

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461692

研究課題名(和文) 悪性黒色腫、乾癬の新しい治療戦略におけるIL-23とIL-27の役割とその応用

研究課題名(英文) The roles and applications of IL-23 and IL-27 in new therapeutic strategies for malignant melanoma and psoriasis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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。B16メラノーマ腫瘍内CD4+ Tリンパ球除去とOX40アゴニストによる抗腫瘍相乗効果の機序を明らかにした。また、IL-27トランスジェニックマウスとWSX-1欠損マウスにおけるイミキモド誘導性乾癬様皮膚炎の解析を行った。

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 demonstrated the mechanisms of synergistic antitumor effects induced by intratumoral CD4+ T lymphodepletion and OX40 agonist. We analyzed imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in IL-27 transgenic mice and WSX-1-deficient mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

Interleukin(IL)-23とIL-27はIL-12ファミリーに属するサイトカインである。近年の研究により、IL-23は自己免疫の誘導、腫瘍免疫の抑制作用を有し、IL-27は自己免疫や炎症反応の抑制、腫瘍免疫の促進作用を有することが証明された。これら2つのサイトカインは生体内において疾患・病態によって異なる作用を発揮している可能性が示唆されるが、その免疫制御の詳細は不明である。乾癬と悪性黒色腫は全く異なる疾患であるが、ともにIL-23とIL-27がその病態や治療に深く関与することが明らかとなっていた。IL-27を中心とした乾癬と悪性黒色腫に対する動物モデルの研究によって、研究開始当初に以下の事項を確認していた。IL-12遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ細胞を同系マウスに接種し、OX40アゴニストを投与すると抗腫瘍効果は増強される。コントロールベクター導入あるいはIL-27遺伝子導入B16F10メラノーマ腫瘍ではOX40アゴニストによる増強効果を認めないが、抗CD4抗体投与を併用すると、OX40アゴニストによる増強効果が誘導され、IL-27遺伝子導入B16メラノーマ腫瘍では、腫瘍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す。イミキモドを用いた乾癬様皮膚炎モデルにおいて、IL-27の組み換え蛋白を全身性に5日間連続に腹腔内投与しても、皮膚炎に変化を認めない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乾癬と悪性黒色腫におけるIL-23とIL-27の病態および治療的役割について解析し、両サイトカインおよびそれぞれの疾患特性を考慮した新しい治療戦略を探求することである。

3. 研究の方法

(1)悪性黒色腫

B16F10メラノーマ細胞を用いたin vivoの解析

抗CD4抗体(GK1.5)を用いたCD4⁺Tリンパ球除去によって誘導されるIL-27遺伝子導入B16F10メラノーマ腫瘍の顕著な腫瘍縮小効果の機序を明らかにするため、抗CD4抗体をB16F10メラノーマ腫瘍内に局所投与し、腫瘍内のCD4⁺ helper Tリンパ球を除去した。抗体投与7日目の腫瘍組織を採取し、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リガンドとの併用による抗腫瘍効果増強の有無を調べるため、腫瘍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、腫瘍径の計測お

よびフローサイトメトリーおよびリアルタイムPCRの解析を行った。

ヒト黒色腫細胞株を用いたIL-27と化学療法剤の併用効果についての解析

ヒト黒色腫細胞株を用いて、IL-27と化学療法剤の併用による増殖抑制効果をMTTアッセイにて解析した。

ヒト黒色腫細胞株を用いたPD-L1、IDO発現についての解析

本研究期間内に、IL-27がヒト黒色腫細胞表面のPD-L1分子の発現を増加させるという論文が発表されたため、その検証を行った。また、PD-L1と同じく、抗腫瘍免疫に対して抑制的に作用するIDO(インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ)の発現についても解析した。

(2)乾癬

イミキモド、IL-23を利用したマウスの乾癬モデルに対する解析を行った。

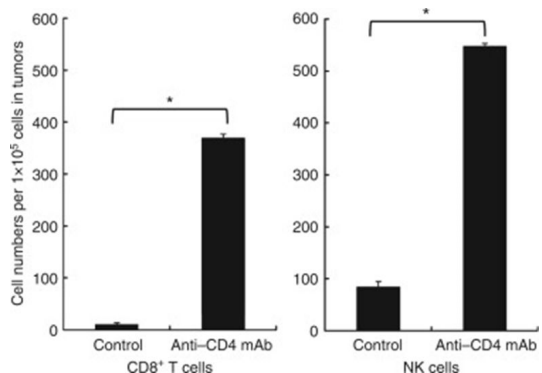
IL-27トランスジェニックマウスおよびWSX-1(IL-27のレセプターのサブユニットの1つ)欠失マウスを用いて、イミキモド誘発性あるいはIL-23の皮膚への局所投与による乾癬様皮膚炎の変化を解析した。

糖尿病合併乾癬患者さんにおいて、DPP-4阻害薬が乾癬に有効であった症例を経験したことをきっかけに、糖尿病発症マウス(db/dbマウス)におけるイミキモド誘発性乾癬様皮膚炎においてもDPP-4阻害薬の経口投与により乾癬様皮膚炎が抑制されるかを検討した。

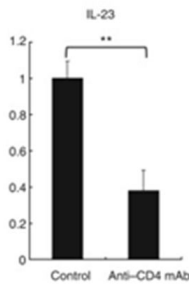
4. 研究成果

(1)悪性黒色腫

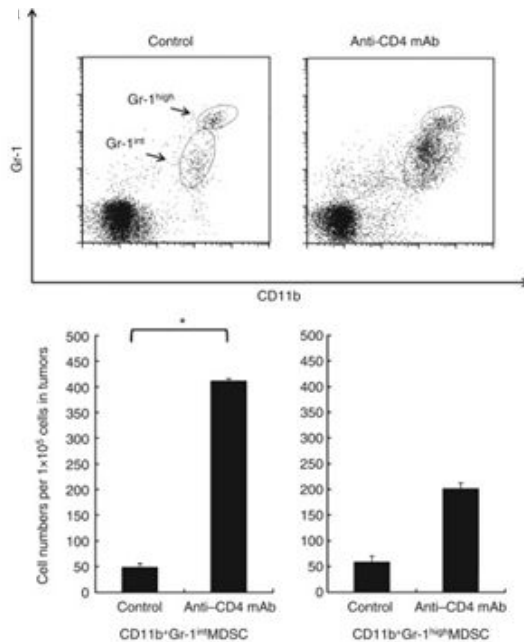
マウスB16メラノーマ細胞に対する抗CD4抗体局所投与による抗腫瘍効果増強のメカニズムを調べるため、腫瘍組織のサイトカイン・ケモカイン発現や組織に浸潤している細胞群を、リアルタイムPCRやフローサイトメトリーで解析したところ、抗CD4抗体投与群において種々の炎症性サイトカインおよびケモカインが増加し、多数のCD8⁺Tリンパ球やNK細胞が浸潤していることを確認し、その抗腫瘍効果は主としてCD8⁺Tリンパ球依存性であった。



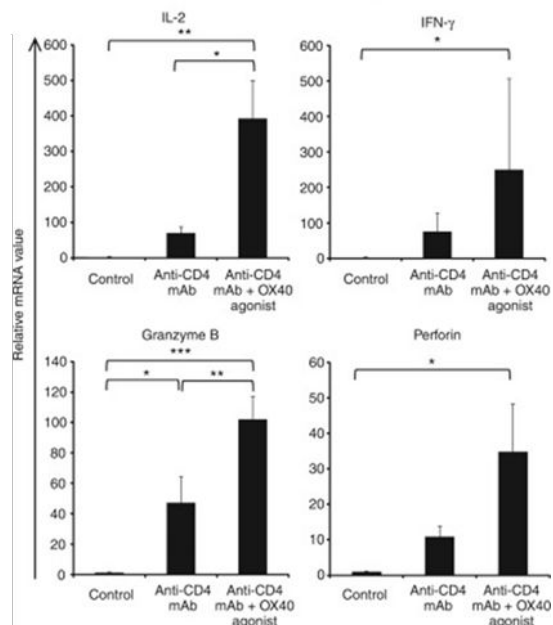
興味深いことに、抗腫瘍免疫抑制効果が報告されている IL-23 は抗 CD4 抗体投与群で減少していた。



またこれらのエフェクター細胞のみならず、抗 CD4 抗体投与群では、CD11b⁺Gr-1⁺骨髄性免疫抑制性細胞(MDSC)の浸潤も伴っていることを確認した。増加している MDSC は、Gr-1^{high} よりも Gr-1^{int} の細胞が主であり、単球性の MDSC と考えられた。



次に、OX40 リガンドの全身投与によって抗 CD4 抗体投与による抗腫瘍効果が増強する機序について解析を行った。その結果、OX40 リガンドを投与しても浸潤する免疫細胞の数や割合に変化はなかったが、IL-2 や interferon-gamma などの抗腫瘍性サイトカインおよびパーフォリンやグランザイム B などの細部傷害分子の発現が有意に増強していることが明らかとなり、抗腫瘍効果増強機序の 1 つであると考えられた。



過去の報告において、OX40 アゴニストは免疫原性の高い腫瘍では抗腫瘍効果が誘導されるが、B16F10 メラノーマ細胞のような免疫原性の低い腫瘍では効果が乏しいことが報告され、通説化されていたが、本研究の結果から、CD8⁺T リンパ球がしっかりと腫瘍内に侵入している状態では低免疫原性の腫瘍に対しても OX40 アゴニストは抗腫瘍効果を発揮できることが明らかになった。B16F10 メラノーマ細胞に対する IL-27 の抗腫瘍効果は、NK 細胞が主であり、CD8⁺T リンパ球非依存性であることから、IL-27 は OX40 アゴニストとの併用効果が発揮されなかった可能性を考えた。一方、B16F10 メラノーマ細胞に対する IL-12 の抗腫瘍効果は、NK 細胞と CD8⁺T リンパ球の両者が関与していることから、OX40 アゴニストとの併用効果が得られた可能性を考えた。

以上の結果をまとめて、英文誌に報告した(J. Invest. Dermatol. 134: 1884-1892, 2014)。

ヒト黒色腫細胞株を用いて、IL-27 と化学療法剤の併用による増殖抑制効果の相乗作用を調べたが、明らかな相乗効果を確認できなかった。

ヒト黒色腫細胞株に対して、IL-27 を作用させると、PD-L1 および IDO の発現を有意に増強させ、tumor necrosis factor (TNF)-alpha と相乗的な発現増強作用があることも確認した。以前に申請者は、ヒト角化細胞に対して、TNF-alpha と IL-27 が相乗的にケモカイン発現増強作用を発揮すること、さらにその相乗的増強効果を IL-17 が抑制することを報告しているため、ヒト黒色腫細胞についても TNF-alpha と IL-27 による PD-L1 および IDO の相乗的な発現増強作用に対して、IL-17 が抑制的に作用している可能性を期待し解析したが、有意な抑制効果は確認できなかった。

(2)乾癬

IL-27 トランスジェニックマウスおよび WSX-1 欠失マウスを用いて、イミキモド誘発性乾癬様皮膚炎の変化を解析したところ、IL-27 トランスジェニックマウスでは野生型マウスと比較して皮膚病変は改善傾向をきたし、反対に WSX-1 欠失マウスでは増悪する傾向を認めた。IL-23 組み換え蛋白の皮膚への連続局所投与による乾癬様皮膚炎モデルでは有意な変化を確認できなかった。

糖尿病発症マウス (db/db マウス) において DPP-4 阻害薬の経口投与群と非投与群におけるイミキモド誘発性乾癬様皮膚炎について解析したが、両者に有意な差を認めることはできなかった。

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)

H. Nagai, S. Fujiwara, Y. Takahashi, C. Nishigori. Ameliorating effect of the novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin on psoriasis: A report of two cases. J. Dermatol. 42: 1094-1097, 2015

S. Fujiwara, H. Nagai, N. Shimoura, S. Oniki, T. Yoshimoto, and C. Nishigori. Intratumoral CD4⁺ T Lymphodepletion Sensitizes Poorly Immunogenic Melanomas to Immunotherapy with an OX40 Agonist. J. Invest. Dermatol. 査読有、134: 1884-1892, 2014

Y. Chiba, I. Mizoguchi, K. Mitobe, K. Higuchi, H. Nagai, C. Nishigori, J. Mizoguchi, T. Yoshimoto. IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanomas and inhibits their tumor growth in cooperation with a TLR3 agonist poly(I:C) partly in a TRAIL-dependent manner. PLoS One 査読有、14;8(10):e76159, 2013

[学会発表](計 2 件)

永井 宏、藤原 進、錦織 千佳子、高橋 裕、DPP-4 阻害薬が皮膚症状改善に寄与したと思われた糖尿病合併乾癬の 2 例、第 108 回近畿皮膚科集談会、2015.07.12、メルパルク京都(京都府)
Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Noriko Shimoura, Shuntaro Oniki, Takayuki Yoshimoto, and Chikako Nishigori. Intratumoral CD4⁺ T Lymphodepletion Sensitizes Poorly Immunogenic Melanomas to Immunotherapy with an

OX40 Agonist. 日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会、2014.12.12-14、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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：