

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2023
課題番号：16K11024
研究課題名（和文）癌抑制因子ATBF1の細胞内局在をバイオマーカーとする前立腺癌悪性度診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a diagnostic method for prostate cancer malignancy using intracellular localization of tumor suppressor ATBF1 as a biomarker

研究代表者
川口 誠（Kawaguchi, Makoto）
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：50204699
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ATBF1の発現量は様々な人の癌の悪性度を分類し、予後診断に活用できる。乳癌では mRNA 発現量が高いほど予後が良好であった。膀胱癌は mRNA 発現量だけでは長期的な予後を予測するためには、核と細胞質の鑑別を免疫組織学的に行う必要があった。ATBF1は400kDaの巨大タンパク質であり、核と細胞質の細胞内局在と確実に鑑別できる市販の抗体はなかった。そこで私たちは抗原提示領域を一次構造から推定して、すべて抗ATBF1抗体として精製した。その特異的アミノ酸を標的とするモノクローナル抗体を作成することも達成した。これらの特異抗体の作成の結果、核内ATBF1であることを自動的に認識できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
癌の悪性度を分類して診断することは、それぞれのがん患者に対する治療法を考える上で極めて重要な診断になる。病理組織学的にはHE染色による悪性度を分類が現在も主流である。しかし、膀胱癌においてはATBF1の核と細胞質の鑑別を免疫組織学的に診断することで、10年予後まで極めて正確に予測できることを、本研究成果として達成することができた。私たちが開発した核と細胞質の細胞内局在と確実に鑑別できる抗体を用いることにより、画像解析により核内ATBF1であることを自動的に認識できるようになった。このことは臨床現場で癌の悪性度を判断するための重要な客観的データとして実用化されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The expression levels of ATBF1 can classify the malignancy of various human cancers and can be used for the marker to differentiate the prognosis. In breast cancer, the higher the mRNA expression level, the better the prognosis. However, in bladder cancer, in order to predict the long-term prognosis based on the mRNA expression level alone, it was necessary to perform immunohistochemical analysis to differentiate between the nucleus and the cytoplasm. Because ATBF1 is a huge protein of 400 kDa, and there was no commercially available antibody that could reliably differentiate between the intracellular localization of the nucleus and the cytoplasm. Therefore, we estimated the antigen-presenting region from the primary structure and purified all of them as anti-ATBF1 antibodies. We also succeeded in creating a monoclonal antibody that targets its specific amino acid. As a result of creating these specific antibodies, it became possible to automatically recognize intranuclear ATBF1.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ATBF1 SNP 脳梗塞 肺血栓塞栓症 川崎病

1. 研究開始当初の背景

肝臓は血漿タンパク質の主成分として胎児期にアルファフェトプロテイン(AFP)を産生し、成体ではアルブミン(ALB)を産生する。AFP 遺伝子も ALB 遺伝子もヒトの染色体 4q11 に並んで存在する。この二つの遺伝子は、極めて構造的に似ていることから同一の祖先遺伝子が重複して形成されたものと考えられている。しかしこの二つの遺伝子の発現調節は全く異なることが本研究開始の原点になっている。AFP 遺伝子は胎児期に大量に産生される一方、出生後から発現量が急激に低下し、成体ではほとんど認められない。ところが肝臓では、再びその発現量が急上昇する。この特性を利用して、血漿中の AFP タンパク質は肝臓癌の腫瘍マーカーとして実用化が進んでいる。私たちはこの AFP 遺伝子の発現制御に関わる分子メカニズムに興味を持って研究を進めた。プロモーター領域にエンハンサー領域として AT-rich element と称する特異的な塩基配列 GTTAATNATTAAC が存在し、HNF1 が結合する。我々は、この HNF1 と DNA 結合領域で競合する DNA 結合タンパク質である ATBF1 の存在に着目をした。ATBF1 は増殖性の細胞ではほとんど発現せず、細胞分化するとともにその発現量を増加させるという意味では AFP の発現とはちょうど逆の発現パターンを持っている。さらに重要な特性として、ATBF1 は、肝臓という臓器特異性に拘束されることなく、神経系細胞、乳腺、胃、肺、膀胱など様々な臓器で発現が認められる点である。様々な臓器由来の癌の悪性度評価に使える可能性がある。最初に発見したことは、神経系由来の小児癌として神経芽細胞癌の悪性度評価系としての価値である。2歳未満で発症する神経芽細胞癌は孤発例が多く転移なく自然縮退する傾向が強い。しかし2歳以上で発症する神経芽細胞癌は転移性が強く非常に悪性度が高い。抗 ATBF1 抗体で、この二種類の神経芽細胞癌組織を染めてみると、良性経過をたどる症例では抗 ATBF1 抗体が核に染まり、悪性経過をたどる症例では細胞質に染まって、核染色性が見られないことがわかった。

2. 研究の目的

第一に ATBF1 の標的遺伝子群を解明し、ATBF1 の個体発生における機能と、発癌メカニズムと予後決定機能を解明する。第二に、抗 ATBF1 抗体で免疫組織染色をすることにより、様々な癌の予後予測(悪性度診断)し臨床医学的意義を明確にすることを本研究の目的として企画した。

3. 研究の方法

(1) ATBF1 の標的遺伝子群をスクリーニングする目的で mRNA の発現をマイクロアレイを用いて実施して候補遺伝子群を同定した。

(2) ATBF1 の KO マウスを作成して全身の臓器の初期発生における ATBF1 の役割を同定した。

(3) 膀胱癌の臨床検体のスクリーニングを行い、抗 ATBF1 抗体で免疫組織染色を実施して ATBF1 の細胞内局在診断と臨床経過の相関性を統計的に解析した。このスクリーニングに使うための抗 ATBF1 抗体として ATBF1 アミノ酸配列全体をカバーする7種類の領域に

対する抗 ATBF1 抗体を作成した。これらの 7 種類の領域を構成する ATBF1 の領域は、ATBF1 に含まれる 4 つの核局在シグナル (NLS) の機能ドメインを含む領域のもの、それ以外の領域のものによって構成された。ヒト膀胱癌の初回の経尿道的切除術 (TUR、transurethral resection) から採取した合計 117 のサンプルを分析した。病理学的評価前に化学療法や放射線療法を受けた患者はいなかった。

4 . 研究成果

ATBF1 は DNA 結合タンパク質であり、4 個の Homeotic domain と 23 個の Zinc finger を持つ転写調節因子である。この因子が転写調節する標的遺伝子として、200 種類以上がマイクロアレイ発現解析から判明した。その中で血小板由来増殖因子受容体 B (PDGFRB) に着目して研究を展開してきた。PDGFRB は血管壁周囲細胞 (血管外皮細胞、平滑筋細胞) の分化誘導因子であることの解明が進んだ。この異常から、血管系の様々な異常が起こることが予想された。大規模ゲノムスクリーニングによる疾患特異性の高い責任遺伝子の解析結果として、心房細動、脳卒中、冠動脈疾患、動脈硬化などの心臓血管系の疾患が明らかになった。モデル動物のマウスを使った実験で、マウス胎児の肺で ATBF1 は高発現していることを明らかにした。ATBF1 は肺で高発現していることから、肺を構成する細胞群の細胞周期を止め、肺胞内の細胞数を減らすことで肺胞腔の形成に貢献している可能性が示唆された。ATBF1 の発現量が減少することにより、肺胞内の細胞数が異常増加し、肺高血圧等の循環器障害を惹起する可能性も想定された。肺胞周囲に多数の毛細血管が発達してガス交換の場となっているので、肺の実質細胞数が過剰になると、肺高血圧症を誘引し、さらに心臓不全を引き起こすことが予想され、KO マウスの作成を試みた結果、うっ血性心不全状態で肺胞への空気の流入なく胎児死亡することがわかった。癌の予後診断に関する基本テーマに関しては、膀胱癌の臨床検体のスクリーニングを行い、抗 ATBF1 抗体で免疫組織染色をすることによる 10 年生存率の予測が可能になることを解明した。ATBF1 の核局在は、ATBF1 上の 3 つの NLS によって相乗的に制御されていた。ATBF1 の細胞質断片には NLS がなかった。患者は ATBF1 の陽性核染色に従って 2 つのグループに分けられ、ATBF1+(n = 110) と ATBF1 -(n = 7) の症例間で全生存率 (P = 0.021) と膀胱内再発なし生存率 (P = 0.013) に有意差が認められた。多変量解析により、細胞グレードと病理学的ステージングを調整した後、ATBF1 染色は膀胱内再発なし生存率の独立した予後因子であることが明らかになった (P = 0.008)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 3095-3102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2017.7016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi M, Hara N, Bilim V, Koike H, Suzuki M, Kim TS, Gao N, Dong Y, Zhang S, Fujinawa Y, Yamamoto O, Ito H, Tomita Y, Naruse Y, Sakamaki A, Ishii Y, Tsuneyama K, Inoue M, Itoh J, Yasuda M, Sakata N, Jung CG, Kanazawa S, Akatsu H, Minato H, Nojima T, Asai K, Miura Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 A diagnostic marker for superficial urothelial bladder carcinoma: lack of nuclear ATBF1 (ZFHX3) by immunohistochemistry suggests malignant progression.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 805-816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-016-2845-5	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0件

〔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
研究分担者	三浦 裕 (Miura Yutaka) (90285198)	至学館大学・健康科学部・教授 (33909)	

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