

氏 名 たかぎ こうじ
高木 康司

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 351 号

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

Elucidation of the factors regulating high invasiveness of
pancreatic cancer and the profound involvement of
Interleukin 32 in the invasive mechanisms of the tumor cells
(膵臓癌の高浸潤性を制御する因子の解明と腫瘍細胞の
浸潤機構におけるInterleukin-32の深い関与)

論文審査委員

(主査) 教授 笹原 正清
(副査) 教授 一條 裕之
(副査) 教授 藤井 努
(副査) 教授 安田 一朗
(指導教員) 教授 井村 穰二

論 文 要 旨

Elucidation of the factors regulating high invasiveness of pancreatic cancer
and the profound involvement of Interleukin 32 in the invasive mechanisms of the tumor
cells

氏 名 高木 康司

- 備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。
② A4 判とする。

〔目的〕

膵癌は極めて予後不良な癌であり、ごく早期の段階においても、腫瘍の浸潤や転移による病変が形成されうる。膵癌の生物学的特徴として、**desmoplastic response** と呼ばれる豊富な線維性間質を伴う点が挙げられる。この変化によって免疫細胞や抗癌剤の腫瘍細胞への到達が妨げられ、癌の生存に有利に働くと考えられる。一方で、浸潤や転移の過程においては、周囲の硬い間質が不利に働くことが予想されるが、膵癌細胞は容易に浸潤することが可能であり、膵癌の予後不良性を規定する重要な因子の一つと考えられている。膵癌細胞の高い浸潤性については、**Transforming growth factor beta** を含む様々なサイトカインの関与や、上皮間葉転換などの介在が想定されるが、未解明な点も多い。従来、浸潤性に関与する因子の検索は主に個々の遺伝子を対象として行われてきたが、多大な労力と時間を要するため、より簡便で包括的な手法が望まれる。

今回我々は、膵癌の高浸潤性をもたらす因子の解明を目的として研究を行った。まず、複数の高浸潤性膵癌株を樹立することで網羅的遺伝子解析を行うことを可能とした。続いて、候補遺伝子に対して発現解析を行い、特に **Interleukin-32 (IL-32)** が膵癌の浸潤性に深く関与する可能性があることを確認した。更に、同遺伝子のノックアウト系及び過剰発現系を作成し、浸潤性や発現遺伝子変化を評価した。

〔方法並びに成績〕

1. 高浸潤性膵癌株の樹立

6種のヒト膵癌細胞親株 (P) を用いて **Invasion Assay 法** を繰り返し行い、選択株 (S) を得た。各々の浸潤性について **xCelligence system** によるリアルタイム解析を用いて評価したところ、4種の膵癌細胞株において (S) が (P) よりも高い浸潤性を示し、残りの2種では浸潤性の変化が見られなかった。前者を高浸潤性株、後者を低浸潤性株とし、以降の実験を行った。

2. 網羅的遺伝子解析と発現解析

マイクロアレイ解析を行い、高浸潤性株 (S) で発現が亢進した多数の遺伝子を認めた。高い **Fold change** を示した複数の遺伝子に対して **real time PCR** による発現解析を行った所、特に **IL-32** において、高浸潤性株 (S) が有意差をもって高浸潤性株 (P) よりも高発現を示した。一方で、低浸潤性株では (S)、(P) いずれにおいても殆ど発現が見られなかった。**Western blot** にて **IL-32** は高浸潤性株 (S) のみに高発現を示し、また免疫組織化学的検討では、正常膵組織で殆ど発現を見ない一方で、膵癌組織、特

に浸潤先進部において高い発現を示す傾向が認められた。





3. IL-32 発現抑制系と過剰発現系の解析

膵癌高浸潤性株である Panc-1 に対し、*CRISPR/Cas9* を用いて *IL-32* 発現をノックアウトした系を作成したところ、浸潤性の著明な低下が認められた。対照的に、Panc-1 に対して pEBMulti-Neo vector を用いて *IL-32ε* の過剰発現系を作成したところ、浸潤性の亢進を認めた。これらの系において real time PCR による発現解析を行った所、複数の遺伝子発現変化が観察された。とりわけ、E-cadherin の発現は *IL-32* 発現と対照的な挙動を示した。即ち、低浸潤性細胞では E-cadherin 発現が保たれている一方で、高浸潤性細胞では発現がほぼ消失しており、これはタンパク発現レベルにおいても同様であった。E-cadherin の喪失は上皮間葉転換における重要な過程であり、*IL-32* が同機構を介して膵癌の浸潤性に寄与する可能性が示唆された。

[総括]

今回の研究では、ヒト膵臓癌細胞由来の複数の高浸潤性株を樹立することに成功し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析が可能となった。続いて、効率的に選出された候補遺伝子のうち、浸潤機構に深く関与すると想定される *IL-32* を特定した。実際に、*IL-32* の発現抑制系では浸潤性が低下し、過剰発現系では浸潤性が亢進したことは、これを裏付けるものと考ええる。更に、*IL-32* と対照的な発現を示す因子として E-cadherin が特定されたことから、*IL-32* の一つのシグナル経路として、上皮間葉転換の関与が推定された。*IL-32* は近年注目を集めつつある Interleukin で、様々な腫瘍との関連が明らかにされつつある。膵癌においても、正常組織と比較して発現が亢進していることが報告されているが、本研究によって *IL-32* が膵癌の浸潤性に深く関与することが示唆された。膵癌の進展機構の解明やその治療を考える上で、一つの重要な知見が得られたと考える。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	高木 康司
論文審査委員	職 名	氏 名	   
	(主査) 教授	笹 原 正 清	
	(副査) 教授	一 條 裕 之	
	(副査) 教授	安 田 一 朗	
(副査) 教授	藤 井 努		
指導 (紹介) 教員	井 村 穰 二		
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) Elucidation of the factors regulating high invasiveness of pancreatic cancer and the profound involvement of Interleukin 32 in the invasive mechanisms of the tumor cells [膵臓癌の高浸潤性を制御する因子の解明と腫瘍細胞の浸潤機構における Interleukin-32 の深い関与]			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
〔目的〕			
<p>膵癌は極めて予後不良な悪性腫瘍であり、ごく早期の段階においても、膵実質内あるいは周囲臓器に浸潤し易く、その結果、遠隔転移も高頻度に生ずる。膵癌の一般的な特徴として、desmoplastic reaction と呼ばれる豊富な線維性間質を伴う点が挙げられる。この変化により、腫瘍免疫に働く担当細胞や抗がん剤の腫瘍組織への到達が妨げられ、腫瘍細胞の生存に有利に働くと考えられる。しかし、一方で、浸潤や転移の過程においては、この周囲の硬い間質は不利に働くことも予想されるが、膵癌細胞は容易に浸潤しており、膵癌の予後不良性を規定する重要な因子の一現象と言える。膵癌細胞の高い浸潤性については、TGF-β を含む様々なサイトカインの関与や、上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) に関わる分子の介在が想定されるが、未解明な点も多い。この様に浸潤を規定する分子が未だ同定されていないのは、従来、浸潤性に関与する因子の探索に関する研究は、主に個々の遺伝子を対象として行われてきたが、多大な労力と時間を要するためであり、従って重要な役割を演じている分子を同定するには至っていない。そこで、高木氏は、複数の高浸潤性膵癌株を樹立し、これらの細胞で発現が亢進している分子を同定することを目的に、網羅的遺伝子解析を行った。次に、候補遺伝子に対してそれぞれの発現解析を行い、高浸潤性細胞で発現が亢進しているものを同定した。同定遺伝子に対して、Knockdown あるいは Knockout させた抑制系と、発現ベクターを導入させた過剰発現系を作成し、浸潤性への関与と関連する分子の同定を試みた。</p>			
〔方法並びに成績〕			
1.高浸潤性膵癌株の樹立			
6 種のヒト膵癌由来細胞親株 (PANC-1、AsPC-1、KP-3、BxPC-3、TCC-PAN-2、MIA PaCa-2) を用いてInvasion Assay法を応用し、Matrigel® 層および有窓膜を通過した細胞を回収、再度、この作業を繰り返すことで、浸潤性に優れた選択株 (S) を Sub clone 化し得た。各々の			

浸潤性については xCelligence system® によるリアルタイム解析を用いて評価した。4種の膵癌細胞株 (PANC-1、KP-3、BxPC-3、TCC-PAN-2) において (S) が (P) よりも高い浸潤性を示し、残りの 2 種では浸潤性の変化が見られなかった。前者を高浸潤性株、後者を低浸潤性株とし、以降の実験に用いた。

2.網羅的遺伝子解析と発現解析

網羅的遺伝子解析として、マイクロアレイ解析 (GeneChip® 3'IVT Express kit) を用い、高浸潤性株の元の親株 (P) に対し、これらから得られた Sub clone (S) で発現が亢進している遺伝子を探った。高いFold change を示した複数の遺伝子に対して、検証する目的で、(S) と (P) 細胞から得られたcDNAを基に real time PCR による発現解析を行った。発現が亢進している遺伝子の中でも、特に IL-32 は、(S) において有意差をもって (P) よりも高発現 (最大25倍) していた。一方で、低浸潤性株では (S)、(P) いずれにおいても IL-32 は殆ど発現の差異が認められなかった。高浸潤性株では、Western blot 法にて IL-32 が (S) のみに高発現した。免疫組織化学では、正常膵組織では、膵管並びに膵腺房細胞に IL-32 の発現を認めないが、膵癌細胞では細胞質内での発現が同定され、特に浸潤先進部において多くの腫瘍細胞に発現を示す傾向が認められた。

3.IL-32 発現抑制系と過剰発現系による解析

膵癌高浸潤性細胞株である PANC-1 に対して、IL-32 に対する選択的な siRNA 導入を用いた Knockdown および CRISPR/Cas9 による遺伝子編集を用いた Knockout 系を作成したところ、何れの処理とも、PANC-1 の浸潤性が著明に低下した。一方、殆ど浸潤しない MIA PaCa-2 に対し、pEBMulti-Neo vector を用いて IL-32の過剰発現系を作成したところ、浸潤性の獲得を認めた。さらに IL-32 により制御を受ける下流分子について、これまで浸潤性あるいは浸潤による一現象であるEMT 等に関わる分子について探った。その結果、複数の分子の遺伝子ならびに蛋白発現に IL-32 が発現調節していることを認めた。とりわけ E-cadherin の発現は IL-32 発現と逆相関の関係を示した。IL-32 はE-cadherinの発現を抑制し、EMTを促進することによって膵癌の高浸潤性を誘導する可能性が示唆された。

〔総括〕

膵臓癌は浸潤性が高い予後不良の悪性腫瘍である。本研究では、ヒト膵臓癌由来細胞株を用いて、高浸潤能を獲得する因子の同定とその作用機序を同定した。複数の膵癌の培養細胞から、高浸潤性を示すSub clone 株を樹立した。これらの、網羅的遺伝子解析により浸潤に関わる分子を同定した。特に、IL-32 の遺伝子及び蛋白は高浸潤性細胞株から得た高い浸潤性をしめす選択株で顕著に高発現した。IL-32 の発現抑制ないしは過剰発現実験から、IL-32 が当該選択株の浸潤性に関与することを機能的に明らかにした。IL-32 のシグナル伝達経路に E-cadherin が存在し、IL-32によりE-cadherin の発現が抑制される結果、上皮間葉転換を促し、高浸潤能が誘導されていることが推定された。

IL-32 は近年同定され、注目されつつある Cytokine であるが、一方で、様々な腫瘍との関連が明らかにされつつある。本研究によって IL-32 が膵癌の浸潤性に深く関わっていることを見出したことには新規性があり、膵癌の進展機構の一端を解明したものとして学術的重要性が高い。さらに、今後、分子標的薬の開発など、膵癌の治療分野など臨床への応用も図られる基盤ともなり得ることから臨床的発展性が期待できる。以上より本審査委員会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。