

論文内容の要旨

Molecular biological role of epithelial splicing regulatory protein 1 in intrahepatic cholangiocarcinoma

肝内胆管癌における ESRP1 の分子生物学的役割

日本医科大学医学研究科 消化器外科分野

大学院生 春名孝洋

Hepatology research. 2024 July 22. Online ahead of print.

(背景)

肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma; iCCA)は典型的な症状に乏しいため早期発見が難しく、手術切除以外に有効な治療法が確立されていない。さらに術後再発も65%程度認める非常に予後不良な疾患である。そのため、iCCAの病態を解明し特異的なバイオマーカーや新規治療薬の開発が急務である。また、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)は腫瘍細胞の進行や転移を引き起こし、様々なシグナル伝達機構によって制御されるプログラムとして知られている。EMTを起こした上皮性の腫瘍細胞は細胞接着能が低下し、遊走能や細胞外マトリックスへの浸潤能を獲得することにより、腫瘍の進行や他臓器転移をもたらす。乳癌や肺癌、膵癌においてESRP1, ZEB1, CD44 isoformsによる相互作用を及ぼし合うfeedback loopがEMTを制御し、腫瘍の進行や再発・転移に影響を及ぼすことが報告されている。本研究では、RNA結合タンパクの1つであるESRP1に注目し、iCCAにおいてEMTを介した腫瘍の進行や再発・転移に影響を及ぼす分子生物学的病態の解明を目指す。

(方法)

・細胞実験(2D cell culture)

3種類の肝内胆管癌の細胞株(HuCCT1, KKU100, SSP-25)を購入し、それぞれの腫瘍の性質を確認するため増殖能、遊走能、浸潤能を測定した。腫瘍内のESRP1, ZEB1, CD44 isoformsの発現量や上皮系マーカー(E Cadherin)や間葉系マーカー(N Cadherin, Vimentin)の発現をRealtime PCRやWestern blotを用いて確認した。タンパクの発現量と腫瘍の性質を比較した。さらに、ESRP1とZEB1のsiRNAを用いて発現抑制を行い、それぞれのタンパク発現の変化や腫瘍の性質の変化を測定した。

・細胞実験(3D cell culture)

それぞれの細胞株でスフェロイドを作成し、遊走能を測定した。また、ハイドロゲルを用いた浸潤能の測定も行った。さらに、2D cell cultureと同様にESRP1とZEB1のsiRNAを用いて発現抑制を行い、腫瘍の性質の変化を測定した。

・免疫組織学的検討

2010-2022年に当科で手術切除されたiCCAの患者57名の腫瘍標本を用いて検討を行った。ESRP1とZEB1の免疫染色を行い、発現の程度をスコア化し臨床病理学的検討を行った。また、iCCAは不均一な腫瘍のため1症例につき腫瘍先進部、腫瘍中心部、先進部と中心部のスコアを合算したものをそれぞれ評価した。さらに、術後無再発生存期間に関する検討を行った。

・網羅的解析

ESRP1 に関連のある分子生物学的メカニズムの更なる解明のため、HuCCT-1 と SSP-25 において ESRP1 の発現をコントロールし、変化を認めるタンパクの網羅的解析 (Proteomics analysis) を行った。

(結果)

・細胞実験

HuCCT-1, SSP-25, K KU-100 の順で ESRP1 の発現量が多く、KKU-100, SSP-25, HuCCT-1 の順で ZEB1 の発現量が多かった。増殖能に差は認めなかったが、SSP-25, K KU-100 は HuCCT-1 と比較し遊走能、浸潤能が有意に高値であった。以上の結果より siRNA を用いた検討では、HuCCT-1, SSP-25 に対し ESRP1 の発現抑制、KKU-100 に対し ZEB1 の発現抑制を行った。ESRP1 抑制群では増殖能、遊走能、浸潤能が亢進し、ZEB1 抑制群では増殖能、遊走能、浸潤能が低下した。EMT マーカーや CD44 isoforms の発現においては、ESRP1 抑制群において上皮系マーカーが低下、間葉系マーカーが上昇、CD44s が亢進し、ZEB1 抑制群においては上皮系マーカーが上昇、間葉系マーカーが低下、CD44s が低下した。さらに、3D cell culture では、SSP-25 が最もコンパクトで、KKU-100 が最もまばらなスフェロイドを形成した。ESRP1 発現を抑制した HuCCT-1, SSP-25 のスフェロイドは辺縁がまばらな形態に変化し、ZEB1 を抑制した K KU-100 のスフェロイドは辺縁のばらつきが減少した。また、ハイドロゲルを用いて SSP-25 のスフェロイドを観察すると、ESRP1 抑制群ではスフェロイド辺縁の細胞がハイドロゲルへ浸潤する所見が認められた。

・免疫組織学的検討

iCCA の腫瘍細胞において、ESRP1 と ZEB1 は対となる発現様式であった。分化度の検討では、高分化型～中分化型線癌では低分化型線癌と比較し有意に ESRP1 発現が高値、ZEB1 発現が低値であった。一方で、低分化型線癌で高分化型～中分化型線癌と比較し有意に ESRP1 発現が低値、ZEB1 発現が高値であった。ESRP1 に関する検討では、腫瘍先進部の ESRP1 低値群では有意に腫瘍が大きい結果であり、ZEB1 に関する検討では、腫瘍先進部の ZEB1 高値群において有意に CEA が高値であったが、その他の項目で有意な結果を認めなかった。術後無再発生存期間に関しては、3 種類全ての検討において ESRP1/ZEB1 比が低値の群は有意に術後再発を認めた。

・網羅的解析

ESRP1 抑制群に共通して発現上昇したタンパクを 24 種類認めた。その中で本研究に関連のあるタンパクとして細胞接着に影響を及ぼす flotillin 2 に注目した。Western blot で

ESRP1 抑制群において flotillin 2 は上昇し、ZEB1 抑制群において flotillin 2 は低下することを確認した。

(考察、結語)

本研究により、ESRP1 低発現、ZEB1 高発現の腫瘍細胞は間葉系の性質を獲得し、CD44s の発現を亢進させることで細胞接着能を低下させ、細胞の遊走能、浸潤能を亢進させる。そのため、ESRP1/ZEB1 比が低値の腫瘍は有意に再発、転移を認めた。また、iCCA においても ZEB1-ESRP1-CD44 isoforms は相互作用を及ぼし合う feedback loop の形成を証明し、flotillin 2 も含めた新たな feedback loop が存在し得ると考えられた。これにより、ESRP1 を中心としたこれらのタンパクは iCCA の治療戦略の新たなターゲットとして提案され、今後の研究においてそのメカニズムをさらに探求することが期待される。