

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590708

研究課題名（和文）温熱療法の分子基盤の解明-熱ショック誘導性新規蛋白質の解析を通して
 研究課題名（英文）Molecular basis of hyperthermia-through investigation into a newly identified heat-shock induced protein

研究代表者

中島 日出夫（NAKAJIMA HIDEO）

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00333394

研究成果の概要（和文）：

FAM107 ファミリー分子は進化の上で保存された分子であり、哺乳類は FAM107A と FAM107B の2つのサブタイプが存在し、FAM107A は癌抑制遺伝子の候補として多くの報告がなされている。我々は機能が知られていなかった FAM107B について、癌細胞で共通して発現が低下する熱ショック蛋白質の一種であることを証明し、HITS と命名した。HITS は腫瘍の増殖抑制効果を持つことから癌抑制遺伝子の候補と考えられ、他の熱ショック蛋白質が癌遺伝子であるのと対照的な、ユニークな機能を持った分子である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Family with sequence similarity 107 (FAM107) consists of two subtypes of FAM107A and B in mammals. Emerging data regarding FAM107A as a candidate tumor suppressor gene have been accumulated, although few biological information is available about the other FAM107 family protein, FAM107B. We have reported that FAM107B expression was downregulated in cancer and induced by heat-shock stimulation, and designated it as heat shock-inducible tumor small protein (HITS). Since forced expression of HITS inhibited tumor growth, HITS would be a potential tumor suppressor gene, which contrasts with previously described oncogenic activities of other heat shock proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：代替医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 温熱療法の歴史と現況

温熱療法は古来よりその有効性が伝えられ、古代ギリシャのヒポクラテスの文献にも見ることができ、日本でも湯治という形で、

腫瘍・創傷・神経疾患・循環器病・消化器病・リウマチをはじめとする免疫疾患など多種の病気に対してその効能を発揮してきた。19世紀に入って William B. Coley が微生物由来のワクチンで、発熱による腫瘍への治療効果を実証した。現在でも温熱療法は、神経疾患の症状緩和や癌治療の選択肢の一つとして医療に取り入れられ、その効果が期待されている。感覚的には、温熱療法によって血行の改善、神経再生、体力や免疫力の底上げなどが行われ、自然治癒力を向上させると理解されている。しかしながら、その分子機構や生体内での働きが依然として曖昧なために、補助療法として確固たる地位を築いてきたとは言い難い。

(2) 温熱療法の分子基盤

温熱療法の分子基盤として熱ショックに対する生体の応答が研究されてきた。熱ショックはストレス応答の一環として、遺伝子発現、DNA 損傷や蛋白質の変性などの方向から解析されてきて、熱ショック関連遺伝子のクローニングやその機能解析が進んでいる。なかでも中心的な役割を担うヒートショック蛋白質 (HSP) は、分子量を基準に5つのグループに分類されており、分子シャペロンとして多種多様な働きをしていることがわかっている。例えば、毒素、熱ショックや低酸素など各種ストレスに対する抵抗性の獲得、蛋白質の産生とフォールディングの介助、免疫系細胞に対する抗原提示機能などがその代表である。

本研究者は以前、MHC 分子を認識する免疫受容体群 (ILT family) に関する研究を行っていて、受容体群は抑制型 (免疫を制御) と活性型 (免疫を刺激) に分類されるが、熱ショックによって活性型受容体 (ILT-1) の転写が誘導されることを見出した (J Immunol 171: 6611-20, 2003)。これは熱ショックによる免疫活性化の分子基盤の一つと考えられ、温熱療法の分子機構に興味を抱くきっかけとなった。そこで、白血病 T 細胞に熱ショックを与えて DNA マイクロアレイの解析を行ったところ、興味深い新規の蛋白質を同定することができた。HITS (Heat-shock Induced Tumor Small protein) と命名したこの分子は、がん温熱療法や神経の発生・再生において重要な役割を果たしている可能性があり、その機能を明らかにするために研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の特色の一つは代替医療 (温熱療法) に分子のメスを入れることにある。がん温熱療法が 1990 年代に隆盛となってから衰退してきているのも、化学療法などと比べて分子基盤の脆弱さに問題があると考えられ

る。癌細胞は一般的にヒートショック蛋白質 (HSP) の発現が上昇していてアポトーシスやストレスに耐性となっており、なかでも HSP70 は癌細胞の増殖・悪性化機能を持つことが最近の話題となっている。しかし、本研究者の実験結果では、HITS は他の HSP とは逆に癌細胞での発現が極端に低く、加えて細胞増殖の抑制効果も持つことから、がん抑制遺伝子の候補と考えられた。このように、HITS は熱ショックで誘導されながらも、その発現・機能は一般の HSP と対極をなすものであり、ユニークな存在であると考えている。またデータベース検索上、HITS は動物種を越えて非常に良く保存された分子であることも判明しており、組織の中では神経系での発現が際立っていて、がん抑制効果だけではなく、神経の発生・再生などでも根幹をなす働きをしている可能性がある。そこで、本研究では *in vivo/in vitro*・組織・疾患・動物種などの枠にとらわれることなく研究の幅を広げていき、HITS という分子を通して温熱療法本来の幅広い効能を分子レベルでとらえることに意義を見いだすこととした。

3. 研究の方法

(1) HITS の病理組織学的検討

HITS の mRNA の発現から、組織学的に神経系の発生のごく初期の段階から HITS が発現し、癌化や神経変性疾患などの発症に伴って HITS の発現が急激に低下すると予想される。これを確認するために、作製した抗体を使用して免疫組織学的に、ヒトの疾患 (癌・神経変性疾患など) で HITS の発現がどうなっているのか、またマウスの発生の過程で組織分布がどのようになっているのか調べる。予備的な実験の結果、HITS は消化管や肺の腺上皮に発現が高いことが判明しており、代表的な胃癌・大腸癌の組織標本を集め、HITS の発現パターンを調べる。さらに他の癌種 (乳癌・肺癌・子宮癌など) にも広げて病理学的解析を行う。温熱療法後に摘出した検体を免疫染色し、また担癌マウス/ラットなどの個体に熱ショックを与えて腫瘍を摘出し、HITS の発現上昇が見られるか確認する。

(2) HITS の機能解析

HITS と相互作用する分子を酵母ツーハイブリッド/免疫沈降/プルダウンアッセイで同定して蛋白相互作用をもとにシグナル伝達系を解明し、HITS の遺伝子導入細胞・遺伝子ノックダウン細胞の作製とその機能解析と DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行う。熱ショック・酸化ストレス・放射線障害・抗がん剤による DNA 傷害など各種ストレスを細胞に与え、HITS からのシグナル伝達経路がどのように関与するか調べ、そのシグ

ナルによって細胞保護の方向に向かうのか、細胞死の方向に向かうのか明らかにする。また、HITS は細胞増殖抑制作用があることも予測され、細胞周期・細胞増殖シグナル・細胞死シグナルなどの経路との相関を調べる。さらに RNAi による HITS のノックダウンやレトロウイルスによる HITS の誘導発現系 (Tet-ON) を使って、癌化・癌の増殖・転移/浸潤能の獲得などに HITS の発現がどのように影響を与えているのか明らかにする。

(3) 個体レベルでの HITS の解析

in vivo の系では、HITS 遺伝子の誘導発現系 (Tet-ON) やノックダウン細胞等をヌードマウスや SCID マウスに移植して、癌の増殖に対する HITS の働きを病理組織学的に解析する。

ショウジョウバエを使って HITS の遺伝子操作を個体レベルで行い、生体で根幹をなす働きを解明する。ショウジョウバエにおける HITS の相同遺伝子 (CG9328) の mRNA の発現は、成虫の脳と神経節で極めて高い発現を示しており、さらに胚の成長過程では神経系の発生の時期に一致して高い発現を示している。CG9328 の遺伝子発現を GAL4-UAS の系で操作し、その発現調節 (強制発現やノックダウン等) を神経系 (elav-GAL4)、眼 (GMR-GAL4)、全身 (tublin-GAL4) など組織特異的に行って、その表現型を解析する。また、疾患モデル (癌化や神経変性疾患) の系とも交配させて、CG9328 の発現がどのような影響を与えるか解析する。ショウジョウバエの場合、個体に酸化ストレスや熱ショックなどを与えることも容易であるため、HITS を欠損した個体があるようなストレスにどう対応するのか明らかにする。

4. 研究成果

(1) 癌組織における HITS の発現低下

抗 HITS 抗体 (ウサギポリクローナル抗体) が作製済みであり、それを利用して各種組織における免疫染色を行い、癌化との関連を病理組織学的に調べた。HITS は核に局在する蛋白であり、広汎な組織に発現し、消化管組織においては、大腸癌への多段階進展過程 (正常粘膜→腺腫→癌) の経過に伴って HITS の発現量が段階的に低下し、また、胃癌をその主要な組織型別に解析したところ、腸型癌では HITS の発現量が顕著に低下しているのに対して、びまん型癌では低下していないことが判明した。胃癌・大腸癌に共通する組織亜系である粘液癌では HITS の発現は陽性であった (次表)。

組織アレイを用いて大規模スクリーニングを行った結果、癌化に伴った HITS の発現低下が、消化管以外に甲状腺・乳腺・肺・子

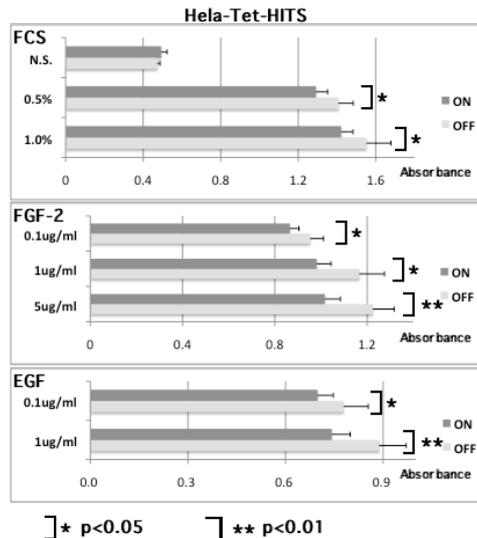
宮頸部・精巣など複数の臓器で見られた。さらにそれぞれの臓器に対する組織アレイを用いて統計学的解析を施行した結果、病理学的ステージ分類など複数のパラメータに対して HITS 発現との相関関係が得られた (論文作成中)。

胃・大腸腫瘍における HITS の発現

器官	腫瘍型	組織型*	例数	腫瘍中の HITS の発現		
				陽性	減弱	陰性
結腸・直腸	管状腺腫		22	13 (59%)	8 (36%)	1 (5%)
		腺癌	14	0 (0%)	7 (50%)	7 (50%)
		33	1 (3%)	13 (39%)	19 (58%)	
	粘液性	4	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	
	未分化型	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
胃	腺癌	腸型	22	1 (3%)	9 (41%)	12 (55%)
		びまん型	12	10 (83%)	2 (17%)	0 (0%)
	粘液性	2	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

*組織型は WHO 分類による
胃癌の腸型とびまん型の混合型は除いた

(2) HITS の癌細胞増殖抑制機能



上図のごとく、Tet-ON システムによる誘導発現系を用いた実験で、癌細胞に HITS を *in vitro* で強制発現させる (ON) と増殖因子に対する応答性が低下して細胞増殖の抑制が見られた。さらに SCID マウスにこの細胞を移植し、テトラサイクリンを飲水中に入れて *in vivo* で HITS を誘導発現させても腫瘍の増殖抑制効果が確認された。

(3) ショウジョウバエの遺伝子改変体の表現型

ショウジョウバエにおける HITS の相同遺伝子 (CG9328) を強制発現させたトランスジェニックとノックダウンさせた系統をそれぞれ数ライン作製し、実験に使用した。いずれも GAL4-UAS の系によって発現が調整されており、GAL4 を全身に発現する tublin-GAL4 や眼に発現する GMR-GAL4 などと交配させる事で、HITS の発現を組織特異的にコントロールする事が可能となった。その結果、tublin-GAL4 によって HITS を全身に強制発現すると、体毛や羽に異常が出て、パラコートによる酸化ストレス/熱ショックによるストレスに対して耐性が低下する事が判明した。一方、ノックダウンの系では発生やストレス耐性に対しての異常は観察されなかったが、疾患モデル (癌化) である oncogenic Ras85DV12 を眼に特異的に発現させた系統と交配させると、Ras85DV12 による眼の変性がレスキューされる事が観察された (下図)。従って、癌化と HITS との遺伝学的相関を *in vivo* で証明することができた。

Ras85DV12



Ras85DV12
x HITS knockdown



一方、神経変性疾患-自閉症のモデルであるユベキチンリガーゼ Ube3a の変異を眼に発現させた系統と交配した結果、HITS を強制発現する事により約 50% で眼の変性をレスキューする事ができ、HITS と神経変性疾患との遺伝学的相関を証明する事ができた (下図)。

Ube3a x GMR-GAL4



Ube3a x GMR-GAL4
x HITS



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1件)

- ① Nakajima H, Koizummi K, Minamoto T, Motoo Y (他 14 名、1&18 番目)
Induction of HITS, a newly identified family with sequence similarity 107 protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation.
International Journal of Oncology
37(3):583-593 (2010) 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 中島日出夫、元雄良治、小泉恵太 (他 5 名、1&2 番目)
Induction of HITS, a newly identified tumor suppressor protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation.
第 33 回日本分子生物学会年会
2010 年 12 月 8 日 神戸
- ② 中島日出夫、源利成、小泉恵太、元雄良治 (他 3 名、1&7 番目)
熱ショック誘導性新規がん抑制遺伝子の解析
第 21 回日本消化器癌発生学会総会
2010 年 11 月 18 日 軽井沢

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: HITS (FAM107B) を用いた癌の検査
発明者: 中島日出夫
権利者: 金沢医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-137406
出願年月日: 2010 年 6 月 16 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~cancer/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 日出夫 (NAKAJIMA HIDEO)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00333394

(2) 研究分担者

元雄 良治 (MOTOO YOSHIHARU)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80210095