

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460692

研究課題名(和文) 中皮腫マーカー・インテレクトイン-1の転写制御因子の同定

研究課題名(英文) Analysis of transcription factor that regulates intelectin-1 expression in mesothelioma

研究代表者

辻 祥太郎 (Tsuji, Shoutaro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：30285192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の過程で、我々は中皮腫を高精度かつ高感度に検出できるマーカー・HEG1を発見した。HEG1はインテレクトイン-1を含む既存のすべての中皮腫マーカーよりも優れた特異性(99%)と感度(92%)を有していた。また、HEG1の発現を抑制すると中皮腫細胞の増殖が抑制され、HEG1は中皮腫の発がんや増殖に関与していると考えられた。本研究成果は、中皮腫の病理診断精度の向上に貢献し、新しい治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a new highly specific and sensitive marker for mesothelioma, HEG1. The specificity (99%) and sensitivity (92%) of HEG1 to mesothelioma were higher than those of other mesothelioma markers, containing intelectin-1. We also found that gene silencing of HEG1 significantly suppressed proliferation of mesothelioma cells; this result suggested that HEG1 was associated with oncogenesis or proliferation of mesothelioma cells. Results of this study can contribute to the improvement of pathologic diagnosis and the development of medical treatment for mesothelioma.

研究分野：腫瘍検査学

キーワード：中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫（以下、中皮腫）は、アスベストの曝露が主要原因で発生する悪性腫瘍として、大きな社会問題となっている疾患である。早期発見が困難であり、しばしば病理学的鑑別にも難渋する。中皮腫は、抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示し、がん幹細胞様の性質を持つ細胞集団が多いのではないかと考えられているが、その分子腫瘍学的な理由については明らかになっていない。

我々は、中皮腫の新規診断マーカーの開発、およびそのマーカー抗原の発現機序の解明を目的として研究を進めている。これまでに、インテレクチン-1 が上皮型中皮腫で高発現し胸水中のバイオマーカーになりうること、インテレクチン-1 が正常中皮細胞をはじめ大部分の組織やがんで発現しておらず、感度および特異性に優れた上皮型中皮腫の病理診断マーカーであることを報告している。

インテレクチン-1 は正常組織では腸管の杯細胞に特異的に発現する分泌型の生体防御レクチンである。感染により発現が増強されるが、その発現調節機構は未だ解明されていない。中皮組織におけるインテレクチン-1 は中皮細胞の異常な増殖とがん化にともない発現してくることから、インテレクチン-1 の発現を誘導する転写因子は、中皮腫の増殖や発がん過程に関与していることが考えられた。

ルシフェラーゼアッセイにより中皮腫細胞におけるインテレクチン-1 遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、エンハンサー領域の塩基配列を元にした転写因子予測を行ったところ、OctファミリーおよびSoxファミリーの関与が推測された。

Oct・Sox 転写因子群は個体発生における細胞増殖や分化、ES細胞やiPS細胞の多能性維持に関わる転写因子である。しかし、中皮腫における Oct・Sox 転写因子の発現、およびその作用についての報告はこれまでになされていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 中皮腫細胞株における Oct・Sox 転写因子群の発現を測定し、発現している転写因子について、インテレクチン-1 のエンハンサー領域への結合と作用を解析する。これにより、中皮腫における Oct・Sox 転写因子の発現とインテレクチン-1 転写制御への関与について検討を行うことを目的とする。

(2) 中皮腫細胞からインテレクチン-1 のエンハンサー配列に結合する転写因子複合体を精製し、エンハンサー領域に結合する転写制御因子複合体の同定を試みる。

(3) 中皮腫に特徴的な分子に対するモノクローナル抗体の作製を行い、インテレクチン-1 の発現制御に対する作用、中皮腫の発がんや増殖機序への関与について解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) インテレクチン-1 を発現する ACC-MESO1、ACC-MESO4、NCI-H2452 を用いて、Oct ファミリーおよび Sox ファミリーの mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

(2) 転写因子を直接精製するため、インテレクチン-1 を大量に発現し増殖の早い中皮腫細胞株の亜株 (ACC-MESO4HG) を選抜した。インテレクチン-1 のエンハンサー領域の配列をタンデムに連結した DNA をラテックスビーズに固定し、ACC-MESO4HG の核抽出液と混合して、アフィニティ精製を行い、SDS-PAGE および銀染色にて、配列特異的に結合する蛋白質の検出と解析を行った。

(3) 中皮腫に特徴的な分子に対するモノクローナル抗体の作製を行うため、凍結した ACC-MESO4HG をマウスに免疫し、中皮腫細胞株と中皮腫組織切片に特異的に反応するクローンを選抜した。最も優れた反応性を示すクローン (SKM9-2) について、中皮腫、各種がん、健常組織の検体について免疫組織染色を行った。

SKM9-2 が認識する抗原を同定するために、ACC-MESO4HG の細胞可溶化液から、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィを用いて抗原の精製を行い、質量分析を行って抗原分子を同定した。

## 4. 研究成果

### ○研究の主な成果

(1) 複数の中皮腫細胞株を用いてインテレクチン-1 と Oct ファミリー、Sox ファミリーの mRNA の発現プロファイルを解析した。各分子の発現は細胞株とその培養状態に大きく影響を受け、明らかな相関性を示さなかった。従って、Oct ファミリー、Sox ファミリーの分子の発現の有無が、インテレクチン-1 の発現を制御しているのではないと考えられた。

(2) インテレクチン-1 を大量に発現し増殖の早い中皮腫細胞株の亜株 (ACC-MESO4HG) を樹立し、その核抽出液からインテレクチン-1 のエンハンサー領域に結合する転写因子の精製を試みた。エンハンサー領域に再現性良く結合する分子は得られず、エンハンサー領域と転写因子の結合条件を決めるためには更なる検討が必要と考えられた。

(3) 中皮腫に特徴的に発現している分子をモノクローナル抗体の作製により探索し、インテレクチン-1 の発現制御に対する作用を検討することを試みた。この過程で、インテレクチン-1 を含む既存のすべての中皮腫マーカーよりも優れた特異性と感度を有し、中皮腫の増殖に関与する新規中皮腫マーカー・HEG1 を発見した。

この発見により、中皮腫の精密診断と治療に大きく貢献する研究成果が得られ、中皮腫の増殖機序についても新たな知見を得ることができた (発表論文 1)。

① 中皮腫細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体 SKM9-2 を樹立した。計 130 症例の中皮腫と 310 症例の他のがんの病理組織切片の免疫染色の解析から、中皮腫に対する感度 92%、特異度 99%と算出され、既存のマーカーの感度と特異度を上回っていた (表 1)。健常組織に対する反応性もほとんど認められず、SKM9-2 抗原は極めて優れた中皮腫病理診断マーカーになりうると考えられた。

	感度	特異度
SKM9-2 抗原	92%	99%
Calretinin	80%	82%
Cytokeratin5/6	78%	72%
Podoplanin	82%	79%
WT-1	87%	96%
Mesothelin	79%	81%

表 1. 中皮腫に対する各マーカーの反応性

② SKM9-2 抗原は分子量 400 kD の巨大膜蛋白質であった (図 1,2)。ACC-MESO4HG の細胞可溶化液を用いて、SKM9-2 の反応性を指標に、分別沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、レクチンアフィニティクロマトグラフィーを行い、精製抗原を得た (図 2)。精製抗原の質量分析による解析から SKM9-2 抗原は HEG1 であることが示唆された。

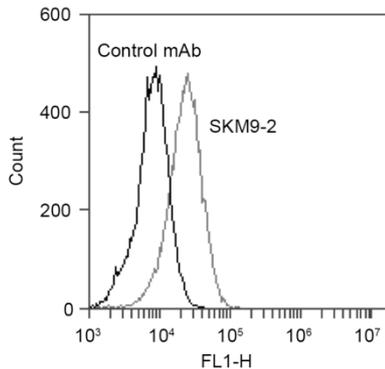


図 1. 細胞膜上の SKM9-2 抗原の検出

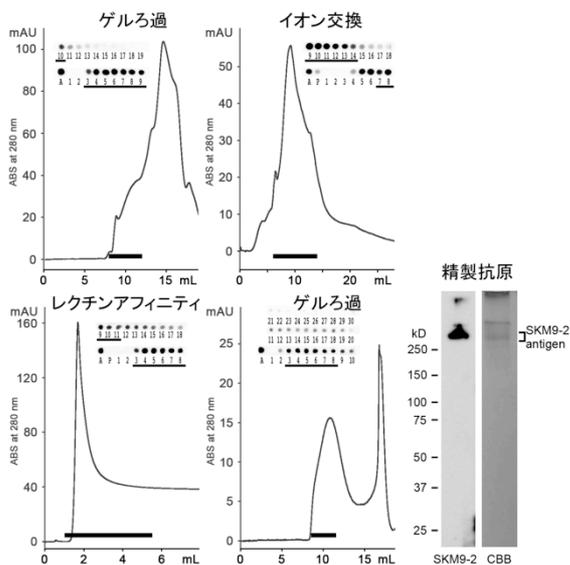


図 2. SKM9-2 抗原の精製

siRNA または shRNA で中皮腫細胞の HEG1 の発現を抑制すると SKM9-2 抗原が減少し (図 3)、HEG1 非発現細胞に HEG1 を遺伝子導入すると SKM9-2 が反応したことから (図 4)、SKM9-2 抗原が HEG1 であることが明らかとなった。

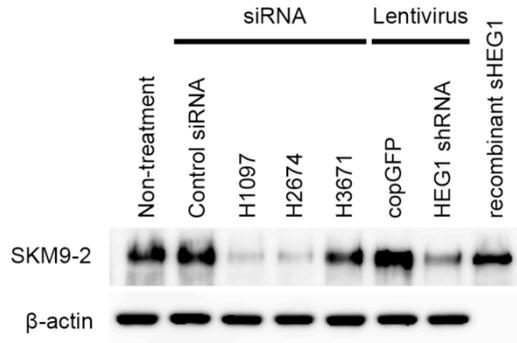


図 3. HEG1 siRNA による SKM9-2 抗原の減少

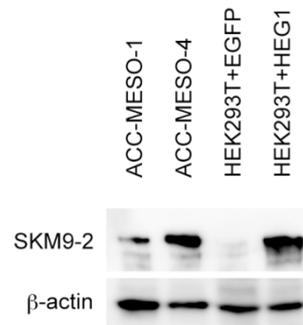


図 4. HEG1 発現細胞に対する SKM9-2 の反応

③ siRNA で ACC-MESO4 の HEG1 の発現を抑制すると時間依存的な細胞数の減少が認められた。この細胞増殖抑制作用は複数の HEG1 siRNA で認められ (図 5)、ACC-MESO4 以外の中皮腫細胞株 (NCI-H2454) でも観察された (図 6)。従って、一部のの中皮腫細胞では HEG1 依存的な細胞増殖が起こっていると考えられた。

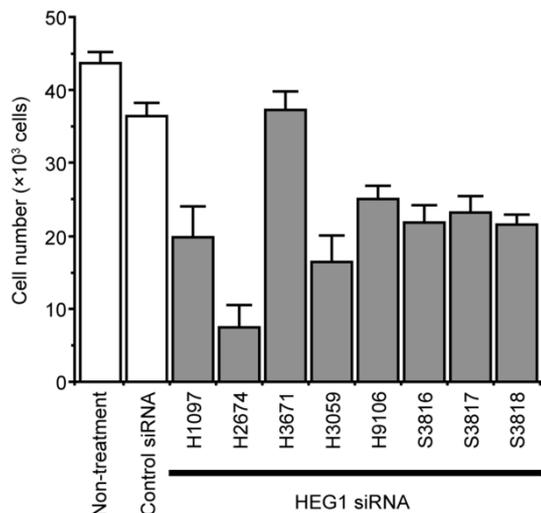


図 5. HEG1 siRNA による ACC-MESO4 の細胞増殖の抑制

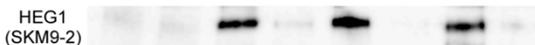
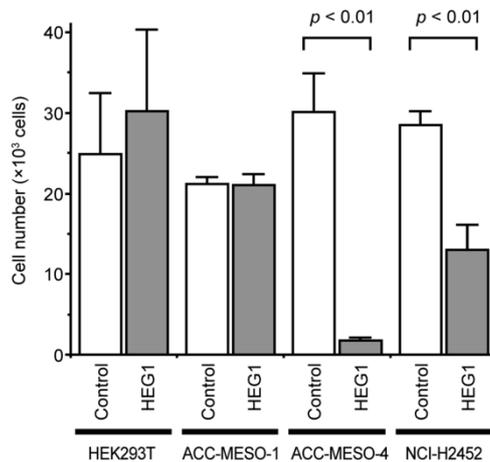


図 6. HEG1 siRNA による中皮腫細胞株の増殖の抑制

(4) 中皮腫に対するモノクローナル抗体を製作する過程で SLURP-1 に対する抗体が得られた。SLURP ファミリーの発現制御について解析をおこなったところ、IL-22 によってその発現が制御されていることが明らかとなった (発表論文 2,3)。

#### ○位置づけとインパクト

本研究により、中皮腫を高精度かつ高感度に検出できるマーカー HEG1 が発見され、中皮腫の診断精度を大きく改善できる成果が得られた。また、研究成果は中皮腫の分子標的治療にも応用可能と考えられ、中皮腫の診断と治療に大きく貢献すると考えられる。さらに、HEG1 が中皮腫の細胞増殖に関与するという今回の発見は、未解明な点が多い中皮腫の発がん過程や増殖機序をあきらかにする上で重要になると考えられ、中皮腫の基礎研究にも大きな貢献を果たすと考えられる。

#### ○今後の展望

本研究により、中皮腫に特異性が高く、その細胞増殖に関与する分子 HEG1 を発見できた。今後、臨床応用を前提に HEG1 を標的とした診断と治療法の開発を行うことで、中皮腫の治療成績の向上に役立つ成果が得られると考えられる。HEG1 に対して高い親和性を持つ抗体は我々の開発した SKM9-2 以外には開発されていない。そこで、HEG1 に対する抗体医薬品開発を中心に研究開発を進めたいと考えている。

#### 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 3 件)

(1) Shoutaro Tsuji, Kota Washimi, Taihei Kageyama, Makiko Yamashita, Mitsuyo Yoshihara, Rieko Matsuura, Tomoyuki Yokose,

Yoichi Kameda, Hiroyuki Hayashi, Takao Morohoshi, Yukio Tsuura, Toshikazu Yusa, Takashi Sato, Akira Togayachi, Hisashi Narimatsu, Toshinori Nagasaki, Kotaro Nakamoto, Yasuhiro Moriwaki, Hidemi Misawa, Kenzo Hiroshima, Yohei Miyagi, and Kohzoh Imai. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. **Scientific Reports** 7:45768, 2017. doi: 10.1038/srep45768. (査読有)

(2) Yasuhiro Moriwaki, Kiyoko Takada, Toshinori Nagasaki, Natsuki Kubo, Tomohiro Ishii, Kazuaki Kose, Taihei Kageyama, Shoutaro Tsuji, Koichiro Kawashima, Hidemi Misawa. IL-22/STAT3-Induced Increases in SLURP1 Expression within Psoriatic Lesions Exerts Antimicrobial Effects against Staphylococcus aureus. **PLoS ONE** 10:e0140750, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0140750. (査読有)

(3) Yasuhiro Moriwaki, Kiyoko Takada, Shoutaro Tsuji, Koichiro Kawashima, Hidemi Misawa. Transcriptional regulation of SLURP2, a psoriasis-associated gene, is under control of IL-22 in the skin: A special reference to the nested gene LYNX1. **International Immunopharmacology** 29:71-75, 2015. doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.030. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 長崎 俊憲, 森脇 康博, 三澤 日出巳, 辻 祥太郎. 中皮腫マーカー蛋白質, インテレクチン-1 と 1,2-diol の結合様式の解析. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎新聞分化ホール (長崎県長崎市), 2017.3.15.

(2) 辻 祥太郎, 今井 浩三. 極めて優れた特異度と感度をしめす新規中皮腫マーカー分子の同定. 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016.10.5.

(3) 辻 祥太郎, 松浦 利絵子, 今井 浩三. 新規中皮腫マーカー分子の同定. 第 7 回 Japan Mesothelioma Interest Group 研究会, JP タワー名古屋ホール&カンファランス (愛知県名古屋市), 2016.9.3.

(4) 辻 祥太郎, 今井 浩三. 中皮腫バイオマーカー・インテレクチンの新しい臨床応用. 第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015.10.7.

(5) 辻 祥太郎. インテレクチン-1 の Ca<sup>2+</sup>結合能の解析. 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2014.10.16.

〔産業財産権〕

○出願状況（計4件）

(1) 名称：膜型ムチン様タンパク質の認識とその医療応用.

発明者：辻 祥太郎, 影山 泰平, 鷺見 公太, 辻 真紀子, 松浦 利絵子, 吉原 光代, 今井 浩三.

権利者：独立行政法人神奈川県立病院機構、東京大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2017/1250

出願年月日：2017.1.16.

国内外の別：国外

(2) 名称：結合体及びその使用.

発明者：辻 祥太郎, 今井 浩三.

権利者：独立行政法人神奈川県立病院機構、東京大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2016/056797

出願年月日：2016.3.4.

国内外の別：国外

(3) 名称：膜型ムチン様タンパク質の認識とその医療応用.

発明者：辻 祥太郎, 影山 泰平, 鷺見 公太, 辻 真紀子, 今井 浩三.

権利者：独立行政法人神奈川県立病院機構、東京大学

種類：特許権

番号：特願 2016-25689

出願年月日：2016.2.15.

国内外の別：国内

(4) 名称：結合体及びその使用.

発明者：辻 祥太郎, 今井 浩三.

権利者：独立行政法人神奈川県立病院機構、東京大学

種類：特許権

番号：特願 2015-043459

出願年月日：2015.3.5.

国内外の別：国内

〔その他〕

(1) 記者会見：優れた新規中皮腫がんマーカーの発見と診断・治療法への応用. 神奈川県庁. 2016.3.23. 新聞記事 3紙に掲載、NHKニュースにて紹介

(2) 記者会見：がん治療における敗血症から救命する革新技术. 神奈川県立がんセンター. 2015.3.24. 新聞記事 4紙、雑誌 2誌に掲載

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 祥太郎 (SHOUTARO TSUJI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん治療学部・主任研究員

研究者番号：30285192

(2) 研究協力者

鷺見 公太 (KOTA WASHIMI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局・医師

研究者番号：30716733

今井 浩三 (KOHZOH IMAI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局・顧問

研究者番号：60117603

松浦 利絵子 (RIEKO MATSUURA)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん治療学部・研究補助員