

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390252

研究課題名（和文） ユビキチンリガーゼ Fbw7 によるタンパク質分解制御からの胆道癌発現機序解明

研究課題名（英文） Analysis of carcinogenic mechanism of biliary tract cancer from the protein control by ubiquitin ligase Fbw7

研究代表者

片寄 友（KATAYOSE YU）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20302151

研究成果の概要（和文）：胆道癌発症における Fbw7 の役割を解明するべく、胆管癌細胞株の Fbw7 の遺伝子変異を検討し  $\alpha$ ・ $\beta$ ・ $\gamma$  の 3 種の isoform が存在し特に  $\gamma$  の発現量はすべての細胞株で優位に低いことを突き止めた。次に、胆道癌のタンパク分解制御を解明するため、Fbxw7 コンディショナルノックアウト（CKO）マウス由来の胎仔線維芽細胞（MEF）により検討し、CDK インヒビターは、Fbxw7 による蛋白分解システムによる複雑な制御を受けていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The gene variation of Fbw7 of a biliary tract cancer cell line was considered, three sorts of isoform(s) of alpha-beta-gamma existed, and especially the expression level of gamma traced that it was low in predominance by all the cell strains in order to solve the role of Fbw7 in a biliary tract cancer occurrence. Next, in order to solve protein control of a biliary tract cancer, the Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) of Fbxw7 conditional KO (CKO) mouse, CDK inhibitor showed clearly to have received the complicated control by the proteolytic mechanism by Fbxw7.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,540,000	6,370,000	16,310,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆道癌、ユビキチンリガーゼ、Fbw7

### 1. 研究開始当初の背景

生体のホメオスタシス維持にはタンパク質分子の細胞内局在を含めた時空間的な発現制御が必須であり、タンパク質の量的調節には分解速度が大きく寄与することが認識されるようになってきている。特にユビキチン・プロテアソーム系は基質特異的にたんぱ

く質を分解することからその重要性が注目されている<sup>(1)</sup>。基質特異性はユビキチンを付与するユビキチンリガーゼによって発揮される。本研究課題で取り上げる Fbw7 は多くの癌細胞で変異が見つかっており癌抑制遺伝子と考えられ<sup>(2, 3)</sup>、CyclinE、c-Myc、Notch など癌遺伝子産物と結合、ユビキチン化し分

解を促進することをわれわれのグループなどが報告した<sup>(4)</sup>。2.の研究目的に記載したとおり胆道癌では約35%に変異が見つかるが、変異に伴う生物学的特性についての解析は行われていない。本研究課題では、胆道癌において Fbw7 変異がタンパク質の発現量を調節しているのか、その場合、発がんにどのような役割を果たしているかを解明する。具体的には、① ヒト胆道癌細胞株における Fbw7 変異と基質タンパク質の蓄積を示し、細胞生物学的解析を行う。② ヒト病理組織検体より Fbw7 の変異と基質タンパクの蓄積を解析、臨床病理学的検討を行う、③ マウスにおいて胆管上皮特異的に Fbw7 不活性化を行い、胆管癌マウスモデルを作製し、病理学的解析を行うと同時に治療法開発の端緒とする。

### (1) 学術的背景

胆道癌は、胆道系に発生する悪性腫瘍の総称であり、肝外胆管癌・胆のう癌・十二指腸乳頭部癌に大別される。世界的には日本をはじめとした東アジアに多く、本邦においては、東北地方、特に宮城県は全国でも有数の胆道癌症例が多い県である。

胆道癌はしばしば閉塞性黄疸を機に診断されるが、有症状時には進行癌となっていることも多く、進行癌の予後は不良であり、現在外科的切除以外に根治治療が期待できる治療法は存在しない。その発症機序として、p53、p16、p27、p57、SMAD4、Ras、AKT、c-Myc などの多くの腫瘍抑制遺伝子の不活性化型変異、癌遺伝子の活性化型変異は報告されているものの、胆道癌モデル動物が存在しないこともあり、これらの変異が、腫瘍発生や進行、予後への関与の仕方は明らかではなく、生物学的な解明が遅れている。

一方、われわれ及び他のグループがユビキチンリガーゼとして報告した Fbw7 はサイクリン E、c-Myc、Notch、c-Jun などの癌遺伝子産物とリン酸化依存的に結合し、それらをユビキチン化することにより時空間特異的分解を行なっている。また、胆道癌、T細胞性白血病など多くのがんでは不活性化型変異が報告されていることから癌抑制遺伝子であると考えられている<sup>(2, 3)</sup>。

研究分担者中山らは、Fbw7 ノックアウトマウス (KO) の作製を行い機能解析を行っていた。Fbw7KO マウスでは、胎生中期に血管形成異常のため死亡し、遺伝子変異の発癌への寄与について考察できなかった。但し、KO マウスは胎生中期に Notch-4 の異常蓄積が観察され、この時期における Fbw7 の機能は血管内

皮細胞における Notch-4 の分解と結論している<sup>(4)</sup>。

別のグループはこのヘテロ欠損マウス (Fbw7+/-) は、放射線誘導により腫瘍発生を誘導すること、p53 KO マウスと交配させた Fbw7+/- p53+/- マウスは癌化がより高まることを報告し、生体内において Fbw7 が癌抑制遺伝子として機能していることを明らかにした<sup>(5)</sup>。

### 2. 研究の目的

そこで我々は、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウス (CKO) を作製し<sup>(6)</sup>、その解析を行ったところ、①未熟な Tリンパ球での過剰な増殖②成熟リンパ球では抗原刺激依存的によるアポトーシスの発生③胎仔線維芽細胞における増殖停止<sup>(7)</sup>④表皮角化細胞における過剰な増殖と分化の亢進が観察されている。また遺伝子変異に伴い観察されるタンパク質の過剰蓄積も組織依存性であり、Fbw7 は組織特異的な機能を有することが示唆される。そこで本研究課題では、胆道癌において Fbw7 変異の臨床病理学的意義を明らかにするために、基質タンパク質の蓄積と細胞増殖やアポトーシスの異常を中心に細胞、組織レベルから個体レベルまで解析し、胆道癌におけるタンパク質分解が発がん果たす役割を明らかにする

FBW7 について現在発表されている論文 (3) では、FBW7 の mutation の原発腫瘍別には、乳癌 1/122、膀胱癌 0/20、胆管癌 7/20、大腸癌 3/31、肝癌 0/12、肺癌 1/38、黒色腫 0/20、卵巣癌 0/32、前立腺癌 0/83、胃癌 8/52 であり、胆管癌は 35%であり、現在わかっている癌腫では、高率に FBW7 の mutation を認めた。

1. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(5):369-81.
2. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 2008;8(2):83-93.
3. Akhondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res* 2007;67(19):9006-12.
4. Tsunematsu R, Nakayama K, Oike Y, Nishiyama M, Ishida N, Hatakeyama S, et al. Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. *J Biol Chem* 2004;279(10):9417-23.

5. Mao JH, Perez-Losada J, Wu D, Delrosario R, Tsunematsu R, Nakayama KI, et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* 2004;432(7018):775-9.
6. Onoyama I, Tsunematsu R, Matsumoto A, Kimura T, de Alboran IM, Nakayama K, et al. Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* 2007;204(12):2875-88.
7. Ishikawa Y, Onoyama I, Nakayama KI, Nakayama K. Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. *Oncogene* 2008.

### 3. 研究の方法

#### (1)胆道癌細胞株における Fbw7 変異と異常蓄積タンパクの同定

胆道癌は発生部位の解剖学的な問題から進行癌では手術適応とならないことも多く、臨床検体から大量の癌細胞採取は困難である。また、高度な増殖を誘導できる培養条件はいまだ確立されておらず、また、マウスへの生着も悪いことから、細胞株の樹立は極めて難しい。しかし、われわれは過去に多数の細胞株の樹立に成功しており、細胞生物学および生化学的解析に成功し、現在当科で樹立した細胞株を含む 14 種類(6 種は本学医用細胞センター管理、8 種は理化学研究所バイオリソースセンターより購入)の極めて多くの胆道癌細胞株を保有し、常時数種類の細胞株を用いて実験を行っている。

まず 14 種類の胆道癌細胞株よりゲノミック DNA を抽出する。そこで、PCR SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法により異常バンドが認められれば、さらに DNA シーケンスによって Fbw7 遺伝子の変異有無、配列を確認する。合わせて胆道癌で変異が多数報告されている p53、p16<sup>Ink4a</sup>、p14<sup>Arf</sup> の変異も確認する。

確認された Fbw7 野生株、変異株を用いて immunoblotting を行い、Fbw7 の基質である CyclinE、c-Myc、Notch、c-Jun のタンパク質発現量を比較し、異常なタンパク質の蓄積の有無を調べる。

#### (2)病理組織検体における Fbw7 変異と基質タンパク蓄積の同定

われわれは、現在 200 症例以上のホルマリン固定パラフィン切片胆道癌病理組織検体を有している。また、現在年間 40 例(平成 19

年度)の胆道癌手術を施行しておりその数は日本有数の施設である。手術摘出標本は平成 18 年 6 月 19 日に本学倫理委員会に承認を得て、原則全例を RNA 抽出用、タンパク抽出用、凍結切片用に保存、定期的に total RNA と genomic DNA の形で保存している。現在胆道癌 80 例の検体の収集を終了しており使用可能な状態である。

このような凍結保存標本より癌部、非癌部組織から抽出したゲノミック DNA を用い、PCR-SSCP 法により異常バンドを検出、異常バンドを DNA シーケンスにより Fbw7 の変異を検出する。合わせて p53、p16<sup>Ink4a</sup>、p14<sup>Arf</sup> の変異を明らかにする。Fbw7 の基質であるサイクリン E、c-Myc、Notch 等のたんぱく質発現量を免疫染色によって評価し、Fbw7 の変異にもなう基質分子蓄積の関連を調べる。

また、長期観察症例の中から臨床経過が明らかであり予後が判明しているパラフィン包埋病理組織検体を用い、Laser Capture microdissection (LCM) 法により、癌部、非癌部を分別して採取し、同上の検索を行うことで Fbw7 変異の有無を解析する。合わせて LCM 法により採取した癌部、それに対応する正常部を用い、ティッシュアレイ法を用い、サイクリン E、c-Myc、Notch 等の基質分子のたんぱく質発現量を解析し、Fbw7 の変異と基質タンパク質蓄積の関連、臨床学的予後との相関を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 胆道癌細胞株における Fbw7 遺伝子変異の検索・発現量解析 (図 1)

胆道癌発症における Fbw7 の役割を解明するべく、胆管癌細胞株 5 種類 (HuCCT1, TFK-1, HuH28, IHGGK, TKKK) について、Fbw7 の遺伝子変異を検討したところ、HuCCT1 において Fbw7 の遺伝子変異を認めた。また、発現量の差を調べるために定量的 PCR を行ったと

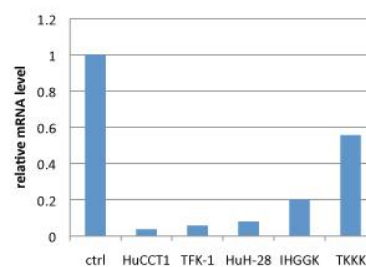


図 1

ころ、細胞株間で優位な発現量の差は認めら

れなかった。Fbw7 の  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$  の 3 種の Isoform 毎の発現量を比較したところ、 $\alpha \cdot \beta$  がすべての細胞株で同等に発現していたのに対し、 $\gamma$  の発現量はすべての細胞株で優位に低かった。

(2) 胆道癌のタンパク分解制御を解明するため、はじめにユビキチンリガーゼFbxw7に着目し検討した。Fbxw7コンディショナルノックアウト (CKO) マウス由来の胎仔線維芽細胞 (MEF) では、基質であるNotch1の細胞内ドメイン (NICD1) とc-Mycの蓄積により、細胞周期停止が誘導された。しかしながら、NICD1 とc-Mycの蓄積が、細胞周期停止を引き起こすメカニズムは明らかにはされておらず、Fbxw7欠損MEFにおけるCDKインヒビターの発現を解析したところ、p27Kip1 と p57Kip2の発現量が奇妙にも減少していることが分かった (図2、3)。

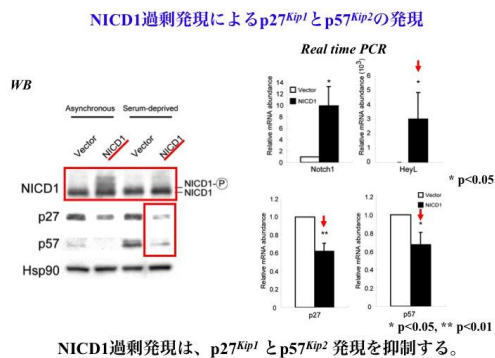


図2



Fbxw7<sup>Δ/Δ</sup>MEFにおいて、p27<sup>Kip1</sup>とp57<sup>Kip2</sup>の発現抑制を認めた。

図3

MEFにおけるp19ARFの発現上昇は、c-Mycの過剰発現で再現でき、c-Mycのノックアウトにより回復した。これらのことから、p19ARFの増加はc-Mycの蓄積によるものであると思われた。それとは異なり、p16Ink4aの発現上昇は、c-Mycに依存しなかった (図4)。これらの結果は、CDKインヒビターは、Fbxw7による蛋白

分解システムによる複雑な制御を受けていることを示している。(図5)

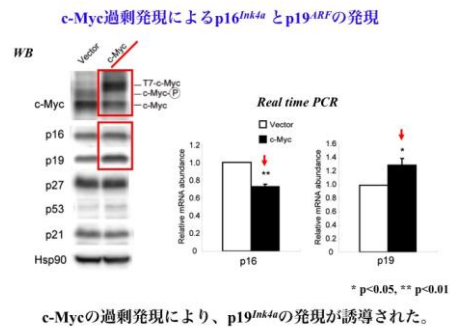


図4

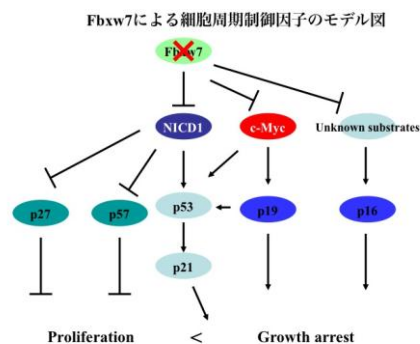


図5

## 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4件)

1. Nakagawa K, Katayose Y, Unno M. Efficacy of neoadjuvant chemoradiation therapy for clinical Stage II cholangiocarcinoma as a preoperative diagnosis. Gan To Kagaku Ryoho. 2012 ;39(12):1945-1947. Japanese (査読あり)

( <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/39120/1945>)

2. Katayose Y, Ohtsuka H, Kitamura Y, Masuda K, Nakagawa K, Yamamoto K, Yoshida H, Onogawa T, Motoi F, Naitoh T, Rikiyama T, Egawa S, Unno M. An analysis of a

second-line S-1 monotherapy for gemcitabine-refractory biliary tract cancer. Hepatogastroenterology. 2012 ;59(115):691-695. (査読あり) doi: 10.5754

3. Katayose Y, Nakagawa K, Yamamoto K, Yoshida H, Hayashi H, Mizuma M, Ohtsuka H, Fukase K, Onogawa T, Motoi F, Rikiyama T, Egawa S, Unno M. Lymph nodes metastasis is a risk factor for bone metastasis from extrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterology. 2012 ;59(118):1758-1760. (査読あり) doi: 10.5754

4. Katayose Y, Rikiyama T, Motoi F, Yamamoto K, Yoshida H, Morikawa T, Hayashi H, Kanno A, Hirota M, Satoh K, Ariga H, Suzuki M, Ohyauchi M, Kondo Y, Ikeya S, Ogawa Y, Shimosegawa T, Egawa S, Unno M. Phase I trial of neoadjuvant chemoradiation with gemcitabine and surgical resection for cholangiocarcinoma patients (NACRAC study). Hepatogastroenterology. 2011;58(112):1866-1872. (査読あり) doi: 10.5754

[学会発表] (計4件)

1. 片寄 友、ゲムシタビン耐性胆道癌に対するS-1の効果と有害事象の検討、第48回 日本胆道学会総会、2012年09月20日～2012年09月21日、東京

2. Yo Kitamura, Yu Katayose, Kei Nakagawa, Hiroshi Yoshida et al. CD133-expressing Cells Have Cancer Stem Cell-like Properties in Cholangiocarcinoma、22nd Biennial European Association for Cancer Research(EACR) Congress、2012年07月07日～2012年07月10日、Barcelona, Spain

3. 中川 圭、StageII胆管癌への術前化学放射線療法の意義、第24回 日本肝胆膵外科学会、2012年05月30日～2012年06月01日、大阪

4. 北村 洋、片寄 友、中川 圭、吉田 寛 他。胆管癌におけるCD133陽性細胞の特徴、第112回 日本外科学会総会、2012年04月12日～2012年04月14日、千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片寄 友 (KATAYOSE YU)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：20302151

### (2) 研究分担者

山本 久仁治 (YAMAMOTO KUNIHARU)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：00375073

吉田 寛 (YOSHIDA HIROSHI)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：60436152

中川 圭 (NAKAGAWA KEI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20542294

林 洋毅 (HAYASHI HIROSHI)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：30422124

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：