

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10131

研究課題名(和文) Zfp57遺伝子系をターゲットとした大腸癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) ES cell-specific transcription factor ZFP57 promotes liver metastasis of colorectal cancer

研究代表者

高村 博之 (Takamura, Hiroyuki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：40377396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌培養細胞を用いた研究で、ZFP57を過剰発現させると、その増殖能が亢進するとともに、マウスの脾注モデルで大腸癌肝転移を促進することを明らかにした。一方、ZFP57をノックダウンすると増殖能が抑制されるとともに、マウスにおける肝転移が抑制された。大腸癌の臨床検体を用いてZFP57の発現を免疫組織学的に評価した結果、肝転移を有する症例の原発巣や肝転移巣では肝転移陰性例の原発巣に比べてZFP57が過剰発現している頻度が有意に高く、多変量解析でもZFP57の過剰発現が肝転移の有意な規定因子と判断された。以上より、ZFP57過剰発現は大腸癌肝転移を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In liver metastatic experiments using human colorectal cancer cell lines, liver polymetastasis occurred with high frequency in the case of ZFP57-overexpressing cells, while control cells produced only oligometastasis. When we examined the relationship between the clinicopathological feature of colorectal cancer and ZFP57 overexpression using clinical specimens, liver metastasis-positive cases were more frequently associated with ZFP57 overexpression than negative cases in primary lesions of colorectal cancer. In addition, the expression level of ZFP57 showed significant correlations with that of NANOG, a metastasis-related gene. We also found that ZFP57 overexpression results in reduced disease-free survival rate of patients in colorectal cancer. This study demonstrated that ZFP57 plays an important role in liver metastasis of colorectal cancer. ZFP57 would be a novel target molecule of treatment for liver metastasis of colorectal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：ZFP57 大腸癌 肝転移

1. 研究開始当初の背景

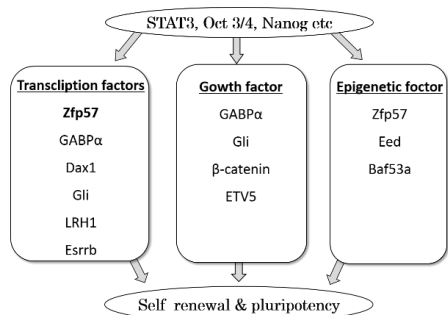
我々はこれまでの ES 細胞とがん細胞の相同性の研究から、Zfp57 遺伝子が両者の増殖で重要な役割を担っていることを報告した (Akagi T et al. Biochem Biophys Res Commun 2005, Tada Y et al. Oncogene 2014). 即ち、この遺伝子を制御することによりがん幹細胞を制御することにつながると確信している。Zfp57 は染色体の 6p22 に存在する遺伝子で、我々はこの遺伝子が Nanog, STAT3, OCT3/4 で制御され(図 1)、インプリンティング遺伝子の IGF2 や Dlk1 の発現を制御していることを明らかにした。Zfp57 は 516 個のアミノ酸で構成され、1つの KRAB ドメインと 7 つの C2H2 型 Zinc finger を含む Kruppel C2H2 型 zinc finger protein family に属する遺伝子である。正常細胞では精巣や卵巣、脳などに発現が限定しているため治療の分子標的となる可能性を秘めた遺伝子である。我々はこれまでの研究から以下の知見を得ている。

Zfp57 をノックアウトした ES 細胞をヌードマウスに移植しても、wild type の ES 細胞を移植した際に認められるような幼若な腫瘍塊は認められず、比較的分化・成熟した細胞塊が認められるのみであった。即ち、Zfp57 をノックアウトすることにより、ES 細胞の造腫瘍性が制御される。このことは、今後、遺伝子導入で作成された iPS 細胞を臨床応用する上で、重要な意義を持つ。

ヒト線維肉腫由来の HT-1080 は Zfp57 の過剰発現によって足場非依存性増殖能が亢進する。

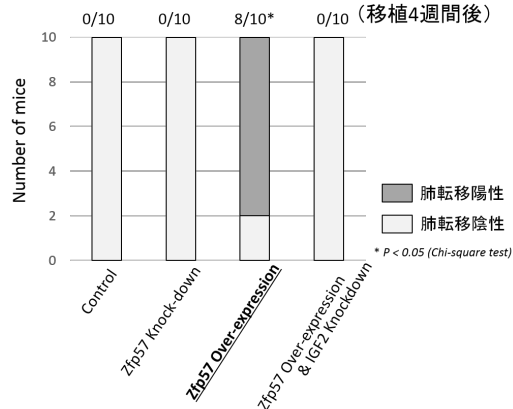
HT-1080 細胞において Zfp57 遺伝子を過剰発現すると、浸潤能が亢進し、またヌードマウスの大腿筋内への移植実験で肺転移能が獲得されることを明らかにした。Wild type の HT-1080 細胞をヌードマウスの大腿筋内へ移植しても肺転移は形成されなかったが、Zfp57 過剰発現細胞を移植すると肺転移(図 2)が高頻度に出現した。Zfp57 の過剰発現により「がん」の浸潤能が亢進し、血行性転移能が獲得される。

図1. ES細胞における Self renewal & Pluripotency 維持の分子機構



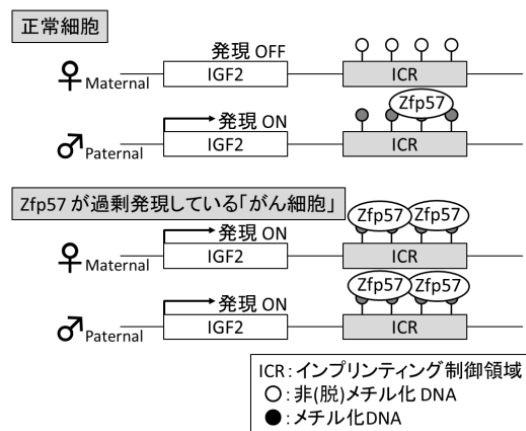
HT-1080 細胞を用いた研究から、Zfp57 遺伝子がインプリンティング遺伝子である IGF2 の発現を調節し、さらにこれらの遺伝子の loss of imprinting が Zfp57 によるがん

図2. HT-1080 細胞のマウス大腿筋移植モデルにおける肺転移出現率



増殖促進の重要な因子と考えられる(図 3)。Zfp57 遺伝子が「がん」におけるインプリンティング遺伝子の異常を引き起こす原因遺伝子の一つである。

図3. Zfp57 による IGF2 のゲノムインプリンティング異常の仮説



食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、胆道癌、肝癌、乳癌の切除標本を用いて Zfp57 の発現を評価した結果、多くの癌で Zfp57 の高発現が確認された。特に大腸癌肺転移症例では Zfp57 が過剰発現しており、これらのリンパ節転移巣と肝転移巣では Zfp57 の発現が著明に亢進していた。また、これまでの研究で、Zfp57 の上流には Nanog が存在し、この Nanog が Zfp57 の発現を制御していることを明らかにした (Yamaguchi Y, Takamura H, et al. Biochem Biophys Res Commun 2014)。Nanog の高発現は多くの癌で予後不良因子とされ、悪性腫瘍の増殖・進展に関与する Cyclin D1, Bcl2, BclxL, Gli1, Gli2 の発現を調節することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

以上の背景より、Nanog の下流に存在する Zfp57 の過剰発現は、ES 細胞の造腫瘍性のみならず、大腸癌においてもその増殖能や転移能獲得にきわめて重要な役割を担う遺伝子と結論付けられる。これまでの知見をもと

に、本研究では Zfp57 遺伝子が大腸癌の肝転移やリンパ節転移の治療における新規分子標的となることを明らかにする。

3. 研究の方法

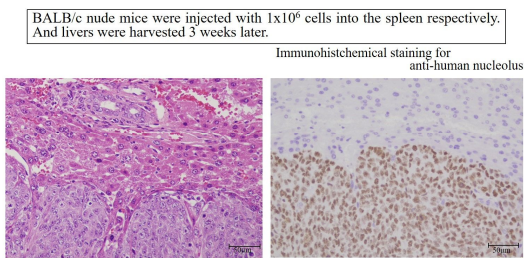
大腸癌由来の HCT116 細胞と HT29 細胞を用いて、これまで HT-1080 細胞で行ってきた実験と同様の検討を行い、Zfp57 遺伝子の発現を制御（過剰発現とノックダウン）することにより、増殖、浸潤、転移能を制御できるかどうかを、in vitro のみならずヌードマウスを用いた in vivo 実験系で明らかにする。

大腸癌の原発巣，リンパ節転移巣，肝転移巣の臨床検体を用いて，免疫組織学的に Zfp57, Nanog, IGF2 の発現を詳細に評価し，これらの遺伝子が実際の大腸癌においてどのような機能を有しているのかを検証する。

4. 研究成果

大腸癌由来の HCT116 細胞と HT29 細胞において，Zfp57 遺伝子を過剰発現すると増殖能が亢進し，ノックダウンすると増殖能が抑制されることを明らかにした。また，ヌードマウスを用いた in vivo 実験系で，Zfp57 を過剰発現すると HCT116細胞とHT29細胞がともに脾注による肝転移能が亢進することを明らかにした（図 4-1, 4-2, 5-1, 5-2）。一方，両細胞において Zfp57 をノックダウンすると脾注による肝転移能が低下することを明らかにした。

図4-1. Liver metastasis of HCT116 cells in nude mice xenograft model



BALB/c nude mice injected with 1×10^6 cells into the spleen respectively. The livers were harvested 3 weeks later. The liver metastasis was ascertained in three representative, maximal coronal sections with 200 μ m distance between slices.

図4-2. Zfp57 overexpression promotes liver metastasis of HCT116 cells in nude mice xenograft model

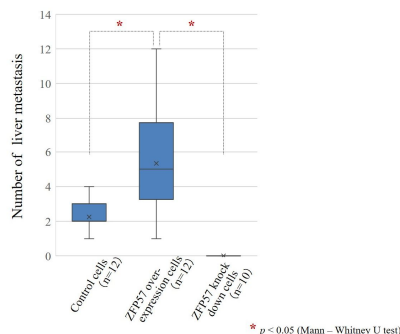
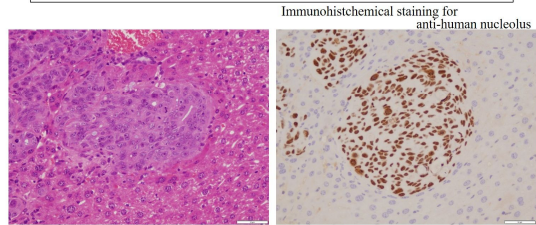


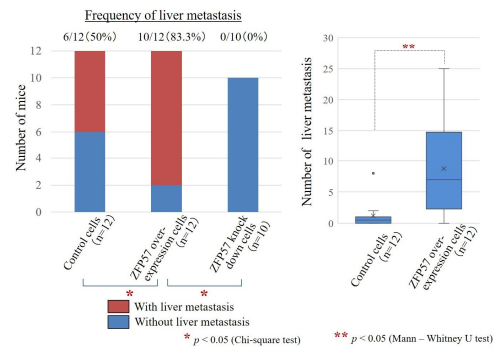
図5-1. Liver metastasis of HT29 cells in nude mice xenograft model

BALB/c nude mice were injected with 5×10^6 cells into the spleen respectively. And livers were harvested 3 weeks later.



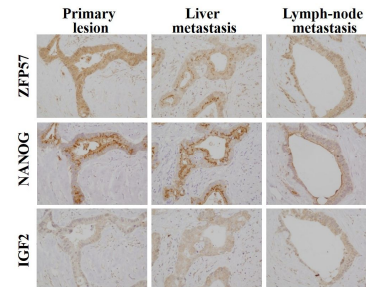
BALB/c nude mice injected with 5×10^6 cells into the spleen respectively. The livers were harvested 3 weeks later. The liver metastasis was ascertained in three representative, maximal coronal sections with 200 μ m distance between slices.

図5-2. Zfp57 overexpression promotes liver metastasis of HT29 cells in nude mice xenograft model



大腸癌の臨床検体を用いて，Nanog, Zfp57, IGF2 の発現を評価したところ（図 6），Nanog と Zfp57 および Nanog と IGF2 の発現の間に有意な相関が認められることを明らかにした（図 7）。さらに，肝転移陽性例では原発巣

図6. Immunohistochemical staining for Zfp57, Nanog and IGF2 in the same case of colorectal cancer



The staining intensity was designated as non-existent (0), weak (1), moderate (2), or strong (3). The number of cells was scored as no staining (0), <10% (1), 10%–50% (2), 50%–80% (3), or >80% staining (4). After multiplying these two variables, a score of 0–3 was considered negative (representing no overexpression of ZFP57, NANOG, or IGF2), while a score of 4–7 was considered positive (representing overexpression of ZFP57, NANOG, or IGF2).

図7. Correlation Zfp57, Nanog and IGF2 in primary lesion of colorectal cancer (n=172)

ZFP57	NANOG positive rate
Negative	63.6% (42/66)
Positive	82.8% (168/203) *

IGF2	NANOG positive rate
Negative	62.6% (62/99)
Positive	87.1% (148/170) *

ZFP57	IGF2 positive rate
Negative	63.6% (42/66)
Positive	63.1% (128/203)

* $p < 0.05$ (Chi-square test)

における Zfp57 の発現が肝転移陰性例に比べて有意に亢進し、肝転移巣でも発現の亢進が認められることを明らかにした(図 8)．大腸癌の臨床病理学的因子と肝転移との関係を多変量解析したところ、脈管侵襲、壁深達度、リンパ節転移に加えて Zfp57 の過剰発現も有意な独立した規定因子であると判断された(図 9)．原発巣における Zfp57 高発現例の Progression free survival は、陰性例に比べて有意に低下していた(図 10)．

図8. Immunohistochemical evaluation for the ZFP57 in primary lesions, liver metastasis and lymph node metastasis of colorectal cancer. (n=172)

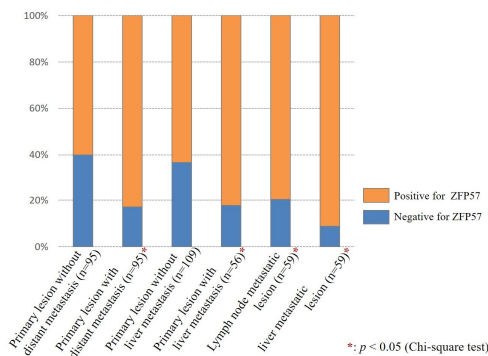
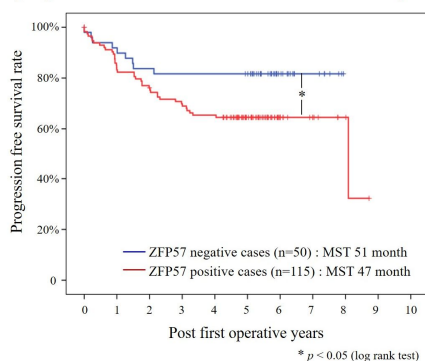


図9. Multivariate analysis of clinic-pathological features for liver metastasis in colorectal cancer (n=172)

Multiple logistic regression analysis

Factor	Odds Ratio (95% CI)
Venous permeation (-)	—
Venous permeation (+)	6.695 (1.427–31.397)
No	—
N1-2	3.615 (1.683–7.765)
T1-3	—
T4	3.025 (1.241–7.375)
ZFP57 negative	—
ZFP57 positive	2.473 (1.029–5.940)

図10. ZFP57 expression in primary lesions reduces progression-free survival of colorectal cancer patients.



【結論】

ES細胞特異的転写因子 Zfp57 の過剰発現は大腸癌肝転移を促進することが明らかとなり、Zfp57 は大腸癌治療の新規ターゲット分

子となりえる。

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 1 件)

1. Shoji Y, Takamura H, Koide H, et al. ES cell-specific transcription factor ZFP57 promotes liver metastasis of colorectal cancer. J Surgical Research, in press.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. TAKAMURA H. et al. 「ES cell-specific transcription factor ZFP57 promotes liver metastasis of colorectal cancer」 The 30th meeting of Japanese society of hepato-biliary-pancreatic surgery. 2018年6月 パシフィコ横浜(横浜)

2. 高村博之, その他. 「胚性幹細胞特異的転写因子の ZFP57 遺伝子は新規がん遺伝子で大腸癌肝転移を促進する」 第 39 回癌免疫外科研究会 2018年5月 岐阜都ホテル(岐阜)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 博之 (Hiroyuki Takamura)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：40377396