

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07163

研究課題名(和文) 膜結合型インターロイキン12(IL-12)による抗腫瘍免疫増強作用

研究課題名(英文) Enhancement of anti-tumor immunity with membrane-bound interleukin 12 (IL-12)

研究代表者

浅尾 裕信 (ASAO, Hironobu)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：80250744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IL-12はTh1型細胞性免疫誘導に重要なサイトカインである。IL-12には分泌型と膜結合型が存在するが、私達は膜結合型IL-12が分泌型よりも強いTh1誘導能を示すことを報告した。そこで膜結合型IL-12発現を制御することによりTh1応答を介した抗腫瘍免疫能が促進されるのではないかと考えた。そのために、まず膜結合型IL-12の分泌メカニズムの解明を試みたところ、ADAM17と呼ばれる蛋白質分解酵素が間接的に関与している可能性を見出した。膜結合型IL-12はADAM17により切断される何らかの分子と会合していることが予想され、現在その分子を検索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADAM17は膜結合型TNFを切断して分泌させる酵素として発見された。これまでに多くの膜分子がADAM17により切断され、機能が調節されることが判明している。IL-12についても、ADAM17が膜結合型から分泌型への変換に関わっていることが示唆された。膜結合型IL-12がどのようなメカニズムでTh1免疫応答を亢進させるのかについて、これまでのところ結論を得ることはできなかったが、今後ADAM17を介した新たな細胞性免疫応答の調節機構となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：IL-12 is an important cytokine for the induction of Th1 cell-mediated immunity. There are secretory and membrane-bound types of IL-12, and we have reported that membrane-bound IL-12 exhibits stronger Th1 inducibility than the secretory type. Therefore, we thought that regulation of membrane-bound IL-12 expression might promote anti-tumor immunity mediated by Th1 response. To this end, we first attempted to elucidate the secretory mechanism of membrane-bound IL-12, and found that a proteolytic enzyme called ADAM17 may be indirectly involved. Membrane-bound IL-12 is expected to be associated with some molecule that is cleaved by ADAM17 and is currently being searched for that molecule.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-12 ADAM17

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私達は IL-21 の情報伝達に対して、レドックス制御分子 Ape1/Ref-1 が ERK1/2 の活性化に必須の役割を持つ事を報告した (*Biochem Biophys Res Commun* 420:628-634,2012)。その後の解析で、Ape1/Ref-1 の阻害薬が樹状細胞を介してナイーブ T 細胞から IFN- γ 産生を促進するなど、Th1 応答を促進することを発見した。Ape1/Ref-1 阻害薬がなぜ Th1 応答を促進するのか、その原因を検索したところ、樹状細胞からの IL-12 分泌は抑制されるものの、樹状細胞上の膜結合型 IL-12 が増加することを見出し報告した (*J Biol Chem* 291:23672-23680,2016)。IL-12 は p35 と p40 という 2 つのサブユニットから構成されるが、構造上 p35 は IL-6 と、p40 は IL-6 受容体と相同性があることが知られていて、IL-12 はサイトカインとその受容体が結合したような構造をしている。

しかし、膜結合型 IL-12 がどのような機構で分泌型 IL-12 になるのかは全く不明である。また、膜結合型 IL-12 がどのようにして Th1 誘導を促進しているのか、という点も不明である。

2. 研究の目的

1) p40 シェダーゼの同定とその調節機構の解明

IL-12p40 と相同性がある IL-6 受容体は ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) と呼ばれる蛋白分解酵素 (シェダーゼ) により可溶性 IL-6 受容体になることが知られている。そこで IL-12p40 についても何らかのシェダーゼが関与している可能性があり、その同定と IL-12p40 の分泌機構を解明することを目的とする。

2) 膜結合型 IL-12 による Th1 誘導促進メカニズムの解明

Ape1/Ref-1 阻害薬を使った研究から、膜結合型 IL-12 が分泌型 IL-12 よりも Th1 誘導を亢進させる結果を得ている。そこでこの Th1 誘導亢進メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

8~12 週齢の C57BL/6 マウスから骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を GM-CSF 存在下に作成する。この BMDC を ADAM17 阻害薬の存在下に LPS 刺激し、分泌される IL-12、TNF、IL-6 を cytokine beads array 法 (CBA 法) で測定する。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞について、CRISPR-Cas9 を用いて ADAM17 欠損細胞を作成し、LPS 刺激後のサイトカインを測定する。

BMDC を LPS 刺激後に可溶化し、IL-12p40 を免疫沈降する。免疫沈降物について、質量分析を行い、共沈する分子を同定する。

IL-12 受容体 1 と 2 を HEK293T 細胞に発現させ、樹状細胞と共培養し、樹状細胞の機能に変化があるのかどうかを解析する。

4. 研究成果

BMDC を LPS 刺激し、経時的に培養液中のサイトカインを測定した結果、ADAM17 阻害薬存在下に、IL-12p40 と IL-12p70 の分泌量が減少した。ADAM17 は TNF のシェダーゼとして同定されていることから、TNF の分泌を陽性コントロールとしたところ、明らかに TNF 分泌も低下していた。これらサイトカインの分泌抑制が細胞のダメージ等によるものではないことを確認するために、シェダーゼによる影響を受けないと考えられる IL-6 を陰性コントロールとしたところ、IL-6 についてはほとんど変化がなかった。これらの結果から、IL-12p40 は ADAM17 により分泌制御を受けていることが予想された。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を LPS で刺激しても IL-12 の産生がほとんど認められなかった。そこでマウス IL-12p40 の発現ベクターを導入し、IL-12p40 を恒常的に産生する細胞 (RAW12b-3 細胞) を作成した。その RAW12b-3 細胞を ADAM17 阻害薬で処理したところ、IL-12p40 の分泌量が減少したが、同時に測定した TNF と比較すると、その程度はあまり大きくなかった。そこで ADAM17 の影響をはっきりさせるために、RAW12b-3 細胞に対して CRISPR-Cas9 システムを用いて ADAM17 をノックアウトした細胞 (RAW12bKO 細胞) を作成した。RAW12bKO 細胞での IL-12p40 を測定したところ、分泌量は明らかに低下していた。

IL-12p40 は IL-6 受容体と相同性があるが、IL-6 受容体と異なり IL-12p40 は膜貫通領域を持たない。そこで、確認のため IL-12p40 を IL-6 受容体の ADAM17 切断部位を持たない膜貫通領域と融合させ、ADAM17 により切断されるのかを検討した。その結果、IL-12p40-IL-6 受容体融合蛋白は細胞膜に固定され、全く分泌されないことが明らかとなり、IL-12p40 は ADAM17 の直接の

ターゲットではないことが明らかとなった。そこで IL-12p40 が ADAM17 により分泌制御される要因として、何らかの分子と細胞膜上で会合し、その分子が ADAM17 のターゲットになっているのではないかと考えた。LPS 刺激した BMDC をジギトニンなどの穏やかな可溶化試薬を用いることで会合を保存できる状態で可溶化し、IL-12p40 を免疫沈降して質量分析装置で解析した。IL-12p40 の免疫沈降物を解析したところ、IL-12p40 以外にいくつかの特異的分子が同定された。現在これらの分子について、ADAM17 のターゲットになっているのかを含め解析を進めている。

IL-12 受容体 1 および 2 発現 HEK293T 細胞と樹状細胞と共培養したが、樹状細胞のサイトカイン産生能等に明らかな変化は認められなかった。さらに条件を変えて解析を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	奈良 英利 (NARA Hidetoshi) (00375338)	石巻専修大学・理工学部・准教授 (31308)	
研究分担者	武田 裕司 (TAKEDA Yuji) (90302299)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	

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