

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09154

研究課題名(和文) 消化器癌進展におけるE3ユビキチンリガーゼ発現異常の役割解明

研究課題名(英文) Evaluation of the role of E3 ubiquitin ligase in the progression of gastrointestinal cancers

研究代表者

右田 和寛 (Migita, Kazuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40570990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌切除標本を抗RNF135特異抗体を用いて免疫組織染色を行った。176例中171例(97.2%)の腫瘍において、RNF135の発現を認めた。RNF135高発現例は低発現例と比較し生存期間は有意に短く、RNF135発現レベルは独立予後規定因子であった。ヒト胃癌細胞株MKN45、MKN74のRNF135発現をsiRNAでノックダウンした。RNF135ノックダウン細胞株はコントロールと比較して、腫瘍細胞のG2/M期での細胞周期停止が誘導され、有意に細胞増殖が抑制された。以上の結果から、胃癌においてRNF135は臨床的意義を有するだけでなく、腫瘍の増殖に関与し、治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はユビキチンシステムにおいて中心的役割を担うE3ユビキチンリガーゼに着目し、胃癌進展におけるその異常の意義・役割を検討した。E3ユビキチンリガーゼであるRNF135はヒト胃癌組織で過剰発現しており、独立した予後規定因子となるなど臨床的意義を有することが判明した。また、発現レベルは胃癌細胞の増殖能と関連することが明らかとなった。本研究の成果はユビキチンシステム異常を介した消化器癌進展の解明、新たな癌治療開発の礎となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of Ring finger protein 135 (RNF135) in the progression of gastric cancer. In the immunohistochemical analyses, the RNF135 was expressed in 171 (97.2%) of 176 gastric cancers. The patients with a RNF135-high tumor had a significantly lower overall survival rate than the patients with a RNF135-low tumor. Multivariate analysis identified the RNF135 status as an independent prognostic factor. We further investigated the roles of RNF135 in vitro using a small interfering RNA (siRNA). RNF135 gene silencing significantly inhibited the proliferation of human gastric cancer cells, MKN45 and MKN74, through the G2/M cell cycle arrest. Our findings indicate that RNF135 might have a clinical significance in gastric cancer and play an important role in regulating the proliferation of gastric cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：E3ユビキチンリガーゼ RNF135 胃癌

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はタンパク質翻訳後修飾系であり、細胞周期・シグナル伝達・転写調整などあらゆる生命現象を制御しており、その異常は癌を含め様々な疾患と関連することが示されてきた。最近では、RING finger protein 135 (RNF135)等のE3ユビキチンリガーゼが乳癌や脳腫瘍等の悪性腫瘍で過剰発現していることが確認された。種々の研究で、これらの発現・機能異常は腫瘍細胞内のDNA修復や種々のシグナル伝達、細胞周期制御、上皮間葉転換に深く関与し、腫瘍進展に重要な役割を担うことが示唆されている。しかしながら、現在までのところ、消化器癌におけるRNF135等のE3ユビキチンリガーゼ異常の意義は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌を対象として、ユビキチン修飾系異常を介した癌の進展機序を包括的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

◎臨床検体を用いた検討

術前未治療の胃癌症例176例の切除標本を抗RNF135特異抗体を用いて免疫組織染色を行った。腫瘍におけるRNF135陽性率を算出し、臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。

◎in vitro実験系での腫瘍におけるRNF135の役割の解明

ヒト胃癌細胞株のRNF135発現をRNA干渉法を用いてノックダウンし、細胞増殖アッセイ(CellTiter-Blue Cell Viabilityアッセイ)、フローサイトメトリーを行った。

4. 研究成果

◎臨床検体を用いた検討

176例中171例(97.2%)の腫瘍において、RNF135の発現を認めた(図1)。腫瘍におけるRNF135発現割合が50%以上を高発現群(n = 101, 57.4%)、50%未満を低発現群(n = 75, 42.6%)とし、臨床病理学的因子との関連を検討したところ、RNF135発現レベルは組織型と有意な関連を認めた(表1)。

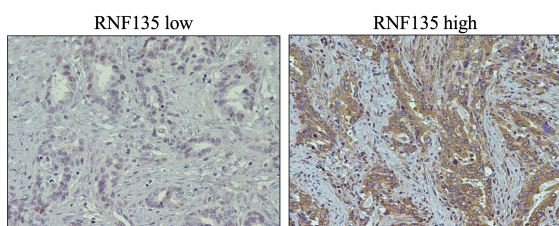


図1 RNF135免疫組織染色

RNF135発現と術後全生存との関連を検討した。高発現群は5年全生存率57.9%と低発現群76.3%に比べ有意に予後不良であった(図2A、 $P = 0.01$)。また、疾患特異的生存率においても高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であった(図2B、 $P = 0.027$)。多変量解析の結果、RNF135発現は独立予後規定因子であった(表2、ハザード比1.711、95%信頼区間1.027-2.851、 $P = 0.039$)。

