

令和元年6月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10564

研究課題名(和文) 転写因子KLFによる消化器癌浸潤、転移制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the role of KLF5, 17 in metastatic cascade of gastrointestinal cancer

研究代表者

酒井 望 (Nozomu, Sakai)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌肝転移における転写因子KLF5の役割について研究を行った。大腸癌細胞株を用いたin vitroの実験では、KLF5が細胞増殖を促進すること、自己複製能を維持することが示唆され、その下流のたんぱく(Cyclin D1、c-Mycなど)の関与も明らかにすることができた。当科の大腸癌肝転移切除症例の臨床データ、サンプルを用いた検討では、KLF5高発現群腫瘍径が大きく、また、有意に全生存期間、切除不能再発までの期間が短いことが分かった。さらに多変量解析の結果、肝切除後の全生存期間においてKLF5高発現は独立した予後規定因子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発癌や癌の進展に様々に関与することが知られているKLF familyのなかのKLF5に注目し、細胞実験によりKLF5が大腸癌肝転移の増殖や自己複製能の維持に関与することが分かった。さらに臨床データにより実際の患者の予後の悪化にも関与することがわかり、細胞実験の結果が裏付けられた。この成果をもとに、他の癌での役割も明らかにし消化器癌他臓器転移の制御へ向けたさらなる発展的研究の基礎を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of transcription factor KLF5 in colorectal liver metastases. In vitro experiments using colon cancer cell lines suggested that KLF5 promotes cell proliferation and maintains cancer stem cell property. To confirm these findings, we next assessed KLF5 expression by immunohistochemistry and evaluated the association of KLF5 expression and colinical outcome. High KLF5 expression was significantly associated with large tumor diameter. Furthermore, the overall survival time and the time to surgical failure were significantly shorter in patients with high KLF5 expression. Multivariate analysis demonstrated that high KLF5 expression was an independent prognostic factor for overall survival after resection of liver metastases.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：転移 増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、大腸癌肝転移は積極的切除により予後が改善するとされているが、治療成績は未だ十分とはいえないのが現状であり、癌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。我々はこれまでに、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基礎研究、臨床病理学的検討を行っており、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(右参照; 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、このリガンドとレセプター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。CXCR4 は癌の biology を解き明かす上で極めて魅力的な分子であり、かつ新たな治療ターゲットとして有力であると考えられるが、非常に興味深い事に、この CXCR4 の上流の転写因子として Krüppel-like factor5、17 (KLF5、17)が CXCR4 の発現を制御している可能性が近年報告された(Frigo DE *et al. Mol Endocrinol* 2009, Gumireddy K *et al. Nat Cell Biol.* 2009)。KLF family はこれまでに iPS 細胞誘導因子(山中因子)の1つである KLF4 を含め KLF1 から KLF17 まで 17 種類の isoform が同定されている(Tetreault MP *et al. Cancer* 2013)。KLF は個体の発生・分化、幹細胞機能の制御において多岐にわたって重要な役割を果たすことが報告されているが、その機能に family 分子間で redundancy のあること、ひとつの KLF family 分子が種々の条件下で異なる役割を果たすこと等が報告されている。

2. 研究の目的

癌転移制御の key molecule として我々がこれまでに研究を行ってきたケモカインレセプター CXCR4 の上流調節因子としての転写因子 Krüppel-like factor (KLF) family に注目し、原発巣から他臓器転移形成過程における細胞増殖、浸潤、遊走能、EMT、MET との関連を明らかにするための研究を行う。特に CXCR4 との相関が示唆されている KLF5、KLF17 の機能解析を行い、さらには他の KLF family、KLF の上流、下流の制御因子についての検索、解析を行う。その上で臨床サンプルを用いた解析も行い、消化器癌の他臓器転移に対する新たな治療戦略構築を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

in vitro 癌細胞株の増殖、遊走、浸潤能、EMT に対する KLF5 の役割について 3D culture、invasion assay、sphere formation assay 等により *in vitro*での機能解析を行う。

