

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08262
研究課題名(和文) Truncated IL-36 を用いた悪性黒色腫治療

研究課題名(英文) Treatment of melanoma with IL-36

研究代表者

沼崎 宗夫 (Numasaki, Muneo)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：50344677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞や上皮細胞から産生される IL-36 の悪性黒色腫に対する抗腫作用を検討する目的で、マウス IL-36 のN末端の30個のアミノ酸を除去した truncated IL-36 を発現する2種類の遺伝子組換えレトロウイルスを作成し、B16-F10-PTH-truncated IL-36 および B16-F10-GH-truncated IL-36 を樹立した。樹立した細胞株は野生株に比較して in vivo の増殖が著明に抑制される。この現象には IL-36 の T リンパ球の PD-1 発現を抑制する作用機序が関係している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-36 は抗腫作用を有しており、その抗腫機序として CD4 および CD8 T 細胞上の免疫チェックポイント分子 PD-1 の発現を低下させる作用が関与している可能性が示唆された。今後 IL-36 が CD4 および CD8 T 細胞上の PD-1 の発現を低下させる作用の機序を解明すれば、新たな公害材の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：IL-36 is produced by bronchial epithelial cells and dendritic cells. To examine the anti-tumor activity of IL-36, we constructed two types of recombinant retroviral vector DFG-PTH-truncated IL-36 -IRES-Neo and DFG-GH-truncated IL-36 -IRES-Neocarrying truncated IL-36, and transduced into B16-F10 melanoma cells. Established B16-F10-PTH-truncated IL-36 cells and B16-F10-GH-truncated IL-36 cells grew very slowly compared with that of parental B16-F10 cells in vivo. We examined the mechanisms of anti-tumor effects of truncated IL-36, and found that truncated IL-36 could down-regulate the surface expression levels of programmed cell death (PD)-1 on CD4 and CD8 T cells stimulated by anti-CD3 monoclonal antibody and anti-CD28 monoclonal antibody.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：IL-36 悪性黒色腫 PD-1

1. 研究開始当初の背景

Interleukin (IL)-36 は、IL-1 cytokine family member で、 α 、 β および γ の 3 種類のアイソフォームが存在し、N-末端 30 個のアミノ酸を除去した truncated type の活性が full length に比較して約 1000 倍強いことが報告されている。IL-36 は、樹状細胞に作用して CD80 や CD86 の発現を増加し、さらに IL-12 の産生を増強して Th1 型免疫反応を促進する生物活性を有している。我々は、IL-36 が Th1 型免疫反応を促進することより、癌組織局所で IL-36 を産生させて、癌特異的 Th1 型免疫応答を増強することで癌を治療できる可能性があるのではないかと考察し、IL-36 の 3 種類のアイソフォームの中で最も Th1 型免疫反応増強作用の強い、IL-36 β の truncated form を用いて IL-36 の抗癌作用を検討した。Truncated IL-36 β cDNA にはシグナル配列がないので、truncated IL-36 β cDNA を発現する遺伝子組換えレトロウイルスを作製して癌細胞に感染させても、truncated IL-36 β は細胞外に分泌されない。そこで、マウス truncated IL-36 β cDNA の前部にヒト成長ホルモンまたはヒト副甲状腺ホルモンのシグナル配列を結合した DNA を作製し、これらを MFG レトロウイルスベクターに挿入して構築した DFG-GH-truncated IL-36 β -IRES-Neo (GH) および DFG-PTH-truncated IL-36 β -IRES-Neo (PTH) をパッケージング細胞にトランスフェクションして、truncated IL-36 β を発現する遺伝子組換えレトロウイルスを作製した。作製した組換えレトロウイルスを IL-36 を発現していないマウス腫瘍細胞に感染させ、truncated IL-36 β を産生・分泌する細胞株を樹立した。これらの細胞から分泌される truncated IL-36 β に生物活性があることは、これらの細胞の培養上清に線維芽細胞からの IL-6 分泌促進作用があることで確認した。Truncated IL-36 β 産生腫瘍細胞は、野生株細胞 (Wild-type : WT) および ネオマイシン耐性遺伝子導入細胞 (Neo) と in vitro の増殖には違いがないが、同系マウスの皮下に接種して in vivo の増殖を比較検討した結果、truncated IL-36 β を分泌する細胞は、WT や Neo に比較して in vivo の増殖が著明に抑制されることが明らかになった。

2. 研究の目的

Truncated IL-36 β により誘導される抗腫瘍免疫反応を担当する effector cell の同定、truncated IL-36 β の抗腫瘍免疫増強作用における IFN- γ および IL-12 の関与の検討、Truncated IL-36 β の抗腫瘍免疫増強作用への抑制性 T 細胞の関与の検討、リコンビナント truncated IL-36 β タンパクの腫瘍組織への投与による腫瘍退縮効果の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Truncated IL-36 β により誘導される抗腫瘍免疫反応を担当する effector cell の種類の同定
Truncated IL-36 β を遺伝子導入したマウス腫瘍細胞 (MCA205-GH-IL-36 β) やコントロールの腫瘍細胞 (MCA205WT) を同系マウス (n = 7) の腹部皮下に接種する。Truncated IL-36 β を遺伝子導入した MCA205-GH-IL-36 β を接種したマウスと MCA205WT の腫瘍細胞を接種したマウスの腹腔内に、抗 GR-1 抗体、抗アシアロ GM1 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD25 抗体を投与 (400 ~ 500 μ g/mouse/回) (day -1, day 4, day 9, day 14, day 19, day 24 および day 29) し、定期的に腫瘍組織の大きさを計測する。

(2) Truncated IL-36 β の抗腫瘍免疫増強作用における IFN- γ および IL-12 の寄与検討
Truncated IL-36 β を遺伝子導入したマウス腫瘍細胞やコントロールの腫瘍細胞 (MCA205Neo) を同系マウス (n = 7) の腹部皮下に接種する。腫瘍細胞を接種したマウスの腹腔内に IFN- γ 中和抗体または IL-12 中和抗体を投与 (500 μ g/mouse/回) (day -1, day 4, day 9, day 14, day 19, day 24 および day 29) し、定期的に腫瘍組織の大きさを計測する。

(3) 腫瘍細胞から産生された truncated IL-36 β が、脾臓の regulatory T cell の比率に影響を与えるか検討する。また、T 細胞の細胞表面の PD-1 の発現に影響を及ぼすか検討する。
Truncated IL-36 β を遺伝子導入したマウス腫瘍細胞やコントロールの腫瘍細胞 (MCA205Neo) を同系マウス (n = 5) の腹部皮下に接種する。腫瘍細胞を接種して 12 ~ 17 日後に脾臓を採取し、脾細胞中の CD4 T cell、CD8 T cell および regulatory T cell の比率、および T 細胞の PD-1 発現の程度を flow cytometry を用いて解析する。

(4) 腫瘍細胞から産生された truncated IL-36 β が担癌マウスの脾臓の T 細胞のサイトカイン産生に影響を与えるか検討する。
Truncated IL-36 β を遺伝子導入した B16-F10-GH-IL-36 β または B16-F10Neo を同系マウス (n = 5) の腹部皮下に接種する。腫瘍細胞を接種した 12 日後にマウスより脾臓を採取し、脾細胞中の CD4 T cell および CD8 T cell を分離後、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激して 48 ~ 72 時間培養する。

培養上清を回収して、培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17A および IL-35 の濃度を ELISA にて測定する。

4. 研究成果

(1) Truncated IL-36 β により誘導される抗腫瘍免疫反応を担当する effector cell の同定
抗体による depletion の実験結果より MCA205 tumor model における truncated IL-36 β により誘導される抗腫瘍効果に関与する effector cell は CD8 T cell と CD4 T cell であることが明らかとなった。

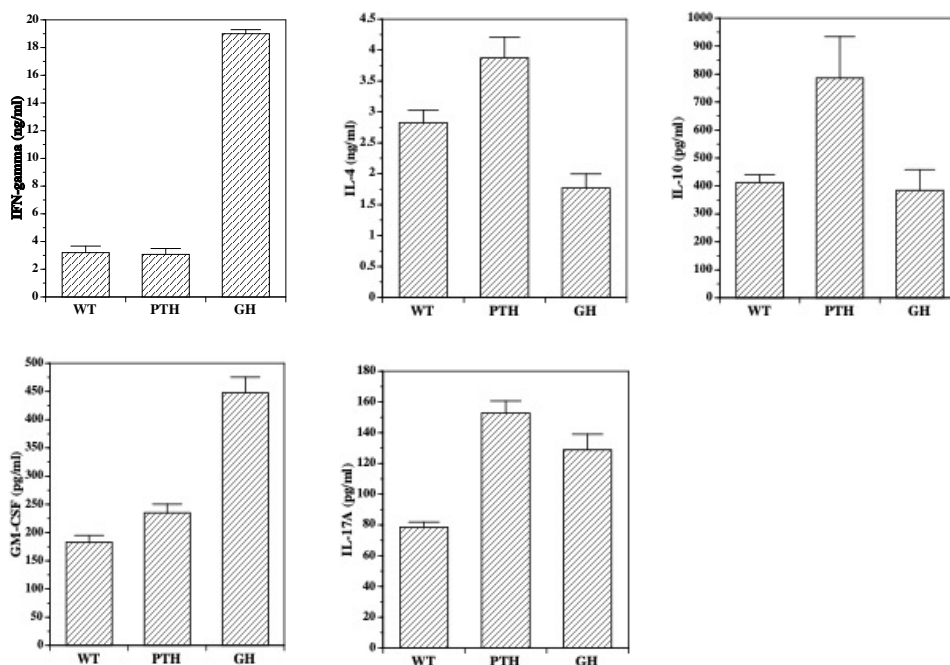
(2) Truncated IL-36 β の抗腫瘍免疫増強作用における IFN- γ および IL-12 の寄与の検討
中和抗体の投与による IFN- γ および IL-12 の阻害実験の結果より、MCA205 tumor model における truncated IL-36 β の抗腫瘍作用は IFN- γ 依存性であり、IL-12 の関与は極めて限定的であることが明らかとなった。

(3) 腫瘍細胞から産生された truncated IL-36 β が、脾臓の regulatory T cell の比率に影響を与えるか検討する。また、T 細胞の細胞表面の PD-1 の発現に影響を及ぼすか検討する。
PTH および GH を接種したマウスの脾臓の CD4 陽性、CD25 陽性、CD177 low 細胞はやや増加傾向である。また、PTH および GH を接種したマウスの脾細胞の PD-1 発現は減少していた。

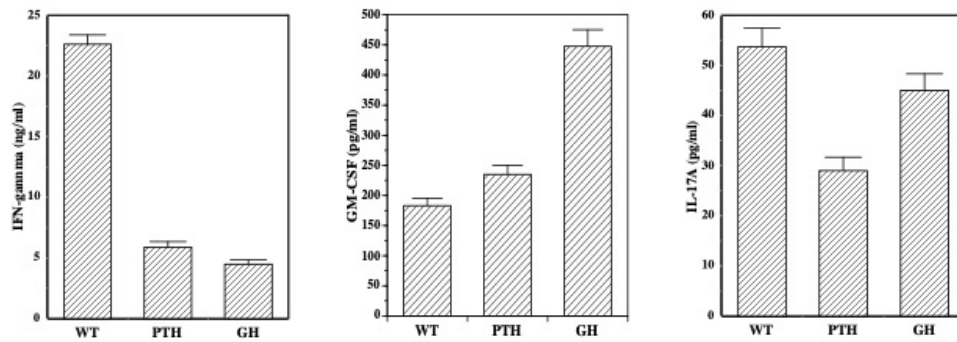
(4) 腫瘍細胞から産生された truncated IL-36 β が担癌マウスの脾臓の T 細胞のサイトカイン産生に影響を与えるか検討する。

MCA205 tumor model における PTH または GH を接種したマウスの CD8 T cells からの IL-4 および IL-10 産生は検出濃度以下であった。また、IL-35 は CD4 T cell および CD8 T cell 共に検出濃度以下であった。GH を接種したマウスの CD8 T cell および CD4 T cell からの IFN- γ 産生は対照的であり、PTH を接種したマウスの CD8 T cell および CD4 T cell からの IFN- γ 産生はコントロールに比較して同等かむしろ低下している。GH および PTH を接種したマウスの CD8 T cell および CD4 T cell からの GM-CSF 産生は増加し、IL-36 β の抗腫瘍効果の一部に関与している可能性がある。

CD4 T cells



CD8 T cells



5. 考察

IL-36 β の抗癌作用の機序を検討する目的で、effector cellの同定、リンパ球からのサイトカイン産生への影響、regulatory T cell (Treg)への影響およびPD-1発現への影響などを検討した。IL-36 β の誘導する抗腫瘍効果のeffector cellはCD4 T cellおよびCD8 T cellと思われる。また、PTHおよびGH担癌マウスの脾臓のCD4 T cellおよびCD8 T cellのIFN- γ 産生が異なることより、IL-36 β のCD4 T cellおよびCD8 T cellに対する作用はIL-36 β 濃度により変化する可能性が高い。脾臓のTregは多少増加する傾向が見られたが、脾細胞のPD-1発現はコントロールに比較して減少する傾向が見られた。今後担癌マウス血中のtruncated IL-36 β 濃度を測定し、濃度による生体内での生理作用の違いなどをより詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Tsukamoto H, Kozakai S, Kobayashi Y, Takanashi R, Aoyagi T, Numasaki M, Ohta S, Tomioka Y.	4. 巻 49(4)
2. 論文標題 Impaired antigen-specific lymphocyte priming in mice after Toll-like receptor 4 activation via induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 546-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201847805	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 Tomita N, Kojima T, Ishiki A, Ueda J, Numasaki M, Okinaga S, Akishita M, Arai H.	4. 巻 19(2)
2. 論文標題 Could problem lists summarize comprehensive geriatric assessments? A nationwide cross-sectional survey on geriatricians' attitudes towards problem lists.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatr. Gerontol. Int.	6. 最初と最後の頁 159-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13574	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 沼崎宗夫、石木愛子、富田尚希、沖永壮治、荒井啓行	4. 巻 70 (2)
2. 論文標題 Overuse/Underuse を見逃さないプロのみかたと対処法 抗認知症薬	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬局	6. 最初と最後の頁 273-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Tsukamoto H, Kozakai S, Kobayashi Y, Takanashi R, Aoyagi T, Numasaki M, Ohta S, Tomioka Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 Impaired antigen-specific lymphocyte priming in mice after Toll-like receptor 4 activation via induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 546-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201847805	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 Tomita N, Kojima T, Ishiki A, Ueda J, Numasaki M, Okinaga S, Akishita M, Arai H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Could problem lists summarize comprehensive geriatric assessments? A nationwide cross-sectional survey on geriatricians' attitudes towards problem lists.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatr. Gerontol. Int.	6. 最初と最後の頁 159-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13574	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3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 沼崎宗夫、富岡佳久
2. 発表標題 IL-32 の過剰発現は、悪性胸膜中皮腫の増殖とVEGFおよびIL-8の産生に影響を与える
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田寿里、石木愛子、沖永壯治、富田尚希、沼崎宗夫、古川勝敏、荒井啓行
2. 発表標題 東日本大震災被災地居住高齢者における、認知機能低下の割合とその経時的変化
3. 学会等名 第8回日本認知症予防学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼崎宗夫
2. 発表標題 新規サイトカイン IL-36 の誘導する抗腫瘍免疫増強作用
3. 学会等名 日本病院薬剤師会 東北ブロック 第10回学術大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	藤村 卓 (Fujimura Taku) (50396496)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------