

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07635

研究課題名（和文）IL-18阻害抗体をもちいた新規膵がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel pancreatic cancer treatment using IL-18 inhibitory antibody

研究代表者

加美野 宏樹（KAMINO, Hiroki）

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：00625692

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）：ヒト膵がん細胞MIA PaCa-2を使って担がんマウスを作成し、5-FU投与後のIL-18活性化を観察したが、活性型IL-18の誘導が検出できなかったため治療実験ができなかった。一方で、5-FUによるIL-18活性化メカニズムについてはpyroptosisが関与することを明らかにした。研究の過程からヒト活性型IL-18はマウスIL-18受容体と反応しないことが判明したため、マウス実験に使える抗体作製に着手し、活性型マウスIL-18阻害抗体の作製に成功した。ヒト膵がん組織を用いた免疫組織化学染色では、活性型IL-18の発現と局在について新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗がん剤5-FUによる膵がん細胞からの活性型IL-18の産生メカニズムについて明らかにした。5-FUは膵がんを始め複数のがん治療で使用される抗がん剤だが、治療の際に周囲のがん微小環境で炎症が生じる可能性が示唆された。一方で、ヒト活性型IL-18とマウスIL-18受容体が結合しないことを見出した。そのためマウス実験に利用するためのマウスIL-18阻害抗体を作製し、その成果を論文や学会で報告した。この交代は膵がん治療以外にもIL-18の関与が疑われるさまざまな炎症性疾患マウスモデルの治療実験にも応用できる可能性があり、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Tumor-bearing mice with human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells were prepared, and IL-18 activation was examined after the anticancer drug 5-FU treatment. We couldn't detect any active IL-18 protein in serum and stopped treatment study using IL-18 antibody. On the other hand, we demonstrated the novel mechanism that 5-FU induces pyroptosis in pancreatic cancer cells, resulting in activation of IL-18. We also identified that human IL-18 protein does not bind to mouse IL-18 receptor. Thus, we generated a novel inhibitory antibody against active mouse IL-18 protein that can be used in mouse experiments, and we reported the results in paper and academic conferences. In immunohistochemical staining experiment of human pancreatic cancer tissue with our IL-18 antibody, we analyzed the expression and localization of active IL-18 and obtained some new information.

研究分野：腫瘍診断および治療学関連

キーワード：インターロイキン18（IL-18） 膵臓がん 阻害抗体 5-フルオロウラシル（5-FU）

1. 研究開始当初の背景

「炎症」と「がん」は密接な関係にあり、飲酒や喫煙、ウイルス感染等を起因とする慢性的な炎症は、肝臓がんや膵臓がんといったさまざまな組織でのがんの発生・進展を促進する重要なファクターの一つである。この炎症を引き起こす因子として腫瘍壊死因子 (TNF) - γ やインターロイキン (IL) -1, IL-6 などが知られており、総称として「炎症性サイトカイン」と呼ばれる。研究対象である「IL-18」は IL-1 ファミリーに属する炎症性サイトカインの一つであり、通常は活性のない前駆体としてさまざまな細胞内に発現しているが、炎症性シグナルが入ることにより活性化したプロテアーゼが前駆体を切断することで「活性型 IL-18」となる。さらに細胞外に放出された活性型 IL-18 は、IL-18 受容体と結合することで炎症シグナルを増強する。そのため、活性型 IL-18 の阻害は過剰な炎症を抑制できる可能性がある。

IL-18 と膵がんの関連性については複数の報告があり、膵がんの前癌病変と考えられる慢性膵炎患者の血液中では IL-18 が高値で検出されている (Manohar et al., World J Gastrointest Pharmacol Ther. 8(1): 10-25, 2017)。また膵がん患者においても健常人と比べて血清中の IL-18 値が高いことが知られている (Xingjun et al., Clin Cancer Res. 22(23):5939-5950, 2016)。この報告では「がん局所の IL-18 値が高いほど予後が悪くなる」という興味深いデータも示されている。本研究者はこれまでに「ヒト活性型 IL-18」に対して強力な阻害効果を示す抗体を作製し、報告してきた (Nariai et al., Arch Biochem Biophys. 2019 Mar 15;663:71-82.)。IL-18 の阻害が膵がんに対する治療効果の増強、あるいは患者の予後延長に寄与する可能性があるのではと考え、この抗体を利用した研究の着想に至った。

一方で、がん患者などで高値を示す IL-18 がどこから出てくるのか？についてはいまだに不明である。抗がん剤である「5-フルオロウラシル / 5-FU」をヒト膵がん細胞株 Capan-2 に処理すると、細胞内の IL-18 が増加するという現象が 2005 年に報告された (Carbone et al., Cancer Biol Ther. 2005 Feb;4(2):231-41.)。本研究者もヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞を用いて同様の実験をおこなったところ、活性型 IL-18 の増加が確認できた。5-FU によるがん細胞からの活性型 IL-18 誘導について詳細なメカニズムを明らかにすることができれば、抗がん剤治療の際にがん局所で生じる炎症の伝播を食い止められる可能性がある。加えて、本研究者の作製した IL-18 抗体は免疫組織化学染色にも利用できるため、本研究を遂行することで膵がん組織での活性型 IL-18 の発現や局在という新しい情報提供ができると考えた。

2. 研究の目的

これまで膵がんの発生・進展について IL-18 の関与が客観的に示されてきたものの、その詳細については不明なままであった。膵がん患者で高値を示す IL-18 はどこからどうやって供給されているのか？膵がん組織で IL-18 はどのような発現様式をしているのか？IL-18 を阻害することは、膵がん治療に役立つのか？本研究者が作製した独自の IL-18 抗体を利用することで、膵がんと IL-18 の関係性をより明らかにするとともに、IL-18 阻害抗体を利用した新規膵がん治療法の可能性を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MIA PaCa-2 担がんマウスを使った 5-FU 投与実験

本研究者は MIA PaCa-2 細胞に 5-FU を処理すると活性型 IL-18 が誘導されることをこれまでに確認していた。そのため MIA PaCa-2 細胞を使った担がんマウスを用意し、5-FU 添加による *in vivo* での活性型 IL-18 誘導を観察した。なお当初は IL-18 阻害抗体の投与による治療実験を計画していたが、後述の理由により中断することとなった。

(2) マウス活性型 IL-18 特異的抗体の作製、機能解析と担がんマウス実験

研究の途中で、「活性型ヒト IL-18」は「マウス IL-18 受容体」と結合しないことが明らかとなった。そのため、マウス実験に使用するための新たな研究資材としてマウス活性型 IL-18 に対するモノクローナル抗体を作製し、詳細なエピトープ解析や阻害効果の有無、マウス血液中での半減期などを検討した。さらにマウス IL-18 を発現するマウス膵がん細胞株を樹立し、担がんマウスを作製したうえでの抗体投与実験をおこなった。

(3) 抗がん剤 5-FU による MIA PaCa-2 細胞からの活性型 IL-18 誘導のメカニズム解明

5-FU 添加による MIA PaCa-2 細胞からの活性型 IL-18 誘導メカニズムはいまだ不明である。そのため通常 IL-1 / IL-18 の活性化に関わるとされる「NLRP3 インフラマソームの活性化機構」に着目し、さまざまな分子生物学的手法をもちいて詳細な検討をおこなった。

(4) ヒト膵がん組織を使用した IL-18 免疫組織化学染色

活性型 IL-18 がヒト膵がん組織でどのように発現しているのか、これまで調べられた報告はない。本研究者が持つ独自の活性型 IL-18 抗体を使って、その発現や分布を解析した。

4. 研究成果

(1) MIA PaCa-2 担がんマウスを使った 5-FU 投与実験

ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成後に 5-FU の腹腔内投与をおこなった。72 時間後に血清を採集し、市販の ELISA キットによって IL-18 測定をおこなったところ、5-FU 投与の有無にかかわらずヒト IL-18 の存在が検出された。この結果はヒト腫瘍からヒト IL-18 の漏出が起きたことを示唆するが、その理由は不明である。一方、本研究者が開発した「ヒト活性型 IL-18 検出 ELISA」では、残念ながらシグナルが検出できなかった。そもそもの存在量が少ないとともに検出感度の悪さが理由として考えられた。その後も検出感度の改善のための研究を進め、最近ようやく感度が 50~100 倍程度向上した ELISA の開発に成功した。検証実験をおこなうとともに、他施設との共同実験をすすめているところだり、今後改めて本研究に利用したいと考えている。

一方、研究を進める過程でヒト活性型 IL-18 はマウス IL-18 受容体と反応しないことを示唆する結果が得られた(図 1)。これはヒトがん細胞から出てくるヒト活性型 IL-18 が、マウス個体内では働かない可能性が高いことを示唆する。マウス由来の資材で研究を遂行するために、新たにマウス活性型 IL-18 特異的抗体の作製を進めた。

(2) マウス活性型 IL-18 特異的抗体の作製、機能解析と担がんマウス実験

タンパク質分解酵素カスパーゼ 1/4 により切断される活性型マウス IL-18 の断端配列は図 2A のようになる。その配列を持つペプチドをマウスに免疫し、活性型マウス IL-18 のみを認識するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を 5 種類作製した。そのうち「5-4.1」と「9-3.1」について詳細な解析を進め、活性型マウス IL-18 を免疫沈降ができることや(図 2B)、その詳細なエピトープマッピングをおこなった(図 2C)。さらに阻害効果を示す中和活性の測定(図 2D)やマウス体内での抗体半減期の測定(図 2E)をおこない、その成果を論文として報告した(Uchida et al., Arch Biochem Biophys. 2022 Sep 30;727:109322.)。

作製した抗体を治療実験に利用するため、担がんマウス実験に使えるマウス膵がん細胞株を探したものの、IL-18 を発現する細胞はみつからなかった。そこでマウス膵がん細胞である「mT3」にマウス IL-18 を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。マウス皮下への移植・腫瘍形成後の抗体投与による治療実験をおこなったが、腫瘍に対する明らかな影響は確認できなかった。この細胞では *in vitro* において 5-FU 添加による活性型 IL-18 誘導が確認できなかったことから、ヒトとマウスでは 5-FU に対する反応が異なる可能性が考えられたが、詳細については今後の研究課題である。なお今回作製したマウス活性型 IL-18 抗体については、他施設共同研究における複数の炎症性疾患モデルマウスに対して治療効果が認められており、今後のマウス研究にとって重要な資材が作製できたと考えている。

(3) 抗がん剤 5-FU による MIA PaCa-2 細胞からの活性型 IL-18 誘導のメカニズム解明

5-FU による膵がん細胞からの活性型 IL-18 誘導は、がん局所での IL-18 量増加の要因、ひいては予後不良の遠因となりうるため、そのメカニズムの解明は重要な意味を持つ。がん局所は栄養状態が悪いことが知られているため、低栄養培地で培養した 2 種類の膵がん細胞株に 5-FU 処理をしたところ、活性型 IL-18 の誘導が確認された(図 3A)。その際、培養皿中で浮遊した細胞と接着したままの細胞が混在していることに気づき、それぞれを分離して解析したところ、特に浮遊した細胞で活性型 IL-18 が誘導されていることが明らかとなった(図 3B)。また 5-FU を添加していないコントロール群でもわずかながら細胞が浮遊しており(栄養飢餓による影響と考えられる)、集めて解析したところ、驚いたことに活性型 IL-18 の存在が確認された(図 3C)。膵がん細胞は栄養飢餓状態で 5-FU に曝されると、より強い活性型 IL-18 誘導が引き起こされる可能性がある。

またさらなる実験から、この現象には一般的な IL-18 活性化経路に関わる Caspase-1/4 ではなく Caspase-8 が関与すること、パイロトシスによる細胞死に重要な分子であるガスダーミン D (GSDMD) の活性化が関与することを明らかにした(図 3C)。これらの現象はがん細胞で生じる新しい IL-18 活性化メカニズムを提唱するものであり(図 3D)、これらの結果については学会で報告するとともに、現在論文投稿の準備しているところである。

(4) ヒト膵がん組織を使用した IL-18 免疫組織化学染色

ヒト膵がんにおける IL-18 の発現や局在を検討するため、島根大学で集められた検体 40 例について、IL-18 を認識する抗体「11-4.1」と活性型 IL-18 のみを認識する抗体「9-10.2」を使って免疫染色をおこなった。結果として膵がん細胞における IL-18 染色は比較的高頻度に見られた(図 4)。核に局在する例や細胞質が強く染まる例など、染色パターンはさまざまであり、病理医と共同した詳細な解析(染色強度と病期・予後との相関等)は現在も検討中である。一方、活性型 IL-18 は膵がん細胞での発現がほとんど観察されなかったが、

ランゲルハンス島に存在する細胞での強染色が観察された。興味深い現象であるが、現在のところ理由や意味は不明であり、今後の検討が必要である。

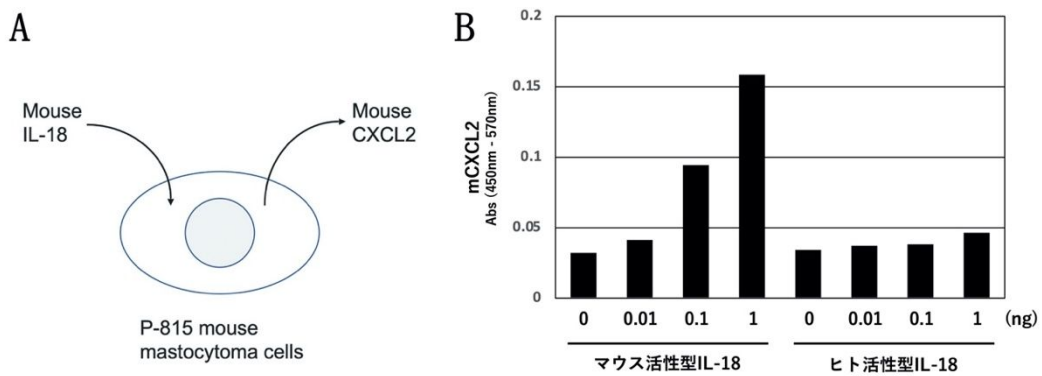


図1 A) 新しく発見した活性型マウスIL-18の機能評価実験系の概略。
B) P-815細胞からのmCXCL2誘導はマウス活性型IL-18で誘導されるが、ヒト活性型IL-18では誘導されない。

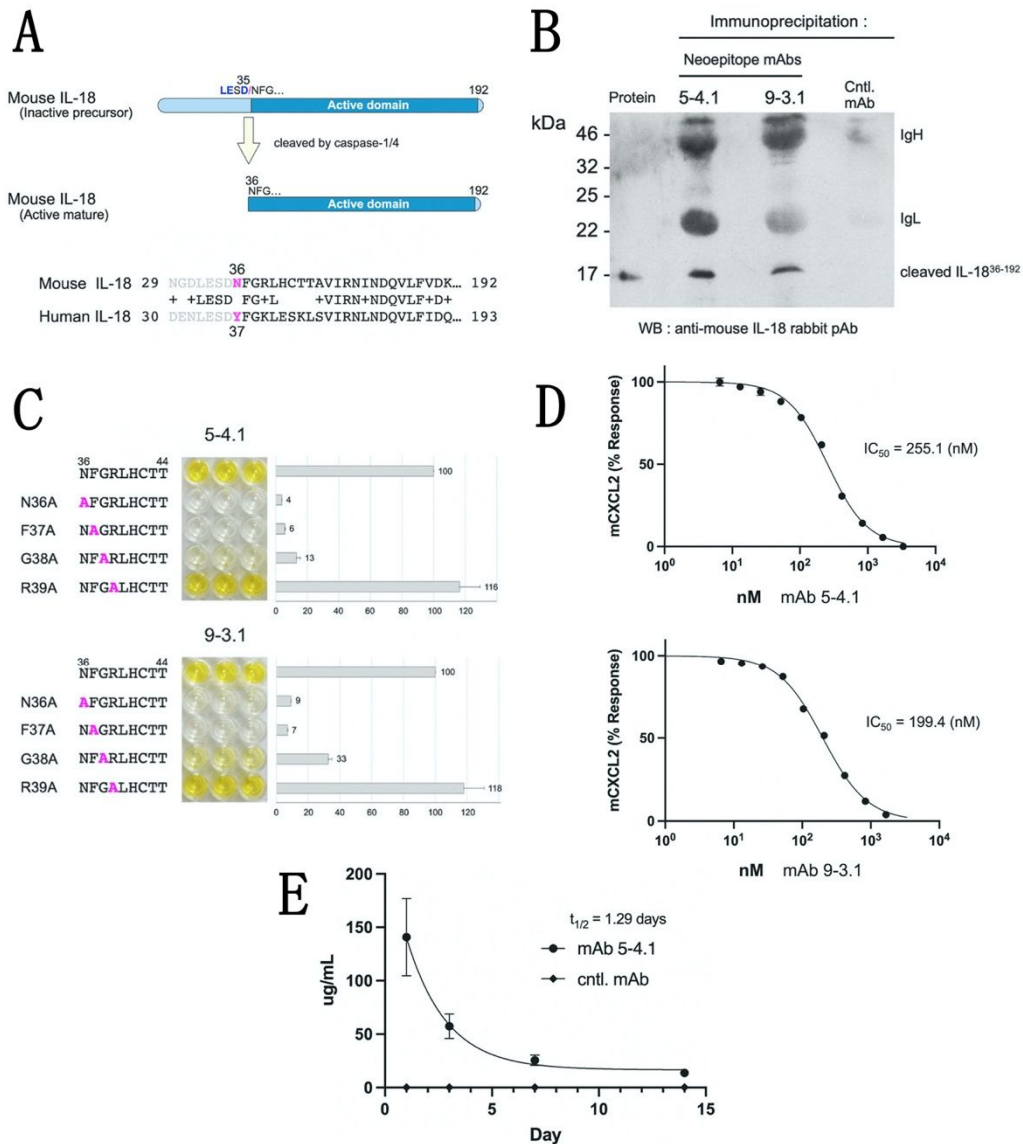


図2 A) ヒトとマウスのIL-18配列を比較した図。
B) 2種類のマウス活性型IL-18認識抗体(5-4.1、9-3.1)による活性型マウスIL-18の免疫沈降実験の結果。
C) ELISAによるエピトープマッピング。断端配列のアミノ酸をアラニンに置換して反応性を確認した。
D) 5-4.1と9-3.1を使った機能阻害実験の結果。活性型マウスIL-18と各抗体を混ぜて添加後、P-815細胞の培養上清中に含まれるmCXCL2量をELISAによって検出した。
E) マウス血液中での抗体の半減期を調べた結果。5-4.1をマウス静脈中に投与し、血中での経時的な減少をELISAによって検出した。

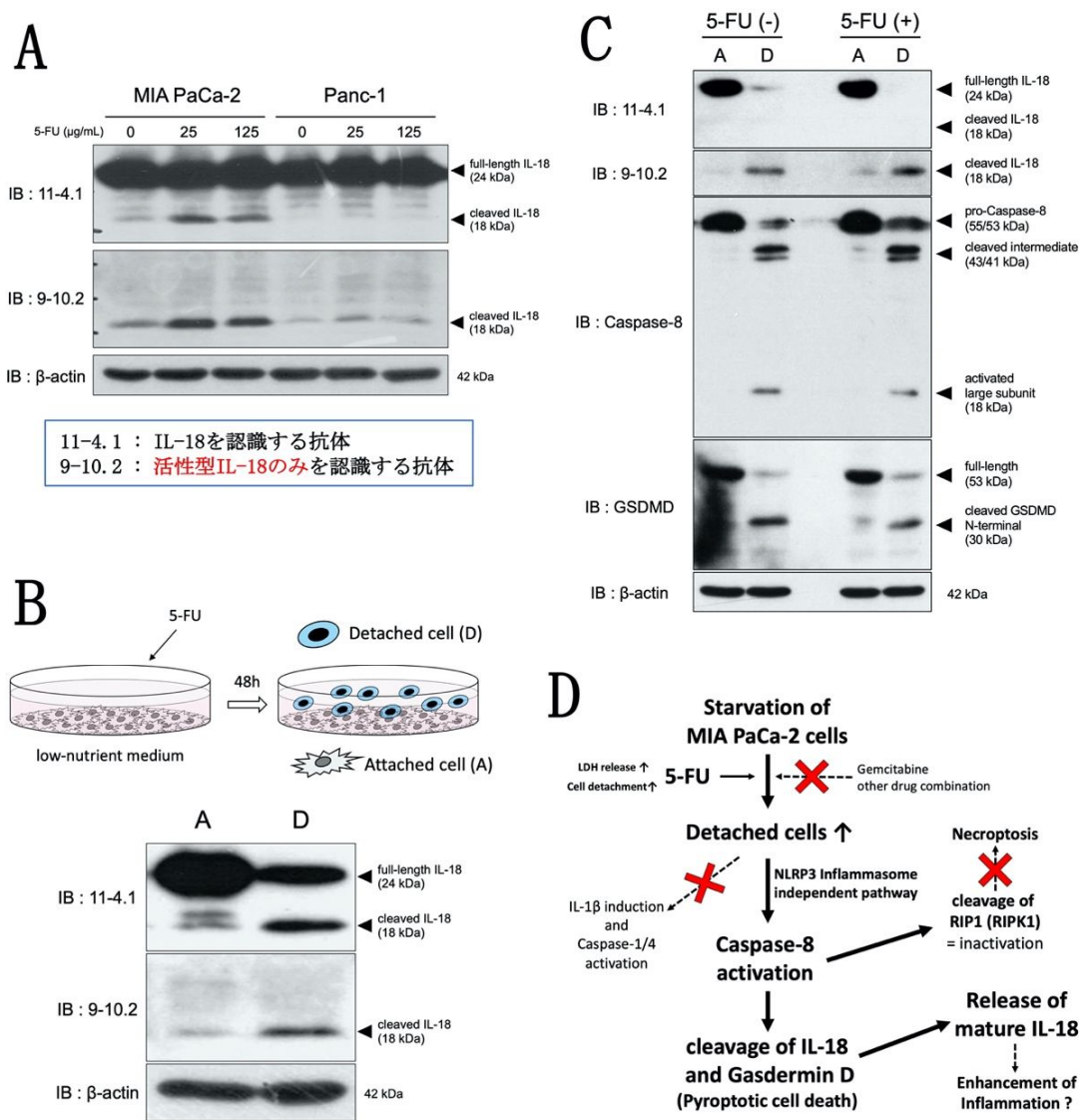


図3 A) 5-FU処理後のヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2とPanc-1における活性型ヒトIL-18誘導の実験結果。
 B) 5-FU処理後、浮遊した細胞 (D) と接着したままの細胞 (A) を集めておこなった実験の結果。
 低栄養培養液を使用し、飢餓状態で実験をおこなった。
 C) 5-FU有無の低栄養培養液下で得られた各細胞を集めておこなった実験の結果。IL-18の活性化に
 ともなって、Caspase-8とGSDMDの活性化が観察された。
 D) 今回の結果から得られた各分子の相関予測図。

11-4.1

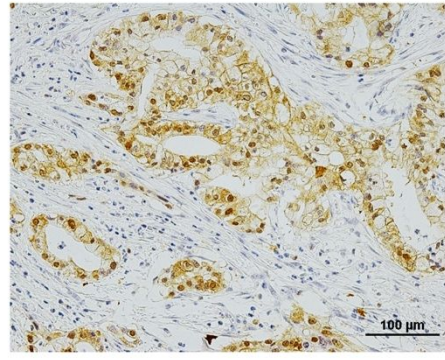


図4 ヒト膵がん組織をもちいた免疫組織化学染色の結果。
 11-4.1はIL-18タンパク質を検出できる抗体で、核や細胞質に染色が観察された。

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 5件）

1. 著者名 Sugiura Tomoko, Sugiura Hiroaki, Kato Hiroaki, Nariai Yuko, Mizumoto Yuuki, Hanada Kozue, Takahashi Rieko, Hinotubo Yukari, Tanaka Naoko, Sasaki Mutsumi, Eguchi Haruki, Kamino Hiroki, Urano Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Kinetics of Anti-SARS-CoV-2 Antibody Response Following Two Doses of the BNT162b2 mRNA Vaccine: A Japanese Single-Center Primary Care Clinic Report Involving Volunteers and Patients with Autoimmune Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Disease Reports	6. 最初と最後の頁 24 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/idr15010003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Yuki, Nariai Yuko, Obayashi Eiji, Tajima Yoshitsugu, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Urano Takeshi, Kamino Hiroki	4. 巻 727
2. 論文標題 Generation of antagonistic monoclonal antibodies against the neopeptide of active mouse interleukin (IL)-18 cleaved by inflammatory caspases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109322 ~ 109322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hotta Takamasa, Nariai Yuko, Kajitani Naoyo, Kadota Kyuichi, Maruyama Riruke, Tajima Yoshitsugu, Isobe Takeshi, Kamino Hiroki, Urano Takeshi	4. 巻 208
2. 論文標題 Generation of the novel anti-FXYD5 monoclonal antibody and its application to the diagnosis of pancreatic and lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 160 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2023.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugiura Tomoko, Kamino Hiroki, Nariai Yuko, Murakawa Yohko, Kondo Masahiro, Kawakami Makoto, Ikeda Noboru, Uchio Yuji, Urano Takeshi	4. 巻 205
2. 論文標題 Screening of a Panel of Low Molecular Weight Compounds That Inhibit Synovial Fibroblast Invasion in Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3277 ~ 3290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1901429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Hitoya, Futamura Manabu, Gaowa Siqin, Kamino Hiroki, Nakamura Yasuyuki, Yamaguchi Kazuya, Tanaka Yoshihiro, Yasufuku Itaru, Nakakami Akira, Arakawa Hirofumi, Yoshida Kazuhiro	4. 巻 529
2. 論文標題 p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control plays an important role as a tumor suppressor in gastric and esophageal cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 582 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 成相裕子、内田有紀、尾林栄治、田島義証、古賀智裕、川上純、浦野健、加美野宏樹
2. 発表標題 活性化型マウスIL-18のネオエピトープに対する機能阻害モノクローナル抗体の作製とその評価方法の開発
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、田島義証、浦野健
2. 発表標題 ヒト膀胱がん細胞株MIA PaCa-2は栄養飢餓によりインターロイキン-18活性化を伴うパイロトーシスを誘導し、この現象は抗がん剤5-フルオロウラシルによって増強される
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、内田有紀、田島義証、浦野健
2. 発表標題 フルオロウラシル処理は低栄養培養下での膀胱がん細胞におけるIL-18活性化を増強する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 ワクチン組成物	発明者 加美野 宏樹、成相 裕子、浦野 健（他6 人）	権利者 旭化成（株）、 島根大学、京都 大学、三重大
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-204470	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 活性化インターロイキン-18タンパク質のネオエピトープを認識する抗体、及びその応用	発明者 浦野 健、成相 裕 子、加美野 宏樹、尾 林 栄治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-559206	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 活性化インターロイキン-18タンパク質のネオエピトープを認識する抗体、及びその応用	発明者 浦野 健、成相 裕 子、加美野 宏樹、尾 林 栄治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17/264,479	出願年 2021年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 活性化インターロイキン-18タンパク質のネオエピトープを認識する抗体、及びその応用	発明者 浦野 健、成相 裕 子、加美野 宏樹、尾 林 栄治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、19893223.8	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	浦野 健 (URANO Takeshi) (70293701)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

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