

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701074

研究課題名（和文） 免疫アジュバント受容体シグナルによる癌細胞死とオートファジー

研究課題名（英文） Cancer cell death and autophagy induced by the signaling of immune adjuvant receptors

研究代表者

原嶋 奈々江（HARASHIMA NANA E）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60345311

研究成果の概要（和文）：免疫細胞のエンドソーム受容体 TLR3 及び細胞質内受容体 MDA-5 のリガンドである poly(I:C) は免疫応答を増強できる有用なアジュバントである。poly(I:C) との共培養によりヒト前立腺癌細胞株にオートファジーを伴った癌細胞死が誘導された。また、細胞質内に poly(I:C) を導入すると、ヒト乳癌細胞死が生じ、同時にオートファジーが誘導された。オートファジー関連遺伝子発現を抑制すると細胞死が促進した。よってオートファジーは癌細胞死に対して防衛的に働いていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：An adjuvant receptor ligand, poly(I:C), is a well-known ligand for both an endosomal receptor TLR3 and a cytoplasmic receptor MDA-5, and can augment immune responses. Cancer cell death accompanying autophagy was induced in human prostate cancer cell line after poly(I:C) treatment. Poly(I:C) transfection into cytoplasm induced autophagy concurrently with apoptosis in human breast cancer cell lines. Blocking of autophagy significantly promoted cancer cell death after poly(I:C) transfection. These results indicate that autophagy plays a cytoprotective role in cell death of human prostate and breast cancer cells when treated with poly(I:C).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：癌、免疫、シグナル伝達、アポトーシス、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 免疫療法と T 細胞応答の現状

T 細胞や抗体に認識される癌関連抗原の同定は、癌に対する特異的免疫療法を可能にした。これまでに申請者自身も、癌患者由来 T 細胞に認識される腫瘍特異抗原や抗原ペプチドを同定し報告した。国内外の多施設で癌ワクチン療法の臨床試験が実施され一部では治療効果が報告されているものの、その一方で、腫瘍抗原や HLA-class I 発現が、実際は低下・欠失していることにより、治療効果が不十分である原因の一つになっていると考え

られる。特に前立腺癌と乳癌は、HLA-class I 分子の発現が低いことが報告されている (J. Urol, 2007; Hum. Immunol, 2001; Clin. Cancer Res, 2010)。

## (2) アジュバント受容体と癌免疫

Toll 様受容体 (TLRs: Toll-like receptors) は癌に対する適応免疫の誘導、特に樹状細胞の活性化において重要な役割を担っており、癌免疫療法への応用が期待されている。一方で、腎細胞癌、メラノーマ、肝臓癌といった種々の癌細胞での発現が報告され、癌細胞の TLRs を標的とした治療は、癌細胞破壊と抗腫

瘍免疫応答増強を同時に誘導できる可能性がある。癌免疫領域における TLRs の研究は主に樹状細胞の抗原提示能に焦点が当てられており、癌細胞における TLR の役割の解明やその癌治療応用に関する研究は国内外において希少である。癌細胞を TLR3 リガンド (poly(I:C)) で刺激した場合、特定の癌細胞において細胞死を誘導することを見出した。

### (3) オートファジーと癌細胞死

細胞の自己成分大規模分解系であるオートファジーは、主に栄養飢餓により誘導されることが知られていて、細胞内環境を維持し、生存に必要なアミノ酸プールを供給するなど、細胞生存に重要な役割果たしている (Nature, 2008 等)。オートファジーは、immunoblot 法による type II microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II) の発現や共焦点レーザー顕微鏡下での GFP-LC3 foci 出現により確認することができる。申請者自身が得た結果をふまえ、オートファジー本来の cytoprotective な役割を考えると、治療に反応して癌細胞で生じるオートファジーは、癌治療抵抗性の獲得に関与していることが示唆される。オートファジーによる caspase-8 の分解が、癌細胞のアポトーシス抵抗性に関与している可能性が最近報告された (Autophagy, 2010) が、癌治療後における癌細胞死とオートファジーの関係、残存癌幹細胞や上皮間葉転換の誘導におけるオートファジーの役割、及びこれら癌治療抵抗性の克服に関する研究は不十分である。

## 2. 研究の目的

近年の腫瘍免疫学の急速な発展により、T 細胞や抗体に認識される腫瘍関連抗原が多数同定され、癌ペプチドワクチン療法や癌反応性 T 細胞を用いた特異的癌免疫療法の臨床研究が国内外で実施されているが、治療効果は未だ満足できるものではない。その原因としては、腫瘍細胞上の HLA-class I 分子発現の低下・欠失や、癌幹細胞の存在や上皮間葉転換による癌細胞の治療抵抗性獲得などが挙げられるが、その機序の解明と克服法が確立されていないため、腫瘍根絶の大きな壁となっている。一方、生体内での適応免疫応答において TLR が重要な役割を担っており注目されているが、癌免疫分野においてその大部分は樹状細胞やマクロファージなどのプロフェッショナル APC での抗原提示能に局限している。樹状細胞等は、病原体が固有にもつ構造 (PAMP) を認識するアジュバント受容体 (TLRs, RLRs (RIG-I, MDA-5, LGP2) など) を発現させることで病原体の侵入を検知している。種々の癌細胞での TLR の発現が報告されているにもかかわらず、癌細胞における TLR の機能やシグナル伝達に関する報告は少

ない。本研究では、上皮性癌において、免疫アジュバント受容体シグナルが癌細胞死や増殖抑制あるいは治療抵抗性に及ぼす影響を検討する。また、免疫アジュバント受容体を介するシグナルで誘導されるオートファジーの、癌細胞死に対する役割を解明し、癌治療抵抗性の克服を目指す

## 3. 研究の方法

(1) 上皮性癌細胞株において、TLR リガンドの刺激が、癌細胞に対して細胞増殖 (生存維持) 促進的にまたは抑制的に作用するのか、癌細胞の細胞生存率及び増殖能、アポトーシス、サイトカイン産生等を検討する。

(2) 癌細胞株を TLR リガンド刺激した場合のシグナル経路 (特に、phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt 経路、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路、caspase 経路等について) を解明する。

(3) 癌細胞株を TLR リガンド刺激した場合のオートファジーの有無は、immunoblot 法による LC3-II の発現確認、GFP-LC3 融合タンパクを発現させた癌細胞を用い、細胞質内に形成される GFP-LC3 foci を共焦点レーザー顕微鏡にて観察して検討する。オートファジー阻害剤として 3-MA を用い、アポトーシスとの関連を検討する。

## 4. 研究成果

本研究では、免疫アジュバント受容体シグナルが癌細胞死や増殖抑制あるいは治療抵抗性に及ぼす影響と、オートファジーの癌細胞死に対する役割を解明することを目的とした。エンドソーム受容体 TLR3 及び細胞質内受容体 MDA-5 のリガンドである poly(I:C) との共培養により、一部のヒト前立腺癌細胞株で Akt/PI3K 経路の抑制が関与した細胞死が誘導されることを明らかにした (Harashima, et al. Cancer Immunol Immunother, 2012)。また、ヒト乳癌細胞株の細胞質内に poly(I:C) を導入すると、caspase 依存性のアポトーシスを生じ、同時にオートファジーが誘導された。オートファジー関連遺伝子 Beclin-1 を RNA 干渉で抑制するとアポトーシスが促進した。ヌードマウスを用いた実験で、癌局所へ poly(I:C) 導入後、癌増殖が有意に抑制された (Inao, et al. Breast Cancer Res Treat, 2012)。これらの成果より、poly(I:C) によるアジュバント受容体刺激は、癌細胞に対する抗癌効果と免疫賦活を同時に誘導するのに有効であることや、治療抵抗性の獲得にオートファジーが重要な役割を担っている可能性が示唆された。癌細胞株を TLR リガンド刺激した場合のシグナル伝達経路の解析はまだ不明な点も多く、

癌細胞死とオートファジーの関連性を今後  
もさらに検討したい。また、免疫細胞のひ  
つである樹状細胞では、TLR を介する刺激  
により HLA 分子の発現が高まることから、  
乳癌や前立腺癌で低い HLA 分子の発現を  
回復させる可能性があり、腫瘍特異的 CD8  
陽性キラー T 細胞による癌関連抗原の認  
識及び細胞傷害活性の増強が期待される。  
TLR と癌細胞死誘導に関する報告は希少  
であったが、今回の研究成果が本邦で進  
められているがんペプチドワクチン療法  
をはじめとした免疫療法の治療効果を  
さらに確実なものとする為に、また薬  
剤治療抵抗性の改善に役立つことも期  
待される。

#### 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 5 件)

- ① Monma H, Harashina N, Inao T, Okano S, Tajima Y, and Harada M. The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin-mu enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*, 査読有, 12(4), 2013, 341-351, DOI:10.1158/1535-7163.MCT-12-0954
- ② Inao T, Harashina N, Monma H, Okano S, Itakura M, Tanaka T, Tajima Y, and Harada M. Antitumor effects of cytoplasmic delivery of an innate adjuvant receptor ligand, poly(I:C), on human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 査読有, 134(1), 2012, 89-100, DOI:10.1007/s10549-011-1930-3
- ③ Harashina N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, and Harada M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 査読有, 61(5), 2012, 667-76, DOI: 10.1007/s00262-011-1132-1

[学会発表] (計 20 件)

- ① 原嶋奈々江 他, Inhibition of autophagy augments cancer cell death induced by an adjuvant receptor ligand, poly(I:C), 第 71 回日本癌学会, 2012 年 9 月 19 日, ホテルロイトン札幌 (北海道札幌市)
- ② 門馬浩行, 原嶋奈々江 他, Effect of pifithrin-mu, a new HSP70 and autophagy inhibitor, on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells, 第 71 回日本癌学会, 2012 年 9 月 21 日, ホテルロイトン札幌 (北海道札幌市)

- ③ 原嶋奈々江 他, Poly(I:C) トランスフェクションによるヒト腎癌細胞での ROS の産生とアポトーシスの誘導, 第 16 回日本がん免疫学会, 2012 年 7 月 28 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)
- ④ 門馬浩行, 原嶋奈々江 他, HSP70 および autophagy 阻害剤 pifithrin-mu は TRAIL によるヒト膵癌細胞の apoptosis を増強する, 第 16 回日本がん免疫学会, 2012 年 7 月 26 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)
- ⑤ 門馬浩行, 原嶋奈々江 他, 膵臓癌細胞に対する TRAIL と HSP70 阻害剤 pifithrin-mu 併用による抗腫瘍効果, 第 43 回日本膵臓学会, 2012 年 6 月 29 日, ホテルメトリポリタン山形 (山形)
- ⑥ 稲尾瞳子, 原嶋奈々江 他, ヒト乳癌細胞の抗癌剤抵抗性におけるオートファジーの役割, 第 20 回日本乳癌学会, 2012 年 6 月 30 日, 熊本市民会館他 (熊本)
- ⑦ 原田守, 原嶋奈々江 他, Role of autophagy in apoptosis of human cancer cells after stimulation through innate adjuvant receptors, 第 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 29 日, 幕張メッセ (千葉)
- ⑧ 原嶋奈々江 他, Apoptosis and ROS production in poly(I:C)-transfected human renal cell carcinoma, 第 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27 日, 幕張メッセ (千葉)
- ⑨ 稲尾瞳子, 原嶋奈々江 他, Anti-tumor effect and autophagy in human breast cancer cells after the transfection with poly(I:C), 第 70 回日本癌学会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋国際会議場 (愛知)
- ⑩ 稲尾瞳子, 原嶋奈々江 他, Poly(I:C) transfection により誘導されるヒト乳癌細胞でのアポトーシスとオートファジー, 第 19 回日本乳癌学会, 2011 年 9 月 3 日, 仙台国際センター (宮城)
- ⑪ 原嶋奈々江 他, 乳癌細胞に発現するアジュバント受容体を利用した immunogenic cancer cell death の誘導, 第 15 回日本がん免疫学会, 2011 年 6 月 30 日, 千里ライフサイエンスセンタービル (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原嶋 奈々江 (HARASHIMA NANAÉ)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60345311

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：