

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08753

研究課題名(和文) 化学療法とIL-18 阻害抗体の併用による膵がん治療に向けた基盤的研究

研究課題名(英文) Fundamental study for the treatment of pancreatic cancer by a combination of chemotherapy and IL-18 function-blocking antibody

研究代表者

田島 義証 (Tajima, Yoshitsugu)

島根大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20264228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：作製した抗IL-18活性化断端抗体を用いて、膵がん細胞株におけるヒトIL-18活性化機構を検討した結果、膵がん細胞の低栄養微小環境と抗腫瘍薬5-FUによる処理の両方が、炎症性細胞死であるパイロトーシスを介して、IL-18活性化による炎症を誘導している可能性を突き止めた。抗腫瘍薬とIL-18 機能阻害抗体の併用による新しい膵がん治療の可能性を導き出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「活性型 IL-18」のみを認識し、強い機能阻害効果を持つモノクローナル抗体を作製・報告し特許を取得した。この抗体を作製・保有していたことで、膵がんや大腸がんなどでも使用される抗腫瘍薬 5-FU が膵がん細胞の低栄養微小環境と相まって活性型 IL-18 を誘導させることを初めて確認できた。活性型 IL-18 を対象にした新規治療法や診断応用の確立に向けた研究を独自に進められる。

研究成果の概要(英文)：We have generated and patented a monoclonal antibody that recognizes only "active IL-18" and has a strong inhibitory effect on the function of IL-18. Using this antibody, we investigated the mechanism of human IL-18 activation in pancreatic cancer cell lines and found that both the hypotrophic microenvironment of pancreatic cancer cells and treatment with the anti-tumor drug 5-FU may induce inflammation through IL-18 activation via pyroptosis, which is inflammatory cell death. The combination of anti-tumor drugs and the antibody that inhibits IL-18 function could lead to a new therapeutic approach for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：インターロイキン-18(IL-18) 膵がん 機能阻害抗体 5-フルオロウラシル(5-FU) 炎症性細胞死(パイロトーシス)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2019年の我が国における死因の第1位は悪性新生物（腫瘍）であり、がん治療成績の向上は国民の安心・健康を確保する上で極めて重要である。なかでも膵がんは、他のがんと比べて薬物治療の効果が乏しく、予後不良であることから新規の治療法が求められている。

飲酒や喫煙等を起因とする慢性的な炎症は、膵がん以外でも、肝がんや肺がんといったさまざまな組織での発がんを促進することはよく知られている。特に最近では、間質細胞や免疫細胞などにより、がんの周囲で形成される「がん微小環境」が注目されている。このがん微小環境は免疫によるがん細胞排除を阻害し、また血管新生誘導因子が血管形成を促進するなど、がんにとって有利に働く。また、がん微小環境内にはマクロファージやリンパ球など、炎症性サイトカインを放出する細胞が集まっており、炎症の増大はがん細胞の増殖、あるいは浸潤・転移などに寄与する。このように、炎症とがんは密接に関連しており、がん周囲の炎症を抑制することが、がん治療に繋がる。生体内で炎症を調節している因子は、総称して「炎症性サイトカイン」と呼ばれ、なかでもインターロイキン (IL) -18」が今回の研究対象である。

IL-18 は、IL-1 ファミリーの一つであり、活性のない「前駆体」として細胞内に存在するが、炎症性シグナルが入ることで活性化されたカスパーゼにより切断され「活性型 IL-18」となる (図1)。同時に、細胞外に放出され、IL-18 受容体と結合することで機能する。IL-18 の前駆体はがん細胞も含めてさまざまな細胞で発現していることが知られているが、免疫系細胞以外での働きや役割についてはいまだ不明な点が多い。

IL-18 と膵がんとの関連についてもいくつか報告されている。膵がん患者において、健常人と比べて血清中の IL-18 値が高く、がん局所の IL-18 値が高いほど予後が悪くなるという興味深いデータが示されている (Xingjun *et al.*, *Clin Cancer Res.* 22: 5939-5950, 2016)。また、免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 の阻害薬と IL-18 の機能を阻害する IL-18 binding protein (IL-18BP) を併用することで、マウス膵がんモデルにおける腫瘍増大の抑制および転移能の低下も報告されている (Zhao *et al.*, *Oncotarget* 19: 14803-14814, 2017)。

現在膵がんの化学療法には、奏効率が比較的良好ことから「FOLFIRINOX 療法」と呼ばれる多剤併用治療が選択されることが多い。これは抗がん剤の「5-FU」「イリノテカン」「オキサリプラチン」および「レボホリナート」の4剤併用療法である。大腸がんなどの化学療法で使われる5-FU をヒト膵がん細胞株 Capan-2 に処理すると、細胞内の IL-18 が増加するという報告がある (Carbone *et al.*, *Cancer Biol Ther.* 4: 231-241, 2005)。申請者らもヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を用いて追試をおこなったところ、「5-FU」「イリノテカン」「オキサリプラチン」および「レボホリナート」の4剤のうち、「5-FU」のみが前駆体 IL-18 の高発現とともに活性型 IL-18 を増加させることを初めて確認できた (図1)。

5-FU によって誘導される活性型 IL-18 は、細胞自身あるいは周りの環境に炎症を生じさせ、膵がんにとって有利な微小環境を形成することが予想される。そのため 5-FU 治療と同時に IL-18 阻害抗体を投与することで IL-18 の作用を阻害し、炎症を抑制することができれば、治療効果の増強につながり、新規のがん治療法になり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、5-FU と IL-18 阻害抗体との併用療法による膵がん治療効果への影響を明

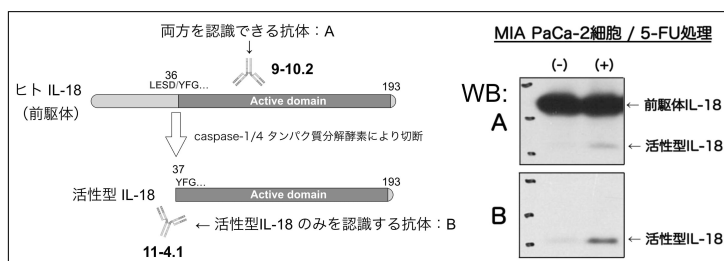


図1 5-FU は活性型 IL-18 を誘導する

らかにすること、また膵がん組織における IL-18 発現を詳細に解析し、診断に応用することである。これまで膵がん進展における IL-18 の関与が客観的に示されているものの、IL-18 阻害の影響については一切調べられていない。がん局所における IL-18 阻害が抗がん治療のサポートに重要であることを、担がんマウスを使った実験で明らかにする。また膵がん組織における IL-18 発現を詳細に調べることで膵がんと IL-18 の関係をより明らかにし、新たな治療法・診断法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

① IL-18 を欠損した膵がん細胞株の増殖能および造腫瘍性への影響評価

IL-18 の発現と、膵がん細胞の増殖能・造腫瘍性への影響を明らかにするため、遺伝子編集技術を利用して IL-18 タンパク質を持たない MIA PaCa-2 膵がん細胞株 (IL-18 KO/MIA PaCa-2) を数種類樹立する。樹立した細胞の増殖能あるいは造腫瘍性への影響を *in vitro*・*in vivo* の実験で確認する。*in vitro* においては生細胞数の検出に汎用されている MTT アッセイを用い、IL-18 KO 細胞の増殖を経時的に測定することで、増殖能の差異を評価する。*in vivo* においてはヌードマウスに MIA PaCa-2 (親株) ならびに IL-18 KO 細胞を皮下移植し、経時的な測定による腫瘍の増大および担がんマウスの全生存率を比較する。

② 担がんマウスモデルによる、膵がん組織での活性型 IL-18 の評価 (I)

