

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06228・19K21328

研究課題名(和文)皮膚科疾患におけるインターフェロン誘導性遺伝子の解析とその応用

研究課題名(英文)Analyses and applications of type I interferon-inducible genes in skin disorders

研究代表者

金丸 央 (Kanemaru, Hisashi)

熊本大学・病院・病院教員

研究者番号：20823313

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)：I型インターフェロン(IFN)は悪性黒色腫に対する重要な抗腫瘍因子として注目されている。本研究はI型IFN誘導性遺伝子の役割に焦点を当て、これらの遺伝子に影響を与える因子を探索し、その病態における機序を解明することを目的とした。I型IFN誘導性遺伝子に影響を与える因子の探索を行った結果、腫瘍代謝産物X(未公開)により、樹状細胞において抗腫瘍効果を持つサイトカインIL-12bの産生が抑制された。網羅的解析からXは転写因子Y(未公開)を誘導することが分かった。遺伝子Yはヒトの悪性黒色腫の組織において病期ステージが進行するほど発現率が上昇しており、腫瘍免疫において重要な因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、I型インターフェロン誘導遺伝子および腫瘍由来の代謝産物の役割に関しその機序を解明することで、診断・予後マーカーとしての可能性を探り、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の奏効率改善も含めた治療応用についての可能性を検討することを目的としている。本研究は皮膚悪性腫瘍に対する治療成績の向上、および診断・予後予測精度の向上により、ICIの奏効率改善だけではなく、ICIに関連するコストの圧縮やさらに同様の手法を他の悪性腫瘍に展開できる可能性があるという側面もあり、学術的・社会的な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma (MM) is an aggressive and potentially fatal neoplasm, for which effective treatments need to be developed urgently. Some reports suggest that type I interferons (IFNs), secreted by dendritic cells (DCs), could be involved in the therapeutic effectiveness of immune checkpoint blockers. From this perspective, we hypothesized that type I IFN-inducible genes may also be involved in tumor immunity. We found that a tumor-derived factor X (unpublished) can suppress the expression of type I IFN-inducible genes and of IL-12 p40 in mouse bone marrow-derived DCs. Additionally, we found that X can induce the expression of gene Y, a transcription factor (unpublished), in DCs. There was a significant increase in Y expression ratios in the primary tissues of patients with invasive MM as compared with the tumor tissues of MM in situ. These data suggest that factor X and gene Y may prove to be useful targets for treatment of MM with immune checkpoint blockers.

研究分野：皮膚科学

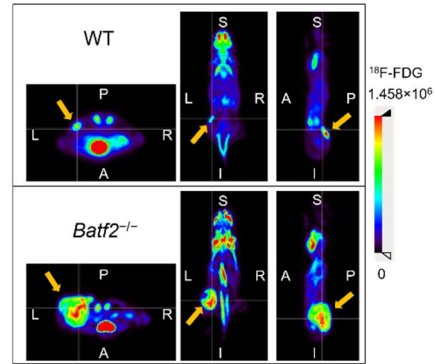
キーワード：インターフェロン 悪性黒色腫 代謝 腫瘍免疫 転写因子 樹状細胞 サイトカイン 免疫療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の有効性は近年注目されているが、その奏効率は未だ限定的であり、どのような因子がその奏効率に影響を与えているのかについてメカニズムの解明が課題となっている。さらに、どのような患者に有効であるのか、ICI がコストの大きい治療法であることから医療経済的な問題も含め、診断・予後マーカーの探索が課題となっている。ICI の治療成績に影響を与える重要な因子として、樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫により産生されるサイトカインが注目されており、特に I 型インターフェロン (IFN) は悪性黒色腫に対して臨床で使用される薬剤の一つでもあることから、重要な因子として注目されている。申請者は皮膚癌の一つである悪性黒色腫の患者に対する治療法の一つである I 型 IFN 局注療法を臨床の現場

図1 PET-CT fusion imageによる *Batf2*^{-/-} と野生型 (WT) マウスの画像解析。悪性黒色腫細胞株の皮下移植2週間後。矢印：腫瘍部分



で行ってきた経緯があり、悪性腫瘍に対する I 型 IFN の有効性について着目した。この着想を背景として、申請者は I 型 IFN 誘導性遺伝子の一つである *BATF2* が重要な抗腫瘍効果を持っていることを発見した (Kanemaru H, et al., *PNAS*, 2017, 図 1)。この研究では *BATF2* がサイトカイン IL-12b の発現促進を通じた腫瘍抑制効果を持っていることが分かり、腫瘍免疫における重要性が明らかとなった。さらに *BATF2* が IL-12b の発現促進に関して複数の促進経路を有していることを発見した (Kanemaru H, et al., *Int Immunol.* 2018, 図 2)。

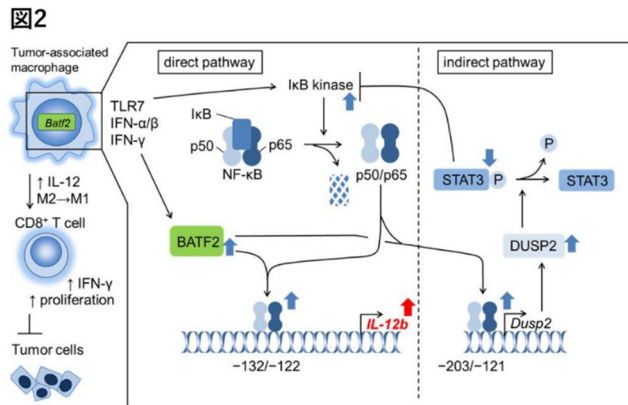


図 2)。本研究は *BATF2* が腫瘍免疫に関連した新しい標的かつ新規マーカーである可能性を示唆しており、ICI との関連について現在さらに研究を進めている。さらに、上記報告に関連した更なる検討から、腫瘍由来の特定の代謝産物が I 型 IFN 誘導性遺伝子に重大な影響を与えていることを、近年申請者等は見出した。本研究はさらに上記の代謝産物が I 型 IFN 誘導性遺伝子も含めどのようなメカニズムで腫瘍免疫に影響を与えているのか解明するとともに、ICI の奏効率に影響を与えている可能性について検討を試みるものである。

2. 研究の目的

本研究は、I 型 IFN 誘導性遺伝子および腫瘍由来の代謝産物の役割に関しその機序を解明することで、診断・予後マーカーとしての可能性を探り、ICI の奏効率改善も含めた治療応用についての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

皮膚疾患の病態において重要と考えられる I 型 IFN 誘導性遺伝子の選出と解析

まず、I 型 IFN 誘導性遺伝子に重要な影響を与える腫瘍由来の因子について探索しそのメカニズムについて解析を行った。マウス由来の骨髄細胞から樹状細胞 (BMDC) を誘導し、腫瘍微小環境中で生じると考えられる各種の代謝産物で刺激し、治療標的となりうる因子 X (未公開) を選出した。X について、マイクロアレイを用いて各遺伝子の動態について網羅的に解析を行った。その結果、樹状細胞において抗腫瘍効果をもたらす重要なサイトカインの一つである、IL-12b を X が抑制することが分かった。そのメカニズムについて IL-12b プロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイで解析を行った。また、OT-I マウスを用いて X の存在下での樹状細胞の CD8⁺T 細胞への抗原提示能力について解析を行った。さらに、X により誘導された遺伝子群の中から、X により最も誘導される遺伝子であり、かつ治療応用の観点で有望と考えられる遺伝子 Y (転写因子、未公開) を選出した。

予後・治療成績と I 型 IFN 誘導性遺伝子との関連についての解析とその応用の検討

次に、得られた遺伝子 Y に対し、ヒト悪性黒色腫の各ステージにおける Y の発現について、免疫染色法を用いて解析を行った。ステージごとに解析を行い、診断・予後マーカーとしての可能性について検討を行った。

治療効果を得る手法についての検討

上記の腫瘍由来代謝産物 X が腫瘍免疫を抑制する作用があるという結果が得られ、X を抑制することで治療効果を高めることができる可能性が考えられたことから、X を抑制する手法について検討を行った。

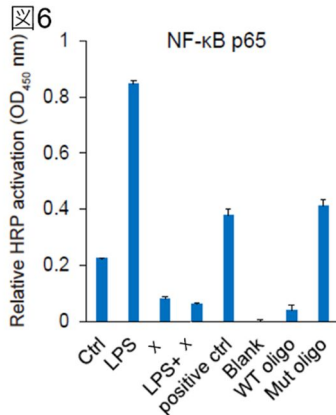
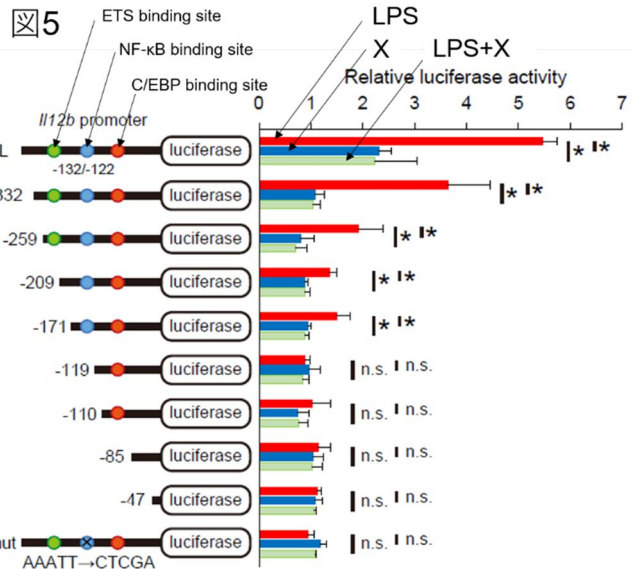
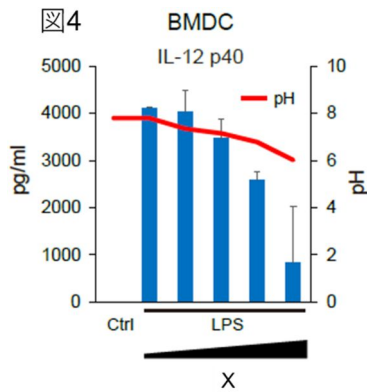
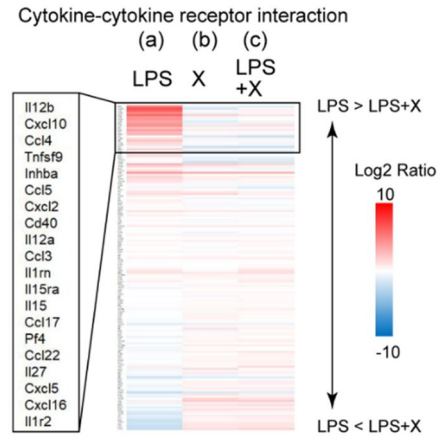
4. 研究成果

皮膚疾患の病態において重要と考えられる I 型 IFN

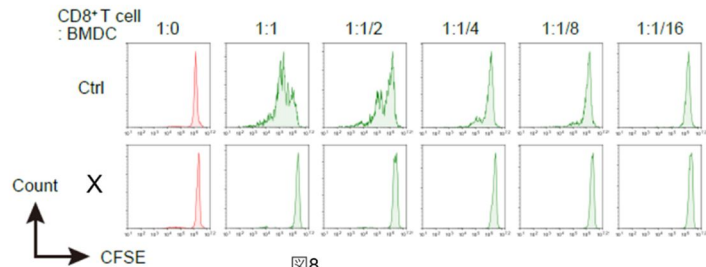
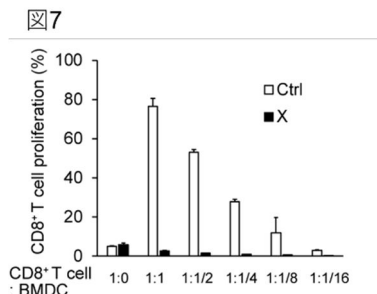
誘導性遺伝子の選出と解析:

マウス骨髄由来の樹状細胞を用いた解析から、腫瘍由来の代謝産物 X により、上記の遺伝子 BATF2 の他、重要な抗腫瘍効果を持つサイトカインの一つ IL-12b が著明に抑制されるという結果が得られた (図 3)。この結果は、別途 ELISA 法でも X の濃度依存性に IL-12 p40 が低下することが確認できた (図 4)。そのメカニズムについて IL-12b プロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイで解析を行ったところ、X の存在下では、IL-12b プロモーター内の NF- κ B 結合領域に欠失変異あるいは置換変異を加えたときに抑制効果が消失することが分かった (図 5)。NF- κ B binding assay の結果からも、X の IL-12b プロモーターにおいて、X により NF- κ B が抑制されることが明らかとなった (図 6)。

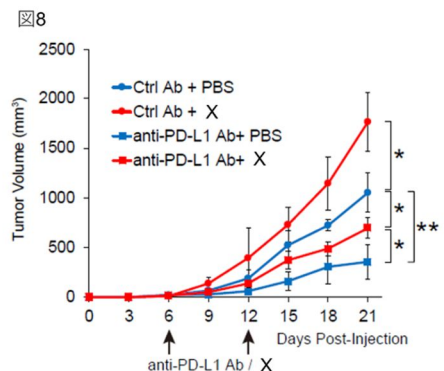
図3



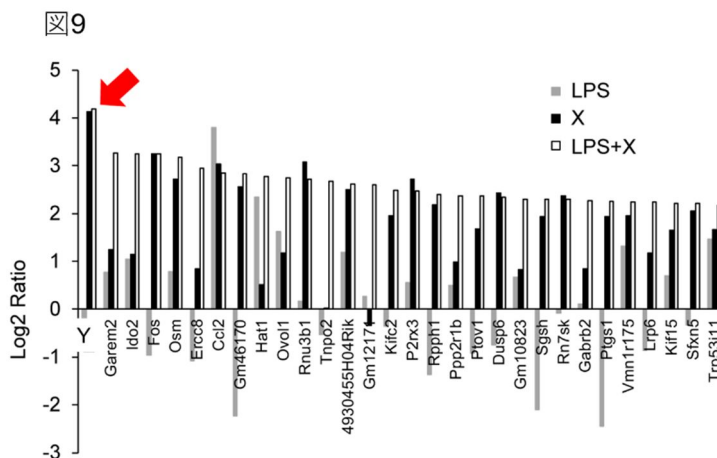
また、OVA ペプチドに特異的に反応して増殖する CD8⁺T 細胞を持つ OT-I マウスを用いて、X の存在下での樹状細胞の CD8⁺T 細胞への抗原提示能力について解析を行ったところ、X の存在下では OT-I CD8⁺T 細胞の増殖が著明に抑制された (図 7)。この結果から、X の存在下では樹状細胞の抗原提示能力が抑制されていることが示唆された。



これらの結果を踏まえ、*in vivo* において、担癌マウスを用いて X の存在下での anti-PD-L1 抗体による治療効果を検証する実験を行ったところ、X の存在下では anti-PD-L1 抗体の治療効果は減弱した (図 8)。



次に、X により誘導される遺伝子について、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。その結果、X は遺伝子 Y (転写因子) の発現を著明に促進させ、さらに Y は他の I 型 IFN 誘導性遺伝子と比較しても非常に高く誘導された (図 9)。

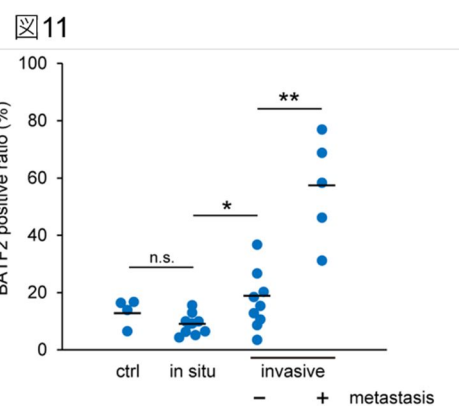
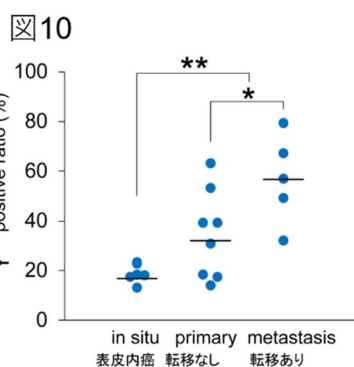


予後・治療成績と I 型 IFN 誘導性遺伝子との関連についての解析とその応用の検討:

で得られた遺伝子 Y について、ヒト悪性黒色腫の各ステージにおける Y の発現について、免疫染色法を用いて解析を行った。

その結果、悪性黒色腫の表皮内癌においては遺伝子 Y の発現は低値に留まるが、浸潤癌、転移とステージが進むにつれて、原発巣での遺伝子 Y の発現率が上がることが分かった (図 10)。

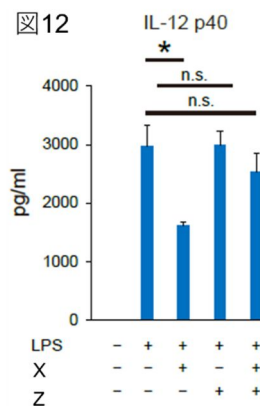
同時に、上記の転写因子 BATF2 についても、ヒト悪性黒色腫の各ステージで解析を行ったところ、遺伝子 Y と同様に、腫瘍のステージが進むほど、発現率が上昇することが分かった (図 11、論文投稿中)。現在、遺伝子 Y のノックアウトマウスを作成し、遺伝子 Y の X との関係と、その具体的なメカニズムについて解析中である。



治療効果を得る手法についての検討

上記を踏まえ、代謝産物 X を抑制する手法について検討を行った。その結果、X と反応を起こすことが知られている Z により、X の IL-12 p40 抑制効果がキャンセルされることが分かり (図 12)、現在さらに解析中である。

上記の研究成果 - について、現在、論文作成中であり、発表予定としている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Hisashi Kanemaru, Noritoshi Honda, Yosuke Kubo, Haruna Nishihara, Takehiro Onuma, Keisuke Sakai, Satoshi Fukushima, Yuji Inoue, Yumi Honda, and Hironobu Ihn	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Case of cutaneous myoepithelioma managed with surgical resection without recurrence for 4 years	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14769	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 Haruka Kuriyama, Ikko Kajihara, Hisashi Kanemaru, Yuki Nishimura, Toshikatsu Igata, Shinichi Masuguchi, Yukihiro Imaoka, Keishi Makino, Hironobu Ihn	4. 巻 13
2. 論文標題 Brain abscess in an angiosarcoma patient during a disease-free interval	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 175-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2019.01042	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 Kazumi Urata, Ikko Kajihara, Hitomi Miyauchi, Tselmeg Mijiddorj, Saki Otsuka-Maeda, Ryoko Sakamoto, Soichiro Sawamura, Hisashi Kanemaru, Saori Kanazawa-Yamada, Katsunari Makino, Jun Aoi, Takamitsu Makino, Satoshi Fukushima, Yoshihiro Komohara, Hironobu Ihn	4. 巻 -
2. 論文標題 The Warburg effect and tumour immune microenvironment in extramammary Paget's disease: overexpression of lactate dehydrogenase A correlates with immune resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.16145	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 Yukari Mizukami, Hisashi Kanemaru (Corresponding Author), Kayo Nakamura, Syunpei Hashigo, Ikko Kajihara, Azusa Miyashita, Jun Aoi, Satoshi Fukushima, Yumi Honda, Hironobu Ihn	4. 巻 47
2. 論文標題 Successful treatment of occult pancreatic melanoma using BRAF/MEK inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e126-e127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15198	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 Ryoko Sakamoto, Ikko Kajihara, Hitomi Miyauchi, Saki Maeda-Otsuka, Saori Yamada-Kanazawa, Soichiro Sawamura, Hisashi Kanemaru, Katsunari Makino, Jun Aoi, Takamitsu Makino, Satoshi Fukushima, Mamiko Masuzawa, Mikio Masuzawa, Yasuyuki Amoh, Daichi Hoshina, Riichiro Abe, Hironobu Ihn	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Endoglin Exerts Antitumor Effects through the Regulation of Non-Smad TGF-Signaling in Angiosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.01.031	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 Haruka Kuriyama, Satoshi Fukushima, Satoshi Nakahara, Hisashi Kanemaru, Azusa Miyashita, Jun Aoi, Yusuke Tomita, Takeshi Kawasaki, Kisato Nosaka, Hironobu Ihn	4. 巻 -
2. 論文標題 Serious disseminated intravascular coagulation associated with combination therapy of nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15336	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 Toshihiro Kimura, Satoshi Fukushima, Etsuko Okada, Haruka Kuriyama, Hisashi Kanemaru, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-derived myeloid cells expressing OX40 ligand amplify antigen-specific T cells in advanced melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12887	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 Saori Kiyohara, Hisashi Kanemaru (corresponding author), Takehisa Suzuki, Kayo Nakamura, Noritoshi Honda, Katsunari Makino, Ikko Kajihara, Takamitsu Makino, Takashi Ohba, Hironobu Ihn	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful prednisolone treatment of peripartum Behçet's disease associated with HLA-A26	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australasian Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
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 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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金丸 央、佐藤 荘、福島 聡、尹 浩信、審良 静男
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージにおける転写因子BATF2のIL-12p40発現促進による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金丸 央、佐藤 荘、福島 聡、尹 浩信、審良 静男
2. 発表標題 転写因子BATF2のIL-12p40発現促進による抗腫瘍効果について
3. 学会等名 第34回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金丸 央、佐藤 荘、福島 聡、尹 浩信、審良 静男
2. 発表標題 腫瘍免疫における転写因子BATF2のIL-12p40発現促進の機序について
3. 学会等名 第35回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸 央、佐藤 荘、福島 聡、尹 浩信、審良 静男
2. 発表標題 皮膚科疾患における転写因子BATFファミリーの意義とその応用
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸 央、佐藤 莊、福島 聡、尹 浩信、審良 静男
2. 発表標題 転写因子BATF2のIL-12p40発現促進機構
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸 央
2. 発表標題 The antitumor effect of BATF2 through IL-12 p40 up-regulation in tumor-associated macrophages
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第11回きさらぎ塾
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸央、梶原一亨、宮内仁美、宮下梓、青井淳、福島聡、尹浩信
2. 発表標題 悪性黒色腫の患者における血漿cfDNAを用いたBRAF遺伝子変異の検出
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----