

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501323

研究課題名(和文)がん細胞でのYB-1の機能解析と発現意義 統合的理解へ向けて

研究課題名(英文)Functional analysis and expression of YB-1 in cancer cells, for integrated understanding

研究代表者

河野 公俊 (KOHNO, Kimitoshi)

産業医科大学・名誉教授・名誉教授

研究者番号：00153479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：この研究で、我々はTOP01がYB-1の新しい会合分子であることを発見した。核内YB-1がTOP01との直接的な分子会合を介してTOP01の酵素活性を促進し、その阻害剤であるCPTの感受性も増強する事が分かった。また、臨床試料を用いてYB-1の発現を検討し、胃がんでは、YB-1発現レベルは、胃がんの組織病理分類ごとに、それぞれ異なる結果となった。YB-1はがん細胞と血管内皮細胞において胃癌の進展を促進し、YB-1が有力なバイオマーカーであることが示唆された。本研究に関する内容で、2015年2月には「腫瘍新生血管血管内皮細胞の新しいバイオマーカーとそれを標的とした癌治療薬」が特許登録された。

研究成果の概要(英文)：In this study, our findings suggest that YB-1 located in the nucleus serves as an intracellular promoter of TOP01 catalytic activity through direct interaction with TOP01, but meanwhile, it also enhances the sensitivity of TOP01 inhibitor camptothecin (CPT). In addition, we examined the expression of YB-1 in various solid tumors. In gastric cancer, the level of YB-1 expression significantly differed with respect to various histopathological classification. Nevertheless, YB-1 promotes cancer progression in both cancer cells and vascular endothelial cells, thus it is suggested to be a potential biomarker for gastric cancer. As an integrated achievement of the past studies related to this research theme, it has become a registered patent, "a new biomarker of tumor neovessels and its endothelial cells, and a cancer therapeutic drug that use it as the target." (Patent number: 5697010) in February, 2015.

研究分野：がんの分子生物学

キーワード：抗がん剤 がん化学療法 耐性 転写関連因子 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

YB-1 はコールドショックドメインタンパクファミリーの1つで MHC Class プロモーターの Y-box に結合する転写因子として同定された。我々は YB-1 が多剤耐性遺伝子 MDR1 のプロモーターに結合し転写制御することや抗がん剤耐性に関わることをはじめに示した。その後、転写のみならず、翻訳や DNA 修復、ストレス応答時に関わることを示してきた。一方、YB-1 はがん患者の予後に関わる重要な分子であることが我々をはじめ、国外からも報告されてきているが、最近臨床腫瘍においてがん細胞のみならず、がん新生血管の内皮細胞に高発現していることを見出した。

2. 研究の目的

そこで、がん細胞と血管内皮神経細胞等の正常細胞内とでの YB-1 の役割を統合的に理解するため、本研究の目的として：核内機能、会合分子解析、YB-1 結合 microRNA 解析、YB-1 の発現制御に関わる転写因子の解析 発達段階のヒトの標本での発現とその局在解析を進める。

3. 研究の方法

(1) YB-1 の N 末、CSD、C 末に分割クローニングし、核移行シグナルを融合した発現プラスミドを構築する。

(2) このプラスミドを用いて、核移行 YB-1 の安定発現がん細胞株を樹立し、増殖解析 (FACS 等) DNA 損傷シグナル解析、薬剤感受性解析等を進める。どのがん細胞を選択するかは、YB-1 全長の核内発現で増殖の促進がみられるがん細胞を用いる必要がある。

(3) ドメイン特異的発現細胞及び転写因子発現細胞を用いて、ドメイン特異的 YB-1 siRNA による発現抑制系を用いて YB-1 ドメイン依存性の増殖・上皮間葉転換等への関与を明らかにする。このレシプロカル実験で、YB-1 の機能ドメインの評価を行って確認す

る。

(4) 安定発現がん細胞を用いて、YB-1 の会合分子を免疫沈降で単離して、会合分子の同定と機能解析を進める。会合分子については、cDNA クローン化発現系、抗体等、準備して同様に機能解析を行う。臨床試料での発現解析：免疫組織染色に適したオリジナル抗体を作成し、様々な組織型のがん組織の免疫染色を行い、視点を変えた YB-1 の発現解析を病理学の共同研究者と討議した。

(5) YB-1 の転写制御因子として上皮間葉転換の責任分子であることが有力であり、これらの過剰発現細胞株を樹立し、YB-1 の発現レベルや局在を解析する。さらに、3D カルチャー系で増殖能・浸潤能や DNA マイクロアレイ解析を行う。さらに in vivo ノードマウス移植系での細胞増殖等の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 発現プラスミドの作成と機能解析 YB-1 の各ドメインもしくは隣り合う2つのドメインをカバーする発現プラスミドの作成を進めた。YB-1 の核内機能に関しても報告があることから、cDNA の C 末端に核移行シグナルを融合できるベクターに挿入した。ヒトがん細胞に導入しその発現について解析、発現を確認後、安定発現株の作成を開始した。乳がん細胞株 MCF7 は YB-1 のみならず dbpA と dbpC/Contrin を発現しており、コールドショックドメインタンパクファミリーすべてを発現しているユニークな細胞であるが、特異的 siRNA によるノックダウン実験の結果、YB-1 のみが細胞増殖に関与することが明らかとなり、成果をまとめている。

(2) YB-1 結合マイクロ RNA YB-1 の免疫沈降後、RNA を抽出し、マイクロ RNA の発現プロファイル解析をした。主たる結合マイクロ RNA は全く報告のない機能未知であり、発現ベクターを用いた、増殖解析を進めている。

(3) 臨床試料での発現解析 免疫組織

染色に適したオリジナル抗体をすでに作成していたので、視点を変えた発現解析を病理学の共同研究者と討議した。進行胃癌では YB-1 の強発現と肝転移がよく相関し、予後不良であることが判明した。また乳がん細胞株 MCF7 に YB-1 発現プラスミド導入株を作成した。YB-1 導入株では cMYC や HER2 の発現が亢進し、抗エストロゲン剤の感受性が低下した。一方ノックダウンではこれらの発現は低下するが逆に ER の発現が亢進した。導入株は細胞増殖 G1 期停止や細胞死は明らかに抑制されていた。一方 YB-1 は腫瘍新生血管内皮に発現することを以前報告したことから、血管内皮由来の腫瘍での発現とその意義について解析した

(4) 会合分子と機能解析 真核細胞の DNA トポイソメラーゼは、I 型 (TOP01) と II 型 (TOP02) が知られており、DNA 鎖の切断と再結合に関与する DNA 複製関連酵素である。一般的に増殖能の高い細胞で高発現しており、その阻害剤は抗がん剤として臨床で使用されている。我々は、今回 YB-1 が直接 TOP01 と分子会合して、TOP01 の酵素活性を促進することを見出した。がん細胞を TOP01 阻害剤カンプトテシン (CPT) で処理すると、YB-1 と TOP01 の間の分子会合は増加した。一方、TOP02 阻害剤アドリマイシンでは分子会合の増加は観察されなかった。この CPT 誘導性の分子会合増加は、抗酸化剤である N-アセチル・システインで前処理すると阻害された。さらに、siRNA で YB-1 の発現を抑制すると CPT に耐性を示した。これらの結果から、核内 YB-1 が TOP01 との直接的な分子会合を介して CPT 感受性を増強すると考えられた。

(5) 胃癌、肺癌、悪性中皮腫、婦人科腫瘍などの臨床試料を用いて、がん細胞と腫瘍間質細胞、血管内皮細胞での YB-1 の発現の解析も行った。臨床試料での発現解析胃がんの種々の組織型での YB-1 の発現に特徴があることから、その内、163 例胃癌患者の外科切

除標本に対しての分子病理学手法により解析を行い、YB-1 のがん細胞と腫瘍新生血管内皮細胞での発現が密接に関連していること、さらに癌の進行度と分化度及び肝転移などとの相関性も見出した。YB-1 の発現ががん患者の予後についての判断には有意なバイオマーカーであることを判明した。また、悪性胸膜中皮腫症例をモデルとして、組織型、臨床病理学マーカーと YB-1 の発現を検討した。特に YB-1 の発現を制御する上皮・間葉移行にかかわる転写因子 Twist を含め上皮・間葉移行にかかわるマーカーとともに解析しその結果を報告した。

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 7 件)

Y-box binding protein 1 expression in gastric cancer subtypes and association with cancer neovasculature.

Wu Y¹, Wang KY, Li Z, Liu YP, Izumi H, Yamada S, Uramoto H, Nakayama Y, Ito K, Kohno K.

Clin Transl Oncol. 2015 ;17(2):152-9. doi:10.1007/s12094-014-1208-4014-1208-4. Epub 2014 Jul 31. 査読あり

Y-box binding protein 1 enhances DNA topoisomerase 1 activity and sensitivity to camptothecin via direct interaction.

Wu Y^{1,2}, Wang KY³, Li Z⁴, Liu YP⁵, Izumi H⁶, Uramoto H⁷, Nakayama Y⁸, Ito K⁹, Kohno K¹⁰.

J Exp Clin Cancer Res. 2014;33(1):112. doi: 10.1186/s13046-014-0112-7,

査読あり

Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition-associated markers in malignant pleural mesothelioma.
Iwanami T¹, Uramoto H, Nakagawa M, Shimokawa H, Yamada S, Kohno K, Tanaka F.

Oncology. 2014;86(2):109-16. doi: 10.1159/000356874. 査読あり

Peroxiredoxins, thioredoxin, and Y-box-binding protein-1 are involved in the pathogenesis and progression of dialysis-associated renal cell carcinoma.

Fushimi F¹, Taguchi K, Izumi H, Kohno K, Kuwano M, Ono M, Nakashima Y, Takesue T, Naito S, Oda Y.

Virchows Arch. 2013;463(4):553-62. doi: 10.1007/s00428-013-1460-y. Epub 2013 Aug 2. 査読あり

Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer.

Hyogotani A¹, Ito K, Yoshida K, Izumi H, Kohno K, Amano J.

Clin Lung Cancer. 2012 ;13(5):375-84. doi: 10.1016/j.clcc.2011.11.006. Epub 2012 Jan 27. 査読あり

Alteration of Y-box binding protein-1 expression modifies the response to

endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer.

Ito T¹, Kamijo S, Izumi H, Kohno K, Amano J, Ito K.

Breast Cancer Res Treat. 2012;133(1):145-59. doi: 10.1007/s10549-011-1731-8. Epub 2011 Aug 24. 査読あり

Strong YB-1 expression is associated with liver metastasis progression and predicts shorter disease-free survival in advanced gastric cancer.

Wu Y¹, Yamada S, Izumi H, Li Z, Shimajiri S, Wang KY, Liu YP, Kohno K, Sasaguri Y.

J Surg Oncol. 2012;105(7):724-30. doi: 10.1002/jso.23030. Epub 2012 Jan 3. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

王 克鏞 YB-1とDNAトポイソメラーゼ1の分子会合とカンプトテシン感受性の分子会合とカンプトテシン感受性
第18回日本がん分子標的治療学会、2014年6月25 - 27日、
会場：仙台市情報・産業プラザ、宮城県仙台市

王 克鏞 Y-box binding protein 1 expression in gastric cancer
第104回日本病理学会 2015年4月30 - 5月2日
会場：名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計1件）

名称：腫瘍新生血管血管内皮細胞の新しいバイオマーカーとそれを標的とした癌治療薬

発明者：河野 公俊、笹栗 靖之、島尻 正平、和泉 弘人

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5697010 号

出願年月日：2009 年 10 月 26 日

取得年月日：2015 年 2 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者：河野 公俊 (KOHNO, Kimitoshi)

産業医科大学・名誉教授

研究者番号：00153479

(2) 研究分担者：笹栗 靖之 (SASAGURI, Yasuyuki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60140646

(3) 研究分担者：王 克鏞 (WANG, Ke-Yong)

産業医科大学・共同利用研究センター・准教授

研究者番号：30369053