

論文内容の要旨

論文提出者 岡村 新一

論文題目

Overexpression of IL-6 by Gene Transfer Stimulates IL-8-Mediated Invasiveness of KYSE170 Esophageal Carcinoma Cells.

論文内容の要旨

食道癌を含む様々な癌種において、腫瘍組織内や体循環中の炎症性サイトカイン発現の上昇は、病期の進行や不良な予後と相関することが既に報告されている。また、治療誘発性に腫瘍組織や腫瘍細胞中に過剰発現した炎症性サイトカインが、治療の効果や腫瘍細胞の悪性度にも影響を与える可能性が示唆されている。本研究では、遺伝子導入によって食道癌細胞株に IL-6 を過剰発現させる事で食道癌細胞株 KYSE170 の浸潤能が亢進すること、そしてこの浸潤能亢進には IL-6 によって発現が誘導された IL-8 が大きく関わる事を示した。

ヒトの食道癌細胞株である KYSE170 を 24well plate へ 1×105 cells/well で 24 時間培養した後、Lipofectamine とプラスミドベクター(pBApo-CMV-Neo、pBApo-CMV-hIL-6)を用いて遺伝子導入。24 時間後に 10cm dish へと細胞を移し、以降の培養に G418 を添加し耐性クローンを選択する事で IL-6 高発現の KYSE-IL6 とコントロールとしての KYSE-NEO を樹立させた。

KYSE-IL6, KYSE-NEO それぞれの浸潤能解析は、8μm の小孔フィルターと Matrigel でコーティングされた膜を有する 24well dish を用いた。上段容器に Serum-free の環境下で 1×105 cells/well、下段容器には culture medium を入れて 48 時間培養し、上段容器の表面側で浸潤せずに残った細胞を拭い取った後に、上段容器の膜を固定・染色し下段側へ浸潤した細胞数を計測した。siRNA による実験では、12-well plate の 1×105 cells/well に対して同様に siRNA を導入し、48 時間後に回収した細胞を浸潤能解析に用いた。

IL-6 とコントロールのそれぞれの遺伝子導入を行った細胞株を用いて浸潤能試験で評価を行った。IL-6 強制発現細胞株の浸潤能は、コントロール細胞株よりも有意に高く、IL-6 特異的な siRNA によって有意に低下した。また RT-PCR 解析では、HGF や VEGF の発現には差を認めなかったものの、IL-6 強制発現細胞株ではコントロール細胞株よりも有意に高い IL-8 発現を認めた。この IL-6 強制発現細胞株における IL-8 発現は、IL-8 特異的な siRNA によって有意に低下したが、IL-6 発現には影響を認めなかった。更に、IL-8 特異的な siRNA によって IL-6 強制発現細胞株の浸潤能は有意に低下を認めた。これらの結果により、IL-6 の強制発現が食道癌細胞株 KYSE170 の浸潤能を増加させることと共に、IL-6 によって誘導された IL-8 がこの中心的役割を担っている事が示された。

IL-6 は、腫瘍細胞に対して多種多様な働きを持っており、直接的には腫瘍細胞の増殖能を抑制するにも関わらず、抗アポトーシス因子としての働きによって、化学療法や放射線に対する抵抗性を獲得する事で、腫瘍細胞の増殖を促進させる方向にも作用する。過去の我々の報告では、本研究と同じ食道癌細胞株を用いた遺伝子導入による IL-6 の強制発現が、食道癌細胞株にシスプラチンによるアポトーシス誘導への抵抗性の獲得を認めたが、腫瘍細胞の増殖能への影響は認めなかった。本研究では、IL-6 の遺伝子導入による強制発現と siRNA を用いた発現抑制によって、IL-6 が KYSE170 の浸潤能を亢進させる事を明らかにした。

過去の同様の報告では、頭頸部の扁平上皮癌細胞や乳癌細胞を用いた研究において、IL-6 が腫瘍細胞の浸潤能を亢

進させる事が報告されている。しかし、これら過去の研究は、腫瘍微小環境における外因性の IL-6 が腫瘍細胞に与える影響に着目していたのに対し、本研究では、治療誘発性に腫瘍細胞内に過剰発現した内因性 IL-6 の与える影響について考察するため、遺伝子導入の手技を用いる事で検討を行った。

単独の炎症性サイトカインの過剰発現は、しばしば他のサイトカインや他の増殖因子の共発現や発現増加を伴う事が知られている。IL-8 や HGF, VEGF といった血管新生因子の過剰発現が、食道癌細胞の増殖にも関連がある事が報告されている。本研究では、IL-6 の過剰発現が IL-8 の発現を有意に増加させ、siRNA を用いた IL-8 の抑制によって KYSE170 の浸潤能が抑制される事を認めた。これらの結果によって、IL-6 の示す浸潤能亢進には IL-8 が大きく関与している事が示された。

IL-8 は炎症性サイトカインであると同時に血管新生促進にも作用するサイトカインであり、IL-6 と同様にその過剰発現は、血管内皮細胞や好中球、腫瘍関連マクロファージ等、様々な癌種の腫瘍組織に発現が認められている。IL-8 は、腫瘍微小環境の腫瘍-宿主、腫瘍-間質の関係性において血管新生や浸潤、転移に対する役割を担っており、特に血清 IL-8 値の上昇は、進行した病期における病状進行に関連している。食道扁平上皮癌細胞では、血清 IL-8 値の上昇がリンパ節や遠隔臓器への転移に相関する事が報告されている。乳癌細胞や前立腺癌細胞においても、IL-8 が浸潤能へ促進的に作用する事が報告されている。一方で、IL-6 における腫瘍細胞の浸潤能亢進に関わるメカニズムは、主に乳癌細胞において上皮間葉移行に関わる分野での研究が行われている。本研究は、IL-6 の下流因子として IL-8 が作用する事で、腫瘍細胞の浸潤能が制御される事を食道癌細胞において示した。

浸潤能に関連するサイトカインの相互作用については、IL-6 が皮膚の扁平上皮癌細胞間のサイトカインの相互作用を制御する事で浸潤能を亢進させる事が報告されている。IL-6 は、IL-8 や GM-CSF, VEGF の発現を誘導するのに対し、IL-8 は VEGF, GM-CSF の発現は誘導するが IL-6 の発現は誘導しない。この IL-8 に対する IL-6 の一方向性の作用が、IL-6 の遺伝子導入によって IL-8 は誘導されるけれども、siRNA による IL-8 の抑制では IL-6 発現には影響がないという我々の結果と一致した。

本研究では、遺伝子導入による IL-6 の過剰発現が食道癌細胞株 KYSE170 の浸潤能を亢進させること、更に、この浸潤能亢進の中心的役割は、細胞内の一方向性の情報伝達経路によって IL-6 から誘導された IL-8 の働きによる事が示された。腫瘍微小環境における複雑なサイトカインの相互作用が、浸潤や転移、治療抵抗性といった臨床的な癌細胞の振る舞いを制御している可能性が示唆された。従って、サイトカイン相互作用の中心的役割を担う特定の情報伝達経路を抑制する事は、疾患の進行を制御する為の有効な治療戦略になり得る。