

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430132

研究課題名(和文) 分子標的を用いた癌早期診断と癌予防

研究課題名(英文) Early diagnosis and prevention of cancers using a molecular target

研究代表者

高橋 淳 (TAKAHASHI, ATSUSHI)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80303840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：FEAT蛋白は、大半のヒト癌で異常増加している腫瘍促進因子です。この性質を利用し、分子標的を用いた癌の早期発見、癌予防を目指した前臨床研究を行いました。1) 自作の抗体でELISAキットを作り、健康人8名と癌患者134名の血漿を調べ、癌患者の血中FEAT濃度は健康人より高いことがわかりました。2) FEATを欠失したマウスES細胞を解析し、FEATが神経系の構築に必要であることがわかりました。3) ペプチドでFEATに対する免疫反応を誘導しても、正常組織に障害を起こしませんでした。4) FEATに結合するタンパクがわかり、今後FEATの酵素活性測定系を作り、FEATを阻害する阻害薬を探索する予定です。

研究成果の概要(英文)：FEAT is an intracellular protein that potently drives tumorigenesis in vivo. FEAT is only weakly expressed in normal human tissues including the testis, whereas it is aberrantly upregulated in most human cancers. The present study investigated whether FEAT is applicable to early detection and prevention of cancers. 1) The plasma FEAT concentrations of 134 cancer patients and 8 normal volunteers were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Plasma FEAT levels were significantly higher in the presence of cancers. 2) Analyses of mouse embryonic stem cells deficient in *Mettl13* gene encoding FEAT suggest that FEAT is required for neuronal differentiation. 3) Immune responses against FEAT can be induced without deleterious side effects on mice. 4) We identified proteins that interact with FEAT to develop an assay for enzymatic activity of FEAT and screen for inhibitors. The findings suggest that FEAT is a candidate for applications in early diagnosis and prevention of cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌予防 癌早期発見 癌遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌は、ゲノム及びエピゲノムレベルで非常に不均一な細胞集団から成ります。近年開発された分子標的治療薬でも癌は治癒せず、癌は早期に耐性化して再発します。治療開始前の段階から既に、分子標的治療薬に抵抗性の癌細胞を含んでいるからです。

しかし、癌が遺伝子変異を蓄積する前の、早期癌あるいは前癌病変の段階で見出すことができれば、分子標的治療薬に抵抗性の細胞が出現する前に治療を開始することで、癌をコントロールできると考えられます。また、癌化の早期の段階を抑える方法があれば、それ以上の癌化を停止させる癌予防が可能で、人類は難治性のウイルス疾患をワクチンによる予防で克服してきました。治療から予防へのパラダイムシフトにより癌の撲滅を目指したいと考えています。

(2) 癌の早期発見や癌予防は、大半の癌を網羅することが望めます。例えば、前立腺癌だけ早期発見や癌予防をしても、肺癌や大腸癌には無効で、女性は恩恵を受けられません。

また、多種の癌に対して広く有効な方法が望めます。例えば、女性で8割の癌を早期発見するために、乳癌、大腸癌、胃癌、肺癌、子宮癌、肝癌、膵癌、胆のう癌、卵巣癌、甲状腺癌の10項目の検査を定期的に行うことは、医療経済学的に現実的ではありません。これまで、癌の早期発見や予防を可能にする分子標的は見出されていませんでした。

我々が新たに見出した腫瘍促進因子 FEAT が増えている癌は、日本人の癌の約8割に及びます。しかも、早期癌や前癌病変でも増えています。大多数の癌で早期から増えている癌化に働くタンパクが初めて見つかったことから、FEAT を標的とした癌のスクリーニングと癌予防が可能であるかを検証すると共に、そのための技術開発を行いました。

## 2. 研究の目的

(1) FEAT を分子標的として用いた癌早期診断の可能性を検証するために、血液中の FEAT タンパクの濃度が癌患者で正常人に比して増加しているかを明らかにします。

(2) FEAT を標的とした癌予防の妥当性を検証するために、FEAT タンパクを欠失したマウスを作り、FEAT の消失により発癌が抑制されるか調べます。

(3) FEAT 標的癌予防の方法論として、マウスで、FEAT に対する免疫反応で癌の増殖が抑制されるか、FEAT への免疫反応でマウスの諸臓器に障害が起らないかを調べます。

(4) FEAT を抑制する薬を作るための第一歩として、小分子阻害剤を見出します。まず、FEAT の酵素活性を測定する系を構築し、その系を用いて小分子ライブラリーから FEAT 阻害剤

を見出します。

## 3. 研究の方法

(1) アフィニティー精製したウサギのポリクローナル抗 FEAT 抗体を ELISA プレートに固相化し、標識した別の抗 FEAT 抗体を用いて検出するサンドイッチ ELISA キットを作成します。精製 FEAT タンパクを用いて検量線を作り、FEAT タンパク濃度を定量します。過去の臨床研究で悪性腫瘍患者および健常人ドナーから得られた血漿を用い、FEAT 濃度を測定します。

(2) 既にターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入して、片方の FEAT 遺伝子を発現しないようにした FEAT<sup>+/-</sup> ES 細胞を作成しました。この変異 ES 細胞をマウスの胚盤胞に注入して仮親の偽妊娠マウスの子宮で生育させ、生まれたキメラマウスを交配して、FEAT<sup>+/-</sup> マウスを得ます。オスとメスの FEAT<sup>+/-</sup> マウスを交配して、FEAT ノックアウト (FEAT<sup>-/-</sup>) マウスを得ます。ノックアウトマウスに異常が起っていないかを、血液検査や解剖で調べます。さらに、FEAT<sup>-/-</sup> マウスを癌を自然発症するモデルマウスと交配し、発癌が抑制あるいは遅延されるかを統計的に解析します。

(3) C57BL/6 マウスの主要組織適合抗原に適合するマウス FEAT のペプチド2種類を合成し、アジュバントと共にマウスの皮下に接種して免疫します。その後、FEAT を発現しているメラノーマ B6-F10 細胞を皮下注射し、腫瘍の形成を観察し、採血検査をします。腫瘍が大きくなったらマウスを解剖して病理標本を作り、腫瘍の状態、諸臓器の異常を顕微鏡観察します。

(4) HeLa 細胞から FEAT と相互作用するタンパクを共免疫沈降法で得て、マスマスペクトロメトリーで同定します。それらのタンパクの cDNA をクローニングし、共免疫沈降法や Duolink を用いて、細胞内での共局在と結合を確認します。さらにこれらのタンパクを GST 融合タンパクとして大腸菌に発現して精製します。

FEAT と直接結合するタンパクを見出すために、精製した FEAT タンパクと結合するか調べ、直接結合するタンパクを基質として用いて、FEAT によるメチル転移反応時に発生する蛍光を検出するアッセイ法を構築します。このアッセイ系を用いて、化合物ライブラリーをスクリーニングして阻害物質を同定します。

## 4. 研究成果

(1) ウェスタンブロッティングにより、癌患者の血漿に FEAT タンパクが存在することがわかりました。

定量のための標準試料としての FEAT タン

パクの精製を行いました。His タグ融合 FEAT は大腸菌で不溶性の封入体を形成しました。そこで、誘導条件を最適化し非変性条件で一部可溶性の FEAT が発現しましたが、Ni<sup>2+</sup>および Co<sup>2+</sup>レジンに結合しにくく、収量、純度が低かったため断念しました。封入体を塩酸グアニジンによる変性条件で可溶化し、高純度で十分な収量のタンパクを得ました。

免疫沈降法で、癌患者の血漿に FEAT タンパクが存在し、自作のポリクローナル抗体により捕捉可能であることが分かりました。そこでポリクローナル抗体を捕捉用抗体とし、業者と共同研究で作出したモノクローナル抗体を検出用抗体に用いたサンドイッチ法により血漿中の FEAT を検出する ELISA キットを、IBL 社に受託して作製しました。

九州大学病院 先端分子・細胞治療科において行われた臨床試験で凍結保存した癌患者の血漿を測定しました。検討症例数は、健康人 8 例と癌患者 134 例、うち非小細胞肺癌 17 例、小細胞肺癌 5 例、乳癌 4 例、食道癌 14 例、胃癌 22 例、大腸癌 43 例、膵癌 14 例、胆嚢癌 1 例、胆管癌 2 例、卵巣癌 4 例、子宮体癌 2 例、子宮頸癌 4 例、悪性中皮腫 4 例、咽喉頭癌 2 例、尿管癌 2 例、悪性黒色腫 2 例、原発不明癌 2 例です。血中 FEAT 濃度は癌患者において、健康人に比べ有意に上昇していました。癌種別のノンパラメトリック多重比較では、Kruskal-Wallis 検定で有意差があり、Steel 検定で卵巣癌と非小細胞肺癌に健康人との有意差を認めました。

(2) ① FEAT<sup>+/−</sup>マウス ES 細胞の胚盤胞期胚への注入により、キメラマウスを得て交配しましたが、FEAT<sup>+/−</sup>マウスは 1 匹生まれたのみで、しかも不妊でした。

② FEAT<sup>+/−</sup>マウスが不妊であることから、通常のノックアウトマウスの作成が困難と考えられました。そこで、国際共同プロジェクト IMPC の KOMP プログラムよりターゲティングベクターを購入し、がん研究ネットワークメンバーに対する「個体レベルでのがん研究支援活動」の協力を得て、FEAT のコンディショナルノックアウトマウスの作出を開始しました。

ターゲティングベクターをマウス ES 細胞にエレクトロポレーションで導入し、240 個の neo 耐性 ES 細胞をピックアップし、液体窒素で保存すると同時にゲノム DNA を抽出しました。PCR によるスクリーニングで 240 個中、35 個が陽性でした。現在サザンブロッティングにより解析中です。

③ ES 細胞での FEAT の機能を明らかにするために、ノックアウト ES 細胞を作成しました。FEAT<sup>+/−</sup>マウス ES 細胞を高濃度の G418 で薬剤選択し、FEAT ノックアウト (FEAT<sup>−/−</sup>) ES 細胞を 4 クローン得ました。アルカリフォスファターゼ染色、免疫蛍光染色による Oct4, SSEA1,

Nanog の発現により、多能性の維持には FEAT が必要ないと考えられました。

ES 細胞を胚様体に分化させ、RT-PCR で nestin, Brachyury, GATA-4 の発現を解析して 3 胚葉への分化を調べた所、FEAT 欠失により神経系への分化に障害がありました。

FEAT ノックアウト ES 細胞に胚様体を形成させ、レチノイン酸で神経系へ分化誘導したところ、神経特異的な  $\beta$  III-tubulin の発現と神経突起形成が阻害されていました。そこで、FEAT ノックアウト ES 細胞を SCID マウスの精巣と大腿に移植し奇形腫形成を調べたところ、外胚葉, 中胚葉, 内胚葉系への分化を示し、神経組織も認めました。FEAT は神経分化よりも、神経細胞の維持に必要であると考えられました。また、HMT 社に受託して、神経分化誘導時のメタボローム解析を行ったところ、神経分化時に複数の解糖系酵素の異常が起こることが示唆されました。

(3) H-2Kb, H-2Db 適合マウス FEAT ペプチドを 2 種類、アジュバントと共に C57BL/6 マウスの皮下に 2 回接種後、B16-F10 メラノーマ細胞を皮下注射しました。特に 2 種類のペプチドを混合して接種した際に、腫瘍に炎症反応が誘導されました。肺、肝、腎を組織学的に調べ、ペプチドに起因する異常は認められず、血清 AST, ALT, Cre の上昇は認めませんでした。FEAT に対する免疫反応を、生体に副反応を起こさずに利用できる可能性が示唆されました。

(4) HeLa 細胞から FEAT と共免疫沈降するタンパクを見出し、15 個のタンパクの cDNA をクローニングしました。共免疫沈降法、Duolink キット、GST プルダウンアッセイにより、FEAT との相互作用を確認しました。

15 個のタンパクを GST 融合タンパクとして大腸菌に発現し、Glutathione レジンをを用いて精製しました。精製した His タグ融合 FEAT との結合を調べ、4 個のタンパクが FEAT と直接結合することがわかりました。今後この 4 タンパクを基質として、メチル転移反応時に発生する蛍光を検出するアッセイ法を樹立する予定です。

## 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 3 件)

[学会発表] (計 12 件)

- ① C. Satomi, M.M. Mona, K. Kobayashi, Y. Li, K. Tani, A. Takahashi, Regulation of human FEAT gene promoter, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/10、「名古屋国際会議場 (名古屋)」

- ② Y. Li, K. Kobayashi, C. Satomi, K. Tani, A. Takahashi、Biochemical and intracellular function of FEAT protein、第74回日本癌学会学術総会、2015/10/8、「名古屋国際会議場（名古屋）」
- ③ Y. Li, K. Kobayashi, M.M. Mona, C. Satomi, K. Tani, A. Takahashi、Biochemical and intracellular functions of antiapoptotic FEAT protein、Cell Symposia: Hallmarks of Cancer: Asia、2014/11/9、「Beijing (China)」
- ④ Y. Li, K. Kobayashi, M. M. Mona, C. Satomi, K. Tani, A. Takahashi、FEAT inhibits cell death by modifying intracellular localization of apoptotic signaling factors、Gordon Research Conference on Cell Death、2014/6/8-13、「West Dover (USA)」
- ⑤ Y. Li, K. Kobayashi, M.M. Mona, K. Tani, A. Takahashi、Identification of proteins that interact with FEAT tumor promoter、第72回日本癌学会学術総会、2013/10/4、「パシフィコ横浜（横浜）」
- ⑥ K. Kobayashi, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani, A. Takahashi、Functions of FEAT tumor promoter in ES cells. 腫瘍促進因子 FEAT の ES 細胞における機能、第72回日本癌学会学術総会、2013/10/3、「パシフィコ横浜（横浜）」

〔図書〕（計1件）

- ① 高橋 淳, 谷 憲三朗、医学書院、再生医療「臍帯血移植の基礎と臨床（浅野茂隆、谷口克監修）」、2014、pp. 243-260

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

日経産業新聞（2015年3月23日）「がん細胞目印抗体で光らす 九大 血中の量を把握 早期診断の手掛かりに／視点：がん克服 発症予防で目指す 他の方法と組み合わせ」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 淳 (TAKAHASHI, Atsushi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80303840

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

鈴木 聡 (SUZUKI, Akira)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：10311565

谷 憲三郎 (TANI, Kenzaburo)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：00183864

### (4) 研究協力者

小林 恭介 (KOBAYASHI, Kyosuke)

李 妍 (LI, Yan)

Marwa Mohammed Hassan Mona (MONA, Marwa)

里見 智佳子 (SATOMI, Chikako)