

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591891

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変異機序の解明と癌医療への応用

研究課題名(英文)Clinical application of cancer treatment by revealing alternative splicing mechanism of c-myc transcriptional suppressor FBP-interacting repressor

研究代表者

松下 一之 (MATSUSHITA, Kazuyuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90344994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：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。さらにヒト大腸癌組織ではN末端(exon2)が欠損したFIRスプライシングバリエーション(FIR exon2)が発現しておりc-mycの発現増大とアポトーシス誘導阻害が起こっている。本研究の意義は、FIR発現ベクターとして用いた癌遺伝子治療の開発を目指し、同時に担癌患者の末梢血中FIR exon2のタンパク質、mRNAレベルの検出を試みた。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に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Recently, an interaction between FBP-interacting repressor, FIR, and TFIIH/p89/XPB helicase was found to repress c-myc transcription and so might be important for suppressing tumor formation. Further, enforced expression of FIR induced apoptosis. Deletion of FIR's amino terminal repression domain rescued the cells from apoptosis, as did co-expression of c-Myc with FIR. Thus repression of c-myc mediates FIR-driven apoptosis. A splicing variant of FIR unable to repress c-myc nor driving apoptosis was frequently discovered in human primary colorectal cancers, but not in the adjacent normal tissues. In this study, adenoviral or Sendai virus FIR expression vector was examined its anti-tumor efficacy. Additionally, FIR splicing variant was detected at their protein or mRNA level in the peripheral blood of colorectal cancer patients.

研究分野：医歯薬学

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：がん診断 バイオマーカー がん治療

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌組織では *c-myc* 遺伝子の転写抑制因子 FIR (FBP interacting repressor) の転写抑制部位が欠損した複数のスプライシング変異体 (FIR s) が高発現し、そのために癌では正常型 FIR の機能が阻害され、その結果 TFIIH/p89/ERCC3/XPB の DNA ヘリカーゼ機能を抑制できずに *c-myc* 遺伝子の持続的な賦活化が惹起されることを研究した (Matsushita K et al. Cancer Res 2006)。癌組織で高発現が確認されている蛋白質やペプチドを高感度に血液中に検出することができれば、従来のバイオマーカーよりも感度・特異度ともに優れた癌早期診断法を開発することを目指した。そのための方法論 (質量分析装置や血清の前処理技術) も整備・確立されている。

2. 研究の目的

癌組織中に高発現している FIR や FIR s、(FIR のスプライシング変異体) およびこれらに結合する蛋白質複合体等の超微量核蛋白質を血液中に検出して、新規の腫瘍マーカー候補を同定することを目的とした。さらに、FIR によるアポトーシス誘導は「がんにおける *c-myc* 遺伝子依存 (oncogene addiction)」を遮断することがその主な原因と考えられることから、FIR によるアポトーシス誘導を利用した、FIR 遺伝子導入による癌治療の可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 癌においてスプライシング変異により転写されたイントロンの検出。大腸癌においては、各種のスプライシング因子の発現が増大 (あるいは減少) している。そこで、癌化に重要な癌遺伝子のスプライシングも変化しているのではないかと考え、その発現を調べた。その結果、*c-myc* 遺伝子のイントロンが転写されていた。すなわち、これら特定の遺伝子のイントロンの転写産物がペプチドに翻訳されて安定に発現していること、および血中に検出することできれば、従来よりも感度・特異度の優れた新しい腫瘍マーカー候補となる。我々は癌組織においてイントロンが特異的に転写、翻訳される遺伝子を中心に、「イントロンの転写産物がペプチドに翻訳されて安定に発現していること、および血中に検出すること」を検討した。

(2) FIR および FIR exon2 に結合する化合物

を「NPDepoArray」を用いて 23,275 種類の化合物バンクの中からスクリーニングした (理化学研究所基幹研究所 長田裕之研究室との共同研究、未発表データ)。その結果、FIR のみに特異的に結合する化合物 9 種類、FIR_exon2 に結合する化合物 4 種類をすでに同定している (うち FIR と FIR_exon2 の両方に結合する化合物 1 種類)。これら化合物の細胞に与える影響を調べることにより、抗癌剤候補の同定が期待できる。同定されたこれらの基本的な性質 (細胞増殖に与える影響や毒性、マウスへの副作用など) を検討した。

(3) *c-myc* 転写抑制因子 FIR を各種細胞株に遺伝子導入し、細胞抑制効果及び細胞死 (アポトーシス) 誘導メカニズムの解析をさらに詳細に行う; さらに FIR は U2 snRNP 複合体の主な構成因子である SF3b(SAP)155 と結合する。FIR pre-mRNA のスプライシングには FIR-SAP155 複合体が必要であることから (FIR による auto-splicing の可能性) 大腸癌では、「FIR-SAP155-*c-myc*」のフィードバックサーキットが存在することを見出した。すなわち SAP155 には遺伝子の選択性があり、細胞周期の G1-S 期を cdk2/cyclinE の発現を抑制することにより抑制する、p27Kip1 をスプライシングし短縮型の p27* の発現を増大させる。このような新規の細胞死誘導のメカニズムをさらに解析していきたい。本邦の課題である創薬研究開発型のテーマであり、国際特許の取得も順調に進捗しており、今後の展開が期待できる。

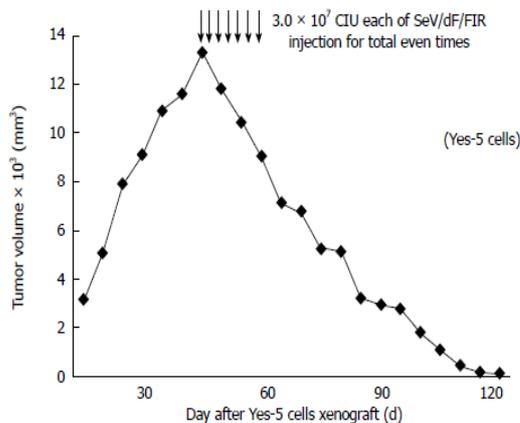
(4) FIR あるいは FIR exon2 の個体に対する与える影響を調べる (コンディショナル FIR ノックアウトマウス、FIR exon2 トランスジェニックマウスの作成) (松下); *c-Myc* 蛋白質は癌遺伝子 *c-myc* によりコードされ、細胞増殖と細胞死の両者に重要な影響を与える蛋白質である。即ち癌遺伝子 *c-myc* を抑制することにより癌治療にも応用可能である。そこでさらに FIR および FIR exon2 の機能を調べるために、FIR あるいは FIR exon2 の個体に対する影響を調べるため遺伝子改変マウスを作成する。既に FIR \square exon2 トランスジェニックマウスは作成済である。FIR ノックアウトマウスは腸管の FIR 遺伝子のみをノックアウトできるコンディショナル FIR ノックアウトマウスを作製に成功した。

(5) FIR と FIR exon2 蛋白質の X 線結晶構造

解析の違いから、FIR Δ exon2 蛋白のみの核内輸送を阻害する低分子物質（ペプチド含む）をコンピューターシミュレーションにより設計する(松下);もし FIR exon2 が *c-myc* 遺伝子の発現増大を誘導し、細胞の癌化を導くなら、細胞質で産生さ FIR exon2 の核内輸送のみを選択的に阻害する物質は抗癌剤の候補である。そのために FIR あるいは FIR Δ exon2 の可溶性蛋白質を大量精製し X 線結晶解析により、転写抑制部位であるそれぞれの蛋白質のアミノ末端の構造を決定する。

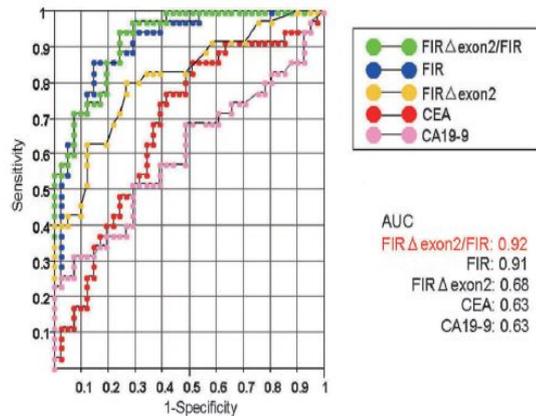
4. 研究成果

(1) FIR遺伝子を用いた癌治療への応用;癌移植動物モデルを用いてFIRアデノウイルスおよびセンダイウイルスベクター (DNAVEC社、つくば市)による癌抑制効果の検討を行った。いずれのベクターを用いても、FIR発現ベクターでは癌細胞のマウス移植モデルにおいて著明な細胞増殖抑制効果を認めた。さらにセンダイウイルスベクターは国産の特許を有するため将来の臨床応用を考慮した時に有利である。さらにマウスを用いた動物実験では、種々の癌細胞に対してFIRセンダイウイルスベクターが移植癌細胞の増殖を有意に抑制することがわかっている。同時に、各種抗癌剤との併用実験も行い、FIRセンダイウイルスベクターとの相乗効果、相加効果などを確認している。



(2) FIR遺伝子を用いた癌診断への応用; FIRおよびFIRバリエーションに対する自己抗体の検出とそれぞれのmRNAの癌患者末梢血中の検出:FIR自己抗体検出のためのELISAキットの作製を行った。抗FIRマウスモノクローナル抗体を産生するメラノーマ細胞を用いたマウスハイブリドーマ細胞は既に樹立済みである。この抗FIR抗体を用いて、末梢血中の

抗FIR抗体を検出するためのELISAキット作製し、癌患者の血清中に抗FIR抗体免疫複合体あるいはFIR断片ペプチドが検出されか検討中である。FIRおよびFIRバリエーションに対するそれぞれのmRNAが大腸癌患者末梢血中に存在するかどうかを調べたところ、大腸癌患者では健常人コントロールと比較して有意にmRNAが増大していた。



