

氏名・(本籍)	酒井利隆 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第864号
学位授与の日付	平成26年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	The roles of interferon regulatory factor (IRF) 1 and IRF2 in the progression of human pancreatic cancer (膵臓がんの進展における IRF1 および IRF2 の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 山田 祐一郎 (副査) 教授 後藤 明輝 教授 田中正光

## 学位論文内容要旨

The roles of interferon regulatory factor (IRF) 1 and IRF2 in the progression of human pancreatic cancer.

(膵臓がんの進展における IRF1 および IRF2 の役割)

申請者氏名 酒井利隆

### 研究目的

膵臓がんは最も悪性度の高い癌の一つである。近年、膵臓がんの診断方法や治療の選択肢に若干の進歩がみられるものの、早期の状態で診断することが困難なことや、浸潤傾向が強いことなどから、生存率や中央生存値は改善されているとは言い難い。膵臓がんの腫瘍形成には種々の遺伝子異常が関わっていると考えられ、次に挙げるインターフェロン(IFN)調節因子(Interferon regulatory factor, IRF)もその一つと考えられる。

IRFは転写因子の一つであり、現在ヒトではIRF1から9までの9つの因子から成るファミリーを形成している。IRFはIFN誘導遺伝子の発現制御領域に結合してその転写を調節し、IFNによる細胞応答を制御することによって感染防御や免疫反応、細胞の成長調節に大きく関与している。

IRF1はIRFの中で一番初めに発見された因子である。IRF1はIFN- $\gamma$ 誘導遺伝子等のプロモーター領域に結合し、主に正の方向に転写を調節する。結果として、ウイルス感染した細胞の成長を妨げ、アポトーシスを誘導することにより生体の防御などの役割を果たす。IRF2はIRF1のアンタゴニストとして働き、IRF1の標的遺伝子の転写を抑制することが多いことから、ネガティブフィードバックとして働いていると考えられる。さらにIRF1とIRF2は癌抑制遺伝子や癌遺伝子としての機能も有すると考えられている。線維肉腫細胞や悪性黒色腫細胞、肺がん細胞において、IRF1の発現の低下とIRF2の発現の増加を認め、それが腫瘍の悪性度に関わっていることが示されている。一般的にはIRF1は癌抑制遺伝子として、IRF2は癌遺伝子として働いているとされる。最近、我々はIRF2が急性膵炎の発症に関与する因子であることを明らかにしたが、膵炎は膵臓がん発生の危険因子でもある。

今回、膵臓がんと正常膵組織におけるIRF1とIRF2の発現、及びその発現が膵臓がん細胞に及ぼす影響について検討した。

### 研究方法

秋田大学医学部附属病院にて外科的切除を行った膵臓がん45症例(男性:24、女性:21;年齢42-89(68.1 $\pm$ 10.2))について、IRF1, IRF2の発現を免疫組織化学的に検討し、その臨床病理学的特徴を解析した。またヒト膵臓癌由来細胞株であるPANC-1細胞を用い、コントロール細胞(PANC-1/Cont)、IRF1過剰発現細胞(PANC-1/IRF1)、IRF2過剰発現細胞(PANC-1/IRF2)、不活性型IRF2過剰発現細胞(PANC-1/dnIRF2)を作成し、細胞増殖(細胞数、BrdU取り込み、Western Blot)、アポトーシス(Western Blot、TUNEL)、抗癌剤であるGemcitabine(GEM)への反応性(MTT assay)について検討した。

### 研究成績

免疫組織学的染色によるスコアリングにおいて膵臓がん組織では、正常の膵組織と比較してIRF1の発現が低下し、IRF2の発現が増強していた(p<0.001)。また臨床病理学的には、IRF1の発現が強いほど腫瘍の進展度が低く(p=0.027)、腫瘍径が小さく(p=0.001)、生存期間も長かった(p=0.046)のに対し、IRF2の発現が強いほど腫瘍の進展度が高い(p=0.022)という結果であった。PANC-1細胞において、経時的に細胞数をカウントし、またBrdU取り込みを比較するとPANC-1/IRF2は他の細胞と比べて細胞増殖が亢進していた(p<0.01)。Western blotでも、PCNA、Cyclin-D1等の細胞増殖に関わる因子がPANC-1/IRF2において亢進していた。それに対し、PANC-1/IRF1ではアポトーシス関連因子であるBAXが亢進していた。TUNEL法において、アポトーシス細胞数の割合を比較するとアポトーシスはPANC-1/IRF2で抑制、PANC-1/IRF1で亢進していた(p<0.05)。GEM存在下のMTT試験における細胞活性はPANC-1/IRF1、PANC-1/dnIRF2で有意に減少したが(p<0.05)、PANC-1/IRF2では逆に減少が抑制された(p<0.05)。

### 結論

IRF1とIRF2の発現は膵臓がんの臨床病理学的特徴と相関し、IRF1は腫瘍形成を抑制する方向に、IRF2は促進する方向に関係していた。また、膵臓がん細胞において、IRF2の発現は細胞増殖を亢進し、アポトーシスを抑制し、GEMへの抵抗性を示し、IRF1は逆の結果を示した。膵臓がんにおいてIRF-1は癌抑制遺伝子、IRF-2は癌遺伝子として働いており、これらは膵臓がん治療の新たな標的となりうると考えられた。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：山田祐一郎

申請者：酒井 利隆

論文題名：The roles of interferon regulatory factor (IRF) 1 and IRF2 in the progression of human pancreatic cancer. (膵臓がんの進展における IRF1 および IRF2 の役割)

## 要旨

膵臓がんは最も悪性度の高い癌の一つであり、生存率が改善されているとは言い難い。著者の研究は、論文内容要旨に示すように、膵臓がんの腫瘍形成には様々な遺伝子が関与しているが、インターフェロン誘導遺伝子等のプロモータ領域に結合する転写因子である **interferon regulatory factor (IRF) 1** と **IRF2** に着目し、膵臓がんと正常膵における発現やヒト膵臓がん由来細胞株への強制発現などによって、**IRF1** が癌抑制遺伝子、**IRF2** が癌遺伝子として働く可能性を明らかにしたものである。また、抗癌剤である **gemcitabine** の反応性から **IRF1** と **IRF2** が新たな膵臓がん治療の標的となりうることを示した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

膵臓がんは最も悪性度の高い癌の一つであり、**K-Ras** や **p16** など様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子が関与している。**IRF2** が急性膵炎の発症に関与することを示す申請者のグループの研究を進展させ、**IRF1** と **IRF2** の膵臓がんへの関与を、次の検討で明らかにした。すなわち、秋田大学医学部附属病院で外科的切除を行った膵臓がん 45 症例の膵臓がん組織では、正常の膵組織と比較して **IRF1** の発現が低下し **IRF2** の発現が増強したことや **IRF1** の発現が強いほど腫瘍の進展度が低く生存期間も長いが、**IRF2** の発現が強いほど腫瘍の進展度が高いことを示した。また、ヒト膵臓がん由来細胞株に **IRF1**、**IRF2**、あるいは不活性型 **IRF2** を発現させると、**IRF2** 発現細胞では細胞増殖が亢進するのに対し、**IRF1** 発現細胞ではアポトーシスが亢進することを示し、膵臓がんにおいて **IRF1** が癌抑制遺伝子、**IRF2** が癌遺伝子として働く可能性を明らかにしたことに斬新さがある。

## 2) 重要性

膵臓がんは、早期の状態で診断することが困難で、浸潤傾向が強いことなどから、現在でも生存率が改善されているとは言い難い。また、gemcitabine などいくつかの抗癌剤が臨床応用されているが、十分な効果を発揮していない。本研究では、gemcitabine 投与で、IRF1 発現細胞では細胞活性が減少したが、IRF2 発現細胞では細胞活性の減少が抑制されることを示した。IRF1 が癌抑制遺伝子、IRF2 が癌遺伝子として働くことも考え合わせ、これらの発現や機能を調節することが膵臓がん治療の新たな標的となることを示した点が重要である。

## 3) 実験方法の正確性

外科的切除を行った組織標本を、ブラインドで免疫組織学的に IRF1 や IRF2 発現細胞の陽性率でスコア化し、臨床情報との相関を検討したこと、ヒト膵臓がん細胞株に IRF1、IRF2、あるいは不活性型 IRF2 を遺伝子導入し、細胞増殖やアポトーシス、ならびにそれに関連する蛋白の発現量の検討したこと、さらに、抗癌剤である gemcitabine 投与による生存率の変化をみた検討を行っている。ヒト組織標本の解析は倫理委員会で承認を得て、患者から文書での同意を得て行なわれており、得られた結果は的確に統計学的検討が行われており、正確性があると考えられる

## 4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決に向けた、研究目的、方法、実験結果、考察を明瞭に記載している。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。