

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590898

研究課題名(和文)がん温熱療法の新規分子マーカー候補FAM107ファミリー蛋白質の発現・機能解析

研究課題名(英文)Expression and functional analysis of FAM107 family proteins as a new molecular marker for the onco-hyperthermia therapy

研究代表者

中島 日出夫(Nakajima, Hideo)

熊本大学・エイズ学研究センター・客員研究員

研究者番号：00333394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規熱ショックタンパク質FAM107B(HITS)の解析を行ったところ、同じ分子ファミリーのFAM107A(TU3A/DRR1)と同様に、HITSも多種の癌で発現が低下し、癌の増殖抑制効果を持っていた。これは熱ショックタンパク質の多くが原がん遺伝子であるのと対照的である。HITSの発現低下は癌の組織型と進行度に特異的であり、腫瘍マーカーとして有用と考えられた。

神経系における作用を調べたところ、HITSは神経軸索の伸張と神経細胞移動に強い抑制効果を持つが、FAM107Aはそれほどでもない事が判明した。

以上、FAM107ファミリー分子は癌と神経の発生/進展に特徴的な働きをしている事がわかった。

研究成果の概要(英文)：We have identified a unique molecule FAM107B, a novel heat-shock-inducible protein, and designated it HITS. The other FAM107 family protein, FAM107A (TU3A/DRR1), has attracted oncologists as a candidate tumor suppressor gene. Similar to FAM107A, loss of HITS expression is commonly observed in cancers of multiple organs and involved in tumor growth, which contrasts with oncogenic activities of other heat-shock proteins (HSPs) such as HSP70 and HSP90. Because downregulation of HITS expression was marked by histopathological-type and clinical-stage-specific manners in distinct organs, HITS can be a useful marker for diagnosis in various cancers.

Since both HITS and FAM107A expressed strongly in neuronal tissues, we also investigated to elucidate neuronal functions. HITS significantly inhibits neurite outgrowth and cell migration, while FAM107A does not so much.

These results suggest FAM107 family proteins are involved both in oncogenesis and neurogenesis with distinctive functions.

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：熱ショック蛋白質 癌 ストレス応答 発達障害 FAM107B (HITS)

## 1. 研究開始当初の背景

(1)温熱療法は、古来より湯治などの形でさまざまな疾患に対して行われており、その効果はがん治療においても有効性が証明されている。がん温熱療法は化学療法や放射線療法との併用で抗腫瘍効果を増強させることから、補助療法の一つとして位置づけられているが、その分子機構には謎が多い。一方、熱に対する生体の応答は熱ショック蛋白質(HSP)を中心として研究・理解されていて、HSP70やHSP90は癌細胞で発現が上昇し、その発現によって各種治療に抵抗性となる。また、HSPの発現を誘導する転写因子HSF1も癌化を促進する。したがってHSPは原がん遺伝子であり、実臨床(温熱療法)と基礎医学(HSP)との間に理論上大きな矛盾が存在し、がん温熱療法の効果判定をする際に既知のHSPの発現を指標(分子マーカー)にする事はできない。これを解決すべく白血病細胞に熱ショックを与えてDNAマイクロアレイ解析を行い、新規癌抑制遺伝子候補であるFAM107B分子を同定し、HITS(Heat-shock Inducible Tumor Small protein)と命名した。

(2)FAM107は、種を越えて高度に保存された機能未知のN末端ドメイン(DUF1151)を有しており、哺乳類をはじめ、カエル、魚類、ショウジョウバエにも相同遺伝子が存在し、また、ヒトとマウス/ラットの間ではそのアミノ酸配列が98%以上一致している。哺乳類はFAM107AとFAM107Bの2つのサブタイプが存在し、アミノ酸配列の相同性はN末端側のDUF1151で65%、C末端側のcoiled-coil可変領域で28%である。FAM107A分子と癌との関連が数編の論文で報告されており、FAM107AはTU3AあるいはDRR1と命名され、腎細胞癌、肺癌、脳腫瘍などで発現が低下して強制発現で腫瘍の増殖抑制や細胞死を誘導する事から、癌抑制遺伝子の候補とされている。

## 2. 研究の目的

温熱療法は癌に対する補助療法の一つであるが、生体の熱に対する応答の主たる働きを担う熱ショック蛋白質は原がん遺伝子であり、温熱療法の臨床効果と生体応答の分子機構との間には理論上大きな矛盾を抱えている。白血病細胞に熱ショックを与えることで新規熱ショック蛋白質であるHITSを同定したが、今までの研究の結果、HITSは広汎な組織に発現し、癌の進展に伴いその発現が顕著に低下、またHITS自体が腫瘍の増殖抑制効果も有する事が明らかとなった。熱ショック誘導性蛋白質でありながら腫瘍抑制効果を合わせ持つHITSのユニークな機能を多角的に解析し、がん温熱療法の分子機構の解明と臨床応用への探索を目指す。

## 3. 研究の方法

病理学的解析・生化学的解析・動物実験など多角的なアプローチにより、FAM107ファミリー分子の腫瘍抑制効果の分子メカニズムを解明し、がん抑制遺伝子である事の証拠を蓄積する。またモノクローナル抗体の作製や、動物実験や病理組織学的解析でHITSが温熱療法において主要な役割を果たし、効果判定などで分子マーカーとして使用できる事を証明し、温熱療法の分子マーカーとしての実用化を目指した研究も行う。さらにFAM107ファミリー蛋白質は神経系をはじめとして広汎な組織に発現しており、培養細胞や動物実験で神経系の発生・分化における働きや神経関連疾患との関連を解明する。FAM107ファミリータンパク質は、温熱療法などがん治療のみならず、発達障害や神経変性疾患など多岐にわたってマーカーとして有効である事の分子機構の解明を目指す。

### (1)FAM107ファミリー分子ががん抑制遺伝子である事の証明

#### 病理組織学的解析

胃癌・大腸癌においてHITSの発現量が低下することを明らかにしてきた。本研究では、癌種を拡大して種々の腫瘍でFAM107分子の発現が低下することを病理組織学的に証明する。肺癌、乳癌、膵癌、肝癌、腎癌などへと対象を拡大していき、組織分類、進行度、悪性度や予後とFAM107分子の発現との相関を調べる。

#### 担癌モデルによる腫瘍抑制効果の証明

HITSがテトサイクリンで発現誘導される(Tet-ON)ヒトがん細胞株が作製済みであり、これを利用する。その細胞株を免疫不全マウス(Scid等)に接種し、飲水中のテトサイクリンの有無によりHITSの発現を誘導調節し、腫瘍の増殖に与える影響を病理学的・生化学的に調べる。

#### 腫瘍抑制の分子機構の解明

分子間相互作用やシグナル伝達機構の解明をマイクロアレイやプロテオーム解析の技術を駆使して行う。予備実験の結果、HITSとFAM107Aは癌細胞の浸潤や神経突起の伸長などで重要な働きをする細胞骨格系の制御と関連している可能性が示唆されている。そこで、分子間相互作用の解明を目的として、FAM107蛋白質を含んだ複合体の免疫沈降やリコンビナント蛋白質を利用したプルダウンアッセイを行って質量分析装置による結合蛋白質の同定を行う。

### (2)神経系の解析

FAM107ファミリー分子は神経系での発現が高い。予備実験の結果、FAM107分子の発現で神経突起の伸長に変化が起きる事を確認した。そのメカニズムや生理学的意義の解明に、前述の分子間相互作用、シグナル伝達機構の解析を神経系の細胞も使って行う。また、培養細胞(PC12など)や神経のprimary cultureの系を用いて形態学的観察・免疫染色・生

学的解析を進める。さらに、新たな手法として胎児に遺伝子を導入する技術を用い、神経発生/発達における FAM107 ファミリー分子の働きを *in vivo* で証明する。

#### 4. 研究成果

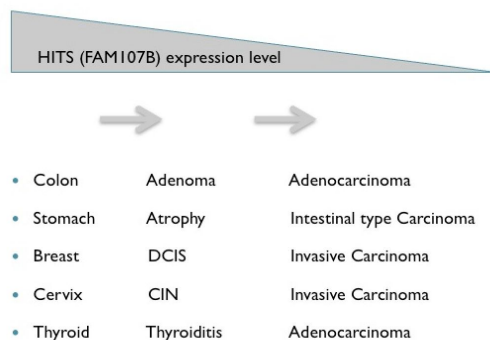
##### (1)がんとの相関

###### 臨床病理学的解析

抗 HITS 抗体 (ウサギポリクローナル抗体) を作製済し、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解析した。FAM107A の発現は神経系に偏在しているのに対して HITS は広汎な組織に発現し、各種臓器の進化・分化の過程において重要な働きをしている事が予想された。以前の我々の研究では、消化器癌において、大腸癌への進展 (腺腫 癌) に伴って HITS の発現量の低下が見られ、また、胃癌の組織型において腸型では HITS の発現量が著明に低下するのに対して、びまん型では低下が見られない。今回、組織アレイを用いて組織を拡大し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、甲状腺癌・乳癌・肺癌・子宮頸癌・精巣腫瘍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、乳癌・甲状腺癌では HITS 発現強度と病理学的ステージ分類 (TNM 分類、なかでも T 因子) との間に逆相関関係が見られた。さらに乳癌では、PgR 陰性、HER2 陽性、Ki67 陽性、スキルタイプで HITS の発現量が高いことが証明された。

つまり、大腸 (腺腫 癌) 胃 (萎縮 腸型癌) 子宮 (CIN 子宮頸癌) など、長期間の感染などが関与する癌化への進展過程において、HITS の発現が徐々に低下していくことが、複数の臓器で確認された (図 1)。広範な臓器において HITS は組織型特異的、進行度特異的に発現が低下する事から、各種病理診断の補助としても有用であると考えられた。

図 1 癌の進展に伴って HITS の発現が低下する



##### 動物実験

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

現させると、増殖因子に対する応答性が低下して細胞増殖が抑制されることを以前報告した。今回、*in vivo* のヌードマウスを使った xenograft モデルで 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。つまり、HITS の発現により腫瘍が増殖抑制される事が *in vivo*, *in vitro* の両方の系で証明された。

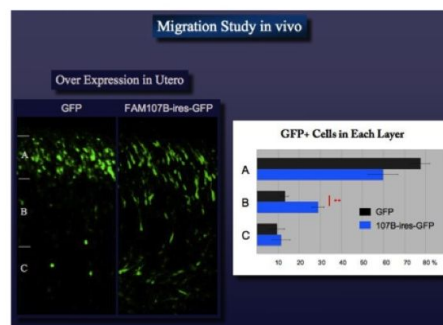
以上の事から、HITS は癌細胞で発現が低下して強制発現により腫瘍の増殖抑制効果を持つ事から、癌抑制遺伝子の候補と考えられた。この事は、癌細胞において HITS は他の熱ショックタンパク質と正反対の機能を持っており、がん温熱療法の理論的基盤を提供すると共に、治療効果予測などのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

##### (2)神経系における働き

FAM107A は他グループの最近の研究から、母子分離などのストレスにより発現が上昇し海馬の spine 形成に影響を与える事が報告されており、ヒト認知発達に重要な役割を持つことが示唆されている。一方 FAM107B (HITS) に関しては脳神経に関する研究がこれまで報告されていない。

PC12 (ラット副腎髄質由来の褐色細胞腫) マウス初代培養神経を使い *in vitro* での研究を進めた結果、ストレス応答ホルモン、グルココルチコイドのアゴニストであるデキサメタゾン初代神経培養細胞液中に添加すると FAM107B の mRNA 発現上昇が見られ、FAM107B もストレス応答分子である事が示唆された。

図 2 マウス胎児の脳内における神経細胞移動への影響



PC12 細胞を用いた神経細胞の移動 -Transwell Assay により、NGF (神経成長因子) 誘導による migration 活性を調べたところ、FAM107A/B の強制発現により migration 活性が上がる事がわかった。

