

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790493

研究課題名：上皮—間充織形質転換の観点から見た消化器疾患におけるプロスタグランジンの意義

研究課題名：The significance of prostaglandin in epithelial-mesenchymal transition in pathophysiology of gastrointestinal disease

研究代表者：谷川 徹也（TANIGAWA TETSUYA）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：70423879

研究成果の概要：プロスタグランジン(PG)は消化管創傷治癒促進作用や消化管癌の発生・増殖・浸潤・転移に重要な役割を果たしている。本研究ではPG代謝酵素である15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase(15-PGDH)の発現動態が上皮間充織形質転換(EMT)を調節する因子となりうるかどうかを検討するための予備的研究を行い、15-PGDHの発現低下は、胃癌の独立した予後不良因子であること、胃潰瘍においてはEGF受容体シグナル伝達系を介して15-PGDHの発現低下が認められることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin (PG) plays an important role in gastrointestinal wound healing and carcinogenesis by enhancing cell proliferation, migration, invasion and metastasis. In the preliminary study for the research of epithelial to mesenchymal transition (EMT) and PG in pathophysiology of gastrointestinal disease, we investigated the alteration of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in gastric cancer and gastric ulcer.

1. We determined the correlations between pattern of expression of 15-PGDH in gastric adenocarcinoma and various clinicopathological factors and patient outcome. In 35 of 71 cases of gastric adenocarcinoma, expression of 15-PGDH protein was reduced in tumor tissues. Multivariate analysis revealed reduction of 15-PGDH expression to be an independent predictor of poor survival.
2. We investigated the expression of 15-PGDH in the stomach and acetic acid-induced gastric ulcer in mice and the mechanism by which 15-PGDH is regulated during gastric ulcer healing. Expression of mRNA for PGDH was reduced by 57% compared with normal tissue. Consistent with this, protein level of 15-PGDH in ulcer tissue was decreased compared with that in normal tissue. Epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitor reversed the down-regulation of mRNA expression of 15-PGDH in ulcer tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：(1) 上皮-間充織形質転換 (2) プロスタグランジン (3) 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (4) 創傷治癒 (5) 胃癌

1. 研究開始当初の背景

Prostaglandin (PG)は消化管粘膜創傷治癒促進作用や消化管癌の発生や増殖、進展、浸潤、転移に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかしながら PG が細胞運動に及ぼす意義については不明な点が多い。一方、上皮細胞が何らかの細胞外あるいは細胞内の刺激により間葉系細胞の形態に変化し、それにより運動能などの特徴を獲得するユニークな現象は、epithelial mesenchymal transition(上皮間充織形質転換、以下 EMT)と呼ばれており、粘膜損傷の修復や癌細胞の浸潤、転移能の亢進のメカニズムの一つとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究では PG 代謝酵素である 15-PGDH の発現動態が EMT を調節する因子となりうるかどうかを検討するための予備的知見を得ることを目的として、以下に示すような検討を行った。

- (1)胃癌における 15-PGDH の発現動態と予後について検討する。
- (2)胃潰瘍における 15-PGDH の発現動態について検討し、其の調節機構を解明する。

3. 研究の方法

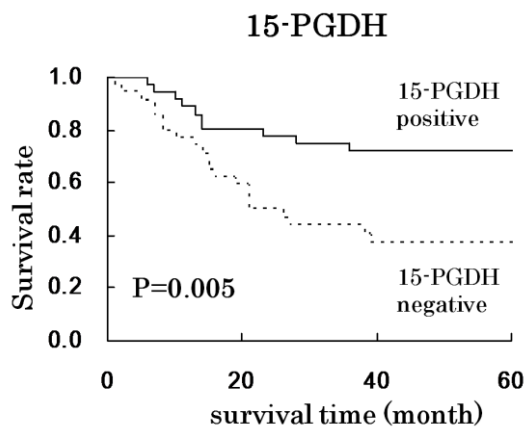
- (1)当院にて外科的に切除された分化型進行胃癌 71 症例を対象とした。切除標本から作成したホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を用いて 15-PGDH に対する免疫化学組織染色を行った。15-PGDH の発現状態を半定量的に評価して Kaplan-Meier 法で 15-PGDH の発現状態と予後の関係を検討した。
- (2)胃癌患者の臨床病理学的因子に対して単変量および多変量解析を行い予後に関与する因子を検討した。
- (3)胃癌組織中 15-PGDH および Ki67 (細胞増殖マーカー) に対する蛍光二重染色を行い両者の発現の関係を検討した。さらに抗 Ki67 抗体による免疫化学染色を行って胃癌組織における Ki67-labeling Index を算出し、胃癌組織における 15-PGDH の発現と細胞増殖の関係を検討した。
- (4)胃癌細胞株 (AGS, MKN45, MNN7, NUGC3,

NCI-N87) における 15-PGDH のタンパクおよび mRNA の発現状態を調べ、PGE₂ が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。さらに 15-PGDH の活性もしくは発現の阻害が細胞増殖に与える影響を特異的 siRNA および特異的阻害剤 (CAY10397) を用いて検討した。

(5) C57BL/6 マウスに酢酸潰瘍を作成し、潰瘍作成 3 日目を潰瘍発生日 (Day 0) として潰瘍発生日 4 日目 (Day 4) および 7 日目 (Day 7) に胃を摘出し胃潰瘍組織における 15-PGDH の mRNA およびタンパクの発現動態を解析した。また、胃潰瘍組織における 15-PGDH の発現の局在は免疫染色法により検討した。15-PGDH の発現動態に対する epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナルの関与についてはマウスに EGFR キナーゼ活性阻害薬 (tyrphostin AG1478) を Day 3 および 4 に腹腔内投与して胃潰瘍組織における 15-PGDH の mRNA 発現量を検討した。

4. 研究成果

- (1)胃粘膜および胃癌組織における 15-PGDH の発現
非腫瘍部の胃組織において 15-PGDH は粘膜上皮細胞の細胞質内に恒常的に発現していた。腫瘍組織においても 15-PGDH は腫瘍細胞の細胞質内に発現していたが、71 例中 35 例の腫瘍組織では 15-PGDH の発現は低下もしくは消失していた。
- (2)胃癌における 15-PGDH の発現と胃癌患者の予後の関係
15-PGDH の発現が低下もしくは消失している群では 15-PGDH の発現を維持している群と比較して有意に累積生存率が低下していた。胃癌患者の予後に関する臨床病理学的因子は単変量解析では胃癌の進行度と 15-PGDH の発現低下が有意な予後不良因子であった。この 2 つの因子は多変量解析でも有意であり、15-PGDH の発現低下は独立した予後不良因子であることが明らかとなった。



進行胃癌における 15-PGDH の発現と予後

Variables		Relative Risk (95% CI)	P-value
Cancer Stage	Stage I	1	
	Stage II	0.94 (0.58- 16.10)	0.96
	Stage III	8.75 (1.09- 70.60)	0.04
	Stage IV	42.60 (5.42- 334.35)	<0.01
Expression of 15-PGDH	Positive	1	
	Negative	2.81 (1.21-6.56)	0.02

進行胃癌における
予後因子の検討 (多変量解析)

(3) 胃癌組織における 15-PGDH の発現と細胞増殖の関係：

非腫瘍部粘膜に比較して 15-PGDH の発現が低下・消失している胃癌組織では Ki67 陽性細胞数が増加していた。同一胃癌組織内において 15-PGDH の発現状態が不均一な例でも、15-PGDH の発現が低下している部分では Ki67 陽性細胞数が増加していた。15-PGDH の発現状態と Ki67 Labeling Index の関係を検討すると、15-PGDH の発現が低下・消失している群は 15-PGDH の発現を維持している群と比較して Ki67-labeling Index が有意に高値であった。

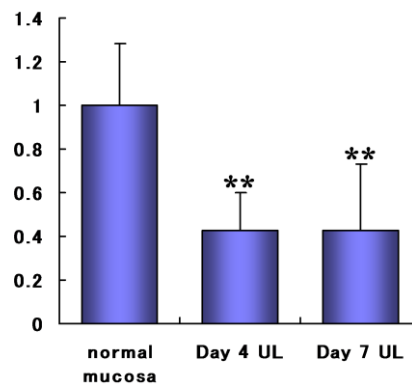
(4) 胃癌細胞株における 15-PGDH タンパクと mRNA の発現：

AGS と MKN45 は 15-PGDH のタンパクおよび mRNA の発現を認めたが、NUGC3、MKN7、NCI-N87 ではタンパク、mRNA とも発現を認めなかった。

(5) 15-PGDH が細胞増殖に与える影響の検討：PGE₂ の添加は細胞増殖に有意な影響を与えなかったが、15-PGDH では代謝されない 16, 16-dimethyl PGE₂ を添加したところ細胞増殖が有意に亢進した。また、15-PGDH 活性阻害剤である CAY10397 を AGS に添加すると細胞増殖は有意に亢進した。AGS の 15-PGDH の発現を 15-PGDH に特異な siRNA によって抑制した場合でも AGS の細胞増殖は有意に亢進した。

