

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430096

研究課題名(和文)新規IL-9作動性抗腫瘍因子の同定とメラノーマ自然発症モデルマウスの活用

研究課題名(英文)Analysis of anti-tumor activity of interleukin-9 in melanoma models.

## 研究代表者

川本 善之(KAWAMOTO, Yoshiyuki)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：10410664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はメラノーマ自然発症モデルマウスであるRETトランスジェニックマウスを用い、IL-9の抗腫瘍効果の検証とその作動性因子を見出すことを目的として行った。メラノーマ移植モデルにおいてはIL-9のin vivo投与により、腫瘍増殖抑制作用が報告されていた。RETトランスジェニックマウスでは、IL-9によりメラノーマの発症、進展を抑制することはなかったが、腫瘍周辺での顆粒球浸潤亢進を認めた。さらにヌードマウス移植モデルでもIL-9の抗腫瘍効果は認められなかった。本研究からIL-9の抗腫瘍効果は少なくともT細胞依存性であること、顆粒球を介する免疫応答亢進の活性化に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether IL-9 play an anti-melanoma activity in a RET-transgenic mouse, a spontaneous melanoma model. Previous study reported that IL-9 mediates tumor immunity to melanoma using a B16F10 mouse melanoma model. Our results indicated that in vivo administration of IL-9 did not suppress the spontaneous melanoma, though intratumoral accumulation of some granulocytes were observed. In addition, IL-9 also did not exert anti-tumor activity in a nude mice transplanted with B16F10. We concluded that administration of IL-9 failed to prevent a spontaneous melanoma progression in RET-transgenic mice, but IL-9 may potentiate anti-tumor activity mediated by T cell and granulocytes function.

研究分野：分子免疫学

キーワード：メラノーマ IL-9

### 1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ RET は多発性内分泌腺腫症 (MEN)2A 型や甲状腺乳頭癌の原因遺伝子として知られる原癌遺伝子であるが、申請者の所属研究室では RET を強発現する RET トランスジェニックマウスを独自に保有しており、その解析が進められてきた。メタロチオネインプロモーターで発現誘導される本 RET トランスジェニックマウスは、生誕直後から全身の皮膚色が黒く、約 15 週齢以降、皮膚良性腫瘍をほぼ 100% の確率で発症し、その後、高確率 (約 70%) で高度な転移所見が認められるメラノーマを自然発症する特徴を持つ (Kato M. et al, *Oncogene*, 1998)。

腫瘍排除において CD4 陽性ヘルパー T 細胞は重要な役割を担っており、少なくとも動物実験レベルでは腫瘍特異的 CD4 陽性細胞の移植によりメラノーマが抑制されることが確認されている。CD4 陽性ヘルパー T 細胞は、未熟なナイーブ T 細胞 (Th0) から種々のサイトカイン刺激を受け、そのサイトカインプロファイルによって Th1, Th2, Th17 等のサブセットに分化する。近年、ナイーブ T 細胞が IL-4 と TGF- $\beta$  で刺激を受け分化し、IL-9 を分泌する新しいサブセットの CD4 陽性細胞、Th9 細胞が報告された。その役割については大部分が不明であるが、ごく最近、Th9 細胞は驚くべきことにリンパ球ではなくマスト細胞の活性化を介し、メラノーマおよび肺癌の腫瘍増殖を強く抑制する、との報告がなされた (Purwar R. et al, *Nat Med*, 2012)。しかし、株化癌細胞を用いた移植実験では明確な結果が得られているが、自然発症する腫瘍に対する Th9 や IL-9 の効果の検討はなされていない。癌の自然発症モデルを用いた解析は、ヒトとの比較、治療応用に向けたアプローチには必須と考える。

### 2. 研究の目的

IL-9 は、直接メラノーマ細胞を殺すことはできない。また、T 細胞や B 細胞が欠損した Rag1 ノックアウトマウスを用いた解析から、IL-9 は T 細胞や B 細胞が無くても、メラノーマを抑制できる。このことは、T 細胞や B 細胞以外の細胞が IL-9 のエフェクターとなり、そこから何らかの (真の) 抗腫瘍因子が発現することを強く示唆する。その候補となる細胞は、c-Kit 陽性かつ IL9 受容体陽性細胞、すなわち、マスト細胞であることが分かっている。本研究では、前述の研究背景、およびこれまでの研究成果・予備知見をもとに、IL-9 作動性の真の抗腫瘍性因子を同定し、それを用いた全く新しい治療薬、診断法の確立の基盤となる研究を行うため、下記研究方法を計画した。

### 3. 研究の方法

(1). *In vitro* において、IL-9 添加マスト細胞から放出されるメラノーマ細胞増殖抑制

因子の探索を行う。

(2). メラノーマ自然発症モデルでの IL-9 の抗腫瘍効果を調べるため、RET トランスジェニックマウスにおいて、Th9 細胞の養子移植またはレコンビナント IL-9 の導入を行い、抗腫瘍効果を確かめる。

(3). マウスメラノーマ培養細胞株 (RET トランスジェニックマウスの腫瘍より独自に樹立した細胞株: Mel-ret 細胞) を用い、上記 (1) で同定した因子による抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。

(4). 本研究はヒトへの応用が究極の目的である。そこで、ヒトのメラノーマ細胞株のみならず、他の株化癌細胞を可能な限り用い、上記 (1) で得られた因子による増殖抑制効果について、癌細胞に対する作用特異性があるか調べる。

### 4. 研究成果

マウス骨髄細胞より IL-3 にて分化させた肥満細胞 (BMMC) を取得し、IL-9 にて賦活した BMMC 馴化培地は、マウスメラノーマ細胞株に対して増殖抑制効果を有するか否か検討した。実験の結果、馴化培地によるメラノーマ細胞株の増殖抑制効果は見られなかった。このことから、IL-9 処理された BMMC の馴化培地には、直接メラノーマ細胞の増殖・生死に寄与する因子は存在しない可能性が示唆された。また、メラノーマ自然発症トランスジェニックマウスである RET-Tg マウスに、IL-9 を投与し、腫瘍周辺の浸潤細胞について組織切片標本を作成し調べた。検討の結果、IL-9 投与群では、ギムザ染色陽性 (青紫) の顆粒球が多く浸潤している知見が得られ、マスト細胞もしくは好塩基球の腫瘍組織への浸潤促進作用が示唆された。IL-9 は腫瘍組織でのマスト細胞の浸潤または活性化を促し、何らかの抗腫瘍作用に寄与している可能性が考えられた。

腫瘍を発症した RET-Tg マウス (1 年齢) に対し、IL-9 を腹腔内投与し (2 日おき、4 週間) 抗腫瘍効果に関する影響の有無について検討を行った。まず、脾臓、胸腺におけるリンパ球への影響について調べたところ、胸腺における CD4, CD8 マーカー解析においては顕著な差は見られなかったが、脾臓において、IL-9 投与マウスでは CD3 陰性 CD45R 陽性細胞、および CD8 陽性 T 細胞の割合がそれぞれ増加したことが分かった。次に、リンパ節、脾臓の薄切組織切片を作製し、HE 染色およびマッソン・フォンタナ染色にて調べたところ、IL-9 投与マウスではメラニン含有細胞が顕著に増加した。これは F4/80 陰性であったことから単球・マクロファージではなく、メラノサイトもしくは何らかのメラニンを貪食した細胞である可能性が考えられた。脾臓において、IL-9 投与により c-Kit 陽性 Fc $\epsilon$ R1 陽性のマスト細胞の割合が増加した。IL-9 による NK 細胞の賦活が考えられたが、腫瘍組織での NK 細胞の有意な増加は見られなかった。

一方、IL-9 投与により脾臓、リンパ節重量が大きく低下したが、この意義についてはさらに検討を進める必要がある。ここまでの結果から、メラノーマ自然発症モデルを用いた本実験により、IL-9 はマスト細胞や他の細胞から分泌される何らかの IL-9 応答物質が、貪食細胞や CD8 陽性 T 細胞を活性化させ、抗腫瘍に寄与する可能性が考えられた。

腫瘍未発症のヘアレス RET-Tg マウスに、3 ヶ月間定期的に IL-9 を腹腔内投与し、その後の腫瘍発症への影響を調べた。またヌードマウスに浸透圧ポンプを用い、持続的な IL-9 投与条件における移植 B16 メラノーマ細胞の増大の抑制について検討した。腫瘍発症した RET-Tg マウスには、IL-9 を腹腔内投与し、リンパ組織や腫瘍周辺の浸潤細胞について組織切片標本を作成し、免疫組織学的染色法により、各種免疫系細胞について調べた。ヘアレス RET-Tg マウスにおいて、IL-9 投与による腫瘍抑制効果は認められず、本モデルでは IL-9 の抗腫瘍効果は得られないとの結論に至った。また、ヌードマウスへのメラノーマ移植モデルにおいても、IL-9 の抗腫瘍効果は認められなかったことから、T 細胞の存在が必須である可能性が示唆された。IL-9 を投与した RET-Tg マウスにおいて、脾臓およびリンパ節でメラノファージ様細胞の増加が見られ、二次リンパ組織における免疫応答の活性化が示唆された。また、腫瘍周辺に顆粒球が多く浸潤している知見が得られ、マスト細胞もしくは好塩基球の腫瘍組織への浸潤促進作用が示唆された。以上、IL-9 は T 細胞の存在下において二次リンパ組織での免疫応答の亢進活性化を促し、顆粒球を介する抗腫瘍作用に寄与している可能性が考えられるが、少なくとも自発腫瘍モデルに対しての抗腫瘍効果は得られなかったため、他の自発的腫瘍モデルでの精査が必要と考える。

#### 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 8 件)

N. Mizutani, Y. Omori, Y. Kawamoto, S. Sobue, M. Ichihara, M. Suzuki, M. Kyogashima, M. Nakamura, K. Tamiya-Koizumi, Y. Nozawa, and T. Murate. 2016. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMAse (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 470: 851-856. (査読有)

Y. Kawamoto, Y. Ueno, E. Nakahashi, M. Obayashi, K. Sugihara, S. Qiao, M. Iida, M. Y. Kumasaka, I. Yajima, Y. Goto, N. Ohgami, M. Kato, and K. Takeda. 2016. Prevention of allergic rhinitis by ginger and the molecular basis of immunosuppression by 6-gingerol through T

cell inactivation. *J Nutr Biochem* 27: 112-122. (査読有)

N. Mizutani, Y. Omori, K. Tanaka, H. Ito, A. Takagi, T. Kojima, M. Nakatochi, H. Ogiso, Y. Kawamoto, M. Nakamura, M. Suzuki, M. Kyogashima, K. Tamiya-Koizumi, Y. Nozawa, and T. Murate. 2015. Increased SPHK2 Transcription of Human Colon Cancer Cells in Serum-Depleted Culture: The Involvement of CREB Transcription Factor. *Journal of cellular biochemistry* 116: 2227-2238. (査読有)

T Yanagishita, I. Yajima, M. Kumasaka, Y. Kawamoto, T. Tsuzuki, Y. Matsumoto, D. Watanabe, and M. Kato. 2014. Actin-binding protein, Espin: a novel metastatic regulator for melanoma. *Molecular cancer research : MCR* 12: 440-446. (査読有)

T. Yanagishita, K. Sugiura, Y. Kawamoto, K. Ito, Y. Marubashi, N. Taguchi, M. Akiyama, and D. Watanabe. 2014. A case of Bjornstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene. *The British journal of dermatology* 170: 970-973. (査読有)

K. Takeda, Y. Kawamoto, M. Iida, Y. Omata, C. Zou, and M. Kato. 2014. Commentary to Pastore et al. (2014): Epidermal growth factor receptor signaling in keratinocyte biology: implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors. *Archives of toxicology* 88: 2319-2320. (査読有)

Y. Hirako, Y. Yonemoto, T. Yamauchi, Y. Nishizawa, Y. Kawamoto, and K. Owaribe. 2014. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Experimental cell research* 324: 172-182. (査読有)

T. Yanagishita, K. Sugiura, Y. Kawamoto, K. Ito, Y. Marubashi, N. Taguchi, M. Akiyama, and D. Watanabe. 2013. A case of Bjornstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene. *The British journal of dermatology*. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

川本善之、中山翔太、水谷直貴、村手隆、武田湖州恵、メラノーマ自然発症および移植モデルマウスを用いた IL-9 の抗腫瘍効果の解析 Analysis of anti-tumor activity of interleukin-9 in melanoma models. BMB2015 第 38 回 日本分子生物学会 第 88 回 日本生化学会 合同大会、2015 年 12 月 3 日(神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)

Yoshiyuki Kawamoto, Inhibition of lipid raft-mediated signaling by curcumin in Jurkat T cells. 7th International

Conference on Polyphenols and Health,  
Oct.27, 2015 (Tours, France)

川本善之、杉野諒、長谷川まり、武田湖州  
恵、メラノーマモデルマウスを用いた IL-9  
の抗腫瘍効果の解析、Analysis of  
anti-tumor activity of interleukin-9 in a  
melanoma model. 第 87 回 日本生化学会大  
会、2014 年 10 月 17 日 ( 国立京都国際会館、  
京都府京都市 )

川本善之、上野有紀、喬善楼、飯田真知子、  
矢島伊知郎、後藤友二、大神信孝、加藤昌志、  
武田湖州恵、6-ジンゲロールによる T 細胞活  
性化抑制機序に基づくショウガのアレルギー  
性鼻炎予防効果、Prevention of allergic  
rhinitis by ginger and the molecular basis  
of immunosuppression by 6-gingerol  
through T cell inactivation. 第 86 回 日  
本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日 ( パシフ  
ィコ横浜、神奈川県横浜市 )

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

川本 善之 ( KAWAMOTO, Yoshiyuki )  
中部大学・生命健康科学部・准教授  
研究者番号 : 10410664

研究者番号 :

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :