

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591476
 研究課題名（和文） TGF- β シグナル伝達抑制によるスキルス胃癌進展抑制と治療への応用
 研究課題名（英文） The inhibitory effect on progression of scirrhus gastric carcinoma by blocking TGF-beta signal pathway
 研究代表者
 井上 透（Inoue Toru）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：60381985

研究成果の概要：スキルス胃癌細胞が粘膜下層に浸潤すると、線維芽細胞あるいはスキルス胃癌細胞産生する TGF- β により癌細胞の浸潤能が促進される。腹膜転移における腹膜への接着には、 $\alpha 2$, $\alpha 3 \beta 1$ -integrin が関与し、TGF- β はこれらの接着分子発現を増強する。このようなスキルス胃癌の進展様式において、TGF- β のシグナル伝達を抑制することでスキルス胃癌細胞の浸潤・接着能は抑制される事が示され、今後のスキルス胃癌治療における分子標的治療への展開が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：胃癌・シグナル伝達・TGF- β ・発現抑制

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦における主要な癌であり、近年の医学の進歩により治療成績の向上した癌の一つである。しかるにスキルス胃癌はいまだ予後不良な癌であり、治療成績向上の恩恵をほとんど受けていない。疫学的にも比較的若年者に多い癌であり治療の進歩が望まれている。我々のこれまでの研究成果によりスキルス胃

癌の広範な増殖進展に胃癌細胞周囲の線維芽細胞の産生する細胞増殖因子が関与していることを明らかにした。ことにスキルス胃癌細胞の浸潤能の亢進には線維芽細胞や胃癌細胞が産生する TGF- β が関わっていることが示唆されたことから、TGF- β は paracrine 的および autocrine 的に作用する重要なスキルス胃癌進展促進因子と考えられている。

2. 研究の目的

TGF- β はスキルス胃癌の原発巣および転移巣に強く発現しており、TGF- β の抑制はスキルス胃癌の進展を制御すると考えられる。そこで今回、TGF- β のシグナル伝達抑制によるスキルス胃癌の進展抑制の検討を研究目的とした。現在、多くの種類の悪性腫瘍性病変に対し、様々な分子標的治療が試みられ、実際に臨床の現場においてもその優れた治療効果が認められている。スキルス胃癌に対して、将来の分子標的治療への可能性を検討することを目的として、本研究を施行した。

3. 研究の方法

(1) TGF- β signal 伝達抑制に有効な SiRNA を作成し、当科で樹立したスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 に対する TGF- β によるスキルス胃癌細胞の浸潤促進作用への抑制効果を検討する。SiRNA によるノックダウンのターゲットとする遺伝子として、SMad2 遺伝子および TGF- β type II receptor 遺伝子を選択した。

① 当科で樹立したスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の培養系へ SMad2 遺伝子に対する SiRNA を添加し、SMad2 mRNA 発現抑制効果を RT-PCR にて確認する。

② スキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の培養系に TGF- β type II receptor 遺伝子に対する SiRNA を添加し、その発現抑制効果をフローサイトメトリーにて確認する。

③ Double chamber を用いた invasion assay を用いて SMad2 遺伝子の発現を抑制する SiRNA の培養系への添加によるスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の浸潤能抑制効果を検討する。

④ Matrigel、Laminin、Fibronectin、腹膜中皮細胞を用いた接着試験を行い、SMad2 遺伝子の SiRNA の培養系への添加によるスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の接着能抑制効果に

つき検討する。

⑤ 接着抑制効果に関して、SMad2 遺伝子の SiRNA によるスキルス胃癌細胞に発現する接着因子 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ -インテグリンの mRNA 発現抑制効果を RT-PCR 法にて検討する。

(2) TGF- β の作用を抑制する生体内物質である Decorin を用いたスキルス胃癌細胞の浸潤抑制効果を検討した。Double chamber を用いた invasion assay を用いて、Decorin 添加によるスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の浸潤能抑制効果を検討する。

4. 研究成果

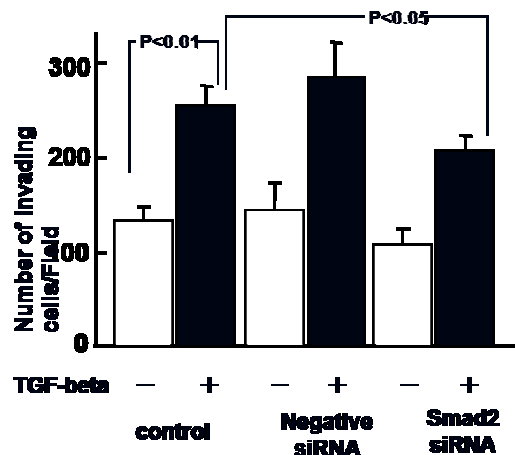
(1) スキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 への Smad2 の SiRNA

(Sense, 5' -GUCCCAUGAAAAGACUUAAtt-3' ;
Anti-sense, 5' -UUAAGUCUUUCAUGGGACTt-3')
の添加 (30nmol/L) により、スキルス胃癌細胞 Smad2 mRNA 発現を 86% 抑制した。



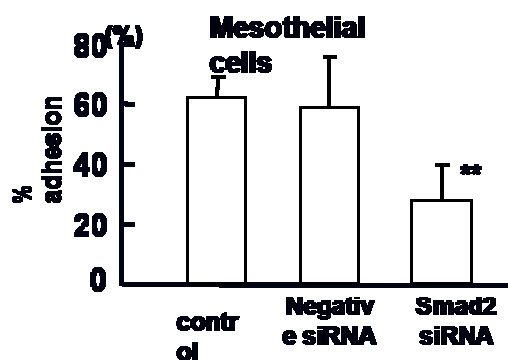
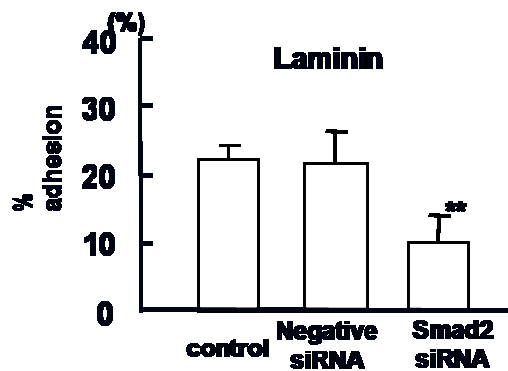
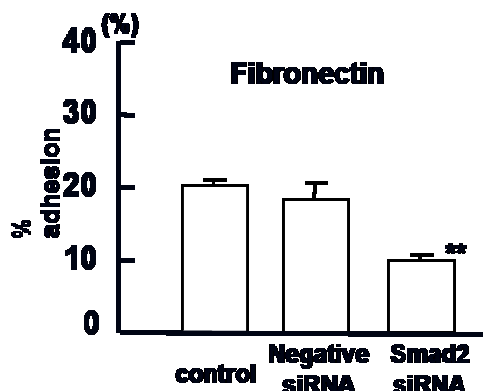
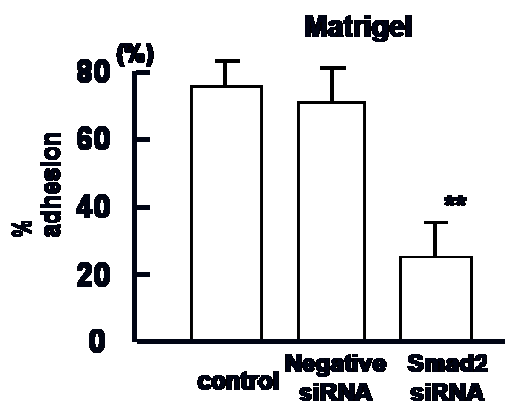
(TGF-beta type II receptor の SiRNA 添加による OCUM-2MD3 の TGF- β type II receptor 発現抑制効果はフローサイトメトリーにて有意でなく、以下の実験には、Smad2 の SiRNA を用いた。)

(2) Double chamber を用いた invasion assay にてスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の浸潤能は TGF- β 添加 (10ng/ml) により有意に促進されたが SMad2 の SiRNA の添加により、この促進作用は有意に抑制された。

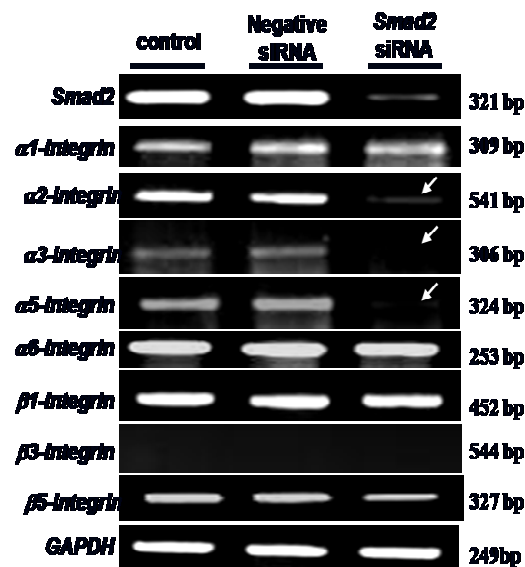


(3) Smad2 の SiRNA 添加 (30nmol/L) によりスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 の増殖能には影響を認めなかった。

(4) Smad2 の SiRNA 添加 (30nmol/L) によりスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 のマトリゲル、フィブロネクチン、ラミニン、中皮細胞との接着が有意に抑制された。



(5) Smad2 の SiRNA 添加 (30nmol/L) によりスキルス胃癌細胞 OCUM-2MD3 に発現する接着因子インテグリンのうち $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ -インテグリンの mRNA 発現は抑制された。



(6) Decorin(sigma 社)を 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml 添加することにより、OCUM-2MD3 の浸潤能はそれぞれ、67%、43%、16%に抑制された。TGF- β の添加による OCUM-2MD3 の浸潤能促進作用はDecorinを1ug/ml, 10ug/ml,

100ug/ml添加することにより、80%、58%、44%に抑制された。胃壁線維芽細胞培養上清の添加によりOCUM-2MD3の浸潤能は促進され、その促進作用は培養上清中のTGF- β によることがこれまでの研究結果によりわかっているが、さらにDecorinを1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml添加することにより、OCUM-2MD3の浸潤能はそれぞれ、83%、66%、39%に抑制された。

(7)本研究の成果はスキルス胃癌細胞の進展においてautocrine かつparacrine的に促進作用を持つTGF- β のシグナル抑制をすることがその進展を抑制しうることを示し、今後の分子標的治療を念頭に置いた新しいスキルス胃癌治療の開発へ繋がるものであると考えられた。

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1件)

- ①Kawajiri H, Yashiro M, Shinto O, *et al.* A Novel Transforming Growth Factor beta Receptor Kinase Inhibitor, A -77, Prevents the Peritoneal Dissemination of Scirrhus Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14: 2850-60. (査読あり)

[学会発表] (計6件)

- ①Takafumi Nishii, Masakazu Yashiro, Toru Inoue, c-Met inhibitor might be a promising molecular targeted molecule against for CPT-11-resistant cancer stem cells. , American Association for Cancer Research annual meeting, 2009. 4. 19, Denver
- ②野田悟、八代 正和、井上 透、胃癌腹膜転移における低酸素環境が細胞-腹膜基質間相互作用に及ぼす影響.、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋
- ③Masakazu Yashiro, Toru Inoue ,A novel molecular targeting compound as FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for scirrhus gastric cancer. , American Association for Cancer Research annual meeting, 2008. 4. 14, San Diego
- ④Osamu Shinto, Masakazu Yashiro, Inhibitory effect of TGF-beta receptor inhibitor, SB-431542, on the lymph node

metastasis of gastric cancer , American Association for Cancer Research annual meeting, 2008. 4. 15, San Diego

- ⑤神藤 理、八代 正和、井上 透、TGF- β 受容体阻害剤であるKi - 26894の胃癌に対する影響について.、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月3日、名古屋
- ⑥川尻 成美、八代 正和、井上 透、スキルス胃癌腹膜播種における TGF- β 阻害剤と抗癌剤の併用効果.、第62回日本消化器外科学会定期学術総会、2007年7月18日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上透 (INOUE TORU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60381985

(2)研究分担者

八代正和 (YASHIRO MASAKAZU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60305638

(3)連携研究者

なし