

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17058

研究課題名（和文）ユビキチン・プロテアソーム系を標的とした新規胃癌治療の開発

研究課題名（英文）Explore the utility of the ubiquitin-proteasome system as a novel gastric cancer treatment

研究代表者

尾関 貴紀（Ozeki, Takanori）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：10865702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、胃癌細胞株および胃癌組織検体を用いて、胃癌のバイオマーカーや治療標的となりうるBTBPの探索および機能の解析を行い、胃癌に発現し、その病態に強く関与していると考えられるBTBPの一つとしてKLHL26を同定した。バイオアッセイによりKLHL26は胃癌細胞の増殖能や浸潤能を促進することが示され、また、臨床検体の免疫組織学的検証から、胃癌の浸潤や転移など胃癌の進展に関与している可能性が示された。さらなる検討の余地は大きいですが、本研究の成果により、胃癌の予後予測バイオマーカーや治療標的分子としてのKLHL26の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ユビキチンリガーゼのアダプター蛋白の一つであるKLHL26が、胃癌の新たなバイオマーカー、治療標的となりうる蛋白の同定に至った。これまでの研究から、KLHL26は胃癌の進展に強く関与していることが明らかとなった。しかし、その作用メカニズム、特にユビキチンリガーゼのアダプター蛋白として、どのように胃癌の進展に関与しているのか、は明らかではない。胃癌治療の標的としてKLHL26の有用性を明らかにするためには、さらなる検証が必要であるが、本研究では、その足がかりとなる知見を示すことができ、新規胃癌治療の開発につながる成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored the potential BTBPs as biomarkers or therapeutic targets for gastric cancer, using gastric cancer cell lines and clinical samples of gastric cancer. Among BTBP, KLHL26 was identified as a candidate that is strongly associated with the pathogenesis of gastric cancer. Biological assays indicated that KLHL26 promotes the proliferative and invasive capabilities of gastric cancer cells, and immunohistochemical staining demonstrated that KLHL26 might contribute to gastric cancer progression, such as infiltration and metastasis. Although there remains substantial scope for further investigation, the results of this study suggest the potential of KLHL26 as a predictive biomarker and therapeutic target for gastric cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：胃癌 ユビキチン BTBP

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン(Ub)は76アミノ酸からなる小さなタンパク質であり、生体内に普遍的に存在する。標的蛋白質(基質)はポリユビキチン化されることによりプロテアソームに不要な蛋白と認識され、分解される。この翻訳後蛋白質修飾機構は、生体の維持に欠かせない重要な役割を果たしている。また、腫瘍細胞のPD-L1発現のコントロールを担うなど、癌の進展や治療抵抗性などにも強く関与していることが明らかとなりつつある。我々はユビキチン-プロテアソーム系の構成因子のなかでも、ユビキチンE3リガーゼ複合体足場蛋白質、Cullin3(CUL3)のアダプター分子であるBTBドメイン含有蛋白質(BTBP)に着目し、消化器癌の新規バイオマーカーや治療標的としての可能性について検討してきた。CUL3はアダプター蛋白BTBPと結合し、CUL3-BTBP E3リガーゼ複合体を形成し、ユビキチン化により基質蛋白の分解や機能制御を行っている。この時、標的となる基質は、CUL3に結合するBTBPに特異的に決定されるため、CUL3-BTBP E3リガーゼ複合体の機能解析の足掛かりとして、まずはCUL3と結合するBTBPの網羅的な探索が必要となる。これまでに愛媛大学との共同研究により、183種のBTB蛋白を合成し(小麦胚芽抽出液タンパク質合成システム) Alpha Screen 法(タンパク質間相互作用解析法)を用い、CUL3と結合能を有するBTBPの一群であるBACK-Kelch蛋白質群を研究対象のBTBPとして同定した。さらに胃癌細胞株において、複数のBTBP(BACK-Kelch)が発現していること、siRNAによるknockdownにより細胞増殖抑制効果がもたらされることを確認している。これらのデータは、BTBPがCUL3-BTBP E3リガーゼ複合体として機能し、胃癌の増殖、進展に促進的に関与していることを示すものであり、BTBPが胃癌の新規バイオマーカーや治療標的の候補分子として有用であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に分子生物学的な手法を用い、胃癌のバイオマーカーや治療標的となりうるBTBPの探索および機能解明を目的としている。また、ヒト胃癌の臨床検体を用い、BTBPの発現について評価し、臨床応用への可能性について検証している。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株におけるBTB蛋白発現の検証

胃癌細胞株を用い複数の候補BTBPのsiRNAを使用し、細胞増殖アッセイにより胃癌において重要な役割を果たしていると考えられるBTBP蛋白の同定を試みる。胃癌細胞株はSNU-1、NCIN87、MKN7を使用する。候補BTB蛋白としては、これまでに胃癌細胞株での発現を確認している、KLHL2、KLHL3、KLHL4、KLHL5、KLHL6、KLHL9、KLHL12、KLHL19、KLHL26、KLHL27、KLHL36、KLHL37、KLHL39を対象とし検証する。

(2) 胃癌におけるBTB蛋白の細胞レベルでの機能解析

胃癌細胞株を用い、候補BTBPのsiRNAを使用した、細胞増殖アッセイやTrans-wellアッセイを用い、胃癌細胞株の増殖や浸潤能に及ぼす影響を検討する。候補BTBPのsiRNAによる細胞内シグナル伝達経路の変化を、細胞増殖や細胞浸潤能に関連したシグナルに対する抗体Arrayを用いて検証する。

(3) ヒト組織検体を用いたBTB蛋白の病理学的検証

ヒトの正常胃組織、胃癌組織におけるCUL3、候補BTB蛋白、標的基質蛋白の発現について免疫組織染色を用いて検証し、in vitro、in vivoの実験結果に矛盾しないデータが得られるかを検証する。この検証では、申請者らが構築した、約200症例の胃癌組織標本ライブラリを用いる。さらに、BTBPの胃癌バイオマーカーとしての有用性について検討する。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株におけるBTB蛋白発現の検証

胃癌細胞株として、SNU-1、NCIN87、MKN7の3種類を使用した。CUL3と結合すると確認されているKLHL2、KLHL3、KLHL4、KLHL5、KLHL6、KLHL9、KLHL12、KLHL19、KLHL26、KLHL27、KLHL36、KLHL37、KLHL39のsiRNAを作成し、これらの胃癌細胞株における発現を確認した。各siRNAによる遺伝子発現抑制効果をqRT-PCRで確認した後、各胃癌細胞株に対するKLHL siRNAの細胞増殖抑制効果をWSTアッセイを用いて検証した。SNU-1においては、KLHL5、KLHL26、KLHL36のsiRNAにより、NCI-N87およびMKN7ではKLHL26のsiRNAにより、細胞増殖が有意に抑制されたことが確認された。細胞増殖を増強するKLHL siRNAも複数確認したが、その効果が限定的であったため、研究対象から除外した。3種類の細胞株すべてで細胞増殖を有意に抑制したKLHL26を研究対象と定め、さらに検証を進めた。

(2) 胃癌におけるBTB蛋白の細胞レベルでの機能解析

胃癌細胞株SNU-1、NCI-N87、MKN7に対してsiRNAを用いてKLHL26をノックダウンし、KLHL26の機能を各種アッセイにより検証した。KLHL26のノックダウンにより、これらの胃癌細胞株の運動能が有意に低下したことがwound healing assayにより確認された。さらに、Trans-well

assay を用いて、KLHL26 をノックダウンした胃癌細胞株 SNU-1、NCI-N87、MKN7 の浸潤能を検証した結果、コントロールと比較して浸潤能が有意に低下したことが認められた。

(3) ヒト組織検体を用いた BTB 蛋白の病理学的検証

胃癌組織における KLHL26 の発現を、臨床検体の免疫染色を用いて検証した。KLHL26 は胃の正常粘膜では発現が認められなかったが、前がん病変である胃腺腫では KLHL26 の軽度の発現が確認され、胃癌ではその発現が強まっていた。胃がんの進行度による KLHL26 の発現の違いを検証した結果、Stage II では、Stage II、Stage I に比べて KLHL26 の発現が有意に高かった。一方、Stage I と腺腫との間では、Stage I での KLHL26 の発現が高い傾向が見られたが、有意な差は確認できなかった。次に、Stage II 以上の進行胃がんにおける KLHL26 の発現を検討したところ、KLHL26 は腫瘍の表層部よりも浸潤部での発現が強い傾向が見られた。また、KLHL26 の発現形態は比較的、びまん性に見られた。患者背景と KLHL26 の発現の関連を検証したところ、KLHL26 の高発現は進行がん、特に進行したステージの胃癌と関連していることが示され、転移とも関連していた。一方で、組織型と KLHL26 の発現の関連は今回の検証では確認できなかった。これらの研究結果から、KLHL26 は胃癌細胞の増殖能や浸潤能を促進する蛋白質であると推測され、胃がんの浸潤や転移など胃癌の進展に関与している可能性が示された。さらなる検討の余地は大きいですが、胃がんの予後予測バイオマーカーや治療標的分子としての KLHL26 の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------