

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700984

研究課題名(和文)新規創薬標的TRA2Bの機能の解明

研究課題名(英文)Functional analysis for TRA2B, as novel target of cancer therapy

研究代表者

和田 智(Wada, Satoru)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：80438837

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)：我々は新たな分子標的薬剤の開発を目指し、網羅的な遺伝子発現解析によって、不死化癌細胞特異的に高発現していたTRA2Bを標的候補として策定した。本研究ではTRA2Bが癌と関わりの深い遺伝子群について、発現レベルのみでなくスプライシングパターンについても調節していることが示された。このことから、TRA2Bがこれらの遺伝子群を制御することによって、癌細胞の生死に直接的に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have selected that TRA2B, a splicing factor, was a candidate gene participated in cancer-specific immortalization. TRA2B expression levels significantly differed among cancer cells and immortalized normal ones. In this study, we revealed that cancer-related genes, such as MAD2L1 and tumor suppressor gene LATS2 have altered their expression levels in response to TRA2B knockdown. Furthermore, we found that TRA2B might regulate alternative splicing of 19 cancer-related genes. These results suggested that TRA2B was a possible upstream regulator of these genes, and may affect cancer cell growth via the regulation of these gene expressions and splicing pattern.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌遺伝子 選択的スプライシング TRA2B 分素標的薬

### 1. 研究開始当初の背景

癌治療における分子標的薬剤の進歩は目覚しく、現在も新たな標的の探索や薬剤開発が盛んに進められている。しかし、慢性骨髄性白血病に対するイマチニブや肺癌におけるALK阻害剤などは非常に稀な成功例に過ぎない。これまで、増殖や転移、浸潤など癌の悪性形質にかかわる既知パスウェイの因子を標的とした創薬戦略によって、新規の創薬標的の探索が主に行われてきたが、この従来の方法では有効な標的を抽出するに至っていないのが現状である。真に有用なターゲット因子を策定するためには、既知情報に頼ったスクリーニングではなく、これまでに類の無い観点から探索する必要があるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

既知パスウェイの構成因子をターゲットとした標的探索ではなく、癌細胞や癌組織など多数のサンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、癌特有の悪性形質である不死化に關与する因子として、*TRA2B* (transformer 2 beta homolog, *Drosophila*) を同定した。この*TRA2B*に関しては、現在まで癌との関連性研究の報告は少なく、癌細胞内での役割について明確にはなっていない。そこで、本研究では、*TRA2B*を分子標的とした新規薬剤構築の第一歩として、*TRA2B*の癌不死化メカニズムにおける機能について解析する。また、これまでに報告されている*TRA2B*の選択的スプライシング制御機能に着目し、*TRA2B*が産生する癌細胞特異的スプライシングバリエーションの探索と、その機能解析を進め、癌不死化との関連について検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 培養癌細胞株を用いた*TRA2B*ノックダウン実験を行い、網羅的遺伝子発現解析とネットワーク解析から*TRA2B*によって制御されている遺伝子群を抽出する。それらの遺伝子と*TRA2B*の制御関係について、定量的遺伝子発現解析やタンパク質発現解析、プロモーター解析などによって検証し、不死化との関わりについて明らかにする。

(2) エクソアレイによる全遺伝子のエクソンレベルでの発現解析および高機能シークエンサーによる大量並列シークエンサーデータを基にした網羅的遺伝子発現解析と塩基配列解析から、*TRA2B*によって選択的スプライシングを制御されている遺伝子群を抽出する。さらに、それらのスプライシングバリエーションについて、定量的遺伝子発現解析やタンパク質発現解析、RT-PCR解析などを用いて検証し、*TRA2B*の癌細胞不死化における機能について明らかにする。

### 4. 研究成果

*TRA2B*の新規標的候補としての可能性について検討するため、ノックダウン実験を行った

ところ顕著な増殖抑制効果が得られた(図1)。

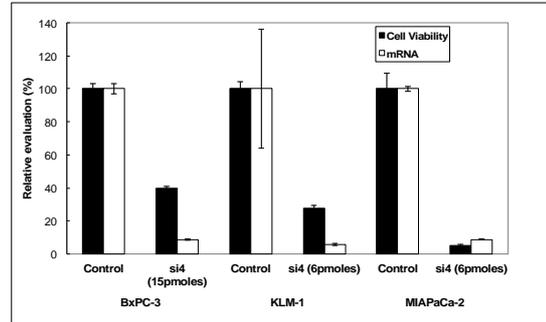


図1.

このことから、*TRA2B*が新規抗癌標的となることが示唆された。また、増殖抑制効果と、*TRA2B*のノックダウン効率との間に相関がみられたことから、*TRA2B*が癌細胞の生死を規定する重要な因子であると考えられた(図2)。

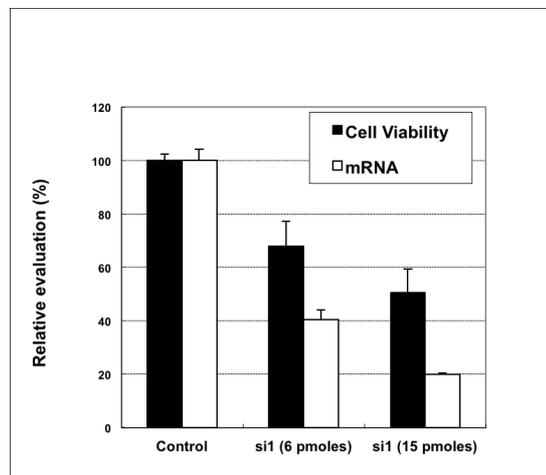


図2.

次に、*TRA2B*と機能的関連のある因子を策定するため、*TRA2B*ノックダウン細胞に対し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、様々な遺伝子に発現変化が認められ、特にスピンドルチェックポイントの機能因子である*MAD2L1*の発現低下や癌抑制遺伝子*LATS2*の発現が亢進していることが明らかとなった。これらに関してはreal-time RT-PCR法とウェスタンブロッティング法により、mRNAレベルだけでなくタンパク質レベルで発現変動していることが示された。さらに、*MAD2L1*ノックダウン実験では、*TRA2B*の遺伝子発現に変動が見られないこと、様々な癌細胞やがん組織における*TRA2B*の遺伝子発現と*MAD2L1*発現との間に相関関係が認められることから、*TRA2B*が*MAD2L1*発現を制御していることが示唆された(図3)。

一方、マイクロアレイによる全遺伝子発現データに対するネットワーク解析においても、*TRA2B*ノックダウンによってさまざまな細胞周期チェックポイントパスウェイが有意に変動していることが示唆された。

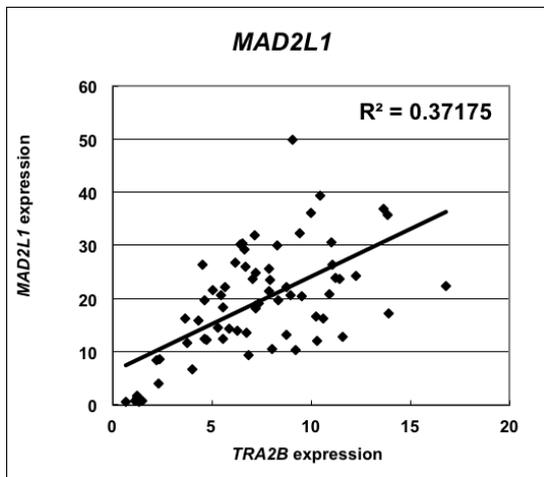


図 3.

これらの結果から、*TRA2B* が *MAD2L1* や *LATS2* などの様々な遺伝子の発現調節を介し、癌細胞の不死化に関わるパスウェイ制御を行っていることが示唆されたが、その制御機構については不明な部分が多く、今後の研究課題である。そこで、*TRA2B* が選択的スプライシングを制御する因子であることに着目し、*TRA2B* によって産出されるがん特異的なスプライシングバリエーションが癌細胞の増殖や細胞周期制御など、不死化に関わるパスウェイ因子の発現調節に関与している可能性について検討することとした。*TRA2B* をノックダウンした癌細胞から RNA を抽出し、エキソアレイおよび高機能シーケンサーを用いて、*TRA2B* によってスプライシング制御される癌関連遺伝子について、がん特異的なバリエーションの策定を試みた。エキソアレイによる全遺伝子のエキソレベルでの発現変動解析を行ったところ、*TRA2B* によってスプライシングパターンを制御されている可能性のある遺伝子が多数検出された（図 4）。

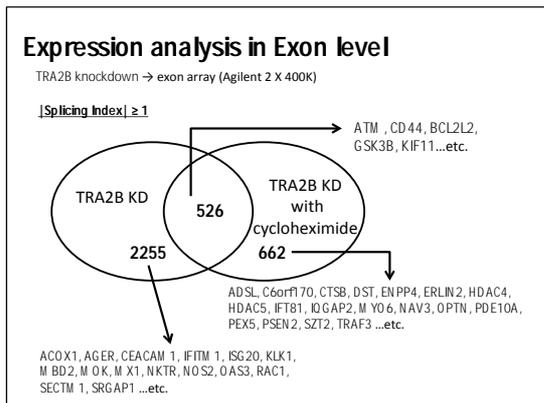


図 4.

一方、ネットワーク解析の結果から、*TRA2B* ノックダウンによって影響を受ける細胞周期制御などのパスウェイを構成する因子のうち、特に癌との関連が示唆されている遺伝子についてキャプチャーアレイを作成し、高

機能シーケンサーを用いてがん特異的なバリエーションの策定を行った。その結果、すでに癌との関連が示されている *CD44* を含め、19 の癌関連遺伝子において新規バリエーション候補を検出することができた。現在はこれらのバリエーション候補についてのバリデーションを進めており、癌細胞の不死化との関連について、配列解析やクローニングなどのバイオインフォマティクスと分子生物学的手法を用いた機能解析を進める予定である。本研究において、*TRA2B* が分子標的薬剤の新たなターゲットとなりうることが示された。*TRA2B* は、様々なシグナル伝達経路を構成する因子を対象とした創薬戦略によって選択されていた受容体型チロシンキナーゼなどの標的とは異なり、これまでに類のない斬新な標的候補といえる。さらに、*TRA2B* が制御する、がん特異的なスプライシングバリエーションは、その具体的な機能などについては今後の研究課題となるが、癌の不死化に関与している可能性がある。正常な選択的スプライシング機構の破綻が、癌化もしくは癌の悪性化と関連があるという報告はこれまでもなされているが、本研究結果は 1 スプライシングファクターによって同様な影響が出る可能性を示唆しており、今後のがん研究、特に創薬標的策定研究において、スプライシング制御機構の重要性を示すものと考えられる。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

和田智、*TRA2B* による癌細胞特異的なバリエーションの探索、日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸コンベンションセンター

和田智、新規創薬標的 *TRA2B* の機能の解明、日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場

和田智、Search for variants of cancer related gene in alternative splicing caused by *TRA2B*、日本癌学会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 智 (WADA, Satoru)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80438837

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし