

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18128

研究課題名（和文）ユビキチン修飾系を標的とした新規食道癌治療法の臨床導入を目的とした研究

研究課題名（英文）Clinical significance of ubiquitin proteasome system in esophageal cancer

研究代表者

國重 智裕（Kunishige, Tomohiro）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70745801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：RING box protein-1(RBX1)はSCF-ユビキチンリガーゼの構成タンパク質の一つである。術前未治療食道癌120例の切除検体を免疫染色にてRBX1発現の臨床的意義を検討した。壁深達度、リンパ節転移、腫瘍径、リンパ管侵襲、静脈侵襲において発現率に有意な差を認め、RBX1高発現は独立した予後不良因子であった。ヒト食道細胞株のRBX1発現をノックダウンすると、増殖能は有意に抑制され、5-FUの増殖抑制効果が増強された。術前化学療法後検体61例の検討では、RBX1高発現群は予後不良であった。RBX1は食道癌に対し臨床的意義を有し、腫瘍の進展において重要な役割を担っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、発癌および癌の進展におけるユビキチンシステム異常の重要性が明らかにされてきている。食道癌は、他癌腫に比べエビデンスを認めた抗癌剤の数は少なく、切除不能例や術後再発例の治療法の選択に苦慮することも多い。よって、本研究では食道癌における飛躍的な予後の改善のためにユビキチン・プロテアソームシステムの中心的役割を担うE3ユビキチンリガーゼの一つであるSCF複合体に着目し、従来の抗癌剤がターゲットにしている機序とは異なる新たな観点から、難治癌である食道癌の進展機序を解明し、新規治療標的としての可能性について検証した。

研究成果の概要（英文）：RING box protein-1(RBX1) is an essential component of the SCF ubiquitin ligases. We examined 120 esophageal cancer (EC) patients who underwent curative esophagectomy and 61 EC patients who underwent neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-FU (DCF) by immunohistochemistry. The RBX1 expression level showed significant differences according to the tumor size, tumor depth, lymph node metastasis, pathological stage, lymphatic invasion, and venous invasion. A multivariate analysis identified the RBX1 status as an independent prognostic factor of overall survival (OS). RBX1 gene silencing inhibited the proliferation of human EC cells and enhanced the antitumor effect of 5-FU. Among patients who underwent neoadjuvant DCF therapy, the RBX1-high group had a significantly lower OS rate than the RBX1-low group. In conclusion, RBX1 has significant prognostic value. RBX1 may play an important role in the tumor progression of EC.

研究分野：消化器癌

キーワード：ユビキチンプロテアソームシステム 食道癌 胃癌

1. 研究開始当初の背景

早期診断や手術技術の向上，新規抗癌剤や分子標的薬の開発等により癌治療は飛躍的な進歩をとげ，多くの癌腫において治療成績は向上している．しかしながら，難治性消化器癌においては依然として切除不能進行症例も多く，また治癒切除後であってもある一定の確率で再発をきたし，一度再発をきたすと既存の治療法では治療限界が存在する．そのなかでも食道癌は，他癌腫に比べエビデンスを認めた抗癌剤の数は少なく，切除不能例や術後再発例の治療法の選択に苦慮することも多い．近年，発癌および癌の進展におけるユビキチンシステム異常の重要性が明らかにされてきている．RING box protein-1(RBX1)は SCF-ユビキチンリガーゼの構成タンパク質の一つであり，その過剰発現が癌細胞の増殖や再発に関連していると報告されている．しかし，RBX1 と食道癌の関係について詳細な報告はまだ認めていない．

2. 研究の目的

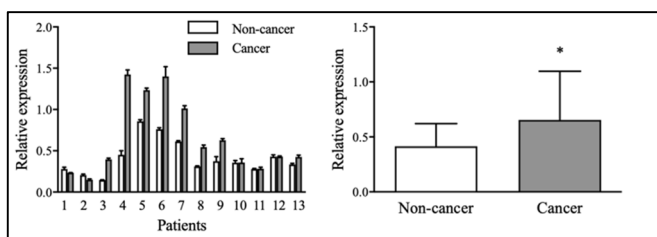
食道癌を対象として，癌の進展における RBX1 の役割を解明する．また新規癌治療法としての有用性を検証し，治療標的としての意義を明らかにすることを本研究の目的とする．

3. 研究の方法

1995 年から 2011 年に根治的切除を受けた術前未治療食道癌 120 例の切除標本を抗 RBX1 特異抗体で免疫組織染色を行い，臨床病理学的因子，予後との関連を検討した．さらに RNA 干渉法を用いてヒト食道細胞株 TE-1,TE-6 の RBX1 発現をノックダウンし RBX1 発現と増殖能との関連を検討した．また，術前化学療法後の切除標本 61 例での検討も行なった．

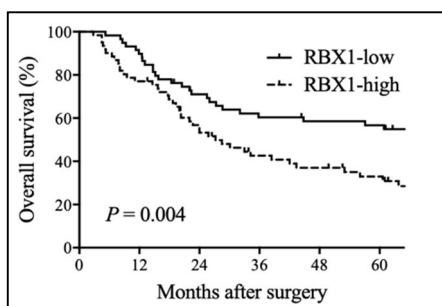
4. 研究成果

癌部非癌部での RBX1 mRNA の発現



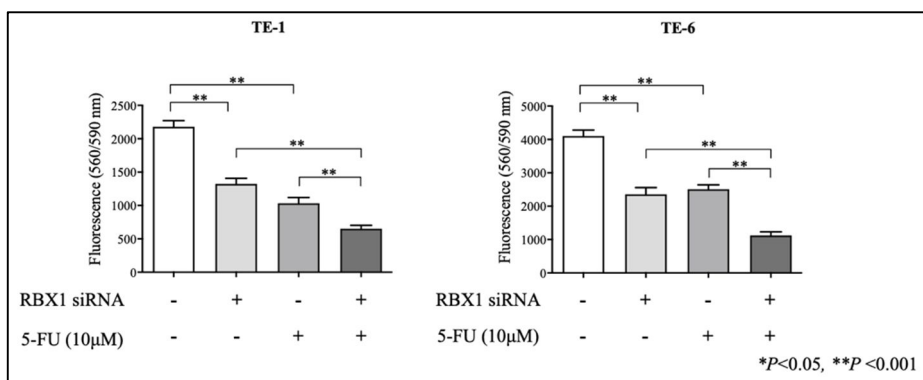
PCR にて RBX1 mRNA は癌部で有意に発現していることを確認した．

術前未治療の食道癌切除標本を用いた臨床学的意義の検討



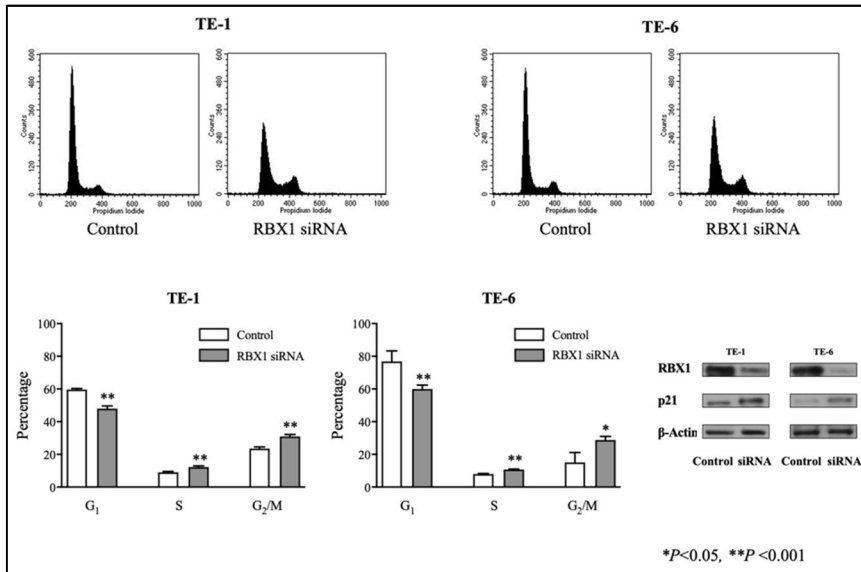
抗 RBX1 抗体を用いて免疫染色を行った．平均 RBX1 陽性率は $65.1 \pm 24.8\%$ であった．臨床病理学的因子との関連を検討したところ，壁深達度(pT1-2 58.5 % v.s. pT3-4 72.0 %, $P = 0.002$)，リンパ節転移(陰性 56.8 % v.s. 陽性 70.6 %, $P = 0.004$)，腫瘍径(<50mm 60.0 % v.s. ≥ 50 mm 75.0 %, $P < 0.001$)，リンパ管侵襲(陰性 51.7 % v.s. 陽性 70.4 %, $P = 0.001$)，静脈侵襲(陰性 59.6 % v.s. 陽性 74.0 %, $P = 0.001$) において発現率に有意差を認めた．陽性率 63% をカットオフ値とし high 群 ($n = 80$) と low 群 ($n = 40$) に分類したところ，5 年全生存率は high 群 37.9 %，low 群 58.6 % と high 群は有意に予後不良であった($P = 0.003$)．また，多変量解析でも RBX1 高発現は独立した予後不良因子であった．

RNA 干渉法を用いたヒト食道細胞株での検討



siRNA を用いて RBX1 をノックダウンすると増殖能が有意に抑制された．さらに，5-FU と併用することにより，その増殖抑制効果が増強された．

FACS による機序の解明

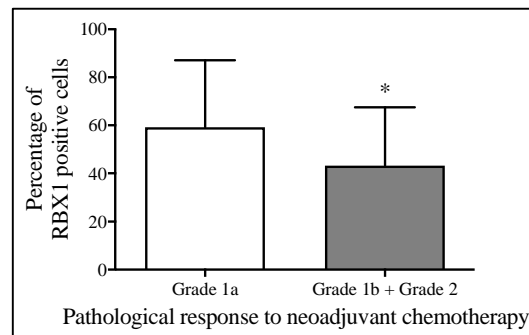
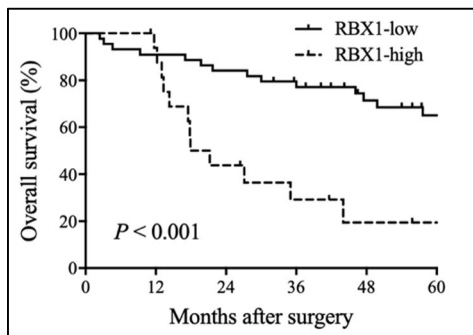


Control と siRNA によって RBX1 を ノックダウンした細胞株を用いて FACS を行い、G₂/M 期での細胞周期停止が誘導されていることが確認された。

さらに、Western blot にて RBX1 を ノックダウンすることにより、p21 が蓄積することがわかった。

術前化学療法後の切除検体を用いた検討

術前化学療法後切除標本 60 例を抗 RBX1 抗体を用いて免疫染色を行い、予後の評価を行なったところ、RBX1 高発現群は有意に予後が不良であった。さらに、化学療法の効果と RBX1 の発現率には関連があることがわかった。



以上の から の検証より、RBX1 は食道癌の進展において重要な役割を担っており、新たなバイオマーカーや治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunishige Tomohiro, Migita Kazuhiro, Matsumoto Sohei, Wakatsuki Kohei, Nakade Hiroshi, Miyao Shintaro, Kuniyasu Hiroki, Sho Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Ring box protein-1 is associated with a poor prognosis and tumor progression in esophageal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2919 ~ 2927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國重 智裕
2. 発表標題 食道癌におけるRING box protein-1(RBX1)発現の臨床的意義
3. 学会等名 第120回 外科学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------