

機関番号：32206

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591598

研究課題名 (和文) イノシトール3リン酸受容体発現と大腸癌における転移、術前化学療法との関連について

研究課題名 (英文) The role of InsP3 receptor expression in colorectal cancer patients and its relation to metastasis and neo-adjuvant chemotherapy

研究代表者 平田 敬治 (Keiji Hirata)

国際医療福祉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：70269059

研究成果の概要 (和文)：

イノシトール3リン酸レセプター (IP3Rs) は滑面小胞体の細胞膜に存在し、細胞内へのカルシウム放出に関与している。細胞内カルシウムシグナリングは重要な細胞機能に関与しているため、IP3Rsの発現もまた細胞機能に深く関与しており、アポトーシスや細胞増殖、分化との関連も示唆されている。IP3レセプターには1型から3型の3種類のサブタイプが存在し、胆汁うっ滞性疾患で発現が減少するなど病因との関係が明らかになってきているが、大腸癌を含めたヒト癌組織におけるIP3R発現の意義については未だ検討されていない。そこで、我々は大腸癌切除例における3型IP3Rの発現を免疫組織学的に評価し、臨床病理学的解析、分子生物学的解析を加え検討した。1型、2型IP3Rは非癌部、癌部で発現を認めた。3型IP3Rは非癌部では発現が認められなかったが、癌部では過剰発現している症例を認めた。IP3R発現と臨床病理学的因子との検討では、1型、2型IP3Rは関連を認めなかったが、3型IP3Rは腫瘍進達度、リンパ節転移、遠隔転移と相関関係を認めた。また、予後解析の結果、3型IP3Rは予後規定因子となることが明らかになった。以上より3型IP3R発現は大腸癌における新しい悪性度の指標となる可能性が示唆された。また、ヒト癌細胞株を用いてIP3R発現を抑制、過剰発現させた実験でIP3R発現は、細胞増殖には、影響を与えないにも関わらず、アポトーシス耐性と関連する事が、今回明らかとなった。以上の結果より、IP3R発現はヒト癌治療における新しいターゲットとなる可能性が示唆された。我々の得た結果はCell Calciumに掲載された。更に現在、IP3Rと抗がん剤治療の関連性について興味ある知見を得ており、現在、解析を進めており、今後発表予定である。

研究成果の概要 (英文)：

The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (InsP3R) mediates Ca²⁺ signaling in epithelia and regulates cellular functions such as secretion, apoptosis and cell proliferation. Loss of one or more InsP3R isoform has been implicated in disease processes such as cholestasis. Here we examined whether gain of expression of InsP3R isoforms also may be associated with development of disease. Expression of all three InsP3R isoforms was evaluated in tissue from colorectal carcinomas surgically resected from 116 patients. Type I and II InsP3Rs were seen in both normal colorectal mucosa and colorectal cancer, while type III InsP3R was observed only in colorectal cancer. Type III InsP3R expression in the advancing margins of tumors correlated with depth of invasion, lymph node metastasis, liver metastasis, and TNM stage. Heavier expression of type III InsP3R also was associated with decreased 5-year survival. shRNA knockdown of type III InsP3R in CACO-2 colon cancer cells enhanced apoptosis, while over-expression of the receptor decreased apoptosis. Thus, type III InsP3R becomes expressed in colon cancer, and its expression level is directly related to aggressiveness of the tumor, which may reflect inhibition of apoptosis by the receptor. These findings suggest a previously unrecognized role for Ca²⁺ signaling via this InsP3R isoform in colon 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
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科・消化器外科

キーワード：カルシウムシグナリング、IP3 レセプター、大腸癌、細胞増殖、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

イノシトール3リン酸レセプター (IP3Rs) は滑面小胞体の細胞膜に存在し、細胞内へのカルシウム放出に関与している。細胞内カルシウムシグナリングは重要な細胞機能に関与しているため、IP3Rsの発現もまた細胞機能に深く関与しており、アポトーシスや細胞増殖、分化との関連も示唆されている。IP3レセプターには1型から3型の3種類のサブタイプが存在し、胆汁うっ滞性疾患で発現が減少するなど病因との関係が明らかになってきているが、大腸癌を含めたヒト癌組織におけるIP3R発現の意義については未だ検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌切除標本、ヒト大腸癌細胞株を用いて、IP3レセプター発現の意義について検討し、IP3レセプターが新たな治療ターゲットとなり得るか否か検討することである。

3. 研究の方法

(1) 当科で手術を施行し、予後調査を施行した大腸癌切除症例 116 例を対象とした。
 (2) ホルマリン固定パラフィン切片で1型、2型、3型 IP3レセプター蛋白に対する抗体を用いて免疫組織化学染色をし、細胞内分布を検討した。
 (3) 予後の判明している大腸癌症例のホルマリン固定パラフィン切片で IP3レセプター抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的に検討。IP3レセプター発現と既知の予後規定因子との相関、独立した予後因子であるかを単変量解析、多変量解析で統計学的に検討した。

(4) IP3レセプターのRNAiを作製、大腸癌細胞株に導入し、細胞増殖、アポトーシス誘導への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織染色

免疫組織学的に評価し、臨床病理学的解析を加え検討した。1型、2型 IP3R は非癌部、癌部で発現を認めた。3型 IP3R は非癌部では発現が認められなかったが、癌部では過剰発現している症例を認めた。(図1)。

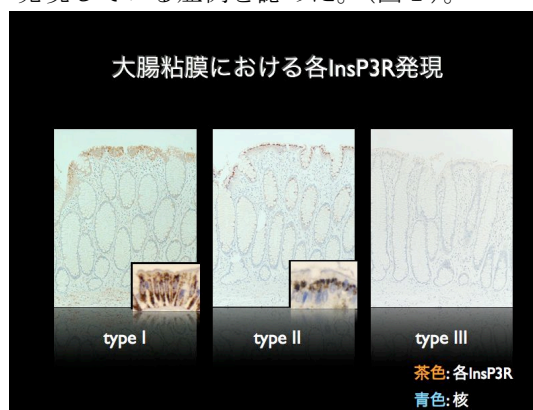


図1：正常粘膜におけるIP3R発現

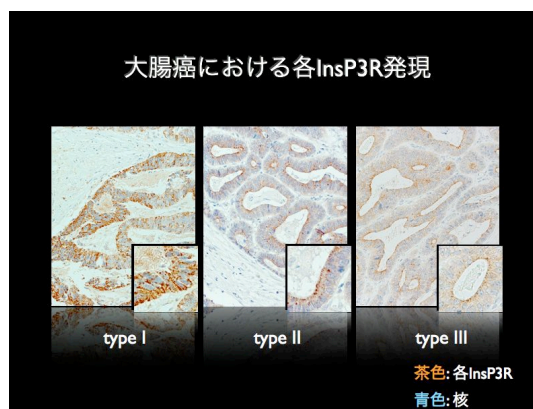


図2：癌部におけるIP3R強発現例

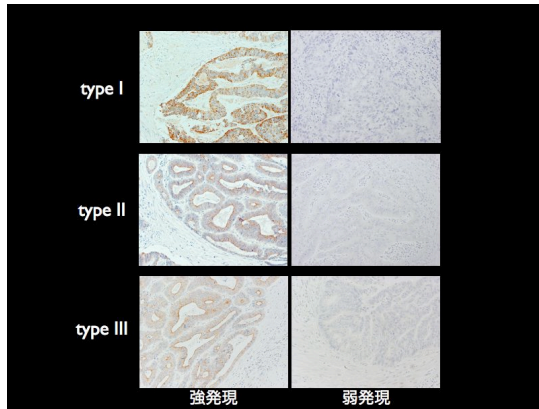


図 3 : 癌部における IP3R 強弱発現例

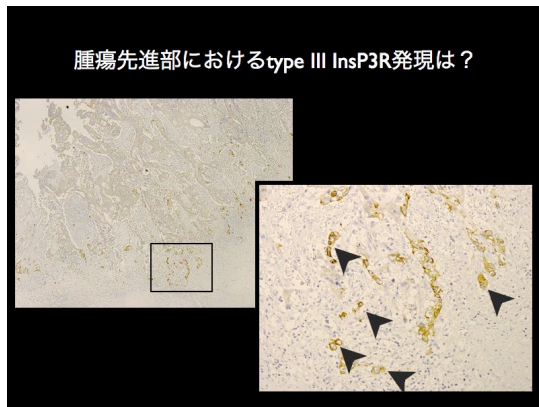


図 4 : 先進部における IP3R 過剰発現

InsP3R発現のまとめ

	正常粘膜	癌部
1型	+	+
2型	+	+
3型	なし	+

表 1 : IP3R 発現まとめ

癌部では過剰発現している症例と減弱をしている症例を認めた (図 2、3)。カルシウムシグナリングは細胞増殖やアポトーシスなどに大きな影響を与えるため、正常粘膜と大腸癌では IP3 レセプターの発現様式 (各亜型の発現量、細胞内分布) の差が、癌細胞に特異的な細胞増殖、アポトーシス誘導回避などに関連している可能性が推測された。

(2) 癌部における IP3R 発現と臨床病理学的因子、予後との検討

	症例数 (%)		P値
	3型IP3R弱発現群 (n=82)	3型IP3R強発現群 (n=34)	
年齢 (歳) (平均 ± SD)	66 ± 1.2	64.9 ± 2.2	0.649
性別			0.104
男性	42 (51.2)	23 (67.6)	
女性	40 (48.8)	11 (32.4)	
占拠部位			0.999
結腸	41 (50)	17 (50)	
直腸	41 (50)	17 (50)	
組織型			0.999
高分化型	20 (24.4)	8 (23.5)	
中分化型	57 (69.5)	24 (70.6)	
低分化型	3 (3.7)	1 (2.9)	
粘液癌	2 (2.4)	1 (2.9)	

表 2 : 症例背景

癌部において IP3R 強発現群と弱発現群の 2 群に分け、IP3R 発現と臨床病理学的因子との相関を検討した (表 2)。

	症例数 (%)		P値
	3型IP3R弱発現群 (n=82)	3型IP3R強発現群 (n=34)	
深達度			0.029
T1	1 (1.2)	0 (0)	
T2	21 (25.6)	2 (5.9)	
T3	42 (51.2)	21 (61.8)	
T4	18 (22)	11 (32.3)	
リンパ節転移			0.004
N0	46 (56.2)	8 (23.5)	
N1	22 (26.8)	17 (50)	
N2	14 (17)	9 (26.5)	
肝転移			0.02
なし	75 (91.5)	26 (76.5)	
あり	7 (8.5)	8 (23.5)	
腹膜播種			0.761
なし	76 (92.7)	32 (94.1)	
あり	6 (7.3)	2 (5.9)	
Distant metastasis			0.185
なし	65 (79.3)	24 (70.6)	
あり	17 (20.7)	10 (29.4)	
病期分類			0.015
I	17 (20.7)	1 (2.9)	
IIa	23 (28)	7 (20.6)	
IIb	2 (2.4)	0 (0)	
IIIa	3 (3.7)	3 (8.8)	
IIIb	13 (15.9)	10 (29.4)	
IIIc	7 (8.5)	2 (5.9)	
IV	17 (20.7)	11 (32.3)	

表 3 : 3 型 IP3R 発現と臨床病理学的特徴

1 型、2 型 IP3R は関連を認めなかったが、3 型 IP3R は腫瘍進達度、リンパ節転移、遠隔転移と相関関係を認めた (表 3)。また、予後解析の結果、3 型 IP3R は予後規定因子となることが明らかになった (図 5)。以上より 3 型 IP3R 発現は大腸癌における新しい悪性度の指標となる可能性が示唆された。

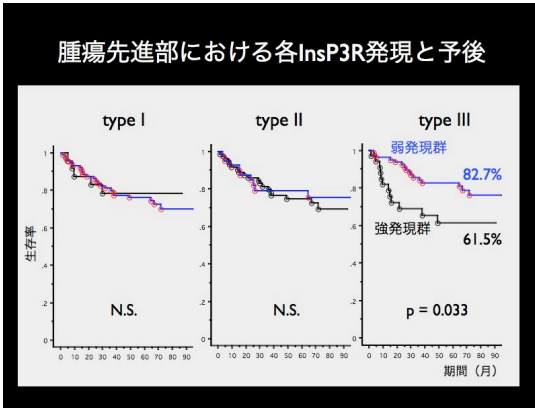
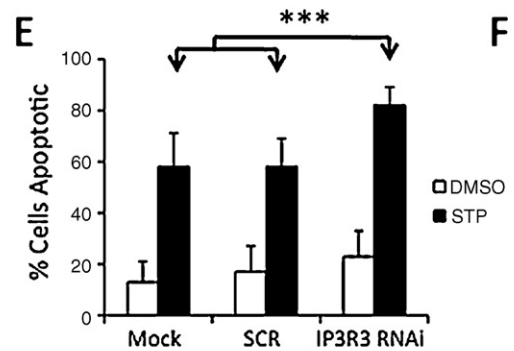
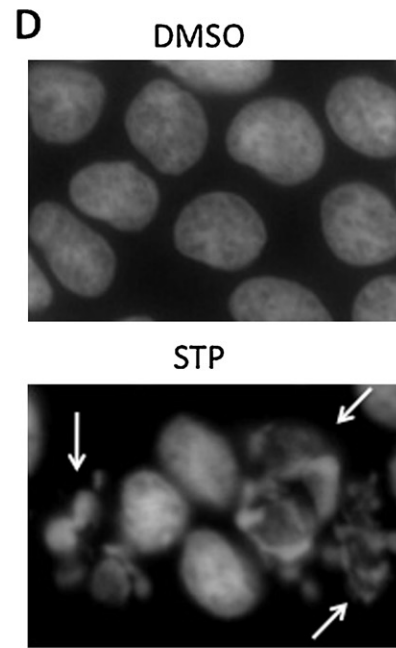
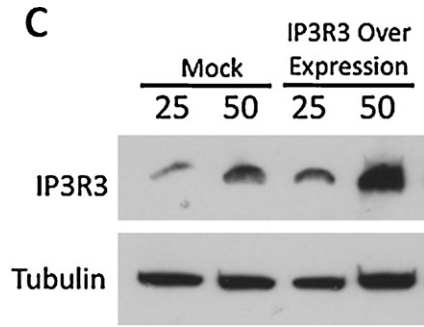
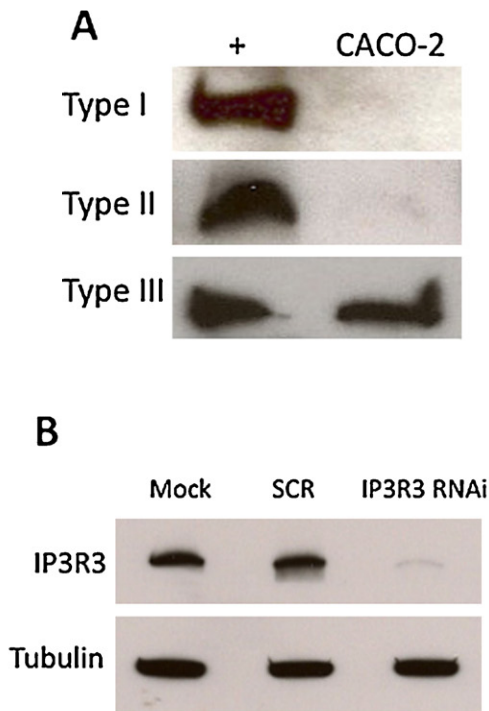


図 5 : 腫瘍先進部における IP3R 発現と予後

(3) 大腸癌細胞株 CACO-2 を用いた遺伝子導入実験
 ヒト癌細胞株を用いて IP3R 発現を抑制、過剰発現させた実験で 3 型 IP3R 発現は、細胞増殖には、影響を与えないにも関わらず、アポトーシスと関連する事が、明らかとなった。



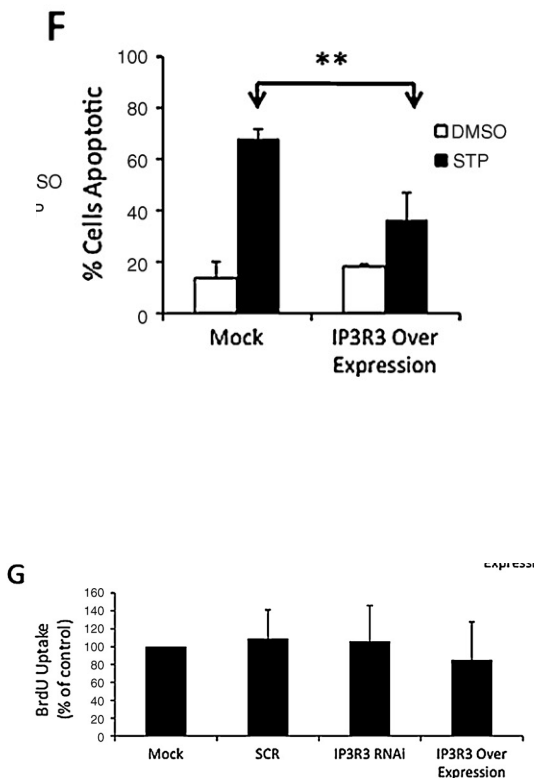


図4：3型IP3R発現はアポトーシス耐性を誘導する。(A) Western blot解析。1, 2, 3型IP3Rのポジティブコントロール(それぞれマウスの脳、肝細胞、CHO細胞から抽出)。CACO-2はほぼ3型IP3Rのみを発現している。(B) 3型IP3RのshRNAはCACO-2細胞内の3型IP3Rを90%以上抑制する。Mock: mock transfection。Transfection reagentをRNAi materialなしで遺伝子導入したコントロール。SCR: scrambled control。Alpha-tubulinは、loading controlとして用い、50 μ gのタンパクをローディングした。(C) 3型IP3R過剰発現実験。3型IP3R cDNAを遺伝子導入し、3型過剰発現を誘導した。25, 50 μ gタンパク質をそれぞれローディングした。遺伝子導入により、3型IP3Rは、ほぼ2倍の発現量となった(D) レーザー顕微鏡下のアポトーシス誘導実験。Hoescht染色。DMSO添加では、アポトーシスは誘導されないが、STP (1 μ g)添加で→に示す如くアポトーシスが誘導され、フラグメンテーションが起こった核を観察できる。(E) 3型IP3R RNAiで3型IP3R発現を減少させたCACO-2細胞においては、Mock, SCRを導入した細胞に比べ、STP添加でアポトーシス誘導が増大する(p<0.0001)。(F) 3型IP3R cDNAで3型IP3R発現を増加させたCACO-2細胞においては、Mockを導入した細胞に比べ、STP添加でアポトーシス誘

導が減少する(p<0.01)。E, Fの結果より、3型IP3R発現は、アポトーシス耐性を生じる事が明らかとなった。(G) BrdU取り込み実験によるIP3R発現が細胞増殖に及ぼす影響評価。Mock, SCR, 3型IP3R RNAi, 3型IP3R cDNAを遺伝子導入したCACO-2細胞において細胞増殖に及ぼす影響をBrdU取り込み能で評価した。いずれの細胞でもBrdU取り込みは統計学的な有意差はなく、3型IP3R発現は、細胞増殖には影響を与えないと考えられた。

以上より、IP3R発現はヒト癌治療における新しいターゲットとなる可能性が示唆された。我々の得た結果はCell Calciumに掲載された。更に現在、IP3Rと抗がん剤治療の関連性について興味ある知見を得ており、現在、解析を進めており、今後発表予定である。

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)

The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, Iwakiri Y, Nathanson MH, Yamaguchi K. Cell Calcium. 2010 Dec;48(6):315-323, 査読あり

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田敬治 (Keiji Hirata)

国際医療福祉大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：70269059

(2) 研究分担者

柴尾 和徳 (Kazunori Shibao)

産業医科大学・第1外科・助教

研究者番号：10330987

山口 幸二 (Koji Yamaguchi)

産業医科大学・第1外科・教授

研究者番号：50191226

(3) 連携研究者

なし