

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659074
 研究課題名（和文）蛋白プロセッシングシステム制御マイクロ RNA による消化管癌の病態解明とその応用
 研究課題名（英文）Protein processing system-regulating microRNA in gastrointestinal carcinogenesis and its clinical application
 研究代表者
 安井 弥 (YASUI WATARU)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：40191118

研究成果の概要（和文）：

蛋白プロセッシングシステムの中で、SPC21 ではなく SPC18 が、EGF および TGF α の分泌を制御し、その過剰発現は EGFR の活性化を惹起した。SPC18 抗体を作成し、SPC18 発現を免疫染色で解析したところ、SPC18 陽性胃癌症例は陰性例に比較して有意に予後不良であった。また、癌細胞では miR-143 はメチル化によって発現抑制を受け、TGF β の発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In protein processing system, SPC18, but not SPC21, regulated secretion of EGF and TGF α by cancer cells and activated EGFR. SPC18-positive gastric cancer patients, monitored by immunostaining using anti-SPC18 antibody produced by our laboratory, showed worse prognosis. Down-regulation of miR-143 by DNA methylation regulated TGF β expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：消化管癌、蛋白プロセッシング、マイクロ RNA、シグナルペプチダーゼ、診断、治療

1. 研究開始当初の背景

消化管癌は全がん罹患のうち、男性では40%以上、女性でも30%以上を占めており、この制圧はきわめて重要である。申請者らはこれまでに、SAGE (serial analysis of gene expression) 法および CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法を用いて、Reg VI、MIA、OLFM4、ADAMTS16、DSC2などの胃癌診断の標的となる可能性のある遺

伝子を見いだしてきた。一方、遺伝子発現制御における microRNA (miRNA) の重要性が明らかになってきた。がんの発生・進展における miRNA の役割については、当初、抑制的に働くと考えられていたが、その後の研究により、標的遺伝子の差異によって促進的に働くものも多く存在することが明らかになってきている。蛋白プロセッシングシステムの中で、がんの増殖や分化、血管新生、上皮・間葉移

行 EMT に関わる多くの増殖因子・サイトカインのシグナルペプチダーゼによる分泌制御は、癌の発生・進展において根幹をなすものと考えられる。分泌蛋白の大部分は、そのアミノ末端に約 10-20 残基の疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチド配列を持った前駆体として合成される。これにより小胞体膜に移動、局在した後に、シグナルペプチダーゼによって切断され、成熟分泌蛋白となり小胞と細胞膜の融合・エンドサイトーシスを経て細胞外に放出される。申請者らは、SAGE データを基盤とした解析から、signal peptidase complex 18KDa (SPC18) が胃癌の進行度と関連する発現態度を示すことを突き止めた。蛋白プロセッシングシステムに注目するきわめて革新的なストラテジーであり、増殖因子・サイトカインの広いスペクトラムを標的とする根幹的診断、さらに治療の道が拓けるものと期待される。

2. 研究の目的

蛋白プロセッシングシステムの中で、がんの増殖や分化、血管新生、上皮・間葉移行 EMT に関わる多くの増殖因子・サイトカインのシグナルペプチダーゼによる分泌制御は、癌の発生・進展において根幹をなすものと考えられる。シグナルペプチダーゼ複合体は、5つのサブユニットからなり、その中で SPC18 および SPC21 が酵素活性を担っていると考えられているが、SPC の基質となる分泌蛋白の特異性の詳細は不明である。さらに、消化管癌はもちろんのことすべてのがんにおける SPC の発現および機能については国内外で全く報告はない。申請者らは、予備的検討において SPC18 が TGF α の分泌促進を介して、胃癌細胞株の増殖・浸潤を促進することを確認している。そこで本研究は、消化管癌における蛋白プロセッシングシステムの役割を明らかにするために、シグナルペプチダーゼの発現および機能解析、がんの増殖・進展における標的分泌蛋白と miRNA による制御機構を解析し、消化管癌の分子病態の解明およびそれを診断・治療へ応用することを目的とする。診断・治療標的として、蛋白プロセッシングシステムに注目するきわめて革新的なストラテジーであり、増殖因子・サイトカインの広いスペクトラムを標的とする消化管に対する根幹的な治療展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) 蛋白プロセッシング分子の発現と局在の検討

定量的 RT-PCR により、シグナルペプチダーゼの 5つのサブユニット (SPC12、SPC18、SPC21、SPC22/23、SPC25) の発現を消化管癌培養株および癌組織新鮮凍結サンプルを用いて検討する。蛋白レベルの発現解析のため

に、全長 cDNA から蛋白を合成し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作成する。これを用いて、培養細胞においては共焦点レーザー顕微鏡により詳細な細胞内局在を検討する。臨床検体については、免疫染色にて多数例を tissue microarray で検討し、臨床病理学的事項との関連を解析する。

(2) 蛋白プロセッシング分子の標的分泌蛋白の解析とその分子機構

SPC18 と SPC21 の発現ベクターを構築し消化管癌細胞株に強制発現する。逆に、siRNA 処理により発現を抑制する。TGF α 、TGF β 、EGF、VEGF 等の代表的増殖因子・サイトカインの培養液中の濃度を ELISA 法で、mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法で測定し、シグナルペプチダーゼ強制発現による変化を検討する。

(3) 蛋白プロセッシング分子の発現制御における miRNA の役割

Human microRNA Targets 等の miRNA データベースを用い、上記で同定した増殖因子、サイトカイン等の分泌蛋白をコードする遺伝子からその制御をする可能性のある miRNA を抽出する。miRNA の強制発現系あるいは発現抑制系によるターゲット遺伝子の発現の変化を確認する。シグナルペプチダーゼの発現を制御する miRNA に関して、他のターゲット遺伝子を探索する。

(4) 蛋白プロセッシング分子の制御による細胞生物学的機能解析

消化管癌細胞株の SPC18 あるいは SPC21 強制発現系および siRNA による RNA 干渉系を用いて、細胞生物学的機能解析を行なうことにより、治療標的となることを確認する。具体的には、anchorage-independent growth、細胞増殖、MTT アッセイ、ボイデンチャンバーを用いた invasion アッセイ、wound healing による migration アッセイ、薬剤抵抗性等に関して検討する。

(5) CAST 法で同定された新規分泌蛋白の蛋白プロセッシング分子による分泌調節の解析

申請者らは、食道癌および胃癌における分泌蛋白の網羅的解析を CAST 法で行なっている。本研究と平行して検討を進め、見いだされた新規分泌蛋白に関しても、既知の増殖因子、サイトカインの場合と同様に、シグナルペプチダーゼによる分泌の制御、前駆体の切断の解析などを行なう。

4. 研究成果

(1) 蛋白プロセッシング分子の発現と局在の検討

小胞体シグナルペプチダーゼ複合体 (SPC) のサブユニットの内、SPC1-18 と SPC-21 が酵素活性を有しており、SPC18 の定量的 RT-PCR 解析では、40%胃癌症例で過剰発現が認めら

れ、ステージの進行、リンパ節転移と有意な相関を示した。そこで、全長 cDNA から蛋白を合成し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作成した。ウエスタンブロットではマイクロソーム画分に集積しており、免疫染色では、正常胃粘膜上皮には発現は認められず、胃癌では組織型によらず、22/99 例 (26%) で細胞質に陽性であった。さらに、SPC18 の発現と粘液形質との関連解析では、SPC18 陽性例は分類不能型に多く、腸型や胃腸混合型には少ない傾向が認められた。陽性症例はステージの進行した症例で有意に高頻度に認められ、進行癌症例に限ってみても SPC-18 陽性症例は陰性症例に比較して有意に予後不良であった。SPC-18 の予後因子としての意義を組織マイクロアレイ約 900 例における解析で確認した。

(2) 蛋白プロセッシング分子の機能解析および標的分泌蛋白の解析

SPC-18 遺伝子を強制発現させた胃癌細胞株 (MKN-1-SPC-18) を準備し、増殖能、運動能、浸潤能をそれぞれ、MTT assay, Wound healing assay, invasion assay で検討しコントロール細胞株と比較したところ、いずれも有意に促進された。さらに、SPC-18 強制発現株はコントロールと比較して、SCID マウス皮下における腫瘍増殖スピードが有意に早かった。標的分泌蛋白を同定する目的で、強制発現させた胃癌細胞株 (MKN-1-SPC-18) とともに、SPC-18 と SPC-21 の si-RNA を準備し、両 SPC を発現している胃癌細胞株 KATO-III を処理したところ、各々の SPC が発現抑制できることが確認された。これらを用いて、種々のサイトカインの変化を検討した。

(3) 蛋白プロセッシング分子 SPC18 の標的サイトカインの解析

SPC18 陰性の MKN-1 細胞と SPC18 強制発現細胞 MKN-1-SPC-18 ならびに SPC18 と SPC21 を共発現している KATO-III 細胞の si-RNA ノックダウンシステムを用いて、標的サイトカインの検索を行なった。SPC18 の強制発現によって、培養上清への EGF および TGF α の分泌が促進され、また、SPC21 ではなく SPC18 ノックダウンにより分泌が抑制された。SPC18 の強制発現により、EGFR の活性化が確認された。

(4) microRNA によるサイトカインの制御および CAST 解析

胃癌においてメチル化により発現抑制されている miR-143 を同定した。TGF β は miR-143 を誘導するが、一方で miR-143 は TGF β の発現を抑制した。さらに、胃癌間質線維芽細胞では miR-143 により versican の発現が抑制されている可能性を示した。胃癌細胞株および癌組織の CAST 解析により、いくつかの癌特異的分泌蛋白コード遺伝子を同定した。

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 13 件)

下記論文はすべて査読有

1. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, in press
2. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y and Tsukita S: Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of interleukin-1beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology* 142:292-304, 2012
3. Hayashi T, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, Ohara S, Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: Expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology* 78:277-284, 2011
4. Sumida T, Kitadai Y, Shinagawa K, Tanaka M, Kodama M, Ohnishi M, Ohara E, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic mouse model. *Int J Cancer* 128:2050-2062, 2011
5. Saeki N, Saito A, Choi IJ, Matsuo K, Ohnami S, Totsuka H, Chiku S, Kuchiba A, Lee YS, Yoon KA, Kook MC, Park SR, Kim YW, Tanaka H, Tajima K, Hirose H, Tanioka F, Matsuno Y, Sugimura H, Kato S, Nakamura T, Nishina T, Yasui W, Aoyagi K, Sasaki H, Yanagihara K, Katai H, Shimoda T, Yoshida T, Nakamura Y, Hirohashi S and Sakamoto H: A functional SNP in MUC1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer Short title: MUC1 is a gastric cancer susceptibility gene. *Gastroenterology* 140:892-902, 2011
6. Qui W, Wang X, Leibowitz, Liu H, Barker N, Okada H, Oue N, Yasui W, Clevers H, Schoen RE, Yu J and Zhang L: Chemoprevention by nonsteroidal

- anti-inflammatory drug eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 107:20027-20032, 2010
7. Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W and Ohdan H: CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. Cancer Res 70:6767-6778, 2010
 8. Tanaka M, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Oue N, Yasui W and Chayama K: Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. Cancer Sci 101:2121-2127, 2010
 9. Kodama M, Kitadai Y, Sumida T, Ohnishi M, Ohara E, Tanaka M, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor β is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma. Cancer Sci 101:1984-1989, 2010
 10. Anami K, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM and Yasui W: Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. J Pathol 221:275-284, 2010
 11. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA and Croce CM: Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. Lancet Oncol 11:136-146, 2010
 12. Sakamoto N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and Yasui W: Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci 101:1038-1044, 2010
 13. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W and Kikuchi A: Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. Oncogene 29:2036-2046, 2010

[学会発表] (計20件)

1. 大上直秀、柳原五吉、内藤 寛、阿南勝宏、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: 胃癌における Signal peptidase complex のサブユニット SPC18 の高発現とその生物学的意義. 第84回日本胃癌学会総会、2月8-10日、大阪、2012
2. 坂本直也、内藤 寛、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: 胃癌における miR-148a の発現低下と MMP7 を介した浸潤への関与. 第22回日本消化器癌発生学会、ワークショップ3、11月25-26日、佐賀、2011
3. 安井 弥、大上直秀、柳原五吉、仙谷和弘、坂本直也、浦岡直礼、野口 剛: SEC11A は TGF- α の分泌を促進し、胃癌の進行に関与する. 第70回日本癌学会学術総会、10月3-5日、名古屋、2011
4. 阿南勝宏、大上直秀、坂本直也、林哲太郎、仙谷和弘、浦岡直礼、Htoo Zarni Oo、内藤 寛、坂根潤一、後藤景介、野口 剛、安井 弥: CAST 法を用いた胃癌細胞株における遺伝子発現解析. 第70回日本癌学会学術総会、10月3-5日、名古屋、2011
5. 内藤 寛、坂本直也、浦岡直礼、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: microRNA-143 の胃癌における機能解析と腫瘍マーカーとしての有用性. 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会、10月2日、名古屋、2011
6. Oue N, Yanagihara K, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y and Yasui W: Overexpression of SEC11A is associated with tumor progression through TGF- α secretion in gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka (Japan), September 21-23, 2011
7. Yasui W: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets of gastric cancer by transcriptome dissection. The Third CREST - SBM International Conference, Hiroshima (Japan), June 8-9, 2011
8. 安井 弥: 胃癌の発生・進展の分子機序のマイルストーン. 第100回日本病理学会総会、シンポジウム1、4月28-30日、横浜、2011
9. 坂本直也、内藤 寛、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: 胃癌における microRNA 発現解析. 第100回日本病理学会総会、ワークショップ1、4月28-30日、横浜、2011
10. 大上直秀、林哲太郎、柳原五吉、若松雄太、内藤 寛、仙谷和弘、坂本直也、安井 弥: SAGE-based microarray により同定した SEC11A (SPC18) は TGF- α の分泌を促進し胃癌の進行に関連している. 第100回日本病理学会総会、4月28-30日、横浜、2011
11. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami

- K, Naito Y and Oue N: Novel diagnostic and therapeutic targets of gastric cancer identified by “Omics” study. 9th International Gastric Cancer Congress, Symposium 7, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
12. Oo HZ, Uraoka N, Hayashi T, Anami K, Sakamoto N, Sentani K, Oue N and Yasui W: Gene expression profile in scirrhou type gastric mcancer by CAST method. 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
13. Sakamoto N, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N and Yasui W: microRNA expression profiles in gastric cancer: miR-148a is down-regulated in gastric cancer and involved in gastric cancer invasion by repression of MMP7 expression. 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
14. Yasui W, Oue N, Sentani K, and Sakamoto N: Molecular character of gastric and intestinal phenotypes of gastric cancer. The 6th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Lecture, Houston, Texas (USA), January 6-8, 2011
15. 安井 弥: トランスクリプトーム解析による新規診断標的の同定とがん病理診断への応用. 第 69 回日本癌学会学術総会、シンポジウム 5、9 月 22-24 日、大阪、2010
16. 安井 弥、内藤 寛、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: 胃癌における microRNA 発現解析: miR-148a の胃癌組織における発現低下. 第 69 回日本癌学会学術総会、9 月 22-24 日、大阪、2010
17. 大上直秀、阿南勝宏、内藤 寛、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: 胃癌における細胞表面蛋白質 desmocollin2 の解析. 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 ミニシンポジウム (2)、6 月 16-17 日、金沢、2010
18. Yasui W: Molecular basis of intestinal and gastric phenotypes of gastric cancer. The 17th Seoul International Cancer Symposium “Gastric Cancer Update 2010”, Seoul (Korea), June 1, 2010
19. 坂本直也、内藤 寛、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた胃癌における microRNA 発現解析. 第 99 回日本病理学会総会、4 月 27-29 日、東京、2010
20. Anami K, Oue N, Sakamoto N, Hayashi T, Ohara S, Sentani K, Noguchi T and Yasui W: Desmocollin 2 (DSC2), identified by

CAST method, is associated with intestinal phenotype of gastric cancer. The 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 17-21, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byoril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 弥 (YASUI WATARU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 40191118

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: