

## 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6月12日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591470

研究課題名（和文）食道癌におけるユビキチン類似蛋白質の意義

研究課題名（英文）Clinical significance of ubiquitin-like protein in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

石橋 由朗 (ISHIBASHI YOSHIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00246373

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン類似蛋白質 SUMO-1 は、標的蛋白質へ共有結合しその働きを修飾することで細胞の癌化のメカニズムに関与している。今回我々は、食道癌における SUMO-1 の意義を検討した。食道癌では核や細胞質で SUMO-1 の発現を認め、多種類の SUMO-1 結合蛋白質が認められた。高発現群はリンパ節転移、脈管侵襲が有意に多かった。また生命予後も高発現群は悪い傾向を認めた。

研究成果の概要（英文）：

SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1) is a novel ubiquitin-like protein that is conjugated like ubiquitin by a set of enzymes to cellular regulatory proteins including oncogenes and tumor suppressor genes. In this study, we aimed to investigate the significance of SUMO-1 expressions in esophageal cancer as a prognostic factor. In an esophagus cancer, revelation of SUMO-1 was accepted with a core or cytoplasm and SUMO-1 binding protein of varieties was accepted. The high revelation group had intentionally much lymph node metastasis and vessel invasion. Moreover, the life prognosis also accepted the tendency for a high revelation group to be bad.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器外科

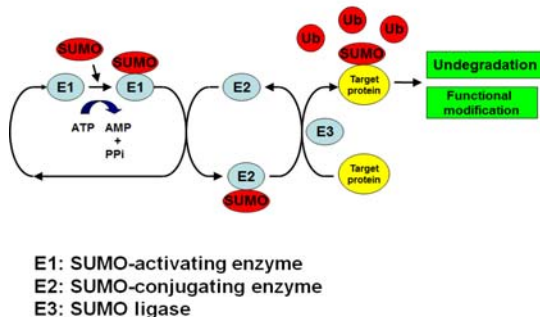
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ユビキチン、SUMO-1、食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌とユビキチン-プロテアソームシステムによる蛋白分解との密接な関係が明らかにされてきた。我々の研究グループでは、これまで癌とユビキチンに関して、様々な研究を進めてきた。各種ヒト悪性腫瘍におけるユビキチンの蓄積を免疫組織学的に見出し、大腸癌、胃癌、肝癌において遊離型、結合型（分解シグナルであるマルチユビキチン鎖）の両ユビキチンともに増加していることを報告し、大腸癌ではその発現と臨床病理学的因子との相関を報告している。また食道癌組織のDNAチップを用いた解析では、癌組織でユビキチン類似蛋白質の一つである small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) の発現の増加を見出した。さらにこの発現は、予後不良な群に特に多く認められていた (Ishibashi Y, et al. Cancer Res 2003)。SUMO-1 は、標的蛋白質へユビキチンと同様に可逆的に共有結合 (SUMO-1 化) する移動性の翻訳後修飾分子である。最近いくつかの癌遺伝子および癌抑制遺伝子産物のユビキチン化部位に SUMO-1 が結合することから、細胞の癌化のメカニズムにも関与していることが指摘されている。この SUMO-1 については、いまだ癌の臨床検体での報告も少なくその働きは不明な点を多く残しており、食道癌での検討も全く行われていない。

### SUMOylation



## 2. 研究の目的

本研究では、手術検体の食道癌組織において SUMO-1 の蛋白レベルでの発現を検討し、DNA チップを用いた研究で得られた、RNA レベルでの発現が増加していた結果と比較する。そして、免疫組織化学的に臨床病理学的な検討もあわせて行い、食道癌における SUMO-1 の意義を検証する。癌で SUMO-1 の有意な増加がみとめたならば、食道癌培養細胞 (KYSE70, KYSE30 等) で SUMO-1 遺伝子発現阻害を行い、『細胞増殖への影響』、『アポトーシス誘導の有無』など SUMO-1 の阻害が、新しい癌治療の標的になるかを検証する。

## 3. 研究の方法

食道癌検体におけるユビキチン類似蛋白

質の一つである SUMO-1 発現をイムノブロット、免疫組織化学手法等にて解析する。そしてその発現と臨床病理学的因子、予後との関連を検討する。あわせて食道癌でのユビキチン-プロテアソームシステムにおけるユビキチンとの相互関係について検討する。有望な結果が得られた場合は、small interfering RNA (siRNA) による特定遺伝子発現阻害実験モデルを用いて SUMO-1 発現抑制と抗癌作用の検討を行う。

### (1) SUMO-1 蛋白レベルの検討

#### ①免疫組織学的検討

当院において手術適応となった食道癌のホルマリン固定、パラフィン包埋された病理検体を用いて、免疫組織学的に SUMO-1 の染色性、局在を確認する。また、臨床病理学的因子との関連を検討し、SUMO-1 の食道癌における意義を検証する。また SUMO-1 conjugating enzyme (E2) である Ubc9 についても免疫組織染色で検討を加える。

#### ②イムノブロット解析

食道癌細胞を SDS-PAGE 試料用緩衝液で抽出し、SUMO-1 抗体を用いて各試料の SUMO-1 量をイムノブロットにて分析する。

### (2) SUMO-1 発現抑制の検討

#### ① siRNA の合成

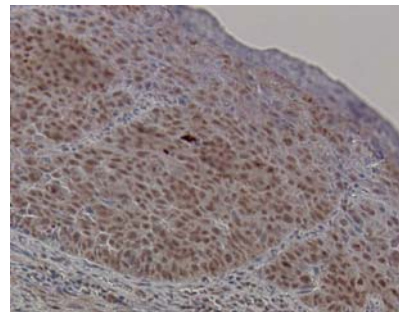
蛋白レベルの検討で有望な結果が得られた SUMO-1 の開始コドンから全長にわたり、AA の配列を探し、AA 配列とそれに隣接する 3' 側の 19 塩基を siRNA 配列の候補とする。siRNA Construction Kit を使用して siRNA を合成する。

#### ② siRNA による SUMO-1 遺伝子の発現阻害の検討

食道癌細胞株に合成した siRNA を導入試薬を用いて導入し、SUMO-1 遺伝子発現阻害効果をノーザンブロッティング、抗 SUMO-1 抗体を用いたイムノブロットにて確認する。

## 4. 研究成果

### (1) 食道癌における SUMO-1 蛋白発現



抗 SUMO-1 Rabbit ポリクローナル抗体 (PC603) による食道癌の免疫染色

食道癌では陽性例で癌細胞の核および細胞

質が染色され、SUMO-1 蛋白の局在が確認された。

(2) SUMO-1 発現の臨床病理学的検討

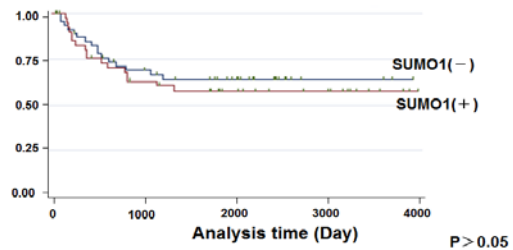
1994 年から 2000 年までに当院で内視鏡あるいは外科的に切除された食道扁平上皮癌 96 例 (Stage 0 19 例、I 16 例、II 25 例、III 26 例、IV-A 7 例、IV-B 3 例) を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、抗 SUMO-1 抗体 (PC603) を用いた免疫組織染色を行い検討した。

Vaibles	Negative (n=53)	Positive (n=43)	P
Age	59.3 ± 7.7	62.4 ± 8.8	0.074
Histologic grade			
Well	21	12	0.186
Moderate	22	17	
Poorly	9	14	
Blood vessel invasion			
v0	35	19	0.0015
v1	16	13	
v2	2	10	
v3	0	1	
Lymphatic vessel invasion			
ly0	28	14	0.003
ly1	17	10	
ly2	8	11	
ly3	0	8	
T, Primary tumor			
Tis	4	1	0.197
T1a	9	6	
T1b	18	8	
T2	6	7	
T3	16	21	
N, Regional lymphnode			
(-)	32	17	0.042
(+)	21	26	
M, Distant metaatasis			
M0	51	38	0.141
M1	2	5	
Stage			
0	13	6	0.086
I	9	7	
II	3	1	

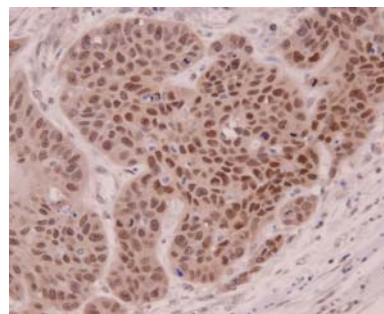
(3) SUMO-1 発現と食道癌患者の予後の検討

食道癌手術患者について SUMO-1 発現を認めた群と認められなかった群に分け生存率を検討した。生存率は、Kaplan-Meier 法で解析した。SUMO-1 発現陽性例では、有意な差はないものの生存率が低い傾向が認められた。

Kaplan-Meier survival estimates, by SUMO1



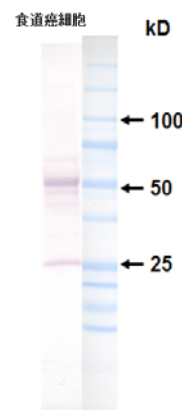
(4) 食道癌における Ubc9 蛋白発現



抗 Ubc9 Goat ポリクローナル抗体 (ab21193) による食道癌の免疫染色

食道癌では陽性例で癌細胞の核および細胞質が染色され、Ubc9 蛋白の局在が確認された。強陽性例では、核膜に強い染色性を認められた。臨床病理学各因子との検討では、各因子に対し染色性と有意な関係は認められなかった。

(5) Western blot 解析による食道癌細胞の SUMO-1 発現



抗 SUMO-1 モノクローナル抗体 (21C7) を用いた食道癌細胞の Western blot 解析

市販の抗 SUMO-1 抗体 (monoclonal antibody 21C7) を用いて SUMO-1 蛋白のウェスタンブロット分析を行った。食道癌細胞に

よる検討では、ユビキチンと同様に複数のバンドが検出された。これはユビキチン化蛋白質と同様に SUMO 化された蛋白質を示していると考えられた。以前研究グループが同定したユビキチン化蛋白質と同様に癌固有の SUMO 化蛋白質の存在が示唆された。

#### (6) RNAi による SUMO-1 蛋白質発現抑制

siRNA の導入条件の設定のために、FITC 標識オリゴ dsRNA を用いた導入実験を行った。取り込み率が 30%程度となり、この条件では十分な発現抑制が得られなかった。siRNA 導入後、添加から 48~60 時間後に細胞を回収し、Western blot により解析し発現評価も行っているが、十分な発現抑制(ノックダウン)効果は認められなかった。

#### 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 8 件)

1. Hoshino M, Omura N, Yano F, Tsuboi K, Kashiwagi H, Yanaga K. Immunohistochemical study of the muscularis externa of the esophagus in achalasia patients. *Dis Esophagus*, 査読有, 26, 2013, 14-21.
2. Fujita A, Shida A, Fujioka S, Kurihara H, Okamoto T, Yanaga K. Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol*, 査読有, 17, 2012, 137-42.
3. Nagasaki E, Yuda M, Tanishima Y, Arakawa Y, Kobayashi K, Sakuyama T, Inoue D, Nishikawa K, Kobayashi M, Omura N, 他 2 名. Complete response of esophageal small cell carcinoma amrubicin treatment. *J Infect Chemother*, 査読有, Nov 18, 2012, Epub ahead of print.
4. Ishibashi Y, Kashiwagi H. Esophageal cancer treatment in DPC system. *Nihon Rinsho*, 査読無, 69, 2011, 484-490.
5. Omura N, Kashiwagi H, Yano F, tsuboi K, Ishibashi Y, 他 2 名. Effect of laparoscopic esophagomyotomy on chest pain associated with achalasia and prediction of therapeutic outcomes. *Surg Endosc*. 査読有, 25, 2011, 1048-1053.
6. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, 他 2 名. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 査読有, 465, 2010, 346-9.
7. Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, 他 3 名. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced

reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells. *Eur J Haematol*, 査読有, 85, 2010, 68-75.

8. Janer A, Werner A, Fujigasaki T, Daret A, Fujigasaki H, Takada K, 他 4 名. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Hum. Mol. Genet.* 査読有, 19, 2010, 181-195.

[学会発表] (計 5 件)

1. Ishibashi Y, Omura N, Kashiwagi H, 他, Clinical significance of ubiquitin-like protein in esophageal squamous cell carcinoma. WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR DISEASES OF THE ESOPHAGUS 2012, 2012年10月17日, ベネチア、イタリア.
2. 高田 耕司, 青木 勝彦, 山田 宙史, 岩室 祥一, 大川 清, 細胞内ポリユビキチン鎖の定量による化学物質の毒性発現機序の検討. 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日, 京都.
3. 小村 伸朗, 柏木 秀幸, 矢野 文章, 石橋 由朗, 他, GERDに対する腹腔鏡下噴門形成術の治療成績, 第66回日本消化器外科学会総会, 2011年7月14日, 名古屋.
4. Ishibashi Y, Omura N, Kashiwagi H, 他, Quantitative analysis of free ubiquitin and multi-ubiquitin chain in precancerous and cancerous gastric tissues. 20<sup>th</sup> WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF SURGEONS, GASTROENTEROLOGISTS AND ONCOLOGISTS, 2010年10月23日, カイロ、エジプト.
5. 高田 耕司, 福田 隆浩, 青木 勝彦, 加藤 尚志, 大川 清, Changes in the properties of renal proteins in mice repeatedly administered with cadmium, 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010年12月8日, 神戸.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 由朗 (ISHIBASHI YOSHIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00246373

(2)研究分担者

志田 敦男 (SHIDA ATSUO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00338906

小村 伸朗 (OMURA NOBUO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70271301

(3)連携研究者

高田 耕司 (TAKADA KOJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30179452