

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590414

研究課題名(和文) IL-18誘導性腫瘍細胞遊走抑制因子の同定と遊走抑制機構の解明

研究課題名(英文) Identification of IL-18-induced Tumor-Cell Migration Inhibitory Factor(s) and Elucidation of its Action Mechanism.

研究代表者

山田 直子 (YAMADA NAOKO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10319858

研究成果の概要(和文)：IL-18は細胞障害活性をもつT細胞やNK細胞を活性化することで抗腫瘍効果をもつが、我々は更に、IL-18が血清中に腫瘍細胞の遊走を抑制する因子を誘導し腫瘍の転移を抑制することを見つけた。この研究はこの遊走抑制因子を同定する事を目的とした。この研究において、①IL-18は、血清だけでなく肝臓や肺の細胞溶解液中にも腫瘍細胞遊走抑制活性を誘導すること、②遊走活性を持つ蛋白は、分子量約3万以下であることを明らかにし、いくつかの遊走抑制因子の候補を見つけた。

研究成果の概要(英文)：IL-18 shows an anti-tumor action through activation of T cells and natural killer cells. We found another action of IL-18, i.e., the inhibition of metastasis by inducing the factor(s) in serum which suppresses the tumor cell mobility. In this study, we aimed to identify the tumor-cell migration inhibitory factor(s). We have revealed that IL-18 induces the factor(s) in not only serum but also the cell lysate of the liver and lung and that the factor(s) is a protein of molecular weight of less than 30,000 daltons. We have also found several candidates for the factor(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の転移は患者の予後を左右するため、転移の抑制は悪性腫瘍の治療において重要な課題である。Interleukin-18 (IL-18)

はNK細胞やT細胞の細胞傷害活性を増強することにより腫瘍増殖抑制作用を示すことが、我々を含む多くの研究により明らかにされた。又、IL-18は腫瘍の転移を抑制するこ

とも報告されたが、それは IL-18 が転移の成立ではなく、転移成立後の腫瘍増殖を抑制することの報告であった。そこで我々は、IL-18 が腫瘍増殖抑制作用とは無関係に、転移の成立自体を抑制することができるか否かについて検討し、その成果を報告した (Nakamura Y. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother, 2006)。

この研究結果を簡単に述べる。IL-18 の腫瘍増殖抑制作用を除くため、NK 細胞を不活性化する抗アシアロ GM1 血清を投与した T 細胞を欠損するヌードマウスに腫瘍細胞 (高肺転移骨肉腫細胞; LM8) を尾静脈から注入 (静注) する実験的肺転移モデルを用いて、IL-18 の転移成立自体の抑制作用を検討した。LM8 は、IL-18 受容体を保有しておらず、IL-18 が LM8 に直接作用する可能性はない。この転移モデル系で IL-18 を LM8 静注後 5 日目より毎日投与しても肺の転移数は IL-18 を投与しない場合と変わらなかった。しかし、IL-18 を LM8 静注の 5 日から 1 日前に毎日投与すると肺の転移数は著しく減少した。この結果 IL-18 はその腫瘍増殖抑制作用とは無関係に LM8 の肺転移成立を抑制する事が明らかになった。この肺転移抑制機構を解析するため、IL-18 投与マウス血清の LM8 の遊走に及ぼす影響を傷つけアッセイ (wound assay) で検討したところ、血清は LM8 の遊走を著しく抑制した。このことから、血中の IL-18 誘導性 LM8 遊走抑制因子の存在が示された。なおこの因子は B16 メラノーマ細胞、Lewis 肺癌細胞の遊走も抑制した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-18 投与でマウスの血中に増加する腫瘍細胞遊走抑制因子を同定し、その因子の作用の分子機構を解明することである。

今回行った研究項目は、以下の 4 項目である。

(1) IL-18 投与後の血清中遊走抑制因子の濃度が最大となる条件の決定

(2) IL-18 投与マウスの血清以外の臓器における遊走抑制因子の存在の検討

(3) 遊走抑制因子を産生する細胞の特定

(4) IL-18 投与マウス血清又は臓器中の遊走抑制因子の同定

3. 研究の方法

(1) IL-18 投与後の血清中の遊走抑制因子濃度が最大となる条件の決定

①マウスの系統は、ICR ヌードマウスと C57BL/6 マウスで比較した。② IL-18 (2 μ g/mouse) の投与回数は、1 回と 4 回で比較した。③ IL-18 (2 μ g/mouse) 投与後の血清回収時期は、5、16、24、30 時間後で比較

