

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10706

研究課題名(和文) 膵癌肝転移抑制因子ITIH5の肝転移抑制機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Genome-wide in vivo RNAi screen identifies ITIH5 as a metastasis suppressor in pancreatic cancer

研究代表者

佐々木 健 (Sasaki, Ken)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：00418849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイドshRNAライブラリーを用いた機能喪失型遺伝子スクリーニングにより同定した肝転移抑制因子ITIH5の転移抑制機構の解明を行った。

手術検体で免疫組織化学的染色を行いITIH5発現は神経叢浸潤の有無、肝転移再発、予後と関連があることを示した。ヒト膵癌細胞株を用いた実験で、ITIH5は遊走能・浸潤能に影響し、2種類の無胸腺マウスモデルにおいてITIH5をノックダウンすると肝転移が促進されることを示した。シグナルペプチド欠損型の細胞外分泌されないITIH5も完全長の細胞外分泌されるITIH5と同様に、遊走能・浸潤能を抑制し、マウスモデルにおいて転移能を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで膵癌において生体内で探索・同定された肝転移抑制因子の報告はない。ITIH5は、ゲノム全体を対象にしたshRNAライブラリーを用いて、生体内で、機能に基づいて、網羅的に発見された非常に期待の持てる新規の膵癌肝転移抑制因子である。ITIH5が膵癌の肝転移を抑制する分子メカニズムの一部を解明したことは、転移を抑制するというこれまでにない全く新しい画期的な治療法の開発に繋がる可能性があり研究意義が大きいと考える。また、ITIH5は膵臓以外の正常臓器でも発現していることから、あらゆる臓器の癌の転移制御にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using an unbiased genome-wide shRNA screen, we identified ITIH5 as a new suppressor of pancreatic cancer metastasis to the liver and shown that expression of ITIH5 was correlated with slowed cell motility, reduced invasion and metastasis without significant inhibition of primary tumor growth, we sought to understand how ITIH5 might alter pancreatic cancer biology to suppress metastasis.

ITIH5 is a secreted protein thought to play a role in stabilization of the extracellular matrix, we tested whether secretion of ITIH5 is required to suppress metastasis by deleting the N-terminal secretion sequence and expressing this secretion-deficient ITIH5 (ITIH5<sup>s</sup>) in highly metastatic human PDAC cell lines. Expression of this non-secreted ITIH5<sup>s</sup> is associated with the same rounded cell morphology, reduced cell motility and reduction in liver metastasis as secreted ITIH5. These data suggest that the mechanism of metastasis suppression by ITIH5 may be mediated by an intracellular mechanism.

研究分野：消化器外科学

キーワード：転移抑制因子 膵癌 肝転移 shRNA ライブラリー 機能喪失型遺伝子スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 膵癌の治療成績向上のためには肝転移の制御が重要

膵癌患者は国内外で年々増加しており、2030年までには癌による死亡原因の第2位になると予測されている。診断時に手術可能な症例は20-30%にすぎず、たとえ適切に切除されても術後早期に転移再発を来し、患者の90%が転移が原因で死亡する。膵癌において、最も転移頻度の高い肝転移の分子メカニズムの解明とその制御は治療成績向上のための最重要課題である。

### 2) ゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーニング法による膵癌肝転移抑制因子 ITIH5 の発見

これまで膵癌においていくつかの転移抑制因子の報告があるが、いずれも *in vitro* モデルでの研究であり、生体内での転移を指標に発見されたものではない。癌の転移は極めて複雑な過程を経ることから、臨床を反映した再現性の高い前臨床モデルでのスクリーニング法による転移抑制因子の探索・同定が必要不可欠である。申請者らは、ヒト膵癌細胞株、マウスの経門脈的血管性肝転移モデル、21,416種類の疾患関連遺伝子に対する74,468種類のヒト shRNA をコードした shRNA ライブラリーを用いた機能喪失型遺伝子スクリーニング法により、新規の膵癌肝転移抑制因子を、生体内(*in vivo* マウスモデル)で、機能に基づいて(経門脈的血管性肝転移モデル)、網羅的に(shRNA ライブラリー)発見できると予測し実験を行い、Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 5(ITIH5)を同定した。ITIH5 は生体内でのゲノムワイドスクリーニング法により同定された初めて膵癌肝転移抑制因子である。このような動物モデルを用いた網羅的スクリーニング法は、個々に遺伝子機能解析を行う手法に比べ画期的であり、また、非常に効率的であるため、この手法により検索・同定された ITIH5 は、非常に期待の持てる新規の膵癌肝転移抑制因子である。ITIH5 は血清中に存在するインター- $\alpha$ -トリプシンインヒビターファミリーの長鎖をコードする遺伝子であり、ヒアルロン酸との共有結合部位を有するとされている。ITIH5 は胎盤で高発現しており、その他、膵臓を含めた正常消化器臓器にも発現しているが、その機能はよくわかっていない。

### 3) ヒト膵癌細胞株における ITIH5 発現は転移能と逆相関する

ITIH5 の機能を解析するにあたり、ヒト正常膵管上皮細胞株(HPDE)と転移能の異なる5種類のヒト膵癌細胞株における ITIH5 の蛋白発現を評価したところ、HPDE、非転移性あるいは低転移性膵癌細胞株では ITIH5 が発現し、逆に高転移性膵癌細胞株では ITIH5 発現が著明に抑制されていることが示され、ITIH5 が有力な肝転移抑制因子であることが示唆された。また、S2-028(非転移性)の ITIH5 をノックダウンすると細胞形態が円形から紡錘形へと劇的に変化したことから、ITIH5 発現抑制と転移能獲得の可能性が示唆された。

本研究の目的は、これまでにない画期的で効率的な生体内でのゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーニング法により発見した新規の膵癌肝転移抑制因子である ITIH5 について、これまでの予備実験の結果をもとに機能解析を行い血管性転移の分子メカニズムを解明すること、治療標的としての妥当性を検証すること、さらには転移を抑制するというこれまでにない全く新しい治療法を開発することである。

## 2. 研究の目的

膵癌は早期から転移を引き起こす極めて予後不良な消化器癌である。転移メカニズムの解明とその制御は、治療成績向上のための重要課題である。これまでに生体内でのゲノムワイドスクリーニング法により同定された膵癌肝転移抑制因子の報告はない。我々は、マウスの経門脈的血管性肝転移モデルとゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた機能喪失型遺伝子スクリーニング法により、新規の膵癌肝転移抑制因子である ITIH5 を同定した。本研究の目的は、臨床検体を用いて ITIH5 発現と臨床病理学的因子との関連性を検討すること、ITIH5 の機能解析を行い血管性転移の分子メカニズムを解明すること、それらの結果から治療標的としての妥当性を検証すること、さらには転移を抑制するというこれまでにない全く新しい治療法を開発することである。

## 3. 研究の方法

### 1) 臨床検体における ITIH5 の発現解析と臨床像との関連検討

手術で得られた膵癌臨床検体のホルマリン固定パラフィン組織切片を用いて、免疫組織化学的に ITIH5 の蛋白発現を解析する。免疫染色の染色性は腫瘍細胞の染色強度および染色範囲をそれぞれスコア化し総合的に評価する。染色性と予後や再発部位なども含めた臨床病理学的因子との関連を検証する。すでに ITIH5 を強発現する正常胎盤組織において抗 ITIH5 抗体を用いた免疫染色を行い、染色条件は確認済みである。凍結標本からは RNA を抽出し、一部は逆転写して定量的 RT-PCR 解析を行う。

### 2) ヒト膵癌細胞株における ITIH5 の表現型への影響(*in vitro*)

ITIH5 を発現したヒト膵癌細胞株細胞、すなわち、非転移性膵癌細胞株(S2-028)の ITIH5 を

shRNA(GeneCopoeia 社)を用いて発現抑制した細胞株(オフターゲット効果を回避する目的で2種類樹立)と、ITIH5を低発現あるいは発現していない細胞株、すなわち、転移性膵癌細胞株(S2-007、MIAPaCa-2)においてITIH5プラスミドベクター(GeneCopoeia 社)を用いて過剰発現させた細胞株を樹立し実験に使用する。これらの細胞株を用いてITIH5の表現型への影響を検証する。

- i. 細胞増殖能：細胞数の計測、WST-1アッセイで評価する。
- ii. 遊走能：創傷治癒アッセイ、遊走能アッセイキットで評価する。
- iii. 浸潤能：マトリジェルトランスウェル浸潤能アッセイキットで評価する。
- iv. コロニー形成能：軟寒天コロニー形成アッセイ法で足場非依存性の増殖能力を評価する。

### 3) ヒト膵癌細胞株におけるITIH5の機能解析(in vitro、in vivo)

i. ITIH5は分泌蛋白であることから、膵癌細胞内外でのITIH5の機能評価を行う。ITIH5のN端には細胞外分泌に不可欠なシグナルペプチドが付加されているため、シグナルペプチド欠損ITIH5のプラスミドベクターを作成した後、これを膵癌細胞株に導入し、完全長のITIH5の機能と比較検討する。さらに、ITIH5はヒアルロン酸との共有結合部位を有することから、ITIH5とヒアルロン酸の複合体が腫瘍周囲の細胞外マトリックスを増大させ腫瘍の遊走・浸潤を制御するという仮説のもと、ITIH5が細胞外マトリックスに及ぼす影響についても検討する。ITIH5の発現の有無と細胞培養液へのヒアルロン酸分泌量の変化、腫瘍周囲血管・リンパ管新生への影響、マクロファージの浸潤、線維芽細胞浸潤などを比較検討する。

ii. ITIH5を発現抑制あるいは過剰発現させた膵癌細胞株を腫瘍被膜に直接移植した膵癌局所モデルを用いて、ITIH5の発現の有無と原発巣・転移巣の腫瘍の特性を明らかにする。具体的には、膵局所にマトリジェルで希釈した膵癌細胞株を直接移植し、4週間後に安楽死させ、腫瘍の体積、肝・肺・腹膜などへの転移の状況の評価する。

iii. ITIH5を発現抑制あるいは過剰発現させた膵癌細胞株を脾静注した経門脈的肝転移モデルを用いて、ITIH5の発現の有無と転移巣の腫瘍の特性を明らかにする。具体的には、ハルクス液で希釈した膵癌細胞株を脾静注し、4週間後に安楽死させ、肝転移の大きさ・個数、他臓器転移の有無などを評価する。

### 4) ITIH5による肝転移抑制の分子メカニズムの解明と治療標的としての妥当性の検証

- i. ITIH5の発現の有無による遺伝子の発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析する。
- ii. ITIH5と癌関連シグナル伝達との関連を評価する。
- iii. 抗癌剤感受性試験を行う(シスプラチン、ジェムザール、オキサリプラチン等)。
- iv. これまでの実験で得られた結果からITIH5が肝転移を抑制するメカニズムを検証する。さらに、ITIH5が不活化されるメカニズムを検証し、ITIH5不活化の抑制、あるいは活性を上昇させる技術の開発を行う。

## 4. 研究成果

1)手術で得られた膵癌臨床検体のホルマリン固定パラフィン組織切片を用いて、ITIH5の免疫組織化学的染色を行った。免疫染色の染色性は腫瘍細胞の染色強度および染色範囲をそれぞれスコア化し総合的に評価した。膵癌臨床検体のITIH5蛋白発現と病理学的神経叢浸潤の有無に関連が認められた。また、ITIH5発現陰性群では肝転移再発例が多く、さらに、予後との関連も認められた(Sasaki K, et al. Clin Exp Metastasis 34, 229-23, 2017)。

2) ITIH5を低発現あるいは発現していないヒト膵癌細胞株とITIH5を過剰発現させたヒト膵癌細胞株を樹立し表現型への影響を検証した。ヒト膵癌細胞株におけるITIH5の発現は遊走能・浸潤能に影響したが、増殖能へは影響しなかった。

3)2種類の無胸腺マウスモデル(膵癌局所モデル、経門脈的移行性肝転移モデル)を用いた実験において、非転移性膵癌細胞株のITIH5をノックダウンすると肝転移が促進され、高転移性膵癌細胞株のITIH5を過剰発現させると肝転移が抑制された。

4)ITIH5は分泌蛋白であるが、細胞外分泌に必要なシグナルペプチドを欠損させたITIH5のプラスミドベクターを作成し、これを膵癌細胞株に導入し、完全長のITIH5の機能と比較検討した。シグナルペプチド欠損型の細胞外分泌されないITIH5も完全長の細胞外分泌されるITIH5と同様に、遊走能・浸潤能を抑制し、また、無胸腺マウスモデル(経門脈的移行性肝転移モデル)を用いた実験において、転移能を抑制することを示した。(査読中 Young E, Sasaki K, Welch D, et al. Suppression of Pancreatic Cancer Liver Metastasis by Secretion-Deficient ITIH5)。

5) ITIH5による肝転移抑制の分子メカニズムの解明と治療標的としての妥当性の検証を行うことを計画していたが、予定期間内に研究成果を上げることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki K, Kurahara H, Young E, Natsugoe S, Ijichi A, Iwakuma T, Welch D.	4. 巻 34
2. 論文標題 Genome-wide in vivo RNAi screen identifies ITIH5 as a metastasis suppressor in pancreatic cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 229-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10585-017-9840-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	前村 公成  (Maemura Kosei)  (30398292)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授    (17701)	
研究分担者	内門 泰斗  (Uchikado Yasuto)  (30464465)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特例准教授    (17701)	
研究分担者	夏越 祥次  (Natsugoe Shoji)  (70237577)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	蔵原 弘  (Kurahara Hiroshi)  (70464469)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教    (17701)	