

平成22年6月15日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890302
 研究課題名（和文） サイトカインシグナル伝達抑制分子（SOCS）の癌治療への応用
 研究課題名（英文） Development of cancer therapy using suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules.
 研究代表者
 世良田 聡 (SERADA SATOSHI)
 医薬基盤研究所・基盤的研究部・免疫シグナルプロジェクト・研究員
 研究者番号：50463302

研究成果の概要（和文）：

前立腺癌、乳癌などの悪性腫瘍においてサイトカインシグナル伝達制御の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている。本研究では我々の研究室にて単離されたサイトカインシグナル伝達抑制分子である SOCS 分子を用いた前立腺癌細胞特異的な治療法の開発を試みた。SOCS3 の遺伝子導入は前立腺癌細胞株 (DU145, LNCaP) に対して優れた抗腫瘍効果を示した。また、前立腺癌特異的膜蛋白質である PSMA を認識する抗体とナノ粒子を用いて前立腺癌細胞株移植モデルマウスにて前立腺癌特異的な薬物送達システムも開発した。

研究成果の概要（英文）：

Dysregulated cytokine signaling is associated with development and progression of cancers such as prostate cancer and breast cancer. In this study, we established a prostate cancer targeted therapy using suppressor of cytokine signaling (SOCS), a family of negative regulators of cytokine signaling, previously cloned in our laboratory. We demonstrated that SOCS3 showed growth inhibition activity in prostate cancer cell lines (DU145, LNCaP) *in vitro*. We also established a prostate cancer-specific drug delivery system using a monoclonal antibody against PSMA, a prostate cancer-specific antigen conjugated nanoparticle *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：サイトカイン、SOCS、癌

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは細胞の分化・増殖・細胞死などの生理機能を調節する分子である。近年、前立腺癌、乳癌などの悪性腫瘍において JAK/STAT 経路にみられる STAT-3 の持続的活性化のようなサイトカインシグナル伝達制御の異常と発癌や癌細胞の増殖亢進との関係が明らかにされている (Yoshimura A, Naka T *et al.* 2007 Nat Rev Immunology)。これらの事は STAT-3 を標的とした阻害剤が癌など難病治療において非常に効果的である事を示唆している。実際に STAT を活性化するキナーゼである JAK に対する低分子阻害剤がこれまで開発され、*in vitro*において抗腫瘍効果を示すことが報告されている。しかしながら、JAK の低分子阻害剤は *in vivo*において正常細胞への重篤な副作用を示したため、癌治療薬として臨床応用されるに至らなかった。そこで、サイトカインシグナル伝達の抑制分子を標的とする癌細胞特異的に輸送する手法を確立することが出来れば、正常組織への副作用を抑えることが出来るため癌の画期的な治療法になるものと期待される。

我々の研究室にて単離された SOCS (suppressor of cytokine signaling) は JAK/STAT 経路を阻害する分子であるが (Naka T *et al.* 1997 Nature)、細胞内に強制発現させることで FAK (Focal adhesion kinase) など様々なキナーゼを阻害する機能を持つことが明らかにされているため、SOCS 分子は優れた抗癌剤として利用できることが期待される。従って、*in vivo*で SOCS 分子を遺伝子の発現ベクターなどの形状で癌細胞特異的に輸送し、癌細胞に SOCS 分子を過剰発現させる技術を開発することが出来れば、正常細胞への副作用の少ない癌の新規治療法が実現できると考えられる。

2. 研究の目的

前立腺癌において、STAT-3 の持続的活性化が癌細胞の増殖亢進と関係していることも明らかにされており (Yu H, Jove R 2004 Nature Reviews Cancer)、SOCS 分子は前立腺癌に対する新規抗癌剤として有用できると考えられる。また、前立腺癌は前立腺癌特異的膜蛋白質抗原として PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) が発現している事が知られている。そこで、PSMA 陽性細胞特異的な薬物送達システム (DDS) を開発することにより、静脈注射により癌細胞特異的な遺伝子治療が可能となることが期待される。

本研究では SOCS3 が前立腺癌に抗腫瘍効果を示すことを明らかにする事、及び、PSMA 陽性細胞特異的な DDS の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SOCS3 による前立腺癌細胞増殖抑制効果の解析

