

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590952

研究課題名(和文)大腸癌における上皮細胞増殖因子関連新規分子標的遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Role of a novel transcriptional repressor gene, ZFP-BA, in colon cancer proliferation and apoptosis

研究代表者

小笠原 尚高(OGASAWARA, NAOTAKA)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00433219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞増殖因子(EGF)前駆体(HB-EGF)の細胞内領域(HB-EGF-CTF)が核内移行することによりEGF関連新規転写抑制遺伝子ZFP-BAの発現が低下し、大腸癌細胞の増殖を促進するが、核内移行したHB-EGF-CTFとZFP-BAとの結合はtelmisartanの投与により阻止され、ZFP-BA発現の低下が抑制された。核内でのZFP-BAの発現が維持されることで、その下流の細胞増殖促進因子の活性化が抑制され、大腸癌細胞の増殖が抑制された。telmisartanは生体投与が可能な薬剤であり、既存の抗癌剤にかわる新規分子標的薬の一つとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：ZFP-BA, a novel transcriptional repressor gene, degradation caused by interaction with the Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor-C-terminal fragment (HB-EGF-CTF) should induce some important factors for cell proliferation and inhibit others for cell apoptosis in colon cancers. The inhibition of interactions between HB-EGF-CTF and ZFP-BA is considered essential because agents that can inhibit HB-EGF-CTF translocation might suppress ZFP-BA downregulation. Telmisartan, angiotensin II type 1 receptor blockers (ARBs), is one of the candidate inhibitors of HB-EGF-CTF nuclear translocation in vitro. However, treatment for humans with colon cancer would require high volume of telmisartan to prevent cell proliferation. The inhibition of HB-EGF-CTF nuclear translocation signaling will comprise a new strategy against the development of colorectal cancer. ZFP-BA might become one of the targets of future strategies to treat colon cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸癌 上皮細胞増殖因子 アンギオテンシンII受容体拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体を活性化するリガンドが癌細胞の細胞膜から放出 (shedding) されるメカニズムにおいて、膜型メタロプロテアーゼ (a disintegrin and metalloprotease ; ADAM) 10 は重要な因子の一つであるが、最近の研究結果から IL- β や IL-8 などの炎症性サイトカインが ADAM10 を活性化し、shedding と同時に EGF 前駆体 (heparin-binding EGF ; HB-EGF) の細胞内ドメイン (Carboxyl terminal fragment ; HB-EGF-CTF) が核内に移行後、転写抑制遺伝子 PLZF や BCL6 と結合し、cyclinA、cyclinD2、c-Myc などの転写因子を誘導することがわかった。

これまでに、HB-EGF-CTF の標的となる分子は、PLZF や BCL6 以外に知られていなかったが、我々は、これまでに HB-EGF-CTF と結合する数種類の転写抑制遺伝子を同定し、その機能制御に関する解析を行ってきた。そして、データベースに存在する遺伝子の中から、PLZF と BCL6 に類似した構造を持つ転写抑制遺伝子 12 種類を同定した。さらに、予想される塩基配列から、定量的 PCR のプライマー等を作成し、胃癌、大腸癌、食道癌および膵癌の培養細胞およびヒト病理組織検体における発現をスクリーニングしたところ、大腸癌において特異的に発現している EGF 関連の新規転写抑制遺伝子 ZFP-BA を見出し、クローニングすることができた。その後の研究で、この新規転写抑制遺伝子 ZFP-BA は、染色体 17p13 に位置し、全長が約 1900bp の遺伝子であることが確認された。

ZFP-BA を発現している大腸癌培養細胞では、IL- β や IL-8 により活性化された ADAM10 が HB-EGF を shedding することで HB-EGF-CTF が核内に移行し、ZFP-BA の発現が低下すること、その一方 HB-EGF-CTF の核内移行を抑制した結果、ZFP-BA の発現が維持されることを確認した。ZFP-BA の発現が低下

することにより、PLZF や BCL6 の発現の有無に関係なく、細胞増殖能および細胞遊走能は著しく増加しており、この ZFP-BA が大腸癌細胞の進展に重要な影響を及ぼしていることが推察された。

2. 研究の目的

大腸癌細胞増殖抑制メカニズムにおいて、EGF 関連の新規転写抑制遺伝子を同定し、その機能解析を行うとともに、既存の抗癌剤にかかわる新規分子標的薬の可能性を検討する。さらには炎症 (潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患) と大腸癌発癌との関連について、その機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 【転写抑制遺伝子 ZFP-BA の細胞内局在の検討】

大腸癌培養細胞 (CaCo2, HT29) において、ZFP-BA、HB-EGF-CTF 発現と炎症性サイトカインとの関連および細胞増殖能やアポトーシスについて解析する。GFP でラベリングされた ZFP-BA (ZFP-BA-GFP) を作成し、細胞内局在を蛍光顕微鏡にて確認、リガンド (IL- β 、IL-8) の shedding 誘導後に ZFP-BA-GFP の細胞内局在の変化とその発現量を解析する。

(2) 【ZFP-BA 抗体によるヒト正常上皮およびヒト大腸癌における発現の検討】

臨床症例において ZFP-BA の発現と予後との関連などを比較検討し、ZFP-BA の臨床的意義を探るため、ZFP-BA のモノクローナル抗体を用い、ヒト組織免疫染色を行う。消化管内視鏡検査時に生検で採取したヒト正常大腸粘膜組織およびヒト大腸癌組織を用い、ZFP-BA の mRNA 発現量とタンパク発現量を比較検討する。

(3) 【DNA micro array による解析】

ZFP-BA 遺伝子が制御している下流の転写

遺伝子を解析する。大腸癌培養細胞において ZFP-BA の siRNA による低発現状態(ノックダウン状態)と Transfection vector による高発現状態から mRNA を調整し, Micro array 解析を行う。

(4) 【転写抑制遺伝子 ZFP-BA と HB-EGF-CTF との結合抑制に関する検討】

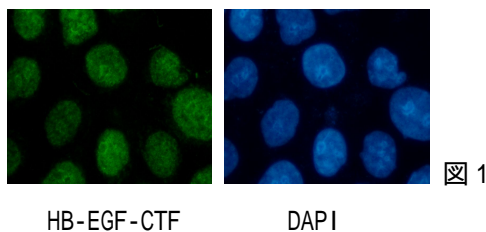
ZFP-BA の発現を制御する新規分子標的薬および HB-EGF-CTF の核内移行を抑制する分子標的薬を検索同定する。HB-EGF-CTF の核移行抑制と本遺伝子をターゲットとした大腸癌発癌および進展を抑制する分子を検索する。shedding 誘導にて HB-EGF-CTF は核移行するが,その移行を抑制する物質として ADAM 活性抑制剤 (KB-R7785 が存在する。しかし, KB-R7785 はその毒性のため生体投与が不可能であることが過去のマウスを用いた研究から判明している。そのため,shedding を抑制することが可能な KB-R7785 類似物質を検索する。

これまでの検討で,一部のアンギオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB, 高血圧治療薬) によって, HB-EGF-CTF と ZFP-BA との結合が抑制されることが判明し,ZFP-BA の発現低下を抑制することが推察されるため,大腸癌培養細胞 (HT29, HCT116, CaCo2) に対して, TPA を添加後, telmisartan, candesartan, olmesartan, losartan をそれぞれ培養細胞に投与し, Cell Proliferation Assay (CCK-8 Kit Assay) を用いて, 経時的に各培養細胞の増殖能を検討する。

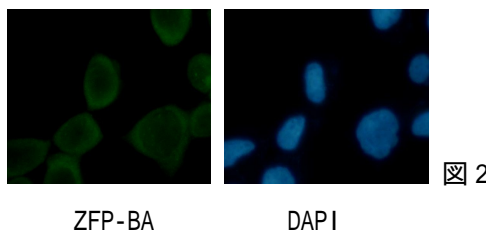
4. 研究成果

(1) 【転写抑制遺伝子 ZFP-BA の細胞内局在の検討】

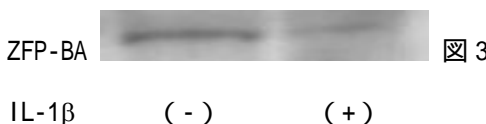
大腸癌培養細胞 (CaCo2, HT29) に ADAM 活性のリガンドである IL-1 β および IL-8 を投与したところ, 投与後 1 時間で HB-EGF-CTF は核内に移行した (図 1)。



その 2 時間後 (投与 3 時間後) には ZFP-BA は核内から細胞質へ移動することが確認された (図 2)。



さらにその 4 時間後 (投与 6 時間後) ZFP-BA は細胞質から消失した。ZFP-BA の発現をウェスタンブロット法で確認したところ, 投与 6 時間後の ZFP-BA 発現量は著明に減少していた (図 3)。また, これら一連の反応は, ADAM 活性抑制剤 (KB-R7785) にて抑制された。



(2) 【ZFP-BA 抗体によるヒト正常上皮およびヒト大腸癌における発現の検討】

大腸内視鏡検査時に生検で採取されたヒト正常大腸粘膜上皮における ZFP-BA 抗体による免疫染色では, ZFP-BA は大腸上皮細胞核に発現していた。また, 一部, 大腸腺底部に存在するパネート細胞にもその発現が認められた。大腸内視鏡検査時に採取された大腸腺腫組織および手術にて摘出された大腸癌組織における ZFP-BA の発現を検討したところ, 前癌病変とされる大腸腺腫細胞ではその発現が認められた。一方, ヒト大腸癌組織においてはその発現は著しく減少していた (図

4, 図5) .

さらに, Stage I/II 大腸癌と比較し, Stage III/IV 大腸癌ではその発現はほとんど認められなかった(33.1% vs 7.6% , $p < 0.05$) .

以上の結果より,ZFP-BAは大腸発癌における抑制因子として機能しておらず,大腸癌発癌後における大腸癌の増殖・進展にかかわる抑制的な役割を果たしている因子であることが推察された.つまり,大腸発癌とその進展過程において,ZFP-BAの発現消失が大きく関与していることが確認された.

ヒト大腸癌組織における ZFP-BA 抗体を用いた免疫組織学的染色

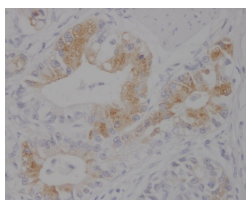


図 4

ヒト大腸癌組織における ZFP-BA の発現頻度

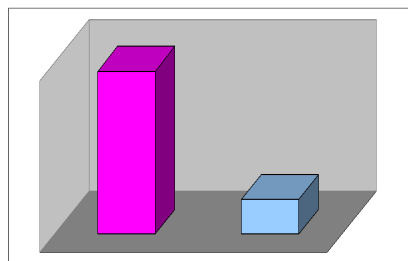


図 5

ZFP-BA (-) (+)
N=28 N=5

さらに,同様に採取されたヒト大腸癌組織および大腸腺腫組織を用い,ZFP-BAの mRNA とタンパク発現を比較したところ(定量 PCR およびウェスタンブロット法),大腸正常組織における ZFP-BA の mRNA とタンパク発現に比べ,癌組織では有意にその発現の低下が見られ(図 6),ヒト大腸組織における免疫染色の結果を裏付ける結果となった.

ZFP-BA  図 6

大腸正常組織 大腸癌組織

ZFP-BA の発現と予後(生存期間)との関連を検討したところ,ZFP-BA 陰性大腸癌は,ZFP-BA 陽性大腸癌と比べ予後不良であった($p < 0.05$).しかし,抗癌剤による治療効果と ZFP-BA 発現との関連は今回認められなかった.

(3) 【DNA micro array による解析】

ZFP-BA の siRNA を大腸癌培養細胞(CaCo2, HT-29)に導入し,ZFP-BA をノックダウン状態にしたのち mRNA を抽出し Microarray 解析を行った.その結果,細胞周期調節因子の 1 つである CDC25A 遺伝子とアポトーシス抑制遺伝子の 1 つである BIRC2 の発現増加が認められた.また,これら 2 つの ZFP-BA の Transfection vector (pME18 s III-ZFP-BA) を導入した培養細胞では,優位に抑制された.

この結果から,ZFP-BA は CDC25A と BIRC2 に対して抑制的に働いていることが確認された.つまり,EGF 関連新規転写抑制遺伝子 ZFP-BA は,細胞周期の進展とアポトーシスの抑制に関与し,大腸癌細胞における ZFP-BA の発現低下は大腸癌の増殖に関与する因子の 1 つとして考えられた.

(4) 【転写抑制遺伝子 ZFP-BA と HB-EGF-CTF との結合抑制に関する検討】

HB-EGF-CTF の核移行抑制と ZFP-BA をターゲットとした大腸癌発癌および進展を抑制する分子を検索した.

大腸癌培養細胞(HT29,HCT116,CaCo2)に対して,TPA(100nM)を添加後,telmisartan(50 μ M),candesartan(50 μ M),olmesartan(50 μ M),losartan(50 μ M)をそれぞれ培養細胞に投与し,Cell Proliferation Assay(CCK-8 Kit Assay)を用いて,経時的に各培養細胞の増殖能を検討したところ,いずれの大

腸癌培養細胞においても, telmisartanの投与により, 細胞増殖は有意に抑制されていた. しかしながら, 同じ条件下で行った実験結果では, candesartan, olmesartan, losartanのいずれにおいても細胞増殖は十分に抑制されなかった.

TPA 刺激後, telmisartan の投与を行った大腸癌培養細胞において, ウェスタンブロット法および免疫沈降法にて確認したところ, HB-EGF-CTF と ZFP-BA との結合が抑制された (図7).

IP:HB-EGF-CTF Blot:ZFP-BA



Telmisartan (-) (+)

また, HB-EGF-CTF と ZFP-BA の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて確認したところ, HB-EGF-CTF の核内移行に引き続いてみられる ZFP-BA の核外排出は, ほとんど認められなかった. さらに核内での ZFP-BA 発現は維持されていた. その一方, candesartan, olmesartan, losartan を投与した大腸癌培養細胞では, HB-EGF-CTF と ZFP-BA との結合は十分に抑制されず, ZFP-BA は核外に排出され, ZFP-BA の発現量が低下していた. 以上の結果より, TPA 刺激にて HB-EGF が shedding を受け, HB-EGF-CTF の核内移行が誘発されるが, 核内移行した HB-EGF-CTF と ZFP-BA との結合は telmisartan の投与により阻止され, ZFP-BA の発現が維持されることで, 細胞増殖を抑制することが確認された. telmisartan は高血圧治療薬としてすでに臨床応用されているため生体投与は可能な薬剤であり, 既存の抗癌剤にかわる新規分子標的薬の一つとなりうる可能性が示唆された. telmisartan の生体への投与量の決定にはさらなる詳細な検討が必要ではあるものの, 大腸癌細胞増殖抑制メカニズムにおいて臨床

応用につながることを期待される.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 尚高 (OGASAWARA Naotaka)

研究者番号 : 00433219