

200924009A

別紙1

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北林 一生

平成22(2010)年 5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	7
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	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	13
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	16
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	19
江成 政人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

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 国立がん研究センター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 急性骨髄性白血病において、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、M-CSF 受容体特異的チロシンキナーゼ阻害剤が発症を抑制することを見出した。酸化ストレス抵抗性などに関与する Ossa、足場非依存性に関わる CDCP1、細胞間接着や運動能にかかわる ephrin-B1 などの Src の基質蛋白質群の作用メカニズムを明らかにして、その阻害系が *in vivo* のモデルにおいて転移・浸潤や腹膜播種を抑えることを明らかにした。新規 p53 標的遺伝子として LXC5A 遺伝子、TMPS 遺伝子、NEEP21 遺伝子を同定し、強力な細胞増殖抑制と、その後の細胞死を認めた。Mieap 蛋白質は新規のオートファジー関連蛋白質で、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 遺伝子は様々なヒトがん細胞株において高頻度にメチル化によって不活性化されており、メチル化によって Mieap の欠失した細胞株では、ミトコンドリアの高度の機能不全が確認された。がん抑制タンパク質 p53 の活性化を阻害する Negative regulators と p53 との結合量を定量する実験系を確立し、p53 と Mdmx との相互作用を阻害する化合物を同定した。その低分子化合物をがん細胞に添加すると、p53 の活性化を伴い、p53 依存的にがん細胞が死滅させること、野生型 p53 を持つがん細胞は、変異型 p53 を持つがん細胞に比べ、その低分子化合物による細胞増殖抑制効果が高い傾向にあることがわかった。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ラーゼの 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、が RdRP 活性の阻害作用を有する 1 種類の化合物を見出した。

分担研究者

堺 隆一（国立がん研究センター研究所、細胞増殖因子研究部・部長）

荒川 博文（国立がん研究センター研究所・生物物理部・部長）

増富 健吉（国立がん研究センター研究所・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（国立がん研究センター研究所・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。

Src キナーゼの基質蛋白質群のうち腫瘍において特異的な役割を持つ蛋白質を同定・機能解析し、腫瘍で活性化した Src キナーゼの引き起こす腫瘍の悪性形質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ことが本研究の目的である。

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。

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 を不活化する Negative regulators が過剰発現していることから、p53 とそれら Negative regulators との相互作用を阻害する低分子化合物が開発されれば、有用な抗癌剤になると考えられる。そこで、その相互作用を定量する方法を確立、そして、その相互作用を阻害する化合物を探索し、p53 経路を標的とした新たな抗癌剤の開発を目指す。

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ラーゼ分子標的治療法の開発を目指す。

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。

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 や肺がん細胞の足場非依存性増殖に関わる新規分子 CDCP1 の腫瘍における生物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。細胞間接着や運動能に関わる ephrin-B1 については、細胞内シグナルを阻害するペプチドを設計し、スキルス胃がんの腹膜播種に対する抑制作用を調べた。

大腸菌大量発現系を用いて、Negative regulators をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と融合させたタンパク質を調製し、p53 との結合実験に用いた。それら GST 融合タンパク質を精製した後、グルタチンコートしたプレートに固相化、そして、精製した FLAG 標識した p53 を反応させた。反応後、horseradish peroxidase 標識した抗 FLAG 抗体および発色基質を用いて、その結合量を定量した。低分子化合物ライブラリーは文部科学省がん特定領域・化学療法基盤情報支援班より分与された。また、低分子化合物の薬効試

験には、野生型 p53 を持つがん細胞および変異型 p53 を持つがん細胞を用いた。細胞増殖抑制活性には、クリスタル・バイオレット法を用いて定量した。

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) (Nature, Maida *et al.*, 2009) を確立した。天然化合物あるいは合成化合物中から、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。

動物実験は、「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、施設内動物倫理委員会の承認を受けて、生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに実施した。遺伝子組換え実験は、施設内組換え実験安全委員会の承認を受け、遺伝子組換え実験安全管理規定に従って行った。

C. 研究結果

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 や MLL-AF10 融合遺伝子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。この白血病マウスの骨髄細胞からセルソーターを用いて細胞集団を分画して、野生型マウスに再移植することにより白血病誘導活性を調べたところ、M-CSF 受容体の発現が高い細胞に強い白血病誘導活性が見られ、発現が低い細胞にはその活性が殆どないことが示された。M-CSFR 遺伝子プロモーターに Fas 遺伝子を連結した融合遺伝子導入したトランスジェニックマウスを用いて、M-CSFR を高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、白血病

発症が抑制された。これらの結果は、白血病幹細胞は M-CSFR 高発現細胞に含まれ、これらの細胞を除去することにより白血病が治癒出来ることを示している。M-CSF 受容体のチロシンリン酸化阻害剤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。

Ossa は PI3 キナーゼの制御と RNA 結合分子としての両面から腫瘍の進展に関わり、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ため重要な分子であることが示され、実際、スキルス胃癌細胞の 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。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。ephrin-B1 の C 末領域の機能を競合的に阻害するペプチドはスキルス胃癌のマウスモデルでの腹膜播種を著明に抑制した。

新規 p53 標的遺伝子として UNC5A 遺伝子、TMPS 遺伝子、NEEP21 遺伝子を同定した。それぞれの遺伝子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。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、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 遺伝子は様々なヒトがん細胞株において高頻度にメチル化によって不活性化されており、メチル化によって Mieap の欠失した細胞株では、ミトコンドリアの高度の機能不全が確認された。

約 160 種類の化合物について行ったスクリーニングで活性阻害作用のある 1 種類の化合物を同定した。培養細胞 (HeLa 細胞、THP-1 細胞) を用いた実験では、これら 1 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 Negative regulators と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。この系を用いて、

p53 と Negative regulators 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たところ、p53 と Mdmx との相互作用を阻害する低分子化合物が得られた。実際、野生型 p53 遺伝子を持つがん細胞に得られた低分子化合物を添加すると、p53 の活性化を伴い、その低分子化合物の用量依存的にがん細胞を死滅させることがわかった。また、様々ながん細胞を用いて、その低分子化合物の細胞増殖抑制活性を調べたところ、野生型 p53 を持つがん細胞は、変異型 p53 を持つがん細胞に比べ、その低分子化合物による細胞増殖抑制効果が高い傾向にあった。

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。

固形腫瘍が酸化ストレスや足場の喪失など悪環境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 を軸にして酸化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し、膜蛋白質 CDCP1 は足場非依存性のみならず、運動能や基質分解能などの悪性形質を腫瘍から取り去るために、有望な標的分子であることが示された。また ephrin-B1 の例で示した膜透過ペプチドとシグナル阻害ペプチドの有望ペプチドは、少なくともスキルス胃癌の腸管膜播種などにおいては、細胞内の腫瘍特異的シグナルの阻害により固形腫瘍を治療する良いモデルとして提示できたと考えている。

UNC5A 遺伝子、TMPS 遺伝子、NEEP21 遺伝子は、いずれも p53 細胞死誘導経路の新しい仲介分子であり、これらの機能解析やヒト癌での異常解析から、ヒト癌で不活性化された細胞死経路の詳細と、

細胞死を基盤とした新しい癌治療法の開発が可能になると思われる。また、p53 及び Micap の異常による、癌における異常ミトコンドリアの蓄積は、Warburg 効果のメカニズムと考えられる。

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。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。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 1 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。

本研究において、p53 を負に調節するタンパク質と p53 と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、p53 と Mdmx との相互作用を阻害し、p53 依存的にがん細胞の増殖抑制効果を示す低分子化合物を得た。今後、Mdmx の過剰発現が原因で p53 の不活化が起こり、それに伴って悪性化しているがんの新たな治療法の実現に発展していくことが期待される。

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。

Ossa、CDCP1、ephrin-B1 などの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、これらの分子が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格好のターゲットとなりうることを示された。

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実現が強く望まれる。

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実現の可能性が期待された。

p53 の Negative regulators である Mdmx と p53 との結合を阻害する低分子化合物を同定した。その低分子化合物は細胞増殖抑制活性を有し、p53 依存的な経路を活性化することでがん細胞の増殖を阻害していることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.*, 329:176-190, 2009. (4.416)

Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, Kitabayashi I, Tsukada T, Nomura T, Miyachi Y, Taniuchi I, Sakaguchi S. Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* 31:609-620, 2009.

Yamagata K, Kitabayashi I. Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:1355-1360, 2009.

Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. A Higher-Order Complex Containing AF4 and ENL Family Proteins with P-TEFb Facilitates Oncogenic and Physiologic MLL-Dependent Transcription. *Cancer Cell*, 17: 198-212, 2010.

Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med*, 16: 580-585, 2010.

Miyazawa, Y., Uekita, T., Hiraoka, N., Fujii, S., Kosuge,

T., Kanai, Y., Nojima, Y., & Sakai, R. CDCP1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation *Cancer Res.* 2010 in press

Yamaguchi, H., Yoshida, S., Muroi E., Kawamura, M., Kouchi, Z., Nakamura, Y., Sakai, R., & Fukami, K. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ia are required for invadopodia formation in human breast cancer cells *Cancer Sci.* 2010 in press

Tanaka, M., Kamata, R., Yanagihara, K. & Sakai, R. Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide. *Cancer Sci.* 101: 87-93, 2010

Futami, H. & Sakai, R. RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-nu neuroblastoma cell line. *Cancer Sci.* 100:1034-1039, 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.* 69: 2935-2940, 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

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

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.* 2009 29; 402-413, 2009

Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, Arakawa H, Nakamura Y, Matsuda K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene*, 28: 3081-3092, 2009

Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y,

Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol*, 36: 1253-1260, 2010

Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain. *Oncol Rep* 2010 (in press)

Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. *Int J Oncol* 2010 (in press)

Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, Masutomi K An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 2009; 461: 230-235

Masami Kodama, Chihiro Otsubo, Toru Hirota, Jun Yokota, Masato Enari*, and Yoichi Taya: Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol. Cell. Biol.*, 30, 1620-1633, 2010. *Corresponding author

Hirokazu Ohata, Nobuyuki Ota, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Jun Yokota, Yoichi Taya and Masato Enari*: Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation. *J. Mol. Biol.*, 394, 460-471, 2009. *Corresponding author

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

発明の名称：「p53-mdmx相互作用を阻害する低分子抗がん剤」

発明者：江成政人、上里新一

出願日：2010年2月26日

出願番号：特願2010-43548

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、
学校法人 関西大学

発明の名称：A mammalian RNA dependent RNA polymerase

発明者:増富健吉、毎田佳子他
PCT 移行
出願番号:米国仮特許 US61/188,743
出願人: 廣橋説雄 他

なし
3.その他
なし

2. 実用新案登録

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 国立がん研究センター研究所 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の発症メカニズムを解析した。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 や MLL-AF10 融合遺伝子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。この白血病マウスの骨髄細胞からセルソーターを用いて細胞集団を分画して、野生型マウスに再移植することにより白血病誘導活性を調べたところ、M-CSF 受容体の発現が高い細胞に強い白血病誘導活性が見られ、発現が低い細胞にはその活性が殆どないことが示された。M-CSFR 遺伝子プロモーターに Fas 遺伝子を連結した融合遺伝子導入したトランスジェニックマウスを用いて、M-CSFR を高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、白血病発症が抑制された。これらの結果は、白血病幹細胞は M-CSFR 高発現細胞に含まれ、これらの細胞を除去することにより白血病が治癒出来ることを示している。M-CSF 受容体のチロシンリン酸化阻害剤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

MOZ-TIF2 融合遺伝子を導入したマウス白血病モデルと同様に、MLL 融合遺伝子を導入したマウス白血病モデルでも M-CSF 受容体を高発現する細胞に強い白血病誘導活性が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することを明らかにした。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、この経路が白血病発症に必須であることを証明した。MOZ-TIF2を導入したマウス白血病モデルで、M-CSF受容体プロモーター制御下にアポトシスを誘導する遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを用いて、M-CSF受容体の発現の高い細胞にアポトシスを誘導すると白血病が完全に抑制されることを明らかにした。M-CSF受容体特異的阻害(Ki20227)をMOZ-TIF2融合遺伝子を導入したマウス白血病モデルに投与すると白血病発症が抑制されて、発症が遅れることを明らかにした。

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。本研究において、MOZ-TIF2融合遺伝子およびMLL-AF10の発現により誘導される白血病において、M-CSF受容体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。また、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ので、3種類のM-CSF受容体阻害を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したところ、白血病発症が抑制されて、発症が顕著に遅れることが示された。また、M-CSF受容体の発現の高い細胞に強い白血病幹細胞の活性があることを見出し、これらの細胞にアポトシスを誘導すると白血病が完全に抑制されることを明らかにした。このことは白血病幹細胞を除去することにより白血病の完全治癒が期待できることを示している。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。

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

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.*, 329:176-190, 2009. (4.416)

Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, Kitabayashi I, Tsukada T, Nomura T, Miyachi Y, Taniuchi I, Sakaguchi S. Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* 31:609-620, 2009.

Yamagata K, Kitabayashi I. Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:1355-1360, 2009.

Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. A Higher-Order Complex Containing AF4 and ENL Family Proteins with P-TEFb Facilitates Oncogenic and Physiologic MLL-Dependent Transcription. *Cancer Cell*, 17: 198-212, 2010.

Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med*, 16: 580-585, 2010.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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 国立がん研究センター研究所 細胞増殖因子研究部 部長

研究要旨 チロシンキナーゼである Src ファミリーは、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。本研究の目的は転移・浸潤における Src ファミリー基質群の役割を明らかにするとともに、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ことである。新規の Src 基質 Ossa は PI3 キナーゼの制御から腫瘍の酸化ストレス抵抗性に関わり、足場非依存性の制御分子として同定した Src 基質 CDCP1 は運動能やマトリックス分解能にも関わることが分かった。さらに CDCP1 蛋白質が膵がん・肺がんで臨床的に予後不良と深くかかわる蛋白質であることを示した。これらの蛋白質やすでに解析の進んだ ephrin-B1 蛋白質の阻害系が *in vivo* のモデルにおいて転移・浸潤や腹膜播種を抑えることを示すことができた。これらのがん細胞の悪性形質に密接に関係した分子群を見出したことは、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。本研究ではその中でも Src 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 Src 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

我々は最近、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。種々の生物機能の解析から 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が明らかになった。そこで、我々はこの分子に Ossa (Oxidative Stress-associated Src Activator) と名付けた。この分子の、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た。

足場非依存性は腫瘍の転移・浸潤に関わる腫瘍特性であるが、これを制御するチロシンリン酸化蛋白質として肺癌細胞株から CDCP1 を近年同定した。CDCP1 は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おり、CDCP1 の発現抑制が固形腫瘍の遠隔転移を抑えることを示した。膵臓がんなどの系で CDCP1 の発現と臨床的な予後との相関を解析するとともに、膵がん細胞株などでみられ CDCP1 の新規機能、細胞運動能の制御やマトリックスメタロプロテアーゼの活性化などについて詳細な解析を行った。

最近我々は Src の基質 ephrin-B1 の C 末端の領域が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアー

ゼ分泌を促すこと関わることを示した。また同じ C 末領域を介して ephrin-B1 が細胞運動など転移・浸潤に関わる複数の性質を制御するシグナルを伝えることを明らかにしてきている。今年度は ephrin-B1 の C 末からのシグナルをブロックする膜透過性ペプチドを設計し、細胞内シグナルの抑制効果と実際の転移・浸潤、特にスキルス胃がんの腹膜播種に対する抑制作用を動物モデルを用いて調べた。

C. 研究結果

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。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。

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、多くの固形腫瘍で活性化した Src ファミリーによりリン酸化され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 PKC δ を活性化し、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 がコルタクチンと複合体をつくること、さらに CDCP1 は MMP9 などのメタロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。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、他施設との共同研究により肺がんなどでも予後と深くかかわる因子であることが示された。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。

膜型のリガンドである ephrin-B1 の C 末領域の機能を競合的に阻害する ephrin-B1C 末の 16 アミノ酸からなるペプチドに、細胞膜を透過する HIV の TAT 配列由来の 13 アミノ酸を付加した形で合成し、その機能を解析した。この融合ペプチド PTD-EPNB1-C は、がんセンターで樹立された腹膜播種を高頻度に起こすスキルス胃がんの細胞株 44As3 細胞において *in vitro* で細胞運動能や MMP 分泌の阻害を示し、*in vivo* でも腹腔内注射した際の腹膜播種が著明に抑えられた。ephrin-B1 はスキルス胃がんの腸管膜播種を初めとする固形腫瘍の転移浸潤の治療標的の候補になりうると考えている。

D. 考察

固形腫瘍は酸化ストレスを含め飢餓・低酸素など悪環境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 を軸にして酸化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。一方腫瘍の足場非依存性をもたらす分子として同定された CDCP1 は、CDCP1 高発現群が予後不良であることもあり固形腫瘍の転移・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。また ephrin-B1 の例で示した膜透過ペプチドとシグナル阻害ペプチドの有望ペプチドは、少なくともスキルス胃がんの腸管膜播種などにおいては、腫瘍特異的シグナルの阻害により固形腫瘍を治療する良いモデルを提示できたと考えている。

E. 結論

今回の研究で Ossa、CDCP1、ephrin-B1 などの特定のチロシンリン酸化蛋白質が伝えるシグナルが、それぞれ転移・浸潤に関わる違った特性に作用することにより転移・浸潤の成立に深く関わることを

示すことができた。このような分子が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ことが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazawa, Y., Uekita, T., Hiraoka, N., Fujii, S., Kosuge, T., Kanai, Y., Nojima, Y., & Sakai, R. CDCP1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation *Cancer Res.* 2010 in press

Yamaguchi, H., Yoshida, S., Muroi E., Kawamura, M., Kouchi, Z., Nakamura, Y., Sakai, R., & Fukami, K. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I α are required for invadopodia formation in human breast cancer cells *Cancer Sci.* 2010 in press

Tanaka, M., Kamata, R., Yanagihara, K. & Sakai, R. Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide. *Cancer Sci.* 101: 87-93, 2010

Futami, H. & Sakai, R. RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-nu neuroblastoma cell line. *Cancer Sci.* 100:1034-1039, 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.* 69: 2935-2940, 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

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

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.* 2009 29: 402-413, 2009

2. 学会発表

堺隆一、田中正光: スキルス胃癌の酸化ストレス抵抗性に関わる分子 Ossa の機能解析 (2009.7.23-24) 第18回日本がん転移学会学術集会・総会 (旭川)

上北尚正、堺隆一: CDCP1 は膵癌の転移・浸潤能に関わる予後因子である (2009.7.23-24) 第18回日本がん転移学会学術集会・総会 (旭川)

二見仁康、堺隆一: 神経芽腫細胞株におけるレチノイン酸による ALK の発現抑制及びアポトーシス誘導との関わり (2009.10.1-3) 第68回日本癌学会学術総会 (横浜)

上北尚正、堺隆一: Src キナーゼ基質 CDCP1 による転移・浸潤の制御 (2009.10.1-3) 第68回日本癌学会学術総会 (横浜)

澤井勇一郎、大木理恵子、堺隆一: 癌遺伝子 Src の下流因子 p130Cas の C 末端断片化のがん化及びがん転移における意義 (2009.10.1-3) 第68回日本癌学会学術総会 (横浜)

宮澤悠里、上北尚正、堺隆一: 膵臓がんにおける CDCP1 発現と転移・予後との関わり (2009.10.1-3) 第68回日本癌学会学術総会 (横浜)

八木玲子、田中正光、堺隆一: スキルス胃癌細胞の腹膜播種における ARAP3 の役割 (2009.10.1-3) 第68回日本癌学会学術総会 (横浜)

堺隆一、田中正光: 癌の酸化ストレス抵抗性に関わる新規分子 Ossa の機能解析 (2009.11.13-14) 第4回日本プロテインホスファターゼ研究会学術総会 (熊本)

Ryuichi Sakai: Regulation of invasion and metastasis by a Src substrate, CDCP1. (2009.7.7-9) 2nd DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research, Tokyo, Japan.

Ryuichi Sakai: Role of membrane protein, CDCP1 in tumor metastasis and invasion. (2009.9.16-19) Japanese-German Cancer Workshop, Hamburg, Germany.

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 国立がん研究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とする。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とする。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、カスパーゼ依存性か非依存性か等の詳細を明らかとし、これらの経路をメディエートする分子を活性化する分子・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とし、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 UNC5A 遺伝子、TMPS 遺伝子、NEEP21 遺伝子を同定した。それぞれの遺伝子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。

さらにアデノウイルスベクターを構築し、様々な癌細胞株へ導入したところ、いずれの遺伝子においてもカスパーゼ3活性化依存的なアポトーシスを強力に誘導した。

UNC5A 遺伝子はディペンデンスレセプターに属するが、本来の発現組織である神経芽腫のみでなく、大腸癌や乳癌など、さまざまな上皮系悪性腫瘍において細胞死を誘導できた。

TMPS 遺伝子は、sushi domain を有する一回膜貫通型の膜タンパク質であるが、これまでのデスレセプターによる細胞死とは異なるメカニズムによって、細胞膜からのアポトーシスシグナルを伝達する。

NEEP21 遺伝子は、神経細胞におけるエンドサイトーシスに関与するタンパク質であるが、非神経細胞においてカスパーゼ活性化によるアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

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 遺伝子は様々なヒトがん細胞

株において高頻度にメチル化によって不活性化されていることが明らかとなった。メチル化によって Micap の欠失した細胞株では、ミトコンドリアの高度の機能不全が確認された。Micap 欠失細胞に Micap を導入したところ、強力な腫瘍増殖抑制活性を認めた。

D. 考察

UNC5A 遺伝子は、新規ディペンデンスレセプターとして、p53 細胞死経路の重要なメディエーターの一つと考えられる。ネトリンとの相互作用などの検討が、今後必要となると考えられる。また、非神経細胞におけるディペンデンスレセプターとしてのネトリンレセプターのヒト癌における包括的な解析を行う必要がある。

TMPS 遺伝子は、細胞膜に局在する膜タンパク質であるが、デスレセプターなどとは異なり、デスドメインは有していない。p53 細胞死経路における新規細胞死経路の仲介分子である可能性が高い。Sushiドメインを有しており、アポトーシス誘導のメカニズムの解明が今後重要と思われる。

NEEP21 遺伝子は、カスパーゼ依存性のアポトーシスを強力に誘導した。もともと神経細胞におけるエンドソーム関連タンパク質であることより、リソソーム関連細胞死の重要なメディエーターの一つと考えられる。また最近では、p53 のエンドサイトーシスによるレセプター型の増殖因子の分解機構で、腫瘍抑制に働く報告があり、今後は p53 のエンドサイトーシスにおけるメディエーターとしての機能についても検討が必要と思われる。

新規オートファジー関連蛋白質である Micap は、癌における不要なミトコンドリアを標的として、オートファジーによるミトコンドリアの品質管理に重要な働きを持つ。多くの癌で、メチル化によって不活性化されていることより、ヒト癌においては p53 の変異、あるいは Micap のメチル化によって、ミトコンドリアの品質管理が異常を起し、不良なミトコンドリアの蓄積を招いている可能性が高い。このことは、癌における好氣的解糖系が亢進しているという Warburg 効果を説明するメカニズムであると考えられる。この研究を推進することで、将来的に、癌における不良なミトコンドリアの機能を正常化することが、癌の増殖抑制を引き起こし、新しい癌治療法となり得る可能性を示唆している。

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。

癌におけるミトコンドリア機能については不明な点が多く、今回の研究成果から、癌における異常なミトコンドリアは癌特異的である可能性が高く、それを標的とした新しい癌治療法の開発の可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, Arakawa H, Nakamura Y, Matsuda K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene*, 28: 3081-3092, 2009

Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol*, 36: 1253-1260, 2010

Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain. *Oncol Rep* 2010 (in press)

Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. *Int J Oncol* 2010 (in press)

2. 学会発表

1. 二村学、宮本祐士、喜多村憲章、中村康之、宮本嵩史、金井弥栄、中西幸浩、森谷宣浩、荒川博文 第 68 回日本癌学会学術総会ポスター4-13 p53 関連遺伝子 (3) 演題「Micap のヒトがんにおける不活性化」

2. 宮本嵩史、尾野雅哉、荒川博文 第 68 回日本癌学会学術総会ポスター4-13 p53 関連遺伝子 (3) 演題「IP-2DICAL を用いた Micap 結合タンパク質の解析」

3. 荒川博文 第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム S16 がんとオートファジー 演題「ミトコンドリアの品質管理とがん」

日. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

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 国立がん研究センター研究所・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。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た RdRP 活性を検出する *in vitro* RdRP アッセイ系を確立した（Nature, Maida *et al.*, 2009）。新規酵素活性であるテロメラーゼの 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。昨年度までの 140 種類の化合物とは別に本年度は約 160 種類の化合物の中から、1 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。

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ラーゼ分子標的治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

テロメラーゼ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、大阪大学、立命館大学と共同研究契約を締結の上、分与を受けた、天然化合物あるいは合成化合物の中から、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。
（倫理面への配慮）特記事項なし。

C. 研究結果

約 160 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 1 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 1 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

テロメラーゼ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1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ラーズ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1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ズ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

Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, Masutomi K
An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 2009; 461: 230-235

毎田佳子, 増富健吉
ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼの発見とRNAサイレンシングへの関与
実験医学 28:439-443, 2010「カレントトピックス」

毎田佳子, 増富健吉
RNA依存性RNAポリメラーゼをめぐる新たな展望
Medical Science Digest 35:571-577, 2009
2009年12月号 特集「RNAと医薬品」
毎田佳子, 増富健吉
小分子RNAと疾患
BIO Clinica 24:718-723, 2009

2. 学会発表

Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase formed by hTERT and the RNA component of RNase MRP”

Joint Colloquium: “Current approaches and future

perspectives on the human genome, transcriptome and proteome” Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm, Jan 19, 2010(招待講演)

Masutomi K

“A Mammalian RNA Dependent RNA Polymerase Formed by hTERT and the RNA Component of RNase MRP”

2010 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Telomere Biology and DNA Repair”
RAVC Royal Pine Resort Ashmore, Queensland, Australia, October 9-14, 2009 (口頭発表)

Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase (RdRP) formed by hTERT and the RNA component of RNase MRP”

Cold Sprig Harbor Laboratory Meeting “Telomere and Telomerase” April 28-May 2, 2009 (口頭発表)

毎田佳子, 安川麻美, 岡本奈緒子, Vivi Kasim, Timo Lassmann, 林崎良英, 増富健吉
hTERT produces endogenous siRNA through its RNA dependent RNA polymerase activity
第32回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
2009年12月9日~12日 (口頭発表)

岡本奈緒子, 安川麻美, 毎田佳子, 工富知子, 深見希代子, William C. Hahn, 増富健吉
hTERTと核小体GTP結合タンパク質NS/GNL3Lによる腫瘍形成能の制御
第32回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
2009年12月9日~12日 (ポスター発表)

毎田佳子, 安川麻美, Vivi Kasim, Timo Lassmann, 岡本奈緒子, 林崎良英, William C. Hahn, 増富健吉
hTERTはRNA依存性RNAポリメラーゼ活性により内在性siRNAの産生に関与する
第68回日本癌学会総会 パシフィコ横浜
2009年10月1日~3日 (口頭発表)

岡本奈緒子, 安川麻美, 毎田佳子, 工富知子, 深見希代子, William C. Hahn, 増富健吉
hTERTと核小体GTP結合タンパク質GNL3L/NSは腫瘍形成能を制御する
第68回日本癌学会総会 パシフィコ横浜
2009年10月1日~3日 (口頭発表)

岡本奈緒子, 増富健吉

hTERT と核小体 GTP 結合タンパク質
Nucleostemin/GNL3L による腫瘍形成能の制御
第 2 回 SYMPHONY ホテルメトロポリタンエドモン
ト飯田橋

2009 年 9 月 12 日～13 日

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

PCT 移行

出願番号：米国仮特許 US61/188,743

出願人：廣橋説雄 他

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし