

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10517

研究課題名(和文)食道癌におけるSUMO特異的プロテアーゼの意義と発現抑制による抗癌作用の解析

研究課題名(英文)Significance of SUMO-specific protease 1 in esophageal squamous cell carcinoma and Analysis of anti-cancer effect by suppressing its expression

研究代表者

石橋 由朗 (ISHIBASHI, YOSHIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00246373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：最近いくつかの癌での高発現が指摘されているSUMO-specific protease 1 (SEN1)について食道癌での意義を検討した。免疫組織化学的検討では、ヒト食道癌の核や細胞質にSEN1の発現が確認された。食道癌培養細胞では、検討した5細胞株において正常食道上皮細胞に比べSEN1発現が増加していた。培地の血清濃度を下げることで細胞増殖の低下・停止を誘導すると SEN1の発現量は、蛋白レベル、遺伝子レベルで増加した。またsiRNAを用いたSEN1遺伝子の発現抑制により、食道癌培養細胞で抗腫瘍薬の耐性に影響を与える傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SUMO-specific protease 1 (SEN1)は、最近前立腺癌、大腸癌、膵臓癌で発現の増加が報告されている。本研究では、食道癌でのSEN1発現について検討した。SEN1は食道癌の核、細胞質に発現しており、癌細胞の増殖の低下や停止に伴って発現量が増加したことから細胞死抑制への関与が示唆された。またSEN1遺伝子の発現抑制が食道癌細胞の増殖抑制につながる可能性や抗癌薬の作用にも影響を与えることを確認した。SEN1は食道癌での検討がまだ行われておらず、本研究は食道癌におけるSEN1の意義について新しい知見を見出し、今後の医学応用への可能性を示唆したものである。

研究成果の概要(英文)：The significance of SUMO-specific protease 1 (SEN1), which has been recently pointed out to be highly expressed in some cancers, in esophageal cancer was examined. Immunohistochemical studies confirmed the expression of SEN1 in the nucleus and cytoplasm of human esophageal cancer. In cultured esophageal cancer cells, SEN1 expression was increased in the 5 cell lines examined compared to normal esophageal epithelial cells. The expression level of SEN1 increased at the protein level and at the gene level when cell growth was reduced or stopped by lowering the serum concentration of the medium. In addition, suppression of SEN1 gene expression using siRNA tended to affect antitumor drug resistance in cultured esophageal cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：SEN1 食道癌 SUMO-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌とユビキチン-プロテアソームシステムによる蛋白分解との密接な関係が明らかにされてきた。我々の研究グループでは、食道癌組織の DNA チップを用いた解析で癌組織でのユビキチン類似蛋白質の一つである small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) の発現の増加を見出した。さらにこの発現は、予後不良な群に特に多く認められていた (Ishibashi Y, et al. Cancer Res 2003)。SUMO-1 は、標的蛋白質へユビキチンと同様に可逆的に共有結合 (SUMO 化) し、その機能を調節する移動性の翻訳後修飾分子である。SUMO-1 は、いくつかの癌遺伝子および癌抑制遺伝子産物のユビキチン化部位に結合することから、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する負の制御、標的タンパク質の機能修飾など細胞の癌化のメカニズムにも関与していることが指摘されている。

(2) SUMO 化は可逆的な修飾であり、基質 (標的タンパク質) から SUMO を脱修飾する際には、SUMO 特異的プロテアーゼ (SUMO-specific protease SENP) が働いており、6 つの SENP がヒトで同定されている。SENP によって SUMO 化タンパク質と非 SUMO 化タンパク質のバランスは調節されており、正常な細胞生理の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。SENP の一つである SENP1 は、最近前立腺癌、大腸癌、膵臓癌などでその発現の増加が報告され、特に前立腺癌においては SENP1 の発現と癌の浸潤性および再発との相関が指摘されている。このように SENP1 には癌との密接な関係が示されているが、いまだ癌の臨床検体での報告は少なくその働きは不明な点を多く残している。また我々が SUMO-1 の過剰発現を報告した食道癌においても SENP1 についての検討が全く行われていない。

