

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08660

研究課題名(和文) スプライシングバリエーションによる病態形成メカニズムの解明と新規治療ターゲットの創出

研究課題名(英文) Abnormalities in alternative splicing in cancer; therapeutic targets

研究代表者

眞田 文博 (SANADA, FUMIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30722227

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)：ペリオスチンはC末端に選択的スプライシングバリエーションを有し、治療抵抗性乳がんでは病態形成に関与するが、その詳細な役割については明らかとなっていない。我々はスプライシングベクターを作成しSUM159PTトリプルネガティブ乳がん細胞株に導入し、ペリオスチンエクソン21含有、非含有細胞群を比較した。エクソン21発現細胞は細胞外マトリックス蛋白、FAK、炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現が著明に高く、エクソン21含有細胞のみxenograft modelで腫瘍を形成した。さらにエクソン21中和抗体は腫瘍形成を著明に抑制した。これらの結果はペリオスチンバリエーションが腫瘍環境形成に寄与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは日本において年間8万人が新規に発症し、1.2万人が失命する、女性に最も多いがん腫となっている。乳がんのうち約15%の患者は治療ターゲットのないトリプルネガティブ乳がんであり、再発率が高くまた40歳以下の若い患者が多く、アンメットメディカルニーズの高い疾患である。今回の研究により、病的なペリオスチンバリエーションがトリプルネガティブ乳がん腫瘍形成に関与していること、その抑制が治療につながることを証明できた。従来の治療法とは異なり、生理的なバリエーションを抑制しないため、疾患特異性が高く、安全性の高い治療法につながるものと考えられ、社会的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Periostin (Pn) is extracellular matrix (ECM) protein involved in multiple process of cancer progression. Pn has alternative splicing variants at the c-terminal lesion, and its role in cancer progression is largely unknown. In the present experiment, the role of Pn with exon 21 in TNBC progression is addressed. We first established SUM159PT cell line carrying splicing vector that allow us to visualize the cells expressing Pn exon 21 (+E21 cells) and lacking it (E21 cells). +E21 cells have higher expression of ECM related gene, focal adhesion related gene and inflammatory cytokines as compared to E21 cells. In xenograft model, only +E21 cells can progress. Addition of neutralizing antibody against Pn exon 21 suppressed +E21 cells growth with reduced TAM accumulation. These data suggest that Pn with exon 21 activate regulates transcription of key ECM genes and cytokines, which in turn establish a microenvironmental niche supportive of breast cancer stem cells.

研究分野：がん、循環器

キーワード：選択的スプライシングバリエーション 細胞外マトリックス蛋白 ペリオスチン トリプルネガティブ乳がん

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペリオスチンはその N 末端に分泌シグナルを持つ細胞外マトリックス蛋白で fasciclin family に属する。炎症の亜急性期から発現が上昇し、組織リモデリング過程では線維芽細胞での発現が維持され、組織慢性炎症と線維化に関わる(図 1)。一方、ペリオスチン C 末端には 4 つの splicing variant が存在し

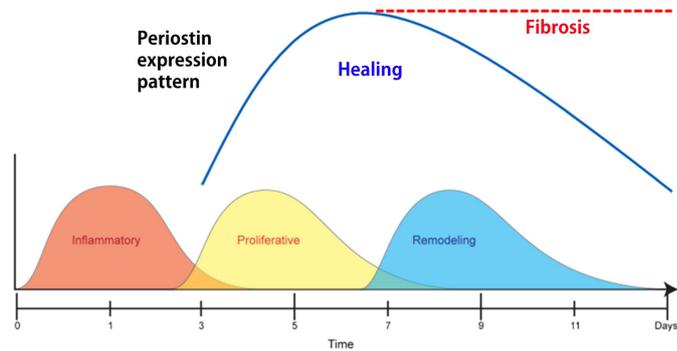


図 1 慢性炎症性疾患におけるペリオスチンの発現パターン

(図 2)、定常状態では exon 17/21 のないバリエント 4(Pn4)が他のバリエントに比べて 1000-10000 倍発現している(図 3)。つまり exon 17/21 が常に除外されるメカニズムが存在する。これまでに申請者らは、1、Pn1/3 は細胞接着を抑制し心筋梗塞後慢性心不全の形成に寄与する(文献 1)、2、Pn2 が癌の上皮間葉転換に関わり、抗がん剤治療抵抗性を誘導する(文献 2)ことを証明してきた。しかしながら各スプライシングバリエントの病態形成に関わる役割は明らかとなっていない。

