

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16436

研究課題名（和文）新規分子標的FIR exon2をコンパニオンマーカーとしての意義や発現機序の解明

研究課題名（英文）The significance of the novel molecular target FIRdeltaexon2 as a companion marker and the mechanism of its expression.

研究代表者

小林 崇平（Kobayashi, Sohei）

国際医療福祉大学・成田保健医療学部・講師

研究者番号：90846940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗FIR exon2自己抗体を癌患者血清中に検出することを目的として臨床検体を用いたコンパニオンバイオマーカーとしての意義を検討し予後や治療反応性など臨床的意義の解明を提案することであった。今回検討する抗FIR exon2自己抗体は多くの癌腫で発現増大しているため、有効活用できる診断マーカーとなり、それを元に従来の腫瘍マーカーに比べより検出感度が良くかつ診断効率が增大する検査になるものを到達目標とした。主に消化器癌における抗FIR exon2自己抗体の臨床的意義の検討を中心に行った。様々な診断評価の解析方法等を用いて、食道癌・胃癌・大腸癌患者血清を解析評価し論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の個別化（層別化）医療の考えからがん遺伝子パネル検査が保険収載された。原発不明癌や標準治療が不応となった患者において免疫チェックポイント阻害剤や適応外治療薬等の治療に結び付ける。最適な治療薬を探す目的からであるが、現状治療に繋がる割合が1割とかなりの低確率である。わが国における使用可能な分子標的薬が少ないということが要因としてあげられる。本研究では新規分子標的FIR exon2は、抗FIR exon2自己抗体の癌患者血清中に検出することを目的として臨床検体を用いたコンパニオンバイオマーカーとしての意義を検討し予後や治療反応性など臨床的意義や発現機序の解明を提案する。

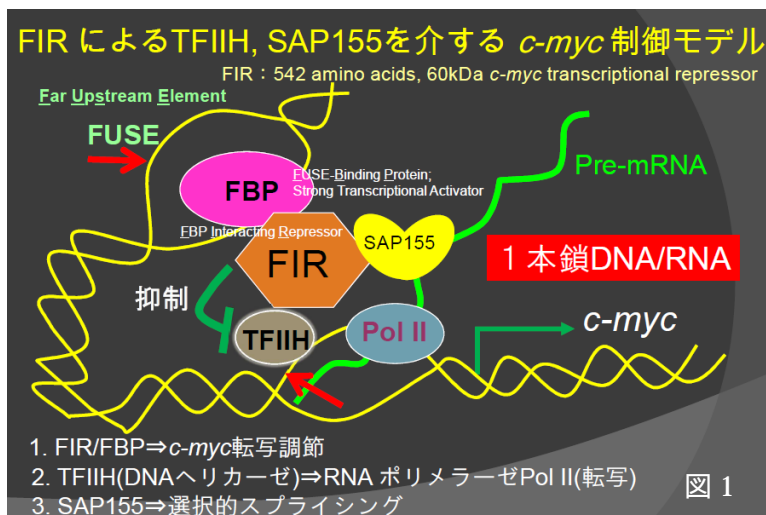
研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to detect anti-FIR exon2 autoantibody in the serum of cancer patients, to examine its significance as a companion biomarker using clinical specimens, and to propose the elucidation of its clinical significance in terms of prognosis and response to treatment. Since the expression of anti-FIR exon2 autoantibody is increased in many carcinomas, we set the goal of this study as whether it would be a diagnostic marker that can be effectively utilized, and whether it would be a test with better detection sensitivity and higher diagnostic efficiency than conventional tumor markers based on it. We mainly focused on the clinical significance of anti-FIR exon2 autoantibody in gastrointestinal cancer. We analyzed and evaluated serum from patients with esophageal cancer, gastric cancer, and colorectal cancer using various diagnostic evaluation methods and reported the results in a paper.

研究分野：分子腫瘍学、臨床検査医学

キーワード：分子標的マーカー 悪性腫瘍 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

癌化や細胞増殖に重要な c-myc 遺伝子の転写は FUSE (Far Upstream Element) と呼ばれる領域に結合するタンパク質 FBP (FUSE-binding protein、遺伝子名 FUBP1) によって強く促進される。FIR (FBP interacting repressor) は FBP と基本転写因子である DNA ヘリカーゼ TFIIH に結合し c-myc の転写を抑制する。FIR は癌では転写抑制部位である exon2 を欠損したスプライシング変異体 (FIR exon2) が発現し優性阻害 (ドミナントネガティブ) 効果を発揮する (図 1)。すなわち FIR は c-myc 遺伝子のプロモーター上流の FUSE に結合する FBP やスプライシング因子 SAP155 と相互作用して c-myc の転写と転写後調節 (pre-mRNA のスプライシング) の双方に関与している。さらに FIR は DNA 損傷修復、FIR ヘテロノックアウトマウスの癌化・白血病化、癌代謝 (FIR は解糖系の PKM2 の発現調節に関与していること: 未発表データ) などに関わる多機能分子である。FIR の多様な機能は相互作用するタンパク質の違いにより発揮される (図 1)。従って FIR と相互作用するタンパク質ネットワーク機構は癌診断や癌治療の良い分子標的である。FIR Δ exon2 タンパク質は癌特異的に発現増大されている。FIR Δ exon2 は大腸癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺腺癌、肝臓癌など幅広く多くの癌において、10%~50%



スの癌化・白血病化、癌代謝 (FIR は解糖系の PKM2 の発現調節に関与していること: 未発表データ) などに関わる多機能分子である。FIR の多様な機能は相互作用するタンパク質の違いにより発揮される (図 1)。従って FIR と相互作用するタンパク質ネットワーク機構は癌診断や癌治療の良い分子標的である。FIR Δ exon2 タンパク質は癌特異的に発現増大されている。FIR Δ exon2 は大腸癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺腺癌、肝臓癌など幅広く多くの癌において、10%~50%

の高頻度で遺伝子増幅もしくは mRNA レベルで発現が亢進している、癌患者では抗 FIRs (PUF60/FIR/FIR Δ exon2) 自己抗体が検出されることを世界で初めて報告した。さらに、食道癌患者血清中に既存の腫瘍マーカー (CEA・TP53・CYFRA 等) では検出されなかった抗 FIR exon2 自己抗体が検出された。近年、悪性腫瘍が合併する自己免疫疾患患者 (SLE, シェーグレン症候群や皮膚筋炎) の血清中に抗 FIRs 自己抗体が見いだされることが報告されている。すなわち慢性炎症と癌では共通の Wnt シグナル経路 (c-myc 遺伝子の発現増大をもたらす) が共通して活性化していると考えられる。がんと自己免疫性疾患に共通のスプライシング異常を標的とする診断法・治療法の開発へと繋げる。また、FIR exon2 の発現異常は多くの遺伝子のスプライシング変化をもたらすことが考えられる (未発表)。リンチ症候群に発生する癌はリンパ球浸潤が多く予後が良いことが知られている。リンチ症候群の in frame のタンパク質異常とは異なるが、タンパク質の変化であることは同じであるため抗 FIR exon2 自己抗体を持った癌患者はスプライシング異常タンパク質により予後が良い、あるいはリンパ球浸潤が多く免疫チェックポイント阻害剤に反応することが示せれば、コンパニオン診断に繋がるものと想定している。既存の MSI (マイクロサテライト不安定性) 検査とは同じ位置付けの全く別な視点からの診断・治療が可能となる。

