

平成 21 年度

金沢大学がん研究所
共同研究成果報告書

2010.4

金沢大学がん研究所

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年4月30日提出

対象研究テーマ：HGF-Met系を中心とする制がん研究

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：構造生物学を基盤とするHGF-Met系阻害の分子創薬

研究代表者：大阪府立大学大学院理学系研究科 准教授 木下誉富

研究成果の概要：

2.9Å分解能でのHGFβ・シード化合物の複合体構造解析に成功した。シード化合物の結晶中における占有率が100%に達しておらず、詳細は議論できないが、インシリコによる創薬過程で見出されたS2サイトに結合していることが明らかとなった。このS2サイトはMetがβ鎖に結合する際に重要であることがわかっており、シード化合物が直接HGFとMetの結合を阻害している様子を捉えている。これにより、Structure-Based Drug Designによる高活性HGFアンタゴニストを創出できる構造基盤が整った。

研究分野：構造生物学、創薬化学

キーワード：X線結晶構造解析、Structure-Based Drug Design (SBDD)

1. 研究開始当初の背景

HGF（肝細胞増殖因子）はMet受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGFは肝臓をはじめ、腎臓、心血管系、脳神経系など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGFを投与・補充することが、肝硬変、急性・慢性腎不全、脳硬塞や筋萎縮性側索硬化症、皮膚潰瘍など様々な疾患の治癒・改善につながる事が明らかにされている。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが癌細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGFは様々な癌に対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met受容体系は癌の浸潤・転移阻止につながる分子標的になると考えられている。したがって、HGF-Met受容体系を阻害する分子（HGF-Metアンタゴニスト）は癌の浸潤・転移・成長阻害につながる新規制癌分子になる一方、Met受容体を活性化するアゴニストは様々な疾患の治癒・改善につながる再生医薬となることが期待される。

2. 研究の目的

タンパク質の結晶化技術やX線結晶構造解析技術の進歩がコンピュータの進歩と相まって、構造生物学とバイオインフォーマティクス技術を使用して新しい医薬を探索する手法が進展している。本研究ではHGF-Met受容体複合体の立体構造に基づき、インシリコ創薬技術を基盤として、HGF-Met受容体系

を阻害する低分子アンタゴニストあるいはMet受容体の活性化につながる低分子アゴニストを創成することを目的とする。とりわけ、HGF依存的Met受容体活性化の活性化様式を考慮し、HGF-Met系を阻害する低分子アンタゴニスト化合物の創成を主たる目的とする。

3. 研究の方法

これまでの共同研究からインシリコ創薬により、NK1-NK1相互作用面、HGFβ鎖-Met相互作用面を遮断するHGFアンタゴニストを探索し、後者の相互作用を特異的に阻害する化合物を得ている。HGF分子内ドメインであるβ鎖の蛋白質サンプルを結晶化用至高純度精製し、シード化合物との複合体の結晶を調製する。この結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構においてX線回折データ測定を行い、構造解析を行う。

4. 研究成果

2.9Å分解能でのHGFβ・シード化合物の複合体構造解析に成功した。シード化合物の結晶における占有率が100%に達しておらず、詳細は議論できないが、インシリコによる創薬過程で見出されたS2サイトに結合していることが明らかとなった（図1）。このS2サイトはMetがβ鎖に結合する際に重要であることがわかっており、シード化合物が

直接 HGF と Met の結合を阻害している様子を捉えている。今後、X線結晶中における化合物の占有率を上げることで化合物の詳細な結合様式を明らかにし、論理的創薬手法である Structure-Based Drug Design 研究を展開し、高活性化合物の創出を目指す。

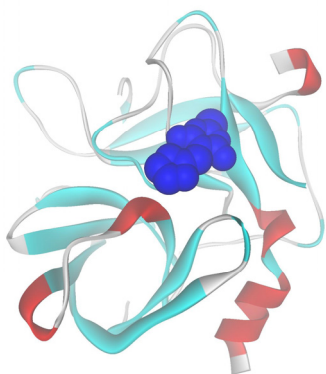


図 1 シード化合物（青色）の結合様式

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 5 件)

1. Combined high-resolution neutron and x-ray analysis of inhibited elastase confirms the active-site oxyanion hole but rules against a low-barrier hydrogen bond, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11033-11040 (2009). T. Tamada, T. Kinoshita, K. Kurihara, M. Adachi, T. Ohhara, K. Imai, R. Kuroki, T. Tada

[学会発表] (計 1 8 件)

1. Experimental Approaches to Advanced Structure-Based Drug Design, T. Kinoshita, CBI-KSBSB Joint Conference (釜山、2009年)、招待講演

[図書] (計 1 件)

1. 「インシリコ技術を駆使した薬剤開発の実際」木下誉富、仲西功 (著者分担)、コンピューターで薬を創ろう、化学同人 (2009), 81-94.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

PCT/JP2010/052765

(元出願 : 特願 2009-03997)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪府立大学理学系研究科 木下誉富
准教授

(2) 研究分担者

大阪府立大学理学系研究科 仲庭哲津子
ポストドク

大阪府立大学理学系研究科 関口雄介
M 2

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御 松本邦夫 教授

平成 22 年 4 月 15 提出

対象研究テーマ：Fas リガンドの生理的・病的役割の解明

研究期間：2009 年 8 月 17 日～2010 年 3 月 31 日

研究題目：Toll 様レセプター (TLR) 刺激により誘導される前立腺癌の細胞死メカニズムの解明

研究代表者：島根大学医学部微生物免疫学講座 教授 原田 守

研究成果の概要：

Toll-like receptors (TLRs) は、免疫応答の誘導において重要な役割を担っている。TLRs は、種々の癌細胞にも発現しており、TLRs を標的にした癌治療は、癌細胞の破壊と抗癌免疫応答の増強を同時に誘導できる可能性がある。そこで、TLR3 リガンドである poly(I:C) の TLR3 を発現した前立腺癌細胞株 (LNCaP、PC3、DU145) に対する抗腫瘍効果を検討し、特に、poly(I:C) に感受性を示した LNCaP での作用機序の解明を試みた。その結果、poly(I:C) による TLR3 を介するシグナルは、LNCaP 前立腺癌細胞に、autophagy を伴った apoptosis を誘導するとともに細胞増殖阻害を生じさせ、その機序として、PI3K/AKT 経路の抑制が関与していることを明らかにした。

