

厚生労働科学研究費補助金

－第3次対がん総合戦略研究事業－

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 典子
平成25 (2013) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

がん化パスウェイネットワークが規定するがんの分子標的の解析
並びに予後予測法の確立 _____ 1

後藤 典子

II. 分担研究報告

1. 肺癌のプロテオミクス _____ 7

野村 将春

2. p53不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索 _____ 8

江成 政人

3. PI3K-AKTシグナル伝達経路活性化分子機構の解明 _____ 11

野口 昌幸

I. 総括研究報告

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

主任研究者 後藤 典子

東京大学医科学研究所 分子療法分野 がん分子標的研究グループ 特任准教授

研究要旨

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

p53 失活に伴って誘導される膜蛋白質を多数見出し、その中で、肺がんの予後とも関連する因子として *TSPAN2* 遺伝子を同定した。*TSPAN2* 遺伝子は、4 回膜貫通型蛋白質をコードしており、このファミリーに属する蛋白質は、がんの浸潤や転移といった腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていることから、肺がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、*TSPAN2* 遺伝子の発現が誘導され、肺がんを亢進させるモデルが考えられた。

プロトオンコジン *TCL1 b* は他の protooncogene *TCL1 isoform* と同様に AKT を活性化し、類似した遺伝子を誘導した。beta-actin promoter を用い、*TCL1 b* を全身性に過剰発現する transgenic mice を作製した結果、マウスは全例消化管由来の血管肉腫を発症し、8 ヶ月以内に死亡した。*TCL1b* を特異的に認識する polyclonal 抗体を作製し、ヒトのがんの免疫組織染色を行ったところ、血管肉腫始め、各種上皮性由来の多くの悪性腫瘍において活性化されていることが明らかとなった。その結果、*TCL1 b* が AKT を活性化することにより、ヒトの悪性腫瘍における各種の病態発現に関与している可能性が示唆された。

手術により採取された肺癌切除組織、又はそこから培養された細胞を用いて様々な質量分析装置でタンパク質解析を行った。悪性度の強い肺癌に関係するタンパク質及び、薬剤感受性に関係するタンパク質を解析し、いくつかの物質を同定した。

HER がん化パスウェイに含まれる分子から、血清早期がんマーカー候補分子を選別した結果、FGL-1 の濃度が、早期肺がん血漿中において有意に高かった。

イレッサ耐性の分子機構のひとつは、Wnt-beta-catenin パスウェイの活性上昇によることが明らかになった。

HER-PI3 kinase がん化パスウェイ並びに HER-NFkB がん化パスウェイの詳細時系列トランスクリプトーム解析を行い、がん幹細胞シグネチャー、新規分子標的候補、がん早期、再発診断マーカー候補分子の抽出を行った。HER-NFkB がん化パスウェイ鍵分子として初期解析の結果得た 71 分子の解析を進め、いくつかについてがん幹細胞維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

野村 将春	東京医科大学 第一外科学講座 講師
江成 政人	国立がん研究センター研究所 ユニット長
野口 昌幸	北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

A.研究目的

がんを早期に診断し、適切な治療法を選択できるテーラーメイド医療を実現し、がんの罹患率及び死亡率を激減するには、個々の症例により異なるがんの複雑な病態を統合的に解明、理解することが重要である。分子生物学の限界が指摘される中、申請者はがんのシステム生物学を4年前に提唱し、独創的な解析手法を試みたところ、従来法では発見されずにおかれたバイオマーカーや分子標的の発見に有用であった(PCT 出願 JP2009/70386, 特願 2009-023933, 特願 2008-3114-81, British J. Cancer, 2010)。がん細胞の増殖、浸潤、転移という病態の進行は、主だったが、がん遺伝子やがん抑制遺伝子を中心とするいくつかのがん化パスウェイネットワークの相互作用として、統合的に理解されうる。申請者は、このがん化パスウェイを構成する鍵分子を高精度に抽出できる手法を開発した。本研究では、これを応用発展することにより、がんの複雑性の全貌を統合的に解明し、これを基盤として、バイオマーカーや革新的分子標的を同定することを目的とする。そして、診断薬や創薬への実用化を目指す。

24年度、肺がんでは、K-Ras 並びに p53 がん化パスウェイネットワークの解析のために、詳細時系列遺伝子発現データを取得する。イレッサ耐性がん化パスウェイネットワークの解析をさらに進める。乳がんでは、HER-NFkB 並びに HER-PI3 kinase がん化パスウェイの解析をさらに進める。そして、HER2 陽性乳がんのマウス個体レベルの解析を行う。(重点項目)そして、臨床検体の網羅的遺伝子、miRNA または蛋白質発現プロファイリング並びに網羅的遺伝子変異情報の解析、さらにはパラフィン切片標本、新鮮臨床検体の解析も組み合わせ、予後予測、(超)早期診断マーカー、症例の特性にあった分子標的候補を抽出する。さらに、がん細胞株の抗がん剤感受性情報付き網羅的遺伝子発現プロファイリングも用いて、抗がん剤の効果予測マーカー、新規分子標的候補を抽出する。

同時に、これまでに得られた候補分子の分子生物学的機能解析並びに、臨床検体を用いた評価をさらに進め、診断薬開発並びに創薬へ進める。(重点項目)腎細胞がんについても解析を開始する。

がんのシステム生物学は、国際的に注目され、アメリカがん学会(AACR)でも連年シンポジウムが組まれている。国内でもその機運が高まる中、申請者の研究はその先駆けになっている。本研究を推進することにより、更なるブレークスルーが期待できる。

B.研究方法

肺がん及び乳がんのがん化パスウェイの解析を行う。得られた新規バイオマーカーや分子標的候補の評価を行う。最終的にはがんの診断薬、分子標的創薬を目指す。

1.肺がんのがん化パスウェイの解析

(後藤、江成、野村)

22年度に、ヒト不死化肺上皮細胞に、活性型 K-Ras 並びに p53-ER を発現する系ができた。時系列マイクロアレイ解析を行い、バイオインフォマティクス解析に供する。

2.肺がん臨床検体、細胞株のオミクス解析

(後藤、江成、野村)

予後予測精度の更なる向上、早期診断マーカー、新規分子標的候補のさらなる抽出を行う。プロテオミクス解析は、ホルマリン標本から得られた蛋白質発現情報を元に組織切片を用いた評価を行い、予後因子などを含めた臨床情報との関連を調べる。様々な肺癌細胞株を用いた薬剤感受性や抵抗性に関する解析も行う(野村の項にも詳述)。

3.肺がんの抗がん剤耐性がん化パスウェイの解析(後藤)

PC9 細胞並びにイレッサ耐性 PC9A2 細胞の解析を継続する。詳細時系列トランスクリプトーム、プロテオーム、エクソームシーケンス、全ゲノムシーケンスデータがすべてそろったので、これを用いて抗がん剤耐性の分子機構を見だし、耐性マーカー、新規分子標的を同定する。

4. 乳がん幹細胞のがん化パスウェイの解析

(後藤)

22、23年度に、乳がん細胞株を Heregulin 刺激して、PI3 kinase 並びに NFkB を活性化させ、詳細時系列 mRNA 並びに ncRNA のマイクロアレイデータ取得し、解析した。その結果、新規バイオマーカー、分子標的候補群を得た。このがん化パスウェイの解析を進め、がんの超早期診断、再発診断マーカー、革新的分子標的候補を得る。

5. 新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

(後藤、江成、野口、野村)

候補分子について、分子生物学的に詳細な解析を行い、臨床検体を用いた評価を行う。手術検体並びに血清は、国立癌センターと東京大学病院より入手する。

23年度に同定した、p53 不活化に伴い誘導される2つの4回膜貫通型蛋白質が、がん細胞の運動能、浸潤能や転移能を亢進しているのか分子機構を詳細に調べる。がん幹細胞のマーカーである CD44、膜結合型メタロプロテアーゼ MT1-MMP

等と結合することが分かっている。そこで、これら結合分子に対する siRNA やパスウェイ特異的な阻害剤等を用いて調べる。4 回膜貫通型蛋白質に対する特異的な抗体を作製し、肺がん等の組織を用いて、免疫組織染色を行い、p53 変異とこれら膜蛋白質発現との相関性について調べる。(江成の項に詳述)

TCL1 ファミリー分子のヒト各種悪性腫瘍における病態への関与は不明である。構造と機能の解析に基づいて、生化学的にさらに詳細な TCL1B による AKT 活性化の分子機構を明らかにする。TCL1B を全身に過剰発現させたマウスを作製し、in vivo 発がん性を検証する。TCL1 ファミリー/TCL1、TCL1B、MTCP1 の3種類のアイソフォーム特異的な抗体を作成し、ヒト各種悪性腫瘍パネルを用い、蛋白質発現レベルと AKT の活性化の相関性、さらにはその発がんの背景因子としての可能性を検証する(野口の項に詳述)。

6. HER2 陽性乳がんのがん化パスウェイの解析(後藤): 24,25 年度

23 年度、マウス乳がんより、スフェア培養を行う系を立ち上げ、FRS2beta ががん幹細胞の維持に重要な役割を果たすことが確認できたので、解析を進める。

C. 研究結果

1-1. 肺がんの HER がん化パスウェイの解析(後藤)

HER がん化パスウェイに含まれる 139 分子のうち、一分子の発現で、肺腺癌の 5 年生存あるいは再発率において、予後の悪いハイリスク群を予測できる分子は、72 分子得られている。そのうち、ハイリスク群の患者に発現の高い分子 36 分子について、低分子化合物による創薬候補という点から、より絞り込みをかけ、新規分子標的候補としての評価を行っている。現在、MTHFD2、SMOX、VCP などの評価を進めている。

MTHFD2 は、葉酸-グリシン代謝経路にある酵素のひとつである。葉酸-グリシン代謝経路の阻害剤としては、methotrexate (MTX) が、関節リウマチや一部の悪性腫瘍に用いられている他、臨床で使用できる抗がん剤としてあまり開発されていない。ごく最近がん細胞がグリシン依存性であると報告されたため、この代謝経路とがんの病態との関わりが急速に注目されている。MTHFD2 は、いくつかの肺がん細胞株において発現が認められ、siRNA を用いてノックダウンを行うと、グリシンをのぞいた培地で培養した際に、細胞増殖が抑制された。また、軟寒天培地中の足場非依存性増殖や、がん幹細胞様細胞のスフェア形成能力も減弱した。MTHFD2 は、EGF によって発現誘導され、HER チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib によってその

発現が減弱する。以上より、肺がん細胞やがん幹細胞様細胞において、HER チロシンキナーゼによって MTHFD2 が発現誘導され、細胞増殖や、がん幹細胞性が維持される可能性が示された。

早期肺癌の術後再発リスクを診断する qRT-PCR 診断薬を目指して、Hazard Ratio をもとに、どの遺伝子発現プロファイルでも予後に相関する 46 遺伝子に絞り込んだ。現在、ミシガン大学へ研究員を派遣して、更なる遺伝子絞り込みを行っている。

1-2. 肺がんの p53 がん化パスウェイの解析: p53 不活化に伴って誘導される経路の探索(江成の項に詳述)

前年度、ヒト肺上皮由来細胞 (SAEC) を用いて、p53 不活化に伴って誘導される 4 回細胞膜貫通型蛋白質をコードする遺伝子 *TSPAN2* を同定した。*TSPAN2* 遺伝子の発現を抑制すると、細胞増殖や足場非依存的増殖に影響を与えなかったが、肺がん細胞の運動能や浸潤能そして転移能を著しく低下させた。その詳細なメカニズムについて様々なシグナル伝達経路の解析をしたところ、*TSPAN2* の発現抑制に伴い、p38MAP キナーゼの活性化や細胞内活性酸素 (ROS) の増加が惹起されることがわかった。その ROS 産生にはがん幹細胞のマーカーである CD44 が関与しており、*TSPAN2* は CD44 との相互作用を介して抗酸化経路を活性化していることが示唆された。更に、細胞内酸化還元状態が、浸潤能に影響を与えるか調べたところ、抗酸化剤が、浸潤能を亢進させること、酸化誘導剤が浸潤能を著しく低下させることがわかった。

1-3. 肺癌のプロテオーム解析(野村の項に詳述)

特に予後不良な神経内分泌癌の中で化学療法感受性の高い小細胞癌と感受性の低い大細胞神経内分泌癌の比較解析を行い、特異的な蛋白質を同定した。

肺がん臨床検体を用いたプロテオミクス解析より得られた、補助療法(uracil-tegafur)の耐性に関与する vimentin 分子を発現するがん細胞は、gefitinib 耐性パスウェイが活性化していた。つまり、vimentin パスウェイは、gefitinib 耐性パスウェイを活性化する可能性が示された。

1-4. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウェイネットワークの解析(後藤、江成、野村)

Gefitinib 耐性 M2 細胞内では、その親株で gefitinib 感受性の PC9 細胞に比較して、GSK3alpha のリン酸化が亢進、さらには beta-catenin の核内移行が見られた。このことよ

り、実際に wnt パスウェイの活性化が M2 細胞内で起こっていることが示された。そこで、siRNA を用いて、beta-catenin をノックダウンすると、M2 細胞の gefitinib 感受性が回復した。M2 細胞内のほうが PC9 細胞内よりそのリン酸化が上昇していた。このことは、gefitinib 耐性細胞内で、Akt の活性化が起こることにより、wnt パスウェイの活性化が起こり、それとともに、gefitinib 耐性になることが示唆された。

2. AKT がん化パスウェイの解析：プロトオンコジ ン T C L 1 b の発がん性とヒト悪性腫瘍における 生物効果の検証（野口の項に詳述）

Proto-oncogene T C L 1 は、Akt に直接結合し、その活性を増強する「Akt 活性化補助因子」である。In vivo での生物機能について検討するため、transgenic mice を作製したところ、2 ラインの T C L 1 b-transgenic mice で angiosarcoma を呈した。この免疫組織染色では、リン酸化 AKT 陽性像を呈した。8 例中 8 例のヒト angiosarcoma において T C L 1 b、リン酸化 AKT 陽性像を呈することを確認した。さらに、各種ヒト悪性腫瘍パネルを用いて T C L 1 b、リン酸化 AKT の解析を行ったところ 146 例中 69 例で T C L 1 b 陽性、うち 46 例（67%）でリン酸化 AKT 陽性だった。また、A k t-T C L 1 b 複合体の構造解析に基づいて開発した A K T 活性化ペプチド阻害剤「T C L 1 b-A K T-in」を用いて A k t リン酸化に対する抑制効果を検証したところ、従来の「T C L 1 b-A k t-in」に勝る A k t 活性抑制効果が認められた。

3. 乳がん幹細胞におけるがん化パスウェイの解析 （後藤）

HER-PI3 kinase-NFkB がん化パスウェイが、乳がん幹細胞の自己複製能維持に重要であることを新鮮臨床検体を用いて証明した。HER-PI3 kinase がん化パスウェイ並びに HER-NFkB がん化パスウェイの詳細時系列トランスクリプトーム解析を行い、がん幹細胞シグネチャー、新規分子標的候補、がん早期、再発診断マーカー候補分子の抽出を行い、その評価を進めている。Amphiregulin, IGFII, SDF などが新規分子標的候補として得られた。

D. 考察

1. 肺がんのがん化パスウェイの解析

HER がん化パスウェイ 139 分子のうち、qRT-PCR 診断薬の開発を目指して、絞り込んだ遺伝子群の

中に、製薬企業的な視点からも分子標的薬を開発できそうな 3 分子が選び込まれている。その中でも、MTHFD2 は、候補分子として最上位にあがっており、これまでに他での報告もなく、今後いろいろな面からの研究を加速させるべき分子である。

開発のリスクは高いが、qRT-PCR 診断薬も実用化されれば、手術検体のホルマリン標本を用いて、MTHFD2 の発現値についても情報が得られる。MTHFD2 の発現値が高い症例にはこれを標的とする抗がん剤を使用するなど、補助療法に用いる抗がん剤の選択も、同時に行えることになる。個別化医療に貢献できると考えられる。

肺がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、TSPAN2 遺伝子の発現が誘導され、それに伴い、細胞内を還元状態に維持することで、肺がんを亢進させるモデルが考えられた。TSPAN2 は、細胞膜分子であるので、抗体を始めとした、特異的な分子標的薬の開発が可能である。

Gefitinib 耐性の分子機構として、beta-catenin パスウェイの活性化を見いだした。その主な原因は、Akt の活性上昇と考えられる。これまでに報告された gefitinib 耐性の分子機構としては、MET 遺伝子の増幅、HGF の過剰発現などが報告されているが、これらもひいては Akt の活性上昇を起こして耐性獲得につながっていると考えられる。さらに、Uracil-tegafur に対する耐性肺がん強く発現している vimentin を介したが、がん化パスウェイにも、gefitinib 耐性パスウェイが活性化しているという興味深い知見も得られている。今回見いだした beta-catenin パスウェイの活性化は、チロシンキナーゼシグナル伝達分子を標的とした抗がん剤耐性のみならず、他の抗がん剤に対する耐性獲得にも、普遍的な分子機構である可能性がある。

今後、beta-catenin の免疫染色像で、gefitinib のみならず、より一般的な抗がん剤に対する耐性を予測する可能性について、詳細に検討する予定である。

2. AKT がん化パスウェイの解析

新規 A K T 活性化ペプチド阻害剤である「T C L 1 b-A K T-in」を用いることにより、癌増殖を抑制、コントロールが可能か、さらにヒト悪性腫瘍において新規の治療分子標的となりえるか否か、ヒト各種悪性腫瘍において新たな予後因子としての可能性を含めた新たな治療への道標としての可能性を検証していく予定。

3. 乳がん幹細胞におけるがん化パスウェイの解析

この解析を更に進めるとともに、乳がんの新規分子

標的、バイオマーカーを更に同定し、評価を進め、日本発の分子標的薬並びにバイオマーカーの開発へとつなげる予定である。

E. 結論

これまでにない形態での共同研究は、画期的な成果が出た。この成果は、国内国際学会での発表、招待講演、論文発表として世界へ発信されている。さらに、知的財産の獲得、実用化へと着実な筋道がつけられている。本研究をさらに加速、推進させることにより、21世紀の医療として注目されているがんの個別化医療へ着実に進めるものと考えられる。

論文発表

1) Cai, Z., Tao, C., Li, H., Ladher, R., Gotoh, N., Feng, G.-S., Wang, F. & Zhang, X.: Deficient FGF signaling causes optic nerve dysgenesis and ocular coloboma. *Development*, in press.

2) Kano, Y., Tsuchiya, K., Zheng, X., Horita, N., Fukushima, K., Hibiy, S., Yamauchi, Y., Nishimura, T., Hinohara, K., Gotoh, N., Suzuki, S., Okamoto, R., Nakamura, T. & Watanabe, M.: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 432, 175-181, 2013.

3) Minegishi, Y., Shibagaki, Y., Mizutani, A., Fujita, F., Tezuka, T., Kinoshita, M., Kuroda, M., Hattori, S. & Gotoh, N.: An adaptor protein complex of FRS2beta and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. *Cancer Sci.*, 104, 345-352, 2013.

4) Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N. & Kuroda, M.: Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy*, 21, 185-191, 2012.

5) Yamauchi, M., Yamaguchi, R., Nakata, A., Kohno, T., Nagasaki, M., Shimamura, T., Imoto S., Saito A., Ueno, K., Hatanaka, Y., Yoshida, R., Higuchi, T., Nomura, M., Beer, D.G., Yokota, J., Miyano, S. & Gotoh, N.: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 7, e43923, 2012.

6) Nakata, A. & Gotoh, N.: Recent understanding of the molecular mechanisms for the efficacy and resistance of EGF receptor-specific

tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 16, 771-781, 2012.

7) Hinorara, K., Kobayashi S., Kanauchi, H., Shimizu, S., Nishioka, K., Tsuji, E., Tada, K., Umezawa, K., Mori, M., Ogawa, T., Inoue, J., Tojo, A. & Gotoh, N.: ErbB/NF-kB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 109, 6584-6589, 2012.

8) Hinohara, K. & Gotoh, N.: NF-kB pathways in breast cancer stem cells for tumorigenesis. In: *Breast cancer, Bentham eBooks, Bentham Science*, in press.

9) Kojima, K., Imoto, S., Yamaguchi, R., Fujita, A., Yamauchi, M., Gotoh, N. & Miyano, S.: Identifying regulational alterations in gene regulatory networks by state space representation of vector autoregressive models and variational annealing. *BMC Genomics*, Suppl. 1, S6, 2012.

10) Okayama, H., Khono, T., Ishii, Y., Shimada, Y., Shiraishi, K., Iwakawa, R., Furuta, K., Tsuta, K., Shibata, T., Yamamoto, S., Watanabe, S., Sakamoto, H., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Gotoh, N., Mizuno, H., Sarai, A., Kawano, S., Yamaguchi, R., Miyano, S. & Yokota, J.: Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 72, 100-111, 2012.

学会発表

「Receptor tyrosine kinase signaling controls breast cancer stem cells and their niche」

第35回日本分子生物学会年会

ワークショップ「がん研究の新局面～Akt シグナルと癌幹細胞」

オーガナイザー

「早期肺がん予後予測シグネチャーと gefitinib 耐性の分子機構」

2012年12月12日

福岡 招待講演

「乳癌幹細胞スフェア培養が解き明かす腫瘍形成の分子機構」

“Discovery of potential molecular targets for breast cancer stem cells by using cultured tumor spheres”

第71回日本癌学会総会 ランチョンセミナー

2012年9月20日

札幌 招待講演

「増殖因子受容体による癌幹細胞とニッチ制御の分子機構」

“Growth factor receptor signaling controls breast

cancer stem cells and their niche”

第71回日本癌学会総会 シンポジウム「がん幹細胞の分子標的」

2012年9月19日

札幌 招待講演

「増殖因子による乳がん幹細胞制御の分子機構」

第22回日本サイトメトリー学会 シンポジウム

2012年6月30日

大阪 招待講演

「増殖因子受容体シグナルによる癌幹細胞制御の分子機構」

第8回文京乳腺研究会 特別講演

2012年6月14日

東京 招待講演

招待講演その他

第5回疾患医科学ミニシンポジウム

「肺がんと呼吸器疾患〜ゲノム研究-疫学-依存症-生活習慣病」

2012年11月1日

東京（医科研）

「増殖因子による乳がん幹細胞と肺がんシグナルの制御機構から見えてくるがんの個別化医療への道筋」

政策課題対応型研究推進セミナー

2012年10月3日

金沢（がん進展制御研究所）

「増殖因子による乳がん幹細胞と肺がんシグナルの制御機構から見えてくるがんの個別化医療への道筋」

第二回腫瘍病理セミナー

2012年10月2日

金沢（金沢医科大学）

学会座長

マイクロRNA

第71回日本癌学会学術総会

2012年9月20日

札幌

受賞

第22回日本サイトメトリー学会学術集会最優秀演題

2012年6月30日

知的財産

米国成立 登録番号：US8173365

発明者：後藤典子、黒田雅彦、土田信夫

名称：シグナル伝達阻害方法、それに用いるシグナル伝達阻害剤およびその用途

出願人：東京大学法人

登録日：2012年5月8日

II. 分担研究者報告

【肺癌のプロテオミクス】

分担研究者 野村 将春 東京医科大学 第一外科学講座 講師

研究要旨

肺癌は個々によって不均一性が強く、個々の患者に合わせた治療が必要な悪性疾患の一つである。生体内で直接作用するタンパク質を解析する事により、疾患に強く関与している物質を同定する事が重要である。また抗がん剤などの薬剤に関与する蛋白質を解析する事により、各症例の治療に最適な薬剤を選択可能になる。また特定の蛋白質を標的にした薬剤の開発への道が広がる可能性がある。

A. 研究目的

肺癌の臨床検体及び初期培養した細胞株を用いてタンパク質解析を行い個々の患者の特性を明らかにすると同時に薬剤感受性などを試験を行い、最適な化学療法を選択する。

B. 研究方法

手術により採取された肺癌切除組織、又はそこから培養された細胞を用いて様々な質量分析装置でタンパク質解析を行う。有意と思われる蛋白質を遺伝子レベルで操作し、増殖能や薬剤感受性の変化などを調べる。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ条約に基づいたICを所得する

C. 研究結果

これまでに肺癌の中で特に悪性度の高い癌のタンパク質解析を行い、いくつかのタンパク質を同定した。その中には、癌幹細胞のマーカーとされている物質や薬剤感受性に関与している物質が同定された。薬剤感受性の蛋白質を遺伝子レベルでノックアウトする事により、薬剤感受性の変化が観察された。またノックアウト前後の遺伝子を解析した結果、薬剤感受性のネットワークを含めた様々なネットワークの関与が明らかになった。

D. 考察

悪性度の強い肺癌に関係している物質は、癌幹細胞のマーカーや薬剤感受性物質として報告されているものであり、治療や予後の指標になる可能性がある。今後、それらの機能を解析し、他の肺癌や、他臓器の悪性疾患に応用できる可能性を考慮する。また、神経内分泌物質を産生して

いる肺癌で多く産生されている物質は、ある薬剤にとっては感受性の、また別の薬剤にとっては抵抗性の指標になる事が示唆された。

E. 結論

悪性度の強い肺癌に関係するタンパク質及び、薬剤感受性に関係するタンパク質を解析し、いくつかの物質を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Journal of Clinical Bioinformatics 2011,1,23

<http://www.jclinbioinformatics.com/content/1/1/23>.

Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. An FFPE proteomic study

2. 学会発表

1) 第102回米国癌学会

Masaharu Nomura et al,

Novel characteristic proteins of large cell neuroendocrine carcinoma of lung

102nd Annual Meeting of AACR, Orlando, Florida, USA. April 2-6, 2011 (Poster)

2) 5th EORCT-NCI-ASCO Annual meeting on "Molecular markers in Cancer" Brussels, Belgium October 27-29 (Poster)

Masaharu Nomura et al.

Stathmin-1 – drug sensitivity associated protein of Lung cancer

Abstract is described on European Journal of Cancer, Vol.47, Suppl.4, S26, Oct 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

【p53 不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索】

分担研究者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

がん抑制因子 p53 は、肺がんの進行に伴って変異失活することが知られており、肺がんの浸潤・転移などの進展機序を解明する上で、p53 経路の制御機構の解析が重要であると考えられる。本年度は、肺がんの進展過程で起こる p53 パスウェイの不活化によって誘導される膜蛋白質 TSPAN2 の機能を解明することを目的とした。本年度は、まず TSPAN2 と相互作用する因子を探索した。その結果、MT1-MMP、Integrins 及び CD44 などが TSPAN2 と特異的に相互作用することがわかった。また、様々な解析から TSPAN2 は、CD44 を介した抗酸化系を亢進するのに重要な役割を担っていることが判明した。この結果は、p53 の不活化によって誘導される TSPAN2 は CD44 と協調的に働き、抗酸化系を活性化し細胞内活性酸素の産生量を減弱させるメカニズムによって、肺がんを進展させるモデルが考えられた。

A. 研究目的

肺腺がんは様々な遺伝子の異常により悪性度の高いがんへと進展すると考えられている。特に非浸潤性から浸潤性のがんへの進展過程においては、がん抑制遺伝子 p53 の変異失活を伴う症例が非常に多いことから、p53 パスウェイは、がんの増殖抑制ばかりではなく、浸潤や転移などのがんの進展にも関与していることが示唆されている。今まで、p53 経路の研究に関して、様々な細胞系でその伝達経路が解明されてきたが、多くのシグナル伝達系は細胞固有の性質に大きく左右されることから、腫瘍抑制因子としての p53 機能の本質を理解するには、ヒトがんの主な発生源である上皮系の細胞を用いて、p53 機能損失による細胞の変質や遺伝子発現動態の変化を理解することこそが重要であると考えられる。前年度の研究において、ヒト肺腺がんの発生源と考えられているヒト肺細気管支上皮細胞を用いて、p53 不活化に伴って誘導される膜蛋白質を多数同定した。そして、様々な解析から、4 回膜貫通型蛋白質 TSPAN2 が p53 不活化に伴って誘導され、肺がんの進展過程に重要な因子であることがわかった。本年度は、どのようにして TSPAN2 が肺がんの浸潤や転移を亢進させているのか、その分子メカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト肺上皮由来の細胞 (SAEC) へ TSPAN2 に

対する siRNA あるいはコントロール siRNA を導入した後、それら細胞の運動能や浸潤能を 8 μm 孔のボイデンチャンバーを用いて解析した。TSPAN2 に相互作用する因子を同定するため、FLAG-HA-His エピトープ標識した TSPAN2 発現ベクターを構築した。その際、がん転移抑制因子として知られている 4 回膜貫通型蛋白質 CD82/KAI1 の発現ベクターを同様に構築し、コントロールとして用いた。相互作用因子の同定には、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体による免疫沈降法を用いた。同定した因子の中で細胞運動や浸潤の関与が予想される幾つかのパスウェイについてウエスタンブロット法を用いて解析した。また、細胞内活性酸素量は、DCFH-DA を細胞に添加し、過酸化水素で刺激後、その細胞抽出液中を調製し、蛍光分光光度計 (励起: 480 nm、取り込み: 530 nm) を用いて測定した。Integrin のリサイクリング実験には、NHS-SS-biotin を用いて細胞表面を biotin ラベルし、biotin 化蛋白質をインターナリゼーションさせた後、還元剤 (MESNa) を用いて細胞表面に残っている biotin を除去した。そして、細胞表面にリサイクルバックしてくる Integrin 量をキャプチャー-ELISA 法で測定した。CD44 の shedding には、無血清培地で細胞を培養し、48 時間後にその培養上清を回収した。そして、TCA 沈殿後培養上清に存在する切断された CD44 量をウエスタンブロット法を用いて解析した。

C. 研究結果

前年度、ヒト肺細気管支上皮細胞 (SAEC) を用いて、誘導される膜蛋白質を多数同定し、そのうち、*TSPAN2* 遺伝子が肺がんの予後とも関連する因子であることを発見した。*TSPAN2* 遺伝子は、4 回膜貫通型蛋白質をコードしており、このファミリーに属する蛋白質は、がんの浸潤や転移といった腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていることから、ここで見出された *TSPAN2* 蛋白質も肺がんの進展に関わる因子であることが推測された。更に、RNAi 法を用いて、*TSPAN2* 遺伝子の発現抑制は、細胞増殖や足場非依存的増殖等には影響せず、肺がん細胞の運動能や浸潤能、そして転移能を著しく低下させることがわかった。本年度は、*TSPAN2* がどのようなメカニズムで p53 不活化によって惹起される運動能や浸潤能を亢進させているのか調べる目的で、まず、免疫沈降法を用いて、*TSPAN2* と相互作用する因子を同定したところ、MT1-MMP、数種の Integrins や CD44 が *TSPAN2* と相互作用することがわかった。MT1-MMP はがん細胞の浸潤過程で重要な働きをになっており、CD44 を切断し、CD44 の機能を制御していることが知られている。そこで、*TSPAN2* 発現が CD44 の切断過程に影響を与えるかどうか調べたところ、培養上清中に CD44 の切断蛋白質が検出されたが、*TSPAN2* 発現による切断量の変化は認められなかった。ついで、*TSPAN2* が Integrins と結合すること、Integrins のリサイクリングが肺がん細胞の浸潤能に関与していることから、*TSPAN2* 発現が Integrins のリサイクリングに影響を与えるか検討した。しかしながら、*TSPAN2* 発現が Integrins のリサイクリングに影響を与えなかったことから、p53 不活化によって惹起される運動能や浸潤能の亢進には、別のメカニズムが存在すると考えられた。浸潤・転移過程の関与が予想される様々なパスウェイを調べたところ、p38MAPK パスウェイが *TSPAN2* の発現抑制によって亢進することがわかった。p38MAPK パスウェイは酸化ストレスによって活性化されること、CD44 が酸化-還元系の制御を担っていることから、*TSPAN2* 発現抑制によって細胞内活性酸素の産生量に影響を与えるか調べた。面白いことに、RNAi 法で *TSPAN2* の発現を抑制すると、過酸化水素によって上昇する活性酸素の産生量が著しく増大した。また、*TSPAN2* 発現によって抑制される細胞内

活性酸素産生量は、CD44 発現抑制によってキャンセルされることから、*TSPAN2* は CD44 と協調的に働いていることが示唆された。

D. 考察

本研究において、p53 不活化に伴って誘導され、肺腺がん予後と関連する膜蛋白質 *TSPAN2* の一つの機能を明らかにした。すなわち、*TSPAN2* は CD44 と相互作用し、CD44 を介した抗酸化系を亢進する役割を担っていた。CD44 ががん幹細胞のマーカーであること、抗酸化系の亢進は、がん幹細胞様性質の維持に重要であることなどの理由から、*TSPAN2* は肺がんのがん幹細胞様性質維持に関与しているかもしれない。p53 は酸化-還元系の双方に関与しており、細胞種に依存していることが知られている。肺がんにおいては、おそらく p53 は細胞内活性酸素の産生を促すことで、肺がん細胞の浸潤や転移を抑制しているのだろう。もし、*TSPAN2* が、がん幹細胞様性質維持に重要な因子であるならば、肺腺がんの浸潤や転移、そしてがん幹細胞の標的分子と考えられ、*TSPAN2* に対する抗体等が抗がん剤として期待できる。

E. 結論

以上の結果、がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、*TSPAN2* 遺伝子の発現が誘導され、そして CD44 と協調的に抗酸化系を亢進させ、肺がんを進展させるモデルが考えられた。この知見は、将来的に抗がん転移薬の開発に役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirokazu Ohata, Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Yuko Matsushima-Hibiya, Chihiro Otsubo, Takahiro Nagase, Hirofumi Arakawa, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya and Masato Enari: **Mol. Cell. Biol.**, In press, 2013
- 2) Yuudai Kondo, Kentaro Nagai, Shingo Nakahata, Yusuke Saito, Tomonaga Ichikawa, Akira Suekane, Tomohiko Taki, Reika Iwakawa, Masato Enari, Masafumi Taniwaki, Jun Yokota, Sumio Sakoda and Kazuhiro Morishita: Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC

with p53 inactivation. Cancer Sci., 103, 782-790, 2012.

- 3) Takashi Kohno, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Totoki, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Hiromi Sakamoto, Koji Tsuta, Koh Furuta, Yoko Shimada, Reika Iwakawa, Hideaki Ogiwara, Takahiro Oike, Masato Enari, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Aage Haugen, Vidar Skaug, Suenori Chiku, Itaru Yamanaka, Shun-ichi Watanabe, Ikuo Sekine, Seishi Ogawa, Curtis C. Harris, Hitoshi Tsuda, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota and Tatsuhiko Shibata: KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat. Med., 18, 375-377, 2012.

2. 学会発表

- 1) Anaplastic lymphoma kinase による p53 チロシンリン酸化を介した p53 不活化機構: 江成政人
第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年

9 月 19 日

- 2) がん間質の p53 発現低下に伴うがん浸潤亢進メカニズムの解析: 大友 亮、大坪 千裕、宮崎 允、日比谷 優子、田代 文夫、江成政人
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 12 日
- 3) p53 転写選択性における NuMA の役割: 宮崎 允、大畑 広和、大坪 千裕、大友 亮、日比谷 優子、田代 文夫、田矢 洋一、江成政人
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 12 日

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【PI3K-AKT シグナル伝達経路活性化分子機構の解明】

分担研究者 野口 昌幸 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

A. 研究目的

セリンスレオニンキナーゼAktは細胞内の細胞死制御の要の分子として細胞反応の様々な機能制御因子として重要な働きをしている。私たちの研究室では、細胞死の制御の要であるセリンスレオニンキナーゼAKTの活性化機構について特にその結合分子による活性化の修飾機構についての研究を進めている。その中で、protooncogene TCL1bのAKT活性化補助因子としての機能を解析しヒト悪性腫瘍への機能的な関与を明らかにすることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

我々はこれまで機能の分からなかったプロトオンコジンTCL1がAKT キナーゼを活性化する「AKT活性補助因子」であることを示し、ヒトT細胞芽球性白血病 (T-PLL) の分子学的な原因を明らかにした。さらにAKT-TCL1複合体の構造と機能との解析から、AKT特異的活性化阻害性剤ペプチドを同定した(*J. Biol. Chem* 2004; 特許出願 2003-416556, *Faseb J* 2007)。プロトオンコジンTCL1にはTCL1bという2つのisoformが存在する。私たちはTCL1bが生化学的にAKT活性化補助因子として機能しているかどうか、TCL1bにより誘導される遺伝子群にはTCL1あるいは恒常活性型AKTとどのような類似性あるいは違いがあるかどうか、TCL1bとAKTの活性化ならびに発がんなどの病態や機能との間に違いがあるかどうか、さらには多くのヒト悪性腫

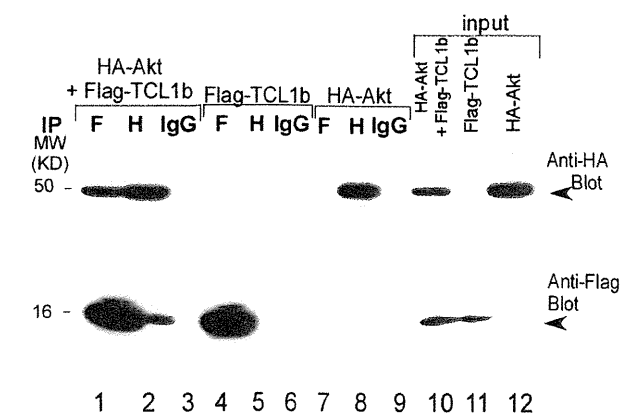
瘍においてどのように寄与しているかどうかの点についての解明を目指して以下の方法により検討を行った。

1. AKT との結合性をあきらかにする。
2. AKT 活性化に及ぼす効果を検証する。
3. Transcriptome 解析に基づく Bioinformatics を用いた解析により、恒常活性型 AKT あるいは他の AKT 活性化補助因子である TCL との誘導遺伝子の比較解析を行う。
4. TCL1b を ubiquitous に過剰発現する transgenic mouse を作製し、oncogenesis をはじめとする in vivo での解析を行う。
5. ヒト sarcoma をふくめた悪性腫瘍における TCL1b と AKT 活性化の免疫組織学的検証を行う。
6. TCL1b の構造解析に基づく AKT 活性化ペプチド阻害剤を用い AKT 活性化能のならびに腫瘍増殖抑制効果を検証する。

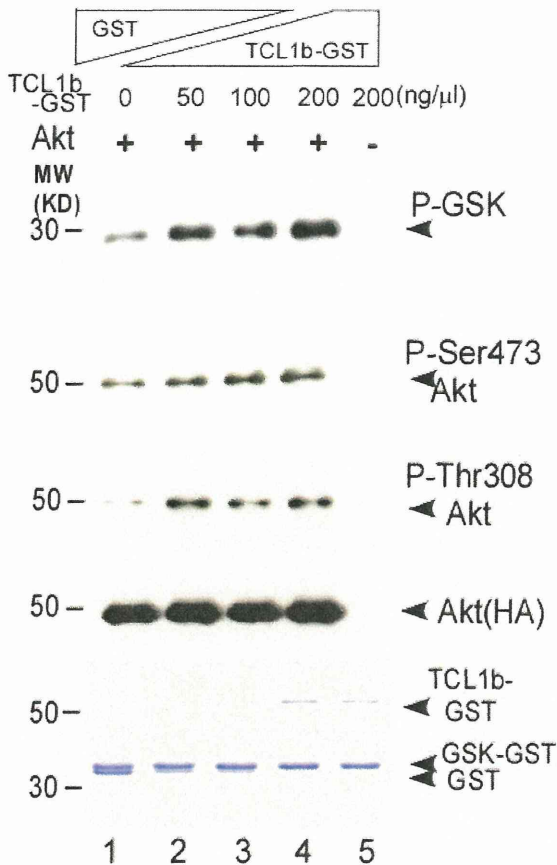
C. 研究結果

Protooncogene TCL1b の発がんに関する機能解析について

1. まず、HEK293 細胞を用いた過剰発現系による免疫共沈法により AKT と TCL1b との結合性を検証した。その結果、AKT と TCL1b との結合性が確認できた。

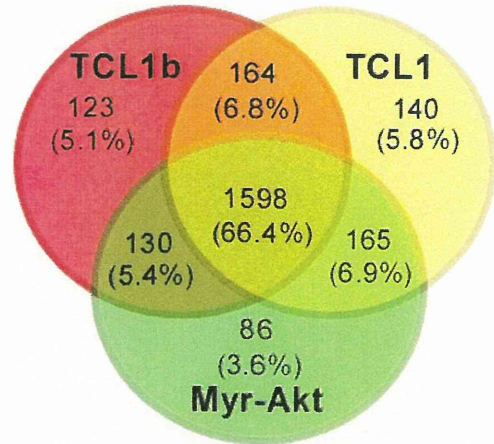


2.次に TCL1b による AKT 活性化に及ぼす効果を検証した。その結果リコンビナント TCL1b を用いた *in vitro* Kinase assay において TCL1b はその容量依存的に AKT を活性化を増強することが判明した。



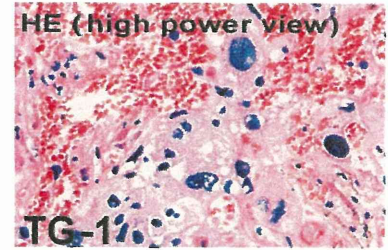
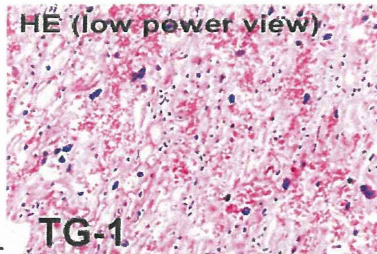
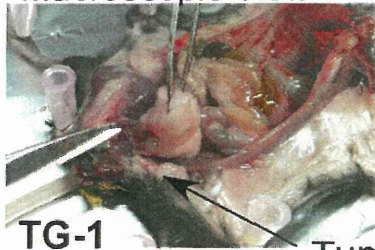
3. Bioinformatics 解析は生命現象を数理的に解析証明する有効な手段として利用されている。我々は TCL1b により誘導される遺伝子群を恒常活性化型 AKT あるいは別の isoform である TCL1 と比較を試みた。ここでは Transcriptome 解析に基づく Bioinformatics を用いた解析により、AKT 活性化との関係を検証した。その結果、TCL1b

は恒常活性化型 AKT や AKT 活性化補助因子である TCL1 と類似、重複した遺伝子群を誘導することが判明した。

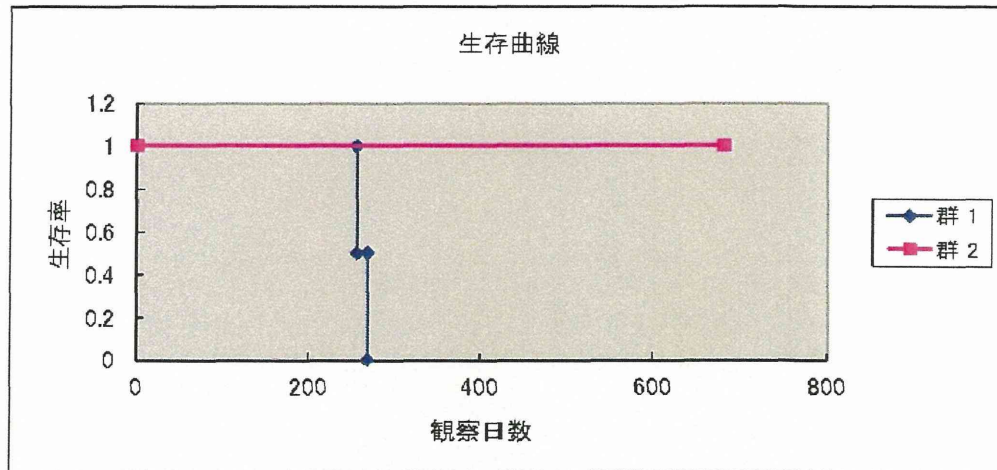


4. TCL1b が TCL1b は恒常活性化型 AKT や AKT 活性化補助因子である TCL1 と類似、重複したした遺伝子群を誘導することから、TCL1b には恒常活性化型 AKT や AKT 活性化補助因子である TCL1 と同様な oncogenicity があるのではないかと推測した。そこで我々は TCL1b を beta-actin promoter により ubiquitous に過剰発現する transgenic mouse を作製し、その *in vivo* での発がん性などの phenotype の解析を行った。その結果、独立した2つの founder ラインで小腸血管由来の angiosarcoma を呈し約8か月でマウスが死亡した。

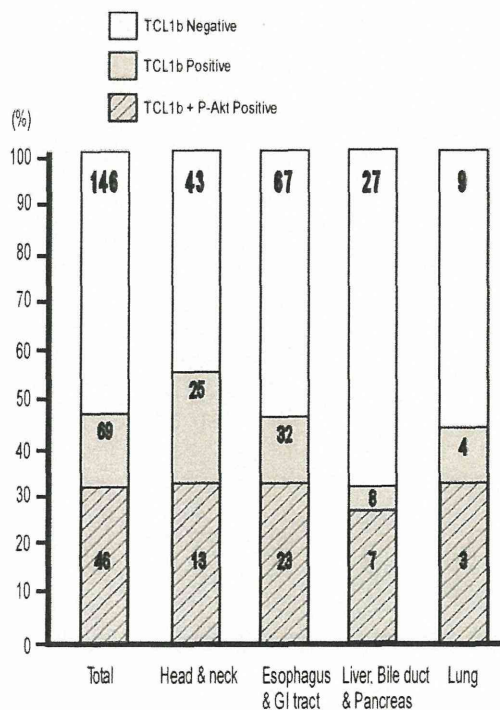
Macroscopic View



TG-1 Tumor



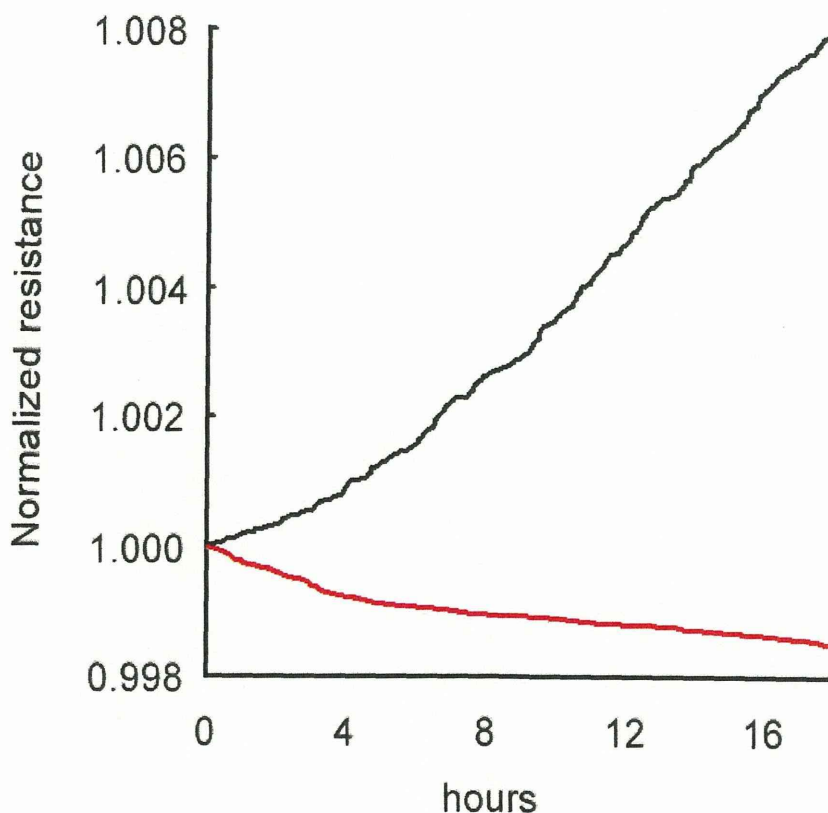
5. TCL1b がマウスで angiosarcoma を呈することから、TCL1b はヒト悪性腫瘍においてその発症や病態の発現に何らかの役割を担っているのではないかと考えた。その仮説に基づいてヒト sarcoma をふくめた悪性腫瘍における TCL1b と AKT 活性化の比較検証を行った。ヒト悪性腫瘍の組織パネルを用いた TCL1b と活性化 AKT 解析による免疫染色で、69/146 の症例で TCL1b が陽性であり、そのうち 46 例ではリン酸化 TCL1b と活性化 AKT が共に陽性であった。



6.我々は先に TCL1 - AKT 複合体のその結合平面の構造と機能の解析に基づいて、AKT 活性化阻害剤を同定している。そこで、我々は TCL1 family タンパクの構造類似性に基づいて、TCL1b の構造に基づく AKT 活性化阻害剤を design しその腫瘍増殖効果を検証した。その結果、TCL1b の構造に基づく AKT 活性化阻害剤 TCL1b-Akt-in は sarcoma 系細胞の増殖を効果的に抑制した。

TCL1b Akt-in

--maseasvRLGVPPGRLWIQRPGile
Akt-in



D. 考察

プロトオンコジンTCL1 b は他のprotooncogene TCL1 isoform と同様にAKTを活性化し、AKT活性化補助因子として機能していることを明らかにした。このことから類推されるように恒常活性型AKTなどにより誘導される遺伝子群と類似した遺伝子が活性化することがtranscriptomeを用いた解析により明らかとなった。TCL1bを過剰発現するマウスがangiosarcomaを呈すること、またヒトhemangiosarcomaにおいて、TCL1bとともにAKTの活性化が認められることにより、TCL1bは血管肉腫の発症に関与している可能性が示唆された。また、ヒ

ト癌パネルによる146例の解析によると約半数の症例で、TCL1bが活性化されていることが明らかとなり、その約3分の2の症例でAKTが活性化されているという結果から、各種上皮性由来の多くの悪性腫瘍においてTCL1bが活性化され、AKTを活性化し、様々なヒトの悪性腫瘍における各種の病態発現に関与している可能性が示唆された。さらにこれらの結果から、TCL1 b の発現がヒト各種悪性腫瘍における予後因子として機能している可能性、TCL1 b の機能を抑制することによってAKTの活性化を下げることによる治療法への可能性が示唆された。

E. 結論

TCL1b は AKT 活性化補助因子として angiosarcoma をはじめとする悪性腫瘍の発症あるいは病態の修飾に関与している可能性が示唆され、angiosarcoma をはじめとする悪性腫瘍の治療の分子標的となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

平田徳幸、柳川芳毅、野口昌幸：IL-10 産生 T 細胞を誘導する樹状細胞

臨床免疫・アレルギー科,57 (3)

: 259-263,2012

2. 学会発表

国際学会発表

Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Mami Matsuda,

Noriyuki Hirata, Tadashi Nagamine, Sinya Tanaka, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an AKT kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. Mechanisms & Models of Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory.

2012/8/14

国内学会発表

野口昌幸：ウイルス感染症における TCL1B による AKT シグナル伝達系の活性化機構

第86回日本感染症学会 長崎市 2012年4月

25日

Manabu Hashimoto, Mami Matsuda Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata Hiroko Noguchi, Wataru Tokuyama, Sinya Tanaka Wataru Tokuyama Masayuki Noguchi:

Characterization of the protooncogene TCL1b as an Akt kinase co-activator.

The 4th international Young Researcher Seminar for Zoonosis Control 2012.

2012.9.19 ~ 20 Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

Manabu Hashimoto, Mami Matsuda Futoshi Suizu, Tadashi Nagamine, Noriyuki Hirata,

Hiroko Noguchi, Sinya Tanaka, Wataru Tokuyama, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an AKT kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. 第71回日本癌学会学術集会 2012年9月19~21日 札幌市

野口昌幸、水津太：Modulation of the Akt signal by its binding proteins.

第35回分子生物学会 2012年12月13日 福岡市

Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Tadashi Nagamine, Sinya Tanaka, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b Functions as An Akt Kinase Co-activator that Exhibits On cogenic Potency In Vivo.

第35回分子生物学会 2012年12月13日 福岡市