2. 研究の目的

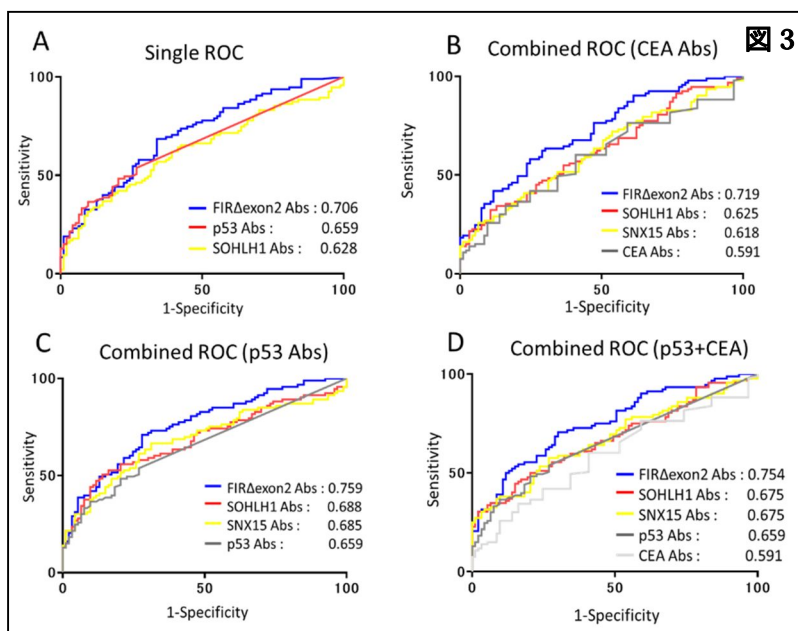
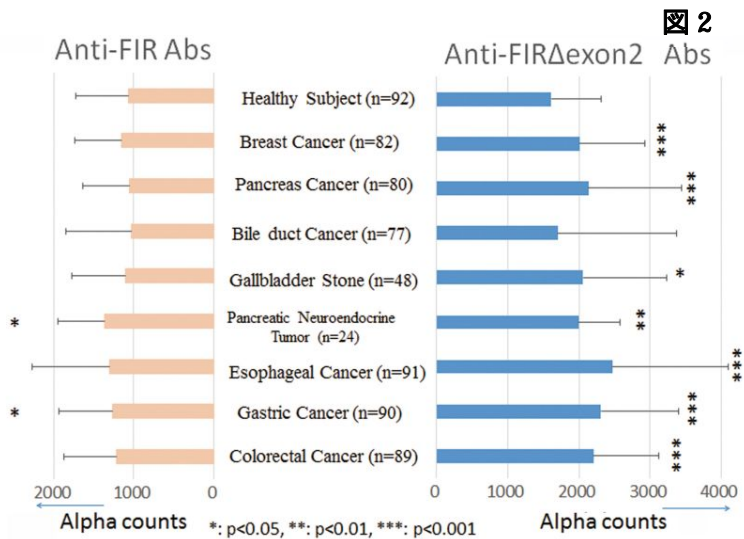
近年の個別化 (層別化) 医療の考えからがん遺伝子パネル検査が保険収載された。原発不明癌や標準治療が不応となった患者において免疫チェックポイント阻害剤や適応外治療薬等の治療に結び付ける。最適な治療薬を探す目的からであるが、現状治療に繋がる割合が 1 割とかなりの低確率である。わが国における使用可能な分子標的薬が少ないということが要因としてあげられる。本研究では新規分子標的 FIR exon2 は、抗 FIR exon2 自己抗体の癌患者血清中に検出することを目的として臨床検体を用いたコンパニオンバイオマーカーとしての意義を検討し予後や治療反応性など臨床的意義や発現機序の解明を提案する。

3. 研究の方法

課題 1: 主に消化器癌における抗 FIR exon2 自己抗体の臨床的意義の検討を中心に行った。AlphaLISA (化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ) を用いた検討では多種類の担癌患者血清中に抗 FIR exon2 自己抗体が検出された (図 2)。

また、SEREX 法を用いて、食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌などの診断に有用なバイオマーカーを testis cDNA フェージライブラリーを用いて探索した。SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法は癌細胞由来の cDNA 発現ライブラリーの中から患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子を同定する方法で、癌抗原検出のスクリーニング法として優れている。IgG 抗体によって認識される抗原として、

FIRs (PUF60/FIR/FIR exon2) が食道癌患者血清で示され、血清検体中の抗原に対する自己抗体の存在を報告した。食道癌では AlphaLISA を用いて健常者との有意差検定をした際、食道癌患者血清中に有意な発現増大が確認された。既存の腫瘍マーカー (p53-Abs, CEA, CYFRA, SCC) との相関関係は見られなく、独立したマーカーであった。ROC 曲線解析において、抗 FIR exon2 自己抗体が最も高い AUC 値を示した。また、診断効率を向上させるべく、既存の腫瘍マーカーと組み合わせられるようアルゴリズムを設定した。統計解析において比較検討する際データ群間を標準化 (Z-score) することで比較可能となる、データ群平均値からの距離を標準偏差の倍数で表した数値を算出し、再び ROC 曲線解析をした。その結果、**抗 FIR exon2 自己抗体 + p53-Abs の組み合わせにおいて抗 FIR exon2 自己抗体単独よりも高い AUC 値を示し組み合わせた中でも最も良いと示された (図 3)**。さらに、早期癌と進行癌に分類し同様の評価を行った際、抗 FIR exon2 自己抗体 + p53-Abs の組み合わせにおいて抗 FIR exon2 自己抗体単独よりも高い AUC 値を示し、最も良いペアと示された。単独マーカーとの比較、さらには組合せマーカー同士の比較において

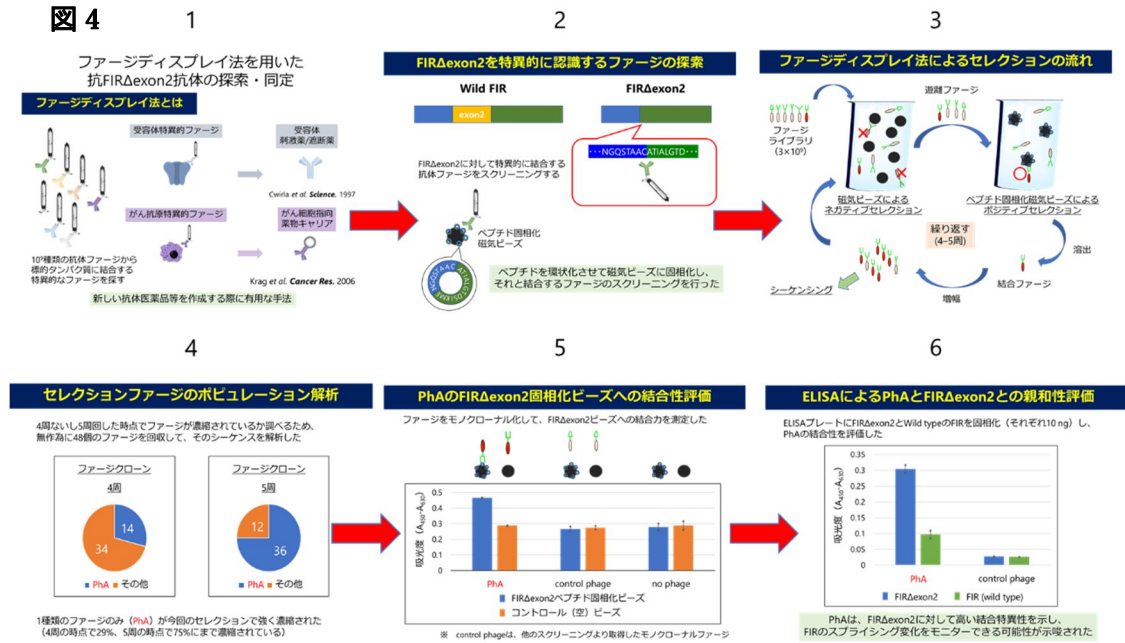


DeLong 検定を用いて評価した際は、抗 FIR exon2 自己抗体 + p53-Abs や抗 FIR exon2 自己抗体 + p53-Abs + CEA の組み合わせに有意差が見られた。同様の解析方法を用いて、大腸癌、胃癌患者血清を高性能 PC により解析評価した。Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線から予後評価の検討した。

