

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09164

研究課題名(和文) ユビキチンE3リガーゼをターゲットにした消化器癌の進展、転移制御機構の解明

研究課題名(英文) Tumor-suppressive role of Smad ubiquitination regulatory factor 2 in patients with colorectal cancer

研究代表者

酒井 望 (Sakai, Nozomu)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70436385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸直腸癌原発巣切除標本の免疫染色を行い、Smurf2の発現と臨床病理学的因子や予後との関係を解析し検討した。Smurf2は大腸癌原発巣において低発現、肝転移巣においては高発現が有意に多かった。また、転移再発なし大腸癌は転移再発あり大腸癌と比較して有意にSmurf2高発現が多かった。さらに、肝転移巣におけるSmurf2高発現群は低発現群と比較して有意に肝切除後の予後が良好であった。細胞実験では、Smurf2ノックダウンにより細胞遊走能、sphere形成能、EpCAM発現が増強した。Smurf2は大腸癌幹細胞能の制御に関与し、癌抑制的に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移、再発は癌患者の予後を規定する重要な因子である。本研究では、ユビキチンリガーゼのひとつであるSmurf2に注目し、Smurf2が癌細胞のstemnessに関与する重要な因子であることが分かった。今後、Smurf2を新たなターゲットとして、これを制御することで新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf2) plays various roles in cancer progression. However, the correlation between Smurf2 and clinical outcomes has not been determined in patients with colorectal cancer and colorectal liver metastases. We analyzed 66 patients with colorectal cancer who developed liver metastases. Smurf2 expression was assessed using immunohistochemical analysis of primary and metastatic liver tumors. High Smurf2 expression in both primary and metastatic tumors was significantly associated with longer overall survival time and time to surgical failure. Multivariate analyses revealed that low Smurf2 expression in primary tumors was an independent predictor of poor prognosis. In vitro experiments demonstrated that knockdown of Smurf2 increased cell migration and tumor sphere formation. Western blot analyses revealed that Smurf2 knockdown increased the protein expression of EpCAM. Smurf2 can be considered a positive biomarker of cancer stem cell-like properties.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：転移 浸潤 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の他臓器転移は重要な予後規定因子の1つである。肝臓は癌の転移好発臓器であり、大腸癌肝転移では複数回切除を含む積極的な外科的切除や分子標的治療薬を含む化学療法の進歩による予後延長効果が報告されているが、原発臓器によっては必ずしも切除は有効でなく、また、日常臨床では、診断時に切除不能と判断せざるを得ない腫瘍径の大きい症例や、多発症例に遭遇することも多く、このような症例の予後は著しく不良であり、全体としての治療成績は未だ改善の余地がある。したがって、癌の増殖、浸潤、転移形成のメカニズムの解明と新たな治療ターゲット、治療法の開発は喫緊の課題である。当教室では、これまでに発癌から増殖、転移巣形成に至る様々な過程に関与、制御する分子、蛋白について研究を進めてきた。研究代表者は、CXCR4/CXCL12 axis に注目し転移性肝癌制御に向けた新規治療法開発のための検討を行っており、大腸癌肝転移巣における CXCR4/CXCL12 の発現パターンが予後と密接に相関することを明らかにした (Sakai et al. Clin Exp Metastasis. 2012;29:101-10.)。また、腫瘍周囲の肝組織 (非癌部) における CXCL12 の発現量が腫瘍細胞における CXCR4 の発現レベル、局在 (cytoplasmic expression, nuclear expression) を変化させることを示し、腫瘍と周囲微小環境との相互作用が予後に影響を及ぼす可能性があることを報告した。また、CXCR4/CXCL12 axis の分子標的治療のターゲットとしての可能性についても報告している (酒井他 最新医学 2012 年 6 月増刊号 1526-1533.)。CXCR4 の癌の増殖、転移に多くの機能を有することが近年他癌種でも報告されているが、CXCR4 の上流の制御因子について、我々は Krüppel-like factor (KLF) family 転写因子のひとつである KLF5 に注目し現在研究を行っている。これまでの成果として KLF5 の tumor promoter としての機能を示唆する興味深いデータが得られており、実際の肝切除後の予後とも有意な相関がみられることから、今後さらに研究を進展させ治療標的とすることを想定した場合、KLF5 の post-translational な制御の可否が焦点のひとつとなると考えられる。このような観点から regulator の候補を検討し、本研究ではユビキチンプロテアソーム系による蛋白分解機能に注目することとした。ユビキチンプロテアソーム系による蛋白分解は生体の homeostasis 維持に必須な機能であるが、近年癌治療のターゲットとしても注目されている (Hoeller D, et al. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. Nature. 2009;458:438-44.)。ユビキチン転移酵素(E3)のひとつ HECT 型リガーゼの Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factor 2) は TGFβ/BMP シグナルの調節因子として同定された酵素で、Smurf2 が KLF5 をターゲットとしその分解を制御する可能性が示唆されているが、癌の biology における機能については数少ない報告で "context-dependent" とされており、特に消化器癌の増殖、転移過程における Smurf2 の機能は何か、については未だ不明である。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では KLF5 の post-translational regulator としての Smurf2 の機能を中心に、癌の増殖、浸潤、転移形成の一連の過程における Smurf2 の役割を分子生物学的に詳細に検討し、予後との相関についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、全体を *in vitro*、clinical に分けて実験計画を作成した。