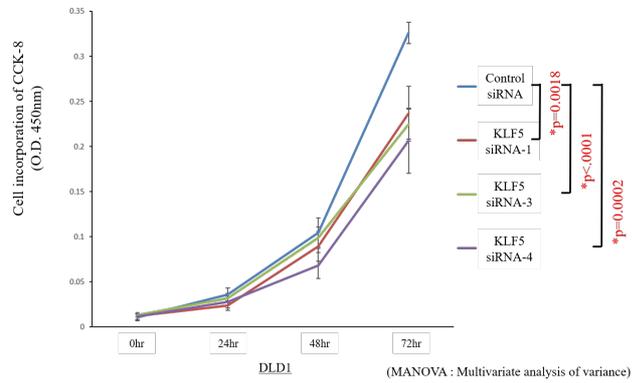
clinical 転移性肝腫瘍ならびに周囲肝組織における KLF5 の発現と予後を含めた臨床病理学的因子との相関を明らかにする。

4. 研究成果

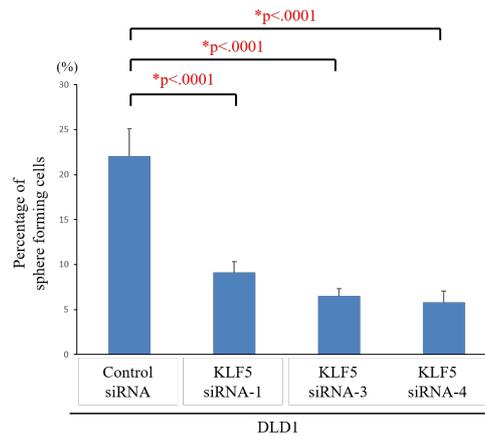
in vitro

細胞実験は、ヒト大腸癌原発巣細胞株 DLD1、SW48 を用いて行った。siRNA で KLF5 の Knock down を行い、3 種類の siRNA で KLF5 が Knock down されることを確認した。

細胞増殖能の評価を行うため、KLF5siRNA を投与し 24 時間培養後 96well plate に 1.0×10^3 個/well となるようにまき、0hr24hr48hr72hr の 4 点で Cell counting Kit-8 assay で評価した。結果は DLD1、SW48 とともに KLF5 を Knock down することにより細胞増殖能が減弱することが証明された。

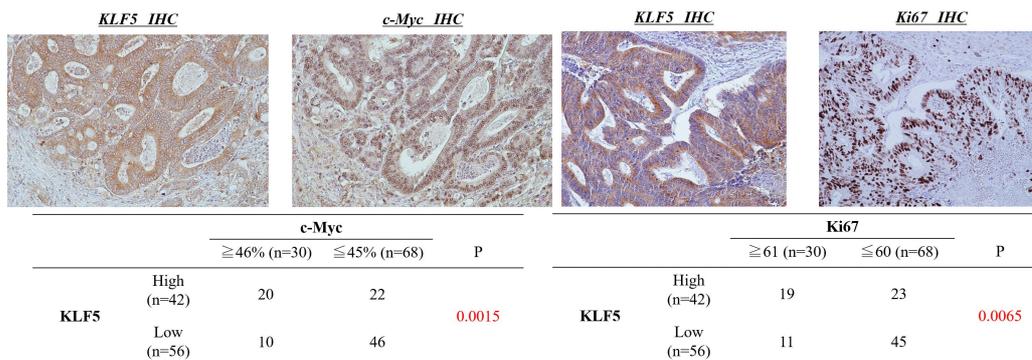


次に細胞の自己複製能を評価し、cancer stem cell property への関与を検討するため、tumor sphere formation assay を行い評価した。Ultra low attachment plate を用いて癌細胞の接着を阻害した環境下で、10 日目に自己複製して形成された sphere をカウントした。結果は DLD1、SW48 とともに KLF5 を Knock down することにより sphere 形成が有意に減少することが証明された。



