

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20309

研究課題名(和文) 眼瞼脂腺がん治療の新規ターゲット遺伝子の解明

研究課題名(英文) Novel target genes for eyelid sebaceous gland carcinoma

研究代表者

柚木 達也 (YUNOKI, TATSUYA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・講師

研究者番号：30401805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：当院で手術を施行し、摘出した眼瞼脂腺癌基底細胞癌の解析を行った。組織免疫染色でヒートショック応答タンパク質であり、様々ながんで高発現しているBAG3の発現を始めて報告した。また、眼瞼基底細胞癌からRNAを抽出し、網羅的遺伝子解析を行い、高発現している遺伝子によるネットワークを示した。さらに、cancer cell growth, tumorigenesis, cell survivalに関連する遺伝子ネットワークも示すことができ、分子レベルでのメカニズム解析に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the analysis of surgically derived samples with SGC of the eyelid at Toyama University Hospital. The expression of BAG3, anti-apoptotic protein in various cancers, was evaluated by immunohistochemistry. BAG3 was highly expressed in sebaceous gland carcinoma of the eyelid. BAG3 may play an important role in the pathogenesis and progression of sebaceous gland carcinoma of the eyelid. In addition, we performed global gene expression analysis of surgical tissue samples of BCC of the eyelid by using a GeneChip system. Ingenuity pathway analysis showed that the gene network in BCC of the eyelid. And we identified unique gene networks related to cancer cell growth, tumorigenesis, and cell survival. These results of integrating microarray analyses provide further insights into the molecular mechanisms involved in BCC of the eyelid.

研究分野：眼科

キーワード：眼瞼腫瘍 脂腺癌 BAG3

1. 研究開始当初の背景

眼瞼腫瘍等眼科領域のがん治療の医療満足度は高くなく、新たな治療戦略が望まれている。熱ショック転写因子 1 (HSF1) や HSF1 により主に発現制御される Bcl-2 associated athanogene 3 (BAG3) は熱ショック応答に関連するタンパク質で、各々、種々のがんで高発現していることから、がんとの関連性が注目されている。BAG3 は様々ながん細胞において、Heat shock protein 70 (Hsp70) のクライアントタンパク質の安定化を通して、抗アポトーシス作用を発揮するといわれているが、その詳細なメカニズムは十分に分かっていない。また、近年、我々は、レチノブラストーマの種々の機能に BAG3 が関与することを初めて明らかにした。眼瞼腫瘍をはじめとした眼科領域のがん細胞において HSF1 や BAG3 の研究はほとんど行われておらず、がん細胞の増殖や生存にどのように関与するかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト眼瞼脂腺がんを用いて、がん細胞の機能における HSF1 や BAG3 の関与を最新の技術を用いて、ゲノムからタンパク質レベルまで精査する。我々が調べた限り、脂腺がんヒートショック応答の観点から調べた報告はない。従って、脂腺がんにおいて HSF1 に制御されるヒートショック応答による BAG3 の発現亢進や BAG3 の抗アポトーシス効果等が解明できれば、脂腺がんの増殖、転移機構の一部が明らかになり、新規の治療法開発や予後因子の同定への糸口が見つかる可能性がある。脂腺がんにおける分子生物学的なアプローチにより、新たな知見が得られれば、眼科領域の様々ながんにおいても応用でき、新規治療法の開発に貢献できると考える。

3. 研究の方法

この研究を行うにあたり、ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針の学内講習会に参加し、適正な実施を行うための知識を取得する。そして、学内倫理審査委員会による承認と十分なインフォームドコンセントを行ったうえで研究を行う。眼瞼脂腺がん患者から摘出した検体において、安定化細胞株を樹立する。その細胞から RNA とタンパク質を抽出し、BAG3 が高発現しているか否かを、ウエスタンブロットやリアルタイム PCR の手法を用いて検討する。樹立した細胞株において、BAG3 遺伝子ノックダウンを行い、アポトーシスが誘導されるかをフローサイトメトリーとウエスタンブロットで検討する。そして、網羅的遺伝子解析を行うことで、BAG3 のターゲット遺伝子の同定を行い、BAG3 の抗アポトーシスメカニズムの一部を明らかにする。さらに、BAG3 と転移や浸潤との関連性を、Migration アッセイと Invasion アッセイで検討する。以上より、BAG3 と眼瞼脂腺がんとの関連性を明らかにする。

4. 研究成果

Hsp70 の co-chaperon であり、様々なストレスに対して細胞保護作用を有する BAG3 が、眼瞼脂腺癌においてどのように発現しているかについて検討した。当院で手術を施行した眼瞼脂腺癌患者 5 例に対して、組織免疫染色を行い BAG3 の発現について検討した。細胞膜、細胞質に染色が見られる場合、陽性とし、強陽性 (3+)、中等度陽性 (2+)、弱陽性 (1+) の 3 段階に分け、それぞれの割合を算出した。1+ ~ 3+ の合計をその症例の BAG3 陽性率とした。BAG3 は全症例の細胞質において、びまん性に染色された。全症例の強陽性の腫瘍細胞の割合は $10.0 \pm 13.0\%$ 、中等度陽性の割合は $26.0 \pm 29.6\%$ 、弱陽性の割合は $37.0 \pm 23.1\%$ であった。全症例の腫瘍細胞における BAG3 の陽性率は $73.0 \pm 26.0\%$ であった。

眼瞼脂腺癌において BAG3 が高発現していることが確認された。眼瞼脂腺癌における分子レベルでの病態解明につながると考えている。

また、眼瞼基底細胞癌から RNA を抽出し、網羅的遺伝子解析を行い、高発現している遺伝子によるネットワークを示した。当院で手術を行った BCC の 2 症例において、GeneChip マイクロアレイ解析システムを用いて、網羅的遺伝子解析を行い、コントロール（ヒト正常ケラチノサイト細胞株 NHEK 細胞）と比べて、5 倍以上発現が上昇した遺伝子を解析した。そして、バイオインフォマティクスツールである GeneSpring ソフトウェアを用いて、発現する遺伝子の解析、遺伝子間相互作用を表現した遺伝子ネットワークを構築した。さらに、cancer cell growth, tumorigenesis, cell survival に関連する遺伝子ネットワークも示すことができ、本研究で得られた遺伝子情報は、眼瞼 BCC の病態解明や新たなバイオマーカー発見の一助となると考えている。

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 2 件)

1.Expression of Anti-apoptotic Protein BAG3 in Human Sebaceous Gland Carcinoma of the Eyelid. Yunoki T, Tabuchi Y, Hayashi A.
Anticancer Res. 2017,37:1931-1934.

2.Overexpression of the anti-apoptotic protein BAG3 in human choroidal melanoma: A case report. Yunoki T, Tabuchi Y, Kondo T, Ishii Y, Hayashi A. Oncol Lett. 2017,13:4169-4172.

〔学会発表〕(計 3 件)

眼瞼基底細胞癌における網羅的遺伝子解析

柚木達也, 田淵圭章, 三輪重治, 井村譲二, 林篤志 第 122 回日本眼科学会総会 2018 年 4 月 大阪

眼瞼脂腺癌における抗アポトーシスタンパク質 BAG3 の発現解析

柚木達也, 田淵圭章, 林篤志 第 35 回日本眼腫瘍学会 2017 年 9 月 東京

脈絡膜悪性黒色腫における抗アポトーシスタンパク質 BAG3 の高発現について

柚木達也, 田淵圭章, 近藤隆, 石井陽子, 林篤志 第 121 回日本眼科学会総会 2017 年 4 月 東京

〔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
柚木達也 (YUNOKI, tatsuya)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
講師
研究者番号：30401805

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4)研究協力者
なし ()