

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591583

研究課題名 (和文) ヒト胃癌におけるイノシトール3リン酸受容体発現の意義とその重要性

研究課題名 (英文) The role of InsP3 receptor expression in gastric cancer patients

研究代表者：柴尾 和徳 (SHIBAO KAZUNORI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10330987

研究成果の概要 (和文)：

イノシトール3リン酸レセプター (IP3Rs) は滑面小胞体の細胞膜に存在し、細胞内へのカルシウム放出に関与している。細胞内カルシウムシグナリングは重要な細胞機能に関与しているため、IP3Rs の発現もまた細胞機能に深く関与しており、アポトーシスや細胞増殖、分化との関連も示唆されている。IP3 レセプターには1型から3型の3種類のサブタイプが存在し、胆汁うっ滞性疾患で発現が減少するなど病因との関係が明らかになってきているが、胃癌を含めたヒト癌組織における IP3R 発現の意義については未だ検討されていない。そこで、我々は胃癌切除例における3型 IP3R の発現を免疫組織学的に評価し、臨床病理学的解析、分子生物学的解析を加え検討した。1型、2型、3型 IP3R は非癌部、癌部で発現を認めた。非癌部では IP3 レセプターが腺管の頂端膜側 (apical membrane) に強く集中して存在しており、胃癌ではびまん性に発現していた。非癌部と癌部では癌部で過剰もしくは減弱発現している症例を認めた。IP3R 発現と臨床病理学的因子との検討では、1型、2型、3型 IP3R は腫瘍進達度、遠隔転移関連を認めなかった。また、今回検討した40症例の予後解析では、IP3R は予後規定因子とはならなかったため、症例を増やしてさらに検討する予定である。また、ヒト癌細胞株を用いて IP3R 発現を抑制、過剰発現させた実験で IP3R 発現は、細胞増殖には、影響を与えないにも関わらず、アポトーシス耐性と関連する事が、今回明らかとなった。以上の結果より、IP3R 発現はヒト癌治療における新しいターゲットとなる可能性が示唆された。我々の得た結果は Cell Calcium に掲載された。更に現在、IP3R と抗がん剤治療の関連性について興味ある知見を得ており、現在、解析を進めており、今後発表予定である。

研究成果の概要 (英文)：

The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (InsP3R) mediates Ca²⁺ signaling in epithelia and regulates cellular functions such as secretion, apoptosis and cell proliferation. Loss of one or more InsP3R isoform has been implicated in disease processes such as cholestasis. Here we examined whether gain of expression of InsP3R isoforms also may be associated with development of disease. Expression of all three InsP3R isoforms was evaluated in tissue from gastric carcinomas surgically resected from 40 patients. All subtypes of InsP3Rs were seen in both normal colorectal mucosa and colorectal cancer. Dense apical localization of InsP3 receptors were seen in colorectal mucosa. Meanwhile, diffuse expression of InsP3 receptors were seen in colorectal cancer. No correlation between IP3 receptor expression and clinical parameter were observed in gastric cancer patients. shRNA knockdown of type III InsP3R in CACO-2 colon cancer cells enhanced apoptosis, while over-expression of the receptor decreased apoptosis. Thus, type III InsP3R becomes expressed in human cancer, and its expression level is directly related to aggressiveness of the tumor, which may reflect inhibition of apoptosis by the receptor. These findings suggest a previously unrecognized role for Ca²⁺ signaling via this InsP3R isoform in human cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科・消化器外科

キーワード：カルシウムシグナリング、IP3 レセプター、胃癌、細胞増殖、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

イノシトール3リン酸レセプター (IP3Rs) は滑面小胞体の細胞膜に存在し、細胞内へのカルシウム放出に関与している。細胞内カルシウムシグナリングは重要な細胞機能に関与しているため、IP3Rs の発現もまた細胞機能に深く関与しており、アポトーシスや細胞増殖、分化との関連も示唆されている。IP3 レセプターには1型から3型の3種類のサブタイプが存在し、胆汁うっ滞性疾患で発現が減少するなど病因との関係が明らかになってきているが、胃癌を含めたヒト癌組織におけるIP3R 発現の意義については未だ検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌切除標本、ヒト癌細胞株を用いて、IP3 レセプター発現の意義について検討し、IP3 レセプターが新たな治療ターゲットとなり得るか否か検討することである。

3. 研究の方法

- (1) 当科で手術を施行し、予後調査を施行した胃癌切除症例40例を対象とした。
- (2) ホルマリン固定パラフィン切片で1型、2型、3型IP3レセプター蛋白に対する抗体を用いて免疫組織化学染色をし、細胞内分布を検討した。
- (3) 予後の判明している胃癌症例(約300例)のホルマリン固定パラフィン切片でIP3レセプター抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的に検討。IP3レセプター発現と既知の予後規定因子との相関、独立した予後因子であるかを単変量解析、多変量解析で統計学的に検討した。
- (4) IP3レセプターのRNAiを作製、ヒト

癌細胞株に導入し、細胞増殖、アポトーシス誘導への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織染色

免疫組織学的に評価し、臨床病理学的解析を加え検討した。1型、2型、3型IP3Rは非癌部、癌部で発現を認めた。非癌部ではIP3レセプターが腺管の頂端膜側 (apical membrane) に強く集中して存在しており、胃癌ではびまん性に発現していた (図1)。

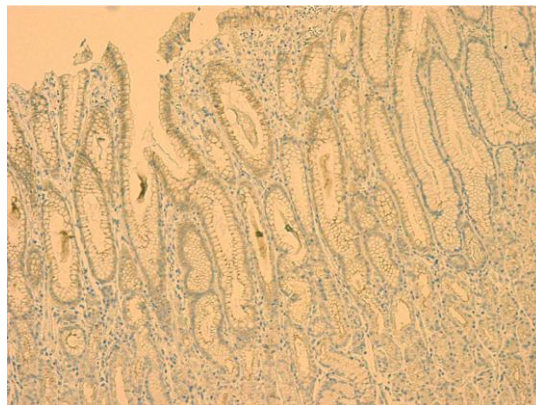


図1：正常粘膜における3型IP3R

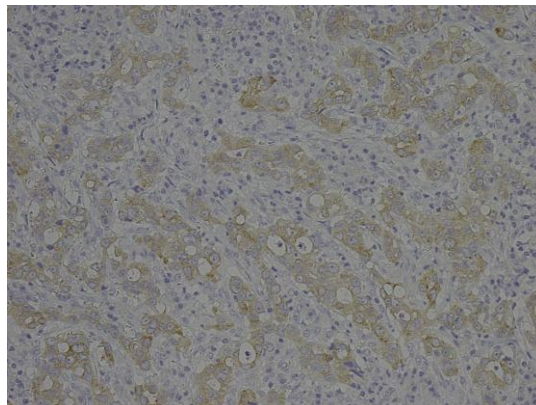


図2：癌部における3型IP3R強発現例

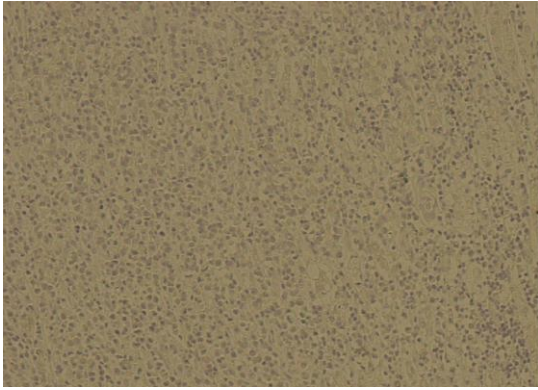


図 3 : 癌部における IP3R 弱発現例

非癌部と癌部では癌部で過剰発現している症例と減弱をしている症例を認めた (図 2、3)。カルシウムシグナリングは細胞増殖やアポトーシスなどに大きな影響を与えるため、正常粘膜と胃癌では IP3 レセプターの発現様式 (各亜型の発現量、細胞内分布) の差が、癌細胞に特異的な細胞増殖、アポトーシス誘導回避などに関連している可能性が推測された。

(2) 癌部における IP3R 発現と臨床病理学的因子、予後との検討

癌部において IP3R 強発現群と弱発現群の 2 群に分け、IP3R 発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。1 型、2 型、3 型 IP3R は腫瘍進達度、遠隔転移などに関連を認めなかった (表 1)。

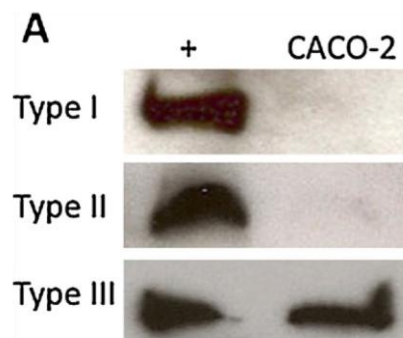
また、今回 Kaplan-Meier 法を用いて検討した 40 症例の予後解析では、IP3R は予後規定因子とはならなかったため、今後、症例を増やしてさらに検討する予定である。

	症例数 (%)		P 値
	3型IP3R弱発現群	3型IP3R強発現群	
年齢 (歳) (平均 ± SD)	(n=22) 64 ± 1.2	(n=18) 65.2 ± 2.2	0.649
性別			0.104
男性	11 (50)	8 (44.4)	
女性	11 (50)	10 (55.6)	
組織型			0.999
高分化型	6 (27.3)	8 (44.4)	
中分化型	10 (45.5)	7 (38.9)	
低分化型	5 (22.7)	3 (16.7)	
深達度 ^a			0.329
T1	0 (0)	0 (0)	
T2	7 (31.8)	6 (33.3)	
T3	10 (45.5)	6 (33.3)	
T4	5 (22.7)	6 (33.3)	
リンパ節転移			0.564
N0	7 (31.8)	6 (33.3)	
N1	10 (45.5)	7 (38.9)	
N2	4 (18.2)	4 (22.2)	
N3	1 (4.5)	1 (5.6)	
遠隔転移			0.887
M0	21 (95.5)	17 (94.4)	
M1	1 (4.5)	1 (5.6)	
病期分類 ^b			0.672
IA	0 (0)	0 (0)	
IB	0 (0)	0 (0)	
IIA	2 (9.1)	1 (5.6)	
IIB	6 (27.3)	7 (38.9)	
IIIA	13 (59.1)	10 (55.6)	
IIIB	2 (9.1)	2 (11.1)	
IV	1 (4.5)	1 (5.6)	

表 1 : 臨床病理学的特徴と IP3R 発現

(3) ヒト癌細胞 CACO-2 を用いた遺伝子導入実験

ヒト癌細胞株を用いて IP3R 発現を抑制、過剰発現させた実験で 3 型 IP3R 発現は、細胞増殖には、影響を与えないにも関わらず、アポトーシスと関連する事が、明らかとなった。



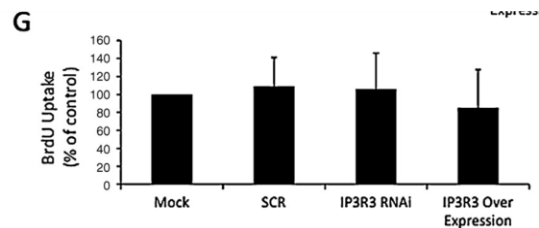
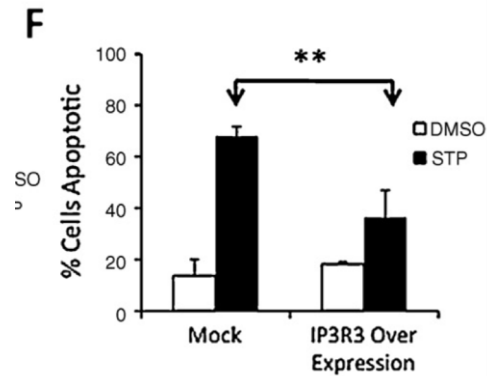
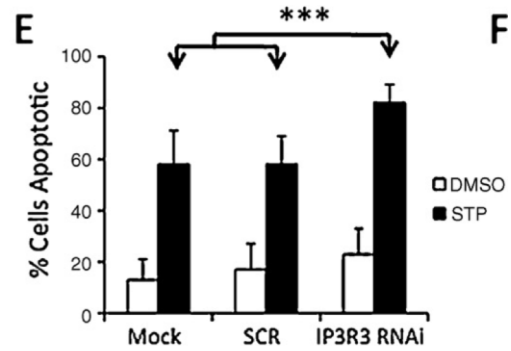
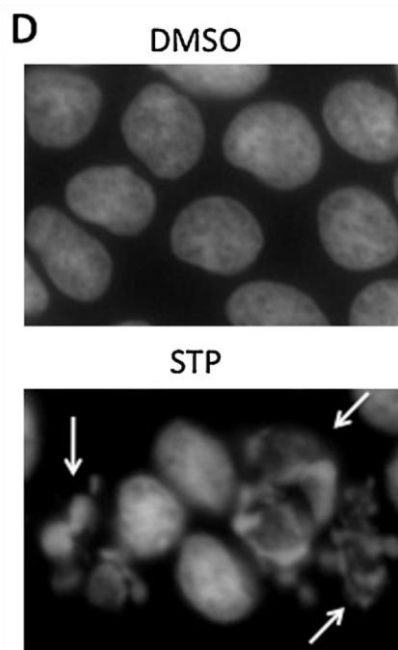
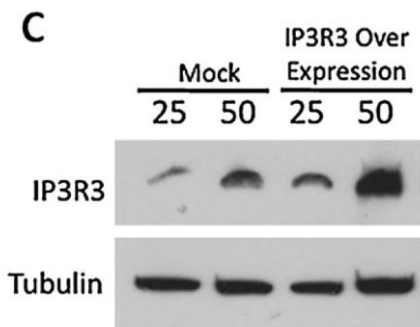
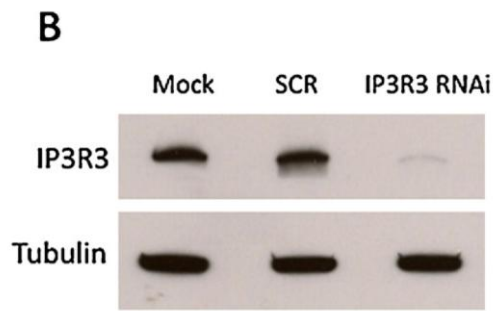


図4：3型IP3R発現はアポトーシス耐性を誘導する。(A) Western blot解析。1, 2, 3型IP3Rのポジティブコントロール(それぞれマウスの脳、肝細胞、CHO細胞から抽出)。CACO-2はほぼ3型IP3Rのみを発現している。(B) 3型IP3RのshRNAはCACO-2細胞内の3型IP3Rを90%以上抑制する。Mock: mock transfection。Transfection reagentをRNAi materialなしで遺伝子導入したコントロール。SCR: scrambled control。Alpha-tubulinは、loading controlとして用い、50 μ gのタンパクをローディングした。(C) 3型IP3R過剰発現実験。3型IP3R cDNAを遺伝子導入し、3型過剰発現を誘導した。25, 50 μ gタンパク質をそれぞれローディングした。遺伝子導入により、3型IP3Rは、ほぼ2倍の発現量となった(D) レーザー顕微鏡下のアポトーシス誘導実験。Hoescht染色。DMSO添加では、アポトーシスは誘導されないが、STP(1 μ g)添加で→に示す如くアポトーシスが誘導され、フラグメンテーションが起こった核を観察できる。(E) 3型IP3R RNAiで3型IP3R発現を減

小さくした CACO-2 細胞においては、Mock, SCR を導入した細胞に比べ、STP 添加でアポトーシス誘導が増大する ($p < 0.0001$)。 (F) 3 型 IP3R cDNA で 3 型 IP3R 発現を増加させた CACO-2 細胞においては、Mock を導入した細胞に比べ、STP 添加でアポトーシス誘導が減少する ($p < 0.01$)。 E, F の結果より、3 型 IP3R 発現は、アポトーシス耐性を生じる事が明らかとなった。 (G) BrDU 取り込み実験による IP3R 発現が細胞増殖に及ぼす影響評価。 Mock, SCR, 3 型 IP3R RNAi, 3 型 IP3R cDNA を遺伝子導入した CACO-2 細胞において細胞増殖に及ぼす影響を BrdU 取り込み能で評価した。 いずれの細胞でも BrdU 取り込みは統計学的な有意差はなく、3 型 IP3R 発現は、細胞増殖には影響を与えないと考えられた。

以上より、IP3R 発現はヒト癌治療における新しいターゲットとなる可能性が示唆された。我々の得た結果は Cell Calcium に掲載された。更に現在、IP3R と抗がん剤治療の関連性について興味ある知見を得ており、現在、解析を進めており、今後発表予定である。

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)

①The type III inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma.
Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, Iwakiri Y, Nathanson MH, Yamaguchi K.
Cell Calcium. 2010 Dec;48(6):315-323, 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

柴尾 和徳 (SHIBAO KAZUNORI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：10330987

(2) 研究分担者

平田敬治 (HIRATA KEIJI)
国際医療福祉大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：70269059

山口 幸二 (YAMAGUCHI KOJI)

産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：50191226

(3) 連携研究者

なし