

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430169

研究課題名(和文) 抗腫瘍性サイトカインIL-24遺伝子改変細胞を用いたがん転移抑制機序の解明

研究課題名(英文) The evaluation of suppressive effects for suppression of tumor metastasis using retrovirally introduced antitumor cytokine, IL-24 into prostate cancer cells.

研究代表者

北里 英郎 (Kitasato, Hidero)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90195256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規抗腫瘍性サイトカインIL-24をIL-24受容体を有しない前立腺癌細胞に、レトロウイルスベクターを用いて導入したところ、細胞増殖抑制とともにアポトーシス誘導と上皮系マーカーの上昇などの抗腫瘍効果が有意に観察された。興味深いことに、これらの作用はリコンビナントIL-24蛋白質を添加した際には認められなかった。今後詳細なメカニズムを解析する。

研究成果の概要(英文)：In this study, antitumor effects such as cell proliferation inhibition, apoptosis induction and epithelial marker elevation, were significantly observed in retrovirally IL-24 introduced into prostate cancer defecting IL-24 receptors. Interestingly, those effects were not observed by administration of recombinant IL-24 to the prostate cancer cells. The detail of mechanism for the antitumor effects by introduced IL-24 may dissolve in the future.

研究分野：総合領域

キーワード：インターロイキン24 抗腫瘍性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

IL-24 は、当初 mda-7 という腫瘍抑制遺伝子産物として注目され、乳がん、肺がん、前立腺がんなどで増殖抑制効果がある (Oncogene, 21, 708-21, 2002 など)、一方、ヒトの正常細胞にはその影響を及ぼさずにがん細胞選択的な増殖抑制効果が期待されている (Proc Natl Acad Sci., USA, 95, 14400-5, 1998. など)。IL-10 の family に分類され、がん細胞特異的なアポトーシス、血管・リンパ管新生の抑制、化学療法への応答性の向上などが知られている (BBRC., 439 (2) 215-20, 2013)。また、がんに対する T cell 免疫応答を向上することも期待されている (Methods Mol Biol., 651, 241-70, 2010)。

2. 研究の目的

Interleukin (IL)-24 は、その抗腫瘍効果が、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導などを中心に報告されている。本研究では、IL-24 をレトロウイルスベクターにより高発現させたマウス繊維芽細胞を用いた細胞療法を、マウス肺がん転移モデルにおいて実施する。細胞療法は、局所で一定期間安定して、IL-24 を発現するため、原発巣、転移巣における抗腫瘍効果を検討し、特にリンパ管・血管新生への影響なども含めた網羅的な転移機序の解明を考察する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変細胞 C57-IL-24, DU145-IL-24 の作製

Human IL-24 遺伝子 (Accession No. BC009681) をレトロウイルスベクター pDON-5Neo (Takara) を用いて、マウス繊維芽細胞 C57 およびヒト前立腺癌細胞 DU145 へ導入した (C57-IL-24, DU145-IL-24)。対照として、C57 にレトロウイルスベクター pDON-5Neo だけを導入し、C57-EV 及び DU145-IL-24 を作製した。

(2) *In vitro* における IL-24 における IL-24 の抗腫瘍効果の検討

リコンビナント IL-24 を用いて、ヒト肺癌細胞 A549, RERF-LC-AI, ヒト前立腺癌 DU145, PC-3 に対し、WST 増殖アッセイ法により細胞増殖の解析を行った。また、BrdU ELISA 及び Cell death detection ELISA により、DU145-IL-24 の細胞増殖とアポトーシス誘導の解析を行った。

(3) IL-24 による上皮系および間葉系形質の解析

DU145-IL-24 における細胞形態違いを、蛍光ファロイジンにより検出した。上皮系マーカー及び間葉系マーカー遺伝子の解析を、real time PCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) リコンビナント IL-24 蛋白質による腫瘍細胞と遺伝子発現解析

リコンビナント IL-24 を添加後 96 時間培養した A549, RERF-LC-AI, DU145, PC-3 細胞を WST アッセイ法を用いて解析した。リコンビナント IL-24 による腫瘍細胞への増殖抑制効果は、いずれの細胞においても認められなかった。

A549, RERF-LC-AI, DU145, PC-3 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR を用いて IL-24 受容体の遺伝子発現を確認した。A549, RERF-LC-AI, PC-3 細胞で、IL-24 受容体発現が認められた。DU145 細胞では、いずれの IL-24 受容体遺伝子の発現も認められなかった (図 1)。

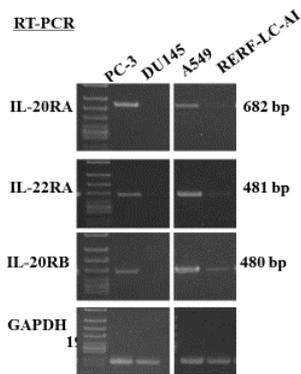


図1. 癌細胞におけるIL-24受容体発現

(2) IL-24 遺伝子導入による抗腫瘍効果の検討

IL-24 受容体を持たない DU145 細胞にレトロウイルスベクターを用いて、IL-24 遺伝子を導入した。IL-24 の mRNA 発現および蛋白質発現は、RT-PCR および ELISA を用いて、それぞれ確認した。その結果 DU145-IL-24 でのみ IL-24 mRNA 及び IL-24 蛋白質の発現が確認された (図 2)。

IL-24 遺伝子導入による抗腫瘍効果を WST アッセイ、BrdU ELISA、cell death detection ELISA を用いて解析したところ、DU145-IL-24 は DU145-EV と比較し、細胞増殖が有意に抑制され、アポトーシスが誘導されていることが確認された。

(3) IL-24 遺伝子導入による細胞形質の変化

DU145 細胞は、IL-24 遺伝子の導入により細胞形態の変化を生じた。蛍光ファロイジンを用いてアクチンを染色すると、DU145-IL-24 では、DU145-EV と比較し、ストレスファイバーの形成が減少していた。また、mRNA 発現を real time PCR にて確認したところ、DU145-IL-24 では、DU145-EV と比較し、上皮系マーカーの上昇や間葉系マーカーが確認された (data not shown)。

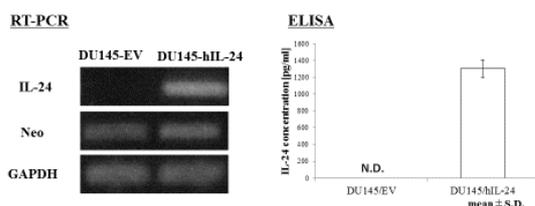


図2. DU145-IL-24のIL-24遺伝子産物の確認

(4) 得られた成果とインパクト

IL-24 の抗腫瘍作用は主にアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療に基づいている。IL-24 の導入された細胞は IL-24 を分泌することにより、周囲の細胞のバイスタンダーエフェクトにより、抗腫瘍効果を発揮することも報告されている。我々の検討では、リコンビナント IL-24 の添加により、IL-24 受容体を介した抗腫瘍効果が認めなかった。一方で、IL-24 受容体を発現しない前立腺癌細胞株において IL-24 遺伝子導入により細胞増殖抑制効果と腫瘍細胞の運動や浸潤に関わる遺伝子変化を引き起こすことが明らかとなった。これらのことから IL-24 が細胞外からのシグナル伝達だけでなく、細胞内で抗腫瘍性に働く新たな制御機構が存在する可能性が示唆される。この成果は第 37 回日本炎症・再生医学界において高く評価された (学会発表)。

(5) 今後の展望

In vitro で得られた抗腫瘍メカニズムを *in vivo* で検討する。マウス体内での腫瘍形成能の変化を、腫瘍浸潤と悪性度に着目して解析を進める。また、バイスタンダーエフェクトの解析をフローサイトメトリー、Elispot assay、免疫組織化学染色により明らかにする。また、前立腺癌以外の腫瘍細胞においても、同様の抗腫瘍メカニズムが引き起こされるか、現在検討中である。

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7件)

Maehana S, Nakamura M, Ogawa F, Imai R, Murakami R, Kojima F, Majima M, Kitasato H. Suppression of lymphangiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in a mouse lung cancer model. Biomed Pharmacother. 84, 660-5, (2016) (査読有り)

Amano H, Nakamura M, Ito Y, Kakutani H, Eshima K, Kitasato H, Narumiya S, Majima M. Thromboxane A synthase enhances blood flow recovery from hindlimb ischemia. J Surg Res. 204, 153-163, (2016) (査読有り)

船津 栄、宮田聡子、村下一晃、原和矢、北里英郎 爪床に生じた Bowen 病 皮膚科の臨床. 58, 99-102, (2016) (査読有り)

Park K, Amano H, Ito Y, Kashiwagi S, Yamazaki Y, Takeda A, Shibuya M, Kitasato H, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. Biomed Pharmacother. 78, 140-92, (2016) (査読有り)

Matsumoto K, Ikeda M, Matsumoto T, Nagashio R, Nishimori T, Tomonaga T, Nomura F, Sato Y, Kitasato H, Iwamura M. Serum perioplakin as a potential biomarker for urothelial carcinoma of the urinary bladder. Asian Pac J Cancer Prev. 15, 9927-31, (2014). (査読有り)

Ogawa F, Amano H, Eshima Y, Ito Y, Matsui Y, Hosono K, Kitasato H, Iyoda A, Iwabuchi K, Kumagai Y, Satoh Y, Narumiya S, Majima M. Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes. J. Clin. Invest.

124, 4882-94, (2014) (査読有り)

Ogawa F, Amano H, Ito H, Matsui Y, Hosono K, Kitasato H, Satoh Y, Majima M. Aspirin reduces lung cancer metastasis to regional lymph nodes. Biomed Pharmacother. 68, 79-86, (2014) (査読有り)

[学会発表](計1件)

松本優汰, 前花祥太郎, 小島史章, 中村正樹, 北里英郎. Interleukin-24 による前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果とその作用機序の解析. 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都市勧業館みやこめっせ(京都府京都市). 2016年6月16~17日 [ポスター番号 P16-3]

[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

北里 英郎 (Kitasato Hidero)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号： 90195256

(2) 研究分担者

片桐 真人 (Katagiri Masato)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号： 50152674

馬嶋 正隆 (Majima Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号： 70181641

松本 和将 (Matsumoto Kazumasa)

北里大学・医学部・講師

研究者番号： 7036603

中村 正樹 (Nakamura Masaki)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号： 30724554

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者