

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791560

研究課題名 (和文) がん抑制遺伝子 Fbxw7 の子宮筋における機能と子宮肉腫との関わりについての解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of Fbxw7 in uterine myometrioma and uterine sarcoma

研究代表者

小野山 一郎 (ONOYAMA ICHIRO)

九州大学・医学研究院・周産期小児医療学講座・客員助教

研究者番号：00444802

研究成果の概要 (和文)：

がん抑制遺伝子として注目される遺伝子 Fbxw7 の婦人科腫瘍における発現について検討を行った。婦人科悪性腫瘍で大きな死因の一つとなっている卵巣癌では、良性卵巣腫瘍、境界悪性腫瘍に比べて Fbxw7 の発現が低く抑えられていること、卵巣癌の中でも進行期が進むと Fbxw7 の発現が低下することが明らかとなった。この結果から、卵巣悪性腫瘍の形質獲得とその進展に Fbxw7 の発現を抑制する機構が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the expression of oncosuppressor Fbxw7 in gynecologic cancers. Among them, the expression of Fbxw7 is suppressed in ovarian cancers compared to ovarian tumors of borderline malignancy and benign tumors. We need more analysis about the relationship between Fbxw7 and cancer developments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Fbxw7 は SCF 型ユビキチンリガーゼ複合体を形成する F-box タンパク質であり、Notch、サイクリン E、c-Myc、c-Jun などの細胞周期を正に制御するタンパク質のユビキチン化依存的分解を担っている。そのため、以前から Fbxw7 はがん抑制遺伝子として機能しているのではないかと推測されていたが、実際、胆管癌、T 細胞性急性リンパ性白血病、膵癌、

胃癌、大腸癌、前立腺癌など種々のヒト悪性腫瘍で *FBXW7* の変異が報告が相次いでいる。また、ヒト悪性腫瘍における変異の報告のみならず、発生工学的手法を用いて作製した T 細胞特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウス、骨髄細胞特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウス、乳腺上皮細胞特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウスではそれぞれ T 細胞リンパ腫、T 細胞性急性リンパ性白血病、乳癌を自然発症し、Fbxw7 が確かに細胞周期を負に制御するがん抑制

遺伝子として生体内で機能していることが明らかとなってきた。さらに、骨髄細胞特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウスの解析では、*Fbxw7* が造血幹細胞の維持に重要な役割を担っていることも明らかにされており、*Fbxw7* は現在、医学的見地からも生物学的見地からも非常に注目を集めている。

一方、子宮体部悪性腫瘍において子宮肉腫は比較的まれな疾患で、婦人科腫瘍で最も予後の悪い腫瘍の一つである。発症頻度が低いこともあり標準的治療法は確立されておらず、ある種の抗癌剤治療が有効であったとする症例報告が散見されるのみである。このような状況にも関わらず、子宮肉腫の分子生物学的特性、遺伝子変異に関しては報告がとても少ない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、細胞周期を制御するがん抑制遺伝子 *Fbxw7* の子宮平滑筋、および婦人科腫瘍における発現について解析を行い、その生理学的役割、腫瘍発生、発育、転移における機能を解析することを目的として研究を行った。

(1) *Fbxw7* α 、 β 、 γ の発現パターンについての解析

正常子宮筋、子宮筋腫などの良性腫瘍、子宮肉腫における *Fbxw7* α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームの発現パターン、発現量の変化について定量的 RT-PCR 法を用いて解析を行う。*Fbxw7* のアイソフォームのうち、*Fbxw7* α は細胞周期の制御に関わっており、*Fbxw7* γ は筋細胞特異的に発現してその分化と密接に関わっているため、この解析は *Fbxw7* の子宮筋における機能を理解する上で重要である。

(2) 子宮肉腫における *FBXW7* の変異についての解析

子宮肉腫における *FBXW7* の変異の頻度、変異の入る部位について臨床像と照らし合わせて解析を行う。この解析は子宮肉腫が発生するプロセス、腫瘍進展のメカニズムを解く上で重要な手掛かりとなる。

