

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に
関連する新規遺伝子の同定およびその機能的
意義の解明と臨床応用に関する研究

(H16・3次がん・一般・005)

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 中川原 章

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の
同定およびその機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

中川原 章 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析

中川原 章 ----- 7

2. 発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析

尾崎 俊文 ----- 11

3. 発がんとはがんの進展を制御する遺伝子の解析

竹永 啓三 ----- 15

4. マウスモデルを用いた個体発生と発がんに関連する遺伝子の解析

古関 明彦 ----- 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
平成18年度 総括研究報告書

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定
およびその機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

主任研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨 個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにするために、ゲノム情報と個体発生の分子機構から以下のことを明らかにした。(1) 神経芽腫および肝芽腫 cDNA プロジェクトをほぼ終了し、神経芽腫 240 例のアレイ CGH 解析と in-house cDNA マイクロアレイを用いた 136 例の発現解析から、神経芽腫の新しい次世代リスク分類を構築した。(2) 神経芽腫で増幅している MYCN がん遺伝子のターゲットとして新規 NLXX および KI08 遺伝子を同定し、1p36 がん抑制遺伝子候補として Kxxxx と p73、11q がん抑制遺伝子候補として TSLC1、17q23 がん遺伝子候補として OAN と Survivin をこれまでに候補として同定した。(3) 正常神経発生と神経芽腫の発がんに関わる遺伝子として、LM03 を同定し、そのターゲットが交感神経の細胞運命決定遺伝子である Mash1 であることを新たに見いだした。(4) 14-3-3σ が p73 の転写標的遺伝子であることを見だし、その発現昂進が制癌剤に対する感受性を大幅に増強した。また、ケラチノサイトの分化誘導を担う p63 の標的遺伝子として 25kDa 蛋白質をコードする遺伝子を見いだした。(5) 低酸素処理により HIF-1α 依存性に転移抑制遺伝子 *nm23-H1* の発現が抑制され、浸潤が亢進した。また、ミトコンドリア *ND6* の病理性ミッセンヌ変異による活性酸素の過剰産生と、高転移性との関係を明らかにした。(6) 新規ポリコム群タンパク Pcl2 に結合する蛋白質群を同定し、Pcl2 はポリコム群の発現調節を介してがん抑制因子として機能することを明らかにした。

分担研究者

尾崎俊文・千葉県がんセンター・上席研究員
竹永哲三・千葉県がんセンター・主席研究員
古関明彦・理化学研究所免疫アレルギー科学
総合研究センター・チームディレクター

A. 研究目的

がんの個性は、それが由来する正常組織の発生生物学的特性に依存しており、そのことが、それぞれのがんの治療に対する反応性の違いに大きな影響を及ぼしている。そこで、昨年度に引き続き、ゲノム情報に基づいて、個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝

子を同定及び機能解析し、それを臨床応用することを目的とした。また、個体発生に関連する遺伝子のなかで、既に発がんの制御に関わることが明らかになっている重要な遺伝子に関して機能の解析を行い、臨床応用のための新しい分子標的探索に貢献することを目的とした。

B. 研究方法

個体発生と発がんに関連する新規遺伝子の同定は、同一組織から発生する小児がんと成人がん（神経芽腫と脳腫瘍、肝芽腫と肝細胞がん）のゲノム異常と発現遺伝子の対比から

行うこととしたが、本年度は神経芽腫、肝芽腫、肝細胞がんに関してアレイ CGH および cDNA マイクロアレイ解析を行った。アレイ CGH 用チップは、米国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が開発した 2464 BAC クローンを搭載したチップ、および Agilent 社のゲノムチップを用いた。また、in-house cDNA microarray は、神経芽腫組織に由来する複数の cDNA ライブラリーから抽出した 5300 個の cDNA を固定したものを、Cy3, Cy5 を蛍光マーカーとして使用した。また、分子生物学的解析には、ノザンブロット、ウエスタンブロット、免疫沈降法、ChIP アッセイ、などを用い、細胞内への遺伝子導入はトランスフェクション法を用いた。さらに、マウスモデルとして、コンディショナルノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

用いた神経芽腫、肝芽腫、肝細胞がん組織は、各施設において I.C. が得られ匿名化されたものを用いた。また、がん組織に由来する DNA, RNA の取り扱いに関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 発がんが治療の分子標的探索

これまでに、神経芽腫および肝芽腫 cDNA プロジェクトから、それぞれ 5000 個以上の cDNA を取得し、予後と相関する遺伝子情報の抽出を終了した。また、神経芽腫 240 例のアレイ CGH 解析と in-house cDNA マイクロアレイを用いた 136 例の発現解析から、神経芽腫の新しい次世代リスク分類を構築した。神経芽腫の分子標的探索に関しては、増幅している MYCN がん遺伝子のターゲットとして新規 NLXX および KI08 遺伝子を同定し、1p36 がん抑制遺伝子候補として Kxxxx と p73、11q がん抑制遺伝子候補として TSLC1、17q23 がん抑制遺伝子候補として OAN と Survivin をこれまでに候補としてマップし、詳細について解析中である。さらに、神経芽腫と神経膠芽腫、肝芽腫と肝細胞がんとのゲノム異

常の比較解析から新たな発がん候補領域や遺伝子が明らかになってきた。また、正常神経発生と神経芽腫の発がんに関わる遺伝子として、LM03 を同定し、そのターゲットが交感神経の細胞運命決定遺伝子である Mash1 であることを新たに見いだした。

(2) p53 ファミリーと多剤耐性克服および分化制御に関する研究

制癌剤耐性を示ししかも変異型 p53 を持つヒト乳癌細胞では p73 依存性の 14-3-3 σ の発現昂進の阻害が観察されたが、14-3-3 σ の過剰発現によって当該乳癌細胞の制癌剤に対する感受性の大幅な増加が認められた。また、カルシウム刺激によるヒトケラチノサイトの分化誘導系において、p53 ファミリーメンバーである p63 の発現誘導に伴う、25kDa の分子量を示す蛋白質の経時的な分泌が検出された。p63 によるこの遺伝子の発現誘導がケラチノサイトの分化誘導において極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 低酸素と転移、浸潤に関連する遺伝子の同定

低酸素処理によりヒト乳癌細胞で hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 依存性に転移抑制遺伝子 *nm23-H1* の発現が抑制され、浸潤が亢進されることを見出した。また、高転移性肺癌細胞において、ミトコンドリア *ND6* 遺伝子中の病理性ミッセンズ変異による活性酸素種の過剰産生を介して、抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 及び HIF-1 α 発現並びに VEGF 産生の促進が惹起され、転移能が亢進していることが判った。また、ROS scavenger がミトコンドリア DNA 変異が関与する転移の抑制に有効であることが示された。

(4) 個体発生と発がんの分子機序

新規ポリコム群タンパク Pc12 は、ポリコム群の発現を制御することで Ink4a の転写制御に寄与する。野生型及び Pc12 欠損 MEF より抽出し、蔗糖濃度勾配法によって分画すると、ポリコム群をコードする mRNA は、非翻訳画分から顕著に減少していたことから、この発現制御過程は、ポリコム群タンパクの翻訳調節の過程を含むことが明らかになった。Pc12 に TAP タグを付加

して Pc12 結合タンパクをプルダウンすると、リボソームタンパク、RNA ヘリケース、RNA 結合タンパク、各種核小体タンパクなど翻訳に寄与するタンパクが有意に免疫共沈降されてきた。以上の結果は、Pc12 はポリコム群の発現調節を介してがん抑制因子として機能することを示している。

D. 考察

第3次対がん総合戦略研究事業における初回3年の最終年を迎え、in-house cDNA マイクロアレイを用いた神経芽腫の網羅的発現解析とデータベースの作製がほぼ終了し、BAC アレイを用いた網羅的ゲノム異常の解析との組み合わせで新しいリスク分類を確立することができた。一方、それらのゲノム情報から、神経芽腫の具体的な発がん候補遺伝子が見つかった。Ip suppressor gene としては、極く最近 CHD5 が初めて Cell 誌に報告され、注目を集めているが、我々はその distal にマップされる p73 に加え、proximal にマップされる Kxxxx が新たな suppressor genes であることを同定した。神経芽腫における Ip 欠失は MYCN 増幅と強く相関しており、神経芽腫の発がん機構を知るうえでも重要な鍵を握る。我々の preliminary data では、Kxxxx の LOH は神経芽腫と神経膠芽腫とで高頻度に見られたが、前者での欠失の頻度がより高かった。いずれにしても、Kxxxx の tumor suppressor gene としての機能解析が緊急に必要である。また、神経芽腫のがん遺伝子である LMO3 が Mash1 を直接転写誘導する転写複合体に含まれるという発見は、神経堤細胞の発生分化と神経芽腫の発がん機構との関係を考えるうえで極めて重要と思われた。一方、p53 不活化腫瘍における p73 とそのターゲットである 14-3-3σ を介した制癌剤感受性の増強に関する知見は、将来の治療法開発に有用と思われた。また、がん細胞のミトコンドリアで産生される活性酸素を消去することによる転移の抑制法開発も期待できる。さらに、Pc12 は Nucleolin やリボソームの構成成分と複合体を形成し、p53 の翻訳調節を介して細胞の不死化に関わっており、その抑制によるがん治療薬の開発も期

待できる。

E. 結論

多角的なゲノム情報に基づき、がんの候補遺伝子の同定まで至ることができた。まだ解析未知の情報が埋もれており、それらの発掘研究がさらに必要である。また、それらを含む候補遺伝子の解析から、治療法開発への可能性が高まった。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* 25:917-928, 2006
2. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
3. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
4. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
5. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W,

- Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* 25:1931-1942, 2006
6. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25:5046-5055, 2006
 7. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A. Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 15:1281-1285, 2006
 8. Sang M, Li Y, Ozaki T, Ono S, Ando K, Yamamoto H, Koda T, Geng C, Nakagawara A. p73-dependent induction of 14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:327-333, 2006
 9. Hayashi S, Ozaki T, Yoshida K, Hosoda M, Todo S, Akiyama S, Nakagawara A. p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:60-66, 2006
 10. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351:57-63, 2006
 11. Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A. NF- κ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway. *Oncogene* 25:7608-7617, 2006
 12. Okahara F, Itoh K, Nakagawara A. Murakami M, Kanaho Y, Maehara T. Critical role of PICT1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol. Biol. Cell* 17:4888-4895, 2006
 13. Abe M, Westermann F, Nakagawara A. Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett.* 247:253-258, 2007
 14. Tomizawa M, Horie H, Yamamoto H, Matsunaga T, Sasaki F, Hashizume K, Hiyama E, Kaneko M, Suita S, Ando H, Hayashi Y, Ohnuma N, Nakagawara A. Reciprocal expression of CCAAT/enhancer binding proteins α and β in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344, 2007
 15. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A. Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133:185-192, 2007
 16. Antonelli A, Lenzi L, Nakagawara A. Ozaki T. Chiaretti A, Aloe L. Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependyoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor. *Cancer Investigation* 25:1-6, 2007
 17. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:892-898, 2007
 18. Yamamoto H, Ozaki T, Nakanishi M, Kikuchi H, Yoshida K, Horie H, Kuwano H, Nakagawara A. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes to Cells* (in press)
 19. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Ono S, Takada N, Koda T, Todo S, Kamijo T, Nakagawara A.

- DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene* (in press)
20. Furuya K, Ozaki T, Hanamoto T, Hosoda M, Hayashi S, Barker PA, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. Stabilization of p73 by nuclear IKK- α mediates cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* (in press)
 21. Takenaga K, Nygren J, Zelenina M, Ohira M, Iuchi T, Lukanidin E, Sjoquist, Kozlova EN. Modified expression of S100A4/Mts1 protein in C6 glioma cells or surrounding astrocytes affects migration of tumor cells in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis.* 2007; 25:455-463.
 22. Ito A, Koshikawa N, Mochizuki S., Omura K, Takenaga K. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the expression of DNA polymerase β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 351: 306-311.
 23. Fang Z, Duthoit N, Wicher G, Kallskog O, Ambartsumian N, Lukanidin E, Takenaga K, Kozlova EN. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 2006; 111:213-219.
 24. Fang Z, Forslund N, Takenaga K, Lukanidin E, Kozlova EN. Sensory neurite outgrowth on white matter astrocytes is influenced by intracellular and extracellular S100A4 protein. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83:619-626.
 25. Takenaga K, Kozlova EN. The role of intra-cellular S100A4 for migration of rat astro-cytes. *Glia.* 2006; 53:313-321.
 26. Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, Kato Y, Koseki H, Ohno H. FoxH1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning due to dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2006) 291:163-170.
 27. Blewitt ME, Vickaryous NK, Paldi A, Koseki H, Whitelaw E. Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet.* (2006) 2:49.
 28. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. (2006) Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells *Cell* 125(2):301-313.
 29. Fujimura Y, Isono K, Vidal M, Endoh M, Kajita H, Mizutani-Koseki Y, Takihara Y, van Lohuizen M, Otte A, Jenuwein T, Deschamps J, Koseki H. (2006) Distinct roles of Polycomb group gene products between transcriptionally repressed and active domains of Hoxb8. *Development* 133:2371-2381
 30. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I. (2006) Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBOJ.* 25:3955-3965.
 31. Jorgensen HF, Giadrossi S, Casanova M, Endoh M, Koseki H, Brockdorff N, Fisher AG. (2006) Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stemcells. *Cell Cycle.* 5:1411-144.
 32. Sato T, Endoh M, Yoshida H, Yasuo S, Katsuno T, Saito Y, Isono K, Koseki H. (2006) Mammalian Polycomb complexes are required for Peyer's patch development by regulating lymphoid cell proliferation. *Gene.* 379:166-174.
 33. Nakayama M, Iida M, Koseki H, Ohara O. (2006) A gene-targeting approach for functional characterization of KIAA genes encoding extremely large proteins. *FASEB J.* 20:1718-1720.
 34. Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S,

- Mechtler K, Spahn L, Koseki H, Jenuwein T, Wutz A. (2006) Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J*. 25:3110-3122.
35. Nakajima Y, Morimoto M, Takahashi Y, Koseki H, Saga Y. (2006) Identification of Epha4 enhancer required for segmental expression and the regulation by Mesp2. *Development* 133:2517-2525.
36. Hosokawa H, Kimura MY, Shinnakasu R, Suzuki A, Miki T, Koseki H, van Lohuizen M, Yamashita M, Nakayama T. (2006) Regulation of Th2 Cell Development by Polycomb Group Gene bmi-1 through the Stabilization of GATA3. *J Immunol*. 177:7656-64.
37. Ogino J, Sakurai K, Yoshiwara K, Suzuki Y, Ishizuka N, Seki N, Suzuki Y, Koseki H, Shirasawa T, Hashimoto N, Yagui K, Saito Y. (2006) Insulin resistance and increased pancreatic beta-cell proliferation in mice expressing a mutant insulin receptor (P1195L). *J Endocrinol*. 190:739-747.
38. Nakajima M, Ogawa M, Shimoda Y, Koseki H, Shirasawa T, Furukawa K. (2007) Accelerated acquisition of permeability barrier function in the skin of presenilin-1-deficient embryos. *Arch Dermatol Res*. 298:339-345.
39. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Hasegawa T, Koseki H, Ohara O, Nakayama M, Toyooka K, Matsuoka K, Hotta H, Yamamoto A, Ishido S. (2007) Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J*. 26:846-854.
40. Takada Y, Isono K, Shinga J, Turner JM, Kitamura H, Ohara O, Watanabe G, Singh PB, Kamijo T, Jenuwein T, Burgoyne PS, Koseki H. (2007) Mammalian Polycomb Scmh1 mediates exclusion of Polycomb complexes from the XY body in the pachytene spermatocytes. *Development* 134:579-590.
41. Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Nagao K, Inagaki Y, Nishikawa M, Tajima S, Koseki H, Tsuda H, Takasaki Y, Nakauchi H, Iwama A. (2007) Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 353:992-998.
42. Dietrich N, Bracken AP, Trinh E, Schjerling CK, Koseki H, Rappsilber J, Helin K, Hansen KH. (2007) Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus. *EMBO J*. (in press)
43. Kato Y, Koseki H, Vidal M, Nakauchi H, Iwama A. (2007) Unique composition of polycomb repressive complex 1 in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol*. 85:179-181.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
平成18年度 分担研究報告書

個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨 個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにするために、ゲノム情報を利用して以下のことを明らかにした。（1）神経芽腫および肝芽腫 cDNA プロジェクトをほぼ終了し、それぞれ採取した 5000 個以上の cDNA から予後と相関する遺伝子情報の抽出を終了した。（2）神経芽腫 240 例のアレイ CGH 解析と in-house cDNA マイクロアレイを用いた 136 例の発現解析から、神経芽腫の新しい次世代リスク分類を構築した。（3）神経芽腫の分子標的探索に関しては、増幅している MYCN がん遺伝子のターゲットとして新規 NLXX および KI08 遺伝子を同定し、1p36 がん抑制遺伝子候補として Kxxxx と p73、11q がん抑制遺伝子候補として TSLC1、17q23 がん遺伝子候補として OAN と Survivin をこれまでに候補としてマップし、詳細について解析中である。（4）正常神経発生と神経芽腫の発がんに関わる遺伝子として、LM03 を同定し、そのターゲットが交感神経の細胞運命決定遺伝子である Mash1 であることを新たに見いだした。これらの同定した分子は、難治性神経芽腫に対する治療薬開発のための標的分子となる可能性があり期待される。