前立腺癌細胞株 (DU145, LNCaP) に SOCS-3 遺伝子をアデノウイルスベクターにて導入する事で、増殖抑制効果を MTT アッセイ法にて評価した。さらに、DU145, LNCaP における STAT-3 の持続的活性化の阻害効果についてもウェスタンブロット法にて確認した。抗腫瘍効果についてはアポトーシスの誘導を評価するため、cleaved-caspase-3 の発現をウェスタンブロット法評価した。

前立腺癌膜抗原である PSMA を標的とした前立腺癌特異的な DDS システムを開発するため、まず、DU145 と LNCaP における PSMA の発現の有無を FACS にて確認した。

(2) 前立腺癌特異的薬物輸送システムの開発

LNCaP を用いた前立腺癌移植モデルマウスを作成した。LNCaP 細胞を PBS で懸濁し、3 倍容量の BD マトリゲルに懸濁して、細胞懸濁液 1.0×10^8 cells / ml (1×10^7 cells / 0.1ml / マウス) とした。細胞の移植は Balb/c nu/nu (オス、6 週) の右側背部皮下に 30 G ニードル付シリンジで、0.1ml (1×10^8 cells / ml) を注入した。腫瘍径の測定は細胞移植後、7、14、21、25、27、29 日目に腫瘍の長径と短径をデジタルノギスで計測した。腫瘍体積の計算は以下の方法で行った。
腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍の長径 \times 短径 \times 短径) / 2

生着条件を検討後、*in vivo* での前立腺癌を標的とした DDS の開発を以下の通り行った。抗体ラベリングキット (Cy5.5) (住商ファーマインターナショナル (株)) の説明資料に従って、抗 PSMA モノクローナル抗体 (MBL medical & Biological laboratories) をリポソームに結合した。抗体ラベリングキット (Cy5.5) のリポソーム溶液 2 ml のうち 1 ml をリポソーム製造に使用した。

1. 抗体未修飾リポソーム (コントロール) : 300 μ l 略名 : Cy5.5-Lip
2. 抗 PMSA 抗体結合リポソーム (500) : 300 μ l 略名 : PSMA-Cy5.5-Lip (500)
抗 PMSA 抗体の終濃度を 500 μ g/ml として抗体結合反応を行った。
3. 抗 PMSA 抗体結合リポソーム (250) : 300 μ l : PSMA-Cy5.5-Lip (250)
抗 PMSA 抗体の終濃度を 250 μ g/ml として抗体結合反応を行った。

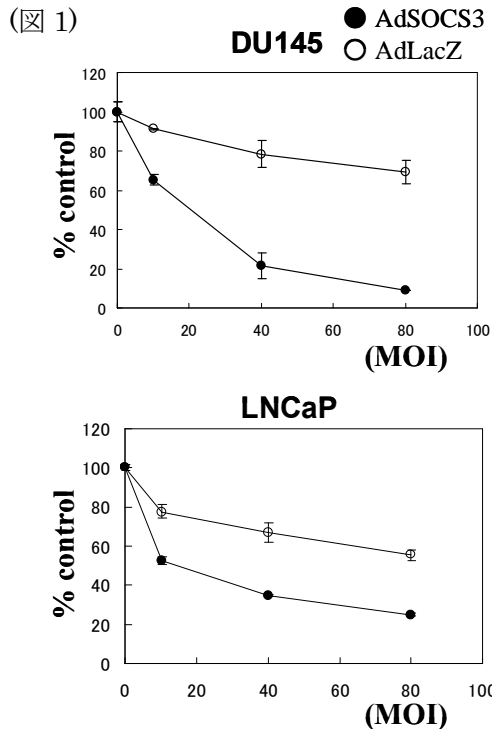
Balb/c nu/nu に腫瘍移植後 25 日後に抗体未修飾 Cy5.5 内包リポソーム、抗 PMSA 結合 Cy5.5 内包リポソーム (500)、抗 PMSA 結合 Cy5.5 内包リポソーム (250) をマウスの尾静脈から投与した。各被験物質は 100 μ L / マ

