

大腸癌の発癌、進展、転移形成における 新規治療ターゲットとしてのYAF2の機能解析

千葉大学医学部附属病院 肝胆膵外科

助教 酒井 望

(共同研究者)

千葉大学大学院臓器制御外科学

教授 大塚 将之

千葉大学大学院臓器制御外科学

特任助教 佐藤 駿介

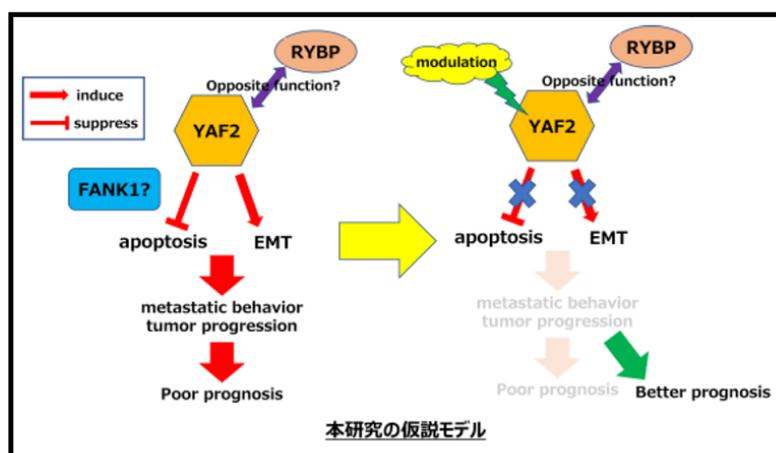
はじめに

近年、腫瘍細胞が有する genetic な因子とは別に、腫瘍発生後に変化し得る epigenetic な腫瘍制御機構が明らかとなっており、この制御機構を原発巣から転移形成まで包括的に理解することは新たな治療戦略を構築するうえで不可欠である。Epigenetics は、DNA 塩基配列の変化を伴わず、細胞分裂を越えて維持される遺伝子発現調節機構であり、その制御には、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン改変、non-coding RNA、micro RNA などが関与することが知られている。近年の epigenetics 研究の成果により、塩基配列の変異、欠失による genetic な遺伝子異常だけでなく、塩基への修飾による epigenetic な遺伝子異常によっても発癌することが明らかとなってきた。我々はこれまでに転写調節因子 YY1 (Ying Yang 1)、RYBP、RING1A/B に注目し研究を行ってきた。これらは polycomb 複合体による epigenetic な転写抑制機構に深く関与していることが知られている。

PcG (polycomb group) protein のひとつである YAF2 は、我々が注目してきた転写因子 YY1 (Yin Yang 1) と相互作用するタンパクで、YY1-SIRT6 interaction を誘導することが知られており、その結果 YY1 の腫瘍抑制的機能、SIRT6 による癌の悪性度抑制、apoptosis 促進が起これ、大腸癌に対し腫瘍抑制的に働く可能性がある。

また、YAF2 は PDCD5 の安定化を介し apoptosis 誘導、遊走、浸潤能抑制に寄与する可能性も考えられる。本研究ではこれらの仮説の分子機構を明らかにし、臨床データも併せて YAF2 の抗腫瘍効果を証明することにより、大腸癌における新規治療標的としての可能性を追求する。(図1)

図1



結果

1. 臨床大腸癌標本の検討

①2012年から2013年の1年間に当院で手術を施行したStage I-IVの大腸癌症例151例を対象として病理組織標本の免疫組織染色を行い、YAF2の発現パターンと臨床病理学的因子や予後との相関について解析した。

大腸癌 (Stage I-IV) の151例中YAF2高発現が108例、低発現が43例であった。Stage I-IVを合わせた全症例の検討ではYAF2発現の高低で原発巣切除後の全生存期間 (overall survival, OS) に有意差を認めなかった (p=0.209)。深達度と遠隔転移の発生率で有意差を認め、T4症例はYAF2高発現群で17.6% (19/108例)、低発現群で37.2% (16/43例)であり低発現群でT4症例が多かった (p=0.010)。遠隔転移の発生率はYAF2高発現群が21.3% (23/108例)、低発現群が37.2% (16/43例)であり低発現群で高かった (p=0.044)。(表1、図2)

Stage II, IIIのサブグループで検討を行うと、YAF2高発現が76例、低発現が26例で、YAF2高発現群ではOS (p=0.031) と無再発生存期間 (disease free survival, DFS) (p=0.016) がともに有意に長く、多変量解析でYAF2発現が予後と関連していた。(図3、表2)

表1

	YAF2 expression		p value
	positive (n=108)	negative (n=43)	
Age at primary surgery (years), Median (range)	70 (29-91)	68 (27-91)	0.309
Sex, Male / Female	69/39	30/13	0.490
CEA, mean	17.4(±5.3)	11.6 (±8.05)	0.274
CA19-9, mean (±SD)	96.6 (±47.6)	93.4 (±72.3)	0.485
Site of tumor, Right / Left	12/96	6/37	0.627
Neoadjuvant therapy, + / -	10/87	4/38	0.888
T stage (UICC 8th edition), 1-3 / 4	89/19	27/16	0.001
ly, 0 / 1-3	48/60	21/22	0.625
v, 0 / 1-3	47/61	16/27	0.476
Size of tumor(mm), mean (±SD)	340.7 (±1.89)	42.2 (±3.00)	0.673
Lymph node metastasis, + / -	45/63	15/28	0.442
TNM stage (UICC 8th edition), I / II / III / IV	19/43/33/13	10/15/11/7	0.714
RAS mutation, Wild / Mutant	18/10	12/7	0.937
BRAF mutation, Wild / Mutant	27/1	17/2	0.349
Adjuvant chemotherapy, + / -	39/69	10/33	0.128
Distant metastasis (Stage I-IV), + / -	23/85	16/27	0.044
Recurrence after curative resection (Stage I-III), + / -	11/85	10/27	0.027

図2

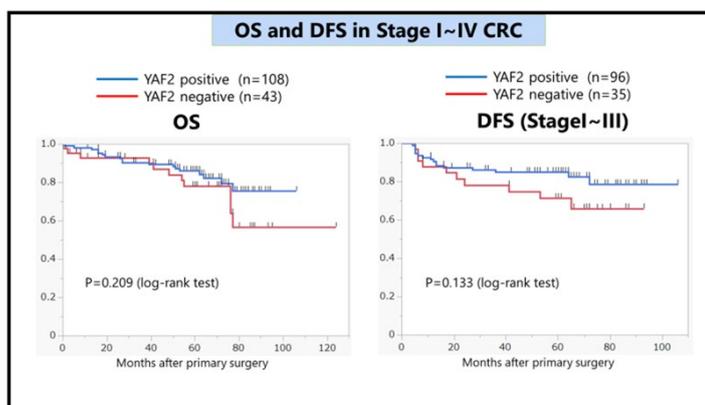
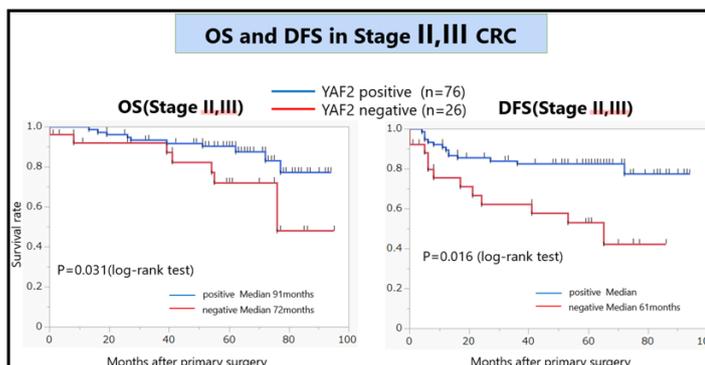


表2

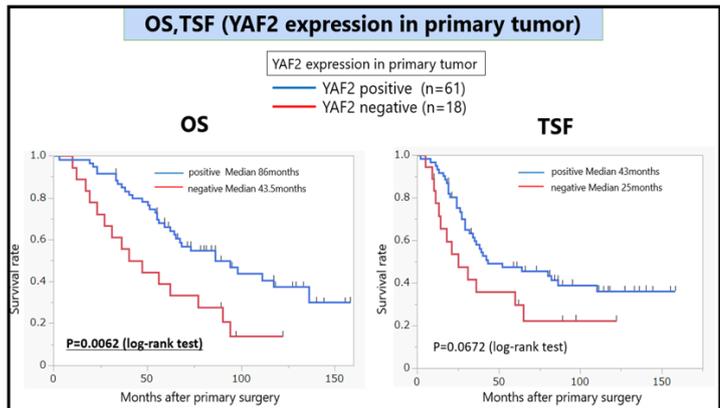
Prognostic factors for overall survival (Stage II,III)					
Variable	n	5-year survival (%)	Univariate P value	HR (95%CI)	P value
Age at primary surgery, <65 / ≥65 years	29/77	81.6/85.2	0.208		
Sex, Male / Female	38/68	77.7/96.0	0.136		
CEA before primary surgery, ≥5 / <5 ng/mL	54/40	75.5/87.0	0.43		
CA19-9 before primary surgery, ≥37 / <37 U/mL	77/17	61.5/87.1	0.296		
Site of primary tumor, Left / Right	90/16	83.4/88.2	0.118		
T stage (UICC 8th edition), 4 / 1-3	26/80	73.3/86.8	0.506		
ly, 0/1,2,3	37/68	85.0/83.1	0.001	0.46(0.18-1.19)	0.117
v, 0/1,2,3	45/60	88.0/81.0	0.744		
Lymph node metastasis, +/-	62/44	87.7/78.5	0.1	2.28 (0.28-28.0)	0.589
TNM stage (UICC 8th edition), II / III	61/45	84/88	0.133	2.74	0.622
RAS mutation, Mutant / Wild	11/18	58.0/68.7	0.876		
Neoadjuvant chemotherapy, + / -	12/82	57.1/85.7	0.205		
Adjuvant chemotherapy after primary surgery, + / -	64/42	77.2/87.8	0.004	1.69 (0.54-5.27)	0.361
Expression of YAF2 in primary tumor, + / -	76/26	86.1/78.0	0.062	0.33(0.12-0.87)	0.031

図3



②2005年から2012年に当院で手術を施行した大腸癌症例のうち、肝転移を生じ肝切除を行った79症例を対象として同様に解析を行った。肝転移切除を施行した79例で原発巣のYAF2発現を検討すると、YAF2高発現が61例、低発現が18例であった。原発巣切除後の全生存期間は高発現群で有意に長かった（86か月 vs 43.5か月、 $p=0.006$ ）。肝転移巣の病理検体でも同様にYAF2発現の評価を行うと、YAF2高発現が62例、低発現が16例であったが、OS、TSFは両群で有意差を認めなかった。（図4）

図4



2. 大腸癌細胞株を用いた*in vitro*研究

大腸癌細胞株DLD-1, SW620を用いて腫瘍細胞におけるYAF2発現の影響を検討した。siRNAを用いてYAF2をknockdownし、proliferation assay, wound healing assayを行った。proliferation assayでは、YAF2発現の有無で細胞増殖に有意差を認めなかった。

DLD-1を用いたwound healing assayではYAF2 knockdownにより有意に遊走能が増加した。（図5、6）

図5

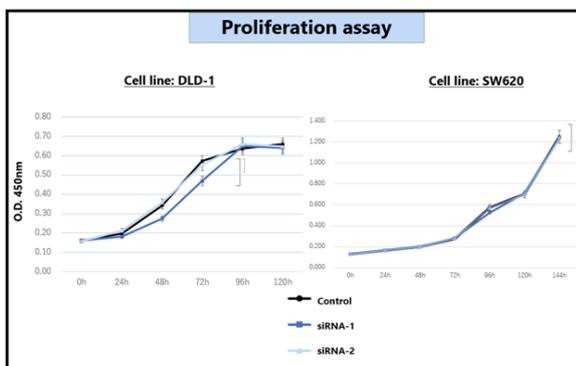
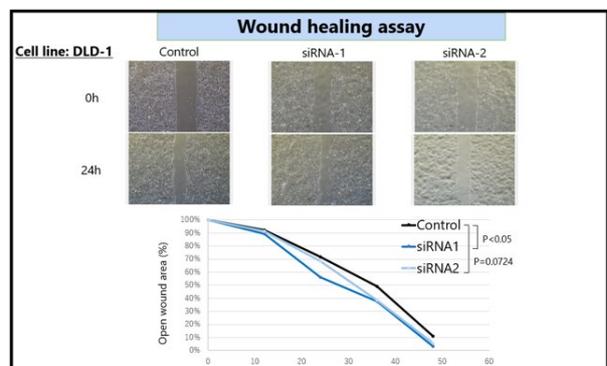


図6



考 察

これまで大腸癌の臨床検体を用いたYAF2に関する研究報告は無く、本研究は大腸癌症例の臨床検体をもとに、YAF2が大腸癌に及ぼす影響を検討した初めての研究である。当院における大腸癌症例の検討では、原発巣でのYAF2高発現群でOS、DFSともに有意に延長が見られ、多変量解析を行うとYAF2発現が予後規定因子として抽出された。臨床病理学的には、YAF2高発現群でT因子（深達度）が低く、遠隔転移が有意に少なかった。これらより大腸癌においてYAF2が腫瘍進展および遠隔転移を抑制する方向にはたらき、予後を改善している

可能性が示唆された。

大腸癌細胞株を用いた*in vitro*の検討では、大腸癌腫瘍細胞におけるYAF2の役割を証明すべく検討を行った。Wound healing assayではYAF2 knockdownにより細胞遊走能が増加しており、臨床病理学的所見と矛盾しない結果であった。今後、transwell chamberを用いたinvasion assay, migration assay を行い遊走能や浸潤能を詳細に評価していく。

YAF2の腫瘍抑制メカニズムは解明されておらず、これまで報告されているYY1やPDCD5とYAF2の相互作用を評価することに加え、新たな分子機構解明に向けて臨床検体を用いてYAF2発現が腫瘍周囲環境にもたらす変化などを解明していく必要がある。*in vitro*ではYY1やPDCD5のノックダウン、これらとYAF2とのダブルノックダウンなどによる腫瘍細胞への影響を評価するとともに、細胞増殖に関連するCyclin family、Ki-67などのタンパクや、EMT/METへの関与を調べるためEMTマーカーやapoptosis関連タンパク発現につき評価、解析を行っていく。*in vivo*ではマウス大腸癌モデル/肝転移モデルを作成し、YAF2の遺伝子発現制御のタイミングを変化させて、大腸癌転移形成の様々なフェーズでYAF2の腫瘍抑制への関与を解明していく。さらにはmRNAを抽出しYAF2発現調整で変化する諸因子をmicroarrayで網羅的に解析しYAF2を介した腫瘍進展抑制シグナルをmRNAレベルでも明らかにしていく方針である。

現在、研究と並行して論文投稿に向けての論文作成を進めている。また、国内外の学会発表（本年7月に行われた第32回がん転移学会にて発表した）を随時行い他施設の研究者と意見交換することで、多角的な知見を取り入れ、最新の大腸癌治療戦略に基づいた研究内容を組み込んでいく予定である。

要 約

PcG (polycomb group) proteinのひとつであるYAF2は、転写因子YY1 (Yin Yang 1) と相互作用するタンパクで、YY1-SIRT6 interactionや、YAF2はPDCD5の安定化を介して腫瘍抑制的にはたらく可能性が示唆されている。本研究ではYAF2の抗腫瘍効果を証明することにより、大腸癌における新規治療標的としての可能性を追求することを目的としている。

臨床大腸癌標本の検討では①2012年から2013年の1年間に当院で手術を施行したStage I-IVの大腸癌症例151例の検討では大腸癌 (Stage I-IV) の151例中YAF2高発現が108例、低発現が43例であった。T4症例はYAF2高発現群で17.6% (19/108例)、低発現群で37.2% (16/43例) であり低発現群でT4症例が多かった (p=0.010)。遠隔転移はYAF2高発現群が21.3% (23/108例)、低発現群が37.2% (16/43例) であり低発現群で高かった (p=0.044)。StageII,IIIのサブグループで検討を行うと、YAF2高発現が76例、低発現が26例で、YAF2高発現群では全生存期間 (p=0.031) とDFS (p=0.016) がともに有意に長く、多変量解析でYAF2発現が予後と関連していた。②2005年から2012年に当院で手

術を施行した大腸癌症例のうち、肝転移を生じ肝切除を行った79症例を対象として同様に解析を行った。肝転移切除を施行した79例で原発巣のYAF2発現を検討すると、YAF2高発現が61例、低発現が18例であった。原発巣切除後の全生存期間は高発現群で有意に長かった(86か月 vs 43.5か月, $p=0.006$)。肝転移巣の病理検体でも同様にYAF2発現の評価を行うと、YAF2高発現が62例、低発現が16例であったが、全生存期間は両群で有意差を認めなかった。

大腸癌細胞株を用いた*in vitro*研究では大腸癌細胞株DLD-1, SW620を用いて腫瘍細胞におけるYAF2発現の影響を検討した。siRNAを用いてYAF2をknockdownし、proliferation assay, wound healing assayを行い、proliferation assayでは、YAF2発現の有無で細胞増殖に有意差を認めなかった。DLD-1を用いたwound healing assayではYAF2 knockdownにより有意に遊走能が増加した。

大腸癌の臨床検体、細胞株を用いた検討においてYAF2が、腫瘍進展と遠隔転移を抑制することで腫瘍抑制的に働く可能性が示唆された。今後、*in vivo*での実験も含めさらに詳細にYAF2の腫瘍抑制メカニズムの解明を行っていく予定である。

文 献

1. Sato N, Sakai N, et al. Yin Yang 1 regulates ITGAV and ITGB1, contributing to improved prognosis of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 47 (5) :5–24, 2022
2. Morinaka T, Sakai N, et al. RYBP contributes to improved prognosis in colorectal cancer via regulation of cell cycle, apoptosis and oxaliplatin sensitivity. *Int J Oncol.* 63 (5) :120, 2023
3. Kalenik JL, et al. Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1. *Nucleic Acids Res.* 25 (4) :843-849, 1997
4. Kawamura K, et al. YAF2-Mediated YY1-sirtuin6 interactions responsible for mitochondrial downregulation in aging tunicates. *Mol. Cell. Biol.* 41 (7) :e00047-21, 2021
5. S.-Y.Park., et al, YAF2 promotes TP53-mediated genotoxic stress response via stabilization of PDCD5. *Biochim. Biophys. Acta.* 1853 (5) :1060-1072, 2015
6. Lin X., et al. TV-circRGP6 Nanoparticle Suppresses Breast Cancer Stem Cell-Mediated Metastasis via the miR-26b/YAF2 Axis. *Mol. Ther.* 29:244-262, 2021