

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09004

研究課題名（和文）非ウイルス性慢性炎症に伴う発癌メカニズムの解明と早期血清診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of detection methods of early cancers with chronic inflammation by non-viral mechanism

研究代表者

松下 一之（Matsushita, Kazuyuki）

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90344994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では慢性炎症刺激による発癌動物モデルと臨床検体の解析を行い、Wntシグナルの活性化とFIRの機能異常の関連性に着目した。種々の癌患者（千葉大学医学部附属病院通院中）の血清中のFIR exon2に対する自己抗体の検出系を確立してFIRスプライシング変異を指標とした新しい癌診断法の一助にすることをを行った。具体的には、精製されたFIR exon2（513アミノ酸）の全長タンパク質を抗原を精製した。事前に文書による同意を得た種々の癌患者（千葉大学医学部附属病院における治療等により通院中の患者）と健常者（コントロール）血清を用いて、FIR exon2に対する自己抗体を検出し論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では慢性炎症刺激による発癌のカギ分子となる候補として、FIRの機能異常に着目して検討を行った。種々の癌患者（千葉大学医学部附属病院通院中）の血清中のFIR exon2に対する自己抗体が検出されることを確認し、新しい癌診断法の開発を行った。FIR exon2（513アミノ酸）の全長タンパク質を抗原を精製した。癌患者と健常者血清を用いて、抗FIR exon2自己抗体が検出可能であり論文報告した。ヒト胃癌組織ではp-ERK、FBW7、E-cadherinの発現変化が炎症から癌化への形質転換に重要であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：FIR, a splicing variant of the PUF60 gene, is a transcriptional repressor of c-myc. Previously, large-scale SEREX (serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning) screenings have identified anti-FIR auto-antibodies in the sera of cancer patients. In the present study, we revealed the presence and significance of anti-FIR (FIR/FIR exon2) antibodies (Abs) in the sera of patients with gastric cancer (GC). Our results were validated by performing an Alpha-LISA (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) using sera of patients with various cancers types. We revealed that anti-FIR exon2 Ab had higher sensitivity than anti-FIR Ab. ROC (receiver operating curve) analysis was performed for evaluating the use of anti-FIR exon2 Ab as candidate markers such as CEA and CA19-9, and the highest area under the ROC analysis was observed in combination of anti-FIR exon2 Ab and CEA.

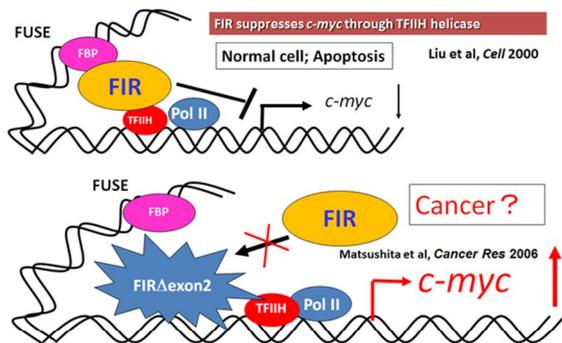
研究分野：臨床検査医学、臨床遺伝、ゲノム医療

キーワード：がんバイオマーカー 慢性炎症 発がん

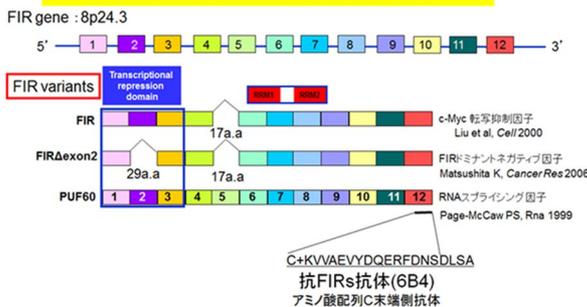
1. 研究開始当初の背景

Far-upstream element-binding protein-interacting repressor (FIR)は炎症と癌化に共通する活性化された Wnt シグナルを集約する *c-myc* 遺伝子の発現調節に重要であることを我々は研究してきた。このような着眼は世界でもほとんど行われていないきわめてユニークな研究である。これまでに Wnt と PGE2 (ProstaglandinE2) 双方の活性化により、炎症反応依存的な低悪性度胃癌病態モデル (Gan マウスモデル: K19-Wnt1/C2mE × FIR+/-マウス) の作製に成功し 100% の非浸潤性の胃腫瘍 (高分化腺癌) の発生を認めている。ヒト胃癌組織との比較から胃癌の悪性化、間質の線維化や浸潤に関わる標的遺伝子 (マイクロアレイ) やタンパク質群 (プロテオーム) を同定し FBW7 (タンパク質ユビキチン化酵素) や E-cadherin の発現増大が癌の浸潤に重

FIR Δexon2 の拮抗阻害 (ドミナントネガティブ) 効果



FIRのスプライシングバリエント



要である。

(1) Gan マウスや NASH 肝がん発癌モデルマウスなどの慢性炎症により発癌するメカニズムをタンパク質、遺伝子レベルの解析で検討する。そのための設備や人材などの研究体制は全てそろっている。すぐに研究開始可能である。

(2) TP53 ホモ欠失マウスでは急性リンパ性白血病 (T-ALL) が発症する。TP53 ホモ欠失と FIR+/- の複合変異マウスは T-ALL の臓器浸潤や骨髄浸潤が有意に多い。従って TP53 変異が先行する T-ALL では FIR の機能不全は臓器浸潤に寄与していることが示唆される。

(3) 中枢性摂食調節に重要な役割を果たすメラノコルチン 4 型受容体の欠損マウス

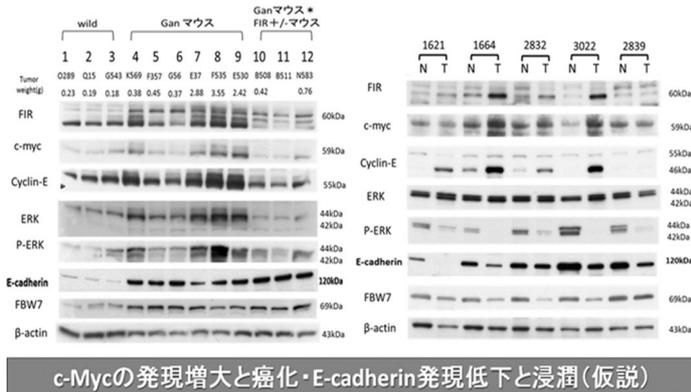
(MC4R-KO マウス) に高脂肪食を負荷すると、NASH 様肝病変と多発性の肝細胞癌を発症する。すでに動物モデルの系は確立し千葉大学医学部の動物施設で維持しており本実験 (NASH による炎症肝がん発癌モデル) のマウスを用いた動物実験は同施設で使用して行った。

2. 研究の目的

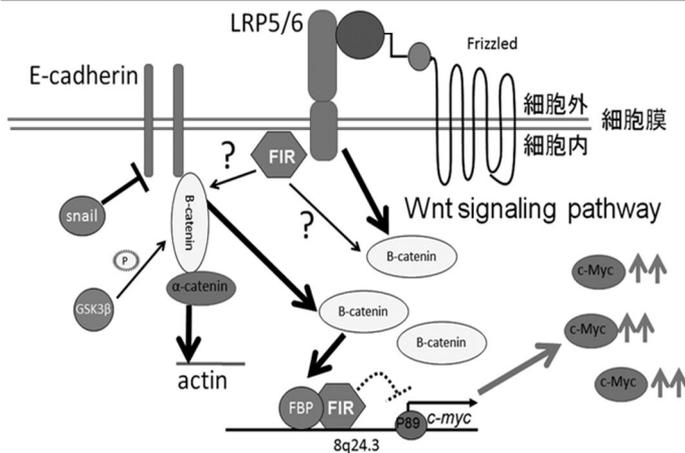
非ウイルス性の慢性炎症が癌化を誘導するメカニズムは未解明の点が多い。我々は *c-myc* 遺伝子転写抑制因子 FIR (Far-upstream element-binding protein-interacting repressor) (別名 PUF60) が Wnt シグナル (*c-myc* 遺伝子の発現増大をもたらす) の活性化からみた発癌機序や早期診断法の確立を目指す。消化器癌では FIR の転写抑制部位の exon 2 を欠損したスプライシング変異 (FIR exon 2) が発現し、ドミナントネガティブ効果により *c-myc* 遺伝子の転写が活性化している。一方悪性腫瘍が合併する自己免疫疾患患者 (シェーグレン症候群や皮膚筋炎) 血清中に抗 PUF60/FIR 自己抗体が見いだされた。すなわち慢性炎症と癌では Wnt シグナル経路が共通して活性化している。本研究では Wnt シグナルに注目して、非ウイルス性の慢性炎症刺激に基づく発癌メカニズムをマウスモデル (Gan マウス) と臨床検体を用いて明らかにし、抗 FIRs 自己抗体の検出系を確立して自己免疫疾患に合併する早期発癌の新規癌診断法の一助にすることを目的とした。

