

平成23年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2012.4

金沢大学がん進展制御研究所

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月4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：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：分子イメージングによる組織幹細胞可視化法の開発と応用

研究代表者：公益財団法人がん研究会がん研究所 部長 原 英二

研究成果の概要：

幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが知られているBmi-1とその標的分子であり、細胞老化の重要な誘導因子であるp16^{INK4a}の関係解明を通して細胞老化と個体老化および発癌との関係解明を目指した。p16^{INK4a}遺伝子の発現をインビボ・イメージング出来るマウスとBmi-1ノックアウトマウスとを交配させることにより、Bmi-1非存在下でのp16^{INK4a}遺伝子の発現動態を調べた。その結果、Bmi-1非存在下では生後間もない時期から体の殆ど全ての組織においてp16^{INK4a}の発現が著しく上昇していたが、加齢に伴いp16^{INK4a}の発現が更に上昇することが分かった。このため、加齢の過程で起こるp16^{INK4a}の発現とそれに伴う細胞老化の誘導にはBmi-1はあまり関与していないものと考えられる。また、細胞老化に伴いSASPと呼ばれる発癌促進作用が有る様々な分泌性蛋白質を高発現する現象が如何にして起こるかについて解析を行った。その結果、DNAダメージシグナルのよりDNAメチル化酵素 (DNMT1) 及びヒストンメチル化酵素 (G9a/GLP) の発現レベルが低下することによりクロマチンリモデリングが起きることでSASPが起こることを見出した。今後、加齢に伴って起こるSASPの誘導機構を特異的に阻害できる方法の開発へとつながることが期待される。

研究分野：がん生物学

キーワード：細胞老化、インビボ・イメージング、DNAダメージ

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞にテロメアの短小化や癌遺伝子の活性化など、発癌の危険性がある異常が生じるとp16^{INK4a}などのサイクリン依存性キナーゼ(CDK) 阻害因子が発現し、不可逆的な増殖停止状態である細胞老化が誘導されることが知られている。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く一方で、組織幹細胞を枯渇させ個体老化を進行させる原因になっていることも明らかになりつつある。また、最近では細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素など炎症や発癌を促進する様々な分泌性蛋白質を高発現するSenescence Associated Secretory Phenotypes (SASP) と呼ばれる現象を引き起こすことも明らかに成り、細胞老化には生体のホメオスタシスを維持する作用と破綻させる作用の両方が存在していると考えられるようになってきた。

我々はこれまで発癌過程における細胞老化と組織幹細胞の関係解明を目指して金沢大学がん進展制御研究所の平尾教授との共同研究を行い、細胞老化誘導遺伝子である

p16^{INK4a}の発現を発光シグナルとしてマウスの生体内でリアルタイムに可視化・計測(イメージング)出来るトランスジェニックマウスの開発を行ってきた(Yamakoshi *et al.* **J. Cell Biol.** 2009)。更にこのマウスを用いて、加齢の過程で細胞老化を起こす組織を特定することに成功し、加齢の過程で起こる細胞老化の作用機序とその役割の解明に努めてきた。

2. 研究の目的

本研究では生体内で起こる細胞老化の誘導と組織幹細胞の枯渇がどのように関係しているのかを明らかにすることを通して個体老化と発癌との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p16^{INK4a}発現イメージングマウスと組織幹細胞の未分化性の維持に係わるBmi-1遺伝子を欠損したBmi-1ノックアウトマウスを交配させることでBmi-1遺伝子を欠損した状態でのp16^{INK4a}遺伝子の発現動態を加齢の過程で解析することにより、生体内での幹細胞性の維持と細胞

胞老化の誘導がどのような関係になっているのかを明らかにすることを試みた。

(2) 細胞老化の負の側面である SASP が起こる分子機構を明らかにするために、細胞老化の原因である DNA 損傷ストレスにより発現が変化する転写調節因子を DNA マイクロアレイを用いた解析によって絞り込んだ。更に RNAi によるノックダウンとクロマチン免疫沈降法を組み合わせることで SASP の制御に係わる転写因子の同定を試みた。

(3) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで加齢の過程で細胞老化を起こす組織を特定し、その組織で SASP が起こっているかどうかを調べると同時に(2)で解析した SASP 誘導機構が働いているかどうかについても検討を行った。

4. 研究成果

1) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで Bmi-1 遺伝子を欠損した状態での p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態を加齢の過程で解析した。その結果、生後直後から体の殆ど全ての部位で p16^{INK4a} の発現が 10 倍以上高くなることが明らかに成り、Bmi-1 は殆ど全て組織で p16^{INK4a} 遺伝子の発現が高くなり過ぎないようにすることで組織幹細胞が細胞老化を起こさないように働いていることが示唆された。また興味深いことに、Bmi-1 遺伝子を欠損した状態でも加齢と共に、p16^{INK4a} の発現が更に上昇したことから、Bmi-1 は p16^{INK4a} 遺伝子の発現を抑制する重要な遺伝子であることに間違いはないが、加齢の過程で起こる p16^{INK4a} 遺伝子の発現誘導にはあまり関与しておらず、Bmi-1 の機能低下以外のメカニズムで p16^{INK4a} 遺伝子の発現レベルが上昇する可能性が示唆された。

2) DNA 損傷ストレスにより発現が変化する転写調節因子を DNA マイクロアレイにより探索した結果、遺伝子発現を負に制御することが知られている DNA メチル化酵素の一つである DNMT1 の発現レベルが顕著に低下していることを見出した。更に増殖中の細胞で DNMT1 の発現を RNAi によりノックダウンするとそれだけで SASP 因子の発現レベルが上昇したことから DNA ダメージにより DNMT1 の発現レベルが低下することが SASP の誘導を引き起こすことを見出した。興味深いことに DNMT1 の発現低下は DNA 損傷シグナルを更に活性化させることでヒストンメチル化酵素である G9a/GLP の発現低下を引き起こし、このためにクロマチンリモデリングが起こり SASP 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。

3) p16^{INK4a} イメージングマウスを用いることで加齢の過程で肺、脾臓、小腸などの組織が細胞老化を起こすことを見出した。それら

の組織では DNA ダメージシグナルの亢進、G9a/GLP 発現レベルの低下と SASP 遺伝子の発現レベルの亢進が認められ、2) で見出した SASP 誘導機構が生体内でも働いていることが明らかになった。

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)

Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H. and Hara E.

DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. *Mol. Cell*, 45: 123-131. (2012)

Fukuyo, Y., Takahashi, A., Hara, E., Horikoshi, N., Pandita, T.K. and Nakajima, T.

E2FBP1 antagonizes the p16^{INK4A}-Rb tumor suppressor machinery for growth suppression and cellular senescence by regulating promyelocytic leukemia protein stability.

Int. J. Oral Sci. 4: 200-208. (2011)

[学会発表] (計 4 件)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

日本分子生物学会春季シンポジウム
2011 年 5 月 25~26 日 (金沢)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

国際癌治療増感研究会
2011 年 6 月 24~25 日 (仙台)

原 英二

細胞老化の癌抑制と発癌促進における役割

光老化研究会
2011 年 7 月 22 日 (大阪)

Takahashi, A and Hara, E.

The roles and mechanisms regulating cellular senescence in aging and cancer.

日本分子生物学会シンポジウム
2011 年 12 月 13~16 日 (横浜)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

公益財団法人がん研究会がん研究所・部長
原 英二

(2) 研究分担者

公益財団法人がん研究会がん研究所・主任研
究員 大谷直子

公益財団法人がん研究会がん研究所・主任研
究員 高橋暁子

公益財団法人がん研究会がん研究所・嘱託研
究員 山越貴水（現：国立長寿医療研究セン
ター・室長）

公益財団法人がん研究会がん研究所・嘱託研
究員 吉本 真

公益財団法人がん研究会がん研究所・研究生
佐藤正大

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦

平成24年4月25日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がん病体モデルの作製と解析

研究代表者：国立がん研究センター研究所 研究員 大木理恵子

研究成果の概要：

大島正伸教授が作製した消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究ではこのマウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、胃がんにおいて p53 遺伝子が持つ機能を解明する。p53 喪失により、がんの悪性化が予測されるが、その悪性化にどのような p53 標的遺伝子群が関わるのか、明らかにしたいと考えている。これまでに p53 を欠損した消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)の作製に成功し、現在詳細な解析を行っている所である。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：消化器がん、p53、癌の悪性化

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第一位は「癌」であり、癌の克服を目指した研究は大きな社会貢献につながる。分子生物学やゲノム解析の進展を足場に、癌化のメカニズムの解明を目指した癌関連遺伝子(癌抑制遺伝子、癌遺伝子)の研究は大きく進み、多くの重要な遺伝子が明らかにされてきた。しかしながら、肺癌や乳癌のように、研究の比較的進んでいるものでさえ、これまでに明らかにされた遺伝子異常などで説明できるのは一部にとどまっており、大部分のものについては未解決のままである。これからも地道な研究が必要とされるゆえである。

癌抑制遺伝子 p53 は、ヒトの癌で最も高頻度に変異が認められており、p53 による癌抑制機能の解明と p53 研究の癌治療及び診断への応用は、癌克服を考えた上でも、最も重要な到達目標の一つである。p53 は転写因子であり、標的遺伝子を転写誘導することにより、細胞にアポトーシスや細胞周期停止、DNA 修復などを引き起こし、癌化を抑制している。癌では高頻度に p53 の DNA 結合ドメインに変異が検出され、発癌過程において、p53 の転写因子としての機能欠損が重要である事を物語っている。転写因子としての p53 の機能を解明することは癌研究のさらなる進展につながることを考え、研究を進めている。

申請者はこれまでに Noxa、Reprimo、AEN や PHLDA3 という新規 p53 標的遺伝子を同定

した。機能未知であったそれぞれの遺伝子の機能を初めて明らかにする事により、p53 がいかにして癌化を抑制するのか明らかにしてきた。p53 機能喪失はがんの悪性化と関わる事が知られるが、その分子的なメカニズムは明らかにされていない。また、特に胃がんにおいて p53 機能喪失がどのような悪性質の獲得につながるのかは未解明である。

2. 研究の目的

本研究により、悪性胃がんの良いモデルマウスを作製するとともに、胃がんの悪性化メカニズムを解明し、胃がん患者と死亡者を減らす事につながる新しい胃がん治療薬/診断薬の開発につながる研究成果を得たいと考えている。

大島正伸教授が作製した消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究ではこのマウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、胃がんにおいて p53 遺伝子が持つ機能を解明する。p53 喪失により、がんの悪性化が予測されるが、その悪性化にどのような p53 標的遺伝子群が関わるのか、明らかにしたいと考えている。

本研究により、p53 標的遺伝子群の中から、がんの悪性化を抑制する遺伝子を同定する

事で、それらの遺伝子を標的とした癌治療や診断への応用が期待できる。

3. 研究の方法

① 消化器がんモデルマウス (K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse) と p53 欠損マウスを掛け合わせる。p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取する。

② p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取する。

③ 病理解析、X線 CT 解析、および免疫不全マウスへの移植実験などを行い、悪性胃がんの新規病体モデルとなるこのマウスの組織を詳細に解析する。p53 喪失に伴ったがんの性質の変化を明らかにする。

④ 得られた癌組織より、mRNA を精製し、マイクロアレイ発現解析により、p53 依存性に発現する遺伝子群を同定する。

⑤ 申請者は、ゲノムワイドな p53 結合部位を ChIP-chip 解析により同定している。そこで、p53 依存性に発現する遺伝子の中から、p53 結合が認められる遺伝子、すなわち p53 の直接の標的遺伝子を同定する。

⑥ 同定した遺伝子が、胃がんの発生及び悪性化とどのように関わるか解析する。

4. 研究成果

これまでに消化器がんモデルマウス (K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse) 及び p53 欠損マウスを導入し、マウスの掛け合わせを行った。その結果、p53 欠損の消化器がんモデルマウスの作製に成功し、現在詳細な解析を進めている。また、消化器がんモデルマウスが発症した胃がんの p53 は野生型であり、正常な機能を持っている事が明らかになった。さらに、p53 欠損の消化器がんモデルマウスでは、より悪性度が高い胃がんが発症する事が明らかになりつつある。

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)

Chikako Ozeki, Tatsuhiro Shibata, Takashi Kohno, Yuichiro Sawai, Koji Okamoto, Jun Yokota, Fumio Tashiro, Seiichi Tanuma, Ryuichi Sakai, Tatsuya Kawase, Issay Kitabayashi, Yoichi Taya and Rieko Ohki[#]. (**#corresponding author**) Cancer susceptibility polymorphism of p53 at

codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 286, pp. 18251-18260, 2011.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国立がん研究センター研究所・研究員
大木理恵子

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月24日提出

対象研究テーマ：HGF-Met系を中心とするがん転移・薬剤耐性のメカニズムと制がん研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：HGF-Metの活性化機構に基づく分子創薬研究

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：

HGFβ・ベンゼン誘導体阻害剤複合体のX線構造の再精密化を行なった。明らかとなった相互作用様式は、これまでに合成された100誘導体についての構造活性相関を矛盾なく説明できる。誘導体から3～5Å離れたところに、正電荷及び負電荷サブポケットが存在していることがわかり、これらのポケットを狙ったStructure-Based Drug Designを行なったところ、カルボン酸誘導体に顕著な活性向上が認められた。この化合物のカルボン酸部分は正電荷サブポケットにあるアルギニン残基側鎖と相互作用しているものと推測される。これまでの構造活性相関を整理し、さらに高活性HGFアンタゴニストの創出を目指す。

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、腎不全、脊髄損傷、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、がん細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGFは様々ながんに対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met受容体系はがんの浸潤・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、がんの浸潤・転移・成長阻害につながる新規制がん分子になる。また、矢野ら（金沢大学がん研究所）により、肺がんのイレッサ耐性獲得にHGF依存的なMet受容体の活性化が関与すること、イレッサとHGF-Met阻害の併用療法がイレッサ耐性の克服につながる事が示された。さらに、平尾ら（金沢大学がん研究所）により脳腫瘍（グリオブラストーマ）モデルでの腫瘍幹細胞の浸潤性成長にHGF-Met系の活性化が関与することが明らかにされた。これらの背景をふまえ、

HGF-Met系阻害分子、とりわけ、阻害分子としての独自性、医薬品としての汎用性、チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性出現を考慮すると、HGFとMet受容体の相互作用を細胞外で阻害する低分子化合物医薬は、独自性、汎用性、耐性出現が生じ難い点において優れた抗がん剤になる。

