

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：17501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K08406
研究課題名(和文) 胃癌悪性化におけるDDX27発現亢進の機能的意義

研究課題名(英文) Overexpression of DDX27 in gastric cancer

研究代表者

塚本 善之 (Yoshiyuki, Tsukamoto)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に染色体20q13領域にコードされたDDX27遺伝子が胃癌の進行に伴うゲノム増幅により過剰発現することを発見した。本研究ではDDX27の過剰発現が胃癌細胞にどのような影響を与えているか明らかにすることを目的とした。本研究の開始までに我々はDDX27過剰発現が胃癌患者の予後と相関すること、胃癌細胞のコロニー形成能に寄与していること、を既に明らかにしていた。本研究では、DDX27が1)生体における腫瘍形成に関与すること、2)細胞分裂を制御すること、3)リン酸化Aktを介してシグナル伝達に影響すること、を明らかにした。これらの研究成果は胃癌の心筋分子標的治療法の開発に貢献すると確信する。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that DDX27 gene is amplified and overexpressed with the progress of gastric carcinogenesis. In this project, we aimed to determine whether DDX27 contributes to malignancy of gastric cancer. Before we started this project, we found that expression of DDX27 is related to colony formation of gastric cancer cells and patients' survival. In this project, we analyzed the impact of DDX27 knockdown on gastric cancer cells and found that 1) DDX27 contributes to tumor formation in vivo, 2) DDX27 regulates cell cycle of gastric cancer cells and 3) DDX27 regulates phosphorylation of Akt. These results contribute to establish a novel molecular targeted therapy in gastric cancer. We reported these data in American Journal of Cancer Research.

研究分野：分子病理学

キーワード：胃癌 DDX27

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの研究グループが胃癌の網羅的遺伝子異常解析を実施し、多数の標的候補分子を同定してきた。しかし、未だに胃癌の効果的な分子標的治療は確立されていない。この原因として、多数の標的候補の中から実際に胃癌の悪性化を促進させる遺伝子異常を選び出すのが困難であることが考えられる。早期胃癌は悪性度が低く、切除術が効果的であるのに対し、進行胃癌は転移・再発の頻度が高く、外科手術だけでなく補助的な治療も必要である。従って、胃癌において分子標的治療を確立させるためには、「複雑な遺伝子異常の中から、悪性化に直接関与する遺伝子異常を同定することが重要である。」と考えた。

このような視点で我々は、早期胃癌 20 症例と進行胃癌 30 症例についてアレイ CGH によりゲノムコピー数を網羅的に解析した。さらに進行胃癌 30 症例については、ゲノム異常に伴い異常発現する遺伝子およびマイクロ RNA を網羅的に解析している。これらの解析により、我々は胃癌の発生および進行時期に蓄積される様々な遺伝子異常を同定した。

特に、早期胃癌に比べて進行胃癌で有意に高頻度に検出される染色体 20q13 領域のゲノム増幅に注目し、そこに存在する胃癌関連遺伝子のスクリーニングを行った結果、DDX27 を候補として同定した。さらに、DDX27 の過剰発現が胃癌の予後不良と関連することを発見した。siRNA を用いた DDX27 の発現抑制実験では、DDX27 が胃癌細胞のコロニー形成能に重要な役割を果たしていることを示した。以上の実験結果から、20q13 ゲノム増幅に伴い発現亢進する DDX27 は胃癌の悪性度に関与するとの仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、上述の仮説を証明するため、

- ・ DDX27 過剰発現が個体レベルでの腫瘍形成に与える影響を明らかにすること
 - ・ DDX27 が治療標的となり得るか明らかにすること
 - ・ DDX27 がどのように癌化能を発揮するかメカニズムを明らかにすること
- を目的とした。

3. 研究の方法

DDX27 が腫瘍形成に与える影響

DDX27 に対する誘導性 shRNA 発現胃癌細胞株のマウス移植モデルを確立し、DDX27 発現が個体での腫瘍形成に重要であるか、明らかにした。

1) DDX27 に対する誘導性 shRNA (TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA, Thermo

Scientific 社) を 44As3 細胞へ導入し、ピューロマイシンでセレクションすることで、shRNA をドキシサイクリン依存的に誘導できる細胞株を樹立した (44_DDX27Ish)。44As3 は 20q13 領域がゲノム増幅しており DDX27 が発現亢進していることを既に確認していた。

2) 作製した細胞株 5×10^6 個を 100 μ l の 1xPBS へ懸濁し、免疫不全マウスの皮下へ移植した。

3) 経時的にノギスで腫瘍容量を測定した。

4) 一定の大きさに達したら、移植マウスを 2 群に分け、Control 群はショ糖液を、ノックダウン群はショ糖液+ドキシサイクリンを飲料水として与えた。

DDX27 過剰発現が胃癌細胞のアポトーシス誘導、細胞周期に与える影響の解析

DDX27 がどのようなメカニズムで胃癌細胞の腫瘍形成能に関与するか明らかにするため、DDX27 発現抑制後にアポトーシス誘導能および細胞周期を解析した。

1) 胃癌細胞株 AGS および 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA を導入して 72 時間後に Cell Death Detection ELISA PLUS (ロッシュ社) にてアポトーシス誘導を測定した。

2) 胃癌細胞株 AGS および 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA を導入して 96 時間後に細胞を 70%EtOH で固定した。固定した細胞を Propidium iodide (PI) で染色し、FACS calibur flow cytometer (BD 社) にて細胞周期を測定した。

3) 胃癌細胞株 AGS および 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA を導入して 72 時間後に Cell Proliferation ELISA BrdU kit (ロッシュ社) にて DNA 合成の割合を測定した。

DDX27 過剰発現がタンパク合成およびプレリボソーム RNA 合成に与える影響の解析

DDX27 は核小体に存在する。核小体の主な役割はタンパク質合成である。

1) 胃癌細胞株 AGS および 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA を導入して 48 時間後に RNA を回収し、プレリボソーム RNA 量を qRT-PCR にて定量した。

2) 胃癌細胞株 AGS および 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA を導入して 72 時間後に放射性メチオニンで細胞を 30 分ラベルし、タンパク質ライセートを回収した後、SDS-PAGE でタンパク質を分離し、ラベル化されたタンパク質を定量した。

DDX27 が関与するシグナル伝達経路の探索

胃癌細胞株 44As3 へ DDX27 を標的とした siRNA およびコントロールオリゴを導入し、72 時間後にそれぞれの導入細胞のライセートを回収した。このライセートを用いて、リン酸化タンパク質アレイを行った (Proteome Profiler Arrays, R&D systems 社)。

DDX27 の個体発生における役割

これまでに DDX27 の個体レベルでの機能は明らかにされていなかった。そこで DDX27 ノックアウトマウスを International Mouse Phenotyping Consortium で購入し、DDX27 ノックアウトマウスの解析を行った。

4. 研究成果

DDX27 は個体における腫瘍形成能に重要である

DDX27 に対する shRNA を胃癌細胞株 44As3 へ導入し、ヌードマウスへ移植した。導入された shRNA はドキシサイクリンにより発現誘導され、標的の mRNA 発現を抑制する。その結果、DDX27 を発現抑制した 44As3 は個体における腫瘍形成が抑制された(図 1)。この結果は DDX27 が個体における腫瘍形成に必要であることを示唆する。

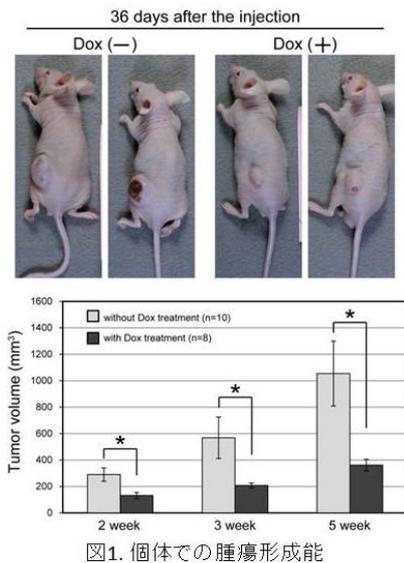


図1. 個体での腫瘍形成能

DDX27 は胃癌細胞株の抗アポトーシス能ではなく、細胞周期の進行を制御する

次に、DDX27 がどのようなメカニズムで腫瘍形成能に関与するか明らかにするため、DDX27 発現抑制がアポトーシス誘導能、細胞周期、DNA 合成、に与える影響を調べた。その結果、DDX27 の発現抑制はアポトーシス誘導には影響が無く、細胞周期の遅延を引き起こしていた(図 2)。さらに、DNA 合成の割合が低下することが分かった。これらの結果は、DDX27 がアポトーシスではなく、DNA 合成を介した細胞周期制御に関与することを示唆する。

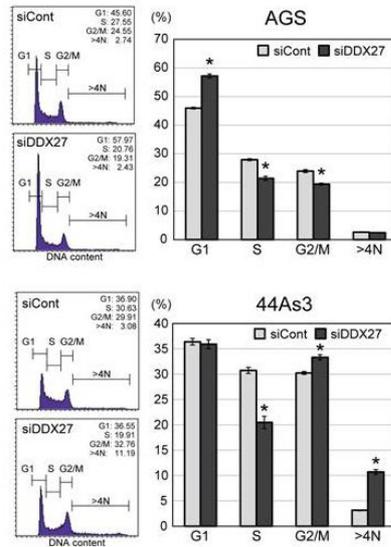


図2. 細胞周期解析

DDX27 は核小体に存在するが、胃癌細胞においてプレリボソーム RNA とタンパク質合成には貢献していない。

我々は細胞免疫染色により、DDX27 が核小体に局在することを発見した。核小体の主な役割はリボソーム RNA の合成とタンパク質合成である。そこで、我々は DDX27 がリボソーム RNA 合成もしくはタンパク質合成で機能するかもしれない、と仮説を立てた。この仮説を証明するため、AGS および 44As3 細胞で DDX27 をノックダウンし、プレリボソーム RNA およびタンパク質合成への影響を解析した。その結果、DDX27 の発現抑制はいずれの合成にも影響を与えないことが分かった(図 3)。これらの結果は、DDX27 は核小体に局在するが、リボソーム RNA 合成やタンパク質合成には関与していないことを示唆する。

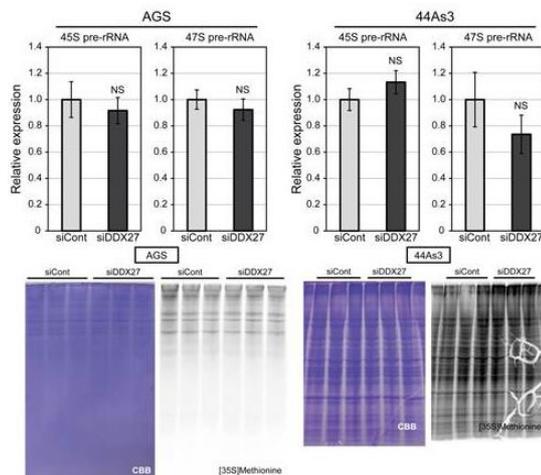


図3. プレリボソーム RNA 合成とタンパク質合成

DDX27 は Akt のリン酸化を制御する

次に、DDX27 がどのようなメカニズムで癌化能に寄与するか明らかにするため、4As3 細胞で DDX27 をノックダウンし、シグナル

伝達タンパク質のリン酸化を解析した。その結果、DDX27の発現抑制はAKTのリン酸化低下を引き起こすことが分かった(図4)。



図4.リン酸化アレイおよびウェスタンブロット

以上の研究成果より、DDX27が胃癌においてゲノムコピー数の増幅とともに過剰発現し、癌細胞の悪性化に寄与することが示唆された。さらに、そのメカニズムとして既知の癌遺伝子であるAKTのリン酸化を制御することが示唆された。このように、我々のデータはDDX27が胃癌の新規標的分子であり、新しい治療法の開発へつながる可能性を示している。現在、DDX27を直接制御する低分子化合物は開発されていない。しかし、今回明らかとなったDDX27の標的であるAKTに対する低分子化合物は既に存在し、臨床応用へ向けた試験も行われている。したがって、DDX27が過剰発現している胃癌患者へAKT阻害効果が認められるか、明らかにすることが今後の新しい治療法開発へつながると考えている。

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9件)

1. Tsukamoto Y, Hirashita Y, Moriyama M (全14名).

Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer.

2015, Am J Cancer Res. 査読有
15;5(10):2998-3014. eCollection.

2. Narimatsu T, Tsukamoto Y, Moriyama Y (全14名).

Downregulation of NDUFB6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma.

2015, Cancer Med. 査読有
Jan;4(1):112-24. doi: 10.1002/cam4.351.

3. Takahashi M, Tsukamoto Y, Moriyama Y (全13名)

Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma.

2016, Cancer Sci. 査読有

Apr;107(4):417-23. doi: 10.1111/cas.12892.

4. Kai T, Tsukamoto Y, Moriyama M (全16名)

Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway.

2016, J Pathol. 査読有
May;239(1):97-108. doi: 10.1002/path.4706.

5. Hirashita Y, Tsukamoto Y, Moriyama M (全16名)

Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells.

2016, Cancer Sci 査読有
Dec;107(12):1919-1928.
doi: 10.1111/cas.13094.

6. Hijiya N, Tsukamoto Y, Moriyama M (全19名)

Genomic Loss of DUSP4 Contributes to the Progression of Intraepithelial Neoplasm of Pancreas to Invasive Carcinoma.

2016, Cancer Res 査読有
May 1;76(9):2612-25.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1846.

7. Hijiya N, Tsukamoto Y, Moriyama M (全11名)

Overexpression of cannabinoid receptor 1 in esophageal squamous cell carcinoma is correlated with metastasis to lymph nodes and distant organs, and poor prognosis.

2017, Pathol Int 査読有
Feb;67(2):83-90. doi: 10.1111/pin.12495.

8. Fujishima H, Tsukamoto Y, Moriyama M (全9名)

A 17-molecule set as a predictor of complete response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in esophageal cancer.

2017, PLoS One 査読有
Nov 14;12(11):e0188098.
doi: 10.1371/journal.pone.0188098.

9. Ichimanda M, Tsukamoto Y, Moriyama M (全11名)

Downregulation of dual-specificity phosphatase 4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas.

2018, Cancer Sci 査読有
Jan;109(1):250-258. doi: 10.1111/cas.13444.

[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〕

大分大学分子病理学のホームページ
<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 善之 (TSUKAMOTO, Yoshiyuki)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00433053

(2)研究分担者

守山 正胤 (MORIYAMA, Masatsugu)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90239707

平下 有香 (HIRASHITA, Yuka)
大分大学・医学部・医員
研究者番号：70771955