

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

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と
癌の診断治療への応用

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 北村 俊雄

平成21(2009)年4月

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

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と
癌の診断治療への応用に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 北村 俊雄

平成21（2009）年4月

目 次

I. 総合研究報告

レトロウィルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する研究

北村 俊雄 -----1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----15

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----16

総合研究報告書

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する研究

研究代表者 北村 俊雄

研究要旨

近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によって完治するケースが多くなってきた。しかしながら膵がんなど早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。本研究の研究対象は、早期診断が難しく予後が悪い膵がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、ユーイング肉腫、予後は中等度であるが同じく早期診断が難しい腎がん、また本邦に多い胃がんおよび近年本邦で増加しつつある大腸がん、前立腺がん、膀胱がんを設定した。本研究の目的は、これらのがんに対するマーカー分子を用いた血清診断の確立および抗体を用いた治療への応用を目指すことである。

主任研究者らがレトロウイルス技術に基づき開発したシグナルシーケンストラップ SST-REX 法によって、上記がん細胞株に発現するマーカー候補分子、治療標的候補分子を同定した。さらに本研究においては、これらの候補分子に対するモノクローナル抗体樹立法を考案することにより、抗腫瘍活性などの生理活性機能を有する抗体を効率良く取得することに成功した。

分担研究者 野阪 哲哉
三重大学大学院医学系研究科
感染症制御医学分野 教授

A. 研究目的

多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占める。がんを早期に発見し適切な治療を速やかに行うことは、国民の健康増進に役立つことに加え、増大する医療費の軽減効果も期待できる。従って、がんの早期診断および治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によってがんが完治するケースも多くなってきた。しかしながら膵がん、ユーイング肉腫、グリオブラストーマを代表とする脳腫瘍など早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。特に膵がんが初期にみつかることは稀で、症状が出てからの発見例では極めて予後が悪い。肝がんや大腸がんなど一部のがんでは α フェトプロテインやCEAなど高頻度に血中で検出可能ながん細胞由来マーカー

蛋白質が見つかっているが、膵がんやグリオブラストーマにおいても同様のマーカーがあればスクリーニング検査として利用可能である。また胃がんや肺がんなど胃カメラや胸部X線で早期発見が可能ながんにおいても、血液検査で検出できるマーカー分子があれば非侵襲的検査でスクリーニングができる利点がある。つまり胃カメラや胸部X線検査を受けない人に対するスクリーニングとして有効性が期待できる。

本研究の目的は、早期診断法が難しく予後が悪い膵がん、ユーイング肉腫、グリオーマ（グリオブラストーマを含む）、予後は中等度であるがやはり早期診断の難しい腎がん、本邦に多い胃がん、本邦で最近増加しつつある前立腺がん、大腸がん、膀胱がんなどのマーカー分子を同定し、これらのマーカー遺伝子に対する抗体を作成することおよ

び抗体療法に利用できるがん抗原および抗体を同定することである。

B. 研究方法

本研究では、主任研究者らが開発した高効率かつ正確なシグナルシーケンストラップ法 SST-REX (Kojima and Kitamura, Nat Biotech, 1999) を利用して、がん特異的抗原を同定し、モノクローナル抗体を作成する。

特定のがん細胞からシグナルシーケンストラップ用のライブラリーを作成し SST-REX 法でスクリーニングを行うと、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 にヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質がサイトカインレセプター MPL との融合蛋白質として一種類ずつ発現する細胞カタログが得られる。SST-REX 法では、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞の自律増殖能獲得を指標としてライブラリーをスクリーニングする。実験の原理は、シグナルシーケンスを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が恒常的活性型サイトカインレセプター MPL と融合して Ba/F3 表面に発現された場合は細胞の自律増殖が誘導されることである。自律増殖能を獲得した細胞に挿入されている cDNA は PCR で容易に回収できる。シグナルシーケンスを持たない蛋白質が恒常的活性型 MPL と融合しても細胞の自律増殖は誘導できない。

本研究においては SST-REX 法の過程で得られるがん細胞由来の分泌蛋白質あるいは膜蛋白質と MPL の融合蛋白質として発現している Ba/F3 細胞群 (以後 SST クローンと呼ぶ) を免疫源としてマウスモノクローナル抗体を作製する。患者がん組織あるいはがん細胞株を利用して樹立した抗体の特異性およびがん細胞株に対する増殖抑制効果を調べる。

また上記の実験で樹立した SST クローンを利用して細胞チップ作製し、モノクローナル抗体のスクリーニング、患者血清中に存在すると考えられるがん抗原に対する抗体のアッセイに利用することを旨とする。

(倫理面への配慮)

本研究ではすでに他所で樹立されたヒトの細胞株を使用しており、患者サンプルを直接使用していない。樹立した抗体を利用してヒト血清中のがん抗原をアッセイする利用する目的で、当該施設の倫理予備審査委員会の承認を得た研究計画書に基づき、該当者に説明し同意書を得たうえで検体を採取した。

動物実験においては、Sacrifice するとき麻酔を行うなど動物 (主にマウス) に苦痛を与えないように配慮する。また 1 年に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

C. 研究成果

主任研究者らが開発したレトロウイルスベクターを利用したシグナルシーケンストラップ SST-REX 法を利用して総計 4,318 クローンの解析を行い、のべ 963 種類の膜蛋白質および分泌蛋白質に対する遺伝子を同定した。同定したがん細胞マーカー候補分子のうち 47 種類に対してモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は様々ながん細胞を認識したことに加え、約 1/3 の抗体がヒトがん細胞株の増殖を培養系で抑制し、3 種類の抗体が担がんマウスにおけるヒトがん細胞株の増殖を抑制した。また、ユーイング肉腫については 3 種の候補遺伝子を同定したが、1 種類は早期発見に役立つ可能性のある分泌蛋白質である。

(Table4)

本研究によって SST-REX 法で得られる SST クローン（ヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞膜上に発現しているマウス細胞）を利用することによって効率良くモノクローナル抗体を作製できることが確認され、さらには得られた抗体が抗腫瘍活性などの生理活性機能を有する事が確認された。

1) SST-REX スクリーニング

現在までに膵がん、胃がん、膀胱がん、大腸がん、腎がん、グリオーマ/グリオブラストーマ、前立腺がん、ユーイング肉腫の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。計 4,061 クローンの解析を行い、のべ 1,044 種類の膜蛋白質および分泌蛋白質に対する遺伝子を同定した。同定したがん細胞マーカー候補分子のうち 47 種類に対してモノクローナル抗体を作製した。作製した 47 種類の抗体のうち in vitro 実験において、ヒトがん細胞株

の増殖を抑制する抗体が 17 種類存在し、複数のがん種にまたがって機能を有するものを加えると、延べ 26 種類においてヒトがん細胞株の増殖抑制効果を認めた。

1. 各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) の実施

我々は、この 3 年間で膵臓がん、前立腺がん、グリオーマ、胃がん、膀胱がん、ユーイング肉腫、腎臓がん、大腸がんという 8 種類のがん種について、細胞株 28 種のシグナルシーケンストラップを行い、4,061 クローンを解析した。その結果、それぞれの細胞株に発現する膜蛋白質・分泌蛋白質として、合計 963 種類の同定を行った。Table1 にがん種ごとの内訳一覧表を示す。

Table1. 各がん種における SST-REX 法の解析クローンおよび同定遺伝子数

ガン種	細胞種	解析クローン数	遺伝子数
前立腺ガン	Du145, PC3, LNCap	518	145
膵臓ガン	AsPC1, BxPC3, Capan1	602	106
グリオーマ	T98G, U251, U87MG	442	99
胃ガン	MKN1, GCIY, KATOIII	532	114
膀胱ガン	T24, UM-UC-3, 5637	582	215
腎臓ガン	Caki1, KMRM-M1, KMRC2	620	130
大腸ガン	HCT116, DLD1, SW480, WiDr	508	154
ユーイング肉腫	SJES-2, 3, 5, 6, 7, 8	257	81
合計		4061	963

2. がんマーカーおよび分子標的の候補分子に対するモノクローナル抗体の作成

SST-REX 法で同定した上記のがん細胞由来膜蛋白質および分泌蛋白質のうち、データベースを参考にして、がん診断マーカーおよび治療の分子標的の候補分子 47 種を選別し、当該分子を発現す

白質および分泌蛋白質のうち、データベースを参考にして、がん診断マーカーおよび治療の分子標的の候補分子 47 種を選別し、当該分子を発現す

る SST クローンを免疫原としてモノクローナル抗体を作成した (Table2)

Table2 作製したモノクローナル抗体一覧

ガン種	抗体数	抗体作製遺伝子数
前立腺ガン	75	21
膵臓ガン	34	12
グリオーマ	14	7
胃ガン	17	7
合計	140	47

これらのモノクローナル抗体はいずれも種々のがん細胞を認識するが、17種遺伝子産物に対する抗体はヒトがん細胞株の増殖を *in vitro* 培養系で

抑制することが判明した。また、そのうち3種類の抗体は担がんマウスにおけるヒトがん細胞株の増殖も抑制した (Table3)。

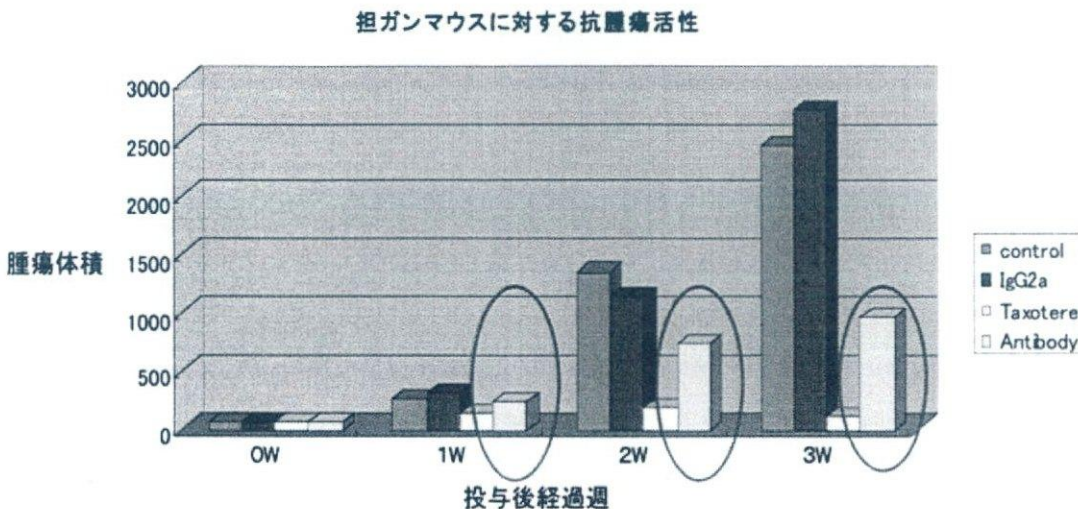
Table3 抗体の Characterization

ガン種	<i>in vitro</i> 増殖抑制活性	<i>in vivo</i> 抗腫瘍活性
前立腺ガン	4	1
膵臓ガン	5	0
グリオーマ	8	未検討
胃ガン	9	2

例えば、前立腺がんの SST クローンに対するモノクローナル抗体のうち、抗 EPHA2 抗体は前立腺が

ん細胞株の培養系および担がんマウス系における増殖を抑制した (図1)。

図1 担がんマウスにおける抗EphA2抗体の腫瘍細胞増殖抑制効果



また抗 EPHA2 抗体は胃癌、膀胱がん、グリオブラストーマ、膵がんなど複数のヒトがん細胞の培養系での増殖も抑制した (図2)。また、Table 3に

おいて担がんマウスの胃癌の増殖を抑制する抗体は抗 EPHA2 抗体と、抗 SPARC 抗体であった。

ユーイング肉腫については、257 クローン 81 種

類の遺伝子を単離した。内訳は膜蛋白が 58 種、分泌蛋白が 14 種、その他（機能不明も含む）が 9 種であった（Table 4）。ユーイング肉腫と PNET に特異的とされる t(11;22)(q24;q12)由来の融合蛋白質 EWS-FLI-1 によって発現が誘導される分泌蛋白質

IGFBP3 や IGFBP5 が同定されており、スクリーニングがうまくいっていることを示している。81 種の遺伝子のうち、ユーイング肉腫の診断あるいは治療に役立つ可能性がある 3 種の遺伝子を選別し抗体作成を開始した。

図2 抗EphA2抗体の腫瘍細胞増殖抑制効果 (in vitro)

