

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591220

研究課題名（和文） 悪性黒色腫、乾癬、円形脱毛症に対する IL-27 の治療的有用性について
 の基礎的検討

研究課題名（英文） Basic studies on therapeutic utilities of IL-27 for malignant melanoma, psoriasis and alopecia areata.

研究代表者

永井 宏 (NAGAI HIROSHI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80335447

研究成果の概要（和文）：

マウスを用いた実験モデルにおいて、悪性黒色腫および乾癬におけるインターロイキン 27 (IL-27) の治療有効性について検討を行った。また、IL-27 がヒト表皮ケラチノサイトからのケモカイン産生に及ぼす影響についても検討を行い、IL-27 と IL-17 が TNF-alpha 誘導性の乾癬関連ケモカインの産生に反対の作用を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We conducted studies on therapeutic effects of interleukin (IL)-27 on malignant melanoma and psoriasis in murine models. We also examined the effects of IL-27 on chemokine production from human epidermal keratinocytes and demonstrated that IL-27 and IL-17 exerted opposite effects on tumor necrosis factor-alpha-mediated psoriasis related chemokine production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、乾癬、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

Interleukin(IL)-27 は、近年の研究によって pro-inflammatory 作用と anti-inflammatory 作用の両方を有する免疫制御性サイトカインであることが明らかにされた。pro-inflammatory 作用としては、マウスの実験系で種々の腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果が証明されている。しかし、悪性黒色腫に対する詳細な抗腫瘍機序についてはま

だ十分に解明されておらず、臨床的治療モデルでの解析も全くなされていない。また anti-inflammatory 作用としては、関節炎や自己免疫性脳脊髄炎の発症抑制作用が近年報告され注目されているが、皮膚免疫疾患に対する作用は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚科領域における IL-27

の治療的有用性の可能性を探るため、皮膚免疫疾患や悪性黒色腫を対象とした治療モデルの動物実験を行い解析することである。

3. 研究の方法

(1) 悪性黒色腫については、IL-27 産生 B16F10 メラノーマ細胞を用いた解析を行った。同系マウスである C57BL/6 マウスの背部皮膚に、B16F10 細胞および IL-27 遺伝子導入 B16F10 細胞 (B16/IL-27) の接種を行い、腫瘍形成された 7 日目に抗 CD4 抗体 (GK1.5) を腫瘍内に注射を行い腫瘍内の CD4⁺ helper T 細胞を除去した。その後の腫瘍径および白斑様の体毛変化の誘導を経時的に観察した。CD4⁺T 細胞除去によって増強される抗腫瘍免疫反応の機序を解明するため、抗 CD4 抗体の注射 7 日目に B16F10 腫瘍組織を採取し、フローサイトメトリーおよびリアルタイム PCR の解析を行い、腫瘍局所の浸潤細胞やサイトカインプロファイルの変化を解析した。また、OX40 リガンドと IL-27 との併用による抗腫瘍効果増強の有無を調べるため、B16 メラノーマおよび B16/IL-27 を接種したマウスに OX40 リガンド作用を有する OX86 (1mg) を 5 日おきに腹腔内投与した。

(2) 乾癬モデルについては、マウスを用いた実験系に並行して、正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) を用いた実験も行った。

①マウスを用いた実験では、imiquimod を利用した乾癬モデルと IL-23 の連続皮内注による乾癬モデルを用いて、IL-27 が及ぼす影響を調べた。

②NHEK を用いた実験では、乾癬の病態における key cytokine の 1 つである TNF- α に着目して実験を行った。TNF- α は、ケラチノサイトに作用し、多種のケモカインを産生誘導することが知られている。このケモカインが多くの炎症細胞を遊走させ、乾癬の病態形成に寄与している。そのため、IL-27 が TNF- α を介した NHEK からのケモカイン産生にどのような影響を及ぼすかを調べた。

4. 研究成果

(1) IL-27 遺伝子導入マウス B16 メラノーマ細胞を同系マウスに接種し、抗 CD4 抗体を全身投与すると、腫瘍を拒絶するマウスが確認され、その多くは白斑様体毛変化を示した。治療モデルとして、抗 CD4 抗体を腫瘍接種後の 4 日目に腫瘍局所に注射してみたが、全身投与と同様に抗腫瘍効果の増強と体毛の白斑様変化が誘導されることを確認した。次に、コントロールベクター導入マウス B16 メラノーマ細胞についても同処置を行ったところ、腫瘍拒絶には至らないものの、抗腫瘍が増強されることを確認できた。この抗 CD4 抗体局所投与による抗腫瘍効果増強のメカニズムを調べるため、腫瘍組織のサイトカイン・ケ

モカイン発現や組織に浸潤している細胞群を、リアルタイム PCR やフローサイトメトリーで解析したところ、抗 CD4 抗体投与群において種々の炎症性ケモカインが増加し、多数の CD8⁺細胞や NK 細胞が浸潤していることを確認した。またこれらのエフェクター細胞のみならず、免疫抑制性細胞群の浸潤も伴っていることを確認した。また、OX40 リガンド投与によって、上記の抗腫瘍効果は増強することが明らかとなり、その効果増強機序について解析を行った。現在、論文を作成し投稿中である。

(2)

①まず最初に、マウスを用いた乾癬モデルの予備実験として、imiquimod を利用した乾癬モデルを既報告の論文 (J. Immunol. 182: 5836-5845, 2009) に従って行った。その結果、確かに論文と同様の皮膚炎症を C57BL/6 マウスと Balb/c マウスにおいて肉眼的かつ病理組織学的に確認することが出来た。しかし、imiquimod の塗布 4-5 日後あたりになると、自然に皮膚炎が軽快していくマウスがいることを確認した。既報告の論文には、そのような記載はなされていないが、TLR トレランスが生じているのではないかと考えた。IL-27 による治療的有効性を判断するには、さらに長い期間皮膚炎が持続するモデルが必要であろうと考え、imiquimod を利用した乾癬モデルはひとまず終了とした。次に、マウス IL-23 組み換え蛋白を用いた乾癬モデルの実験を行った。IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデルの既報告の論文に従い、マウス耳介あるいは背部皮膚に IL-23 を 5 日間連続で皮内注すると、耳介の腫脹および皮膚局所の IL-17 や IL-22 の亢進を認め、組織学的に表皮肥厚を伴った乾癬様皮膚炎が誘導されることを確認できた。このモデルを用いて IL-27 が乾癬様皮膚炎に及ぼす影響を調べた。まず、マウス IL-27 組み換え蛋白の全身投与による影響を調べたが、IL-27 投与による乾癬様皮膚炎への有意な影響は確認できなかった。次に IL-27 トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、IL-27 トランスジェニックマウスと野生型マウスの間において、乾癬様皮膚炎の程度に有意な差を認めなかった。このモデルは 5 日間という短期間のモデルであるため、有意な差が認められなかった可能性もあると考え、IL-23 をさらに長期にわたって皮内注を継続する慢性炎症モデルでの検討を予定している。

②乾癬の病態における key cytokine の 1 つである TNF- α は NHEK に作用し、乾癬の炎症に関与するケモカイン CXCL1、CXCL2、CXCL8、CXCL10、CCL2、CCL5、CCL20 の産生を誘導した。IL-17 は、乾癬病変部局所で増加していることが示され、その病態に深く関与するサイトカインの 1 つであることが示さ

れている。IL-17はNHEKに作用し、CXCL1、CXCL2、CXCL8、CCL20の産生を誘導するが、興味深いことにIL-27によって産生増強されるCXCL9、CXCL10、CCL2、CCL5に関しては抑制的に作用した。これとは反対にIL-27はTNF-alphaによって誘導されるCXCL1、CXCL2、CXCL8、CCL20の産生を抑制した(図1)。以上のようにIL-17とIL-27はTNF-alpha関連性ケモカインの産生誘導に対して相反する作用を有しており、乾癬病変部におけるIL-17とIL-27のバランスが局所のケモカイン産生に影響を与えていることが示唆された。事実、血管新生においてもIL-17は血管新生促進作用であるのに対して、IL-27は血管新生抑制作用を有しており、相反する作用を有している。以上の知見は、IL-27が乾癬の発症病理に関与する新しい機序の一つと考え、英文誌に報告した(Exp. Dermatol.: 70-72, 2012.)。

IL-17 and IL-27 exert opposite effect on the TNF-α-mediated production of psoriasis-related chemokines in keratinocyte.		
	IL-17	IL-27
CXCL1	↑	↓ ^a
CXCL2	↑	↓ ^a
CXCL8	↑	↓ ^a
CCL20	↑	↓ ^a

CXCL9	↓ ^b	↑ ^c
CXCL10	↓ ^b	↑ ^c
CCL2	↓ ^b	↑ ^c
CCL5	↓ ^b	↑ ^c

↑ : enhance; ↓ : suppress;
^a suppression of the chemokine expression induced by TNF- α .
^b suppression of the chemokine expression synergistically induced by TNF- α and IL-27.
^c enhancement of the chemokine expression by IL-27 independently or synergistically with TNF- α .

図 1

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① S. Fujiwara, H. Nagai, S. Oniki, T. Yoshimoto, and C. Nishigori. Interleukin(IL)-17 versus IL-27: Opposite effects on tumor necrosis factor-alpha-mediated chemokine production in human keratinocytes. Exp. Dermatol.: 70-72, 2012. (査読有)
DOI:10.1111/j.1600-0625.2011.01384.x

- ② T. Kuramoto, R Fujii, H. Nagai, M.L.

Belladonna, T. Yoshimoto, Y. Kohjimoto, T. Inagaki, and I. Hara. IL-23 gene therapy for mouse bladder tumor cell lines. BJU int. 108:914-921, 2011. (査読有)

DOI:10.1111/j.1464-410X.2010.10025.x

- ③ H. Nagai, S. Oniki, S. Fujiwara, T. Yoshimoto, and C. Nishigori. Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members. Immunotherapy. 2:697-709, 2010 (査読有)
DOI: 10.2217/imt.10.46

[学会発表] (計2件)

- ① Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Shuntaro Oniki, Takayuki Yoshimoto, and Chikako Nishigori. Interleukin-17 and interleukin-27 exert opposite effects on tumor necrosis factor-alpha-mediated psoriasis related chemokine production in human keratinocytes. 2nd Easeterm Asia Dermatology Congress 2012年6月13-15日、Beijing, China
- ② Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Shuntaro Oniki, Takayuki Yoshimoto, and Chikako Nishigori. IL-17 versus IL-27: Opposite effects on tumor necrosis factor-alpha-mediated chemokine production in human keratinocytes. 2011年12月9-11日、日本研究皮膚科学会第36回年次学術大会・総会、京都

[図書] (計2件)

- ① 永井 宏、メラノーマに伴う白斑の病態・診断・鑑別診断、皮膚科臨床アセット11、p259-261, 2012.
- ② 永井 宏、Sutton 白斑の病態・診断・鑑別診断、皮膚科臨床アセット11、p254-258, 2012.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 宏 (NAGAI HIROSHI)
神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80335447

(2)研究分担者

善本 隆之 (YOSHIMOTO TAKAYUKI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80202406

(3)連携研究者

()

研究者番号：