

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430165

研究課題名(和文) CD4+T細胞を介した抗腫瘍免疫応答に対する可溶性IL-6受容体の影響の解明

研究課題名(英文) The detrimental effect of soluble IL-6 receptor on CD4 T cell-mediated anti-tumor immune responses

研究代表者

栗井 博丈(塚本博丈)(Tsukamoto, Hirotake)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10433020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 担癌個体における免疫機能低下のメカニズムの解明はがんの制圧には必須であるが、未だ不明な点が多い。本研究課題では、担癌個体においてCD4+T細胞の機能分化が抑制される機序について検討した。そして、担癌個体において増加する可溶性IL-6受容体(sIL-6R)が、CD4+T細胞に作用し、腫瘍特異的Th1細胞の分化を抑制することを見出した。さらに、これは、腫瘍特異的CD8+T細胞の誘導を阻害し、結果的に担癌個体では抗腫瘍効果が減弱する、というメカニズムを明らかにした。これらの結果は、担癌個体において、がんに対する免疫療法の感受性低下の是正を目指したアプローチへの基盤的知見を与え得るものである。

研究成果の概要(英文)： It is well known that pro-inflammatory cytokine IL-6 produced by tumor cells promotes their own survival, therefore is a poor prognostic factor in cancer patients. In terms of anti-tumor immune responses, Th1 differentiation of tumor-specific CD4 T cells is attenuated in tumor-bearing animals in an IL-6-dependent fashion. In this study, we investigated the immune-suppressive effects of IL-6 signaling by focusing on IL-6 trans-signaling mediated through a soluble form of IL-6 receptor (sIL-6R). We found that accompanied by the systemic increase of sIL-6R in cancer patients, blunted activity of sIL-6R restored the Th1 responses, their helper activity toward CD8 T cells, and anti-tumor activity in tumor-bearing mice. Our findings suggest the implication of the increase in IL-6 signaling as an adverse event counteracting tumor-specific Th1 generation, and that sIL-6R is considered for a rational target to improve the effectiveness of T cell-mediated cancer immunotherapy.

研究分野：免疫学

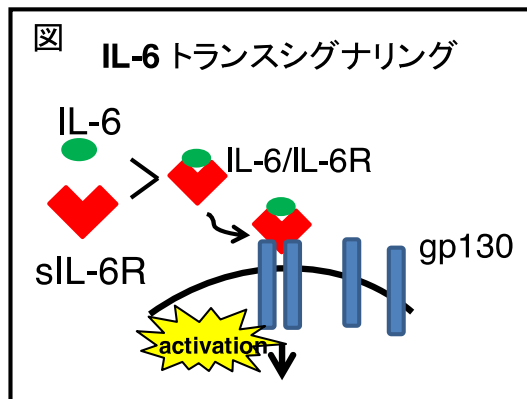
キーワード：抗腫瘍免疫応答 炎症 T細胞 IL-6 免疫抑制 がん免疫療法 sIL-6R

1. 研究開始当初の背景

がん細胞を攻撃する T 細胞を活性化して、がん排除を促す免疫療法は、今後さらなる開発により、効果が期待される治療法である。近年の研究より、がん細胞を直接傷害する CD8⁺T 細胞に加え、様々な免疫担当細胞の活性化を促進する CD4⁺T 細胞も腫瘍拒絶に重要な役割を担うことが示唆されている。CD4⁺T 細胞が抗腫瘍効果を発揮するには、がん細胞に発現する抗原を認識して活性化し、腫瘍拒絶に必須なサイトカインである IFN- γ を産生するエフェクター Th1 細胞へ分化する必要がある。しかし、担癌個体では、腫瘍抗原特異的 CD4⁺T 細胞の機能不全、特に Th1 細胞の分化阻害が観察される。その結果、効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導が妨げられる。そのため、Th1 細胞の分化抑制の改善は、がんに対する免疫療法の効果を増強する方法の一つと考えられる。

炎症性サイトカインである IL-6 は担癌個体で増加することが知られており、がんの予後不良因子としても注目されている。我々はこれまで、IL-6 が CD4⁺T 細胞に作用し、Th1 細胞への分化を抑制することにより CD4⁺T 細胞の抗腫瘍効果を減弱させることを明らかにしてきた。