申請者らが現有している「ヒト活性型 IL-18」のみを認識するモノクローナル抗体は、活性化断端配列が異なるため、「マウス活性型 IL-18」を認識することができない。担がんマウスでのがん微小環境を確認するため、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製する必要がある。「ヒト活性型 IL-18」のみを認識するモノクローナル抗体を作製した時と同様に、「マウス活性型 IL-18」断端ペプチドを用いて、常法に従って、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製する。さらに、血清中の「マウス活性型 IL-18」を検出できるサンドイッチ ELISA 測定法を樹立する。

③ 担がんマウスモデルによる、膵がん組織での活性型 IL-18 の評価 (II)

MIA PaCa-2 (親株) ならびに IL-18 KO 細胞を用いた担がんマウスを作製し、5-FU 投与によりがん組織内外でのヒト活性型 IL-18 の発現が増加するかどうかを検討する。申請者らが作製した抗体は免疫組織化学染色にも使用できるため、がん組織内での「ヒト活性型 IL-18」を検出が可能である。担がんマウスに 5-FU を投与し、抗活性型 IL-18 抗体を用いた免疫組織化学染色をおこなう。プラセボ群と比較し、がん組織内での活性型 IL-18 の増加および局在を確認する。また、活性型 IL-18 を検出できるサンドイッチ ELISA 測定法も当研究室で構築しており、マウス血清中のヒト活性型 IL-18 量を測定することが可能である。5-FU 投与群および非投与群の担がんマウスから採血をおこない、ヒト活性型 IL-18 量を測定・比較する。同様に、マウス活性型 IL-18 の挙動についても、② で作製した「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて、検討する。

④ 担がんマウスモデルによる、抗がん剤と IL-18 阻害抗体の併用治療効果の評価

活性型 IL-18 による炎症が膵がんの増殖に対し有利に働くとすれば、腫瘍内外の活性型 IL-18 を抗体で阻害することが効果的な膵がん治療になると考えられる。MIA PaCa-2 を用いた担がんマウスについて、5-FU 投与とともに IL-18 阻害抗体を腫瘍に局所注入あるいは腹腔内投与することで、治療への影響を検討する。また、5-FU の単剤投与以外に、先述の「FOLFIRINOX」投与や、膵がん治療に使われる抗がん剤である「ジェムシタビン」投与をおこない、IL-18 阻害抗体との併用による治療効果を検証する。経時的な腫瘍径の測定による腫瘍縮小効果、また担がんマウスの全生存率を、化学療法単独群と抗体併用群とで比較する。

⑤ 「活性型 IL-18」認識抗体をもちいたヒト膵がん組織における免疫組織化学染色

これまでがん組織における IL-18 発現を調べた報告はあるが、既存の抗体では「前駆体 IL-18」

と「活性型 IL-18」が同時に検出されるため、本当に IL-18 の生理的機能を反映しているかどうかについては疑問が残る。そこで「活性型 IL-18」認識抗体をもちいて膵がん組織（100 例程度）の免疫染色をおこない、細胞内外の発現と局在について精査する。また、患者情報と照らし合わせ、予後との相関性を検討する。抗がん剤治療がおこなわれた症例については、5-FU 使用の有無と発現量の変化を追跡する。包括的な解析により、これまでにない IL-18 発現情報を提供でき、あらたな治療や診断の糸口になる可能性がある。

4. 研究成果

① IL-18 を欠損した膵がん細胞株の増殖能および造腫瘍性への影響評価

IL-18 の発現と、膵がん細胞の増殖能・造腫瘍性への影響を明らかにするため、遺伝子編集技術を利用して IL-18 タンパク質を持たない MIA PaCa-2 ヒト膵がん細胞株 (IL-18 KO/MIA PaCa-2) を数種類樹立した。IL-18 KO/MIA PaCa-2 細胞の増殖を経時的に測定評価したが、親株との間に増殖能の差異は認めなかった。また、IL-18 KO/MIA PaCa-2 細胞の造腫瘍性への影響についてヌードマウスを用いた *in vivo* の実験で確認したが、*in vitro* 同様に親株との間に腫瘍の増大には差を認めなかった。

② 担がんマウスモデルによる、膵がん組織での活性型 IL-18 の評価 (I)

「マウス活性型 IL-18」断端ペプチドを用いて、常法に従って、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識し、機能阻害効果を持つモノクローナル抗体を 2 種類作製した (図 2)。

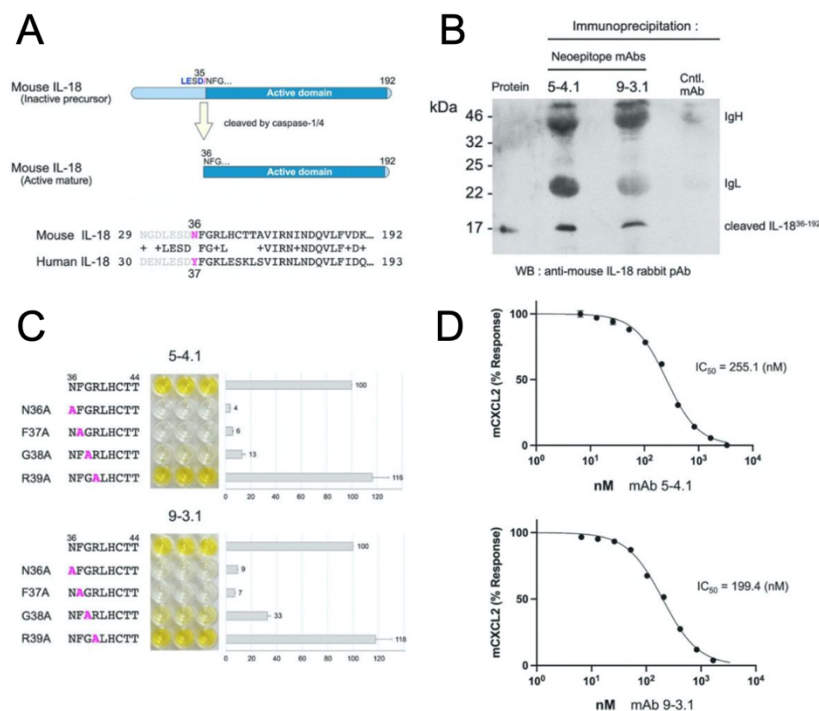


図2

- A) ヒトとマウスの活性型 IL-18 配列の比較
 B) 2 種類のマウス IL-18 活性型断端認識抗体による活性型マウス IL-18 の免疫沈降
 C) 断端配列のアミノ酸をアラニン置換したエピトープマッピング
 D) モノクローナル抗体による機能阻害

さらに、血清中の「マウス活性型 IL-18」を検出できるサンドイッチ ELISA 測定法を樹立するため、マウス活性型 IL-18 に対するポリクローナル抗体及び樹立した 5 種類のモノクローナル抗体の組み合わせを検討し、一番感度の高い組み合わせを選択できたが、ヒト血清中の正常濃度に匹敵する 50 – 250 ng/mL というオーダーの感度には到達できなかった。今後、さらに検討を進める。

③ 担がんマウスモデルによる、膵がん組織での活性型 IL-18 の評価 (II)

MIA PaCa-2 ヒト膵がん細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成後に 5-FU の腹腔内

投与を行なった。72 時間後に血清を採取し、市販の ELISA キットにより IL-18 測定を行ったところ、5-FU 投与の有無に関わらずヒト IL-18 を検出した。一方、我々が作製したヒト活性型 IL-18 検出 ELISA キットではシグナルを検出できなかった。この結果はヒト腫瘍からヒト前駆体 IL-18 の漏出が起きたことを示唆する結果である。

④ 担がんマウスモデルによる、抗がん剤と IL-18 阻害抗体の併用治療効果の評価

MIA PaCa-2 ヒト膵がん細胞株及び ① で作製した IL-18 タンパク質を持たない MIA PaCa-2 (IL-18 KO/MIA PaCa-2) 担がんマウスモデルを用いて、ヒト活性型 IL-18 のみを認識し機能阻害効果を持つ抗体 9-10.2 による治療実験を行ったが、治療効果は認められなかった。

作製した活性型マウス IL-18 に対する抗体を治療実験に使用するため、担がんマウス実験に使えるマウス膵がん細胞株を検討したが、IL-18 を発現する細胞株は見つからなかった。そこでマウス膵がん細胞株である「mT3」にマウス IL-18 を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。この細胞株では *in vitro* において 5-FU 添加による活性型 IL-18 誘導が確認できなかった。また、この細胞株をマウス皮下への移植・腫瘍形成後の阻害抗体投与による治療実験をおこなったが、腫瘍縮小など腫瘍に対する明らかな影響は確認できなかった。ヒトとマウスでは 5-FU に対する反応が異なる可能性が示唆された。

⑤ 「活性型 IL-18」認識抗体をもちいたヒト膵がん組織における免疫組織化学染色

我々が樹立したヒト IL-18 を認識する抗体「11-4.1」とヒト活性型 IL-18 のみを認識する抗体「9-19.2」を用いて、ヒト膵がん検体の免疫組織染色を実施した。膵がん細胞における IL-18 の染色は比較的高頻度に見られた (図 3)。一方、活性型 IL-18 は膵がん細胞での発現はほとんど観察されなかったが、ランゲルハンス島の細胞では高頻度に強染色が観察されている。

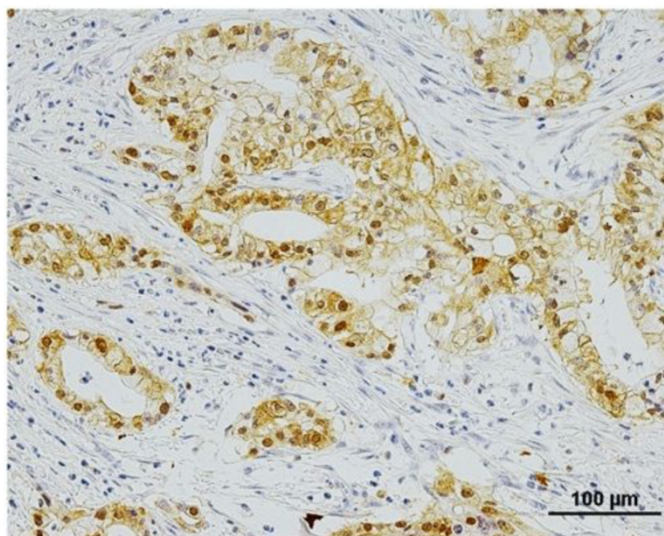


図 3

ヒト膵がん組織を用いた免疫組織化学染色
使用した抗体 11-4.1 はヒト IL-18 の活性型および前駆体を検出できる抗体

⑥ 5-FU によるヒト膵がん細胞株からの活性型 IL-18 誘導のメカニズム解析

がん局所は栄養状態が悪いことが知られているため、低栄養培地で培養した 2 種類の膵がん細胞株に 5-FU 処理したところ、活性型 IL-18 の誘導が確認された。その際、培養皿中で浮遊した細胞と接着したままの細胞が混在していることに気づき、それぞれ分離して解析したところ、特に浮遊した細胞で活性型 IL-18 が誘導されていることが明らかとなった。また、5-FU を添加していないコントロール群でもわずかながら浮遊している細胞を集めて解析したところ、やはり活性型 IL-18 が確認された。膵がん細胞は栄養飢餓状態で 5-FU に暴露されると、より強く活性型 IL-18 誘導が引き起こされることを発見した。さらなる実験から、この現象は一般的な IL-18 活性化経路に関わるカスパーゼ 1/4 ではなく、カスパーゼ 8 が関与しており、また炎症性細胞死であるパイロトーシスに重要と言われているガスダーミン D の活性化が関与していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ikegami Shuji, Maeda Keiko, Urano Takeshi, Mu Jingxi, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Sawada Tsunaki, Ishikawa Eri, Yamamoto Kenta, Muto Hisanori, Oishi Akina, Iida Tadashi, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Takuya, Kakushima Naomi, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Honda Takashi, Ishigami Masatoshi, Kawashima Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Monoclonal Antibody Against Mature Interleukin-18 Ameliorates Colitis in Mice and Improves Epithelial Barrier Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izad292	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 Uchida Yuki, Nariai Yuko, Obayashi Eiji, Tajima Yoshitsugu, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Urano Takeshi, Kamino Hiroki	4. 巻 727
2. 論文標題 Generation of antagonistic monoclonal antibodies against the neoepitope of active mouse interleukin (IL)-18 cleaved by inflammatory caspases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109322 ~ 109322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109322	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 Hotta Takamasa, Nariai Yuko, Kajitani Naoyo, Kadota Kyuichi, Maruyama Riruke, Tajima Yoshitsugu, Isobe Takeshi, Kamino Hiroki, Urano Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of the novel anti-FXYD5 monoclonal antibody and its application to the diagnosis of pancreatic and lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2023.01.002	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 Okuni Noriko, Honma Yoshio, Urano Takeshi, Tamura Kenji	4. 巻 49
2. 論文標題 Romidepsin and tamoxifen cooperatively induce senescence of pancreatic cancer cells through downregulation of FOXM1 expression and induction of reactive oxygen species/lipid peroxidation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 3519 ~ 3529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-07192-9	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 Otaki Satomi, Kawabata Yasunari, Nishi Takeshi, Hayashi Hikota, Iwahashi Teruaki, Maruyama Riruke, Tajima Yoshitsugu	4. 巻 51
2. 論文標題 Extranodal Rosai-Dorfman Disease Involving the Pancreas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 e89 ~ e91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000002089	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 川畑康成、中村光佑、岸 隆、西 健、田島義証	4. 巻 76
2. 論文標題 【高難度肝胆膵外科手術アトラス2022】膵臓 膵癌に対する腹腔鏡下脾合併膵体尾部切除 (Lap-RAMPS) (図説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 手術	6. 最初と最後の頁 667-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hayashi Hikota, Kawabata Yasunari, Nishi Takeshi, Kishi Takashi, Nakamura Kosuke, Kaji Shunsuke, Fujii Yusuke, Tajima Yoshitsugu	4. 巻 28
2. 論文標題 Accurate prediction of severe postoperative complications after pancreatic surgery: POSSUM vs E-PASS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 156 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.839	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加美野宏樹, 成相裕子, 前田啓子, 川嶋啓揮, 浦野健
2. 発表標題 ヒト活性型IL-18を高感度に検出する新規ELISAの開発とその応用
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成相 裕子, 内田 有紀, 尾林 栄治, 田島 義証, 古賀 智裕, 川上 純, 浦野 健, 加美野 宏樹
2. 発表標題 活性化型マウスIL-18のネオエピトープに対する機能阻害モノクローナル抗体の作製とその評価方法の開発
3. 学会等名 第95回 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、田島義証、浦野健
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞株MIA PaCa-2は栄養飢餓によりインターロイキン-18活性化を伴うパイロトーシスを誘導し、この現象は抗がん剤5-フルオロウラシルによって増強される
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、内田有紀、田島義証、浦野健
2. 発表標題 フルオロウラシル処理は低栄養培養下での膵がん細胞におけるIL-18活性化を増強する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Urano
2. 発表標題 Development of Biopharmaceuticals using monoclonal antibodies
3. 学会等名 2nd Nagoya University - Chittagong University Joint Biochemistry Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 活性型 I L - 1 8 検出キット、及び検査方法	発明者 浦野 健、加美野 宏 樹、成相 裕子（他7 人）	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-195765	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

島根大学医学部附属病院消化器・総合外科HP https://www.shimane-u-dgs.jp/
--

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	内田 有紀 (Uchida Yuki) (60868719)	島根大学・医学部・特別協力研究員 (15201)	
研究 分担者	浦野 健 (Urano Takeshi) (70293701)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

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