

## 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24年6月6日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791295

研究課題名（和文）胃癌における新規アダプター蛋白XB130によるc-Myc発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Roles of XB130, a novel adaptor protein, in cell cycle progression of gastric cancer cells via regulation of c-Myc

研究代表者

塩崎 敦 (SHIOZAKI ATSUSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40568086

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで、新規アダプター蛋白 XB130 をクローニングし、その機能解析により、甲状腺癌・肺癌細胞株における細胞周期・アポトーシス制御機構を明らかにしてきた。本研究では、胃癌・食道癌における XB130 の機能解析・臨床病理学的意義の検討を試みた。その結果、c-Myc や p21 を介する G1/S チェックポイント制御機構が存在する可能性を見出し、細胞周期における XB130 の新たな機能を解明した。また、胃癌・食道癌患者の手術標本の免疫組織化学により、XB130 の核内での高発現が、独立した予後因子となることを解明した。これらは、上部消化器癌における XB130 の分子マーカーとしての可能性を示すと共に、XB130 を分子標的とした新たな腫瘍制御概念を構築するきっかけとなる成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adaptor proteins can participate in the regulation of various cellular functions, depending on the functional role of their interacting partners. We have cloned a novel adaptor protein, XB130, which has been implicated as a substrate and regulator of tyrosine kinase-mediated signaling and in controlling cell proliferation and apoptosis in thyroid and lung cancer cells. However, its expression and role in gastrointestinal cancer have not been investigated. In the present study, we sought to determine the role of XB130 in gastric and esophageal cancer cells and examine its expression and effects on the prognosis of patients with upper gastrointestinal cancer. Using knockdown experiments with XB130 siRNA, we found that XB130 regulate cell cycle progression via c-Myc and p21 in gastric and esophageal cancer cells. Immunohistochemical analysis revealed that expression of XB130 in cancer tissue was observed in 71.2% of patients with esophageal cancer, and that XB130 expression in the nucleus was an independent prognostic factor. The present study leads to the discovery of XB130 as an important prognostic factor in upper gastrointestinal cancer, and has the potential to present as a novel mediator and/or biomarker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：消化器外科学

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：アダプター蛋白、胃癌、食道癌、細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

アダプター蛋白は、それ自体酵素活性を持つことはないが、結合ドメインを介して他の蛋白と複合体を形成し、細胞シグナルを伝播する。近年我々は、新規アダプター蛋白 XB130 をクローニングし、その機能解析により、甲状腺癌・肺癌細胞株における細胞周期・アポトーシス制御機構を明らかにした。しかしながら、胃癌、食道癌等の上部消化器癌細胞株・組織における XB130 の発現レベルや、臨床病理学的因子との関係については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

我々は、甲状腺癌・肺癌細胞株における XB130 の機能解析を行う過程で、XB130 による c-Myc 発現制御系が存在する可能性を見出した。本研究では、“XB130 は c-Myc の発現制御を介して胃癌細胞の細胞周期・アポトーシスを制御する”という実験仮説の検証を行う。その結果から、XB130 による全く新たな c-Myc 制御機構を解明し、XB130 を分子標的とした斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト胃癌・食道癌細胞株における XB130、c-Myc 発現レベルの解析と、XB130 による c-Myc 発現制御機構の有無の検討

まず、種々のヒト胃癌・食道癌細胞株における XB130 蛋白の発現をウェスタンブロット法で確認する。さらに、各細胞株における、c-Myc の発現をウェスタンブロット法で確認し、XB130 発現レベルとの相関関係を解析する。さらに、胃癌・食道癌細胞株に、XB130 siRNA をトランスフェクションし、c-Myc の発現の変化を定量的 RT-PCR、ウェスタンブロット法で解析する。

#### (2) ヒト胃癌・食道癌組織における XB130 発現レベルの解析と、臨床病理学的因子との相関性の検討

ヒト胃癌・食道癌組織における XB130 の発現レベルを解析するため、手術臨床標本のパラフィンブロックを用い、XB130 に対する免疫染色を行い、発現レベルの相関性を解析する。さらに、組織型、壁深達度、脈管侵襲、リンパ節転移度等の種々の臨床病理学的因子や、予後・再発形式との相関を解析する。

#### (3) ヒト胃癌・食道癌細胞株における XB130 を介する細胞周期・アポトーシス制御機構の解析

ヒト胃癌細胞株に、XB130 発現ベクター、XB130 siRNA をトランスフェクションし、細胞周期・アポトーシスへの影響をフローサイトメトリーを用いて検証する。さらに、c-Myc が制御することで知られている、p21、p27、

CDK2、CDK4/6、Rb などの G1-S 期関連蛋白の発現やリン酸化、アポトーシス関連蛋白の発現をウェスタンブロット法で解析することにより、具体的制御機序を明らかにする。

### 4. 研究成果

胃癌細胞株 (MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, KATO-III, NUGC-4) における、XB130 の発現をウェスタンブロット法で解析したところ、MKN45, KATO-III において XB130 の高発現を認めた。同様に、c-MYC の発現を解析すると、MKN74 以外の細胞株において、c-MYC の発現が確認された (図 1)。同様に、食道癌細胞株 (TE2, TE5, TE9, TE13, KYSE170) を用い、ウェスタンブロット法、蛍光免疫染色により、XB130 発現解析をおこなったところ、TE2, TE5, TE9 において XB130 の高発現が確認された (図 2)。

また、siRNA を用いた XB130 のノックダウンにより、胃癌細胞株において c-MYC の遺伝子発現が抑制されることが明らかになった (図 3)。さらに、胃癌・食道癌細胞株において、XB130 のノックダウンにより G0/G1 停止・細胞増殖抑制がおり、p21 の発現が増強されることが明らかになった (図 4, 5, 6, 7)。p53, p16, Rb 等の他の細胞周期関連因子には発現変化を認めなかった。食道癌細胞株における、XB130 ノックダウンによるアポトーシス増強効果・細胞浸潤抑制効果も確認された。

胃癌手術標本の XB130 免疫染色では、多くのサンプルで癌組織内での XB130 高発現が確認された (図 8)。また、食道癌手術標本の免疫染色により、約 70% のサンプルで、癌部での XB130 の高発現が確認された (図 9)。さらに、XB130 の発現パターンと、臨床病理学的因子の関係を解析したところ、XB130 の核内での高発現が、食道癌患者の独立した予後因子となることが明らかとなった (図 10, 表 1)。また、手術標本での p21 発現解析により、XB130 の核内発現と p21 labeling index に相関を認めた。

これらの結果より、XB130 は、胃癌・食道癌細胞株において、c-MYC、p21 を介して細胞周期制御を行う可能性が示唆された。また、XB130 の核内での高発現が、上部消化管癌患者の独立した予後因子となることが明らかとなり、XB130 の分子マーカーとしての可能性を示すと共に、XB130 を分子標的とした新たな腫瘍制御概念を構築するきっかけとなる成果と考えられる。これらの研究成果は、既に国内外の学会で発表し、英文論文としてまとめアクセプトされた (XB130 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2012, in press.)。

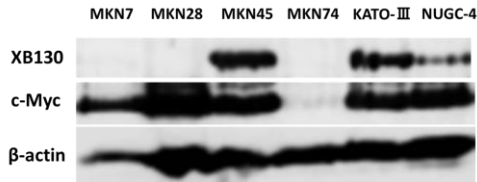


図1 胃癌細胞株におけるXB130、c-Mycの蛋白発現解析

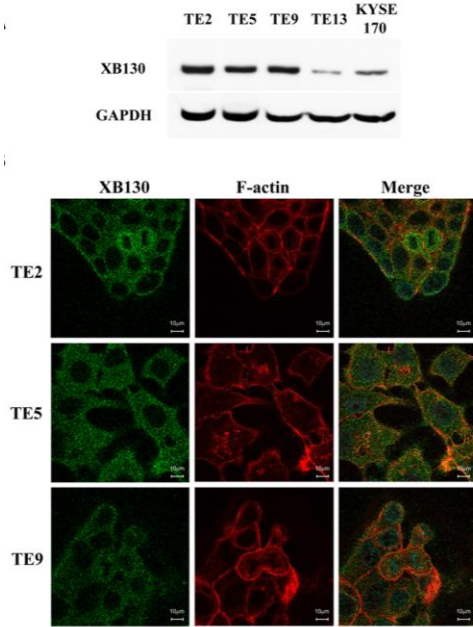


図2 食道癌細胞株におけるXB130の蛋白発現解析

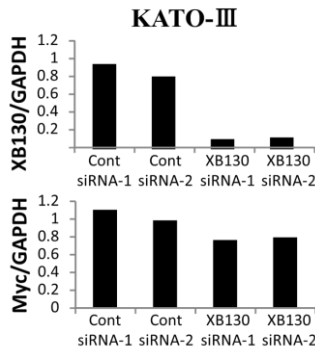


図3 胃癌細胞株におけるXB130ノックダウンによるc-Myc遺伝子発現抑制

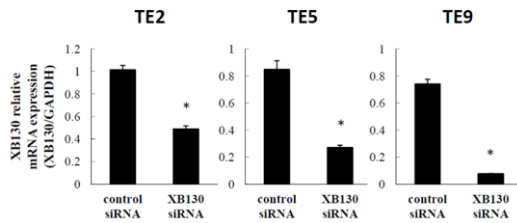


図4 食道癌細胞におけるsiRNAによるXB130発現抑制効果

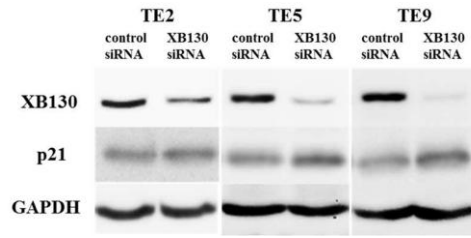


図5 食道癌細胞株におけるXB130ノックダウンによるp21発現増強

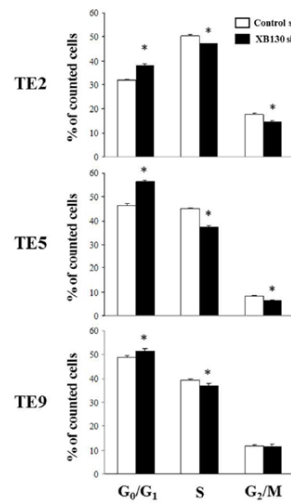
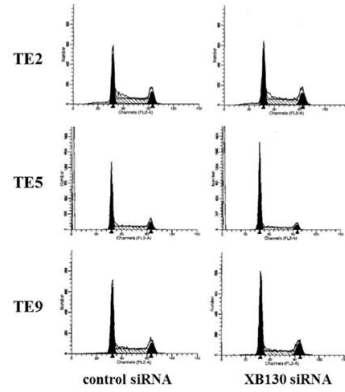


図6 食道癌細胞株におけるXB130ノックダウンによるG0/G1停止効果

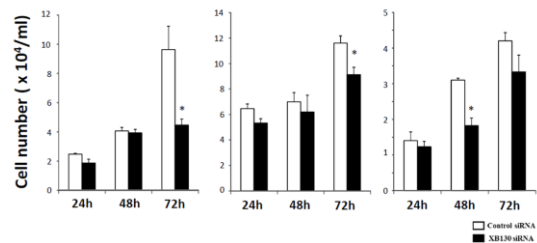


図7 食道癌細胞株におけるXB130ノックダウンによる細胞増殖抑制効果

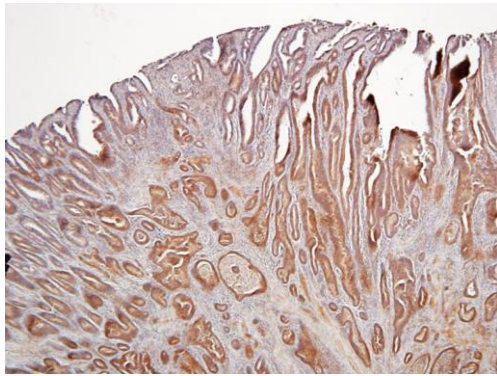


図8 ヒト胃癌組織におけるXB130発現

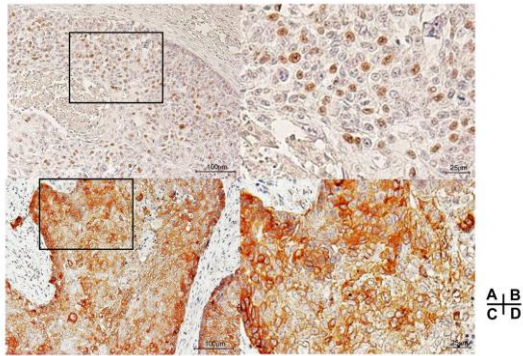


図9 ヒト食道癌組織におけるXB130発現 (A,B) 核内発現例 (C,D) 細胞質発現例

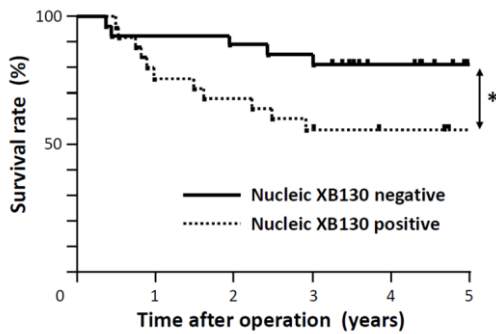


図10 ヒト食道癌組織におけるXB130核内発現と予後

Variables		Risk ratio	95% CI	p value
pT	pT1			
	pT2pT3	3.398	0.929-12.428	0.0645
pN	pN0			
	pN1	5.609	1.253-25.107	0.0241*
Lymphatic invasion	negative			
	positive	6.491	1.418-29.719	0.0159*
XB130 expression in nucleus	negative			
	positive	3.050	1.010-9.209	0.0480*

表1 食道癌手術症例の多変量解析結果

#### 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 17 件)

- 1) Shiozaki A, Liu M, Otsuji E, et al. XB130 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2012, 印刷中, 査読有.
- 2) Shiozaki A, Takeshita H, Liu M, et al. Claudin 1 mediates TNF $\alpha$ -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells. *PLoS One* 2012;7:e38049. 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0038049
- 3) Shiozaki A, Lodyga M, Liu M, et al. XB130, a Novel Adaptor Protein, Promotes Thyroid Tumor Growth. *Am J Pathol* 2011;178:391-401. 査読有, 10.1016/j.ajpath.2010.11.024
- 4) Shiozaki A, Liu M. Roles of XB130, a novel adaptor protein, in cancer. *Journal of Clinical Bioinformatics*. 2011;1:10. 査読有, 10.1186/2043-9113-1-10
- 5) Shiozaki A, Otsuji E, Marunaka Y. Intracellular chloride regulates the G(1)/S cell cycle progression in gastric cancer cells. *World J Gastrointest Oncol*. 2011; 15: 119-122. 査読有, 10.4251/wjgo.v3.i8.119
- 6) Shiozaki A, Fujiwara H, Otsuji E et al. Video-assisted surgery for gastric carcinoma arising in a gastric tube reconstructed via a retrosternal route. *Surgery Today* 2012;42: 209-213. 査読有, 10.1007/s00595-011-0029-0
- 7) Shiozaki A, Fujiwara H, Otsuji E et al. Posterior mediastinal lymph node dissection using the pneumomediastinum method for esophageal cancer. *Esophagus* 2012;9: 58-64. 査読有, 10.1007/s10388-011-0304-6
- 8) Shiozaki A, Fujiwara H, Otsuji E et al. Risk factors for postoperative respiratory complications following esophageal cancer resection. *Oncol Lett* 2012;3: 907-912. 査読有, 10.3892/ol.2012.589
- 9) Oyaizu T, Shiozaki A, Liu M, et al. Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2012;38: 894-905. 査読有, 10.1007/s00134-012-2498-z
- 10) Bawa R, Shiozaki A, Liu M, et al. Self-assembling peptide-based

- nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. *Nanomedicine*. 2011, 印刷中, 査読有, 10.1016/j.nano.2011.08.007
- 11) Iitaka D, Shiozaki A, Otsuji E et al. Blockade of Chloride Ion Transport Enhances the Cytocidal Effect of Hypotonic Solution in Gastric Cancer Cells. *J Surg Res*. 2011, 印刷中, 査読有, 10.1016/j.jss.2011.10.039
  - 12) Kosuga T, Shiozaki A, Otsuji E et al. Pleural lavage with distilled water during surgery for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2011;26:577-86. 査読有, 10.3892/or.2011.1307.
  - 13) Umehara S, Shiozaki A, Otsuji E et al. PSK induces apoptosis through the inhibition of activated STAT3 in human esophageal carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2012;41: 61-66. 査読有, 10.3892/ijo.2012.1454.
  - 14) Konishi H, Shiozaki A, Otsuji E et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer*. 2012;106: 740-747. 査読有, 10.1038/bjc.2011.588.
  - 15) Kawaguchi T, Shiozaki A, Otsuji E et al. Nodal Counts on MDCT as a Surrogate Marker for Surgical Curability in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012, 印刷中, 査読有, 10.1245/s10434-012-2283-9
  - 16) Morimura R, Shiozaki A, Otsuji E et al. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2011;105: 1733-1740. 査読有, 10.1038/bjc.2011.
  - 17) Komatsu S, Shiozaki A, Otsuji E et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105: 104-111. 査読有, 10.1038/bjc.2011.198.
- [学会発表] (計 25 件)
- (1) 塩崎敦、市川大輔、大辻英吾ら。甲状腺癌における新規アダプター蛋白 XB130 の機能解析。日本癌学会, 2011 年 10 月 3-5 日, 愛知。
  - (2) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。食道扁平上皮癌における XB130 の発現と機能。日本癌学会, 2011 年 10 月 3-5 日, 愛知。
  - (3) 飯高大介、塩崎敦、大辻英吾ら。胃癌細胞株におけるクロライド輸送を阻害すると低浸透圧溶液の殺細胞効果が増強する。日本癌学会, 2011 年 10 月 3-5 日, 愛知。
  - (4) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。新規アダプター蛋白 XB130 の食道扁平上皮癌における発現と細胞周期制御。日本食道学会, 2011 年 9 月 26 日, 宮城。
  - (5) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。蒸留水(低浸透圧刺激)の食道癌細胞株に対する殺細胞効果の検討。日本食道学会, 2011 年 9 月 26 日, 宮城。
  - (6) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。EBUS-TBNA (超音波気管支鏡ガイド下針生検)による食道癌縦隔再発診断。日本食道学会, 2011 年 9 月 26 日, 宮城。
  - (7) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法によるサルベージ食道切除術の一例。日本食道学会, 2011 年 9 月 26 日, 宮城。
  - (8) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法を用いた食道切除術 39 例の治療経験と有効性の検討。日本食道学会, 2011 年 9 月 26 日, 宮城。
  - (9) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。食道癌における新規アダプター蛋白 XB130 の発現と機能解析。日本消化器外科学会, 2011 年 7 月 13-15 日, 愛知。
  - (10) 飯高大介、塩崎敦、大辻英吾ら。食道扁平上皮癌における xCT 発現とその意義。日本消化器外科学会, 2011 年 7 月 13-15 日, 愛知。
  - (11) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。HALS + 気縦隔法を用いた食道切除術~30 例の治療経験~。日本消化器外科学会, 2011 年 7 月 13-15 日, 愛知。
  - (12) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。食道癌手術における蒸留水を用いた胸腔内洗浄の有効性。日本外科学会, 2011 年 紙面開催。
  - (13) 飯高大介、塩崎敦、大辻英吾ら。食道扁平上皮癌における Ki67 発現の検討。日本癌治療学会, 2011 年 10 月 27-29 日, 愛知。
  - (14) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法による食道切除術, 50 例の治療経験と有効性の検討。日本癌治療学会, 2011 年 10 月 27-29 日, 愛知。
  - (15) 飯高大介、塩崎敦、大辻英吾ら。食道扁平上皮癌の xCT 発現について。日本胸部外科学会, 2011 年 10 月 10-12 日, 愛知。
  - (16) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法による食道癌後縦隔リンパ節郭清手技。日本胸部外科学会, 2011 年 10 月 10-12 日, 愛知。
  - (17) Kosuga T, Shiozaki A, Otsuji E et

- al. Pleural Lavage with Distilled Water during Surgery for Thoracic Esophageal Squamous Cell Carcinoma. International Surgical Week, 2011年8月28日-9月1日, Yokohama.
- (18) Iitaka D, Shiozaki A, Otsuji E et al. The clinicopathological significance of xCT expression in esophageal squamous cell carcinoma. International Surgical Week, 2011年8月28日-9月1日, Yokohama.
- (19) Shiozaki A, Fujiwara H, Otsuji E et al. Pneumomediastinum method for resection of esophageal duplication cyst. International Surgical Week, 2011年8月28日-9月1日, Yokohama.
- (20) Shiozaki A, Fujiwara H, Otsuji E et al. Pneumomediastinum method for esophageal cancer. International Surgical Week, 2011年8月28日-9月1日, Yokohama.
- (21) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法を用いた食道切除術におけるロングデバイスの有効性。日本内視鏡外科学会, 2011年12月7-9日, 大阪。
- (22) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法による食道切除術54例の治療経験とその有効性の検討。日本内視鏡外科学会, 2011年12月7-9日, 大阪。
- (23) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。食道癌における気縦隔法を用いた後縦隔・腹腔リンパ節連続郭清手技。日本内視鏡外科学会, 2011年12月7-9日, 大阪。
- (24) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。食道癌手術における気縦隔法を用いた安全な左後縦隔操作。日本臨床外科学会, 2011年11月17-19日, 東京。
- (25) 塩崎敦、藤原斉、大辻英吾ら。気縦隔法を用いた食道切除術におけるロングエンシールの有効性。日本臨床外科学会, 2011年11月17-19日, 東京。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩崎 敦 (SHIOZAKI ATSUSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40568086

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：