PC12 細胞を用いた免疫染色から、FAM107A/B とともに NGF の分化誘導による核内局在とは別に、伸長突起上の構造 (ruffle) が観察され、FAM107A/B とともにこの突起上で F-アクチンとの共発現が観察された。

In Utero エレクトロポレーションによるマウス脳皮質神経への遺伝子導入を行い、神経細胞 migration への影響を in vivo で調べたところ、FAM107B の強制発現は神経の migration を遅らせることが示された(図2)。

これらの実験結果から、FAM107B 分子は FAM107A と良く似た細胞内局在を示すものの、機能的には別の役割を持つことが示された。また、遺伝学的に発達性障害、双極性障害、統合失調症などの精神疾患との関連を示唆するデータも得られた。

以上の癌と神経に関して得られた結果をまとめて Biomedical Reports 誌に総説を掲載した。

#### 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 2件)

Nakajima H and Koizumi K

Family with sequence similarity 107: A family of stress responsive small proteins with diverse functions in cancer and the nervous system (Review)  
BIOMEDICAL REPORTS 2: 321-325, 2014  
査読あり DOI: 10.3892/br.2014.243

Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T and Motoo Y  
Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis  
International Journal of Oncology 41:1347-1357, 2012 査読あり  
DOI: 10.3892/ijo\_0000707

[学会発表](計 10件)

Koizumi K, Nakajima H.

発達障害に関わる事が期待される新規遺伝子 FAM107A/B の解析  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013/12/3 神戸国際会議場

Koizumi K, Nakao K, Nakajima H.

Study of new candidate genes that may have critical role for autism and also schizophrenia.  
Neuroscience Meeting  
2013/11/12 San Diego, USA

中島日出夫

新規熱ショック誘導性蛋白質 HITS (FAM107B) は癌の進展と診断のマーカーとして有用である  
第 7 2 回日本癌学会学術総会

2013/10/5 パシフィコ横浜

中島日出夫, 小泉恵太

新規熱ショック誘導性蛋白質 HITS (FAM107B) は癌の進展と診断のマーカーとして有用である  
第 30 回日本ハイパーサーミア学会: シンポジウム 2 「再発、転移に対する温熱生理」  
2013/8/30 横浜シンポジア

Koizumi K, Nakao K, Nakajima H.

Study of new candidate genes that may have critical role for autism and also schizophrenia.  
Neuro2013  
2013/6/21 国立京都国際会館

Koizumi K, Nakajima H, Higashida H.

New candidate genes critical for human developmental disorders such as autism and mental retardation.  
第 35 回日本分子生物学会年会  
2012/12/11 福岡国際会議場

Nakajima H, Koizumi K.

HITS (FAM107B): novel heat-shock induced protein involved in cancer progression and neurogenesis.  
17<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology  
2012/10/1 Athens, Greece

Koizumi K, Nakajima H, Higashida H.

Fly/mouse studies identify genes that have important role to cause human developmental disorders such as mental retardation and autism.  
第 34 回日本分子生物学会年会  
2011/12/14 パシフィコ横浜

中島日出夫, 源利成, 元雄良治

新規熱ショック誘導性蛋白質 (HITS) の発現を利用した癌の診断  
第 22 回日本消化器癌発生学会  
2011/11/25 ホテルニューオータニ佐賀

Nakajima H, Minamoto T, Motoo Y.

HITS (FAM107B): novel heat-shock induced protein as a maker for cancer progression and diagnosis.  
16<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology  
2011/10/7 Rhodes Island, Greece

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

Award for outstanding performance

( 16th World Congress on Advances in  
Oncology, Greece ) 2011 年 10 月 8 日

[http://www.spandidos-publications.com/p  
ages/conference](http://www.spandidos-publications.com/pages/conference)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中島 日出夫 (NAKAJIMA, Hideo)

熊本大学・エイズ学研究センター・客員研  
究員

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

### (3)研究分担者

小泉 恵太 (KOIZUMI Keita)

金沢大学・子どものこころ発達研究センタ

ー・准教授

研究者番号： 70377406

### (4) 研究分担者

源 利成 (MINAMOTO Toshinari)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号： 50239323