

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10991

研究課題名(和文) IL-18の新たな生理作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new physiological function of IL-18

研究代表者

寺田 信行 (Terada, Nobuyuki)

兵庫医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50150339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン18(IL-18)は本学で発見され、世界中の研究者によってその生理的意義について調べられ、生体の恒常性維持といった生命機能に重要な役割を担っていることが示された。我々の研究は中でもがんに対してIL-18が発する抑制性シグナルに関して、その作用性を精査し生理的意義の一端を明らかにするものである。本研究ではIL-18の抑制性シグナルの一つとしてCXCL9及びCXCL10の可能性を示した。これらのケモカインは細胞増殖や血管内皮細胞との接着性には影響を及ぼさないが、血管内皮細胞を介して腫瘍細胞の浸潤を阻止す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

我々はIL-18の抗腫瘍効果に関する研究を行ってきた。その中でIL-18による抗腫瘍効果は、T細胞やNK細胞による細胞障害活性の増強であることを明らかにした。しかしIL-18はT細胞やNK細胞に依存せずIL-18誘導性がん転移抑制シグナルに因って転移を抑制することも明らかにした。この研究結果は他には報告されておらず、我々独自のものである。さらに本研究ではIL-18の転移抑制シグナルの一部にCXCL9及びCXCL10が存在する可能性を示した。このことによりIL-18の新たな生理的意義が明らかにされ、新たな視点によるがん治療法の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Interleukin 18 (IL-18) was discovered in our college, and its physiological significance was investigated by researchers around the world. It was shown that IL-18 plays an important role in biological functions such as the maintenance of homeostasis. Among them, our research is to clarify the part of physiological significance by examining the mechanism of the inhibitory signal of IL-18 against cancer. In this study, we showed the possibility of CXCL9 and CXCL10 as one of the inhibitory signals of IL-18. It was shown that these chemokines do not affect cell proliferation or adhesion to endothelial cells, but inhibit tumor cell invasion through endothelial cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：インターロイキン18 骨肉腫 CXCL9 CXCL10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-18 は本学の岡村らにより発見された炎症誘導性のインフラマソームサイトカインであるが、これまでの研究からがんや病原菌感染などに対する生体防御反応、過剰な免疫応答であるアレルギー反応、細胞の正常機能を保証するためのオートファジーの誘導、ミトコンドリア機能障害の是正といった生命の維持に重要な役割を演じるとともに、神経変性疾患のような退行性病変には細胞増殖や神経活動維持といった活性化シグナルをもたらす可能性が示唆され、生命現象の基幹に触れる多岐にわたる生理作用を有していることが明らかになりつつある。IL-18 の基礎医学研究の進展により生命機能維持のメカニズムに迫ることが期待できるとともに、これら研究を通じて、生命の営みの在り様をあらためて考える契機となる。

我々はこれまで IL-18 の抗腫瘍効果に焦点を充て、中でも骨肉腫に多くの時間を割いて研究を行ってきた。1) IL-18 が T・NK 細胞の増殖・活性化により細胞傷害活性を増強し、腫瘍細胞の増殖・転移を抑制すること^{文献1-4}、2) マウス骨肉腫の高肺転移株 (LM8) を用いた研究で細胞傷害活性に非依存的に転移自体を抑制すること^{文献3}、3) IL-18 ががん転移抑制シグナルを誘導し転移を抑制すること (未発表)、さらに 4) IL-18 投与マウスの血清中に IL-18 誘導性がん転移抑制シグナルが見出され、これらは骨肉腫に限らず、肺癌、メラノーマなどの腫瘍細胞の遊走や浸潤を抑制することを *in vitro* 実験で証明した (未発表)。

がん転移抑制シグナルの同定には抗体アレイを用いた解析を行い、IL-18 で誘導される複数の転移抑制シグナル分子の存在が確認され、本研究ではその中でも CXCL9 と CXCL10 が IL-18 により誘導されるシグナル分子の候補として考えられ、その真偽を確かめた上で、これらの作用を明らかにし、IL-18 の抗腫瘍効果における意義を確定する。

CXCL9 と CXCL10 はリンパ球の走化因子として見出され、リンパ球を局所に誘導する能力と血管新生を阻害する作用が、抗腫瘍効果と関係している可能性が報告されている。しかしに関しては細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) と免疫制御性リンパ球 (Treg) を誘導する腫瘍免疫では功罪相半ばすることが報告され、に関しては腫瘍栄養血管を減少させエネルギー不足を招きがん細胞の壊死を促進することが明らかになっているが^{文献5,6}、その機序の解明は今後の課題である。IL-18 はマウス尾静脈からの骨肉腫細胞注入に先行投与しても、肺転移を抑制できることを既報した^{文献3}。また IL-18 はマウス骨肉腫細胞に直接作用し殺細胞効果もたらずものではないことから、特に本研究で着目する IL-18 誘導性がん転移抑制が「宿主に働きかけてがん細胞の転移を阻み幽閉する (循環血中) 環境の構築 (以下、“転移しにくい環境作り”) を促す」とする仮説の検証を進める。さらに骨肉腫細胞が肺を標的として嗜好し生着することは、肺静脈血管内皮細胞の表面に発現している接着分子と骨肉腫細胞の高親和性によって決定されていると思われる。そこで、IL-18 による骨肉腫細胞と血管内皮細胞との接着性について、CXCL9 と CXCL10 の関与を調べるとともに、IL-18 によるがん細胞が“転移しにくい環境作り”における IL-18 の役割を明らかにすることを通して、IL-18 の生理的意義の証左のひとつとする。

文献 1 Yamada N et al. *Tumour Biol.* 2009 30(4):176-84.

文献 2 Nishio S et al. *Cancer Sci.* 2008 99(1):113-20.

文献 3 Nakamura Y et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 55(9):1151-8.

文献 4 Okamoto T et al. *J Interferon Cytokine Res.* 2004 24(3):161-7.

文献 5 Sgadari C et al. *Blood.* 1997 89(8):2635-43.

文献 6 Kanegane H et al. *J Infect Dis.* 1997 176(1):254-7.

2. 研究の目的

IL-18の発見後、世界中の研究者によってその生理的意義や病理的意味について広く調べられ、最近、本学でも非常に重要な発見、すなわち生体の恒常性維持といった生命機能に重要な役割を担っていることが示された。本研究では、そのうちがんに対してIL-18が発する抑制性シグナルに関して、その作用性を精査し生理的意義の一端を詳らかにするものである。抑制性シグナルの候補としてCXCL9とCXCL10が考えられ、その真偽を確かめた上で、その作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CXCL9及びCXCL10による骨肉腫細胞の増殖に対する影響

マウス骨肉腫細胞LM8を96well-plateにまき、24時間後CXCL9又はCXCL10を培養液に50, 100ng/mlの濃度で添加する。1, 3日後にCell Counting kit 8(DOJINDO)を用いて細胞の増殖率を調べる。

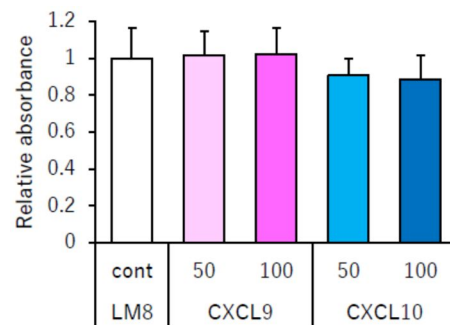


図1 CXCL9, 10の増殖への影響

(2) CXCL9及びCXCL10による骨肉腫細胞の遊走能と浸潤能に対する影響

遊走能の判定にはwound assayという細胞移動距離を測定する方法を用いる。LM8を96well-plateにconfluentになるように24時間培養し、黄チップの先で細胞間に傷をつけ、その間隔を測定し、培養液にCXCL9又はCXCL10を50, 100ng/mlの濃度で添加する。24時間培養後、

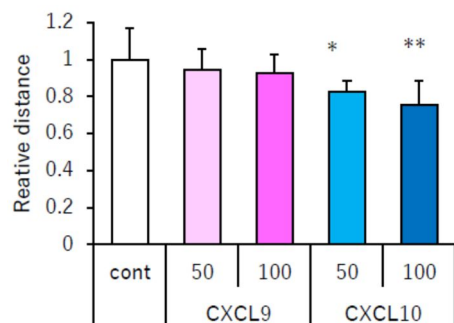


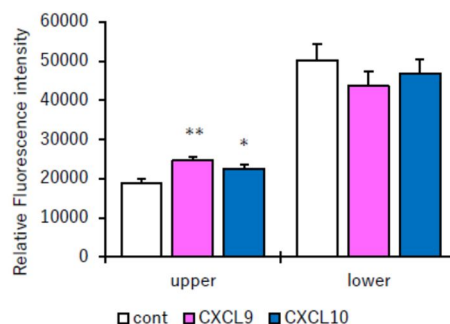
図2 CXCL9, 10の遊走能への影響

同じ場所の間隔を測定し、その間隔の差である移動距離で遊走能を評価する。浸潤能の判定にはBoyden chamber(FluoroBlok, BD Falcon)を用いる。Upper chamberにCalcein AMでラベルしたLM8を入れ、upper chamber又はlower chamberの培養液にCXCL9又はCXCL10を100ng/mlの濃度で添加する。24時間後AR VO X4(PerkinElmer)で蛍光強度を測定し、解析を行う。

(3) CXCL9及びCXCL10による骨肉腫細胞と血管内皮細胞との接着性に及ぼす影響

マウス血管内皮細胞としてb.end3, MS1, SVEC4-10の3種類を用いる。血管内皮細胞を96well-plateにconfluentになるように培養した後、

CXCL9又はCXCL10を50, 100ng/mlの濃度で添加して24時間培養する。Calcein AMでラベルしたLM8を血管内皮細胞の上にまき24時間後にPBSでよく洗浄した後、Infinite M200PRO(Tecan)で蛍光強度を測定し、解析を行う。



(4) CXCL9及びCXCL10による血管内皮細胞の増殖に対する影響

CXCL9及びCXCL10による血管内皮細胞の増殖へ

図3 CXCL9, 10の浸潤能への影響

の効果を調べるために実験方法(1)と同様に3種類のマウス血管内皮細胞に対して行う。

(5) 骨肉腫細胞と血管内皮細胞での CXCR3 の発現

CXCL9 及び CXCL10 のレセプターである CXCR3 が骨肉腫細胞と血管内皮細胞に存在するかどうかを flow cytometry で確認する。抗体には抗マウス CXCR3 PE 標識抗体 (ThermoFisher) を用い、LSRFortessaX-20(BD Biosciences)で測定し、解析する。

(6) CXCL9 及び CXCL10 による血管内皮細胞を介した骨肉腫細胞の浸潤能に対する影響
浸潤能の判定は実験方法(2)と同様に行う。Upper chamber に血管内皮細胞の b.end3, MS1 を confluent になるように培養し、upper chamber 又は lower chamber に CXCL9 又は CXCL10 を 50, 100ng/ml の濃度で添加する。1 時間後、Upper chamber に Calcein AM でラベルした LM8 を入れて培養し、24 時間後に測定・解析を行う。

(7) CXCL9 及び CXCL10 による骨肉腫細胞の転移への効果

IL-18 による転移抑制作用に CXCL9 及び CXCL10 がどの程度関与しているかをマウス転移モデルと中和抗体を用いて明らかにする。IL-18 と CXCL9 又は CXCL10 の中和抗体を 5 日間連日投与したマウスの尾静脈に LM8 を注入し、3 週間後に実体顕微鏡下で肺の転移結節を数え評価する。

4. 研究成果

研究成果は研究の方法の項目別に表示する。

(1) CXCL9 及び CXCL10 は 1, 3 日間の培養においてマウス骨肉腫細胞 LM8 の増殖には影響を及ぼさなかった(図 1)。

(2) CXCL9 及び CXCL10 による骨肉腫細胞の遊走能への効果は、CXCL10 には遊走抑制効果が見られた(図 2)。一方 CXCL9 では有意差がみられなかった。CXCL9 及び CXCL10 による骨肉腫細胞の浸潤能への効果は、CXCL9, CXCL10 共に upper chamber に添加した時には促進効果がみられ、lower chamber に添加したときには影響は見られなかった(図 3)。

(3) 3 種類の血管内皮細胞と LM8 との接着性は、細胞の種類によって異なっていたが、CXCL9 又は CXCL10 による接着性への影響はみられなかった(図 4)。

(4) CXCL9 及び CXCL10 は 3 種類の血管内皮細胞の増殖に影響しなかった(図 5)。

(5) CXCR3 は LM8 に検出され、

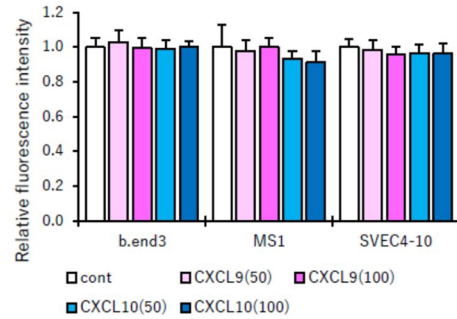


図4 CXCL9, 10によるLM8と血管内皮細胞との接着への影響

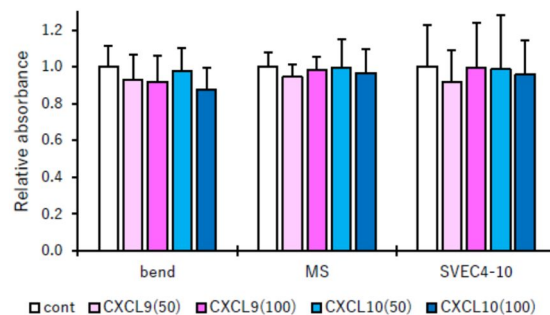


図5 CXCL9, 10の血管内皮細胞の増殖への影響

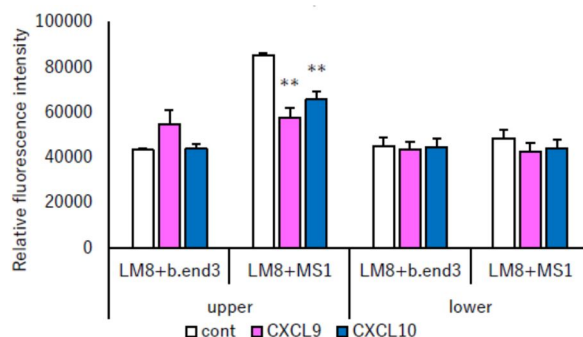


図6 CXCL9, 10の血管内皮細胞を介したLM8の浸潤能への影響

b.end3, MS1, SVEC4-10 の 3 種類のマウス血管内皮細胞にも強く検出された。

(6) MS1 を用いた場合、upper chamber に CXCL9 又は CXCL10 を添加すると LM8 の浸潤が抑制された。しかし b.end3 を用いた場合は、コントロールと変わらなかった。また lower chamber に CXCL9 又は CXCL10 を添加した場合も変化がみられなかった (図 6)。

(7) LM8 の肺転移は IL-18 投与によって強く抑制された。そこに中和抗体を入れると、CXCL10 ではわずかに IL-18 抑制効果に阻害がみられた。一方 CXCL9 ではわずかに阻害されたが有意差はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada N, Kato-Kogoe N, Yamanegi K, Nishiura H, Fujihara Y, Fukunishi S, Okamura H, Terada N, Nakasho K.	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of Asparagine-linked Glycosylation Participates in Hypoxia-induced Down-regulation of Cell-surface MICA Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1353-1359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12358	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 直子、平山 円、山根木 康嗣、西浦 弘志、藤原 勇輝、中正 恵二、寺田 信行
2. 発表標題 マウス骨肉腫に対するIL-18誘導性がん転移抑制シグナル
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田直子、山根木康嗣、西浦弘志、中正恵二、寺田信行
2. 発表標題 骨肉腫の低酸素状態におけるMICA認識回避のメカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017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
研究 分 担 者	山田 直子 (Yamada Naoko) (10319858)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山根木 康嗣 (Yamanegi Koji) (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究 分担者	西浦 弘志 (Nishiura Hiroshi) (90284760)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究 分担者	中正 恵二 (Nakasho Keiji) (00217712)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	