

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658266

研究課題名(和文)SR蛋白質の機能制御によるグルココルチコイド感受性回復法の検討

研究課題名(英文)A study on restoration of glucocorticoid sensitivity by regulating SR protein

研究代表者

田中 あかね(TANAKA, AKANE)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80418673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルココルチコイド受容体(GR)のスプライシングを調節することで、グルココルチコイド耐性を解除する方法を検討した。転写因子NF-kappaBを抑制すると、グルココルチコイド耐性が改善するが、このとき転写因子PU.1と、スプライシング因子SRp30cが減弱しており、機能的GRの発現が増強されることを見いだした。PU.1およびSRp30cをサイレンシングすると、前者ではGR pre-mRNAの発現が、後者では機能的GRの発現が増加した。そこで、GRにおけるSRp30cの結合部位を競合拮抗するオリゴヌクレオチドを作用させると、機能的GRが誘導されグルココルチコイド感受性が回復した。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoid (GC) resistance loses therapeutic options for patients with hematopoietic malignancies. Here we present the novel strategy to overcome GC resistance by modulating splicing regulation of GC receptors (GR) in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Dexamethasone exhibited its effects on GC resistant ALL cells when it was administered with a NF-kappaB inhibitor. NF-kappaB inhibition reduced PU.1 and serine-arginine-rich (SR) protein p30c, leading to the increase in a functional isoform but not a dominant negative isoform of GR. PU.1 silencing upregulated total GR pre-mRNA expression, though SRp30c silencing elevated the functional GR. Blocking of the SRp30c binding site in GR pre-mRNA with complementary oligonucleotide restored GC resistance in vivo. We provide the first evidence that NF-kappaB activation induces GC resistance by promoting GR splicing with SRp30c, and blocking of SRp30c binding to GR pre-mRNA accelerates the GC sensitivity by inducing the functional GR.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学/獣医学・臨床獣医学

キーワード：治療 薬剤反応性 リンパ腫・白血病 アレルギー 免疫学

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンの1つであるが、合成されたグルココルチコイド製剤はいわゆるステロイド系抗炎症剤として古くから医療現場で使用されてきた。その強力な抗炎症作用・抗腫瘍作用から臨床適応は極めて多岐にわたり、すべての医薬品の中で最も健康保険の適応疾患が多い。しかし、喘息患者の5~10%、リウマチ患者の約30%、炎症性腸疾患患者の20~50%、子供の急性リンパ性白血病の10~25%など、一定の割合でグルココルチコイド耐性の発現が認められる。申請者はこれまでに、免疫系細胞であるリンパ球および肥満細胞においてグルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor, GR) の発現状態がグルココルチコイド感受性を制御していること、その原因分子が転写因子NF- κ Bシグナルの下流に存在することを証明してきた (Res. Vet. Sci., 2010; Vet. Immunol. Immunopathol., 2011)。また、グルココルチコイド感受性にはGRのスプライシングバリエーションであるGR₁ (機能性受容体)とGR₂ (ドミナントネガティブ受容体)の発現比が重要であることを突き止めたが、その発現を調節する方法は全く開発されていない。スプライシング因子であるSR蛋白質がGRのスプライシングに関与するとの報告があるため、本研究ではSR蛋白質の機能を特異的に阻害することで免疫系細胞や造血系悪性腫瘍細胞におけるグルココルチコイド感受性を回帰させる研究を着想した。

2. 研究の目的

グルココルチコイド製剤は炎症性疾患・自己免疫性疾患・アレルギー疾患・腫瘍性疾患等に広く使用される重要な薬剤である。多くの症例ではグルココルチコイドの投与による抗炎症効果や免疫抑制効果、抗腫瘍効果が認められるが、耐性に陥り、有効な治療効果が得られない症例も多数存在する。他の免疫抑制剤や抗がん剤を用いる治療では、強い副作用の発現や高額の治療費などの問題点があるため、グルココルチコイド作用の増強あるいは耐性を解除する方法の開発が強く望まれている。本研究では、プレmRNAのスプライシング因子であるSR蛋白質の機能調節を介してグルココルチコイド受容体の発現を調節し、免疫系細胞や造血系腫瘍細胞におけるグルココルチコイド感受性の特異的な増強および耐性解除法確立のための基礎研究を実施するとともに、耐性解除法の基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、リンパ球や肥満細胞等の免疫系細胞におけるグルココルチコイド耐性の発生病機を、特にSR蛋白質に注目して解析し、感受性増強法および耐性解除法の確立を目指すものである。これを実現するために具体的

には以下の方法により実施した。

(1) SR蛋白質 (SR20, SR30, SR40 など)のうち、免疫系細胞のGR₁、GR₂の発現にどの蛋白質が関与しているかについて、細胞株を用いて検証した。

細胞株は、リンパ球として Raji、Jurkat、RPMI8226 を、マクロファージとして THP-1 を、肥満細胞として HMC-1 を使用した。各細胞株における GR₁ および GR₂ の発現状況と各種 SR 蛋白質 (SR20, SR30, SR40 など) の発現状況を RT-PCR 法やウェスタンブロット法を用いて確認した。

特異的阻害剤や siRNA を用いて NF- κ B の活性化を阻害した際の各細胞株における各 SR 蛋白質の発現変化を RT-PCR 法やウェスタンブロット法を用いて確認した。

(2) SR 蛋白質の機能を阻害するためリン酸化阻害剤や siRNA を使用し、各種細胞株におけるグルココルチコイド感受性の変化を細胞増殖試験にて解析した。

(3) GR プレ mRNA に特異的なブロッキングオリゴを作成し、細胞株に導入して GR₁ および GR₂ の発現の変化を確認した。

GR₁ と GR₂ のスプライシングを行うためには、両者が分かれるエクソン9周辺に結合部位があるものと予想し、GRのDNAエクソン9に相当するプレmRNAの配列周辺に結合能を持つオリゴヌクレオチドを設計した。また、SR蛋白質はAGリッチな部分に結合しやすいとの報告があったため、その配列を含むオリゴヌクレオチドを数十種類作成した。作成したブロッキングオリゴを電気穿孔法により各細胞株へ導入し、RT-PCR法にて GR₁ および GR₂ の発現変化を検証した。これにより、GR₁ の発現を増加させる、あるいは GR₂ の発現を減少させる、あるいはその両方の作用を示すオリゴヌクレオチドの配列を特定した。特定した配列を持つブロッキングオリゴについて、電気穿孔法で各細胞株に導入したのち、BrdU 取り込み試験を行い、グルココルチコイド感受性を実際に改善するかどうか確認した。同時にブロッキングオリゴの導入による細胞毒性を確認し、最も細胞毒性の少ないオリゴヌクレオチドの配列を選抜した。

(4) リンパ腫細胞にブロッキングオリゴ発現ベクターを導入し、免疫不全マウスの担がんモデルを作成してグルココルチコイド感受性改善効果を *in vivo* で判定した。ブロッキングオリゴ発現ベクターを導入したリンパ腫細胞株を作成、遺伝子導入した細胞株における SR 蛋白質活性や GR₁ あるいは GR₂ の発現比、デキサメサゾン反応性を確認したのち、細胞毒性がなく GR₁ 比およびグルココルチコイド感受性のみを調節することを確認した。腫瘍性疾患のモデルマウスに、ブロッキングオリゴ発現ベクターと空ベクターを導入し

たリンパ腫細胞を移植、グルココルチコイド(プレドニゾロン)を投与し、ブロッキングオリゴの発現によるグルココルチコイドの感受性の改善(生存期間の延長など)が認められるかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) NF- κ B の活性化と GR /GR 発現調節をつなぐ SR 蛋白質の解析

Raji 細胞および Jurkat 細胞等のリンパ球系細胞において低分子阻害剤や siRNA による NF- κ B の機能阻害を行ったところ、GR /GR 比が増加することが RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により示され、同時にグルココルチコイド感受性が回復することが MTT 法および BrdU 取り込み試験にて確認した。さらに、SR 蛋白質の中でも特に SRp30c の発現が減少していることが判明した。このことから、SR 蛋白質の中でも特に SRp30c がリンパ球の GR /GR 発現調節において重要な役割を担っている可能性が考えられた。

(2) SR 蛋白質の機能阻害による免疫系細胞のグルココルチコイド感受性変化の解析

siRNA を用いて SRp30c をサイレンシングし GR 発現を確認したところ、GR の発現量が増加し、GR の発現量が減少していることがわかった。また同時にグルココルチコイド感受性が回復していることも確認できた。さらに、SRp30c が GR プレ mRNA に結合する配列を予想し、その配列に対するブロッキングオリゴヌクレオチドを多数設計して細胞に導入した。その結果、予想どおりに GR /GR 比が上昇し、グルココルチコイド感受性が回復することが明らかとなった。

(3) 病態モデルマウス(腫瘍性疾患)を用いた有効性の検討

上記ブロッキングオリゴヌクレオチドを恒常的に発現する Raji 細胞を、遺伝子導入およびセルソーティングによって作成した。予備実験として、その細胞を CB17/1cr-Prkdcscid マウスに腹腔内接種したところ、通常の Raji 細胞と同様に生着することが確認できた。接種されたマウスは腹水貯留を起こし、3~7 週間のうちに死亡したことから、病態モデルマウスとして使用できると判断した。

そこで上記の担癌マウスモデルを用いて、選抜したブロッキングオリゴヌクレオチドの有効性を検証した。グルココルチコイドの耐性を示すひとリンパ芽球性白血病細胞にブロッキングオリゴヌクレオチド発現ベクターを導入し、免疫不全マウスに移植し、グルココルチコイドを投与したところ、何も投与しない陰性対照群と比較して有意に生存期間が延長した。以上の結果より、スプライシング因子 SRp30c を GR 特異的に拮抗阻害することで、グルココルチコイド感受性が改善することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- (1) Oida K, Matsuda A, Jung K, Xia Y, Jang H, Amagai Y, Ahn G, Nishikawa S, Ishizaka S, Jensen-Jarolim E, Matsuda H, Tanaka A. Nuclear factor- κ B plays a critical role in both intrinsic and acquired resistance against endocrine therapy in human breast cancer cells. *Sci. Rep.* 17:4057. 2014. doi: 10.1038/srep04057. 査読あり
- (2) Nishikawa S, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jang H, Jung K, Amagai Y, Ahn G, Okamoto N, Ishizaka S, Matsuda H. A molecular targeting against nuclear factor- κ B, as a chemotherapeutic approach for human malignant mesothelioma. *Cancer Med.* 3:416-25. 2014. doi: 10.1002/cam4.202. 査読あり
- (3) Amagai Y, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Res. Vet. Sci.* 96:124-6. 2014. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.10.014. 査読あり
- (4) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Increased expression of the antiapoptotic protein MCL1 in canine mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 75(7):971-4. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428776> 査読あり
- (5) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Matsuda H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumors. *J. Small Anim. Prac.* 54: 377-380, 2013. doi: 10.1111/jsap.12069. 査読あり
- (6) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Matsuda H. The phosphoinositide 3-kinase pathway is crucial for the growth of canine mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 75(7): 971-974, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328607> 査読あり
- (7) Furusaka T, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Superselective intra-arterial chemoradiation therapy for functional laryngeal preservation in advanced squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Acta. Otolaryngol.* 133(6): 633-640. 2013. doi: 10.3109/00016489.2012.759275. 査読あり

- (8) Furusaka T, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Laryngeal preservation in advanced piriform sinus squamous cell carcinomas using superselective intra-arterial chemoradiation therapy with three agents. *Acta. Otolaryngol.* 133(3): 318-326. 2013.
doi: 10.3109/00016489.2012.744144.
査読あり
- (9) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Ohmori K, Matsuda H. Stem cell factor contributes to tumorigenesis of mast cells via an autocrine/paracrine mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 93(2): 245-250. 2013.
doi: 10.1189/jlb.0512245. 査読あり
- (10) Ahn G, Bing SJ, Kang SM, Lee WW, Lee SH, Matsuda H, Tanaka A, Cho IH, Jeon YJ, Jee Y. The JNK/NF B pathway is required to activate murine lymphocytes induced by a sulfated polysaccharide from *Ecklonia cava*. *Biochim Biophys Acta.* 1830(3): 2820-2829. 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23262141> 査読あり
- (11) Furusaka T, Asakawa T, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Efficacy of multidrug superselective intra-arterial chemotherapy (docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil) using the Seldinger technique for tongue cancer. *Acta Otolaryngol.* 132(10): 1108-1114. 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998559> 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) 松田彬、田中あかね、他
リンパ球のグルココルチコイド感受性におけるスプライシング制御因子の役割
Conference of BioSignal and Medicine 2012
2012 年 9 月 1 日
和歌山県伊勢市、伊勢グランドホテル

(2) 田中あかね (招待講演)
Clinical and molecular biology of mast cell tumors.
全南大学 60 周年記念シンポジウム
2012 年 10 月 29 日
韓国、全南大学

(3) 田中あかね、松田彬、他
Splicing regulation of glucocorticoid receptor isoforms in lymphocytes with glucocorticoid resistance.
EAACI-WAO Congress 2013

2013 年 6 月 23 日

イタリア・ミラノ

(4) 松田彬、田中あかね、他
NF- κ B の機能阻害によるリンパ球性白血病のグルココルチコイド耐性解除効果
Conference of BioSignal and Medicine 2013
2013 年 7 月 13 日
山梨県石和市

(5) 田中あかね (招待講演)
The role of splicing factors in glucocorticoid sensitivity in neoplastic lymphocytes.
18th World Congress on Advances in Oncology
2013 年 10 月 10 日
ギリシャ・クレタ

〔図書〕(計 2 件)

(1) 田中あかね、松田彬、他
インターズー J Vet
肥満細胞における分指標的治療法の最近の知見
2012 年 8-16 ページ

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: オリゴヌクレオチド、グルココルチコイド感受性増強剤、医薬組成物、及び発現ベクター
発明者: 田中あかね、松田浩珍、松田彬
権利者: 田中あかね、松田浩珍、松田彬
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/078245
出願年月日: 2012 年 10 月 31 日
国内外の別: 国内、国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/

6. 研究組織

(1) 研究代表者
田中 あかね (Tanaka Akane)
国立大学法人東京農工大学・農学研究院・教授
研究者番号: 80418673

(2) 研究分担者
松田 彬 (Matsuda Akira)
国立大学法人東京農工大学・農学研究院・研究員
研究者番号: 90613969