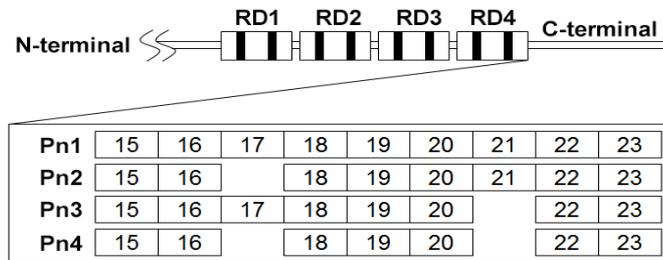


図 2 ペリオスチンバリエント(exon 15~23を表示)

### 2. 研究の目的

ひとつの遺伝子から複数の産物を生み出す機構 “ Alternative splicing variant”は多細胞生物の複雑な形態や細胞機能獲得を可能にするだけでなく、いくつかの病態形成に深く関わる。私たちは組織リモデリング時に発現が維持される細胞外マトリックス蛋白、ペリオスチンの C 末端に存在する splicing variant の役割を検討している。ペリオスチンバリエントの変化(variant switch)により、乳がん細胞は抗がん剤治療抵抗性を獲得し、心不全時に心拡大が誘導される。

この研究では選択的スプライシングレポ - タ - およびエクソン特異的中和抗体を用いてペリオスチンバリエントの制御メカニズムを明らかにし、variant switch が癌を含む慢性炎症性疾患の新たな治療標的となりうることを証明する。

### 3. 研究の方法

(1) 選択的スプライシングレポ - タ - の構築。

(2) 選択的スプライシングリポーターを用いて目的エクソン含有細胞と非含有細胞の遺伝子プロファイリング。

(3) エクソン特異的中和抗体による down stream メカニズムおよび治療効果の確認。

これらの研究計画を、乳がん細胞(トリプルネガティブ乳がん)をターゲットに in vitro および in vivo で解析した。

### 4. 研究成果

(1) まず、図 3 に示すようにエクソン 21 スプライシングレポーターを作成し、トリプルネガティブ乳がん細胞株 (SUM159PT) に FLIP in system を用いて導入した。SUM159PT 細胞はペリオスチンを高発現する細胞である。

(2) FACS の図で示すようにエクソン 21 含有 (Double positive) および非含有 (GFP のみ陽性) 細胞を認めたため、この細胞群をソーティングし、遺伝子発現を解析した。図 4 に示すように、ペリオスチンエクソン 21 含有細胞はと非含有細胞では多くの遺伝子発現に差を認め、特に細胞外マトリックス蛋白、細胞外マトリックス蛋白からのシグナルを細胞内に伝達する、Focal adhesion に関する遺伝子群がエクソン 21 含有細胞群で有意に発現上昇していた。

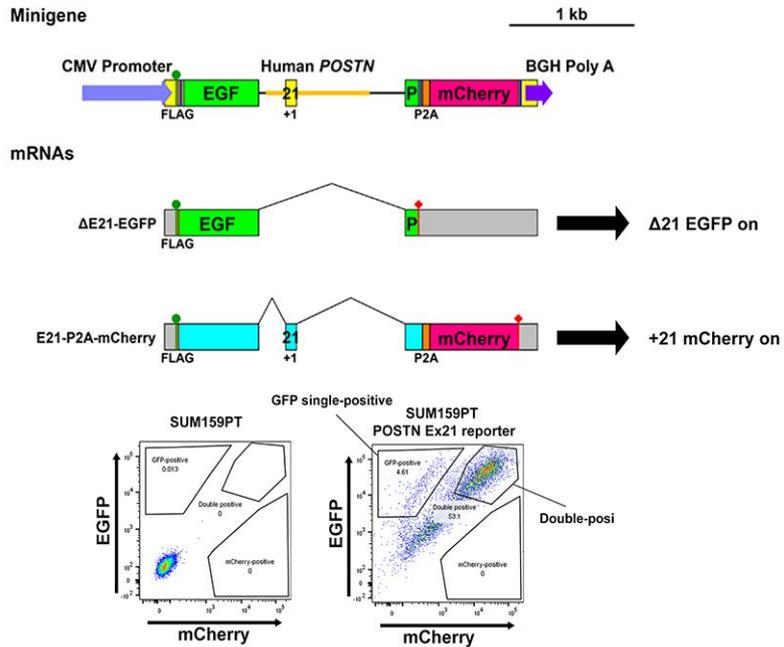


図3 エクソン21スプライシングレポーター

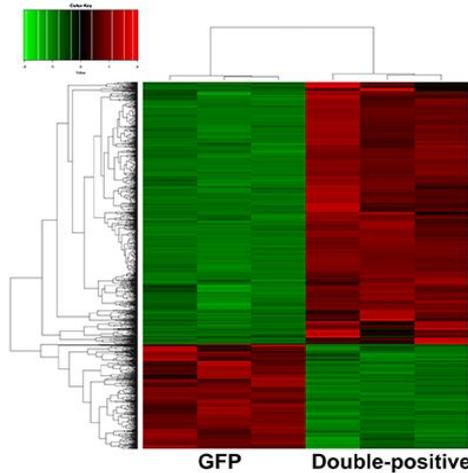


図4 遺伝子発現プロファイリング

• Focal adhesion (P value 3.21E-13)

TLN2, VCL, SHC2, MYL5, MYL9, MYLK4, MYLK2, MYLK, FLNB, VEGFC, CCND2, RELN, LAMC2, LAMB1, LAMC1, PARVA, PPP1R12B, RASGRF1, IGF1R, PIK3R3, THBS1, THBS2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL4A1, COL4A5, COL5A3, COL5A2, COL6A3, COL6A2, COL6A1, COL11A2, COL24A1, COL27A1, ITGA1, ITGB3, ITGB5, ITGA10, ITGA11, ITGA7, ITGB8, PDGFD, PDGFRA, PDGFRB, HGF, LAMA4, CCND1, LAMC3, EGFR, LAMA1, GSK3B, DIAPH1, ITGA6, PDGFA,

• ECM-receptor interaction (P value 1.89E-11)

COL3A1, COL27A1, COL6A3, COL6A2, COL6A1, COL1A2, COL11A2, COL1A1, COL24A1, COL4A2, COL4A1, COL5A3, COL5A2, COL4A5, COL24A1, ITGA1, ITGB3, ITGB5, ITGA7, ITGB8, ITGA10, ITGA11, THBS1, THBS2, LAMA4, LAMB1, LAMC1, LAMC2, LAMA1, ITGA6, LAMC3, RELN, HMMR,

(3) 次にペリオスチンエクソン 21 含有、非含有トリプルネガティブ乳がん細胞群をヌードマウスに移植する xenograft モデルを作成したところ、ペリオスチンエクソン 21 含有細胞群でのみ腫瘍の形成を認めた。さらにエクソン 21 特異的に結合する中和抗体を作成し、エクソン 21 含有細胞群を移植した SUM159PT xenograft モデルに投与すると、腫瘍形成は有意に抑制され、腫瘍周辺の腫瘍関連マクロファージの集積、コラーゲン架橋に関わる因子が著明に抑制されていた。さらに抗がん剤を併用すると、ペリオスチン中和抗体投与群で著大な腫瘍縮小効果が得られた。

これ等の結果は、ペリオスチンが腫瘍形成の initiator として働くこと、さらに抗がん剤抵抗性を引き起こすことを示唆した。

<引用文献>

文献 1 Taniyama Y, Katsuragi N, Sanada F, et al. Selective Blockade of Periostin Exon 17 Preserves Cardiac Performance in Acute Myocardial Infarction. Hypertension. 2016;67(2):356-361.

文献 2 Nakazawa Y, Taniyama Y, Sanada F, et al. Periostin blockade overcomes chemoresistance via restricting the expansion of mesenchymal tumor subpopulations in

breast cancer. Sci Rep. 2018;8(1):4013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 眞田文博、谷山義明、村津 淳、大津 礼、柴田佳那、ブルーレー・メイ・加和子、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチンスプライシング制御による治療抵抗性乳がん治療法の樹立
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihito Sanada, Yoshiaki Taniyama, Jun Muratsu, Tatsuya Fujikawa, Kana Shibata, Kanako May Brule, Hiromi Rakugi, Ryuichi Morishita
2. 発表標題 Periostin splicing variant regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction
3. 学会等名 International Society of Hypertension 2018 Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、村津 淳、大津 礼、柴田佳那、ブルーレー・メイ・加和子、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチン選択的スプライシングバリエント制御による治療抵抗性乳がん治療法の確立
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞田 文博
2. 発表標題 Specific inhibition of periostin alternative splicing variant ameliorated cardiac fibrosis after myocardial infarction
3. 学会等名 Cardio Renal Diabetes Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田文博、谷山義明、村津淳、大津礼、柴田佳那、ブルーレー・メイ・加和子、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチンスプライシング制御による難治性乳癌治療法の開発
3. 学会等名 Molecular Cardiovascular Metabolic Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村津淳、眞田文博、谷山義明、大津礼、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 Periostin exon17の選択的阻害による腎線維化への影響
3. 学会等名 第21回日本心血管内分泌代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞田文博、谷山義明、村津淳、大津礼、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチンスプライシングバリエントは抗がん剤抵抗性乳がんの治療ターゲットである
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞田文博、谷山義明、村津淳、大津礼、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 Periostin splicing variant specific inhibition ameliorates heart failure after myocardial infarction.
3. 学会等名 第6回 IRG (Inflammation and ReGeneration) Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真田文博
2. 発表標題 Selective blockade of periostin exon 17 inhibits cardiac and renal fibrosis
3. 学会等名 Cardio Renal Diabetes Conference 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学講座  <a href="http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/index.html">http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/index.html</a></p>
---

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