

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 6 月 1 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791548

研究課題名（和文）

TFF1 をターゲットとした胃癌腹膜播種の分子標的治療に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）

TFF1 targeting therapeutic strategy for dissemination of gastric cancer

研究代表者

中村 淳 (Jun Nakamura)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60404175

研究成果の概要（和文）：

Trefoil factor 1 (TFF1)は、胃癌において癌抑制遺伝子と考えられているがそれを示唆するような臨床データは皆無である。今回、胃癌切除症例 182 例を用いて免疫組織染色で TFF1 発現を評価し、臨床病理学的因子および予後との関連について検討を行った。さらにその発現制御に関しては DNA メチル化に注目し、バイサルファイトシーケンス法でメチル化の程度と発現の相関について検討した。その結果、TFF1 低発現例は高発現例と比較して、有意に深達度が高く予後不良であり、多変量解析においては独立した予後規定因子であった。In vitro 実験においても、TFF1 のノックダウンにより浸潤能の亢進を認めた。また、細胞株・切除組織の双方において、プロモーター領域のメチル化は TFF1 の発現と逆相関しており、TFF1 がメチル化によってサイレンシングされていることが示唆された。今後は、TFF1 低発現（高メチル化）症例を対象とした TFF1 組み換え蛋白による胃癌の新規治療法・予防法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Trefoil factor 1 (TFF1) is considered to be a tumor suppressor gene in gastric cancer. However, the role of TFF1 expression and its regulation in gastric cancer patients remain unclear. The aims of this study were to clarify the clinical significance of TFF1 and to determine its regulatory mechanisms. We assessed the immunohistochemical expression of TFF1 in 182 gastric cancer patients and examined whether or not TFF1 is associated with the clinicopathological factors and patient survival. *In vitro* study using TFF1 knockdown gastric cancer cells evaluated the role of TFF1 in cancer invasion. Bisulfite sequencing was performed to assess DNA methylation of TFF1 in cells and resected tissues. Patients with low expression of TFF1 showed a significantly deeper invasion of the tumor than those with high expression ($p=0.037$). Low expression of TFF1 was also associated with a poor survival ($p=0.029$) in 108 patients who were treated by surgery alone. Both TFF1 expression and lymph node metastasis are independent predictive factors for disease-specific survival in a multivariate analysis. In an *in vitro* study, invasive power of the cells was significantly increased in the

TFF1-deficient cells compared with the control cells. Bisulfate sequencing showed that TFF1 expression is strongly dependent on DNA methylation in both gastric cancer cells and tissues. Interestingly, methylation status of two specific CpG sites, which are located close to a TATA box and hypoxia response element (HRE), determined the TFF1 expression in the resected tissues. TFF1 expression is silenced by DNA methylation and is associated with tumor invasion and a poor survival in gastric cancer patients. The expression and/or methylation status of TFF1 may, therefore, serve as a useful biomarker for predicting survival in patients with advanced 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	2,600,000	780,000	3,380,000

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：TFF1、胃癌、低酸素、DNAメチル化、浸潤能

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは以前から胃癌の悪性度亢進における低酸素環境の関与に着目し研究を行ってきた。癌の低酸素応答において中心的役割を果たす転写因子が HIF-1 α であり、癌治療における有望なターゲットと考えられているが、抗 HIF-1 治療は毒性やドラッグデリバリーの問題で未だに確立されていない。そこで、代表者は HIF-1 下流の遺伝子群のなかから新たな標的分子を見出すことを考案した。HIF-1 α 欠失胃癌細胞株を 2 種類樹立し、低酸素および常酸素での遺伝子発現をマイクロアレイ解析で網羅的に評価、コントロール細胞と比較ところ、胃癌で HIF-1 α 依存的に低酸素誘導を受ける遺伝子群の 1 つとして TFF1 を抽出した。

2. 研究の目的

胃癌における TFF1 の発現意義と、発現制御を明らかとし、治療への応用について検討する。

3. 研究の方法

2000 年～2008 年における連続した進行胃癌根治切除症例 182 例を対象とし、免疫染色による TFF1 発現解析を行い、低発現例と高発現例の 2 群に分け、臨床病理学的因子および生存・再発との関連を解析した。In vitro 実験においては TFF1 ノックダウン細胞を樹立し、増殖能・浸潤能および抗癌剤耐性についてコントロール細胞との比較を行った。さらに TFF1 の発現制御機構について、DNA メチル化に注目し、細胞株および切除標本を用いメチル化解析（バイサルファイトシーケンス法）を行い、発現との関連性を調べた。

4. 研究成果

TFF1 低発現症例は有意に深達度が高く、生存不良であった。多変量解析においても独立した予後規定因子であった。In vitro 解析においても、TFF1 knock down により胃癌細胞の浸潤能亢進を認めた。（増殖能や抗癌剤耐性には寄与しなかった。）

また、メチル化解析の結果、細胞株および切除標本においても、プロモーター領域のメチル化が TFF1 の発現をサイレンシングしていることが明らかとなった。特に TATA box および HRE 近傍のメチル化と発現が関与しており、TFF1 は DNA メチル化と低酸素の両方によって発現調節されていると推測された。

TFF1 は低分子の分泌蛋白であり、基礎実験においては TFF1 蛋白が胃癌細胞の増殖を抑制することが報告されている。今後、TFF1 低発現（高メチル化）症例を対象に TFF1 組み換え蛋白による治療の開発が期待される。

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）

T Tanaka, J Nakamura, et al. Int J Oncol 2013, 42: 894-902

Loss of trefoil factor 1 (TFF1) is regulated by DNA methylation and is an independent predictive factor for a poor survival in advanced gastric cancer.

査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

（1）第 85 回 日本胃癌学会

進行胃癌における TFF1 発現の意義とその制御機構

田中智和、中村淳 ほか 2013. 2. 27～3. 1 大阪国際会議場

（2）第 71 回 日本癌学会

Trefoil factor 1 (TFF1) is silenced by DNA methylation, and associated with a T factor and prognosis in gastric cancer

中村淳 ほか 2012. 9. 19～21 ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会

館

（3）第 112 日本外科学会

進行胃癌の予後マーカーとしての TFF1 発現意義と発現制御機構に関する検討

田中智和、中村淳 ほか 2012. 4. 12～14 幕張メッセ、ホテルニューオータニ幕張

（4）第 22 回 日本消化器癌発生学会

進行胃癌の予後における TFF1 発現の意義とその制御機構

田中智和、中村淳 ほか 2011. 11. 25 ホテルニューオータニ佐賀

（5）第 70 回 日本癌学会

Trefoil factor 1 (TFF1) is silenced by DNA methylation, and associated with a poor prognosis in advanced gastric cancer.

田中智和、中村淳 ほか 2011. 10. 5 名古屋国際会議場

（6）第 66 回 日本消化器外科学会

胃癌における新規癌抑制遺伝子 TFF1 の発現調節および臨床的意義

中村淳 ほか 2011. 7. 14 名古屋国際会議場

（7）第 111 回 日本外科学会定期学術集会

進行胃癌の予後における TFF1 発現の意義

田中智和、中村淳 ほか 2011. 5. 25（紙上開催）

〔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

中村 淳 (Jun Nakamura)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60404175

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：