

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462049

研究課題名(和文) TLR7アプタマーによる内因性Denger Signalの制御と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategies for endogenous danger signals by a TLR7 aptamer

研究代表者

上原 圭介 (Uehara, Keisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50467320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌症例、膵癌症例においてTLR7とTLRファミリーであるTLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR9に関して臨床病理学的に検討を行ない、TLR7は胆管癌症例、膵癌症例において癌組織で高発現していた。TLR7以外のTLRファミリーTLR3、TLR4、TLR5、TLR6も癌組織で有意に高発現していた。胆管癌細胞株、膵癌細胞株においてTLR7のアゴニストは増殖抑制効果を示した。担癌動物モデルの検討によりTLR7のアゴニストが抗腫瘍効果を有していることを明らかにした。本研究によりTLR7を標的にした新規治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of TLR7 and other members of the TLR family, including TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR9, and the clinicopathological features of cholangiocarcinoma and pancreatic cancer. TLR7 was highly expressed in both cancers. In addition, TLR3, TLR4, TLR5 and TLR6 were highly expressed in both cancers. Administration of a TLR7 agonist suppressed cell proliferation in a cholangiocarcinoma cell line and a pancreatic cancer cell line. Furthermore, a TLR7 agonist demonstrated anti-cancer effects in a xenograft mouse model. This study suggests that novel anti-cancer therapies can be developed to target TLR7.

研究分野：外科学

キーワード：Denger Signal

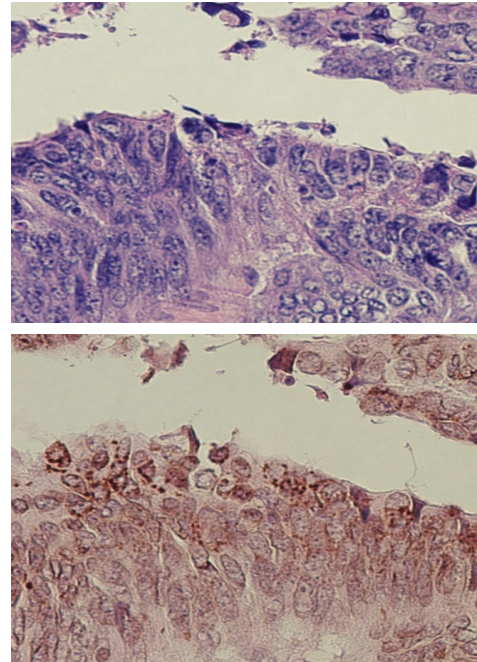
1. 研究開始当初の背景

癌研究の進歩により癌周囲の微小環境が癌に対して大きく影響を及ぼしていることが明らかになっている (Sun Y. *Nat Med.* 2012)。癌周囲の炎症が癌の増殖、浸潤、転移さらには発癌にまで関連していると考えられ、微小環境での炎症や感染による発癌機構として Myd88, NF- κ B など炎症シグナルの関与が報告されている (Ikebe M. *J Surg Oncol.* 2009)。炎症反応は、外部からの刺激である Danger signal が樹状細胞に作用して免疫応答を誘導することにより生じ、Danger signal は外因性 Danger signal (感染による病原体成分) と内因性 Danger signal (死細胞から放出される成分) に分けられ、内因性 Danger signal から誘導される非感染性炎症は、感染性炎症と区別され自然炎症と定義されている。外因性 Danger signal に関する研究は多くされているが、内因性 Danger signal に関しては、癌浸潤による組織破壊により周囲組織から内因性 Danger Signal が生じ、免疫応答をおこし、癌の進展に影響するという報告 (Porta C. *Cancer Lett.* 2011) はあるが多くはない。しかも、癌自体からの内因性 Danger Signal に関する研究はほとんど行われていない。

我々は大腸癌周囲に存在する microabcess が予後に関連していることを報告しており (Uehara K. *Br J Surg.* 2006)、平成 22 年-24 年度科学研究費「大腸癌 microscopic abscess における免疫誘導の解明とその臨床応用」(代表: 上原圭介) において、大腸癌 microabcess を有する症例においては癌特異的に TLR (Toll like receptor) 7 の高発現を同定した(図 1)。TLR7 は、免疫細胞である形質細胞で発現しており、感染に対する防御機構において、IFN、IL-1 などサイトカイン産生や樹状細胞など抗原提示能の増強および獲得免疫誘導などの重要な役を果たしている。肥満、動脈硬化においては、組織破

壊による死細胞由来の核酸が、内因性 Danger signal として TLR7 を活性化し、炎症を誘導、増強する可能性が指摘されている (Boyd JH. *Cardiovasc Res.* 2006)。これまで癌における TLR7 と内因性 Danger signal についての報告はなく、癌における TLR7 の機能についても十分にわかっていない。

図 1 上図: HE, 下図: TLR7



2. 研究の目的

外部からの刺激である Danger signal が樹状細胞に作用して免疫応答を誘導することが分かっている。しかし、癌と内因性 Danger signal (死細胞から放出される成分) や癌における TLR7 と内因性 Danger signal の関連性については十分にわかっていない。われわれは先行実験で大腸癌での TLR7 の発現亢進を明らかにしており、MonoLex 法を用いて TLR7 を標的にしたアプタマーを開発する。このアプタマーにより TLR7 を抑制し、内因性 Danger signal のメカニズムを解明する。さらに内因性 Danger signal の制御による新規治療法や診断法を開発する。本研究の最終目的は、開発された TLR7 を標的にしたアプタマーにより癌の治療成績を

向上させることである

3. 研究の方法

【TLR7 (Toll-like receptor 7)の臨床病理学的検討】

名古屋大学医学部附属病院において手術施行された胆管癌46例(男32:女14、平均年齢63.5)、膵癌28例(男15:女13、平均年齢67.4)についてTLR7 とTLR ファミリーであるTLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR9の正常組織と癌組織での発現についてリアルタイムPCR法にて比較検討を行った。

TLR7の関連分子としてMyd88、IRF (Interferon regulatory factor)ファミリーの発現についてリアルタイムPCR法にて検討した。

【TLR7 に関する機能解析】

胆管癌細胞株RBE、HuCCT1、膵癌細胞株Panc1、PK8、PK9、正常膵臓由来細胞株R1515についてTLR7の発現をウェスタンブローディングにて検討した。TLR7 を標的にしたsiRNAを合成し、TLR7 siRNAを胆管癌細胞株HuCCT1に導入し増殖能(MTT アッセイ法)、浸潤能(インベーションアッセイ法)、アポトーシス(TUNEL 法)について検討した。また膵癌細胞株Panc1に関してもTLR7 siRNAを導入し、増殖能(MTT アッセイ法)を検討した。

【ヒト由来癌細胞株におけるTLR7アゴニストの機能解析】

TLR7 を標的にしたアプタマーの同定ができなかったため、TLR7のアゴニストであるイミキモドを用いてTLR7の機能解析を行った。胆管癌細胞株RBE、HuCCT1にイミキモドの投与を行い、増殖能(MTT アッセイ法)、細胞死誘導能(トリパンブルー色素法)にて検討した。イミキモドを膵癌細胞株Panc1に投与し、増殖能(MTT アッセイ法)、アポトーシス(TUNEL 法)を検討した。

【担癌動物モデルに対するTLR7アゴニストの機能解析】

胆管癌細胞株HuCCT1による胆管癌皮下発癌モデルにイミキモドの投与を行い、抗腫瘍効果について49日間経過観察を行った。切除標本を用いてTLR7の関連分子としてMyd88、IRF (Interferon regulatory factor)ファミリーの発現についてリアルタイムPCR、ウェスタンブローディングによる解析をおこなった。体重減少、副作用の検討をおこなった。

【TLR4のアゴニストの機能解析】

TLR7 以外のTLR ファミリーTLR3、TLR4、TLR5、TLR6は正常組織と比較して癌組織で有意に高発現していた。特にTLR4は炎症との関連が報告されておりTLR4のアゴニストをラット炎症モデルへ投与し、免疫誘導に関してIL6、TNFaの発現をリアルタイムPCRにて検討した。

4. 研究成果

【TLR7 (Toll-like receptor 7)の臨床病理学的検討】

TLR7は胆管癌症例、膵癌症例のいずれにおいても正常組織と比較して癌組織で高発現していた。TLR7 以外のTLR ファミリーTLR3、TLR4、TLR5、TLR6は正常組織と比較して癌組織で有意に高発現していた。TLR9については癌組織で高発現している傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

胆管癌症例において癌部でのTLR7の発現は他のTLRファミリーより有意に高発現していたが、膵癌症例に関しては癌部でのTLR7の発現は他のTLRファミリーの発現より亢進していたが、有意差は認めなかった。

胆管癌症例、膵癌症例においてTLR7とMyd88の発現に相関を認めた。また胆管癌症例、膵癌症例においてIRFファミリーの内IRF3の発現はTLR7同様に亢進していた。

【TLR7 に関する機能解析】

TLR7は胆管癌細胞株RBEにおいて最も高発現であり、胆管癌細胞株HuCCT1、膵癌細胞株Panc1、PK8は中等度発現、膵癌細胞株PK9、

正常膵臓由来細胞株RI515についてはほとんど発現していなかった。

TLR7 siRNAによりTLR7の発現を抑制させることによりHuCCT1の増殖が抑制され浸潤も抑制したが、アポトーシスの亢進は認めなかった。また膵癌細胞株Panc1においてもTLR7の発現を抑制により増殖が抑制された。

【ヒト由来癌細胞株におけるTLR7アゴニストの機能解析】

TLR7 を標的にしたアプタマーの同定ができなかったため、TLR7のアゴニストであるイミキモドを用いてTLR7の機能解析を行った。胆管癌細胞株RBE、HuCCT1のいずれにおいてもイミキモドは細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導した。イミキモドは膵癌細胞株Panc1においても細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導した。

【担癌動物モデルに対するTLR7アゴニストの機能解析】

胆管癌皮下発癌モデルへの生食投与群において腫瘍の縮小は認めなかったが、イミキモド投与群において明らかな腫瘍の縮小を認めた。この切除標本でのMyd88、IRF3の発現については有意差を認めることができなかった。また生食投与群、イミキモドの投与群において体重減少を認めず、明らかな副作用は認めなかった。

【TLR4のアゴニストの機能解析】

ラット炎症モデルにおいて IL6、TNFa の発現が亢進していた。TLR ファミリーで炎症との関連が報告されている TLR4 のアゴニストは発現亢進した IL6、TNFa の発現を低下させた。

胆管癌細胞株、膵癌細胞株においてTLR7のアゴニストは増殖抑制効果を示し、担癌動物モデルにおいてもTLR7のアゴニストは抗腫瘍効果を有していた。本研究によりTLR7を標的

にした新規治療法開発の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Mansour MA, Hyodo T, Akter KA, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Senga T. SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Jan 26;7(4):4993-5006. doi:

10.18632/oncotarget.6651. (査読有)

Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Kurita K, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling. *FEBS J*. 2015 Apr;282(8):1394-405. doi:

10.1111/febs.13227. (査読有)

Oya S, Yokoyama Y, Kokuryo T, Uno M, Yamauchi K, Nagino M. Inhibition of Toll-like receptor 4 suppresses liver injury induced by biliary obstruction and subsequent intraportal lipopolysaccharide injection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Feb;306(3):G244-52. doi: 10.1152/ajpgi.00366.2013. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上原 圭介 (UEHARA, KEISUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号 : 50467320

(2)研究分担者

榎野 正人 (NAGINO, MASATO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378091

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：60378023

吉岡 裕一郎 (YOSHIOKA, YUICHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50597854

(平成 25 年度)