



Expression of PRL-3 Phosphatase in Human Gastric Carcinomas : Close Correlation with Invasion and Metastasis

Upik, Anderiani Miskad

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2958

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002958>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 108 】

氏 名・（本 籍） Upik Anderiani Miskad（インドネシア）
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第1568号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Expression of PRL-3 Phosphatase in Human Gastric
Carcinomas: Close Correlation with Invasion and
Metastasis
(ヒト胃癌におけるPRL-3フォスファターゼの発現：
浸潤および転移との密接な関連性について)

審 査 委 員

主 査 教 授 前 田 盛
教 授 林 祥剛
教 授 堀 田 博

INTRODUCTION

PRL-3, one of the PRL family tyrosine phosphatase was reported to be associated with human colorectal cancer metastasis. Gene expression profiling using serial analysis of gene expression (SAGE) revealed that among 144 up-regulated genes detected in metastatic liver samples of colorectal carcinomas, *PRL-3* is the only gene consistently overexpressed in all 18 of the cancer metastasis examined with lower levels in non-metastatic tumors and normal colorectal epithelium. In this study, we examined the expression of *PRL-3* mRNA in gastric carcinoma cell lines and investigated the levels of PRL-3 protein in primary gastric carcinoma tissues as well as corresponding non-neoplastic mucosa and matched regional lymph node metastases.

METHODS

Expression of *PRL-3* mRNA in 8 human gastric carcinoma cell lines (HSC-42, HSC-44PE, HSC-45, HSC-57, HSC-58, HSC-59, HSC-60 and SH101-P4) was examined by RT-PCR analysis using OneStep RT-PCR assay kit (Qiagen, Germany). The expression of PRL-3 was also detected in 94 human gastric carcinomas and 54 matched lymph node metastases by immunohistochemistry using the primary polyclonal rabbit antibody, anti-PRL-3 (1:100 dilution, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) and analyzed the relationship with clinicopathological parameters. To confirm a specificity of anti-PRL-3 antibody, Western blotting and Immunofluorescence microscopy were carried out for SH101-P4 and HSC-60 cell lines. Immunoreactivity of anti-PRL-3 antibody was graded as follows: negative, almost no positive cells; low, 5-50% of tumor cells showed weak to moderate immunoreactivity; high, over 50% of tumor cells showed strong immunoreactivity.

RESULTS

PRL-3 mRNA was clearly detected in 7 (87.5%) of 8 gastric cancer cell lines with highest expression level in SH101-P4 cells and lowest expression level in HSC-60 cells. In tumor samples, PRL-3 expression was detected in 68% of primary gastric carcinoma (with nodal metastasis, 81.5%; without nodal metastasis, 50%, $p = 0.004$). PRL-3 expression was weak to negative in non-neoplastic gastric mucosa. In the tumor cells, PRL-3 immunoreactivity was mainly located in the cytoplasm and more intense in the cell membranes. Expression of PRL-3 was closely associated with stage of tumor ($p = 0.045$), lymphatic vessel invasion ($p = 0.002$) and extent of lymph node metastasis ($p = 0.002$). Moreover, the incidence of PRL-3 expression in lymph node metastasis was significantly higher than those in primary gastric cancers ($p < 0.001$). High PRL-3 expression was also detected in other metastatic sites, such as liver and peritoneum.

DISCUSSION

The PRL phosphatases (PRL-1, -2 and -3) are three closely related intracellular enzymes that possess the PTP active site and are believed to play key roles in cellular transformation. Recently, overexpression of *PRL-3*, resulting from gene amplification at chromosome 8q24.3 was reported to be associated with tumor metastasis of human colorectal cancer. This striking report prompted us to examine the expression of PRL-3 in primary gastric carcinomas and lymph node metastasis. In this study, 7 (87.5%) of 8 gastric cancer cell lines expressed distinct *PRL-3* mRNA constitutively suggest that *PRL-3* may responsible for the invasive activity of many gastric carcinomas. Immunohistochemical examination revealed that PRL-3 expression was closely associated with stage of tumor, invasion of lymphatic vessels

and extent of lymph node metastasis. High expression of PRL-3 in lymph node metastasis and advanced gastric cancer support the evidence for the role of this gene in metastasis. Distribution pattern of PRL-3 in the cell membrane supports the previous report that localization of PRL-3 in the cytoplasmic membrane when its prenylated enhanced several membrane processes including protrusions, ruffles and some vacuolar-like membrane extensions, which reported to play a role in invasion and cell movement. Stable transfection of PRL-3 in non-metastatic CHO cells has been also reported to induce the acquisition of metastasis-associated properties.

Upregulated PRL-3 in cancer provides an excellent target for developing novel therapeutics, especially for intractable tumors due to cancer metastasis. Although the specific protein substrate for PRL-3 has not been identified yet, blocking or reducing the functions of PRL-3 in metastasis could be done by inhibition of prenylation and/or inactivating the catalytic function of PRL-3 phosphatase active site.

CONCLUSION

These results strongly suggest that PRL-3 expression may play a significant role in invasion and metastasis of gastric carcinoma. PRL-3 might be a novel molecular marker and therapeutics for aggressive gastric cancer.

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1569 号	氏名	Uptk Anderiani Miskad
論文題目	<p>Expression of PRL-3 Phosphatase in Human Gastric Carcinomas: Close Correlation with Invasion and Metastasis</p> <p>ヒト胃癌におけるPRL-3 フォスファターゼの発現： 浸潤および転移との密接な関連性について</p>		
審査委員	<p>主 査 前田 誠</p> <p>副 査 林 祥岡</p> <p>副 査 塚田 博</p>		
審査終了日	平成 16 年 2 月 26 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

近年胃癌の発生頻度は減少傾向にあるものの、世界レベルにおいてもいまだ癌による死亡原因の第二位を占めている。その予後を規定する因子としては所属リンパ節への転移が重要視されているが、その分子機構はいまだ十分には解明されていない。近年、大腸癌肝転移巣および原発巣癌細胞、正常大腸上皮細胞の serial analysis of gene expression (SAGE)法による網羅的遺伝子発現解析から、肝転移巣癌細胞に特異的に発現亢進する遺伝子として PRL-3 (phosphatase of regenerating liver-3) が単離された。本遺伝子は染色体 8q24.3 に位置しC端側に特異なプレニル化部位を有するフォスファターゼをコードしており、転移能を有さない CHO 細胞に導入することにより浸潤、転移能を付加することが報告されている。本研究者は、胃癌の増殖、浸潤、転移における PRL-3 の役割を明らかにする目的で胃癌細胞株、胃癌臨床検体原発巣および転移巣における PRL-3 の発現を免疫組織化学的に解析し、臨床病理学的要因との比較検討を行った。

研究に用いた材料は、胃癌細胞株 8 株 (HSC-42, HSC-44PE, HSC-45, HSC-57, HSC-58, HSC-59, HSC-60, SH101-P4) ならびに神戸大学医学部附属病院にて外科的に切除された胃癌 94 例である。胃癌症例の内、54 例は所属リンパ節転移を有していた。胃癌細胞株については PRL-3 特異的プライマーを用いた RT-PCR 法、PRL-3 特異抗体を用いたウェスタンブロット法ならびに共焦点レーザー顕微鏡による蛍光免疫染色により、PRL-3 の発現の程度と細胞内局在を検討した。胃癌症例についてはパラフィン切片を用いた免疫組織化学により PRL-3 の組織内局在ならびに発現態度を検索した。PRL-3 免疫活性は、陰性 (殆どの腫瘍細胞に免疫活性陰性)、低発現 (半数までの腫瘍細胞が中等度までの免疫活性陽性) および高発現 (半数以上の腫瘍細胞が強い免疫活性陽性) に分類し、各症例の臨床病理学的要因ならびに予後との関係を統計学的に解析した。

胃癌細胞 8 株 (の RT-PCR による解析では、HSC-60 を除く 7 株で PRL-3 の発現が確認され、SH101-P4 が最も高い発現レベルを示していた。ウェスタンブロット解析では、mRNA 高発現を示す SH101-P4 では 22 kDa に陽性所見を得たが、HSC-

60 ではタンパク発現が確認されなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光免疫染色では、SH101-P4 では、強い PRL-3 免疫活性が確認されたが、HSC-60 では陰性であった。免疫組織化学的に PRL-3 は胃癌細胞の細胞膜を中心とした細胞質に局在し、非癌部位粘膜での発現は極めて微弱であった。胃癌切除材料 94 例の検索では、胃癌原発巣の 68%に PRL-3 免疫活性が認められ、所属リンパ節転移陽性例での陽性率 (81.5%)は陰性例 (50%)に比較して有意に高率であった ($p=0.004$)。次に各胃癌症例における臨床病理学的要因と PRL-3 免疫活性の関連を解析したところ、胃癌原発巣における PRL-3 の高発現は臨床病期 ($p=0.045$)、リンパ管侵襲 ($p=0.002$)、リンパ節転移の程度 ($p=0.002$) と有意に相関した。また、同一症例のリンパ節転移巣は原発巣に比して有意に強い PRL-3 発現を示していた ($p=0.001$)。これらの結果より、PRL-3 は胃癌の浸潤、転移に重要な役割を果たし、その診断、治療の新たな分子標的となる可能性が示唆された。

以上のごとく、本研究は新規転移関連フォスファターゼ PRL-3 の発現について、胃癌細胞株、胃癌原発巣及び転移巣組織を用いて免疫組織化学的に解析したものであるが、従来報告のない胃癌の浸潤、転移と PRL-3 高発現との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。