

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591982

研究課題名(和文) 胚性幹細胞研究に基づく肝癌幹細胞増殖機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the proliferative mechanism of liver cancer stem cell based on the study of embryonal stem cell

研究代表者

高村 博之 (TAKAMURA, HIROYUKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：40377396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：胚性幹細胞(ES細胞)特異的転写因子のZfp57は、ヒトがん細胞において、imprinting 遺伝子である IGF2 の loss of imprinting を介して AKT をリン酸化し、造腫瘍性を亢進させるとともに、血行性転移能獲得に中心的な役割を果たすことを明らかにした。Zfp57 は「がん遺伝子」として機能する。

研究成果の概要(英文)：Zfp57 is required for the tumorigenicity and hematogenous metastatic ability of humoral cancer cell line by upregulating IGF2 expression and Zfp57 activates AKT through IGF2 signaling. Zfp57 is over-expressed in several humoral cancer tissues and especially in liver metastasis of colorectal cancer.

研究分野：肝臓外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：Zfp57

1. 研究開始当初の背景

ES細胞とがん幹細胞との共通性を探る一環として、ES細胞とがん細胞株とに共通した転写関連分子や増殖関連分子の探索を行ったところ Zfp57 遺伝子が同定されました。そこで、この Zfp57 遺伝子を解析したところ、ES細胞やiPS細胞の未分化能維持に欠かすことのできない STAT3 や Oct3/4、Nanog を中心とした転写因子ネットワークの中心に位置することが判明した。Zfp57 遺伝子の解析を進めることは、がん幹細胞の研究の一助になると確信し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

Zfp57 遺伝子は胚性幹細胞 (ES 細胞) 特異的な転写因子であり、足場非依存性増殖のために必要不可欠な遺伝子であることを見出した。さらに研究を進めた結果、ES細胞と同様に「がん幹細胞」でも Zfp57 遺伝子が重要な役割を担っているのではないかと仮説に至った。そこで、ヒトがん細胞における同遺伝子の機能を解析することを目的として本研究を立案した。

3. 研究の方法

- (1) ES細胞と、ヒト線維肉腫由来の HT-1080 細胞を用いて Zfp57 遺伝子の機能解析を行った。ES細胞を用いて Zfp57 が Nanog の制御を受けていることを探索した。
- (2) HT-1080 細胞を用いて、Zfp57 の過剰発現細胞とノックダウン細胞を作製し、Zfp57 の足場非依存性増殖に及ぼす影響や、マウス皮下移植モデルにおける増殖活性を評価した。
- (3) Zfp57 の下流には IGF2 などの Imprinting 遺伝子が存在することを見出していたが、HT-1080 細胞を用いて、

Zfp57 が imprinting 遺伝子の IGF2 の imprinting control region (ICR) に直接作用し loss of imprinting を引き起こすかどうかを検討するとともに、さらに下流で AKT のリン酸化が亢進するかどうかを検討した。

- (4) HT-1080 細胞を用いて Zfp57 の過剰発現が血行性転移能の獲得に寄与するかをマウスの肺転移モデルを用いて検証した。
- (5) 最後に、各種ヒト癌の切除標本を用いて、癌部で Zfp57 の過剰発現を認めるかどうかを検証した。

4. 研究成果

- (1) Zfp57 遺伝子は胚性幹細胞 (ES 細胞) 特異的な転写因子であり、足場非依存性増殖のために必要不可欠な遺伝子であることを見出した。さらに研究を進めた結果、ES細胞と同様に「がん幹細胞」でも Zfp57 遺伝子が重要な役割を担っているのではないかと仮説に至った。そこで、ヒトがん細胞における同遺伝子の機能を解析することを目的として本研究を立案した。Zfp57 遺伝子は ES細胞に特異的な転写因子の Stat3 や Oct3/4 の下流に位置することはわかっていたが、さらに我々は Nanog の支配を受けることを見出した。Zfp57 遺伝子の Enhancer 領域に Nanog が働くことにより Zfp57 遺伝子が活性化されることを証明した (投稿準備中)。
- (2) Zfp57 遺伝子を高発現させた ES細胞をマウスに移植すると、造腫瘍性が高まることを見出した。ES細胞や iPS細胞、Muse細胞を臨床応用するためには、Zfp57 遺伝子の機能をコントロールすることが肝要である。

(3) ヒト悪性腫瘍由来の HT1080 細胞を用いて腫瘍細胞における Zfp57 遺伝子の機能を解析した。HT1080 細胞を用いて Zfp57 過剰発現細胞と Zfp57 ノックダウン細胞を作成し、それらの増殖能を評価した結果、Zfp57 過剰発現細胞は増殖能が高く、一方、Zfp57 ノックダウン細胞は増殖が抑制されることが明らかとなった。さらにそれらの細胞をマウスの皮下へ移植したところ、Zfp57 過剰発現の HT1080 細胞はやはり増殖能が高く、一方、Zfp57 ノックダウン細胞は増殖能が低いことが確認された (Figure 1, 2)。

Fig. 1 hZFP57 Knockdown inhibits tumorigenicity of HT1080 cells in nude mice subcutaneous injection model

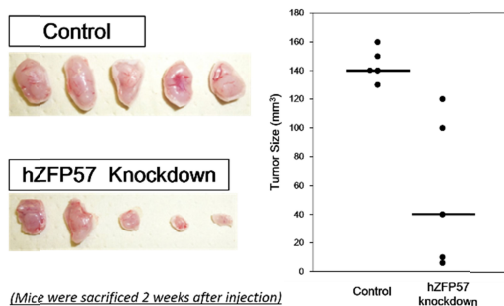
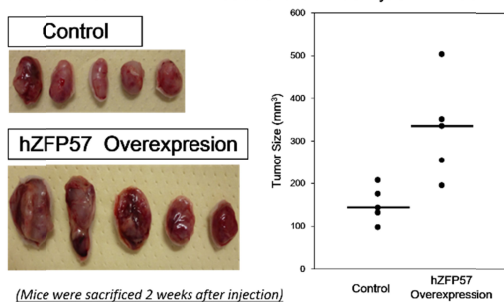


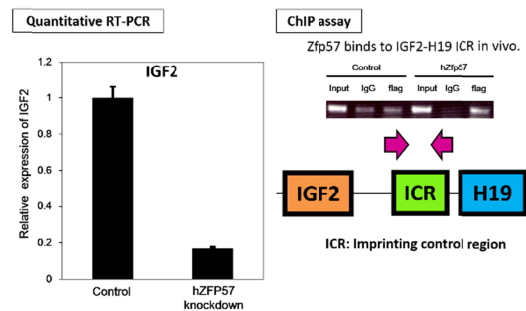
Fig. 2 Overexpression of hZFP57 enhances tumorigenicity of HT1080 cells in nude mice subcutaneous injection model



(4) Zfp57 は IGF2 や Dlk1 などのインプリンティング遺伝子を調節することを明らかにした。そこで、ChIP assay を用いて検討した結果、Zfp57 が IGF2 のインプリンティング調節領域 (ICR) に結合することを確認した。さらに Zfp57 過

剰発現細胞と Zfp57 ノックダウン細胞において IGF2 の発現を評価したところ Zfp57 を高発現させると IGF2 の発現が亢進し、ノックダウンすると低下することが確認された。即ち、Zfp57 が IGF2 の ICR 領域に直接作用して loss of imprinting に関与していることを確認した (Figure 3)。

Fig. 3 hZFP57 regulates IGF2 expression in HT1080 cells



(5) 次に HT1080 細胞における IGF2 そのものの働きを評価した。HT1080 細胞で IGF2 を高発現させると、Zfp57 高発現細胞と同様に足場非依存性の増殖が亢進し、その効果は IGF2 の中和抗体やノックダウンで著明に抑制された。また、マウスの移植モデルにおいても IGF2 造腫瘍性の亢進はノックダウンで抑制された (Figure 4, 5, 6)。

Fig. 4 IGF2 is required for anchorage-independent growth of HT1080 cells

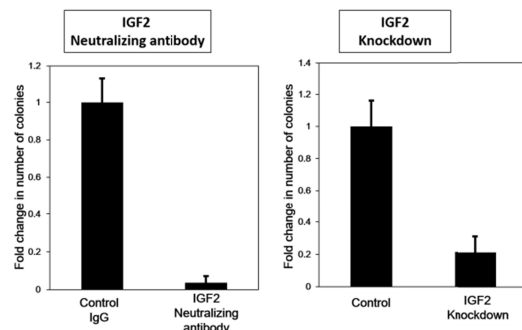


Fig. 5 IGF2 is required for tumorigenicity of HT1080 cells in nude mice subcutaneous injection model

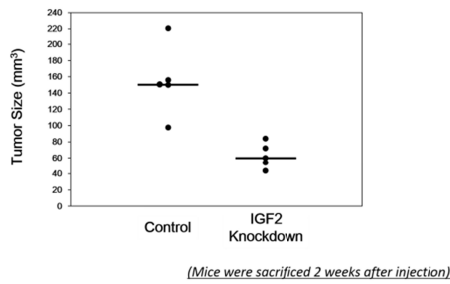
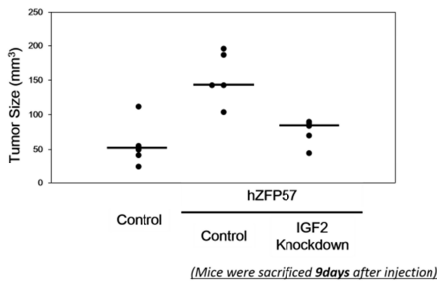


Fig. 6 IGF2 knockdown attenuates hZFP57-enhanced tumorigenicity of HT1080 cells in nude mice subcutaneous injection model



(6) HT1080 細胞において Zfp57 を高発現させても, IGF2 をノックダウンすると, 足場非依存性増殖やマウス移植モデルにおける造腫瘍性が低下した (Figure 6) . 以上の結果より, Zfp57 は imprinting 遺伝子である IGF2 の loss of imprinting を介して腫瘍細胞の造腫瘍性に関与していることが確認された .

(7) 次に, IGF2 の下流因子を探索した結果, HT1080 細胞は IGFR1 を発現しており, IGF2 の刺激で IGFR1 が活性化され, AKT がリン酸化されることを確認した . また, IGF2 をノックダウンした場合と同様に Zfp57 をノックダウンしても AKT のリン酸化が抑えられることを確認した . 以上より Zfp57 は IGF2 の loss of imprinting を介して AKT のリン酸化を亢進し, 造腫瘍性を亢進させることが明らかとなった (Figure 7, 8) .

(8) 次に, マウスの肺転移モデルを用いて

Fig. 7 IGF2 activates AKT in HT1080 cells

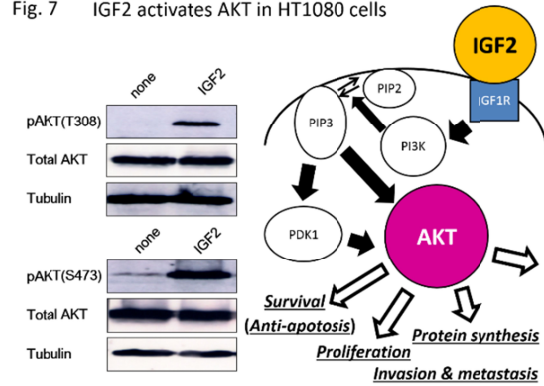
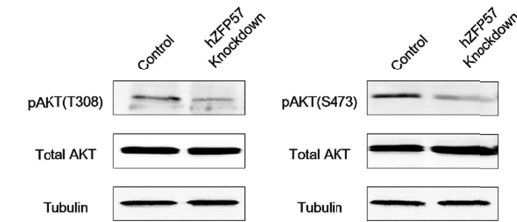
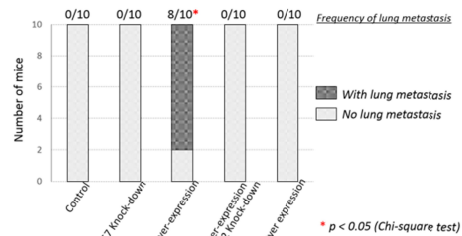


Fig. 8 hZFP57 regulates AKT activity in HT1080 cells



Zfp57 遺伝子の血行性転移に及ぼす役割を評価した . マウスの大腿四頭筋に HT1080 細胞を移植したところ, コントロール細胞では肺転移は形成されなかったが, Zfp57 を高発現させると肺転移が高率に形成された . 一方, Zfp57 を高発現した細胞でも IGF2 をノックダウンすると肺転移は形成されなかった . 即ち, Zfp57 は IGF2 を介して血行性転移能の獲得に主要な役割を担っていることが明らかとなった (Figure 9) .

Fig. 9 hZFP57 overexpression promotes lung metastasis (hematogenous metastasis) of HT1080 cells in nude mice

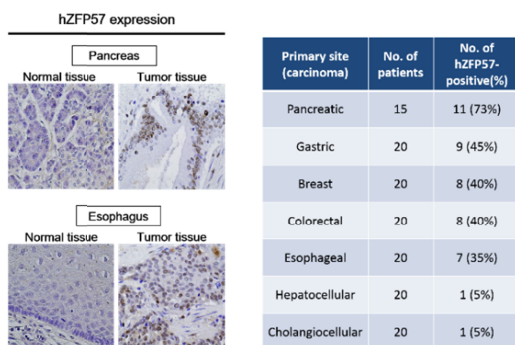


BALB/c nude mice injected with 5×10^5 cells into the quadriceps femoris muscle, respectively. The lungs were harvested 6 weeks later. The lung metastasis was ascertained in three representative, maximal coronal sections with 200 μ m distance between slices.

(9) 食道癌, 胃癌, 大腸癌, 膵癌, 肝癌, 乳癌などのヒト癌組織を用いて Zfp57 の発現を検討した結果, 様々な癌組織で Zfp57 蛋白の発現が認められることが明

らかとなった (Figure 10) .その中で特筆すべきことは、大腸癌の全ての肝転移巣やリンパ節転移巣で Zfp57 が高発現していることを確認した .

Fig. 10 hZFP57 is overexpressed in several cancer tissues



(10)まとめ . Zfp57 遺伝子は ES 細胞で足場非依存性増殖や造腫瘍性においてきわめて重要な遺伝子であることを見出ししていたが ,さらに ,ヒト腫瘍においても Zfp57 は IGF2 の loss of imprinting を介して AKT のリン酸化を引き起こし ,足場非依存性の増殖に関与するとともに ,造腫瘍性や血行性転移能獲得にきわめて重要な役割を担っていることを見出した . ES 細胞に特異的な転写因子 Zfp57 は ,「がん幹細胞」においても転写因子として重要な役割を担っていると推察される .

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1件)

(1) Tada Y, Yamaguchi Y, Kinjo T, Song X, Akagi T, Takamura H, Ohta T, Yokota T, Koide H. The stem cell transcription factor ZFP57 induces IGF2 expression to promote anchorage-independent growth in cancer cells. *Oncogene* 2014 Jan 27. doi: 10.1038/onc.2013.599. 査読有

[学会発表](計1件)

(1) 高村博之, 山口 紫, 庄司泰弘, 他 . ES 細胞特異的遺伝子 Zfp57 は癌遺伝子として機能する . 第 114 回日本外科学会総会 . 2014 年 4 月 5 日 , 国立京都国際会館 (京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高村 博之 (TAKAMURA HIROYUKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号 : 40377396