

主論文の要旨

FBXO50 Enhances the Malignant Behavior of Gastric Cancer Cells

〔 胃癌悪性度と F-box-only 50 遺伝子発現の関連性の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

三輪 高嗣

【背景】

進行胃癌は多様な転移再発様式を呈する予後不良な疾患である。胃癌の悪性度を司る分子生物学的機序の解明は、新規バイオマーカーおよび治療法開発のために重要である。我々は先行研究において同時性遠隔転移を有する胃癌患者の癌部における網羅的発現解析で、F-box only protein 50 遺伝子 (*FBXO50*) の発現が亢進していることを発見した。*FBXO50* は細胞傷害性免疫系細胞の細胞間シグナル伝達に関与するとされるが、その胃癌における役割は不明である。そこで *FBXO50* 発現と胃癌悪性度の関連性について検討することを本研究の目的とした。

【対象と方法】

10 種の胃癌細胞株および非腫瘍性腺上皮細胞株 (FHs74) を用いて、*FBXO50* mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法で測定し、PCR array にて解析した 84 種の上皮間葉転換関連遺伝子発現結果との相関性を検討した。また、これら細胞株において DNA コピー数を調べた。siRNA 法による *FBXO50* のノックダウンを行い、胃癌細胞株の増殖能、接着能、浸潤能、遊走能を評価した。200 例の胃癌切除検体の癌部および非癌部組織を対象に *FBXO50* mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法で測定し、臨床病理学的因子および予後との相関性を解析した。

【結果】

10 種中 5 種の胃癌細胞株で FHs74 と比べて *FBXO50* の発現上昇を認めた (Fig. 1a)。4 種の胃癌細胞株で *FBXO50* DNA コピー数増加を認め、その内 3 種で *FBXO50* 発現上昇を認めた (Fig. 1a)。PCR array 結果を解析すると、上皮間葉転換関連遺伝子である integrin subunit alpha 5 (*ITGA5*), integrin subunit beta 1 (*ITGB1*), matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*), moesin (*MSN*), collagen type V alpha 2 chain (*COL5A2*), G protein subunit gamma 11 (*GNG11*), Wnt family member 5A (*WNT5A*) と *FBXO50* 発現量がスピアマン相関係数 0.6 以上の正の相関性を示した (Fig. 1b)。胃癌細胞株の中で最も高い *FBXO50* 発現量を示した MKN1 を用いてノックダウン実験を行った。まず、定量的 RT-PCR 法で特異的 siRNA により *FBXO50* がノックダウンされていることを確認した (Fig. 2a)。*FBXO50* のノックダウンを行うことにより MKN1 の増殖能が有意に減少した (Fig. 2b)。また、フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV、フィブリノゲンに対する接着能が減弱した (Fig. 2c)。さらに浸潤能 (Fig. 3a)、遊走能 (Fig. 3b) も有意に低下した。癌部組織中 *FBXO50* 発現量が非癌部より高いものを発現上昇群、低いものを発現低下群と定義し 2 群に分けて解析をすると、*FBXO50* 発現上昇は病理学的深達度、浸潤性発育、リンパ節転移、腹腔洗浄細胞診陽性と有意な相関を示した (Table 1)。*FBXO50* 発現上昇群では術後全生存期間および無再発生存期間が有意に短縮していた (Fig. 4a および 4b)。術後累積再発率を比較すると、*FBXO50* 発現上昇群は血行性再発と腹膜播種再発を来しやすい傾向にあった (Fig. 4c)。

【考察】

本研究では、*FBXO50* が胃癌細胞の増大・転移に必要な能力に関与していることが示された。*FBXO50* は第 19 染色体長腕 13 に位置し、ヒト組織では食道扁平上皮、皮膚で比較的豊富に発現している。*FBXO50* の属する F-Box ファミリーは、細胞のシグナル伝達や細胞周期の調節機能を持つとされるが、悪性腫瘍における *FBXO50* の詳細な機能は十分に解明されていない。そこで *FBXO50* の発現解析および機能解析が胃癌における *FBXO50* 発現の分子生物学的意義を解明し得ると考え本研究を行った。

コピー数増加は癌遺伝子の発現増加の一因となるとされる。大腸癌や膵癌では第 19 染色体長腕 13 のコピー数増加を認めるという報告があるが、胃癌ではこの遺伝子座のコピー数変化に関する報告はない。本研究では、*FBXO50* mRNA の発現量増加を示した胃癌細胞株の 75% でコピー数が増加しており、これが *FBXO50* mRNA の発現調節機序の一つである可能性が示唆された。

FBXO50 mRNA の発現量は分化度による変化はなかったが、転移性胃癌から樹立された、より悪性度の強い胃癌細胞株 (MKN1、SC-6-JCK、N87) で高発現していた。一方、FHs74 よりも *FBXO50* mRNA の発現量が低い胃癌細胞株も認めた。臨床検体の解析では *FBXO50* mRNA の発現量は一部の予後不良な集団で過剰発現していた。*FBXO50* mRNA の発現量増加は胃癌において普遍的に存在する現象ではなく、悪性度に関与する可能性を窺わせるものであった。

上皮間葉転換は癌の進展や悪性形質の獲得に重要な役割を果たしており、様々な転写因子により調節されている。そこで我々は胃癌細胞株で PCR array 法による上皮間葉転換関連遺伝子の網羅的発現解析を行った。その結果、*ITGA5*、*ITGB1*、*MMP2*、*MSN*、*COL5A2*、*GNG11*、*WNT5A* といった上皮間葉転換関連遺伝子と *FBXO50* の mRNA 発現量が正の相関を示した。この結果は、*FBXO50* が上皮間葉転換の過程に干渉する可能性を示している。

FBXO50 が癌細胞活性に関与しているかどうかを検証するために、siRNA 法による *FBXO50* のノックダウンを行い、胃癌細胞株の増殖能、接着能、浸潤能、遊走能を評価したところ、これらの能力が有意に低下することを発見した。さらに、胃癌組織中 *FBXO50* の発現量増加と、腫瘍深達度、リンパ節転移、および腹腔内洗浄細胞診陽性などの胃癌の高悪性度を示す臨床病理学的因子と有意に相関していること、*FBXO50* mRNA 発現上昇群では術後再発率が高く予後不良であったこともまた、*FBXO50* が胃癌の悪性度に関与する可能性を支持するものである。

【結論】

FBXO50 は胃癌悪性度に関与しており、新規バイオマーカーおよび治療標的分子として有望な候補であると考えられた。