

Title	EGFR変異陽性肺癌におけるFBXO17の役割の解明
Sub Title	Role of FBXO17 in EGFR mutation positive NSCLC
Author	浜本, 純子(Hamamoto, Junko)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	FBXO17の発現を抑制することにより, 試した8種類の細胞のうち6種類の肺癌細胞株の細胞増殖の阻害を認めた。さらにFBXO17過剰発現細胞を用いてEGFR経路活性化に与える影響を検討したところ, 一部の細胞でERKのリン酸化の上昇を認めた。また, 細胞周期のG1/Sチェックポイントに影響を与えている可能性が示唆された。 本研究ではFBXO17の結合タンパク同定には至らなかったことから機能を直接的に説明することはできなかったものの, FBXO17が肺癌細胞の増殖, 細胞周期, EGFR経路に影響を及ぼす因子であることを見出した。 We found that knockdown of FBXO17 induced cell growth arrest in 6 lung cancer cell lines out of tested 8 cell lines. Not all but some lung cancer cell lines showed up-regulation of phosphorylated ERK by FBXO17 overexpression. Moreover, G1/S cell cycle checkpoint was disrupted by FBXO17 overexpression in all tested lung cancer cell lines. We could not identify the binding protein of FBXO17, but we've suggested that FBXO17 is an important gene implicating in cell growth, cell cycle and EGFR pathway.
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2014 ~ 2015 課題番号: 26860614 研究分野: 肺癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26860614seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860614

研究課題名（和文）EGFR変異陽性肺癌におけるFBX017の役割の解明

研究課題名（英文）Role of FBX017 in EGFR mutation positive NSCLC

研究代表者

浜本 純子（HAMAMOTO, JUNKO）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40570239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）： FBX017の発現を抑制することにより、試した8種類の細胞のうち6種類の肺癌細胞株の細胞増殖の阻害を認めた。さらにFBX017過剰発現細胞を用いてEGFR経路活性化に与える影響を検討したところ、一部の細胞でERKのリン酸化の上昇を認めた。また、細胞周期のG1/Sチェックポイントに影響を与えている可能性が示唆された。

本研究ではFBX017の結合タンパク同定には至らなかったことから機能を直接的に説明することはできなかったものの、FBX017が肺癌細胞の増殖、細胞周期、EGFR経路に影響を及ぼす因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）： We found that knockdown of FBX017 induced cell growth arrest in 6 lung cancer cell lines out of tested 8 cell lines. Not all but some lung cancer cell lines showed up-regulation of phosphorylated ERK by FBX017 overexpression. Moreover, G1/S cell cycle checkpoint was disrupted by FBX017 overexpression in all tested lung cancer cell lines.

We could not identify the binding protein of FBX017, but we've suggested that FBX017 is an important gene implicating in cell growth, cell cycle and EGFR pathway.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は癌死因の第一位であり、年間にわが国で7万人、全世界で100万人以上の死亡の原因となっている。日本人の肺腺癌の30-50%がEGFR遺伝子の変異をもつことが知られており、陽性例にはチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKIs)が治療効果を示す。しかし、EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対して高い感受性を示すEGFR-TKIsも、初期耐性あるいはT790M変異に代表される獲得耐性によりその効果は限定的となっている。非小細胞肺癌におけるEGFR pathwayについては、今までに多くの研究がなされ、どのようにしてEGFRが活性化しシグナルを下流に伝えるのかなどが明らかにされた。しかし「EGFR pathwayがどのようにその活性化状態を維持するのか?」など未だ不明な点も多い。今後これだけ多くのEGFR肺癌患者の予後を少しでも改善するために、新たなアプローチに基づいた治療法が期待されている。

(2) 我々はEGFR遺伝子の変異をもつ肺腺癌細胞株PC9においてEGFR-TKIsの一つであるgefitinibの耐性細胞株を作成し(Terai, Hamamoto et al. 2013)、cDNA microarrayを行って遺伝子発現解析をおこなった。その結果、gefitinibに対する耐性化に関わる遺伝子の候補としてFBX017, IL-32, NRG3の3遺伝子を同定した。「FBX017がgefitinibへの耐性化を誘導しているのではないか?」という仮説のもと、PC9の親株とPC9 gefitinib耐性株でsiRNAによるノックダウン実験を行った。その結果、仮説に反してFBX017はgefitinibに対する薬剤感受性に影響を与えなかった。

