

平成24年度

金沢大学がん進展制御研究所  
共同研究成果報告書

2013.4

金沢大学がん進展制御研究所



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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がん幹細胞の表面抗原分子を標的とした抗体治療法の開発

研究代表者：東京大学分子細胞生物学研究所 教授 宮島 篤

研究成果の概要：

肝臓に存在する幹／前駆細胞としては、胎児肝の肝芽細胞と成体障害肝のオーバル細胞が知られるが、我々はこれらの細胞で高発現する膜タンパク分子を20分子以上同定してきた。本課題ではこれらの分子が抗体治療の標的分子となりうるかについて検討するため、マウス正常肝の構成細胞や肝がん細胞、ヒトがん細胞株での遺伝子発現解析やフローサイトメトリー解析、免疫染色等を行ない、最終的に4つの有望な分子に絞り込んだ。

研究分野：免疫学

キーワード：幹細胞、抗体

#### 1. 研究開始当初の背景

肝幹細胞とは肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有し、自己複製することのできる細胞と定義される。胎児期の肝臓においては肝芽細胞と呼ばれる細胞集団が肝幹／前駆細胞であるとされる一方で、成体においてもげっ歯類の肝障害モデルを用いた実験系で、重篤な肝障害を受けた際に出現するオーバル細胞は成体肝の幹／前駆細胞であると考えられていた。特にヒト肝がん組織においてもオーバル細胞様の細胞が認められることから、オーバル細胞と発癌との関連性やがん幹細胞としての可能性も指摘されている。我々は肝芽細胞やオーバル細胞に特異的に発現し、正常な成体肝臓には発現しない膜タンパク分子を複数同定し、その抗体を用いて肝臓の幹／前駆細胞の分離や幹細胞としての性状解析を行ってきた。肝芽細胞やオーバル細胞のような未分化な幹／前駆細胞に高発現する分子はがん幹細胞にも発現している可能性は高いと考えられたことから、本研究でその検証を行なった。

#### 2. 研究の目的

本研究では、マイクロアレイ解析から見出された肝芽細胞や肝幹／前駆細胞に高発現する分子について、膜タンパク質をコードする遺伝子に焦点を絞り、がん幹細胞に対する抗体治療の標的となりうるかについて検討を行なう。

#### 3. 研究の方法

本研究では候補分子について、以下の解析を行なった。(1)マウスの正常肝構成細胞における候補遺伝子のリアルタイムRT-PCRによる発現解析(2)マウスがん組織での免疫染色、(3)ヒトがん細胞株(肝がんや膵がん細胞株等)でのリアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析、(4)ヒト肝がん細胞株でのフローサイトメトリー解析。以上の解析から候補分子の絞り込みを行なった。

#### 4. 研究成果

(1)当初、肝芽細胞や肝幹／前駆細胞で高発現する候補分子は20遺伝子近くあったが、発現解析の結果、正常肝臓の肝細胞や非実質細胞での発現が高いものは特異性が低いと判断し、半分に絞り込んだ。さらに、(3)ヒトがん細胞株(膵臓がん8株、肝臓がん9株、大腸がん4株、肺がん1株、乳がん2株)の計24株について候補遺伝子の発現解析を行なった結果、肝細胞株で発現の多い分子を4分子(LPCM#1～4と命名)に絞り込んだ。(2)LPCM#1～4についてマウスの肝がん組織を用いて免疫組織化学的染色を行なった結果、LPCM#3,4ががん部で強く染色された。(4)ヒト肝がん細胞株(HuH7, HepG2)を用いてLPCM#1～4に対する抗体でフローサイトメトリー解析を行なった結果、いずれの分子もシフトが見られた。特にLPCM#1はHuH7株において強陽性と弱陽性集団に分かれた。今後はこれらの分子のがん細胞における

機能を調べるとともに、発現強度に違いが見られた細胞集団についても性状の違いなどについて検討を行なう。

#### 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)

Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.

Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.

Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A.  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 5-Containing laminins regulate the development of bile ducts via  $\beta$ 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586–28597, 2012.

Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.

Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and*

*Development* 27, 169-181, 2013.

[学会発表] (計7件)

Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima  
Critical role of FGF7 for development of adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers

FASEB Summer Research Conference “Liver Biology: Fundamental mechanisms and translational applications. Snowmass Village Colorado, July 29-August 3, 2013.

Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima  
"Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers"  
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting  
Thursday, June 14th, 2012

伊藤 暢、高瀬 比菜子、宮島 篤  
「Critical role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response and regeneration in diseased mouse livers」  
第85回 日本生化学会大会  
平成24年12月16日 福岡市

谷貝 知樹、田中 稔、宮島 篤  
肝再生および肝線維化におけるSemaphorin 3Eの機能. 第85回生化学会大会, 福岡  
2012年12月16日

西條 栄子、内木 隆、宮島 篤  
肝臓の発生および代謝機能獲得におけるTribbles遺伝子の役割学会  
第35回日本分子生物学会年会福岡国際会議場・マリンメッセ福岡  
2012年12月12日

Miyajima A. “Cellular basis for liver regeneration”

Liver Metabolism, Diseases and Cancer,  
Cold Spring Harbor Asia, Suzhou

May 21-25, 2012

Miyajima A. “Role for stem/progenitor cells in liver regeneration”

First EHBH International Forum on  
Liver Biomarkers

Shanghai, May 26-26, 2012

〔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

東京大学分子細胞生物学研究所・教授  
宮島 篤

##### (2) 研究分担者

##### (3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：マウス胃がんモデルにおける幹細胞マーカーDclk1の役割

研究代表者：京都大学医学部附属病院 講師 妹尾 浩

#### 研究成果の概要：

マウス胃がんモデルおよびその他の消化器がんモデルにおいて、腫瘍幹細胞特異的のマーカ候補である Dclk1 の意義を検証した。K19-C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスの過形成胃粘膜には Dclk1 陽性細胞が著明に増加していたが、子孫細胞を供給しなかった。これにより、胃では非がん部の Dclk1 陽性細胞は幹細胞性を示さないこと、プロスタグランジン E2 が Dclk1 の発現を誘導することが明らかになった。K19-Wnt1/C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスの解析は生後 50 週以降で行うため、2013 年春に解析を予定する。さらにマウス消化管粘膜から Dclk1 陽性細胞をソーティングし、cDNA アレイを行った。その結果、Dclk1 陽性細胞にはプロスタグランジン合成酵素の他、ロイコトリエン合成酵素も高発現していることが明らかとなった。また、Dclk1 C 末端蛋白に対するモノクローナル抗体樹立のためにマウス免疫を進め、Gan マウスにおける Dclk1 陽性細胞に対する細胞標的治療の可能性を探るべく準備を進めている。

#### 研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：胃がん、がん幹細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞を標的とするがん治療実現のためには、がん幹細胞と正常組織幹細胞を区別する、がん幹細胞特異的のマーカの同定が必要である。しかし、これまでに報告されたがん幹細胞マーカの多くは、正常組織幹細胞にも発現する点が問題であった。研究代表者らは、マウス腸がんモデルにおいて Dclk1 が、正常腸組織では分化した細胞を、腸腫瘍では腫瘍幹細胞をマークすることを示した。さらに Dclk1 陽性の腫瘍幹細胞を選択的に障害することによって、マウス腸腫瘍が劇的に退縮することを示した。すなわち、Dclk1 は、マウス腸管において、がん幹細胞と正常組織幹細胞を区別することが出来るユニークな因子であることが示された。そこで、腸以外の他の臓器でも Dclk1 陽性細胞が腫瘍幹細胞の特異的のマーカであるか否かを検討するとともに、Dclk1 を利用したがん幹細胞治療の実現へ向けたストラテジー構築が必要と考えられた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、種々の消化器がん、とくに胃

がんにおいて、Dclk1 が腫瘍幹細胞に特異的なマーカであるか否かを検討し、Dclk1 陽性細胞を標的とする新規抗がん治療の可能性を検証することを目的とした。そのため、代表的なマウス胃がんモデルである Gan マウスを用いた研究が必要と考えられ、腫瘍遺伝学・大島研究室と共同研究を行った。

#### 3. 研究の方法

K19-Wnt1/C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスを作成して、マウス胃がんモデルにおけるリニエージトレーシングを行う。また、Dclk1 陽性細胞をソーティングし、cDNA アレイによって Dclk1 陽性細胞に特異的に高発現する因子を同定する。さらに、Dclk1 陽性細胞に対する細胞標的治療を可能にするための方策として、Dclk1 C 末端蛋白に対するモノクローナル抗体を樹立する。

#### 4. 研究成果

① K19-C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスを作成した。既報のごとく、同マウスの胃粘膜には過形成が生じ、同部では Dclk1 陽性細胞が著明に増加していた。しかし、タ

モキシフェン投与を行ってリニエージトレーシングを行ったところ、胃過形成性粘膜の Dcl1 陽性細胞からは子孫細胞が供給されなかった。このことから、胃においても非がん部の Dcl1 陽性細胞は幹細胞性を示さないことが明らかとなった。さらに、プロスタグランジン E2 が Dcl1 の発現を誘導することが示唆され、Dcl1 陽性細胞の発現誘導に関する初めての知見が得られた。なお、がん部の Dcl1 陽性細胞の意義を検証するためには、K19-Wnt1/C2mE; Dcl1-CreERT2; Rosa26-R マウスを生後 50 週以降で解析する必要がある。そのため、同マウスの解析を 2013 年春に予定して、交配を進めている。

② マウス消化管粘膜から Dcl1 陽性細胞をソーティングし、RNA を抽出して、cDNA アレイを行った。Dcl1 陽性細胞と Dcl1 陰性細胞の間で比較を行った結果、Dcl1 陽性細胞には Cox-1 などプロスタグランジン合成酵素の他、Lox などロイコトリエン合成酵素も高発現していることが明らかになった。現在、これらアラキドン酸カスケードの諸因子が Dcl1 陽性細胞の維持・機能に果たす役割を検討している。

③ Dcl1 に対するモノクローナル抗体樹立のため、作業を進めた。そのために、GST フュージョン蛋白を用いて約 200 アミノ酸からなる Dcl1 C 末端蛋白を合成し、マウス免疫を開始した。モノクローナル抗体作製後は、同抗体を殺細胞化合物で標識し、Gan マウスなどのマウスがんモデルを用いて、Dcl1 陽性細胞に対する細胞標的治療の可能性を探る。

#### 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 8 件)

1. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Chiba T. Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. (in press)
2. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet*. 2013 Jan;45(1):98-103.

3. Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM, Sakai Y. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *Int J Cancer*. 2013 Jan 15;132(2):276-87.

4. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa TO, Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor-suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*. 2012 Aug 30;31(35):3949-60.

5. Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, Chiba T. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2012 Jun 28;31(26):3111-23.

6. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake R, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T. Nardilysin promotes gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF-alpha. *EMBO Mol Med*. 2012 May;4(5):396-411.

7. 中西祐貴、妹尾浩、千葉勉：腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDcl1 の同定：分子消化器病. 10, 93-97, 2013.

8. 上尾太郎、妹尾浩：Notchシグナルは、消化管上皮細胞の分化と癌化にどのように関わっているのか：分子消化器病. 9, 325-329, 2012.

[学会発表] (計 9 件)

1. Nakanishi Y, Seno H, Ueo T, Chiba T. The role of Dcl1-positive cells in the intestinal homeostasis. 2012 James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology. Aug 27-28, 2012, Chicago.

2. Seno H. Dcl1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. GI Research Academy 2012. June 15, 2012, Tokyo.

3. Kanda K, Komekado H, Seno H, Chiba T. Nardilysin maintains gastric cancer cell growth via promoting shedding of TNF- $\alpha$  and intrinsic cytokine signaling. Research Forum, Lecture Presentation. Digestive Disease Week 2012. May, 2012, San Diego.

4. 中西祐貴、妹尾浩、上尾太郎：正常腸管および腸腫瘍における Dcl1/Lgr5 陽性細胞の役割：第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.23 鹿児島

5. 神田啓太郎、妹尾浩、千葉勉、西英一郎：ナルディライジンは TNF- $\alpha$  のシェディングを促進し、マウス腸腫瘍を増大させる：第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19 札幌

6. 中西祐貴、妹尾浩、千葉勉：Cox-2 阻害は IFN- $\gamma$  依存性に腫瘍関連マクロファージの極性を変化させる：第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19 札幌

7. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩：腸腫瘍幹細胞特異的マーカー Dcamk11 の同定：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

8. 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志：Hes1 は大腸上皮細胞の一を規定し、ニッチ由来の Wnt や BMP シグナルによる分化制御に関与する：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

9. 神田啓太郎、妹尾浩、木村勇斗、石津祥子、米門秀行、千葉勉：Nardilysin は TNF- $\alpha$  のシェディングを促進し、腸炎を増悪させる：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

〔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

京都大学医学部附属病院・消化器内科  
講師 妹尾 浩

### (2) 研究分担者

京都大学医学部附属病院・消化器内科  
教授 千葉 勉  
京都大学医学部附属病院・消化器内科  
医員 上尾太郎  
京都大学大学院医学研究科・消化器内科学  
大学院生 中西祐貴  
京都大学大学院医学研究科・消化器内科学  
大学院生 山賀雄一

### (3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸



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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：悪性胸膜中皮腫に対する特異的免疫療法の開発

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 教授 西岡安彦

#### 研究成果の概要：

悪性胸膜中皮腫（malignant pleural mesothelioma: MPM）に高発現するポドプラニン分子に注目し、ラット抗ヒトポドプラニン抗体NZ-1およびそのヒト・キメラ抗体NZ-8のMPMに対する特異的免疫療法の可能性を検討した。MPM細胞株および腫瘍組織におけるポドプラニン抗原は、細胞株では73% (11/15)、腫瘍組織では92% (33/36)に発現を認めた。NZ-1およびNZ-8はポドプラニン発現MPM細胞に対して、高い抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC）を示した。エフェクター細胞の解析では、NK細胞にADCC活性を認めたが、単球はADCC活性を示さなかった。以上からNZ-1およびNZ-8のADCCにはNK細胞が重要であることが明らかとなった。NZ-8はヒト単核球をエフェクター細胞とした場合、NZ-1に比較して有意に高いADCC活性を示した。補体依存性細胞傷害活性（complement-dependent cytotoxicity: CDC）についても、NZ-8はNZ-1に比較して高い活性を示した。ACC-MESO-4細胞のSCIDマウス皮下移植系を用いた検討では、ヒトNK細胞とNZ-8を投与した群に有意に腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、NZ-8は他の抗ポドプラニン抗体D2-40とは認識エピトープが異なっており、正常細胞よりMPMに発現するポドプラニン分子を認識しやすい特徴を有していた。以上から、ヒト・キメラ抗ポドプラニン抗体NZ-8を用いた臨床応用の可能性が示唆された。

#### 研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、ポドプラニン、抗体、ADCC

##### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫（malignant pleural mesothelioma: MPM）は化学療法や放射線療法に抵抗性で、診断後の平均生存期間が1年と予後不良の疾患であることから新規治療法の開発が望まれている。我々はMPMに対する特異的免疫療法の開発の視点から、抗体療法に注目し検討を進めてきた。これまでにMPMに高発現する細胞膜蛋白であるポドプラニンに対する抗体を作製し、その抗体がADCC活性を有することから臨床応用を視野に検討を進めている。一方、連携研究者の矢野聖二教授らは前臨床研究に有用なMPMの同所移植モデルを開発し、MPMに対する治療研究を進めている。

##### 2. 研究の目的

本研究では、臨床応用の視点からヒト・キメラ抗体およびヒト化抗体を用いてMPM治療のための前臨床研究を行うことを目的とする。特に、抗ポドプラニン抗体NZ-1のヒト・キメラ抗体を作製し、MPMに対する抗腫瘍

活性を検討することを目的とした。

##### 3. 研究の方法

ヒトIgG1のFc部分を融合させたラット・ヒトキメラ抗体NZ-8を共同研究（山形大学、加藤幸成博士）にて作製し、ヒト末梢血単核球を用いて<sup>51</sup>Cr遊離試験にてADCC活性を検討した。同時にウサギ補体を用いてCDC活性を検討した。また、SCIDマウスの皮下に移植したMPM細胞株ACC-MESO-4に対して、NZ-8とNK細胞を投与し抗腫瘍効果を検討した。一方、MPMにおけるポドプラニン分子の発現について、細胞株を用いたフローサイトメトリー法と腫瘍組織の免疫染色法にて検討した。正常組織に発現するポドプラニン分子に対する認識を、市販の抗ポドプラニン抗体D2-40と比較検討した。

##### 4. 研究成果

(1) MPM細胞株および腫瘍組織におけるポドプラニン抗原発現は、細胞株では73% (11/15)、腫瘍組織では92% (33/36)に発現を認めた。

(2) NZ-8 はヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として高いADCC活性を示した。このADCC活性は NZ-1 に比較して有意に高かった。また、エフェクター細胞の解析では、NK細胞が重要であることが明らかとなった。

(3) NZ-8 は NZ-1 に比較して有意に高い CDC 活性を示した。

(4) SCID マウスモデルでは、NZ-8 はヒト NK 細胞と同時に投与された場合に、腫瘍増殖抑制効果を示した。その抗腫瘍効果は NZ-1 に比較して有意に高かった。

(5) NZ-8 は、D2-40 と比較して正常組織より MPM に発現するポドプラニン分子を認識しやすい傾向を認めた。

#### 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)

1. Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, Sato S, Sakaguchi S, Dat LT, Nishioka Y, Akiyama SI, Sone S. SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model. **Respirology** 17(6):984-990, 2012.
2. Nishioka Y. Malignant pleural effusion: further translational research is crucial. **Transl Lung Cancer Res** 1(3):167-169, 2012.
3. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Shimizu E Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. **Am J Pathol** 181(3): 1034- 1043, 2012.
4. Kaneko MK, Kunita A, Abe S, Tsujimoto Y, Fukayama M, Goto K, Sawa Y, Nishioka Y, Kato Y. Chimeric anti- podoplanin antibody suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Cancer Sci** 103(11):1913-1919, 2012.
5. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** 18(6):1663-1671, 2012.
6. Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S,

Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. **J Immunol**. 2013 (in press)

7. 西岡安彦. がん分子標的治療における一体化開発の現状と展望. がん分子標的治療 10(4):267-275, 2012.

[学会発表] (計 5 件)

1. Nishioka Y, Abe S, Kaneko MK, Aono Y, Huang J, Goto H, Kishuku M, Hanibuchi M, Sone S, Minakuchi K, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma via ADCC. **American Thoracic Society 2012 International Conference**, San Francisco, U.S.A., 2012.5.23
2. Nishioka Y, Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Mitsuhashi A, Sato S, Minakuchi K, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma. **14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, Brisbane, Australia**, 2012. 9.3
3. Nishioka Y, Abe S, Kishuku M, Kawazoe K, Huang J, Hanibuchi M, Minakuchi K, Sone S, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin rat-human chimeric antibody NZ-8 against malignant mesothelioma. **第71回日本癌学会学術総会、札幌**、2012.9.19
4. 埴淵昌毅、阿部真治、加藤幸成、金子美華、川添和義、黄俊、三橋惇志、水口和生、西岡安彦. 抗ポドプラニン抗体NZ-1の悪性胸膜中皮腫に対する抗体依存性細胞障害活性と抗腫瘍効果. **第53回日本肺癌学会総会、岡山**、2012.11.9
5. 阿部真治、加藤幸成、金子美華、黄俊、埴淵昌毅、曾根三郎、西岡安彦. 悪性胸膜中皮腫に対するヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体療法 of の検討. **第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷**、2012.12.14

[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

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授 西岡安彦

(2) 研究分担者

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授 埴淵昌毅  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師 柿内聡司  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師 後東久嗣

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野聖二

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：慢性骨髄性白血病幹細胞ニッチシグナルの同定と制御機構の解明

研究代表者：慶応義塾大学医学部 専任講師 田久保圭誉

研究成果の概要：

マウス慢性骨髄性白血病(CML)を白血病幹細胞(LSC)のモデル系として検討を行い、CMLのLSC分画で発現しているCML LSC抗原のスクリーニングを行い、候補分子を得た。候補分子に対する抗体を用いてさらにLSC分画を細分化したところ、分画ごとにサイトカインやLSCを維持するニッチ因子の発現が異なっていることを見出した。さらに、連続移植システムによってLSC活性の検討を行ったところCMLは複数のLSC分画を持っていることを見出した。一方、正常の造血幹細胞(HSC)のニッチシグナルについても更なる検討を進め、HSCが他の分化した前駆細胞や終末分化した血球細胞に比べて解糖系優位のエネルギー産生を行っており、分子機構としてはピルビン酸脱水素酵素リン酸化酵素(Pdk)による解糖系からミトコンドリアTCAサイクルへの代謝流束の抑制が重要であることを見出した。さらに、Pdk様化合物によって体外でHSCを静止状態に保つことが可能になった。

研究分野：がん生物学

キーワード：幹細胞ニッチ、白血病幹細胞、造血幹細胞、低酸素応答

### 1. 研究開始当初の背景

HSCは自己複製能と多分化能を保ち、生涯にわたりすべての血球細胞を産生する能力を持つ。その機能を発揮するためには、哺乳類のHSCは骨髄のニッチで維持される。ひとたびこの幹細胞/ニッチの相互作用が破たんすると、幹細胞はその機能を失い、老化したりあるいは腫瘍化の一因になったりすると考えられている。

我々はこれまでに正常のHSCは骨髄の中でも低酸素環境に存在し、VHL/HIF-1 $\alpha$ 制御系によって維持されていることを示してきた(Takubo et al. Cell Stem Cell 2010, Shima et al. Exp Hematol 2010)。本制御系によってHIF-1 $\alpha$ の適切な量が保たれてHSCの細胞周期の静止状態が維持されていることまでを確認してきたものの、その下流で駆動される分子メカニズムは不明であった。さらに、LSCは骨髄でこういったニッチシグナルによって維持されているかも全く未解明であった。CMLはHSCにおいて融合遺伝子BCR-ABLが転座により獲得された結果、BCR-ABLの恒常活性化型チロシンキナーゼ活性によるクローナルな増殖が引き起こされて発症する。これまでにチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)によって病勢の良好なコントロールが得られるが、TKI耐性のクローンが出現

すること、LSCをTKIでは確実には根絶できないことなどから、LSCの特性の解明とそれに基づいた標的療法の開発は不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、LSCに対する標的療法開発を行うためにCML LSCをモデルとしたニッチシグナルを受容する表面抗原の同定を行う。また、LSCのカウンターパートとしての正常HSCの細胞特性の解明を行う。

### 3. 研究の方法

LSCモデルとしてマウス造血幹・前駆細胞LSK細胞にレトロウイルスでBCR-ABLを導入して致死量放射線照射したレシピエントマウスに正常骨髄細胞とともに移植するマウスCMLモデルを用いた。本モデル骨髄LSC分画で特異的に発現している表面抗原を蛍光標識抗体でスクリーニングした。また、同定された抗原の発現に基づいてLSC様分画をさらに細かく分画し、遺伝子発現や生物学的特性を検討する。とりわけ、LSC活性については連続移植モデルを用いて検討を行う。

一方、LSCのカウンターパートとして正常HSCについても生物学的特性、とりわけ

代謝特性についての知見を得るために細胞内の代謝産物の網羅的解析と、その制御分子の同定を行う。また、得られた制御分子のノックアウトマウスを用いて HSC の代謝特性と、幹細胞活性の検討を行う。

#### 4. 研究成果

CML の LSC 分画で発現している CML LSC 抗原のスクリーニングを蛍光標識抗体を使用して行い、候補分子を得た。候補分子に対する抗体を用いてさらに LSC 分画を細分化したところ、分画ごとにサイトカインや LSC を維持するニッチ因子の発現が異なっていることを見出した。連続移植システムによって LSC 活性の検討を行ったところ、これまでの概念では単一の LSC サブセットが存在すると考えられていた CML が、実は複数の LSC 分画を含んでいることを見出した。一方、正常 HSC のニッチングナルについても更なる検討を進め、HSC が他の分化した前駆細胞や終末分化した血球細胞に比べて解糖系優位のエネルギー産生を行っており、解糖系中間産物を多く含んでいることを見出した。その分子機構としては Pdk による解糖系からミトコンドリア TCA サイクルへの代謝流束の抑制が重要であり、その中でも Pdk2 と Pdk4 を共欠損した HSC は代謝特性を失うだけでなく、ストレス耐性を失って老化しやすいことを見出した。さらに、Pdk 様化合物を用いて体外で HSC を培養したところ、長期培養後も試験管内で静止状態に保つことが可能であり、その結果幹細胞活性を保持させることが可能になった。

#### 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 4 件)

Ikushima YM, Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T, Narumiya S, Suda T.

Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells.

*Blood*. 2013 Mar 14;121(11):1995-2007.

Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T.

Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in

hematopoietic stem cells.

*Cell Stem Cell*. 2013 Jan 3;12(1):49-61.

Takaesu G, Inagaki M, Takubo K, Mishina Y, Hess PR, Dean GA, Yoshimura A, Matsumoto K, Suda T, Ninomiya-Tsuji J.

TAK1 (MAP3K7) signaling regulates hematopoietic stem cells through TNF-dependent and -independent mechanisms.

*PLoS One*. 2012;7(11):e51073.

Takubo K, Suda T.

Roles of the hypoxia response system in hematopoietic and leukemic stem cells.

*Int J Hematol*. 2012 May;95(5):478-83.

