

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 3 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861099

研究課題名(和文) 消化器癌腹膜転移に対するIL-17をターゲットとした新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) A development of novel molecular target therapy targeting IL-17 for peritoneal metastasis of gastrointestinal cancer

研究代表者

早田 啓治 (Hayata, keiji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：90637654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス消化器癌腹膜転移モデルにおいてIL-17を抑制することでTreg細胞やMDSCの腫瘍免疫逃避機構を解除し、Th1有意な免疫環境を生み出し、抗腫瘍免疫を活性化することが判明した。さらにIL-17を抑制することで血管新生を抑制できることが明らかとなったが、一方、がん幹細胞の抑制効果は認めなかった。以上、消化器癌腹膜転移においてIL-17は新規の分子標的の一つとなりうることを判明した。

研究成果の概要(英文)：The inhibiting IL-17 in the peritoneal metastasis model of gastrointestinal cancer in mice releases the tumor immunity escape mechanism of Treg cells and MDSC, produces a Th1 dominant immune environment, and augments anti-tumor immunity. Furthermore, the inhibition of IL-17 suppressed angiogenesis, however, it could not reduce cancer stem cells. IL-17 is one of new molecular targets in peritoneal metastasis of gastrointestinal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：IL-17 腫瘍免疫 血管新生 がん幹細胞 腹膜転移 消化器癌

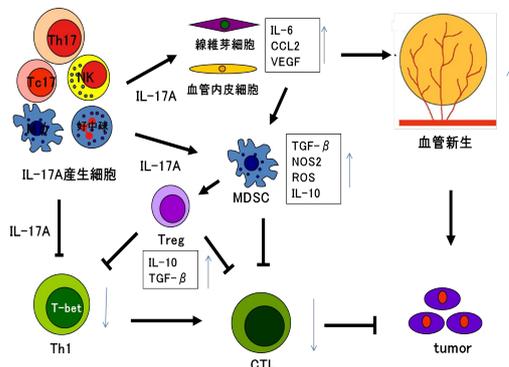
1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器癌腹膜転移

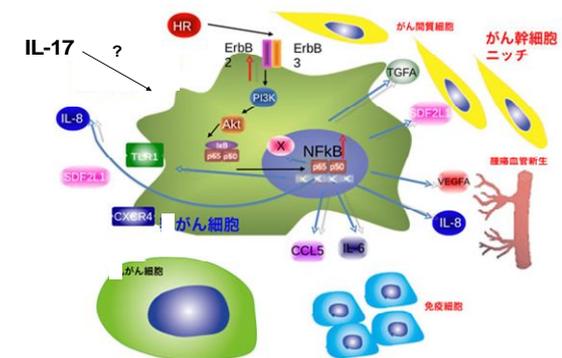
消化器癌においては手術手技の確立、新規抗癌剤、さらには新規分子標的治療薬の登場によりその予後は近年、飛躍的に改善された。しかし、遠隔転移、特に腹膜転移では化学療法、分子標的薬が治療の中心となるが、治療抵抗性であることが多く、有効な治療法が未だ無いのが現状である。このような状況を克服するためにはより強力な治療法の開発とともに、治療抵抗性の原因となる血管新生、がん幹細胞、腫瘍免疫逃避機構の解明、打破がキーポイントとなる。がん幹細胞、腫瘍免疫逃避機構、血管新生はすべて腫瘍内の慢性炎症環境おいての間質との相互作用の結果、それぞれが維持、増殖されていることは明らかであるが、特定の分子は同定されていない。

(2) IL-17 と腫瘍

IL-17 は炎症性腸疾患、関節リウマチなどで慢性炎症のキーサイトカインとして注目されてきた炎症性サイトカインである (Gut, 2003、Arthritis Rheum, 1999)。IL-17 と腫瘍との関連は腫瘍増殖因子であるとする報告や (J Exp Med, 2009) 反対に抑制因子であるとする報告があり (Blood, 2009) IL-17 が腫瘍増殖に働くのかは controversial であった。しかし我々はヒト胃癌腫瘍組織において IL-17 の発現量と新生血管の増生は正の相関を示し、さらには脈管侵襲、リンパ節転移および病期との有意な相関を認めること報告した (Iida, Hayata et al, Oncol Rep, 2011)。さらに申請者



