

令和元年6月28日現在

機関番号：14401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2017～2018
 課題番号：17H06845
 研究課題名（和文）がん細胞由来尿中シェディング産物の網羅的検出を応用した胃癌バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Investigation of useful biomarker for gastric cancer using comprehensive detection of urinary shedding products derived from cancer cells.

研究代表者
 萩 隆臣（Hagi, Takaomi）
 大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50804465
 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）：文部科学省次世代がん研究戦略推進プロジェクトで得られたデータの中から、胃癌新規バイオマーカーを合計12種類同定した。その中からTrefoil factor 3 (TFF3)に着目し胃癌のバイオマーカーとしての有効性について検討した。切除検体を用いた免疫染色によるTFF3の発現解析では進行度や予後と相関を示した。また、胃癌患者において血清TFF3高値群では予後不良な結果を認めた。vitrolによる機能解析では、TFF3発現の抑制は腫瘍の増殖、浸潤を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 文部科学省次世代がん研究戦略推進プロジェクトで得られたデータの中から、胃癌新規バイオマーカーを合計12種類同定した。これらの蛋白の中からより癌との関連が深いと思われるものを選定し、胃癌手術により得られた腫瘍組織検体における発現量と臨床情報との相関について検討を行った。更に、臨床情報と照合することで新規バイオマーカーとしての有用性、さらには再発マーカーとしての有用性や治療効果判定における有用性についてもあわせて検討を行った。本研究により血清TFF3の発現が胃癌におけるバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Trefoil factor 3 (TFF3) is a small molecule secreted by the mammalian gastrointestinal tract and is overexpressed in some human malignant tumors. We investigated the prognostic values of immunohistochemical (IHC) TFF3 expression and serum TFF3 levels in patients with gastric cancer, and whether TFF3 influenced tumor proliferation and invasion in vitro. IHC TFF3 expression showed significant associations with depth of invasion, lymph node metastasis, and RFS. Serum TFF3 levels were correlated with IHC TFF3 expression. RFS was significantly poorer in patients with high compared to low serum TFF3 levels. In vitro assays, TFF3 down regulation significantly inhibited both proliferation and invasion of gastric cancer cells. Serum TFF3 levels could be useful prognostic markers in patients with gastric cancer. TFF3 may play various biological roles in proliferation and invasion of gastric cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 TFF3 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における死亡原因の一位は癌であり、中でも胃癌はもっとも罹患率が高い悪性腫瘍である。近年、検診の普及と内視鏡診断技術の向上に伴い、胃癌の早期発見の割合は増加し、根治が望めるようになってきた。しかしながら、今日においても進行した状態で発見される症例も多く、このような進行癌症例の予後は現在もなお不良であることから、有効な胃癌早期診断システムの開発が期待される。そのような背景の中、平成24年度より文部科学省次世代がん研究戦略推進プロジェクトの一環である、「がん細胞が特異的に生成するシェディング産物の網羅的解析によるがんの早期診断システムの開発」が開始され、当科もこれまで共同研究施設として参加してきた。当研究により、胃癌切除後に発現を低下する有力な新規バイオマーカー候補を合計12種類同定できた。しかしこれらの候補蛋白の胃癌バイオマーカーとしての有用性は不明なままである。

そこで同定された候補蛋白を対象にさらなる研究を行うこととする。候補蛋白の一つであるTFF(Trefoil factor)は分子量12~20kDの小さな分泌蛋白である。TFF1、TFF2、TFF3の3つのファミリー蛋白が存在し、それぞれ消化管粘膜の維持と修復機能の役割を担っていると考えられ、これまでに萎縮性胃炎の患者に多く発現しているという報告がある。TFFはその特徴的なS-S結合による分子の安定化により肝代謝を受けることなく尿中に排泄される蛋白である。つまり腫瘍より排出された尿中あるいは血中に存在するTFF発現量は胃癌の新たなバイオマーカーとなり得ることが示唆される。最近の報告ではTFF3は乳がんなどの細胞株においてIL8産生を介して微小血管新生を促す(Lau W, et al. Plos one 2015)、Twistを介した上皮間葉転換(EMT)を誘導するなどといった報告が散見されており癌細胞の増殖・浸潤に対して重要な役割を担っていると考えられさらなる研究が注目されている(Zheng Q, et al. BIOCHEM BIOPH RES CO 2013)。

2. 研究の目的

胃癌患者における尿中シェディング産物のペプチド断片を網羅的に解析することでTFFなどといった多くの新規胃癌バイオマーカー候補を同定できた。しかしこれらのバイオマーカー候補は限られた胃癌患者から得られた尿サンプルを解析した結果であり、臨床に則したものであるかどうかは依然不明である。このため早期診断や予後予測あるいは分子標的治療に応用できるかどうかを検討するために研究を行う。まず当院で保管する過去の胃癌切除検体を用いた腫瘍組織中のTFF蛋白の発現を確認したのち、胃癌患者と健常者ボランティアを対象に尿および血清を採取し、ELISA法にて尿中・血中のTFF蛋白発現量を測定し、臨床情報と照合することで新規バイオマーカーとしての有用性を検討する。また術後フォロー中あるいは化学療法中の蛋白発現量の推移を解析することで、再発マーカーとしての有用性や治療効果判定における有用性についても検討する。さらには胃癌細胞株に対しsiRNAやshRNAを用いたRNA干渉を行うことで細胞増殖や浸潤・転移における機能についてもあわせて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

当科で保存されている胃癌切除組織検体を用いてTFFの免疫染色を行い、蛋白発現を確認し、胃癌患者の血清および尿検体を用いてELISAを行い胃癌早期診断における感度・特異度を算出する。また健常者ボランティアから同意を得た上で採取・保管済みの尿および血清を用いた同様の解析を行う。さらに胃癌患者術後のTFF蛋白発現量の推移から再発マーカーとしての有用性を検討し、再発患者に対しては化学療法前後での蛋白発現量の推移を解析することで治療反応性との相関についてもあわせて検討する。また分子標的治療としての有用性を検討するためにin vitroとin vivoの実験についても並行して行う。In vitro研究では癌細胞株への遺伝子導入を用いた機能解析を行うこととし、当科が保管する胃癌細胞株(MKN45、AGS、NUGC3、KATO、OCUM1)癌細胞における各バイオマーカーのcDNA量をpPCRにて測定し、cDNA量を多く認めた細胞株に対してsiRNAあるいはshRNAの導入により標的バイオマーカーの発現を抑制させ、浸潤能や増殖能などの機能解析を予定する。In vivo研究ではNude mouseを用いた皮下腫瘍モデルと腹膜播種モデルを作成し、標的バイオマーカーの発現を抑制させた胃癌細胞株とControl細胞株の間で腫瘍の増殖速度や腹膜生着率について比較する。

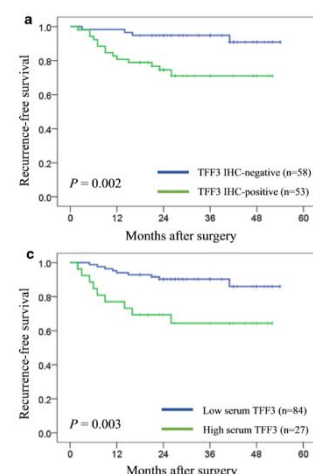
4. 研究成果

1) 胃癌組織および血清におけるTFF3発現と予後の相関

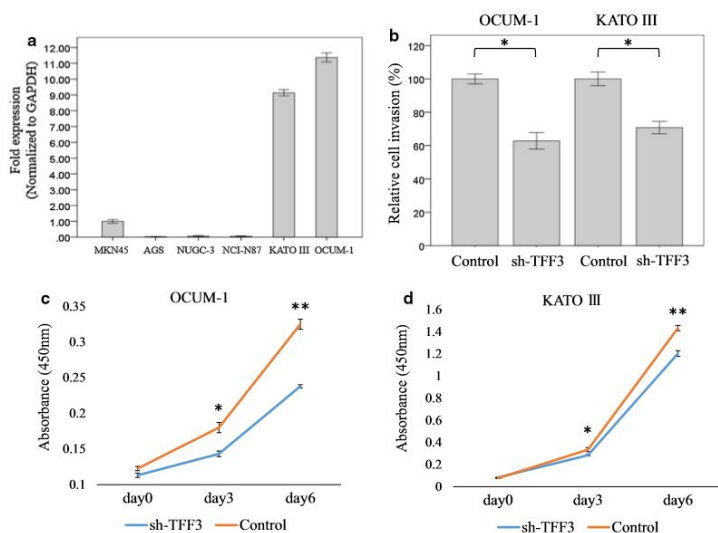
胃癌切除組織のTFF3免疫染色および胃癌患者の血清TFF3のELISA解析を行い、予後との相関について検討した。胃癌組織中のTFF3発現と無再発生存期間(RFS)との検討では、TFF3発現陽性群において陰性群と比較して有意に予後不良であった($P=0.002$ 、図a)。また、血清TFF3発現high群においてlow群と比較して有意に予後不良であった($P=0.003$ 、図c)。

さらに胃癌組織中のTFF3発現と血清TFF3発現は有意な相関関係にあった($P=0.013$)。

2) 胃癌細胞株におけるTFF3の発現抑制による機能解析



当科で保有する胃癌細胞株(MKN45, AGS, NUGC3, NCI-N87, KATO , OCUM-1)において TFF3 発現解析を行ったところ、KATO 、OCUM-1 において TFF3 の高発現を認めた(図 a)。KATO 、OCUM-1 において TFF3 のノックダウンを行ったところ、腫瘍の浸潤(図 b)および増殖(図 c,d)の抑制を認めた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshiki Taniguchi, et al. Prognostic Value of Trefoil Factor 3 Expression in Patients with Gastric Cancer. World J Surg 2018; 42:3997-4004. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。