

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16389

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌の薬剤耐性獲得におけるIL-26の機能解明

研究課題名（英文）IL-26 mediates epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor resistance in triple-negative breast cancer cells

研究代表者

伊藤 匠 (Itoh, Takumi)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：80811835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)はエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2の治療標的因子が全て陰性の乳癌であり、有効な標的治療法が確立されていない最も予後が悪いサブタイプである。上皮成長因子受容体(EGFR)はTNBCで高発現が認められるが、臨床でのEGFR阻害薬の有効性は乏しい。本研究では炎症性サイトカインのIL-26がTNBC細胞のバイパスシグナルを強力に活性化し、小胞体ストレスを緩和することでEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の耐性を獲得させる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

本研究では、申請者が培ってきた独自の疾患モデルや技術を使用してEGFR-TKI耐性におけるIL-26の役割を明らかにし、IL-26による薬剤耐性メカニズムを解明した。さらに、ヒト化抗IL-26mAbの中和活性評価を行い、マウスのTNBCモデルに対するIL-26をターゲットとした治療法の有効性を確認した。これにより、IL-26抗体はEGFR-TKI耐性獲得が問題となっている肺癌や治療標的の無い難治性癌などに対しても、新しい治療法を確立するシーズとなる可能性が期待できる。さらに、樹立した抗体は、IL-26が関与する炎症性疾患の治療応用にも将来的に波及させることも可能だと考える。

研究成果の概要（英文）：Triple-negative breast cancer (TNBC) has a poor prognosis compared to other breast cancer subtypes. Although epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in TNBC, clinical trials with EGFR inhibitors including tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) in TNBC have heretofore been unsuccessful. In this study, to understand the molecular mechanisms involved in the differences in EGFR-TKI efficacy on TNBC between human and mouse, we focused on the effect of IL-26, which is absent in mice. We investigated the mechanisms involved in IL-26-mediated EGFR-TKI resistance in TNBC. IL-26 induced activation of AKT and JNK signaling against EGFR-TKI-induced endoplasmic reticulum (ER) stress, leading to tumor growth. Meanwhile, the blockade of IL-26 overcame EGFR-TKI resistance in TNBC. Our work provides novel insights into the mechanisms of EGFR-TKI resistance in TNBC, while also suggesting IL-26 as a possible therapeutic target in TNBC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：炎症性サイトカイン IL-26 乳癌 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

治療標的が見つからないトリプルネガティブ乳癌(TNBC)ではEGFRの高発現が認められるもののEGFR分子標的治療の臨床的効果は乏しく、EGFRをターゲットにした新しい治療法の開発が望まれている(*N Engl J Med* 2008)。申請者は乳癌の中で最も悪性度の高いサブタイプであるTNBCにおいてIL-26が予後不良と相関する可能性をデータベース上で見出し、TNBCにおけるIL-26の役割について着目した。また、IL-26は種々の癌の中でも特にTNBCに対して多くの細胞活性化シグナルを誘導する予備データを得た。そこで、TNBCに浸潤するTh17細胞などのヘルパーT細胞が産生するIL-26がEGFR-TKI薬剤耐性を誘導することを見出し、作製したIL-26中和mAbとEGFR-TKIの併用によって乳癌の増殖を顕著に阻害することを明らかにした(*Cell Death Dis.* 2021)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、TNBCにおけるEGFR-TKI耐性獲得に重要なバイパス経路活性化のメカニズムを探索することでより詳細な役割の解明を行う予定であった。また、新たに作製したヒト化IL-26抗体の有効性をスクリーニングし、EGFR-TKI薬剤耐性獲得により悪性化した癌に対し、IL-26をターゲットとした革新的且つ効果的な副作用の少ない治療法の確立に繋げることを目指した。

3. 研究の方法

(1) EGFR-TKI 耐性機構における新規 IL-26 レセプターの役割およびバイパスシグナルの解明

申請者はTNBC細胞株のHCC70細胞をIL-26刺激し、マイクロアレイによって得られたデータをパスウェイ解析していくつかのシグナル経路の活性を見出した。そこで、パスウェイ解析により得られたデータを元にIL-26が誘導するバイパス経路活性を予測し、EGFR-TKIとIL-26の共刺激によるシグナルタンパクのリン酸化をウェスタンブロットで検証した。また、マイクロアレイによって得られたデータをGene Ontology解析によって分析し、分子細胞生物学的な機能を捉える。さらにそこで得られたGene Ontologyの結果から、Gene Ontologyと関連性の高い遺伝子発現変化やシグナル活性化を調査した。

(2) TNBCにおけるヒト化抗IL-26抗体中和活性評価

IL-26分子標的治療を目指すため、アメリカのJN Biosciences LLCと共同で樹立したヒト化抗IL-26抗体の中和活性実験を行うため、TNBCのヒト細胞株HCC70およびマウス細胞株E0771にIL-26および作製した数種類のヒト化抗IL-26抗体を添加し、最も効率的にEGFR-TKI薬剤耐性誘導を阻害する抗体をスクリーニングした。また、IL-26刺激によって誘導される遺伝子群の発現亢進が樹立ヒト化抗体によって抑えられるか検討し、新規に作製したヒト化抗体の中和活性が明らかとした。

(3) TNBCモデルにおけるヒト化抗IL-26抗体治療有効性評価

中和活性が高かった抗体のin vivoでの治療効果を評価するため、hIL-26TgマウスにE0771細胞を同所移植してEGFR-TKIおよび樹立したヒト化抗IL-26抗体を投与してコンビネーション治療を行い、ヒト化抗体の治療効果を評価した。これにより、臨床試験に向けたPOCデータを取得する。

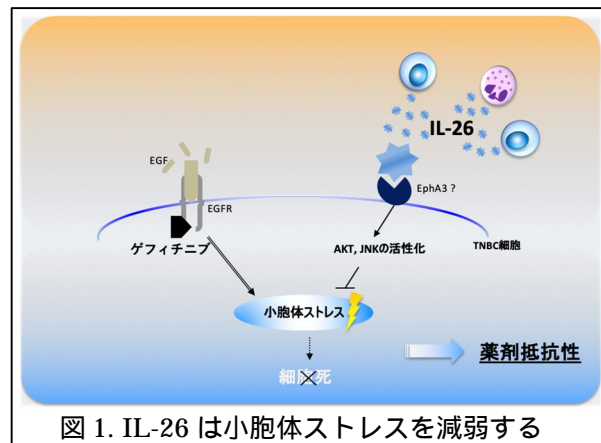
4. 研究成果

(1) EGFR-TKI 耐性機構における新規 IL-26 レセプターの役割およびバイパスシグナルの解明

マウスTNBC細胞株E0771とヒトTNBC細胞株HCC70及びMDA-MB468の増殖に対してIL-26と

EGFR-TKI であるゲフィチニブとの併用効果を評価した。ゲフィチニブ治療は各種 TNBC 細胞の増殖を抑制したが、IL-26 を添加した群では IL-26 の用量依存的にゲフィチニブ誘導性細胞増殖抑制を阻害した。この薬剤耐性誘導のシグナル伝達経路を調査するため、IL-26 の添加によって活性化されるシグナル活性化因子をウェスタンブロットで検討した。IL-26 は単独刺激では、各種 TNBC 細胞で AKT と JNK のリン酸化を活性化した。さらに、ゲフィチニブ処理条件下においても IL-26 の添加は AKT と JNK の活性化をもたらした。また、AKT と JNK の両方を阻害すると IL-26 の薬剤耐性効果は減弱した。したがって、IL-26 は AKT および JNK のリン酸化の増加を誘導し、EGFR-TKI 関連のバイパス経路を活性化することで、マウスおよびヒト TNBC 細胞の増殖をもたらすことを明らかにした(図 1)。

また、IL-26 およびゲフィチニブで処理した HCC70 細胞の DNA マイクロアレイによって得られたデータから Gene Ontology 解析とパスウェイ解析を行った。これにより、IL-26 刺激によって小胞体ストレス関連分子の発現レベルが大幅に低下していることが明らかになり、IL-26 およびゲフィチニブで処理した HCC70 細胞で小胞体ストレスシグナル伝達経路が変化していることが示された。そこで、IL-26 およびゲフィチニブで処理した



した TNBC 細胞における PERK、IRE1、ATF6 の活性化を解析した。ゲフィチニブ処理後、PERK-eIF2 経路は促進されたが、ゲフィチニブで刺激された HCC70 細胞では IRE1 のリン酸化はほとんど観察されなかった。しかし、ゲフィチニブと IL-26 の併用刺激は、HCC70 においてゲフィチニブ誘導性の PERK および eIF2 のリン酸化を有意に減少させた。また、IL-26 およびゲフィチニブで処理した TNBC 細胞における小胞体ストレスシグナル伝達マーカー、DDIT3、ATF3、ATF4 の発現レベルを解析したところ、これらの mRNA 発現レベルは IL-26 の添加によって顕著に減少した。他の TNBC 細胞株である MDA-MB468 および E0771 でも、ゲフィチニブ存在下で IL-26 を添加することで DDIT3、ATF3、ATF4 の mRNA 発現レベルが有意に減少した。したがって、これらの結果は、ゲフィチニブ存在下で IL-26 が TNBC 細胞の AKT および JNK のリン酸化を誘導し、小胞体ストレス応答を緩和し、細胞生存および増殖を誘導する可能性を示した(図 1)。

(2) TNBC におけるヒト化抗 IL-26 抗体中和活性評価

これまでの結果から、IL-26 標的治療は IL-26 によってもたらされる TNBC 細胞の EGFR-TKI 薬剤耐性を減弱できると考え、申請者が作製した抗 IL-26 中和抗体の中和活性を評価した。各種 TNBC 細胞で誘導された IL-26 の EGFR-TKI 薬剤耐性効果は作製したヒト化抗 IL-26 中和抗体によって抑制できることが明らかとなり、さらに、これらの抗体は IL-26 が誘導する小胞体ストレスの緩和を解除し、小胞体ストレス因子の発現亢進を誘導した。また、4 種類の中和抗体クローンの中から最も有効性の高いクローンを見出すことができた。

(3) TNBC モデルにおけるヒト化抗 IL-26 抗体治療有効性評価

hIL-26Tg マウスではゲフィチニブによる治療が IL-26 の薬剤耐性効果によって阻害される。そこで、(2)で評価した最も有効性が高かったクローンのヒト化抗体を用いて hIL-26Tg マウスに対するゲフィチニブとの併用治療効果を検討した。E0771 を移植した担癌マウスにヒト化 IL-26 抗体とゲフィチニブを投与すると腫瘍の成長が有意に減少し、樹立した抗体の有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatano Ryo, Itoh Takumi, Otsuka Haruna, Saeki Harumi, Yamamoto Ayako, Song Dan, Shirakawa Yuki, Iyama Satoshi, Sato Tsutomu, Iwao Noriaki, Harada Norihiro, Aune Thomas M., Dang Nam H., Kaneko Yutaro, Yamada Taketo, Morimoto Chikao, Ohnuma Kei	4. 巻 22
2. 論文標題 Humanized anti-IL-26 monoclonal antibody as a novel targeted therapy for chronic graft-versus-host disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.17178	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 Itoh Takumi, Hatano Ryo, Horimoto Yoshiya, Yamada Taketo, Song Dan, Otsuka Haruna, Shirakawa Yuki, Mastuoka Shuji, Iwao Noriaki, Aune Thomas M., Dang Nam H., Kaneko Yutaro, Okumura Ko, Morimoto Chikao, Ohnuma Kei	4. 巻 12
2. 論文標題 IL-26 mediates epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor resistance through endoplasmic reticulum stress signaling pathway in triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03787-5	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 該当する
1. 著者名 Ono-Ohmachi A, Yamada S, Uno S, Tamai M, Soga K, Nakamura S, Udagawa N, Nakamichi Y, Koide M, Morita Y, Takano T, Itoh T, Kakuta S, Morimoto C, Matsuoka S, Iwakura Y, Tomura M, Kiyono H, Hachimura S, Nakajima-Adachi H	4. 巻 14
2. 論文標題 Effector memory CD4+T cells in mesenteric lymph nodes mediate bone loss in food-allergic enteropathy model mice, creating IL-4 dominance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1335 ~ 1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00434-2	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shirakawa Y, Hatano R, Itoh T, Otsuka H, Okumura K, Morimoto C.
2. 発表標題 IL-26 facilitates cartilage destruction and infiltration of inflammatory cells into synovium in a collagen induced arthritis model.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤匠
2. 発表標題 がん免疫における多機能性サイトカインの役割
3. 学会等名 第19回日本免疫治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Hatano, Haruna Otsuka, Takumi Itoh, Harumi Saeki, Ayako Yamamoto, Yuki Shirakawa, Satoshi Iyama, Noriaki Iwao, Tsutomu Sato, Taketo Yamada, Chikao Morimoto, Kei Ohnuma
2. 発表標題 Anti-interleukin-26 therapy for the control of chronic inflammation in GVHD.
3. 学会等名 第83回日本血液学会
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
---------	---------