

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析 (HI5-がん-014)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 崎山 樹

平成 16 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析	1
崎山 樹	

II. 分担研究報告

1. 1 番染色体短腕に座位する新規がん抑制遺伝子の単離	6
中川原 章	
2. がん細胞の転移を制御する遺伝子の探索と解析	9
竹永 啓三	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	17
-----------------	----

厚生科学研究費（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

発がんの分子機構に関する研究
(ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析)
主任研究者 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局長

研究要旨

1) BMP2 による神経芽腫の細胞周期停止および細胞分化誘導過程において、CDK インヒビターである p27^{KIP1} の発現誘導および BMP に対する阻害因子である DAN の発現抑制が観察され、DAN を介したフィードバック制御機構の存在が示唆された。2) 260 例の神経芽腫 DNA を対象として、2,400 個の BAC クローンを搭載したチップを用いたアレイ CGH 法による解析の結果、ゲノム異常のパターンから神経芽腫には少なくとも 5 つのサブセットが存在し、それぞれ異なる予後を示すことを明らかにした。3) 我々が前に報告した神経芽腫細胞株の 1p36 ホモ欠失領域にマップされる KIF1B の機能解析を行ったところ、発現を抑制した NMuMG 細胞は、ヌードマウスに腫瘍を形成する能力を獲得したが、今回は、さらに、KIF1B をアデノウイルスに組み込み培養細胞で過剰発現させたところ、アポトーシスが誘導されることを確認した。従って、KIF1B はがん抑制遺伝子として機能する可能性が示唆された。4) シスプラチンによるアポトーシス誘導過程において、p73 の安定化に伴う IKK- α の核内蓄積が検出された。さらに、IKK- α は p73 と直接結合しそのユビキチン化を阻害することによって、p73 を特異的に安定化させることが明らかになった。従って、DNA 損傷に伴うアポトーシス誘導過程における IKK- α による p73 の新たな制御機構の存在が示唆された。5) 低酸素応答性エレメントを用いた弱毒型 DTA 発現ベクターを開発し、リボソーム法により高転移性肺癌細胞が形成した腫瘍内に遺伝子導入したところ、低酸素下腫瘍細胞の治療に有効である可能性が示唆された。6) 損傷乗り越え DNA polymerase に注目しその発現を調べたところ、低酸素により DNA polymerase iota (Pol*I*) の発現が誘導されることが判明した。

分担研究者

1. 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局 局長
2. 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 部長
3. 竹永 啓三 千葉県がんセンター研究局 主席研究員

A. 研究目的

発がんおよび転移に関し抑制的に働く遺伝子を単離し、その構造解析ならびに産物の機能を解析する。これらの遺伝子の発現や存在様式をがんの組織型や悪性度との関連で把握することにより、各遺伝子産物の役割を明らかにし、それらを指標にした、がんの診断、治療、予後の判定や転移の予知および抑止法を開発することを最終目的とする。15 年度の具体的な目的は以下のとおりである。1) BMP シグナルとその抑制因子である DAN の機能に関する解析と、そのがん細胞における病態生理学的意義の解明。2) アレイ CGH 法による神経芽腫のゲノム異常の解析とその臨床的意義の解明。3) 1 番染色体短腕 1p36 にマップされたがん抑制候補遺伝子の解析。4) シスプラチンによる DNA 損傷時の p73 と NF κ B 経路のクロストークの有無に関する解析。5) 低酸素下で機能する遺伝子発現ベクターの開発。6) 低酸素により誘導される遺伝子の同定。

B. 研究方法

- 1) RTBM1 神経芽腫細胞株を BMP2 で処理し神経分化を誘導した後、時間経過に伴う遺伝子および蛋白質の発現をそれぞれ RT-PCR 法および Western 法により測定した。
- 2) アレイ CGH 法には、カリフォルニア大学サンフランシスコ分校がんセンターで開発され、2,400 個の BAC クローンを搭載した DNA チップを用いた。データ解析には "Cluster and Tree View" および "Significance Analysis of Microarrays" を使用した。
- 3) KIF1B の機能解析には、レトロウイルスおよびアデノウイルスをベースにしたアンチセンスおよびセンス発現ベクターを構築し、フォーカス形成能、軟寒天コロニー形成能、ヌードマウス造腫瘍能および FACScan による Sub-G1 DNA content の増加を指標としたアッセイを行った。
- 4) p73, IKK- α および DAN の発現ならびに機能解析には、半定量 RT-PCR 法、ウエスタン法、GST pull-down assay, 免疫沈降法、蛍光免疫染色法、ルシフェラーゼレポーター法および β -gal 染色法を用いた。また、遺伝子導入には COS7, U2OS, H1299, HeLa, SH-SY5Y, NB-C201, RT-BM1 細胞を用いた。さらに、ユビキチン化蛋白質の検出にはヒスチジンで標識されたポリユビキチンおよび基質蛋白質を共発現させた後、ニッケルアガロースを用いてユビキチン化蛋白

質を濃縮した。

- 5) DTA 発現ベクター作製には、弱毒型 DTA を用い、常酸素下では素早く分解されてしまうように、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 由来の oxygen dependent degradation (ODD) 領域と融合した蛋白質を発現するようにした。DTA/ODD 発現ベクターの腫瘍内遺伝子導入は、DNA を DMRIE-C と混合した後、ルイス肺癌由来の A11H10 細胞（低酸素誘導アポトーシスに高抵抗性で高転移性）が形成した皮下腫瘍内へ直接注入することにより行った。アポトーシスは、annexin V 染色、FACScan による sub-G1 の解析および TUNEL 法により検出した。腫瘍内低酸素部位は EF5 を用いて検出した。
- 6) 低酸素の PolI の発現に及ぼす影響は、肝癌由来の HepG2 細胞を用いて行った。細胞は、常酸素あるいは 1% O₂ 濃度下で 0~24 時間培養した。PolI の発現は半定量 RT-PCR 法により解析した。
- 7) 倫理面での配慮：実験動物の使用時は、千葉県がんセンター実験動物管理規定を遵守し、実験動物の生命の尊厳性を重んじて実験を行った。臨床材料については、千葉県がんセンターおよびカリフォルニア大学倫理審査委員会承認された基準に基づき、プライバシーの保護を厳守し患者の同意の得られた検体または連結不可能匿名化された検体に限定して研究を行った。

C. 研究成果

- 1) 1p35 にマップされる DAN は BMP に対する阻害因子として機能し、その発現は p73 によって正に制御されていることを前回までに明らかにしたが、今回は、BMP2 による神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y, RT-BM1) の細胞周期停止および細胞分化誘導過程において、CDK インヒビターの一つである p27^{KIP1} の発現誘導、および p73 の発現抑制に起因すると考えられる DAN の発現抑制が観察された。従って、BMP シグナルは p73 の発現を抑制しその標的遺伝子の一つである DAN を介して、自らのシグナルを調節するというフィードバック制御機構の存在が示唆された。
- 2) 神経芽腫 260 例を対象としたアレイ CGH 法による解析の結果、以下の知見が得られた。1 番染色体短腕の欠失を含むゲノム異常のパターンから神経芽腫には少なくとも 5 つのサブセットが存在すること、

ならびに Kaplan-Meier 法による生存分析の結果それぞれ異なる予後を示すことが判明した。また、発がんに関連すると考えられる領域の詳細が明らかになった。

- 3) アンチセンス KIF1B を発現するレトロウイルスベクターを構築した後、NMuMG 細胞に導入し KIF1B 低発現株を樹立した。この低発現株ではコントロール株に比べて、フォーカス形成能およびコロニー形成能の昂進が観察された。また、この低発現株はヌードマウスにおける造腫瘍能を獲得していた。さらに、神経芽腫細胞株で同定された KIF1B の 3 種類のスプライス変異体をアデノウイルスベクターを用いて SH-SY5Y, NB-C201, および HeLa 細胞で過剰発現させたところ、2 種の変異体のみアポトーシスを誘導した。従って、KIF1B はスプライス変異体特異的がん抑制遺伝子であることが示唆された。
- 4) シスプラチンによる U2OS 細胞のアポトーシス誘導過程において、NFκB リン酸化酵素 IKK の活性サブユニットの一つである IKK-α が細胞核内に蓄積することが判明した。また、IKK-α は p73 と特異的に結合しそのユビキチン化を阻害することによって、その半減期を延長させるとともにその転写活性化能およびアポトーシス誘導能を昂進させることが認められた。さらに、IKK-α による p73 の安定化にはキナーゼ活性が必須であった。一方、IKK-α による p53 の機能昂進は検出されなかった。従って、DNA 損傷に伴うアポトーシス誘導過程における IKK-α による p73 の新たな制御機構の存在が示唆された。
- 5) ERBP 結合領域の効果を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に ERBP 結合領域を組み込んだレポータープラスミドを構築した。これを A11 細胞に遺伝子導入し、常酸素と低酸素下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、低酸素下で培養すると顕著にルシフェラーゼ活性が上昇することが判った。次に、低酸素下で VEGF を高発現するマウス肺癌由来 A11 細胞に発現ベクターとルシフェラーゼ発現ベクターを同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標に蛋白質合成阻害能を調べたところ、DTA/ODD 発現ベクターの場合には酸素濃度に関わらず強い阻害を示したのに対し、弱毒型 W153F DTA/ODD 発現ベクターの場合には常酸素下では阻害が弱い低酸素下では強いことが判った。また、いずれのベクターを用いても常酸素下に比べ

低酸素下でアポトーシスが強く誘導されたが、W153F DTA/ODD では常酸素下に比べ低酸素下でのアポトーシス誘導能が高いことが判った。そこで、W153F DTA/ODD 発現ベクターを DIMRIE-C と混合し、低酸素誘導アポトーシスに高抵抗性の A11H10 細胞が形成した皮下腫瘍内に直接遺伝子導入し、2日後に低酸素領域 (EF5 陽性領域) と常酸素領域 (EF5 陰性領域) におけるアポトーシスを TUNEL 染色により検出した。その結果、低酸素領域において顕著に TUNEL 陽性細胞が多いことが判明した。

- 6) HepG2 細胞を低酸素下で 0、6、12、24 時間培養した後、RNA を調製し、Poli の発現を RT-PCR により調べた。その結果、培養時間が長くなるに伴って Poli RNA の発現が増加することが判明した。

D. 考察

- 1) BMP による神経芽腫の細胞分化誘導に伴って、DAN の発現抑制を介した BMP シグナルのフィードバック制御機構の存在が示唆された。レチノイン酸による神経芽腫の細胞分化過程においては、DAN および p73 の発現は昂進することから、両者の発現レベルの増減が BMP およびレチノイン酸による細胞分化の分子機構の違いを反映しているものと考えられた。
- 2) アレイ CGH 法による解析から、それぞれの神経芽腫サブセットにおけるゲノム異常のパターンが明らかになり、各神経芽腫サブセットの生物学的特性を決定するがん関連遺伝子の同定がより具体的になった。
- 3) 神経芽腫における KIF1B のがん抑制遺伝子としての意義が明らかになったことにより、今後同じ 1p 欠失を有する成人がんにおける KIF1B の意義について早急に検討する必要があるが出てきた。加えて、KIF1B による新たなアポトーシス誘導機構の同定へ向けた研究の展開が期待される。
- 4) シスプラチンによる p73 の安定化の新たなしくみとして、核内 IKK- α との直接結合を介した p73 のユビキチン化の阻害機構の存在が判明した。IKK- α による p73 の安定化は p53 の存在の有無とは関係なく検出されることから、p53 変異を持つがん細胞のアポトーシス誘導において、両者の相互作用は極めて重要な役割を担っていると考えられる。シスプラチンによる IKK- α の核内蓄積の分子機構については今後の検討課題である。
- 5) VEGF プロモーター制御下で DTA/ODD 融合蛋白質

を発現するベクターを構築し、これを皮下腫瘍内にリポソーム法により遺伝子導入すると、低酸素領域においてアポトーシスが誘導される系を確立した。本研究により、VEGF プロモーター制御下の W153F DTA/ODD 発現ベクターが、放射線療法や化学療法に抵抗性である低酸素下のがん細胞を殺すのに有効である可能性が示唆された。

- 6) 低酸素が Poli の発現を誘導することから、Poli 遺伝子のプロモーター領域にも HRE が存在する可能性が考えられ、今後、これらの HRE が機能するのか、また Poli の低酸素による発現誘導に本当に HIF-1 が関与するのかどうかを検討する必要がある。低酸素による Poli の発現誘導がどのような生物学的な意味を有するのかは今後の検討課題である。

E. 結論

- 1) BMP2 による神経芽腫の細胞分化誘導過程における DAN の発現抑制を介したフィードバック制御機構の存在を明らかにした。
- 2) アレイ CGH 法によるゲノム異常のパターンの解析から、神経芽腫には少なくとも 5 つのサブセットが存在し、それぞれ異なる予後を示すことが判明した。
- 3) 神経芽腫細胞株の 1p36 ホモ欠失領域にマップされる KIF1B が、アポトーシス誘導を介したがん抑制機能を持つことを明らかにした。
- 4) NF κ B リン酸化酵素 IKK の活性サブユニットの一つである IKK- α が、シスプラチンによるアポトーシス誘導過程における p73 の安定化および活性化を担う因子の一つであることを明らかにした。
- 5) 低酸素応答性エレメントを用いた W153F DTA/ODD 発現ベクターが低酸素下腫瘍細胞の治療に有効である可能性が示唆された。
- 6) 低酸素により Poli の発現が誘導されることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Nakamura, Y., Ozaki, T., Koseki, H., Nakagawara, A. and Sakiyama, S. Accumulation of p27 KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 307: 206-213, 2003.
- 2) Ozaki, T., Watanabe, K., Nakagawa, T., Miyazaki, K., Takahashi, M. and Nakagawara, A. Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB. *Oncogene*, 22: 3231-3242, 2003.

- 3) Okamoto, Y., Ozaki, T., Miyazaki, K., Aoyama, M., Miyazaki, M. and Nakagawara, A. UbCH10 is the cancer-related E2 Ubiquitin conjugating enzyme. *Cancer Res*, 63: 4167-4173, 2003.
- 4) Ohira, M., Morohashi, A., Inuzuka, H., Shishikura, T., Kawamoto, T., Kageyama, H., Nakamura, Y., Isogai, E., Takayasu, H., Sakiyama, S., Suzuki, Y., Sugano, S., Goto, T., Sato S, and Nakagawara, A. Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets with chromosomal mapping. *Oncogene*. 22: 5525-5536, 2003.
- 5) Saito-Ohara, F., Imoto, I., Inoue, J., Nakagawara, A., and Sugimoto, T. and Inazawa, J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res*, 63: 1876-1883, 2003.
- 6) Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Sakuma, S., Muramatsu, T. and Kadomatsu, K. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer*, 88:1522-1526, 2003.
- 7) Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Hayashi, S., Hosoda, M., Todo, S. and Nakagawara, A. Negative autoregulation of p73 and p53 by DNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, 197:105-109, 2003.
- 8) Ohira, M., Morohashi, A., Nakamura, Y., Isogai, E., Furuya, K., Hamano, S., Machida, T., Aoyama, M., Fukumura, M., Miyazaki, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Hirato, J. and Nakagawara, A. Neuroblastoma oligo-capping cDNA Project: Toward the understanding of the genesis and biology of neuroblastoma. *Cancer Lett* 197: 63-68, 2003.
- 9) Kawamoto, T., Ohira, M., Hamano, S., Hori, T. and Nakagawara, A. High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, Nbla03145/ECEL1alpha and beta, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Int J Oncol*, 22: 815-822. 2003.
- 10) Miyazaki, K., Ozaki, T., Kato, C., Hanamoto, T., Fujita, T., Irino, S., Watanabe, K., Nakagawa, T., Nakagawara, A. A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Comm*, 308: 106-113, 2003.
- 11) Carninci, P., Waki, K., Shiraki, T., Konno, H., Shibata, K., Itoh, M., Aizawa, K., Arakawa, T., Ishii, Y., Sasaki, D., Bono, H., Kondo, S., Sugahara, Y., Saito, R., Osato, N., Fukuda, S., Sato, K., Watahiki, A., Hirozane-Kishikawa, T., Nakamura, M., Shibata, Y., Yasunishi A., Kikuchi, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Gustincich, S., Beisel, K., Povan, W., Aidinis, V., Nakagawara, A., Held, W. A., iwata, H., Kono, T., Nakauchi, H., Lyons, P., Wells, C., Hume, D. A., Fagiolini, M., Hensch, T. K., Brinkmeier, M., Camper, S., Muramatshu, M., Okazaki, Y., Kawai, J. and Hayashizaki, Y. Targeting a complex transcriptome: the construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia. *Genome Res*, 6B: 1273-89, 2003.
- 12) Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M. and Takenaga, K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene*, 22: 6717-6724, 2003.
- 13) Duarte, WR., Shibata, T., Takenaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, I., Yamauchi, M. and Kasugai, S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, 18: 493-501, 2003.
- 14) Oga, M., Takenaga, K., Sato, Y., Nakajima, H., Koshikawa, N., Osato, K. and Sakiyama S. Inhibition of metastatic brain tumor growth by intramuscular administration of the endostatin gene. *Int J Oncol*, 23: 73-79, 2003.
- 15) Ugai, S., Shimozato, O., Kawamura, K., Wang, YQ., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther*, 10: 187-192, 2003.
- 16) Tada, Y., O-Wang, J., Yu, L., Shimozato, O., Wang, YQ., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takenaga, K., Sakiyama, S., and Tagawa, M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther*, 10: 451-456, 2003.
- 17) Iwadate, Y., Yamaura, A., Sakiyama, S., Sato, Y. and Tagawa, M. Glioma-specific cytotoxic T cells can be effectively induced by subcutaneous vaccination of irradiated wild-type tumor cells without artificial cytokine production. *Int J Oncol*, 23: 483-488, 2003.
- 18) Sakiyama, S., Yu, L., Tomizawa, M., Shimada, H., Kadomatsu K., Muramatsu, T., Ikematsu, S., Nakagawara, A. and Tagawa M. Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner. *Adv*

- Enzyme Regul**, 43: 57-66, 2003.
- 19) Tomizawa, M., Watanabe, K., Saisho, H., Nakagawara, A. and Tagawa, M. Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein α and β hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker. **Anticancer Res**, 23: 351-354, 2003.
- 20) Ugai S, Shimozato O, Yu L, Wang YQ, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S. Tagawa M. Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects. **Cancer Gene Ther**, 10: 771-778, 2003.
- 21) Tomioka, N., Kobayashi, H., Kageyama, H., Ohira, M., Nakamura, Y., Sasaki, F., Todo, S., Nakagawara, A., Kaneko, Y. Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: Evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas. **Genes Chromosomes Cancer** 36:139-150, 2003.
- 22) Nakagawara, A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. **Prog Brain Res**, 143: 233-242, 2004.
- 23) Kawamura, K., Bahar, R., Seimiya, M., Chiyo, M., Wada, A., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Honda, I., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer**, 109: 9-16, 2004.
- 24) Miyazaki, K., Fujita, T., Ozaki, T., Kato, C., Kurose, Y., Sakamoto, M., Kato, S., Goto, T., Itoyama, Y., Aoki, M. and Nakagawara, A. NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled 1, Targets mutant superoxide dismutase 1. **J Biol Chem**, 279:11327-11335, 2004.
- 25) Ohtori, S., Isogai, E., Hasue, F., Ozaki, T., Namamura, Y., Nakagawara, A., Koseki, H., Yuasa, S., Hanaoka, E., Shinbo, J., Yamamoto, T., Chiba, H., Yamazaki, M., Moriya, H. and Sakiyama, S. Reduced inflammatory pain in mice deficient for the differential screening-selected gene aberrant in Neuroblastoma. **Mol Cell Neurosci**, in press, 2004.
- 26) Nakagawara, A., Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. **Cancer Lett**, in press, 2004.
- 27) Hamano, S., Ohira, M., Isogai, E., Nakada, K., Nakagawara, A. Identification of Novel Human Neuronal Leucine-Rich Repeat (hNLRR) Family Genes and Inverse Association of Expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the Prognosis of Primary Neuroblastomas. **Int. J. Oncol.** (in press)
- 28) Wang, Y.Q., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J. Elevated expression of DNA polymerase θ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. **Int. J. Oncol.** (in press)
- 29) Yamada, S., Ohira, M., Horie, H., Ando, K., Takayasu, H., Suzuki, Y., Sugano, S., Matsunaga, T., Hiyama, E., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Suita, S., Kaneko, M., Sasaki, F., Hashizume, K., Ohnuma, N., Nakagawara, A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the Plk1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. **Oncogene** (in press).
- 30) Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M., Nakagawara, A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. **J. Biol. Chem.** (in press).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願中

発明の名称：ヒト 1p36 ホモ接合性欠失領域

分担研究報告書

1 番染色体短腕に座位する新規がん抑制遺伝子の単離とその機能解析

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター生化学研究部 部長

研究要旨 1番染色体短腕にマップされるがん抑制遺伝子の同定とその候補遺伝子の機能解析を目的として以下の結果を得た。(1) 260例の神経芽腫 DNA を対象として、2,400個の BAC クローンを搭載したチップを用いたアレイ CGH 法による解析の結果、ゲノム異常のパターンから神経芽腫には少なくとも5つのサブセットが存在し、それぞれ異なる予後を示すことを明らかにした。(2) 我々が前に報告した神経芽腫細胞株の 1p36 ホモ欠失領域にマップされる KIF1B の機能解析を行ったところ、発現を抑制した NMuMG 細胞は、ヌードマウスに腫瘍を形成する能力を獲得したが、今回は、さらに、KIF1B をアデノウイルスに組み込み培養細胞で過剰発現させたところ、アポトーシスが誘導されることを確認した。従って、KIF1B はがん抑制遺伝子として機能する可能性が示唆された。(3) シスプラチンによるアポトーシス誘導過程において、p73 の安定化に伴う IKK- α の核内蓄積が検出された。さらに、IKK- α は p73 と直接結合しそのユビキチン化を阻害することによって、p73 を特異的に安定化させることが明らかになった。従って、DNA 損傷に伴うアポトーシス誘導過程における IKK- α による p73 の新たな制御機構の存在が示唆された。

A. 研究目的

1番染色体短腕領域は、神経芽腫をはじめとする多くのヒト腫瘍においてゲノムレベルでの欠失が検出されていることから、複数のがん抑制遺伝子がこの領域に存在していると考えられているが、未だにこのゲノム異常領域に由来する神経芽腫関連がん抑制遺伝子は同定されていない。そこで、本研究では、神経芽腫由来のゲノム DNA を対象としたアレイ CGH 法を用いて、1番染色体短腕領域を含むゲノム異常の共通領域を同定するとともに、その領域の狭小化を試みることによって、候補遺伝子の絞り込みを行うことを目的とした。また、我々が見いだした 1p36 ホモ欠失領域にマップされる候補遺伝子に関して機能解析を進めるとともに、従来より解析を進めている 1p36 のがん抑制遺伝子候補である p73 の DNA 損傷に伴う活性化の機構に関し、Nf κ B シグナル伝達経路との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

アレイ CGH 法には、カリフォルニア大学サンフランシスコ分校がんセンターで開発され、2,400個の BAC クローンを搭載した DNA チップを用いた。データ解析には "Cluster and Tree View" および "Significance Analysis of Microarrays" を使用した。KIF1B の機能解析には、レトロウイルスおよびアデノウイルスをベースにしたアンチセンスおよびセンス発現ベクターを構築し、フォーカス形成能、軟寒

天コロニー形成能、ヌードマウス造腫瘍能および FACScan による Sub-G1 DNA content の増加を指標としたアッセイを行った。p73, IKK-a および DAN の発現ならびに機能解析には、半定量 RT-PCR 法、ウエスタン法、GST pull-down assay, 免疫沈降法、蛍光免疫染色法、ルシフェラーゼレポーター法および b-gal 染色法を用いた。また、遺伝子導入には COS7, U2OS, HI299, HeLa, SH-SY5Y, NB-C201, RT-BM1 細胞を用いた。さらに、ユビキチン化蛋白質の検出にはヒスチジンで標識されたポリユビキチンおよび基質蛋白質を共発現させた後、ニッケルアガロースを用いてユビキチン化蛋白質を濃縮した。

C. 研究成果

(1) 神経芽腫 260例を対象としたアレイ CGH 法による解析の結果、以下の知見が得られた。1番染色体短腕の欠失を含むゲノム異常のパターンから神経芽腫には少なくとも5つのサブセットが存在すること、ならびに Kaplan-Meier 法による生存分析の結果それぞれ異なる予後を示すことが判明した。また、発がんに関連すると考えられる領域の詳細が明らかになった。

(2) 神経芽腫細胞株の 1p36 ホモ欠失領域にマップされる KIF1B のがん抑制機能を検討する目的で、アンチセンス KIF1B を発現するレトロウイルスベクターを構築した後、NMuMG 細胞に導入し KIF1B 低発現株を樹立した。この低発現株ではコントロール

株に比べて、フォーカス形成能およびコロニー形成能の昂進が観察された。また、この低発現株はノドマウスにおける造腫瘍能を獲得していた。さらに、神経芽腫細胞株で同定された KIF1B の3種類のスプライス変異体をアデノウイルスベクターを用いて SH-SY5Y, NB-C201, および HeLa 細胞で過剰発現させたところ、2種の変異体のみアポトーシスを誘導した。従って、KIF1B はスプライス変異体特異的がん抑制遺伝子であることが示唆された。

(3) シスプラチンによる U2OS 細胞のアポトーシス誘導過程において、NF κ B リン酸化酵素 IKK の活性サブユニットの一つである IKK-a が細胞核内に蓄積することが判明した。また、IKK-a は p73 と特異的に結合しそのユビキチン化を阻害することによって、その半減期を延長させるとともにその転写活性化能およびアポトーシス誘導能を昂進させることが認められた。さらに、IKK-a による p73 の安定化にはキナーゼ活性が必須であった。一方、IKK-a による p53 の機能昂進は検出されなかった。従って、DNA 損傷に伴うアポトーシス誘導過程における IKK-a による p73 の新たな制御機構の存在が示唆された。

D. 考察

アレイ CGH 法による解析から、それぞれの神経芽腫サブセットにおけるゲノム異常のパターンが明らかになり、各神経芽腫サブセットの生物学的特性を決定するがん関連遺伝子の同定がより具体的になった。また、アレイ CGH の結果から得られたゲノム異常のパターンと臨床的予後との強い相関は、新しい予後予測法の開発へ繋がるものと期待される。一方、神経芽腫における KIF1B のがん抑制遺伝子としての意義が明らかになったことにより、今後同じ 1p 欠失を有する成人がんにおける KIF1B の意義について早急に検討する必要があるが出てきた。加えて、KIF1B による新たなアポトーシス誘導機構の同定へ向けた研究の展開が期待される。また、シスプラチンによる p73 の安定化の新たなしくみとして、核内 IKK-a との直接結合を介した p73 のユビキチン化の阻害機構の存在が判明した。IKK-a による p73 の安定化は p53 の存在の有無とは関係なく検出されることから、p53 変異を持つがん細胞のアポトーシス誘導において、両者の相互作用は極めて重要な役割を担っていると考えられる。シスプラチンによる IKK-a の核内蓄積の分子機構については今後の検討課題である。

E. 結論

1. アレイ CGH 法によるゲノム異常のパターンの解析から、神経芽腫には少なくとも5つのサブセットが存在し、それぞれ異なる予後を示すことが判明した。
2. 神経芽腫細胞株の 1p36 ホモ欠失領域にマップされる KIF1B が、アポトーシス誘導を介したがん抑制機能を持つことを明らかにした。
3. NF κ B リン酸化酵素 IKK の活性サブユニットの一つである IKK-a が、シスプラチンによるアポトーシス誘導過程における p73 の安定化および活性化を担う因子の一つであることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. Tomioka N, Kobayashi H, Kageyama H, Ohira M, Nakamura Y, Sasaki F, Todo S, Nakagawara A, Kaneko Y. Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: Evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas. **Genes Chromosomes Cancer** 36:139-150, 2003.
 2. Tomizawa M, Watanabe K, Saisho H, Nakagawara A, Tagawa M. Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein α and β genes in human hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker. **Anticancer Res.** 23: 351-354, 2003.
 3. Kawamoto T, Ohira M, Hamano S, Hori T, Nakagawara A. High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, Nbla03145/ECEL1 α and β , is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. **Int. J. Oncol.** 22:815-822, 2003.
 4. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. **Cancer Res.** 63: 1876-1883, 2003.
 5. Sakiyama S, Yu L, Tomizawa M, Shimada H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Nakagawara A, Tagawa M. Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner. **Advan. Enzyme Regul.** 43:57-66, 2003.
 6. Carninci P, Waki K, Shiraki T, Konno H, Shibata K, Itoh M, Aizawa K, Arakawa T, Ishii Y, Sasaki D, Bono H, Kondo S, Sugahara Y, Saito R, Osato N, Fukuda S, Sato K, Watahiki A, Hirozane-Kishikawa T, Nakamura M, Shibata Y, Yasunishi A, Kikuchi N, Yoshiki A, Kusakabe M, Gustincich S, Beisel K,

- Pavan W, Aidinis V, Nakagawara A, Held W. A., Iwata H, Kono T, Nakauchi H, Lyons P, Wells C, Hume D. A., Fagiolini M, Hensch T. K., Brinkmeier M, Camper S, Muramatsu M, Okazaki Y, Kawai J, Hayashizaki Y. Targeting a complex transcriptome: The construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia. **Genome Res.** 13:1273-1289, 2003.
7. Ozaki T, Watanabe K, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Nakagawara A. Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB. **Oncogene** 22:3231-3242, 2003.
 8. Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, Nakagawara A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin conjugating enzyme. **Cancer Res.** 63:4167-4173, 2003.
 9. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K. Correlation of elevated level of serum midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. **Br. J. Cancer** 88:1522-1526, 2003.
 10. Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Hayashi S, Hosoda M, Todo S, Nakagawara A. Negative autoregulation of p73 and p53 by DNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. **Cancer Lett.** 197:105-109, 2003.
 11. Ohira M, Morohashi A, Nakamura Y, Isogai E, Furuya K, Hamano S, Machida T, Aoyama M, Fukumura M, Miyazaki K, Suzuki Y, Sugano S, Hirato J, Nakagawara A. Neuroblastoma Oligo-capping cDNA Project : Toward the Understanding of the Genesis and Biology of Neuroblastoma. **Cancer Lett.** 197:63-68, 2003.
 12. Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A. Expression profiling and characterization of 4,200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. **Oncogene** 22:5525-5536, 2003.
 13. Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 308:106-113, 2003.
 14. Nakamura Y, Ozaki T, Koseki H, Nakagawara A, Sakiyama S. Accumulation of p27KIP1 is associated with BMP2-mediated growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 307:206-213, 2003.
 15. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In NGF and Related Molecules in Health and Disease, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, Elsevier Science Publisher, pp233-242, 2004.
 16. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a Novel Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase for Dishevelled-1, Targets Mutant Superoxide Dismutase-1. **J. Biol. Chem.** 279: 11327-11335, 2004.
 17. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. **Cancer Lett.** 204:213-224, 2004.
 18. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of Novel Human Neuronal Leucine-Rich Repeat (hNLRR) Family Genes and Inverse Association of Expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the Prognosis of Primary Neuroblastomas. **Int. J. Oncol.** (in press)
 19. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. **Int. J. Oncol.** (in press)
 20. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the Pk1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. **Oncogene** (in press).
 21. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. **J. Biol. Chem.** (in press).

分担研究報告書

がん細胞の転移を制御する遺伝子の検索と解析

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター化学療法研究部主席研究員

研究要旨

(1) 腫瘍組織内の低酸素領域において増殖休止状態にある細胞に対してもその強力な蛋白質合成阻害活性により殺細胞効果が期待できるジフテリア毒素 A 鎖 (DTA) を vascular endothelial growth factor (VEGF) プロモーターの制御下で発現させる発現ベクターを構築し、その殺細胞効果を検証した。低酸素応答の特異性を増加させるために、弱毒型 DTA と hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 由来の oxygen dependent degradation (ODD) 領域とが融合した蛋白質を発現するように、また、低酸素下で融合蛋白質の発現を高めるために erythropoietin mRNA の 3'非翻訳領域に存在する低酸素下で mRNA を安定化する領域 (ERBP 結合領域) を有する mRNA を発現するように構築した。この発現ベクターをリボソーム法により高転移性肺癌細胞が形成した腫瘍内に遺伝子導入したところ、腫瘍内の低酸素部位においてアポトーシスを起こしている細胞の割合が顕著に増加していることが判った。従って、低酸素応答性エレメントを用いた弱毒型 DTA 発現ベクターが低酸素下腫瘍細胞の治療に有効である可能性が示唆された。(2) 低酸素はがん細胞における突然変異の頻度を数倍上げることが知られているが、その機序については不明である。そこで、1つの可能性として損傷乗り越え DNA polymerase に注目しその発現を調べたところ、低酸素により DNA polymerase iota (PolI) の発現が誘導されることが判明した。

A. 研究目的

(1) 固形腫瘍内低酸素領域に存在するがん細胞は、細胞分裂休止状態にあり放射線や化学療法等の治療に対し抵抗性を示す。以前我々は、低酸素により活性化される vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子プロモーター制御下自殺 (HSV-TK) 遺伝子のがん細胞への導入とガンシクロピルの投与が抗腫瘍効果を示すことを報告した。しかしこの効果は、その殺細胞の作用機作からすると、活発に増殖しているがん細胞には有効であるが、低酸素下で増殖休止状態にあるがん細胞には期待できないのではないかと考えられた。そこで、休止状態にあるがん細胞に対してもその強力な蛋白質合成阻害活性により殺細胞効果が期待できるジフテリア毒素 A 鎖 (DT-A) を VEGF プロモーターの制御下で発現させる発現ベクターを構築し、その効果を検証することを目的とした。

(2) がん細胞を低酸素下で培養すると突然変異の頻度が数倍増加することが知られている。このために遺伝子不安定性が増し、悪性度進展が促進されると考えられている。しかし、何故低酸素により突然変異の頻度が増加するのかについての機序の解析は殆どなされていない。そこで、1つの可能性として損傷乗り越え DNA polymerase に注目し、その発現が低酸素によりどのように変化するかを検討すること

を目的とした。

B. 研究方法

(1) DTA 発現ベクターは次のように作製した。DTA は毒性が強いので正常細胞へ誤って入った場合には副作用が出る恐れがある。そこで、弱毒型 H2IA DTA および W153F DTA を用いた。さらに、常酸素下では素早く分解されてしまうように、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 由来の oxygen dependent degradation (ODD) 領域と融合した蛋白質を発現するようにした。また、低酸素下で融合蛋白質の発現を高めるために、erythropoietin mRNA の 3'非翻訳領域に存在する低酸素下で mRNA を安定化する領域 (ERBP 結合領域) を有する mRNA を発現するように構築した。DTA/ODD 融合蛋白質のポリユビキチン化は、35S 標識融合蛋白質を、ユビキチン、ユビキチンアルデヒド、ATP 存在下で 293T 細胞から調製した S100 画分とインキュベートすることにより調べた。DTA/ODD 融合蛋白質の蛋白質合成阻害活性は、SP6 TNT in vitro transcription/ translation system におけるルシフェラーゼ蛋白質の合成阻害能を計測することにより調べた。DTA/ODD 発現ベクターの腫瘍内遺伝子導入は、DNA を DMRIE-C と混合した後、ルイス肺癌由来の A11H10 細胞 (低酸素誘導アポトーシスに高抵抗性で高転移性) が形成した皮下腫瘍内へ直接注入することにより行った。アポトーシスは、annexin V 染色、

FACScanによる sub-G1 の解析および凍結切片を用いて TUNEL 法により検出した。腫瘍内低酸素部位は EF5 を用いて検出した。

(2) 低酸素の Poli の発現に及ぼす影響は、肝癌由来の HepG2 細胞を用いて行った。細胞は、常酸素あるいは 1% O₂ 濃度下で 0~24 時間培養した。Poli の発現は半定量 RT-PCR 法により解析した。

