

平成30年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713006

研究課題名(和文) 癌治療の個別化への道を切り開く予後規定因子CYLD発現消失の分子機能動態の解明

研究課題名(英文) Elucidating clinical significance of CYLD down-regulation for establishing individualized cancer therapy

研究代表者

城野 博史 (Jono, Hirofumi)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40515483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん抑制遺伝子CYLDの発現消失による癌患者の生命予後悪化の要因究明を目的とし、研究成果として、腫瘍組織のCYLD発現消失は、低酸素環境に加え、腫瘍微小環境の変化などの複合的要因により惹起されていること、腫瘍悪性化には、TGF- β 、NF- κ B、MAPKシグナルなどの細胞内シグナルが関与していること、CYLD発現が抗がん剤の効果予測マーカーとして有用である可能性、などが示され、腫瘍組織におけるCYLDの分子機能動態の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study was to elucidate the clinical significance of tumor suppressor CYLD down-regulation in cancer patient with poor prognosis. In this study, we revealed as follows: 1. CYLD down-regulation in tumor tissues was caused by multiple factors, such as hypoxic environment and microenvironment of the tumor. 2. Some of cell signal transduction, such as TGF- β , NF- κ B, and MAPK signaling may be involved in tumor malignancy caused by CYLD down-regulation. 3. Molecular diagnosis targeted CYLD expression may be useful for predicting the effect of anticancer agents. Those results revealed the molecular function of CYLD in tumor tissues, and may open up novel strategies for establishing personalized medicine for malignant tumors.

研究分野：分子病態解析学

キーワード：個別医療 予後予測因子 シグナル伝達 薬剤感受性 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

癌の克服は国民の生命及び健康にとって重大な課題である。近年、分子標的薬の登場により生命予後の改善が認められ、治療の選択肢は広がりつつあるが、早期診断や予後予測、治療の有効症例の特定・効果予測は困難を極め、分子レベルの病態把握による個別化治療の確立が急務である。

新規癌抑制遺伝子 *Cylindromatosis* (CYLD) は、家族性円柱腫症の原因遺伝子として同定され、その遺伝子変異は腫瘍形成の要因となる (Bignell et al., Nat Genet 2000)。後の研究から、CYLD は、タンパク質のコピキチン化を制御する脱コピキチン化酵素としての機能を有し、癌の病態進展に深く関与する、NF- κ B シグナルをはじめと様々な細胞内シグナルを制御している可能性が示されつつある (Brummelkamp et al., Nature 2003)。

申請者はこれまで、本 CYLD 分子に着目し、難治癌の治療戦略開発に新たな道を切り開くべく、癌患者における CYLD の臨床的意義の解明を目的とした臨床研究を展開してきた。これまでに実施してきた種々の臨床検体 (腫瘍組織) を用いた分子病態解析から、申請者は、CYLD が、癌治療における大きな障壁となっている、予後予測・治療効果予測の困難さ、癌の悪性化・薬剤耐性化、を解決する突破口となりうる可能性を示す、以下の3つの臨床的知見を得た。

- 1) CYLD 発現自体の消失による機能不全が、癌患者の生命予後を著しく悪化させている：これらの病変組織において、脱コピキチン活性を喪失させる CYLD の遺伝子変異は認められないことから、CYLD は、変異がなくとも発現自体の消失に起因する機能不全により癌患者の生命予後を左右する因子である可能性がある。
- 2) 腫瘍の悪性度に伴い CYLD の発現は低下し、浸潤部では完全に消失している：浸潤部での CYLD 発現が完全に消失にしていることから、腫瘍の悪性化 (癌幹細胞化・浸潤転移) における CYLD の関与が推察される。
- 3) CYLD の存在が癌細胞の薬剤感受性を左右する：CYLD の発現を抑制した癌細胞は、各種抗癌剤の感受性・治療効果が通常の癌細胞と大きく異なり、CYLD の存在が癌細胞の抗がん剤に対する薬剤感受性を変化させ、生命予後の悪化に深く関与する可能性を示している。

これらの基礎的知見から、腫瘍組織における CYLD の詳細な分子機能動態メカニズムが明らかとなれば、予後予測因子としての有用性の実証、悪性形質獲得・薬剤耐性化メカニズムの解明と新たな治療標的の発見など、分子レベルの病態把握による個別化治療の確立に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、CYLD 発現消失が癌患者の生命予後の悪化を導く要因を解明するため、

【1】腫瘍組織における CYLD 発現消失の原因究明、【2】CYLD 消失に伴う腫瘍悪性化に関与する細胞シグナルの同定、【3】抗癌剤の薬剤感受性を左右する CYLD の新規標的分子の同定、に取り組み、腫瘍組織における CYLD の分子機能動態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、CYLD の発現消失が癌患者の生命予後を左右する要因を解明し、CYLD の観点から難治癌の治療戦略開発に新たな道を切り開くべく、以下の3つのサブテーマを設定し、腫瘍組織における CYLD の分子機能動態を明らかにした。

【1】腫瘍組織における CYLD 発現消失の原因究明：腫瘍および CYLD 発現との関連が報告されている、標的遺伝子発現を特異的に抑制する micro RNA、転写因子、および腫瘍微小環境など、CYLD の発現に対する影響の評価から発現消失の原因を解明した。

【2】CYLD 消失に伴う腫瘍悪性化に関与する細胞シグナルの同定：癌幹細胞化・浸潤転移を軸とした癌細胞の特性 (上皮間葉移行、増殖など) に対する CYLD 発現抑制の影響を検討し、各表現型に関与する細胞内シグナルへの関与を検証した。

【3】抗癌剤の薬剤感受性を左右する CYLD の新規標的分子の同定：様々な抗癌剤の作用点に対する CYLD 発現抑制の影響を検討することで、薬剤感受性を左右する CYLD の新規標的分子の同定を試みた。

4. 研究成果

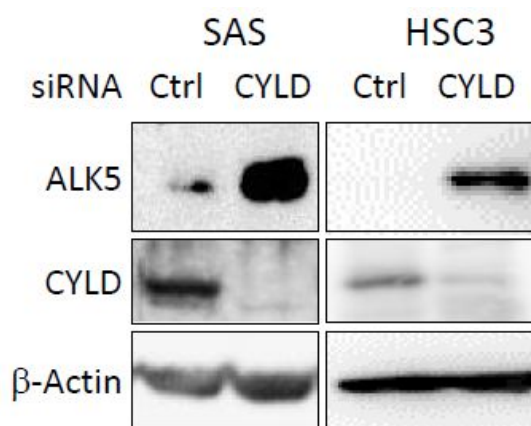
本研究期間内に、サブテーマごとに以下の研究成果を得た。

【1】腫瘍組織における CYLD 発現消失の原因究明：各種腫瘍組織の CYLD 分子の発現解析により、腫瘍組織における低酸素領域と一致して CYLD の発現が消失していることが明らかとなった。各種癌由来の細胞株を用いた in vitro 解析においても同様の現象が確認され、低酸素環境下で CYLD 遺伝子発現が mRNA およびタンパク質レベルで著明に低下していた。

さらに、CYLD 発現消失メカニズムについて解析したところ、標的遺伝子発現を特異的に抑制する micro RNA (miR-182 など) の発現変動が一部関与しており、低酸素環境に加え、腫瘍微小環境 (炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカインの上昇など) の変化に伴う細胞内シグナルの活性化など、複合的要因が CYLD 発現消失に関与している可能性が示された。

【2】CYLD 消失に伴う腫瘍悪性化に関する細胞シグナルの同定：各種癌細胞株において siRNA により CYLD 発現をノックダウンすることによって、腫瘍の悪性化（上皮間葉移行、抗アポトーシスなど）に関与することが知られている TGF- β 、NF- κ B、MAPK シグナルなどの細胞内シグナル伝達経路の過剰な活性化が惹起されることが明らかとなった。

CYLD 発現消失によるこれらの細胞内シグナル伝達の異常は、癌種によって異なり、各癌固有の悪性化メカニズムに寄与している可能性がある。さらに CYLD 発現低下による各シグナル異常のメカニズムの一つとして、分解低下による TGF 受容体のタンパクレベルの上昇が確認され、TGF シグナルの持続的な活性化が、結果的に過剰活性化を引き起こしている可能性が示された（図）。



（図）各種口腔扁平上皮がん細胞株（SAS、HSC3）における、CYLD 発現低下による TGF 受容体（ALK5）発現への影響：ウェスタンブロット解析の結果、siRNA によって CYLD 発現を低下させると、分解低下により TGF 受容体のタンパクレベルが上昇している。

【3】抗癌剤の薬剤感受性を左右する CYLD の新規標的分子の同定：CYLD 発現の消失による薬剤感受性への影響は、従来から使用されている細胞障害性抗がん剤（シスプラチン、5-FU など）と、近年主流となりつつある分子標的薬とは大きく異なり、大変興味深い知見として、同じ分子を標的とした作用機序の異なる分子標的薬に対しても、その治療効果が異なるケースも確認された。

細胞障害性抗がん剤（シスプラチン、5-FU など）に対する薬剤耐性化メカニズムとして、細胞周期の変化、薬剤トランスポーターを介した抗がん剤の細胞内蓄積低下、抗アポトーシス作用の亢進などの複数の可能性が示された。このような細胞障害性抗がん剤に対する耐性化が確認された一方、特定の分子標的薬に関しては逆に感受性が著しく増強している可能性が示された。本研究結果は、予後不良・治療不応と診断された CYLD 陰性のがん患者に対して、効果を示す分子標的薬を提供できる可能性を示し、抗がん剤の効果予測マーカーとしての有用性を示す可能性がある。

以上【1】～【3】の結果より、CYLD 発現消失が癌患者の生命予後の悪化を導く要因、および腫瘍組織における CYLD の分子機能動態の一端が明らかとなった。

様々な腫瘍組織にて確認される CYLD 発現消失は、低酸素環境に加え、腫瘍微小環境の変化に伴う細胞内シグナルの活性化など、複合的要因により惹起されている可能性がある。また、腫瘍の悪性化に関与するシグナルとして、TGF- β 、NF- κ B、MAPK シグナルなどの細胞内シグナル伝達経路が同定され、CYLD の存在が各種抗がん剤の癌細胞に対する薬剤感受性を規定していることから、抗がん剤の効果予測マーカーとしての可能性も明らかとなった。

今後は、今回得られた知見を基盤に、腫瘍組織における CYLD の分子機能動態の更なる解析に加え、CYLD に着目した分子診断の有用性の検証として、CYLD 消失の臨床分子病態解析・治療効果予測マーカーとしての有用性検証、CYLD 消失による分子標的薬の治療効果向上メカニズムの解明、CYLD 消失癌細胞における各種抗がん剤の感受性プロファイリング、などの課題に取り組み、CYLD の分子病態解析を突破口に、予後不良・治療不応と診断されたがん患者に対する、新たな治療選択提供に向け、研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Shinriki S, Jono H, Maeshiro M, Nakamura T, Guo J, Li JD, Ueda M, Yoshida R, Shinohara M, Nakayama H, Matsui H, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell invasion via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.*, 査読有, 244, 2018, 367-379

Jono H, Establishing Individualized Medicine for Intractable Cancer Based on Clinical Molecular Pathogenesis. *Yakugaku Zasshi*, 138, 2018, 451-455

Shinojima N, Fujimoto K, Makino K, Todaka K, Yamada K, Mikami Y, Oda K, Nakamura K, Jono H, Kuratsu JI, Nakamura H, Yano S, Mukasa A. Clinical significance of polyglutamylation in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol Commun.*, 査読有, 6, 2018, 15

城野博史：悪性腫瘍組織における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現消失の臨床的意義、*臨床化学*, 45 巻, 2016, 120-126

Hirayama M, Tomita Y, Yuno A, Tsukamoto H, Senju S, Imamura Y, Abu SM, Irie A, Yoshitake Y, Fukuma D, Shinohara M,

Hamada A, Jono H, Yuba E, Kono K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakayama H, Nishimura Y. An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *Oncology*, 査読有, 5, 2016, e1123368

Jono H, Shinriki S, Guo J, Li JD, Ando Y. CYLD: a critical regulator of hypoxia-mediated inflammation in tumor. *Inflammation and Cell Signaling*, 査読有, 2, 2015, e479

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, Hayashi M, Yoshida R, Ota T, Ota K, Kawahara K, Nakagawa Y, Yamashita S, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando A. Osteopontin-integrin $\alpha 3$ axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. *FEBS Lett*, 査読有, 589, 2015, 231-9

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Guo J, Ueda M, Hayashi M, Yamashita S, Zijlstra A, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Intrinsic TGF- $\beta 2$ -triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 査読有, 6, 2015, 1008-19

Guo J, Shinriki S, Su Y, Nakamura T, Hayashi M, Tsuda Y, Murakami Y, Tasaki M, Hide T, Takezaki T, Kuratsu J, Yamashita S, Ueda M, Li JD, Ando Y, Jono H. Hypoxia suppresses cylindromatosis (CYLD) expression to promote inflammation in glioblastoma: possible link to acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget*, 査読有, 5, 2014, 6353-64

Taguchi K, Kouroki M, Ohmura T, Jono H, Endo F, Saito H. Carbamazepine-imatinib interaction in a child with chronic myeloid leukemia. *Pediatr Int.*, 査読有, 56, 2014, e33-6

Hayashi M, Jono H, Shinriki S, Nakamura T, Guo J, Sueta A, Tomiguchi M, Fujiwara S, Yamamoto-Ibusuki M, Murakami K, Yamashita S, Yamamoto Y, Li J-D, Iwase H, Ando Y. Clinical Significance of CYLD Downregulation in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 査読有, 143, 2014, 447-457

Shinriki S, Jono H, Ueda M, Obayashi K, Nakamura T, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Guo J, Hayashi M, Hiraki A, Nakayama H, Yamashita S, Shinohara M, Ando Y. Stromal Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Correlates with Poor Differentiation

and Adverse Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Histopathology*, 査読有, 64, 2014, 356-64

[学会発表](計 15件)

Jono H, Hayashi M, Shinriki S, Hirai C, Ando Y, Iwase H, Saito H: Tumor suppressor CYLD as a novel prognostic biomarker in primary breast cancer. 15th Congress of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, 2017.9.24-27, Kyoto, Japan

城野博史:新たながん薬物療法の開発を目指した標的分子探索と臨床応用 第34回日本薬学会九州支部大会(シンポジウム), 2017年11月26日、崇城大学、熊本

城野博史、安東由喜雄、齋藤秀之:臨床病態解析を基盤とした口腔扁平上皮癌の従来にはない薬物療法の開発 第57回日本臨床化学会 年次学術集会(シンポジウム), 2017年10月7日、北海道大学、札幌

城野博史、齋藤秀之:新たながん薬物療法の開発を目指した標的分子探索と臨床応用 医療薬学フォーラム2017 第25回クリニカルファーマシーシンポジウム(シンポジウム)、2017年7月1日、鹿児島市民文化ホール、鹿児島

城野博史、齋藤秀之:臨床病態解析に立脚した革新的がん薬物療法の開発 日本薬学会第137年会(シンポジウム)、2017年3月24-27日、仙台国際センター、仙台

城野博史、林光博、神力悟、安東由喜雄、岩瀬弘敬:乳癌における腫瘍抑制遺伝子CYLD 発現消失の臨床的意義の解明 医療薬学フォーラム2016/第24回クリニカルファーマシーシンポジウム、2016年6月26日、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、滋賀

城野博史、齋藤秀之:臨床分子病態解析に基づく難治がんの個別化治療の確立 第33回日本薬学会九州支部大会(受賞講演)、2016年12月3日、鹿児島大学、鹿児島

城野博史、神力悟、松井啓隆、安東由喜雄、齋藤秀之:骨髄播種癌細胞の増殖抑制・抗癌剤耐性化における自律的 TGF- $\beta 2$ -SDF1-CXCR4 シグナルの役割 日本薬学会第136年会、2016年3月26-29日、パシフィコ横浜、横浜

城野博史:乳癌における腫瘍抑制遺伝子CYLDの臨床的・生物学的意義の解明 日本臨床腫瘍薬学会 学術大会 2016(シンポジウム)、2016年3月13日、鹿児島市民文化ホール、鹿児島

Jono H, Shinriki S, Guo J, Li JD: Clinical significance of CYLD downregulation in glioblastoma: CYLD, a critical regulator of hypoxia-mediated

inflammation in tumors. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (Invited symposium), 2015.10.16-17, Kumamoto, Japan
城野博史、林光博、神力悟、齋藤秀之、安東由喜雄、岩瀬弘敬：乳癌における腫瘍抑制遺伝子 CYLD の臨床的・生物学的意義の解明 第 55 回日本臨床化学会 年次学術集会、2015 年 10 月 30 日、大阪大学、大阪
城野博史、林光博、神力悟、安東由喜雄、岩瀬弘敬：乳癌における予後規定因子 CYLD の臨床的・生物学的意義の解明 日本薬学会第 134 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸学院大学 & 兵庫医療大学、神戸
Jono H, Guo J, Shinriki S, Obayashi K, Ando Y: Clinical significance of CYLD down-regulation in glioblastoma. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18-20 日、名古屋国際会議場、名古屋
城野博史、神力悟、植田光晴、大林光念、齋藤秀之、安東由喜雄：腫瘍組織における癌抑制遺伝子 CYLD 発現消失の臨床的意義の解明 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2014 年 11 月 15-16 日、熊本大学、熊本
城野博史、神力悟、植田光晴、大林光念、齋藤秀之、安東由喜雄：頭頸部扁平上皮癌におけるがん抑制遺伝子 CYLD 発現消失の臨床的意義の解明 第 54 回日本臨床化学会 年次学術集会、2014 年 9 月 4-7 日、東京大学、東京

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし

〔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〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/pharmacy/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城野 博史 (JONO, hirofumi)
熊本大学・医学部附属病院薬剤部・
准教授
研究者番号：40515483

(2) 研究分担者

なし