研究分野：癌治療、免疫療法

キーワード：TLR、前立腺癌、細胞死、PI3K/AKT

1. 研究開始当初の背景

近年の腫瘍免疫学の発展により T 細胞や抗体に認識される癌関連抗原が多数同定され、特異的癌免疫療法の臨床研究が国内外で実施されている。しかしながら、癌ワクチン療法による治療効果は十分とは言えず、免疫療法による治療効果を高めるためには、癌細胞側の治療抵抗性の機序や細胞死のメカニズムをより詳細に解明する必要があると考えられる。一方、生体内での免疫応答誘導における Toll 様受容体 (TLR: Toll-like receptor) の役割の重要性が注目されているが、癌免疫分野における TLR に関する研究の大部分は、樹状細胞などの抗原提示細胞に関するものであり、多くの癌細胞が TLR を発現しているにもかかわらず、癌細胞での TLR の機能や TLR を標的とした癌治療の研究は非常に少ない。

2. 研究の目的

申請者は、複数の前立腺癌細胞株を用いて TLR の発現やそのリガンドが前立腺癌細胞に及ぼす影響についての研究に取り組んできた。その過程で、一部の前立腺癌細胞株は、

TLR3 リガンドである poly(I:C) の存在下で細胞死による増殖抑制を受けることを観察し、さらに、poly(I:C) で誘導される前立腺癌細胞自身が Fas と Fas リガンドを発現していることを観察した。TLRs は、種々の癌細胞にも発現しており、癌細胞の TLRs を標的にした癌治療は、癌細胞の破壊と抗癌免疫応答の増強を同時に誘導でき、有効な治療になる可能性がある。本研究では、TLR3 リガンドである poly(I:C) が、TLR3 を発現した前立腺癌細胞株に対する抗腫瘍効果と、特に、poly(I:C) に感受性を示した LNCaP 前立腺癌での作用機序の解明と Fas/Fas リガンドの関与を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

TLR3 を発現した前立腺癌細胞株 (LNCaP、PC3、DU145) を poly(I:C) の存在下で培養し、2 日後の細胞生存率を WST 法で検討した。この培養系に balifomycin や chloroquine を添加し、抗腫瘍効果に endosome が関与しているかを調べた。apoptosis による細胞死を Annexin V/PI 染色によるフローサイトメトリー法と抗 caspase 抗体による immunoblot 法により検討した。

癌細胞の Fas と Fas リガンドの発現をフローサイトメトリー法で解析し、また、Fas/Fas リガンド相互作用による apoptosis の可能性を抗 Fas リガンド抗体による阻害実験で検討した。さらに、autophagy の関与を、LC3 に対する抗体による immunoblot 法と GFP/LC3 を発現させた LNCaP 細胞での LC3 foci の形成を調べた。次に、poly(I:C) による癌細胞増殖抑制の可能性を、Ki67 の発現と BrdU の取り込み試験により検討した。LNCaP 細胞は、PTEN を欠損しているために PI3K/AKT 経路が恒常的に活性化しているが、poly(I:C) が LNCaP の AKT のリン酸化に対する効果を immunoblot 法で調べた。さらに、細胞周期・増殖や apoptosis に関連する分子の発現も immunoblot 法で調べた。

4. 研究成果

TLR3 を発現した前立腺癌細胞株 (LNCaP, PC3, DU145) の中で LNCaP 細胞は、poly(I:C) により細胞生存率が著しく低下した。この効果は、balifomycin や chloroquine により解除されることから、endosome を介すると考えられた。Annexin V/PI 染色と caspase に対する immunoblot 法により、poly(I:C) は LNCaP に caspase 依存性の apoptosis を起こしていることが判明した。しかし、pan-caspase inhibitor である z-VAD を添加しても poly(I:C) の LNCaP に対する効果は部分的にしか解除されないことから、caspase 依存性 apoptosis 以外の機序の関与が示唆された。また、LNCaP 細胞は、細胞表面に Fas と Fas リガンドを発現していたが、抗 Fas リガンド阻害抗体の添加は、poly(I:C) による LNCaP の細胞生存率の低下を回復させなかったことから、Fas/Fas リガンド相互作用による apoptosis の可能性は低いと考えられた。さらに、Apoptosis 以外の細胞死機序である autophagy の関与を、type II LC3 の発現と GFP/LC3-plasmid を transfect した LNCaP で検討したところ、poly(I:C) 処理後の LNCaP には、type II の発現が高まり、GFP-LC3 foci が形成されたことから、poly(I:C) 処理された LNCaP 細胞では、autophagy が生じていることが判明した。さらに、細胞死以外の機序として、poly(I:C) による癌細胞増殖抑制の可能性も検討した。Poly(I:C) 処理により LNCaP での Ki67 の発現や BrdU の取り込みが減少していた。また、PTEN を欠損しているために LNCaP 細胞の増殖には PI3K/AKT 経路が関与しているが、poly(I:C) 処理により LNCaP の AKT(Ser473, Thr308) のリン酸化が抑制されていた。さらに、細胞増殖を調節する cyclin D と c-myc の発現も低下し、逆に、細胞周期を負に制御する p21 と p27 の発現は増

強していた。また、apoptosis に関連する分子である p53、NOXA の蛋白の発現も高まっていた。以上より、poly(I:C) による TLR3 を介するシグナルは、LNCaP 前立腺癌細胞に、autophagy を伴った apoptosis と細胞増殖阻害を生じさせ、その機序として、PI3K/AKT 経路の抑制が関与していることが強く示唆された。

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 4 件)

1) Hamaguchi M, Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Harano M, Tatsugami K, Teshima T, Harada M, Yoshikai Y, Naito S. Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in mice. **Cancer Science**, 100: 138-143, 2009.

2) Kondo M, Murakawa Y, Harashima N, Kobayashi S, Yamaguchi S, Harada M. Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/FasL interaction in pathogenesis of inflammatory myopathies. **Immunology**, 128: e589-e599, 2009.

3) Komohara Y, Takemura K, Lei XF, Sakashita N, Harada M, Suzuki H, Kodama T, Takeya M. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to up-regulation of nitric oxide and IFN- γ production by tumor-associated macrophages. **Cancer Science**, 100: 2160-2166, 2009.

4) Tongu M, Harashima N, Yamada T, Harada T, Harada M. Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 59: 769-777, 2010.

[学会発表] (計 5 件)

1) Nanae Harashima, Miki Tongu, Mamoru Harada: TLR3 ligand-induced prostate cancer cell death through endogenous production of type I IFN. 2009年10月1日-3日・横浜・第68回日本癌学会総会

2) Mamoru Harada, Masahiro Kondo, Nanae Harashima: TLR3 ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells. 2009年12月2日-4日・大

阪・第39回日本免疫学会総会

3) Nanae Harashima, Ryu Imamura, Shinji Okano, Takashi Suda, Mamoru Harada: TLR3 ligand-induced apoptotic cell death with autophagy and growth arrest in human prostate cancer cells. 2010年8月22-27日・神戸・第14回国際免疫学会

4) 原嶋奈々江、稲尾瞳子、岡野慎士、原田守: TLR3 リガンド刺激により誘導される前立腺癌細胞のアポトーシスと細胞増殖阻害。2010年7月22-23日・熊本・第14回日本がん免疫学会総会

5) Shinji Okano, Yoshikazu Yonemitsu, Mamoru Harada, Yasunobu Yoshikai, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa: RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus (rSeV) is a novel stimulant for human dendritic cells. 2010年7月22-23日・熊本・第14回日本がん免疫学会総会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島根大学医学部微生物免疫学講座(免疫学)
原田 守 教授

(2) 研究分担者

島根大学医学部微生物免疫学講座(免疫学)
原嶋奈々江 助教

(3) 本研究所担当者

免疫炎症制御 須田貴司 教授

平成22年4月30日提出

対象研究テーマ：Pim キナーゼ阻害薬のスクリーニング

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：Pim キナーゼを阻害する低分子化合物の合成

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授 石橋弘行

研究成果の概要：

筆者らは、数種のステモナミド合成中間体がPim-3 キナーゼ活性を強く阻害するのみならず、膵臓がん細胞株の試験管内ならびにヌードマウス内での増殖を抑制することを見出した。そこで、これらの化合物をリード化合物として、新たな抗がん剤の開発を目指した。また、新たに、数種の置換フェナントレン類がPim-3 キナーゼ活性を阻害することを明らかにした。

研究分野：がん分子標的治療

キーワード：Pim-3 キナーゼ・膵臓がん・置換フェナントレン類・低分子抗がん剤の開発

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは、特徴的な症状がないことと、膵臓の解剖学的特性から、根治手術可能な早期の状態での診断が、現時点で困難であるのみならず、今後とも困難であり、将来にわたって抗がん剤を主体とする治療法が主体となると考えられる。しかしながら、現在行われているゲムシタビン (gemcitabine) を主体とする膵臓がんに対する化学療法では生存期間が1年以下であり、有効性は低く、膵臓がん発症の分子機構を解明による、標的分子の同定を通じた、新たな治療薬の開発が強く望まれている。

金沢大学がん研究所の向田らのグループは、セリン/スレオニン・キナーゼ活性を示す原がん遺伝子であるPim-3が、内胚葉由来の正常臓器では発現していないにもかかわらず、がん化にともない発現が亢進することを発見した。特に膵臓がんでは全例で発現が亢進していることを確認した。さらに、Pim-3が、好アポトーシス分子であるBadの112番目のセリン残基をリン酸化し、不活化することによって、がん細胞のアポトーシスを抑制し、がん細胞の生存に有利に働いている可能性を示唆する結果も得た。すなわち、Pim-3の発現あるいは活性を抑制する薬剤は、従来の抗がん剤が標的としていない分子を標的とする、新たな種類の抗がん剤となる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに合成した数種のステモナミド合成中間体がPim-3 キナーゼ活性を阻害するのみならず、膵臓がん細胞株の試験管内ならびにヌードマウス内での増殖を抑制することを見出しているため、これらをリード化合物として、膵臓がんを始めとする内胚葉由来臓器のがんに対する新たな抗がん剤の開発を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

低分子化合物を合成し、Pim キナーゼ活性阻害活性を指標として、以下のスクリーニングを行った。

①すでに確立した、酵素免疫学的方法にてPim-3ならびにPim-1・Pim-2活性を測定する方法で、種々の低分子化合物のPim キナーゼ活性への抑制効果を検討した（詳細な方法は発表論文に記載している）。

②Pim-3活性を抑制した低分子化合物の膵臓がん細胞株の試験管内での増殖への影響を、MTTアッセイ法にて用いて検討した。

4. 研究成果

①ステモナミド合成中間体がPim キナーゼ活性の阻害のみならず、ヒト膵臓がん細胞株の試験管内ならびにマウス個体内での増殖を抑制することを報告している (Li et al., 2010)。これをリード化合物とする化合物を合成し、同様のスクリーニングを行った。し

かし、論文に報告した化合物に比べて、強い Pim キナーゼ活性抑制作用ならびにヒトがん細胞株の増殖抑制作用を示す化合物を見出すことは出来なかった。

2) 置換フェナントレン類の数種の化合物が Pim-3 キナーゼ活性を阻害するとともに、ヒト膵臓がん細胞株の試験管内での増殖を抑制することを見出し、特許出願を行った。

今後、特許申請した置換フェナントレン類の化合物をリード化合物とした化合物の合成を行い、Pim キナーゼ活性ならびにヒト膵臓がん細胞株の増殖への影響を検討する予定である。

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1件)

Li, Y.-Y., Wang, Y.-Y. Taniguchi, T., Kawakami, T., Baba, T., Ishibashi, H., Mukaida, N. Identification of stemonamide synthetic intermediates as a novel potent anticancer drug with an apoptosis-inducing ability. *Int. J. Cancer*, in press.

[学会発表] (計2件)

アミンとジスルフィドを用いる一電子移動型ラジカル反応

藤井達矢、井戸田 淳、谷口剛史、石橋弘行
第39回複素環化学討論会(千葉)

鉄とヒドリドを用いる 1,6-ジエン類の酸化還元的ラジカル環化反応

後藤直也、西端亜紗美、谷口剛史、石橋弘行
第35回反応と合成の進歩シンポジウム(金沢)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

特願 2009-16200

向田直史、石橋弘行、谷口剛史

置換フェナントレン化合物を有効成分とするがんを予防および/または治療するための医薬組成物

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者
金沢大学医薬保健研究域薬学系 石橋弘行
教授

(2)研究分担者
金沢大学医薬保健研究域薬学系 松尾淳一
准教授

金沢大学医薬保健研究域薬学系 谷口剛史
助教

(3)本研究所担当者
分子生体応答 向田直史 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 22 年 4 月 28 日提出

対象研究テーマ：胃がんマウスモデルを用いたがん幹細胞の探索・維持機構、新規薬物の薬効評価に関する研究

研究期間：2009 年 8 月 17 日～2010 年 3 月 31 日

研究題目：胃がん細胞の Wnt シグナル伝達における Smoothened の役割

研究代表者：京都大学医学研究科 准教授 青木正博

研究成果の概要：

複数のヒト胃癌細胞株において Smoothened をノックダウンしたところ、活性型 β -catenin の減少を伴って Wnt シグナルが強く抑制された。胃癌細胞において Smoothened が Hedgehog 経路のみならず Wnt 経路の制御にも関与していることが示唆された。

研究分野：

キーワード：胃癌、Hedgehog 経路、Wnt 経路、Smoothened、

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog(Hh)経路は、消化管を含む多くの臓器において、細胞の増殖や分化に関与する重要なシグナル伝達経路である。この経路は、Hh リガンドが受容体 Patched(Ptch) に結合することにより、7 回膜貫通型受容体 Smoothened (SMO)への抑制が解除され、転写因子 Gli の核内移行が促進し、その標的遺伝子の転写が誘導されるシグナル伝達経路として理解されている。近年、様々な癌種において Hh 経路の活性化の関与が示唆されている一方で、Hh 経路が働いているのは主に間質細胞であるという報告がされるなど、癌化における Hh 経路諸分子の役割には未知の部分が多い。我々は最近、Wnt 経路の亢進により腸管腺腫を自然発症する *Apc* 変異マウスの腫瘍、及び一部のヒト大腸癌細胞株において、Hh 経路の活性化は認められないものの Hh の重要なシグナル伝達分子である SMO が高発現しており、その発現が腸管腫瘍の増殖・拡大に寄与していることを見出した。また、その分子機序として、SMO が活性型 β -catenin の核移行を制御することにより、Hh 経路ではなく β -catenin 依存的な Wnt 経路を正に制御することを示した。これらの結果は、Hh 経路の活性化の有無に関わらず、SMO の発現抑制が、大腸腺腫症又は大腸癌に対する新たな治療戦略となる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究計画では、胃癌における SMO の役割について、胃癌マウスモデル *Wnt1/C2mE* トランスジェニックマウス、及びヒト胃癌細胞株を用いて明らかにすることを目的と

した。胃癌においては大腸癌とは異なる機序で Wnt 経路の活性化が見られるため、SMO による活性型 β -catenin の核移行制御機構について大きな洞察を得られると考えられる。また、SMO の胃癌治療の分子標的としての評価にも繋がることを期待される。

3. 研究の方法

ヒト胃癌細胞株における SMO をはじめとする Hh 経路シグナル分子の発現を定量的 RT-PCR によって解析した。SMO を発現している胃癌細胞株において、siRNA を用いて SMO の発現をノックダウンし、Wnt 経路に対する影響をレポーター遺伝子アッセイ、及び Wnt 標的遺伝子の発現解析、活性型 β -catenin の発現によって評価した。

4. 研究成果

ヒト胃癌細胞株 MKN74、AGS、KATOIII のいずれにおいても SMO の発現が確認され、これらの細胞で SMO を siRNA によってノックダウンしたところ、細胞増殖が抑制された。その際、活性型 β -catenin の発現レベルが顕著に減少し、Hh 経路の標的遺伝子 Patched の mRNA レベルに加えて、Wnt シグナルの標的遺伝子 Cyclin D1 の mRNA レベルも減少していた。更に、TOPFLASH レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより、MKN74 細胞、AGS 細胞における SMO のノックダウンは、Wnt シグナルを強く抑制することが分かった。これらの結果は、大腸癌細胞のみならず胃癌細胞においても、SMO は Wnt シグナル経路を正に制御していることを示している。大腸癌細胞と異なり胃癌細胞では Hh 経路も活性化されてい

ることが知られており、SMO が同じ細胞で Hh 経路と Wnt 経路の両者に関与している可能性が示唆された。

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)

Arimura, S., Matsunaga, A., Kitamura, T., Aoki, K., Aoki, M., Taketo, M.M.

Reduced Level of Smoothened Suppresses Intestinal Tumorigenesis by Down-Regulation of Wnt Signaling. *Gastroenterology*, 137,629-638 (2009)

Kakizaki, F., Aoki, K., Miyoshi, H., Carrasco, N., Aoki, M., Taketo, M.M.

CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of Solute Carrier Family 5, Member 8 in the Colonic Epithelium *Gastroenterology*, 138, 627-635 (2010)

[学会発表] (計 1 件)

青木正博、有村純暢、藤下晃章、武藤 誠
「消化管腫瘍形成における Smoothened 及び mTORC1 の役割」

第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム
2009 年 10 月 2 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都大学大学院医学研究科
生体制御医学講座遺伝薬理学教室
青木正博 准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学 大島正伸 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年4月1日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：分子イメージングによる幹細胞可視化法の開発

研究代表者：財団法人癌研究会癌研究所 部長 原 英二

研究成果の概要：

インビボ・イメージングを用いることによりマウスの生体内においての Bmi-1 遺伝子と p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態を解析することに成功した。DMBA/TPA を用いた化学皮膚発癌の過程や加齢の過程で Bmi-1 遺伝子と p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態を比較検討した結果、両者の発現は必ずしも逆相関の関係にあるわけではなく、p16^{INK4a} 遺伝子の発現は Bmi-1 以外の転写調節因子によっても制御されていることが明らかとなった。特に癌化した組織においては Bmi-1 以外のメカニズムにより、p16^{INK4a} 遺伝子の発現が制御されている可能性が大きいことが強く示唆された。

研究分野：癌生物学

キーワード：p16^{INK4a}, Bmi-1, 可視化、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞に発癌の危険性のある異常が生じると、p16^{INK4a} 遺伝子の発現レベルが上昇し、細胞老化が誘導される。細胞老化は異常細胞の増殖を防ぐ重要な癌抑制機構として働いている一方で、組織幹細胞において細胞老化が起こると生体機能の衰え、即ち個体老化を起こすことが明らかになりつつある。これまで主に培養細胞を用いた研究から p16^{INK4a} 遺伝子の発現はポリコム・グループ転写因子の一つである Bmi-1 により精密に制御されていることが示されてきた。しかし、発癌や個体老化の過程において Bmi-1 が生体内のどこで、いつ、どのように p16^{INK4a} 遺伝子の発現を制御しているのかについては殆ど明らかにされていない。この問題を解決するために我々は昨年度から平尾敦 教授との共同研究を進めてきた。

2. 研究の目的

これまでの共同研究により、Bmi-1 遺伝子の発現と p16^{INK4a} 遺伝子の発現をマウスの生体内でリアルタイムに測定できるイメージングマウスの開発に成功している。本年度はこれらのマウスを用いて、加齢や発癌の過

程での Bmi-1 と p16^{INK4a} 遺伝子発現の生体内ダイナミクスの解明を目指した。更に、p16^{INK4a} 遺伝子または Bmi-1 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを用いた解析と組み合わせることにより Bmi-1 による p16^{INK4a} 遺伝子発現調節の生体内での役割及びその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

昨年度までに作成した Bmi-1 レポーターマウスと p16^{INK4a} レポーターマウスとを用いて発癌や個体老化の過程で Bmi-1 及び p16^{INK4a} の発現動態をインビボ・イメージングにより解析する。

4. 研究成果

DMBA/TPA を用いた化学皮膚発癌の過程で、Bmi-1 レポーターマウスと p16^{INK4a} レポーターマウスが発する発光シグナルを解析することにより、発癌ストレスにより誘導される p16^{INK4a} 遺伝子の発現は Bmi-1 の発現と必ずしも逆相関の関係にないことが分かった。

また、同様の結果が固体老化の過程でも認められ、p16^{INK4a} と Bmi-1 の関係は組織、及び受けたストレスの種類に応じて大きく異なることが強く示唆された。

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)

Fernandez-Marcos, P.J., Pantoja, C.,
Gonzalez-Rodriguez, A., Martin, N., Flores, J.M.,
Valverde, A.M., Hara, E. & Serrano, M.

Normal proliferation and tumorigenesis but
impaired pancreatic function in mice lacking the
cell cycle regulator sei1.

PLoS One. 18: e8744 (2010).

Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama,
R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M.,
Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Naka,
K., Matsumoto, M., Ohtani, N. & Hara, E.

Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} reveals
cross-talk with p53.

J. Cell Biol. 186, 393-407 (2009)

[学会発表] (計 2 件)

Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N., &
Hara, E. :

Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} expression
unveils a cross-talk between p53 and p16^{Ink4a}

The Salk Institute Meeting /Mechanisms &
Models of Cancer (La Jolla, U.S.A.)

2009年8月12-16日

Hara, E. :

Real-time in vivo imaging of p16^{Ink4a} reveals
cross-talk with p53.

IMCB symposium on cell cycle regulation and
tumorigenesis. (Singapore, Singapore)

2009年9月7-8日

[図書] (計 1 件)

高橋暁子、原 英二

細胞周期アッセイ法

がん分子標的治療研究マニュアル

(鶴尾 隆/曾根三郎編) 金芳堂 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

財団法人癌研究会癌研究所 原 英二
部長

(2) 研究分担者

財団法人癌研究会癌研究所 大谷直子
主任研究員

財団法人癌研究会癌研究所 高橋暁子
研究員

財団法人癌研究会癌研究所 山越貴水
嘱託研究員

財団法人癌研究会癌研究所 吉本 真
嘱託研究員

財団法人癌研究会癌研究所 杉田千鶴
嘱託研究助手

財団法人癌研究会癌研究所 今井良紀
大学院生

財団法人癌研究会癌研究所 田島丈子
大学院生

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築 平尾 敦 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年3月25日提出

対象研究テーマ：胃がんマウスモデルを用いたがん幹細胞の探索および維持機構に関する研究

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：胃癌幹細胞におけるCD44の発現意義とその機能解析

研究代表者：慶應義塾大学医学部 教授 佐谷秀行

研究成果の概要：

我々は胃癌自然発生モデル K19-Wnt1/C2mE トランスジェニックマウスを用いて幹細胞様胃癌細胞の候補となる細胞の探索を行った。その結果、CD44+胃癌細胞には、別の癌幹細胞マーカーである CD133+細胞が約 30%程度含まれることを見出し、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により CD44+ 細胞は未分化な細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを示した。また一方で CD44+胃癌細胞には幹細胞の特徴の一つである BrdU 長期保持を示す腫瘍細胞も多く含まれることが分かった。これらの結果から、このマウス胃癌組織において CD44+胃癌細胞は癌幹細胞の特徴をもつ未分化な細胞の存在が強く示唆された。さらに、CD44^{-/-} Wnt1/C2mE マウスの解析結果から、CD44 は何らかのメカニズムにより癌細胞内の p38MAPK の活性化を抑制することにより胃癌細胞の未分化性維持機構に関わっていると考えられた。

研究分野：

キーワード：胃癌、癌幹細胞、CD44

1. 研究開始当初の背景

CD44 は、乳癌や大腸癌などの固形癌における癌幹細胞の表面マーカーであり、近年胃癌においても CD44 が癌幹細胞表面マーカーとして注目されている。しかしながら、癌幹細胞における CD44 の発現意義およびその機能については、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

CD44+胃癌細胞に着目してその癌幹細胞としての性質の解明および癌幹細胞における CD44 の機能解析を行う。

3. 研究の方法

K19-Wnt1/C2mE 胃癌マウスを用いて CD44+胃癌細胞の拡大に関わる因子を同定する。Wnt1/C2mE 胃癌マウスから CD44+胃癌細胞を単離した後、遺伝子発現プロファイルの解析および CD44 を介した癌幹細胞としての性質を維持するシグナルについて生化学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

K19-Wnt1/C2mE マウス胃癌において CD44+胃癌細胞は未分化な細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを示した。また一方で CD44+胃癌細胞には幹細胞の特徴の一つである BrdU 長期保持を示す腫瘍細胞も多く含まれていた。これらの結果から、このマウス胃癌組織において CD44+胃癌細胞は癌幹細胞の特徴をもつ未分化な細胞の存在が強く示唆された。さらに、CD44^{-/-} Wnt1/C2mE マウスの解析結果から、CD44 は癌細胞内の p38MAPK の活性化を抑制することにより胃癌細胞の未分化性維持機構に関わっていると考えられ、CD44 およびその下流シグナルをターゲットとすることが癌幹細胞の拡大を抑制し、癌治療に有効であることが示唆された。

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 1 件)

CD44⁺ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by the cooperative actions of Wnt and prostaglandin E₂ in gastric tumorigenesis
Cancer science in press

Takatsugu Ishimoto, Hiroko Oshima,
Masanobu Oshima, Kazuharu Kai, Ryota Torii,
Takashi Masuko, Hideo Baba, Hideyuki Saya
and Osamu Nagano

[学会発表] (計 1 件)

第 68 回日本癌学会学術総会・口演
「胃幹細胞様細胞における CD44 の機能的役割について」
石本崇胤、永野修、八戸敏史、吉川桃子、
大島正伸、馬場秀夫、佐谷秀行

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

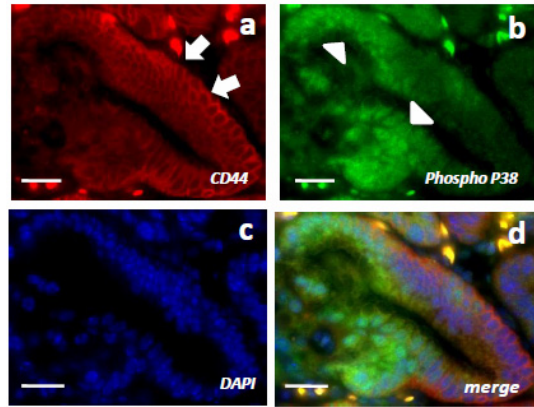
慶應義塾大学医学部 佐谷秀行 教授

(2) 研究分担者

慶應義塾大学医学部 永野 修 助教
熊本大学医学部 石本崇胤 共同研究員

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学 大島正伸 教授



金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年4月7日提出

対象研究テーマ：MT1-MMPの機能解析と分子標的治療法の開発

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：MT1-MMPによる膜タンパクシェディングの病理学的解析

研究代表者：慶応義塾大学医学部 教授 岡田保典

研究成果の概要：

MT1-MMPの新規基質として免疫グロブリン様ドメインを有するGI24/SIP1およびKidney Injury Molecule-1 (KIM-1)を同定し、MT1-MMPによる切断・シェディングの浸潤・転移における役割を検討した。

研究分野：腫瘍分子科学

キーワード：MT1-MMP、膜タンパク、シェディング、浸潤

1. 研究開始当初の背景

MT1-MMPの機能はMMP-2の活性化、細胞外マトリックス成分の分解活性が中心であった。最近になり細胞膜タンパクのシェディング活性が注目を集めるようになったがその実態については不明の点が多い。膜タンパクのシェディングにはMMPと近縁のADAMファミリーも関わっておりその関連も不明である。

2. 研究の目的

MT1-MMPによる膜タンパクシェディングの生理的意義を検討するため、新規MT1-MMP基質として膜タンパクを同定するとともにその生理機能を細胞生物学的に明らかにする。次にMT1-MMPによる切断・シェディングの生理的意義、とりわけがんの浸潤・転移における役割を解明する。

3. 研究の方法

佐藤研究室で同定された新規MT1-MMP基質の中から特に膜タンパク（免疫グロブリン様ドメインを有するGI24/SIP1およびKidney Injury Molecule-1; KIM-1）に注目し、膜タンパクそのものの機能およびシェディングされた細胞ガイドメインあるいは細胞質に残る細胞質ドメインの機能を生理・病理学的に検討する。

4. 研究成果

GI24は細胞のフィブロネクチン、コラーゲンなどへの接着を著しく亢進した。またMT1-MMPと相互作用することによりMMP-2活性化を促進し、その結果GI24発

現細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックス分解活性が有意に上昇し細胞浸潤能も亢進した。KIM-1は最近フォスファチジルセリンのレセプターと同定され、発現細胞は大腸菌などを貪食することが報告されたが、MT1-MMPによるシェディングによりその活性を喪失した。がん細胞の発現するKIM-1の機能については引き続き検討中である。

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）

1. Fujishima S., Shiomi T., Yamashita S., Yogo Y., Nakano Y., Inoue T., Nakamura M., Tasaka S., Hasegawa N., Aikawa N., Ishizaka A. and Okada Y.: Production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin-1) in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Arch. Pathol. Lab. Med. 2010, in press.
2. Ishida M., Mikami S., Kikuchi E., Kosaka T., Miyajima A., Nakagawa K.,

- Mukai M., Okada Y. and Oya M.: Activation of the Aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by up-regulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis* 2010, in press.
3. Stokes A., Joutsa J.T., Ala-aho R., Pitchers M., Pennington C.J., Martin C., Premachandra D.J., Okada Y., Peltonen J., Grenman R., James H.A., Edwards D.R. and Kahari V-M: Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010, in press.
 4. Mikami S., Katsube K., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mochizuki S., Ikeda T., Mukai M. and Okada Y.: Increased RANKL expression is related to tumor migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J. Pathol.* 218:530-539, 2009.
 5. Hattori N., Mochizuki S., Kishi K., Nakajima T., Takaishi H., D'Armiento J. and Okada Y.: MMP-13 plays a role in migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing. *Am. J. Pathol.* 175:533-546, 2009.
- [学会発表] (計 2 件)
1. 三上修治、望月早月、岡田保典、他5名。
Elevated RANKL expression is associated with metastasis and prognosis of renal cell carcinomas. 第 68 回日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 1 日-3 日, 横浜
 2. 望月早月、下田将之、岡野洋尚、岡田保典
ADAM28 supports lung cancer metastasis by escaping from von Willebrand factor-induced apoptosis.
第 68 回日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 1 日-3 日, 横浜
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 0 件)
なし
- [その他]
- なし
6. 研究組織
(1) 研究代表者
慶応義塾大学医学部 岡田保典 教授
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 本研究所担当者
細胞機能統御 佐藤 博 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年4月7日提出

対象研究テーマ：MT1-MMPの機能解析と分子標的治療法の開発

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：悪性脳腫瘍幹細胞におけるMT1-MMPの機能解析

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域医学系 助教 中田光俊

研究成果の概要：

がん幹細胞のマーカーとされるCD133陽性グリオブラストーマ細胞を分離し、MT1-MMPおよび関連遺伝子の発現レベルを検討した結果、陽性細胞ではMT1-MMPおよびインテグリン $\alpha 3$ の発現レベルが陰性細胞に比して著しく高く、これらは共に基底膜分解、ERK1/2の活性化を通して、遊走能・浸潤能を亢進していることが示唆された。

研究分野：がん医科学

キーワード：MT1-MMP、CD133、グリオブラストーマ

1. 研究開始当初の背景

MT1-MMPは細胞膜上の細胞接着斑などに局在し、細胞接着分子などと協調し細胞機能制御に密接に関与するなど、そのダイナミックな機能は複雑多岐にわたっている。悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマにおいてもMT1-MMPが高レベルで発現し、発現レベルが悪性度と相関する。MT1-MMPを標的としたグリオブラストーマ制御法の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

グリオブラストーマにおいてはCD133ががん幹細胞マーカーの一つとされている。CD133陽性グリオブラストーマ細胞におけるMT1-MMPおよび関連因子の発現レベルの検討とその機能を解析する。

3. 研究の方法

グリオブラストーマ細胞株およびヒト臨床サンプルからがん研究所のAutoMaxProを用いてCD133陽性細胞を分離しMT1-MMPおよび関連遺伝子の発現と腫瘍原性・転移性に果たす役割を検討する。

4. 研究成果

グリオブラストーマ細胞株およびヒト臨床サンプルから分離したCD133陽性細胞は陰性細胞に比してMT1-MMPレベルが極めて高かった。同時に陽性細胞ではインテグリン $\alpha 3$ の発現レベルが著しく高く、インテグリン $\alpha 3$ を介したERK1/2の活性化はがん細胞の遊走能・浸潤能と密接に関与していることが示唆

された。

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3件)

1. Yoshida Y, Nakada M, Sugimoto N, Harada T, Hayashi Y, Kita D, Uchiyama N, Hayashi Y, Yachie Y, Takuwa Y, Hamada JI.
Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with survival of patients with glioblastoma. *Int J Cancer* in press
2. Yoshida Y, Nakada M, Harada T, Tanaka S, Furuta T, Hayashi Y, Kita D, Uchiyama N, Hayashi Y, Hamada JI.
The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *J Neurooncol* in press

3. Miyashita K, Nakada M, Shakoori A, Ishigaki Y, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T.

An emerging strategy for cancer treatment targeting aberrant glycogen synthase kinase 3 β . *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9: 1114-1122, 2009

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakada M, Nambu E, Yoshida Y, Furuyama N, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Uchiyama N, Hamada JI.

Integrin α 3 prevents neurosphere formation and proliferation of glioma stem cells 2009 Joint Meeting of the Society for Neuro-Oncology and the AAAS/CNS Section on Tumors, October 22-24, 2009, Mew Orleans, Louisiana

2. 中田光俊、喜多大輔、林康彦、内山尚之、林裕、濱田潤一郎

Ephrin-A2 regulates glioma cell invasion through EphA signaling and predicts patient survival

第 68 回日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 1 日-3 日, 横浜

[図書] (計 1 件)

1. Nakada M, Kita D, Hayashi Y, Hamada JI, Kawakami K, Minamoto T.

RNAi in malignant brain tumors: relevance to molecular and translational research.

RNA Technologies and Their Applications, Springer-Verlag Heidelberg 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢大学医薬保健研究域医学系 中田光俊
助教

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御 佐藤 博 教授

平成22年4月22日提出

対象研究テーマ：肺がん多臓器転移モデルを用いた転移機構解明と標的分子の探索

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：骨転移能を有する癌細胞と骨芽細胞の接触による相互作用の検討

研究代表者：徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部環境病理学分野 准教授 上原久典

研究成果の概要：

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の相互作用に関しては多くの報告があるが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものであり、癌細胞と骨芽細胞が直接接触することによって起きる相互作用に関しては不明な点が多い。そこで、骨転移巣から樹立されたヒト癌細胞株を用いて癌細胞と骨芽細胞の直接接触による相互作用を検索するための共培養モデルを確立し、癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、PC3 ヒト前立腺癌細胞では骨芽細胞と接触することによって4つの破骨細胞誘導関連遺伝子 (IL-1 β , COX-2, IL-6, C3) の発現上昇を伴って破骨細胞誘導が促進されており、抗 cadherin-11 中和抗体によって COX-2, C3 の発現上昇が抑制された。以上より、溶骨性増殖を示す前立腺癌細胞と骨芽細胞が接触することによって破骨細胞誘導が促進され、これに cadherin-11 が部分的に関与している可能性が示唆された。

研究分野：癌の転移

キーワード：骨転移、細胞接触、網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

癌の骨転移は重篤な臨床症状を惹起し患者の QOL を低下させる重要な病態である。しかし、そのメカニズムの解明や治療法の確立は十分なされていない。申請者はこれまでにヒト前立腺癌細胞株をヌードマウスの脛骨に接種するモデルを用いて骨転移形成において platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体や epidermal growth factor (EGF) 受容体に関与していること (J Natl Cancer Inst. 2003 95(6): 458-470, Clin Cancer Res. 2003 9(14):5161-5170)、および可溶性プロスタグランジン E₂ 受容体を用いてプロスタグランジン E₂ を中和することにより、破骨細胞の誘導が阻害され、骨における前立腺癌細胞の増殖が抑制されること (Mol Cancer Ther. 7(9): 2807-16, 2008) を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の間には様々な相互作用が存在すると考えられ、多くの報告がなされているが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものである。骨に転移した癌細胞は造骨性、溶骨性、あるいは両者が混在する病変を形成

するが、いずれの病変においても様々な程度で骨芽細胞と接触しているが、癌細胞と骨芽細胞が直接接触することによって起きる相互作用に関しては報告がない。

本研究は骨転移巣から樹立されたヒト癌細胞株とヒト骨芽細胞を用いて、癌細胞と骨芽細胞が直接接触することによって起きる相互作用を検索するための共培養モデルを確立し、接触による遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析し、骨芽細胞と癌細胞との直接接触が骨での癌細胞の増殖、生存にどのように影響するかを明らかにすることを目的とし、これによって骨転移に対する新しい分子標的治療の開発に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

1) 癌細胞と骨芽細胞の共培養モデルの確立

不死化したヒト骨芽細胞(hFOB 1.19) と骨転移巣から樹立されたヒト前立腺癌細胞株 (マウスの骨で溶骨性増殖を示す PC-3、および造骨性増殖を示す MDA PCa 2b) を用い、骨芽細胞を緑色、癌細胞を赤色のそれぞれ異なる蛍光色素でラベルした後、cell culture insert を用いた癌細胞と骨芽細胞の二層培養 (癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子のみ)、および癌細胞と骨芽細胞を混合して

培養する接触培養（癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子と直接接触の2つ）を行った。培養は無血清状態で48時間行い、接触培養については培養終了後にソーティングを行い、骨芽細胞と癌細胞を分離した。コントロールとして単独で培養した癌細胞を用いた。

2) 骨芽細胞との接触により変動した癌細胞の遺伝子発現の網羅的解析

培養終了後に得られた癌細胞から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ (Affimetrix 社) を行った。遺伝子発現が3倍以上異なるものを有意とした。アレイの結果は RT-PCR で確認した。

3) 癌細胞と骨芽細胞の接触が破骨細胞誘導に及ぼす影響

マウス骨髄細胞を一週間培養後、浮遊細胞を取り除き、ディッシュに接着していた細胞を96穴プレートに 2×10^4 個ずつ播種し、二層培養、あるいは接触培養後の PC-3 細胞ライセートを $10 \mu\text{g}$ 添加し、 10ng/ml の RANKL と M-CSF を含む培地で10日間培養した。その後、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

4) 抗 N-cadherin、および抗 cadherin-11 中和抗体が骨芽細胞と癌細胞の接触に及ぼす影響

骨転移との関連が示唆されている接着分子である N-cadherin、あるいは cadherin-11 に対する中和抗体 ($40 \mu\text{g/ml}$) で骨芽細胞を処理 (37°C 、30 分) 後、接触培養を行い、癌細胞における IL-1 β 、COX-2、IL-6、C3 の遺伝子発現の変化を RT-PCR によって調べた。

4. 研究成果

1) ヒト前立腺癌細胞 (PC-3、および MDA PCa 2b) とヒト骨芽細胞 (hFOB 1.19) を用いて二層培養、および接触培養を行い、単独で培養した癌細胞をコントロールとした。それぞれの培養システムにおける癌細胞の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて比較したところ、PC-3 細胞における遺伝子発現は、単独培養と二層培養間で有意な差は認められなかったが、二層培養と接触培養間では、接触培養で発現が上昇している遺伝子が7個、低下している遺伝子が1個認められ、RT-PCR でも同様の結果が確認された。発現が上昇している7個の遺伝子のうち4個 (COX-2、IL-1 β 、IL-6、C3) は破骨細胞形成への関与が報告されているものであった。

2) MDA PCa 2b 細胞については、単独培養、二層培養、接触培養のいずれを比較しても有意な遺伝子発現の変化は認められなかった。

3) 接触培養後の PC-3 細胞ライセートは、二層培養後のものと比較して、有意に *in vitro* での破骨細胞形成を促進した ($P < 0.005$)。

4) 抗 cadherin-11 中和抗体で骨芽細胞を処

理後、PC-3 細胞と接触培養を行った場合、RT-PCR で PC-3 細胞における COX-2、C3 の発現上昇の抑制が認められた。一方、抗 N-cadherin 中和抗体による処理では PC-3 細胞の遺伝子発現に変化は認められなかった。

以上より、溶骨性増殖を示す前立腺癌細胞と骨芽細胞が接触することによって破骨細胞誘導が促進され、これに cadherin-11 が部分的に関与している可能性が示唆された。

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 0 件)
投稿準備中

[学会発表] (計 1 件)
Shiirevyamba Avirmed、上原 久典、高橋 徹行、金山 博臣、泉 啓介 Change of gene expressions of prostate cancer cells by direct contact with osteoblasts 第 68 回日本癌学会学術総会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者
徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部
環境病理学分野 上原久典 准教授

(2) 研究分担者
なし

(3) 本研究所担当者
腫瘍内科 矢野聖二 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成22年4月28日提出

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化に関わる新しいがん関連遺伝子の単離

研究期間：2009年8月17日～2010年3月31日

研究題目：ウイルス挿入変異によって同定されたがん関連遺伝子 *Jmjd5* の血液・血管の発生における機能解析

研究代表者：東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員 原 孝彦

研究成果の概要：

がん関連遺伝子として同定された *Jmjd5* の正常細胞での機能を解析するために、*Jmjd5* の組み換えマウスを用いた研究を行った。このマウスでは *Jmjd5* の発現が低下しており、胎生 9.5-10.5 日において、卵黄囊の血管新生の異常が認められた。また、卵黄囊、および AGM 領域(Aorta-Gonad-Mesonephros 領域)での造血活性の低下が認められたことから、*Jmjd5* が血液・血管内皮細胞の発生に重要な働きを持つことが明らかとなった。

研究分野：分子生物学

キーワード：*Jmjd5*, 造血幹細胞, 血管内皮細胞, 発生

1. 研究開始当初の背景

がん発症のメカニズムを解析するためには、その原因となる遺伝子を同定することが重要である。マウスゲノムにウイルスの挿入変異を起こすことによりがんを発症させ、その挿入部位を解析することで、がん原因遺伝子を同定することが行われていた。ヒストン脱メチル化酵素ファミリーの一つである *Jmjd5* はこの方法によって同定されていた。*Jmjd5* をはじめとするヒストン脱メチル化酵素の正常細胞での機能は未だ不明な点も多いため、その解析を行うことは重要である。

2. 研究の目的

白血病などのがん発生に関わる遺伝子として、AML/RUNX1, SCL/Tal1, Lmo2 などの多くの遺伝子が知られている。これらの遺伝子は、がんの原因遺伝子となるとともに、血液・血管内皮細胞の分化、発生に関わることが明らかとされてきた。がん関連遺伝子 *Jmjd5* においても、同様の機能を持つ可能性がある。本研究は *Jmjd5* の *in vivo* での血液・血管内皮細胞発生への関与を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

両アレルに Neo カセットを含む *Jmjd5* コンディショナルノックアウトマウスは、*Jmjd5* の発現の低下が観察された。このマウスを胎生 9.5-10.5 日で回収し、卵黄囊や AGM 領域(Aorta-Gonad-Mesonephros 領域)での造血活性をコロニーアッセイやフロー

サイトメトリーによって、検討する。

4. 研究成果

両アレルに Neo カセットを持つ *Jmjd5*Neo/Neo マウスは出産されることが無く、胎生致死となっていることがわかった。このマウスで、*Jmjd5* の発現を検討したところ、野生型に比べて、Neo/Neo マウスは約 20%以下までその mRNA レベルが低下していた。このことより、*Jmjd5* ゲノム中への Neo カセット挿入による影響で、*Jmjd5* の発現が低下し、それによる胎生致死が起こっていることがわかった。

次に、胎生 9.5-10.5 日の *Jmjd5*Neo/Neo マウスを観察したところ、卵黄囊における血管新生が著しく抑制されていることがわかった。この卵黄囊から血液細胞を採取し、その造血活性を検討したところ、赤血球コロニーをはじめとする、造血前駆細胞の減少が認められた。また、成体型造血幹細胞が発生することが知られている AGM 領域のコロニーアッセイの結果でも、造血前駆細胞の減少が認められている。

以上の結果より、*Jmjd5* は血液細胞・血管内皮細胞の共通前駆細胞であるヘマンジオブラスト経路による血液・血管内皮細胞の発生に重要な働きを持つことが示唆された。今後は、*Jmjd5* コンディショナルマウスと Tie2-Cre マウスを掛け合わせ、*Jmjd5* 遺伝子を血液・血管内皮細胞特異的に欠損させることで、さらに詳細な解析を行う予定である。

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)

K. Tanaka, S. Okamoto, Y. Ishikawa, H. Tamura, and T. Hara. DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes. *Oncogene*, 28: 2142-2151, 2009.

K. Ohbayashi, K. Tanaka, K. Kitajima, K. Tamura, and T. Hara. A novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of *cyclin-D2*, *E-cadherin*, and integrin- α family genes in mouse spermatocyte-derived cells. *Genes to Cells*, (in press)

[学会発表] (計 4 件)

田中貴代子, 原 孝彦: DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes. 第68回日本癌学会学術総会, 2009.10.1-3, 横浜.

峯畑健一, 北島健二, 原 孝彦: The role of Foxo1 in the development of hematopoietic cells. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜.

石村昭彦, 峯畑健一, 寺島農, 原 孝彦, 鈴木健之: Functional analysis of Jmjd5, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜.

K. Minehata, K. Kitajima, and T. Hara. The role of Foxo1 in the development of hematopoietic cells. DECODE Winter Workshop 2010, 2010.1.18-20, Niigata.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 幹細胞プロジェクト 原 孝彦
副参事研究員

(2) 研究分担者

東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 幹細胞プロジェクト 峯畑健一
主任研究員

(3) 本研究所担当者

機能ゲノミクス 鈴木 健之 教授