

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17698

研究課題名（和文）食道癌におけるWNTシグナル～ベータカテニンを介さないTCF活性のメカニズム

研究課題名（英文）WNT Signaling in Esophageal Cancer - Mechanism of TCF Activity without Beta-catenin

研究代表者

藤幡 士郎 (Fujihata, Shiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：10825483

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）：食道癌臨床検体171例における β -cateninの発現と予後や病理学的因子に関して、免疫染色を施行し、比較検討した。 β -cateninの発現量と予後に関連がある傾向はみられたが、有意な結果は得られなかった。また、細胞実験においては食道癌細胞は正常食道細胞と比べて β -cateninの発現が多くみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討では有意差は認められなかったが、食道癌においては β -cateninの発現量が予後に関連する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We compared the expression of β -catenin with prognostic and pathological factors in 171 clinical specimens of esophageal cancer by immunostaining, and found a trend toward an association between β -catenin expression and prognosis, but no significant results. In cellular experiments, esophageal cancer cells expressed more β -catenin than normal esophageal cells.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 β -catenin

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは発生の過程で種々の臓器の形成を制御し、出生後は臓器の恒常性の維持に関与する。大腸癌や肝癌においてはβカテニンが核へ異常蓄積することによって Wnt シグナルが伝達され転写因子 TCF を活性化し、下流遺伝子の発現が上昇することが知られている。食道癌ではβカテニンの核への蓄積症例は少数であり、従来 Wnt シグナルは活性化していないと考えられてきたが、我々は食道癌臨床検体を用いた予備実験で、免疫染色で転写因子 TCF4 の核強陽性症例を約半数に認め、食道癌細胞株での TCF 転写活性が大腸癌と同等であることを突き止めた。つまりβカテニンの核移行を必要としない Wnt シグナル活性化のメカニズムがある可能性がある。βカテニン異常蓄積のない癌腫に対する研究として大きな進歩になり得る。

2. 研究の目的

本研究の目的は食道癌で Wnt シグナルが活性化しているか否かを明確にすることと、何が TCF4 の転写活性をあげているのかを同定することである。Wnt シグナルが癌化に関与するのは大腸癌、肝癌など一部の癌のみとされている。βカテニンの核移行の少ない食道癌でも、Wnt シグナルが On になっていることを示す。TCF4 は核内で LEF1 と複合体を形成し、Bcl9、Pygo、CBP などの転写を活性する補助因子とともにβカテニンと結合し転写に関与する。特に Bcl9、Pygo、CBP などのタンパクが結合することでシグナルが活性化されるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

食道癌臨床検体 200 例、食道癌細胞株 TE シリーズ、KYSE シリーズ、及び食道正常細胞株 Het-1A を用いて免疫染色を行う。カテニン、TCF4、LEF1、Bcl9、Pygo の各々の一次抗体を用いて status を解析する。臨床検体 80 例程度、TE シリーズ 10 株程度のカテニン免疫染色は行っており、症例と細胞株の種類を増やしカテニンに関わるその他の分子においても発現を把握したい。TCF4 と LEF1 についてはカテニンと核内で結合することが知られているが、カテニンが核内に蓄積していない細胞での status を確認する。臨床検体に関し予後など臨床病理学的因子との比較検討も可能で、各因子と Wnt シグナル分子の有効性関連を検討する。

Wnt シグナルの活性の証明は転写因子 TCF4 の転写活性を確認することである。TCF4 はカテニンや LEF1 と結合し活性化され、TCF の Binding site に結合し下流遺伝子の発現を誘導する。そのため、TCF の Binding site をベクターに組み込んだ TOPFlash を用い、TCF が Binding site に結合したらルシフェラーゼを発現する原理を利用して細胞の TCF 活性を測定する。既に測定済の細胞株に加え、食道癌細胞株 KYSE シリーズも測定したい。予備実験では SW480 以外の大腸癌細胞株と食道癌 TE シリーズはほぼ同等であった。

Wnt シグナルの下流遺伝子として最も有名な遺伝子は CyclinD1 である。一方、食道癌では CyclinD1 の発現が高値であることが知られている。我々の仮説は CyclinD1 の高発現に Wnt シグナルの活性化が関係している、というものである。そのため、まず CyclinD1、c-Myc、などの既知の Wnt シグナル下流遺伝子について、定量 RTPCR で臨床検体と細胞株での発現を確認したい。その上で、実験 1 で施行した TCF4 結合蛋白の免疫染色と比較検討した

い。

4 . 研究成果

食道癌臨床検体 109 例および食道癌細胞株 TE シリーズ、KYSE シリーズを用いて、それぞれ β -catenin、TCF4、LEF-1 の免疫染色を施行した。臨床検体に関しては β -catenin および TCF4、LEF-1 に関して高発現群と低発現群とに分類し、それぞれの予後を比較検討した各遺伝子の発現量と予後あるいは T 因子 N 因子など病理学的因子との間に明らかな相関や有意差は認めなかった。さらに 2016 年～2020 年までの 62 例の臨床検体を追加し、同様に免疫染色を施行した。各遺伝子の発現量と予後あるいは T 因子 N 因子など病理学的因子との関連性に関して検討したが有意差は特にみられなかった。細胞実験に関しては食道癌細胞株 TE シリーズ、KYSE シリーズおよび食道正常細胞である Het1A を用いて、それぞれ β -catenin、TCF4、LEF-1、Bcl9、Pygo のおのこの発現量を調べた。遺伝子レベルでの発現量を調べるため、RT-PCR を施行し、タンパクレベルでの発現を調べるため、ウエスタンブロットリング および免疫染色を施行し、解析した。食道癌細胞シリーズは Het1A と比べ、 β -catenin の発現が若干多くみられた。

今回の研究では食道癌において Wnt シグナルが活性化していることを明確にすることはできなかった。

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

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