

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650586

研究課題名(和文)腫瘍由来のDNAを標的とする自然免疫応答の解析

研究課題名(英文)Analysis of the innate immune response to nucleic acids in tumor cells.

研究代表者

早川 清雄(HAYAKAWA, Sumio)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00368292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：パターン認識受容体は、ウイルスや細菌など病原体の細胞膜や鞭毛などを構成する糖やタンパク質、核酸などの分子パターンを感知し、下流のシグナル伝達経路を活性化することで、自然免疫応答を誘導し、病原体排除へと働く。本研究では、腫瘍細胞における核酸認識と自然免疫応答に関する経路を細胞レベルおよびマウスの個体レベルで検討した。腫瘍細胞に核酸処理を行うことは、組織特異性があるものの、効率よく自然免疫応答を活性化させ、同時に腫瘍細胞の細胞死(アポトーシス)を強く誘導させることができた。今後、さらに生化学的な視点から腫瘍と核酸の認識、自然免疫応答についての詳細を追求していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Pattern recognition receptors (PRRs)-mediated activation of the innate immune response is triggered by recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as a various bacterial cell wall components, peptidoglycan and lipoprotein, as well as bacterial and viral nucleic acids. In this study, we demonstrate that nucleic acids are recognized by PRRs in some tumor types, and promoted the activation of IRF and NF- κ B pathway. However, some types of tumor cells are not activated. Furthermore, we are able to find the relationship between the tissue specificity of innate immune response and apoptosis induction. In in vivo experiment, nucleic acids inhibit growth of transplantation tumor in nude mice. Thus, these finding indicate that nucleic acids may contribute to the progress of material for therapeutic cancer. We consider clarifying the detail mechanism of nucleic acids recognition on innate immune response from the molecular, biochemical and cell biology viewpoints.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学

キーワード：自然免疫 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

病原体センサー、即ちパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) は、現在までに多くの種類が同定され、ウイルスや細菌など病原体の細胞膜や鞭毛などを構成する糖やタンパク質、をはじめ、RNA や DNA といった核酸などの分子パターン (PAMPs) を感知する。その結果、受容体下流でシグナル伝達経路が活性化されることで、インターフェロンや炎症性サイトカイン・ケモカインの発現誘導などの自然免疫応答が起こり、適応免疫系への連携を介することで病原体排除へと働く。申請者は、この自然免疫系における I 型インターフェロンの産生誘導メカニズムやシグナル伝達経路について研究を行ってきた。その一環として核酸を介する自然免疫機構に関わる研究を行ってきた結果、ウイルス RNA 認識受容体である RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) を調節する分子 ZAPS (Zinc finger Antiviral Protein 1, Short isoform) を見いだした。一方で、病原体由来の核酸のみならず、自己由来の核酸、とくに DNA に対しても自然免疫応答が誘導されることが示されている。また、DNase II 欠損マウスの肝臓のマクロファージにおいて、アポトーシスを起こした細胞由来の自己 DNA が分解されず、TLRs や NLRs (NOD-like receptors) 非依存性に IFN- γ の発現が観察されるという興味深い報告もある (Yoshida, H. *et al.*, *Nat. Immunol.*, 6, 49-56, 2005)。自己由来の核酸がセンサーを介して自然免疫応答の活性化の 1 つの病態形成の局面で影響を及ぼしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍における核酸の認識が、どのような分子パターン認識特性に基づいて細胞応答の活性化につながるのか、その場合、核酸が、どのようなセンサー分子によって認識され、どのような下流のシグナル伝達経路が活性化するのかを明らかにすることである。さらに腫瘍細胞と正常細胞とでは、各々細胞由来の核酸の質的な相違によって応答性に及ぼす影響が異なる可能性についても検討することを考えている。最終的には個体レベルで、核酸が及ぼす腫瘍形成への影響について評価することを計画している。

3. 研究の方法

細胞質に存在する DNA 認識に関するセンサーとして AIM2 (absent in melanoma 2) が同定されたことや、poly(dA-dT)・(dT-dA) などの AT-rich な二本鎖 DNA の場合、RNA polymerase III を介して 5' 末端三リン酸をもった二本鎖 RNA が転写されることで RIG-I 依存性経路が活性化されること (Chiu, Y.H. *et al.*, *Cell*, 138, 576-91, 2009; Ablasser, A. *et al.*, *Nat. Immunol.* 10, 1065-72, 2009) など、核酸認識機構に関連する新しい報告がなされている。一方で、AT-rich な二本鎖 DNA

以外の DNA については、ヒトの末梢血単核球などの特定の種類の細胞においてのみ I 型 IFN 産生誘導などの応答を示すことが報告されており、この場合、どのようなセンサーによって認識されるかは明らかにされていない。本課題では、まず、ヒト由来の細胞を用いた実験系において解析を進めることを計画している。これまでに細胞株を用いて、核酸に対する応答性を、ルシフェラーゼレポーターアッセイや定量的 RT-PCR 等で解析可能な系を確立している。実際、12well plate の 1well に対して、細胞を 3×10^5 cells となるように調整した後、核酸を用いて様々な細胞を処理し、至適時間において、細胞から RNA を抽出し qRT-PCR を用いた解析、または培地の上清を使用して ELISA 法にてタンパク質量の解析を行った。また、由来の異なる腫瘍細胞と正常細胞において細胞応答 (サイトカイン遺伝子発現ならびにタンパク質発現の誘導など) の活性化能に違いがあるのかについて検討を行った。次に、これらの核酸による応答性の検討から、マウス (BALB/cAJc1-nu/nu) を用いた腫瘍移植の実験において、核酸が及ぼす腫瘍に対する効果について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 最初に、正常な細胞株とさまざまな腫瘍細胞株 (5 種類) に対して、核酸による処理を行った。その結果、5 種類の腫瘍細胞株の中でも、ELISA 法を用いた解析から、ある種の腫瘍細胞株においてのみインターフェロンの産生が特に高くなる傾向がみられることがわかった。そこで、ある種の腫瘍細胞株に着目し、異なる形質の細胞株 (4 種類) に対して核酸による処理を行いサイトカインの mRNA 発現について qRT-PCR を用いて解析を行った。その結果、1 種類の細胞株において、インターフェロン誘導に対する応答性が非常に低くなることがわかった。その応答性は、核酸の種類を変えても同様に、低い傾向を示した。

(2) 核酸処理に対する応答性の減少が、どのようなシグナル伝達分子によるのかを検討するため、自然免疫応答に関与すると報告されている、センサー分子、mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) 等のアダプター分子、interferon regulatory factor 3 (IRF-3) 等の転写因子の発現量を qRT-PCR で検討した結果、それらシグナル伝達分子の発現量とインターフェロンやサイトカインの発現応答における関連性は認められなかった。そこで、核酸によるインターフェロン誘導能が低いある種の腫瘍細胞株においてインターフェロンに対する応答性が機能しているのかどうかを検討するために、インターフェロン- γ 処理を行い、下流のシグナル分子の応答性がみられるのかどうかを検討したところ、

2'-5'-oligoadenylate synthetase が、強く誘導されていたことから、受容体下流のシグナル分子は、機能していることがわかった。

(3) インターフェロンの発現誘導に重要な転写因子が機能しているのかどうかを検討するため、IRF-3 や NF- κ B のターゲット遺伝子の発現変化を qRT-PCR で解析したところ、インターフェロン同様に発現量が低かった。すなわち、センサー分子・アダプター分子の下流で機能する転写因子の活性化が機能していないことが示唆された。

(4) 本研究から、インターフェロン誘導能が低いある種の腫瘍細胞株においては、細胞死が誘導されない傾向があることがわかった。トリパンブルー染色法を用いて核酸処理を行い細胞死数について検討したところ、インターフェロンが誘導される細胞においては50%~60%まで細胞生存率が低下したのに対し、インターフェロンの誘導が低いある種の腫瘍細胞株においては、生存率が約95%と核酸処理前後で、ほとんど変化が認められなかった。さらに、この核酸による細胞死が、アポトーシスによるものかどうかを検討するため Annexin V と PI 染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った結果、アポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。また、このアポトーシスの誘導は、インターフェロン受容体に対する中和抗体を用いた実験結果から、一部の細胞死は抑制されたものの完全に細胞死が抑制されなかったことから、インターフェロンのみならず、核酸刺激による他の効果も関与していることが強く示唆された。核酸投与による細胞死は、インターフェロン単独投与による細胞死より強く誘導されることもわかった。

これまでの実験結果から、腫瘍(組織の違い)によって核酸によるインターフェロンの誘導能が異なること、また同じ組織由来の腫瘍でもインターフェロン誘導能が異なること、その誘導能の違いによって細胞死(アポトーシス)誘導の割合が異なることがわかってきた。

(5) これまで行ってきた *in vitro* の実験結果から、実際にヌードマウスに腫瘍を移植し、核酸による抗腫瘍効果について検討を行った。7週齢の雌のマウスに、ヒト由来の腫瘍細胞株(核酸によってインターフェロンが誘導される細胞株/ほとんど誘導されない細胞株、2種類)を各々 1×10^6 cells となるように皮下に接種し、腫瘍が5mmを超えた時点で、PBSまたは核酸(2種類)、インターフェロンを3日ごとに腫瘍に対してシリンジを用いて直接投与を行い、経時的に腫瘍サイズを測定することから、腫瘍の重量を算定した。その結果、インターフェロンが誘導される腫瘍細胞株では、PBS またはインターフェ

ロンを投与した場合、腫瘍重量の増加が認められた。しかしながら、核酸を投与したマウスにおいては、腫瘍重量の減少、すなわち腫瘍の退縮が認められた。一方、核酸処理に対して、ほとんどインターフェロンが誘導されない細胞株では、PBS、インターフェロン、核酸のいずれを投与しても、腫瘍重量の増加が認められた。*in vitro*の実験結果と同様に個体に腫瘍を移植した *in vivo*の実験においても、腫瘍細胞が示す核酸に対する応答性に相関が認められた。

本研究では、腫瘍細胞を用いた核酸の認識と自然免疫応答に関する検討を行った。腫瘍細胞に核酸処理を行うことは、組織-腫瘍特異性があるものの、効率よく自然免疫応答を活性化させることができ、かつ、腫瘍細胞の細胞死(アポトーシス)を強く誘導させることができることわかった。さらに、*in vitro*の実験ではあるが、細胞の生存率において、核酸投与は、正常細胞に対して強くアポトーシスを誘導することはなかった(細胞生存率約95%)。このことは、インターフェロン投与とは異なる、腫瘍局所での自然免疫応答活性化を介する抗腫瘍治療法の開発につながる基礎的研究となることが考えられる。

癌患者の血液中には、遊離核酸が増加することが報告されている。さらに、最近、癌微小環境に存在するマクロファージである TAM (tumor-associated macrophage) が、組織における腫瘍の増殖に関与していることが報告されている。このようなマクロファージの活性化に腫瘍由来の核酸が関与するのか、すなわち自然免疫応答と核酸の関与について解析を検討している。

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)

(現在投稿準備中)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 清雄 (HAYAKAWA, Sumio)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：00368292

(2) 研究分担者

亀山 武志 (KAMEYAMA, Takeshi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・研究員
研究者番号：40569505

足立 義博 クリストファー (ADACHI,
Yoshihiro Christopher)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・研究員
研究者番号：10616204

(3) 連携研究者

()

研究者番号：