

表 題 IFN-λ2 (IL-28A) のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果の研究

論文の区分 論文博士

著 者 名 手塚康裕

所 属 自治医科大学外科学講座呼吸器外科部門

2013 年 11 月 1 日 申請の学位論文

紹介教員 自治医科大学外科学講座呼吸器外科部門

職名・氏名 教授 遠藤俊輔

目次

1. はじめに (背景)	2
2. 研究の材料・方法	4
3. 研究結果	8
4. 考察	19
5. おわりに (結論)	24
6. 謝辞	25
7. 引用文献	26

1. はじめに(背景)

原発性肺癌は本邦、世界いずれでも癌関連死の主要な原疾患の一つであり、非小細胞肺癌(NSCLC)の 5 年生存率は 15%にも満たない[1, 2]。特に進行癌における現行の放射線治療や全身化学療法は特定の遺伝子変異を有するものを除き[3]、その治療効果は限定的であり、新たな治療法の開発が望まれている。

インターフェロン(IFN)は宿主免疫を活性化し、抗ウイルス効果、抗腫瘍効果、免疫調節効果を示すサイトカインであり、大きく I 型(IFN- α 、 β 等)、II 型(IFN- γ)、III 型(IFN- λ)、IL-10 ファミリー(IL-10、-20、-22 等)に分類される(図 1)。

インターフェロン α (以下、IFN- α)を代表とする I 型インターフェロンは、既に腎細胞癌やメラノーマといった固形癌における免疫療法や分子標的薬との組み合わせの治療法として実臨床で使用されている[4, 5]。しかし、肺癌に対するインターフェロン療法は、臨床試験の段階で有意な治療効果や生命予後の改善を証明できず[6-8]、副作用等の問題も指摘され[6]、ほとんど行われていないのが現状である。

インターフェロン λ 2(IL-28A) (以下、IFN- λ 2)は、2002 年に報告された III 型インターフェロンの一つである[9]。その特徴として、I 型インターフェロンと同等の生物学的効果を有する一方、臓器によってレセプター分布に偏りがあることが挙げられ[10]、治療対象に対し選択的に働き、他臓器への副作用の少ない治療薬として期待が持たれている。実臨床では一部の C 型肝炎に対する治療報告があるが[11]、他疾患を含めた治療適応の拡大は進んでおらず、未だ発展途上の状態である。しかし、前臨床段階における IFN- λ 2 の抗腫瘍効果は幾つかの癌種(メラノーマ、食道癌、神経内分泌腫瘍、等)で既に報告されており[12-16]、

特にメラノーマに関しては、既に本学の研究で、IFN- λ 2 発現の遺伝子導入を行ったマウスモデルにおいて、B16 メラノーマ移植細胞株に対する IFN- λ 2 の抗腫瘍効果を実証している[12]。

以上のような背景から、本研究では IFN- λ 2 のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果を検証し、将来的な実臨床への応用可能性について検討した。

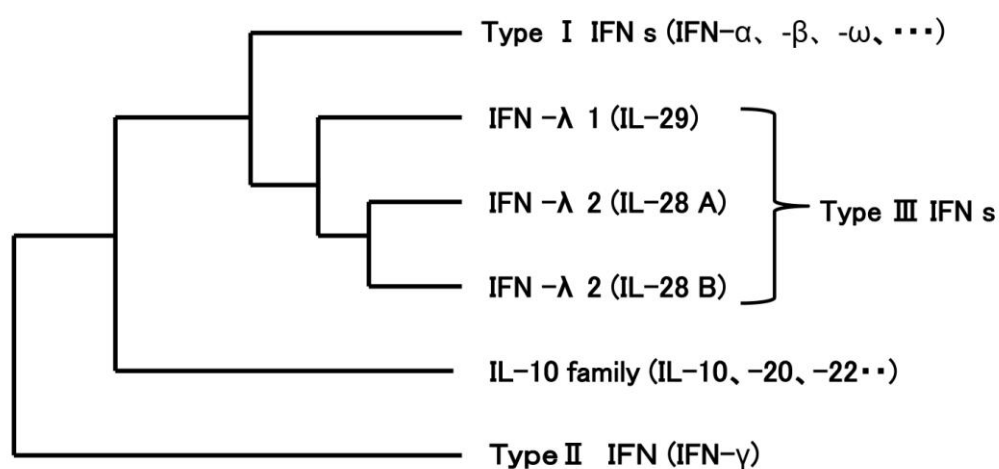


図1 インターフェロンの分類

研究の材料・方法

細胞、実験動物

ヒト肺癌細胞株 (HCC827, NCI-H1975, NCI-H1650, NCI-H460, NCI-H441, NCI-H23) は RPMI1640 (Invitrogen)、10% FCS、supplements [17]を、ヒト肺癌細胞株 A549 と、ヒトメラノーマ細胞株 (MM-LH, RPM-MC, SK-MEL-2, SK-MEL-28, Mewo, Colo679, MM-RU) は DMEM (Invitrogen)、10% FCS、supplements を培地に用い、37°C、5% CO₂、湿度 95%の条件下で培養した。

実験動物には 8-12 週齢の NOD.C.B-17-Prkdc^{scid}/J (NOD/SCID) マウス (チャールズブリバー社) を用いた。全ての動物実験は自治医科大学動物実験指針に基づいて行った。

RT-PCR による各種腫瘍細胞株における IFN-λ レセプター発現の確認

各種細胞株から Total RNA を RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN)で抽出した。Total RNA (3μg)から SuperScript III[™] reverse transcriptase (Invitrogen)を用い first strand cDNA を合成し、PCR は Ex Taq[®] (TaKara) を用いて行った。PCR 反応は下記のプライマーを使用し、95°C2 分、55°C45 秒、72°C1.5 分を 1 サイクル後、95°C 30 秒、57°C30 秒、72°C1 分を 34 サイクル行った。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動で解析した。

Primer

IL-10R2 sense, 5'-TAT TGG ACC CCC TGG AAT-3'

IL-10R2 anti-sense, 5'-GTA AAC GCA CCA CAG CAA-3'

IL-28R1 sense, 5'-ACC TAT TTT GTG GCC TAT CAG AGC T-3'

IL-28R1 anti-sense, 5'-CGG CTC CAC TTC AAA AAG GTA AT-3'

GAPDH sense: 5'-GTA TCG TGG AAG GAC TCA TG-3'

GAPDH anti-sense: 5'-AGT GGG TGT CGC GCT GTT GAA G-3'

*GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株の作成

ルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株（以下 luc-A549, luc-HCC827, luc-NCI-H1975）の作成は以下の手順で行った。

- ① pGL3 basic (Promega)に由来する 蛍光素 (Photinus pyralis) ルシフェラーゼ cDNA を pMSCVpuro retroviral vector (Clonotech) に挿入し、p-MSCV-luciferase を作成。
- ② これを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて GP2-293 packaging cells (Clonotech) に pVSV-G (Clonotech) とともにトランスフェクションする。
- ③ ウイルス上清と、8μg/ml polybrene (Sigma-Aldrich) を、約 50% confluent のヒト肺癌細胞株へ添加し培養。
- ④ 15μg/ml puromycin を含む培地で、ルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株のみを選択的に継代維持。

In vitro bioluminescent アッセイ、Caspase 3/7 アッセイ

luc-A549, luc-HCC827, luc-NCI-H1975（各 1×10^4 cells/well）を 96-well plate に seeding し、12 時間後に 100ng/ml の recombinant human IFN-λ2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ)を加える。IFN-λ2 添加 24 時間後、48 時間後、各々の培地に 150μg/ml の D-luciferin を添加し、Appliskan® multimode microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA)で細胞発光量を測定し、細胞増殖能を定量化した。

