

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10526

研究課題名(和文) IL-6による免疫抑制を介した大腸がん肝転移機構の解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for liver metastasis of colon cancer through IL-6-mediated immunosuppression and its application to development of novel cancer therapy

研究代表者

高橋 典彦 (Takahashi, Norihiko)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：30399894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸がん肝転移マウスモデルを作出し、担がん環境から産生されるIL-6の作用効果を検討した結果、IL-6欠損条件下では、肝転移巣の形成が著しく抑制された。またマウス生体より樹状細胞・マクロファージあるいはキラーT細胞を除去したところ、IL-6欠損による肝転移巣の形成抑制効果が解除された。さらに、大腸がん患者臨床検体を使用し、血清IL-6レベルやがん細胞の悪性化に関連する血清microRNAを探索し、IL-6シグナルが腫瘍の悪性度や腫瘍免疫の制御に多面的に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の死亡原因の第一位はがんで、特に大腸がんは年々増加をしており、既存の標準治療に加え、新たな治療の開発が望まれている。生体にはがん免疫監視機構が存在し、がん細胞を特異的に排除する能力が備わっており、その能力を賦活する、がん特異的免疫応答の活性化によるがん免疫治療は、副作用の少ないがん治療法として着目されている。本研究の成果は、IL-6シグナルの下流標的分子ががん特異的免疫応答を強化する可能性を示唆しており、がん免疫治療のさらなる進化と、既存の化学療法との併用等の新展開が期待され、学術的にも社会的にも意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a liver metastasis mouse model and investigated the effect of IL-6 produced from tumor-bearing host on the tumorigenesis in the liver. We found that liver metastasis of colon cancer cells was significantly reduced in IL-6-deficient mice compared to wild-type mice. Depletion of dendritic cells and macrophages or killer T cells from the liver metastasis model mice cancelled the reduction of liver metastasis under IL-6-deficient condition. We identified IL-6-related microRNA by using serum of colorectal cancer patients and confirmed that liver metastasis and serum IL-6 levels of immunodeficient mice were augmented by the IL-6-related microRNA-overexpressing human colon cancer cells compared to the mock control cells. Based on these findings we speculate that blockade of IL-6 signaling may be a promising strategy in the development of effective cancer immunotherapy for cancer patients.

研究分野：大腸癌、腫瘍免疫、消化器外科

キーワード：大腸がん 肝転移 IL-6 樹状細胞 キラーT細胞 microRNA がん免疫治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死亡原因の第一位はがんで、特に大腸がんの発生、罹患率は年々増加をしており、既存の標準治療に加え、新たながん治療の開発が望まれている。生体には免疫システムによるがん免疫監視機構が存在し、常にがん細胞を特異的に排除する能力が備わっている。従って、がん特異的免疫応答の活性化によるがん免疫治療は、副作用の少ないがん治療法として着目されており、非常に多くの基盤的研究や臨床研究が実施されている。

最近、腫瘍を攻撃する T 細胞の機能不全状態を解除するための抗 PD1 抗体、抗 CTLA-4 抗体などのヒト化・ヒト型抗体医薬が開発され、これまでに非常に良い治療効果が報告されているが、全てのがん患者を救済するまでには至っていない。このことから、がん患者生体内には、抗腫瘍免疫システムが上手く作動しない複数の作用メカニズムが存在していることが考えられる。

これまでに、血清 IL-6 レベルが高値であると大腸がんの予後が悪いこと、進行がん患者に対するゲムシタピンの治療効果が悪いこと、がんペプチドワクチン治療の予後が悪いことが報告されている。本申請者らは、担がん環境下で IL-6 や IL-11 が産生され、ミエロイド系免疫抑制性細胞群の分化・増殖が亢進されることや、IL-6 が STAT3 の活性化を介して樹状細胞のサイトカイン産生や抗原提示能を抑制し、抗原特異的 T 細胞の誘導・活性化が阻害されることを証明した。

また最新の研究でマウス大腸がん細胞株 CT26 を皮内に投与する大腸がんマウスモデルを構築し、担がん環境下で産生される IL-6 の腫瘍形成への影響を検討した結果、野生型マウスに比べ IL-6 欠損マウスにおいて、腫瘍形成が著しく抑制されることを見出した。さらに申請者らは、これまでに大腸がん患者臨床検体を解析し、腫瘍組織に浸潤している CD11b 陽性 CD11c 陽性免疫細胞が IL-6 を産生していること、この腫瘍浸潤細胞は、T 細胞の活性化を抑制する働きを持つ MDSC であることを確認した。これらの実験結果から、担がん環境下で宿主より産生される IL-6 が、宿主免疫応答を抑制し、大腸がんの形成に寄与していることを示唆している。従って、腫瘍内における IL-6 シグナルの遮断は、大腸がん肝転移の制御において、有用なツールの一つとして有望と考えた。

microRNA は細胞のゲノムから転写される短鎖 RNA で標的遺伝子群の発現調節を行なうことが知られている。最近、血清中にも安定的に存在し、大腸がんの悪性度、生命予後を予測できる有望なバイオマーカーと成り得ることが報告されている。そこで本申請者らは、これまでに担がん環境下において血清 IL-6 と関連する新規 microRNA の探索を行い、その機能を解析した結果、ヒト大腸がん細胞株の分化・増殖と関連する機能性 microRNA を見出した。従って、これまでに得られた IL-6 関連 microRNA は、がん患者個々の腫瘍の悪性度や担がん状態を予測するバイオマーカーとして有用なだけでなく、がん細胞の増殖を制御する作用をもつ可能性があると考えられた。

そこで、本研究において、担がん環境下で産生される IL-6 による免疫抑制状態と肝転移に関する詳細な作用メカニズムとその制御因子を明らかにすることで、大腸がん・肝転移を対象とした、より精度・効果の高いがん治療システムの確立に貢献する新しい科学的エビデンスが得られると考えた。

2. 研究の目的

近年医学の進歩により、がん患者の生命予後は著しく向上したが、がんは依然として日本人の死亡原因の第一位であり、特に大腸がんは年々増加し続けているため、既存の標準治療に加えて、新たながん治療法の確立は重要である。

そこで本研究では、担がん環境下で産生される IL-6 に着目し、大腸がんの肝転移メカニズムにおける宿主免疫システムへの作用・効果を明らかにすることを目指した。また大腸がん肝転移モデルマウスを使用し、宿主免疫と関連した IL-6 関連肝転移制御因子を同定し、転移をコントロールする新たな分子標的薬としての有用性を証明し、さらに、がん患者個々の免疫状態と大腸がんの悪性化、転移の発生との関連性について、大腸がん患者臨床検体を使用して検証し、最終的に、大腸がん・肝転移領域における、宿主免疫の制御による画期的ながん治療法の確立に繋ぐ、科学的エビデンスを得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず野生型 BALB/c マウスおよび同系の IL-6 欠損マウスを使用し、それぞれのマウスに蛍光タンパク遺伝子を導入した CT26 マウス大腸がん細胞株を脾臓内投与し、生存率、in vivo イメージングによる腫瘍の計測、組織染色を行ない、肝転移能を評価した。

また、各種免疫染色および肝臓の組織からリンパ球を回収し、各種免疫担当細胞の解析をフローサイトメトリーにて実施し、肝転移における IL-6 を基軸とした免疫状態について検証した。

次に、本モデルマウスにおける免疫抑制と肝転移の制御メカニズムについて、抗 IL-6R 抗体に加え、IL-12、IFN- γ 、TNF- α などに対する中和抗体を投与し、肝転移に関連するエフェクターサイトカインを同定した。さらに肝臓から CD11c 陽性樹状細胞、CD11b 陽性マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞など各種免疫細胞を単離し、再刺激した後に産生されるサイトカインプロファイルを確認するとともに、これらの細胞を除去する試薬・抗体を投与して肝転移との関係性を明らかにした。

