

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09204

研究課題名（和文）肝内胆管癌におけるIL-11の機能解析と分子マーカーへの応用

研究課題名（英文）Functional analysis of IL-11 in cholangiocarcinoma and its clinical application

研究代表者

宇山 直樹 (Uyama, Naoki)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70402873

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト肝内胆管癌組織における3種類のIL-11抗体を用いた免疫染色では再現性のある結果が得られなかった。予後との関連はどの交代も認めなかった。細胞実験ではヒト胆管内癌細胞株（SSP-25, RBE, HuCCT1, TKKK）におけるIL-11受容体であるIL11Ra及びgp130の発現をwestern blottingで調べたところ、すべてのヒト胆管内癌細胞株でIL-11R及びgp130の発現を認めた。IL-11の培養ヒト胆管内癌細胞株に対する増殖能への関与を認めた。また、マトリゲルコートカルチャーインサートをを用いた細胞浸潤アッセイではIL-11の浸潤能への影響は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織レベルではIL-11の明らかな予後への関与が認められなかったが、細胞レベルでは、IL-11はICCの増殖能に関与している可能性が示された。今後ICCの治療にIL-11の活性を抑制する薬剤やIL-11シグナルを抑制するような薬剤が見つければ、増殖能が抑制される可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Three kinds of antibodies used to evaluate the reactivity for IL-11 in the human ICC tissues. Reactivity of these antibodies was different and significant relationship between IL-11 reactivity and patient prognosis was not found. In human ICC cell lines, expression of IL-11 receptor complex, IL-11Ra and gp130, was found. IL-11 significantly was significantly involved in the proliferation of all ICC cell lines. However, in matrigel invasion assay, IL-11 was not involved in the ability of invasion in all ICC cell lines. IL-11 may be involved in the proliferation of ICC.

研究分野：肝内胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 IL-11 gp130 増殖能

1. 研究開始当初の背景

ICC において新規の有用なバイオマーカーの発見や新たな分子標的治療を中心とした化学療法剤の開発は急務である。

以前から ICC 患者における血中 IL-6 濃度は高値で、IL-6 の MAPK 経路を介したヒト ICC 細胞の増殖能、STAT-3 を介した上皮間葉移行 (EMT) や転移能への関与が報告されている。しかし、最近、胃癌や大腸癌の消化器癌マウスモデルにおいて IL-6 family の一員である IL-11 による STAT3 シグナルの方が IL-6 による STAT3 シグナルよりも腫瘍の進行・進展に重要な働きをしていることが報告されており、ICC における IL-11 の機能解析も必要と考えている。

IL-11 は元々骨髄間質細胞の産生する造血に關与するサイトカインと考えられていたが、今では血液系細胞のみならず、消化管上皮細胞、呼吸上皮細胞、関節軟骨細胞などの全身諸臓器に働きかけ、多彩な生理効果を発揮することが解明されてきている。癌組織において、その発現は胃癌、大腸癌、腎癌、肺癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮内膜癌などの癌で報告されている。ヒト子宮内膜癌症例においては洗浄液中に IL-11 を認め、濃度と腫瘍の悪性度が関連していると報告されているほか、組織中の IL-11 及び IL-11R の発現と腫瘍の悪性度との関連も報告されている (参考文献 1)。

IL-11 の受容体は、IL-11 specific な IL-11R

(鎖) および他の IL-6 family と共通の signal transducer である gp130 (鎖) から構成され、細胞内シグナル伝達には鎖が関与している (Fig.1)。IL-11 は細胞膜上の IL-11R に結合することにより、gp130 のホモダイマーが形成され、高親和性受容体が構成され、JNK/STAT-3 経路および Grb2/SOS/Ras/Raf/MAP キナーゼ経路、PI3-Akt 経路 (Fig.2) を介して遺伝子発現を制御している (Classic Signaling, Fig.1) また、ADAM10 などのプロテアーゼなどで遊離された soluble IL-11R が IL-11 と結合し、IL-11R が存在しない細胞の細胞膜上の gp130 受容体と結合し上記 signal 伝達を行う場合も報告されている (Trans-Signaling, Fig.1) また、これらの IL-11 によるシグナルは、IL-6 同様、IL-11R 中和抗体にて抑制されることが分かっている。実際、子宮内膜癌 Xenograft マウスモデルにおいて IL-11R 中和抗体が腫瘍の増殖能および転移能を抑制したことが報告されており (参考文献 2)、IL-11 が癌の progression にも深くかかわっている可能性を示唆している。

癌間質を構成細胞である CAFs は TGF- β 、Periostin、Tenascin-C、Thrombospondin-1、Galectin-1、CXCL-12、HGF などを分泌し、癌細胞の増殖能・浸潤能を制御していることが報告されている (参考文献 3)。CAFs における IL-11 の発現は胃癌と肺癌で報告されており (参考文献 4)、癌細胞の抗癌剤抵抗性に関与している可能性が報告されている。また、IL-11 投与マウスにて心臓と腎臓に線維化が誘導することが示されたほか、IL-11R KO マウスでは Angiotnsin によって誘導される心臓の繊維化が抑制されたことが報告され、IL-11 の線維化への関与が考えられる (参考文献 5)。また、培養 cardiac fibroblast にて IL-11 は TGF- β によって誘導され、IL-11 単独添加によっても Collagen (I) の産生が誘導されたことが報告されている。また、TGF- β によって誘導される Collagen (I) 産生能は抗 IL-11 抗体にて抑制される報告もあり、IL-11 が TGF- β の機能を制御する可能性が考えられる。また、TGF- β が癌細胞における EMT 誘導因子であることも考慮すると、癌組織で産生される TGF- β によって誘導される癌細胞の EMT が IL-11 中和抗体や IL-11R 中和抗体にて抑制される可能性

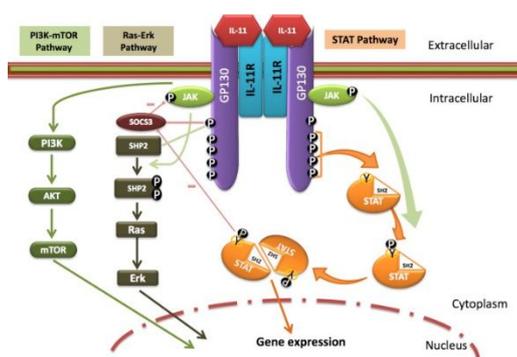


Fig.1 Classic signaling and trans-signaling of IL-11

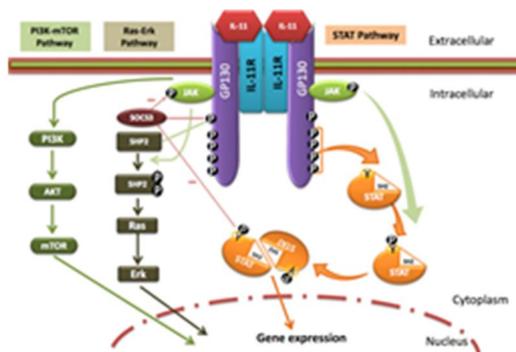


Fig.2 Intracellular signaling transduction of IL-11

が考えられる。以上のことから、IL-11 は、癌細胞のみならず、CAFs に働き、間質構成や癌細胞の機能制御に働く可能性がある。

【参考文献】

1. Interleukin 11 is upregulated in uterine lavage and endometrial cancer cells in women with endometrial carcinoma. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Jun 17;8:63.
2. Targeting Interleukin-11 Receptor- Impairs Human Endometrial Cancer Cell Proliferation and Invasion In Vitro and Reduces Tumor Growth and Metastasis In Vivo. *Mol Cancer Ther*. 2016 Apr;15(4):720-30.
3. Cancer-associated fibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011 May;27(3):276-84.
4. Cancer-associated fibroblasts-stimulated interleukin-11 promotes metastasis of gastric cancer cells mediated by upregulation of MUC1. *Exp Cell Res*. 2018 Jul 15;368(2):184-193.
5. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*. 2017 Dec 7;552(7683):110-115.

2 . 研究の目的

肝内胆管癌における IL-11 の役割を明らかにし、臨床応用することが本研究の主目的である。また、本研究では IL-11 の癌細胞への直接的効果（増殖能、浸潤能、血管新生能、EMT）以外に、CAFs への直接効果（増殖能、浸潤能、血管新生能、コラーゲン産生能）も明らかにする。

3 . 研究の方法

A. 切除ヒト肝内胆管癌組織における IL-11、IL-11R の免疫染色と予後の検討

我々は今までに40例のICC切除組織を保存している。癌細胞におけるIL-11発現およびIL-11Rと予後の関係を調べる予定である。

B. 血中IL-11、IL-11R の濃度と肝内胆管癌ステージの相関

我々が保存している 24 例の血液検体を用いて IL-11、IL-11R の濃度を ELISA にて測定する。濃度と予後の関係を調べる予定である。

C. 肝内胆管癌細胞株に対する効果

ヒト肝内胆管癌細胞株は RBE 細胞、SSP-25 細胞、HuCCT-1 細胞、TKKK 細胞を使用する。実験に移る前に、これらの細胞における IL-11、IL-11R および Gp130 の発現を QRT-PCR および Western Blot にて確認する。

1. 増殖能：6 well plateに上記癌細胞を 5×10^5 細胞の密度で培養し、培養開始24時間後にIL-11を添加する（癌細胞にIL-11受容体 が存在しないときはsoluble IL-11R (sIL-11R)も添加する）。添加後48、72時間後に各群の増殖能をAlamar Blue Assay にて測定し、無添加培養群の増殖能と比較検討する。また、Autocrineの関与を調べるため、培養開始24時間後にIL-11R 中和抗体を添加し、増殖能の変化を調べる。
2. 浸潤能：6 well用マトリゲルコートカルチャーインサート(8 μ M pore)表面に上記癌細胞を培養する。培養開始24時間、後培養液中にIL-11を添加し、48時間後にインサート裏面に移動した癌細胞数をカウントし、浸潤能を評価する。同様、オートクラインの関与を調べるため、培養開始24時間後にIL-11R 中和抗体を添加し、浸潤能の変化を調べる。
3. 血管新生能： の実験と同様に細胞培養する。培養開始24時間後にIL-11を添加し、血管新生因子（VEGF、bFGF、angiopoietins、など）の発現変化を24時間後に調べる。また、同様、オートクラインの関与を調べるため、培養開始24時間後にIL-11R 中和抗体を添加し、血管新生因子発現の変化を調べる。

4 . 研究成果

A. ヒト肝内胆管癌組織における三種類の IL-11 抗体を用いた免疫染色では異なった結果が得られ、再現性のある結果が得られなかった。傾向としては予後との関連は認められなかった。

B. サンプル内の結腸濃度を測定したが、明らかな予後との関連は見当たらなかった。

C. 細胞実験ではヒト胆管内癌細胞株 (SSP-25, RBE, HuCCT1, TKKK)における ILT1 受容体である ILT1Ra 及び gp130 の発現を western blotting で調べたところ、すべてのヒト胆管内癌細胞株で:L-11R 及び gp130 の発現を認め、IL-11 に対するレセプターのサブユニットが発現していることを確認した。次に:L-11(100 ng/mL)の培養ヒト胆管内癌細胞株に対する増殖能を Alamar Blue アッセイにて調べたところ、添加 48, 72, 96 時間後に、コントロール群に比べ有意な細胞数の増殖を認めた。また、マトリゲルコートカルチャーインサート(8mm pore)を用いた細胞浸潤アッセイでは ILT1(100 ng/mL)添加 72 時間後に、コントロール群に比べ、有意な浸潤細胞数の増加は認めなかった。

以上のことから、IL-11 はヒト肝内胆管癌の増殖因子になりうる可能性があることが考えられた。

血管新生能に関する実験は行うことができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	末岡 英明 (Sueoka Hideaki) (20419831)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究分担者	須藤 誠 (Sudo Makoto) (40415427)	兵庫医科大学・医学部・ポストドクター (34519)	
研究分担者	藤元 治朗 (Fujimoto Jiro) (90199373)	兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授 (34519)	
研究分担者	波多野 悦朗 (Hatano Etsuro) (80359801)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	岡本 共弘 (Okamoto Tomohiro) (00567208)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------