

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19343

研究課題名(和文) BTB蛋白を介したCullin3 E3リガーゼの新たな消化器疾患メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of new alimentally cancer disease mechanism of Cullin3 E3 ligase mediated by BTB protein

研究代表者

尾関 啓司(Ozeki, Keiji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70750610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞においてBTB蛋白-Cullin3-E3リガーゼは新たな治療ターゲットになる可能性が報告されている。Alpha screening assayを使用しCullin3と強く結合するBTB蛋白(BACK-Kelchタンパク質群)を同定した。BTB蛋白のSiRNAを使用し、大腸癌細胞増殖能に変化を認めるBTB蛋白(KLHL-X)を見出した。KLHL-Xの発現が大腸癌において増殖、浸潤に関与している可能性が示された。また、側方発育型大腸腫瘍(LST)の浸潤度と粘膜粘液形質に関する報告は認めていない。ヒト検体による検討で異所性胃粘液形質発現がLSTの悪性化や病期進行度と関連することが示された。

研究成果の概要(英文)： BTB protein - Cullin 3 - E 3 ligase has been reported that they may become a new therapeutic target in cancer cells, although there are many unclear points about the function of about BTB proteins. BTB protein (BACK-Kelch protein group) strongly binding to Cullin 3 was identified by using Alpha screening assay. We found a BTB protein (KLHL-X) associated with cell proliferation, due to comprehensively performing SiRNA of BTB protein on colon cancer cell line. Further examinations showed that the expression of KLHL-X might be involved in proliferation and invasion in colorectal cancer.

Next, the relationship of ectopic gastric mucinous phenotype and colorectal lateral spreading tumors (LSTs) are not reported. We analyzed 105 colorectal LSTs to identify factors indicative of malignant transformation and invasion. Ectopic gastric and intestinal phenotype, neuroendocrine cell differentiation, and SOX2 expression differ according to tumor grade on colorectal LSTs.

研究分野：cancer

キーワード：大腸癌 BTB蛋白 Cullin3 ユビキチン 異所性胃型粘液形質

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は本邦においても罹患率、死亡率ともに増加しており、その発生機序解明と治療ターゲットの解析は非常に重要な命題となっている。今回、我々は大腸癌における以下の2点の発生機序と治療ターゲット・バイオマーカーについての検討を行った。

### 【検討1】

ユビキチンタンパクは、不要な蛋白質に付加されポリユビキチン化することでプロテアソームに不要な蛋白を認識させ(ユビキチン-プロテアソームシステム)分解させる。このことにより生体内の蛋白質の分解、細胞周期やシグナル伝達、形態形成や分泌、オルガネラの構築、DNA 修復、翻訳調節などにおいてユビキチン-プロテアソームシステムは非常に重要な役割を担っている。標的蛋白質に対するユビキチン化は3つのユビキチン酵素、ユビキチン活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、さらに転移酵素(ユビキチンリガーゼ)(E3)によって行われる。この中でユビキチンリガーゼは作用基質を認識する重要な役割を担っている。最近までこの多種に及ぶユビキチンリガーゼの作用機構の詳細については大部分不明であった。近年の研究で BTB ドメイン構造を持つ蛋白質群の中には、Cullin3 といわれる蛋白質と特異的に BTB ドメイン部位で結合するものがあることが判明している。生体内で約 183 種類あるといわれている BTB ドメインを有する蛋白質の機能解析はほとんど行われておらず不明な点が多いが、BTB 蛋白群は Cullin3 を中心とした E3 ユビキチンリガーゼ複合体が標的蛋白(基質)と結合するための重要なつなぎ役を果たすことが判明してきた。その結果として結合された基質がユビキチン化され機能変化をおこし生物内において重要な働きを担っており、その遺伝子変異は病因とも関係が深い。

BTB 蛋白として、KLHL20, Keap1, KCAS2・3, RhoBTB, SPOP などと Cullin3-E3 リガーゼ複合体の異常が前立腺癌、乳癌、髄芽腫などで報告されており、癌細胞においても BTB ドメイン蛋白-Cullin3-E3 ユビキチンリガーゼはあらたな治療ターゲットになる可能性が報告されている。

### 【検討2】

早期大腸癌では、粘膜下層剥離術(ESD)などの内視鏡治療手技の神秘により、一括で粘膜内病変が切除可能な時代になり、巨大な側方発育型大腸腫瘍なども粘膜内早期大腸癌は内視鏡的で治癒切除が目指せる時代にはいった。一方、粘膜下浸潤癌は微小浸潤であれば、各種ガイドライン通り内視鏡の局所切除で治癒切除となるが、多くの粘膜下層浸潤癌は腸管外リンパ節転移のリスクが数十%に認められるために追加外科治療をおこなっている。しかし、これらの症例のうち大半

は必要のない追加外科治療を施行していることになっている。真に追加外科治療が必要な症例を見出すための治療バイオマーカーの探索をすることで、さらなる治療リスクの低下と治療成績の向上が見込まれる。

我々は以前から、胃癌や膵臓癌に関する、粘膜粘液形質の変化と癌の浸潤度の関連について報告してきた。大腸腺腫と粘膜粘液形質に関する報告も認める。しかし、側方発育型大腸腫瘍の浸潤度と粘膜粘液形質に関する報告は認めていない。

## 2. 研究の目的

### 【検討1】

今回、我々は大腸癌における BTB ドメイン蛋白質-Cullin3-E3 ユビキチンリガーゼ複合体が果たしている役割について検討することであらたな癌治療ターゲットを見出し治療に役立てることを本研究の目的とした。

### 【検討2】

今回、我々は大腸側方型発育腫瘍における、異所性胃型粘液形質発現を検討することで、腺腫から癌へと悪性化する時におきる粘液形質変化の関連と、大腸癌の浸潤度と異所性胃型粘液形質発現の関連につき検討して大腸癌の治療バイオマーカーとして使用できるかの検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【検討1】

まずは、BTB 蛋白質、Cullin3 の蛋白精製と small interfering RNA (siRNA)の作成を行った。共同研究所である愛媛大学で開発されたコムギ胚芽無細胞蛋白質合成法を利用した試験管内蛋白質合成システムにより BTB 蛋白質を精製した。これは、安定した翻訳鋳型 mRNA を作製するために、蛋白質コード配列上流に翻訳活性化エレメントと RNA ポリメラーゼ認識プロモーター配列および下流に非翻訳領域の配列を付加できるようにスプリット PCR 法を用い、mRNA 合成を行うものである。さらに翻訳時には、基質アミノ酸混合液、リボゾーム、ATP などを添加した新しい反応法の開発など新技術が取り入れられており、完全試験管内合成反応のため生命体の制約を受けることは皆無である。よって、蛋白合成活性が非常に高いシステムである。それにより現在判明している BTB 蛋白質遺伝子 183 種のタンパク質と Cullin3 蛋白を作成したものを共同研究の愛媛大学から提供頂いた。また、同様に、183 種類の BTB 蛋白質に対する siRNA を提供していただいた。

合成 BTB 蛋白質と CUL3 を Donor と Acceptor beads に付替えた検出系 (Alpha screening assay) を作成した。すなわち、1.25  $\mu\text{g/mL}$  の CUL3 5  $\mu\text{L}$  と 1.25  $\mu\text{g/mL}$  のピオチン化 BTB 蛋白質のそれぞれ 2.5  $\mu\text{L}$  を 30 分間インキュベーションし、その後 1.8  $\mu\text{g/mL}$  の抗 GST 抗体 2.5  $\mu\text{L}$  を加え、さらに 1 時間以上インキュベーションする。その

後、streptavidin-coated donor beads を 5  $\mu$ L 加え、暗所で 2 時間インキュベーションする。AlphaScreen シグナルは、buffer (25 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl, pH 7.4, 0.1 % BSA) を使用し、23 °C 加温下で EnVision microplate reader (Perkin-Elmer) で測定する。183 種すべての BTB 蛋白質について網羅的に解析し、CUL3 に強く結合する BTB 蛋白質 (BACK-Kelch タンパク質群) を同定した。

大腸癌細胞株 (HCT116, HT29, SW480, WiDr, CaCo2) において BACK-Kelch 蛋白質の一種である KLHL 蛋白質群の siRNA を使用して、特異的 BTB 蛋白質 (KLHL 蛋白質群) のノックダウンを行うことで、大腸癌細胞株 (HCT116) の形質発現 (足場依存性および非依存性細胞増殖能・浸潤能) の変化を観察した。

足場依存性細胞増殖能評価は、10cm 培養皿に細胞数 500 個程度撒き 10%FBS 培養液で 24 時間培養後、KLHL-X の siRNA を加え、single cell から colony 細胞数を毎日に数え、細胞増殖カーブにて検討した。足場非依存性細胞増殖能評価は 1.8 % agar 溶液  $2 \times 10^5$  cells/ml に調整し、細胞懸濁液 100  $\mu$ L を 15 mL チューブに移し、agar を 3 mL/tube 加えて 1.5 mL ずつ bottom agar の上に播いた。2-3 日毎に培養液を交換し培養して。培養 48 時間後に KLHL-X で siRNA を施行する群とコントロール群にわけ、1-2 週間後 5mg/mL MTT 溶液を用いコロニーを染色し、カウントした。浸潤能は、浸潤能力をしらべるのにマトリゲルチャンパーアッセイを施行した。

また、浸潤性大腸癌 19 症例 (ステージ分類、  
、  
、  
= 3 例、3 例、4 例、8 例) と腺腫症例 9 症例のヒトの検体を使用して、KLHL-X の免疫組織染色を施行して、その蛋白質発現の有無と病気の浸潤度の関連につき検討した。

免疫組織染色の手順は、パラフィン固定検体を 2  $\mu$ m の連続切片で、濃度勾配のあるアルコールを使用してパラフィンの除去と脱水処理を施行した。その後、内因性のペルオキシダーゼブロッキングのために 3%過酸化水素/メタノール溶液を 20 分間反応させた。次に、抗原活性化のために、10mM、pH6 のクエン酸緩衝液を抗原賦活溶液として使用して、98 度で 10 分間マイクロウェーブ処理を行った。検体を一次抗体と反応させてその後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、Horseradish peroxidase (HRP) タグ化された二次抗体と反応させた。最後に、3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) 液を使用して発色して蛋白検出を行った。

#### 【検討 2】

大腸腫瘍のうち側方発育型腫瘍 (LST) で、2012 年から 2015 年の間に内視鏡的粘膜切除術が名古屋市立大学で施行された 105 症例に関して検討した。LST はその肉眼型に応じて

顆粒型 LST (LST-G) 症例と非顆粒型 LST (LST-NG) に分類した。すべての症例は 10% のホルマリン固定後、パラフィン包埋後薄切して Hematoxylin and eosin 染色を施行された。LST は WHO の分類に従い、組織学的に腺腫 (LAs)、粘膜内癌 (HAs)、粘膜下層浸潤癌 (SMs) に分類した。また、MUC5AC、MUC6、CD10、クロモグラニン A、SOX2 による免疫組織染色を施行した。免疫染色の方法は前記に準じて施行した。

#### 4. 研究成果

##### 【検討 1】

183 種類の候補 BTB 蛋白質のうち、Alpha screening assay を使用することで、試験管内で Cullin3 と強く結合する BTB 蛋白質 (BACK-Kelch タンパク質群) を同定した。BTB 蛋白質の siRNA ライブラリーを使用して、大腸癌細胞株で網羅的に BTB 蛋白質の siRNA を行ったところ、細胞増殖能に変化を認める、大腸癌細胞株に対する BTB 蛋白質 (KLHL-X) を見出すことが可能であった。

大腸癌細胞株 (HCT-116) において、足場依存性、非依存性にかかわらず、KLHL-X をノックダウンすることで、コントロール群と比較して有意に細胞増殖能の低下を認めた。また、同様に KLHL-X をノックダウンすることでコントロール群と比較して有意に浸潤能の低下を示した。

大腸癌と大腸腺腫の臨床検体を使用して、KLHL-X 染色を行ったところ、コントロールの正常大腸粘膜ではほとんど、KLHL-X は検出されなかった。しかし、大腸腺腫、大腸癌の病期が進行するにつれて KLHL-X の発現が有意に増加していた。また、KLHL-X の発現は癌の表層部より浸潤深部での発現が高率であった。

以上のことから、BTB 蛋白質の一種である KLHL-X の発現が大腸癌において増殖、浸潤に関与している可能性が示された。その詳細なメカニズムに関しては、さらなる検討が必要である。しかし、CUL3-E3 リガーゼの器質アダプタータンパクとして KLHL-X が増殖・浸潤能への影響を与えている可能性があり、その阻害剤を開発することにより新たな癌治療の選択肢となり得ると考えられた。

##### 【検討 2】

105 症例の LST の内、60 症例が LST-G 症例で 45 症例が LST-NG 症例であった。LST-G 症例は、5 例が LAs で 45 例が HAs、10 例が SMs であった。一方、LST-NG 症例は、8 例が LAs で、25 例が Has であり、12 例が SMs であった。MUC-5AC の発現は、LST-NG 群に比べて LST-G 群で有意に高かった。また、LST すべての症例において、LAs にくらべて HAs になるに従い MUC5AC の発現が有意に増加した。すなわち、MUC-5AC 発現が癌の発生や浸潤と関連する可能性が示唆された。また、SM 浸潤群において、LST-G 群では MUC6 と SOX2 の発

現、LST-NG 群ではクロモグラニン A の発現が有意に高かった。同様に CD10 の発現は LST-NG 群において SMs 群において有意に発現が増加していた。以上のことから、大腸 LST における異所性胃粘液形質発現や腸型粘液、内分泌分化傾向や SOX2 は腫瘍の悪性化と関連して、これらの治療進行度をはかるマーカーになり得る可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours.

Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T.

Mol Med Rep. 2017 9; 16(3):3095-3102.

Ectopic Gastric and Intestinal Phenotypes, Neuroendocrine Cell Differentiation, and SOX2 Expression Correlated With Early Tumor Progression in Colorectal Laterally Spreading Tumors.

Katano T, Mizoshita T, Tsukamoto H, Nishie H, Inagaki Y, Hayashi N, Nomura S, Ozeki K, Okamoto Y, Shimura T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Kuno T, Takahashi S, Joh T.

Clin Colorectal Cancer. 2017 6; 16(2):141-146.

〔学会発表〕(計 3 件)

第 14 回日本消化管学会学術集会  
平成 30 年 2 月 9 日

大腸癌の進展と関連した新規因子の機能解析

第 59 回日本消化器病学会学術集会  
平成 29 年 10 月 13 日

大腸側方発育型腫瘍における悪性化・粘膜下層浸潤予測因子の臨床病理学的検討

第 36 回消化器病態生理勉強会  
平成 29 年 7 月 29 日

大腸癌の進展と関連した新規因子の機能解析

〔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 尾関 啓司 (OZEKI Keiji)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
消化器・代謝内科学 助教

研究者番号：70750610

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )