

氏名	てづか やすひろ 手塚 康裕
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 681 号
学位授与年月日	平成 26年 2月 20日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学位論文名	IFN- λ 2 (IL-28A) のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果の研究
論文審査委員	(委員長)教授 杉山 幸比古 (委員)准教授 岩本 雅弘 准教授 菊池 次郎

論文内容の要旨

1 研究目的

原発性肺癌は癌関連死の主要な原疾患の一つであり、特に進行癌に対し予後を改善させる新たな治療法の開発が望まれている。

インターフェロン(以下 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、I 型(IFN- α 、 $-\beta$ 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。IFN- α に代表される I 型 IFN 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。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、副作用等の問題も指摘され、ほとんど行われていないのが現状である。

III 型 IFN は I 型 IFN と同等の生物学的効果を有する一方、臓器によって受容体の分布に偏りがあることが特徴の一つとして挙げられ、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。そこで、III 型 IFN に属する IFN- λ 2(IL-28A)のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果を検証し、将来的に実臨床での応用可能性について検討した。

2 研究方法

肺癌の代表的遺伝子変異である EGFR 遺伝子変異もしくは K-RAS 遺伝子変異を有するヒト肺癌細胞株(計 7 株)を用い、まず各細胞株における IFN- λ 受容体の発現の有無を PT-PCR 法で確認した。

次に、各細胞株にホタル(*Photinus pyralis*)由来発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子導入を行い、組み換え型 IFN- λ 2 添加後の細胞数の変化と、ルシフェラーゼ発光量を指標に細胞増殖能を定量化した。また、IFN- λ 2 添加後の細胞形態の変化や、DAPI 染色による核の断片化の観察、および Caspase3/7 活性を計測し IFN- λ 2 のアポトーシス誘導能を評価した。

JAK/STAT 経路を介した抗腫瘍シグナル伝達の活性化は、STAT1 のリン酸化の有無をウエスタンブロット法で評価した。

最後に IFN- λ 2 の cDNA を遺伝子導入したルシフェラーゼ発現肺癌細胞株を作成し、コロニーフォーメーションアッセイで、一過性 IFN- λ 2 発現による腫瘍細胞の増殖抑制効果を確認した。その細胞株を NOD/SCID マウスの胸腔内へ注射し、ヒト肺癌細胞株の胸腔内播種モデルを作成し、In vivo Bio-Luminescence Imaging 法で、一過性 IFN- λ 2 発現によるヒト肺癌細胞株の生体内増殖能

の変化を経時的に定量化した。

3 研究成果

使用した全てのヒト肺癌細胞株において、IL-28R1、IL-10R2 の 2 量体から構成される IFN- λ 受容体が発現していた。また、いずれの細胞株でも IFN- λ 2 添加による STAT1 のリン酸化を認め、JAK/STAT 経路の活性化が示唆された。この結果は、IFN- λ 2 による抗腫瘍効果や STAT1 のリン酸化が、IL-28R1 受容体の発現に依存するメラノーマ細胞株と全く異なる点であり、肺癌自体が他の癌腫よりも、IFN- λ 2 に対し元々高い感受性を有している可能性が考えられた。

しかし、実際にそれらの肺癌細胞株に対する IFN- λ 2 の抗腫瘍効果を検証した結果、細胞株の遺伝的背景により明らかな感受性の違いがあることが判明した。EGFR 単一遺伝子変異(exon19、E746-A750 欠失)を有する細胞株で有意な抗腫瘍効果を認める一方、K-RAS 遺伝子変異を有する細胞株はほとんど増殖抑制効果を認めなかった。

また、EGFR 遺伝子変異肺癌の治療薬である EGFR-TKI に対し耐性を示す、EGFR 二重遺伝子変異(L858R と T790M)を有する NCI-H1975 細胞株において、IFN- λ 2 の抗腫瘍効果は、K-RAS 遺伝子変異細胞株より優るものの、EGFR 単一遺伝子変異細胞株には及ばない結果だった。

IFN- λ 2 に対し最も高い感受性を示した EGFR 単一遺伝子変異細胞株(HCC827)は、NOD/SCID マウスを用いた、ヒト肺癌細胞株の胸腔内播種モデルにおいても懸念された副作用(体重減少)もなく、IFN- λ 2 の抗腫瘍効果が示された。

4 考察

遺伝的背景の違いに関わらず、全ての肺癌細胞株に IFN- λ 受容体が発現し、そのシグナル伝達として JAK/STAT 経路の活性化を認めたことから、肺癌は IFN- λ 2 の潜在的な治療対象になり得ることが推測された。

しかし、実際は EGFR 遺伝子変異を有する細胞株にのみ抗腫瘍効果を認め、K-RAS 遺伝子変異を有する細胞株では、JAK/STAT 経路等を介した抗腫瘍シグナルを打ち消す何らかの機序が働き、腫瘍細胞の増殖が十分に抑えられなかった可能性が考えられた。

また、いずれも IFN- λ 2 に対する感受性を認めた、EGFR 単一遺伝子変異肺癌細胞株と、EGFR 二重遺伝子変異肺癌細胞株(EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株)の間でも抗腫瘍効果に違いがあり、EGFR 単一遺伝子変異に二次的遺伝子変異(T790M 等)が加わることにより、IFN- λ 2 を介した増殖抑制メカニズムに何らかの変化が生じ、抗腫瘍効果が減弱する可能性がある。しかし、IFN- λ 2 に対する感受性が完全に消失している訳ではなく、今後、EGFR-TKI との組み合わせ療法により、治療の相乗効果や、薬剤耐性獲得の遅延効果が期待できると思われた。

本研究のマウス動物実験で用いた手法上、IFN- λ 2 cDNA を遺伝子導入した EGFR 遺伝子変異肺癌細胞(HCC827)が外来性 IFN- λ 2 を発現する期間は約 1 週間と推測され、あくまで短期間の IFN- λ 2 の暴露実験であるという限界はある。しかし、28 日間の観察期間中、対象群マウスと比し有意な死亡率上昇や体重減少は観察されなかった。この結果は、他のインターフェロン療法でしばしば問題となっている副作用が少ない治療法である可能性を示し、将来的な臨床応用へ期待が持てる結果であった。

5 結論

IFN- λ 2 の抗腫瘍効果は肺癌の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。

論文審査の結果の要旨

インターフェロンには抗ウイルス効果や抗腫瘍効果があり、様々な疾患の治療に実際に用いられている。申請者はこのうちⅢ型といわれるインターフェロン・ラムダ 2 (IL-28A) に注目し、ヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果を *in vitro* 及びマウスモデルで検討した。

1) 様々なヒト肺癌細胞株を検討し、IFN- λ の受容体がすべて発現していることを見出した。またこれらの細胞株で IFN- λ 2 添加により、STAT1 のリン酸化を認め、メラノーマ細胞と肺癌細胞の差がみられ肺癌細胞が IFN- λ 2 に高感受性である可能性を示した。

2) また、ヒト肺癌細胞の中でも EGFR 変異を有する細胞株で有意な抗腫瘍効果を認める一方、K-RAS 変異株では殆ど効果がなかった。

3) IFN- λ 2 に高感受性の EGFR 単一遺伝子変異株を NOD/SCID マウスに移植するモデルでは、IFN- λ 2 による副作用はみられず、抗腫瘍効果が発現した。

以上のように、本研究は新しい肺癌治療薬の候補としての、インターフェロン・ラムダ 2 について基礎的な検討を行い、一定の成果を示し、今後の展開に大きな可能性を明らかにしたものであり、学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判定した。

試問の結果の要旨

申請者は日常肺癌の臨床に従事されており、その観点から肺癌治療に対しての基礎的研究に取り組んだ成果である。研究の background や方法論についてもその限界を含めよく理解しており、論文発表もきわめて明快であった。また、質疑に対しても適切な応答を行い、周辺の知識も十分と考えられた。以上より、申請者の学識および研究能力は学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判断した。