(3) *Fbxw7* の筋組織における機能解析

筋細胞においては *Fbxw7* のアイソフォームのうち、*Fbxw7* α と *Fbxw7* γ が主に発現している。特に *Fbxw7* γ は筋細胞の分化する際に特異的に発現が上昇するため、筋細胞分化において重要な機能を担っている可能性が非常に高い。そのため、筋細胞における *Fbxw7* の機能について細胞株やノックアウトマウスを用いて解析を行う。正常筋組織における *Fbxw7* の機能解析が進めば、子宮肉腫における *Fbxw7* の発現パターンの変化、変異の存在

などを総合的に検討し、子宮肉腫の生物学的特性に関しての理解は急速に進展すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) *Fbxw7* α 、 β 、 γ の発現パターンについての解析

インフォームドコンセントを得られた症例の検体に関して mRNA を抽出、cDNA を作製する。*Fbxw7* α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームを区別する特異的プライマーを設定し、定量的 RT-PCR を用いて各アイソフォームの発現量を解析する。比較対象とするのは、良性腫瘍である子宮筋腫、そして正常子宮筋である。子宮肉腫、子宮筋腫、正常子宮筋の3群間で *Fbxw7* α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームの発現量の変化を解析し、*Fbxw7* の機能がどのように肉腫疾患に関与しているのかについて検討を行う。

(2) 子宮肉腫における *FBXW7* の変異についての解析

本解析では、上述のように集めた検体の DNA を抽出して、そのシーケンスについて解析を行う。これまで報告されているヒト悪性腫瘍における *FBXW7* の変異は、おもにその基質認識部位である WD40 ドメインに集中しており、これらの報告は、「*FBXW7* の変異、基質であるがん遺伝子産物の分解障害、細胞周期亢進・発がん・がんの進展」という一連の流れを考える上で非常にリーズナブルである。よって、本研究においても *FBXW7* の WD40 ドメインを中心にシーケンスを行う。

(3) *Fbxw7* の筋組織における機能解析

臨床検体における発現の解析、変異の解析のみでは、本研究の目的である「子宮肉腫治療に向けた新しい治療法の礎となる基礎医学的知見を得る」ことはできない。そこで、本研究では *Fbxw7* の筋組織における機能解析に特に力を入れて研究を進める。

① 組織特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウスを用いた解析

本研究者が以前に作製した組織特異的 *Fbxw7* ノックアウトマウスを用いて、筋細胞特異的に *Fbxw7* をノックアウトし、その表現型について解析を行う。この解析では、生体内での *Fbxw7* の筋組織発生に関する機能、筋細胞の増殖における機能、そして組織幹細胞における役割についての理解が一気に進むと考えられる。また、*Fbxw7* γ 特異的なノックアウトマウスを作製中であり、このマウスと従来の *Fbxw7* ノックアウトマウスとの表現型の比較を行えば、筋組織特異的な発現をする *Fbxw7* γ の機能解析に大きな進展が見込める。さらに、この実験では *Fbxw7* が筋組織に

においてがん抑制遺伝子として機能しているか否かについても検討を行うことができる。

②マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた Fbxw7 の機能解析

マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた筋細胞の分化誘導は、現在非常によく使われている実験系である。これまでの予備的実験から、C2C12 細胞に筋細胞への分化誘導をかけると筋細胞特異的アイソフォームである Fbxw7 γ の発現が大幅に上昇することが分かっている。そこで、この細胞に Fbxw7 γ を過剰発現させたり、あるいは shRNAi でその発現を抑えてやった状態で分化誘導実験を行い、筋芽細胞の分化にどのような影響があるのか、さらに Fbxw7 のどの基質がその原因となっているのかについて解析を行う。

③子宮肉腫細胞株を用いた Fbxw7 の機能解析

子宮肉腫細胞株 MES-SA や SK-UT-1 に対して Fbxw7 α 、Fbxw7 γ のそれぞれを過剰発現したり、ノックダウン実験を行い、増殖能・造腫瘍能に対する影響や、がん幹細胞分画への影響に関して解析を行う。

