

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591975

研究課題名(和文) スプライシング因子阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用効果の検討

研究課題名(英文) Combination of splicing factor inhibitor and histone deacetylase inhibitor

研究代表者

富田 尚裕 (Tomita, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：SF3B1阻害剤FR901464 (FR)を用い、SF3B1阻害とSF3B1遺伝子変異の意義を検討した。FRは癌細胞に対し*in vitro*で強い細胞傷害性を示し、コドン1074の変異が薬剤耐性と相関した。この変異は大腸癌患者245人で認められず、全エクソンでもDLD1細胞でエクソン10に遺伝子変異を認めたのみであった。FRは毒性が強く、動物実験で抗腫瘍効果が得られなかったがFR耐性細胞は親細胞に比べ腫瘍増殖が抑制されていた。マイクロアレイ解析でFRは細胞周期、Fanconi貧血、相同組み換え、塩基除去修復などのパスウェイを抑制していた。これらからSF3B1は大腸癌の有望な分子標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：SF3B1 gene mutations and their relevance to cancer progression have been shown in hematological malignancies and melanoma. We assessed the significance of inhibition of SF3B1 gene expression and SF3B1 gene mutation in colorectal cancer (CRC) using FR901464 (FR), a specific inhibitor of SF3B1. FR showed strong cytotoxicity in CRC cancer cell lines. All FR-resistant clones had the missense mutations in the codon 1074, which mutations have not been found in 245 CRC patients. Animal experiments showed antitumor effect by FR was limited by toxicity, although FR resistant clones with SF3B1 mutations grew significantly slowly than their parental cells. Microarray analysis showed FR inhibited pathways related with cell cycle, Fanconi anemia, homologous recombination, nucleotide excision repair. The influence of SF3B1 mutation of codon 1074 on alternative splicing has not been found like uveal melanoma. These results indicate that SF3B1 is a novel molecular target for CRC treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：スプライシング因子 阻害剤 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

FR901464 は抗癌作用を持つ物質として同定されたが、その抗癌作用が何を介しているのかは長らく不明であった。2007年にFR901464 (誘導体がスプライソスタチン)、プラジエノライドという化学構造の異なる二つの抗癌作用を持つ物質がスプライシング因子SF3B1の阻害作用を持つことが日本の二つのグループから報告された (Kotake et al Nat Chem Biol 2007, Kaida et al Nat Chem Biol 2007)。これらの物質はSF3B1を阻害することでスプライシングを抑制し、その結果多くの癌関連遺伝子を含む多くの遺伝子に影響を与えて抗癌作用を示すと考えられている。

化学構造が異なるにも関わらず、共通の機序により抗癌作用を示す物質としてはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤があり、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用の有無をスクリーニングすることによって多くの物質が抗癌作用を有することが分かった。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が多くの細胞内の遺伝子発現を増強するばかりでなく、細胞内に導入した遺伝子発現をも増強することから、申請者等はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるFR901228 (FK228) に注目し、遺伝子発現増強剤として特許を取得した (特願 2000 256141、Yamano et al, Mol Ther. 2000)。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が癌細胞のエストロゲンレセプターの発現を増強することから、ヒトメラノーマ細胞株においてケモカインレセプターCCR7、CXCR4の発現もまたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により増強されることを見出したが、これはマイクロアレイを用いた網羅的な実験では示されていなかった (Mori T, Yamano et al Cancer Res 2005)。

FR901464もヒストン脱アセチル化酵素阻害剤もその化学構造、作用機序は異なるものの、遺伝子発現を調節するという点においては同様であり、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で影響を受ける遺伝子はFR901464でも影響を受ける可能性があると考えた。

2. 研究の目的

抗癌作用を有する化合物として同定されたFR901464は近年スプライシング因子SF3B1の阻害剤であることが示された。本研究ではFR901464をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (トリコスタチン A) と併用し、ヒト大腸癌細胞において、導入した遺伝子発現への影響、ケモカインレセプターCCR7・CXCR4への影響、抗腫瘍効果への影響を検討する。

研究開始後、SF3B1遺伝子変異が血液疾患で多いことが分かり、それまでスプライシングという生命現象に欠かすことの出来ないと思われている機能も疾患と関わっていることが分かった。そのため当初は予定されていなかった、SF3B1遺伝子変異について大腸癌で検討した。

3. 研究の方法

(1) 導入遺伝子へのFR901464の影響

遺伝子導入した際のFR901464による影響をルシフェラーゼ発現ベクターを用いて検討する。

(2) FR901464の細胞傷害性の検討 (in vitro)

大腸癌細胞株を中心に、癌細胞株でのIC50を調べた。

(3) FR901464耐性細胞の樹立

(4) SF3B1遺伝子変異の検索

(5) in vivoにおけるFR901464の抗腫瘍効果の検討

(6) SF3B1遺伝子変異の細胞増殖、腫瘍増殖に与える影響の検討

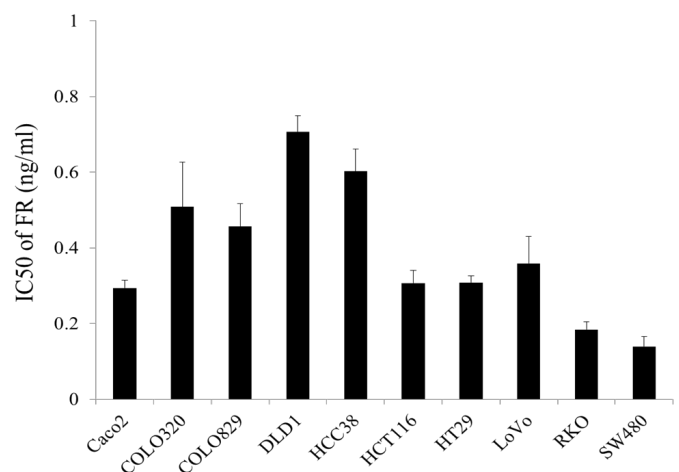
(7) マイクロアレイ解析

4. 研究成果

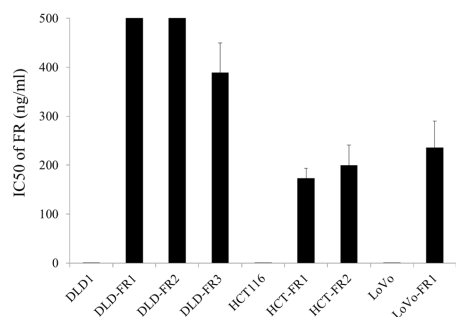
(1) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) がプロモーターに依らず導入遺伝子発現を上昇させるのに対してFRはプロモーターに依って低下するものもあり、その効果も小さい。

cell	HCT116 FR(-)	HCT116 FR(+)	HCT116 TSA(+)	HCT FR2 FR(-)	HCT FR2 FR(+)	HCT FR2 TSA(+)
TERT	156875	132848 (85%)	332126 (212%)	3485	5042 (145%)	23090 (663%)
Midkine	133842	195223 (146%)	766030 (572%)	2940	4403 (150%)	43557 (1482%)
SV40	151932	296339 (195%)	500278 (329%)	7036	9067 (129%)	62304 (940%)
Thymidine kinase	3040	1981 (65%)	9075 (299%)	83	60 (71%)	784 (886%)

(2) FRは腫瘍細胞に対して強い抗腫瘍作用を示した。



(3) (2)で用いた腫瘍細胞に FR を持続投与して耐性細胞を樹立した。これらの細胞はFR に対して強い抵抗性を示した。



(4) SF3B1 遺伝子変異

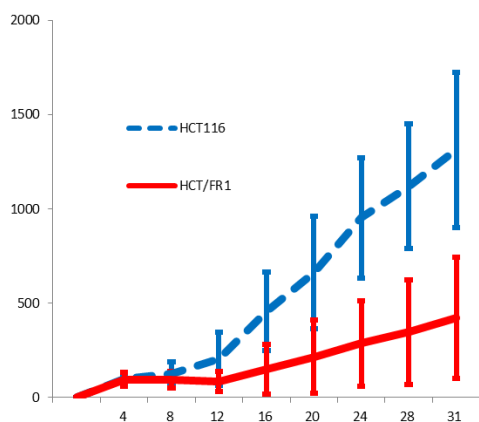
遺伝子変異は大腸癌では DLD1 のみであった。

Exons analyzed	1-25	8, 10, 12-15, 22	8, 10, 22
CRC cell lines	1/9(exon 10)	-	-
Cancer cell lines	1/2(exon 15)	-	-
CRC tumors	0/75	0/49	0/121
Primary tumor	75	48	111
Metastatic tumor	0	1	10
Other tumors	0/6	-	0/6
Malignant	5	-	1
Benign	1	-	5
total	2/92	0/49	0/127

(5) in vivo における FR901464 の抗腫瘍効果の検討：腹腔内投与では抗腫瘍効果よりも毒性が上回っていた (0.5µg/kg)。

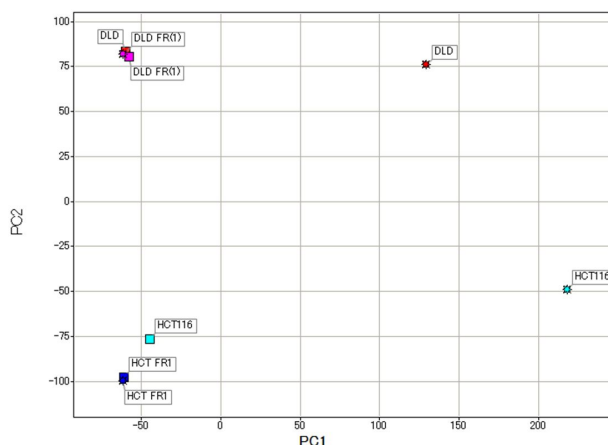
(6) SF3B1 遺伝子変異の細胞増殖、腫瘍増殖に与える影響の検討

SF3B1 遺伝子変異をもつ HCT/FR1, HCT/FR2, DLD/FR1 は親細胞に比べて腫瘍増殖が有意に抑制されていた。



(7) マイクロアレイ解析

FR によって DLD1, HCT116 で共に変動する遺伝子は 7000 個以上あり、主成分分析を行った。



その結果 PC1 が FR に関する遺伝子群と考え解析を施行した。その結果 Spliceosome, Cell cycle, Fanconi anemia pathway, Ubiquitin mediated proteolysis, Homologous recombination, Nucleotide excision repair, Oocyte meiosis, Basal transcription factors, Endocytosis に関係するパスウェイが強く影響を受けていることが分かった。

rank	pathway	p-value
1	Spliceosome	0.0001
2	Circadian rhythm	0.0027
3	p53 signaling pathway	0.0033
4	mRNA surveillance pathway	0.0049
5	Neuroactive ligand-receptor interaction	0.0065
6	RNA transport	0.0079
7	Malaria	0.011
8	RNA polymerase	0.0184
9	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	0.0216
10	Taurine and hypotaurine metabolism	0.0216
11	NF-kappa B signaling pathway	0.0299
12	Riboflavin metabolism	0.0447
13	Ribosome	0.048

rank	pathway	p-value
1	Cell cycle	0
2	Fanconi anemia pathway	0
3	Ubiquitin mediated proteolysis	0
4	Homologous recombination	0
5	Nucleotide excision repair	0
6	Oocyte meiosis	0
7	Basal transcription factors	0
8	Endocytosis	0
9	SNARE interactions in vesicular transport	0.0001
10	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.0001
11	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0.0003
12	Glycerophospholipid metabolism	0.0017
13	Viral carcinogenesis	0.0022
14	DNA replication	0.0031
15	Phosphatidylinositol signaling system	0.004
16	Inositol phosphate metabolism	0.0042
17	Pancreatic cancer	0.0042
18	Adherens junction	0.0058
19	HTLV-1 infection	0.007
20	Fructose and mannose metabolism	0.0095
21	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	0.0112
22	Mismatch repair	0.0114
23	One carbon pool by folate	0.017
24	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0191
25	Hepatitis C	0.0208
26	Vasopressin-regulated water reabsorption	0.0212
27	RNA degradation	0.0231
28	Herpes simplex infection	0.0247
29	Selenocompound metabolism	0.0256
30	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	0.0278
31	Metabolic pathways	0.0308
32	Epstein-Barr virus infection	0.0329
33	Base excision repair	0.0377
34	Folate biosynthesis	0.0389
35	Lysine degradation	0.0398
36	Pyrimidine metabolism	0.0474
37	Regulation of actin cytoskeleton	0.0483

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 0件)

〔学会発表〕(計6件)

Tomoki Yamano, Naohiro Tomita et al 「Influence of SF3B1 gene mutation is different from that of SF3B1 inhibitor in colorectal cancer」、AACR2014, 2014, April 8, San Diego, USA

Tomoki Yamano, Naohiro Tomita et al 「SF3B1 inhibitor as a novel molecular targeted drug candidate for colorectal cancer」、日本癌学会、2013年10月5日、横浜

Tomoki Yamano, Naohiro Tomita et al 「Low frequencies of SF3B1 mutations indicate SF3B1 inhibitor as a novel molecular targeted drug for colorectal cancer」、AACR2013, 2013, April 9, Washington DC, USA

Tomoki Yamano, Naohiro Tomita et al 「Effect of cytotoxicity and transgene expression by FR901464 in human colon cancer cells and its resistant cells」、日本癌学会、2012年9月20日、札幌

浜中美衣, 山野智基, 富田尚裕ら「スプライシング因子阻害剤 FR901464 とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の大腸癌細胞株への増殖抑制効果の検討」、日本消化器外科学会、2012年7月20日、富山

山野智基, 富田尚裕ら「スプライシング因子SF3B1阻害剤FR901464の大腸癌細胞における細胞傷害性と導入遺伝子発現への影響」、日本癌学会、2011年10月3日、名古屋

〔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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 尚裕(TOMITA, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00252643

(2)研究分担者

山野 智基(YAMANO, Tomoki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00599318