

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北林 一生

平成21(2009)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新しいがん治療法の開発に関する研究	8
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	11
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	13
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	15
江成 政人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	20

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

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

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 急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病において、これらの融合遺伝子産物が転写因子 PU.1 と結合することにより M-CSF 受容体の発現を誘導し、M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であることから、これらの白血病では M-CSF 受容体を治療の分子標的となることを見出した。腫瘍の足場非依存性に関わる CDCP1 蛋白質が細胞運動能や MMP 分泌にも関わることを示し、更に転移・浸潤部位に発現する、新規のチロシンリン酸化蛋白質 Ossa が酸化ストレス抵抗性など腫瘍に密接する生物学的機能に関わることを明らかにした。がん抑制タンパク質 p53 の新規標的遺伝子として BLNK 遺伝子と Mielap 遺伝子を同定し、BLNK は細胞質分裂を抑制してカスパーゼ依存性細胞死を誘導し、Mielap はミトコンドリアのオートファジーを誘導して強力な腫瘍増殖抑制活性を有することを明らかにした。テロメラーゼ触媒コンポーネントの TERT が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) 活性を有することを見出し、RdRP 活性を検出するアッセイ系を確立して阻害物質のスクリーニングを行い2種類の RdRP 活性阻害化合物を同定し、これらは細胞分裂を阻害し細胞死を誘導することを確認した。癌治療の標的として、p53 を阻害する E3 ユビキチンリガーゼの p53 結合部位を同定し、ELISA 法を用いて p53 との結合量を定量する系を確立した。

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

難治性白血病の発症の分子メカニズムについて、特に治療抵抗性や再発の原因となることが予想される白血病細胞を同定してその制御機構を明らかにし、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

チロシンキナーゼの基質蛋白質群にスポットを当てて、そのそれぞれの腫瘍における役割を明らかにすることで、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、転移・浸潤などの新しい選択的な標的治療につなげる。

進行がん根治療法開発の目的で、がん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い、最も効果的な細胞死誘導法を開発する。

本研究では、テロメラーゼの新規酵素活性であるに

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ注目することで、これまでの臨床応用への問題点であった「効果の遅延性」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。

p53 の負の制御因子であるユビキチンリガーゼは野生型 p53 を持つヒト癌で過剰発現している場合が多く、野生型 p53 を持つ癌細胞に対する新規抗癌剤開発の分子標的となることが考えられる。そこで、p53 と上記ユビキチンリガーゼの相互作用をモニターできる簡便な方法を確立、そして、その結合を阻害する低分子化合物を探索し、p53 経路を標的とした新たな抗癌剤の開発を目指す。

B. 研究方法

白血病幹細胞を同定するため白血病マウスモデルからセルソーターを用いて細胞集団を分画して再移植することにより白血病誘導活性を調べた。分子機構を解析するため、免疫沈降実験により MLL/MOZ と M-CSFR の制御に関わる転写因子との結合を調べ、レポーター遺伝子を用いて転写における効果を検討した。PU.1 欠損細胞、PU.1 遺伝子改変マウス、M-CSFR 遺伝子改変マウスを用いて、転写制御および白血病発症におけるこれらの重要性を確認した。

肺がん細胞の足場非依存性増殖に関わる新規分子 CDCP1 や、スキルス胃がんの腹膜播種部位でリン酸化されている機能不詳の蛋白質 Ossa の腫瘍における機

能の解析を進めるとともに、マウスモデルを用いてこれらの分子の *in vivo* での腫瘍の増殖・転移・浸潤に与える影響を調べた。

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た。*in vivo* における抗腫瘍効果の評価を行って行く。これらの経路を活性化する分子・化合物の開発を試みた。

精製組み換え hTERT タンパク質を用いて RdRP 活性の試験管内再構成アッセイ系を確立した。天然化合物ライブラリーあるいは既知の抗がん剤ライブラリーの中から、阻害物質のスクリーニングを *in vitro* RdRP アッセイ系を用いて行った。同定した化合物に関しては、培養細胞（がん細胞樹立株）を用いて、がん細胞に及ぼす影響を観察した。

p53 結合部位を含むユビキチンリガーゼと p53 との結合は ELISA 法を用いて定量した。また、癌細胞における E3 ユビキチンリガーゼの発現解析には、79 種類のヒト肺癌由来の細胞株および 30 種類の肺癌患者由来の癌組織における E3 ユビキチンリガーゼの発現についてリアルタイム PCR 法を用いて定量した。

C. 研究結果

MLL-AF10 及び MOZ-TIF2 を導入した白血病マウスモデルからセルソーターを用いて細胞集団を分画して再移植することにより白血病誘導活性を調べ、M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であることを見出した。免疫沈降実験およびレポーターアッセイにより MLL および MOZ 融合遺伝子産物が転写因子 PU.1 と結合して M-CSFR プロモーターを強く活性化し、PU.1 及び M-CSFR 遺伝子改変マウスでは MLL-AF10 及び MOZ-TIF2 による白血病発症がみられないことを示した。M-CSFR を発現する細胞にアポトーシスを誘導すると白血病細胞が消失した。

CDCP1 は Src の活性化に応じて足場非依存性・細胞運動能・MMP 分泌を含めた複数の悪性形質を固形腫瘍に付与することにより、腫瘍の転移・浸潤に関わっていることが示された。肺がん、膵がんなどの系で、CDCP1 高発現群は低発現群と比較して、有意に予後が不良であることが統計学的に明らかになった。Ossa はシグナル伝達分子と RNA 結合分子としての両面から腫瘍の進展に関わり、特に腫

瘍が酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得する際に重要なシグナルを伝える分子であることが示された。実際、スキルス胃がん細胞の Ossa の発現を RNAi により抑制するとそのマウスモデルでの腸間膜浸潤が抑えられた。

新規 p53 標的遺伝子として BLNK 遺伝子と Mieap 遺伝子を同定した。様々な癌細胞株へ BLNK 遺伝子を導入し、一過性の過剰発現したところ、すべての細胞株で強力な細胞質分裂抑制を認め、その後カスパーゼ依存性の細胞死を認めた。BLNK の発現抑制は、DNA 損傷後の細胞質分裂の促進を招き、染色体異常性の発生を認めた Mieap 蛋白質が新規オートファジー関連蛋白質であることを見出した。Mieap によるオートファジーの標的器官はミトコンドリアであった。細胞内における一過性の過剰発現で、カスパーゼ依存性の細胞死が誘導された。Mieap 遺伝子のがん細胞への導入で、ヌードマウス皮下移植腫瘍の顕著な腫瘍増殖抑制を認めた。

約 140 種類の化合物について *in vitro* RdRP アッセイ系を用いて行ったスクリーニングで活性阻害作用のある 2 種類の化合物を同定した。これらの化合物は試験管内で量依存的な阻害作用を示すことから、RdRP を標的とした阻害剤としての可能性が期待される。培養細胞（HeLa 細胞、THP-1 細胞）を用いた実験では、これら 2 種類の化合物は細胞分裂を阻害し約 72 時間後にはがん細胞は死滅した。化合物処理後の 72 時間ではテロメア長の変化はなかった。これらのことから、TERT のテロメア維持機構とは独立した機能阻害による細胞死であることが確認された。

p53 と E3 ユビキチンリガーゼの相互作用を阻害する低分子化合物を探索するために、まず様々な E3 ユビキチンリガーゼの欠失変異体を作製し、どの領域が p53 結合部位か同定した。その結果、E3 ユビキチンリガーゼ活性に必要な Ring ドメインや HECT ドメインの領域には結合せず、既知の構造モチーフを持たない領域に結合することがわかった。そしてさらに、同定した p53 結合部位を含む E3 ユビキチンリガーゼと p53 との結合量をモニターできる実験系を確立した。一方、肺癌細胞におけるこれらユビキチンリガーゼの発現を解析するために、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、様々な肺癌細胞および肺癌患者由来の癌組織で様々な E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇が認められた。

D. 考察

予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病において、これらの融合遺伝子産物が PU.1 との結合を介して M-CSFR の発現を誘導することを見出し、PU.1 及び M-CSFR 遺伝子改変マウスでは MLL-AF10 及び MOZ-TIF2 による白血病発症がみられないことから、この経路が白血病発症に必須であることを示した。M-CSFR のチロシンキナーゼ活性の阻害剤は白血病発症を顕著に阻害した。また、M-CSFR を発現する細胞にアポトーシスを誘導することにより、白血病発症が阻害された。これらの結果から、この経路が治療の標的であり、M-CSFR 阻害剤や M-CSFR に対する抗体が有効であることが示唆された。

CDCP1 は膜透過ドメインを持つ膜蛋白質であり、その多量体化が活性に関わると考えられているため、CDCP1 の細胞外ドメインに結合して多量体化を抑える分子を現在スクリーニング中である。このような細胞外から CDCP1 シグナルを抑制する分子により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られる。また腫瘍に酸化ストレスに対する抵抗性をもたらしめている Ossa は、Src の恒常的活性化にも関わるためその意味でも分子標的として有望であり、腫瘍のストレス抵抗性のもたらす異常増殖・転移・浸潤、更には治療抵抗性などの悪性形質を正常化させる、全く新しい薬剤の開発につながる可能性がある。

多くの細胞質分裂促進因子が、ヒトがんで高頻度に過剰に活性化している事実が報告されており、それらに対する機能阻害の化合物が新規抗がん剤として治験が進められている。BLNK は世界で初めての細胞質分裂抑制因子であり、今後の詳細なメカニズムの解析により、細胞質分裂を標的とした、全く新しいがん治療法の開発が期待できる。オートファジー関連分子によるがん抑制機能が報告されてきているが、そのメカニズムは未だ不明である。Mieap による腫瘍抑制機序の解析によって、オートファジーによるがん抑制機序の解明と、がんミトコンドリアを標的とした全く新しいがん治療法の開発が期待される。

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選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。TERT は逆転写酵素活性とは別に、新規酵素活性である RdRP 活性を保証していることを見出した。本研究において、テロメラーゼの新規機能である RdRP 活性を検出す

るための、*in vitro* RdRP アッセイ系を独自に確立し 2 種類の化合物が RdRP 阻害作用を有することを見出した。がん細胞株を用いた実験でこれらの化合物を添加後、約 72 時間という比較的早い段階で細胞死が誘導されたことから、テロメラーゼ短縮に伴う細胞死ではなく、新規酵素活性阻害に伴う細胞死の可能性が強く示唆された。

本研究において、p53 を負に調節する E3 ユビキチンリガーゼと p53 との結合領域を決定し、その結合を簡便にモニターすることのできる実験系を確立した。この結果は、p53-ユビキチンリガーゼ結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行うための重要なアッセイ系を提供すると共に、構造解析を行う際にも重要な情報となると考えられる。今後、数多くの低分子化合物による阻害実験を行い、阻害活性を持つ低分子化合物に抗腫瘍活性があるかどうか検討しなければならないだろう。一方、肺癌細胞における E3 ユビキチンリガーゼの発現解析より、多くの肺癌細胞において種々のユビキチンリガーゼの発現増強が認められることから、臨床応用可能な抗癌剤となり得るのではないかと考えられる。

E. 結論

急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病 M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であり、M-CSF 受容体の阻害剤や抗体医薬による治療が期待される。

これまでのがん特異的シグナルの解析によって、CDCP1 や Ossa のような特定のチロシンリン酸化蛋白質が伝えるシグナルが転移・浸潤などの特性に深く関わり、次世代の分子標的治療の絶好のターゲットとなりうることを示した。

がん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、現存するがん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。

TERT は逆転写酵素活性とは別に RdRP 活性を有することを見出し、RdRP 活性阻害作用を有する 2 種類の化合物を見出した。これらの化合物は、がん細胞死を早期に誘導することから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の可能性が期待された。

p53 を負に調節する E3 ユビキチンリガーゼと p53 と

の結合領域を決定し、その結合を簡便にモニターすることのできるアッセイ系を確立した。また、多くの肺癌細胞で p53 を負に制御する E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Marshall LJ, Moore AC, Ohki M, Kitabayashi I, Patterson D, Ornelles DA. RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis. *J Virol.*, 82,6395-408, 2008

Katsumoto T, Yoshida N and Kitabayashi I, Roles of the histone acetyltransferase MOZ in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.*, 99:1523-7, 2008.

Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase Inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.*, 283:24420-5, 2008

Shima Y, Shima T, Chiba T, Irimura T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML activates transcription by protecting HIPK2 and p300 from SCF/Fbx3-mediated degradation. *Mol Cell Biol.*, 28, 7126-7138, 2008.

Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y,

Kitabayashi I. MOZ interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem.* 284, 237-244, 2009.

Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, Kitabayashi I, Kudo A. Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyltransferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Dev Biol.*, in press 2009

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.* 6: 654-662, 2008

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.* 172: 1729-1739, 2008

Nakamoto T, Seo S, Sakai R, Kato T, Kutsuna H, Kurokawa M, Noda M, Miyasaka N, Kitagawa S. Expression and tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) protein in human neutrophils. *J Cell Biochem.* 105 : 121-128, 2008

Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K. & Sakai, R. A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 29 :402-413, 2009

Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A. & Sakai, R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28: 662-673, 2009

Ikeda, J., Oda, T., Inoue, M., Uekita, T., Sakai, R., Okumura, M., Aozasa, K. & Morii, E. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci.* 100: 429-433, 2009

Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. & Inoue, S. Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer

cells. *Cancer Res.* 2009 in press

Futami, H. & Sakai, R. RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-nu neuroblastoma cell line. *Cancer Sci.* 2009 in press

Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K and Arakawa H. B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis. *Cancer Sci*, 99: 2444-2454, 2008

Possemato R, Timmons JC, Bauerlein EL, Wada N, Baldwin A, Masutomi K, Hahn WC
Effects of Inhibition of POT1 on Telomere Length and Senescence in Diploid Human Cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6:1582-1593

Imamura S, Uchiyama J, Koshimizu E, Hanai J, Raftopoulou C, Murphey RD, Bayliss PE, Imai Y, Burns CE, Masutomi K, Gagos S, Zon LI, Roberts TM, Kishi S A Non-Canonical Function of Zebrafish Telomerase Reverse Transcriptase is Required for The Differentiation and Survival of Embryonic Hematopoietic Cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e3364

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

Kazuji Ohmori, Yoshie Endo, Yusuke Yoshida, Hirokazu Ohata, Kazuo Yamamoto, Yoichi Taya and Masato Enari*: Monomeric but not Trimeric Clathrin Heavy Chain Regulates p53-Mediated Transcription. *Oncogene*, 27, 2215-2227, 2008. *Corresponding author

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: 2008 年 12 月 12 日

出願番号: PCT/JP2008/072609

出願人: 国立がんセンター総長

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

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 急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病において、これらの融合遺伝子産物が転写因子 PU.1 と結合することにより M-CSF 受容体の発現を誘導し、M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であることから、これらの白血病では M-CSF 受容体を治療の分子標的となることを見出した。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。

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、難治性白血病の発症の分子メカニズムについて、特に治療抵抗性や再発の原因となることが予想される白血病細胞を同定してその制御機構を明らかにし、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 および MLL-AF10 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。白血病幹細胞を同定するため白血病マウスモデルからセルソーターを用いて細胞集団を

分画して再移植することにより白血病誘導活性を調べた。分子機構を解析するため、免疫沈降実験により MLL/MOZ と M-CSFR の制御に関わる転写因子との結合を調べ、レポーター遺伝子を用いて転写における効果を検討した。PU.1 欠損細胞、PU.1 遺伝子改変マウス、M-CSFR 遺伝子改変マウスを用いて、転写制御および白血病発症におけるこれらの重要性を確認した。

C. 研究結果

MLL-AF10 および MOZ-TIF2 を導入した白血病マウスモデルからセルソーターを用いて細胞集団を分画して再移植することにより白血病誘導活性を調べ、M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であることを見出した。免疫沈降実験およびレポーターアッセイにより MLL および MOZ 融合遺伝子産物が転写因子 PU.1 と結合して M-CSFR プロモーターを強く活性化し、PU.1 及び M-CSFR 遺伝子改変マウスでは MLL-AF10 及び MOZ-TIF2 による白血病発症がみられないことを示した。M-CSFR を発現する細胞にアポトーシスを誘導すると白血病細胞が消失した。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 および MLL-AF10 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 PCT 特許出願した。

D. 考察

予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝

子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病において、これらの融合遺伝子産物が PU.1 との結合を介して M-CSFR の発現を誘導することを見出し、PU.1 及び M-CSFR 遺伝子改変マウスでは MLL-AF10 及び MOZ-TIF2 による白血病発症がみられないことから、この経路が白血病発症に必須であることを示した。M-CSFR のチロシンキナーゼ活性の阻害剤は白血病発症を顕著に阻害した。また、M-CSFR を発現する細胞にアポトーシスを誘導することにより、白血病発症が阻害された。これらの結果から、この経路が治療の標的であり、M-CSFR 阻害剤や M-CSFR に対する抗体が有効であることが示唆された。今後、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

急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病 M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であり、M-CSF 受容体の阻害剤や抗体医薬による治療が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Marshall LJ, Moore AC, Ohki M, Kitabayashi I, Patterson D, Ornelles DA. RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis. *J Virol.*, 82, 6395-408, 2008

Katsumoto T, Yoshida N and Kitabayashi I, Roles of the histone acetyltransferase MOZ in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.*, 99:1523-7, 2008.

Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase Inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.*, 283:24420-5, 2008

Shima Y, Shima T, Chiba T, Irimura T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML activates transcription by protecting HIPK2 and p300 from SCF/Fbx3-mediated degradation. *Mol Cell Biol.*, 28, 7126-7138, 2008.

Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. MOZ interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem.* 284, 237-244, 2009.

Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, Kitabayashi I, Kudo A. Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyl transferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Dev Biol.*, in press 2009

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: 2008 年 12 月 12 日

出願番号: PCT/JP2008/072609

出願人: 国立がんセンター総長

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

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 様々なシグナル伝達分子群の中でチロシンキナーゼである Src ファミリーの分子とその基質群は、腫瘍の悪性化に関わる形質変化に深く関わっていることがこれまでの解析により示されている。本研究では腫瘍の進展に伴う Src ファミリーの活性や基質特異性の変化を解析することにより、腫瘍の悪性化、特に転移・浸潤における Src ファミリーと、その下流でシグナルを伝える分子群の役割を明らかにすることで腫瘍の進展のメカニズムの本質的な理解を目指すとともに、Src のシグナル経路を標的とした治療への発展につながる基盤を作成する。今年度は腫瘍の足場非依存性に関わる Src ファミリーの基質である CDCP1 蛋白質が細胞運動能や MMP 分泌にも関わることを示し、更に転移・浸潤部位に発現する、新規のチロシンリン酸化蛋白質 Ossa が酸化ストレス抵抗性など腫瘍に密接する生物学的機能に関わることを明らかにした。これらの機能はがん細胞の悪性形質に密接に関係していると考えられ、さらには転移・浸潤に対する選択的な治療薬開発につながると思われる。

A. 研究目的

固形腫瘍において転移・浸潤は、その治療方針を決めるうえでも生命予後を考えるうえでも最も重要な要素である。転移・浸潤などの性質には、細胞レベルでの数多くの腫瘍特異的な特性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、血管新生能などがあるが、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。標的分子としてもこれらの諸過程に関与するチロシンキナーゼの阻害が現時点でも最も有力であるが、特異性や副作用の問題も多く、数多くの改善の余地を残している。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、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、新しい選択的な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

我々は近年、腫瘍の転移・浸潤に関わる腫瘍特性である足場非依存性を制御するチロシンリン酸化蛋

白質 CDCP1 を肺癌細胞株から精製により同定した。CDCP1 は Src ファミリーキナーゼの基質分子である機能不詳の膜蛋白質であり足場非依存性の強い肺癌で発現とチロシンリン酸化レベルが高い。RNAi および変異体を用いた実験で、CDCP1 がチロシンリン酸化した状態でアポトーシス関連分子 PKC δ を介して肺癌細胞の足場喪失時のアポトーシスを抑制していることが明らかになった。更に CDCP1 の発現抑制が幾つかの系で腫瘍の遠隔転移を抑えることを示した。この機能に加え CDCP1 は細胞の運動能を制御し、未知のマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を介して細胞の浸潤能と深く関わることがわかりつつある。この機能は腫瘍の浸潤における役割を考える上でも重要であると考えられ、さらに解析を進める。

スキルス胃がんの腹膜浸潤部位で強くチロシンリン酸化されている蛋白質として機能不詳の c9orf10 蛋白質を同定した。c9orf10 は酸化ストレスによりチロシンリン酸化を受け Src と PI3 キナーゼの活性化を誘導することで、腫瘍細胞の酸化ストレス抵抗性に関わることを明らかになった。このことから、我々はこの分子に Ossa (Oxidative Stress-associated Src Activator) と名付けた。酸化ストレスに対する腫瘍細胞の抵抗性は、腫瘍の異常増殖や浸潤・転移さらには治療抵抗性について考える際に極めて重要であり、RNAi や発現ベクターを用いて、機能発揮のメカニズ

ム、そのほかの生理機能の探索など解析を進める。

C. 研究結果

固形腫瘍の足場非依存性増殖に関わる分子として2007年に肺がん細胞から同定したCDCP1は、Srcファミリーによりリン酸化して下流のエフェクター分子PKC δ を膜にリクルートすることで、固形腫瘍の足場非依存性増殖や運動能・浸潤能を制御することがわかった。浸潤能に関してはCDCP1及びPKC δ がコルタチンと複合体をつくること、さらにCDCP1は未同定のメタロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。ヒトスキルス胃がん44As3細胞においてCDCP1をRNAiによって抑制するとマウス腹腔内に注射した際に生ずる腸間膜転移が強く抑制されるが、造腫瘍能などに対する影響は見られない。一方で、他施設との共同研究も併せて肺がん、膵がんなどの系で、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Srcの活性化に応じて足場非依存性を含めた複数の悪性形質を固形腫瘍に付与することにより、腫瘍の転移・浸潤に関わっていることが示された。

スキルス胃がん44As3細胞をマウス腹腔内に注射すると腸管膜転移を起こすが、この腸管膜転移部位で通常培養時に比べ強くチロシンリン酸化された蛋白質として新規蛋白質c9orf10(Ossa)が質量分析により同定された。ヒトの組織染色ではOssaは粘膜下に浸潤したスキルス胃がん組織で周囲の正常粘膜に比べ強い発現があることが確認された。Ossaは正常組織でも消化管系を中心に広い発現が認められることから、その生理作用について幅広い解析を行った。解析の結果Ossaは紫外線や過酸化水素などの酸化ストレス刺激によって細胞内でSrcファミリーキナーゼによってチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的にPI3キナーゼと会合しPI3キナーゼ-AKTシグナルを活性化することが分かった。またOssaはC末側にRNA結合ドメインを持ち、この領域を介してIGF-IIなどの発現を調節していることが明らかになった。この結果としてOssaを高発現する細胞は酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得していると考えられ、スキルス胃がん細胞のOssaの発現をRNAiにより抑制するとそのマウスモデルでの腸間膜浸潤が抑えられた。Ossaによる酸化ストレスに対する抵抗性は固形腫瘍の化学療法や放射線療法に対する耐性獲得にも関わる可能性があり、マウスを用いた治療モデルの構築などを行っていく。

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。CDCP1高発現群が予後不良であることもあり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つ膜蛋白質であり、その多量体化が活性に関わると考えられているため、CDCP1の細胞外ドメインに結合して多量体化を抑える分子を現在スクリーニング中である。このような細胞外からCDCP1シグナルの抑制出来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られる。

Ossaはシグナル伝達分子とRNA結合分子としての両面から腫瘍の進展に関わり、特に腫瘍が酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得する際に重要な分子であることが示された。Ossaは腫瘍におけるSrcの恒常的活性化にも深くかかわっていることが示され、Src-Ossa間のシグナルをブロックすることにより、腫瘍特異的にSrcファミリーの恒常的活性化を抑えることができる可能性もある。腫瘍は酸化ストレスを含め飢餓・低酸素など各種ストレスに抵抗性を有することが、その異常増殖・転移・浸潤をもたらす大きな要因であり、場合によっては治療抵抗性にも関わる。Ossaを軸にしてこのストレス抵抗性を解除する薬剤がデザインできれば、腫瘍細胞の正常化という方向性を持つ全く新しい薬剤の開発につながる可能性がある。

E. 結論

既に多くのチロシンキナーゼ阻害薬が実用化されつつあり、腫瘍の分子標的薬として非常に有望であるが、残念ながらキナーゼ阻害剤はその全ての基質のリン酸化を抑え、生理機能も含めた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。我々はこれまでがん特異的なシグナルを解析してきて、これらのうちCDCP1やOssaのような特定のチロシンリン酸化蛋白質が伝えるシグナルが転移・浸潤などの特性に深く関わることを示すことができ、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* **6**: 654-662, 2008

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.* **172**: 1729-1739, 2008

Nakamoto T, Seo S, Sakai R, Kato T, Kutsuna H, Kurokawa M, Noda M, Miyasaka N, Kitagawa S. Expression and tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) protein in human neutrophils. *J Cell Biochem.* **105** : 121-128, 2008

Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K. & Sakai, R. A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **29** :402-413, 2009

Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A. & Sakai, R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* **28**: 662-673, 2009

Ikeda, J., Oda, T., Inoue, M., Uekita, T., Sakai, R., Okumura, M., Aozasa, K. & Morii, E. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci.* **100**: 429-433, 2009

Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. & Inoue, S. Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009 in press

Futami, H. & Sakai, R. RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-*nu* neuroblastoma cell line. *Cancer Sci.* 2009 in press

2. 学会発表

田中正光、鎌田礼子、佐々木一樹、堺隆一: スキルス型癌の間質浸潤におけるリン酸化蛋白質の解析 (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会総会(名古屋)

東浩太郎、浦野友彦、林慎一、堺隆一、大内耐義、井上聡乳癌細胞におけるエストロゲン受容体 α /HDAC6複合体による新規 nongenomic 作用 (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会総会(名古屋)

森井英一、池田純一郎、上北尚正、堺隆一、青笹克之: 肺腺癌における新規レセプターCDCP1の発現意義 (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会総会(名古屋)

宮澤悠里、上北尚正、堺隆一: CDCP1によるがん細胞の運動能・浸潤能制御機構の解析 (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会総会(名古屋)

上北尚正、堺隆一: がん細胞の足場非依存性増殖を制御するCDCP1の機能ドメインの解析 (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会総会(名古屋)

堺隆一: 肺癌細胞の足場非依存性と転移能を制御する新規蛋白質CDCP1の解析 (2008.7.24-25) 第17回日本がん転移学会学術集会・総会(鹿児島)

Sakai R., Ohira, M., Nakagawara, A. & Miyake, I.: ShcC protein controls differentiation of neuroblastoma cells. (2008.5.21-24) Advances in Neuroblastoma Research 2008, Chiba, Japan

Sakai R. Roles of phosphotyrosine-containing molecules in tumor progression. (2008.11.12) Kyoto Prize 2008 Memorial Workshop, Kyoto, Japan

Sakai R., Uekita T. & Miyazawa Y.: Analysis of domain function of CDCP1 in anoikis resistance of cancer cells. (2007.8.13-17) Mechanisms & Models of Cancer Meeting, Cold Spring Harbor, USA

H. 知的所有権の出願・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

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 進行がん根治療法開発の目的で、がん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。がん細胞特異的な遺伝子導入法と組み合わせ、進行がん根治療法開発のための重要な基盤を作っていく。抗がん剤や放射線照射、分子標的治療によるがん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、カスベース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。

様々ながん細胞株にガンマ線、抗がん剤、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、カスベース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させる分子・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

本年度は新規 p53 標的遺伝子として BLNK 遺伝子と Mieap 遺伝子を同定した。BLNK 遺伝子は B-cell 白血病のがん抑制遺伝子で、B-cell receptor のシグナル伝達に関与することが報告されている。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、強力な細胞増殖抑制と、その後の細胞死を認めた。タイムラプス顕微鏡観察を行ったところ、BLNK は細胞質分裂抑制活性を有することが明らかとなった。内在性 BLNK の抑制で、染色体異常性の発生を惹起した。この細胞質分裂抑制活性は、Aurora-B などの細胞質分裂促進因子との相互作用がメカニズムである可能性が示唆された。

一方、Mieap 遺伝子の機能解析を進めたところ、Mieap 蛋白質は新規のオートファジー関連蛋白質であることが明らかとなった。また、Mieap によるオートファジーの標的器官がミトコンドリアであることを見出した。Mieap 遺伝子の様々ながん細胞株における一過性の過剰発現で、最終的にカスベース依存性の細胞死が誘導された。Mieap 遺伝子は多くのがん細胞株においてメチル化によって不活性化されていた。Mieap メチル化がんへの Mieap 遺伝子の導入は、ヌードマウス皮下移植腫瘍の増殖を強力に抑制した。

D. 考察

BLNK が強力な細胞質分裂抑制活性を有することを初

めて明らかとした。調べたすべてのがん細胞株において、この活性を認め、細胞分裂の抑制後、カスベース依存性の細胞死を誘導した。多くの細胞質分裂促進因子がヒトがんで過剰発現している事実が報告され、それに対する機能阻害の化合物が、すでに新規抗がん剤として、その有効性に対する治験が進められている。BLNK は世界で初めての細胞質分裂抑制因子であり、今後の詳細なメカニズムの解析により、これら細胞質分裂促進因子の阻害因子として、全く新しいがん治療法の開発が期待できる。

新規オートファジー関連蛋白質である Mieap は、ミトコンドリアを標的として、in vivo における強力な腫瘍増殖抑制活性を認めた。オートファジーのがん抑制機能は既に報告されているが、そのメカニズムは未だ不明である。Mieap による腫瘍増殖抑制活性の今後の詳細な解析を行うことで、なぜ、オートファジーのがん抑制機能に関与するかが明らかとなり、がんのミトコンドリアを標的とした、全く新しいがん治療法の開発が期待される。

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

Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K and Arakawa H. B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis. *Cancer Sci*, 99: 2444-2454, 2008

2. 学会発表

1. 宮本祐士、中村康之、喜多村憲章、加峰弘毅、宮本嵩史、二村学、馬場秀夫、荒川博文 第67回日本癌学会学術総会一般口演 4-2 p53 関連遺伝子(1) 演題「p53 のがん抑制機能に関与する新規オートファジー関連蛋白質の同定」
2. 中村康之、加美野宏樹、喜多村憲章、宮本祐士、加峰弘毅、宮本嵩史、二村学、荒川博文 第67回日本癌学会学術総会一般口演 4-4 p53 関連遺伝子(3) 演題「BLNK は細胞質分裂を阻害することにより染色体異数性を防ぐ」
3. 喜多村憲章、二村学、中村康之、宮本祐士、加峰弘毅、宮本嵩史、荒川博文 第67回日本癌学会学術総会一般口演 4-4 p53 関連遺伝子(2) 「細胞死抑制、

H. 知的所有権の出願・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

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

テロメレース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 テロメレースは、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、テロメレースの新規機能を標的とした分子標的治療の開発を目指す。逆転写酵素（RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ）として知られるテロメレーズ触媒コンポーネントの TERT が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRP）活性を有することを見出した RdRP 活性検出する *in vitro* RdRP アッセイ系を確立した。新規酵素活性であるテロメレーズの RdRP 活性を標的とした治療法を検討するため *in vitro* RdRP アッセイ系を用いて、天然化合物ライブラリーあるいは抗がん剤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た。約 140 種類の化合物の中から、2 種類の化合物が RdRP 活性の阻害作用を有することを見出した。

(倫理面への配慮) 特記事項なし。

A. 研究目的

テロメレーズ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、テロメレーズ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、テロメレーズ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、テロメレーズが逆転写酵素（RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ）活性のみならず RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRP）活性をも有することに注目し、新規同定酵素活性である RdRP 活性を標的とした阻害剤を検索することで、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。

B. 研究方法

テロメレーズ触媒コンポーネントである TERT の組み換えタンパクを大腸菌にて発現させ精製した。精製組み換え hTERT タンパク質を用いて RdRP 活性の試験管内再構成アッセイ系（以下、*in vitro* RdRP アッセイ系）を確立した。協和発酵キリン株式会社と共同研究契約を締結の上、分与を受けた天然化合物ライブラリーあるいは文部科学省がん特定領域研究・統合がん、化学療法基盤情報支援班から提供を受けた抗がん剤ライブラリーの中から、阻害物質のスクリーニングを *in vitro* RdRP アッセイ系を用いて行った。同定した化合物に関しては、培養細胞（がん細胞樹立株）を用いて、がん細胞に及ぼす影響を観察した。

C. 研究結果

約 140 種類の化合物について *in vitro* RdRP アッセイ系を用いて行ったスクリーニングで活性阻害作用のある 2 種類の化合物を同定した。これらの化合物は試験管内で量依存的な阻害作用を示すことから、RdRP を標的とした阻害剤としての可能性が期待される。培養細胞（HeLa 細胞、THP-1 細胞）を用いた実験では、これら 2 種類の化合物は細胞分裂を阻害し約 72 時間後にはがん細部は死滅した。化合物処理後の 72 時間ではテロメア長の変化はなかった。これらのことから、TERT のテロメア維持機構とは独立した機能阻害による細胞死であることが確認された。

D. 考察

テロメレーズを標的として開発されてきた従来型の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）が問題とされてきた。テロメレーズ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。新規機能を担う酵素活性の同定を試み、TERT は逆転写酵素活性とは別に、新規酵素活性である RdRP 活性を保証していることを見出した。本研究において、テロメレーズの新規機能である RdRP 活性を検出するための、*in vitro* RdRP アッセイ系を独自に確立した。RdRP 活性標的とした治療法の可能性に繋がる化合物のスクリーニングを行い 2 種類の化合物が RdRP 阻害作用を有することを見出した。がん細胞株を用い

た実験でこれらの化合物を添加後、約 72 時間という比較的早い段階で細胞死が誘導されたことから、テロメア短縮に伴う細胞死ではなく、むしろ新規酵素活性阻害に伴う急性の細胞死の可能性が強く示唆された。このような、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。

E. 結論

TERT は逆転写酵素活性とは別に RdRP 活性を有することを見出し、RdRP 活性阻害作用を有する 2 種類の化合物を見出した。これらの化合物は、がん細胞死を早期に誘導することから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の可能性が期待された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Possemato R, Timmons JC, Bauerlein EL, Wada N, Baldwin A, Masutomi K, Hahn WC
Effects of Inhibition of POT1 on Telomere Length and Senescence in Diploid Human Cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6:1582-1593

Imamura S, Uchiyama J, Koshimizu E, Hanai J, Raftopoulou C, Murphey RD, Bayliss PE, Imai Y, Burns CE, Masutomi K, Gagos S, Zon LI, Roberts TM, Kishi S
A Non-Canonical Function of Zebrafish Telomerase Reverse Transcriptase is Required for The Differentiation and Survival of Embryonic Hematopoietic Cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e3364

岡本奈緒子, 増富健吉
がん性幹細胞研究の現状と今後の展望.
BIO EX-press

古内美穂, 増富健吉
テロメラーゼと癌 - テロメラーゼの新たな機能.
実験医学 26(10):169(1627)-172(1630), 2008

2. 学会発表

第 8 回日本再生医療学会総会
「テロメラーゼの新規機能と幹細胞」
東京国際フォーラム
2009 年 3 月 5 日～6 日(口頭発表)
増富 健吉

BMB2008(日本分子生物学会、生化学会)
“Novel function of telomerase reverse transcriptase (TERT)”
神戸ポートアイランド
2008 年 12 月 9 日～12 日(口頭発表)
増富 健吉

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願:

発明の名称: A mammalian RNA dependent RNA polymerase
発明者: 増富健吉、毎田佳子他
出願日: 2008 年 8 月 12 日
出願番号: 米国仮特許 US61/188,743
出願人: 増富健吉、毎田佳子他

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

がん抑制因子 p53 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 江成 政人 国立がんセンター研究所 生物学部 室長

研究要旨 がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する E3 ユビキチンリガーゼ (COP1, Pirh2, ARF-BP1, Synoviolin, Mdm2) の様々な欠失変異体をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として作製し、p53 との結合実験を実施した。その結果、それぞれの E3 ユビキチンリガーゼの p53 結合部位が同定できた。そして、その結合領域を含む GST 融合タンパク質を用いて、p53 との結合量を定量化出来る実験系を確立した。また、上記 E3 ユビキチンリガーゼのヒト肺癌由来の細胞株および臨床検体における発現解析を行ったところ、肺癌細胞の多くで p53 発現を負に調節する様々な E3 ユビキチンリガーゼの発現が亢進していた。

A. 研究目的

がん抑制遺伝子 p53 は約半数のヒト癌で変異が認められており、がん発生の抑制に重要な役割を担っている。しかしながら、残りの半数の癌では p53 が野生型であり、多くの場合、p53 の Negative regulators が過剰発現していることが報告されている。がん抑制因子 p53 の Negative regulators として E3 ユビキチンリガーゼ Mdm2 がよく知られていたが、近年、Mdm2 同様、p53 に結合し、そして p53 をユビキチン化し、分解を促進する E3 ユビキチンリガーゼが 4 種類同定された。これらのユビキチンリガーゼは野生型 p53 を持つヒト癌で過剰発現している場合が多く、野生型 p53 を持つ癌細胞に対する新規抗癌剤開発の分子標的となることが考えられる。すなわち、p53 とそれらユビキチンリガーゼの相互作用を阻害する低分子化合物やそれらユビキチンリガーゼに対する特異的な低分子阻害剤が開発されれば有用な抗癌剤になると考えられる。そこで、p53 とそれらユビキチンリガーゼの相互作用をモニターできる簡便な方法を確立、そして、その相互作用を阻害する低分子化合物を探索し、p53 経路を標的とした新たな抗癌剤の開発を目指す。

B. 研究方法

p53 とその E3 ユビキチンリガーゼの相互作用を阻害する低分子化合物を探索するために、以下の実験手順でその定量法 (改良型 ELISA 法) を確立した。まず、大腸菌大量発現系を用いて、5 種類のユビキチンリガーゼの欠失変異体をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として調製し、p53 との結合領域の同定を試みた。同定した p53 結合部位

を含む GST 融合タンパク質をグルタチオンセファロースで精製し、0.05% Tween20 を含むリン酸緩衝液で透析した後、グルタチンコートしたプレートに固相化した。そして、大腸菌大量発現系を用いて、FLAG エピトープ標識した p53 を調製し、固相化した GST 融合タンパク質と反応させた。反応後、horseradish peroxidase 標識した抗 FLAG 抗体および発色基質を用いて、p53-ユビキチンリガーゼの結合量を定量した。また、癌細胞における E3 ユビキチンリガーゼの発現解析には、79 種類のヒト肺癌由来の細胞株および 30 種類の肺癌患者由来の癌組織 (対照となる正常組織を含む) から RNA を調製し、逆転写酵素を用いて鋳型となる cDNA を作製した。そしてリアルタイム PCR 法を用いて、上記ヒト肺癌細胞における E3 ユビキチンリガーゼの発現を定量した。

C. 研究結果

p53 と E3 ユビキチンリガーゼの相互作用を阻害する低分子化合物を探索するために、まず様々な E3 ユビキチンリガーゼの欠失変異体を作製し、どの領域が p53 結合部位か同定したところ、ユビキチンリガーゼ活性に必要な Ring ドメインや HECT ドメインの領域には結合せず、既知の構造モチーフを持たない領域に結合することがわかった。そこで、同定した p53 結合部位を含む GST 融合タンパク質を調製し、グルタチンコートしたプレートに固相化、そして、FLAG エピトープ標識した p53 と固相化した GST 融合タンパク質とを反応させた。その方法を用いて p53-ユビキチンリガーゼの結合量を定量したところ、加えた p53 の容量に依存してその結合量が増加することがわかった。現在

、この系を用いて、p53-ユビキチンリガーゼ間相互作用を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行っている。一方、肺癌細胞におけるこれらユビキチンリガーゼの発現を解析するために、リアルタイム PCR法を用いて検討した。その結果、様々な肺癌細胞および肺癌患者由来の癌組織で様々な E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇が認められた。

D. 考察

本研究において、p53 を負に調節する E3 ユビキチンリガーゼと p53 との結合領域を決定し、その結合を簡便にモニターすることのできるアッセイ系を確立出来た。この結果は、p53-ユビキチンリガーゼ結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行うための重要なアッセイ系を提供すると共に、構造解析を行う際にも重要な情報となると考えられる。今後、数多くの低分子化合物による阻害実験を行い、阻害活性を持つ低分子化合物に抗腫瘍活性があるかどうか検討しなければならないだろう。一方、肺癌細胞における E3 ユビキチンリガーゼの発現解析より、多くの肺癌細胞において種々のユビキチンリガーゼの発現増強が認められることから、臨床応用可能な抗癌剤となり得るのではないかと考えられる。

E. 結論

p53 を負に調節する E3 ユビキチンリガーゼと p53 との結合領域を決定し、その結合を簡便にモニターすることのできるアッセイ系を確立した。また、多くの肺癌細胞で p53 を負に制御する E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇が認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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) Kazuji Ohmori, Yoshie Endo, Yusuke Yoshida, Hirokazu Ohata, Kazuo Yamamoto, Yoichi Taya and Masato Enari*: Monomeric but not Trimeric Clathrin Heavy Chain Regulates p53-Mediated Transcription. **Oncogene**, 27, 2215-2227, 2008. *Corresponding author

2. 学会発表

- (1) 新規核内クラスリン重鎖結合タンパク質 NuMA による p53 の転写制御
大畑広和、横田淳、田矢洋一、江成政人
第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28 日
 - (2) Non-canonical p53 phosphorylation at Ser46 by ATM
Masami Kodama, Masato Enari, Yoichi Taya
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、神戸
2008 年 12 月 9 日
 - (3) p53 によって制御される細胞運動調節因子の探索
大坪千裕、杉山温美、横田淳、田矢洋一、江成政人
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、神戸
2008 年 12 月 9 日
 - (4) p53 を介した転写に関与する核内クラスリン重鎖結合因子の同定
江成政人、大畑広和、横田淳、田矢洋一
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、神戸
2008 年 12 月 9 日
- #### H. 知的所有権の出願・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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, <u>Kitabayashi I</u> , Kudo A.	Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyl transferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons.	Dev Biol..		In press	2009
Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, <u>Kitabayashi I</u> .	MOZ interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest.	J Biol Chem.	284	237-244	2009
Shima Y, Shima T, Chiba T, Irimura T, Pandolfi PP, <u>Kitabayashi I</u> .	PML activates transcription by protecting HIPK2 and p300 from SCF/Fbx3-mediated degradation.	Mol Cell Biol.	28	7126-7138	2008
Katsumoto T, Yoshida N and <u>Kitabayashi I</u>	Roles of the histone acetyltransferase MOZ in normal and malignant hematopoiesis.	Cancer Sci.,	99	1523-7	2008
Marshall LJ, Moore AC, Ohki M, <u>Kitabayashi I</u> , Patterson D, Ornelles DA.	RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis.	J Virol.	82	6395-408	2008
Hayakawa F, Abe A, <u>Kitabayashi I</u> , Pandolfi PP, Naoe T..	Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis.	J Biol Chem.	283	24420-5	2008
Tachibana M, Tezuka C, Muroi S, Nishimoto S, Katsumoto T, Nakajima A, <u>Kitabayashi I</u> , 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
Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, <u>Kitabayashi I</u> .	Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBPε and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation.	Leukemia	22	273-280	2008
Yoshida H, <u>Kitabayashi I</u> .	Chromatin regulation by AML1 complex.	Int. J. Hematol.	7,	19-24	2008.
Sugimoto N, <u>Kitabayashi I</u> , 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.
Tazaki T., Miyazaki K., Hiyama E., Nakamoto T., <u>Sakai R.</u> , 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. <u>Sakai, R.</u>	Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas.	Mol. Cancer Res.	6	654-662	2008
Uekita, T., Tanaka, M., Takigahira, M., Miyazawa, Y., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Yanagihara, K. <u>Sakai, R.</u>	CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma.	Am. J. Pathol.	172	1729-1739	2008
Nakamoto, T., Seo S., <u>Sakai, R.</u> , Kato, T., Kutsuna, H., Kurokawa, M., Noda, M., Miyasaka, N. Kitagawa, S.	Expression and tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) protein in human neutrophils.	J. Cell Biochem.	105	121-128	2008
Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K. <u>Sakai, R.</u>	A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis.	Mol. Cell Biol.	29	402-413	2009
Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A. <u>Sakai, R.</u>	Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma.	Oncogene	28	662-673	2009
Ikeda, J., Oda, T., Inoue, M., Uekita, T., <u>Sakai, R.</u> , Okumura, M., Aozasa, K. Morii, E.	Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung.	Cancer Sci.	100	429-433	2009.
Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., <u>Sakai, R.</u> , Ouchi, Y. Inoue, S.	Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells.	Cancer Res.	In press		2009
Futami, H. <u>Sakai, R.</u>	RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-nu neuroblastoma cell line.	Cancer Sci.	In press		2009
Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K and <u>Arakawa H</u>	B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis	Cancer Science	99 (12)	2444-2454	2008
Possemato R, Timmons JC, Bauerlein EL, Wada N, Baldwin A, <u>Masutomi K</u> , Hahn WC	Effects of Inhibition of POT1 on Telomere Length and Senescence in Diploid Human Cells	Mol. Cancer Res.	6	1582-1593	2008
Imamura S, Uchiyama J, Koshimizu E, Hanai J, Raftopoulos C, Murphey RD, Bayliss PE, Imai Y, Burns CE, <u>Masutomi K</u> , Gagos S, Zon LI, Roberts TM, Kishi S	High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival	PLoS ONE	3	e3364	2008
Kazuji Ohmori, Yoshie Endo, Yusuke Yoshida, Hirokazu Ohata, Yoichi Taya and <u>Masato Enari</u>	Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription.	Oncogene	27	2215-2227	2008