

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06169・19K21278

研究課題名（和文）IL-26を標的とした新規癌転移制御療法の確立

研究課題名（英文）Development of novel IL-26 targeted therapeutic approaches for cancer metastasis

研究代表者

伊藤 匠 (Takumi, Itoh)

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・博士研究員

研究者番号：80811835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では癌微小環境中に浸潤したCD4陽性T細胞から産生されたIL-26がSnail-1の発現誘導を介してEMT様の細胞形質転換やanoikis resistanceなどを亢進させることで癌細胞に高転移能を獲得させている可能性が示唆され、IL-26が悪性黒色腫の高転移能獲得の重要な因子であることを明らかにした。これらの結果により、IL-26を標的とした新規癌転移治療法の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトIL-26トランスジェニックマウスを用いた担癌モデルを作製してIL-26の機能の詳細な解明を行っており、これまで明らかにならなかった癌微小環境でのIL-26の機能を明らかにし、IL-26が癌の転移能を亢進させる新しいメカニズムを明らかにした。これにより、根治が難しい癌転移における新しい治療の開発や免疫治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）： We recently show that the Th17 cytokine IL-26 promotes angiogenesis and activates fibroblasts in inflammatory conditions, while its role in tumor microenvironment still remains to be elucidated.

Since IL-26 is absent in rodents, human IL-26 transgenic (hIL-26Tg) mice were used in our study. After subcutaneous transplantation of murine melanoma B16F10 cells into hIL-26Tg mice, sarcoma-like transformation, upregulation of Snail1 were observed. To investigate the metastatic potential of IL-26-educated B16F10, B16F10 cells resected from the subcutaneous tissue of hIL-26Tg mice were intravenously injected into C57BL/6 wild-type mice. Lung metastasis was prominently observed following injection of IL-26-educated cells as compared with control mice-derived cells. Our results suggest that IL-26 promotes melanoma metastasis through Snail1-mediated epithelial-mesenchymal transition, and blockade of IL-26 appears to be a promising novel therapeutic strategy for the control of tumor metastasis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Th17 IL-26 炎症性サイトカイン 悪性黒色腫 癌微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は数多くの癌種の中でも極めて生物学的悪性度が高い。近年、悪性黒色腫に対する免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用が急速に進展したことから癌微小環境中に浸潤する免疫細胞と癌の相互作用が注目されてきた中で、自己免疫疾患で中心的な役割を担っている Th17 細胞が腫瘍の増大を抑制あるいは亢進するという両刃な役割について多くの議論が存在し、特に癌微小環境中での役割は未だ不明な点が多い。IL-26 は Th17 から主に産生されるサイトカインとして近年注目されているが、癌における役割の多くが明らかになっていない。この要因としてモデル動物に代表されるげっ歯類では IL-26 の遺伝子が発現していないことが挙げられ、担癌モデルを使用した研究がほとんどされておらず、癌微小環境における IL-26 役割の解明及び担癌モデルの検証は行われていない。申請者はこれまでに、ヒト IL-26 トランスジェニック (hIL-26Tg) マウスを使用した炎症性皮膚疾患モデルを作製し、IL-26 が血管内皮細胞やケラチノサイトを活性化することで強力な血管新生と炎症細胞浸潤を誘導することを明らかにしている。また、マウスの高転移性メラノーマ B16F10 を IL-26 で刺激すると上皮間葉移行を誘導する Snail-1 やリンパ管新生を誘導する VEGF-C の mRNA 発現レベルが顕著に上昇することを確認している。これらの結果は炎症病態で確認された血管新生の亢進とは異なる新しいアプローチでメラノーマの高転移性獲得に寄与する可能性を示し、IL-26 の機能解明は微小環境中の Th17 細胞の腫瘍免疫制御機構の解明に繋がると考えられる。本研究では高転移性悪性黒色腫において癌微小環境中で産生される IL-26 の役割を解明することで、Th17 および IL-26 が腫瘍の高転移能獲得のプロセスに如何に関与しているか明らかにし、IL-26 分子標的治療の有効性評価を行う。これにより、最も予後の悪い遠隔転移性の悪性黒色腫を根絶する新たな分子標的療法を提供し、様々な転移性癌治療の応用を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまで明らかにされてこなかった微小環境中における IL-26 の高転移能亢進機構に着目し、悪性黒色腫における IL-26 の役割の詳細な解明を行い、マウス担癌モデルを使用して高転移性悪性黒色腫における IL-26 を分子標的とした革新的な癌転移制御療法の開発を目指す。IL-26 はマウスで欠損した遺伝子であるため、免疫細胞から産生される IL-26 の機能について疾患モデルを使用した実験によって解明することは困難であったが、本研究では hIL-26Tg マウスを用いて担癌モデルを作製し、IL-26 が癌の転移能亢進に重要であることを立証し、高転移性悪性黒色腫における IL-26 を標的とした抗体転移治療法の評価をすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro における IL-26 刺激実験

ヒト悪性黒色腫細胞株 Mel 501 細胞、マウス悪性黒色腫細胞株の B16F10-Luc 細胞をヒトリコンビナント IL-26 で 6 時間刺激し、RNA を抽出して qRT-PCR によって mRNA の発現動態を解析した。また、リコンビナント IL-26 を 3-30ng/ml の濃度の刺激条件下で 96well ディッシュを用いて培養し、48-72 時間後に MTT Assay を行って IL-26 刺激による細胞増殖能の影響を調査した。さらに同刺激条件下で低接着性の 96well を使用して 48-72 時間培養し、MTT Assay を行って anoikis resistance に対する IL-26 の影響を調査した。また、Snail-1 の関与を明らかにするため、siRNA を用いて Snail-1 の発現を抑制し、同刺激条件下で低接着性の 96well を使用して 48-72 時間培養して MTT Assay により anoikis resistance に対する IL-26 の影響を調査した。

IL-26 30ng/ml の濃度で 0, 5, 15, 30, 60 分とそれぞれ刺激した悪性黒色腫細胞株のタンパクを抽出し、ウェスタンブロットを行ってシグナル活性化を調査した。また、これにより明らかになった IL-26 活性化シグナルの阻害剤を用いて anoikis resistance への影響を調査するため、IL-26 刺激条件下で各種阻害剤を添加し、シグナル阻害によって IL-26 の anoikis resistance が抑制されるか検討した。さらにこれらのシグナル阻害剤を添加して IL-26 による Snail-1 の発現が抑制されるか否かを qRT-PCR によって mRNA の発現動態を解析した。

### (2) IL-26Tg マウス担癌モデルの作製および転移モデルの作製

B16F10-Luc を野生型および IL-26Tg マウスに移植し、初期から後期(day 7-28)の腫瘍を採取し、免疫細胞の浸潤と IL-26 の発現、形質転換や血管新生の有無について免疫染色および qRT-PCR を用いて解析した。また、リセクトした腫瘍を野生型マウスの尾静脈に投与し、転移モデルを作製し、hIL-26Tg マウス由来の癌細胞と野生型由来の癌細胞で転移にどのような差があるか in vivo イメージングにより観察した。また、採取した細胞を尾静脈に投与後、一週間で肺と骨を採取し、浸潤した細胞を集めて培養し、6 チオグアニンによって生存した癌細胞をホルマザン染色して 1 週間で肺や骨に到達した細胞を確認した。

#### 4. 研究成果

##### [1] IL-26 による高転移能獲得メカニズムの解明

癌における IL-26 の役割はほとんど解明されていないが、ヒトおよびマウスの悪性黒色腫細胞株を IL-26 で刺激し、mRNA 発現動態を解析したところ、特に Snail-1, Twist-1 などの上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)に関連する遺伝子の発現亢進が顕著に見られ、E-cadherin の発現が抑制されることが明らかとなり、IL-26 が EMT を誘導することで癌細胞の高転移化を促進する可能性が示唆された。そこで、これら結果から IL-26 は癌細胞に対して直接的に作用して細胞を活性化することを予測し、ヒトおよびマウスの悪性黒色腫細胞株を IL-26 刺激し、増殖能への影響を検討したが、IL-26 は細胞の増殖能に影響を与えないことが明らかとなった。一方で、Snail-1 の発現レベルの亢進や EMT 様の形質転換を誘導することから、anoikis resistance が亢進される可能性を考え、低接着性のウェルに悪性黒色腫を播種して IL-26 刺激したところコントロールと比較して IL-26 刺激条件下の細胞は anoikis resistance が亢進されることを見出した。また、Snail-1 をノックダウンした細胞では IL-26 による anoikis resistance の亢進は見られなかったことから、Snail-1 は IL-26 の anoikis resistance の亢進に重要な因子であることが示唆された。また、anoikis resistance を亢進するシグナル活性化機構を解明するために IL-26 刺激した悪性黒色腫細胞株のタンパクを抽出し、ウェスタンブロットを用いて解析したところ Akt, Erk, JNK などのシグナルを活性化することがわかった。これらが EMT や高転移化に関与しているか確認するため、各シグナル阻害剤を用いて IL-26 刺激を行ったところ、これらシグナル阻害剤によって Snail-1 の発現レベルの亢進や anoikis resistance の亢進は阻害されたことからこれらのシグナルは IL-26 による癌高転移能獲得に重要な因子である可能性が示唆された。現在は、これらのシグナルの中でどのシグナル活性化が最も高転移化に重要であるか調査している。また、より詳細な機能を解明するために IL-26 刺激した細胞のマイクロアレイ解析やその他の癌種の細胞株での動態などを確認している。

##### [2] IL-26 による高転移能獲得メカニズムの解明

hIL-26Tg マウスに B16F10 メラノーマ細胞株を皮下移植した担癌モデルを作製し、野生型のマウスと比較したところ、腫瘍の大きさなどに顕著な差はなかったものの、hIL-26Tg の原発巣の腫瘍では血管新生が顕著に観察された。また、免疫染色を行ったところ Snail-1 の発現が顕著に亢進されており、E-cadherin の発現低下、Vimentin と N-cadherin の発現の亢進が観察された。さらに、[1]の結果を踏まえて IL-26 によって高転移能を獲得している可能性を考え、hIL-26Tg マウスおよび野生型マウスから原発巣の腫瘍を回収し、野生型マウスの尾静脈へ投与する転移モデルの作製を検討したところ、hIL-26Tg マウス由来の細胞を移植した転移モデルではわずか 1 週間で肺や骨に多くの癌細胞の浸潤が確認でき、非常に強い転移能を獲得している可能性が明らかになった(図 1)。また、さらに観察を続け、野生型由来の細胞を移植した転移モデルと比較して hIL-26Tg マウス由来の細胞は顕著な肺転移が観察された。これにより、IL-26 に感作された B16F10 細胞は高転移能を獲得していることが明らかとなった。この in vivo における IL-26 の高転移能誘導プロセスに Snail-1 がいかに関与するか検討するため、shRNA によって Snail-1 のノックダウン細胞を樹立しており、hIL-26Tg マウスに移植して微小環境中の IL-26 に感作させ、高転移能を獲得が阻害されるか検討中である。また、申請者研究室で樹立した抗 hIL-26 モノクローナル抗体を用いて、IL-26 の高転移能亢進を阻害できるか検討中である。

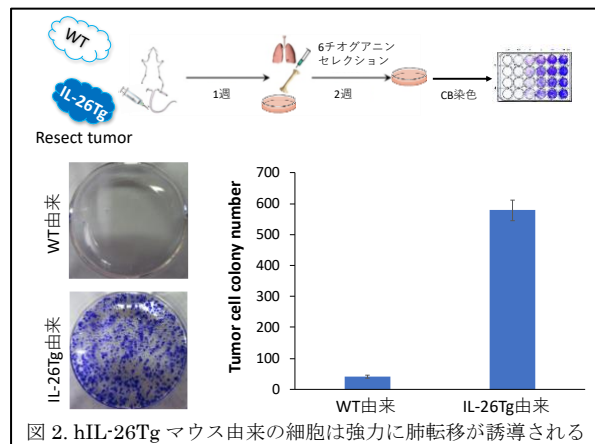


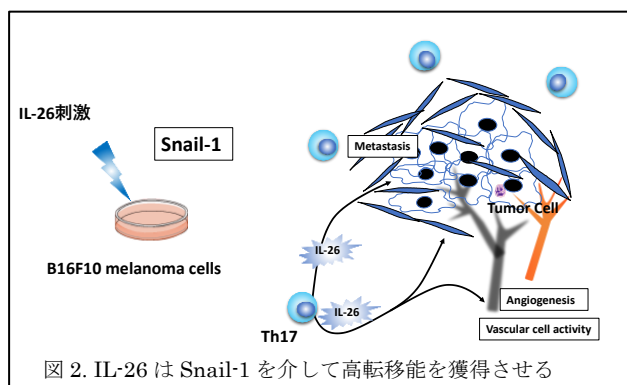
図 2. hIL-26Tg マウス由来の細胞は強力に肺転移が誘導される

##### [3] 転移性メラノーマの癌微小環境における IL-26 発現細胞の同定

申請者は hIL-26Tg マウスを用いた薬剤誘導性乾癬様皮膚炎症モデルの炎症皮膚病変部組織で CD4 陽性細胞が IL-26 を発現し、炎症病態の悪化を誘導していることを見出した。そこで、癌微小環境に集積した CD4 陽性 T 細胞が IL-26 を産生していることを予測し、悪性黒色腫における IL-26 産生細胞の同定を行うため、hIL-26Tg マウスを用いてマウスの高転移性メラノーマ

B16F10-Luc を移植した腫瘍の原発巣を免疫染色したところヒト IL-26Tg マウスの担癌モデルでは野生型と比較してマクロファージや CD4 陽性 T 細胞などの免疫細胞の顕著な浸潤が観察された。また、CD4 と IL-26 の共染色により、CD4 と IL-26 の共局在が見られたことから、微小環境中に浸潤した CD4 陽性 T 細胞から IL-26 が産生されている可能性が明らかになった。また、現在はフローサイトメトリーを用いて、微小環境中で IL-26 を産生している細胞のより詳細な解明を行っており、悪性黒色腫の患者検体組織アレイを用いて IL-26 の発現と産生細胞の同定を行っている。

以上のことから IL-26 は癌微小環境中に浸潤した CD4 陽性 T 細胞から産生され、Snail-1 の発現誘導を介して EMT 様の細胞形質転換や anoikis resistance などを亢進させることで癌細胞に高転移能を獲得させている可能性が示唆された(図 2)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh T, Hatano R, Komiya E, Otsuka H, Narita Y, Aune TM, Dang NH, Matsuoka S, Naito H, Tominaga M, Takamori K, Morimoto C, Ohnuma K	4. 巻 139
2. 論文標題 Biological Effects of IL-26 on T Cell-Mediated Skin Inflammation, Including Psoriasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of investigative dermatology	6. 最初と最後の頁 878-889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.09.037	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 該当する

1. 著者名 Hatano R, Itoh T (Co-first author), Otsuka H, Okamoto S, Komiya E, Iwata S, Aune TM, Dang NH, Kuwahara-Arai K, Ohnuma K, Morimoto C	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of novel anti-IL-26 neutralizing monoclonal antibodies for the treatment of inflammatory diseases including psoriasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mAbs	6. 最初と最後の頁 1428-1442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420862.2019.1654305.	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 該当する

〔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 古宮 栄利子, 富永光俊, 波多野良, 伊藤匠, 大塚春奈, 本田耕太郎, 外山扇雅, 鎌田弥生, 大沼圭, 森本幾夫, 高森建二
2. 発表標題 加齢皮膚で誘発される機械的かゆみ調節機構の解明
3. 学会等名 第15回加齢皮膚医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古宮 栄利子, 波多野良, 大塚春奈, 伊藤匠, 松田浩則, 須賀康, 大沼圭, 富永光俊, 森本幾夫, 高森建二
2. 発表標題 機械的かゆみの調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第82回日本皮膚科学会東京支部
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

乾癬などの炎症性皮膚疾患が悪化するメカニズムを解明  
<https://www.juntendo.ac.jp/news/20190417-01.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----