

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590092

研究課題名(和文)がん細胞特異的細胞死誘導分子の局在制御に着目した分子標的がん治療の新たな展開

研究課題名(英文)A new cancer therapy by intracellular localization control of apoptosis inducing death receptor in tumor cells

研究代表者

小島 裕子(Kojima, Yuko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60231312

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文): 正常細胞には細胞死を誘導せず、腫瘍細胞に対してのみ細胞死を誘導するTRAILタンパク質は、そのレセプターの一つであるDR5タンパク質と腫瘍細胞膜で結合して死のシグナルを伝達する。TRAIL低感受性ヒト腫瘍細胞株では、DR5が膜より核内に多く局在していることから、薬剤の添加で、核内のDR5が細胞膜に移行するようにしたヒト腫瘍細胞を作製、マウスの皮下に生着させた。腫瘍塊が一定の大きさに達した時点で、局在変化を誘導する薬剤とDR5に対する刺激抗体を投与したところ、腫瘍の退縮または消失が見られた。腫瘍細胞のDR5の局在を核から細胞膜に変化させる薬剤の開発が、今後のがん治療に繋がる可能性が示された。

研究成果の概要(英文): Induction of tumor cell apoptosis is an important for cancer therapy. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and death receptor 5 (DR5)-mediated apoptosis plays one of the key roles for tumor cell elimination, because this pathway has no effect on normal cells. In TRAIL/DR5-resistant tumor cells, DR5 localizes not only on the cell membrane but also in the nucleus. To translocate of nuclear DR5 to cell membrane, I generated drug-induced knockdown of importin 1 in TRAIL-resistant human tumor cells. These cells and control shRNA cells were xenografted to mice. After the establishment of tumor nodules, drug and anti-DR5 agonistic antibody (Ab) were administrated. By the drug administration, shRNA was induced in tumor cells. Moreover, in case of drug and anti-DR5 Ab administration, tumor growth was suppressed or tumor nodule was rejected. These data indicated that inhibition of importin 1 may be an useful application of apoptosis induction in tumor cells and cancer therapy.

研究分野：生物系薬学

キーワード：腫瘍細胞 アポトーシス 分子局在 がん治療 インポートン TRAIL Death receptor 5

1. 研究開始当初の背景

(1) TNF (Tumor necrosis factor) ファミリー分子には、がん細胞に細胞死を誘導するデス因子が多く、TNF α 、Fas リガンド、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)、Apo3 リガンドは、いずれも強力なアポトーシス誘導作用を持つ。その中で、他のデス因子とは異なる、TRAIL 分子の持つ最も注目すべき特徴は、“腫瘍細胞や形質転換細胞にはアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しない”ことである。しかし、その理由は明らかでない。

(2) TNF レセプターファミリーに属し、TRAIL に結合する複数の分子のうち、アポトーシス誘導能を持つ DR5 (Death receptor 5) に対するアゴニスティック抗体を用いた“がん抗体療法”が、抗 TRAIL 抗体と同様に、基礎実験を経て既に海外では臨床試験に入っている。しかし、動物実験において、動物の系統によっては胆管や肝臓に副作用が出るとの報告や、海外の臨床学会で、臨床試験における副作用の報告も出始めている。

(3) これまでに、ヒト腫瘍細胞株を用いた *in vitro* の実験において、TRAIL 低感受性の細胞株では、TRAIL と結合するために細胞膜に局在すべき DR5 が、主に核内に局在し、核移行シグナルを介してインポーチン $\beta 1$ (Imp $\beta 1$) で運ばれることを明らかにした。更に Imp $\beta 1$ をノックダウンすることにより、TRAIL 感受性が有意に上昇することがわかっている。

2. 研究の目的

(1) マウス腫瘍細胞株において DR5 の局在を調べ、TRAIL 感受性と DR5 の局在との間に、ヒトと同様の相関があるかを検討する。相関が認められれば、*in vitro* での実験を経て、マウスの系における *in vivo* でのインポーチンノックダウンの効果を調べ、ヒトのがん治療への応用の可能性を探る。

(2) (1)で、マウスとヒトとの間で、DR5 の局在と TRAIL の機能制御との関係が異なる場合には、ヒトの系に絞って、核内に局在する DR5 が遺伝子の転写調節に関与するなど、核内で何らかの機能を発揮することで腫瘍細胞の生存や増殖に寄与する可能性があるかを明らかにする。

(3) TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株に対して、各種阻害剤を作用させて、TRAIL 依存性細胞死を増強させる薬物を検索する。また、その時の DR5 の局在との関係を明らかにする。

(4) TRAIL 低感受性で核内に DR5 が局在するヒト腫瘍細胞株に、Imp $\beta 1$ の shRNA の発現を誘導してマウスに異種移植し、DR5 に対するアゴニスティック抗体を投与した場合に、コントロールの shRNA 誘導細胞に比べて、有意に腫瘍の退縮や拒絶が誘導されるかを調べ、*in vitro* で見られた Imp $\beta 1$ の機能調節が、今後の新たな分子標的がん治療のター

ゲットになり得るかを追求する。

3. 研究の方法

(1) TRAIL 低感受性の、マウス肺がん細胞株 3LL とメラノーマ細胞株 B16 を、未固定または固定後に抗マウスモノクローナル抗体 (mAb) で蛍光標識し、フローサイトメーター (FACS) で細胞表面及び細胞内の DR5 の発現を調べると共に、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で局在を解析した。

(2) TRAIL 低感受性及び感受性ヒト腫瘍細胞株に対して DR5 のノックダウンを行い、ノックダウンによる TRAIL 感受性の変化を調べ、核内 DR5 が及ぼす腫瘍細胞の生存や増殖への影響を調べた。

(3) TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株に対して、細胞分裂阻害剤: K858, Paclitaxel, Tryprostatin A, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤: バルプロ酸, インポーチン阻害剤: Importazole を作用させ、Caspase-3 活性, MTT assay, 位相差顕微鏡観察により、TRAIL 依存性細胞死が増強されるかを検討した。

(4) TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株に、薬剤誘導性に Imp $\beta 1$ shRNA を発現するレンチウイルスベクタープラスミド DNA を元に作製したレンチウイルスを感染させて、薬剤誘導性に Imp $\beta 1$ がノックダウンされる細胞を作製。それらの細胞をクローニングした後、ウエスタンブロットで顕著なノックダウンが確認されたクローンを、マウス背部皮下に異種移植して、飲水に薬剤を添加した群と無添加群に分け、更にヒト抗 DR5 抗体に対するアゴニスティック抗体を投与しながら、腫瘍径を経時的に計測した。各群のマウスから、腫瘍が生着した箇所の皮膚を回収して、薬剤誘導性に shRNA と共に発現する蛍光タンパク質の発現を、FACS で確認した。また、腫瘍を移植した皮膚を切除し、組織を保存、病理標本作製した。

4. 研究成果

(1) ① TRAIL 低感受性のマウスの腫瘍細胞株における DR5 の局在を FACS で解析した結果、3LL, B16 共に細胞膜に局在しており、細胞内にはほとんど局在していなかった。

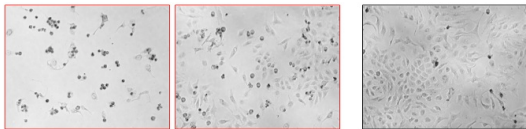
② CLSM による DR5 の局在解析でも、核内の DR5 は検出されず、細胞膜の他、一部がゴルジ装置を含む細胞質に検出された。

③ ヒト腫瘍細胞株: A549, SW620, SK-Mel 5, 526 Mel は、いずれも MTT assay を測定した結果、TRAIL に対して低感受性を示し、FACS と CLSM による解析の結果、DR5 は細胞質とゴルジ装置を含む細胞質の他、主に核に局在していた。従って、①～③の結果から、マウスにおいても、ヒト遺伝子配列中で見出される核移行シグナル類似の配列が見られるものの、TRAIL 低感受性と DR5 の局在との関係は、ヒトと同様にそのまま正立するわけではなく、他の因子による何

らかの制御が働いている可能性が考えられた。そのため、当初予定していた *in vivo* の実験は、マウスの同種移植ではなく、異種移植に変更して、(4)で行うこととした。

(2)① TRAIL 低感受性及び高感受性ヒト腫瘍細胞株に対して、DR5 のノックダウンを行い、MTT assay で細胞の生存率を調べたところ、TRAIL 高感受性腫瘍細胞株は、ターゲットの異なる 3 種の siRNA のいずれでも、細胞の生存率が変化しなかった。これに対して、TRAIL 低感受性の腫瘍細胞株は、複数の siRNA 配列で、細胞の生存率が有意に低下したが、コントロール siRNA では変化がなかった(図 1)。この時、いずれの DR5 の siRNA においても、DR5 が顕著にノックダウンされていることをウェスタンブロットで確認した。また、CLSM で、TRAIL 低感受性の腫瘍細胞株の核内 DR5 が、ノックダウンによって著しく減少していることを確認した。

TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株



TRAIL 高感受性ヒト腫瘍細胞株

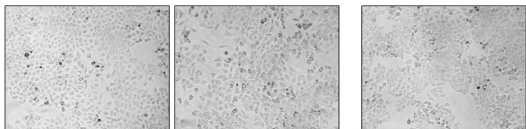
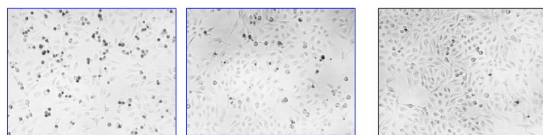


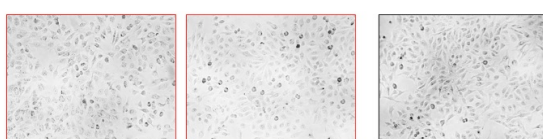
図 1 siRNA を移入したヒト腫瘍細胞株
(左 2 列 : DR5 siRNA 2 種,
右 1 列 : Control siRNA)

② ①で見られた現象のうち、TRAIL 低感受性のヒト腫瘍細胞株での現象は、位相差顕微鏡による細胞形態の観察でも認められた。更に、アポトーシスの阻害剤: Z-VAD, ネクロトーシスの阻害剤: Necrostatin-1 を添加すると、Z-VAD でのみ、DR5 のノックダウンによる細胞生存率の低下が阻害されたことから、アポトーシスが誘導されていたと考えられた(図 2)。

None



+ Z-VAD



+ Necrostatin-1

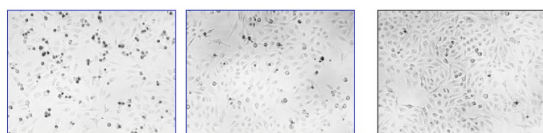


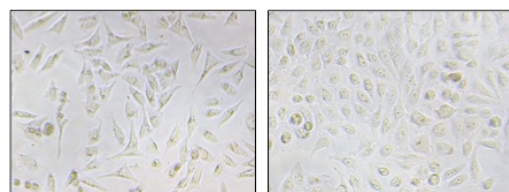
図 2 siRNA を移入した TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株

(左 2 列 : DR5 siRNA 2 種,
右 1 列 : コントロール siRNA)

③ ①~②の現象は、複数の TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株においても見られることから、核内に DR5 が大量に局在している TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株では、核内で DR5 が腫瘍細胞の生存に有利に働いている可能性が考えられた。そこで、TRAIL 低感受性腫瘍細胞と高感受性腫瘍細胞のそれぞれの核分画について、抗 DR5 抗体による免疫沈降後、ウェスタンブロットを行い、低感受性腫瘍細胞と高感受性腫瘍細胞の間で、バンドに差が生じているゲル部分を切り出した。各々をペプチドに分解、抽出し、液体クロマトグラフィーを行った後質量分析に掛け、核内 DR5 の結合分子の同定を試みた。しかし、量的に不十分で純度が低く、方法を改良して、DR5 及び目的のタンパク質を濃縮してサンプリングする必要があったが、期間内に明らかにすることはできなかった。

(3)① TRAIL 低感受性の細胞株に、それぞれの薬剤を作用させ、TRAIL 依存性の細胞死誘導が増強されるかを、方法記載欄に示した解析によって調べたところ、K858, Paclitaxel, バルプロ酸には、有意な上昇は見られなかった。これに対して、Tryprostatin A と Importazole では、細胞死誘導の有意な増強効果が認められた(図 3)。

None



+ TRAIL

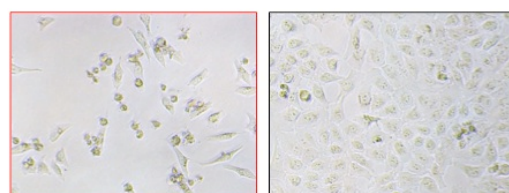


図 3 TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株
(左 : Importazole 添加, 右 : None)

② ①で効果のあった Tryprostatin A と Importazole について、FACS で細胞表面と細胞内も含めた細胞全体での発現を解析したところ、細胞表面の発現量の増加が認められた。細胞全体の発現量には変化が見られなかったことから、細胞内の DR5 が細胞表面に移行した可能性が考えられた。

③ ②の 2 つの薬剤について、CLSM で DR5 の局在を解析したところ、核内 DR5 が減少し、ゴルジ装置を含む細胞質の DR5 が増加していた(図 4, 図 5)。

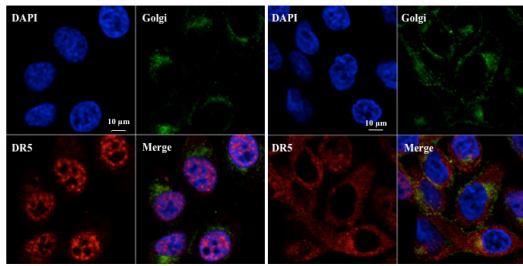


図4 TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株
(左: None, 右: Tryprostatin A 添加)

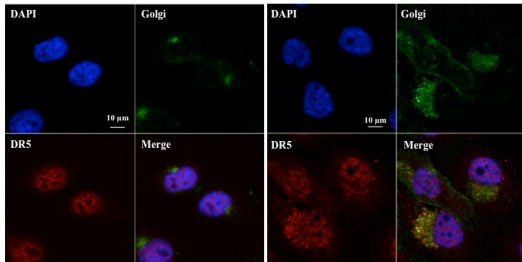


図5 TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株
(左: None, 右: Importazole 添加)

①～③の結果から, Tryprostatin A と Importazole は, *in vivo* でも効果がある可能性が考えられるが, *in vivo* で投与した報告がないので, 実際に実験を行う場合には, 投与方法や薬剤の可溶化方法を工夫する必要がある。

(4)① shRNA は誘導するものの, いずれのタンパク質の発現にも影響を及ぼさないコントロール shRNA と, Imp β1 の異なる 3 箇所の遺伝子配列を標的にした Imp β1 shRNA を薬剤誘導性に発現するレンチウイルスベクタープラスミドを, それぞれ増幅, 精製した. HEK293T 細胞株を用いてレンチウイルス増殖させた後, ウイルスを回収, 濃縮し, それぞれ TRAIL 低感受性ヒト培養細胞株に感染させた. プューロマイシンでセレクションした後, 薬剤誘導性に shRNA が発現していることを, turboRFP の蛍光で確認した (図6)。

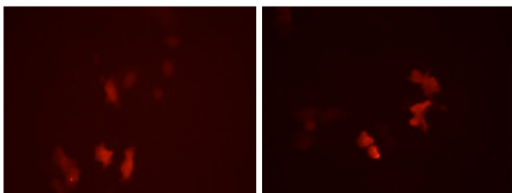


図6 shRNA を移入した TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株 (左: コントロール shRNA 右: Imp β1 shRNA)

② 薬剤誘導性に turboRFP を高発現する細胞分画を FACS でソーティングして培養し, 薬剤を添加しないで培養した細胞と添加して培養した細胞を各々可溶化し, ウェスタンブロットで解析, Imp β1 のノックダウンを確認した。

③ 各 shRNA 細胞分画をクローニングし, 遺伝子の標的部位の異なるクローンを含め

た, 計 17 クローン得た. 各クローンの Imp β1 ノックダウン効率をウェスタンブロットで確認し, 2 種のクローン, #B1 と #C14 を得た。

④ ③で得たクローンとコントロールの細胞について, 薬剤添加と薬剤添加なしの群に分けて, DR5 の細胞表面と細胞全体の発現を, TurboRFP と DR5 の 2 カラーで FACS 解析した結果, 薬剤を添加して Imp β1 の発現をノックダウンした細胞で, 細胞表面の DR5 の発現レベルの上昇があった. この時, 細胞全体の Imp β1 の発現レベルに変化はなかった. 従って, Imp β1 をノックダウンすることにより, DR5 の核への移行が阻害され, 細胞膜に局在が変化したと考えられた。

⑤ コントロール shRNA を発現する細胞と③で得た 2 種のクローンを, 免疫不全マウスの皮下に異種移植し, 腫瘍細胞の生着を確認した後, 細胞毎にそれぞれマウスを 4 群に分けた. そのうち 2 群の飲水に, shRNA を誘導する薬剤の添加を開始, 実験終了まで週 2 回薬剤入りの飲水を交換しながら, 薬剤の投与を続けた. また, 薬剤投与開始の翌日から, 4 群のうち 2 群に対して, コントロール用のヒト IgG (hIgG) または DR5 に対するアゴニスティック抗体 (α-DR5) を, 週 2 回腹腔内投与し, 実験終了まで繰り返し投与した. 即ち, 細胞毎に, マウスを hIgG 投与群, hIgG + 薬剤投与群, α-DR5 投与群, α-DR5 + 薬剤投与群の 4 群に分け, 全てのマウスの背部皮下の腫瘍径の長径と短径を, ノギスで計測した。

⑥ 実験期間中に, 各群より一部のマウスの皮下腫瘍を回収し, FACS にて薬剤誘導性に発現する TurboRFP の発現を確認した結果, それぞれ細胞の 80 % から 90 % について, shRNA の発現が確認された. 従って, *in vitro* だけでなく, *in vivo* でも薬剤誘導性に shRNA が発現誘導されたことが確かめられた。

⑦ コントロール shRNA を発現する TRAIL 低感受性細胞株を移植したマウスは, 4 群全てで腫瘍が増大の一途を辿った. これに対し, Imp β1 shRNA を発現する 2 つのクローンは, いずれも α-DR5 + 薬剤投与群にのみ, 有意な腫瘍の退縮または消失を見た (図7)。

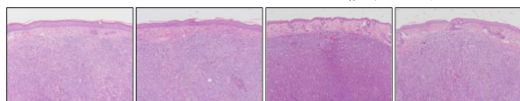


図7 shRNA を発現する TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞を背部皮下に異種移植した α-DR5 + shRNA 誘導薬剤投与マウス

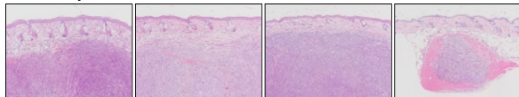
(左 1 匹：コントロール，
右 4 匹：Imp β 1 ノックダウン)

⑧ 各群のマウスの移植皮膚組織を切除し，病理標本を作製して比較した結果，計測した腫瘍の大きさに比例して，腫瘍の増殖または退縮及び消失が確認された (図 8)。

shRNA コントロール細胞移植マウス



Imp β 1 shRNA クローン#B1 移植マウス



Imp β 1 shRNA クローン#C14 移植マウス

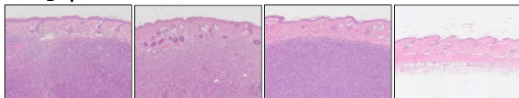


図 8 shRNA を発現する TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞を異種移植したマウスの背部皮膚

(左端：hIgG，左 2 列目：hIgG+薬剤，
右 2 列目： α -DR5，右端： α -DR5+薬剤)

④～⑧の結果から，これまで *in vitro* で見られた，Imp β 1 のノックダウンによる TRAIL 低感受性ヒト腫瘍細胞株の細胞死誘導の増強が，*in vivo* でも起きることが明らかになった．しかも，クローン#C14 については，腫瘍の消失が見られたことから，今後，Imp β 1 分子が，新たながん治療の標的分子になる可能性が示唆された．これまでの，TRAIL や DR5 を標的としたがん抗体療法による副作用を軽減した上で，更に治療効果の改善が期待される．

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 裕子 (KOJIMA Yuko)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60231312

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし