

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月30日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790775

研究課題名（和文）SOCS分子を用いた悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of SOCS gene therapy for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

岩堀 幸太（IWAHORI KOTA）

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：80566448

研究成果の概要（和文）：

申請者は SOCS アデノウイルスベクターが悪性胸膜中皮腫に対して様々なメカニズムで抗腫瘍効果を発揮することを明らかにし、さらに従来の抗癌剤（悪性胸膜中皮腫に対する標準治療であるシスプラチンとペメトレキシド）との併用によって相乗的な抗腫瘍効果が得られることを示した。本研究における悪性胸膜中皮腫に対する SOCS アデノウイルスベクターの胸腔内投与モデルは悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療として実地臨床への応用が期待される成果である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed suppressor of cytokine signalling (SOCS) gene therapy, which targets multiple signaling, for the treatment of mesothelioma. Specifically, we demonstrated that SOCS gene delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed, the first line chemotherapy of this disease, to inhibit tumor growth of mesothelioma in vitro and in vivo. This study provides new insights into the clinical application of SOCS-1 gene therapy for the treatment of mesothelioma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、遺伝子治療、SOCS

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、そのほとんどがアスベストの吸引により発生することが知られており、アスベスト鉱山労働者やアスベストを扱う労働者に限らず、鉱山や工場周辺の住民にも発生していることが報告されている。悪性胸膜中皮腫は、アスベストに曝露してから発症するまでの期間が長いのが特徴で、最

で20年前後、平均で約40年程度かかることが知られている。我が国においては1970年頃に石綿輸入がピークとなっており、2030年頃には悪性胸膜中皮腫による死亡者数がピークに達すると予測されている。

悪性胸膜中皮腫は胸膜から発生する腫瘍であるため、解剖学的に肺癌などと比べて画像検査にて早期に発見することが困難であ

り、外科的切除が困難であることが多い。化学療法については現在シスプラチンとペメトレキシドの併用療法が標準的であるが、生存期間中央値は約 12 ヶ月であり、新規治療法の開発が緊急の課題となっている。

SOCS (suppressor of cytokine signaling) は細胞内情報伝達の負の制御因子として申請者の研究室で世界に先駆けてクローニングされた分子である (Naka T *et al.*, Nature 1997)。近年、SOCS 分子が様々な悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。また、様々な悪性腫瘍において SOCS 遺伝子がメチル化により発現抑制されており、それが癌化と関係していることも報告されている (Yoshikawa *et al.*, Nature genetics 2001, He *et al.*, PNAS 2003)。SOCS 分子が制御する細胞内シグナル伝達経路として IL-6/JAK/STAT シグナル伝達経路が知られている。IL-6/JAK/STAT 系の活性化は癌化にかかわっていることが報告されており、申請者は複数の悪性胸膜中皮腫細胞株において IL-6/JAK/STAT 系が亢進していることを見出した。さらに中皮腫において SOCS がこれらのシグナルを抑制し、抗腫瘍効果を示すことも明らかにした。また、SOCS は FAK (focal adhesion kinase) の活性化を抑制することも報告されている (Niwa *et al.*, Oncogene 2005)。FAK は癌の浸潤、転移にかかわっていることが知られている分子であり癌治療の標的分子の一つとして注目されている。その他に申請者は SOCS によって p53 の発現が亢進することも見出した。さらに、このメカニズムには IL-6/JAK/STAT 系以外のシグナルがかかわっていることを明らかにした。このように SOCS は癌にかかわる複数のシグナルを抑制することから、癌に対する治療分子として有望であると考えられる。そのため申請者はこれまでの研究成果をふまえて、SOCS を用いた悪性胸膜中皮腫に対する治療法の開発を目指すこととした。

悪性胸膜中皮腫に対する標準治療として現在シスプラチンとペメトレキシドの併用療法最も有効とされているが、生存期間中央値は約 12 ヶ月であり根治は望み難いのが現状である。SOCS は癌にかかわる複数のシグナルを抑制することから、抗癌剤との併用により相乗的な治療効果を発揮する可能性がある。

申請者は SOCS を悪性胸膜中皮腫の治療分子として用いるにあたり、蛋白質、遺伝子、低分子それぞれについて検討した結果、遺伝子を用いる方法が最も効率が良いことを見出した。悪性胸膜中皮腫の臨床的特徴として、胸腔内局所で進行するが遠隔転移をしにくいという性質がある。そのため、米国では悪性胸膜中皮腫に対して胸腔内投与による遺伝子治療についての臨床試験が行われてい

る (Sterman DH *et al.*, Clin Cancer Res 2005, Sterman DH *et al.*, Clin Cancer Res 2007)。悪性胸膜中皮腫における胸腔内局所投与は治療分子を効率的に腫瘍に送達できるのに加え、全身投与と比べて副作用を少なくできるという利点もあるため、悪性胸膜中皮腫に対する胸腔内投与による SOCS を用いた遺伝子治療は有望であると期待される。

2. 研究の目的

本研究では SOCS を用いた悪性胸膜中皮腫に対する治療法として SOCS 遺伝子の胸腔内局所投与による遺伝子治療を確立することを目標とする。さらに、SOCS 遺伝子治療と現在の標準的な化学療法であるシスプラチンとペメトレキシドを用いた抗癌剤との併用による相乗効果についても検討し、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

悪性胸膜中皮腫細胞株 (MESO-4, H226, H-28) について *in vitro* で SOCS をアデノウイルスベクター (AdSOCS) を用いて導入し、抗腫瘍効果を MTT アッセイにて確認した。これらの細胞株に AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群との間の抗腫瘍効果の比較、及び、アポトーシスの誘導効率、細胞浸潤抑制効果について、それぞれ MTT アッセイ法と AnnexinV/7-AAD 染色を用いた FACS 解析、invasion assay により *in vitro* で解析した。AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群との間における FAK のリン酸化及びトータルタンパク質の発現抑制についてウェスタンブロット法にて解析した。次に、AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed 併用投与による抗腫瘍効果の相乗効果についてアポトーシス誘導に焦点を絞り、AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群との間における抗アポトーシスタンパク質である XIAP, Survivin, FLIP の発現の変化もウェスタンブロットで解析し、AKT, FAK のリン酸化、トータルタンパク質の発現をウェスタンブロットで解析した。AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用併用投与による活性型 caspase-3, 活性型 caspase-8, 活性型 caspase-9 の発現をウェスタンブロット法により確認した。また、AKT, FAK, Src, STAT3 について、活性型 caspase-3 により認識されて分解されるかどうかについて、細胞より抽出したタンパク質に対して組み換え caspase-3 を添加し、caspase-3 の基質になる分子を探索した。

AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+

Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群において、MESO-4 細胞における、STAT-3 と NF・B の転写活性を解析した。

まず、MESO-4 細胞を TNF- α で刺激し、ウェスタンブロット法で NF・B の核内移行について確認した。また、AdSOCS およびによる NF・B の核内移行の抑制と、NF・B のリン酸化状態をウェスタンブロットで確認した。続いて、AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+ Pemetrexed 併用投与群における MESO-4 細胞の STAT3(Y705) のリン酸化について、ウェスタンブロットで確認した。さらに、MESO-4 に対し、NF・B および、STAT3 を siRNA で発現抑制した際に、抗アポトーシスタンパク質である Survivin , XIAP, FLIP の発現変動をウェスタンブロットで確認した。

次に、AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群における MESO-4 細胞での NF・B および STAT3 の DNA 結合アッセイとルシフェラーゼアッセイを行った。

3x10⁶ 個の MESO4 細胞、および H226 細胞を ICR-nu/nu マウスの胸腔内に移植した悪性胸膜中皮腫モデルマウスを作成し、AdLacZ+PBS、AdSOCS+PBS、AdLacZ+Cisplatin+ Pemetrexed、AdSOCS+Cisplatin+ Pemetrexed 投与の 4 群について腫瘍重量を解析することで *in vivo* での SOCS と抗癌剤との併用療法の相乗効果を解析した。

4. 研究成果

アデノウイルスベクターを用いて SOCS を様々な悪性胸膜中皮腫細胞株に導入した結果、AdSOCS はコントロールの AdLacZ 処理群と比べ、MESO4, H226, H28 の増殖を著明に抑制した(図. 1)。また、SOCS はこれらの細胞に対して単独投与でも抗腫瘍効果を示すが、Cisplatin と Pemetrexed と併用投与した結果、単独投与よりも優れた抗腫瘍効果を示した(図. 2)。これらの条件でのアポトーシスの誘導を解析するため、7-AAD/AnnexinV 染色後、FACS にて解析した結果、全ての細胞において、SOCS はコントロール群に比べ、Cisplatin と Pemetrexed と併用することでアポトーシスを有意に強く誘導した(図. 3)。SOCS による悪性胸膜中皮腫細胞 (MESO4, H28, H226) の浸潤に対する抑制作用を調べた結果、AdSOCS 処理群では AdLacZ 処理群よりも有意に細胞の浸潤を抑制し、さらに Cisplatin+Pemetrexed と組み合わせることによっても有意な細胞浸潤の抑制効果の増強が認められた(図. 4)。

図. 1

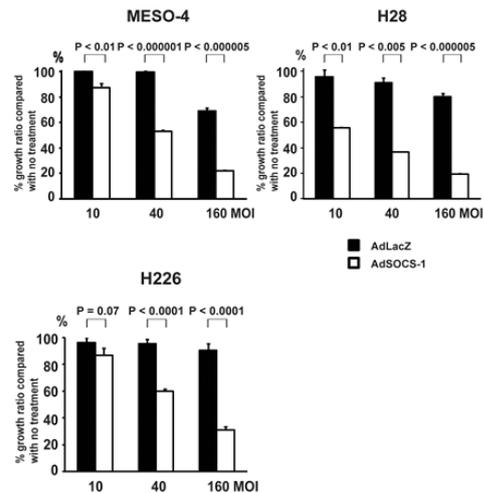


図. 2

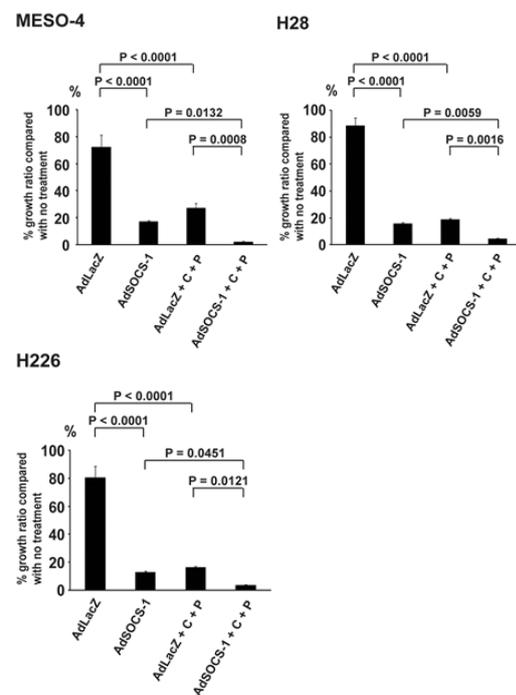
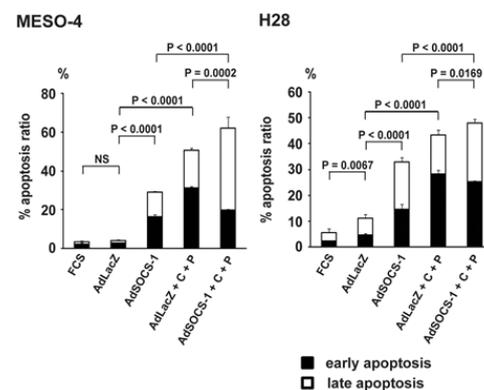