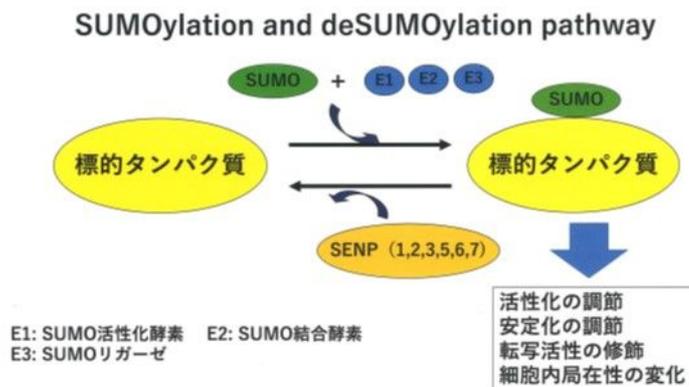


図1 標的タンパク質のSUMO化と脱SUMO化による機能調節

2. 研究の目的

本研究では、いまだ SENP1 の検討がなされていない食道癌において、手術検体の食道癌組織や各種食道癌培養細胞 (KYSE70, KYSE30 等) の SENP1 の蛋白レベルでの発現を免疫組織化学手法、イムノブロット等にて解析する。そしてその発現と臨床病理学的因子、予後との関連を検討する。次に、血清濃度を低下させることで細胞増殖抑制培養条件を作成し、ストレス下での食道癌培養細胞の SENP1 タンパク質の発現、ユビキチン動態の変化を確認する。また SENP1 遺伝子発現阻害を行い、細胞増殖への影響を検討する。さらに SENP1 遺伝子発現阻害が食道癌の抗癌薬感受性に与える影響を検証する。

3. 研究の方法

【対象】

(1) 食道癌組織

術前化学療法を施行されず東京慈恵会医科大学附属病院で手術を施行した食道癌患者を対

象とした。手術施行後の食道癌標本のホルマリン固定、パラフィン包埋された病理検体が用いられた。なお本研究は、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得ている。

(2) 細胞株

JCRB 細胞バンクより購入した食道癌培養細胞 (KYSE50、KYSE70、KYSE150、KYSE170、KYSE510) と正常ヒト食道上皮細胞 (HEsEpiC) を使用した。

【方法】

(1) 食道癌における SENP1 蛋白発現の検討

免疫組織学的検討

当院で手術が施行された食道癌のホルマリン固定、パラフィン包埋した病理標本を用いて、抗 Anti-SENP1 抗体 (ab3657 abcam、ab108981 abcam) を使用し免疫組織学的に SENP1 の染色性、局在を観察し、非癌部との差について確認した。またその染色強度と臨床病理学的因子、予後との関連について検討した。

イムノプロット解析

Anti-SENP-1 抗体 (EPR3844 Abcam) を用いて、各種食道癌培養細胞 (KYSE50、KYSE70、KYSE150、KYSE170、KYSE510) と正常ヒト食道上皮細胞 (HEsEpiC) において SDS-PAGE 試料用緩衝液で抽出後 SENP1 蛋白発現のウエスタンプロット分析を行った。

(2) 牛胎児血清 (FCS) 濃度変化に対する食道癌培養細胞の増殖へ影響と SENP1 発現の検討

血清濃度による細胞増殖の変化と SENP1 発現

各種食道癌培養細胞 (KYSE70 (低分化型)、KYSE150 (低分化型)、KYSE510 (高分化型)) において 3 種類の FCS 濃度 (10%、1%、0.1%) で培養を行い 10 日後の増殖状態を検討した。またその時点での SENP-1 蛋白の発現のウエスタンプロット分析を行った。また Real-time PCR の手法を用いて同様に FCS 10% の細胞と 5 日間の無血清培養の細胞との Senp1 の発現を比較し検討した。

SENP-1 蛋白の発現とポリユビキチン量について

SUMO 修飾はユビキチン修飾と拮抗してタンパク質の安定化に働くことがあるため、細胞内のポリユビキチン量と SENP1 の発現量に相関があるか検討した。上記の条件で培養した 9 試料の細胞内ポリユビキチンの総量をサンドイッチ ELISA で測定し、mg タンパクあたりの量を算出して比較した。

(3) SENP-1 発現抑制の検討

siRNA の合成

培養細胞における SENP1 遺伝子の発現を抑制するため、Silencer select pre-designed siRNA (s26616, Aambion) を試薬に用いた実験をメーカーのプロトコールに従って実施した。

細胞増殖

SENP1 を特異的に抑制する siRNA (si-SENP1) と non-targeting control siRNA (si-NTC) を用いて SENP1 遺伝子の発現抑制時の食道癌培養細胞 (KYSE70、KYSE170、KYSE510) の細胞増殖への影響について WST-1 細胞増殖アッセイを用いて評価した。

SENP1 遺伝子の発現抑制と抗腫瘍薬効果

同じ条件下でさらに 0.05、0.5、5 μ M の CDDP 暴露下で 2 日間培養し、WST-1 細胞増殖アッセイで細胞の生存率を測定した。その他、Docetaxel (DTX)、5FU の暴露についても検討した。

4 . 研究成果

(1) 食道癌手術標本における SENP1 蛋白発現

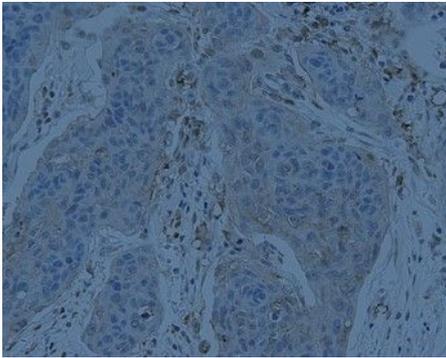
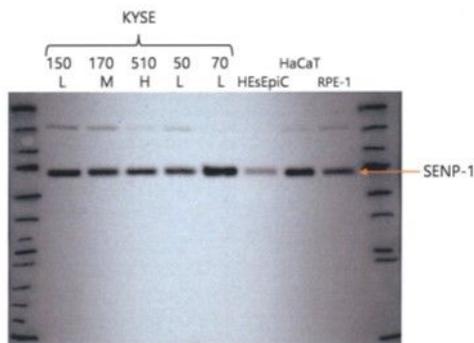


図2 抗 SENP1 Rabbit ポリクローナル抗体(PC603)による食道癌の免疫染色(x400)

食道癌では癌細胞の核および細胞質が染色され、SENP1 蛋白発現の細胞内分布が確認された。また非癌部での染色濃度は癌部に比較して低レベルであった。染色強度と食道癌患者の臨床病理学的因子について検討したが、今回は特に有意な関連性は指摘できなかった。

(2) 食道癌培養細胞での SENP1 蛋白発現



KYSE 150 (低分化型) KYSE170 (中分化型) KYSE510 (高分化型)
 KYSE 50 (低分化型) KYSE 70 (低分化型)
 HEsEpiC 正常ヒト食道上皮細胞 HaCaT ヒト角化細胞由来株化細胞
 RPE-1 ヒト網膜色素上皮由来株化細胞
 試料: whole cell extracts, 50 µg protein/lane
 抗体: 抗SENP-1 EPR3844, Abcam

図3 各種培養細胞での SENP1 蛋白発現

食道癌培養細胞では、いずれの細胞にも SENP1 発現が確認され、すべての細胞で正常食道上皮細胞に比べ SENP1 発現が増加していた。食道癌の中では低分化型の KYSE70 での発現が最も多く認められたが、癌細胞の分化度での発現に大きな差は認めなかった。

(3) 血清濃度による細胞増殖の変化と SENP1 発現

各種 食道癌培養細胞 (KYSE70 (低分化型) KYSE150 (低分化型) KYSE510 (高分化型)) において3種類の FCS 濃度 (10%、1%、0%) で10日間培養を行い、SENP1 蛋白の発現のウエスタンブロット分析を行った。すべての細胞が FCS 濃度 0%では増殖停止し、1%では僅かに増殖という結果であった。増殖の低下・停止に伴って KYSE170 と KYSE510 の SENP1 タンパク量の増加が認められた。

細胞株	FCS濃度	10%	1%	0.1%
KYSE-50	細胞密度 at 0 day	50%飽和度	50%飽和度	50%飽和度
	細胞密度 at 10 day	80%飽和度	5%飽和度	0%飽和度
KYSE-150	細胞密度 at 0 day	50%飽和度	50%飽和度	50%飽和度
	細胞密度 at 10 day	120%飽和度	70%飽和度	1%飽和度
KYSE-510	細胞密度 at 0 day	50%飽和度	50%飽和度	50%飽和度
	細胞密度 at 10 day	120%飽和度	120%飽和度	120%飽和度
KYSE-70	細胞密度 at 0 day	70%飽和度	70%飽和度	70%飽和度
	細胞密度 at 10 day	120%飽和度	120%飽和度	100%飽和度
KYSE-170	細胞密度 at 0 day	50%飽和度	50%飽和度	50%飽和度
	細胞密度 at 10 day	120%飽和度	120%飽和度	100%飽和度

図4 培地中の牛血清濃度(FCS)濃度が食道癌培養細胞の増殖に与える影響

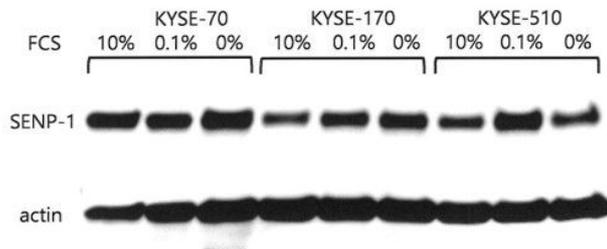


図5 培地中の牛血清濃度(FCS)濃度が食道癌培養細胞の SENP1 発現に与える影響

また、Real-time PCR を用いて FCS 10%の細胞と 5 日間の無血清培養の細胞との SENP1 発現について比較検討したところ、KYSE70, 170, 510 の全細胞において SENP1 発現量が無血清で培養すると 3~4 倍増加した。

(4) SENP1 蛋白の発現とポリユビキチン量

同様の条件で食道癌培養細胞 (KYSE70、KYSE150、KYSE510) を 3 種類の FCS 濃度 (10%、1%、0%) で培養後、細胞内のポリユビキチン量と SENP1 の発現量を検討した。その結果、KYSE70 でのみ SENP1 量とポリユビキチン量について僅かながら相関が認められた。またポリユビキチン量は、いずれの食道癌培養細胞も正常ヒト食道上皮細胞のより多く認められた。

(5) siRNA を用いた SENP1 遺伝子の発現抑制

SENP1 を特異的に抑制する siRNA (si-SENP1) を用いて SENP1 遺伝子の発現抑制の食道癌培養細胞 (KYSE70、KYSE170、KYSE510) の細胞増殖への影響について検討した。SENP1 遺伝子の発現抑制により KYSE70、KYSE510 でコントロール細胞に比べ細胞増殖の抑制傾向が認められたが、Non-targeting siRNA でも同様の作用が観察されたので引き続き検討が必要である。

(6) SENP1 遺伝子の発現抑制と抗腫瘍薬効果

si-SENP1 を用いて同じ条件下で SENP1 遺伝子の発現抑制を行い、さらに 0.05、0.5、5 μ M の CDDP を投与したところ、KYSE70、KYSE510 において CDDP の細胞増殖抑制効果が阻害される傾向が認められた。また同様に他の抗腫瘍薬の 1 μ M Docetaxel (DTX) 0.1 μ M 5FU の投与を行ったところ、DTX でも同様に細胞増殖抑制効果が阻害される傾向が認められた。

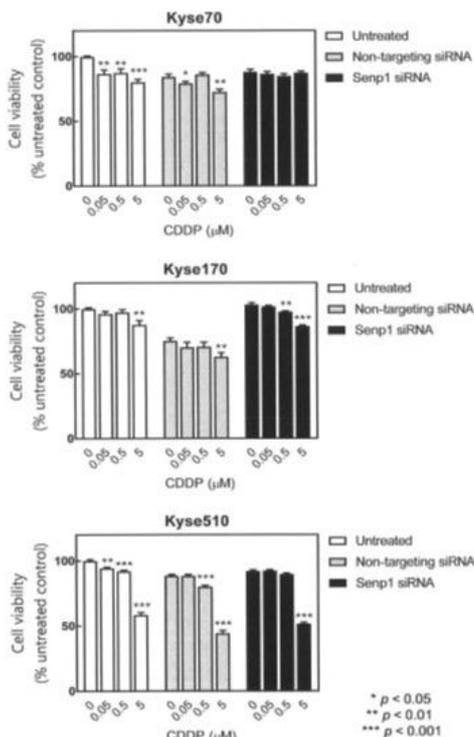


図6 si-SENP1 による SENP1 遺伝子の発現阻害が食道癌培養細胞の増殖、CDDP の抗腫瘍効果に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志田 敦男 (SHIDA Atsuo) (00338906)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	高田 耕司 (TAKADA Koji) (30179452)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	松本 晶 (MATSUMOTO Akira) (20366272)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	田中 雄二郎 (TANAKA Yujiro) (90408419)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	