

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870846

研究課題名(和文) IL-13R 2を標的とした膵臓癌転移抑制と生命予後の延長

研究課題名(英文) Development of the new therapeutic approach targeting IL-13Ralpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究代表者

藤澤 聡郎 (Fujisawa, Toshio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50627346

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)：ヒト膵臓癌の切除検体を用いてIL-13Ralpha2の発現と生命予後の関係を検討した。国内2施設の膵臓癌切除標本、計236検体におけるIL-13Ralpha2の発現を評価したところ、IL-13Ralpha2の高発現群で生命予後の短縮が見られた。またIL-13Ralpha2の発現と腫瘍の神経浸潤との相関を認め、IL-13Ralpha2が神経浸潤を促進している可能性が示唆された。

また緑茶に含まれるEpigallocatechin gallate(EGCG)は膵臓癌細胞においてIL-13Ralpha2の発現を抑制し、膵臓癌モデルマウスに対してEGCGを投与することにより宿主の生存期間を延長した。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationship between the expression of IL-13Ralpha2 and survival time using the surgically resected samples of pancreatic cancer. Totally, 236 samples were examined, and they indicated that IL-13Ralpha2-high expresser showed significantly short survival time. Furthermore, IL-13Ralpha2 could enhance invasion to the nerve, because the expression of IL-13Ralpha2 showed strong correlation with the perineural invasion. Then, we examined the cancer therapy targeting IL-13Ralpha2. Epigallocatechin gallate (EGCG) included in the green tea suppressed the expression of IL-13Ralpha2 in the pancreatic cancer cells. Orally administered EGCG extended the survival time of the host in the model mouse of pancreatic cancer.

研究分野：胆膵癌の治療

キーワード：IL-13Ralpha2 膵臓癌 浸潤 転移 生命予後 ポリフェノール 神経浸潤 HAT阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は固形癌のうち、最も予後が悪い癌の1つであり、その理由として発見が困難、早期より転移を認めるといった特徴が挙げられる。近年の画像診断、治療の進歩により治療成績は改善しているものの5年生存率は未だ10%以下である。全世界的にも膵臓癌の研究は固形癌に対する研究の中で Top priority であり、多額の予算が組まれている。今回の研究において、膵臓癌における Interleukin-13 receptor  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) の発現と予後との関係、そして治療ターゲットとしての IL13R $\alpha 2$  の可能性を検討する。

(1) IL13R $\alpha 2$  と膵臓癌: IL13R $\alpha 2$  は IL-13 receptor を構成する subunit で、380 アミノ酸からなる1回膜貫通型膜たんぱく質である。IL13R $\alpha 2$  は単独で IL-13 と高い affinity を示し、IL-13 と結合すると internalization を起こす。細胞内ドメインが短く以前は酵素活性を持たない decoy receptor と考えられていたが、近年細胞内 signal に直接関与することが明らかになっている (Fichtner-Feigl et al. Nat Med. 2006)。脳腫瘍をはじめとする癌細胞特異的に発現しており癌特異抗原として注目されている。膵臓癌においては mRNA、蛋白レベル共に約 60% の検体で高発現していた (Shimamura et al. Clin Cancer Res. 2010)。

(2) 癌転移と IL13R $\alpha 2$  との関係: はじめに乳癌細胞において IL13R $\alpha 2$  が癌の転移を促進しており、その発現の低下は転移を抑制することが示された (Minn et al. Nature 2005)。この知見に基づき研究代表者が膵臓癌細胞を用いて IL13R $\alpha 2$  と膵臓癌転移の関連性に関して検討を行った。ヌードマウスを用いた膵臓癌異種同所移植モデルにおいて IL13R $\alpha 2$  の過剰発現が転移を促進することにより予後を短縮し、発現低下が転移を抑制して予後を延長ことが明らかになった (図 1)。またその機序として MAP kinase を介した matrix metalloproteinase の増加が転移を促進すると考えられた (Fujisawa et al. Cancer Res. 2009)。IL-13PE は IL-13 と緑膿菌の菌体外毒素 (pseudomonas exotoxin) のキメラ蛋白であり IL13R $\alpha 2$  をターゲットとした癌治療薬として開発された。その IL-13PE を膵臓癌担癌マウスに投与すると、膵臓癌細胞における IL13R $\alpha 2$  の発現は減少し、転移の抑制、生存期間の延長が認められた (Fujisawa et al. Int J Cancer 2011)。

(3) IL13R $\alpha 2$  発現の制御: IL13R $\alpha 2$  遺伝子は X 染色体上に位置しておりその promoter region も明らかになっている。研究者は膵臓

癌における IL13R $\alpha 2$  の発現のメカニズムを genomics と epigenomics の両面において解析を行った。結果、膵臓癌細胞と正常細胞では塩基配列に差はなく、IL13R $\alpha 2$  高発現株において promoter lesion における Histon のアセチル化が高度であり、IL13R $\alpha 2$  陽性細胞における IL13R $\alpha 2$  の発現が AP-1 転写因子の活性と同様の動きを示した。IL13R $\alpha 2$  陰性細胞に Histone deacetylase inhibitor (HDACI) を投与すると IL13R $\alpha 2$  の発現が上昇し IL-13PE への感受性も向上した (Fujisawa et al. J Transl Med. 2011)。しかしこれらはヒト膵臓癌細胞株やマウスモデルを用いた研究であり臨床サンプルを用いたヒトでの研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

これまでマウスモデルを用いた動物実験が主であったが、本研究は臨床医の立場でこれまでの動物実験で得られた知見を臨床に応用する試みである。これまでに得られた動物実験の結果から今回の研究結果を予測すると、IL13R $\alpha 2$  の発現が強い膵臓癌では比較的早期から遠隔転移がみられ、予後が悪いと推察される。逆に IL13R $\alpha 2$  の発現が弱い癌では転移が遅く、予後は比較的保たれると考えられる。本研究では、

研究目的 臨床サンプルを用いて膵臓癌における IL13R $\alpha 2$  の発現が腫瘍の転移、患者の生命予後との関連性を調べる。

研究目的 IL13R $\alpha 2$  の発現を意図的に調節することにより転移を抑制し生命予後を改善できるか検討する

以上の2つの点を明らかとするのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

研究目的 に関して

横浜市立大学を中心とした関連病院群 (横浜市立大学医学部付属病院、NTT 東日本関東病院、都立広尾病院) において過去 10 年間に手術切除され経過が追えた膵臓癌患者を匿名化してリストを作成する。病理標本から未染色のプレパラートを作成し IL13R $\alpha 2$  の免疫染色、in situ hybridization を行い蛋白、RNA レベル両方での発現を確認する。古い検体ではパラフィンが劣化しており一定の基準を設けて再包埋してからプレパラートを作成する。IL13R $\alpha 2$  の発現は最低 1 人の病理専門医を含む経験豊富な臨床医 3 人が独立して評価を行い、blind 化された検体を 0~3+ までの 4 段階に区分する。最終評価は 3 人の平均を用いるが評価が大きく異なった場合は 3 人で話し合い評価を確定する。すべての検体の評価が定まった後に blind 化を終了し、臨床データと合わせて IL13R $\alpha 2$

の発現と転移の状態、生命予後、その他の因子を統計学的に解析する。

#### 研究目的 に関して

これまでの研究で IL13R $\alpha$ 2 の promoter lesion における histone のアセチル化が IL13R $\alpha$ 2 の発現に大きくかかわっていることがわかっており、ヒト膵臓癌細胞株を移植したヌードマウスに HDACI を投与すると腫瘍における IL13R $\alpha$ 2 の発現が増強される。今回の実験では HDACI とは逆の作用を持つ Histone acetyltransferase inhibitor (HATI) や IL13R $\alpha$ 2 の転写因子として重要な c-jun の阻害剤を膵臓癌細胞、担癌マウスに投与して IL13R $\alpha$ 2 の発現の低下、転移の抑制、マウスの生命予後の延長を確認する。具体的には

#### In vitro

1. 薬剤の毒性のチェック: IL13R $\alpha$ 2 高発現のヒト膵癌細胞 (HT766T, MIA-PaCa-2 等) を用いて MTT assay 等にて毒性の出現しない薬の有効濃度を確認する。
2. IL13R $\alpha$ 2 発現抑制の確認: 薬の有効域における IL13R $\alpha$ 2 の抑制効果を上記細胞を用いて real-time qPCR、western blotting にて RNA、蛋白両レベルで確認する。
3. ヒストンアセチル化の確認: Chromatin immunoprecipitation にて IL13R $\alpha$ 2 promoter 領域のみ抽出し realtime-qPCR にて Histone のアセチル化状態の変化を定量する。
4. 遊走能、浸潤能への効果: Wound healing assay, Marigel invasion assay 等を用いて薬剤の膵臓癌細胞に対する遊走能、浸潤能の抑制効果を検討する。

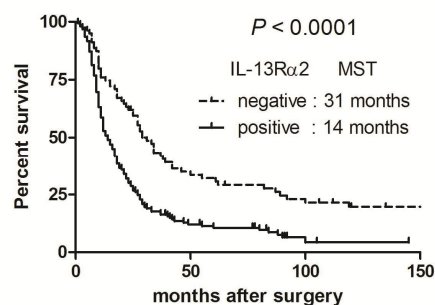
#### In vivo

5. 動物モデルでの転移、予後の検討: ニードマウスの膵臓に上記ヒト膵臓癌細胞を移植し異種同所移植モデルマウスを作製する。マウスに薬剤を投与し一定期間観察した後、副作用の有無、転移の状態を検討する。さらにマウスの生命予後も Kaplan-Meier 法にて検討する。特に副作用の検討は重要であり、マウスの行動、体重、食事、水分摂取量の変化を詳細に観察し、適宜採血により肝機能、腎機能等をモニターする。
6. 腫瘍における IL13R $\alpha$ 2 発現の変化: 薬剤を投与後マウスより腫瘍を取り出し IL13R $\alpha$ 2 の発現低下を RNA、蛋白レベルで確認する。同時に histone のアセチル化の状態も検討する。

## 4. 研究成果

#### 研究目的 に関して

最終的に NTT 東日本関東病院と横浜市立大学医学部附属病院の2施設より、1996年から2012年の間に施行された膵臓癌手術検体計236検体の IL13R $\alpha$ 2 の発現と生命予後を検討した。約65%の膵臓癌で IL13R $\alpha$ 2 が高発現(2~3+)していた。236検体をまとめて解析しても、各施設別々に解析しても IL13R $\alpha$ 2 の高発現群で生命予後が有意に短縮していた。



さらに IL13R $\alpha$ 2 の発現と相関する因子を検討したところ、膵外神経叢浸潤、膵内神経浸潤とともに IL13R $\alpha$ 2 低発現群に比べ高発現で有意に多く浸潤を認めた。IL13R $\alpha$ 2 は glioblastoma などの神経系悪性腫瘍に特に強く高頻度で発現していることがわかっており IL13R $\alpha$ 2 と神経浸潤の親和性が予想される結果であった。

本研究の結果は現在、英文誌に投稿中である。

#### 研究目的 に関して

今まで臨床応用されていない新規薬剤ではヒトに対する安全性が確保できておらず、臨床適応に関して、多くの基礎実験、安全性試験が必要であり、実用化までの時間が長くなってしまふ。そのため既に臨床薬として使用されている薬剤、もしくは食品として投与可能なものを IL13R $\alpha$ 2 をターゲットとする薬剤として研究を行なった。ウコンの主成分である curcumin は Histone acetyltransferase inhibitor として IL13R $\alpha$ 2 の発現を抑制する可能性があるだけでなく、ポリフェノール類の一種として抗酸化作用を持つ。同様に食品に含まれるポリフェノール類として、緑茶の Epigallocatechin gallate (EGCG) や赤ワインの resveratrol などがあげられ、これらの薬剤を候補薬として実験を行なった。結果 EGCG がもっとも強く膵臓癌細胞中の IL13R $\alpha$ 2 の発現を最も抑制したため、EGCG を中心に膵臓癌に対する抗腫瘍効果を検討した。

*in vitro*での検討では EGCG 投与により marigel に対する invasion が減少した。*In vivo*の検討では、膵臓癌モデルマウスに対して EGCG を連日経口投与することにより、宿主の生存期間を延長する傾向がみられた。しかし同時に EGCG 投与により体重減少や食思不振の副作用が観察された。この結果を踏まえて、今後は副作用対策や薬剤を変更して、

IL13R $\alpha$ 2を更に強力に抑制し、抗腫瘍効果の強く、副作用の少ない薬剤を検討中である。本研究は上記のような問題点を解決して論文として投稿する予定である。

#### <引用文献>

1. Fichtner-Feigl et al. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nat Med.* 2006;12(1):99-106
2. Shimamura et al. Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor  $\alpha$ 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):577-86.
3. Minn et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005;436(7050):518-24.
4. Fujisawa et al. A novel role of interleukin-13 receptor  $\alpha$ 2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2009;69(22):8678-85.
5. Fujisawa et al. Targeting IL-13R $\alpha$ 2 in human pancreatic ductal adenocarcinoma with combination therapy of IL-13-PE and gemcitabine. *Int J Cancer.* 2011; 128(5):1221-31.
6. Fujisawa et al. Histone modification enhances the effectiveness of IL-13 receptor targeted immunotoxin in murine models of human pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2011;9:37

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 1件)

1. 藤澤聡郎 30年後の膵臓癌治療—免疫療法を中心とした集学的治療—、治療 2015;97(6):858-862
2. Joshi BH, Suzuki A, Fujisawa T, Leland P, Varrichio F, Lababidi S, Lloyd R, Kasperbauer J, Puri RK. Identification, characterization, and targeting of IL-4 receptor by IL-4-Pseudomonas exotoxin in mouse models of anaplastic thyroid cancer. *Discov Med.* 2015;20(111):273-84.
3. Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell

carcinoma. *BMC Cancer.* 2014 Mar 11;14:173.

##### [学会発表](計 2件)

1. 藤澤聡郎、中島淳、松橋信行 膵臓癌における IL13R $\alpha$ 2 の予後規定因子と治療標的としての可能性 第102回日本消化器病学会総会 2016年4月21日東京
2. Toshio Fujisawa, Takeshi Shimamura, Joshi H. Bharat, Raj K. Puri. Overexpressed Interleukin-13 Receptor  $\alpha$ 2 Shorten Survival Time in Surgically Resected Pancreatic Cancer Patients. SITC (The society for immunotherapy of cancer) 2015 annual meeting. 2015年11月4日 Washington D.C. USA

##### [図書](計 0件)

なし

##### [産業財産権]

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

##### [その他]

ホームページ等

なし

##### 6. 研究組織

###### (1)研究代表者

藤澤 聡郎 (FUJISAWA, Toshio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50627346

###### (2)研究分担者

なし

###### (3)連携研究者

なし

###### (4)研究協力者

中島 淳 (NAKAJIMA, Atsushi)

横浜市立大学・医学部・教授

PURI, Raj,K

US Food and Drug Administration

Center for Biologics Evaluation and

Research Organization

Department director