

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10531

研究課題名(和文) TLR7を標的にした新規癌治療法における作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of a new cancer treatment targeting TLR7

研究代表者

上原 圭介 (UEHARA, KEISUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50467320

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)：ヒト癌細胞株に対してTLR7アゴニストであるイミキモドは増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能の抑制効果を認め、投与12時間後にはearly apoptosisを認めた。イミキモド投与により小胞体ストレスのマーカーであるBiP(immunoglobulin heavy chain-binding protein)の発現が亢進しており、アポトーシスの原因として小胞体ストレスが考えられた。しかし、別な小胞体ストレスのマーカーであるPERK(PKR-like ER kinase)の発現は変化していなかった。更なる研究は必要であるが、TLR7の機能阻害による抗腫瘍効果の新たな作用機序を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、TLR7アゴニストであるイミキモドの抗腫瘍効果およびその作用機序として小胞体ストレスによるアポトーシスの関与を明らかにした。新たな知見が明らかになっただけでなく、臨床応用への可能性も示唆されており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Imiquimod, a TLR7 agonist, suppressed proliferation, motility and invasion and induced cell death in a human cancer cell line (DLD1, KLM1, Panc1 and HuCCT1). The cell morphology was different in each cancer cell line after imiquimod treatment. In addition, imiquimod induced early apoptosis in the cancer cell lines after 12 hours of treatment. Immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP), which is a marker of endoplasmic reticulum stress, was highly expressed in cancer cells after imiquimod treatment. Therefore, endoplasmic reticulum stress was considered a cause of imiquimod-induced apoptosis. However, the expression of PKR-like ER kinase (PERK), which is another marker of endoplasmic reticulum stress, did not change. This result suggested that a mechanism different from endoplasmic reticulum stress was involved in imiquimod-induced apoptosis. Further investigations will be required for clinical applications.

研究分野：消化器外科学

キーワード：TLR7 Danger signal

1. 研究開始当初の背景

炎症は外部刺激に対する生体反応の1つであり、多くの生体现象との関与が報告されている。炎症が癌の増殖、浸潤、転移などに関与すると報告も散見され、発癌に関しても炎症シグナルである Myd88, NF- κ B などの関与が報告されている。我々は大腸癌周囲に存在する microabscess (微小膿瘍) が予後に関連していることを報告しており、これまで炎症と癌に関する研究を行ってきた。平成 22 年-24 年度科学研究費「大腸癌 microscopic abscess における免疫誘導の解明とその臨床応用」において、大腸癌 microabscess (微小膿瘍) を有する症例において癌特異的に TLR (Toll like receptor) 7 の高発現を明らかにしている。TLR7 は、主に免疫細胞である形質細胞で発現しており、感染に対する防御機構において、IFN、IL-1 などサイトカイン産生や樹状細胞など抗原提示能の増強および獲得免疫誘導などに重要な役を果たしている。Danger signal は炎症を誘導、増強する外部からの刺激のことである。TLR7 はこの Danger signal との関与が報告されている。Danger signal は外因性 Danger signal (感染による病原体成分) と内因性 Danger signal (死細胞から放出される成分) に分けられ、内因性 Danger signal から誘導される非感染性炎症は、感染性炎症と区別され自然炎症と定義されている。内因性 Danger signal と癌に関しては、癌浸潤による組織破壊により周囲組織から内因性 Danger Signal が生じ、免疫応答をおこし、癌の進展に影響するという報告がされている。しかし内因性 Danger Signal のメカニズムは明らかになっていない。我々は平成 25 年-27 年度科学研究費「TLR7 アプタマーによる内因性 Danger Signal の制御と新規治療法の開発」において大腸癌での内因性 Danger Signal と TLR7 の関連性に関する研究を行なった。その結果、大腸癌において TLR7 の機能阻害による増殖抑制が可能であり、大腸癌における TLR7 の内因性 Danger signal 制御の可能性を明らかにしている。TLR7 の機能阻害は内因性 Danger signal 制御による新規癌治療法になると考えられる。

TLR7 の機能を阻害する医薬としては、核酸医薬、抗体医薬、小分子化合物がある。核酸医薬に関してはドラッグデリバリーシステムの開発が不十分であり、早期臨床応用は困難である。また抗体医薬に関しても、開発に時間とコストがかかり早期臨床応用は困難である。早期臨床応用が可能な創薬としては小分子化合物である TLR7 阻害剤と考え、これまで TLR7 阻害剤による新規癌治療法も開発をおこなってきた。しかし TLR7 阻害剤による新規癌治療法の臨床応用について、いくつか解明しなければならないことがある。TLR7 自体がどのように癌の増殖能などに関わっているのか、TLR7 の機能阻害による抗腫瘍効果の詳細なメカニズムがなにか明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌における TLR7 の機能阻害による抗腫瘍効果の詳細なメカニズムを明らかにし、最終的に TLR7 を標的にした新規癌治療法の開発、臨床応用により治療成績を向上させることである。

3. 研究の方法

【TLR7 阻害剤による抗腫瘍効果の検討】

ヒト大腸癌細胞株 (DLD1)、ヒト膵癌細胞株 (KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株 (HuCCT1) に対して TLR7 アゴニストであるイミキモドを 10、5、2.5、1.25、0.6 μ M または ODN20958 を 0.1 μ

M、0.05 μ M、0.01 μ Mにて投与し、非投与と各濃度において投与前、投与後24、48時間後の増殖能をMTTアッセイにて経時的に検討した。

ヒト大腸癌細胞株(DLD1)、ヒト膵癌細胞株(KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株(HuCCCT1)に対してイミキモドを10、5、2.5、1.25、0.6 μ MまたはODN20958を0.1 μ M、0.05 μ M、0.01 μ Mにて投与し、非投与と各濃度において投与24時間後の細胞死誘導能についてトリパンプルー色素排出試験にて検討した。

ヒト大腸癌細胞株(DLD1)、ヒト膵癌細胞株(KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株(HuCCCT1)に対してイミキモドを10、5、2.5、1.25、0.6 μ MまたはODN20958を0.1 μ M、0.05 μ M、0.01 μ Mにて投与し、24時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

【TLR7阻害剤による抗腫瘍効果の詳細なメカニズムの解明】

ヒト大腸癌細胞株(DLD1)、ヒト膵癌細胞株(KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株(HuCCCT1)に対してイミキモドを10、5、2.5、1.25、0.6 μ MまたはODN20958を0.1 μ M、0.05 μ M、0.01 μ Mにて投与し、経時的な形態の変化、アポトーシス誘導能について検討した。

アクチンの蛍光染色により細胞形態、特に細胞骨格を観察したアポトーシスについてはTUNEL法およびMuseTM Annexin V & Dead Cell kitを用いて検討した。

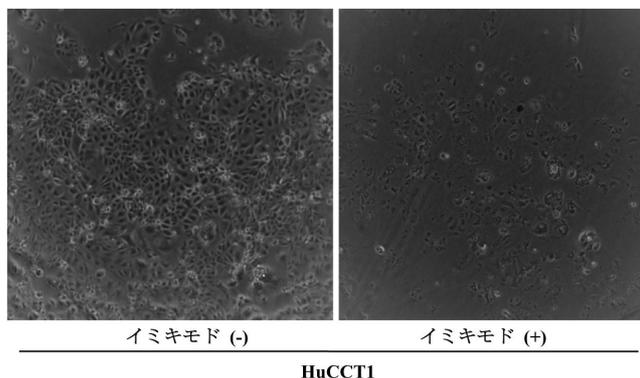
ヒト胆管癌由来細胞株(HuCCCT1)に対して、イミキモド5、2、1 μ Mを投与し、非投与群と各投与群の投与後のPERK(PKR-like ER kinase)タンパクおよびBiP(immunoglobulin heavy chain-binding protein)タンパクの発現をウェスタンブロッティングにて検討した。

4. 研究成果

【TLR7阻害剤による抗腫瘍効果の検討】

ヒト大腸癌細胞株(DLD1)、ヒト膵癌細胞株(KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株(HuCCCT1)に対してTLR7アゴニストであるイミキモドを10、5、2.5、1.25、0.6 μ MまたはODN20958を0.1 μ M、0.05 μ M、0.01 μ Mにて投与し、増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能について検討した。増殖能に関して、イミキモドはいずれの細胞株においても未治療群と比較してイミキモド10から1 μ Mにて増殖抑制効果を認めた。細胞死誘導能に関して、いずれの細胞株においてもイミキモド10から1 μ Mにて細胞死の誘導が亢進されており、HuCCCT1に関しては細胞死の誘導が有意に亢進していた(図1)。

図1



また、いずれの細胞株においても、イミキモド 5 μM において運動能、浸潤能において抑制効果を認めた。イミキモドが癌細胞に対して増殖抑制以外の抗腫瘍効果を有していることが明らかになった。

一方、ODN20958 は 0.5 μM から 0.05 μM にて増殖抑制効果と細胞死の誘導効果を認めたが、運動能、浸潤能については十分な抑制効果を確認することができなかった。ODN20958 の有効とされる濃度は 0.5 μM から 0.05 μM であったが、HuCC11 に関してはそれより低濃度での効果を認めた。TLR7 の機能障害が癌の増殖抑制に関与していることが明らかになった。

【TLR7 阻害剤による抗腫瘍効果の詳細なメカニズムの解明】

ヒト大腸癌細胞株 (DLD1)、ヒト膵癌細胞株 (KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株 (HuCC11) に対してイミキモドを 10、5、2.5、1.25、0.6 μM または ODN20958 を 0.1 μM 、0.05 μM 、0.01 μM にて投与し、経時的な形態の変化、アポトーシス誘導能について検討した。

経時的な形態の変化について、胆管癌細胞株 (HuCC11) は 5 μM で投与 1 日目、2.5 μM で投与 3 日目に、ヒト大腸癌細胞株 (DLD1) は 10 μM で投与 1 日目、5 μM で投与 3 日目に形態の変化を認めた。一方で、ヒト膵癌細胞株 (KLM1、Panc1) は 10 μM で投与 1 日目に軽度の形態変化を認めたが、投与 3 日目以降でも形態の大きな変化を認めなかった。

アポトーシス誘導能について、ヒト胆管癌細胞株 (HuCC11)、ヒト大腸癌細胞株 (DLD1)、ヒト膵癌細胞株 (KLM1、Panc1) において、イミキモド 5 μM の投与 48 時間後にアポトーシスを認めた。

ヒト大腸癌細胞株 (DLD1)、ヒト膵癌細胞株 (KLM1、Panc1)、ヒト胆管癌細胞株 (HuCC11) に対してイミキモドを 10、5、2.5、1.25、0.6 μM を投与し、蛍光染色による細胞死の過程の経時的な観察および Muse Annexin V & Dead Cell kit を用いてアポトーシス誘導能についても検討した。TUNEL 法ではイミキモド 5 μM の投与により 48 時間後にアポトーシスを認めていたが、Muse Annexin V & Dead Cell kit では投与 12 時間後に early apoptosis が出現していた。

アポトーシスの原因として小胞体ストレスの関与を考えた。ヒト胆管癌細胞株 (HuCC11) に対してイミキモドを 5、2、1 μM を投与し、非投与群と各投与群における小胞体ストレスのマーカーである PERK (PKR-like ER kinase) および BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein) の発現について検討した。PERK の発現はイミキモド投与によって変化しなかったが、BiP はイミキモド 5 μM の投与により発現が亢進していた。TLR7 阻害による細胞死が小胞体ストレスである可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榑野 正人

ローマ字氏名：(NAGINO,masato)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20237564

研究分担者氏名：横山 幸浩

ローマ字氏名：(YOKOYAMA,yukihiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 80378091

研究分担者氏名：國料 俊男

ローマ字氏名：(KOKURYO,toshio)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 60378023

研究分担者氏名：山口 淳平

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI,junpei)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00566987

(2)研究協力者

なし