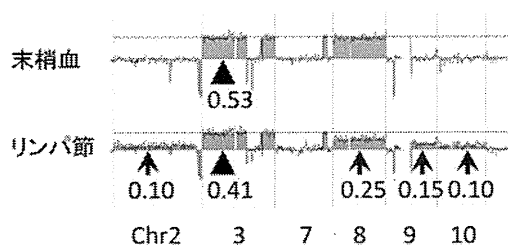


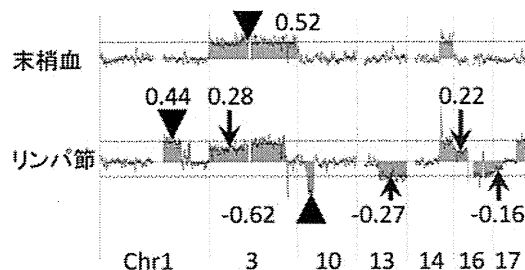
同一患者の末梢血検体とリンパ節検体を 44K oligo-array CGH でゲノム異常を調べたところ、両者でゲノム異常様式が異なっていることが明らかとなった(図 1)

図1. Log2 ratio imbalance



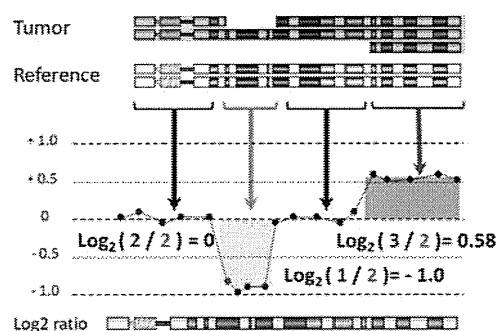
すなわち、同一患者でありながら、末梢血内腫瘍とリンパ節内腫瘍のゲノム異常様式が異なることが明らかとなった。このような末梢血腫瘍細胞とリンパ節内腫瘍のゲノム異常様式が異なるのは決して例外的ではなく、他の症例でも見いだされる(図 2)。

図2. Log2 ratio imbalance



リンパ節では、様々な値の log2 ratio が得られるが、これを Log2 ratio imbalance と呼ぶこととした。Log2 ratio は腫瘍細胞含有量と直線的な関係にあり、また、理論値(図 3)と実測値がほぼ一致する。

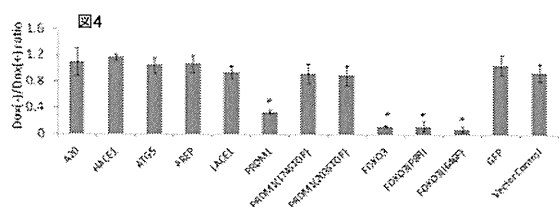
図3. Array CGH法 (Log2 ratio)



1 コピー欠失の場合は、理論的 log2 ratio が -1.0 となり、1 コピー増幅の場合は、+0.58 となる。Log2 ratio imbalance については、図 2 を例にすると、リンパ節での最大値は 0.44 であり、0.28 の値は腫瘍細胞が、 $0.28/0.44=0.64$ 、すなわち、64%の腫瘍細胞に 3p の増幅が認められることを意味する。このように、同一患者の中に、複数のクローンが存在することが明らかとなった。

2. ENKTL のゲノム異常の解析と責任遺伝子の探索

400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べたところ、6q21 欠失領域がもっとも高頻度に認められた領域であり、最小共通欠失領域(36%の症例)には 7 個(POPDC3, PREP, PRDM1, ATG5, AIM1, LACE1, FOXO3)の遺伝子が見いだされた。発現解析により正常 NK 細胞に比較して明らかに発現抑制されていたものは POPDC3 と AIM1 を除く 5 個であった。また、6q21-23.3 領域から我々が見いだした TNFAIP3/A20 と他の研究グループから NK 腫瘍のがん抑制遺伝子として報告された HACE1 も加え、機能的検討に 7 遺伝子を検討したところ、これらの遺伝子のうち、著明な増殖抑制効果が認められたのは FOXO3 と PRDM1 遺伝子であった(図 4)。



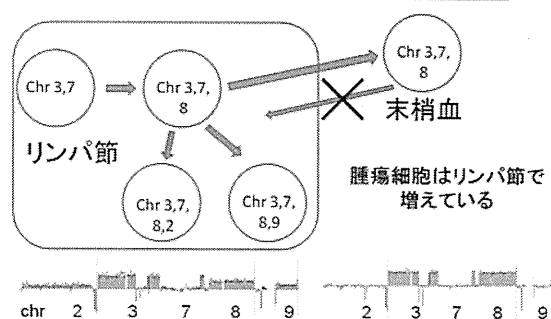
すなわち、発現が抑制されているだけではなく、再発現させることで、増殖抑制が認められたことより、PRDM1とFOXO3は真の標的遺伝子であり、がん抑制遺伝子として機能していることが明らかとなった。

D. 考察

1. ATLL 症例のゲノム異常の解析

ATLL 症例において、同一患者内に複数のクローンが存在することが明らかとなったのは初めての発見である。これらのクローンは、HTLV-1 ウイルス挿入サイトあるいは T 細胞受容体を用いたクローナリティーの解析において共通するクローン由来であることが明らかとなった (Data not shown)。すなわち、共通するクローンが次々とゲノム異常を蓄積し、クローンが進化して行くことが明らかとなった (Clonal evolution)。しかしながら、末梢血腫瘍では、log2 ratio imbalance の頻度が低く、また、詳細な検討から、ATLL 腫瘍細胞はリンパ節で増殖し、クローンの進化を起こし、その一部が末梢血中に出ていることが推測された (図 5)

図5. アレイCGH解析による急性型ATLLの発展モデル



このようなクローンの進化はATLL症例13例中9例(70%)に認められた。

2. ENKTL のゲノム異常の解析と責任遺伝子の探索

今回、400Kの密度を持つoligo-array CGHで検討したところ、これまで見いだせなかった狭い領域の欠失を特定の症例で見いだすことができた。この狭い領域に絞ることができたので、7つの候補遺伝子にまで絞ることができ、遺伝子発現と相関させることで、5つの候補遺伝子に絞ることができた。ENKTL 検体のように、解析するための検体量がきわめて少ない症例が多い中、きわめて少ない mRNA 量で検討できたことは本研究にとって大変重要であった。また、今回の研究で明らかになった重要な点は、今回の責任遺伝子は、発現解析による差異だけからは到達することができなかったことである。また、機能的な検討においても5つの遺伝子に絞ることができたのは、本研究の効率を大いに上げることになった。6q21-23.3領域はリンパ造血器腫瘍にとって、高頻度に欠失が見られる領域であり、代表的なものでは我々が世界に先駆けて単離したTNFAIP3/A20遺伝子はがん抑制遺伝子としてよく知られている。また、フランスの研究グループから提唱されていたHACE1も候補遺伝子と出たため、機能的検索に加えたが、両者はNK細胞株の増殖を抑制しなかった。また、増殖抑制効果を示したものはFOXO3とPRDM1遺伝子のみであり、両者はNK/Tリンパ腫の6q21領域のがん抑制遺伝子であることを証明することができたのは意義が高く、機能的な証明をすることができたのは本研究が最初である。PRDM1に関してはB細胞の分化を促進する遺伝子として知られており、PRDM1遺伝子の発現抑制が分化の抑制に働き、腫瘍化に関与することが示された。今後の研究の方向性において大変意義が高い。一方、FOXO3遺伝子に関しては、増殖に関する機能はよくわかっておらず、その機序も不明であった。今回、発現誘

導系で証明することができたのは意義が深い。また、増殖抑制効果は、PRDM1は細胞 lineage を越えて、増殖抑制を示したが、FOXO3はNK細胞系統に特異的に増殖抑制が認められた。すなわち、FOXO3はより副作用の少ないNK特異的分子標的として有用であることが示唆された。

E. 結論

1. ATLL には 70%の症例において複数のクローンが存在し、主としてリンパ節で腫瘍細胞が増殖していることが示唆された。

2. ENKTL 症例における最も高頻度なゲノム異常領域は 6q21 領域であり、FOXO3 と PRDM1 が責任遺伝子であることを機能的に証明した。

3. FOX3 遺伝子はNK細胞特異的がん抑制遺伝子であり、PRDM1 は非 NK 細胞（非血液細胞を含む）においても増殖抑制効果を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, Suh YL, Kim SH, Kim JY, Kim SJ, Kim WS, Seto M, Ko YH.: Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-1300, 2011.
2. Kato H, Kagami Y, Kodaira T, Oka S, Oki Y, Chihara D, Taji H, Yatabe Y, Nakamura T, Nakamura S, Seto M, Yamamoto K, Morishima Y.: Nodal relapse after helicobacter pylori eradication in a patient with primary

localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 106: 549-551, 2011.

3. Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, Seto M.: Clonal evolution of adult T cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood*, 117: 5473-5778, 2011.
4. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M.: Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*, 224: 280-288, 2011.
5. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M.: Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117: 3858-3868, 2011.
6. Iqbal J, Weisenburger DD, Chowdhury A, Tsai MY, Srivastava G, Greiner TC, Kucuk C, Deffenbacher K, Vose J, Smith L, Au WY, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Ko YH, Sng I, Liu X, Loughran TP, Armitage J, Chan WC.: International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Natural killer cell lymphoma shares strikingly similar molecular features with a group of non-hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphoma and is highly sensitive to a novel aurora kinase A inhibitor in vitro. *Leukemia*, 25: 348-358, 2011.
7. Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T,

- Moriyama M.: Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*, 6: e22313, 2011.
8. Nakagawa M, Tsuzuki S, Honma K, Taguchi O, Seto M.: Synergistic effect of Bcl2, Myc and Ccnd1 transforms mouse primary B-cells into malignant cells. *Haematologica*, 96 : 1318-1326, 2011.
 9. Kumar V, Matsuo K, Takahashi A, Hosono N, Tsunoda T, Kamatani N, Kong SY, Nakagawa H, Cui R, Tanikawa C, Seto M, Morishima Y, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K.: Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Gene*, 56: 436-439, 2011.
 10. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Takeuchi I, Honma K, Nakashima Y, Shimizu N, Ko YH, Morishima Y, Ohshima K, Nakamura S, Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood*, 118: 3195-3204, 2011.
 11. Kato H, Yamamoto K, Taji H, Oki Y, Chihara D, Seto M, Kagami Y, Morishima Y.: Interstitial pneumonia after autologous hematopoietic stem cell transplantation in B-cell non-hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11: 483-489, 2011.
 12. Tsuzuki S, Seto M.: Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-735, 2012.
 13. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima Y.: Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, Jan; 26:166-169, 2012.
 14. Chihara D, Matsuo K, Kanda J, Hosono S, Ito H, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K, Tanaka H.: Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol*, in press.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

研究分担者 中西速夫

愛知県がんセンター研究所、腫瘍病理学部、室長

研究要旨：消化器がんの分子標的治療は本邦においては数年前より大腸がんにおいて **Cetuximab**, **Bevacizumab** を用いた分子標的治療が行われ一定の成果を挙げている。しかし、胃がんにおいては **HER2** 陽性胃がんに対し昨年度からようやく **Trastuzumab** 療法が開始されたものの、頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)においてはまだまだ行われておらず基礎的研究も大きく立ち遅れているのが現状である。本研究では腫瘍の悪性化の機構として重要な **EMT**（上皮間葉移行）に関し、分子標的治療により **EMT** を来たし耐性を獲得した頭頸部扁平上皮がん細胞、ならびに転移性が高く予後不良の **HER2** 陽性胃がんを標的とする分子標的治療に関し、前臨床における抗腫瘍効果とその分子機構について独自に樹立した細胞株を用いて解析し、以下の諸点を明らかにした。1) 頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)では新規に作成した **Gefitinib** 抵抗性株が **EMT** を示すことを見だし、その機構を解析した。その結果、**EGFR** の発現低下と代償性の **Akt/GSK3b/snail** 経路の活性化が **EMT** を引き起こす可能性を示唆し、同シグナル経路の阻害により、**EMT** が抑制されることを明らかにした。2) また **HER2** 陽性胃がんでは独自に樹立した日本人由来株において親株と **Trastuzumab** 耐性株を比較し、耐性株における **MUC 4** の発現亢進と **PI3K/Akt** などの下流シグナルの活性化ならびに **Lapatinib**、不可逆性チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)による有意な増殖抑制を見出し、耐性株に対する新しい **Trasuzumab** 耐性機構と耐性株に対する新しい治療法の可能性を明らかにした。

A. 研究目的

1. **Gefitinib** 抵抗性 HNSCC 細胞株からの **EMT** 形質を示す亜株の分離
2. 上記 HNSCC 由来 **Gefitinib** 抵抗性株を用いた **EMT** 発生機構の解析と治療法の開発
3. **HER2** 陽性 **Trastuzumab** 耐性胃癌細胞株を用いた **Trastuzumab** 耐性機構の解析
4. 上記 **Trastuzumab** 耐性株に対する **Lapatinib** および不可逆性 TKI の抗腫瘍効果

B. 研究方法

1. **EGFR** を高発現する複数の HNSCC 細胞株に *in vitro* で **gefitinib** を反復投与、耐性株を作成し、このうち **EMT** 形質をしめし、繊維芽細胞様形態を示す細胞株を選別した。
2. 上記 **EMT** 形質をしめす **Gefitinib** 細胞株における **snail** 発現制御機構を明らかにする。
3. **HER2** 遺伝子増幅胃がん細胞株 (GLM-1) およびそれから *In vivo* 選択により作成した **Trastuzumab** 耐性株を用いてその耐性機序の一端を明らかにする。
4. 作成した GLM-1 **Trastuzumab** 耐性細胞株

を用いて Lapatinib および不可逆性チロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果とその作用機序を明らかにする。

C. 研究結果

1. Gefitinib 抵抗性 HNSCC 細胞株からの EMT 形質を示す亜株の分離

HNSCC 細胞株(UMSCC81)を用いて *in vitro* で Gefitinib 暴露を反復、耐性細胞を作成し、繊維芽細胞様形態を示す細胞株(81-Fb)を選別した。81-Fb は EMT マーカーである vimentin 発現、Snail 発現、遊走性の亢進と同時に E-cadherin 発現消失など典型的な EMT 形質を示した。また親株である UMSCC81 細胞に比べてユビキチン化亢進による EGFR のダウンレギュレーション、細胞膜から細胞質へ局在の変化が認められた。

2. HNSCC 由来 Gefitinib 抵抗性株を用いた EMT 発生機構の解析と治療法の開発

ウエスタンブロットによる解析の結果、81-Fb 細胞では EGFR の発現低下と代償的に FBS 存在下では Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が見られ、この Snail 発現は PI3K 阻害剤である Ly294002 により有意に抑制されたことから 81-Fb 細胞の EMT 形質獲得に Akt/GSK3b/snail 経路が関与していることが明らかとなった。

そこで次に EGFR の発現低下と EMT の因果関係を明らかにするために EGFR 発現ベクターを用いて 81-Fb 細胞に EGFR を強制発現させたところ、細胞膜の EGFR 発現の回復に伴い、E-cadherin の発現が上昇、上皮様形態も一部回復した。同時に gefitinib 感受性の有意な回復が見られた。

3. HER2 陽性 Trastuzumab 耐性胃癌細胞株を用いた Tmab 耐性機構の解析

HER2 陽性 (遺伝子増幅) 胃癌細胞株 (GLM-1) から Herceptin 耐性株 (GLM1-

HerR2)を(*in vitro* では Herceptin は殆ど増殖抑制しないため)、*in vivo* selection により分離し、耐性機構について検討した。免疫組織およびウエスタンブロット、qRT-PCR による解析から耐性株 GLM1-R2 において膜結合型ムチンの一つである MUC4 の発現亢進が明らかとなった。MUC4 は EGF-like ドメインを介して HER2 と結合性を有し、シグナル伝達に関与することが乳がん細胞で知られている。そこで次に免疫沈降、ウエスタンブロット法により両者の結合性を検討したところ、HER2 は HER3 および MUC4 との複合体を形成すること、すなわち HER2/HER3 ヘテロダイマーに MUC4 が結合し、さらに下流 (PI3K/Akt)シグナルが活性化されている可能性を見いだした。以上のことから HER2 陽性胃癌細胞の Trastuzumab 耐性に MUC4 のアップレギュレーションが関与する可能性が示された。

4. Trastuzumab 耐性株に対する可逆性、不可逆性 TKI の抗腫瘍効果

GLM-1 細胞ならびに耐性株 GLM1-HerR2 に対し、まず可逆性 EGFR/HER2 dual TKI である Lapatinib の抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro*, *in vivo* ともに有意な抗腫瘍効果を示し、さらに Trastuzumab との併用療法において additive な抗腫瘍効果を明らかにした。一方、不可逆性 TKI は *in vitro* では Lapatinib の IC₅₀=2 に比べて、IC₅₀=0.1 と有意に強い増殖抑制効果を示し、*in vivo* のヌードマウス移植腫瘍系でも Lapatinib に比べ強い抗腫瘍活性の傾向 (ただし、統計的有意差はなし) が認められ、Trastuzumab 耐性株に対する有効性が示唆された。

D. 考察

1,2) Gefitinib 抵抗性 HNSCC 細胞株から

の EMT 形質を示す亜株の分離とそれを用いた EMT 発生機構の解析

EMTを獲得し、より悪性化する消化器がんはHNSCCに限らず胃がん、大腸がんなど臓器を超えて普遍的に見られる。今回の研究からこれらの癌は従来報告されてきた化学療法のみならず、EGFRを標的とする分子標的治療に対しても耐性機構としてEMTを獲得する可能性が明らかとなった。今回、gefitinib耐性の81-Fb細胞ではEGFRの発現低下とそれと代償的なAkt/GSK3b/snail経路の活性化が見られた。このSnail発現はPI3K 阻害剤であるLy294002により有意に抑制されたことから81-Fb細胞のEMT形質獲得にAkt/GSK3b/snail経路が関与していることが明らかとなった（下図）。ただし、代償性に発現が亢進していると予想されるリガンドとその受容体が何であるかは現時点では不明である。

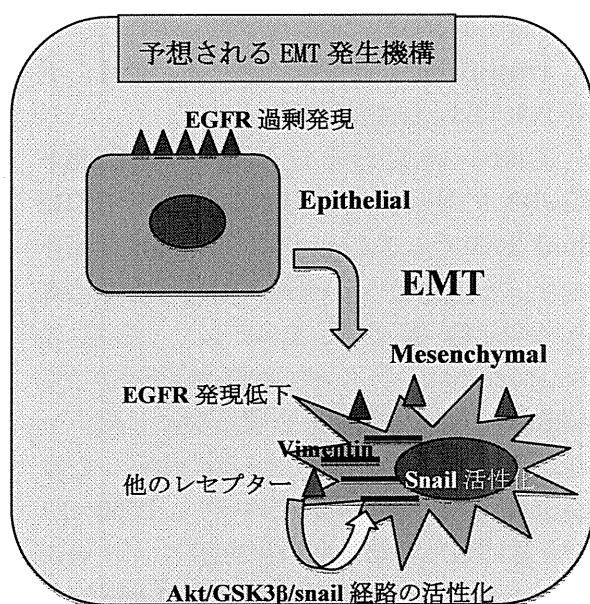


図 HNSCC細胞におけるEMT発生のメカニズム

可能性としてはEGFリガンドの発現亢進、TGF-beta/Smad 経路の活性化およびHRG/HER2経路の活性化等が考えられる。このうちEGFがEMTを誘導することはこれ

までに報告されているが、81-Fb細胞ではEGFリガンドの発現はむしろ低下しているので否定的である。またTGF-beta/Smad経路は確かに81-Fb細胞において活性化が見られるが、TGFR1受容体阻害剤であるSD208によりTGF-beta/Smad経路を阻害してもSnail発現に変化が見られなかったことからやはり否定的である。HRG/HER2経路の活性化に関してはHER3リガンドであるNeuregulin 2 (NRG2)とHER2のアップレギュレーションが認められることからNRG2によりHER2/HER3 ダイマー形成が促進され、結果的にPI3K/Akt経路が活性化された可能性が考えられるが、この点に関しては今後更なる詳細な検討が必要である。

3, 4) HER2 陽性 Trastuzumab 耐性胃癌細胞株を用いた耐性機構の解析と新規治療法

Trastuzumabは遺伝子増幅を伴うHER2高発現胃癌細胞に対してはin vitroではアポトーシス誘導を示さず、軽度の増殖抑制しか示さないが、in vivoの皮下腫瘍、腹膜転移に対

しては単独でも有為な抗腫瘍効果、転移抑制効果を有することからシグナル伝達経路の抑制よりも抗体依存性細胞障害活性(ADCC)が主として関与することをこれまでに明らかにしてきた。本研究ではまずLapatinibがTrastuzumabとは全く抗腫瘍効果の作用機序が異なり、PI3K/Aktシグナル経路の遮断によりアポトーシス誘導と細胞周期G1期停止を誘導することを実験的に明らかにした。さらに不可逆性TKIのHER2陽性胃癌およびTrastuzumab耐性株に対する抗腫瘍効果を比較検討したところ、in vitroでは有意に、in vivo（マウス移植モデル）でも前記Lapatinibよりも高い増殖抑制傾向ならびに抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。作用機序はLapatinibと同様、アポトーシス誘導と細胞周期G1期停止である

が、Lapatinibに比べ低い濃度でHER2下流のP-HER3、P-AktおよびP-Erk1/2シグナル経路のリン酸化（殊にPI3K/Akt経路）を阻害することが明らかとなり、これがより高い抗腫瘍効果を示す原因と考えられる。

一方、Trastuzumab耐性機構に関しては乳がんにおいて関与が報告されている P95 HER2 は HER2 陽性胃がんでは予想に反して耐性株においてアップレギュレーションは認められなかった。しかし、GLM-1 株においては耐性株で膜結合型ムチン糖タンパクである MUC4 のアップレギュレーションが認められた。また HER2 は HER3 および MUC4 との複合体を形成すること、すなわち HER2/HER3 ヘテロダイマーに MUC4 が結合し、さらに下流(PI3K/Akt)シグナルが活性化されていること

を見いだした。以上のことから MUC4 は従来言われている糖鎖による Trastuzumab 抗体の HER2 への結合阻害ばかりではなく、HER2 下流シグナルの PI3K/Akt 経路を活性化することにより耐性を獲得するという新しい耐性機序の可能性が示唆された（下図）。

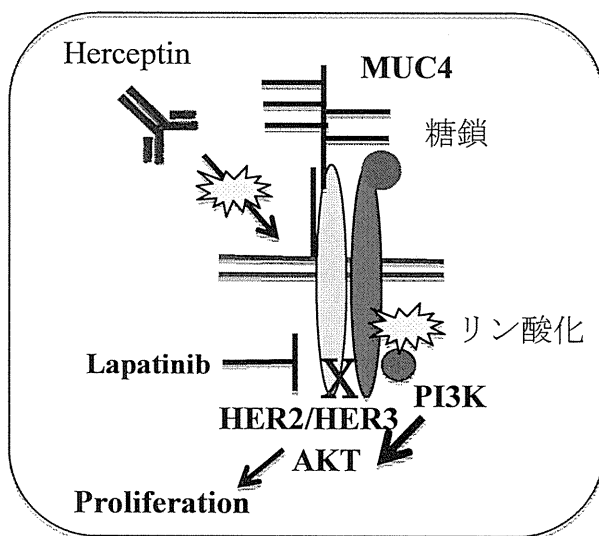


図 予想される MUC4 を介した Trastuzumab 耐性機構

Trastuzumab の大規模な第 III 相試験 (TOGA study)の結果に続いて、現在、化学療法にLapatinib を併用する群としない群の 2 アームの大規模な第 III 相試験 (LOGiC Trial)が進められている。今回の我々の前臨床試験の結果からも、Lapatinibの臨床試験の結果が待たれるところであるが、さらに次世代型として不可逆性TKIのHER2陽性胃がんに対する臨床試験も今後必要になってくるものと思われる。HER2陽性胃がんは分化型腺がん圧倒的に多く、我々の臨床材料を用いた免疫組織学的検討では、とくに肝転移では60% 以上がHER2陽性と考えられ、そのうちかなりの症例がHER2遺伝子増幅を有すると予想されることから、HER2を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、Trastuzumab、Lapatinibならびに不可逆性TKIなどの作用機序の異なる分子標的薬を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待できる。

E. 結論

頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)では新規に作成した gefitinib 抵抗性株から EMT 形質を示す亜株を樹立し、その機構を解析、EGFR の発現低下と代償性の Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が EMT を引き起こすことを明らかにし、また同シグナル経路の阻害により、EMT が抑制されることを明らかにし、EMT に対する新規治療法の可能性を示唆した。一方、日本人由来 HER2 陽性胃がん細胞株から Trastuzumab 耐性株を分離し、耐性株に対する Lapatinib と不可逆性 TKI の抗腫瘍効果を比較し、その主たる機構は PI3K/Akt 経路の遮断によるアポトーシス誘導であること、Lapatinib

に比べ不可逆性 TKI がより効果的であることを明らかにし、HER2 陽性胃癌ならびに Trastuzumab 耐性胃癌に対する新しい治療法となりうることを示唆した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
論文発表

1. Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, and Kodera Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. Gastric Cancer, in press, 2012.
2. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y.; TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. J Exp Med, in press, 2012.
3. Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, and Nakada H.; Different levels of Sialyl-Tn Antigen expressed on MUC16 in Patients With Endometriosis and Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer, in press, 2012.
4. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E and Nakanishi H.; Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-

resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signaling pathway. Br J cancer, 106(6):1196-1204, 2012.

5. Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H.; Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. Clin Exp Metastasis, (3):229-38, 2012.
6. Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Murakami H, Kodera Y.: "In Vivo Imaging" Methods and Protocols, Hoffman, R. M. (ed.), Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. Humana Press, Totowa, NJ. in press, 2012.
7. Hagiwara M, Niimi M, Kawahara T, Yamanishi Y, Nakanishi H, Arai F. : On-Chip Particle Sorting into Multiple Channels by Magnetically Driven Microtools. Journal of Robotics and Mechatronics, 23 (3), 370-377, 2011
8. Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, Takase T, Fujimoto I, Suda T, Nakamori S, Nakamura M, Nakayama F, Irimura T, Nakanishi H, Watanabe M, Narimatsu H, Nishihara S.: Expression and the role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma. Glycobiology, 21(2):235-246, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明名称：特定の糖鎖構造を有する糖タ

ンパク質を検出することによる癌を検出する方法 特願 2009-188106 出願人：独立行政法人産業技術総合研究所、愛知県、学校法人東京医科大学 発明者：池原 譲、 他 3 名（独立行政法人産業技術総合研究所）：中西速夫（愛知県がんセンター）：野口雅之（筑波大学）：野村将春（東京医科大学）

2. 発明名称：上皮性卵巣癌鑑別マーカー上皮性卵巣癌鑑別マーカー 特願 2011-005199 出願人：独立行政法人産業技術総合研究所、愛知県 発明者：池原 譲、成松 久、 他（独立行政法人産業技術総合研究所）：中西速夫、中西 透（愛知県がんセンター）
3. 発明名称：卵巣癌の検出方法、卵巣癌と子宮内膜症との鑑別方法、並びにキット 特願 2011-16236 出願人：学校法人京都産業大学、独立行政法人産業技術総合研究所、愛知県、京都府公立大学法人 発明者：中田 博、秋田 薫（京都産業大学）：成松 久、池原 譲（独立行政法人産業技術総合研究所）：中西速夫（愛知県がんセンター）：北脇 城（京都府立医科大学）
4. 発明名称：がん細胞自動分離装置およびがん細胞自動分離方法 特許出願番号：特願 2011-115083 出願人：名古屋大学、愛知県 発明者：新井 史人、益田 泰輔、新美 京（名古屋大学）：中西速夫（愛知県がんセンター） 出願日：平成 23 年 5 月 24 日

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

胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

研究分担者 関戸好孝

愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 悪性腫瘍は様々なジェネティック異常およびエピジェネティック変化の蓄積により発生・進展する。胸部腫瘍の中でも悪性胸膜中皮腫は標準的な化学療法、放射線療法に対して極めて抵抗性が高く、患者予後は不良である。悪性中皮腫細胞株の網羅的発現解析を行い、細胞接着に係る **ALCAM** 分子が高発現し、悪性中皮腫の浸潤能、運動能などの悪性形質を促進することを明らかにした。**ALCAM** のホモフィリック結合を阻害する可溶性 **ALCAM** (**sALCAM**) を精製して細胞培養液中に添加したところ、中皮腫細胞の浸潤能、運動能を抑制した。一方、昨年度までに明らかにした中皮腫における転写コアクチベーターであるがん遺伝子 **YAP** の恒常的活性化について検討を進め、**YAP** が恒常的に活性化している中皮腫細胞株3株において **YAP** のノックダウンを行い、網羅的発現解析を行った。3細胞株に共通して発現が低下した遺伝子を解析したところ、**YAP** により正に制御される遺伝子は228個あり、細胞周期に関わる遺伝子が多く関与していた。その中で、**Cyclin D1 (CCND1)**、**Forkhead box M1 (FOXM1)** 遺伝子はプロモーター領域に **YAP-TEAD** が結合して転写が亢進され、中皮腫の細胞増殖が促進されることが明らかとなった。本年度の研究の推進により、悪性中皮腫の悪性化に関わる機構と、その分子標的としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫は極めて難治の胸部悪性腫瘍である。ゲノム変異やエピジェネティック異常、さらにそれらによって引き起こされる細胞内シグナル伝達系の異常に関する知見も他の頻度の高い腫瘍に比べて極めて乏しい。本研究では悪性中皮腫における新たなゲノム異常を同定し、その遺伝子産物に関わる細胞内シグナル伝達系や細胞膜表面蛋白を標的とした新規治療戦略を構築することを目的とする。同時に小分子化合物や既知の阻害剤に対する中皮腫細胞の感

受性や細胞特性を検討する。これらのアプローチにより、より有効な治療標的分子・標的シグナル伝達系を見出し、悪性中皮腫に対する新たな治療戦略開発を試みる。

B. 研究方法

中皮腫細胞株は当部で樹立した中皮腫細胞株（**Y-MESO-9**, **Y-MESO-14**, **Y-MESO-27** など14株）、**Dr. Adi F. Gazdar** あるいは **ATCC** から供与を受けた中皮腫細胞株（**NCI-H290**, **MSTO-211H** など5株）および不死化正常中皮細胞

(MeT-5A) を使用した。

アジレント社の 44K オリゴアレイを用いて網羅的発現解析を行った。個々の遺伝子・蛋白発現およびリン酸化修飾は real-time RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色法などを用いた。外科的に切除された中皮腫切除標本を用いて免疫組織染色を施行した。

全長 ALCAM および可溶型 ALCAM の cDNA を作成し、pcDNA3.1 ベクターにクローニングした。可溶型 ALCAM 発現ベクターを HEK293FT 細胞にトランスフェクションして上澄みを回収し、His-タグ蛋白抽出キットを用いて抽出し、さらに透析して精製した。

クロマチン免疫沈降法に関しては、CCDN1, FOXM1 のプロモーター領域に対する PCR プライマーを作成し、細胞抽出物に対して抗 YAP 抗体、抗ヒストン H3 抗体で免疫沈降を行った後、沈降物をテンプレートとして PCR を行った。リポーターアッセイに関しては、CCDN1, FOXM1 のプロモーター領域をクローニングし、pGL3 ルシフェラーゼリポータープラスミドに組み込んだ。

細胞内への遺伝子導入は、plasmid 発現ベクターおよびレンチウイルス (pLL3.7) を用いた。細胞増殖は細胞数および MTT アッセイ法にて検討した。細胞の運動能、浸潤能は Boyden-Chamber 法を用い、後者においてはマトリジェルコートフィルターを使用した。足場非依存性増殖能はソフトアガロース寒天培地法を用いた。動物移植モデルは KSN/Scl ノードマウス (6-8 週、雌) を用いた。細胞株 5×10^6 個を胸腔に移植し、隔日にマウスの体重および生存を

モニターし、生存曲線は Kaplan-Meier 法にて記載し、log-rank 法にて有意差を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を、動物実験においては動物委員会の審査・承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 悪性中皮腫細胞における ALCAM/CD166 発現解析

中皮腫細胞株から抽出した RNA を用いて網羅的発現解析を行った。103 個の細胞接着に関わる遺伝子に着目したところ、ALCAM は 2 番目に発現スコアが高かった。定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法を用い、不死化正常中皮細胞株 MeT-5A に比べ中皮腫細胞株 20 株すべてにおいて ALCAM の高発現を確認した。さらに、免疫組織染色では 47 例中 26 例 (55%) において ALCAM の発現は陽性であった。中皮腫細胞株 2 株を用いて RNA 干渉法による ALCAM ノックダウンを行い悪性形質の変化を検討したところ、増殖への影響は認めなかった一方、運動能、浸潤能は 30-50% の低下を認めた。可溶型アイソフォーム sALCAM 蛋白を作成・精製し、細胞株培養液中に添加したところ、中皮腫細胞株の運動能・浸潤能の低下を誘導した。さらに、中皮腫細胞に sALCAM を発現させ、マウ

ス胸腔内に移植して経過を観察したところ、マウスの生存が有意に延長した。

2. YAP の活性化による転写標的遺伝子の同定

がん遺伝子産物 YAP の恒常的活性化が認められた3つの悪性中皮腫細胞株 (H290, Y-MESO-27, Y-MESO-30) に対して YAP のノックダウンを行った後、網羅的発現解析を行った。共通して発現が低下した遺伝子 228 個の遺伝子に対して Gene Ontology および Gene pathway 解析を行ったところ、細胞周期に関わる遺伝子群が有意に低下していた。CCDN1, FOXM1 のプロモーター領域に YAP-TEAD 結合モチーフが想定されたため、クロマチン免疫沈降法を行ったところ、YAP および TEAD は両遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用い、YAP および TEAD を発現させると CCND1, FOXM1 の転写能が上昇し、恒常的活性変異型 YAP をトランスフェクションすることにより、さらに転写能が増強されることが明らかとなった。RNA 干渉法を用いて中皮腫細胞における CCND1, FOXM1 をノックダウンしたところ、CCDN1 抑制により G1 アレストが誘導された。しかし、YAP そのものに比べ、CCND1, FOXM1 それぞれ単独の増殖抑制能は顕著ではなかった。

3. HDAC 阻害剤による中皮腫細胞抑制効果の検討

中皮腫細胞株 (MSTO-211H および H290) を生後 5-6 週の KSN/slc 雌ヌードマウスの右胸腔内移植した。移植後 3 日目か

ら腹腔内にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (SAHA および YM753) を隔日投与し、マウスの体重およびの生存を観察した。カプランマイヤー法にて生存曲線を作成し Log-Rank テストにて検定したところ、HDAC 阻害剤間における有意な生存能延長に対する差は観察されなかった。

D. 考察

悪性中皮腫細胞において細胞接着分子 ALCAM が腫瘍細胞の悪性形質を促進させることが明らかとなった。ALCAM は細胞膜に局在する分子であり標的分子として様々な阻害剤のアプローチが行いやすいと考えられた。他の癌腫においても同様に ALCAM のがん促進性が報告されつつあり、本研究結果を支持するものであると考えられた。

Merlin-Hippo シグナル伝達系は中皮腫の 70-80% において不活性化しており、その結果として、YAP ががん遺伝子産物が恒常的に活性化される。本年度の研究で、転写コアクチベーターとして機能する YAP の標的遺伝子として細胞周期に関わる遺伝子の関与が明らかとなった。CCDN1, FOXM1 が YAP-TEAD によって直接転写制御される遺伝子であることが示されたが、それぞれの単独のノックダウンでは悪性中皮腫細胞の増殖能は一部抑制されるものの、YAP に比べて効果が少ないことが示唆された。このことは、Merlin-Hippo シグナル伝達系破綻の鍵となる分子は YAP そのものであり、YAP を中皮腫治療の分子標的としてとらえる重要性をさらに示唆するものであると考えられた。

E. 結論

悪性中皮腫において細胞接着因子である ALCAM が発現し、中皮腫の悪性化に関与していることが示唆された。ALCAM は悪性中皮腫の新規分子治療標的候補になりうる可能性が示唆された。Merlin-Hippo シグナル伝達系に関わる異常はがん遺伝子である YAP の恒常的活性化を引き起こし、CCND1, FOXM1 などの細胞周期促進に関わる遺伝子の発現を直接、亢進していることが明らかになった。CCND1, FOXM1 のノックダウンは中皮腫細胞の増殖等の抑制を引き起こすが、YAP に比べてその抑制能は顕著ではなく、YAP そのものをターゲットとして治療法の可能性を探ることが重要であることが示唆された。中皮腫に対する HDAC 阻害剤は *in vivo* における効果は限定的であることが明らかとなった。本年度の一連の研究により、悪性中皮腫細胞の分子特性が明らかとなり、新たな治療戦略の可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y: Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Ann Surg Oncol* , in press.

2. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. *Oncogene*, in press.
3. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii F, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Promotes Malignant Phenotypes of Malignant Mesothelioma. *J Thorac Oncol*, in press.
4. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med* 209 : 479-494, 2012.

2. 学会発表

1. 藤井万紀子、豊田武士、長田啓隆、谷田部恭、松平康枝、村上秀樹、近藤豊、樋田豊明、関戸好孝: 悪性中皮腫細胞の増殖における CTGF (connective tissue growth factor) の役割について。日本組織培養学会第 84 回大会 (東京) (口演) 2011.

2. 水野鉄也、村上秀樹、藤井万紀子、石黒太志、近藤豊、赤塚慎也、豊國伸哉、横井香平、長田啓隆、関戸好孝: ヒト悪性胸膜中皮腫における YAP を介した細胞増殖機構。第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (東京) (ポスター) 2011.
 3. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni T, Ueda Y, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP transcription coactivator induces malignant mesothelioma cell proliferation by up-regulating cell cycle progression. The 14th World Conference on Lung Cancer (Amsterdam) (Poster) 2011.
 4. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth by inducing CTGF expression. FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES: The TGF- β Superfamily : Signaling in Development and Disease. (Italy) (Poster) 2011.
 5. 関戸好孝: 悪性中皮腫における Hippo シグナル伝達系異常。第 84 回日本生化学会大会 (京都) (シンポジウム) 2011.
 6. 水野鉄也、村上秀樹、藤井万紀子、石黒太志、近藤豊、赤塚慎也、豊國伸哉、上田裕一、横井香平、長田啓隆、関戸好孝: YAP transcriptional coactivator induces malignant mesothelioma cell proliferation via up-regulating cell cycle-regulating genes including CCND1. 第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋) (ポスター) 2011.
 7. 藤井万紀子、豊田武士、中西速夫、谷田部恭、佐藤鮎子、村上秀樹、近藤豊、近藤英作、樋田豊明、辻村亨、長田啓隆、関戸好孝: 悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- β シグナルと hippo pathway の役割。第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋) (ポスター) 2011.
 8. 関戸好孝: 悪性中皮腫の分子病態。第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋) (セミナー) 2011.
 9. 石黒太志、村上秀樹、水野鉄也、藤井万紀子、近藤豊、宇佐美範恭、横井香平、長田啓隆、関戸好孝: Overexpression of activated leukocyte cell adhesion molecule is involved in invasion of malignant mesothelioma cells. 第 70 回日本癌学会学術集会 (名古屋) (ポスター) 2011.
 10. Sekido Y: Dysregulation of signal transduction cascades in malignant mesothelioma cells induces connective tissue growth factor (CTGF) expression. 9th China-Japan Joint Conference of Cancer (Shanghai)(Oral) 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

研究分担者 稲垣 昌樹

愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

<研究要旨>正常上皮細胞の分化の特徴は、はっきりした極性や細胞間接着などに見られる。このような分化と細胞増殖は相反する現象である。一方がんではこれらの分化の特徴がしばしば消失し、また無秩序な増殖に傾く。ケラチンは分化上皮細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白質であるにも関わらず、がんに関わりの深い上皮分化制御についての研究は立ち遅れていた。私どもは、ケラチン結合蛋白質アルバトロスとトリコプレインの解析を通じてケラチンおよびこれらの分子が上皮細胞の分化制御に関わるという新知見を増やしつつある。この2つの分子をそのアミノ酸配列から **TPHD** (トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン) 分子群と名付けた。**TPHD** 分子群の特徴は、分化状態では主に細胞間接着部位に、そして増殖中は主に中心体に局在を変えることである。このことは、**TPHD** 分子群が分化と増殖の両方の分子メカニズムに関わる **bi-player** 分子であり、がん化の新たなメカニズムに関与し得る可能性を示している。当研究においてはこの **TPHD** 分子群の主にトリコプレインの中心体機能解析について着目してきた。これまでに、その機能の一つがナイニン、**Odf2** 分子を介した微小管の係留であることを報告した。本年は、もう一つの機能として、トリコプレインは一次線毛形成を抑制するが、実はこれが円滑な細胞周期進行に必要であることを明らかにした。また、その分子機序として、トリコプレインがオーロラ A キナーゼと G1 期に結合しこれを活性化させることも、分子内ドメインのレベルで確認した。この成果の特徴は、分裂期キナーゼであるオーロラ A をトリコプレインが G1 期に活性化するという新知見と、もう一つはこの系を抑えると一次線毛が形成され細胞周期進行が止まるという新発見にある。つまりトリコプレインとオーロラ A キナーゼの結合を阻害するような薬剤が開発されれば、がん幹細胞に一次線毛形成を誘導することでがんを増殖停止へと導き得る可能性がある。

A. 研究目的

発がんに関わりの深い上皮細胞の極性形成・維持の調節機構の研究では、アクチンや微小管細胞骨格系の視点によるものに比べ、ケラチン（中間径フィラメント）細胞骨格系およびその結合蛋白質の視点から行

われた研究が立ち遅れていた。私どもは、新規ケラチン結合蛋白質分子群として、**TPHD**（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン）を有するアルバトロス、トリコプレインを同定した。現在までに、**TPHD** 分子群が細胞の分化相と増殖相に応じて、

細胞間接着部位あるいは中心体に局在する **bi-player** 分子であることを見出し、その機能的知見を増やしつつある。最終目標は、これらの分子の分化と増殖状態のそれぞれにおける細胞機能制御機構の解明であり、さらに **TPHD** 分子群の解析を通して得られる結果を統合していくことで、細胞分化と増殖の二律背反を分子レベルで理解し、がん化に関わる新たなメカニズムの解明を目指す。本年は、トリコプレインの中心体での分化増殖制御機能のうち特に一次線毛形成制御に関わる部分に焦点を置いて解析を行った。

B. 研究方法

1. 中心体での局在解析

それぞれに特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を高解像度顕微鏡（デルタビジョン）により確認した。また、分画を調整しそのイムノプロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

2. 分子間結合実験

イーストハイブリッド法、免疫沈降法、リコンビナント精製蛋白質による *in vitro* 結合実験を適宜行った。

3. オーロラ A キナーゼアッセイ

HeLa 細胞を用い、トリコプレインとオーロラ A の共発現によるオーロラ A リン酸化（**pT288**）の変化を検討した。また *in vitro* のキナーゼ活性変化はトリコプレインとオーロラ A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン **H3** を基質にすることで検討した。

4. トリコプレインの中心体機能の解析

siRNA による機能欠失、すなわちノックダウンを **HeLa** あるいは **RPE1** 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色により解析必要な分子の検討をした。トリコプレイン機能欠失による一次線毛形成については主に **RPE1** 細胞で検討した。表現型の確認のためには適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

5. トリコプレインの細胞周期制御の検討

RPE1 細胞では一次線毛形成と細胞周期停止は同時に起こることが知られている。そこでトリコプレインの細胞周期への直接影響の有無をみるために、一次線毛を生じない系を **IFT20** 蛋白質のノックダウンにより確立し、これにトリコプレイン **siRNA** を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討した。

6. トリコプレイン変異体解析

分子内ドメイン解析のため、トリコプレインの断片を蛋白質および発現ベクターとして作製し、上述の実験系で適宜使用した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組み換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. トリコプレインの中心体機能の解析

1-1 一次線毛形成抑制機能

一次線毛形成との関連については以下のような結果を得た。血清飢餓による増殖停止で一次線毛が形成されると **RPE1** 細胞ではトリコプレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコプレインを強制

発現すると、一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態でトリコプレインノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。同時に細胞周期の休止を認めた。この時オーロラ A キナーゼの活性化の指標である T288 のリン酸化は免疫染色およびイムノブロットで減弱した。この一次線毛形成はオーロラ A ノックダウンでも見られた。さらに、トリコプレインとオーロラ A キナーゼの直接結合を *in vitro* で確認し、*in vitro* キナーゼアッセイではトリコプレインがオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。トリコプレインの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化かつ中心体局在・機能に必要な最小単位が、1-130 アミノ酸残基であることを確認した。特に 52 番目のアラニンと 54 番目のトリプトファンがオーロラ A キナーゼの活性化に重要であった。

1-2 細胞周期制御との関与

細胞周期進行中は一次線毛形成が抑えられることは知られているが、そのメカニズムは今まで不明であった。トリコプレイン機能抑制は細胞周期の休止を起こしたが、一次線毛を除去した系ではそれが見られなくなった。このことは増殖マーカーすなわち Cyclin A の発現、BrdU の取り込み、FACS での S, G2/M 期の存在により確認した。つまり、トリコプレインは一次線毛形成を抑制することで円滑な G1 期細胞周期進行に寄与していると考えられる。まとめると、この成果の特徴は Aurora-A 分裂期キナーゼの活性化が実はトリコプレインによって G1 期の中心小体で起こることと、もう一つはこの系を抑えると一次線

毛が形成され細胞周期進行が止まるという新発見にある。

D. 考察

トリコプレインの中心体機能の特異性が、一次線毛形成抑制を含めた分化・増殖制御との関わりにおいて示せた。オーロラ A キナーゼの機能は活性化因子に依存して多様で、細胞分裂に伴う紡錘体形成のための中心体成熟に加え、非対称分裂や一次線毛形成抑制等、様々な分化・増殖制御との関連の報告が増えつつあるが、トリコプレイン-オーロラ A 活性化経路による一次線毛形成抑制の特異性を示せることの意味は大きい。つまりトリコプレインとオーロラ A キナーゼの結合を阻害するような薬剤が開発されれば、がん幹細胞に一次線毛形成を誘導することでがんを増殖停止へと導き得る可能性がある。

E. 結論

現時点での解析結果を統合すると、分化上皮細胞の細胞間接着部位にアルバトロスとトリコプレインは局在し、そのうちアルバトロスは極性化分子 Par3 と複合体を形成し、細胞極性を制御している。また、ケラチンはこの機能に対し促進的に働いている。中心体での分化増殖制御としては、アルバトロスは微小管重合核制御、トリコプレインは微小管係留そして一次線毛形成抑制による円滑な細胞周期進行への寄与が明らかになりつつある。これらの TPHD 分子群に見られるユニークな特徴は腫瘍化に関わる上皮細胞の分化増殖制御メカニズムとしても際立っている。

今後、これらの未解決な分子機構を結合

分子の検索等も駆使して補完し、その分子メカニズムの相違点を明らかにし、統合していくことで、**bi-player** 分子群およびケラチンによる上皮細胞の新規分化増殖制御機構の全容解明に努め、がん化のメカニズムを新たに理解する一助としたい。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ibi M, Zou P, Inoko A, Shiromizu T, Matsuyama M, Hayashi Y, Enomoto M, Mori D, Hirotsune S, Kiyono T, Tsukita S, Goto H, Inagaki M.: Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J. Cell Sci*, 124: 857-864, 2011.
2. Helfand BT, Mendez MG, Murthy SN, Shumaker DK, Grin B, Mahammad S, Aebi U, Wedig T, Wu YI, Hahn KM, Inagaki M, Herrmann H, Goldman RD.: Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell*, 22: 1274-1289, 2011.
3. Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M.: Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J. Cell Sci*. 124: 2113-2119, 2011.
4. Ohmuro-Matsuyama, Y., Inagaki M. and Ueda, H. Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich

Immunoassay. *Integrative Proteomics*. ed. Leung, H.-C.E. InTech, 197-214, 2012. (ISBN 978-953-51-0070-6)

5. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* in press.
6. Li P, Goto H, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, Inagaki M.: P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol Biol Cell*, in press.
7. Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M.: Novel regulation of checkpoint kinase 1 (Chk1): Is Chk1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci*, in press.

2. 学会発表

1. Inagaki M. : Novel regulatory mechanism of Plk1 at mitosis. MEXT Priority Research Project International Symposium “Cell Division”, 2011, (箱根), [シンポジウム]
2. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Inagaki, M.: Trichoplein blocks the aberrant assembly of primary cilia in proliferating cells. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, (名古屋), [シンポジウ

- ム]
3. Goto, H., Li, P., Yatabe, Y., Kasahara, K., Matsuyama, M., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation at Ser280 by p90 ribosomal S6 kinase (p90 RSK). 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, (名古屋), [ワークショップ]
 4. Izawa, I., Hayashi, Y. and Inagaki, M.: Odin/ANKS1A, a PTB domain-containing protein, is localized at focal adhesion. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, (名古屋), [ポスター]
 5. Kasahara, K., Goto, H. and Inagaki, M.: 14-3-3 gamma activates Plk1 and controls mitotic progression. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, (名古屋), [ポスター]
 6. Matsuyama, M., Kobori, K., Tanaka, H. and Inagakai, M.: Functional analyses of Vimentin phosphorylation in mice. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, (名古屋), [ポスター]
 7. Goto, H., Li, P., Kiyono, T., Matsuyama, M., Kasahara, K., Murakami, Y., Yatabe, Y. and Inagaki, M.: Chk1 Phosphorylation by p90 Ribosomal S6 Kinase (p90 RSK). The 51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011, (Denver), [ポスター]
 8. 笠原広介, 後藤英仁, 渡邊信元, 清野透, 稲垣昌樹: 新規リン酸化反応による分裂期キナーゼ Plk1 の活性制御メカニズム. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ワークショップ]
 9. 笠原広介, 後藤英仁, 渡邊信元, 清野透, 稲垣昌樹: 新規リン酸化反応による分裂期キナーゼ Plk1 の活性制御メカニズム. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ポスター]
 10. 松山誠, 田中宏樹, 小堀恭子, 井澤一郎, 稲垣昌樹: ビメンチンの細胞周期特異的なリン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変マウスは腫瘍形成や白内障を引き起こす. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ワークショップ]
 11. 松山誠, 田中宏樹, 小堀恭子, 井澤一郎, 稲垣昌樹: ビメンチンの細胞周期特異的なリン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変マウスは腫瘍形成や白内障を引き起こす. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ポスター]
 12. 李萍, 後藤英仁, 松山誠, 笠原広介, 村上善子, 谷田部恭, 清野透, 稲垣昌樹: p90 RSK (Ribosomal S6 Kinase) による Chk1-Ser280 のリン酸化修飾. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ポスター]
 13. Hee-Jin Jeong, 大橋広行, 大室(松山)有紀, 稲垣昌樹, 上田宏: Quenchbody 法によるビメンチンセリンリン酸化の検出. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, (横浜), [ポスター]