ウスで各々3匹ずつ投与した。

4. 研究成果

(1) SOCS3 による前立腺癌の増殖抑制効果

SOCS による前立腺癌の治療法を開発するため、まず前立腺癌細胞株における SOCS3 の抗腫瘍効果を検討した。SOCS3 をアデノウイルスベクター (AdSOCS3) により前立腺癌細胞株 DU145 と LNCaP に導入した結果、いずれにおいても対照の AdLacZ よりも著明な細胞増殖抑制を示した (図 1)。



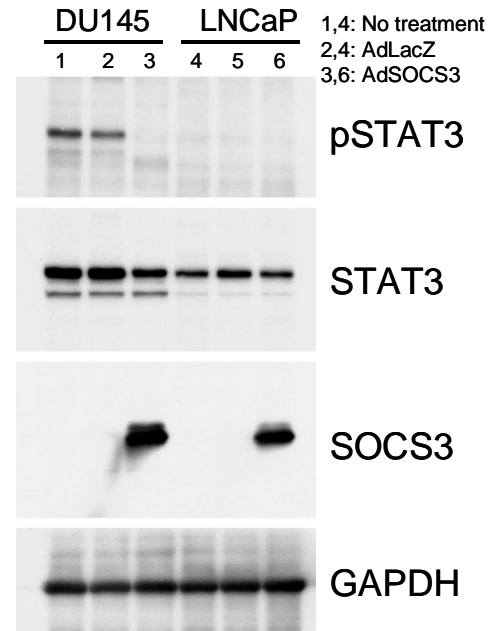
(2) SOCS3 による前立腺癌の増殖抑制機序の解析

AdSOCS3 による前立腺癌の抗腫瘍メカニズムを調べた。ウェスタンブロット法にて STAT3 のリン酸化を評価した結果、AdSOCS3 はホルモン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 において STAT3 の持続的活性化を抑制した (図 2-1)。一方で、ホルモン依存性の LNCaP において STAT3 の持続的活性化が認められなかった (図 2-1)。これらの結果、SOCS3 は STAT3 が持続的に活性化している DU145 だけでなく、STAT3 非依存的に増殖が亢進している LNCaP においても増殖抑制効果を示すことが判明した。

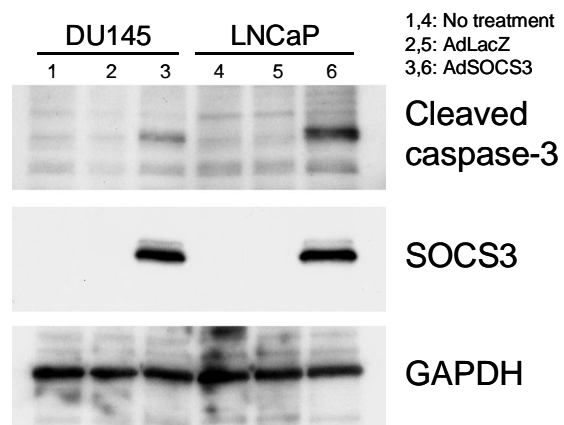
SOCS-3 による抗腫瘍効果がアポトーシスに依存するかについて cleaved caspase-3 の発現をウェスタンブロット法にて確認した結果、DU145, LNCaP いずれにおいても SOCS-3 遺伝子導入群にて cleaved caspase-3 の発現が認められたことから (図

2-2)、SOCS-3 はこれらの細胞株において STAT3 の活性化を阻害することでアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことが判明した。前立腺癌においては STAT-3 が癌細胞の増殖亢進と関係していることが示唆されているため、SOCS-3 は前立腺癌において抗癌剤として有用であることを示している。

(図 2-1)



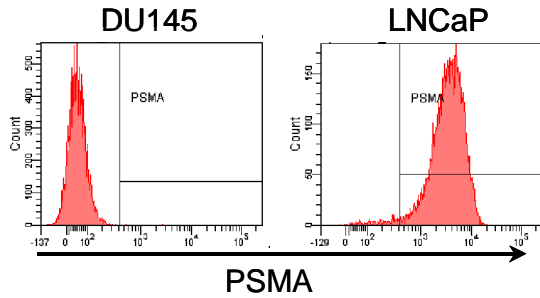
(図 2-2)



(3) FACS による PSMA 陽性細胞の解析

DU145 と LNCaP について、PSMA の発現の有無を FACS にて解析した結果、PSMA は LNCaP にて発現が認められたが、DU145 では認められてなかった (図 3)。

(図 3)



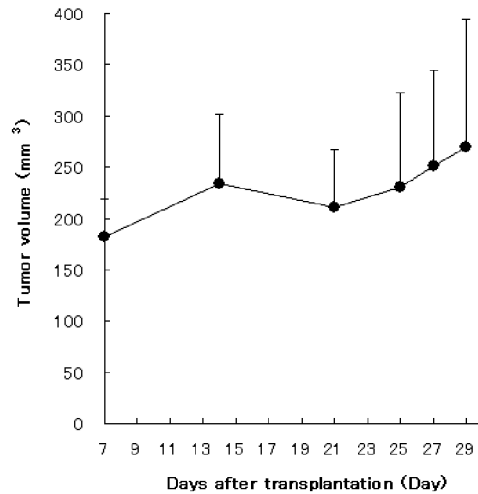
(4) PSMA 陽性癌細胞を標的とした *in vivo* での DDS システムの開発

LNCaP 細胞を Balb/c nu/nu の皮下に移植させるために生着予備実験を行った結果、 1×10^7 cells / 0.1ml / マウスが適していることが明らかになった (図 4-1)。

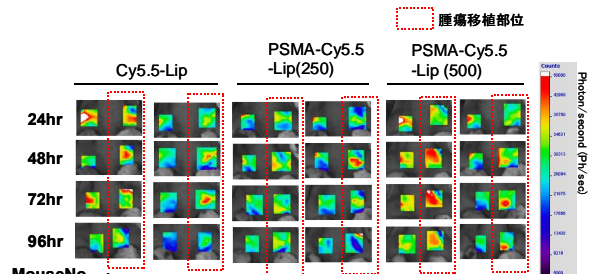
次に、day25 にリポソームを用いた 3 種類の Cy5.5 標識ナノ粒子 (1. PSMA 抗体未標識 (Cy5.5-Lip)、2. PSMA 抗体 250 μ g/ml 標識 (PSMA-Cy5.5-Lip(500))、3. PSMA 抗体 500 μ g/ml 標識 (PSMA-Cy5.5-Lip(500))) を尾静脈し (n=3)、24, 48, 72, 96 時間後の腫瘍移植部位の蛍光強度を蛍光イメージング装置: eXplore Optix (ART 社) 励起波長: 680 nm、蛍光波長: 700 nm で計測した (図 4-2)。腫瘍部位の蛍光シグナルを photon count/second の総量として評価を行った。リポソーム未投与の腫瘍部位の photon count をバックグラウンドとして、リポソーム投与群の photon count から差し引いた。3 個体の平均値によりグラフを作成した (図 4-3)。

PSMA-Cy5.5-Lip(500) は、PSMA-Cy5.5-Lip(250) および Cy5.5-Lip よりも投与後 72 時間で腫瘍への高い集積が確認された。表面修飾のない Cy5.5-Lip および PSMA-Cy5.5-Lip(500) の癌部位への集積は、48 時間をピークに徐々に減少する傾向が認められた。Cy5.5-Lip および PSMA-Cy5.5-Lip(500) の癌部位への集積は、enhanced permeability and retention effect (EPR) 効果によるリポソームの受動的送達能に起因すると考えられる。PSMA-Cy5.5-Lip(500) においては、それらとは異なる挙動を示し、投与後 48 時間から 72 時間での腫瘍集積量の減少は認められなかった。このことから、PSMA-Cy5.5-Lip(500) においては、抗 PSMA 抗体によるターゲティング効果が認められているのではないかと考えられる。粒子の投与量を調製することで腫瘍部位へのより効果的な集積が可能となると考えられる。今後、SOCS3 の遺伝子発現ベクターなどを封入したナノ粒子を投与することで、LNCaP の増殖抑制効果を *in vivo* で評価する事が期待される。