さらに、ヒト健常人末梢血および大腸がん患者臨床検体を使用して、IL-6 依存的な免疫抑制

作用と肝転移制御因子の探索と同定を試みた。また IL-6 あるいは前述の解析で同定されたエフェクターサイトカインで処理した免疫担当細胞あるいはがん細胞株について、microRNA と mRNA の統合解析を実施し、その結果得られた microRNA を、申請者がすでに得ている血清 IL-6 レベルと関連した候補 microRNA と比較検討した。また、有望な microRNA について、公開されているデータベースを活用して標的遺伝子を検索するとともに、候補標的分子について、模倣分子および阻害剤を添加した培養系にて、抗腫瘍効果や免疫抑制効果を確認した。

これまでに得られた IL-6 と関連する肝転移制御因子について、大腸がん患者の末梢血、原発腫瘍組織および肝転移検体サンプルを使用し、EIA/ELISA、フローサイトメトリー、免疫染色によりその発現レベルを確認し、それらの発現の程度が大腸がんの悪性度、肝転移の有無、量と関連するかどうか検証した。さらに患者背景と免疫状態ともリンクし、簡便に被験者の免疫状態と肝転移の状況を検索することのできる免疫データベースを構築するとともに、可能な限り、被験者の肝転移の状態を追跡調査した。

次に、特に有望な候補 microRNA あるいはその標的分子について、模倣分子あるいは阻害剤を準備し、大腸がん肝転移を制御する分子標的薬としての有効性を検証した。IL-6 関連 microRNA を発現するヒト大腸がん細胞株(HCT116)を免疫不全マウスに脾臓内移植し、ヒト化肝転移モデルにおいても IL-6 シグナル関連因子の制御により、その転移能が変化するかどうかを確認した。

これらのヒト化担がん・肝転移モデルマウスについて、生存率、IVIS による腫瘍の計測、肝転移巣の HE 染色・免疫染色を行ない、肝転移に及ぼす効果を評価した。ここで、コントロール薬剤として、既存の大腸がんに対する制がん剤を使用して、がん細胞の増殖に及ぼす効果を確認した。これらの検討の結果から、候補制御分子について、大腸がんの肝転移を制御する分子標的薬としての有効性および毒性を確認した。

前述の候補分子の模倣分子・阻害剤について、マウス大腸がん細胞 CT26 を使用した肝転移モデルマウスを使用し、宿主免疫が存在するモデル系でも、肝転移の制御剤としての有効性を確認する。有効性が認められた分子について、肝臓および全身の免疫状態を免疫担当細胞についてフローサイトメトリーによる解析や免疫応答性について、各種サイトカインの産生レベルを ELISA にて検証し、宿主免疫の制御により肝転移が阻害されたか否かについて確認した。

以上の結果を総合的に分析し、ヒト臨床応用に向けて最適化した治療プロトコルを勧告し、実際の大腸がん患者において、IL-6 のシグナル遮断とその関連因子の制御が、新たな大腸がん・肝転移治療法開発への応用を考察した。

4 . 研究成果

本研究において、マウス大腸がん CT26 細胞株をマウスの脾臓内に投与する大腸がん肝転移モデルを作出し、担がん環境から産生される IL-6 の作用効果を検討した結果、宿主 IL-6 欠損条件下では、肝転移巣の形成が著しく抑制され、生存率も延長することを確認した。

また、本モデルマウスの肝転移巣において、IL-6 欠損下では、成熟型の樹状細胞やエフェクターメモリータイプのキラーT 細胞の浸潤が認められた。マウス生体より樹状細胞・マクロファージあるいはキラーT 細胞を除去したところ、IL-6 欠損による肝転移巣の形成抑制効果が解除された。肝転移巣に浸潤している樹状細胞について、IL-6 欠損条件下では IFN- γ や IL-12 の発現亢進が確認された。また CD8 陽性 T 細胞について、細胞傷害性分子の発現レベルが IL-6 欠損条件下において高いことを確認した。IL-6 欠損下において抗 PD-L1 抗体を投与すると大腸がん肝転移巣形成が効率よく抑制されること、生存率がさらに延長することを確認した。

大腸がん患者臨床検体を使用し、腫瘍組織の IL-6 の発現レベルと生命予後を検討した結果、IL-6 を高発現する患者は予後不良であることを確認した。さらに血清 IL-6 レベルやがん細胞の悪性化に関連する血清 microRNA を見出すとともに、当該 microRNA を高発現するヒト大腸がん細胞株を作出し、ヒト化大腸がん肝転移モデルを作出した結果、マウス血清中の IL-6 レベルの上昇と肝転移巣の形成促進が認められた。

以上の結果から、今後 IL-6 シグナル下流標的分子の同定とマウス肝転移モデルでの治療効果の検証、さらに大腸がん患者における標的分子と病態との関連を精査することで、より有効ながん免疫治療の開発に資する有望な成果・エビデンスが蓄積できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

北村 秀光、項 慧慧、がん微小環境下における効果的な Th1 型免疫の導入によるがん免疫治療法の確立、*BIO Clinica*、査読無、33、2018、97-100

DOI : なし

項 慧慧、北村 秀光、担がん生体における Th1 免疫の制御による効果的ながん免疫治療、*BIO Clinica*、査読無、33、2018、67-70

DOI : なし

Ohno Yosuke, Toyoshima Yujiro, Yurino Hideaki, Monma Norikazu, Xiang Huihui, Sumida Kentaro, Kaneumi Shun, Terada Satoshi, Hashimoto Shinichi, Ikeo Kazuho, Homma Shigenori, Kawamura Hideki, Takahashi Norihiko, Taketomi Akinobu, Kitamura Hidemitsu,

Lack of IL-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy、Cancer Science、査読有、108、2017、1959-1966
DOI : 10.1111/cas.13330.

Kitamura Hidemitsu, Ohno Yosuke, Toyoshima Yujiro, Ohtake Junya, Homma Shigenori, Kawamura Hideki, Takahashi Norihiko, Taketomi Akinobu、IL-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy、Cancer Science、査読有、108、2017、1947-1952

DOI : 10.1111/cas.13332.

北村 秀光、血清マイクロ RNA による免疫体質判定法の確立とコンパニオン診断薬への応用、化学工業、査読有、67、2016、27-33

DOI : なし

[学会発表](計 19 件)

北村 秀光、大野 陽介、豊島 雄二郎、項 慧慧、橋本 真一、池尾 一穂、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、担がん生体における IL-6 を標的とした抗腫瘍免疫システムの改善と新規がん免疫治療への応用、第 16 回 日本免疫治療学会学術集会(一般演題)2019
Hidemitsu Kitamura, Yosuke Ohno, Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi、IL-6-deficient condition augments anti-tumor effector cells and facilitates the efficacy of cancer immunotherapy、第 47 回 日本免疫学会学術集会(ワークショップ発表) 2018

Yosuke Ohno, Hidemitsu Kitamura, Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Sumida Kentaro, Kaneumi Shun, Kazuho Ikeo, Shinichi Hashimoto, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi、Lack of IL-6 in tumor microenvironment augments type-1 anti-tumor immune responses and facilitates efficacy of cancer Immunotherapy、第 77 回 日本癌学会学術総会(受賞講演)(招待講演) 2018

Hidemitsu Kitamura, Yosuke Ohno, Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi、IL-6 attenuates function of dendritic cells and effector T cells in tumor-bearing host、The 37th Sapporo International Cancer Symposium(国際学会) 2018

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、項 慧慧、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、担がん生体で産生される IL-6 は肝臓における抗腫瘍免疫を抑制し、転移性大腸がん細胞の肝転移巣形成を促進する、第 54 回 日本肝癌研究会(ワークショップ発表) 2018

大野 陽介、北村 秀光、豊島 雄二郎、木井 修平、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、武富 紹信、大腸がんにおける免疫チェックポイント阻害剤の有効症例の拡大を目指した新規がん免疫治療戦略、第 118 回 日本外科学会定期学術集会(一般演題) 2018

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、項 慧慧、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、IL-6 は樹状細胞の機能抑制を介し、大腸がん肝転移を促進する、第 118 回 日本外科学会定期学術集会(一般演題) 2018

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、項 慧慧、寺田 聖、岡田 尚樹、木井 修平、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、IL-6 は樹状細胞を介した抗腫瘍免疫応答を抑制し、大腸がん肝転移を促進する、第 28 回 日本消化器癌発生学会総(一般演題) 2017

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、項 慧慧、寺田 聖、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、IL-6 は担がん環境下において樹状細胞の機能抑制を介し、大腸がん肝転移を増悪させる、第 72 回 日本大腸肛門病学会学術集会(一般演題) 2017

Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Naoki Okada, Shuhei Kii, Yosuke Ohno, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura、IL-6 suppresses dendritic cell-mediated antitumor immunity and promotes liver metastasis of colorectal cancer cells、第 76 回 日本癌学会学術総会(一般演題) 2017

Hidemitsu Kitamura, Yosuke Ohno, Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi、IL-6 attenuates function of dendritic cells and effector T cells in tumor-bearing host、The 36th Sapporo International Cancer Symposium(国際学会) 2017

Yujiro Toyoshima, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Naoki Okada, Shuhei Kii, Yosuke Ohno, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura、IL-6 suppresses dendritic cell-mediated antitumor immunity and promotes

liver metastasis of colorectal cancer cells、The 36th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会) 2017

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、項 慧慧、寺田 聖、市川 伸樹、吉田 雅、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、IL-6 は担がん環境下においてタイプ I 型抗腫瘍免疫応答を抑制し、大腸がん肝転移を促進する、第 117 回 日本外科学会定期学術集会 (一般演題) 2017

Yujiro Toyoshima, Naoki Okada, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Shuhei Kii, Yosuke Ohno, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura、IL-6 causes dysfunction of antitumor immunity and promotes tumorigenesis in a liver metastasis model using colorectal cancer cells、第 45 回 日本免疫学会学術総会・学術集会 (一般演題) 2016

Yujiro Toyoshima, Yosuke Ohno, Huihui Xiang, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura、IL-6 suppresses Type-1 immune responses in tumor microenvironment and promotes liver metastasis of colon cancer、第 75 回 日本癌学会学術総会 (一般演題) 2016

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、寺田 聖、項 慧慧、市川 伸樹、吉田 雅、本間重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、IL-6 による免疫抑制メカニズムの解明と新規大腸がん肝転移治療への応用、第 27 回 日本消化器癌発生学会総会 2016 年 09 月 15 日～2016 年 09 月 16 日 城山観光ホテル (シンポジウム発表) 2016

豊島 雄二郎、大野 陽介、大竹 淳矢、寺田 聖、項 慧慧、岡田 尚樹、木井 修平、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、北村 秀光、IL-6 と関連したマイクロ RNA の新規機能と担がん生体におけるバイオマーカーとしての有用性、第 8 回 血液疾患免疫療法学会 (一般演題) 2016

豊島 雄二郎、大野 陽介、項 慧慧、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、北村 秀光、IL-6 による免疫抑制メカニズムの解明と新規大腸がん肝転移治療への応用 (一般演題) 2016

豊島 雄二郎、北村 秀光、大野 陽介、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、担がん環境下で産生される IL-6 を標的とした新規大腸がん免疫治療の構築、第 116 回 日本外科学会定期学術集会 (一般演題) 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：武富 紹信

ローマ字氏名：TAKETOMI, Akinobu

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：70363364

研究分担者氏名：川村 秀樹

ローマ字氏名：KAWAMURA, Hideki

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：70645960

研究分担者氏名：本間 重紀

ローマ字氏名：HOMMA, Shigenori

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：講師

研究者番号（8桁）：30533674

研究分担者氏名：吉田 雅

ローマ字氏名：YOSHIDA, Tadashi

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：70772333

研究分担者氏名：北村 秀光

ローマ字氏名：KITAMURA, Hidemitsu

所属研究機関名：北海道大学

部局名：遺伝子病制御研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40360531

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。