しかし、FBX017ノックダウンによりPC9親株において著しい細胞増殖抑制をもたらした(gefitinib 0 μM)。PC9 gefitinib耐性株においても細胞増殖抑制効果は認められたが、PC9親株に比べてその効果は限定的であった。PC9 gefitinib耐性株に関して我々はこれまでにEGFR pathwayが活性化していることを見出ししている(Terai, Hamamoto et al. 2013)。EGFR pathwayにのみ依存して増殖するPC9親株とEGFRおよびFGFR1 pathway両方に依存するPC9 gefitinib耐性株のFBX017ノックダウンによる増殖抑制効果の差から、我々は「FBX017がEGFR pathway活性化あるいは安定化に関係しているのではないか?」との仮説に至った。

(3) FBX017はF-box proteinsの1つであり、F-box proteinsはSCF(SKP1-cullin-F-box)と呼ばれるユビキチンリガーゼの構成要素の一つである。ユビキチンにより標識されたタンパク質をプロテアソームで分解する系はユビキチン-プロテアソームシステムと呼ばれ、目的タンパク質を特異的に分解し、細胞内から除去することを目的としている。このシステムは細胞周期制御、免疫応答、シグナル伝達といった細胞中の様々な働きに関わる機構である。この

システムの中で、どのタンパク質を分解するのかという特異性を決める役割を担うのがユビキチンリガーゼである。FBX017は主に脳に局在すること、SCFを形成することが報告されている(Glenn et al. 2008)のみで、基質ははまだ特定されておらず、従ってFBX017の機能は未知である。我々の実験結果とFBX017がユビキチン化を担うことを合わせて考えるとFBX017はEGFR pathwayを負に制御する因子をユビキチン化し分解することによりEGFR pathwayの蛋白を安定化し、EGFR pathway signalの活性化状態を維持している可能性がある(図1)。

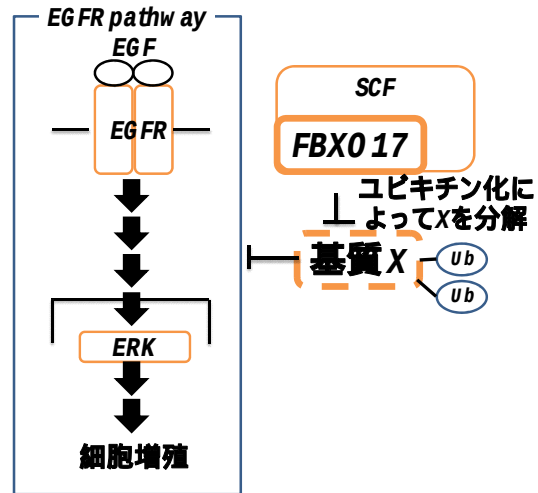


図1

2. 研究の目的

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) は非小細胞肺癌の代表的な癌遺伝子の一つである。今までに、各種のEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKIs)が開発された。しかしEGFR-TKIs治療にも関わらず、依然としてEGFR変異陽性肺癌患者は多くの場合数年で死亡する。これだけ多くいるEGFR肺癌患者を救うためには、EGFR肺癌に対する新たなアプローチが必要である。

我々は予備実験の結果から蛋白のユビキチン化に関わるFBX017がEGFR経路の活性化・安定化に関わる可能性を見出した。本研究の目的は、この結果をさらにin vitroおよびin vivoで検討し、EGFR変異陽性肺癌におけるFBX017の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 肺癌におけるFBX017の役割を解明するためsiRNA(短期間 knockdown モデル、in vitro)、過剰発現の系を構築した。これらの細胞で細胞増殖能をMTSアッセイ、足場非依存性増殖能をColony formation assayによって調べた。

(2) FBX017による細胞増殖抑制のメカニズムを解明するため、構築した細胞を用いてWestern BlottingによりEGFR pathwayに与えるFBX017の影響を、FACSにより細胞周期

に与える影響を検討した。
 (3) 結合タンパクを同定するため過剰発現系で免疫沈降を施行した。

4. 研究成果

(1) 我々が所有していた肺癌細胞及び気道上皮細胞計 16 種類について mRNA, タンパクレベルの FBX017 発現量を調べた後、9 種類の細胞に対して siRNA を用いて FBX017 の発現をノックダウンした。試した 9 種類の細胞のうち 8 種類の肺癌細胞でノックダウンでき、このうち 6 種類において細胞増殖の阻害が観察された(図 2 に H358 細胞を例として示す)。

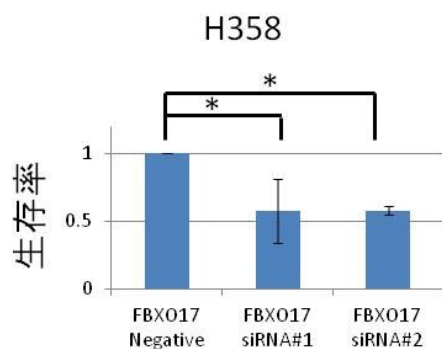


図 2

一方 Myc-tag 及び Flag-tag を付加した FBX017 遺伝子をクローニングして過剰発現系を様々な肺癌細胞で構築し、増殖速度に影響があるかどうかを細胞カウント及び Colony formation assay によって検討したが、明らかな差を見出すことはできなかった。

(2) 次に、これらの過剰発現細胞の EGFR pathway 活性に与える影響を検討した(図 3)。その結果、肺腺癌細胞 A549 において ERK のリン酸化の上昇が認められたが、様々な細胞に共通した大きな変化を見出すことはできなかった。

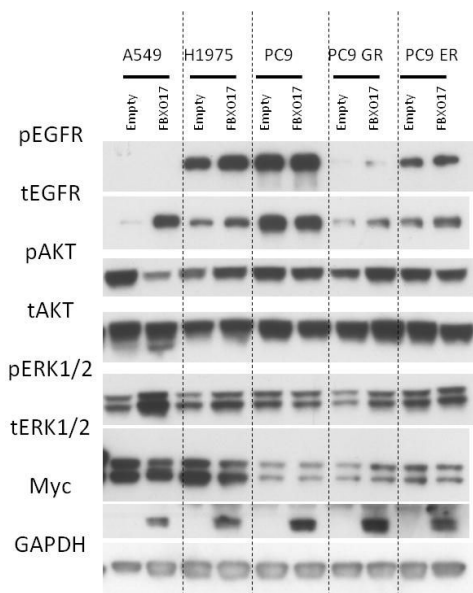


図 3

(3) FBX017 が複合体を形成している SCF(SKP1-cullin-F-box)は、細胞周期 G1/S および G2/M の移行を制御することが知られている。そのため FBX017 が細胞周期に影響を与えている可能性が高い。細胞周期のどの phase に関わっているかを検討するため、構築した FBX017 過剰細胞の細胞周期を FACS を用いて解析した。exponential の細胞の細胞周期は FBX017 過剰発現により変化がなかったため、過剰量のチミジンを添加することにより G1/S 期境界で停止させるダブルチミジンブロックを行った。その結果、試したどの細胞においても FBX017 過剰発現により細胞は G1/S 期境界で停止することができず、G2/M 期へ移行してしまうことが分かった(図 4 に PC9ER 細胞を例として示す)。

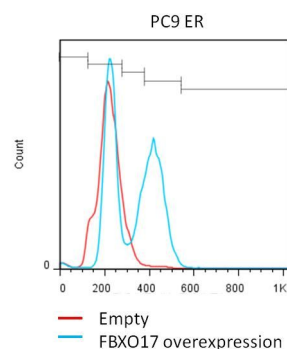


図 4

(4) 結合タンパクを同定するため過剰発現系で付加した tag の抗体を用いて免疫沈降を施行した。

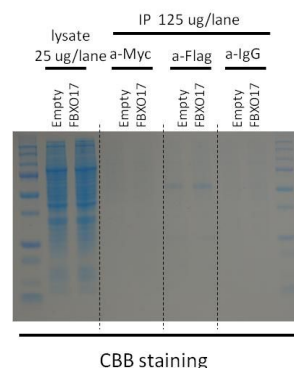
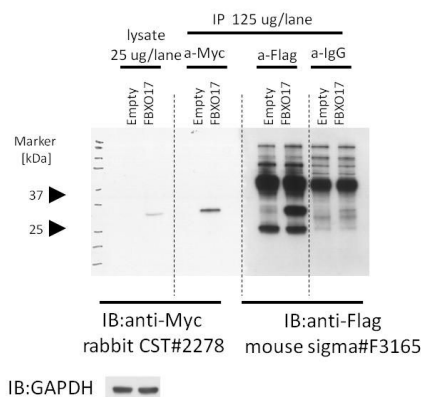


図 5

しかし、結合タンパクの候補となるような、CBB 染色でFBX017 過剰発現細胞特異的なバンドは得られなかった（図5）。

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）

〔学会発表〕（計0件）

〔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〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

浜本 純子（HAMAMOTO, Junko）
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号： 40570239

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし