

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790536

研究課題名（和文） HB-EGF 発現を制御する転写因子の同定と癌の診断及び治療への応用

研究課題名（英文） Application for genes involved in regulation of HB-EGF expression as diagnostic markers and target molecules for breast cancer

研究代表者

四元 房典（YOTSUMOTO FUSANORI）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：40533089

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳がんの標的分子である HB-EGF の発現を制御する遺伝子として翻訳の際に HB-EGF mRNA の exon junction に結合し、HB-EGF のタンパクへの翻訳を増進する遺伝子(X)を同定した。遺伝子(X)が in vivo モデルで造腫瘍能を亢進させ、乳がん患者の予後因子となることから、HB-EGF と同様にがんの診断と治療において有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified the gene (X) involved in regulation of the expression of HB-EGF, a target molecule of breast cancer therapy. The gene (X) enhanced translation of HB-EGF mRNA into protein by the function of binding the exon junctions of HB-EGF mRNA, resulting in increasing the tumorigenic potential in vivo model and associating with prognosis of breast cancer patients. Therefore, gene (X) might be a potent diagnostic marker and therapeutic target molecule for breast cancer as well as HB-EGF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：HB-EGF、乳癌

1. 研究開始当初の背景

EGF Family は増殖因子とその受容体から構成され、増殖因子の一つである HB-EGF が乳癌、卵巣癌、胃癌などの多くの悪性腫瘍の標的分子となることが報告されている。さらに、HB-EGF に結合しその増殖活性を抑制する作用をもつ CRM197 は臨床試験において期待どおりの抗癌効果を示している。

したがって、HB-EGF 発現を制御する転写因子を同定することは、その転写因子が単な

る腫瘍マーカーになるだけでなく、HB-EGF を標的とする治療の有効例の選定や新たな標的分子の検索につながる情報を提供する重要な研究となると考えられる。

2. 研究の目的

癌の存在診断に有用な腫瘍マーカーは癌診断の補助的な指標や治療経過のモニタリングなどに応用されているが、腫瘍マーカーの臨床的意義が改めて問い正されるととも

に、新規腫瘍マーカーの出現に期待が寄せられ、とくに治療の標的にもなりうる抗原の開拓が望まれている。そこで、上皮性細胞増殖因子の一つである HB-EGF が種々の悪性腫瘍の癌標的分子であることから、本研究はその HB-EGF 発現に関与する転写因子を同定し、その転写因子が HB-EGF と同様に癌の診断と治療において有用であることを明確にすることである。

3. 研究の方法

(1) HB-EGF の発現に関連する遺伝子群のスクリーニング

転写因子及び転写共役因子群の探索のために特定の細胞機能に関連する遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法として注目されている short hairpin RNA (shRNA) ライブラリー (System Biosciences 社製) を用いて HB-EGF 発現に関連する遺伝子群を明らかにする。遺伝子を抑制することによって網羅的に解析する shRNA 発現ライブラリーの具体的方法を下図に示す (図 1)。

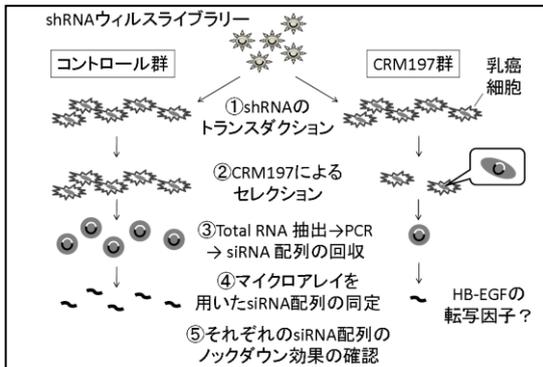


図1. shRNAライブラリーによるHB-EGF発現関連遺伝子スクリーニング

- ① レンチウイルスに感染効率の高い HB-EGF 高発現乳癌細胞株である MDA-MB-231、BT549 に shRNA ライブラリーを導入し、感染細胞をピューロマイシンで選別する。
- ② CRM197 を細胞上清に加え、72 時間培養後に生存細胞を取り出し、継代培養する。
- ③ 生存細胞、すなわち CRM197 耐性細胞は HB-EGF の発現亢進を引き起こす遺伝子が発現抑制された細胞であり、その RNA を抽出する。
- ④ shRNA 特異的配列を PCR で増幅させた後、Affymetrix 社の Gene Chip を用いて解析する。
- ⑤ 解析によって得られた遺伝子群の発現抑制効果については Real-Time PCR 法で確認する。

