

令和元年6月19日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19912

研究課題名(和文)胆道癌移植モデルを用いた脱ユビキチン化酵素の機能解析と新規薬物療法の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of deubiquitinating enzyme in bile cancer using xenograft model

研究代表者

石田 晶玄(Ishida, Masaharu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90619660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌のうち、特に予後が不良である肝内胆管癌と胆嚢癌において、脱ユビキチン化酵素であるBAP1の遺伝子変異が多く認められることを、臨床手術検体において明らかにした。BAP1の遺伝子変異は、癌組織におけるBAP1タンパク発現の低下に関連しており、BAP1遺伝子の低発現症例は、高発現症例に比べて、予後が不良であることを示した。BAP1の機能解析は癌細胞株を用いて行い、BAP1の発現低下により細胞の遊走能と浸潤能が増加することを示した。一方で増殖能には有意な差は認めなかった。臨床検体から胆道癌の樹立を行い、現在までのところ3系統が樹立されており、遺伝子の網羅的解析を施行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌、特に胆嚢癌や肝内胆管癌は、胆道癌のなかでも予後が特に不良であり、また日本人に多く認められるため、本邦における研究は特に重要である。本研究は、脱ユビキチン化酵素であるBAP1が胆嚢癌において、海外の少数症例を対象とした研究に比べて、高頻度に変異していることを精度の高い方法で示し、またその変異が予後と関係していることを証明した。細胞株を用いた実験ではBAP1の発現低下が、癌の遊走能と浸潤能を増加させていることを示し、治療のターゲットとなり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：It was clarified in clinical surgery specimens that gene mutations of BAP1, which is a deubiquitinating enzyme, are frequently found in intrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder cancer. The gene mutation of BAP1 was associated with a decrease in BAP1 protein expression in cancer tissue, and cases with low expression of BAP1 gene showed a poor prognosis compared to high expression cases. Functional analysis of BAP1 was performed using a cancer cell lines, and it was shown that the decrease in BAP1 expression increases the cell migration ability and infiltration ability. On the other hand, there was no significant difference in proliferation ability.

Biliary tract cancers were cultured from clinical samples, and 3 lines have been established so far, and comprehensive analysis of genes was performed.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆嚢癌 遺伝子変異 脱ユビキチン化酵素 胆道癌

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は、消化器癌では特に予後不良な癌の一つであり、胆道癌の中でも特に肝内胆管癌や胆嚢癌は、生命予後が不良である。胆道癌は、胃癌や大腸癌に比べ症例数が少なく、診断・治療の開発は遅れており、新たな診断・治療法の開発は喫緊の課題である。

肝内胆管癌などにおいてBAP1などのクロマチンリモデリング複合体遺伝子の変異が報告されており、BAP1低下症例では予後不良な傾向を認めるとされる。一方でBAP1に代表されるクロマチンリモデリング複合体遺伝子異常と癌との明らかな関連は詳細に検討されていない。

報告者は、これまで肝内胆管癌においてBAP1遺伝子の発現低下が、腫瘍悪性度の増加に関連していることを細胞レベル、また臨床検体にて示し、また抗癌剤感受性への関与を明らかにしてきた。BAP1などのクロマチンリモデリング複合体遺伝子は、胆道癌の進展および治療に関して重要な遺伝子と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クロマチンリモデリング複合体遺伝子の胆道癌における意義について解明することである。抗癌剤の感受性との関連を明らかにすることで、新たな治療法の開発を目的とした。

胆道癌は、乳頭癌、胆管癌、肝内胆管癌、胆嚢癌が含まれるが、その中でも特に日本人に多く、海外での診断・治療法開発が進みにくい胆嚢癌を主な対象とした。

3. 研究の方法

胆道癌細胞株におけるクロマチンリモデリング複合体遺伝子の発現を抑制することにより、細胞機能の変化を解析する目的で、siRNAを用いたノックダウンを行った。ノックダウンモデルに対して、MTSアッセイによる細胞増殖能、スクラッチアッセイによる遊走能、マトリゲルチャンバーを用いた浸潤能を評価し、コントロールと比較を行った。

また、ノックダウンモデルに対して、胆道癌に対して使用される抗癌剤(5-FU, ゲムシタピンなど)や、クロマチン複合体に異常がある場合に効果があると報告されるトリコスタチン、バルプロ酸に対する薬剤感受性試験を行い、クロマチンリモデリング複合体の発現抑制の薬剤感受性における影響を検討した。

胆道癌細胞株と、手術により摘出した胆道癌標本の遺伝子解析を行い、クロマチンリモデリング複合体遺伝子のシーケンスを行い、遺伝子異常や欠失の有無を検索した。また手術により摘出した胆道癌症例の標本を免疫抑制マウスに移植し、xenograftモデルの作成を行った。

胆道癌症例におけるクロマチンリモデリング複合体遺伝子の発現を免疫染色にて評価して、臨床予後との比較を行った。

4. 研究成果

クロマチンリモデリング複合体遺伝子であるBAP1の発現抑制をsiRNAを用いて行い、発現低下をRNAレベルは定量的PCRにて、タンパクレベルはウェスタンブロットにて確認し、発現抑制モデルを作成した。発現抑制モデルを用いて機能解析を行ったところ、増殖能に大きな違いはないが、遊走能・浸潤能が上昇することを明らかにした。肝内胆管癌、胆嚢癌においては、初めての知見である。

発現抑制モデルを用いて、抗癌剤感受性への影響も解析した。一般に胆道癌に対して使用される抗癌剤に関しては、クロマチンリモデリング複合体遺伝子の発現低下は影響を及ぼさないが、プロテオソーム阻害剤に対しては感受性が低下する結果を得た(図1)。

胆嚢癌の症例においてBAP1遺伝子の解析を行ったところ、過去の少数の報告よりもはるかに多い頻度で遺伝子変異があることを発見した(図2)。遺伝子変異の形式に関しては決まった傾向はなく、そのほとんどが遺伝子発現を低下させる変異であった。その結果タンパクレベルにおけるBAP1発現が低下していることを示した。

胆嚢癌症例に対して、BAP1抗体による免疫染色を行った(図3)。発現強度により高発現例、低発現例の2群に分けて解析を行ったところ、BAP1の発現低下が予後と関連していることを明らかにした(図4)。

上記の研究結果は、論文報告を行っている。クロマチンリモデリング複合体遺伝子の胆嚢癌に関する知見はほぼなく、本研究が初めてのまとまった症例を対象とした報告である。

Xenograftモデルの作成を行い、樹立を行っている。

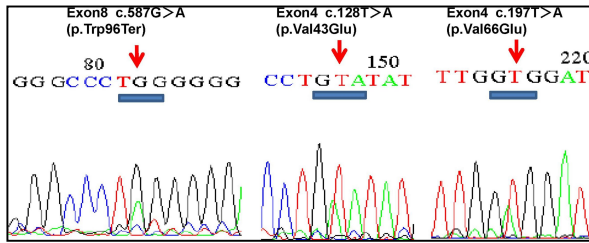


図 1

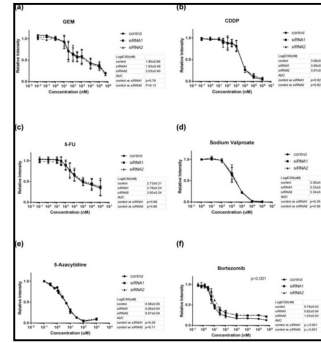


図 2

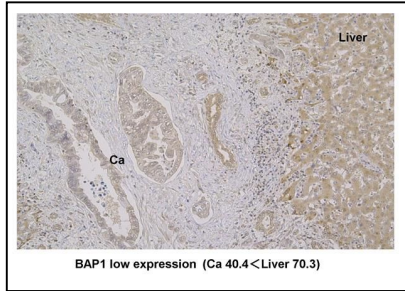


図 3

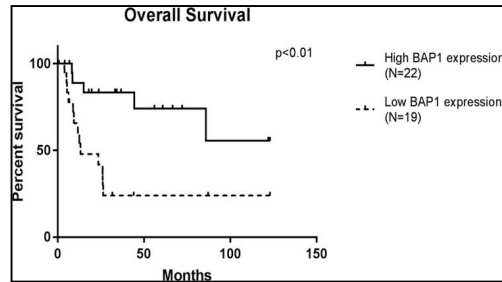


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

PLoS One 誌に論文報告を行った。(13 (11) 2018 年)

Loss of BAP1 expression is associated with genetic mutation and can predict outcomes in gallbladder cancer.

Hirosawa T, Ishida M, Ishii K, Kanehara K, Kudo K, Ohnuma S, Kamei T, Motoi F, Naitoh T, Selaru FM, Unno M.

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。