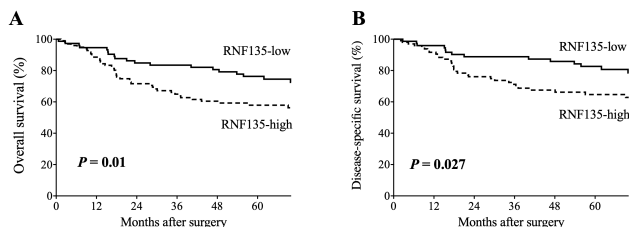


図2 RNF135発現レベルと術後生存

Ki67免疫組織染色を行い、RNF135発現と腫瘍細胞増殖能との関連を検討した。RNF135高発現腫瘍は低発現腫瘍と比較して、Ki67陽性率は高率な傾向にあった(23.4% VS. 20%、 $P = 0.076$)。

以上のことから、RNF135は胃癌患者の予後、胃癌細胞の増殖に関連し、RNF135発現は臨床的意義を有することが示唆された。

◎in vitro実験系での腫瘍におけるRNF135の役割の解明

胃癌細胞株MKN1、MKN7、MKN45、MKN74、KatoIIIのRNF135発現をreal-time PCRを用いて検討

表1 RNF135発現レベルと腫瘍関連因子

Variables		RNF135-low (n = 75, %)	RNF135-high (n = 101, %)	P value
Histology	Differentiated	31 (41.3)	62 (61.4)	0.008
	Undifferentiated	44 (58.7)	39 (38.6)	
Tumor size (mm)	<50	46 (61.3)	66 (65.3)	0.584
	≥50	29 (38.7)	35 (34.7)	
Tumor depth	T1, T2	39 (52)	41 (40.6)	0.133
	T3, T4	36 (48)	60 (59.4)	
Lymph node metastasis	Negative	31 (41.3)	34 (33.7)	0.297
	Positive	44 (58.7)	67 (66.3)	
Distant metastasis	Negative	73 (97.3)	95 (94.1)	0.258
	Positive	2 (2.7)	6 (5.9)	
Lymphatic invasion	Negative	14 (18.7)	17 (16.8)	0.752
	Positive	61 (81.3)	84 (83.2)	
Venous invasion	Negative	50 (66.7)	53 (52.5)	0.059
	Positive	25 (33.3)	48 (47.5)	

表2 多変量生存解析

Variables		Hazard ratio (95% CI)	P value
Tumor size (mm)	≥50<50	1.879 (1.146-3.081)	0.012
Tumor depth	T3, T4/T1, T2	1.486 (0.847-2.607)	0.167
Lymph node metastasis	Positive/negative	2.079 (1.158-3.73)	0.014
Distant metastasis	Positive/negative	4.065 (1.653-10)	0.002
Venous invasion	Positive/negative	1.7 (1.01-2.861)	0.046
RNF135 expression	High/low	1.711 (1.027-2.851)	0.039

した (図 3A)。発現レベルが高い MKN45、MKN74 の RNF135 発現を siRNA を用いてノックダウンした (図 3B)。細胞増殖アッセイを行ったところ、いずれの細胞株においても、RNF135 発現ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、有意に増殖が抑制された (図 4)。FACS による細胞周期解析の結果、RNF135 発現ノックダウンにより G2/M 期細胞の割合が有意に増加した (図 5)。

以上の結果から、RNF135 は細胞周期調整などを介して胃癌細胞の増殖能に関与することが示唆された。

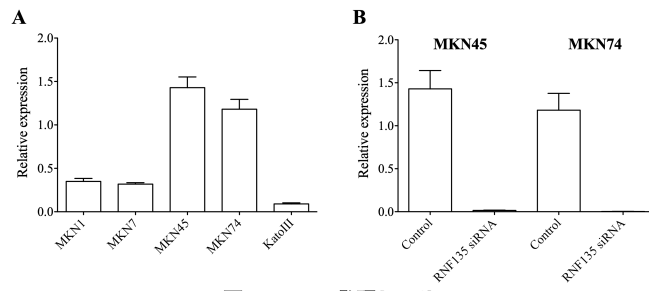


図3 RNF135発現レベル

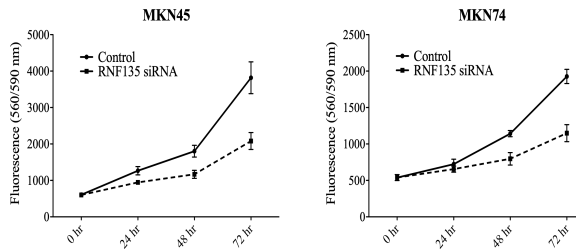


図4 RNF135発現と増殖能

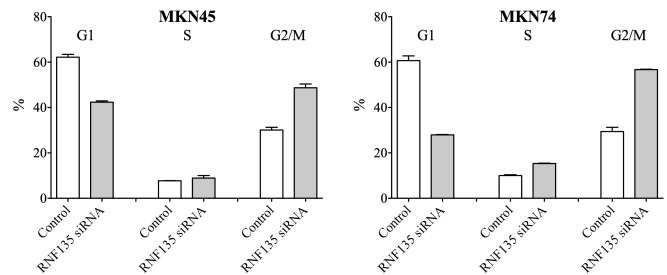


図5 細胞周期解析

これらの結果から、RNF135 は腫瘍細胞の増殖能に関与し、胃癌患者の予後に影響を与える可能性が示唆された。RNF135 は新たな癌治療の標的となりうると考えられる。

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	中出 裕士 (Nakade Hiroshi) (90745796)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	國重 智裕 (Kunishige Tomohiro) (70745801)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	宮尾 晋太郎 (Miyao Shintaro) (00833708)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関