

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15819

研究課題名（和文）膵癌におけるインフラマソームおよびASCの役割と癌進展との関連

研究課題名（英文）The role of inflammasome and ASC in pancreatic adenocarcinoma progression

研究代表者

小泉 光仁 (Koizumi, Mitsuhiro)

愛媛大学・医学部附属病院・講師（病院教員）

研究者番号：40748307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では炎症の中心的役割を果たすタンパク質複合体であるインフラマソームと、その重要な構成タンパクであるapoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) に着目した。そのほかのインフラマソーム構成タンパクと比較して、ASCは膵臓の非癌部より癌部に多く発現していた。複数の膵癌細胞株において膵管上皮細胞株と比較してASCが発現しており、膵癌細胞株のASCを減少させると、癌細胞の細胞増殖が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌に対する分子標的治療が開発されているが、その治療効果は十分ではなく、新しい治療ターゲットの確立が必要である。本研究により、ASCが膵癌の増殖に寄与していることが明らかになった。膵癌においてASCを標的とした新しい治療法の確立につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Although molecular targeted therapies for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) have been developed, their therapeutic effects are not sufficient and new therapeutic targets are warranted. In this study, we focused on inflammasome, a protein complex that plays a central role in inflammation, and its important constituent protein, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). Compared with other inflammasome constituent proteins, ASC was expressed more in PDAC tissues than in the noncancerous pancreatic tissues. ASCs were expressed in multiple PDAC cell lines as compared to pancreatic ductal epithelial cells. Reducing ASCs of PDAC cell lines suppressed cell growth of cancer cells. This study revealed that ASC contributes to the growth of PDAC. Our findings may lead to the establishment of a new therapeutic method targeting ASC in PDAC.

研究分野：膵臓病

キーワード：膵癌 ASC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における膵癌の死亡数は年々増加傾向にあり、2014年のがん統計では部位別がん死亡数第4位である。膵癌は早期発見が困難で初診時にはすでに切除不能であることが多く、手術例を含めた5年生存率は10%以下の予後不良な癌の代表である。膵癌の切除不能症例に対して化学療法や分子標的治療薬による延命効果が期待できるようになってきたが、生命予後の大幅な改善は期待できない。そのため膵癌に対する新しいバイオマーカーや治療法の確立が急務である。

我々は細胞質に存在するプロテアーゼの一種であるカスパーゼ-1の活性化を引き起こすことで炎症の要となるタンパク質複合体であるインフラマソームに着目した。我々のこれまでの検討で、膵癌細胞にはインフラマソームの重要な構成タンパクである apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) の発現がみられた。ASCは抗がん剤でアポトーシスを誘導した白血病細胞で巨大な凝集塊を形成する細胞質蛋白質として発見され、インフラマソームにかかわる作用だけではなく、アポトーシスを誘導することが報告されている。インフラマソームやASCは癌の病態に関わるとされるが、これまでにインフラマソームやASCの膵癌における役割は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

インフラマソーム・ASCの膵癌における役割、生理的意義を膵癌細胞株、ヒト膵癌組織を用いた検討により同定する。そして膵癌の臨床マーカーとしての有用性、膵癌治療標的としてのインフラマソーム・ASCの可能性を明らかにすることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

oncomine の分析:

膵癌におけるインフラマソーム関連遺伝子の発現パターンを、Oncomine データベース (www.oncomine.org) のデータセットを用いて解析した。

細胞培養:

各細胞株について、播種後、37℃、5%CO₂の湿潤環境下で培養した。hTERT-HPNEの培養液は、75(v/v)% DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社製) および 25(v/v)% Medium M3 Base を含む培養液に、5%胎児血清、1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。PANC-1の培養液はDMEM 培地に10%牛胎児血清、1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。ASPC-1およびBxPC-3の培養液は、RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific 社製) に、10%牛胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。

Real-time RT-PCR:

各細胞株を回収し、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて、添付のプロトコルに従って、各細胞株から total RNA を抽出した。各 total RNA と、RT-PCR 試薬 (LightCycler 480 SYBR Green 1 Master, Roche Diagnostics 社製) と、下記プライマーセットと、サーマルサイクラー (LightCycler 480, Roche Diagnostics) を用いて測定した。内在性コントロールとしては、GAPDH を用い、各遺伝子の mRNA 量は、GAPDH に対する相対的発現量として算出した。

ASC 用プライマーセット

フォワードプライマー: 5'-GCCAGGCCTGCACTTTATAGA-3' (配列番号 413-433)

リバースプライマー: 5'-GTTTGTGACCTCGCGATAAG-3' (配列番号 450-470)

NLRP3 用プライマーセット

フォワードプライマー: 5'-ACTGCAAGCTTCAGGTGTTG-3' (配列番号 3565-3584)

リバースプライマー: 5'-TCTGGCTGGAGGTCAGAAGT-3' (配列番号 3635-3654)

Caspase-1 用プライマーセット

フォワードプライマー: 5'-GGAAACAAAAGTCGGCAGAG-3' (配列番号 478-797)

リバースプライマー: 5'-ACGCTGTACCCAGATTTTG-3' (配列番号 624-643)

GAPDH 用プライマーセット

フォワードプライマー: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' (配列番号 83-101)

リバースプライマー: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' (配列番号 130-148)

Western Blotting:

各細胞株を回収し、RIPA Buffer (10mM Tris-HCl, 1% SDS, 0.5% Nonidet P-40, 150mM NaCl, 1x Halt Protease Inhibitor cocktail: Thermo Fisher Scientific, 1x Halt Phosphatase Inhibitor cocktail: Thermo Fisher Scientific) を用いて、細胞溶解液を調整した。得られた細胞溶解液と、ゲル (4-12% Bis-Tris Gel, Thermo Fisher Scientific 社製) とを用いて SDS-PAGE を行なった後、前記ゲルからニトロセルロースメンブレン (Millipore 社製) にタンパク質を転写した。転写後、一次抗体として、抗 ASC 抗体 (Proteintech 社製) を、二次抗体として、HRP 標識抗 Rabbit 抗体 (GE Healthcare 社製) を用いた。また一次抗体として抗 β -actin 抗体 (Chemicon 社製) を、二次抗体として HRP 標識抗 mouse 抗体 (GE Healthcare 社製) を用いた。そして、発光基質として、ECL Prime Kit (GE Healthcare 社製) を用い、光学測定機器 (ImageQuant

LAS 4000 system、GE Healthcare 社製)を用いて、シグナルを検出した。

Small interfering RNA siRNA の効果の検討：

膵癌細胞株に下記の ASC siRNA-1 または 2 を、リポフェクション試薬 (Lipofectamine 2000、Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて導入した。導入後、3 日後に ASC の mRNA 発現量およびタンパク質の発現量を測定した。コントロールは、コントロールの siRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool (#2)、GE Healthcare 社製)を用いた。

ASC siRNA-1

センス鎖： 5'-AACUGGACCUGCAAGGACUUGTT-3' (配列番号 578-598)

アンチセンス鎖：5'-CAAGUCCUUGCAGGUCCAGUUTT-3' (配列番号 578-598)

ASC siRNA-2

センス鎖： 5'-CCGCCGAGGAGCUCAAGAATT-3' (配列番号 117-135)

アンチセンス鎖：5'-UUCUUGAGCUCUCGCGGTT-3' (配列番号 117-135)

細胞増殖能の検討：

膵癌細胞株の ASC 発現を siRNA でノックダウンした。siRNA 導入時を基準として、1、3 および 5 日目における細胞数を MTS 法用のキット (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay、Promega 社製)を用いて測定した。また、導入後 5 日目における各細胞株の形態について、位相差顕微鏡 (Axio Vert.A1 : ZEISS 社製)を用いて観察した。

RNA sequencing による遺伝子変化の解析：

膵癌細胞株 PANC-1 に上記の ASC siRNA-1 または 2 を導入した。3 日後に全 RNA を精製し、RNA の品質は 6000 Nano kit (Agilent 社製)を用いて、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 社製)により解析した。各サンプル 500ng を使用して、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs 社製)でライブラリーを作成した。ライブラリーのシーケンス解析は Miseq system (Illumina 社製)を用いた。UNIX Tophat を用いてヒトゲノム (hg19) にマッピングし、UNIX featureCounts でリードをカウントし、R TCC パッケージで正規化した。得られた遺伝子を Metascape (<http://metascape.org/>)により解析した。

フローサイトメトリー法による細胞周期の解析：

膵癌細胞株 PANC-1 に上記の ASC siRNA-1 または 2 を導入した。3 日後に細胞を回収、染色して (BD cycletest Plus DNA kit : BD Biosciences 社製)、フローサイトメータを用いて蛍光強度を測定、Flowjo software を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)インフラマソームに関連する NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)、ASC、Caspase-1 について、Oncomine (<http://www.oncomine.org>) に登録されているすべてのデータセットを解析した。その結果 ASC が非癌部と比較して膵癌部に高発現していた ($p=0.039$)。一方で NLRP3 ($p=0.107$)、Caspase-1 ($p=0.052$) では非癌部と膵癌部で発現に有意な差はみられなかった。そこで本研究では、膵癌で高発現する ASC に着目して細胞株での実験を行った。

(2)Realtime RT-PCR において癌化していない膵管上皮細胞株 hTERT-HPNE と比較して、複数の膵癌細胞株 (PANC-1、ASPC-1、BxPC-3) で ASC 発現が増加していた (図 1A)。Western Blotting でも同様に hTERT-HPNE と比較して、複数の膵癌細胞株 (PANC-1、ASPC-1、BxPC-3) に ASC のタンパク発現が増加していた (図 1B)。これらの結果より、癌化していない膵組織と比較して、膵癌では ASC が高発現していることが明らかになった。

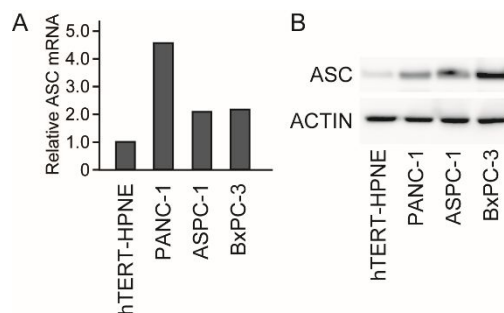


図 1 細胞株の ASC 発現

(3)次に、ASC siRNA による ASC の knockdown 効果を確認するため、realtime RT-PCR および Western Blotting を行った。膵癌細胞株 PANC-1、ASPC-1 に ASC siRNA-1 および 2 を導入したところ、コントロールと比較して、ASC siRNA-1 および 2 を導入した細胞では、ASC

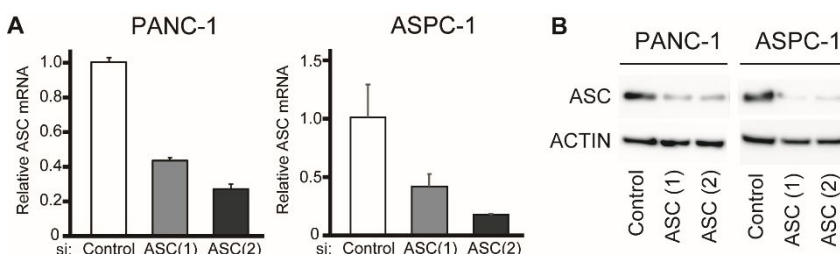


図 2 膵癌細胞株の ASC knockdown

の発現量が低下することを確認した(図2A、B)。

(4) siRNA を導入した培養細胞を観察していたところ、ASC siRNA-1、2 を導入した細胞では細胞増殖の抑制が起きていると推測した。そこで、MTS法を用いて、細胞増殖能を検討した。ASC siRNA が導入された膵癌細胞株 PANC-1、ASPC-1 は、コントロールの siRNA が導入された膵癌細胞株と比較して、有意に細胞増殖能が低下していた(図3A、B)。

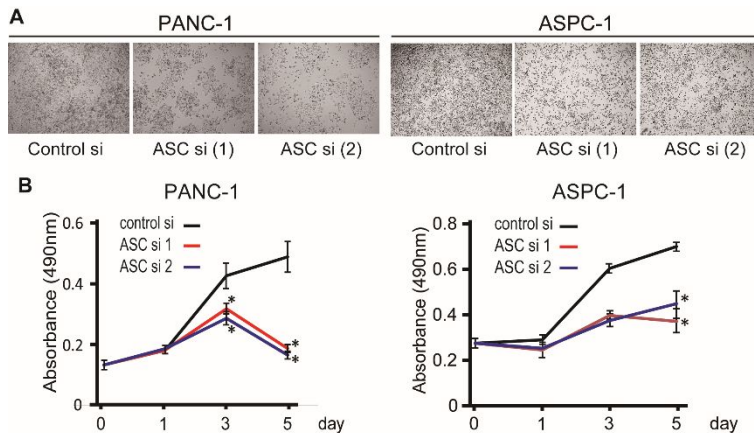


図3 ASC knockdown による膵癌細胞株の変化

(5) その細胞増殖の抑制機序を明らかにするため、ASC 発現抑制によって引き起こされる遺伝子の変化を、RNA-seq により網羅的に解析した結果、細胞周期に関わる遺伝子群の変化が起きている。フローサイトメトリー法による細胞周期の解析では、ASC 発現抑制により G1 期の割合が増加し、S 期の割合が減少していた(図4)。

(6) これらの結果より、ASC は膵癌の増殖に寄与していることが明らかになり、膵癌において ASC を標的とした新しい治療法の確立につながる可能性があると考えられた。

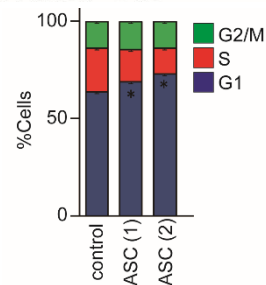


図4 ASC knockdown による細胞周期の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumagi, T. Terao, T. Yokota, T. Azemoto, N. Kuroda, T. Imamura, Y. Uesugi, K. Kisaka, Y. Tanaka, Y. Shibata, N. Koizumi, M. Ohno, Y. Yukimoto, A. Tange, K. Nishiyama, M. Kanemitsu, K. Miyake, T. Miyata, H. Ishii, H. Hiasa, Y.	4. 巻 94
2. 論文標題 Early Detection of Pancreatic Cancer in Patients With Chronic Liver Disease Under Hepatocellular Carcinoma Surveillance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mayo Clin Proceedings	6. 最初と最後の頁 2004-2010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mayocp.2018.12.034	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 -

1. 著者名 Tanaka, Y. Kumagi, T. Terao, T. Kuroda, T. Yokota, T. Azemoto, N. Imamura, Y. Uesugi, K. Kisaka, Y. Shibata, N. Koizumi, M. Ohno, Y. Kanemitsu, K. Yukimoto, A. Tange, K. Nishiyama, M. Miyake, T. Miyata, H. Ishii, H. Abe, M. Hiasa, Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 ABO Blood Type and the Long-term Outcomes of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Medicine	6. 最初と最後の頁 761-768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3748-19	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小泉光仁, 今村良樹, 兼光梢, 黒田太良, 渡辺崇夫, 熊木天児, 阿部雅則, 日浅陽一
2. 発表標題 膵癌におけるインフラマソームとASCの役割
3. 学会等名 第112回日本消化器病学会四国支部例会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----