

平成21年 4月16日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790260
 研究課題名（和文） ヒト胃癌における新規がん抑制遺伝子産物 CYR61 蛋白発現と浸潤抑制効果の検討
 研究課題名（英文） Expression of CYR61 and its effects on suppression of tumor cell invasion in human gastric carcinoma cells
 研究代表者
 尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)
 鳥取大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：40325006

研究成果の概要：

プロテオーム解析により同定した新規ヒト胃癌抑制遺伝子産物候補 CYR61 の発現細胞の同定、発現低下メカニズムと CYR61 の機能解析をおこなった。胃粘膜における CYR61 発現は、主としてセロトニン産生細胞であり、がんの進展に伴い、エピジェネティックな異常により発現が抑制されることが示された。CYR61 は、胃癌細胞株に対し浸潤能抑制性に作用し、同時に Matrilysin/MMP-7 発現の低下が観察された。加えて、胃癌組織標本において MMP-7 発現例と CYR61 発現例が逆相関していた。以上より、ヒト胃において CYR61 発現はエピジェネティックな異常により低下し、結果として MMP-7 発現誘導により胃癌細胞の浸潤を促進する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

CYR61(cysteine-rich 61)蛋白は、CCN(CYR61, CTGF, NOV)ファミリーの一つであり、細胞の接着、増殖、生存、遊走および血管新生を制御する因子として、線維芽細胞より同定された分泌蛋白であ

る(O'Brien et al. Mol. Cell Biol. 1990)。がんにおけるその発現の増加は、血管新生の促進に関与し、ヒト乳癌組織、ヒト前立腺癌細胞株において CYR61 発現の増加が報告されている(Menendez et al. Endocr Relat Cancer 2003, Sakamoto et

al. Prostate 2004)。一方、ヒト肺癌細胞株とヒト子宮内膜癌細胞株では CYR61 遺伝子導入により細胞増殖は抑制され、増殖抑制因子としての作用が報告されている (Tong et al. J. Biol. Chem. 2001, Chien et al. J. Biol. Chem. 2004)。したがって、CYR61 は個々の臓器において異なる作用を有することが示唆されているが、依然不明な点が多い。申請者らのグループが行ったヒト胃癌切除組織標本 14 例を用いたプロテオーム解析により、CYR61 は非腫瘍胃粘膜と比較し胃癌組織において発現が低下している蛋白として同定された (Nishigaki, Osaki et al. Proteomics 2005)。加えて、100 例以上の胃切除標本を用いた組織学的解析をおこない、以下の点を明らかにしている。

- 1) CYR61 蛋白は、主として胃粘膜の内分泌細胞に発現している
- 2) 胃腺腫、早期胃癌および進行胃癌における発現を解析した結果、前二者と比較し進行胃癌において明らかな陽性細胞数の減少が観察された。
- 3) CYR61 発現と臨床病理学的因子との関連を解析した結果、CYR61 発現と癌の深達度、脈管侵襲およびリンパ節転移との間に有意な逆相関を見出した。
- 4) 進行胃癌の先進部における組織学的検索により、CYR61 発現と Matrilysin/MMP-7 発現が逆のパターンを示すこと、即ち、CYR61 発現が陰性の領域では Matrilysin/MMP-7 陽性癌細胞が明らかに多く観察されることを見出した。

以上のデータは、胃における CYR61 発現低下がヒト胃癌細胞の浸潤能を促進して

いること、さらにその一部は Matrilysin/MMP-7 発現を介した機序で生じていると推察できる。換言すれば、胃の内分泌細胞等により分泌された CYR61 蛋白は、周囲の胃上皮細胞あるいは胃癌細胞に対し細胞の遊走および浸潤を抑制していることを示唆している。これまでに、線維芽細胞などの非上皮系細胞における CYR61 の発現や遊走との関連は報告されているが、ヒト胃における CYR61 の発現および機能（特に細胞の遊走や癌細胞の浸潤）を解析した報告はない。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに CYR61 がヒト胃粘膜において内分泌細胞に発現していること、胃癌、特に進行癌における CYR61 発現細胞数は有意に低値を示し、胃癌細胞の浸潤・転移に関与しており、CYR61 発現領域と Matrilysin/MMP-7 発現領域が逆のパターンを示すことを見出ししてきた。したがって本研究では、

- 1) ヒト胃における CYR61 蛋白発現細胞を同定すること、
 - 2) ヒト胃細胞において CYR61 発現低下のメカニズムを解析
 - 3) ヒト胃癌細胞株を用い CYR61 発現と浸潤能との関連を *in vitro* の系で検討
- を目的とした。

3. 研究の方法

- 1) ヒト胃における CYR61 蛋白発現細胞の同定

ヒト胃における内分泌細胞は、主にガストリン産生 G 細胞、セロトニン産生 EC 細胞およびソマトスタチン産生 D 細胞である。ヒト胃切除標本を用い、正常粘膜、

良性腫瘍である腺腫および悪性腫瘍である腺癌のそれぞれにおいてCYR61 蛋白発現を免疫組織化学的に検出し、連続切片を用いて各内分泌細胞マーカー蛋白に対する抗体で同様に検出した。免疫活性の類似性が高いマーカーについて、組織切片上で蛍光二重染色をおこない、両者の蛍光が同一細胞において一致するかを確認した。

2) ヒト胃細胞における CYR61 発現低下のメカニズムを解析

CYR61 発現の乏しい胃癌細胞株 MKN-45 および TMK-1 を含むいくつかの細胞株を用い CYR61 遺伝子変異を PCR-SSCP 法およびシーケンス解析により検索した。さらに、脱メチル化阻害剤

(5-aza-2'-deoxycytidine) およびヒストン脱アセチル化阻害剤

(Trichostatin A) を細胞に添加し、

CYR61 発現量の変化をリアルタイム PCR およびウエスタンブロット法にて検索し、細胞株における発現量との関連を解析した。

3) ヒト胃癌細胞株を用い CYR61 発現と浸潤能との関連を検討

CYR61 発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎由来細胞株 293T 細胞に導入し、培養上清を回収した。この上清を含む培地でヒト胃癌細胞を培養し、Matrigel Invasion Assay による浸潤能への影響をコントロールベクター導入株と比較し、検索した。

4. 研究成果

ヒト胃切除標本 127 例を用いた免疫組織化学法により、ヒト胃粘膜における CYR61 蛋白陽性細胞は、内分泌細胞であることが形態的に示唆され、蛍光二重染色法により、CYR61

陽性細胞は主としてセロトニン産生細胞と一致することが示された。次に、CYR61 発現低下メカニズムについて、ヒト胃癌細胞株 8 株 (CYR61 高発現株: MKN-1, -7, -28、低発現株: MKN-45, -74, TMK-1, KATO-III, HSC39) を用いてジェネティックおよびエピジェネティックな観点から検索した。全株とも CYR61 コード領域に遺伝子変異はなかった。低発現株にヒストン脱アセチル化阻害剤を添加したところ、いずれの株も mRNA レベルでの発現量増加が観察された。かかる所見は、ヒト胃癌細胞における CYR61 発現低下は、ヒストン脱アセチル化によるエピジェネティックな異常により生じていることが示された。しかしながら、一部の細胞株ではヒストン脱アセチル化阻害剤による蛋白レベルでの発現量増加が観察されなかったことから、さらに転写後調節後異常の関与も示唆された。以上の結果より、分泌蛋白である CYR61 は、主としてセロトニン産生細胞から分泌され、パラクラインおよびオートクライン的に作用し、胃上皮細胞の増殖あるいは遊走能を制御していると考えられる。エピジェネティックな異常がきっかけとなり、CYR61 発現低下が引き起こされ、胃癌の発生あるいは進展に関与していることが示唆された。

さらに、CYR61 の機能を解析するために CYR61 発現ベクターの構築にとりかかり、CYR61 の N 末端に FLAG タグをつけたプラスミドベクターを作製した (pcDNA3/FLAG-CYR61)。ヒト胎児腎由来細胞株 293T 細胞に導入し、培養上清中に FLAG-CYR61 発現を確認した。この FLAG-CYR61 を含む上清と pcDNA3 のみ導入した 293T 由来の上清をそれぞれヒト胃癌細胞株 MKN-45 に添加し、マトリゲルを用いたインベーションアッセイをおこなったところ、CYR61 蛋白を含む上清の添加量依存的に浸潤能が抑制さ

れた。一方、細胞増殖能には影響しなかった。そこで、胃癌細胞株の浸潤能に関わる因子の代表として知られるマトリックスメタロプロテアーゼ-7(MMP-7)発現を解析したところ、対照群と比較し FLAG-CYR61 を含む上清を80%置換した場合、MMP-7 蛋白発現量が約20%抑制された。CYR61 発現と MMP-7 発現の関連をヒト胃癌組織標本を用い比較検討したところ、CYR61 高発現例の多くが MMP-7 低発現例であり同時に CYR61 低発現例の多くが MMP-7 高発現例であり、統計学的に有意に逆相関していた($P < 0.001$)。加えて、ヒト胃癌細胞株8株(MKN-1 -7, -28, -45, -74 TMK-1, KATO-III, HSC-39)における CYR61 および MMP-7 発現をウエスタンブロットで解析したところ、8株中5株でヒト胃癌組織標本と同様に両蛋白発現の逆相関が観察された。以上より、胃癌細胞における CYR61 発現低下は、MMP-7 発現を誘導し、結果として胃癌細胞の浸潤能を促進し、胃癌の進展に関与している可能性が示唆された。

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2件)

- ① Maeta N, Osaki M, Shomori K, Inaba A, Kidani N, Ikeguchi M, Ito H: CYR61 down-regulation correlates with tumor progression by promoting MMP-7 expression in human gastric carcinoma. *Oncology* 73: 118-126, 2007 (査読有)

- ② 尾崎充彦、前田憲孝、井藤久雄: CYR61 タンパク発現低下と胃癌の進展との関連
胃癌-基礎・臨床研究のアップデート-
日本臨床 66巻 109-113, 2008(査読無)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)
鳥取大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40325006