

2010|9027A

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

造血器悪性腫瘍及び転移性がんで高頻度に異常を来している遺伝子を
標的とした新たな治療法の開発に資する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北林 一生

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
造血器悪性腫瘍及び転移性がんで高頻度に異常を来している遺伝子を標的とした新たな治療法の開発に資する研究	1
II. 分担研究報告	
1. 難治性白血病治療薬の開発に関する研究	7
北林一生	
2. アポトーシス誘導因子及びシグナル伝達因子を標的としたがん治療法の開発に関する研究	9
直江 知樹	
3. 幹細胞を標的とした白血病根治療法の開発	11
赤司 浩一	
4. チロシンキナーゼ基質分子を標的とした腫瘍特性の制御	13
堺 隆一	
5. チロシンホスファターゼの異常と発がん、浸潤・転移	16
的崎 尚	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	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

造血器悪性腫瘍及び転移性がんを高頻度に異常を来している遺伝子を標的とした
新たな治療法の開発に資する研究

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(AML)幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 および M-CSFR を同定した。Tim-3 および M-CSFR は大多数の AML 幹細胞に高発現しているが、正常造血幹細胞に発現を認めず、理想的な標的候補と考えられた。M-CSF 受容体特異的の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。Tim-3 陽性細胞株に殺細胞効果を有する抗 Tim-3 抗体を作成し、AML を再構築させたマウスで有効性を検証している。急性リンパ性白血病(ALL)の一部症例において認められる融合癌遺伝子 PAX5-PML が、B 細胞分化のマスター遺伝子である PAX5 に対しドミナントネガティブに作用しその転写活性を抑制する事を示した。一方、PAX5-PML は PML に対してもその細胞内局在を変化させ、PML nuclear body を破壊することで、そのアポトーシス誘導能を阻害している事も示した。これらの結果から PAX5-PML が B 細胞に対して分化障害を起こしつつアポトーシス抵抗性を与える事が ALL 発症の原因である事が示唆された。固形腫瘍の足場非依存性と転移性に関わる CDCP1 は、運動能や細胞外基質の分解能も制御し、また肺がんに加え脾がんの系でも CDCP1 高発現群が低発現群と比較して有意に予後が不良であることが明らかになった。胃がんの腹膜播種部位に発現する ARAP3 はリン酸化によって播種を抑制する働きがあることを示した。チロシンホスファターゼ (PTP) の異常が発がんやがんの浸潤・転移にどのように関わっているかにつき研究を行ったところ、受容体型 PTP である SAP-1 が Src ファミリーチロシンキナーゼと結合し活性化することを明らかにした。また、Shp2 の結合分子 SIRP α はマクロファージによる食食を負に制御するが、SIRP α 遺伝子 KO マウスでは、がん細胞表面抗原抗体による腫瘍排除が増強した。

分担研究者

直江 知樹 (名古屋大学大学院・医学系研究科・教授)

赤司 浩一 (九州大学大学院・医学系研究科・教授)

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)

的崎 尚 (群馬大学生体調節研究所・バイオシグナル分野・客員教授)

A. 研究目的

近年の診断技術や治療法の進歩により多くのがんで生存率が上昇したが、難治性がんに対しては長期生存率に大きな改善が見られていない。これは、このような難治性がんでは再発や転移が頻繁に生じることが最大の原因である。再発の主な要因は治療耐性を示すがん幹細胞が残存するためであると考えられ、また、転移・浸潤能の獲得にチロシンリン酸化シグナルが関与することが示されている。本研究では、特に再発や転移に深く関与するがん幹細胞やチロシンリン酸化シグナルの制

御に関わる分子を標的とした造血器腫瘍や転移性がんに対する新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

マルチカラー・フローサイトメトリーにより単離された高純度正常造血幹細胞および AML 幹細胞 (CD34+CD38-Lin⁻ 分画) を用いて、microarray により AML 幹細胞に特異的に高発現する分子を網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較して AML 幹細胞に高発現する細胞表面抗原 M-CSFR および Tim-3 を同定した。実際の AML 検体におけるこれらの発現頻度を調べるとともに、M-CSFR 阻害剤および抗ヒト Tim-3 抗体の作製を行い、その殺白血病効果を検討した。

PAX5 の転写活性に対する PAX5-PML の作用を検討した。また PAX5-PML 安定発現株を作成し、その細胞における PML NB、アポトーシス抵抗性の変化を観察し、亜硫酸投与の効果を検討した。STAT3 阻害剤候補物質 OPB-31121 を *ex vivo* で各種細胞株に投与し増殖抑制効果を検討した。また OPB-31121

を添加して培養した細胞の溶解液を用いて、STAT3 及びその上流キナーゼのリン酸化の状態を検討した。またその細胞溶解液から STAT3 を免疫沈降し、その STAT3 を *in vitro* でリン酸化する反応を行い、その系における OPB-31121 の作用を調べた。

肺がん細胞の足場非依存性と転移性に関わるチロシンリン酸化蛋白質として同定した CDCP1 の膵臓がんの臨床サンプルにおける発現解析と、膵臓がん細胞における機能解析を行った。またスキルス胃がんの腹膜播種マウスモデルにおいて、腹膜播種に際してチロシンリン酸化の変化する分子として ARAP3 を同定し、その機能解析を行った。マウスの *in vivo* イメージングモデルを用いて、Src 基質群の遠隔転移制御能を評価する系を樹立する。

SAP-1 の遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製し、この腸上皮細胞よりチロシンリン酸化レベルが高度である蛋白質を生化学的に分析した。さらに、この脱チロシンリン酸化基質と結合する分子を解析した。SAP-1 および構造的に類似な PTP である VE-PTP のチロシンリン酸化の有無を検討し、他の分子と会合する可能性を検討した。また、マウス悪性黒色腫細胞株 (B16 メラノーマ) 接種による肺転移モデルにおいて、抗体依存性の細胞障害 (ADCC) 活性を有する抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除を検討した。この効果における SIRP α の関与を明らかにするため、SIRP α KO マウスを用いた腫瘍排除を検討した。さらに、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗 SIRP α モノクローナル抗体が ADCC 活性を増強できるか否かにつき検討を行った。

C. 研究結果

正常ヒト造血細胞における Tim-3 の発現分布と生理的機能を解析した。ヒト末梢血の顆粒球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞では Tim-3 の発現は認めず、単球のみ高発現を認めた。骨髄中の CD34⁺CD38⁺前駆細胞に遡って Tim-3 の発現を検討したところ、骨髄球系共通前駆細胞と巨核球・赤芽球系前駆細胞には Tim-3 は発現していないが、顆粒球・単球系前駆細胞 (GMP) の一部に Tim-3 陽性分画を認めた。Tim-3 陽性および陰性 GMP を純化して、その分化能を検討したところ、Tim-3 陰性 GMP から単球系・顆粒球細胞に分化したが、Tim-3 陽性 GMP は単球系細胞のみ生じた。すなわち Tim-3 は単球系前駆細胞の段

階で発現を開始しているため、Tim-3 抗体は正常造血幹細胞を障害しないことが併せて明らかとなった。次に AML の FAB 分類別に解析症例数を拡大して、Tim-3 の発現パターンを解析した。AML-M3 を除くすべての FAB タイプ全症例の AML 幹細胞において Tim-3 の高発現を認めた。すなわち、Tim-3 は AML に対して理想的な標的治療候補であることが示された。また、マウスにヒト Tim-3 タンパクを免疫することで、抗ヒト Tim-3 マウス IgG2a 抗体を純化・精製することに成功した (ATIK2a)。ATIK2a は Tim-3 を遺伝子導入した細胞株に対して、高い殺細胞効果を有することを確認した。現在は AML サンプルをマウスに移植し、ヒト AML が再構築されたマウスにおいて ATIK2a による分子標的治療の開発を実行している。

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た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。

PAX5-PML はルシフェラーゼアッセイにおいて PAX5 の転写活性をドミナントネガティブに抑制し、またリンパ球に PAX5-PML を発現させると PAX5 の転写標的である CD19 の発現が低下した。PAX5-PML は核内でび漫性の局在を示し、PML と共発現すると PML NB の形成を阻害した。PAX5-PML の安定発現 HeLa 細胞株では PML NB は破壊されており、この細胞株は放射線照射などに対しアポトーシス抵抗性を示した。一方、これに亜硫酸を投与すると、PML NB の再構成が認められ、コントロール細胞株と同程度のアポトーシス

が誘導された。OPB-31121 は白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫など各種造血器悪性腫瘍の細胞株及び、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、腎癌、前立腺癌等多彩な固形癌細胞株に対しても IC50 が 10nM 以下という強い増殖抑制活性を示した。また OPB-31121 添加後の経時的なウエスタンブロットによる検討では、HEL 細胞株 (JAK2 に恒常的活性化変異があり、これにより STAT3 が恒常的にリン酸化されている) では薬剤添加後 JAK2 のリン酸化に変化のない時点から STAT3 のリン酸化が消失し、また H1650 細胞株 (EGFR に恒常的活性化変異があり、これによる Src のリン酸化により STAT3 がリン酸化されている) では Src のリン酸化に変化のない時点から STAT3 リン酸化の消失を認めた。更に HepG2 細胞株の溶解液から免疫沈降した STAT3 を試験管内でリコンビナントな JAK2 または Src ファミリーキナーゼの一つである Lyn でリン酸化するシステムで OPB-31121 のリン酸化抑制効果を検討した。試験管内でのリン酸化反応に OPB-31121 を加えても STAT3 のリン酸化反応は阻害されなかった。しかし、OPB-31121 を添加して培養した HepG2 の細胞溶解液から免疫沈降した STAT3 を用いて同様のリン酸化反応を行うと、この STAT3 はリン酸化されなかった (試験管内に OPB-31121 は加えていない)。この時、JAK2、Lyn のリン酸化は影響を受けていなかった。細胞内で未知のタンパクを介して OPB-31121 が STAT3 と複合体を形成する事が STAT3 リン酸化の阻害に関わっていると考えられた。

ヒト組織を用いた発現解析では、これまでの肺がんに加えて膵がんの系で、CDCP1 高発現群が低発現群と比較して統計学的に有意に予後が不良であることが明らかになった。膵がん細胞の系で CDCP1 は PKC δ 及びコルタクチンと複合体をつくることで細胞運動に関わり、さらに PKC δ との協調作用によって MMP9 などのマトロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。胃がんの移植マウスで腹膜播種部位より同定した ARAP3 は Src の基質であり、ヒト胃がん細胞株に過剰発現させるとマウスモデルにおいて腹膜播種を抑制した。ドメイン解析にて ARAP3 の Rho-GAP ドメイン及びチロシンリン酸化部位が、スキルス胃がんの腹膜播種の抑制に関わっていることが明らかになった。H322 肺がん細胞株のマウス転移モデル系を用いて *in vivo*

セレクションにより骨転移を高頻度に起こす亜株を樹立した。この H322-B04 細胞株を用いて、SFK の基質として転移浸潤に関わることを示した分子群 (Ossa, CDCP1, p130cas) の発現を shRNA により恒常的に抑制し、骨転移に与える影響を観察した。*in vivo* イメージングを用いた解析の結果、どれも抑制傾向が見られたが、特に最近固形腫瘍の酸化ストレス抵抗性に関わることを示した Ossa 蛋白質の発現抑制により、著明に骨転移の進展が遅延することが示され、治療ターゲットとして効果が高い可能性が示唆された。

SAP-1 の KO マウスの腸上皮細胞よりチロシンリン酸化レベルが野生型マウスと比較して高度である蛋白質を生化学的に同定したところ、膜貫通型糖化分子である pp90 を同定した。pp90 は、その細胞内部分にチロシンリン酸化を受ける部位があり、これが SAP-1 により脱チロシンリン酸化を受けることを確認した。さらに、この細胞内チロシンリン酸化部位に細胞質型のチロシンキナーゼが結合することを確認した。また、pp90 のチロシンリン酸化は、他の細胞質型チロシンキナーゼにより促進されることが明らかになった。また、SAP-1 と VE-PTP はそれらの C 末端が共通してチロシンリン酸化を受け、Src ファミリーチロシンキナーゼに結合しこれを活性化する可能性を明らかにした。マウス悪性黒色腫細胞株 (B16 メラノーマ) 接種による肺転移モデルにおいて、ADCC 活性を有する抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除を検討したところ、SIRP α KO マウスにおいて腫瘍排除が顕著に増強していることを見出した。

D. 考察

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。

AML 幹細胞が同定されて現在までに多数の AML 幹細胞に対する分子標的候補が挙げられてきた。しかしながら、未だに有効な治療法の開発には至っていない。それは、白血病幹細胞の生存や増殖に重要である自己複製能や抗アポトーシス関連分子の大多数が、正常造血幹細胞と AML 幹細胞が共有しているために、治療標的として双方を識別するのは困難であるためである。また、AML 幹細胞に特

異的に発現する表面抗原候補も、例えば CD33, CD96, CD123, CLL-1 など同定されてきたが、これら抗原は正常造血幹細胞にも発現しているため、AML 治療に有効な抗体の開発が進んでいない。本研究で我々が同定した Tim-3 は、大多数の AML 症例の AML 幹細胞に高発現している一方、正常造血幹細胞には発現していないことから、理想的な標的対象である。Tim-3 陽性細胞に対して高い殺細胞効果を有する抗ヒト Tim-3 抗体の作製に成功し、今後は *in vivo* での有効性を検証する。以上のように、AML 根治に向けた基盤技術開発として、本研究が果たす社会的意義は極めて大きい。

PAX5-PML が PAX5, PML 双方に対しドミナントネガティブに作用し、PAX5 の機能を障害する事で分化障害を起こし、PML の機能を障害する事でアポトーシス作用を細胞に与える仕組みが示され、これが ALL 発症に関与している可能性が示唆された。また PML-RAR α に次いで PAX5-PML を持つ細胞に対しても亜ヒ酸が破壊された PML NB の再構成とアポトーシスを誘導した事は、亜ヒ酸の作用点が PML にあり、その作用機序は PML NB の再構成を介している事を示唆しており、亜ヒ酸の作用機序の解明を大きく前進させることになった。また、PAX5-PML 陽性 ALL に対しては亜ヒ酸が有効である可能性が示された。今回の結果から OPB-31121 は JAK ファミリー、Src ファミリー等の STAT3 上流キナーゼの活性を阻害するのではなく、STAT3 への直接の作用によりリン酸化を阻害している事が示唆された。STAT3 は多彩な腫瘍で活性化されているシグナル伝達因子であるが、複数の経路でリン酸化されるため、特定の上流キナーゼの阻害剤では十分 STAT3 のリン酸化を抑える事ができず、また適応される癌種も限られる。OPB-31121 は上流の活性化経路によらず STAT3 のリン酸化を強く阻害する作用があり、幅広い癌種に適応のある抗がん剤となる可能性がある。またその阻害機序はおそらくユニークなもので、その解明は今後の抗がん剤開発において非常に有用であると考えられる。

肺がん、膵がん、スキルス胃がんなど転移性が強く、臨床上大きな問題になっている固形腫瘍に焦点を当て、*in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて新しい標的分子を同定し、その作用機序の解明と効果判定を進めていくことができた。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。

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・浸潤に関わっており、膜蛋白質であることも併せて、転移・浸潤をターゲットとした分子標的の良い候補となることが示唆された。また Ossa 蛋白質は酸化ストレスに対する抵抗性の獲得という新しい形で固形腫瘍の転移浸潤を促進する蛋白質であることから、これまでの分子と異なる新しい作用機序で肺がんなどの固形腫瘍の骨転移を抑制する分子として臨床応用できる可能性がある。ARAP3 は Src キナーゼの基質分子としては例外的に腹膜播種に対して抑制的に働く分子であり、その作用にリン酸化が必要なことも併せて、ARAP3 ないしそのアゴニストが腫瘍特異的な作用を発揮し、腹膜播種などの治療標的分子になる可能性がある。

SAP-1 はヒト胃がんや大腸がんに高度に発現する PTP であり、大腸がんモデルにおいて SAP-1 ががんの発生を促進的に制御することを見出していたが、その分子基盤は不明であった。今回、SAP-1 と VE-PTP が Src ファミリーチロシンキナーゼに結合しこれを活性化する可能性を明らかにした。Src ファミリーチロシンキナーゼは、細胞がん化との関連が最初に示されたチロシンキナーゼであり、胃がんや大腸がんにおける SAP-1 の高発現ががん化に関わる分子基盤の一端が解明されたと言える。また本研究では、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質として膜貫通型糖化分子である pp90 を同定した。pp90 は SAP-1 と同様に腸上皮細胞に高度に発現することから、SAP-1 が pp90 の脱チロシンリン酸化を介して、腸上皮細胞の生理的な機能制御に関わる可能性が強く示唆された。今後、pp90 のがんにおける異常や SAP-1 による発がん機序への関与につき検討する必要がある。マウスメラノーマ肺転移モデルにおいて、抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除が SIRP α KO マウスにおいて顕著に増強していることから、がん細胞上に存在する CD47 は貪食細胞上の SIRP α と相互作用することで、貪食細胞による ADCC 活性を抑制していることが推定された。一方、SIRP α KO マウスでは、この抑制が解除され ADCC 活性が亢進した結果、腫瘍排除が増強することが示唆された。さらに、乳がん細胞株に対する抗 HER2 抗体の細胞障害性が、抗 SIRP α 抗体の存在下で増強する傾向を認めつつある。この結果から、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗 SIRP α モノクローナル抗体が ADCC 活性を増強でき、既存の分

子標的薬の効果を高める新たながん治療薬として臨床応用が可能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。

AML 幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 を同定した。Tim-3 は正常造血幹細胞には発現せず、Tim-3 陽性 AML 細胞のみが白血病再構築可能であることより、Tim-3 に対する標的治療の有用性が期待される。

PAX5-PML が PAX5、PML 双方に対して抑制的に働く事で白血病発症に関与している可能性を示した。また PAX5-PML も PML NB を破壊し、亜ヒ酸がその再構成を誘導した後、アポトーシスを誘導した事は PML NB 破壊の白血病発症への関与と、亜ヒ酸の作用機序が PML NB の再構成にある事を示唆するものであった。

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事が示された。

受容体型 PTP である SAP-1 の異常による発がんの分子基盤として、Src ファミリーチロシンキナーゼの活性化が示唆された。また、Shp2 の結合分子である SIRP α の機能を人為的に操作することにより、がんの分子標的薬の効果が増強でき、新たながん治療法となる可能性が示された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Goto E, Tomoita A, Hayakawa F, Naoe T. et al. Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood* (in press)

Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T. PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*. 30:1822-30. 2011

Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Tanizaki R, Iwasaki T, Kobayashi M, Matsushita T, Kaibuchi K, Senga T, Kojima T, Kohno T, Hamaguchi M, Naoe T. FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4 \beta 1$ integrin and Pyk2 signalling. *Eur J Haematol*. 86:191-8. 2011

Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29:3723-31. 2010

Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7:708-717, 2010

Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T, Akashi K. High incidence of HHV6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-1602, 2010.

Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-344, 2010

Numata A, Miyamoto T, Ohno Y, Kamimura T, Kamezaki K, Tanimoto T, Takase K, Hengan H, Kato K, Takenaka K, Fukuda T, Harada N, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K, Harada M, Eto T. Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. *Bone Marrow Transplant* 45:311-316, 2010.

- Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* 120:2370-8, 2010.
- Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akakshi K, Sugiyama D. Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse. *Development* 137:3941-52, 2010
- Parmar K, Kim J, Sykes SM, Shimamura A, Stuckert P, Zhu K, Hamilton A, Deloach MK, Kutok JL, Akashi K, Gilliland DG, D'andrea A. Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. *Stem Cells* 28:1186-95, 2010
- Tanaka M, Kamata R, Yanagihara K, Sakai R. Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide. *Cancer Sci.* 101: 87-93, 2010.
- 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.* 101: 1632-1638, 2010.
- Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, Sakai R. CUB domain—containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res.* 70: 5136-5146, 2010.
- Tazaki T, Sasaki T, Uto K, Yamasaki N, Tashiro S, Sakai R, Tanaka M., Oda H., Honda Z, Honda H. p130Cas, crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration. *Hepatology* 52: 1089-1099, 2010
- Futami H, Sakai R. All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. *Cancer Lett.* 297: 220-225, 2010.
- Yagi, R, Tanaka, M, Sasaki, K, Kamata, R, Nakanishi, Y, Kanai, Y, Sakai, R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 30 :1413-1421, 2011
- Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem.* 286: 18251-18260, 2011.
- Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation. *J. Cell Biol.* 2011 in press
- Murata Y, Mori M, Kotani T, Supriatna Y, Okazawa H, Kusakari S, Saito Y, Ohnishi H, Matozaki T. Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn. *Genes Cells,* 15: 513-524, 2010.
- Mori M, Murata Y, Kotani T, Kusakari S, Ohnishi H, Saito Y, Okazawa H, Ishizuka T, Mori M, Matozaki T. Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins. *J Cell Physiol,* 224: 195-204, 2010.
- Matozaki T, Murata Y, Mori M, Kotani T, Okazawa H, Ohnishi H. Expression, localization and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals. *Cell Signal,* 22: 1811-1817, 2010.
- Saito Y, Iwamura H, Kaneko T, Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Kanazawa Y, Sato-Hashimoto M, Kobayashi H, Oldenborg P-A, Naito M, Kaneko Y, Nojima Y, Matozaki T. Regulation by SIRP α of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues. *Blood,* 116: 3517-3525, 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

難治性白血病治療薬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(AML)幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 および M-CSFR を同定した。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た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。また、MOZ-TIF2 による白血病誘導には PU.1 との結合を介した M-CSFR 経路の活性化と Brpf1 との結合を介した Hox 経路の活性化が重要であることが示唆された。

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。

Monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ) 関連融合遺伝子は急性骨髄性白血病(AML)の原因となり、予後不良である。MOZ 融合タンパクは、自己複製能をすでに喪失した前駆細胞において自己複製能の再獲得に働き、白血病幹細胞への形質転換に寄

与する。われわれは、これまでに MOZ-TIF2 白血病の生成および維持機構に PU.1 を介した M-CSFR の発現上昇およびその下流のチロシンリン酸化経路の活性化が重要であることを明らかにした。一方、MOZ 白血病患者サンプルでは白血病の原因となるホメオボックス蛋白(HOX)の過剰発現が報告されているが、MOZ 白血病における HOX 制御機構は不明である。MOZ 白血病の生成および維持にかかわる M-CSFR 経路とは別な新たな経路を解明する。

B. 研究方法

MOZ と HAT 複合体を形成する Bromodomain-PHD finger protein 1 (Brpf1)は Hox 遺伝子の発現に必須であることから、免疫沈降により MOZ-TIF2 と Brpf1 の結合ドメインを特定した。また、MOZ-TIF2 の Brpf1 結合ドメインを欠失した deletion mutant および HAT 活性を欠失した point mutant を用いて、白血病マウスモデルの作製および in vitro colony formation assay を行い、Brpf1 および HAT 活性の MOZ 白血病生成機構における意義を検討した。

ポリコーム蛋白は正常造血幹細胞および白血病幹細胞の自己複製能の維持に重要な役割を果たす。Bmi1 とともに PRC1 複合体を形成するポリコーム蛋白である Ring1A/Bに着目し、Ring1A ノックアウト Ring1B コンディショナルノックアウトマウスを用いて白血

病マウスモデルの作製および colony formation assay を行い、Ring1A/B の MOZ 白血病維持機構における役割を検討した。

C. 研究結果

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。MOZ 融合遺伝子として MOZ-TIF2 を選択し、まず免疫沈降により、MOZ-TIF2 は MOZ の HAT ドメインの N 末端を介して Brpf1 と結合することを明らかにした。次に、Brpf1 結合ドメインを欠く MOZ-TIF2 deletion mutant を用いて白血病機能解析を行った。この mutant は Brpf1 との結合能および HAT 活性を喪失しているが、M-CSFR 活性は保持していた。しかし、マウスにおいて白血病誘導能はなく、Hox の過剰発現もみられなかった。よって、MOZ 白血病の誘導には M-CSFR 経路の活性化だけでは不十分であり、Hox 経路の重要性が示唆された。さらに、Brpf1 結合能を保持した HAT 活性欠損型 MOZ-TIF2 point mutant でも白血病誘導能を喪失し、Hox の過剰発現もないことから、MOZ 白血病の誘導に必要な Hox 経路の活性化には、HAT 活性が必要であることが示された。

D. 考察

本研究において、MOZ-TIF2 融合遺伝子および 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ー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。MOZ-TIF2 による白血病誘

導には Brpf1 が必要であることが示唆された。Brpf1 非結合型 MOZ 変異体は HAT 活性を欠くことから、今後は Brpf1 ノックアウトマウスを用いて HOX 制御機構およびその意義を明らかにし、MOZ 白血病の発症機構に迫りたい。

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。MOZ-TIF2 による白血病誘導には PU.1 との結合を介した M-CSFR 経路の活性化と Brpf1 との結合を介した Hox 経路の活性化が重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem*. 286: 18251-18260, 2011.

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

アポトーシス誘導因子及びシグナル伝達因子を標的としたがん治療法の開発に関する研究

研究分担者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨 急性リンパ性白血病(ALL)の一部症例において認められる融合癌遺伝子 PAX5-PML が、B 細胞分化のマスター遺伝子である PAX5 に対しドミナントネガティブに作用しその転写活性を抑制する事を示した。一方、PAX5-PML は PML に対してもその細胞内局在を変化させ、PML nuclear body を破壊することで、そのアポトーシス誘導能を阻害している事も示した。これらの結果から PAX5-PML が B 細胞に対して分化障害を起こしつつアポトーシス抵抗性を与える事が ALL 発症の原因である事が示唆された。更に急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬でもある亜ヒ酸が、破壊された PML nuclear body を再構成させ、PAX5-PML によりもたらされるアポトーシス抵抗性を克服する事を示し、本剤が PAX5-PML 陽性 ALL の治療薬となる可能性を示した。またシグナル伝達因子阻害剤の開発に関しては、スクリーニングされてきた強い腫瘍増殖抑制活性を持つ物質が JAK キナーゼ活性を阻害する事なく STAT3 リン酸化を阻害する事を試験管内、及び細胞株において示した。

A. 研究目的

PML は細胞内で 70 種を超すタンパクと結合し、PML nuclear body (NB) と呼ばれる構造物を形成し、腫瘍抑制、アポトーシス誘導など多彩な機能を発揮する。PML とレチノイン酸受容体 (RAR α) の融合癌タンパク PML-RAR α が認められる急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として亜ヒ酸が知られている。亜ヒ酸は破壊された PML NB の再構成を誘導する事で白血病細胞にアポトーシスを誘導していると考えられているが、PML-RAR α による PML NB の破壊は PML NB の形態上の変化が小さく、検出が困難なこともあり、はっきりした事は分かっていない。PML の発現が欠失/低下しているなど、PML 機能が低下している事が発癌に関与していると考えられる症例は、肺癌、乳癌、大腸癌などの固形腫瘍にも多く認められるため、PML 機能を増強する作用を持つ薬剤には抗がん剤としての大きな可能性があり、亜ヒ酸がそうした作用を持つ薬剤であるのかどうかを確認し、その機序を明らかにする事は重要である。今回 PML-RAR α 以外で始めて発見された PML 関連融合蛋白である PAX5-PML を用いて PML NB の破壊の有無、亜ヒ酸の効果を検討した。

更に、幅広い腫瘍に抗腫瘍効果を持つ薬剤の開発を目指し、多くの細胞増殖シグナルに共通したシグナル伝達因子であり、多彩な腫瘍で活性化が認められる STAT3 の阻害剤の開発を進めている。今回は候補物質としてスクリーニングされてきたものの STAT 抑制効果と抗腫瘍効果を検討した。

B. 研究方法

PAX5-PML 発現ベクターを作製しルシフェラーゼアッセイを用いて PAX5 の転写活性に対する PAX5-PML の作用を検討した。更に B 細胞に PAX5-PML を遺伝子導入し PAX5 転写標的遺伝子の発現の変化を検討した。また PAX5-PML 安定発現株を作成し、その細胞における PML NB、アポトーシス抵抗性の変化を観察し、亜ヒ酸投与の効果を検討した。

STAT3 阻害剤候補物質 OPB-31121 を *ex vivo* で各種細胞株に投与し増殖抑制効果を検討した。また OPB-31121 を添加して培養した細胞の溶解液を用いて、STAT3 及びその上流キナーゼのリン酸化の状態を検討した。またその細胞溶解液から STAT3 を免疫沈降し、その STAT3 を *in vitro* でリン酸化する反応を行い、その系における OPB-31121 の作用を調べた。

C. 研究結果

PAX5-PML はルシフェラーゼアッセイにおいて PAX5 の転写活性をドミナントネガティブに抑制し、またリンパ球に PAX5-PML を発現させると PAX5 の転写標的である CD19 の発現が低下した。PAX5-PML は核内でびまん性の局在を示し、PML と共発現すると PML NB の形成を阻害した。PAX5-PML の安定発現 HeLa 細胞株では PML NB は破壊されており、この細胞株は放射線照射などに対しアポトーシス抵抗性を示した。一方、これに亜ヒ酸を投与すると、PML NB の再構成が認められ、コントロール細胞株と同程度のアポト

ーシスが誘導された。

OPB-31121 は白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫など各種造血器悪性腫瘍の細胞株及び、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、腎癌、前立腺癌等多彩な固形癌細胞株に対しても IC₅₀ が 10nM 以下という強い増殖抑制活性を示した。また OPB-31121 添加後の経時的なウエスタンブロットによる検討では、HEL 細胞株 (JAK2 に恒常的活性化変異があり、これにより STAT3 が恒常的にリン酸化されている) では薬剤添加後 JAK2 のリン酸化に変化のない時点から STAT3 のリン酸化が消失し、また H1650 細胞株 (EGFR に恒常的活性化変異があり、これによる Src のリン酸化により STAT3 がリン酸化されている) では Src のリン酸化に変化のない時点から STAT3 リン酸化の消失を認めた。更に HepG2 細胞株の溶解液から免疫沈降した STAT3 を試験管内でリコンビナントな JAK2 または Src ファミリーキナーゼの一つである Lyn でリン酸化するシステムで OPB-31121 のリン酸化抑制効果を検討した。試験管内でのリン酸化反応に OPB-31121 を加えても STAT3 のリン酸化反応は阻害されなかった。しかし、OPB-31121 を添加して培養した HepG2 の細胞溶解液から免疫沈降した STAT3 を用いて同様のリン酸化反応を行うと、この STAT3 はリン酸化されなかった (試験管内に OPB-31121 は加えていない)。この時、JAK2、Lyn のリン酸化は影響を受けていなかった。細胞内で未知のタンパクを介して OPB-31121 が STAT3 と複合体を形成する事が STAT3 リン酸化の阻害に関わっていると考えられた。

D. 考察

PAX5-PML が PAX5、PML 双方に対しドミナントネガティブに作用し、PAX5 の機能を障害する事で分化障害を起こし、PML の機能を障害する事で抗アポトーシス作用を細胞に与える仕組みが示され、これが ALL 発症に関与している可能性が示唆された。また PML-RAR α に次いで PAX5-PML を持つ細胞に対しても 亜ヒ酸が破壊された PML NB の再構成とアポトーシスを誘導した事は、亜ヒ酸の作用点が PML にあり、その作用機序は PML NB の再構成を介している事を示唆しており、亜ヒ酸の作用機序の解明を大きく前進させることになった。また、PAX5-PML 陽性 ALL に対しては亜ヒ酸が有効である可能性が示された。今回の結果から OPB-31121 は JAK ファミリー、Src ファミリー等の STAT3 上流キナーゼの活性を阻害するのではなく、STAT3 への直接的作用によりリン酸化を阻害している事が示唆された。STAT3 は多彩な腫瘍で活性化されているシグナル伝達因子であるが、複数の経路でリン酸化されるため、特定の上流キナーゼの阻害剤では十分 STAT3 のリン酸化を抑える事がで

きず、また適応される癌種も限られる。OPB-31121 は上流の活性化経路によらず STAT3 のリン酸化を強く阻害する作用があり、幅広い癌種に適応のある抗がん剤となる可能性がある。またその阻害機序はおそらくユニークなもので、その解明は今後の抗がん剤開発において非常に有用であると考えられる。

E. 結論

PAX5-PML が PAX5、PML 双方に対して抑制的に働く事で白血病発症に関与している可能性を示した。また PAX5-PML も PML NB を破壊し、亜ヒ酸がその再構成を誘導した後、アポトーシスを誘導した事は PML NB 破壊の白血病発症への関与と、亜ヒ酸の作用機序が PML NB の再構成にある事を示唆するものであった。

OPB-31121 には強い STAT3 リン酸化阻害作用と腫瘍増殖抑制作用が認められた。その作用機序は上流のキナーゼ活性阻害によらない機序が予想された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Goto E, Tomoita A, Hayakawa F, Naoe T. et al. Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood* (in press)

Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T. PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*. 30:1822-30. 2011

Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Tanizaki R, Iwasaki T, Kobayashi M, Matsushita T, Kaibuchi K, Senga T, Kojima T, Kohno T, Hamaguchi M, Naoe T. FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4\beta 1$ integrin and Pyk2 signalling. *Eur J Haematol*. 86:191-8. 2011

Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29:3723-31. 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

幹細胞を標的とした白血病根治療法の開発

分担研究者 赤司 浩一 九州大学大学院 医学研究院 教授

研究要旨 ヒト急性骨髄性白血病(AML)の幹細胞に特異的に発現する表面抗原 Tim-3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3)を同定した。Tim-3 は AML-M3 を除く全症例の AML 幹細胞に高発現しているが、正常造血幹細胞には発現を認めなかった。また Tim-3 陽性細胞を移植したマウスのみ AML を再構築することから、AML 治療の理想的な標的分子候補と考えられた。Tim-3 陽性細胞株に対して高い殺細胞効果を有する抗ヒト Tim-3 マウス抗体の作製に成功した。AML 幹細胞特異的に発現する Tim-3 抗体による効果的な新規分子標的療法の開発が期待される。

A. 研究目的

重症免疫不全マウスと細胞純化技術の開発により、継代してマウスにヒト急性骨髄性白血病(AML)を再構築させる機能的な AML 幹細胞分画が同定された。この AML の源である AML 幹細胞のみ選択的に死滅させることが副作用を伴わない究極の治療法である。しかし、現在までに分離可能な AML 幹細胞では、正常の造血幹細胞と細胞特性や表面抗原が極めて酷似しているため、正常造血幹細胞に影響を与えることなく AML 幹細胞を標的とした治療法の開発は困難である。したがって、AML 幹細胞に特異的に発現する表面抗原や機能分子が同定できれば、白血病幹細胞を直接標的とした新たな治療法の開発が可能となる。

B. 研究方法

マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常ヒト造血幹細胞および前駆細胞の純化方法を確立した。この手法により高純度で単離された正常造血幹細胞および AML 幹細胞(CD34⁺CD38⁻Lin⁻分画)を用いて、microarray により AML 幹細胞に特異的に高発現する分子を網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較して AML 幹細胞に約 13 倍高発現する細胞表面抗原 Tim-3 を同定した。FACS による解析では、Tim-3 は正常造血幹細胞には発現していないが、AML 幹細胞に高発現していた。AML 幹細胞の特異的表面抗原と報告されている CD123 や CD33 が正常造血幹細胞においても弱陽性であるのに対し、Tim-3 は AML 幹細胞にのみ発現していることから、理想的な抗体治療の標的分子候補と考えられた。そこで、実際の AML 検体における Tim-3

の発現頻度を調べるとともに、抗ヒト Tim-3 抗体の作製を行い、その殺白血病効果を検討している。

C. 研究結果

Tim-3 はマウス Th1 細胞上に発現する表面抗原で、免疫調節に重要な役割を担うことが知られているが、ヒト造血細胞における Tim-3 の詳細は明らかでない。そこで Tim-3 の標的治療を行う上で、正常ヒト造血細胞における Tim-3 の発現分布と生理的機能を解析した。ヒト末梢血の顆粒球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞では Tim-3 の発現は認めず、単球のみ高発現を認めた。骨髄中の CD34⁺CD38⁺前駆細胞に遡って Tim-3 の発現を検討したところ、骨髄球系共通前駆細胞と巨核球・赤芽球系前駆細胞には Tim-3 は発現していないが、顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)の一部に Tim-3 陽性分画を認めた。Tim-3 陽性および陰性 GMP を純化して、その分化能を検討したところ、Tim-3 陰性 GMP から単球系・顆粒球細胞に分化したが、Tim-3 陽性 GMP は単球系細胞のみ生じた。すなわち Tim-3 は単球系前駆細胞の段階で発現を開始しているため、Tim-3 抗体は正常造血幹細胞を障害しないことが併せて明らかとなった。

次に AML の FAB 分類別に解析症例数を拡大して、Tim-3 の発現パターンを解析した。AML-M3 を除くすべての FAB タイプ全症例の AML 幹細胞において Tim-3 の高発現を認めた。すなわち、Tim-3 は AML に対して理想的な標的治療候補であることが示された。また、マウスにヒト Tim-3 タンパクを免疫することで、抗ヒト Tim-3 マウス IgG2a 抗体を純化・精製することに成功した(ATIK2a)。ATIK2a は

Tim-3 を遺伝子導入した細胞株に対して、高い殺細胞効果を有することを確認した。現在は AML サンプルをマウスに移植し、ヒト AML が再構築されたマウスにおいて ATIK2a による分子標的治療の開発を実行している。

D. 考察

AML 幹細胞が同定されて現在までに多数の AML 幹細胞に対する分子標的候補が挙げられてきた。しかしながら、未だに有効な治療法の開発には至っていない。それは、白血病幹細胞の生存や増殖に重要である自己複製能や抗アポトーシス関連分子の大多数が、正常造血幹細胞と AML 幹細胞が共有しているために、治療標的として双方を識別するのは困難であるためである。また、AML 幹細胞に特異的に発現する表面抗原候補も、例えば CD33, CD96, CD123, CLL-1 など同定されてきたが、これら抗原は正常造血幹細胞にも発現しているため、AML 治療に有効な抗体の開発が進んでいない。本研究で我々が同定した Tim-3 は、大多数の AML 症例の AML 幹細胞に高発現している一方、正常造血幹細胞には発現していないことから、理想的な標的対象である。Tim-3 陽性細胞に対して高い殺細胞効果を有する抗ヒト Tim-3 抗体の作製に成功し、今後は *in vivo* での有効性を検証する。以上のように、AML 根治に向けた基盤技術開発として、本研究が果たす社会的意義は極めて大きい。

E. 結論

AML 幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 を同定した。Tim-3 は正常造血幹細胞には発現せず、Tim-3 陽性 AML 細胞のみが白血病再構築可能であることより、Tim-3 に対する標的治療の有用性が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T,

Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7:708-717, 2010

Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T, Akashi K. High incidence of HHV6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-1602, 2010.

Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-344, 2010

Numata A, Miyamoto T, Ohno Y, Kamimura T, Kamezaki K, Tanimoto T, Takase K, Henzan H, Kato K, Takenaka K, Fukuda T, Harada N, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K, Harada M, Eto T. Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. *Bone Marrow Transplant* 45:311-316, 2010.

Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* 120:2370-8, 2010.

Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K, Sugiyama D. Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse. *Development* 137:3941-52, 2010

Parmar K, Kim J, Sykes SM, Shimamura A, Stuckert P, Zhu K, Hamilton A, Deloach MK, Kutok JL, Akashi K, Gilliland DG, D'andrea A. Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. *Stem Cells* 28:1186-95, 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

チロシンキナーゼ基質分子を標的とした腫瘍特性の制御

分担研究者 堺 隆一 国立がん研究センター研究所 転移浸潤シグナル研究分野 分野長

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。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り、その発現が膵がんなどの固形腫瘍の予後不良と相関することを示した。さらにスキルス胃がんで播種を抑制する Src の基質分子 ARAP3 を同定した。またマウスの *in vivo* イメージングの系を用いて Src キナーゼの基質群の転移・浸潤に対する効果を評価する系を確立した。解析中のリン酸化タンパク質群はがん細胞の悪性形質に密接に関係する機能を有し、転移・浸潤に対する選択的な治療薬開発につながると考えられる。

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

肺がん細胞の足場非依存性と転移性に関わるチロシンリン酸化蛋白質として同定した CDCP1 の膵臓がんの臨床サンプルにおける発現解析と、

膵がん細胞における機能解析を行った。またスキルス胃がんの腹膜播種マウスモデルにおいて、腹膜播種に際してチロシンリン酸化の変化する分子として ARAP3 を同定し、その機能解析を行った。

マウスの *in vivo* イメージングモデルを用いて、Src 基質群の遠隔転移制御能を評価する系を樹立する。

C. 研究結果

ヒト組織を用いた発現解析では、これまでの肺がんに加えて膵がんの系で、CDCP1 高発現群が低発現群と比較して統計学的に有意に予後が不良であることが明らかになった。膵がん細胞の系で CDCP1 は PKC δ 及びコルタクチンと複合体をつくることで細胞運動に関わり、さらに PKC δ との協調作用によって MMP9 などのマトロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。

胃がんの移植マウスで腹膜播種部位より同定した ARAP3 は Src の基質であり、ヒト胃がん細胞株に過剰発現させるとマウスモデルにおいて腹膜播種を抑制した。ドメイン解析にて ARAP3 の Rho-GAP ドメイン及びチロシンリン酸化部位が、スキルス胃がんの腹膜播種の抑制に関わっていることが明らかになった。

H322 肺がん細胞株のマウス転移モデル系を用いて *in vivo* セレクションにより骨転移を高頻度

に起こす亜株を樹立した。この H322-BO4 細胞株を用いて、SFK の基質として転移浸潤に関わることを示した分子群 (Ossa, CDCP1, p130cas) の発現を shRNA により恒常的に抑制し、骨転移に与える影響を観察した。in vivo イメージングを用いた解析の結果、どれも抑制傾向が見られたが、特に最近固形腫瘍の酸化ストレス抵抗性に関わることを示した Ossa 蛋白質の発現抑制により、著明に骨転移の進展が遅延することが示され、治療ターゲットとして効果が高い可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、肺がん、膵がん、スキルス胃がんなど転移性が強く、临床上大きな問題になっている固形腫瘍に焦点を当て、in vitro および in vivo のモデルを用いて新しい標的分子を同定し、その作用機序の解明と効果判定を進めていくことができた。

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。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・浸潤に関わっており、膜蛋白質であることとも併せて、転移・浸潤をターゲットとした分子標的の良い候補となりうることを示唆された。また Ossa 蛋白質は酸化ストレスに対する抵抗性の獲得という新しい形で固形腫瘍の転移浸潤を促進する蛋白質であることから、これまでの分子と異なる新しい作用機序で肺がんなどの固形腫瘍の骨転移を抑制する分子として臨床応用できる可能性がある。ARAP3 は Src キナーゼの基質分子としては例外的に腹膜播種に対して抑制的に働く分子であり、その作用にリン酸化が必要なこととも併せて、ARAP3 ないしそのアゴニストが腫瘍特異的な作用を発揮し、腹膜播種などの治療標的分子になる可能性がある。

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を示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.* 101: 1632-1638, 2010.

Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, Sakai R. CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res.* 70: 5136-5146, 2010.

Tazaki T, Sasaki T, Uto K, Yamasaki N, Tashiro S, Sakai R, Tanaka M, Oda H, Honda Z, Honda H. p130Cas, crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration. *Hepatology* 52: 1089-1099, 2010

Futami H, Sakai R. All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. *Cancer Lett.* 297: 220-225, 2010.

Yagi, R, Tanaka, M, Sasaki, K, Kamata, R, Nakanishi, Y, Kanai, Y, Sakai, R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 30 :1413-1421, 2011

Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem.* 286: 18251-18260, 2011.

Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia

formation. J. Cell Biol. 2011 in press

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

チロシンホスファターゼの異常と発がん、浸潤・転移

分担研究者 的崎 尚 群馬大学 生体調節研究所 バイオシグナル分野 客員教授

研究要旨 チロシンリン酸化シグナルの制御には、チロシンキナーゼと共にチロシンホスファターゼ(PTP)が重要である。しかし、PTPの異常が発がんやがんの浸潤・転移にどのように関わっているかについては不明の点が多い。大腸がんの発生を促進的に制御する可能性のある受容体型PTPであるSAP-1について、その作用機構を明らかにする目的で、SAP-1の基質分子の同定を試み、腸上皮細胞に発現する膜型糖化分子pp90を見出した。pp90は、細胞内領域がチロシンリン酸化を受け、細胞質型チロシンキナーゼが結合し作用することを明らかにしつつある。また、SAP-1および構造的に類似なPTPであるVE-PTPがSrcファミリーチロシンキナーゼに結合しこれを活性化する可能性を明らかにした。白血病で遺伝子異常が検出されるPTPであるShp2の結合分子SIRP α はマクロファージによる食食を負に制御するが、SIRP α 遺伝子ノックアウトマウスでは、ADCC活性を利用したがん細胞表面抗原抗体の細胞障害性が顕著に増強した。この結果から、SIRP α 機能を人為的に操作することにより、新たながん治療法を開発できる可能性が示された。

A. 研究目的

チロシンリン酸化シグナルは、生理的な細胞の増殖・分化・運動の制御に重要なシグナル系であり、一方、がんの発生、浸潤・転移の分子機構にこのシグナル系の異常が深く関与していることが示されている。チロシンリン酸化シグナルの制御には、チロシンキナーゼと共にチロシンホスファターゼ(PTP)が重要であるが、PTPの異常が発がんやがんの浸潤・転移にどのように関わっているかについては未だ不明の点が多い。分担研究者が見出した受容体型PTPであるSAP-1は、ヒト胃がんや大腸がんに高度に発現するPTPであり、大腸がんモデルにおいて、SAP-1が発がんの発生を促進的に制御することを見出している。一方、SAP-1は腸上皮細胞の微絨毛に特異的に発現するがその生理機能は未だ不明である。そこで、本研究では、SAP-1の生理機能と発がんにおける役割を明らかにすることを目的とする。また、細胞質型PTPであるShp2は増殖因子によるRasの活性化に重要であることが知られており、最近では、Shp2の活性型遺伝子変異がNoonan症候群と呼ばれる遺伝疾患やそれに随伴するAMLやMDSなどの血液系腫瘍の原因として見出され注目されている。分担研究者はShp2の結合分子として受容体型分子SIRP α を見出しているが、がんにおける役割は不明である。SIRP α はマクロファージに強く発現しており、標的細胞上のリガンド分子であるCD47がSIRP α に結合するとマクロファージによる食食を負に制御

することが知られている。そこで、本研究では、CD47-SIRP α 系を利用した、新たながん治療法開発の基礎的検討を行う。

B. 研究方法

(1) SAP-1の脱チロシンリン酸化基質分子を明らかにする目的で、SAP-1の遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製し、この腸上皮細胞よりチロシンリン酸化レベルが高度である蛋白質を生化学的に分析した。さらに、この脱チロシンリン酸化基質と結合する分子を解析する。SAP-1および構造的に類似なPTPであるVE-PTPのチロシンリン酸化の有無を検討し、他の分子と会合する可能性を明らかにする。

(2) マウス悪性黒色腫細胞株(B16メラノーマ)接種による肺転移モデルにおいて、抗体依存性の細胞障害(ADCC)活性を有する抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除を検討した。この効果におけるSIRP α の関与を明らかにするため、SIRP α KOマウスを用いた腫瘍排除を検討した。さらに、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗SIRP α モノクローナル抗体がADCC活性を増強できるか否かにつき検討を行った。

C. 研究結果

(1) SAP-1のKOマウスの腸上皮細胞よりチロシンリン酸化レベルが野生型マウスと比較して高度である蛋白質を生化学的に同定したところ、膜貫通型糖化分子であるpp90を同定した。pp90は、その細胞

内部分にチロシンリン酸化を受ける部位があり、これがSAP-1により脱チロシンリン酸化を受けることを確認した。さらに、この細胞内チロシンリン酸化部位に細胞質型のチロシンキナーゼが結合することを確認した。また、pp90のチロシンリン酸化は、他の細胞質型チロシンキナーゼにより促進されることが明らかになった。また、SAP-1とVE-PTPはこれらのC末端が共通してチロシンリン酸化を受け、Srcファミリーチロシンキナーゼに結合しこれを活性化する可能性を明らかにした。

(2) マウス悪性黒色腫細胞株 (B16メラノーマ) 接種による肺転移モデルにおいて、ADCC活性を有する抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除を検討したところ、SIRP α KO マウスにおいて腫瘍排除が顕著に増強していることを見出した。

D. 考察

SAP-1はヒト胃がんや大腸がんに高度に発現するPTPであり、大腸がんモデルにおいてSAP-1ががんの発生を促進的に制御することを見出していたが、その分子基盤は不明であった。今回、SAP-1とVE-PTPがSrcファミリーチロシンキナーゼに結合しこれを活性化する可能性を明らかにした。Srcファミリーチロシンキナーゼは、細胞がん化との関連が最初に示されたチロシンキナーゼであり、胃がんや大腸がんにおけるSAP-1の高発現ががん化に関わる分子基盤の一端が解明されたと言える。また本研究では、SAP-1の脱チロシンリン酸化基質として膜貫通型糖化分子であるpp90を同定した。pp90はSAP-1と同様に腸上皮細胞に高度に発現することから、SAP-1がpp90の脱チロシンリン酸化を介して、腸上皮細胞の生理的な機能制御に関わる可能性が強く示唆された。今後、pp90のがんにおける異常やSAP-1による発がん機序への関与につき検討する必要がある。マウスメラノーマ肺転移モデルにおいて、抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除がSIRP α KO マウスにおいて顕著に増強していることから、がん細胞上に存在するCD47は貪食細胞上のSIRP α と相互作用することで、貪食細胞によるADCC活性を抑制していることが推定された。一方、SIRP α KOマウスでは、この抑制が解除されADCC活性が亢進した結果、腫瘍排除が増強することが示唆された。さらに、乳がん細胞株に対する抗HER2抗体の細胞障害性が、抗SIRP α 抗体の存在下で増強する傾向を認めつつある。この結果から、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗SIRP α モノクローナル抗体がADCC活性を増強でき、既存の分

子標的薬の効果を高める新たながん治療薬として臨床応用が可能であることが示唆された。

E. 結論

本研究により、受容体型PTPであるSAP-1の異常による発がんの分子基盤として、Srcファミリーチロシンキナーゼの活性化が示唆された。また、Shp2の結合分子であるSIRP α の機能を人為的に操作することにより、がんの分子標的薬の効果が増強でき、新たながん治療法となる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Murata Y, Mori M, Kotani T, Supriatna Y, Okazawa H, Kusakari S, Saito Y, Ohnishi H, Matozaki T. Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn. *Genes Cells*, 15: 513-524, 2010.

Mori M, Murata Y, Kotani T, Kusakari S, Ohnishi H, Saito Y, Okazawa H, Ishizuka T, Mori M, Matozaki T. Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins. *J Cell Physiol*, 224: 195-204, 2010.

Matozaki T, Murata Y, Mori M, Kotani T, Okazawa H, Ohnishi H. Expression, localization and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals. *Cell Signal*, 22: 1811-1817, 2010.

Saito Y, Iwamura H, Kaneko T, Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Kanazawa Y, Sato-Hashimoto M, Kobayashi H, Oldenborg P-A, Naito M, Kaneko Y, Nojima Y, Matozaki T. Regulation by SIRP α of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues. *Blood*, 116: 3517-3525, 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

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
Goto E, Tomoita A, Hayakawa F, <u>Naoe T</u> . et al.	Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment.	Blood		in press	2011
Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, <u>Naoe T</u> .	PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML.	Oncogene	30	1822-30	2011
Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Tanizaki R, Iwasaki T, Kobayashi M, Matsushita T, Kaibuchi K, Senga T, Kojima T, Kohno T, Hamaguchi M, <u>Naoe T</u> .	FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4 \beta 1$ integrin and Pyk2 signalling.	Eur J Haematol.	86	191-8	2011
Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, <u>Naoe T</u> , Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H.	Array-based genomic resequencing of human leukemia.	<i>Oncogene</i> .	29	3723-31	2010
Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, <u>Akashi K</u> .	TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells.	<i>Cell Stem Cell</i>	7	708-717	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
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 $I\alpha$ are required for invadopodia formation in human breast cancer cells	Cancer Sci.	101	1632-1638	2010