4. 研究成果

Fbxw7 の子宮平滑筋、および子宮肉腫における発現について解析を行い、Fbxw7 の 3 つのアイソフォーム(α 、 β 、 γ)のうち、筋組織特異的な発現を示す γ の子宮平滑筋の増殖、分化への関与が期待されたが、実際には正常子宮平滑筋での発現は認めなかった。

また、婦人科腫瘍で大きな死因となっている卵巣癌における Fbxw7 の発現解析を行い、良性卵巣腫瘍、境界悪性腫瘍に比べて Fbxw7 の発現が低く抑えられていること、卵巣癌の中でも進行期が進むと Fbxw7 の発現が低下することを明らかにした。この結果から、卵巣悪性腫瘍の形質獲得とその進展に Fbxw7 の発現を抑制する機構が関わっている可能性が示唆された。

さらに、子宮における Fbxw7 の生理学的役割を解析する目的で、子宮特異的な Fbxw7 ノックアウトマウスを作製を行っており、Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウスを交配して増やし、子宮特異的に遺伝子をノックアウトするため、Cre recombinase を発現するアデノウイルスを作製している。今後、このノックアウトマウスの解析を行うことが今後の研究課題である。

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 8 件)

- ① Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, Zhai B, Wan L, Gutierrez A, Lau AW, Xiao Y, Christie AL, Aster J, Settleman J, Gygi SP, Kung AL, Look T, Nakayama KI, DePinho RA, Wei W.: SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature*. 2011; 471(7336):104-9. 査読有り
- ② Matsumoto A, Onoyama I, Sunabori T, Kageyama R, Okano H, Nakayama KI.: Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J Biol Chem*. 2011; Feb 24. 査読有り
- ③ Matsumoto A, Tateishi Y, Onoyama I, Okita Y, Nakayama K, Nakayama KI.: Fbxw7 β resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci*. 2011; 102(4):749-55. 査読有り
- ④ Iriuchishima H, Takubo K, Matsuoka S, Onoyama I, Nakayama KI, Nojima Y, Suda T.: Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α ; overexpression. *Blood*. 2011; 117(8):2373-7. 査読有り
- ⑤ Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest*. 2011; 121(1):342-54. 査読有り
- ⑥ Masuda K, Ishikawa Y, Onoyama I, Unno M, de Alborán IM, Nakayama KI, Nakayama K.: Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene*. 2010; 29(12):1798-809. 査読有り
- ⑦ Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, Toh H, Onoyama I, Nakayama KI, Baba H, Mori M.: Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance. *Int J Cancer*. 2010; 126(8):1828-37. 査読有り

- ⑧ Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, Ishii H, Onoyama I, Fukagawa T, Kuwano H, Nakayama KI, Mori M: p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res.* 2009; 69(9): 3788-94. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小野山一郎、恒松良祐、小林裕明、和氣徳夫、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 による細胞周期制御と細胞分化制、第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 21 年 4 月 3 日、京都
- ② 小野山一郎、恒松良祐、小林裕明、中山敬一、和氣徳夫、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 による細胞周期制御、細胞分化制御と発がん抑制機構、第 8 回日本婦人科がん分子標的研究会、平成 21 年 7 月 3 日、福岡
- ③ 小野山一郎、恒松良祐、小林裕明、中山敬一、和氣徳夫、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 による細胞周期制御と細胞分化制御、第 14 回日本病態プロテアーゼ学会、平成 21 年 8 月 21 日、大阪
- ④ 小野山一郎、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 による G0 期維持機構とその破綻による発がん、第 14 回生殖医学フォーラム、平成 21 年 9 月 19 日、大津
- ⑤ 北出尚子、小野山一郎、小林裕明、和氣徳夫、ユビキチンリガーゼ Fbxw7 の上皮性卵巣腫瘍における発現解析、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 22 年 4 月 23 日、東京

[図書] (計 1 件)

小野山一郎、小林裕明、診断と治療社、「産科と婦人科」第 78 巻 1 号、特集婦人科がんの Molecular Biology、アポトーシス

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

小野山 一郎 (ONOYAMA ICHIRO)
九州大学大学院・医学研究院・周産期小児医療学講座・客員助教
研究者番号：00444802

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：