

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

(H19・3次がん・一般・006)

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 中川原 章

平成20(2008)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. 神経細胞腫瘍化における Epigenetic 変化の役割の解析

上條 岳彦 ----- 11

3. 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 ----- 15

4. 腫瘍内低酸素ががんの進展とがん幹細胞の生存維持に及ぼす影響

竹永 啓三 ----- 19

5. 翻訳調節を介した細胞増殖と老化の総合的制御メカニズムの解明

古関 明彦 ----- 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

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19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、本年度は以下のことを明らかにした。(1) 神経芽腫と神経膠芽腫および肝芽腫と肝細胞がんの網羅的ゲノム異常、遺伝子発現プロファイル解析が終了し、発生系統と発がんに関する類似と相違に関し比較解析を始めた。(2) 神経芽腫および他のがんの染色体 1p36.2 にマップされるがん抑制遺伝子として KIF1Bβ を同定した。機能解析の結果、haploinsufficient tumor suppressor gene であることが示唆された。また、11q23 の候補遺伝子として TSLC1、17q 増加領域のがん遺伝子として新規 non-coding RNA を同定し ncRAN と命名した。(3) 神経芽腫における MYCN の新規ターゲットとして、発がん起序に重要なポリコム複合体の構成分子 Bmi1 を見出した。(4) 基本転写因子である TBP 関連遺伝子産物の一つである TRF2 が、p53 ファミリーメンバーである TAp63 の転写レベルにおける特異的な調節に重要な役割を担っていることを明らかにした。(5) ミトコンドリア *ND6* 遺伝子中のミスセンス変異が細胞に高転移性を賦与することが判り、B82 細胞由来の高転移性細胞 B82Met で、*ND6* 遺伝子中にナンセンス変異が存在することを見いだした。また、27 症例のヒト転移性脳腫瘍のうち 3 例において 4 種類のミスセンス変異を見出した。(6) 新たながん抑制候補遺伝子である新規ポリコム群タンパク Pc12 の解析から、Pc12 はヒストンコードを文脈として読み取るタンパクであること、また、ヒストン以外のメチル化タンパクを認識しうる可能性が示唆された。また、Bmi1 が MYCN の標的遺伝子であることを明らかにした。

分担研究者

上條岳彦・千葉県がんセンター・部長
尾崎俊文・千葉県がんセンター・主席研究員
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

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）の網羅的ゲノム異常と遺伝子発現プロファイルの対比のために、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 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 を固定したものをを用いた。また、分子生物学的解析には、ノザンプロット、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) 発がんとはがん治療の分子標的探索

網羅的ゲノム解析情報から、発生母地を同じくするも発生系統を異にする神経芽腫と神経膠芽腫に共通する 1p36 がん抑制遺伝子候補として、*KIF1B-β* と *p73* を同定した。とくに前者は、増瘍能を有すると共に、haploinsufficient ながん抑制遺伝子として機能し、細胞周期調節に関与することが示唆された。また、17q gain の候補遺伝子として新規 *ncRAN* を同定した。*ncRAN* は oncogene 機能を有する新規 non-coding RNA であると考えられた。さらに、11q loss 候補遺伝子として *TSLC1* を同定したが、神経芽腫においてはメチル化以外のエピジェネティックな制御を受けているものと思われた。一方、神経芽腫の網羅的解析から同定した *LMO3* がん遺伝子が交感神経細胞運命決定遺伝子 *Mash1* を転写ターゲットとするのみでなく、p53 および Mdm2 と複合体を形成し p53 の機能を抑制していることを見出した。また、アレイ CGH に基づく新しいリスク分類とゲノム異常の詳細な解析から、神経芽腫の治療抵抗性に関連するゲノム的因子の抽出に成功した。

(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

TRF2 を細胞に過剰発現させると、p53 ファミリーメンバーに属する因子群の中で、TAp63 のみが発現誘導された。siRNA による内在性の TRF2 のノックダウンは TAp63 の発現抑制に伴う制癌剤に対するがん細胞の感受性を著しく低下させた。従って、制癌剤に応答した TAp63 の発現昂進は蛋白質レベルでの安定化のみならず、TRF2 による転写活性化が密接に関与していると考えられた。さらに、臨床材料を用いた発現解析から、扁平上皮肺癌においては、TRAF2 および TAp63 の発現レベルがその予後と有意に関連していることが明らかとなった。

(3) 低酸素と転移、浸潤に関連する遺伝子の同定

B82mtA11 細胞を樹立し、mtDNA が完全に交換されていることを PCR-RFLP 法で確認した。そこで、B82mtA11 細胞と対照として樹立した B82mtB82 の

転移能を調べたところ、B82mtA11 細胞が高転移性を示すことが判った。さらに、B82 細胞由来の高転移性細胞 B82Met 細胞の mtDNA 中の変異を調べたところ、*ND6* 遺伝子中にナンセンス変異が存在することが明らかになった。これらの *ND6* 遺伝子の変異を有する細胞では、呼吸鎖 complex I 活性の低下による ROS の高産生が認められた。さらに、ヒト肺癌の転移性脳腫瘍 27 例における *ND6* 遺伝子の変異を調べたところ、3 症例において 4 種類のミスセンス変異が検出された。

(4) 個体発生と発がんの分子機序

神経芽腫における MYCN の新規ターゲット検索を行い、発がん起序に重要なポリコム複合体の構成分子 Bmi1 を見出した。Bmi1 は神経芽腫細胞の増殖を主に正に制御し、また神経芽腫の分化誘導を制御した。さらに in vivo における MYCN の Bmi1 プロモーター結合を ChIP アッセイで検証したところ、MYCN によって Bmi1 の転写が調節されていた。

一方、Pcl 2 の機能発現機序を明らかにするために、本年度は、その Tudor ドメイン及びふたつの PHD フィンガーについて構造解析及び生化学的特性の解析を行った。その結果、いずれも異なるヒストン修飾を認識しうることが示され、Pcl 2 はヒストンコードを文脈として読み取るタンパクであることが示唆された。また、ヒストン以外のメチル化タンパクを認識しうる可能性が示唆された。

D. 考察

小児がんとは発生系統を同じくする成人がんを対比させ、その広範なゲノム情報から発がんの分子機構と具体的な候補遺伝子の同定を目指して研究を行ってきたが、ここに来て具体的な標的遺伝子とその機能が明らかになってきた。なかでも、神経芽腫を含む多くのがんで高頻度の欠失が見られる染色体 1p36 の候補遺伝子として *KIF1Bβ* を同定しその機能を明らかにしたことは大きな成果であった。我々とほとんど同時に、Dana Faber がん研究所 (ボストン) の W. Kaelin のグループが、神経芽腫と同じ副腎交感神経系から発生する家族性褐色細胞腫の原因遺伝子探索の結果、*KIF1Bβ* を同定するに至り (Dr. Kaelin からの情報)、本遺伝子の重要性がさらに重要となった。今後、この機能解析を展開し、発がん機構の解明を進める。また、11q23 欠失領域にマップされる *TSLC1* が神経芽腫の候補遺伝子が明らかになったことも大きな成果であった。ただし、他のがん種と異なり、メチル化を全く受けていなかったことは興味深い。さらに、全く新規の non-coding RNA

である ncRAN を 17q 増加領域にマップされる新しいがん遺伝子として同定したことは、治療法開発のための新しい標的分子ともなり、今後の展開が期待される。

神経芽腫のがん遺伝子として同定した LM03 は神経発生の重要な制御因子としてその重要性が増しているが、新たな神経発生制御因子としてポリコム遺伝子群 Bmi1 や Pc12 の重要な役割が明らかになってきた。今後、発がんの過程でこれらがどのように機能しているのか、具体的な解析が必要である。

TAp63 は幹細胞の stemness 維持に関して極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。今回、TRF2 が TAp63 の転写を制御しており、肺扁平上皮がんなど上皮性がんにおいてその発がんや悪性度の獲得に関連しているという結果は極めて興味深い。今後さらにその機能解析を展開していく必要がある。

E. 結論

これまでの多面的なゲノム情報に基づき、がんの候補遺伝子の同定が具体的になり、並行して、幹細胞と発がんの分子機構解明へも大きな進展が見られた。今後さらに、未知の遺伝子が同定され、新しい診断や治療法の開発に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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 a and b in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344. 2007
3. 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
4. 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.* 25:94-101. 2007
5. 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.* 12:461-471. 2007
6. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamiyo 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
7. 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. *Oncol. Rep.* 17:1315-1320. 2007
8. Nimura Y, Kawata T, Uzawa K, Okamura J, Liu C, Saito M, Shimada H, Seki N, Nakagawara A, Ito H, Ochiai T, Tanzawa H. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 30:1477-1484. 2007
9. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Ono S, Takada N, Koda T, Todo S, Kamiyo T, Nakagawara A. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene.* 26:5669-5673. 2007
10. Furuya K, Ozaki T, Hanamoto T, Hosoda M, Hayashi S, Barker PA, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. Stabilization of p73 by nuclear I κ B kinase- α Mediates Cisplatin-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282:18365-18378. 2007
11. Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, Hanamoto T, Kikuchi H, Furuya K, Asaka M, Delia D, Nakagawara A. NFB1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 282:22993-23004. 2007

12. Iwao-Koizumi K, Maekawa K, Nakamura Y, Saito S, Kawamoto S, Nakagawara A, Kato K. A novel technique for measuring variations in DNA copy-number: competitive genomic polymerase chain reaction. *BMC Genomics*. 8:206. 2007
13. Ito S, Koshikawa N, Mochizuki S, Takenaga K. 3-Methyladenine suppresses cell migration and invasion of HT1080 fibrosarcoma cells through inhibiting phosphoinositide 3-kinases independently of autophagy inhibition. *Int J Oncol*. 31:261-268, 2007.
14. Stock J, Giadrossi S., Casanova M., Brookes E., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N., Fisher A.G., Pombo A. (2007) Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in ES cells. *Nat Cell Biol*. 9:1428-1435
15. Sharif J., Muto M., Takebayashi S., Suetake I., Iwamatsu A., Endo T.A., Shinga J., Mizutani-Koseki Y., Toyoda T., Okamura K., Tajima S., Mitsuya K., Okano M., Koseki H. (*Senior authors) (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450:908-912.
16. Mimura N, Yuasa S, Souma M, Jin H, Kimura K, Goto S, Koseki H, Aoe T. (2007) Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. *Mol Cell Biol*. 28:293-301.
17. Hiraoka S., Furuichi T., Nishimura G., Shibata S., Yanagishita M., Rimoin D.L., Superti-Furga A., Nikkels P.G., Ogawa M., Katsuyama K., Isono K., Toyoda H., Kinoshita-Toyoda A., Ishida N., Sanai Y., Cohn D.H., *Koseki H. *Ikegawa S. (*Corresponding authors) (2007) Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nat Med*. 13:1363-1367.
18. 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.
19. Elderkin S, Maertens G.N., Endoh M., Mallery D., Morrice N., Koseki H., Peters G., Brockdorff N., Hiom K. (2007) A phosphorylated form of Mel-18 targets the Ring1B histone H2A ubiquitin ligase to chromatin. *Mol Cell* 28:107-120.
20. Miki J, Fujimura Y, Koseki H, Kamijo T. (2007) Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in cooperation with E2F3. *Genes Cells*. 12:1371-1382.
21. 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.
22. 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*. 26:1637-1648.
23. Miyake Y, Kaise H, Isono K, Koseki H, Kohno K, Tanaka M. (2007) Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II Cells. *J Immunol*. 178:5001-5009.
24. de la Cruz CC, Kirmizis A, Simon MD, Isono K, Koseki H, Panning B. (2007) The polycomb group protein SUZ12 regulates histone H3 lysine 9 methylation and HP1 alpha distribution. *Chromosome Res*. 15:299-314.
25. Sakamoto Y, Watanabe S, Ichimura T, Kawasuji M, Koseki H, Baba H, Nakao M. (2007) Overlapping roles of the methylated DNA-binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HOXA genes and heterochromatin foci formation. *J Biol Chem*. 282:16391-16400.
26. Mimura N, Hamada H, Kashio M, Jin H, Toyama Y, Kimura K, Iida M, Goto S, Saisho H, Toshimori K, Koseki H, Aoe T. (2007) Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP. *Cell Death Differ*. 14:1475-1485.
27. Takahashi Y, Takagi A, Hiraoka S, Koseki H,

- Kanno J, Rawls A, Saga Y. (2007) Transcription factors *Mesp2* and *Paraxis* have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Dev Dyn.* 236:1484-1494.
28. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM, Saito T. (2007) The adaptor protein *CARD9* is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 8:619-629. 107.
29. Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamiyo T, Miyazaki T, Sato S, Ikeda H, Ikebuchi K, Koike K. A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion.* 2007 Feb;47(2):326-34.
30. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. *TAp63*-dependent induction of growth differentiation factor 15 (*GDF15*) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene.* 27:409-420. 2008
31. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene.* 27:441-449. 2008
32. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. *ATM*-dependent nuclear accumulation of *IKK- α* plays an important role in the regulation of *p73*-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene.* 27:1183-1188. 2008
33. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamiyo T. Stress via *p53* pathway causes apoptosis by mitochondrial *Noxa* up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene.* 27:741-754. 2008
34. Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. *Spl*-mediated transcriptional regulation of *NFBD1/MDC1* plays a critical role in DNA damage response pathway. *Genes Cells.* 13:53-66. 2008
35. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamiyo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces *p53*-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. *J. Biol. Chem.* 283:3979-3987. 2008
36. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Sugita K, Nakagawara A. *ERAP140/Nbl1a10993* is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncol. Rep.* In press
37. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase *NEDL1* enhances the *p53*-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene.* In press
38. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamiyo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of *Plk1* in the regulation of *p73*-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* In press
39. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. *DeltaNp63/BMP-7*-dependent expression of *matrilin-2* is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press
40. Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono KI, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, Koseki H, Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH. (2008) *PRC1* and *Suv39h* specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet.* In press.
41. Calés C, Román-Trufero M, Pavón L, Serrano I, Melgar T, Endoh M, Pérez C, Koseki H, Vidal M. (2008) Inactivation of the polycomb group protein *Ring1B* unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with