した。④内因性の IL-18 の血中濃度を増加させるために *Propionibacterium acnes* (P. acnes) での前処置と LPS (Lipopolysaccharide) を投与し、血清回収時期を LPS 投与後、0、2、2.5、3、3.5、4、5 時間で、LPS の投与量を 0.05、0.1、0.2、0.5 μ g/mouse で比較した。この 4 条件で回収した血清の腫瘍細胞遊走抑制活性は、高肺転移骨肉腫細胞 (LM8) を用いて遊走抑制能アッセイのために我々が改良したインベージョンアッセイ法及び傷つけアッセイ法を用いて評価した。

インベージョンアッセイ法: 24 ウェル用のトランスウェル (HTS FluoroBlock Insert, FALCON; 励起光を透過しない膜を使用) の下面にフィブロネクチンをコートする。LM8 細胞をトランスウェル上室に入れ、培養液に IL-18 投与及び非投与ヌードマウス血清等を添加する。24 時間培養後細胞を蛍光標識し、下方励起下方側光蛍光プレートリーダーで測定すると、フィルター下面にインベージョンした細胞の蛍光のみ測定できる。この蛍光強度により LM8 細胞遊走に及ぼす効果を定量的に評価する。これまでの傷つけアッセイ法に比べて、この方法は測定感度がかなり改良されている。

(2) IL-18 投与マウスの血清以外の臓器における遊走抑制因子の存在の検討

T 細胞を欠損している ICR ヌードマウスに NK 細胞活性を抑制させるため抗アシアロ GM1 血清を投与したマウスに PBS または IL-18 (2 μ g/mouse) を 1 日目から 4 日間連日投与し、最終投与から 24 時間後に血清の回収と肝臓、脾臓、胸腺、肺の摘出を行った。摘出した各臓器はホモジネート後、遠心機で上清を分離した。分離した細胞溶解液中の腫瘍細胞遊走抑制因子の活性はインベージョンアッセイ法及び傷つけアッセイ法を用いて評価した。

(3) 遊走抑制因子を産生する細胞の特定

C57BL/6 マウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、3 日後に腹腔内から侵出性マクロファージを分離した。分離した腹腔内マクロファージを IL-18 添加または無添加の培養液で 1 週間培養し、培養液を回収した。回収した培養液中の遊走抑制活性はインベージョンアッセイ法を用いて評価した。

(4) IL-18 投与マウス血清又は臓器中の遊走抑制因子の同定

①遊走抑制因子の分子量の解析

[1]遠心式フィルターを用いた分子量の解析

IL-18 投与及び非投与マウスの血清あるいは細胞溶解液を種々の分子量用遠心式フィルターで各分子量に分離し、各分離の腫瘍

細胞遊走抑制活性はインベーションアッセイ法及び傷つけアッセイ法を用いて評価した。遠心式フィルターは、タンパク質の分画分子量 3 千、1 万、3 万、5 万、10 万のフィルター (MICROCON, Millipore) を用いた。

[2]液体クロマトグラフィーを用いた解析

IL-18 投与及び非投与マウスの血清あるいは細胞溶解液を高速液体クロマトグラフィー (Smart System) で陰イオン交換カラム (MonoQ) やゲル濾過カラム (Superdex) を用いて分画し、各分画の遊走抑制活性はインベーションアッセイ法及び傷つけアッセイ法を用いて評価した。陰イオン交換カラムによる分画は 10%ゲルで SDS-PAGE を行い、ゲルはクマシーブルーによる染色、あるいはウェスタンブロットを行った。

②活性分画の 2 次元電気泳動法による解析

IL-18 投与及び非投与マウスの血清あるいは細胞溶解液またはその分画試料を用いて 2 次元電気泳動を行った。1 次元目等電点電気泳動には pH3-10 または pH4-7 のストリップゲル、2 次元目 SDS-PAGE には 12%ゲルを用いた。ゲルは蛍光染色液 (Flamingo, BioRad) で染色し、スキャナーで読み取った。読み取ったデータから IL-18 処置、未処置試料で発現に差のあるスポットを見つけ、各スポットの分子量と等電点 (pI) を割り出し、Web 上のデータベースで検索を行った。

③質量分析装置を用いた解析

2 次元電気泳動を行い蛍光染色したゲル上で IL-18 投与及び非投与マウスの試料で発現に差のあるスポットを見つけ、各スポットを切り出し、トリプシンで各スポットのゲルをゲル内消化した後、タンパク質を抽出した。抽出した各タンパク質は、質量分析装置 (TOF-MS Voyager) を用いて質量分析を行った。マトリックスには CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸) を用いた。得られた質量値は Web 上でデータベースを用いて検索し、タンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) IL-18 投与後の血清中遊走抑制因子の濃度が最大となる条件の決定

①マウスの系統、②IL-18 投与回数、③IL-18 投与後回収時期、④P. acnes 及び LPS を用いた場合の回収時期と LPS 投与量の 4 条件に関して、各条件の血清を回収しインベーションアッセイ法を用いて LM8 細胞の遊走抑制活性を調べた。①マウスの系統は、ICR ノードマウスと C57BL/6 マウスの血清で共に IL-18 誘導性遊走抑制活性が見られた。しかし基本的な細胞遊走活性は C57BL/6 マウスより ICR ノードマウスの血清のほうが高く、遊走抑制活性の差が大きかった。②ICR ノードマウスに 1 回あるいは 4 日連日 4 回 IL-18

を投与した血清の遊走抑制活性を比較すると、1 回より 4 回投与血清のほうが遊走抑制活性は高かった。③ICR ノードマウスに IL-18 を 4 日連日 4 回投与後 5、16、24、30 時間の血清の遊走抑制活性を比較すると、24 及び 30 時間後血清に高い遊走抑制活性が見られた。④LPS は 0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で投与し、LPS 投与後 0、2、2.5、3、3.5、4、5 時間の血清を回収し、遊走抑制活性を調べた。遊走抑制活性は LPS の投与量が多いほど、また LPS 投与後の時間が長いほど高かったが、LPS より IL-18 投与のほうが遊走活性は高かった。これらの IL-18 誘導性遊走抑制因子がマウス内で高くなる条件を合わせ、抗アジアロ GM1 血清を投与した ICR ノードマウスに、4 日連日 4 回 IL-18 を投与した 24 時間後に採材する事にした。

(2) IL-18 投与マウスの血清以外の臓器における遊走抑制因子の存在の検討

IL-18 投与あるいは非投与マウスの血清及び肝臓、脾臓、胸腺、肺の細胞溶解液中での遊走抑制活性をインベーションアッセイ法及び傷つけアッセイ法を用いて調べた。血清ではインベーションアッセイ法 (図 1)、傷つけアッセイ法どちらも IL-18 誘導性遊走抑制活性が見られた。しかし肝臓、肺の細胞溶解液ではインベーションアッセイ法のみ IL-18 誘導性遊走抑制活性が見られた。また脾臓、胸腺はどちらのアッセイ法でも IL-18 誘導性遊走抑制活性は見られなかった。このことから血清以外にも肝臓、肺で IL-18 誘導性遊走抑制因子が存在する可能性が示された。

(3) 遊走抑制因子を産生する細胞の特定

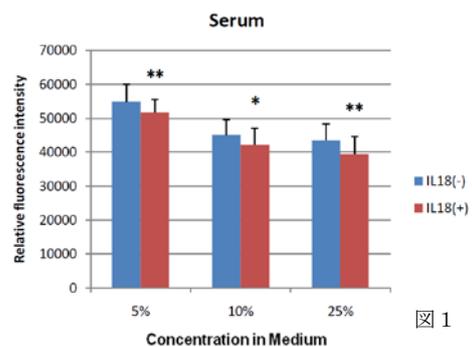


図 1

血清や肝臓、肺に共通する IL-18 誘導性遊走抑制因子を産生する細胞の 1 つとしてマクロファージである可能性を調べた。マウス腹腔内マクロファージを IL-18 添加または無添加の培養液で 1 週間培養した培養液を回収した。回収した培養液中の遊走抑制因子の活性はインベーションアッセイ法を用いて評価した。血清に比べて回収した培養液を用いた場合は基本的な腫瘍細胞遊走活性が低く、IL-18 の添加と無添加による遊走抑制活性の差は検出できなかった。改善策として①培養

液の濃縮と透析を行う。②細胞数を増やすためマクロファージの培養細胞株 RAW264.7 を用いる。③遊走抑制活性が見られた IL-18 投与マウスの肝臓や肺のマクロファージを使う。ことが考えられ、今後行う予定である。

(4) IL-18 投与マウス血清又は臓器中の遊走抑制因子の同定

①遊走抑制因子の分子量の解析

[1]遠心式フィルターを用いた分子量の解析

IL-18 投与及び非投与マウスの血清及び肝臓細胞溶解液を遠心式フィルターで分画し、各分画の遊走抑制活性をインベージョンアッセイ法及び傷つけアッセイ法で調べた。各フィルターの上層と下層の分画をそれぞれアッセイした結果、分子量 3 万以下の分画に大きな遊走抑制活性が見られた。また、2つのフィルターを組み合わせた場合、分子量 5 万～10 万の分画では遊走抑制活性は見られないが、分子量 3 万～10 万の分画には遊走抑制活性が見られた。またこれまでに血清を熱処理やトリプシン処理することで抑制活性が見られなくなることから IL-18 誘導性遊走抑制因子はタンパク質であると予想される。そこで IL-18 誘導性遊走抑制因子は 3 万以下あるいは 3 万付近のタンパク質と考えられる。

[2]液体クロマトグラフィーを用いた解析

IL-18 投与及び非投与マウスの血清あるいは肝臓細胞溶解液を高速液体クロマトグラフィーで分画し、各分画の遊走抑制活性をインベージョンアッセイ法及び傷つけアッセイ法で調べた。ゲルろ過カラムで各血清を 30 個に分画し、傷つけアッセイ法を用いて遊走抑制活性を調べた結果、第 20 と第 26 分画に遊走抑制活性が見られた。また陰イオン交換カラムで各血清を 30 個に分画し、インベージョンアッセイ法及び傷つけアッセイ法で遊走抑制活性を調べたが、活性を検出できなかった。そこで SDS-PAGE を行い、クマシーブルーで染色して比較したところ、第 9～第 15 分画、第 15 分画、第 15～第 16 分画、第 20～第 21 分画、第 25 分画、第 26～第 27 分画に IL-18 投与、非投与間で差のあるバンドが見られた。そのうち第 9～第 15 分画の約 70kDa はウェスタンブロットにより mouseIgG heavy chain であることが分かったが、他のバンドに関しては同定できていない。

②活性分画の 2 次元電気泳動法による解析

血清あるいは肝臓細胞溶解液または遠心式フィルターによる分子量 3 万以下の分画を用いて 2 次元電気泳動を行い、発現に差のあるスポットを確認した。しかし、各スポットのおおよその質量と等電点は分かったが、厳密な質量と等電点を求めることはできなかった。

③質量分析装置を用いた解析

2 次元電気泳動を行い蛍光染色したゲル上のスポットからタンパク質を抽出し、TOF-MS 装置質量分析装置を用いて質量分析を行った。泳動した試料は、IL-18 投与及び非投与マウスの血清を遠心式フィルターで分子量 3 万以下の分画を用いた。また 1 枚のゲル上の 1 つのスポットから抽出したタンパク質の量では質量解析は困難だったため、何枚かのゲルから同じスポットを回収してからタンパク質を抽出した。TOF-MS 装置を用いて得られた質量値は Mascot 等 Web の解析ソフトで検索を行った。これまでに 41 個のタンパク質の検索を行い、いくつかの候補を見つけた。今後この中から IL-18 誘導性遊走抑制因子の同定を行っていく予定である。

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 9 件)

1. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Nishioka T, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Oncol Rep.* 24(6):1621-7. 2010、査読有

2. Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nishimura F, Meguro M, Yoshizawa S, Okada Y, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Higashi T, Terada N, Matsushita S. Fibroblasts stimulated via HLA-II molecules produce prostaglandin E(2) and regulate cytokine production from helper T cells. *Lab Invest.* 90(12):1747-56. 2010、査読有

3. Yamada N, Hata M, Ohyama H, Yamanegi K, Kogoe N, Nakasho K, Futani H, Okamura H, Terada N. Immunotherapy with Interleukin-18 in Combination with Preoperative Chemotherapy with Ifosfamide Effectively Inhibits Postoperative Progression of Pulmonary Metastases in a Mouse Osteosarcoma Model. *Tumour Biol.* 30(4):176-184, 2009、査読有

4. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. The

Involvement of IL-23 and the Th17 Pathway in Periodontitis. J Dent Res. 88(7):633-8, 2009、査読有

5. Nishio S, Yamada N, Ohyama H, Yamanegi K, Nakasho K, Hata M, Nakamura Y, Fukunaga S, Futani H, Yoshiya S, Ueda H, Taniguchi M, Okamura H, Terada N. Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of alpha-galactosylceramide and interleukin-18. Cancer Sci.; 99(1):113-120, 2008、査読有

6. Yamanegi K, Yamane J, Hata M, Ohyama H, Yamada N, Kato-Kogoe N, Futani H, Nakasho K, Okamura H, Terada N. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, decreases the secretion of soluble Fas by human osteosarcoma cells and increases their sensitivity to Fas-mediated cell death. J Cancer Res Clin Oncol. 135(7):879-889, 2008、査読有

7. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Nishimura F, Takeuchi-Hatanaka K, Matsushita S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nakasho K, Terada N. Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 on NK- and T-cell activity. J Interferon Cytokine Res. 28(9):563-9, 2008、査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 山根木康嗣、小林健太、大山秀樹、小越菜保子、西岡稔浩、秦正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行 ヒストン脱アセチル化阻害剤とDNAメチル化阻害剤の併用による抗腫瘍免疫細胞に対する感受性増加、第 99 回日本病理学会総会、東京、2010. 04. 27-29

2. 山田直子、大山秀樹、山根木康嗣、小越菜保子、秦正樹、中正恵二、岡村春樹、寺田信行 骨肉腫に対するIL-18 とイホマイドの併用療法の可能性 (Immunotherapy with interleukin-18 in combination with preoperative chemotherapy with ifosfamide effectively inhibits postoperative progression of pulmonary metastases in a mouse osteosarcoma model)、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009. 12. 9-12

3. Naoko Yamada, Shoji Nishio, Hideki Ohyama, Koji Yamanegi, Keiji Nakasho, Haruki Okamura, Nobuyuki Terada, Cooperative Antitumor Effects by Combined Administration α -Galactosylceramide and

Interleukin-18 on Pulmonary Metastasis of Malignant Melanoma Cells. The 11th Mutagenesis and Experimental Pathology Society of Australia, December 1-4, 2009, Sydney, NSW, Australia.

4. 大山秀樹、小越菜保子、西岡稔浩、中正恵二、山根木康嗣、山田直子、秦正樹、山根順子、寺田信行 IL12RB2 転写制御領域の多型はT細胞とNK細胞との間で異なった影響を及ぼす、第 98 回日本病理学会総会、京都、2009. 05. 1-3

5. 山根順子、山根木康嗣、大山秀樹、小越菜保子、秦正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行 DNAメチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の併用によるヒト骨肉腫細胞の抗腫瘍免疫細胞抵抗性の減弱、第 98 回日本病理学会総会、京都、2009. 05. 1-3

6. 山根木康嗣、山根順子、大山秀樹、小越菜保子、秦正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行 ヒストン脱アセチル化阻害剤によるヒト骨肉腫細胞の免疫療法抵抗性の減弱、第 98 回日本病理学会総会、京都、2009. 05. 1-3

7. Nishio S, Yamada N, Fukunaga S, Fukunishi S, Futani H, Okamura H, Terada N and Yoshiya S. Enhanced Suppression of Pulmonary Metastasis of Malignant Melanoma Cells by Combined Administration of α -Galactosylceramide and Interleukin-18. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 22-25, 2009, Las Vegas, Nevada.

8. 山根木康嗣、山根順子、秦正樹、大山秀樹、山田直子、小越菜保子、中正恵二、寺田信行 ヒト骨肉腫細胞の免疫療法抵抗性に対するhistone deacetylase inhibitorの効果、第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008. 05. 15-17

9. 大山秀樹、畑中加珠、小越菜保子、西村英紀、曾我賢彦、中正恵二、山根木康嗣、山田直子、秦正樹、山根順子、高柴正悟、寺田信行 IL12RB2 転写制御領域の遺伝子多型が侵襲性歯周炎に対する疾患感受性の個体差に及ぼす影響、第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008. 05. 15-17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 直子 (YAMADA NAOKO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10319858

(2)研究分担者

寺田 信行 (TERADA NOBUYUKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50150339

中正 恵二 (NAKASHO KEIJI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：00217712

大山 秀樹 (OHYAMA HIDEKI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90280685

山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00434944