

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790424

研究課題名(和文)新規膵癌関連遺伝子ZIC2による細胞増殖メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the cell growth mechanism by ZIC2 transcription factor in pancreatic cancer cells.

研究代表者

稲熊 真悟 (Inaguma, Shingo)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80410786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々は神経系の発生を制御する転写因子ZIC2が、膵癌細胞において高発現し、FGFR3やANXA8を含む転写標的遺伝子群を活性化していることを新たに見出した。ZIC2はFGFR3依存的にERKのリン酸化を亢進させ、細胞増殖活性を亢進させるとともに、ANXA8誘導を介し、膵臓癌細胞株のアポトーシスを抑制することを明らかにした。また、ZIC2およびその標的遺伝子群は正常膵管上皮ではほとんど発現しておらず、PanIN病変、浸潤癌組織で著明に発現が上昇していることを見出した。以上から、ZIC2はFGFR3、ANXA8を介して膵臓癌細胞の増殖を促進させ、膵臓がんに関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ZIC2 is one of five members of ZIC family gene those are indispensable for the development of central nervous system. Recently, we uncovered that ZIC2 is a unique member which is expressed in all (11/11) of the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines we tested. From the cDNA expression microarray analysis, we identified ANXA8 and FGFR3 as ZIC2 transcriptional targets. Furthermore, we uncovered that forced expression of ANXA8 reduced the apoptotic cell death of the ZIC2-knockdown PDAC cells and that ZIC2 accelerated ERK phosphorylation in FGFR3 dependent manner. Although ZIC2, ANXA8 and FGFR3 expressions were immunohistochemically under-detectable levels in the normal pancreatic duct, their expression was prominent in PanIN and PDAC cells. Our in vitro and in vivo experimental results indicate that ZIC2-ANXA8 and ZIC2-FGFR3-ERK axis are important signaling pathways for the regulation of apoptosis and cell proliferation in the PDAC development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ヘッジホッグ 膵臓癌 ZIC2 アポトーシス 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌細胞は生物学的に高い増殖能、転移・浸潤能や薬剤耐性などの悪性形質を有し、早期発見や治療切除が困難であることも加え、通常型膵管癌の5年生存率は9.5%とその予後は著しく不良であり、疾患の分子メカニズム解明と新規治療法の確立が切望されている。

(2) 近年、Wnt-beta-catenin 経路や Notch 経路、Shh-GLI 経路といった個体発生に重要なシグナル経路が様々な腫瘍の発生、進展に寄与していることが報告されており、膵浸潤癌においては遺伝子改変動物を用いた実験研究から、Shh-GLI 経路と K-RAS 経路の協調的活性化が重要であることが報告されている。

(3) Zinc-finger 型転写因子 ZIC2 は、Shh-GLI1 シグナル経路や SIX3 遺伝子とともに、中枢神経の発生に不可欠な遺伝子であり、他の遺伝子群と同様、全前脳胞症 (holoprosencephaly) の原因遺伝子として知られている。

(4) ZIC2 はまた GLI1 の核移行を促進し、その転写活性を亢進させることで、子宮頸部扁平上皮癌の増殖を制御していることが報告されているが、ZIC2 自身が特異的な転写標的や機能を有しているか否かは現在までに明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

(1) 申請者は膵臓がんにおける Shh-GLI1 シグナル経路の重要性を解析してきたが、膵癌細胞株や外科切除材を用いた予備実験の結果から、膵癌細胞が ZIC2 を高発現し、細胞増殖を正に制御していること、また ZIC2 を特異的 siRNA で knockdown すると、膵臓癌細胞株がアポトーシスに陥ることを新たに発見した。

(2) そこで、cDNA マイクロアレイを用いて膵癌細胞における ZIC2 の転写標的遺伝子群を網羅的に解析し、ZIC2 がどのような転写標的遺伝子を介して、膵癌細胞株の増殖活性やアポトーシスを制御するのか、そのメカニズムも明らかにし、難治性固形腫瘍である膵臓癌に対する治療応用の可能性を検討すべく、本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) Tet system を用いて膵臓癌細胞株 PANC-1 に ZIC2 を強制発現させた場合と、ZIC2 特異的 siRNA を用いて ZIC2 を knockdown した場合に関して、逆方向に変化する遺伝子群を cDNA マイクロアレイ解析によって抽出し、ZIC2 転写標的遺伝子を同定する。

(2) 同定された ZIC2 標的遺伝子群の中から、細胞増殖およびアポトーシスの制御に関与

する可能性がある遺伝子を選択し、膵臓癌細胞株を用いた機能解析実験を行い、ZIC2 が細胞増殖およびアポトーシスを制御するメカニズムを明らかにする。

(3) 外科切除された膵癌組織を用いて、ZIC2 およびその標的遺伝子の発現を解析するとともに、細胞増殖活性との関連を免疫組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) cDNA アレイを用いた網羅的遺伝子解析の結果、ZIC2 が正に制御する 42 遺伝子と、負に制御する 2 遺伝子を同定した。(図 1) また、ZIC2ER キメラ遺伝子を用いた発現解析から、すくなくとも ANXA8 および FGFR3 は ZIC2 の直接的転写標的である可能性が示唆された。

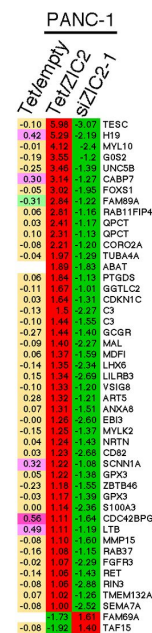


図 1. ZIC2 標的遺伝子群

(2) ANXA8 は膵臓癌において高発現し、そのアポトーシスを抑制していることが報告されている。そこで ANXA8 を PANC-1 に強制発現させたところ、ZIC2 の knockdown によって誘導されるアポトーシスを部分的にはあるが、回避させることができた。(図 2)

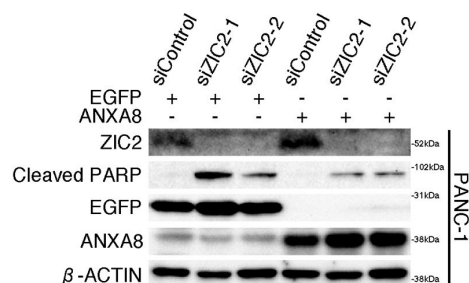


図 2. ZIC2 は ANXA8 を介して膵臓癌細胞株のアポトーシスを抑制する

(3)FGFR 遺伝子群はERKリン酸化を亢進させ、膵臓癌細胞株を含む、種々の腫瘍細胞の増殖活性を亢進させることが知られている。そこで PANC-1 細胞株に、ZIC2 および FGFR3 特異的 siRNA を遺伝子導入したところ、ZIC2 は FGFR3 依存的に ERK のリン酸化を亢進させ、細胞増殖活性を上昇させている可能性が示唆された。(図 3)

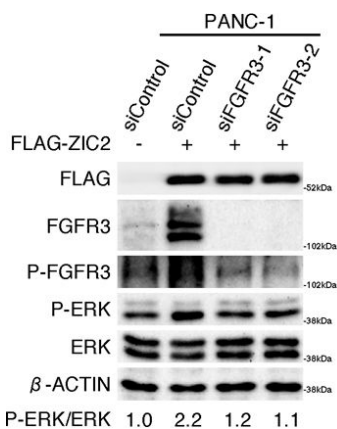


図 3. ZIC2 は FGFR3 依存的に ERK のリン酸化を亢進させる

(4)20 例の膵臓癌切除材を用いて、ZIC2、ANXA8、FGFR3 発現、および Ki-67 標識率を検討した。その結果、正常膵管上皮においては ZIC2、ANXA8、FGFR3 の発現は観察されなかったが、PanIN および浸潤癌において、これらの遺伝子発現亢進と Ki-67 標識率の上昇が観察された。(図 4)

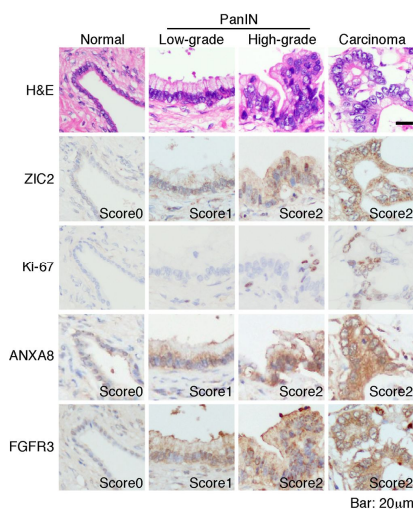


図 4. 膵臓癌組織を用いた免疫組織学的解析結果

(4)本研究の結果、膵臓がん過程において、ZIC2 は ANXA8 を介して膵臓癌細胞株のアポトーシスを抑制する一方、FGFR3 を介して ERK のリン酸化を亢進させ、細胞増殖活性を上昇させている可能性が明らかとなった。膵臓癌細胞における ZIC2-ANXA8 および ZIC2-FGFR3-ERK シグナルの制御が、難治性固

形腫瘍である膵臓癌の治療標的となる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Shingo INAGUMA et.al.
ZIC2 is an indispensable transcription factor for the cell growth of pancreatic ductal adenocarcinoma.
USCAP 2014 annual meeting,
4th March 2014, San Diego.

稲熊真悟ら
ヘッジホッグシグナル系転写因子 ZIC2 は FGFR3, ANXA8L2 発現誘導を介して膵臓がんを促進する。
第 103 回 日本病理学会総会
2014 年 4 月 25 日 広島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
稲熊 真悟 (INAGUMA, Shingo)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：80410786

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：