A. 研究目的

ゲノム情報に基づいた発がんの分子機構解明のために、アレイ CGH (array comparative genomic hybridization) 法と in-house cDNA microarray 法を組み合わせ、神経および肝から発生する小児および成人のがんを対比させる研究戦略を計画し、本年度は新たな候補遺伝子の同定を含め、具体的な候補分子の機能解析を進めることを計画した。環境因子の少ない小児がんを研究対象に加えることにより、正常組織発生の分子機構と発がんのメカニズムをより単純な系で解析でき、さらに、その結果から得られる比較類推から、組織幹細胞に由来すると思われる成人がんの発がん機構を明らかにすることがより容易になることを期待した。今年度は、これまでに得られたゲノム情報をさらに深く解析し、将来の創薬を視野に入れた具体的な候補遺伝子の同定まで

行うことを目的とした。

B. 研究方法

アレイ CGH 用チップは、米国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が開発した 2464 BAC クローンを搭載したチップを用いた。また、in-house cDNA microarray は、神経芽腫組織に由来する複数の cDNA ライブラリーから抽出した 5300 個の cDNA を固定したものをを用い、Cy3, Cy5 を蛍光マーカーとして使用した。そのほか、通常の分子生物学的、生化学的解析手法を用いた。

C. 研究結果

（1）神経芽腫、肝芽腫ゲノムデータベースの作製完了
複数の神経芽腫組織および小児肝がん組織から作製した oligo-capping cDNA libraries か

ら抽出したそれぞれ 5340 個、5000 個の cDNA を対象に、がん部と正常部での発現差、細胞の分化、増殖、アポトーシス等に関連して動く遺伝子の抽出を終わり、データベース化した。また、神経芽腫 243 例（再発例を含むと 267 例）、肝芽腫 58 例と対象とした BAC アレイによるアレイ CGH データベース作製を完了した。

(2) ゲノム情報に基づく神経芽腫の次世代リスク分類の確立

神経芽腫 243 例のアレイ CGH データから、まず、次のようなゲノム異常パターンによるリスク分類を作製した。A: Silent group, B: Partial gain/loss group, C: Whole chromosome gain/loss group。さらに、それぞれのグループを、MYCN 増幅、1p 欠失、11q 欠失の有無でサブグループ化し、それぞれ予後の異なるリスク分類を可能にした。また、これに、in-house cDNA マイクロアレイを用いて、神経芽腫 136 例を対象とした遺伝子発現データによる予後予測法を重ね合わせ、より詳細なリスク分類が可能となることを明らかにした。さらに、これらゲノム情報と臨床データを詳細に解析することにより、神経芽腫発がんのモデルを作製し、その検証を開始した。

(3) 神経芽腫標的遺伝子の同定とその機能解析

現在、神経芽腫に加え、神経膠芽腫 70 例のアレイ CGH 解析もほぼ終了し、両者のゲノム異常の類似点と相違点を探索中である。一方、得られたゲノム情報と培養細胞を用いた機能解析により、神経芽腫の発がん候補遺伝子ならびに治療法開発のための分子標的探索を行ったところ、増幅している MYCN がん遺伝子のターゲットとして新規 NLXX および KI08 遺伝子を同定し、1p36 がん抑制遺伝子候補として Kxxxx と p73、11q がん抑制遺伝子候補として TSLC1、17q23 がん遺伝子候補として OAN と Survivin をこれまでに候補としてマップし、詳細について解析中である。なかでも、新規 NLXX は MYCN の直接の転写ターゲットであることが明らかになり、予後不良な神経芽腫に

おける意義が重要になってきているためその機能を解析している。また、Kxxxx は、遺伝子変異は少ないものの、haploinsufficient tumor suppressor gene であることが明らかになり、細胞に過剰発現すると p53 非依存的にアポトーシスを誘導した。さらに、TSLC1 は 11p LOH の有力ながん抑制遺伝子であると思われ、現在、遺伝子変異、メチル化の有無等について解析中である。

(4) 神経堤発生と神経芽腫発がんを結ぶ LM03/Mash1 経路の発見

我々が神経芽腫 cDNA プロジェクトから同定した新規がん遺伝子である LM03 が bHLH 転写因子である HEN2 と転写複合体を形成し、神経芽腫で持続的に高発現している Mash1 遺伝子を直接の転写ターゲットとしていることを見いだした。

D. 考察

第 3 次対がん総合戦略研究事業初回 3 年の最終年を迎え、in-house cDNA マイクロアレイを用いた神経芽腫の網羅的発現解析とデータベースの作製がほぼ終了した。また、BAC アレイを用いた網羅的ゲノム異常の解析からは、新しいリスク分類となることが期待されるサブグループの存在が明らかになった。一方、それらのゲノム情報から、神経芽腫の具体的な発がん候補遺伝子が見つかった。1p suppressor gene としては、極く最近 CHD5 が初めて Cell 誌に報告され、注目を集めているが、我々はその distal にマップされる p73 に加え、proximal にマップされる Kxxxx が新たな suppressor genes であることを同定し、その機能を解析中である。神経芽腫における 1p 欠失は MYCN 増幅と強く相関しており、神経芽腫の発がん機構を知るうえでも重要な鍵を握る。我々の preliminary data では、Kxxxx の LOH は神経芽腫と神経膠芽腫とで高頻度に見られたが、前者での欠失の頻度がより高かった。いずれにしても、Kxxxx の tumor suppressor gene としての機能解析が緊急に必要である。

神経芽腫のがん遺伝子である LM03 が Mash1

を直接転写誘導する転写複合体に含まれるという発見は、神経堤細胞の発生分化と神経芽腫の発がん機構との関係を考えるうえで極めて重要である。候補遺伝子とその機能および上流、下流の経路が少しずつ明らかになりつつあり、今後の展開が期待される。

E. 結論

神経芽腫のゲノム情報に基づき、具体的な候補遺伝子が複数同定された。今後さらに、発生系統が分かれた神経系がんおよび肝臓系がんのゲノム情報を対比させ、個体発生のプログラムと発がんの分子機構を明らかにし、それらを基盤に臨床応用を試みる必要がある。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* 25:917-928, 2006
2. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
3. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
4. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
5. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCCI*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* 25:1931-1942, 2006
6. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25:5046-5055, 2006
7. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *RASGRF2* and *RASSF1A* in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 15:1281-1285, 2006
8. Sang M, Li Y, Ozaki T, Ono S, Ando K, Yamamoto H, Koda T, Geng C, Nakagawara A. p73-dependent induction of 14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:327-333, 2006
9. Hayashi S, Ozaki T, Yoshida K, Hosoda M, Todo S, Akiyama S, Nakagawara A. p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:60-66, 2006
10. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351:57-63, 2006
11. Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A. NF- κ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its

- proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway. *Oncogene* 25:7608-7617, 2006
12. Okahara F, Itoh K, Nakagawara A, Murakami M, Kanaho Y, Maehara T. Critical role of PICT1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol. Biol. Cell* 17:4888-4895, 2006
 13. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett.* 247:253-258, 2007
 14. Tomizawa M, Horie H, Yamamoto H, Matsunaga T, Sasaki F, Hashizume K, Hiyama E, Kaneko M, Suita S, Ando H, Hayashi Y, Ohnuma N, Nakagawara A. Reciprocal expression of CCAAT/enhancer binding proteins α and β in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344, 2007
 15. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133:185-192, 2007
 16. Antonelli A, Lenzi L, Nakagawara A, Ozaki T, Chiaretti A, Aloe L. Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependymoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor. *Cancer Investigation* 25:1-6, 2007
 17. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:892-898, 2007
 18. Yamamoto H, Ozaki T, Nakanishi M, Kikuchi H, Yoshida K, Horie H, Kuwano H, Nakagawara A. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes to Cells* (in press)
 19. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Ono S, Takada N, Koda T, Todo S, Kamijo T, Nakagawara A. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene* (in press)
 20. Furuya K, Ozaki T, Hanamoto T, Hosoda M, Hayashi S, Barker PA, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. Stabilization of p73 by nuclear IKK- α mediates cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
平成18年度 分担研究報告書

発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析

分担研究者 尾崎俊文 千葉県がんセンター研究所生化学研究部 上席研究員

研究要旨 乳癌細胞株をモデル細胞として用いて、制癌剤耐性の分子機構の解明を試みた。その結果、アドリマイシン耐性細胞 MDA-MB-436 では、アドリマイシン処理に応答した p73 とその下流標的遺伝子である 14-3-3 σ の顕著な発現低下が認められた。また、14-3-3 σ は p73 の蛋白質としての安定性を増加させることによって、p73 の活性を昂進する機能を持つことが明らかになった。さらに、一過性の過剰発現実験から、14-3-3 σ は MDA-MB-436 細胞のアドリマイシン感受性を飛躍的に増大させる機能を持つことが示唆された。しかしながら、アドリマイシン処理に応答した p73 の発現低下の仕組みについては不明である。

一方、カルシウム添加によるヒトケラチノサイトの分化誘導系において、我々は p63 の下流標的遺伝子の一つとして分泌蛋白質をコードする遺伝子を同定した。この蛋白質は細胞分化の進行に伴って、細胞外に分泌されることが明らかになった。今回の実験結果から、この分泌蛋白質は、パラクラインあるいはオートクラインに細胞に作用して、ケラチノサイトの細胞分化を促進している可能性が示唆された。

A. 研究目的

制癌剤に暴露されたがん細胞が、やがて制癌剤に対する耐性を獲得する現象は、制癌剤によるがん治療効果を著しく減少させる大きな問題である。我々は、制癌剤に反応してがん細胞死を誘導する p53 ファミリーに属する転写因子群 (p53, p73, p63) の機能調節機構の解明に焦点を絞って研究を遂行している。これらの研究から、制癌剤処理に反応した p53 ファミリー分子群の機能を活性化あるいは不活性化する新たな蛋白質の因子群、あるいは新たな分子機構の存在を明らかにすることが出来れば、制癌剤耐性克服のための新たな戦略を構築することが可能になると期待される。本研究では、制癌剤感受性および耐性の乳癌細胞株をモデルとして、その制癌剤耐性の分子機構の解明を試みた。

一方、p53 ファミリーのノックアウトマウスの表現型の解析から、p73 は正常な神経系および免疫系の正常な発生に重要な役割を担っていることが判明している。また、p63 は

主として皮膚の発生に関与することが報告されている。我々は、皮膚の発生、分化過程における p63 の機能を明らかにする目的で、ヒトケラチノサイトの細胞分化系に着目し、p63 の下流標的遺伝子であり、しかもケラチノサイトの細胞分化に伴って発現昂進する遺伝子群の検索を試みた。

B. 研究方法

アドリマイシン感受性乳癌細胞株として、MCF-7 および MDA-MB-231 を用いた。また、アドリマイシン耐性細胞株として、MDA-MB-436 を用いた。アドリマイシンによる細胞死は MTT アッセイ及びフローサイトメトリー法によって検討した。p53 ファミリーの下流標的遺伝子群 (p21, Noxa, 14-3-3 σ) の発現レベルは RT-PCR あるいはウェスタンブロット法で調べた。14-3-3 σ の過剰発現による MDA-MB-436 の細胞増殖抑制及び細胞死の昂進は、コロニー形成法およびタネル法を用いて行った。

カルシウムを含む分化培地に HaCaT 細胞を移して、ケラチノサイトの細胞分化を誘導した。分化マーカーとしては、ケラチン 10 およびインボルクリンを用いた。p63 の発現レベルは、定量 PCR、半定量 RT-PCR ウェスタンブロット法で調べた。転写制御機構の解析はルシフェラーゼレポーター法およびクロマチン免疫沈降法を用いて行った。

C. 研究結果

1) 14-3-3 σ によるアドリアマイシン感受性の向上

1 μ M のアドリアマイシン存在下において、MCF-7 および MDA-MB-231 細胞は処理時間依存性に生存率が明らかに低下したのに対して、MDA-MB-436 細胞はアドリアマイシン耐性を示した。野生型 p53 を発現している MCF7 細胞では、アドリアマイシンに応答して p53 の下流標的遺伝子群である *p21*, *Noxa*, *14-3-3 σ* の発現誘導が RT-PCR 法およびウェスタンブロット法で確認された。一方、変異型 p53 を発現する MDA-MB-436 細胞では、アドリアマイシンに応答した *p21* の発現誘導は認められたが、*14-3-3 σ* の発現低下が観察された。免疫沈降実験から、アドリアマイシン処理に反応して p53 ファミリーに属する p73 の発現が顕著に低下することが判明した。一過性の過剰発現実験およびルシフェラーゼレポーターアッセイから、*14-3-3 σ* 遺伝子は p73 の標的遺伝子の一つであること、及び *14-3-3 σ* は p73 の蛋白質としての安定性を増加させることによって、p73 の活性を昂進する機能を持つことが明らかになった。さらに、*14-3-3 σ* 遺伝子を過剰発現させた MDA-MB-436 細胞では、アドリアマイシンに対する感受性が顕著に昂進した。

2) p63 標的遺伝子産物によるケラチノサイトの細胞分化の制御機構の解析

ヒトケラチノサイト由来の HaCaT 細胞を通常培地からカルシウムを添加した分化培地に移すと、分化マーカーであるケラチン 10 およびインボルクリンの発現昂進を伴う細胞分化を観察することが出来る。この細胞分化システムにおける p63 の発現の動態について

は統一的な見解が出てはいないが、我々の実験条件下においては、p63 の蛋白質レベルでの発現上昇がウェスタン法で観察された。細胞分化の開始から、経時的に RNA を抽出して半定量 RT-PCR 法を用いて様々な遺伝子の発現パターンを調べたところ、25 kDa の分泌蛋白質をコードする遺伝子の発現レベルが p63 のそれとほぼ一致していた。siRNA によるノックダウン実験、ルシフェラーゼレポーターアッセイ及びクロマチン免疫沈降法を用いた解析から、この遺伝子は p63 の標的遺伝子群の一つであると考えられた。また、細胞分化に伴って、この蛋白質の分泌量が増加した。さらに、siRNA によるノックダウン実験、分化マーカーであるケラチン 10 およびインボルクリンの発現昂進が著しく抑制された。

D. 考察

14-3-3 σ は p53 の下流標的遺伝子の一つとして報告されているが、その生理的機能については不明である。ヒト乳癌の細胞株である MDA-MB-436 細胞では、アドリアマイシンに対する耐性と *14-3-3 σ* 及び p73 の発現低下が相関していること、及び *14-3-3 σ* 遺伝子の過剰発現によって、アドリアマイシンに対する感受性が回復することから、p73/*14-3-3 σ* 経路の活性化の分子機構の解明が制癌剤耐性克服を可能にするヒントを提供してくれるものと期待される。また、アドリアマイシンに反応した p73 の発現低下のメカニズムは不明である。

一方、カルシウム添加によるヒトケラチノサイトの分化誘導系において、我々が見いだした p63 の下流標的遺伝子は分泌蛋白質をコードしており、細胞分化の進行に伴って、細胞外に分泌されることが明らかになった。今回の実験結果から、この分泌蛋白質は、パラクラインあるいはオートクラインに細胞に作用して、ケラチノサイトの細胞分化を促進している可能性が考えられる。また、皮膚の発生あるいは再生に深く関与する可能性も考えられる。

E. 結論

変異型 p53 を発現するヒト乳癌細胞の制癌剤感受性を規定する因子の一つとして、p73/14-3-3 σ 経路の活性化の関与が示唆された。

ヒトケラチノサイトの分化誘導系において、分泌蛋白質をコードする p63 の標的遺伝子を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakanishi H, Ozaki T, Nakamura Y, Hashizume K, Iwanaka T, Nakagawara A. Purification of human primary neuroblastomas by magnetic beads and their in vitro culture. *Oncology Rep.* 2007; in press.
2. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Takada N, Ono S, Koda T, Todo S, Kamijo T, Nakagawara A. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007; in press.
3. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2007; 354: 892-898.
4. Yamamoto H, Ozaki T, Nakanishi M, Kikuchi H, Yoshida K, Horie H, Kuwano H, Nakagawara A. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes Cells* 2007; in press.
5. Ozaki T, Li Y, Miyazaki K, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2006; 351: 57-63.
6. Sang M, Li Y, Ozaki T, Ono S, Ando K, Yamamoto H, Koda T, Geng C, Nakagawara A. p73-dependent induction of

14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347: 327-333.

7. Hayashi S, Ozaki T, Yoshida K, Hosoda M, Todo S, Akiyama S, Nakagawara A. p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347: 60-66.
8. Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A. NF- κ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway. *Oncogene.* 2006; 25: 7608-7617.
9. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene.* 2006; 25: 5046-5055.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
平成18年度 分担研究報告書

発がんのがんの進展を制御する遺伝子の解析

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター研究所化学療法研究部 主席研究員

研究要旨 低酸素が転移抑制遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、ヒト乳癌細胞 MCF7 細胞を低酸素下で培養すると *nm23-H1* mRNA の発現が低下することが判明した。この発現低下は hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) 阻害剤 TX-402 及び histone deacetylase (HDAC) 阻害剤 trichostatin A 処理により抑制された。MDA-MB-231 細胞を低酸素下で培養あるいは siRNA で *nm23-H1* の発現を抑制するとマトリゲル浸潤能の亢進が認められた。これらの結果から、低酸素下では HIF-1 及び HDAC を介して *nm23-H1* の発現が抑制され浸潤が亢進されることが示唆された。

一方、低転移性肺がん細胞株と比較して、高転移性細胞株がミトコンドリア由来活性酸素種 (ROS) を過剰産生していることから、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基配列を調べたところ、高転移性細胞特異的に NADPH dehydrogenase 6 (*ND6*) 遺伝子中に病因性ミッセンズ変異があることを見出した。そこで、mtDNA を低転移性と高転移性細胞株間で入れ換えた細胞 (サイブリッド) を作製したところ、高転移性細胞の mtDNA を導入した低転移性細胞で ROS の産生が高まることが判った。また、HIF-1 α 及び vascular endothelial growth factor (VEGF) 並びに抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 の発現が高くなり、転移能も亢進されることを見出した。さらに、ROS scavenger N-acetylcystein を高転移性細胞に作用させると、HIF-1 α 、VEGF、Mcl-1 発現がいずれもが低下し、転移能も低下することが判明した。これらの結果から、ROS の産生亢進に繋がる mtDNA 中の病因性ミッセンズ変異が、がん細胞の転移能を亢進する可能性が示唆された。

A. 研究目的

腫瘍内低酸素下のがん細胞では、解糖系酵素や血管新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子の発現亢進、アポトーシスに関する遺伝子の発現修飾、転移能に関する遺伝子の発現亢進、遺伝子不安定性に関する遺伝子の発現修飾、脱分化の促進、抗癌剤や放射線耐性に関与する遺伝子の発現亢進などが惹起される。これらの大部分の遺伝子の発現変化には転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が関わっているが、HIF-1 標的遺伝子やシグナル伝達経路の解明は、がんの悪性度進展や浸潤・転移を抑制するための標的の解明につながる可能性がある。本年度は、低酸素ががん細胞の浸潤・

転移を亢進する機序の1つとして、低酸素が転移抑制遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼしているのではないかとこの想定に基づき、ヒト乳癌細胞株を用いて解析を行った。

一方、我々は、ルイス肺癌由来の高転移性細胞が、低転移性細胞と比較して、(1) 抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 を高発現するためアポトーシス抵抗性を示し、(2) 低酸素下で HIF-1 α 及び VEGF を高発現するため血管新生能が高く、(3) 活性酸素種 (ROS) を多量に産生することを報告してきた。本研究では、ROS の産生とミトコンドリアとの関連及び ROS の産生と転移能との関連を、細胞間でミトコンドリア DNA (mtDNA) を完全に交換したサイブリッド細胞を用いて検討した (筑

波大学・林純一教授との共同研究)。

B. 研究方法

細胞は、ヒト乳癌由来の低浸潤性細胞株 MCF-7、高浸潤性細胞株 MDA-MB-231 及びルイス肺癌由来の低転移性細胞株 P29、高転移性細胞株 A11 を用いた。低酸素下培養は 1%酸素濃度あるいは<0.1%酸素濃度下で行った。転移抑制遺伝子 (*nm23-H1*, *BRMS1*, *RHOGDI2*, *KAI1*, *MKK4*, *CRSP3*, *KISS1*) の発現は RT-PCR あるいはウェスタンブロット法で調べた。細胞運動能及び浸潤能はトランスウェルチャンパー及びマトリゲルでコートしたトランスウェルチャンパーを用いて測定した。ケモアトラクタントとして 10%牛胎児血清を使用した。HIF-1 α 活性阻害剤 TX-402 は徳島大学工学部・堀均教授及び岐阜薬科大学・永澤秀子教授から供与された。腫瘍組織中の低酸素領域は EF5 染色により、nm23-H1 蛋白質発現は組織免疫染色により検討した。

サイブリッド細胞は、P29 及び A11 細胞から樹立した mtDNA-less 細胞を脱核した A11 及び P29 細胞とそれぞれ細胞融合させて作製した P29mtA11 及び A11mtP29 細胞 (それぞれ核 DNA は P29 及び A11 由来で、mtDNA は A11 及び P29 由来) を用いた。対象として P29mtP29 及び A11mtA11 細胞を用いた。ROS 産生は DCFH-DA 染色後に flowcytometry で、mtDNA 遺伝子型は PCR-RFLP 法で、腫瘍内血管は CD31 染色で、転移能は尾静脈内移植で検討した。Mcl-1 の発現はウェスタンブロット法で、HIF-1 α の発現はノーザンブロット法及びウェスタンブロット法で調べた。

C. 研究結果

1) 低酸素による *nm23-H1* 遺伝子発現の低下

MCF7 細胞及び MDA-MB-231 細胞を 1% あるいは<0.1%酸素下で培養すると、nm23-H1 及び BRMS1 の発現が mRNA 及び蛋白質レベルで低下することが判った。他の転移抑制遺伝子の発現には顕著な差は見出せ

なかった。これらの発現の低下は HIF-1 α 活性阻害剤 TX-402 及び HDAC 阻害剤 trichostatin A (TSA) 処理により抑制された。MDA-MB-231 細胞を低酸素下で培養あるいは siRNA で nm23-H1 の発現を抑制するとマトリゲル浸潤能の亢進が認められた。MDA-MB-231 の皮下腫瘍内での nm23-H1 蛋白質の発現を調べたところ、低酸素領域 (EF5 陽性領域) においてその発現が低下している傾向が認められた。

2) ミトコンドリア *ND6* 遺伝子の病理性ミッセンズ変異による転移能の亢進

P29 及び A11 細胞での ROS の産生を比較すると、A11 細胞が極めて多くの ROS を産生する。この ROS がミトコンドリア由来であることが予備実験により推察されたので、P29 及び A11 細胞の mtDNA を完全に入れ替えた P29mtA11 と A11mtP29 細胞を作製し、ROS 産生能を比較した。その結果、P29mtA11 細胞では ROS 産生が亢進し、逆に A11mtP29 細胞では抑制されることが判明した。対象として用いた P29mtP29 及び A11mtA11 細胞ではそれぞれ P29 及び A11 細胞と同程度の ROS 産生能を示した。さらに、A11mtA11 及び P29mtA11 細胞では呼吸鎖 complex I 活性が顕著に低下していた。この原因を究明するために、mtDNA の塩基配列の解析を行ったところ、NADPH dehydrogenase 6 (*ND6*) 遺伝子中に A11 細胞特異的に病理性ミッセンズ変異が存在することが判った。次に、転移能を検討したところ、P29mtA11 は高転移性を獲得し、逆に A11mtP29 は転移能を喪失することが判明した。P29mtP29 及び A11mtA11 細胞はそれぞれ P29 及び A11 細胞と同様の転移能を示したことから、この転移能の変化は mtDNA によることが示唆された。また、P29mtA11 細胞では Mcl-1 発現が亢進し低酸素、グルコース欠乏や血清除去によるアポトーシス誘導に対して抵抗性が高くなること、HIF-1 α 及び VEGF 発現が亢進し腫瘍内血管密度が高くなること、逆に A11mtP29 では低下することも判明した。さらに、P29mtA11 及び A11mtA11 細胞に ROS scavenger

N-acetylcystein (NAC) を処理すると、Mcl-1 及び HIF-1 α 発現並びに VEGF 産生が抑制され、転移能も低下することが明らかになった。

D. 考察

低酸素による転移能の亢進には、c-Met や CXCR4 の HIF-1 を介した発現亢進が報告されている。本研究では、ヒト乳癌細胞を低酸素下で培養すると転移抑制遺伝子 nm23-H1 の発現低下が起こることが示された。同様の現象が皮下腫瘍内の低酸素領域でも観察されることから、*in vivo* においても起こることが示唆された。また、この発現低下が浸潤に関与することが、siRNA により nm23-H1 発現を抑制すると浸潤能が亢進することからも支持された。低酸素による nm23-H1 遺伝子の発現低下の機序を解析した結果、TX-402 処理で発現低下が抑制されること、さらに HIF-1 α を強制発現させると nm23-H1 遺伝子の発現低下が起こることより、HIF-1 の関与が考えられた。また、TSA 処理によっても発現低下が抑制されることから、蛋白質のアセチル化も関与していることが推察された。

mtDNA は常に ROS に曝されているため突然変異が起こりやすく、そのことが発がんに関連しているのではないかと推測されている。しかし、決定的な証拠は未だ無い。本研究の結果は、mtDNA の特定のミッセンス突然変異が、細胞核がコードしている転移関連遺伝子の発現を epigenetic に変化させることで転移能を亢進させていることを示している。すなわち、mtDNA 変異により ROS が大量に産生され、これが Mcl-1 の発現を亢進させることでアポトーシス抵抗性をがん細胞に賦与し、また HIF-1 α の発現を亢進することで VEGF 産生量を増加させ、ひいては腫瘍内血管密度を高めていると考えられる。今後、同じ現象が他の腫瘍、特にヒトの腫瘍においても起きているかどうかを検討することが重要であろう。さらに本研究で、ROS scavenger NAC を高転移性細胞株に作用させると、Mcl-1、HIF-1 α 、VEGF の発現が抑制され、転移能も抑制されることが明らかになった。

このことは、mtDNA が関与する転移亢進の抑制に ROS scavenger が有効であることを示唆している。転移抑制のための1つの方法論として重要であろう。

E. 結論

低酸素処理により乳癌細胞で nm23-H1 の発現が抑制され、これには HIF-1 及び HDAC が関与している可能性が推察された。また、nm23-H1 の低下が低酸素による浸潤の亢進に関与することが示唆された。

ND6 遺伝子中の病理性ミッセンス変異により転移能が亢進し、これには ROS 産生の亢進による Mcl-1 及び HIF-1 α 発現並びに VEGF 産生の促進が関与していることが判った。また、ROS scavenger が mtDNA 変異の関与する転移の抑制に有効であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takenaga K, Nygren J, Zelenina M, Ohira M, Iuchi T, Lukanidin E, Sjoquist, Kozlova EN. Modified expression of S100A4/Mts1 protein in C6 glioma cells or surrounding astrocytes affects migration of tumor cells in vitro and in vivo. Neurobiol Dis. 2007; 25:455-463.
2. Ito A, Koshikawa N, Mochizuki S., Omura K, Takenaga K. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the expression of DNA polymerase β . Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006; 351: 306-311.
3. Fang Z, Duthoit N, Wicher G, Kallskog O, Ambartsumian N, Lukanidin E, Takenaga K, Kozlova EN. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. Acta Neuropathol. (Berl). 2006; 111:213-219.
4. Fang Z, Forslund N, Takenaga K,