[学会発表] (計 2 件)

Keiyo Takubo

Regulation of Leukemia Initiating Cells in the Hypoxic CML Niche

第 10 回幹細胞シンポジウム(2012 年 5 月 31 日・淡路)

Keiyo Takubo

Regulation of Leukemia Initiating Cells in the Hypoxic CML Niche

第 71 回日本癌学会学術総会(2012 年 9 月 20 日・札幌)

[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

慶應義塾大学医学部・専任講師

田久保 圭誉

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦



対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：FRET バイオセンサーマウスと Gan マウスを用いた胃癌発生の可視化

研究代表者：金沢医科大学 病理学 I 教授 清川悦子

#### 研究成果の概要：

マウス胃組織から類器官培養する手法を習得し、一細胞から形成される類器官形成の過程をライブでイメージングする方法を確立した。また、大島教授の共同研究者であるシンガポール医学生物学研究所・幹細胞研究グループ Marc Leushacke 博士 から、異なる類器官培養方法の教授を受け、形状の異なる類器官が形成されることも確認した。

現施設の現時点では、励起光・Z 軸方向での解像度を満たす顕微鏡が限られており、これまで使用してきた CFP-YFP ペアの FRET バイオセンサーを持つ細胞の経時観察は困難であることから、代わりに、理化学研究所から、汎用の赤・緑蛍光蛋白質で、生きたマウスにおける細胞周期を検出できる Fucci マウスを搬入・繁殖させ、胃類器官における細胞周期の観察をする準備を整えることが出来た。

研究分野：がん生物学

キーワード：類器官、ライブイメージング

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達に関与する蛋白質や脂質の相互作用は、プラスチックやガラス基板に培養した細胞を用いて多くの知見を得てきた。しかし、近年このような基板は生体環境より 10 の 9 乗程度硬い環境であり、また癌は環境が硬いほどに悪性化するという警告がなされ、生体内の環境下における細胞伝達の解明の重要性が提唱されている。一方で、遺伝子改変技術の発展に伴い様々な疾患モデルマウスの開発が進んでいるが、そのフェノタイプの解析は従来通りのホルマリン固定>HE 染色あるいは免疫染色による標本観察によって行われているため、個々の細胞の動態解析が不可能であり時間軸の情報の正確さに欠けている。細胞内信号伝達に関与する酵素群の活性を検出する FRET バイオセンサーが 10 年ほど前に開発され (Mochizuki et al., *Nature*, 2001)、生きた細胞における分子活性の時空間情報が得られるようになった。更に、リン酸化酵素 ERK や PKA の FRET バイオセンサーを発現するマウス (FRET-TG) が樹立され (Kamioka et al., *Cell Struct. & Funct.*, 2012)、個体における細胞内情報伝達を視るツールが整った。

汎用の共焦点顕微鏡を用いて観察できる生体に近いモデルとして、類器官培養法がある。この方法は、培養細胞をラミニンなどの

ゲル内に埋め込むことで生体内の組織に類似構造を試験内で取らせる方法で、特に上皮構造維持機構の解明に貢献している。申請者は FRET バイオセンサーを発現する MDCK 細胞の類器官培養を共焦点顕微鏡で観察する手法を用いて、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化パターンの時空間的相違があること、それを乱すと形態異常が誘導されることを見出してきた (Yagi et al., *EMBO Rep*, 2012)。

#### 2. 研究の目的

MDCK 細胞で確立した類器官形成時の信号伝達の可視化技術を、マウス胃組織から類器官培養に適用し、胃腺管の形態維持機構・その破綻による癌化を可視化する。

#### 3. 研究の方法

野生型マウスの胃組織から類器官培養を行い、まずは生きた細胞の核を染色する蛍光試薬・DyeCycle を加え、共焦点顕微鏡で観察した。

また炭酸ガス供給 37°C 恒温器内で観察可能な倒立顕微鏡で、1 細胞から分裂をして類器官になる過程を観察した。

#### 4. 研究成果

マウス胃組織から類器官培養する手法を、大島教授より習得した。まずは、成熟した類

器官の核を DyeCycle で標識し共焦点顕微鏡で生きたまま観察したところ、1層の上皮細胞の外側には、基底膜を這うような細胞が観察された。これは1種類の培養細胞 MDCK 細胞では観察されなかったことであり、組織から単離した細胞の分化の多様性を示唆するものである。

現行の共焦点顕微鏡には、保温箱や炭酸ガス供給装置が設置されておらず、数時間による経時観察が現時点では困難であるため、CO<sub>2</sub>インキュベータ内に設置された倒立顕微鏡を用いて1細胞から細胞分裂し、多細胞からなる類器官の形成過程を3日間観察することに成功した。この時、観察途中での増殖因子の再添加がないと細胞が死滅してしまうことがわかった。また類器官形成の初期では、類器官そのものが非常に速い速度で運動・回転していることを発見した。更に、異なるサイトカインを加えることで形状の異なる類器官が形成されることも確認した。

現施設の現時点では、励起光・Z軸方向での解像度を満たす顕微鏡が限られており、これまで使用してきた CFP-YFP ペアの FRET バイオセンサーを持つ細胞の経時観察は困難であることから、代わりに、理化学研究所から、汎用の赤・緑蛍光蛋白質で、生きたマウスにおける細胞周期を検出できる Fucci マウスを搬入・繁殖させ、胃類器官における細胞周期の観察をする準備を整えることが出来た。これまでは類器官の蛍光観察は共焦点顕微鏡でのみしか行っていなかったが、通常の倒立型蛍光顕微鏡であっても、解像度は落ちるものの観察可能であることを MDCK 細胞の類器官を用いて確認した。

## 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 0 件)

〔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

金沢医科大学病理学 I・教授 清川悦子

### (2) 研究分担者

金沢医科大学病理学 I・助教 吉崎尚良

### (3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013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、がんの悪性化をどのように p53 が抑制する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の作製に成功し、得られた胃がん組織と胃がん細胞の性質について詳細な解析を進めている。

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と考え、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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 平成 24 年度 個体レベルでのがん研究支援活動 ワークショップ、ポスター発表、2013. 2

「がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析」

[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

難治がん研究分野・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

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：胃がん発症モデルマウスを用いた絶対定量プロテオーム解析による  
がん微小環境変化と発がん機構の解析

研究代表者：愛媛大学プロテオーム医学研究センター 教授 東山繁樹

研究成果の概要：

大島正伸教授が保有する胃がん発症モデルマウス K19-Wnt1/C2mE マウスおよびそのコントロールマウス K19-C2mE マウスと野生型マウスの3系統マウスから、時間軸に沿って尿を採取し、プロテオーム解析を行った。その結果、約900種のタンパク質を検出し、K19-C2mE マウスに特異的な約120種のタンパク質、さらに、K19-Wnt1/C2mE マウスに特異的な約30種のタンパク質を検出した。これら合わせて約150種のタンパク質の安定同位体標識リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し、各タンパク質のプロテオタイプピックペプチドを質量分析により決定した。この情報を基に、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)システムの構築を進めた。

研究分野：がんマーカー分子探索

キーワード：胃がん、マーカータンパク質、尿プロテオミクス、MRM、タンパク質絶対定量

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの発がんの分子機構解析には、既にかん化した組織(細胞)由来のゲノム解析による遺伝子異常の解析・同定が主流であり、これにより、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が発見・報告されてきた。しかし、顕著な遺伝子異常の見出されないがんも多く、発がんに至る過程での遺伝子変異によらない細胞の増殖・悪性化・転移等に関わる細胞内シグナル伝達因子をつぶさに解析することが極めて重要と考えられる。また、がん化細胞の増殖・悪性化には、これを支持するがん細胞周辺の微小環境の変化が極めて重要であることが、最近指摘されている。このような観点から、細胞のがん化に向けた変化とともに微小環境の変化をも解析するためには、①がん発症前段階から、がん化に至る過程を時間軸に沿って解析すること、②遺伝子解析では検出できない、細胞増殖や運動の変化や、がん細胞周辺の微小環境変化をモニタリングすること、の2点が必須である。そこで、①は、ヒトでは不可能であり、モデル動物の確立とその利用が不可欠である。金沢大学がん進展制御研究所の大島正伸教授が確立された胃がん発症モデルマウスは、100%胃がん発症のモデル動物として極めて有用であり、このモデルマウスを用いることで可能となる。また、②は、申請者のグループが、

独自に開発してきたタンパク質絶対定量プロテオミクス解析技術を基盤として、これまでに絶対定量が極めて困難とされている複数膜貫通型タンパク質をも含めたほぼ全てのタンパク質をアトモルからフェムトモルレベルで高感度・絶対定量することにより、生体分子の量的変動と様々な修飾による質的変動をモニタリングすることで可能となる。

### 2. 研究の目的

胃がん発症モデルマウスとタンパク質絶対定量プロテオミクス解析技術を融合させることで、これまでに報告の無い、胃がん発症前段階でのマウス生体のプロテオーム動態を的確に把握することを試みる。これにより、がん細胞増殖に向けたがん微小環境の変化をモニタリングすることを可能とし、新たな治療標的分子の解明に繋げる。また、これらの成果を、胃がん発症の分子機構解明、早期診断に向けてのバイオマーカー探索、ならびに、新規な早期診断法の開発にまで繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

K19 遺伝子プロモーターを用いて胃粘膜上皮で Wnt シグナルを亢進させた K19-Wnt1 マウス(胃粘膜には微小前癌病変が発生)、PGE2 経路を誘導させた K19-C2mE マウス(胃炎の

発生と、同時に粘液細胞からなる過形成病変が発生)、および、これらのマウスを交配して作製した K19-Wnt1/C2mE マウス (100%の効率が胃がん発生) の 3 系統マウスと正常コントロールマウスから、時間軸 (腫瘍形成がまだ確認できない 10 週齢から炎症を伴う腫瘍形成が認められる 55 週齢まで各週) に沿って尿を採取する。

2: 採取した各マウス尿のショットガンプロテオミクスを行い、尿中のタンパク質を同定する。

この解析結果より、K19-Wnt1 マウス、K19-C2mE マウス、K19-Wnt1/C2mE マウスにそれぞれ特異的な尿中タンパク質を同定する。

3: 実験項目 2 で同定する各マウス特異的タンパク質の血清中濃度を絶対定量するために、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) を構築する。

4: 実験項目 3 で構築する MRM システムと我々の持つタンパク質絶対定量用安定同位体標識内部標準タンパク質ライブラリー SIRPL を組み合わせ、各マウス特異的タンパク質の絶対定量を行う。

#### 4. 研究成果

##### 尿プロテオーム解析

胃がん発症モデルマウス K19-Wnt1/C2mE マウスおよびそのコントロールマウス K19-C2mE マウスと野生型マウスの 3 系統マウスから、時間軸に沿って尿を採取し、プロテオーム解析を行った。その結果、約 900 種のタンパク質を検出し、K19-C2mE マウスに特異的な約 120 種のタンパク質、さらに、K19-Wnt1/C2mE マウスに特異的な約 30 種のタンパク質を検出した。これら合わせて約 150 種のタンパク質の安定同位体標識リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し、SIRPL に組み込んだ。さらに、各タンパク質のプロテオタイプックペプチドを質量分析により決定した。また、安定同位体標識効率は 99.7% と算出し、タンパク質絶対定量に品質の高い内部標準タンパク質として利用可能であることが示された。さらに、リコンビナントタンパク質を用いて、各タンパク質の特徴的なイオン化ペプチド (プロテオタイプックペプチド) を質量分析により決定した。

##### MRM システムの構築

リコンビナントタンパク質の質量分析に

より得られたプロテオタイプックペプチド情報を基に、このペプチドをタンデムに繋ぎ合わせた完全人工内部標準タンパク質 QconCAT をデザインし、これを再度、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成すると同時に、安定同位体標識した。作成した QconCAT 内部標準タンパク質が、内部標準として機能するかどうかを質量分析により検証し、確認した。各タンパク質より 3 種のプロテオタイプックペプチドを検出用チャンネルとして用い、合計  $150 \times 3 = 450$  個の検出用チャンネルを作成した。この方法により、一度の解析で、150 種のタンパク質を絶対定量可能なシステムを構築できた。今後この測定システムを用いてマウス尿サンプル解析をさらに進め、有用なバイオマーカーを同定して行く。

#### 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 8 件)

Miwa D, Inoue H, Takemori N, Kurokawa M, Sakaue T, Fukuda S, Omi K, Goishi K, Higashiyama S. (2013) Protein kinase D2 and heat shock protein 90 beta are required for BCL6-associated zinc finger protein mRNA stabilization induced by vascular endothelial growth factor-A. *Angiogenesis in press*

Nakayama D, Fukuda S, Matsushita N, Nishida-Fukuda H, Inoue H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. (2013) HuR-mediated mRNA stabilization is required for UVB-induced autoinduction of amphiregulin in keratinocytes. *J. Biol. Chem. in press*

Nanba D, Toki F, Matsushita N, Matsushita S, Higashiyama S, Barrandon Y. Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol. Med.* 2013 in press

Diaz B, Yuen A, Higashiyama S, Courtneidge SA. (2013) Notch increases the shedding HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J. Cell Biol.* In press

Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. (2012) Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated

ectodomain shedding of proamphiregulin. Mol Biol Cell. 23, 1964-1975.

Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. (2012) A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by  $\alpha 5\beta 1$  integrin in kidney mesangial cells. PLoS One. 7, e33350.

Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S. (2012) BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signaling in angiogenesis. Blood. 119, 2688-2698.

Yoshida M, Shimura T, Fukuda S, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Nakazawa T, Higashiyama S, Joh T. (2012) Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer. Cancer Sci. 103, 708-715.

〔学会発表〕 (計 1 件)

Takemori N, Takemori A, Higashiyama S. Absolute Quantitative Analysis of Urinary Proteome Alterations Using Wheat Germ Cell Free Protein Synthesis and MRM Mass Spectrometry. HUPO 11<sup>th</sup> Annual World Congress, September 9-13, 2012, Boston, MA

〔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

愛媛大学プロテオ医学研究センター・  
教授 東山繁樹

### (2) 研究分担者

愛媛大学プロテオ医学研究センター・  
講師 武森信暁

### (3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がん幹細胞と非がん幹細胞間の細胞競合

研究代表者：北海道大学遺伝子病制御研究所 教授 藤田恭之

#### 研究成果の概要：

がん幹細胞・非がん幹細胞の関係を細胞競合の観点から考察するため、遺伝学的背景のできるだけ似通ったがん幹細胞・非がん幹細胞モデルの樹立を試みた。本年度は特に、Rb 遺伝子のステータスの異なるがん細胞株群を樹立し、未分化性、浸潤・転移能、代謝等の面から、がん幹細胞を特徴付けると予想された表現型に差違が観察されるかを検討した。細胞競合の測定のためには、一定期間がん幹細胞様の表現型が維持される必要がある。本年度は、2週間程度がん幹細胞様の表現型を安定的に示す細胞集団を濃縮・維持することに成功し、細胞競合測定の準備が整った。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞、細胞競合

#### 1. 研究開始当初の背景

1980年頃に最初の癌遺伝子 *Src* が発見されて以来、数多くの癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子が同定されてきた。そして、それらの変異がどのように細胞のシグナル伝達や性状に影響を与えるかについて多くのことが明らかにされてきた。しかし、ヒトの正常細胞層に癌が生じた際に、癌細胞と直接それを取り囲む正常細胞の間で何が起こるかについては明らかでなく、癌研究のブラックボックスとなっている。ショウジョウバエにおいては、正常上皮細胞と変異細胞が共存した時に、両者の境界でさまざまな現象が起こることが複数報告されている。特に、正常細胞と変異細胞が生存を争う細胞競合と呼ばれる現象は現在非常にホットなトピックとなっている。しかし、脊椎動物でも同様の現象が起こるかについては明らかでなかった。我々は、テトラサイクリン依存性に癌タンパク質 (Ras、Src など) の発現あるいは癌抑制タンパク質 (Scribble など) の shRNA の発現を誘導できる上皮培養細胞系を確立し、哺乳類でも正常上皮細胞と変異細胞間で様々な現象が起こることを世界で初めて明らかにしてきた (Hogan et al., 2009, Nature Cell Biology; Tamori et al., 2010, PLoS Biology など)。また最近の研究で、変異細胞と正常細胞間の細胞競合関係を制御するシグナル伝達経路が少しずつ明らかになってきた。

#### 2. 研究の目的

がん幹細胞仮説は、腫瘍が一樣な細胞の集まりではなく、クローン (腫瘍原性) 維持を担保し、組織幹細胞様の役割を担うがん幹細胞と、この細胞から恐らくは非対称性分裂を経て産み出され、腫瘍の大半を形成する、分化した非がん幹細胞に分かれると主張する。この仮説は、がんの再発や転移あるいは薬剤耐性を説明する上で大変役立つ。がん幹細胞は、専ら、細胞周期静止を誘導あるいは分化を阻害するニッチを提供する周辺正常細胞との関係において研究されている。しかし、腫瘍の大半を占めるとされる非がん幹細胞とがん幹細胞の間にも生物学的に重要な相互関係が存在する可能性がある。この観点からなされた研究は申請者の知るところ皆無である。我々は、主として細胞競合という視点から、腫瘍内不均一性の意義の解明に挑戦することを目指す。

#### 3. 研究の方法

高橋らは、Rb-p53 欠損マウス由来の細胞から、そのがん幹細胞様の挙動が、p53 アレルの変化に依存して、劇的に変化する細胞系を樹立している。p53 アレル数の異なる2群の細胞を様々な条件で混合し、細胞競合を観察することができる。2群の細胞間で、顕著な細胞競合関係が観察されるならば、我々が従来見出してきた細胞競合

シグナルを測定してみる。この実験系においては、2群の細胞間において観察される様々な相互関係を p53 アレルへの依存性という点において整理することができるので、観察された現象の分子メカニズムに切り込むことが容易である。また、不均一な腫瘍細胞集団におけるがん幹細胞様細胞群のダイナミックな挙動を解析することによって、がん転移の新しい機序の解明に繋がる可能性も秘める。

#### 4. 研究成果

平成 24 年度の高橋らとの共同研究において、いくつかの p53 欠損マウスに独立に発生した soft tissue sarcoma を基盤に、Rb のみの追加的不活性化によって、がん幹細胞らしい様々な表現型を誘導することの出来る系を作製した。がん幹細胞らしい表現型とは、分化マーカーの消失、EGF-bFGF 培地における自己複製能亢進、血清含有培地における BrdU 取り込み低下、浸潤・転移能亢進、解糖・脂肪酸合成経路等の変化、ペントースリン酸経路の抑制等であった。これらの表現型は Rb の再構成によって顕著に抑制される。また、Rb の再構成は、このような細胞の正常培地における増殖にはほとんど影響を与えなかった。また、細胞競合の測定のためには、一定期間がん幹細胞様の表現型が維持される必要がある。本年度は、2 週間程度がん幹細胞様の表現型を安定的に示す細胞集団を濃縮・維持することに成功した。この系を利用し、Rb の活性と幹細胞様の挙動が異なる 2 群の細胞に異なるラベルを施し細胞競合測定する準備に入っている。さらに、高橋らは、乳腺上皮初期培養と mammosphere を利用し、上記と似通った実験系を上皮細胞においても確立しつつある。細胞競合は、正常・変異上皮細胞をもととの観察対象としてきたため、好適である。来年度も共同研究を継続する予定であるので、この系の完成を待って、細胞競合を測定する。

#### 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 0 件)

[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

北海道大学遺伝子病制御研究所・教授  
藤田恭之

##### (2) 研究分担者

北海道大学遺伝子病制御研究所・助教  
梶田美穂子

北海道大学遺伝子病制御研究所・助教  
加藤洋人

北海道大学遺伝子病制御研究所・  
博士研究員 山内 肇

北海道大学遺伝子病制御研究所・  
修士 2 年 大岡敦子

##### (3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：Rb遺伝子欠損マウスでの腺癌発症機構におけるスフィンゴ脂質代謝調節を介した細胞周期制御の解明

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：

Rb遺伝子欠損マウスにおいて効率的に甲状腺癌が発症するモデルを作成でき、マウス腫瘍発生モデルとして、このマウスの系にSMS1欠損マウスを掛け合わせることが可能となった。セラミドの増加は、細胞周期上の重要因子であるP21のCDK2との結合や、CDK2の脱リン酸化を促進することが知られているため、Rb遺伝子欠損マウスの系を用いて、SMS欠損によるセラミド、SM制御がRb欠損によるE2Fの活性化の下流シグナルであるサイクリンA、EやCDK2にどのように影響するかについて検討し、悪性腫瘍の細胞周期調節破綻に基づく細胞増生に対するスフィンゴ脂質代謝調節の意義について研究した。

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

スフィンゴ脂質セラミドが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。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、申請者は、初めてSMSの遺伝子クローニングに成功した(Okazaki T. et al. *J. Biol. Chem.*, 279, 18688-93, 2004)。これまで、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を明らかにする研究を進めて来たが、最近、膜マイクロドメインでのSMの機能制御が細

胞増殖を調整することが明らかにされ、セラミドのみならずSMの制御機構としてSMSが注目されている。

### 2. 研究の目的

Rb遺伝子欠損マウスにおいて効率的に甲状腺癌が発症するモデルを作成でき、マウス腫瘍発生モデルとして、このマウスの系にSMS1欠損マウスを掛け合わせることが可能となった。セラミドの増加は、細胞周期上の重要因子であるP21のCDK2との結合や、CDK2の脱リン酸化を促進することが知られている(Exp Cell Res. 2000 Dec 15;261(2):303-11)。したがって、このRb遺伝子欠損マウスの系を用いて、SMS欠損によるセラミド、SM制御がRb欠損によるE2Fの活性化の下流シグナルであるサイクリンA、EやCDK2にどのように影響するかについて検討し、悪性腫瘍の細胞周期調節破綻に基づく細胞増生に対するスフィンゴ脂質代謝調節の意義について研究する。

### 3. 研究の方法

(1) SMS1-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腺癌細胞のサイズ、マウス生存率によって検討  
 高橋らは、Rb ヘテロ型マウスに生じる甲状腺C細胞腺腫が、野生型 N-ras 遺伝子座の欠落によって、高度に悪性化するという観察 (Takahashi et al., *Nature Genetics* 38: 118-123 2006)をヒントに、Rb 不活性化によって誘導される腫瘍の悪性化が、細胞老化と DNA 損傷応答によって拮抗されることを見いだした (Shamma et al., *Cancer Cell* 15: 255-269, 2009)。Rb ヘテロ型 p16/Ink4a ホモ型マウス、Rbヘテロ型 ATM ホモ型欠損マウスともに、やはり悪性度の高い甲状腺C細胞腺がんを生じる(Shamma ら投稿準備中)。昨年、マウス Rb 遺伝子 cDNA 内にネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挿入した Rb ノックアウトマウスを作成して、ホモ型欠損が高頻度に甲状腺腺癌を発症することを確認した。岡崎らのグループは、スフィンゴミエリン (SM) を産生しない変異細胞株 WR19L 細胞を用いてスフィンゴミエリン産生酵素 (SMS) 1, 2 を遺伝子クローニングし、SMS 遺伝子 1, 2 を欠損した SMS1,2-KO マウスを作成した。SMS 1, 2 KO マウスと Rb 欠損マウスの交配によるダブル KO マウスの作製が、金沢大学がん研究所学際科学実験センター実験動物施設角間分室で、高橋の管理の下に進行中である。甲状腺腺癌発生に与える SMS 欠損の影響に対する検討は、ダブル KO マウスの全生存率と甲状腺、脾臓、胸腺、骨髄などの腫瘍細胞増生の解析と免疫担当 M1 マクロファージの活性化や腫瘍関連 M2 マクロファージ (TAM) の抑制を FACS にて測定することで試行する。

(2) Rb 欠損細胞株と Rb-KO マウス由来 ME F における SMS 制御による Rb の下流シグナルである細胞周期関連分子の制御の検討  
 (i) Rb 欠損株甲状腺 C 細胞や ME F において Rb 関連シグナル分子である CDK 2 の活性化をヒストン H1 を基質にしたキナーゼアッセイ法で、サイクリン A, E の変化をウエスタンブロットニング方で検討する。  
 (ii) siRNA にて阻害した SMS が Rb 欠損細胞株または SMS-KO とのダブル KO マウス由来 ME F で CDK 2, サイクリン A, E の活性化を抑制するかについて検討する。

#### 4. 研究成果

SMS 1-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腺癌細胞のサイズ、マウス生存率によって検討するために、ダブル KO マウスの作成を行っているが、現時点では KO マウスの作成が十分でなく、更なる検討のために SMS 1 fl/fl マウスを作成し、現在順調に育成されている。Rb 欠損細胞株と Rb-KO マウス由来 ME F における SMS 制御による Rb の下流シグナルである細胞周期関連分子の制御の検討については、それぞれで、G1/0 における細胞周期の停滞が生じており、CDK 2, サイクリン A, E の制御について解析が進行している。

#### 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 10 件)

1. Masato Yano, Tadashi Yamamoto<sup>1</sup>, Naotaka Nishimura, Tomomi Gotoh, Ken Watanabe, Kazutaka Ikeda, Yohei Garan, Ryo Taguchi, Koichi Node, Toshiro Okazaki and Yuichi Oike. Increased Oxidative Stress Impairs Adipose Tissue Function in Sphingomyelin Synthase 1 Null Mice. *Plos One* 7, in press 2013
2. Elodie Lafont, Kazuyuki Kitatani, Toshiro Okazaki and Bruno, Ségui Sphingomyelin Biosynthesis Modulates Cancer Cell Death and Growth *Topics in Anti-Cancer Research*, 454-481, 2012
3. Takafumi Kawanami, Toshioki Sawaki, Tomoyuki Sakai, Miyuki Miki, Haruka Iwao, Akio Nakajima, Takuji Nakamura, Tomomi Sato, Yoshimasa Fujita, Masao Tanaka, Yasufumi Masaki, Toshihiro Fukushima, Yuko Hirose, Makoto Taniguchi, Naotoshi Sugimoto, Toshiro Okazaki, Hisanori Umehara. Skewed Production of IL-6 and TGF $\beta$  by Cultured Salivary Gland Epithelial Cells from Patients with Sjögren's Syndrome *Plos One* 7, Issue 10, e45689, October 2012
4. Zama K., Mitsutake S., Watanabe K, Okazaki T., Igarashi Y., A sensitive cell-based method to screen for selective inhibitors of SMS1 or SMS2 using HPLC and a fluorescent substrate *Chem. Physic. Lipids*: 167(7), 760-768, 2012
5. Makoto Taniguchi, Kazuyuki Kitatani, Tadakazu Kondo, Mayumi Hashimoto,



- Satoshi Asano, Akira Hayashi, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi, Hisanori Umehara, Hiroyuki Takeya, Junzo Kigawa, and **Toshiro Okazaki**. Regulation of autophagy and its associated cell death by sphingolipid rheostat: reciprocal role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in the mTOR pathway *J. Biol. Chem.*, 287(47): 39898-39910, 2012
6. N. Sugimoto, O. Shido, K. Matsuzaki, T. Ohno-Shosaku, Y. Hitomi, M. Tanaka, T. Sawaki, Y. Fujita, T. Kawanami, Y. Masaki, **T. Okazaki**, H. Nakamura, S. Koizumi, A. Yachie, H. Umehara. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(2): 450-7, 2012
  7. Mei-Hong Lu, Makoto Takemoto, Ken Watanabe, Huan Luo, Masataka Nishimura, Masato Yano, Hidekazu Tomimoto, **Toshiro Okazaki**, Yuichi Oike and Wen-Jie. Song Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. *J. Physiology* 2012 May 28. [Epub ahead of print]
  8. Elodie Lafont, Romain Dupont, Nathalie Andrieu-Abadie, **Toshiro Okazaki**, Klaus Schulze-Osthoff, Thierry Levade, Hervé Benoist and Bruno Ségui Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta-Lipid* 1821(4): 684-93, 2012
  9. L. Dong, K. Watanabe, M. Itoh, C-R. Huan, X-P. Tong, T. Nakamura, M. Miki, H. Iwao, A. Nakajima, T. Sakai, T. Kawanami, T. Sawaki, Y. Masaki, T. Fukushima, Y. Fujita, M. Tanaka, M. Yano, **T. Okazaki** and H. Umehara CD4+ T cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Inter Immunol.* 24: 327-337, 2012
  10. S. Asano, K. Kitatani, M. Taniguchi, M. Hashimoto, K. Zama, S. Mitsutake, Y. Igarashi, M. Takeya, R. Kigawa, A. Hayashi, H. Umehara and **T. Okazaki** Regulation of Cell Migration by Sphingomyelin Synthases: Sphingomyelin in Lipid Rafts Decreases Responsiveness to Signaling by the CXCL12/CXCR4 Pathway. *Molecular and Cell Biology*, 32(16):3242-52, 2012
- [学会発表] (計 5 件)
1. **Okazaki T.**, Mutual function of S1P with ceramide in autophagic cell death through mTOR, Niseko, Hokkaido Japan, 4-9 August, 2013 (invited)
  2. **Okazaki T.**, The mechanisms to overcome cell resistance by sphingolipids, Golf of Seilh, Toulouse France, 6-7 May, 2013 (invited)
  3. **Okazaki T.**, Thrombocytopenia caused by sphingomyelin synthase 1 (SMS1) deficiency in mice, EMBO Molecular Medicine Workshop, Ramot, Sea of Galilee Israel, 16 - 21 October, 2012 (invited)
  4. **Okazaki T.**, Sphingosine-1-phosphate/S1P3 counteracts ceramide-induced autophagy-associated cell death through mTOR pathway in leukemia cells ICBL, Banff Canada, Sept 2012
  5. **Okazaki T.** Hot Topics in Sphingolipid metabolism, Renaissance. Gordon Conference, Glycolipid and sphingolipid, II Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy April 22-27, 2012 (discussion leader)

〔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

金沢医科大学血液免疫内科学・教授

岡崎俊朗

### (2) 研究分担者

金沢医科大学血液免疫内科・大学院生

Lusi Oka Wardhani

### (3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

対象研究テーマ：がん特異的脂質代謝異常の分子機序に関する基礎研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がん幹細胞制御を目指した癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる  
細胞内代謝・脂質代謝調節における基盤的研究

研究代表者：千葉大学大学院医学研究院 講師 田中知明

研究成果の概要：

高橋らは、これまでに種々の Rb 複合遺伝子欠損マウスの解析結果から、LOH による Rb 不活性化が原因で生じる Rb+/-;p53 KO マウス由来カルシトニン産生細胞(C細胞)腫は、その他の遺伝子欠損や p53 ヘテロ型背景のマウスから生じた腫瘍と比較して、足場非依存的増殖能が非常に高く、分化マーカーの発現が著しく低い、未分化な腫瘍であることを明らかにした。また、p53KO マウスに自然発生した軟部組織肉種より樹立した初代培養細胞においても、Rb の不活性化ががん幹細胞様の細胞群を誘導することを明らかにした。

そこで本年度は、p53 欠損背景において Rb 不活性化により、がん幹細胞様細胞が誘導される分子機構を解明するため、高橋らが、Sphere 形成能を指標として、Rb 不活性化により誘導されるがん幹細胞様細胞を選択的に培養し、申請者らが、RNA-sequence により、これらの細胞群の遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型背景において Rb の標的としてすでに特定されていたメバロン酸経路および脂肪酸合成経路に加えて、p53 欠損背景における Rb 不活性化により、解糖系およびヘキソースアミン経路、グルタミン代謝に関与する種々の代謝関連遺伝子群が変動することを明らかにした。またこれら遺伝子群の発現変化が実際に代謝経路に及ぼす影響を、高橋らが、放射性標識グルコース誘导体や放射性標識グルタミン誘导体、Extracellular flux analyzer 等を用いて解析した結果、p53 および Rb がともに不活性化したがん細胞群では、脂質合成系の亢進、グルタミン代謝の亢進、ミトコンドリア活性の低下が観察された。Trp53 および pRb 不活性化細胞が示す遺伝子発現の変化、代謝経路の変化については、「4. 研究成果」の項目で具体的に記載する。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：

#### 1. 研究の背景

がん細胞には解糖系の亢進など「ワールブルク効果」に代表される特有のエネルギー代謝があり、その制御系の解明が創薬のために期待されている。また解糖系に加えて、脂肪酸は脂質合成や蛋白質修飾のみならず  $\alpha$  酸化を介してエネルギー産生の基質となる幅広い用途の細胞内中間生成物であるが、癌細胞では de novo 脂肪酸合成増加やコレステロール合成経路のみならず、phosphatidylinositol や phosphatidylcholine などの脂質代謝調節経路が様々な腫瘍性細胞内シグナルと深く関わっていることが注目を集めている。加えて、脂質代謝を含む細胞内代謝酵素群やミトコンドリアでの抗酸化・エネルギー調節機構が深く関わっている分子病態は、がん幹細胞 (cancer initiating cell)・iPS 細胞・細

胞老化とも密接につながっており、新規サイズ開発や臨床応用にむけて、世界中で激しい研究競争が繰り広げられている。一方、癌抑制遺伝子産物 p53 や Rb の新たな側面として、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかにされつつあり、細胞老化や核初期化に関わるエピゲノム制御機能などの多彩な生理作用と密接にクロストークしていることがわかってきた。従って、治療抵抗性やがん幹細胞の分子病態の根底にはがん特異的脂質代謝異常を含む細胞内代謝制御機序が存在し、p53 と Rb 経路のクロストークによるその調節メカニズムの解明が期待されている。

#### 2. 研究の目的

p53 と Rb のクロストークによる代謝制御

の基盤的研究については、転写因子がゲノムワイドでの転写産物調節を引き起こすこと、代謝動態はダイナミックに変化することから、その統合的解析が非常に立ち遅れているのが現状である。そこで共同研究として、細胞内代謝動態を網羅的に捉えることが可能なメタボローム解析を駆使して、高速シーケンサーによるゲノムワイドの探索と各研究者が有しているp53とRbの知見と情報を有機的に結びつけることで、癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節機構を明らかにする。細胞内(脂質)代謝制御という視点からp53-Rb ネットワークの生化学的・ゲノムワイド解析・動物モデル解析を連結させるという独創的な研究提案であり、この研究を通じて発見される知見や分子群は、がん幹細胞・細胞老化・ES/iPS の接点で機能する共通の代謝制御因子であることが予想され、新規の創薬シーズ開発や解析技術開発につながり、がん分子病態のブレークスルーが期待できる。

### 3. 研究の方法

申請者らが発見した p53 の抗酸化・エネルギー産生調節作用機構に加え、現在解析を進める脂質代謝制御関連遺伝子 (linc RNA を含む) 群のゲノムワイドの探索と機能解析手法と、高橋らが開発してきた p53/Rb の KO マウスモデルや Rb のコレステロール合成経路とイソプレノイドに関する知見を融合し、新たに効果的に進展・展開する計画である。方法としては、高速シーケンサーによるゲノムワイドの探索と各研究者が有している p53 と Rb の知見を有機的に結びつけることで、癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節を明らかにする。新たな視点での創薬基盤構築とがん幹細胞制御の共通分子基盤の解明に貢献することが期待できる。

### 4. 研究成果

p53 欠損背景において Rb 不活性化により、がん幹細胞様細胞が誘導される詳細な分子機構を解明するため、申請者らが、RNA-sequence により遺伝子発現解析を行い、高橋らが、放射性標識グルコース誘導体や放射性標識グルタミン誘導体、Extracellular flux analyzer 等を用いて代謝状態を解析した。その結果、p53 および Rb 不活性化がん細胞群では、脂質合成系の亢進、グルタミン代謝の亢進、ミトコンドリア活性の低下が観察された。以下に、上記の研究より得られた具体的な実験結果を示す。

① メバロン酸経路の種々の遺伝子群が高

発現しており、メバロン酸経路阻害剤であるスタチンで処理すると Sphere 形成能が抑制された。また各種阻害剤を用いた実験から、メバロン酸経路の下流経路として、特にコレステロール合成系亢進ががん幹細胞能の獲得に重要であると考えられ、実際に細胞内コレステロール含有量の増加が観察された。

② 脂肪酸合成経路の種々の遺伝子群が高発現しており、細胞内のトリグリセリド含有量が増加していた。

③ グルコーストランスポーター

(Glut1, Glut4) や解糖系経路の種々の遺伝子群を高発現しているが、放射性標識グルコース誘導体の取り込み実験や

Extracellular flux analyzer を用いた ECAR (細胞外酸性化速度) 測定の結果から、実際のグルコース取り込み量はむしろ減少していることが明らかとなった。

④ 解糖系の分枝経路であるヘキソースアミン経路の種々の遺伝子群が、律速酵素である GFAT を筆頭に高発現しており、現在、ヘキソースアミン経路の代謝産物である N アセチルグルコサミン等の細胞内含有量をメタボローム解析により検討中である。

⑤ グルタミントランスポーター (Slc1a5) の発現が亢進しており、放射性標識グルタミン誘導体を用いた解析により、実際にグルタミン取り込み量の亢進が観察された。コントロール細胞群 (pRb 活性あり) と比較して、グルタミン要求性が高く、グルタミン枯渇に対して素早く細胞死が誘導されることを明らかにした。

⑥ Extracellular flux analyzer により OCR (酸素消費速度) を測定した結果、基本酸素消費量および最大酸素消費量ともに低い値を示した。また陽イオン性色素 JC-1 によりミトコンドリア膜電位を測定した結果、ミトコンドリア膜電位が低いことが明らかになった。

今後は、申請者らによる高速シーケンサーによるトランスクリプトーム解析と、高橋らによるメタボローム解析を駆使することで、これら代謝経路の変化における Trp53 依存性経路と pRb 依存性経路をそれぞれ明確にし、Trp53-pRb クロストークによる代謝経路制御の詳細な分子機構を解明する計画である。

### 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 4 件)

1. Hosokawa H\*, Tanaka T\*(Co-first author), Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y,

- Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. unfunctionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. Proc Natl Acad Sci USA. (in press) (査読有)
2. Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Komiyama A, Suzuki S, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Tatsuno I, Ichikawa T. High predictive accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese patients with aldosterone-producing adenoma. Surgery (2012) (査読有)
  3. Terano T, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Suyama K, Tanaka T, Yamamoto K, Tatsuno I. Glycemic control and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. Diabetology International, (2012) (査読有)
  4. 田中知明 p53による細胞内代謝調節機構, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, (2012) (査読無)

[学会発表] (計9件)

1. 鈴木佐和子、田中知明。p53はGLS2によるグルタミン代謝制御を介した抗酸化作用とエネルギー調節により腫瘍抑制作用を發揮する。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡。
2. 中山哲俊、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)p53による転写抑制遺伝子群の探索的解析と癌における予後の検討。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡。
3. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)p53下流遺伝子DPYSL4の癌抑制機構と細胞内エネルギー調節作用。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡。
4. 佐久間一基、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、中山哲俊、樋口誠一郎、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡。
5. 橋本直子、田中知明。(ポスター口演)p53クロマチン複合体に含まれるNuclear body protein SP110と細胞老

化誘導・癌抑制機能第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡。

6. 鈴木佐和子、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明。p53とGLS2のミトコンドリア制御を介した生活習慣病および癌における役割。第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、北海道。
7. 橋本直子、滝口朋子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明。癌細胞におけるCOP9signalosomeによるp53およびp73のリン酸化と安定化の制御機構。第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、北海道。
8. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明。RNA-sequencing解析を用いたp53下流遺伝子DPYSL4の同定とそのエネルギー代謝調節機構。第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、北海道。
9. 田中知明。癌抑制遺伝子産物p53による細胞内代謝制御機構〜がん、エネルギー代謝、肝細胞性の接点の新展開〜第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、北海道。

[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

千葉大学大学院医学研究院・講師  
田中知明

(2) 研究分担者

Columbia University, Biological Sciences  
・ Professor Carol Prives

(3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

対象研究テーマ：マトロプロテアーゼを標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：高特異性 MMP インヒビターの分子設計による制癌剤の開発

研究代表者：横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 准教授 東 昌市

研究成果の概要：

(1) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) に対する生理的インヒビターTIMP-2 と、アミロイド前駆体由来 MMP-2 選択的インヒビターペプチドである APP-IP とを組み合わせることで、MMP-2 に対し、強力かつ高い特異性を持つインヒビターの設計に成功した。(2) コレステロール硫酸による MMP-7 基質特異性変換機構を解明し、このメカニズムを応用した MMP-7 選択的阻害剤開発の手掛かりを得た。

研究分野：構造生物化学

キーワード：分子認識及び相互作用

#### 1. 研究開始当初の背景

悪性のがん組織では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が高発現し、がん細胞の浸潤・転移に寄与している。しかしながら、ヒトで見出されている 24 種の MMPs の全てが、がんの浸潤・転移を促進するのではなく、特異性の低い阻害剤によって標的以外の MMPs が阻害されると、がんの転移を助長する可能性や、副作用が現れることが示唆されていた。事実、研究開始当初までに開発された多くの MMPs インヒビターはいずれも特異性が低く、臨床試験の過程で、がんの抗転移剤としての効果が明確ではない場合や、確認された様々な副作用が原因となり、がん治療薬としての利用に至っていなかった。したがって、標的 MMPs に対し、高い特異性を持つインヒビターの開発が重要であると考えた。

MMPs の一つである MMP-2 は、がんの浸潤・転移に対し促進的に作用することが示唆されており、がん治療の良好なターゲット分子であるが、私達は、 $\beta$ -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が MMP-2 に高い選択性を持つインヒビター領域を持ち、その領域が APP 分子内の ISYGNALMP 配列 (APP-IP と命名) に局在することを見出した (Higashi and Miyazaki *J. Biol. Chem.* 2003)。また、キメラ MMP-2 改変体を用いた解析 (Higashi and Miyazaki *J. Biol. Chem.* 2008) や APP-IP

と MMP-2 触媒ドメインから成る複合体の結晶構造解析 (Hashimoto *et al. J. Biol. Chem.* 2011) から、APP-IP による MMP-2 選択的阻害様式を明らかにしてきた。

一方、MMP-7 は特に大腸がんにおいて高頻度で発現しており、その発現量と大腸がんの悪性度が高い相関を示すことが知られていた。私達は、MMP-7 が大腸がん細胞の細胞表層に結合し、特定の細胞膜タンパク質を切断することで、細胞間接着能を高めることを見出していた。この細胞間接着能の獲得により、大腸がん細胞の肝臓への転移能が顕著に増強されることが判明している。さらに、細胞表層のコレステロール硫酸 (CS) が MMP-7 の特異的な結合分子であることを同定し、この脂質との相互作用が上記細胞膜タンパク質の切断に必須であることを明らかにしていた (Yamamoto *et al. J. Biol. Chem.* 2006)。また、CS との結合に重要な MMP-7 分子内のアミノ酸残基を同定したところ、これらの残基が触媒活性部位とは反対側に位置することが明らかになり、CS がアロステリック効果により MMP-7 の活性部位に作用することを明らかにしていた (Higashi *et al. J. Biol. Chem.* 2008)。

#### 2. 研究の目的

本研究では、がんの増殖および浸潤・転移



に促進的に寄与する MMP-2 および MMP-7 の活性を特異的に抑制する阻害剤を、それぞれ、APP-IP および CS との選択的相互作用を基に開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) APP-IP のアミノ酸配列を TIMP-2 の NH<sub>2</sub> 末端側に付加した融合タンパク質を設計し、その cDNA を動物細胞発現用のベクターに導入後、ヒト繊維芽肉腫 HT1080 細胞にトランスフェクトした。この融合タンパク質の安定発現株の conditioned medium から各種クロマトグラフィーを用いて融合タンパク質を精製した。

合成ペプチド基質を用いた MMPs 活性測定系により、各種 MMPs 活性に及ぼす融合タンパク質の阻害効果を調べた。また、培養細胞系の MMP-2 活性に及ぼす融合タンパク質の効果を調べた。

(2) CS による MMP-7 機能変換機構を調べる目的で、種々の濃度の CS 存在下において、MMP-7 と各種基質タンパク質をインキュベートした。その後、SDS-PAGE あるいは基質タンパク質に対する抗体を用いた Western blotting 法で解析することにより、基質タンパク質の分解速度を調べた。また、各基質タンパク質と CS との親和性を、共沈法を用いて調べた。さらに、細胞表層に CS を介して結合した MMP-7 が細胞培養液中あるいは培養プラスチックプレートにコートした基質タンパク質を分解できるか否かについて調べた。

### 4. 研究成果

(1) APP-IP が MMP-2 に対して高い選択性を持つことに着目し、さらに特異性の高いインヒビター分子の設計を試みた。私達の以前の研究より、生体内の MMP インヒビタータンパク質である TIMP-2 の主鎖の NH<sub>2</sub> 末端 α-アミノ基を修飾すると、MMP インヒビター活性が完全に失われるのに対し、MMP-2 の非触媒ドメインに対する結合能は保持されることが分かっていた。そこで、今回、TIMP-2 の NH<sub>2</sub> 末端に APP-IP のアミノ酸配列を付加したところ、TIMP-2 が持っていた他の MMPs に対する阻害活性は失われたのに対し、MMP-2 に対しては強力な阻害活性を持つ分子となることが判明した (図 1)。この融合タンパク質 APP-IP-TIMP-2 は MMP-2 の合成基質水解活性

を非常に低い阻害定数 (K<sub>i</sub> = 0.68 pM) で阻害するほか、MMP-2 を分泌するがん細胞の移動やこの細胞による IV 型コラーゲンの分解を抑制することが判明した。がん細胞が基底膜を破壊して浸潤・転移する際に基底膜の主成分である IV 型コラーゲンの分解が重要になるが、APP-IP-TIMP-2 はこの浸潤過程を抑制するのに有効な薬剤と成り得る可能性がある。

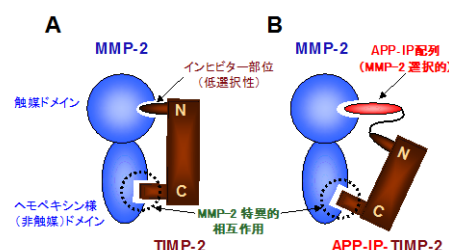


図1. APP-IP-TIMP-2によるMMP-2阻害の模式図  
TIMP-2 (A) と APP-IP-TIMP-2 (B) によるMMP-2 阻害様式の比較

(2) プロテアーゼを細胞膜表層に局在させることは、細胞膜タンパク質の分解やプロセッシングを効率化するだけでなく、近傍の細胞外タンパク質を限定的に分解する上でも極めて有効である。上述のように私達は、MMP-7 が、がん細胞膜表層の CS に結合し、特異的膜タンパク質を切断することで、がん細胞の転移能を増強することを見出してきた。本研究では、CS との相互作用が MMP-7 の細胞外マトリックスタンパク質分解活性に及ぼす効果について調べた。その結果、MMP-7 単独では基底膜構成成分の一つである laminin-332 を殆ど分解しないのに対し、CS 存在下ではその分解が著しく促進されることを見出した。反対に、MMP-7 によるカゼインの分解は CS の存在下、顕著に阻害された。一方、MMP-7 による fibronectin の分解は、低濃度の CS 存在下では部分的に阻害されたものの、高濃度の CS 存在下では有意に促進されることが判明し、CS によって MMP-7 の基質特異性が変化することが示唆された。さらに、この基質特異性変化のメカニズムについて調べたところ、CS 存在下で MMP-7 による分解が促進される基質タンパク質は全て CS に対し親和性を持つことが明らかになった。したがって、CS は MMP-7 とその基質タンパク質の両方に結合することで、これらを架橋し、酵素反応を促進することが予想された。これに対し、CS が MMP-7 側のみに結合すると、そ

の基質認識部位が影響を受け、酵素反応における Km 値が増大することで反応速度が低下することが明らかになった。一方、CS を介して細胞膜に結合した MMP-7 は溶液中およびプラスチックプレートにコートした laminin-332 や fibronectin を分解することが判明し、これら細胞接着タンパク質の分解に伴ったがん細胞の脱着が観察された。以上の結果から、細胞表層の CS に結合した MMP-7 は近傍の CS と親和性を持つ細胞接着タンパク質を選択的に分解しつつ、がん細胞の移動を促進する可能性が考えられた。この結果は、CS と MMP-7 との相互作用を標的とする抗転移剤開発の可能性を与えるものとする。

#### 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. Eriko Komiya, Momoko Furuya, Naoko Watanabe, Yohei Miyagi, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Elevated expression of angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in tumor stroma and its roles in fibroblast activation. *Cancer Sci.* **103**, 691-699, 2012

2. Jun Oyanagi, Takashi Ogawa, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki: Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. *PLoS One.* **7**, e53209, 2012

3. Shouichi Higashi, Tomokazu Hirose, Tomoka Takeuchi, and Kaoru Miyazaki: Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *J. Biol. Chem.* **288**, 9066-9076, 2013

[学会発表] (計 6 件)

1. 竹内友香、宮崎 香、東 昌市: カルシウムイオン結合部位を欠く MMP-7 変体は、がん細胞表層のコレステロール硫酸に強く結合し、MMP-7 が誘導する細胞凝集を抑制する。第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (浜松)、演題番号 2、2012 年 8 月 10-11 日

2. Eriko Komiya, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, Kaoru Miyazaki: Overexpression of Angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in Tumor Stroma and Vasculature: Differential Regulation and Functions. Brisbane, The 14th International Biennial congress of the Metastasis Research Society (Brisbane, Australia), No.174 (Abstract p29), September 2-5, 2012

3. Hiroki Sato, Takashi Ogawa, Eriko Komiya., Jun Oyanagi, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: Laminin gamma2 chain promotes invasion of tumor cells into vascular endothelial cell layer in vitro. The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (Brisbane, Australia), No.191 (Abstract p29), September 2-5, 2012,

4. Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: EMT of tumor cells promotes microtubule-based protrusions in 3D collagen matrix, suppressing cell growth. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo), J-1055, September 19-21, 2012

5. Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki: Laminin gamma 2 chain induces transendothelial migration of cancer cells by modulating cytoskeleton of endothelial cells. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo), J-3073, September 19-21, 2012

6. 竹内友香、宮崎 香、東 昌市: がん細胞表層に結合した MMP-7 を分子標的とするがん転移抑制剤の開発。第 85 回日本生化学会大会 (福岡)、演題番号 3T28-6 および 3P-276、2012 年 12 月 14-16 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〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横浜市立大学  
大学院生命ナノシステム科学研究科  
准教授 東 昌市

(2) 研究分担者

横浜市立大学  
大学院生命ナノシステム科学研究科  
教授 宮崎 香

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博

対象研究テーマ：メタロプロテアーゼを標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：メタロプロテアーゼ ADAM28 の遺伝子発現機構解析に基づく治療法  
開発の基礎研究

研究代表者：慶應義塾大学医学部 専任講師 望月早月

研究成果の概要：ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28)は、ヒト乳癌や非小細胞肺癌で癌細胞特異的に発現し、癌細胞の増殖やリンパ節転移に関与することが知られている。本研究では、癌細胞における ADAM28 遺伝子発現メカニズムを解明するために MDCK イヌ腎上皮細胞株を5種類のがん遺伝子 (v-Src, LMP1, ErbB2, Ha-Ras, c-Fos) で形質転換し、ADAM28 発現の検討を行った。その結果、ADAM28 は v-Src による形質転換で特異的に発現するとともに細胞間接着のない浮遊細胞となった。形質転換細胞株をヌードマウス皮下移植すると、v-Src 形質転換細胞株では最も強い腫瘍形成能があり、その腫瘍形成は抗 ADAM28 中和抗体の局所投与で抑制された。本細胞株では ADAM28 発現が上昇しており、Src kinase 阻害剤(radicicol)でほぼ完全に発現抑制された。PI3 kinase 阻害剤(LY294002)あるいは MAP kinase 阻害剤(PD98059、U0126)では部分的に抑制され、両経路の阻害剤処理で完全消失した。ヒト乳癌、肺癌、卵巣癌、大腸癌細胞株においても ADAM28 発現と Src のリン酸化は正の相関を示し、ADAM28 高発現癌細胞株では、Src kinase、PI3 kinase および MAP kinase の阻害剤処理で発現抑制された。また、ヒト乳癌、肺癌、卵巣癌、大腸癌の免疫組織染色で ADAM28 とリン酸化 Src が癌細胞で共発現していた。以上のことから、v-Src 形質転換細胞株とヒト癌細胞における ADAM28 遺伝子発現には Src の活性化が重要であり、その下流の MEK/ERK と PI3K/mTOR の両経路が関与していることが示唆された。

研究分野：実験病理学、生化学

キーワード：ADAM, 形質転換

#### 1. 研究開始当初の背景

ADAM 分子は、MMP (matrix metalloproteinase) のメタロプロテアーゼドメインを共有する遺伝子ファミリーである。ADAMは、細胞膜上の増殖因子・レセプター・細胞接着分子のshedding、細胞外マトリックスの分解、インテグリンへの結合などによる細胞の接着・運動・増殖に関わる多機能分子であり、MMPと同様に癌細胞の増殖・

浸潤・転移への関与が示唆されている (Cancer Sci 98:621-628, 2007; Nat Rev Mol Cell Biol 8 :245-257, 2007; Curr Pharm Des 15:2349-2358, 2009)。

申請者は、ヒト癌組織におけるADAM分子の遺伝子発現を網羅的にスクリーニングし、ADAM28のヒト乳癌や肺癌細胞での選択的遺伝子発現と癌細胞の増殖との相関を示すとともに、insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)の分解による乳癌細胞増

殖促進作用を実証してきた (Biochem Biophys Res Commun 315:79-84, 2004; Cancer Res 66:9913-9920, 2006)。また、yeast two-hybrid 法を用いた ADAM28 結合タンパク質の探索から、ADAM28 の基質として connective tissue growth factor (CTGF)を見出し、ADAM28 が CTGF/ vascular endothelial growth factor (VEGF)複合体のうちCTGFを選択的に分解し、遊離したVEGFが血管新生を促進することを証明した (Biochem Biophys Res Commun 402:651-657, 2010)。同様にyeast two-hybrid法によりADAM28 結合タンパク質の候補として von Willebrand factor (VWF)を見出し、癌細胞で発現するADAM28 は血中でのVWF分解を介してVWF誘導性アポトーシスを回避し、癌細胞転移促進に働く可能性を証明した (J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012)。さらに、ADAM28 を検出するELISA法を開発し、肺癌患者の血中ADAM28 レベルは、臨床病期、リンパ節転移、再発と正の相関を示し、本ELISA系が肺癌の診断や病勢のモニター法として有望であることを報告している (Int.J.Cancer 127:1844-1856, 2010)。これら一連の研究により、ADAM遺伝子ファミリー分子の中でも、ADAM28 はヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移に深く関与することを明らかにするとともに、本分子がヒト癌の診断や治療標的となり得ることを示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで未解決な癌細胞における ADAM28 遺伝子発現機構と本分子を標的とした治療薬開発の基礎的研究を行った。遺伝子発現機構に関しては、種々の癌遺伝子で形質転換した細胞やヒト乳癌・肺癌細胞株を用いて ADAM28 遺伝子発現に関わる分子の同定と細胞内シグナル伝達機構を解析した。次いで、発現調節において最も重要な分

子に対する阻害剤やヒト型抗 ADAM28 抗体による癌細胞の増殖・浸潤・転移抑制作用を検討し、ADAM28 の発現と活性を標的とする新規治療薬開発のための基礎研究を行った。

## 3. 研究の方法

MDCK イヌ腎上皮細胞株をがん遺伝子 (v-Src、LMP1、ErbB2、Ha-RAS、C-Fos) で形質転換させた細胞株での ADAM28 発現を RT-PCR 法、イムノブロット法、免疫組織化学染色法で調べ、ヌードマウス皮下移植での腫瘍形成能を検討した。これらの細胞株及び ADAM28 発現・非発現ヒト癌細胞株を Src 阻害剤 (PP-2、Radicicol)、PI3 kinase 阻害剤 (LY294002)、MAP kinase 阻害剤 (PD98059、U0126 など) で処理し、ADAM28 発現に関わる細胞内シグナルを検討した。

## 4. 研究成果

ADAM28 発現は MDCK 細胞では陰性であり、v-Src で形質転換した細胞株のみで発現がみられた。また、同細胞株では v-Src のリン酸化が上昇しており、マウス皮下での腫瘍形成能が最も高いことが明らかとなり、その作用は抗 ADAM28 抗体処理により抑制された。同細胞株における ADAM28 の発現は、PI3 kinase と MAP kinase の阻害剤で部分的に抑制され、両阻害剤処理で完全消失した。ヒト癌細胞株においては、ADAM28 発現レベルと Src のリン酸化は正の相関を示し、Src、PI3 kinase および MAP kinase の阻害剤で ADAM28 発現は阻害された。以上のデータは、癌細胞における ADAM28 の遺伝子発現は、PI3 kinase と MAP kinase を介して Src が制御していることを示唆している。

## 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 4 件)

1. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Aya Sasaki, Hiroataka James Okano, Hideyuki Okano, Yasunori Okada : Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand Factor. **J. Natl. Cancer Inst.** 104:906-922 (2012).
2. Jeremy Jowett, Yasunori Okada, Peter Leedman, Joanne Curran, Matthew Johnson, Eric Moses, Harald Goring, Satsuki Mochizuki, John Blangero, Leah Stone, Holly Allen, Chris Mitchell and Vance Matthews: ADAM28 is elevated with the metabolic syndrome and is a sheddase of human tumour necrosis factor. **Immun. Cell Biol.** 90: 966-973 (2012).
3. Miyuki Murata, Kousuke Noda, Junichi Fukuhara, Atsuhiko Kanda, Satoru Kase, Wataru Saito, Yoko Ozawa, Satsuki Mochizuki, Shioko Kimura, Yukihiko Mashima, Yasunori Okada and Susumu Ishida : Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 53:4055-4062 (2012).
4. Atsushi Anzai, Toshihisa Anzai, Shigenori Nagai, Yuichiro Maekawa, Kotaro Naito, Hidehiro Kaneko, Yasuo Sugano, Toshiyuki Takahashi, Hitoshi Abe, Satsuki Mochizuki, Motoaki Sano, Tsutomu Yoshikawa, Yasunori Okada, Shigeo Koyasu, Satoshi Ogawa, and Keiichi Fukuda.: Regulatory role of dendritic cells in post-infarction healing and left ventricular remodeling. **Circulation** 125: 1234-1245 (2012).

[学会発表] (計 5 件)

1. 望月早月、副島見事、下田将之、阿部仁、佐々木文、岡野ジェイムズ洋尚、岡野英之、岡田保典 :

ADAM28 の von Willebrand factor 分解による新規癌細胞転移機構

第 101 回日本病理学会総会、東京、2012 年 4 月 28 日

2. 望月早月、副島見事、下田将之、岡田保典: ADAM28 による癌細胞新規転移促進機構  
第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、広島、2012 年 7 月 13 日

3. 望月早月、副島見事、下田将之、阿部仁、佐々木文、岡野ジェイムズ洋尚、岡野栄之、岡田保典 :

メタロプロテアーゼ ADAM28 による von Willebrand factor 分解と癌細胞転移機構  
第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、浜松、2012 年 8 月 10 日

4. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, and Yasunori Okada: Novel effect of ADAM28 on promotion of carcinoma cell metastasis  
XXIIIrd FECTS and ISMB Joint Meeting, Katowice, 2012 年 8 月 28 日

5. Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada: ADAM28 as a possible molecular target for non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and breast carcinoma  
第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 21 日

[図書] (計 1 件)

1. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada: ADAM28 In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Ed. by Rawlings N.D. and Salvesen G. pp1136-1139 (2013).

[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

慶應義塾大学医学部・専任講師 望月早月

(2) 研究分担者

順天堂大学医学部・博士課程大学院生

阿部 仁

慶應義塾大学医学部・教授 岡田保典

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：ケモカイン CXCL14/BRAK による発癌抑制と転移抑制の分子機構の研究

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：

我々が作成したケモカインCXCL14/BRAK (BRAK) を過剰発現するトランスジェニック (BRAKTg) マウスと野生型 (Wt) マウスを用いて化学発癌に対する応答と、悪性黒色腫細胞の実験的肺転移に対する応答を調べた。BRAK Tgマウスの大腸癌の数はWtの 1/10 であり有意 ( $P < 0.001$ ) に少なかった。また、悪性黒色腫の数を変えて注射すると、すべての細胞数においてBRAKTgマウスの方がWtマウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、生存率が高かった。さらに、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数  $3 \times 10^3$  ではWtマウスの生存率が 50% に対してTgでは 100% であった。また、NK細胞活性の阻害によりTgマウス、Wtマウスともに転移腫瘍数が激増し、両者における肺転移にNK細胞が関与している事が明らかにされた。健康人でもBRAKTgレベルの発現をしているヒトが存在したため、ケモカインCXCL14/BRAK は今後の副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な標的分子と考えられる。

研究分野：癌の分子標的治療法の開発

キーワード：癌抑制性ケモカイン・CXCL14/BRAK・発癌抑制・転移抑制

## 1. 研究開始当初の背景

### A. ケモカイン BRAK は *in vivo* で癌進展抑制作用を示す：

癌では上皮増殖因子 (EGF) 受容体 (EGFR) の異常な活性化が多く見られる。癌進展の *in vitro* のモデルとして、舌癌由来の細胞 (HSC-3) を無血清下で培養し、この細胞を EGF 処理した時に発現の低下する分子を遺伝子チップ法などにより検索した。その結果、白血球の遊走を促進するケモカインの一種である BRAK の発現が顕著に低下することを見いだした。BRAK は正常細胞で多く発現されており、ヒト頭頸部癌において低下することから、癌進展抑制因子に該当すると考えた。そこで、HSC-3細胞にBRAK遺伝子を導入して発現を高めた癌細胞 (HSC-3 BRAK) を作成し、Tリンパ球機能を欠損したヌードマウス (Ozawa *et al.*, 2006)、あるいはTリンパ球およびBリンパ球機能を欠損した SCID マウスに移植した (Ozawa *et al.*, 2009b)。対照の HSC-3 は大きな腫瘍を形成するのに対して、HSC-3 BRAK 細胞の移植腫瘍は 1ヶ月後には消滅した。このことから BRAK は我々の体内に存在する腫瘍進展抑制因

子である可能性が考えられた。また、BRAK の発現制御は ERK マップキナーゼと p38 マップキナーゼのシグナルクロストークによることを明らかにした (Ozawa *et al.*, 2009b, 2010, 畑, 2011)

### B. BRAK 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは腫瘍抑制作用、転移抑制作用を示す：

さらに、C57BL/6 マウスに BRAK 遺伝子を強制発現させ、血中 BRAK 値が野生型マウスの 10 倍高く発現するトランスジェニック (BRAK Tg) マウスを作製した。このマウスに Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞あるいは悪性黒色腫細胞を移植すると、癌の増殖抑制・進展抑制が見られたので、BRAK は生体内に存在する腫瘍進展抑制因子であることが確認された。移植腫瘍の増殖・進展の抑制は 3 系統の BRAK Tg マウスで観察されたので、腫瘍の進展抑制は BRAK 遺伝子導入による宿主マウスの腫瘍進展促進因子遺伝子の破壊の結果ではなく、高い BRAK の発現が腫瘍の増殖・進展抑制に効いていると考えられた (Izukuri *et al.*, 2010)。我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、LLC 細胞、悪性黒色腫細胞の癌進展抑制作用を

示すことが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ケモカイン CXCL14/BRAK を高発現する BRAK Tg マウスを用いて、

I. BRAK Tg マウスの移植癌の増殖抑制だけでなく、発癌に対する抵抗性を示す事を明らかにし、 II. 癌転移抑制におけるナチュラルキラー (NK) 細胞の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

I. BRAK Tg マウスと野生型マウスの腹腔にアゾキシメタン (12mg/kg body weight) を注射後、3%のデキストラン硫酸ナトリウムを間欠的に飲料水に加えることにより実験的大腸癌を発生させた。

II. BRAK TgマウスとWtマウスの尾静脈より  $3 \times 10^3$ – $2 \times 10^5$  の悪性黒色腫の細胞を注入し、一定期間後に肺の黒色腫の数を数えた。また、一部のマウスについてはanti-asialoGMI 抗体、あるいはanti-NK1.1 抗体を注入しNK細胞活性を阻害した。

## 4. 研究成果

I. アゾキシメタン注射 56 日後のマウスでは BRAK Tg マウスの腫瘍数は Wt マウスの 1/10 であり有意 ( $P < 0.001$ ) に少なかった。

II. すべての細胞数においてBRAK Tgマウスの方がWtマウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、生存率が高かった。また、NK細胞活性の阻害によりTgマウス、Wtマウスともに転移腫瘍数が激増し、両者における肺転移にNK細胞が関与している事が明らかにされた。さらに、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数  $3 \times 10^3$  ではWtマウスの生存率が50%に対してBRAKTgでは100%であった。ケモカイン CXCL14/BRAK は正常細胞で大量に合成されており、健康人でも BRAKTg レベルの発現をしているヒトが存在したので、今後の副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な分子標的と考えられる。

## 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. Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukur K, Kato Y, Hata R, Lee M-C: Fasudil suppresses fibrosarcoma growth by stimulating secretion of the chemokine CXCL14/BRAK. Journal of Pharmacological Sciences, 120,

241-249, 2012.

2. Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor for head and neck squamous cell carcinoma. ISRN Otolaryngology, 2012, ID797619, p1-12, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

1. Hata R, Izukur K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: NK cells are indispensable for suppression of tumor growth and metastasis in transgenic mice over-expressing chemokine CXCL14/BRAK. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012, Chicago, USA, 2012. 3. 31-4. 4.

2. Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor. Bit's 5th Annual World Cancer Congress, Beijing, China, 2012. 5. 18-20.

3. Hata R, Izukur K, Kato Y: Expression of chemokine CXCL14/BRAK suppresses tumor cell metastasis. 90<sup>th</sup> International Association for Dental Research, Iguassu Falls, Brazil, 2012. 6. 20-23.

4. 畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正: ケモカイン CXCL14/BRAK は癌細胞の肺転移を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 郡山, 2012, 9. 14-16.

5. 宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 徳富文彬, 高橋聡子, 畑隆一郎, 李昌一 ROCK 阻害剤 (fasudil) による抗腫瘍性ケモカイン (CXCL14/BRAK) の分泌促進作用を応用した新規抗腫瘍療法の研究開発. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012. 9. 14-16.

6. 前畑洋次郎, 宮本千央, 吉野文彦, 加藤靖正, 吉田彩佳, 高橋聡子, 高橋俊介, 畑隆一郎, 李昌一: 頭頸部扁平上皮癌細胞において酸化ストレスは腫瘍抑制性ケモカイン BRAK/CXCL14の発現を抑制する. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012. 9. 14-16.

7. Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Hata R, Kurata S: p63 (TP63) activates Wnt target gene expression by directly interacting with TCF. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

8. Hata R, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of CXCL14/BRAK suppresses tumor growth and metastasis and prolongs the life span of tumor-burden mice. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

9. Maehata Y, Ozawa S, Yoshino F, Kobayashi K, Miyamoto C, Kato Y., Hata R, Lee M-C: Reactive oxygen species reduce the production of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. The EMBO Meeting, Nice, France, 2012. 9. 22-25.

10. Miyamoto C., Maehata Y, Ozawa S., Ikoma T., Hata R, Lee M-C: ROCK Inhibitor fasudil suppresses growth of fibrosarcoma by stimulating secretion of chemokine CXCL14/BRAK. The EMBO Meeting, Nice, France. 2012. 9. 22-25.

11. Hata R, Izukuri K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of chemokine BRAK/CXCL14 suppresses tumor growth and metastasis NK cell dependently and increases survival rate of tumor-bearing mice. 9<sup>th</sup> AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Maui, Hawaii, USA, 2013. 2. 21-24.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

特開2012-12330「癌転移抑制剤および医薬組成物」

○取得状況(計1件)

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



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：2012年4月1日～2013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：

昨年度に引き続き、Pimキナーゼ阻害剤を合成し *in vitro* 評価を進めた。Pim3 が高発現しているヒト膵臓がん細胞株の増殖を  $IC_{50}$  値 0.5  $\mu$ M以下で抑制する化合物を見出した。

研究分野：がん分子標的治療

キーワード：Pim1 キナーゼ、Pim3 キナーゼ、膵臓がん

### 1. 研究開始当初の背景

Pim1 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 Pim3 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。また本研究開始現時点で臨床試験段階にある薬剤はない (2012年に入ってから AstraZeneca が AZD-1208, Novartis が LGH-447 でそれぞれ Phase I を開始した)。

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、Pim3 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 Pim1 および Pim3 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 Pim1 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 Pim3 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 Pim1、Pim3、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。
- ④Pim3 阻害活性を有する化合物について L3.6pl、MiaPaca-2、PANC-1 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  $IC_{50}$  を決定する。

### 4. 研究成果

新規に合成した 77 化合物について Pim3 阻害活性を測定した。  $IC_{50}$  値は 0.5 nM から 2000 nM 超であった。構造最適化上キーとなる化合物についてはキナーゼプロファイリング (450 種以上のキナーゼについて 5 化合物)、 *in vitro* ADMET 試験 (溶解性、CYP 阻害、ミクロゾーム代謝安定性、経口吸収性、h ERG

阻害などについて9化合物)を行った。またPim3 阻害活性が良好であった11化合物についてヒト膵臓がん細胞株L3.6pl、MiaPaca-2、PANC-1 に対する細胞増殖抑制を調べた。2化合物が3種の細胞についてIC<sub>50</sub>値0.5μM以下の強い活性を示した。

今後は、化合物の最適化合成をさらに進めるとともに、細胞増殖抑制試験で活性の強かった上記化合物についてvivoでの投与方法を詳細に検討し、膵臓がん治療薬の開発に向けて、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1件)

1. Hirofumi Nakano, Nae Saito, Lorien Parker, Yukio Tada, Masanao Abe, Keiko Tsuganezawa, Shigeyuki Yokoyama, Akiko Tanaka, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, and Tetsuo Nagano

Rational evolution of a novel type of potent and selective PIM1 kinase inhibitor from a screening-hit compound. J. Med. Chem., 55 (11), 5151-5164 (2012).

[学会発表] (計2件)

1. Hirofumi Nakano, Nae Saito, Lorien Parker, Yukio Tada, Masanao Abe, Keiko Tsuganezawa, Shigeyuki Yokoyama, Akiko Tanaka, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano

DISCOVERY OF A POTENT AND SELECTIVE PIM1 INHIBITOR BY RATIONAL COMPOUND EVOLUTION  
EFMC-ISMIC 2012 (ベルリン、2012年9月)

2. Shingo Kondo, Junko Mitsuhashi, Kazuhiko Katayama, Kohji Noguchi, Hirofumi Nakano, Takayoshi Okabe, Yoshikazu Sugimoto

Antitumor activity of a new Pim kinase inhibitor

第71回日本癌学会学術総会(札幌市、2012年9月)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

WO 2011/136319 「抗がん剤」

EP2565192 “ANTICANCER AGENT”

○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

特任講師 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

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：抗がん剤において産生誘導されるケモカインの同定と病態生理学的役割の解析

研究代表者：福井大学医学部 教授 中本安成

研究成果の概要：

複数の抗がん剤を担がんマウスに投与すると、がん組織への白血球浸潤・免疫反応の増強が認められることが報告されている。しかし、その分子・細胞レベルでの機構については未だ不明な点が多い。一方で、多くの抗がん剤が、腫瘍細胞によるケモカイン産生を *vitro* では誘導することも報告されている。しかしながら、腫瘍細胞によって産生されるケモカインが生体内での腫瘍への免疫反応の成立に果たしている役割を解明することを目的とした。抗がん剤によって特異的腫瘍免疫反応が誘導される条件を検討し、オキサリプラチンによって特異的腫瘍免疫反応が誘導される可能性を示す結果を得られた。今後抗がん剤による特異的腫瘍免疫反応が誘導される条件の最適化を図るとともに、特異的腫瘍免疫反応の成立に関与しているケモカインの同定と機能解析を行う予定である。

研究分野： がんの微小環境

キーワード：オキサリプラチン、腫瘍免疫、白血球浸潤、ケモカイン

#### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の中本と担当教員の向田とは従来から共同研究を行い、自殺遺伝子治療法やラジオ波照射療法にて、壊死に陥った腫瘍細胞がケモカイン CCL3 を産生することによって、腫瘍特異的免疫反応が生じる可能性を示す結果を論文報告している。

複数の抗がん剤を担がんマウスに投与すると、がん組織への白血球浸潤・免疫反応の増強が認められることが報告されている。しかし、その分子・細胞レベルでの機構については未だ不明な点が多い。

一方で、多くの抗がん剤が、腫瘍細胞によるケモカイン産生を *vitro* では誘導することも報告されている。しかしながら、このように腫瘍細胞によって産生されるケモカインが、生体内での腫瘍への白血球浸潤・免疫反応の成立に果たしている役割についてはほとんど解明されていない。本研究計画ではこの点の解明を目指す。

#### 2. 研究の目的

種々の抗がん剤にて処置した腫瘍細胞を正常マウスに投与し、**Rechallenge** した際に拒絶される条件を同定する。拒絶が生じる条件下で産生が誘導されるケモカインの機能解析を行うことによって、抗がん剤による免疫賦活過程に重要な役割を果たしているケモカインを標的とした抗がん治療法の開発

を最終的に目指す。

#### 3. 研究の方法

1)卵白アルブミン抗原(OVA)と EGFP を発現するレトロウイルスベクター(pLEGFP-N1)をエコトロピックパッケージング細胞(Phoenix)にトランスフェクトし、得られたウイルス粒子を Polybrene 存在下にマウス肝がん細胞株(BNL 1ME A.7.R.1、以下 BNL)に感染させ、安定的に OVA を発現する BNL 細胞株(BNL-OVA)を作成する。

2)セリン/スレオニン・キナーゼ活性を保有する原がん遺伝子 Pim-3 の発現を BNL 細胞株で確認し、Pim-3 を阻害する置換フェナントレン化合物 T-26 で処置した際の細胞死の状態と免疫原性を評価する。

3)抗がん化学物質であるオキサリプラチン(OXA)、シクロホスファミド(CTX)および T-26 で処置した BNL 細胞を Balb/c マウス側腹部の皮下に接種し、7 日後に対側の腹部に BNL 細胞を皮下注射することで、抗がん剤治療によるがん細胞の免疫原性を確認する。

#### 4. 研究成果

1)安定的に OVA を発現する BNL-OVA 細胞株を作成し、蛍光顕微鏡下および RT-PCR で EGFP、OVA の発現を確認した。今後、当細胞株を抗がん剤投与時の抗原特異的な免疫応答の判定に利用する予定である。

2)BNL 細胞株において RT-PCR で Pim-3 の発現を確認した。BNL 細胞に対し in vitro で 50~100 $\mu$ M の T-26 で処置した際に、顕著なアポトーシスを認めた。しかしながら T-26 で処置した BNL 細胞の皮下接種を行った Balb/c マウスでは、再度の BNL 細胞接種においてワクチン効果を認めなかった。

3)OXA で処置した BNL 細胞の接種において、弱いワクチン効果を確認した。強力なアポトーシスを誘導する T-26 の併用下で、ワクチン効果の増強が見られるか確認中である。また、担がんマウスに対する CTX 投与時の免疫誘導効果も確認中であり、ともに効果が見られれば、種々のケモカインとの関連を明らかにする予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. 内藤 達志、根本 朋幸、森瀬 涼子、里見 聡子、大谷 昌弘、須藤 弘之、山崎 幸直、中本 安成。当院におけるB型肝炎再活性化の現状とガイドラインの運用に関する検討 第48回日本肝臓病学会総会 (金沢) 2012年6月7日

2. 内藤達志、根本朋幸、松田秀岳、大谷昌弘、須藤弘之、中本安成。 当院における治療法によるB型肝炎再活性化の検討 第16回日本肝臓病学会大会 (神戸) 2012年10月11日

3. Tatsushi Naito, Tomoyuki Nemoto, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Hiroyuki Suto, Yasunari Nakamoto. High incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies 第63回米国肝臓病学会議(The 63<sup>rd</sup> annual meeting of AASLD) (ボストン) 2012年11月10日

4. 内藤達志、根本朋幸、松田秀岳、大谷昌弘、須藤弘之、中本安成。 当院における治療法別のB型肝炎再活性化の現状 第99回消化器病学会総会 (鹿児島) 2013年3月23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]

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

福井大学医学部・教授 中本安成

(2)研究分担者

福井大学医学研究科・大学院生 内藤達志

(3)本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：皮膚発がんにおける骨髄由来細胞とケモカインの包括的役割解析

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：

種々の臓器において炎症反応の遷延化，すなわち慢性炎症が発癌において重要なステップであることが知られており，皮膚発がんにおいても同様である．そこで，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/200µl 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．また，マクロファージおよびT細胞浸潤も KO マウスで有意に減少していたが，CX3CL1-CX3CR1 シグナルがマクロファージおよびT細胞浸潤に密接に関連し，皮膚発がんにおける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：骨髄由来細胞，ケモカイン，皮膚発癌

### 1. 研究開始当初の背景

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，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，サイトカイン・ケモカインによる炎症性シグナルの活性化が，がんの発症・進展に関与している．

皮膚は物理的または化学的刺激に対して恒常性を維持するために，その機能は多義に亘っている．特に皮膚組織の機能的・構造的破綻は「創傷」と呼ばれるが，創傷を受けた組織では，破壊された組織・細胞などに対し，修復過程，すなわち Wound healing (創傷治癒) が起こる．しかしながら，慢性炎症のように皮膚組織に対する刺激が継続することは正常な創傷治癒機構を破綻させ，その結果として皮膚組織のがん化が生じる．創傷治癒過程における微小環境と癌の微小環境は，白血球浸潤や線維芽細胞の増殖，血管新生など共通点が多い．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．そこで，遺伝子欠損マウスを用いて慢性炎症による皮膚発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．

### 2. 研究の目的

申請者らは既に平成 23 年度において，ケ

モカインレセプターの CX3CR1 遺伝子欠損マウスでは皮膚発がんが有意に減弱していたことから，皮膚発がんにおけるケモカインシグナルの重要性を示唆する結果を得ている．これらの研究をさらに発展させ，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 CX3CR1 遺伝子欠損マウスを用いた．

#### 2) 二段階皮膚発がんモデル

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

#### 3) 腫瘍形成

23 年度において CX3CR1 遺伝子欠損マウスでは，皮膚発がんが有意に減弱していたことから，皮膚発がんにおける CX3CR1 陽性細胞の同定およびその由来について骨髄キメラマウスを樹立して，がん幹細胞との関連について検討を行う．



4) 病理組織学および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、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た。また、CX3CL1, CX3CR1, マクロファージ, Tリンパ球, および新生血管を免疫組織化学的に検索した「

5) 遺伝子発現検索

背部皮膚を採取し、リアルタイム RT-PCR 法で遺伝子発現を検索した。

4. 研究成果

1) 野生型マウスにおいて TPA 塗布 2 および 10 週後において、皮膚における CX3CL1 および CX3CR1 の遺伝子発現が有意に上昇していた (図 1)。また、2 重蛍光免疫染色によって、マクロファージが CX3CL1 および CX3CR1 の発現細胞であった。また、CX3CR1 は T 細胞とマクロファージにも発現が認められた (図 2)

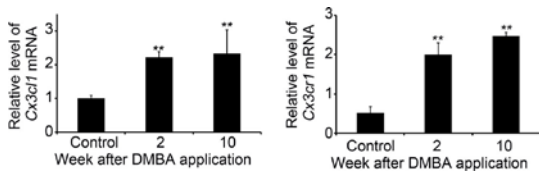


図 1

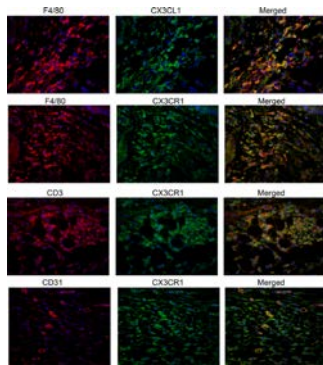


図 2

2) WT マウスでは、乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から観察され、20 週目では薬 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 (図 3)。

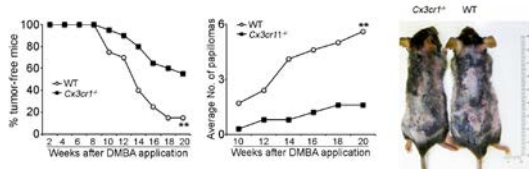


図 3

3) 病理組織学的に WT マウスでは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 (図 4)。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、KO マウスでは、マクロファージ、リンパ球ともに有意に減弱していた。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 (図 5)。

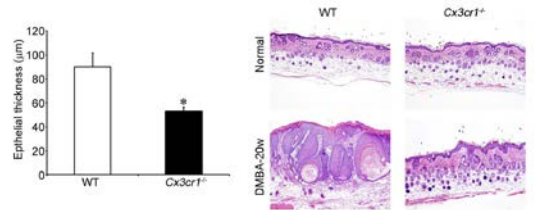


図 4

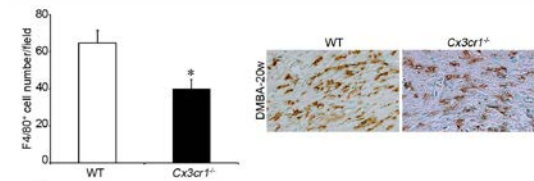


図 5

4) 皮膚局所における CXCL1, CXCL2, IL-1β, IL-6, TNFα 及び COX-2 の遺伝子発現が KO マウスで減弱していた (図 6)。

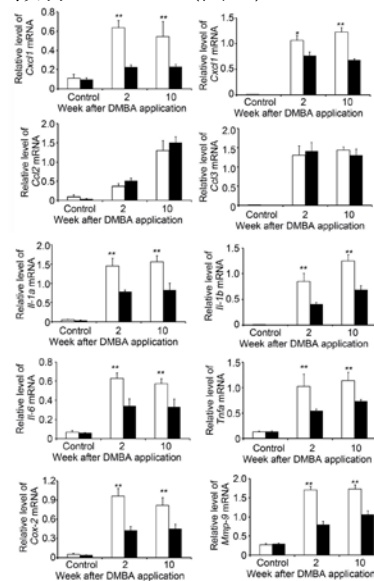


図 6

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. 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. Kimura A, Ishida Y, Inagaki M, Nakamura Y, Sanke T, Mukaida N, Kondo T. Interferon- $\gamma$  is protective in cisplatin-induced renal injury by enhancing autophagic flux. Kidney Int, 82:1093-104. 2012
3. Lu P, Li L, Liu G, Baba T, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T, Zhang X, Mukaida N. Critical role of TNF- $\alpha$ -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 53:3516-26. 2012

[学会発表] (計 3 件)

1. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Essential role of CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibocyte infiltration. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Geneva, 2012.9
2. Kondo T, Ishida Y, Mukaida N. Pathophysiological roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chemical-induced skin carcinogenesis. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012.9
3. Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of TNF-Rp55 Impairs Thrombus Resolution through Reduced Expression of MMPs and uPA. 45th Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology, Maui, 2012.10

[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法医学教室・教授  
近藤稔和

(2) 研究分担者

和歌山県立医科大学法医学教室・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



対象研究テーマ：細胞死の分子機構と死細胞による炎症誘導機構に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：BCGの抗癌活性発現における炎症反応および免疫応答の分子基盤の確立

研究代表者：琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授 松崎吾朗

#### 研究成果の概要：

膀胱がんに対する BCG 療法の作用機序に関する動物モデルの研究により、抗癌作用には炎症性サイトカインとして知られる Interleukin (IL)-17A の発現が必須であり、また非典型的な T 細胞である TCR  $\gamma\delta$ 型 T 細胞が IL-17A 産生細胞として重要である。しかし、BCG 抗癌療法における IL-17A の誘導機序、ならびに IL-17A により誘導される抗腫瘍効果の発現機序について詳細は不明であった。BCG 療法において IL-17A 依存的に発現される遺伝子プロファイルを解析するため、BCG 接種した IL-17A 遺伝子欠損マウスを用いた DNA マイクロアレイ法による網羅的な発現解析を行った。現在、得られた解析データを詳細に検証しているところであるが、炎症局所へのエフェクター細胞の動員に関するケモカインの発現や組織を構築している細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)類の発現レベルが IL-17A 依存的に変動している可能性が示唆されている。

研究分野：腫瘍免疫、膀胱がん、BCG 療法

キーワード：膀胱がん、IL-17A、遺伝子発現解析

#### 1. 研究開始当初の背景

*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG)製剤の膀胱内注入療法が膀胱癌、特に上皮内癌に対する治療として好成績を挙げている。しかしながら、BCG 膀胱内注入療法は血尿や発熱などの副作用が高頻度で認められ、また免疫不全状態の患者では BCG の全身感染の恐れもあるため、BCG 生菌を用いず副作用の少ない製剤の開発が必要である。BCG 療法を基盤として次世代の抗癌療法を開発するためには、BCG に対する炎症および免疫応答の分子基盤を解明することが重要である。

膀胱がんに対する BCG 療法の作用機序を検証するための動物モデルの解析より、抗癌作用には炎症性サイトカインの一つである IL-17A が必要であり、それを産生する細胞が非典型的な T 細胞亜集団である TCR  $\gamma\delta$ 型 T 細胞であることが報告された。しかし、BCG 抗癌療法における IL-17A の誘導、ならびに IL-17A により誘導される抗腫瘍効果の発現機序は未だ不明瞭である。これらの点を解明することは、BCG 療法の副作用を軽減しつつより効果の高い治療法を開発するために重要な情報となる。

#### 2. 研究の目的

本研究では、Fas-FasL 相互作用に誘発される

炎症反応と BCG に対する免疫応答の共通事項を考慮しつつ、膀胱がんに対する BCG 製剤の膀胱注による膀胱癌治療の免疫学的作用機序を明らかにし、さらに副作用の少ない製剤を開発するための基盤的研究である。本研究では、マウスの粘膜臓器における BCG 製剤に対する反応を、網羅的遺伝子プロファイリングにより解析することを目的とした。その結果から BCG 製剤による抗癌活性の本質が解明されるものと期待される。また、その情報を基に抗癌活性に必須な反応系を残しながら副作用を示さない製剤の要件を明らかにすることにより、新規の抗膀胱癌製剤の開発を促進することが可能な点で、本研究は今後の癌治療の開発に貢献するものと期待される。

#### 3. 研究の方法

基本的な研究システムとして、マウスに BCG 製剤を接種したのちに認められる遺伝子発現プロファイルの変化について DNA マイクロアレイによる発現解析により検討した。モデル動物として、野生型 C57BL/6 マウスおよび IL-17A 遺伝子欠損(KO)マウスを用いた。BCG 製剤を経気道接種した後 14 日目および 28 日目に肺組織から total RNA を精製した。バイオアナライザで品質チェックした RNA を用い、Cyanine3 のラベル化

(1色法)、ハイブリダイゼーションを行った後、マイクロアレイをスキャニングし、データを抽出した。データ解析は Gene Spring GX (Agilent Technologies)を用いた。

同時に DNA マイクロアレイ解析に用いるサンプル(肺組織)はパラフィン切片を作製し H&E 染色で組織病理学的解析すると共に、BCG 接種により誘導される既知の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法で標的遺伝子の発現レベルを調べた。

