

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20834

研究課題名(和文)核酸による抗癌作用メカニズム解析と乳癌治療応用のための基礎研究

研究課題名(英文)The mechanical analysis of nucleic acid-induced cancer selective apoptosis for breast cancer therapy

研究代表者

石川 浩三(Ishikawa, Kozo)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・学術研究員

研究者番号：20624795

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)：癌細胞において核酸が自然免疫系を介しアポトーシスを誘導する現象が報告されているが、詳細な機序は解明されていない。本研究では、自然免疫系のRNAセンサー分子RIG-I(retinoic acid-inducible gene-1)が、IFN(interferon)関連分子であるMAVS(mitochondrial antiviral signaling protein)を直接介さずアポトーシスを誘導する経路を分子生物学的に示した。また核酸治療を行った癌転移モデルにおいて、転移病巣にIFN非依存性なアポトーシスを認めた。この成果は、IFN産生による副作用を回避した癌治療薬の探索に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Single/double strand RNAs have been reported to induce tumor selective apoptosis in vitro or in vivo experiment and expected as a novel tumor therapy. However, the mechanism that lead to tumor selective apoptosis via IFN (interferon) is controversial, and precise intracellular signaling has not been elucidated. In the present study, an innate sensor RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) is found to evoke tumor selective apoptosis signal without direct involvement of MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) which induce IFN production, by using gene editing tool and proteome analysis in vitro. Moreover, in colorectal cancer metastatic mice model, an artificial nucleic acid 3pRNA is found to induce tumor selective apoptosis without dependent effect of IFN in liver metastatic lesions. The present results may open a new horizon for the tumor treatment which can avoid the side effect of IFN like fever, depression and general malaise.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：自然免疫 癌細胞選択的アポトーシス 核酸ナノデリバリー

1. 研究開始当初の背景

現在我が国では、若年層を含めて乳癌の有病率が上昇傾向にあり、経済人口の減少や国家医療費の高騰、癌治療薬の副作用の改善は昨今、医療の重要課題の一つである。癌治療において自然免疫療法は、核酸により癌細胞選択的アポトーシスが誘導され (Kaneda Y, Oncoimmunology, 2013) 従来の抗癌剤に対し副作用の低減化が期待される。これまでに核酸(ssRNA/dsRNA)刺激によって、多種の癌細胞が死滅することが報告されてきた (Besch R, J Clin Invest, 2009), (Matsushima-Miyagi T, Clin Cancer Res, 2012)。しかし、その細胞死誘導メカニズムや癌細胞特有の作用因子については未だ詳細に解明されていない。特に治療の副作用に関連する自然免疫系賦活化に伴うインターフェロン(interferon / ; IFN /)産生やその関連分子 MAVS (Mitochondrial antiviral signaling protein)、IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) の活性化が細胞死誘導に直接関与するか否かは明確化すべき事項であると考え本研究で解析を行った。

また、一般的に薬剤や放射線治療の抵抗性への関与が知られる p53 について、核酸によるアポトーシス誘導への関与およびその詳細な機序もまた明確に示されていない。研究代表者は予備実験から様々な癌細胞株において、5'-ppp ssRNA (3pRNA) によるアポトーシス誘導性を調べたところ、p53 mutant 癌細胞に共通してアポトーシス誘導性が低い傾向が分かり、p53 の関与にも注目した。

一方で、近年、生体内への核酸導入法として、腫瘍選択性あるいは臓器選択性の核酸送達システム MEND (multifunctional envelope-type nano carrier) が開発され、担癌マウスにおける核酸の癌治療効果が報告されている (Nakamura T, Acc.Chem.Res, 2012)。そこで、当研究機関の協力の下、3pRNA を搭載した肝臓送達型 MEND の作製を依頼し、転移性癌への治療応用を想定した実験系を検討した。今回、まず、マウス大腸癌肝転移モデルに投与し、肝臓における転移病巣限局的なアポトーシス誘導効果を調べた。

2. 研究の目的

背景より、(1)核酸 3pRNA の癌細胞選択的アポトーシス誘導機序を IFN 産生系依存性が否か、即ち MAVS 下流が直接関与するか否か解明する。さらに、3pRNA によるアポトーシスにおける p53 がどのように関与するか、即ち UV 照射や抗癌剤暴露により誘発される DNA 損傷シグナルを介するか否か調べる。総じて 3pRNA の癌細胞選択的アポトーシス誘導シグナルの樹立を試みる。

(2)臨床応用に向けた模擬実験として、MEND を用いて、3pRNA が転移性腫瘍モデルにおいて癌選択的細胞死を誘導するか否

か。また、IFN 産生および ISG (IFN-stimulating-gene) とアポトーシスとの関連性を双方のマーカーを用いて示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) In vitro 実験系にて、核酸 3pRNA の癌細胞選択的アポトーシスの誘導機序を示す。A549 (肺癌)、MCF7 (乳癌)、HepG2 (肝癌)、HeLa (子宮頸癌) を用いた。

各種癌細胞において、3pRNA 誘導アポトーシスが IFN 産生を介するか否か示す。

-1) IFN 受容体 AR1 中和抗体あるいは AR1 の siRNA-knockdown による影響を Annexin/PI アッセイにより調べる。また、IFN を添加し、相乗的に細胞死の増加が認められるか調べる。

-2) IFN 産生関連分子、MAVS と IRF-3 の siRNA-knockdown による細胞死への影響を Annexin/PI アッセイにより調べる。また、Western blotting 法により、活性型 Caspase3 の検出を基にアポトーシスの発現を確認する。

-3) これらの所見を証明するため、IFN 高発現株である A549 を用いて IFN 産生シグナル上流の MAVS の knockout 株を CRISPR/Cas9 遺伝子編集により作製し、Annexin/PI アッセイによりアポトーシスへの関与を調べる。

-4) A549 において、RIG-I から MAVS へのシグナル伝達の関与を調べるため、まず RIG-I を CRISPR/Cas9 により Knockout させ、3pRNA 誘導アポトーシスが消失することを確認した後、そこへ正規の RIG-I あるいは遺伝子欠失変異により MAVS との結合性を喪失させた RIG-I (T55I) を遺伝子導入する。そして、正規と mutant の RIG-I 発現株、両者に細胞死誘導の差が生じるか調べる。

3pRNA アポトーシス誘導による p53 の関与について、UV 照射や抗癌剤による DNA 損傷シグナル (ATM や ATR リン酸化) との比較を中心に調べる。

-1) 3pRNA 刺激によるアポトーシスに p53 リン酸化 (Noxa, Puma, Bim 等アポトーシス促進遺伝子の発現に関与する) を Western blotting 法で評価する。

-2) ATM、ATR のリン酸化とその下流にある p53 の Serine 20 (リン酸化 ATM およびリン酸化 ATR により修飾される箇所) のリン酸化を Western blotting 法により評価する。

-3) A549 の ATM、ATR の Knockout 株を CRISPR/Cas9 により作製し、3pRNA によるアポトーシス誘導を Annexin/PI アッセイおよび Western blotting 法による活性型 Caspase3 の検出にて行う。

の結果を受けて癌細胞選択的アポトーシス誘導シグナルが RIG-I から MAVS への結合 (IFN 産生シグナル) と異なる場合に、独自の新規 Pathway を探索する。

-1) RIG-I と直接会合する分子を RIG-I との免疫沈降および Mass spectrometry 解析により、検出する。

-2) 結合蛋白リストのうち、データベースにより癌細胞選択的な高発現分子を選択し、それらの siRNA を用いてスクリーニング的にアポトーシスアッセイを行う。

(2) In vivo 実験系にて、核酸 3pRNA の癌細胞選択的なアポトーシス誘導効果を示す。転移性腫瘍モデルにおいて、3pRNA を搭載した MEND (3pRNA-MEND) で治療し、肝臓転移巣の退縮および蛍光標識した癌細胞選択的な Apoptosis の発現を調べる。

BALB/c マウスに転移性大腸癌 CT26 (Luciferase 標識株または YFP 標識株) を経脾的に移植し、肝臓転移モデルを作製する。

3pRNA-MEND 30 μg/マウスを血管内投与し、IVIS により Bioluminescence intensity (BLI) の低下により治療効果を評価する。

-1) 3pRNA-MEND を投与し、48 時間後に安楽死下に還流固定および肝臓の摘出を行い、凍結切片標本を作製する。Anti-GFP (Nacalaitesque, 04404-26) 抗体による癌細胞の標識と TUNEL (MBL, MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit III) および anti-active Caspase3 (abcam, ab2301) による Apoptosis 検出、さらに anti-IRF-3 ser396 (Sigma, SAB4504031)、anti-viperin (Enzo, RSAD2) 抗体による IFN シグナル検出を行う。

-2) さらに Apoptosis の癌細胞選択性について、肝臓全体で評価するため 3pRNA-MEND を投与後 48 時間目に、安楽死下に 0.1MPBS による還流洗浄を行った後、肝臓を摘出し、collagenase Type (Worthington, Worthington) 処理を 37、30 分行い、MACS 破砕機 (Miltenyi, gentleMACS, 130-093-235) による細胞分離を行う。続いて肝臓細胞サンプルを TUNEL (MBL, MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit III) 染色後、FACS (CANTO II, BD) にて解析を行う。

4. 研究成果

(1) 核酸 3pRNA による癌細胞アポトーシス誘導機序の解析

核酸刺激によるアポトーシス誘導に対する IFN の関与について

-1) A549、MCSF7、HepG2、HeLa 細胞について、中和抗体および siRNA-knockdown による IFN 受容体 AR の抑制下に 3pRNA 刺激を行ったところ、全ての細胞株において AR 受容体抑制によるアポトーシスへの影響は認められなかった。また IFN 添加によるアポトーシスの相乗効果は認められなかった。

-2) IFN 産生関連分子、MAVS と IRF-3 の siRNA-knockdown により、アポトーシスの減

少は認められず、また、活性型 Caspase3 の Westernblotting 評価からもアポトーシスマーカーの減少は認められなかった。

-3) ところが、A549 において MAVS の knockout 株 (MAVS^{-/-}) を作製し、Annexin/PI アッセイを行ったところ、有意にアポトーシスが抑制された。これより MAVS の核酸によるアポトーシス誘導への関与は完全には否定できないことが示された。

-4) 一方で、A549 の RIG-I knockout 株を作製し、さらに正規の RIG-I および T551C (MAVS との結合を欠如した mutant RIG-I) をともに遺伝子構築してアポトーシスアッセイを行ったところ、Annexin/PI および Westernblotting による活性型 Caspase3 が両者で同程度に検出された。これより、3pRNA によるアポトーシスが RIG-I と MAVS の結合に非依存的に誘導されることが示された。

以上から、MAVS は間接的に 3pRNA アポトーシス誘導に関与するが、RIG-I からのアポトーシス誘導シグナル分子そのものではないことが示唆された。

3pRNA 誘導アポトーシスにおける p53 の関与を調べた。UV 照射や抗癌剤等による DNA 損傷シグナル (ATM や ATR リン酸化) が 3pRNA 誘導アポトーシスに関連するか否かを Westernblotting 法により調べた。

-1) 3pRNA 刺激により、p53 においてアポトーシス促進因子にシグナルを伝える箇所の serine のリン酸化が認められた。

-2) ATM、ATR のリン酸化の下流にある Ser20 において p53 リン酸化は認められなかった。

-3) A549 の ATM、ATR Knockout 株において、正規の A549 と同様に 3pRNA によるアポトーシス誘導が起こることが、Annexin/PI 法および Westernblotting 法で認められた。

以上から DNA 損傷に起因する ATM や ATR シグナルが 3pRNA 誘導アポトーシスに関与していないことが示された。即ち癌細胞において RIG-I の活性化は直接 p53 リン酸化を介してアポトーシスを誘導することが示唆される。

MAVS 非依存性の癌細胞選択的なアポトーシス経路を新規に探索する。

-1) RIG-I と直接会合する分子を調べるため、RIG-I との免疫沈降を行い、その沈降サンプルを Mass spectrometry 解析に供した。

-2) RIG-I 結合タンパク質群のうち、癌細胞に選択的に高発現する分子を選択し、それらの siRNA スクリーニングを行った。その結果、幾つかの候補が選定された。

現在、これらとアポトーシス関連分子との結合性やアポトーシス発現への関与につき精査を進めている。

(2) In vivo 実験系にて、核酸 3pRNA の癌細胞選択的なアポトーシス誘導効果および IFN 発現の関与を免疫組織化学的に解析した。転移性腫瘍モデルにおいて、3pRNA を搭載した

MEND (3pRNA-MEND)で治療し、肝臓転移腫瘍巣の退縮および蛍光標識した癌細胞選択的な Apoptosis 発現を調べる。

BALB/c マウス転移性大腸癌モデルにおいて、-1) 3pRNA-MEND 30 µg/マウスを血管内投与すると 48 時間後に肝臓において Bioluminescence intensity(BLI)が半減し治療効果が確認された。

-1) 3pRNA-MEND 投与し、48 時間後の肝臓において GFP 陽性(YFP 標識 CT-26 細胞)の癌転移病巣選択的にアポトーシス所見 (TUNEL 陽性、active-caspase3 陽性)が認められた。一方で、IFN 発現亢進所見 (IRF-3 ser396 陽性)および IFN シグナル陽性所見 (Viperin 陽性)は自然免疫応答により、正常細胞と癌細胞両者に同程度に検出された。これより、3pRNA 誘導アポトーシスは IFN 産生や IFN シグナルに非依存性に発現することが示された。

-2) さらに 3pRNA-MEND を投与し、48 時間後の肝臓全細胞を MACS 破砕機により、細胞分離した。そのサンプルについて、FACS を用いて、正常細胞と癌細胞(YFP 陽性)を分画し、アポトーシス (TUNEL 陽性) の評価を行ったところ、YFP 陽性分画と TUNEL 陽性 (アポトーシス陽性) の相関性が強く認められた。即ち、3pRNA-MEND より、肝臓において癌細胞選択的なアポトーシス発現が誘導されることが示された。

現在、引き続き、転移性乳癌モデルを用いて、肺、肝臓、骨等転移巣における 3pRNA-MEND の治療効果を同様に解析中である。

結論

本研究から、核酸 3pRNA の癌細胞に対する選択的アポトーシス誘導が in vitro 系および in vivo 系においても認められた。また、In vitro 系の細胞内シグナル解析の結果から、3pRNA のセンサー分子である RIG-I のアポトーシス誘導シグナルは既知の IFN 産生経路と独立して存在する可能性が考えられた。p53 の癌細胞における核酸誘導アポトーシス機序については、さらに直接的経路の詳細な解析を中心に進めてゆく。その結果、治療標的の特定を目指し、癌細胞独自のアポトーシスシグナル経路をより明確にしてゆきたいと考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 浩三 (Ishikawa Kozo)
北海道大学遺伝子病制御研究所
学術研究員
研究者番号 : 20624795

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()

(4)研究協力者

なし