

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591543  
 研究課題名（和文） *c-myc* 遺伝子転写抑制因子のスプライシングを分子標的とした  
 癌診断・治療法開発  
 研究課題名（英文） Development of novel cancer diagnosis and treatment targeting  
 splicing variants of *c-myc* transcriptional suppressor FIR  
 研究代表者 松下 一之（Kazuyuki Matsushita）  
 千葉大学・大学院医学研究院・講師  
 研究者番号：90344994

## 研究成果の概要（和文）：

*c-Myc* 蛋白は細胞の増殖、分化、細胞死（アポトーシス）を制御する転写因子である。FIRはそのアミノ末端の作用により *c-Myc* 発現抑制を惹起し、その結果アポトーシスを誘導する。本研究ではFIRをアデノウイルスあるいはセンダイウイルスを発現ベクターとして用いて治療が困難で患者数の増加が予測される悪性中皮腫に対する新しい癌遺伝子治療を開発し、さらに癌細胞に特異的に発現するFIR $\Delta$ exon2を末梢血中に検出することにより癌診断に臨床応用することを目指す。

## 研究成果の概要（英文）：

Far UpStream Element (FUSE)-binding protein-interacting repressor (FIR), a *c-myc* transcriptional suppressor, is alternatively spliced and futilely produced in colorectal cancer tissues that abundantly express *c-Myc*. Human malignant pleural mesothelioma (HMPM) is highly resistant to conventional therapy, and novel therapies are thus required. We previously reported that overexpression of FIR induces apoptosis via *c-Myc* suppression, and is thus a suitable cancer therapy. In the current preclinical trial, a fusion gene deleted non-transmissible Sendai virus vector encoding FIR (SeV/ $\Delta$ F/FIR) was prepared and its cytotoxic activity against an orthotopic xenograft model of HMPM, in combination with cisplatin, was assessed. SeV/ $\Delta$ F/FIR significantly reduced cell viability in 3 HMPM cell lines but was less effective in non-tumor immortalized mesothelial cells. SeV/ $\Delta$ F/FIR cytotoxicity was partly due to apoptosis induction via *c-Myc* suppression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学・医療

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般・

キーワード：(1) 癌遺伝子治療 (2) *c-myc* 遺伝子 (3) 癌診断 (4) 癌治療 (5) スプライシング阻害薬 (6) SF3b155 (7) 転写制御因子 (8) アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

c-Myc 蛋白は細胞の増殖、分化、細胞死（アポトーシス）を制御する転写因子である。細胞内の c-Myc 蛋白は増加しても減少してもアポトーシスを誘導するが、その詳細なメカニズムや癌化との関わりについては不明の点が多い。*c-myc* 遺伝子の転写抑制因子である FIR (FBP Interacting Repressor) を HeLa 細胞に発現誘導したところ、アポトーシスが誘導された。一方 FIR の転写活性部位である N 末端 77 個のアミノ酸を削除した変異 FIR 蛋白ではアポトーシスが誘導されず、c-Myc 発現プラスミドを共発現させると FIR によるアポトーシス誘導は阻害された。すなわち FIR はそのアミノ末端の作用により c-Myc 発現抑制を惹起し、その結果アポトーシスを誘導するものと考えられた。我々は以前から FIR のアポトーシス誘導能を利用した FIR 発現ベクターを用いた消化器扁平上皮癌遺伝子治療の可能性を研究してきた。これまでに得られた知見は以下の通りである。①c-Myc の発現増大が認められる消化器（大腸）癌組織中では転写抑制部位を欠損した FIR スプライシングバリエーション (FIR $\Delta$ exon2) が癌特異的に発現増大し、②FIR $\Delta$ exon2 が正常型 FIR の機能を競合阻害し、c-Myc の発現増大とアポトーシス誘導阻害を同時にもたらすことが細胞の癌化に寄与しているという新規メカニズムを提唱した。

### 2. 研究の目的

以上の研究結果をもとにして本研究の目的は治療が困難で患者数の増加が予測される悪性中皮腫に対する新しい癌遺伝子治療を開発し、さらに癌細胞に特異的に発現する FIR $\Delta$ exon2 を末梢血中に検出することにより癌診断に臨床応用することを目指す。

### 3. 研究の方法

FIR をアデノウイルスあるいはセンダイウイルスを発現ベクターとして用いて治療が困難で患者数の増加が予測される悪性中皮腫に対する新しい癌遺伝子治療を開発し、さらに癌細胞に特異的に発現する FIR $\Delta$ exon2 を末梢血中に検出することにより癌診断に臨床応用することを目指す。

### 4. 研究成果

本研究の推進に必要な国際・国内特許を積極的に申請し、FIR 遺伝子を用いた「アポトーシス誘導剤およびアポトーシス誘導方法」

に関する国際特許を取得した。本研究により得られた成果をもとに、実用化へ向けて臨床試験への道筋を示した。

### 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 12 件)

1. Kitamura A, Matsushita K, Takiguchi Y, Shimada Hideaki, Tomonaga T, Matsubara H, Inou, M, Mamoru H, Sato Y, Levens D, Tatsumi K, Nomura F. Synergistic effect of non-transmissible Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor plus cisplatin in treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Science*. 2011 *in press*.
2. Wu D, Matsushita K, Matsubara H, Nomura F, Tomonaga T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(5):1018-30.
3. Nishimura M, Yamamoto H, Yoshida T, Seimiya M, Sawabe Y, Matsushita K, Umemura H, Sogawa K, Takizawa H, Yokosuka O, and Nomura F. Decreases in the Serum VLDL-TG/Non-VLDL-TG Ratio from Early Stages of Chronic Hepatitis C: Alterations in TG-Rich Lipoprotein Levels. *PLoS ONE* Research Article, published 25 Feb 2011
4. Kawahira H, Matsushita K, Shiratori T, Shimizu T, Nabeya Y, Hayashi H, Ochiai T, Matsubara H and Shimada H. Viral shedding after *p53* adenoviral gene therapy in 10 cases of esophageal cancer. *Cancer Science*. 2010 ;101(1):289-91.
5. Murakami K, Matsubara H, Hoshino I, Akutsu Y, Miyazawa Y, Matsushita K, Sakata H, Nishimori T, Usui A, Kano M, Nishino N, Yoshida M. CHAP31 Induces Apoptosis Only via the Intrinsic Pathway in Human Esophageal Cancer Cells. *Oncology*. 2010;78(1):62-74.
6. Kuga T, Nozaki N, Matsushita K, Nomura F and Tomonaga T. Phosphorylation

- statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Exp Cell Res.* 2010;316(14): 2301-12.
7. Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Umemura H, Matsushita K, Nomura F. Reducing the incidence of pseudohyperkalemia by avoiding making a fist during phlebotomy: a quality improvement report. *Am J Kidney Dis.* 2010; 56(4):686-92.
  8. Ritchie SA, Heath D, Yamazaki Y, Grimmalt B, Kavianpour A, Krenitsky K, Elshoni H, Takemasa I, Miyake M, Sekimoto M, Monden M, Tomonaga T, Matsubara H, Sogawa K, Matsushita K, Nomura F, Goodenowe DB. Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age. *BMC Gastroenterology* 2010;10:140
  9. Oshima Y, Yajima S, Yamazaki K, Matsushita K, Tagawa M, and Shiomada H. Angiogenesis-related factors are molecular targets for diagnosis and treatment of patients with esophageal carcinoma. Review. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2010 16(6):389-393
  10. Shimada H, Shiratori T, Takeda A, Matsushita K, Okazumi S, Akutsu Y, Matsubara H, Nomura F, Ochiai T. Perioperative Changes of Serum p53 Antibody Titer is a Predictor for Survival in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *World J Surg.* 2009;33(2):272-7.
  11. Matsushita K, Tomonaga T, Kajiwara T, Shimada H, Itoga S, Hiwasa T, Kubo S, Ochiai T, Matsubara H, Nomura F *c-myc* suppressor FBP-interacting repressor for cancer diagnosis and therapy. *Frontiers in Bioscience* 2009; 14: 3401-3408, January 1
  12. Hattori N, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Shinozaki K, Nomura F, Tomonaga T, Matsushita K, Kodera Y, Sogawa K, Satoh M, Hirasawa H. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock.* 2009;32(4): 393-400.

[学会発表] (計 10 件)

- 1 伊瀬恵子、内本高之、澤部祐司、松下一之、野村文夫。シスタチンCを中心とした腎機能マーカーと尿沈渣円柱の関連性について。日本臨床検査自動化学会42回大会。2010年10月9日。(神戸)
- 2 清宮正徳、吉田俊彦、澤部祐司、松下一之、

野村文夫酵素活性測定用JSCC標準化対応法の性能比較は必要か?日本臨床検査自動化学会42回大会。2010年10月9日。(神戸)

- 3 子安未緒、清宮正徳、吉田俊彦、佐藤謙一、糸賀栄、澤部祐司、松下一之、野村文夫アーキテクトを用いたHCVコア抗原測定の検討。日本臨床検査自動化学会42回大会。2010年10月8日。(神戸)
- 4 清宮正徳、吉田俊彦、澤部祐司、松下一之、野村文夫。小型臨床化学検査装置BBxの検討。日本臨床検査自動化学会42回大会。2010年10月8日。(神戸)
- 5 梅村啓史、外川明、曾川一幸、茂籙薫、西村基、松下一之、小寺義男、野村文夫。血清プロテオミクスによる早期胃癌診断マーカーの同定。第69回日本癌学会。2010年9月22日。(大阪)
- 6 松下一之、梶原寿子、糸賀栄、佐藤守、西村基、梅村啓史、澤井撰、ウーディー、朝長毅、小寺義男、野村文夫。ガンにおける選択的スプライシングの意義と遺伝子診療への応用。第17回日本遺伝子診療学会。2010年8月7日。(三重)
- 7 糸賀栄、ジュレットウブリ、佐藤謙一、石毛宗之、宇津野恵美、松下一之、野村文夫。HRM(High Resolution Melting)法を用いた遺伝性大腸癌の遺伝子変異スクリーニング。第17回日本遺伝子診療学会。2010年8月7日。(三重)
- 8 宇津野恵美、澤井撰、糸賀栄、佐藤謙一、梅村啓史、西村基、松下一之、野村文夫。千葉大学院遺伝子診療部における脊髄小脳変性症の遺伝カウンセリング(記録と遺伝学的検査結果の検討)。第17回日本遺伝子診療学会。2010年8月7日。(三重)
- 9 澤井撰、宇津野恵美、梅村啓史、西村基、松下一之、金井数明、桑原聡、羽田明、野村文夫。遺伝性神経筋疾患の発祥前診断における遺伝カウンセリング(千葉大病院における20例の検討)。第17回日本遺伝子診療学会。2010年8月7日。(三重)

○取得状況 (計 2 件)

①名称:「癌に特異的な遺伝子及びそれを用いた診断キット」  
 発明者: 島田英昭、朝長毅、松下一之、落合武徳、野村文夫  
 権利者: 国立大学法人 千葉大学  
 番号: 特許第 4677565  
 取得年月日: 平成 23 年 2 月 10 日  
 国内外の別: 国内

②名称:「腫瘍マーカー及びそれを用いた診断キット」

発明者：島田英昭、朝長毅、松下一之、落合  
武徳、野村文夫、車 英俊、松本和将  
権利者：国立大学法人 千葉大学  
番号：特許第 4660776 号  
取得年月日：平成 23 年 1 月 14 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moldiag/>

千葉大学大学院医学研究院先端応用外科学

<http://www.academic-surgery.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 松下 一之

(Kazuyuki Matsushita)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：90344994