

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 6 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23791525
 研究課題名（和文） マイクロRNA網羅的解析を用いた胃癌腹膜播種転移の分子機構解明と新規治療法開発
 研究課題名（英文） MicroRNA expression analysis of the gastric cancer peritoneal carcinomatosis
 研究代表者
 奥川 喜永（OKUGAWA YOSHINAGA）
 三重大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号： 30555545

研究成果の概要（和文）：

消化器癌転移メカニズムの解明と克服法の確立は生命予後改善に大きく貢献する。そこで本研究では、癌転移、とりわけ胃癌腹膜播種転移の分子シグナル機構の解明を目的として胃癌同時性腹膜播種を認めたhuman clinical sampleを中心としたmiRNA解析とcDNA発現解析を行った。胃癌組織におけるmiR-151-5p発現が腹膜播種群と有意な相関を示し、独立予後規定因子を示した。In vitroでは、miR-151-5p発現抑制が増殖能、浸潤能を有意に抑制していることが確認された。現在、さらなる機能解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Establishment of metastasis mechanism contributes greatly to improving prognosis. The aim of this study is to clarify the significance of miRNA / mRNA expression profile in gastric cancer tissues and to clarify the mechanism of peritoneal metastasis in gastric cancer. MiR151-5p expression analysis in cancer tissue and adjacent normal mucosa in gastric cancer patients demonstrated that overexpression of miR151-5p was significantly correlated with synchronous peritoneal metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients. In vitro analysis, downregulation of miR151-5p suppressed the proliferation and invasive ability in gastric cancer cells. On the other hand, we have demonstrated that brain derived neurotrophic factor / tropomyosin-related kinase B pathway is deeply involved in the formation of peritoneal metastasis in the gastric cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：消化管悪性腫瘍の癌進展機能解析
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器科学
 キーワード：胃十二指腸外科学

1. 研究開始当初の背景

近年の抗癌剤の進歩により、胃癌に対して全身化学療法の効果期待できる現代でさえ、遠隔転移を示すような切除不能胃癌では平均生存期間は1年程度であり、予後不良と言わざるを得ない。とりわけ、腹膜播種は胃癌の再発形式として最も頻度が高く、漿膜浸潤を伴う未分化型癌では特に高

率に認められる病態である。播種が進行すると、イレウスや水腎症、腹水貯留を併発し、いわゆる癌性腹膜炎の状態となり、全身状態は急速に悪化する。したがって、腹膜播種の治療は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、その成績は胃癌の予後を大きく左右するといえる。本邦では胃癌に対してTaxane系薬剤が適応されており、胃癌腹

膜播種症例に対しても近年、Paclitaxel の腹腔内投与で著効を示したという症例報告は散見されるが、大規模臨床試験での証明はされていない。つまり胃癌腹膜播種に対しては、近年の化学療法の進歩を考慮に入れても、いまだに「標準的治療」と言うべき治療法は存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

癌転移のメカニズムには、癌細胞原発巣からの遊離、転移巣での接着、浸潤と増殖、血管新生の各過程に多数の転移促進・抑制分子群が関与している。これには癌細胞側で異常が認められる細胞接着・運動や増殖等の制御分子群だけでなく、転移臓器に特異的な微小環境条件が存在し癌細胞の臓器選択性と親和性を規定する分子群が想定されるが未解明な部分が多い。

本研究は、胃癌腹膜播種に関与する microRNA と mRNA を同定し、腹膜播種転移メカニズムの解明と、新たな分子診断法の確立や新規治療法の開発をすることで、胃癌腹膜播種転移への新たな治療戦略を確立し、胃癌患者の予後・QOL の向上をめざすことを目的とする

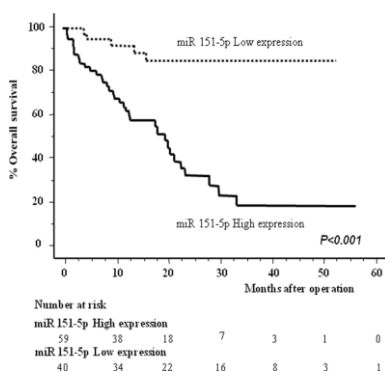
3. 研究の方法

胃癌にて当院で切除された摘出標本を用い、RNA later sample が保存されていた 99 例から胃癌組織と正常組織から miRNA の抽出を行い、realtime PCR にて測定した。また一方で、mRNA レベルでの発現が胃癌腹膜播種発症と有意な相関を認めた BDNF/TrkB の蛋白発現解析を胃癌切除標本の免疫染色を行い評価。さらに、胃癌細胞株として TrkB 発現を認めた MKN7、MKN74、NUGC3 の三細胞株を用いてその機能解析を加え、ヌードマウスを用いた腹膜播種モデルにおける治療への転用の可能性を検討した。

4. 研究成果

miR-151-5p は、肝細胞癌において浸潤能、遊走能を増強すると報告がある一方で、胃癌におけるこの臨床的意義はこれまで報告されていない。胃癌組織における miR-151-5p 発現は、臨床病理学的因子では、腹膜播種群と有意な相関 ($p < 0.01$) を示し、発現高値群で生存率の低下 ($p < 0.001$) を認めた。

Kaplan-Meier calculation of overall survival rates with or without elevated



比例ハザードモデルによる多変量解析でも、腹膜播種とともに、miR151-5p 高発現が独立予後規定

因子 ($p < 0.001$) を示した。

Multivariate Analysis for Predictors of Survival

Variable	Univariate			Multivariate		
	HR	95%CI	p-value	HR	95%CI	p-value
Tumor Size (≥ 5.5cm in diam)	1.51	0.78-2.87	0.217			
T classification (T3-4)	2.62	1.23-5.62	0.013*	2.05	0.92-4.52	0.078
Histological type (intestinal type)	0.68	0.36-1.29	0.237			
Lymphatic invasion (present)	2.25	0.54-9.35	0.264			
Venous invasion (present)	3.44	1.05-11.2	0.041*	2.19	0.64-7.86	0.212
Node involvement (present)	3.59	1.41-9.26	0.008*	1.56	0.56-4.35	0.394
Peritoneal carcinomatosis (present)	18.3	4.99-67.2	<0.001*	6.02	2.18-17.0	<0.001*
miR-151-5p high expression	7.00	2.75-18.3	<0.001*	5.58	2.18-14.0	<0.001*

HR: hazard ratio * $p < 0.05$

Multivariate Analysis for Peritoneal Carcinomatosis

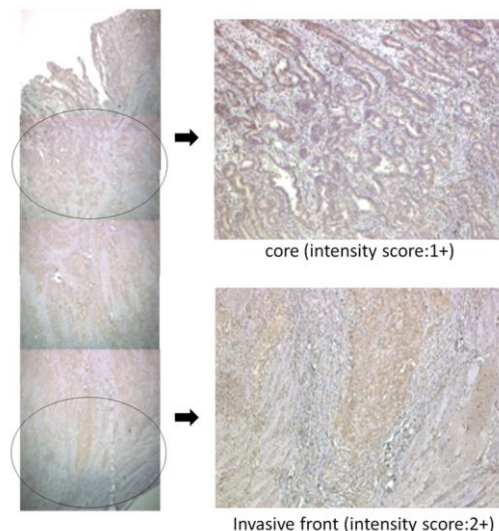
Variable	univariate			Multivariate		
	Odds ratio	95%CI	p-value	Odds ratio	95%CI	p-value
Tumor Size (≥ 5.5cm in diam)	3.38	1.06-11.1	0.037*	2.21	1.21-39.6	0.024*
T classification (pT3-4)	2.69	0.72-10.1	0.143			
Histological type (intestinal type)	0.55	0.18-1.58	0.266			
Lymphatic invasion (present)	NA	NA	0.995			
Venous invasion (present)	4.18	0.52-33.8	0.179			
Lymph Node Metastasis (present)	NA	NA	0.995			
miR-151-5p high expression	6.48	1.39-30.2	0.017*	7.46	1.55-35.8	0.001*

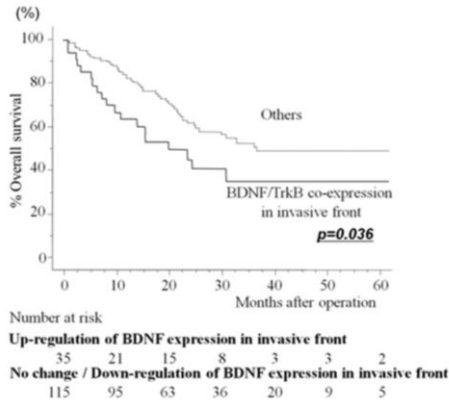
* $p < 0.05$

胃癌細胞株において miR-151-5p 高発現を認めた MKN45、MKN74 の 2 細胞株を使用し、Anti-miR を用いて siRNA transfection を行ったところ、miR-151-5p 発現抑制が増殖能、浸潤能を有意に抑制していることが確認された。現在、さらなる機能解析を行っているほか、その標的となる遺伝子解析を今後予定している。

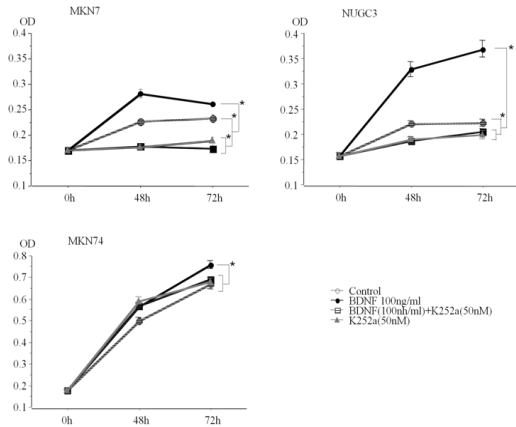
また一方で、細胞が細胞外マトリックスに接着できず、アポトーシスに至る現象は”anoikis”と呼ばれるが、腹膜播種発症の機序として”anoikis”の抑制が関与している可能をわれわれは着目した。mRNA からのアプローチでは、この”anoikis”に深くかかわる Tropomyosin-related kinase B(TrkB) とさらにその ligand である Brain derived neurotrophic factor (BDNF) を中心に解析を行ったところ、免疫組織染色において、胃癌組織における BDNF 高発現、とりわけ、胃癌先進部での高発現群は、腹膜播種と相関し、さらに予後不良を呈することが示唆された。

胃癌組織における BDNF 発現変化





さらに胃癌細胞株の中で、TrkB 高発現を認めた MKN7, MKN74, NUGC3 を用いて recombinant BDNF と、さらに TrkB inhibitor である” k252a” を用いることで、BDNF/ TrkB axis の機能解析を行った。BDNF/ TrkB axis が、増殖能、浸潤能、遊走能、アノキス抑制への関与が示唆された。



胃癌細胞株における増殖能

また、BALBc nu/nu マウスを用いた NUGC3 腹膜播種モデルでは、BDNF/TrkB axis が腹膜播種治療標的となりうるということが示唆された。

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 4 件)

1. Brain-derived neurotrophic factor / tropomyosin -related kinase B pathway in gastric cancer.

Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, Kawamura M, Kawamoto A, Hiro J, Saigusa S, Toiyama Y, Ohi M, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.

Br J Cancer. 2013 Jan 15;108(1):121-30.
査読有

2. Smad interacting protein 1 (SIP1) is associated with peritoneal carcinomatosis in intestinal type gastric cancer.

Okugawa Y, Inoue Y, Tanaka K, Kawamura M, Saigusa S, Toiyama Y, Ohi M, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.

Clin Exp Metastasis. 2012 Nov 11. [Epub ahead of print]

査読有

3. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma.

Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Iwata T, Fujikawa H, Saigusa S, Konishi N, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M.

J Surg Res. 2012 Jun 15;175(2):e67-73.

査読有

4. Clinical significance of Zinc finger E-box Binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer.

Okugawa Y, Toiyama Y, Tanaka K, Matsusita K, Fujikawa H, Saigusa S, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Uchida K, Kusunoki M.

J Surg Oncol. 2012 Sep 1;106(3):280-5.

査読有

5. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer.

Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, Uchida K, Mohri Y, Inoue Y, Kusunoki M.

Eur J Cancer. 2012 Sep;48(14):2244-51.

査読有

6. Intravital dual-colored visualization of colorectal liver metastasis in living mice using two photon laser scanning microscopy.

Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Kimura K, Mizoguchi A, Kusunoki M.

Microsc Res Tech. 2012 Mar;75(3):307-15.

査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 奥川喜永 ほか

胃癌組織における miR151-5p 発現の臨床病理学的意義 第 67 回日本消化器外科学会総会 2012. 7. 20 富山

2. 奥川喜永 ほか

Brain derived neurotrophic factor/Tropomyosin-related kinase B (TrkB) axis caused peritoneal dissemination via anoikis resistant in gastric cancer. 第71回日本癌学会総会 2012.9.19 札幌

〔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

奥川 喜永 (OKUGAWA YOSHINAGA)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 30555545

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：