



High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島田, 真衣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/790

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 528号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏名	島田真衣		
論文題目	High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers (p27のE3リガーゼであるPirh2の高発現は、頭頸部癌におけるp27の低発現と予後不良に関与する)		

博士(医学) 島田真衣

論文題目

High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers

(p27 の E3 リガーゼである Pirh2 の高発現は、頭頸部癌における p27 の低発現と予後不良に関与する)

論文内容の要旨

[はじめに]

p27 (p27^{Kip1}) はサイクリン依存性キナーゼ (CDK: cyclin dependent kinase) の阻害タンパク質 (CKI: CDK inhibitor) として細胞周期の G1 期進行を抑制的に制御している。生化学第一講座では p27 の分解機構を解析しており、p27 をユビキチン化しプロテアソームにおいて分解に導くユビキチンリガーゼとして Pirh2 を新たに同定した (Hattori et al, Cancer Res 2007)。Pirh2 は p53 のユビキチンリガーゼとしても報告され、肺癌や前立腺癌組織で高発現しているという報告がある。しかし p27 との関連での報告はなく、また頭頸部癌での Pirh2 発現に関する報告もない。本研究では、頭頸部癌細胞を用い Pirh2 の発現とその標的としての p27 の発現の関係を解析し、頭頸部癌細胞の増殖における Pirh2 の機能を検討した。さらに、頭頸部癌臨床検体の免疫組織学的解析を行い病理学的因子との相関について検討した。

[材料ならびに方法]

頭頸部癌細胞 5 種類 (Ho-1-u-1 細胞、Ho-1-N-1 細胞、HSC-2 細胞、HSC-3 細胞、Ca9-22 細胞) を用いて、ウエスタンブロットリング法、免疫組織学的染色法により Pirh2 及び p27 の発現を解析した。また Pirh2 に対する siRNA を細胞にトランスフェクションすることによりノックダウンし、Pirh2 の減少による p27 の変動と細胞増殖、細胞周期への影響を検討した。また、1991 年から 2002 年までに浜松医科大学歯科口腔外科において 1 次治療として根治的外科手術のみを受けた頭頸部癌 (口腔癌) 患者 57 例の外科切除標本を用いて、Pirh2 及び p27 の免疫組織学的染色による発現の解析を行った。染色結果により高発現群と低発現群の 2 群に分けて、腫瘍のサイズ (T 分類)、リンパ節転移の有無、ステージ分類、病理学的分化度、生存率、免疫組織学的染色法による p27 発現との相関を統計学的に検討した。

[結果]

頭頸部癌細胞 5 種類全てで Pirh2 の発現を認めた、そのうち Ho-1-u-1、Ho-1-N-1 細胞を用いて siRNA による Pirh2 ノックダウンを行い、Pirh2 タンパクの減少により内因性の p27 が蓄積することがウエスタンブロットリング及び免疫組織学的染色の両方法で確認された。また Pirh2 の減少に伴う細胞周期 G1-S 移行の遅延と細胞増殖能の低下が認められた。外科切除標本における免疫組織学的染色結果では、正常上皮と比較して有意に癌組織で Pirh2 の発現が高く ($P < 0.001$)、p27 の発現率の結果と有意に逆相関していた ($P = 0.019$)。臨床病理学的因子との関連では、T 分類 ($P = 0.014$)、ステージ分類 ($P = 0.006$) と相関したが、リンパ節転移の有無、病理学的分化度とは相関しなかった。Kaplan-Meier 法による検討では Pirh2 低発現群に比べ高発現群で有意に予後不良であり ($P = 0.03$)、p27 と逆相関している症例の予後ではさらに有意性を持って予後不良であった ($P = 0.004$)。また、多変量解析において Pirh2 は独立した予後因子として同定された。

[考察]

頭頸部癌細胞株を用いた実験で、Pirh2 ノックダウンにより p27 が蓄積し、細胞増殖及び細胞周期進行が抑制された。さらに癌検体を用いた免疫組織学的染色結果からも、Pirh2 が T 分類、ステージ分類と相関することが明らかになり、Pirh2 が細胞周期のブレーキである p27 の分解を亢進することにより頭頸部癌の増殖に影響を与えていることが推測された。しかしながらリンパ節転移の有無とは相関を認めず、今回の研究では転移症例が少なかったことから転移能への関与については更なる研究が必要と考えられた。また、Pirh2 高発現のものは予後不良であり、p27 発現と逆相関している群での予後比較ではさらに大きな差を認めたことから、Pirh2 が癌細胞における p27 分解に密接に関与し、腫瘍の増殖及び予後に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、多変量解析において独立した予後因子と同定されたことから、予後予測因子の一つとなる可能性が示唆された。Pirh2 は p53 のユビキチンリガーゼとして知られていたが、多種の腫瘍において p53 遺伝子は変異しており、Pirh2 による p53 の分解と癌化の関係については更なる研究が必要と考えられる。一方で p27 の腫瘍における遺伝子変異や欠失はごくまれであり、ヒト腫瘍において癌抑制機能を持つタンパク質 p27 が Pirh2 の高発現により過剰な分解を受け、腫瘍の増殖及び予後に影響を与えていると推察される。これまで多種の癌において p27 の低発現が報告され、p27 の癌における分解要因としては SCF^{Skp2} と Cks1 の協力によるユビキチン依存的分解がその主因とされてきた。本研究は p27 の新たなユビキチンリガーゼである Pirh2 がヒトの癌において p27 の発現量の制御に関与し、癌の増殖や予後に影響を及ぼしている可能性を示した初めての報告である。Pirh2 は予後診断マーカーとして期待でき、予後不良の癌に対する新たな分子標的として Pirh2 阻害剤の探索が待たれる。

