

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07659

研究課題名（和文）疾患特異的スプライシングバリエントをターゲットにした乳がん治療・診断法の確立

研究課題名（英文）Development of new therapeutics and diagnostics for breast cancer targeting specific alternative splicing variants

研究代表者

眞田 文博（Sanada, Fumihito）

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30722227

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）：細胞外マトリックス蛋白であるペリオスチンは様々ながん種において治療抵抗性と深く関わる。本研究ではペリオスチン、中でも特定のスプライシングバリエントが、がん微小環境形成に関与し、治療抵抗性を惹起することを明らかとした。また病態形成に関与するペリオスチンスプライシングバリエントをターゲットにした新規治療法の開発を目指し、特定のペリオスチンバリエント検出による診断法の開発を行った。これにより将来的な治療患者の選択または次のターゲット候補疾患を選定することが可能になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりがん特異的ペリオスチンバリエントの機能および腫瘍局所でのペリオスチン発現パターンが明らかとなり、これによりペリオスチン発現細胞の同定ならびにペリオスチン高値を示す患者群の特定が可能となる。ペリオスチンは多くの難治性がんで発現が亢進することが知られており、本知見により、がん特異的ペリオスチンバリエントの機能が明らかとなり、その発現解析が難治性がんの診断につながるため、学術的意義は大きい。がん特異的ペリオスチンバリエントの制御は難治性がんに対する治療法開発に進むため、社会的意義も伴う。

研究成果の概要（英文）：Periostin, an extracellular matrix protein, is associated with chemoresistance in various cancer types. In this study, we found that periostin, especially a specific splicing variant, is involved in the development of cancer microenvironment and induces chemoresistance. In order to develop a novel therapy targeting periostin splicing variants involved in pathogenesis, we developed a diagnostic method by detecting specific periostin variants. This will enable selection of patients for treatment or selection of the next candidate target disease in future.

研究分野：循環器 腫瘍

キーワード：選択的スプライシングバリエント ペリオスチン 治療抵抗性乳がん 慢性心不全

1. 研究開始当初の背景

ひとつの遺伝子から複数の産物を生み出す機構“選択的スプライシングバリエント”は多細胞生物の複雑な形態や細胞機能獲得を可能にするだけでなく、いくつかの病態形成に深く関わる。これまでに私たちは細胞外マトリックス蛋白、ペリオスチン(Pn)のC末端に存在するスプライシングバリエントの検討を一貫して行ってきた。Pn スプライシングバリエントの変化により、乳がん細胞は転移能、抗がん剤治療抵抗性を獲得し、心不全では心拡大が誘導される。乳がんのうち特にトリプルネガティブ乳がん(TNBC)で Pn の発現が高く、その発現は抗がん剤治療後の再発・予後と逆相関する(図1)。これまでに抗がん剤によりがん特異的な Pn バリエントの変化と発現亢進が起こること、がん特異的な Pn バリエントの制御により、抗がん剤抵抗性が解除されることを証明してきた1)。

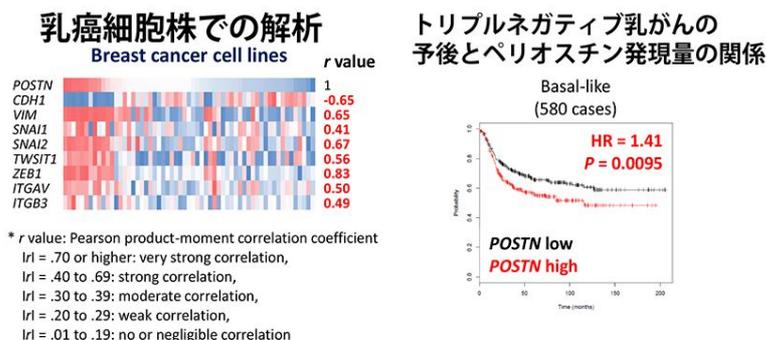


図1 ペリオスチン発現と上皮間葉転換マーカーの関係

2. 研究の目的

本研究ではがん特異的な Pn バリエントの作用機序を明らかにし、疾患特異的な Pn バリエントの診断的意義並びに治療ターゲットとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

A. がん特異的な Pn バリエント発現がん細胞の機能解析

- (1) スプライシングレポーターを用いたがん特異的な Pn バリエント発現細胞の分離。
- (2) 分離した細胞の遺伝子プロファイリング。

B. Pn バリエント特異的作用の解明

- (1) 各 Pn スプライシングバリエント cDNA を挿入した HaloTag ベクターを構築。
- (2) 各 Pn スプライシングバリエント過剰発現モデルによるがん細胞機能解析を実施。
- (3) 各 Pn バリエント特異的なリコンビナント蛋白による、がん微小環境への影響の検討。

C. Pn バリエント発現の検討

- (1) In situ hybridization (ISH) 法による Pn バリエント発現分布解析

4. 研究成果

A. がん特異的な Pn バリエント発現がん細胞の機能解析

- (1) スプライシングレポーターを用いたがん特異的な Pn バリエント発現細胞の分離。
- (2) 分離した細胞の遺伝子プロファイリング

SUM159PT ヒト TNBC 細胞にスプライシングレポーターを挿入し、がん特異的な Pn バリエント高発現細胞、低発現細胞を FACS にて分離し、細胞の遺伝子プロファイリングを RNA-seq にて解析した。がん特異的な Pn バリエント高発現細胞では、自己複製に関与する IL-6、IL-8、腫瘍関連マクロファージ誘導に関与する CCL2、IL-1A 発現が高く、がん細胞自身が抗がん剤の効きにくい微小環境を作り出していることが示唆された2)。この研究結果から、がん特異的な Pn スプライシングバリエントの病的意義を解明するため、以下の検討を行った。

B. Pn バリエント特異的作用の解明

- (1) 各 Pn スプライシングバリエント cDNA を挿入した HaloTag ベクターを構築。
- (2) 各 Pn スプライシングバリエント過剰発現モデルによるがん細胞機能解析を実施。
各 Pn スプライシングバリエント HaloTag ベクターを構築し、複数の TNBC 乳がん細胞に過剰発現させ、遺伝子発現解析を行った。細胞外マトリックス蛋白発現並びに炎症性サイトカイン発現は各バリエントにより有意に発現が異なり、生理的に発現するペリオスチンバリエントではこれらの発現は CTRL ベクターと同様に発現亢進は認めなかった。この結果は A の検討結果をサポートするものであった。
- (3) 各 Pn バリエント特異的なリコンビナント蛋白による、がん微小環境への影響の検討。

次に各 Pn バリエント特異的リコンビナント蛋白を用いて、In vitro における機能解析を実施した。HUVEC を用いた血管新生アッセイ、がん細胞をもちいた血管擬態アッセイ、マウス・ヒト単核球を用いたマクロファージ極性に関するアッセイでは、各バリエントにより血管新生作用、血管擬態作用、M2 マクロファージ極性変化作用に有意な差が見出された。がん特異的 Pn バリエントで特に強い血管新生作用が認められた。これらの作用はいずれも生理的なバリエントには認められなかった。

C、がん特異的 Pn バリエント発現の検討

(1) In situ hybridization (ISH) 法による Pn バリエント発現分布解析
 Pn バリエント特異的な ISH プローブをデザインし、がん特異的 Pn バリエントの発現パターンを検討した。乳がん Tissue micro array sample を用いた検討では、乳がん間質、特にがん関連線維芽細胞で強い陽性シグナルが認められた。これらの発現パターンは乳がんに限らず、頭頸部がん、膵がん、悪性黒色腫(図 2)等のがん種でも同様であり、間質由来がん特異的 Pn バリエントによるがん微小環境形成、抗がん剤抵抗性惹起作用が予想された。

これらの結果から、がん間質由来 Pn バリエントとがん細胞由来 Pn バリエントの存在が示唆された。

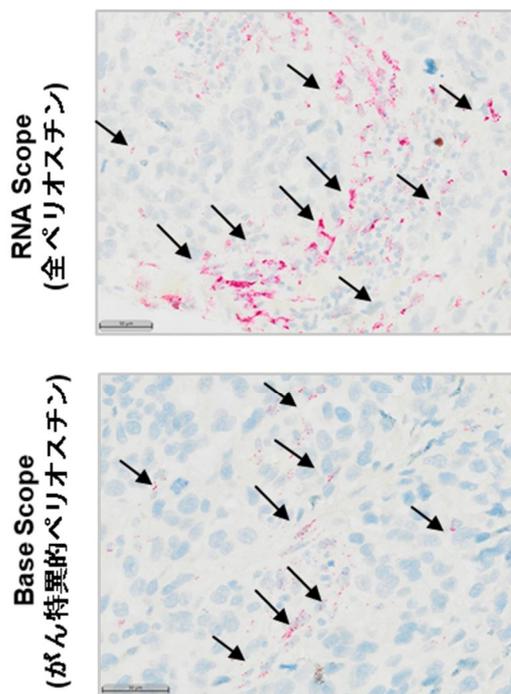


図 2 ISH法によるバリエント発現解析

<引用文献>

- 1 . Nakazawa Y, Taniyama Y, Sanada F, Morishita R, Nakamori S, Morimoto K, Yeung KT, Yang J. Periostin blockade overcomes chemoresistance via restricting the expansion of mesenchymal tumor subpopulations in breast cancer. *Sci Rep.* 2018 Mar 5;8(1):4013.
- 2 . Fujikawa T, Sanada F, Taniyama Y, Shibata K, Katsuragi N, Koibuchi N, Akazawa K, Kanemoto Y, Kuroyanagi H, Shimazu K, Rakugi H, Morishita R. Periostin Exon-21 Antibody Neutralization of Triple-Negative Breast Cancer Cell-Derived Periostin Regulates Tumor-Associated Macrophage Polarization and Angiogenesis. *Cancers (Basel).* 2021 Oct 11;13(20):5072.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fujikawa T, Sanada F, Taniyama Y, Shibata K, Katsuragi N, Koibuchi N, Akazawa K, Kanemoto Y, Kuroyanagi H, Shimazu K, Rakugi H, Morishita R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Periostin Exon-21 Antibody Neutralization of Triple-Negative Breast Cancer Cell-Derived Periostin Regulates Tumor-Associated Macrophage Polarization and Angiogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5072-5086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13205072.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田佳那、谷山義明、眞田文博、葛城鳴門、鯉淵信孝、池田（岩部）裕香、村津 淳、藤川龍弥、金本佑子、赤澤 香、中川涼子、平本はるか、島津研三、楽木宏実、森下竜一
2. 発表標題 POSTNの選択的スプライシングと癌の微小環境
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、葛城鳴門、鯉淵信孝、柴田佳那、中川涼子、楽木宏実、森下竜一
2. 発表標題 抗癌剤治療抵抗性トリプルネガティブ乳がんにおける新規治療法の創出
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 眞田文博、谷山義明、楽木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチンはトリプルネガティブ乳がんの予後予測因子である
3. 学会等名 本内科学会 第232回 近畿地方会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、柴田佳那、葛城鳴門、鯉淵信孝、中川涼子、染木宏実、森下竜一
2. 発表標題 抗癌剤治療抵抗性トリプルネガティブ乳がんに対する治療法の確立
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年～2021年

〔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	黒柳 秀人 (Kuroyanagi Hidehito) (30323702)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	伊藤 薫 (Ito Kaoru) (50375664)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー (82401)	

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