

平成 2 6 年 5 月 2 7 日現在

機関番号 : 1 4 4 0 1

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 7 9 1 4 1 4

研究課題名 (和文) 細胞周期解析による I F N α / 5 - F U 療法の機序解明研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of IFN α /5-FU treatment by visualization of cell cycle

研究代表者

前田 栄 (Maeda, Sakae)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 5 0 5 9 7 4 9 0

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要 (和文) : インターフェロンの効果を増強した場合の細胞周期に与える影響を検討するために、インターフェロンレセプター (IFNAR2) を強制発現させた細胞株を作成した。Fucciシステムを導入し細胞周期を可視化した。72時間のtime lapse imagingの解析によりIFN α はG0/G1期を、5FUはS/G2/M期で細胞死を誘導し、異なる細胞周期で効果を発現することがわかった。さらに、細胞周期を同調させた後にIFN α を投与することで、いずれの細胞周期にIFN α を投与してもS/G2/M期を経た後のG0/G1期で細胞死を迎える頻度が最も高くIFN α はS/G2/M期に作用点を持つことが観察された。

研究成果の概要 (英文) : To study the role of IFN α in the induction of apoptosis of HCC cells, we transduced interferon-alpha-receptor-2 (IFNAR2) into the human HCC cell line. Cell cycle was visualized by induction of Fucci system. Time lapse imaging for 72 hours after IFN α or 5-FU treatment showed that IFN α induced cell death at G0/G1 phase whereas 5-FU induced cell death at S/G2/M phase. Time lapse imaging after synchronization of cell cycle revealed that cell death induced by IFN α was observed at G0/G1 phase following after S/G2/M phase. This showed S/G2/M phase was active point for IFN α .

研究分野 : 生体イメージングを用いた癌細胞の動態解析

科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード : インターフェロン 5FU HCC Cell cycle

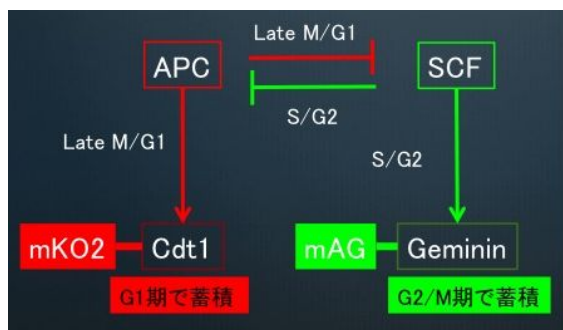
1. 研究開始当初の背景

門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝癌の平均予後は 2.5 ヶ月と非常に不良である (CLIP Investigators, Hepatology 1998)。教室ではこれまでに門脈内腫瘍栓を伴う多発肝癌症例に対してインターフェロン (IFN)- α /5-FU 併用化学療法を行い 1 年生存率 36%と良好な結果を得てきた (Ota H, et al. Br Jr Cancer 2005, Nagano H, et al. Oncology 2011)。その作用機序として IFN レセプター (IFNAR2) を介したシグナル伝達と細胞周期遅延が重要な役割を担うことが考えられた。 (Eguchi H, et al. Clin Cancer Res 2000)

1997 年に Dick らによって白血病幹細胞が初めて同定され (Dick J, et al. Stem cells 1997)、その後、各種固形癌においても、癌幹細胞が続々と報告されている。癌幹細胞は体性幹細胞と同様に細胞周期を静止期 (G0 期) に維持し、多分化能を保持しながら長期にわたり癌組織を維持し、増殖、進展、転移、さらに治療抵抗性や再発に深く関与している。治療抵抗性を持った癌幹細胞に対してのアプローチが以降盛んに行われ、これまでに肝癌幹細胞マーカーとして EpCAM、CD24、CD44、CD90、CD133 が報告されている。我々の教室では CD13 陽性肝癌細胞が肝癌幹細胞のマーカーとして有用であることに加え、過酸化物質の排泄をつかさどるグルタチオンパスウェイの酵素としての機能を有しており治療標的分子となり得ることを報告した。 (Haraguchi N, et al. J Clin Invest 2010)

2009 年に Marieke らによりマウスにインターフェロンを投与することで骨髓中の休止状態にある骨髓幹細胞が活性化され細胞分裂が誘導されることが報告された。休止状態の骨髓幹細胞は DNA 合成阻害薬に抵抗性を示したが、活性化された骨髓幹細胞で 5-FU の感受性増大が証明され、今後は癌幹細胞の治療にも IFN が大きな役割を果たす可能性が示唆された (Marieke G, et al Nature 2009)。

2010 年に Sawano らによって Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) が開発され細胞周期の可視化が可能となった。これは G1 期に特異的に発現する Cdt1 を Kusabira Orienge (mKO2) で赤色に標識し、S/G2/M 期に特異的に発現する Geminin に Azami Green (mAG) で緑に標識する技術である。



Fucci システムを導入した細胞は顕微鏡下に生きた状態で細胞周期の変化を観察することが可能であり、これまでは集団数の変化としてしか捉えることの出来なかった細胞周期の解析が個々の細胞レベルで可能となった。また、癌幹細胞は G0 期に存在し、活性化を受けることで G1/S 期に移行すると考えられており、細胞周期と密接な関係がある。

細胞周期や癌幹細胞に着目したインターフェロン α /5-FU 併用療法の機序解明は未だ不十分であり今後の研究が期待される分野である。

2. 研究の目的

(1) IFN- α /5-FU 併用療法が個々の細胞周期に与える影響を明らかにする

Fucci システムの導入による個々の細胞レベルでの細胞周期を可視化し、IFN- α 、5-FU 単独もしくは併用投与が細胞周期に与える影響を解析する。また、細胞周期毎に展開した分画に対する IFN- α と 5-FU の治療効果を増殖抑制試験、アポトーシス解析を行うことで細胞周期の変化と抗腫瘍効果の関係を明らかにし、細胞周期と抗腫瘍効果に関わる分子を解明することであらたな標的治療を開発する。

(2) 各癌幹細胞マーカーを発現する肝癌幹細胞の細胞周期の挙動と IFN- α /5-FU 併用療法の影響を明らかにする

Fucci で展開された細胞周期の分画を各肝癌幹細胞マーカーで染色することによって G0/G1 期に存在する癌幹細胞マーカーを同定し、薬剤投与による癌幹細胞マーカー陽性細胞の細胞周期変化を解析することで癌幹細胞に対する IFN- α /5-FU 併用療法の働きを解明する。

(3) G0 期に存在する癌幹細胞と IFN- α により活性化された癌幹細胞での特徴を明らかにする

肝癌幹細胞マーカー陽性細胞を MACS sorting を行なって抽出し IFN 投与を行う。IFN による活性化誘導を細胞周期の変化で確認する。IFN- α 投与前の G0 期に存在する癌幹細胞と IFN- α 投与により活性化され細胞周期に誘導された癌幹細胞をそれぞれ sorting し、活性化前後での遺伝子発現の変化を網羅的遺伝子発現解析を用いて捉え、IFN- α により誘導される癌幹細胞活性化因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IFN- α 高感受性株の樹立

肝癌細胞である HuH7 にインターフェロンレセプターの一つである IFNAR2 をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入を行った後

に薬剤選択により IFNAR2 を高発現する株を樹立した。qRT-PCR, Western blotting により IFNAR2 の発現を確認し、インターフェロン投与後の 72 時間の MTT アッセイによりインターフェロン感受性の変化を解析した。

(2) 細胞周期の可視化

HuH7 にレンチウイルスにより Fucci システムを導入して FACS ソーティングにより mK02 及び mAG を発現する細胞を選択し、Hoechst3342 による核染色で表される細胞周期との一致を確認した。共焦点レーザー顕微鏡を使用して Fucci 導入株を生きた状態で経時的に撮影し、細胞周期の変化を個々の細胞レベルで捉え、経時的に撮影画像を重ね合わせることで time-lapse imaging を行った。

(3) IFN- α , 5-FU の細胞周期に与える影響の可視化

Fucci 導入後の HuH7 に IFN- α 及び 5-FU をそれぞれ段階濃度での投与を行い、72 時間の time-lapse imaging を行い、それぞれの細胞周期における細胞死の発生頻度を解析した。さらに、段階濃度における IFN- α 及び 5-FU 投与 48 時間における細胞周期の変化を FACS により解析した。

(4) 細胞周期における IFN の作用点の解析

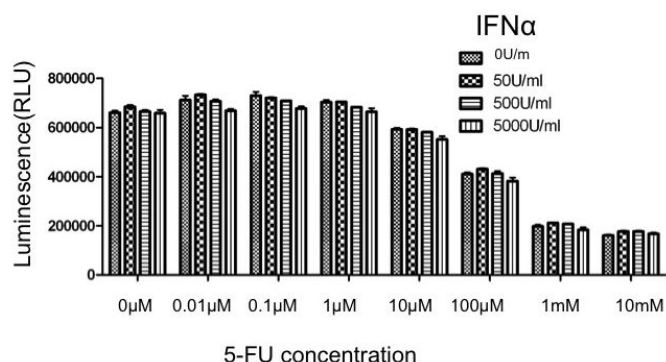
細胞周期における IFN- α の作用点を解析するために、Aphidicoline を用いて HuH7 の細胞周期を早期 S 期及び G0/G1 期に同調させた。それぞれの同調させた周期より IFN を投与と同時に同調を解除し、72 時間の time-lapse imaging を行い、細胞死の発生と細胞周期の変化を個々の細胞毎に解析した。

(5) 分子生物学的解析

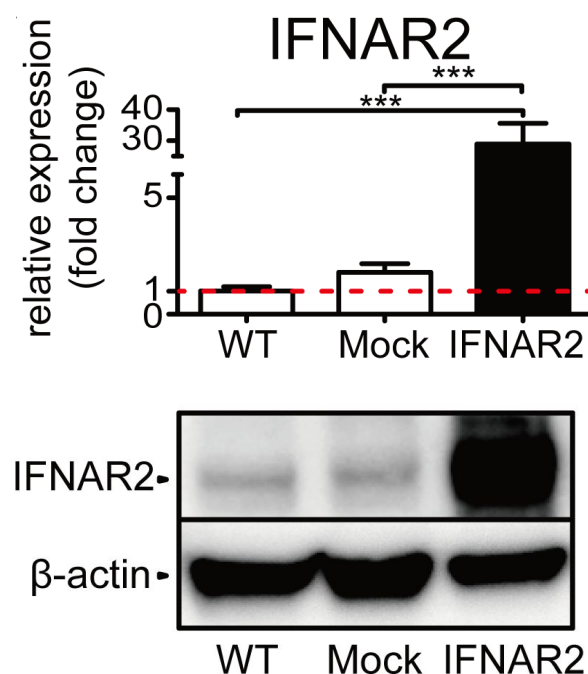
IFNAR2 を強制発現させた HuH7 に対して IFN- α 1000IU/ml を投与し、24 時間後に Fucci による G0/G1 期と S/G2/M 期をそれぞれ FACS ソートにより分離した後、IFN- α により誘導される因子の発現を Western blotting 法に行った。

4. 研究成果

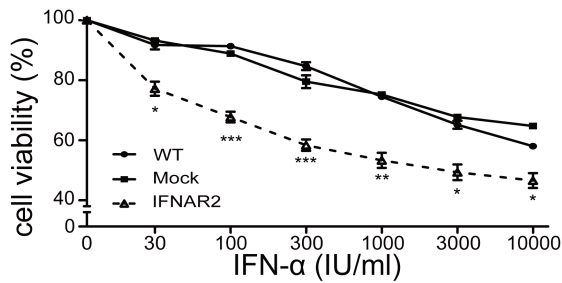
(1) 72 時間の MTT アッセイにおいてヒト肝癌細胞株 HuH7 は、5-FU に対しては濃度依存性に細胞活性の低下が見られたが、IFN α に対しては濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果が得られず、5-FU との併用においても IFN- α の相乗効果は得られなかった(下図)。



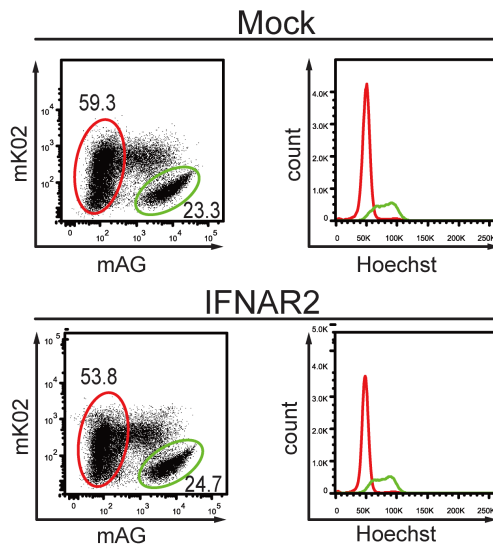
(2) IFN- α のシグナル IFN- α がインターフェロンレセプターに結合し、Jak/STAT 経路が活性化されることでさまざまな転写活性因子が誘導されることが知られている (Pestka, S. et al. *The Journal of biological chemistry* 2007)。このために、インターフェロンレセプターを介した IFN により誘導される因子が細胞周期に与える影響を検討するために、インターフェロンレセプター (IFNAR2) を強制発現させた細胞株を作成した。qRT-PCR 法及び、Western blotting 法では IFNAR2 の遺伝子導入により mRNA および蛋白レベルでの IFNAR2 の発現が得られていることが確認できた(下図)。



(3) IFN- α 投与 72 時間後の MTT アッセイによる解析では、IC70 はコントロール群:1966.2 IU/ml、IFNAR2 強制発現群:83.3 IU/ml と IFNAR2 の強制発現により IFN- α の感受性が増加していることが示された(下図)。



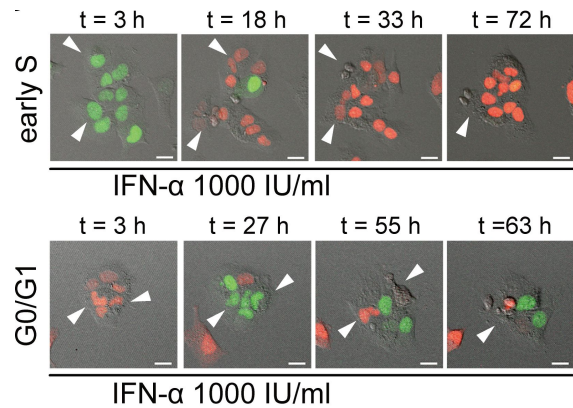
(4) 細胞周期を可視化するために Fucci システムを HuH7 に導入し、安定株を樹立した。Mock 及び IFNAR2 を遺伝子導入した HuH7 に Fucci システムを導入し、mK02、mAG の各細胞周期毎における発現、消退が Hoechst33342 染色による細胞周期解析と一致することを確認した。数回にわたり両方の蛍光プローブを発現している細胞を sorting し継代することで Fucci 安定発現株を樹立した(下図)



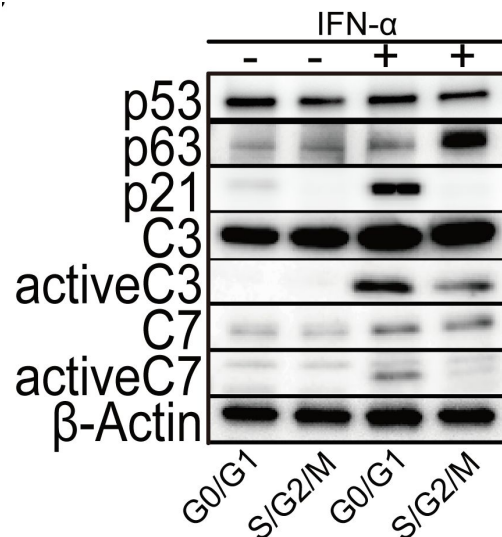
5-FU 投与後 72 時間の time-lapse imaging では、Mock 及び IFNAR2 導入株において、細胞周期が S/G2/M 期で延長していることが観察され、更に S/G2/M 期において細胞死が誘導されていることが観察された。IFN-α 1000 IU/ml の投与下では細胞周期は G0/G1 期で延長しており、G0/G1 期において細胞死が誘導されている様子が観察された。IFNAR2 導入後の HuH7 において、G0/G1 期での細胞死の発生頻度を比較すると IFN-α 1000 IU/ml 投与では 81.8%、5-FU 1000 μM 投与下で 4.6%であった。これらの結果より、IFN-α は G0/G1 期を、5FU は S/G 2/M 期で細胞死を誘導し、異なる細胞周期で効果を発現していた(下図)。

(5) IFN-α の細胞周期上での作用点を解析するために Aphidicolin を用いて細胞周期を同調させた。Aphidicolin の 24 時間暴露により HuH7 は早期 S 期に同調された。さらに、Aphidicolin の暴露を 12 時間解除することで細胞周期を G0/G1 に同調させることに成功した。IFN-α を投与し time-lapse imaging を行

い、細胞周期の変化と細胞死の関連を解析した(下図)。この結果、細胞死の発生頻度は S/G2/M 期で細胞死を迎えた群(8.3±4.7%)、S/G2/M 期より G0/G1 期に移行した後に細胞死を迎えた群(57.1±25.6%)、再度 S/G2/M 期に突入後細胞死を迎えた群(4.5±2.2%)で、G0/G1 期への IFN-α 投与群では、G0/G1 期で細胞死を迎えた群(10.0±3.7%)、G0/G1 期より S/G2/M 期に移行した後に細胞死を迎えた群(6.0±4.5%)、再度 G0/G1 期に突入後細胞死を迎えた群(29.4±4.8%)であり、いずれの細胞周期に IFN-α を投与しても S/G2/M 期を経た後の G0/G1 期で細胞死を迎える頻度が最も高く IFN-α は S/G2/M 期に作用点を持つことが観察された。



(6) IFN-α 投与により細胞周期依存性に発現の異なる因子として IFNα 投与後に G0/G1 期で p63 の発現が誘導されていることが Western blotting 法により示された(下図)。HuH7 においてはアポトーシスの誘導や細胞周期の停止を誘導する p53 は変異により失活しており、p63 が補完的に IFN-α により誘導されている可能性が示唆された。



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 4 件)

1. 前田栄、細胞周期から見た IFN α /5FU 併用療法の作用機序解明を目指した基礎的研究、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月、宮崎

2. 前田栄、インターフェロンレセプターの遺伝子導入及び細胞周期の可視化による IFN/5-FU 併用療法の機序解明に関する検討、第 113 回日本外科学会総会、2013 年 4 月、福岡

3. 前田栄、生体イメージングによるインターフェロンの細胞周期調整作用の可視化、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 19 日、富山

4. 前田栄、細胞周期の可視化によるインターフェロン/5-FU 併用療法の作用機序解明を目指した基礎的研究、第 22 回日本サイトメトリ学会、2012 年 6 月 9 日、大阪

〔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 0 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

前田 栄 (Maeda Sakae)
大阪大学医学部附属病院・医員
研究者番号：50597490

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

