149　Interleukin-36 Familyの肺癌微小環境における意義	木下　郁彦

【目的】Interleukin（IL）-36 Family は IL-36 Receptor（IL-36R）を介して幅広い免疫・非免疫細胞を活性化し、炎症や発癌を制御することが知られている。IL-36 には、IL-36α、IL-36β、IL-36γの 3 つのサブフォームがある。また、2001 年に新たに発見された IL-38 も IL-36 Family に属する。我々は、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。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、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、本研究の目的を IL-38 と TANs や TAMs の関連を明らかにすることで、IL-38 の治療応用への可能性を探究することとした。

【方法】肺腺癌切除症例 209 例を対象に免疫組織化学染色にて IL-38 発現と TANs、TAMs を評価し、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。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製し、腫瘍内の TANs、TAMs の変化を評価した。

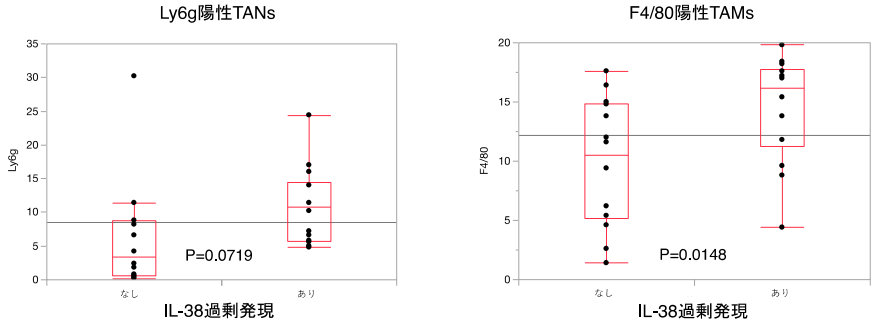
【結果】肺腺癌切除症例において、TANs 高浸潤の症例では有意に pT2 以上、p N1 以上、pStage Ⅱ以上、胸膜浸潤陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった（p＜0.0001）。また、TAMs 高浸潤の症例では有意に高齢者、pT2 以上、pStage Ⅱ以上、胸膜浸潤陽性、血管侵襲陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった（p＝0.0081）。動物実験においても、IL-38 強制発現によって TANs と TAMs の浸潤が増加していた（TANs：11.0 個／視野対 6.0 個／視野、p＝0.0719；TAMs：14.6 個／視野対 9.7 個／視野、p＝0.0148）。IL-38 によって TANs、TAMs の浸潤が誘導され、腫瘍形成に関わっている可能性が示された。

IL-38 発現と TANs 及び TAMs との関係

A. 肺腺癌切除症例におけるIL-38発現とCD66b陽性TANs及びCD163陽性TAMsとの関係

		CD66b⁺TANs					CD163⁺TAMs				
		Low (n=103)		High (n=106)		p value	Low (n=105)		High (n=104)		p value
IL-38 expression	Low	60	(58.3%)	32	(30.2%)	<0.0001	56	(53.3%)	36	(34.6%)	0.0081
	High	43	(41.7%)	74	(69.8%)		49	(46.7%)	68	(65.4%)	

B. 動物実験モデルにおけるIL-38過剰発現とLy6g陽性TANs及びF4/80陽性TAMsとの関係



149. Interleukin-36 Family の肺癌微小環境における意義

木下　郁彦

九州がんセンター 呼吸器腫瘍科

Key words：肺腺癌，腫瘍微小環境，Interleukin，腫瘍関連好中球，腫瘍関連マクロファージ

緒　言

Interleukin（IL）-36 Family は IL-36 Receptor（IL-36R）を介して、マクロファージ、T 細胞、ケラチノサイト、上皮細胞などの幅広い免疫・非免疫細胞を活性化し、皮膚、肺、腎臓、肝臓、腸などの様々な炎症、発癌を制御することが知られている［1］。IL-36 には、IL-36α、IL-36β、IL-36γの 3 つのサブフォームがある。また、2001 年に新たに発見された IL-38 も IL-36 Family に属する［2］。

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［3］。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［4］。

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［5，6］、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［7，8］、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。

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（0.5μg/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（500μg/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）を作製した。

6 週齢の C57BL/6J マウス（CLEA Japan）に充分な麻酔の後、5×10^6 個の LLC-IL38 細胞または LLC-vector 細胞を 100 μl 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。

結　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 1 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。

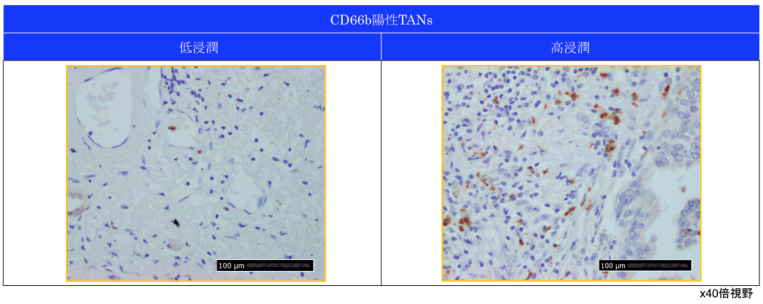


図 1. 肺腺癌切除検体における CD66b 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像
CD66b 陽性 TANs 低浸潤（左）および高浸潤（右）の症例の画像を示す。スケールバー：100 μm。

CD163 の免疫組織化学染色の典型画像を図 2 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。

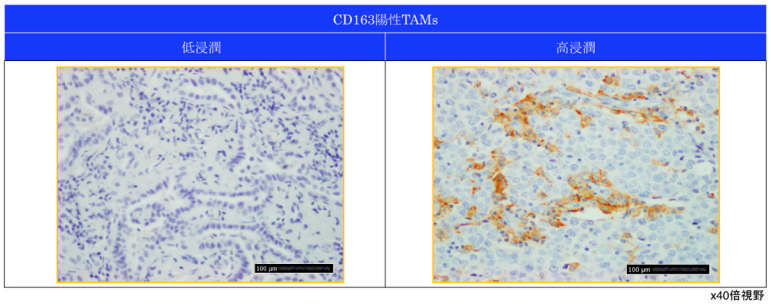


図 2. 肺腺癌切除検体における CD163 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像
CD163 陽性 TAMs 低浸潤（左）および高浸潤（右）の症例の画像を示す。スケールバー：100 μm。

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

		CD66b+TANs				
Characteristics		Low (n=103)		High (n=106)		p value
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 ±SD	22.3	(±3.0)	22.6	(±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%)	

CD66b 陽性 TANs 低浸潤群と高浸潤群の臨床病理学的因子及び IL-38 発現を Fisher の正確検定で比較した。

CD66b 陽性 TANs 高浸潤群では有意に 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。

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

		CD163+TAMs				
Characteristics		Low（n=105）		High（n=104）		p value
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	(17.90%)	
Pleural invasion	Negative	92	(87.60%)	75	(72.10%)	0.0058
	Positive	13	(12.40%)	29	(17.90%)	
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%)	

CD163 陽性 TAMs 低浸潤群と高浸潤群の臨床病理学的因子及び IL-38 発現を Fisher の正確検定で比較した。CD163 陽性 TAMs 高浸潤群では有意に高齢者、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。

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 3 に示す。Ly6g 陽性 TANs の平均数は X 個／視野であった。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 4）。

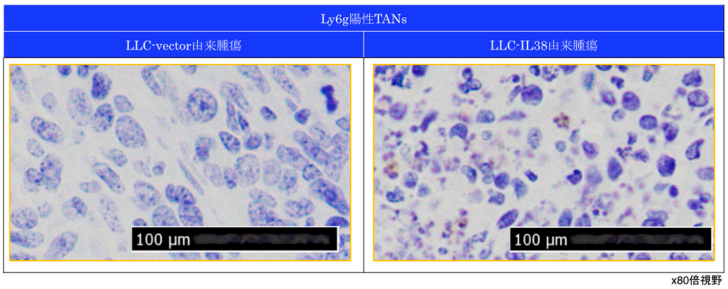


図 3. マウス腫瘍組織における Ly6g 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像
LLC-vector 由来腫瘍（左）と LLC-IL38 由来腫瘍（右）の Ly6g 陽性 TANs の画像を示す。スケールバー：100 μm。

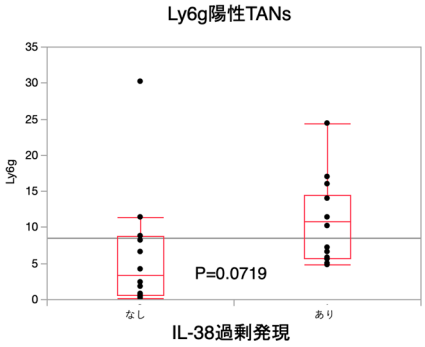


図 4. IL-38 強制発現による腫瘍組織への Ly6g 陽性 TANs 浸潤数の違い
LLC-vector 由来腫瘍（左）と LLC-IL38 由来腫瘍（右）の Ly6g 陽性 TANs 浸潤数を示す。LLC-IL38 由来腫瘍で Ly6g 陽性 TANs 浸潤数が多い傾向を認める（t 検定）。

F4/80 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像を図 5 に示す。F4/80 陽性 TAMs の平均数は X 個／視野であった。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 6）。

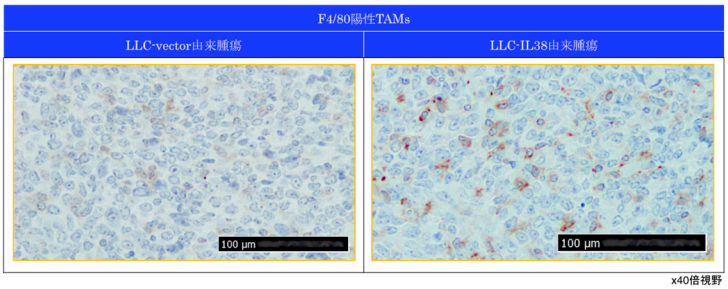


図 5. マウス腫瘍組織における F4/80 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像
LLC-vector 由来腫瘍（左）と LLC-IL38 由来腫瘍（右）の F4/80 陽性 TAMs の画像を示す。スケールバー：100 μm。

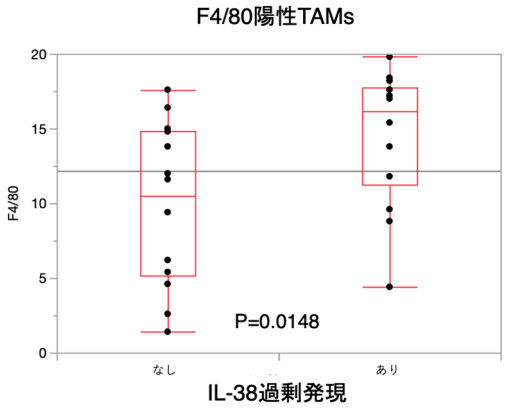


図 6. IL-38 強制発現による腫瘍組織への F4/80 陽性 TAMs 浸潤数の違い
LLC-vector 由来腫瘍（左）と LLC-IL38 由来腫瘍（右）の F4/80 陽性 TAMs 浸潤数を示す。LLC-IL38 由来腫瘍で F4/80 陽性 TAMs 浸潤数が有意に増加している（t 検定）。

考　察

本研究によって、肺腺癌切除症例において IL-38 高発現が TANs 及び TAMs の高浸潤と関連していること、マウス皮下腫瘍モデルにおいて IL-38 強制発現 TANs 及び TAMs の浸潤を誘導することが明らかとなった。

IL-38 の受容体である IL-36R をノックアウトしたマウス（IL-36R KO マウス）を用いた創傷治癒モデルを用いた研究で、IL-36R KO マウスでは創傷治癒の際に好中球やマクロファージの浸潤が増加し、創傷治癒が遅延することが報告された。また、IL-36R KO マウスでは IL-36γ、C-X-C モチーフケモカインリガンド 1（CXCL1）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）-βなどのサイトカインの発現の増加が認められたほか、Toll 様受容体 4（TLR4）阻害剤である TAK-242 の投与によって IL-36R KO マウスの創傷治癒が正常化し、創傷治癒の遅延が改善したことから、TLR4 を介したシグナルやサイトカイン産生が IL-36R KO マウスにおける好中球やマクロファージの浸潤増加に関与したものと報告された［5］。これは、IL-36R のアンタゴニストとして作用する IL-38 も好中球やマクロファージの浸潤を誘導する機序になりうると考えられる。

一方で、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の動物実験において、IL-36R シグナル刺激によって CXCL1 や CXCL8、溶出性マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）が放出されることで好中球による炎症反応が増幅されることが報告されている［6］。IL-36R シグナルを阻害することで好中球性の炎症が抑制されることや、IL-36 シグナルが GM-CSF やウイルス模倣物質 poly（I:C）を介して好中球やマクロファージの活性化を促進することが報告されており［6］、IL-36 シグナルの好中球やマクロファージに対する作用はコンセンサスが得られていない。

我々は今後、LLC-IL38 由来腫瘍内のケモカインやサイトカイン、TLR4 シグナルなどの解析をさらに行い、IL-38 と好中球、マクロファージとの関係をさらに明らかにしていく方針である。

共同研究者・謝辞

本研究は公益財団法人上原記念生命科学財団から頂いた 2022 年度研究奨励金により実施することができました。この場をお借りして深謝いたします。

文　献

1) Byrne J, Baker K, Houston A, et al. IL-36 cytokines in inflammatory and malignant diseases: not the new kid on the block anymore. Cell Mol Life Sci. 2021;78:6215-6227. PMID: 34365521, PMCID: PMC8429149, DOI: 10.1007/s00018-021-03909-4

2) Bensen JT, Dawson PA, Mychaleckyj JC, et al. Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14. J Interferon Cytokine Res. 2001;21:899-904. PMID: 11747621, DOI: 10.1089/107999001753289505

3) Kinoshita F, Tagawa T, Akamine T, et al. Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. Cancer Immunol Immunother. 2021;70:123-135. PMID: 32653939, DOI: 10.1007/s00262-020-02659-9

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;12:1–15. PMID: 28727766, PMCID: PMC5519175, DOI: 10.1371/journal.pone.0181598

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. PMID: 32901055, PMCID: PMC7479622, DOI: 10.1038/s41598-020-71256-8

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. PMID:35763349, PMCID: PMC9462491, DOI: 10.1172/jci.insight.155581

7) Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16:601–620. PMID: 31160735, DOI: 10.1038/s41571-019-0222-4

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. PMID: 30930117, PMCID: PMC6472943, DOI: 10.1016/j.ccell.2019.02.009