同様に、IFN- λ 2 添加後の caspase3/7 活性を、Caspase-Glo 3/7 Assay System (Promega)を用いて測定し、アポトーシス誘導能を定量化した。いずれの測定結果も 3well の平均値で解析を行った。また同じ実験系で、IFN- λ 2 に対する抗体である anti-IFN- λ 2 antibodies (R&D Systems, Mineapolis, MN)と、コントロール抗体として rat IgG2a (BD Pharmigen, San Diego, CA)を添加し IFN- λ 2 のアポトーシス誘導能が抑制されるか否かを検討した

ウエスタンブロッティング

ヒト肺癌細胞株およびヒトメラノーマ細胞株を RIPA buffer に溶解した後に遠心し[17]、上清を回収した。上清サンプル(10 μ g のタンパク)を sample buffer で処理した後、SDS-PAGE 電気泳動を行った。ニトロセルロース膜にゲル内タンパクを転写させ、TBS-T 液(Tris-buffered saline, Tween-20)でブロッキング後、一次抗体の Anti-STAT1、Anti-phospho STAT1 (両者とも Cell signaling Technology, Beverly,MA)を 16 時間作用させた。二次抗体は、protein G-conjugated HRP(Cell signaling Technonogy) を用いた。

コロニーフォーメーションアッセイ

pcDNA3.1 ベクターにマウス IFN- λ 2 を挿入した、pcDNA3.1-mIFN- λ 2 を作成する。次にルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株(5×10^5 個)に、Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、pcDNA3.1-mIFN- λ 2 もしくは、pcDNA3.1(Mock)を、各 5 μ g トランスフェクションし、2 日間培養を行った。G418 geneticine (GIBCO, 800 μ g/ml)で 14 日間 selection を行い、3mm 以上の G418 耐性コロニーをメチレンブルーで染色後、コロニー数をカウントした。

胸腔内腫瘍移植と in vivo bioluminescence imaging

イソフルレンで麻酔した NOD/SCID マウスの右胸腔内に、0.2 ml PBS に懸濁したルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株(1×10^6 個) をエコーガイド下(Vevo770 high resolutionUS system)に注射した (図 2)。

移植終了直後と、それ以降 1 週間の間隔を空け計 4 回(1 ヶ月間)、イソフルレンで麻酔した担癌マウスに、2mg の D-luciferin (Biosynth)を腹腔内投与し、非侵襲的バイオイメージングシステム IVISTM (Xenogen) を用いて、速やかに腫瘍細胞株由来のルシフェラーゼ活性(発光)を検出し定量化した。

本システムは、基質となる D-luciferin を投与するのみで、非侵襲的にマウス生体内の腫瘍動態を経時的に複数回計測可能という特徴があり、これまで本学の生体内腫瘍動態イメージング(In vivo luminescence imaging)の研究で成果を挙げてきた手法の一つである[12, 18]。

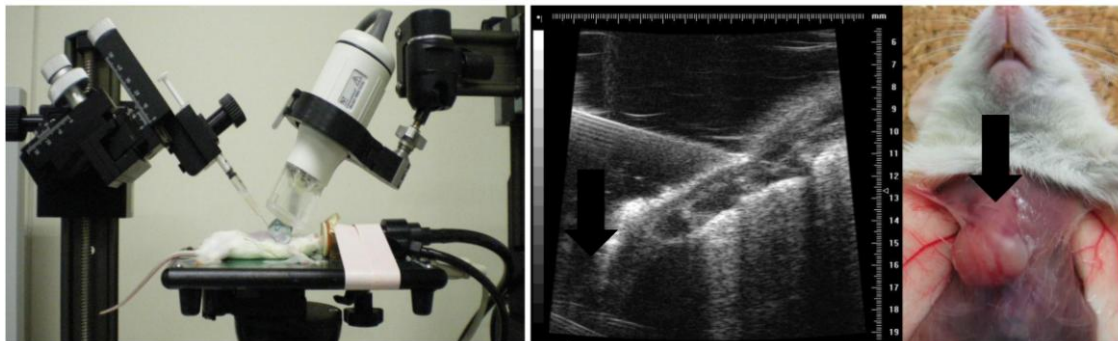


図 2 ヒト肺癌細胞株の胸腔内播種モデル作成

エコーガイド下胸腔内腫瘍細胞株注射(左写真)と、処置中のエコー画像(中央写真)。

ヒト肺癌細胞株(NCI-H1975)胸腔内移植後 1 カ月の胸腔内腫瘍巣(右写真矢印)。

統計学的解析

統計学的処置は解析ソフト Stat Mate (ATMS) を使い、P 値は Student's t-test で検定し、0.05 未満で 2 群間に有意差があると判断した。

研究結果

ヒト肺癌細胞株の IFN- λ レセプター発現

RT-PCR 法を用いて、ヒト肺癌細胞株における IFN- λ レセプターの発現を調べた。IFN- λ レセプターは、IL28-R1(IFN- λ R1) と IL-10R2 の 2 量体で構成されるが[19](図 3 C は文献 20 より引用)、今回調べた全 7 種類のヒト肺癌細胞株に、両レセプターの発現を確認した(図 3A)。対照的にヒトメラノーマ細胞株では、IL-10R2 レセプターが全細胞株に発現する一方、IL-28R1 レセプターの発現は 7 株中 2 株にとどまった (図 3B)。この結果は、肺癌が IFN- λ 2 の潜在的な治療標的になり得る可能性を示唆した。

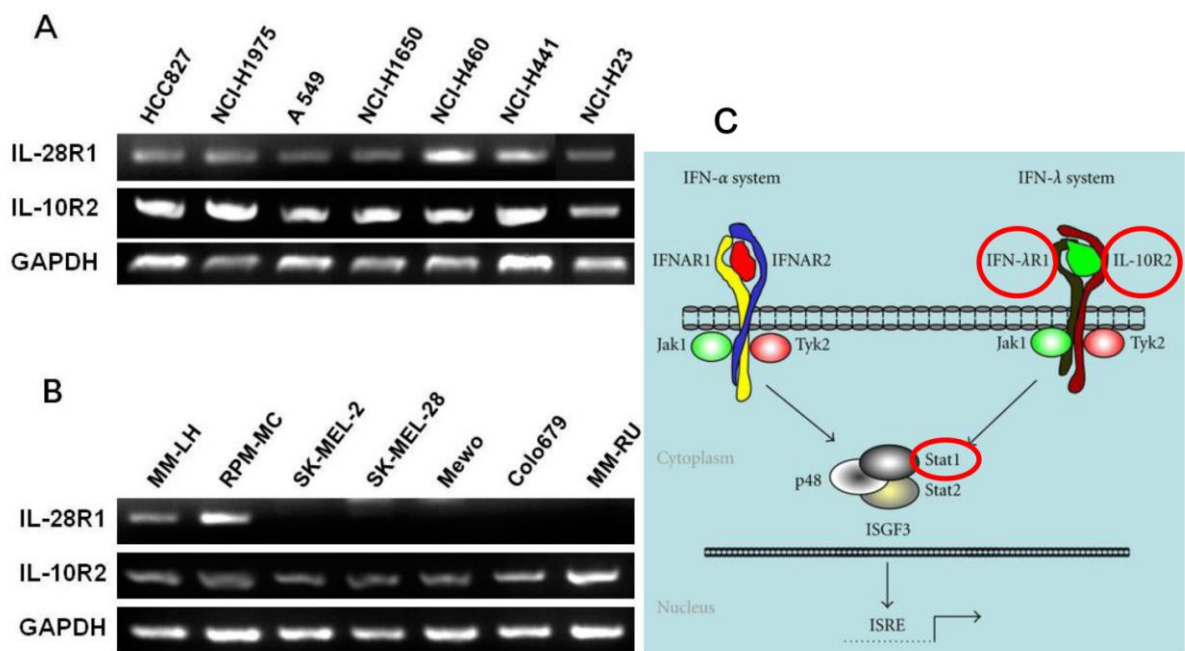


図 3 ヒト肺癌細胞株とヒトメラノーマ細胞株の IFN- λ レセプター発現

IL-28R1(IFN- λ R1)と IL-10R2 の 2 量体で構成される IFN- λ レセプター(C)の mRNA の発現を RT-PCR で評価した。(A)ヒト肺癌細胞株(HCC827、NCI-H1975、A549、NCI-H1650、

