

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトがんで高頻度に変異・発現亢進・活性化している遺伝子を標的とした

新たな治療法の開発に関する研究

平成19-21年度 総合研究報告書

研究代表者 北林 一生

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
III. 研究成果の刊行物・別刷	13

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）
総合研究報告書

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を見出した。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から、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やマトリックス分解能に関わる CDCP1 蛋白質、酸化ストレス抵抗性に関わる新規蛋白質 Ossa、細胞間接着・運動能などに関わる ephrin-B1 などがどれも Src ファミリーの基質として転移・浸潤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。これらの分子の阻害は実際にマウスモデルで転移・浸潤などを抑制し、このような腫瘍特性に対する選択的な治療薬開発につながると考えられる。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、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すると共に、肺がんにおける Negative regulators の発現解析を行い、様々ながんにおいて Negative regulators が高発現していることがわかった。さらに、上記定量法を用いて、190 種類の低分子化合物をスクリーニングした結果、p53 と Mdmx との相互作用を阻害する化合物が得られ、その低分子化合物はがん細胞の増殖に対し、抑制的に働くことがわかった。そして、その抑制効果は、p53 依存的であり、Mdmx の過剰発現が原因で p53 が不活化しているがんの新たな治療法の開発に発展していくことが期待される。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 3 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。

腫瘍の悪性化に伴い活性化することが知られる Src ファミリーの基質として腫瘍の増殖異常や転移浸潤能に関わるチロシンリン酸化分子を明らかにして、それを媒介するチロシンキナーゼの基質分子の腫瘍における機能の詳細を明らかにするとともに、これらの分子のシグナルをブロックする系を確立する。このシグナルのブロックが *in vitro* の培養細胞系と *in vivo* のマウス転移モデルにおいて癌細胞に与える影響を解析することにより、腫瘍特異的な効果をもたらす分子標的治療のモデルを開発する。

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を開発を目指す。

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。

転移巣や転移性腫瘍株における特異的なチロシンリン酸化蛋白質を質量分析で解析することにより、腫瘍の悪性形質に関わる多くのリン酸化分子を見出ししてきた。その中で機能解析により重要性

が浮かび上がってきた、細胞接着・運動能・マトリックス分解などに関わる ephrin-B1、足場非依存性や浸潤能に関わる CDCP1、酸化ストレス抵抗性に関わる Ossa などの Src 基質分子を中心に、変異体や siRNA などを用いて *in vitro* の培養系や *in vivo* のマウス転移モデル機能解析や、分子標的としての有望性の評価を行った。

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 標的遺伝子の機能を解析した。 *in vivo* における抗腫瘍効果の評価を行った。これらの経路を活性化する分子・化合物の開発を試みた。 Negative regulators とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を調製し、p53 との結合実験に用いた。低分子化合物は、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。 Negative regulators の発現解析には、79 種類のヒト肺癌由来の細胞株から RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて定量した。

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、合成化合物中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。

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。

細胞相互作用に関わる ephrin-B1 は腫瘍間質相互作用においてもマトリックス分解や運動能などの機序で浸潤を誘導することを示した。ephrin-B1 の C 末を欠損する変異体の過剰発現や C 末領域の機能を競合的に阻害するペプチドの投与によりスキルス胃がんの腹膜播種が著明に抑制された。Ossa は PI3 キナーゼの制御によ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、スキルス胃がんでは Ossa の発現を抑制するとマウス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、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。

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 300 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 3 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 3 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。

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結果、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 を持つがん細胞にその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、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。一方、肺がん細胞株における Negative regulators の発現を解析したところ、様々な肺がん細胞株で様々な Negative regulators 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。ヒト急性骨髄性白血病患者における M-CSF 受容体の発現について FACS を用いた発現解析を行い、プロトコルが確立されれば国立がんセンター中央病院のルーチンの検査項目として急性骨髄性白血病患者全般を検査する。倫理委員会の審査承認後、急性骨髄性白血病の再発患者を対象にグリベックを用いた治療の臨床試験を行う。

固形腫瘍は正常細胞と違い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、我々の見出した ephrin-B1、Ossa、CDCP1 はどれも違う形でこの性質に関わっている。腫瘍における Src キナーゼの活性化はこのような分子の腫瘍特異的な活性化を介して転移・浸潤などの性質をもたらすと考えられた。

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 Miceap 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。

p53 を負に調節するタンパク質と p53 との結合を簡単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。また、肺がん細胞における Negative regulators の発現解析より、多くの肺がん細胞において種々の Negative regulators の発現増強が認められ、今後、Negative regulators の一つである Mdmx の過剰発現が原因で p53 が不活化しているがんの新たな治療法の開発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。

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、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が示された。

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 3 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 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 acetyltransferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Dev Biol.*, 329:176-190, 2009.

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.

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.

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

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

Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP ϵ

- induced expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007.
- 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 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
- 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
- Uekita, T., Tanaka, M., Takigahira, M., Miyazawa, Y., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Yanagihara, K. & Sakai, R. CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* 172: 1729-1739, 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
- 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
- Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T. & Sakai, R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 27:7649-7660, 2007
- Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R. & Sakai, R. Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J. Cell Sci.* 120 :2179-2189, 2007
- Tanaka, M., Kamata, R., Takigahira, M., Yanagihara, K. & Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* 171:68-78, 2007
- 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)

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

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

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

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

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

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

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

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:「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

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

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

発明者:北林一生

出願日:2007年12月12日出願番号:特願2007-321256

出願人:国立がんセンター総長

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
Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, <u>Kitabayashi I</u> .	PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2.	Nat Med	16	580-585	2010
Yokoyama A, Lin M, Naresh A, <u>Kitabayashi I</u> , 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
Yamagata K, <u>Kitabayashi I</u> .	Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX.	Biochem Biophys Res Commun	390	1355-1360	2009
Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, <u>Kitabayashi I</u> , 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
Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, <u>Kitabayashi I</u> , Kudo A.	Brapf1, 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
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/EBP ϵ 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.
Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S.	Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1.	Nature	446	685-689	2007.
Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I.	Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription.	<i>Oncogene</i> .	26	7231-7239	2007.
Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I.	PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP ϵ induced-expression in myeloid differentiation.	Mol. Cell. Biol.	27	5819-5834	2007.
Miyazawa, Y, Uekita, T, Hiraoka, N, Fujii, S, Kosuge, T, Kanai, Y, Nojima, Y, <u>Sakai, R</u>	CDCP1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation.	Cancer.Res..		In press	2010
Yamaguchi, H, Yoshida, S, Muroi E, Kawamura, M, Kouchi, Z, Nakamura, Y, <u>Sakai, R</u> , Fukami, K	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I α are required for invadopodia formation in human breast cancer cells.	Cancer Sci.		In press	2010
Tanaka, M, Kamata, R, Yanagihara, K, <u>Sakai, R</u>	Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide.	Cancer Sci.	101	87-93	2010
Futami, H, <u>Sakai, R</u>	RET protein promotes non-adherent growth of NB-39-nu neuroblastoma cell line.	Cancer Sci.	100	1034-9	2009
Azuma, K, Urano, T, Horie-Inoue, K, Hayashi, S, <u>Sakai, R</u> , Ouchi, Y, Inoue, S	RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis.	Cancer.Res.	69	2935-40	2009
Ikeda, J, Oda, T, Inoue, M, Uekita, T, <u>Sakai, R</u> , Okumura, M, Aozasa, K, Morii, E	Acetylation of PML is involved in histone deacetylase Inhibitor-mediated apoptosis.	Cancer Sci.	100	429-33	2009

Miyake, I, Ohira, M, Nakagawara, A, <u>Sakai, R</u>	Phosphorylation of Runx1 at Ser249, Ser266, and Ser276 is dispensable for bonemarrow hematopoiesis and thymocyte differentiation.	Oncogene	28	662-73	2009
Tanaka, M, Sasaki, K, Kamata, R, Hoshino, Y, Yanagihara, K, <u>Sakai, R</u>	Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBPe and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation.	Mol Cel. Biol.	29	402-13	2009
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	121-8	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 scirrhus carcinoma.	Am J Pathol.	172	1729-39	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	654-62	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	145-57	2008
Uekita, T, Jia, L, Narisawa-Saito, M, Yokota, J, Kiyono, T, <u>Sakai, R</u>	CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma.	Mol Cell Biol.	27	7649-60	2007
Tanaka, M, Sasaki, K, Kamata, R, <u>Sakai, R</u>	Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells.	J Cell Sci.	120	2179-89	2007
Tanaka, M, Kamata, R, Takigahira, M, Yanagihara, K, <u>Sakai, R</u>	Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhus carcinoma.	Am J Pathol.	171	68-78	2007
Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y, <u>Arakawa H.</u>	Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression	Cancer Res.	67	1451-1460	2007
Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, <u>Arakawa H</u> , Nakamura Y, Munnich A, Rotig A.	Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion.	Nat.Genet.	39	776-780	2007
Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K, <u>Arakawa H.</u>	B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis.	Cancer Sci.	99	2444-2454	2008
Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, <u>Arakawa H</u> , 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, <u>Arakawa H.</u>	Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis.	Int J Oncol	36	1253-1260	2010
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
Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, <u>Masutomi K</u>	An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA	Nature	461	230-235	2009
Masami Kodama, Chihiro Otsubo, Toru Hirota, Jun Yokota, <u>Masato Enari*</u> , and Yoichi Taya <u>*Corresponding author</u>	: Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences.	Mol. Cell. Biol.	30	1620-1633	2010
Hirokazu Ohata, Nobuyuki Ota, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Jun Yokota, Yoichi Taya and <u>Masato Enari*</u> <u>*Corresponding author</u>	Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation.	J. Mol. Biol.	394	460-471	2009
Kazuji Ohmori, Yoshie Endo, Yusuke Yoshida, Hirokazu Ohata, Yoichi Taya and <u>Masato Enari*</u> <u>*Corresponding author</u>	Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription.	Oncogene	27	2215-2227	2008
Yoshie Endo, Atsumi Sugiyama, Shun-Ai Li, Kazuji Ohmori, Hirokazu Ohata, Yusuke Yoshida, Masabumi Shibuya, Kohji Takei, <u>Masato Enari*</u> and Yoichi Taya <u>*Corresponding author</u>	Regulation of clathrin-mediated endocytosis by p53.	Genes to Cells	13	375-386	2008

急性骨髄性白血病 幹細胞を狙い治療

国立がん研究センター

子腫瘍学部長らは、ヒトの白血病の原因遺伝子を組み込んだマウスを使い、白血病が発症する仕組みを調べた。

その結果、M-ICSFというたんぱく質の受容体がある細胞を遺伝子操作で取り除くと、白血病の原因遺伝子があっても発症しないことを発見。この受容体を持つ細胞の中に、白血病を発症させる「がん幹細胞」が含まれていると結論づけた。

さらに、この受容体の働きを抑える薬剤を白血病のマウスに投与したところ、発症が抑えられ、生存日数も2倍ほどに延びたという。

米医学誌「ネイチャー・メディシン」(電子版)に発表した。
(福島慎吾)

国立がん研究センターなど日米の研究チームが、急性骨髄性白血病の発症にかかわる細胞に特徴的な受容体を見つけた。この受容体を目印にして細胞を取り除くことで発症を抑えることに、マウスの実験で成功した。再発を防ぐ治療法の開発につながる可能性がある。