課題 2: 現在までのところ AlphaLISA の検討では 10 - 20% 程度の頻度であった。しかしながら、

AlphaLISA は定量性や迅速性に課題があるため、大量検体を扱う場合には ELISA での検出系の開発が必要である。これまでに FIR のカルボキシル末端のモノクローナル抗体 (6B4) はすでに作製済みである。本研究では不安定な構造を持つ FIR exon2 のアミノ末端に対するモノクローナル抗体を、バクテリアに感染するウイルスであるバクテリオファージの表面に、標的となる分子に対して特異的に相互作用する分子を見つけ出すことファージディスプレイ法を用いて作製する (図 4)。そのためのファージクローンはすでにスクリーニング済である。FIR exon2 のアミノ末端に対するモノクローナル抗体の性能を検討し、FIR exon2 精製タンパク質を用いた反応性をタンパク質発現変化のウエスタンブロット法で確認する。さらにその FIR exon2 のアミノ

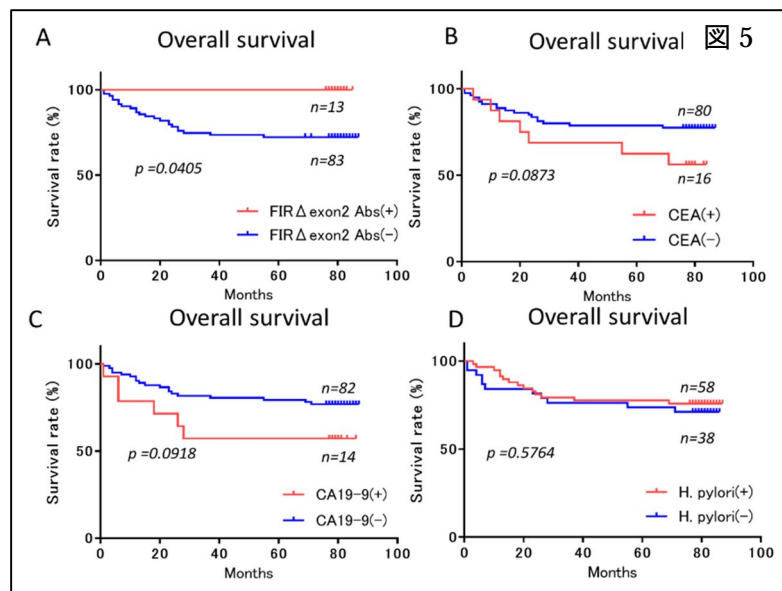
末端に対するモノクローナル抗体(PhA)の2種類を用いてサンドイッチEILSA系の確立を目指した。



4. 研究成果

課題 1、主に消化器癌における抗 FIR exon2 自己抗体の臨床的意義の検討を中心に行うことであった。食道癌患者血清では AlphaLISA 法を用いて健常者と比べ有意な発現増大が確認された。既存の腫瘍マーカーとの相関は見られなく独立したマーカーであった。ROC 曲線解析では抗 FIR exon2 自己抗体が最も高い AUC 値を示した。抗 FIR exon2 自己抗体 + p53-Abs の組み合わせにおいて抗 FIR exon2 自己抗体単独よりも高い AUC 値を示された。食道癌患者血清において論文報告した。診断評価の解析方法等を用いて、胃癌・大腸癌患者血清を解析評価した。

胃癌 (GC) の全生存期間または治療反応を効率的に示すための臨床的に利用可能なバイオマーカーはない。抗 FIR exon2 の血清中の自己抗体 (Abs) は、健康なドナー (HD) よりも GC 患者で著しく高かった。年齢を一致させた HD と比較して、GC 患者の抗 FIR exon2 Abs のレベルは有意に高かった (P < 0.001)。抗 FIR exon2 Abs と CEA (癌胎児性抗原) などの臨床的に利用可能な腫瘍マーカーとの間のスピアマンの順位相関分析は統計的に有意ではなく、FIR exon2 Abs が独立した



バイオマーカーであることを示した。CEA および CA19-9 の候補バイオマーカーとして抗 FIR exon2 Abs を評価するために、受信者動作曲線 (ROC) 分析を実行した。抗 FIR exon2 Abs 力価が高い GC 患者の全生存期間 (OS) は、抗 FIR exon2 Abs が検出されなかった患者よりも有意に良好であった (P = 0.04 図 5)。しかし、臨床病期は、抗 FIR exon2 Abs、CEA、および CA19-9 のレベルと明らかに相関していなかった。総合すると、GC 患者で検出された抗 FIR exon2 Abs は、より良い予後をモニタリングするための潜在的なバイオマーカーであった。胃癌患者血清において論文報告した。

大腸癌患者血清においては、健康なドナーと比較して、大腸癌 (CRC) 患者の血清中の抗 FIR exon2 抗体 (Abs) は著しく高かった。さらに、3 つの腫瘍マーカー (CEA、CA19-9、抗 p53 Abs)

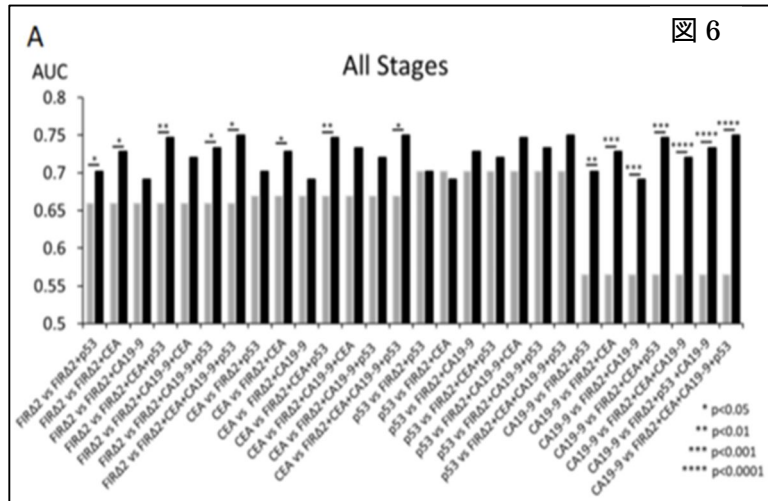


図 6

の間には相関が見られなかったことから、抗 FIR exon2 Abs は CRC 患者の独立した候補マーカーであることが示された。一般に、臨床的に利用可能な腫瘍マーカーと組み合わせた抗 FIR exon2 Abs のレベルは、CEA、CA19-9 と比較して有意に高いことが判明した。さらに、早期 CRC では、既存の腫瘍マーカーと組み合わせた抗 FIR exon2 Abs のレベルは、CEA、CA19-9 のレベルよりも高かった。CRC は

非常に異質な性質を持っているため、単一の腫瘍マーカーは、一般的に感度や特異性が不十分であるため、単独の診断検査にはなりそうにないが腫瘍マーカーの抗体検出法を組み合わせることで CRC 診断に使用することは、効果的な方法となる可能性があった(図 6)。大腸癌患者血清において論文報告した(引用文献)。

課題 2、サンドイッチ ELISA 確立のための抗体作製と AlphaLISA 法との臨床的意義をすり合わせることであった。不安定な構造を持つ FIR exon2 のアミノ末端に対するモノクローナル抗体のファージディスプレイ法を用いて作製した。FIR exon2 に対するモノクローナル抗体を作製することに成功し、性能を検討した上でターゲットモノクローナル抗体はサンドイッチ ELISA に使用できることが判明した(未発表データ)。また、ターゲットモノクローナル抗体は抗がん作用がある可能性が示唆されている。現在では更なる感度を高めるべく改良中である。感度の良い精製されたターゲットモノクローナル抗体ができれば新たな抗がん剤候補として、加えて関連したコンパニオン診断薬候補となる。

<引用文献>

Kobayashi S, Hiwasa T, Kitamura K, Kano M, Hoshino T, Hirano S, Hashimoto M, Seimiya M, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Combinational antibody detection approach increases the clinical validity of colorectal cancer screening. J Clin Lab Anal. 2023 Nov;37(21-22): e24978.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Arasawa Takahiro, Hiwasa Takaki, Kagaya Akiko, Maruyama Tetsuro, Uesato Masaya, Kano Masayuki, Kobayashi Sohei, Takizawa Hiroataka, Iwase Katsuro, Nomura Fumio, Matsushita Kazuyuki, Matsubara Hisahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Analysis of patients with colorectal cancer shows a specific increase in serum anti-ING1 autoantibody levels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-10845-y	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 該当する

1. 著者名 Li Shu-Yang, Sohei Kobayashi, Takaki Hiwasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum anti-AP3D1 antibodies are risk factors for acute ischemic stroke related with atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92786-9	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 該当する

1. 著者名 Takaki Hiwasa, Sohei Kobayashi, Yasuo Iwadate	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum anti-DID01, anti-CPSF2, and anti-FOXJ2 antibodies as predictive risk markers for acute ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Medicine	6. 最初と最後の頁 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12916-021-02001-9	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 該当する

1. 著者名 Nobufumi Sekino, Sohei Kobayashi, Hisahiro Matsubara	4. 巻 100
2. 論文標題 Metformin-Induced Heat Shock Protein Family A Member 6 Is a Promising Biomarker of Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 267-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000522446	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Sohei, Hiwasa Takaki, Ishige Takayuki, Kano Masayuki, Hoshino Tyuji, Rahmutulla Bahityar, Seimiya Masanori, Shimada Hideaki, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Anti FIR exon2 autoantibody as a novel indicator for better overall survival in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 847 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14767	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 該当する

1. 著者名 Ailiken Guzhanuer, Kitamura Kouichi, Hoshino Tyuji, Satoh Mamoru, Tanaka Nobuko, Minamoto Toshinari, Rahmutulla Bahityar, Kobayashi Sohei, Kano Masayuki, Tanaka Tomoaki, Kaneda Atsushi, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of BRG1 by FIR exon2 in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-020-0205-4	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 該当する

1. 著者名 Sumazaki Makoto, Shimada Hideaki, Ito Masaaki, Takemoto Minoru, Yokote Koutaro, Takizawa Hirotaka, Kashiwado Koichi, Shin Hideo, Kishimoto Takashi, Matsushita Kazuyuki, Kobayashi Sohei, Nakamura Rika, Shinmen Natsuko, Kuroda Hideyuki, Zhang Xiao Meng, Wang Hao, Goto Ken ichiro, Hiwasa Takaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Serum anti LRPAP1 is a common biomarker for digestive organ cancers and atherosclerotic diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4453 ~ 4464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14652	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須田竜一郎, 須田竜一郎, 酒井望, 松下一之, 石毛崇之, 小林崇平, 川崎洋平, 仕子優樹, 古川勝規, 三島敬, 中台英里, 海保隆, 大塚将之
2. 発表標題 国内患者集団におけるミスマッチ修復欠損胆道癌の免疫組織学的特徴と予測因子についての検討
3. 学会等名 日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清宮 正徳 , 岡村 澗 , 松永 結夏 , 小林 崇平 , 松下 一之
2. 発表標題 肝細胞癌診断のための血清中抗CHC抗体測定法の検討
3. 学会等名 生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清宮 正徳 , 安達 愛香 , 金子 葵 , 北野 萌子 , 平井 佑芽 , 米根 鉄矢 , 小林 崇平 , 松下 一之
2. 発表標題 光がビリルビン測定値に与える影響
3. 学会等名 生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清宮 正徳 , 鈴木 友乃 , 伝福 友加 , 米根 鉄矢 , 小林 崇平 , 松下 一之
2. 発表標題 乳びや蛋白質濃度が電解質測定値に与える影響
3. 学会等名 生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本真由子、小林崇平、亀田朋希、後藤陽登、平野翔、宮嶋亮弥、志田隆史、大星航、松下一之、清宮正徳
2. 発表標題 癌抑制因子FIRは肝臓癌細胞株の細胞増殖に関与する
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野翔、小林崇平、松下一之、清宮正徳
2. 発表標題 肝臓癌細胞株における癌抑制因子FIRとFIRスプライシング変異体FIR exon2の機能解析
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林崇平、志田隆史、竹内啓晃、長沢光章、三宅克也、清宮正徳
2. 発表標題 癌抑制因子FIRのスプライシング変異体FIR exon2に対する自己抗体は胃癌の生存率を改善するための新しい指標
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅谷陸、小林崇平、大星航、川崎健治、松下一之、長沢光章、清宮正徳
2. 発表標題 肝疾患メカニズムによる腫瘍免疫監視機構因子MICBの有用性
3. 学会等名 第31・32回生物試料分析科学会合同学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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