#### 4. 研究成果

今回、マウスへの BCG 勝注の技術移転が困難であったため、BCG 注入した膀胱と同じ応答が起こると論理的に推定される粘膜臓器として、肺組織への BCG 注入を新たなモデルとして利用することとした。その根拠として、BCG 製剤の膀胱注および経気管内注入では、ともに IL-17A を発現する TCR  $\gamma\delta$  型 T 細胞が早期から誘導され、IL-17A が好中球誘導による炎症誘導に必須であることが挙げられる。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果より、BCG 接種局所へのエフェクター細胞の動員に参与するケモカインレセプターとして、CCR5、CCR8、CCR9、CXCR6などがIL-17A 依存的に発現上昇していることが明らかになった。また、エフェクター細胞が局所に速やかに浸潤するには、コラーゲンをはじめとする細胞周辺の細胞外基質(extracellular matrix, ECM)の分解が必要であり、そこに参与するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のうち、MMP-2やMMP-9の活性化を誘導するMMP-13の発現レベルの上昇がIL-17A KOマウスでは認められなかった。その他のBCG製剤によるIL-17A 依存的な遺伝子発現の変化は現在解析中である。

一方、同時に採取した肺組織の組織病理所見の比較では、BCG 製剤接種により形成されるマクロファージ集簇を取り囲むリンパ球浸潤、すなわち肉芽腫形成、の不全がIL-17A KOマウスで認められ、これはDNA マイクロアレイの解析結果から導き出せる現象に相関するものと考えられた。さらに、エフェクターT細胞の走化性に参与するケモカインとして CXCL9/MIG、CXCL10/IP10、CXCL11/I-TACなどの発現もIL-17A 依存的である可能性が示唆された。

今後、今回得られた結果からIL-17A 依存性抗癌メカニズムに参与する遺伝子候補を抽出することにより、その情報を活用して、有効かつ副作用の少ない膀胱癌治療製剤が開発できるものと期待している。

#### 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0件)

現在、論文執筆中

[学会発表](計5件)

1. 梅村正幸, 岡本祐子, 矢作綾野, 當山清悟, 安田直子, 松崎吾朗「マイコバクテリア感染肺におけるインターロイキン(IL)-17A 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明」(第 82 回実験結核研究会, 広島 (2012/05/09))
2. 梅村正幸, 當山清悟, 岡本祐子, 矢作綾野, 安田直子, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗「結核菌に対する感染防御におけるIL-17Fの関与」(第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 神戸商工会議所, 神戸市, 2012/06/21~22)
3. 梅村正幸, 當山清悟, 岡本祐子, 矢作綾野, 安田直子, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗「結核菌感染肺におけるIL-17Fの防御能」(第 23 回日本生体防御学会学術総会, 東京 (2012/07/09~11))
4. Umemura M., Touyama S., Fukui M., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G.「Role of IL-17F in chronic pulmonary mycobacterial infection」(第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸市, 2012/12/05~08)
5. Umemura M., Touyama S., Fukui M., Yoshida-Okamoto Y., Yahagi A., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G.「Role of IL-17F in protective immunity at earlier stage of chronic pulmonary mycobacterial infection」(第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 2013/03/18~20)

[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

琉球大学熱帯生物圏研究センター・教授  
松崎吾朗

(2) 研究分担者

琉球大学熱帯生物圏研究センター・准教授  
梅村正幸  
琉球大学熱帯生物圏研究センター・研究員  
福井雅之

(3) 本研究所担当者

免疫炎症制御・教授 須田貴司

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・創薬研究

研究期間:2012年4月1日～2013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—X線構造を基盤とした最適化研究

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・ベンゼン誘導体複合体のX線構造に基づき、辺縁に正電荷及び負電荷を有するサブポケット(S2)を狙ったStructure-Based Drug Design (SBDD)を行ったが、活性向上には至らなかった。このことはS2サブポケットを埋めるだけでは活性向上が難しいことを示唆している。そこで、HGFβ-Metの相互作用に関わる他のサブポケット(S1, S1')を同時に阻害するペプチド性化合物を分子モデリングにより設計した。これらの化合物は弱いながら阻害活性を示した。今後、エントロピーロスを最小限にするためにコンホメーションを分子内で固定化した化合物を設計して高活性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:HGF、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療・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(金沢大学がん進展制御研究所)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(金沢大学がん進展制御研究所)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

本研究グループは、これまでのがん研究所との共同研究の成果(平成20年度～23年度)として、また、独立法人医薬基盤研究所から保健医療分野における基礎研究推進事業(平成18年度～22年度)として支援を受け、HGF-Met系の活性化の分子機構に基づいてシグナル伝達を阻害する化合物創出に成功している。HGF(N-K1-K2-K3-K4-β鎖の各ドメインから成る)は、Metの細胞外ドメインと特有の幾何学的配置をもったヘテロ4量体を形成することで、細胞内キナーゼドメインが自己リン酸化し活性化する。細胞外で活性4量体を形成するには、①NK1-NK1相互作用、②NK1-Met相互作用、③HGFβ鎖-Met相互作用のすべてが必須である。我々は、タンパク質と結晶構造解析技術、インシリコ創薬技術などを利用することによって、結合力の最も弱い③を遮断するHGFアンタゴニスト化合物を探索し、がん細胞の浸潤機能を抑制する化合物を複数個得ている。さらにこ

れら化合物はイレッサ耐性に対して緩和傾向を示した。シード化合物の1つと HGFβ 鎖の X 線構造解析に基づいた Structure-Based Drug Design (SBDD) を行い、ベンゼン誘導体の最適化を図った。さらに、これまで手つかずであったサブサイトを利用した SBDD 最適化研究を進めて、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-ベンゼン誘導体複合体の立体構造に基づいて HGFβ 鎖-Met 相互作用面のうち S2 サブサイトに作用するベンゼン誘導体を設計、合成した。さらに HGFβ-Met 複合体の立体構造に基づいて分子モデリングを行い、S1, S1' 及び S2 サブサイト (図1) に同時に作用するペプチド化合物を設計、合成した。得られた誘導体及び化合物は 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。

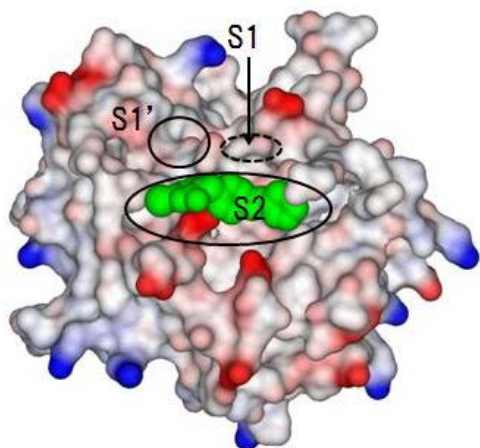


図1 HGFβのサブサイト

### 4. 研究成果

辺縁に正電荷及び負電荷を有するサブポケット (S2) を狙った Structure-Based Drug Design を行ったが、活性向上には至らなかった。このことから、S2 サブポケットを埋めるだけでは阻害活性を向上することができないことが示唆された。そこで、HGFβ-Met の相互作用に関わる他のサブポケット (S1, S1') を同時に阻害するペプチド性化合物を設計したが、これらは弱いながら阻害活性を示した。ペプチド性化合物は相互作用エネルギーを得ているが、コンホメーションに関連するエントロピーロスが想定以上に大きくなったと考えられる。今後、エントロピーロスを最小限化するためにコンホメーションを分子内で固定化した化合物を設計して高活性 HGF アンタゴニストの創出を目指す。

### 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 5 件)

1. Y. Takashima, E. Mizohata, S.R. Krungkrai, Y. Fukunishi, T. Kinoshita, T. Sakata, H. Matsumura, J. Krungkrai, T. Horii, T. Inoue, The in silico screening and X-ray structure analysis and the inhibitor complex of *Plasmodium falciparum* orotidine-5'-monophosphate decarboxylase, *J. Biochem.* **152**,133-138 (2012).
2. T. Matsumoto, T. Kinoshita, H. Furukawa, R. Nakai, Y. Kirii, K. Yokota, T. Tada, Crystal structure of non-phosphorylated MAP2K6 in a putative auto-inhibition state, *J. Biochem.* **151**, 541-549 (2012).
3. T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada, A. Yamano, Crystal and solution structures disclose a putative transient state of mitogen-activated kinase kinase 4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 195-200 (2012).
4. T. Nakaniwa, H. Fukada, T. Inoue, M. Gouda, R. Nakai, Y. Kirii, M. Adachi, T. Tamada, S. Segawa, R. Kuroki, T. Tada, T. Kinoshita, Seven cysteine-deficient mutants depict interplay between thermal and chemical stabilities of individual cysteine residues in MAP kinase JNK1, *Biochemistry* **51**, 8410-8421 (2012).

[学会発表] (計 8 件)

1. Binding energy estimation of CK2 inhibitors by the *ab initio*-based fragment molecular orbital method, T. Kure, S. Nakamura, M. Kanemitsu, K. Murata, K. Kitaura, T. Kinoshita, Z. Hou, Y. Suzuki, H. Ohno, S. Oishi, N. Fujii, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, I. Nakanishi, 22nd International Medicinal Chemistry Symposium, (Berlin, 2012)
2. Crystal and solution structures disclose a transient state of non-phosphorylated MAP2K4, T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada, A. Yamano, Asian Crystallographic Association 2012 conference AsCA12/CRYSTAL28, (Adelaide, 2012)
3. 「アザインドール骨格またはフェニルアゾール骨格を有する新規プロテインキナーゼ CK2 阻害剤の開発研究」 侯 増燁, 大石真也, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 村田克美, 北浦和夫, 平澤 明, 辻本豪三, 大野浩章, 藤井信孝, 仲西功, 中村真也, 呉竜英, 木下 豊, 第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム (2012 年)

4. 「X線小角散乱を利用したタンパク質構造変化の視覚化」松本崇, 木下誉富, 山崎優, 中島良介, 多田俊治, 山口明人, 山野昭人, 第12回日本蛋白質科学会年会(2012年)
5. 「ヒトMAPキナーゼJNK1におけるシステイン残基の化学的安定性および熱安定性への関与」仲庭哲津子, 深田はるみ, 合田正貴, 中井良子, 桐井康行, 安達基泰, 玉田太郎, 黒木良太, 瀬川新一, 木下誉富, 第12回日本蛋白質科学会年会(2012年)
6. 「フェニルアゾール骨格を有する新規プロテインキナーゼCK2阻害剤の開発」侯増輝, 大石真也, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 村田克美, 北浦和夫, 平澤明, 辻本豪三, 大野浩章, 仲西功, 中村真也, 呉竜英, 木下誉富, 藤井信孝, 第42回複素環化学討論会(2012年)
7. 「非経験的フラグメント分子軌道法を活用した高活性Protein Kinase CK2阻害剤の設計」呉竜英, 侯増輝, 木下誉富, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 中村真也, 大野浩章, 村田克美, 北浦和夫, 平澤明, 大石真也, 藤井信孝, 仲西功, 第40回構造活性相関シンポジウム(2012年)
8. 「受容体チロシンキナーゼFGFR3のX線結晶構造解析」藤井翔太, 力津朗, 桐井康行, 合田正貴, 多田俊治, 木下誉富, 平成24年度日本結晶学会年会(2012年)

[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. 構造生物学と創薬、木下誉富、第3回和漢研・がん研ジョイントセミナー「アカデミア創薬の心・技・体」(2013年2月、金沢)

#### 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

なし

##### (3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫



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・創薬研究

研究期間:2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目:Ror1チロシンキナーゼ-Met相互作用を介した肺がん分子標的薬耐性の新規機構の研究

研究代表者:神戸大学大学院医学研究科 准教授 西田 満

研究成果の概要:

肺腺がんの治療において上皮成長因子受容体EGFRに変異が認められるケースではEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるゲフィチニブが奏効する。しかしその多くは薬剤耐性を獲得し1年程度で再発するため、耐性獲得メカニズムの完全な解明が急務である。耐性機構には、がん細胞における*Met*の増幅、また、がん細胞自身や間質の線維芽細胞が産生するHGFによるHGF-Metシグナルの活性化などが関わっていることが明らかになっている。本研究では、肺腺がん細胞のHGF-Metシグナルによるゲフィチニブ耐性化における受容体型チロシンキナーゼRor1の役割について検討した。その結果、Ror1がHGFによるゲフィチニブ耐性化において、細胞増殖に重要なErkの活性化に関与していることを見出した。さらに、Ror1と*Met*が結合することも見出した。

研究分野:腫瘍生物学

キーワード:薬剤耐性、肺がん、HGF-Met、Ror1

### 1. 研究開始当初の背景

*EGFR* 遺伝子に活性型変異を有する肺腺がんに対して、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)であるゲフィチニブやエルロチニブが奏効する。しかし、EGFR活性型変異を有する肺腺がんであってもEGFR-TKIに自然耐性を示す症例があることや、奏効した症例もほぼ例外なく耐性を獲得することから、EGFR-TKIに対する耐性機構の解明と耐性の克服が臨床的にも重要な課題となっている。耐性機構には、がん細胞における*EGFR*の二次的変異や*Met*の増幅、また、がん細胞自身や間質の線維芽細胞が産生するHGFによるHGF-Metシグナルの活性化が関わっていることが明らかになっている。*Met*増幅とHGF-Metシグナルの活性化は、共にPI3K/Akt経路を活性化することで耐性を獲得させる。しかし、前者はErbB3の活性化を介するが、後者はErbB3を介さずにPI3K/Akt経路を活性化することから、*Met*から下流へのシグナル伝達機構は両者の間で異なると考えられている。

HGFは、その $\alpha$ 鎖に*Met*との結合に重要な4個のクリングルドメインを有する。Rorファミリーは細胞外領域にクリングルドメインを有する唯一の受容体型チロシンキナーゼであるが、我々は世界に先駆けてマウスRor1、Ror2を同定し、ノックアウトマウス等の解析からRor1、Ror2がWnt5a受容体として

non-canonical ( $\beta$ -catenin非依存的)Wntシグナルを活性化し、肺、心臓、骨・軟骨系等の発生に必須な役割を担っていることを明らかにしてきた(Minami et al., Dev. Dyn. 2010)。また、Ror1、Ror2はがん関連遺伝子産物としても機能し、諸種のがんにおけるRor1、Ror2またはWnt5aの過剰発現に伴うRorを介するシグナルの恒常的活性化が、がんの増悪過程と密接に関係することを見出している(Nishita et al., Trends Cell Biol. 2010)。特に、難治性トリプルネガティブ乳がん細胞株においては、Ror1が過剰発現しておりPI3K/Akt経路の活性化を介した細胞の生存・増殖に関与することを見出している(未発表)。さらに、*Met*の増幅が認められる肺腺がんや胃がんの細胞において、Ror1が*Met*にリン酸化されることで細胞増殖に関与することが最近報告された(Gentile et al., Cancer Res. 2011)。しかしながら、Ror1と*Met*の相互作用が、どのようにして細胞内シグナル伝達系を活性化し、細胞増殖を引き起こすのかは明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、培養肺腺がん細胞を用いて、HGF-MetシグナルとRor1の相互作用による細胞増殖の制御機構と、そのEGFR-TKI耐性化における役割を明らかにすることを目的と

する。本研究により得られる知見は、*Met* の増幅や HGF-Met シグナルの活性化による肺腺がんの薬剤耐性のメカニズムを解き明かし、EGFR-TKI の適応をより明確に判定するための検査方法や、薬剤耐性を克服するための新たな治療方法の確立に貢献する。

### 3. 研究の方法

ヒト肺腺がん細胞株である HCC827 細胞に *Ror1* siRNA をトランスフェクションすることによって *Ror1* の発現を抑制した。HGF とゲフィチニブを単独もしくは両方同時に処理した細胞を溶解し、Western blotting によって各種タンパク質の発現やリン酸化レベルの解析を行った。*Ror1* と *Met* の相互作用は抗 *Ror1* 抗体を用いた共免疫沈降によって解析した。また、*Ror1* における *Met* 結合部位を明らかにするため、COS7 細胞に Flag タグを付加した各種 *Ror1* 変異体および野生型 *Met* を強制発現させ、抗 Flag タグ抗体を用いて共沈免疫沈降実験を行った。

### 4. 研究成果

ゲフィチニブ感受性である HCC827 肺腺がん細胞株を HGF 処理することにより、ゲフィチニブ耐性を誘導することができる。また私たちは HCC827 を含む複数の肺腺がん細胞株において *Ror1* の発現を確認している。そこで、HCC827 細胞を用いて *Ror1* の発現を抑制した後 HGF およびゲフィチニブ処理を行い、各種シグナル伝達因子のリン酸化動態を解析した。その結果、*Ror1* の発現抑制処理に関わらず、ゲフィチニブは EGFR とそれと共役する ErbB3、また細胞増殖・生存に重要な Erk および Akt のリン酸化を阻害した。また、コントロール siRNA を導入した細胞において、HGF はゲフィチニブ添加による EGFR と ErbB3 のリン酸化阻害には影響を与えず、Erk および Akt のリン酸化阻害を解除した。この結果は、HGF がゲフィチニブ存在下で増殖・生存シグナルを活性化しうること、すなわちゲフィチニブ耐性を誘導したことを意味している。一方、*Ror1* siRNA を導入した細胞においては、ゲフィチニブ添加による Erk のリン酸化阻害は HGF を同時添加しても完全には解除されなかった。したがって、*Ror1* が HGF によるゲフィチニブ耐性化において、Erk の活性化を介して細胞増殖に関与していることが示唆された。

HGF 受容体である *Met* は ErbB3 をリン酸化し、ErbB3-Erk/Akt 経路を活性化することによりゲフィチニブ耐性を誘導することが知られている。しかし、HGF はゲフィチニブ存在下で ErbB3 のリン酸化を誘導しなかったことから、HGF-Met は ErbB3 非依存的に Erk/Akt を活性化していると考えられる。そこで、*Met* が *Ror1* に結合しうるかを調べるた

め共沈実験を行った。HCC827 細胞において内在性の *Ror1* を免疫沈降した結果、内在性の *Met* の共沈が検出され、さらに HGF 刺激によって *Met* の共沈量が増加した。したがって、*Met* と *Ror1* は結合し、HGF 刺激に伴いその結合が増強することが示された。次に *Met* と *Ror1* の結合に *Ror1* のキナーゼ活性が必要か、また *Met* が *Ror1* のどのドメインに結合するかを検討するために *Ror1*DK および各種欠失変異体を用いて解析を行った。その結果、*Ror1* の DK および細胞内領域を全て欠失させた Tc 変異体において *Met* が結合したことから、*Met* との結合に *Ror1* のキナーゼ活性や細胞内領域は必要ではないことが明らかになった。現在、これらの結果を踏まえ、HGF-Met シグナルと *Ror1* シグナルの相互作用による細胞増殖の制御機構と、その EGFR-TKI 耐性化における役割について解析を行っている。

### 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 4 件)

1. Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., and Minami, Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells*, 2013, in press.
2. Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., and Takahashi, N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat. Med.* 18: 405-412, 2012
3. Endo, M., Doi, R., Nishita, M., and Minami, Y. Ror family receptor tyrosine kinases regulate the maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. *J. Cell Sci.* 125: 2017-2029, 2012.
4. Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., and Minami, Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 Signaling Leading to Matrix Metalloproteinase (MMP-13) Expression. *J. Biol. Chem.* 287:



1588-1599, 2012.

[学会発表] (計1件)

1. 西田満、喬森、宮本真里、山田真紀子、大谷浩、Christine Hartmann、西中村隆一、南康博「マウス腎臓発生におけるWnt5a-Ror2 シグナルの役割」日本分子生物学会年会、2012年12月(福岡)

[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

神戸大学大学院医学研究科・准教授  
西田 満

### (2) 研究分担者

神戸大学大学院医学研究科・教授  
南 康博

### (3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫

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:2012年4月1日~2013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がん細胞の高い増殖能の維持に寄与すると考えられている。がん細胞の増殖における Mnk1 の役割を解析するために、Mnk1 に対する miR30-mimetic shRNA を作成して培養細胞に導入し、Mnk1 の発現を効率良く抑制する系を作成した。また、Mnk1/2- DKO マウスから樹立した MEF 細胞に Mnk1 を用いて解析した結果、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。

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ERKやp38MAPキナーゼによって活性化されてeIF4Eをリン酸化する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、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や、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報告した。また最近、mTOR経路によるeIF4Gのリン酸化をMnkが負に制御することも示された。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

2つの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の治験が行なわれている。本研究の成果は、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にも繋がることを期待できる。

### 3. 研究の方法

トMnk1に対する2種類のmiR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7)を設計し、pLMP発現プラスミドに挿入した。これらをHEK293T細胞で発現させ、抗ヒトMnk1Abを用いたウェスタンブロットによりノックダウンの検討を行なった。他方、ヒトMnk1に種々の点変異や欠失変異を導入した変異体を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。

#### 4. 研究成果

がん細胞における Mnk1 の役割を解析するために、ヒト Mnk1 のノックダウンを行った。ヒト Mnk1 に対する 2 種類の miR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7) を設計し、RNA ポリメラーゼ II によって shRNA を発現するレトロウイルスベクター-pLMP を用いて HEK293T 細胞に導入してノックダウン効率を検討した。Mnk1-5 あるいは Mnk1-7 の単独でも内生 Mnk1 の発現抑制が認められたが、両者の Co-transfection がより効果的であった。現在、Tet-on 応答プロモーターを有する pTMP ベクターを利用して 2 種類の shRNA を培養細胞に導入し、誘導的に Mnk1 のノックダウンを行う系を構築している。また、Mnk1 と Mnk2 は細胞外シグナルによる活性化動態が全く異なることから、その機能相違を明らかにする目的で、Mnk2 のノックダウン系を同様に構築している。

一方、Mnk1 を強制発現させた Mn1/Mnk2 ダブルノックアウト MEF 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 レベルが急速に低下する現象を見出した。オカダ酸や Cyclosporin などの脱リン酸化阻害剤および各種の 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ではなく、Ser1105 あるいは Ser1106 残基のリン酸化によってリン酸化 Ser1108 抗体による認識が阻害されている可能性が示唆された。そこで現在、Ser1105/1106 が Mnk1 あるいは他のプロテインキナーゼによってリン酸化される可能性について検討している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Sharma, B., Joshi, S., Sassano, A., Majchrzak, B., Kaur, S., Aggarwal, P., Nabet, B., Bulic, M., Stein, B.L., McMahon, B., Baker, D. P., Fukunaga, R., Altman, J. K., Licht, J. D., Fish, E. N., and Plataniias, L. C.: Sprouty proteins are negative regulators of interferon (IFN)-signaling and IFN-inducible biological responses. *J. Biol.Chem.* 287,

42352-42360 (2012)

2. 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* 32, 190-197 (2013)
3. Gorentla, B. K., Krishna, S., Shin, J., Inoue, M., Shinohara, M. L., Grayson, J. M., Fukunaga, R., and Zhong XP: Mnk1 and 2 are dispensable for T cell development and activation but important for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*190, 1026-1037 (2013)

[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

対象研究テーマ：GSK3 $\beta$  阻害によるがん治療法の開発と臨床試験

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：GSK3 $\beta$  阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験

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：

我々は膵癌細胞で glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  の発現と活性が高く、膵癌細胞の生存と増殖に GSK 3 $\beta$  が必須であることを見出し、GSK3 $\beta$  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 $\beta$  が膵癌の新しい治療標的であることを同定した。GSK 3 $\beta$  の機能解析により、GSK3 $\beta$  が誘導するシグナルが p53 がん抑制分子経路、Rb 細胞周期制御経路、細胞不死化経路に影響する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 $\beta$  阻害剤の併用が 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 2012)。本研究では、とくに膵癌細胞の形態特性と運動能に着目して GSK3 $\beta$  の機能を多角的に解析した。膵癌培養細胞のスクラッチアッセイとトランスウェルアッセイにより、GSK3 $\beta$  阻害剤は膵癌細胞の遊走と浸潤を抑制した。また、GEM により誘導される膵癌細胞の形態変化と FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路が GSK3 $\beta$  阻害剤により抑制された。これらの基礎的解析と並行して、GSK3 $\beta$  阻害作用を有する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) を継続中である。

#### 研究分野：

キーワード：膵癌、GSK3 $\beta$ 、浸潤、TP53INP1、ゲムシタビン(GEM)

#### 1. 研究開始当初の背景

固形癌の分子標的治療薬では上皮増殖因子受容体(EGFR)の阻害剤や抗体医薬が、いくつかの癌種で良好な治療効果を示しているが、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ない。我々は最近、glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  の発現や活性の亢進に伴う病的作用が観察され、我々は GSK3 $\beta$  阻害により膵癌細胞の生存・増殖抑制のみならず、ゲムシタビン(GEM)の感受性を高めることを *in vitro* と *in vivo* で実証した。これらの予備結果から、GSK3 $\beta$  が膵癌細胞の浸潤を促進しているのではないかとという着想に至った。我々の研究と前後して GSK3 $\beta$  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 による形態変化誘導のメカニズムと GSK3 $\beta$  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因子の発現・機能解析を行ない、GEM による形態変化誘導作用機序を明らかにする。(2) この形態変化誘導因子について、GSK3 $\beta$  阻害による影響、機能解析を行い、GSK3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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、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同様の形態変化を誘導する蛋白質を発見した。

形態変化の評価は、顕微鏡による形態学的観察と、N-cadherin, E-cadherin, vimentin, ZO-1, snail など、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した。

②GSK3 $\beta$  阻害による抗がん剤誘導性形態変化の抑制メカニズムの解明

GSK3 $\beta$  阻害による形態変化抑制効果の作用機序について、小分子 GSK3 $\beta$  阻害剤や RNA 干渉法を用いて、GSK3 $\beta$  阻害による影響を検討した。

③GSK3 $\beta$  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 $\beta$  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で承認を受け、本臨床試験を開始した。

### 4. 研究成果

膵癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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。GSK3 $\beta$  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と、FAK/Rac1/MMP-2 機軸経路が抑制された

(Kitano A et al. PLoS One 2013) . これらの解析と並行して、GSK3 $\beta$  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、現在までに 4 例の症例に対して治療を行ない、治療薬の投与量の検討を行った。

### 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 7 件)

1. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. PLoS One, 8(2):e55289, 2013.
2. Nakaya N, Ishigaki Y, Nakajima H, Murakami M, Shimasaki T, Takata T, Ozaki M, Dusetti NJ, Iovanna JL, Motoo Y. Meaning of tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in the molecular mechanism of gemcitabine sensitivity, Mol Clin Oncol 1 :100-104, 2013.
3. Takata T, Ishigaki Y, Shimasaki T, Tsuchida H, Motoo Y, Hayashi A Tomosugi N. Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment *in vitro*. Oncol Rep 28: 1968-1976, 2012.
4. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of

HITS(FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. Int J Oncol, 41: 1347-1357, 2012.

5. Okada G, Watanabe H, Ohtsubo K, Mouri H, Yamaguchi Y, Motoo Y, Sawabu N. Multiple factors influencing the release of hTERT mRNA from pancreatic cancer cell lines in in vitro culture. Cell Biol Int. 36(6): 545-53, 2012.
6. Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the development of pancreatic cancer. J Carcinog. 11(1):15, 2012.
7. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 川上 和之, 上田 順彦, 友杉 直久, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. GSK3 $\beta$  標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤. 膵臓 27(3): 469, 2012.

[学会発表] (計 4 件)

1. 島崎 猛夫, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. ポスター 消化器病 膵臓(腫瘍 4): GSK3 $\beta$  標的治療を併用した膵癌の新規治療戦略と分子基盤. 第 54 回日本消化器病学会大会, (神戸, '12.10.10).
2. 島崎 猛夫, 北野 綾子, 石垣 靖人, 高田 尊信, 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)3B $\beta$ : がん浸潤に対する作用. 第 71 回日本癌学会学術総会, (札幌, '12.9.19).
3. 島崎 猛夫, 北野 綾子, 佐藤 博, 源 利成, 元雄 良治. 肝胆膵がん②: GSK3 $\beta$  の異常活性に起因する膵がん細胞の浸潤と治療抵抗性. 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会, (大阪, '12.07.28).
4. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 川上 和之, 上田 順彦, 友杉 直久, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. 主題関連セッション 切除不能膵癌 (1): GSK3 $\beta$  標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤. 第 43 回日本膵臓学会大会, (山形, '12.06.29).

[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

金沢医科大学腫瘍内科学・教授 元雄良治

### (2) 研究分担者

金沢医科大学総合医学研究所・准教授

石垣 靖人

金沢医科大学総合医学研究所・講師

島崎猛夫

金沢医科大学・大学院生 馬 少福

### (3) 本研究所担当者

腫瘍制御・教授 源 利成



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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：大腸がんの分子病理学的特性の解析と診断、治療のための分子指標の解明

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：大腸がん病態の指標となる候補分子を調べる目的で、大腸がん患者 35 症例を対象に、 $\beta$ -カテニンの新規転写標的 CRD-BP (coding region-determinant protein) の発現を、その関連分子 ( $\beta$ -TrCP1, c-myc, IGF-II, Gli-1) の発現や臨床病理学的諸因子と比較解析した。その結果、大腸がん原発巣において CRD-BP と c-myc の発現は有意に相関し、IGF-II の発現とも相関傾向があった。CRD-BP 発現の高い症例は有意にリンパ節転移の頻度が高く、病期がより進行していた。大腸癌において  $\beta$ -catenin により発現誘導される CRD-BP は、c-myc や IGF-II を介して腫瘍の増殖やリンパ行性転移に関与することにより、がん病態の分子指標になると考えられた。

研究分野：腫瘍外科学、分子腫瘍学

キーワード：大腸がん、分子病理、CRD-BP

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんの早期診断と治療が長足の進歩を遂げている現在でも、進行・再発大腸がん症例は増加し、その治療の効率化と効果の改善が課題である。そのためには、がんの分子病態の理解は重要である。

我々は 2011 年度に、大腸がん患者の組織バンクを保有する貴研究所の共同研究に採択され、腫瘍制御研究分野と連携して大腸がんにおける既知の遺伝子変異やエピジェネティック異常の解析を開始し、今回の申請課題の基盤になるデータを集積している (2011 年度研究成果報告書を参照)。

### 2. 研究の目的

この数年間に同研究分野は Wnt シグナル経路の解析を進め、がん腫-宿主境界の腫瘍環境における  $\beta$ -catenin 活性化の重要性を提唱している。そして、 $\beta$ -catenin と I $\kappa$ B $\alpha$  に共通のエピキチン連結酵素  $\beta$ -TrCP1 と、その発現を転写後に mRNA レベルで制御する  $\beta$ -catenin シグナルの新規標的分子 coding region determinant-binding protein (CRD-BP) を同定し、大腸がん細胞レベルにおける病的作用を明らかにした。CRD-BP は c-myc, IGF-II や Gli-1 などの mRNA 安定性も修飾する既知の RNA トランス因子であることから、大腸がんでは複数の主要な細胞増殖経路 (Wnt, NF- $\kappa$ B, c-Myc, hedgehog など)

を共働させ、がん病態や治療感受性に影響する可能性が考えられる。

これまでに、少数例の大腸がんや卵巣がんを対象に CRD-BP の発現解析が報告されているが、がん病態との関連は明らかではない。本研究では、大腸がん症例の腫瘍組織における CRD-BP と関連分子の発現を臨床病理学的因子と比較解析し、CRD-BP が癌病態の分子指標になるかを検討した。

### 3. 研究の方法

金沢大学がん進展制御研究所ヒトがん組織バンクに登録された大腸がん 35 例を対象とした。切除標本の腫瘍および正常粘膜の新鮮組織検体から cDNA を調製し、定量的 RT-PCR により CRD-BP、 $\beta$ -TrCP1、c-myc、IGF-II と Gli-1 の発現を測定した。これらの分子の発現解析には大腸がん細胞株 SW480 を陽性対照として使用し、各 cDNA 検体の GAPDH 発現量を対照として補正定量した。CRD-BP と各分子同士の発現および臨床病理学的因子との関係を統計学的に比較解析した。

### 4. 研究成果：

大腸がんにおいて CRD-BP と c-myc の発現は有意に強く相関し ( $p=0.0024$ )、IGF-II の発現とも相関傾向 ( $p=0.0791$ ) があった。CRD-BP と  $\beta$ TrCP1, IGF-II あるいは Gli-1 の発現には相関はみられなかった。臨床病理



学的因子との比較では、CRD-BP 発現が高い症例は有意にリンパ節転移の頻度が高く (p=0.006)、病期がより進行していた (p=0.013)。

大腸がんにおいて  $\beta$ -catenin の活性化により誘導される CRD-BP は、c-myc や IGF-II の発現を介して腫瘍の増殖やリンパ行性転移を促進すると考えられた。そして、原発腫瘍における CRD-BP の発現はリンパ節転移や病期の分子指標となることが示唆される。

今後は症例を追加して同様の解析を継続する。また、大腸がんの分子病態の理解をさらに深めるために、これらのデータと、昨年度までに得られている大腸がんの遺伝子変異やエピジェネティック異常との関連についてさらに解析を進める予定である。

#### 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 13 件)

1. M.Noguchi, M.Noguchi, Y.Nakano, Y.Ono, T.Kosaka : Axillary reverse mapping using a fluorescence imaging system in breast cancer, *J. Surg. Oncol.*, 105:229-234, 2012.

2. Katsuhito Miyazawa, Yoshitaka Takahashi, Nobuyo Morita, Manabu T Moriyama, Takeo Kosaka, Matomo Nishio, Tanihiro Yoshimoto, Koji Suzuki : Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E2 regulate the attachment of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells, *Int. J. Urol.*, 19 : 936-943, 2012.

3. T.Onishi, T.Kosaka, E.Morioka, D.Kaida, Y.Tomita, Y.Ono, M.Noguchi, H.Funaki, S.Kinami, K.Omote, Y.Nakano, N.Ueda : Low preoperative total cholesterol level predicts poor survival following curative resection in gastric cancer, *J. Kanazawa. Med. Univ.*, 37:127-131, 2012.

4. M.Noguchi, Y.Nakano, M.Noguchi, Y.Ono, T.Kosaka : Local therapy and survival in breast cancer with distant metastases, *J. Surg. Oncol.*, 105:104-110, 2012.

5. 藤村 隆, 木南伸一, 柄田智也, 木下 淳, 尾山勝信, 伏田幸夫, 太田哲生, 三輪晃一 : 胃癌のセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の現状, 癌と化療, 39:1345-1349, 2012.

6. 小坂健夫 : 胃切除術後障害の実態と、改善への challenge, *日本外科系連合学会誌*, 37:1066-1067, 2012.

7. 木南伸一, 中田浩二, 熊谷一秀, 愛甲

孝 : 幽門保存胃切除術の現況-「胃切除術式と胃術後障害の疑問に答える-PPG」ライブアンケートより, *手術*, 66:1759-1764, 2012.

8. 大野由夏子, 木南伸一, 甲斐田大資, 大西敏雄, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 表 和彦, 上田順彦, 中野泰治, 野口昌邦, 小坂健夫, 黒瀬 望 : 乳房内のセンチネルリンパ節に転移を認めた 1 例, *北陸外科会誌*, 30:27-29, 2011.

9. 富田泰斗, 表 和彦, 木南伸一, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木洋, 上田順彦, 中野泰治, 小坂健夫 : TS-1 が奏効した空腸腺癌の一例, *北陸外科会誌*, 30:31-33, 2011.

10. 上田順彦, 森岡絵美, 甲斐田大資, 富田泰斗, 大西敏雄, 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, 中田聡子, 湊 宏, 高村博之 : 薬剤耐性再発 GIST に対して肝・横隔膜合併腫瘍切除した 1 例, 癌と化療, 39:2438-2440, 2012.

11. 大西敏雄, 木南伸一, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木洋, 表 和彦, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫 : 大動脈周囲リンパ節再発に対し CPT-11+CDDP療法が奏効した胃原発神経内分泌細胞癌の 1 治験例, 癌と化療, 39:2384-2386, 2012.

12. 森岡絵美, 大野由夏子, 野口美樹, 中野泰治, 野口昌邦, 小坂健夫, 高仲 強 : 局所療法 (外科的切除と SBRT) と全身療法により長期生存が得られた乳癌再発症例, 癌と化療, 39:1942-1944, 2012.

13. 富田泰斗, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 表 和彦, 中野泰治, 上田順彦, 野口昌邦, 小坂健夫 : 盲腸癌肺転移術後の胸腔鏡ポートサイト再発を切除した 1 例, 癌と化療, 39:1923-1925, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

1. S.Kinami, T.Kosaka, D.Kaida, T.Onishi, Y.Ono, Y.Tomita, M.Yokoi, K.Omote, N.Ueda, Y.Nakano, S.Fushida, T.Fujimura, T.Ohta : The life prognosis of patients performed the function-preserving gastrectomy for gastric cancer. , The international college of surgeons THE 58th annual congress of Japan section, (Tokyo, 2012 年 6 月)

2. D.Kaida, S.Kinami, T.Onishi, Y.Ono, Y.Tomita, M.Noguchi, H.Funaki, K.Omote, N.Ueda, Y.Nakano, T.Kosaka : A case of the gastric tube cancer who was reconstructed using the free jejunal autograft after the local resection of gastric tube. , The

international college of surgeons The 58th annual congress of Japan section, (Tokyo, 2012年6月)

3. T.Ito, H.Kitakata, S.Kinami, K.Kawaura, T.Kosaka : A clinical study of endoscopic full-thickness resection for submucosal invasive gastric cancer without sentinel node metastasis. , UEGW2012 , ( Amsterdam :The Netherlands, 2012年10月)

4. M.Noguchi, M.Noguchi, Y.Nakano, E.Morioka, Y.Ohno, T.Kosaka : Axillary reverse mapping during sentinel lymph node biopsy in breast cancer, 22nd World Congress of International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, (Bangkok, 2012年12月)

5. Y.Nakano, Y.Ohno, M.Noguchi, M.Noguchi, T.Kosaka : A false negative for metastatic axillary lymph nodes in PET-CT of a breast cancer patient, 22nd World Congress of International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, (Bangkok, 2012年12月).

6. 富田泰斗, 上田順彦, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木洋, 木南伸一, 表 和彦, 小坂健夫 : 当科における大腸癌イレウス症例の検討, 第48回日本腹部救急医学会総会, (金沢, 2012年3月)

7. 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, (宇都宮, 2012年1月)

8. 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, (大阪, 2012年2月),

9. 富田泰斗, 表 和彦, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木洋, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 野口昌邦, 小坂健夫 : 盲腸癌肺転移の胸腔鏡ポートサイト再発切除を行った一例, 第34回日本癌局所療法研究会, (福島, 2012年6月)

10. 島崎猛夫, 石垣靖人, 高田尊信, 川上和之, 上田順彦, 友杉直久, 小坂健夫, 源 利成, 元雄良治 : GSK38標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤, 第43回日本膵臓学会大会, (山形, 2012年6月)

11. 富田泰斗, 上田順彦, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大野由夏子, 大西敏雄, 野口美樹, 木南伸一, 表 和彦, 中野泰治, 小坂健夫 : 完全腹腔鏡下に切除し得た後腹膜嚢胞性腫瘍の2例, 第25回日本内視鏡外科学会総会, (横浜, 2012年12月)

(富山, 2012年9月)

[図書] (計1件)

1. 小坂健夫 : がん診療の現状 : 大腸癌. 今日の診療のために ガイドライン外来診療 2013. p563-567. 日経メディカル開発. 東京

[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  
大学院生 大西敏雄

金沢医科大学一般・消化器外科学  
大学院生・富田泰斗 (金沢大学で研究指導)

(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

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がんの悪性化に関与するヒストン修飾変化とその解析ツールの開発

研究代表者：大阪大学大学院生命機能研究科 准教授 木村 宏

#### 研究成果の概要：

がんの発症や悪性進展過程におけるヒストンのメチル化修飾状態の制御異常を解析するために、さまざま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行した。作製した特異的抗体を用いて、TGF $\beta$ 処理で上皮・間葉転換 (EMT) が誘導されるがん細胞について、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンの翻訳後修飾の経時的な変化を調べた。その結果、特にヒストン H3K27 のトリメチル化 (me3) レベルの著しい上昇が観察された。現在、H3K27 メチル化修飾を担う酵素群 PRC2 複合体の細胞内動態 (複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など) に注目し、EMT の新しいエピジェネティックな制御メカニズムの解析を進めている。

#### 研究分野：分子生物学

キーワード：がん, エピジェネティクス, ヒストン, 翻訳後修飾, 上皮・間葉転換

#### 1. 研究開始当初の背景

がんは、正常な細胞の分化・維持機構の破綻が原因のひとつであり、ジェネティックな変異に加えて、エピジェネティックな制御機構の異常もまた、がんの発症・悪性進展を引き起こす要因と考えられている。そのような異常を同定するために、ヒトの発がんの様々な過程を再現する発がんモデルマウスの有用性は大きい。レトロウイルス感染発がんモデルマウスでは、ウイルスのゲノムへの挿入による遺伝子変異や周辺遺伝子の発現異常が原因でがんが発症するため、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。これまでに、ウイルス挿入変異の標的として、ヒストンのメチル化酵素・脱メチル化酵素の多くが、高頻度に同定されてきた。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の関与が既に解析されており、脱アセチル化酵素の阻害剤 (Trichostatin A, SAHA など) が抗がん剤として開発されている。これに対し、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行している注目される研究分野であり、次世代のエピジェネティック医薬の臨床開発への貢献が期待されている。

#### 2. 研究の目的

がんに関係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、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の開発を進行する。開発した抗体を用いて、ChIP 法などによるエピゲノム解析と個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン翻訳後修飾の動態解析を行う。特に、上皮・間葉転換 (EMT) をはじめとするがん細胞の悪性進展過程における新しいエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを旨とする。

#### 3. 研究の方法

遺伝子の転写制御に最も重要なヒストン H3 のメチル化修飾部位である K4、K9、K27、K36、K79 等について、それぞれのメチル化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。作製した抗体を用いて、正常細胞とがん細胞、あるいは悪性度の異なるがん細胞を比較しながらヒストンのメチル化修飾のダイナミクスを解析する。特に、がんの悪性進展過程に重要な上皮・間葉転換 (EMT) のプロセスにおいて、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンのメチル化修飾の変化を調べ、その分子メカニズムを解析する。

#### 4. 研究成果

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾リジン

残基について、さまざまなメチル化修飾状態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認識する抗体についても、抗体作製を完了しつつある。これらの特異的修飾抗体を用いて、肺がん細胞 A549 が TGFβ 処理で EMT を誘導されるモデル実験系において、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンの翻訳後修飾の経時的な変化を調べた。その結果、特に H3K27 のトリメチル化 (me3) レベルの著しい上昇が観察された。この結果は、A549 細胞における H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3 のノックダウンによる EMT 誘導という機能ゲノミクス分野が見いだした実験結果とも合致する。しかしながら、H3K27 メチル化修飾を担う酵素群 PRC2 複合体の各構成要素の発現そのものは、TGFβ によってほとんど変化しないことがわかった。そのため現在は、PRC2 複合体の細胞内動態（複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など）に注目し、EMT のエピジェネティックな制御メカニズムの解析を進めている。

#### 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 8 件）

Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, Yamamoto H, Mori M, Matsuura S, and Matsuura N. (2013). Cancer associated up-regulation of H3K9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Sci* (E-pub ahead of print; doi: 10.1111/cas.12166)

Shang WH, Hori T, Martins NM, Toyoda A, Misu S, Monma N, Hiratani I, Maeshima K, Ikeo K, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, and Fukagawa T. (2013). Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres. *Dev Cell* 24, 635-648.

Nozawa RS, Nagao K, Igami K, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, Sado T, Kimura H, and Obuse C. (2013). Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat Struct Mol Biol* (E-pub ahead of print; doi: 10.1038/nsmb.2532).

Osakabe A, Tachiwana H, Takaku M, Hori T, Obuse C, Kimura H, Fukagawa T, and Kurumizaka H. (2013). Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription. *J Cell Sci* (in press;

doi: 10.1242/jcs.112623)

Tachiwana H, Yuta M, Shono N, Ohzeki J-i, Osakabe A, Otake K, Larionov V, Earnshaw WC, Kimura H, Masumoto H, and Kurumizaka H. (2013). Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes. *Nucleic Acids Res* (E-pub ahead of print; doi: 10.1242/jcs.112623)

Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, and Nifuji A. (2013). Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Pat* 13, 84-90.

Deguchi K, Nagamatsu G, Miyachi H, Kato Y, Morita S, Kimura H, Kitano S, Hatada I, Saga Y, Tachibana M, and Shinkai Y. (2013). Posttranscriptional regulation of histone lysine methyltransferase GLP in embryonic male germ cell. *Biol Reprod* 88,36.

Mishima Y, Watanabe M, Kawakami T, Jayasinghe CD, Otani J, Kikugawa Y, Shirakawa M, Kimura H, Nishimura O, Aimoto S, Tajima S, and Suetake I. (2013). Hinge and chromoshadow of HP1α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol* 425, 54-70.

〔学会発表〕（計 1 件）

木村 宏. ヒストン修飾動態制御の単一細胞解析. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞核構造体によるエピゲノム制御機構」(2012 年 12 月 11-14 日、福岡)

〔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

大阪大学大学院生命機能研究科・准教授  
木村 宏

##### (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

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がんの発症・悪性進展過程におけるヒストン脱メチル化酵素 JMJD3 の役割の解析

研究代表者：広島大学原爆放射線医科学研究所 教授 本田浩章

研究成果の概要：

ヒストンのメチル化修飾状態の制御異常は、がんの発症や悪性進展を引き起こす重要な要因のひとつと考えられている。我々は、ヒストン脱メチル化酵素のメンバーである JMJD3 遺伝子について、がんとの関連を調べるために、JMJD3 ノックダウン細胞の表現型を解析した。JMJD3 の発現を恒常的にノックダウンした細胞では、細胞運動能の亢進と上皮・間葉転換 (EMT) の促進が観察された。遺伝子の発現解析から、E-Cadherin など EMT マーカー遺伝子や EMT 誘導転写制御因子の発現変化に JMJD3 が関与することがわかった。さらに、これらの遺伝子も含めて、JMJD3 酵素が直接発現制御する標的遺伝子を探索するために、ChIP 解析に使用する JMJD3 特異的モノクローナル抗体の作製を現在進行している。

研究分野：分子生物学

キーワード：がん, エピジェネティクス, ヒストン, 翻訳後修飾, 上皮・間葉転換

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列が変化することなく、遺伝子発現の多様性を生み出し、異なる表現型を誘導するしくみであり、生物の発生や分化の過程において重要なシステムのひとつである。がんは、正常な細胞の分化・維持機構の破綻が原因であり、エピジェネティクス制御機構の異常もまた、がんの発症・悪性進展を引き起こす要因と考えられる。例えば、ゲノム DNA のメチル化の異常は、古くから様々なタイプの悪性腫瘍の発がん過程で検出されている。さらに近年、ヒストンの翻訳後修飾やそれに関与する酵素の異常が、様々なかたちで発がん過程に関わっていることが報告されている。こうしたエピジェネティクス制御の異常は、次世代のがん治療の標的として特に注目されている。これまでに、ウイルス感染発がんモデルマウスを用いた挿入変異の標的として、ヒストンのメチル化酵素 (SET ドメインタンパク質) と脱メチル化酵素 (JmjC ドメインタンパク質) の多くが同定されてきた。現在、ヒストンのメチル化の制御は、がん研究の分野において注目されている研究領域であり、新しいエピジェネティック医薬の臨床開発への貢献が期待されている。

### 2. 研究の目的

我々の研究グループは、ヒストンの脱メチ

ル化酵素のひとつである JMJD3 遺伝子について、その個体における機能や発がんとの関連を調べるために、JMJD3 コンディショナル・ノックアウトマウスを作製して、研究を進行している。本共同研究では、JMJD3 ノックアウト細胞や JMJD3 ノックダウン細胞を利用して、JMJD3 脱メチル化酵素によって発現制御される標的遺伝子および遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的とする。さらに、得られた情報をもとに、がんの発症・悪性進展過程における JMJD3 酵素の新しい役割とその作用メカニズムを解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

JMJD3 ノックアウトおよびノックダウン細胞について、細胞の増殖、運動能、刺激応答性、薬剤感受性などをコントロール細胞と比較して解析し、JMJD3 の新しい細胞生物学的機能を見いだす。これらの細胞で、発現の変化する遺伝子、すなわち JMJD3 酵素が発現制御する標的遺伝子の候補を探索する。JMJD3 タンパク質を特異的に認識する高力価のモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いた ChIP 解析を行なって、JMJD3 酵素によってエピジェネティックに発現調節される標的遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

shRNA 発現ウイルスを用いて、JMJD3 の発現を恒常的にノックダウンした細胞では、細胞の増殖には顕著な変化が見られないものの、細胞の運動能が有意に亢進することが観察された。上皮・間葉転換 (EMT) を観察しやすい肺がん細胞 A549 において、同様のノックダウン実験を行なうと、EMT の促進効果が示された。遺伝子発現変化の解析から、JMJD3 のノックダウンは、上皮系マーカー E-Cadherin の発現低下や、間葉系マーカー Fibronectin の発現上昇などを誘導することが示された。さらに、EMT 誘導に關与する転写制御因子 ZEB1 や ZEB2 の発現変化にも關与することがわかった。こうした遺伝子が、JMJD3 酵素の直接の標的遺伝子かどうか調べるために、ChIP 解析に使用する JMJD3 モノクローナル抗体の作製を進行している。得られた抗体は、cDNA 発現ベクターで発現させた JMJD3 タンパク質を検出できるが、内在性の JMJD3 タンパク質については、まだ明確な結論が出ておらず、抗体の精製も含めて、現在対策を検討している。

#### 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 7 件)

Akimoto T, Okuhira K, Aizawa K, Wada S, Honda H, Fukubayashi T, and Uchida T. Skeletal muscle adaptation 1 in response to mechanical stress in p130Cas<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C541-547, 2013

Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, and Suda T. Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. *Stem Cells* 31, 479-487, 2013

Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, and Honda H. *EED* mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia* 26, 2557-2560, 2012

Zhang X, Kinuko Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Yagita H, Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K, Endo M, and Inukai T. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute

lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia* 26, 2483-2493, 2012

Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, and Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol Cell* 47, 694-706, 2012

Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, and Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. *Exp Dermatol* 21, 554-556, 2012

Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Ohishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M, and Saya H. Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 31, 2849-2861, 2012

[学会発表] (計 3 件)

Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Z, Shih YH, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. Functionally defective mutants of *EED*, a non-catalytic subunit of PRC2, identified in MDS patient. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Nagamachi A, Takubo K, Ebihara Y, Inaba T, Sanada M, Tsuji K, Suda T, Ogawa S, Honda H. Acquired expression of c-Cbl Q367P mutation induces myeloid cell proliferation. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

Nagamachi A, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Sanada M, Tsuji K, Inaba T, Ogawa S, Honda H. A20, a ubiquitin-modifying enzyme for NF-kappaB, plays an important role in normal hematopoiesis. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

[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

広島大学原爆放射線医科学研究所・教授  
本田浩章

(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



対象研究テーマ：肺がんの分子標的薬耐性機構の解明とその克服に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：新たなるEGFR-TKI耐性機構としてのKeap1/Nrf2システム  
－ その遺伝子診断や治療への応用

研究代表者：筑波大学医学医療系 准教授 石井幸雄

研究成果の概要：

Nrf2は抗癌剤耐性や細胞増殖に関与する転写因子であり、非小細胞肺癌で活性化が見られる。非小細胞肺癌におけるNrf2活性化は、その抑制タンパクであるKeap1の機能欠失か、上皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングの亢進によって生じる。このことは、Keap1遺伝子に機能欠失性変異が生じると、EGFRシグナリングに関係なくKeap1依存的なNrf2活性化による細胞増殖が恒常的に生じることを意味し、EGFR阻害薬(TKI)の耐性機構として重要と思われる。本研究では非小細胞肺癌患者を対象に、EGFR-TKI感受性とEGFR遺伝子変異、Keap1遺伝子変異の関連を調べ、Keap1遺伝子変異の検索がEGFR-TKI有効性予測の新たな遺伝子診断法となりうるかを検討した。EGFR-TKI感受性EGFR遺伝子変異を有した腺癌症例でEGFR-TKIが初回より無効であった症例は見られなかった。これらのうち、能転移巣でEGFR-TKIが無効であった症例でKeap1遺伝子変異を検討したところ、脳転移巣のみに機能欠失性Keap1遺伝子変異を認めたことから、Keap1遺伝子変異はEGFR-TKI獲得耐性の一因である可能性が示唆された。Keap1遺伝子は微量検体でも解析できたことより、今後多くの症例でその有用性を検証したい。

研究分野：肺癌、遺伝子診断

キーワード：Nrf2、Keap1、EGFR-TKI、薬剤耐性、遺伝子診断

### 1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌細胞において、Nrf2は薬物代謝酵素群、薬剤排出ポンプ、細胞周期関連タンパクなどの発現を誘導し、抗癌剤耐性や癌細胞増殖を助長する(Clin Cancer Res 15: 3423, 2009)。非小細胞肺癌細胞におけるNrf2活性化は上皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングの亢進か、抑制タンパクKeap1の機能欠失性変異によって生じる。このことは、肺癌細胞にKeap1遺伝子の機能欠失性変異が生じると、EGFRシグナリングに関係なくKeap1依存的なNrf2活性化による細胞増殖が恒常的に生じることを意味し、EGFR阻害薬(EGFR-TKI)耐性のメカニズムを考える上で、臨床的に極めて重要な所見である。すなわちKeap1/Nrf2系はEGFR-TKI感受性EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者のEGFR-TKI耐性形成の新たな分子機構であり、Keap1遺伝子変異の検索はEGFR-TKI有効性の遺伝子診断として有用なツールとなる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究ではEGFR-TKI耐性非小細胞肺癌におけるKeap1変異の頻度や変異部位を臨床検体で解析し、実際の肺癌患者におけるEGFR-TKI耐性とKeap1遺伝子変異との関連を明らかにするとともに、EGFR-TKI有効性の新規遺伝子診断法としてのKeap1遺伝子変異測定の有用性を検証する。更に、気管支鏡下肺生検等の微量臨床検体からのKeap1遺伝子変異検索法を確立することを目的として、研究を行った。

### 3. 研究の方法

EGFR-TKI(イレッサ、タルセバ)の投与された非小細胞肺癌患者で、病理検体の研究使用に対する包括同意を得られている症例を対象とした。EGFR-TKIの臨床効果はRECIST基準に準じて判定した。

これらの症例において経気管支生検、胸腔鏡下生検、剖検などから得られた肺癌組織検体を用いて、Nrf2活性化、Keap1遺伝子変異、EGFR遺伝子変異を解析した。Nrf2活

性化については、パラフィン包埋標本における免疫組織化学法にて *in situ* で解析した。Keap1 遺伝子変異、EGFR 遺伝子変異は、パラフィン包埋標本より DNA を抽出し、直接シーケンス法にて解析した。

EGFR-TKI の効果が持続している症例、EGFR-TKI が初回より無効な症例、および EGFR-TKI に耐性を獲得した症例に分け、それぞれの症例における Nrf2 活性化の程度や、Keap1 遺伝子変異の有無および変異部位を確認し、EGFR-TKI 耐性との関連について検討した。

#### 4. 研究成果

1) 非小細胞肺癌では、腺癌、扁平上皮癌ともに殆どの症例で Nrf2 に対する免疫染色が陽性であった。

2) 検体からの Keap1 遺伝子変異解析では、アミノ酸変異を伴う Keap1 遺伝子変異は2例でどちらも腺癌であった。変異はどちらも Keap1 の Kelch 領域という Nrf2 結合領域に存在した。EGFR 遺伝子変異陽性で、肺原発巣に Keap1 遺伝子変異を有した症例は認めなかったが、脳転移巣で Keap1 遺伝子変異を認めた症例が1例あった。同症例では肺病巣に対し EGFR-TKI は有効であったが、使用中に癌性髄膜炎を発症したことから、脳病変に同剤は有効でなかったものと判断した。

3) 1例のみの検討であるが、気管支鏡下肺生検による微少臨床検体から Keap1 遺伝子の解析は可能であった。

以上より、非小細胞肺癌では腺癌のみならず、扁平上皮癌でも Nrf2 活性化が認められた。過去の報告とあわせると、腺癌では Keap1 遺伝子異常、扁平上皮癌では Nrf2 の遺伝子異常によりそれぞれ Nrf2 活性化が生じる可能性が高いと思われた。Kelch 領域に生じた Keap1 遺伝子変異は、過去の報告とも併せ機能欠失性変異であると考えられた。Keap1 遺伝子変異のあった転移巣で EGFR-TKI が無効であった症例より、Keap1 が EGFR-TKI 獲得耐性の新たなメカニズムとなりうる可能性が示されたが、今回の検討では EGFR-TKI 感受性 EGFR 遺伝子変異がありながら、EGFR-TKI に耐性を示した症例が殆どなく、EGFR-TKI 耐性と Keap1 遺伝子変異の関連性を明らかにするためには今後多くの症例の集積が必要と思われた。Keap1 遺伝子変異は EGFR 遺伝子変異のように EGFR-TKI 感受性との相関が確立されたものはまだないので、現時点ではシーケンスで少なくとも Kelch 領域全般は調べる必要があるが、TBLB 等による微少標本でも解析は可能であると考えられた。

#### 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2件)

Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Morishima Y, Kurishima K, Itoh K, Yamamoto M, Minami Y, Noguchi M, Hizawa N. Molecular mechanisms for regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, 31: 4768-4777 (2012)

Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Kurishima K, Minami Y, Noguchi M, Hizawa N. Resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer with Keap1 gene mutation. *International Cancer Conference Journal* 1: 63-66 (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

筑波大学医学医療系・教授 石井幸雄

##### (2) 研究分担者

筑波大学医学医療系・講師 森島祐子

本間晋介

大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター腫瘍内科・医長

山鳥忠宏

##### (3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野聖二

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：ヒトがん細胞を用いた抗転移性低酸素サイトトキシン類の開発

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、Akt 阻害活性を有する低酸素サイトトキシン類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、TX-2137 および化合物 2（特許未出願のため名称は省略）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期待される。

#### 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。また、低酸素環境はがんの基本環境であり、低酸素環境および低酸素がん細胞が癌治療の分子標的として再認識されている。一方、セリン・スレオニンキナーゼである Akt は、増殖因子など様々な細胞外からの刺激により活性化され、白血球、線維芽細胞、血管内皮細胞、がん細胞の運動に重要であることが示されており、抗転移剤のターゲット分子として近年注目されている。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素がん細胞選択的な細胞毒性を有する低酸素サイトトキシン類に、MMP や Akt に対する阻害作用を付与した多機能性薬剤を分子設計・合成し、生物活性および作用機序を調べることで、より効果的な抗転移性抗がん剤を創製することである。

#### 3. 研究の方法

2-Nitroaniline を出発原料として合成した 3-Chloro-1,2,4-benzotriazin 1-oxide と 4-Hydroxyaniline との反応により TX-2123 を得、次いで TX-2123 を酸化して TX-2137 を得た。また、1-(4-Piperidyl)-2-benzimidazolinone を出発原料として 3 工程で化合物 1 を得、次いで化合物 1 を酸化して化合物 2 を得た。MMP 阻害活性は HT-1080 細

胞を用いたザイモグラフィにより、Akt 阻害活性は U87 細胞を用いたウェスタンブロットにより評価を行った。in vitro における細胞増殖抑制活性はマウス黒色腫 B16-F10、ヒト線維肉腫 HT-1080、ヒト胃がん MKN-45 細胞を用いた MTT アッセイにより、また in vivo 抗転移活性は発育鶏卵モデルを用いた B16-F10 の肝転移巣の抑制試験により評価した。

#### 4. 研究成果

TX-2137 および化合物 2 は AKT1/2 キナーゼ阻害剤と異なり Akt のリン酸化を抑制しなかったがタンパク発現量を低下させた。これと相関して転写因子 NF $\kappa$ B の活性化型である phospho-p65、および転写因子 HIF-1 $\alpha$  の発現が抑制された。MMP 阻害剤である BB94 とは異なり、TX-2137 および化合物 2 は MT1-MMP による MMP-2 の活性化は阻害しなかったが、化合物 2 では MMP-9 産生の抑制効果が認められた。Akt のタンパク発現量の低下と MMP-9 産生の抑制効果の関連性については今後さらに検討する必要がある。TX-2137 および化合物 2 は B16-F10、HT-1080、MKN-45 細胞の増殖を抑制し、各細胞に対する IC50 値はいずれも 4  $\mu$ M 以下であった。さらに、TX-2137 および化合物 2 はアドリアマイシンと同程度の B16-F10 の肝転移巣に対する抑制効果を示した。結論として、Akt/MMP-9 阻害と細胞増殖抑制作用を併せ持つ新規抗転移性抗がん剤 TX-2137 および化合物 2 の創製に成功した。

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 5 件)

1. Munakata R, Inoue T, Koeduka T, Sasaki K, Tsurumaru Y, Sugiyama A, Uto Y, Hori H, Azuma J, Yazaki K, Characterization of coumarin-specific prenyltransferase activities in Citrus limon peel, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1389-93, 2012.
2. Uto Y, Yamamoto S, Mukai H, Ishiyama N, Takeuchi R, Nakagawa Y, Hirota K, Terada H, Onizuka S, Hori H,  $\beta$ -Galactosidase treatment is a common first-stage modification of the three major subtypes of Gc protein to GcMAF, *Anticancer Res.*, **32**, 2359-64, 2012.
3. Morishige J, Uto Y, Hori H, Satouchi K, Yoshiomoto T, Tokumura A, Lysophosphatidic acid produced by hen egg white lysophospholipase D induces vascular development on extraembryonic membranes, *Lipids*, **48**, 251-62, 2013.
4. Hori H, Uto Y, Nakata E, Boron tracedrugs challenge for neutron dynamic therapy, *Anticancer Res.*, **32**, 2235-9, 2012.
5. Kawashima T, Manda S, Uto Y, Ohkubo K, Hori H, Matsumoto K, Fukuhara K, Ikota N, Onizuka S, Fukuzumi S, Ozawa T, Anzai K, Nakanishi I, Kinetics and Mechanism for the Scavenging Reaction of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical by Synthetic Artepillin C Analogues, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 877-83, 2012.

[学会発表] (計 9 件)

1. 発育鶏卵を工学的動物モデルとした制がん剤のメディシナルケミストリー、宇都義浩、遠藤良夫、久保健太郎、乾 利夫、堀 均、日本化学会第 93 春季年会 (2013 年 3 月、草津市)
2. 解糖系からみた癌増感のターゲット:糖修飾放射線増感剤のメディシナルケミストリー、宇都義浩、皆巳和賢、原田 浩、遠藤良夫、前澤 博、増永慎一郎、堀 均、第 15 回癌治療増感研究シンポジウム (2013 年 2 月、奈良)
3. FTY720 をリードとした血管新生阻害性  $\alpha$ -トコフェロール誘導体 UTX-93 の分子設

計、宇都義浩、田中 涼、田中大地、野口智帆、堀 均、第 24 回ビタミンE研究会 (2013 年 1 月、東京)

4. GcMAF含有ヒト血清のマクロファージ食食活性化能および抗腫瘍活性の評価、宇都義浩、向井大貴、石山統子、田中大地、久保健太郎、坂本憲広、乾 利夫、堀 均、第 16 回バイオ治療法研究会学術集会 (2012 年 12 月、東京)
5. beta-Galactosidase treatment is common modification method of three major subtypes of Gc protein to GcMAF in vivo、宇都義浩、堀 均、第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月、札幌)
6. Evaluation of in vivo antioxidative activity of O-TEMPO-RNP using our newly developed chicken egg assay、宇都義浩、安部千秋、吉富 徹、長崎幸夫、遠藤良夫、堀 均、The 16th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (2012 年 9 月、ロンドン)
7. HIF-1/GFP発現系を利用した腫瘍移植鶏卵における低酸素領域の解析と放射線による分布変化の観察、宇都義浩、田中大地、野口智帆、原田 浩、遠藤良夫、前澤 博、増永慎一郎、堀 均、第 18 回癌治療増感研究会 (2012 年 6 月、大阪)
8. イソプレノミクスを基盤としたプレニルアシルフロログルシノール類の合成と抗酸化活性の評価、宇都義浩、田中 涼、大仲 健太、堀 均、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2012 年 6 月、徳島)
9. 血清Gc protein の糖鎖構造-マクロファージ活性相関解析と免疫賦活剤創生へのメディシナルケミストリー、宇都義浩、第 3 回グライコバイオロジクス研究会 (2012 年 6 月、徳島)

[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 2年 田中 涼  
徳島大学先端技術科学教育部  
博士前期課程 2年 田中大地

(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

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：2012年4月1日～2013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：東京工業大学大学院生命理工学研究科 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。

本年度ではこの二つのトランスポーターの役割を詳しく解析するためにこれらの過剰発現株・発現抑制株を樹立し、その解析を行った。さらに ALA による光線力学治療の耐性細胞におけるこれらのトランスポーターの役割も調べた。

研究分野：

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った。その結果、PEPT1 ならびに ABCG2 の発現が変化している細胞が腫瘍特異的なポルフィリン蓄積に関与していることが示唆されている。そこで本年度はこれらの過剰発現株・発現抑制株を用いた解析を行った。

#### 4. 研究成果

本年度は PEPT1 の過剰発現株ならびに ABCG2 発現抑制株を樹立し、その機能解析を行った。その結果、PEPT1 の過剰発現株ならびに ABCG2 発現抑制株ではポルフィリン蓄積能が飛躍的に向上した。PEPT1 は ALA の取り込みに関与しており、ABCG2 はポルフィリンの排出に関与しているため、これらのトランスポーターの役割の重要性が証明できた。

さらに ALA を用いた光線力学治療における

耐性株においてもこれらのトランスポーターの発現異常が観察された。以上のことからALAを投与した後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積にはPEPT1ならびにABCG2が重要な因子であることが明らかとなった。

#### 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3件)

1. Hagiya Y, Fukuhara H, Matsumoto K, Endo Y, Nakajima M, Tanaka T, Okura I, Kurabayashi A, Furihata M, Inoue K, Shuin T, Ogura S: Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013, in press.
2. 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, 2012, 1, 23-31.
3. 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, 2012, 9, 204-214.

[学会発表] (計3件)

1. 遠藤良夫、小倉俊一郎、米村豊、石

塚昌宏、井上克司、高橋究、中島元夫、木村仁: 5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法における耐性化機構 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月(札幌)

2. 米村豊、遠藤良夫、小倉俊一郎、水元明良、石橋治昭、Emel Canbay: アミノレブリン酸による腹膜播種診断 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月(札幌)
3. 遠藤良夫、小倉俊一郎、米村豊: 5-ALAを用いるがんの光線力学的療法における耐性化機構の解析 日本薬学会第133年会 2013年3月(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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

東京工業大学大学院生命理工学研究科  
特任准教授 小倉俊一郎

##### (2) 研究分担者

東京工業大学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研究科  
修士2年 松本健太郎  
東京工業大学生命理工学研究科  
修士1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



対象研究テーマ：がん幹細胞を標的とした薬剤スクリーニング法の開発に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：miRNAによる慢性骨髄性白血病(CML)幹細胞の治療抵抗性制御機構の解析

研究代表者：秋田大学大学院医学系研究科 講師 田川博之

研究成果の概要：

B6 マウスから幹細胞を採取し Bcr-abl 遺伝子を導入後、腫瘍発生組織(脾臓)から、幹細胞をとりだし、RNA を採取、その後網羅的 miRNA 遺伝子解析を行った。Bcr-abl 陽性のマウス白血病幹細胞では、正常対応細胞と比較し、いくつかの miRNA が過剰発現または、発現低下をしており、それらは miR-203,miR-200c, miR-26,miR-21,miR-2105, miR-181 などであった。そのうち miR-200c は KLS 陽性細胞と陰性細胞の分画で比較しても発現差をみた。現在 bcr-abl 陽性白血病における miR-200c の標的蛋白の同定の為の実験を行っている。

研究分野：血液内科学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA(以下 miRNA)と呼ばれる non coding RNA が、蛋白の翻訳を阻害し、細胞の分化、増殖に重要な働きをもつことが報告されている。一方、がん幹細胞はがん細胞の供給源となる細胞として注目を集めている。このがん幹細胞は抗がん剤治療に対して抵抗性を示し、治療後の再発を引き起こす原因になると考えられている。最近、乳がんや前立腺がん、その他の固形癌で、miRNA ががん幹細胞で異常発現し重要な働きをしているという報告が次々となされている (Shimono et al., Cell 2008; O'Connell et al., PNAS 2010; Leu et al.,2010 Nat.Med)。しかし、がん幹細胞の治療抵抗性メカニズムにおける miRNA の役割は解明されていない。

慢性骨髄性白血病(CML)は幹細胞レベルで、BCR-ABL1 転座が生じることが明らかになっている。CML 患者の治療には BCR-ABL1 遺伝子産物のチロシンキナーゼ活性を標的とするグリベック、スプリセルなどのチロシンキナーゼ阻害薬が広く用いられている。しかし、このようなチロシンキナーゼ阻害薬による治療後の再発は患者の生命を脅かす重大な問題となっている。CML 幹細胞の残存は、このような CML の再発を引き起こす原因になることが報告されている。さらに、チロシンキナーゼ阻害薬に不応性の T315I 変異を有する BCR-ABL1 の発現は CML 患者に治療を行う上で非常に大きな障壁となっている。CML 幹細胞は、この T315I 変異を有する CML 細胞を産み出す発症母細胞となる可能性が考えられる。従っ

て、CML 幹細胞の薬剤に対する抵抗性メカニズムを解明することは重要な研究課題であり、現在、国内外の研究者によって活発に研究がおこなわれている。

申請者はこれまでに、miRNA の研究で世界をリードする優れた研究成果あげてきた。この miRNA 領域での研究基盤に立脚し、白血病でも幹細胞レベルで miRNA の異常が生じている可能性が高いと着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、BCR-ABL 陽性白血病のマウス発症モデルを用いて、がん幹細胞分画を純化し、網羅的 miRNA 発現解析を行って「**白血病がん幹細胞で異常発現する miRNA**」を同定する。同定された場合はその機能解析を行い、miRNA ががん幹細胞に及ぼす病理・病態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1)マウス CML 幹細胞における miRNA の発現解析 (遺伝子組み換え、動物実験有)

C57BL/6 マウス (以下 B6 マウス) の造血幹細胞分画(cKit 陽性 Sca1 陽性分化マーカー陰性細胞 以下 KSL)に BCR-ABL1 キメラ遺伝子を導入し、同感染細胞を B6 マウスに移植する。BCR-ABL 陽性白血病発症マウスから CML 幹細胞 (KSL 分画)、前駆細胞様 CML 細胞(cKit 陽性 Sca1 陰性分化マーカー陰性細胞)、並びに分化 CML 細胞をセルソーターで抽出し、RNA を精製し、miRNA(non-coding) や通常遺伝子(coding)の網羅的発現解析を行い、がん幹細胞特異的に発現する miRNA や遺伝子を同定する。

### 2) ヒト CML 患者由来の CML 幹細胞における miRNA の発現解析

ヒト患者検体の幹細胞 CD34+CD38-分化マ

ーカー陰性細胞をセルソーターで採取し、マウスで同定された miRNA の定量解析 (Taqman PCR)を行う。マウス、ヒトで共通に異常発現する miRNA を同定し、その後、同 miRNA の標的遺伝子の探索、機能解析へと研究を進展させる。

### 3) CML 幹細胞特異的発現 miRNA の標的遺伝子の解析

遺伝子発現解析と miRNA 発現解析で、連動して動く miRNA と遺伝子の関係を明らかにする。また、Target Scan などの program を使用し、miRNA の target を絞り込む。標的遺伝子候補は、Taqman 法によるバリデーションを行い、CML 細胞株などに、候補遺伝子を導入した transfectant を用いて標的蛋白の発現の変化を検討する。

### 4) CML 幹細胞特異的 miRNA を標的とする CML 治療方法の検討

BCR-ABL1 遺伝子に T315I 突然変異のある CML マウスモデルを作製し、同様に遺伝子発現解析を行う。通常の CML 発症マウスと miRNA の発現差が幹細胞レベル、あるいは他の lineage であるか否かを検討したい。

### 5) マウス CML 幹細胞の治療抵抗性機構における miRNA の役割

CML 幹細胞に特異的な miRNA のアンチセンス RNA の発現ベクターを CML 幹細胞に導入し、マウスに移植を行う。このマウスにチロシンキナーゼ阻害薬を投与して、CML 幹細胞の治療抵抗性における miRNA の役割を解明する。

### 6) miRNA をターゲットとするマウス CML 幹細胞の治療効果の検証

同定された miRNA のアンチセンスを CML

発症マウスに経静脈的に投与することにより、腫瘍に抑制効果が生じるか等を検討する。

#### 4. 研究成果

B6 マウスから幹細胞を採取し *Bcr-abl* 遺伝子を導入後、腫瘍発生組織(脾臓)から、幹細胞をとりだし、RNA を採取、その後網羅的 *miRNA* 遺伝子解析を行った。*Bcr-abl* 陽性のマウス白血病幹細胞では、正常対応細胞と比較し、いくつかの *miRNA* が過剰発現または、発現低下をしており、それらは *miR-203*, *miR-200c*, *miR-26*, *miR-21*, *miR-2105*, *miR-181* などであり、そのうちのいくつかは、*KLS* 陽性細胞と陰性細胞の分画で比較しても発現差をみた。例えば *miR-200c* がそうであるが、現在 *CML* における *miR-200c* の標的蛋白の同定の為の実験を行っている。

#### 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. Tagawa H, Ikeda S, Sawada K. The role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma, 2013 in press.
2. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Oshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H. Dysregulation of *BMI1* and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene* 2013 in press.

[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

秋田大学大学院医学系研究科・講師  
田川博之

##### (2) 研究分担者

秋田大学大学院医学系研究科・大学院生  
手島和暁  
秋田大学大学院医学系研究科・大学院生  
伊藤 貢血

##### (3) 本研究所担当者

がん幹細胞探索プロジェクト・准教授  
仲 一仁

)

対象研究テーマ：がん幹細胞を標的とした薬剤スクリーニング法の開発に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：Notch シグナルを標的としたグリオーマ幹細胞の制御

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：

本研究では、膠芽腫患者由来の9種類の膠芽腫幹細胞株を使用し Notch 阻害剤である  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤(MRK-003 以後 MRK)の有効性を *in vitro* で評価した。MRK により膠芽腫幹細胞の細胞増殖抑制、アポトーシス促進、幹細胞形質の喪失を認めた。膠芽腫幹細胞株には MRK 高感受性群と低感受性群が存在した。CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が低い膠芽腫幹細胞様細胞に MRK は有効であり CD44 および CD133 発現量は Notch 阻害剤感受性のバイオマーカーになりうると考えられた。

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ、分子標的療法、グリオーマ幹細胞、Notch、増殖、浸潤

#### 1. 研究開始当初の背景

近年の医療技術の進歩によりヒトがんの予後は急速に改善している。しかしながら悪性グリオーマの悲惨な治療成績は30年以上前からほとんど変わっていない。悪性グリオーマは周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の性質を踏まえた時、手術で全部摘出することは不可能である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法薬剤の開発が急務であると言える。

グリオーマ細胞形質の維持に関与している複数のシグナル伝達経路がこれまでの基礎研究により明らかとなっている。Notch シグナルは幹細胞の発生・分化に関わることが公知であり、特に神経幹細胞の維持には Notch が必須である。近年、悪性グリオーマ内には腫瘍幹細胞が存在し腫瘍形成の根源であるとするがん幹細胞仮説が提唱され、研究領域が急速に拡大している。これまでに Notch シグナルが悪性グリオーマ幹細胞においてもその発生シグナルとして機能していることが証明されている。さらに近年 Notch シグナルはグリオーマの浸潤に関与していることが報告された。このことから Notch はグリオーマ細胞の格好の標的分子であることが予想される。

#### 2. 研究の目的

本研究プロジェクトの目的は、「グリオーマ幹細胞のシグナル伝達を担う Notch を阻害

することによりグリオーマの制御は可能である」との仮説に基づき、いまだヒトがんに対して臨床応用されていない Notch の新規経口分子標的薬剤 MRK003 を使用し *in vitro*, *in vivo* の実験結果から臨床応用への可能性を探ることにある。

#### 3. 研究の方法

9種類の膠芽腫幹細胞株を使用した。MRK 処理後の細胞増殖能評価のために MTT assay、幹細胞形質評価のために sphere forming assay を行い、アポトーシス細胞の検出に AnnexinV-FITC を用いたフローサイトメトリーによる解析を行った。また、癌幹細胞マーカーである CD44 と CD133 の発現量計測はフローサイトメトリーを用いた。

#### 4. 研究成果

下記の5点を明らかにした。

- 1、MTT assay の結果から、膠芽腫患者由来の9種類の膠芽腫幹細胞様細胞は MRK003 に対する感受性評価により高感受性細胞群 (A 群) 5種類と低感受性細胞群 (B 群) 4種類に分けられた。
- 2、Sphere forming assay では、低濃度の MRK003 により A 群では sphere 形成が阻害され、B 群では高濃度の MRK003 で sphere 形成能が阻害された。
- 3、AnnexinV-FITC を用いたフローサイトメトリーでは A 群で低濃度の MRK003 によりアポトーシスが誘導された。

- 4、CD44 と CD133 の発現量は、A 群ではそれぞれ 87.9-100%、0-33.4%であり、B 群では 0.24-87.7%、84.2-99.4%であった。
- 5、CD44 および CD133 の発現量と MRK003 に対する IC50 に有意な相関関係が認められた。

以上より、ヒト膠芽腫由来の膠芽腫幹細胞には Notch 阻害剤高感受性群と低感受性群が存在した。Notch 阻害剤は CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が低い膠芽腫幹細胞に有効であり CD44 および CD133 発現量は Notch 阻害剤感受性のバイオマーカーになりうると考えられた。

近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法が模索されている。また、がん治療は個別化の方向へ向かっている。手術検体から CD44 および CD133 の発現量を調べ、膠芽腫幹細胞を狙って Notch 阻害剤を使用する個別化療法は画期的なグリオーマ治療につながる可能性があると考えられる。

#### 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. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin  $\alpha 3$  is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer*, in press 査読有
2. Jin R, Nakada M, Teng L, Furuta T, Sabit H, Hayashi Y, Demuth T, Hirao A, Sato H, Zhao G, Hamada JI. Combination therapy using Notch and Akt inhibitors is effective for suppressing invasion but not proliferation in glioma cells. *Neuroscience letters* 534: 316-321, 2012 査読有
3. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada JI. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma *Frontiers in Radiation Oncology* 2: 98, 2012 査読有

[学会発表] (計 1 件)

中田光俊、金日華、藤雷、古田拓也、淑瑠へムラサビット、林裕、佐藤博、濱田潤一郎  
膠芽腫細胞株に対する Akt 阻害剤と Notch 阻害剤の併用効果  
第 13 回日本分子脳神経外科学会、平成 22 年 9 月 20 日-21 日、熊本

[図書] (計 1 件)

Nakada M, Kita D, Teng L, Pyko IV, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI. Receptor tyrosine kinases: principles and functions in glioma invasion *Advances in Experimental Medicine and Biology* 986:143-70, 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

中田光俊、田中慎吾、平尾敦、濱田潤一郎  
Notch シグナルを標的としたグリオーマ幹細胞の制御  
平成 24 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、平成 24 年 12 月 18 日、角間

#### 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・助教  
中田光俊

##### (2) 研究分担者

金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生  
田中慎吾

##### (3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦

対象研究テーマ： がん幹細胞を標的とした薬剤スクリーニング法の開発に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：輸送体を利用したがん幹細胞標的化戦略の基盤構築

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 中西猛夫

研究成果の概要：DHEASを基質として輸送する有機アニオントランスポーター (OATP)がアンドロゲン枯渇下の前立腺癌細胞増殖において果たす役割を明らかにすることを目的として検討をした。アンドロゲン枯渇下で培養されたヒトアンドロゲン受容体陽性前立腺癌細胞 LNCaP や 22Rv1 細胞において、OATP1A2 の発現が顕著に増大した。発現が増大した OATP1A2 によりアンドロゲン枯渇下では血中濃度が変動しない DHEAS (不活性型) が細胞へ取り込まれ、細胞内の steroid sulfatase により DHEA や DHT などアンドロゲン (活性型) へ代謝されて利用され、アンドロゲン枯渇下でもその細胞増殖能が維持されることが初めて明らかになった。本研究成果は前立腺癌の CRPC への進行において、OATP がアンドロゲンの前駆体として DHEAS の供給に寄与し、細胞増殖に維持する役割を担うと考えられた。

研究分野：化学療法、輸送体 (トランスポーター)

キーワード：前立腺癌、有機アニオン輸送体、OATP 1 A2、アンドロゲン

#### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は腫瘍形成、細胞増殖、浸潤・転移に重要な役割を果たすため、がん幹細胞を治療標的とした化学療法の開発は急務である。近年、慢性骨髄性白血病由来幹細胞様細胞に有機カチオンを輸送する分子 (Organic Cation Transporter) の高い発現が基質薬物であるイマチニブに対する感受性を増大させることや、未分化性維持に重要な転写因子の異状発現により腫瘍組織のエネルギー代謝が活性化されアミノ酸輸送体を介したエネルギー源の供給が盛んになるなど、がん幹細胞の生命維持機構と輸送体との興味深い発見がなされている。

#### 2. 研究の目的

がん幹細胞特異的に発現する輸送体の機能調節やそれを利用した薬物送達法の開発は、がん幹細胞標的化の有効な手段となり得る。したがって、がん幹細胞特異的に発現し栄養輸送などその生命維持および分化に関わる輸送体遺伝子の同定と腫瘍形成における役割の解明は、輸送体を標的分子とした新しい化学療法の基盤構築に有益な知見を与える。そこで、本研究では、ヒト前立腺癌由来細胞におけるホルモン輸送体の発現と去勢抵抗性細胞増殖について検討を行った。

#### 3. 研究の方法

去勢抵抗性前立腺癌モデルとしてアンドロゲン受容体陽性 LNCaP および 22Rv1 細胞を用い、アンドロゲン枯渇条件下での細胞増殖と水溶性不活型 DHEA 硫酸抱合体ホルモン (dehydroepiandrosterone sulfate、以下 DHEAS) を輸送する有機アニオン輸送体 (OAT および OATP) の発現変動との関係について、1) アンドロゲン枯渇が DHEAS 輸送体発現に与える影響 (qRT-PCR 法および Western blotting 法)、2) アンドロゲン枯渇下における細胞増殖に対する DHEAS の効果、3) OATP1A2 分子発現抑制 LNCaP 細胞の作製と増殖能、を検討し去勢抵抗性と輸送体との関係について考察した。

#### 4. 研究成果

ヒト前立腺癌細胞を用いて検討を行った。DHEASによる細胞増殖促が観察され、この効果はDHEASを活性型アンドロゲンであるDHEAへと変換するsteroid sulfatase 阻害剤によって消失した。また、OATPのmRNA発現をqRT-PCRやWestern Blottingによって検討した結果、アンドロゲン枯渇下で、OATP1A2をはじめとする複数のOATP分子の発現上昇が観察された。さらに、 $[^3\text{H}]$ DHEASの細胞内取り込みは、アンドロゲン枯渇下で培養することで増加した。以上より、LNCaP細胞はアンドロゲン枯渇下でOATP輸送体増加により、DHEAS取り込みが増加することが明らかに

なった。さらに、LNCaP細胞におけるOATP1A2の発現を安定的に抑制するOATP1A2/KD細胞において、アンドロゲン枯渇下における細胞増殖に対するDHEASの効果が消失したことから、OATP1A2が細胞増殖に重要な役割を果たすことが証明された。現在、アンドロゲン受容体陽性前立腺癌細胞における本輸送体の発現転写制御機構およびアンドロゲン枯渇下における前立腺癌細胞のクローン選択における役割を鋭意解明中である。OATP1A2に関する研究は、去勢抵抗性前立腺癌治療に有益な化学療法の創製に資すると期待される。

#### 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)

1) Arakawa H, Nakanishi T, Yanagihara C, Nishimoto T, Wakayama T, Mizokami A, Namiki M, Kawai K, Tamai I. Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions. *Biochem Pharmacol*, **84**(8):1070-1077, 2012.

[学会発表] (計2件)

1) 西本朋弘、中西猛夫、柳原千泰、荒川大、玉井郁巳.  
前立腺癌細胞におけるトランスポーターを介したアンドロゲン供給調節機構の解明、日本薬剤学会第27年会、2012年5月24-26日、神戸国際会議場(神戸)。

2) 中西猛夫  
新しい化学療法を目指したがん細胞における輸送体の機能特性と発現調節に関する研究、日本薬物動態学会第27年会奨励賞受賞講演、2012年11月20-22日、タワーホール船堀(千葉)

[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

金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授  
中西猛夫

##### (2) 研究分担者

金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授  
玉井郁巳

##### (3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦



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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：Pim キナーゼを阻害するフェナントレン誘導体の合成

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：新たな3種の置換フェナントレンおよびナフタレン誘導体の合成に成功し、そのPim キナーゼ阻害活性を評価した。今回合成した化合物の阻害はいずれも、以前見出したフェナントレン誘導体より10-100倍低いものであった。この結果を比較することにより、必要な置換基の位置と組み合わせに関する新しい情報を得ることができた。

研究分野：創薬化学

キーワード：Pim キナーゼ、膵臓がん、フェナントレン誘導体、有機合成、置換基

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは早期発見が困難であるだけでなく、ゲムシタビンを主体とする化学療法を積極的に行ったとしてもその予後は極めて不良である。そのため、膵臓がん発症の機構を明らかにし、それを標的とした分子標的型抗がん剤の開発が強く望まれている。本学、向田教授らの研究グループはセリン/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全く発現していないにもかかわらず、がん化によって発現が亢進していることを見出した。特に、膵臓がんにおいては全例での発現亢進がみられた。また、Pim-3 はがん細胞のアポトーシスを抑制し、その生存に有利に働いている可能性も示唆された。このことは、Pim-3 の発現や活性を抑制する薬剤が新たな分子標的型の抗がん剤となる可能性を示している。我々は有機合成化学の観点から、新たな分子標的薬の探索を行い、以下のように重要な知見を得ることに成功している。

### 2. 研究の目的

これまでに、我々のグループで合成した数種の低分子化合物がPim-3の阻害活性を示すことを見出している。いくつかの化合物群の中で、フェナントレン誘導体1-3が強力な阻害活性を有することが示唆された(図1)。本研究では、構造最適化に先だって、どの化学構造が活性発現に関与しているのかを知るために、いくつかの鍵となる誘導体の合成を行い、その活性評価を行う。

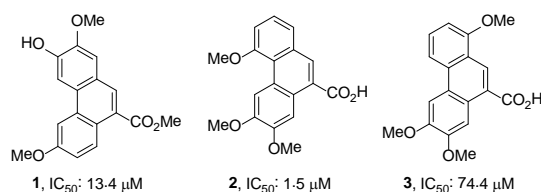


図 1

### 3. 研究の方法

化合物1-3の構造を少しずつ変化させた、5種の誘導体4-8の合成を提案した(図4)。三環性化合物であるフェナントレン誘導体4-7の合成はすべて同じ方法論を用いて合成できる(図2)。すなわち、対応するアルデヒド成分とカルボン酸成分を用いたPerkin反応を適用することですべての炭素骨格を導入する。フェナントレン環の構築には酸化的カップリングが最も容易であるが、場合によってはラジカル反応やC-Hカップリング反応などで目的を達する。ナフタレン誘導体8はバニリン誘導体を出発原料として四炭素成分を導入した後、Friedel-Crafts反応によってナフタレン骨格を構築する(図3)。これらを合成した後、向田教授らの研究グループにおいて確立された方法を用いて、Pim キナーゼ阻害活性を評価する。

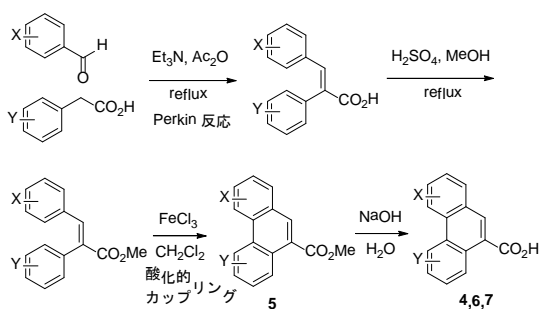


図 2

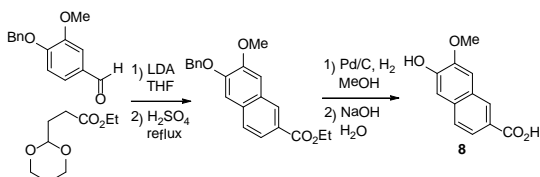


図 3

#### 4. 研究成果

結果として、研究方法に従って5つの誘導体のうち3つの化合物 **4**, **6**, **8** の合成に成功し、その活性を評価することができた (図 4)。これら3つの Pim-3 キナーゼ阻害活性は以前合成したフェナントレン誘導体 **1** や **2** と比べていずれも 10–100 倍以上低いということが明らかになった。**2** と **4** の結果を比べれば、上部の芳香環にあるメトキシ基の必要性が見取れる。また、**1** と **6** を比べればエステル基の存在が活性を向上させているように見えるが、**2** はカルボン酸の状態が高い活性を有していることから、この部分は芳香環の構造に依存してその影響が変化し得ると考えられる。**8** は非常に活性が低く、フェナントレン骨格の重要性を示すものと考えられるが、他の構造を試験する余地を残している。この結果から、フェナントレン環そのものよりは、その置換基の種類と位置が活性に大きく影響を与えるということが示唆された。そして、個々の置換基の効果だけでなく、他の置換基との組み合わせが活性向上のための鍵になり得ると考えられる。まだ合成が完了していない化合物 **5** および **7** については、Perkin 反応での低収率と酸化的カップリングによる反応の複雑化が問題となった。本研究に関連して、ラジカル環化反応による生理活性物質の骨格合成法を開発したので、今後、それを応用することにより合成が達成されるものと考えられる。結論として、本研究は活性向上そのものを目的としたものではないため、今回得られた結果は失敗例ではなく今後の活性向上を成功させるための重要な手がかりとなったと言える。

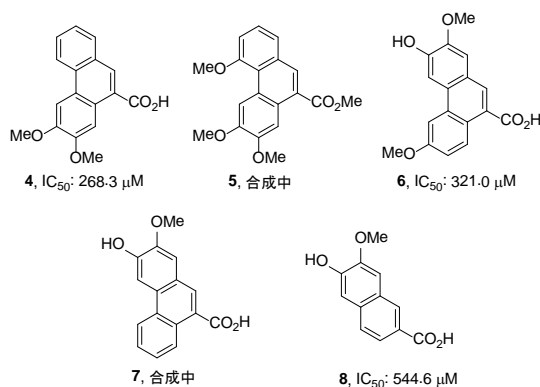


図 4

#### 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)

Hisaki Zaimoku, Tsuyoshi Taniguchi, Hiroyuki Ishibashi: Synthesis of the Core of Actinophyllic Acid Using a Transannular Acyl Radical Cyclization. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1656–1658.

[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

金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授  
石橋弘行

##### (2) 研究分担者

金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教  
谷口剛史

##### (3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：DNA脱メチル化関連酵素の幹細胞およびがん細胞における役割の解析

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授 小出 寛

研究成果の概要：

ゲノム DNA の積極的脱メチル化に関連する酵素群（ヒドロキシラーゼ、デアミナーゼ、グリコシラーゼ）について、胚性幹細胞（ES 細胞）やがん細胞株をはじめとする様々な細胞株での発現様式を定量 RT-PCR 法で測定した。DNA 脱メチル化の第一段階を担う TET1 ヒドロキシラーゼ遺伝子が、ES 細胞の分化・未分化状態、初代培養細胞の増殖・セネセンス状態に対応して、特徴的な発現を示すことが明らかになった。また、特定のがん細胞株における TET1 遺伝子の著しい発現低下は、がんの悪性度・予後と関係が深い CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) との関連が強く示唆された。

研究分野：分子生物学

キーワード：がん, 幹細胞, エピジェネティクス, DNA メチル化

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の調節にとって、ゲノム DNA のメチル化は、重要なエピジェネティクス修飾のひとつである。特にシトシンの 5-メチル化は、正常な発生、細胞の分化や幹細胞の恒常性維持に必須であり、X 染色体不活性化、遺伝子刷り込み等で重要な役割を果たしている。また、DNA メチル化の異常は、様々なタイプの悪性腫瘍の発がん過程で検出されている。すなわち、がん細胞ゲノム全体における低メチル化は、ゲノム不安定性やレトロトランスポゾンの発現を誘導し、ゲノムの特定領域での高メチル化は、がん抑制遺伝子の転写抑制を引き起こして、がんの発症に寄与すると考えられている。さらに近年、DNA メチル化に加えて、ヒストンの翻訳後修飾やそれに関与する酵素の異常が、様々なかたちで発がん過程に関わることが報告されている。これらのエピジェネティクス制御異常による遺伝子発現の変化は、遺伝子自体に変異が存在するわけではなく、可逆的に元に戻すという治療戦略が想定されるため、次世代のがん治療の標的として注目が集まっている。これまで、DNA のメチル化についての解析は詳細に行われてきたが、脱メチル化に関係する酵素やその作用機構は不明のままであった。しかし最近、DNA 脱メチル化に関係する酵素として TET ヒドロキシラーゼファミリーが報告され、その機能に注目が集まっている。

### 2. 研究の目的

ES 細胞、初代培養細胞、がん細胞株等を対象に、DNA の積極的脱メチル化経路に関連する酵素群の発現様式と発現調節機構を解析して、ES 細胞の未分化性維持や多分化能、がん細胞の増殖や悪性化における DNA の脱メチル化経路の役割を明らかにすることを目的とする。ES 細胞とがん細胞を比較しながら解析することで、がん細胞の幹細胞的性質と DNA 脱メチル化経路との関連性を見だし、がん幹細胞を標的とする新しいエピジェネティック医薬の開発の可能性を探索することも目標のひとつとする。

### 3. 研究の方法

未分化 ES 細胞および特定の細胞系列に分化誘導した ES 細胞、マウス胚線維芽細胞 (MEF)、様々ながん細胞株を対象に、DNA 脱メチル化関連酵素群（ヒドロキシラーゼ、デアミナーゼ、グリコシラーゼ）の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定する。特徴的な発現変化を示す酵素について、shRNA によるノックダウンなどを用いて、細胞の増殖、未分化性、運動能などの表現型に与える影響を調べる。特に、TET1 ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現制御の分子機構に関して、遺伝子制御領域における DNA の高メチル化との関連を解析する。

### 4. 研究成果

DNA の積極的脱メチル化経路の第一段階を担う TET1 ヒドロキシラーゼの発現は、未分化 ES 細胞で極めて高く、神経や心筋への分化誘導を行うことにより、その発現が著しく低下することが確認された。また、MEF 細胞をさまざまな細胞密度や血清濃度で培養すると、それに応じてダイナミックな TET1 の発現変化が観察されることがわかった。さらに種々の刺激によって細胞のセネセンスを誘導した状態でも発現変化が見られることがわかり、細胞の増殖状態やセネセンスと TET1 の発現が密接な関係があることが示唆された。また、特定のがん細胞株では、TET1 遺伝子の著しい発現抑制が検出されるが、これらのがん細胞は、CpG アイランドの同時多発的なメチル化をもつ CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) を示す傾向があることを見いだした。CIMP 表現型は、がんの悪性度・予後と深く関わっていることから、CIMP 表現型や TET1 遺伝子の発現抑制を導く分子メカニズムについて、さらに解析を進めている。

#### 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)

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., Wutz, A., Vidal, M., Elderkin, S., Brockdorff, N. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at Polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*, 148, 664-678, 2012.

Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H., Yokota, T. Dax1 associates with Esrrb and regulates its function in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 印刷中

[学会発表] (計 6 件)

Akagi, T., Kuure, S., Koide, H., Constantini, F., Yokota, T. Involvement of Ets-related transcription factors ETV4 and ETV5 in pluripotency and proliferation of mouse embryonic stem cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Tada, Y., Akagi, T., Yokota, T., Koide, H. Nanog/Zfp57 pathway promotes anchorage-independent growth of HT1080 cells by inducing imprinted genes expression. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H., Yokota, T. Dax1 associates with Esrrb and functions as a repressor in embryonic stem cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Koide, H. Epigenetic control in embryonic stem cells. Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, 2012.11. 金沢

金井 大, 武石 健, 上田 篤, 赤木 紀之, 小出 寛, 横田 崇 マウス ES 細胞における LRR-1 の増殖制御機構の解析 第 85 回日本生化学会大会, 2012. 12. 福岡

藤井優佳, 懸川まどか, 赤木紀之, 小出 寛, 横田 崇 zfp296 のマウス ES 細胞における役割 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 福岡

[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

金沢大学医薬保健研究域医学系・准教授  
小出 寛

(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

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：nicked  $\beta$ 2-Glycoprotein I の腫瘍転移抑制薬への応用

研究代表者：北海道大学遺伝子病制御研究所 特任教授 宮崎忠昭

研究成果の概要：

$\beta$ 2-Glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI)は、主に凝固線溶系における制御因子として解析されてきた。この分子は plasmin 産生が亢進している状態下では nicked form として存在する。我々はこれまでに $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI が血管新生抑制物質であることを報告した。本研究では VEGFR2 の下流に存在し、腫瘍転移に重要な細胞内シグナル伝達経路 GEP100-Arf6-AMAP1 に対する $\beta$ 2GPI、nicked  $\beta$ 2GPI の制御能を評価し、腫瘍転移抑制分子としての機能を解析した。あわせて、これら分子の腫瘍細胞に対する直接的な作用を調べた。その結果、 $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI は VEGF-A 存在下で血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する効果を有し、特に nicked  $\beta$ 2GPI は細胞間の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスを強く抑制した。また、腫瘍細胞への直接的作用を検討した結果、 $\beta$ 2GPI のみが細胞増殖と浸潤を阻害した。これらの結果から、 $\beta$ 2GPI は抗血管新生作用および抗腫瘍増殖・転移効果を併せ持つことが示された。

研究分野：分子生物学

キーワード：血管新生、 $\beta$ 2GPI

#### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍転移と血管の機能は密接に関係しており、高転移性を示す腫瘍の血管内皮細胞では低転移細胞に比べ細胞増殖因子や低酸素誘導因子などが高発現しており、血管新生能が高い事が明らかにされた。また癌の転移浸潤に関わる細胞内 GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル経路が VEGFR2 の下流に存在し、この活性化により VE-cadherin の細胞内輸送や細胞透過性等が亢進することが示された。

我々はこれまでに $\beta$ 2GPI とその plasmin 切断産物である nicked  $\beta$ 2GPI が血管新生抑制作用を有し、nicked  $\beta$ 2GPI が plasminogen の自己分解産物である angiostatinKring1-4,5 (AS4.5)と結合し、AS4.5 の血管内皮細胞の遊走増殖阻害効果や管腔形成抑制効果を制御する事を報告した (Nakagawa H., et al. Blood, 2009, Vol. 114, No. 12, pp. 2553-2559)。これらの $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI の作用は腫瘍血管内皮細胞においても示されるものと考えられ、血栓症の病態形成に関与するのみならず腫瘍転移に関わる血管新生を制御する機能を有することが想定された。

#### 2. 研究の目的

本研究では $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI の

VEGF-A 存在下での血管新生制御作用を解析し、腫瘍転移における役割を明らかにするため血管内皮細胞間の透過性や細胞間接着に対する制御機能を調べる。また、腫瘍細胞への直接的な作用を検討し、血管新生を阻害する新規制癌剤としての応用の可能性を評価する事を目的とした。

#### 3. 研究の方法

腫瘍転移に重要な VEGF-A による血管内皮細胞の透過性と VE カドヘリンエンドサイトーシスの亢進に対する  $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI の影響を検討した。 $\beta$ 2GPI と腫瘍細胞との直接作用を検討する為、A549細胞、Hep3B細胞、MDA MB 453S 細胞、MDA MB 468LN 細胞を用いて、MTT 法による細胞増殖実験および細胞浸潤に対する作用を解析した。 $\beta$ 2GPI 添加群のみ細胞形態が異なっていたため phalloidin 染色により解析した。

#### 4. 研究成果

$\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI が VEGF-A 存在下で血管内皮細胞の増殖、遊走を有意に阻害する事を確認した。腫瘍転移には血管内皮細胞間の透過性の程度が関わるため、 $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI による細胞間の透過性

に対する制御効果を検討した。これまでに、細胞間の接着は VEGF の存在下で Arf6 により抑制され、細胞間の透過性が亢進する事が報告されている。我々の実験の結果、 $\beta$ 2GPI を添加することにより、FITC-dextran の細胞間透過は抑制された ( $p < 0.05$ )。nicked  $\beta$ 2GPI の添加は、より強く細胞透過性を抑制した ( $p < 0.01$ )。さらに VE カドヘリンエンドサイトーシスへの影響を検討した結果、 $\beta$ 2GPI 添加群 ( $p < 0.05$ )、および nicked  $\beta$ 2GPI 添加群 ( $p < 0.01$ ) においてエンドサイトーシスが有意に抑制された。これらの  $\beta$ 2GPI と nicked  $\beta$ 2GPI の作用は VEGF 非存在下では認められなかった。

これまでに  $\beta$ 2GPI による腫瘍細胞の増殖・浸潤制御作用は明らかになっていない。本研究では  $\beta$ 2GPI の腫瘍細胞に対するこれらの直接的な作用を検討する為、腫瘍細胞増殖実験および浸潤実験を行った。その結果、 $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI は腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制した。しかし、血管内皮細胞に対する作用結果と異なり、nicked  $\beta$ 2GPI は腫瘍細胞の増殖・浸潤に抑制的に働くがその効果は弱く、逆に  $\beta$ 2GPI は強い抑制効果を示した。また、増殖実験において細胞の形態を鏡下で確認した所、 $\beta$ 2GPI を添加した細胞では接着形態がコントロール細胞と異なっていた。従って  $\beta$ 2GPI が細胞骨格に何らかの影響を与えることが考えられたため、phalloidin 染色により F-アクチンの重合を調べた。その結果、腫瘍細胞増殖実験の結果と同様に、nicked  $\beta$ 2GPI 添加群はコントロール群と同程度の F-アクチンの重合を認めたが、 $\beta$ 2GPI 添加群では、有意に F-アクチンの重合を阻害した。これらの結果から、 $\beta$ 2GPI および nicked  $\beta$ 2GPI は異なる作用機序によって腫瘍転移に抑制的に働くことが示唆された。今後、 $\beta$ 2GPI と nicked  $\beta$ 2GPI の血管内皮細胞および腫瘍細胞に対する作用点とその制御機構について詳細なメカニズムを明らかにする。

#### 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) Daisuke Fujikura, Masatoshi Ito, Satoko Chiba, Tanenobu Harada, Frank Perez, John C Rees, Toshimitsu Uede, Tadaaki Miyazaki: CLIPR-59 regulates TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. Cell Death and Disease (2012) 3, e264

2) Yasuko Nakagawa, Hiroshi Kataoka, Takashi Kurita, Hisako Nakagawa,

Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Tatsuya Atsumi, Takao Koike: Impaired expression of Act1 mRNA in B cells of patients with Sjögren's syndrome.

Japanese Journal of Clinical Immunology 01/2012; 35(1):75-80.

[学会発表] (計 3 件)

1) 中川 久子、保田 晋助、藤枝 雄一郎、堀田 哲也、渥美 達也、小池 隆夫:  $\beta$ 2-Glycoprotein I 379T/-フレームシフト変異と抗  $\beta$ 2GPI 抗体の関連性 第 56 回日本リウマチ学会総会 2012

2) Yoichiro Fujioka, Masumi Tsuda, Tomoe Hattori, Junko Sasaki, Takehiro Sasaki, Tadaaki Miyazaki, Yusuke Ohba: The Ras-PI3K Signaling Pathway is Involved in the Uptake of Exogenous Factors into Cells 第 35 回日本分子生物学会年会 2012

3) 宮崎 忠昭: 腫瘍転移抑制薬開発を目指した TNF ファミリー分子及び beta2-glycoprotein I の機能解明 金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所 ジョイントシンポジウム 2012

[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

北海道大学遺伝子病制御研究所・特任教授  
宮崎忠昭

##### (2) 研究分担者

北海道大学遺伝子病制御研究所・  
博士研究員 中川久子

##### (3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史



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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：細胞外マトリックス分子/ケモカインを標的とした成人T細胞白血病  
制御法の開発

研究代表者：北海道大学遺伝子病制御研究所 助教 前田直良

研究成果の概要：

成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia[ATL]) 患者血漿中ではオステオポンチン (osteopontin[OPN]) 産生量が増加しており、病態や予後との相関性が示唆されている。本研究では、ATL病態形成における宿主OPNの生理学的意義を明らかにするとともに、OPNを分子標的とした新規ATL発症予防法や、進展制御法の可能性について検討する。腫瘍細胞由来OPNと、宿主間質細胞由来OPNを識別するために、免疫不全マウス (NOD/Shi-*scid*, *IL2Rg<sup>null</sup>*[NOG]) の皮下にATL由来細胞株を接種することにより、腫瘍増殖・血中浸潤にともない、血漿中のOPN産生量が増加すること、また生存率と逆相関することを見出した。すなわち、ATL患者で観察される現象を、本モデルを用いて再現することができた。また、ATL細胞株とマウス線維芽細胞との共接種により、OPN産生増加、およびATL細胞の腫瘍増殖/臓器転移の促進が観察されたことから、ATL病態形成における線維芽細胞の重要性が明らかとなった。さらに、抗OPN抗体投与による腫瘍形成、および腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制効果を見出した。

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：成人T細胞白血病、オステオポンチン、細胞外マトリックス

#### 1. 研究開始当初の背景

ATLは、ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type I [HTLV-I]) 感染に起因する予後不良な末梢性T細胞腫瘍であることから、新たな治療方法の開発や標的分子の同定が急務とされている。ATLでは、腫瘍細胞のモノクローナルな異常増殖と同時に、臓器浸潤が顕著であることから、腫瘍細胞の増殖を抑制する (Maeda *et al.*, *Cancer Sci.* 2010;101:224-230) と同時に、臓器浸潤・転移を抑制することも重要な治療戦略の1つになると考えられる。

近年、癌微小環境構築における細胞外マトリックスの関与が注目されている。この細胞外マトリックスを構成する上で重要な因子であるマトリセルラータンパク質の一つOPNは、様々な炎症性疾患や癌転移において発現が上昇することから、病態形成において重要な因子であることが示唆されている (Uede, *Pathol Int.* 2011;61:265-280)。産生されたOPNは、インテグリン (インテグリンファミリーは18種類の $\alpha$ -サブユニットと8種類の $\beta$ -サブユニットで構成されており、 $\alpha\beta$ のヘテロ二量体を形成して機能する) のうち、

$\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンなどを受容体として利用し、細胞間の接着や遊走に関与することで、乳癌、前立腺癌等の浸潤・転移に深く関与している。ATL患者血漿中でもOPN産生量が増加しており、病態や予後との相関性が指摘されている (Chagan-Yasutan *et al.*, *Leuk Res.* 2011;35:1484-1490)。興味深いことに、ATL細胞株が培養上清中に分泌するOPN産生量は、微量、もしくは検出感度以下であること、またATL患者のCD68陽性マクロファージや血管内皮細胞でOPNが検出されることから、間質細胞由来OPNの病態への関与が強く示唆されている。しかしながら、宿主OPNの産生誘導機序、あるいはATL病態形成におけるOPN-インテグリン相互作用の生理学的意義については不明である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ATL腫瘍細胞由来OPNと、宿主間質細胞由来OPNを識別するために、移植マウスモデル系を用いて、ATL病態形成における宿主OPNと、腫瘍細胞が発現するインテグリンとの相互作用の生理学的意義を明らかにする。また、得られた結



果をもとに、OPN-インテグリン相互作用を分子標的とした新規ATL発症予防法や、進展制御法の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) ATL細胞株をNOGマウスに皮下接種後、原発巣形成を確認する。また、定期的に血漿を回収し、ヒトOPN、およびマウスOPN産生量をELISA法により定量化する。
- (2) 皮下接種したATL細胞株の血管浸潤は、末梢血リンパ球を分離後、HTLV-I *tax* 遺伝子を検出する定量性PCR法により確認する。
- (3) 定期的に各臓器(肺、肝臓、腎臓など)を摘出し、ヒトCD4陽性T細胞染色により転移を観察するとともに、マウスOPNとヒトOPNをそれぞれに特異的なモノクローナル抗体で染色し、H&E染色とともにマウスOPN産生細胞を同定する。
- (4) 野生型BALB/cマウス、およびOPN遺伝子欠損マウスから胎児線維芽細胞を単離後、ATL細胞株とともにNOGマウスの皮下に共接種することにより、腫瘍増殖や浸潤・転移におけるOPNの機能を検討する。
- (5) ATL細胞株を皮下接種し生着確認後、抗OPN抗体を定期的に腹腔内投与し、生存率、あるいは腫瘍形成/臓器浸潤・転移に対する抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

NOGマウスにATL由来細胞株を皮下接種することにより、腫瘍増殖・血中浸潤にともない、血漿中のOPN産生量が増加すること、また生存率と逆相関することを見出した。すなわち、ATL患者で観察されるATL病態進行に伴いOPN産生が増加するという現象を、本モデルを用いて再現することができた。また、ATL細胞株とマウス線維芽細胞との共接種により、OPN産生増加、およびATL細胞の血中浸潤・臓器転移促進が観察され、またOPN遺伝子欠損マウス由来線維芽細胞との共接種群では、その頻度が減少したことから、間質細胞由来OPNはATL病態形成を促進することが明らかとなった。さらに、抗OPN抗体による腫瘍形成、および腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制効果を見出した。これらの結果は、新規ATL制御法開発において、OPN-インテグリン相互作用が有効な標的分子となりうる可能性を示唆するものである。

### 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0件)

[学会発表] (計6件)

- (1) 前田直良  
jaagsiekte sheep retrovirusによるヒツジ肺上皮細胞腫瘍化のメカニズム  
第155回日本獣医学会学術集会 春シンポジウム教育講演「動物レトロウイルス感染症を知る」  
平成25年3月28日(東京)
- (2) 前田直良  
細胞外マトリックス分子による成人T細胞白血病の病態発現制御とその臨床応用  
金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム「がんの悪性進展過程とその微小環境」  
平成24年11月5日(札幌)
- (3) Naoyoshi Maeda, Takashi Ohashi, Haorile Chagan-Yasutan, Toshio Hattori, Yayoi Takahashi, Hideo Harigae, Hiroo Hasegawa, Masahiro Fujii, Katsumi Maenaka, Toshimitsu Uede  
Osteopontin-integrin interaction as a molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia  
第71回日本癌学会学術総会  
平成24年9月19日(札幌)
- (4) Daichi Ota, Naoyoshi Maeda, Toshimitsu Uede  
Alpha9beta1 integrin regulates growth and lymphatic metastasis of human breast cancer cells  
第71回日本癌学会学術総会  
平成24年9月19日(札幌)
- (5) Naoyoshi Maeda, Toshimitsu Uede  
Osteopontin as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia  
2012 FASEB Science Research Conference on Osteopontin Biology  
平成24年8月5-10日(Vermont, USA)
- (6) 前田直良、大橋貴、Haorile Chagan-Yasutan、服部俊夫、高橋弥生、張替秀郎、長谷川寛雄、藤井雅寛、前仲勝実、上出利光  
オステオポンチン-インテグリン相互作用を標的とした新規成人T細胞白血病治療法の開発  
第23回日本生体防御学会学術総会  
平成24年7月11日(東京)

〔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

北海道大学遺伝子病制御研究所・助教  
前田直良

### (2) 研究分担者

北海道大学遺伝子病制御研究所・教授  
上出利光  
東北大学災害科学国際研究所・教授  
服部俊夫  
北海道大学薬学研究院・教授  
前仲勝実  
北海道大学遺伝子病制御研究所・准教授  
大橋 貴

### (3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史