

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300350

研究課題名(和文)がん微小環境の炎症性サイトカインIL-1による血管新生と転移の機序とその制御

研究課題名(英文)The critical role of an inflammatory cytokine IL-1 in tumor microenvironment on regulation of tumor angiogenesis and metastasis

研究代表者

小野 真弓(Ono, Mayumi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80128347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円、(間接経費) 5,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年炎症とがん悪性進展との関連が注目されている。本研究では炎症性サイトカインIL-1を高発現している高転移能肺癌細胞株と同じ親株より樹立された低転移株の比較検討により、IL-1がマクロファージの浸潤とがん促進マクロファージへの分化誘導を介してがん血管・リンパ管新生を誘導し、がん細胞のリンパ節転移を促進することを明らかにした。さらにIL-1/IL-1Rシグナルを標的とした薬剤が高転移能肺癌細胞株のがん血管・リンパ管新生及びリンパ節転移を著明に抑制することを示した。以上の結果よりがん微小環境におけるIL-1/IL-1Rシグナルは、がん血管・リンパ管新生及び転移の有用な治療標的となることを示した。

研究成果の概要(英文)：Recently it is highlighted that inflammation is closely linked to tumor progression. In this study we demonstrate that IL-1 promotes tumor angiogenesis and lymphangiogenesis through infiltration of tumor supporting macrophages expressing angiogenic and lymphangiogenic factors, resulting in lymph node metastasis of lung cancer cells by comparing highly metastatic human lung cancer cell line expressing higher IL-1 α with its low metastatic counterpart expressing lower IL-1 α . Furthermore, we also demonstrate that IL-1/IL-1R-targeted drug significantly suppresses tumor angiogenesis, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis. IL-1/IL-1R may thus play crucial roles in malignant progression by lung cancer cells, and the therapeutic efficacy of IL-1R-targeted drugs may lead to an alternative novel strategy to treat lymph node metastasis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：炎症 血管新生 リンパ管新生 IL-1 リンパ節転移 マクロファージ VEGF-A VEGF-C

1. 研究開始当初の背景

炎症は胃癌、子宮頸癌、肝癌などをはじめ多くのがんの発症から進展に深く関与し、さらにはがん血管新生と深く関与することが多大の注目を集めている。世界中でがんと炎症に関する研究が活発に行われているが、未だ炎症を標的とした有効ながん治療法は確立されていない。そのため炎症のがん悪性進展への関与機序を解明し、治療標的を創出することは重要な課題となっている。インターロイキン-1 (IL-1) はがんの増大や浸潤/転移に深く関与する代表的な炎症性サイトカインである。我々はこれまでに世界に先駆けて IL-1 をはじめとした炎症が血管・リンパ管新生を誘導することを報告している。さらに IL-1 ががん間質にマクロファージや好中球を集積させ、がんの悪性進展に最適な微小環境を形成することを報告している。以上の背景より、IL-1 とその受容体 (IL-1R) のがん転移に深く関連するがん血管・リンパ管新生への関与機序を明らかにし、新規のがん血管・リンパ管新生を標的としたがん治療の基盤を創出することが重要であると考えた。

2. 研究の目的

- (1) がんの血管・リンパ管新生や高転移能の獲得における代表的な炎症性サイトカイン IL-1/IL-1R シグナルの関与機序を明らかにする。
- (2) IL-1/IL-1R シグナルやそれに関連する因子の中から、がん血管・リンパ管新生やがん転移に関与するメカニズムを基盤にした新規血管・リンパ管新生阻害薬の開発を進める。

3. 研究の方法

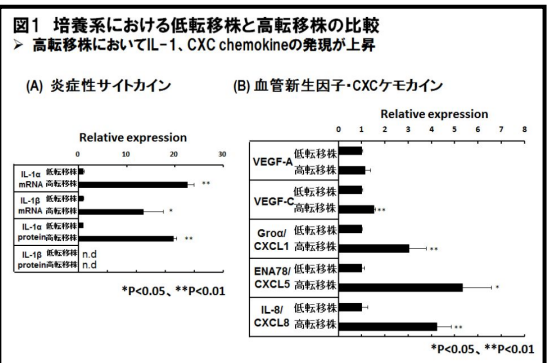
- (1) 高転移性肺癌細胞株と低転移性肺癌細胞株の樹立：高転移性肺癌細胞株と低転移性肺癌細胞株は名古屋大学高橋隆教授よりご提供いただいた。樹立方法は、ヒト肺癌細胞をマウスの皮下に移植し、肺・リンパ節へと転移しなかった細胞株を低転移性肺癌細胞株とした。肺へと転移した転移巣からがん細胞を採取することを2回繰り返し、その後その細胞を皮下移植しリンパ節へと転移した転移巣から採取した細胞を高転移性肺癌細胞株とした。
- (2) 皮下移植実験： 1.0×10^6 個の細胞株を 100 μ L の無血清 RPMI 1640 培地に懸濁し、KSN ノードマウスの右腹壁部の皮下に移植した。IL-1R アンタゴニスト (IL-1Ra) は移植初日より連日皮下投与を行った。移植後は、週2回、測径器で腫瘍径を測定し、次のような計算式にて腫瘍体積を算出した；体積 = 長径 \times 短径² \times 0.5。35日後に腫瘍、リンパ節を回収した。
- (3) 腫瘍内マクロファージの単離：コラゲナ

ーゼにより皮下移植腫瘍を細胞ごとに分離し、磁気ビーズ標識 CD11b 抗体により腫瘍内よりマクロファージを単離した。単離した細胞はマクロファージ特異的マーカーである F4/80 抗体を用いた FACS により 70% 以上がマクロファージであることを確認した。

- (4) ヒト肺癌細胞株とマウス腹腔内マクロファージの共培養実験：マウス腹腔内マクロファージを回収後、通常培養条件下で 24 時間培養し、ヒト肺癌細胞株 2.5×10^4 個とマクロファージ 2.0×10^5 個を 10% FBS RPMI 1640 培地中、35mm dish に播種した。翌日、IL-1Ra 50ng/mL の入った培地に置換し、さらに 72 時間培養した。その後、RNA を回収し、real time RT-PCR 法を用いて mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

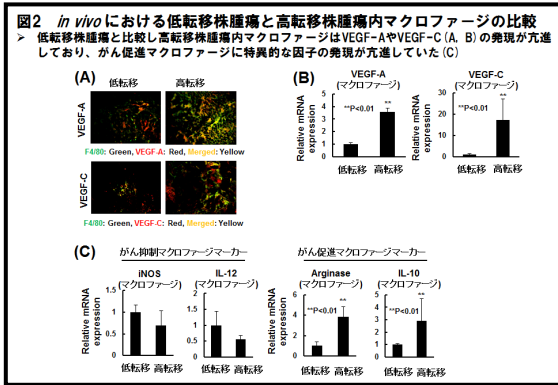
- (1) 高転移性肺癌細胞株と低転移性肺癌細胞株間で遺伝子発現やタンパク質発現を対比したところ、高転移性肺癌細胞株で IL-1 の発現亢進が観察された (図 1)。さらにマクロファージ走化性因子である CXC ケモカイン (CXCL1/Gro α 、CXCL5/ENA78、CXCL8/IL-8) の発現亢進がみられた (図 1)。細胞内シグナルにおいては、炎症性シグナルである COX-2 や NF- κ B シグナルの亢進を観察した。しかしながら血管・リンパ管新生因子である VEGF-A や VEGF-C の発現量に大きな差は見られなかった (図 1)。



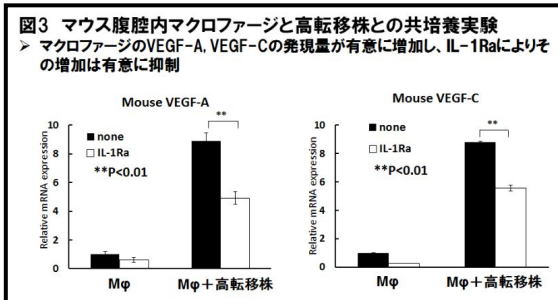
- (2) in vivo の系で高転移株腫瘍では腫瘍体積や腫瘍内血管・リンパ管新生密度、マクロファージ浸潤数、リンパ節転移が低転移株腫瘍に比べ有意に増加していた。また腫瘍内における間質細胞由来 VEGF-A や VEGF-C の発現上昇が観察された。しかし、がん細胞由来の VEGF-A や VEGF-C の著明な発現上昇は観察されなかった。
- (3) 間質細胞由来の VEGF-A や VEGF-C がどの細胞により産生されているかを検討するため、抗ヒト及びマウス VEGF-A 及び VEGF-C 抗体を用いて腫瘍組織切片の免疫染色を行ったところ、高転移株腫瘍内における VEGF-A 及び VEGF-C はマクロファ

ージ特異的なマーカーである F4/80 と共染された (図 2A)。

- (4) 磁気ビーズを用いて腫瘍内よりマクロファージを精製し、腫瘍内マクロファージにおける VEGF-A 及び VEGF-C の発現を qRT-PCR 法により比較したところ、高転移株腫瘍由来のマクロファージでこれらの因子の発現の増加が観察された (図 2B)。さらにこのマクロファージはがん促進マクロファージ特異的な因子 (Arginase, IL-10) の発現が増加しており、がん抑制的マクロファージ特異的な因子 (iNOS, IL-12) の発現が減少していた (図 2C)。

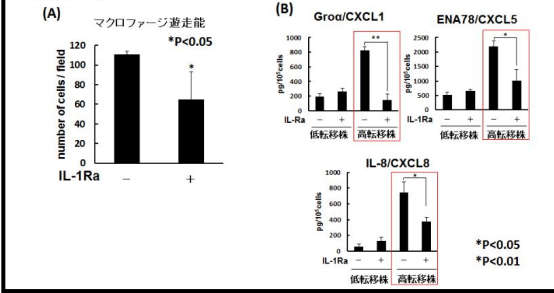


- (5) *in vitro* 系で高転移株とマクロファージの共培養により、マクロファージからの VEGF-A 及び VEGF-C の有意な発現量の増加が観察された。この時 IL-1R アンタゴニスト (IL-1Ra) の投薬によりこれらの発現増加が有意に抑制された (図 3)。

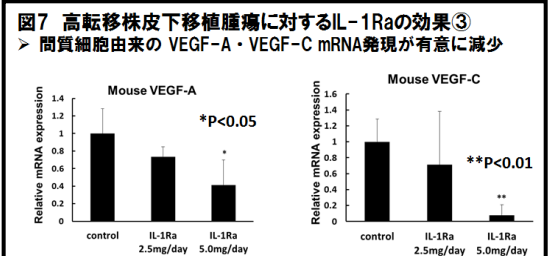
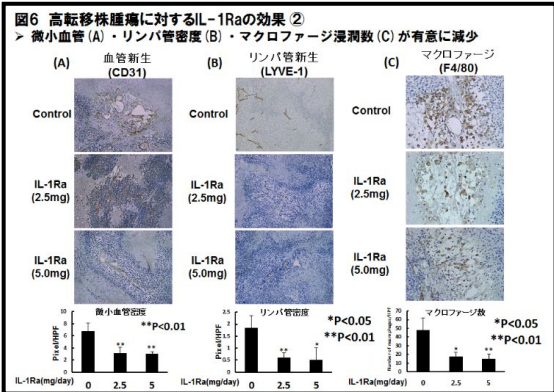
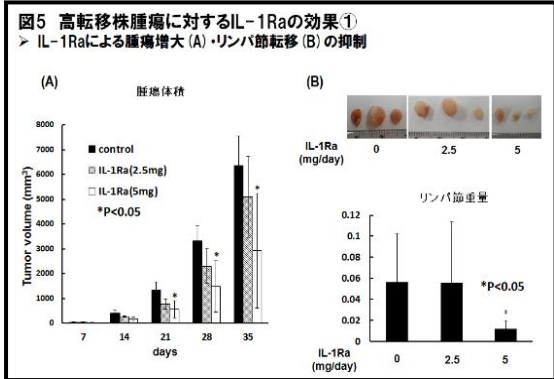


- (6) *in vitro* 系で高転移株誘導のマクロファージの遊走能は IL-1Ra 投薬により有意に抑制された。この時 IL-1Ra の投薬により高転移株のマクロファージ走化性因子である CXC ケモカイン (CXCL1/Gro、CXCL5/ENA78、CXCL8/IL-8) の発現が有意に抑制された (図 4)。

図4 IL-1Raにより高転移株誘導のマクロファージの遊走が阻害され
 (A)、高転移株におけるマクロファージ走化因子である CXC ケモカインの発現が抑制された (B)



- (7) IL-Ra 処理により高転移株の腫瘍増殖とリンパ節転移 (図 5)、腫瘍内血管・リンパ管密度、マクロファージ浸潤数 (図 6) が著明に抑制された。さらにはがん間質細胞由来の VEGFA、VEGF-C の発現抑制も観察された (図 7)。



以上の結果よりがん微小環境における IL-1/IL-1R シグナルを標的とした治療戦略は、マクロファージによる血管・リンパ管新生因子の産生とがん促進的な性質の獲得を抑制し、腫瘍内血管・リンパ管新生さらにリンパ節転移を抑制するために有用であるこ

とを示した。

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12件)

Watari, K.(1番目), Kage, M.(12番目), Ono, M.(14番目), et al. 計14名.
Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. PLoS ONE, 2014, in press, 査読有.
(doi:10.1371/journal.pone.0099568)

Murakami, Y.(1番目), Watari, K.(2番目), Ono, M.(11番目), et al. 計11名.
N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatory angiogenesis through JNK activation and autocrine loop of interleukin-1 by human gastric cancer cells. J Biol Chem., 288:25025-25037, 2013, 査読有.
(doi:10.1074/jbc.M113.472068)

Kanda, R.(1番目), Kage, M.(8番目), Ono, M.(12番目), et al. 計12名.
Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin α 1/Src/Akt-driven bypass signaling. Cancer Res., 73:6243-6253, 2013, 査読有.
(doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4502)

Jeong, D.(1番目), Watari, K.(2番目), Ono, M.(4番目), et al. 計10名.
Studies on lymphangiogenesis inhibitors from Korean and Japanese crude drugs. Biol. Pharm. Bull., 36: 152-157, 2013, 査読有.
(doi:10.1248/bpb.b12-00871)

Ureshino, H.(1番目), Kage, M.(6番目), Ono, M.(12番目), et al. 計12名.
N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes metastasis of human scirrhous gastric cancer cells through epithelial mesenchymal transition. PLoS ONE, 7: e41312, 2012, 査読有.
(doi:10.1371/journal.pone.0041312)

Azuma, K.(1番目), Ono, M.(10番目), Kage, M.(12番目), et al. 計16名.
NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. Journal of Thoracic Oncology. 7: 779-789, 2012, 査読有.
(doi:10.1097/JTO.0b013e31824c92b4)

Watari, K.(1番目), Nakamura, M.(2番目), Ono, M.(10番目), et al. 計10名.
The antitumor effect of a novel

angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- κ B pathway. International Journal of Cancer, 131: 310-321, 2012, 査読有.
(doi:10.1002/ijc.26356)

Garofalo, M.(1番目), Romano, G.(2番目), Ono, M.(12番目), et al. 計17名.
EGFR and MET receptor tyrosine kinase -altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. Nature Medicine, 18: 74-82, 2011, 査読有.
(doi:10.1038/nm.2577)

Fujiwara, T.(1番目), Fukushi, J.(2番目), Ono, M.(10番目), et al. 計16名.
Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. The American Journal of Pathology, 179: 1157-1170, 2011, 査読有.
(doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.034)

Akiba, J.(1番目), Kage, M.(11番目), Ono, M.(13番目), et al. 計14名.
N-myc downstream regulated gene1/Cap43 overexpression suppresses tumor growth by hepatic cancer cells through cell cycle arrest at the G₀/G₁ phase. Cancer Letters, 310: 25-34, 2011, 査読有.
(doi:10.1016/j.canlet.2011.05.034)

Kawahara, A.(1番目), Ono, M.(13番目), Kage, M.(14番目), et al. 計14名.
Nuclear expression of N-myc downstream regulated gene 1/ Ca²⁺-associated protein 43 is closely correlated with tumor angiogenesis and poor survival in patients with gastric cancer. Experimental and Therapeutic Medicine, 2: 471-479, 2011, 査読有.
(doi:10.3892/etm.2011.222)

Furuno, A.(1番目), Watari, K.(2番目), Ono, M.(6番目), et al. 計6名.
A natural anti-inflammatory enone fatty acid inhibits angiogenesis by attenuating nuclear factor- κ B signaling in vascular endothelial cells. Int J Oncol., 38: 493-501, 2011, 査読有.
(doi:10.3892/ijo.2010.856)

[学会発表](計21件)

Kosuke Watari, Masayoshi Kage, Mayumi Ono, et al.
Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis, and lymph node metastasis through activation of M2-type macrophages by lung cancer cells. AACR

Annual Meeting 2014, April 5th- 9th, 2014, San Diego, CA, USA

Tomohiro Shibata, Masayoshi Kage, Mayumi Ono, et al.
Y-box binding protein-1 YB-1 negatively regulates ER expression accompanying by enhanced HER2/ErbB2 expression in breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 5th- 9th, 2014, San Diego, CA, USA

柴田 智博、小野 眞弓、他。
がん細胞由来インターロイキン-1はマクロファージの活性化と腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移を促進する。第30回日本薬学会九州支部大会、2013年12月7日~8日、長崎県佐世保市

渡 公佑、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
NDRG1はマクロファージの修飾を介してがん血管新生を誘導する - NDRG1 deficiency suppresses tumor angiogenesis through interference of macrophage activation. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日~5日、神奈川県横浜市

柴田 智博、小野 眞弓、他。
肺癌のリンパ節転移機序 マクロファージのリンパ管新生への関与。第22回日本がん転移学会学術集会・総会、2013年7月11日-12日、長野県松本市

渡 公佑、小野 眞弓、他。
がん血管新生はN-myc downstream regulated gene-1(NDRG1)によって特異的に制御される。第22回日本がん転移学会学術集会・総会、2013年7月11日-12日、長野県松本市

藤原 稔史、小野 眞弓、他。
腫瘍関連マクロファージはユーイング肉腫の予後と関連する Macrophages infiltration associates with poor prognosis in Ewing sarcoma. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、北海道札幌市

柴田 智博、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
Interleukin-1 (IL-1)と下流シグナル活性化による肺癌のリンパ節転移亢進の機序と制御 Interleukin 1 promotes lymph node metastasis by lung cancer cells through modification of tumor stromal cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、北海道札幌市

渡 公佑、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)はがん血管新生に重要な役割をはたす Suppression of tumor angiogenesis and macrophage infiltration in N-myc

downstream regulated gene-1 (NDRG1)-deficient mice. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、北海道札幌市

村上 雄一、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
NDRG1は胃癌の血管新生をIL-1/AP-1を介して促進する NDRG1 promotes tumor angiogenesis through interleukin-1 (IL-1)/AP-1 activation pathway in human gastric cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、北海道札幌市

柴田 智博、小野 眞弓、他。
Interleukin-1 (IL-1)とその下流シグナルはヒト肺癌のリンパ管新生とリンパ節転移を促進する Interleukin 1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis by lung cancer cells. 第21回日本がん転移学会学術集会・総会、2012年7月12日-13日、広島県広島市

渡 公佑、小野 眞弓、他。
N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1)はがん血管新生に重要な役割をはたす NDRG1-deficient mice exhibit suppression of tumor angiogenesis and macrophage infiltration. 第21回日本がん転移学会学術集会・総会、2012年7月12日-13日、広島県広島市

藤原 稔史、小野 眞弓、他。
マクロファージの浸潤はヒトEwing肉腫の予後不良の予測因子である。第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012年6月27日-29日、福岡県北九州市

村上 雄一、小野 眞弓、他。
胃癌におけるNDRG1の血管新生促進作用にIL-1/Ap-1が関与する。第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012年6月27日-29日、福岡県北九州市

渡 公佑、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1)はがん血管新生に重要な役割をはたす。第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012年6月27日-29日、福岡県北九州市

柴田 智博、鹿毛 政義、小野 眞弓、他。
Interleukin-1 (IL-1)とその下流シグナルはヒト肺癌のリンパ管新生とリンパ節転移を促進する。第16回(平成24年度)日本がん分子標的治療学会学術集会、2012年6月27日-29日、福岡県北九州市

Mayumi Ono, Michihiko Kuwano, et al.
Sorting nexin 2 (SNX2) controls drug sensitivity to molecular targeted anticancer agents through membrane

trafficking of c-Met protein in cancer cell. AACR Annual Meeting 2012, March 31st - April 4th, 2012, Chicago, Illinois, USA

岡田 悠子、小野 眞弓、他.

Y-box binding protein-1は骨肉腫細胞の増殖を調節し、骨肉腫の臨床予後と関連する. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、愛知県名古屋市

嬉野 浩樹、鹿毛 政義、小野 眞弓、他. NDRG1によるヒト胃癌の転移促進へEMTが関与する. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、愛知県名古屋市

渡 公佑、鹿毛 政義、小野 眞弓、他. オクタヒドロナフタレン誘導体 AMF-26は VEGF受容体やNF- κ Bシグナルを阻害することにより腫瘍の増大を抑制する. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、愛知県名古屋市

²¹嬉野 浩樹、小野 眞弓、他. 胃癌の腹膜播種における上皮間葉移行 (EMT) への NDRG1 の関与. 第20回日本がん転移学会学術集会・総会、2011年6月30日-7月1日、静岡県浜松市

〔図書〕(計1件)

渡 公佑、小野 眞弓. 血管新生・血流正常化を標的としたがん治療. 最新がん薬物療法学 - がん薬物療法の最新知見 - 日本臨牀社, 日本臨牀 72 巻増刊号 2:66-71, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)
なし

取得状況 (計0件)
なし

〔その他〕

ホームページ
<http://shuyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 眞弓 (ONO Mayumi)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 80128347

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鹿毛 政義 (KAGE Masayoshi)
久留米大学・病理部・教授
研究者番号: 80148840