

論 文 要 約

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

〔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られた。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する。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。