

論文の内容の要旨

論文題目 胃腫瘍におけるインターロイキン6の役割

氏名 木下 裕人

序文

胃癌は癌関連死の原因として世界第2位の疾患である。近年確立されてきた化学療法をもってしても進行胃癌の予後はいまだ不良であり、分子標的薬を含めた新規治療法の開発が望まれている。インターロイキン6 (IL-6) は多様な生理活性を持つ多機能サイトカインであり、胃癌を含めた種々の腫瘍に対して促進的に作用することが報告されている。これまでの報告は胃癌臨床検体や胃癌細胞株において IL-6 の発現と腫瘍の性質との関連を解析したものや、胃癌患者の血清中 IL-6 レベルと予後の関連を解析したものであり、IL-6 を標的とした治療の可能性を検討するためには、IL-6 の作用メカニズムをさらに詳細に検討することが重要である。本研究では、胃癌臨床検体およびマウス胃化学発癌モデルの解析により、胃腫瘍における IL-6 の役割を検討した。ヒトおよびマウスの胃腫瘍において、間質線維芽細胞が IL-6 を産生すると考えられるデータを得たため、線維芽細胞と上皮細胞の相互作用の観点から IL-6 の機能を解析するため、初代培養ヒト胃線維芽細胞を用いて *in vitro* の検討を行った。また、IL-6 によるシグナル伝達において重要な転写因子 Signal transducers and activator of transcription (STAT) 3 の活性化やその意義に関して、胃癌細胞株およびマウスの胃腫瘍組織を用いて検討した。

ヒト胃癌組織における IL-6 の発現

ヒト胃癌組織における IL-6 の発現量を検討するため、胃癌組織 (22 例) およびコントロールとして *Helicobacter Pylori* 陰性の正常胃粘膜 (6 例) のライセートタンパク中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。胃癌では 86%の症例で IL-6 の発現が確認できたが、正常胃粘膜

では全例で IL-6 は検出感度以下であった。次に、ヒト胃癌組織における IL-6 の局在について検討するため、胃癌 31 症例の検体を用いて IL-6 の免疫染色を行った。36%の症例において腫瘍細胞の細胞質で IL-6 陽性であり、74%の症例において腫瘍の間質の細胞で IL-6 が陽性であった。間質の IL-6 陽性細胞の形態から、これらは線維芽細胞であると考え、線維芽細胞マーカー α smooth muscle actin (α SMA)の免疫染色を行ったところ、IL-6 陽性細胞の多くが α SMA 陽性であった。以上から、胃癌症例の一部では IL-6 の発現が上昇しており、また胃癌症例の一部では間質線維芽細胞が IL-6 を産生していることが示唆された。

マウス胃化学発癌モデル

胃腫瘍の発生における IL-6 の役割を検討するため、化学発癌剤 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) による胃化学発癌モデルを IL-6 ノックアウト ($Il-6^{-/-}$) マウスおよび野生型 (WT) マウスを用いて施行した。このモデルでは、1 週間おきに計 5 サイクル、飲料水に MNU を混ぜて投与すると、40 週目に中等度ないし高度異型腺腫相当の胃腫瘍が形成される。WT マウスの胃腫瘍の免疫染色では、ヒト胃癌と同じく、IL-6 は間質線維芽細胞で陽性であった。すべての WT マウスで胃腫瘍が形成されたのに対し、 $Il-6^{-/-}$ マウスでは胃腫瘍が形成されたのは 56%のみであり、腫瘍数および腫瘍の最大径も $Il-6^{-/-}$ マウスで有意に減少していた。マウス胃化学発癌モデルにおいて、IL-6 は胃腫瘍形成に関与することが示唆された。

胃線維芽細胞からの IL-6 産生メカニズム

ヒト胃由来の間質線維芽細胞を *in vitro* で培養し、IL-6 産生のメカニズムを検討した。胃線維芽細胞を通常の培養条件および胃癌細胞株の培養上清の存在下で 24 時間培養し、その培養液中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。通常の培養条件では IL-6 濃度は 0.2 ng/ml 程度であったが、胃癌細胞株の培養上清で刺激すると IL-6 濃度は 5~600 倍に増加した。

次に、どのようなシグナルを介して胃線維芽細胞から IL-6 が産生されるかを検討した。IL-6 の発現に関わる転写因子として NF κ B や AP-1 がよく知られており、I κ B α や MAP キナーゼの活性について調べることにした。胃線維芽細胞を胃癌細胞株の培養上清で刺激し、ウエスタンブロットで解析したところ、I κ B α のリン酸化とデグラデーション、JNK、p38 および ERK のリン酸化が同時に起こることがわかった。

I κ B α 、JNK および p38 を同時にリン酸化させるシグナル経路として、Tumor necrosis factor (TNF) receptor および Interleukin-1 (IL-1) receptor を介する経路が知られている。抗 TNF α 中和抗体および IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) を胃癌細胞株の培養上清に添加して胃線維芽細胞を刺激したところ、IL-6 産生は IL-1RA により著明に抑制されたが、抗 TNF α 中和抗体には影響されなかった。胃線維芽細胞からの IL-6 産生には IL-1 が関与することが示唆された。

SH101 細胞の培養上清中にわずかに IL-1 α (10 pg/ml) を認めたが、その他の胃癌細胞

株の培養上清中には IL-1 α および IL-1 β は検出されず、胃癌から分泌される IL-1 α あるいは IL-1 β が胃線維芽細胞を活性化するわけではないと考えた。正常の培養条件でも胃癌細胞の株培養上清による刺激後でも、胃線維芽細胞の培養上清中の IL-1 α および IL-1 β は検出感度以下であり、胃線維芽細胞自身が IL-1 α あるいは IL-1 β を分泌しオートクリンで作用しているわけでもないと考えた。

IL-1 β は分泌型のみが活性を持つのにに対し、IL-1 α は膜型も活性を持つと言われており、胃線維芽細胞の胃癌培養上清に対する反応に、胃線維芽細胞自身の膜型 IL-1 α が関与する可能性を検討することとした。胃癌細胞株の培養上清で刺激した胃線維芽細胞のライセートを用いて、IL-1 α の mRNA をリアルタイム PCR で、また IL-1 α タンパクを ELISA で定量したところ、IL-1 α mRNA および IL-1 α タンパク双方とも、上昇を認めた。以上の結果から、胃線維芽細胞の膜型 IL-1 α の発現上昇が IL-6 産生に関与していることが示唆された。

IL-6 の胃癌細胞への影響

IL-6 が胃癌細胞に与える影響を、胃癌細胞株を IL-6 で刺激することにより検討した。4 胃癌細胞株 (SH101、NUGC4、MKN74、AGS) を IL-6 で刺激した際の STAT3 のリン酸化をウエスタンブロットにより調べたところ、AGS 以外の 3 種では IL-6 により STAT3 のリン酸化が増強した。次に 8 種の胃癌細胞株 (SH101、NUGC4、MKN74、AGS、MKN1、MKN7、MKN45、TMK1) を IL-6 で刺激し、72 時間後までの細胞数を計測したが、IL-6 刺激による細胞増殖への影響は認められなかった。また、3 種の胃癌細胞株 (SH101、NUGC4、MKN74) を MNU で刺激することで細胞死を誘導し、そこへ IL-6 を添加することにより抑制されるかどうかを検討したが、IL-6 による細胞死抑制効果は認められなかった。また、IL-6 刺激により胃癌細胞からのサイトカイン産生に変化があるかどうかを、胃癌細胞株 NUGC4 を IL-6 で 24 時間刺激した後に回収した培養上清をサンプルとして、50 種のサイトカインに対する抗体を搭載したメンブレンアレイにより解析したが、IL-6 刺激は胃癌細胞からのサイトカイン産生に影響しなかった。以上から、胃癌細胞株を IL-6 で刺激する実験系では、IL-6 の胃癌細胞への影響は大きくないと考えられた。

胃癌における STAT3 活性化の意義

IL-6 によるシグナル伝達において重要な転写因子 STAT3 の活性化について、マウス胃化学発癌モデルで採取した胃組織を用いて解析した。マウスの腫瘍部および非腫瘍部の組織を用いたウエスタンブロットにより、MNU 投与後の WT マウスにおいては、コントロールの WT マウスと比し STAT3 が強くリン酸化されていたが、IL-6^{-/-}マウスにおいては MNU による STAT3 の活性化が全く認められなかった。また、マウスの非腫瘍部の組織を用いてリン酸化 STAT3 の免疫染色を行うと、MNU 投与後の WT マウスでは上皮細胞の核にリン酸化 STAT3 の染色を認めたが、IL-6^{-/-}マウスではリン酸化 STAT3 の核への染色は全く認められなかった。以上より、マウス胃化学発癌モデルにおいて、IL-6 は胃腫瘍形成過程における STAT3 の活

活性化に必要であると考えられた。

次に、胃癌細胞における STAT3 の活性化の意義を調べるため、通常の培養条件で STAT3 が比較的強くリン酸化している 2 種の胃癌細胞株 (SH101、AGS) を、Janus kinase (JAK) 阻害剤 Pyridone 6 (P6) の存在下で培養した。P6 はこれらの胃癌細胞株の STAT3 のリン酸化を減弱させるとともに、細胞増殖を優位に抑制した。以上より、STAT3 の活性化は胃癌細胞の増殖に重要であることが示唆された。

結論

一部の胃癌症例では間質線維芽細胞が IL-6 を産生する。上皮細胞由来の何らかの因子が、胃線維芽細胞自身の膜型 IL-1 α の発現上昇を介して、胃線維芽細胞の IL-6 産生を増加させる。IL-6 は上皮細胞の STAT3 を活性化させることで、胃腫瘍形成を促進する。