(3) FIR遺伝子のスプライシングの解析によりFIR exon2 mRNAの核外輸送のみを選択的に阻害する。FIR Δ exon2蛋白の核内輸送を選択的に阻害することと同様に、FIR Δ exon2 mRNAの核外輸送のみを選択的に阻害する低分子物質も抗癌剤の候補である。本研究ではその物質を見出す手始めとしてFIR遺伝子のスプライシングに關与するスプライシングファクターの同定を試みる。我々はすでに癌と非癌組織から抽出された蛋白質のプロテオミクスにより、癌特異的に発現変化が見られるスプライシングファクターを多種類同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 33 件) 全て査読あり

Rahmutulla B, Matsushita K, Satoh M, Seimiya M, Tsuchida S, Kubo S, Shimada H, Otsuka M, Miyazaki M, and Nomura F. Alternative splicing of FBP-interacting repressor coordinates c-Myc, P27Kip1/cyclinE and Ku86/XRCC5 expression as a molecular sensor for bleomycin-induced DNA damage pathway. *Oncotarget* 2013. December 21, [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=1650](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=1650)

Kajiwara T, Matsushita K, Itoga S, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara

H, Shimada H, Habara Y, Matsuo M, Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor far-upstream element-binding protein-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. *Cancer Sci.* 2013;104(2):149-56. doi: 10.1111/cas.12058.

Matsushita K, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Levens D, He L, Liu J, Yoshida M, and Nomura F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression. *Mol Cancer Res.* 2013;11(7):689-98. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0673.

Seimiya M, Ohno S, Yamamoto H, Fujiwara K, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Matsushita K, Nomura F. The Child-Pugh grade is altered by the albumin measurement method. *Hepatology* 2013;57(5):2093-2094. doi: 10.1002/hep.25972.

Matsushita K, Kajiwara T, Tamura M, Satoh M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Yoshimoto R, Ito A, Kubo S, Natsume T, Levens D, Yoshida M, Nomura F. SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) serves as a molecular switch for c-myc gene expression. *Mol Cancer Res.* 2012;10(6):787-99. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0462.

Nomura F, Sogawa K, Noda K, Seimiya M, Matsushita K, Miura T, Tomonaga T, Yoshitomi Hideyuki, Imazeki F, Takizawa H, Mogushi K, Miyazaki M and Yokosuka O. Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma *BBRC* 2012;421(4):837-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.099.

Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Koderu Y, Matsushita K, Nomura F Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel

periodontal disease markers. *Proteomics* 2012;12(13):2190-202. doi: 10.1002/pmic.201100655.

〔学会発表〕(計 21 件)

松下一之、糸賀 栄、宮内英聡、鈴木一史、太田 聡、中谷行雄、松原久裕、野村文夫。
当院におけるリンチ症候群に対する MSI (microsatellite instability) 検査の立ち上げについて。先端応用外科例会(2013.12.2) (千葉)

Matsushita K, Satoh M, Tomonaga T and Nomura F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression revealed by GeLC-MS approach. Human Proteome Organization (HUPO). Sep14-18. 2013, Yokohama.

Kajiwara T, Matsushita K, Itoga S, Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor FBP-interacting repressor splicing variants as colon cancer screening biomarkers. Am Assoc Clinical Chem. Houston, USA. 2013. July 29-Aug 1. (発表 2013. July 30) .

松下一之、石塚寿子、糸賀 栄、野村文夫。
大腸癌新規腫瘍マーカー候補：末梢血中の c-myc転写抑制因子FIRのスプライシングバリエーション FIR exon2 mRNAの検出。A novel diagnostic value of splicing variant form of c-myc transcriptional repressor FUSE-Binding protein-Interacting repressor for colorectal cancers。第20回日本遺伝子診療学会(浜松)。2013. 7. 18-20 (発表7. 18)。

松下一之、吉田 稔、長田裕之、野村 文夫。
SAP155 と FUSE-binding protein-interacting repressor の相互作用は細胞周期と増殖をリンクする。日本がん分子標的治療研究会(2013.6.14.京都国際会議場)

松下一之、石塚寿子、糸賀 栄、野村文夫。
c-myc転写抑制因子FIR splicing variant検出による大腸癌診断・治療への応用59回日本臨床検査医学会学術集会(2012.11/29-12/1)(京都)

松下一之、石塚 寿子、佐藤 守、松原 久

裕、島田 英昭、朝長 毅、久保 秀司、吉田 稔、野村 文夫。c-myc遺伝子転写抑制因子FIRとスプライシング因子SAP155の結合による新規がん化メカニズムについて

(international session). 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日(札幌)

Matsushita K, Kajiwara T, Satoh M, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Yoshida M, and Nomura F. SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) serves as a molecular switch for *c-myc* gene expression. 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research JCSCR2012 . (幕張) 2012年5月9日から5月11日。

松下一之、松原久裕、宮崎 勝、野村文夫 . 治療抵抗性固形癌の克服のための臨床検体を用いた病態解析の取り組み . 第112回日本外科学会定期学術集会 . 2012年4月12日(木)~14日(土)(幕張)

〔産業財産権〕

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下一之 (MATSUSHITA Kazuyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90344994

(2) 研究分担者

野村 文夫 (NOMURA Fumio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：80164739

佐藤 守 (SATO MAMORU)
千葉大学・医学部附属病院・寄附研究部門
教員
研究者番号：20401002