

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08692

研究課題名(和文) 個別化医療への応用を目指したインターフェロン の腫瘍細胞増殖抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) Study on interferon-gamma inhibitory effect on tumor cell proliferation for personalized medicine

研究代表者

近藤 智子(古屋智子)(KONDO, Tomoko)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30379979

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)：インターフェロン(IFN-)の腫瘍細胞に対する直接的な細胞増殖抑制効果の作用機序の解明と感受性のある腫瘍細胞を識別するためのマーカーを特定するために複数種類の培養細胞を用いてINF-による細胞内タンパクの発現レベルの変化をイメージサイトメトリーで解析した。INF-受容体など検討できた分子の中にINF-感受性細胞と非感受性細胞との間で発現レベルが大きく異なるものはなく、識別マーカーを決定することはできなかったが、未検討の候補分子について今後も検討を続ける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFN-は以前よりがんのサイトカイン療法で、あるいは直接的な抗腫瘍効果を期待してがん治療に用いられてきたが、効果は限定的である。しかし、がん免疫においてIFN-は免疫細胞を活性化するだけでなく、直接腫瘍細胞の細胞周期を停止させることがわかってきており、INF-による直接的抗腫瘍効果に感受性のある腫瘍細胞を識別することができれば、がん免疫療法により効果のある腫瘍に対する個別化治療につながる可能性がある。識別マーカーの特定には至らなかったが今回得られた知見は今後のマーカー検索のヒントとなり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanisms of suppression of tumor cell proliferation by interferon gamma (IFN-gamma) and identify markers for INF-gamma sensitive tumor cells, we analyzed the expression levels of intracellular protein by image cytometer. No difference in the expression level of the evaluated candidate molecules including INF-gamma receptor between INF-gamma sensitive cells and insensitive cells, and we could not identify the molecular marker specific for INF-gamma sensitive cells. We will continue to evaluate the candidate molecules that have not been evaluated.

研究分野：人体病理、サイトメトリー

キーワード：インターフェロン トリプルネガティブ乳癌 細胞周期 イメージサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性において最も罹患率の高い悪性腫瘍である。乳癌の薬物療法については、ホルモン受容体であるエストロゲンレセプター(以下 ER)およびプロゲステロンレセプター(以下 PgR)の発現の有無、HER2遺伝子の過剰発現の有無、そして細胞増殖能を示す Ki67 陽性率により表1に示すサブタイプ分類を行い、それぞれのサブタイプごとに治療法がガイドラインで定められている。

表1 乳癌のサブタイプ分類  
(国立がん研究センターがん情報サービスより改変)

サブタイプ分類	ホルモン受容体		HER2	Ki67値
	ER	PgR		
ルミナルA型	陽性	陽性	陰性	低
ルミナルB型(HER2陰性)	陽性または陰性	弱陽性または陰性	陰性	高
ルミナルB型(HER2陽性)	陽性	陽性または陰性	陽性	低～高
HER2型	陰性	陰性	陽性	—
トリプルネガティブ	陰性	陰性	陰性	—

このうちトリプルネガティブ乳癌(Triple Negative Breast Cancer、以下 TNBC)については有効な特異的薬物治療法が確立されておらず、従来の化学療法剤が選択されてきた。

我々はこれまでに臨床検体を用いたがんの遺伝子変異について研究を行い、乳癌についても外科的に切除された乳癌組織についてゲノムコピー数の変化に着目したゲノム変化の研究を行った。その中で TNBC において 12p14 領域の DNA コピー数減少が特異的に認められることが分かった。そこで 12q14 のコピー数減少と腫瘍の表現型(生物学的特徴)との関連について検討を行ったところ、同領域にコードされているインターフェロン(IFN- $\gamma$ )が TNBC 由来の培養細胞に対し直接的に細胞増殖抑制効果を示すことを先の研究課題で明らかにした。しかし TNBC 由来培養細胞の中にも IFN- $\gamma$  に影響を受けない培養細胞株があり、一方非 TNBC 由来の培養細胞株でも IFN- $\gamma$  で細胞増殖が抑制されるものもあり IFN- $\gamma$  が TNBC の特異的治療薬として臨床応用するのは難しいとの結論に至った。

しかしながら、IFN- $\gamma$  がある種の腫瘍細胞に対して細胞増殖を抑制することは明らかであり、IFN- $\gamma$  に感受性のある細胞を識別するマーカーを突き止めれば、臨床応用につなげることができると考えた。

2. 研究の目的

先行研究の結果を受けて、IFN- $\gamma$  のがん治療への応用を目指して、腫瘍細胞増殖抑制作用を種々の培養細胞で検討し、IFN- $\gamma$  の直接的細胞増殖抑制作用のメカニズムの解明とともに、IFN- $\gamma$  に感受性のある細胞を見分ける有効なマーカー分子の特定を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1)細胞: TNBC 由来の培養細胞3種類(HCC38、HCC1395、HCC1937)非 TNBC 由来培養細胞3種類(MCF-7、HCC202、HCC1500)、乳癌以外の培養細胞として子宮体癌由来培養細胞を使用した。細胞は ATCC および JCRB 細胞バンクより入手した。
- (2)細胞培養: それぞれの培養細胞は 10% 仔牛血清を加えた推奨培地で培養した。IFN- $\gamma$  の濃度は先行研究と同様 5ng/ml とした。
- (3)細胞増殖解析: 培養細胞は IFN- $\gamma$  添加培地と非添加培地で培養し、それぞれ Day0、Day1、Day2、Day3、Day4 の5時点で細胞数を計測し細胞増殖曲線を得た。
- (4)細胞周期解析およびタンパク質発現解析: 細胞数を計測し終えた細胞は PBS(-)で洗浄し、オートスマアでスライドガラス上に張り付けた後、100% エタノール、常温 10 分で固定後、風乾した。IFN- $\gamma$  受容体や細胞周期関連タンパク(サイクリン B、リン酸化ヒストン H3(Ser10)、Ki-67 など)について蛍光免疫染色(関節法)を行い、その後室温で 15 分間 RNase (1mg/mL)処理し、50  $\mu$ g/mL の propidium iodide (以下 PI)で DNA 染色を行った。染色後、カバーガラスをかけた透明マニキュアで周囲に封をし、イメージサイトメーター(RS100、オリンパス)で各 DNA 量およびタンパク質の発現強度を測定した。各細胞の核 DNA 量および DNA ヒストグラ各細胞周期(G1 期、S 期、G2/M 期)にある細胞数の割合を算出した。タンパク質の発現強度を測定し、陽性率を算出した。

4. 研究成果

(1)培養細胞における IFN- $\gamma$  の細胞増殖抑制効果とタンパク発現レベル解析の結果  
細胞増殖解析および IFN- $\gamma$  受容体、細胞周期関連タンパクの発現レベル解析を行ったが、その中から TNBC 由来培養細胞の HCC38 と非 TNBC 由来培養細胞の HCC1500 についての結果を示す。IFN- $\gamma$  受容体の発現レベル(全細胞における陽性率)は HCC38 が 26.4%に対し、HCC1500 は 8.35%であり HCC38 の方が陽性率が高かったが、両者ともに IFN- $\gamma$  による細胞増殖抑制効果は認められなかった(図1)。

細胞内タンパク質の発現レベルの解析においては、サイクリン B1、リン酸化ヒストン H3(Ser10)、Ki-67 の発現レベルを INF- 添加培地と INF- 無添加培地で比較したところタンパク質の発現レベルは HCC38 ではリン酸化ヒストン H3(Ser10)、サイクリン B1 は両者に差はなく、Ki-67 は INF- 添加群で Day1 から Day3 にかけて上昇していた。HCC1500 細胞ではリン酸化ヒストン H3(Ser10)および ki-67 では両者に差はなくサイクリン B1 は HCC1500 において陽性率が軽度低下していた(図2、図3)。子宮内膜癌での検討については期間内に必要なデータが得ることができなかった。

## (2) 考察

本研究課題で INF- による細胞増殖抑制効果を示す細胞を識別するマーカー検索を目的にしていたが、INF- 受容体の発現は INF- による直接的細胞増殖抑制効果との関連はなく、つまり INF- 受容体は INF- に感受性のある細胞を識別するマーカー候補にはなりえないことが分かった。また細胞増殖解析では差を認めなかった細胞においても、細胞周期関連タンパク質の発現レベルには INF- による変化が軽度ではあるが生じていた。

INF- が細胞増殖に与える影響については以前より報告があり、TNBC で変異が認められる *BRCA1* との関連について報告(参考文献1)や、がん免疫において NK 細胞から分泌される INF- および TNF- が細胞周期を停止させるという報告もある(文献2および3)。しかしながらそのメカニズムについては完全には解明されておらず、また INF- に感受性のある細胞を識別するマーカー分子に報告については現時点ではなく、INF- をがんの個別化医療に応用するにはこのマーカー分子の探索が求められる。研究期間中には臨床応用につながる成果を得ることができなかったが、引き続き研究を続けていく予定である。

## 参考文献

1. Andrews, H. N. et al. BRCA1 regulates the interferon gamma-mediated apoptotic response. J. Biol. Chem. 277, 26225-26232 (2002).
2. Braumuller, H. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature 494, 361-365. (2013)
3. Barrow, A. D et al. Natural killer cells control tumor growth by sensing a growth factor. Cell, 172, 534-548. (2018)

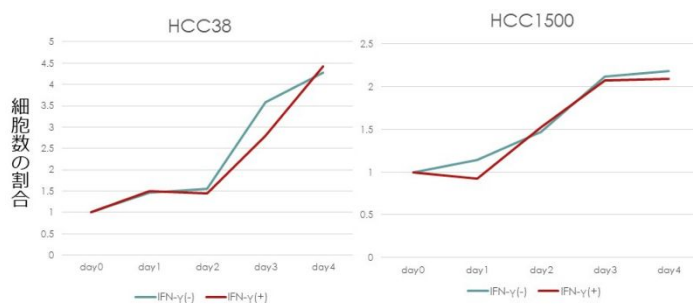


図1 HCC38細胞とHCC1500細胞の細胞増殖曲線

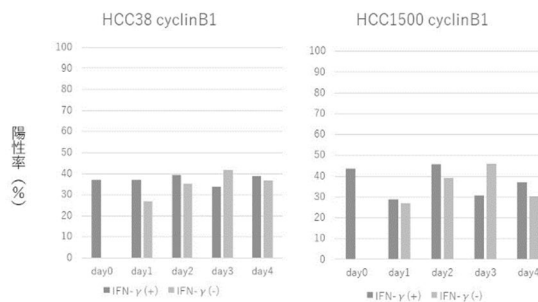


図2 サイクリンB1の陽性率

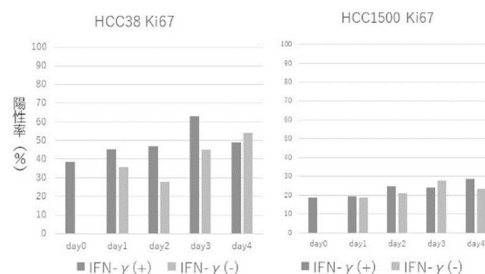


図3 Ki-67陽性率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古屋 智子
2. 発表標題 病理組織の分子細胞遺伝学的解析によるゲノム変化と病態との関連について
3. 学会等名 第105回日本病理学会
4. 発表年 2016年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----