

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17640

研究課題名(和文)大腸癌の転移制御におけるSmurf2-YY1axisの役割

研究課題名(英文)Role of Smurf2-YY1 axis in regulating colorectal cancer metastasis

研究代表者

佐藤 菜実 (Sato, Nami)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：40867272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は大腸癌においてユビキチンプロテアソーム系(UPS)E3リガーゼSmurf2がUPSを介して転写因子YY1を分解し上皮間葉移行(EMT)を抑制することで腫瘍抑制的な働きをする可能性を検証することを目的とした。臨床検体と細胞株を用いた検討では仮説に反しSmurf2・YY1・EMTの関連は低いと考えられた。ただしYY1について機能解析を進めると大腸癌細胞の遊走と浸潤を抑制し腫瘍抑制的機能をもつという結果が得られた。さらにマイクロアレイ解析によりYY1が細胞接着や癌転移に関連するインテグリンファミリーであるITGAVとITGB1遺伝子をdown regulationしていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

残念ながらUPS系やEMTに焦点をあてた大腸癌の転移メカニズム解明という目的は果たせなかった。一方で、大腸癌においてYY1がITGAVとITGB1の遺伝子発現を調節することで腫瘍抑制的役割を果たすことを示唆するデータはこれまで報告されておらず、新たな知見である。今後さらなる検証を重ねることで大腸癌の新たな転移機構を解明する一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the possibility that the ubiquitin proteasome system (UPS) E3 ligase Smurf2 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by degrading the transcription factor YY1 through the UPS and suppressing the epithelial-mesenchymal transition (EMT).

Contrary to the hypothesis, the relationship between Smurf2, YY1, and EMT was considered to be low in the examination using clinical specimens and cell lines. However, further analysis of YY1 function revealed that it has a tumor-suppressive role by suppressing colon cancer cell migration and invasion. Furthermore, microarray analysis confirmed that YY1 down-regulated ITGAV and ITGB1 genes, which are integrin family members related to cell adhesion and cancer metastasis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：YY1 大腸癌 転移 ITGAV ITGB1

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで大腸癌における発癌、増殖、転移巣形成における分子機構について研究を進めてきた。本研究の前段階として研究開始当初はユビキチンプロテアソーム系(UPS)を標的とした癌制御に着目して、E3 ユビキチンリガーゼ Smad-ubiquitination regulatory factor2 (Smurf2) に関する研究を行っていた。大腸癌原発巣および肝転移巣の臨床サンプルを用いた検討では Smurf2 高発現群は予後良好であり、*in vitro* では Smurf2 をノックダウンした細胞株は有意に遊走能が亢進した(Scientific reports 2022; 12: 5495)。Smurf2 が tumor suppressor として機能することが示唆されたが、臨床応用を考慮すると Smurf2 の標的分子や下流のシグナル伝達といった詳細な分子機構をより追究していく必要があった。Smurf2 の標的となる分子はこれまで多数報告されているが、近年 Smurf2 が Zinc finger 型転写因子 Yin Yang 1 (YY1)を degradation することがヒト胎児腎細胞株を用いた実験系によって報告された (Biochim Biophys Acta 2014, 2005-11)。YY1 は NFκB/YY1/Snail loop を介して細胞を上皮間葉移行(EMT)へ誘導することが報告されている (Crit Rev Oncog 2017;22(1-2):49-61)。これらをまとめると、Smurf2 が UPS を介して YY1 をプロテアソーム分解することで、NFκB/YY1/Snail system を制御するのではないか、という構想に至った(図 1)。

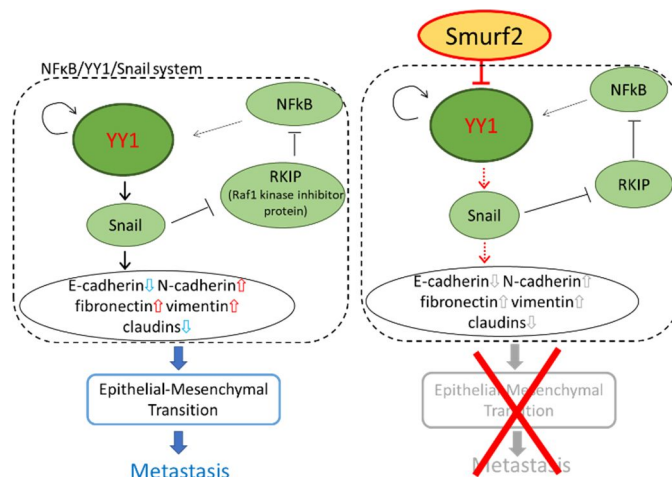


図1 本研究の仮説モデル

2. 研究の目的

研究当初は「EMT 誘導機能をもつ YY1 シグナルを down regulate することで Smurf2 が tumor suppressor としての機能を果たす」という仮説のもと、大腸癌の転移形成における Smurf2-YY1 axis の分子機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Smurf2 と YY1、Snail、EMT マーカーの相関に関する検討

2005-2014 年に当院で手術を施行した大腸癌原発巣とその肝転移巣のペア 66 例を対象に、Smurf2 および YY1 の発現を免疫染色にて評価した。

大腸癌細胞株において siRNA を用いて Smurf2 を knockdown し、YY1、Snail、EMT マーカー(E-cadherin, Vimentin)の発現について Western blot 法により検討した。

ここまでの研究で当初の仮説とは反する結果が得られつつあった。そこで、その理由を検証すべく大腸癌における YY1 の機能解析についても検討を進めることとした。

(2) 臨床検体を用いた YY1 発現と患者予後との相関に関する検討

2012-2013 年に当院で手術を施行した大腸癌原発巣 143 例と、2005-2014 年に当院で手術を施行した大腸癌原発巣および肝転移巣のペア 66 例を対象に免疫染色を行い、YY1 発現と予後を含めた臨床病理学的因子との相関を検証した。

(3) 大腸癌細胞株を用いた検討

大腸癌細胞株 2 種類(DLD1,SW48)に対して siRNA による YY1 knock down を行った。Migration assay、Wound healing assay、Invasion assay を行い *in vitro* での機能解析を行った。

(4) マイクロアレイ解析とバイオインフォマティクスを用いた YY1 下流遺伝子の同定と検証

YY1 の下流遺伝子を調べる目的で、cDNA microarray assay にて YY1 knock down に伴う遺伝子発現を解析してハブ遺伝子を同定し、さらに Western blot と免疫染色を行って YY1 発現との相関を検証した。また、同定したハブ遺伝子のプロモーター配列に YY1 結合部位が存在するかを遺伝子配列に関するデータベースを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体と大腸癌細胞株における Smurf2 と YY1、Snail、EMT マーカーの発現について

大腸癌原発巣と肝転移巣いずれにおいても Smurf2 と YY1 の発現に有意な相関は認めなかった。また、大腸癌細胞株において Smurf2 と YY1、Snail、EMT マーカーの発現を Control と Smurf2 knockdown 細胞とで比較したがいずれも有意差をみとめず、仮説に反して Smurf2、YY1、EMT の関連性は低いと考えられた(図 2)。

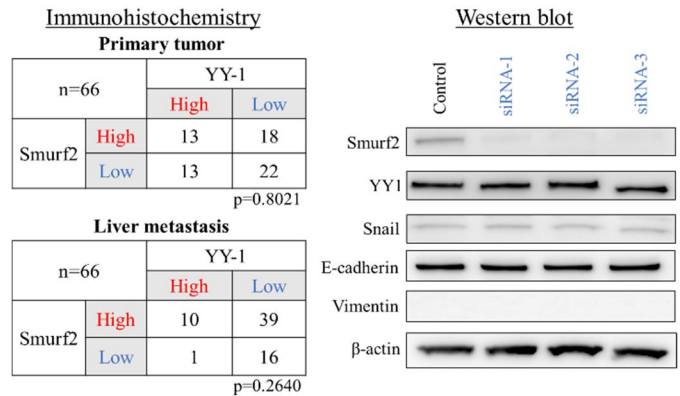


図2 Smurf2, YY1, EMTマーカーの相関

(2) 臨床検体における YY1 発現と患者予後、臨床病理学的因子との相関について

原発巣における YY1 低発現群は有意に予後不良であり、リンパ節転移、遠隔転移、術後再発、多発肝転移、major hepatectomy が有意に多かった。多変量解析では原発巣における YY 低発現は独立した予後不良因子であった(図 3)。

YY1発現と患者予後、臨床病理学的因子との相関

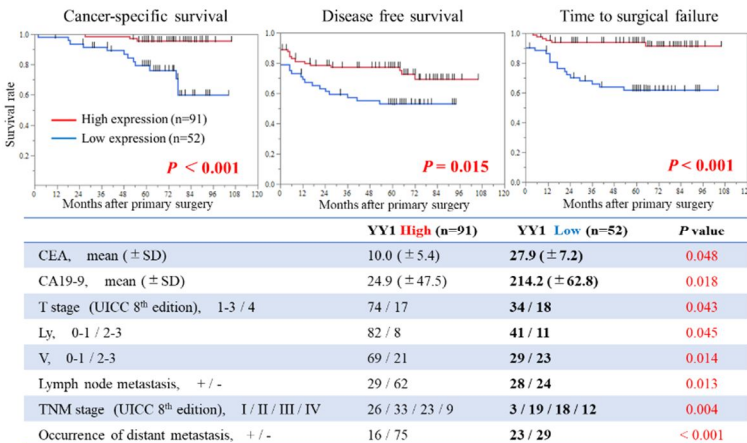


図3 YY1発現と予後および臨床病理学的因子との相関

YY1発現と臨床病理学的因子に関する多変量解析

Variable	n	5-year survival(%)	Univariate P value	Multivariate analysis HR (95%CI)	P value
Age at primary surgery, <65 / ≥65	44 / 99	92.3 / 84.3	0.201		
Sex, Male / Female	93 / 51	84.1 / 100	0.102		
CEA ≥5 / <5 < ng/mL	58 / 86	83.9 / 93.3	0.106		
CA19-9 ≥37 / <37 < U/mL	26 / 118	74.5 / 92.6	0.094		
Site of primary tumor, Left / Right	132 / 12	89.7 / 88.9	0.846		
Neoadjuvant chemotherapy before primary surgery, +/-	16 / 128	73.3 / 91.4	0.140		
T stage (8 th edition), 4 / 1-3	35 / 109	87.5 / 90.2	0.354		
Degree of differentiation, por, muc / tub, pap	4 / 137	50.0 / 90.8	0.050	3.36 (0.64-17.57)	0.151
Ly, 2-3 / 0-1	19 / 124	58.4 / 94.6	<0.001	4.51 (1.31-15.53)	0.017
V, 2-3 / 0-1	44 / 99	81.1 / 93.5	0.044	1.05 (0.36-3.09)	0.932
Lymph node metastasis, +/-	57 / 87	79.5 / 96.8	<0.001	3.17 (0.58-17.33)	0.184
RAS mutation, Mutant / Wild	17 / 29	61.9 / 74.1	0.380		
Adjuvant chemotherapy after primary surgery, +/-	48 / 96	79.6 / 95.6	0.002	1.70 (0.48-5.96)	0.409
Expression of YY1 in primary tumor, Low / High	51 / 91	79.7 / 95.6	<0.001	4.54 (1.22-16.88)	0.024

(3) 大腸癌細胞株を用いた YY1 knockdown による細胞遊走能と浸潤能の検討

YY1 knock down 細胞は Control 群と比較して遊走能と浸潤能が有意に促進された(図 4)。

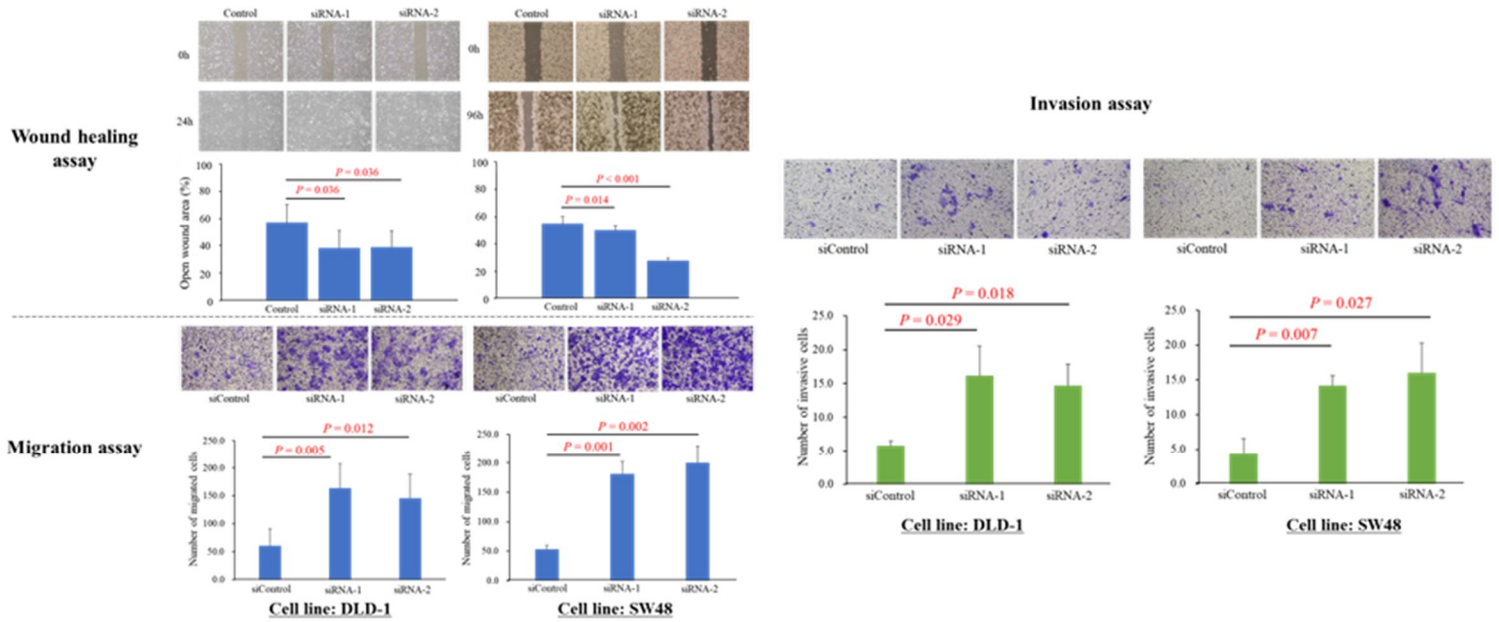


図4 *In vitro*における機能解析

(4) マイクロアレイ解析による YY1 下流遺伝子の網羅的解析とハブ遺伝子の同定、免疫染色と

Western blot によるタンパク発現の検証

マイクロアレイ解析により、YY1 ノックダウンに伴い発現が変化した遺伝子を網羅的に解析した。Fold change 1.5 以上の発現変化を認めた遺伝子を抽出し、さらにジーンエンリッチメント解析とネットワーク解析といったバイオインフォマティクス的手法を用いて解析を行った。その結果、細胞接着や癌転移と密接に関係するインテグリンファミリー分子である ITGAV と ITGB1 が YY1 knock down に伴う up-regulated hub genes として同定された(図 5)。

Western blot と免疫染色による評価では YY1 と ITGAV 及び ITGB1 の発現が負の相関関係にあることが確認された(図 6)。

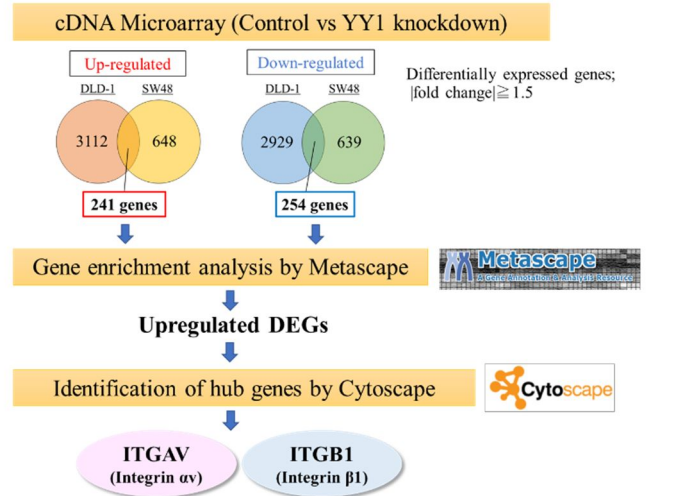


図5 マイクロアレイ解析とバイオインフォマティクス的手法を用いたハブ遺伝子の同定

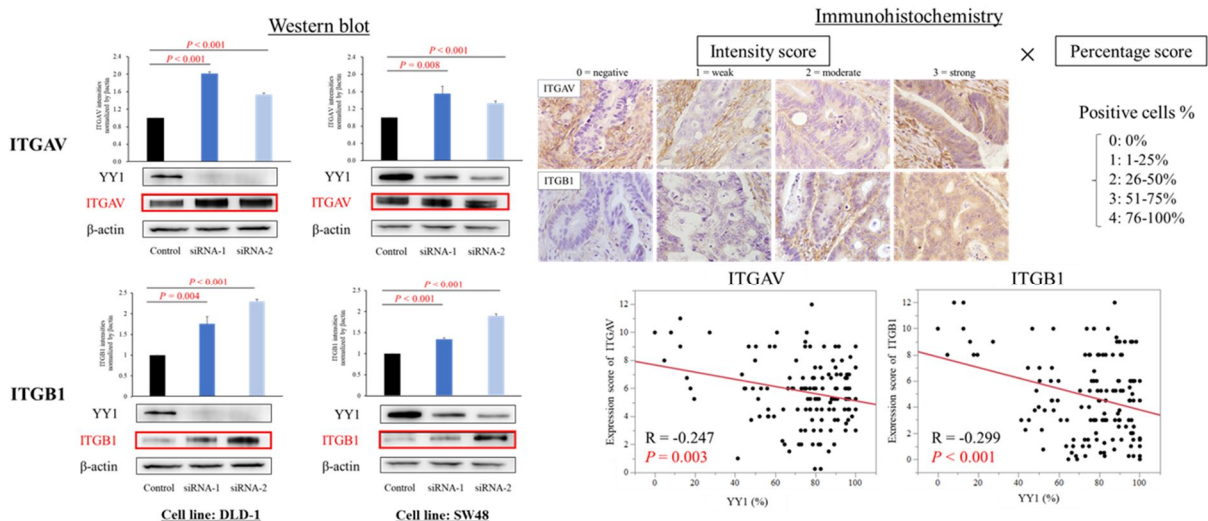


図6 YY1とITGAV、ITGB1の相関

遺伝子配列に関するデータベースを用いた検討では ITGAV と ITGB1 のプロモーターにどちらも YY1 特異的な結合部位が確認された(図 7)。

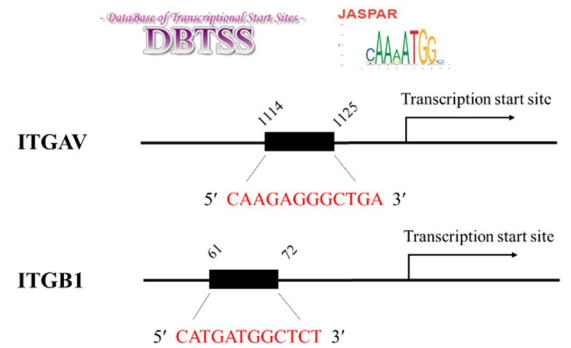


図7 YY1結合部位の同定

以上より、本研究では、YY1 が大腸癌の進行において重要な役割を果たす ITGAV と ITGB1 の発現を抑制することが確認された。この転写調節により大腸癌細胞の遊走と浸潤が抑制されている可能性が示唆された。全体として YY1 は腫瘍抑制的な役割を果たし大腸癌患者の予後向上に寄与している可能性がある。研究当初の目的を果たすこととはならなかったがこれは新たな知見であり、今後さらなる検証を重ねることで大腸癌の新たな転移機構を解明する一助になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 1791-2431
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 菜実、酒井望、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、細川勇、三島敬、西野仁恵、大塚将之
2. 発表標題 転写因子YY1はITGAV, ITGB1の遺伝子発現を調節し大腸癌細胞の遊走と浸潤を抑制することで大腸癌患者の予後に寄与する
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------