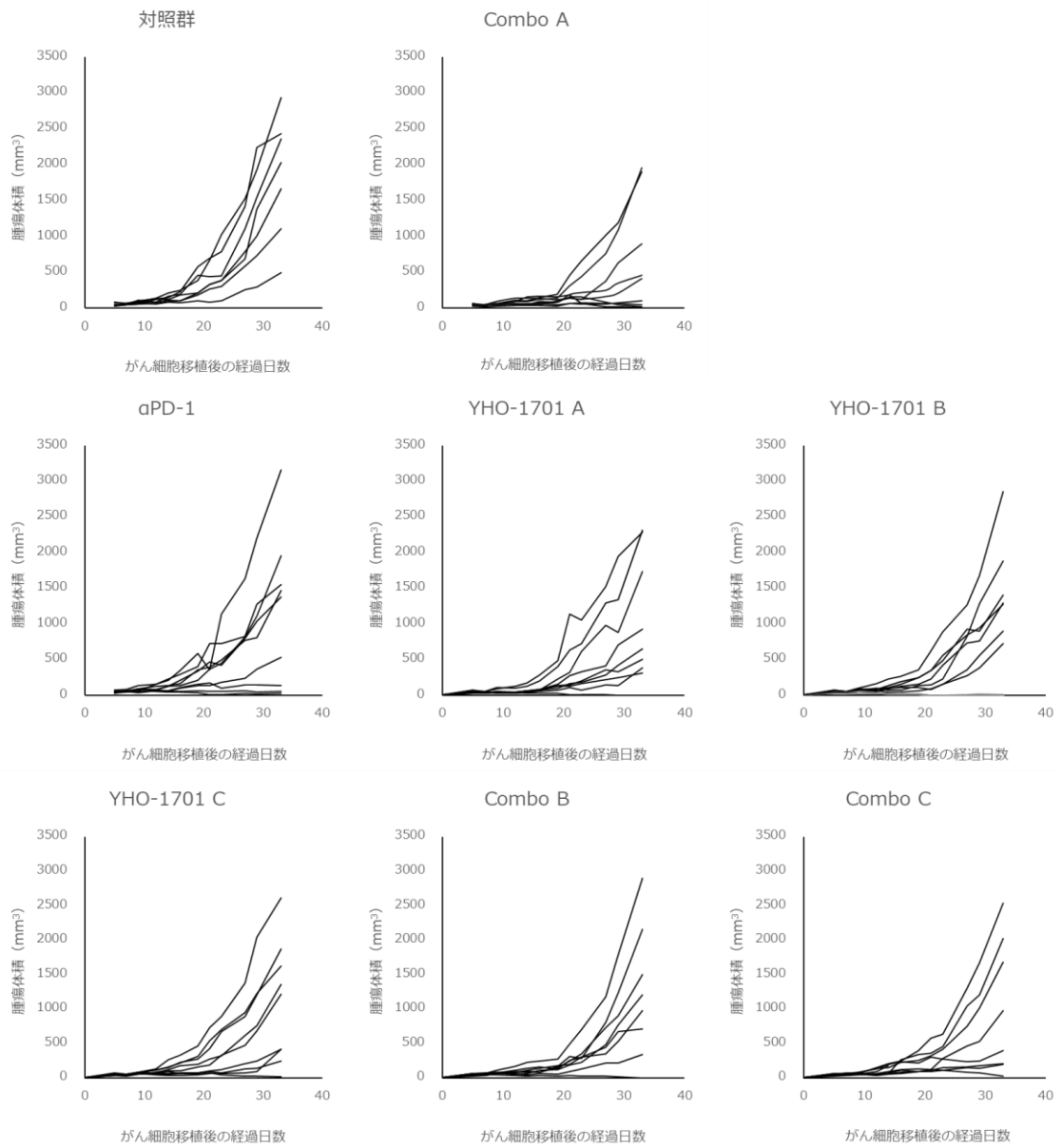


図 9 マウス個体毎の腫瘍体積推移

実線は対照群及び各投与群の個体毎の腫瘍体積の推移を示す。

### 1-2-3 免疫チェックポイント阻害療法不応性モデルにおける YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果

YHO-1701 に抗 PD-1 抗体との併用効果が認められたことから、がん抗原を含む表面抗原が乏しいためにマウスモデルにおいて抗 PD-1 抗体が不応性であると報告されている CMS5a 移植マウスモデル [34]における YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を評価した。先の実験で YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果が認められた CT26 モデル (図 8) は抗 PD-1 抗体に対して感受性があると報告されているが [35, 36, 37]、CMS5a モデルは抗 PD-1 抗体不応性であることから、抗 PD-1 抗体の投与量を、CT26 モデルを用いた試験時の 4 倍量である 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  と設定した。なお、YHO-1701 の投与量については CT26 モデルを用いた試験時と同じく 40  $\text{mg}/\text{kg}$  とした。

YHO-1701 単独又は抗 PD-1 抗体単独投与した群 (YHO-1701 群及び  $\alpha\text{PD-1}$  群) においては有意な腫瘍増殖抑制効果は認めなかったが、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体を併用投与した群 (併用群) においては有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 10)。

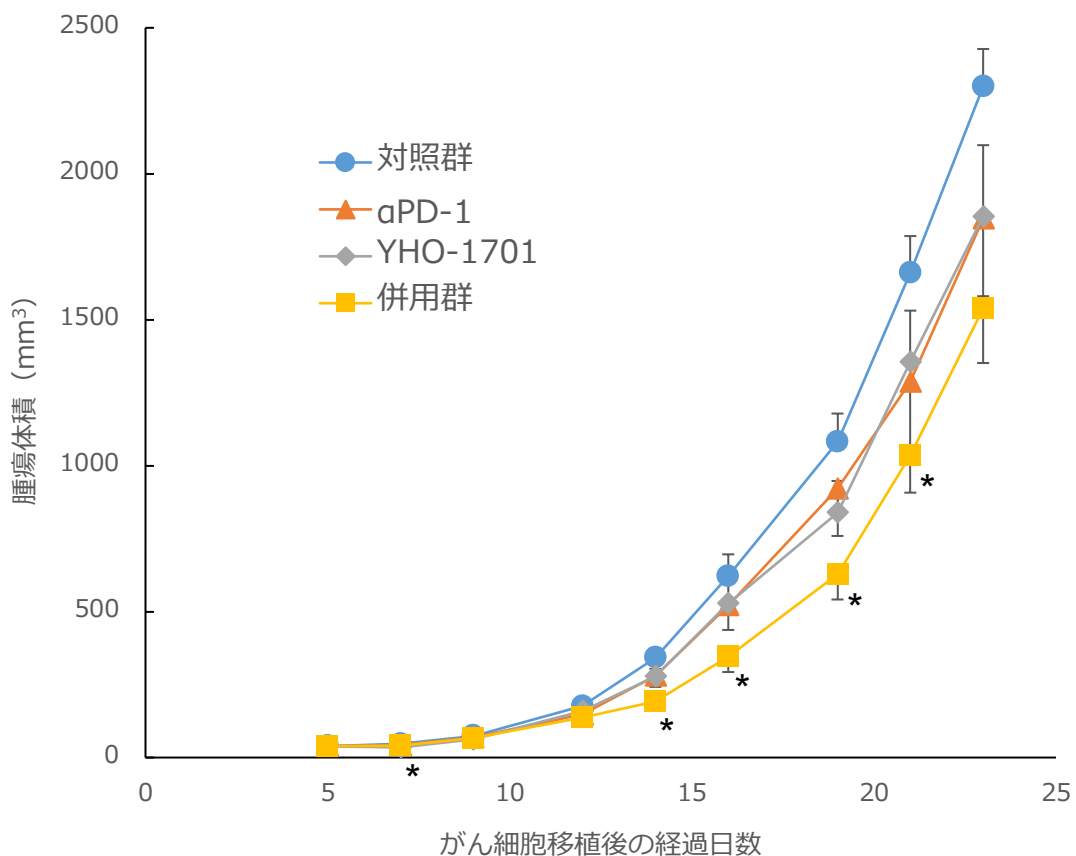


図 10 CMS5a モデルにおける YHO-1701 及び抗 PD-1 抗体の併用効果

各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値 $\pm$ 標準誤差で示す (n = 9 – 10)。\* は対照群に対する Dunnett 検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを示す。

### 1-3 考察

YHO-1701 はヒトのリン酸化 STAT3 の SH2 ドメインに結合し、その二量体化を阻害することを目的に設計、検証された低分子阻害薬であり、本研究において使用したマウス大腸がん細胞株 CT26 において、YHO-1701 がマウス STAT3 を阻害するかどうかを評価した。リン酸化されホモ二量体化した STAT3 は核内に移行して転写因子として働くことから、STAT3 の核内移行を指標として YHO-1701 によるマウス STAT3 の二量体化阻害について実験した結果、濃度依存的な核内移行阻害が認められた (図 2)。また、対象とする細胞株により作用は異なるものの、YHO-1701 によるヒト STAT3 二量体化阻害によりヒト STAT3 のリン酸化阻害が観察されていることから [8]、YHO-1701 によるマウス STAT3 の 705 番目のチロシン残基のリン酸化阻害について実験したところ、濃度依存的なリン酸化阻害が認められた (図 3)。これらの結果はヒトがん細胞株において認められた YHO-1701 の作用と同様であり [8]、CT26 細胞において YHO-1701 がマウス STAT3 の二量体化及びリン酸化を阻害することが示された。次に CT26 細胞に対する YHO-1701 の細胞増殖抑制作用、細胞周期への作用及びアポトーシス誘導能について評価した。その結果、時間及び濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示し (図 4)、48 時間培養の条件における IC<sub>50</sub> 値は 1.31  $\mu$ M であった (表 5)。細胞周期への作用については、濃度依存的な sub-G1 期細胞の増加が認められた (図 5)。この結果は YHO-1701 が CT26 細胞に対してアポトーシス誘導能を有することを示唆するものであるため、annexin V を指標として YHO-1701 によるアポトーシス細胞数の変化を測定した。その結果、高濃度 ( $3 \times \text{IC}_{50}$ ) の YHO-1701 を曝露した条件下において後期アポトーシス細胞の増加が認められた。YHO-1701 濃度依存的な sub-G1 期細胞の増加及び annexin V 陽性細胞の増加が認められたことから、YHO-1701 は CT26 細胞に対して直接的なアポトーシス誘導能を有することが示された。また、これらの結果はヒトがん細胞株に対する YHO-1701 の作用と同様であり [8, 10]、YHO-1701 はヒトがん細胞株における結果と同様にマウス大腸がん細胞株 CT26 においても STAT3 二量体化阻害作用を示すことが示された。これらの結果から、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を評価できることが報告されている CT26 移植マウスモデル [35, 36, 37] を用い、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を試験することが妥当であることを確認した。一方、初期アポトーシス細胞数については、中濃度 ( $1 \times \text{IC}_{50}$ ) 及び高濃度の YHO-1701 曝露条件下で統計学的に有意な減少が認められたが、sub-G1 期細胞が低濃度から高濃度にかけて YHO-1701 濃度依存的に増加したのに対し、後期アポトーシス細胞は高濃度でのみ有意な増加を認めたこと、後期アポトーシス細胞の測定方法ではネクロトーシスやその他のアポトーシス以外の細胞死を生じた細胞も併せて検出されることを考慮すると、STAT3 阻害薬で報告されているネクロトーシスやフェロトーシス [38] を YHO-1701 が誘導する可能性や YHO-1701 濃度により優勢となる作用が異なる可能性が考えられる。

前述の結果を踏まえ、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の評価に CT26 移植マウ

モデルを用いた。併用効果に対し、両剤の相対的な投与タイミングが併用効果に影響を与える可能性を考慮し、適切な投与スケジュールの検討も同時に行った(図 7)。免疫チェックポイント阻害剤との併用療法については、併用薬の投与タイミングがその併用効果に影響を与えたという報告と、逆に与えなかったという報告があり [39, 40, 41]、その違いは併用する薬剤の作用機序や、実験モデルにおいて免疫チェックポイント阻害剤を投与するタイミング等の影響を含めて考える必要があるが、投与タイミングによる併用効果の差異を評価することは、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の作用機序の推測にも有用であると考えられた。そこで、投与スケジュールも含めた YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を試験した結果、YHO-1701 投与後に抗 PD-1 抗体を投与した群においてのみ、対照群に対して統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた(図 8)。この結果は、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与は併用効果を示すが、その効果は、少なくとも本研究において使用したモデルにおいては、両剤の相対的な投与タイミングの影響を受けることを示唆した。免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果は、腫瘍の免疫微小環境の影響を受けることが知られているが [42, 43, 44]、CT26 細胞を用いたマウスモデルにおいても腫瘍免疫微小環境が経時的に変化していることが報告されている [45]。これらの報告と、本研究において YHO-1701 の前投与のみが抗 PD-1 抗体との併用効果を認めた結果を総合して考えると、YHO-1701 が腫瘍免疫微小環境の変化を介して抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を向上させた可能性が考えられた。なお、STAT3 阻害剤と抗 PD-1 抗体又は抗 PD-L1 抗体との併用効果が認められたとの複数の報告があるが [35, 36, 37]、投与タイミングの影響に関する報告は著者の知る限り報告されていない。

臨床においては、腫瘍微小環境における免疫細胞の活性が抑制されている事例が報告されており [46, 47, 48]、標準療法として広く用いられている抗 PD-1 抗体による腫瘍微小環境における免疫細胞の活性化に対し、抵抗性を示す症例が多く存在することも報告されている [49]。そこで YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を、抗 PD-1 抗体抵抗性のモデルを用いて試験した。その結果、免疫細胞が認識できる表面抗原を欠いているため抗 PD-1 抗体に抵抗性であると報告されている CMS5a マウスがん細胞株を移植したマウスモデル [34]において、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与による有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。免疫細胞による細胞傷害活性が期待できない腫瘍に対しても、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体とを併用投与することにより腫瘍増殖抑制効果を示した結果を考えると、腫瘍免疫が十分機能を発揮できていない腫瘍に対しても、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体の併用療法は一定の効果が期待できると考えられる。

これらの結果に基づき、本研究において YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果への免疫細胞の寄与及び YHO-1701 の腫瘍免疫への作用を検証することとした。

## 第2章 YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の機序

第1章で述べた通り、STAT3 二量体化阻害薬である YHO-1701 と抗 PD-1 抗体とは、マウスがん細胞移植マウスモデルにおいて併用効果が認められた。今日ではがん治療に対する有効な薬物療法として抗 PD-1 抗体療法は重要な位置を占めており、抗 PD-1 抗体との併用投与による併用効果が認められる薬剤の探索、開発が進められている [31, 32]。そのなかで、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与がどのような特徴を持つのかを検討するため、その機序の探索を試みた。

抗 PD-1 抗体の作用機序は、PD-1 とそのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との結合を阻害し、がん抗原特異的な T 細胞の増殖、活性化及び細胞傷害活性の増強等により、腫瘍増殖を抑制すると考えられているが [50]、NK 細胞の活性制御にも関連することが報告されている [51]。そこで、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の機序を検討するにあたり、T 細胞又は NK 細胞の機能を抑制したマウスモデルを用いて併用効果の機序を検討することとした。T 細胞の機能抑制モデルでは、T 細胞の表面抗原の一つである CD4 又は CD8 に対する特異的抗体 [52]を、NK 細胞の機能抑制モデルでは NK 細胞の表面抗原の一つであるアシアロ GM1 に対する特異的抗体 [53]を、それぞれ投与した。

## 2-1 実験材料及び実験方法

### 2-1-1 実験材料

#### 2-1-1-1 試薬

- 抗アシアロ GM1 (ウサギ) (富士フイルム和光純薬)
- ジメチルスルホキシド (富士フイルム和光純薬)
- メチルセルロース 400 (富士フイルム和光純薬)
- YHO-1701 (創薬探索センター又は株式会社ヤクルト本社で合成)
- GoInVivo™ Purified anti-mouse CD279 (PD-1) (RMP1-14) Antibody (BioLegend)
- RIPA Buffer (10 ×) (Cell Signaling Technology)
- Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100 ×) (Thermo Fisher Scientific)
- GoInVivo™ Purified anti-mouse CD4 (GK1.5) Antibody (BioLegend)
- GoInVivo™ Purified anti-mouse CD8 (53.6-7) Antibody (BioLegend)
- NK Cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec)
- ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (× 100) (富士フイルム和光純薬)
- RPMI-1640 培地 (富士フイルム和光純薬)
- マウス IL-2 (Miltenyi Biotec)
- マウス IL-6 (BioLegend)
- Recombinant Mouse IL-6R alpha (aa 20-357) Protein (R&D systems)
- Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所)
- Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Alexa Fluor™ 488 anti-mouse H-2K<sup>d</sup> (SF1-1.1) Antibody (BioLegend)
- BD Phosflow™ Fix Buffer I (BD Biosciences)

#### 2-1-1-2 細胞

- マウス大腸がん細胞株 CT26 (American Type Culture Collection)

#### 2-1-1-3 動物

- BALB/cCrSlc 雌性マウス (日本エスエルシー株式会社)
- BALB/cSlc-*nu/nu* 雌性マウス (日本エスエルシー株式会社)

### 2-1-2 実験方法

#### 2-1-2-1 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルの作成

##### 2-1-2-1-1 動物の入手及び飼育

6 週齢の BALB/cCrSlc 雌性マウスを供給元から入手し、がん細胞移植までの一週間を



馴化期間としてプラスチックケージにて飼育した。動物は静岡県立大学動物実験規程を順守して取り扱い、実験は動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号 186319、216492)。

#### 2-1-2-1-2 投与液の調製

抗アジアロ GM1 (ウサギ) に PBS (pH 7.2) を 1 mL 加えて再溶解し、抗アジアロ GM1 抗体投与液とした。

#### 2-1-2-1-3 抗アジアロ GM1 抗体の投与

1-1-2-6-3 に示す通りマウスに CT26 細胞を移植した。移植後 4 日目に下表に従い各群 10 匹ずつ 4 群に群分けし、NK 細胞の活性抑制を行う群に抗アジアロ GM1 抗体投与液を 10  $\mu$ L 腹腔内投与し、また、11 日目にも同様に 10  $\mu$ L 投与することにより NK 細胞の活性を抑制した (表 7)。

表 7 群一覧

群名称	略称	抗体投与
NK 細胞活性抑制なし/溶媒対照群	対照群	なし
NK 細胞活性抑制あり/溶媒対照群	$\alpha$ GM1	あり
NK 細胞活性抑制なし/併用投与群	Combo	なし
NK 細胞活性抑制あり/併用投与群	$\alpha$ GM1/Combo	あり

#### 2-1-2-2 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルにおける併用効果

NK 細胞活性を抑制した CT26 移植マウスに、下表に従い YHO-1701 及び抗マウス PD-1 抗体 (以下、抗 PD-1 抗体) を併用投与した (表 8)。

表 8 投与量、投与スケジュール及び投与方法

群略称	αGM1	投与薬剤	投与量	投与日 (移植後)	投与方法
対照群	-	溶媒	-	5~9、12、14、16 日 目	腹腔内／
αGM1	投与	溶媒	-		強制経口投与
Combo	-	YHO-1701	40 mg/kg	5~9 日目	強制経口投与
	-	抗 PD-1 抗体	50 µg	12、14、16 日目	腹腔内投与
αGM1/Combo	投与	YHO-1701	40 mg/kg	5~9 日目	強制経口投与
	投与	抗 PD-1 抗体	50 µg	12、14、16 日目	腹腔内投与

移植後 4、6、8、11、13、15 及び 18 日目に、1-1-2-6-4 に示す方法に従って各群のマウスの腫瘍径を計測し、腫瘍体積を算出した。

## 2-1-2-3 正常及び免疫不全マウスにおける YHO-1701 の効果比較

### 2-1-2-3-1 動物の入手及び飼育

6 週齢の BALB/cCrSlc 雌性マウス及び 7 週齢の BALB/cSlc-*nu/nu* マウスを供給元から入手し、がん細胞移植までの一週間を馴化期間としてプラスチックケージにて飼育した。動物実験計画は動物実験委員会の承認を得て（承認番号 186319）、動物は静岡県立大学動物実験規程を順守して取り扱った。

### 2-1-2-3-2 腫瘍増殖の阻害

正常マウスとして BALB/cCrSlc マウスを、免疫不全マウスとして BALB/cSlc-*nu/nu* マウスを用いた。1-1-2-6-1 及び 1-1-2-6-3 に示す方法と同様に CT26 移植マウスを作製し、移植後 5 日目に正常マウスについては各群 9 匹ずつ、免疫不全マウスについては各群 5 匹ずつ、それぞれ対照群と YHO-1701 投与群の 2 群に群分けした。

対照群には溶媒を、YHO-1701 投与群には YHO-1701 60 mg/kg を移植後 5~9 日目及び 12~16 日目に強制経口投与した。

各群のマウスの腫瘍径を、移植後 4、6、8、11、13、15、18、20 及び 26 日目に、1-1-2-6-4 に示す方法に従って腫瘍系を計測し、腫瘍体積を算出した。

## 2-1-2-4 腫瘍内のリン酸化 STAT3 の検出

### 2-1-2-4-1 YHO-1701 投与及び腫瘍の摘出

1-1-2-6-3 に示す方法で CT26 移植マウスを作製し、移植後 5 日目に各群 7 匹ずつ対照群と YHO-1701 投与群の 2 群に群分けした。移植後 5 日目に YHO-1701 60 mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 7.5 時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍の重量を測定した後、液体窒素で凍結した。

#### 2-1-2-4-2 腫瘍からのタンパク質抽出

RIPA Buffer (10 ×) を Milli-Q 水で 10 倍希釈し、Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100 ×)、0.5 M エチレンジアミン四酢酸及び 0.1 M フッ化フェニルメチルスルホニルをそれぞれ 1/100 容量添加して溶解緩衝液を作製した。

gentleMACS M Tube (Miltenyi Biotec) に 10 mg 腫瘍組織/mL となるように溶解緩衝液を分注し、凍結した腫瘍組織を投入してハサミで細かく切断し、倒立混合して組織を破碎領域に落とした。

M Tube を gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) にセットし、プロトコル「Protein\_01」を実行してタンパク質を抽出した。

内容液を M Tube から遠沈管に移し、4,000 × g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を 2 mL チューブに分取して速やかに液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

#### 2-1-2-4-3 リン酸化 STAT3 の検出及び定量

2-1-2-4-2 で調製したタンパク質抽出液を、タンパク質量として 6 µg を 1-1-2-3 に示す方法に従いイムノブロットを行い、リン酸化 STAT3 量を定量した。

#### 2-1-2-5 T 細胞活性抑制 CT26 モデルの作成

##### 2-1-2-5-1 投与液の調製

GoInVivo Purified anti-mouse CD4 Antibody 及び GoInVivo Purified anti-mouse CD8 Antibody を終濃度が 0.25 mg/mL となるように PBS (pH 7.2) でそれぞれ希釈して投与液を調製した。

##### 2-1-2-5-2 抗 CD4 又は抗 CD8 抗体の投与

1-1-2-6-3 に示す通りマウスに CT26 細胞を移植した。移植後 4 日目に下表に従い各群 9 匹ずつ 6 群に群分けし、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞活性抑制を行う群に抗マウス CD4 抗体 (以下、抗 CD4 抗体) 又は抗マウス CD8 抗体 (以下、抗 CD8 抗体) 投与液を 200 µL 腹腔内投与し、T 細胞の活性を抑制した (表 9)。

表 9 群一覧

群名称	略称	抗体投与
T 細胞非活性抑制／溶媒対照群	対照群	なし
T 細胞非活性抑制／YHO-1701 投与群	YHO-1701	なし
CD4 陽性 T 細胞活性抑制／溶媒対照群	αCD4/対照群	抗 CD4 抗体
CD4 陽性 T 細胞活性抑制／YHO-1701 投与群	αCD4/YHO-1701	抗 CD4 抗体
CD8 陽性 T 細胞活性抑制／溶媒対照群	αCD8/対照群	抗 CD8 抗体
CD8 陽性 T 細胞活性抑制／YHO-1701 投与群	αCD8/YHO-1701	抗 CD8 抗体

### 2-1-2-6 T 細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の抗腫瘍効果の評価

T 細胞の活性を抑制した CT26 移植マウスに、下表に従い YHO-1701 及び抗 PD-1 抗体を併用投与した (表 10)。

表 10 投与スケジュール

群名称	投与薬剤	投与日 (移植後)
対照群	溶媒	移植後 5～9 日目
YHO-1701	YHO-1701	移植後 5～9 日目
αCD4/対照群	溶媒	移植後 5～9 日目
αCD4/YHO-1701	YHO-1701	移植後 5～9 日目
αCD8/対照群	溶媒	移植後 5～9 日目
αCD8/YHO-1701	YHO-1701	移植後 5～9 日目

各群のマウスの腫瘍径を、移植後 4、7、9、11、14、18 及び 20 日目に、1-1-2-6-4 に示す方法に従って腫瘍系を計測し、腫瘍体積を算出した。

αCD4/対照群及び αCD8/対照群で算出した腫瘍体積について、それぞれ対照群の腫瘍体積に対する Dunnett 検定により、5%有意水準で仮説検定した。また、αCD4/YHO-1701 群及び αCD8/YHO-1701 群で算出した腫瘍体積について、それぞれ YHO-1701 群の腫瘍体積に対する Student の t 検定により、5%有意水準で仮説検定した。

### 2-1-2-7 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の抗腫瘍効果の評価

2-1-2-1 に示す方法により作成した NK 細胞活性抑制 CT26 移植マウスを、表 11 に従い群分けした。

表 11 群一覧

群名称	略称	抗体投与
NK 細胞非活性抑制／溶媒対照群	対照群	なし
NK 細胞活性抑制／溶媒対照群	αGM1	あり
NK 細胞非活性抑制／YHO-1701 投与群	YHO-1701	なし
NK 細胞活性抑制／YHO-1701 投与群	αGM1/YHO-1701	あり

NK 細胞の活性を抑制した CT26 移植マウスに、表 12 に従い YHO-1701 60 mg/kg を強制経口投与した。

表 12 投与スケジュール

群名称	投与薬剤	投与日（移植後）
対照群	溶媒	移植後 5～9 日目
αGM1	YHO-1701	移植後 5～9 日目
YHO-1701	溶媒	移植後 5～9 日目
αGM1/YHO-1701	YHO-1701	移植後 5～9 日目

各群のマウスの腫瘍径を、移植後 4、7、9、11、14、16 及び 18 日目に、1-1-2-6-4 に示す方法に従って腫瘍系を計測し、腫瘍体積を算出した。

各群で算出した腫瘍体積について、対照群で算出した腫瘍体積に対して Dunnett 検定により、5%有意水準で仮説検定した。また、YHO-1701 群で算出した腫瘍体積について、αGM1/YHO-1701 群で算出した腫瘍体積に対して Student の t 検定により、5%有意水準で仮説検定した。

## 2-1-2-8 YHO-1701 のマウス NK 細胞活性抑制の阻害

### 2-1-2-8-1 YHO-1701 マウス NK 細胞への曝露

BALB/c マウスから脾臓を摘出し、NK Cell Isolation Kit, mouse を用いて NK 細胞を分離した。10% FBS、0.3 g/L L-Gln、100 U/mL ペニシリン及び 100 mg/L ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地（以下、培養培地）に、50 μM 2-メルカプトエタノール及び 500 U/mL IL-2 を添加し、 $3 \times 10^5$  cells/mL となるように分離した NK 細胞を加え、3 μM YHO-1701 又は 0.1% DMSO（溶媒）を添加して CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 1 時間静置した。

## 2-1-2-8-2 マウス NK 細胞の活性化評価

YHO-1701 又は溶媒を添加して培養した NK 細胞に、30 ng/mL IL-6 及び 30 ng/mL Recombinant Mouse IL-6R alpha (aa 20-357) Protein を添加して CO<sub>2</sub>インキュベータ中で 20 時間静置した。

## 2-1-2-8-3 CT26 細胞に対するマウス NK 細胞の細胞傷害活性の評価

2-1-2-8-2 で活性化抑制した NK 細胞を回収し、培養培地で 2 回洗浄し、培養培地中で  $4 \times 10^4$  細胞となるように NK 細胞懸濁液調製した。

培養培地 100  $\mu$ L を 96 穴プレートに分注し、CT26 細胞  $3 \times 10^3$  細胞を播種して CO<sub>2</sub>インキュベータ中で一晩培養した後、上清を除去し、培養培地 100  $\mu$ L を加えた。そこへ調製した NK 細胞懸濁液 100  $\mu$ L を加え、CO<sub>2</sub>インキュベータ中で 4 時間静置した。

その後、NK 細胞を含む上清を除去し、PBS 200  $\mu$ L で 3 回洗浄した。そこへ RPMI-1640 培地 (10% FBS 含有、フェノールレッド不含) (以下、測定用培地) 70  $\mu$ L を加え、測定用培地で 3 倍希釈した Cell Counting Kit-8 30  $\mu$ L を添加した。添加直後と発色後の 450 nm の吸光度を蛍光プレートリーダーを用いて測定し、生細胞数を測定した (n=3)。

## 2-1-2-8-4 統計解析

測定した生細胞数から細胞傷害活性百分率を算出し、IL-6/IL-6RA 非添加/溶媒対照群に対する IL-6/IL-6RA 添加/溶媒対照群の細胞傷害活性百分率、IL-6/IL-6RA 添加/溶媒対照群に対する IL-6/IL-6RA 添加/YHO-1701 群の細胞傷害活性百分率について Student の t 検定により、5% 有意水準で仮説検定した。

## 2-1-2-9 YHO-1701 による CT26 細胞の MHC クラス I 分子の発現抑制

### 2-1-2-9-1 YHO-1701 による CT26 細胞の MHC クラス I 分子の発現への作用の評価

24 穴プレートに、培養培地中で  $0.5 \times 10^5$  cells/mL/well となるように CT26 細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub>インキュベータ中に 37°C で一晩静置した。その後、培養上清を除去し、RPMI-1640 培地で 2 回洗浄し、0.5% FBS 含有 RPMI-1640 培地 900  $\mu$ L を加えた。そこへ 0.5% FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いて終濃度の 10 倍濃度 (6.25, 12.5 及び 25.0  $\mu$ M) に調製した YHO-1701 の 5% DMSO 溶液 100  $\mu$ L を添加し、5% CO<sub>2</sub>インキュベータ中に 37°C で 24 時間静置した。培養上清をチューブに回収し、プレートに PBS (-) 1 mL を加えて 1 分間静置し、上清をチューブに回収し、これをもう一度繰り返した。

プレートに Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS 0.5 mL を加え、2~3 分間、室温で静置した後、顕微鏡で細胞の剥離状態を確認し、チューブに回収し、440  $\times$  g、4°C で 5 分間遠心分離して上清を除去し、2% FBS 含有 PBS (-) 5 mL を加えて再度 440  $\times$  g、

4°C で 5 分間遠心分離して上清を除去した。沈殿を 2 % FBS 含有 PBS (-) 1 mL に懸濁し、96 穴 V 底プレートに 200  $\mu$ L/well で分注した。

プレートを 410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L を加えて沈殿を懸濁し、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、100 倍希釈した Alexa Fluor™ 488 anti-mouse H-2Kd Antibody 50  $\mu$ L を加え、遮光下、4°C で 15 分間静置した後、2 % FBS 含有 PBS 150  $\mu$ L を加え、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L を加えて沈殿を懸濁した後、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、BD Phosflo Fix Buffer I 100  $\mu$ L を添加し、遮光下、室温で 20 分間静置した。その後 2 % FBS 含有 PBS 100  $\mu$ L を加えて沈殿を懸濁し、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L を加えて沈殿を再度懸濁し、プレートを 410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去した。

2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L を加えて沈殿を再懸濁し、BD FACSCanto™ II (BD) を用いて測定した。

#### 2-1-2-9-2 統計解析

フローサイトメトリー法にて測定した対照群の平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity: MFI) に対する各群の MFI について Williams 検定より、5 %有意水準で仮説検定した。

## 2-2 実験結果

### 2-2-1 抗 PD-1 抗体との併用効果に対する NK 細胞の寄与

CT26 移植マウスで認められた YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果について、その機序を探索することを目的として、免疫チェックポイント阻害療法において主に抗腫瘍免疫を担う T 細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞の寄与を検証した。

抗 PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果が CD8 陽性 T 細胞に依存することが報告されているため [54]、併用機序については、まず STAT3 による腫瘍免疫活性化に関与すると報告されているリンパ球の一つである NK 細胞 [51] の寄与を検証することとし、マウス NK 細胞の活性を減少させるため、抗アシアロ GM1 抗体を投与したマウスモデルを用いた [53]。CT26 移植マウスにおいて、抗アシアロ GM1 抗体は腫瘍の増殖を有意に促進した (図 11)。これは当該モデルにおいて、NK 細胞が CT26 細胞の増殖を抑制しているためであると考えられた。抗アシアロ GM1 抗体により NK 細胞の活性を減少させた条件下において、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果は消失し、両剤の併用効果に NK 細胞が寄与していることが示唆された (図 11)。



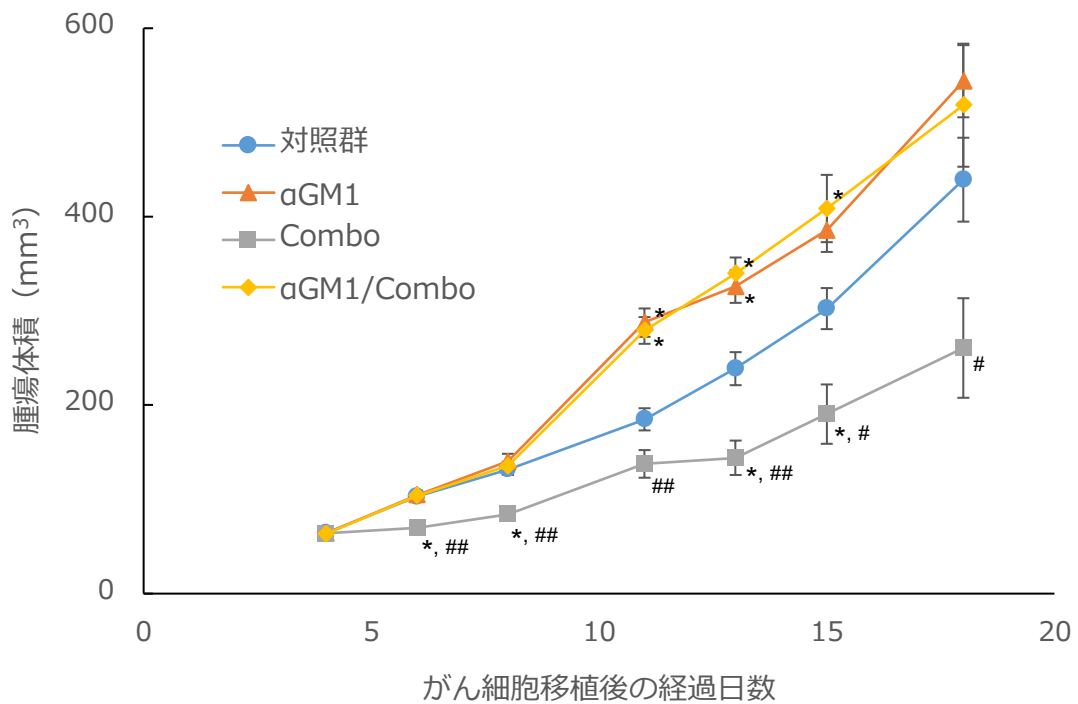


図 11 YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果に対する NK 細胞活性抑制の影響

NK 細胞活性を抑制するため、αGM1 群及び αGM1/Combo 群において CT26 細胞移植後 4 日目及び 11 日目に抗アシアロ GM1 抗体を腹腔内投与した。Combo 群及び αGM1/Combo 群においては、YHO-1701 (40 mg/kg) 及び抗 PD-1 抗体 (50 µg) を図 7 の YHO-1701 A 群の投与スケジュールに従って移植後 5 日目から 9 日目に連日投与した。各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値±標準誤差で示す (n = 9–10)。\* は対照群に対する Dunnett の検定の結果  $p < 0.05$  であったこと、# 及び ## は αGM1/Combo 群に対する Student の t 検定の結果がそれぞれ  $p < 0.05$  又は  $p < 0.01$  であったことを示す。

### 2-2-2 YHO-1701の腫瘍内STAT3のリン酸化阻害作用

CT26モデルにおいてYHO-1701(60 mg/kg)投与後に腫瘍中のSTAT3リン酸化阻害を評価するため、YHO-1701単回投与後の腫瘍を摘出し、STAT3が活性化され、二量体化、核内移行、およびDNA結合が誘導されるリン酸化部位であるチロシン705のリン酸化STAT3及び非リン酸化STAT3の量をウェスタンブロット法により測定した。

その結果、YHO-1701の投与により腫瘍中のSTAT3量は変化せず、リン酸化STAT3量が低下した(図12及び図13)。

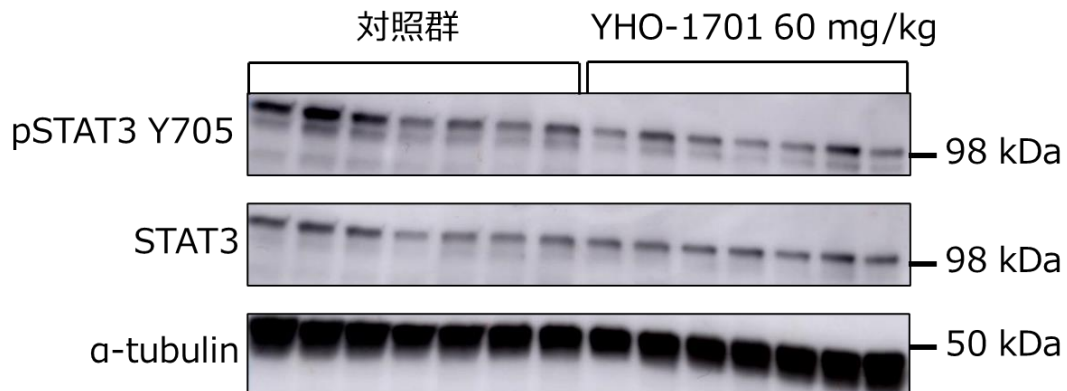


図12 YHO-1701単回投与後の腫瘍内リン酸化STAT3量及びSTAT3量

CT26移植マウスにYHO-1701を単回投与し、7.5時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍内のSTAT3量及びY705リン酸化STAT3(pSTAT3 Y705)量をウェスタンブロット法により測定した。

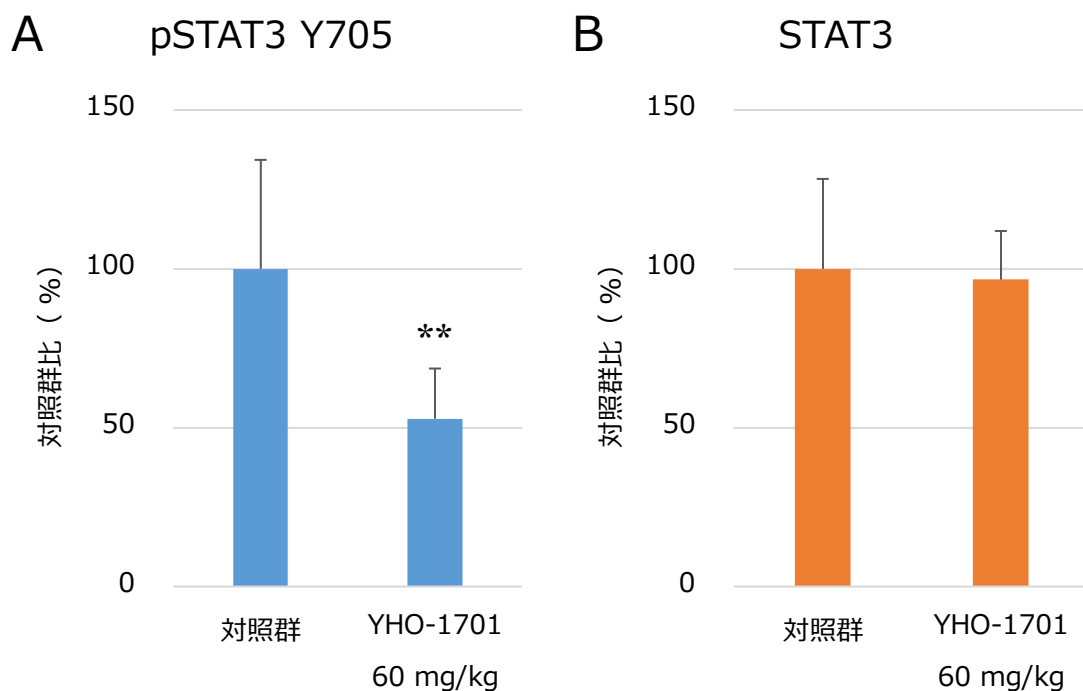


図 13 ウェスタンブロット結果の画像解析結果

- A. 抗 Tyr 705 リン酸化 STAT3 (pSTAT3 Y705) 抗体を用いた Western ブロットの結果を画像解析により定量化した結果を示す。結果は  $\alpha$ -チューブリンで補正した対照群の定量値の平均を 100 %とした際の、 $\alpha$ -tubulin 補正後の百分率平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n = 7)。\*\* は対照群に対する Student の t 検定の結果が  $p < 0.01$  であったことを示す。
- B. 抗 STAT3 抗体を用いた Western ブロットの結果を画像解析により定量化した結果を示す。結果は  $\alpha$ -チューブリンで補正した対照群の定量値の平均を 100 %とした際の、 $\alpha$ -tubulin 補正後の百分率平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n = 7)。対照群に対する Student の t 検定の結果は  $p > 0.05$  であった。

### 2-2-3 正常及び免疫不全マウスにおける YHO-1701 の効果比較

抗 PD-1 抗体単独投与において、その細胞増殖抑制効果に T 細胞及び NK 細胞が寄与することが報告されているため [54, 51]、YHO-1701 単独投与による細胞増殖抑制効果に対する腫瘍免疫の寄与を検証することとした。まず、CT26 を免疫不全マウスである BALB/c ノードマウスに移植したモデルを用い、正常な免疫機能を持つ BALB/c マウスに移植したモデルを用いた場合との YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果を比較した。なお、本実験における YHO-1701 の投与量は、単剤による有意な腫瘍増殖抑制効果を期待して、抗 PD-1 抗体との併用において選択した 40 mg/kg よりも高用量である 60 mg/kg を選択した。

その結果、CT26 移植 BALB/c マウスで認められた有意な腫瘍増殖抑制効果は、CT26 移植ノードマウスでは認められなかった (図 14)。これらの結果から、CT26 移植 BALB/c マウスモデルで認められた YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果には、T 細胞が関与していることが示唆された。

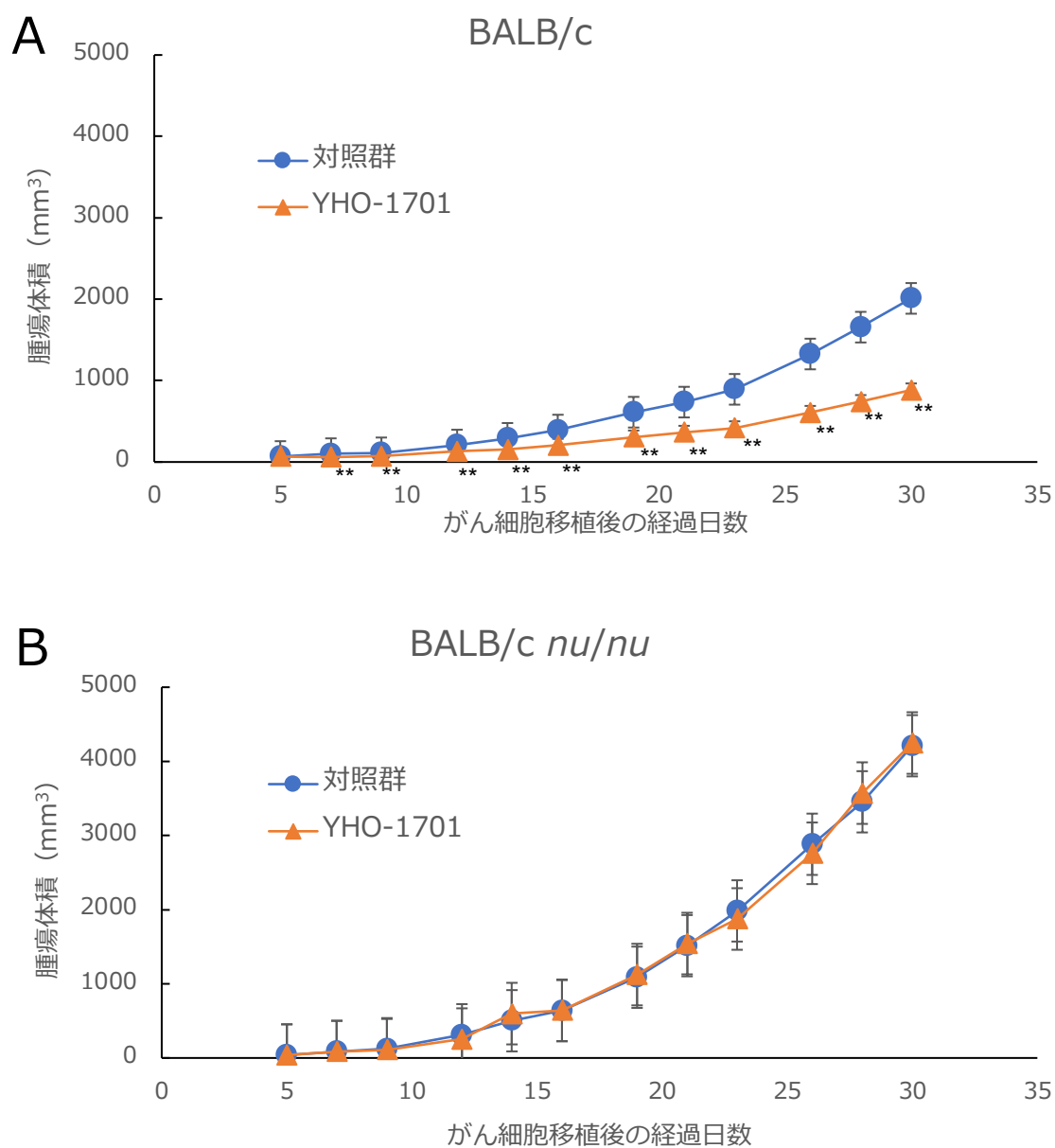


図 14 BALB/c マウス及びヌードマウスにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果

BALB/c マウス及び BALB/c *nu/nu* ヌードマウスに CT26 細胞を移植し、移植後 5 日目から 9 日目、12 日目から 16 日目に YHO-1701 (60 mg/kg) を投与した。各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値±標準誤差で示す (BALB/c マウス : n=9、BALB/c ヌードマウス : n=5)。\*\* は対照群に対する Student の t 検定の結果が  $p < 0.01$  であったことを示す。

#### 2-2-4 T細胞活性減少 CT26 モデルにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果

BALB/c ノードマウスは胸腺を欠失しており、成熟 T 細胞を作り出すことができないことから [55]、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する CD4 又は CD8 陽性 T 細胞の寄与を検証するため、CT26 移植 BALB/c マウスモデルを用い、マウス CD4 又は CD8 に対する抗体を用い、CD4 陽性 T 細胞又は CD8 陽性 T 細胞の活性を抑制し、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する両 T 細胞の寄与を評価した。

その結果、CD8 陽性 T 細胞活性抑制条件下 YHO-1701 投与 ( $\alpha$ CD8/YHO-1701) 群において YHO-1701 群で認められた腫瘍増殖抑制効果が消失した (図 15 及び表 13)。CD4 陽性 T 細胞活性抑制条件下 YHO-1701 投与 ( $\alpha$ CD4/YHO-1701) 群においては腫瘍移植後 7~11 日目に CD4 陽性 T 細胞活性抑制 ( $\alpha$ CD4/Control) 群に対して有意な腫瘍増殖抑制効果を示したが、 $\alpha$ CD4/Control 群も対照群に対し、腫瘍移植後 7 日目以降に有意ではないものの低い腫瘍体積で推移し、腫瘍移植後 18~20 日目で有意に腫瘍増殖が抑制されていたため、その意味するところ及び YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する CD4 陽性 T 細胞の寄与について、本実験結果をもとに評価することができなかつた。また、CD8 陽性 T 細胞活性抑制 ( $\alpha$ CD8/Control) 群では対照群に対して有意な腫瘍増殖の亢進が認められた。

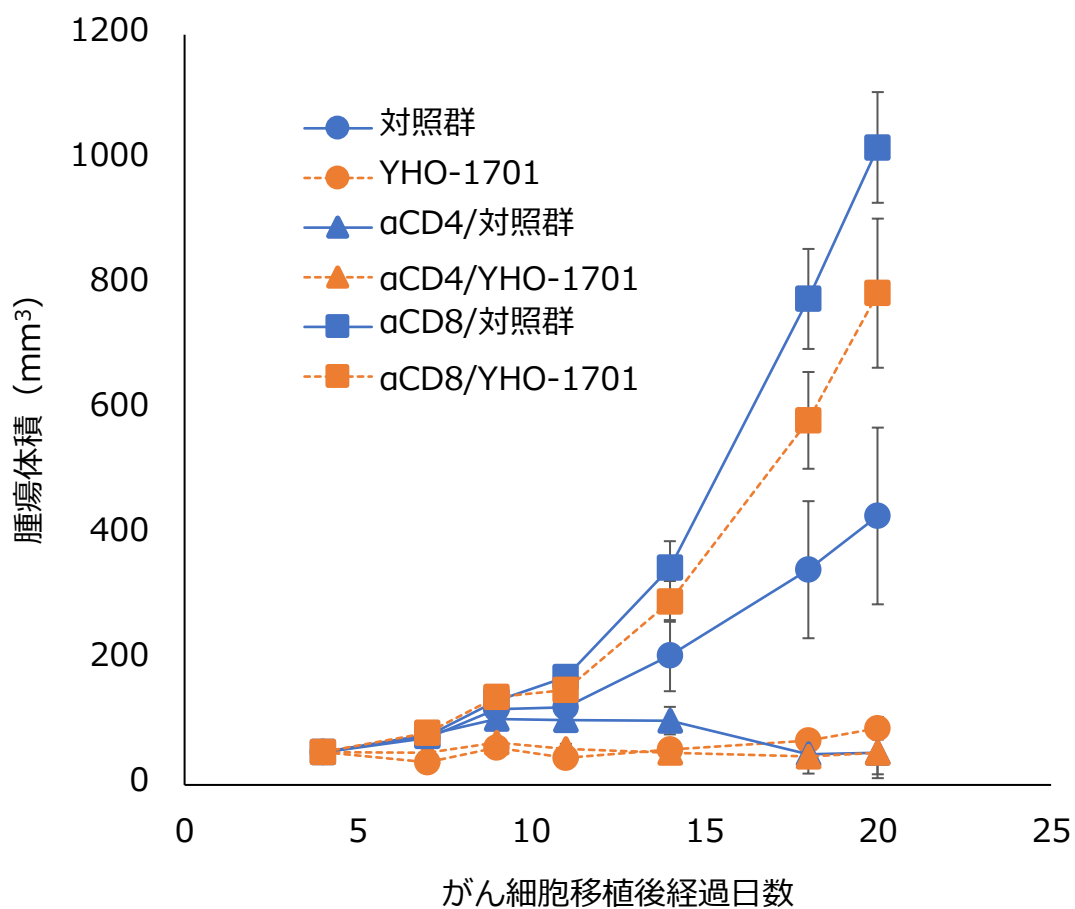


図 15 YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する T 細胞活性抑制の影響

T 細胞活性を阻害するため、αCD4/Control 群及び αCD4/YHO-1701 群並びに αCD8/Control 群及び αCD8/YHO-1701 群において CT26 細胞移植後 4 日目にそれぞれ抗 CD4 抗体又は抗 CD8 抗体を腹腔内投与した。YHO-1701 群、αCD4/YHO-1701 群及び αCD8/YHO-1701 群においては、YHO-1701 (60 mg/kg) を移植後 5 日目から 9 日目に連日投与した。各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値±標準誤差で示す (n = 9)。

表 13 主要群間の Dunnett 検定及び Student の t 検定の結果

比較群名	がん細胞移植後経過日数						
	4	7	9	11	14	18	20
対照群 vs αCD4/Control	NS	NS	NS	NS	NS	*	*
対照群 vs αCD8/Control	NS	NS	NS	NS	NS	**	**
対照群 vs YHO-1701	NS	**	**	**	*	*	*
αCD4/Control vs αCD4/YHO-1701	NS	**	*	*	NS	NS	NS
αCD8/Control vs αCD8/YHO-1701	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
YHO-1701 vs αCD4/YHO-1701	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
YHO-1701 vs αCD8/YHO-1701	NS	**	**	**	**	**	**

NS: 有意差なし、\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$



## 2-2-5 NK 細胞活性抑制 CT26 モデルにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果

BALB/c ノードマウスは成熟 T 細胞を持たないが [55]、NK 細胞をはじめとする免疫細胞は具備していることから、1-2-2 で述べた抗 PD-1 抗体との併用効果の試験と同様に、抗アジアロ GM1 抗体を用いて NK 細胞の活性を抑制し、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する NK 細胞の寄与について検証した。

その結果、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果は NK 細胞の活性抑制によって消失したことから、YHO-1701 の CT26 移植マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制効果に NK 細胞が寄与していることが示された (図 16)。なお、抗アジアロ GM1 抗体の投与により腫瘍増殖の亢進傾向が認められたが、本実験においては統計学的有意差を認めなかった。

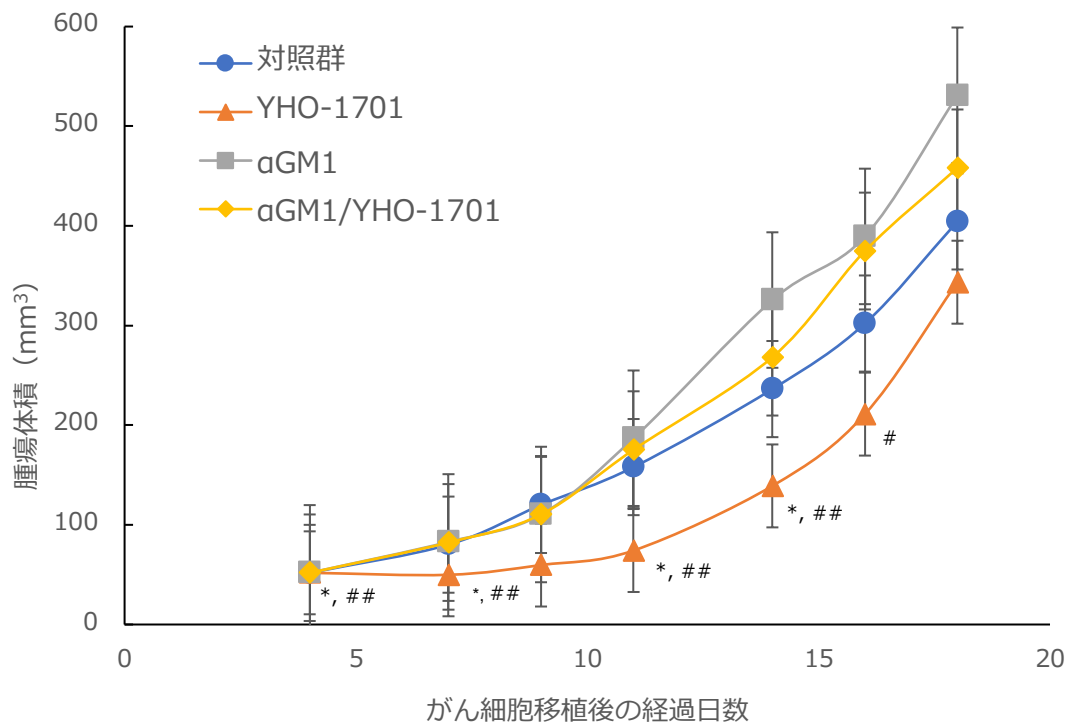


図 16 YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果に対する NK 細胞活性抑制の影響

NK 細胞の活性を抑制するため、αGM1 群及び αGM1/YHO-1701 群において CT26 細胞移植後 4 日目及び 11 日目に抗アジアロ GM1 抗体を腹腔内投与した。YHO-1701 群及び αGM1/YHO-1701 群においては YHO-1701 (60 mg/kg) を移植後 5 日目から 9 日目に連日投与した。各群における腫瘍体積の経時的変化を腫瘍体積の平均値±標準誤差で示す (n = 7 - 8)。\* は対照群に対する Dunnett の検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを、# 及び ## は αGM1 群に対する Student の t 検定の結果がそれぞれ  $p < 0.05$  又は  $p < 0.01$  であったことを示す。

### 2-2-6 YHO-1701によるマウスNK細胞活性抑制の阻害

YHO-1701のCT26モデルにおける腫瘍増殖抑制効果に免疫細胞が寄与していることが示されたことから、YHO-1701が免疫活性を向上させる機序を検討した。サイトカインであるIL-6によりSTAT3が活性化され、STAT3経路の亢進によりNK細胞の細胞傷害活性が抑制されることが報告されていることから [51]、YHO-1701がSTAT3により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性を回復させるかどうか、マウスの脾臓から抽出したNK細胞を用いて *in vitro* での細胞傷害活性を実験した。

その結果、YHO-1701はIL-6及びIL-6RAによるNK細胞のCT26細胞に対する細胞傷害活性の抑制を阻害することが示された (図 17)。

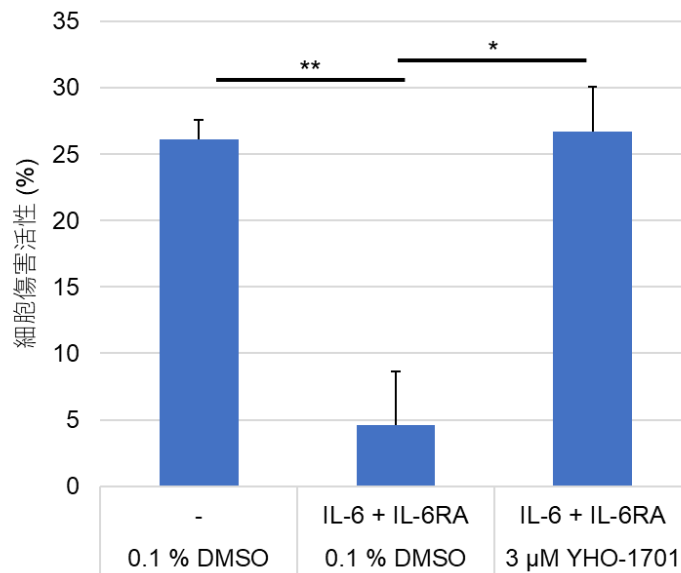


図 17 YHO-1701によるマウスNK細胞の細胞傷害活性の抑制阻害

マウス脾臓から抽出したNK細胞をYHO-1701 (3 μM) 添加及び非添加培地で1時間培養後、IL-6及びIL-6RA (各 30 ng/mL) 添加培地で20時間培養し、NK細胞数とCT26細胞数の比率 (E:T) を4:1とした際のNK細胞のCT26細胞に対する細胞傷害活性を、WST-8法を用いて測定した結果を平均値±標準誤差で示した (n = 3)。\* は Student の t 検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを、\*\* は結果が  $p < 0.01$  であったことを示す。

### 2-2-7 YHO-1701 による CT26 細胞の MHC クラス I 分子の発現抑制

YHO-1701 による NK 細胞への直接的作用が認められたため、腫瘍微小環境において NK 細胞の細胞傷害活性に対し抑制的に作用するがん細胞への作用を評価した。がん細胞表面に発現する主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) クラス I 分子は、NK 細胞の受容体に結合し NK 細胞の細胞傷害活性を抑制的に制御することが知られている [56]。そこで本研究では CT26 細胞が発現するマウスの MHC クラス I 分子である H-2K<sup>d</sup> の発現量を指標として YHO-1701 のがん細胞における MHC クラス I 分子の発現に与える作用を検討した。

その結果、YHO-1701 の濃度依存的な MHC クラス I 分子の発現量低下が認められ、CT26 細胞における YHO-1701 による MHC クラス I 分子の発現抑制作用が示された (図 18)。

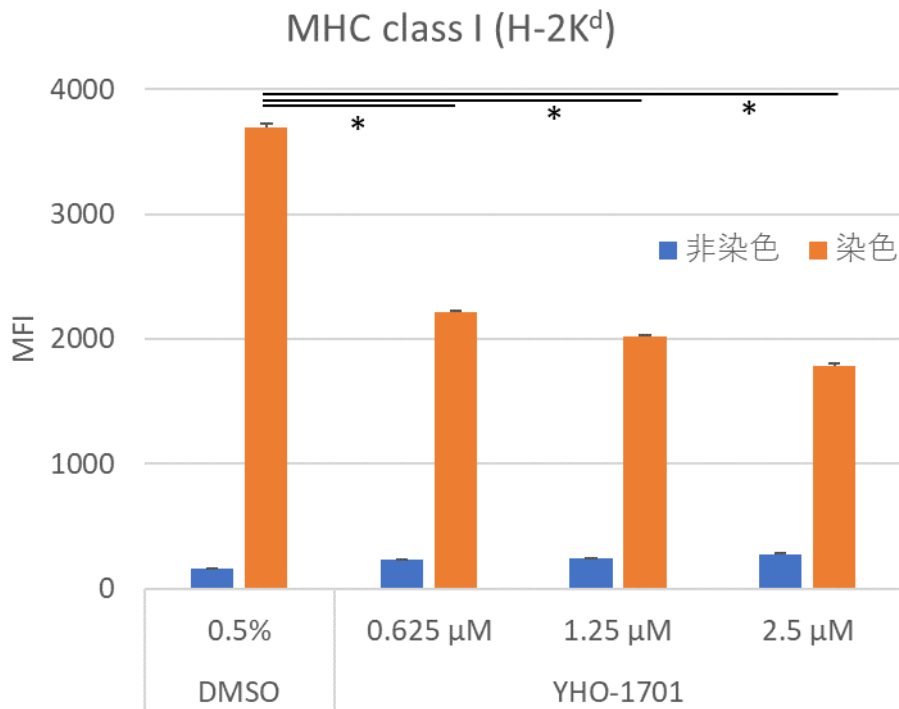


図 18 CT26 細胞における YHO-1701 による MHC クラス I 分子の発現抑制

CT26 細胞を用いて YHO-1701 によるマウスの MHC クラス I 分子である H-2K<sup>d</sup> の発現抑制を評価した。CT26 細胞に YHO-1701 (0.625、1.25 及び 2.5 μM) を添加して 24 時間培養し、H-2K<sup>d</sup> の発現量をフローサイトメトリーにより測定した (n = 4)。各培養条件における H-2K<sup>d</sup> 非染色及び染色条件下での MFI を示す。\* は Williams 検定の結果が p < 0.05 であったことを示す。

### 2-3 考察

本章では、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果の機序を探索する目的で実施した、免疫細胞の活性を抑制したマウスモデルを用いた試験結果について述べた。STAT3 は NK 細胞の細胞傷害活性の制御に関与していることが報告されており [57]、また、抗 PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果に関与していることが報告されている [35, 36, 37]。これらの報告から、YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果に NK 細胞が寄与している可能性を検証するため、NK 細胞の活性を抑制した CT26 移植マウスモデルを用いて YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用による腫瘍増殖抑制効果を試験した。その結果、NK 細胞活性抑制条件下においては YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与による腫瘍増殖抑制効果は認められなかった (図 11)。この結果から YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用投与による腫瘍増殖抑制効果は、NK 細胞の寄与が重要であることが示唆された。

また、薬物動態及び薬力学的観点から、YHO-1701 を本研究で選択した 60 mg/kg よりも高用量である 80 mg/kg をヒト腫瘍移植マウスに経口投与した際の血漿中及び腫瘍中濃度推移が報告されている [8]。本研究において CT26 移植マウスに 60 mg/kg を経口投与した後、腫瘍中の STAT3 Y705 のリン酸化阻害が示されたことから (図 12 及び図 13)、異なるマウスモデル間での比較ではあるものの、60 mg/kg 投与後においても 80 mg/kg 投与後と同様に、YHO-1701 が STAT3 二量体化を阻害することができる腫瘍中濃度に到達していたことが強く推察された。

抗 PD-1 抗体単独投与による細胞増殖抑制効果に T 細胞及び NK 細胞が寄与することが報告されていることから [54, 51]、YHO-1701 単独投与による細胞増殖抑制効果に対する免疫細胞の寄与を検証するため、CT26 を免疫不全マウスである BALB/c ノードマウスと正常な免疫機能を持つ BALB/c マウスに移植したモデルを用いて YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果を比較した。その結果、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果は免疫不全マウスモデルでは認められず、正常な免疫機能を持つマウスモデルでのみ認められた (図 14)。このことから、CT26 移植 BALB/c マウスモデルにおける YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果は T 細胞を主とした免疫作用に基づくものであることが示唆された。

YHO-1701 単剤の腫瘍増殖抑制効果に対する免疫細胞の寄与が示唆されたため、寄与する免疫細胞の探索を行った。対象とする免疫細胞として CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞及び NK 細胞を選択し、これらの活性を抑制した CT26 移植マウスモデルを用い、各免疫細胞の併用効果への寄与を検証した。その結果、CD8 陽性 T 細胞又は NK 細胞の活性を抑制した条件下では YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果が認められなかった (図 15 及び図 16)。これらの結果から、CT26 移植マウスモデルにおける YHO-1701 単剤の腫瘍増殖抑制効果に、CD8 陽性 T 細胞及び NK 細胞が大きく寄与していることが示唆された。これまでに実施された YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果の試験は、免疫不全マウスにヒトがん細胞を移植したモデルを用いており [8, 9, 10]、本研究において認められたこれらの結果は、YHO-1701 が腫瘍免疫に作用して腫瘍増殖抑制効果を発揮することを示唆する新たな発

見であると考えられる。

CT26 移植マウスモデルにおいて YHO-1701 単剤の腫瘍増殖抑制効果に対する NK 細胞の寄与が明らかとなったことから、YHO-1701 が NK 細胞に対して直接的に作用するかどうかを検討するため、マウスの脾臓から抽出した NK 細胞を用いて YHO-1701 が NK 細胞の細胞傷害活性に与える影響を評価した。腫瘍において NK 細胞は、STAT3 経路の活性化によりその細胞傷害活性が抑制されていることが報告されていることから [58]、本研究では STAT3 経路を活性化するサイトカイン IL-6 及びその受容体 IL-6RA による NK 細胞の細胞傷害活性抑制を、YHO-1701 が阻害するかどうかを評価した。その結果、IL-6 及び IL-6RA を曝露した NK 細胞の、CT26 細胞に対する細胞傷害活性は抑制されたが、YHO-1701 で前処理した後に IL-6 及び IL-6RA を曝露した NK 細胞では細胞傷害活性は抑制されなかった (図 17)。この結果から、YHO-1701 は NK 細胞に直接作用し、STAT3 経路の活性化を抑制し、細胞傷害活性の抑制を阻害することができることが示唆された。これは YHO-1701 ががん細胞のみならず、免疫細胞に対しても直接的作用を及ぼすことを示唆する新たな発見であると考えられる。

NK 細胞の細胞傷害活性は、標的細胞であるがん細胞表面の MHC クラス I 分子によって抑制されることがある。MHC クラス I 分子は腫瘍免疫において細胞内のがん抗原を細胞傷害性 T 細胞に提示する役割を果たしているが、NK 細胞に対しては抑制的リガントとして作用する [56]。本研究においては、YHO-1701 ががん細胞への直接的作用により NK 細胞の細胞傷害活性に及ぼす影響を評価するため、CT26 細胞におけるマウス MHC クラス I 分子である H-2K<sup>d</sup> の発現量に与える YHO-1701 の作用について検討した。その結果、YHO-1701 濃度に依存的な H-2K<sup>d</sup> 発現量の抑制が認められた (図 18)。この結果から、YHO-1701 ががん細胞に直接的に作用し、NK 細胞の細胞傷害活性を向上させようと考えられる。

NK 細胞の抗腫瘍効果に着目した場合、YHO-1701 は NK 細胞への直接的作用に加え、がん細胞への直接的作用により MHC クラス I 分子の発現を抑制し、NK 細胞とがん細胞の両方向から、直接的及び間接的に NK 細胞の細胞傷害活性を向上させようと考えられる。MHC クラス I 分子については、一方では細胞傷害性 T 細胞へのがん抗原の提示を担っており、その発現抑制は細胞傷害性 T 細胞による抗腫瘍効果を抑制するとされている [59]。CT26 移植マウスモデルにおける腫瘍微小環境において YHO-1701 がどのように作用しているのかを評価するには、本研究の実験条件及び結果では限界がある。しかしながら、YHO-1701 の腫瘍増殖抑制効果は、NK 細胞の活性抑制のみならず、CD8 陽性 T 細胞の活性抑制によっても消失したという結果が得られたことを考慮すると (図 15 及び図 16)、少なくとも CT26 移植マウスモデルの腫瘍微小環境において、細胞傷害性 T 細胞を過剰に抑制するような作用は示していないものと考えられる。CT26 移植マウスモデルにおける腫瘍に浸潤した免疫細胞の経時的変化に関する報告によると [45]、移植後の腫瘍形成初期から細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞の浸潤が比較的多く、免疫チェックポイント阻害によ

る腫瘍増殖抑制効果が高いモデルであることが示されている。従って、少なくとも細胞傷害性 T 細胞の抗腫瘍効果が十分に期待できる状況においては、YHO-1701 によるがん細胞の MHC クラス I 分子の発現抑制は、全体として細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞を中心とした免疫細胞による抗腫瘍効果に悪影響を及ぼすものではなく、その効果を向上させる方向に作用するものと考えられる。

### 第3章 YHO-1701 のヒト免疫細胞に対する作用

第2章で述べた通り、YHO-1701 はマウスがん細胞株 CT26 を移植したマウスモデルにおいて免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を示し、NK 細胞を介して腫瘍免疫応答を増強することが示唆された。そこで、マウスモデルで認められた作用をヒトに外挿することができるかどうかを検討するため、本研究において確立することができたヒトのがん細胞、免疫細胞を用いた *in vitro* モデルにより YHO-1701 のヒト免疫細胞に対する作用について検討した。

### 3-1 実験材料及び実験方法

#### 3-1-1 実験材料

##### 3-1-1-1 試薬

- DMEM (富士フイルム和光純薬)
- MEM $\alpha$  (L-グルタミン, ピルビン酸ナトリウム, ヌクレオシド含有) (富士フイルム和光純薬)
- Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific)
- ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ( $\times 100$ ) (富士フイルム和光純薬)
- FBS (Sigma-Aldrich)
- RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬)
- YHO-1701 (創薬探索センター又は株式会社ヤクルト本社で合成)
- Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Zombie Green (BioLegend)
- APC anti-human CD45 Antibody (BioLegend)
- BD Phosflow™ Fix Buffer I (BD Biosciences)
- MICA 抗体 (2C10) PE (Santa Cruz Biotechnology)
- D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (富士フイルム和光純薬)
- IMDM with L-Glutamine, Phenol Red, HEPES and Sodium Pyruvate (富士フイルム和光純薬)
- ImmunoCult™ Dendritic Cell Medium (STEMCELL TECHNOLOGIES)
- ImmunoCult™ Dendritic Cell Differentiation Supplement (STEMCELL TECHNOLOGIES)
- ImmunoCult™ Dendritic Cell Maturation Supplement (STEMCELL TECHNOLOGIES)
- IL-12, Human, ELISA Kit, Quantikine (R&D systems)

##### 3-1-1-2 細胞

- ヒト NK 細胞株 NK92-MI (American Type Culture Collection)
- ヒト大腸がん細胞株 HT-29 (American Type Culture Collection)
- ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa (理化学研究所バイオリソース研究センター)
- ヒト末梢血単核球 (STEMCELL TECHNOLOGIES)



## 3-1-2 実験方法

### 3-1-2-1 細胞の培養

#### 3-1-2-1-1 ヒトNK細胞株 NK92-MI

ヒトNK細胞株NK92-MIの培養培地として、MEM $\alpha$  (L-グルタミン, ピルビン酸ナトリウム, ヌクレオシド含有) に終濃度として100 U/mL ペニシリン及び100 mg/L ストレプトマイシンを添加し、そこへ非働化した12.5% FBS 及び12.5% ウマ血清を添加し、更に、使用直前に終濃度として200  $\mu$ M イノシトール、20  $\mu$ M 葉酸及び100  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを添加して混合したものを調製した。凍結保存したNK92-MIを37°Cの湯浴にて融解し、培養培地に細胞を懸濁し、190 $\times g$ 、室温で3分間遠心分離した後、上清を除去し、培養培地で再懸濁して培養容器に播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置して、約80%コンフルエントになるまで培養し、目的の細胞数が得られるまで継代培養を行った。

#### 3-1-2-1-2 ヒト大腸がん細胞株 HT-29

ヒト大腸がん細胞株HT-29の培養培地として、RPMI-1640培地に終濃度10% FBS、0.3 g/L L-Gln、100 U/mL ペニシリン及び100 mg/L ストレプトマイシンを添加して混合したものを調製した。凍結保存したHT-29細胞を37°Cの湯浴にて融解し、培養培地にそれぞれ懸濁し、190 $\times g$ 、室温で3分間遠心分離した後、上清を除去し、培養培地で再懸濁して培養容器に播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置して3、4日毎に培地交換を行い、約80%コンフルエントになるまで培養し、目的の細胞数が得られるまで継代培養を行った。

#### 3-1-2-1-3 ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa

ヒト子宮頸がん細胞株HeLaの培養培地として、DMEM培地に10% FBS、100 U/mL ペニシリン及び100 mg/L ストレプトマイシンを添加して混合したものを調製した。凍結保存HeLaを37°Cの湯浴にて融解し、培養培地にそれぞれ懸濁し、190 $\times g$ 、室温で3分間遠心分離した後、上清を除去し、培養培地で再懸濁して培養容器に播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置して3、4日毎に培地交換を行い、約80%コンフルエントになるまで培養し、目的の細胞数が得られるまで継代培養を行った。

### 3-1-2-2 ヒトNK細胞株のヒトがん細胞株に対する細胞傷害活性の評価

#### 3-1-2-2-1 NK細胞の準備

NK92-MIの培養培地10 mLにNK92-MI細胞 $1 \times 10^6$ 細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中に37°Cで48時間静置した。細胞を50 mL チューブに回収し、190 $\times g$ 、室温で3分間遠心分離した後、上清を除去し、HT-29細胞又はHeLa細胞の培養培地で再懸濁

した。これを3回繰り返して、 $1.5 \times 10^6$  cells/mL の NK92-MI 細胞懸濁液を得た。

#### 3-1-2-2-2 がん細胞（標的細胞）の準備

HT-29 細胞及び HeLa 細胞の培養培地に、それぞれ HT-29 細胞又は HeLa 細胞を  $1.5 \times 10^6$  細胞播種し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 24 時間静置した。そこへ培養培地に溶解した YHO-1701 を終濃度 2.5 µM となるように添加し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 24 時間静置した。上清を除去し、PBS 10 mL を添加して洗浄・上清除去したのち、PBS 20 mL を添加して 5 分間静置した。上清を除去し、Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS 5 mL を添加して 5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 5 分間静置した。顕微鏡観察にて細胞接着の弱まりを確認したのち、ピペッティングで細胞を剥離して 50 mL チューブに回収した。50 mL チューブを 190 × g、室温で 3 分間遠心分離した後、上清を除去し、HT-29 細胞又は HeLa 細胞の培養培地で再懸濁した。これを 3 回繰り返して、 $3 \times 10^5$  cells/mL の HT-29 細胞及び HeLa 細胞懸濁液をそれぞれ得た。

#### 3-1-2-2-3 NK 細胞と標的細胞との共培養

96 穴プレートに HT-29 細胞又は HeLa 細胞懸濁液 100 µL を分注し、等量の培養培地又は NK92-MI 細胞懸濁液を添加し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 5 時間静置した。V 底プレートに細胞を回収し、410 × g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去して PBS（アジ化ナトリウム、Tris, protein 不含）200 µL を添加して洗浄し、これを再度繰り返した。そこへ Zombie Green 1 µL 及び PBS 100 µL を添加し、室温で 20 分間静置した。そこへ 2 % FBS 含有 PBS 100 µL を添加し、410 × g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去したのち、細胞を 2 % FBS 含有 PBS 200 µL に再懸濁し、15 mL チューブに回収し、そこへ 2 % FBS 含有 PBS 1.8 mL を添加した。280 × g、4°C で 5 分間遠心分離して上清を除去し、V 底プレートに移した。V 底プレートを 410 × g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去して APC anti-human CD45 Antibody を 2 % FBS 含有 PBS にて 100 倍希釈して 50 µL を添加したのち、遮光して 4°C で 15 分間静置した。そこへ 2 % FBS 含有 PBS 150 µL を添加し、410 × g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、2 % FBS 含有 PBS 200 µL を添加し、410 × g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去した。そこへ BD Phosflow™ Fix Buffer I 100 µL を添加したのち、遮光して室温で 20 分間静置した。その後 2 % FBS 含有 PBS で 2 回洗浄を繰り返して、2 % FBS 含有 PBS 200 µL に再懸濁して BD FACSCanto™ II (BD) を用いて測定した。

#### 3-1-2-2-4 統計解析

NK92-MI 細胞を添加した条件下における死細胞率から添加しなかった条件下における死細胞率を減じて、これを 100 から添加した条件下における死細胞率を減じた値で除し、細胞傷害活性率を算出した。

得られた結果について、YHO-1701 を添加しなかった条件（溶媒対照群）と添加した条件（被験群）の細胞傷害活性率を Student の t 検定により、5 % 有意水準で仮説検定した。

### 3-1-2-3 YHO-1701 曝露後の MICA 発現量の測定

10 cm dish に、培養培地で懸濁した HT-29 細胞を  $1.5 \times 10^6$  細胞播種し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 24 時間静置した。そこへ培養培地に溶解した YHO-1701 を終濃度 0.625、1.25 又は 2.5  $\mu$ M となるようにそれぞれ添加し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 24 時間静置した。上清を除去し、PBS 10 mL を添加して洗浄・上清除去したのち、PBS 20 mL を添加して 5 分間静置した。上清を除去し、Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS 5 mL を添加して 5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 5 分間静置した。顕微鏡観察にて細胞接着の弱まりを確認したのち、ピペッティングで細胞を剥離して 50 mL チューブに回収した。50 mL チューブを 190  $\times$  g、室温で 3 分間遠心分離した後、上清を除去し、HT-29 細胞の培養培地で再懸濁した。これを 3 回繰り返す、 $3 \times 10^5$  cells/mL の HT-29 細胞懸濁液を得た。

V 底プレートに細胞懸濁液を分注し、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去して MICA 抗体 (2C10) PE (santa-cruz sc-23870 PE) の 100 倍希釈液 100  $\mu$ L を添加したのち、遮光して 4°C で 15 分間静置した。そこへ 2 % FBS 含有 PBS 150  $\mu$ L を添加し、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去し、2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L を添加し、410  $\times$  g、4°C で 2 分間遠心分離して上清を除去した。そこへ BD Phosflow™ Fix Buffer I 100  $\mu$ L を添加したのち、遮光して室温で 20 分間静置した。その後 2 % FBS 含有 PBS で 2 回洗浄を繰り返す、2 % FBS 含有 PBS 200  $\mu$ L に再懸濁して Cytomics FC500™ MXP (BECKMAN COULTER) を用いて測定した。

### 3-1-2-4 YHO-1701 曝露後のヒト樹状細胞成熟化の誘導

#### 3-1-2-4-1 各種培地の調製

D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red に終濃度 10 % の FBS 及び 1 % のペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ( $\times 100$ ) を添加し、細胞洗浄用培地を調製した。

IMDM with L-Glutamine, Phenol Red, HEPES and Sodium Pyruvate に終濃度 10 % の FBS 及び 1 % のペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ( $\times 100$ ) を添加し、単球培養培地を調製した。

ImmunoCult™ Dendritic Cell Medium に 1/100 量の ImmunoCult™ Dendritic Cell Differentiation Supplement を添加し、樹状細胞分化培地を調製した。

#### 3-1-2-4-2 ヒト末梢血単核球から樹状細胞への分化

液体窒素中に保存したヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC)

を、37°Cの湯浴にて融解し、細胞洗浄用培地 9 mL に懸濁し、190 × g、室温で 5 分間遠心分離して上清を除去し、単球培養培地で懸濁した細胞の一部を等量のトリパンブルーと混合し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。懸濁液を 190 × g、室温で 5 分間遠心分離して上清を除去し、細胞ペレットを樹状細胞分化培地で  $3.0 \times 10^5$  cells/250 μL の細胞懸濁液を調製した。

### 3-1-2-4-3 IL-10 によるヒト樹状細胞の成熟化阻害及び生細胞数測定

48 穴プレートに細胞懸濁液 250 μL を分注し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 72 時間静置した。その後培地を除去し、樹状細胞分化培地 250 μL を添加し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で 48 時間静置し、ImmunoCult™ Dendritic Cell Maturation Supplement 2.5 μL、終濃度 10 ng/mL の IL-10 及び 1.0、3.0 又は 10.0 μM の YHO-1701 を添加して穏やかに混合し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ中に 37°C で更に 48 時間静置した。

各穴の培養液をピペッティングして懸濁し、1.5 mL チューブに採取した。採取した懸濁液 20 μL を 96 穴プレートに移し、トリパンブルー溶液と混合して生細胞数を計測した。残りの懸濁液を 300 × g、室温で 10 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに分取し、ELISA による解析を行うまで -80°C で凍結保存した。

培養上清を氷上にて解凍し、IL-12, Human, ELISA Kit, Quantikine™ を用いて、培養上清中の IL-12p70 濃度を測定した。

### 3-1-2-4-4 統計解析

IL-10 添加条件(樹状細胞成熟化抑制)下と非添加条件下における培養上清中の IL-12p70 濃度、IL-10 添加 YHO-1701 非添加条件下と YHO-1701 各種濃度添加条件下における培養上清中の IL-12p70 濃度及び生細胞数について、それぞれ Student の t 検定及び Williams 検定により、5 % 有意水準で仮説検定した。

### 3-1-3 実験結果

#### 3-1-3-1 ヒトがん細胞株及びヒト NK 細胞株を用いた YHO-1701 による細胞傷害活性の向上作用

ヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 及びヒト NK 細胞株 NK-92MI を用いて、YHO-1701 のがん細胞に対する作用が NK 細胞の細胞傷害活性に及ぼす作用を *in vitro* で実験した。

その結果、YHO-1701 のがん細胞に対する作用が NK-92MI 細胞のがん細胞に対する細胞傷害活性を有意に上昇させることが示された (図 19)。

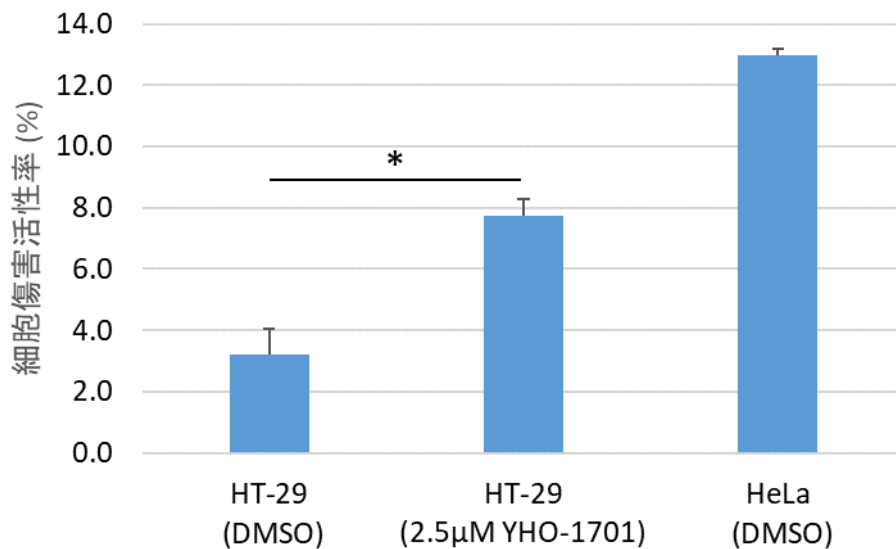


図 19 ヒト株化NK細胞における YHO-1701 による細胞傷害活性の向上

ヒト NK 細胞株 NK-92MI のヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 に対する細胞傷害活性を評価した。YHO-1701 添加/非添加条件下における HT-29 細胞と NK-92MI 細胞との共培養時の死細胞数の変化率を、細胞傷害活性率として百分率で平均値±標準誤差で示した (n = 3)。また、陽性対照として同様にヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に対する細胞傷害活性率を示した (n = 3)。共培養において NK-92MI 細胞と HT-29 細胞又は HeLa 細胞との細胞数の比率 (E:T) は 5:1 とした。\* は Student の t 検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを示す。

### 3-1-3-2 YHO-1701 のヒトがん細胞における NK 細胞活性化分子の発現量に及ぼす作用

YHO-1701 のヒトがん細胞における NK 細胞活性化分子の発現量に及ぼす作用を評価するため、HT-29 細胞株を用いて YHO-1701 による NK 細胞の細胞傷害活性向上作用を、NK 細胞を活性化させる natural killer group 2, member D (NKG2D) リガンドの一つである MICA [60] の発現量に及ぼす作用を評価した。

その結果、YHO-1701 の濃度依存的な MICA 発現量の増加が認められた (図 20)。なお、本実験は  $n = 1$  で実施したが、同じ実験を  $n = 1$  で再度実施し、再現性があることを確認した。

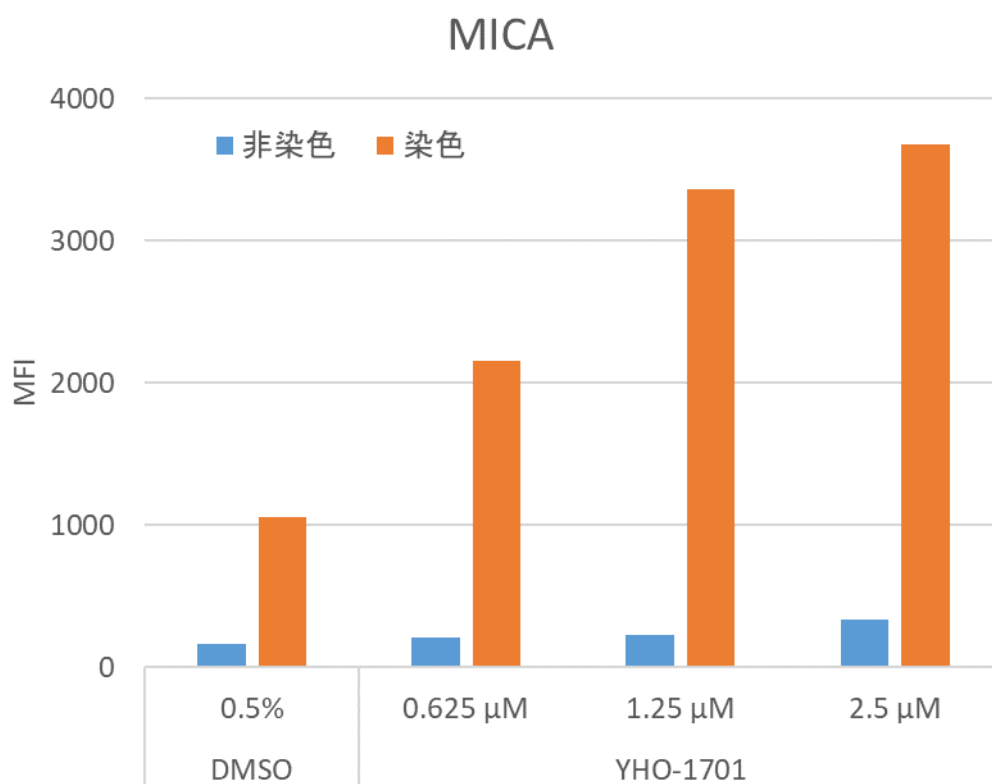


図 20 YHO-1701 のヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 の MICA 発現量に及ぼす作用  
HT-29 細胞に YHO-1701 を 0.625, 1.25 及び 2.5 μM 添加して 24 時間培養し、細胞表面の MICA 分子の発現量をフローサイトメトリー法により測定した ( $n = 1$ )。各培養条件における MICA 非染色及び染色条件下での平均蛍光強度を示す。

### 3-1-3-3 YHO-1701 のヒト樹状細胞成熟化に対する作用

腫瘍微小環境において、抑制的に作用するサイトカインにより樹状細胞の成熟化が阻害されていることが報告されていることから [61]、本研究においてはヒト PBMC を用いて *in vitro* で樹状細胞前駆細胞へ分化させ、その後の成熟化を IL-10 により抑制した条件下における YHO-1701 の樹状細胞成熟化に対する作用を評価した。

成熟化した樹状細胞が分泌するサイトカインである IL-12 p70 を ELISA にて測定したところ、YHO-1701 濃度に依存的な IL-12 p70 濃度の上昇が認められた (図 21)。なお、有意な IL-12 p70 濃度の上昇が認められた際の YHO-1701 濃度 (10  $\mu$ M) において、生細胞数の減少が認められたことから、測定された培地中 IL-12 p70 濃度は、減少した生細胞減少の影響を受けたものと考えられた (図 22)。

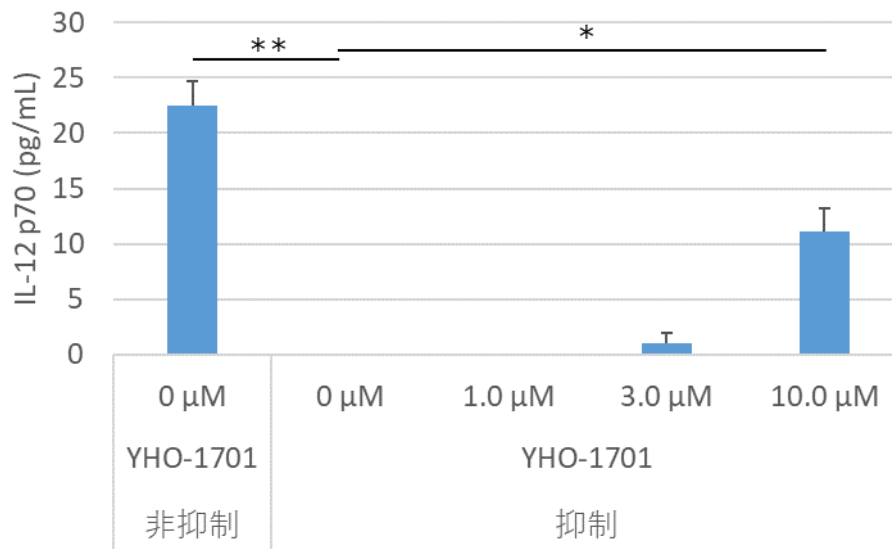


図 21 ヒト樹状細胞の成熟化抑制条件下における YHO-1701 の成熟化抑制解除作用

ヒト PBMC より分化させた樹状細胞の成熟化を IL-10 により抑制した条件下における YHO-1701 (1.0、3.0 及び 10.0  $\mu$ M) 添加による樹状細胞成熟化への影響を、成熟化の指標として培地中に分泌された IL-12 p70 濃度を測定した (n = 3)。グラフは IL-12 p70 濃度を平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。\*は Williams 検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを、\*\*は Student の t 検定 (片側) の結果が  $p < 0.01$  であったことを示す。

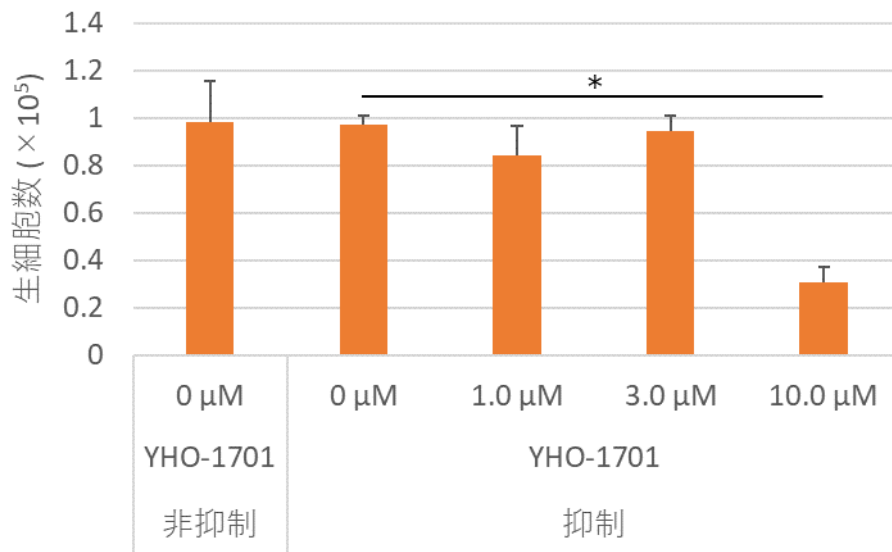


図 22 YHO-1701 添加によるヒト樹状細胞生細胞数への影響

成熟化培養後のヒト樹状細胞の生細胞数を測定した。グラフは生細胞数を平均値±標準誤差で示す。\*は Williams 検定の結果が  $p < 0.05$  であったことを示す。



### 3-2 考察

マウスモデルで認められた YHO-1701 の腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果が、ヒトにおいても認められる可能性を検討するため、各種ヒト細胞を用いた実験を行った。実験に用いたヒト結腸腺がん細胞株 HT-29 は、NK 細胞の細胞傷害作用に対して抵抗性を示すことが報告されている [62]。YHO-1701 を HT-29 細胞に曝露した後、株化ヒト NK 細胞と共培養した結果、NK 細胞の細胞傷害活性の向上を認めた (図 19)。このことから、YHO-1701 はマウスがん細胞と同様に、ヒトがん細胞における STAT3 二量体化阻害作用により、NK 細胞の細胞傷害活性を増強できると考えられた。また、NK 細胞による細胞傷害作用に抵抗性を示す HT-29 細胞への細胞傷害活性を向上させたことから、臨床において NK 細胞抵抗性となっているがん細胞に対し、NK 細胞への感受性を回復できる可能性があると考えられた。

NK 細胞は自らを活性化するレセプターである NKG2D 分子のリガンドである MICA を認識すると、細胞傷害活性を増強することが報告されている [60]。そこで YHO-1701 が HT-29 細胞の MICA 発現量に及ぼす影響を評価した。その結果、YHO-1701 は HT-29 細胞の MICA 発現量を有意に増加させた (図 20)。したがって、YHO-1701 はがん細胞への直接的な作用として MHC クラス I 分子の発現量を変化させ、NK 細胞によるがん細胞に対する細胞傷害活性を向上させようと考えられた。

更に、がん細胞への直接作用を介した NK 細胞の活性向上作用に加え、NK 細胞以外の免疫細胞に対する YHO-1701 の作用を評価するため、ヒト PBMC を樹状細胞へ分化させ、樹状細胞の成熟化が抑制されている条件下において、YHO-1701 による成熟化抑制解除作用を実験した。その結果、YHO-1701 は IL-10 により抑制された条件下において、樹状細胞の成熟化を誘導できることが示された (図 21)。よって、YHO-1701 はヒト NK 細胞の活性向上に加え、成熟化が抑制されたヒト樹状細胞に対しても成熟化を誘導したことから、ヒト腫瘍微小環境において活性や成熟化が抑制された状態にある NK 細胞や樹状細胞の活性向上および樹状細胞の成熟化抑制解除を通じ、腫瘍免疫の活性を向上させる機序が考えられた。

本研究においてはヒト NK 細胞及び樹状細胞以外の免疫細胞に対する YHO-1701 の作用を評価するための実験系構築を試みたが、これら 2 つの免疫細胞以外の実験系を構築することはできなかった。したがって、本研究では限られた免疫細胞への限られた条件下における YHO-1701 の作用のみが評価できた状況であるため、本併用療法の有用性を評価するためには、今後さらなる検討が必要である。しかし、本研究から得られた結果に基づくと、YHO-1701 が腫瘍微小環境において免疫細胞とがん細胞の両方に直接的に作用することにより、マウスモデルで認められた抗 PD-1 抗体との併用による腫瘍増殖抑制効果を臨床においても期待できると考えられる。

## 総括及び結論

本研究においては、STAT3 二量体化阻害薬 YHO-1701 の抗 PD-1 抗体との併用効果の評価と作用機序の解析を行い、YHO-1701 の腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果を明らかにした。

YHO-1701 はヒトがん細胞への直接的作用に注目して研究開発が進められていたことから、腫瘍免疫を評価する際の実験モデルとなる、同系移植モデルを構成するマウスがん細胞における STAT3 二量体化阻害作用の有無について、評価がなされていなかった。そこで本研究の前提として、マウスがん細胞における YHO-1701 の STAT3 二量体化阻害活性を評価した。その結果、ヒトがん細胞と同様に、マウスがん細胞においても十分な STAT3 阻害作用が示された。

がん免疫療法として確立されている免疫チェックポイント阻害剤のうち、STAT3 阻害との併用効果が報告されている抗 PD-1 抗体 [35, 36, 37] と YHO-1701 との併用効果を、マウスがん細胞の同系移植モデルを用いて試験した。その結果、腫瘍増殖抑制作用について YHO-1701 と抗 PD-1 抗体との併用効果を認めた。ただし、この併用効果は YHO-1701 と抗 PD-1 抗体の相対的な投与タイミングに依存するものであり、投与タイミングが併用効果の作用機序に関係することを示唆するものであった。当該併用効果の作用機序を探索するため、抗 PD-1 抗体の作用機序及び耐性機序との関連が報告されている免疫細胞 [16, 18] を中心に、当該併用効果への寄与の有無を検証した。本研究において確立できた実験系は限られたものであるが、抗腫瘍活性を示す主要な免疫細胞である T 細胞及び NK 細胞の関与を検証した。その結果、抗 PD-1 抗体の主要な作用点である CD8 陽性 T 細胞が、予想通り当該併用効果に寄与していたことに加え、NK 細胞も強く寄与していることが示された。NK 細胞は、IL-6 等により活性化された STAT3 により細胞傷害活性が抑制されていることが報告されているが [51]、マウス NK 細胞に IL-6 を曝露させて活性を抑制した実験系において、YHO-1701 はその抑制を阻害したことから、当該併用効果には YHO-1701 の NK 細胞に対する直接的作用が関与していることが示唆された。また、がん細胞に対する直接的作用と NK 細胞の細胞傷害活性との関係については、マウスがん細胞に対して YHO-1701 が、NK 細胞に対して抑制的に作用する MHC クラス I 分子の発現を抑制することが示された。これらの結果から、腫瘍微小環境において YHO-1701 は NK 細胞への直接的作用に加え、がん細胞への作用を介して NK 細胞の細胞傷害活性を上昇させる作用を持つことが示唆された (図 23)。

マウスがん細胞を用いた各種実験系において、YHO-1701 の腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果が認められたが、結果のヒトへの外挿性を評価するため、ヒトがん細胞及びヒト免疫細胞を用いた実験を行った。YHO-1701 はヒトがん細胞の STAT3 二量体化を阻害し、ヒト NK 細胞を活性化させる分子である MICA の発現上昇をもたらすことが、NK 細胞活性を向上させる作用機序の一つであることを示唆する結果を得た。また、T 細胞及び NK 細胞以外の免疫細胞として、ヒト樹状細胞に注目した実験系を確立して YHO-1701 の作用を検証した。IL-10 等のサイトカインにより活性化した STAT3 シグナルにより、樹状細胞の成

熟化が抑制されていることが報告されているが [61]、IL-10 曝露により成熟化を抑制したヒト樹状細胞に対し、YHO-1701 は成熟化抑制を阻害した (図 23)。

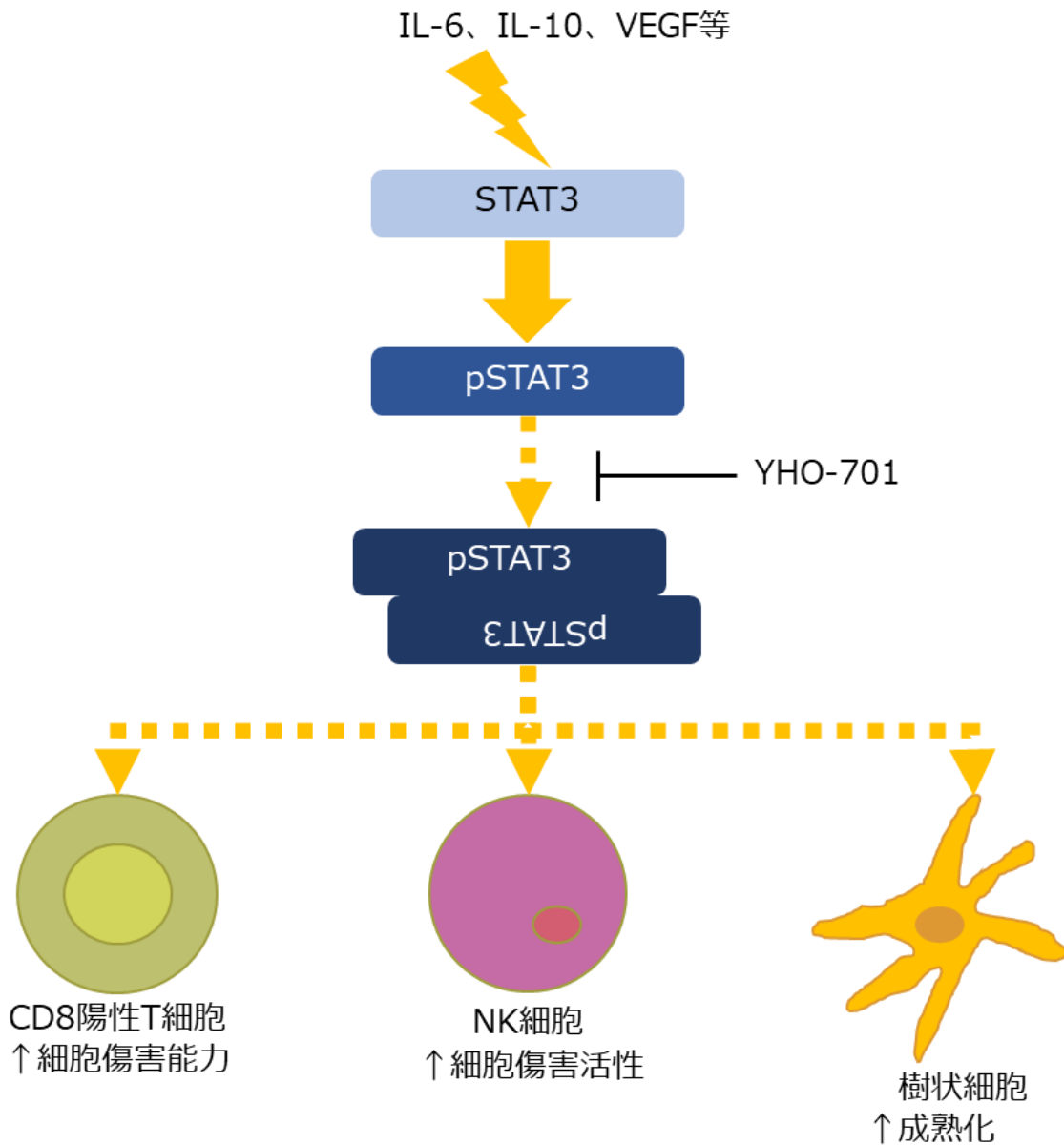


図 23 STAT3 二量体化阻害薬 YHO-1701 による免疫細胞への作用

本研究において得られた実験結果に基づき、YHO-1701 を用いた STAT3 二量体化阻害による CD8 陽性 T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞)、NK 細胞及び樹状細胞に認められた作用を図示した。

STAT3 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである danvatirsen と抗 PD-L1 抗体との併用効果が報告されているが、danvatirsen の第 I 相臨床試験において、投与前と投

与後の生検検体を用いた細胞内取り込みに関する報告によると、danvatirsen は腫瘍微小環境に存在するがん細胞以外の細胞への取り込みは認められたが、がん細胞への取り込みは認められなかった [63]。一方、低分子化合物である YHO-1701 はがん細胞にも取り込まれて STAT3 の二量体化を阻害することにより、ヒトがん細胞における NKG2D リガンドの発現を増加させた。これは YHO-1701 が腫瘍微小環境において danvatirsen とは異なる作用を示す可能性を示唆するものであり、治療選択肢を広げるという観点で重要なものであると考えられる。

以上、本研究においては、動物モデルを用いて YHO-1701 の腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果を明らかにし、また、ヒトがん細胞及びヒト免疫細胞を用いたモデル系において、ヒトにおける腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果を発揮することが期待される結果を得た。したがって、STAT3 二量体化阻害薬は、近年発展の著しいがん免疫療法における新たな選択肢として開発する価値のある新規抗がん剤標的となる作用機序の候補であると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導と御鞭撻を賜り、また多大な御尽力をいただいた静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター教授 浅井章良先生に厚く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり御助言、御校閲を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院薬理学講座教授 石川智久先生、免疫微生物学講座教授 梅本英司先生、生化学講座教授 竹内英之先生に心より感謝申し上げます。

本研究の実施、本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜り、貴重な御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター講師 小郷尚久先生、助教 村上央先生、愛知県がんセンター研究所 村岡大輔先生、多大な御協力、御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター 三好奈央氏に心より感謝申し上げます。

本研究に際して、御助言、御協力をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センター及び株式会社ヤクルト本社の諸兄に厚く感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] A. Kaptein, V. Paillard and M. Saunders, "Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction," *J Biol Chem*, vol. 271, 5961-4, 1996.
- [2] Z. Zhong, Z. Wen and E. J. J. Darnell, "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6," *Science*, vol. 264, 95-8, 1994.
- [3] N. Kanda, H. Seno, Y. Konda, H. Marusawa, M. Kanai, T. Nakajima, T. Kawashima, A. Nanakin, T. Sawabu, Y. Uenoyama, A. Sekikawa, M. Kawada, K. Suzuki, T. Kayahara, H. Fukui, M. Sawada and T. Chiba, "STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells," *Oncogene*, vol. 23, 4921-9, 2004.
- [4] G. Niu, L. K. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, M. L. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove and H. Yu, "Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis," *Oncogene*, vol. 21, 2000-8, 2002.
- [5] S. T. Udayakumar, S. M. Stratton, B. R. Nagle and T. G. Bowden, "Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3," *Neoplasia*, vol. 4, 60-7, 2002.
- [6] K. Matsuno, Y. Masuda, Y. Uehara, H. Sato, A. Muroya, O. Takahashi, T. Yokotagawa, T. Furuya, T. Okawara, M. Otsuka, N. Ogo, T. Ashizawa, C. Oshita, S. Tai, H. Ishii, Y. Akiyama and A. Asai, "Identification of a New Series of STAT3 Inhibitors by Virtual Screening," *ACS Med Chem Lett*, vol. 1, 371-5, 2010.
- [7] Y. Uehara, M. Mochizuki, K. Matsuno, T. Haino and A. Asai, "Novel high-throughput screening system for identifying STAT3-SH2 antagonists," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 380, 627-31, 2009.
- [8] F. Nishisaka, K. Taniguchi, M. Tsugane, G. Hirata, A. Takagi, N. Asakawa, A. Kurita, H. Takahashi, N. Ogo, Y. Shishido and A. Asai, "Antitumor activity of a novel oral signal transducer and activator of transcription 3 inhibitor YHO-1701," *Cancer Sci*, vol. 111, 1774-84, 2020.
- [9] K. Taniguchi, H. Konishi, A. Yoshinaga, M. Tsugane, H. Takahashi, F. Nishisaka, Y. Shishido and A. Asai, "Efficacy of combination treatment using YHO-1701, an orally active STAT3 inhibitor, with molecular-targeted agents on cancer cell lines," *Sci Rep*, vol. 11, 6685, 2021.
- [10] N. Yanagimura, S. Takeuchi, K. Fukuda, S. Arai, A. Tanimoto, A. Nishiyama, N.

- Ogo, H. Takahashi, A. Asai, S. Watanabe, T. Kikuchi and S. Yano, "STAT3 inhibition suppresses adaptive survival of ALK-rearranged lung cancer cells through transcriptional modulation of apoptosis," *NPJ Precis Oncol*, vol. 6, 11, 2022.
- [11] H. Yu, M. Kortylewski and D. Pardoll, "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment," *Nat Rev Immunol*, vol. 7, 41-51, 2007.
- [12] A. Witalisz-Siepracka, K. Klein, B. Zdársky and D. Stoiber, "The Multifaceted Role of STAT3 in NK-Cell Tumor Surveillance," *Front Immunol*, vol. 13, 947568, 2022.
- [13] J. Huynh, A. Chand, D. Gough and M. Ernst, "Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer — using tissue repair as a road map," *Nat Rev Cancer*, vol. 19, 82-96, 2019.
- [14] J. Bromberg, M. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. Pestell, C. Albanese and J. J. Darnell, "Stat3 as an oncogene," *Cell*, vol. 98, 295-303, 1999.
- [15] K. Yonemitsu, C. Pan, Y. Fujiwara, Y. Miyasato, T. Shiota, H. Yano, S. Hosaka, K. Tamada, Y. Yamamoto and Y. Komohara, "GM-CSF derived from the inflammatory microenvironment potentially enhanced PD-L1 expression on tumor-associated macrophages in human breast cancer," *Sci Rep*, vol. 12, 12007, 2022.
- [16] R. Y. Murciano-Goroff, B. A. Warner and D. J. Wolchok, "The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations," *Cell Res*, 507-19, 2020.
- [17] Y. Iwai, M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo and N. Minato, "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, 12293-12297, 2002.
- [18] W. Zou, "Immune regulation in the tumor microenvironment and its relevance in cancer therapy," *Cell Mol Immunol*, vol. 19, 1-2, 2022.
- [19] T. Tang, X. Huang, G. Zhang, Z. Hong, X. Bai and T. Liang, "Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 6, 72, 2021.
- [20] D. A. Waldman, J. M. Fritz and J. M. Lenardo, "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice," *Nat Rev Immunol*, vol. 11, 651-68, 2020.
- [21] E. W. Weber, M. V. Maus and C. L. Mackall, "The Emerging Landscape of Immune

- Cell Therapies," *Cell*, 46-62, 2020.
- [22] C. K. Conlon, D. M. Miljkovic and A. T. Waldmann, "Cytokines in the Treatment of Cancer," *J Interferon Cytokine Res*, vol. 39, 6-21, 2019.
- [23] Y. Zhang and Z. Zhang, "The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications," *Cell Mol Immunol*, vol. 17, 807-21, 2020.
- [24] Y. Shiravand, F. Khodadadi, S. Kashani, R. S. Hosseini-Fard, S. Hosseini, H. Sadeghirad, R. Ladwa, K. O'Byrne and A. Kulasinghe, "Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy," *Curr Oncol*, vol. 29, 3044-60, 2022.
- [25] B. Healey Bird, K. Nally, K. Ronan, G. Clarke, S. Amu, S. A. Almeida, R. Flavin and S. Finn, "Cancer Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors- Biomarkers of Response and Toxicity; Current Limitations and Future Promise," *Diagnostics (Basel)*, vol. 12, 124, 2022.
- [26] M. Ottaviano, S. De Placido and A. P. Ascierto, "Recent success and limitations of immune checkpoint inhibitors for cancer: a lesson from melanoma," *Virchows Arch*, vol. 474, 421-32, 2019.
- [27] P. Dobosz, M. Stepień, A. Golke and T. Dzieciatkowski, "Challenges of the Immunotherapy: Perspectives and Limitations of the Immune Checkpoint Inhibitor Treatment," *Int J Mol Sci*, vol. 23, 2847, 2022.
- [28] S. Pesce, M. Greppi, G. Tabellini, F. Rampinelli, S. Parolini, D. Olive, L. Moretta, A. Moretta and E. Marcenaro, "Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 139, 335-46, 2017.
- [29] Q. Lei, D. Wang, K. Sun, L. Wang and Y. Zhang, "Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors," *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, 672, 2020.
- [30] N. Mitsuiki, C. Schwab and B. Grimbacher, "What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system?," *Immunol Rev*, vol. 287, 33-49, 2019.
- [31] A. H. Tawbi, D. Schadendorf, J. E. Lipson, A. P. Ascierto, L. Matamala, C. E. G. P. Rutkowski, J. H. Gogas, D. C. Lao, J. J. De Menezes, S. Dalle, A. Arance, J. J. Grob, S. Srivastava, M. Abaskharoun, M. Hamilton, S. Keidel, L. K. Simonsen, M. A. Sobiesk, B. Li, S. F. Hodi and V. G. Long, "Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma," *N Engl J Med*, vol. 386, 24-34, 2022.
- [32] A. Granito, S. Marinelli, A. Forgione, M. Renzulli, F. Benevento, F. Piscaglia and F. Tovoli, "Regorafenib Combined with Other Systemic Therapies: Exploring



- Promising Therapeutic Combinations in HCC," *J Hepatocell Carcinoma*, vol. 26, 477-92, 2021.
- [33] D. Hong, R. Kurzrock, Y. Kim, R. Woessner, A. Younes, *et al.*, "AZD9150, a Next-Generation Antisense Oligonucleotide Inhibitor of STAT3 with Early Evidence of Clinical Activity in Lymphoma and Lung Cancer," *Sci Transl Med*, vol. 7, 314ra185, 2015.
- [34] D. Muraoka, N. Seo, T. Hayashi, Y. Tahara, K. Fujii, I. Tawara, Y. Miyahara, K. Okamori, H. Yagita, S. Imoto, R. Yamaguchi, M. Komura, S. Miyano, M. Goto, I. S. Sawada, A. Asai, H. Ikeda, K. Akiyoshi, N. Harada and H. Shiku, "Antigen delivery targeted to tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance," *J Clin Invest*, vol. 129, 1278-94, 2019.
- [35] M. De Martino, M. Tkach, S. Bruni, D. Rocha, F. M. Mercoglia, E. M. Cenciarini, F. M. Chervo, J. C. Proietti, F. Dingli, D. Loew, A. E. Fernández, V. P. Elizalde, E. Piaggio and R. Schillaci, "Blockade of Stat3 oncogene addiction induces cellular senescence and reveals a cell-nonautonomous activity suitable for cancer immunotherapy," *Oncimmunology*, vol. 9, 1715767, 2020.
- [36] L. Huang, Y. Xu, J. Fang, W. Liu, J. Chen, Z. Liu and Q. Xu, "Targeting STAT3 Abrogates Tim-3 Upregulation of Adaptive Resistance to PD-1 Blockade on Regulatory T Cells of Melanoma," *Front Immunol*, vol. 12, 654749, 2021.
- [37] W. T. Kim, Y. Kim, H. Keum, W. Jung, M. Kang and S. Jon, "Combination of a STAT3 inhibitor with anti-PD-1 immunotherapy is an effective treatment regimen for a vemurafenib-resistant melanoma," *Mol Ther Oncolytics*, vol. 26, 1-14, 2022.
- [38] H. Guo, Y. Xiao, Z. Yuan, X. Yang, J. Chen, C. Chen, M. Wang, L. Xie, Q. Chen, Y. Tong, Q. Zhang and Y. Bai, "Inhibition of STAT3Y705 phosphorylation by Stattic suppresses proliferation and induces mitochondrial-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells," *Cell Death Discov*, vol. 8, 116, 2022.
- [39] J. D. Messenheimer, M. S. Jensen, E. M. Afentoulis, W. K. Wegmann, Z. Feng, J. D. Friedman, J. M. Gough, J. W. Urban and A. B. Fox, "Timing of PD-1 Blockade Is Critical to Effective Combination Immunotherapy with Anti-OX40," *Clin Cancer Res*, vol. 23, 6165-77, 2017.
- [40] M. H. Nguyen, K. P. Bommareddy, W. A. Silk and D. Saha, "Optimal timing of PD-1 blockade in combination with oncolytic virus therapy," *Semin Cancer Biol*, vol. 86, 971-80, 2022.
- [41] K. Shioya, T. Matsumura, Y. Seki, H. Shimizu, T. Nakamura and S. Taniguchi, "Potentiated antitumor effects of APS001F/5-FC combined with anti-PD-1 antibody in a CT26 syngeneic mouse model," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 85,

324-31, 2021.

- [42] F. Petitprez, M. Meylan, A. de Reyniès, C. Sautès-Fridman and H. W. Fridman, "The Tumor Microenvironment in the Response to Immune Checkpoint Blockade Therapies," *Front Immunol*, vol. 11, 784, 2020.
- [43] K. Oura, A. Morishita, J. Tani and T. Masaki, "Tumor Immune Microenvironment and Immunosuppressive Therapy in Hepatocellular Carcinoma: A Review," *Int J Mol Sci*, vol. 22, 5801, 2021.
- [44] A. J. Marin-Acevedo, O. E. Kimbrough and Y. Lou, "Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond," *J Hematol Oncol*, vol. 14, 45, 2021.
- [45] A. M. Taylor, M. A. Hughes, J. Walton, M. L. A. Coenen-Stass, L. Magiera, L. Mooney, S. Bell, D. A. Staniszewska, C. L. Sandin, T. S. Barry, A. Watkins, S. L. Carnevalli and L. E. Hardaker, "Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery," *J Immunother Cancer*, vol. 7, 328, 2019.
- [46] H. Takahashi, K. Sakakura, T. Kudo, M. Toyoda, K. Kaira, T. Oyama and K. Chikamatsu, "Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages," *Oncotarget*, vol. 8, 8633-47, 2017.
- [47] R. Kondou, A. Iizuka, C. Nonomura, H. Miyata, T. Ashizawa, T. Nagashima, K. Ohshima, K. Urakami, M. Kusuhara, K. Yamaguchi and Y. Akiyama, "Classification of tumor microenvironment immune types based on immune response-associated gene expression," *Int J Oncol*, vol. 54, 219-28, 2019.
- [48] L. Lisi, G. Ciotti, M. Chiavari, M. Pizzoferrato, A. Mangiola, S. Kalinin, L. D. Feinstein and P. Navarra, "Phospho-mTOR expression in human glioblastoma microglia-macrophage cells," *Neurochem Int*, vol. 104485, 129, 2019.
- [49] C. Genova, C. Dellepiane, P. Carrega, S. Sommariva, G. Ferlazzo, P. Pronzato, R. Gangemi, G. Filaci, S. Coco and M. Croce, "Therapeutic Implications of Tumor Microenvironment in Lung Cancer: Focus on Immune Checkpoint Blockade," *Front Immunol*, vol. 12, 799455, 2022.
- [50] C. Wang, K. B. Thudium, M. Han, X. T. Wang, H. Huang, D. Feingersh, C. Garcia, Y. Wu, M. Kuhne, M. Srinivasan, S. Singh, S. Wong, N. Garner, H. Leblanc, R. T. Bunch, D. Blanset, M. J. Selby and A. J. Korman, "In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates," *Cancer Immunol Res*, vol. 2, 846-56, 2014.
- [51] J. Hsu, J. J. Hodgins, M. Marathe, J. C. Nicolai, C. M. Bourgeois-Daigneault, N. T. Trevino, S. C. Azimi, K. A. Scheer, E. H. Randolph, W. T. Thompson, L. Zhang,

- A. Iannello, N. Mathur, E. K. Jardine, A. G. Kirn, C. J. Bell, W. M. McBurney, H. D. Raulet and M. Ardolino, "Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade," *J Clin Invest*, vol. 128, 4654-68, 2018.
- [52] A. M. Kruisbeek, "In vivo depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8-specific T cells," in *Curr Protoc Immunol*, 1992, Chapter 4:Unit 4.1.
- [53] H. Yoshino, T. Ueda, M. Kawahata, K. Kobayashi, Y. Ebihara, A. Manabe, R. Tanaka, M. Ito, S. Asano, T. Nakahata and K. Tsuji, "Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice," *Bone Marrow Transplant*, vol. 26, 1211-6, 2000.
- [54] Y. Jin, X. An, B. Mao, R. Sun, R. Kumari, X. Chen, Y. Shan, M. Zang, L. Xu, J. Muntel, K. Beeler, R. Bruderer, L. Reiter, S. Guo, D. Zhou, X. Q. Li and X. Ouyang, "Different syngeneic tumors show distinctive intrinsic tumor-immunity and mechanisms of actions (MOA) of anti-PD-1 treatment," *Sci Rep*, vol. 12, 3278, 2022.
- [55] M. Pelleitier and S. Montplaisir, "The nude mouse: a model of deficient T-cell function," *Methods Achiev Exp Pathol*, vol. 7, 149-66, 1975.
- [56] S. D. Kaufman, A. R. Schoon and J. P. Leibson, "MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition," *J Immunol*, vol. 150, 1429-36, 1993.
- [57] J. Wu, X. F. Gao, C. Wang, M. Qin, F. Han, T. Xu, Z. Hu, Y. Long, M. X. He, X. Deng, L. D. Ren and Y. T. Dai, "IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma," *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 38, 321, 2019.
- [58] D. Gotthardt, M. E. Putz, E. Straka, P. Kudweis, M. Biaggio, V. Poli, B. Strobl, M. Müller and V. Sexl, "Loss of STAT3 in murine NK cells enhances NK cell-dependent tumor surveillance," *Blood*, vol. 124, 2370-9, 2014.
- [59] F. Garrido, I. Algarra and M. A. García-Lora, "The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 59, 1601-6, 2010.
- [60] L. Ferrari de Andrade, E. R. Tay, D. Pan, M. A. Luoma, Y. Ito, S. Badrinath, D. Tsoucas, B. Franz, F. J. K. May, J. C. Harvey, S. Kobold, W. J. Pyrdol, C. Yoon, C. G. Yuan, S. F. Hodi, G. Dranoff and W. K. Wucherpfennig, "Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity," *Science*, vol. 359, 1537-42, 2018.
- [61] T. De Smedt, M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo and M. Moser,

- "Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function," *Eur J Immunol*, vol. 27, 1229-35, 1997.
- [62] T. Wex, H. Wex, R. Hartig, S. Wilhelmsen and P. Malfertheiner, "Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells," *FEBS Lett*, vol. 552, 115-9, 2003.
- [63] T. A. Proia, M. Singh, R. Woessner, L. Carnevalli, G. Bommakanti, *et al.*, "STAT3 Antisense Oligonucleotide Remodels the Suppressive Tumor Microenvironment to Enhance Immune Activation in Combination with Anti-PD-L1," *Clin Cancer Res*, vol. 26, 6335-49, 2020.
- [64] C. Robert, "A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy," *Nat Commun*, vol. 11, 3801, 2020.
- [65] J. Majidpoor and K. Mortezaee, "The efficacy of PD-1/PD-L1 blockade in cold cancers and future perspectives," *Clin Immunol*, vol. 226, 108707, 2021.