tumorigenesis associated with Ink4a deletion. Mol Cell Biol. 28:1018-1028.

2. 書籍

1. Kamijo T. “INK4a” in “Encyclopedia of Cancer” Chief Editor: Manfred Schwab, Springer, Germany, 2008, In press

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19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 ゲノム情報に基づいて個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにし、新しい臨床リスク分類の開発と治療の標的分子を明らかにすることを目的として、以下の知見を得た。(1) 網羅的ゲノム解析情報から、発生母地を同じくするも発生系統を異にする神経芽腫と神経膠芽腫に共通する 1p36 がん抑制遺伝子候補として、*KIF1B-β*と *p73* を同定した。前者は増腫瘍能を有すると共に、haploinsufficient ながん抑制遺伝子として機能し、細胞周期調節に関与することが示唆された。(2) 17q gain の候補遺伝子として新規 *ncRAN* を同定した。*ncRAN* は、oncogene 機能を有する新規 non-coding RNA であると考えられた。(3) 11q loss 候補遺伝子として *TSLC1* を同定したが、神経芽腫においてはメチル化以外のエピジェネティックな制御を受けているものと思われた。(4) 神経芽腫の網羅的解析から同定した *LMO3* がん遺伝子が交感神経細胞運命決定遺伝子 *Mash1* を転写ターゲットとするのみでなく、p53 および Mdm2 と複合体を形成し p53 の機能を抑制していることを見出した。(5) アレイ CGH に基づく新しいリスク分類とゲノム異常の詳細な解析から、治療抵抗性に関連するゲノムの因子の抽出に成功した。

A. 研究目的

ゲノム情報を利用し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た。発がんの過程において環境因子の影響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と思われる。そこで、本年度も引き続き、網羅的ゲノム異常および遺伝子発現解析の情報を基にして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、臨床へ展開することを目的とした。

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、およびアジレント社の 44K 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。そのほか、通常分子生物学的、生化学的解析手法を用いた。

C. 研究結果

(1) 神経芽腫と神経膠芽腫の比較ゲノム情報解析

神経芽腫 243 例および神経膠芽腫 68 例のアレイ CGH 解析が終了した。これらのゲノムデータを比較し、両腫瘍において共通したゲノム異常と異なるゲノム異常の領域を明らかにし、とくに予後と関連する異常領域を重点的に分析中である。また、両者の網羅的遺伝子発現データも揃ったので、ゲノム異常領域にマップされる予後に関連した発現遺伝子の分析を今後展開する。

(2) 肝芽腫と肝細胞がんの比較ゲノム

情報解析

肝芽腫 58 例と肝細胞がん 45 例のアレイ CGH が終了し、この両者もゲノム異常様式を比較検討し、予後と相関する遺伝子の同定作業に入った。ゲノム異常として最も顕著に異なるのは 17p 欠失で、肝細胞がんでは極めて高頻度に見られるのに対し、肝芽腫ではほとんどその異常が認められなかった。

(3) 染色体 1p36 がん抑制遺伝子候補の同定

1p36 がん抑制遺伝子として従来より解析している TAp73 については、がん遺伝子として機能している P1k1 と直接結合し、互いに負に制御しあっていることを新たに明らかにした。

また、神経芽腫細胞株 NBI においてホモ欠失の見られた 1p36 の 500 kb 領域から、強制発現によって細胞のアポトーシスを誘導する KIF1B β をがん抑制遺伝子候補として同定した。KIF1B β は神経芽腫においては gene dosage によって機能しており、haploinsufficient tumor suppressor gene と考えられた。また、これによる細胞死誘導は p53 非依存性であり、細胞周期の G2/M 期において機能していることが示唆された。遺伝子変異は稀であった。

(4) 染色体 11q 欠失領域のがん抑制遺伝子候補の同定

神経芽腫の 11q がん抑制遺伝子候補として、TSLC1 を同定した。予後不良な神経芽腫において発現が低下しており、その制御はエピジェネティックな機構によるものと思われたが、プロモーター領域のメチル化は見られなかった。興味深いことに、多変量解析により MYCN 増幅との強い相関性が見られた

