

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09124

研究課題名(和文) 腫瘍関連マクロファージをターゲットにしたIL-18免疫療法の可能性

研究課題名(英文) Potential for IL-18 immunotherapy targeting tumor-associated macrophages

研究代表者

山田 直子 (Yamada, Naoko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10319858

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)：インターロイキン18(IL-18)は本学で発見され、生体の恒常性維持といった生命機能に重要な役割を担っていることが示された。我々の研究は中でもがんに対してIL-18が抗腫瘍活性を持つことを示してきた。本研究ではマクロファージ、特に腫瘍関連マクロファージへのIL-18の作用を調べるものである。そのために本研究ではin vitroで解析するためにM1、M2マクロファージの分化誘導系を確立させ、培養条件の違いによるM1、M2の特徴を調べた。IL-18はこの系においてM1、M2の分化誘導には影響していなかったが、IL-18は様々なM2マーカーの発現に抑制的に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はIL-18の抗腫瘍効果に関する研究を行ってきた。これまでにT細胞、NK細胞を介する以外の作用で抗腫瘍効果を発揮することが分かっているが、そのメカニズムは分かっていない。腫瘍内には腫瘍関連マクロファージ(TAM)が存在し、M2タイプのTAMが腫瘍促進性に働くことが分かっている。本研究ではIL-18は直接M1、M2の分化誘導には影響していなかったが、M2に作用し抑制していることが明らかとなった。このことによりIL-18の新たな生理的意義が明らかにされ、新たな視点によるがん治療法の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Interleukin 18 (IL-18) was discovered in our college, and its physiological significance was investigated by researchers around the world. It was shown that IL-18 plays an important role in biological functions such as the maintenance of homeostasis. Our studies have shown that IL-18 has anti-tumor activity against cancer. The activity is mainly mediated by T cells and NK cells. In this study, we investigate the effect of IL-18 on macrophages, especially on tumor-associated macrophages. We established a system to induce differentiation of M1 and M2 macrophages for in vitro analysis and examined the characteristics of M1 and M2 under different culture conditions. We found that IL-18 has a suppressive effect on the expression of various M2 markers although IL-18 did not affect the induction of M1 and M2 differentiation.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：IL-18 腫瘍関連マクロファージ がん微小環境 M1 M2

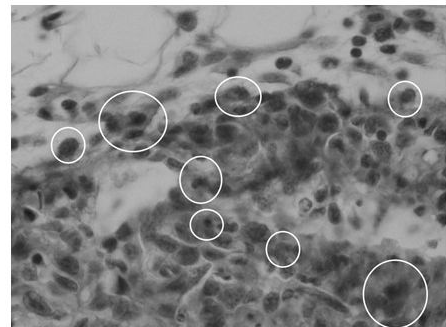
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は、その発症者の約 75% が 25 歳未満の未来ある小児・若年者である。骨肉腫の治療は、腫瘍の切除が第一選択であるが、切除後の肺転移が多いことが問題となる。切除と共に抗がん剤の多剤併用療法も行われているが、副作用や再発のリスクが高いため副作用や肺転移を減らし予後を改善することが課題である。

固形がんは、がん細胞を中心に免疫細胞や間質細胞などを含むがん微小環境を形成する。近年その中の腫瘍関連マクロファージ (TAM) が腫瘍の成長をサポートしていることが分かってきた。マクロファージは Th1 反応を示し抗腫瘍効果をもつ M1 と、制御性に反応し腫瘍増殖と免疫反応に抑制効果をもつ M2 に分類される (Murray PJ and Wynn TA 2011)。TAM は M2 と同様の働きを持つと考えられているが、その可塑性を活かして M1 に転換させて腫瘍抑制性の環境に再構築させる方法が模索されている。

インターロイキン 18 (IL-18) は本学の岡村らにより発見された炎症誘導性のサイトカインである。これまでの研究からがんや病原菌感染などに対する生体防御反応、過剰な免疫応答であるアレルギー反応、細胞の正常機能を保証するためのオートファジーの誘導、ミトコンドリア機能障害の是正といった生命の維持に重要な役割を演じるとともに、神経変性疾患のような退行性病変には細胞増殖や神経活動維持といった活性化シグナルをもたらす可能性が示唆され、生命現象の基幹に触れる多岐にわたる生理作用を有していることが明らかになりつつある。我々は岡村らと共に IL-18 がメラノーマや骨肉腫の増殖や転移の抑制に作用することを報告している (Okamoto et al. 2004; Nakamura et al. 2006; Nishio et al. 2008; Yamada et al. 2009)。その研究においてマウス骨肉腫の腫瘍塊に多数の F4/80⁺ マクロファージ (図 1) が存在していることや、転移抑制活性を持つ IL-18 投与マウスの血清中に CXCL9, CXCL10 が産生されていることを確認している。これらのケモカインは M1 から分泌されることが分かっている。また最近マウス線維肉腫に IL-18 を過剰発現させると IL-18 が M1 を腫瘍に誘引し、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導して腫瘍壊死を引き起こすことが報告された (Xing et al. 2016)。



これらのことから我々が報告してきた IL-18 による骨肉腫の増殖・転移抑制効果と、がん微小環境内のマクロファージの動態に関連があるのかという「問い」が生じた。

図1 腫瘍内F4/80⁺マクロファージ

2. 研究の目的

我々は IL-18 が骨肉腫の肺転移を抑制することを明らかにしてきたが、IL-18 ががんをサポートしているがん微小環境に作用するかどうかは不明である。そこで本研究の目的は骨肉腫の IL-18 免疫療法におけるがん微小環境内のマクロファージの動態を調べ、IL-18 の抗腫瘍効果と TAM の関係を解明することである。

我々はこれまで IL-18 を用いた骨肉腫治療の研究を行ってきた。その間に骨肉腫の治療成績は格段に良くなってきているが、骨肉腫は若年者に発症することが特徴であり未来ある若者のためには完治を目指したい腫瘍である。我々は IL-18 が単独でも十分に抗腫瘍活性を発揮し、NK, T 細胞依存的にも非依存的にも骨肉腫の転移を抑制することを報告した。

ほとんどの IL-18 は血清中の binding protein と結合しており、効率的に腫瘍で作用するためには腫瘍局所での作用機序解明が重要だと考えられる。本研究により局所的な作用が明らかになることで今後のがん治療に一石を投じることになる。

3. 研究の方法

研究の方法

(1) M1, M2 マクロファージの分化誘導

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いて M1, M2 マクロファージの分化誘導させる系を確立させる。そのために M1 誘導因子(LPS, IFN γ), M2 誘導因子(IL-4, TGF β , IL-1 β , IL-10)の各サイトカインの適正濃度を調べる。培養 7 日間の形態変化を観察し、培養条件を決める。分化誘導したマクロファージの細胞表面マーカーをフローサイトメトリー(FACS)解析する。細胞表面マーカーにはマクロファージマーカー(F4/80), M1 マーカー(CD80, CD86), M2 マーカー(CD163, CD206)を用いる。マウス骨髄細胞を回収し、M-CSF を添加培養して分化させたマクロファージを用いて同様の実験を行い、primary cell での分化誘導系を確立させる。

(2) IL-18 による M1, M2 マクロファージの分化誘導への影響

M1, M2 マクロファージの分化誘導中に IL-18 を併用添加して培養する。培養後の細胞で Real Time PCR 解析および FACS 解析を行う。Real Time PCR 解析では、培養 6, 24 時間後の細胞から回収した RNA を用いて、IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 α , IL-12 β , IL-18, IL-23, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL22, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL16, CCR2, CCR7, IRF4, IRF5, CD80, CD86, CD163, CD206, TLR1, TLR2, TLR4, TLR8, TNF α , TGF β , G-CSF, GM-CSF, iNOS, COX2, MHCII, MMP9, arginase1, FIZZ1, IFN γ , IFN β の発現を調べる。FACS 解析では、培養 1, 3, 5, 7, 10 日後の細胞を用いて、マクロファージの細胞表面マーカーの発現を調べる。

(3) 分化した M1, M2 の polarization への IL-18 の効果

M1, M2 に分化したマクロファージが polarization することは知られている。そこで分化誘導後の M1, M2 に異なる分化誘導因子或いは IL-18 を添加培養し polarization への影響を調べる。RAW264.7 を 6 日間培養した分化させた M1, M2 マクロファージをよく洗浄した後、IL-18 或いは 6 日間添加していたサイトカインとは異なるサイトカインを添加し 5 日間(最終 11 日間)培養する。培養 6 日間および培養 11 日間の細胞を方法(2)と同様に Real Time PCR 解析および FACS 解析を行う。

(4) in vivo での TAM に及ぼす IL-18 の影響

マウス(C3H)の尾静脈に骨肉腫細胞(LM8)を注射すると肺に転移し、3 週間後には実体顕微鏡下で確認できる大きさの転移巣ができる(図2)。我々はこれまでに尾静脈注射の前に IL-18 を腹腔に投与しても宿主の環境を変えることで転移が抑制されることを明らかにしている。この転移モデルを用いて尾静脈注射

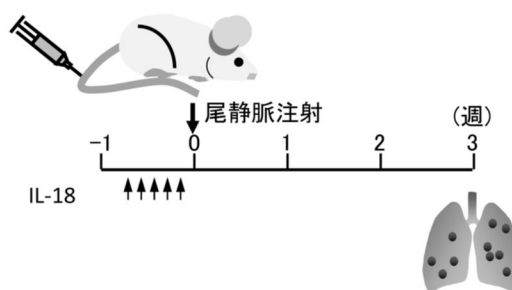


図2 骨肉腫の転移モデル

の前に IL-18 を腹腔に投与し、転移巣の内部に存在する腫瘍関連マクロファージ(TAM)への影響を調べるため、転移巣の組織免疫染色を行う。染色にはマクロファージマーカー(F4/80), M1 マーカー(iNOS), M2 マーカー(arginase1)を用いる。

4. 研究成果

研究成果は研究の方法の項目別に示す。

(1) M1, M2 マクロファージの分化誘導

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いて M1, M2 マクロファージを 10%FBS DMEM で培養した。M1, M2 分化誘導因子である LPS, IFN γ , IL-4, TGF β , IL-1 β , IL-10 を添加培養し、増殖率と形態的变化から各因子のそれぞれ濃度を決定した。培養 3, 5, 7 日の細胞を形態観察したところ、培養 3 日目から M1 誘導因子(LPS, IFN γ)と M2 誘導因子(IL-4, TGF β , IL-1 β , IL-10)に大きな違いが見られた。M1 タイプの細胞は丸く平面的に広がり、M2 タイプは細胞の足を細長く伸ばすように変化した(図3)。

またマウス骨髄細胞を回収し、M-CSF 存在下で 1 週間培養し、primary なマクロファージを作成した。このマクロファージに LPS, IFN γ , IL-4 を添加すると RAW264.7 と同様の变化がみられた。

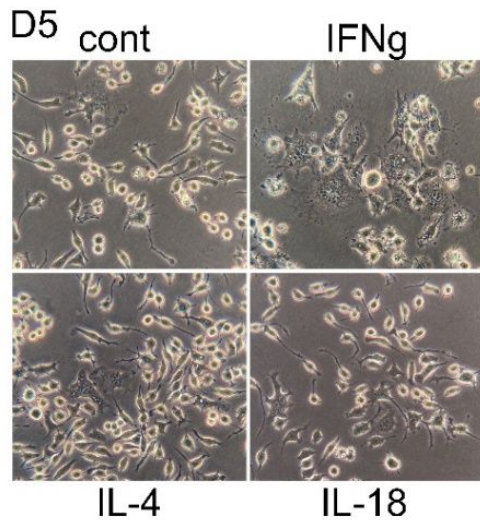


図3 M1, M2の形態変化

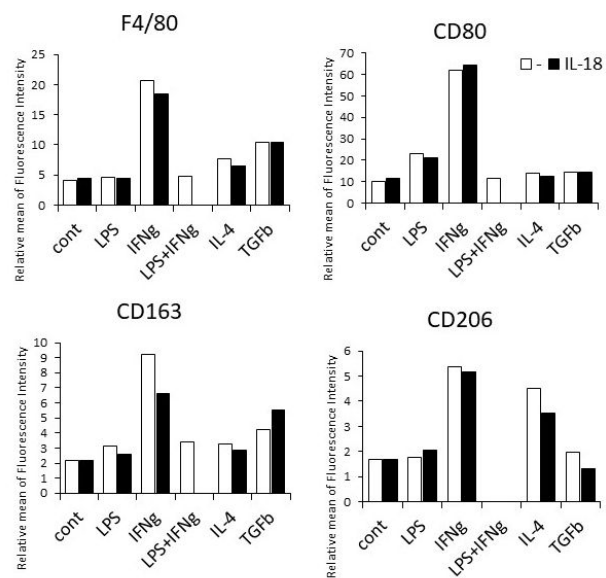


図4 M1M2細胞表面マーカーの発現

(2) IL-18 による M1, M2 マクロファージの分化誘導への影響

M1, M2 マクロファージの分化誘導中に IL-18 を併用添加して培養した。10 日間培養した細胞の FACS 解析を図 4 に示す。M1 マーカーの CD80 は IFN γ 誘導により発現が上昇した。M2 マーカーの CD206 は IL-4 および IFN γ で上昇し、IL-4 または TGF β と IL-18 の併用により発現が減少した。CD163 は IFN γ で発現が上昇し、IL-18 との併用により発現が減少した。

培養 6 時間および 24 時間後の細胞を用いて Real Time PCR 解析を行った。IL-18 と併用することで遺伝子発現が上昇したものを赤、減少したものを青、変化しない

		cont	LPS	IFN γ	LPS+IFN γ	IL-4	TGF β	IL-1 β	IL-10
IL-23	M1		Red		Red				
CCL5	M1		Red		Red				
IL-1b	M1		Red		Red				
CCL4	M1		Red		Red				
IL-6	M1		Red		Red				
CCL3	M1		Red		Red				
CXCL10	M1		Red		Red				
CXCL16	M1		Red		Red				
TNFa	M1		Red		Red				
MMP9	M1		Red		Red				
IL-12b	M1		Red		Red				
CXCL9	M1		Red		Red				
CXCL11	M1		Red		Red				
iNOS	M1		Red		Red				
IL-18	M1		Red		Red				
CCL2	M1		Red		Red				
CCL22	M1,M2a		Red		Red				
CXCL2	M1,M2b		Red		Red				
COX2	M1,M2b		Red		Red				
MHCII	M1,M2a,b		Red		Red				
TGFb	M2		Blue		Blue				
IL-1ra	M2		Blue		Blue				
IL-10	M2		Blue		Blue				
arginase1	M2a		Blue		Blue				
GM-CSF	M2b		Blue		Blue				
G-CSF	M2b		Blue		Blue				

図5 IL-18によるM1M2マーカーの発現変化

ものを黄、検出できないものを白で示した(図5)。IL-18 との併用において LPS は M1 関連遺伝子の発現を増強させ M2 関連遺伝子の発現を減少させる傾向がみられた。また IL-4 は M1 関連遺伝子の発現には影響しないが、M2 関連遺伝子の発現を減少させる傾向がみられた。

(3) 分化した M1, M2 の polarization への IL-18 の効果

RAW264.7 を 6 日間培養して M1, M2 に分化させたマクロファージを IL-18 添加有り、無しで 5 日間培養した細胞を用いて Real Time PCR 解析を行った。M1 マーカーの CD80 と CD86 は IL-18 添加培養に切り替えても発現は大きく変化しなかった。一方 M2 マーカーの CD163 と CD206 は IL-18 添加培養に切り替えることで発現が減少した(図6)。他の遺伝子に関しても M2 関連遺伝子の発現が減少していた。

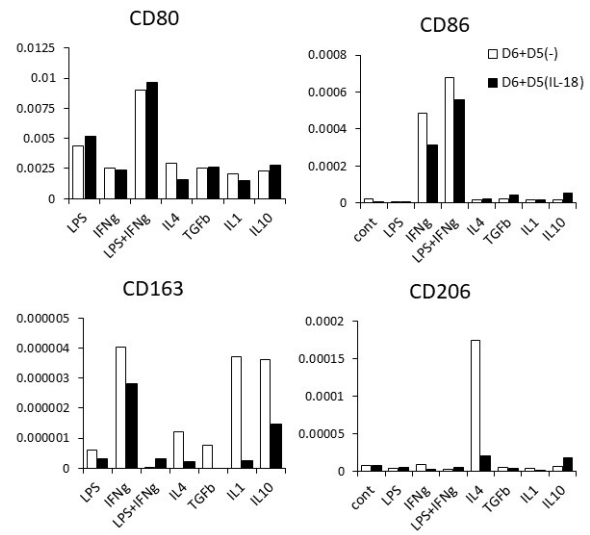


図6 M1M2へのIL-18の効果

(4) in vivo での TAM に及ぼす IL-18 の影響

マウス(C3H)の尾静脈に骨肉腫細胞(LM8)を注射して作成した肺転移巣の組織標本を製作し観察した。転移巣無いには F4/80 陽性のマクロファージは確認できなかった。IL-18 を投与した場合でも同様の結果だった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 直子、平山 円、寺田 信行
2. 発表標題 IL-18誘導ケモカインによるがん転移抑制機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 直子、平山 円、山根木 康嗣、西浦 弘志、藤原 勇輝、中正 恵二、寺田 信行
2. 発表標題 マウス骨肉腫に対するIL-18誘導性がん転移抑制シグナル
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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	中正 恵二 (Nakasho Keiji) (00217712)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	削除：2019年2月13日
研究分担者	山根木 康嗣 (Yamanegi Koji) (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	削除：2022年3月7日

6. 研究組織（つづき）

	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	西浦 弘志 (Nishiura Hiroshi) (90284760)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	削除：2019年5月15日

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