

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08668

研究課題名(和文) 胸膜中皮腫の予後改善を目指した診断マーカーと阻害化合物の探索

研究課題名(英文) Search for diagnostic markers and molecular-targeted compounds for the treatment of malignant mesothelioma

研究代表者

細川 好孝 (Hosokawa, Yoshitaka)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60229193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胸膜中皮細胞を用いて癌抑制遺伝子ノックアウト株を作成し、cDNAマイクロアレイ網羅的発現解析とリアルタイムPCR解析によって、NF2ノックアウト株で高発現する遺伝子としてFGF受容体2を同定し、FGF受容体2が診断バイオマーカーのための有望な候補であることを示した。次に、NF2/p16ダブルノックアウト細胞株を樹立し、CD24遺伝子が特異的に高発現していることを見出し、FGF受容体2と共にCD24が新たな診断バイオマーカーの候補であることを示した。さらに、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンが特異的な細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連して発症し、発病までの期間は約20-30年と長期に渡り、中皮腫患者の死亡者数は10万人を超えると予測されている。多くは進行した状態で診断され、化学療法や免疫チェックポイント阻害薬の併用療法が行われているが、その効果は極めて限定的である。本研究では、胸膜中皮細胞を用いて癌抑制遺伝子ノックアウト株を作成し、新規診断マーカーや新規治療薬の候補分子を探索することを目的とした。今回、新規診断マーカーとしてFGF受容体2およびCD24を同定し、阻害化合物としてセルレニンを発見した。悪性胸膜中皮腫の治療状況の現状を鑑みて、今回の発見の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignancy of the pleura that is currently incurable due to the lack of an effective early diagnostic method and specific medication. To understand how these mutations contribute to MPM tumor growth, we generated NF2-knockout and NF2/p16 double-knockout (DKO) cell clones using human mesothelial cell lines. cDNA microarray analysis, quantitative PCR and western blot analyses showed upregulation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) and CD24, respectively, in NF2-knockout and NF2/p16 double-knockout (DKO) cell clones. These results strongly indicate the potential use of FGFR2 and CD24 as prognostic markers as well as novel diagnostic and therapeutic targets for MPM.

研究分野：腫瘍学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 ゲノム編集技術 癌抑制遺伝子 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連して発症し、発病までの期間は約 20-30 年と長期に渡る。2000 年から 2039 年までの 40 年間で、中皮腫患者の死亡者数は 10 万人を超えると予測されている。多くは進行した状態で診断され、化学療法や免疫チェックポイント阻害薬の併用療法が行われているが、その効果は極めて限定的である。悪性中皮腫では、癌抑制遺伝子である p16INK4a、NF2、BAP1 に不活化変異が高頻度に検出される。癌抑制遺伝子に着目した分子標的治療の開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、胸膜中皮細胞を用いて癌抑制遺伝子ノックアウト株を作成し、中皮腫の増殖・浸潤・転移に関わる細胞内分子および阻害化合物を同定し、新規診断マーカーや新規治療薬の候補分子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術を駆使し、胸膜中皮細胞株において NF2 ノックアウト株 NF2/p16 とダブルノックアウト細胞株を樹立する。cDNA マイクロアレイ網羅的発現解析、リアルタイム PCR 解析、免疫組織化学を用いて、中皮腫で高い発現を示す分子を同定する。小分子化合物ライブラリーのスクリーニングし、ノックアウト株特異的に細胞増殖抑制効果を示す化合物を探索する。

4. 研究成果

(1) cDNA マイクロアレイ網羅的発現解析とリアルタイム PCR 解析によって、NF2 ノックアウト株で高発現する遺伝子として FGF 受容体 2 を同定した。FGF 受容体 2 抗体を用いた組織アレイ解析では、中皮腫 23 検体中で 9 検体が陽性を示し、FGF 受容体 2 が診断バイオマーカーのための有望な候補であることを示した。

(2) NF2/p16 ダブルノックアウト細胞株を樹立し、CD24 遺伝子が特異的に高発現していることを見出した。CD24 抗体を用いた組織アレイ解析では、中皮腫 45 検体中で 34 検体が陽性を示し、FGF 受容体 2 と共に CD24 が新たな診断バイオマーカーの有力な候補であると考えられた。

(3) ダブルノックアウト細胞株を用いて 400 個小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンが特異的な細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。セルレニンは、化学療法剤であるシスプラチンやベネトレキセドと比較して、ダブルノックアウト中皮腫細胞株に対して有意に細胞生存率の低下を示した。セルレニンは、コントロールと比較して、ダブルノックアウト中皮腫細胞株を免疫不全マウスに移植した造腫瘍能実験において、有意に腫瘍増殖能を低下させた。セルレニンは、悪性胸膜中皮腫に対する分子標的薬の有望な候補になると考えられた。

業績

1. Wahiduzzaman M, Karnan S, Ota A, Hanamura I, Murakami H, Inoko A, Rahman ML, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y. Establishment and characterization of CRISPR/Cas9-mediated NF2-/- human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci*. 2019 Jan;110(1):180-193.
2. Sivasundaram Karnan, Akinobu Ota, Hideki Murakami, Md Lutfur Rahman, Muhammad Nazmul Hasan , Md Wahiduzzaman , Ichiro Hanamura , Lam Quang Vu , Akihito Inoko , Toshinori Hyodo , Hiroyuki Konishi , Shinobu Tsuzuki, Yoshitaka Hosokawa Identification of CD24 as a potential diagnostic and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. *Cell Death Discov*. 2020, 18:127-
3. Sivasundaram Karnan, Akinobu Ota, Hideki Murakami, Md. Lutfur Rahman, Md Wahiduzzaman, Muhammad Nazmul Hasan, Lam Quang Vu, Ichiro Hanamura, Akihito Inoko, Miho Riku³, Hideaki Ito, Yoshifumi Kaneko, Toshinori Hyodo, Hiroyuki Konishi, Shinobu Tsuzuki¹, Yoshitaka Hosokawa¹*CAMK2D: A Novel Molecular Target for *BAP1*-Deficient Malignant Mesothelioma. *Cell Death Discov*. 2023 in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akira Koshino , Aya Nagano , Akinobu Ota , Toshinori Hyodo, Akane Ueki , Masayuki Komura , Akane Sugimura-Nagata , Masahide Ebi , Naotaka Ogasawara , Kenji Kasai , Yoshitaka Hosokawa , Kunio Kasugai , Satoru Takahashi , Shingo Inaguma	4. 巻 12
2. 論文標題 Phosphorylation and Suppresses Migration and Invasion With CDH1 Stabilization in Colorectal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01978-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S Karnan , I Hanamura , A Ota , S Takasugi , A Nakamura , M Takahashi , K Uchino , S Murakami , Md Wahiduzzaman , L Q Vu , Md L Rahman , M N Hasan , T Hyodo , H Konishi , S Tsuzuki , K Yoshikawa , S Suzuki , R Ueda , Mi Ejiri , Y Hosokawa , A Takami	4. 巻 7
2. 論文標題 CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00446-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Md Lutfur Rahman , Toshinori Hyodo , Muhammad Nazmul Hasan , Yuko Mihara , Sivasundaram Karnan , Akinobu Ota , Shinobu Tsuzuki , Yoshitaka Hosokawa , Hiroyuki Konishi	4. 巻 41
2. 論文標題 Flow cytometry-based quantification of targeted knock-in events in human cell lines using a GPI-anchor biosynthesis gene PIGP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20212231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KarnanS, Ota A, Murakami H, Rahman ML, Hasan MN, Wahiduzzaman MD, Hanamura I, Vu LQ, Inoko A, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of CD24 as a potential diagnostic and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 127-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-020-00364-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wahiduzzaman M, Karnan S, Ota A, Hanamura I, Murakami H, Inoko A, Rahman ML, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of CRISPR/Cas9-mediated NF2-/- human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 180-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	太田 明伸 (Ota Akinobu) (30438048)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

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