

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08707

研究課題名(和文)膵がんの浸潤過程に関わるInterleukin-32の役割とその発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of Interleukin-32 involved in the invasive process of pancreatic cancer and its expression mechanism.

研究代表者

井村 穰二 (Imura, Johji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80316554

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)：膵癌の予後不良を規定する易浸潤性を制御する因子を探る目的で研究を行った。ヒト由来膵癌細胞株から高浸潤性細胞株を樹立し、発現が亢進している遺伝子の中からIL-32を見出し、浸潤性に関与しているか否かを確認した。siRNAでのノックダウンでは浸潤性が減弱し、浸潤性を認めなかった細胞株で強制発現させると浸潤性を獲得することを見出した。さらに、膵癌組織では、正常膵管で認めなかったIL-32が腫瘍細胞で発現を認め、特に浸潤先進部で増強していた。次に、IL-32によって制御される因子としては数種類が上げられた。

以上、IL-32は炎症性のみならず、膵癌の浸潤性に関わる重要な因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最近、死亡率が増加の一途を辿っている。何故に、膵癌が予後不良なのか？その原因は数々あるが、特に膵癌は容易に周辺臓器に浸潤し易く、手術不能となることも要因である。では、なぜに易浸潤性なのか？浸潤を制御している機構や分子はどのようなものがあるのか？それらを明らかにすることが本研究の目的である。まず、浸潤性の高い細胞を作成し、これらで高発現している分子の中からIL-32を見出した。さらに、IL-32を減少させると浸潤性が減弱し、亢進させると浸潤性を増すことを確認した。また、IL-32によって制御を受ける分子も明らかにした。今後、IL-32と共に、他の分子を抑制するような創薬にも繋がる研究である。

研究成果の概要(英文)： This study was performed to investigate the invasiveness regulating factors that defines poor prognosis for pancreatic cancer. First, a highly invasive cell was established from the human-derived pancreatic cancer cell lines. IL-32 has been highly enhanced among several genes to expression. Furthermore it was confirmed whether IL-32 was involved in invasiveness. It was found that the invasiveness was inhibited by siRNA for IL-32, and the invasiveness was obtained when IL-32 was forcibly expressed in non-invasive cell. In pancreatic cancer tissues, the expression of IL-32 was not appeared in normal pancreatic ducts, was expressed in tumor cells, and it was particularly enhanced in the infiltrating area. The factors regulated by IL-32 were involved E-Cadherin, MMP4, 14-9, Thrombospondin 1, Slug, BMP4 and etc.

From the above, it was suggested that IL-32 may be an important factor involved not only in inflammation but also in the invasiveness of pancreatic cancer.

研究分野：病理学

キーワード：膵癌 浸潤 IL-32

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は主要な死に至る癌であり、罹患数は世界中で増加傾向にある。診断や治療に関する進歩はあるものの、膵癌と診断された者の 5 年生存率は極めて低い。ではなぜに膵癌は予後不良なのか？膵臓が深部臓器であるが故に、症状が現れ難く、早期発見が難しいことが挙げられる。しかも、顕性化した段階では周囲臓器への浸潤や転移を伴っていることも多く、手術可能な症例が少ない。さらに膵臓癌の生物学的特性は特徴的である、周囲の間質量が豊富、即ち Desmoplastic change が高度であるのに対し、膵癌細胞は容易に硬い間質内を浸潤している特徴を有している。浸潤性を獲得するにはがん細胞のもつ運動性や周囲の硬い間質を破壊する性質を有していなければならない。では、この浸潤性を制御している因子は何なのか？これを探ったのが本研究である。

2. 研究の目的

これまでの浸潤性に関する研究では、特定の因子の発現と浸潤性を比較検討するものが多かったが、特定するまでには、多くの時間と労力を有する。従って、浸潤性を制御する因子を網羅的に解析する手段として、高浸潤性の細胞を樹立し、この細胞で高発現している因子を特定することが得策である。本研究ではまず高浸潤性の細胞を樹立し、網羅的な遺伝子解析を行い、関与する因子を見付けることとした。そして、関与する因子が直接的に浸潤に関わるか、また、他の分子と共同して浸潤を制御するかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料

用いた材料はヒト膵癌由来細胞株 (KP-1N、Panc-1、AsPC-1、KP-3、BxPC-3、TCC-PAN2、MIA-PaCa) と手術によって摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋切片: FFPE である。

2) 高浸潤性細胞活の樹立

Matrigel Invasion Assay 法を応用して、高浸潤性細胞をサブクローン化した。具体的には Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion chamber (Corning, NY, United States) を用い、各細胞株を上層の Chamber に播種し、Matrigel と膜を通過し下層の Chamber に落下した細胞を回収、再度上層 Chamber に播種する作業を 4 回繰り返し、最終的に落下した細胞を以下の実験に用いた。

3) 浸潤能の測定

xCelligence system (ACEA Biosciences, San Diego, CA, United States) を用い、経時的浸潤細胞の変化を定量化し、浸潤能を測定化した。

4) 網羅的遺伝子解析

元の細胞と共に 4 回パッセージした細胞より RNA を抽出、³ IVT PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific) により cRNA を合成、これを Human Genome U133 Plus 2.0 Array と Hybridization Oven 640 と Scanner 3000 7G と Command Console Software 3.1 (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific) により発現遺伝子を網羅的に解析した。

5) RT-PCR による検証

網羅的遺伝子解析により亢進が確認された遺伝子について、RT-PCR による個別の mRNA 発現量を半定量的に解析した。

6) 蛋白発現

各細胞から蛋白を抽出し、亢進を確認した遺伝子の産物に対する特異抗体を用い、Western blotting 法により、発現の有無を半定量的に解析した。

7) siRNA 及びノックアウトによる浸潤性の変化

IL-32 に対する特異的 siRNA と各種の IL-32 のスプライスバリエーションに共通する領域をノックアウトする抗生物質耐性ベクターを作成し、各細胞に遺伝子導入することで、浸潤能に変化を来すか検討した。

8) 強制発現系による浸潤性の変化

IL-32 の強制発現させる抗生物質耐性ベクターを作成し、低浸潤性の細胞に遺伝子導入することで浸潤能が上昇するか検討した。

9) 免疫組織化学的検索

IL-32 に対する特異抗体を用い、FFPE 切片に対し、免疫組織化学的方法を用い観察した。

10) 関与分子の特定

浸潤性あるいは IL-32 との関連性が示唆される分子を選択し、それらに対する特異抗体を用いて Western blotting 法による比較検討を行った。

4. 研究成果

1) 高浸潤性細胞活の樹立

4 回のパッセージにて、元の細胞と比較して明らかに浸潤性が亢進している細胞 (Panc-1, KP-1N, KP3, BxPC, Tcc-Pan2) 5 株が得られた。一方、AsPc-1, Mia-PaCa の 2 株は元の細胞では浸潤する細胞は少なく、パッセージでも浸潤性を増した細胞は得られなかった。

2) 網羅的遺伝子解析

網羅的遺伝子の解析により、38500 個の遺伝子の中から、高浸潤性細胞で共通して発現が亢進している遺伝子を探ったところ、多くの遺伝子が存在することが判明した。その中で、発現量に差が大きく、浸潤性との関わりが予測される *IL-32*, *ARHGDI1*, *PTX3*, *PCYT1B* を選択し、RT-PCR による検証を行った。各遺伝子とも有意に高浸潤性細胞で発現が亢進していることを確認した。

3) 高浸潤性細胞における IL-32 の発現亢進

RT-PCR の結果より、最も IL-32 が各細胞の高浸潤性細胞で共通して発現が亢進しており、さらに、Western blotting 法にて蛋白レベルでも発現が亢進していることを確認した。

4) 免疫組織化学

免疫組織学的に IL-32 の局在を観察したところ、正常膵組織とくに膵癌の発生源の多くである膵管での発現は認められず、膵癌細胞を主体に細胞質内に局在していることを確認した。さらに、浸潤先進部で、その傾向を増すことも認められた。

5) siRNA 及びノックアウトによる浸潤性の変化

IL-32 に対する siRNA を用いたノックダウン実験ならびに各 IL-32 スプライスバリエーションに共通する領域をノックアウトした細胞では、その浸潤性が減少していることを確認した。

6) 強制発現系による浸潤性の変化

IL-32の発現ベクターを浸潤性が殆ど認められなかったMIA-Paca2に遺伝子導入すると浸潤性を獲得することを確認した。

7) 関与分子の探索

高浸潤性細胞で発現に変化をしめす分子を探ったところ、IL-32をはじめとしてE-Cadherin、MMP4・14・9、Thrombospondin 1、Slug、BMP4が上げられ、さらにIL-32の発現を調節すると、これらの分子も変化することを確認した。

8) 考察

膵癌は近年、罹患率も上昇し、かつ他臓器に比して予後不良なことを反映して死亡率も増加の一途を辿っている。何故に膵癌が発生のみならず死亡率も増加しているのか、前者には諸説あるが、後者に関する研究は未だ途上段階にある。特に、膵癌の予後不良をもたらす原因には種々あり、例えば膵臓が深部臓器であるが故に、早期発見が難しく、症状を呈した場合には加療の適応範囲を超えている場合が多いことも一因とされる。一方、他臓器悪性腫瘍に比して膵癌の生物学的特性の一つとして、他ではあまり観られない腫瘍組織内での間質量の豊富さが上げられる。腫瘍細胞は浸潤性を獲得して、周囲への移動するのが浸潤現象であるが、この硬い間質の存在はむしろ逆の効果を招く可能性もある。しかし、膵癌細胞はこの硬い間質内を容易に浸潤していく点では、一部を除き、他臓器悪性腫瘍であまり観られない現象かもしれない。即ち、膵癌細胞は浸潤性に長けた生物学的機能を有していると言っても良い。ではこの易浸潤性を制御する機構や働く分子にはどのようなものがあるのか。多段階発癌過程の晩期現象である浸潤そして転移には様々な因子が関わっているものと思われる。本研究では、新たな方法を用い、この膵癌細胞における長けた浸潤性を制御する因子を同定することを目的とした。

これまでの浸潤性に関わる分子の研究は、まず予想させる因子を決め、その発現の有無で浸潤性に変化をもたらすかの検討が殆どであった。しかし、この方法では浸潤に関わる因子を特定するまでに、時間と労力を有する。数多くの関与因子から候補因子を探るにはまず、浸潤性に差がある細胞間で、発現に差異を認める分子を網羅的に同定することが目的とする因子に辿り着ける最も効果的は方法である。本研究ではMatrigel Invasion Assay法を応用して、まず高浸潤性細胞株をえた。多くのヒト由来腫瘍細胞株は単一な細胞由来とされるが、その後の変化として様々な生物学的特性を獲得する亜種が混在してとされる。一方では、化療に耐性な細胞や浸潤・転移性に長けた細胞などが種々の割合で混在していると思われる。その中から、今回の研究の目的である高浸潤性の細胞を得ることにより、これらの細胞で発現している分子を同定することが可能となる。

今回、得られた高浸潤性細胞で発現が亢進している遺伝子を網羅的に解析した結果、*IL-32*、*ARHGDI1*、*PTX3*、*PCYT1B*などが上げられた。その中でも、*IL-32*は他の遺伝子と比較しても、有意に高発現していることが判った。そこで、*IL-32*に関して研究を絞って検索を行った。まず、*IL-32*が直接あるいは間接的に、浸潤を制御しているかを検討した。まず、*IL-32*に対する特異的siRNAによるノックダウン、さらに、持続的に*IL-32*ノックアウト実験を行い、発現を停止させた細胞株で浸潤能を測定した。その結果、siRNAでも、ノックアウト細胞でも、高浸潤性細胞では浸潤性が減弱することが確認された。一方、殆ど浸潤性が認められなかった細胞株に*IL-32*を強制発現させると

浸潤性を獲得することが判った。これにより、IL-32 が浸潤性と密接に関連性があることを証明できた。さらにこの現象を裏付けるものとして、膵癌組織における IL-32 の発現の局在を免疫組織学的に探ったところ、正常組織では発現を認めず、腫瘍細胞にその発現を認め、さらに、浸潤先進部で、その傾向増すことを確認した。即ち、IL-32 は腫瘍化に伴い発現し、かつ腫瘍細胞の浸潤を促すものと考えられる。また浸潤性が活発な部分こそ、IL-32 の発現が高いことを説明していると考え。この結果からも、膵癌の浸潤に IL-32 が重要な因子として役割を演じていることが判った。

次に、IL-32 が単独に浸潤を制御しているのか？または IL-32 により制御を受ける因子が存在するか？この点を解明することから、IL-32 の発現の有無で影響を受ける因子を探った。その結果、細胞接着因子である E-Cadherin は IL-32 の発現低下によりその発現が復活し、同様に基底膜分解酵素の一部である MMP2・4 をはじめとして、Epithelial mesenchymal transition: EMT に関わる Slug、その他、Thrombospondin 1 や BMP4 も相互に関連している可能性が示唆された。未だ IL-32 に関するシグナル伝達に関する研究が進んでおらず、これらの分子との相互作用に関しては不明な点が多いが、今回の研究において、相互に関連性を有していることが判った。

今回、我々が見出した膵癌での IL-32 による浸潤性の制御機構を考える上で、課題もある。それは IL-32 には様々なスプライスバリエントが存在している。現在のところ、特定は出来ていないが、複数のバリエントが存在しているようで、その中でも浸潤と関わる可能性が存在している。今後は特定のバリエントが浸潤を制御していることが判った場合、それらに対する拮抗薬や分子標的治療薬などの創薬開発にも繋がるかもしれない。今後の研究課題と方向性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Hayakawa, C, Imura J (他 3 名, 3 番目). Bile cytology: A new scoring system for improving diagnostic accuracy. *Diagn Cytopathol*, 47; 641-7, 2019.
- 2) Kokaji E, Imura J, (他 7 名, 8 番目). Endoglin (CD105) and SMAD4 regulate spheroid formation and the suppression of the invasive ability of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*, 52; 892-900, 2018.

〔学会発表〕(計 2 件): 癌学会 2 件

- 1) Imura J, (他 7 名, 1 番目). Exploratory study for regulatory molecules expressed in pancreatic cancer cell lines showing various behaviors. 第 77 回日本癌学会学術集会, 2018.
- 2) 井村穰二, (他 6 名, 1 番目). IL-32 は膵癌における腫瘍細胞の浸潤を制御する, 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件): 出願予定

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

- (1) 研究分担者: 該当なし
- (2) 研究協力者: 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解

や責任は、研究者個人に帰属されます。