

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590480

研究課題名(和文) インターロイキン18関連がん転移抑制因子の同定とその機構の解明

研究課題名(英文) Identification and the elucidation of the mechanism of interleukin 18 induced metastasis inhibitory factor(s)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかのIL-18誘導性がん転移抑制因子の存在の可能性を示した。本研究ではこのIL-18誘導性がん転移抑制因子を同定し、その転移抑制機構を明らかにすることを目的としている。この因子は主に血清に存在していた。抗体アレイを用いてIL-18誘導性がん転移抑制因子の候補を32個見つけた。そのうち5個の因子の転移抑制活性を調べた結果、3個の因子が転移抑制活性を示した。また、二次元泳動とMALDI-TOF-MS装置を用いた質量分析の結果、IL-18誘導性がん転移抑制因子の候補因子を42個同定した。

研究成果の概要(英文)：We showed the possibility of the presence of IL-18-induced metastasis inhibitory factor(s) in the previous paper. The purpose of this research is to identify the factor(s) and to clarify its metastasis suppression mechanism. We revealed that this factor mainly existed in serum. We found 32 candidates of the factor(s) using the antibody arrays. As a result of investigating the metastasis suppressing activity of five factors with high expression level, three of them inhibited the tumor cell invasion. Further, we found 42 candidates of the factor(s) through two-dimensional electrophoresis and the MALDI-TOF-MS.

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：インターロイキン18 転移 骨肉腫

### 1. 研究開始当初の背景

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。IL-18がNK細胞やT細胞の腫瘍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は、我々を含む多くの研究で明らかにされてきた。更にIL-18が腫瘍の転移を抑制することも報告されている。しかしながらそれはIL-18が転移の成立自体を抑制するのではなく、転移成立後の腫瘍増殖を抑制することによると考えられていた。

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、マウスはT細胞を欠損するヌードマウスを用い、NK細胞を不活性化する抗アシアロGM1血清を投与し続けた。腫瘍細胞(高肺転移骨肉腫細胞; LM8)は尾静脈から注入(静注)して肺転移を起こさせた。この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転移が成立したLM8静注5日後から連日IL-18を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LM8を静注する5日前から前日までIL-18を投与すると肺の転移数は著しく減少した。この結果、IL-18は転移後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ことが明らかになった。この肺転移抑制機構を解析するため、IL-18投与マウス血清が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、この血清はLM8の遊走を著しく抑制した。また血清の抑制作用は熱で失われた。このことから、血清中のIL-18関連がん転移抑制因子の存在が示唆された。なおこの血清はB16メラノーマ細胞、Lewis肺癌細胞の遊走も抑制した。

更に自然発症肺転移モデルでもIL-18が転移抑制作用を示すことを報告した(Yamada N. *et al.*, Tumour Biol., 2009)。この研究結果を簡単に述べる。人の骨肉腫治療を参考にマウスモデルを作製した。マウスの背部皮下にLM8を移植し腫瘍を形成させた。背部腫瘍は肺転移が実体顕微鏡下で確認されない移植3週間目に切除し、抗癌剤(イホマイド)は腫瘍切除前に投与した。またIL-18は腫瘍切除日を挟む1週間連日投与し、IL-18の自然発症肺転移への抑制作用を検討した。このモデル系でIL-18は背部腫瘍の増殖に影響しなかったが、肺転移数を著しく減少させた。この転移抑制作用はNK細胞を不活性化する抗アシアロGM1血清を投与しても抑制されず、NK細胞とT細胞の細胞数やその腫瘍細胞傷害活性にもIL-18は有意な効果を示さなかった。この研究成果もIL-18関連がん転移抑制因子

の存在の可能性を示唆するものであった。

### 2. 研究の目的

IL-18は様々な生物活性を持っているが、その一つに抗腫瘍作用がある。この抗腫瘍作用はT細胞やNK細胞の細胞傷害活性の増強、血管新生の抑制によることが我々の研究を含めた多数の研究で明らかにされている。更に我々は血中に存在するがん転移抑制因子の可能性を示した。そこで本研究の目的は、このIL-18関連がん転移抑制因子を同定し、その転移抑制機構を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 転移抑制因子を含む試料の調整

NK細胞活性を抑制する抗アシアロGM1血清を投与したヌードマウスに、IL-18(対照群:PBS)を5日間連日投与し、最後のIL-18投与から24時間後の血清、各臓器(肝臓、脾臓、肺等)を回収する。各臓器は細胞溶解液を用いてホモジェネートした後、超遠心により可溶性画分を分離する。血清および各臓器の細胞抽出液は分注して冷凍保存する。

#### (2) 各臓器におけるIL-18関連転移抑制因子の存在の確認

血清および各臓器の細胞抽出液の転移抑制活性は、マウス高肺転移骨肉腫細胞(LM8)および我々が改良したインベージョンアッセイ法または傷つけアッセイ法を用いて評価する。インベージョンアッセイ法(浸潤能測定): 24ウェル用のトランスウェル(HTS FluoroBlock Insert, FALCON)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の血清または細胞抽出液を添加する。24時間培養後細胞を蛍光染色し、下方励起下方側光蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定する。傷つけアッセイ法(遊走能測定): 96ウェルにLM8細胞をまき24時間後にチップの先で細胞表面に線を書くように傷つけ、調整した血清または細胞抽出液を含む培養液に交換し、24時間培養する。培養前と後の傷の幅の距離を顕微鏡下で計測し、24時間で縮まった距離を比較する。

#### (3) 抗体アレイを用いた転移抑制因子の同定

Bio-RadのBio-Plex Proマウスサイトカイン抗体結合磁気ビーズ検出システム、R&DのProteome Profiler Array Kit、およびRay BiotechのAntibody Arrayを用いてIL-18投与及び非投与ヌードマウスの血清中に含まれるタンパク量を相対比較する。実験手技は各製品のプロトコルに沿って行う。

#### (4) 二次元電気泳動とTOF-MSを用いた転移抑制因子の同定

IL-18関連がん転移抑制因子を含む活性分画

とIL-18非投与マウス試料のそれを含まない分画をそれぞれ2次元電気泳動し、IL-18で誘導されたタンパク質のスポットを切り出す。切り出した各スポットゲルはトリプシンで処理し、ゲルに含まれるタンパク質をペプチドとして抽出する。このペプチドの質量は質量分析装置(MALDI-TOF-MS)を用いて分析し、Web上のデータベースを用いた解析でタンパク質を同定する。

#### 4. 研究成果

(1) 傷つけアッセイ法およびインベーションアッセイ法を用いて、各臓器にIL-18関連転移抑制因子が存在するかどうかを確認した。その結果、IL-18関連転移抑制因子は血清中に多く存在することが分かった(図1)。肝臓、脾臓、肺の細胞抽出液を用いた場合には培養液への添加量を増やすことで転移抑制活性が見られ、IL-18関連転移抑制因子が各臓器にも存在していることが分かった。

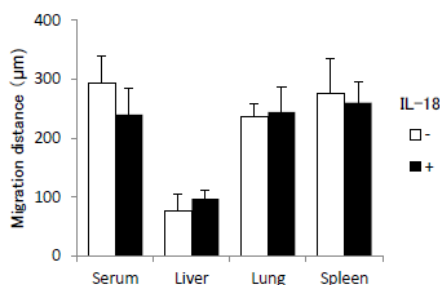


図1 傷つけアッセイ

(2) 抗体アレイを行い、IL-18関連転移抑制因子の候補(IL-18で誘導されるタンパク質)を32個見つけた。これらの候補の中から比較的発現量が高く、転移との関連が報告されている5個の因子をピックアップした。この5個の因子は市販のリコンビナントタンパク質を使用し、各因子の転移能抑制活性をインベーションアッセイ法および傷つけアッセイ法を用いて調べた。その結果、3個の因子は転移抑制活性をもつことが分かった(図2)。

(3) 調整した血清を限外濾過フィルターを通して分子量別に分画し、各分子量別血清分画の細胞遊走抑制活性を傷つけアッセイ法を用いて調べた。その結果、分子量1~3万の分画に細胞遊走抑制活性が存在した。この分子量3万以下の分画を用いて二次元泳動を行い、IL-18投与の有無によって発現量に差が生じるタンパク質のスポットを切り出した。スポットゲル中のタンパク質はトリプシン処理した後MALDI-TOF-MS装置を用いてペプチド質量データセットを得た。このデータをWeb上のデータベースで解析し、IL-18関連転移抑制因子の候補を42個同定した。

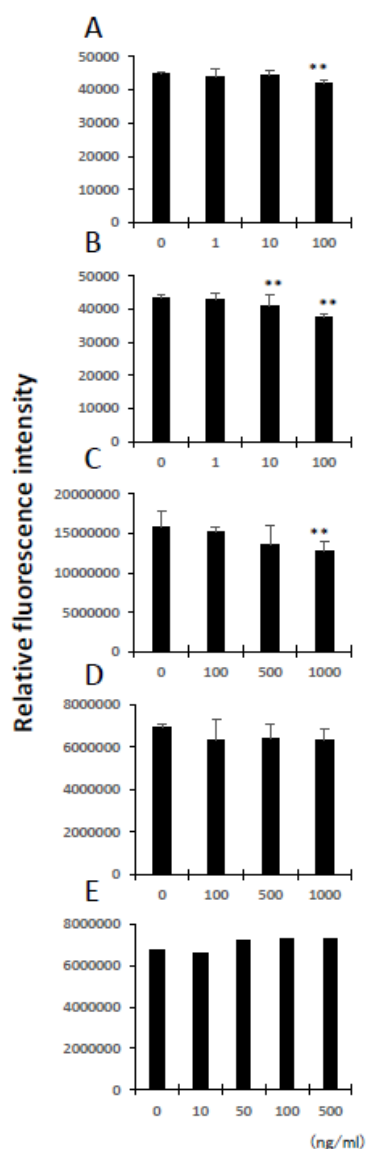


図2 転移抑制活性の測定

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Yukitatsu Y, Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Nakasho K, Kojima Y, Oka H, Tsuzuki K, Sakagami M, Terada N. Decreased expression of VE-cadherin and claudin-5 and increased phosphorylation of VE-cadherin in vascular endothelium in nasal polyps. *Cell Tissue Res*. 2013 Jun;352(3):647-57. doi: 10.1007/s00441-013-1583-0. 査読有

Yamada N, Yamanegi K, Ohyama H, Hata M, Nakasho K, Futani H, Okamura H, Terada N. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1-dependent manner. *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):2005-12. doi: 10.3892/ijo.2012.1630. 査読有

Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M,

Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep*. 2012 Nov;28(5):1585-90. doi: 10.3892/or.2012.1981. 査読有

Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death. *Int J Oncol*. 2012 Jul;41(1):83-91. doi: 10.3892/ijo.2012.1438. 査読有

Kato-Kogoe N, Nishioka T, Kawabe M, Kataoka F, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamamoto T, Nakasho K, Urade M, Terada N, Ohyama H. The promotional effect of IL-22 on mineralization activity of periodontal ligament cells. *Cytokine*. 2012 Jul;59(1):41-8. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.024. 査読有

〔学会発表〕（計7件）

山田直子、山根木康嗣、大山秀樹、寺田信行、中正恵二 低酸素による細胞表面 MICA の糖鎖修飾の低下 第 36 回日本分子生物学会 2013.12.3 神戸

山田直子、山根木康嗣、大山秀樹、中正恵二、秦正樹、寺田信行 骨肉腫細胞における低酸素誘導性の細胞表面 MICA の発現低下 第 35 回日本分子生物学会 2012.12.11-14 福岡

山根木康嗣、小林健太、中正恵二、大秀樹、山田直子、秦正樹、寺田信行 ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた腫瘍血管新生抑制 第 101 回日本病理学会総会 2012.04.26-28 東京

大山秀樹、片岡芙紗、川辺睦記、小越菜保子、山根木康嗣、山田直子、秦正樹、中正恵二、寺田信行 Th17 細胞産生性サイトカインが血管石灰化に及ぼす影響 第 101 回日本病理学会総会 2012.04.26-28 東京

山田直子、秦正樹、山根木康嗣、大山秀樹、中正恵二、麩谷博之、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 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.14 横浜

山根木康嗣、小林健太、大山秀樹、秦正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行 Epigenetic drug によるヒト骨肉腫細胞の抗腫瘍免疫細胞に対する感受性亢進 第 100 回日本病理学会総会 2011.04.28-30 横浜

大山秀樹、小越菜保子、山根木康嗣、山田直子、秦正樹、片岡芙紗、中正恵二、寺田信

行 IL12RB2 転写活性の個体差における AP-1 ファミリー転写因子の関与 第 100 回日本病理学会総会 2011.04.28-30 横浜

## 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・名誉教授  
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