

平成22年5月7日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890145

研究課題名(和文) KLEIPの発癌機構における役割についての検討

研究課題名(英文) Studies on effects of KLEIP on cancer-progression.

研究代表者

原 貴彦 (HARA TAKAHIKO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70511715

研究成果の概要(和文)：

われわれは、Kelch-like ECT2 binding protein (KLEIP) を単離し、KLEIP が MDCK 細胞において細胞接着に関与していることを見出した。今回、われわれは膀胱癌における KLEIP の発現を免疫組織学的手法を用いて検討した。

まず、代表的な膀胱癌細胞株の KLEIP の発現について免疫蛍光法で検討した。調べた細胞株のすべてに KLEIP は発現していた。蛍光免疫染色法を用いた Golgi marker との多重染色の結果、膀胱癌細胞株において KLEIP は Golgi 装置に局在していることを明らかにした。

次に、抗 KLEIP 抗体を用いた免疫組織学的染色法で膀胱正常組織と膀胱癌の KLEIP 発現量を検討した。その結果、KLEIP 発現量は癌の悪性度と相関がある可能性が示された。以上より、抗 KLEIP 抗体による免疫染色法は悪性度判定の新しいツールとして有用であると期待された。

研究成果の概要(英文)：

Kelch-like ECT2-interacting protein (KLEIP) is a member of the kelch-related actin-binding proteins and was originally isolated as a binding partner of the ECT2 oncoprotein. ECT2 is a guanine nucleotide exchange factor for the Rho family of small GTPases, and is also a critical regulator of cytokinesis. KLEIP is involved in actin assembly at sites of cell-cell adhesion in MDCK cells. KLEIP also controls vascular endothelial growth factor-induced endothelial migration and sprouting angiogenesis. Therefore, KLEIP seems to have diverse functions in various situations. Since some kelch-related proteins have relationships with cancer cells and KLEIP can interact with ECT2, KLEIP may be involved in carcinogenesis. In this study, we found that KLEIP was localized to the Golgi complex in cultured urothelial cells, indicating that KLEIP is a novel trans-Golgi network-associated protein. Next, we examined the KLEIP expression levels in 71 available specimens, comprising 8 normal epithelial cells and 63 transitional cell carcinomas (TCCs). KLEIP expression was observed in 5 of 8 normal epithelial cells and 49 of 63 TCCs, respectively. The intensity of KLEIP expression varied among the samples. Further analyses indicated that the intensity of KLEIP expression was correlated with the tumor grade, but not with the T stage. Therefore, KLEIP could represent a novel biomarker for urothelial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	640,000	192,000	832,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,240,000	372,000	1,612,000

研究分野：泌尿器科癌

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：KLEIP, 尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

私は、新規タンパク“Kelch-like ECT2 binding protein (KLEIP)”を、癌遺伝子 ECT2 と結合するタンパク質として単離した。さらに、KLEIP はアクチン結合タンパクであり、MDCK 細胞では細胞接着部位のアクチンと co-localization しており、細胞接着時のアクチンの再構成に関与する可能性があることを示した。後に、Kroll.J 等は、血管内皮細胞においては VEGF を介する内皮細胞の移動、血管新生を KLEIP が制御していることを明らかにした。また、Yamaguchi.Y 等は Wnt シグナルにより KLEIP の発現量が制御されていることを示し、皮膚の色素沈着に KLEIP が関与していることが示唆された。このように KLEIP の細胞生物学的な役割は多岐にわたっていると考えられる。しかしながら、癌化と KLEIP の関係は未だ明らかではない。

一方で、KLEIP の binding partner である ECT2 は Rho family GTPase に対する GEF であり、細胞質分裂の制御において重要な分子のひとつである。近年、他の GEF と同様に ECT2 もまた Rho family GTPase を介する細胞運動に関与していることが明らかになってきた。臨床癌において、ECT2 の発現は Glioma の浸潤性と正に相関しており、ECT2 の発現が Glioma の予後推測因子になることが示された。このことは、癌の細胞運動、浸潤において、強発現した ECT2 が関与していることを示唆している。

したがって ECT2 結合タンパクである KLEIP も ECT2 を介して、臨床癌の浸潤、悪性度に関与している可能性があることが推測され、新たな癌診断のツール、予後推測因子になることが期待された。

2. 研究の目的

膀胱癌と KLEIP 発現との関係の検討を目的とした。また、KLEIP の膀胱癌での生物学的役割を検討するため KLEIP の細胞内局在について検討した。

3. 研究の方法

抗 KLEIP 抗体を用いて免疫組織学的手法を用いて KLEIP の発現を検出した。まず、作製した抗 KLEIP 抗体が KLEIP を認識しうるか否かを、GFP-KLEIP 発現ベクターを作製し KK47 細胞に導入させ GFP-KLEIP を強制発現させた後、発現された GFP-KLEIP を認識しうるかを検討した。

また、KLEIP はアクチン結合タンパクであるので膀胱癌細胞株におけるアクチンと KLEIP の関係を調べるため、KLEIP の細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。

次に、膀胱癌の KLEIP 発現量を免疫組織学的手法で解析し、臨床的パラメーターとの関係を検討した。

4. 研究成果

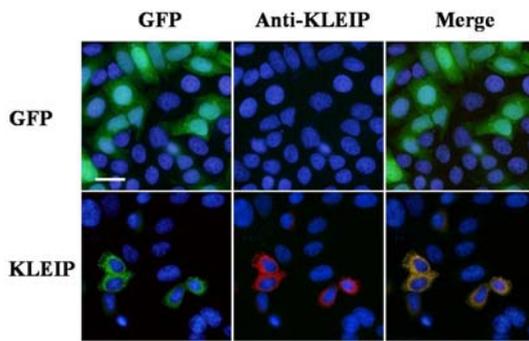
われわれは、Kelch-like ECT2 binding protein (KLEIP) を単離し、KLEIP が MDCK 細胞において細胞接着に関与していることを見出した。これまで、癌における KLEIP の役割は未だ検討されていない。

そこで、われわれは膀胱癌における KLEIP の発現を、免疫組織学的手法を用いて検討した。

(1) KLEIP の細胞内発現と局在

まず、KLEIP 抗体の免疫組織学手法での有用性を検討した。KLEIP を GFP と融合させた発現ベクターを作製し、GFP—KLEIP 融合タンパクを KK47 に強制発現させた後、KLEIP 抗体で KLEIP を検出した。KLEIP 抗体は強制発現された GFP—KLEIP を認識しており、KLEIP 抗体は免疫組織学的染色法において、KLEIP を検出しうることを確認した (図 1)。

(図 1)

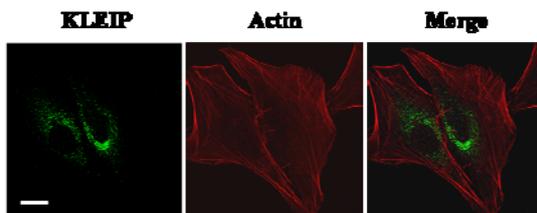


次に、代表的な膀胱癌細胞株 (T24, EJ-1, TCC-SUP, KK-47, ScaBER) の KLEIP の発現について免疫蛍光法で検討した。検討した 5 個の細胞株すべてに KLEIP は発現していた。

KLEIP はアクチン結合タンパクであるので膀胱癌細胞株におけるアクチンと KLEIP の関係を調べるため蛍光免疫染色法で KLEIP の細胞内局在を検討した。KLEIP の局在とアクチン繊維との明らかな関係は認められなかった。

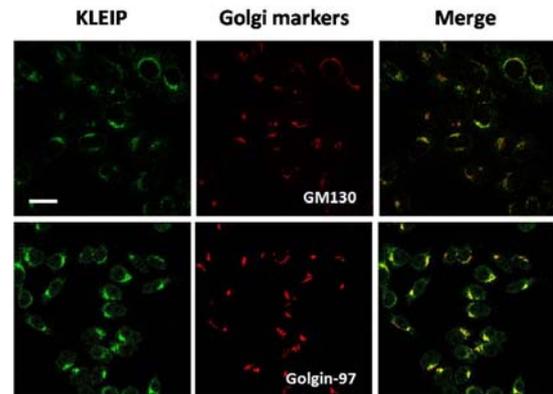
(図 2)

(図 2)



KLEIP は細胞質内に存在し、蛍光免疫染色法を用いた Golgi maker (GM130, Golgin 97) との多重染色法の結果、膀胱癌細胞株において KLEIP は Golgi maker と colocalization していた (図 3)。

(図 3)



さらに、ゴルジ輸送阻害薬 (BrefeldinA, Nocodazole) の付加により、KLEIP の局在は細胞内に散在化されることより、KLEIP は Golgi 装置に局在していることを確認した。

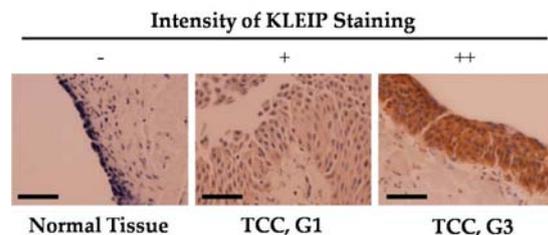
## (2) 膀胱癌における KLEIP の発現

膀胱正常組織と膀胱癌との間で、抗 KLEIP 抗体を用いた免疫組織学的染色法で KLEIP の発現量を検討し、細胞核異型度 (Grade)、T 分類との相関を検討した。

膀胱癌患者 42 例より得られた標本 71 検体 (正常組織 8 検体、膀胱癌 63 例) について調べた。膀胱癌の背景は、Grade 別に、G1 : 7 例、G2 : 32 例、G3 : 24 例で、Stage 別では、pTa : 50 例、pT1 : 6 例、pT2 以上 : 7 例であった。

正常組織では KLEIP の染色は 8 例中 5 例 (62.5%) が陽性であった。陽性例はいずれも弱陽性であった。膀胱癌組織では、63 例中 49 例 (77.8%) が陽性を呈した。KLEIP の発現に関して、癌特異性を認めなかった。しかしながら、KLEIP 染色の強度は症例により差があった (図 4)。

(図 4)



Grade における検討で、強陽性を呈した例は、G3 症例 24 例中 12 例 (50%)、G1 および G2 症例 で 39 例中 7 例 (18%) であり、Grade

が高いほど KLEIP の発現量が多いことが明らかになった (表 1)。

(表 1)

KLEIP 染色強度	Grade 1+2	Grade 3
陰性	10	4
弱陽性	22	8
強陽性	7	12

T 分類での検討では, Ta 症例では 50 例中 13 例 (26%), T1 以上の症例では, 13 例中 6 例 (46.2%) が強陽性を示したが,  $\chi$  二乗検定では, 統計学的な有意差を認めなかった。

以上より, KLEIP の発現量は癌の悪性度と相関がある可能性が示された。また, 抗 KLEIP 抗体による免疫染色法は悪性度判定の新しいツールとして有用であると期待された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 貴彦 (HARA TAKAHIKO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70511715

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし