

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591580

研究課題名（和文）

胃癌発癌機構の臨床的解析

研究課題名（英文）

Clinicopathological analysis of carcinogenesis of gastric carcinoma

研究代表者

笹子 三津留 (Sasako Mitsuru)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40143490

研究成果の概要（和文）：

【研究の目的】胃癌組織における各種 morphogen 遺伝子変異および AID 遺伝子発現と臨床予後との関連性を解析し、stem cell signal と密接に関連する上皮間葉細胞間分化転換 EMT:epithelial-mesenchymal transition の関連についても明らかにする。

【研究実績】

1. AID/EMT 遺伝子の発現と予後との関連性を univariate analysis にて統計学的に解析するために症例を追跡中である
2. 浸潤度別・組織型別の EMT 関連分子や AID 遺伝子発現を real-time RT-PCR array で行った。浸潤能の評価には AID 遺伝子よりも EMT 関連遺伝子の発現の方が重要であり、病期・予後との強い関連性を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Purpose

We focused to prognosis of gastric cancer patients, and the expression of AID/Epithelial-mesenchymal transition related gene in gastric cancer tissue.

Results

1. We established a database of gastric cancer patients in Hyogo Collage of Medicine, which contains clinical factor, pathological factors, the expression of AID/EMT related genes.
2. Clinicopathological features of gastric cancer are pathological heterogeneity and invasiveness. We performed quantitative real-time RT-PCR array for AID/EMT (84genes) using resected gastric cancer tissue in our hospital. EMT related gene was significantly related to invasiveness of diffuse type of 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
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：外科系臨床医学・胃十二指腸外科学

キーワード：癌幹細胞・ピロリ菌・食道・胃癌・hedgehog情報伝達系・シチジデアミナーゼ・分化

1. 研究開始当初の背景

近年、上部消化管の癌化には cancer stem cell model に基づいて、Hedgehog (Hh)・Wnt/E-cadherin・Notch 情報伝達系など発生分化に関わる様々な morphogen の関与が報告されている (Nature 425: 846-51, 2003,)。またヘリコバクター・ピロリ (H. pylori) 菌感染は胃発癌の危険因子であるが、2007 年 cag 病原性アイランド (cagPAI) 陽性の H. pylori が胃上皮細胞に感染すると I κ B キナーゼ依存性 NF- κ B 活性化経路を介して、DNA/RNA 編集酵素として作用するシチジンデアミナーゼファミリーに属する活性化誘導型シチジンデアミナーゼ (AID) の異所性発現が誘導されることから、AID の異所性発現が胃粘膜での遺伝子変異を蓄積させ発癌を引き起こす可能性が明らかとなった (Nature Med 13:470-6, 2007.)。一方で、癌浸潤や創傷治癒に深く関与するとされている上皮間葉細胞間分化転換 Epithelial-mesenchymal transition: EMT 関連分子である E-cadherin・Notch・SNAIL・ZEB・SOX なども、同時に癌化における morphogen であるとの報告がある。これらの基礎研究の成果を踏まえて経験症例を再考した結果、癌化・再発を防ぎ胃癌患者の予後を根幹的に向上させるには、癌細胞の供給源である cancer stem cell や宿主の代謝・免疫応答を考慮した治療法の再構築が不可欠であると考えに至った。そこでわれわれは、胃癌外科標本の臨床データおよび病理組織サンプルを用いて、胃癌組織における各種 morphogen 遺伝子変異および AID/EMT 遺伝子発現と臨床予後との関連性を解析し、将来の分子標的療法に繋げるべく本研究を立案した。

2. 研究の目的

胃癌組織における各種 morphogen 遺伝子変異および AID 遺伝子発現と臨床予後との関連性を解析し、将来の分子標的療法に繋げるべく本研究を立案した。また、胃がんにおける stem cell signal と密接に関連する EMT: epithelial-mesenchymal transition の関連についても明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 胃癌症例の性・年齢・部位・ステージ・進達度・分化度・遠隔転移の有無・リンパ節転移の有無・腹膜播種の有無・組織における AID/EMT 遺伝子の発現などを網羅したデータベ

ースの構築を行い、多変量解析を行うための準備を行った。当科では年間胃癌手術症例数は約 150 症例であり、そのうち化学療法などの手術前治療の無い症例を対象とした。

- (2) 胃癌切除組織より RNA を精製して AID/EMT 遺伝子発現を定量的リアルタイム RT-PCT array を行い、関連分子の発現解析を行った。具体的には、組織型別・浸潤度別・部位別 (粘膜側腫瘍・漿膜側腫瘍・腹膜転移腫瘍など) 別に、AID/EMT 遺伝子発現を解析した。胃癌組織・非癌部組織を同一症例から採取した。腹膜播種症例から腹膜転移組織のみを採取した。解析対象 84 遺伝子は以下のとおりであり、GAPDH 遺伝子発現をコントロールとして定量解析を行った。

Differentiation & Development:

AKT1, BMP1, BMP7, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSP, ERBB3, F11R, FOXC2, FZD7, GSC, JAG1, KRT14, MITF, MST1R, NODAL, NOTCH1, PTP4A1, SMAD2, SNAI1, SNAI2, SOX10, TGFB2, TGFB3, TMEFF1, TWIST1, VCAN, WNT11, WNT5A, WNT5B.

Morphogenesis:

CTNNB1, FOXC2, JAG1, RAC1, SMAD2, SNAI1, SOX10, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TWIST1, WNT11, WNT5A

Cell Growth & Proliferation:

AKT1, BMP1, BMP7, CAV2, CTNNB1, EGFR, ERBB3, FGFBP1, FOXC2, IGFBP4, ILK, JAG1, MST1R, NODAL, PDGFRB, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, VCAN, ZEB1.

Migration & Motility:

CALD1, CAV2, EGFR, FN1, ITGB1, JAG1, MSN, MST1R, NODAL, PDGFRB, RAC1, STAT3, TGFB1, VIM

Cytoskeleton:

CAV2, KRT7, MAP1B, PLEK2, RAC1, VIM.

Extracellular Matrix & Cell Adhesion:

BMP1, BMP7, CDH1, CDH2, COL1A2, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSC2, EGFR, ERBB3, F11R, FN1, FOXC2, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, MMP2, MMP3, MMP9, PTK2, RAC1, SERPINE1, SPP1, TGFB1, TGFB2, TIMP1, VCAN.

Signaling Pathways:

Estrogen Receptor: CAV2, ESR1, KRT19, TGFB3.
G-Protein Coupled Receptor: AKT1, FZD7, GNG11, RAC1, RGS2.
Integrin-Mediated: COL3A1, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, PTK2.
Notch: FOXC2, JAG1, NOTCH1.
Receptor Tyrosine Kinase: EGFR, ERBB3, PDGFRB, RGS2, SPARC.
TGF β / BMP: BMP1, BMP7, COL3A1, SMAD2, TGFB1, TGFB2, TGFB3.
WNT: CTNNB1, FZD7, GSK3B, WNT11, WNT5A, WNT5B.

Transcription Factors:

CTNNB1, ESR1, FOXC2, GSC, MITF, NOTCH1, SIP1, SMAD2, SNAI2, SNAI3, SOX10, STAT3, TCF3, TCF4, TWIST1, ZEB1, ZEB2.

- (3) 特異的に発現変化の見られた分子については、同一症例での免疫組織染色を行って組織における局在解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 胃癌症例において性・年齢・部位・ステージ・進達度・分化度・遠隔転移の有無・リンパ節転移の有無・腹膜播種の有無・組織における AID/EMT 遺伝子の発現などを covariate として、予後の関連性を univariate analysis にて統計学的に解析するために症例を追跡中である
- (2) 病期と生命予後に強く影響を与える浸潤能の評価には AID 遺伝子よりも EMT 関連遺伝子の発現の方が重要であり、病期・予後の強い関連性を認めた。具体的には、浸潤型胃癌では早期に EMT (type3) が起きており腹膜播種胃癌組織においてその傾向は顕著であった。また、同一症例においても部分的に浸潤型組織型に変化した場合は、やはり EMT 関連分子の発現変化が起きることも明らかになった。浸潤型胃癌 (印環細胞癌・低分化胃癌・粘液癌) では粘膜内で既に EMT 関連分子の発現が明らかであり、腫瘍先進部位における変化は乏しかった。一方で分

化型胃癌を代表とする腫瘍では腹膜転移では EMT 関連分子の高発現を認めるものの、粘膜内と漿膜側での変化は少なかった。しかし、分化型胃癌が腫瘍先進部において浸潤型に変化する場合には主に TWIST1 などの転写因子に大きな変化が見られた。

- (3) スキルス胃がんを代表とする低分化浸潤性胃がんでは、がん関連線維芽細胞: CAFs の増生・浸潤が高度であるが、SNAIL2/PDGFRB などの発現亢進が著明であり EMT (type2) が起きていることも明らかになった。本来、創傷治癒における生理的反応である EMT (type2) が腫瘍浸潤において活発に起きており、癌細胞自身の細胞接着能の変化 (E-cadherin の発現低下など) と相互反応を起こしていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

すべての論文は査読あり

(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7件)

1. H. Iinuma, T Watanabe, K. Mimori, M. Adachi, N. Hayashi, J. Tamura, K. Matsuda, R. Fukushima, K. Okinaga, M. Sasako, and M. Mori: Clinical Significance of Circulating Tumor Cells, Including Cancer Stem-Like Cells, in Peripheral Blood for Recurrence and Prognosis in Patients with Dukes' Stage B and C Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(12): 1547-1555, 2011.
2. Y. Kurokawa, M. Sasako, T. Sano, T. Shibata, S. Ito, A. Nashimoto, A. Kurita and T. Kinoshita, for the Japan Clinical Oncology Group: Functional outcomes after extended surgery for gastric cancer. *British Journal of Surgery*, 98: 239-245, 2011.
3. M. Iwatsuki, M Koshi, T. Fukagawa, H. Ishii, T. Yokobori, M. Sasako, H. Baba and M Mori: The Clinical Significance of Vimentin-Expressing Gastric Cancer Cells in Bone Marrow. *Ann Surg Oncol*, 17: 2526-2533, 2010

4. Y. Kita, T. Fukagawa, K. Mimori, Y. Kosaka, K. Ishikawa, T. Aikou, S. Natsugoe, M. Sasako and M. Mori: Expression of uPAR mRNA in peripheral blood is a favourite marker for metastasis in gastric cancer cases. *British Journal of Cancer*, 100: 153-159, 2009.
5. K. Mimori, T. Fukagawa, Y. Kosaka, K. Ishikawa, M. Iwatasuki, T. Yokobori, S. Hirasaki, Y. Takatsuno, H. Sakashita, H. Ishii, M. Sasako, M. Mori: A Large-Scale Study of MT1-MMP as a Marker for Isolated Tumor Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow in Gastric Cancer Cases. *Annals of Surgical Oncology*, 15(10): 2934-2942, 2008.
6. Y. Yamada, T. Arao, T. Gotoda, H. Taniguchi, I. Oda, K. Shirao, Y. Shimada, T. Hamaguchi, K. Kato, T. Hamano, F. Koizumi, T. Tamura, D. Saito, T. Shimoda, M. Saka, T. Fukagawa, H. Katai, T. Sano, M. Sasako and K. Nishio: Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. *Cancer Science*, 99(11): 2193-2199, 2008.
7. R. Yoshikawa, Y. Nakano, L. Tao, K. Koishi, T. Matsumoto, M. Sasako, T. Tsujimura, T. Hashimoto-Tamaoki and Y. Fujiwara: Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. 98:1670-1674, 2008.

〔学会発表〕（計4件）

1. 菊池正二郎、竹村雅至、小石健二、堀高明、松本友寛、海辺展明、山下英孝、花山寛之、辻村亨、笹子三津留：胃癌浸潤における上皮間葉細胞分化転換EMTの解析。第83回日本胃癌学会総会、青森、平成23年3月（3-5日）
2. 菊池正二郎、賀来佳子、花山寛之、海辺展明、山下英孝、松本友寛、堀高明、小石健二、竹村雅至、笹子三津留：高度進行胃癌における上皮-間葉細胞分化転換の網羅的解析。第72回日本臨床外科学会総会、横浜、平成22年11月（21-23日）。
3. 菊池正二郎、保井裕子、竹村雅至、小石健二、堀高明、松本友寛、海辺展明、山下英孝、花山寛之、辻村亨、笹子三津留：漿膜浸潤胃癌におけるEMTの免疫組織学的解析。第48回日本癌治療学会学術集会、京都、平成22年10月（28-30日）。
4. 菊池正二郎、竹村雅至、小石健二、堀高明、松本友寛、海辺展明、山下英孝、花山寛之、辻村亨、笹子三津留：ヒト胃癌組織と腹膜播種組織におけるEMT array解析。第69回日本癌学会学術集会、大阪、平成22年9月（22-24日）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹子 三津留 (Sasako Mitsuru)
 兵庫医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40143490

(2) 研究分担者

菊池 正二郎 (Kikuchi Shojiro)
 兵庫医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70381960

海邊 展明 (Kaibe Nobuaki)
 兵庫医科大学・医学部・病院助手
 研究者番号：40529351

藤原 由規 (Fujiwara Yoshinori)
 近畿大学・医学部・診療講師
 研究者番号：10258155

吉川 麗月 (Yoshikawa Reigetsu)
 神戸アベンチスト病院・外科・医師
 研究者番号：90319864