

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590418

研究課題名（和文） インターロイキン IL-27 の血管新生阻害による抗腫瘍作用の解析

研究課題名（英文） Analysis of antitumor effect by antiangiogenic activity of interleukin-27

研究代表者

清水 本武 (SHIMIZU MOTOMU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：10124463

研究成果の概要:本研究では IL-6/IL-12 ファミリーメンバーの IL-27 による抗腫瘍作用機構について検討した。高転移性で低抗原性の悪性メラノーマ B16F10 に IL-27cDNA を導入した腫瘍において、IL-27 は強い抗腫瘍効果を示した。IL-27 の血管新生阻害を検討すると、強い阻害作用を示した。従って、IL-27 の抗腫瘍作用は免疫増強ばかりではなく、血管新生阻害が重要であること示唆された。IL-27 は IL-12 に比べ毒性は少なく、抗腫瘍効果が同等であることから、がんの免疫療法に有望であることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：癌、免疫学、抗腫瘍作用、インターロイキン 27、IL-27、血管新生阻害

1. 研究開始当初の背景

がん増殖のためには、血管から栄養と酸素の供給が必要不可欠である。がんは血管新生因子を遊離して、血管内皮細胞に働きかけ、血管を新たに作っている。そこで、がんの血管を壊せば、がんは死滅する。従って、血管新生阻害はがん治療の重要な標的である。それゆえ、血管新生阻害剤は、がんの増殖、浸潤および転移を抑制し、がん治療に非常に有効である。しかし、IL-27 のがん血管新生阻害の機構はまだ解明されていない。我々は、IL-27 の抗腫瘍機構を調べる過程で、血管新生阻害作用に気がつき、現在、IL-27 によるがん血管新生の阻害機構を詳細に解析中である。

IL-27 は、がん血管新生阻害では血管内皮細胞に、抗腫瘍免疫では T 細胞に作用し、それぞれ異なる標的に作用しており、しかも抗腫瘍作用に相乗的に働くので、IL-27 によるがん治療効果が更に増強する。従って、IL-27 は作用機序が異なる二つの抗腫瘍作用によって、がんの増殖と転移を阻害する。即ち、IL-27 は、がん治療に極めて有効ながん血管新生阻害と抗腫瘍免疫増強の両方を持つので、がん治療に最適かつ理想的な新規サイトカインである。

2. 研究の目的

我々は新規インターロイキン IL-27 による抗腫瘍免疫の増強作用を検討している。その

過程で、IL-27はT, B, NK細胞欠損の免疫不全 NOD-SCID マウスにおいても強い抗腫瘍効果が認められたことより、IL-27の血管新生阻害作用が予想された。そこで、血管新生阻害作用を検討した結果、我々は、IL-27の強い血管新生阻害作用を世界で最初に明らかにした(M. Shimizu, M. Shimamura, T. Yoshimoto, et al., *Antiangiogenic and antitumor activities of interleukin-27 (IL-27)*. *J. Immunol.* 176, 7317-7324, 2006.)。従って、IL-27は、がん血管新生阻害作用と抗腫瘍免疫の増強作用を示すので、がん治療に最良の新規サイトカインである。しかし、IL-27のがん血管新生阻害作用はまだ不明である。本研究の目的はIL-27のがん血管新生阻害機構を解明した後、IL-27による新規がん治療法を確立することである

3. 研究の方法

(1) IL-27のin vitroがん血管新生阻害作用の解析

ヒト臍帯血管内皮細胞はIL-27受容体を発現しているため、IL-27は血管内皮細胞に直接作用すると考えられる。従って、IL-27の血管内皮細胞に対する作用を検討した。

① IL-27による血管内皮細胞の増殖抑制活性の検討

ヒト臍帯血管内皮細胞を用いた細胞増殖抑制活性を行った。細胞を血管内皮増殖因子VEGFまたは上皮細胞増殖因子EGFの共存下、各種濃度のIL-27を加えて、48時間培養後、細胞数をカウントし、IL-27の増殖阻害効果を検討した。

② IL-27の血管内皮細胞遊走活性の検討

ヒト臍帯血管内皮細胞の遊走能に対するIL-27の阻害活性は、培養細胞を一定の幅で掻き取った後、細胞が隙間を再び埋めるまでの時間を比較した(wound法)。

③ IL-27の管腔形成能の検討

増殖因子の共存下IL-27を添加して、マトリゲル処理したウェルでヒト臍帯血管内皮細胞を培養して、形成される管腔(擬似血管)を観察し、IL-27の管腔形成阻害活性を調べた。

(2) IL-27のin vivoがん血管新生阻害作用の解析

① IL-27発現B16F10腫瘍内での血管新生阻害ケモカイン産生

IL-27発現B16F10腫瘍の皮内移植部位から腫瘍を採取した後、mRNAを抽出し、RT-PCR法で血管新生阻害ケモカインIP-10及びMIGが産生しているかどうかを調べた。

② IP-10 KOマウス及び抗MIG mAb投与による解析

IL-27発現B16F10腫瘍をIP-10KOマウスの皮内移植し、または抗MIG mAbを併用し、抗腫瘍効果の低下を検討した。

③ マウス背部皮下法によるIL-27の血管新生阻害作用の検討

IL-27発現B16F10腫瘍をミリポアフィルターで仕切ったチャンバーの中に入れ、マウスの背部皮下に移植した。一週間後に移植部位の皮膚を取り、血管の写真判定をした。IL-27が、B16F10腫瘍で誘導されたがん血管新生を抑制するかどうかを検討した。

④ がん新生血管の組織化学的解析

IL-27発現B16F10腫瘍をマウスに移植した後、腫瘍組織を取り、血管内皮細胞のマーカーCD31の特異抗体を用いて、血管の組織化学的検索をした。

⑤ DNAマイクロアレイによるIL-27の血管新生阻害の解析

IL-27発現またはNeo発現B16F10をマウスに皮内移植した後、腫瘍組織を採取し、RNAを抽出した。DNAマイクロアレイ法により、IL-27によって増減した遺伝子を同定し、IL-27の血管新生阻害作用を遺伝子レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) IL-27のin vitroがん血管新生阻害作用の解析

① IL-27による血管内皮細胞の増殖抑制活性の検討

IL-27は血管内皮細胞に対して増殖抑制活性がなかった。

② IL-27の血管内皮細胞遊走活性の検討

IL-27の血管内皮細胞遊走に対する抑制活性はなかった。

③ IL-27の管腔形成能の検討

IL-27は管腔形成を阻害しなかった。

(2) IL-27のin vivoがん血管新生阻害作用の解析

① IL-27発現B16F10腫瘍内での血管新生阻害ケモカイン産生

IL-27発現B16F10腫瘍内で血管新生阻害ケモカインIP-10とMIGの産生が認められた。

② IP-10 KOマウス及び抗MIG mAb投与による解析

IP-10 KOマウスに抗MIG mAb投与しても、IL-27の抗腫瘍作用は低下しなかった。

③ マウス背部皮下法によるIL-27の血管新生阻害作用の検討

IL-27による血管新生阻害作用が認められた。

④ がん新生血管の組織化学的解析

IL-27によって組織化学的に血管新生の阻害が認められた。

⑤ DNAマイクロアレイによるIL-27の血管新生阻害の解析

IL-27によって誘導され抗腫瘍に関係すると示唆される分子の候補が同定された。

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 5 件)

- ① T. Yoshimoto, N. Morishima, I. Mizoguchi, M. Shimizu, H. Nagai, S. Oniki, M. Oka, C. Nishigori, J. Mizuguchi, Anti-proliferative activity of IL-27 on melanoma. 査読有 J. Immunol., 180, 6527-6535, 2008.
- ② J. Kasuga, D. Yamasaki, K. Ogura, M. Shimizu, M. Sato, M. Makishima, T. Doi, Y. Hashimoto, H. Miyachi, SAR oriented novel discovery of substituted phenylpropanoic acid-PPAR pan agonist with 4-adamantylphenyl group as a hydrophobic tail part. 査読有 Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 1110-1115, 2008.
- ③ S. Lee, C. Shinji, K. Ogura, M. Shimizu, S. Maeda, M. Sato, M. Yoshida, Y. Hashimoto, H. Miyachi, Design, synthesis, and evaluation of isoindolinone-hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase (HDAC) inhibitors. 査読有 Bioorg. Med. Chem. Lett., 17, 4895-4900, 2007.
- ④ 武田泰隆、榮光子、善本隆之、森本純司、清水本武、柳衛広宣: 正電荷ポリマーによる乳癌細胞に対する遺伝子導入の基礎研究. 査読有 乳癌基礎研究, 16, 43-49, 2007.
- ⑤ 清水本武, 島村眞里子, 善本隆之: IL-27の血管新生抑制作用. 査読無 臨床免疫, 47, 298-302, 2007.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Shimizu, M., Mizuguchi, J, Yoshimoto, T. : Analysis of in vivo antitumor activity of IL-27 against melanoma. The 38th Annual Meeting of the Japanese society for immunology. 2008.12.1-3, Kyoto.
- ② Shimizu, M., Sato, M., Ogura, K., Nishito, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J, Yoshimoto, T. : Analysis of antitumor activity of IL-2. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008.10.28-30, Nagoya.
- ③ Ogura, K., Kawashima, I., Ishikawa, Y-I., Sato, M., Shimizu, M. : Comprehensive gene expression analysis of melanoma B16 cells that Hgs expression level changed metastasis activity. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008.10.28-30, Nagoya.
- ④ Sato, M., Yajima Y., Ogura, K., Shimizu, M., Nishito, Y., Miyachi H. : A novel PPAR alpha/beta/gamma-pan agonist inhibits

cell growth in human pancreatic cancer cell lines. 67th Annual Meeting of the Japanese cancer association. 2008.10.28-30, Nagoya.

- ⑤ Ogura, K., Kawashima, I., Sato, M., Shimizu, M. : Effects of Hgs on metastasis ability of mouse melanoma B16 cells. The 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008.6.27-7.3, Athens (Greece).
- ⑥ Sato, M., Yajima Y., Ogura, K., Shimizu, M., Miyachi H. : TIPP-703, A peroxisome proliferator-activated receptor pan agonist, induces a G1-phase arrest in human pancreatic carcinoma cell lines. The 33rd FEBS Congress - 11th IUBMB Conference "Biochemistry of Cell Regulation" 2008.6.28-7.3, Athens (Greece).
- ⑦ 小倉潔, 佐藤眞友美, 清水本武: Hgs 高発現および抑制マウスメラノーマ B16 細胞の遺伝子発現プロファイリング. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回生化学会大会合同大会, 2007.12.11~15, 横浜.
- ⑧ Shimizu, M., Mizuguchi, J., Yoshimoto, T. : Role of chemokines in antitumor activity of Fas ligand (CD95L)-expressing tumor. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007.11.20-22, 東京.
- ⑨ Shimizu, M., Sato, M., Ogura, K., Takeda, Y., Mizuguchi, J, Yoshimoto, T. : Role of macrophages and neutrophils in antitumor activity of Fas ligand (CD95L)-expressing tumor. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2007.10.3-5. Yokohama.
- ⑩ Ogura, K., Horiguchi, S., Sato, M., Shimizu, M. : Effects of RNA Interference of GEF-1/Hgs on Metastasis of Mouse Melanoma B16 cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2007.10.3-5. Yokohama.
- ⑪ Sato, M., Ogura, K., Shimizu, M., Kunimasa, K., Ohta, T., Kaji, K., Miyachi, H. : Novel PPAR α, γ dual agonists induce a G1-phase arrest in pancreatic cancer cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2007.10.3-5. Yokohama.
- ⑫ Shimamura, M., Ashino, H., Shimizu, M., Yamamoto, Y., Minamikawa-Tachino, R., Takahashi, S. : L-carnosine, an endogenous bioactive dipeptide inhibits angiogenesis and tumor metastasis. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.

2007. 10. 3-5, Yokohama.

- ⑬ 武田泰隆, 榮光子, 善本隆之, 森本純司,
清水本武, 柳衛宏宣, 螺良愛朗: 正電荷ボ
リマーを用いた Fas リガンド (FasL) 遺伝
子導入による乳癌遺伝子治療に向けた基
礎的研究. 第 18 回乳癌基礎研究会,
2008. 7. 12-13, 福島.

[その他]

ホームページ

<http://www.rinshoken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 本武 (SHIMIZU MOTOMU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床
医学総合研究所・主任研究員

研究者番号: 10124463

(2) 研究分担者

島村 眞里子 (SHIMAMURA MARIKO)

(2007 年度で終了) 財団法人東京都医学
研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主
任研究員

研究者番号: 00124462

(3) 連携研究者

善本 隆之 (YOSHIMOTO TAKAYUKI)

(2007 年度は研究分担者) 東京医科大学
医学部・助教授

研究者番号: 80202406