

Title	Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer
Author(s)	山田, 大作
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59744">https://hdl.handle.net/11094/59744</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【125】

氏 名	やま だ だい さく 山 田 大 作
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 9 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer （胆道癌におけるインターロイキン -6 と TGF- $\beta$ 1 相互干渉による EMT と化学療法耐性の役割）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 森 正樹 （副査） 教 授 梅下 浩司 教 授 竹原 徹郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕胆道癌は局所浸潤や遠隔転移をきたした状態で発見されることが多く、さらに既存の抗癌剤による治療効果も十分ではないため、最も治療困難な癌の1つといわれている。胆道癌における浸潤・転移、抗癌剤耐性の機序を解明するために、われわれは上皮－間葉系転換（epithelial－

mesenchymal transition; 以下EMT) と呼ばれる変化について着目した。一般的に上皮系癌細胞は、組織・細胞特有の因子により間葉系転換を誘導され、浸潤・転移能を獲得し、さらに抗癌剤耐性を獲得すると考えられており、癌の進展経過においては、このようなEMT誘導因子に常時暴露されていると考えられる。他癌と比べ、胆道癌は炎症と密接に関与する癌であり、その臨床経過および併存する炎症より、EMT誘導因子としてインターロイキン-6(以下IL-6)とTGF- $\beta$  1が影響していると推察される。以上より、本研究においては胆道癌におけるEMT誘導と抗癌剤耐性に関わるIL-6とTGF- $\beta$  1の影響について検討した。

〔方法〕4つの胆道癌細胞株(MzChA-1, HuCCT-1, CCLP-1, KMCH)と胆管炎を伴う胆道癌20症例の切除標本を対象とした。細胞株におけるIL-6, TGF- $\beta$  1の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(以下qRT-PCR)とEnzyme-Linked Immunosorbent Assayで、各受容体の発現をqRT-PCRとウェスタンブロット法で調べた。EMTに関しては、細胞の形態変化、上皮系(E-cadherin)および間葉系マーカー(N-cadherin, Vimentin)の発現変化をqRT-PCRと細胞免疫染色を用いて検討し、方錐形への形態変化、上皮系マーカーの減少、間葉系マーカーの上昇をもってEMTが誘導されていると評価した。さらに、細胞の悪性能は浸潤能と抗癌剤耐性についてインベイジョンアッセイと薬剤感受性試験(ゲムシタビン)を用いて検討した。また、IL-6およびTGF- $\beta$  1の下流経路は、STAT3, Akt, Erk1/2, p38, Smad4に代表される。各蛋白の核移行を核蛋白のウェスタンブロット法を用いて調べ、下流経路の賦活を評価した。切除標本に対しては、免疫組織化学でIL-6, TGF- $\beta$  1, N-cadherin, Smad4の発現を検討した。

〔成績〕4つの細胞株全てにおいて、IL-6およびTGF- $\beta$  1受容体の発現を認めた。IL-6及びTGF- $\beta$  1の発現は細胞株間で差を認めた。他3つの細胞株と比べ、IL-6/TGF- $\beta$  1両者の有意な高発現を示した細胞株(HuCCT-1,  $p<0.01$ )では、EMT細胞を多く含み、浸潤能が高く、ゲムシタビン耐性が高く、いずれも統計学的有意差を認めた( $p<0.01$ )。残りの3細胞株に、リコンビナントIL-6、もしくはTGF- $\beta$  1の添加実験を行ったところ、全ての細胞株において同様に変化を示し、IL-6およびTGF- $\beta$  1の発現を増加し、EMTを誘導し、浸潤能を増強し、ゲムシタビン耐性を増強した。これらの変化にはいずれも統計学的有意差を認めた( $p<0.01$ )。一方、ゲムシタビン感受株(MzChA-1)から樹立したゲムシタビン耐性株(MzChA-1<sub>GR</sub>)では、親株と比べIL-6及びTGF- $\beta$  1の発現・分泌が有意に上昇しており、有意に多くのEMT細胞を含んでいた( $p<0.01$ )。以上から、胆道癌においてIL-6とTGF- $\beta$  1は相互干渉の関係にあり、この相互干渉はEMT及び抗癌剤耐性と密接な関係にあることが示された。IL-6とTGF- $\beta$  1の主要下流経路(STAT3, Akt, Erk1/2, p38, Smad4経路)に対し、各特異的阻害剤を用いて評価したところ、Smad4経路阻害剤のみ、IL-6もしくはTGF- $\beta$  1の添加によって誘導される全ての主要蛋白核移行を阻害した。MzChA-1<sub>GR</sub>に対するSmad4のノックダウン実験では、阻害剤と同様に全ての下流経路賦活を阻害した上に、IL-6とTGF- $\beta$  1の発現を有意に低下し、EMT細胞を有意に減少させ、抗癌剤耐性を有意に減弱した( $p<0.01$ )。臨床検体では、19例(98%)で癌部におけるIL-6, TGF- $\beta$  1の発現を認め、浸潤部で増強していた。更に、浸潤部の癌細胞は、膜部でN-cadherinの強発現を(14例:70%)、核内でSmad4の強発現を(12例:60%)示した。臨床検体の所見は、IL-6及びTGF- $\beta$  1を多く含む胆汁の暴露によって、原発巣の胆道癌がSmad4を介したIL-6とTGF- $\beta$  1の相互干渉を引き起こし、EMTしつつ胆管内に浸潤したものと考えられた。

〔総括〕IL-6及びTGF- $\beta$  1は相互干渉しつつEMTと抗癌剤耐性を胆道癌に誘導していた。この相互干渉における主要な経路はSmad4を介しており、この機序の解明が新たな治療標的になりうる可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

胆道癌における上皮－間葉系転換(epithelial－mesenchymal transition; 以下EMT)の機序を明らかにし、胆道癌に対する新たな治療標的の探索を行った。

EMT制御関連因子の内、胆道癌の臨床経過と密接に関係する炎症性サイトカインであり、予後とも関連するIL-6とTGF- $\beta$  1に着目した。切除標本及び細胞株を用いて検討し、胆道癌はIL-6とTGF- $\beta$  1を共に発現しているだけでなく、それぞれの分子の暴露により、互いを産生する相互干渉の関係にあることを示した。また、これらの分子がEMTおよび薬剤耐性を誘導していることを示した。一方、抗癌剤耐性株を樹立し検討した結果、耐性株ではIL-6及びTGF- $\beta$  1を強発現し、EMTが誘導されていることを示した。続いて、IL-6及びTGF- $\beta$  1に各阻害剤を用いて検討し、相互干渉に関する主要な経路はSmad4経路である事を示した。さらに、Smad4の制御によりIL-6, TGF- $\beta$  1の発現、EMT, 薬剤耐性が減弱することを示した。

本研究によって、胆道癌ではIL-6とTGF- $\beta$  1が相互干渉することで、Smad4を介してEMT、化学療法抵抗性を誘導していることを証明し、この経路が胆道癌に対する新たな治療標的になりうるということが初めて明らかとなった。

この内容は学位の授与に値すると考えられる。