

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861093

研究課題名(和文) ユビキチン修飾系を標的とした新たな癌治療法の臨床導入を目的とした研究

研究課題名(英文) Research for clinical introduction of new cancer therapy targeting ubiquitin system

研究代表者

右田 和寛 (Migita, Kazuhiro)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40570990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍におけるRing box protein-1 (RBX1)の役割、治療標的としての意義を検討した。術前未治療胃癌145例の切除標本を用いて免疫組織染色を行った。RBX1高発現例は低発現例と比較し生存期間は有意に短く、RBX1発現レベルは独立予後規定因子であった。ヒト胃癌細胞株のRBX1発現をsiRNAでノックダウンしたところ、腫瘍細胞の細胞周期停止が誘導され、有意に増殖が抑制されるとともに、抗癌剤感受性が改善された。さらには、RBX1発現ノックダウンにより、細胞遊走能が有意に低下した。以上の結果から、RBX1は腫瘍の増殖、転移、抗癌剤治療抵抗性に関与し、治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the functions of Ring box protein-1 (RBX1) in tumors. In the immunohistochemical analyses, the patients with the RBX1-high tumor had a significantly lower overall survival rate than the patients with the RBX1-low tumor. Furthermore, RBX1 expression status was identified as an independent prognostic factor in the multivariate analysis. We further investigated the roles of RBX1 in vitro using the small interfering RNA (siRNA). RBX1 gene silencing significantly inhibited the proliferation of human gastric cancer cells through the cell cycle arrest. Furthermore, RBX1 gene silencing improved the sensitivity to the chemotherapeutic agent. In addition, migrated cells decreased significantly in the cells treated with RBX1 siRNA compared with the control. These findings indicate that RBX1 may be associated with the proliferation, metastasis, and resistance to chemotherapy in human cancers.

研究分野：胃外科

キーワード：E3ユビキチンリガーゼ 胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌をはじめとする難治性消化器癌では今なお切除不能進行症例も多い。また、治癒切除後であっても再発の頻度が高く、一度再発すれば治療抵抗性であり、十分な治療成績が得られていないのが現状である。したがって、これら癌腫の大幅な予後改善のためには、新たな観点からの治療法の開発が望まれる。

近年、新たな癌治療戦略としてユビキチン・プロテアソーム系を標的とした治療が注目されている。ユビキチン修飾系はタンパク質翻訳後修飾系であり、細胞周期・シグナル伝達・転写調整などあらゆる生命現象を制御している。最近では癌の浸潤、転移、再発におけるユビキチン修飾系異常の意義が明らかにされつつある。これまでの基礎研究によって、ユビキチン修飾系で重要な役割を担う E3 ユビキチンリガーゼである SCF 複合体の構成分子 Skp2 や β -TrCP、FBXW7 などの発現異常が様々な癌腫で確認された。RING finger 構造を有する RBX1 も SCF 複合体の構成因子であり、E2 ユビキチン結合酵素と相互作用し、基質ユビキチン化反応に必須である。現在までのところ、腫瘍における RBX1 の意義は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は E3 ユビキチンリガーゼである SCF 複合体の構成因子 RBX1 に着目し、腫瘍における RBX1 の役割を明らかにするとともに、RBX1 を標的とした新規癌治療法の有用性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

◎臨床検体を用いた検討

術前未治療の胃癌症例 145 例の切除標本を RBX1 特異抗体を用いて免疫染色を行った。腫瘍における RBX1 陽性率を算出し、臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。

◎in vitro 実験系での腫瘍における RBX1 の役割の解明

ヒト胃癌細胞株 MKN45、MKN74 の RBX1 発現を RNA 干渉法を用いてノックダウンし、細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ、CellTiter-Blue Cell Viability アッセイ)、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、細胞遊走アッセイを行った。

◎in vitro での抗癌剤との併用による RBX1 ノックダウンの抗腫瘍効果の確認

上記胃癌細胞株を使用し、RBX1 ノックダウン、5-fluorouracil (5-FU) 併用による増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

◎臨床検体を用いた検討

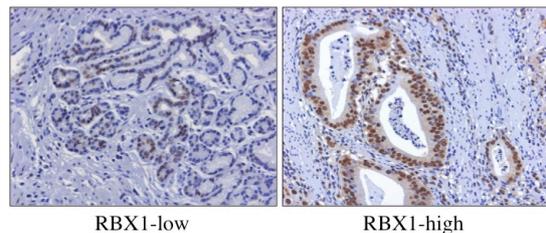
145 例すべての腫瘍において RBX1 の発現を認めた (図 1)。腫瘍における平均 RBX1 陽性率は 51.6%であった。臨床病理学的因子との関

連を検討したところ、平均 RBX1 陽性率は分化型胃癌で未分化型胃癌より有意に高く、壁深達度とも有意な関連を認めた。さらには、遠隔転移陽性例、静脈侵襲陽性例は平均 RBX1 陽性率が有意に高率であった (表 1)。

RBX1 発現と術後生存期間との関連を検討した。全症例を RBX1 陽性率 48%で高発現群、低発現群に分けたところ、高発現例は 5 年全生存率 54.9%と低発現例 85.1%に比べ有意に予後不良であった (図 2, $P < 0.001$)。また、術後再発は高発現群で低発現群と比較し有意に高率 (33.7% vs. 16.1%, $P = 0.02$) であり、なかでも血行再発が有意に高率 (13.5% vs. 1.8%, $P = 0.013$) であった。多変量生存解析の結果、RBX1 発現レベルは独立予後規定因子であった (表 2)。

Ki67 免疫染色を行い、RBX1 発現と腫瘍細胞増殖能との関連を検討した。RBX1 高発現腫瘍は低発現腫瘍と比較して平均 Ki67 陽性率は有意に高率であった (25.8% vs. 15.7%, $P < 0.001$)。また、RBX1 陽性率は Ki67 陽性率と有意な正の相関を示した (図 3)。

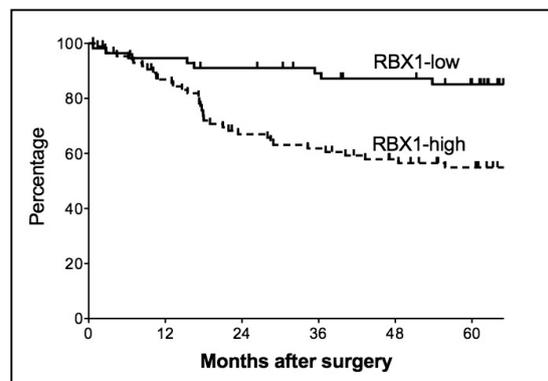
以上のことから、RBX1 は胃癌細胞の増殖、転移に関連し、RBX1 発現は臨床的意義を有することが示唆された。



(図 1) RBX1 免疫組織染色

表1. 腫瘍因子と RBX1 発現

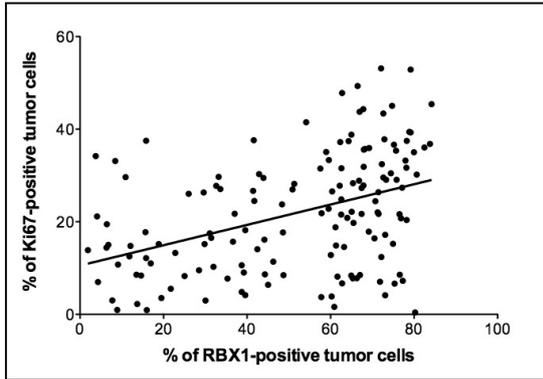
Variables		% of RBX1 positive cells	P value
Histology	Diff.	60 ± 21.7	<0.001
	Undiff.	43.6 ± 22.8	
Tumor depth	T1	38 ± 25.9	0.008
	T2	52.8 ± 23.1	
	T3	49.3 ± 23.5	
	T4	60.4 ± 20.2	
LN metastasis	No	51.7 ± 21.8	0.98
	Yes	51.6 ± 24.7	
Distant metastasis	No	50.8 ± 23.8	0.016
	Yes	67 ± 14.6	
Lymph invasion	No	48.2 ± 23.7	0.362
	Yes	52.6 ± 23.7	
V invasion	No	47.6 ± 24.4	0.005
	Yes	58.5 ± 20.9	



(図 2) RBX1 発現と術後全生存期間

表2. 多変量生存解析

Variables		HR	95%CI	P value
Tumor size, mm	>50/<50	1.98	1.07-3.63	0.029
Tumor depth	T3-4/T1-2	1.25	0.65-2.39	0.506
LN metastasis	+/-	2.61	1.18-5.81	0.018
Distant metastasis	+/-	3.68	1.48-9.14	0.005
Venous invasion	+/-	1.37	0.74-2.54	0.314
RBX1 expression	High/low	3.27	1.55-6.89	0.002

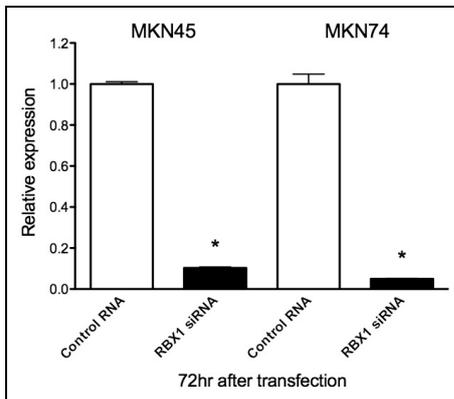


(図3) RBX1 陽性率と Ki67 陽性率

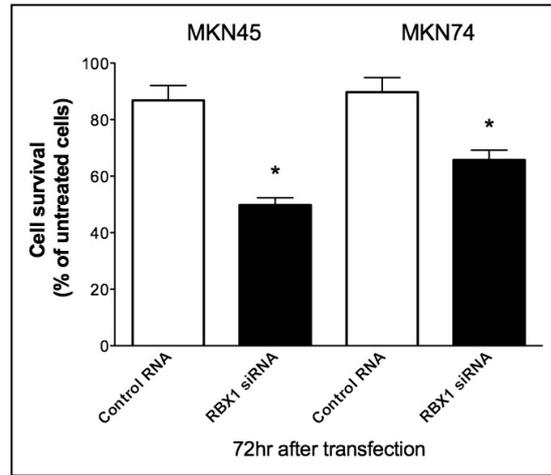
◎in vitro 実験系での腫瘍における RBX1 の役割の解明

胃癌細胞株 MKN45, MKN74 の RBX1 発現を siRNA を用いてノックダウンを行った (図4)。増殖アッセイを行ったところ、いずれの細胞株においても RBX1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、有意に増殖が抑制された (図5)。FACS による細胞周期解析の結果、RBX1 ノックダウンにより G1 期、S 期細胞の割合が有意に増加した (図6)。また、ウェスタンブロットの結果、RBX1 ノックダウン細胞では p21 レベルが増加していた (図7)。以上の結果から、RBX1 は細胞周期調整などを介して胃癌細胞の増殖能に関与することが示唆された。

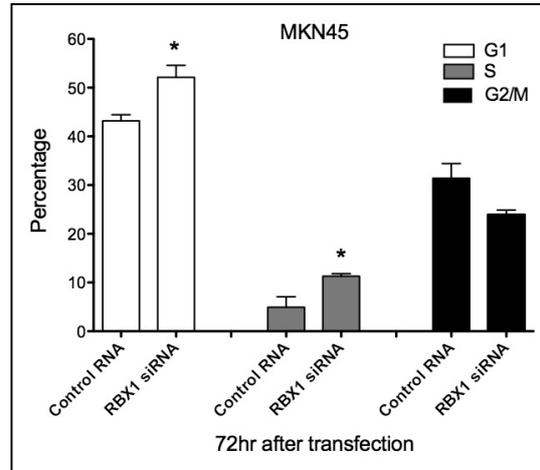
細胞遊走アッセイの結果、RBX1 ノックダウンにより、遊走細胞数は有意に低下した (図8)。RBX1 は胃癌細胞の遊走能に関与する可能性が示唆されたが、詳細は不明であり今後、更なる検討を要する。