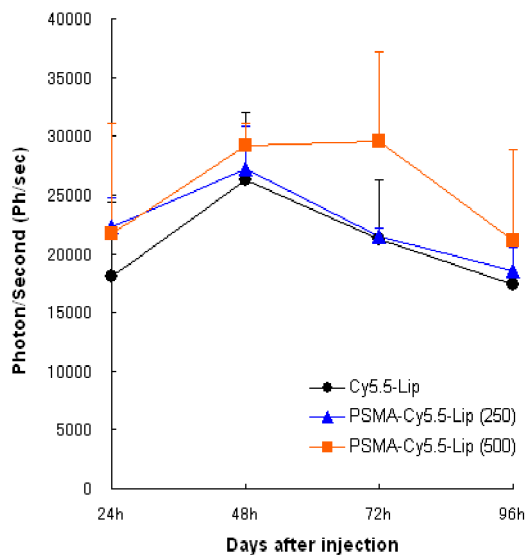
(図 4-1)



(図 4-2)



(図 4-3)



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)

- (1) Serada S, Naka T *et al.* (13 人中 1 番目)
iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases.
Ann Rheum Dis 2009 In Press (査読有)
- (2) Kim A, Enomoto T, Serada S, Naka T *et al.* (13 人中 3 番目) Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin.
International Journal of Cancer 2009 ; 125(10):2316-22 (査読有)
- (3) Fujimoto M, Serada S, Naka T *et al.* (13 人中 3 番目) Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses.
Arthritis Rheum. 2008 ; 58: 3710-3719.
(査読有)
- (4) Serada S, Fujimoto M, Kishimoto T, Naka T *et al.* (15 人中 1 番目) IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ;105(26):9041-6. (査読有)
- (5) Takahashi T, Naka T, Fujimoto M, Serada S, Nishida T *et al.* (14 人中 4 番目)
Aberrant Expression of Glycosylation in Juvenile Gastrointestinal Stromal Tumors. Proteomics clinical applications. 2008 ; (2):9: 1246-1254. (査読有)
- (6) Horino J, Fujimoto M, Terabe F, Serada S,

- Kishimoto T, Naka T *et al.* (14 人中 4 番目) Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.
Int Immunol. 2008 ; (6):753-62. (査読有)
- (7) Iwahori K, Osaki T, Serada S, Fujimoto M, Naka T *et al.* (16 人中 3 番目)
Megakaryocyte potentiating factor as a tumor marker of malignant pleural mesothelioma: Evaluation in comparison with mesothelin.
Lung Cancer 2008 ;62(1):45-54. (査読有)
 - (8) Nishikawa T, Hagihara K, Serada S, Naka T, Yoshizaki K *et al.* (10 人中 3 番目)
Transcriptional Complex Formation of c-Fos, STAT3, and HNF-1 α is Essential for Cytokine-Driven CRP Gene Expression.
Journal of Immunology 2008 ;180(5):3492-501. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- Serada S, Naka T. *et al.* (6 人中 1 番目)
Proteomics-based identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker associated with disease activity of inflammatory autoimmune disorders
第 39 回日本免疫学会総会、12/2-12/4、大阪
- Souma Y, Serada S, Naka T. *et al.* (7 人中 4 番目)
Anti-proliferative effect of SOCS-1,-3 through the suppression of JAK/STAT and P38 MAPK signaling pathways in gastric cancer cells
ECCO 15 - 34th ESMO Multidisciplinary Congress
Internationale Congress Centrum Berlin (ICC Berlin), Berlin, Germany from Sunday 20 to Thursday 24 September 2009.
- Iwahori K, Serada S, Naka T. *et al.* (5 人中 2 番目)
SOCS-3 protein exhibits potent anti-tumor activity in malignant pleural mesothelioma
13th World Conference on Lung Cancer

San Francisco, California, USA. 31 July to
4 August 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：SOCS 活性化剤を有効成分とする抗癌剤

発明者：仲 哲治、世良田 聡、岩堀 幸太、

藤本 穰

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興
財団

種類：特許権

番号：特願 2008-301919 号

出願年月日：2008 年 11 月 27 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

世良田 聡（セラダ サトシ）

研究者番号：50463302

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：