

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16443

研究課題名（和文）膵がん細胞での炎症性サイトカインIL-18の機能確認と阻害抗体を用いた治療応用

研究課題名（英文）Analysis of inflammatory cytokine IL-18 function in pancreatic cancer cells and the study for therapeutic application using IL-18 inhibitory antibody

研究代表者

内田 有紀 (UCHIDA, Yuki)

島根大学・医学部・医科医員

研究者番号：60868719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：IL-18発現ががん細胞に与える影響を検討するため、遺伝子編集技術を利用してIL-18遺伝子を欠損させたMIA PaCa-2膵がん細胞株（MIA PaCa-2 / IL-18 KO）を樹立した。親株と比較して、IL-18 KO細胞は増殖能やヌードマウスへの造腫瘍能に差が見られなかった。またMIA PaCa-2担がんマウスを準備し、5-FU投与による活性型IL-18誘導を検討したが、明らかな誘導は観察できなかった。一方でマウス活性型IL-18に対する新規阻害抗体を作製し、その成果を論文や学会で報告した。また5-FUによる膵がん細胞での活性型IL-18産生メカニズムについて一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではIL-18欠損MIA PaCa-2細胞を作製してその影響を調べたが、自身の増殖や造腫瘍性には影響がないことが示された。がん細胞で発現するIL-18は、細胞自身ではなく周囲のがん微小環境に影響を及ぼしている可能性がある。また抗がん剤5-FUによりヒト膵がん細胞から活性型IL-18が産生されること、そこにはパイロトーシスが関与することを明らかにした。さらに本研究では世界で初めてマウス活性型IL-18に対する阻害抗体を作製した。この抗体はがん研究のみならず、IL-18が関連する炎症性疾患モデルマウスの治療実験に応用できる可能性があり、大きな学術的成果が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effect of IL-18 expression on cancer cells, we generated several clones of IL-18 knockout human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells (MIA PaCa-2 / IL-18 KO) by using genome editing technology. These IL-18 KO cells showed no difference in proliferation in culture or in tumorigenicity in nude mice compared to the parent cells, suggesting that IL-18 may have an alternative role. We also prepared MIA PaCa-2 tumor-bearing mice and examined the activation of IL-18 after anti-cancer drug 5-FU treatment, but no clear induction into mice serum was observed. On the other hand, we generated new inhibitory antibodies against the mouse active IL-18 protein, and these results was published an article in an academic journal and was presented in academic conferences. In addition, we clarified the mechanism of active IL-18 production by 5-FU treatment, which is observed in pancreatic cancer cells.

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 抗体 膵臓がん 5-フルオロウラシル

1. 研究開始当初の背景

現在我が国における死因の第1位は悪性新生物(腫瘍)であり、がん治療の成績向上は国民の健康を確保する上で極めて重要な課題である。膵がんは症例のほとんどが無症状で経過、かつ早期発見が困難であるため、進行した状態で発見される場合が多い。そのため術前および術中に切除不能と判断されることも多く、その場合は化学療法(抗がん剤による治療)が適応となる、しかしながら膵がんにおいて有効な化学療法は、他のがん治療に対するものほど多くは確立されてはいない。そのうえ奏効率も低く、治療予後も著しく不良であるため、臨床現場において膵がんに対する新しい機序の治療薬が求められている。

近年、炎症とがんが密接に関係していることが明らかになってきた。飲酒や喫煙等を起因とする慢性的な炎症は、膵がん以外でも、肝がんや肺がんといったさまざまな組織での発がんを促進することはよく知られている。最近はがんの周囲で形成される「がん微小環境」が注目を集めている。そこにはマクロファージやリンパ球など、さまざまなサイトカインやケモカインを放出する免疫細胞や間質細胞が集まっており、腫瘍細胞の増殖、あるいは浸潤・転移などに寄与する。そのため、特に炎症性サイトカインの阻害はがん治療に役立つ可能性がある。

炎症性サイトカイン IL-18 は IL-1 ファミリーの一つであり、活性のない前駆体の「pro-IL-18」タンパク質として細胞内に存在している。さまざまな刺激により炎症性シグナルが活性化されることで、細胞内で前駆体タンパク質の一部が切断される。これにより活性型 IL-18 (cleaved IL-18/cIL-18) となって細胞外に放出され、IL-18 受容体と結合することで炎症の拡散を引き起こしている。IL-18 は主に炎症性疾患の発症や重篤化に寄与していると考えられているが、膵がんとの関連についても報告が散見される。膵がん患者の血清中では健常人と比べて IL-18 が高値であることが報告されている (Xingjun et al., Clin Cancer Res 2016;22:5939-5950)。また、免疫チェックポイント分子として注目を集めている PD-1/PD-L1 の阻害剤と IL-18 機能を阻害する IL-18 binding protein (IL-18BP) を併用することで、マウス膵がんモデルにおける腫瘍増大の抑制および転移能の低下が報告されている (Zhao Y et al., Oncotarget 2017;19:14803-14814)。そのため IL-18、特に炎症拡散機能を持つ cIL-18 の阻害は膵がん治療に役立つかもしれないと着想した。

2019年、島根大学の浦野教授らは cIL-18 のみを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、その成果を報告した (Nariai et al., Arch Biochem Biophys 2019;663:71-82)。この抗体は cIL-18 の断端部と結合することで cIL-18 を特異的に認識し、更に機能を阻害することが可能である。すなわち cIL-18 によって引き起こされる炎症を抑制できる可能性があり、この抗体を利用した新しい膵がん治療法について研究を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

膵臓がんに対する化学療法としては、「FOLFIRINOX療法」と呼ばれる比較的奏効率の良い4剤併用治療が選択される事が多い。以前、このなかに含まれる抗がん剤の一つである「5-フルオロウラシル(5-FU)」を膵がん細胞株 Capan-2 に添加すると、細胞内の cIL-18 が増加するという報告があった (Carbone et al., Cancer Biol Ther 2005 4:2, 231-241)。本研究者らが別の膵がん細胞株である MIA PaCa-2 を用いて同様の実験をおこなったところ、cIL-18 の増加が確認できた。膵がん細胞が発現している IL-18 は、がん細胞にとってどのような機能を持っているのか? 5-FU 投与による膵がん細胞からの cIL-18 誘導が in vivo でも起こるのか? その場合、放出された cIL-18 の働きを阻害抗体でブロックすることは、新しい膵がん治療法の開発につながるのか? そもそも 5-FU はどのように cIL-18 誘導を引き起こすのか? 上記のさまざまな疑問点を明らかにすることを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) IL-18 を欠損した膵がん細胞株の増殖能および造腫瘍性への影響

膵がん細胞の増殖や造腫瘍性に IL-18 が与える影響を明らかにするため、遺伝子編集技術を利用して IL-18 遺伝子を欠損した MIA PaCa-2 膵がん細胞 (MIA PaCa-2/IL-18 KO) を樹立した。樹立した細胞の増殖能あるいは造腫瘍性への影響を in vitro や in vivo で検討し、膵がん細胞と IL-18 発現との関係性について検討した。

(2) 担がんマウスモデルを使った 5-FU 投与による cIL-18 増加の評価

MIA PaCa-2 細胞を皮下に移植した担がんマウスを準備し、5-FU 投与による cIL-18 誘導が in vivo で生じるかどうかを検討した。cIL-18 認識モノクローナル抗体を利用した ELISA キットが浦野教授らによって作製されており、マウス血清中の cIL-18 量を測定することで 5-FU 投与による変化を観察した。

(3) マウス cIL-18 特異的抗体の作製とその解析

研究の過程で、ヒト cIL-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。そこでマウス cIL-18 に対するモノクローナル抗体を作製することにした。マウス cIL-18 の N 末断端特異的なペプチドを免疫することで複数の抗体産生ハイブリドーマを樹立し、得られた抗体の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を検討した。

(4) 5-FU による MIA PaCa-2 細胞からの cIL-18 誘導のメカニズム解明

一般的に IL-18 の活性化には「NLRP3 インフラマソームの活性化機構」が関与するとされている(Kelley N et al., Int J Mol Sci 2019 Jul 6;20(13):3323)。5-FU による cIL-18 誘導にこの機構が関与しているのか否かについて詳細な検討をおこなった。また 5-FU 以外の抗がん剤も同じ現象を起こすのかについても検討した。

4. 研究成果

(1) IL-18 を欠損した膵がん細胞株の増殖能および造腫瘍性への影響

ヒト IL-18 特異的 CRISPR/Cas9 発現プラスミドを購入してヒト膵がん細胞 MIA PaCa-2 へ導入後、共発現する GFP を指標として Cell Sorting を行い、最終的に複数のクローン細胞を単離した。次にウエスタンブロット法にて IL-18 発現を確認したところ、完全な発現消失を示すクローンや発現を維持するクローンが得られた(図 1A)。続いて MIA PaCa-2 親株と IL-18 発現を維持した細胞、さらに発現消失した 2 つの細胞をもちいて、MTT アッセイによる細胞増殖の変化を観察したが、ほとんど差が見られなかった(図 1B)。続いてそれぞれの細胞を 5×10^6 cells ずつヌードマウスの皮下 2 箇所注射し、造腫瘍性とその増殖速度について検討した。図 1C で示すように、親株にくらべ、それ以外の細胞群は腫瘍の増殖速度が緩やかであったが、IL-18 発現との相関性は確認できなかった。これらの結果から、膵がん細胞における IL-18 発現は、自身の増殖速度やヌードマウスへの造腫瘍性には影響しないことが示唆された。しかしながら、この現象がすべての膵がん細胞に当てはまるか否かについては、別の細胞株を使ったさらなる検討が必要と考える。

(2) 担がんマウスモデルを使った 5-FU 投与による cIL-18 増加の評価

膵がん細胞株 MIA PaCa-2(親株)をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍体積が 100mm^3 になったところで 5-FU を腹腔内投与した(0~300mg/kg)。72h 後に血清を回収し、浦野教授らが開発した「cIL-18 検出 ELISA キット」で測定を試みたが、シグナルが全く検出できなかった。理由の一つとして、検出感度の低さが考えられた。一方で市販の IL-18 ELISA キットを使ったところ、5-FU 投与の有無に関わらず、MIA PaCa-2 細胞を移植したマウスの血清から、微量ではあるが IL-18 が検出された。何らかの理由で壊れた MIA PaCa-2 細胞から放出された IL-18 が検出されたものと考えられた。しかしながら市販のキットでは前駆体 IL-18 か cIL-18 かの区別がつかず、また検出されたシグナルが本当に IL-18 かどうかを調べる術もない。問題解決のためには「cIL-18 検出 ELISA キット」のブラッシュアップが急務であるが、最近この時のキットよりも 50~100 倍程度高感度なものができつつあり、今後の研究に使用していく予定である。なお、当初は摘出しておいた腫瘍について抗 cIL-18 抗体による免疫組織化学染色をおこなう予定であったが、後述する問題点が生じたため保留とした。以上の結果から、MIA PaCa-2 細胞で作製した担がんマウスにおいて、5-FU 投与による in vivo での cIL-18 誘導は確認できなかった。

(3) マウス cIL-18 特異的抗体の作製とその解析

本研究を進める過程で、指導教官らにより「ヒト cIL-18 はマウス IL-18 受容体と反応しない」ことが明らかにされた。すなわちヒト膵がん細胞株で作った担がんマウスでは、5-FU 処理により cIL-18 が誘導されたとしても、周囲のがん微小環境(マウス由来)には影響を与えず、同時に抗体投与による cIL-18 阻害実験も意味をなさなくなる。そこで当初の計画を変更し、全てがマウスで完結する実験系を作るため、マウス cIL-18 特異的抗体を作ることにした。図 2A に示すように、マウス前駆体 IL-18 の切断によって生じる N 末断配列をペプチドとしてマウスに免疫し、マウス cIL-18 を認識するマウスモノクローナル抗体(mAb)を複数単離した。また「5-4.1」と「9-3.1」の 2 種類に着目し、そのエピトープ配列について詳細に検討した(図 2B)。

一方、これまでにマウス cIL-18 に対する阻害効果を調べる実験系が存在しなかった。そこでさまざまなマウス細胞株について IL-18 受容体を構成する「IL18r1」および「IL18rap」の遺伝子発現を RT-qPCR で確認したところ、マウス肥満細胞腫の細胞株である P-815 で高発現していることを突き止めた(図 2C)。さらに cIL-18 と反応させた後で強く誘導されてくる下流遺伝子として Cxcl2 を見出した(図 2C)。マウス cIL-18 抗体の阻害効果についてこの反応系を利用して検討したところ、どちらの抗体も阻害効果を持つことが示された(図 2D)。マウス cIL-18 抗体作製に関する一連の研究成果は、論文として報告した(Uchida Y et al., Arch Biochem Biophys 2022;727: 109322)。なおマウス cIL-18 阻害抗体は、現在

他施設との共同研究として、IL-18 が疾患の要因として考えられている炎症性疾患マウスモデルに対する治療実験に使われており、炎症の抑制と症状の緩和を示す事例が観察されている。この抗体は今後の IL-18 研究に非常に有用となる資材であり、膵がん治療に対する研究にも使用して行きたいと考えている。

(4) 5-FU による MIA PaCa-2 細胞からの cIL-18 誘導のメカニズム解明

5-FU 治療による膵がん細胞からの cIL-18 誘導は、がん局所での炎症を引き起こす原因となるため、そのメカニズムを明らかにすることは重要な意味をもつ。複数の膵がん細胞株を用いて 5-FU 添加実験を試みたところ、強弱はあるものの、いずれの細胞からも cIL-18 誘導が確認できた (図 3A)。また 5-FU 処理の際に浮遊した細胞と接着した細胞が混在していることに気づき、分けて解析したところ、浮遊した細胞でより強い cIL-18 誘導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) の活性化が起きていることがわかった (図 3B)。一般的な IL-18 活性化にはシステインプロテアーゼの Caspase-1/4 が関与することが知られているが、興味深いことにこの現象には Caspase-8 が関与することが明らかとなった (図 3C)。また Gemcitabine は膵がん治療にも使用される抗がん剤の一つであるが、MIA PaCa-2 細胞に Gemcitabine 処理しても cIL-18 誘導が起ころなかった (図 3D)。他の抗がん剤もいくつか使用してみたが、cIL-18 誘導がみられたのは 5-FU のみであり、その理由については今後さらに調べていきたいと考えている。

一連の IL-18 活性化現象は「5-FU」が誘導するユニークなメカニズムを提唱するものであり、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。本研究では 5-FU 治療と併用する IL-18 阻害の膵がん治療効果について最終的な結論を得ることができなかったが、その基礎となるデータや資材を準備できたと考えており、今後この資材を利用しながら研究を進展させたい。

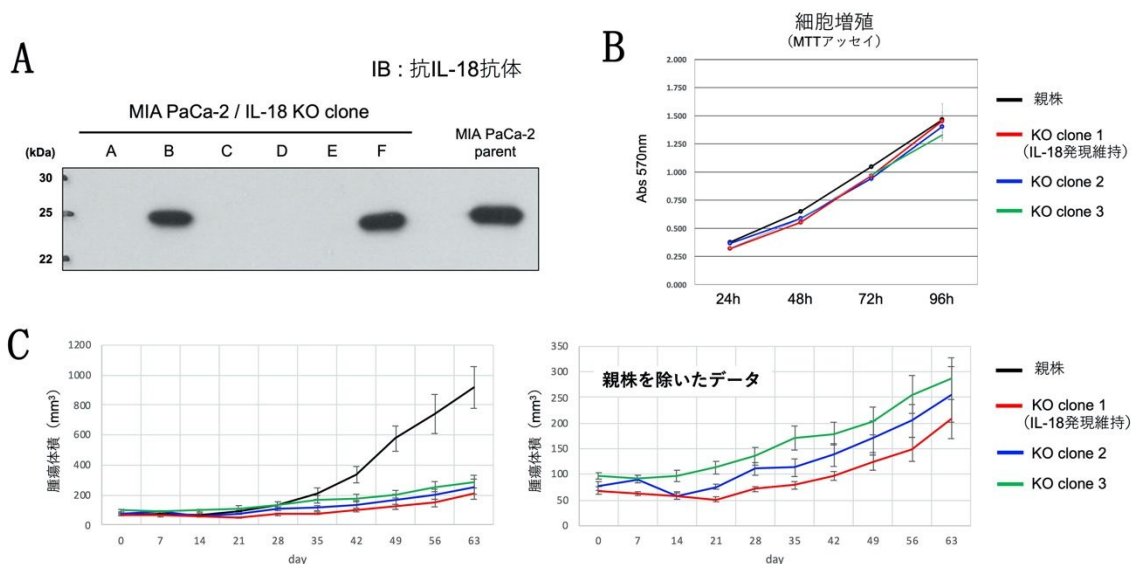


図 1 A) MIA PaCa-2 / IL-18 KO クローンのIL-18発現を調べた実験結果。A~Fはそれぞれ別のクローンを示す。
 B) MIA PaCa-2 親株およびIL-18 KO細胞 (うちKO clone 1はIL-18発現を保持) について、細胞増殖能を MTTアッセイにより検討した実験結果。
 C) B) で用いた細胞をヌードマウスの皮下に移植して、造腫瘍性および腫瘍増殖能を観察した実験結果。

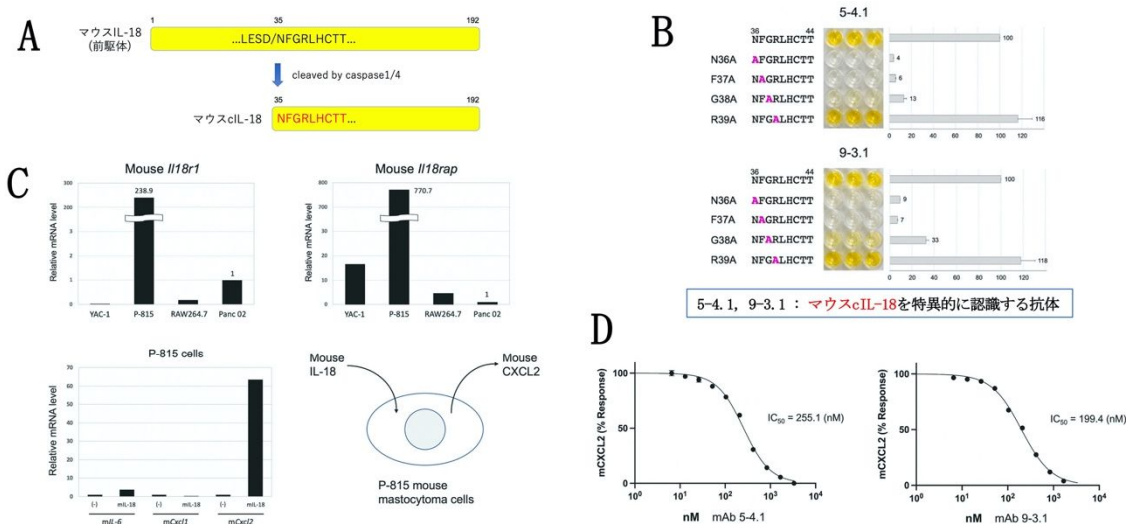


図2 A) マウスIL-18前駆体および活性型IL-18 (cIL-18) の模式図。
 B) マウスcIL-18認識抗体 5-4.1と9-3.1のエピトープマッピング。いくつかのアミノ酸をアラニンに置換して結合の強度を算出した。
 C) マウスcIL-18の働きを評価する実験系の開発。上段はIL-18受容体を構成するIl18r1 (左上) とIl18rap (右上) のmRNA発現をさまざまなマウス細胞株で調べた実験結果。下段左はP-815細胞にマウスcIL-18を添加した際に誘導されるサイトカイン・ケモカインのmRNA発現を調べた実験結果。下段右は開発した機能評価実験系の概要。
 D) マウスcIL-18抗体である5-4.1 (左) と9-3.1 (右) の阻害効果を検討した実験結果。抗体量依存的な阻害効果が見られた。

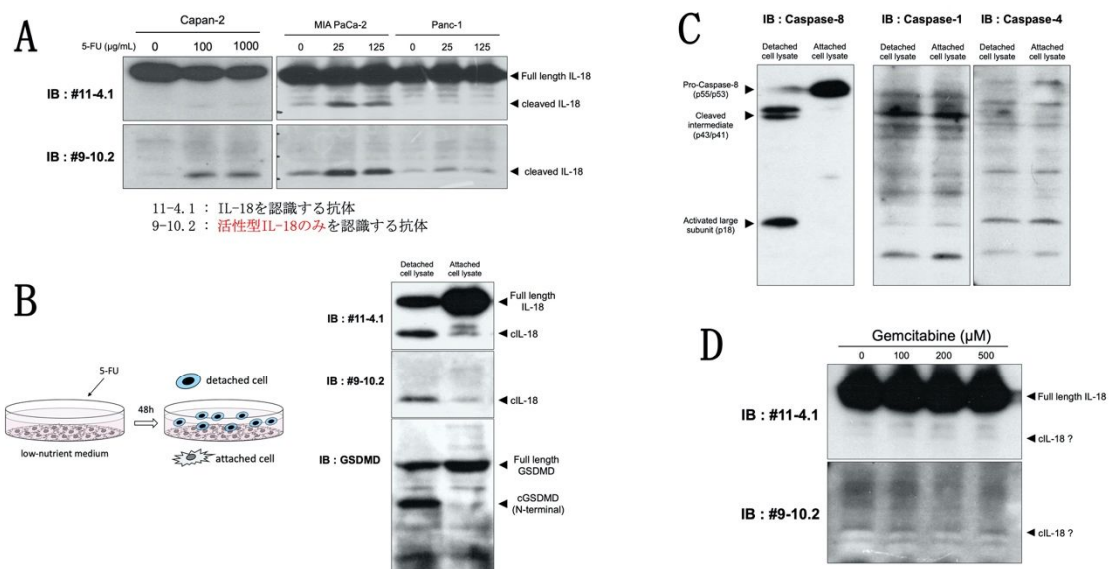


図3 A) ヒト膵がん細胞株 (Capan-2, MIA PaCa-2, Panc-1) に5-FU処理した後のcIL-18誘導を調べた実験結果。
 B) 低栄養培地で培養したMIA PaCa-2細胞に5-FUを添加すると、浮遊する細胞 (detached cells) と接着したままの細胞 (attached cell) が得られる (左の模式図)。それぞれの細胞を集め、IL-18とGSDMDの発現および活性化を調べた実験結果 (右図)。
 C) cIL-18誘導時において、Caspase-8 / Caspase-1 / Caspase-4 の活性化を調べた実験結果。
 D) MIA PaCa-2細胞にGemcitabine処理した後のcIL-18誘導を調べた実験結果。

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 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 neoepitope 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 Hirahara N, Matsubara T, Kaji S, Uchida Y, Yamamoto T, Hyakudomi R, Zotani H, Kawakami K, Sasaki Y, Tajima Y.	4. 巻 71:103001
2. 論文標題 A safe, reliable, and efficient robot-assisted port site closure for robot-assisted gastrectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Med Surg (Lond)	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.amsu.2021.103001	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 Hirahara N, Tajima Y, Matsubara T, Fujii Y, Kaji S, Kawabata Y, Hyakudomi R, Yamamoto T, Uchida Y, Taniura T.	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Systemic Immune-Inflammation Index Predicts Overall Survival in Patients with Gastric Cancer: a Propensity Score-Matched Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastrointest Surg.	6. 最初と最後の頁 1124-1133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11605-020-04710-7	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 Hirahara N, Matsubara T, Kaji S, Uchida Y, Yamamoto T, Hyakudomi R, Takai K, Ishitobi K, Tajima Y.	4. 巻 19(1):317
2. 論文標題 A safe and simple technique for nasogastric tube insertion in patients with thoracic esophageal cancer surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Surg Oncol.	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) 10.1186/s12957-021-02428-7	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 Hirahara N, Matsubara T, Kaji S, Yamamoto T, Hyakudomi R, Takai K, Ishitobi K, Uchida Y, Tajima Y.	4. 巻 21(1):1073
2. 論文標題 Phase II feasibility study of adjuvant chemotherapy with docetaxel/cisplatin/S-1 followed by S-1 for stage III gastric cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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) 10.1186/s12885-021-08795-4	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、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膵がん細胞における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

1. 発表者名 内田有紀、百留亮治、荒川将司、大谷麻、田中航、内藤聖記、片岡祐子、象谷ひとみ、高井清江、松原毅、山本徹、長瀬真実子、平原典幸、門田球一、田島義証
2. 発表標題 ダブルバルーン内視鏡検査で部位を特定し得た小腸海綿状血管腫の1例
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会学術総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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