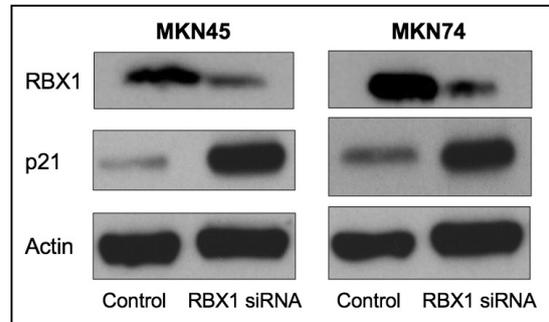
(図4) RBX1 発現ノックダウン



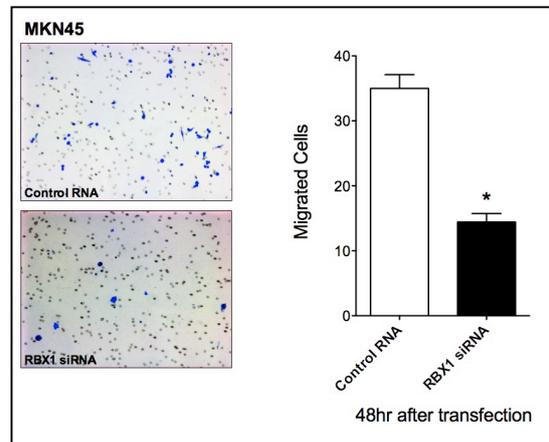
(図5) RBX1 発現と増殖能



(図6) 細胞周期解析



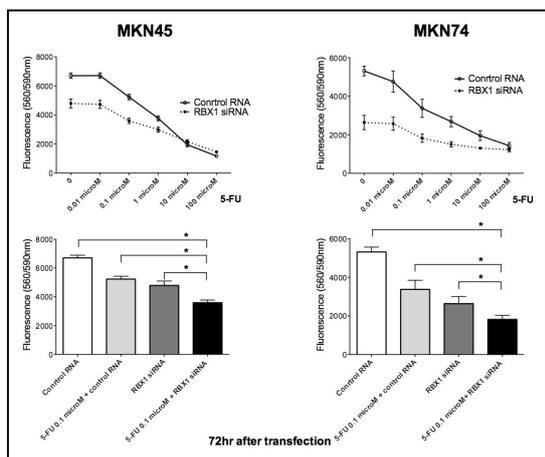
(図7) ウェスタンブロット



(図8) 細胞遊走アッセイ

◎in vitro での抗腫剤との併用による RBX1
ノックダウンの抗腫瘍効果の確認

5-FU、RBX1 ノックダウン併用はそれぞれの単
独と比較して、有意な腫瘍細胞増殖抑制効果
を示した (図 9)。これらのことから、RBX1
は抗腫剤治療抵抗性に関連し、RBX1 を標的と
した治療により、抗腫剤感受性が改善する可
能性が示唆された。



(図 9) RBX1 ノックダウンと 5-FU との併用
効果

以上の結果から、RBX1 は腫瘍細胞の増殖能、
遊走能、薬剤治療抵抗性に関与することが判
明した。RBX1 を標的とした治療によって、画
期的な治療効果が得られる可能性が示唆さ
れた。今後、動物モデルなどを行い、さらに
その有用性を確認する必要があると考えら
れた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

ヒト胃癌における RBX1 発現の臨床病理学的
意義 右田和寛、松本壮平、若月幸平、田仲
徹行、伊藤眞廣、國重智裕、中出裕士、中島
祥介 第 115 回日本外科学会定期学術集会

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 和寛 (MIGITA, Kazuhiro)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究
員

研究者番号：40570990

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし