

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591611

研究課題名(和文) ウイルス感知レセプターの自然免疫力を活用する新規癌療法の確立

研究課題名(英文) Development of new anticancer therapy utilizing the innate immunity

研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI, YASUSHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50322946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回、IFN- β 刺激によるRIG-Iタンパクの発現誘導が、ヒトメラノーマ由来培養細胞において確認された。また、24時間のIFN- β 刺激により培養ヒトメラノーマ細胞の増殖能は有意に抑制された。その他のサイトカイン、IFN- α 、TNF- α 、TGF- β 刺激では、メラノーマ細胞によるRIG-I発現増強効果はみられなかった。合成核酸アナログであるpoly-(I:C)刺激では、ヒトメラノーマ細胞におけるRIG-I発現増強効果は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：I confirmed that cultured melanoma cells expressed RIG-I protein by IFN-beta stimulation. Moreover, proliferation activities of melanoma cells were suppressed by IFN-beta. Poly-(I:C), known as synthetic analog of double-stranded RNA, has no effect on the induction of RIG-I expression in the human melanoma cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラノーマ RIG-I

1. 研究開始当初の背景

生体最外層に位置する皮膚は、常に細菌・ウイルスなどの微生物に曝されているが、「自然免疫」と「獲得免疫」という2つの感染防御システムにより、皮膚の恒常性は維持されている。特に「自然免疫」システムは、侵入してくる病原体の早期発見とその感染拡大の抑制に重要な役割を担っている。細胞内に侵入したウイルスを認識する細胞内受容体として retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) が同定され、I 型 IFN である IFN- α の発現を誘導することが解明された (Yoneyama et al, *Nat. Immunol*, 2004) (図 1)。また、RIG-I は正のフィードバック制御により、誘導された IFN 刺激により RIG-I の発現自体が更に持続的に誘導されることが判明している。近年、細胞内新規アダプターである stimulator of interferon genes (STING) が小胞体上に存在し、ウイルス由来 DNA、RNA を認識し「自然免疫」を高めることが解明された (Ishikawa and Barber, *Nature*, 2008)。皮膚悪性腫瘍であるメラノーマに対して、人為的に RIG-I・STING 発現を促すことにより I 型 IFN の過剰産生を促し、I 型 IFN の直接的作用としてメラノーマ細胞の増殖抑制、抗原の感作なしに腫瘍細胞を傷害する natural killer 細胞 (NK 細胞) の活性化が期待できる。表皮細胞、線維芽細胞、ならびにリンパ球から RIG-I・STING 誘導性 I 型 IFN が産生され、局所的な免疫賦活効果が腫瘍縮小を誘導すると考える。

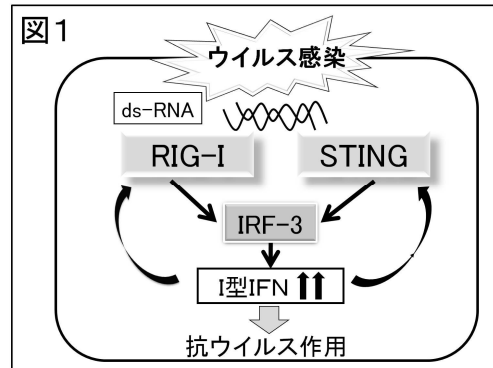
2. 研究の目的

本研究は、「自然免疫」に必須な細胞内ウイルス感知レセプターを人為的に亢進させることにより、局所的に免疫を賦活させ抗腫瘍効果を導き出すことである。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト表皮細胞 (HaCaT 細胞)、ヒトメラノーマ細胞 (SK-Mel-28, Colo679, 501mel, MeWo、



G-361) を、10% fetal bovine serum (FBS)、0.1 mg/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin、2.5 μ g/ml amphotericin B を添加した DMEM 培地にて培養した。ウエスタンブロット及び RT-PCR では、各種サイトカイン (IFN- α 、IFN- β 、TNF- α 、TGF- β) を添加する前に 0.1% FBS の DMEM 培地で 24 時間培養処理した。

(2) ウエスタンブロット

すべての細胞株において 70% コンフルエントの状態にて各種サイトカイン (IFN- α 10,000 unit/ml、IFN- β 10 ng/ml、TNF- α 10 ng/ml、TGF- β 10 ng/ml) および poly-(I:C) (10 μ g/ml) を添加、12 時間後に RIPA buffer を用いて細胞回収した。タンパク 15 μ g で SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写、ラビット抗 RIG-I 抗体を用いて検出した。比較検証のためのコントロールとしてマウス抗 β -actin 抗体を使用した。

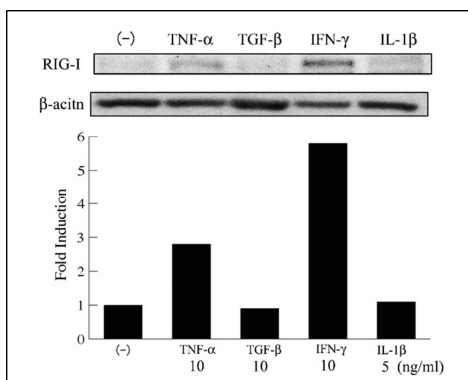
(3) Cell Viability Assay

ヒト悪性黒色腫細胞 501mel を 96-well plate で培養、IFN- α (10,000 unit/ml)、poly-(I:C) (10 μ g/ml) を添加、48 時間後に、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega 社) にて細胞生存率を評価した。

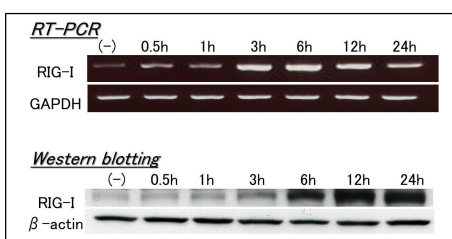
4. 研究成果

(1) ヒト表皮細胞の RIG-I 発現

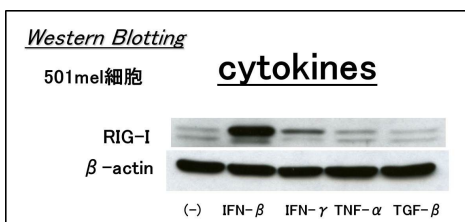
ヒト表皮細胞である HaCaT 細胞を各種サイトカインで刺激、RIG-I 発現の増減を RT-PCR にて確認したところ、TNF- α 、IFN- α 添加で RIG-I 発現が有意に上昇していた。



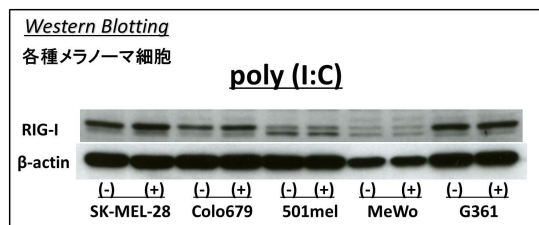
また、合成核酸である poly-(I:C) 刺激による RIG-I 発現を経時的に確認したところ、RNA、タンパクレベルで発現増強を確認できた。



(2)メラノーマ細胞の RIG-I 発現
ヒトメラノーマ細胞である 501mel 細胞を各種サイトカインで刺激したところ、IFN- γ 刺激で RIG-I 発現増強を確認した。



また、合成核酸である poly-(I:C) 刺激による RIG-I 発現を様々な培養ヒトメラノーマ細胞で経時的に確認したが、タンパクレベルでは RIG-I 発現増強はみられなかった。



(3)メラノーマ細胞の増殖抑制
ヒトメラノーマ細胞である 501mel 細胞に RIG-I 誘導能をもつ IFN- γ を加えたところ、501mel 細胞の増殖能は有意に低下した。RIG-I が腫瘍細胞の増殖抑制効果を有すると

推測される。

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 16 件)

1. Minakawa S, Matsuzaki Y, et al. (4 番目). Mutational analysis on 16 Japanese population cases with epidermolysis bullosa simplex. 査読有, J Dermatol Sci, 72:330-332, 2013. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.08.001.
2. Nakajima K, Matsuzaki Y, et al. (5 番目). Signet-ring cutaneous squamous cell carcinoma arising on the back of the finger. 査読有, Case Rep Dermatol, 10:215-218, 2013. doi: 10.1159/000354536.
3. Matsuzaki Y, et al. (1 番目). Deep pseudocystic dermatophytosis caused by Trichophyton rubrum in a patient with myasthenia gravis. 査読有, Acta Derm Venereol, 93:358-359, 2013. doi: 10.2340/00015555-1452
4. Nishikawa Y, Matsuzaki Y, et al. (2 番目). Characterization of stimulator of interferon genes (STING) expression in human epidermal keratinocytes. 査読有, Hiroasaki Med J, 64: S58-64, 2013. <http://hdl.handle.net/10129/4867>
5. Minakawa S, Matsuzaki Y, et al. (2 番目). Acantholysis caused repeated hemorrhagic bullae in a case of acantholytic acanthoma. 査読有, J Dermatol, 39:1107-1108, 2012. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01564.x.
6. Rokunohe D, Matsuzaki Y, et al. (6 番目). Spindle Cell Hemangioma and Decorin Expression. 査読有, J Cos Dermatol Sci Appl, 2:8-10, 2012.

- doi: 10.4236/jcdsa.2012.21002
7. Rokunohe D, Matsuzaki Y, et al. (5 番目). : Multiple aplasia cutis congenita lesions located along Blaschko's lines in a patient with tetralogy of Fallot-A. 査読有, J Dermatol Case Rep, 6:40-42, 2012. doi:10.3315/jdcr.2012.1096.
 8. Kimura K, Matsuzaki Y, et al. (2 番目). Characterization of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) expression corresponding to viral infection and UVB in human keratinocytes. 査読有, J Dermatol Sci, 66:64-70, 2012. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.02.006.
 9. Akasaka E, Matsuzaki Y, et al. (2 番目). Normolipidaemic xanthomatosis with systemic involvement of the skin, bone and pharynx. 査読有, Clin Exp Dermatol, 37:305-307, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04187.x.
 10. Korekawa, Matsuzaki Y, et al. (4 番目). Late-onset, Eruptive Syringoma in an Elderly Man: Correlation with Carbamazepine. 査読有, Acta Derm Venereol, 92:87-88, 2012. doi: 10.2340/00015555-1156.
 11. 澤村大輔(1 番目) 松崎康司 (2 番目)、他. 各種皮膚感染症に対するナジフロキサシン軟膏 1% の治療効果. 査読有、臨床医薬、第 28 巻第 5 号、419-425、2012 年.
 12. Akasaka E, Matsuzaki Y, et al. (9 番目). Diffuse and focal palmoplantar keratoderma can be caused by a keratin 6c mutation. 査読有, Br J Dermatol, 165:1290-1292, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10552.x.
 13. Takeda H, Matsuzaki Y, et al. (5 番目). Follicular mucinosis associated with radiation therapy. 査読有, J Dermatol, 38:1116-1118, 2011. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01187.x.
 14. Matsuzaki Y, et al. (1 番目). Actinic granuloma associated with erythema nodosum. 査読有, Eur J Dermatol, 21:806-807, 2011. doi: 10.1684/ejd.2011.1480.
 15. Hiromi N, Matsuzaki Y, et al. (3 番目). Immunohistochemical analysis of in vivo UVB-induced secretion of IL-1 and IL-6 in keratinocytes. 査読有, Mol Med Report, 4:611-614, 2011. doi: 10.3892/mmr.2011.478.
 16. Takeuchi S, Matsuzaki Y, et al. (2 番目). Garlic-induced irritant contact dermatitis mimicking nail psoriasis. 査読有, J Dermatol, 38:280-282, 2011. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00940.x.
- [学会発表](計 13 件)
1. 松崎康司、矢口貴志、中野 創、澤村大輔: *Trichophyton rubrum* による囊腫様深在性白癬の 1 例. 第 111 回日本皮膚科学会総会、2012.6.1-3. 京都
 2. 松崎康司、西川陽平、木村一之、北村英夫、中野 創、今泉忠淳、佐藤 敬、澤村大輔: ヒトメラノーマ細胞における RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-1 発現との関連と細胞増殖. 第 19 回分子皮膚科学フォーラム、2012.4.13-14. 青森
 3. Nishikawa Y, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D. Characterization of stimulator of interferon genes (STING) expression in human epidermal keratinocytes. 41th Annual European Society for Dermatological Research meeting.2011.9.7-10. Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50322946

(2) 研究分担者

澤村大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60196334