

令和元年6月19日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08391

研究課題名(和文) STAT3シグナルにおけるVCP、UBL4A(GdX)の関与の検討

研究課題名(英文) Analysis of VCP and UBL4A involvement in STAT3 signaling

研究代表者

富田 裕彦 (tomita, yasuhiko)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：60263266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：VCPとUBL4Aの関連、STAT3との関係を明らかにすることが研究開始当初の目的であった。しかしUBL4Aの動態は通常の細胞株では再現性が乏しかった。よってVCP、UBL4Aの遺伝子改変モデルを用いた検討が適切と考え、VCP-conditional KOマウス、VCP-transgenic mouseを作製し、UBL4A-KOマウスとも検討を行うことにした。VCP-conditional KOマウス、VCP-transgenic mouseを作製し、UBL4A-KOマウスの復元には成功したので、表現型の検討を後続の検討として行う。がんの進展、リンパ節転移に関する臨床病理学的な検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VCPとUBL4Aの関連の検討は、モデルマウスの作製が必須と考え、作製には成功したが、研究期間内では、さらなる検討には至らなかった。後続の検討を行い成果を発表していきたい。
そのほか、がんに関する臨床病理学的検討を行い、乳がんのリンパ節転移を検出するOne-step nucleic acid amplification assayの有用性を明らかにし、中咽頭扁平上皮癌のHPV statusと治療効果の関係、食道腺癌のリンパ節転移に関与する因子、EGFR遺伝子変異を伴わない肺腺癌の進展に関与する因子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to clarify the correlation between VCP and UBL4A in the STAT3 signaling pathway. In the first step, analysis using cell lines was not reproductive. Then, analysis using gene-modified mouse was planned. VCP-conditional KO mouse, VCP-transgenic mouse were successfully made. In addition, clinic-pathologic analysis on cancer development and metastasis was performed.

研究分野：がんの進展

キーワード：VCP UBL4A STAT3 臨床病理学的検討

1. 研究開始当初の背景

我々は、Valosin-containing protein (VCP) mRNA 発現が抗アポトーシス性に関与すること、転移と密接な関係があることを報告した (Jpn. J Cancer Res. 2002)。引き続き、VCP 発現が、様々な腫瘍において転移、予後と関連した独立する予後因子であることを報告した。

VCP 転写調節機構についての検討を行い、Pre B cell leukemia transcription factor 1 (PBX1)が VCP 転写因子であることを示した (Am J Pathol. 2007)。一方、肺癌、食道癌、胃癌において、PBX1 ではなく、PBX2 が独立予後因子であった (Cancer Sci. 2009、Int. J Oncol. 2010)。

以上の検討結果により、PBX/TALE 群に属する転写因子の機能をより詳しく検討する必要があると考え、膵臓癌細胞株 Panc1 に対し PBX/TALE 群転写因子に対する small interfering RNA (siRNA)をトランスフェクションした後、mRNA マイクロアレイによる解析を行った。その結果、Meis1 siRNA による Meis1 発現低下によりミトコンドリア遺伝子の発現が低下したが、PBX1, PBX2, Prep1 に対する siRNA では低下しなかった (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011)。

VCP の働きに関しては、6 量体を形成し、ユビキチン化たんぱく質の分解に関与することが知られているが、それ以外の働きに関しては、十分に解明されているとはいえない。Shirogane らは、gp130 を介した STAT3 活性化シグナルに VCP が関与することを報告している (Shirogane T. et al. Immunity 1999)。