(2) HB-EGF 発現に関連する遺伝子の同定

① (1) でスクリーニングした遺伝子群を用いてミニアレイを作成し、HB-EGF の発現が高いヒト乳癌組織を用いて、HB-EGF の発現に関わる遺伝子をさらに絞り込む。

② ① で絞り込まれた遺伝子群の中で、HB-EGF の発現を亢進させる遺伝子を同定するため以下の方法を用いる。

- ・HB-EGF 低発現乳癌細胞に遺伝子をそれぞれ導入し、HB-EGF の発現について mRNA の発現は RT-PCR 法、蛋白量は細胞培養上清中のタンパク量を ELISA 法にて解析する。

- ・HB-EGF のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだコンストラクトを乳癌細胞に導入し、遺伝子をそれぞれ導入して、その発光強度を測定することで転写活性を解析する。

③ 最終的に、上記の方法で同定された HB-EGF の発現を亢進させる遺伝子が標的分子として妥当であるか以下の方法を用いる。

- ・遺伝子の発現を恒常的に抑制した細胞株を樹立し、細胞増殖能については MTT 法を用いて、また腫瘍形成能についてはヌードマウスを用いて解析する。

- ・ヒト乳癌組織における遺伝子の発現を Real-Time PCR 法で解析し、臨床病理学的因子との関連を検証する。

4. 研究成果

(1) HB-EGF の発現に関連する遺伝子群のスクリーニング

HB-EGF の転写に関わる遺伝子群を HB-EGF の発現を抑制させることと、逆に発現を亢進させることの 2 種類の方法で網羅的にスクリーニングした。まず、HB-EGF の発現を抑制させる実験系として、HB-EGF 特異的抑制剤である CRM197 を用いた。HB-EGF 高発現細胞株に shRNA 発現ライブラリーを導入し、培養上清中に CRM197 (10 μ g/ml) を添加し、72 時間後に生存細胞から RNA を回収した (A)。また、HB-EGF の発現を亢進させる実験系として HB-EGF 低発現乳癌細胞に HER2 や Kras 遺伝子導入し、HB-EGF の発現を亢進させた (B)。A と B の RNA を用いた発現アレイ解析により、HB-EGF の発現に関与する候補遺伝子として HB-EGF の受容体である EGFR の下流に位置する遺伝子 (MAPK 及び Akt) や乳癌において癌増殖に関連する遺伝子、癌の血管新生に関連する遺伝子が同定された。また、核内転写因子として PPAR γ や他の転写因子 (特許のため遺伝子名は伏せさせていただく) も同定された。最終的に HB-EGF 高発現細胞株に対して、上記で抽出された遺伝子の発現を抑制し、CRM197 に対して抵抗性を示すことができた 115 遺伝子を HB-EGF の発現に関連する遺伝子群とした。

(2) HB-EGF 発現に関連する遺伝子の同定

(1) でスクリーニングした HB-EGF の発現に関与する 115 遺伝子のヒト乳癌組織での発現解析を行い、HB-EGF の発現に関わる遺伝子を

さらに絞り込み、それらの遺伝子が HB-EGF の発現及び癌増殖機構に関与するかを検討した。HB-EGF の発現が高いヒト乳癌組織 30 例と低いヒト乳癌組織 17 例を用いて前述の 115 遺伝子の発現量を解析したところ、HB-EGF の発現量と相関する遺伝子として翻訳の際に HB-EGF mRNA の exon junction に結合し、HB-EGF のタンパクへの翻訳を増進する遺伝子 X (特許のため遺伝子名は伏せさせていただく) が同定された。HB-EGF 高発現乳癌細胞株を用いて siRNA 法による遺伝子 X の発現量を抑制すると、HB-EGF mRNA の断片化を認め、細胞培養上清中に分泌される HB-EGF タンパク量が抑制された。また、遺伝子 X の発現が恒常的に抑制された乳癌細胞を作製し、in vivo での造腫瘍能抑制効果を検討したところ、コントロールの細胞と比較して遺伝子 X の発現が抑制された細胞では造腫瘍能は抑制された。さらに、ヒト乳癌組織における遺伝子 X の発現量は無病増悪期間と有意な相関を示した。以上より、本研究で同定された遺伝子 X は HB-EGF の発現にタンパクへの翻訳を増進することで関与し、乳癌における新たな標的分子となることが示唆された。今後は遺伝子 X を特異的に抑制する低分子化合物を同定し、臨床応用への可能性を追求していく予定である。

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 10 件)

- ① Hikita S, Yotsumoto F, Fukami T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Tsujioka H, Ueda T, Shiota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Research*. 査読有. Vol.31, 2011, pp.2553-2559.
- ② Kunami N, Yotsumoto F, Ishitsuka K, Fukami T, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Tamura K, Kuroki M, Miyamoto S. Antitumor effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Research*. 査読有. Vol.31, 2011, pp.2483-2488.
- ③ Tsujioka H, Fukami T, Yotsumoto F, Ueda T, Hikita S, Takahashi Y, Kondo H, Kuroki M, Miyamoto S. A possible clinical adaptation of CRM197 in combination with conventional chemotherapeutic agents for ovarian cancer. *Anticancer Research*. 査読有. Vol.31, 2011, pp.2461-2465.
- ④ Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Science*. 査読有. Vol.102, 2011, pp.111-116.
- ⑤ Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K, Mekada E. A Novel Anti-Human HB-EGF Monoclonal Antibody with Multiple Anti-Tumor Mechanisms Against Ovarian Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 査読有. Vol.17, 2011, pp.6733-6741.
- ⑥ Yotsumoto F, Oki E, Tokunaga E, Maehara Y, Kuroki M, Miyamoto S. HB-EGF orchestrates the complex signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *International Journal of Cancer*. 査読有. Vol.127, 2010, pp.2707-2717.
- ⑦ Yotsumoto F, Fukami T, Yagi H, Funakoshi A, Yoshizato T, Kuroki M, Miyamoto S. Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through epidermal growth factor receptor and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer. *Cancer Science*. 査読有. Vol.101, 2010, pp.2351-2360.
- ⑧ Sanui A, Yotsumoto F, Tsujioka H, Fukami T, Horiuchi S, Shiota K, Yoshizato T, Kawarabayashi T, Kuroki M, Miyamoto S. HB-EGF inhibition in combination with various anticancer agents enhances its antitumor effects in gastric cancer. *Anticancer Research*. 査読有. Vol.30, 2010, pp.3143-3149.
- ⑨ Tsujioka H, Yotsumoto F, Shiota K, Horiuchi S, Yoshizato T, Kuroki M, Miyamoto S. Emerging strategies for ErbB ligand-based targeted therapy for cancer. *Anticancer Research*. 査読有. Vol.30, 2010, pp.3107-3112.
- ⑩ Tsujioka H, Hachisuga T, Hikita S, Ueda T, Yotsumoto F, Shiota K, Yoshizato T, Kawarabayashi T, Kuroki M, Miyamoto S. Apoptosis as a possible

candidate mechanism for removal of tamoxifen-related endometrial cells with KRAS mutations. Anticancer Research. 査読有. Vol.30, 2010, pp. 3119-3123.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四元 房典 (YOTSUMOTO FUSANORI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：40533089

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：