

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07333

研究課題名(和文) IL-12関連サイトカインIL-27によるがん治療の臨床応用を目指した包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive study on IL-27, one of the IL-12 family cytokines, aiming at its clinical application for cancer immunotherapy

研究代表者

徐 明利 (Xu, Mingli)

東京医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：80597964

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)：IL-27が抗腫瘍効果を示す報告が多いが、一方で、小児白血病細胞株などは、IL-27依存的に細胞増殖を誘導することも報告されている。また、我々は、IL-27が造血幹細胞(HSC)に直接作用することも報告した。そこで、本研究では、慢性骨髄性白血病(CML)の原因融合遺伝子BCR-ABLをHSCに導入し、放射線照射したマウスに移植し、CMLを発症させるマウスCMLモデルを用いて検討した。その結果、外来性IL-27は、CD8+T細胞を活性化しBCR-ABL+CML幹細胞のアポトーシスを増強し、一方、内在性IL-27は、直接HSCに作用して細胞増殖を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは、今や国民の半数が罹患し、死因の1/3を占める深刻な病気となっている。今日、免疫チェックポイント阻害薬やキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法などのがん免疫療法が注目されているが、治療効果に個人差があることや特定のがんには効かないなど、改善が迫られている。そこで、これらのがん免疫療法と、がんワクチン療法、サイトカイン療法などと併用し最善の治療方法を確立することが必要である。サイトカイン療法は、その副作用が大きいことが臨床応用への大きな妨げになっている。IL-12ファミリーサイトカインの1つIL-27は、比較的副作用が少なく強い抗腫瘍活性を示す報告が我々の報告を含め多数ある。

研究成果の概要(英文)：A number of evidence revealed that IL-27 exerts antitumor effects through multiple mechanism, while it was also reported that IL-27 promotes proliferation of human leukemic cell lines. In addition, we previously demonstrated that IL-27 directly acts on hematopoietic stem cells (HSCs). Herein, we investigated the effects of exogenous IL-27 on the development of chronic myeloid leukemia (CML) using its mouse model, that is established by transferring causative gene BCR-ABL-transduced HSCs into irradiated mice. The results suggest that exogenous IL-27 activated CD8 + T cells and induced apoptosis of BCR-ABL+CML stem cells, which were shown using IL-27-transgenic mice. We also investigated the effects of endogenous IL-27 on the development of CM by transferring WSX-1 - BCR-ABL+HSCs into wild-type mice. The results suggest that endogenous IL-27 directly acted on BCR-ABL+CML stem cells and inhibited their proliferation. These results may suggest its inhibitory effect on CML stem cells.

研究分野：がん免疫

キーワード：IL-27 がん治療 慢性骨髄性白血病 BCR-ABL

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは、今や国民の半数が罹患し、死因の1/3を占める深刻な病気となっている。今日、免疫チェックポイント阻害薬やキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) 療法などのがん免疫療法が注目されているが、治療効果に個人差があることや特定のがんにしか効かないなど、改善が迫られている。そこで、これらのがん免疫療法と、がんワクチン療法、サイトカイン療法などと併用し最善の治療方法を確立することが必要である。サイトカイン療法は、その副作用が大きいことが臨床応用への大きな妨げになっている。

我々は、これまでに IL-12 ファミリーサイトカインの1つ IL-27 が強い抗腫瘍活性を有していることを世界で初めて報告して以来、IL-27 が腫瘍の性質により複数の作用機序により強い抗腫瘍効果を示すが、副作用は少ないことなどを明らかにしてきた(1, 2)。さらに、造血幹細胞 (HSC) からミエロイド系前駆細胞への分化増殖を強く誘導することなども明らかにしてきた(3)。一方、IL-27 が血液系のがん細胞の増殖を誘導するという報告もある。さらに、IL-27 は、がん治療の妨げに繋がると懸念される免疫チェックポイント分子 PD-L1 や Tim-3、制御性 T 細胞 (Treg)、抑制性サイトカイン IL-10 などの抑制性分子の発現を増強することも知られている。また、IL-27 が HSC に作用するなら、同様にがん幹細胞にも作用してがん細胞を増やさないかなども懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、IL-27 を用いた新しいがん治療法の確立を目指し、種々の条件下で前臨床試験研究を行い、臨床応用に懸念される問題点を解決し、最適な治療方法を明らかにすることが目的である。まず、慢性骨髄性白血病 (CML) の原因融合遺伝子 BCR-ABL を GFP とバイシストロニックに骨髄造血幹細胞にレトロウイルスで感染・発現させ、放射線照射したマウスに移植し発症させる CML マウスモデルを用いて、内在性および外来性の IL-27 のがん幹細胞への効果を明らかにする。さらに、*in vitro* でマウス骨髄細胞を GM-CSF と M-CSF、IL-13 で培養して MDSC へ分化誘導する系を用いて、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) への IL-27 の効果をなどについて検討する。

3. 研究の方法

(1) BCR-ABL/GFP⁺LSK がん幹細胞移植による CML モデルマウスの作製

CML の原因遺伝子 BCR-ABL-IRES-GFP のレトロウイルス発現ベクターおよびそのコントロールベクターMSCV-IRES-GFP (いずれも現広島大学仲先生より分与) を、エクトロピックレトロウイルスパッケージング細胞株 PLAT-E (東京大学北村先生より分与) に Fugene 6 (プロメガ社) を用いて遺伝子導入し、3日後その培養上清を回収した。これらの培養上清を、マウス骨髄細胞からソーティングにより精製した HSC を高濃度含む骨髄 Lineage-Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) 細胞に加え、ポリブレン存在下で 90 分間プレート遠心し感染させた。そして次の日に、放射線照射した C57BL/6 マウスに少量の骨髄細胞と共に静注した。1週間ごとに、尾静脈より採血し、FACS 解析により、白血球の数や各種細胞分布の割合、GFP⁺細胞や CD11b⁺細胞の割合を調べる。4週間後、脾臓を取り出し、その重量を測定し、脾臓および骨髄細胞の各種細胞分布の割合を FACS で調べた。マウスとして、野生型 C57BL/6 マウスの他、IL-27 を肝臓特異的 Serum amyloid protein P のプロモーターの下流に一本鎖 IL-27 を繋いだトランスジェニックマウス (IL-27-Tg)、IL-27 のレセプターサブユニットの1つ WSX-1 の遺伝子欠損マウスを用いた。まず、野生型 C57BL/6 マウスの骨髄より精製した LSK 細胞に BCR-ABL-IRES-GFP を遺伝子導入し、野生型マウスと IL-27-Tg マウスに移植し、外来性 IL-27 の CML 発症への効果を調べた。次に、野生型マウスと WSX-1 遺伝子欠損マウスの骨髄より精製した LSK 細胞に BCR-ABL-IRES-GFP を遺伝子導入し、野生型マウスに移植し、がん幹細胞への直接の IL-27 の効果を調べた。

(2) BCR-ABL/GFP⁺Ba/F3 細胞を用いたがん幹細胞モデルの作製

CML がん幹細胞モデルとして、IL-3 依存性に増殖するマウス pro-B 細胞株 Ba/F3 細胞に、上述の白血病の原因遺伝子 BCR-ABL-IRES-GFP の発現ベクターとコントロールベクターMSCV-IRES-GFP をレトロウイルスを用いて感染させ遺伝子導入し、1週間後に GFP⁺細胞をソーティングした。Ba/F3 細胞は、IL-27 のレセプターサブユニットの1つ WSX-1 は内在性に発現しているが、gp130 は発現していない。そこで、gp130 発現ベクターを遺伝子導入し G418 で選択した Ba/F3-gp130 細胞を入手し (北海道大学村上先生より供与)、この細胞に同様にレトロウイルスを用いて BCR-ABL-IRES-GFP およびその空ベクターを遺伝子導入して、GFP⁺細胞をソーティングした。即ち、Ba/F3-gp130-Vector と Ba/F3-gp130-BCR-ABL 細胞を作製し、それぞれの IL-27 刺激による、細胞増殖誘導とアポトーシスの誘導を、それぞれ、ATP 量を発光で測定する CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (プロメガ社) と FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-ADD (Biologend 社) で測定した。

(3) 抑制性細胞 MDSC の関与について

マウス骨髄細胞を GM-CSF と M-CSF、IL-13 で 1 週間培養して MDSC へ分化誘導する系に、IL-27 の存在下および非存在下で MDSC を分化誘導する。次に、抗 CD11b 抗体ビーズと AutoMACS Pro を用いて CD11b⁺MDSC 細胞を精製する。さらに、H-2K^b 拘束性卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-I) 由来脾臓細胞を、OVA 蛋白質で刺激して増殖を誘導する際、IL-27 存在下で分化誘導した MDSC 細胞を加え、増殖への影響を ³H-thymidine の取り込みで定量した。また、MDSC へ分化誘導する際、RNA を抽出し、MDSC 分化制御に関わる分子の発現をリアルタイム RT-PCR により調べ、それらの関与と作用機序を検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型 BCR-ABL/GFP⁺LSK がん幹細胞の IL-27-Tg マウスへの移植の検討

野生型 C57BL/6 マウスの骨髄より精製した LSK 細胞に BCR-ABL-IRES-GFP またはコントロールベクターをレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、野生型マウスおよび IL-27-Tg マウスに移植し、外来性 IL-27 の CML 発症への効果を検討した。コントロールの GFP⁺LSK 細胞を野生型マウスに移植すると、血中の白血球数は、1 週間目は低下したがその後は上昇し、2~3 週間目で元の数に戻った。IL-27-Tg マウスに移植して同様であった。一方、BCR-ABL/GFP⁺LSK 細胞を野生型マウスに移植すると、血中の白血球数は早くから増え続け 4 週間目で約 2 倍ぐらいまでに増えた。ところが、IL-27-Tg マウスに移植すると、コントロール GFP⁺LSK 細胞を移植した時と同様に白血球数の上昇が抑えられた。4 週間後、脾臓の重量を測定すると、白血球数の増加と同様に、BCR-ABL/GFP⁺LSK 細胞を野生型マウスに移植すると、約 2 倍に脾臓が大きくなっていたが、IL-27-Tg マウスへの移植では、それが抑制されていた。FACS 解析により、野生型マウスの脾臓では、CD11b⁺Gr-1⁺ のミエロイド細胞の数が増えていたが、IL-27-Tg マウスの脾臓では、その増加が抑制されていた。さらに、IL-27-Tg マウスの脾臓では、活性化した CD107a⁺CD8⁺ T 細胞の割合が増加し、GFP⁺PI⁺Annexin V⁺細胞死が誘導された細胞の割合も増えていた。さらに、この時の脾臓での種々のサイトカイン等の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で調べると、IL-27-Tg マウスでは、IL-6 の発現が減少傾向にあった。

(2) WSX-1 欠損 BCR-ABL/GFP⁺LSK がん幹細胞の野生型マウスへの移植の検討

次に、野生型および WSX-1 欠損マウスの骨髄より精製した LSK 細胞に BCR-ABL-IRES-GFP をレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、野生型マウスに移植し、内在性 IL-27 の CML 発症への効果を検討した。WSX-1 欠損 LSK 細胞の移植では、白血球数が著明に増加し、4 週間後には、脾腫もより大きく、脾臓での CD11b⁺Gr-1⁺ のミエロイド細胞の数も増えていた。

(3) BCR-ABL/GFP⁺Ba/F3 細胞を用いたがん幹細胞モデルでの検討

(2) の結果より内在性 IL-27 が LSK 細胞に直接作用し、がん幹細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。そこで、このことを *in vitro* の再構成で証明するために、Ba/F3-gp130-Vector と Ba/F3-gp130-BCR-ABL 細胞を作製し、それぞれを IL-27 で刺激し、細胞増殖への影響を検討した。Ba/F3-gp130-Vector 細胞では、増殖が見られないが、Ba/F3-gp130-BCR-ABL 細胞では、強い増殖が見られた。そこへ IL-27 を加えていくと、Ba/F3-gp130-Vector 細胞では、IL-27 濃度依存的に細胞増殖が誘導された。一方、Ba/F3-gp130-BCR-ABL 細胞では、既に強い細胞増殖が誘導されているので、IL-27 を加えてもさらに強い増殖は見られなかった。そこで、細胞数を少なくして同様な実験を行うと、高濃度の IL-27 では、むしろ増殖が抑制される傾向が見られた。

以上の結果より、BCR-ABL/GFP⁺LSK のがん幹細胞モデルを用いて、IL-27 はがん幹細胞に直接作用し増殖を抑制する可能性が示唆された。

(4) 抑制性細胞 MDSC の関与について

IL-27 を加えると、骨髄系 G-MDSC への分化の割合は殆ど変わらなかったが、単球系 M-MDSC への分化が減少する傾向にあった。さらに、IL-27 存在下で分化誘導した MDSC は、OVA 特異的 CD8⁺T 細胞の増殖の抑制活性が減弱していた。

【参考文献】

1. N. Orii *et al.*, Protective effects against tumors and infection by interleukin-27 through promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells into myeloid progenitors. *Oncoimmunology* **7**, e1421892 (2018).
2. T. Yoshimoto *et al.*, Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent. *Cancer Sci* **106**, 1103-1110 (2015).
3. J. Furusawa *et al.*, Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLoS Pathog* **12**, e1005507 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hasegawa H, Mizoguchi I, Orii N, Inoue S, Katahira Y, Yoneto T, Mingli X, Miyazaki T, Yoshimoto T.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 IL-23p19 and CD5 antigen-like form a possible heterodimeric cytokine and contribute to experimental autoimmune encephalomyelitis development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84624-9	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 -

1. 著者名 Mizoguchi I, Ohashi M, Hasegawa H, Chiba Y, Orii N, Inoue S, Kawana C, Xu M, Sudo K, Fujita K, Kuroda M, Hashimoto S, Matsushima K, and Yoshimoto T.	4. 巻 130(11)
2. 論文標題 EBV-induced gene 3 augments IL-23R protein expression through a chaperone calnexin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 6124-6140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI122732	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 -

1. 著者名 Shindo R, Ohmura M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Deguchi Y, Yamazaki S, Nishina T, Yoshimoto T, Kakuta S, Koike M, Uchiyama Y, Konishi H, Kiyama H, Mikami T, Moriwaki K, Araki K, Nakano H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of intestinal epithelial cells induces type 3 innate lymphoid cell-dependent lethal ileitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.011.	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 -

1. 著者名 Koda Y, Nakamoto N, Chu P, Ugamura A, Teratani T, Shiba S, Taniki N, Sujino T, Miyamoto K, Mikami Y, Suzuki T, Yamaguchi A, Morikawa R, Sato K, Yoshimoto T, Kanai K.	4. 巻 129(8)
2. 論文標題 Plasmacytoid dendritic cells protect against immune-mediated acute liver injury via IL-35.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 3201-3213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI125863.	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 -

1. 著者名 Pages F, Mlecnik B, Xu M, Kawakami Y, Galon J, et al.	4. 巻 391(10135)
2. 論文標題 Worldwide consortium-based validation of Immunoscore for the classification of colon cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lancet	6. 最初と最後の頁 2128-2139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S0140-6736(18)30789-X	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 Orii N, Mizoguchi I, Chiba Y, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Nagai T, Ochiai M, Mochizuki Y, Owaki T, Yoshimoto T.	4. 巻 7(5)
2. 論文標題 Protective effects against tumors and infection by IL-27 through promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells into myeloid progenitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 e1421892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2017.1421892	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 -

1. 著者名 Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, Sugahara M, Miyamoto Y, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T.	4. 巻 75(8)
2. 論文標題 Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell. Mol. Life Sci.	6. 最初と最後の頁 1363-1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-017-2724-5	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 -

1. 著者名 Chiba Y, Mizoguchi I, Furusawa J, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T.	4. 巻 78(1)
2. 論文標題 Interleukin-27 exerts its antitumor effects by promoting differentiation of hematopoietic stem cells to M1 macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 182-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-0960	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 坂本恵梨、片平泰弘、井上楨也、古阪悠馬、渡邊有麻、長谷川英哲、米戸敏彦、徐 明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 化粧品美白成分による白斑症誘発の作用機序の解明とそのin vitro評価法の開発
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 折井直子、長谷川英哲、米戸敏彦、徐 明利、大脇敏之、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病(CML)マウスモデルを用いたCML発症におけるIL-27の役割
3. 学会等名 東京医科大学記念館ポスター発表懇談会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Orii N, Hasegawa H, Xu M, Mizoguchi I, Yoshida H, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Antitumor effects of IL-27 against a mouse chronic myeloid leukemia (CML) model.
3. 学会等名 第183回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi I, Hasegawa H, Orii N, Inoue S, Kawana C, Yoneto T, Xu M, Yoshimoto T.
2. 発表標題 EB13, one of subunits shared among the IL-12 cytokine family, plays a critical role in up-regulation of MHC class I during DC maturation.
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshimoto T.
2. 発表標題 Comparative analysis of the major parameters of bone marrow derived mesenchymal stem cells, obtained from young and elderly donors.
3. 学会等名 International Toxicological school by Ukrainian Toxicology Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi I, Inoue S, Orii N, Hasegawa H, Xu M, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Development of a novel alternative method for evaluation of sensitizing potential and allergenicity by measuring human T cell activation and differentiation in vitro.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Orii, N., Mizoguchi, I., Chiba, Y., Hasegawa, H., Xu, M., Ochiai, N., Mochizuki, Y., Owaki, T., and Yoshimoto, T.
2. 発表標題 Protective role for IL-27 in the development of mouse chronic myeloid leukemia model.
3. 学会等名 The 45th NATITO CONFERENCE ON Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 折井直子、長谷川英哲、溝口 出、仲 一仁、善本隆之
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病(CML)マウスモデルを用いたCML発症におけるIL-27の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Orii, N., Hasegawa, H., Xu, M., Mizoguchi, I., Yoshida, H., and Yoshimoto, T.
2. 発表標題 Antitumor effects of IL-27 against a mouse chronic myeloid leukemia (CML) model.
3. 学会等名 第182回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Orii, N., Hasegawa, H., Xu, M., Mizoguchi, I., Yoshida, H., and Yoshimoto, T.
2. 発表標題 Antitumor effects of IL-27 against a mouse chronic myeloid leukemia model.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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	善本 隆之 (Yoshimoto Takayuki) (80202406)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

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
---------	---------