NCI-H460、NCI-H441、NCI-H23) は、全細胞株に IL-28R1、IL-10R2 レセプターが共に発現。(B)ヒトメラノーマ細胞株 (MM-LH、RPM-MC、SK-MEL-2、SK-MEL-28、Mewo、Colo679、MM-RU)は、全細胞株に IL-10R2 レセプターが発現するも、IL-28R1 レセプターは2細胞株(MM-LH、RPM-MC)のみに発現。

IFN- λ のヒト肺癌細胞株に対する増殖抑制効果

これまでマウスのメラノーマ細胞株等で、IFN- λ 2 の抗腫瘍効果が実証されているが[12]、ヒト肺癌細胞株で同様の効果はまだ実証されていない。そこで、24well plate で培養したヒト肺癌細胞株(5×10^5 個)に対し、recombinant ヒト IFN- λ 2(100ng/ml)を添加し、一定時間経過後(24 時間後、48 時間後)に生存細胞数をカウントした。そして 5well の平均値から IFN- λ 2 を添加していないコントロール群との生存細胞数の比較を行い、IFN- λ 2 のヒト肺癌細胞株に対する増殖抑制効果を評価した。その結果、EGFR 単一変異(エクソン 19、E746-A750 欠失)を有する HCC827(図 4A)、NCI-H1650(図 4C)の 2 つの細胞株において、IFN- λ 2 添加後 48 時間で有意な増殖能低下を認めた。対照的に、K-RAS 変異を有する A549(図 4B)、NCI-H441 (図 4D)、および NCI-H23、NCI-H460(データ割愛)は、IFN- λ 2 に対する感受性を認めなかった。また、EGFR 二重変異(L858R および T790M)を有する NCI-H1975 は有意差はないが若干の増殖抑制効果を認めた(データ割愛)。

一方、ヒトメラノーマ細胞株において同様の実験を行ったところ、IL-28R1 レセプター陽性の MM-LH(図 4E)で増殖抑制効果を認めたが、IL-28R1 レセプター陰性の SK-MEL-28(図 4F)では有意な変化を認めなかった。

以上より、IFN- λ 2 のヒトメラノーマ細胞株に対する増殖抑制効果は IL-28R1 レセプター依存的な反応である一方、ヒト肺癌細胞株では、IL-28R1 レセプタ

一に依存しない感受性の違いが存在することが推測され、その要因の一つとして EGFR 変異や、K-RAS 変異等の遺伝的背景の相違が挙げられた。

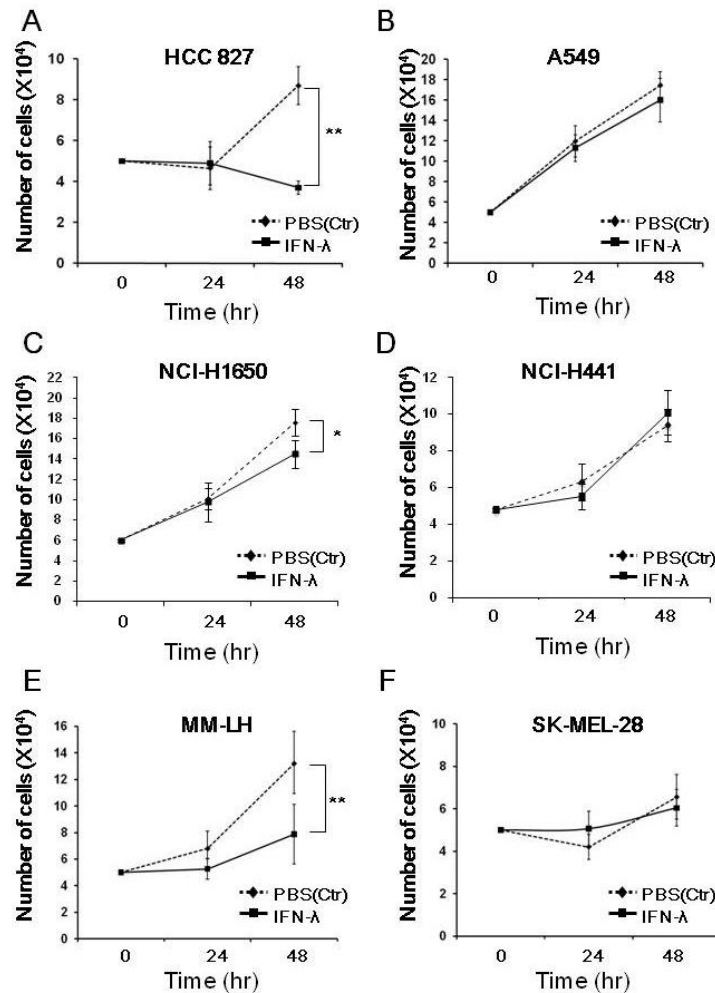


図 4 IFN-λ2 のヒト肺癌細胞株とヒトメラノーマ細胞株に対する増殖抑制効果

Recombinant ヒト IFN-λ2(100ng/ml)を添加した細胞(実線四角)と、コントロール細胞(点線三角)に対し、24 時間、48 時間後に dye exclusion test を行い、細胞数をカウントした(n=5)。ヒト肺癌細胞株(上段・中段)において IFN-λ2 による増殖抑制効果は EGFR 変異を有するヒト肺癌細胞株(A、C)で高く、K-RAS 変異を有するヒト肺癌細胞株(B、D)で低い傾向を認めた。また、ヒトメラノーマ細胞(最下段)では、IL-28R1 レセプターが発現している MM-LH 細胞株(E)で増殖抑制効果が高く、IL-28R1 レセプターが発現していない SK-MEL-28 細胞株(F)で低かった。*P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t-test)

ヒト癌細胞株における IFN- λ 2 を介した STAT1 の活性化

IFN- λ 2 の抗腫瘍効果は、主に JAK/STAT 経路のシグナル伝達を介して行われている[19-21]。IFN- λ レセプターに入った刺激は、STAT1(Tyrosine 701)のリン酸化につながり、STAT1、STAT2、IRF9 から構成される ISGF3 と呼ばれる三量体を形成して核内に移行した後、ISRE (IFN-Stimulated Response Element) と呼ばれる細胞増殖を抑制する機能を有した遺伝子の転写活性が起こる[19-21]。(図 3C) そこで、IFN- λ 2 のヒト癌細胞株に対する増殖抑制効果が、実際に JAK/STAT 経路の活性化の結果として引き起こされていることを証明する目的に、ヒト肺癌細胞株とヒトメラノーマ細胞株に IFN- λ 2(100ng/ml)を添加し、一定時間後(15 分、30 分、1 時間、2 時間)に、STAT1 のリン酸化の有無をウェスタンブロット法で解析した。

その結果、ヒトメラノーマ細胞株では、IL-28R2 レセプター陽性かつ、増殖抑制効果を認めた MM-LH で STAT1 のリン酸化を認め(図 5C)、IL-28R2 レセプター陰性で、増殖抑制効果も認めない SK-MEL-28 で STAT1 のリン酸化を認めなかった (図 5D)。

一方、興味深いことに、ヒト肺癌細胞株では、IFN- λ 2 による増殖抑制効果が異なる、HCC827(EGFR 変異ヒト肺癌細胞株)と、A549(K-RAS 変異ヒト肺癌細胞株)において、STAT1 のリン酸化が同程度に観察され (図 5A、B)、IFN- λ 2 に対し感受性の低いヒト肺癌細胞株でも IFN- λ レセプターを介した JAK/STAT 経路のシグナル伝達は通常通り行われている可能性が示唆された。この結果は、IFN- λ レセプターから JAK/STAT 経路に通常のシグナルが入っても、その更に下流で何らかの要因が働き、本来起こるはずの抗腫瘍効果が打ち消されている可能性を示し、IFN- λ 2 に対する感受性の違いはそこから生じていると推測された。

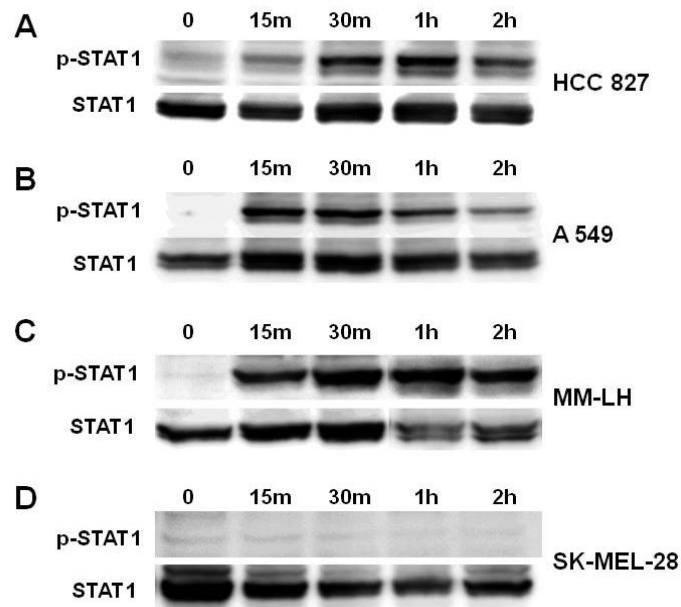


図 5 ヒト肺癌細胞株、ヒトメラノーマ細胞株の IFN- λ 2 を介した STAT1 活性化
 ヒト肺癌細胞株、ヒトメラノーマ細胞株に IFN- λ 2(100ng/ml)を添加した後、15 分、30 分、1 時間、2 時間後の STAT1 のリン酸化(p-STAT1)をウエスタンブロット法を用い評価した。ヒトメラノーマ細胞株では、IFN- λ 2 の細胞増殖抑制効果が高い MM-LH (C) で、STAT1 のリン酸化を認める一方、IFN- λ 2 に対する感受性の低い SK-MEL-28 (D) ではリン酸化を認めなかった。ヒト肺癌細胞株は、IFN- λ 2 に対する感受性の有無に関わらず、STAT1 のリン酸化を認めた(A、B)。

IFN- λ 2 によるヒト肺癌細胞株に対するアポトーシス誘導

ルシフェラーゼ発現細胞は基質である D-ルシフェリンと反応すると、発光する特性を有し、その発光量は生きた細胞の数と高い相関関係を有する[22]。この原理を利用し、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト肺癌細胞株に IFN- λ 2 を添加した後、その発光量を定量化する実験を行った。また、IFN- λ 2 の添加に

よりアポトーシスが誘導され癌細胞の増殖が抑制されることを証明する目的に、Caspase 3/7 アッセイを行った。

IFN- λ 2 に対する感受性が高いと予測された、EGFR 変異(エクソン 19、E746-A750 欠失)を有する HCC827 と EGFR 二重変異(L858R および T790M)の NCI-H1975 各細胞株は、IFN- λ 2 の添加後、48 時間で有意な発光量の減少と、Caspase 3/7 活性が増加し、アポトーシスが誘導され細胞増殖が抑制されていることが証明された (図 6 上・中段)。また、IFN- λ 2 に対する感受性が低いと予測された、K-RAS 変異(G12S)を有する A549 細胞株では、IFN- λ 2 添加後も発光量の有意な減少や Caspase 3/7 活性の増加を認めなかった (図 6 下段)。

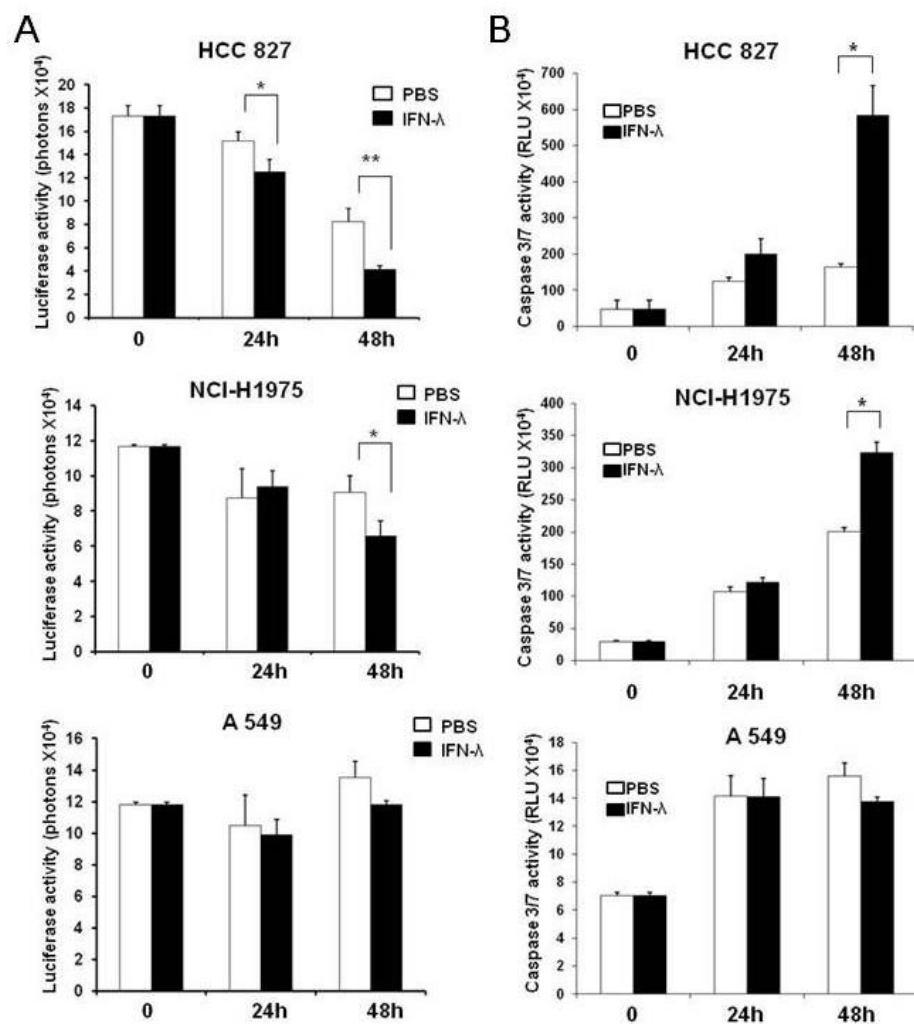


図 6 ヒト肺癌細胞株における IFN- λ 2 の増殖抑制とアポトーシス誘導

(A) ルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株(luc-HCC827、luc-NCI-H1975、luc-A549) (n=3) を 96well plate で培養し、100ng/ml の IFN- λ 2 を添加後、24 時間、48 時間後の生存細胞の発光量を定量化し(黒棒)、コントロール(白棒)と比較した。 luc-HCC827 > luc-NCI-H1975 > luc-A549 の順に高い増殖抑制効果を認めた。*P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t-test)

(B) ヒト肺癌細胞株(HCC827、NCI-H1975、A549) (n=3)を 96well plate で培養し、100ng/ml の IFN- λ 2 を添加後、24 時間、48 時間後の Caspase 3/7 活性を計測、アポトーシス誘導を定量化し(黒棒)、コントロール(白棒)と比較した。(A)の結果同様、HCC827 > NCI-H1975 > A549 の順に高いアポトーシス誘導を認めた。*P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t-test)

