

主論文の要旨

**Therapeutic potential of targeting protein for  
Xklp2 silencing for pancreatic cancer**

〔Targeting protein for Xklp2 を抑制することによる膵癌治療への可能性〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

三輪 知弘

## 【緒言】

膵癌は消化器領域の悪性腫瘍の中で最も予後不良なうちのひとつである。近年、様々な化学療法や分子標的療法が開発されているが、未だ十分な効果を示すものはない。

Targeting protein for Xklp2 (TPX2) は、ヒト染色体 20q11.1 上の遺伝子にコードされ、細胞分裂における微小管形成や細胞周期の進行、DNA 損傷の修復に関わるとされる蛋白である。これまで多くの悪性腫瘍において過剰発現が報告され、その異常発現が発癌過程へ関与すると考えられているが、詳細な機序は明らかでない。今回の研究では、膵癌における TPX2 の発現の解析、発現抑制による治療への可能性を評価した。また、膵癌の進行過程に対する TPX2 の関与の研究として、TPX2 と腫瘍内血管新生の関係を評価した。

## 【対象及び方法】

1. ヒト膵癌組織と膵癌細胞株における TPX2 の発現をそれぞれ RT-PCR、ウェスタンブロットティング法で解析した。ヒト膵癌組織は、膵手術で採取した膵組織 28 例を使用し、膵癌細胞株は 7 つの cell line (KLM1, KP4, Panc1, PK45H, PK8, PK9, MIAPaca2) を使用した。それぞれ正常膵組織、正常膵細胞株 (ACB RI515) と比較した。
2. 3 種類の TPX2siRNA (1-3) 導入により TPX2 発現を抑制した。発現抑制によるヒト膵癌細胞 (KLM1, KP4, Panc1) に対する細胞増殖抑制効果を、トリパンブルー染色、MTT 試験により評価した。siRNA はエレクトロポレーション法で導入した。
3. ノードマウス皮下発癌モデルに対して TPX2 siRNA 局所投与の抗腫瘍効果を検討した。ノードマウス (BALB/C ♂ 8 週齢) 大腿皮下にヒト膵癌細胞 KLM1 を移植し、3 群 (PBS、control siRNA、TPX2siRNA) に分類。形成された腫瘍局所にそれぞれ 2 回/週×3 週間投与し、腫瘍体積を比較した。
4. 上記の動物実験で得られた腫瘍組織の組織学的検討をした。抗 CD34 抗体免疫染色により腫瘍内の血管新生数を比較した。続いて腫瘍組織の protein array により血管新生因子の発現解析を行った。Protein array で得られた結果より、血管新生因子である Insulin-like growth-factor binding-protein-3 (IGFBP-3) に対する invitro の実験を行なった。膵癌細胞株 KLM1 に対して、siRNA 導入により TPX2、IGFBP-3 の発現をそれぞれ単独で抑制した細胞株、TPX2 と IGFBP-3 をいずれも抑制した細胞株を作成し、それらと未処置の膵癌細胞株、合計 4 群間で MTT 試験により細胞増殖を比較した。

## 【結果】

1. RT-PCR 法による TPX2mRNA 発現の比較では、ヒト膵癌組織では正常膵組織よりも高発現していた (Fig. 1A :  $12.4 \pm 2.5$  VS  $1 \pm 0.7$ )。ウェスタンブロットティング法による TPX2 蛋白の発現の比較では、ヒト膵癌細胞株では正常膵細胞株よりも高発現していた (Fig. 1B)。
2. TPX2 siRNA 導入により、3 種類の膵癌細胞株の増殖はいずれも約 60% 前後まで抑

制された (Fig. 2A、Fig. 2B)。

3. 皮下発癌モデルにおいて TPX2 siRNA 投与群では腫瘍増殖抑制を認め (Fig. 3A)、組織内における TPX2 の発現は抑制されていた。

4. 組織学的検討では、TPX2 siRNA 投与群において腫瘍内の抗 CD34 抗体陽性血管新生数の有意な減少を認めた (Fig. 4A)。Protein array による血管新生因子の解析では、TPX2 siRNA 投与群で IGFBP-3 の発現亢進を認めた (Fig. 4B)。KLM1 に対して、TPX2、IGFBP-3 それぞれ単独、IGFBP-3 と TPX2 両方を抑制した細胞株、未処置の細胞株、の 4 群間の細胞増殖の比較では、細胞数は IGFBP-3 単独 > 未処置 > TPX2 + IGFBP-3 両方 > TPX2 単独の順であった (Fig. 4C)。

### 【考察】

TPX2 は、これまで膵癌、大腸癌、食道癌、膀胱癌、肝細胞癌などにおいて過剰発現が報告され、その抑制による細胞増殖抑制効果が報告されている。今回の実験では、膵癌組織、膵癌細胞株において TPX2 の過剰発現を確認した。我々は、TPX2 の発現を抑制することが、膵癌治療へとつながる可能性があると考え今回の実験を計画した。その結果、*invitro* の実験では膵癌細胞株における細胞増殖抑制効果を認め、さらにヌードマウスにおける動物実験でもその抗腫瘍効果を証明した。過去の報告では、TPX2 を抑制した膵癌細胞をマウス皮下に移植し、その増殖が抑制されることを示したものがあがるが、今回の我々の報告では形成された腫瘍に対して siRNA を投与することで抗腫瘍効果を示した。これは、単に腫瘍形成のメカニズムの解明ではなく、臨床的応用への可能性を示す結果であるといえる。動物実験で得られた切除組織における組織学的検討において、TPX2 siRNA 投与群では腫瘍内の抗 CD34 抗体陽性の血管新生が抑制されていた。悪性腫瘍の癌化、細胞増殖、転移などの形成において、血管新生は不可欠な過程である。一般的に膵癌は乏血性の腫瘍と言われるが、膵癌においても血管新生は不可欠であり、膵癌と血管新生因子との関連も多数報告されている。そのため、他の悪性腫瘍で既に臨床応用されているように、膵癌治療に対しても血管新生の抑制が標的となりえると考えた。Protein array による血管新生因子の解析では、TPX2 siRNA 群において IGFBP-3 の増殖を認めた。IGFBP-3 は、血管新生抑制、細胞増殖抑制、転移抑制、アポトーシス促進作用などが報告されている。そこで我々は、TPX2 の抗腫瘍効果の少なくとも一部には IGFBP-3 が関与していると考えた。これまでに TPX2 と IGFBP-3 の関連は報告されていない。TPX2 の発現抑制による抗腫瘍効果は、細胞分裂の正常な進行を妨げることにより細胞増殖を抑制することが主な経路とされているが、今回我々が報告した IGFBP-3 と関連して血管新生抑制作用を示すことは新しい発見である。今回の実験は、TPX2 が膵癌治療の新しい標的となりえることを示した。TPX2 を抑制することで IGFBP-3 の発現が亢進することが、膵癌の増殖と血管新生に関して少なくとも部分的には関与していることが示唆された。今後の実験で、より詳細な機序の解明と、臨床応用への道を探りたい。

**【結語】**

今回の実験で、膵癌において TPX2 の発現を抑制することで治療へつながる可能性が示唆された。TPX2 を抑制することにより IGFBP-3 の発現が亢進することが、膵癌の増殖と血管新生に関して少なくとも部分的には関与していることを示した。