

【要約】

Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity  
in pancreatic cancer progression

(上皮可塑性を調節する Grainyhead-like 2 の膵癌進展に及ぼす影響)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：大塚将之教授)

西野 仁恵

## 【目的・背景】

膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、手術や化学療法など治療法の進歩にも関わらず、膵癌の5年生存率は低く、原発巣の根治切除が出来た膵癌患者群においても未だ20～25%である。また、膵癌は全身への転移再発率が非常に高い。その原因は、膵癌の原発巣からの癌浸潤及び全身への癌細胞の播種が非常に早い段階で起こることにあると考えられている。膵癌遺伝子改変マウスモデルでは、前癌病変（PanIN）の段階からすでに膵癌の circulating tumor cells (CTCs) が血中に浸潤・播種していることが証明されている。膵癌の予後を改善するためには、膵癌細胞が早期に浸潤し転移を形成するメカニズムを分子レベルで解明する必要がある。

我々は、癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)及び間葉上皮転換(mesenchymal-epithelial transition: MET)に注目した。同一の細胞が上皮系細胞から間葉系細胞に移行する現象を EMT、間葉系細胞から上皮系細胞に移行する現象を MET と呼ぶ。癌細胞は、EMT もしくは MET を起こすことで、癌進展における様々な環境で有利な細胞形態・形質に変化し、癌浸潤から転移形成を来すメカニズムに寄与するとされる。EMT 及び MET を制御する各種の制御因子が知られているが、その一つに Grainy-head like 2 (GRHL2) があり、EMT を抑制する転写因子であることがすでにわかっている。GRHL2 は元来、発生の分野で神経管閉鎖や創傷治癒、表皮バリアの形成などに関わることで知られていた。GRHL2 の作用機序として、TGF- $\beta$  から ZEB1 を介した EMT を促進するカスケードを抑制することが解明されているが、その他の EMT・MET 制御因子との関与など未だ研究段階である。GRHL2 の癌進展における機能的役割は、乳癌、大腸癌、胃癌などで研究されてきたが、膵癌の進展における機能的役割については未だ報告がない。そこで、本研究は、膵癌における GRHL2 の生物学的機能、特に転移形成に及ぼす影響の解明を目的とした。

## 【方法】

ヒト膵癌細胞株 (PANC-1、BxPC-3、MIA PaCa-2、AsPC-1、Hs 766T、CFPAC-1)、ヒト膵上皮細胞株 (HPDE)、マウス膵癌細胞株 (KC、KPC1、KPC2、KPC1Liv、KPC2Liv) を用いた *in vitro* での細胞実験を行った。各細胞株における GRHL2、E-cadherin、Vimentin の発現を Western blotting 及び qRT-PCR で調べた。次に、二種類の siRNA により GRHL2 発現を knockdown したヒト膵癌肝転移細胞株 (CFPAC-1) を用いて、3D organotypic culture、Cell proliferation assay、Gemcitabine cytotoxicity assay、Pancreatosphere formation assay、Anoikis assay、Flow cytometry analysis (CD133) を行い、膵癌細胞における GRHL2 の機能を検討した。

また、膵癌切除標本 155 例に用いて、GRHL2、E-cadherin、Vimentin、CD133 の発現性を免疫組織化学分析により検討した。それぞれの免疫染色結果は、staining intensity により評価し、高発現・低発現の二群に分類した。

## 【結果・考察】

ヒト膵癌膵癌細胞株の Western blotting、qRT-PCR では、正常膵上皮細胞株 (HPDE) 及び肝転移細胞株 (CFPAC-1) において、GRHL2 が高発現を示した。HPDE と CFPAC-1 においては E-cadherin も高発現であった。一方、膵癌原発巣の細胞株 (PANC-1、BxPC-3、MIA PaCa-2) において、GRHL2 は低発現を示した。マウス膵癌細胞株の Western blotting では、PanIN 細胞株 (KC) 及び肝転移細胞株 (KPC1Liv、KPC2Liv) において GRHL2 及び E-cadherin が高発現であった。膵癌原発巣における癌細胞は、EMT を起こし移動・浸潤能を持った間葉系細胞様に変化しており、一方、膵癌転移巣では癌細胞が MET を起こし、再び上皮系細胞に変化し増殖能を得て colonization を起こすと言われている。つまり、Western blotting と qRT-PCR において、膵癌原発巣の細胞株で GRHL2 が低発現であり、膵癌肝転移の細胞

株では GRHL2 が高発現であった結果は、E-cadherin 高発現していた点とあわせて、GRHL2 が膵癌細胞の上皮化と関連している可能性を示唆するものと考えられた。

更に、GRHL2 が膵癌細胞の上皮可塑性の維持に機能的役割を果たすかを検証するため、GRHL2 高発現のヒト膵癌肝転移細胞株 CFPAC-1 を用い、同細胞の GRHL2 を二種類の siRNA で knockdown した。Knockdown 効率は Western blotting によって、二種類の siRNA により GRHL2 発現及び E-cadherin が顕著に抑制されることを確認した。これらの細胞を用い、まず 3D culture を行ったところ、CFPAC-1 の control cell で spheroid cyst の形態を持つ上皮系細胞が多数を認めたが、二種類の siRNA で GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 においては、間様系細胞に特徴的な spindle shaped cell や irregular cyst が control cell と比較し、有意に増加した。同じ CFPAC-1 を用いた Cell Proliferation assay では、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 では、細胞増殖能が Control の CFPAC-1 と比較し有意に低下した。以上より、GRHL2 は形態的にも、機能面でも CFPAC-1 の上皮系の形質の維持に関与することが示唆された。更に、Gemcitabine cytotoxicity assay を行ったところ、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 は control cell の CFPAC-1 と比較し、ゲムシタビンの細胞毒性への抵抗性が有意に増強した。一般に、癌細胞は EMT のプロセスを経て間様系細胞に変化することで薬剤抵抗性が増強することが知られる。Gemcitabine cytotoxicity assay の結果は、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 では EMT が起き間様系細胞が増加することにより、Gemcitabine に対する薬剤抵抗性が増したことによる結果であり、GRHL2 が EMT を抑制し上皮化の方向に働くことを支持する結果と考えられた。

次に、GRHL2 の cancer stemness への関与を検討した。Pancreatosphere formation assay では、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 における sphere 形成能は control cell の CFPAC-1 と比較し有意に低下した。よって、GRHL2 が in vitro での CFPAC-1 の自己複製能の維持に関与が示唆された。Anoikis assay でも同様に、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 が

control cell の CFPAC-1 と比較し、anoikis 抵抗性が有意に減弱していた。Anoikis 抵抗性は近年、cancer stemness の一要素と考えられている。GRHL2 が CFPAC-1 の自己複製能と anoikis 抵抗性の維持に関与することが示されたことは、GRHL2 が CFPAC-1 の cancer stemness の獲得に関わることを示唆する。そこで更に、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 および control cell の CFPAC-1 について、cancer stemness の細胞表面マーカーである CD133 発現を検討した。Flow cytometry analysis により CD133 陽性数を比較したところ、GRHL2 を knockdown した CFPAC-1 は control cell の CFPAC-1 と比較し、CD133 陽性細胞数は有意に低下した。この結果からも、GRHL2 の膵癌転移細胞株における cancer stemness への関与が示唆された。

最後に、当院における膵癌切除標本における GRHL2 の発現を免疫染色により検討した。膵癌の膵切除検体 155 例では、GRHL2 高発現 (100 例)、GRHL2 低発現 (55 例) に分類された。GRHL2 発現と E-cadherin 発現、もしくは CD133 発現の間には、正の相関を認めた。前述した in vitro の実験では、GRHL2 が膵癌細胞の上皮可塑性および stemness の維持に関与することが示されたが、免疫染色結果における GRHL2 と E-cadherin 及び CD133 発現との相関性は、in vitro で示された GRHL2 の機能的役割と合致する結果であった。また、膵癌の肝転移切除標本 7 例における GRHL2 の発現性も免疫染色によって検討すると、7 例はすべて GRHL2 高発現であった。同 7 例において、対応する原発巣切除標本における GRHL2 発現の強弱に関わらず、GRHL2 高発現を示したことから、GRHL2 が膵癌の転移形成に関与している可能性が考えられた。

## 【結論】

GRHL2 は膵癌細胞の上皮可塑性を制御し、cancer stemness を維持する機能を持つことが示された。GRHL2 の機能により、膵癌転移形成が促進される可能性が示唆された。