2. 研究の目的

これまでの研究において、このシードとなる化合物とHGFβ鎖のX線構造解析に基づいたStructure-Based Drug Design (SBDD)を行い、ベンゼン骨格を有する新規化合物群を創出している。これらの化合物は活性が減弱するものの最適化探索つまり合成展開上有利になる。これら誘導体とHGFβ鎖との複合体のX線結晶構造情報に基づいたSBDD創薬研究を進めて、HGF阻害活性が飛躍的に向上した医薬品候補化合物を得ることを目指す。

3. 研究の方法

HGFβ-ベンゼン誘導体阻害剤複合体の立体構造を再精密化し、その構造に基づいてHGFβ鎖-Met相互作用面を遮断するHGFアンタゴニストを設計、合成した。得られた誘導体はHGFβ鎖-Metの結合阻害活性、HGF依存的細胞Scattering作用に対する阻害活性、

HGF 依存的 Met リン酸化活性阻害、及びがん細胞の浸潤阻害活性により評価した。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に高純度精製し、各種阻害化合物との複合体の結晶を調製した。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、構造解析を行った。

4. 研究成果

ベンゼン誘導体の HGFβへの結合様式に基づき、新たに疎水性相互作用および水素結合を形成するように誘導体を設計した。特にベンゼン骨格からそれぞれ 3 Å と 5 Å 離れたところに正電荷サブポケット (図 1 青) と負電荷サブポケット (図 1 赤) を作用する置換基を導入した化合物を合成した。誘導体のほとんどは期待されたほどの活性向上を示さないものの、活性を保持していた。一方、カルボン酸基を導入した誘導体は顕著な活性向上を示した。この化合物はこれまで最強であった化合物と同等の生物活性を示す。

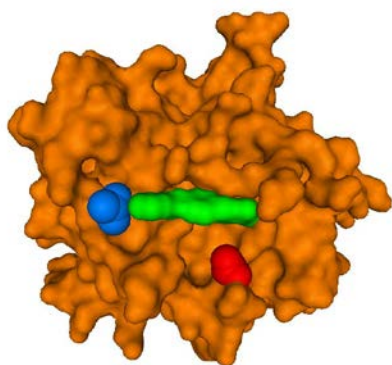


図 1 HGF (橙) とベンゼン誘導体 (緑) の結合様式

この活性向上した化合物のカルボン酸部分は正電荷サブポケットにあるアルギニン側鎖と相互作用しているものと推定される。この化合物の結合様式などの構造情報とこれまでの合成化合物の構造活性相関を整理し、結合ポケットで適切に相互作用するように、Structure-Based Drug Design 研究を展開し、さらなる高活性化合物の創出を目指す。

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 7 件)

1. Sakai, K., Nakamura, T., Kinoshita, T., Nakamura, T., and Matsumoto, K. HGF-Antagonists: Structure, Activities,

and Anti-cancer Approach. *Current Signal Transduction Therapy* **6**, 191-199, 2011.

2. Kinoshita, T., Sekiguchi, Y., Fukada, H., Nakaniwa, T., Tada, T., Nakamura, S., Kitaura, K., Ohno, Y., Suzuki, Y., Hirasawa, A., Nakanishi, I., Tsujimoto, G. A detailed thermodynamic profile of cyclopentyl and isopropyl derivatives binding to CK2 kinase. *Moll. Cell. Biochem.* **356**, 97-105, 2011.

[学会発表] (計 8 件)

1. 立体構造を基盤としたシグナル伝達メカニズムの解明とドラッグディスカバリー、木下誉富、プロテイン・モールド関西情報交流セミナー・第 11 回日本蛋白質科学会年会共催

[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]

1. HGF-Metの活性化機構に基づく分子創薬研究、木下誉富、平成 23 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会 (2011 年 12 月、金沢)
2. SBDDによる毒性回避ーパラレルSBDDー、木下誉富、SAR News No. 21、7-12, 2011.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

大阪大学大学院工学研究科・教授 南方聖司

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月20日提出

対象研究テーマ：中皮腫の同所移植モデルを用いた進展機構解明と標的分子の探索

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：癌細胞と脂肪細胞の接触による相互作用の検討

研究代表者：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授 上原久典

研究成果の概要：

様々な腫瘍の進展過程において癌細胞の脂肪組織への浸潤が認められる。近年、脂肪組織は中性脂肪の貯蔵だけでなく、炎症性サイトカインを含む多くの活性物質を放出する内分泌器官としても重要であることが明らかになってきている。従って、脂肪組織に浸潤した癌細胞と脂肪細胞の間には何らかの相互作用が働いている可能性があるが、それについてはこれまで十分な検討が行われていない。本研究では脂肪細胞と癌細胞の共培養モデルを確立し、脂肪細胞との接触による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、乳癌細胞が成熟脂肪細胞と接触することによって secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) や乳癌の進展との相関が報告されているいくつかの遺伝子の発現上昇を示すこと、および脂肪細胞で脂肪分化マーカーの発現が低下することがわかった。また、脂肪前駆細胞の培養上清が乳癌や前立腺癌細胞の浸潤を促進すること、および脂肪細胞から分泌される FABP4 が前立腺癌細胞の浸潤を促進することが明らかになった。以上より、乳癌細胞が脂肪細胞に接触した際には脂肪細胞を幼若化し、浸潤に有利な環境を形成すること、および脂肪細胞が分泌する FABP4 が腫瘍浸潤を促進する可能性が示唆された。

研究分野：癌の微小環境

キーワード：脂肪細胞、癌の浸潤、細胞接触、網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

これまでに金沢大学がん研究所腫瘍内科矢野聖二教授との共同研究において、前立腺癌、肺癌、乳癌などの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することによって、PC3 ヒト前立腺癌細胞では骨芽細胞からの液性因子のみでは有意な遺伝子発現の変動はみられず、骨芽細胞と接触することによってはじめて IL-1 β 、COX-2、IL-6 など代表的な破骨細胞誘導関連遺伝子の発現が上昇し、これに cadherin-11 や N-cadherin が部分的に関与していることを明らかにした (Br J Cancer 104: 505-513, 2011)。

2. 研究の目的

様々な腫瘍の進展過程において癌細胞の脂肪組織への浸潤が認められる。腹腔内、縦隔、皮下などには多量の脂肪組織が含まれており、例えば消化器癌は腹腔内脂肪組織に、肺癌や胸膜中皮腫は縦隔の脂肪組織に、乳癌や皮膚癌は皮下脂肪組織にそれぞれ浸潤する。近年、脂肪組織は中性脂肪の貯蔵だけで

なく、炎症性サイトカインを含む多くの活性物質を放出する内分泌器官としても重要であることが明らかになってきている。従って、脂肪組織に浸潤した癌細胞と脂肪細胞の間には何らかの相互作用が働いている可能性があるが、それについてはこれまで十分な検討が行われていない。

本研究では脂肪細胞と癌細胞との共培養モデルを確立し、脂肪細胞との接触による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、癌細胞の増殖、浸潤への脂肪細胞の関与を明らかにすることを目的とし、これによって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) cDNA マイクロアレイを用いた脂肪細胞との接触による乳癌細胞の遺伝子発現の網羅的解析

女性の胸部脂肪組織から採取された脂肪前駆細胞を脂肪分化培地で2週間培養することにより得られた成熟脂肪細胞とヒト乳癌細胞株 MCF7 を用いた。MCF7 細胞を蛍光色素でラベルした後、cell culture insert を用いた癌細胞と脂肪細胞の二層培養（癌細

胞と脂肪細胞の相互作用が液性因子のみ)、および癌細胞と脂肪細胞を混合して培養する接触培養(癌細胞と脂肪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、脂肪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MCF7細胞を用いた。

培養終了後に得られたMCF7細胞からmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイを行った。また、脂肪細胞を色素で標識し、同様の方法で培養を行い、得られた脂肪細胞を用いたマイクロアレイも行った。

2) 成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清が癌細胞の浸潤に及ぼす影響

マイクロアレイの結果から、MCF7細胞と成熟脂肪細胞が接触することにより脂肪細胞の分化が抑制されることが分かったので、この現象が癌細胞にとって有利であるかどうかを調べるために、成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清を用いて invasion assay を行った。MCF7細胞は invasion assay に適さないため、ヒト乳癌細胞のMDA-MB-231、およびヒト前立腺癌細胞PC-3を用いた。

3) Fatty acid binding protein 4 (FABP4)が癌細胞の浸潤に及ぼす影響

脂肪細胞から分泌されるFABP4が癌の浸潤に及ぼす影響を調べるためにヒト前立腺癌細胞PC-3、DU145を用いて invasion assay を行った。また、アラキドン酸がPC-3細胞の浸潤を促進し、ドコサヘキサエン酸(DHA)がその効果を抑制することが分かっているが、このモデルにFABP4が及ぼす影響についても検討した。

4. 研究成果

1) ヒト乳癌細胞MCF7とヒト成熟脂肪細胞を用いて二層培養、および接触培養を行い、単独で培養した乳癌細胞、あるいは成熟脂肪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MCF7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、10倍以上の発現の変動がみられた遺伝子は、二層培養と接触培養間で12個(いずれも接触培養により発現上昇)あったが、単独培養と二層培養間では認められなかった。接触培養によって最も高い発現上昇を示したのは、脂肪細胞の分化を抑制することが知られている secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) で、約52倍であった。続いて、decorin, microfibrillar associated protein 5, MMP 2, periostin がいずれも15倍以上の発現上昇を示していた。Decorin 以下の4つの遺伝子についてはいずれも乳癌の進展と相関するという報告があり、乳癌細胞と脂肪細胞が接触することで

腫瘍浸潤が促進される可能性を示唆する結果であった。SPARCについては、SPARCが結合する受容体の1つである stabilin-1 を分泌するように遺伝子導入を行ったMCF7細胞をヌードマウス皮下に移植し、SPARCが捕捉されることで腫瘍増殖が抑制されるかどうかを現在検討している。

一方、脂肪細胞については、接触培養において脂肪分化マーカーである FABP4, PPAR γ , C/EBP α の発現がそれぞれ0.03倍、0.15倍、0.29倍と低下していたことから、癌細胞との接触によって脂肪細胞の分化が抑制されることが示唆された。

2) 癌細胞との接触による脂肪細胞分化の抑制が癌細胞に及ぼす影響を調べるために、成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清を用いて invasion assay を行った。ヒト乳癌細胞のMDA-MB-231、およびヒト前立腺癌細胞PC-3はいずれも脂肪前駆細胞の培養上清によって有意に浸潤が促進されたことから、癌細胞は脂肪分化を抑制することによって浸潤に有利な環境を形成していると考えられた。

3) 脂肪細胞は血中にFABP4を放出していることが知られているが、FABP4が腫瘍に及ぼす影響についてはほとんどわかっていない。FABP4を添加して invasion assay を行うと、用量依存的にヒト前立腺癌細胞の浸潤が促進された。また、FABP4はアラキドン酸のPC-3細胞に対する浸潤促進効果には影響を及ぼさなかったが、DHAの浸潤抑制効果を阻害した。FABP4と脂肪酸の結合を阻害する薬剤を添加することによってFABP4の作用は減弱した。これらの結果から、FABP4が特定の脂肪酸と結合することによってその脂肪酸の癌細胞への作用を阻害している可能性が示唆された。

以上より、乳癌細胞が脂肪細胞に接触した際には脂肪細胞を幼若化し、浸潤に有利な環境を形成すること、および脂肪細胞が分泌するFABP4が腫瘍浸潤を促進す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)

論文作成中

[学会発表] (計 2件)

上原 久典、泉 啓介 FABP4が前立腺癌細胞の増殖・浸潤に及ぼす影響 第20回日本がん転移学会学術総会

上原 久典、高橋 徹行、渡邊 俊介、泉 啓介 FABP4が前立腺癌の運動性と浸潤性に及ぼす影響 第70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〕

なし

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・准教授 上原久典

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野 聖二

平成24年4月5日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：消化器がん幹細胞制御因子のマウス発がん過程における制御機構

研究代表者：国立がん研究センター研究所 分野長 岡本康司

研究成果の概要：

ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養法を確立したが、この培養系において、がん幹細胞マーカーCD44の発現が、がん幹細胞としての特質維持に重要である事を明らかにした。樹立したCD44陽性がん幹細胞において、幹細胞性の維持に重要な役割を果たす候補制御因子、及びCD44バリエントフォームを同定しつつある。これらのがん幹細胞制御因子は、発がん過程において重要な役割を担うと予想される。従って、がん幹細胞制御因子の消化器発がんにおける役割を明らかにする目的で、胃がんモデルマウスにおける発現プロファイルを検討すべく準備を進めている。

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞、大腸がん、CD44

1. 研究開始当初の背景

CD44は大腸がんのみならず、膵がん、乳がん、前立腺がん等、さまざまな種類のがん幹細胞に特異的なマーカーである。モデルマウス (*K19-Wnt1/C2mE*) における胃がんの発がん過程においてもSCJ領域に存在する幹細胞様細胞に特異的な発現を示す事が明らかになってきており、消化器がん幹細胞の形成過程に普遍的な役割を果たす事が予想される。又、CD44(とりわけそのバリエントフォーム)のがん幹細胞の成立における機能的な重要性も報告されている。

研究代表者のグループは、最近の研究により、ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養法を確立した。さらに各種マーカーの発現、分化能の検討、免疫不全マウスにおける造腫瘍性の検討等により、スフェロイド中のCD44陽性細胞が典型的ながん幹細胞としての形質を有する事を明らかにした。

2. 研究の目的

本共同研究においては、消化器がん幹細胞の成立に重要な役割を果たすと予想されるCD44経路の解析を行う事により、胃がん発生過程におけるがん幹細胞の成立機序を明らかにする事を目的とする。

がん幹細胞制御におけるCD44を介した制御機構を明らかにする目的で、がん幹細胞の*in vitro*培養系を用いて、CD44により発

現制御をうける遺伝子群の同定を進める。同定されたCD44関連因子の機能解析を行う一方、これら新規因子の消化器発がん過程における発現様式の解明をマウス胃発がんモデルの系で行う。これらの研究で得られるCD44経路の新たな知見を統合解析する事により、消化器発がんにおけるがん幹細胞の発生及び進展過程を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

申請者らが樹立した複数の大腸がん幹細胞をフローサイトメトリーによりCD44高発現細胞と低発現細胞に分け、CD44高発現細胞において有意に上昇ないし低下している遺伝子群を同定する。同定した遺伝子に対応するshRNAのプールを構築し、がん幹細胞の増殖、転移に対する各遺伝子の発現抑制の効果を検証する。

CD44にはスタンダードフォームの他に幾つかのバリエントフォームの存在が知られている。バリエントフォームのがん化における重要性が示唆されている事から、これらのアイソフォームをレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入によりがん幹細胞に高発現させ、がん幹細胞の増殖、転移能に対する影響を検討する。

4. 研究成果

ヒト大腸がん由来がん幹細胞を含むスフ

エロイド in vitro 培養系を用い、スフェロイド中の CD44 陽性細胞と陰性細胞を、フローサイトメトリーを用いて分離し、両細胞より RNA を抽出後、遺伝子発現マイクロアレイを用いて陽性細胞又は陰性細胞に特異的に発現する遺伝子群の同定を行った。同定したがん幹細胞制御因子の役割を、対応する shRNA の細胞導入による機能解析により検討中である。又、スフェロイド細胞、マウス xenograft 等における発現解析により、同定した候補因子の CD44 依存的な発現パターンの検証を行っている。さらに、これらの CD44 関連因子の、マウス胃発がんモデルの系における検証の準備を行っている。

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 5 件)

K. Okamoto, T. Ishiguro, Y. Midorikawa, H. Ohata, M. Izumiya, N. Tsuchiya, A. Sato, H. Sakai, H. Nakagama: miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. **EMBO J.** doi: 10.1038/emboj.2012.25 (2012)

T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto: Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418, 199-204 (2012)

M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. **Cancer Sci.** 102, 1615-21 (2011)

N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Ogata-Kawata, K. Okamoto, Y. Fujiwara, M. Nakai, A. Okabe, A.J. Schetter, E.D. Bowman, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, H. Aburatani, C.C. Harris, H. Nakagama: Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. **Cancer Res.** 71, 4628-4639 (2011)

C. Ozeki, Y. Sawai, T. Shibata, T. Kohno, K. Okamoto, J. Yokota, F. Tashiro, S. Tanuma, R. Sakai, T. Kawase, I. Kitabayashi, Y. Taya, R. Ohki: Cancer Susceptibility Polymorphism of p53 at Codon 72 Affects Phosphorylation and Degradation of p53 Protein. **J. Biol Chem.** 286,18251-18260 (2011)

[学会発表] (計 4 件)

岡本康司、大畑広和、石黒竜也、緑川泰、中釜斉「大腸がん肝転移を抑制する新規因子の同定及び解析」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

大畑広和、石黒竜也、岡本康司、中釜斉「大腸がん幹細胞における分化可塑性の解析」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

石黒竜也、大畑広和、岡本康司、中釜斉「新たな卵巣癌スフェロイド培養法の確立」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

岡本康司「大腸がん転移を抑制する新規マイクロ RNA の同定及び解析」
第 26 回発癌病理研究会 (札幌市、2011 年 8 月)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国立がん研究センター研究所 ・ 分野長
岡本康司

(2) 研究分担者

国立がん研究センター研究所 ・ 研究員
大畑広和

国立がん研究センター研究所 ・ リサーチ
レジデント 石黒達也

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学 ・ 教授 大島正伸

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月27日提出

対象研究テーマ：in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：がん幹細胞の脂質代謝における Rb がん抑制遺伝子と SREBP-1 遺伝子の関係

研究代表者：筑波大学医学医療系 教授 島野 仁

研究成果の概要：

SREBP の発がん・悪性進展における役割を探索するために、SREBP を欠損する様々な発がんマウスの樹立を目指す。共同研究期間中に、我々が本来着目していた Rb と SREBP-1,2 の転写・プロセッシングにおける関係に加え、変異 p53 が SREBP-2 と直接に結合し、その転写活性を促進するという報告がなされた。mTORC1 と SREBP-1,2 との関係も 2010 年に報告があり、がん化シグナルの標的としての SREBP の役割に益々注目が集まっている。クリーニングを終えた REBP-1 KO マウスと Rb^{+/+}; p53^{+/+} マウスとの交配を開始した。PTEN^{flox}, Rbf^{flox} マウスとの交配も間もなく開始する。また、SREBP-1 KO 細胞あるいは SREBP-2 ノックダウン細胞において様々ながん化シグナルを亢進させ、その帰結（トランスフォーム、がん幹細胞様の挙動、糖代謝、脂質代謝）を観察している。現時点において、結果の観察には行き着いていないが、研究計画の遂行に必要なマテリアルは着々と揃ってきた。

研究分野：内分泌学、代謝学

キーワード：SREBP、Rb

1. 研究開始当初の背景

共同研究者の金沢大学がん進展制御研究所の高橋らは、Rb がん抑制遺伝子の不活性化が Ras プロトがん遺伝子産物の膜輸送と活性化を制御する経路を探索し、Rb による E2F 依存的な SREBP ファミリー遺伝子発現調節機構を発見した (Shamma et al., Cancer Cell 15: 255-269, 2009)。Rb が不活性化すると、SREBP-1,2 の転写制御を介してあるいは直接に E2F-1,3 によって多数のイソプレニル化関連酵素の発現が誘導されるために、Ras 蛋白質の成熟と活性化が加速される。この経路によって、Rb 不活性化は、腫瘍の分化能や転移・浸潤能を制御、また、細胞によっては、逆に細胞をがん化から守る生体防御機構を誘導する。更に、この経路は、Ras のみならず、様々な CAAX 蛋白質の活性制御にも関わる。一方、Rb と SREBP ファミリーの関係は、蛋白質イソプレニル化のみならず、Fatty acid synthase など、脂質代謝やがんの悪性形質の生成において重要な役割をはたす遺伝子の制御にも関わると思われる。実際、Rb ヘテロ型マウスには、脂肪肝が生じる。また、Fatty acid synthase 阻害剤は、臨床がんへの効果が強く期待されている化合物である。がんの代謝異常には、ふたつある。よく知られている Warburg 効果は、解糖系の亢進で

あり、近年、p53 がん抑制遺伝子がこの系を制御することが知られつつある。もう一つは、lipogenic phenotype と呼ばれる脂質代謝の異常である。これは、脂質二重膜を構成する脂質の合成の亢進がその本態であり、盛んな細胞分裂に追いつくための膜脂質合成亢進、あるいは、膜脂質によって制御される PI3K/AKT シグナル等の制御に関与すると思われる。実際、高橋らは、Rb 不活性化が、AKT シグナルを亢進させることを見出し、我々との共同研究によって、その機構を探索する。そして、Rb が腫瘍の lipogenic phenotype を制御する可能性を探索する。

2. 研究の目的

本研究では、Rb と SREBP ファミリー遺伝子を同時欠損する複合変異マウスを作製、Rb 不活性化によって生じる表現型（胎性致死、分化異常、細胞周期異常、細胞死異常、細胞老化、DNA 損傷応答、エピジェネティック異常、腫瘍、転移、薬剤耐性、がん幹細胞）の生成において SREBP ファミリー遺伝子の果たす役割を遺伝学的に確立する。そして、SREBP ファミリーに依存した Rb の新規機能を同定する。また、Rb 不活性化によって生じる脂質あるいはメタボローム異常を網羅的に探索する。SREBP を含め、Rb

不活性化によって機能亢進する転写因子や酵素を見出し、その阻害剤が Rb 不活性化腫瘍の挙動に与える影響を探索する。

3. 研究の方法

Rb ヘテロ欠損マウスと SREBP-1 ヘテロ欠損マウスと交配し、これによって得られるダブルヘテロ型マウスどうしを更に交配し、様々な遺伝型のマウスを得る。Rb ホモ型は、完全に胎性致死、SREBP-1 ホモ型は、部分的に胎性致死であるので、理論的には、Rb+/+; SREBP-1-/-マウスを得ることができる。このマウスに生じる下垂体腺腫と甲状腺 C 細胞腺腫の組織像や腫瘍細胞の性質を解析する。また、timed pregnancy によって、胎生 12.5 日付近の胚を得、これを観察する。これまでに、高橋や米国 MIT の Tyler Jacks 博士らによって、Rb ホモ型欠損と同時に様々な関連遺伝子を欠損する複合変異マウスに生じる様々な表現型が、非常に詳細に調べられており、これらの知見との対比に於いて、Rb ホモ型表現型に SREBP-1 同時欠損が与える影響を解釈する。

4. 研究成果

SREBP-1 KO マウスを筑波大学から金沢大学に輸送した。マウスの観察を SPF 環境下で行うために、学際科学実験センター実験動物研究施設において、浅野雅秀教授の協力の下、SREBP-1 KO マウスのクリーニングを行った。所期の SPF 化マウスを得た後、これを同上角間分室に移動。Rb+/+; p53+/+マウスとの交配を開始した。共同研究期間中に我々が着目していた Rb と SREBP-1,2 のプロセッシングの関係に加え、変異 p53 が SREBP-2 と直接に結合し、その転写活性を促進するという報告がなされた。mTORC1 と SREBP-1,2 との関係も 2010 年に報告があり、がん化シグナルの標的としての SREBP の役割に益々注目が集まっている。現在、SREBP-1 KO 細胞あるいは SREBP-2 ノックダウン細胞において様々ながん化シグナルを亢進させ、その帰結（トランスフォーム、がん幹細胞様の挙動、糖代謝、脂質代謝）を観察している。結果の観察には行き着いていないが、研究計画の遂行に必要なマテリアルは着々と揃ってきた。

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 6 件)

1. Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A,

Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7 α (Fbw7 α) causes hepatosteatosis through Krüppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. *J Biol Chem*. 286(47):40835-46, 2011.

2. Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Macrophage Elovl6 deficiency ameliorates foam cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(9):1973-9, 2011.

3. Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(8):1788-95, 2011.

4. Amemiya-Kudo M, Oka J, Takeuchi Y, Okazaki H, Yamamoto T, Yahagi N, Matsuzaka K, Okazaki S, Osuga J, Yamada N, Murase T, Shimano H. Suppression of the pancreatic duodenal homeodomain transcription factor-1 (Pdx-1) promoter by sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c). *J Biol Chem*. 286(32):27902-14, 2011.

5. Iwasaki H, Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 regulates muscle metabolic gene expression, increases glycogen stores, and enhances insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 302(7): E896 – 902, 2012.

6. Heianza Y, Hara S, Arase Y, Saito K, Fujiwara K, Tsuji H, Kodama S, Hsieh SD,

Mori Y, Shimano H, Yamada N, Kosaka K, Sone H. HbA1c 5.7-6.4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet*. 378 (9786):147-55.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 島野 仁 動脈硬化戦略における脂質管理の新しい視点：臓器脂質の量的制御と質的制御 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会（札幌）2011 年 5 月 20 日

2. 島野 仁 飢餓応答肝臓特異的転写因子 CREBH の糖脂質代謝制御 第 84 回日本内分泌学会年次学術集会（神戸）2011 年 4 月 21 日

3. Rie Matsumori, Takashi Matsuzaka, Tsuyoshi Yamazaki, Haruna Shinozaki, Daida Hiroyuki, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano. A novel bile salt sequestering agent_”PEGylated and quaternized polyamine nanogel” reduces VLDL and LDL cholesterol, raises HDL cholesterol, and prevents atherosclerosis in mice. 第 84 回米国心臓協会学術集会（AHA Scientific Sessions 2011）フロリダ

4. Rie Matsumori, Takashi Matsuzaka, Tsuyoshi Yamazaki, Haruna Shinozaki, Hiroyuki Daida, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano. PEGylated and quaternized polyamine nanogel” a novel bile salt sequestering agent, ameliorates dyslipidemia through reduction of VLDL and LDL cholesterol, and induction of HDL cholesterol. 第 43 回日本動脈硬化学会学術集会（ロイトン札幌）

5. Haruna Shinozaki, Takashi Matsuzaka, Rie Matsumori, Tsuyoshi Yamazaki, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano. A novel bile salt sequestering agent_”PEGylated and quaternized polyamine nanogel” reduces VLDL and LDL cholesterol, raises HDL cholesterol, and prevents atherosclerosis in mice. 第 34 回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜）

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑波大学医学医療系・教授 島野 仁

(2) 研究分担者

筑波大学医学医療系・准教授 松坂 賢

(3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月2日提出

対象研究テーマ：in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：SMS抑制による細胞死誘導セラミド・シグナル増強を介したRb遺伝子欠損マウスにおけるリンパ腫発症機構の制御

研究代表者：金沢医科大学血液免疫内科学 教授 岡崎俊朗

研究成果の概要：

スフィンゴ脂質セラミドを介した細胞死誘導が、Rb遺伝子欠損状態で発症する腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つかについて検討したが、Rb欠損KOマウスにおける腫瘍発症効率の低さとSMS1-KOマウスの出生率の低さによって、当初予想した、セラミド産生増加によってRb欠損時の腫瘍に対して抗腫瘍効果を認めるかについては、最終的な結論が出ず、今後の実験モデルの再構築が必要となる。

研究分野：脂質生物学、脂質腫瘍学

キーワード：スフィンゴ脂質、発癌機構

1. 研究開始当初の背景

申請者は、スフィンゴ脂質セラミドは細胞死誘導脂質として、細胞膜の解剖学的成分として機能するのみでなく細胞機能を制御するメディエーターであることを報告した (Okazaki T., et al. *J. Biol. Chem.*, 264: 19076-19080, 1989)。スフィンゴ脂質セラミドの調節機構として産生系であるスフィンゴミエリン (SM) 加水分解酵素スフィンゴミエリナーゼ (SMase) そして代謝系であるSM産生酵素 (SMS) とグルコシルセラミド産生酵素 (GCS) が知られており、これらを介したセラミド・シグナル制御機構を“セラミド・バイオスタット”と呼んでいる。これまで様々な細胞死誘導刺激によってSMaseの活性化とSMSの抑制が誘導され、セラミドが増加することで細胞死が惹き起こされることが知られている。申請者は、近年、SMSの遺伝子クローニングに成功して (Yamaoka S., Miyaji M., Kitano T., Umehara H., and Okazaki T. *J. Biol. Chem.*, 279, 18688-93, 2004)、SMSの機能制御の解析により腫瘍細胞の生死におけるセラミドの意義について明らかにする研究を進めている。

2. 研究の目的

本共同研究の課題として ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子欠損による腫瘍発生時のセラミド・シグナルの関与を申請し検討した。ATM欠損マウスに p16/Ink4a 欠損マウスを交配することでダブル KO マウスを作成し悪性リンパ腫発生を試みたが、発生効率が非常に低く、このダブル

KOマウスにSMS1-KOマウスを掛け合わせて、トリプルKOマウスを作成することが困難なことが判明した。その後、マウス腫瘍発生モデルとしてRb遺伝子欠損マウスにおいて、効率的に腺癌が発症するモデルを作成できたため、今後、このマウスの系に関してSMS1欠損マウスを掛け合わせることで、セラミド産生の抑制が誘導され腺癌腫瘍細胞の増大を阻害できるかについて検討する。

3. 研究の方法

- (1) Rb欠損細胞におけるセラミド・シグナルの変化
- (2) Rbノックアウトマウスの作成とその予想表現型
- (3) SMSまたは2-KOマウスとRb-KOのダブルKOマウスの作成とRb欠損腺癌発症におけるSMS欠損によるセラミド産生増強の影響を検討
- (4) SMS/RbダブルKOマウス由来MEFを用いてセラミド産生機構の分子制御の検討

4. 研究成果

Rb欠損細胞では、セラミド産生機構が抑制されており、Rb-KOマウスにおける腺癌発症にセラミド/スフィンゴミエリン系の関与が示唆させる。Rb-KOマウスでの腫瘍形成にSMS1-KOマウスを掛け合わせて、SMS抑制によるセラミド増加による抗腫瘍効果を検討する予定であった

が、SMS 1-KOマウスが発症率、生存率ともに非常に脆弱で有り、解析できる個体数を得ることができなかった。したがって、今後のマウスKO個体の増加によって、Rb欠損状態による腫瘍増生をSMS 1欠損が抑制するかについて結論を出す必要がある。

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5件)

1. Elodie Lafont, Kazuyuki Kitatani, Bruno Ségui and Toshiro Okazaki Regulation of death and growth signals at the plasma membrane by sphingomyelin synthesis: implications for hematological malignancies. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 6(3):324-33, 2011

2. Mitsutake S., Zama K., Yokota H., Yoshida T., Tanaka M., Mitsui M., Tanaka T., Yamashita T., Takemoto H., Okazaki T., Watanabe K., and Igarashi Y. Sphingomyelin synthase 2 is responsible for obesity and lipid droplet formation in liver and is a novel regulator of membrane microdomain. J. Biol. Chem. 12;286(32):28544-55, 2011

3. Abdel Shakor A.B., Taniguchi M., Kitatani K., Hashimoto M., Asano A., Bielawski J., Bielawska A., Watanabe K., Kobayashi T., Igarashi Y., Umehara H., Tkakeya H. and Okazaki T. SMS1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation. J. Biol. Chem., 286(41):36053-62., 2011

4. Yano M., Watanabe K., Yamamoto T., Ikeda K., Senokuchi T., Lu M., Kadomatsu T., Tsukano H., Ikawa M., Okabe M., Yamaoka S., Okazaki T., Umehara H., Gotoh T., Song W-J., Node K., Taguchi T., Yamagata K. and Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1 null mice. J. Biol. Chem, 286(5); 3992-4002, 2011

5. Fujiwara K., Kitatani K., Fukushima K., Yazama H., Kikuchi M., Igarashi Y., Kitano H., and Okazaki T. Inhibitory effects of dietary glucosylceramide on squamous cell carcinoma of the head and neck in NOD/SCID mice. Int. J. Clin. Oncol. 16(2):133-40, 2011

[学会発表] (計2件)

1. Okazaki T., Role of SMS in cell proliferation and migration.-transferrin traffic and CXCL12/CXCR4 system- Naito International Symposium, Sapporo, Japan, June 28-July , 2011 (invited)

2. Okazaki T., Asano S., Kitatani K., Taniguchi M., Hashimoto M., Zama K., Mitsutake S., Igarashi Y., Kiyokawa E., Matsuda M., Takeya H., ICBL, Warsaw, Sep. 2011

[図書] (計1件)

セラミド：基礎と応用(食品化学新聞社)セラミドの細胞内機能概論-スフィンゴミエリン合成酵素ファミリー、北谷和之、岡崎俊朗、50-55, 2011

セラミドとがん、岡崎俊朗、セラミド：基礎と応用、171-179, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥取大学医学部・教授、金沢医科大学血液免疫内科学・教授 岡崎俊朗

(2)研究分担者

鳥取大学医学部付属病院・助教 北谷和之
鳥取大学医学部・研究員 谷口真
鳥取大学医学部・研究員 橋本真由美
鳥取大学医学部・研究員 浅野智志

(3)本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

平成24年4月24日提出

対象研究テーマ：Pim キナーゼを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：Pim キナーゼ阻害剤の抗腫瘍剤としての開発研究

研究代表者：東京大学創薬オープンイノベーションセンター 特任教授 岡部隆義

研究成果の概要：

Pim キナーゼ阻害剤プロジェクトにおいて、Pim-3 キナーゼを強力に阻害する化合物を見出した。本阻害剤は Pim-3 が高発現しているヒト膵臓がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑えただけでなく、*in vivo* でも増殖抑制効果を示した。

研究分野：がん分子標的治療

キーワード：Pim-1 キナーゼ、Pim-3 キナーゼ、膵臓がん

1. 研究開始当初の背景

Pim-1 キナーゼはある種の白血病や前立腺癌で高発現しており、アポトーシスや細胞周期制御に関わるタンパク質をリン酸化することにより、細胞の癌化やがん細胞の増悪、抗がん剤への抵抗性などを促進するセリン/スレオニン・キナーゼである (Cell, 37, pp. 141-150, 1984; EMBO J., 4, pp. 1793-1798, 1985; The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37, pp. 726-730, 2005; European Journal of Cancer, 44, pp. 2144-2151, 2008)。

一方 Pim-3 キナーゼは肝臓がんや膵臓がんでは恒常的に発現していることが知られており、アポトーシスを抑制していると考えられている (Int J Cancer, 114, pp20-218, 2005; Cancer Res. 66, pp6741-6747, 2006, Cancer Sci., 98, pp321-328, 2007)。

Pim キナーゼ阻害剤はこれまでに欧米のバイオベンチャー、メガファーマよりいくつかの化合物が発表されている。しかしながらいずれの化合物も阻害活性の強さ、選択性の点から充分ではない。また現時点で臨床試験段階にある薬剤はない (SuperGen の SGI-1776 は PhI にあったが、2010 年 11 月心毒性のためドロップした)。

膵臓がんは極めて予後が悪く、難治療腫瘍の代表である。標準治療薬はゲムシタビンであるがその奏成功率は 10-20% と低く、新しい治療薬の開発が求められている。このような現況下、Pim-3 キナーゼ阻害という新しい切り口で膵臓がんをはじめとする各種腫瘍の治

療薬を開発することには社会的要請がある。

2. 研究の目的

本研究は上述の Pim-1 および Pim-3 の特徴的な作用から、Pim キナーゼを抗腫瘍剤開発のターゲットとしてとらえ、その選択的な阻害剤を合成、評価することにより治療薬の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

これまで我々は Pim キナーゼ阻害剤を Pim-1 キナーゼ阻害の観点から白血病を治療ターゲットとして評価を進めてきた。本研究では Pim-3 阻害剤/膵臓がん治療薬の観点から、以下のように研究を進めた。

①化合物の Pim-1、Pim-3、FLT3 (ref.) キナーゼに対する酵素阻害活性を mobility shift assay を用いて評価する。

②代表的な化合物についてキナーゼプロファイリングを行う。

③代表的な化合物について代謝安定性、CYP 阻害、経口吸収性などを評価する。

④Pim-3 阻害活性を有する化合物について L3.p16、MiaPaca-2 などのヒト膵臓がん細胞株の *in vitro* での細胞増殖を検討し、それぞれの化合物の IC₅₀ を決定する。

⑤ヒト膵臓がん細胞株を接種したヌードマウスに対して、上記の検討で細胞増殖抑制効果が認められた化合物を IC₅₀ を勘案した用量で投与した時の、マウス個体内での細胞増殖抑制作用を検討する。

⑥上記の検討時において、マウスの血液を採取し、血液学的ならびに血液生化学的に検査するとともに、脳・心臓・肺臓・肝臓・腎臓

などの臓器を採取し、病理組織学的に検査し、副作用の有無を検討する。

4. 研究成果

新規に合成した化合物を含め、44化合物について Pim-3 阻害活性を測定した。IC50 値は 0.6nM から 2000 nM 超であった。Pim-3 阻害活性の強かった化合物の 1 つ、TPC-053 (IC50 : 4.5nM) がヒト膵臓がん細胞株 PCI66 の増殖を *in vitro* で抑制したので、大量に合成し、ヌードマウス内での増殖抑制効果を検討した。TPC-053 は 20mg/kg 及び 30mg/kg の投与量で、毒性を示すことなく PCI66 細胞の増殖を有意に抑制した。

今後は、化合物の最適化を進めるとともに、*vivo* での投与方法の検討も行い、膵臓がん治療薬の開発に向けて、さらに研究を進めて行く予定である。

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)

1. Keiko Tsuganezawa, Hisami Watanabe, Lorien Parker, Hitomi Yuki, Shigenao Taruya, Yukari Nakagawa, Daisuke Kamei, Masumi Mori, Naoko Ogawa, Yuri Tomabechi, Noriko Handa, Teruki Honma, Shigeyuki Yokoyama, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Akiko Tanaka
A Novel Pim-1 Kinase Inhibitor Targeting Residues That Bind the Substrate Peptide. *Journal of Molecular Biology*. 417(3), 240-252 (2012).

2. Hirofumi Nakano, Nae Saito, Lorien Parker, Yukio Tada, Masanao Abe, Keiko Tsuganezawa, Shigeyuki Yokoyama, Akiko Tanaka, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, and Tetsuo Nagano
Rational evolution of a novel type of potent and selective PIM1 kinase inhibitor from a screening-hit compound. *Journal of Medicinal Chemistry*, in press

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)
WO 2011/136319 「抗がん剤」

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任教授 岡部隆義

(2) 研究分担者
東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任研究員 中野浩史
東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任研究員 齊藤奈英

(3) 本研究所担当者
分子生体応答・教授 向田直史

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月19日提出

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：ケモカイン CXCL14/BRAK による発癌と転移の抑制機構の研究：CXCL14/BRAK のNK細胞の活性制御の分子機構

研究代表者：神奈川県大学 特任教授 畑 隆一郎

研究成果の概要：

ウイルスベクターを用いてドキシサイクリン存在下でのみ CXCL14/BRAK を発現する B16 メラノーマ細胞を作成し、メラノーマ細胞における CXCL14/BRAK の発現が、転移に及ぼす影響を種々の遺伝的背景を持つマウスを用いて調べた。野生型 C57BL/6 マウス、および T 細胞と B 細胞を欠損する SCID マウスの場合、ドキシサイクリンを飲料水に添加してメラノーマ細胞に BRAK を発現させると、肺への転移がドキシサイクリンを添加しない場合より有意 ($P < 0.01$) に抑制された。一方、NK 細胞を欠損する NOG マウスの場合、転移巣の数が野生型マウスの 10 倍に上昇し、さらに BRAK の発現は転移巣の数に影響を与えなかった。昨年度の結果を含めて、BRAK の発現レベルが、腫瘍を移植される宿主のマウスで高くても、メラノーマ細胞で高くても、腫瘍の肺転移が抑制され、この抑制は NK 細胞に依存している事が明らかにされた。

研究分野：癌の分子標的治療

キーワード：癌抑制性ケモカイン・CXCL14/BRAK・転移抑制

1. 研究開始当初の背景

我々が作製したケモカイン CXCL14/BRAK トランスジェニックマウス(Tg)は移植腫瘍の抑制ばかりでなく B16 メラノーマ細胞および LLC 細胞の肺への実験的転移を抑制し、かつ、マウスの寿命の延長がみられた。Anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理することによりナチュラルキラー(NK)細胞を除去するとこの抑制はみられなくなることから、腫瘍抑制と転移抑制にはNK細胞が関与していることが示された。また、Tg マウスに α -Galactosylceramide であらかじめ処理し、NKT 細胞を活性化すると、肺への転移抑制作用と寿命延長作用はさらに顕著となった。

2. 研究の目的

今年度は癌細胞 (B16 メラノーマ細胞) にケモカイン CXCL14/BRAK を発現させた時に癌細胞のマウス肺への実験的転移が抑制されるかどうか、および抑制する場合はNK細胞が関与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

ウイルスベクターを用いてドキシサイクリン存在下でのみ CXCL14/BRAK を発現する B16 メラノーマ細胞を作成し、この細胞を種々の遺伝的背景を持つマウスの尾静脈より注入し、転移巣の数をかぞえた。

4. 研究成果

野生型 C57BL/6 マウスではドキシサイクリンを飲料水に添加してメラノーマ細胞に BRAK を発現させると、肺への転移がドキシサイクリンを添加しない場合より有意 ($P < 0.01$) に抑制された。T 細胞および B 細胞を欠損する SCID マウスの場合、転移巣の数はともに上昇したが、やはり、BRAK の発現により転移が抑制された。一方、NK 細胞を欠損する NOG マウスの場合、転移巣の数が野生型マウスの 10 倍に上昇し、さらに BRAK の発現は転移巣の数に影響を与えなかった。以上のことから、BRAK の発現レベルが、腫瘍を移植される宿主のマウスで高くても、メラノーマ細胞で高くても、腫瘍の肺転移が抑制され、この抑制はNK細胞に依存している事が明らかにされた。

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)

1) 畑 隆一郎 : MAPキナーゼのサブタイプ特異的シグナルクロストークによるがん抑制性ケモカインCXCL14/BRAKの発現制御. 生化学 83(8):731-736, 2011.

2) Ikoma T., Ozawa S., Suzuki K., Kondo T., Maehata Y., Lee MC., Hata R., Kubota E.:

Calcium-calmodulin signaling induced by epithelial cell differentiation upregulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region. *Biochemical Biophysical Research Communications*: 420(2):217-22,2012. Feb 20. [Epub ahead of print].

[学会発表] (計 14 件)

[受賞講演]

1) Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato : Production of transgenic mice resistant to cancer cell growth and metastasis -Toward Cancer Therapy using Endogenous Tumor Suppressing Chemokines-. 2nd International Conference on Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, Budapest, Hungary, 2011, 5.2-5. (Outstanding Abstract and Selected Oral Presentation Award)

[一般発表・国際学会]

2) Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato: NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. Roche/Nature Medicine Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy, Nutley New Jersey, USA. 2011.9.11-13.

3) Miyamoto C., Maehata Y., Ozawa S., Ikoma T., Komori R., Hata R. -I., Lee M-C: Fasudil, a specific inhibitor of ROCK, stimulates secretion of CXCL14/BRAK and suppresses tumor growth *in vivo*. The EMBO meeting, Vienna, Austria. 2011.9.10-13.

[一般発表・国内学会]

4) 畑 隆一郎. 佐藤-楠畑かおり. 小澤重幸. 加藤靖正. 古江-楠田美保 : ケモカイン CXCL14/BRAKは幹細胞分化因子か? 第43回日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会大会合同学術集会. 別府ビーコンプラザ. 2011.6.10.~6.11.

5) Ryu-Ichiro Hata, Kaori Sato-Kusubata, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Miho Kusuda Furue: Chemokine CXCL14/BRAK stimulates differentiation of cancer stem cells. *Connective Tissue* 53(1). 70-71,2012.

6) 畑 隆一郎. 居作和人. 加藤靖正. 小澤重幸. 鈴木健司. 生駒丈晴. 前畑洋次郎. 宮本千央. 椎木直人. 矢島伸之. 久保田英朗. 李昌一. 槻木恵一: 癌に強いマウスを作る副作用のない癌の治療法を目指してー. バイオアカデミックフォーラム. 東京ビッグサイト 2011 6. 29-7. 1.

7) 宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 小森令賀, 居作和人, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一: 選択的ROCK阻害剤FasudilによるCXCL14/BRAK細胞外分泌促進を介した抗腫瘍効果の検討. 第125回日本薬理学会関東部会. 日本大学薬学部. 千葉. 2011.10.15

8) 宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 小森令賀, 居作和人, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一: ROCK阻害剤(Fasudil)は抗腫瘍性ケモカイン(CXCL14/BRAK)の細胞外分泌促進を介して腫瘍進展を抑制する. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岐阜, 岐阜. 2011.9.30-10.2.

9) 加藤靖正. 前畑洋次郎. 前田豊信. 畑隆一郎: オステオネクチンノックアウトマウスの肺における遺伝子発現プロファイリング. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岐阜, 岐阜. 2011.9.30-10.2.

10) 加藤伊陽子. 福西菜穂子. 畑隆一郎. 井川洋二. 倉田俊一: 扁平上皮癌での p63 による核内 GSK-3 β シグナルを介した β -cateninの制御. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-5.

11) 加藤靖正. 畑隆一郎. 佃守. 宮崎香. 長嶋洋治: TRPM-5 は. 酸性細胞外pHシグナルに関与し. メラノーマの肺転移に関与する. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-10.5.

12) Ryu-Ichiro Hata, Yasumasa Kato, Kazuyoshi Takeda, Masaru Taniguchi: NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-10.5.

13) 宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 居作和人, 畑隆一郎, 李昌一: ROCK阻害剤 fasudil による CXCL14/BRAK 分泌促進を介した抗腫瘍効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第137回例会. 神奈川, 横須賀. 2011.12.3.

14) 居作和人, 畑 隆一郎: ケモカイン CXCL14/BRAK遺伝子トランスジェニックマウスの腫瘍抑制・転移抑制機構の解明. 神奈川歯科大学学会 第137回例会. 神奈川, 横須賀. 2011.12.3.

[図書] (計1件)

畑 隆一郎 (編集代表). 高橋信博. 宇田川信之. 東 俊文. 上條竜太郎. 石崎 明. 加藤靖

正 [編著] 早川太郎. 須田立雄. 木崎治俊[監修]: 口腔生化学, pp.1-352. 第5版. 医歯薬出版. 東京. 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

特願 2010-150125 癌転移抑制剤及び医薬組成物

○取得状況 (計1件)

特許取得 特許第4805641号 頭頸部癌抑制剤および医薬生成物

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神奈川歯科大学・特任教授 畑 隆一郎

(2)研究分担者

神奈川歯科大学歯学部・講師 居作和人

(3)本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史

平成24年4月25日提出

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：皮膚発がんにおけるケモカインの病態生理学的役割解析

研究代表者：和歌山県立医科大学 教授 近藤稔和

研究成果の概要：

二段階皮膚腫瘍形成モデルを用いて皮膚発がんにおける、CX3CL1-CX3CR1の病態生理学的役割を解析した。8週齢・雄 C57BL/6 マウス(WT)および CX3CR1 遺伝子欠損マウス(KO)の背部に DMBA (100 µg/200 µl acetone) 塗布後、TPA(30 µg/200 µl acetone)を週に2回、20週連続塗布して腫瘍形成を誘導する。肉眼的に乳頭腫および皮膚腫瘍の形成を観察したところ、KO マウスでは乳頭腫形成が有意に少なかった。したがって、皮膚発がんにおける CX3CL1-CX3CR1 シグナルの重要性が明らかとなった。

研究分野：皮膚科学，実験病理学，免疫学

キーワード：ケモカイン，皮膚発癌

1. 研究開始当初の背景

炎症とは、生体が内外から有害な刺激（ストレス）を受けたときに生じる生体防御反応であり、これにより誘導される免疫反応と症候あるいは病理組織学的変化のことであり、一過性に生じた後消褪する「急性炎症」とその反応が長期にわたって継続する「慢性炎症」に大別される。近年、慢性炎症が、糖尿病、動脈硬化、神経変性疾患、癌の発症・浸潤・転移と大きく関わっていることが知られてきた。慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のために生体防御反応としての炎症が遷延化し、適応の破綻により不可逆的な「組織リモデリング」が生じて臓器の機能不全に陥り、その結果として様々な病態を発症させるものと考えられている。特に、がんの炎症性微小環境では、慢性炎症により組織の恒常性が失われており、実質細胞に由来する腫瘍細胞と腫瘍組織の間質に浸潤したマクロファージの両者において、炎症シグナル経路の活性化されて、がんの発症・進展に関与することが証明されている。具体的には、炎症性サイトカイン・ケモカインなどの炎症性メディエーター並びにそれら遺伝子発現を調節する転写因子が大きく関わっていることは言うまでもない。申請者は、これまで皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカインやケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。

2. 研究の目的

皮膚組織は、体の最も外側にあるために、

外界から恒常的に物理的または化学的的刺激を受けている。それらの刺激が大きい場合は、組織の機能的・構造的破綻、いわゆる「創傷」が生じるが、創傷を受けた組織では、それらの解剖学的な不連続性や破壊された組織・細胞などに対し、修復反応、すなわち **Wound healing**(創傷治癒)が起こる。しかしながら、皮膚組織において刺激が継続することにより、正常な創傷治癒機構が破綻した場合、局所における慢性炎症が生じ、皮膚がんが発症する。癌の微小環境においても、創傷治癒と同様に白血球浸潤や線維芽細胞の増殖、血管新生が観察されることから、Coussens & Werb は、“Tumors are wounds that do not heal(癌は癒えることのない創傷)”と提唱している。すなわち、創傷治癒過程における微小環境と癌の微小環境には共通点が多い。申請者らは、これまで皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカイン・ケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。また、炎症性サイトカインやケモカインは、急性、慢性を問わず炎症反応の **key molecule** であることから、本研究では、ケモカイン・ケモカインレセプターの遺伝子欠損マウスを用い、慢性炎症による皮膚がんモデルにおいて、がんの発症・進展におけるケモカインシステムの病態生理学的役割を解析する。さらに、ケモカインが、皮膚がんの発症予防や進展抑制の分子標的となり得るか否かの可能性について明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 遺伝子欠損マウス

C57BL/6 マウスを遺伝子背景とする CX3C ケモカインレセプター-1 (CX3CR1) の各遺伝子欠損マウスを用いた。

2) 2段階皮膚発がんモデル

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 100 μ g/200 μ l acetone)をマウス背部に塗布後、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, 30 μ g/200 μ l)を 20 週連続塗布して腫瘍形成を誘導する。

3) 腫瘍形成

背部における腫瘍(乳頭腫)形成について、経時的に観察し、遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

4) 病理組織学的検索

背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、表皮の厚さを計測し遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

5) 免疫組織化学的検索

背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、マクロファージ、Tリンパ球、および新生血管を免疫染色し、遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

4. 研究成果

1) WT マウスでは、肉眼的に乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から観察され、20 週目では 80% のマウスに認められたが、KO マウスでは乳頭腫形成が有意に少なく、約半数のマウスでしか乳頭腫がみられなかった (Fig. 1)。

2) 病理組織学的検査では、WT マウスでは著明な表皮肥厚が観察されたが、KO マウスでは表皮層の肥厚が有意に減弱していた。さらに、免疫組織化学的検索において、WT マウスでは F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性リンパ球浸潤が顕著に観察された。しかしながら、WT マウスに比べて KO マウスでは、マクロファージ、リンパ球ともに有

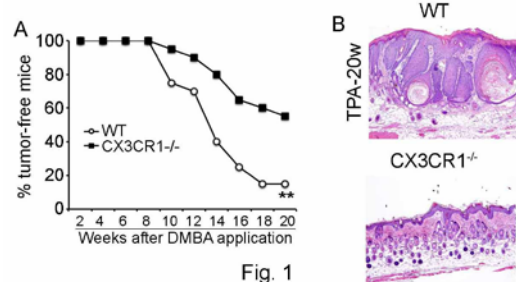


Fig. 1

意に減弱していた。さらに、血管新生についても、KO マウスでは腫瘍内血管数が有意に

少なかった。

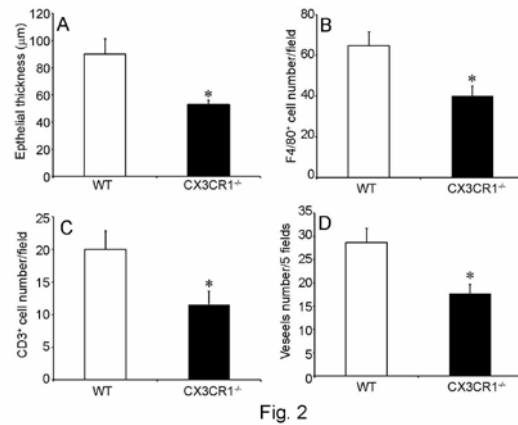


Fig. 2

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. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest.* 122:711-21, 2012.
2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest.* 121:2911-20, 2011
3. Inui M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Immunol.* 186:423-31, 2011
4. Fujii H, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Yamagishi M, Kawano M, Mukaida N. Ablation of the Ccr2 gene exacerbates polyarthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 63:96-106, 2011

〔学会発表〕（計4件）

1. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Experimental Biology 2011, Washington D.C., 2011.4
2. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Nosaka M, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Essential role of chemokine receptor CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibrocyte infiltration. The 10th World Congress on Inflammation, Paris, 2011.6
3. Kondo T, Ishida Y, Inui M, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N. Essential roles of CCL3-CCR1 axis in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 9th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Florence, 2011.10

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和歌山県立医科大学・教授 近藤稔和

(2) 研究分担者

和歌山県立医科大学・講師 石田裕子

(3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月23日提出

対象研究テーマ：がん化シグナル伝達系における足場タンパク質 JSAP の役割とその分子機構

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析

研究代表者：大阪薬科大学薬学部 教授 福永理己郎

研究成果の概要：

ERK および p38 MAP キナーゼによって活性化される Mnk プロテインキナーゼは、翻訳開始因子 eIF4E のリン酸化などを介して翻訳制御に関与すると考えられている。Mnk1/2- DKO マウスから樹立した MEF 細胞に Mnk1 を発現させ、翻訳制御における mTOR シグナル系と Mnk シグナル系のクロストークについて解析した。その結果、mTOR シグナル系の活性化による eIF4G (Ser1108) のリン酸化が Mnk1 シグナル系によって阻害あるいは修飾されることを見出した。これはリン酸化 Ser1108 残基の脱リン酸化ではなく、Ser1105/1106 のリン酸化による可能性が示唆された。他方、Mnk1 の構成的活性化変異体が、標的タンパク質である eIF4E と比較的安定な複合体を形成することを見出し、これを基質トラップ変異体として標的タンパク質の探索に利用できる可能性が示唆された。

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：プロテインキナーゼ，足場タンパク質，翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

Mnk1 及び Mnk2 は、MAP キナーゼによって活性化されるセリン/スレオニン・プロテインキナーゼであり、翻訳開始因子 4E (eIF4E: mRNA キャップ結合蛋白質) をリン酸化することにより、一群の mRNA の翻訳開始を制御すると考えられている。研究代表者は、Mnk1/Mnk2 ノックアウトマウスを作製することにより、Mnk が生体内でも ERK や p38MAP キナーゼによって活性化されて eIF4E のリン酸化を担うことを明らかにした。翻訳開始の律速因子である eIF4E は多くの悪性腫瘍で過剰発現しており、細胞のがん化に伴うタンパク合成促進に重要な役割を果たしている。eIF4E の活性は主に mTOR と Mnk の 2 つのプロテインキナーゼ経路で制御されることが近年明らかにされた。mTOR は PI3K の下流で活性化され、eIF4E 阻害因子である 4E-BP をリン酸化して不活化することによって翻訳開始複合体形成を促進し、一方、Mnk は eIF4E を直接リン酸化して mRNA の選択的翻訳に機能すると考えられている。研究代表者らは、mTOR 経路を阻害するとフィードバック的機構によって Mnk 経路が活性化されることを見出した。また、Bリンパ腫・Tリンパ腫発症モデルマウスにおいて、Mnk1/2 が発がん促進的に作用することを示した。一方、善岡らはストレス応答 MAP キナーゼ (JNK, p38) の足場タンパク質として同

定した JSAP1 が ERK のシグナル伝達をも制御することを明らかにし、JSAP/JLP が Mnk を介した翻訳制御に関与する可能性を示した。

2. 研究の目的

主要な翻訳制御シグナル系である mTOR 経路と Mnk 経路の相互作用における JSAP1/JLP の機能を明らかにすることを目的として本研究を計画した。近年、タンパク合成の亢進が認められる多くの悪性腫瘍に対して、mTOR などのタンパク合成促進分子を標的とする治療法が試みられ、ラパマイシン類縁体 (RAD-001 など) の治験が行なわれている。本研究では、がん治療において両経路の阻害剤を併用する試みの分子的基盤を提供すると共に、新たな標的分子の探索を目指す。

3. 研究の方法

ヒト Mnk1 に種々の点変異や欠失変異を導入して、優勢ネガティブ変異体や構成的活性化型変異体などを作製した。これらの変異体や野生型 Mnk1 をレトロウイルスベクターを用いて Mnk1/2-ダブルノックアウト (DKO) マウスの不死化胚性線維芽細胞 (MEF) に導入し、安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞を TPA や FCS で刺激し、翻訳制御に関わる mTOR シグナル系および Mnk シグナル系について、eIF4G (Ser1108 残基) のリン酸

化やeIF4E(Ser209)のリン酸化を主な指標として解析した。各部位のリン酸化レベルは、リン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。他方、翻訳開始因子やJSAP/JLPとMnk1の相互作用を解析するために、HAタグやFLAGタグを接続した組換えタンパク質をHEK293T細胞で発現させ、免疫沈降法とウエスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

ヒトMnk1の野生型および各種変異体を安定に発現するMnk-DKO-MEF細胞を用いてmTORシグナル系およびMnkシグナル系におけるRapamycinやCyclosporinの影響を調べたが、MEFでは顕著な差は認められなかった。しかし、この解析の過程で、Mnk1を強制発現させたMnk-DKO細胞を血清で刺激すると、リン酸化特異抗体で検出したeIF4Gのリン酸化Ser1108レベルが急速かつ劇的に低下することを見出した。そこで、脱リン酸化阻害剤(オカダ酸やCyclosporin)および各種のMnk1変異体を用いてSer1108の脱リン酸化について検討した結果、プロテインホスファターゼの活性化が関与しているのではなく、Ser1108近傍のSer1105あるいはSer1106残基がリン酸化される可能性が示唆された。このことを検証するために、現在、Ser1105/1106がMnk1によってリン酸化されるか否かについて検討中である。

他方、eIF4EやeIF4GとMnk1との相互作用について免疫沈降法について解析した結果、構成的活性化変異(Thr344Glu変異)を有するMnk1が、基質であるeIF4Eと比較的安定な複合体を形成することを見出した。野生型Mnk1や他の変異体では安定複合体を形成しないことから、Thr344Glu変異体は、いわゆる基質トラップ変異体であると考えられる。今後は、この複合体形成にJSAP/JLPが関与する可能性について検討するとともに、Thr344Glu変異体を利用してMnk1の未知の標的タンパク質の同定を試みる予定である。

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2件)

Joshi, S., Sharma, B., Kaur, S., Majchrzak, B., Ueda, T., Fukunaga, R., Verma, A. K., Fish, E. N., and Platanias, L. C. Essential role for Mnk kinases in Type II interferon (IFN γ) - signaling and its suppressive effects on normal hematopoiesis. *J. Biol.Chem.* 286, 6017-6026 (2011)

Shi, Y., Frost, P., Hoang, B., Yang, Y., Fukunaga, R., Gera, J., and Lichtenstein, A. MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells. *Oncogene* Feb 27. doi: 10.1038/onc.2012 (2012)

[学会発表] (計0件)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪薬科大学薬学部・教授 福永理己郎

(2) 研究分担者

大阪薬科大学薬学部・講師 藤井忍

(3) 本研究所担当者

シグナル伝達・教授 善岡克次

平成24年3月28日提出

対象研究テーマ：GSK3 β 阻害によるがん治療法の開発と臨床試験

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：GSK3 β 阻害による新規膵がん化学療法の実験と臨床試験

研究代表者：金沢医科大学腫瘍内科学 教授 元雄良治

研究成果の概要：

膵癌の難治性の根底には腫瘍細胞の高い増殖能・浸潤能・薬剤耐性などがある。我々は膵癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 β の発現と活性が高く、腫瘍細胞の生存と増殖に必須であることを見出した。そして、GSK3 β 阻害によるがん治療効果を細胞レベルと担がん動物モデルで実証し、GSK3 β が膵癌の新しい治療標的であることを同定した。その機能解析から、がん細胞で異常活性を示す GSK3 β が誘導するシグナルが p53 がん抑制分子経路、Rb 細胞周期制御系や細胞不死化経路に影響を及ぼすことを明らかにした。また、ヒト膵癌細胞移植動物において薬理的 GSK3 β 阻害剤の併用は TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1) を介する DNA 修復機構を制御して、ゲムシタビン (GEM) の抗腫瘍効果を相乗的に増強することを実証した (Shimasaki T, et al. J Gastroenterol 2011 Epub)。本研究では、膵癌の浸潤に伴うがん細胞の形態特性と運動能に着目して GSK3 β の機能を多角的に解析した。培養細胞のスクラッチ試験とトランスウェルアッセイにより、GSK3 β 阻害剤はがん細胞の遊走と浸潤を抑制した。その効果に伴い、GEM により誘導されるがん細胞の形態変化 (epithelial-mesenchymal transition) と、がん浸潤を誘引するある種の熱ショック蛋白質の発現や FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路が抑制された。これらの解析と並行して、GSK3 β 阻害効果が科学的に立証された既存医薬品の適応外使用と GEM の併用による進行膵癌治療の医師主導型第 I / II 相臨床研究 (UMIN 00005095) を 2011 年に開始した。

研究分野：腫瘍内科学、分子腫瘍学

キーワード：膵癌、GSK3 β

1. 研究開始当初の背景

膵癌の標的分子の探索と同定では、発がん・進展過程で活性化されている細胞シグナル伝達系が注目されている。分子標的治療薬のうち上皮増殖因子受容体 (EGFR) の阻害剤や抗体医薬が、いくつかの癌種では良好な治療効果を示している。一方、膵癌では erlotinib のみが第 III 相臨床試験で GEM との併用効果が証明されているにすぎず、今後、新たな標的分子の探索と薬剤の開発が望まれている。我々は最近、glycogen synthase kinase (GSK) 3 β が膵癌を含む多くの消化器癌に共通する治療標的であることを明らかにしてきた。

GSK3 β はインスリン経路で発見され、その基質に応じて細胞周期、増殖・分化、アポトーシス、細胞運動など、基幹的細胞生命現象を司る多機能セリン・スレオニンリン酸化酵素である。疾患との関連では、インスリン経路、神経細胞、造骨細胞への作用から、2型

糖尿病、アルツハイマー病、骨粗鬆症などの創薬標的として注目され、多数の阻害剤が開発されている。GSK3 β は正常細胞の Wnt 経路制御作用からがん抑制的に作用すると認識されてきたが、我々は、GSK3 β の過剰発現や酵素活性の調節不全ががん細胞の生存や増殖を維持・促進するという Wnt 経路抑制機能とは異なる病的作用を発見した。そして、GSK3 β 阻害の抗腫瘍効果を大腸癌や脳膠芽腫で実証し、本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した。その機能解析から、がん細胞で異常活性を示す GSK3 β が誘導するシグナルが、がん抑制分子 (p53) 経路、細胞周期制御 (Rb) 系や細胞不死化経路に影響を及ぼすことを明らかにした。

膵癌でも同様に GSK3 β の発現や活性の亢進に伴う病的作用が観察され、研究代表者らは GSK3 β 阻害により腫瘍細胞の生存・増殖抑制のみならず、gemcitabine (GEM) の感受性を高めることを培養細胞と担がん動物モデ

ルで実証した。また、低濃度の GEM が膵癌細胞の上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を誘導して浸潤性を高めるが、GSK3 β 阻害によりこの EMT 誘導が抑制されることを見いだしている (未発表)。これらの予備結果から、GSK3 β が膵癌細胞の浸潤を促進しているのではないかとこの着想に至った。我々の研究と前後して GSK3 β は膵癌の新たな治療標的であること示唆する成果が海外で報告されているが、本研究と同じ発想の研究報告は国内外ではみられない。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌における GEM による EMT 誘導のメカニズムと GSK3 β 阻害の作用機序の解明を目的として、下記の到達目標を設定した。(1) 我々が最近、同定した膵癌細胞から分泌される EMT 誘導分子の発現・機能解析を行ない、GEM による EMT 誘導作用機序を明らかにする。(2) この EMT 誘導分子について、GSK3 β 阻害による発現や分泌への影響、機能解析を行い、GSK3 β によるがん細胞の浸潤抑制機序を明らかにする。(3) 本研究から期待される結果と今までに得た知見を応用して、GSK3 β 阻害作用を示すことが報告されている複数の医薬品と GEM の併用による進行・再発膵癌の第 I / II 相臨床試験を現在、実施している。これらの臨床試験の結果とともに、同定した EMT 誘導分子が本治療法のバイオマーカーとなるかについて検討する。本研究により、GEM と GSK3 β 阻害剤の併用による膵がん治療法の作用分子基盤の解明とともに、進行膵癌患者に対する同治療法の安全性と効果を見極めることができると期待される。

3. 研究の方法

①我々は、複数の培養ヒト膵癌細胞株において、低濃度の抗がん剤により細胞間接着性が低下し、EMT が誘導されて細胞の遊走と浸潤能が亢進することを発見した。膵癌細胞 PANC-1 の調整培地のプロテオーム解析により、EMT 誘導因子の候補となる 55 種類の分子を同定した。ほとんどの分子は GEM 投与により分泌が低下したが、有意に分泌が上昇した 8 種類の分子のうち、組換え蛋白質の添加により EMT 同様の形態変化を誘導する蛋白質を発見した (EMT-related Protein: EP1~EP3 と略す)。

1) EP1~EP3 の EMT 誘導効果の検証: EP1~EP3 のそれぞれに特異的な抗体、小分子阻害薬、RNAi、cDNA を用いて、膵癌由来培養細胞における EP1~EP3 の機能解析を行う。EP1~EP3 に対する特異抗体、小分子阻害薬、RNA 干渉法によるそれぞれの分子の活性や発現の抑制及びそれぞれの遺伝子導入による強制発現を行い、EP1~EP3 の発現量の違いからみた EMT 誘導性について解析する。EMT の評

価は、顕微鏡による形態学的観察と、N-cadherin, E-cadherin, vimentin, ZO-1, snail などの EMT 関連マーカーの発現と細胞内局在の変化を、Western blot 法と免疫蛍光染色法により観察する。

2) EP1~EP3 の細胞内発現条件の検討:

EP1~EP3 がどのような条件で細胞内に発現するかを解析する。具体的には、抗がん剤の種類・濃度を変えて、細胞内発現量に違いがあるか、組換え EP1~EP3 蛋白質を培地に添加した場合に、各分子の細胞内発現量の変化、小分子 GSK3 β 阻害剤による EP1~EP3 の細胞内発現抑制効果、を解析する。これらの細胞内発現量は real-time RT-PCR、Western blot 法、免疫蛍光染色法を用いて観察・計測する。②GSK3 β 阻害による抗がん剤誘導性 EMT の抑制メカニズムの解明

GSK3 β 阻害による EMT 抑制効果の作用機序について、EP1~EP3 の発現あるいは機能の抑制によるものであるかを検討する。具体的には、小分子 GSK3 β 阻害剤や RNA 干渉法を用いて、GSK3 β 阻害による影響を検討する。EP1~EP3 の蛋白発現量の測定には、Western blot 法を用いる。EP1~EP3 の機能抑制であるかどうかについては、既に EP1~EP3 の機能的な経路は明らかとなっているため、EP1~EP3 関連経路を構成する分子群を対象にして、Real-time RT-PCR 法や Western blot 法を用い、mRNA レベルあるいは、蛋白質レベル (発現量やリン酸化解析) における制御であるかなどを明らかにする。

③GSK3 β 阻害剤の併用による進行膵がん治療の第 I・II 相臨床試験の実施 すでに医薬品として処方されているものの中で GSK3 β 阻害作用を有する複数の薬剤を GEM と併用する化学療法により、進行膵癌患者における腫瘍の縮小や良好な QOL を保ちながらの生存期間の延長が得られるかを検証する。すでに金沢医科大学病院倫理審査委員会にて承認を受け、本臨床試験を開始した。

4. 研究成果

膵癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 β の発現と活性が高く、腫瘍細胞の生存と増殖に必須であることを見出した。そして、GSK3 β 阻害によるがん治療効果を細胞レベルと担がん動物モデルで実証し、GSK3 β が膵癌の新しい治療標的であることを同定した。その機能解析から、がん細胞で異常活性を示す GSK3 β が誘導するシグナルが p53 がん抑制分子経路、Rb 細胞周期制御系や細胞不死化経路に影響を及ぼすことを明らかにした。また、ヒト膵癌細胞移植動物において薬理的 GSK3 β 阻害剤の併用は TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1) を介する DNA 修復機構を制御して、ゲムシタピン (GEM) の抗腫瘍効果を相乗的に増強するこ

とを実証した。GSK3 β 阻害剤はがん細胞の遊走と浸潤を抑制した。その効果に伴い、GEMにより誘導されるがん細胞の形態変化(EMT)と、がん浸潤を誘引するある種の熱ショック蛋白質の発現やFAK/Rac1/MMP-2 機軸経路が抑制された。これらの解析と並行して、GSK3 β 阻害効果が科学的に立証された既存医薬品の適応外使用とGEMの併用による進行膵癌治療の医師主導型第I/II相臨床研究(UMIN 000005095)を2011年に開始した。

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3件)

1. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol.* 2011 Nov 1. [Epub ahead of print]
2. Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Shimasaki T, Tatsuno T, Takano F, Ueda Y, Motoo Y, Takegami T, Nakagawa H, Kuwabata S, Nemoto N, Tomosugi N, Miyazawa S. Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial-mesenchymal transition. *Microsc Res Tech.* 2011 Mar 16.
3. Motoo Y, Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakajima H, Kawakami K, Minamoto T. Metabolic Disorder, Inflammation, and Deregulated Molecular Pathways Converging in Pancreatic Cancer Development: Implications for New Therapeutic Strategies. *Cancers*, 3(1), 446-460, 2011.

[学会発表] (計9件)

1. Nakaya N, Ishigaki Y, Bian Q, Ma S, Shimasaki T, Nakajima H, Motoo Y. Molecular mechanisms of TP53INP1 in the gemcitabine sensitivity. The International Pancreatic Research Forum 2011, (Osaka, '11.11.26).
2. Motoo Y. Pancreatic cancer: experimental sensitization to gemcitabine and patient care with traditional Japanese medicine. International Conference on Cancer Prevention, (Seoul, Korea, '11.8.26).

3. Motoo Y. Chemotherapy for pancreatic cancer: Molecular analysis and clinical application. "Asian Oncology Summit 2011" GI Symposium 3, (Hong Kong SAR, China, '11.4.9).
4. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 有香, 川上 和之, 舟木 洋, 上田 順彦, 小坂 健夫, 友杉 直久, 源 利成, 元雄 良治. 膵癌細胞におけるgemcitabine誘導性EMTに関連する新規分子の同定. 第22回日本消化器癌発生学会, (佐賀, '11.11.25).
5. 島崎 猛夫, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. 切除不能進行膵癌に対するGSK3 β を標的とした新規治療戦略. 第53回日本消化器病学会大会, (福岡, '11.10.21).
6. 中谷 直喜, 島崎 猛夫, 元雄 良治. ゲムシタビン感受性の分子機構におけるTP53INP1の意義. 第53回日本消化器病学会大会, (福岡, '11.10.21).
7. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 由香, 川上 和之, 竹上 勉, 友杉 直久, 源 利成, 元雄 良治. 膵癌の新規治療標的としてのglycogen synthase kinase(GSK)3 β : 化学療法戦略の新展開. 第70回日本癌学会学術総会, (名古屋, '11.10.3).
8. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 有香, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 友杉 直久, 元雄 良治. ゲムシタビン単剤療法の壁への挑戦: 新規標的分子の同定と膵癌化学療法への展望. 第42回日本膵臓学会大会, (弘前, '11.7.29).
9. 高田 尊信, 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 元雄 良治, 友杉 直久. 膵癌培養細胞PANC-1に対する塩酸ゲムシタビンの作用についてのプロテオミクス解析. 金沢医科大学医学会第47回学術集会, (内灘, '11.7.9).

[図書] (計1件)

Motoo Y, Xia QS, Nakaya N, Shimasaki T, Nakajima H, Ishigaki Y. Stress responses of pancreatic cancer cells and their significance in invasion and metastasis. In: Kwang-Sup Soh, Kyung A Kang, David K. (eds), *The Primo Vascular System: Its Role in Cancer and Regeneration*, Springer, New York, etc. 213-217, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢医科大学腫瘍内科学・教授 元雄良治

(2) 研究分担者

金沢医科大学腫瘍内科学・准教授

中島日出夫

金沢医科大学総合医学研究所・准教授

石垣靖人

金沢医科大学腫瘍内科学・講師 島崎猛夫

金沢医科大学腫瘍内科学・助教 中谷直喜

(3) 本研究所担当者

腫瘍制御・教授 源 利成

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月25日提出

対象研究テーマ：ヒト消化器・呼吸器がんの分子病態の解明と臨床応用

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：大腸がん個別化医療のためのバイオマーカー探索

研究代表者：金沢医科大学一般・消化器外科学 教授 小坂健夫

研究成果の概要：

大腸がん症例を対象に、がん関連遺伝子の異常を多角的に検索した。得られた遺伝子特性と大腸がんの臨床病理学的諸因子と対比した。大腸がん患者 500 例を対象として microsatellite instability (MSI) と CpG island methylator phenotype (CIMP) の両表現型の解析分類および K-ras と B-raf 遺伝子の変異を解析した。その結果、本邦の大腸がん症例では MSI および CIMP 表現型を示すがんは、海外からの報告と同様に複数の分子病理学的特徴を示すことが明らかになった。右側結腸では MSI および CIMP の表現型を示すがんの頻度は高く、臨床応用を目的に、予後や治療感受性との関連などをさらに検討する価値があると考えられた。

研究分野：腫瘍外科学，分子腫瘍学

キーワード：大腸がん、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、進行・再発大腸がん薬物治療の奏効率と安全性は向上してきているが、いまだに無効例や治療不耐例を経験する。この化学療法の効果および有害事象の不均一性を克服すること、すなわち大腸がんの薬物治療を個別化することが実地臨床では求められつつある。本邦の大腸がん治療ガイドラインで推奨される薬剤のうち capecitabine に対する dihydropyrimidine dehydrogenase 欠失、cetuximab や panitumumab に対する epidermal growth factor receptor 発現と K-ras 変異、irinotecan に対する uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 遺伝子多型などが有効なバイオマーカーとされている。これらのバイオマーカーは実臨床で用いられているものの、症例によっては当該薬剤の効果が不十分であったり、重篤な有害事象が発生したりすることがまれでない。また、これらのバイオマーカーのほとんどは海外で実施された臨床試験から見出されたものであり、本邦の大腸がんの特性や治療効果・有害事象の予測を必ずしも反映するものではない。

2. 研究の目的

本研究では、大腸がん切除標本から組織検体を収集し、がん関連遺伝子や分子の異常をジェネティック・エピジェネティックな側面から多角的に検索を行う。そして、得られる遺伝子・分子特性と大腸がんの臨床病理学的諸因子や標準的な薬物治療にともなう臨床情報を対比することにより、本邦における大腸がん個別化医療のためのバイオマーカー

を探索することをおもな目的とする。

3. 研究の方法

金沢大学がん進展制御研究所がん組織バンクに集積されている組織検体のうち 500 例の大腸がん組織より DNA を調整し、K-ras、B-raf の遺伝子変異および IGF2, CACNA1G, NEUROG1, RUNX3, SOCS1 のプロモーターメチル化を検出、測定した。また、5 つの異なる microsatellite locus marker の解析により microsatellite instability (MSI) と MS stability (MSS) の表現型を判定した。これらの解析結果と大腸がんの臨床病理学的諸因子との関連を統計学的に比較検討した。

4. 研究成果

解析したプロモーターメチル化から CpG island methylator phenotype (CIMP) を判定した。MSI と CIMP の表現型の有無により大腸がんは 4 群に分類され、CIMP+/MSI、CIMP+/MSS、CIMP-/MSI、CIMP-/MSS はそれぞれ 19 例 (3.8%)、27 例 (5.4%)、16 例 (3.2%)、438 例 (87.6 %) であった。K-ras 変異は 166 例 (33.2%)、B-raf 変異は 45 例 (9%) に認めた。CIMP+/MSI 群では K-ras はすべて野生型であった。一方、B-raf は CIMP+/MSI 群の全例と CIMP+/MSS 群の 12 例 (44.4%) に変異を認めた。このように、大腸がんの表現型と遺伝子変異型は強く相関した。

腫瘍の発生部位別に検討すると、CIMP+/MSI 群と CIMP+/MSS 群が右側結腸に高頻度に発生し、左側結腸がんではこれらの遺伝子型を

示す腫瘍は 5% 以下であった。一方、CIMP-MSI 群と CIMP-/MSS 群は左側結腸に高頻度に発生していた。大腸がんの組織型別に検討した結果、CIMP+/MSI 群では分化度の低い腫瘍を多く認めた。今回検討した遺伝子異常の頻度は大腸がん症例の性別、腫瘍深達度、あるいはリンパ節転移の有無とは有意な相関は認められなかった。

以上の結果から、本邦の大腸がん症例では MSI および CIMP 表現型を示すがんは、海外からの報告と同様に複数の分子病理学的特徴を示すことが明らかになった。右側結腸では MSI および CIMP の表現型を示すがんの頻度は高く、臨床応用を目的に、予後や治療感受性との関連などをさらに検討する価値があると考えられた。

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 7 件)

(杉山 貢), 國崎主税, 加藤広行, 今田敏夫, 島田英昭, 平田公一, 小坂健夫, 吉田 昌, 北島政樹, 愛甲 孝: 胃切除後の骨代謝障害に対するアレンドロネートの有用性の検討, 日消外会誌, 44:361-373, 2011.

上田順彦, 澤 敏治, 小坂健夫: 左葉型肝内胆管癌のリンパ節転移様式および郭清の意義, 金医大誌, 36:19-24, 2011.

上田順彦, 澤 敏治, 小坂健夫: 肝門部胆管癌の外科的治療成績向上のための課題, 金医大誌, 36:77-82, 2011.

M.Noguchi, M.Inokuchi, Y.Ohno, M.Yokoi-Noguchi, Y.Nakano, T.Kosaka : Oncological and cosmetic outcome in breast cancer patients undergoing "moving window" operation , Breast Cancer Res. Treat. , 129:849-856, 2011.

(藤村 隆), 木下 淳, 尾山勝信, 伏田幸夫, 太田哲生, 木南伸一 : ラジオアイソトープ (RI) ・色素併用法による胃癌センチネルリンパ節生検手技と臨床応用, 手術, 65:433-440, 2011.

Mi.Noguchi, Ma.Noguchi, Y.Nakano, Y.Ohno, T.Kosaka : Axillary reverse mapping using a fluorescence imaging system in breast cancer, J. Surg. Oncol., 105:229-234, 2012.

Ma.Noguchi, Y.Nakano, Mi.Noguchi, Y.Ohno, T.Kosaka : Local therapy and survival in breast cancer with distant metastases, Breast Cancer., 105:104-110, 2012.

[学会発表] (計 1 2 件)

T. Kosaka, D. Kaida, T. Ohnishi, Y. Tomita, Y. Ohno, M. Noguchi, H. Funaki, S. Kinami, K. Omote, Y. Nakano, N. Ueda, M. Noguchi.: S-1

and cisplatin regimen followed by conversion gastrectomy for borderline resectable AGC. 9th International gastric cancer congress 2011年4月、Seoul

島崎猛夫, 石垣靖人, 高田尊信, 中村有香, 川上和彦, 上田順彦, 小坂健夫, 源 利成, 友杉直久, 元雄良治 ゲムシタビン単剤療法の壁への挑戦: 新規標的分子の同定と膀胱癌化学療法への展望 第 42 回日本膀胱学会大会、2011年7月、弘前

木南伸一, 表 和彦, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 上田順彦, 中野泰治, 小坂健夫. : ICG蛍光法による胃癌センチネルリンパ節生検を指標とした、腹腔鏡下機能温存胃癌根治手術. 第 73 回日本臨床外科学会総会、2011年11月、東京

島崎猛夫, 石垣靖人, 高田尊信, 中村有香, 川上和之, 舟木 洋, 上田順彦, 小坂健夫, 友杉直久, 源 利成, 元雄良治. 膀胱癌細胞における gemcitabine 誘導性 EMT に関連する新規分子の同定. 第 22 回日本消化器癌発生学会、2011年11月、佐賀

上田順彦, 中野達夫, 高仲 強, 小坂健夫. : 進行・再発膀胱癌に対する定位放射線を用いた化学放射線療法の有用性. 第 42 回日本膀胱学会大会、2011年7月、弘前

小坂健夫, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 表 和彦, 中野泰治, 上田順彦. : 治癒切除境界進行胃癌に対する SP 療法 の有用性と Conversion Gastrectomy. JDDW2011、第 9 回日本消化器外科学会大会、2011年10月、福岡

小坂健夫, 甲斐田大資, 大野由夏子, 大西敏雄, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 表 和彦, 中野泰治, 上田順彦. : 治癒切除境界の進行胃癌に対する SP 療法と胃切除は NAC 後の胃切除および Conversion 胃切除のいずれにおいても安全で有用である. 第 73 回日本臨床外科学会総会、2011年11月、東京

富田泰斗, 小坂健夫. : 高度進行直腸癌に伴う DIC に Cetuximab が著効した一例. 第 66 回日本大腸肛門病学会学術集会、2011年11月、東京

富田泰斗. : 大腸がん個別化療への応用に向けたジェネティック・エピジェネティック解析. 第 23 回臨床外科フォーラム、2011年11月、金沢

上田順彦, 甲斐田大資, 大西敏雄, 富田泰斗,
大野由夏子, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一,
表 和彦, 中野泰治, 小坂健夫. : 化学放射線
療法施行後切除した進行膵体尾部癌の 1 例.
第 122 回北陸肝胆膵勉強会・年度末大会、2011
月 12 月、金沢

小坂健夫, 甲斐田大資, 大野由夏子, 大西敏雄,
富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 表
和彦, 中野泰治, 上田順彦. : 腹腔内遊離がん
細胞診断の意義と問題点, 第 76 回大腸癌研
究会、2012 年 1 月、宇都宮

小坂健夫, 甲斐田大資, 大野由夏子, 大西敏雄,
富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 表
和彦, 中野泰治, 上田順彦. : 胃癌に対するS-1
を含む化学療法の効果と有害事象の予測. 第
84 回日本胃癌学会総会、2012 年 2 月、大阪

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢医科大学一般・消化器外科学・教授

小坂健夫

(2) 研究分担者

金沢医科大学一般・消化器外科学・准教授

表 和彦

金沢医科大学一般・消化器外科学・准教授

木南伸一

金沢医科大学一般・消化器外科学・大学院

大西敏雄

金沢医科大学一般・消化器外科学・大学院

富田泰斗

(3) 本研究所担当者

腫瘍制御・教授 源 利成

腫瘍制御・准教授 川上和之

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月10日提出

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化におけるヒストンのメチル化制御に関する研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：ヒストン修飾解析ツールの開発とがんのエピゲノム解析

研究代表者：東京工業大学バイオフィロンティアセンター 特任准教授 野崎直仁

研究成果の概要：

がんの発症や悪性化に関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析するために、メチル化・脱メチル化酵素および様々なメチル化修飾ヒストンに特異的なモノクローナル抗体の開発を進めた。作製した抗体を用いた ChIP 解析によって、ヒストン H3 の K4 (4 番目のリジン残基) 脱メチル化酵素である PLU1 が、その標的遺伝子 KAT5/Tip60 の発現をエピジェネティックに制御することにより、がん細胞の細胞浸潤能を亢進することを見だし、がんの悪性進展過程における酵素の新しい役割を明らかにした。

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス、ヒストン、翻訳後修飾、がん

1. 研究開始当初の背景

がんの発症や悪性化の分子メカニズムの解明には、原因遺伝子の同定が重要である。レトロウイルス感染発がんモデルマウスでは、ウイルスがゲノムへ挿入することで、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の発現異常を誘導し、がんを発症する。そのため、ウイルス挿入部位を解析することで、原因遺伝子を容易に同定することができる。ウイルス挿入変異の標的として高頻度に同定される宿主因子として、ヒストンのメチル化酵素・脱メチル化酵素の多くがこれまでに同定されてきた。ヒストンの翻訳後修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等）は、転写制御、DNA 複製、ヘテロクロマチン形成など様々な生物学的現象に関与している。ヒトのがんでは、ヒストンのアセチル化酵素の変異や脱アセチル化酵素の発現異常が観察されており、脱アセチル化酵素の阻害剤（Trichostatin A, SAHA 等）が抗がん剤として開発されている。一方、ヒストンのメチル化と発がんの関係は、まさに現在解析が進んでいる注目される研究分野である。

2. 研究の目的

がんに関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析し、エピゲノム異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明することを目的とする。そのために、ヒストンの翻訳後修飾の詳細な解析に必要な修飾特異的、修飾部位特異的なモノクローナル抗体や、メチル化・脱メチル化

酵素自身に対する抗体の開発を進行する。また、開発した抗体を用いた ChIP 法などによって、エピゲノム変化を解析し、がん細胞の悪性進展過程における遺伝情報発現異常の本質を明らかにする。さらに、ヒストンのメチル化制御酵素を標的とする阻害剤のスクリーニングシステムの構築を目指した抗体の活用法を検討する。

3. 研究の方法

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾部位である K4 (4 番目のリジン残基)、K9、K27、K36、K79 等について、それぞれモノメチル、ジメチル、トリメチル修飾、あるいは未修飾の状態を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を進行する。また、ヒストンのメチル化制御酵素の発現異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明するために、作製した抗体を用いた ChIP 法などによって、がん細胞のエピゲノムを解析する。さらに、大規模 DNA シークエンスによる転写開始点決定を利用したデジタル発現プロファイリングの結果とあわせて、がん細胞における遺伝情報の発現異常のメカニズムを調べる。

4. 研究成果

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾リジン残基 (K4, K9, K27, K36, K79) について、さまざまなメチル化修飾状態 (mono-, di-, tri-)

を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を進行し、多くの場合において、特異性の高い抗体の作製に成功した。また、他の翻訳後修飾（アセチル化、リン酸化など）とメチル化修飾が併存する状態を特異的に認識する抗体に関しても、重要な組み合わせについて抗体作製を完了しつつある。

本共同研究においては、乳がんや前立腺がんで高発現が見られるがん遺伝子 PLU1 脱メチル化酵素が、がんの発症だけでなく、がん細胞の細胞浸潤能を亢進する活性をもつことを示し、がんの悪性化における酵素の新たな役割を見つけた。さらに、デジタル発現プロファイルを用いて PLU1 酵素によるがん細胞の浸潤の重要な標的 KAT5/Tip60 ヒストンアセチル化酵素とその下流の標的である CD82/ KAI1 遺伝子を同定した。作製した抗体を用いた ChIP 解析等から、PLU1 が KAT5 の発現をエピジェネティックに制御することを見だし、PLU1 の制御する遺伝子発現カスケードが、がんの悪性進展過程に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

現在、発がんに関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素自身 (JMJD3, LSD1, PLU1, Suv39h1, etc.) に対する抗体についても、ハイブリドーマのスクリーニングを順調に進行している。

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6件)

Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K and Suzuki T. PLU1 histone demethylase decreases the expression of KAT5 and enhances the invasive activity of the cells. *Biochemical J.*, 437, 555-564, 2011.

Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res.*, 39, 6475-88, 2011.

Ishikawa K, Ohsumi T, Tada S, Natsume R, Kundu LR, Nozaki N, Senda T, Enomoto T, Horikoshi M, Seki M. Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. *Genes Cells.*, 16, 1050-62. 2011.

Sugiyama T, Chino M, Tsurimoto T, Nozaki N, Ishimi Y. Interaction of heliquinomycin with

single-stranded DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. *J Biochem.*, 151, 129-37, 2011.

Kokabu Y, Murayama Y, Kuwabara N, Oroguchi T, Hashimoto H, Tsutsui Y, Nozaki N, Akashi S, Unzai S, Shimizu T, Iwasaki H, Sato M, Ikeguchi M. Fission yeast Swi5-Sfr1 protein complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated dogleg-shaped structure. *J Biol Chem.*, 286, 43569-76. 2011.

Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, Kimura H, Ragoussis J, Teichmann SA, Pombo A. Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell.*, 10, 157-70, 2012.

〔学会発表〕(計3件)

木村 宏、林 陽子、山縣 一夫、若山 照彦、海沼 嵩、胡桃坂 仁志、野崎 直仁 FabLEMを用いたヒストン H3 のメチル化とアセチル化の生細胞ダイナミクス. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011.5. 熊本

Bando M, Saito K, Minamino M, Itoh T, Hirota T, Nozaki N, Deardorff M, Krantz I, Shirahige K. HDAC8, and SMC3 deacetylase, is required for the recycling of cohesion complex. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12. 横浜

Sugiyama T, Chino M, Tsurimoto T, Nozaki N, Ishimi Y. Interaction of heliquinomycin with single-strand DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12. 横浜

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京工業大学バイオフィロンティアセンター・特任准教授 野崎直仁

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

機能ゲノミクス・教授 鈴木健之

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月27日提出

対象研究テーマ：ヒト消化器・呼吸器がんの分子病態の解明と臨床応用

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの細胞レベルでの解明

研究代表者：東京工業大学フロンティア研究機構 特任准教授 小倉俊一郎

研究成果の概要：

がん患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与すると、腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積されることが知られており、この現象を利用したがんの蛍光診断・がんの光線力学治療が臨床で用いられている。しかしながら、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究は ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。その結果、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムには ALA 取り込みに関わるトランスポーターである PEPT1 ならびにポルフィリン汲み出しにかかわるトランスポーターである ABCG2 が深く関与していることを細胞レベルで示唆することができた。

本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個性診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。

研究分野：分子生物学、腫瘍診断学

キーワード：アミノレブリン酸・ポルフィリン・光線力学治療・光線力学診断

1. 研究開始当初の背景

ALA を投与すると生合成経路を経てポルフィリンが生成する。この反応は腫瘍において亢進しており、ALA 投与によって腫瘍特異的なポルフィリンの蓄積が観察されている。さらに、悪性グリオーマなど悪性度の高いがんは多くのポルフィリンが蓄積する興味深い所見が得られている。しかしながら、がん細胞への特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個別診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。

3. 研究の方法

種々の細胞株に対して、ポルフィリン蓄積

に関与していると予想される分子のたんぱく質の発現量ならびにその mRNA の発現量の解析を行う。候補としてはポルフィリン生合成に関与する6種類の酵素とALA取り込みに関わるPEPT1およびPEPT2、ポルフィリン輸送に関わるABCG6およびABCG2などの分子があげられる。これらの分子のたんぱく質の発現量はWestern blot解析により、mRNAの発現量は定量的PCRで評価する。さらにこれらの分子の変異の有無について詳細に検討する。また、ALA投与によってこれらのmRNA・たんぱく質の発現量が変化することが考えられるため、ALA投与群と非投与群の比較も行う。これらのデータをポルフィリンの蓄積量と併せて考察する。

4. 研究成果

ポルフィリン生合成に関連する12遺伝子のmRNA配列に特異的なRT-PCR用プライマーを設計した。5種類のヒト胃がん由来細胞株を用いて、RT-PCR法で各遺伝子の発現解析を行った。その結果、ALA投与後にポルフィリンを多く蓄積する細胞と蓄積しない細胞を比較した結果、ポルフィリン生合成酵素発現量はほぼ同一であることが分かった。しかし

ながら、ペプチドトランスポーターPEPT1 およびATP-binding cassette (ABC)トランスポーターABCG2の顕著な発現変化が認められ、ポルフィリン蓄積にはトランスポーターの発現が大きく関わることが強く示唆された。これらのトランスポーターはALAの取り込み並びにポルフィリン排出に関わっていると推測される。現在、これらの過剰発現株・発現抑制株を樹立し、その機能の解析を行っている。

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)

1. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Okura I, Ogura S: Tumor Suppressor Protein p53-dependent Cell Death Induced by 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Cancer cells in Vitro. ALA-Porphyrin Science, December 08, 2011, accepted.
2. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Takahashi K, Ishizuka M, Abe F, Tanaka T, Okura I, Nakajima M, Ishikawa T, Ogura S: Pivotal Roles of Peptide Transporter PEPT1 and ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 in 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photocytotoxicity of Gastric Cancer Cells in Vitro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, in press, available online 4 January 2012 (December 06, 2011, accepted)

[学会発表] (計4件)

1. Yuichiro Hagiya, Yoshio Endo, Yutaka Yonemura, Kiwamu Takahashi, Masahiro Ishizuka, Fuminori Abe, Motowo Nakajima, Toshihisa Ishikawa, Shun-ichiro Ogura: Pivotal Role of PEPT1 and ABCG2 on 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Gastric Cancer Cells *in Vitro*. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月 (名古屋、大阪国際会議場)
2. 遠藤 良夫, 小倉 俊一郎, 萩谷 祐一郎, 米村 豊, 石塚 昌宏, 井上 克司, 高橋 究, 中島 元夫: 5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法感受性と膜輸送系の関連性 日本薬学会第131年会 2011年3月 (静岡、ツインメッセ静岡)

3. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima: Role of membrane transporters in determining ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム 2011年5月 (金沢、石川県立音楽堂)
4. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Masashi Kimura: Significance of membrane transporters in determining the ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月 (名古屋、大阪国際会議場)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京工業大学フロンティア研究機構・特任准教授 小倉俊一郎

(2) 研究分担者

東京工業大学フロンティア研究機構・特任准教授 田島健治

東京工業大学生命理工学部・4年

松本健太郎

東京工業大学生命理工学部・4年

伊藤謙介

(3) 本研究所担当者

中央実験施設・准教授 遠藤良夫

平成24年4月24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：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：ヒトがん細胞を用いた抗転移性制癌剤の開発

研究代表者：徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 准教授 宇都義浩

研究成果の概要：

本研究では、我々の有するケミカルライブラリーについて種々のヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制作用および MMP 阻害活性を有する分子を探索した。その結果、低酸素サイトトキシン類の TX-2137 および TX-2282 が高い細胞増殖抑制作用と MMP-9 産生抑制作用を有することを見出した。両化合物は VEGF 誘導性の血管新生阻害と深く関係する Akt に対する強力な阻害剤でもあるので MMP 阻害とは別の経路での血管新生阻害活性が期待され、抗転移性制癌剤のリード化合物として創出した。

研究分野：創薬化学

キーワード： hypoxic cytotoxin、MMP inhibition

1. 研究開始当初の背景

がんはがん細胞だけでなく、血管や結合組織、免疫担当細胞といったがん周囲組織との相互作用の上で成り立っている。このがん環境をがんの発育に適しないように変えることががん治療上有効と考えられ、治療戦略としてがんの縮小ではなく再燃抑制期間の延長という観点から考えられた新しいがん治療法である「がん休眠療法 (tumor dormancy therapy)」が提唱され研究が進められている。我々はこれまで種々の血管新生阻害剤の開発研究を精力的に進めており、がん休眠療法においてがん転移を抑制できる血管新生阻害剤は最適な制癌剤であるとの考えに至っている。がんの転移は微小転移の段階からランダムな現象ではなく、系統的に連携された連続した段階を伴う現象であり、「がん転移の成立」を左右する最も初期の重要な段階が血管新生である。血管新生阻害性の制癌剤は、がんの転移を抑制しつつ抗腫瘍作用による制癌活性をもつ多機能性薬剤として大変有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、種々のヒトがん細胞を用いた *in vitro* スクリーニング系を用いて、抗転移活性を有する TX-1877 をリードとして分子設計・合成した新規放射線増感剤、ホウ素含有クルクミン誘導体、低酸素サイトトキシンについて抗がん活性を評価し、選出された候補薬剤について MMP に対する阻害活性を

評価し、最終的に *in vivo* 試験に進めるリード化合物を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、B16F10 メラノーマ細胞、ヒト線維肉腫細胞 HT-1080、ヒト胃癌細胞株 MKN-45・NKPS・NUGC-4・KKLS を用いて、WST-8 アッセイ法により 24 時間および 72 時間持続接触における細胞増殖抑制効果を評価し、抑制効果が確認された化合物についてザイモグラフィ法により MMP 阻害活性を評価した。供試した化合物 (TX-2123, 2137, 2140, 2141, 2244, 2258, 2272, 2281, 2282, UTX-42, 44, 47, 50, 51, 73, 74) は、我々が以前に開発した合成法に従って有機合成し、純度 95% 以上のものを用いた。

4. 研究成果

抗転移活性を有する TX-1877 とグルコースをハイブリッドした TX-2141 および TX-2244 は、100 micro-M までの濃度範囲で細胞増殖抑制効果を示さなかった。また、ホウ素含有クルクミン誘導体 (UTX シリーズ) は、UTX-44, 50, 51 が複数のヒト癌細胞に対して数 micro-M オーダーの IC₅₀ 値を示し、特に、UTX-51 は 1.6 micro-M とクルクミンよりも強い抑制効果を示したが、MMP 阻害活性については観察されなかった。一方、低酸素サイトトキシン類については、TX-2137, TX-2258, TX-2282 が複数のヒト癌細胞に対して数 micro-M オーダーの IC₅₀ 値を示し、TX-2137 お

よびTX-2282 についてはMMP-9 産生の抑制効果が認められた。MMP-9 産生には転写因子AP-1, NFkBが関わるのでそちらの抑制効果の可能性もある。また、TX-2137 およびTX-2282 はVEGF誘導性の血管新生阻害と深く関係するAktに対する強力な阻害剤であることが以前の研究より明らかであるので、MMP阻害とは別の経路での血管新生阻害活性が期待され、抗転移性制癌剤のリード化合物として創出された。

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)

1. Miyake K, Nishioka M, Imura S, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, Shimada M, The novel hypoxic cytotoxin, TX-2098 has antitumor effect in pancreatic cancer; possible mechanism through inhibiting VEGF and hypoxia inducible factor-1 α targeted gene expression, *Exp. Cell Res.*, in press, 2012.
2. Abe C, Uto Y, Nakae T, Shinmoto Y, Sano K, Nakata H, Teraoka M, Endo Y, Maezawa H, Masunaga S, Nakata E, Hori H, Evaluation of the in vivo radiosensitizing activity of etanidazole using tumor-bearing chick embryo, *J. Radiat. Res.* **52**, 208-14, 2011.

[学会発表] (計4件)

1. 腫瘍移植鶏卵における低酸素腫瘍の同定とetanidazoleの*in vivo*放射線増感活性の評価、田中大地、宇都義浩、安部千秋、遠藤良夫、前澤 博、原田 浩、増永慎一郎、堀 均、日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月、札幌)
2. 発育鶏卵を用いた低酸素細胞放射線増感剤およびラジカル含有ナノ粒子の*in vivo*評価法の開発、宇都義浩、バイオインダストリー協会 大学発・選り抜きセミナー 徳島大学研究者との集い・第3回東京編 (2011 年 12 月、東京)
3. Development of an *in vivo* screening system for radiosensitizers and antioxidants using a chick embryo model, Uto Y, 4th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology (2011 年 10 月、北九州)
4. Evaluation of the *In vivo* Radiosensitizing Activity of Etanidazole Using Tumor-bearing Chick Embryo, 安部千秋、宇都義浩、遠藤良夫、前澤 博、増永慎一郎、堀 均、第 70 回

日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)

[図書] (計1件)

1. 発育鶏卵を利用した創薬研究と将来展望、安部千秋、宇都義浩、遠藤良夫、堀均、*放射線生物研究*、46、221-233、2011.

[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

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授 宇都義浩

(2) 研究分担者

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・教授 堀 均

徳島大学先端技術科学教育部 博士後期課程・3年 安部千秋

徳島大学先端技術科学教育部 博士後期課程・1年 田中 涼

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博

中央実験施設・准教授 遠藤良夫