

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591943

研究課題名(和文)食道がん細胞株におけるmiR-128b機能解析

研究課題名(英文)The study of the function of miR-128b in ESCC cells

研究代表者

三井 章(Mitsui, Akira)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10405178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：miR-128bが食道扁平上皮癌の予後に関する機序の調査において、細胞の移動に関与するとされるAktの基質Girdinに着目した。食道扁平上皮癌におけるGirdinの役割の研究では、Girdinは食道扁平上皮癌の細胞の移動に関与しており、Girdinの発現が高いと食道扁平上皮癌の浸潤能が亢進することで予後が悪化する可能性があることが示唆された。Girdinが食道扁平上皮癌の予後マーカーとなる可能性、新規治療の標的となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the process of studying the mechanism by which miR-128b influences the survival rate of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients, we focused on Girdin, Akt substrate which is involved in the migration of cells. In the examination of the role of Girdin in ESCC, it was suggested that Girdin is involved in the migration of ESCC as well. In experiments using specimens of ESCC, ESCC tumors whose Girdin expression is high tends to invade deeper. In addition, the 5-year survival rate of the ESCC patients whose Girdin expression is high declined more significantly. Therefore, in ESCC, Girdin may be a prognostic marker and may serve as a therapeutic target as well.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・食道外科学

キーワード：lipofection RT-PCR western blot 移植

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当教室では以前に microarray による解析で miR-128b と食道扁平上皮癌の予後とは相関していることを報告した。

miR-128 は浸潤と細胞の移動に関与しているという報告があり、われわれは Akt の基質の一つで細胞の移動に関与している Girdin に着目した。

2. 研究の目的

miR-128b が食道扁平上皮癌の予後に影響する機序を Girdin を中心に解明する。

3. 研究の方法

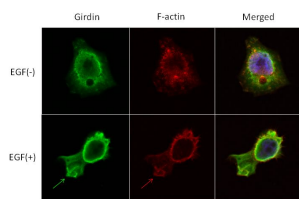
(1) 免疫蛍光染色による Girdin の観察: EGF の刺激下に Girdin の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、葉状仮足の形成における Girdin の機能を観察する。

(2) migration assay: Girdin siRNA によって Girdin を knock down した細胞を用いて、Boyden chamber assay を行うことで Girdin と細胞の移動能との間に関係があるか調べる。

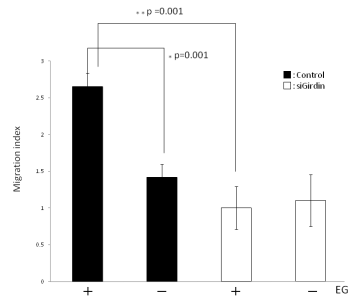
(3) 臨床検体を用いた Girdin の発現と臨床データとの関係の研究: 食道扁平上皮癌の手術標本から Girdin RNA を抽出し、発現量と臨床データとの関係について検討する。

4. 研究成果

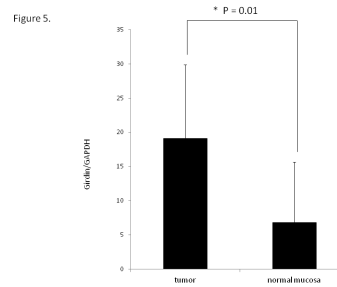
(1) Girdin の抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。EGF で刺激すると食道扁平上皮癌細胞株は葉状仮足を形成した。EGF の刺激なしでは細胞内にびまん性に分布していた Girdin と F-actin は、EGF で刺激すると葉状仮足の先端に集積していた。Girdin は actin との結合部位を有しており、細胞が刺激を受けると actin に結合した Girdin が細胞の進行方向に移動することで葉状仮足を形成する可能性があると考えられた。



(2) migration assay: lipofection によって食道扁平上皮癌細胞株に Girdin siRNA または control siRNA を導入した。これらの細胞株を Boyden chamber assay の upper chamber に入れて 12 時間 incubate。移動した細胞を数えて評価した。Girdin siRNA によって Girdin が knock down された細胞はコントロールに比べて有意に移動能が低下していた。

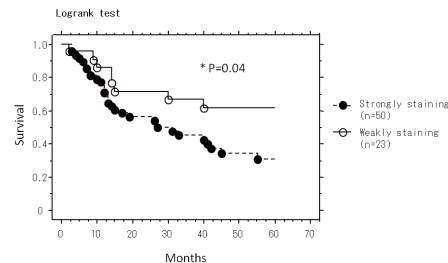


(3) 食道扁平上皮癌患者の手術標本の腫瘍と正常粘膜からそれぞれ RNA を抽出。RNA の発現量を比較すると、同じ患者の Girdin でも Girdin の発現量は正常粘膜よりも腫瘍において有意に高かった。



(3) Girdin RNA 発現量と臨床データとの関係について調査した。食道扁平上皮癌の手術患者を Girdin の発現量の高いグループと低いグループに分けると、Girdin の発現量の高いグループでは Girdin 発現量の低いグループに比べて腫瘍の浸潤度が有意に深かった。また 5 年生存率は、Girdin の発現量が高いグループは低いグループと比べて有意に生存率が低かった。

Girdin expression	Mean age (±SD)	Gender (Male/Female)	primary tumor	lymph node metastasis (+/-)	remote metastasis	TNM stage	lymphatic invasion (+/-)	venous invasion (+/-)
strongly staining (n=50)	63.6 ± 8.3	41/9	T1: 11 T2: 9 T3: 21 T4: 9	33/17	5/45	stage0: 0 stage1: 12 stage2: 9 stage3: 24 stage4: 5	38/10 (2 cases are unknown)	31/17 (2 cases are unknown)
weakly staining (n=23)	62.2 ± 8.6	18/5	T1: 11 T2: 2 T3: 6 T4: 4	8/15	1/22	stage0: 1 stage1: 6 stage2: 3 stage3: 12 stage4: 1	12/8 (3 cases are unknown)	8/13 (2 cases are unknown)
p value	NS	NS	p = 0.024 (T1 vs. T2-T4)	NS	NS	NS (stage0-1 vs. stage2-4) (stage0-2 vs. stage3-4)	NS	NS



以上の結果より、Girdin は食道扁平上皮癌細胞の移動に関与しており、臨床においては食道扁平上皮癌細胞の浸潤能を高めることで予後を不良にする可能性があることが示唆

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 6 件)

Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, Guha S, Sung B, Aggarwal BB, Takahashi H, Takeyama H. Zerb1 inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncol Rep*, peer reviewed, 31, 2014, 51-64

DOI: 10.3892/or.2013.2842

Shibata T, Matsuo Y, Shamoto T, Hirokawa T, Tsuboi K, Takahashi H, Ishiguro H, Kimura M, Takeyama H, Inagaki H. Girdin, a regulator of cell motility, is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, peer reviewed, 29, 2013, 2127-2132

DOI: 10.3892/or.2013.2406

田中達也、桑原義之、木村昌弘、三井 章、石黒秀行、竹山廣光、上腸間膜動脈解離に腹腔動脈解離が合併した 1 例、*臨床外科*、査読有、67, 2012, 825-828

Funahashi H, Wakasugi T, Shiozaki M, Ogawa R, Hara M, Ochi N, Sakamoto M, Matsuo Y, Mitsui A, Takayama S, Kimura M, Sato M, Okada Y, Kuwabara Y, Takeyama H. Two long-term survivors of gastric small cell carcinoma and examine the prognostic factor by using immunohistochemical analysis. 9th International Gastric Cancer Congress, 査読無, 2011, 109-113

Kimura M, Kuwabara Y, Mitsui A, Ishiguro H, Sugito N, Tanaka T, Shiozaki M, Naganawa Y, Takeyama H. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in esophageal cancer. *Oncol Lett*, peer reviewed, 2, 2011, 297-301

Shiozaki M, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Naganawa Y, Shibata T, Fujii Y, Takeyama H. Expression of CD44v6 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, peer reviewed, 2, 2011, 429-434

〔学会発表〕(計 23 件)

Shamoto T, Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Takahashi H, Funahashi H, Okada Y, Takeyama H. Xanthohumol inhibits angiogenesis through VEGF and IL-8 in pancreatic cancer. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

Matsuo Y, Shibata T, Tsuboi K, Shamoto T, Nagasaki T, Morimoto M, Ochi N, Takahashi H, Ishiguro H, Funahashi H, Sato M, Okada Y,

Takeyama H. PTEN down-regulates the VEGF expression and angiogenesis in pancreatic cancer. IAP&KPBA 2013, Sep 4-7, 2013, Sheraton Grande Walkerhill Hotel(Seoul, Korea)

Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Wakasugi T, Funahashi H, Kimura M, Takeyama H. PKD regulates VEGF secretion in gastric cancer. 10th IGCC 2013, Jun19-22, 2013, Centro Congressi Palaexpo Veronafiere(Verona, Italy)

石黒秀行、木村昌弘、舟橋 整、松尾洋一、安藤拓也、小川 了、塩崎みどり、柴田孝弥、齋藤慎一郎、竹山廣光、食道癌における次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析、第 67 回日本食道学会学術集会、2013 年 6 月 13-14 日、大阪国際会議場(大阪府)

佐藤陽子、榊原堅式、上田悟郎、渡邊拓弥、鈴木卓弥、新井根洋、長縄康浩、杉戸伸好、杉浦博士、三井 章、中前勝視、桑原義之、胎便性イレウスで発症した Cystic Fibrosis の 1 例、第 50 回日本小児外科学会学術集会、2013 年 5 月 30-1 日、京王プラザホテル(東京都)

Ishiguro H, Kimura M, Funahashi H, Ogawa R, Shiozaki M, Shibata T, Saito S, Takeyama H. Growth arrest and DNA damage inducible protein 45 alpha (GADD45A) expression is involved in patient prognosis in esophageal cancer. DDW 2013, May18-21, 2013, Orange County Convention Center(Orlando, FL, USA)

柴田孝弥、松尾洋一、齋藤慎一郎、佐川弘之、社本智也、長崎高也、廣川高久、塩崎みどり、小川 了、安藤拓也、高橋広城、若杉健弘、石黒秀行、舟橋 整、竹山廣光、坪井 謙、Akt の基質である Girdin は癌細胞の移動に関与しており、食道扁平上皮癌の予後因子である、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場(福岡県)

石黒秀行、木村昌弘、舟橋 整、若杉健弘、安藤拓也、小川 了、塩崎みどり、竹山廣光、食道扁平上皮癌における膜タンパク(Eカドヘリン、ベータカテニン)の関わり、第 54 回日本消化器病学会大会、2012 年 10 月 10-13 日、神戸国際会議場(兵庫県)

松尾洋一、越智靖夫、高橋広城、坪井 謙、柴田孝弥、社本智也、長崎高也、石黒秀行、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、膵癌における PKD の役割と分子標的治療の可能性、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日ロイトン札幌(北海道)

塩崎みどり、石黒秀行、木村昌弘、佐藤幹則、安藤拓也、小川 了、竹山廣光、大腸癌における CD44v6 発現の検討、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 18-20 日富山国際会議場(富山県)

石黒秀行、木村昌弘、舟橋 整、若杉健弘、安藤拓也、小川 了、塩崎みどり、竹山廣光、食道扁平上皮癌における GPS(Glasgow Prognostic Score)の有用性、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 18-20 日 富山国際会議場(富山県)

松尾洋一、越智靖夫、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、長崎高也、高橋広城、石黒秀行、若杉健弘、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Sung B、Guha S、Natural product(Zerumbone)の抗癌作用に関する検討、日本外科代謝栄養学会第 49 回学術集会、2012 年 7 月 5-6 日 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(東京都)

石黒秀行、木村昌弘、舟橋 整、若杉健弘、安藤拓也、小川 了、塩崎みどり、柴田孝弥、齋藤慎一郎、竹山廣光、食道癌における microRNA 発現、第 66 回日本食道学会学術集会、2012 年 6 月 21-22 日、軽井沢プリンスホテル(長野県)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、柴田孝弥、小出修司、越智靖夫、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、膵癌細胞における zerumbone の VEGF・IL-8 分泌抑制による血管新生抑制効果の検討、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)

松尾洋一、越智靖夫、小出修司、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、高橋広城、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Guha S、膵癌におけるサイトカインネットワークの解明と分子標的治療への応用、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)

柴田孝弥、松尾洋一、齋藤慎一郎、社本智也、長崎高也、廣川高久、坪井 謙、宮前拓、宮井博隆、石黒秀行、竹山廣光、食道扁平上皮癌の浸潤・転移における Girdin の役割、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12-14 日、幕張メッセ(千葉県)

松尾洋一、越智靖夫、小出修司、坪井 謙、社本智也、柴田孝弥、舟橋 整、佐藤幹則、岡田祐二、竹山廣光、Sung B、Guha S、Natural Product Zerumbone の抗腫瘍効果の検討、第 27 回日本静脈経腸栄養学会、2012 年 2 月 23-24 日、神戸国際会議場(兵庫県)

柴田孝弥、松尾洋一、齋藤慎一郎、廣川高久、社本智也、長崎高也、坪井 謙、小出修司、原 賢康、越智靖夫、高橋広城、石黒秀行、竹山廣光、Akt の基質である Girdin と食道扁平上皮癌細胞の移動との関連、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋国際会議場(愛知県)

坪井 謙、松尾洋一、社本智也、長崎高也、廣川高久、柴田孝弥、小出修司、越智靖夫、若杉健弘、舟橋 整、木村昌弘、岡田祐二、竹山廣光、Zerumbone は胃癌の VEGF 産生を減らし、血管新生を抑制する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、

名古屋国際会議場(愛知県)

社本智也、松尾洋一、長崎高也、廣川高久、齋藤慎一郎、坪井 謙、柴田孝弥、小出修司、越智靖夫、高橋広城、舟橋 整、岡田祐二、竹山廣光、ゼルンボンに NF- B の活性を抑えることにより膵癌血管新生を抑制する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋国際会議場(愛知県)

- ②① 長縄康浩、石黒秀行、齋藤慎一郎、柴田孝弥、塩崎みどり、小川 了、三井 章、木村昌弘、桑原義之、竹山廣光、食道扁平上皮癌における WRNmRNA の発現と臨床病理学的意義、第 65 回日本食道学会学術集会、2011 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県)
- ②② 舟橋 整、松尾洋一、原 賢康、若杉健弘、高山 悟、三井 章、木村昌弘、岡田祐二、桑原義之、竹山廣光、膵癌細胞に対するグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を介した uPA と MMP の役割、第 66 回日本消化器外科学会総会、2011 年 7 月 13-15 日、名古屋国際会議場(愛知県)
- ②③ 塩崎みどり、石黒秀行、桑原義之、木村昌弘、三井 章、長縄康浩、竹山廣光、大腸癌における CD44variant6 発現の臨床病理学的意義、第 111 回日本外科学会定期学術集会、紙上開催

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 章(MITSUI Akira)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)研究員

研究者番号: 10405178

(2) 研究分担者

柴田孝弥(SHIBATA Takahiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)助教

研究者番号: 90592501

塩崎みどり(SHIOZAKI Midori)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)助教

研究者番号: 90531004