

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893016

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素BAP1の胆管癌における役割の解明

研究課題名(英文) Study about BAP1, deubiquitinase, in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

石田 晶玄 (ISHIDA, Masaharu)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：90619660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌の細胞株においてBAP1の変異をヘテロに導入し、増殖能、遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性試験を行い、またsiRNAを用いてBAP1発現をノックダウンし、同様に機能解析を行った。BAP1の発現が低下した細胞株では、遊走能、浸潤能が増強し、また肝内胆管癌に対して使用される抗癌剤のゲムシタビンへの感受性が亢進する傾向を認めた。

肝内胆管癌の手術標本のBAP1発現を免疫染色にて評価し、臨床予後と比較したところ、BAP1低発現症例では、浸潤傾向が強く、進行度も高い傾向を認め、ゲムシタビンが有効であった。以上より、BAP1変異症例や低発現症例ではゲムシタビンが有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional analyses were performed on cell lines of intrahepatic cholangiocarcinoma, whose genome encoding BAP1 was mutated by zinc finger nuclease, or ones whose BAP1 expression was knocked-down by siRNA for BAP1. The proliferation was not affected by BAP1 mutation or knock-down, but the capability of migration and invasion was increased. The chemosensitivity to gemcitabine, an anti-tumor drug for intrahepatic cholangiocarcinoma, was improved by the mutation or knocking-down.

The expression of BAP1 of intrahepatic cholangiocarcinoma analyzed by immunohistochemistry was compared to the clinical factors. The cases of low BAP1 expression showed more invasive character than high BAP1 expression, and they were more sensitive to gemcitabine than high BAP1. Those results indicated gemcitabine should be effective to the cases of intrahepatic cholangiocarcinoma with low BAP1 expression.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝内胆管癌 遺伝子変異 ゲムシタビン

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は原発性肝癌の約 5-10% を占める、胆管由来とされる悪性腫瘍である。予後不良な癌の一つとして知られており、根治的治療のためには手術による切除が必要であるが、根治切除後の再発も多く、また発見時には手術適応とならないほど進行している症例も数多い。肝内胆管癌の治療成績向上のためには、早期発見のための診断技術の改良と、より有効な抗癌剤治療の開発が必要である。

2013年に肝内胆管癌の全 mRNA のシーケンスが、アメリカとシンガポールの別々の施設で行われ、遺伝子異常の解析がなされた。その結果、脱ユビキチン化酵素の一つである、BAP1 (BRCA associated protein 1) に高頻度に変異が認められることが報告された。

BAP1 は、肝内胆管癌で変異が報告される以前より、眼内黒色腫、腎細胞癌、悪性中皮腫などの悪性腫瘍においても高頻度に変異を認めることが知られていた。ほとんどの BAP1 変異が、BAP1 蛋白の発現を低下させるように働き、BAP1 は癌抑制遺伝子として働いていると考えられている。しかしながら、その一方で BAP1 の変異や発現低下がどのように細胞機能に影響を及ぼすか、という点に関する研究は、あまり報告がなされていない。特に *in vitro* においては、BAP1 の発現低下が細胞増殖を亢進させるという報告と、変化がない、という報告があり、BAP1 の癌細胞に対する影響はわかっていない。一方で、眼内黒色腫などの癌腫においては、BAP1 発現が低下している症例では、予後が不良であるという傾向が報告されている。

2. 研究の目的

肝内胆管癌における BAP1 発現の低下が、細胞機能、臨床予後にどのような影響を及ぼしているかを明らかにする。

細胞機能については、肝内胆管癌細胞株において BAP1 の発現を低下させることで、その機能への影響を検討する。

肝内胆管癌の切除標本で BAP1 の免疫染色を行い、臨床予後因子と BAP1 発現の関連を明らかにする。

BAP1 変異が肝内胆管癌に及ぼす影響を解明することで、臨床応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)肝内胆管癌細胞株である HuCCT1、TFK1、Rb1 に対し、BAP1 の発現をノックダウンしてその機能解析を行った。

<細胞株>

入手可能な 3 種類の肝内胆管癌細胞株の BAP1 発現をウェスタンブロットにて検討した。BAP1 発現を認めない細胞株においては

発現低下の実験系をデザインできないため、除外し、BAP1 発現を認める細胞株のみを以降の *in vitro* の実験に用いた。

< BAP1 >

BAP1 発現に対するアプローチとして 2 つの方法を用いる。一つは Zinc finger nuclease 技術を用いて、直接肝内胆管癌細胞株の BAP1 をコードするゲノムに遺伝子変異を導入し、発現を低下させる方法であり、もう一つは、BAP1 に対する siRNA をトランスフェクションによって導入し、発現をノックダウンする方法である。

< 機能解析 >

BAP1 発現を低下させた後、増殖能、遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性などの機能評価を行う。増殖能は MTS 試験により行い、遊走能はスクラッチアッセイで評価し、浸潤能はマトリゲルチャンバーを用いて評価した。抗癌剤感受性に対しては、胆道癌に対して使用される抗癌剤である 5-FU、ゲムシタピンを使用し、また脱ユビキチン化酵素の変異時に効果があるとされるヒストン脱アセチル化酵素であるトリコスタチン A とバルプロ酸も使用した。

(2)臨床標本の BAP1 発現を解析し、臨床予後因子との関連を検討する。

< 対象 >

東北大学病院肝胆膵外科で手術し、標本を摘出した肝内胆管癌症例を対象とした。

< 免疫染色 >

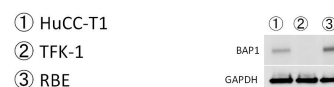
切除標本の BAP1 発現を評価するために、BAP1 抗体による免疫染色を行い、染色性に応じて高発現、中発現、低発現と分類する。BAP1 の発現状態と、腫瘍の進行度、抗癌剤の影響、無再発生存期間、全生存期間などの臨床予後との比較を行う。

4. 研究成果

(1)HuCCT1、TFK1、RBE の 3 つの細胞株における BAP1 のタンパク質レベルにおける発現をウェスタンブロットで解析したところ、TFK1 では発現を全く認めず、HuCCT1 と RBE に発現していることを確認した。以降の BAP1 の発現させる実験には HuCCT1 と RBE を使用した。

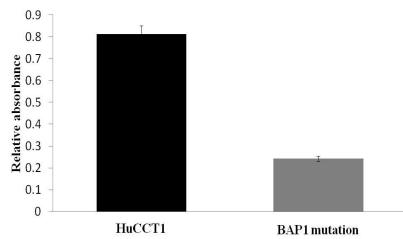
✓ BAP1 positive : HuCC-T1, RBE

✓ BAP1 negative : TFK-1



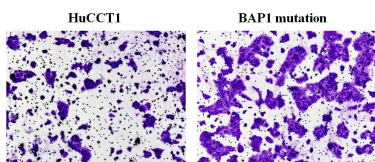
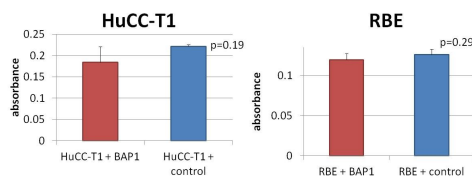
Zinc finger nuclease を用いて HuCCT1 の BAP1 をコードするゲノムにヘテロな変異を導入した細胞株を用いて、増殖能、遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性を検討した。親株と比較して、増殖能に差は認めなかったが、遊走

能、浸潤能は BAP1 変異株で増強し、肝内胆管癌の化学療法として使用されるゲムシタピンへの感受性が BAP1 で上昇する傾向を認めた。

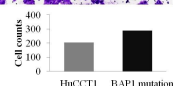


✓ 変異株は親株に比較して、ゲムシタピンに対する感受性が上昇した。

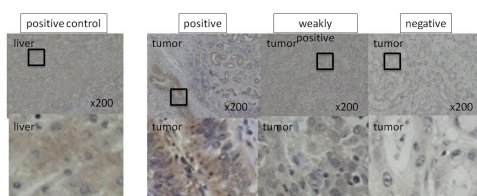
HuCCT1、Rb1 とともに siRNA にて BAP1 をノックダウンし、同様に機能解析を行った。Zinc finger nuclease による遺伝子変異の結果と同様に増殖能に変化は認めなかった。



✓ 変異株で浸潤能の上昇を認めた。

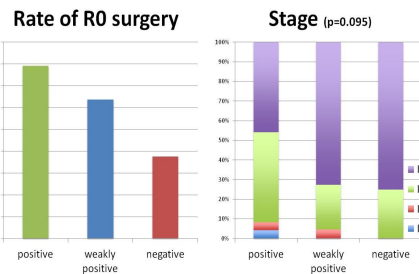


(2)肝内胆管癌の手術標本を BAP1 抗体にて免疫染色して、染色の程度に応じて、高発現、中発現、低発現に分類した。

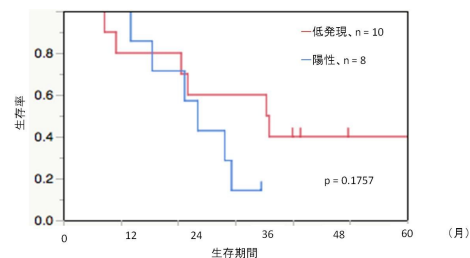


BAP1 中発現や低発現の症例は、高発現の症例に比べ、周囲に浸潤が強い傾向を認め、腫瘍の進行度も高い結果であった。

またゲムシタピンを使用した症例でみると、BAP1 低発現症例において効果が高い傾向を認めた。



細胞株において BAP1 をゲノム上において、または RNA レベルにおいてその発現を低下させると、遊走能および浸潤能が亢進し、ゲムシタピン感受性が上昇する結果であった。



手術標本において BAP1 発現と臨床因子を検討したところ、BAP1 の発現が低い症例では浸潤傾向が強く、臨床病期も進んでいる傾向を認めた。また細胞株の実験と同様に BAP1 発現が低い方が、ゲムシタピンへの感受性が高い傾向を認めている。

in vitro の細胞株の実験、および手術標本を用いた臨床因子との解析とも同様の結果を示しており、BAP1 の発現低下は腫瘍の浸潤能や転移能に関わっていることが推測される。また BAP1 低発現症例では、ゲムシタピンによる化学療法が有効である可能性が示された。

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 0 件)

現在、執筆中

〔学会発表〕(計 1 件)

石居健太郎、石田晶玄ほか 肝内胆管癌における BAP1 変異の影響、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 晶玄 (ISHIDA, Masaharu)
東北大学 高度教養教育・学生支援機構
助教
研究者番号：90619660