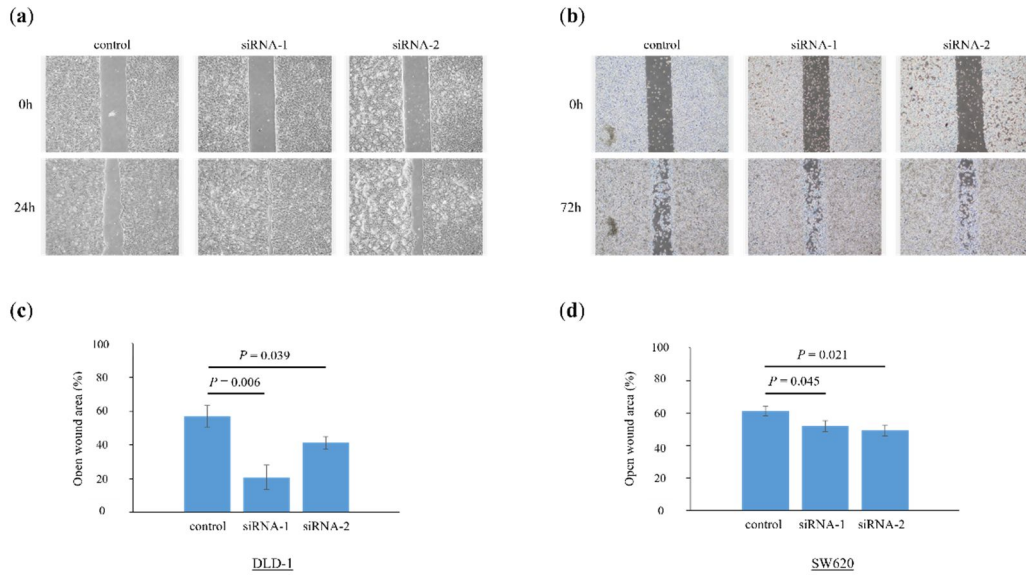
- (1) *in vitro* 癌細胞株の増殖、遊走、浸潤能、EMT に対する Smurf2 の役割について invasion assay, sphere formation assay 等により *in vitro* での機能解析を行う。
- (2) *clinical* 原発大腸癌、転移性肝腫瘍ならびに周囲肝組織における Smurf2 の発現を評価。Smurf2 発現との相関や、予後を含めた臨床病理学的因子との相関を明らかにする。

4. 研究成果

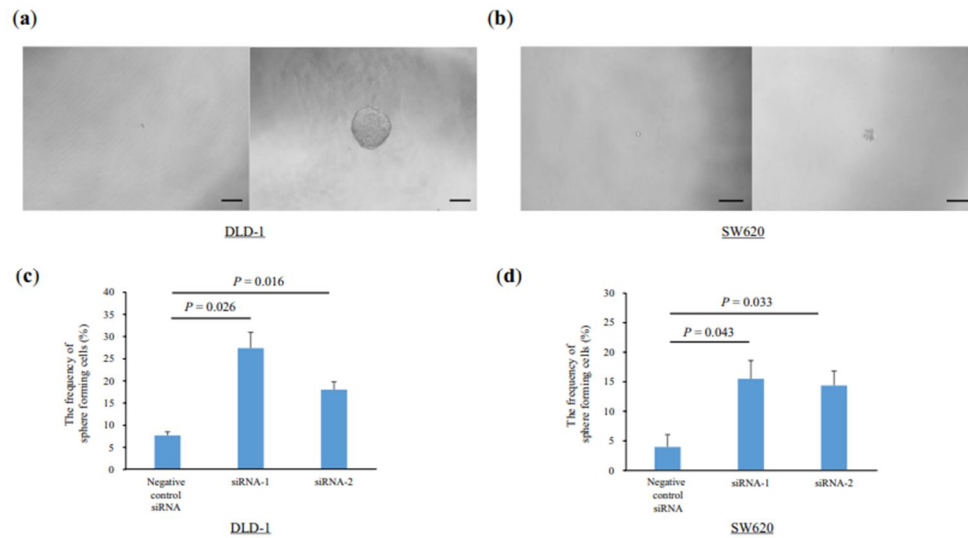
in vitro

大腸癌細胞株 DLD-1 と SW620 を用いて実験を行った。siRNA で Smurf2 の Knock down を行い、3 種類の siRNA で Smurf2 が Knock down されることを確認した。

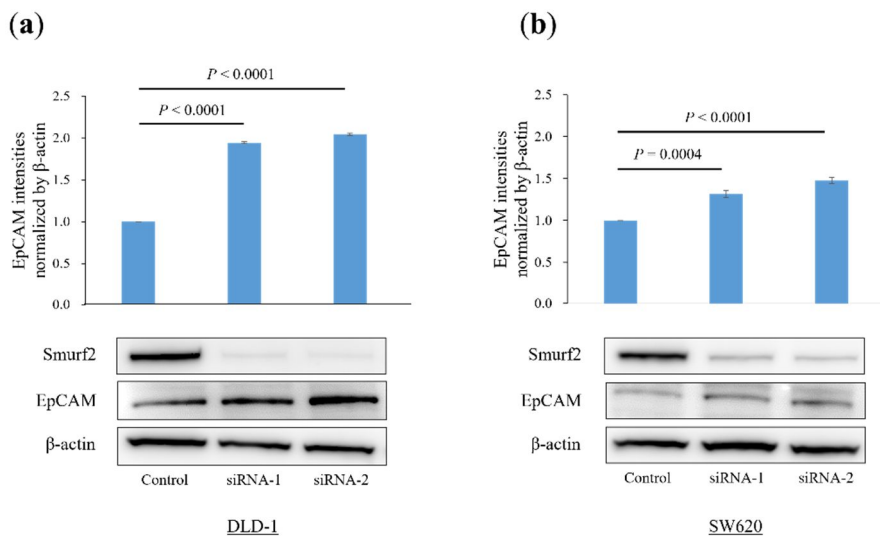
細胞遊走能の評価を行うため wound healing assay を行った。Smurf2 ノックダウンにより両細胞株において細胞遊走能は有意に亢進した。



Sphere formation assay では、Smurf2 ノックダウンにより両細胞株において有意に Sphere 形成が亢進した。



Cancer stemness property を評価するため、EpCAM 発現を Western blot にて評価した。Smurf2 ノックダウンにより、両細胞株において EpCAM 発現は有意に亢進した。

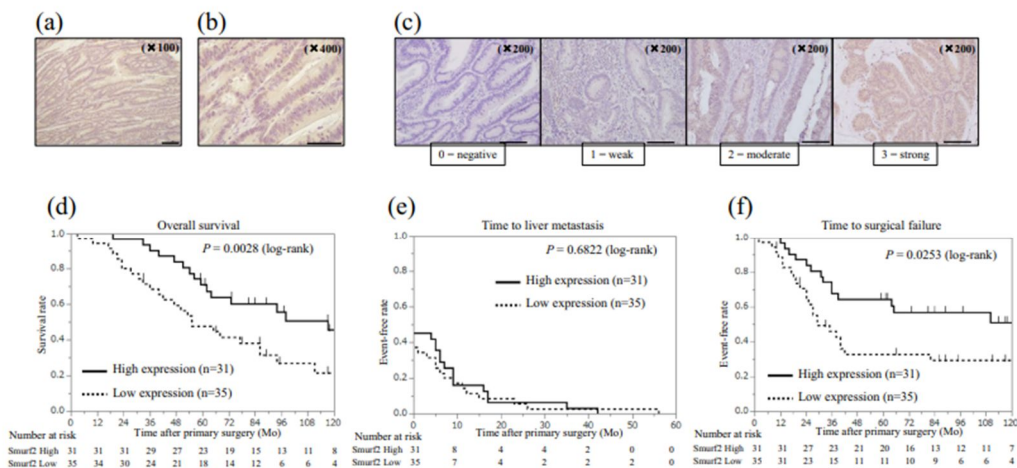


細胞増殖能、細胞浸潤能には有意な差はみられなかった。

Clinical

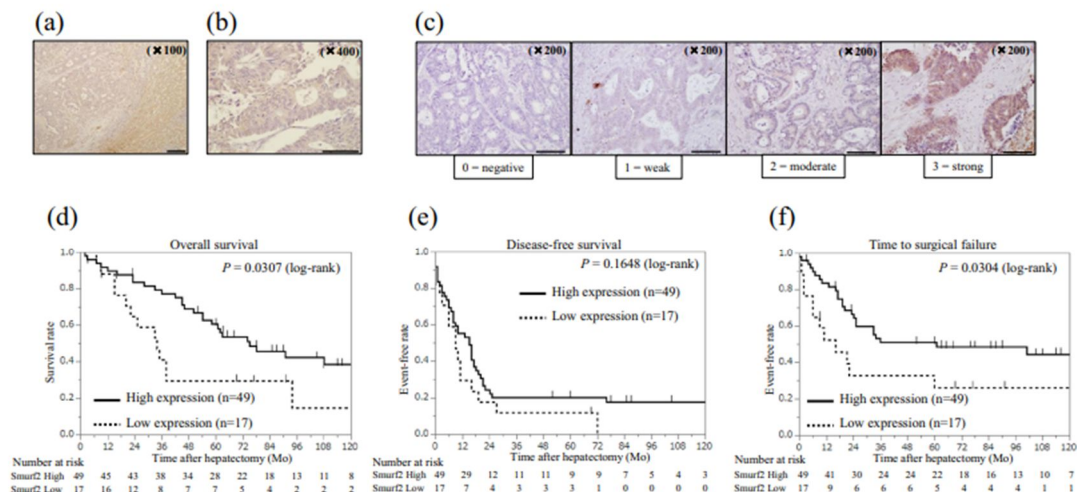
2005年-2014年に当科で初回肝切除を施行した肝転移症例66例を対象として、肝転移巣とそのペアとなる大腸直腸癌原発巣切除標本の免疫染色を行いSmurf2発現について評価した。さらに、Smurf2の発現と臨床病理学的因子や予後との関係を解析し検討した。また、転移再発なし群(n=60)の大腸癌も免疫染色を行い、転移再発あり群とSmurf2発現を比較した。Smurf2は大腸癌原発巣において低発現、肝転移巣においては高発現が有意に多かった。また、転移再発なし大腸癌は転移再発あり大腸癌と比較して有意にSmurf2高発現が多かった。

原発巣でのSmurf2高発現群は低発現群と比較して、全生存率、手術不能再発までの期間 Time to surgical failure が有意に良好であった。予後因子解析を行ったところ、Smurf2低発現は独立した予後不良因子であった。



Smurf2 expression in primary CRC and the long-term outcome based on the Smurf2 expression. Immunohistochemistry analysis for Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf 2) expression in (a, b) primary colorectal cancer (CRC). Scale bar=200 μ m (a) and 100 μ m (b). (c) Representative images of each score evaluating Smurf2 expression in primary CRC. Scale bar=200 μ m (c). The Kaplan-Meier analysis for (d) overall survival, (e) time to liver metastasis, and (f) time to surgical failure based on the Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf 2) expression in primary CRC.

さらに、肝転移巣におけるSmurf2高発現群も低発現群と比較して全生存率、手術不能再発までの期間 Time to surgical failure が有意に良好であった



Smurf2 expression in colorectal liver metastases and the long-term outcome based on Smurf2 expression. Immunohistochemistry analysis for Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf 2) expression in (a, b) colorectal liver metastases. Scale bar=200 μ m (a) and 100 μ m (b). (c) Representative images of each score evaluating Smurf2 expression in colorectal liver metastases. Scale bar=200 μ m (c). The Kaplan-Meier analysis for (d) overall survival, (e) disease-free survival, and (f) time to surgical failure based on the Smad

ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf 2) expression in metastatic liver tumors.

以上の結果から、Smurf2 は大腸癌患者における独立した予後規定因子であり、細胞遊走能、cancer-stem cell property の制御を介し、腫瘍抑制的に機能する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Nami, Sakai Nozomu, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Ohira Gaku, Miyuchi Hideaki, Matsubara Hisahiro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Tumor-suppressive role of Smad ubiquitination regulatory factor 2 in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09390-8	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 -
1. 著者名 Sato Nami, Sakai Nozomu, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Ohira Gaku, Matsubara Hisahiro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Yin Yang 1 regulates ITGAV and ITGB1, contributing to improved prognosis of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2022.8298	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 -
1. 著者名 Sakai Nozomu, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential effects of KRAS mutational status on long-term survival according to the timing of colorectal liver metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-08144-5	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 -
1. 著者名 Sakai Nozomu, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 406
2. 論文標題 Recurrence patterns and their effects on clinical outcomes after R1 resection of colorectal liver metastases: a propensity score?matched analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 2739 ~ 2747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00423-021-02096-x	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 Sakai Nozomu, Hayano Koichi, Mishima Takashi, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Kawasaki Yohei, Matsubara Hisahiro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Fat signal fraction assessed with MRI predicts hepatic recurrence following hepatic resection for colorectal liver metastases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-022-02482-z	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 腫瘍因子と宿主因子に基づく大腸癌肝転移の治療戦略
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nozomu Sakai
2. 発表標題 Treatment strategy for multiple colorectal liver metastases
3. 学会等名 15th IHPBA World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 切除可能大腸癌肝転移に対する術前化学療法の意義
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 Treatment strategy for multiple colorectal liver metastases
3. 学会等名 第33回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 切除不能大腸癌肝転移に対するconversion surgeryの治療成績
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Sakai
2. 発表標題 Long-term outcome and prognostic factors of synchronous colorectal liver metastases
3. 学会等名 14th IHPBA World Congress
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 大腸癌肝転移に対する切除後補助化学療法の意義
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 大腸癌肝転移R1切除後の再発形式，予後についての検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井望
2. 発表標題 Clinical outcome and prognostic factors of synchronous colorectal liver metastases
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	古川 勝規 (Furukawa Katsunori) (00400987)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	高屋敷 吏 (Takayashiki Tsukasa) (30456024)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	久保木 知 (Kuboki Satoshi) (50571410)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	大塚 将之 (Otsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	賀川 真吾 (Kagawa Shingo) (90507302)	千葉県がんセンター・肝胆膵外科・主任医長 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関