

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390306

研究課題名(和文) 胃がん腹膜播種に対する新しい免疫細胞を用いた治療開発

研究課題名(英文) Effect of combination of IL-18 and immune checkpoint inhibitors on peritoneal dissemination of tumor cells

研究代表者

岡村 春樹 (Okamura, Haruki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60111043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はインターロイキン 18 (IL-18) のがん治療への応用の可能性を探るために行われた。近年PD-1, PD-L1 などの免疫・炎症を抑制する分子を標的とした免疫チェックポイント阻害薬が臨床で使われるようになり、その治療効果の増強、副作用の低減などを目的とする研究が求められるようになった。我々は動物モデルを用いてIL-18が免疫チェックポイント阻害薬の効果を強く増進させることを観察し、IL-18の作用機序として、IL-18がNK, CD8陽性T細胞などエフェクターリンパ球の増殖や機能を顕著に高める一方、Tregを減少させることを示し、がんの免疫治療における有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out on the trial to examine the utility of interleukin-18 (IL-18) for cancer immunotherapy. Recent development of immune checkpoint inhibitors targeting PD-1 or PD-L1 for cancer immunotherapy have made a breakthrough and opened new era in cancer therapy. This therapy requires further progress in augmentation of efficacy and suppression of adverse events. Using an animal model of cancer peritoneal dissemination, we demonstrated that IL-18 markedly augments the efficacy of immune checkpoint inhibitors suppressing tumor growth and prolonging survival of mice inoculated with tumor cells. As a mechanism, it was considered that IL-18 strongly enhances expansion of effector cells including NK cells, T cells, and CD8+ T cells, and oppositely suppresses Treg cells. These results demonstrated utility of IL-18 in cancer immunotherapy and suggested usage of IL-18 for wider range of immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫制御学

キーワード：IL-18 免疫チェックポイント阻害薬 抗CTLA4抗体 抗PD-L1抗体 NK細胞 Treg CD8陽性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

本研究が始まった平成 24 年ころは CTLA4, PD-1, PD-L1 など炎症の抑制に関与する分子を標的としてがん細胞に対する免疫応答を再活性化、持続化するという治療薬(免疫チェックポイント阻害薬)の黒色腫に対する有効性が認められ、臨床に応用することが承認されたばかりであった。この新しいがん治療薬は大きな期待が寄せられ、治療効果の増強、対象疾患の拡大、副作用の低減など、様々な改良と発展が求められるようになっていた。

我々の研究室では IL-18 の中心的な、生物学的役割を明らかにする目的で、リンパ球に対する IL-18 の作用について研究していたが、IL-18 がいくつかの自然リンパ球、あるいは自然免疫リンパ球様細胞の増殖に必要であり、また IL-18 を添加することにより、それらの細胞の増殖が著しく促進されることを観察していた。がんに対する免疫応答には獲得免疫だけではなく自然免疫も重要な役割を持つという報告も多数見られたことから IL-18 は自然リンパ球、あるいは自然免疫リンパ球様細胞の増殖を促進することを通じて免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強することが考えられ、IL-18 とこれら阻害薬との併用効果について検討を加える必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

以上のような背景をもとに、本研究では先ず動物の腫瘍モデルを用いて、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を IL-18 が増強することができるかを明らかにし、併用効果が認められた場合には IL-18 の作用機序を細胞レベルの解析によって明らかにすることを主たる目的としている。その他に、IL-18 の中心的な役割や作用を分子レベルで解明し、IL-18 の効果の裏付けを深めることも目的としている。加えてこの併用が免疫チェックポイント阻害薬の副作用による有害事象を増悪させることはないか、様々な臓器につ

いて観察、検討を行う。

## 3. 研究の方法

マウスの大腸がん細胞、CT26 を腹腔内移入したがん腹膜播種モデル、黒色腫細胞、B16 を静脈内注射した、肺転移モデルなどを用いた。

10%FBSを加えたRPMI1640培養液で培養したCT26細胞を0.05%トリプシン/0.53mmol EDTAでプラスチックプレートからはがし、遠心で3回洗った後、単細胞浮遊液を調製し、 $5 \times 10^4$ 個/マウスのCT26細胞を7-8週令の雄のBALB/cマウスに腹腔内移入した。細胞移入後3-10日の適当な日からPBS, IL-18(グラクソスミスクラインより分与), 抗CTLA4抗体、抗PD-L1抗体、コントロール isotype IgG (BioXcell社)などを、様々な量で、単独、あるいは様々な組み合わせで投与、治療を行った。そして経日的に体重、腹囲、などを測定する一方、生存日数の測定を行った。

がん組織周辺のリンパ球のサブセット、サイトカイン産生や細胞傷害活性などの機能に関する解析も行った。動物モデルはリンパ球の採取が容易なCT26細胞を腹腔内移入した腹膜播種モデルを用いて、腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cells: PEC)を採取、腹腔にリクルートされるリンパ球の数の測定を行うとともに表面抗原(CD3, DX5, CD19, CD4, CD8, CD11c, NKG2Dなど)の観察を行い、リンパ球の種類、サブセットの割合などについて解析した。またこれらのリンパ球の細胞傷害活性や産生するサイトカインの種類、量などの測定をそれぞれ DELFIA EuTDA Cytotoxicity Assay System (PerkinElmer Life Science Wallac Oy)の方法、ELISA法で行った。リンパ球の表面抗原の解析は常法に従って flow cytometry によって行った。

B16/F10 黒色腫細胞は 10%FBS を加えた DMEM 培地で培養し、CT26 細胞と同じくトリプシン/EDTA で処理し、洗浄後  $2 \times 10^5$  個/マウスで 8-10 週令の C57BL/6 マウスの尾静脈よ

り移入、適当な日数のあと、IL-18, 抗体薬などを腹腔内に注射した。20日-60日の間に肺における nodule の大きさと数の測定を行うとともに生存率も測定した。

一方、IL-18の作用機序を明らかにするために、NK細胞を用いて、IL-18が増殖に与える効果、活性化するシグナル伝達系、誘導する蛋白、細胞内器官に対する影響などについて分子レベルでの解析を試みた。手法としては免疫染色、ウエスタンブロッティング、PCRなどを用いた。

#### 4. 研究成果

マウス腹膜播種モデルにおいて、IL-18は免疫チェックポイント阻害薬の腫瘍抑制効果を高め、がん移植マウスの生存を著しく長引かせることがわかった。

がん細胞CT26を移入したマウスにPBSを注射したコントロールマウスの平均生存日数は約27日であったが、抗CTLA4抗体単独で治療したときは約41日であり、有意に生存を長引かせることができた(図1)。さらにIL-18と抗CTLA4抗体とを組み合わせで投与した時は顕著な生存の延長がみられた。また効果はIL-18の投与量に依存する傾向が見られたが、投与量の上限をきめることはできなかった。

治療薬の投与開始の時期は早いほど効果が強く、がん細胞移入3日後から開始した場合、抗CTLA4抗体単独では10日くらいの延命効果が見られ、IL-18との併用では90日間の観察の間、すべてのマウスが生存し、腹腔内で腫瘍の形成を認めなかった。

がん細胞移入7日後から投与開始した場合、抗CTLA4抗体単独ではほとんど効果が見られなかったが、IL-18と組み合わせで投与した場合は約80%のマウスが90日の観察期間中生存することができた。抗PD-L1抗体+IL-18の組み合わせで治療した場合は90日間生存率約40%で抗CTLA4抗体との組み合わせに比べて効果は弱かった。

細胞移入10日後から治療開始した場合は抗CTLA4抗体+IL-18の組み合わせでも90日生存率は約20%で、抗PD-L1抗体+IL-18との組み合わせでは若干の生存延長は認められたものの生存率は0%と低下した(図1)。また抗CTLA4抗体+抗PD-L1抗体の組み合わせはそれぞれ単独よりも強い治療効果を示したが、もっとも強い効果は抗CTLA4抗体+抗PD-L1抗体+IL-18の三つの組み合わせによって得られ、この場合はがん細胞移入から14日後でも弱いながら有意な生存延長が観察された。

このようにIL-18は抗CTLA4, 抗PD-L1抗体など免疫チェックポイント阻害薬の効果を著しく高める可能性が示されたが、投与の開始が遅れると効果が弱い傾向が見られた。

一方、B16黒色腫細胞を用いた肺転移モデルにおいても、抗CTLA4抗体+抗PD-L1抗体の二つの組み合わせと、抗CTLA4+抗PD-L1抗体+IL-18の三つの組み合わせとで腹膜播種モデルの場合と同様、4回投与した時の、肺におけるnoduleの数、生存日数を比較したが、IL-18を併用した時の方が治療効果は有意に高かった。また、このモデルにおいては、抗PD-1抗体単独、抗PD-1抗体+IL-18の組み合わせについても検討を加えたが、やはりIL-18との併用の方が、転移noduleの数も少なく、生存率も高かった(図2)。

一方、乳がん細胞4T1を用いた腫瘍モデルでは、皮下に移植した場合でも、腹腔内移植した場合でも、抗CTLA4, 抗PD-L1抗体、IL-18はいかなる組み合わせによってもほとんど効果は見られなかった。このように、癌腫の違いによって、免疫チェックポイント阻害薬の効果に違いがみられる理由については解析中である。

以上の実験結果からIL-18が免疫チェックポイント阻害薬の効果を高める可能性が示されたが、その作用機序解明のためにがん組織周辺のリンパ球のサブセット、サイトカイ

ン産生や細胞傷害活性などの機能に関する解析も行った。動物モデルはリンパ球の採取が容易な CT26 細胞を腹腔内移入した腹膜播種モデルを用いて、腫瘍細胞移入、免疫チェックポイント阻害薬や IL-18 を投与した後、適当なタイミングで腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells: PEC) を採取し、その数を測定した。その結果、PEC の数は抗 CTLA4 抗体 抗 PD-L1 抗体それぞれ単独、あるいは抗 CTLA4 抗体と抗 PD-L1 抗体とを組み合わせたものに比べて、IL-18 のみを投与した場合の方が有意に増加しており、さらにそれぞれに IL-18 を加えることによって、PEC の数は著しく増加した(図 3)。

また、細胞表面抗原について flow cytometry によって解析したところ、抗 CTLA4 抗体と抗 PD-L1 抗体とを組み合わせたものでも DX5 陽性 B220 陽性の NK 細胞の割合が著しく増加していたが、IL-18 を加えることによってさらに増加していた。この NK 細胞は表面抗原から APC 活性や accessory 機能の強い pre-mature NK 細胞(pre-mNK)と呼ばれる細胞と考えられた。このことから、獲得免疫を刺激する能力を持つ NK 細胞の割合も総数も IL-18 を併用することによって顕著に増加していることがわかった。

一方、CD4 陽性 TCR 陽性、あるいは CD4 陽性 CD25 陽性の T 細胞が PEC の中では占める割合は抗 CTLA4 抗体と抗 PD-L1 抗体とを組み合わせたものに比べて、それらにそれぞれ IL-18 の添加したもののほうが 3 分の 1、から 4 分の 1 と、極めて少ないことがわかった。この CD4 陽性 CD25 陽性の T 細胞は FoxP3 陽性であったことから Treg と呼ばれる細胞であると考えられ、IL-18 を併用することによって、Treg 細胞が強く抑制されることが示された。

CD8 陽性 T 細胞については、IL-18 と組み合わせた場合、PEC の中で占める割合は若干低下していたが、絶対数はやや増加していた。

このように、免疫チェックポイント阻害薬に IL-18 を併用することによって、がん組織周辺の NK 細胞が割合も絶対数も著しく増加することが分かった。この NK 細胞は免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果において中心的な役割を持つことが考えられたが、実際抗 asialoGM1 抗体を治療開始前後で投与して NK 細胞を除いておくと、抗 CTLA4 抗体 + 抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA4 抗体 + 抗 PD-L1 抗体 + IL-18 いずれで治療した場合でも治療効果が失われた。このとき NK 細胞は大きく減少していたが、逆に Treg 細胞が顕著に増えていた (図 4)。

また、抗 CD4 抗体を投与して CD4 陽性 T 細胞を除いた場合は治療効果が影響を受けることはなかったが、抗 CD8 抗体を投与して CD8 陽性 T 細胞を除いた場合はこれら治療薬の効果は強く抑制されたことから、CD4 陽性 T 細胞よりも CD8 陽性 T 細胞の方が、この免疫治療において重要な役割を持つことが示唆された。

この他に IL-18 の組み合わせによって T 細胞が増加することも観察しており、IL-18 は NK , T , CD8 陽性 T 細胞などのエフェクター細胞を増やすことによって抗腫瘍効果を高めることが考えられた。

なお、IL-18 併用で誘導される PEC の CT26 がん細胞に対する傷害活性、あるいは -インターフェロン産生能について検討を加えたが、ともに IL-18 を組み合わせることで増強されていた。

-インターフェロンはがん細胞の PD-L1 発現を高めたり、NK 細胞の細胞傷害活性を高めることから、IL-18 は NK 細胞の抗 PD-L1 抗体による ADCC(antibody dependent cellular cytotoxicity)を増強する機序も考えられた。

マウスでは免疫チェックポイント阻害薬の副作用による自己免疫疾患に似た有害事象は現れにくく、またそのような報告も見当たらないが、ヒトでは重要な問題となってい

る。IL-18 はこれら阻害薬の治療効果を著しく高めることから、有害事象も増強する可能性も考えられたので、治療効果のもっとも強い、抗 CTLA4 抗体 + 抗 PD-L1 抗体 + IL-18 の三つの組み合わせで治療したマウスと、抗 CTLA4 抗体 + 抗 PD-L1 抗体のみで治療したマウスについて、腸、肝臓、腎臓、皮膚などについて、組織学的な検討を加えたが、いずれの治療群でも明確な病理学的変化は認められなかった。さらに肝機能、腎機能などについても血清学的な検討を加えたが、ALS, ALT, ALP などについては、免疫チェックポイント阻害薬の投与によって若干の上昇が見られたのに対して、IL-18 を併用した場合はむしろそれらの値は低減されていた。以前ヒトにおける IL-18 の抗腫瘍効果について治療研究がなされたことがあり、IL-18 単独、あるいは化学療法剤との併用において有意な効果は見いだせなかったが、IL-18 による有害事象もほとんど現れなかった。今回のマウスを用いた実験でも、IL-18 による有害事象や増悪作用はほとんど、問題にならないことが示された。

一方、分子生物学的な手法を用いて IL-18 の作用機序を理解する試みも行った(投稿中)。脾臓のNK細胞はIL-18受容体鎖を発現しており、IL-18はこれらのNK細胞に直接作用し、NF- $\kappa$ BやPI3Kなどを活性化し、蛋白合成、蛋白のリサイクル、オートファジーなどを増強させることを明らかにし、分泌細胞、神経、心筋など、非骨髄系細胞に強く発現されているIL-18の生物学的、病理学的な役割の解明に示唆を得ることができた(投稿中)。

免疫チェックポイント阻害薬はがん治療に大きなブレイクスルーをもたらし、期待が寄せられているが、治療応用は始まったばかりで、いっそうの奏効率の上昇と改善とが求められている。癌に対する免疫応答やその制御の仕組みはまだまだ不明のことが多く、今回

の研究はその仕組みの解明に示唆を与えると思われ、新しいがん免疫治療の改善や発展に有用な知見をもたらしたと考えられる。

図 1

Effect of combined therapy of IL-18 and immune checkpoint inhibitors on disseminated tumor growth in the peritoneum

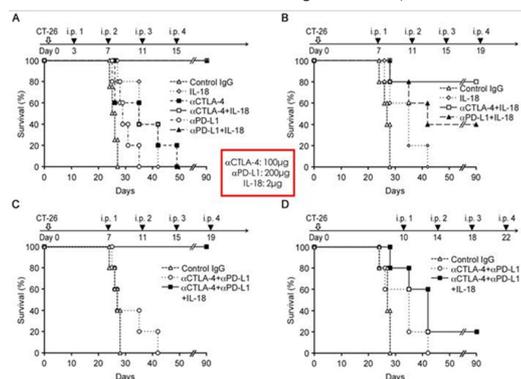


図 2

IL-18 augments anti-tumor effect of immune checkpoint inhibitors in lung metastasis model by B16 melanoma cells

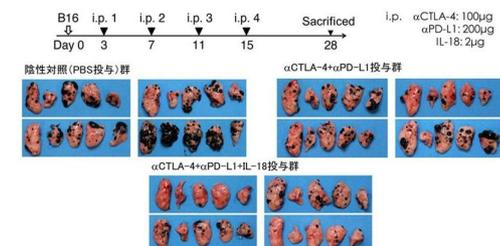
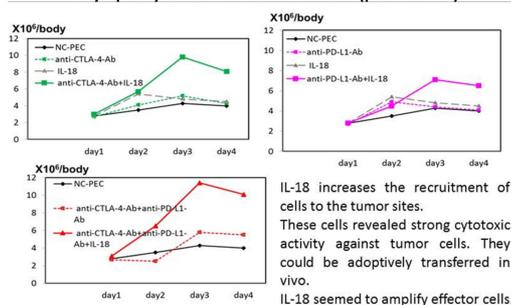


図 3

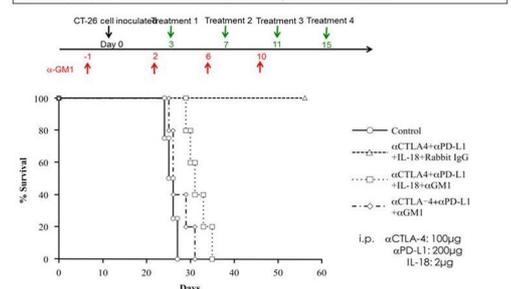
Effect of IL-18 and immune checkpoint inhibitors on recruitment of lymphocytes to tumor environment (peritoneum)



IL-18 increases the recruitment of cells to the tumor sites. These cells revealed strong cytotoxic activity against tumor cells. They could be adoptively transferred in vivo. IL-18 seemed to amplify effector cells.

図 4

Effect of deletion of NK cells by anti-asialoGM1 Ab on anti-tumor activity by IL-18 and immune checkpoint inhibitors



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Li W, Jin D, Hata M, Takai S, Yamanishi K, Shen W, El-Darawish Y, Yamanishi H, Okamura H. Dysfunction of mitochondria and deformed gap junctions in the heart of IL-18-deficient mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読 有、  
2016 Aug 1;311(2):H313-25. doi:  
10.1152/ajpheart.00927.2015. Epub 2016  
Jun 10.

Ma Z, Li W, Yoshiya S, Xu Y, Hata M, El-Darawish Y, Markova T, Yamanishi K, Yamanishi H, Tahara H, Tanaka Y, Okamura H. Augmentation of Immune Checkpoint Cancer Immunotherapy with IL18. 査読 有、  
Clin Cancer Res. 2016 Jun  
15;22(12):2969-80. doi:  
10.1158/1078-0432.CCR-15-1655. Epub 2016  
Jan 11.

[学会発表](計5件)

Ma Z, Li W, Yoshiya S, Xu Y, Hata M, El-Darawish Y, Yamanishi K, Ymanishi H, Tanaka Y, Okamura H. Augmentation of immune sheckpoint blockade therapy with IL-18. The 74th Annual Meeting of The Japanese Cancer Association.2015.10.8.-2015.10.10. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Li W, Okamura H. IL-18 augments efficacy of Immunotherapy against peritoneally disseminated tumor in mice. BIT's 8<sup>th</sup> Annual World Cancer Congress. 2015.5.14-2015.5.16. Beijing(China)

Ma Z, Li W, Hata M, Tanaka Y, Okamura H. IL-18 augments efficacy of anti-CTLA4 and/or anti PD-L1 antibodies against peritoneally disseminated in mice. The 43th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. 2014.12.10.-2014.12.12. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Li W, Tanaka Y, Okamura H. Regulatory roles of CD56brightCD11c+ NK-like cells on expansion of gd T cells. The 42th Annual

Meeting of Japanese Society for Immunology. 2013.12.-2013.12.13. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Li W, Yamamoto H, Yamanishi K, Tanaka Y, Okamura H. Regulatory roles of novel NK-like CD56brightCD11c+ cells on expansion of gd T cells and memory CD8+T cells. 15th International Congress of Immunology - ICI. 2013.8.22-2013.8.27 Milan(Italy).

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 春樹(OKAMURA, Haruki)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:60111043

(2)研究分担者

笹子 三津留(SASAKO, Mitsuru)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:40143490

菊池 正二郎(KIKUCHI, Syojiro)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号:70381960

前山 義博(MAEYAMA, Yoshihiro)  
兵庫医科大学・医学部・その他  
研究者番号:80614031

田中 義正(TANAKAN, Yoshimasa)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号:90280700

(3)研究協力者

李文(LI, Wen)  
馬 智峰(MA, Zhifeng)  
El-Darawish Yosif  
関 初香(SEKI, Hatsuka)