[結論]

頭頸部扁平上皮癌において Pirh2 は高頻度で高発現しており、p27 の発現量と逆相関していた。また Pirh2 の高発現は腫瘍サイズや予後不良と相関していた。Pirh2 は細胞周期のブレーキである p27 を分解することにより腫瘍細胞の増殖に寄与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

p27 (p27^{Kip1}) はサイクリン依存性キナーゼの阻害タンパク質として細胞周期の G1 期進行を抑制的に制御している。生化学第一講座では p27 の分解機構を解析しており、p27 をユビキチン化しプロテアソームにおいて分解に導くユビキチンリガーゼとして Pirh2 (p53-inducible protein with RJNG-H2 domain) を新たに同定した。Pirh2 は p53 のユビキチンリガーゼとしても報告され、肺癌や前立腺癌組織で高発現しているという報告がある。しかし p27 との関連での報告はなく、また頭頸部癌での Pirh2 発現に関する報告もない。そこで申請者は、頭頸部癌細胞を用い Pirh2 の発現とその標的としての p27 の発現との関係を解析し、頭頸部癌細胞の増殖における Pirh2 の機能を検討した。さらに、頭頸部癌臨床検体の免疫組織学的解析を行い病理学的因子との相関について検討した。

[材料ならびに方法]

頭頸部癌細胞 5 種類 (Ho-1-u-1 細胞、Ho-1-N-1 細胞、HSC-2 細胞、HSC-3 細胞、Ca9-22 細胞) を用いて、ウエスタンブロッティング法、免疫組織学的染色法により Pirh2 及び p27 の発現を解析した。また Pirh2 に対する siRNA を細胞にトランスフェクションすることによりノックダウンし、Pirh2 の減少による p27

の変動と細胞増殖、細胞周期への影響を検討した。また、1991年から2002年までに浜松医科大学歯科口腔外科において1次治療として根治的外科手術のみを受けた頭頸部癌(口腔癌)患者57例の外科切除標本を用いて、Pirh2及びp27の免疫組織学的染色による発現の解析を行った。染色結果により高発現群と低発現群の2群に分け、腫瘍のサイズ(T分類)、リンパ節転移の有無、ステージ分類、病理学的分化度、生存率、免疫組織学的染色法によるp27発現との相関を統計学的に検討した。

[結果]

頭頸部癌細胞5種類全てにPirh2の発現を認め、p27の発現量とは逆相関していた。Ho-1-u-1細胞、Ho-1-N-1細胞を用いてsiRNAによるPirh2ノックダウンを行い、Pirh2タンパクの減少により内因性のp27が蓄積することがウエスタンブロッティング及び免疫組織学的染色の両方法で確認された。またPirh2の減少に伴う細胞周期G1-S移行の遅延と細胞増殖能の低下が認められた。外科切除標本にやける免疫組織学的染色結果では、正常上皮と比較して癌組織で有意にPirh2の発現が高く($p < 0.001$)、p27の発現と有意に逆相関していた($P = 0.019$)。臨床病理学的因子との関連では、T分類($P = 0.014$)、ステージ分類($P = 0.006$)と相関したが、リンパ節転移の有無、病理学的分化度とは相関しなかった。Kaplan-Meier法による検討ではPirh2低発現群に比べ高発現群では有意に予後が不良であり($P = 0.03$)、p27と逆相関している症例ではさらに有意に予後が不良であった($P = 0.004$)。また、多変量解析においてPirh2は独立した予後因子として同定された。

以上の結果から、p27の新たなユビキチンリガーゼであるPirh2がヒトの癌においてp27の発現量の制御に関与し、癌の増殖や予後に影響を及ぼしていることが証明された。審査委員会では、Pirh2による癌の制御について初めて証明したこと、またPirh2の臨床応用(予後診断マーカー、Pirh2阻害剤の開発など)への可能性を示した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 培養細胞(p53変異細胞)について
- 2) Transfectionの効率について
- 3) p27、Pirh2発現の増減の率について
- 4) Doubling timeのチェックについて
- 5) 蛍光免疫染色をしなかった理由について
- 6) 抗原の賦活化について
- 7) ビオチン反応系のデメリットについて
- 8) 腫瘍例と正常例の比較について
- 9) 免疫染色のカットオフ値についてPirh2の核内移行について
- 10) 正常細胞のPirh2の発現について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 峯田 周幸

副査 上田 啓次

新村 和也