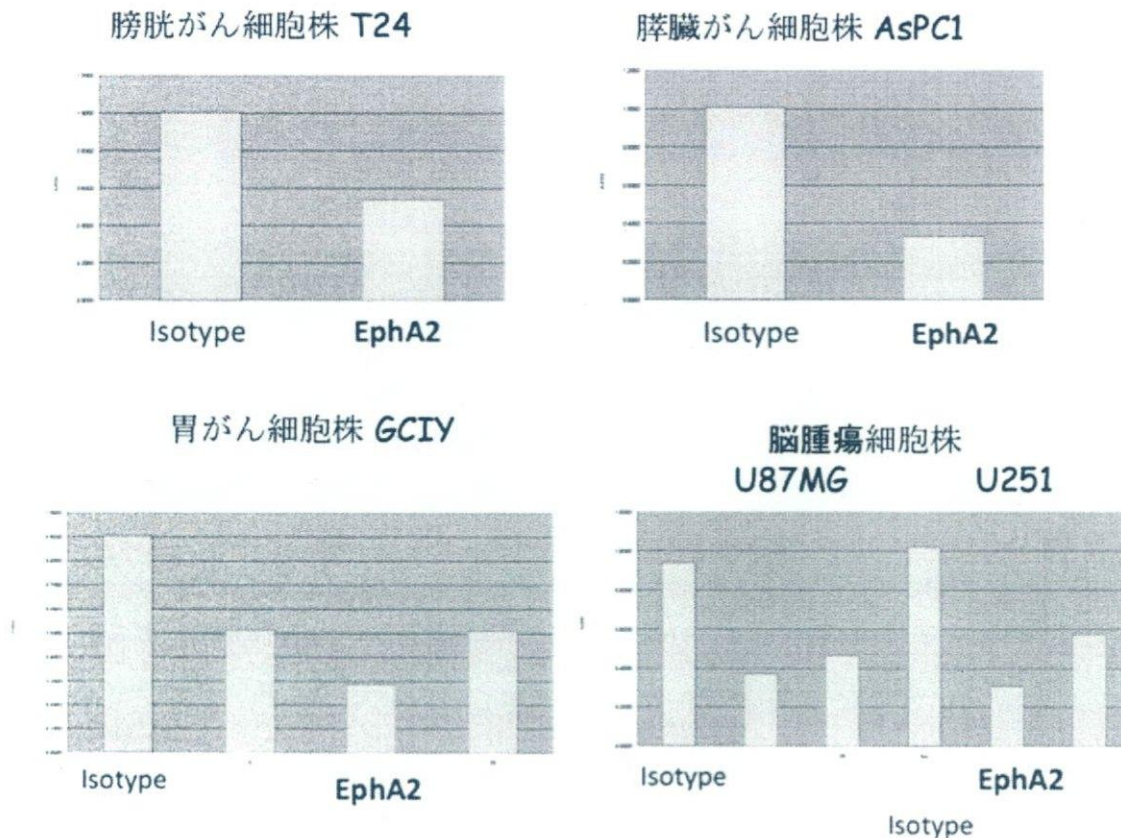


Table4 シグナルシーケンストラップ法によりユーイング肉腫細胞株から単離された遺伝子（左端の数字は得られた頻度）

22	NM_002087.	Homo sapiens granulin (GRN). mRNA
16	NM_201414.	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (peptidasenexin-II. Alzheimer disease) (APP). transcript variant3. mRNA
	NM_201413.	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (peptidasenexin-II. Alzheimer disease) (APP). transcript variant2. mRNA
	NM_000484.	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (peptidasenexin-II. Alzheimer disease) (APP). transcript variant1. mRNA
14	NM_000918.	Homo sapiens procollagen-proline. 2-oxoglutarate 4-dioxygenase(proline 4-hydroxylase). beta polypeptide (P4HB). mRNA
12	NM_173614.	Homo sapiens NODAL modulator 2 (NOMO2). transcript variant 2. mRNA
	NM_001004060.	Homo sapiens NODAL modulator 2 (NOMO2). transcript variant 1. mRNA
12	NM_014287	Homo sapiens NODAL modulator 1 (NOMO1). mRNA
11	NM_001004067.	Homo sapiens NODAL modulator 3 (NOMO3). mRNA

- 10 [NM_012201.](#) Homo sapiens golgi apparatus protein 1 (GLG1). mRNA
- 6 [NM_001018111.](#) Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL). transcript variant 1. mRNA
1. [NM_005397.](#) Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL). transcript variant 2. mRNA
- 6 [NM_013995.](#) Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2).transcript variant LAMP2B. mRNA
- [NM_002294.](#) Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2).transcript variant LAMP2A. mRNA
- 6 [NM_000598.](#) Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3).transcript variant 2. mRNA
- 6 [NM_198589.](#) Homo sapiens basigin (Ok blood group) (BSG). transcript variant 2.mRNA
- 6 [NM_004393.](#) Homo sapiens dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)(DAG1). mRNA
- 5 [NM_015393](#) Homo sapiens DKFZP564O0823 protein. mRNA
- 4 [NM_001962.](#) Homo sapiens ephrin-A5 (EFNA5). mRNA
- 4 [NM_003118.](#) Homo sapiens secreted protein. acidic. cysteine-rich (osteonectin)(SPARC). mRNA
- 4 [NM_001025160.](#) Homo sapiens CD97 molecule (CD97). transcript variant 3. mRNA
0. [NM_078481.](#) Homo sapiens CD97 molecule (CD97). transcript variant 1. mRNA
- 4 [NM_004343.](#) Homo sapiens calreticulin (CALR). mRNA
- 4 [NM_001552.](#) Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4).mRNA
- 3 [NM_006505.](#) Homo sapiens poliovirus receptor (PVR). mRNA
- 3 [NM_002998.](#) Homo sapiens syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1. cellsurface-associated. fibroglycan) (SDC2). mRNA
- 3 [NM_201575.](#) Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2).transcript variant 2. mRNA
- [NM_012410.](#) Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2).transcript variant 1. mRNA
- 3 [NM_025240.](#) Homo sapiens CD276 molecule (CD276). transcript variant 2. mRNA
- [NM_001024736.](#) Homo sapiens CD276 molecule (CD276). transcript variant 1. mRNA
- 3 [NM_181836.](#) Homo sapiens transmembrane emp24 protein transport domaincontaining 7 (TMED7). mRNA
- 3 [NM_002951.](#) Homo sapiens ribophorin II (RPN2). mRNA
- 3 [NM_000271.](#) Homo sapiens Niemann-Pick disease. type C1 (NPC1). mRNA
- 3 [NM_018475.](#) Homo sapiens transmembrane protein 165 (TMEM165). mRNA.
- 3 [NM_005514.](#) Homo sapiens mRNA for MHC class I antigen (HLA-B gene).
- 3 [NM_000758.](#) Homo sapiens colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)(CSF2). mRNA
- 2 [NM_002507.](#) Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFR superfamily. member16) (NGFR). mRNA
- 2 [NM_002950](#) Homo sapiens ribophorin I (RPN1). mRNA
- 2 [NM_207351](#) Homo sapiens proline-rich transmembrane protein 3 (PRRT3). mRNA
- 2 [NM_203339](#) Homo sapiens clusterin (CLU). transcript variant 2. mRNA
- 2 [NM_002778.](#) Homo sapiens prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy) (PSAP), mRNA
- 2 遺伝子 B
- 2 [NM_005561.](#) Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1). mRNA
- 2 [NM_001004128.](#) Homo sapiens quiescin Q6 (QSCN6). transcript variant 2. mRNA
8. [NM_002826](#) Homo sapiens quiescin Q6 (QSCN6). transcript variant 1. mRNA
- 2 [NM_017455.](#) Homo sapiens neuroplastin (NPTN). transcript variant alpha. mRNA
- 2 [NM_002901.](#) Homo sapiens reticulocalbin 1. EF-hand calcium binding domain(RCN1). mRNA
- 2 [NM_031935.](#) Homo sapiens hemicentin 1 (HMCN1). mRNA
- 2 [NM_004995.](#) Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)(MMP14). mRNA
- 2 [NM_001848](#) Homo sapiens collagen. type VI. alpha 1 (COL6A1). mRNA
- 2 [NM_000247.](#) Homo sapiens MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA).mRNA

2 NM_002332. Homo sapiens low density lipoprotein-related protein 1(alpha-2-macroglobulin receptor) (LRP1). mRNA

2 NM_052932. Homo sapiens transmembrane protein 123 (TMEM123). mRNA

2 NM_001855. Homo sapiens collagen. type XV. alpha 1 (COL15A1). mRNA

2 NM_005373 Homo sapiens myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL). mRNA

2 NM_002743. Homo sapiens protein kinase C substrate 80K-H (PRKCSH). transcriptvariant 1. mRNA

NM_00100132 Homo sapiens protein kinase C substrate 80K-H (PRKCSH). transcriptvariant 9. mRNA

2 NM_152920. Homo sapiens egf-like module containing. mucin-like. hormonereceptor-like 2 (EMR2). transcript variant 6. mRNA

NM_152916. Homo sapiens egf-like module containing. mucin-like. hormonereceptor-like 2 (EMR2). transcript variant 2. mRNA

NM_152919. Homo sapiens egf-like module containing. mucin-like. hormonereceptor-like 2 (EMR2). transcript variant 5. mRNA

2 NM_000089. Homo sapiens collagen. type I. alpha 2 (COL1A2). mRNA

2 NM_005567. Homo sapiens lectin. galactoside-binding. soluble. 3 bindingprotein (LGALS3BP). mRNA

1 NM_130440. Homo sapiens protein tyrosine phosphatase. receptor type. F(PTPRF). transcript variant 2. mRNA

1 NM_001901 Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF). mRNA

1 NM_004911 Homo sapiens protein disulfide isomerase family A. member 4(PDIA4). mRNA

1 NM_005545. Homo sapiens immunoglobulin superfamily containing leucine-richrepeat (ISLR). transcript variant 1. mRNA

1 NM_000088 Homo sapiens collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA

1 NM_002593. Homo sapiens procollagen C-endopeptidase enhancer(PCOLCE) . mRNA

1 NM_017860. Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 56 (C1orf56). mRNA

1 NM_003254. Homo sapiens TIMP metallopeptidase inhibitor 1 (TIMP1). mRNA

1 NM_000599. Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5).mRNA

1 NM_000094. Homo sapiens collagen. type VII. alpha 1 (epidermolysis bullosa.dystrophic. dominant and recessive) (COL7A1). mRNA

1 NM_024959. Homo sapiens solute carrier family 24 (sodium/potassium/calciumexchanger). member 6 (SLC24A6). mRNA

1 NM_004540. Homo sapiens neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2). mRNA

1 NM_000093. Homo sapiens collagen. type V. alpha 1 (COL5A1). mRNA

1 NM_020404. Homo sapiens CD248 molecule. endosialin (CD248). mRNA

1 NM_004107. Homo sapiens Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha(FCGRT), mRNA

1 NM_006184. Homo sapiens nucleobindin 1 (NUCB1). mRNA

1 NM_139072 Homo sapiens delta-notch-like EGF repeat-containing transmembrane(DNER). mRNA

1 NM_002338 Homo sapiens limbic system-associated membrane protein (LSAMP).mRNA

1 NM_002317. Homo sapiens lysyl oxidase (LOX). mRNA

1 遺伝子 C

1 AY738975. Homo sapiens isolate Tor36(ZE657) mitochondrion. complete genome

1 NM_005570. Homo sapiens lectin. mannose-binding. 1 (LMAN1). mRNA

1 NM_031462. Homo sapiens CD99 molecule-like 2 (CD99L2). transcript variant 1.mRNA

NM_134446 Homo sapiens CD99 molecule-like 2 (CD99L2). transcript variant 2.mRNA

1 NM_005711 Homo sapiens EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3(EDIL3). mRNA

1 NM_022464 Homo sapiens SIL1 homolog. endoplasmic reticulum chaperone (S.cerevisiae) (SIL1). transcript variant 2. mRNA

1 遺伝子 A

1 NM_032348. Homo sapiens matrix-remodelling associated 8 (MXRA8). mRNA

1 NM_000094. Homo sapiens collagen. type VII. alpha 1 (epidermolysis bullosa.dystrophic. dominant and recessive) (COL7A1). mRNA

1 NM_006404. Homo sapiens protein C receptor. endothelial (EPCR) (PROCR). mRNA

1 NM_00103228 Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor(lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (TFPI).transcript variant 2. mRNA

1 NM_001235 serpin peptidase inhibitor. clade H (heat shockprotein 47). member 1. (collagen binding protein 1)(SERPINH1)

2) SST クローン上の融合蛋白質発現量増加試み

抗体作成をより効率よく行うためおよび細胞チップへの応用に向けて、SST クローン上の癌抗原発現量を高める目的で、SST ベクターのマウス白血病ウイルス LTR の代わりに、EF1 α 、CAG、CMV、SR α など強力なプロモーターを使用して SST クローン上の MPL 融合蛋白質の発現を高めることを試みた。しかしながら、Ba/F3 細胞中において LTR より強い活性を有するプロモーターはなく、LTR によって最も高い発現が得られた。このことは一過性のトランスフェクションで行ったルシフェラーゼアッセイにおいても確認された。

3) 細胞チップの開発

上記の SST クローンを細胞チップにして、モノクローナル抗体のスクリーニングや、患者血清中に存在する癌抗原に対する抗体の検出に利用する目的のために、細胞チップ作成の基礎条件を検討し、細胞固定後、PBS/5% Sucrose、1%BSA で30分間、室温でブロッキングを行うと免疫染色を行う場合のシグナル/ノイズ比が高いことを明らかにした。この条件で SST クローンを細胞チップに固定し、モノクローナル抗体に対する反応性を調べたところ、セルソーターの結果と相関が認められた。さらに感度をあげるために、ルシフェリンを利用した化学発光を導入した結果、感度は大幅に改善し、S/N 比も高くなった。しかしながら現在使用している 96 ウェルプレートでは隣のウェルに発光が漏れ込むことも明らかになった。実用化にはさらなる工夫が必要である。

D. 考察

シグナルシーケンスの結果得られる SST クロ

ーンをマウスに直接免疫することによってモノクローナル抗体が簡便かつ網羅的に樹立できることが確認できた。がん細胞が発現する膜蛋白質、分泌蛋白質47種に対しモノクローナル抗体140種類取得したが、すべての抗体が細胞上に発現している自然な形の膜蛋白質を認識した。また、細胞に増殖抑制などの機能を有する機能抗体である確率が予想以上に高いことが判明した。47種の分子に対して抗体を作成し、in vitro でがん細胞の増殖を抑制する抗体が17種の分子に対する抗体で取得でき、そのうち2種の遺伝子 (EPHA2 と SPARC) は延べ3種の担がんマウス系でのがん細胞増殖を抑制した。また抗体作成は途上であるが、ユーイング肉腫の早期発見に利用できる分泌蛋白質を同定している。本研究計画を継続することによって、がんの早期診断や治療に利用できる抗体が複数樹立できることが期待できる。

SST クローン上の融合蛋白質の発現量を高めることができれば、モノクローナル抗体をさらに効率良く作製でき、また細胞チップへの応用も容易になると考えられたので、マウス白血病ウイルス LTR の代わりに EF1 α 、CMV、CAG、SR α など強力なプロモーターを使用したが発現している Ba/F3 細胞では、LTR が最も強い活性を有した。

SST クローンを利用した細胞チップの実用化にはさらなる工夫が必要であるが、抗体の評価のために代替手段も考案している。最近、患者がん組織のマイクロアレイを作成している富山大学の福岡先生と共同研究において、ある核内蛋白質に対する抗体で染色したところ、かなり良い結果を得ることができた。今後、本研究計画で樹立した癌マーカーに対するモノクローナル抗体についても同様の共同研究を行うことも予定している。

E. 結論

癌細胞株のシグナルシーケンストラップを施行し、癌細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質を963種同定した。がん由来分子を47種選別し、これらの分子に対するモノクローナル抗体を140種類作成した。これらの抗体のうち1/4程度が何らかのがん細胞のin vitroでの増殖を抑制し、さらに2種類がin vitroあるいはin vivoで癌細胞株の増殖を抑制した。この結果は本方法によって高い確立で機能抗体が得られることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara, A., Iwama, A., Yamazaki, S., Fruta, C., Hirasawa, R., Morita, Y., Osawa, M., Motohashi, T., Eto, K., Ema, H., Kitamura, T., Vestweber, D., and Nakauchi, H. (2006) Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks stem cells throughout development. *J. Exp. Med.* 202: 1483-1492.
2. Oki, T., Kitaura, J., Eto, K., Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Nagai, H., Yamanishi, Y., Kumagai, H. and Kitamura, T. (2006) Integrin α IIb β 3 induces the adhesion and activation of mast cells through interaction with fibrinogen. *J. Immunol.* 176:52-60.
3. Nakajima, H., Shibata, F., Fukuchi, Y., Goto-Koshino, Y., Ito, M., Urano, A., Nakahata, T., Aburatani, H., and Kitamura, T. (2006) Immune suppressor factor confers stromal cell line with enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340: 35-42.
4. Nakajima, H., Watanabe, N., Shibata, F., Kitamura, T., Ikeda, Y., and Handa, M. (2006) N-terminal region of CCAAT/ enhancer binding protein a is critical for cell cycle arrest, apoptosis and functional maturation during myeloid differentiation. *J. Biol. Chem.* 281:14494-14502.
5. Nakajima, H., Shibata, F., Kumagai, H., Shimoda, K., and Kitamura, T. (2006) Tyk2 is dispensable for induction of myeloproliferative disease by mutant FLT3. *Int. J. Hematol.* 84:54-59.
6. Fukuchi, Y., Shibata, F., Ito, M., Goto-Koshino, Y., Sotomaru, Y., Ito, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2006) Comprehensive analysis of myeloid lineage conversion using mice expressing an inducible form of C/EBP α . *EMBO J.* 25: 3398-3410.
7. Huang, H., Ryu, R., Chang, E-J., Kim, H.J., Kim, H-M., Kitamura, T., Lee, Z.H., and Kim, H-H. (2006) Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF- κ B transactivation by RANKL. *Cell Death and Differentiation* 13: 1879-1891.
8. Kawashima, T., Bao, Y.C., Nomura, Y., Moon, Y., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Hatori, T., Kiyono, M., Nosaka, T., Nakajima, H., Williams, D.A., and Kitamura, T. (2006) Rac1 and a GTPase activating protein MgcRacGAP are required for nuclear translocation of STAT transcription factors. *J. Cell Biol.* 175: 937-946.

9. Morikawa, Y., Hisaoka, T., Kitamura, T., and Senba, E. (2006) TROY, a novel member of tumor necrosis factor receptor superfamily in the central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1088: A1-A10.
10. Ozaki, K., Hishiya, A., Hatanaka, K., Nakajima, H., Wang, G., Hwu, P., Kitamura, T., Oza wa, K., Leonard, W.J., Nosaka, T. (2006) Over expression of Interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Hematol.* 84: 224-230.
11. 小埜良一、野阪哲哉. MLL 関連白血病の分子病態. *血液・腫瘍科* 52(6): 615-624, 2006.
12. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Oki, T., Shibata, F., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Hauchins, J.P., Tybulewicz, V.L.J., Takai, T., and Kitamura, T. (2007) Functional analysis of an activating receptor LMIR4 as a counterpart of an inhibitory receptor LMIR3. *J. Biol. Chem.* 25: 17997-18008.
13. Nakayama, M., Underhill, D.M., Peterson, T.W., Li, B., Kitamura, T., Takai, T., and Aderem, A. (2007) Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production. *J. Immunol.* 178:4250-4259.
14. Sekine, R., Kitamura, T., Tsuji, T., and Tojo, A. (2007) Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. *Immunol. Letters* 111:21-25.
15. Lu, Y., Kitaura, J., Oki, T., Komeno, Y., Ozaki, K., Kiyono, M., Kumagai, H., Nakajima, H., Aburatani, H. and Kitamura, T. (2007) Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. *Leukemia* 21:2246-2257.
16. Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007) Identification of TIM4 as a phosphatidylserine receptor for engulfment of apoptotic cells. *Nature* 450:435-440.
17. Morikawa, Y., Komori, T., Hisaoka, T., Ueno, H., Kitamura, T. and Senba, E. (2007) Expression of mKirre in the developing sensory pathways: its close apposition to nephrin-expressing cells. *Neuroscience* 150:880-886.
18. 中島秀明、北村俊雄 (2007) 造血幹細胞/造血器腫瘍と Wnt シグナル *血液腫瘍科* 54:224-230
19. 北村俊雄、渡辺直子 (2007) 発癌機構: 概論 造血器腫瘍—基礎臨床領域における最近の研究動向 *日本臨床* 65:17-22.
20. 北村俊雄 (2007) レトロウイルスベクターによる蛍光タンパク質導入の有効活用法 *バイオテクノロジージャーナル* 3-4:222-227
21. Sugano, Y., Takeuchi, M., Hirata, A., Atsushita, H.M., Kitamura, T., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2008) Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 111:1167-1172.
22. Watanabe-Okochi, N., Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and Kitamura, T. (2008) AML1 mutations induced MDS and

- MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111: 4297-4308.
23. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka, T., Oki, T., Lu, Y., Shibata, F., Yamazaki, S., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Tybulewicz, V.L.J., Takai, T., and Kitamura, T. (2008) Analysis of mouse LMIR5/CLM7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM7 between mouse and human. *Blood* 111:688-698.
 24. Kawashima, T., and Kitamura, T. (2008) Rac and Nuclear Translocation of STAT Transcription Factors. *Methods in Enzymology* 431:171-180.
 25. Sekine, R., Kitamura, T., Tsuji, T. and Tojo, A. (2008) Efficient retroviral transduction of human B-lymphoid and myeloid progenitors: mark inhibition of their growth by the Pax5 transgene. *Int. J. Hematol.* 87:351-362.
 26. Komori, T., Gyobu, H., Ueno, H., Kitamura, T., Senba, E. and Morikawa Y. (2008) Expression of kin of irregular chiasm-like 3/mKirre in proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia and its interaction with nephrin in muscle spindles. *J. Comp. Neurol.* 511:92-108.
 27. Ikeya, M., Nosaka, T., Fukushima K., Kawada, M., Furuta, Y., Kitamura, T., and Sasai, Y. (2008) Twisted gastrulation mutation suppresses skeletal defect phenotypes in Crossveinless 2 mutant mice. *Mech. Dev.* 125: 832-842.
 28. Hiwatari, M., Ono, R., Taki, T., Hishiya, A., Ishii, E., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2008) Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 22: 2279-2280.
 29. Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T., and Kolakofsky D. (2008) Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein: a possible role in promoting viral fitness. *J Virol* 82: 6130-6138.
 30. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2008) Robo4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. *Stem cells* 27:183-190.
 31. Fukuchi, Y., Ito, M., Shibata, F., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2008) Activation of C/EBPα or PU.1 in hematopoietic stem cells leads to their reduced self-renewal and proliferation. *Stem cells* 26:3172-3188.
 32. Nakajima, H., Tamura, T., Ito, M., Shibata, F., Kuroda, K., Fukuchi, Y., Watanabe, N., Kitamura, T., Ikeda, Y., and Handa M. (2008) SHD1 is a novel cytokine-inducible, negative feedback regulator of STAT5-dependent transcription. *Blood* 113:1027-1036.
 33. Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S.,

- Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009) Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science* 323:388-393.
34. Komeno, Y., Kitaura, J. and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models. *J Cell. Physiol.* in press.
35. Kitamura, T., Oki, T., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Nakajima, H., Tojo, A., Nosaka, T. and Kitaura, J. (2009) Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood Cells, Molecules and Diseases* in press.
36. Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Takahashi, N., Nosaka, T., Inoue, M., Sato, T., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Mol Cell Biol.* 29:1796-1813.
37. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int J. Hematology*, in press.
38. 北村俊雄, 等泰道 (2008) FLT3 阻害剤と JAK 阻害剤: 造血器腫瘍に対するチロシンキナーゼ阻害剤の有効性と開発状況 *医学のあゆみ* 224:103-107.
39. 米野由希子, 北村俊雄 (2008) 癌幹細胞と遺伝子異常—マウス骨髄移植モデルの有用性 *医学のあゆみ* 227:67-71.
40. 野阪哲哉 (2008) 造血器腫瘍マウスモデル. がん分子標的治療 6:101-109.
- ## 2. 学会発表
- 1) Minoshima, Y., Hori, T., Okada, M., Kimura, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Bao, Y. C., Kawashima, T., Kitamura, T., and Fukagawa, T. CENP-50, a centromere component, is required for recovery from spindle damage. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress Kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
- 2) Hori, T., Minoshima, Y., Okada, M., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Okawa, K., Kimura, H., Kitamura, T., and Fukagawa, T. Analysis of the CENP-50 complex that required for the proper kinetochore functions. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress, Kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
- 3) Kawashima, T., Tonozuka, Y., Minoshima, Y. and Kitamura, T. MgcRacGAP controls cell differentiation and cell division converting its target small GTPases through cell cycle. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress Kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
- 4) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝 智彦、林 泰秀、北村 俊雄、野阪 哲哉 MLL 融合蛋白による多段階発癌モデルマウス: MAP キナーゼの重要性 第65回日本癌学会学術総会 2006年9月28日~30日 横浜
- 5) Kitamura, T. Rac1 and MgcRacGAP are required for nuclear transport of the tyrosine phosphorylated form of STAT3 and STAT5. キー

ストンシンポジウム、プレナリートーク Steamboat Springs, Colorado, (2007年1月)

6) Kitamura, T. Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. 日米血液腫瘍セミナー、招待講演 (2007年3月)

7) 小埜良一、北村俊雄、野阪哲哉 MLL 融合蛋白による多段階発癌における Raf-MAP キナーゼ系活性化の重要性. 日本プロテインホスファターゼ研究会 第3回国内集会. (2007年3月)

8) 渡辺・大河内直子、北浦次郎、小埜良一、原田浩徳、原田結花、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北村俊雄 AML1 点変異はマウス BMT モデルにおいて MDS/AML を発症させる. 第5回幹細胞シンポジウム、口演 (2007年5月)

9) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉 Hoxa9 と Ras-MAP キナーゼ系の協調作用が MLL 融合蛋白による急性白血病の発症に重要である. 第66回日本癌学会学術総会、ポスター (2007年10月)

10) 北村俊雄、野阪哲哉 白血病および MDS の分子病態: マウス骨髄移植モデルおよび発現クローニング法を利用した解析. 第66回日本癌学会学術総会、シンポジウム (2007年10月)

11) 渡辺(大河内)直子、沖俊彦、小埜良一、原田浩徳、湯地晃一郎、東條有伸、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北浦次郎、北村俊雄 RasGRP4 と変異型 AML1 はマウス BMT モデルにおいて協調的に働き、T細胞性白血病を誘発する. 第69回日本血液学会総会、口演 (2007年10月)

12) 松下弘道、中島秀明、中村嘉彦、塚本秀雄、田中由美子、浅井さとみ、小埜良一、野阪哲哉、安藤潔、宮地勇人 活性誘導型 C/EBP α および C/EBP ϵ による MLL キメラ遺伝子を有する骨髄単球性白血病細胞の単球系分化. 第69回日本血液学会総会、口演 (2007年10月)

13) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉 MLL 融合蛋白は Ras-MAP キナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する. 第69回日本血液学会総会、口演 (2007年10月)

14) 川島敏行、北村俊雄 STAT3/5 の活性化メカニズムと分子標的療法 第69回日本血液学会総会、シン

ポジウム (2007年10月)

15) 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、沖俊彦、北村俊雄 活性型レセプターLMIR5 の機能解析: マウスおよびヒト LMIR5 の相違. 第4回麒麟塾、口演 (2008年7月)

16) Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz V.L, Takai T, and Kitamura T. Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. The 15th East Asia Joint Conference. (2008年7月)

17) Komeno Y, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Kato N, Oki T, Honjo T and Kitamura T. Overexpression of AID causes both T and B lymphoma in a mouse BMT model. ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Poster Session (2008年7月)

18) 北村俊雄 白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群発症の分子メカニズム. 第70回日本血液学会総会、シンポジウム (2008年10月)

19) 渡辺(大河内)直子、北浦次郎、原田浩徳、米野由希子、加藤菜穂子、小埜良一、野阪哲哉、中島秀明、北村俊雄 マウス骨髄移植モデルにおいて、Evi1 は MDS/AML を誘発する. 第70回日本血液学会総会、口演 (2008年10月)

20) 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺(大河内)直子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄 AML, MDS でみられた C/EBP α 変異体のマウス BMT model. 第70回日本血液学会総会、口演(2008年10月)

21) 米野由希子、北浦次郎、渡辺(大河内)直子、加藤菜穂子、沖俊彦、本庶佑、北村俊雄 BMT モデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第70回日本血液学会総会、口演 (2008年10月)

22) 川島敏行、土屋秋穂、北村俊雄 新しいメカニズムで JAK/STAT シグナルを抑制する阻害剤の同定. 第70回日本血液学会総会、口演 (2008年10月)

23) 中島秀明、越野裕子、柴田文、福地由美、Dean Li、北村俊雄 Robo4 の造血幹細胞における生理学的

機能. 第 70 回日本血液学会総会、ポスター (2008 年 10 月)

24) 和田妙子、菊池次郎、清水瑠美、北村俊雄、古川雄祐 ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による血球分化の制御と白血病における過剰発現. 第 70 回日本血液学会総会、ポスター (2008 年 10 月)

25) 米野由希子、加藤菜穂子、北村俊雄 BMT モデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会、口演 (2008 年 10 月)

26) 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 可溶性 LMIR5 は LPS による炎症反応を増強する. 第 38 回日本免疫学会総会、口演 (2008 年 12 月)

27) 榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 活性化レセプター LMIR7 の機能解析. 第 38 回日本免疫学会総会、口演 (2008 年 12 月)

28) 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、松岡孝幸、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 LMIR3 はマスト細胞において細胞内領域の ITIM を介した抑制化シグナルと ITAM を有する FcR γ との会合を介した活性化シグナルを伝達する. 第 38 回日本免疫学会総会、口演 (2008 年 12 月)

29) 杉内正弘、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 活性化レセプターの LMIR6 は末梢血の樹状細胞に高発現する. 第 38 回日本免疫学会総会、ポスター (2008 年 12 月)

30) 土屋秋穂、川島敏行、北村俊雄 インターロイキン 6(IL-6)阻害剤のスクリーニング法の開発と阻害剤の評価. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、ポスター (2008 年 12 月)

31) Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Oki T, Takai T and Kitamura T. Analysis of Mouse LMIR5/CLM-7 as An Activating Receptor: Differential Regulation of LMIR5/CLM-7 in Mouse Versus Human Cells. 50th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (2008 年 12 月)

32) 北村俊雄 Lessons from mouse BMT models for leukemia, MDS and MPD. 日米血液腫瘍ワークショップ、招待口演 (2009 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

シグナルシーケンストラップ法

特許第 3 4 9 9 5 2 8 号

中外製薬株式会社、北村俊雄

発明者：北村俊雄、小嶋哲郎

パッケージング細胞

特許第 3 9 0 4 4 5 1 号

北村俊雄、中外製薬株式会社

発明者：北村俊雄、森田純代

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

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
川島 敏行	Rac1 and a GTPase activating protein MgcRacGAP are required for nuclear translocation of STAT transcription factors.	J. Cell Biol.	175	937-946	2006
呂 洋	Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD.	Leukemia	21	2246-2257	2007
渡辺 (大河内) 直子	AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model.	Blood	111	4297-4308	2008
山西 吉典	Analysis of mouse LMIR5/CLM7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM7 between mouse and human.	Blood	111	688-698	2008
川島 敏行	A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors.	Mol Cell Biol.	29	1796-1813	2009

Rac1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors

Toshiyuki Kawashima,¹ Ying Chun Bao,¹ Yasushi Nomura,¹ Yuseok Moon,^{1,4} Yukio Tonozuka,¹ Yukinori Minoshima,¹ Tomonori Hatori,¹ Akiho Tsuchiya,¹ Mari Kiyono,² Tetsuya Nosaka,² Hideaki Nakajima,³ David A. Williams,⁵ and Toshio Kitamura¹

¹Division of Cellular Therapy, ²Division of Hematopoietic Factors, and ³Center of Excellence, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

⁴Department of Microbiology and Immunology, Medical Research Institute, Pusan National University Medical School, Busan 602-739, Korea

⁵Division of Experimental Hematology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229

STAT transcription factors are tyrosine phosphorylated upon cytokine stimulation and enter the nucleus to activate target genes. We show that Rac1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, bind directly to p-STAT5A and are required to promote its nuclear translocation. Using permeabilized cells, we find that nuclear translocation of purified p-STAT5A is dependent on

the addition of GTP-bound Rac1, MgcRacGAP, importin α , and importin β . p-STAT3 also enters the nucleus via this transport machinery, and mutant STATs lacking the MgcRacGAP binding site do not enter the nucleus even after phosphorylation. We conclude that GTP-bound Rac1 and MgcRacGAP function as a nuclear transport chaperone for activated STATs.

Introduction

The signal transducer and activator of transcription (STAT) family consists of seven members (STAT1–4, -5A, -5B, and -6). STATs are phosphorylated by cytokine stimulation, form homo- or heterodimers, and enter the nucleus, where they regulate expression of their target genes (Darnell, 1996; Ihle, 1996). Although STATs have a variety of functions under physiological conditions, the pathological importance of STAT functions has also been reported in many studies. STAT3 and -5 were activated in a broad spectrum of human hematological malignancies as well as in solid tumors (Darnell, 2002). A constitutively active form of STAT5 and -3 transformed IL-3-dependent Ba/F3 cells and fibroblasts, respectively (Onishi et al., 1998; Bromberg et al., 1999; Nosaka et al., 1999). An internal tandem duplication (ITD) mutant of receptor tyrosine kinase Flt3 (ITD-Flt3), a causative mutation of acute myeloid leukemia (Yokota et al., 1997; Hayakawa et al., 2000), induced phosphorylation of STAT5 on its tyrosine residues, thereby playing critical roles in

cell transformation (Mizuki et al., 2000; Zhang et al., 2000; Murata et al., 2003).

The mechanisms by which STATs are phosphorylated by cytokines and the activated STATs regulate the expression of the target genes have been well characterized. How activated STATs are transported to the nucleus has also been investigated; activated STAT1 and -3 were reported to bind importin $\alpha 5$ and several importin α s, respectively, which mediated the nuclear transport of STATs (Sekimoto et al., 1997; McBride et al., 2002; Liu et al., 2005; Ushijima et al., 2005; Ma and Cao, 2006). However, molecules other than importins could also participate in the regulation of the nuclear translocation of STATs.

We have recently described the interactions among STAT3, Rac1, and a Rac/Cdc42 GTPase-activating protein (GAP), MgcRacGAP (male germ cell Rac-GAP), and have shown that MgcRacGAP is required for transcriptional activation of STAT3 (Tonozuka et al., 2004). However, the mechanisms by which Rac and MgcRacGAP regulate transcriptional activation of STAT3 remained unclear. In the present work, we investigated the molecular mechanisms of nuclear transport of a tyrosine-phosphorylated form of STAT5A, a close relative of STAT3, and found that GTP-bound Rac1 and MgcRacGAP were required for transport of activated STATs to the nucleus, indicating a novel function of Rac1 GTPase.

Correspondence to Toshio Kitamura: kitamura@ims.u-tokyo.ac.jp

Abbreviations used in this paper: DBD, DNA binding domain; EMSA, electrophoretic mobility shift analysis; GAP, GTPase-activating protein; ITD, internal tandem duplication; MBP, maltose binding protein; MgcRacGAP, male germ cell Rac-GAP; STAT, signal transducer and activator of transcription; TB, transport buffer.

The online version of this article contains supplemental material.

Results

STAT5A, Rac, and MgcRacGAP form a complex in hematopoietic cells

To test whether Rac1 and MgcRacGAP bind STAT5A, as was the case for STAT3 (Tonozuka et al., 2004), we did coimmunoprecipitation. STAT5A and MgcRacGAP were coimmunoprecipitated with Rac1 (Fig. 1 A) and Rac2 in Ba/F3 cells (unpublished data). In addition, STAT5A was coimmunoprecipitated with MgcRacGAP in Ba/F3 cells and in several other human and mouse cell lines, as well as in human primary T cells (unpublished data). These data show that Rac, STAT5A, and MgcRacGAP form a complex *in vivo*.

Augmentation of MgcRacGAP association with STAT5A by IL-3 stimulation

A considerable amount of STAT5A protein was coimmunoprecipitated with MgcRacGAP in IL-3-starved Ba/F3 cells, and this association was enhanced by IL-3 stimulation (Fig. 1 B, left). Vice versa, a small amount of MgcRacGAP protein was coimmunoprecipitated with STAT5A in the starved cells, and this association was enhanced by IL-3 (Fig. 1 B, middle). In Ba/F3 cells expressing a constitutively active form of STAT5A (CA-STAT5A), which is more stable in the phosphorylated form than the wild-type STAT5A (Onishi et al., 1998), a considerable amount of STAT5A protein bound MgcRacGAP, even in unstimulated cells. This binding was also enhanced by IL-3 (Fig. 1 C). Thus, the association between MgcRacGAP and STAT5A does not require phosphorylation of STAT5A, but is enhanced by phosphorylation.

To map the interacting domains between MgcRacGAP and STAT5A, we prepared a series of truncated mutants of MgcRacGAP and STAT5A fused with maltose binding protein (MBP; Fig. S1, a, b, d, and e, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200604073/DC1>). It was found that STAT5A and Rac1 interacted with the Cys-rich and GAP domains of MgcRacGAP, whereas MgcRacGAP interacted with the DNA-binding domain (DBD) of STAT5A (Fig. S1, c and f). The binding domains between STAT5A and MgcRacGAP were similar to those between STAT3 and MgcRacGAP (Tonozuka et al., 2004).

Simultaneous translocation of STAT5A and MgcRacGAP to the nucleus upon IL-3 stimulation

We next investigated the stoichiometry of STAT5A/MgcRacGAP binding in the cytoplasm or nucleus. IL-3-starved Ba/F3 cells were stimulated with IL-3 for 0, 15, or 90 min, and the cell lysates were fractionated. The cytosol and nuclear fractions were then immunodepleted with the anti-MgcRacGAP or anti-STAT5A antibody. The amounts of total STAT5A and tyrosine-phosphorylated STAT5A (p-STAT5A) in the nuclear fraction increased 15 min after IL-3 stimulation and decreased 90 min after IL-3 stimulation (Fig. 2 A, a–d, lanes for the control antibody). Notably, most of p-STAT5A in the cytosolic fractions was immunodepleted with the anti-MgcRacGAP antibody as well as with the anti-STAT5A antibody (Fig. 2 A, c). On the other hand, a considerable part of p-STAT5A was left in the nuclear extracts of IL-3-stimulated cells after the immunodepletion with the anti-MgcRacGAP antibody

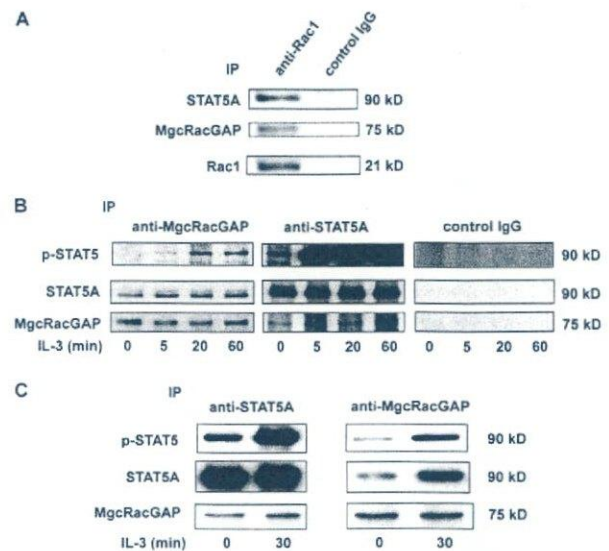


Figure 1. MgcRacGAP, Rac1, and STAT5 formed a protein complex in IL-3-dependent Ba/F3 cells. (A) STAT5A and MgcRacGAP were coprecipitated with Rac1. The cell lysates of IL-3-dependent Ba/F3 cells were subjected to immunoprecipitation with an anti-Rac1 or control antibody, followed by the immunoblotting with the anti-MgcRacGAP, anti-STAT5A, or anti-Rac1 antibody. (B) IL-3 enhanced association between STAT5A and MgcRacGAP. Ba/F3 cells were incubated in the presence or absence of 5 ng/ml IL-3 for the times indicated, and the cell lysates were subjected to immunoprecipitation with the anti-MgcRacGAP, anti-STAT5A, or control antibody, followed by the immunoblotting with the anti-p-STAT5 (top), anti-STAT5A (middle), or anti-MgcRacGAP antibody (bottom). Each row of images of the immunoprecipitation using the anti-MgcRacGAP and anti-STAT5A antibodies is derived from the same exposure of one gel, and each using the control antibody is derived from a similar exposure of the different gel. (C) The association of STAT5A and MgcRacGAP was enhanced in Ba/F3 cells expressing CA-STAT5A. Ba/F3 cells expressing CA-STAT5A were incubated in the presence or absence of 5 ng/ml IL-3 for 30 min, and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with the anti-STAT5A (left) or anti-MgcRacGAP antibody (right), followed by the immunoblotting with the anti-p-STAT5 (top), anti-STAT5A (middle), or anti-MgcRacGAP antibody (bottom). Each row of images is derived from the same exposure of one gel.

(Fig. 2 A, a). These results suggested that most of p-STAT5A was bound by MgcRacGAP in the cytoplasm of IL-3-stimulated cells and was released from MgcRacGAP in the nucleus.

The amount of cytoplasmic STAT5A immunoprecipitated with the anti-MgcRacGAP antibody gradually increased after IL-3 stimulation (Fig. 2 A, h), and concomitantly the amount of cytoplasmic STAT5A immunodepleted with the anti-MgcRacGAP antibody gradually decreased (Fig. 2 A, d), implicating that MgcRacGAP maintained interaction with STAT5A in the cytoplasm of IL-3-stimulated cells even after the dephosphorylation of STAT5A. The fractionation was confirmed by Western blotting with the anti-HDAC (for nuclear fraction) or RhoA (for cytosol fraction) antibody (unpublished data).

Next, we visualized STAT5A and MgcRacGAP by immunostaining using adherent 293T cells. To enhance phosphorylation and nuclear translocation of STAT5, we used a constitutively active tyrosine kinase receptor, ITD-Flt3 (Yokota et al., 1997). In the absence of ITD-Flt3, ectopically expressed STAT5A-Flag localized to the cytoplasm and colocalized in part with the endogenous MgcRacGAP. Expression of ITD-Flt3 led to translocation