

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23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北林 一生

平成24（2012）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	8
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	10
直江 知樹	
3. 幹細胞を標的とした白血病根治療法の開発	12
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	15
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	19
的崎 尚	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書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

主任研究者 北林 一生 国立がん研究センター研究所 造血器腫瘍研究分野 分野長

研究要旨 急性骨髄性白血病(AML)幹細胞に関しては、特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 及び M-CSFR を同定した。これらは他の AML 幹細胞特異的抗原候補とは異なり、正常造血幹細胞に発現を認めない理想的な分子標的候補と考えられる。抗 Tim-3 抗体及び抗 M-CSFR 抗体を作成し、AML を再構築させたマウスで白血病幹細胞に対する殺細胞効果を検証した。今後は臨床応用への拡大を目指す。新規 STAT 阻害剤に関しては OPB-31121 の in vivo での抗腫瘍効果を検討した。マウスに腫瘍細胞株を皮下播種して作成した腫瘍は OPB-31121 の経口投与により著明に退縮した。また患者白血病細胞を骨髄内に移植したモデルにおいても、本薬剤の経口投与で白血病細胞の著明な減少と正常造血細胞の回復が確認された。スキルス胃がん細胞株のリン酸化蛋白質解析により、Met キナーゼとその下流のリン酸化が強く Met 阻害剤が増殖を抑制するグループと、Met 阻害剤が効かず Src 阻害剤が有効で、この経路が活性化したグループに分けられることが分かった。Ras を介した腫瘍の転移、浸潤特性の獲得は、下流の Erk の活性化により著明な発現誘導を受ける CDCP1 に依存することが示された。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のかにつき研究を行ったところ、受容体型 PTP である SAP-1 の脱リン酸化基質として腸上皮細胞に発現する pp90 を見出した。また、Shp2 の結合分子 SIRP α の抗体が新たながんの分子標的薬として利用できる可能性を示した。

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。

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。

STAT3 は細胞内の多くの細胞増殖シグナル経路で共用される主要な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ている。我々は大塚製薬との共同研究で、STAT3 の阻害剤の開発を進めている。昨年度までに、同社より阻害候補物質としてスクリーニングされてきた新規低分子化合物 OPB-31121 の STAT 抑制効果と抗腫瘍効果を検討し、本薬剤が ex vivo で多彩なヒト腫瘍細胞株に対し強い腫瘍増殖抑制効果を持つこと、ヒト腫瘍細胞株内で STAT3 のリン酸化を強力に抑制する事、そ

の作用機序は JAK family kinase や Src family kinase などの上流キナーゼの抑制ではない事などを確認した。そこで本年度はヒト腫瘍細胞株をマウスに播種したモデル、あるいは患者白血病細胞を高度免疫不全マウスに移植したモデル（より実際の白血病細胞に近い細胞を使って薬効を検討できる）での本薬剤の抗腫瘍効果を検討した。

また、急性リンパ性白血病 (ALL) で発見した PAX5-PML の分子生物学的発癌機序を昨年度までの研究で明らかにしてきたが、本年度はその正常カウンターパートである B 細胞分化の制御を担う PAX5 の機能制御について検討し、PAX5 の機能障害による造血器腫瘍発生の機序解明に努めた。

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、腫瘍で活性化したチロシン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。

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な点が多い。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。すでに、SIRP α を高度に発現するヒトメラノーマ細胞の *in vitro* での migration を抗 SIRP α 抗体が抑制することを明らかにしている。また、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貪食を負に制御することが知られている。そこで、前年度、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 遺伝子破壊 (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。そこで、本年度はさらに、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った。

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 surface 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、細胞傷害活性を有する抗ヒト TIM-3 モノクローナル抗体の作製を行い、マウス内

で再構築したヒト AML に対する治療モデルの確立、および AML 幹細胞における TIM-3 発現の生物学的意義の解明を行う。

造血器腫瘍を中心としたヒト細胞株を SCID マウス皮下に播種したモデル、あるいは患者白血病細胞またはリンパ腫細胞を NOG マウスの静脈内あるいは腹腔内に播種したヒト白血病／リンパ腫モデルマウスを作成した。これらに対し、OPB-31121 100～300mg/kg を 10～28 日間経口投与した後、骨髓、脾臓細胞中のヒト腫瘍細胞の割合をフローサイトメーターで計測した。試験管内でのリン酸化反応により MAP キナーゼによる PAX5 のリン酸化を確認するとともに、リン酸化サイト候補のアミノ酸に変異を導入し、リン酸化サイトを同定するとともにその変異の PAX5 機能に与える影響を検討した。PAX5 の機能として Blimp1 (形質細胞分化を制御する) の発現抑制能に注目し、リン酸化が Blimp1 発現抑制に与える影響を検討した。

胃癌細胞株を浸潤能や腹膜播種性の強いスキルスタイプの胃癌とそのような性質の弱い高分化型に分けてチロシンリン酸化蛋白質のパターンを抗リン酸化チロシン抗体を用いて解析する。その差につながるようなチロシンリン酸化蛋白質を精製したのち質量分析により同定し、機能解析を行う。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 の発現レベルが予後不良と相関が見られたことから、次にどのような経路の活性化が CDCP1 の発現に関わるのか肺がん細胞株と肺がん腫瘍組織の発現解析により明らかにする。腹膜播種に関わる分子を見出すために、スキルス胃癌細胞株 (44As3 細胞) を用いた腹膜播種マウスモデルにおいて、形成された腫瘍内で特異的にチロシンリン酸化状態が変化する蛋白質を LC/MS/MS で解析してきた。その系で同定された分子の一つで明らかに腹膜播種において異なった役割を持つ ARAP3 について機能解析を進め腹膜播種における役割を明らかにする。

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。

SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子として同定していた pp90 のモノクローナル抗体を作製し、組織分布や細胞内局在を検討した。また、pp90 の細胞内のチロシンリン酸化に重要な分子ならびに結合分子の探索を行った。さらに、培養細胞に強制発現した際のシグナル分子の挙動につき解析をした。B16 メラノーマ接種による肺転移モデルを用いて、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 (TA99) による腫瘍排除を検討すると共に、抗 SIRP α 抗体単独あるいは TA99 との併用による腫瘍排除の効果を検討した。

C. 研究結果

機能的 AML 幹細胞が TIM-3 を発現しているか否かを確認するために、同一症例より TIM-3 陽性 AML 細胞と TIM-3 陰性 AML 細胞を純化し、免疫不全マウスに異種移植を行い腫瘍再構築能力の差異を評価した。TIM-3 陽性 AML 細胞が効率的に AML をマウス内に再構築可能であるのに対して、TIM-3 陰性 AML 細胞は AML 再構築能力が認められなかった。即ち、CD34⁺CD38⁻Lin⁻で定義される表面形質上の AML 幹細胞のみならず、異種移植の系で定義される機能的 AML 幹細胞が TIM-3 を細胞表面に発現していることが確認された。次に、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 *in vitro* で確認した。そこで、臍帯血を移植しヒト正常造血を再構築した免疫不全マウスに ATIK2a 投与を行った結果、TIM-3 陽性単球のみが傷害され、正常造血幹細胞を

含めた TIM-3 陰性細胞に対して影響がない事が確認された。さらに、同様の異種移植により AML を再構築した免疫不全マウスに対して同様に ATIK2a 投与を行い *in vivo* での治療効果を評価したところ、ATIK2a 投与マウスではコントロール群のマウスと比較して有意にマウス内での AML 細胞が減少していた。次に、治療後残存する AML 細胞の幹細胞活性を評価するために、2 次マウスへの連続移植実験を行った。コントロール群マウスから回収した AML 細胞は 2 次マウス内に効率的に AML を再構築可能である一方、ATIK2a 投与群マウス内で残存する AML 細胞は 2 次マウス内における腫瘍再構築能力を失っていた。即ち、ATIK2a 治療により TIM-3 を高発現する機能的 AML 幹細胞が *in vivo* で傷害されていることが示された。ヒトへの臨床応用を目指して、まず ATIK2 のヒトマウスキメラ抗体を作成した。すなわち ATIK2a のマウス由来 Fab 可変部位とヒト由来 IgG1 定常部位を結合させた。現在まで複数のカニクイザルに投与し、その安全性を検証している。造血障害を含め明らかな重篤な副作用は認めていない。併せてヒト化モノクローナル抗体の作成も検討している。

細胞株のマウスモデルでは急性骨髄性白血病 (AML) 3 例 (KG-1, HEL92.1.5, HL-60)、ALL 1 例 (Tccy/sr)、慢性骨髄性白血病 (CML) 1 例 (KU812)、多発性骨髄腫 1 例 (CRL8062) を播種したモデルを作成した。OPB-31121 投与群ではコントロール群と比較し腫瘍サイズが 0~16% 程度に縮小しており著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた。特に KG-1 細胞では腫瘍の消失が認められた。ヒト白血病細胞マウスモデルは AML 1 例、ALL 3 例、CML 1 例を作成した。これらに対し OPB-31121 を経口投与し、治療群では腫瘍細胞割合がコントロール群に対し 4~58% に減少していた。興味深いのは OPB-31121 投与群では腫瘍細胞が減少するだけでなく、マウスの正常造血細胞が増加して骨髄の造血細胞の総数が治療群とコントロール群でほとんど変化がないことであった。これは同じマウスをシタラビン (既存の抗がん剤のコントロールとして使用) で治療した時に、腫瘍細胞数は減少したものの正常造血細胞も同じ程度に減少し (つまり骨髄全体の細胞数が減少し)、腫瘍細胞割合は治療群とコントロール群でほとんど変化が無かった事と対照的で、OPB-31121 の増殖抑制が腫瘍特異的である事を示唆していた。PAX5 は 189, 283 番目のセリンで MAP

キナーゼによりリン酸化された。そのリン酸化は PAX5 による Blimp1 発現抑制能を低下させ、抗原刺激による Blimp1 発現上昇に重要であった。

スキルス胃がん細胞株は高分化型胃がんに比べ明らかにチロシンリン酸化レベルが高く、複数のチロシンリン酸化蛋白質のバンドが認められたが、その中で約半数に見られた約 180 kD の強くチロシンでリン酸化された蛋白質は、質量分析の結果 Met キナーゼであった。このような細胞株ではメット阻害剤により Erk や Akt のリン酸化が抑制され細胞の増殖抑制効果もはっきりと認められたが、残りの約半数の細胞株では、Met 阻害剤の増殖やシグナルに対する効果は弱く、逆に Src 阻害剤がこちらの群に特異的に増殖成功かがあることがわかった。それぞれの群に特徴的なチロシンリン酸化蛋白質の同定・機能解析が進行している。CDCP1 の発現に Ras-Erk 経路の活性化が大きく関わっていることが明らかになった。Ras の活性化した細胞株や組織では CDCP1 の発現が有意に高く、また活性化 Ras 経路をブロックすることで、CDCP1 の発現は抑制された。活性化 Ras によりもたらされる細胞運動能や足場非依存性増殖は誘導される CDCP1 に依存的であることも示され、CDCP1 が活性化した Ras の主要なエフェクターとして働いていることが明らかになった。マウスモデルでの腹膜播種部位の腫瘍組織におけるリン酸化蛋白質として同定された ARAP3 は、その発現がほとんど無いスキルス胃がん細胞株に恒常的に発現させたところ、予想に反してヌードマウス腹膜播種モデルにおける腸間膜転移や血清腹水の産生が顕著に抑制された。また、ARAP3 を発現するスキルス胃がん細胞である 44As3 細胞から ARAP3 の発現を恒常的に抑制したところ、細胞の接着能と浸潤能・運動能が亢進することが分かった。ARAP3 変異体を発現させる実験によりこの腹膜播種抑制能は ARAP3 の RhoGAP 活性を持つドメインと、チロシンリン酸化部位が重要であることが明らかになった。ARAP3 はチロシンリン酸化を介した他分子との結合と低分子量 G 蛋白質の Rho の制御によって浸潤や腹膜播種を抑制する分子であることが示された。

SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子 pp90 の組織発現を検討したところ、腸管に特異的に発現し、さらに腸上皮細胞の微絨毛に局在することが明らかとなった。また、pp90 の細胞内領域のチロシンリン酸化には、細胞質型チロシンキナーゼの Src や Fyn が重要であり、SAP-1 の強制発現により脱リ

ン酸化されることが分かった。さらに、pp90 の強制発現により、MAP キナーゼの活性化や複数のシグナル分子のチロシンリン酸化が誘導されることが明らかとなった。マウス B16 メラノーマにおいても、SIRP α が高度に発現することを確認した。そこで、B16 メラノーマ接種による肺転移モデルにおいて抗 SIRP α 抗体単独の効果を検討した結果、有意に肺転移を抑制することが分かった。また、ADCC 活性を有する抗メラノーマ特異的抗体 TA99 との併用による腫瘍排除の効果を検討したところ、有意な相乗効果が観察された。現在、この機序につき細胞特異的 SIRP α KO マウスなどを用いて検討中である。

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。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全く発現していないことから、理想的な標的対象である。本研究では、モノクローナル抗体 ATIK2a を開発し、マウス内で再構築した AML に対する *in vivo* での劇的な治療効果を確認しており、臨床応用が期待される。今後は AML 幹細胞における TIM-3 の機能解析を行う。以上のように、AML 根治に向けた基盤技術開発として、本研究の果たす社会的意義は極めて大きい。

今回の結果から OPB-31121 は生体内でも強い腫瘍増殖抑制を示す事が確認された。本薬剤でマウスの正常造血が障害されず、薬剤投与中にむしろ正常造血が回復してきた事は非常に興味深く、本薬剤は骨髓抑制をきたす事の無い安全な抗がん剤となる可能性がある事を示唆している。今後はヒト正常臍帯血を NOG マウスに移植したモデルを作成し、本薬剤の正常造血細胞への影響を検討していく予定である。STAT3 はがん細胞だけでなく正常細胞にとっても重要な増殖／生存シグナルであるが、おそらく腫瘍細胞ではその異常増殖を支えるために STAT3 シグナルへの依存度がより高いものと予想される。そのことが本薬剤により腫瘍増殖

が特異的に抑制された原因であると考えられた。本研究の成果などをもとに大塚製薬では本薬剤の第一相臨床試験を肝細胞癌に対して開始した。患者リンパ腫細胞を移植したマウスモデルも作成し、今後本薬剤の効果も検討していく予定であるが、上述の白血病マウスモデルと併せて、NOG マウス内で継代可能となった白血病／リンパ腫細胞を成果有体物として届けた。B 細胞受容体を抗原が刺激すると Blimp1 発現が上昇し、形質細胞分化の契機になる事は知られていたがその機序は不明であった。今回の研究で抗原刺激は MAP キナーゼシグナルを介して PAX5 をリン酸化し、それによる PAX5 の Blimp1 抑制の解除が Blimp1 発現、更には形質細胞分化を誘導するという機序が明らかになった。PAX5 の過剰発現がリンパ腫発症の原因となる報告がなされているが、これは PAX5 の過剰発現により B 細胞受容体からのシグナルによっても PAX5 による Blimp1 の発現抑制を解除できなくなり、形質細胞への分化が障害されることが原因であると推測される。

本研究では、チロシンキナーゼの基質分子に焦点を当て、*in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて転移や腹膜播種の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。

スキルス胃がんは Met 阻害剤の感受性に差があることは経験的に知られているが、今回のシグナルレベルの解析でその 2 つの群を見分け、更に感受性の低い群には Src ないしその下流の阻害剤が有効である可能性が示唆された。また今回 CDCP1 が発現レベルで Ras のコントロール下にあることが明らかになり、これまでの Src に基質としての CDCP1 の働きの解析と併せて CDCP1 は 2 つのがん蛋白質 Ras と Src をリンクして、これら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。CDCP1 は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が示唆された。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。

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。すでに、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 を同定しており、今年度はこの pp90 の性状を詳細に解析した。pp90 は腸上皮細胞に高度に発現し微絨毛に局在することから、この分子が in vivo における SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質である可能性がより高まった。また、pp90 のチロシンリン酸化の機序や下流の細胞内シグナルが一部明らかとなった。今後は、pp90 の生理機能や 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。すでに、SIRP α KO マウスにおいて抗メラノーマ特異的抗体による腫瘍排除が顕著に増強することを見出しており、抗 SIRP α 抗体を用いて CD47-SIRP α 結合を阻害することで、ADCC 活性を有する分子標的薬の効果増強の可能性が示唆された。今回、抗 SIRP α 抗体単独でも、メラノーマの肺転移を抑制したことから、抗 SIRP α 抗体が 2 つの異なる機序を介したがん治療薬として利用できる可能性が考えられた。今後、抗 SIRP α 抗体単独の効果が、この抗体自体が誘導する ADCC 活性を介したものであるか否か、あるいはがん細胞の migration を抑制し転移の過程を阻害しているかなどにつき、in vitro 系における検討が必要である。

E. 結論

急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病 M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であり、M-CSF 受容体の阻害剤や抗体医薬による治療が期待される。

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。免疫不全マウスを用いた in vivo での治療モデル確立に成功しており、TIM-3 に対する標的治療の有用性が期待される。今後は臨床応用への拡大を目指す。

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。

今回の研究でチロシンリン酸化蛋白質が伝えるシグナルが、それぞれ転移・浸潤に関わる違った特性に作用することにより転移・浸潤の成立に深く関わることを示すことができた。このような分子が腫瘍の特性や組織系に照準を絞った次世代の分子標的治療の絶好のターゲットとなりうることが示された。

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。

本研究により、受容体型 PTP である SAP-1 の作用機構に新規膜型分子である pp90 が関与する可能性が示唆された。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、がんの分子標的薬として利用でき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, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci.*, 124:2208-2219, 2011.

Shima Y, Kitabayashi I. Deregulated transcription factors in leukemia. *Int J Hematol.* 94:134-41, 2011.

Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood.* 118:2443-53, 2011.

Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma SI, 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.

Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* 208: 285-294, 2011

Kamimura T, Miyamoto T, Harada M, Akashi K. Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci* 102: 1929-1937, 2011

Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 458-465, 2011

Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20: 246-259, 2011

Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118: 6702-6708, 2011

Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant* ,2011

Kawano N, Yoshida S, Ono N, Himeji D, Nagahiro Y, Sayaka Kawano, Yamashita K, Ikeda N, Uezono S, Ochiai H, Kawano F, Kikuchi I, Ishikawa F, Shimoda K, Ueda A, Akashi K. Clinical features and outcomes of 35 disseminated intravascular coagulation cases treated with recombinant human soluble thrombomodulin at a single institution. *J Clin Exp Hematop* 51: 101-107, 2011

Niino H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 119: 2263-2273, 2011

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 p110a regulates invadopodia formation. *J. Cell Biol.* 193: 1275-1288, 2011

Uekita T, Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 102: 1943-1948, 2011

Iwamura H, Saito Y, Sato-Hashimoto M, Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Kanazawa Y, Kaneko T, Kusakari S, Kotani T, Nojima Y, Matozaki T. Essential roles of SIRP α in homeostatic regulation of skin dendritic cells. *Immunol Lett*, 135: 100-107, 2011.

Sato-Hashimoto M, Saito Y, Ohnishi H, Iwamura H, Kanazawa Y, Kaneko T, Kusakari S, Kotani T, Mori M, Murata Y, Okazawa H, Ware CF, Oldenborg P-A, Nojima Y, Matozaki T. Signal regulatory protein α regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen. *J Immunol*, 187: 291-297, 2011.

Verjan Garcia N, Umemoto E, Saito Y, Yamasaki M, Hata E, Matozaki T, Murakami M, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, Jang MH, Aozasa K, Miyasaka M. SIRP α /CD172a regulates eosinophil homeostasis. *J Immunol*, 187: 2268-2277, 2011.

Zhao X, van Beek EM, Schornagel K, van der Maaden, H, van Houdt M, Otten MA, Finetti P, van Egmond M, Matozaki T, Kraal G, Birnbaum D, van Elsas A, Kuijpers TW, Bertucci F, van den Berg TK. CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 18342-18347, 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

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 造血器腫瘍研究分野 分野長

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

急性骨髄性白血病(AML)は造血幹細胞・前駆細胞が染色体転座や複数の遺伝子変異を獲得し、分化の阻害された異常な芽球がクローナルに増殖した疾患である。AML は従来の化学療法により高い寛解率が得られるが、長期的には約 60%に再発がみられることから、おもに静止期にある白血病幹細胞が根絶されず、微小残存病変として生き残っていることが示唆される。AML 根治のためには白血病幹細胞を標的とした治療の早期開発が重要である。本研究では、白血病幹細胞の維持に必須な因子およびその機能を見出し、AML 根治療法の開発を目指す。われわれは、ポリコム複合体 PRC1 を構成する RING タンパク (Ring1A および Ring1B) が、白血病幹細胞の維持に必須であることを明らかにした。RING タンパクが白血病幹細胞標的治療開発につながると考え、Ring1A および Ring1B による白血病幹細胞の制御機構を解析した。

B. 研究方法

Ring1A および Ring1B は相補的な作用を示すため、ダブルノックアウトマウスでの解析を行った。Ring1A ノックアウトマウスは目立った phenotype を示さないが、Ring1B ノックアウトマウスは胎生致死のため、Ring1B についてはコンディショナルノック

アウトマウスを用いた。

①Colony formation assay

マウスの骨髄幹細胞・前駆細胞にレトロウイルス感染の系を用いて AML 融合遺伝子 MOZ-TIF2 を導入した。感染した細胞をセルソーターでソートし、半固形培地で繰り返し培養し、コロニー形成能を評価した。

②マイクロアレイ解析

Ring1A 欠損および Ring1A/B 欠損の MOZ-TIF2 白血病細胞を回収し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の変化を評価した。

