

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590412

研究課題名（和文） 転写因子ELF2の機能解析と予後因子としての有用性の検討

研究課題名（英文） Functional analysis of transcription factor ELF2 and investigation of its prognostic significance

研究代表者 富田 裕彦（TOMITA YASUHIKO）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）

病理・細胞診断科・主任部長

研究者番号：60263266

研究成果の概要（和文）：転移関連因子であるVCPの発現に関連する転写因子PBX群、ELF2の機能解析を行った。肺癌、食道癌、胃癌の検討では、PBX2が最も予後を反映する臨床病理学的に有用な因子であることが明らかになった。膵がん細胞株に対しcDNAマイクロアレイを用いた検討を行ったところ、*Meis1* siRNA導入によりミトコンドリア遺伝子の発現が低下したが、*PBX1*、*PBX2*、*Prep1*、*ELF2*に対するsiRNAでは低下しなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the function of PBX1 family and ELF2, transcription factors of metastasis-related molecule VCP, the present study was employed. Analysis of patients with lung cancer, esophageal cancer, and gastric cancer revealed the prognostic significance of PBX2. cDNA microarray analysis using pancreatic cancer cell line revealed the decrease of mitochondrial gene expression by *Meis1* siRNA transfection, but not by *PBX1*, *PBX2*, *Prep1*, and *ELF2* siRNA transfection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究者らは、マウス骨肉腫細胞株を用いたcDNA subtraction hybridizationにより、

Valosin-containing protein (VCP) mRNAと転移との関連を見出した。VCP発現は抗アポトーシス性に関与すること、転移と密接な関

係があることが示唆された。肝臓癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌等において、VCP 発現は転移、予後と関連した独立する予後因子であった。

(2) VCP 転写調節機構についての検討により転写因子 Pre B cell leukemia transcription factor 1 (PBX1)ならびに E74-like factor 2 (ELF2)に着目し検討を行なった。

クロマチン免疫共沈法により VCP 5' 領域塩基配列と ELF2 が結合することを確認した。ELF2-si RNA の導入により、ELF2 の発現を抑えると VCP 発現も抑制されることをウエスタンブロット法、並びに免疫蛍光染色にて確認した。さらに乳癌組織を用いて免疫染色を用いて検討したところ、腫瘍細胞の ELF2 発現は VCP 発現ならびに、細胞増殖能の指標である Ki-67 Labelling index と関連することを見いだした。VCP 5' 領域塩基配列には ELF2 結合配列が-671 と-270 に存在し、そのうち-671 の配列が転写により重要であることを見いだした。

2. 研究の目的

研究者らの見出した VCP の鍵となる転写因子である PBX ならびに ELF2 の機能解析を進め、特に癌の進展に関する PBX ならびに ELF2 の働きを分子生物学的、並びに臨床的に明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) PBX, ELF の機能解析

ヒト培養細胞を用いて PBX 群, ELF2 に対する siRNA を導入し cDNA マイクロアレイを用いて発現の変化する遺伝子の検討を行う。

(2) ヒト腫瘍における PBX, ELF2 発現の臨床的意義の検討

ヒト癌組織における PBX, ELF2 の発現パターンを検討し、癌の深達度、脈管浸潤、予後等

との関連を検討することにより PBX, ELF2 の臨床病理学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト腫瘍における PBX, ELF2 発現の臨床的意義の検討

肺癌細胞株 A549 と PC14 を用いて検討したところ、PBX1 siRNA より PBX2 siRNA のほうが、導入により VCP の抑制効果が大きかった。PBX2 も PBX1 同様 VCP 5' 領域塩基配列に結合した。肺非小細胞癌症例 206 例を用いた検討では、PBX2 発現パターン (図 1) は VCP 発現パター

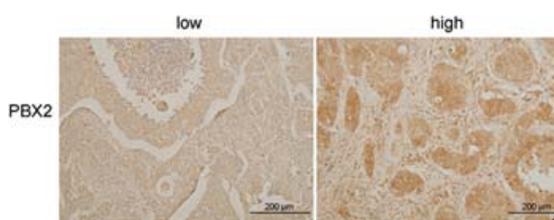


図 1

ンと関連し、PBX2 発現パターン再発予後、生命予後ともに PBX2 発現と関連することが明らかとなった (図 2)。

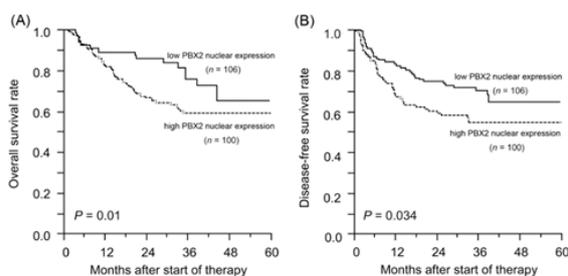


図 2 PBX2 高発現症例は、低発現症例に比較して生命予後 (A)、再発予後 (B)ともに悪い傾向にある

多変量解析にても、PBX2 発現が他の臨床病理学的因子と独立した予後因子であることが明らかになった。

さらに、食道癌、ならびに胃癌症例においても再発予後、生命予後ともに PBX2 発現と関連した (図 3)。

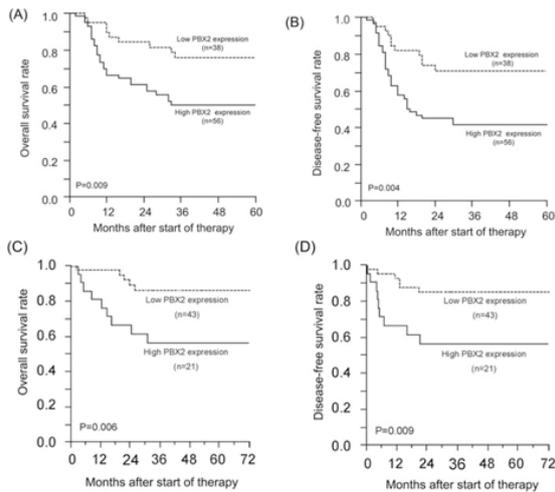


図3 胃癌 (A, B)、食道癌 (C, D)とも PBX2 高発現症例は、低発現症例に比較して生命予後 (A, C)、再発予後 (B, D)とも悪い傾向にある

胃癌細胞株 MNK45、並びに食道癌細胞株 KYSE70 に *PBX2* siRNA を導入して検討したところ、*in vitro*、*in vivo* いずれにおいても腫瘍形成能が低く、アポトーシスに陥りやすい傾向にあった。

(2) PBX、ELF2 の機能解析

ヒト膵がん細胞株 Panc1 に対して、*PBX1*、*PBX2*、*Meis1*、*ELF2* に対する siRNA を用いた遺伝子発現抑制を導入し、発現の変化する遺伝子を cDNA マイクロアレイを用いて検討した。*ELF2* siRNA により *TNFSF18*、*CXCL5*、*CTGF*、*NFIB* 等の遺伝子の発現低下が観察された。この発現の変化が *ELF2* の転写活性に関与するものであることを確認し、またそれらの遺伝子発現ががん進展と関連する因子かどうかについて検討中である。*Meis1* 発現低下によりミトコンドリア遺伝子の発現が低下したが、*PBX1*、*PBX2*、*Prep1*、*ELF2* に対する siRNA では低下しなかった。Real-time PCR を用いて *Meis1* siRNA によるミトコンドリア遺伝子の発現低下を再確認した (図4)。

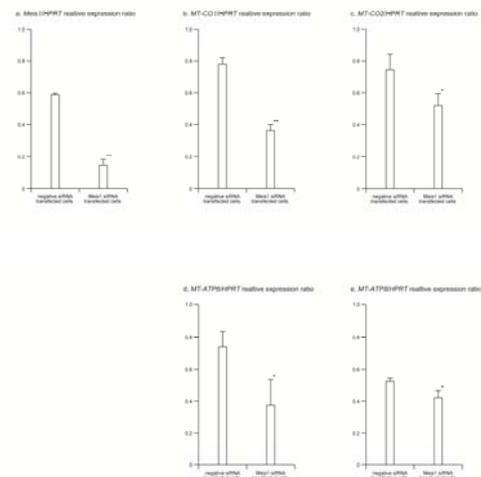


図4 *Meis1* siRNA によるミトコンドリア遺伝子発現抑制

ミトコンドリア遺伝子転写因子結合部位に *Meis1* 仮想結合部位が存在することと、その DNA 配列に対する *Meis1* の結合を確認した。

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 11 件)

- ① Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Gotoh K, Yamada T, Nagata S, Tomita Y, Eguchi H, Doki Y, Yano M. Perineural invasion and lymph node involvement as indicators of surgical outcome and pattern of recurrence in the setting of preoperative gemcitabine-based chemoradiation therapy for resectable pancreatic cancer. *Ann Surg* 査読有 2012;255:95-102. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823d813c.
- ② Tomoeda M, Yuki M, Kubo C, Yoshizawa H, Kitamura M, Nagata S, Nishizawa Y, Tomita Y. Role of *Meis1* in mitochondrial gene transcription of pancreatic cancer cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun 査読有 2011;410:798-802. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.066.
- ③ Akita H, Nagano H, Takeda Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Takahashi H, Ohigashi H, Tomita Y, Ishikawa O, Mori M, Doki Y. Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene* 査読有 2011;30:3468-76. DOI: 10.1038/onc.2011.59.
- ④ Nagata S, Jin YF, Tomoeda M, Kitamura M, Yuki M, Yoshizawa H, Kubo C, Ito Y, Uedo N, Ishihara R, Iishi H, Tomita Y. Influential factors in procedure time of endoscopic submucosal dissection for gastric cancer with fibrotic change. *Dig Endosc* 査読有 2011;23:296-301. DOI: 10.1111/j.1443-1661.2011.01148.x.
- ⑤ Yamamoto H, Kojima A, Nagata S, Tomita Y, Takahashi S, Oda Y. KIT-negative gastrointestinal stromal tumor of the abdominal soft tissue: a clinicopathologic and genetic study of 10 cases. *Am J Surg Pathol* 査読有 2011;35:1287-95. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182206f15.
- ⑥ Qiu Y, Song B, Zhao G, Deng B, Makino T, Tomita Y, Wang J, Luo W, Doki Y, Aozasa K, Morii E. Expression level of Pre B cell leukemia homeobox 2 correlates with poor prognosis of gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 査読有 2010;36:651-63. Doi: 10.3892/ijo_00000541.
- ⑦ Naka N, Takenaka S, Araki N, Miwa T, Hashimoto N, Yoshioka K, Joyama S, Hamada K, Tsukamoto Y, Tomita Y, Ueda T, Yoshikawa H, Itoh K. Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem Cells* 査読有 2010;28:1119-31. DOI: 10.1002/stem.452.
- ⑧ Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Eguchi H, Gotoh K, Yamada T, Nakaizumi A, Uehara H, Tomita Y, Nishiyama K, Yano M. Serum CA19-9 alterations during preoperative gemcitabine-based chemoradiation therapy for resectable invasive ductal carcinoma of the pancreas as an indicator for therapeutic selection and survival. *Ann Surg* 2010;251:461-9. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181cc90a3.
- ⑨ Qiu Y, Morii E, Tomita Y, Zhang B, Matsumura A, Kitaichi M, Okumura M, Aozasa K. Prognostic significance of pre B cell leukemia transcription factor 2 (PBX2) expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Sci* 査読有 2009;100:1198-209. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01156.x.
- ⑩ Zhang B, Tomita Y, Ch'ng E, Qiu Y, He J, Jin YF, Tomoeda M, Hamada K, Ueda T, Aozasa K. Prognostic significance of phosphorylated FOXO1 expression in soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol* 査読有 2009;16:1925-37. DOI: 10.1245/s10434-009-0481-x.
- ⑪ Nagata S, Jin YF, Yoshizato K, Tomoeda M, Song M, Iizuka N, Kitamura M, Takahashi H, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Tomita Y. CD74 is a novel prognostic factor for patients with

pancreatic cancer receiving multimodal therapy. Ann Surg Oncol 査読有 2009;16:2531-8. DOI: 10.1245/s10434-009-0532-3.

[学会発表] (計3件)

- ① Jin YF, Tomoeda M, Nagata S, Yoshizato K, Kitamura M, Yuki M, Kubo C, Yoshizawa H, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Tomita Y. Phosphorylated FOXO1 Is a Novel Prognostic Factor for Patients with Pancreatic Cancer Receiving Multimodal Therapies 100th annual meeting of United States & Canadian Academy of Pathology 2011 San Antonio, TX, U.S.A.
- ② Tomoeda M, Yuki M, Kubo C, Yoshizawa H, Kitamura M, Nagata S, Nishizawa Y, Tomita Y. Role of Meis1 in the mitochondrial gene transcription of pancreatic cancer cells 100th annual meeting of United States & Canadian Academy of Pathology 2011 San Antonio, TX, U.S.A.
- ③ Jin YF, Ioka T, Song M, Tomoeda M, Nagata S, Kitamura M, Yuki M, Yoshizawa H, Nishizawa Y, Tomita Y. Impact of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphisms on survival of patients with unresectable pancreatic cancer receiving multimodal therapies 99th annual meeting of United States & Canadian Academy of Pathology 2010 Washington D.C., U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 裕彦 (TOMITA YASUHIKO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター (研究所) 病理・細胞診断科・主任部長
研究者番号: 60263266

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし