

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791440

研究課題名(和文)食道癌におけるアダプター蛋白XB130とシスチン輸送体xCTの分子間相互作用解析

研究課題名(英文)Molecular roles of xCT and XB130 in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

塩崎 敦(Shiozaki, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40568086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌におけるxCT発現の意義、アダプター蛋白XB130との分子間相互作用を検討した。TE13, KYSE170において、xCT-siRNA導入によりXB130発現が抑制された。また、TE2, TE9, TE13, KYSE170において、XB130-siRNA導入によりxCT発現が増強されたが、共免疫沈降では両者の直接的結合は確認できなかった。xCT-siRNA導入TE13のマイクロアレイ解析により、G1-S期関連遺伝子の発現が制御されることを解明。さらに切除検体の免疫組織染色により、xCT陽性率とKi67標識率の正相関を見出すとともに、xCT高発現が独立した予後因子となることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study were to determine the roles of xCT, cysteine/glutamate transporter in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, its clinical significance and interaction with XB130, adaptor protein. Knocking-down (KD) of xCT decreased XB130 expression, and KD of XB130 increased xCT expression in ESCC cells. Immunoprecipitation revealed no interaction between xCT and XB130. In TE13 and KYSE170 cells, KD of xCT inhibited G1-S phase progression. Microarray analysis identified 1652 genes whose expression levels in TE13 cells were altered by the KD of xCT. Pathway analysis showed that the top-ranked pathway was the G1/S checkpoint regulation. Immunohistochemical staining showed that the xCT positivity rate was positively correlated with the Ki-67 labeling index. Further, its expression was an independent prognostic factor. These observations suggest that the expression of xCT in ESCC cells might affect the cell cycle and impact on the prognosis of ESCC patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌 xCT XB130

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、新規アダプター蛋白 XB130 の機能解析を行い、食道癌における細胞周期制御機構、予後因子としての意義を明らかにしてきた。一方近年、アミノ酸輸送体 xCT は、癌幹細胞表面マーカーである接着分子 CD44 と結合して機能することが報告され、様々な癌腫との関連が報告されている。我々が XB130 に関する研究を進める過程で、恒常 XB130 非発現甲状腺癌細胞株を用いたマイクロアレイにより、xCT の mRNA 発現が抑制されることが明らかとなり、両者の分子間相互作用機序が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、“XB130/xCT 分子間相互作用により食道癌細胞の細胞周期が制御される”という実験仮説の検証を行う。その結果から、XB130/xCT による全く新たな細胞周期制御機構を解明し、両者の分子間相互作用機序を標的とした斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道癌細胞株における XB130、xCT 発現レベルの解析

種々のヒト食道癌細胞株における XB130、xCT の蛋白発現レベルをウェスタンブロット法で確認。

(2) ヒト食道癌細胞株における XB130、xCT 発現調節 (siRNA) による相互発現変化解析と蛋白質間相互作用の解明

xCT 高発現細胞株に xCT-siRNA を導入した際の XB130 発現を解析。同様に、XB130 高発現細胞株に XB130-siRNA 導入した際の xCT 発現を解析。蛋白・mRNA の発現はウェスタンブロット法・定量的 RT-PCR で解析。XB130 と xCT の直接的結合の有無を共免疫沈降法により解析。

(3) ヒト食道癌細胞株における xCT 発現調節 (siRNA) と細胞周期・microarray 解析

xCT 高発現細胞株に xCT-siRNA 導入後、細胞周期への影響をフローサイトメトリーを用いて検証。また、関連遺伝子発現変化を microarray により網羅的に解析。

(4) ヒト食道癌組織における xCT 発現レベルの解析と、臨床病理学的因子との相関性の検討

手術臨床標本のパラフィンブロックを用い、xCT に対する免疫染色で発現レベルを確認すると共に、臨床病理学的因子・予後・再発形式との相関を解析。また、種々の細胞増殖制御因子 (Ki67・CyclinD1・p21・Anit-phosphohistone H3・E2F5) との相関を解析。

4. 研究成果

まず、ヒト食道癌細胞株 (TE2, TR5, TE9, TE13, KYSE70, KYSE170) における XB130、xCT の蛋白発現レベルを確認した。ウェスタンブロット法で解析したところ、TE2, TR5, TE9, TE13, KYSE170 において、両者の発現を認めた (図 1)。TE13, KYSE170 において、xCT-siRNA を導入したところ、XB130 の蛋白・mRNA 発現レベルが抑制された (図 2)。また、TE2, TE9, TE13, KYSE170 において、XB130-siRNA の導入したところ、xCT の mRNA 発現レベルが増強された (図 3)。xCT・XB130 の直接的結合の有無を確認するため、xCT 発現ベクターを導入した TE9, KYSE170 細胞株において、Halo tag Resin を用いた共免疫沈降を施行。結果、両者の直接的結合が存在しないことが明らかとなり、他の細胞増殖制御因子を介した間接的作用機序の存在が強く示唆された。

一方、xCT 高発現の細胞株 2 株 (TE13, KYSE170) において xCT-siRNA を導入し、細胞周期解析及び細胞増殖解析を行ったところ、G1 停止を介する増殖抑制効果が確認できた (図 4, 5)。xCT-siRNA を導入した TE13 を Microarray で解析したところ、cyclinD1, p21, p53, E2F5 等を含む 1652 個の遺伝子発現に変化を認め、Pathway 解析では、“G1/S checkpoint regulation”が xCT に関連する機能として抽出された (図 6)。食道扁平上皮癌 49 例の切除標本における xCT 発現を免疫組織染色で解析したところ、xCT 陽性率と Ki67 Labeling index には正の相関が認められた (図 7)。全生存期間は xCT 高発現群で予後不良な傾向を認め、多変量解析では T2-3、リンパ管侵襲陽性、xCT 高発現が独立した予後因子として抽出された (図 8)。これらの研究成果は英文論文として発表した (J Gastroenterol:2014)。

同時に、食道癌における XB130 の細胞周期制御機構と臨床病理学的意義の解明 (Ann Surg Oncol:2013) を行うとともに、他の癌細胞株を用いた XB130 に関する基礎実験を行い、XB130 による Akt を介する細胞増殖・アポトーシス制御機構 (PLoS One:2012)、XB130 による microRNA 制御機構を解明した (PLoS One:2013)。さらに詳細な食道癌細胞増殖制御因子の個別解析を進め、p21・Anit-phosphohistone H3・E2F5 の予後因子としての意義を明らかにし、各々英文論文として発表した (Anticancer Research:2013, 3 編)。また、アミノ酸輸送体 xCT の研究から、食道癌における他の輸送体の発現意義についても解析を進め、水輸送体である AQP5 (J Gastroenterol:2014)、イオン共輸送体である NKCC1 (World J Gastroenterol:2014 in press) の発現意義を検証し、各々英文論文として発表した。

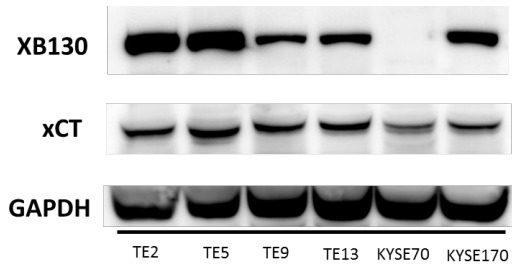


図1 食道癌細胞株におけるXB130・xCT発現

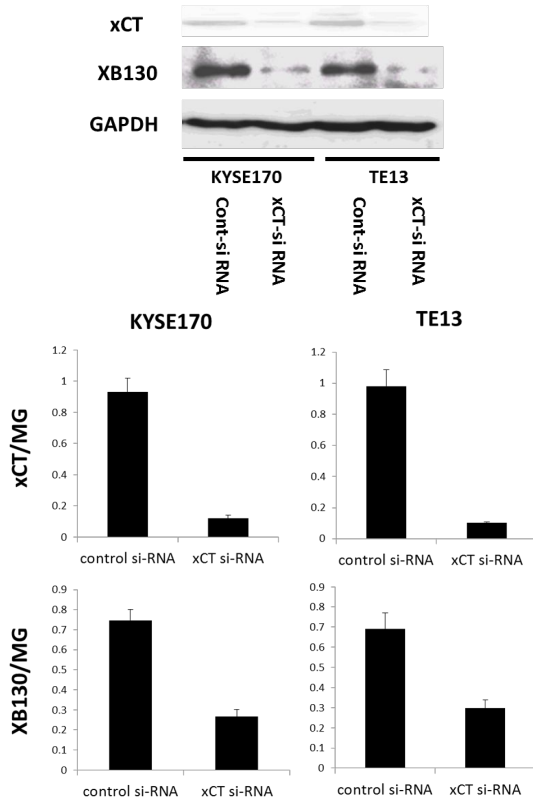


図2 xCT-siRNA導入によるXB130発現変化

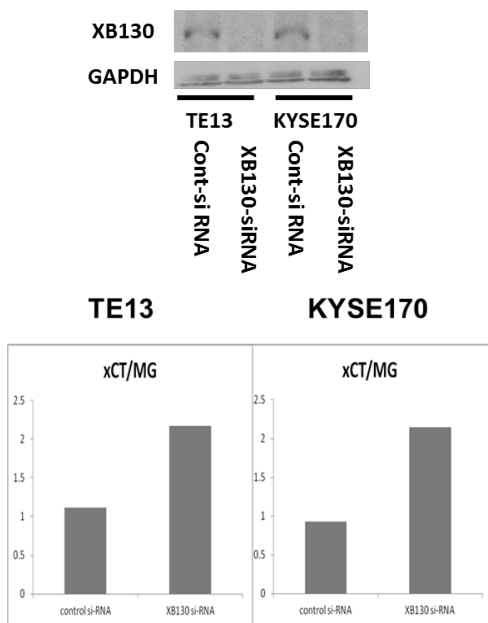


図3 XB130-siRNA導入によるxCT発現変化

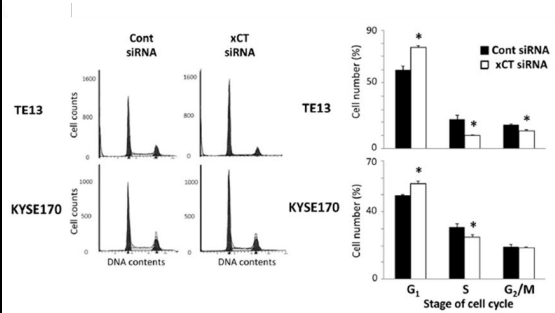
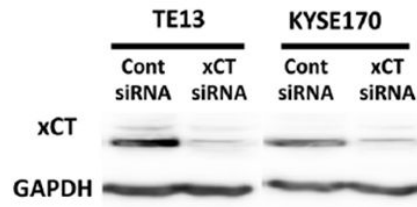


図4 細胞周期解析

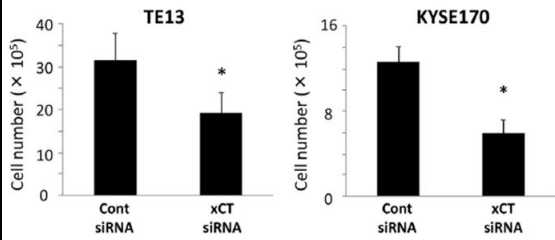


図5 細胞増殖解析

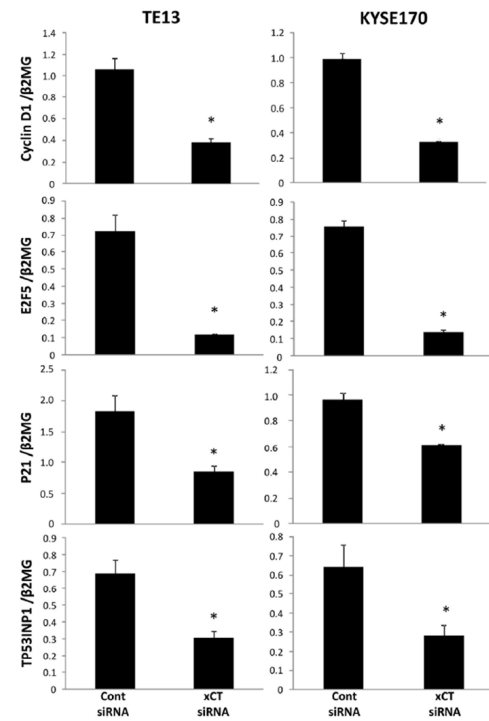


図6 細胞周期関連遺伝子の発現変化

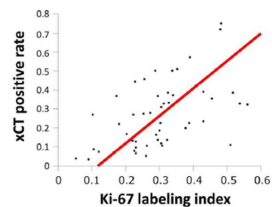
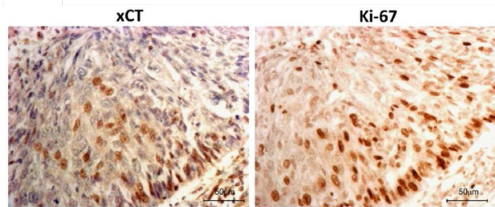


図7 食道扁平上皮癌における xCT・Ki-67 発現

Variables		Risk ratio	95% CI	p value
pT	pT1			
	pT2-3	2.060	1.123-4.405	0.018*
pN	negative			
	positive	1.431	0.609-3.973	0.420
Histological type	differentiated type SCC			
	poorly differentiated type SCC	1.355	0.793-2.294	0.259
Lymphatic invasion	negative			
	positive	2.518	1.295-6.460	0.005*
xCT positive rate	<20%			
	≥20%	2.096	1.036-5.156	0.039*

図8 多変量解析結果

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22件)

- (1) Shiozaki A, Iitaka D, Ichikawa D, et al. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol.* 2014;49(5):853-63. 査読有
- (2) Shiozaki A, Nako Y, Ichikawa D, et al. Role of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in cell cycle progression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(22):6844-59. 査読有
- (3) Shimizu H, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol.* 2014;49(4):655-66. 査読有
- (4) Takemoto K, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Evaluation of the efficacy of peritoneal lavage with distilled water in colorectal cancer surgery - in vitro and in vivo study. *J Gastroenterol.* 2014, 印刷中、査読有
- (5) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Esophagectomy with gastric tube reconstruction for patients who previously underwent free jejunal

transfer. *Esophagus.* 2014, 印刷中、査読有

- (6) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Middle and lower esophagectomy preceded by hand-assisted laparoscopic transhiatal approach for distal esophageal cancer. *Molecular and clinical oncology.* 2014;2(1):31-7. 査読有
- (7) Shiozaki A, Nakashima S, Ichikawa D, et al. Prognostic Significance of p21 Expression in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research.* 2013;33(10):4329-35. 査読有
- (8) Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Anit-phosphohistone H3 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research.* 2013;33(2):461-8. 査読有
- (9) Ishimoto T, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. E2F5 as an independent prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research.* 2013;33(12):5415-20. 査読有
- (10) Shiozaki A, Kosuga T, Ichikawa D, et al. XB130 as an Independent Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(9):3140-50. 査読有
- (11) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Novel technique for dissection of subcarinal and main bronchial lymph nodes using a laparoscopic transhiatal approach for esophageal cancer. *Anticancer Research.* 2013;33(6):2577-85. 査読有
- (12) Takeshita H, Shiozaki A, Bai Xiao-Hui, et al. XB130, a new adaptor protein, regulates expression of tumor suppressive microRNAs in cancer cells. *PLOS ONE.* 2013;8(3):e59057. 査読有
- (13) Shiozaki A, Shen-Tu G, Bai X, et al. XB130 mediates cancer cell proliferation and survival through multiple signaling events downstream of Akt. *PLoS One.* 2012;7(8):e43646. 査読有
- (14) Shiozaki A, Bai XH, Shen-Tu G, et al. Claudin 1 mediates TNF α -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e38049. 査読有
- (15) Iitaka D, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Blockade of chloride ion transport enhances the cytotoxic effect of hypotonic solution in gastric cancer

cells. J Surg Res. 2012;176(2):524-34.
査読有

- (16) Nako Y, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Enhancement of the cytotoxic effects of hypotonic solution using a chloride channel blocker in pancreatic cancer cells. Pancreatol. 2012;12(5):440-8. 査読有
- (17) Sasagawa H, Shiozaki A, Iitaka D, et al. Ki-67 labeling index as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus. 2012;9(4):195-202. 査読有
- (18) Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, et al. Perioperative outcomes of esophagectomy preceded by the laparoscopic transhiatal approach for esophageal cancer. Dis Esophagus. 2012, 印刷中、査読有
- (19) Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, et al. Posterior mediastinal lymph node dissection using the pneumomediastinum method for esophageal cancer. Esophagus. 2012;9(1):58-64. 査読有
- (20) Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, et al. Hand-assisted laparoscopic transhiatal approach for mediastinal esophageal duplication cyst resection. Esophagus. 2012;9(4):247-51. 査読有
- (21) Shiozaki A, Fujiwara H, Ichikawa D, et al. Video-assisted surgery for gastric carcinoma arising in a gastric tube reconstructed retrosternally. Surg Today. 2012;42(2):209-13. 査読有
- (22) Shiozaki A, Fujiwara H, Okamura H, et al. Risk factors for postoperative respiratory complications following esophageal cancer resection. Oncol Lett. 2012;3(4):907-12. 査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

- (1) 竹下宏樹、塩崎敦、市川大輔ら。甲状腺癌における新規アダプター蛋白 XB130 の癌抑制 microRNA を介した癌遺伝子の発現制御。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13
- (2) 中島慎吾、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌症例における phosphohistone H3 発現の臨床病理学的意義の検討。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13
- (3) 名幸義仁、塩崎敦、市川大輔ら。食道癌における Na(+)/K(+)/2Cl(-) Cotransporter 1(NKCC1)の機能解析。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13
- (4) 清水浩紀、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌におけるアクアポリン 5 の発現

と役割。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13

- (5) 塩崎敦、小菅敏幸、市川大輔ら。食道癌におけるアダプター蛋白 XB130 による G1/S 期制御機構の解明。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13
- (6) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら。消化器癌細胞におけるクロライド輸送体制御を利用した低浸透圧細胞破壊効果の増強。第 113 回日本外科学会定期学術集会。福岡：2013.4/11.12.13
- (7) 中島慎吾、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌患者における p21/CCND1 発現と予後との関連。第 51 回日本癌治療学会学術集会。京都：2013.10/24.25.26
- (8) 名幸義仁、塩崎敦、市川大輔ら。Na(+)/K(+)/2Cl(-) Cotransporter1(NKCC1)の食道癌細胞増殖制御における役割について。第 51 回日本癌治療学会学術集会。京都：2013.10/24.25.26
- (9) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら。低浸透圧刺激の消化器癌細胞における細胞破壊効果と生体内投与における安全性の検討。第 51 回日本癌治療学会学術集会。京都：2013.10/24.25.26
- (10) 清水浩紀、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌におけるアクアポリン 5 の意義。第 67 回日本食道学会学術集会。大阪：2013.6/13.14
- (11) 名幸義仁、塩崎敦、市川大輔ら。Na(+)/K(+)/2Cl(-) Co-transporter 1(NKCC1) の食道癌における細胞増殖制御機構の解析。第 67 回日本食道学会学術集会。大阪：2013.6/13.14
- (12) 中島慎吾、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌症例における phosphohistone H3 発現の検討。第 67 回日本食道学会学術集会。大阪：2013.6/13.14
- (13) 塩崎敦、清水浩紀、市川大輔ら。食道扁平上皮癌におけるアクアポリン 5 による細胞増殖制御機構の解明。第 72 回日本癌学会学術集会。横浜：2013.10/3.4.5
- (14) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら。消化器癌細胞における低浸透圧細胞破壊効果の確認とクロライド輸送体制御の利用。第 72 回日本癌学会学術集会。横浜：2013.10/3.4.5
- (15) 中島慎吾、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌症例における phosphohistone H3 発現の予後的意義の検討。第 72 回日本癌学会学術集会。横浜：2013.10/3.4.5
- (16) 名幸義仁、塩崎敦、市川大輔ら。食道扁平上皮癌における Na(+)/K(+)/2Cl(-) Cotransporter 1(NKCC1)の機能解析。第

- 72 回日本癌学会学術集会 . 横浜 :
2013.10/3.4.5
- (17) Shiozaki A, Itaka D, Fujiwara H, et al.
Clinical significance of Ki-67 labeling
index in patients with esophageal
squamous cell carcinoma. 13th World
Congress of the International Society
for Diseases of the Esophagus. Venice,
ITALY: 2012.10/15.16.17
- (18) Shiozaki A, Kosuga T, Fujiwara H, et
al. Roles of XB130, a novel adaptor
protein, in esophageal squamous cell
carcinoma. 13th World Congress of the
International Society for Diseases of
the Esophagus. Venice, ITALY:
2012.10/15.16.17
- (19) Shiozaki A, Itaka D, Fujiwara H, et al.
Roles of xCT, cysteine/glutamate
transporter, in esophageal squamous
cell carcinoma. 13th World Congress of
the International Society for Diseases
of the Esophagus. Venice, ITALY:
2012.10/15.16.17
- (20) Shiozaki A, Itaka D, Ichikawa D, et al.
Roles of chloride ion transporter in
hypotonic shock on gastric cancer cells.
38th Biennial World Congress of the
International College of Surgeons.
Brisbane, Australia: 2012.11/7.8.9.10
- (21) Nako Y, Shiozaki A, Ichikawa D, et al.
Enhancement of cytotoxic effect of
distilled water using chloride channel
blocker in pancreatic cancer cells. 38th
Biennial World Congress of the
International College of Surgeons.
Brisbane, Australia: 2012. 11/7.8.9.10
- (22) 飯高大介, 塩崎敦, 市川大輔ら . 食道扁
平上皮癌(ESCC)腫瘍増殖に関わる xCT
の役割と意義について . 第 112 回日本外
科学会定期学術集会 . 千葉 (幕張) :
2012.4/12.13.14
- (23) 中島慎吾, 塩崎敦, 市川大輔ら . 食道扁
平上皮癌手術症例における新規アダプタ
ー蛋白 XB130 の発現解析 . 第 112 回日
本外科学会定期学術集会 . 千葉 (幕張) :
2012.4/12.13.14
- (24) 清水浩紀, 塩崎敦, 市川大輔ら . 腫瘍進
展における Claudin-1 の意義 : TNF- α の
メディエーターとしての可能性 . 第 112
回日本外科学会定期学術集会 . 千葉 (幕
張) : 2012.4/12.13.14
- (25) 北川真希, 塩崎敦, 市川大輔ら . 胃癌細
胞における細胞内 Cl⁻ を介した遺伝子発
現制御機構の解明 . 第 112 回日本外科学
会定期学術集会 . 千葉 (幕張) :
2012.4/12.13.14
- (26) 名幸義仁, 塩崎敦, 市川大輔ら . 膵臓癌
細胞株におけるクロライドイオンチャン

- ネルを用いた低浸透圧殺細胞効果の増強 .
第 71 回日本癌学会学術総会 札幌:2012 .
- (27) 中島慎吾, 塩崎敦, 市川大輔ら . 食道扁
平上皮癌患者における XB130/p21 の発
現と予後との関連 . 第 71 回日本癌学会学
術総会 . 札幌 : 2012.9/19.20.21
- (28) 塩崎敦, 市川大輔, 小松周平ら . 新規ア
ダプター蛋白 XB130 による PI3K/Akt
経路を介する癌細胞増殖・アポトーシス
制御機構の解明 . 第 71 回日本癌学会学術
総会 . 札幌 : 2012.9/19.20.21
- (29) 竹下宏樹, 塩崎敦, 市川大輔ら . 甲状腺
癌における XB130 の癌抑制 microRNA
の発現抑制と癌増殖への関与 . 第 71 回日
本癌学会学術総会 . 札幌 :
2012.9/19.20.21

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 塩崎敦 他、へるす出版、消化器外科 手
術記録の書き方、2014、561-5.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塩崎 敦 (SHIOZAKI ATSUSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 40568086