

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462492

研究課題名(和文)腎癌に対するサイトカインシグナル制御による新しい抗体療法の開発

研究課題名(英文)Blockade of IL-6 signal increases the susceptibility of renal cell carcinoma to interferon

研究代表者

石橋 啓 (Ishibashi, Kei)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90347211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで腎癌におけるSOCS3の発現が細胞増殖やインターフェロンに対する感受性に関与していることを明らかにしてきた。SOCS3を効率よく抑制することが可能であれば新たな腎癌治療法として利用可能と考えた。そこで腎癌に対してIL-6受容体抗体を投与して、SOCS3の発現をコントロールをしインターフェロンを投与したところ、インターフェロンによる細胞増殖抑制効果が増強し、かつTRAILによる細胞死誘導も増強した。ヌードマウスモデルにおけるIL-6受容体抗体とインターフェロンの併用で腫瘍内の細胞浸潤が顕著となりTRAIL発現が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of a new strategy against human renal cell carcinomas (RCCs) that modifies interleukin (IL)-6 signaling was investigated in vitro and in vivo. In RCC cell lines, interferon (IFN)- α alters the autocrine production of the proinflammatory cytokine IL-6. The growth inhibitory effects of IFN- α under IL-6R knockdown conditions by tocilizumab were demonstrated by MTT assay. The in vivo effects of injections of tocilizumab and IFN administration were evaluated in groups of nude mice bearing s.c. xenografts of 786-0. The growth of the tumors in mice receiving combination therapy with tocilizumab and IFN- α was significantly suppressed in comparison with those in the tocilizumab, IFN- α and non-treated groups. TRAIL was up-regulated in the tumors which were treated with combination therapy with tocilizumab and IFN.

研究分野：腎癌

キーワード：腎癌 サイトカイン TRAIL

1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する治療として分子標的薬が注目されていたが実情は期待通りではないと言うレポートが発表され、事実その効果が限定的であることが明らかとなってきた。本邦ではインターフェロン(IFN)が腎癌細胞に対するオプションとして再び見直されつつある。

これまで我々はサイトカインシグナル抑制に働く SOCS3 分子の発現がインターフェロンの抗腫瘍効果に影響することを報告してきた。

2. 研究の目的

IFN に抵抗性の腎癌において特に高レベルで発現する“SOCS3”の生物活性を解析し、腎細胞癌が IFN によって活性化された宿主免疫の攻撃から回避する機構を解明する。さらに、SOCS3 シグナルをコントロールすることによる、制癌を達成するための新たな抗体併用療法の有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 腎癌細胞における SOCS3 発現と TRAIL 受容体発現の相関関係の解析:

SOCS3 発現と TRAIL 受容体発現レベルの相関関係をより明らかにするため入手可能な腎癌細胞株を収集し、Real time PCR 法とウエスタンブロット法を用いて SOCS3 および TRAIL 受容体発現量を定量する。

(2) SOCS3 強制発現用プラスミドの作成と腎癌細胞への導入時の TRAIL 受容体発現量解析、IL-6 受容体抗体による SOCS3 抑制効果の解析: SOCS3 強制発現のために腎細胞癌株 786-0 から調整した cDNA をテンプレートとし PCR 法にて SOCS3 を増幅。動物細胞発現用プラスミド pCI-neo にライゲーションすることで作成する。このプラスミドで SOCS3 を抑制したとき IL-6 受容体抗体 tocilizumab で SOCS3 を抑制したときの腎癌における TRAIL 発現と各種薬剤感受性を解析する。

(3) ノードマウス皮下移植モデルにおける tocilizumab を用いた抗腎癌療法の効果。In vivo imaging system を用いた抗腫瘍効果の解析および病理学的検討。培養した 786-0 細胞 2x10⁶ cells を PBS に懸濁し、ノードマウス側腹部に移植生着させる。皮下に腫瘍が形成されたことを確認した後、コントロール群、tocilizumab 単独投与群、interferon 単独投与群、tocilizumab + interferon 投与群に分け腫瘍の増大、縮小を腫瘍径の測定から判定する。腫瘍容積は腫瘍系から推定重量を算出する。腫瘍は 50 日間観察されたのち摘除する。摘出標本は免疫染色にて apoptosis、TRAIL-Receptor の発現等の観察に供する。また、別の in vivo 実験系では皮下移植モデルをコントロール群、tocilizumab 単独投与群、分子標的薬 sorafenib 単独投与群、tocilizumab + sorafenib 投与群に分け腫瘍の縮小効果と、病理診断結果を比較検討す

る。

4. 研究成果

(1) 腎癌細胞株の中では 786-0 株が TRAIL 受容体の発現が蛋白レベルで低く、ACHN や Caki2 株は高発現していた。TRAIL の感受性は 786-0 は受容体発現に相関して低かった。しかしインターフェロンの投与での TRAIL 受容体発現の変化を解析したところ、発現量は上昇していた。インターフェロン投与での SOCS3 発現は 786-0 で最も高く、ACHN、Caki2 株では低かった。mRNA レベルでは TRAIL 受容体と SOCS3 の相関は認めなかったが、蛋白レベルで SOCS3 発現が強いと TRAIL 受容体は減少する傾向が認められた。

(2) SOCS3 強制発現のために腎細胞癌株 786-0 から調整した cDNA をテンプレートとし PCR 法にて SOCS3 を増幅。動物細胞発現用プラスミド pCI-neo にライゲーションすることで作成した。pCI-SOCS3 を腎癌細胞にトランスフェクションすると、SOCS3 の mRNA 発現量は約 50000 倍まで上昇していた。腎癌細胞に SOCS3-siRNA、IL-6 受容体抗体、pCI-SOCS3 を与え、TRAIL、IFN、sorafenib に対する感受性を観察したところ、SOCS3-siRNA、IL-6 受容体抗体を投与した腎癌細胞は TRAIL に感受性が上昇する傾向が認められた。加えて IFN と sorafenib に対する感受性も上昇した。一方、SOCS3 強制発現させた ACHN 株において TRAIL 耐性の誘導は認められなかった。

(3) ノードマウス皮下移植モデルにおける tocilizumab と IFN もしくは sorafenib の併用効果を検討した。腫瘍径の測定から、IFN、sorafenib 両薬剤とも tocilizumab の併用で有意に腫瘍増殖を抑制することが可能であった。摘出標本の HE 染色において、tocilizumab と IFN の併用マウスの腫瘍では、特に TRAIL 受容体の発現が顕著であった。また、tocilizumab と sorafenib 併用のマウスでは sorafenib 単独マウスと比較して、腫瘍の壊死と血管新生の抑制が顕著であった。

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 1 件)

(1) Oguro T, Ishibashi K, Sugino T, Hashimoto K, Tomita S, Takahashi N, Yanagida T, Haga N, Aikawa K, Suzutani T, Yamaguchi O, Kojima Y. Humanised antihuman IL-6R antibody with interferon inhibits renal cell carcinoma cell growth in vitro and in vivo through suppressed SOCS3 expression. Eur J Cancer. 2013 May;49(7):1715-24. doi: 10.1016 /

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) Kei Ishibashi, Toshiki Oguro; Shin Kumagai; Norio Takahashi; Nobuhiro Haga; Masanori Nomiya; Tomohiko Yanagida; Ken Aikawa; Yoshiyuki Kojima. Combination therapy with humanized antihuman IL-6R antibody and interferon- successfully prevents the growth of 786-0 renal cell carcinoma cells. American Urological Association Annual Meeting 2013. San Diego. 5.4-5.8. 2013.

(2) Kei Ishibashi, Toshiki Oguro; Shin Kumagai; Kataoka Masao, Akaihata Hidenori, Ken Aikawa; Yoshiyuki Kojima. IL-6 and SOCS3 regulates cell proliferation in renal cell carcinoma cells. American Urological Association Annual Meeting 2013. San Diego. 5.4-5.8.2013.

(3) 石橋 啓, 小黒俊樹, 熊谷 伸, 熊谷 研, 赤井畑秀則, 榎田信博, 柳田知彦, 相川 健, 小島祥敬. IL-6-SOCS3 の腎癌増殖に及ぼす影響について. 第 101 回日本泌尿器科学会総会. 札幌市. 4.25-4.28.2013.

(4) 石橋 啓, 小黒俊樹, 片岡政雄, 熊谷 伸, 熊谷 研, 柳田知彦, 相川 健, 小島祥敬. 腎細胞癌における SOCS3 発現 ~ サイトカインシグナルと予後との関連について ~ 第 72 回日本癌学会. 横浜市. 10.3 ~ 5. 2013.

(5) 石橋 啓, 小黒俊樹, 片岡政雄, 熊谷 伸, 熊谷 研, 矢部通弘, 胡口智之, 野宮正範, 柳田知彦, 相川 健, 小島祥敬. 腎細胞癌における SOCS3 発現 ~ サイトカインシグナルと予後との関連について ~ 第 51 回日本癌治療学会学術集会. 京都. 10.24-26. 2013.

(6) Ishibashi Kei, Kojima Yoshiyuki, Haber T, Thüroff, J., Brenner, W. IL-6 induced by TKI on RCC cells-as a mechanism of resistance to TKI therapy. 29th European Association of Urology Congress. Stockholm. 4.12.2014.

(7) Ishibashi Kei, Kojima Yoshiyuki, Tobias Haber, Joachim W.Thuroff, Walburgis Brenner. Tyrosine-kinase inhibitors treatment induces IL-6 secretion on renal carcinoma cells. American Urological Association 2014 Annual Meeting. Orlando. 5,18,2014.

(8) 片岡政雄, 石橋啓, 小黒俊樹, 熊谷伸, 矢部通弘, 赤井畑秀則, 榎田信博, 柳田知

彦, 相川健, 小島祥敬. 腎細胞癌における SOCS3 発現とインターフェロン感受性. 第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会. 山形市. 3,15.2014.

(9) 小黒俊樹, 石橋啓, 片岡政雄, 熊谷研, 佐藤雄一, 秦淳也, 羽賀宣博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. IL-6 シグナルの腎癌増殖に及ぼす影響と IL-6 受容体抗体の効果について. 第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会. 山形市. 3,15.2014.

(10) 石橋啓, 熊谷研, 片岡政雄, 佐藤雄一, 秦淳也, 榎田信博, 羽賀宣博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎癌におけるサイトカインシグナルを介した TKI 薬剤耐性機構の解明. 第 102 回日本泌尿器科学会総会. 神戸市. 4,24.2014.

(11) 石橋啓, 秦淳也, 片岡政雄, 矢部通弘, 小黒俊樹, 熊谷研, 熊谷伸, 佐藤雄一, 赤井畑秀則, 小川総一郎, 羽賀宣博, 榎田信博, 柳田知彦, 相川健, 渡辺慎哉, 和栗聡, 小島祥敬. 腎癌における IL-6 による TKI 薬剤耐性機構. 腎癌研究会. 東京. 7.20.2014.

(12) 片岡政雄, 石橋啓, 秦淳也, 矢部通弘, 小黒俊樹, 熊谷伸, 熊谷研, 佐藤雄一, 赤井畑秀則, 小川総一郎, 羽賀宣博, 榎田信博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎細胞癌における SOCS3 発現と予後との関連. 腎癌研究会. 東京. 7.20.2014.

(13) 石橋啓, 秦淳也, 矢部通弘, 熊谷研, 熊谷伸, 片岡政雄, 佐藤雄一, 小黒俊樹, 小川総一郎, 赤井畑秀則, 羽賀宣博, 榎田信博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎癌におけるサイトカインによる TKI 薬剤耐性機構. 日本癌治療学会. 横浜. 8.28.2014.

(14) 石橋啓, 熊谷伸, 片岡政雄, 小黒俊樹, 柳田知彦, 小島祥敬. 腎癌細胞における TKI による IL-6 の発現. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜. 9.26.2014.

(15) Ishibashi Kei, Kubo Hitoshi, Kojima Yoshiyuki, Hader Tobias, W Thuroff, Walburgis Brenner. IL-6 receptor antibody enhances the effect of TKI against renal cell carcinoma. 115th American Urological Association Annual Meeting. New Orleans. 5. 17. 2015.

(16) Ishibashi Kei, Kubo Hitoshi, Kojima Yoshiyuki, Haber Tobias, Joachim W Thuroff, Walburgis. IL-6 receptor antibody enhances the effect of TKI against renal

cell carcinoma. The 18th ECCO-40th ESMO European Cancer Congress. Vienna. 9. 27. 2015.

(17) 石橋啓, 矢部通弘, 片岡政雄, 熊谷伸, 熊谷研, 羽賀宣博, 榑田信博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎癌細胞におけるインターフェロン・分子標的薬による IL-6 の発現. 第 24 回泌尿器科分子・細胞研究会. 東京. 2. 28. 2015.

(18) 石橋啓, 熊谷伸, 熊谷研, 片岡政雄, 矢部通弘, 佐藤雄一, 羽賀宣博, 榑田信博, 柳田知彦, 相川健, 久保均, 小島祥敬. FDG-PET とナノ粒子造影剤を用いた腎癌における IL-6 シグナル制御を利用した TKI 投与後の血液再灌流抑制効果. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 金沢. 4. 18. 2015.

(19) 石橋啓, 久保均, 熊谷伸, 熊谷研, 片岡政雄, 矢部通弘, 秦淳也, 佐藤雄一, 小川総一郎, 羽賀宣博, 榑田信博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎癌における TKI と IL-6 受容体抗体併用効果-動物用 FDG-PET による評価-. 第 46 回腎癌研究会. 東京. 7. 19. 2015.

(20) 石橋啓, 矢部通弘, 秦淳也, 赤井畑秀則, 小川総一郎, 羽賀宣博, 榑田信博, 柳田知彦, 相川健, 小島祥敬. 腎癌における IL-6 シグナル:SOCS3 発現による細胞増殖と術後再発. 日本泌尿器腫瘍学会第一回学術集会. 京都. 11. 1. 2015.

(21) 石橋啓: 進行性腎癌に対する分子標的薬とサイトカイン. 千葉泌尿器科腫瘍セミナー. 千葉. 3. 13. 2015.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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
石橋 啓 (ISHIBASHI Kei)
福島県立医科大学 医学部・准教授
研究者番号: 90347211

(2) 研究分担者
小島祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)
福島県立医科大学 医学部・教授
研究者番号: 60305539

(3) 連携研究者
相川 健 (AIKAWA Ken)
福島県立医科大学 医学部・准教授
研究者番号: 80295419

(4) 連携研究者
柳田知彦 (YANAGIDA Tomohiko)
福島県立医科大学 医学部・講師
研究者番号: 20363765

(5) 連携研究者
羽賀宣博 (HAGA Nobuhiro)
福島県立医科大学 医学部・助教
研究者番号: 50586617

(6) 連携研究者
()

研究者番号: