

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

ヒトがんで高頻度に変異・発現亢進・活性化している遺伝子を標的とした新たな
治療法の開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 北林 一生

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトがんで高頻度に変異・発現亢進・活性化している遺伝子を標的とした新たな治療法の開発に関する研究	1
--	---

II. 分担研究報告

1. がん幹細胞制御因子を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究	6
北林一生	

2. チロシンキナーゼ基質分子を標的とした腫瘍特性の制御	9
堺 隆一	

3. 細胞死誘導を基盤とした新しいがん治療法の開発に関する研究	12
荒川 博文	

4. テロメラーゼの新規機能を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究	14
増富 健吉	

5. がん抑制因子p53新しいがん治療法の開発に関する研究	16
江成 政人	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	21
-----------------	----

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）
総括研究報告書

がん幹細胞制御因子を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究

主任研究者 北林 一生 国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 MOZ-TIF2 による白血病モデルマウスシステムにおいて M-CSF 受容体の発現の高い細胞に白血病誘導活性が強いことを見出し、M-CSF 受容体阻害剤が白血病治療に有効であることが強く示唆された。肺がん細胞株の足場非依存性に関わるチロシンリン酸化蛋白質として CDCP1 を同定し、CDCP1 のチロシンリン酸化がアポトーシス関連分子 PKCδ を介して、肺がん細胞の浮遊状態におけるアポトーシスを抑制することで足場非依存性をもたらすことを明らかにした。アポトーシス誘導に関与する新規 p53 標的遺伝子として NCCRI3 遺伝子を同定し、ガンマ線照射後に誘導される全く新しい p53 依存性細胞死経路の存在を見出した。テロメレースのテロメア構造維持以外の新規機能を担う分子として易がん性を一症候とする遺伝性疾患の原因遺伝子 RNA-X 及び幹細胞因子 stem cell factor Y を同定し、従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる酵素活性を介してクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関わっていることを見出した。

分担研究者

堺 隆一（国立がんセンター研究所、細胞増殖因子研究部・部長）

荒川 博文（国立がんセンター研究所・生物物理部・部長）

増富 健吉（国立がんセンター研究所・がん性幹細胞研究プロジェクト・プロジェクトリーダー）

江成 政人（国立がんセンター研究所・放射線研究部・室長）

A. 研究目的

白血病細胞の自己複製の分子メカニズムを明らかにし、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

チロシンキナーゼでリン酸化される基質蛋白質にスポットを当て、がん細胞特有の性質獲得に関わるチロシンリン酸化蛋白質を同定し、腫瘍における役割を明らかにすることで、このようなリン酸化された基質蛋白質レベルでの腫瘍の異常特性のコントロールを目指す。

進行癌に対する根治療法開発のため癌細胞特異的に、癌細胞の DNA に傷を付けずに完全な細胞死を誘導する方法を開発する。

従来型のテロメレースを標的としたがん治療の弱点は「効果の遅発性」であり、効果発揮までの時間、別の方法を併用してのがんのコントロールが必須であると考えられてきた。本研究では、テロメレースの新規機能に注目することで、これま

での臨床応用への問題点を改善し、より効果的かつ即効的なテロメレーズ分子標的治療法の開発を目指す。

多数報告されている p53 活性阻害タンパク質の性状を網羅的に解析すると共に、新たな p53 活性阻害因子の探索、そしてその知見を基盤とした分子標的化合物を探索することを目的とする。

B. 研究方法

造血幹細胞に急性骨髄性白血病で見られる融合遺伝子 MOZ-TIF2 を導入し、これを放射線照射した野生型マウスに骨髄移植することにより白血病が発症する白血病モデル実験系を確立し、セルソーターを用いてこの活性を持つ細胞集団を分画し、これを再移植することにより白血病誘導活性を調べた。

足場非依存性に関わる新規の Src キナーゼ基質 CDCP1 がどのように浮遊状態での細胞生存に関わるシグナルを媒介しているかを、RNAi 法や変異体を用いた機能解析により明らかにするとともに、マウスモデルを用いてこの分子を介するシグナルの阻害が転移・浸潤に与える影響を解析した。

マイクロアレイによる新規 p53 標的遺伝子のスクリーニングによって同定された、新しい候補 p53 標的遺伝子の中で、細胞死誘導に関与する p53 標的遺伝子の機能解析を進める。in vivo における抗腫瘍効果の評価を行った。様々な癌細胞株にガンマ線、抗癌

剤などを用いて細胞死を誘導し、その細胞死誘導のメカニズムを解析することにより、これらの経路を活性化分子・化合物の開発を試みた。

tandem affinity peptide (TAP) purificationの方法によりテロメラーゼの新規機能に関わる複合体を精製する。この複合体をタンパク質質量分析解析などにより解析することで、テロメラーゼの新規機能に関わる分子群を同定する。また、RNA群にも注目し複合体内の存在する RNA を同定した。

がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する 5 種類の E3 ユビキチンリガーゼに対する siRNA を作製し、p53 遺伝子を野生型に持つ 4 種類のがん細胞株へ各々の siRNA を導入した。siRNA 導入 72 時間後、細胞中の p53 下流遺伝子の発現をウェスタンブロット法あるいは定量的 RT-PCR 法により定量した。

C. 研究結果

MOZ-TIF2 による白血病モデルマウスシステムにおいて M-CSF 受容体の発現の高い細胞に白血病誘導活性が強いことを見出した。M-CSF 受容体のチロシンリン酸化活性をメシル酸イマチニブ (グリベック) を白血病モデルマウスに投与したところ、白血病の発症が顕著に抑制された。これらの結果から M-CSF 受容体阻害剤が白血病治療に有効であることが強く示唆された。

足場非依存性の強い一群の肺がん細胞株において、浮遊培養下に顕著なチロシンリン酸化を受ける蛋白質として CDCP1 を同定した。CDCP1 の発現抑制により、肺がん細胞 A549 の浮遊状態におけるアポトーシスが誘導され、ソフトアガーのコロニー形成能も抑えられた。逆に CDCP1 と Fyn を発現させることにより足場依存性の細胞株が足場非依存性を獲得することから CDCP1 は肺がん細胞の足場非依存性に関与することが示され、さらにこの過程にアポトーシス関連分子 PKC δ が関与することも明らかになった。CDCP1 の発現抑制は、ヒト肺がん細胞のスキルス胃がん細胞の *in vivo* での転移・浸潤能を著明に低下させ、CDCP1 が実際の腫瘍の転移の過程に関わる分子であることが示された。

アポトーシス誘導に関与する新規 p53 標的遺伝子として NCCRI3 遺伝子を同定した。様々な癌細胞株へ NCCRI3 アデノウイルスベクターを感染させ、NCCRI3 蛋白質を過剰発現したところ、すべての細

胞株で強力な細胞死が誘導された。この時、カスパーゼの活性化を認めた。以上の結果から、NCCRI3 は p53 の新規標的遺伝子として、p53 依存性アポトーシスの新しいメディエーターであることが示唆された。6 種類の様々な癌細胞株へガンマ線を照射して細胞死誘導の有無を調べたところ、1 種類の癌細胞種において強力な細胞死誘導が観察された。この細胞死は完全な p53 依存性かつカスパーゼ依存性アポトーシスであった。この細胞死は、アポトーシス関連標的遺伝子の転写活性化と関係せず、さらにミトコンドリアへの p53 の集積も認められなかった。これまで知られている p53 依存性アポトーシス経路とは異なるメカニズムが推測された。

新規機能を担う分子の同定を試み、易がん性を一症候とする遺伝性疾患の原因遺伝子である RNA-X、あるいは幹細胞因子である stem cell factor Y を同定した。RNA-X は、従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる新規同定酵素活性を介してクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関与していることを見出した。また、新規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を確立した。stem cell factor Y は細胞の幹性維持に直接的にかかわる因子であることから、がん幹細胞の成立に必須の因子であることを見出した。

がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する 5 種類の E3 ユビキチンリガーゼ (COP1、Pirh2、ARF-BP1、Synoviolin、Mdm2) に対する siRNA を作製し、p53 の安定性および活性化におけるそれら siRNA の効果を調べた。幾つかの細胞株を用いて調べたところ、細胞によって各々の siRNA の効果が異なることがわかった。このことは、がん細胞の種類によって p53 阻害タンパク質の発現パターンが異なることが予想される。また、それら E3 ユビキチンリガーゼの中で、最も顕著に効果があり、また、あまり研究報告がなされていないのが、ARF-BP1 であった。そこで、この ARF-BP1 の様々な欠失変異体を作製し、p53 との結合領域の同定を試みたところ、ARF-BP1 の 2748-3381 アミノ酸残基からなる領域に p53 が強く結合することがわかった。

D. 考察

MOZ-TIF2 融合遺伝子の発現により誘導される白血病において、M-CSFR の発現の高い細胞に強い白血病誘導活性があることが示され、M-CSF 受容体阻害活性のあるメシル酸イマチニブに明らかな延命効果があ

ることが確認された。今後、ヒト急性骨髄性白血病患者における M-CSF 受容体の発現について FACS を用いた発現解析を行い、プロトコルが確立されれば国立がんセンター中央病院のルーチンの検査項目として急性骨髄性白血病患者全般を検査する。倫理委員会の審査承認後、急性骨髄性白血病の再発患者を対象にグリベックを用いた治療の臨床試験を行う

足場非依存性の制御分子 CDCP1 のシグナルを抑えると、*in vitro* でがん細胞の足場非依存性が著明に低下すると共に、ヒト肺がんおよびスキルス胃がんの転移・浸潤能が著明に低下することを *in vivo* のモデルで示すことができた。一方で、他施設との共同研究で、ヒト肺腺がんにおいて CDCP1 高発現群は低発現群と比較して予後が不良であることが明らかになりつつある。以上のことから CDCP1 は幾つかの組織のがんの転移・浸潤を抑える標的分子の候補と考えている。CDCP1 は細胞膜に局在する蛋白質であり、もし細胞外から CDCP1 シグナルの抑制できる分子を移植腫瘍などに局注することで腫瘍の転移浸潤に対する効果が得られれば、更に臨床応用に近づくものと考ええる。

新規アポトーシス関連標的遺伝子として NCCRI3 遺伝子を同定した。NCCRI3 蛋白質は細胞膜に局在し、カススペース依存性アポトーシスを誘導することから、新しい p53 細胞死経路のメディエーターである可能性が示唆された。今後は、*in vivo* における抗腫瘍効果の解析や、ヒト癌における異常の有無についての解析が必要と考えられる。ガンマ線照射で誘導される強力な新 p53 細胞死経路の発見は、今後様々な癌における異常の有無の解析、メディエーターを含めた詳細なメカニズムの解析が必要と考えられる。多くの癌で p53 に異常を生じている事実を考えれば、この経路の p53 より下流に存在する分子・シグナルを活性化することで、これまで治療抵抗性であった癌に対する新しい治療法の開発が可能になると考えられる。

テロメラーゼを標的として開発されてきた治療法の欠点として、テロメア短縮までにかかる時間（遅発性）あるいは“がん幹細胞”による治療抵抗性が問題とされてきた。テロメラーゼの新規機能を標的とした治療法を目指すことで従来の問題点である遅発性あるいは抵抗性を克服できる可能性を見据え、新規同定複合体を標的とした治療法に焦点を向け研究を進めた。新規機能を担う分子の同定を試み、新規機能を担う分子を同定した。これらの分子により介在される新規機能は、従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる新規酵素活性であることを見出した。この、また、新

規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を独自に確立した。さらに、新規同定酵素活性を介してヘテロクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関わっていることを見出した。今後は、同定した因子群によって保証される新規酵素活性の阻害物質の探索を行う。

野生型 p53 を発現しているがん細胞では、p53 経路を調節している因子に異常がある場合が多い。p53 を負に調節するユビキチンリガーゼが現在までに 5 種類知られており、これらユビキチンリガーゼが野生型 p53 を発現している幾つかのがん細胞で過剰に発現していることが報告されている。すなわち、これらユビキチンリガーゼが p53 を不活化していることが示唆される。今年度の報告では、これらユビキチンリガーゼの発現抑制が p53 タンパク質を安定化させ、そして活性化を促進することがわかった。特に 4 種類の異なるがん細胞を用いたところ、ARF-BP1 の発現抑制が最も顕著に p53 の活性化を促進しているように思われた。現在、様々ながん細胞でこれらユビキチンリガーゼの発現が解析されているが、網羅的な研究はなされていない。様々ながんの臨床検体におけるこれらユビキチンリガーゼの網羅的な発現解析は、ユビキチンリガーゼに対する阻害剤を開発する上で非常に重要な課題であると考えられる。

E. 結論

M-CSFR の発現の高い細胞に強い白血病誘導活性があることから、M-CSFR が急性骨髄性白血病治療の分子標的として有望であることが示された。

CDCP1 などのチロシンリン酸化蛋白質は、そのシグナル阻害によりがんにおける転移・浸潤などの特性を特異的に制御することが示され、チロシンキナーゼ阻害薬に代わる次世代の分子標的として重要だと考える。

癌細胞に誘導しうる細胞死のメカニズムについては、不明な点が多く、現存する癌治療を難しくしている一因と考えられる。今年度の成果をさらに発展させ、一日も早い強力な細胞死誘導法の開発が強く望まれる。

テロメラーゼの新規機能を司る分子群の同定に成功した。テロメラーゼ新規機能を標的とした治療法を見据えることで従来型のテロメラーゼ標的治療の弱点を克服できる可能性が期待される。

がん細胞の種類によって p53 抑制タンパク質の発現パターンが異なることが示唆され、これらタ

ンパク質に対する低分子阻害剤の探索の際、この知見が役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685-689, 2007.

Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene*. 26, 7231-7239, 2007.

Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP ϵ induced-expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007.

Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, Kitabayashi I. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP ϵ and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22, 273-280. 2008.

Yoshida H, Kitabayashi I. Chromatin regulation by AML1 complex. *Int. J. Hematol.*, 7, 19-24, 2008.

Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Matsukage A, Kiyono T, Fujita M. Identification of Novel Human Cdt1-Binding Proteins by a Proteomics Approach: Proteolytic Regulation by APC/CCdh1. *Mol Biol Cell.*, 1007-1021, 2008.

Tachibana M, Tezuka C, Muroi S, Nishimoto S, Katsumoto T, Nakajima A, Kitabayashi I, Taniuchi I. Phosphorylation of Runx1 at Ser249, Ser266, and Ser276 is dispensable for bonemarrow hematopoiesis and thymocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 368, 536-42, 2008.

Tanaka M, Kamata R, Takigahira M, Yanagihara K, Sakai R. Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination

of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* 171:68-78, 2007.

Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Sakai R. Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J. Cell Sci.*, 120 :2179-2189, 2007

Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, Sakai R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol.Cel. Biol.*, 27:7649-7660,2007

Tazaki T, Miyazaki K, Hiyama E, Nakamoto T, Sakai R, Yamasaki N, Honda Z, Noda M, Miyasaka N, Sueda T, Honda H. Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes Cells* 13, 145-157, 2008

Jia L, Uekita T, Sakai R. Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas. *Mol. Cancer. Res.* 2008 in press

Uekita T, Tanaka M, Takigahira M, Miyazawa Y, Nakanishi Y, Kanai Y, Yanagihara K, Sakai R. CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2008 in press

Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y and Arakawa H. Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53- regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res*, 67: 1451-1460, 2007

Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A and Rotig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* 39: 776-780, 2007

Ohmori K, Endo Y, Yoshida Y, Ohata H, Taya Y and

Masato Enari: Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene* 27, 2215-2227, 2008

Yoshie Endo Y, Atsumi Sugiyama A, Li S, Ohmori K, Ohata H, Yusuke Yoshida Y, Shibuya M, Takei K, Masato Enari and Taya Y: Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis by p53. *Genes to Cells*, 13, 375-386, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称:「M-CSF 受容体を分子標的とする MLL 白血病及び MOZ 白血病治療剤、及びその利用」

発明者:北林一生

出願日: 2007 年 12 月 12 日出願番号:特願 2007-321256

出願人: 国立がんセンター総長

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

がん幹細胞制御因子を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究

分担研究者 北林 一生 国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 MOZ-TIF2 による白血病モデルマウスシステムにおいて M-CSF 受容体の発現の高い細胞に白血病誘導活性が高いことを見出した。M-CSF 受容体のチロシンリン酸化活性をメシル酸イマチニブ（グリベック）を白血病モデルマウスに投与したところ、白血病の発症が顕著に抑制された。これらの結果から M-CSF 受容体阻害剤が白血病治療に有効であることが強く示唆された。白血病治療の分子標的の候補であるユビキチン化酵素 RING1A/B、アセチル化酵素 MOZ、メチル化酵素 MLL の遺伝子改変マウスに MOZ-TIF2 を導入した時に白血病が発症が生じるかどうかを検討した結果、アセチル化酵素 MOZ 欠損マウス、RING1A/B 2 重欠損マウスでは白血病が発症しないことが明らかとなり、これらの因子が分子標的として有望であることが示された。MOZ-TIF2 融合遺伝子に加えて、MLL-AF10 融合遺伝子、N-MYC 遺伝子による白血病モデルマウスシステムを確立した。

A. 研究目的

造血系や神経系などの組織中には多分化能と自己複製能を併せ持つ幹細胞とよばれる集団が存在し、必要に応じて分化した細胞を供給してその更新を維持している。幹細胞は、幹細胞としての性質、すなわち多分化能と自己複製能を維持するために、ニッチ（niche）と呼ばれる微小環境に存在し、細胞分裂を抑制していると考えられる。近年、がんにおいてもがん幹細胞（cancer stem cell）の存在が明らかになってきた。がん幹細胞はがん組織において未分化性と自己複製能を維持しながら子孫細胞を無限に供給する。がん幹細胞は化学療法や放射線療法などに対して抵抗性を示し、しばしば再発の原因となると考えられる。したがって、がん幹細胞の特性を理解することはその根絶治療法の開発のために重要である。本研究では、白血病細胞の自己複製の分子メカニズムを明らかにし、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

マウス骨髄から単離した造血幹細胞に急性骨髄性白血病で見られる融合遺伝子 MOZ-TIF2 をレトロウイルスベクターにより導入し、これを放射線照射した野生型マウスに骨髄移植することにより白血病が発症する白血病モデル実験系を確立した。この白血病発症マウスの骨髄細胞は繰り返し移植可能であることから、セルソーターを用いてこの活性を持つ細胞集団を

分画し、これを再移植することにより白血病誘導活性を調べた。(1)MOZ-TIF2 融合遺伝子に加えて、(2)AML1-MTG8 融合遺伝子、(3)PML-RARA 融合遺伝子、(4)MLL-AF10 融合遺伝子 (5)NPM 変異体、(6)N-MYC 遺伝子の組合せで、白血病モデルマウスシステムを確立することを試みた。白血病治療の分子標的として有望なユビキチン化酵素 RING1A/B、アセチル化酵素 MOZ、メチル化酵素 MLL が白血病幹細胞の自己複製に必須であるかどうかを検討するために、これらの遺伝子改変マウスに MOZ-TIF2 を導入した時に白血病が発症が生じるかどうかを検討した。

C. 研究結果

MOZ-TIF2 遺伝子を導入した白血病マウスの骨髄細胞をさらに別な正常マウスに移植するとそのマウスでも移植後 50 日前後で白血病を発症することが示されたことから、白血病発症マウスの骨髄中には移植可能な十分な自己複製能力を持つ白血病幹細胞が存在することが示唆された。MOZ-TIF2 誘導白血病発症マウスの骨髄細胞の細胞マーカーをしらべたところ、M-CSF 受容体の発現の高い細胞と低い細胞が存在した。これらの細胞分画に白血病幹細胞が含まれるかどうかを検討するため、セルソーターで分画し、限界希釈してマウスに移植したところ、M-CSF 受容体の発現の高い細胞には強い白血病誘導活性があり、低い細胞にはその活性がないことを見出した。M-CSF 受容体のチロシンリン酸化活性はメシル酸イマチニブ（グリ

ベック)が阻害することから、MOZ-TIF2による白血病モデルマウスシステムにメシル酸イマチニブを投与したところ、白血病の発症が顕著に抑制された。これらの結果から M-CSF 受容体阻害剤が白血病治療に有効であることが強く示唆された。これらの知見については特許出願し(特願 2007-321256)、国立がんセンター中央病院及びノバルティス社と共同で臨床試験を行うべく準備を開始した。M-CSFR のプロモーターの結合する転写因子の解析から、MOZ-TIF2 は転写因子 PU.1 と結合して M-CSFR の転写を活性化していることが示された。(1)MOZ-TIF2 融合遺伝子、(4)MLL-AF10 融合遺伝子 (5)NPM 変異体については、単独の発現で白血病を誘導したが、(2)AML1-MTG8 融合遺伝子、(3)PML-RARA 融合遺伝子、(5)NPM 変異体については白血病誘導が見られなかった。造血幹細胞の形成及び自己複製に必須あるユビキチン化酵素 RING1A/B、アセチル化酵素 MOZ、メチル化酵素 MLL、転写因子 AML1・PU.1 が白血病治療の分子標的となるかどうかを検証するため、これらの遺伝子改変マウスに MOZ-TIF2 を導入した時に白血病が発症が生じるかどうかを検討した。その結果、アセチル化酵素 MOZ 欠損マウス、RING1A/B 2 重欠損マウス、PU.1 欠損マウスでは白血病が発症しないことが明らかとなり、これらの因子が分子標的として有望であることが示された。

D. 考察

本研究において、MOZ-TIF2 融合遺伝子の発現により誘導される白血病において、M-CSFR の発現の高い細胞に強い白血病誘導活性があることが示された。M-CSF 受容体阻害活性のあるメシル酸イマチニブ(グリベック)による白血病治療効果について検討した結果、明らかな延命効果があることが確認された。今後、ヒト急性骨髄性白血病患者における M-CSF 受容体の発現について FACS を用いた発現解析を行い、プロトコルが確立されれば国立がんセンター中央病院のルーチンの検査項目として急性骨髄性白血病患者全般を検査する。倫理委員会の審査承認後、急性骨髄性白血病の再発患者を対象にグリベックを用いた治療の臨床試験を国立がんセンター中央病院で行う。キリンファーマから既に開発済みの M-CSF 受容体特異的阻害(Ki20227)の供与を受けて白血病モデルマウスに投与し、白血病治療効果について検討する。

E. 結論

M-CSFR の発現の高い細胞に強い白血病誘導活性が

あることから、M-CSFR が急性骨髄性白血病治療の分子標的として有望であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685-689, 2007.

Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene*. 26, 7231-7239, 2007.

Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP ϵ induced-expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007.

Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, Kitabayashi I. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP ϵ and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22, 273-280. 2008.

Yoshida H, Kitabayashi I. Chromatin regulation by AML1 complex. *Int. J. Hematol.*, 7, 19-24, 2008.

Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Matsukage A, Kiyono T, Fujita M. Identification of Novel Human Cdt1-Binding Proteins by a Proteomics Approach: Proteolytic Regulation by APC/CCdh1. *Mol Biol Cell.*, 1007-1021, 2008.

Tachibana M, Tezuka C, Muroi S, Nishimoto S, Katsumoto T, Nakajima A, Kitabayashi I, Taniuchi I. Phosphorylation of Runx1 at Ser249, Ser266, and Ser276 is dispensable for bonemarrow hematopoiesis and thymocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 368, 536-42, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況

2. 特許取得

発明の名称：「M-CSF 受容体を分子標的とする MLL 白血病及び MOZ 白血病治療剤、及びその利用」
発明者：北林一生

出願日：2007 年 12 月 12 日出願番号：特願 2007-321256
出願人：国立がんセンター総長

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

チロシンキナーゼ基質分子を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究

分担研究者 堺 隆一 国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部 部長

研究要旨 チロシンキナーゼの異常な活性化とその基質分子のリン酸化の異常が、固形腫瘍において転移浸潤に関わる足場非依存性、細胞間接着の低下、運動能亢進など幾つかのシグナルを活性化していることを示してきた。肺がん細胞の足場非依存性に関わるチロシンリン酸化蛋白質として CDCP1 を精製によって同定することに成功し、実際に Fyn キナーゼによる CDCP1 のチロシンリン酸化が、アポトーシス関連分子 PKC δ を介してがん細胞の浮遊状態におけるアポトーシスを抑制することで足場非依存性をもたらすことを明らかにした。CDCP1 の発現抑制は、肺がん細胞の転移能や、スキルス胃がん細胞の転移・浸潤能を著明に低下させ、CDCP1 が実際の腫瘍の転移・浸潤の過程に関わる分子であることが示された。一方膜型のリガンドであり、EphB キナーゼの刺激でチロシンリン酸化する ephrin-B1 は、刺激によりマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導することを見いだした。更に ephrin-B1 の細胞内ドメインが、実際に *in vivo* の転移・浸潤モデルにおいても膵がんやスキルス胃がんの転移・浸潤を強くコントロールすることを示した。

A. 研究目的

がん細胞の転移・浸潤など臨床上問題になる性質には、数多くの腫瘍特異的な細胞特性の変化が関与しており、例えば足場非依存性の獲得、細胞間や細胞基質間の接着性の低下、細胞運動能の亢進、血管新生能などそれぞれの分子メカニズムの解析はこれまで進められてきたがまだ包括的に理解できていない。標的としてもこれらの諸過程に包括的に関与するチロシンキナーゼの阻害の効果の評価が現在のところ主流であるが、本研究ではチロシンキナーゼでリン酸化される基質蛋白質にスポットを当て、がん細胞特有の性質獲得に関わるチロシンリン酸化蛋白質を同定し、腫瘍における役割を明らかにすることで、このようなリン酸化された基質蛋白質レベルでの腫瘍の異常特性のコントロールを目指す。すなわち、腫瘍で活性化したチロシンキナーゼの動かす多くの細胞内シグナルのうち、狙った腫瘍特性のみを選択的にブロックする系を確立し、新しい標的治療につなげることが本研究の目的である。

B. 研究方法

(1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

肺がん細胞株からその転移・浸潤をもたらす特性の一つ、足場非依存能に関わる Src キナーゼ基質を精製と質量分析によって解析し、生物学的機能の解析を進

めてきた。12種類の肺がん細胞株のうち、A549 細胞などを含む足場非依存性が強いグループにおいて Src ファミリーに属する Fyn などと細胞内で結合して強くリン酸化される CDCP1 という機能不詳の膜蛋白質を最近同定した。今年度は、CDCP1 がどのように浮遊状態での細胞生存に関わるシグナルを媒介しているかを RNAi 法などによる機能解析により明らかにするとともに、この分子を介するシグナルのブロックにより転移・浸潤にどれだけの影響をもたらすかをマウスの転移・浸潤モデルを用いて解析する。

(2) ephrin-B1 のがん浸潤における役割

ephrin-B1 は細胞膜表面に発現するリガンドであり、同じく細胞膜表面に発現する EphB 受容体と細胞間接着によって出会うことでチロシンリン酸化され、がんの転移・浸潤に関わるシグナルを伝えることを示してきた。さらに、最近になって ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことがわかった。*in vivo* の膵がん、スキルス胃がんにおいて内在性の ephrin-B1 が実際に転移・浸潤に関わっているかどうかを、siRNA や欠損変異体を用いた ephrin-B1 のシグナルのブロックの系で解析し、実際の転移・浸潤の過程における ephrin-B1 の関与とそのメカニズムの詳細について解析を拡げる。

C. 研究結果

足場非依存性の強い一群の肺がん細胞株において、

浮遊培養下に顕著なチロシンリン酸化を受ける蛋白質として CDCP1 を同定した。CDCP1 の発現抑制により、肺がん細胞 A549 の浮遊状態におけるアポトーシス (anoikis と呼ばれる) が誘導され、ソフトアガーのコロニー形成能も抑えられた。逆に CDCP1 と Fyn を発現させることにより H322 細胞の anoikis が抑制されることから CDCP1 は anoikis の抑制を介して肺がん細胞の足場非依存性に関わることを示された。この過程にアポトーシス関連分子 PKC δ が関与することも明らかになった。CDCP1 の発現抑制は、マウス尾静脈注射の系で A549 肺がん細胞の転移能を著明に低下させ、CDCP1 が実際の腫瘍の転移の過程に関わる分子であることを示した。ヒトスキルス胃がんの系でも、CDCP1 の発現抑制が同所性に移植されたスキルス胃がんの漿膜側への浸潤や腹膜播種を抑制した。

最近、我々は ephrin-B1 を高発現する膵がん細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを見いだしたが、これは活性化した ephrin-B1 がマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導するという新たな機能を持つためであった。この作用に ephrin-B1 の C 末端が深く関わっており、実際、マウスにおけるヒト膵がんの腹膜播種のモデルでも、ephrin-B1 の C 末端の欠損変異体が *in vivo* で腹膜への浸潤を強く抑制した。これまでの解析で ephrin-B1 を介するシグナルが、細胞の運動能や細胞間接着の制御により多面的に腫瘍の転移・浸潤に関わりうることを明らかになった。実際にヒトスキルス胃がんの系でも ephrin-B1 の細胞内シグナルを細胞内ドメインの C 末側のリン酸化部位を欠失する変異体で阻害すると、同所性に移植したスキルス胃がん細胞の漿膜側への浸潤や腹膜播種を著明に抑制することが示された。

D. 考察

本研究において我々は足場非依存性を制御する分子 CDCP1 を同定し、実際にこの分子のシグナルを抑えると、がん細胞の足場非依存性が著明に低下すると共に、ヒト肺がんおよびスキルス胃がんの転移・浸潤能が著明に低下することを *in vivo* のモデルで示すことができた。一方で、他施設との共同研究で、実際のヒト肺腺がんの組織切片における CDCP1 の発現解析を現在進めているが、CDCP1 高発現群は低発現群と比較して、はっきりと予後が不良であることが統計学的に明らかになりつつある。以上のことから CDCP1 はヒトの肺腺がんなどの転移・浸潤を抑える標的分子の候補と考えている。CDCP1 は膜透過ドメインを持ち、細胞

膜に局在する蛋白質であり、その多量体化が活性に関わると考えられている。このため CDCP1 の細胞外ドメインに結合して多量体化を抑える抗体およびペプチドを現在スクリーニング中であり、このような細胞外から CDCP1 シグナルの抑制できる分子を移植腫瘍などに局注することで腫瘍の転移浸潤に対する効果が得られれば、更に臨床応用に近づくものと考ええる。

膜型のリガンドである Ephrin-B1 もスキルス胃がんや膵がんなどの腫瘍において、腫瘍間質-相互作用に関わってメタロプロテアーゼ分泌誘導などの機序で腫瘍の浸潤を抑えることを示してきた。こちらのシステムもこれまでに、C 末端を欠損する変異体の過剰発現で Ephrin-B1 を介したシグナルを抑えると、マウスモデルにおける腫瘍の浸潤能を著明に抑制することを見いだした。Ephrin-B1 も CDCP1 同様に細胞膜外の結合による多量体化が活性化に関わることを分かっている。そこで臨床における実用化を睨んで、細胞外ドメインに対して、多量体化をブロックすることで活性を抑制する分子を作成することを試みている。

E. 結論

現時点で、チロシンキナーゼを阻害する薬剤は、腫瘍の分子標的薬として有望であり、既に多くが実用化されつつあるが、キナーゼ阻害剤はその全ての基質のリン酸化を抑え、シグナルを根こそぎブロックすることで多くの場合強い副作用をもたらす。我々はこれまで、これらのうち特定のチロシンリン酸化蛋白質がチロシンキナーゼの基質としてがんの転移・浸潤などの特性に深く関わることを示してきて、更に今年度の研究でこのような特定の基質のシグナルをブロックすることで、転移・浸潤をコントロールしうることが示された。このような分子は腫瘍の特性や組織系に照準を絞った次世代の分子標的治療の絶好のターゲットとなりうる。とくに CDCP1 や ephrin-B1 のような膜に局在する基質分子は、その細胞外ドメインとの結合分子をデザインすることにより、細胞膜を透過しない分子でも細胞内シグナルをブロックできる可能性があり、現在そのような形でのチロシンリン酸化シグナルの阻害モデルを作成している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka M, Kamata R, Takigahira M, Yanagihara K, Sakai R. Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* 171:68-78, 2007.

Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Sakai R. Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J. Cell Sci.*, 120 :2179-2189, 2007

Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, Sakai R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol. Cell. Biol.*, 27:7649-7660, 2007

Tazaki T, Miyazaki K, Hiyama E, Nakamoto T, Sakai R, Yamasaki N, Honda Z, Noda M, Miyasaka N, Sueda T, Honda H. Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes Cells* 13, 145-157, 2008

Jia L, Uekita T, Sakai R. Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas. *Mol. Cancer. Res.* 2008 in press

Uekita T, Tanaka M, Takigahira M, Miyazawa Y, Nakanishi Y, Kanai Y, Yanagihara K, Sakai R. CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2008 in press

2. 学会発表

二見仁康、堺隆一：神経芽腫における受容体型チロシンキナーゼ RET の役割の検討 (2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会 (横浜)

田中正光、鎌田礼子、堺隆一：分子標的としての

ephrin-B1 信号伝達 (2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会 (横浜)

上北尚正、田中正光、柳原五吉、堺隆一：CDCP1 はスキルス胃がんの腹膜播種の制御に関する因子である (2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会 (横浜)

三宅泉、堺隆一：神経芽腫細胞の分化機構における ShcA および ShcC の機能について (2007.10.3-5) 第 66 回日本癌学会総会 (横浜)

Uekita T., Lin J. & Sakai R.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma. 7th AACR/JCA Joint International Conference, Hawaii, USA (2007.1.21-27)

Sakai R & Uekita T.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma Mechanisms & Models of Cancer Meeting, San Diego, USA(2007.8.8-12)

Sakai R. & Uekita T.: CDCP1 regulates metastatic potential of human cancers through anoikis resistance. The 12th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Sapporo, Japan (2007.12.21-22)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

3. 特許取得

なし

4. 実用新案登録

なし

5. 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

細胞死誘導を基盤とした新しいがん治療法の開発に関する研究

分担研究者 荒川 博文 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨 進行癌根治療法開発の目的で、癌細胞に優しく完全な細胞死を誘導する方法を開発する。そのためにがん抑制遺伝子 p53 の活性型やアポトーシス誘導関連標的遺伝子の同定、機能解析、動物腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果の判定などを行っていき、最も効果的な細胞死誘導法を開発する。癌細胞特異的な遺伝子導入法と組み合わせ、進行癌根治療法開発のための重要な基盤を作っていく。抗癌剤や放射線照射、分子標的治療による癌細胞への細胞死誘導のメカニズムを明らかにする。細胞死経路を特異的に活性化する分子・化合物を同定し、治療へ応用する。

A. 研究目的

がんの早期発見のための診断技術の進歩や治療法としての手術療法、化学療法、放射線療法の進歩により、早期がんはもはや不治の病ではなくなった。一方で、進行癌に対してはいずれの治療法も延命療法の域を出ず、21世紀の今日も根治療法は存在せず、数ヶ月の余命延長に一喜一憂せざるを得ない現状である。進行癌に対する根治療法開発のための重要な鍵は、極めて癌細胞特異的に、優しく（癌細胞のDNAに傷を付けない）かつ完全な細胞死を誘導する方法を開発できるかにかかっている。我々は癌細胞に優しくかつ完全な細胞死を誘導する方法を開発するためにこの研究を遂行する。

B. 研究方法

マイクロアレイによる新規 p53 標的遺伝子のスクリーニングによって同定された、新しい候補 p53 標的遺伝子の中で、細胞死誘導に関与する p53 標的遺伝子の機能解析を進める。具体的には、候補標的遺伝子をプラスミド発現ベクター及びアデノウイルスベクターへ組み込み、大腸癌、肺癌、乳癌など様々なヒト癌細胞株へ導入し、細胞死誘導活性の有無を調べる。細胞死が誘導された場合、その細胞死が、カスパーゼ依存性であるか非依存性であるかを調べていく。また、誘導される細胞死はミトコンドリア経路、デスレセプター経路、ディペンデンスレセプター経路のいずれの経路を介するアポトーシス誘導様式であるかを明らかにする。癌細胞に対する強力な細胞死誘導活性を示したものについては、in vivo における抗腫瘍効果の評価を行って行く。

様々な癌細胞株にガンマ線、抗癌剤、分子標的薬を用いて細胞死を誘導し、その細胞死誘導のメカニ

ズムを解析する。具体的には、p53 依存性か非依存性か、カスパーゼ依存性か非依存性か等の詳細を明らかにし、これらの経路をメディエートする分子を活性化し、分子・化合物の開発や、これら細胞死誘導物質に耐性を生じる原因を明らかにし、細胞死抑制因子に対する阻害剤の開発を試みる。

C. 研究結果

本年度はアポトーシス誘導に関与する新規 p53 標的遺伝子として NCCRI3 遺伝子を同定した。この遺伝子は一回膜貫通型の蛋白質をコードして、SUSHI ドメインを有していた。この蛋白質を発現ベクターにクローニングし、ヒト癌細胞株で発現させたところ、細胞膜に強い染色を認めた。様々な癌細胞株へ NCCRI3 アデノウイルスベクターを感染させ、NCCRI3 蛋白質を過剰発現したところ、すべての細胞株で強力な細胞死が誘導された。この時、カスパーゼの活性化を調べた結果、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ3の活性化を認めた。このことから NCCRI3 で誘導される細胞死はアポトーシスと考えられた。以上の結果から、NCCRI3 は p53 の新規標的遺伝子として、p53 依存性アポトーシスの新しいメディエーターであることが示唆された。

6種類の様々な癌細胞株へガンマ線を照射して細胞死誘導の有無を調べたところ、1種類の癌細胞種において強力な細胞死誘導が観察された。この細胞死は完全な p53 依存性細胞死であった。カスパーゼ9とカスパーゼ3の活性化を認め、カスパーゼ依存性のアポトーシスと考えられた。興味深いことに、この細胞死は、ガンマ線照射後30分から始まる急速なカスパーゼの活性化を示し、PUMA, Noxa, Bax, p53AIP1 などのアポトーシス関連標的遺伝子の転写

活性化と関係していなかった。さらにミトコンドリアへの p53 の集積も認められず、これまで知られている p53 依存性アポトーシス経路とは異なるメカニズムが推測された。

D. 考察

新規アポトーシス関連標的遺伝子として NCCRI3 遺伝子を同定した。NCCRI3 蛋白質は細胞膜に局在し、カスパーゼ依存性アポトーシスを誘導することから、新しい p53 細胞死経路のメディエーターである可能性が示唆された。今後は、in vivo における抗腫瘍効果の解析や、ヒト癌における異常の有無についての解析が必要と考えられる。

ガンマ線照射で誘導される強力な新 p53 細胞死経路の発見は、今後様々な癌における異常の有無の解析、メディエーターを含めた詳細なメカニズムの解析が必要と考えられる。多くの癌で p53 に異常を生じている事実を考えれば、この経路の p53 より下流に存在する分子・シグナルを活性化することで、これまで治療抵抗性であった癌に対する新しい治療法の開発が可能になると考えられる。

E. 結論

癌細胞に誘導しうる細胞死のメカニズムについては、まだ不明な点が多く残されており、そのことが現存する癌治療を難しくしている一因と考えられる。特に進行癌に対する有効な根治療法は現在存在せず、今年度の成果をさらに発展させ、一日も早い強力な細胞死誘導法の開発が強く望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y and Arakawa H. Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53- regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res*, 67: 1451-1460, 2007

Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A and Rotig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* 39: 776-780, 2007

2. 学会発表

1. 二村学、喜多村憲章、中村康之、宮本祐士、加峰弘毅、青木幹根、崔紅艶、荒川博文 第66回日本癌学会学術総会一般口演 4-3 p53 関連遺伝子 (2) 演題「Identification of UNC5A as a novel p53-target gene and its involvement in Caspase-dependent apoptosis」

2. 荒川博文 第66回日本癌学会学術総会シンポジウム S10 Dependence Receptors: A New Concept for Cell-fate Decisions 演題「p53 and dependence receptors」

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

テロメラーゼの新規機能を標的とした新しいがん治療法の開発に関する研究

分担研究者 増富 健吉 国立がんセンター研究所・プロジェクトリーダー

研究要旨 テロメラーゼは、90%を超えるヒトがんでその発現・活性が亢進している一方で正常組織での発現はきわめて低いことから、がん治療の標的分子として注目されてきた。本研究では、テロメラーゼの新規機能を標的とした分子標的治療の開発を目指す。RNAを内在するリボヌクレオ複合体であるテロメラーゼがテロメア構造維持に関わることはよく知られている。しかし最近、テロメア構造維持以外の新規機能とりわけ幹細胞機能維持に関わる役割が注目されている。新規機能を担う分子の同定を試み、易がん性を一症候とする遺伝性疾患の原因遺伝子であるRNA-X、あるいは幹細胞因子である stem cell factor Yを同定した。従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる酵素活性を介してクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関わっていることを見出した。また、新規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を確立した。

A. 研究目的

テロメラーゼはがん細胞で高い発現がみられる一方で正常組織での発現はきわめて低いことから、がん治療の魅力的な分子標的と考えられ研究が進められてきた。これまでも、テロメラーゼを標的とした治療法の治験がすすめられつつある。しかし、テロメラーゼの機能がテロメア構造維持のみに関わるとしてがん治療への応用を考えた場合、治療効果発現までに時間がかかるという問題点があげられてきた。すなわち、テロメラーゼを標的としたがん治療の効果発現にはテロメア短小化に有する時間が必要であり、効果発現までの期間、別の方法を併用してのがんのコントロールが必須であると考えられてきた。本研究では、テロメラーゼの新規機能に注目することで、これまでの臨床応用への問題点を改善し、より効果的かつ即効的なテロメラーゼ分子標的治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

tandem affinity peptide (TAP) purificationの方法によりテロメラーゼの新規機能に関わる複合体を精製する。この複合体をタンパク質質量分析解析などにより解析することで、テロメラーゼの新規機能に関わる分子群を同定する。また、RNA群にも注目し複体内の存在するRNAを同定する。これらの分子のDNA修復機能やクロマチン構造維持機構に果たす役割を、分子生物学的、生化学的手法を用いてさらに解析することで新規治療法の確立を目指す。

1. 新規同定タンパク質群が細胞幹性維持にかかわるかどうかを検討する。また、がん幹細胞の成立

にかかわるかに関しても造腫瘍能の解析から検討する。

2. テロメラーゼは逆転写酵素活性を有する酵素複合体であることから、新規同定RNAが何らかの酵素活性を持たないかに関して検討を行う。さらに、特に新規同定RNAがテロメア構造機能維持以外の機能（とくにクロマチン構造維持機構）に及ぼす生物学的意義に関して検討を行う。

C. 研究結果

新規機能を担う分子の同定を試み、易がん性を一症候とする遺伝性疾患の原因遺伝子であるRNA-X、あるいは幹細胞因子である stem cell factor Yを同定した。RNA-Xは、従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる新規同定酵素活性を介してクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関わっていることを見出した。また、新規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を確立した。stem cell factor Yは細胞の幹性維持に直接的にかかわる因子であることから、がん幹細胞の成立に必須の因子であることを見出した。

D. 考察

テロメラーゼを標的として開発されてきた治療法の欠点として、テロメア短縮までにかかる時間（遅発性）あるいは“がん幹細胞”による治療抵抗性が問題とされてきた。テロメラーゼの新規機能を標的とした治療法を目指すことで従来の問題点である遅発性あるいは抵抗性を克服できる可能性を見据え、新規同定複合体を標的とした治療法

に焦点を向け研究を進めた。新規機能を担う分子の同定を試み、新規機能を担う分子を同定した。これらの分子により介在される新規機能は、従来から知られている逆転写酵素活性とは異なる新規酵素活性であることを見出した。この、また、新規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を独自に確立した。さらに、新規同定酵素活性を介してヘテロクロマチン構造維持あるいは細胞幹性維持に関わっていることを見出した。今後は、同定した因子群によって保証される新規酵素活性の阻害作用を有する物質の探索を行う。我々が確立した新規酵素活性を検出する *in vitro* アッセイ系を用いて、現在、協和発酵工業との共同研究で、天然化合物ライブラリーの中から、阻害物質のスクリーニングを行っている。

E. 結論

テロメレーズの新規機能を司る分子群の同定に

成功した。驚くべきことに、これらの分子群は従来から知られてきた、テロメレーズ逆転写酵素活性とは異なる新規酵素活性を介して、生物学的意義を発揮していることを見出した。これらの新規同定酵素活性により保証される生物学的機能は、ヘテロクロマチン構造維持や細胞幹性維持に深く関わっていることを見出した。このような、テロメレーズ新規機能を標的とした治療法を見据えることで従来型のテロメレーズ標的治療の弱点を克服できる可能性が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第 30 回日本分子生物学会総会

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

がん抑制タンパク質 p53 の活性化阻害因子群を標的とした分子化合物の開発に関する研究

分担研究者 江成 政人 国立がんセンター研究所・放射線研究部・室長

研究要旨 癌抑制遺伝子 p53 はヒトの癌の約半数で変異が認められているが、p53 変異のない癌も多数報告されている。この場合、p53 活性化因子の機能破綻や p53 活性阻害因子の過剰発現を起こしている例が多い。本研究では、p53 活性を負に制御するユビキチンリガーゼの発現抑制が p53 の活性化を促進すること、そして、その中でも、ARF-BP1 が最も顕著に p53 の活性化を促すことがわかった。そして、ARF-BP1 の 2748-3381 アミノ酸残基からなる領域に p53 が強く結合することがわかった。

A. 研究目的

本研究では、多数報告されている p53 活性阻害タンパク質の性状を網羅的に解析すると共に、新たな p53 活性阻害因子の探索、そしてその知見を基盤とした分子標的化合物を探索することを目的とする。

B. 研究方法

がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する5種類の E3 ユビキチンリガーゼ（COP1、Pirh2、ARF-BP1、Synoviolin、Mdm2）に対する siRNA を作製し、p53 遺伝子を野生型に持つ4種類のがん細胞株（乳癌 MCF7 細胞、骨肉腫 U2OS 細胞、大腸癌 HCT116 細胞、繊維腫 HT1080 細胞）へ各々の siRNA を導入した。siRNA 導入72時間後、細胞中の p53 下流遺伝子の発現をウエスタンブロット法あるいは定量的 RT-PCR 法により定量した。

全長 ARF-BP1 をコードする cDNA を鋳型とし、PCR 法を用いて8種類の欠失変異体を作製した。欠失変異体をコードする PCR 断片を N 末端にエピトープタグが付加するように乳類の発現ベクターに挿入した。p53 との結合を検討するために、それら発現ベクターと p53 発現ベクターを p53 欠損肺癌 H1299 細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入してから 24 時間後、細胞を回収し、その細胞抽出液を付加したエピトープに対する抗体を用いて免疫沈降した。その溶出液をそれぞれエピトープタグに対する抗体および p53 に対する抗体を用いてウエスタンブロット法にて検出した。C. 研究結果

がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する 5 種類の E3 ユビキチンリガーゼに対する siRNA を作製し、p53 の安定性および活性化におけるそれら siRNA の効果を調べた。4 種類の細胞株を用いて調べたところ、細胞によって各々の siRNA の効果が異なることがわかった。このことは、

がん細胞の種類によって p53 阻害タンパク質の発現パターンが異なることが予想される。また、それら E3 ユビキチンリガーゼの中で、最も顕著に効果があり、また、あまり研究報告がなされていないのが、ARF-BP1 であった。そこで、この ARF-BP1 の様々な欠失変異体を作製し、p53 との結合領域の同定を試みたところ、ARF-BP1 の 2748-3381 アミノ酸残基からなる領域に p53 が強く結合することがわかった。

D. 考察

野生型 p53 を発現しているがん細胞では、p53 経路を調節している因子に異常がある場合が多い。p53 を負に調節するユビキチンリガーゼが現在までに 5 種類知られており、これらユビキチンリガーゼが野生型 p53 を発現している幾つかのがん細胞で過剰に発現していることが報告されている。すなわち、これらユビキチンリガーゼが p53 を不活化していることが示唆される。今年度の報告では、これらユビキチンリガーゼの発現抑制が p53 タンパク質を安定化させ、そして活性化を促進することがわかった。特に 4 種類の異なるがん細胞を用いたところ、ARF-BP1 の発現抑制が最も顕著に p53 の活性化を促進しているように思われた。また、p53 への結合には ARF-BP1 の 2748-3381 アミノ酸残基からなる領域が必要であることがわかった。この領域には、構造上の特徴がなく p53 との結合状態を予測できないので、X 線結晶あるいは NMR 装置を用いた立体構造解析法を用いて、その結合様式を調べる必要があるだろう。現在、様々ながん細胞でこれらユビキチンリガーゼの発現が解析されているが、網羅的な研究はなされていない。様々ながんの臨床検体におけるこれらユビキチンリガーゼの網羅的な発現解析は、ユビキチンリガーゼに対する阻害剤を開発

する上で非常に重要な課題であると考えられる。

E. 結論

得られた研究成果より、がん細胞の種類によって p53 抑制タンパク質の発現パターンが異なることが示唆され、これらタンパク質に対する低分子阻害剤の探索の際、この知見が役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kazuji Ohmori, Yoshie Endo, Yusuke Yoshida, Hirokazu Ohta, Yoichi Taya and Masato Enari*: Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene*, 27, 2215-2227, 2008. *Corresponding author

Yoshie Endo, Atsumi Sugiyama, Shun-Ai Li, Kazuji Ohmori, Hirokazu Ohata, Yusuke Yoshida, Masabumi Shibuya, Kohji Takei, Masato Enari* and Yoichi Taya: Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis by p53. *Genes to Cells*, 13, 375-386, 2008. *Corresponding author

2. 学会発表

Structural model of p53-clathrin heavy chain interaction: Hirokazu Ohata, Kazuji Ohmori, Yoichi Taya, Masato Enari 日本癌学会 2007 年度学術総会、一般口頭発表、横浜、2007 年 10 月 3 日

(2) Regulation of clathrin-mediated endocytosis and cell migration by p53 : Atsumi Sugiyama, Yoshie Endo, Yoichi Taya, Masato Enari 日本癌学会 2007 年度学術総会、ポスター発表、横浜、2007 年 10 月 3 日

(3) Regulation of p53-mediated transcription by monomeric clathrin heavy chain : Yusuke Yoshida, Kazuji Ohmori, Hirokazu Ohata, Yoichi Taya, Masato Enari 日本癌学会 2007 年度学術総会、ポスター発表、横浜、2007 年 10 月 3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙 5

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
Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S.	Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1.	Nature	446	685-689	2007.
Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I.	Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription.	Oncogene.	26	7231-7239	2007.
Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I.	PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP ϵ induced-expression in myeloid differentiation.	Mol. Cell. Biol.	27	5819-5834	2007.
Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, Kitabayashi I.	Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP ϵ and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation.	Leukemia	22	273-280	2008
Yoshida H, Kitabayashi I.	Chromatin regulation by AML1 complex.	Int. J. Hematol.	7,	19-24	2008.
Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Matsukage A, Kiyono T, Fujita M. , ,	Identification of Novel Human Cdt1-Binding Proteins by a Proteomics Approach: Proteolytic Regulation by APC/CCdh1.	Mol Biol Cell.	19	1007-1021	2008.
Tachibana M, Tezuka C, Muroi S, Nishimoto S, Katsumoto T, Nakajima A, Kitabayashi I, Taniuchi I.	Phosphorylation of Runx1 at Ser249, Ser266, and Ser276 is dispensable for bonemarrow hematopoiesis and thymocyte differentiation.	Biochem Biophys Res Commun.	368	536-42	2008.
Tanaka Masamitsu Kamata Reiko Takigahara Misato Yanagihara Kazuyosi Sakai Ryuichi	Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhou carcinoma.	Am. J. Pathol.	171 (1)	68-78	2007
Tanaka Masamitsu Sasaki Kazuki Kamata Reiko Sakai Ryuichi	Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells.	J. Cell Sci.	120 (13)	2179-2189	2007