遺伝的背景の異なるヒト肺癌細胞株に対する IFN- λ 2 によるアポトーシス誘導能の比較と、抗 IFN- λ 抗体添加による中和実験

これまでの結果から、同じヒト肺癌細胞株であっても、遺伝的背景等によって IFN- λ 2 に対する感受性が異なる可能性が考えられた。その仮説を実証すべく、EGFR 変異を有するヒト肺癌細胞株を 3 種類 (HCC827、NCI-H1975、NCI-H1650)、K-RAS 変異を有するヒト肺癌細胞株を 4 種類 (A549、NCI-H23、NCI-H441、NCI-H460)培養し、IFN- λ 2 添加 48 時間後の Caspase 3/7 活性を計測し、コントロール(IFN- λ 2 無添加細胞株)との相対値でアポトーシス誘導能の比較を行った。その結果、全体的傾向として EGFR 変異を有する細胞株の方が、K-RAS 変異を有する細胞株より IFN- λ 2 を介したアポトーシス誘導能が高いことが証明された。(図 7A)

また、同実験で最も IFN- λ 2 によるアポトーシス誘導能の高かった HCC827 細胞株において、IFN- λ 2 添加後、更に抗 IFN- λ 抗体で中和し、Caspase 3/7 活性

が変化するか否かの実験も行った。これは予測通り、中和抗体を添加することでアポトーシス誘導能(Caspase 3/7 活性)が低下し、IFN- λ 2 が HCC827 細胞株に対し直接的にアポトーシスを誘導していることが証明された。(図 7B)

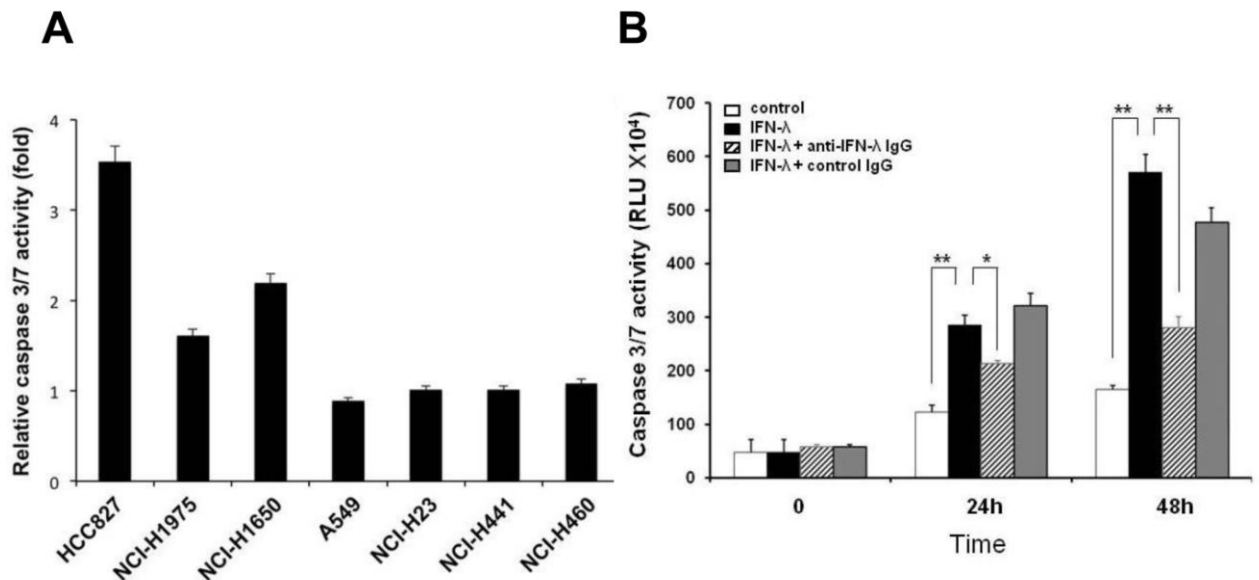


図 7 ヒト肺癌細胞株の違いによる IFN- λ 2 を介したアポトーシス誘導能の比較 (A)と、抗 IFN- λ 抗体を添加した中和実験(B)

(A)コントロール群を 1 とした場合の、IFN- λ 2(100ng/ml)添加 48 時間後の各ヒト肺癌細胞株(n=3)の Caspase 3/7 活性を相対値で比較した。EGFR 変異ヒト肺癌株である、HCC827、H1650 (共に exon19, E746-A750 欠失)、NCI-H1975 (L858R と T790M)で Caspase 3/7 活性が高く、K-RAS 変異ヒト肺癌細胞株の、A549 (G12S)、NCI-H23 (G12C)、NCI-H441 (G12V)、NCI-H460 (Q61H)で Caspase 3/7 活性が低い傾向を認めた。

(B) HCC827 細胞株(n=3)において、コントロール群(白棒)、IFN- λ 2 添加群(黒棒)、IFN- λ 2 と抗 IFN- λ IgG 抗体添加群(縞模様棒)、IFN- λ 2 とコントロール IgG 抗体添加群(灰色棒)の 24 時間、48 時間後の Caspase 3/7 活性を測定した。24 時間、48 時間後ともに、IFN- λ 2 添加群の Caspase 3/7 活性が、コントロール群および IFN- λ 2 と抗 IFN- λ IgG 抗体添加群に対し、有意差をもって高いことが証明された。*P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t-test)

マウス実験(in vivo) における IFN- λ 2 の抗腫瘍効果

本学の研究で、IFN- λ 2 の cDNA を遺伝子導入した腫瘍細胞株を用いた、マウスの腫瘍細胞移植モデルが報告されている[12]。その手法に基づき、前述した in vitro の研究結果で最も IFN- λ 2 による抗腫瘍効果が高いと推測された HCC827 ヒト肺癌細胞株を用い、マウス生体内で外来性の IFN- λ 2 暴露による腫瘍増殖能の変化を観察した。まず、luc-HCC827 細胞株に、一過性に IFN- λ 2 を発現させる cDNA を遺伝子導入し、in vitro でコロニー形成抑制能を確認した。(図 8)

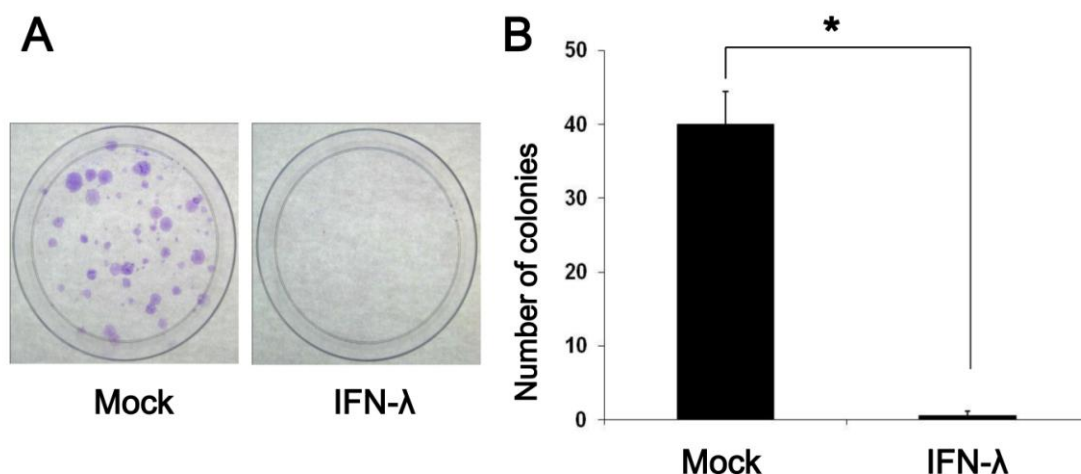


図 8 IFN- λ 2 遺伝子導入によるコロニー形成抑制

(A)Mock の luc-HCC827 細胞株 (左側)と、IFN- λ 2 の cDNA 遺伝子導入を行った luc-HCC827 細胞株 (右側)の、遺伝子導入 14 日後の肉眼的コロニー形成能の比較と、(B)各細胞株(n=3)における直径 3mm 以上のコロニー数の比較。IFN- λ 2 の c-DNA 遺伝子導入を行った細胞株で有意なコロニー形成能の低下を認める。(* $P < 0.01$ Student's t-test)

次に、同細胞株を NOD/SCID マウスの右胸腔内に移植した直後 (day0)と、それ以降は 7 日間おきに計 1 ヶ月間、マウス体内の腫瘍細胞株由来の発光を Luciferase based luminescence imaging 法[12, 18, 22]で計測し、非侵襲的かつ連続的に生体内での腫瘍増殖能を定量化した。

その結果、移植 7 日後、IFN- λ 2 発現 cDNA を遺伝子導入した、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞株を移植したマウスにおいて有意な発光量の減少を認めた(図 9)。また 28 日間の観察期間中、IFN- λ 2 発現腫瘍細胞株を移植したマウスと、mock の腫瘍細胞株を移植したマウスで、有意な体重差を認めず(図 10)、IFN- λ 2 が、副作用が少なく、抗腫瘍効果を発揮していた可能性が示唆された。

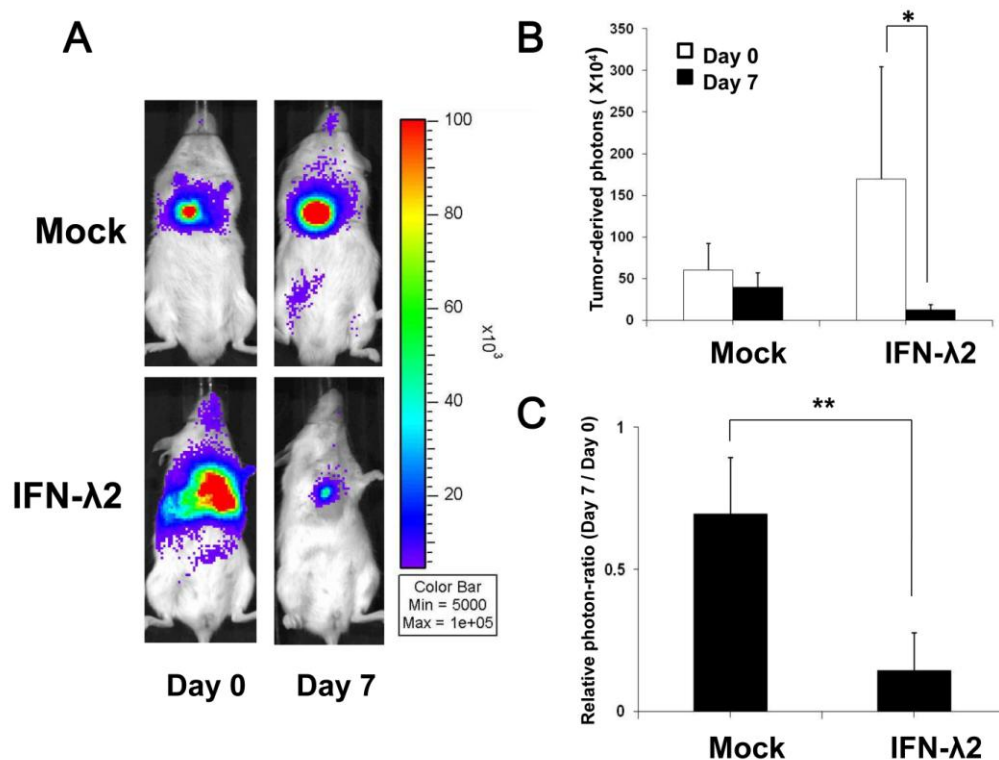


図 9 マウスにおける IFN- λ 2 の抗腫瘍効果 (In vivo luminescence imaging)

(A)Mock の luc-HCC827 細胞株(上段、n=3)と、一過性に IFN- λ 2 を発現する遺伝子導入を行った、luc-HCC827 細胞株(下段、n=3)を、マウスの右胸腔内に移植した直後(day0)と、1 週間経過後 (day7)の腫瘍細胞株由来の発光量の比較。(B)IFN- λ 2 発現の遺伝子導入を行った、luc-HCC827 細胞株を移植したマウスにおいて、移植後 1 週間で有意な腫瘍細胞株由来の発光量減少を認めた。(C)移植直後(day0)と、移植後 7 日目(day7)の腫瘍細胞株由来の発光量の比 (day7/day0)でも、IFN- λ 2 の遺伝子導入を行った、luc-HCC827 細胞株を移植したマウスで発光量減少が著明だった。 (*P<0.05; **P<0.01 Student's t-test)

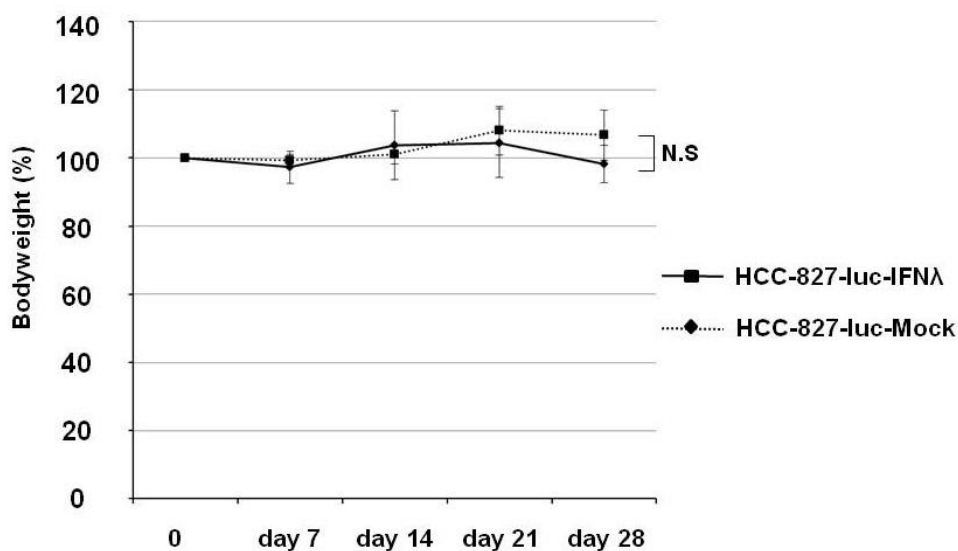


図 10 ヒト肺癌細胞株(luc-HCC827)移植マウスの体重変化

IFN- λ 2 を一過性に発現する luc-HCC827 細胞株(HCC827-luc-IFN- λ 2)と、ベクターのみの遺伝子導入を行った mock の luc-HCC827 細胞株(HCC827-luc-Mock)を移植後、28 日間のマウスの体重推移。観察期間中の両群(n=3)に有意な体重差を認めず、IFN- λ 2 の一過性発現がマウスに与える副作用は軽微と推測された。

考察

近年の肺癌治療は、PET(Positron emission tomography)検査のような非侵襲的全身検索による病期分類や[23]、組織化学や免疫組織化学に基づく病理学的分類に加え[24]、遺伝子工学や、分子生物学的観点から解析を行うことで、以前は同一分類とされていた癌を更に細分化し[3]、その特徴に応じ奏効率の高い治療法を選択する個別化医療の時代へ向かっている。本研究では、IFN- λ 2と言うインターフェロンファミリーでは最も新しいサイトカインが、今後、肺癌治療の選択肢の一つになり得るかの検証と、肺癌の中でも特にどのようなサブグループで治療効果を発揮するかを考察した。

IFN- λ はⅢ型インターフェロンとも呼ばれ、本研究に用いた IFN- λ 2(IL-28a)の他に、IFN- λ 1(IL-29)、IFN- λ 3(IL-28b)の計 3 種類のサブタイプが報告されている[9, 20]。インターフェロン λ 2 が結合するレセプターは、インターフェロン λ 固有のレセプターである IL-28R1 と、他の IL-10 スーパーファミリーと共通レセプターである IL-10R2 の 2 量体から構成される[10]。IL-10R2 レセプターが大半の細胞に発現しているのに対し、IL-28R1 レセプターは限られた臓器の正常細胞や、ヒト癌細胞の一部にのみ発現していると言われるが[9, 25]、本研究で使用了全ての肺癌細胞株において、両レセプターの発現を認めた(図 1)。この結果は肺癌が IFN- λ 2 の潜在的な治療標的になり得る可能性を示唆するものである。しかし、各細胞株のレセプター発現の量的比較は行っておらず、特異的な発現形式をとる IL-28R1 レセプターの発現量が、細胞株によって異なる可能性は否定できない。文献上では健常組織でのレセプター分布の違いを調べた研究はあるものの[26]、肺癌に限定した研究は少なく、後述するような IFN- λ 2

に対する感受性の違いを生み出す要因として、今後検討すべき課題の一つと思われる。

本研究で用いた 7 種類のヒト肺癌細胞株のうち、EGFR 遺伝子変異を有する 3 種の細胞株で IFN- λ 2 を添加することにより、細胞増殖能の低下や(図 4、6)、アポトーシス誘導能が高くなる(図 6、7)現象が観察され、その中でも一番、IFN- λ 2 に対する感受性が高かった、EGFR 単一遺伝子変異を有する、HCC827 細胞株(エクソン 19, E746-A750 欠失)では、IFN- λ 2 添加 48 時間後の顕微鏡所見上、細胞の形態が明らかに変化し(図 11 上段)、「細胞死」を意味する核の断片化を認める細胞が増加した(図 11 下段)。

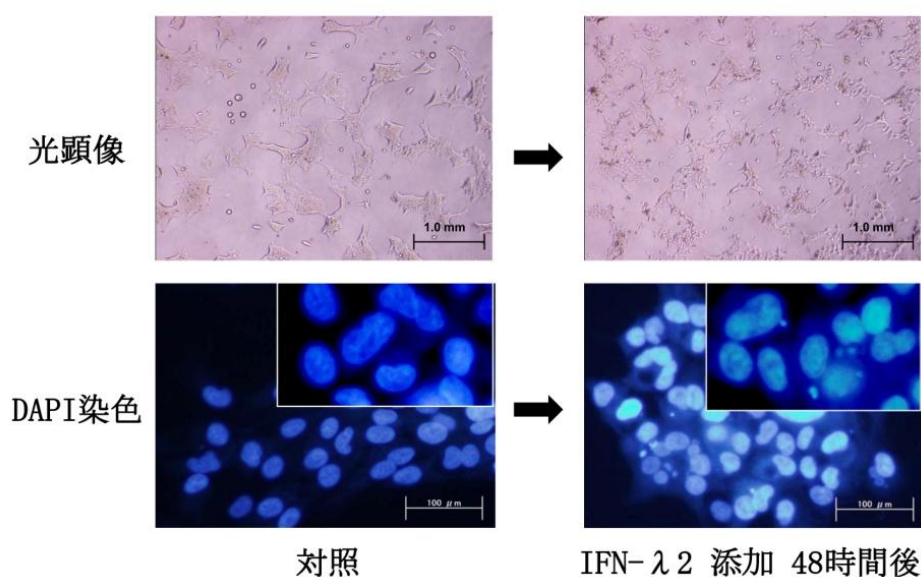


図 11 IFN- λ 2 添加後のヒト肺癌細胞株の形態学的変化

HCC827 細胞株に、IFN- λ 2(100ng/ml)を添加後 48 時間の細胞形態(上段)と、DAPI 染色を行った同細胞核(下段)の観察。上段の光顕像では、IFN- λ 2 を添加することにより個々の細胞質が縮小、凝集している(上段右)。また、DAPI 染色でも細胞核の断片化を認める細胞が増えている(下段右、拡大像)。

以上の実験結果を踏まえ、*in vivo* で同様の抗腫瘍効果が得られるかを確認する目的に、一過性に IFN- λ 2 を発現させる cDNA を luc-HCC827 細胞株に遺伝子導入し、その細胞株を胸腔内に移植するマウスモデルを作成した。そして、Luciferase based luminescence imaging 法を用い、生体内での腫瘍細胞株の増殖を系時的に定量化することで、IFN- λ 2 の抗腫瘍効果を実証することに成功した(図 9)。

多くの抗癌剤に言えることではあるが、根本的問題の一つとして、同じ肺癌であっても、組織型や遺伝的背景により治療効果に違いがある点や、抗癌剤の長期投与等によって耐性を獲得している可能性が残る。肺癌の発生は喫煙の有無により、その分子生物学的特性が異なり、具体的な遺伝背景として EGFR 変異は非喫煙者に、K-RAS 変異は喫煙者と関連が強いと言われている[27]。且つ、肺の腺癌において、EGFR 変異と K-RAS 変異は同時に発現することはなく、お互いが排他的関係である[28]。本研究ではこの両遺伝子に着目し、遺伝的背景による IFN- λ 2 に対する感受性の違いを検証した。興味深いことに、単一 EGFR 変異(エクソン 19 欠失)を有する肺癌細胞株は IFN- λ 2 に高い感受性を認めるのに対し、K-RAS 変異を有する細胞株ではほとんど効果を認めなかった。EGFR 変異細胞株、K-RAS 変異細胞株ともに IFN- λ レセプターが発現し、JAK/STAT 経路を介したシグナル伝達の活性化を示す STAT1 のリン酸化も同程度であったにも関わらず(図 5)、K-RAS 変異細胞株に対する IFN- λ 2 の感受性が低かった原因として、K-RAS 変異がインターフェロン/STAT1 経路の活性化による抗腫瘍効果に対し抵抗性であることや[29]、肺癌予後不良因子として知られる ERK の活性化が EGFR 変異株より強いため[30]、IFN- λ 2 の抗腫瘍効果が相殺されてしまっている可能性が考えられた。

上述の実験結果から IFN- λ 2 に対する感受性が高いと推測された EGFR 遺伝子変異肺癌に対しては、既に分子標的薬の一つである EGFR-TKI(Tyrosine Kinase Inhibitor)が開発されており、初めての臨床報告から約 10 年が経過し[31]、その優れた治療効果から、現在では広く臨床現場で使用されている。同薬剤の特徴として、アジア人、女性、非喫煙者といった要素を満たす EGFR 遺伝子変異肺癌患者の治療奏効率が高い一方[32]、多くのケースで治療経過中、EGFR-TKI に抵抗性の肺癌細胞が出現し、徐々に治療効果が低下していく「薬剤耐性」という現象が問題となっている。その耐性獲得の要因の一つが、治療経過中に起こる T790M という二次的獲得遺伝子変異の出現であると言われている[33]。そこで EGFR-TKI に抵抗性の、二重 EGFR 変異ヒト肺癌細胞株である NCI-H1975 (L858R と T790 の変異)に対しても同様の実験を行った。その結果、単一 EGFR 変異ヒト肺癌細胞株と比較し抗腫瘍効果はやや劣るものの、IFN- λ 2 に対する感受性を有することが確認された(図 6 および図 7A)。以上より、IFN- λ 2 は、特に単一 EGFR 変異を有する肺癌や、EGFR-TKI に抵抗性の肺癌に対し、単独治療もしくは、他抗癌剤との組み合わせ等により治療効果を高める可能性が考えられた。

近年、IFN- α は、腎細胞癌やメラノーマ等の治療に用いられているが[4, 5]、治療効果を得るための適正使用量とその毒性の関係がしばしば問題となり、高用量の IFN- α を用いると、骨髄抑制、発熱、うつ、全身倦怠感といった副作用が出現することが知られている[34]。これは、IFN- α の受容体が癌細胞のみならず、人体の健常組織にも均一に分布することに由来すると考えられる。一方、IFN- λ 2 の IL-28R1 レセプターはある特定の癌細胞や健常組織にのみ発現しており[25]、より選択的かつ副作用の少ない治療効果が期待されている。その観点から健常人体組織における IL-28R1 レセプター発現分布を調べた研究で、

正常肺上皮は他臓器と比較し高いレセプター発現を認めている[26]。この結果は、肺癌(異常肺組織)が IFN- λ 2 の治療ターゲットになり得ると同時に、IFN- λ 2 が正常肺組織に対しても有害事象を引き起こす可能性を間接的に示唆するものである。そこで、本研究のマウス実験では、IFN- λ 2 を一過性に発現させる cDNA の遺伝子導入を行った、ルシフェラーゼ発現ヒト肺癌細胞株を胸腔内に移植したマウスと、ベクターのみの遺伝子導入を行った同細胞株を移植したマウスの生存率および、体重変化の比較を行った。その結果、28 日間の経過観察期間中、両群とも 100%の生存率で、体重変化でも有意差を認めなかった(図 10)。

1 カ月の短期予後で、晩期障害については検証不足ではあるが、少なくとも IFN- λ 2 投与により、急性肺障害(ALI: Acute Lung Injury)等の致命的な急性副作用は発症していない可能性が示唆された。本研究のマウスモデルの限界として、マウスに実際の IFN- λ 2 を投与し抗腫瘍効果を確認したものでなく、あくまで短期間の IFN- λ 2 の遺伝子発現による内部暴露実験である点が挙げられる。

IFN- λ 2 の cDNA の発現は、腫瘍移植後約 1 週間程度と推測され[12]、実際に IFN- λ 2 を一定期間投与した場合に、副作用の発現も含め同様の結果が得られるかどうかは今後の課題として残る。しかし、今後の実臨床への応用化へ向け更に研究を進める価値がある研究成果と思われた。

結論

IFN- λ 2 のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果は遺伝的背景により異なり、特に EGFR 単一遺伝子変異を有する肺癌において、EGFR-TKI 等との組み合わせによる相乗効果や、薬剤耐性獲得後の肺癌に対する補助的使用として、将来的に新たな治療薬の一つになり得る可能性が示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、基礎から実験の手技、方法論、そして論文の執筆まで懇切丁寧に御指導をいただいた、旧バイオイメーシング研究部 村上 孝准教授（現 高崎健康福祉大学薬学部 教授）および、研究の機会を与えて下さった、呼吸器外科部門 遠藤俊輔教授、実験に御協力いただいた研究員・医局の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2006: based on data from 15 population-based cancer registries in the monitoring of cancer incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 2012;42: 139-147.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61: 69-90.
3. El-Telbany A, Ma PC. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? *Genes Cancer* 2012;3: 467-480.
4. Hutson TE. Targeted therapies for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: clinical evidence. *Oncologist* 2011;16 Suppl 2: 14-22.
5. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 2011;16: 5-24.
6. Rossi A, Garassino MC, Cinquini M, Sburlati P, Di Maio M, Farina G, Gridelli C, Torri V. Maintenance or consolidation therapy in small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer* 2010;70: 119-128.
7. Kelly K, Crowley JJ, Bunn PA, Jr., Hazuka MB, Beasley K, Upchurch C, Weiss GR, Hicks WJ, Gandara DR, Rivkin S. Role of recombinant interferon alfa-2a maintenance in patients with limited-stage small-cell lung cancer responding to concurrent chemoradiation: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1995;13: 2924-2930.

8. van Zandwijk N, Groen HJ, Postmus PE, Burghouts JT, ten Velde GP, Ardizzoni A, Smith IE, Baas P, Sahmoud T, Kirkpatrick A, Dalesio O, Giaccone G. Role of recombinant interferon-gamma maintenance in responding patients with small cell lung cancer. A randomised phase III study of the EORTC Lung Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer* 1997;33: 1759-1766.
9. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* 2002;4: 63-68.
10. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2010;30: 555-564.
11. Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, Yoffe B, de la Torre A, Flamm S, Gordon SC, Marotta P, Vierling JM, Lopez-Talavera JC, Byrnes-Blake K, Fontana D, Freeman J, Gray T, Hausman D, Hunder NN, Lawitz E. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010;52: 822-832.
12. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 2006;176: 7686-7694.
13. Li Q, Kawamura K, Ma G, Iwata F, Numasaki M, Suzuki N, Shimada H, Tagawa M. Interferon- λ induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents. *European Journal of Cancer* 2010;46: 180-190.
14. Zitzmann K, Brand S, Baehs S, Göke B, Meinecke J, Spöttl G, Meyer H,

- Auernhammer CJ. Novel interferon- λ s induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;344: 1334-1341.
15. Guenterberg KD, Grignol VP, Raig ET, Zimmerer JM, Chan AN, Blaskovits FM, Young GS, Nuovo GJ, Mundy BL, Lesinski GB, Carson WE. Interleukin-29 Binds to Melanoma Cells Inducing Jak-STAT Signal Transduction and Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 2010;9: 510-520.
 16. Lasfar A, Lewis-Antes A, Smirnov SV, Anantha S, Abushahba W, Tian B, Reuhl K, Dickensheets H, Sheikh F, Donnelly RP, Raveche E, Kotenko SV. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Res* 2006;66: 4468-4477.
 17. Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002;62: 7328-7334.
 18. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaiki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T. Identification and Metastatic Potential of Tumor-Initiating Cells in Malignant Rhabdoid Tumor of the Kidney. *Clinical Cancer Research* 2009;15: 3014-3022.
 19. Lasfar A, Abushahba W, Balan M, Cohen-Solal KA. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* 2011;2011: 349575.
 20. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003;4: 69-77.
 21. Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. Role of

- the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* 2004;279: 32269-32274.
22. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional Modulation Using HDACi Depsipeptide Promotes Immune Cell-Mediated Tumor Destruction of Murine B16 Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 2008;128: 1506-1516.
 23. Chao F, Zhang H. PET/CT in the staging of the non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012: 783739.
 24. Gibbs AR, Thunnissen FB. Histological typing of lung and pleural tumours: third edition. *J Clin Pathol* 2001;54: 498-499.
 25. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* 2008;4: e1000017.
 26. Pulverer JE, Rand U, Lienenklaus S, Kugel D, Zietara N, Kochs G, Naumann R, Weiss S, Staeheli P, Hauser H, Koster M. Temporal and spatial resolution of type I and III interferon responses in vivo. *J Virol* 2010;84: 8626-8638.
 27. de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM. Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol* 2011;2: 367-376.
 28. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 778-790.
 29. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Queralt B, Adrados M, Ortiz R, Cufi S, Hernandez-Yague X, Guardeno R, Baez L, Martin-Castillo B, Perez-Martinez MC,

- Lopez-Bonet E, De Llorens R, Bernado L, Brunet J, Menendez JA. Interferon/STAT1 and neuregulin signaling pathways are exploratory biomarkers of cetuximab (Erbix(R)) efficacy in KRAS wild-type squamous carcinomas: a pathway-based analysis of whole human-genome microarray data from cetuximab-adapted tumor cell-line models. *Int J Oncol* 2011;39: 1455-1479.
30. Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. *Lung Cancer* 2010;70: 94-102.
 31. Pallis AG, Mavroudis D, Androulakis N, Souglakos J, Kouroussis C, Bozionelou V, Vlachonikolis IG, Georgoulas V. ZD1839, a novel, oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. Experience from a single center participating in a compassionate use program. *Lung Cancer* 2003;40: 301-307.
 32. Chang A, Parikh P, Thongprasert S, Tan EH, Perng RP, Ganzon D, Yang CH, Tsao CJ, Watkins C, Botwood N, Thatcher N. Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study. *J Thorac Oncol* 2006;1: 847-855.
 33. Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis* 2011;3: 10-18.
 34. Hutson TE, Figlin RA, Kuhn JG, Motzer RJ. Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: an overview of toxicity and dosing strategies. *Oncologist* 2008;13: 1084-1096.