

研究種目：若手研究 B
研究期間：2006～2008
課題番号：18790803
研究課題名（和文） 皮膚悪性腫瘍に対する新規サイトカン療法の探索研究
研究課題名（英文） Role of the newly identified cytokine IFN-lambda (IL-28/29) in skin cancer
研究代表者
佐藤 篤子 (SATO ATSUKO)
自治医科大学・医学部・研究員
研究者番号：50382916

研究成果の概要：

近年、腫瘍免疫活性化を目的としたサイトカイン治療は、効果が短期間なことや過剰な副作用が問題となっており、より効果的で安全な新規サイトカインが必要とされている。本研究では、新規サイトカイン IFN-lambda の抗腫瘍効果に着目し、固形癌に対する治療戦略を目指した総合的研究を実施した。IFN-lambda は細胞周期 G1/S 停止とアポトーシスを誘導し、腫瘍局所部位で過剰発現させると腫瘍形成と転移を抑制し、その抗腫瘍効果には NK 細胞が必要であることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：腫瘍免疫、インターフェロン、NK 細胞

1. 研究開始当初の背景

IFN-alpha、-beta などの、type I IFNs は直接的、間接的な抗腫瘍効果を示すことが知られている。直接的には、MHC class I の発現増強、さらに、cell cycle modulation による増殖抑制を引き起こし、間接的には、NK 細胞や、CTL などの活性化が挙げられる。しかし、これら腫瘍免疫の活性化を目的として、近年行われているサイトカイン治療は、短期

的な効果しか得られず、過剰な副作用が問題となっている。そこで、ゲノム解析により各種免疫系を惹起する新規サイトカインが同定され、その生物学的意義や応用が大きな興味となっている。

IFN-lambda は、class II サイトカインレセプターファミリーに属する新規サイトカインとして報告された (Kotenko et al, Nat Immunol 2003, Sheppard et al, Nat Immunol 2003)。当初 IFN-lambda は、type I IFNs に

類似した、抗ウイルス活性を有することは報告されていたが、抗腫瘍効果については知られていなかった。そこで、このサイトカインの新しい作用として抗腫瘍活性を持つ可能性が強く予想され、本研究で検証することとした。

2. 研究の目的

腫瘍免疫による、癌治療のアプローチとしては、まず一つ目に、免疫担当細胞の腫瘍抗原の認識、二つ目に腫瘍への浸潤、三つ目に、腫瘍免疫の活性化が挙げられる。本研究ではこの3つ目の治療法について着目した。プラスミド DNA を用いた免疫修飾は、CpG 配列を認識する Toll 様受容体を介した自然免疫系を活性化し、さらに導入されたプラスミド DNA からの発現するタンパク質を通して、宿主の免疫系を惹起し、種々の感染症や癌に対する防御効果を誘導することができる。これまでに、各種サイトカイン遺伝子（例えば、IL-12 や IL-18）の生体内非ウイルス性遺伝子導入によって、宿主免疫系の活性化による優れた抗腫瘍効果が報告されている。本研究では、新規サイトカイン IFN-lambda の抗腫瘍効果に焦点を絞り、各種既存のサイトカインとの効果比較や宿主安全性など、皮膚悪性腫瘍（悪性黒色腫）などの固形癌に対する、安全で効果的な治療戦略を目指した総合的研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) 新規サイトカインのクローニング及び抗腫瘍効果の検討

マウス IFN-lambda のクローニングを行い、またマウスの各種細胞で IFN-lambda Receptor の発現を確認する。CMV ベクター、レトロウイルスベクターなどの expression vector を作成し、B16 メラノーマ細胞及び、colon26 マウス大腸癌細胞などへ、リポフェクション法を用いて形質導入する。IFN-lambda の蛋白発現を確認した後、*in vitro* で IFN-lambda を一過性発現させた、これら腫瘍細胞の増殖抑制効果を確認し、また、MHC、Fas などの表面形質の FACS 解析をおこなう。*In vivo* で、IFN-lambda 一過性発現腫瘍細胞の担癌モデルマウスを作成し、増殖抑制効果、survival rate を確認する。さらに、IFN-lambda の作用機序解明のため、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、asialo GM1 抗体を用いた depletion 実験を行い、抗腫瘍効果を比較検討する。使用する癌腫に依存して臓器特異的転移機構が存在する可能性が十分に考えられるため、癌細胞株の種類が豊富なマウスモデル (C57BL/6, BALB/c) を適宜用いながら検証を進める。

(2) *In vitro, in vivo* におけるバイオイメージングによる遺伝子導入の評価

ルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス腫瘍細胞を作成する。これら腫瘍細胞は、基質である D-ルシフェリンを投与することでルシフェラーゼ発光を起こす。この細胞を用いると IVIS Imaging system (Xenogen) により、定量化による抗腫瘍効果の検討が可能となり、また、リアルタイムに腫瘍の経過観察ができる。*In vitro* でこのルシフェラーゼ発光腫瘍細胞をターゲット細胞とし、IFN-lambda 暴露免疫細胞をエフェクター細胞とした killing assay を行う。また *in vivo* でルシフェラーゼ遺伝子を導入した腫瘍細胞を経静脈的及び経門脈的接種により転移癌モデルを作成し、ハイドロダイナミック法やリポフェクション法で IFN-lambda 遺伝子を導入することにより、その抗腫瘍効果を確認する。

(3) NK 細胞を介した IFN-lambda の癌転移抑制効果の検討

担癌モデルマウスを用いて、非特異的免疫抑制状態での癌治療について研究を進める。非特異的免疫抑制状態では、細胞障害性 CD8⁺-T 細胞の活性化が期待できないため、NK 細胞の機能に注目しながら研究を進める。

(4) 各種サイトカインを用いた免疫療法

これまでに NK 細胞の活性化誘導因子として報告されている IL-21 や、および IFN-lambda に類似した構造を持つ type I IFN である IFN-alpha を用いて、IFN-lambda の NK 細胞誘導効果と抗腫瘍効果を比較検討し差別化する。*In vitro* において、IFN-lambda および IL-21、IFN-alpha 刺激による NK 細胞の増殖、機能的な変化を BrdU の取り込みや Western Blot 法で比較する。さらに刺激後の NK 細胞と腫瘍細胞を co-culture し、その killing 効果を比較検討する。次に、*in vivo* で肺および、肝、皮下の担癌モデルマウスを作成し、ハイドロダイナミック法および、リポフェクション法を用いた IFN-lambda および IL-21、IFN-alpha 遺伝子の導入による抗腫瘍効果を比較検討する。また NK 細胞活性化を介した腫瘍廃絶にいかなる分子間認識が必要なのか、effector 分子の存在の有無による抗腫瘍効果を各種免疫不全マウス (Prf KO, Rag-2 KO, T-bet KO) を用いて腫瘍廃絶について検討を実施する。

4. 研究成果

(1) IFN-lambda は *in vitro* で細胞周期 G1/S 停止とアポトーシスを誘導する

Balb/c マウス骨髄よりクローニングした IFN-lambda は Western Blot 法で蛋白発現を確認した。また、RT-PCR で B16 および colon26

での IFN-lambda Receptor の強い発現を確認した。B16 に IFN-lambda を一過性に過剰発現させると、MHC class I (H-2K^b) の発現が上昇していた。また Rb^(ser780) 脱リン酸化、p21 の up regulation も認め、ルミネッセンスを用いたカスパーゼアッセイで caspase3/7 の有意な上昇を認めた。IFN-lambda は *in vitro* で細胞周期停止とアポトーシスをひきおこすことがわかった。

(2) IFN-lambda の腫瘍局所部位での過剰発現は腫瘍形成と転移を抑制する

In vitro で B16 細胞や colon26 細胞の腫瘍局所にリポフェクション法を用いて一過性に IFN-lambda を過剰発現させると mock と比較し有意に腫瘍増殖は抑制された。また *in vivo* でルシフェラーゼ遺伝子を導入して作成した腫瘍細胞を経静脈的、経門脈的に投与し作成したマウス肺、肝転移癌の増殖を IVIS Imaging system を用いてリアルタイムに評価を行った結果、リポフェクション法もしくはハイドロダイナミック法を用いて腫瘍局所に IFN-lambda を過剰発現すると腫瘍の増殖は有意に抑制された。

(3) 個体内における IFN-lambda による抗腫瘍効果には NK 細胞が必要である

IFN-lambda の抗腫瘍効果の免疫担当細胞を明らかにするために、*in vivo* で抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、asialo GM1 抗体を投与し depletion 実験を行った。その結果、NK 細胞 depletion 群において IFN-lambda の抗腫瘍効果は打ち消され、NK 細胞を介した抗腫瘍効果であることが示された。さらに、*in vivo* においてルシフェラーゼ遺伝子を導入した luc-colon26 を用いて作成したマウス肝転移モデルへ、IFN-lambda 治療前後で asialo GM1 抗体投与を行い、control IgG 投与群とその腫瘍増殖を IVIS Imaging system で比較した。結果、IFN-lambda の抗腫瘍効果はマウス肝転移モデルにおいても NK 細胞が重要であることが示された。

(4) IFN-lambda は肝臓における NK 細胞・NKT 細胞分画を増加させる

IFN-lambda に暴露された肝リンパ球は、FACS 解析で NK 細胞の分画が顕著に増加していた。これら IFN-lambda 暴露 NK 細胞は colon26 細胞に対して有意な killing activity を示した。

(5) IFN-lambda による NK 細胞の増殖・活性化能は、IL-21 および IFN-alpha には及ばない

マウス IFN-lambda による NK 細胞の活性化と抗腫瘍効果について、IFN-alpha や IL-21 など各種サイトカインによる NK 細胞の増殖・活性化能を指標に比較検討を行った。 *In*

vitro で各種サイトカイン刺激後の DX5+NK 細胞内 perforin の induction を Western Blot 法で解析した。その結果、コントロールの IL-2 単独よりも IFN-lambda および IL-21 添加群において perforin の発現が増強していた。また各種サイトカイン存在下で NK 細胞を培養し、細胞の proliferation を BrdU 取り込みで比較したが、その増殖能に大きな差は認めなかった。サイトカイン暴露後の NK 細胞と腫瘍細胞を co-culture し、killing assay を行うと、IFN-lambda による NK 細胞の活性化は IL-21 や IFN-alpha ほど強力なものではないことがわかった。次に、*in vivo* で、B16/F10 細胞による肺転移モデルマウスにおける、IFN-lambda 或は IL-21 遺伝子の導入による抗腫瘍効果を検討した。その結果 IL-21 処理群では優れた肺転移形成抑制能を示したが、IFN-lambda との有意差は認めなかった。Colon26 肝転移モデルマウスに、ハイドロダイナミック法で腫瘍局所に mock、IFN-lambda、IL-21 を強発現させて生存曲線を比較した結果、IL-21 治療群では生存期間の延長を認めたが、IFN-lambda 治療群は IL-21 治療群の効果に及ばなかった。以上の結果から IFN-lambda による NK 細胞の増殖・活性化能は、IFN-alpha および IL-21 ほど強いものではないと示唆された。また興味深いことにハイドロダイナミック法施行後24時間以内の死亡率は IFN-lambda の方が IFN-alpha に比べて低い傾向を示した。

(6) IFN-lambda による NK 細胞を介した腫瘍破壊は effector 分子の存在、すなわち perforin、Th1 サイトカインを介してひきおこされている

NK 細胞活性化を介した腫瘍廃絶にかかわる分子間認識機構を明らかにするため、perforin 欠損の prf KO マウス、及び Th1 細胞のマスターレギュレーターである T-bet の KO マウスを用いて検討を行った。C57BL/6 や Balb/c での固形がん臓器転移モデルでは腫瘍局所に IFN-lambda を過剰発現させると抗腫瘍効果を認めた。しかし、prf KO および T-bet KO マウスでの固形がん肺転移モデルの生存曲線を比較検討した結果、IFN-lambda、IL-21、IFN-alpha それぞれの治療による生存期間の延長は認めず、抗腫瘍効果はキャンセルされた。これらの結果から IFN-lambda による NK 細胞を介した腫瘍破壊について、その治療効果の一部は、effector 分子の存在、すなわち perforin および Th1 サイトカインを介してひきおこされていると示唆された。最近の IFN-lambda の新しい機能として、IFN-lambda に暴露されたヒト末梢血由来樹状細胞は制御性樹状細胞としての機能を獲得し、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞 (Treg) を誘導し、アロ反応を抑制することが報告され

た (Mennechet FJ, et al. Blood 2006)。これはすなわち、IFN-lambda の機能には免疫獲得と免疫寛容誘導の二つの側面があることを意味している。今後は IFN-lambda による NK 細胞と樹状細胞の相互作用、さらに IFN-lambda による Treg 誘導と獲得免疫の切り替えの仕組みなどを明らかにすることで IFN-lambda の characterization、治療手段としての可能性を明確にできると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

①Murakami T, Sato A, Chun NA, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1506-16. 査読有.

②Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol*. 2006;176:7686-94. 査読有.

〔学会発表〕 (計 4 件)

① Sato, A., et, al. Differential NK cell-mediated antitumor activity between IFN-lambda (IL-28/IL-29) and IL-21. The 66TH Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Yokohama.

②Sato, A., et, al. Differential antitumor activity between IFN-lambda and IL-21. The 94TH AAI Annual Meeting Immunology. May 18-22, 2007. Miami.

③ 佐藤 篤子, 村上孝, 小林英司. IFN-λ (IL-28/29) はNK細胞を介して抗腫瘍効果を発揮する. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月.

④A Sato., et, al. The antitumor activity of interferon-λ against murine tumors. Society for Investigative Dermatology, 663, Philadelphia, USA, May3-6, 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 篤子 (SATO ATSUKO)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 50382916