我々は、Yeast-two hybrid 法を用いて STAT3 特異的な制御因子である GdX (UBL4A)を見出した (Mol Cell 2014)。GdX は核内において非特異的な脱リン酸酵素である TC45 と STAT3 の結合を安定化させることにより STAT3 を不活化させた。大腸癌細胞において、GdX はリン酸化 STAT3 を減少させるとともに抗腫瘍効果を示し、逆に GdX の減少によりリン酸化 STAT3 の増加と腫瘍増殖性変化が認められた。臨床検体においては、核内の GdX 発現とリン酸化 STAT3 発現は逆相関を示した。大腸癌の臨床検体を用いた検討において、核内 GdX 発現低下とリン酸化 STAT3 発現亢進は予後不良因子であった。リン酸化 STAT3 発現と癌の悪性度に関しては多くの報告がある。大腸癌を含めたほとんどの癌においては、リン酸化 STAT3 発現は予後不良因子である一方 (Morikawa T. et al. Clin Cancer Res. 2011 等)、乳癌においては予後良好因子であると報告されている (Sheen-Chen SM. et al. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008 等)。我々の検討でも乳癌における核内 GdX 発現低下とリン酸化 STAT3 発現亢進が予後良好因子であることを確認している。一方、VCP に関しても多くの癌では予後不良因子である一方、乳癌においては予後良好のマーカーとして報告されている (Asaka S. et al. Surg, Today 2006)。我々はこの奇妙な一致に興味を持ち、STAT3-GdX と VCP の関与に関して検索したところ、GdX が Bag6 などとともに VCP の複合体を形成するとする報告を見出した (Wang Q. et al. Mol. Cell 2014)

2. 研究の目的

我々はこれまで Valosin-containing protein (VCP)が、抗アポトーシス性、転移に関連することを報告して来た。UBL4A(GdX)は STAT3 不活化に関与するが、VCP との関連も示唆されている。

UBL4A の細胞内動態には不明な点が多い。核内から細胞質内へ、あるいは、細胞質から核内へと UBL4A を移行させるモデルを構築し、VCP と UBL4A の関連、STAT3 との関係を明らかにすることが研究開始当初の目的であった。しかしながら、UBL4A の動態は通常の細胞株では再現性が乏しかった。よって、VCP, UBL4A の遺伝子改変モデルを用いた検討が適切と考え、VCP-conditional KO マウス、VCP-transgenic mouse を作製し、UBL4A-KO マウスとも検討を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) VCP- conditional KO マウスの作製

相同組み換えベクターを ES 細胞に導入し、G418 の選択により、組み換え ES 細胞クローンを得る。アグリゲーション法にてキメラマウスを作製し、野生型マウスと自然交配し、F1 産子を得る。

(2) VCP-transgenic mouse の作製

合成した VCPcDNA を sub-cloning し、ROSA26 トランスジェニック用ベクターに挿入し、相同組み換えベクターを作製する。エレクトロポレーション法にて ES 細胞に導入し、G418 の選択により、組み換え ES 細胞クローンを得る。アグリゲーション法にてキメラマウスを作製し、野生型マウスと自然交配し、F1 産子を得る。

(3) UBL4A-KO マウスの個体復元

UBL4A-KO マウスの精子を用いて、対外受精を行い、F1 産子を得る。

(4) がんに関する臨床病理学的検討

がんに関する臨床病理学的検討を行った。

乳がんのリンパ節転移を検出する One-step nucleic acid amplification assay の有用性の検討を行った。

中咽頭扁平上皮癌の HPV status と治療効果の関係を検討した。

初期食道腺癌のリンパ節転移に関する因子の検討を行った。

EGFR 遺伝子変異を伴わない肺腺癌の進展を検討した。

4. 研究成果

(1) VCP- conditional KO マウスの作製

相同組み換えベクターは IKMC project より購入した。相同組み換えベクターを制限酵素 Sal I で切断、精製の後エレクトロポレーション法にて ES 細胞に導入し、G418 による選択により、20 個の ES 細胞クローンを得た。PCR 法による確認でこのうち、13 個のクローンに目的の長さの PCR 産物を確認した。

得られたクローンのうち 3 個を用いてキメラマウスの作製を行った。ICR 系統の 8 細胞期胚を用い、アグリゲーション法にてキメラ胚を作製した。これらのキメラ胚を移植した受容雌マウスの出産予定日に出産を確認した。得られたマウスを離乳まで飼育し、離乳時に毛色によってキメ

ラ率を判定した。

キメラマウスを野生型マウスと自然交配させ、第1世代(F1)マウスを作製する。F1産子の体組織よりDNA抽出後、PCR法を用いて遺伝子型を判定した。17匹のうち、10匹がヘテロ接合体マウスであると判定した。

