

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590688

研究課題名（和文） ES 細胞特異的 Ras, ERas を標的とした新規胃癌治療の基礎的解析

研究課題名（英文） The significance of ES cell expressed Ras, ERas as a novel target for gastric cancer treatment

研究代表者

久保田 英嗣 (KUBOTA EIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 30405188

研究成果の概要（和文）：

近年、がん治療は著しく進歩したが、胃癌においては未だ十分な成果は得られておらず、新たな治療の開発が喫緊の課題である。この問題を克服するためには、新たな胃癌の治療標的分子を明らかにすることが重要であると考えられる。これまでに我々は新規*Ras*遺伝子、*ERas* (*ES cell-expressed Ras*) が胃癌に発現し、胃癌の浸潤・転移に関与していることを、*ERas*が胃癌の予後診断バイオマーカーとして有用である可能性を示してきた。本研究ではさらに研究を進展させ、*ERas*の転移促進のメカニズム、*ERas*を標的とした治療の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Despite of recent advances in therapies for cancers, it is not sufficient to improve the outcome of advanced gastric cancer patients. Therefore, it is indispensable to develop novel target molecules for gastric cancer treatment. We have previously demonstrated that ES cell-expressed Ras, ERas is expressed in gastric cancer, and is involved in gastric cancer invasiveness and metastasis. Our data also indicated the significance of ERas as a predict biomarker for gastric cancer patients. In this study, we showed the mechanisms by which ERas enhances the metastatic ability, and a utility of ERas as a target of gastric cancer treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：ERas, 胃癌, 新規治療

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療薬の開発が盛んに行われ、がん治療は著しく進歩している。しかし胃癌では十分な成果は得られておらず、新た

な治療の開発が喫緊の課題である。我々はこの問題を克服するために、ES細胞の腫瘍形成因子として発見されたES細胞特異的*Ras*, *ERas*の胃癌における発現に注目し、研究をすすめ

てきた。我々はこのERasが消化器癌，なかでも特に胃癌に発現していることを見出しその機能解析を行ってきた。正常細胞が癌化に伴う脱分化の過程で，癌遺伝子蛋白ERasの発現能を獲得することは非常に興味深い。ERasの発現は大腸癌や膵癌などのK-Ras遺伝子変異が多い癌に少なく，K-Ras遺伝子変異の少ない胃癌に発現が多いというこれまでの検討結果は，H-, K-Rasを含むRas全体からみた癌との関連という分子腫瘍学的見地からも重要と考えられる。我々はこれまでにERasが他のRasファミリーと異なり遺伝子変異を伴わずに恒常的活性化型として機能し，PI3K/Aktシグナルを選択的に活性化しアポトーシスを抑制していることを確認した。また自己複製能と分化能を持ち，腫瘍の発生・維持に欠かせない癌幹細胞(Cancer stem cell)とERas発現との関連を示唆する知見を得てきた。

2. 研究の目的

本研究では胃癌における ERas 発現に関する研究をさらに進め，ERas による転移誘導のメカニズムを明らかにするとともに，ERas を標的とした胃癌治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 独自に作製したヒト ERas 抗体を用い胃癌組織 142 症例に免疫染色を行い，胃癌における ERas の発現を臨床病理学的に検討した。また，ERas の発現と各種臨床パラメータの相関を統計学的に解析した。

(2) 胃癌での ERas の転移・浸潤における役割を siRNA を用いて検討した。siRNA を用い，ERas を knockdown した細胞を使用し，Transwell invasion/migration assay で，ERas の胃癌細胞浸潤能への影響を検討した。

(3) ERas発現による上皮間葉移行の誘導について検討した。ERas発現胃癌細胞からmRNAを抽出し，上皮マーカーおよび間葉マーカー遺伝子の発現をRT-PCRによりコントロールと比較検討した。またERas knockdownによる細胞形態の変化を観察した。

(4) 本研究ではPCRアレイを用い，ERasによる転移能に関連した遺伝子の発現について検討した。なおPCRアレイは転移関連遺伝子から構成されたものを用いた。

(5) 動物実験モデルを用い，ERasの発現による胃癌細胞の転移能への影響を検討した。動物実験は，マウス肝転移モデルを使用した。胃癌細胞株は既に樹立したERas発現GCIY，コントロールとしてコントロールベクター導入GCIYを使用した。免疫不全マウス (Nod-sk id mouse) の脾臓に， 10×10^5 個の胃癌細胞を移植し (各群 N=10)，1週間経過後マウスを屠殺，脾臓における腫瘍形成および肝臓への転移病変を病理学的に検討した。

(6) ERasによる転移促進メカニズムの検討のため，ERas発現によるマイクロRNAの発現変化をマイクロRNAアレイにより解析した。ERas発現細胞およびコントロール細胞からmRNAを抽出し，マイクロRNAアレイにて解析した。

(7) 新規がん治療，ウイルス療法に用いられる腫瘍溶解ウイルス，reovirusの効果をERas発現の点から検討した。これまでに，reovirusはRasの活性を持つ腫瘍に強力な殺細胞効果を持つことが報告されている。この検討では，NIH3T3細胞，胃癌細胞AGSを使用した。KRas発現細胞およびERas発現細胞を作成し，reovirusの殺細胞効果を細胞増殖アッセイで測定し，コントロール細胞と比較検討した。

(8) ERas発現による抗腫瘍薬への耐性獲得および，そのメカニズムについて検討した。この検討では，胃癌治療に頻用されている5-FU，CDDP，およびPaclitaxelへの感受性をERas発現の点から評価した。またERas が選択的に活性化するPI3K/Akt経路の下流因子，mTORを標的とした新規がん治療薬Rapamycinの効果についても検討した。

4. 研究成果

(1) 胃癌における ERas の発現はリンパ節転移 ($P < 0.05$) および肝転移 ($P < 0.001$) と有意に正の相関を示した。なお ERas の発現と胃癌の組織型とは有意な相関は認められなかった (Table 1.)

Table 1. Correlation between Clinicopathological Factors and ERas Expression in Gastric Cancer

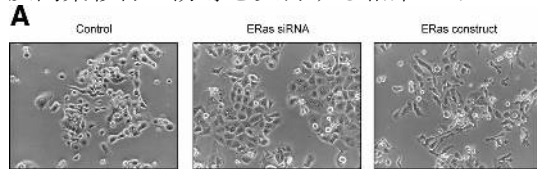
	ERas positive (n = 55)	ERas negative (n = 87)	Positive rate (%)	P value
Age, n				
<50 years	3	5	37.5	
51 to 70 years	27	46	37.0	
>71 years	25	36	41.0	0.54
Sex, n				
Male	39	62	38.6	
Female	16	25	39.0	0.96
Histological classification, n				
Differentiated	32	53	37.6	
Undifferentiated	23	34	40.4	0.75
Depth of invasion, n				
T ₀ to T ₁	17	37	31.5	
T ₂ to T ₄	38	50	43.2	0.16
Lymph node metastasis, n				
Positive	34	36	48.6	
Negative	21	51	29.2	<0.05
Liver metastasis, n				
Positive	14	2	87.5	
Negative	41	85	32.5	<0.0001

T₀ indicates carcinoma in situ; T₁, lamina propria and submucosa; T₂, muscularis propria and subserosa; T₃, exposure to serosa; T₄, invasion into serosa.

(2) 転移・浸潤能の検討では，ERas の knockdown により胃癌細胞の転移・浸潤能が有意に抑制されることが示された。

(3) PCR アレイによる解析結果から ERas は，Fibronectin や Vimentin などの間葉系マーカーの発現増強，E-cadherin などの上皮マーカーの発現抑制を誘導することが明らかとなった。この結果は，ERas が腫瘍転移の重要なメカニズムである上皮間葉移行を誘導し，胃癌細胞の転移・浸潤能を増強していることを示すものであった。細胞の形態に関しても，ERas の強制発現，ERas の knockout により変化が見られた (図 A)。ERas 発現細胞は，間葉細胞様の，ERas knockdown 細胞は上皮細胞様に形態が変化し，ERas 発現による上

皮間葉移行の誘導を支持する結果であった。



(4) PCRアレイでは、ERas発現によるHGF, MMP2, ICAM1など、転移と関連した遺伝子の発現増強が確認され、ERasは上皮間葉移行に加えて、これらの遺伝子の発現増強により転移・浸潤能を増強している可能性が示された。

(5) ERas発現胃癌細胞を移植したマウスでは10個体中5個体(50%)で脾臓に腫瘍の形成を認めた。一方、コントロールでは10個体中2個体(20%)に腫瘍の形成を認めた。肝転移については、ERas発現胃癌細胞株移植マウスでは10個体中4個体(40%)で、肝転移病変を認められたが、コントロールでは肝転移陽性例は認めなかった。以上から、動物実験においてもERas発現により胃癌細胞の腫瘍形成能および転移能が有意に増強されることが示された。

(6) マイクロRNAアレイを用いた、ERasによるマイクロRNA発現変化の検討では、有意な所見は得られなかった。

(7) Reovirusを用いた検討では、ERas発現によるNIH3T3細胞のウイルスへの感受性増強は認めなかった。一方、K-Ras発現NIH3T3細胞はreovirusに強い感受性を示した。胃癌細胞AGSを用いた検討も同様の結果であり、reovirusの感受性とERas発現には有意な相関はみられなかった。

(8) 薬剤耐性の検討では、ERas発現により胃癌細胞はCPT-11に耐性を獲得した。一方、5-FU, CDDPに対する感受性に変化はみられなかった。CPT-11に対する耐性獲得メカニズムについて、薬剤耐性と関連した遺伝子により構成されたPCRアレイを用いて検討したところ、ERas発現によるABCG2(薬剤排出トランスポーター)などの発現誘導を認めた(Table 2)。さらにゲルシフトアッセイによる検討から、ERasはNF- κ Bの活性化を介し、CPT-11への耐性を獲得していることを確認した。ERas発現細胞に対するRapamycinの効果に関しては、単独での抗腫瘍効果は認めなかったが、CPT-11との併用効果を認めた。ERasはPI3/Akt/NF- κ B経路の活性化を介し薬剤耐性を獲得していると考えられ、Rapamycinはこの系を抑制することにより効果を示したと考えられた。

以上から胃癌におけるERas発現は、胃癌肝転移、リンパ節転移と強い相関を持ち、予後予測のバイオマーカーとして有用である可能性が示された。さらに、その転移促進のメカニズムとして、上皮間葉移行の誘導に加えて、HGFなどの転移関連遺伝子の発現増強が重要な役割を果たしていると考えられた。動物実

験の結果は、これらの臨床病理学的検討および分子生物学的検討の結果を支持するもので、ERasは腫瘍形成能のみでなく、転移能も増強することが示された。またERas発現胃癌はCPT-11に耐性を持つこと、CPT-11と新規抗がん剤、Rapamycinの併用が有用であることが示された。この結果は、ERasが抗癌剤効果予測のバイオマーカーとしてだけでなく、治療標的としても有用であることを示唆する結果で、胃癌の新規治療の開発に寄与する研究であると考えられた。

Table 2.

Symbol	GenbankID	Increase	Gene name
ABCC3	NM_003786	2.59	ABC31/EST90757
ABCC6	NM_001171	2.59	ABC34/ARA
ABCG2	NM_004827	2.58	ABC15/ABCP
BRCA2	NM_000059	-3.62	BRCC2/FACD
CYP3A5	NM_000777	4.02	CP35/P450PCN3
ERBB3	NM_001982	-8.44	ErbB-3/HER3
RARB	NM_000965	3.49	HAP/NR1B2
SULT1E1	NM_005420	4.74	EST/EST-1
TNFRSF11A	NM_003839	-4.52	CD265/ODFR

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 Kubota E, Kataoka H, Tanaka M, Okamoto Y, Ebi M, Hirata Y, Murakami K, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Tanida S, Kamiya T, Aoyama M, Asai K, Joh T. ERas Enhances Resistance to CPT-11 in Gastric Cancer. *Anticancer Res* 査読あり, 10: 3353-60, 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965746>

② Aoyama M, Kataoka H, Kubota E, Tada T, Asai K. Resistance to chemotherapeutic agents and promotion of transforming activity mediated by embryonic stem cell-expressed Ras (ERas) signal in neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 査読あり, 37: 1011-6, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811723>

③ Kubota E, Kataoka H, Aoyama M, Mizoshita T, Mori Y, Shimura T, Tanaka M, Sasaki M, Takahashi S, Asai K, Joh T: Role of ES Cell-Expressed Ras (ERas) in Tumorigenicity of Gastric Cancer. *Am J Pathol* 査読あり, 177:955-963, 2010. DOI 10.2353/ajpath.2010.091056

[学会発表] (計2件)

① 片岡洋望, Role of ES cell-expressed Ras, ERas in Tumorigenicity of Gastric Cancer, The 4th Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology (JUCC), 2010年11月17日, 東京

② 久保田英嗣, Role of ES cell-expressed Ras, ERas in Gastric Cancer, 2010 Cancer Research Conference, 2010年11月8日, カナダ

〔図書〕 (計 0 件)

(1) 研究代表者

久保田 英嗣 (KUBOTA EIJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30405188

(2) 研究分担者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
准教授

研究者番号: 40381785

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70212462

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70363918

鈴木 周吾 (SUZUKI SYUGO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員

研究者番号: 60363933

(3) 連携研究者

なし