はマウス大腸癌細胞株 MC38 皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍微小環境での IL-17 制御が新生新生血管の抑制とともに腫瘍局所で抗腫瘍免疫の増強させることで腫瘍増殖抑制することを解明し、腫瘍局所で産生される IL-17 は腫瘍増殖に作用することを明らかにした (Hayata et al, Pros One, 2013)。(左図参照) この研究結果は IL-17 が血管新生増生作用と骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSC)などの免疫抑制性細胞の誘導し、抗腫瘍免疫を減弱させるとする最近の報告と一致する (J Exp Med, 2009、J Immunol, 2010)。一方、IL-17 とがん幹細胞の関連についての報告はこれまでほとんどなく、IL-17 ががん幹細胞に及ぼす影響については全く理解されていない。しかし、腫瘍周囲微小環境、特に血管領域でがん幹細胞



の維持がなされているという、いわゆる血管ニッチの概念が創出されており (Cancer Cell, 2007、Cancer Res, 2010)、新生血管増生と深くかかわりを持つ IL-17 はがん幹細胞にとって重要な役割を担っている可能性は高く、このメカニズムを解明することは、がん幹細胞の制御につながり、将来的な治療抵抗性の打破の一助となる。

(3) IL-17 と他の分子標的薬

しかし、これまでの報告と同様にわれわれの検討でも腫瘍局所 IL-17 制御だけでは腫瘍の根絶には至らなかったため、より強力な腫瘍増殖抑制効果を期待し、他の治療との併用することが必須である。最近、IL-17 が VEGF 阻害に介する腫瘍抵抗性を増殖することが示されたことから (Nat Med, 2013)、血管新生

をターゲットして IL-17 制御と抗 VEGF 抗体 (Bevacizumab) との併用、さらに腫瘍免疫をターゲットしては T 細胞を抑制する CTLA-4 刺激をブロックすることで抗腫瘍免疫を増強する抗 CTCA-4 抗体 (Ipilimumab) との併用療法によりその相乗的な効果が期待できる。

本研究は治療抵抗性である消化器癌腹膜播種に対する新規分子標的治療の開発を目的とし、腫瘍局所の IL-17 を target として、その可能性を検討し、他の分子標的薬とともに臨床応用することが最終目的である。

2. 研究の目的

本研究では IL-17 が治療抵抗性の問題となるがん幹細胞に及ぼす影響を検討し、さらに消化器癌腹膜播種における IL-17 制御と分子標的薬との併用療法による新規の分子標的治療を開発することを目的とする。本研究での具体的研究項目は 腫瘍局所 IL-17 抑制のため、IL-17 siRNA 発現アデノウイルスベクターを使用し、マウス腹膜播種モデルにおける腫瘍増殖抑制効果の検討。 IL-17 制御によるがん幹細胞に及ぼす影響の検討。 腹膜播種モデルにおける IL-17 制御と分子標的薬との併用療法による腫瘍増殖効果の検討。

3. 研究の方法

(1) Ad-IL-17 siRNA を用いた腹膜転移モデルにおける IL-17 発現抑制による腫瘍増殖抑制効果の検討

マウス大腸癌細胞株 MC38、CT26 5×10^5 細胞を C57BL/6 マウス、BALB/c マウスに腹腔内投与する。Day3、6、9 に Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU、Ad-SNC 1×10^9 PFU、PBS を腹腔内投与する 3 群(各群 n=7)で腫瘍増殖抑制効果を検討する。腫瘍増殖抑制効果の判定は、survival と、腫瘍細胞接種 12 日目にマウスを sacrifice し腹膜転移の総重量、個数を計測し、判定する。また、Ad-IL-17 siRNA による腫瘍内 IL-17 抑制効果を検討するために各群の腫瘍から Rneasy Mini Kit (QIAGEN)) を用いて total mRNA を抽出し、real-time PCR を行い、mRNA レベルでの IL-17 knockdown されていることを確認する。また IL-17 のタンパクレ

ベルでの抑制を確認する tumor lysate を使用し、IL-17 を ELISA (R&D) にて測定する。

(2) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の免疫環境変化の検討

(1) の実験で、Day12 に腹膜転移組織を採取し、細切後、酵素処理 (1 mg/ml collagenase、0.2 mg/ml hyaluronidase、0.5 mg/ml DNaseI (Sigma)) の後、メッシュを通過させ単細胞化する。これを 100%、80% FicolI を用いた不連続密度勾配法により免疫担当細胞と腫瘍細胞を分離する。脾臓は同時に採取し、メッシュを通した後、ficoll100% で免疫担当細胞を分離する。分離した免疫担当細胞を FACS にて評価する。Th1/Th2 バランスのため、分離した脾細胞、TIL を GoigiPlug (BD) 存在下で PMA (10 ng/ml) ionomycin (500 ng/ml) (Sigma) で 5 時間刺激し細胞回収後、PerCP-Cy5.5 anti-CD4Ab で細胞表面染色した後、固定、浸透化処理をして FITC anti-IFN γ Ab、PE anti-IL-4Ab (BD) を用いて細胞内染色を行う。また、MDSC は PerCP -Cy5.5 anti-CD45Ab、FITC anti-CD11bAb、PE anti-Gr-1Ab (BD)、Treg 細胞は PerCP-Cy5.5 anti-CD4Ab、FITC anti-CD25Ab で細胞表面染色の後、固定、浸透化処理をして PE anti-FOXP3 Ab で細胞内染色を行う。

(3) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の抗腫瘍免疫に及ぼす影響の検討

(2) の実験と同様に脾細胞、TIL を抽出し、autoMACS を使用し CD5+細胞を分離し、細胞単核球を分離し、脾細胞を in vitro にて X 線照射 (75Gy) で非働化した MC38、CT26 細胞と 3 日間混合培養したのち、autoMACS (Miltenyi Biotec) で CD8+細胞を分離し、MC38、CT26 細胞を target とした 4 時間 Cr-release assay にて CTL 活性を評価する。

(4) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の新生血管、がん幹細胞に及ぼす影響の検討

(1) の実験と同モデルで、Day12 に腹膜転移組織を採取し、新鮮凍結切片を作製し、抗 CD31 抗体にて血管内皮細胞を免疫化学組織染色にて評価する。さらに腫瘍内の VEGF タンパク発現をウエスタンブロットにて定量

化する。がん幹細胞の発現を評価するために、腫瘍組織から Ficol12 層遠心分離にて腫瘍細胞を分離し、FACS で side population (SP)にて評価する。また腫瘍組織切片を作製し、ALDH と CD31 の 2 重染色を施行し、新生血管とがん幹細胞の分布について検討する。

(5) in vitro での IL-17 の血管内皮細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞に及ぼす直接的作用の検討

IL-17 の間質細胞、血管内皮細胞への直接的な血管新生作用の確認するために、マウス線維芽細胞株 MEF 細胞を rIL-17 を 10ng/ml, 100ng/ml 存在下 48 時間培養し、TGF- β 、VEGF 産生能を ELISA で評価し、angiopoietin-1(Ang1)発現量をウエスタンブロットで評価し、コントロール群と比較検討する。さらにヒト血管内皮細胞株 HUVEC を rIL-17 存在下で培養し、新生血管形成能をコントロール群と比較検討する。また IL-17 の腫瘍細胞への直接的な作用を確認するために CT26、MC38 細胞を rIL-17 存在下で 48 時間培養し、TGF- β 、VEGF 産生能を ELISA で確認するとともに、2 週間継代培養した後に、FACS で side population をコントロール群と比較し、がん幹細胞の性状解析を行う。

(6) Ad-IL-17 siRNA を用いた腫瘍局所 IL-17 発現抑制および分子標的薬併用療法による腫瘍増殖抑制効果の検討

MC38、CT26 5×10^5 細胞を C57BL/6、BALB/c マウスに腹腔内投与する。Day3、6、9 に Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU と抗 CTLA-4 抗体、抗 VEGF 抗体を腹腔内投与する。Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU を腹腔内投与のみ、分子標的薬投与のみ (各群 n=7) の 2 群を加え、3 群での腫瘍増殖抑制効果を survival、Day14 の腫瘍個数、腫瘍総重量で比較検討する。

4 . 研究成果

(1) Ad-IL-17 siRNA を用いた腹膜転移モデルにおける IL-17 発現抑制による腫瘍増殖抑制効果の検討

マウス大腸癌細胞株 MC38、CT26 5×10^5 細胞を C57BL/6 マウス、BALB/c マウスに腹腔内投与する。Day3、6、9 に Ad-IL-17 siRNA 1×10^9 PFU、Ad-SNC 1×10^9 PFU、PBS を腹腔内投与する 3 群 (各群 n=7) で腫瘍増殖抑制効果

を検討する。腫瘍増殖抑制効果の判定は、survival と、腫瘍細胞接種 12 日目にマウスを sacrifice し腹膜転移の総重量、個数を計測し、判定する。また、Ad-IL-17 siRNA による腫瘍内 IL-17 抑制効果を検討するために各群の腫瘍から Rneasy Mini Kit (QIAGEN))を用いて total mRNA を抽出し、real-time PCR を行い、mRNA レベルでの IL-17 knockdown されていることを確認する。また IL-17 のタンパクレベルでの抑制を確認する tumor lysate を使用し、IL-17 を ELISA にて測定した結果、Ad-IL-17 siRNA 投与群ではコントロール群と比較して腫瘍内 IL-17 のタンパク質を有意に抑制していた。

(2) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の免疫環境変化の検討

(1)の実験で、Day12 に腹膜転移組織を採取し、細切後、酵素処理 (1 mg/ml collagenase、0.2 mg/ml hyaluronidase、0.5 mg/ml DNaseI) の後、メッシュを通過させ単細胞化する。これを 100%、80%Ficoll を用いた不連続密度勾配法により免疫担当細胞と腫瘍細胞を分離した。分離した腫瘍浸潤免疫担当細胞を FACS で、Th1/Th2 バランス、MDSC の population の変化を検討した。Ad-IL-17 siRNA 投与群ではコントロール群と比較して腫瘍局所では Th1 dominant となっており、Treg、MDSC の減少を認めた。

(3) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の抗腫瘍免疫に及ぼす影響の検討

(2)の実験と同様に腫瘍浸潤免疫担当細胞を抽出し、autoMACS を使用し CD5+細胞を分離し、細胞単核球を分離し、MC38、CT26 細胞を target とした 4 時間 Cr-release assay にて CTL 活性を評価すると、Ad-IL-17 siRNA 投与群ではコントロール群と比較して CTL 活性の増強を認めた。

(4) Ad-IL-17 siRNA 腹腔内投与による腫瘍局所 IL-17 発現抑制の新生血管、がん幹細胞に及ぼす影響の検討

(2)の実験と同モデルで、抗 CD31 抗体にて血管内皮細胞を免疫化学組織染色にて評価すると Ad-IL-17 siRNA 投与群ではコントロール群と比較して腫瘍内の新生血管の減少

を認めた。また腫瘍内の VEGF タンパクも Ad-IL-17 siRNA 投与群ではコントロール群と比較して発現低下を認めた。

がん幹細胞の発現の発現は Ad-IL-17 siRNA 投与群とコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。また腫瘍組織切片を作製し、ALDH と CD31 の 2 重染色を施行し、新生血管とがん幹細胞の分布について検討したが、有意な所見を得られなかった。

(5) in vitro での IL-17 の血管内皮細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞に及ぼす直接的作用の検討

マウス線維芽細胞株 MEF 細胞を rIL-17 の存在下 48 時間培養し、TGF- β 、VEGF 産生能と、angiopoietin-1(Ang1)発現量を評価すると、コントロール群と比較し、rIL-17 投与群でこれらの血管増殖因子の有意な増加を認めた。さらにヒト血管内皮細胞株 HUVEC を rIL-17 存在下で培養し、新生血管形成能をコントロール群と比較検討し、新生血管の増生を確認した。分子標的薬との併用療法については時間的問題から検討できていない。

以上より、マウス消化器癌腹膜転移モデルにおいて IL-17 を抑制することで抗腫瘍免疫を活性化し、血管新生を抑制できることが明らかとなった。このことから消化器癌腹膜転移において IL-17 は新規の分子標的の一つとなりうる事が判明した。

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 0 件)

[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

早田 啓治 (HAYATA, Keiji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号 : 90637654

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()