

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791422

研究課題名(和文)可溶性IL-33受容体の大腸がん転移抑制効果と予後予測因子としての有用性の検討

研究課題名(英文)Antimetastatic effects of a soluble IL-33 receptor and its utility as a prognostic biomarker in colorectal cancer.

研究代表者

秋元 美穂 (AKIMOTO, Miho)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60437556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ヒトおよびマウスの大腸がん細胞における可溶性のIL-33受容体(sST2)の発現が炎症性のがん微小環境の修飾を介して自然転移を抑制することが明らかになった。また、ヒトまたはマウスの大腸がん細胞を移植した担がんマウスにおいてリコンビナントsST2が抗腫瘍効果および転移抑制効果を示すことや、腫瘍組織におけるST2の発現レベルが大腸がんの予後予測マーカーとして有用であることを示した。したがって、sST2を基盤とした新たな大腸がんの治療法や診断法の開発への可能性が本研究により示された。

研究成果の概要(英文)：Our studies revealed that the expression of sST2, a soluble receptor for IL-33, in human and mouse colorectal cancer cells suppress sporadic metastasis via modulating inflammatory tumormicroenvironments. Importantly, the administration of recombinant sST2 showed antitumor and antimetastatic effects in human or mouse colon tumor-bearing mice. Our results also indicated that ST2 expression levels in tumor tissues may be an effective prognostic biomarker in colon cancer. Collectively, our studies demonstrate the potential for developing novel ST2-based therapeutic and diagnostic strategies for colorectal cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移抑制 がん微小環境 大腸がん サイトカイン 予後予測

## 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン-33 (IL-33) は炎症性のサイトカインであり、IL-33 誘導性のサイトカインやケモカインは、がん細胞の増殖・転移を亢進させることが報告されている。しかし、IL-33 やその膜結合型の受容体 (ST2L) やデコイレセプターとして働く可溶性の受容体 (sST2) とがんと直接的な関係を示す報告は無かった。

我々は、腫瘍組織では正常組織と比較して IL-33 が多く存在すること、腫瘍随伴マクロファージやリンパ球等の間質細胞が IL-33 を発現していることを見出した。また、IL-33 はヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) 表面上の ST2L を介して *in vitro* で血管形成を誘導するが、リコンビナント sST2 はこれを抑制することが確認された。これらのことから、がんの微小環境において sST2 は IL-33 誘導性の血管新生の抑制に働く可能性が考えられた。さらに興味深いことに、マウスおよびヒトの転移性の異なる様々ながん細胞株 (大腸がん、乳がん、肺がん、膵がん、胃がん) において sST2 の発現レベルが転移性と逆相関することを見出した。

以上の背景から我々は、sST2 ががんの微小環境に及ぼす影響や大腸がんの転移制御に関与する可能性に注目するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 大腸がん細胞における sST2 の発現が *in vivo* で腫瘍血管新生や転移の制御に関与するか否かを明らかにする。

(2) がん細胞由来の sST2 が炎症性のがん微小環境に及ぼす影響を明らかにする。

(3) sST2 がエンドクライン経路でも転移を制御するか否か、リコンビナント sST2 が大

腸がんの転移抑制に有効か否かを検討する。

(4) 大腸がん組織中の sST2 の発現レベルと悪性度や転移リスクとの相関を検討し、大腸がんの転移予測マーカーとしての sST2 の有用性を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス大腸がん細胞株 NM11 (低転移性、sST2 の発現が高い) および LuM1 細胞 (高転移性、sST2 の発現が低い) を用いた。NM11 細胞で shRNA により sST2 をノックダウンした細胞と LuM1 細胞で発現ベクター (pcDNA3.1) により sST2 を過剰発現させた細胞を作製した。ヒト大腸がん細胞株 SW480 (低転移性、sST2 の発現が高い) と SW620 (高転移性、sST2 の発現が低い) についても同様の手法で sST2 ノックダウン細胞および sST2 過剰発現細胞を作製した。

(2) sST2 をノックダウンあるいは過剰発現したマウスおよびヒトの大腸がん細胞を同系のマウスあるいはヌードマウスの皮下に移植した。腫瘍体積の測定や肺転移結節数の計数により、大腸がん細胞における sST2 の発現が腫瘍の増殖と自然転移に及ぼす影響を検討した。

(3) sST2 をノックダウンあるいは過剰発現したマウスおよびヒトの大腸がん細胞をマウスに移植し、形成された腫瘍から凍結切片を作製して、抗 CD31 抗体で免疫蛍光組織染色した。共焦点レーザー顕微鏡下で腫瘍血管を観察し、Image J software を用いて腫瘍血管密度を定量した。

(4) 腫瘍組織中のサイトカインおよびケモカインの遺伝子発現レベルを PCR アレイで解析した。sST2 高発現の腫瘍と sST2 低発現の

腫瘍で各遺伝子の発現レベルを比較し、がん細胞における sST2 の発現が炎症性の微小環境に及ぼす影響を検討した。

(5) sST2 がエンドクライン経路でも転移を制御するか否かを明らかにするため、sST2 高発現で低転移性のマウス大腸がん細胞 (NM11 細胞) と sST2 低発現で高転移性のマウス大腸がん細胞 (LuM1 細胞) をマウスの両側に分けて移植し、NM11 細胞から分泌された sST2 が LuM1 腫瘍の増殖、血管新生に及ぼす影響を検討した。

(6) マウス sST2-Fc 融合タンパク質の発現プラスミドを作製し、sST2 低発現で高転移性のマウス大腸がん細胞 (LuM1 細胞) を移植したマウスにハイドロダイナミクス法で尾静脈から投与した。血中 sST2 を高濃度で維持するため 7 日毎にプラスミド (10 µg) を投与し、血中 sST2 濃度を ELISA 法でモニタリングした。リコンビナント sST2 発現プラスミド投与群とプラスミドのみを投与した対照群の間で腫瘍体積、腫瘍血管密度、肺転移結節数を比較し、リコンビナントマウス sST2 の生体内強制発現が腫瘍の増殖や転移に及ぼす影響を評価した。

(7) ヒト大腸がん SW620 細胞 (sST2 低発現で高転移性) を移植したヌードマウスの皮下にヒトリコンビナント sST2 または対照として PBS を注入した徐放性のポンプを挿入した。腫瘍体積、腫瘍血管密度、肺転移結節数を sST2 投与群と対照群の間で比較し、ヒトリコンビナント sST2 が腫瘍の増殖や転移に及ぼす影響を評価した。

(8) 大腸がん患者由来の原発巣と肝転移巣のパラフィン包埋切片を抗 ST2 抗体で免疫組織

染色し、大腸がん組織中の ST2 の発現レベルと悪性度や転移リスクとの相関を検討した。

sST2 に対する特異的な抗体が無いため、当初の研究計画では sST2 特異的抗体を作製する予定であった。しかし、完全に sST2 のみを特異的に認識する抗体の作製は困難で、研究期間内には達成できなかった。したがって本研究では染色に際して sST2 とそのアイソフォームである ST2L (膜結合型の IL-33 受容体) を認識する抗 ST2 抗体を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) マウス大腸がん細胞とヒト大腸がん細胞で、sST2 高発現で低転移性の細胞において sST2 をノックダウンすると腫瘍血管新生および自然転移が亢進された。また反対に、sST2 低発現で高転移性の細胞で sST2 を強制発現させると腫瘍血管新生および自然転移が抑制された。このことから、大腸がん細胞における sST2 の発現は生体内で転移抑制に関与することが明らかになった。

(2) sST2 高発現の低転移性細胞を皮下移植したマウスでは、腫瘍体積の増大と共に血中の sST2 レベルの上昇が認められた。sST2 低発現で高転移性の細胞の反対側に sST2 高発現の細胞を移植することにより、高転移性腫瘍の増殖、血管新生、肺転移が抑制された。したがって、sST2 高発現の細胞から分泌された遊離 sST2 が遠隔の腫瘍にエンドクライン経路を介して作用し、転移を抑制することが示唆された。

(3) sST2 高発現の腫瘍では sST2 低発現の腫瘍と比較して腫瘍組織中の Th2 サイトカインや Th2 応答に関連するケモカインの発現レベルが低下していた。また Th2 応答の減衰に伴い、sST2 高発現の腫瘍組織では、がんの悪性

進展の促進に関わる M2 マクロファージの割合も減少しており、sST2 が炎症性のがん微小環境の修飾を介して転移抑制に働くことが示唆された。

(4) sST2 低発現で高転移性のマウス大腸がん細胞を移植したマウスでマウス sST2-Fc 融合タンパク質を生体内強制発現させ、血中 sST2 レベルを高濃度で維持することにより、腫瘍増殖、腫瘍血管新生、肺転移が抑制された。

(5) sST2 低発現で高転移性のヒト大腸がん SW620 細胞を移植したヌードマウスの皮下にヒトリコンビナント sST2 を注入した徐放性のポンプを挿入することにより、腫瘍の増殖および肺への微小転移が抑制された。したがって、リコンビナント sST2 がヒト大腸がん細胞の増殖や転移抑制にも効果的であることが示され、転移抑制剤としてのリコンビナント sST2 の有用性が示唆された。

(6) 同一の大腸がん患者由来の原発巣と肝転移巣のパラフィン包埋切片を用いて抗 ST2 抗体で免疫組織染色を行った結果、ST2 の発現は肝転移巣と比較して原発巣で有意に高いことが確認された。これにより、臨床検体において ST2 が大腸がんの転移予測の指標となりうることが示唆され、転移予測マーカーとしても応用できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Akimoto M, Iizuka M, Kanematsu R, Yoshida M, Takenaga K: Anticancer Effect of Ginger Extract against Pancreatic Cancer Cells Mainly through Reactive Oxygen

Species-Mediated Autotic Cell Death. PLoS One, 2015; 10(5):e0126605. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0126605.

Akimoto M, Nagasawa H, Hori H, Uto Y, Honma Y, Takenaga K. An inhibitor of HIF- $\alpha$  subunit expression suppresses hypoxia-induced dedifferentiation of human NSCLC into cancer stem cell-like cells. World J Med Genet, 2013; 3 (4): 41-54. (査読有) <http://www.wjgnet.com/2220-3184/full/v3/i4/41.htm>

Hattori M, Kawakami K, Akimoto M, Takenaga K, Suzumiya J, Honma Y. Antitumor effect of Japanese apricot extract (MK615) on human cancer cells in vitro and in vivo through a reactive oxygen species-dependent mechanism. Tumori. 2013; 99 (2): 239-48. (査読有) DOI: 10.1700/1283.14199.

Shimojo Y, Akimoto M, Hisanaga T, Tanaka T, Tajima Y, Honma Y, Takenaga K. Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. Clin Exp Metastasis. 2013; 30 (2): 143-54. (査読有)

DOI: 10.1007/s10585-012-9519-8.

〔学会発表〕(計 10 件)

秋元 美穂、竹永 啓三、可溶性 ST2 は炎症性のがん微小環境を修飾し腫がん

の増殖を抑制する、第12回 がんとハイポキシア研究会、2014年11月21日~22日、ホテルマリターレ創世(佐賀県・佐賀市)

原嶋 奈々江、秋元 美穂、竹永 啓三、原田 守、HIF-2 $\alpha$ の阻害はヒト膵がん細胞のTRAIL感受性を増強する。2014年11月21日~22日、ホテルマリターレ創世(佐賀県・佐賀市)

Akimoto M, Harada M, Takenaga K: Soluble ST2 modulates inflammatory tumor microenvironment and inhibits neoangiogenesis and growth of pancreatic cancer. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Takenaga K, Akimoto M: Enhancement of glycolysis and survival of lung carcinoma cells with mtDNA mutation co-cultured with stromal cells. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Harashima N, Hari Y, Monma H, Akimoto M, Takenaga K, Tajima Y, Harada M: Inhibition of HIF-2 $\alpha$  sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

兼松 里衣、秋元 美穂、竹永 啓三、膵臓がん細胞に対する生姜抽出物の抗腫瘍効果。日本生薬学会第61回年会、2014年9月13~14日、福岡大学(福岡県・福岡

市)

Akimoto M, Takenaga K: Soluble ST2 inhibits tumor growth and metastasis of colon carcinoma cells by modulating inflammatory microenvironment. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日~5日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

秋元 美穂、竹永 啓三、可溶性IL-33受容体 sST2 による炎症性微小環境の修飾を介した大腸がんの転移の抑制、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、ホテルブエナビスタ松本(長野県・松本市)

Akimoto M, Honma Y, Takenaga K: Inhibition of tumor growth and metastasis of colon carcinoma cells by sST2. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日~21日、ホテルロイトン札幌(北海道・札幌市)

Shimojo Y, Akimoto M, Tajima Y, Honma Y, Takenaga K: N-Acetylcysteine suppresses hypoxia-induced EMT and hepatic metastasis of human pancreatic cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日~21日、ホテルロイトン札幌(北海道・札幌市)

## 6. 研究組織

研究代表者

秋元 美穂 (AKIMOTO, Miho)

島根大学医学部・生命科学講座・助教

研究者番号: 60437556