

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462396

研究課題名(和文) 泌尿器科癌におけるZFHX3/ATBF1の機能解析と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of ZFHX3/ATBF1 in urological cancer and implication in targeted therapy

研究代表者

富田 善彦 (Tomita, Yoshihiko)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90237123

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)：ZFHX3/ATBF1は最初に フェトプロテイン(AFP)遺伝子の発現を抑制する巨大分子として同定され、その生理的機能は細胞を分化させることである。腎細胞癌(RCC)110例で検討すると14例で発現低下し、予後が不良であった。ZFHX3はPIAS3と結合し、STAT-3の転写活性を抑制する。Stat-3はIL-6の産生を増強するが、IL-6高産生のRCCは予後が不良である。IL-6高産生細胞株A704ではZFHX3が低発現、stat-3リン酸化は高発現であり、レチノイン酸処理はZFHX3発現の増強とともにstat-3の転写活性を低下させ、細胞増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：ZFHX3/ATBF1 was identified to inhibit expression AFP and to promote cell differentiation. Examination of ZFHX3 revealed its reduction in 14 of 110 renal cell cancer (RCC) and they had poorer prognosis. ZFHX3 is known to suppress stat-3 function by binding PIAS3. Stat-3 transactivates IL-6 gene, and RCC cases with IL-6 elevation show shorter survival. A704, a RCC cell line, with high IL-6 production and high phosphorylated stat-3, were treated with retinoic acid which is potential ZFHX3 inducer. As a result, elevation of ZFHX3 and inhibition of stat-3 function, concomitant with decreased cell proliferation were observed.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ZFHX3/ATBF1 renal cell carcinoma IL-6 レチノイン酸 stat-3

1. 研究開始当初の背景

(1) 平成 26 年当時においてのがん薬物療法の進歩は目覚ましいものがあり、腎細胞癌に対してはチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)と mTOR 阻害薬が生存期間の延長を示しているし、前立腺癌、特に CRPC に関してはアンドロゲン合成阻害薬や新規抗男性ホルモン薬、骨転移に対する新規薬剤(アイソトープを含む)などが生存期間の延長を示している。さらに、膀胱癌に関しても、限られた症例であるが mTOR 阻害薬の有用性が期待されている(Science 338, 6104, 2012)。しかし、新規治療薬でも腎細胞癌を長期の完全奏功は極めてまれであるし、CRPC の生存期間もさらなる延長が期待される。膀胱癌については gemcitabine + CDDP 以降、確立された治療法は存在しない。これらのことは、従来の治療の対象とは異なった標的分子の検討が必要であることを示している。

(2) ZFHx3/ATBF1 は最初に フェトプロテイン(AFP) 遺伝子の発現を抑制する巨大分子として同定された。その生理的機能は主に細胞を分化させることであり、その機能の低下は細胞自体の脱分化につながると考えられる。AFP そのものは腫瘍細胞の増殖や、より悪性の形質獲得とは直接には関係しないが、ZFHx3/ATBF1 の機能の消失・減衰は主に細胞の脱分化、細胞外基質の関係の変化から、より高い浸潤能や転移能の獲得に関係していることが胃癌等で明らかになってきている(下表)。

ZFHx3/ATBF1 の発現変化を示す腫瘍	
悪性腫瘍の種類	ZFHx3/ATBF1 の変異
胃癌	遺伝子変異/epigenetic
肝細胞癌	遺伝子変異
乳癌	epigenetic
前立腺癌	遺伝子変異
皮膚癌	epigenetic
頭頸部癌	epigenetic

泌尿器科領域では前立腺癌で遺伝子変異が高頻度であることが早くから報告されているが、その機能的な検討は十分行われてはいない。腎細胞癌や尿路上皮癌では発現の程度も含めて、その報告はない。

2. 研究の目的

泌尿器科癌に対する分子標的治療は、腎細胞癌(RCC)で目覚ましい進歩を遂げたが、完全奏効率の低さや、耐性の出現が問題となっている。研究ではこれまで、泌尿器科癌ではほとんど検討されなかった ZFHx3/ATBF1 (ホメオドメインと Zn フィンガーを持ち、胚の発生、細胞分化に重要な働きをする)の多様な機能に着目し、泌尿器科癌、特に腎細胞癌での臨床病理学的意義の検討と新規標的分子としての可能性を探求することを目

的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下のパートにより施行された。

パート・1 ZFHx3/ATBF1 発現の検討と臨床病理学的因子との関係の解析

免疫組織学的検討により、複数の ZFHx3/ATBF1 を用いて発現を検討する。その結果を種々の臨床病理学的因子、疾患特異的生存期間、無再発生存期間との関係を詳細に検討する。また、この際に、新鮮標本から抽出された蛋白、あるいは RNA が利用可能である場合には、ウエスタンブロット解析、real time PCR により、蛋白発現の程度と、mRCC 発現の程度についても検討する。

パート・2 培養細胞株における ZFHx3/ATBF1 の発現の検討と p53 系を中心とした分子発現の検討

細胞株での ZFHx3/ATBF1 の発現を蛋白レベルでウエスタンブロット解析により検討する。また、これらの細胞株については、我々のこれまでの研究から、p53 遺伝子の status は明らかにしているため、ZFHx3/ATBF1 と p53 をつなぐ可能性のある分子として ATM、PDGFR 等についての検討を加える。さらに、IL-6 系では PIAS3 の発現と、stat-3 のリン酸化の状態についての検討を行う。

パート・3 genotoxic 刺激または growth factor withdrawal に対する各分子の発現とリン酸化の確認と ZFHx3/ATBF1 分解阻害による ZFHx3/ATBF1 発現の restoration による影響の検討 ZFHx3/ATBF1 および、研究対象となる分子群の、蛋白レベルおよび mRNA レベルでの発現に基づいて、腫瘍細胞の増殖抑制、細胞死を誘導する最も効果的な方法を見出すために、抗癌剤、X 線などの genotoxic 刺激、または IL-6 を中心とした growth factor の withdrawal (または抗体による阻害) による、各分子の発現、リン酸化の変化、また細胞回転への影響や細胞死の誘導について検討を行う。また、ZFHx3/ATBF1 低発現の細胞株に関して、ZFHx3/ATBF1 遺伝子発現を増強、または、分解の抑制により、全長 ZFHx3/ATBF1 分子の増加を誘導し、そのものによる細胞増殖抑制、細胞死の誘導が起きるのか否か、また上述の genotoxic 刺激または growth factor withdrawal への感受性の変化について検討する。

4. 研究成果

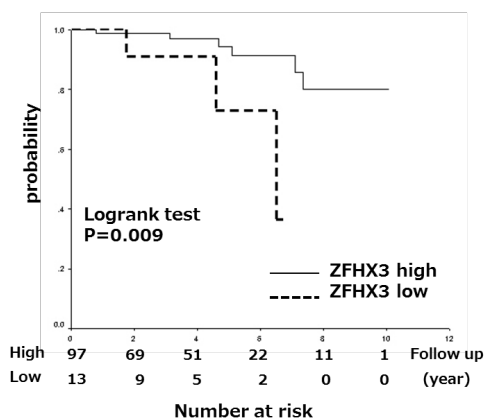
(1) ZFHx3/ATBF1 の腎細胞癌における発現と臨床病理学的因子との検討

ZFHx3/ATBF1 の発現とその臨床的意義を臨床検体を用いて検討した。腎細胞癌の切除標本 110 検体に対し免疫組織学的検討を加えた。これらの検体は遠隔臓器やリンパ節に転移を認めない症例であった。101 例中 14 例(12.7%)で発現の減弱が見られた(下表)。

Median age (range) years	64.5 (25-83)
Male/Female	69/41
Affected side (right/left)	54/56
Surgery	
Laparoscopic/Open	58/52
Radical/Partial nephrectomy	71/39
Histological type	
Clear cell	93
Papillary	8
Chromophobe	1
Cystic	4
Unclassified	4
pT stage	
1a	64
1b	25
2	5
3a	10
3b	6
Infiltration type (α /including β)	86/24
Vascular invasion (V(-)/V(+))	98/12
Nuclear grade	
1	50
2	48
3	12
Total	110

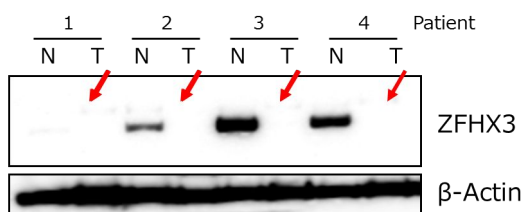
臨床病理学的因子との解析では ZFHX3/ATBF1 の減弱は T 分類で 3b 以上 ($p=0.000391$)、組織学的に浸潤形式が悪性のもの () ($P=0.00291$)、また静脈内浸潤を示す例で高率に認められた ($p=0.000014$)。さらに、生存期間との関係を検討すると減弱を認めた症例では全生存期間 ($p=0.009$) (下図) および無進行生存期間 ($P=0.0004$) が統計学的に有意に短かった。以上より、ZFHX3/ATBF1 の減弱は腎細胞癌の悪性度獲得に深く関与していることが明らかになった。

Overall survival

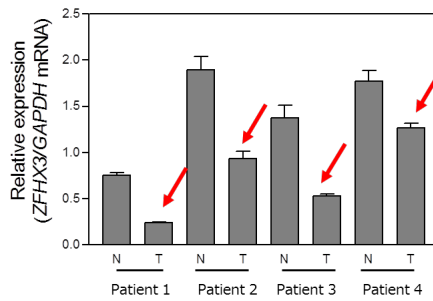


この減弱は、Western blot 法による蛋白レベルや real time PCR による mRNA レベルでも確認できた (下図)。

<Western blot>



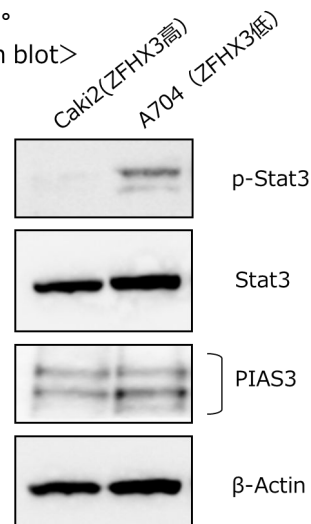
<Quantitative RT-PCR>



(2) ZFHX3/ATBF1 の腎細胞癌培養細胞株を用いた機能解析。

ZFHX3/ATBF1 の機能については、4つの作業仮説、すなわち 1. 酸化ストレス下での血小板由来成長因子受容体の転写を促進する、2. P53 と複合体を形成し P21 の転写促進する。3. 転写因子 v-Myb と結合しその活性を抑制する、4. Protein inhibitor of activated STAT-3 (PIAS3) と結合し、STAT-3 の転写活性を抑制する、のいずれが腎細胞癌で機能しているのかを検討した。この結果、1-3 の仮説を示唆する結果は得られなかったが、4. の IL-6、PIAS3、STAT-3 の系が関係する可能性が高いため、引き続き研究を行った。これまでの報告から、IL-6 高産生の腎細胞癌は予後が不良であることが知られているが、検討した細胞株中 A704 が高産生、Caki-2 が低産生のため、この2株で以降の研究を行った。ZFHX3/ATBF1 は A704 で低発現、Caki-2 で高発現であり、その下流の STAT-3 リン酸化は A704 で高発現であった。このことから、腎細胞癌においては、ZFHX3/ATBF1 が IL-6 のシグナル伝達の障害を介して細胞増殖を抑制していることが示唆された。

<Western blot>



(3) ZFHX3/ATBF1 発現の増強と抗腫瘍効果の誘導

ZFHX3/ATBF1 の減弱が腎癌細胞の増殖につながる可能性が高いことから、

ZFH3/ATBF1 の発現増強が可能な方法を検索したところ、これまでの報告ではレチノイン酸 (RA) が ATM を介して CREB のリン酸化を促進し、ZFH3/ATBF1 の転写を促進することが明らかになっていた。このことから、ZFH3/ATBF1 低発現株 A704 に RA を作用させたところ、定量的 PCR による検討で ZFH3/ATBF1 の mRNA の増強がみとめられ、ウェスタンブロット法では蛋白発現の増強が観察された。さらに、stat-3 のリン酸化の程度は変わらないものの、luciferase assay で検討すると、stat-3 の転写活性は有意に抑制されていた。

このとき細胞増殖自体も抑制され、その効果は細胞回転の検討で G1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少がみられ、G1-S arrest によるものが示唆された。また、stat-3 は IL-6 の発現も増強することから、RA 処理での IL-6 産生能を検討した所、培養上清の濃度は減少するものの、完全には抑制されず、IL-6 産生には他の因子がかかわっている可能性が示唆された。

(4) まとめ

これまでの臨床研究では、進行腎細胞癌症例で RA の投与が一定の効果を示すことが知られており、本研究の結果から、ZFH3/ATBF1 低発現症例は RA による治療の良い適応とも考えられ、臨床応用につながる可能性があると考えられる。

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4件)

1. 伊藤裕美, 一柳統, 櫻井俊彦, 小島遼一, 八木真由, 加藤智幸, 長岡明, 冨田善彦: 腎細胞癌細胞株において ZFH3 は細胞増殖とアポトーシス抑制に関与している. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 名古屋: 2015 年 10 月 10 日

2. 櫻井俊彦, 伊藤裕美, 山岸敦史, 黒田悠太, 八木真由, 西田隼人, 一柳統, 加藤智幸, 長岡明, 冨田善彦: 腎細胞癌における ZFH3 発現低下は予後不良因子である. 第 103 回日本泌尿器科学会総会, 石川県立音楽堂, 金沢: 2015 年 4 月 13 日

3. 伊藤裕美, ビリームウラジミル, 櫻井俊彦, 内藤整, 川口誠, 三浦裕, 冨田善彦: Decreased nuclear expression of ZFH3 in renal cell carcinoma correlates with poorer prognosis. 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 横浜: 2014 年 9 月 27 日

4. 伊藤裕美, ビリームウラジミル, 櫻井俊

彦, 冨田善彦: All-Trans Retinoic Acid Down-regulates Interleukin-6 Cascade by inducing ZFH3/ATBF1 in Renal Cell Cancer Cells. With evidence of aberrant ZFH3/ATBF1 expression as a poor prognostic factor. 第 9 回 Basic Urology Research Seminar, ハイアットリージェンシー大阪, 大阪市: 2014 年 8 月 23 日

[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

冨田 善彦 (TOMITA, Yoshihiko)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 90237123

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし

(4) 研究協力者

伊藤 裕美 (ITO, Hiromi)
櫻井 俊彦 (SAKURAI, Toshihiko)
ビリーム ウラジミル (Bilim, Vladimir)