

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07126

研究課題名(和文)新規がん遺伝子Zfp57による細胞がん化の分子機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of carcinogenesis by novel oncogene Zfp57

研究代表者

小出 寛 (KOIDE, Hiroshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70260536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子Zfp57の機能解析を行った結果、Zfp57がPeg3遺伝子やSnrpn遺伝子といったインプリント遺伝子の発現を抑制することによって足場非依存性増殖(がん細胞が持つ特性の1つで、がんの腫瘍形成において重要な能力)を促進していることを明らかにした。
またマウスに大腸がん由来細胞株を移植する転移モデル実験やヒトの臨床検体を用いたZfp57の発現解析を行った結果、Zfp57がヒトの大腸がんの転移において重要な役割を果たしていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりがん遺伝子に関する知見が深まり、細胞のがん化の分子機構の解明、ひいてはがん治療法の開発につながることを期待される。特に本研究で対象としたZfp57がインプリンティング制御にかかわっていることから、本研究で得られた知見が様々ながんで観察されるloss of imprintingに対する新たながん治療戦略を開発するための糸口を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We performed functional analysis of Zfp57 oncogene, and found that this oncogene promotes anchorage-independent growth, an important characteristic of cancer cells for tumor formation, by suppressing the expression of Peg3 and Snrpn genes.

In addition, metastatic model experiments using colon cancer-derived cell lines and analysis of Zfp57 expression level using human clinical specimens revealed that Zfp57 plays an important role in metastasis of human colon cancer.

研究分野：腫瘍生物学、幹細胞生物学

キーワード：がん遺伝子 ES細胞 足場非依存性増殖 転移

1. 研究開始当初の背景

がんの治療において大きな問題となる再発や転移は、抗がん剤や外科的手術によってがん組織に存在する大半の細胞を取り除いても、がん組織内に少数でも残存してしまうと、がん幹細胞が再び自己複製を行い、足場非依存的に増殖してしまうことが原因である。そのため、がん幹細胞の自己複製維持に関与している遺伝子を同定して自己複製を抑制する方法を見出せば、がん幹細胞による再発や転移を抑制できるという研究アプローチが考えられる。しかし、絶対数の少ないがん幹細胞の単離が難しいことに加え、がん幹細胞の多様性の問題（染色体が不安定であるために自己複製維持とは関係のない遺伝子にも変異が入っていること）もあり、がん幹細胞の自己複製維持に関与しているがん遺伝子の同定は進んでいなかった。

このような現状を打破するために、我々は胚性幹細胞(ES細胞)とがん幹細胞の間の高い類似性に着目し、ES細胞が自己複製維持に関与しているがん遺伝子の単離に適している材料と考えた。実際にES細胞に発現している遺伝子の中からがん遺伝子を探索した結果、転写因子 Zfp57 を同定した(文献1)。Zfp57 はがん細胞やマウス ES 細胞の足場非依存性増殖を促進し、睥がんなど多くのヒトがん組織においてその過剰発現が認められた。また他のグループの研究により、Zfp57 がいくつかのインプリント遺伝子の発現に関与していることや、新生児一過性糖尿病の原因遺伝子であることも明らかになっていた(文献2,3)。しかし我々が見出した新規がん遺伝子 Zfp57 による細胞がん化の分子機構については不明であった。

2. 研究の目的

がんの特徴である「足場非依存性増殖」「転移」「loss of imprinting」における Zfp57 遺伝子の機能を解明するために、本研究では(1) Zfp57 によって発現が調節されるインプリント遺伝子を同定してその機能を解明すること、および(2)がん転移への Zfp57 の関与を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Zfp57 の下流インプリント遺伝子の探索とその機能解析

ヒト繊維肉腫由来 HT1080 細胞やマウス ES 細胞において、Zfp57 遺伝子のノックダウンやノックアウトを行い、それらの細胞についてマイクロアレイ解析を行うことによって、Zfp57 の発現抑制によって発現量に変動があったインプリント遺伝子を探索した。発現量に変動が観察された遺伝子については、さらにリアルタイム PCR を行い、結果の確認を行った。同定したインプリント遺伝子については、腫瘍を形成する際に必要な能力である足場非依存性増殖能への関与を軟寒天コロニー形成アッセイによって調べた。

(2) Zfp57 の癌転移への関与

がん細胞の転移における Zfp57 の関与を調べるために、まずはがん由来細胞株とヌードマウスを用いたがん転移モデル実験系を樹立し、Zfp57 が転移に関与している可能性を検討した。さらに抗 Zfp57 抗体とヒトの臨床サンプル(原発巣や転移巣)を用いて免疫組織染色を行い、がん組織における Zfp57 の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Zfp57 の下流インプリント遺伝子の探索とその機能解析

我々はヒト繊維肉腫由来 HT1080 細胞において Zfp57 が増殖因子として機能するインプリント遺伝子 IGF2 の発現を促進することをすでに報告している。本研究において Zfp57 の新たな下流インプリント遺伝子の探索を行った結果、転写因子として機能する Peg3 や RNA プロセッシングに関与している Snrpn を見出した。ただし IGF2 の場合と異なり、これらの2つの遺伝子については Zfp57 がその発現を抑制していた。

次に、マウス ES 細胞において Peg3 や Snrpn の過剰発現やノックダウンを行い、足場非依存性増殖への影響の有無を調べた。その結果、Peg3 や Snrpn の過剰発現によって ES 細胞の足場非依存性増殖が抑制されることがわかった(図)。Zfp57 はこれらの遺伝子の発現を抑制していることから、この結果はインプリント遺伝子である Peg3 や Snrpn の発現を抑制することによって Zfp57 が ES 細胞の足場非依存性増殖を促進していることを示唆している。今後は同じことをヒトのがん細胞でも検討する予定である。

Snrpn mRNA は mRNA 上に2つの遺伝子(Snrpn と Snurf)がコードされているポリシストロニック mRNA であるため、Snurf についても検討を行った。その結果、Snurf の過剰発現によっても ES 細胞の足場非依存性増殖が抑制されるこ

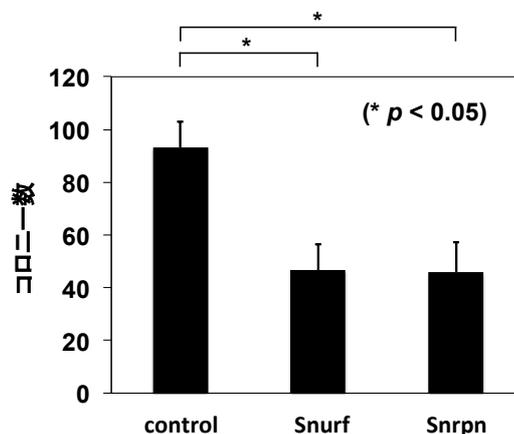


図 SnurfやSnrpnの過剰発現によってES細胞の足場非依存性増殖が抑制される

とを見出した (図)。つまり Zfp57 は、Snrpn mRNA 上から産生される 2 つのタンパク質 (Snrpn と Snurf) の両方の発現を抑制することによって、ES 細胞の足場非依存性増殖を促進していることが示唆された。さらに Snrpn, Snurf が共通のシグナル伝達経路を介して ES 細胞の足場非依存性増殖を抑制している可能性を検討するために、ES 細胞に Snrpn や Snurf を過剰発現させた際に発現量が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析で調べた。その結果、両者の間で共通する下流遺伝子の数は非常に少なく、各々が異なる経路を用いて ES 細胞の足場非依存性増殖を抑制している可能性が示唆された。

(2) Zfp57 の癌転移への関与

マウスに大腸がん由来の HT29 株や HCT116 株を移植して肝臓転移のモデル実験を行った結果、どちらの細胞株においても Zfp57 の過剰発現ががん細胞の転移を促進することを見出した。さらに、ヒトの臨床検体を用いて Zfp57 の発現量を解析した結果、肝臓転移を起こした場合には起こさない場合よりも頻繁に原発巣における Zfp57 の過剰発現が認められること、転移巣においても ZFP57 が非常に高い確率で高発現していること、さらには Zfp57 の過剰発現が大腸がん患者の生存率を下げるなどを見出した。これらの結果から、Zfp57 が腫瘍形成だけでなく、がんの転移においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった (文献 4)。

<引用文献>

1. Tada Y, Yamaguchi Y, Kinjo T, Song X, Akagi T, Takamura H, Ohta T, Yokota T, Koide H. The stem cell transcription factor ZFP57 induces IGF2 expression to promote anchorage-independent growth in cancer cells. *Oncogene* 34, 752-760 (2015)
2. Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev. Cell* 15, 547-557 (2008)
3. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet.* 40, 949-951 (2008)
4. Shoji Y, Takamura H, Yamaguchi Y, Obatake Y, Nakanuma S, Hayashi H, Makino I, Kinoshita J, Nakamura K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Fushida S, Tada Y, Akagi T, Yokota T, Ohta T, Koide H. The ES cell-specific transcription factor ZFP57 promotes liver metastasis of colorectal cancer. *J. Surg. Res.* 237, 22-29 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoji, Y., Takamura, H., Yamaguchi, Y., Yoshinao Obatake, Y., Nakanuma, S., Hayashi, H., Makino, I., Kinoshita, J., Nakamura, K., Miyashita, T., Tajima, H., Ninomiya, I., Fushida, S., Tada, Y., Akagi, T., Yokota, T., Ohta, T., and Koide, H.	4. 巻 237
2. 論文標題 The ES cell-specific transcription factor ZFP57 promotes liver metastasis of colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 22-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2018.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinjo, T., Sun, C., Ikeda, T., Ikegami, T., Tada, Y., Akagi, T., Yokota, T., and Koide, H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Platelet-derived growth factor-C functions as a growth factor in mouse embryonic stem cells and human fibrosarcoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Biology Letters	6. 最初と最後の頁 e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s11658-018-0075-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高村博之, 蒲田亮介, 山口貴久, 岡崎充善, 大畠慶直, 真橋宏幸, 寺井志郎, 中沼伸一, 岡本浩一, 牧野 勇, 木下 淳, 林 泰寛, 中村慶史, 尾山勝信, 宮下知治, 田島秀浩, 二宮 致, 伏田幸夫, 小出 寛, 太田哲生
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第39回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院医学研究科 研究基盤センター共同研究・研修室()ホームページ 研究について
http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kyodo_kenkyu_kensyu/k4.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高村 博之 (TAKAMURA Hiroyuki) (40377396)	金沢大学・大学病院・講師 (13301)	