

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19590733

研究課題名（和文）プロスタグランジンの輸送・代謝機構からの胃癌の病態生理の解明

研究課題名（英文） Roles of prostaglandin transporters and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in the pathogenesis of gastric cancer

研究代表者

渡邊 俊雄 (WATANABE TOSHIO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50336773

研究成果の概要（和文）：

Prostaglandin (PG)の代謝酵素である 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)の胃癌の病態生理における役割について検討した。進行胃癌 71 例中 35 例において 15-PGDH 蛋白の発現は低下しており、多変量解析では 15-PGDH の発現低下は生命予後の不良と関連していた。15-PGDH 陰性群では 15-PGDH 陽性群に比較して Ki67 陽性率は有意に高値であった。15-PGDH 発現を siRNA 法でノックダウンすると胃癌細胞株である AGS 細胞の増殖能は亢進した。以上の結果から 15-PGDH は胃癌における独立した予後規定因子であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated role of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH), a catabolic enzyme for biological inactivation of prostaglandins (PG), in gastric carcinogenesis. 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. The proportion of Ki67-positive cells in 15-PGDH-negative adenocarcinoma was higher than that in 15-PGDH-positive adenocarcinoma. In an in vitro study, use of specific siRNA to silence 15-PGDH enhanced cell proliferation in the gastric cancer cell line AGS, which expresses 15-PGDH. These findings suggest that reduction of 15-PGDH is an independent predictor of poor survival associated with enhancement of cell proliferation in gastric adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：癌・プロスタグランジン・細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン (PG) はアラキドン酸の代謝産物であり、ほぼ全身の臓器で産生され、さまざまな臓器組織で特有の生理活性を發揮し、生体のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている。たとえば、PGE₂は消化管における代表的な PG であるが、胃においては胃酸分泌抑制作用、細胞保護作用ならびに粘液分泌促進作用など多彩な作用を發揮し、外的・内的な傷害因子から胃粘膜を防御している。

一方、PG 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害剤であるアスピリンが大腸癌の死亡率を使用頻度・用量依存的に減少させることが報告されて以来、消化器癌の発生・増殖における PG の役割が精力的に検討され、これまでに多くの知見が得られている。すなわち、COX の誘導型アイソザイムの COX-2 が癌組織、特に癌細胞において高発現しており、COX-2 由来の多量の PG が、1) アポトーシスの抑制、2) vascular endothelial growth factor (VEGF) や hepatocyte growth factor (HGF) などの細胞増殖因子およびその受容体の発現の亢進、3) マトリックスメタロプロテアーゼの活性の亢進、4) 腫瘍免疫の抑制などの作用を介して癌組織の増殖をもたらしていることが示唆されている。

最近、COX 阻害剤による腫瘍増殖の抑制作用が、外因性の PGE₂ 投与により消失することが実験的小腸腫瘍モデルを用いた検討により示され、癌組織の増殖機構においても PGE₂ が中心的な役割を果たしていることが示唆されている。現在では、PG の作用は標的細胞膜上の特異的な受容体を介して発現することが判明しており、PGE 受容体は構造的に異なる四つのサブタイプ (EP1-4) に分類されている。そして、各 EP サブタイプの癌病態における役割が特異的なアゴニスト、アンタゴニストあるいは EP のノックアウトマウスを用いて検討されており、多くの興味深い知見が得られている。

ところで、PG は細胞内で合成されるが膜貫通性はかなり低く、単純な拡散ではなく促進的膜輸送システムにより細胞外に放出されていることが示唆されている。また、細胞外の PG が EP などの細胞表面の受容体に結合しない場合には、細胞内に再取り込みを行い不活化されることになるが、この段階においても特定の機構が存在する。この PG の膜輸送を担っているのがトランスポーター (輸送体) である。したがって、PG の生物学的作用の發揮あるいはその作用の不活にはトランスポーターの存在が不可欠であるといえる。現在、PG のトランスポーターとしてクローニングされたものには、1) PG トランスポーター (PGT)、2) 有機アニオントラン

スポーター 1 (Organic Anion Transporter 1; OAT1)、3) 有機アニオントランスポーター 2 (Organic Anion Transporter 2; OAT2)などが知られている。

一方、PG の代謝・分解系もユニークな機構が存在する。すなわち、PG のトランスポーターで再取り込みされた PGE₂ や PGF₂ は、細胞内に存在する 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) によりそれぞれ対応する 15-ケト PG に代謝され不活化される。一方、PGI₂ は化学的に不安定であり、体循環系において非酵素的に 6-ketoPGF₁ に変換され、その半減期は約 3 分程度である。以上のように、15-PGDH は PGE₂ の作用の短時間の終息や、あるいは過剰な PGE₂ を代謝、不活化することによる作用程度の軽減に極めて重要な役割をはたしているものと考えられる。すなわち、癌増殖機構における PG の役割を解明するためには COX などの合成酵素に加えて、トランスポーターおよび 15-PGDH などから構成される輸送・代謝機構を含めた検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、PG 代謝酵素である 15-PGDH の胃癌の病態生理における役割を検討した。

具体的には、

- (1) 胃癌組織における 15-PGDH の発現動態、
 - (2) 15-PGDH の発現と生命予後との関連、
 - (3) 15-PGDH の細胞増殖機構における役割、
- について検討した。

3. 研究の方法

(1) 大阪市立大学医学部附属病院で外科切除を受けた胃癌患者 71 例を対象にした。切除胃癌組織をホルマリン固定、パラフィン包埋して病理組織標本を作成した。薄切片を作成して 15-PGDH に対する免疫化学組織染色を行い、15-PGDH の発現を半定量して発現状態と生命予後との関連を Kaplan-Meier 法にて解析した。

(2) 抗 15-PGDH および抗 Ki67 抗体を用いて免疫組織化学染色ならびに免疫蛍光染色を行い、胃癌組織における 15-PGDH の発現と細胞増殖の関連を検討した。両者の発現の関係を検討した。なお、細胞増殖能の指標としては胃癌細胞における Ki67 陽性細胞の割合である Ki67-labeling Index を用いた。

(3) 誘導型の PG 合成酵素で、各種腫瘍性疾患との関連が明らかになっている COX-2 についても、抗 COX-2 抗体を用いた免疫組織化学染色により胃癌組織における発現を評価し、Ki67-labeling Index との相関など、1

5-PGDH と同様の検討を行った。

(4) 各種の胃癌細胞株 (AGS, MKN45, MNN7, NUGC3, NCI-N87) における 15-PGDH 発現を検討した。蛋白発現は Western blot 法、mRNA 発現は RT-PCR 法にて検討した。

(5) 胃癌細胞株 AGS 細胞の 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。細胞増殖能については WST-1 法および BrdU-labeling Index を用いた。

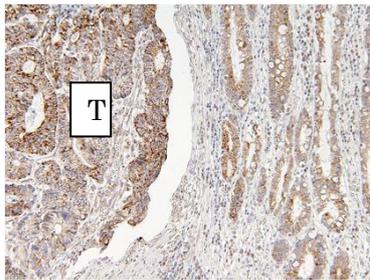
4. 研究成果

(1) 15-PGDH と COX-2 の発現

①胃癌組織および非癌部における発現

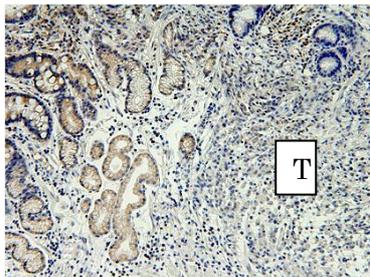
15-PGDH は非癌部においては上皮細胞ならびに間質の炎症性細胞の細胞質に発現していた。一方、胃癌組織では 71 例中 36 例において胃癌細胞の 15-PGDH 発現が認められたが、残りの 35 例では発現が消失あるいは低下していた。

また、COX-2 も胃癌細胞の細胞質に発現が認められ、48 例が陽性であった。



T: 腫瘍部

15-PGDH 発現例 (陽性例)



15-PGDH 発現低下例 (陰性例)

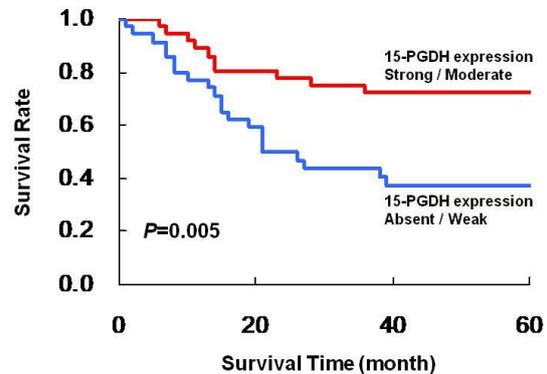
②発現と臨床病理因子との相関

15-PGDH の発現陰性群では陽性群と比較して未分化型胃癌の頻度および胃癌の進行度が有意に高かった。性別、年齢、リンパ節転移の頻度などは両群間に差を認めなかった。

一方、COX-2 発現の有無により 2 群に分けて検討した場合には、上記各臨床病理因子との有意な関連は認めなかった。

(2) 胃癌組織における 15-PGDH の発現と生命予後との関連

15-PGDH 発現陰性群では 15-PGDH 発現陽性群に比較して有意に累積生存率が低下していた。



また、胃癌の進行度も生命予後と有意に相関する因子であったが、COX-2 発現、性別、年齢胃癌の組織型などの因子は予後と関連を認めなかった。さらに、15-PGDH 発現ならびに胃癌の進行度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。多変量解析による胃癌予後因子の検討

Valuables	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

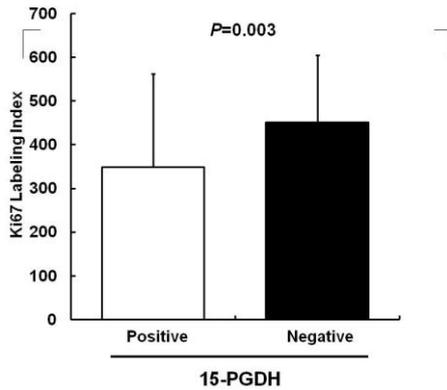
(3) 15-PGDH あるいは COX-2 発現と胃癌細胞増殖

免疫蛍光 2 重染色において 15-PGDH の発現が低下した胃癌組織においては、発現組織に比較して Ki67 陽性細胞が多い傾向が認められた。

15-PGDH 発現陰性群における Ki67-labeling Index は陽性群に比較して有意に高かった。

一方、COX-2 発現の陰性群と陽性群の間には Ki67-labeling Index は差を認めなかった。

(4) 胃癌細胞株における 15-PGDH の発現と役割

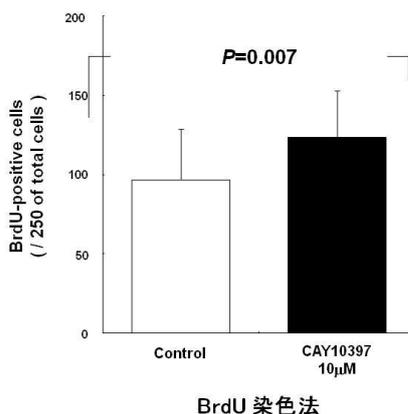
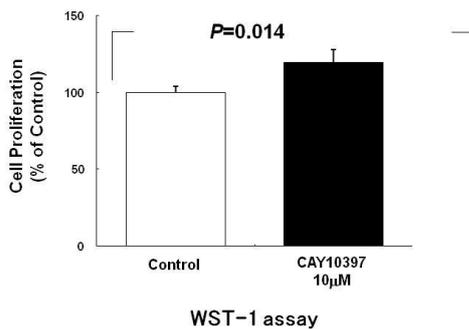


① □各種胃癌細胞における 15-PGDH の発現

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。

② 15-PGDH 活性阻害あるいは発現抑制が細胞増殖能に及ぼす影響

15-PGDH 活性阻害剤である CAY10397 を AGS 細胞に添加すると細胞増殖は有意に亢進した。また、AGS 細胞の 15-PGDH の発現を 15-PGDH に特異的な 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。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Tatsuaki 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, Vol. 101, 2010, 550-558.

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、胃癌における 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase の意義、Progress in Medicine、査読無、30 卷 3 号 2010、791-796

〔学会発表〕 (計 3 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、日本消化器病学会総会、2010 年 4 月 24 日、新潟

② 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

③ 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集会、2008 年 2 月 7 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 俊雄 (WATANABE TOSHIO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50336773

(2) 研究分担者

藤原 靖弘 (FUJIWARA YASUHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40285292

富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80336768

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

(3) 連携研究者

なし