

令和元年5月14日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10513

研究課題名(和文) ユビキチン修飾系異常を介した癌進展機序の包括的解明と新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of cancer progression through dysfunction of ubiquitin system

研究代表者

右田 和寛 (Migita, Kazuhiro)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40570990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：E3ユビキチンリガーゼであるRing finger protein 126(RNF126)の胃癌進展における役割を検討した。胃癌切除標本を用いて免疫組織染色を行ったところ、RNF126発現レベルは腫瘍壁浸達度と有意な関連性を認め、RNF126発現レベルは独立予後規定因子であった。ヒト胃癌細胞株MKN45、MKN74のRNF126発現をsiRNAでノックダウンしたところ、有意に増殖が抑制された。さらには、RNF126発現ノックダウンにより、5-FUの増殖抑制効果が増強された。以上の結果から、胃癌においてRNF126は腫瘍の増殖、抗癌剤治療抵抗性に関与し、治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はユビキチンシステムにおいて中心的役割を担うE3ユビキチンリガーゼに着目し、胃癌進展におけるその異常の意義・役割を検討した。E3ユビキチンリガーゼであるRNF126はヒト胃癌組織で過剰発現しており、その発現レベルは腫瘍浸達度と関連し、独立した予後規定因子となるなど臨床的意義を有することが判明した。また、発現レベルは胃癌細胞の増殖能、抗癌剤への感受性に関連することが明らかとなり、RNF126は胃癌の増殖、治療抵抗性に深く関与することが示唆された。本研究の成果はユビキチンシステム異常を介した消化器癌進展の解明、新たな癌治療開発の礎となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of Ring finger protein 126 (RNF126) in the progression of gastric cancer. In the immunohistochemical analyses, the RNF126 expression level was significantly associated with the tumor depth. The patients with a RNF126-high tumor had a significantly lower overall survival rate than the patients with a RNF126-low tumor. Multivariate analysis identified the RNF126 status as an independent prognostic factor. We further investigated the roles of RNF126 in vitro using a small interfering RNA (siRNA). RNF126 gene silencing significantly inhibited the proliferation of human gastric cancer cells, MKN45 and MKN74, through the cell cycle arrest. Furthermore, RNF126 gene silencing improved the sensitivity to 5-FU. Our findings indicate that RNF126 might play an important role in regulating the proliferation and chemo-resistance of gastric cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 E3ユビキチンリガーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はタンパク質翻訳後修飾系であり、細胞周期・シグナル伝達・転写調整などあらゆる生命現象を制御しており、その異常は癌を含め様々な疾患と関連することが示されてきた。これまでに RING finger ドメインを有する多くのタンパク質が同定され、これらの多くは E3 ユビキチンリガーゼとしての機能を有することが明らかとなった。近年、種々の RING finger family の発現異常、機能異常が様々な癌腫で確認され、癌の進展や治療抵抗性におけるユビキチン修飾系異常の重要性がこれまでの基礎研究において示されてきた。さらに最近では、RNA 干渉法を用いたスクリーニングにより、癌細胞の増殖に関連する RING finger E3 リガーゼとして RING finger protein 126 (RNF126) が同定された。RNF126 は細胞周期調整や DNA 修復などに深く関与していることが示されてきた。しかしながら、消化器癌における RNF126 を含めた RING finger family の詳細な役割は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、予後不良である胃癌などの難治性消化器癌を対象として、ユビキチン修飾系異常を介した癌の進展機序を包括的に解明するのみならず、新規癌治療法としての可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

臨床検体を用いた検討

術前未治療の胃癌症例 170 例の切除標本を RNF126 特異抗体を用いて免疫染色を行った。腫瘍における RNF126 陽性率を算出し、臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。

in vitro 実験系での腫瘍における RNF126 の役割の解明

ヒト胃癌細胞株 MKN45、MKN74 の RNF126 発現を RNA 干渉法を用いてノックダウンし、細胞増殖アッセイ (CellTiter-Blue Cell Viability アッセイ)、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットを行った。

in vitro での抗癌剤の抗腫瘍効果に RNF126 発現が及ぼす影響の検討

上記胃癌細胞株を使用し、RNF126 発現ノックダウン、5-fluorouracil (5-FU) 併用による増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

臨床検体を用いた検討

170 例中 161 例 (94.7%) の腫瘍において RNF126 の発現を認めた (図 1)。腫瘍における平均 RNF126 陽性率は 43.5% であった。臨床病理学的因子との関連を検討したところ、RNF126 陽性率は壁深達度、stage、静脈侵襲と有意な関連を認めた (表 1)。

RNF126 発現と術後全生存との関連を検討した。全症例を RNF126 陽性率 63% で高発現群 (51 例)、低発現群 (119 例) に分類したところ、高発現例は 5 年全生存率 45.4% と低発現例 78.6% に比べ有意に予後不良であった (図 2、 $P < 0.001$)。進行度別に検討した結果、stage III において高発現例は低発現例に比較して有意に生存率が低かった ($P = 0.002$)。多変量解析の結果、RNF126 発現は独立予後規定因子であった (表 2)。また、術後再発は高発現群で低発現群と比較して有意に高率 (45.1% vs. 18.5%, $P < 0.001$) であり、なかでも血行再発が有意に高率 (17.6% vs. 5%, $P = 0.008$) であった。

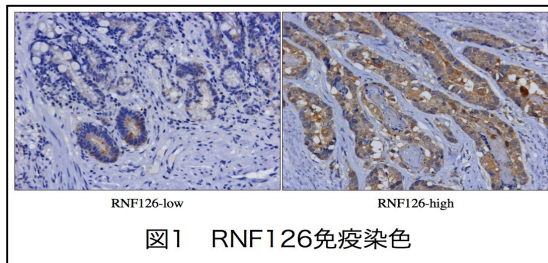


図1 RNF126免疫染色

表1 RNF126発現レベルと腫瘍関連因子

Variables		% of RNF126-positive cells	P value
Histology	Diff.	45.9 ± 28.3	0.196
	Undiff.	40.5 ± 24.5	
Tumor depth	T1	30.0 ± 23.7	0.001
	T2	38.0 ± 27.5	
	T3	46.9 ± 25.0	
	T4	55.2 ± 24.8	
LN metastasis	Negative	41.7 ± 28.3	0.481
	Positive	44.6 ± 25.8	
pStage	IB	34.2 ± 27.1	0.008
	IIA, IIB	45.2 ± 25.7	
	IIIA, IIIB, IIIC	50.1 ± 26.7	
Lymphatic invasion	Negative	37.9 ± 27.6	0.195
	Positive	44.8 ± 26.5	
Venous invasion	Negative	38.0 ± 27.2	0.001
	Positive	51.1 ± 24.2	

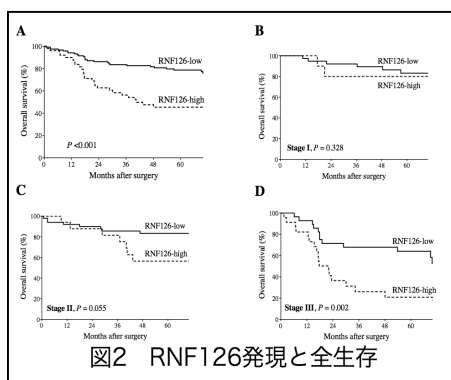


図2 RNF126発現と全生存

表2 多変量生存解析

Variables	HR (95% CI)	P value	
Tumor depth	T3, T4/T1, T2	1.843 (1.003-3.384)	0.049
LN metastasis	Positive/negative	2.700 (1.432-5.092)	0.002
Venous invasion	Positive/negative	1.282 (0.713-2.308)	0.407
RNF126 status	High/low	2.668 (1.568-4.538)	<0.001

Ki67 免疫染色を行い、RNF126 発現と腫瘍細胞増殖能との関連を検討した。RNF126 高発現腫瘍は低発現腫瘍と比較して平均 Ki67 陽性率は有意に高率であった (28.4% vs. 19.4%, $P < 0.001$)。また、RNF126 陽性率は Ki67 陽性率と有意な正の相関を示した (図 3)。

以上のことから、RNF126 は胃癌細胞の増殖、転移に関連し、RNF126 発現は臨床的意義を有することが示唆された。

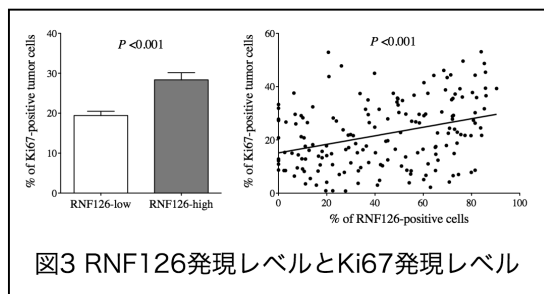


図3 RNF126発現レベルとKi67発現レベル

in vitro 実験系での腫瘍における RNF126 の役割の解明

胃癌細胞株 MKN45、MKN74 の RNF126 発現を siRNA を用いてノックダウンした (図 4A)。細胞増殖アッセイを行ったところ、いずれの細胞株においても RNF126 発現ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、有意に増殖が抑制された (図 4B)。FACS による細胞周期解析の結果、RNF126 発現ノックダウンにより G1 期細胞の割合が有意に増加した (図 5A)。また、ウェスタンブロットの結果、ノックダウン細胞では p21 レベルが増加していた (図 5B)。以上の結果から、RNF126 は細胞周期調整などを介して胃癌細胞の増殖能に関与することが示唆された。

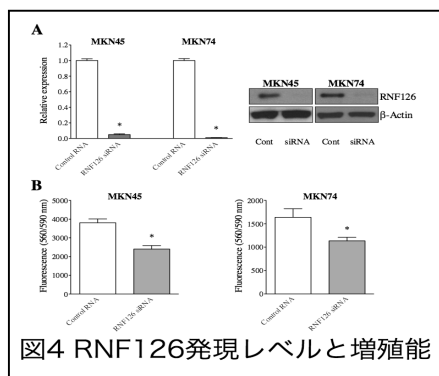


図4 RNF126発現レベルと増殖能

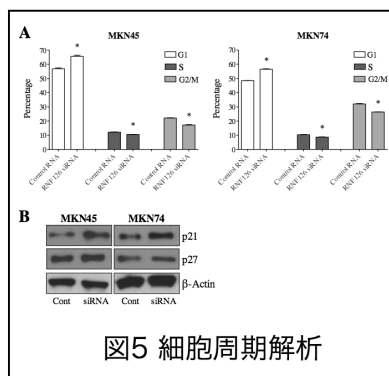


図5 細胞周期解析

in vitro での抗癌剤の抗腫瘍効果に RNF126 発現が及ぼす影響の検討

5-FU、RNF126 発現ノックダウン併用はそれぞれの単独と比較して、有意な腫瘍細胞増殖抑制効果を示した (図 6)。これらのことから、RNF126 は抗癌剤治療抵抗性に関連し、RNF126 を標的とした治療により、抗癌剤感受性が改善する可能性が示唆された。

以上の結果から、RNF126 は腫瘍細胞の増殖能、薬剤治療抵抗性に関与することが判明した。RNF126 は新たな癌治療の標的となりうると思われる。

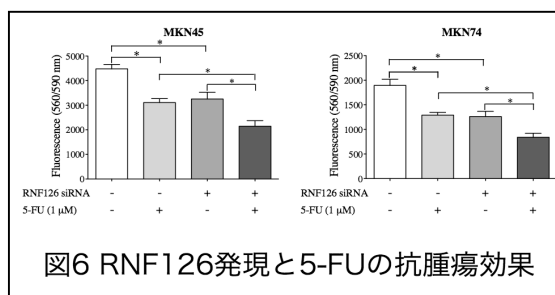


図6 RNF126発現と5-FUの抗腫瘍効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

胃癌における RNF126 の意義 右田和寛、松本壮平、若月幸平、伊藤眞廣、國重智裕、中出裕士、北野睦子、中谷充弘、庄 雅之 第 118 回日本外科学会定期学術集会

Clinical significance of RNF126 in gastric cancer. K. Migita, S. Matsumoto, K. Wakatsuki, M. Ito, T. Kunishige, H. Nakade, M. Sho 第 77 回日本癌学会学術集会

High expression of RNF126 is associated with poor prognosis of gastric cancer. K. Migita, S. Matsumoto, K. Wakatsuki, T. Kunishige, H. Nakade, S. Miyao, M. Sho 第 91 回日本胃癌学会総会

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：尾原 伸作

ローマ字氏名：Obara Shinsaku

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。