3. 研究の方法

Gan マウスに発生する胃腫瘍の腫瘍増殖スピード、発生頻度、組織型、浸潤を調べた。マウス胃腫瘍組織とヒト胃癌組織から蛋白質を抽出して western blot 分析を行ってタンパク質発現変化を調べた。さらに、癌細胞 (HeLa cell) でそれぞれ FIR, SAP155, hnRNPA1 siRNA

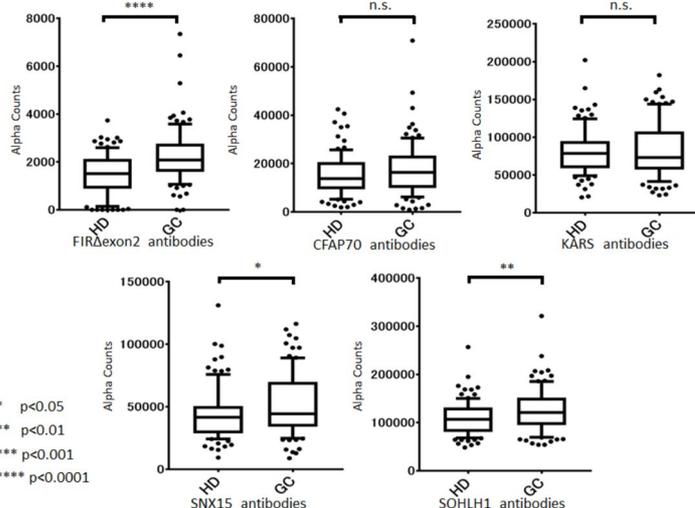


c-Mycの発現増大と癌化・E-cadherin発現低下と浸潤(仮説)



transfection と抗癌剤 (シスプラチン) 処理を行って western blot と qRT-PCR によりタンパク質発現変化を調べる。E-cadherin は細胞接着をつかさどる分子であり細胞と細胞の接着の形成と癌の浸潤や転移に関わる。結腸癌では FBW7 の上皮間葉転移 (EMT) によって転移過程と関係あることが報告されている。そこで p-ERK, FBW7, E-cadherin のタンパク質発現変化が今回検討したマウス胃腫瘍が浸潤しない一因かもしれないと考えられる。本研究の仮説を証明するために培養細胞を用いて、非浸潤性の低悪性度胃癌が 100% 発症する Gan マウスモデルを用いて、FBW7 や E-cadherin の発現減少と癌細胞の浸潤能を検討した。K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse と FBW7 や E-cadherin の発現が減少されたマウスモデルを交配させてタンパクレベルで発現変化を調べる胃腫瘍が浸潤するかどうかを観察した。分子メカニズムの解明のために、胃癌細胞株を使って FBW7 や E-cadherin の siRNA transfection を行って癌の浸潤や転移に関するタンパク質発現変化をウエスタンブロット法により調べた。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義。本研究は多くのこれまでの研究成果に基づくものであり、かつ世界的にもユニークなものである。独自性は



極めて高い。本研究により新しい早期がん診断や治療標的となる分子が同定されることが期待できる。

4. 研究成果

(1) Gan マウスを用いた慢性炎症と Wnt シグナルの活性化による胃癌発癌機序を調べた。

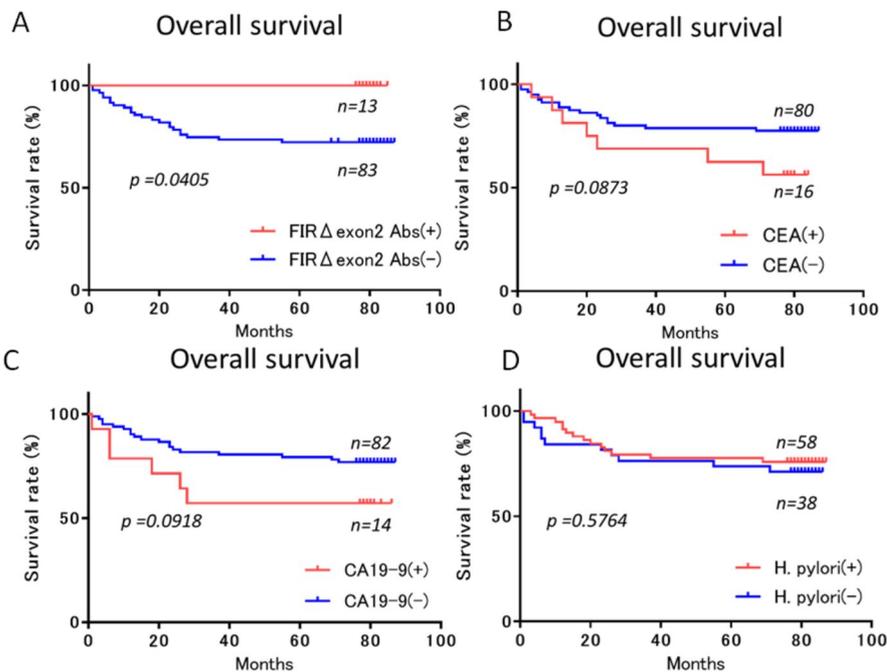
Gan マウスに発生する胃腫瘍 (非浸潤性) とヒト胃癌組織を用いた検討では、p-ERK, FBW7, E-cadherin のタンパク質発現変化が大きく異なっていた。本研究の成果の一部を

もとにタンパク質変化が Wnt シグナルに与える影響について詳しく調べ論文報告した (引用文

献)

(2) 抗 FIR/FIR exon2 自己抗体の消化器がんや自己免疫性疾患患者における検出

種々の消化器癌患者においても、ステージ別に抗 FIR/FIR exon2 自己抗体を有する割合を調べる。これまでの基礎的な検討では、早期癌患者では 2/13(15.4%)例、進行癌患者では 0/9(0%)であった。こちら、抗 FIR/FIR exon2 自己抗体は従来の血清腫瘍マーカーと比較して早期癌で検出率が高いことが示唆される。さらに悪性腫瘍の合併が知られている、シェーグレン症候群や皮膚筋炎の患者血清中の抗 FIR/FIR exon2 自己抗体を調べて、悪性腫瘍の合併との関連を調べた。悪性腫瘍の合併の多いシェーグレン症候群や皮膚筋炎の患者血清中の抗 FIR/FIR exon2 自己抗体が胃がん患者の血清中に検出されるかを調べ論文として報告した(引用文献)。本成果は世界で初めて悪性腫瘍の患者血清中に抗 FIR/FIR exon2 自己抗体が検出されることを示したものである。



<引用文献>

Ailiken G, Kitamura K, Hoshino T, Satoh M, Tanaka N, Minamoto T, Rahmutulla B, Kobayashi S, Kano M, Tanaka T, Kaneda A, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Post-transcriptional regulation of BRG1 by FIR exon2 in gastric cancer. *Oncogenesis*. 2020 Feb 18;9(2):26. doi: 10.1038/s41389-020-0205-4. PMID: 32071290; PMCID: PMC7028737

Kobayashi S, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, Hoshino T, Minamoto T, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Anti-FIR exon2, a splicing variant form of PUF60, autoantibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019 Jun;110(6):2004-2013. doi: 10.1111/cas.14024. Epub 2019 May 20. PMID: 30980774; PMCID: PMC6549911

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 7件）

1. 著者名 Kobayashi Sohei, Hiwasa Takaki, Ishige Takayuki, Rahmutulla Bahityar, Kano Masayuki, Hoshino Tyuji, Minamoto Toshinari, Shimada Hideaki, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 110
2. 論文標題 Anti FIR exon2, a splicing variant form of PUF 60, autoantibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2004-2013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14024	査読の有無 無
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 Kobayashi S, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, Hoshino T, Minamoto T, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Anti-FIR exon2, a splicing variant form of PUF60, auto-antibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14024.	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 -

1. 著者名 Ogura Yukiko, Hoshino Tyuji, Tanaka Nobuko, Ailiken Guzhauer, Kobayashi Sohei, Kitamura Kouichi, Rahmutulla Bahityar, Kano Masayuki, Murakami Kentarou, Akutsu Yasunori, Nomura Fumio, Itoga Sakae, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Disturbed alternative splicing of FIR (PUF60) directed cyclin E overexpression in esophageal cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 22929-22944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25149	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 -

1. 著者名 Kobayashi Sohei, Hiwasa Takaki, Arasawa Takahiro, Kagaya Akiko, Ishii Sayaka, Shimada Hideaki, Ito Masaaki, Suzuki Masae, Kano Masayuki, Rahmutulla Bahityar, Kitamura Kouichi, Sawabe Yuji, Shin Hideo, Takiguchi Masaki, Nomura Fumio, Matsubara Hisahiro, Matsushita Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of specific and common diagnostic antibody markers for gastrointestinal cancers by SEREX screening using testis cDNA phage library	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 18559-18569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24963	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 -

1. 著者名 Asako Kimura, Kouichi Kitamura, Guzhauer Ailiken, Mamoru Satoh, Toshinari Minamoto, Nobuko Tanaka, Fumio Nomura, Kazuyuki Matsushita	4. 巻 8
2. 論文標題 <i>FIR</i> haplodeficiency promotes splicing to pyruvate kinase M2 in mice thymic lymphoma tissues revealed by six-plex tandem mass tag quantitative proteomic analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 67955-67965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.19061	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 -

1. 著者名 松下 一之	4. 巻 263
2. 論文標題 【臨床検査の最前線-将来の検査を展望する】 総論 臨床検査の将来 ゲノム解析技術の進歩と臨床検査への応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 991-998
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 無
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 -

1. 著者名 小林 崇平, 松下 一之, 日和佐 隆樹	4. 巻 32
2. 論文標題 新規腫瘍マーカーと術後モニタリングマーカー候補としての消化器癌患者血清における抗FIRs自己抗体の検出	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本分子腫瘍マーカー研究会誌	6. 最初と最後の頁 39
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 無
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 -

1. 著者名 Ailiken G, Kitamura K, Hoshino T, Satoh M, Tanaka N, Minamoto T, Rahmutulla B, Kobayashi S, Kano M, Tanaka T, Kaneda A, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K	4. 巻 19
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of BRG1 by FIR exon2 in gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogenesis.	6. 最初と最後の頁 26-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-020-0205-4	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 松下 一之
2. 発表標題 ゲノム医療新時代に向けて、病理部と臨床検査部の協調体制のあり方 がんゲノム医療における臨床検査部と病理部との連携
3. 学会等名 臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita and Takayuki Ishige.
2. 発表標題 The significance of genetic testing for the genetic counseling to Lynch syndrome and the at-risk pre-symptomatic family members.
3. 学会等名 The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours 2019. Kitchener Street, Auckland, New Zealand, March 21st, 2019.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita
2. 発表標題 Clinical tumor testing for precision cancer medicine in laboratory medicine
3. 学会等名 2nd International Symposium of MEXT Program "Fostering Health Professionals for Changing Needs of Cancer" Precision Cancer Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita and Sohei Kobayashi
2. 発表標題 Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies were detected in the sera of early-stage colon cancer patients. -Identification of specific and common diagnostic antibody markers for gastrointestinal cancers by SEREX screening using testis cDNA phage library
3. 学会等名 3rd International Cancer Study & Therapy Conference. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita
2. 発表標題 Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients.
3. 学会等名 Interenational conference on biomarker research in clinical medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita and Sohei Kobayashi
2. 発表標題 Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients.
3. 学会等名 Biomarker Research in Clinical Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyuki Matsushita.
2. 発表標題 Current condition and issues of clinical biobanks in Japan
3. 学会等名 Global Biobank Week, ISBER (Stockholm, Sweden) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 松下一之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 150
3. 書名 がんの臨床検査ハンドブック。がんと遺伝子検査「がん遺伝子パネル検査」	

1. 著者名 松下一之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 200
3. 書名 「がん遺伝子パネル検査」検体検査の品質・精度確保の基準の手引き。	

1. 著者名 宮地勇人、丸田秀夫、大西宏明、松下一之（分担執筆）。	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 228
3. 書名 検体検査の品質・精度確保の基準の手引き	

1. 著者名 山田俊幸、前川真人、東田修二、松下一之（分担執筆）。	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 256
3. 書名 がんの臨床検査ハンドブック	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 芳香環含有化合物並びに癌の予防剤および/または治療剤	発明者 松下一之、星野忠治 他	権利者 国立大学法人千 葉大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2014-110822	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

千葉大学医学部附属病院 検査部 https://www.ho.chiba-u.ac.jp/section/kensa/index.html 千葉大学医学部附属病院 遺伝子診療部 https://www.ho.chiba-u.ac.jp/section/idenshi/index.html

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	西村 基 (Nishimura Motoi) (80400969)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	星野 忠次 (Hoshino Tyuji) (90257220)	千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 (12501)	

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