

201220009A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

造血器悪性腫瘍及び転移性がんを高頻度に異常を来している遺伝子を

標的とした新たな治療法の開発に資する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北林 一生

平成25（2013）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	10
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	12
直江 知樹	
3. 幹細胞を標的とした白血病根治療法の開発	14
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	17
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	20
的崎 尚	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	24

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

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

主任研究者 北林 一生 国立がん研究センター研究所 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。作製した抗ヒト TIM-3 マウス抗体は、ヒト白血病モデルマウスにおいて正常ヒト造血には影響を与えず、AML を特異的に障害することが可能であった。AML を連続的に再構築し得る白血病幹細胞に対しても優れた殺白血病効果を有することを見出した。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。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、BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ細胞株において特に増殖抑制効果が高いこと、また正常造血細胞の増殖抑制作用は認められないことを確認した。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、スキルス胃がん播種を抑制する 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。大腸がんの発生を促進的に制御する 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。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 $\alpha$  はマクロファージによる食食を抑制的に調節している。この性質を利用して、SIRP $\alpha$  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。

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、更に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）において本薬剤が高い抗腫瘍効果を示すことを確認してきた。今年度は今後の臨床試験を想定し、*ex vivo* での細胞株に対する薬効試験を更に拡大することで適応癌種の絞り込みを行うと共に、安全性の検討としてヒト正常造血細胞への増殖抑制効果の有無を検討した。また本研究においてその発癌機構を解明してきた PAX5-PML (ALL 患者で発見された融合遺伝子) に関して、その発癌性をマウスモデルで検討した

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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  抗体が抑制することを明らかにしている。また、SIRP $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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

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。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。

マルチカラーFACS を用いて純化した正常および AML CD34 陽性 CD38 陰性分化抗原陰性の幹細胞分画を用いて、AML 幹細胞に特異的に高発現する分子をマイクロアレイにより網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較して AML 幹細胞に高発現する細胞表面抗原 TIM-3 を同定した。FACS によ

る解析では、TIM-3 は正常造血幹細胞の表面には発現しないが、AML 幹細胞に高発現しており、FACS を用いて分離可能であった。AML 幹細胞の特異的表面抗原と従来報告されてきた 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なり得ると考えた。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を行うことを目標とした。また、AML 以外の骨髓増殖性疾患(骨髓異形成症候群(MDS)、慢性骨髓性白血病等)やリンパ球系腫瘍の造血幹細胞分画や前駆細胞分画における TIM-3 発現を解析し、AML 以外の造血器腫瘍性疾患での TIM-3 による分子標的治療の可能性を併せて検討した。

35 種類の造血器悪性腫瘍細胞株に対する本薬剤の増殖抑制効果を調べ IC<sub>50</sub> を算出して比較した。正常ヒト臍帯血細胞、あるいは臨床白血病細胞を NOG マウスに経静脈的に移植し、生着後本薬剤を 200~300mg/kg の量で 10~14 日間連続経口投与し、骨髓内のヒト細胞の割合を抗ヒト CD45 抗体によるフローサイトメトリーで解析した。BALB/c マウス胎児肝臓細胞より pro B 細胞分画をソーティングし、これを OP9 細胞上で培養しながらレトロウイルスにより PAX5-PML 遺伝子を導入した (GFP がマーカー)。その細胞を放射線照射した NOD/SCID マウスに移植し経時的に解剖し GFP 陽性の B 細胞分化を解析した。

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関連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。

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。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 $\alpha$ 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

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。ポリコームタンパクは 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。Glis2 を MOZ-TIF2 導入によって作製された白血病細胞内に強制発現させると白血病細胞の分化が誘導された。従って Glis2 は分化制御を介して白血病幹細胞維持や発症に関与している可能性があると考えられる。そこで、白血病細胞における Glis2 の機能解析を行い、Glis2 による白血病細胞分化制御の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、N 末端側に FLAG タグを付加した Glis2 の発現ベクターを作製し、強制発現させた後、ウェスタンブロットで確認したところ、本来全長として約 56KDa の位置に検出される Glis2 が、白血病細胞 (THP1, MV4. 11, MOZ-TIF2 induced AML cells) ではより分子量の小さな 37KDa 付近に C 末端側を切断されたタンパクとして検出された。Glis2 の機能解析を行うにあたり、その足がかりをつかむために、白血病細胞内で Glis2 と複合体を形成する結合タンパク質の同定を試みた。昨年度までの研究で Ring1A/B による白血病細胞の分化制御は MOZ-TIF2 誘導型の白血病細胞だけでは

なく、MLL 融合遺伝子誘導型の白血病細胞でもみられ、Glis2 が MLL 融合遺伝子を持つ白血病細胞においても機能することが示唆されていたため、Glis2 を強制発現させる細胞には MLL-AF9 の融合遺伝子を有するヒト単球性白血病細胞株 THP1 を用いた。FLAG タグを付加した Glis2 を強制発現させた THP1 細胞 (THP1-Glis2) はコントロール細胞 (THP1-mock) と比較し増殖の低下を示したものの、明らかな分化誘導はされずに大量スケールでの培養が可能であった。それぞれ約  $3 \times 10^8$  個の細胞を回収し、抗 FLAG ビーズを用いて Glis2 と結合タンパク質を共沈させ、マスペクトロメトリーにて解析を行い、Glis2 の結合タンパク質として SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing 1)、CTPS1 (CTP synthase 1)、KCTD5 (BTB/POZ domain-containing protein KCTD5) 等を同定した。

AML 細胞を TIM-3 陽性と TIM-3 陰性細胞に細分画し、マウスに異種移植したところ、TIM-3 陽性 AML 細胞は高効率に AML を連続的に再構築可能であるのに対し、TIM-3 陰性 AML 細胞は AML 再構築能力を認めなかった。即ち、TIM-3 陽性細胞が機能的 AML 幹細胞であり、TIM-3 に対する標的治療の有効性が確認された。樹立した抗ヒト TIM-3 マウス抗体 ATIK2a は、ヒト造血を再構築した免疫不全マウスに投与しても、ヒト造血幹細胞に対して影響がない事を確認した。さらに AML を再構築した白血病モデルマウスにおいて、TIM-3 抗体 ATIK2a は TIM-3 を発現する機能的 AML 幹細胞を *in vivo* で効果的に傷害することが示された。上記の治療モデルの検討に加え、AML 以外の骨髄増殖性疾患において、各細胞分画での TIM-3 発現を解析した。その結果、骨髄異形成症候群 (MDS) や慢性骨髄性白血病においても、CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞分画に TIM-3 が高発現する異常幹細胞の存在を確認した。特に MDS においては CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞分画内の TIM-3 陽性細胞の割合が、AML への病期進行に伴い劇的に上昇していくことを見出した。これらの結果から、TIM-3 が AML のみならず、多くの骨髄性造血器腫瘍において共通して腫瘍性幹細胞を標識している可能性が示唆された。今後解析症例をさらに増やして、TIM-3 陽性異常造血幹細胞の生物学的意義、すなわち白血病化における役割を明らかにして、新規治療法の開発を進めたい。

35 種類の細胞株の中では多発性骨髄腫 (3 株中 3 株)、バーキットリンパ腫 (3 株中 3 株) における  $IC_{50}$  は 10nM 以下で感受性が高かった。白血病の細胞株

では感受性にバラツキがあったが、BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ細胞株では 7 株全てで  $IC_{50}$  が 100nM 以下と感受性が高く、それ以外の細胞株では  $IC_{50}$  が 100nM 以上の非感受性株を 5 株 (12 株中) 認める等感受性は一定しなかった。CD34 陽性ヒト臍帯血細胞を NOG マウスに経静脈的に移植したマウスに対し本薬剤を経口投与してヒト臍帯血細胞に対する増殖抑制効果を調べた所、ほとんど増殖抑制効果を認めなかった (T/C: 99%)。これは昨年度同様の実験をヒトプライマリ白血病細胞で行った際の強い増殖抑制効果 (T/C: 4~58%) と対照的で、本薬剤のヒト正常造血細胞に対する安全性を示していると考えられた。一方、PAX5-PML 白血病マウスの作成では、コントロールとして GFP 遺伝子のみを導入された pro B 細胞は、移植後 3 週間で mature B 細胞までの分化が確認された後、移植マウス骨髄、脾臓内からほぼ消失したのに対し、PAX5-PML 発現ベクターを導入された pro B 細胞は 56 日を経ても pro B 段階で分化停止し、マウス骨髄内に残存し続けた。更に移植後約 150 日あまり経過した頃から急性リンパ性白血病 (ALL) を発症して死亡するマウスを認めるようになった。

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 に依存的事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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ KOマウスなどを用いて検討中である。

#### D. 考察

AML幹細胞特異的に高発現するTIM-3は、正常造血幹細胞には全く発現していないこと、TIM-3陽性AML細胞のみAMLを連続して再構築可能であることから、TIM-3への標的治療は、理想的なAML幹細胞特異的な分子標的治療となり得る。作製したモノクローナル抗体ATIK2aは、マウス内で連続的に再構築可能なAML幹細胞に対する高い殺白血病効果を有し、臨床応用が期待される。さらにAML以外の、多くの骨髄系腫瘍性幹細胞にも共通してTIM-3が高発現することを見出しており、種々の白血病幹細胞に対する有効な治療標的分子となる可能性を示唆している。今後はAML幹細胞および骨髄系

腫瘍性幹細胞におけるTIM-3の分子生物学的特徴を明らかにし、TIM-3の白血病化における役割を解明する。以上のように、AMLのみならず造血器腫瘍の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。

本研究において、Ring1A/Bによる白血病幹細胞を制御するGlis2抑制経路を見出し、Glis2の結合タンパク質としてCTPS1を同定した。これまでに、細胞内におけるCTPの濃度が下がると白血病細胞の分化が誘導されるとの報告がなされている(Mol. Pharmaco. 62 463 2002, Leukemia 18 1857 2004)。従って、Glis2がCTPS1に結合し酵素活性を阻害することでCTP濃度が低下し白血病細胞の分化が誘導されるのではないかと仮説をたて、現在Glis2とCTP濃度、細胞の分化の関連について実験を進めている。具体的には、CTP濃度を減少させる薬剤や、シチジンを培地中へ添加する実験を通して、細胞内CTP濃度の変化がGlis2による白血病細胞分化誘導に影響を与えるかどうかについて調べている。

今回の結果からOPB-31121は多発性骨髄腫、パーキットリンパ腫に感受性が高いことが期待でき、白血病においてはBCR-ABL、FLT3変異、JAK2変異が陽性なものに感受性が高いことが分かった。これらの変異はそれが引き起こす細胞増殖シグナルにSTAT3/5の活性化が重要であることがこれまでの多くの報告で確立されているoncokinaseであり、我々はこれをSTAT adictive oncokinase (SAO)と名付けた。昨年度までに行った細胞株をSCIDマウスに移植したモデル、あるいは臨床白血病細胞をNOGマウスに移植するモデルいずれにおいてもOPB-31121はSAO陽性白血病に対して強い抗腫瘍効果を示しており、今回の検討を裏付けている。更に今回の研究でヒト正常造血細胞に対しては増殖抑制効果が極めて低いことが示され、本薬剤は骨髄抑制の少ない安全性の高い薬剤となる可能性が示された。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開始した(NCT1406574)。PAX5-PMLの遺伝子導入によりpro B細胞が分化停止を起こし、その状態から時間経過と共にALLを発症することを示すことによりPAX5-PMLが白血病の発症を誘導できる癌遺伝子であることが示された。白血病発症までに150日と比較的長い時間がかかるのはPAX5-PMLによる分化障害に加えて、おそらくは細胞増殖を誘導する何らかの遺伝子異常が入ることが白血病発症に必要

であるからと考えられた。今後は白血病化に必要なセカンドヒットがどのようなものであるか、分化停止に必要なのはPAX5のどの機能を抑制することであるのかを、このモデルを用いて検討していく予定である。

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可能性が示唆された。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。

SAP-1はヒト胃がんや大腸がんにも高度に発現する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 $\alpha$  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 $\alpha$ 抗体を用いてCD47-SIRP $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。白血病幹細胞の制御因子としてGlis2を同定し、Glis2の結合タンパク質としてSAMHD1、CTPS1、KCTD5等を同定した。これらはGlis2と協調して作用することが予想される。

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。既に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。さらにAML以外の骨髄系腫瘍性幹細胞にもTIM-3は高発現することを明らかにしており、今後はさらなる適応疾患の拡大と臨床応用の開発を目指す。

OPB-31121多発性骨髄腫、パーキットリンパ腫、およびSAO陽性白血病に対して強い抗腫瘍効果を示し、正常ヒト造血細胞に対する増殖抑制効果は低かった。PAX5-PMLはリンパ球の分化障害を引き起こし白血病を発症させる癌遺伝子であることが分かった。

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 $\alpha$ 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

Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T.  $\beta$ -catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 142:572-581, 2012.

Iwanami A, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. PML mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:4339-4344, 2013.

Rokudai S, Laptenko O, Arnal SM, Taya Y, Kitabayashi I, Prives C. MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:3895-3900, 2013.

Haga A, Ogawara Y, Kubota D, Kitabayashi I, Murakami Y, Kondo T. Interactomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing's sarcoma. *Electrophoresis*, in press.

Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I. Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RAR $\alpha$  inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs. *Cancer Res*. in press.

Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Sci*. in press

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; 188: 6127-6134.

Niimi K, Kiyoi H, Ishikawa Y, Hayakawa F, Kurahashi S, Kihara R, Tomita A, Naoe T. GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. *Leukemia Research Reports* 2013; 2: 21-25

Niuro 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, 2012

Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Landfried K, Akashi K, Lugt MV, Couriel DR, Reddy P, Paczesny S. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 119: 2960-2963, 2012

Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niuro H, Kashiwagai Y, Harashima S, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K. Hereditary angioedema in Japan: genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Med Sci* 343:210-214, 2012

Baba E, Fujishima H, Makiyama A, Uchino K, Tanaka R, Esaki T, Kusaba H, Mitsugi K, Nakano S, Akashi K. Phase 2 Study of Modified Irinotecan and Bolus 5-Fluorouracil/I-Leucovorin in Japanese Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Adv Ther* 29: 287-296, 2012

Katsunuma T, Ohya Y, Fujisawa T, Akashi K, Imamura N, Ebisawa M, Daikoku K, Kondo N, Terada A, Doi S, Nishimuta T, Noma T, Hamasaki Y, Kurihara K, Masuda K, Yamada T, Yamada M, Yoshihara S, Watanabe K, Watanabe T, Kitabayashi T, Morikawa A, Nishima S. Effects of the tulobuterol patch on the treatment of acute asthma exacerbations in young children. *Allergy Asthma Proc* 33: 28-34, 2012

Baba E, Fujishima H, Makiyama A, Uchino K, Tanaka R, Esaki T, Kusaba H, Mitsugi K, Nakano S, Akashi K. Phase 2 Study of Modified Irinotecan and Bolus 5-Fluorouracil/I-Leucovorin in Japanese Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Adv Ther* 29: 287-296, 2012

Fujihara M, Fukata M, Odashiro K, Maruyama T, Akashi K, Yokoi Y. Reduced Plasma Eicosapentaenoic Acid-Arachidonic Acid Ratio in Peripheral Artery Disease. *Angiology* 64: 112-118, 2012

- Shimoda S, Tsuneyama K, Kikuchi K, Harada K, Nakanuma Y, Nakamura M, Ishibashi H, Hisamoto S, Niiro H, Leung PS, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 168: 279-284, 2012
- Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Shimono N, Kamimura T, Akashi K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J Infect Chemother* 18: 741-746, 2012
- Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood* 120: 223-231, 2012
- Iwata S, Yamaoka K, Niiro H, Nakano K, Wang SP, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of Toll-like receptor-mediated signaling through spleen tyrosine kinase in human B-cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1594-1601, 2012
- Takenaka K, Nagafuji K, Takase K, Kamimura T, Mori Y, Ito Y, Nishi Y, Henzan H, Kato K, Harada N, Eto T, Miyamoto T, Teshima T, Akashi K. Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol* 96: 94-100, 2012
- Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J* 31: 2994-3007, 2012
- Mori Y, Miyamoto T, Kamezaki K, Kato K, Kikushige Y, Takashima S, Urata S, Shimoda S, Shimono N, Takenaka K, Iwasaki H, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Low incidence of adenovirus hemorrhagic cystitis following autologous hematopoietic stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 87: 828-830, 2012
- Uchino K, Hirano G, Hirahashi M, Isobe T, Shirakawa T, Kusaba H, Baba E, Tsuneyoshi M, Akashi K. Human Nanog pseudogene8 promotes the proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Exp Cell Res* 318: 1799-1807, 2012
- Saito K, Odashiro K, Maruyama T, Akashi K, Mawatari S, Fujino T. Improvement of diabetic or obese patients' erythrocyte deformability by the program of the brain-oriented obesity control system (BOOCS). *J Physiol Sci* 62: 445-451, 2012
- Kikushige Y, Akashi K. TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1266: 118-123, 2012
- Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120: 4058-4067, 2012
- Maehara K, Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Nagao K, Obuse C, Akashi K, Tachibana T, Sakata T, Ohkawa Y. A co-localization model of paired ChIP-seq data using a large ENCODE data set enables comparison of multiple samples. *Nucleic Acids Res* 41: 54-62, 2012
- Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 121: 962-970, 2012
- Kusaba H, Esaki T, Kishimoto J, Uchino K, Arita S, Kumagai H, Mitsugi K, Akashi K, Baba E. Phase I study of bevacizumab combined with irinotecan and S-1 as second-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 29-34, 2012
- 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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  $\alpha$  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 $\alpha$ /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- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 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** 昨年までに急性骨髄性白血病(AML)幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 M-CSFR を同定し、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ることを明らかにし、白血病幹細胞を除去することにより白血病が治癒出来ることを証明した。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、MLL-AF10 融合遺伝子によって誘導される急性骨髄性白血病の発症にはポリコム群複合体構成因子である Ring1A/B が必要であることを明らかにし、Ring1A/B によって発現が抑制されている遺伝子として Glis2 を同定した。

## 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。

## B. 研究方法

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。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

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。Glis2 を MOZ-TIF2 導入によって作製された白血病細胞内に強制発現させると白血病細胞の

分化が誘導された。従って Glis2 は分化制御を介して白血病幹細胞維持や発症に関与している可能性があると考えられる。そこで、白血病細胞における Glis2 の機能解析を行い、Glis2 による白血病細胞分化制御の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、N 末端側に FLAG タグを付加した Glis2 の発現ベクターを作製し、強制発現させた後、ウェスタンブロットで確認したところ、本来全長として約 56KDa の位置に検出される Glis2 が、白血病細胞 (THP1, MV4. 11, MOZ-TIF2 induced AML cells) ではより分子量の小さな 37KDa 付近に C 末端側を切断されたタンパクとして検出された。

Glis2 の機能解析を行うにあたり、その足がかりをつかむために、白血病細胞内で Glis2 と複合体を形成する結合タンパク質の同定を試みた。昨年度までの研究で Ring1A/B による白血病細胞の分化制御は MOZ-TIF2 誘導型の白血病細胞だけではなく、MLL 融合遺伝子誘導型の白血病細胞でもみられ、Glis2 が MLL 融合遺伝子を持つ白血病細胞においても機能することが示唆されていたため、Glis2 を強制発現させる細胞には MLL-AF9 の融合遺伝子を有するヒト単球性白血病細胞株 THP1 を用いた。FLAG タグを付加した Glis2 を強制発現させた THP1 細胞 (THP1-Glis2) はコントロール細胞 (THP1-mock) と比較し増殖の低下を示したものの、明らかな分化誘導はされずに大量スケールでの培養が可能であった。それぞれ約  $3 \times 10^8$  個の細胞を回収し、抗 FLAG ビーズを用いて Glis2 と結合タンパク質を共沈させ、マスペクトロメトリーにて解析を行い、Glis2 の結

合タンパク質として SAMHD1(SAM domain and HD domain-containing 1)、CTPS1(CTP synthase 1)、KCTD5(BTB/POZ domain-containing protein KCTD5)等を同定した。

#### D. 考察

本研究において、Ring1A/Bによる白血病幹細胞を制御する Glis2 抑制経路を見出し、Glis2 の結合タンパク質として CTPS1 を同定した。これまでに、細胞内における CTP の濃度が下がると白血病細胞の分化が誘導されるとの報告がなされている(Mol. Pharmacol. 62 463 2002, Leukemia 18 1857 2004)。従って、Glis2 が CTPS1 に結合し酵素活性を阻害することで CTP 濃度が低下し白血病細胞の分化が誘導されるのではないかと仮説をたて、現在 Glis2 と CTP 濃度、細胞の分化の関連について実験を進めている。具体的には、CTP 濃度を減少させる薬剤や、シチジン培地中へ添加する実験を通して、細胞内 CTP 濃度の変化が Glis2 による白血病細胞分化誘導に影響を与えるかどうかについて調べている。

#### E. 結論

白血病幹細胞の制御因子として Glis2 を同定し、Glis2 の結合タンパク質として SAMHD1、CTPS1、KCTD5 等を同定した。これらは Glis2 と協調して作用することが予想される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T.  $\beta$ -catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 142:572-581, 2012.

Iwanami A, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. PML mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:4339-4344, 2013.

Rokudai S, Laptenko O, Arnal SM, Taya Y, Kitabayashi I, Prives C. MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:3895-3900, 2013.

Haga A, Ogawara Y, Kubota D, Kitabayashi I, Murakami Y, Kondo T. Interatomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing's sarcoma. *Electrophoresis*, in press.

Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I. Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RAR $\alpha$  inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs. *Cancer Res*. in press.

Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Sci*. in press

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

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、ヒト臨床白血病細胞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、どのような種類の造血器悪性腫瘍に有効であるか、および正常造血細胞へ増殖抑制があるかを検討した。各種ヒト造血器悪性腫瘍細胞株に対する本薬剤の増殖抑制効果を *ex vivo* で検討し比較することで、本薬剤が白血病においては BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ細胞株において特に増殖抑制効果が高いことを見いだした。ヒト臨床白血病細胞を移植したマウスモデルでもこれら白血病に対する本薬剤の効果は高かった。また、正常造血への影響をヒト正常臍帯血を用いて検討し、正常造血細胞の増殖抑制作用は認められないことを確認した。また本研究で発癌機構を明らかにしてきた PAX5-PML を正常骨髄に導入する事で白血病を発症する事を確認し、本融合遺伝子の発癌性を明らかにした。

## 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、更に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）において本薬剤が高い抗腫瘍効果を示すことを確認してきた。今年度は今後の臨床試験を想定し、*ex vivo* での細胞株に対する薬効試験を更に拡大することで適応癌種の絞り込みを行うと共に、安全性の検討としてヒト正常造血細胞への増殖抑制効果の有無を検討した。また本研究においてその発癌機構を解明してきた PAX5-PML（ALL 患者で発見された融合遺伝子）に関して、その発癌性をマウスモデルで検討した。

## B. 研究方法

35 種類の造血器悪性腫瘍細胞株に対する本薬剤の増殖抑制効果を調べ IC<sub>50</sub> を算出して比較した。正常ヒト臍帯血細胞、あるいは臨床白血病細胞を NOG マウスに経静脈的に移植し、生着後本薬剤を 200～

300mg/kg の量で 10～14 日間連続経口投与し、骨髄内のヒト細胞の割合を抗ヒト CD45 抗体によるフローサイトメトリーで解析した。BALB/c マウス胎児肝臓細胞より pro B 細胞分画をソーティングし、これを OP9 細胞上で培養しながらレトロウイルスにより PAX5-PML 遺伝子を導入した（GFP がマーカー）。その細胞を放射線照射した NOD/SCID マウスに移植し経時的に解剖し GFP 陽性の B 細胞分化を解析した。

## C. 研究結果

35 種類の細胞株の中では多発性骨髄腫（3 株中 3 株）、パーキッリンパ腫（3 株中 3 株）における IC<sub>50</sub> は 10nM 以下で感受性が高かった。白血病の細胞株では感受性にバラツキがあったが、BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ細胞株では 7 株全てで IC<sub>50</sub> が 100nM 以下と感受性が高く、それ以外の細胞株では IC<sub>50</sub> が 100nM 以上の非感受性株を 5 株（12 株中）認める等感受性は一定しなかった。

CD34 陽性ヒト臍帯血細胞を NOG マウスに経静脈的に移植したマウスに対し本薬剤を経口投与してヒト臍帯血細胞に対する増殖抑制効果を調べた所、ほとんど増殖抑制効果を認めなかった（T/C: 99%）。これは昨年度同様の実験をヒトプライマリ白血病細胞で行った際の強い増殖抑制効果（T/C: 4～58%）と対照的で、本薬剤のヒト正常造血細胞に対する安全性を示していると考えられた。

一方 PAX5-PML 白血病マウスの作成では、コントロールとして GFP 遺伝子のみを導入された pro B 細胞は、移植後 3 週間で mature B 細胞までの分化が確認された後、移植マウス骨髄、脾臓内からほぼ消

失したのに対し、PAX5-PML 発現ベクターを導入された pro B 細胞は 56 日を経ても pro B 段階で分化停止し、マウス骨髄内に残存し続けた。更に移植後約 150 日あまり経過した頃から急性リンパ性白血病 (ALL) を発症して死亡するマウスを認めるようになった。

#### D. 考察

今回の結果から OPB-31121 は多発性骨髄腫、パーキットリンパ腫に感受性が高いことが期待でき、白血病においては BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異が陽性なものに感受性が高いことが分かった。これらの変異はそれが引き起こす細胞増殖シグナルに STAT3/5 の活性化が重要であることがこれまでの多くの報告で確立されている oncokinase であり、我々はこれを STAT addictive oncokinase (SAO) と名付けた。昨年度までに行った細胞株を SCID マウスに移植したモデル、あるいは臨床白血病細胞を NOG マウスに移植するモデルいずれにおいても OPB-31121 は SAO 陽性白血病に対して強い抗腫瘍効果を示しており、今回の検討を裏付けている。更に今回の研究でヒト正常造血細胞に対しては増殖抑制効果が極めて低いことが示され、本薬剤は骨髄抑制の少ない安全性の高い薬剤となる可能性が示された。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開始した (NCT1406574)。

PAX5-PML の遺伝子導入により pro B 細胞が分化停止を起こし、その状態から時間経過と共に ALL を発症することを示すことにより PAX5-PML が白血病の発症を誘導できる癌遺伝子であることが示された。白血病発症までに 150 日と比較的長い時間がかかるのは PAX5-PML による分化障害に加えて、おそらくは細胞増殖を誘導する何らかの遺伝子異常が入ることが白血病発症に必要なからと考えられた。今後は白血病化に必要なセカンドヒットがどのようなものであるか、分化停止に必要なのは PAX5

のどの機能を抑制することであるのかを、このモデルを用いて検討していく予定である。

#### E. 結論

OPB-31121 多発性骨髄腫、パーキットリンパ腫、および SAO 陽性白血病に対して強い抗腫瘍効果を示し、正常ヒト造血細胞に対する増殖抑制効果は低かった。

PAX5-PML はリンパ球の分化障害を引き起こし白血病を発症させる癌遺伝子であることが分かった。

#### 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; 188: 6127-6134.

Niimi K, Kiyoi H, Ishikawa Y, Hayakawa F, Kurahashi S, Kihara R, Tomita A, Naoe T. GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. Leukemia Research Reports 2013; 2: 21-25

#### 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 急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞に特異的に高発現する表面抗原TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3)を同定した。TIM-3は大多数のAML幹細胞に高発現する一方、正常造血幹細胞には発現を認めないこと、TIM-3陽性AML細胞のみマウス異種移植系でAMLを連続的に再構築することから、TIM-3はAML幹細胞に対する理想的な標的治療候補と考えられた。作製した抗ヒトTIM-3マウス抗体は、ヒト白血病モデルマウスにおいて正常ヒト造血には影響を与えず、AMLを特異的に障害することが可能であった。AMLを連続的に再構築し得る白血病幹細胞に対しても優れた殺白血病効果を有することを見出した。AML以外の骨髄増殖性疾患、すなわち骨髄異形成症候群や慢性骨髄性白血病の造血幹細胞分画においても、TIM-3が高発現する異常幹細胞の存在を確認した。TIM-3がAMLのみならず多数の骨髄系造血器腫瘍において腫瘍性幹細胞を標識する可能性が示唆され、種々の造血器腫瘍において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による異種移植の生着効率改善とマルチカラー・フローサイトメトリー(FACS)を用いた細胞純化技術の進歩により、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幹細胞分画の純化が可能となった。このAMLの源であるAML幹細胞のみを治療標的として選択的に死滅させることが可能となれば、骨髄抑制や重症感染症など致死的な副作用を伴わない究極の治療法となり得る。しかしながら、AML幹細胞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、この2つの幹細胞を鮮明に分離する標的分子が同定されていない時点で、正常造血機構に影響を与えずに、AML幹細胞を標的とした治療法の開発は困難であった。AML幹細胞にのみ特異的に発現する表面抗原や機能分子が同定可能となれば、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FACSを用いて純化した正常およびAML CD34陽性 CD38陰性分化抗原陰性の幹細胞分画を用いて、AML幹細胞に特異的に高発現する分子をマイクロアレイにより網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較してAML幹細胞に高発現する細胞表面抗原TIM-3を同定した。FACSによる解析では、TIM-3は正常造血幹細胞の表面には発現しない

が、AML幹細胞に高発現しており、FACSを用いて分離可能であった。AML幹細胞の特異的表面抗原と従来報告されてきた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なり得ると考えた。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を行うことを目標とした。また、AML以外の骨髄増殖性疾患(骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病等)やリンパ球系腫瘍の造血幹細胞分画や前駆細胞分画におけるTIM-3発現を解析し、AML以外の造血器腫瘍性疾患でのTIM-3による分子標的治療の可能性を併せて検討した。

## C. 研究結果

AML細胞をTIM-3陽性とTIM-3陰性細胞に細分画し、マウスに異種移植したところ、TIM-3陽性AML細胞は高効率にAMLを連続的に再構築可能であるのに対し、TIM-3陰性AML細胞はAML再構築能力を認めなかった。即ち、TIM-3陽性細胞が機能的AML幹細胞であり、TIM-3に対する標的治療の有効性が確認された。樹立した抗ヒトTIM-3マウス抗体ATIK2aは、ヒト造血を再構築した免疫不全マウスに投与しても、ヒト造血幹細胞に対して影響がない事を確認した。さらにAMLを再構築した白血病モデルマウスにおいて、TIM-3抗体ATIK2aはTIM-3を発現する機



能的 AML 幹細胞を *in vivo* で効果的に傷害することが示された。

上記の治療モデルの検討に加え、AML 以外の骨髄増殖性疾患において、各細胞分画での TIM-3 発現を解析した。その結果、骨髄異形成症候群 (MDS) や慢性骨髄性白血病においても、CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞分画に TIM-3 が高発現する異常幹細胞の存在を確認した。特に MDS においては CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞分画内の TIM-3 陽性細胞の割合が、AML への病期進行に伴い劇的に上昇していくことを見出した。これらの結果から、TIM-3 が AML のみならず、多くの骨髄性造血器腫瘍において共通して腫瘍性幹細胞を標識している可能性が示唆された。今後解析症例をさらに増やして、TIM-3 陽性異常造血幹細胞の生物学的意義、すなわち白血病化における役割を明らかにして、新規治療法の開発を進めたい。

#### D. 考察

AML 幹細胞特異的に高発現する TIM-3 は、正常造血幹細胞には全く発現していないこと、TIM-3 陽性 AML 細胞のみ AML を連続して再構築可能であることから、TIM-3 への標的治療は、理想的な AML 幹細胞特異的な分子標的治療となり得る。作製したモノクローナル抗体 ATIK2a は、マウス内で連続的に再構築可能な AML 幹細胞に対する高い殺白血病効果を有し、臨床応用が期待される。さらに AML 以外の、多くの骨髄系腫瘍性幹細胞にも共通して TIM-3 が高発現することを見出しており、種々の白血病幹細胞に対する有効な治療標的分子となる可能性を示唆している。今後は AML 幹細胞および骨髄系腫瘍性幹細胞における TIM-3 の分子生物学的特徴を明らかにし、TIM-3 の白血病化における役割を解明する。以上のように、AML のみならず造血器腫瘍の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。既に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。さらに AML 以外の骨髄系腫瘍性幹細胞にも TIM-3 は高発現することを明らかにしており、今後はさらなる適応疾患の拡大と臨床応用の開発を目指す。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Niuro 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, 2012

Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Landfried K, Akashi K, Lugt MV, Couriel DR, Reddy P, Paczesny S. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 119: 2960-2963, 2012

Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niuro H, Kashiwagai Y, Harashima S, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K. Hereditary angioedema in Japan: genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Med Sci* 343: 210-214, 2012

Baba E, Fujishima H, Makiyama A, Uchino K, Tanaka R, Esaki T, Kusaba H, Mitsugi K, Nakano S, Akashi K. Phase 2 Study of Modified Irinotecan and Bolus 5-Fluorouracil/I-Leucovorin in Japanese Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Adv Ther* 29: 287-296, 2012

Katsunuma T, Ohya Y, Fujisawa T, Akashi K, Imamura N, Ebisawa M, Daikoku K, Kondo N, Terada A, Doi S, Nishimuta T, Noma T, Hamasaki Y, Kurihara K, Masuda K, Yamada T, Yamada M, Yoshihara S, Watanabe K, Watanabe T, Kitabayashi T, Morikawa A, Nishima S. Effects of the tulobuterol patch on the treatment of acute asthma exacerbations in young children. *Allergy Asthma Proc* 33: 28-34, 2012

Baba E, Fujishima H, Makiyama A, Uchino K, Tanaka R, Esaki T, Kusaba H, Mitsugi K, Nakano S, Akashi K. Phase 2 Study of Modified Irinotecan and Bolus 5-Fluorouracil/I-Leucovorin in Japanese Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Adv Ther* 29: 287-296, 2012

Fujihara M, Fukata M, Odashiro K, Maruyama T, Akashi K, Yokoi Y. Reduced Plasma Eicosapentaenoic Acid-Arachidonic Acid Ratio in Peripheral Artery Disease. *Angiology* 64: 112-118, 2012

Shimoda S, Tsuneyama K, Kikuchi K, Harada K, Nakanuma Y, Nakamura M, Ishibashi H, Hisamoto S, Niuro H, Leung PS, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 168: 279-284, 2012

Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Shimono N, Kamimura T, Akashi K. Fatal candidemia

- caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J Infect Chemother* 18: 741-746, 2012
- Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood* 120: 223-231, 2012
- Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang SP, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of Toll-like receptor-mediated signaling through spleen tyrosine kinase in human B-cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1594-1601, 2012
- Takenaka K, Nagafuji K, Takase K, Kamimura T, Mori Y, Ito Y, Nishi Y, Henzan H, Kato K, Harada N, Eto T, Miyamoto T, Teshima T, Akashi K. Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol* 96: 94-100, 2012
- Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J* 31: 2994-3007, 2012
- Mori Y, Miyamoto T, Kamezaki K, Kato K, Kikushige Y, Takashima S, Urata S, Shimoda S, Shimono N, Takenaka K, Iwasaki H, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Low incidence of adenovirus hemorrhagic cystitis following autologous hematopoietic stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 87: 828-830, 2012
- Uchino K, Hirano G, Hirahashi M, Isobe T, Shirakawa T, Kusaba H, Baba E, Tsuneyoshi M, Akashi K. Human Nanog pseudogene8 promotes the proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Exp Cell Res* 318: 1799-1807, 2012
- Saito K, Odashiro K, Maruyama T, Akashi K, Mawatari S, Fujino T. Improvement of diabetic or obese patients' erythrocyte deformability by the program of the brain-oriented obesity control system (BOOCS). *J Physiol Sci* 62: 445-451, 2012
- Kikushige Y, Akashi K. TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1266: 118-123, 2012
- Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120: 4058-4067, 2012
- Maehara K, Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Nagao K, Obuse C, Akashi K, Tachibana T, Sakata T, Ohkawa Y. A co-localization model of paired ChIP-seq data using a large ENCODE data set enables comparison of multiple samples. *Nucleic Acids Res* 41: 54-62, 2012
- Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niuro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 121: 962-970, 2012
- Kusaba H, Esaki T, Kishimoto J, Uchino K, Arita S, Kumagai H, Mitsugi K, Akashi K, Baba E. Phase I study of bevacizumab combined with irinotecan and S-1 as second-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 29-34, 2012
- 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

## 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 堀 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思われる。

## 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抑制成功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。

スキルス胃がんには 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 $\alpha$  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