図. 3



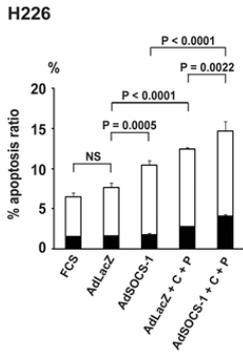
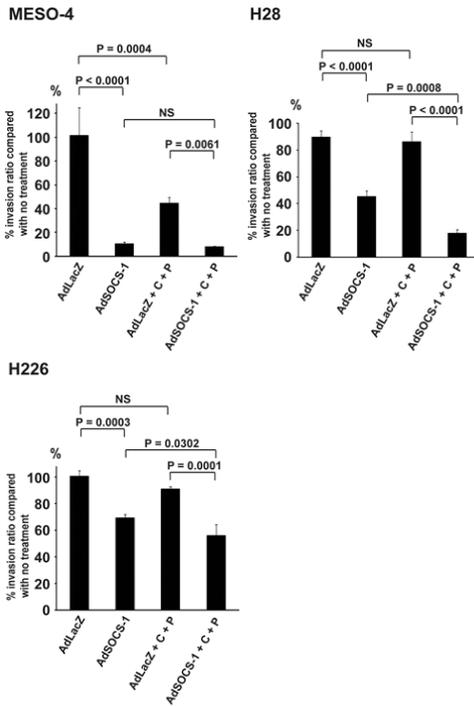


図. 4



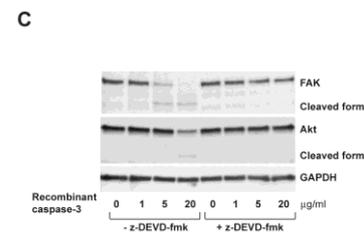
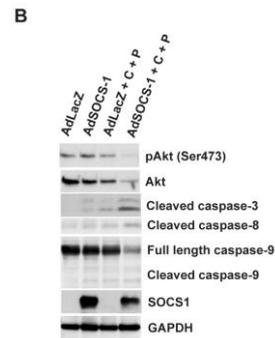
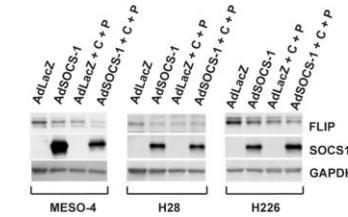
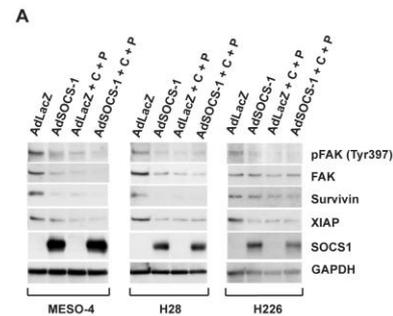
AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed の組合せによる抗腫瘍効果の分子機序を解明するため、悪性胸膜中皮腫細胞 (MESO4, H28, H226) に対して FAK (pY397)、トータル FAK の発現をウェスタンブロットで確認した結果、コントロール群と比較し、AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed の組合せは FAK (pY397) のリン酸化の減少とトータル FAK の発現低下を示した (図. 5A)。さらに、抗アポトーシス蛋白質である XIAP と Survivin の発現変化についてウェスタンブロットで解析した結果、コントロール群と比較し、AdSOCS 単独投与群、AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群はともに XIAP と Survivin の発現を減少させることが明らかとなった (図. 5A)。

MESO-4 細胞において、AdSOCS 処理群ではアポトーシス関連タンパク質である、cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9 の全ての発現を誘導したが、Cisplatin+Pemetrexed と併用することでこれらの活性型 caspase の発現上昇が認め

られた (図. 5B)。AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed の併用投与は AKT のリン酸化の減少と、AKT タンパク質の発現低下が認められた (図. 5B)。

また、AKT, FAK について、活性型 caspase-3 により認識されることにより分解されるかどうかについて調べるため、MESO-4 細胞より抽出したタンパク質に対して組み換え caspase-3 を添加し、caspase-3 の基質になる分子をウェスタンブロット法にて解析した結果、AKT と FAK が caspase-3 により分解される事が明らかになった (図. 5C)。

図. 5



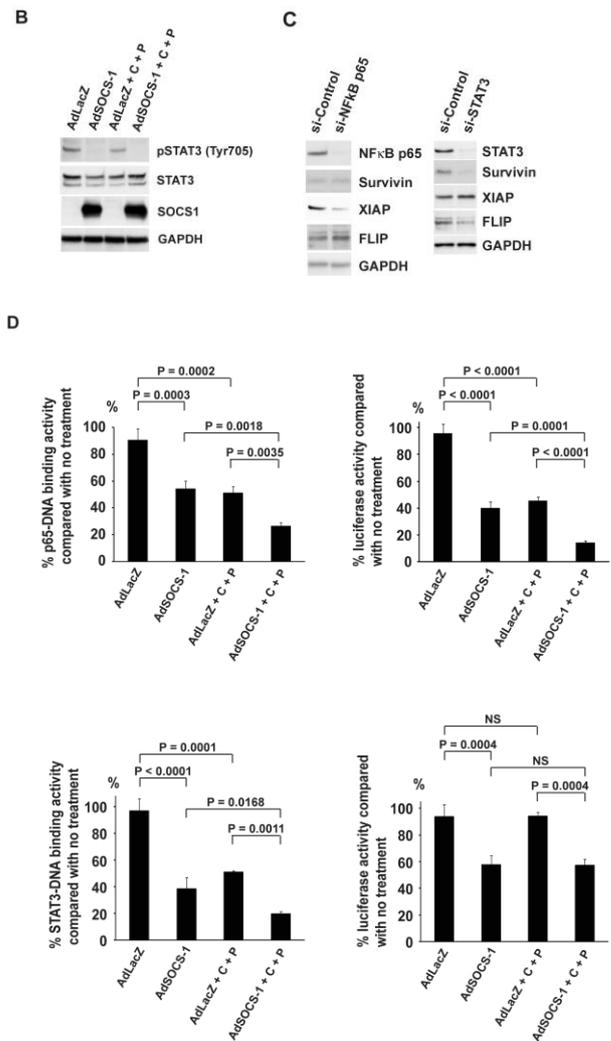
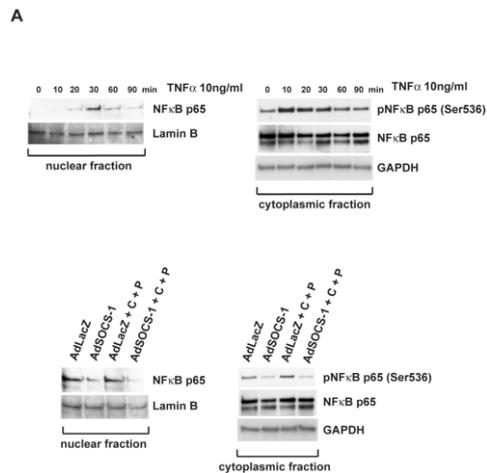
AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群において、MESO-4 細胞における、STAT-3 と NF- κ B の転写活性を解析した。MESO-4 細胞を TNF- α で

刺激し、ウェスタンブロット法で NF- κ B の核内移行について経時変化を調べた結果、刺激後 30 分に核内への以降が最大に達することが判明した(図. 6A)。TNF- α で刺激による NF- κ B の核内移行と NF- κ B のリン酸化状態は AdSOCS および AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群において抑制された(図. 6A)。MESO-4 細胞の STAT3(Y705)の持続的リン酸化は AdLacZ 投与群や AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+ Pemetrexed 併用投与群と比べ、AdSOCS や AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群にて抑制された(図. 6B)。

さらに、MESO-4 に対し、NF- κ B および、STAT3 を siRNA で発現抑制した際に、抗アポトーシスタンパク質である Survivin, XIAP, FLIP の発現変動をウェスタンブロットで調べた結果、XIAP の発現は NF- κ B の発現抑制により、FLIP と Survivin の発現は STAT3 の発現抑制により減少する事が明らかになった(図. 6C)。

次に、AdLacZ 投与群、AdSOCS 投与群、AdLacZ+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群、AdSOCS+Cisplatin+Pemetrexed 併用投与群における MESO-4 細胞での NF- κ B および STAT3 の DNA 結合アッセイとルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、AdSOCS は Cisplatin+Pemetrexed と組み合わせることにより NF- κ B p65 の DNA 結合能力を相加的に低下させる、ルシフェラーゼ活性についても同様の結果が得られた。STAT3 に関して、AdSOCS は Cisplatin+Pemetrexed と組み合わせることにより STAT3 の DNA 結合能力を相加的に抑制した。STAT3 のルシフェラーゼ活性について AdSOCS は Cisplatin+Pemetrexed と組み合わせることによる相加的な作用は見られなかったが、Cisplatin+Pemetrexed 処理により STAT3 のルシフェラーゼの抑制活性が全く認められないためであり、STAT3 のルシフェラーゼアッセイのコンストラクトについて条件を検討する必要もあると考えられる(図. 6D)。

図. 6



AdSOCS を Cisplatin+Pemetrexed と併用投与することで、AdSOCS 単独投与よりも優れた抗腫瘍効果を示すことを *in vivo* で明らかにするため、 3×10^6 個の MESO-4 細胞を ICR-nu/nu マウスの胸腔内に移植することで悪性胸膜中皮腫モデルマウスを作成した。そして、移植後 7 日目から図 7 に示すようなスケジュールで抗癌剤の投与を開始し、腫瘍重量を計測することで抗腫瘍効果を解析した結果、AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed の投与を組み合わせることにより、*in vivo* における癌細胞の増殖抑制に対し相乗効果が認められた(図. 8A, 8B)。このとき、AdSOCS や AdSOCS と Cisplatin+Pemetrexed を投与した群においては腫瘍内でアポトーシスが起きていることを Tunel 法により明らかにした。

図. 7

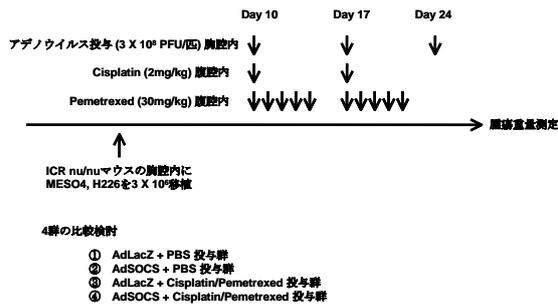
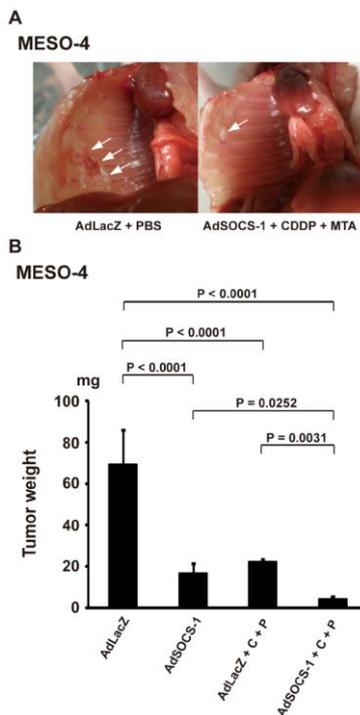


図. 8



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2件)

- ① Souma Y, Nishida T, Serada S, Iwahori K, Takahashi T, Fujimoto M, Ripley B, Nakajima K, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y, Sawa Y, Naka T.
Anti-proliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells.
Int J Cancer. 2011 In press. 査読有
DOI;10.1002/ijc.27350.
- ② Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T.
Overexpression of SOCS3 exhibits

preclinical antitumor activity against malignant pleura esothelioma.
Int J Cancer. 2011;129(4):1005-17. 査読有
DOI;10.1002/ijc.25716

[学会発表] (計2件)

- ① Kota Iwahori, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Hiroyuki Mizuguchi, Tetsuji Naka.
SOCS1 gene delivery, in combination with pemetrexed and cisplatin treatment, enhances therapeutic efficacy in malignant mesothelioma.
第17回日本遺伝子治療学会学術集会
2011年7月15日 福岡
- ② Iwahori K, Serada S, Shimada K, Suzuki H, Hirashima T, Kawase I, Naka T.
SOCS-3 protein exhibits activity in malignant pleural mesothelioma.
The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. 2010.9.2. Kyoto, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/news/2010/10/000033.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩堀 幸太 (IWAHORI KOTA)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：80566448