

令和元年6月17日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07141

研究課題名(和文) 分子標的を用いた癌早期発見と癌二次予防の前臨床研究

研究課題名(英文) Early detection and secondary prevention of cancers using a molecular target

研究代表者

高橋 淳 (Takahashi, Atsushi)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：80303840

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)：腫瘍促進因子FEATを血中で検出して癌を早期発見し、FEAT阻害薬で癌を予防する方法論を着想した。FEAT欠失で発癌が抑制されるか検証するために、コンディショナル・ノックアウトマウス作出を試み、RENKA ES細胞を用いてヘテロ接合型Mettl13(flox/+)マウス作成まで成功した。並行した基礎研究で、FEATが精巣ライディッヒ細胞において一次繊毛形成を抑制してINSL3産生を亢進し、精巣下降を駆動することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1970年代以来の癌関連遺伝子の研究は、癌の診断や治療のみならず、正常組織の機能を分子レベルで明らかにすることにも役立ってきた。停留精巣(停留睾丸)は、新生児の先天異常の中で最も頻度が高く、精子形成不全、不妊症の原因となり、悪性腫瘍(癌)の母地となる。しかし、その分子機構はほとんどわかっていない。当研究は腫瘍促進因子FEATの研究から、停留精巣の分子機構に光を当て、小児の健康に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：FEAT tumor promoter, encoded by the METTL13 gene, is overexpressed in most human cancers and circulates in the bloodstream of cancer patients. We explored the possibility of applying FEAT expression to early diagnostics and secondary cancer prevention strategies. We did not succeed in producing conditional FEAT knockout mice using ordinary ES cells. However, RENKA ES cells of TransGenic Inc. have enabled us to obtain Mettl13(flox/+) mice. We also found that FEAT inhibits primary cilia formation, facilitates INSL3 production, and supports transabdominal testis migration in vivo.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌予防 癌早期発見 遺伝子改変マウス METTL13 ライディッヒ細胞 停留精巣

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌化の早期から癌細胞は全身に転移している。複雑・不均一で抗癌剤に耐性の癌が成立する前の段階での癌予防が求められ、方法論が模索されている。

我々は *METTL13* 遺伝子にコードされる腫瘍促進因子 FEAT タンパクがほとんどのヒト癌の細胞質で異常に増加し、患者の血中に漏出していることを見出した。この発見に基づいて、血中 FEAT を高感度で検出して癌化を早期発見し、FEAT 活性を阻害する薬剤で癌化を停止する方法論を着想した。

2. 研究の目的

癌予防戦略の進展を目ざし、以下の三点を目的とする。

- (1) 遺伝子改変マウスを用いて、FEAT を標的とした癌予防の妥当性を検証する。
- (2) 血中 FEAT の高感度検出技術を開発する。
- (3) FEAT 阻害剤を同定し、癌化を早期に停止させる薬剤の開発を目ざす。

3. 研究の方法

(1) FEAT の欠失で発癌が抑制されるかを明らかにするために、コンディショナル・ノックアウトマウスを作成する。このマウスを *Mob1a/1b* 部分欠損マウスと交配し、組織特異的 Cre 発現マウスを交配して、FEAT および *Mob1a* を Cre リコンビナーゼで組織特異的に欠損させた場合に、発癌が FEAT 欠損によって抑制または遅延されるか検討する。

(2) 癌化を早期発見するために、血中 FEAT を高感度で検出するキットを開発する。多検体処理を可能にするために、メーカーとの共同研究で、自動化 ELISA キットを作製する。日本多施設共同コホート研究からの支援を要請し、保存された生体試料（血清、血漿など）の提供を受ける。キットを用いて血中 FEAT 濃度を調べ、高感度血中 FEAT 測定系が癌の早期発見のためのツールとなりうるか、妥当性を考察する。

(3) FEAT 結合タンパクを GST 融合タンパクとして大腸菌に発現して精製し基質として用いて、FEAT 酵素活性アッセイキットを作成する。これを用いて、京都大学大学院医学研究科の医学研究支援センター「創薬拠点コアラボ」の化合物ライブラリーをスクリーニングして、阻害物質を同定する。毒性試験を行い、重篤な毒性の無い FEAT 阻害剤が得られたら、それを *Mob1a/1b* 部分欠損マウスに投与し、組織特異的 Cre 発現マウスと交配して発癌を誘導し、薬剤による発癌抑制効果を調べる。

4. 研究成果

(1) International Mouse Phenotype Consortium (IMPC) の Knockout-Mouse Program (KOMP) よりターゲティングベクターを購入し、がん研究ネットワークメンバーに対する「個体レベルでのがん研究支援活動」の支援を得て、マウス ES 細胞に導入し、240 個の neo 耐性 ES 細胞を拾い上げ、PCR で 27 クローンが陽性で、サザンブロットティングで 4 クローンの相同組換え ES 細胞を同定した。ゲノムを、PCR 及び outside, inside, neo probe を用いた確認のためのサザン・ブロットティングで解析し、2 クローンを選別した。

文部科学省新学術領域「先端モデル動物プラットフォーム」の支援を得て、2 クローン (#7, #144) の ES 細胞をマウス胚盤胞期胚へ注入し、仮親の子宮へ移植して、キメラ率 5-10% のオスのキメラマウス (#7, 7 匹、#144, 3 匹) を得た。精子を人工授精で正常 C57BL/6 系統と交配したが、#7 系統より生まれた 441 匹、#144 系統より生まれた 183 匹は全てブラックで、agouti は 1 匹も得られなかった。原因は ES 細胞の質が低いためと考えられた。

この技術的問題を克服するために、株式会社トランスジェニックに受託し再挑戦した。生殖系列移行効率がよく戻し交配 (backcross) の不要な RENKA 株の ES 細胞を用い、相同組換えの起った ES 細胞を選別し、凝集法によりキメラマウスを得た。キメラマウスを自然交配し、雌雄のヘテロ接合型 (*Mett113^{lox/+}*) マウス取得を確認し、凍結胚を保存した。

今後、ヘテロ接合型マウスの雌雄を交配してホモ接合型マウスを得る。ヘテロ接合型と *Mob1a/1b* 部分欠損マウスとを交配して、ダブル・コンディショナル・ノックアウトマウスを作成する。組織特異的 Cre 発現マウスと交配することで、種々の組織における発癌が、FEAT 欠失で抑制されるか明らかにしたい。

FEAT (*Mett113*) ノックアウトマウス作成は、*Mett113^{-/-}* マウスが不妊で成功しなかった。雄の *Mett113^{-/-}* マウスに両側性の腹腔内停留精巣 (intraabdominal cryptorchidism) を認め、精巣の異常が示唆された。そこで、精巣組織アレイの免疫組織化学染色およびマウス精巣組織の免疫蛍光染色を行い、FEAT が精巣の胎仔型および成獣型のライディッヒ細胞 (fetal and adult Leydig cells) において発現していることを見出した。

MA-10 ライディッヒ細胞株での proximity ligation assay (PLA) で、FEAT が一次繊毛 (primary cilium) の制御因子である Ezrin, Rab8a および Septin 2 タンパクと相互作用することがわかった。そこで、siRNA で FEAT タンパクを低下させると、MA-10 細胞で一次繊毛が増加し、5' アデノシンーリン酸活性化タンパク質キナーゼ (AMPK) 活性が上昇し、insulin-

like factor 3 (INSL3) 発現が低下した。FEAT はライディッヒ細胞で、一次繊毛を減少し、AMPK 活性を低下させ、INSL3 タンパクを増加すると考えられた。

免疫組織化学染色で、*Mett113*^{+/+}マウスのライディッヒ細胞の INSL3 タンパクが著減していた。以上の結果から、FEAT がマウス精巣の胎仔型ライディッヒ細胞において INSL3 産生を促進し、腹腔内精巣下降 (transabdominal testis migration) を可能にすることが示唆された。

(2) コールドショック発現系 pCold II ベクター (Takara) を使い、大腸菌 Chaperone Competent BL21 Cell (Takara) に FEAT を発現させ、テトラサイクリンと IPTG の濃度を最適化した結果、可溶性の His タグ融合 FEAT を得た。非変性条件で Co²⁺ レジンよりも Ni²⁺ レジンに結合しやすいとがわかり、TALON Metal Affinity Resin (Clontech) から Ni-NTA Agarose (Qiagen) に変更し、精製条件を再検討した。

多数の ELISA キットを作出するために、抗 FEAT モノクローナル抗体の作成を試みたが、予算が不足し計画が中断した。

(3) 最近、FEAT の 2 つのメチル転移酵素ドメインのうち、N 端側のドメインが eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) の Lys55 をメチル化し、C 端側のドメインが eEF1A の N 末端をメチル化することが報告され (Jakobsson, Nat. Commun. 2018; 9: 3411)、阻害剤開発への道が開かれた。組換え eEF1A を基質とし、精製した FEAT の N 側断片と C 側断片を酵素として用いる FEAT 酵素活性アッセイ系を樹立する計画に切り替え、準備中である。

癌二次予防の前臨床研究として橋渡し研究を開始したが、コンディショナル・ノックアウトマウス作成や技術開発が十分進まなかった一方で、FEAT の生体レベルでの機能に関する基礎研究が進んだ。停留精巣 (停留睾丸) は、新生児の先天異常の中で最も頻度が高い。遺伝子が停留精巣に関与する可能性は、臨床応用面で重要な知見であろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Li Y, Kobayashi K, Murayama K, Kawahara K, Shima Y, Suzuki A, Tani K, Takahashi A: FEAT enhances INSL3 expression in testicular Leydig cells. *Genes Cells*. 査読有 2018; 23(11): 952-962. doi: 10.1111/gtc.12644
- ② 高橋 淳: (第 6 回 TOBIRA 研究助成奨励賞) 分子標的を用いた網羅的癌早期発見. *実験医学* 査読無 2018; 36 (18): 3106. (https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/em_adv/9784758125130/images/9784758125130-d3106.jpg)
- ③ Hijikata Y, Okazaki T, Tanaka Y, Murahashi M, Yamada Y, Yamada K, Takahashi A, Inoue H, Kishimoto J, Nakanishi Y, Oda Y, Nakamura Y, Tani K: A phase I clinical trial of RNF43 peptide-related immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors. *PLoS One*. 査読有 2018; 13(1): e0187878. doi: 10.1371/journal.pone.0187878
- ④ Sakamoto C, Kohara H, Inoue H, Narusawa M, Ogawa Y, Hirose-Yotsuya L, Miyamoto S, Matsumura Y, Yamada K, Takahashi A, Tani K: Therapeutic vaccination based on side population cells transduced by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene elicits potent antitumor immunity. *Cancer Gene Ther*. 査読有 2017; 24(4): 165-174. doi: 10.1038/cgt.2016.80.
- ⑤ Li Y, Kobayashi K, Mona MM, Satomi C, Okano S, Inoue H, Tani K, Takahashi A: Immunogenic FEAT protein circulates in the bloodstream of cancer patients. *J. Transl. Med*. 査読有 2016; 14(1): 275. DOI: 10.1186/s12967-016-1034-2
- ⑥ Murahashi M, Hijikata Y, Yamada K, Tanaka Y, Kishimoto J, Inoue H, Marumoto T, Takahashi A, Okazaki T, Takeda K, Hirakawa M, Fujii H, Okano S, Morita M, Baba E, Mizumoto K, Maehara Y, Tanaka M, Akashi K, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda T, Tamura K, Nakamura Y, Tani K: Phase I clinical trial of a five-peptide cancer vaccine combined with cyclophosphamide in advanced solid tumors. *Clin. Immunol*. 査読有 2016; 166-167: 48-58. DOI: 10.1016/j.clim.2016.03.015

[学会発表] (計 5 件)

- ① Li Y, Takahashi A: FEAT downregulates primary cilia formation and enhances INSL3 expression in testicular Leydig cells. Gordon Research Conference on Cell Death, 2018.
- ② Li Y, Takahashi A: FEAT は精巣ライディッヒ細胞において一次繊毛形成を抑制し INSL3 産生を亢進する. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018.
- ③ 高橋 淳, 成松 孝, 小西 珠貴, 川口 学永: 合併症を有する悪性リンパ腫の治療例. 第 64 回日本矯正医学会総会, 2017.

- ④ Li Y, Takahashi A:腫瘍促進因子 FEAT の免疫原性の検討と癌患者血漿での検出. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.
- ⑤ Li Y, Takahashi A: Antiapoptotic FEAT tumor promoter modifies cell polarity. Gordon Research Conference on Cell Death, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：李 妍

ローマ字氏名：(LI, yan)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。