IL-6 シグナルの伝達方法として、膜結合型受容体を介した形式に加え、可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) と IL-6、さらにシグナル伝達を司る gp130 が細胞表面で会合し、細胞内へシグナルが伝えられる形式 (IL-6 トランスシグナリング) が注目されている (図)。これらことから、申請者は、IL-6 シグナルを増幅する sIL-6R が、IL-6 とともに腫瘍特異的 T 細胞に作用し、担がん個体において観察される Th1 細胞の分化抑制に寄与すると仮説を立てた。



2. 研究の目的

担がん個体における IL-6/IL-6 受容体を介した免疫抑制機構は、CD4⁺T 細胞を介したがん免疫療法の効果向上を考える上で重要な標的となると考えられた。そこで、本研究課題では **がん生体内での sIL-6R 産生細胞の同定と CD4⁺T 細胞を介した抗腫瘍効果に対する sIL-6R の影響、を明らかにすること** を目的とした。この解析を通じて、IL-6/sIL-6R を介した免疫抑制機構が、CD4⁺T 細胞によるがん免疫療法の効果向上を目指す上で有望な標的であるという可能性について検証した。

3. 研究の方法

担癌生体内において全身性の sIL-6R の増加に寄与する sIL-6R 産生細胞は不明であった。そこで、担癌マウス由来の様々な細胞における sIL-6R の産生能を *ex vivo* で検討したところ、がん細胞、CD4⁺T 細胞、CD11b⁺ミエロイド系細胞において、sIL-6R の産生が顕著にみられた。これらの細胞が *in vivo* での sIL-6R の増加に寄与するか否か、を検証するため、各々の細胞について sIL-6R を産生しないがん細胞、あるいは担癌マウスを以下の方法により構築し、対照担癌マウス群と比較することにより、それぞれの細胞が、どの程度全身性の sIL-6R の増加に寄与するか、を検討した。

I) 膜型 IL-6R を切断し、sIL-6R を遊離させる酵素である ADAM17/10 を RNA 干渉法により発現低下させ、sIL-6R を産生しないがん細胞を作製した。このがん細胞を移植することにより、がん細胞から sIL-6R が産生されない担癌マウスを作製した。

II) IL-6R 遺伝子が Cre リコンビナーゼの発現依存的に欠失する IL-6R^{f1/f1} マウスと CAG プロモーター制御下で Cre を発現するマウスを交配することにより、全身性に IL-6R 欠損マウスを得た。さらに、このマウスと、モデル腫瘍抗原として用いる卵白アルブミン (OVA) を特異的に認識する抗原受容体 (T cell receptor: TCR) トランスジェニックマウスを交配させることにより、sIL-6R を産生しない O T-IITCR トランスジェニックマウスを作製した。このマウスより得られる OVA 特異的 CD4⁺T 細胞を、担がんマウスへ移入して、移入した腫瘍特異的 T 細胞は sIL-6R を産生しない担癌マウスを作製した。

III) IL-6R^{fl/fl} マウスと、CD11b⁺ミエロイド系細胞に特異的に発現する LysM プロモーター制御下で Cre を発現するマウスを交配させ、ミエロイド系細胞特異的 IL-6R 欠損マウスを得た。これらのマウスへがん細胞を移植し、担癌マウスを作製した。

以上の担癌マウスの血中 sIL-6R レベルを、対照群と比較検討することにより、担癌個体における sIL-6R の産生細胞の同定を試みた。

さらに、申請者は、がん細胞株 MCA205 にモデル腫瘍抗原として OVA を発現するがん細胞を移植した担癌マウスに、OVA を認識する TCR トランスジェニックマウス由来 CD4⁺T 細胞である OT-II 細胞を移入した際に、その Th1 細胞分化が抑制されること、さらに、この担癌マウスに抗 IL-6 抗体を投与することにより、移入したドナー OT-II 細胞の Th1 分化抑制が解除されることを観察し、担癌個体内で腫瘍特異的 Th1 細胞の分化を検討するための実験系を確立している (*Cancer Immunol. Res.*, 2013)。この実験系を利用して、作製した I) sIL-6R を産生しないがん細胞を移植した担癌マウス、II) CD4⁺T 細胞特異的、また III) CD11b⁺ミエロイド系細胞特異的 IL-6R 欠損担癌マウスにおいて、腫瘍特異的 CD4⁺T 細胞の Th1 細胞への分化抑制について検討した。さらに、上記細胞特異的 IL-6R 欠損担がんマウスを用いて、当該細胞由来 sIL-6R が、腫瘍特異的 CD4⁺T 細胞の抗腫瘍(腫瘍進展抑制)効果に与える影響についても検証した。

本研究課題では更に、担癌個体における、IL-6 による Th1 細胞分化抑制の分子メカニズムについて、特にエフェクター T 細胞の分化を規定するマスター転写因子に着目して検討した。我々は、分化に必須な転写因子である T-bet の発現が IL-6/sIL-6R 複合体刺激により抑制されずに発現すること、また Th1 細胞の分化に拮抗する Th2 細胞の分化に重要とされる転写因子 c-Maf が IL-6/sIL-6R 複合体刺激により強く誘導される一方、Th2 分化を規定するマスター転写因子である GATA-3 は誘導されないことを見出した。

そこで、IL-6/sIL-6R 複合体刺激により誘導される“IFN- γ を産生しない T-bet⁺CD4⁺T 細胞”における c-Maf の IFN- γ の産生機構に対する機能を、以下の方法により詳細に解析した。

) RNA 干渉法により、IL-6R の下流分子で

ある STAT3 を発現低下させた CD4⁺T 細胞を作製し、IL-6 存在下での c-Maf の発現および、Th1 分化能について *in vitro* にて検討した。

) c-Maf 変異マウス由来 CD4⁺T 細胞を用いて、IL-6/sIL-6R が増加する担癌個体内での Th1 分化能を検討した。さらに、その抗腫瘍効果を検討した。

) 腫瘍のない野生型マウスを免疫して得られる Th1 細胞 (T-bet⁺c-Maf⁺CD4⁺T 細胞)、担癌個体で免疫されて得られる Th1 抑制細胞 (GATA-3⁺c-Maf⁺CD4⁺T 細胞) さらに IL-6 に対する中和抗体を投与した担癌マウス内で誘導される CD4⁺T 細胞 (c-Maf⁺GATA-3⁻) の遺伝子発現をマイクロアレイにて検討し、CD4⁺T 細胞の抗腫瘍効果を調節する因子を探索した。

4. 研究成果

「研究の方法」I)-III) で作製した担癌マウスの解析より、がん細胞、および T 細胞で sIL-6R を産生しない担癌マウスにおいて、sIL-6R の血中濃度上昇は顕著に抑制されなかった一方、ミエロイド系細胞が sIL-6R を産生できない担癌マウスでは、sIL-6R の濃度が有意に低下した。このことから、ミエロイド系細胞が担癌個体における sIL-6R の上昇に大きく寄与することが分かった。さらに、ミエロイド系細胞特異的(s)IL-6R 欠損担癌マウスでは、対照野生型担癌マウスで観察される Th1 細胞分化抑制が解除されていた。これに合致して、抗腫瘍免疫応答が著明に増加し、抗腫瘍効果が観察された。以上のことから、担癌個体ではミエロイド系細胞が産生する sIL-6R が、IL-6 と協調して Th1 細胞への分化を抑制し、Th1 細胞への分化を抑制することにより、CD4⁺T 細胞による抗腫瘍免疫応答を減弱させると示唆された。

そして、研究の方法「I)-II)」の解析により、IL-6/sIL-6R のシグナルにより誘導される CD4⁺T 細胞の Th1 分化抑制のメカニズムを検討したところ、IL-6/sIL-6R は、STAT3 依存的に転写因子 c-Maf を誘導し、c-Maf を介した IL-4/IL-21 産生を惹起することがわかった。さらに、これらのサイトカインは Th1 細胞分化を抑制し、抗腫瘍免疫応答の減弱に寄与することが明らかとなった。マイクロアレイの解析結果より、IL-6/sIL-6R 刺激により Th1 分化が抑制されてできた細胞は、

114, 1110, Ccr4を発現するが、Cxcr5, Bcl6を発現しない Th2 細胞様の細胞へと分化している可能性が示唆された。

がん患者の予後不良因子である IL-6/sIL-6R は、がんの進展に伴い増加し、自身の生存因子として腫瘍細胞により産生されると考えられている。そのため、がん細胞の増殖抑制を標的とした臨床試験として、がん患者へのヒト化抗 IL-6 中和抗体 (CNT0328) の投与が行われている。一方、IL-6/sIL-6R 複合体が腫瘍特異的 T 細胞に作用し、抗腫瘍効果に重要な Th1 細胞への分化を抑制する、という申請者の発見により、**担癌個体における IL-6/sIL-6R シグナルの阻害は、T 細胞移入療法や腫瘍抗原ワクチンなどの免疫療法との併用において、その抗腫瘍免疫応答を増強させるという戦略が有効であると考えられた。**本研究成果は、担癌個体での腫瘍特異的 CD4⁺T 細胞による抗腫瘍免疫応答を介した治療法の開発に資すると考えられる。さらに、がんに対する T 細胞を介した免疫療法と IL-6 シグナルの阻害とを併用する上で、上記のように臨床試験が進む CNT0328 や、関節リウマチの治療薬として既に使用が認められているヒト化抗 IL-6R 中和抗体 (tocilizumab) が汎用可能であることから、将来的にこのようなアプローチが早期に臨床応用へつながることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Tsukamoto H.*, Fujieda K., Hirayama M., Ikeda T., Yuno A., Matsumura K., Fukuma D, Araki K., Hiroshi M., Nakayama H., Senju S. and Nishimura Y. Soluble IL-6R expressed by myeloid cells Th1 differentiation and drives tumor progression. *Cancer Res.* In press, 2017. (*corresponding author) 査読あり
2. Kouwaki T., Okamoto M., Tsukamoto H., Fukushima Y. and Oshiumi H. Extracellular vesicles deliver host and virus RNA and regulate innate immune response. *Int J Mol Sci.* 18 doi: 10.3390/ijms18030666, 2017. 査読あり
3. Hirayama M., Tomita Y., Yuno A., Tsukamoto H., Senju S., Imamura Y.,

Sayem M., Irie A., Yoshitake Y., Fukuma D., Shinohara M., Hamada A., Jono H., Yuba E., Kono K., Yoshida K., Tsunoda T., Nakayama H., and Nishimura Y. An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *Oncoimmunology* 5: e1123368, 2016. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. 塚本博丈
「加齢に伴う CD4 陽性 T 細胞の機能不全と、それに伴う抗腫瘍免疫応答の低下」
”SASP factor IL-6-mediated dysfunction of CD4 T cells diminishes anti-tumor immunity in old age” シンポジウム “がんの進展制御における老化の役割” 第 47 回 日本分子生物学会、2016 年 11 月 8 日、横浜 (招待講演)
2. 塚本博丈
「CD4 陽性 T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答における IL-6/sIL-6R の免疫抑制因子としての役割」
”Immune-suppressive role of IL-6/sIL-6R signaling in CD4 T cell-mediated anti-tumor immunity” シンポジウム “がん免疫の新たな展開” 第 48 回 日本癌学会、2016 年 10 月 8 日、横浜 (招待講演)

[図書](計 2 件)

1. 塚本博丈 「免疫老化とがん免疫」 アンチ・エイジング医学, メディカルレビュー社 In press 2017.
2. 塚本博丈 「IL-6 と老年における免疫応答の低下」 **臨床免疫・アレルギー科**, 科学評論社 65: 316-322, 2016.

[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:

<https://www.immunology-kumamoto.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟井博丈 (塚本博丈) (Tsukamoto, Hirotake)
熊本大学・生命科学研究部・助教
研究者番号：10433020

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

藤枝浩司 (Fujieda, Koji)
熊本大学・生命科学研究部・リサーチアシスタント
研究者番号：なし

池田徳典 (Ikeda, Tokunori)
熊本大学・医学部附属病院・病院職員
研究者番号：00613530

中山秀樹 (Nakayama, Hideki)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：70381001

荒木喜美 (Araki, Kimi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授
研究者番号：90211705

千住覚 (Senju, Satoru)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号：50274709

西村泰治 (Nishimura, Yasuharu)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：10156119