③Ring1A/B 標的遺伝子の機能解析（強制発現・ノックダウン）

上記②で抽出された遺伝子のうち、Ring1A/B の標的遺伝子を抽出し、機能解析を行った。

C. 研究結果

①Colony formation assay

Ring1A 欠損の MOZ-TIF2 白血病細胞では Wild-type と同様に compact なコロニーが繰り返し多数観察された。一方 Ring1A/B 欠損細胞では、コロニーの形態が compact から loose に変化し、継代を重ねるにつれ、コロニー形成能（不死化能）が失われた。また、コロニーを構成する細胞の形態を May-Giemsa 染色で観察すると、Wild-type および Ring1A 欠損細胞でみられた N/C 比の高い単球系の未熟な細胞が

Ring1A/B 欠損細胞では減少し、マクロファージなど成熟した骨髄系の細胞が多数観察された。

②マイクロアレイ解析

Ring1A 欠損 MOZ-TIF2 細胞に比し、Ring1A/B 欠損 MOZ-TIF2 細胞で約 200 の遺伝子が 2 倍以上の発現上昇を示した。一方、2 倍以上の発現低下を示した遺伝子はわずか 13 であった。ポリコムタンパクは transcriptional repressor であることから、5 倍以上の発現上昇を示した 20 の遺伝子の中から細胞の分化誘導にかかわる遺伝子 Glis2 (Gli similar 2) に着目した。

③Ring1B 標的遺伝子 Glis2 の機能解析

1) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析

MOZ-TIF2 細胞を用いて Ring1B 抗体で ChIP 解析を行った結果、Ring1B は Glis2 の promoter 領域に局在することが示された。また、RING はヒストン H2A を基質の一つとするユビキチン化酵素であるが、Ring1B の局在する Glis2 の領域でヒストン H2A モノユビキチン化シグナルの上昇が観察された。

2) MOZ-TIF2 細胞における Glis2 強制発現の効果

Wild-type の MOZ-TIF2 細胞に Glis2 を導入し、半固形培地で培養した。その結果、compact なコロニーを示す control 細胞に比し、Glis2 強制発現細胞では loose なコロニー形態を示した。また、細胞の形態を確認すると、Glis2 強制発現細胞ではマクロファージが多数観察され、細胞の分化誘導がみられた。

3) Ring1A/B 欠損 MOZ-TIF2 細胞における Glis2 ノックダウンの効果

レンチウイルス感染の系を用いて Glis2 をノックダウンした MOZ-TIF2 細胞において Ring1A/B を欠損させると、control 細胞ではコロニーの形態が loose になり、細胞分化が誘導されたが、Glis2 ノックダウン細胞では compact のコロニーが維持され、細胞の分化も一部抑制された。

D. 考察

本研究において、Ring1A/B による白血病幹細胞の制御メカニズムのひとつとして、Glis2 抑制経路を見出した。Glis2 は転写因子であり、本来腎臓や神経に発現し、ヒトでは先天性ネフロン癆の原因遺伝子として知られる。最近 Glis2 を含む融合遺伝子が急性巨核芽球性白血病の約 40% で同定され、白血病との関係も示された。ChIP 解析の結果から、Glis2 は Ring1B の direct target であり、Ring1B の存在下では Ring1A/B によるヒストン H2A モノユビキチン化を介してその発現が抑制されることが示唆された。

しかしながら、Ring1A/B 欠損の状態では、Glis2 のヒストン H2A モノユビキチン化は解除され、その結果 Glis2 は脱抑制し、白血病細胞の分化が誘導されることが明らかとなった。つまり、Ring1A/B は細胞分化を促進する Glis2 の発現を抑制することにより、白血病幹細胞の維持に貢献することが示唆された。

E. 結論

当初は Ring1A/B が白血病幹細胞の維持に必須であることから、Ring1A/B のユビキチン化活性の特異的阻害剤により、この活性を抑制することで白血病の治癒が期待できると考え、阻害剤の開発も検討した。しかしながら、Ring1A/B は正常造血幹細胞の維持にも必須である可能性が示唆されたため、今後はその標的である Glis2 による分化誘導などの機能を追求し、白血病幹細胞標的治療薬の開発につなげたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. J Cell Sci., 124:2208-2219, 2011.

Shima Y, Kitabayashi I. Deregulated transcription factors in leukemia. Int J Hematol. 94:134-41, 2011.

Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. Blood. 118:2443-53, 2011.

Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma SI, 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

分担研究者 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 シグナル伝達因子阻害剤の開発として、昨年度までに OPB-31121 が JAK キナーゼ活性を阻害する事なく STAT3 リン酸化を阻害し、幅広い種類の細胞株に対して強い腫瘍増殖抑制活性を持つ物質であることを示した。今年度はこの新規抗がん剤が、ヒト造血器腫瘍細胞株、及び患者白血病細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍活性を検討した。各種ヒト造血器悪性腫瘍細胞株を皮下播種したマウスの腫瘍は OPB-31121 の経口投与により退縮、または一部細胞株では消失した。また患者白血病細胞を高度免疫不全マウスに移植したモデルにおいても、本薬剤の経口投与で白血病細胞の著明な減少が確認された。一方でマウスの正常造血細胞の回復も確認され、本薬剤の増殖抑制効果が腫瘍特異的である事が示唆された。また昨年その分子的作用機序を明らかにした融合癌遺伝子 PAX5-PML（急性リンパ性白血病で認められる）の正常カウンターパートである PAX5 の機能が、抗原刺激を受けた B 細胞受容体からの MAP キナーゼシグナルによる PAX5 のリン酸化により制御されている事を明らかにした。

