

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791439

研究課題名(和文) 胃癌リンパ節転移におけるマイクロRNAの発現と意義

研究課題名(英文) The microRNA expression in lymph node metastasis of gastric cancer

研究代表者

齋藤 元伸 (Saito, Motonobu)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90611749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では炎症による発癌の機序とマイクロRNAの関わりを明らかにすることを試みた。210例の胃癌手術切除検体におけるCDX2とp53発現に着目して、その染色性や臨床病理学的因子との相関を検討した。CDX2の発現陰性例(109例)は、患者の予後不良性と有意に相関した。これらCDX2陰性例は、p53の発現が陰性の未分化型胃癌が多かった。つまり、p53変異が認められない症例では、IL-6/STAT3パスウェイがその下流のmiR-181bを介してCDX2の発現を抑制することとp53/miR-34aパスウェイを抑制することで癌化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that decreased expression of CDX2 by immunohistochemistry was associated with poor cancer-specific survival in our 210 gastric cancer cases, consistent with several previous studies. We further investigated the mechanisms of CDX2 suppression, including the IL-6/STAT3 and p53 pathways. We confirmed that CDX2 was suppressed by activation of the IL-6/STAT3 pathway via miR-181b in vitro. We further revealed that gastric cancers, particularly those that are undifferentiated, with CDX2-negative expression are associated with p53-negative staining. The activation of the IL-6/STAT3 pathway suppressed miR-34a, which is induced by p53, suggesting that the activation of this inflammation signaling pathway suppresses the p53 pathway in tumors without TP53 mutation, resulting in poor prognostic outcome. In conclusion, the activation of the IL-6/STAT3 pathway contributes to gastric carcinogenesis through suppression of CDX2 and inactivation of p53, resulting in poor prognostic outcome.

研究分野：ゲノム生物

キーワード：胃癌 CDX2 マイクロRNA 炎症発癌

1. 研究開始当初の背景

(1)胃癌は全癌死の約 10%を占める予後不良な悪性腫瘍であり、開発途上国の男性に特に多く発生することが知られている¹⁾。発生の原因についてはすべてがわかっているわけではないものの、リスク因子として野菜摂取不足、高塩分食の摂取、喫煙などが挙げられる。なかでも、ピロリ菌感染や他の因子による慢性炎症が発がん大きく寄与することが分かってきた²⁾³⁾。

(2) Caudal-type homeobox 2 (CDX2)は小腸の発育に關与するホメオボックス蛋白のひとつで、通常ヒトの正常胃において発現が認められることはない。しかし、ピロリ菌に感染した胃粘膜では腸上皮化生と關連して CDX2 が異所性に過剰発現することが知られている⁴⁾。これまで我々は、CDX2 が低発現した胃癌症例が有意にリンパ節転移や脈管浸潤をきたすことを見だし、CDX2 が胃癌の発生と進展に抑制的に關与する可能性があることを報告してきた⁵⁾。

(3)マイクロ RNA は 20 塩基ほどの長さを持つ非翻訳単鎖 RNA であり、メッセンジャー RNA に対して抑制的に作用することで生体の発生や分化、さらには恒常性の維持に必須な働きをしている⁶⁾。近年、マイクロ RNA の研究は急速な発展をきたしており、とりわけマイクロ RNA と癌の關連が注目を集めている。胃癌においても数多くのマイクロ RNA の発現異常が報告されており、胃癌の発生進展にマイクロ RNA が關与することがほぼ確実である。

2. 研究の目的

(1)従来より我々は胃癌の進展・浸潤に注目して研究を進めてきており、CDX2 が胃癌のリンパ節転移の予測因子として有用である、ということ報告してきた⁵⁾。この蛋白は胃癌組織において発現異常をきたすことにより胃癌の発癌にも關与しており、その発現異常をきたす原因の一つとしてマイクロ RNA を介する経路が想定されている。他の癌種の in vitro の系ではあるものの miR-9 や miR-181b が Cdx2 遺伝子の発現を制御していることが報告されている⁷⁾⁸⁾。Cdx2 遺伝子は IL-6 と STAT3 という炎症が關与する発癌の経路の下流に位置しており、この系はピロリ菌感染が重要な発生原因のひとつである胃癌において重要な因子と考えられている。さらに、IL-6/STAT3 の活性化はその下流のマイクロ RNA である miR-21 や miR-181b を介して NF- κ B の活性化をもたらす発癌に關与することが報告されている⁹⁾。そのため、マイクロ RNA を理解することにより胃癌の病態、特に炎症を起点とした癌化、を一元的により深く解明でき、バイオマーカーのみならずマイクロ RNA をターゲットとした治療法も探れる可能性がある。

(2)同様に、in vitro の系ではあるが miR-21 がマトリックスメタプロテアーゼ制御因子を介し転移促進的に働くことが報告されている¹⁰⁾。このようにマイクロ RNA がリンパ節転移に關与していることは推測されているものの、現在までに臨床検体を用いた知見は乏しいため、まだまだ不明な点が多く研究を進める必要があると思われる。そのため、胃癌症例における CDX2 の発現と臨床病理学的因子との比較、さらに、CDX2 を制御しうるマイクロ RNA の同定、胃癌細胞株を用いた細胞実験での確認などが病態の理解に必須である。

3. 研究の方法

(1)外科的に切除された 210 例の原発胃癌検体を本研究では用いる。全例ともに日本人であり、術前化学療法や術前放射線療法の既往はない。各例において、組織学的分化度・TNM 分類・リンパ節浸潤の有無・脈管浸潤の有無といった病理学的診断とともに、年齢・性別・予後といった臨床的因子を集めた。組織学的分化度については、以前の報告を基に分化型と未分化型に 2 分した。分化型は高分化もしくは中分化管状腺癌と乳頭腺癌を含み、未分化型は低分化腺癌と印環細胞癌を含むものとした。

(2)CDX2 と p53 の発現は免疫染色法を用いて診断した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片から 5 μ m 厚に薄切された切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色による診断とともに、抗 CDX2 抗体と抗 p53 抗体による染色をおこなった。CDX2 発現については、核染色が陽性の腫瘍細胞が全腫瘍細胞の 5%以上である場合を、発現陽性例と診断した。

(3)標的遺伝子を制御しうるマイクロ RNA の選定は、その相補性に基いて予測することができる複数の公開データベースを利用した。Micro Cosm Targets Version5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/#>)、TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、PicTar(<http://pictar.mdc-berlin.de/>)。これらはおの異なる予測モデルを用いているため予測されるマイクロ RNA は各データベースによって異なる結果となる。そのため各アルゴリズムで予測が多く重なったマイクロ RNA を候補として絞り込むことにした。

(4)細胞実験において特異的なマイクロ RNA を発現させるために、マイクロ RNA の前駆体 (pre-miR) を胃癌細胞株に導入した。また、炎症発癌を理解するために IL-6/STAT3 系の上流の因子である IL-6 を発現させるため、IL-6 リコンビナントを胃癌細胞株に導入した。いずれも、導入から 48 時間後に細胞を回収して全 RNA を抽出した。RNA の質を測定して実験に支障がないことを確認したのち、

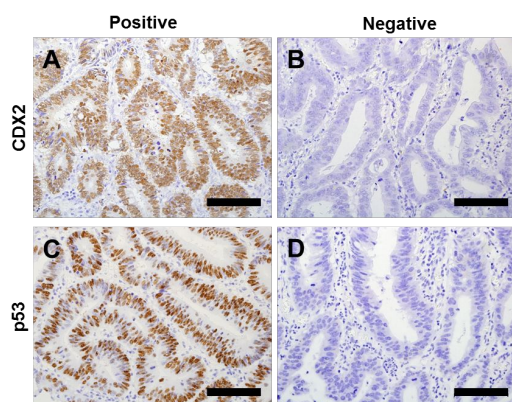
マイクロRNA強制発現の可否を半定量的Real time PCR法 (Taqman法) を用いて調べた。

(5)免疫染色結果は発現陽性と陰性とに2分して、予後との相関を単変量解析と多変量解析を用いておこなった。年齢は65歳を境に2分、腫瘍ステージはIとII/IIIに2分した。図は平均±SD、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると示した。

4. 研究成果

(1)本研究に用いた胃癌210例の平均年齢は64歳(29歳~87歳)、男性149例・女性61例、分化癌112例・未分化癌98例、リンパ節転移陽性173例・陰性37例、脈管浸潤陽性152例・陰性58例、Stage Iが111例、IIが40例、IIIが59例である。まず初めに210症例の胃癌検体におけるCDX2とp53の発現を免疫染色法にて評価した(図1)。CDX2染色陽性は101例・陰性109例、p53染色陽性が104例・陰性が106例であった。

図1



染色結果と臨床病理学的因子を比較するとCDX2発現陰性は女性($P=0.006$)と未分化癌($P=0.002$)に統計学的に有意に多くみられた。また、CDX2発現陰性は腫瘍浸潤が深い例($P < 0.0001$)とステージが高い例($P < 0.001$)に正の相関を示した。

(2)次にCDX2の発現が胃癌の予後予測マーカーとなりうるかについて検討した。まず、癌特異的生存期間と全生存期間をエンドポイントとしてCox回帰単変量解析をおこなった。その結果、CDX2発現陰性は統計学的に有意に癌特異的生存期間の不良性と相関していたが(ハザードレシオ=2.6、95%信頼区間=1.37-5.27、 $P=0.003$)、全生存期間は相関が認められなかった(ハザードレシオ=1.47、95%信頼区間=0.92-2.40、 $P=0.11$)。年齢・性別・組織学的分化度・ステージを加えた多変量解析においてもCDX2発現陰性は独立した癌特異的生存期間の予後予測因子であることが確認できた(ハザードレシオ=2.1、95%信頼区間=1.05-4.41、 $P=0.03$)。

さらに Kaplan-Meier 法(ログランク検定)にてさらに予後との相関を解析したところ、やはり、CDX2発現陰性は癌特異的生存期間の不良性と有意に相関したが($P=0.004$)(図2)、全生存期間とは相関を示さなかった($P=0.109$)(図3)。

図2

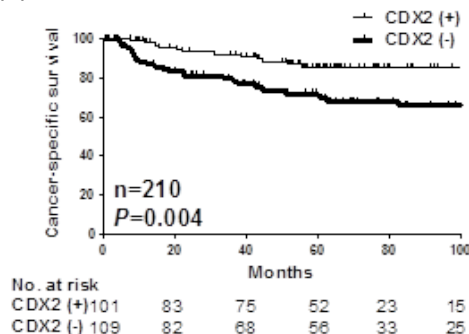
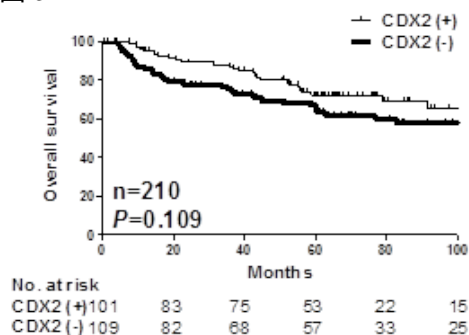


図3

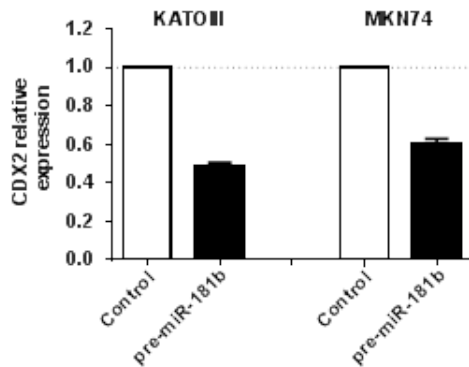


(3)CDX2とp53の発現を比較してみると、p53染色陽性例は、CDX2染色陽性例に比べてCDX2染色陰性例に少なかった。そこで、CDX2陰性例に注目してみると、p53発現陽性例は組織学的分化型例に比べて、有意に未分化型例で少なかった。これらの結果から、p53の変異はすくなくともCDX2発現陽性分化型胃癌に比べてCDX2発現陰性未分化型胃癌例で少ないということが明らかとなった。

(4)最近の多くの研究によって炎症に関連した遺伝子発現はマイクロRNAによって制御されていることが報告されている。そのため、本研究においてもCDX2発現を直接制御するマイクロRNAに注目することとした。文献報告と複数のマイクロRNAの結合予測データベースを用いることにより、IL-6/STAT3パスウェイの下流に位置するmiR-181bを候補マイクロRNAとして選択した。実際にmiR-181bがCDX2の発現を直接制御するかどうかを調べるために、miR-181bの前駆体をp53発現ノックアウト型のKATOIII胃癌細胞とp53野生型のMKN74胃癌細胞に導入してmiR-181bを強制発現させた。その結果、コントロールのマイクロRNA前駆体を導入した細胞に比べて、

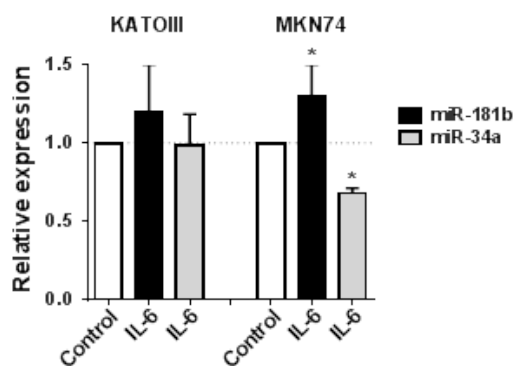
miR-181b が強制発現している細胞において、CDX2 の発現は KATOIII で 0.5 倍と MKN74 で 0.6 倍に低下しており、miR-181b は直接 CDX2 の発現を低下させることが明らかとなった (図 4)。

図 4



(5)次に miR-181b を制御する IL-6/STAT3 パスウェイと p53 のパスウェイのかかわりをマイクロ RNA から理解することとした。IL-6 リコンビナントを導入することによる IL-6 強制発現にて STAT3 の発現が上昇することを確認したのち、STAT3 が制御しうる miR-181b と miR-34a の発現を調べた。MKN74 細胞においては IL-6 発現によって miR-181b の発現上昇と miR-34a の発現低下が認められたにも関わらず、KATOIII 細胞においては共に認められなかった(図 5)。これらの結果は IL-6/STAT3 パスウェイの活性化は miR-181b 発現上昇を介して CDX2 の発現を抑制し、IL-6 が p53 を、また、IL-6 の下流の STAT3 が miR-34a の発現を抑制する可能性があることを示唆している。p53 変異が見られる場合には、もともと miR-34a が抑制されているために IL-6 の強制発現によっても miR-34a の発現抑制が認められなかったと推定された。

図 5



(6)本研究においてはいくつかの制限がある。まず、ピロリ菌感染の既往情報を得られなかったことがある。また、マイクロ RNA の標的

となりうる遺伝子は膨大であるため、今回の細胞実験にてすべてを明らかにすることはできない。そのため、さらなる検討が必要と思われる。

<引用文献>

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011;61(2):69-90.
2. Polk DB, Peek RM, Jr. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer. 2010;10(6):403-14.
3. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. Carcinogenesis. 2010;31(1):37-49.
4. Satoh K, Mutoh H, Eda A, et al. Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: effect of eradication of Helicobacter pylori. Helicobacter. 2002;7(3):192-8.
5. Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, et al. CD44v6, MMP-7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer. Oncol Rep. 2009;22(4):745-55.
6. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat Rev Genet. 2011;12(2):99-110.
7. Ji J, Yamashita T, Budhu A, et al. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. Hepatology. 2009;50(2):472-80.
8. Rotkrua P, Akiyama Y, Hashimoto Y, et al. MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. Int J Cancer. 2011;129(11):2611-20.
9. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. Mol Cell. 2010;39(4):493-506.
10. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et

al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. Mol Cell Biol. 2008;28(17):5369-80.

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)

Saito M (1番目/15人中)、et al、A Three-microRNA Signature Predicts Responses to Platinum-Based Doublet Chemotherapy in Patients with Lung Adenocarcinoma、Clin Cancer Res. 2014 Sep 15;20(18):4784-93、doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1096、査読あり。

Akagi I、Saito M (10番目/19人中)、et al、Combination of protein coding and non-coding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma、Cancer Res. 2013 Jul 1;73(13):3821-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0031、査読あり。

Okayama H、Saito M (2番目/9人中)、et al、NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression、Int J Cancer. 2013 Jan 1;132(1):9-18. doi: 10.1002/ijc.27644、査読あり。

[学会発表](計1件)

齋藤 元伸、他。胃癌における CDX2 遺伝子の発現とその意義、第 85 回日本胃癌学会、2013 年 2 月 28 日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 元伸 (SAITO Motonobu)、
国立がん研究センター 研究所
ゲノム生物学研究分野 研究員
研究者番号：90611749