

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：31308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07153

研究課題名(和文) IL-21のがん微小環境改善による抗腫瘍効果の増強

研究課題名(英文) Enhancement of antitumor effect of IL-21 by improving cancer microenvironment

研究代表者

奈良 英利 (Nara, Hidetoshi)

石巻専修大学・理工学部・准教授

研究者番号：00375338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IL-21による悪性黒色腫の治療の臨床試験が行われているが、これまで際立った効果は得られていない。IL-21は腫瘍内で樹状細胞の活性化を抑制し、リンパ球の活性化を抑えているのではないかと考え、本研究を実施した。骨髄由来樹状細胞は、5段階に分化することを新たに見出し、IL-21は成熟した樹状細胞への分化をその3段階目で停止させることを突き止めた。この時に発現する遺伝子のパターンを網羅的に解析し、現在、その働きについて検討している。また、マウスを用いた実験では、IL-21の過剰発現により、樹状細胞の抑制による免疫反応の減弱を観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんを取り巻く微小な環境では、様々な要因により抗がん剤の影響が阻まれ、十分な効果を発揮できないことがある。IL-21は様々な白血球の活性化を誘導するので、抗腫瘍効果を期待されているが、際立った抗腫瘍効果は得られていない。IL-21は白血球の中で、抗原提示というリンパ球の活性化を担う樹状細胞の活性を抑制することが知られている。よって、その機構を解明することで、新たな治療薬の開発につながるのではないかと考えた。IL-21により、樹状細胞ではいくつかの遺伝子の発現パターンが異なることを見出し、これらを標的とする可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clinical trials of the treatment of malignant melanoma with IL-21 have been conducted, but to date no significant effect has been obtained. The present study was carried out on the basis that IL-21 may suppress activation of dendritic cells in tumor microenvironment and suppress activation of lymphocytes. Bone marrow-derived dendritic cells were newly found to be differentiated into five stages, and it was found that IL-21 arrests differentiation into mature dendritic cells at the third stage. We have comprehensively analyzed the patterns of genes expressed at this time, and are currently examining its function. In addition, in experiments using mice, it was possible to observe a decrease in immune response due to suppression of dendritic cells due to overexpression of IL-21.

研究分野：免疫学

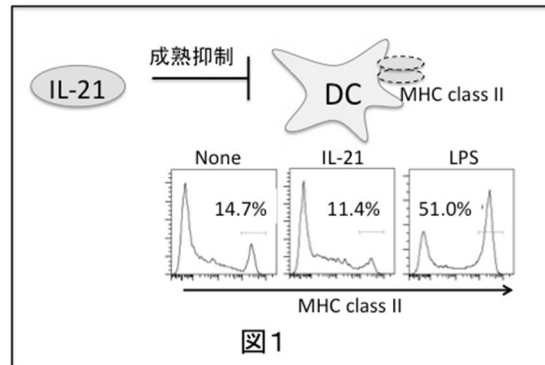
キーワード：インターロイキン21 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(Interleukin21)IL-21は活性化CD4T細胞が産生し、種々の免疫細胞を活性化する。特に、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T cell, CTL)の働きを亢進することから、抗腫瘍効果が期待されており、現に、幾つかの腫瘍では、すでに臨床試験が行われている(1)。しかしながら、今現在期待通りの成果が得られていないことから、さらなる研究が必要であると考えられている。

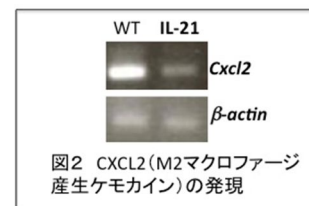
我々はこれまでの研究からIL-21による抗腫瘍効果が十分に得られない原因として、樹状細胞の成熟抑制に原因があると考えた。図1で示すように、骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell, BM-DC)において、成熟マーカーの一つであるMHC class IIの発現がIL-21の存在下で減弱することを明らかにした(申請者、未発表データ)。



腫瘍環境において未熟DCは、T細胞から免疫抑制サイトカインであるIL-10の産生を増強させること(2)、さらに、未熟DCは制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)を誘導し、抗腫瘍効果を抑制することが報告されている(3)。これらのことから、IL-21は腫瘍外ではCTLを活性化させ、抗腫瘍効果を増強させるが、がん微小環境(tumor microenvironment, TME)では、IL-21の作用を受けた未熟DCにより、Tregなどの免疫抑制細胞が誘導され、期待通りの抗腫瘍効果が得られていないと考えられる。

## 2. IL-21による腫瘍環境の改善

優れた抗腫瘍効果を得るためには、TMEの改善が重要となるが、TMEに浸潤している腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophage, TAM)は、主に腫瘍の増殖、生存に寄与するM2型マクロファージが多いことが知られている。M2型は、線維芽細胞からのコラーゲンの産生を増強させ、CTLと抗がん剤のTMEへの侵入を阻む。現に、近年、多くの腫瘍に非常に優れた効果を示す抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体などの免疫チェックポイント阻害薬でさえ、コラーゲンの蓄積やTAMの浸潤などが見られる一部の腫瘍では、TMEを改善しないとその効果は期待できないと報告されている(4)。一方、申請者らは、IL-21がM2型への分化を抑制し、抗腫瘍型のM1マクロファージへ誘導できる可能性を示しており(図2、2016, International Congress of Immunology発表、論文投稿準備中)、TMEの改善を行うことができると考えている。



これらのことから、樹状細胞の成熟抑制という問題点をクリアできれば、IL-21は優れた抗腫瘍効果を発揮できると期待する。

## 2. 研究の目的

黒色腫などの腫瘍に対して、IL-21を用いた臨床試験が行われているが、未だ十分な成果があげられていない。我々はその原因として、腫瘍環境が原因ではないかと考えている。我々はこれまでに、IL-21が獲得免疫に必要な樹状細胞の成熟を抑制することを明らかにしている。つまり、IL-21が未熟樹状細胞を腫瘍組織内で誘導し、抗腫瘍活性を減弱させているのではないかという仮説を立てた。一方、IL-21はマクロファージを抗腫瘍型のM1型へ誘導し、さらに、CTLの活性化を促進する。つまり、樹状細胞の活性化抑制機構を解明し、そこを標的とすれば、IL-21による優れた

抗腫瘍効果が得られると考えている。本研究は IL-21 による新たな癌治療法の開発につながるものである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 骨髄由来樹状細胞の準備

C57BL/6 マウス (6-12 週齢) の大腿骨を採取、リン酸緩衝液 (PBS) による骨髄への注射器によるフラッシングより、骨髄を得た。骨髄は PBS で洗浄後、十分にピペットでほぐし、赤血球の除去処理を行った。単離された骨髄由来細胞は、バクテリア培養用ディッシュにて、GM-CSF (10 ng/mL) を含む 10% FCS/RPMI1640 培地で培養を行った。2, 3 日おきに培養液を交換し、7 日後に非接着細胞を樹状細胞として用いた。その際に一部の細胞培養液中に IL-21 (10 ng/mL) を添加した。

#### 2) フローサイトメトリー

細胞の解析は FACS Canto II を用い、細胞画分の分取には FACS Aria を用いた。各種抗体は全て BioLegend 製品を用い、解析には FlowJo(Tree Star) を使用した。

#### 3) マイクロアレイ解析

FACS Aria で分取した細胞画分は、PBS による遠心洗浄後、Trizol Reagent (Invitrogen) を用い、定法に従い、RNA を抽出した。RNA は東レ株式会社に受託し、メッセンジャーRNA 研究用 DNA チップ解析に供した。

#### 4) 定量 PCR 法

マイクロアレイ解析の確認のための定量 PCR は、MJ Research 社の DNA Engine Opticon2 を用いて解析を行った。定量 PCR のためのサンプルは、培養開始 (Day 0) 3 日目、7 日目に回収し、Trizol Reagent により RNA 抽出を行った。逆転写には Toyobo 社の ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用い、定量 PCR には Takara 社の SYBR Green (TB Green Premix Ex Taq II) を使用した。

#### 5) 接触皮膚炎モデルの作成

BALB/c マウス (6-10 週齢) の野生型マウスと BALB/c バックグラウンドの IL-21 過剰発現マウス (IL-21<sup>iso-Tg</sup>) を使用した。マウスは腹部を剃毛し、0.5% FITC を 100  $\mu$ L 塗布を 2 日間行い、5 日後に耳介に 20  $\mu$ L の 0.5% FITC 液を塗布した。24 時間後に、耳介の厚さを測定し、炎症度合いを比較するとともに、炎症領域 (耳介) と所属リンパ節の樹状細胞の動向をフローサイトメトリーで観察した。

### 4. 研究成果

#### 1) 骨髄由来樹状細胞の新たな分化区分

骨髄細胞を granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の存在下で、培養を行なうと、樹状細胞へ分化させることができる。過去の報告では、樹状細胞への分化誘導後、活性化因子である lipopolysaccharide (LPS) による刺激により、MHC class II や共刺激分子である CD80、CD86 分子の細胞表面への表出が誘導され抗原提示能が増強される、いわゆる樹状細胞の成熟が起きるが、この時に IL-21 が存在すると、これらの細胞表面分子の表出が抑制される。我々は IL-21 が骨髄細胞から樹状細胞への分化誘導過程において、分化自体も抑制することを明らかにした (図 3)。CD80 と PD-L1 をパラメータとし、7 日間、GM-CSF で樹状細胞へ分化誘導した骨髄細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、GM-CSF 単独区では、5 つの集団に分かれることがわかった (図 3 a 上)。それぞれの集団において、樹状細胞の分化マーカーである MHC class II の発現を検討したところ、1 ~ 3 番目の集団で発現が観察されず、4 番目の集団で中程度、5 番目の集団で高い発現が見られた (図 3 b 上)。また、樹状細胞の表面マーカーである CD11c の発現を確認したところ、3

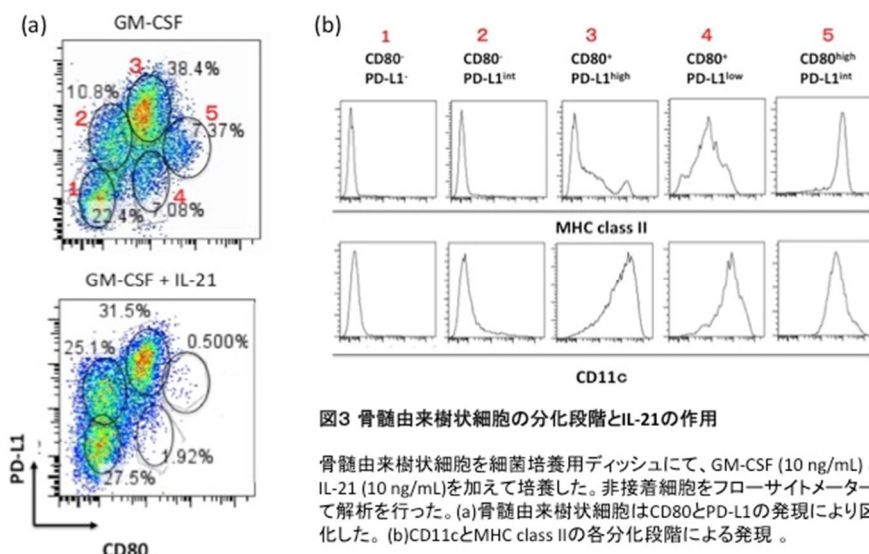


図3 骨髄由来樹状細胞の分化段階とIL-21の作用

骨髄由来樹状細胞を細菌培養用ディッシュにて、GM-CSF (10 ng/mL) と IL-21 (10 ng/mL) を加えて培養した。非接着細胞をフローサイトメーターにて解析を行った。(a)骨髄由来樹状細胞はCD80とPD-L1の発現により区分化した。(b)CD11cとMHC class IIの各分化段階による発現。

番目の集団から発現が確認された(図3b下)。このことから、5番目の集団が最も分化程度が高く、次に4番目、3番目の集団であることが明らかとなった。興味深いことに、IL-21存在下では、4番目、5番目の集団はほとんど現れなかった(図3a下)。

5つの集団の割合を経時的に観察したところ、1~3番目の未分化集団では、IL-21添加による影響は殆ど見られなかった。それに対し、分化誘導5日頃から明らかに分化の進んだ4番目、5番目の集団の割合がIL-21の添加により減少した(図4)。

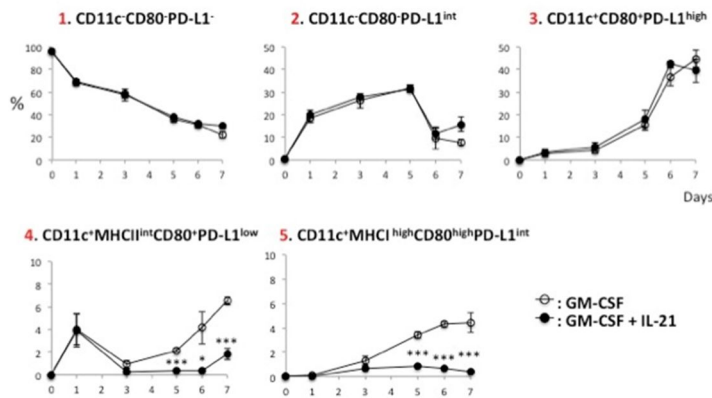


図4 樹状細胞の分化におけるIL-21の作用

それぞれの段階の樹状細胞の割合を示す。白丸はGM-CSF単独添加、黒丸はGM-CSFとIL-21の同時添加。データは平均±SEMで示す(n=4-5 per group)。\*p<0.05, \*\*\*p<0.001。p値は、unpaired Student's t test (GM-CSF only vs. plus IL-21)で計算した。

## 2) マイクロアレイ解析における遺伝子発現

IL-21による樹状細胞の分化抑制機構を調べるために、GM-CSF単独添加区(図3a上)の3番目の

集団とIL-21添加区(図3a下)の3番目の集団の遺伝子発現の相違および、GM-CSF単独添加区の樹状細胞の分化過程でどの様な遺伝子が発現するか、網羅的に解析を行った(図5)。その結果、IL-21の存在により同じ3番目の集団でも発現している

遺伝子が異なることがわかった。IL-21存在下でのみ発現が高くなる遺伝子群が樹状細胞の分化を抑制しており、逆にGM-CSF添加のみで発現が上昇する遺伝子は樹状細胞の分化を促進すると考えられる(図5a)。同様に、GM-CSF刺激のみの場合では、GM

fraction 5にて発現が上昇して

いる分子が樹状細胞の分化促進に関与すると考えられる(図5b)。マイクロアレイ解析の結果は、定量PCR法により確認された(図6)。この中から、*Retnln1*、*Slfn1*そして*stat4*に着目し、現在のこれらの遺伝子の過剰発現およびshRNAを用いた抑制系の構築を行っている。遺伝子改変を行った樹状細胞において、IL-21の影響をヘルパーT細胞の増殖を指標としてこれらの遺伝子群の働きについて明らかにする。このことにより、IL-21が樹状細胞の働きを抑制する機構が明らかになるとと思われる。続いてマウスを用いた生体で解析を行なうことが必要になるとと思われる。

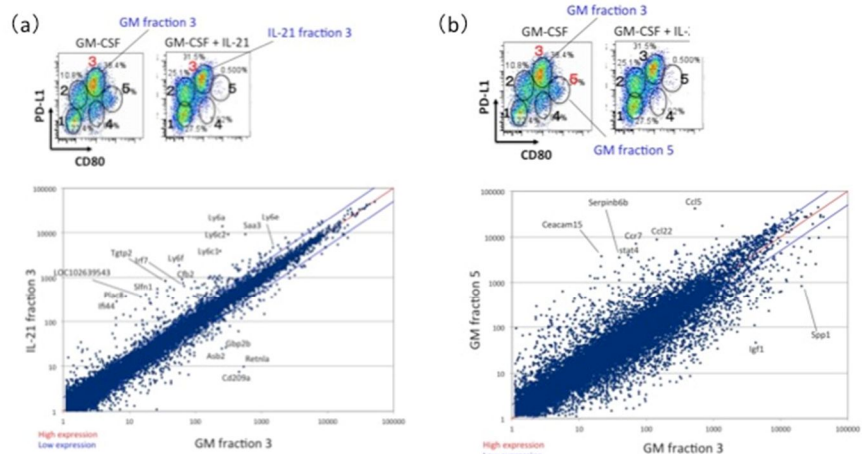


図5 骨髄由来樹状細胞の段階におけるマイクロアレイ解析

(a) GM-CSF単独刺激(GM fraction 3)とIL-21との共刺激(IL-21 fraction 3)を行ったときの3番目の区別のRNA発現の違い。(b) GM-CSF単独刺激の3番目(GM fraction 3)と5番目(GM fraction 5)の区別のRNA発現の違い。

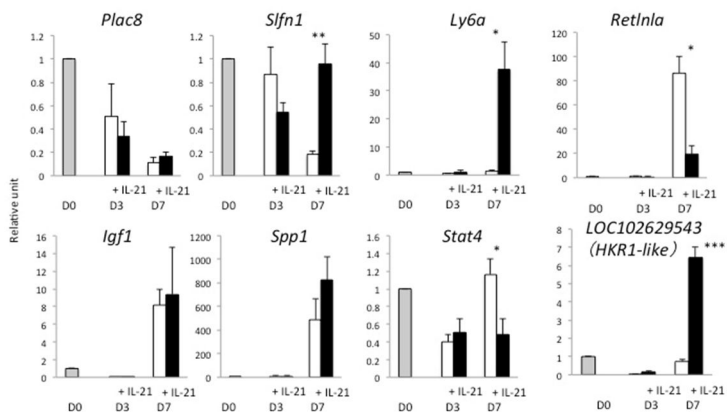


図6 マイクロアレイ解析の結果を定量PCR法で再確認した

骨髄細胞を採取し、GM-CSFを添加し、樹状細胞に分化誘導した。GM-CSFのみで誘導をかけたもの(白抜き棒)、IL-21を添加したもの(黒棒)で表した。細胞はそれぞれ、分化誘導前(D0, Day 0)、3日間培養(D3)、7日間培養(D7)のものを準備した。n=3, 4。データは、平均±SEで表した。検定はIL-21なし vs IL-21添加におけるstudent t-testを行った。\*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001

### 3) IL-21 過剰発現マウスにおける樹状細胞の活性化抑制

申請者は IL-21 の抗腫瘍効果の解析に先んじて、IV 型アレルギーの接触皮膚炎において IL-21 の樹状細胞への影響について IL-21 過剰発現マウス (IL-21 iso-Tg) 解析を行った (図 7)。過去の報告でも IL-21 の樹状細胞への影響については細胞レベルでしか解析されておらず、生体内での解析はこれまでになかった。

IL-21 iso-Tg では、皮膚炎反応は減弱され (図 7a)、炎症領域における樹状細胞数も少なかった (図 7b)。IV 型アレルギーによる皮膚炎が起こるときには、樹状細胞や T 細胞などが集積する樹状細胞 (dendritic cell, DC) クラスターが起こることが知られている (5)。本研究では、DC クラスター数は野生型との差はなかったが (図 7c)、IL-21 iso-Tg において、大型のものが見られた (図 7d)。このことは、IL-21 が過剰発現しているマウスでは、炎症領域で樹状細胞を介した抗原提示が減弱していることを示しており、IL-21 は生体内で樹状細胞の活性化を抑制することができる証拠である。さらに、所属リンパ節での樹状細胞の様子を観察した (図 7e)。常在している樹状細胞 (cDC) はリンパ節内の細胞数に変化はなかったが、IL-21 iso-Tg では、炎症により所属リンパ節への遊走が抑制された (図 7f)。このことは、IL-21 は樹状細胞の活性化のみならず、ケモカインを介した遊走も制御することを示しており、これが活性化抑制による結果生じた現象なのか、ケモカインやその受容体を介した直接的な要因なのかは今後の課題である。

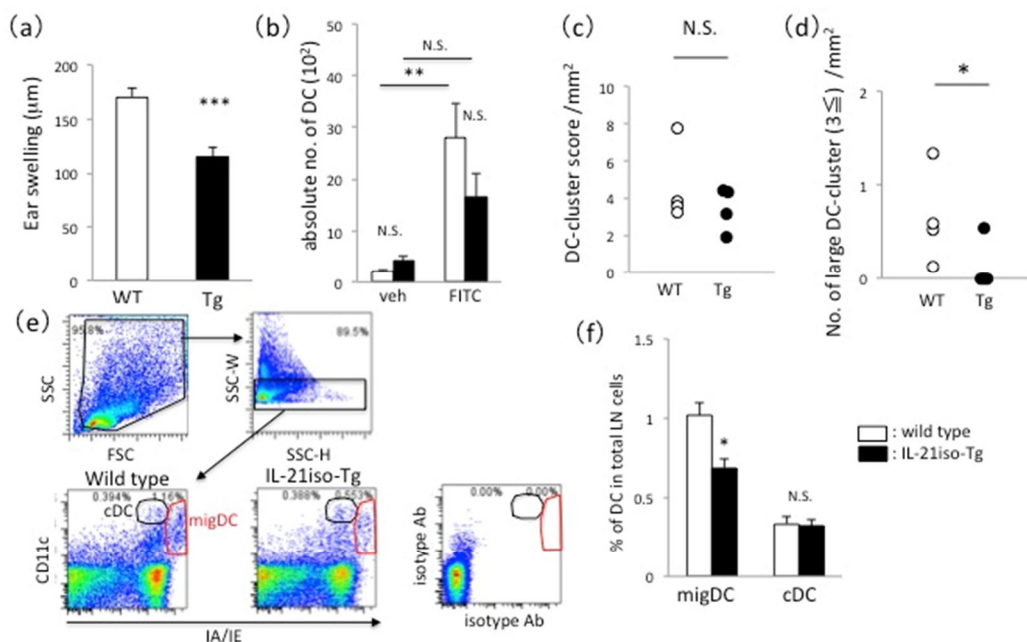


図7 生体内でのIL-21の樹状細胞への影響—IV型アレルギーをモデルとして—

(a) IL-21 iso-Tgの皮膚炎後の耳介の肥厚。(b) 炎症誘発後の耳介の樹状細胞の細胞数。(c) DC-clusterの形成数。(d) 大型のDC-clusterの数。所属リンパ節の遊走型樹状細胞と常在型樹状細胞の分け方(e)とその割合(f)。データは平均±SEMで表示している。(a)、(f)はunpaired t-test、(b)は、二元配置分散分析、(c)、(d)はマンホイットニーUテストをそれぞれ行った。N.S.は有意差なし、\*、p < 0.05、\*\*、p < 0.01、\*\*\*、p < 0.001。

本研究では、腫瘍微小環境における影響は観察していない。しかしながら、細胞培養系と同様に、生体内でも IL-21 が樹状細胞の活性化を抑制することが明らかとなった。興味深いことに、大腸炎や腫瘍発生においては、IL-21 が増悪因子として働くことを申請者は報告している。どの様な状態で IL-21 が樹状細胞の働きを抑制し免疫反応を減弱するのか、それとは逆に、T 細胞やマクロファージなどの活性化を促進し、炎症を亢進するのかは今後の課題である。それにより得られる結果は腫瘍微小環境に対する IL-21 の影響が明らかとなり、IL-21 を利用した腫瘍治療に繋がることを期待される。

### 参考文献

1. Spolski & Leonard, 2014, Nat Rev Drug Discov
2. Mantovani et al., 2008, Lancet
3. Raker et al., 2015, Frontiers in Immunology
4. Jiang et al., 2016, Nature Med
5. Natsuaki et al., 2016, Nature Immunol

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nara Hidetoshi, Komatsu Mikako, Takeda Yuji, Araki Akemi, Akhter Nasrin, Asao Hironobu	4. 巻 138
2. 論文標題 IL-21 Attenuates FITC-Induced Contact Hypersensitivity Response via Regulation of Dendritic Cell Function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2174 ~ 2184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.03.1508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Yuji, Kato Tomoyuki, Nemoto Nobuhito, Araki Akemi, Gazi Mohammad Yeashin, Nara Hidetoshi, Asao Hironobu	4. 巻 20
2. 論文標題 Systemic neutrophil migration and rapid consumption of neutrophils in the spleen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 680 ~ 682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2018.08.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Yuji, Kato Tomoyuki, Nemoto Nobuhito, Araki Akemi, Gazi Mohammad Yeashin, Nara Hidetoshi, Asao Hironobu	4. 巻 110
2. 論文標題 Augmentation of the expression of the eotaxin receptor on duodenal neutrophils by IL-21	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 194 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2018.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Araki Akemi, Jin Lianjin, Nara Hidetoshi, Takeda Yuji, Nemoto Nobuhito, Gazi Md Yeashin, Asao Hironobu	4. 巻 202
2. 論文標題 IL-21 Enhances the Development of Colitis-Associated Colon Cancer: Possible Involvement of Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3326 ~ 3333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.4049/jimmunol.1800550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Nobuhito, Takeda Yuji, Nara Hidetoshi, Araki Akemi, Gazi Md Yeashin, Takakubo Yuya, Naganuma Yasushi, Takagi Michiaki, Asao Hironobu	4. 巻 32
2. 論文標題 Analysis of intestinal immunity and flora in a collagen-induced mouse arthritis model: differences during arthritis progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nara H, TAKEDA Y, Md. GAZI Y, NEMOTO N, ARAKI A, ASAO H.
2. 発表標題 Interleukin21 arrests bone marrow derived dendritic cells PD-L1 high immunosuppressive state
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学医学部 免疫学講座 HP 業績欄 <a href="http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Imm/gyouseki.html">http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Imm/gyouseki.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅尾 裕信 (Asao Hironobu)  (80250744)	山形大学・医学部・教授  (11501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	武田 裕司  (Takeda Yuji)  (90302299)	山形大学・医学部・准教授    (11501)	
研究 協力者	荒木 明美  (Araki Akemi)		