(2) VCP-transgenic mouse の作製

合成したVCPcDNAをsub-cloningし、ベクターからAstAI及び、AScIを用いて切り出した。これをROSA26トランスジェニック用ベクターに挿入し、PCR法にて確認した。相同組み換えベクターを制限酵素Pac1で切断、精製の後エレクトロポレーション法にてES細胞に導入し、G418による選択により、12個のES細胞クローンを得た。PCR法による確認でこのうち、11個のクローンに目的の長さのPCR産物を確認した。さらにneo耐性遺伝子断片をprobeとしたサザンブロット法にて想定されるDNA断片を確認した。

得られたクローンのうち3個を用いてキメラマウスの作製を行った。ICR系統の8細胞期胚を用い、アグリゲーション法にてキメラ胚を作製した。これらのキメラ胚を移植した受容雌マウスの出産予定日に出産を確認した。得られたマウスを離乳まで飼育し、離乳時に毛色によってキメラ率を判定した。

キメラマウスを野生型マウスと自然交配させ、第1世代(F1)マウスを作製する。F1産子の体組織よりDNA抽出後、PCR法を用いて遺伝子型を判定した。10匹のうち、5匹がヘミ接合体マウスであると判定した。

(3) UBL4A-KO マウスの個体復元

UBL4A-KOマウスの精子を用いて、対外受精を行い、10匹の を得た。

(4) がんに関する臨床病理学的検討

がんに関する臨床病理学的検討を行った。

乳がんのリンパ節転移を検出するOne-step nucleic acid amplification assayの有用性の検討
中咽頭扁平上皮癌のHPV statusと治療効果の関係を検討した。HPV statusにより治療効果が異なることを明らかにした。また中咽頭癌のp16染色性と予後との関連を検討した。

食道腺癌のリンパ節転移を検討し、粘膜内、粘膜下500ミクロン以下の浸潤で危険因子が無い場合、リンパ節転移の可能性が低いことを明らかにした。

EGFR遺伝子変異を伴わない肺腺癌の進展において、Her3が重要であることを明らかにした。
軟骨芽腫の臨床病理学的検討を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

Shimazu K, Tanei T, Tamaki Y, Saeki T, Osaki A, Hasebe T, Tomita Y, Daito M, Kobayashi M, Noguchi S. Performance of a new system using a one-step nucleic acid amplification assay for detecting lymph node metastases in breast cancer. Med Oncol. 2019 May 6;36(6):54

Yamamoto Y, Takemoto N, Michiba T, Seo Y, Isohashi F, Otani K, Suzuki M, Fujii T, Yoshii T, Mitani K, Yasui T, Cho H, [Tomita Y](#), Morii E, Teshima T, Ogawa K, Inohara H
Radiotherapy alone as a possible de-intensified treatment for human papillomavirus-related locally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2019 Jun;24(6):640-648.

Maekawa T, Fukaya R, Takamatsu S, Itoyama S, Fukuoka T, Yamada M, Hata T, Nagaoka S, Kawamoto K, Eguchi H, Murata K, Kumada T, Ito T, Tanemura M, Fujimoto K, [Tomita Y](#), Tobe T, Kamada Y, Miyoshi E. Possible involvement of Enterococcus infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Dec 2;506(4):962-969.

Ryu A, Ashimura JI, Nakayama T, Tamaki Y, Nakatsuka SI, [Tomita Y](#). Reliability of Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Expression on Breast Cancer Cells Stored in Cellprep® Vials. *Acta Cytol*. 2018;62(5-6):360-370.

Kida K, Terada T, Uwa N, Omori Y, Fujii T, [Tomita Y](#), Tsuzuki K, Nishikawa H, Sakagami M. Relationship Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer Undergoing Surgery. *In Vivo*. 2018 Jul-Aug;32(4):927-935

Piulats JM, Kondo J, Endo H, Ono H, Hagihara T, Okuyama H, Nishizawa Y, [Tomita Y](#), Ohue M, Okita K, Oyama H, Bono H, Masuko T, Inoue M. Promotion of malignant phenotype after disruption of the three-dimensional structure of cultured spheroids from colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018 Mar 23;9(22):15968-15983

Nishino K, Koda S, Kataoka N, Takamatsu S, Nakano M, Ikeda S, Kamamatsu Y, Morishita K, Moriwaki K, Eguchi H, Yamamoto E, Kikkawa F, [Tomita Y](#), Kamada Y, Miyoshi E. Establishment of an antibody specific for cancer-associated haptoglobin: a possible implication of clinical investigation. *Oncotarget*. 2018 Jan 29;9(16):12732-12744.

Kashiwagi N, Nakatsuka SI, Murakami T, Enoki E, Yamamoto K, Nakanishi K, Chikugo T, Kurisu Y, Kimura M, Hyodo T, Tsukabe A, Kakigi T, [Tomita Y](#), Ishii K, Narumi Y, Yagyū Y, Tomiyama N. MR imaging features of mammary analogue secretory carcinoma and acinic cell carcinoma of the salivary gland: a preliminary report. *Dentomaxillofac Radiol*. 2018 Jul;47(5):20170218.

Kumagai T, [Tomita Y](#), Nakatsuka SI, Kimura M, Kunimasa K, Inoue T, Tamiya M, Nishino K, Susaki Y, Kusu T, Tokunaga T, Okami J, Higashiyama M, Imamura F. HER3 expression is enhanced during progression of lung adenocarcinoma without EGFR mutation from stage 0 to IA1. *Thorac Cancer*. 2018 Apr;9(4):466-471.

Kanesaka T, Uedo N, Yao K, Ezoe Y, Doyama H, Oda I, Kaneko K, Kawahara Y, Yokoi C, Sugiura Y, Ishikawa H, Takeuchi Y, Arao M, Iwatsubo T, Iwagami H, Matsuno K, Muto M, Saito Y, [Tomita Y](#). Multiple convex demarcation line for prediction of benign depressed

gastric lesions in magnifying narrow-band imaging. Endosc Int Open. 2018 Feb;6(2):E145-E155.

Konishi E, Nakashima Y, Mano M, Tomita Y, Kubo T, Araki N, Morii E, Yoshikawa H, Haga H, Toguchida J, Ueda T, Osawa M, Hoshi M, Inoue T, Aono M, Yanagisawa A.

Chondroblastoma of extra-craniofacial bones: Clinicopathological analyses of 103 cases. Pathol Int. 2017 Oct;67(10):495-502.

Yamasaki Y, Uedo N, Kanzaki H, Kato M, Hamada K, Aoi K, Tonai Y, Matsuura N, Kanesaka T, Yamashina T, Akasaka T, Hanaoka N, Takeuchi Y, Higashino K, Ishihara R, Tomita Y, Iishi H. Investigation of mucosal pattern of gastric antrum using magnifying narrow-band imaging in patients with chronic atrophic fundic gastritis. Ann Gastroenterol. 2017;30(3):302-308.

Matsuura N, Takeuchi Y, Yamashina T, Ito T, Aoi K, Nagai K, Kanesaka T, Matsui F, Fujii M, Akasaka T, Hanaoka N, Higashino K, Tomita Y, Ito Y, Ishihara R, Iishi H, Uedo N.

Incomplete resection rate of cold snare polypectomy: a prospective single-arm observational study. Endoscopy. 2017 Mar;49(3):251-257

Ishihara R, Oyama T, Abe S, Takahashi H, Ono H, Fujisaki J, Kaise M, Goda K, Kawada K, Koike T, Takeuchi M, Matsuda R, Hirasawa D, Yamada M, Kodaira J, Tanaka M, Omae M, Matsui A, Kanesaka T, Takahashi A, Hirooka S, Saito M, Tsuji Y, Maeda Y, Yamashita H, Oda I, Tomita Y, Matsunaga T, Terai S, Ozawa S, Kawano T, Seto Y. Risk of metastasis in adenocarcinoma of the esophagus: a multicenter retrospective study in a Japanese population. J Gastroenterol. 2017 Jul;52(7):800-808.

6. 研究組織

研究協力者

久保 千明、Chiaki Kubo、大阪府立国際がんセンター 病理・細胞診断科 医員 研究者番号 なし

北村 昌紀、Masanori Kitamura、大阪府立国際がんセンター 病理・細胞診断科 医員 研究者番号 なし

小谷 将太、Syonta Kotani、大阪府立成人病センター（現大阪府立国際がんセンター） 病理・細胞診断科 研究員 研究者番号 なし

i 岸田 澪華、Mioka Kishida、大阪府立国際がんセンター 病理・細胞診断科 医師 研究者番号 なし