同センターの北林一生・分

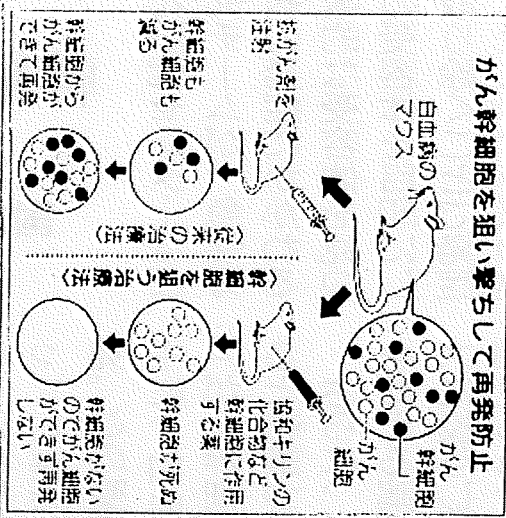
がん、幹細胞狙い再発防ぐ

「元凶」の研究相次ぎ成果

「がん幹細胞」と呼ぶ細胞の研究で成果が相次いでいる。国立がんセンターと協和発酵マリンは白血病のがん幹細胞の構造を解明し、マウスの実験ではこの細胞を特殊な化合物で死滅させることに成功した。東京医科歯科大学も胃がんのがん幹細胞を見つけた。がん幹細胞はがんを引き起こす元凶と考えられ、研究成果はいずれもがんの根治薬の開発につながりそうだ。

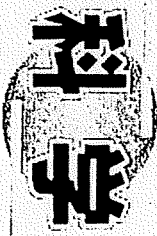
がんセンターと「白血病」で死滅 胃がんでも発見

国立がんセンターが研究 幹細胞、急性骨髄性白血病の北林一平部長が発病は治療しても再発するから取り除き、がん細胞幹細胞を白血病のマウスにばく質ができた細胞が体内で増えたマウスはすべて白血病になった。研究チームは協和発酵マリンが開発したM-1化合物を白血病のマウスに注射した。がん幹細胞が



がん幹細胞 遺伝子の発現によって生じることが年々白血病で見つかり、乳がんや悪性腫瘍にも存在することが分かった。現在は肝臓がんや胃がんなどの他のがんでも研究が進む。がん幹細胞を標的にできれば、根治薬が実現すると考えられている。

死滅した結果、がん細胞にもがん幹細胞があることを確認した。患者から採取した腫瘍(しゅよう)をたばく質も多量に含むことを発見した。研究チームは、がん幹細胞からとらないマウスに移植。がん幹細胞が生まれるマウスにできた腫瘍を取らせたマウスに比べ生存期の一部を免疫機能の低下で3倍に延びた。国立がんセンターの北林部長は「がん幹細胞をただごとで再発を防ぎたい」と再発を防ぐ治療につながることを目指している。今後、化合物を改良して治療の実現を目指す。東京医科歯科大学の深町博史講師は、胃がんに関する細胞の目的(た)は



「M-1-SFR」というたんぱく質がある。正

常なマウスでも、このたんぱく質ができた細胞が体内で増えたマウスはすべて白血病になった。研究チームは協和発酵マリンが開発したM-1化合物を白血病のマウスに注射した。がん幹細胞が

がん幹細胞 遺伝子の発現によって生じることが年々白血病で見つかり、乳がんや悪性腫瘍にも存在することが分かった。現在は肝臓がんや胃がんなどの他のがんでも研究が進む。がん幹細胞を標的にできれば、根治薬が実現すると考えられている。

PU.1-mediated upregulation of *CSF1R* is crucial for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2

Yukiko Aikawa¹, Takuo Katsumoto¹, Pu Zhang², Haruko Shima¹, Mika Shino¹, Kiminori Terui³, Etsuro Ito³, Hiroaki Ohno⁴, E Richard Stanley⁵, Harinder Singh⁶, Daniel G Tenen^{2,7} & Issay Kitabayashi¹

Leukemias and other cancers possess self-renewing stem cells that help to maintain the cancer^{1,2}. Cancer stem cell eradication is thought to be crucial for successful anticancer therapy. Using an acute myeloid leukemia (AML) model induced by the leukemia-associated monocytic leukemia zinc finger (MOZ)-TIF2 fusion protein, we show here that AML can be cured by the ablation of leukemia stem cells. The MOZ fusion proteins MOZ-TIF2 and MOZ-CBP interacted with the transcription factor PU.1 to stimulate the expression of macrophage colony-stimulating factor receptor (*CSF1R*, also known as M-CSFR, c-FMS or CD115). Studies using PU.1-deficient mice showed that PU.1 is essential for the ability of MOZ-TIF2 to establish and maintain AML stem cells. Cells expressing high amounts of *CSF1R* (*CSF1R*^{high} cells), but not those expressing low amounts of *CSF1R* (*CSF1R*^{low} cells), showed potent leukemia-initiating activity. Using transgenic mice expressing a drug-inducible suicide gene controlled by the *CSF1R* promoter, we cured AML by ablation of *CSF1R*^{high} cells. Moreover, induction of AML was suppressed in *CSF1R*-deficient mice and *CSF1R* inhibitors slowed the progression of MOZ-TIF2-induced leukemia. Thus, in this subtype of AML, leukemia stem cells are contained within the *CSF1R*^{high} cell population, and we suggest that targeting of PU.1-mediated upregulation of *CSF1R* expression might be a useful therapeutic approach.

Chromosomal translocations that involve the *MOZ* gene³ (official gene symbol *Mys13*) are typically associated with acute myelomonocytic leukemia and predict a poor prognosis⁴. Whereas MOZ is essential for the self-renewal of hematopoietic stem cells^{5,6}, MOZ fusion proteins enable the transformation of non-self-renewing myeloid progenitors into leukemia stem cells⁷. We previously generated a mouse model for AML by introducing c-Kit⁺ mouse myeloid stem/progenitor cells infected with a retrovirus encoding MOZ-TIF2 and EGFP into lethally irradiated mice⁸.

To identify leukemia-initiating cells (LICs), we investigated the bone marrow cells of these mice for various cell surface markers by FACS analysis. *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cells were present in the bone marrow (Fig. 1a) and expressed equivalent amounts of MOZ-TIF2

protein (Fig. 1b). To determine the LIC activity of these cell populations, we isolated *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cells by cell sorting and transplanted limited numbers (10 to 1×10^4 cells) into irradiated mice. One hundred *CSF1R*^{high} cells were sufficient to induce AML in all transplanted mice (Fig. 1c). Conversely, no mice developed AML after 1×10^5 *CSF1R*^{low} cells were transplanted per mouse, and only half of the mice developed AML with delayed onset when 1×10^4 *CSF1R*^{low} cells were transplanted (Fig. 1d). Thus, the *CSF1R*^{high} cells showed a >100-fold stronger LIC activity than *CSF1R*^{low} cells.

FACS analysis indicated that the *CSF1R*^{high} cell population had the phenotype of both granulocyte-macrophage progenitors (GMPs, Kit⁺Sca-1⁺CD16/CD32⁺) and differentiated monocytes (Mac-1^{low}Gr-1⁺) (Supplementary Fig. 1a). Comparison of the *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cell populations indicated that Mac-1 expression was lower in *CSF1R*^{high} than in *CSF1R*^{low} cells (Fig. 1e). However, we did not observe significant differences between the *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cell populations with respect to their cell morphology (Fig. 1f), colony-forming ability in methylcellulose medium (Fig. 1g), cell cycle distribution (Supplementary Fig. 1b) or homeobox A9 (*HoxA9*) expression (Supplementary Fig. 1c). To investigate whether downstream pathways of *CSF1R* signaling were activated, we measured phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cells. STAT5 was highly phosphorylated in the *CSF1R*^{high} cell population but not in the *CSF1R*^{low} population, whereas ERK was equivalently phosphorylated in the two cell populations (Fig. 1h).

Side population cells, which are present in some types of normal and malignant stem cell populations, were present in the bone marrow of MOZ-TIF2-induced AML mice (Supplementary Fig. 2a). Whereas most side population cells were *CSF1R*^{high}, the non-side population fraction contained both *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cells (Supplementary Fig. 2b). LICs were approximately tenfold more enriched in the side population fraction than in the non-side population fraction (Supplementary Fig. 2c,d). Because the side population fraction was very small (~0.12% of total bone marrow cells), the fraction of LICs in the side population fraction was also small (~1% of all LICs), and most LICs were present in the non-side population fraction (~99%).

¹Molecular Oncology Division, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan. ²Harvard Stem Cell Institute, Boston, Massachusetts, USA. ³Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan. ⁴Pharmacological Research Laboratories, Research Division, Kyowa Hakkō Kirin, Gunma, Japan. ⁵Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA. ⁶Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA. ⁷Cancer Science Institute, National University of Singapore, Singapore. Correspondence should be addressed to I.K. (ikitabay@ncc.go.jp).

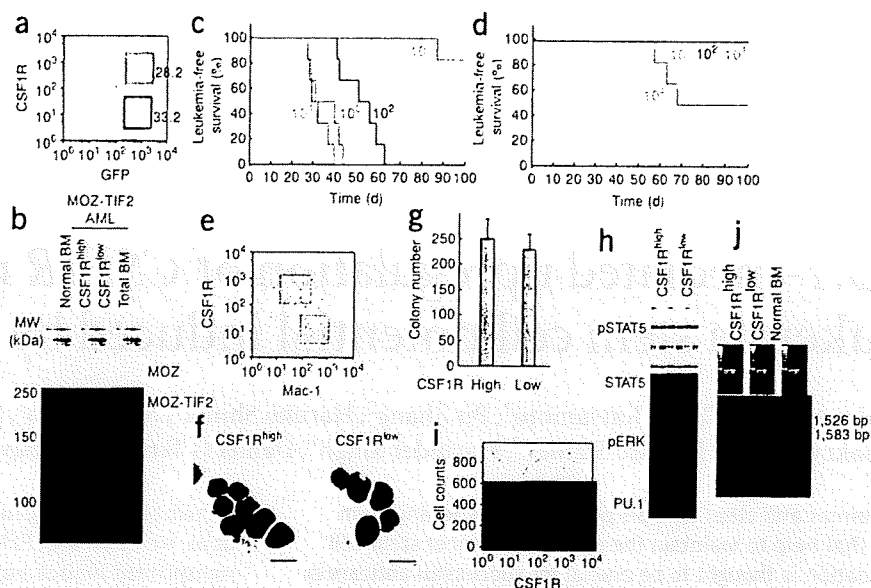
Received 11 January; accepted 18 February; published online 25 April 2010; doi:10.1038/nm.2122

Figure 1 CSF1R^{high} cells show potent leukemia-initiating activity. (a) FACS analysis of bone marrow cells from mice with MOZ-TIF2-induced AML for expression of GFP and CSF1R. The red and black boxes signify CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cell fractions, respectively.

(b) Immunoblot analysis of MOZ-TIF2 expression in CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cell populations (sorted by flow cytometry) with a MOZ-specific antibody. MW, molecular weight; BM, bone marrow. (c,d) Leukemia-free survival after the indicated numbers of flow-sorted CSF1R^{high} (c) and CSF1R^{low} (d) cells were transplanted into sublethally irradiated mice.

$n = 6$, $P = 0.0001$ (1×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6) and 0.3173 (1×10^5) (CSF1R^{high} versus CSF1R^{low} cells). (e) FACS analysis of Mac-1 and CSF1R expression in bone marrow cells from mice with MOZ-TIF2-induced AML. The red and blue boxes signify CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cell fractions, respectively.

(f-h) CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cells were sorted and analyzed for morphology by staining with May-Giemsa (f), colony-forming activity in methylcellulose medium (g) and levels of total and phosphorylated STAT5, phosphorylated ERK and PU.1 (h). Scale bars represent $10 \mu\text{m}$ in f. The error bars represent s.d. in g. (i) FACS analysis of CSF1R expression in bone marrow cells from an individual with AML with a t(8;16) translocation; the cells were cultured for 3 d in 10 ng ml^{-1} human M-CSF. (j) RT-PCR analysis of MOZ-CBP transcripts in CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cells of the individual with t(8;16) AML. The results are representative of 25 (a,e), four (b), three (c,d,f-h) and two (i,j) independent experiments.



To determine whether a high level of CSF1R expression also occurs in human AML cells with MOZ translocations, we investigated CSF1R expression in bone marrow cells from a subject with AML harboring a t(8;16) translocation, yielding a MOZ-CREB-binding protein (CBP, encoded by the *Ctcbp* gene) fusion⁹. FACS analysis indicated that both CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cells were present among the bone marrow cells with this translocation (Fig. 1i). We detected MOZ-CBP fusion transcripts in both the CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cell populations (Fig. 1j).

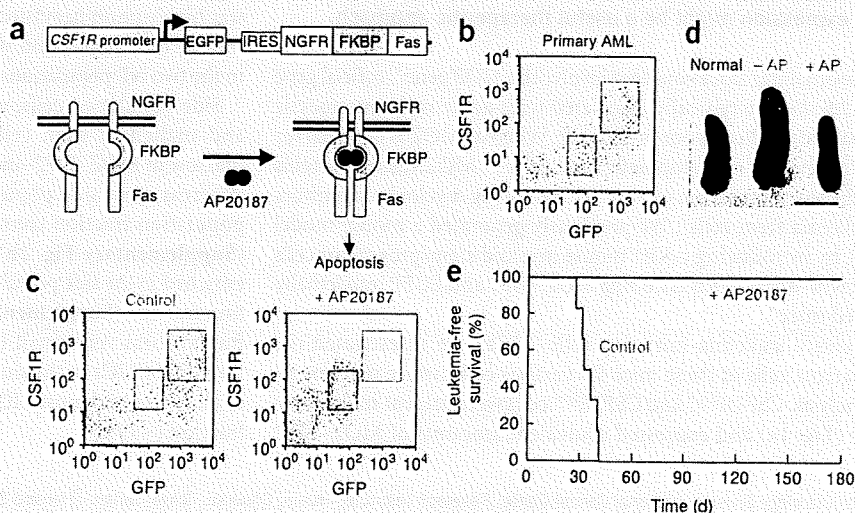
These results suggest that leukemia stem cells in this subtype of AML express a high amount of CSF1R, indicating that leukemia might be cured by inducing apoptosis of CSF1R^{high} cells. To test this idea, we used transgenic mice expressing a drug-inducible FKBP-Fas suicide gene and EGFP under the control of the

CSF1R promoter¹⁰ (Fig. 2a). The suicide gene products are inactive monomers under normal conditions but can be activated by injection of the AP20187 dimerizer, inducing apoptosis of cells expressing high amounts of CSF1R¹⁰. We infected c-Kit⁺ bone marrow cells of transgenic mice with the MOZ-TIF2 retrovirus and transplanted them into lethally irradiated wild-type mice. These mice developed AML ~2 months after transplantation. In the bone marrow of these mice, we observed morphologically indistinguishable CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cells. As expected, endogenous CSF1R expression was proportional to EGFP and FKBP-Fas expression (Fig. 2b and Supplementary Fig. 3a).

Next, we transplanted the bone marrow cells of these AML mice (1×10^5 cells per mouse) into secondary sublethally irradiated recipient mice. Seven days after transplantation, we injected the mice with

Figure 2 Cure of AML by ablation of CSF1R^{high} cells.

(a) Top, structure of the CSF1R promoter-EGFP-NGFR-FKBP-Fas suicide construct. Bottom, schematic showing the activation of the NGFR-FKBP-Fas fusion protein: in transgenic mice carrying this suicide construct, ablation of cells expressing high levels of CSF1R can be induced by exposure to the AP20187 dimerizer. (b) FACS analysis of GFP and CSF1R expression in bone marrow cells of mice with AML 2 months after the transplantation of MSCV-MOZ-TIF2-IRES-GFP-transfected bone marrow cells derived from transgenic mice into lethally irradiated C57BL/6 mice. The red boxes signify CSF1R^{high} and CSF1R^{low} cell fractions. (c-e) Bone marrow cells (1×10^5) of primary transplanted mice with AML, generated as in b, were transplanted into sublethally irradiated C57BL/6 mice. Administration of AP20187 or solvent (control) to the secondary transplanted mice was started by intravenous injection 3 weeks after transplantation. Expression of GFP and CSF1R in bone marrow cells (c) and spleen sizes (d) were analyzed 4 weeks after transplantation. Scale bars, 1 cm. (e) Leukemia-free survival of the untreated ($n = 6$) and AP20187-treated ($n = 6$) secondary transplanted mice. $P < 0.0001$. The results are representative of five (b), four (c) and three (d,e) independent experiments.



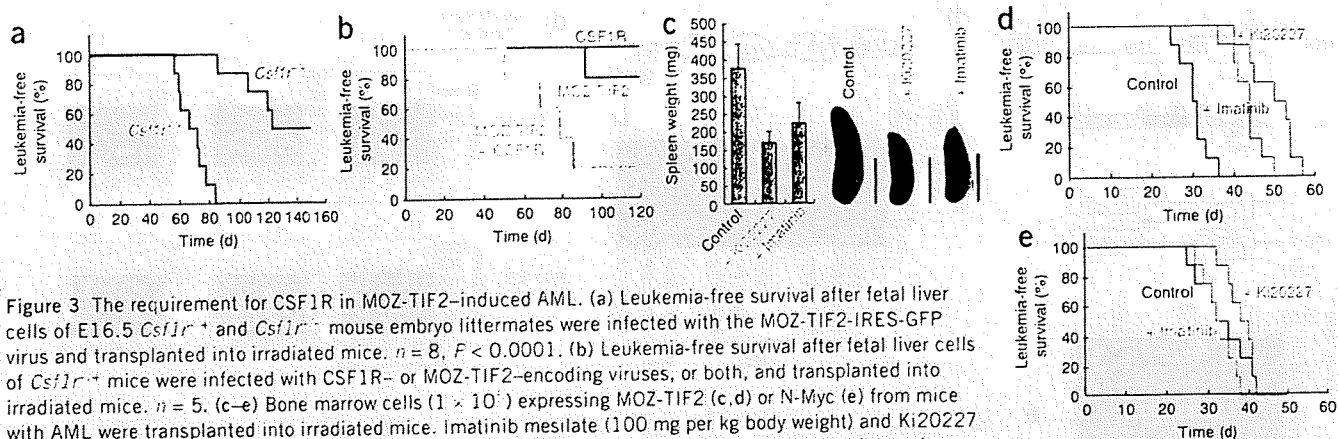


Figure 3 The requirement for CSF1R in MOZ-TIF2-induced AML. (a) Leukemia-free survival after fetal liver cells of E16.5 *Csflr*^{+/+} and *Csflr*^{-/-} mouse embryo littermates were infected with the MOZ-TIF2-IRES-GFP virus and transplanted into irradiated mice. $n = 8$, $P < 0.0001$. (b) Leukemia-free survival after fetal liver cells of *Csflr*^{-/-} mice were infected with CSF1R- or MOZ-TIF2-encoding viruses, or both, and transplanted into irradiated mice. $n = 5$. (c–e) Bone marrow cells (1×10^6) expressing MOZ-TIF2 (c, d) or N-Myc (e) from mice with AML were transplanted into irradiated mice. Imatinib mesilate (100 mg per kg body weight) and Ki20227 (20 mg per kg body weight) were administered twice daily. The micrographs depict spleen sizes of the mice transplanted with MOZ-TIF2-expressing cells, analyzed three weeks after transplantation (c). Scale bars, 1 cm. (d, e) Leukemia-free survival of the control and drug-treated mice was analyzed. In d, $n = 8$, $P < 0.0001$ (control versus + Ki20227 and control versus + imatinib). In e, $n = 8$, $P = 0.3825$ (control v.s. + Ki20227) and 0.4051 (control versus + imatinib).

AP20187 or a control solvent, as previously described¹⁰. We observed an increase in the number of CSF1R^{high} cells (Fig. 2c) and splenomegaly (Fig. 2d) in the control-treated mice 3 weeks after transplantation. However, we detected neither CSF1R^{high} cells nor splenomegaly in the AP20187-treated mice after a 1-week course of treatment (Fig. 2c, d). Although we observed CSF1R^{low} cells in the bone marrow and peripheral blood after the 1-week treatment course, we did not detect these cells after three months of treatment (Fig. 2c and Supplementary Fig. 3b). All control-treated mice developed AML 4–6 weeks after transplantation, but none of the AP20187-treated mice died of AML within 6 months of transplantation (Fig. 2e). These results indicate that ablation of the CSF1R^{high} cells was sufficient to cure MOZ-TIF2-induced AML, and that a high level of CSF1R expression is a key contributor to leukemia stem cell potential.

As it has been reported that N-Myc overexpression rapidly causes AML in mice¹¹, we next tested the specificity of the requirement for CSF1R^{high} cells in AML progression. We transfected the bone marrow cells of suicide gene-expressing transgenic mice with a retrovirus encoding N-Myc and EGFP, and transplanted the cells into lethally irradiated recipient mice, which developed AML. In these mice, GFP⁺ leukemia cells were Mac1⁺Gr1⁺CSF1R⁻ blast cells (Supplementary Fig. 4a, b), and treatment with AP20187 did not affect AML induction (Supplementary Fig. 4c). These results indicate a specific role of CSF1R expression in MOZ-TIF2-induced AML.

To investigate the role of CSF1R in the development of MOZ-TIF2-induced AML, we infected wild-type and *Csflr*^{-/-} (ref. 12) mouse fetal liver cells of embryonic day 16.5 (E16.5) littermate embryos with the MOZ-TIF2 virus and transplanted them into lethally irradiated mice. All mice transplanted with wild-type cells developed AML within 3 months (Fig. 3a). In contrast, AML induction was initially suppressed in mice transplanted with *Csflr*^{-/-} cells, but half of the mice developed AML after a longer latency period (Fig. 3a). The suppression of AML was rescued by co-infection with the retrovirus encoding CSF1R (Fig. 3b). STAT5, which was highly phosphorylated in CSF1R^{high} cells but not in CSF1R^{low} cells (Fig. 1h), was phosphorylated in the bone marrow of recipient mice transplanted with *Csflr*^{+/+} cells but not with *Csflr*^{-/-} cells (Supplementary Fig. 5). To test the specificity of the requirement of CSF1R for AML induction by MOZ-TIF2, we transfected *Csflr*^{+/+} and *Csflr*^{-/-} fetal liver cells with the retrovirus encoding N-Myc and transplanted them into irradiated

recipient mice. All of the mice transplanted with either *Csflr*^{+/+} or *Csflr*^{-/-} cells expressing N-Myc developed AML (Supplementary Fig. 4d). These results indicate that CSF1R has a key role in AML induction by MOZ-TIF2, but not by N-Myc.

The above results suggest that signaling through CSF1R might be a therapeutic target for kinase inhibitors in leukemogenesis induced by MOZ fusions. To test this, we used the CSF1R-specific inhibitor Ki20227 (ref. 13) and the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (ST1571), which inhibits CSF1R^{14–16}. Oral administration of Ki20227 or imatinib inhibited MOZ-TIF2-induced splenomegaly (Fig. 3c) and slowed MOZ-TIF2-induced AML onset (Fig. 3d). However, the drugs did not affect the progress of N-Myc-induced AML (Fig. 3e).

Next, we investigated the molecular mechanism of CSF1R expression in the leukemia cells. Monocyte-specific expression of CSF1R is reportedly regulated by transcription factors such as AML1, PU.1 and CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs)¹⁷. We previously found that MOZ interacts with AML1 and PU.1, but not with C/EBP α or C/EBP ϵ , to stimulate transcription of their target genes^{5, 18}. Deletion analysis indicated that PU.1 interacted with the N-terminal and central regions of MOZ (Fig. 4a and Supplementary Fig. 6), and that the acidic amino acid-rich region (DE region) of PU.1 was required for its high-affinity interaction with MOZ (Fig. 4a and Supplementary Fig. 7a–d). Although binding of PU.1 to N-terminal MOZ (amino acids 1–513) was inhibited by several deletions in the PU.1 protein (Supplementary Fig. 7c), binding to full-length MOZ was not completely inhibited by these deletions (Supplementary Fig. 7b), suggesting that there may be other PU.1-binding sites in MOZ, its associated proteins or both. A pull-down assay with *Escherichia coli*-produced GST-PU.1 or GST-AML1 and *in vitro*-produced N-terminal MOZ indicated a direct interaction between both PU.1 and MOZ and between AML1 and MOZ (Supplementary Fig. 8). However, we cannot rule out a possibility that other factors may facilitate interactions between PU.1 or AML1 and MOZ *in vivo*.

To investigate transcriptional regulation of CSF1R, we performed reporter analysis with a CSF1R promoter-luciferase construct and found that MOZ, MOZ-TIF2 and MOZ-CBP could all activate the CSF1R promoter in the presence of PU.1 but not in the presence of AML1 (Fig. 4b). Moreover, MOZ, MOZ-TIF2 and MOZ-CBP did not activate a CSF1R promoter mutant lacking PU.1-binding sites (Fig. 4c). These results suggest that MOZ and MOZ fusion

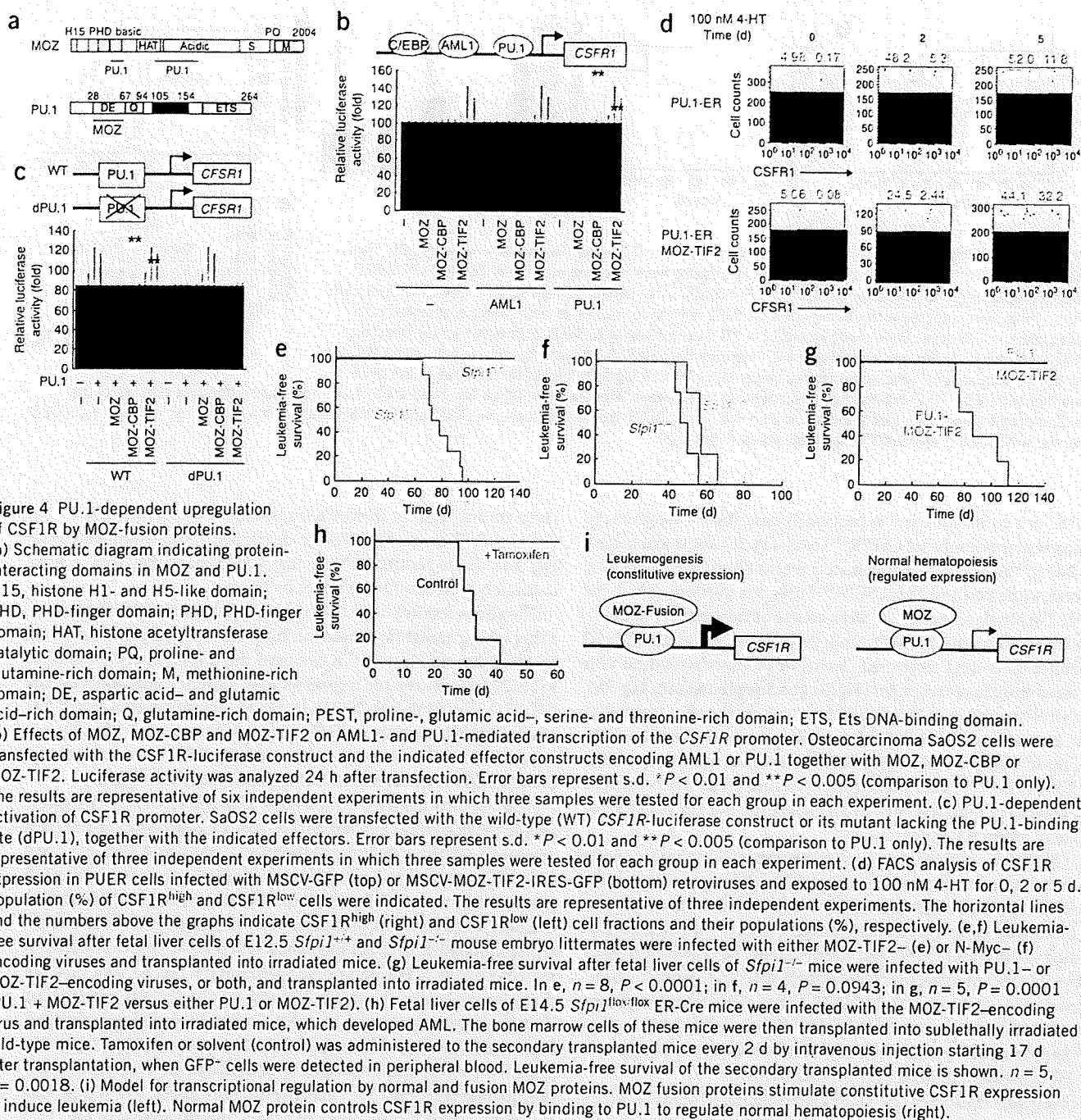


Figure 4 PU.1-dependent upregulation of CSF1R by MOZ-fusion proteins.

(a) Schematic diagram indicating protein-interacting domains in MOZ and PU.1. H15, histone H1- and H5-like domain; PHD, PHD-finger domain; HAT, histone acetyltransferase catalytic domain; PQ, proline- and glutamine-rich domain; M, methionine-rich domain; DE, aspartic acid- and glutamic acid-rich domain; Q, glutamine-rich domain; PEST, proline-, glutamic acid-, serine- and threonine-rich domain; ETS, Ets DNA-binding domain.

(b) Effects of MOZ, MOZ-CBP and MOZ-TIF2 on AML1- and PU.1-mediated transcription of the *CSF1R* promoter. Osteocarcinoma SaOS2 cells were transfected with the *CSF1R*-luciferase construct and the indicated effector constructs encoding AML1 or PU.1 together with MOZ, MOZ-CBP or MOZ-TIF2. Luciferase activity was analyzed 24 h after transfection. Error bars represent s.d. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.005$ (comparison to PU.1 only). The results are representative of six independent experiments in which three samples were tested for each group in each experiment. (c) PU.1-dependent activation of *CSF1R* promoter. SaOS2 cells were transfected with the wild-type (WT) *CSF1R*-luciferase construct or its mutant lacking the PU.1-binding site (dPU.1), together with the indicated effectors. Error bars represent s.d. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.005$ (comparison to PU.1 only). The results are representative of three independent experiments in which three samples were tested for each group in each experiment. (d) FACS analysis of *CSF1R* expression in PUER cells infected with MSCV-GFP (top) or MSCV-MOZ-TIF2-IRES-GFP (bottom) retroviruses and exposed to 100 nM 4-HT for 0, 2 or 5 d. Population (%) of *CSF1R*^{high} and *CSF1R*^{low} cells were indicated. The results are representative of three independent experiments. The horizontal lines and the numbers above the graphs indicate *CSF1R*^{high} (right) and *CSF1R*^{low} (left) cell fractions and their populations (%), respectively. (e, f) Leukemia-free survival after fetal liver cells of E12.5 *Spil*^{+/+} and *Spil*^{-/-} mouse embryo littermates were infected with either MOZ-TIF2- (e) or N-Myc- (f) encoding viruses and transplanted into irradiated mice. (g) Leukemia-free survival after fetal liver cells of *Spil*^{-/-} mice were infected with PU.1- or MOZ-TIF2-encoding viruses, or both, and transplanted into irradiated mice. In e, $n = 8$, $P < 0.0001$; in f, $n = 4$, $P = 0.0943$; in g, $n = 5$, $P = 0.0001$ (PU.1 + MOZ-TIF2 versus either PU.1 or MOZ-TIF2). (h) Fetal liver cells of E14.5 *Spil*^{lox/lox} ER-Cre mice were infected with the MOZ-TIF2-encoding virus and transplanted into irradiated mice, which developed AML. The bone marrow cells of these mice were then transplanted into sublethally irradiated wild-type mice. Tamoxifen or solvent (control) was administered to the secondary transplanted mice every 2 d by intravenous injection starting 17 d after transplantation, when GFP⁺ cells were detected in peripheral blood. Leukemia-free survival of the secondary transplanted mice is shown. $n = 5$, $P = 0.0018$. (i) Model for transcriptional regulation by normal and fusion MOZ proteins. MOZ fusion proteins stimulate constitutive *CSF1R* expression to induce leukemia (left). Normal MOZ protein controls *CSF1R* expression by binding to PU.1 to regulate normal hematopoiesis (right).

proteins activate *CSF1R* transcription in a PU.1-dependent manner. It was recently reported that although chromatin reorganization of *Csf1r* requires prior PU.1 expression together with AML1 binding, stable transcription factor complexes and active chromatin can be maintained at the *Csf1r* locus without AML1 once the full hematopoietic program has been established¹⁹. This might explain why we found that AML1 was not required for MOZ-TIF2-mediated activation of *Csf1r*. Deletion analysis indicated that the DE-rich, Q-rich and ETS DNA-binding domains of PU.1, as well as the histone H1 and H5-like (H15) and the central PU.1-binding domains of MOZ and MOZ fusion proteins, are required for the activation of *CSF1R* transcription (Supplementary Figs. 7e and 9). A truncated version of MOZ (1–1518) lacking the C-terminal region failed to

activate transcription, indicating that the transcriptional activity of MOZ-TIF2 and MOZ-CBP, which do not contain that C-terminal region, requires the TIF2 or CBP portion of the fusion protein.

To test the requirement of PU.1 for the expression of endogenous *CSF1R*, we used PU.1-deficient (*Spil*^{-/-}) myeloid progenitors expressing the PU.1-estrogen receptor fusion protein (PUER). Upon restoration of PU.1 activity by exposure to 4-hydroxytamoxifen (4-HT), PUER cells can differentiate into macrophages²⁰. We infected PUER cells with the MOZ-TIF2 retrovirus or control retrovirus, sorted them for GFP expression and cultured the GFP⁺ cells in the presence of 4-HT. The results of FACS (Fig. 4d) and quantitative RT-PCR (Supplementary Fig. 10) analyses indicated that *CSF1R* expression was induced after exposure to 4-HT, and that MOZ-TIF2 enhanced