C. 研究成果

(1) ERBP 結合領域の効果を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に ERBP 結合領域を組み込んだレポータープラスミドを構築した。これを A11 細胞に遺伝子導入し、常酸素と低酸素下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、低酸素下で培養すると顕著にルシフェラーゼ活性が上昇することが判った。次に、DTA および DTA/ODD 融合蛋白質の常酸素下でのポリユビキチン化を調べたところ、DTA はポリユビキチン化されないが、DTA/ODD はポリユビキチン化され、プロテアソームにより分解されるが判った。また、DTA/ODD 融合蛋白質は desferrioxamine による擬低酸素状態では分解されないことが判った。さらに、DTA/ODD 融合蛋白質は DTA と同等の蛋白質合成阻害能を保持していることも確認された。そこで、低酸素下で VEGF を高発現するマウス肺癌由来 A11 細胞に発現ベクターとルシフェラーゼ発現ベクターを同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標に蛋白質合成阻害能を調べたところ、DTA/ODD 発現ベクターの場合には酸素濃度に関わらず強い阻害を示したのに対し、弱毒型 W153F DTA/ODD 発現ベクターの場合には常酸素下では阻害が弱い低酸素下では強いことが判った。また、W153F DTA/ODD 発現ベクターの方が H21A DTA/ODD 発現ベクターよりも優れていることが判明した。次に、A11 細胞に同ベクターを遺伝子導入した後、アポトーシスを annexin V 染色陽性細胞数および FACscan における sub-G1 の割合を指標にして調べた。その結果、いずれのベクターを用いても常酸素下に比べ低酸素下でアポトーシスが強く誘導されたが、W153F DTA/ODD では常酸素下に比べ低酸素下でのアポトーシス誘導能が高いことが判った。そこで、W153F DTA/ODD 発現ベクターを DIMRIE-C と混合し、低酸素誘導アポトーシスに高抵抗性の A11H10 細胞が形成した皮下腫瘍内に直接遺伝子導入し、2 日後に低酸素領域 (EF5 陽性領域) と常酸素領域 (EF5 陰性領域) におけるアポトーシスを TUNEL

染色により検出した。その結果、低酸素領域において顕著に TUNEL 陽性細胞が多いことが判明した。常酸素領域では TUNEL 陽性細胞は殆ど検出されなかった。また、空ベクターを注入した場合にもアポトーシスは殆ど観察されなかった。

(2) HepG2 細胞を低酸素下で 0、6、12、24 時間培養した後、RNA を調製し、Poli の発現を RT-PCR により調べた。その結果、培養時間が長くなるに伴って Poli RNA の発現が増加することが判明した。

D. 考察

(1) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる解析から、ERBP 結合領域が mRNA の安定化に寄与していることが示唆された。また、DTA/ODD 融合蛋白質が、常酸素下ではポリユビキチン化され分解されるが、擬低酸素化では分解されないことから、ODD 領域が期待通りに働いていることが示唆された。これらの結果を基に、VEGF プロモーター制御下で DTA/ODD 融合蛋白質を発現するベクターを構築した。このベクターを A11 細胞に導入したところ、常酸素下と低酸素下のどちらにおいても強力にアポトーシスを誘導してしまい、低酸素特異性は認められなかった。この結果は、DTA の極めて強い作用によるものと推察された。一方、弱毒型 W153F DTA/ODD 発現ベクターを用いたところ低酸素特異性が認められた。また、このベクターを皮下腫瘍内にリポソーム法により遺伝子導入すると、低酸素領域においてアポトーシスが顕著に増加することが明らかになった。これらの結果は、VEGF プロモーター制御下の W153F DTA/ODD 発現ベクターが、放射線療法や化学療法に抵抗性である低酸素下のがん細胞を殺すのに有効である可能性を示唆する。

(2) 低酸素により誘導される既知の遺伝子のプロモーター領域には HIF-1 が結合する hypoxia-response element (HRE) が存在することが多い。低酸素が Poli の発現を誘導することから、Poli 遺伝子のプロモーター領域にも HRE が存在する可能性が考えられ、実際、塩基配列の解析により 3ヶ所に HRE のコンセンサス配列が存在することを見い出している。今後、これらの HRE が機能するのか、また Poli の低酸素による発現誘導に本当に HIF-1 が関与するのかどうかを検討する必要があるだろう。低酸素による Poli の発現誘導がどのような生物学的な意味を有するのかは今後の検討課題である。低酸素/再酸素化が起こると細胞内で活性酸素種 (ROS) が多量に生じることが知ら

れている。ROS は G を 8-OHG に変換し、G→T transversion mutation の原因になることが良く知られている。この時に、error-prone である Poli が多く存在すると、さらに高率に突然変異が起きてしまう可能性も考えられる。

B. 結論

(1) 低酸素応答性エレメントを用いた W153F DTA/ODD 発現ベクターが低酸素下腫瘍細胞の治療に有効である可能性が示唆された。

(2) 低酸素により Poli の発現が誘導されることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang, Y.Q., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.*, in press (2004).
2. Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M., Takenaga, K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene*, 22, 6717-6724, 2003.
3. Duarte, WR., Shibata, T., Takenaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, Y., Yamauchi, M. and Kasugai, S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 493-501, 2003.
4. Oga, M., Takenaga, K., Sato, Y., Nakajima, H., Koshikawa, N., Osato, K. and Sakiyama, S. Inhibition of metastatic brain tumor growth by intramuscular administration of the endostatin gene. *Int. J. Oncology*, 23, 73-79, 2003.
5. Tada, Y., O-Wang, J., Yu, L., Shimozato, O., Wang, Y. Q., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther.*, 10, 451-456, 2003.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura, Y., Ozaki, T., Koseki, H., Nakagawara, A. and Sakiyama, S.	Accumulation of p27 ^{KIP1} is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines.	Biochem Biophys Res Commun	307	206-213	2003
Ozaki, T., Watanabe, K., Nakagawa, T., Miyazaki, K., Takahashi, M. and Nakagawara, A.	Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB.	Oncogene	22	3231-3242	2003
Okamoto, Y., Ozaki, T., Miyazaki, K., Aoyama, M., Miyazaki, M. and Nakagawara, A.	Ubch10 is the cancer-related E2 Ubiquitin conjugating enzyme.	Cancer Res	63	4167-4173	2003
Ohira, M., Morohashi, A., Inuzuka, H., Shishikura, T., Kawamoto, T., Kageyama, H., Nakamura, Y., Isogai, E., Takayasu, H., Sakiyama, S., Suzuki, Y., Sugano, S., Goto, T., Sato S, and Nakagawara, A.	Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets with chromosomal mapping.	Oncogene	22	5525-5536	2003
Saito-Ohara, F., Imoto, I., Inoue, J., Nakagawara, A., and Sugimoto, T. and Inazawa, J.	PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma.	Cancer Res	63	1876-1883	2003
Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Sakuma, S., Muramatsu, T. and Kadomatsu, K.	Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas.	Br J Cancer	88	1522-1526	2003
Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Hayashi, S., Hosoda, M., Todo, S. and Nakagawara, A.	Negative autoregulation of p73 and p53 by DNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells.	Cancer Lett	197	105-109	2003

Ohira, M., Morohashi, A., Nakamura, Y., Isogai, E., Furuya, K., Hamano, S., Machida, T., Aoyama, M., Fukumura, M., Miyazaki, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Hirato, J. and Nakagawara, A.	Neuroblastoma oligo-capping cDNA Project: Toward the understanding of the genesis and biology of neuroblastoma.	Cancer Lett	197	63-68	2003
Kawamoto, T., Ohira, M., Hamano, S., Hori, T. and Nakagawara, A.	High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, Nbla03145/ECEL1alpha and beta, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas.	Int J Oncol	22	815-822	2003
Miyazaki, K., Ozaki, T., Kato, C., Hanamoto, T., Fujita, T., Irino, S., Watanabe, K., Nakagawa, T., Nakagawara, A.	A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity.	Biochem Biophys Res Comm	308	106-113	2003
Carninci, P., Waki, K., Shiraki, T., Konno, H., Shibata, K., Itoh, M., Aizawa, K., Arakawa, T., Ishii, Y., Sasaki, D., Bono, H., Kondo, S., Sugahara, Y., Saito, R., Osato, N., Fukuda, S., Sato, K., Watahiki, A., Hirozane-Kishikawa, T., Nakamura, M., Shibata, Y., Yasunishi A., Kikuchi, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Gustincich, S., Beisel, K., Povan, W., Aidinis, V., Nakagawara, A., Held, W. A., Iwata, H., Kono, T., Nakauchi, H., Lyons, P., Wells, C., Hume, D. A., Fagiolini, M., Hensch, T. K., Brinkmeier, M., Camper, S., Muramatshu, M., Okazaki, Y., Kawai, J. and Hayashizaki, Y.	Targeting a complex transcriptome: the construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia.	Genome Res	6B	1273-1289	2003

Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M. and Takenaga, K.	Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure.	Oncogene	22	6717-6724	2003
Duarte, WR., Shibata, T., Takenaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, I., Yamauchi, M. and Kasugai, S.	S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation.	J Bone Miner Res	18	493-501	2003
Oga, M., Takenaga, K., Sato, Y., Nakajima, H., Koshikawa, N., Osato, K. and Sakiyama S.	Inhibition of metastatic brain tumor growth by intramuscular administration of the endostatin gene.	Int J Oncol	23	73-79	2003
Ugai, S., Shimozato, O., Kawamura, K., Wang, YQ., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts.	Cancer Gene Ther	10	187-192	2003
Tada, Y., O-Wang, J., Yu, L., Shimozato, O., Wang, YQ., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takenaga, K., Sakiyama, S., and Tagawa, M.	T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines.	Cancer Gene Ther	10	451-456	2003
Iwadate, Y., Yamaura, A., Sakiyama, S., Sato, Y. and Tagawa, M.	Glioma-specific cytotoxic T cells can be effectively induced by subcutaneous vaccination of irradiated wild-type tumor cells without artificial cytokine production.	Int J Oncol	23	483-488	2003
Sakiyama, S., Yu, L., Tomizawa, M., Shimada, H., Kadomatsu K., Muramatsu, T., Ikematsu, S., Nakagawara, A. and Tagawa M.	Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner.	Adv Enzyme Regul	43	57-66	2003
Tomizawa, M., Watanabe, K., Saisho, H., Nakagawara, A. and Tagawa, M.	Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein α and β in hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker.	Anti-cancer Res	23	351-354	2003

Ugai S, Shimozato O, Yu L, Wang YQ, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M.	Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects.	Cancer Gene Ther	10	771-778	2003
Tomioka, N., Kobayashi, H., Kageyama, H., Ohira, M., Nakamura, Y., Sasaki, F., Todo, S., Nakagawara, A., Kaneko, Y.	Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: Evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas.	Genes Chromosomes Cancer	36	139-150	2003
Nakagawara, A.	Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link.	Prog Brain Res	143	233-242	2004
Kawamura, K., Bahar, R., Seimiya, M., Chiyo, M., Wada, A., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Honda, I., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J.	DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers.	Int J Cancer	109	9-16	2004
Miyazaki, K., Fujita, T., Ozaki, T., Kato, C., Kurose, Y., Sakamoto, M., Kato, S., Goto, T., Itoyama, Y., Aoki, M. and Nakagawara, A.	NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled 1, Targets mutant superoxide dismutase-1.	J Biol Chem	279	11327-11335	2004
Ohtori, S., Isogai, E., Hasue, F., Ozaki, T., Namamura, Y., Nakagawara, A., Koseki, H., Yuasa, S., Hanaoka, E., Shinbo, J., Yamamoto, T., Chiba, H., Yamazaki, M., Moriya, H. and Sakiyama, S.	Reduced inflammatory pain in mice deficient for the differential screening-selected gene aberrative in Neuroblastoma.	Mol Cell Neurosci	25	504-514	2004
Nakagawara, A., Ohira M.	Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer.	Cancer Lett	204	213-224	2004

Hamano, S., Ohira, M., Isogai, E., Nakada, K., Nakagawara, A.	Identification of Novel Human Neuronal Leucine-Rich Repeat (hNLRR) Family Genes and Inverse Association of Expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the Prognosis of Primary Neuroblastomas.	Int. J. Oncol.		in press	2004
Wang., Y.Q., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J.	Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53.	Int. J. Oncol.		in press	2004
Yamada, S., Ohira, M., Horie, H., Ando, K., Takayasu, H., Suzuki, Y., Sugano, S., Matsunaga, T., Hiyama, E., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Suita, S., Kaneko, M., Sasak, i F., Hashizume, K., Ohnuma, N., Nakagawara, A.	Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the Plk1 oncogene as a poor- prognostic indicator of hepatoblastomas.	Oncogene		in press	2004
Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M., Nakagawara, A.	Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation.	J. Biol. Chem.		in press	2004

20030151

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。