

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19930

研究課題名(和文)胃癌におけるProx1の役割と分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism and role of PROX1 in gastric cancer

研究代表者

植田 康司(ueta, koji)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00750960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌細胞MKN45において、PROX1の発現を確認し、siRNAを用いてPROX1を抑制する系を確立させた。PROX1を抑制した胃癌細胞では、細胞の形態に異常は認めなかったが、浸潤能・増殖能・遊走能ともに低下していた。臨床研究においても胃癌に対し根治手術を施行した99例をPROX1で免疫染色を行い、強陽性群(n=43)と弱陽性群(n=56)に分類し、後方視的に検討し予後の解析を行った。PROX1強陽性群では弱陽性群に比べて、リンパ節転移・癌進行度・脈管浸潤の有無に有意差をもって高かった。また、生存期間の分析では生存率、無再発生存期間において、強陽性群で有意に低い傾向であった。

研究成果の概要(英文)：In human gastric cancer cell MKN45, we confirmed the expression of PROX1 and established a system that suppresses PROX1 with siRNA. In gastric cancer cells that suppressed PROX1, there was no abnormality in the morphology of the cells, but both invasion, proliferation and migration were decreased. In clinical research, 99 patients who underwent curative surgery for gastric cancer were immunostained with PROX1. We classified into a strongly positive group (n = 43) and a weakly positive group (n = 56), and retrospectively examined and analyzed prognosis. In the PROX1 strongly positive group, there was a significant difference in the presence or absence of lymph node metastasis, cancer progression, vascular invasion compared to the weak positive group. In the analysis of survival time, the survival rate and relapse - free survival time tended to be significantly lower in the strongly positive group.

研究分野：食道胃腸外科

キーワード：胃癌 PROX1 MKN45

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療薬の登場によって、がんの治療は大きく進歩を遂げてきた。分子標的治療薬とは、例えばがん細胞特異的に細胞増殖能を抑制する薬剤であり、従来の殺障害性の抗がん剤に比べて比較的副作用が少ないと言われている。中でも、進行大腸癌に対する薬物療法の進歩は著しく、様々な治療薬の出現によって生命予後の改善が見込まれている。一方で、胃癌分野においては、大腸癌に比べるとその選択肢は少なく、新たな分子標的薬の開発による生命予後の改善が期待される。

Prox1 はリンパ管内皮細胞の発生・分化に必須のホメオボックス転写制御因子である。大腸癌や食道癌では、ヒトがん組織検体中に PROX1 が過剰発現している場合に、予後不良であることが分かってきた。一方で、肝細胞癌に由来する培養細胞株において siRNA により Prox1 を抑制すると腫瘍増殖能が亢進したことから、腫瘍増殖抑制に関与するという逆の可能性を示唆する報告がある。これらのことから、がんにおける Prox1 の役割は現在注目されているが、その作用機序についてはまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト胃癌検体・胃癌細胞株培養を駆使して、胃癌分野における PROX1 発現とがん細胞増殖・がん悪性度・がん微小環境との関連性を解明することを目的とする。In vitro ではヒト胃癌細胞 MKN45 を用いて siRNA による PROX1 の抑制する系を確立させ、癌細胞の増殖能や浸潤能を解析する。また、臨床研究においては、手術検体を PROX1 で免疫染色を行い、後方視的に検討し臨床病理学的因子による予後の解析をすることで、PROX1 と胃癌との関連性を明らかにする。これらによって得られる成果は、Prox1 が及ぼすがんの浸潤・転移の分子機構での解明と、Prox1 が新たな腫瘍マーカーや治療戦略の標的分子となり得る可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

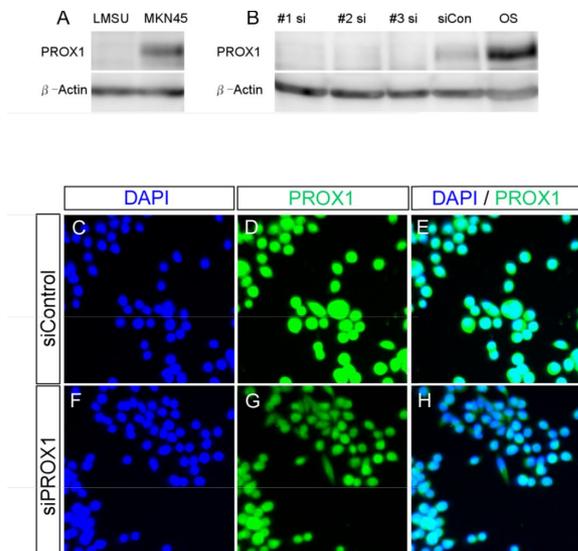
(1)ヒト胃癌細胞で PROX1 の発現による増殖能、浸潤能、遊走能を解析する。
ヒト胃癌細胞 MKN45 で siRNA を用いて PROX1 の発現レベルを抑制させた。発現レベルの確認は免疫染色、western blotting で確認する。
増殖能は Luminescence ATP Detection assay、浸潤能は Cytoselect™ assay、遊走能は Scratch assay で確認する。

(2)臨床研究において、ヒト胃癌検体を PROX1 で免疫染色し解析を行う。
2011年1月から2012年12月までに神戸大学病院で、胃癌に対し根治手術を施行した99例を PROX1 で免疫染色を行った。PROX1 の発現強弱を細胞数で振り分け、強陽性群(n=41)と弱陽性群(n=58)に分類し、後方視的に検討し臨床病理学的因子による予後の解析を行った。生存期間の解析では、統計ソフトとしては EZR を用いた。Kaplan-Meier 法にて logrank 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とし解析を行った。

4. 研究成果

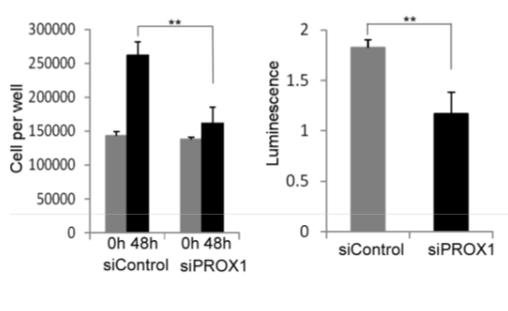
(1)ヒト胃癌細胞セルライン MKN45 における PROX1 発現の有無

ヒト胃癌細胞のセルラインで PROX1 の発現の有無を確認した。胃癌の低分化型細胞である MKN45 細胞では PROX1 の発現を認め、siRNA による抑制を行った。PROX1 の蛍光免疫染色と western blotting で発現の低下を確認した。別の胃癌細胞でリンパ節転移後の LMSU 細胞では、PROX1 の発現が認められなかったため、mProx1、hPROX1 の遺伝子を組み込んだプラスミドをそれぞれ作成し、過剰発現させて実験を行った。

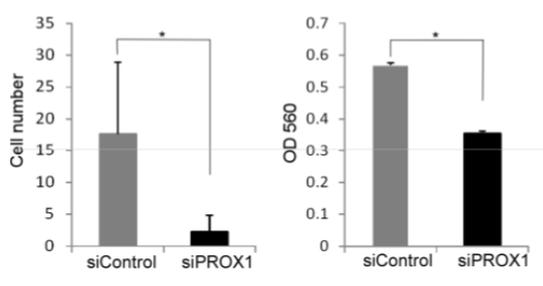


(2)MKN45 細胞で PROX1 を抑制させると、がん増殖能・浸潤能・遊走能が低下する。MKN45 細胞を siRNA で PROX1 の発現を低下させ、コントロール群と細胞機能について解析を行った。それぞれ、増殖能、浸潤能、遊走能ともコントロール群に比べて siPROX1 群で低下を認めた。PROX1 を過剰発現させた LMSU 細胞では、コントロール群と比べて上記細胞機能には有意差を認めなかった。

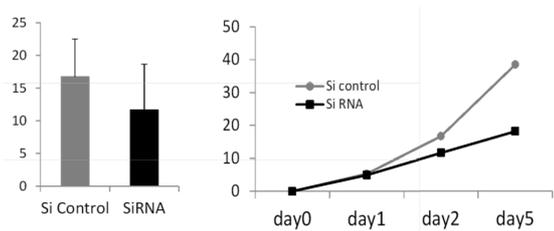
< Invasion assay >



< Prolifration assay >



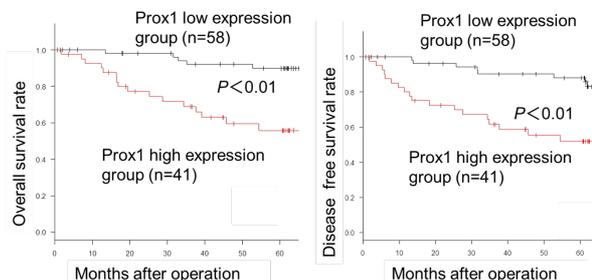
< Migration assay >



(3)胃癌において PROX1 の発現レベルとがん悪性度・予後とは相関する。

2011 年 1 月から 2012 年 12 月までに神戸大学病院で、前治療を行っていない胃癌に対し根治手術を施行した 99 例を PROX1 の免疫染色で強陽性群 (n=41) と弱陽性群 (n=58) に分類し比較した。腫瘍学的因子では、リンパ節転移の有無、がんの進行度、血管・リンパ管浸潤の有無の項目で、強陽性群が有意に高い傾向であった。その他、年齢や性別については有意差を認めなかった。

生存期間の解析では、強陽性群 vs 弱陽性群で 5 年生存率が 55.7% vs 89.8%($p < 0.01$)、無病生存率が 52.1% vs 88.1%($p < 0.01$)と優位に強陽性群で予後が不良であった。また、全生存率の単変量解析では PROX1 の発現レベルと同様に有意差を認めたものは、性別、リンパ節転移の有無、進行度、脈管浸潤の有無であった。多変量解析では全生存率に影響を与える因子として、PROX1 の発現レベル ($p=0.01$) が癌の進行度 ($p < 0.01$) の次に有意なものとして挙げられた。



<まとめ>

PROX1 は近年多種の癌において、その進行度や予後に相関を認めるという報告がなされている。胃癌においてその相関関係を解析したところ、in vitro では PROX1 の発現レベルに相関して細胞機能が低下することが、分かった。これは PROX1 が癌の促進因子の一つであることを示している。PROX1 を調節する因子として、sox18 や NF-kB、HOXD8、Coup-TFII 等が知られており、今後その下流因子や癌の微小環境下での PROX1 の調節因子を模索することで、さらなる癌と PROX1 の関係が明らかとなると考えられる。臨床研究でも、胃癌と PROX1 の発現レベルに相関関係を認め、PROX1 の発現が強いほど全生存率、無病再発率での予後は不良であることが分かった。今後、PROX1 の簡易的な検査が可能となれば、胃癌の新たな腫瘍マーカーの一つとなる可能性や、化学療法において分子標的の一つとなる可能性も考えられた。

<引用文献>

Liu Y, Zhang JB, Qin Y, et al.
PROX1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by way of up-regulating hypoxia-inducible factor 1alpha expression and protein stability. *Hepatology*.58(2):692-705(2013).

Schneider M, Buchler P, Giese N, et al.
Role of lymphangiogenesis and lymphangiogenic factors during pancreatic cancer progression and lymphatic spread. *Int J Oncol*.28(4):883-90(2006).

Yoshimoto T, Takahashi M, Nagayama S, et al.
RNA mutations of prox1 detected in human esophageal cancer cells by the shifted termination assay. *Biochem Biophys Res Commun*. 359(2):258-62(2007).

Akagami M, Kawada K, Kubo H, et al.
Transcriptional factor Prox1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma in esophageal cancer cells. *Ann Surg Oncol*.18(13):3868-77(2011).

Yokobori T, Bao P, Fukuchi M, et al.
Nuclear PROX1 is Associated with Hypoxia-Inducible Factor 1a Expression and Cancer Progression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma *Ann Surg Oncol*. 22(3):1566-73(2015)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植田 康司 (UETA KOJI)
神戸大学・医学研究科・医員
研究者番号 : 00750960

(2)研究協力者

平島 正則 (HIRASHIMA MASANORI)
神戸大学・医学研究科・准教授