

機関番号：14301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21791285  
 研究課題名（和文）IFN- $\gamma$ の抗がん作用における新規がん抑制遺伝子 Prox1 の役割と治療への展開  
 研究課題名（英文）The role of transcriptional factor Prox1 in the antiproliferative action of IFN- $\gamma$  against esophageal cancer  
 研究代表者  
 田中 英治（TANAKA EIJI）  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：70456862

研究成果の概要（和文）：食道癌における IFN- $\gamma$ 起因性の腫瘍増殖抑制効果における機序として、Stat1 の活性化ののちにその下流で Prox1 が発現誘導されること、Prox1 は増殖抑制、アポトーシスを誘導すること、を食道癌細胞株を用いて明らかにした。また臨床検体での検討では、Prox1 は化学療法で治療効果があるような食道癌症例では発現誘導されていた。Prox1 は食道癌に対する新規の治療標的となりうる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We previously reported IFN- $\gamma$ -induced apoptosis in 10 of 31 esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines. However, the molecular basis of antiproliferative action by IFN- $\gamma$  remains elusive. We explore the link between Prox1 and the IFN- $\gamma$  system in ESCC cells. IFN- $\gamma$  induced Prox1 expression in ESCC cells but not in those transfected with dominant-negative STAT1. Cell growth inhibition by IFN- $\gamma$  was significantly suppressed in ESCC cells transfected with Prox1 siRNA. In addition, overexpression of Prox1 induced antiproliferative effect in ESCC cells. We also demonstrate that Prox1 is expressed in primary esophageal cancer tissues (five of nine samples treated with neoadjuvant chemotherapy before surgery). These results suggested that Prox1 may be a candidate target for novel therapeutic strategies of ESCCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌、癌抑制遺伝子、インターフェロン

### 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン(IFN)は、生体に存在する抗がん因子として、その抗がん作用はよく知られているものの、その作用機序は未だよくわかっていない。IFN を実際に臨床で応用する可能性については、より詳細な研究が期待される。我々は手術標本から樹立した食道癌株 KYSE シリーズを用いて、今までに食道癌細胞における IFN- $\gamma$  起因性の細胞増殖抑制効果において Stat1 の活性化が必要であることを報告してきた (Kaganoi J, et al. Ann Surg Oncol. 2007. 14. 1405-15)。

リンパ管内皮細胞の発生・分化に必須のホメオボックス転写因子として同定された Prox1 は、種々の癌腫においては腫瘍増殖抑制に関与していることが最近相次いで報告されており、Prox1 の癌における役割については現在注目されている。我々は今までに肝細胞癌において、Prox1 が細胞分化、細胞増殖抑制に働き、新規の癌抑制遺伝子の候補になりうることを報告してきた (Shimada M, et al. Clin Cancer Res. 2006. 12. 6005-11)。

### 2. 研究の目的

このような背景を踏まえ、本研究では、1) 食道癌細胞株を使って、IFN- $\gamma$  が新規がん抑制遺伝子 Prox1 を誘導することで抗がん作用を示すという仮説を検証すること、2) 臨床サンプルも用いて検討し、Prox1 が食道癌治療の治療ターゲットに結びつくか検討すること、を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究室で樹立した食道癌株 KYSE シリーズを用いて IFN- $\gamma$  に対する感受性を、細胞増殖、アポトーシスのアッセイで検討した。

(2) IFN- $\gamma$  のシグナル解析を行うため、IFN- $\gamma$  感受性の食道癌細胞株 (KYSE510) に Stat1 のドミナント・ネガティブを遺伝子導入した安定株 (以下 DN6J) とそのコントロール株 (CAG) を樹立した。これらの細胞を用いて IFN- $\gamma$  による細胞増殖抑制効果がどのように変化するかを、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイにて放火した。また IFN- $\gamma$  投与時の Prox1 の発現

量の変化を RT-PCR 法および Western blotting 法にて定量的に検討した。

### (3) IFN- $\gamma$ 感受性の食道癌細胞株

(KYSE510) において Prox1 発現を siRNA 法を用いて抑制した場合に、IFN- $\gamma$  起因性の細胞増殖抑制効果がどのように変化するかを、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイにて検討した。

### (4) IFN- $\gamma$ 感受性の食道癌細胞株

(KYSE510) に Prox1 を過剰発現させることで、細胞増殖がどのように変化するかを細胞増殖アッセイ、アポトーシスのアッセイで検討した。

### (5) IFN- $\gamma$ 抵抗性の食道癌細胞株 (DN6J

および KYSE960) に対しても Prox1 を過剰発現させることで、細胞増殖抑制効果がみられるかどうか、細胞増殖アッセイ、アポトーシスのアッセイで検討した。

### (6) 術前化学療法を施行した群 (NAC 群 :

9 例) と施行しなかった群 (非 NAC 群 : 8 例) それぞれにおける Prox1 の発現の有無を、食道癌切除標本を用いて免疫組織染色法にて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 今回評価した複数の食道癌細胞株の検討では、IFN- $\gamma$  に対して感受性を示したのは 31 細胞株中の 10 細胞株 (32%) であった。

(2) CAG では IFN- $\gamma$  投与により Prox1 が mRNA レベルおよびタンパクレベルでも有意に発現誘導された。また IFN- $\gamma$  起因性の細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果も認められた。一方で、DN6J では CAG とは異なり Prox1 は発現誘導されず、また IFN- $\gamma$  起因性の増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果も認められなかった。

(3) Prox1 を siRNA 法で発現抑制すると、IFN- $\gamma$  投与による Prox1 の発現誘導が mRNA レベル、タンパクレベルでも起こらなくなり、IFN- $\gamma$  起因性の細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果も認められなくなった。

(4) IFN- $\gamma$  感受性の食道癌細胞 (KYSE510) に Prox1 を過剰発現させると、IFN- $\gamma$  の投与に関係なく細胞増殖抑制効果が認められるようになった。

(5) IFN- $\gamma$  抵抗性の食道癌細胞株 (DN6J および KYSE960) に対しても Prox1 を過

剰発現させることで細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果が認められるようになった。

(3) 連携研究者：なし

(6) Prox1 は NAC 群では 9 例中 5 例で癌細胞に発現していたのに対し、非 NAC 群では 8 例中 1 例でしか発現していなかった。なお正常の食道粘膜には Prox1 は発現していなかった。

## 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 1 件)

Hiroshi Okabe, Kazutaka Obama, Eiji Tanaka, Akinari Nomura and Jun-ichiro Kawamura, *et al.* Intracorporeal esophageojejunal anastomosis after laparoscopic total gastrectomy for patients with gastric cancer. *Surg Endosc.* 査読有、Vol. 23、No. 9、2009、2167-2171

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中英治 (TANAKA EIJI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70456862

### (2) 研究分担者：なし