

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590470

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌における細胞極性制御因子 PAR-3 遺伝子欠失の機能解析

研究課題名(英文)Alteration of polarity protein PAR-3 in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

安居 幸一郎 (Yasui, Kohichiroh)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30323695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に生じたDNA コピー数異常を高密度オリゴヌクレオチドアレイで網羅的に解析した結果、細胞極性の形成に必須の分子Partition-defective 3 (PAR-3) 遺伝子のホモ欠失と発現消失を発見した。PAR-3とタイトジャンクションのマーカーZO-1との蛍光二重染色、およびPAR-3の強制発現とノックダウン実験から、PAR-3が消失するとタイトジャンクションの形成が阻害されることが示された。臨床検体において、PAR-3発現量の低い症例は有意にリンパ節転移が多いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated DNA copy number aberrations in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines using a high-density oligonucleotide microarray and found a homozygous deletion of PARD3 (the gene encoding PAR-3). The PAR-3 protein is implicated in the formation of tight junctions at epithelial cell-cell contacts. Exogenous expression of PARD3 in ESCC cells lacking this gene enhanced the recruitment of ZO-1, a marker of tight junctions, to sites of cell-cell contact. Conversely, knockdown of PARD3 in ESCC cells expressing this gene caused a disruption of ZO-1 localization at cell-cell borders. Expression of PARD3 was significantly reduced in primary ESCC tumors compared with their nontumorous counterparts, and this reduced expression was associated with positive lymph node metastasis and poor differentiation. Our results suggest that deletion and reduced expression of PARD3 may be a novel mechanism that drives the progression of ESCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：PAR-3 PARD3 食道扁平上皮癌 タイトジャンクション 細胞極性 転移 ZO-1

1. 研究開始当初の背景

「癌は体細胞に生じた遺伝子病」であり、遺伝子および染色体の構造の不安定性により生じたゲノム異常の蓄積がその癌の特性を規定する。したがって、浸潤や転移あるいは薬剤耐性といった癌の悪性形質獲得の機序を解明するためには、それに関与するゲノム異常を明らかにする必要がある。

食道扁平上皮癌はわが国で多い癌で、しかもその予後は不良である。食道扁平上皮癌の発生・進展に関与する分子病態を明らかにすることは、治療標的分子を同定するためにも重要である。

食道扁平上皮癌を対象に、高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いて網羅的 DNA コピー数解析を行った結果、染色体 10p11 に新規ホモ欠失領域を同定した。そして、その欠失領域を限局化し、PAR-3 (partition-defective 3) 遺伝子のホモ欠失と発現消失を見出した。

細胞極性と細胞間接着は組織形成に必須である。逆に、細胞極性と細胞間接着の消失は進行癌に共通して観察され、周囲への浸潤や転移に密接に関連する。細胞極性は、線虫から哺乳類まで進化的によく保存されている partition-defective (PAR) タンパク質ファミリーによって制御されている。その一員である PAR-3 は、細胞間タイトジャンクションにおいて、PAR-6 および atypical protein kinase C (aPKC) と結合し、AR-3 - PAR-6 - aPKC 複合体はタイトジャンクションの形成と細胞極性の確立に必須であることが知られている。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌における PAR-3 欠失の機能的役割とその臨床病理学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

GeneChip 250K アレイ (Affymetrix 社) を用いて食道扁平上皮癌細胞株の DNA コピー数異常を解析した。発見した染色体 10p11 の新

規ホモ欠失領域について genomic PCR で欠失領域を限局化し、最小共通ホモ欠失領域を同定した。食道扁平上皮癌細胞株と臨床検体を対象に、PAR-3 遺伝子の DNA コピー数、mRNA 量を定量した。

機能解析として、PAR-3 遺伝子の欠失が癌細胞のタイトジャンクションの形成および浸潤・転移・増殖に関与するかどうか、遺伝子導入実験 (強制発現およびノックダウン) で検証した。具体的には、PAR-3 の発現が保持されている食道扁平上皮癌細胞株と PAR-3 の発現が消失した細胞株で、PAR-3 とタイトジャンクションのマーカーである ZO-1 の蛍光二重免疫染色を行い、比較した。さらに、PAR-3 発現ベクターを作製し、細胞株にトランスフェクションして PAR-3 強制発現させた。また siRNA をトランスフェクションして、PAR-3 の発現をノックダウンした。

食道扁平上皮癌の臨床検体 (内視鏡生検組織) における PAR-3 の mRNA 発現量変化と体細胞変異の有無について検討した。それらと臨床データおよび病理学的特徴とを照合することで、PAR-3 の食道扁平上皮癌における臨床病理学的意義を検討した。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株 KYSE30 と KYSE270 において PAR-3 遺伝子がホモ欠失し、その最小共通ホモ欠失領域が PAR-3 遺伝子の exon 3 から exon 22 であることを見出した。KYSE30 細胞と KYSE270 細胞ではホモ欠失の結果、PAR-3 mRNA とタンパク質の発現が完全に消失していた。臨床検体では 15% で PAR-3 遺伝子のコピー数が減少していた。シーケンス解析では PAR-3 遺伝子の変異は認めなかった。

PAR-3 と ZO-1 の蛍光二重免疫染色の結果、PAR-3 の発現が保持されている細胞では ZO-1 と PAR-3 が細胞間接着面に共局在していたのに対し、PAR-3 の発現が消失した KYSE30 細胞と KYSE270 細胞では PAR-3 だけでなく ZO-1 の細胞間接着面での局在が消失していた。そ

して、KYSE30 細胞と KYSE270 細胞に PAR-3 を強制発現すると ZO-1 の細胞間接着面での局在が回復し、逆に PAR-3 の発現がある細胞株で PAR-3 の発現をノックダウンすると ZO-1 が細胞間接着面から消失した。以上より、PAR-3 が消失した食道扁平上皮癌細胞ではタイトジャンクションの形成が阻害されることが示唆された。

PAR-3 の臨床病理学的意義についての検討では、内視鏡検査時に採取した食道扁平上皮癌とその周囲の非癌部の生検サンプルを用いて PAR-3 mRNA 量を定量したところ、PAR-3 mRNA 量は非癌部と比較して癌部で有意に低下していた。そして興味深いことに、PAR-3 mRNA 発現量の低い症例は有意にリンパ節転移が多かった。以上まとめると、食道扁平上皮癌における PAR-3 発現低下はタイトジャンクションの形成を阻害し、リンパ節転移を促進する可能性が示唆された。

本研究は、食道扁平上皮癌で PAR-3 遺伝子の異常を初めて発見し、それがリンパ節転移に関与することを明らかにしたことに価値がある。

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 17)

以下、すべて査読有。

1. Akazawa T, Yasui K, Gen Y, Yamada N, Tomie A, Dohi O, Mitsuyoshi H, Yagi N, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T. Aberrant expression of the PHF14 gene in biliary tract cancer cells. *Oncol Lett* 5:1849-1853, 2013. doi: 10.3892/ol.2013.1278.
2. Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma via the AKT/ mTORC1 signaling pathway. *Cancer Sci* 104:810-816, 2013. doi:

10.1111/cas.12155.

3. Yasui K, Takashima H, Miyagawa M, Miyazawa K, Ochiai T, Mukaisho K, Amaike H, Ueda K, Morikawa J, Otsuji E, Yoshikawa T. Selective accumulation of platinum and formation of platinum-DNA adducts in hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization with miriplatin. *Hepatol Res* 43:1093-1099, 2013. doi: 10.1111/hepr.12059.
4. Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liver Int* 33:301-311, 2013. doi: 10.1111/liv.12033.
5. Dohi O, Yasui K, Gen Y, Takada H, Endo M, Tsuji K, Konishi C, Yamada N, Mitsuyoshi H, Yagi N, Naito Y, Tanaka S, Arii S, Yoshikawa T. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 42:411-418, 2013. doi: 10.3892/ijo.2012.1724.
6. Endo M, Yasui K, Zen Y, Gen Y, Zen K, Tsuji K, Dohi O, Mitsuyoshi H, Tanaka S, Taniwaki M, Nakanuma Y, Arii S, Yoshikawa T. Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 33:105-117, 2013. doi: 10.1111/liv.12005.
7. Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H,

- Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 48:515-525, 2013. doi: 10.1007/s00535-012-0653-5.
8. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, **Yasui K**, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arie S, Nishio K, Kudo M. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57:1407-1415, 2013. doi: 10.1002/hep.25956.
 9. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, **Yasui K**, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M, Watanabe S, Kawata S, Imai Y, Kokubo M, Shima T, Park H, Tanaka H, Tajima K, Yamada R, Matsuda F, Okanoue T, The Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Genetic Polymorphisms of the Human PNPLA3 Gene Are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese. *PLoS One* 2012;7:e38322. doi: 10.1371/journal.pone.0038322.
 10. **Yasui K**, Hashimoto E, Tokushige K, Koike K, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Uto H, Takami S, Kawanaka M, Komorizono Y, Okanoue T, and The Japan NASH Study Group. Clinical and pathological progression of nonalcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 42:767-773, 2012. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00986.x.
 11. Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Umemura A, Minami M, **Yasui K**, Mitsuyoshi H, Fujii H, Tochiki N, Nakajima T, Okanoue T, Yoshikawa T. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett* 310:140-147, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.030.
 12. Jo M, Nishikawa T, Nakajima T, Okada Y, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, **Yasui K**, Minami M, Iwai M, Kagawa K, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 46:809-821, 2011. doi: 10.1007/s00535-011-0392-z.
 13. **Yasui K**, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arie S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T, and The Japan NASH Study Group, The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Cl in Gastroenterol Hepatol* 9:428-433, 2011. doi:

- 10.1016/j.cgh.2011.01.023.
14. **Yasui K**, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanoue T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism* 60:735-739, 2011. doi: 10.1016/j.metabol.2010.07.022.
 15. Sumida Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Yoshida N, **Yasui K**, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in non-cirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol* 26:836-842, 2011. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06568.x.
 16. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, **Yasui K**, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 46:257-268, 2011. doi: 10.1007/s00535-010-0305-6.
 17. Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, **Yasui K**, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J*

Gastroenterol 46:101-107, 2011. doi: 10.1007/s00535-010-0291-8.

[学会発表](計 4件)

1. Yasui K, Gen Y, Tomie A, Kitaichi T, Itoh Y. Reduced expression of BRM in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2014 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2014 Apr 9; San Diego, USA.
2. Gen Y, Yasui K, Kitaichi T, Tomie A, Itoh Y. SOX2 promotes tumor growth via activation of the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. Annual Meeting 2014 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2014 Apr 8; San Diego, USA.
3. Dohi O, Yasui K, Jo M, Itoh Y. Regulation of miR-335 expression in association with methylation status of MEST promoter in hepatocellular carcinoma. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 1; Washington DC, USA.
4. Yasui K, Jo M, Nishimura T, Yamaguchi K, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y. Efficacy and safety of sorafenib in patients aged 80 years and older with advanced hepatocellular carcinoma. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 5; Washington DC, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安居 幸一郎 (YASUI, Kohichiroh)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 30323695