A. 研究目的

STAT3 は細胞内の多くの細胞増殖シグナル経路で共用される主要な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ている。我々は大塚製薬との共同研究で、STAT3 の阻害剤の開発を進めている。昨年度までに、同社より阻害候補物質としてスクリーニングされてきた新規低分子化合物 OPB-31121 の STAT 抑制効果と抗腫瘍効果を検討し、本薬剤が *ex vivo* で多彩なヒト腫瘍細胞株に対し強い腫瘍増殖抑制効果を持つこと、ヒト腫瘍細胞株内で STAT3 のリン酸化を強力に抑制する事、その作用機序は JAK family kinase や Src family kinase などの上流キナーゼの抑制ではない事などを確認した。そこで本年度はヒト腫瘍細胞株をマウスに播種したモデル、あるいは患者白血病細胞を高度免疫不全マウスに移植したモデル（より実際の白血病細胞に近い細胞を使って薬効を検討できる）での本薬剤の抗腫瘍効果を検討した。

また、急性リンパ性白血病（ALL）で発見した PAX5-PML の分子生物学的発癌機序を昨年度までの研究で明らかにしてきたが、本年度はその正常カウンターパートである B 細胞分化の制御を担う PAX5 の機能制御について検討し、PAX5 の機能障害による造血器腫瘍発生の機序解明に努めた。

B. 研究方法

造血器腫瘍を中心としたヒト細胞株を SCID マウ

ス皮下に播種したモデル、あるいは患者白血病細胞またはリンパ腫細胞を NOG マウスの静脈内あるいは腹腔内に播種したヒト白血病／リンパ腫モデルマウスを作成した。これらに対し、OPB-31121 100～300mg/kg を 10～28 日間経口投与した後、骨髓、脾臓細胞中のヒト腫瘍細胞の割合をフローサイトメーターで計測した。

試験管内でのリン酸化反応により MAP キナーゼによる PAX5 のリン酸化を確認するとともに、リン酸化サイト候補のアミノ酸に変異を導入し、リン酸化サイトを同定するとともにその変異の PAX5 機能に与える影響を検討した。PAX5 の機能として Blimp1（形質細胞分化を制御する）の発現抑制能に注目し、リン酸化が Blimp1 発現抑制に与える影響を検討した。

C. 研究結果

細胞株のマウスモデルでは急性骨髄性白血病（AML）3 例（KG-1, HEL92.1.5, HL-60）、ALL 1 例（Tccy/sr）、慢性骨髄性白血病（CML）1 例（KU812）、多発性骨髄腫 1 例（CRL8062）を播種したモデルを作成した。OPB-31121 投与群ではコントロール群に比較し腫瘍サイズが 0～16%程度に縮小しており著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた。特に KG-1 細胞では腫瘍の消失が認められた。

ヒト白血病細胞マウスモデルは AML 1 例、ALL 3 例、CML 1 例を作成した。これらに対し OPB-31121 を経口投与し、治療群では腫瘍細胞割合がコントロ

ール群に対し 4～58%に減少していた。興味深いのは OPB-31121 投与群では腫瘍細胞が減少するだけでなく、マウスの正常造血細胞が増加して骨髄の造血細胞の総数が治療群とコントロール群でほとんど変化がないことであった。これは同じマウスをシタラビン（既存の抗がん剤のコントロールとして使用）で治療した時に、腫瘍細胞数は減少したものの正常造血細胞も同じ程度に減少し（つまり骨髄全体の細胞数が減少し）、腫瘍細胞割合は治療群とコントロール群でほとんど変化が無かった事と対照的で、OPB-31121 の増殖抑制が腫瘍特異的である事を示唆していた。

PAX5 は 189, 283 番目のセリンで MAP キナーゼによりリン酸化された。そのリン酸化は PAX5 による Blimp1 発現抑制能を低下させ、抗原刺激による Blimp1 発現上昇に重要であった。

D. 考察

今回の結果から OPB-31121 は生体内でも強い腫瘍増殖抑制を示す事が確認された。本薬剤でマウスの正常造血が障害されず、薬剤投与中にむしろ正常造血が回復してきた事は非常に興味深く、本薬剤は骨髄抑制をきたす事の無い安全な抗がん剤となる可能性がある事を示唆している。今後はヒト正常臍帯血を NOG マウスに移植したモデルを作成し、本薬剤の正常造血細胞への影響を検討していく予定である。STAT3 はがん細胞だけでなく正常細胞にとっても重要な増殖／生存シグナルであるが、おそらく腫瘍細胞ではその異常増殖を支えるために STAT3 シグナルへの依存度がより高いものと予想される。そのことが本薬剤により腫瘍増殖が特異的に抑制された原因であると考えられた。本研究の成果などをもとに大塚製薬では本薬剤の第一相臨床試験を肝細胞癌に対して開始した。

患者リンパ腫細胞を移植したマウスモデルも作成し、今後本薬剤の効果も検討していく予定であるが、上述の白血病マウスモデルと併せて、NOG マウス内で継代可能となった白血病／リンパ腫細胞を成果有体物として届けた。

B 細胞受容体を抗原が刺激すると Blimp1 発現が上昇し、形質細胞分化の契機になる事は知られていたがその機序は不明であった。今回の研究で抗原刺激は MAP キナーゼシグナルを介して PAX5 をリン酸化し、それによる PAX5 の Blimp1 抑制の解除が Blimp1 発現、更には形質細胞分化を誘導するという機序が明らか

になった。PAX5 の過剰発現がリンパ腫発症の原因となる報告がなされているが、これは PAX5 の過剰発現により B 細胞受容体からのシグナルによっても PAX5 による Blimp1 の発現抑制を解除できなくなり、形質細胞への分化が障害されることが原因であると推測される。

E. 結論

OPB-31121 は生体内でも高い腫瘍増殖抑制効果を示した。またその増殖抑制効果は腫瘍細胞特異的で、正常細胞への作用は弱い事が示唆された。

PAX5 は MAP キナーゼによりリン酸化を受けその機能が抑制される事、それが Blimp1 発現を誘導し形質細胞分化の契機である可能性を示した。

G. 研究発表

論文発表

Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B Cell Receptor-ERK1/2 Signal Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1 through PAX5 Phosphorylation: A Mechanism of Antigen-Triggering Plasma Cell Differentiation. *J Immunol.* 2012 in press.

Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood.* 2011;118(6):1600-9.

学会発表

Hayakawa F, Sugimoto K, Kurahashi S, Sumida T, Naoe T, A Novel STAT3 Inhibitor OPB-31121 Induces Tumor-Specific Growth Inhibition in a Wide Range of Hematopoietic Malignancies without Growth Suppression of Normal Hematopoietic Cells. 米国血液学会 San Diego Convention Center, Dec 12, 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

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を再構築したマウスにTim-3抗体を投与したところ、正常ヒト造血には影響を与えずAMLを障害した。さらに連続的にAMLを再構築し得る白血病幹細胞に対しても殺白血病効果を有することを見出した。さらある臨床応用の拡大を目指し、完全ヒト化Tim-3抗体の作成を検討している。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、細胞傷害活性を有する抗ヒトTIM-3モノクローナル抗体の作製を行い、マウス内で再構築したヒトAMLに対する治療モデルの確立、およびAML幹細胞におけるTIM-3発現の生物学的意義の解明を行う。

C. 研究結果

機能的AML幹細胞がTIM-3を発現しているか否かを確認するために、同一症例よりTIM-3陽性AML細胞とTIM-3陰性AML細胞を純化し、免疫不全マウスに異種移植を行い腫瘍再構築能力の差異を評価した。TIM-3陽性AML細胞が効率的にAMLをマウス内に再構築可能であるのに対して、TIM-3陰性AML細胞はAML再構築能力が認められなかった。即ち、CD34⁺CD38⁻Lin⁻で定義される表面形質上のAML幹細胞のみならず、異種移植の系で定義される機能的AML幹細胞がTIM-3を細胞表面に発現していることが確認された。次に、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in vitroで確認した。そこで、臍帯血を移植しヒト正常造血を再構築した免疫不全マウスにATIK2a投与を行った結果、TIM-3陽性単球のみが傷害され、正常造血幹細胞を含めたTIM-3陰性細胞に対して影響がない事が確

認められた。さらに、同様の異種移植により AML を再構築した免疫不全マウスに対して同様に ATIK2a 投与を行い in vivo での治療効果を評価したところ、ATIK2a 投与マウスではコントロール群のマウスと比較して有意にマウス内での AML 細胞が減少していた。次に、治療後残存する AML 細胞の幹細胞活性を評価するために、2 次マウスへの連続移植実験を行った。コントロール群マウスから回収した AML 細胞は 2 次マウス内に効率的に AML を再構築可能である一方、ATIK2a 投与群マウス内で残存する AML 細胞は 2 次マウス内における腫瘍再構築能力を失っていた。即ち、ATIK2a 治療により TIM-3 を高発現する機能的 AML 幹細胞が in vivo で傷害されていることが示された。

ヒトへの臨床応用を目指して、まず ATIK2 のヒトマウスキメラ抗体を作成した。すなわち ATIK2a のマウス由来 Fab 可変部位とヒト由来 IgG1 定常部位を結合させた。現在まで複数のカニクイザルに投与し、その安全性を検証している。造血障害を含め明らかな重篤な副作用は認めていない。併せてヒト化モノクローナル抗体の作成も検討している。

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。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全く発現していないことから、理想的な標的対象である。本研究では、モノクローナル抗体 ATIK2a を開発し、マウス内で再構築した AML に対する in vivo での劇的な治療効果を確認しており、臨床応用が期待される。今後は AML 幹細胞における TIM-3 の機能解析を行う。以上のように、AML 根治に向けた基盤技術開発として、本研究の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。免疫不全マウスを用いた in vivo での治療モデル確立に成功しており、TIM-3 に対する標的治療の有用性が期待される。今後は臨床応用への拡大を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* 208: 285-294, 2011

Kamimura T, Miyamoto T, Harada M, Akashi K. Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci* 102: 1929-1937, 2011

Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 458-465, 2011

Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20: 246-259, 2011

Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118: 6702-6708, 2011

Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant*, 2011

Kawano N, Yoshida S, Ono N, Himeji D, Nagahiro Y, Sayaka Kawano, Yamashita K, Ikeda N, Uezono S, Ochiai H, Kawano F, Kikuchi I, Ishikawa F, Shimoda K, Ueda A, Akashi K. Clinical features and outcomes of 35 disseminated intravascular coagulation cases treated with recombinant human soluble thrombomodulin at a single institution. *J Clin Exp Hematop* 51: 101-107, 2011

Niino H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi

T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. Blood 119: 2263-2273, 2011

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

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 本研究の目的は転移・浸潤の過程でチロシンリン酸化を受ける分子の機能を解析し、標的として治療に結びつく分子経路を明らかにすることである。スキルス胃がんはチロシンリン酸化蛋白質の解析より 2 つの群に分けられ、MET キナーゼ依存性と非依存性の群に対応していることがわかった。質量分析解析よりそれぞれの群に特徴的なリン酸化蛋白質を同定し機能を解析している。また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。足場非依存性と転移能の制御分子として同定した CDCP1 蛋白質は Ras によるがんの悪性形質の獲得と密接に関係していることがわかった。これらのリン酸化蛋白質群はがんの進展に伴う種々の悪性形質の獲得に関わり、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、腫瘍で活性化したチロシン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

胃がん細胞株を浸潤能や腹膜播種性の強いスキルスタイプの胃がんとそのような性質の弱い高分化型に分けてチロシンリン酸化蛋白質のパターンを抗リン酸化チロシン抗体を用いて解析

する。その差につながるようなチロシンリン酸化蛋白質を精製したのち質量分析により同定し、機能解析を行う。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 の発現レベルが予後不良と相関が見られたことから、次にどのような経路の活性化が CDCP1 の発現に関わるのか肺がん細胞株と肺がん腫瘍組織の発現解析により明らかにする。腹膜播種に関わる分子を見出すために、スキルス胃がん細胞株(44As3 細胞)を用いた腹膜播種マウスモデルにおいて、形成された腫瘍内で特異的にチロシンリン酸化状態が変化する蛋白質を LC/MS/MS で解析してきた。その系で同定された分子の一つで明らかに腹膜播種において異なった役割を持つ ARAP3 について機能解析を進め腹膜播種における役割を明らかにする。

C. 研究結果

スキルス胃がん細胞株は高分化型胃がんに比べ明らかにチロシンリン酸化レベルが高く、複数のチロシンリン酸化蛋白質のバンドが認められたが、その中で約半数に見られた約 180 kD の強くチロシンでリン酸化された蛋白質は、質量分析の結果 Met キナーゼであった。このような細胞株ではメット阻害剤により Erk や Akt のリン酸化が抑制され細胞の増殖抑制効果もはっきりと認められたが、残りの約半数の細胞株では、Met 阻害剤の増殖やシグナルに対する効果は弱

く、逆に Src 阻害剤がこちらの群に特異的に増殖成功かがあることがわかった。それぞれの群に特徴的なチロシンリン酸化蛋白質の同定・機能解析が進行している。

CDCP1 の発現に Ras-Erk 経路の活性化が大きく関わっていることが明らかになった。Ras の活性化した細胞株や組織では CDCP1 の発現が有意に高く、また活性化 Ras 経路をブロックすることで、CDCP1 の発現は抑制された。活性化 Ras によりもたらされる細胞運動能や足場非依存性増殖は誘導される CDCP1 に依存的であることも示され、CDCP1 が活性化した Ras の主要なエフェクターとして働いていることが明らかになった。

マウスモデルでの腹膜播種部位の腫瘍組織におけるリン酸化蛋白質として同定された ARAP3 は、その発現がほとんど無いスキルス胃がん細胞株に恒常的に発現させたところ、予想に反してヌードマウス腹膜播種モデルにおける腸間膜転移や血清腹水の産生が顕著に抑制された。また、ARAP3 を発現するスキルス胃がん細胞である 44As3 細胞から ARAP3 の発現を恒常的に抑制したところ、細胞の接着能と浸潤能・運動能が亢進することが分かった。ARAP3 変異体を発現させる実験によりこの腹膜播種抑制能は ARAP3 の RhoGAP 活性を持つドメインと、チロシンリン酸化部位が重要であることが明らかになった。ARAP3 はチロシンリン酸化を介した他分子との結合と低分子量 G 蛋白質の Rho の制御によって浸潤や腹膜播種を抑制する分子であることが示された。

D. 考察

本研究では、チロシンキナーゼの基質分子に焦点を当て、*in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて転移や腹膜播種の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。

スキルス胃がんは Met 阻害剤の感受性に差があることは経験的に知られているが、今回のシグナルレベルの解析でその 2 つの群を見分け、更に感受性の低い群には Src ないしその下流の阻害剤が有効である可能性が示唆された。また今回 CDCP1 が発現レベルで Ras のコントロール下にあることが明らかになり、これまでの Src

に基質としての CDCP1 の働きの解析と併せて CDCP1 は 2 つのがん蛋白質 Ras と Src をリンクして、これら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。CDCP1 は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りうることが示唆された。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。

E. 結論

今回の研究でチロシンリン酸化蛋白質が伝えるシグナルが、それぞれ転移・浸潤に関わる違った特性に作用することにより転移・浸潤の成立に深く関わることを示すことができた。このような分子が腫瘍の特性や組織系に照準を絞った次世代の分子標的治療の絶好のターゲットとなりうることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 193: 1275-1288, 2011

Uekita T, Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 102: 1943-1948, 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

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 神戸大学大学院医学研究科 シグナル統合学分野 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、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質が膜型糖化分子 pp90 であることを見出した。この分子は、腸上皮細胞に特異的に発現し微絨毛に局在する。また、細胞内領域が Src によりチロシンリン酸化をうけ、その強制発現は複数のシグナル分子を活性化する。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貪食を抑制的に調節している。この性質を利用して、SIRP α 機能を人為的に操作することにより、ADCC 活性を有するがんの分子標的薬の効果を増強する、あるいは浸潤・転移を抑制する新たな抗がん剤を開発できる可能性を示すことが出来た。

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な点が多い。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。すでに、SIRP α を高度に発現するヒトメラノーマ細胞の *in vitro* での migration を抗 SIRP α 抗体が抑制することを明らかにしている。また、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貪食を負に制御することが知られている。そこで、前年度、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 遺伝子破壊 (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。そこで、本年度はさらに、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った。

B. 研究方法

(1) 前年度、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子として同定していた pp90 のモノクローナル抗体を作製し、組織分布や細胞内局在を検討した。また、pp90 の細胞内のチロシンリン酸化に重要な分子ならびに結合分子の探索を行った。さらに、培養細胞に強制発現した際のシグナル分子の挙動につき解析をした。

(2) 前年度に引き続き、B16 メラノーマ接種による肺転移モデルを用いて、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 (TA99) による腫瘍排除を検討すると共に、抗 SIRP α 抗体単独あるいは TA99 との併用による腫瘍排除の効果を検討した。

C. 研究結果

(1) SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子 pp90 の