(6) ① 健常胃組織および胃潰瘍組織における 15-PGDH のタンパクおよび mRNA の発現とその局在：

健常組織において 15-PGDH の mRNA およびタンパクの発現が観察され、その局在は主に胃粘膜上皮細胞と粘膜固有層に存在する炎症細胞であった。一方、胃潰瘍組織においては潰瘍辺縁の胃粘膜上皮細胞の 15-PGDH のタンパク発現は著明に低下していた。Day 4 および Day 7 における胃潰瘍組織中の 15-PGDH の mRNA 発現レベルは健常組織に比し 57% 低下していた。



マウス実験胃潰瘍組織における
15-PGDH mRNA の発現動態

(**： p<0.01 vs normal mucosa)

② EGF 受容体キナーゼ阻害薬が胃潰瘍組織中の 15-PGDH 発現動態に及ぼす影響：

AG 1478 の投与は胃潰瘍組織における 15-PGDH の mRNA 発現を増加させた。

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 3 件)

- ① Tatsuwaki H, Tanigawa T, Watanabe T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K, Higuchi K, Arakawa T. Reduction of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression is an independent predictor of poor survival associated with enhanced cell proliferation in gastric adenocarcinoma. Cancer Sci. 査読有 2010 Feb;101(2):550-8.
- ② 達脇大, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 町田浩久,

岡崎博俊, 山上博一, 斯波将次, 渡辺憲治, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 六車和也, 澤田鉄二, 平川弘聖, 樋口和秀, 荒川哲男 【消化器疾患の病態生理】 胃癌における 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase の意義 Progress in Medicine 査読無 30 卷 3 号 Page791-796 (2010 年 3 月)

- ③ 谷川徹也, 渡辺俊雄, 達脇大, 岡崎博俊, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 荒川哲男 胃潰瘍治癒過程におけるプロスタグランジン代謝酵素 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase の発現動態とその調節因子 潰瘍 査読無 36 卷 1 号 Page87-90 (2009 年 5 月)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 谷川徹也, 達脇大, 渡辺俊雄 消化器疾患における分子腫瘍マーカーの新展開 胃癌における 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase の発現低下は独立予後不良予測因子である 第 96 回日本消化器病学会総会 (2010 年 4 月 24 日、新潟)
- ② Tanigawa T, Tatsuwaki H, Watanabe T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Down-regulation of 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase During Gastric Ulcer Healing. The 109th Annual Meeting of the AGA (2009 年 5 月 30 日, Chicago, USA)
- ③ 達脇大, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 岡崎博俊, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 荒川哲男 胃癌の細胞増殖に対する 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase の意義 第 95 回日本消化器病学会総会 (2009 年 5 月 7 日、札幌)
- ④ 達脇大, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 岡崎博俊, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 荒川哲男 胃癌の細胞増殖に対する 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase の意義 第 5 回日本消化管学会総会学術集會 (2009 年 2 月 12 日、東京)
- ⑤ 谷川徹也, 達脇大, 渡辺俊雄, 岡崎博俊, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 荒川哲男 胃潰瘍治癒過程におけるプロスタグランジン代謝酵素: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase の発現動態について 第 5 回 日本消化管学会総会学術総会 (2009 年 2 月 12 日、東京)
- ⑥ 谷川徹也, 達脇大, 渡辺俊雄, 岡崎博俊, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 荒川哲男 胃潰瘍治癒過程におけるプロスタグランジン代謝酵素: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase の発現動態について 第 36 回 日本潰瘍学会 (2008 年 9 月 5 日、北海道)
- ⑦ Hiroshi Tatsuwaki, Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Hirohisa Machida, Hirotohi Okazaki, Masatsugu Shiba, Kazunari Tominaga, Yasuhiro Fujiwara, Nobuhide Oshitani, Kazuya Muguruma, Tetsuji Sawada, Kosei Hirakawa, Kazuhide Higuchi, Tetuso Arakawa Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression is associated with cancer cell proliferation and poor prognosis in gastric cancer. The 108th Annual Meeting of the AGA (2008 年 5 月 17 日、San Diego, USA)
- ⑧ 達脇大, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 町田浩久, 岡崎博俊, 斯波将次, 富永和作, 藤原靖弘, 押谷伸英, 六車一哉, 澤田鉄二, 平川弘聖, 樋口和秀, 荒川哲男 胃癌組織における 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase の発現動態の検討 第 94 回 日本消化器病学会総会 (2008 年 5 月 9 日、福岡)
- ⑨ 達脇大, 谷川徹也, 渡辺俊雄, 町田浩久, 岡崎博俊, 斯波将次, 富永和作, 伊倉義弘, 藤原靖弘, 押谷伸英, 六車一哉, 澤田鉄二, 平川弘聖, 樋口和秀, 荒川哲男 胃癌における 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase の発現動態とその意義 第 4 回 日本消化管学会総会学術総会 (2008 年 2 月 7 日、大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷川 徹也 (TANIGAWA TETSUYA)
大阪市立大学 大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70423879

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし