

## 腎細胞癌における癌遺伝子の研究と臨床応用： 腎細胞癌の抗インターロイキン6療法の試み

京都大学医学部分子病診療学教室（主任：藤田 潤教授）

藤 田 潤

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

武縄 淳，金子 嘉志，奥村 和弘，吉田 修

### ANTI-INTERLEUKIN-6 (IL-6) THERAPY OF IL-6-PRODUCING RENAL CELL CARCINOMA

Jun Fujita

*From the Department of Clinical Molecular Biology, Faculty of Medicine, Kyoto University*

Jun Takenawa, Yoshiyuki Kaneko, Kazuhiro Okumura  
and Osamu Yoshida

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University*

Interleukin-6 (IL-6) has been demonstrated to be an autocrine growth factor of renal cell carcinoma in vitro and released IL-6 has been thought to elicit the acute phase response in vivo. We investigated the possibility of anti-IL-6 therapy of IL-6-producing renal cell carcinoma cell line in the presence of dexamethasone which is known to inhibit the induction of IL-6 messenger RNA. IL-6 receptor antisense oligonucleotide and anti-IL-6 receptor antibody also showed growth inhibition of NC65 cells. IL-6 antisense oligonucleotide and anti-IL-6 antibody did not alter the proliferation of NC65 cells. These findings suggest that inhibitors of IL-6 production or IL-6 function may be useful for some renal cell carcinoma patients.

(Acta Urol. Jpn. 38: 1333-1336, 1992)

**Key words:** Renal cell carcinoma, Interleukin-6, Dexamethasone, Antisense oligonucleotide, Antibody

#### 緒 言

in vitro においてインターロイキン6（以下 IL-6）が腎細胞癌の autocrine growth factor として作用していることが報告されている<sup>1)</sup>。われわれは NC65 を含めほとんどのヒト腎細胞癌細胞株が IL-6, IL-6 レセプター、およびレセプターからのシグナルを伝達する糖蛋白 gp130 を発現していることを示した<sup>2)</sup>。さらに臨床例においても IL-6 および IL-6 レセプターを同時に発現している腎癌が存在しており、IL-6 が腎細胞癌の発生、増殖、および paraneoplastic syndrome に関与している可能性を示唆した<sup>3)</sup>。IL-6 遺伝子の転写はデキサメサゾンなどのステロイドにより抑制を受けることが知られている<sup>3-5)</sup>。また IL-6

のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し IL-6 メッセンジャー RNA（以下 mRNA）の翻訳を阻害すると、IL-6 を増殖因子としている骨髄腫細胞株で増殖抑制がかかることが報告されている<sup>6)</sup>。そこで今回 IL-6 あるいは IL-6 レセプターの産生や機能を抑制することにより腎細胞癌の増殖抑制が可能かどうかをヒト腎細胞癌細胞株 NC65 を用いて検討を加えた。

#### 材 料 と 方 法

##### (1) 細胞

Schroeder らにより樹立されたヒト腎細胞癌株 NC65 を用いた<sup>7)</sup>。培養液は 2% ウン胎児血清 (FCS) を加えた RPMI 1640 (ニッスイ) を用いた。

(2) デキサメサゾン, オリゴヌクレオチド, および抗体

デキサメサゾン (Sigma) は培養液に  $10^{-4}$ M の濃度になるように溶解し  $4^{\circ}\text{C}$  で保存, 使用直前に各濃度に調整した. IL-6 アンチセンスオリゴヌクレオチドとして IL-6 遺伝子の第2エクソンの5コドンに相補的な15ヌクレオチド (TCCTGGGGTACTGG), IL-6 レセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドとして IL-6 レセプター mRNA の開始コドンよりの5コドンに相補的な15ヌクレオチド (GCCGACGGC-CAGCAT), コントロールとして IL-6 遺伝子のセンスオリゴヌクレオチド (AGGACCCCCATGACC) を DNA 合成装置 (Gene Assembler Plus, Pharmacia) で作成して TE 緩衝液 (pH 7.5) に溶解,  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した. 抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体 (MH166) および抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 (PM1) は中外製薬株式会社より提供を受けた. コントロールとしてマウス抗ヒト IgG を使用した.

(3) コロニー形成アッセイ法

1 ml の培養液を入れた 35 mm 培養皿を一晚  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで保存し, これに 0.25% トリプシン処理と pipetting により単一細胞にした NC65細胞を  $1 \times 10^2$ 個ずつ加えた. 24時間後各薬剤を含んだ 1 ml の培養液と交換し, さらに4日間培養した. 16個以上の細胞塊をクラスター (cluster), 30個以上の細胞塊をコロニー (colony) と定義し, 倒立顕微鏡下でそれぞれの個数を数えた.

## 結 果

(1) デキサメサゾン

デキサメサゾンは IL-6 遺伝子の転写を抑制することが知られている<sup>2-5)</sup>. そこで  $1 \times 10^{-5}$ M,  $2.5 \times 10^{-5}$ M,  $5 \times 10^{-5}$ M,  $1 \times 10^{-4}$ M の濃度のデキサメサゾンを含む培養液を作成し NC65 細胞でコロニー形成法を行ったところ, Fig. 1 に示すように濃度依存的な増殖抑制が認められた.

(2) アンチセンスオリゴヌクレオチド

IL-6 のアンチセンスオリゴヌクレオチドは IL-6 mRNA とハイブリッドを形成し, mRNA のタンパク質への翻訳を抑制する. 骨髄腫で有効と報告されているもの同一の塩基配列を用いたが<sup>6)</sup>, NC65 細胞では増殖抑制効果は認められなかった. 一方 IL-6 レセプターのアンチセンスオリゴヌクレオチドではコロニーの形成に対する抑制効果が認められた (Fig. 2).

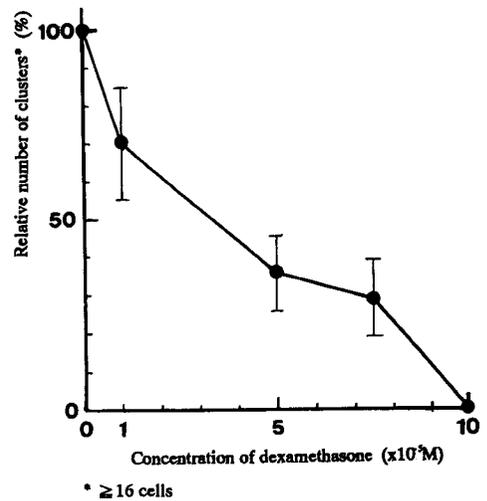


Fig. 1. Effect of dexamethasone on growth of NC65 cell line

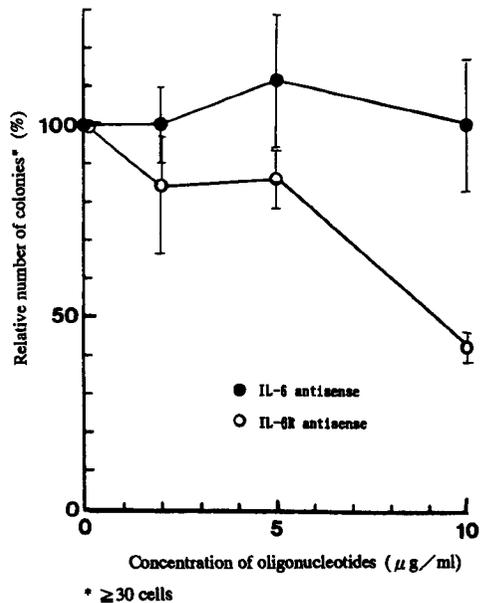


Fig. 2. Effect of antisense oligonucleotides on growth of NC65 cell line

Table 1. Effect of antibody on growth of NC65 cell line

Antibody (25 $\mu\text{g/ml}$ )	No. of clusters*(colonies**) /dish	% control cluster (colony)
control	34 $\pm$ 4 (7 $\pm$ 2)***	100 (100)
anti IL-6	27 $\pm$ 2 (4 $\pm$ 1)	79 (57)
anti IL-6R	16 $\pm$ 1 (3 $\pm$ 0)	48 (43)

\*  $\geq 16$  cells \*\*  $\geq 30$  cells \*\*\* mean  $\pm$  SD

## (3) 抗体

産生された IL-6 が増殖因子として機能するためには細胞表面のレセプターと結合しなければならないが、この結合を阻害する抗 IL-6 抗体, 抗 IL-6 レセプター抗体はともに NC65 細胞の増殖を抑制した (Table 1).

## 考 察

IL-6 は B 細胞の抗体産生細胞への最終段階の分化を誘導する因子としてクローニングされたサイトカインであるが<sup>9)</sup>, 現在では肝臓における急性期蛋白の誘導などさまざまな作用を持つことが知られている<sup>9)</sup>. また IL-6 はリンパ系細胞のみにかぎらず, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 膀胱癌細胞株 T24 やグリオブラストーマなどにおいても産生されていることが報告され<sup>3,10)</sup>, 標的細胞も多種類にわたっている<sup>9)</sup>. 骨髄腫では autocrine growth factor として機能しており<sup>11)</sup>, 近年腎細胞癌においても *in vitro* で autocrine growth factor として働くことが報告された<sup>1)</sup>. 実際には腎摘除術の施行された症例の 23% で癌組織の IL-6 mRNA 発現が亢進していたこと, IL-6 レセプター mRNA の発現も 26% の症例に認められたこと, さらには IL-6 発現亢進例では血清 CRP 値, リンパ節転移の頻度が有意に高いことを報告した<sup>2)</sup>.

IL-6 が産生, 分泌され, 細胞表面のレセプターに結合し細胞内に増殖シグナルを伝達するまでには Fig. 3 に示すようなステップが存在する. IL-6 遺伝子の転写はグルココルチコイドや癌抑制遺伝子産物 p53 で抑制されることが報告されている<sup>3-5,12)</sup>. 今回, デキサメサゾン培養液を加えたところ濃度依存

的に増殖抑制効果が認められた (Fig. 1). しかしながら, この増殖抑制が IL-6 産生低下を介しているものなのか, あるいはグルココルチコイドの別の機能によるものなのかはさらに検討を必要とする.

アンチセンスオリゴヌクレオチドは mRNA とハイブリッドを形成し, 蛋白が発現するのを阻害する. その機序としてハイブリッド形成部の mRNA のリボヌクレアーゼ H による分解などが報告されている<sup>13)</sup>. そこで IL-6 アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養液に加えて NC65 細胞株の増殖に対する影響を検討したが効果は認められなかった. 骨髄腫培養株で増殖抑制効果が報告されているものと同一の塩基配列を用いたが<sup>9)</sup>, NC65 細胞株では効果が認められなかった理由として, 培養液に含まれるヌクレアーゼによるオリゴヌクレオチドの分解, NC65 細胞株は骨髄腫細胞株よりも IL-6 依存性が低いことが考えられるが, より高濃度のオリゴヌクレオチドでより徹底的な IL-6 発現の阻害が必要と思われる. 一方 IL-6 レセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドを加えた場合は NC65 細胞株の増殖抑制が認められた (Fig. 2). IL-6 レセプターの発現量は 1 細胞あたり 100 ないし 1,000 個と少ないため mRNA 発現量も少なく<sup>14)</sup>, 比較的低濃度の IL-6 レセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドで十分な IL-6 レセプター発現の抑制がもたらされたとと思われる. より効果的な増殖抑制のためにはアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ抵抗性を増強したり, ハイブリッドのリボヌクレアーゼ H への感受性を増強する化学的修飾が必要と考えられる<sup>15)</sup>.

産生された IL-6 が増殖因子として機能するためには細胞表面のレセプターと結合しなければならない. この過程を抗 IL-6 モノクローナル抗体, または抗 IL-6 レセプター抗体で阻害することにより NC65 細胞の増殖に影響が見られるかどうかを検討したところ, ともに増殖抑制が認められた (Table 1). 抗 IL-6 レセプター抗体の方でより強い抑制効果が認められた理由としては, アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合と同様に IL-6 と IL-6 レセプターの発現量の差によると考えられる. IL-6 がレセプターと結合すると, IL-6 と結合したレセプターが細胞表面に存在する糖蛋白 gp130 と結合し, この gp130 を介してシグナルが伝達される<sup>16,17)</sup>. 抗 IL-6 レセプター抗体は IL-6 とレセプターの結合を阻害するのみではなくレセプターと gp130 の結合も阻害し, NC65 細胞の増殖抑制をもたらし可能性もある. また gp130 に対する抗体も IL-6 のシグナル伝達阻害を期待できる.

IL-6 のシグナル伝達経路のブロックに伴う *in vitro*

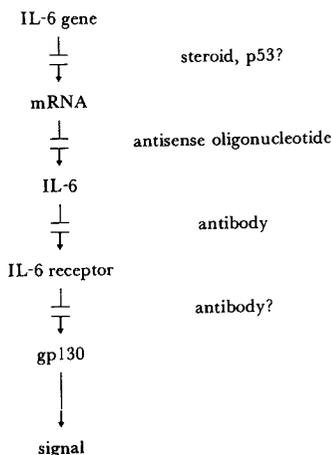


Fig. 3. Anti-IL-6 therapy of IL-6 producing RCC

での NC65 細胞のコロニー形成の抑制が今回認められた。しかしながら *in vivo* での腎細胞癌における IL-6 の役割は評価が定まっていない。また IL-6 の産生や標的細胞への IL-6 の作用の阻害が免疫系をはじめとして生体にどのような影響を与えるか解っていない。今後動物実験を通じて抗 IL-6 療法の副作用検討とともに、腎細胞癌増殖抑制効果や paraneoplastic syndrome の緩和効果を調べていく予定である。

### 結 語

- 1) デキサメサゾンでは IL-6 産生腎細胞株 NC65 の増殖を濃度依存的に抑制した。
- 2) IL-6 レセプター mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび抗 IL-6 レセプター抗体は NC65 の増殖を抑制したが、IL-6 mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび抗 IL-6 抗体では増殖抑制は認められなかった。
- 3) IL-6 の産生や機能を抑制する物質による IL-6 産生腎細胞癌治療の可能性が示唆された。

### 文 献

- 1) Miki S, Iwano M, Miki Y, et al.: Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* **250**: 607-610, 1989
- 2) Takenawa J, Kaneko Y, Fukumoto M, et al.: Enhanced expression of interleukin-6 in primary human renal cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **83**: 1668-1672, 1991
- 3) Kohase M, Henriksen-Destefano D, Sehgal PB, et al.: Dexamethasone inhibits feedback regulation of the mitogenic activity of tumor necrosis factor, interleukin-1, and epidermal growth factor in human fibroblasts. *J Cell Physiol* **132**: 271-278, 1978
- 4) Nishida T, Nakai S, Kawakami T, et al.: Dexamethasone regulation of the expression of cytokine mRNAs induced by interleukin-1 in the astrocytoma cell line U373MG. *FEBS Lett* **243**: 25-29, 1989
- 5) Ray A, LaForge KS and Sehgal PB: On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: Enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol* **10**: 5736-5746, 1990
- 6) Levy Y, Tsapis A and Brouet JC: Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest* **88**: 696-699, 1991
- 7) Höehn W and Schroeder FH: Renal cell carcinoma: Two new cell lines and a serially transplantable nude mouse tumor (NC65). Preliminary report. *Invest Urol* **16**: 106-112, 1978
- 8) Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**: 73-76, 1986
- 9) Kishimoto T: The biology of interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10, 1989
- 10) Meir EV, Sawamura Y, Diserens AC, et al.: Human glioblastoma cells release interleukin 6 *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* **50**: 6683-6688, 1990
- 11) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al.: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**: 83-85, 1988
- 12) Santhanam U, Ray A and Sehgal PB: Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7605-7609, 1991
- 13) Hélène C: Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur J Cancer* **27**: 1466-1471, 1991
- 14) Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, et al.: Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN $\beta$  2) receptor. *Science* **241**: 825-828, 1988
- 15) Degols G, Leonetti JP, Mechti N, et al.: Antiproliferative effects of antisense oligonucleotides directed to the RNA of c-myc oncogene. *Nucleic Acids Res* **19**: 945-948, 1991
- 16) Taga T, Hibi M, Hirata Y, et al.: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**: 573-581, 1989
- 17) Hibi M, Murakami M, Saito M, et al.: Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **68**: 1149-1157, 1990

(Received on August 19, 1992)  
(Accepted on August 24, 1992)