次に Western blot で DLD1、SW48 の KLF5 に関連する蛋白発現について検討した。KLF5 を Knock down することにより細胞増殖に関連する蛋白である CyclinD1、PCNA、また大腸癌の Stem cell marker として知られる c-Myc 発現が減弱することが確認された。

そのため、臨床検体で細胞増殖能と関連する Ki-67 と c-Myc の免疫組織化学染色を施行したところ両者ともに KLF5 発現と正の相関があることが証明された (前者 $p = 0.0065$ 、後者 $p = 0.0015$)。



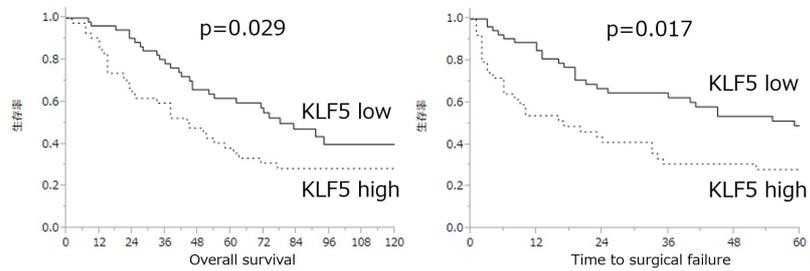
clinical

2006 年 1 月から 2012 年 12 月までの間に大腸癌肝転移に対して初回の肝切除を行った患者 98 例で KLF5 免疫組織化学染色を施行した。98 例中、KLF5 が高発現であったのは 42 例、低発現であったのは 56 例であった。年齢、性別、腫瘍の局在、化学療法の有無などには違いがなく原発巣手術時のリンパ節転移陽性例は KLF5 高発現群で多い傾向があり ($p = 0.1977$)、肝転移腫瘍個数は 4 個以上が KLF5 高発現群で多い傾向があった ($p = 0.1710$)。

腫瘍径に関しては KLF5 高発現群で腫瘍径が有意に大きく ($p = 0.0066$)、H 因子に関しては KLF5 高発現群で有意に H2、H3 が多い ($p = 0.0378$) という結果となった。

全生存期間では、初回手術からの全生存期間も肝切除術後からの全生存期間も KLF5 高発現群が有意差をもって予後が悪いという結果となった (前者: $p = 0.0130$ 、後者: $p = 0.0289$)。

無再発生存期間に関しては有意差はなく、肝内再発に関しても有意差は認めなかった。しかし、手術治療が不可能な再発までの期間をみた Time to Surgical Failure(TSF)では、KLF5 高発現群が低発現群と比較して有意に TSF が短いという結果となった(p = 0.0165)。



また、癌発生部位別にみた KLF5 発現と全生存期間の関係では右側結腸より直腸でより KLF5 発現量による生存期間の差が鮮明になることがわかった。

肝切除からの生存期間に関する単変量解析では術前化学療法施行群、分子標的薬使用群、CEA 高値、原発巣リンパ節陽性、H 因子 2 または 3、腫瘍個数 4 個以上、腫瘍径 5 cm 以上、KLF5 高発現群が有意差をもって予後が悪いという結果となった。多変量解析では腫瘍個数 4 個以上 (p=0.0402)、腫瘍径 5 cm 以上 (p=0.0099)、KLF5 高発現群 (p=0.0450) が独立予後規定因子となった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、中台英里、大塚将之 誌上ディベート 肝胆膵外科における controversial surgery 3. 両葉多発大腸癌肝転移に対する肝切除 2) Major hepatectomy の立場から手術 in press 2018 査読無
- 酒井望、清水宏明、大塚将之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、高野重紹、久保木知、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、宮崎勝 大腸癌肝転移—最新のストラテジー—治療の実際 肝切除 臨床外科 2016;71:409-416. 査読無
- 酒井望、清水宏明、大塚将之、加藤 厚、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、高野重紹、久保木知、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、宮崎勝 外科医が攻める高度進行大腸癌 肝肺同時性転移 臨床外科 2016;71:931-936. 査読無
- 酒井望、清水宏明、大塚将之、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、高野重紹、久保木知、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、宮崎勝 Current Organ Topics: Liver, Pancreas, Biliary Tract Cancer 肝両葉多発の転移性肝がんに対する肝切除戦略 III. ALPPS Up to Date 癌と化学療法 2016;43:1181-1185. 査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

- 第 80 回日本臨床外科学会総会 (2018/11 月、東京) 大腸癌肝転移に対する Conversion surgery の治療成績 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、中台英里、大塚将之
- 第 26 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2018/11 月、神戸) 大腸癌肝肺転移に対する切除成績 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、大塚将之
- 13th IHPBA World Congress (4-7 September/2018, Geneva, Switzerland) Clinical outcome of ALPPS -A Single Institute Experience- Nozomu Sakai, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Shingo Kagawa, Hiroyuki Nojima, Takashi Mishima, Masaru Miyazaki, Masayuki Ohtsuka
- 第 73 回日本消化器外科学会総会 (2018/7 月、鹿児島) Treatment strategy for multiple colorectal liver metastases Nozomu Sakai, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Shingo Kagawa, Hiroyuki Nojima, Masayuki Ohtsuka
- 第 54 回日本肝癌研究会 (2018/6 月、久留米) 大腸癌多発肝転移に対する治療成績 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、大塚将之
- 第 30 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (2018/6 月、横浜) Prognostic impact of preoperative chemotherapy for resectable colorectal liver metastases Nozomu Sakai, Hideyuki

Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Shingo Kagawa, Hiroyuki Nojima, Takashi Mishima, Masayuki Ohtsuka
第 118 回日本外科学会定期学術集会 (2018/4 月、東京) 大腸癌多発肝転移に対する治療戦略 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、大塚将之

第 79 回日本臨床外科学会総会 (2017/11 月、東京) 術後再発からみた大腸癌肝転移に対する Conversion surgery の治療成績 酒井望、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、三島敬、大塚将之

第 72 回日本消化器外科学会総会 (2017/7 月、徳島) Clinical significance of repeat metastasectomy for recurrent colorectal metastases

Nozomu Sakai, Hiroaki Shimizu, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Masaru Miyazaki and Masayuki Ohtsuka

第 29 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (2017/6 月、横浜) Significance of aggressive resection for colorectal liver and lung metastases Nozomu Sakai, Hiroaki Shimizu, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Masaru Miyazaki and Masayuki Ohtsuka

第 29 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (2017/6 月、横浜) Strategy to increase insufficient future liver remnant volume in patients with CRLM -ALPPS, 2-stage and PVE- Nozomu Sakai, Hiroaki Shimizu, Hideyuki Yoshitomi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Shigetsugu Takano, Daisuke Suzuki, Masaru Miyazaki and Masayuki Ohtsuka

第 117 回日本外科学会定期学術集会 (2017/4 月、横浜) 大腸癌肝転移切除後再発に対する外科治療成績の検討 酒井望、清水宏明、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、賀川真吾、野島広之、大塚将之

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮崎 勝

ローマ字氏名：MIYAZAKI, Masaru

所属研究機関名：国際医療福祉大学三田病院

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号 (8桁): 70166156

研究分担者氏名: 高野 重紹

ローマ字氏名: TAKANO, Shigetsugu

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院医学研究院

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 20436380

研究分担者氏名: 高屋敷 吏

ローマ字氏名: TAKAYASHIKI, Tsukasa

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院医学研究院

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 30456024

研究分担者氏名: 久保木 知

ローマ字氏名: KUBOKI, Satoshi

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 50571410

研究分担者氏名: 吉富 秀幸

ローマ字氏名: YOSHITOMI, Hideyuki

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院医学研究院

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 60375631

研究分担者氏名: 賀川 真吾

ローマ字氏名: KAGAWA, Shingo

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 90507302

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。