

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861058

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼFbxw7と基質タンパク質を標的とした胆道癌個別化治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of Individualized treatments in cholangiocarcinoma targeted Ubiquitin ligase Fbxw7 and the substrates

研究代表者

益田 邦洋 (MASUDA, KUNIHRO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30569645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fbxw7とその基質が胆道癌の治療標的となるかを解明するべく、胆道癌細胞株において、Fbxw7と基質の発現量を検証した。全ての細胞株にFbxw7のタンパク質レベルでの発現を確認し、Fbxw7のsiRNAによるノックダウンにより特定の基質の蓄積を明らかにした。その意義を確かめるべく胆道癌組織において、Fbxw7、その基質分子の発現を免疫染色で測定し、臨床病理学的検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：In order to solve the role of Ubiquitin ligase Fbxw7 and the substrates in cholangiocarcinoma, we verified the expression levels of proteins in cholangiocarcinoma cell lines. A particular substrate was accumulated in Fbxw7 knock down cell lines. Now, we are analyzing the expression of Fbxw7 and the substrates in the surgical specimens of biliary tract cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：Fbxw7 cholangiocarcinoma

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は、進行癌の予後は不良であり、現在外科的切除のみが根治を期待できるが、切除後の再発も高く、有効な化学療法も少ない。発症機序として、p53, p16, p27, p57, SMAD4, Ras, AKT, c-Myc などの多くの腫瘍抑制遺伝子の不活性化型変異、癌遺伝子の活性化型変異は報告されているが、これらの変異が腫瘍発生や進行、予後への関与の仕方は明らかではなく、生物学的な解明も遅延している。胆道癌発癌、進展の分子メカニズムを解明し、それらを標的とした新規治療の開発は急務である。

生体のホメオスタシス維持にはタンパク質分子の細胞内局在を含めた時空間的な発現制御が必須であり、特にユビキチン・プロテアソーム系は基質特異的にタンパク質を分解する。ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は cyclinE, c-Myc, Notch, c-Jun, mTOR, Mcl-1 などの多くの癌遺伝子産物と結合し、それらをユビキチン化し分解を行っている。また、胆道癌、T細胞性白血病(T-ALL)など多くのがんで不活性化型変異が報告され、癌抑制遺伝子であると考えられている。

T-ALL では Fbxw7 の変異(約 30%)や Notch1 の活性化型変異が発病、進行に関与し⁽⁴⁾、Fbxw7-Notch を標的とした Notch 阻害剤による臨床応用も開始している。一方、Fbxw7 の変異が多い胆道癌(約 35%)では、Fbxw7 と基質分子との関与の解析は依然として行われていない。しかし、Fbxw7 の基質である Notch1 については、トランスジェニックマウスの実験で肝臓に Notch1 を過剰発現させると胆管癌が発症し、進行が Notch 阻害剤により抑制されることが近年初めて報告された⁽⁵⁾。癌腫は異なるものの、Fbxw7 の変異頻度(約 35%)や基質である Notch1 による発癌など生物学的類似性より、胆道癌の発症、進行における Fbxw7-Notch の関与は疑い得ない。

他の基質については、mTOR と Mcl-1 が報告されており、Fbxw7 変異によるアポトーシス抑制タンパクである Mcl-1 蓄積は抗癌剤(抗チューブリン薬)に耐性を示し、Fbxw7 の機能を欠失した T細胞性急性リンパ性白血病細胞に対する MCL1 阻害剤ソラフェニブが高い細胞死の誘導効果を示すことが報告された。

申請者らは、Fbxw7 欠損胎仔線維芽細胞(MEF)において、基質分子である Notch1 の蓄積、c-Myc の蓄積とそれらに伴う、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p27, p57 の発現減少、p16, p19Arf の蓄積を明らかにした。我々やほかの研究者が明らかにしたように、

タンパク質の過剰蓄積も組織依存性であり、Fbxw7 は組織特異的な機能を有することが示唆される。Fbxw7 の変異を認める胆道癌でも組織や個人特有の蓄積タンパク質があり、それらをターゲットにした治療応用が可能と考える。そこで本研究では、胆道癌新規標的治療にむけて、Fbxw7 変異・発現低下と基質タンパクの蓄積の臨床病理学的意義を明らかにし、基質分子を標的とした個別化治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

難知性疾患である胆道癌の発癌、進展の分子生物学的メカニズムにユビキチンリガーゼ Fbxw7 とその基質分子の関与を明らかにし、それらを標的とした新規治療法を確立し、個別化治療に繋げることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は cyclinE, c-Myc, Notch, mTOR, Mcl-1 など癌遺伝子産物を基質特異的に分解する癌抑制遺伝子として働いており、胆道癌で約 35%の変異が報告されているが、生物学的解析は行われていない。本研究では、胆道癌での臨床病理検体、細胞株を用いて、Fbxw7 の変異・発現量低下と基質蛋白質蓄積を明らかにし、臨床病理学的予後との関連、細胞生物学的解析を行う。また、同定した基質蛋白質を標的とする薬剤を細胞株、皮下腫瘍移植マウスに投与し、細胞生物学的解析、生体での効果を明らかにすることで、新規分子標的治療法開発の端緒とする。

- (1) 臨床検体(病理切除標本)を用いて、Fbxw7 変異の有無や発現量を調べ、それぞれの基質タンパク質の発現の変化を免疫染色にて評価する。予後の明らかな検体を用いることで、Fbxw7 変異や発現量と、基質分子蓄積と臨床的悪性度の評価を行う。
- (2) ヒト胆道癌細胞株において Fbxw7 変異・発現量を調べ、Fbxw7 野生株、変異株(低発現株)における基質タンパ

ク質の発現量を Immunoblotting により生化学的に検証すると同時に、細胞増殖能、浸潤、転移能を比較検討する。

(3) (2)で確認した特徴をもつ細胞株を用いて、蓄積した基質タンパク質を標的とした薬剤 (Notch 阻害剤・mTOR 阻害剤・Mcl-1 阻害剤など) を投与し、細胞増殖能、浸潤能が抑制できるかを検討する。(in vitro)

(4) (2)で確認した特徴をもつ細胞株を用いて、NOD/SCID マウスに移植し、標的とする薬剤を投与し、移植した腫瘍の増殖抑制効果を確認する。(in vivo)

4. 研究成果

(細胞生物学的実験)

胆道癌細胞株 3 種類 Hucct1、RBE、TFK 1 を用いた。

(1) Fbxw7 の realtime PCR の Primer を 2 種類設計し、胆道癌細胞株での Fbxw7 mRNA の発現を確認した。

(2) タンパク質レベルでの発現を Western blotting で確認した。

(3) Fbxw7 のノックダウンを行うため、Fbxw7 の siRNA 3 種購入、ノックダウンを行った。mRNA レベルでのノックダウンは確認できたが、タンパク質レベルでの発現抑制を認めず、購入した抗体((2)の抗体)は機能していないことが考えられた。

(4) human Fbxw7 の過剰発現ベクターの供与してもらい、過剰発現細胞を用い(ポジティブコントロール)機能する抗体を選定した。

(5) 選定した Fbxw7 の抗体は siRNA の細胞株の実験で mRNA レベルでの発現抑制とタンパク質の発現抑制が一致することを解明し、それを使用して実験することにした。

(6) siRNA によるノックダウンの実験により、基質 2 種(未発表)が蓄積することを確認した。

(病理組織標本)

Fbxw7 の抗体の選定に時間がかかってしまった。しかし、既報で報告を認める抗体をはじめ用いて行っていたが、細胞株の実験では

全く Fbxw7 を認識していないと判断している。

現在選定した Fbxw7 の抗体と基質 2 種類の抗体を用いて切除病理標本の免疫染色を行っている。

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 4 件)

Silencing of LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ -catenin signaling pathway.

Douchi D, Ohtsuka H, Ariake K, Masuda K, Kawasaki S, Kawaguchi K, Fukase K, Oikawa M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M.

Cancer Lett. 2015 Aug 28;365(1):132-40.

(査読あり)

doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.023.

【進行膵・胆道癌における血管合併切除の諸問題】肝門部領域胆管癌における門脈浸潤例の切除戦略

益田邦洋, 中川圭, 元井冬彦, 海野倫明
胆と膵, 2015 36(3):213-219. (査読なし)

【ERAS 時代の周術期管理マニュアル】術式別の術前・術中・術後管理 肝 化学療法後の肝切除

益田邦洋, 吉田寛, 片寄友, 海野倫明
臨床外科. 2014 69(11): 162-164. (査読なし)

【胆道癌として外科切除された鑑別困難病変の検証-画像と病理所見の対比-】胆嚢癌と鑑別困難な黄色肉芽腫性胆嚢炎切除例
益田邦洋, 吉田寛, 内藤剛, 海野倫明
胆と膵, 2014 35(3):283-289. (査読なし)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 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

益田 邦洋 (MASUDA, KUNIHIRO)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：30569645

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

盛 彬子 (MORI, AKIKO)
東北大学大学院・消化器外科学・大学院生
研究者番号：