

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15507

研究課題名(和文) Interleukin(IL)-38を標的とした肺癌の新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel immunotherapy for lung cancer targeting Interleukin(IL)-38

研究代表者

木下 郁彦(KINOSHITA, Fumihiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20875794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肺腺癌切除症例209例を対象に免疫組織化学染色にてInterleukin(IL)-38発現と腫瘍関連好中球(TANs)、腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)を評価した。また、動物実験ではIL-38強制発現肺癌細胞株を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、腫瘍内のTANs、TAMsを評価した。肺腺癌切除症例においてIL-38高発現は有意にTANs及びTAMs高浸潤と関連していた。動物実験においても、IL-38強制発現によってTANsとTAMsの浸潤が増加した。IL-38によってTANs、TAMsの浸潤が誘導されることが明らかとなり、IL-38が肺癌の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬の登場によって、原発性肺癌を含む多くの悪性腫瘍の治療成績が向上するとともに腫瘍微小環境への注目が高まった。我々は本研究において、2001年に発見された新規サイトカインのInterleukin(IL)-38の腫瘍微小環境における意義を研究した。本研究では臨床検体を用いた実験と動物実験を行い、IL-38によって腫瘍関連好中球(TANs)、腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)の浸潤が誘導されることが明らかとなった。IL-38の原発性肺癌の腫瘍微小環境における役割がさらに明らかとなって新規免疫療法の開発に繋がれば、肺癌の治療成績が向上することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the expression of Interleukin(IL)-38 in tumor cells, tumor-associated neutrophils(TANs), and tumor-associated macrophages(TAMs) through immunohistochemical staining in 209 specimens of surgically resected lung adenocarcinoma. Additionally, we established a mouse model by subcutaneously injecting lung cancer cell lines overexpressing IL-38 and assessed TANs and TAMs within the tumors. High expression of IL-38 in lung adenocarcinoma was significantly correlated with increased infiltration of TANs and TAMs. Consistently, in the mouse model, IL-38 overexpression resulted in elevated infiltration of TANs and TAMs. Our findings elucidate that IL-38 induces the infiltration of TANs and TAMs, suggesting the potential of IL-38 as a therapeutic target for lung cancer.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：原発性肺癌 肺腺癌 腫瘍微小環境 Interleukin Interleukin-38 腫瘍関連好中球 腫瘍関連マクロファージ

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。

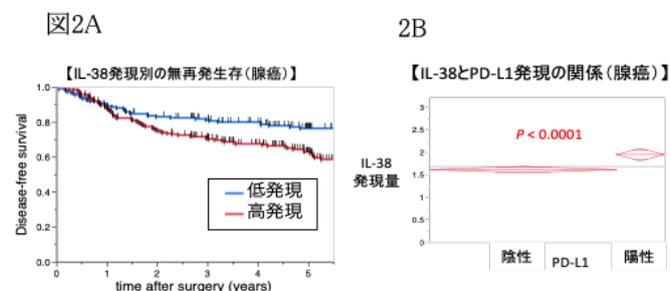
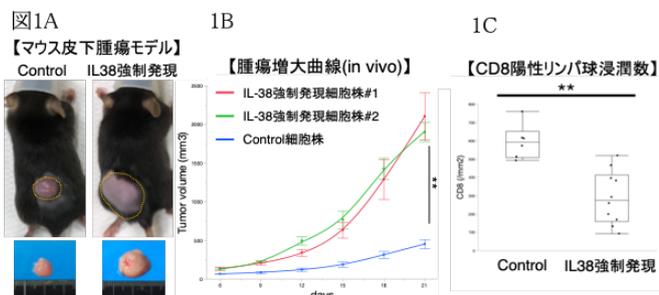
## 1. 研究開始当初の背景

近年、PD-L1 を標的とした免疫療法が、多くの臨床試験で有効性が示され、肺癌における標準治療の一つとなった。しかしながら、免疫療法の奏成功率は未だ十分ではなく、免疫療法の治療効果を高めるために、腫瘍微小環境における免疫系のさらなる解明が求められている。

IL-38 は 2001 年に発見された IL-1 ファミリーに属する新規サイトカインであり、IL-36 受容体に結合し、IL-36 シグナル系を阻害することで、抗炎症作用を示す。肺線維症や気管支喘息、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患、自己免疫疾患において、IL-38 を標的とした治療が開発中であり<sup>[1]</sup>、IL-38 と癌の関連性についても注目を集めている<sup>[2]</sup>。

我々の過去の研究では、動物実験を用いて IL-38 が腫瘍への CD8 陽性リンパ球浸潤を抑制することで、腫瘍の形成を促進することを報告した<sup>[3]</sup>(図 1)。また、肺腺癌切除検体を用いて腫瘍細胞の IL-38 高発現が予後不良因子であることや、免疫チェックポイント分子である Programed cell death ligand 1 (PD-L1) の発現と相関することを報告した<sup>[4]</sup>(図 2)。

一方で、IL-36 Family は好中球やマクロファージなどの自然免疫系の誘導や活性化に関与することが報告されているが<sup>[5,6]</sup>、IL-38 と好中球やマクロファージなどの自然免疫系との関係に関する報告はほとんどない。腫瘍関連好中球(TANs)や腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)は抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍形成を促進することが知られており<sup>[7,8]</sup>、本研究によって IL-38 と TANs や TAMs の関連が明らかになれば、IL-38 の治療応用への可能性をさらに探究できると考えられる。



## 2. 研究の目的

IL-38 と癌関連好中球(TANs)や腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)の関連を明らかにすることで、IL-38 の腫瘍微小環境における役割をさらに解明し、IL-38 の治療応用への可能性を探究することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体を用いた実験

2003 年から 2012 年 12 月に九州大学病院 消化器・総合外科にて手術を行った肺腺癌 209 症例を対象とした。免疫組織化学染色によって腫瘍細胞の IL-38 発現と TANs 及び TAMs の評価を行った。

IL-38 の免疫組織化学染色には Mouse Monoclonal 抗 IL-38 抗体 (0.5  $\mu$ g/ml、#H127C; 久留米大学星野先生よりご提供) を使用し、IL-38 発現の評価は腫瘍細胞の細胞質と細胞膜に弱く染色した症例を低発現、中等度から強く染色した症例を高発現と判断した。TANs 及び TAMs の免疫組織化学染色はそれぞれ Rabbit Polyclonal 抗 CD66b 抗体 (Abcam, ab197678)、Mouse Monoclonal 抗 CD163 抗体 (Leica, NCL-L-CD163) を用いて行った。TANs 及び TAMs の評価は腫瘍内の部位の 5 カ所にて高倍率で陽性細胞をカウントし、平均値をカットオフとして高浸潤と低浸潤に分類を行った。

TANs 低浸潤と高浸潤、TAMs 低浸潤と高浸潤の症例で臨床病理学的因子及び IL-38 発現との関連を解析した。

### (2) 動物実験

ルイス肺癌細胞株(LLC; LL/2, RRCID: CVCL\_4358)に IL-38 プラスミド (NM\_153077; Origene) を jetPRIME kit (Polyplus Transfection) を用いて導入した。コントロールとして、空のベクター (pCMV6-Entry Vector; Origene) も同様に LLC 細胞へ導入した(LLC-vector 細胞)。遺伝子導入から 48 時間後、遺伝子導入細胞を G418(500  $\mu$ g/ml)にてセレクションした。限界希釈法を用いて、遺伝子導入細胞からシングルセルクローンを分離した。セレクションを行った遺伝子導入細胞を各ウェルに 1 細胞となるように蒔き、単一細胞から形成されたクローン集団を培養し、回収した。2 種類のクローンの IL-38 強制発現 LLC 細胞株(LLC-IL38 細胞)を作成した。

6 週齢の C57BL/6J マウス (CLEA Japan) に十分な麻酔の後、 $5 \times 10^6$  個の LLC-IL38 細胞または LLC-

vector 細胞を 100  $\mu$  l の PBS に希釈し、マウス背部の皮下へ投与した。皮下投与 21 日後に腫瘍を回収し、腫瘍組織の免疫組織化学染色によって TANs と TAMs の評価を行った。

TANs 及び TAMs の免疫組織化学染色はそれぞれ Rabbit Monoclonal 抗 Ly6g 抗体 (Abcam, ab238132)、Rabbit Monoclonal 抗 F4/80 抗体 (Abcam, ab111101) を用いて行った。TANs 及び TAMs の評価は腫瘍内の部位の 5 カ所にて高倍率で陽性細胞をカウントし、平均値をカットオフとして高浸潤と低浸潤に分類を行った。

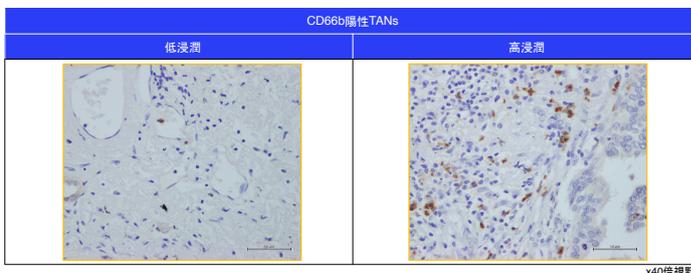
LLC-IL38 由来腫瘍と LLC-vector 由来腫瘍での TANs 及び TAMs の比較を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床検体を用いた実験

CD66b の免疫組織化学染色の典型画像を **図 3** に示す。CD66b 陽性 TANs の平均数は 2.2 個/視野であり、TANs 高浸潤は 106 例、低浸潤は 103 例であった。CD66b 陽性 TANs と臨床病理学的因子、IL-38 発現との関係を **表 1** に示す。TANs 高浸潤の症例では有意に pT2 以上、pN1 以上、pStage II 以上、胸膜浸潤陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった。

**図 3.** 肺腺癌切除検体における CD66b 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像



**表 1.** CD66b 陽性 TANs と臨床病理学的因子、IL-38 発現との関係

Characteristics		CD66b <sup>+</sup> TANs		p value
		Low (n=103)	High (n=106)	
Age	<70	61 (59.20%)	55 (51.90%)	0.3304
	≥70	42 (40.80%)	51 (48.10%)	
Sex	Male	43 (41.70%)	53 (50.00%)	0.2674
	Female	60 (58.30%)	53 (50.00%)	
Smoking	Never smoker	55 (53.40%)	58 (54.70%)	0.8900
	Smoker	48 (46.60%)	48 (45.30%)	
Pack Year Index	mean and range	16.5 (0-150)	23.9 (0-165)	0.0744
BMI	mean and $\pm$ SD	22.3 ( $\pm$ 3.0)	22.6 ( $\pm$ 3.0)	0.4817
pT	T1	75 (72.80%)	50 (47.20%)	0.0002
	≥T2	28 (27.20%)	56 (52.80%)	
pN	N0	99 (96.10%)	91 (85.90%)	0.0144
	≥N1	4 (3.90%)	15 (14.10%)	
pStage	I	94 (91.30%)	72 (67.90%)	<0.0001
	≥II	9 (8.70%)	34 (32.10%)	
Pleural invasion	Negative	91 (88.40%)	76 (71.70%)	0.0032
	Positive	12 (11.60%)	30 (28.30%)	
Vascular invasion	Negative	80 (77.70%)	72 (67.90%)	0.1229
	Positive	23 (22.30%)	34 (32.10%)	
Lymphatic invasion	Negative	91 (88.40%)	91 (85.90%)	0.6816
	Positive	12 (11.60%)	15 (14.10%)	
Histological subtype	Micropapillary/Solid	1 (1.00%)	10 (9.40%)	0.0098
	Others	102 (99.00%)	96 (90.60%)	
EGFR mutation*	Wild type	25 (43.10%)	37 (57.80%)	0.1466
	Mutant	33 (56.90%)	27 (42.20%)	
IL-38 expression	Low	60 (58.30%)	32 (30.20%)	<0.0001
	High	43 (41.70%)	74 (69.80%)	

CD163 の免疫組織化学染色の典型画像を **図 4** に示す。CD163 陽性 TAMs の平均数は 14.6 個/視野であり、TAMs 高浸潤は 104 例、低浸潤は 105 例であった。CD163 陽性 TAMs と臨床病理学的因子、IL-38 発現との関係を **表 2** に示す。TAMs 高浸潤の症例では有意に高齢者、pT2 以上、pStage II 以上、胸膜浸潤陽性、血管侵襲陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった。

**図 4.** 肺腺癌切除検体における CD163 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像

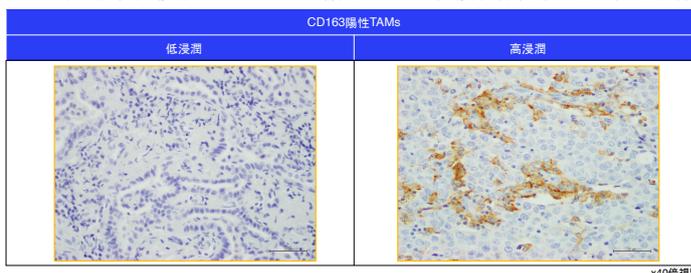


表 2. CD163 陽性 TAMs と臨床病理学的因子、IL-38 発現との関係

Characteristics		CD163 <sup>+</sup> TAMs		p value
		Low (n=105)	High (n=104)	
Age	<70	66 (62.90%)	50 (48.10%)	0.0371
	≥70	39 (37.10%)	54 (51.90%)	
Sex	Male	48 (45.70%)	48 (46.10%)	1.0000
	Female	57 (54.30%)	56 (53.90%)	
Smoking	Never smoker	57 (54.30%)	56 (53.90%)	1.0000
	Smoker	48 (45.70%)	48 (46.10%)	
Pack Year Index	mean and range	17.3 (0-150)	23.3 (0-165)	0.1470
BMI	mean and ±SD	22.3 (±3.0)	22.6 (±3.0)	0.4817
pT	T1	70 (66.70%)	55 (52.90%)	0.0478
	≥T2	35 (33.30%)	49 (47.10%)	
pN	N0	97 (92.40%)	93 (89.40%)	0.4815
	≥N1	8 (7.60%)	11 (10.60%)	
pStage	I	91 (86.70%)	75 (72.10%)	0.0104
	≥II	14 (13.30%)	29 (27.90%)	
Pleural invasion	Negative	92 (87.60%)	75 (72.10%)	0.0058
	Positive	13 (12.40%)	29 (27.90%)	
Vascular invasion	Negative	89 (84.80%)	63 (60.60%)	<0.0001
	Positive	16 (15.20%)	41 (39.40%)	
Lymphatic invasion	Negative	93 (88.60%)	89 (85.60%)	0.5432
	Positive	12 (11.40%)	15 (14.40%)	
Histological subtype	Micropapillary/Solid	2 (1.90%)	9 (8.60%)	0.0333
	Others	99 (98.10%)	95 (91.40%)	
EGFR mutation*	Wild type	38 (56.70%)	24 (43.60%)	0.2026
	Mutant	29 (43.30%)	31 (54.40%)	
IL-38 expression	Low	56 (53.30%)	36 (34.60%)	0.0081
	High	49 (46.70%)	68 (65.40%)	

(2) 動物実験

Ly6g 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像を図 5 に示す。LLC-IL38 由来腫瘍と LLC-vector 由来腫瘍で比較を行うと、LLC-IL38 由来腫瘍で Ly6g 陽性 TANs の浸潤が多い傾向であった (11.0 個/視野 対 6.0 個/視野、 $p=0.0719$ 、図 6)。

図5. マウス腫瘍組織におけるLy6G陽性TANsの免疫組織化学染色の典型画像

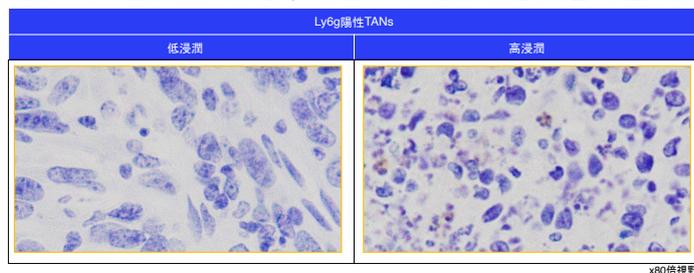
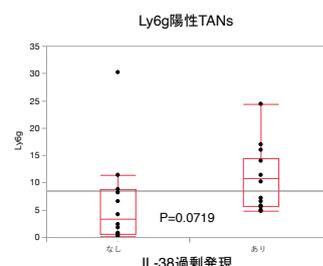


図6. IL-38強制発現による腫瘍組織へのLy6G陽性TANs浸潤



F4/80 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像を図 7 に示す。LLC-IL38 由来腫瘍と LLC-vector 由来腫瘍で比較を行うと、LLC-IL38 由来腫瘍で有意に F4/80 陽性 TAMs の浸潤が多かった (14.6 個/視野 対 9.7 個/視野、 $p=0.0148$ 、図 8)。

図7. マウス腫瘍組織におけるF4/80陽性TAMsの免疫組織化学染色の典型画像

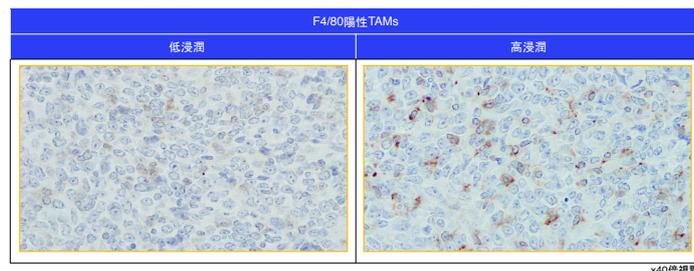
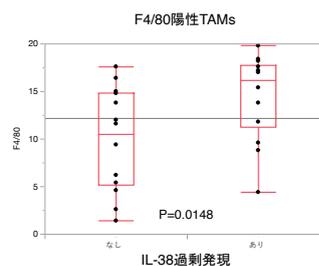


図8. IL-38強制発現による腫瘍組織へのF4/80陽性TAMs浸潤



<引用文献>

- 1). Han Y, Mora J, Huard A, et al. IL-38 Ameliorates Skin Inflammation and Limits IL-17 Production from  $\gamma \delta$  T Cells. *Cell Rep.* 2019;27:835-846.
- 2). van de Veerdonk FL, de Graaf DM, Joosten LA, Dinarello CA. Biology of IL-38 and its role in disease. *Immunol Rev.* 2018;281:191-196.
- 3). Kinoshita F, Tagawa T, Akamine T, et al. Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70:123-135.
- 4). Takada K, Okamoto T, Tominaga M, et al. Clinical implications of the novel cytokine IL-38 expressed in lung adenocarcinoma: Possible association with PD-L1 expression. *PLoS One.* 2017;12:e0181598.
- 5). Saito K, Iwata Y, Fukushima H, et al. IL-36 receptor antagonist deficiency resulted in delayed wound healing due to excessive recruitment of immune cells. *Sci Rep.* 2020;10:1-12.
- 6). Baker JR, Fenwick PS, Koss CK, Owles HB, Elkin SL, Fine J, Thomas M, El Kasmi KC, Barnes PJ, Donnelly LE. IL-36 receptor agonist and antagonist imbalance drives neutrophilic inflammation in COPD. *JCI Insight.* 2022;7:e155581.
- 7). Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:601-620.
- 8). Cassetta L, Fragkogianni S, Sims AH, et al. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell.* 2019;35:588-602.

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

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