(5) 染色体 17q 増加領域のがん遺伝子候補の同定

神経芽腫のゲノム異常と発現プロファイルから、17q 増加領域のがん遺伝子候補として新規 non-coding RNA を同定し、ncRAN と命名した。ncRAN は、ノザンプロットで約 2.3 kb の mRNA であったが、タンパク質をコードせず、細胞への強制発現により増殖の促進を来した。また、siRNA で発現を抑制すると細胞の増殖が抑制された。

(6) 神経堤発生と神経芽腫発がんを結

ぶ LM03/Mash1 経路の解析

神経芽腫の網羅的遺伝子発現解析から見いだしたがん遺伝子 LM03 は、交感神経の発生過程で細胞運命決定を行っているマスター遺伝子である Mash1 をターゲットしていたが、さらに今回は、LM03 が p53 と直接結合し、その機能を抑制していることを見いだした。

D. 考察

対象とする腫瘍のゲノム異常および発現プロファイルの網羅的解析がほぼ終了し、同じ神経幹細胞に由来する神経系細胞とグリア系細胞から発生してくる神経芽腫と神経膠芽腫は、それぞれ特有のゲノム異常を有し、共通および異なる異常を示すことが明らかになった。また、同じ腫瘍の中でも異なる予後を有するサブグループが存在することが示され、今後は具体的な候補遺伝子の同定および機能解析の段階へ移る。同様のことは、肝芽腫と肝細胞がんの対比ゲノム解析においても言えた。今回の具体的候補遺伝子解析として最も重要なものは、1p36.2 にマップされ、我々が神経芽腫細胞株において見いだしていたホモ欠失領域にマップされていた KIF1B β である。我々の解析の結果、KIF1B β は haploinsufficient tumor suppressor gene であり、細胞に高発現させると p53 非依存性アポトーシスを誘導し、発現が低下すると細胞の増殖を促進した。Dana Faber がん研究所の William Kaelin のグループは、家族性褐色細胞腫の研究から、同腫瘍のがん抑制遺伝子として同じ KIF1B β を同定し、少数ながら遺伝子変異を見いだしている (personal communication)。したがって、今後、KIF1B β の発がんにおける役割とその機能解析が重要な課題となってくる。一方、神経芽腫の 11q23 にマップされるがん抑制遺伝子として TSLC1 を同定したが、これもアリル欠失による遺伝子発現量の低下のみならず、メチル化以外の未知のエピジェネティックな制御により発がんががんの進展に寄与しているものと思われた。さらに、17q 増加領域にマップされる新規 non-coding RNA として ncRAN を発見したことは極めて重要であり、今後の標的遺伝子の探索など、極めて興味深い。

E. 結論

ゲノム情報解析に基づいて、具体的な候補遺伝子が複数同定され、本研究プロジェクトも新しい段階に入ってきた。このような、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する研究手法は斬新であり、それらの成果を臨床応用へ展開する具体的な足場が見えてきた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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 a and b in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344. 2007
3. 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
4. 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.* 25:94-101. 2007
5. 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.* 12:461-471. 2007
6. 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
7. 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. *Oncol. Rep.* 17:1315-1320. 2007
8. Nimura Y, Kawata T, Uzawa K, Okamura J, Liu C, Saito M, Shimada H, Seki N, Nakagawara A, Ito H, Ochiai T, Tanzawa H. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 30:1477-1484. 2007
9. 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.* 26:5669-5673. 2007
10. Furuya K, Ozaki T, Hanamoto T, Hosoda M, Hayashi S, Barker PA, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. Stabilization of p73 by nuclear I κ B kinase- α Mediates Cisplatin-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282:18365-18378. 2007
11. Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, Hanamoto T, Kikuchi H, Furuya K, Asaka M, Delia D, Nakagawara A. NFB1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *J.*

- Biol. Chem. 282:22993-23004. 2007
12. Iwao-Koizumi K, Maekawa K, Nakamura Y, Saito S, Kawamoto S, Nakagawara A, Kato K. A novel technique for measuring variations in DNA copy-number: competitive genomic polymerase chain reaction. BMC Genomics. 8:206. 2007
 13. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. Oncogene. 27:409-420. 2008
 14. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. Oncogene. 27:441-449. 2008
 15. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. Oncogene. 27:1183-1188. 2008
 16. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. Oncogene. 27:741-754. 2008
 17. Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. Sp1-mediated transcriptional regulation of NFB1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway. Genes Cells. 13:53-66. 2008
 18. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. J. Biol. Chem. 283 3979-3987. 2008
 19. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Sugita K, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. Oncol. Rep. In press
 20. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. Oncogene. In press
 21. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. J. Biol. Chem. In press
 22. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. Biochem. Biophys. Res. Commun. 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）
分担研究報告書

神経細胞腫瘍化におけるEpigenetic 変化の役割の解析

分担研究者 上條岳彦 千葉県がんセンター研究所 生化学研究部長

研究要旨

神経芽腫におけるMYCNの新規ターゲット検索を行い、発がん起序に重要なポリコーム複合体の構成分子Bmi1を見出した。Bmi1は神経芽腫細胞の増殖を主に正に制御し、また神経芽腫の分化誘導にBmi1が重要な意義を持つことが明らかになった。さらにMYCNによってBmi1の転写が調節されている重要な結果を見出し、In vivoにおけるMYCNのBmi1プロモーター結合をChIPアッセイで検証した。Bmi1のノックダウン系および神経芽腫分化誘導系の実験結果から、神経芽腫細胞の増殖・分化に関するBmi1の発現調節標的分子として、p14ARFとp16INK4a以外の重要な分子の存在が示唆された。以上から、神経芽腫の発がん起序においてポリコーム蛋白Bmi1によるEpigeneticな遺伝子発現調節が重要な役割を持つ可能性が明らかになった。

A. 研究目的

近年、増殖・細胞死制御におけるEpigenetic制御の役割がその意義を増しており、発がん機序においてもEpigenetic制御研究が注目されている。しかしながら神経芽腫の発がん起序におけるEpigenetic制御の役割については未だほとんど報告がなされていない。一方、MYCNがん遺伝子は、神経芽腫の発がん起序に深く関与し、その悪性度の調節の主要な因子である。このMYCNターゲットは神経芽腫発がんに大きな役割を果たしており、分子標的治療の標的になりうるものとして注目されているが、そのターゲットが新規治療の開発に応用されていない。

我々はこのMYCNがん遺伝子の新規ターゲットの検索を行った結果、Epigenetic制御に重要なポリコーム複合体の構成分子Bmi1のプロモーター部分にMYCN結合配列（E box）を見出した。今回の研究ではMYCNによるBmi1の発現調節の実態とそのメカニズムの解析、さらにBmi1の神経芽腫細胞における細胞増殖、コロニー形成、細胞分化の役割を解析し、新たなMYCNがん遺伝子の新規ターゲットBmi1を標的とした治療法開発への基礎データを得ることを目的とした。

B. 研究方法

プロモーター部分にMYCN結合配列を持つ遺伝子をin silicoでスクリーニングする。神経芽腫細胞株および腫瘍検体において、候補遺伝子の発現を1. RT-PCR, 2. Western Blotting

で検討する。さらに候補遺伝子の発現誘導をMYCN誘導細胞株で検証する。神経芽腫細胞株に対して、レンチウイルスを用いて候補遺伝子の遺伝子導入と遺伝子ノックダウンを高効率で行い、新規ターゲットの機能検索を行う。また、神経芽腫細胞の分化との関連を調べるために、分化誘導をレンチノイン酸、TPA, サイトカインなどで行い、分化誘導時の新規ターゲットの発現の変化を検討する。さらに候補遺伝子ノックダウンを行った神経芽腫細胞株の分化促進の有無を神経突起の伸長アッセイと分化マーカーの発現誘導の検索で行う。

（倫理面への配慮）

ヒト試料の解析研究を行うにあたっては千葉県がんセンターの倫理委員会の承認を得、資料等の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて充分配慮する。

動物実験は動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への充分な配慮のもとに、慎重に進めている。

C. 研究結果

MYCNがん遺伝子の新規ターゲットとして、Epigenetic発現調節機構に関与するポリコーム遺伝子Bmi1がin silicoで見出された。

1) Bmi1の神経芽腫細胞における発現とMYCNとの相関

複数の神経芽腫細胞（MYCN非増幅4株、MYCN増幅6株）でMYCN発現とBmi1の発現を、RNA

レベルおよび蛋白レベルで検討したところ、相関が認められた。さらに、MYCN誘導神経芽腫細胞SHEP21NでMYCN誘導を行うと、Bmi1の転写はMYCNによって増加し、Bmi1蛋白量も増加した。

Bmi1プロモーターのE boxにおけるMYCNの結合を検討するために、real-time PCR法を用いた半定量的ChIPアッセイを行ったところ、このE boxに対するMYCNの結合が有意差を持って示された。

2) Bmi1の細胞増殖・コロニー形成に与える影響

Bmi1低発現株にレンチウイルスによるBmi1強制発現を行うと、細胞増殖の促進およびsoft agar colonyの形成促進が認められた。また、MYCN誘導神経芽腫細胞SHEP21NにおいてもMYCNとBmi1の相加的な増殖促進効果が示された。Bmi1高発現株でBmi1をレンチウイルス由来shRNAでノックダウンすると、増殖低下およびコロニー形成の抑制が見られた。この際p14ARFおよびp16INK4aの増加は認められなかった。

3) 神経芽腫細胞分化誘導時のBmi1の発現

さらに、神経芽腫の分化をTPAおよびレチノイン酸で誘導した際に、Bmi1の発現が減少したが、p14ARFとp16INK4aの発現は刺激によって異なっていた。TPA刺激ではp14ARFとp16INK4aの発現は増加したが、レチノイン酸刺激では発現は増加していなかった。

D. 考察

Epigenetic制御に重要なポリコム複合体の構成分子：Bmi1は神経芽腫細胞の増殖を主に正に制御していることが、強制発現系とノックダウンの系で明らかになった。また神経芽腫の分化誘導にBmi1が重要な意義を持つことが今回の研究で明らかになった。

さらにMYCNによってBmi1の転写が調節されている重要な結果を見出した。またBmi1のノックダウン系および神経芽腫分化誘導系の実験結果から、神経芽腫細胞の増殖・分化に関するBmi1の発現調節標的分子として、p14ARFとp16INK4a以外の重要な分子の存在が示唆された。これはBmi1・p16・ARFトリプルノックアウトマウスでBmi1ノックアウトマウスのフェノタイプが完全に解消されなかったことと一致しており興味深い。今後は発現ChIPによる解析およびChIP on chip解析によって新たなBmi1ターゲットを同定したい。

E. 結論

神経芽腫におけるMYCNの新規ターゲットとしてポリコム遺伝子Bmi1を見出した。神経芽腫の発がん起序においてポリコム遺伝子群によるEpigeneticな遺伝子発現調節が重要な役割を持つ可能性が明らかになった。

F. 健康危険情報 (特記なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takada Y, Isono K, Shinga J, Turner JM, Kitamura H, Ohara O, Watanabe G, Singh PB, Kamijo T, Jenuwein T, Burgoyne PS, Koseki H. Mammalian Polycomb Scmh1 mediates exclusion of Polycomb complexes from the XY body in the pachytene spermatocytes. *Development*. 2007 Feb;134(3):579-90.
2. 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 Mar 23;354(4):892-8.
3. Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T, Miyazaki T, Sato S, Ikeda H, Ikebuchi K, Koike K. A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion*. 2007 Feb;47(2):326-34.
4. 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*. 2007 Aug 16;26(38):5669-73. Epub 2007 Mar 12.
5. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2008 Jan

- 31;27(6):741-54. 2007 Jul 23; [Epub ahead of print]
6. Miki J, Fujimura Y, Koseki H, Kamijo T. Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in coordination with E2F3 Genes To Cells. 2007 Dec;12(12):1371-82.
 7. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. J Biol Chem. 2008, Feb 15;283(7):3979-87.
 8. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. J Biol Chem. 2008 Jan 3; [Epub ahead of print]

2. 書籍

1. Kamijo T. "INK4a" in "Encyclopedia of Cancer" Chief Editor: Manfred Schwab, Springer, Germany, 2008, In press

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）
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 主席研究員

研究要旨 本研究では、基本転写因子である TBP 関連遺伝子産物の一つである TRF2 が、p53 ファミリーメンバーである TAp63 の転写レベルにおける特異的な調節に重要な役割を担っていることを明らかにした。TRF2 の過剰発現の結果、p53 ファミリーメンバーに属する因子群の中で、TAp63 のみが発現誘導された。siRNA による内在性の TRF2 のノックダウンは TAp63 の発現抑制に伴う制癌剤に対するがん細胞の感受性を著しく低下させた。従って、制癌剤に応答した TAp63 の発現昂進は蛋白質レベルでの安定化のみならず、TRF2 による転写活性化が密接に関与していると考えられる。さらに、臨床材料を用いた発現解析から、扁平上皮肺癌においては、TRAF2 および TAp63 の発現レベルがその予後と有意に関連していることが明らかとなった。この実験結果は、TRF2/TAp63 経路の何らかの破綻が細胞のがん化および制癌剤に対する感受性の低下を誘導する可能性を示唆している。

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、制癌剤に応答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）の発現および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。現在までの研究成果から、制癌剤処理に応答した p53 ファミリー分子群の発現および機能を活性化あるいは不活性化する新たな蛋白質性の因子群、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、基本転写因子である TBP 関連蛋白質の一つである TRF2 が TAp63 の発現を調節する新たな因子であり、しかも TRF2/TAp63 経路が制癌剤感受性の決定に重要な役割を担っていることを明らかにした。

また、臨床材料を用いた発現解析から、扁平上皮肺癌においては、TRAF2 および TAp63 の発現レベルがその予後と有意に関連していることが明らかとなった。従って、TRF2/TAp63 経路が一部のがんに対する抑制効果を持つことが示唆された。

B. 研究方法

モデル細胞株として HeLa および DT-40 細胞を用いた。エトポシド処理による細胞死は 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。TRF2 および p53 ファミリーに属する遺伝子群（p53, p73, p63）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。また、TRF2 による TAp63 プロモーターの活性化は、ルシフェラーゼレポーター法で検討した。さらに、TAp63 プロモーター上への TRF2 のリクルートメントの有無については、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。

C. 研究結果

基本転写因子 TBP の類似蛋白質である TRF2 をノックアウトしたトリ由来の DT-40 細胞では、DNA 損傷に反応した細胞周期停止や細胞死が抑制され、しかも p53 ファミリーに属する TAp63 の発現レベルが親株に比べて顕著に低下していた。このノックアウト細胞で TRAF2 を過剰発現させると、TAp63 の発現レベルが回復したことから、TRF2 の下流標的遺伝子群の一つとして TAp63 が想定された。

HeLa 細胞において TRAF2 を過剰発現させると、p53 と p73 の発現レベルには変化が認められなかったが、TAp63 の特異的な発現誘導が観察された。TAp63 のプロモーター活性に及ぼす TRAF2 の効果を検討する目的で、TAp63 のプロモーターの系統的な欠失変異体を持ったレポータープラスミドを構築して、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、-487/-26 の領域に TRAF2 にレスポンス

するエレメントが存在することが判明した。さらに、この領域には TRAF2 が効率的にリクルートされることがクロマチン免疫沈降法によって明らかになった。

興味深いことに、エトポシド処理による HeLa 細胞の細胞死誘導過程において、TRAF2 および TAp63 の発現誘導が認められたが、ウエスタン法による解析の結果、TRAF2 は細胞核に集積して来ることが観察された。さらに、siRNA を用いて内在性の TRAF2 をノックダウンすると、エトポシドに対する感受性が顕著に低下した。

一方、臨床材料を用いた発現解析の結果、扁平上皮肺癌においては、TRAF2 および TAp63 の発現レベルがその予後と有意に関連していることが明らかとなった。

D. 考察

制癌剤に応答した p53 ファミリーの発現上昇は主として蛋白質レベルの安定化に起因すると考えられている。しかしながら、最近の報告によれば転写レベルでの発現調節機構の存在を示唆する研究成果が蓄積しつつある。我々の知る限り、現時点において TAp63 の転写因子は不明である。本研究では、基本転写因子である TBP 関連遺伝子産物である TRF2 が、TAp63 の転写レベルでの調節および制癌剤に対するがん細胞の感受性の決定に重要な役割を担うことが示唆された。TRF2 は、制癌剤に応答して細胞核内に移行することによって TAp63 に対する転写因子として機能するものと考えられる。一方で、臨床材料を用いた発現解析から、扁平上皮肺癌においては TRF2 および TAp63 の発現レベルがその予後と有意に関連していた。従って、TRF2/TAp63 経路の何らかの破綻が細胞のがん化および制癌剤に対する感受性の低下に関与するものと考えられる。

E. 結論

基本転写因子 TBP 関連遺伝子産物である TRF2 の直接標的遺伝子の一つが p53 ファミリーに属する TAp63 であることを明らかにした。また、扁平上皮肺癌においては TRF2 および TAp63 の発現レベルはその予後と有意に関連していた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T,

Nakagawara A. Δ Np63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.

2. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamiyo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* in press
3. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene*, in press.
4. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncology Rep.*, in press.
5. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamiyo T, Nakagawara A, Kizaki K. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 3937-3987.
6. Bu Y, Suenaga Y, Ono, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. Spl-mediated transcriptional regulation of *NFBD1/MDC1* plays a critical role in DNA damage response pathway *Genes Cells*, 2008; 13: 55-66.
7. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 2008; 27: 1183-1188.
8. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor

- 15(GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene*, 2008; 27: 409-420.
9. 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 Invest.*, 2007; 25: 94-101.
10. Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, Hanamoto T, Kikuchi H, Furuya K, Asaka M, Delia D, Nakagawara A. NFBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 22993-23004.
11. 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 a cisplatin-induced apoptosis *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 18365-18378.

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