

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－

『がん化パスウェイネットワークが規定する
がんの分子標的の解析並びに予後予測法の確立』
(H22-3 次がん－一般-012)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 典子
平成23 (2011) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
がん化パスウェイネットワークが規定するがんの分子標的の解析並びに 予後予測法の確立 -----	1
後藤 典子	
II. 分担研究報告	
1. p53不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索-----	9
江成 政人	
2. 肺癌のプロテオミクス -----	12
野村 将春	
3. PI3K-AKTシグナル伝達経路活性化分子機構の解明 -----	13
野口 昌幸	

I. 総括研究報告

がん化パスウェイネットワークが規定するがんの分子標的の解析並びに予後予測法の確立
(H22- 3次がん - 一般- 012) に関する研究

主任研究者 後藤 典子

東京大学医学研究所 システム生命医科学技術開発共同ユニット 特任准教授

研究要旨

テーラーメイド医療を実現し、がんの罹患率及び死亡率を激減するには、個々の症例により異なる、複雑ながんの病態（個性）を統合的に解明することが重要である。がん病態の進行は、主だったがん遺伝子やがん抑制遺伝子を中心とする、いくつかのがん化パスウェイを構成する基本成分の、相互作用（ネットワーク）の動態変化ととらえることができる。本研究では、がん化パスウェイの基本成分として、EGFR, K-Ras, p53, PI-3k-AKTパスウェイに焦点をあてる。細胞株やヒト癌組織を用いて、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、ゲノミクス解析に加えて、新規バイオインフォマティクスを組み合わせた解析を行い、がん化パスウェイを統合的に解明する。その過程で、予後予測、早期診断、抗がん剤感受性予測などに有用な新規バイオマーカー並びに個々の症例に合った分子標的候補を同定することを目的とする。

ヒト肺上皮由来の細胞（SAEC）の不死化細胞を用いて、p53の活性を人工的に誘導可能な実験系を作製するために、p53のC-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域を融合させた系を構築した。K-RasをSAECに誘導的に発現させる系も構築した。

EGFRがん化パスウェイ139遺伝子群よりなる肺がん予後予測遺伝子セットは、早期がんIa, Ibに分けても精度高く再発予後を予測できた。139分子の多くは、癌に関わる様々なシグナル伝達系と共有されていた。EGFシグナルは、これまで考えられていた以上に様々な癌化シグナルとクロストークにより影響を与えることが示された。「EGFシグナル鍵分子」＝「癌化パスウェイ鍵分子」である、生物学的意味が見いだされた。

イレッサ感受性細胞と耐性細胞の解析より、イレッサ耐性の分子基盤となりうるいくつかのシグナル伝達系を同定した。

肺癌の臨床検体及び初期培養した細胞株を用いてプロテオミクス解析を行った。これまでに肺癌の中で特に悪性度の高い癌のタンパク質解析を行い、いくつかのタンパク質を同定した。その中には、癌幹細胞のマーカーとされている物質や薬剤感受性に関与している物質が同定された。

HeregulinでErbB3を刺激すると、NFkBが活性化し、この経路が乳がん幹細胞の自己複製に関与することがわかった。この系を用いて、Heregulin刺激によるmRNAの時系列マイクロアレイ解析を行った。

インフルエンザウイルス産生蛋白の一つであるNS1蛋白とAKT - PI3Kシグナル活性化のcross talk 分子制御機構に注目しその研究解明を進めた。NS1蛋白は、AKTに直接結合し、その活性を増強する分子機構を明らかにできた。

得られた候補分子については、分子生物学的な機能解析並びに臨床検体を用いた評価を行い、診断キット、創薬への実用化を目指す。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

野村 将春 東京医科大学 第一外科学講座 講師

江成 政人 国立がん研究センター ユニット長

野口 昌幸 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

A. 研究目的

がんを早期に診断し、適切な治療法を選択できるテーラーメイド医療を実現し、がんの罹患率及び死亡率を激減するには、個々の症例により異なるがんの複雑な病態を統合的に解明、理解することが重要である。分子生物学の限界が指摘される中、申請者はがんのシステム生物学を3年前に提唱し、独創的な解析手法を試みたところ、従来法では発見されずにおかれたバイオマーカーや分子標的の発見に有用であった(PCT 出願 JP2009/70386, 特願 2009-023933, 特願 2008-3114-81,)。がん細胞の増殖、浸潤、転移という病態の進行は、主だったがん遺伝子やがん抑制遺伝子を中心とするいくつかのがん化パスウェイを構成する基本成分の相互作用(ネットワーク)の動態変化として、統合的に理解される。申請者は、この基本成分を高精度に抽出できる手法を開発してきた。本研究では、これを応用発展することにより、がんの複雑性の全貌を統合的に解明し、これを基盤として、バイオマーカーや革新的分子標的を同定することを目的とする。そして、診断薬や創薬への実用化を目指す。

まず、肺がんでは、すでに完了した HER パスウェイの解析に加え、K-Ras, p53, PI-3K-Akt パスウェイを解析する。また、乳がん幹細胞については、申請者が見いだした NFκB パスウェイを解析する。そして、臨床検体の網羅的遺伝子、miRNA または蛋白質発現プロファイリングから、個々の症例のがん化パスウェイネットワークを導きだし、予後予測、(超)早期診断マーカー、症例の特性にあった分子標的候補を抽出する。さらに、がん細胞株の抗がん剤感受性情報付き網羅的遺伝子発現プロファイリングも用いて、抗がん剤の効果予測マーカー、新規分子標的候補を抽出する。次に候補分子の分子生物学的機能解析並びに、臨床検体を用いた評価を行い、診断薬開発並びに創薬へ進める。次年度からは、HER2 陽性乳がん並びに腎細胞がんについても解析を開始する。

がんのシステム生物学は、ここ数年国際的に注目され、アメリカがん学会総会(AACR)

でも 2009、2010 年ともにシンポジウムが組まれている。しかし、まだ臨床応用へ至る主だった成果はない。一方国内では、本研究のようにトランスレーショナルリサーチを積極的に目指す研究は他には行われていない。申請者は、従来法で得られなかった高精度の早期肺がん予後予測遺伝子セットを得、実用化開発を進めるなど、世界のトップとなる独創的研究を展開している。本研究を推進することにより、更なるブレークスルーが

期待できる。

B. 研究方法

1. 肺がんのがん化パスウェイの解析

ヒト肺上皮細胞やこれを不死化した細胞に、活性型K-RasあるいはMyr-AKTを発現させる。p53-ERを発現させることにより、タモキシフェン依存性にp53の活性を制御できる系を構築する(後藤、江成。江成の項にも詳細記載)。時系列mRNA及びmiRNAのマイクロアレイ解析を行い(後藤、江成、野口)、状態空間モデル、Gene set enrichment analysis (GSEA)、MetaGP解析などのバイオインフォマティクス解析、シミュレーションに供する(宮野)。LC-MS/MSを用いたプロテオミクス解析(野村)を組み合わせて、それぞれのがん化パスウェイ基本成分を抽出する。

2. 肺がんの個々の病態を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

網羅的遺伝子発現プロファイリング情報は、NCIプロジェクト(Nat.Med., vol. 14, p822, 2008)などを用いる。国立がんセンター約230例の肺腺がん遺伝子発現プロファイリング情報を作成するために、p53不活性化情報の検索、ゲノム変異の探索を行う(江成ら)。ホルマリン標本を用いたプロテオミクス解析を行う(野村)。数理モデルも使い、予後予測、早期診断マーカー、新規分子標的候補の抽出を行う(後藤、江成、野口、宮野、野村)。

3. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

まずは、イレッサ抵抗性を決めるがん化パスウェイネットワークの解析を行う。イレッサ感受性EGFR変異をもつ肺腺がん由来PC9細胞と、これにイレッサを低濃度暴露により後藤が樹立したPC9亜株A2細胞を用い、網羅的mRNA解析並びにプロテオミクス解析を行う(後藤、野村、宮野)。

4. 乳がん幹細胞のがん化パスウェイネットワークの解析(後藤、宮野)

NFκBパスウェイの解析を行う。申請者がすでに立ち上げた乳がん幹細胞スフェア培養の系に、活性型NFκBを発現させ、時系列マイクロアレイ解析を行う。バイオインフォマティクス解析、シミュレーションに供す。網羅的遺伝子発現プロファイリング情報を組み合わせて、がんの超早期診断、再発診断マーカー、革新的分子標的候補を得る。

5. 肺がんのホルマリン固定切片標本からのプロテオミクス解析(野村の項に詳細記載)

肺腺がんにおける縦隔リンパ節転移例と、転移していない症例の比較から転移関連バイオマーカー候補の抽出を行う。予後の悪いsubtypeの蛋白質の解析を行い、肺がんsubtypeの新規分類法の構築を目指す。

6. 新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価 (後藤、江成、野口、野村)

候補分子について、分子生物学的に詳細な解析を行う。よい抗体がなければ、抗体を作製する。手術検体並びに血清は、国立癌センターと東京大学病院より入手する。

7. PI3K-AKTシグナル伝達系新規パスウェイの解析 (野口)

(野口の項に記載)

(倫理面の配慮)

国立がんセンター (肺がん)、東京大学病院 (乳がん) について：

生検・手術標本を用いる研究は、病理学的検索の後に残った組織を対象として行い、研究対象者から同意を得た上で、検体は匿名・コード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行う。

全ての研究は、原則的には研究者が所属する施設の倫理規定に基づいて行う。あらかじめ倫理委員会の承認が必要な研究に関して既に研究機関の承認が得られている。まだ承認の得られていない一部の研究については、開始前に研究機関の倫理委員会にて承認を得る。

がん組織における遺伝子発現・変異や血清中におけるタンパク質発現を解析する実験に際しては、法律および「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。

東京医大病院について (肺がん)：

臨床検体を用いる研究に関しては既に東京医科大学内の倫理委員会の承認を得ている。基本的には研究に関連する全ての研究者はヘルシンキ宣言に従って試験を実施する。研究の実施にあたっては倫理的配慮を慎重に行い、説明・同意文章を用いて十分説明した上で、資料提供者本人から、別添の説明文章と自由意志による同意文書を用

いてインフォームドコンセントを獲得する。患者の個人名 (イニシャルを含む) は使用せずに、東京医科大学第一外科での登録番号を使用する。

C. 研究結果

1. 肺がんのがん化パスウェイの解析 (江成の項にも詳細記載)

活性化型K-Ras(G12V)を、Doxycyclin (Dox)-onシステムレンチウイルスベクターに組み込み、これをレンチウイルスとして発現させ、トランス制御因子を発現するレンチウイルスとともに、SAEC-I細胞に感染させ、Dox制御下に活性化型K-Rasを発現させる系を構築した。

2. 肺がんの個々の病態を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

国立がんセンター226例の肺腺がん遺伝子発現プロファイリング情報を作製、EGFR, K-RAS, AKT変異情報、p53不活性化情報を含め完成した。

HERがん化パスウェイ139遺伝子群よりなる肺がん予後予測遺伝子セットは、早期がんIa, Ibに分けても精度高く再発予後を予測できることがわかった (PCT出願済み)。

また、EGFR変異情報を元に、ステージIの患者群の5年生存並びに再発のカプランマイヤー曲線についてログランク検定を行ったところ、EGFR変異ありの群において予後が良かった。しかし、EGFR変異による予後予測精度は、139遺伝子群と比較し劣っていた。Positive predictive value (PPV)も、同様の結果を得た。

さらに、139遺伝子は、ステージIのEGFR変異ありの症例、もしくはEGFR変異なしの症例のどちらにおいても、5年生存及び再発について、予後予測が可能であった。139遺伝子がコードする分子のシグナル伝達における役割について、Ingenuity pathway analysis (IPA)ソフトウェアを使って解析したところ、含まれる多くの分子は、様々なシグナル伝達系とクロストークを行う中継点にあることがわかった。そして、クロストークが示されたシグナル伝達系の多くが、癌において重要な役割をもっていることが知られているものであった。このことから、139遺伝子は、様々な癌化シグナルがクロストークする中継点に存在することが示唆された。以上より、EGFシグナルは、これまで考えられていた以上に様々な癌化シグナルとクロストークすることにより、癌に関わる様々なシグナル伝達系に影響を与えること

が示された。「EGFシグナル鍵分子」＝「癌化パスウエイ鍵分子」である、生物学的意味が見いだされた。

3. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウエイネットワークの解析

PC9細胞と、PC9亜株A2細胞を用いた、LTQ Orbitrap XLを用いた高精度LC-MS/MS解析により、両細胞を比較し発現量が数倍以上異なる蛋白質を数十同定した。さらに、両細胞をEGF並びにイレッサ存在下で行った網羅的時系列mRNA解析を、DNAマイクロアレイを用いて行った。様々な数理モデルを用いた解析より、イレッサ耐性の分子基盤となりうるいくつかのシグナル伝達系を同定した。

4. 乳がん幹細胞のがん化パスウエイネットワークの解析

FRS2betaが、ErbB2シグナルを抑制することを見いだした。

HeregulinでErbB3/ErbB2を刺激すると、NFkBが活性化し、この経路が乳がん幹細胞の自己複製に関与することがわかった。この系を用いて、Heregulin刺激によるmRNAの時系列マイクロアレイ解析を行った。

5. 肺がんのホルマリン固定切片標本からのプロテオミクス解析（野村の項に記載）

6. 新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

がん予後予測139遺伝子セットに加えて、国立がんセンター肺腺がん遺伝子発現プロファイリング情報をもとに、肺腺がんの血清バイオマーカー候補を複数同定し、患者血清を用いた評価を行っている。ELISAキットを用いた評価を行い、複数の候補分子を探し当てた。さらに、ELISAキットの存在しない分子については、モノクローナル抗体の作製を開始した。

肺がん予後予測139遺伝子中、一遺伝子でも Kaplan-Meier 曲線にて5年再発率並びに生存率に有意に差のある遺伝子から、分子標的候補をいくつか選んで、細胞内の発現レベル、EGFシグナルとの関わりについて解析を開始した。

7. PI3K-AKTシグナル伝達系新規パスウエイの解

析

（野村の項に記載）

D. 考察

1. 肺がんのがん化パスウエイの解析

肺腺がんの発生起源であるヒト肺上皮細胞におけるp53並びにK-Rasの役割を理解する上で、構築した実験系の構築は、非常に意義深い。この実験系と国立がん研究センターで解析が進められている肺がん患者さんからの臨床検体の発現プロファイルを用いて解析することにより、がんで重要な新たなp53パスウエイ並びにK-Rasパスウエイを同定する予定である。具体的には、時系列mRNA及びmiRNAのマイクロアレイ解析、質量分析(LC-MS/MS)を行い、状態空間モデル、Gene set enrichment analysis (GSEA), MetaGP解析などのバイオインフォマティクス解析、シミュレーションに供する。その結果を基に、がん化に重要なパスウエイを統合的に解析することで、早期診断マーカーや医薬品の標的分子を同定することが期待できる。

2. 肺がんの個々の病態を規定するがん化パスウエイネットワークの解析

国立がんセンター226例の肺腺がん遺伝子発現プロファイリング情報は、国内としては最大レベル、しかもK-Ras、EGFR変異、予後、再発までの期間、補助療法の内容もすべてそろっている。予後予測遺伝子セットの実用化に向けて、至適classifierを設定するために、解析プロトコルが一定し、手術検体の質も高い癌センター標本は、貴重であり、必須である。質、量ともに、ここまでのリソースは、国内外探しても他にはない。今後、残り約70例についても、遺伝子発現プロファイリングを行う予定である。139遺伝子数より減らすことも含め、実用化へ向けた解析を加速させる予定である。

また、これまでに解析した230症例も含めて、次世代シーケンサーを用いた、exome sequencingを開始する。

研究成果1-6と組み合わせた今後の解析により、本研究の最大の目的のひとつである、予後の悪い肺がん患者個人個人によって異なると予想される重要な分子標的を見いだすことが可能になると期

待される。21世紀のがん治療の目標とされている個別化医療の実現に向けて大きな一歩を踏み出すことができると期待される。

EGFシグナルは、これまで考えられていた以上に様々な癌化シグナルとクロストークすることにより、癌に関わる様々なシグナル伝達系に影響を与えることが示された。「EGFシグナル鍵分子」＝「癌化パスウェイ鍵分子」である、生物学的意味が見いだされた。

3. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

PC9細胞並びにイレッサ耐性PC9A2細胞の解析を継続する。Exome sequencing並びに全ゲノムシーケンスにて、イレッサ耐性ととも、変異の生じた遺伝子を網羅的に解析する。分子標的薬に対する耐性の出現は、重要な問題であるが、その分子機構が不明であるため、回避できない状況にある。すでに取得済みの時系列遺伝子発現のマイクロアレイデータ、プロテオミクスデータとともに、全ゲノムシーケンスデータも集まれば、遺伝子発現、蛋白質発現、ゲノム変異情報の三大オミックス情報が手にはいる。これをシステム生物学的に統合的に解析することにより、分子標的薬耐性の分子機構を統合的に理解することが可能になると考えられる。このような研究は、これまでほとんどなされてこなかったため、パイオニア的位置づけの研究成果が得られると期待される。

4. 乳がん幹細胞のがん化パスウェイネットワークの解析

今後得られたデータを、バイオインフォマティクス解析に供する。がんの超早期診断、再発診断マーカー、革新的分子標的候補を得ることが期待できる。

5. 肺がんのホルマリン固定切片標本からのプロテオミクス解析 (野村の項に記載)

6. 新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

臨床に実用化可能な肺がん血清バイオマーカーを得られることが期待される。新規分子標的候補をさらに抽出し、低分子化合物や抗体薬の開発を目指す。

7. PI3K-AKTシグナル伝達系新規パスウェイの解析

(野村の項に記載)

E. 結論

新しいバイオインフォマティクス技術を駆使した、トランスクリプトーム、プロテオミクス、バイオインフォマティクスのこれまでにない形態での共同研究は、画期的な成果が出た。この成果は、国内国際学会での発表、招待講演、論文発表として世界へ発信されている。さらに、知的財産の獲得、実用化へと着実な筋道がつけられている。本研究をさらに加速、推進させることにより、21世紀の医療として注目されているがんの個別化医療へ着実に進めるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Gotoh, N.: Somatic mutations of the EGF receptor and their signal transducers affect the efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 4; 403-409, 2011.

Nasirujjaman K., Kimura-Yoshida, C., Gotoh, N., Hiramatsu, R. and Matsuo I.: A genetic study of the effects of reduced *Frs2alpha* gene dosage in exostoses development and cartilage abnormalities observed in *Ext2* heterozygous mutant mice. *Journal of Osaka Medical Center & Research Institute for Maternal & Child Health.*, in press.

Gotoh, N.: FRS2. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Heidelberg, Germany.

Oyama, M., Nagashima, T., Suzuki, T., Kozuka-Hata, H., Yumoto, N., Shiraishi, Y., Ikeda, K., Kuroki, Y., Gotoh, N., Ishida, T., Inoue, S., Kitano, H., Okada-Hatakeyama, M.: Integrated quantitative analysis of the phosphoproteome and transcriptome in

- tamoxifen-resistant breast cancer. *J. Biol. Chem.*, 286; 818-829, 2010.
- Tasaki, S., Nagasaki, M., Kozuka-Hata, H., Semba, K., Gotoh, N., Hattori, S., Inoue, J., Yamamoto, T., Miyano, S., Sugano, S. and Oyama, M. : Phosphoproteomics-based modeling defines the regulatory mechanism underlying aberrant EGFR signaling. *PLoS ONE*, 5(11); e13926, 2010.
- Gotoh, N.: Possible signaling pathways in cancer stem cells in breast cancer. In: *Cancer Stem Cells*, Nikolic, A. (Ed.), *ITECH, Vienna, Austria*.
- Hinohara, K. and Gotoh, N.: Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 10; 650-654, 2010. (論文の図がこの号の表紙に採用されました)
- Shimamura, T., Imoto, S., Nagasaki, M., Yamauchi, M., Yamaguchi, R., Fujita, A., Tamada, Y., Gotoh, N., Miyano, S. Collocation-based sparse estimation for constructing dynamic gene networks. *Genome Inform.*, 24: 164-178, 2010.
- Sato, T., Shimazaki, T., Naka, H., Fukami, S., Okano, H., Lax, I., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: FGF-FRS2 α -Erk axis controls a self-renewal target Hes1 and growth of neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.*, 28: 1661-1672, 2010.
- Kojima, K., Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Ueno, K., Higuchi, T., , Gotoh, N., Miyano, S.: A state space representation of VAR models with sparse learning for dynamic gene networks. *Genome Inform.*, 22, 56-68, 2010.
- Iejima, D., Minegichi, Y., Takenaka, K., Siswanto, A., Watanabe, M., Huang, L., Watanabe, T., Tanaka, F., Kuroda, M. and Gotoh, N.: FRS2 β , a potential prognostic gene for non-small cell lung cancer, encodes a feedback inhibitor for EGF receptor family members via ERK binding. *Oncogene*, 29: 3087-3099, 2010.
- Murohashi, M., Hinohara, K., Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., Umezawa, K., Tojo, A., Aburatani, H. and Gotoh, N.: Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British J. Cancer*, 102: 206-212, 2010.
- Murohashi, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Ichise, T., Yoshida, N., Yamamoto, T., Shibuya, M., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: An FGF4-FRS2 α -Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces BMP4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells*, 28: 113-121, 2010.
- 2.学会発表
- 第14回東京アンチエイジングアカデミー
- “システム生物学的手法を用いた疾患研究- 肺癌予後予測シグネチャーと乳癌幹細胞シグナルの同定”
- 2011年5月 東京 招待講演
- AAACR-NCI Conference on Systems Biology: Confronting the Complexity of Cancer**
- “Receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of lung adenocarcinoma”
- Noriko Gotoh, Mai Yamauchi, Rui Yamaguchi, Takashi Kohno, Masao Nagasaki, Teppei Shimamura, Seiya Imoto, Kentaro Ogami, Ayumu Saito, Kazuko Ueno, Ryo Yoshida, Tomoyuki Higuchi, Masaharu Nomura, David G. Beer, Jun Yokota, Satoru Miyano.
- 2011年2月 La Jolla, California, USA
- 7th Global-COE International Symposium and 6th Young Investigators Forum:**
- Cancer Stem Cells Inflammation and Immunity**
- “A potential role of NF- κ B pathways in breast cancer stem cells for tumorigenesis”
- 2011年2月 シンガポール 招待講演
- 平成22年度文科省 がん分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム
- “がん研究：最近のトピックス”
- 2011年2月 東京 座長
- 個体レベルでのがん研究支援活動：ワークショップ
- “ErbB2依存型乳癌の発症時におけるFRS2betaの機能”
- 家島大輔¹⁾, 坂本怜子²⁾, 井上優介³⁾, 小林宣隆⁴⁾, 板野直樹⁴⁾, 吉田進昭²⁾, 後藤典子¹⁾

2011年2月 滋賀

第33回日本分子生物学会年会

“システム生物学的手法による臨床的に有用な予後予測シグネチャー並びに新規分子標的候補の同定”

2011年12月神戸

ワークショップオーガナイザー

第33回日本分子生物学会年会

“NF-kappaB regulates the self-renewal of breast cancer stem cells”

日野原邦彦、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、井上純一郎、後藤典子

2011年12月 神戸

第33回日本分子生物学会年会

“An Adaptor Protein FRS2beta Attenuates ErbB2 Signaling through Binding to CIN85/CD2AP-Cbl Complex, Leading to Intracellular Degradation.”

Minegishi, Y., Hattori, S., Gotoh, N.

2011年12月 神戸

第33回日本分子生物学会年会

“FRS2 β は、ErbB2 過剰発現により誘導される乳癌の癌抑制因子である。”

家島大輔、坂本怜子、井上優介、小林宣隆、板野直樹、吉田信昭、後藤典子

2011年12月 神戸

“An Adaptor Protein FRS2beta Attenuates ErbB Signaling through Binding to CIN85/CD2AP-Cbl Complex, Leading to Degradation of the Multi-molecular Complex Including the Receptors.”

Minegishi, Y., Hattori, S., Gotoh, N.,

2010年8月 Salk Institute, La Jolla, California, USA

16th Protein Phosphorylation and Cell Signaling meeting

“A potential role of FRS2beta as a tumor suppressor for mammary tumorigenesis”

Daisuke Iejima, Reiko Sakamoto, Nobuaki Yoshida, and Noriko Gotoh

2010年8月 Salk Institute, La Jolla, California, USA

創薬薬理フォーラム 第18回シンポジウム

“新規バイオインフォマティクス手法を用いた癌幹細胞内シグナル伝達経路の解明”

2010年9月 東京 招待講演

第69回日本癌学会学術総会

“腫瘍抑制候補アダプタータンパク FRS2beta は CIN85/CD2AP と結合し ErbB2 シグナルを減弱化する。”

峯岸ゆり子、服部成介、後藤典子。

2010年9月 大阪

第69回日本癌学会学術総会

“乳癌モデルマウスを用いた新規癌抑制遺伝子 FRS2 β の機能解析”

家島大輔、日野原邦彦、後藤典子

2010年9月 大阪

第69回日本癌学会学術総会

“Potential roles of NF-kappa B pathways in breast cancer stem cells”

日野原邦彦、室橋道子、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、井上純一郎、後藤典子

2010年9月 大阪

The 6th international symposium on Hormonal Oncogenesis,

“A potential role of FRS2beta as a tumor suppressor for mammary tumorigenesis”

Daisuke Iejima, Reiko Sakamoto, Nobuaki Yoshida, and Noriko Gotoh

2010年9月 東京

16th Protein Phosphorylation and Cell Signaling meeting

16th Protein Phosphorylation and Cell Signaling meeting

“Critical Prognostic Genes for Stage I Lung Adenocarcinoma are Identified from Normal Growth Factor-signaling System by Overcoming Cancer Heterogeneity”

Mai Yamauchi, Rui Yamaguchi, Takashi Khono, Jun Yokota, David G Beer, Satoru Miyano, and Noriko Gotoh

2010年8月 Salk Institute, La Jolla, California, USA

American Association for Cancer Research, Translational Research

“Critical prognostic genes for stage I lung adenocarcinoma are identified from normal growth factor-signaling system by overcoming cancer heterogeneity”

Noriko Gotoh

2010年7月 サンフランシスコ、USA

日野原邦彦、室橋道子、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子

2010年4月 Walter E. Washington Convention Center, Washington D.C., USA

American Association for Cancer Research 101th Annual Meeting 2010

“Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells”

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

II. 分担研究者報告

【p53 不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索】

分担研究者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

肺がんは様々な遺伝子の異常が認められており、多くの場合、がん抑制遺伝子 p53 の変異失活が肺がんの進展に伴って起こっている。本研究では、腫瘍抑制因子としての p53 機能の本質を理解するために、ヒトがんの主な発生源である上皮系由来の細胞を用いて、p53 経路の活性破綻による細胞の変質を理解し、そこから見出されるパスウェイを探索・同定することを目的とする。その目的を遂行するため、本年度は、ヒト肺上皮由来の細胞 (SAEC) を不死化し、その不死化細胞を用いて、p53 活性化に伴う遺伝子発現の変化をモニタリングする実験系を構築した。p53 の活性を人工的に誘導可能な実験系を作製するために、p53 の C-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域を融合蛋白質 (p53-ER) として発現するレトロウイルスベクターを構築した。そして、不死化したヒト肺上皮細胞 (SAEC) に、上記レトロウイルスを感染、薬剤選択を行い、エストロゲン誘導体によって p53 の活性を誘導できる不死化 SAEC 細胞株を樹立した。

A. 研究目的

肺がんは様々な遺伝子の異常により悪性度の高いがんへと進行するが、その際、臨床病理的な知見から、がん抑制遺伝子 p53 の変異失活に伴う症例が非常に多いことから、p53 経路はがんの増殖抑制はかりではなく、浸潤や転移などのがんの進展にも関与していることが示唆されている。今まで、p53 経路の研究に関して、様々な細胞系でその伝達経路が解明されてきたが、多くのシグナル伝達系は細胞固有の性質に大きく左右されることから、腫瘍抑制因子としての p53 機能の本質を理解するには、ヒトがんの主な発生源である上皮系の細胞を用いて、p53 機能損失による細胞の変質やそこでの動作原理を理解することこそが重要であると考えられる。本研究では、肺上皮由来の不死化細胞を用いて、p53 活性化に伴う遺伝子発現の変化をモニタリングし、そこから見出されるパスウェイを探索・同定することを目的とする。

B. 研究方法

p53 の活性を人工的に誘導可能な実験系を作製するために、p53 の C-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域を融合蛋白質 (p53-ER) として発現するレトロウイルスベクターを作製した。

方法としては、PCR 法を用いて、ヒトエストロゲン受容体のリガンド結合領域を増幅し、内源性エストロゲンに反応しないように 525 番目の Gly 残基を Arg 残基へ部位特異的に変異を導入した。一方、ヒト p53 遺伝子に関しても PCR 法を用いて遺伝子増幅し、ハイブリッドプライマーを用いた PCR 法により、p53 の C-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域が融合するように、遺伝子増幅し、それを pBabe レトロウイルスベクターへ挿入した。配列を DNA シーケンサーで確認後、Lipofectamine2000 遺伝子導入試薬を用いて、そのベクターをパッケージング細胞 (Phoenix 細胞) へ遺伝子導入した。遺伝子導入 6 時間後、培地を交換し、32℃で二日間培養後、その上清を回収し、不死化した SAEC 細胞へ感染させた。感染後、0.5 µg/ml ピューロマイシンを用いて、p53-ER 融合蛋白質を発現している細胞を薬剤選択した。その細胞を 100~1000 nM 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) で処理し、6~24 時間後、細胞を回収し、p53 標的遺伝子の発現をウエスタンブロット法で確認した。

C. 研究成果

p53 の活性を人工的に誘導可能な実験系を作製するために、p53 の C-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域を融合蛋白質 (p53-ER) として

発現するレトロウイルスベクターを構築し、不死化したヒト肺上皮細胞 (SAEC) に、上記レトロウイルスを感染、薬剤選択を行い、エストロゲン誘導体 4-OHT によって p53 の活性を誘導できる SAEC 細胞株を樹立することを試みた。その結果、ピューロマイシン薬剤耐性の細胞株が得られ、p53-ER 融合蛋白質が発現しているかどうかウエスタンブロット法で確認したところ、予想されるバンドが検出された。この系を用いて、実際、4-OHT で p53-ER 融合蛋白質が活性化されるかどうか検討したところ、4-OHT で細胞を処理すると、親株やコントロールの細胞群では、p53 の標的遺伝子産物である p21 の発現誘導が認められないのに対し、p53-ER 融合蛋白質を発現している細胞群では、明らかに p21 の発現誘導が検出された。

D. 考察

本研究において、p53 の C-末端にエストロゲン受容体のリガンド結合領域を融合蛋白質 (p53-ER) として発現するレトロウイルスベクターを用いて、p53 活性を特異的に誘導できる肺上皮由来の細胞を樹立できた。肺腺がんの発生源であるヒト肺上皮細胞における p53 の役割を理解する上で、この実験系の構築は、非常に意義深く、この実験系と国立がん研究センターで解析が進められている肺がん患者さんからの臨床検体の発現プロファイルを用いて解析することにより、がんでは重要な新たな p53 パスウェイを同定できると考えられる。また、その結果を基に、他のがん化に重要なパスウェイと p53 パスウェイを統合的に解析することで、早期診断マーカーや医薬品の標的分子を同定することが期待でき、将来的に p53 パスウェイを標的とした副作用の少ない抗癌剤の開発へと進展していくことが期待される。

選別を行い、肺がん患者の予後を改善できると考える。

本研究で用いる標本には、これまでの欧米での研究と異なり、喫煙歴や EGFR および KRAS 遺伝子変異の情報が付随している。そこで、遺伝子発現と予後との関連において、喫煙や発がん経路による特異性・相互作用を明らかにすることができる。よって、本研究や他の研究で構築された予後予測 signature の感度、性能に関する詳細な比較・検討が可能である。また、その解析結果は、難治がんである肺がんの悪性度の本態解明のための基盤情報となる。また、本研究で得られる遺伝子発現 profile は、今後、自身らや他の研究者が提案す

る予後予測 signature の評価にも有益である。

E. 結論

p53 活性を特異的に誘導できるヒト肺上皮由来の細胞を樹立した。今後、この実験系は、p53 活性化に伴う遺伝子発現の変化、そして、そこから見出されるパスウェイを探索・同定するためのツールとして役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kodama, M., Othubo, C., Hirota, T., Yokota, J., Enari, M., and Taya, Y.: Requirement of ATM for Rapid p53 Sequences. *Mol. Cell. Biol.*, 30, 1620-1633, 2010

Iwakawa, R., Kohno, T., Enari, M., Kiyono, T., and Yokota, J.: Prevalence of Human Papillomavirus 16/18/33 Infection and P53 Mutation in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, 101, 1891, 1896, 2010

2. 学会発表

p53 と Mdmx との相互作用を阻害する低分子化合物の同定: 江成政人、瓦谷泰之、上里新一、横田淳
第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、
2010 年 9 月 22 日

Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences: 江成政人、児玉昌美、大坪千裕、横田淳、田矢洋一

第 15 回 p53 国際ワークショップ、フィラデルフィア

2010 年 10 月 11 日

ATM による p53Ser46 の直接的リン酸化:

江成政人、児玉昌美、大坪千裕、横田淳、田矢洋一

BMB2010、神戸

2010 年 12 月 7 日

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【肺癌のプロテオミクス】

分担研究者 野村 将春 東京医科大学 第一外科学講座 講師

研究要旨

肺癌は個々によって不均一性が強く、個々の患者に合わせた治療が必要な悪性疾患の一つである。生体内で直接作用するタンパク質を解析する事により、疾患に強く関与している物質を同定する事が重要である。

A. 研究目的

肺癌の臨床検体及び初期培養した細胞株を用いてタンパク質解析を行い個々の患者の特性を明らかにする。

B. 研究方法

手術により採取された肺癌切除組織、又はそこから培養された細胞を用いて様々な質量分析装置でタンパク質解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ条約に基づいたICを所得する

C. 研究結果

これまでに肺癌の中で特に悪性度の高い癌のタンパク質解析を行い、いくつかのタンパク質を同定した。その中には、癌幹細胞のマーカーとされている物質や薬剤感受性に関与している物質が同定された。

D. 考察

悪性度の強い肺癌に関係している物質は治療や予後の指標になる可能性がある。今後、それらの機能を解析し、他の肺癌や、他臓器の悪性疾患に応用できる可能性を考慮する。

E. 結論

悪性度の強い肺癌に関係するタンパク質を解析し、いくつかの物質を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Journal of Clinical Bioinformatics 投稿中。Acceptabel revised

2. 学会発表

第102回米国癌学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

【PI3K-AKT シグナル伝達経路活性化分子機構の解明】

分担研究者 野口 昌幸 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

A. 研究目的

細胞内PI3K-AKTシグナル伝達系は様々な成長因子、増殖因子により活性化され、膜リン脂質の働きを介し細胞内の細胞増殖と細胞死、細胞増殖、細胞周期、蛋白合成、糖代謝など様々な細胞反応を制御することが知られている（図1）。そのためPI3K-AKTシグナル伝達系に関与する分子の遺伝子変異は悪性腫瘍をはじめ糖代謝異常、自己免疫疾患、統合失調症など様々な疾病の原因となっている。

最近、PI3K-AKT活性シグナル伝達系の活性化がウイルス構成蛋白との結合により惹起されウイルス感染に伴う病態の発症への関与が注目されている。この分子機序としてウイルス感染に伴いウイルスの

コードする蛋白がPI3K-AKTシグナル伝達分子と結合、その活性を上昇させウイルス感染の病態に深く関わっていることが推測されている。このようにウイルス蛋白によるPI3K-AKT活性シグナル伝達系の活性化は、これらウイルス感染症に伴うlatent infection, malignant transformationなどの病態への関与が推測され、これらのウイルス感染に伴う悪性腫瘍発症における新しい治療標的となる可能性も示唆されている。私たちはパンデミックな拡がりを見せた人類社会の脅威であるインフルエンザウイルス感染に注目し、病原性インフルエンザの病態を明らかにする目的で、インフルエンザウイルス産生蛋白の一つであるNS1 (Nonstructural protein 1) 蛋白にとAKT - PI3Kシグナル活性化のcross talk 分子制御機構に注目しその研究解明を進めた。

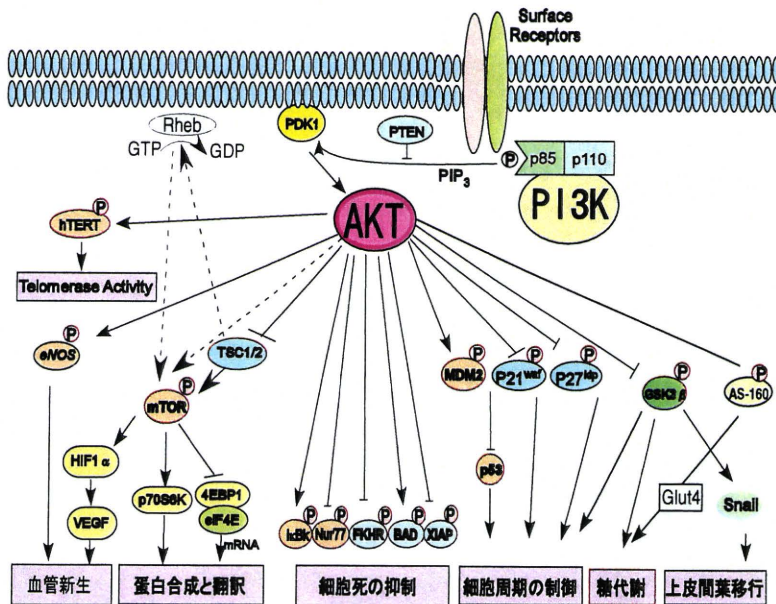


図1. PI3K - AKT シグナルによる多彩な細胞反応の制御

PI3K-AKT シグナル伝達系は膜リン脂質のリン酸化を介して活性化され細胞死（アポトーシス）制御の要の分子として、細胞死、細胞増殖、細胞周期、蛋白合成、血管新生、糖代謝など多彩な細胞反応を制御しており、その制御機構の破綻は様々なヒトの疾病の原因となり、薬剤開発の分子標的として注目されている。

B. 研究方法

インフルエンザウイルス感染宿主細胞では IFN, MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子の発現が誘導されることが知られている。一方、

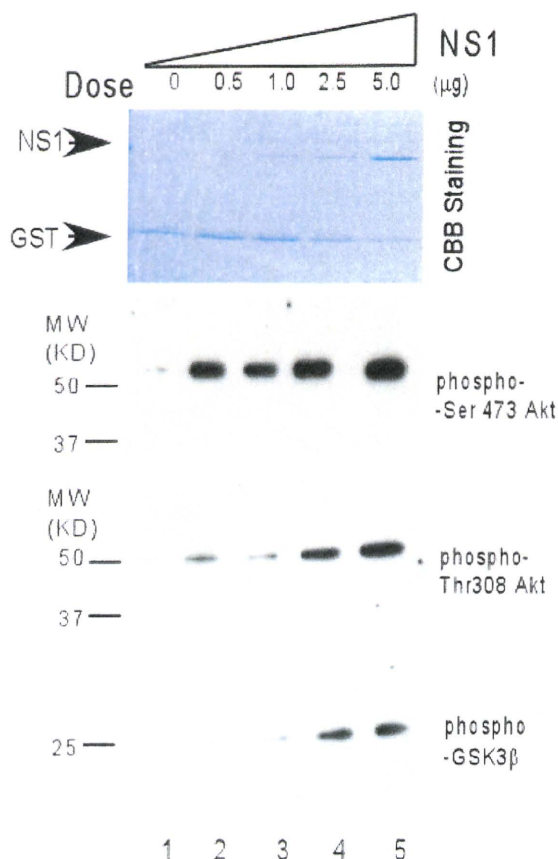
ウイルスタンパク質合成開始に伴って、宿主タンパク質合成の著しい抑制、すなわち、宿主遺伝子発現の shut-off が起こる。中でも私たちの注目しているインフルエンザウイルスが産生する蛋白の中の1つである NS1 蛋白(Nonstructural

protein 1)は様々な細胞内の蛋白や dsRNA に結合して細胞内シグナル伝達レベルで IFN 誘導性遺伝子などの発現を抑制し、その機能を修飾することが知られている。NS1 は PI3K の p85 と結合し下流にシグナルを伝えることがこれまでの知見により知られている。私達は NS1 蛋白のプリテオミクス解析の結果 NS1 にはセリンスレオニンキナーゼ AKT により特異的にリン酸化される可能性のある特異的なモチーフをもつアミノ酸配列 (RXRXXS/T) が存在することに着目した。そこで私達は NS1 が AKT とも相互作用するのではないかと考え、AKT と NS1 の生化学的、細胞生物学的関係についての解析を進めた。

(倫理面への配慮)

本年度の研究で使用する実験動物、その他、放射性同位元素、組み換え DNA、インフルエンザウイルスを用いる研究に関しては北海道大学、遺伝子病制御研究所の規則を確実に遵守し遂行した。本申請に置いて使用した細胞株では既に樹立された細胞株を用いて細胞レベルでの分子学的なメカニズムの解析を行った。

C. 研究結果



まず、インフルエンザ蛋白 NS1 をコードする cDNA を分離、発現ベクターにクローニングし以下の解析を進めた。

1. NS1 蛋白がセリンスレオニンキナーゼ AKT に直接結合することを過剰発現ならびにインフルエンザ感染細胞における免疫共沈法ならびに GST-pull down assay により明らかにした。
2. NS1 の AKT への結合の結果、IVK(in vitro kinase assay)により NS1 蛋白の容量依存的に AKT の活性化を促進することを明らかにした (図2)。
3. 細胞レベルでも NS1 により、AKT の活性化、その下流のシグナルが活性化されることを明らかにした。
4. 恒常活性型 AKT を過剰発現させた哺乳細胞を用いた実験により、NS1 はセリンスレオニンリン酸化酵素 AKT によってリン酸化が誘導されることを確認した。さらに、LC-MS により、AKT は NS1 蛋白の Thr215 アミノ酸のリン酸化を標的とすることを明らかにした。

以上の結果、インフルエンザウイルスの持つ一つの蛋白である NS1 蛋白もまた PI3K -AKT シグナル伝達系に直接結合し、その活性を増強する分子機構を明らかにできた。

図2. NS1 蛋白は In Vitro Kinase assay において容量依存的に AKT ならびにその基質の活性化を促進した。

D. 考察

PI3K-AKTシグナル伝達系は様々な成長因子、増殖因子により活性化され、膜リン脂質の働きを介し細胞内の細胞増殖と細胞死を制御する中心的な役割を担っている。活性化されたセリンスレオニンキナーゼAKTはFKHR (Fork Head Transcription Factor)、BAD、Nur77など様々な細胞死に対して抑制的な機能をもつ細胞内基質をリン酸化し、細胞増殖、細胞周期、蛋白合成、糖代謝など様々な細胞反応を制御する。そのため、AKTを介したシグナル伝達系制御機構の破綻は悪性腫瘍をはじめ糖代謝異常、自己免疫疾患、統合失調症など様々な疾病の原因となっていることが知られている。最近、このPI3K-AKT活性シグナル伝達系の活性化がウイルス構成蛋白との結合により惹起されウイルス感染に伴う病態の発症への関与が

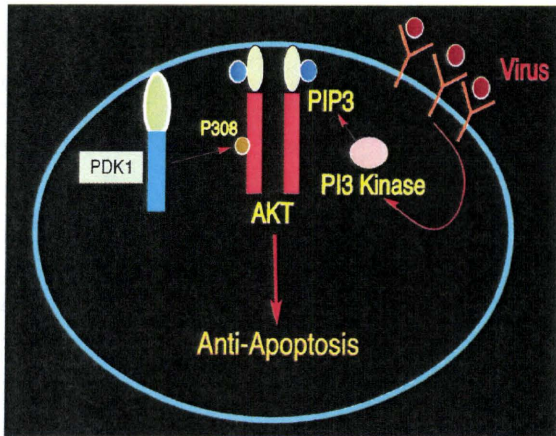


図3. ウイルスによるPI3K-AKT 活性化の意義

ウイルスによるPI3K-AKT 活性化の意義は一元的な説明は困難であるが、ひとつの可能性としては感染した宿主細胞を庇護することにより細胞死を予防し、ウイルスの宿主細胞内での増殖を助けるなどの可能性も考えられる。

E. 結論

私達はパンデミックな感染が危惧されたインフルエンザウイルスのコードするNS1蛋白に注目してそのAKT活性化修飾の分子機構の研究を進めた。その結果、NS1はAKTのリン酸化を促進するとともに、AKTのリン酸化依存的に結合することを見出した。さらにLC-MSを用いたNS1のリン酸化部位の解析においては、NS1はThr215のリン酸化を特異的に促進、誘導させることを明らかにした。このNS1によるAKTシグナル伝達系の感染宿主細胞における修飾機構を制御することによ

注目されている。

我々の研究成果によりこのインフルエンザのコードするNS1蛋白によるAKTシグナル伝達系の感染宿主細胞における修飾機構を制御することにより、インフルエンザウイルスの感染における病態を人為的に修飾し、治療に役立てる可能性が示唆された。この分子機構はパンデミックな広がりが危惧されたヒトインフルエンザH1N1ウイルスなどの感染宿主細胞の細胞死に拮抗する結果、インフルエンザウイルスの増殖に関与することが考えられ、この分子機構を阻害することで、インフルエンザウイルスの宿主細胞における増殖を制御することの可能性を通して感染の広がりを抑えることができ、新しい治療への展望が開かれた(図3)。

り、インフルエンザウイルスの感染における感染宿主細胞における病態を人為的に修飾することが可能であり、新しい治療に役立てる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Matsuda, F.Suizu, N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, & M. Noguchi.:Chracterization of the interaction of Iifluenza virus NS1 with Akt. *BBRC*.312-317;2010

N. Hirata, Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi i, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoe, & K. Iwabuchi.:Dendritic cell-derived TNF- α is responsible for development of IL-10-producing CD4+ T cells. *Cell Immunol.*, 261, 37-41; 2010.

N. Hirata, H. Ogura; M. Satoh; M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, K. Onoe, K. Iwabuchi, Y Yanagawa:The role of tumor necrosis factor- α for interleukin-10 production by murine dendritic cells *Cell Immunol. in press* 2011.

2. 学会発表

第69回 日本癌学会学術総会 シンポジウム
“ユビキチン化によるAKTの活性化制御の仕組み” 野口 昌幸

2010.9 大阪

第69回 日本癌学会学術総会
“TTC3によるAkt活性調節機構の解析” 水津 太、野口 昌幸、他
2010.9 大阪

第33回 日本分子生物学会
“ユビキチン化によるAKT活性の調節メカニズムの解析” 水津 太、野口 昌幸、他
2010.9 神戸

第33回 日本分子生物学会
“Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt” 松田 真実、野口 昌幸、他
2010.9 神戸

Keystone Symposia

“Characterization of the interaction of Akt with virus NS1” M. Matsuda, M.Noguchi
2011.2 Keystone Resort(コロラド・米)

AACR Special Conference

“ Akt regulation by ubiquitin-proteasome pathways” F. Suizu, M.Noguchi, 他
2011.2 Hyatt Regency (サンフランシスコ・米)