

2013/3009A

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－

『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』

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 典子

平成26（2014）年 5月

目 次

I.総括研究報告

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

後藤 典子

II.分担研究報告

1.p53不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索 _____ 9

江成 政人

2.PI3K-AKTシグナル伝達経路活性化分子機構の解明 _____ 12

野口 昌幸

3.難治性進行肺癌の分子標的治療効果を向上するための治療抵抗例に関する研究
_____ 24

加藤 靖文

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 客員研究員

研究要旨

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。本研究では、HER/ErbB 経路、p53 経路、AKT 経路に注目し、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。また、gefitinib など分子標的薬に対する耐性機構の解明も行う。HER がん化パスウェイに含まれる 139 分子から、低分子化合物による創薬候補という点から絞り込まれた MTHFD2 の評価を行い、創薬へ持ち込むことになった。早期肺がんのハイリスク群を予測可能な 7 遺伝子からなるシグネチャーを得た。p53 の不活性化に伴い誘導される TSPAN2 は、CD44 と協調的に ROS 産生を低減させることで、肺がんを亢進させると考えられた。Gefitinib に対する新たな耐性メカニズムとして、AKT-beta-catenin パスウェイの活性化が明らかになった。肺がん臨床検体の解析では、IGF1R の発現が gefitinib 耐性に寄与していることがわかった。Phafin2 が PI3K-AKT-mTOR シグナルによりオートファジーへの方向性決定の鍵を握る分子であることが明らかになった。Amphiregulin、IGFII、ARTN、GDNF などのリガンドならびに細胞内アダプターMICAL3 が、乳がん臨床検体のスフェア形成に重要な役割を果たすことを見いだした。

以上より、Gefitinib などの抗がん剤に対して抵抗を示すようになった症例のがんも、MTHFD2 中毒になっていることが示唆された。低分子化合物をスクリーニングして、分子標的薬を開発するとともに、免疫染色で、得られた結果を追試すると共に、コンパニオン診断薬を目指した解析も重要になってくる。

早期肺がんの予後予測シグネチャー7 遺伝子について、今後は、パラフィン標本を用いて、実際に臨床で使えるよう、多くの検体を用いて、アルゴリズムの再構築が必要である。

TSPAN2とCD44との相互作用を阻害する中和抗体や低分子化合物等が抗がん剤あるいは抗浸潤転移薬になるのではないかと期待できる。

beta-catenin と IGF-1R を組み合わせた免疫染色法により、gefitinib 治療効果判定の精度をあげられる可能性について解析し、良好な結果が得られれば、臨床で使えるようキット化へと持ち込みたい。

Phafin2-Akt 複合体を介したオートファジーを制御することで発がんにかかわるウイルス感染などにおける病態や細胞反応の制御の開発に向けた道標となる可能性がある。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

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

加藤 靖文 東京医科大学病院 呼吸器・甲状腺外科 講師

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。申請者はがんのシステム生物学を提唱し、これを肺細胞におけるHER/ErbB シグナル伝達経路に適用したところ、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(*PLoS ONE*, 2012; *Am. J. Cancer Res.*, 2011; PCT 出願 JP2009/70386; *British J. Cancer*, 2010)。本研究では、HER/ErbB 経路、p53 経路、AKT 経路に注目し、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。また、gefitinib など分子標的薬に対する耐性機構の解明も行う(*Am. J. Cancer Res.*, 2011)。手法としては、申請者らがこれまでに確立した独創的な手法を効果的に組み合わせる。同時に、肺がん臨床検体を用いたプロテオミクス解析を行い、バイオマーカーや革新的分子標的を同定する(*J. Clin. Bioinforma.*, 2011)。さらに、乳がん幹細胞の生体内での維持に、HER/ErbB 経路が重要であることを発見したので、この経路の解析も行う(*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2012)。最終的には、診断薬や創薬への実用化を目指す。

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

1. 肺がん

HER がん化パスウェイ新規分子標的候補 MTHFD2、SMOX、VCP などを評価中。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 23 遺伝子に絞り込んだ(後藤)。

p53 不活化に伴い、定常状態で発現変動のある遺伝子を解析。4 回膜貫通型蛋白質 TSPAN2 が p53 不活化によって誘導され、肺がん細胞の運動能、浸潤能や転移能に関与していた。予後解析より、TSPAN2 が肺がんとの予後相関が得られた。その分子機構を調べたところ、CD44 から伝達される活性酸素除去経路に TSPAN2 が関与していることがわかった。がん幹細胞様の形質が TSPAN2 をノックダウンすると著しく減弱した。また、国立がん研究センター肺線がん症例のエクソームシーケンスより、幾つかの治療標的候補となる融合遺伝子を同定した(江成)。

AKT活性化補助因子の一つであるTCL1Bの過剰発現はin vivoで血管肉腫を引き起こすことを明らかにし、現在発がん制御の分子機構の詳細と治療法開発に向けた研究を遂行中である。AKTに結合する新規ライソゾーム結合因子によるオートファジー制御機構に関して新しい知見を得、その生化学的、生物学的な詳細に関して研究を進めている(野口)。

肺癌でEGFR-TKIの治療例の手術検体標本98例から作製されたTissue Microarray検体を用い、EGFR-TKIの効果を規定するEGFR遺伝子変異のhot spotであるexon19の欠損(E746-A759del.)とexon21(L858R)の点変異を免疫組織学的染色: exon19(E746-A750del.)とexon21(L858R)を施行し、各々の腫瘍内の蛋白の発現の分布を同定した。免疫組織学的染色で得られた過剰発現部位と欠如部位と治療抵抗予測因子としての可能性を秘めたIGF-1Rを免疫組織学的染色にて検討した(加藤)。

2. 乳がん(後藤)

新鮮臨床検体をNOD-SCIDマウスに移植する系を立ち上げ、がん幹細胞性に着眼した、新規分

子標的候補の評価系が構築できた。Amphiregulin, IGF-II, ARTN, GDF-15などの候補分子の評価を進めている。

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)

・新規分子標的

HER がん化パスウェイに含まれる 139 分子から、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、**druggable** と予想された **MTHFD2** について新規分子標的候補としての評価を行った。**MTHFD2** は、葉酸代謝経路の中で、核酸合成に必要な炭素分子をセリンから取り出し、グリシンに変換する 1 炭素代謝経路を触媒する。**MTHFD2** は、ミトコンドリア内にあり、正常の肺細胞ではほとんど発現していない。一方、調べた限りすべての肺がん細胞株において発現が認められた。同様の触媒活性をもつ **MTHFD1** が細胞質内にあるため、正常細胞は細胞質の活性で十分間に合っていると考えられる。**MTHFD2** の発現を、**siRNA** を用いてノックダウンを行うと、細胞増殖が抑制され、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** のノックダウンによる細胞増殖抑制効果は、**MTHFD2** の発現の高い細胞において、より強くとめられた。加えて、下記に述べる **gefitinib** 耐性 **M2** 細胞も、**MTHFD2** のノックダウンにより、細胞増殖が抑制した。さらに、**shRNA** を用いてノックダウンを行った癌細胞を免疫不全マウスに移植すると、**in vivo** の腫瘍の形成が抑制された。**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** ならびに **MEK** 阻害剤によって発現が減弱した。以上より、がん化とともに **HER** などのチロシンキナーゼの活性が上昇すると、**MEK-ERK** パスウェイの活性化を介して **MTHFD2** が発現誘導

され、腫瘍の増殖や、がん幹細胞性が維持されることが示唆された。**MTHFD2** は、分子標的と考えられる。

・予後予測シグネチャー

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。ミシガン大学で収集した凍結標本から抽出した **RNA** を用いて、トレーニングセット 99 例、バリデーションセット 101 例を用いて、遺伝子の絞り込みを行った。まず、できる限り少ない遺伝子に絞り込んだ結果、**CXCL1**、**CXCL1+ID1** もしくは **CXCL1+SMOX** の 3 通りの予後予測アルゴリズムを得た。これらは、それぞれカプランマイヤー曲線において、バリデーションセットのハイリスク群を精度高く予測できることがわかった。次に、カプランマイヤー曲線のみならず多変量解析においても、他の予後因子である年齢、性別、ステージ分類とも独立して、精度高く予後予測できるアルゴリズムとして、7 遺伝子から構成されるシグネチャーが得られた。

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) 江成の項にも詳述

ヒト肺がん発生過程を模倣する **in vitro** 再構成系を樹立し、**p53** 不活化に伴って誘導される 4 回細胞膜貫通型蛋白質 **TSPAN2** をコードする遺伝子を同定した。**TSPAN2** 遺伝子の発現抑制が、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ること、**TSPAN2** はがん幹細胞マーカーとして知られる **CD44** と結合し、そして **CD44** と協調的に細胞内活性酸素種 (ROS) を抑制することを突き止めた。**TSPAN2** の欠失変異体を用いた解析より、**CD44** との結合には **TSPAN2** の細胞内 C 末端領域にある 9 アミノ酸残基が重要であり、その領域が肺がん細胞の運動能や浸潤能亢進、

そして ROS 産生能の低下に関与していることもわかった(論文リバイス中)。また、FACS を用いた Side-Population (SP) 解析より、TSPAN2 は肺がん幹細胞の形質維持にも関与している可能性が示唆された。以上の結果から、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、CD44 と協調的に ROS 産生を低減させることで、肺がんを亢進させると考えられた。

1-3. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウェイネットワークの解析(後藤、江成)

Gefitinib 感受性 PC9 細胞より、我々が樹立した gefitinib 耐性亜株 PC9M2 細胞の特性を解析し、AKT-beta-catenin パスウェイの活性化により、耐性が引き起こされることがわかった。Beta-catenin に対する siRNA もしくは beta-catenin の阻害剤を用いると、gefitinib に対する感受性が回復した。親株の PC9 細胞と PC9M2 細胞を、免疫不全マウスの皮下に移植して形成された腫瘍を beta-catenin 抗体を用いて免疫染色を行った。Beta-catenin は、AKT の活性化により、細胞膜から細胞質、そして核へ移行することが知られている。PC9M2 細胞由来の腫瘍は、PC9 細胞由来の腫瘍に比較し、beta-catenin の細胞質ならびに核への局在が強かった。さらに、32 例の gefitinib 使用したヒト肺癌臨床検体の治療前検体を解析した。その結果、gefitinib 奏功例に比較し、gefitinib 耐性例のほうで、有意に beta-catenin の細胞膜の局在が弱く、細胞質へ移行する傾向がみられた。以上より、gefitinib 耐性の症例の中には、beta-catenin の活性化が、耐性獲得の分子機構になっていることが示唆された。

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：肺癌組

織検体を用いた解析(加藤)

肺癌で EGFR-TKI の治療例の手術検体標本 98 例から作製された Tissue Microarray 検体を用い、EGFR-TKI の効果を規定する EGFR 遺伝子変異の hot spot である exon19 の欠損(E746-A759del.) と exon 21(L858R)の点変異を免疫組織学的染色：exon 19 (E746-A750del.)と exon 21 (L858R)を施行し、各々の腫瘍内の蛋白の発現の分布を同定した。免疫組織学的染色で得られた過剰発現部位と欠如部位と治療抵抗予測因子としての可能性を秘めた IGF-1R を免疫組織学的染色にて検討した。

44 例の EGFR 変異 (Gefitinib が著効する Exon 19 が 28 例、exon 21 が 16 例)と 43 例の wild type であった。Gefitinib の治療効果は、抵抗例 (Progression disease; PD)群が 19 例で治療奏功 (Disease control; DC = 5 Complete response + 16 Partial response + 47 Stable disease) 群が 68 例であり、これらの IGF-1R の蛋白発現は PD 群と DC 群を比べると IGF1R 陽性群 (H score; 中央値 170) に対し IGF1R 陰性群は H score が 120 で統計学的に優位 ($p=0.001$)に PD 群で高値であった。ROC 曲線より、カットオフ値を H score の 165 に設定すると PD の感度 68%, 特異度 73% であった。全生存は、IGF-1R 陽性群の中央値が 13.2 か月で陰性群が 22.6 か月で優位に短かった ($p = 0.00190$)。無再発生存期間は、IGF-1R 陽性群の中間生存 3.5 か月で陰性群の 12.0 か月で優位に短かった ($p = 0.0020$)。55 人の EGFR 変異のある群を解析すると PFS は IGF-1R 陽性群 (9.5 か月)が陰性群 (17.9 か月)より優位に短かった ($p = 0.0435$)。また、cut off を 10% (H score の 40)に設定しても全生存は、38.6 か月と 15.7 か月で統計学的有意差 ($p=0.0295$) をもって、IGF1R 陰性群が長い結果であった。

2. AKT がん化パスウェイの解析 野口の項にも詳述

・プロトオンコジントCL1b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、後藤）

TCL1B を過剰発現する TCL1B-transgenic mice 作製したところ免疫組織染色で TCL1B、リン酸化 AKT 陽性である血管肉腫 (angiosarcoma) を呈した。比較的まれな予後の悪い疾病であるヒト angiosarcoma の 13 症例の検討により、11 例において TCL1B とリン酸化 AKT がともに陽性であった。ヒト悪性腫瘍パネルでの検討では 146 例中 69 例で TCL1B が陽性、うち 46 例 (67%) でリン酸化 AKT が陽性だった。さらに AKT-TCL1B 複合体の構造解析に基づいて開発した新規 AKT 活性化ペプチド阻害剤「TCL1B-AKT-in」は、Akt 活性抑制効果を示し、癌ならびに血管肉腫細胞の細胞増殖の効果的な抑制効果を確認した。

・リソゾームにおける AKT 結合因子 Phafin2 によるオートファジー制御の分子機構（野口）

Yeast two hybrid 法を用いてライソゾーム (lysosome) に局在する AKT に結合する新しい細胞内分子 (Phafin2) を同定した。我々はこの Phafin2 が PI3K-AKT-mTOR シグナルによりオートファジーへの方向性決定の鍵を握る分子として注目した。蛍光色素を用いた共焦点顕微鏡、sucrose-gradient 法によるライソゾームの精製、分子イメージング (FRET) により Phafin2-AKT 複合体のライソゾームへの局在がオートファジーの誘導により増強されることを示した。その結果、オートファジー誘導には Phafin2 とライソゾーム膜状にある膜リン脂質 PtdIns(3)P と結合が重要であること、オートファジー誘導ならびにその機能には AKT ならびに Phafin2 の存在が必須であることを明らかにした。また、Phafin2-AKT 複合体がこれまで広く用いられてきたオートファジー阻害剤である 3-MA の分子標的であることを初めて示すことができた。

3. 乳がんのがん幹細胞におけるがん化パスウェイ (後藤)

HER-PI3 kinase 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。Amphiregulin、IGFII、ARTN、GDNF などのリガンドならびに細胞内アダプター MICAL3 が、臨床検体のスフェア形成に重要な役割を果たすことを見いだした。

D. 考察

1. 肺がんのがん化パスウェイの解析

分子標的 MTHFD2 は、癌細胞において、この分子の発現が高いほど、ノックダウンの効果が強くなることから、癌細胞が MTHFD2 に依存して増殖する、すなわち MTHFD2 中毒になっていることが示唆された。gefitinib などの抗癌剤に対して抵抗を示すようになった症例の癌も、MTHFD2 中毒になっていることが示唆された。今後、免疫染色で、得られた結果を追試すると共に、コンパニオン診断薬を目指した解析も重要になってくる。この代謝経路にある分子の変異によって、MTHFD2 中毒のレベルを測定できる可能性も出てきている。代謝産物の測定など、より詳細な分子機構をつめることにより、臨床で使えるコンパニオン診断薬の開発へとつなげる予定である。

早期肺癌の予後予測シグネチャーは、7 分子という適切な数の遺伝子を用いて、ステージ I のハイリスク群を精度高く予測することが可能なところまで到達できた。今後は、パラフィン標本を用いて、実際に臨床で使えるよう、多くの検体を用いて、アルゴリズムの再構築が必要である。

肺腺がん進展の過程では 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るモデルを提唱するに至った。また、TSPAN2 が、がん幹細胞様

形質維持に重要な因子であることも示唆され、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た。今後将来的には、TSPAN2とCD44との相互作用を阻害する中和抗体や低分子化合物等が抗がん剤あるいは抗浸潤転移薬になるのではないかと期待できる。

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。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。

免疫染色による蛋白発現で治療予測因子としての IGF-1R の可能性が示唆された。

また、Exon 19, exon 21 の染色で陽性部位と陰性部位と蛋白発現が異なる部位が存在することが確認された。現在、この exon 19 の欠失、exon 21 の点突然変異は、保険適応となっている EGFR 遺伝子検査をもって、行われている。一方、遺伝子検査は高額である。安価で簡便な診断方法である免疫組織学的染色の抗体も近年、開発され、感度、特異度共に良好な結果を示している。しかし、あくまでこれは、exon 19 と exon 21 の遺伝子変異の診断までで治療効果までは解明されていない。

今後、beta-catenin と IGF-1R を組み合わせた免疫染色法により、gefitinib 治療効果判定の精度をあげられる可能性について解析し、良好な結果が得られれば、臨床で使えるようキット化へと持ち込みたい。

2. AKT がん化パスウェイの解析

新しい「Akt活性化補助因子」である Protooncogene によるTCL1B-AKT複合体はヒトの様々な悪性腫瘍の原因や背景因子となっている可能性が示され、発がんの背景因子として重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、

このTCL1B-AKT複合体の構造と機能の解析に基づく新規AKT阻害剤「TCL1B-Akt-in」はさまざまな悪性腫瘍において新しい分子標的薬としての期待される抗がん効果を示す可能性があり、新規抗癌治療への展望も期待できる研究成果である。

Phafin2-Akt 複合体の膜リン脂質 PI(3)P 依存的なライソゾームの移行がオートファジー誘導に必須であることを示した。Phafin2-AKT 複合体はこれまで広く用いられてきたオートファジー阻害剤である 3-MA の分子標的を世界で初めて明らかにすることができた。この一連の研究は、細胞内 PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達によるオートファジー制御の仕組みが明らかにするばかりでなく、Phafin2-Akt 複合体を介したオートファジーを制御することで発がんにかかわるウイルス感染などにおける病態や細胞反応の制御の開発に向けた道標となる可能性がある。

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。

E. 結論

本年度で最終年度であるが、シグナル伝達のシステムの解析に立脚した独創的なアプローチにより、いくつかの新規分子標的、予後予測シグネチャー、バイオマーカー候補などが得られた。MTHFD2については、実際に製薬会社による低分子化合物のハイスループットスクリーニングを行っている。今後は、がんの臨床での実用化をめざして、他のシーズについても、積極的に競争的資金を獲得しつつ、開発を進めていきたい。

G. 研究発表 論文発表

Kohsaka, S., Hinohara, K., Wang, L., Nishimura, T., Urushido, M., Yachi, K., Tsuda, M., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., Gotoh, N. & Tanaka, S.: Epiregulin enhances tumorigenicity activating ERK/MAPK pathway in glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, in press.

Ono, K., Kita, T., Sato, S., O'Neill, P., Mak, S.-S., Paschaki, M., Ito, M., Gotoh, N., Kawakami, K. & Ladher, R.K.: Fgfr1-Frs2/3 Signalling Maintains Sensory Progenitors during Inner Ear Hair Cell Formation. *PLOS Genetics.*, in press.

Li, H., Tao, C., Cai, Z., Hertzler-Schaefer, K., Collins, T.N., Wang, F., Feng, G.-S., Gotoh, N. & Zhang, X.: Frs2alpha and Shp2 signal independently of Gab to mediate FGF signaling in lens development. *J. Cell Sci.*, in press.

Tomokuni, A., Eguchi, H., Hoshino, H., Dewi, D.L., Nishikawa, S., Kano, Y., Miyoshi, N., Tojo, A., Kobayashi, S., Gotoh, N., Hinohara, K., Fusaki, N., Saito, T., Suemizu, H., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashji, S., Tanemura, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. & Nagano, H. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol. Lett.* 6, 323-328, 2013.

Gotoh N.: Growth factor signaling regulates breast cancer stem cells. In *Practical molecular target for suppression of cancer. Publication in Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, Begell House Inc. Publisher, CT, USA, 4, 2013.

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

Hashimoto, M., Suizu, F., Tokuyama, W., Noguchi, H., Hirata, N., Matsuda-Lennikov, M., Masuzawa, M., Gotoh, N., Tanaka, S. & Noguchi, M.: Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator which exhibits oncogenic potency in vivo. *Oncogenesis*, 2, e70, doi: 10.1038/oncsis.2013.30.

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*, 140, 2711-2723, 2013.

Kano, Y., Tsuchiya, K., Zheng, X., Horita, N., Fukushima, K., Hibiya, 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.

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.

学会発表

「EGF 受容体チロシンキナーゼ制御遺伝子による肺癌の予後予測診断と乳癌幹細胞の分子標的」

シンポジウム：翻訳後修飾に着目したシグナル伝達研究と創薬の最前線

第134回日本薬学会年会

2014年3月30日

熊本

Prognostic gene signature and novel molecular targets derived from EGF receptor tyrosine kinase signaling.

Korea-Japan Cancer Symposium

2014年11月29日

岐阜

「増殖因子制御遺伝子による予後予測診断と癌幹細胞の分子標的」

“Prognostic gene signature and novel molecular targets derived from growth factor signaling”

分子標的治療のカッティングエッジ

JCA-JSMO 合同シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会

2013年10月3日

横浜

“Growth factor signaling regulates breast cancer stem cells.”

Seminar series in School of Medicine, Yale University

2013年9月19日

New Haven, CT, USA

「増殖因子制御遺伝子による肺癌の予後予測診断と乳癌幹細胞の分子標的」

がん・ゲノム・脳 支援活動 合同シンポジウム

2013年8月6日

東京

「増殖因子による乳がん幹細胞制御の分子機構」

Breast Cancer Conference

2013年7月26日

東京

“Receptor tyrosine kinase signaling controls breast cancer stem cells”

SNUCRI & KUCRI Symposium

2013年7月10日

ソウル 韓国

“Growth factor receptor signaling controls breast cancer stem cells and their niche”

The 86th Annual Meeting of Japanese Tissue Culture Association

2013年5月31日

筑波

「増殖因子による乳癌幹細胞制御の分子機構と臨床応用の可能性」

第29回お茶の水乳腺研究会

2013年5月28日

東京

「がん予防について」

東京消防庁健康管理講演会

2013年5月22日

東京

知的財産

欧州特許成立：許可通知受領：2013年10月1日

発明者：後藤典子

名称：ErbB2 を介するシグナル伝達経路のダウンレギュレーションの有無を判定する方法、抗癌剤による治療の要否の判断を補助する方法

出願者：東京大学法人

特許出願：2013年10月2日 特願 2013-207513

発明者：後藤典子、中田飛鳥

名称：CXCL1 の発現量に基づく肺癌患者の予後判定方法およびキット

出願者：コニカミノルタ株式会社

【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

がん抑制遺伝子 p53 は、肺腺がんの悪性化に伴って変異失活することが知られており、肺腺がんの浸潤・転移等の悪性化への進展機序を解明する上で、p53 パスウェイの制御機構の解析が重要であると考えられる。本年度は、肺腺がんの悪性化に伴って起こる p53 パスウェイの不活化によって誘導される膜蛋白質 TSPAN2 の更なる詳細な機能を解析した。まず TSPAN2 の様々な欠失変異体を作製し、TSPAN2 の細胞内 C 末端領域にがん幹細胞マーカーとして知られる CD44 が結合することがわかった。次に、CD44 と結合できない TSPAN2 変異体を用いた解析から、TSPAN2 の細胞内 C 末端領域が CD44 による細胞内活性酸素産生量の減弱に必要であることが判明した。また、TSPAN2 とがん幹細胞様性質である薬剤排出能との関連について調べたところ、肺腺がん細胞株において TSPAN2 を発現抑制すると、高い薬剤排出能を持つ細胞分画（Side Population 分画）が大幅に減少することがわかった。以上の結果から、p53 不活化によって誘導される TSPAN2 は CD44 と細胞内 C 末端領域を介して結合し、CD44 と協調的に抗酸化系を活性化することにより細胞内活性酸素の産生量を減弱させ、結果として肺腺がんを進展させるモデルが考えられた。そして、TSPAN2 の発現抑制は、がん幹細胞様性質を持つ細胞分画を減少させた。

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。本研究において、ヒト肺腺がんの発生源とさ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 TSPAN2 を同定し、TSPAN2 が p53 不活化に伴って誘導され、肺腺がんの進展過程に重要な因子であることがわかった。また、TSPAN2 は CD44 との相互作用によって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ことによって、肺腺がんの悪性化を助長することを提唱した。本年度は、更に TSPAN2 と CD44 との関連性の詳細を明らかにするために、TSPAN2 と CD44 との結合領域を特定した。そして、その結合領域の知見から、TSPAN2 と CD44 との結合が細胞内活性酸素種の産生に影響を与えるかについて調べた。また、がん幹細胞様性質の指標として Side Population (SP) 解析を用い、TSPAN2 とがん幹細胞様の性質との関連について調べた。

B. 研究方法

TSPAN2 と CD44 との相互作用に必要な領域を特定するために、FLAG-エピトープ標識した TSPAN2 変異体の発現ベクターを構築した。TSPAN2 の欠失変異体を発現するベクターの構築には 2 段階 PCR-based targeted mutagenesis 法を用いた。構築したベクターを肺がん細胞へトランスフェクションし、その細胞抽出液を抗 FLAG 抗体による免疫沈降法を用い、次いで、抗 CD44 抗体を用いたウエスタンブロット法により結合領域を決定した。結合実験に用いた TSPAN2 変異体は以下である。TSPAN2 Δ SEL, small

extracellular loop を欠失した TSPAN2 (38-51 アミノ酸残基欠失); TSPAN2 Δ LEL-VR, large extracellular loop variable region を欠失した TSPAN2 (151-174 アミノ酸残基欠失); TSPAN2 Δ C-tail, cytoplasmic C-terminal tail を欠失した TSPAN2 (213-221 アミノ酸残基欠失). 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。Side population (SP) 分画の割合については、Hoechst33342 染色されにくく、Multi-drug resistance (MDR) トランスポーターの機能阻害剤 Verapamil 処理で消失することを指標としてフローサイトメーターを用いて解析した。また、がん細胞の浸潤能や運動能については、肺がん細胞へ TSPAN2 に対する siRNA あるいはコントロール siRNA を導入した後、8 μ m 孔のボイデンチャンバーを用いて解析した。

C. 研究結果

本研究において、ヒト肺細気管支上皮細胞を用いて、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。また、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たところ、MT1-MMP、数種の Integrins や CD44 が TSPAN2 と相互作用し、それら因子の中でも特に CD44 を介した酸化-還元系の制御に TSPAN2 が関与していること等が示唆された。本年度は更に TSPAN2 と CD44 との関連性を調べるために、TSPAN2 の様々な欠失変異体を用いて、まず CD44 との結合領域を特定した。免疫沈降法を用いた解析から、TSPAN2 の第 1 ループを欠失した TSPAN2 Δ SEL や TSPAN2 の第 2 ループを欠失した TSPAN2 Δ LEL-VR は CD44 との結合にほとんど影響を与えなかったが、TSPAN2 の

cytoplasmic C-terminal tail を欠失した TSPAN2 Δ C-tail は CD44 と結合しなかった。すなわち、TSPAN2 の C 末端 213-221 アミノ酸残基からなる領域が CD44 との主な結合部位であることが判明した。面白いことに、この TSPAN2 Δ C-tail は MT1-MMP や数種の Integrins への結合にはあまり影響を与えないことから、CD44 との結合にある程度特異性があることがわかった。そこで、CD44 に結合できない TSPAN2 変異体が肺がん細胞の浸潤能や細胞内活性酸素種の産生能に影響を与えるか調べた。ボイデンチャンバーを用いた浸潤能の解析から、野生型の TSPAN2 は肺がん細胞の浸潤能を亢進させ、活性酸素種の産生量を減少させたが、CD44 に結合できない TSPAN2 変異体には、そのような活性がなかった。また、DCFH-DA を用いた活性酸素種の測定 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、フローサイトメーターを用いて、TSPAN2 とがん幹細胞様の性質を持つ細胞集団 (SP 分画) との関連性について調べた。肺腺がん細胞株において約 1-2 %程度存在する SP 分画が、TSPAN2 発現抑制によって顕著に減少することがわかった。

D. 考察

本研究において、p53 不活化に伴って誘導される膜蛋白質 TSPAN2 の機能の 1 つを明らかにした。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。その際、TSPAN2 の細胞内 C 末端領域が CD44 との結合、浸潤能の亢進や細胞内活性酸素種産生の抑制に必要であった。CD44 はがん幹細胞のマーカーであり、抗酸化系の亢進が、がん幹細胞様性質の維持に重要であることから、TSPAN2 は肺がんのがん幹細胞様形質維持に関与している可能性が予想された。実際、TSPAN2 の発現抑制はがん幹細胞様形質を持つ細胞集団の割合を減少させることがわかり、TSPAN2 が肺腺がんのがん幹細胞様性質の維持に関与していることが示唆された。今後、TSPAN2 がどのようなメカニズムでがん幹細胞様性質の維持に関与しているのか調べる必要があるだろう。また、がん幹細胞様形質を持つ細胞は抗がん剤等の治療抵抗性にも関連しており、TSPAN2 は有効な肺腺がんに対する新規標的分子と考えられる。

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、肺腺がんを進展させるモデルが考えられた。また、*TSPAN2* とがん幹細胞様性質の維持との関連性が示唆された。これらの知見は、将来的に肺腺がんの新規分指標的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: NuMA is required for the selective induction of p53 target genes. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 2447-2457, 2013.
- (2) Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari: TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. *Cell Reports*, 7, 527-538, 2014.
- (3) Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Koh Furuta, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Shun-ichi Watanabe, Hiroshi Nokihara, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, in press, 2014.

2. 学会発表

- (1) Masato Enari: INACTIVATION OF p53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH THE

DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF p53. Preconference on p53/6th International p63/p73 Workshop, Kazusa, Symposia, September 15, 2013.

- (2) 細胞老化とアポトーシスの運命を決定する遺伝子の同定とその機能解析:長野 大輝、中野 真行、橋本 季明、江成 政人、吉川 潮、鎌田 真司
第 72 回日本がん学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 5 日
- (3) NuMA と CDK8 による p53 標的遺伝子の選択的調節: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 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 4 日
- (4) がん随伴線維芽細胞の p53 による肺がん細胞の浸潤制御機構:大友 亮、大坪 千裕、宮崎 允、日比谷 優子、田代 文夫、江成 政人
第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 4 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

【AKT 結合因子による多彩な生物機能制御の分子機構の解明】

分担研究者 野口 昌幸 北海道大学遺伝子病制御研究所 癌生物分野 教授

研究要旨

これまで PI3K-AKT シグナルはオートファジーの制御の機構の詳細は不明でした。私たちは AKT に結合するリソソームに局在する細胞内分子 (Phafin2) を同定した。さらにその生物学的な機能として、膜リン脂質 PI(3)P 依存的な AKT-Phafin2 複合体のリソソームにおける形成が、オートファジーの誘導に必須であることを明らかにし、その新しい生物学的な機能を報告した (*Matsuda et al., Plos one 2014*)。

また一方で、私たちは、「AKT 活性化補助因子である Proto-oncogeneTCL1B がヒト血管肉腫をはじめとする様々な悪性腫瘍の発症に寄与していることを明らかにした。また、その構造と機能の解析に基づき TCL1B 依存的な AKT の活性を阻害することにより細胞増殖を抑制が可能で、新規分子治療標的としての可能性を明らかにした (*Hashimoto et al., Oncogenesis 2013*)。

A. 研究目的

私たちの研究室では、細胞の分化、増殖として細胞死制御のメカニズムとその異常に基づく様々な生物学的な現象を研究、これらの制御機構の異常によるヒト遺伝子病とその治療法の開発に向けて研究を進めている。セリンスレオニンキナーゼ AKT (Protein Kinase B) は、細胞死 (アポトーシス) や細胞生存制御において重要な働きをする細胞内シグナル伝達因子である。私達は AKT 結合因子による AKT の活性化ならびに細胞反応修飾機構の解析を通して発がんなどの発症の背景となる新しい細胞制御の仕組みを明らかにし、治療への展開を目指す。

B. 研究方法

研究テーマ1. リソゾームにおける AKT 結合因子 Phafin2 によるオートファジー制御の分子機構

研究は yeast two hybrid 法により細胞死制御の要であるセリンスレオニンキナーゼ AKT に対する結合分子のスクリーニングを免疫系細胞の B 細胞を用いたライブラリーを用いて行った。この結果、AKT に特異的に結合する分子の部分的な cDNA 配列を得た。さらにこの分子の全長の cDNA をライブラリースクリーニングにより取得し、哺乳動物発現ベクターならびに大腸菌でのリコンビナントタンパク発現ベクターに野生型、各種機能ドメインの変異型の AKT 結合分子を得た。これらの plasmid 発現ベクターに含まれるタンパクを哺乳動物細胞に発現させ、細胞生物学的手法、生化学的手法さらには生物学的な方法などを用いてこの AKT 結合分子の機能解析を進めた。今回のスクリーニングにより得られた分子はリソゾームに存在し、細胞のタンパク分解のカギを握る分子であるので、オー

トファジーの誘導時の細胞内分布、タンパク分解、膜リン脂質との関係、などの多岐にわたり機能解析を行った。

研究テーマ2. プロトオンコジン TCL1B の機能解析

私たちは Yeast two hybrid 法により AKT 結合因子として同定した AKT 活性化補助因子であるプロトオンコジン TCL1 のファミリーの同属のプロトオンコジン TCL1B の機能解析を in vitro ならびに in vivo で進め、その構造と機能の解析からヒトの悪性腫瘍に TCL1B 依存的な AKT 活性を抑制する事により治療への効果を検証した。

(倫理面への配慮)

実験の一部にヒト由来の細胞株を用いて生化学的、細胞生物学的な機能解析を行った。細胞株は正式な生命倫理基準の下に樹立された細胞株を用い、患者から新たに樹立する細胞は使用していない。また、研究の一部に動物実験、放射性同位元素、組み換え DNA を用いた研究に関しては北海道大学遺伝子病制御研究所の規則に遵守し遂行した。

C. 研究結果

研究テーマ1. リソゾームにおける AKT 結合因子 Phafin2 によるオートファジー制御の分子機構

1. Yeast two hybrid により得られたリソゾーム蛋白の模式図。この蛋白は PH domain, Fyve domain という二つの独立した膜リン脂質に結合する機能ドメインをもつ分子量約 25 KD の小さな分子である。

図 1.

2. ヒト Phafin2 は哺乳動物細胞内において過剰発現させた細胞を用いた免疫共沈降法により

AKT と特異的に結合することを確認した。

図 2.

3. sucrose gradient 法により HBSS 処理によるオートファジー誘導後にリソゾーム分画中に AKT と Phafin2 が共存することが確認できた。

図 3.

4 . BIFC (Bi-molecular Fluorescent complementation) 法を用いた蛍光顕微鏡解析ではオートファジーの誘導後に AKT と phafin2 はリソゾームに共局在することが判明した。

図 4.

5 . さらに siRNA を用いた実験により AKT-Phafin2 複合体におけるそれぞれの因子の必要性を検証したところ、Phafin2 ならびに AKT それぞれの因子がともにリソゾームに局在することがオートファジーの誘導に必須であることが明らかとなった。

図 5

研究テーマ 2. プロトオンコジン TCL1B の機能解析

1. プロトオンコジン TCL1 ファミリーに属する同属の TCL1B はその構造と機能の解析から AKT に結合しその活性化を増強する活性化補助因子であることが判明した。ここでは TCL1B と AKT の結晶構造の図を参考に示す。

図 6

2. TCL1B により誘導される遺伝子は恒常活性化型 AKT ならびに同属のプロトオンコジン TCL1 により誘導される遺伝子群と非常に高い類似性がある。

図 7.

2. ベータアクチンプロモーターを用いて TCL1B を過剰に発現する Transgenic マウスを作製したところこのマウスは小腸由来の血管肉腫を発症した。

図 8

3. TCL1B の構造と機能の解析に基づいて作成

した AKT 阻害剤「TCL1B-Akt-in」は血管肉腫の増殖を in vitro において効果的に抑制した。

図 9.

D. 考察

生体のホメオスターシスは細胞の分裂に基づく増殖と細胞が死んでいくことのバランスの元に成り立っている。このバランスが崩れ細胞が増殖しない状態に傾くと免疫細胞の枯渇により正常な機能が維持できずウイルス感染などに脅かされ死に至る。反対に、癌や白血病では細胞の無制限な増殖がその本態にあり、この結果生体の正常な機能を蝕み生命を脅かす。セリンスレオニンキナーゼ AKT は細胞内アポトーシス制御の要の分子であり、この分子の異常な活性化がヒトの様々な悪性腫瘍の原因となることが知られている。私たちはこのセリンスレオニンキナーゼ AKT の細胞反応制御機構の解明を通して、これまでその発症機序のわかっていないさまざまな病気の発症機構を解明し、さらにその治療法への道標を得るべく研究を進めた。

オートファジーは細胞が持っている、自食(じしょく)とも呼ばれる細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つと考えられ、リソゾームにおける細胞質成分の分解の総称である。オートファジーは細胞内蛋白の再生機構として機能しているばかりではなく、生理機能としても免疫応答、発がんなど様々なヒト疾病に関与していることが推測されています。本研究では Phafin2-Akt 複合体の膜リン脂質 PI(3)P 依存的なライソゾームの移行がオートファジー誘導に必須であることを示しました。この結果、Phafin2-AKT 複合体はこれまで広く用いられてきたオートファジー阻害剤である 3-MA の分子標的を世界で初めて明らかにすることができました。一連の研究は、細胞内 PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達によるオートファジー制御の仕組みが明らかにするばかりでなく、Phafin2-Akt 複合体を介したオートファジーを制御することで発がんにかかわるウイルス感染などにおける病態や細胞反応の制御の開発に向けた道標となる可能性があります。

一方で、新しい「Akt活性化補助因子」である Protooncogene による TCL1B-AKT 複合体はヒトの様々な悪性腫瘍の原因や背景因子となっている可能性が示され、発がんの背景因子として重要な役割を担っていることが明らかとなりました。また、この TCL1B-AKT 複合体の構造と機能の解析に基づく新規 AKT 阻害剤「TCL1B-Akt-in」はさまざまな悪性腫瘍において新しい分子標的薬

としての期待される抗がん効果を示す可能性があり、新規抗がん治療への展望も期待できる研究成果であると考えられる。

E. 結論

申請者らはセリンスレオニンキナーゼ AKT がリソソーム膜の膜リン脂質である PI(3)P 依存的に Phafin2 と結合、リソソームに移行し、オートファジーの誘導を制御していることを明らかにした。また、TCL1B は悪性腫瘍の中で血管肉腫においてその発症にかかわっていることが判明し、その構造と機能の解析に基づく AKT 阻害剤を用いることで、これまでその治療が困難であったこの疾患に対する治療の可能性が開けた。本研究により、生体の恒常性維持に極めて重要な AKT シグナル伝達経路とオートファジーの制御の要となる標的分子の同定ができ、あらにこれまで原因や治療の明らかでなかった血管肉腫におけるその分子生物学的な制御機構の解明さらには個体レベルでの恒常性維持の分子機構を明らかにでき、新しい治療法の開拓などその成果を広く社会に還元することが可能である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mami Matsuda-Lennikov, Futoshi Suizu,

Noriyuki Hirata, Manabu Hashimoto, Kohki Kimura, Tadashi Nagamine, Yoichiro Fujioka[†], Yusuke Ohba, Toshihiko Iwanaga, & Masayuki Noguchi: *Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy Plos one in press*

2. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Noriyuki Hirata, Mami Matsuda-Lennikov, Tatsuma Edamura, Mikio Masuzawa, Noriko Gotoh, Shinya Tanaka & Masayuki Noguchi: *Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator which exhibits oncogenic potency in vivo. Oncogenesis (2013) 2, e 70*
3. 野口昌幸、堺谷 政弘、水津太：
日本臨床 最新がん薬物療法学—がん薬物療法
の最新知見—
「その他のセリン・スレオニンキナーゼ阻害
薬」 *in press 2014*

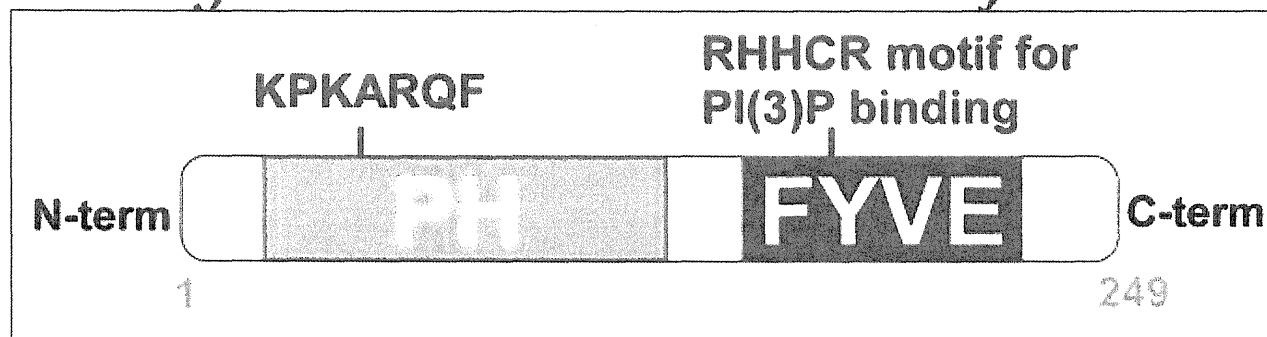
2. 学会発表

Akt結合因子による多彩な細胞反応性の修飾の分子機構

金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同
研究拠点

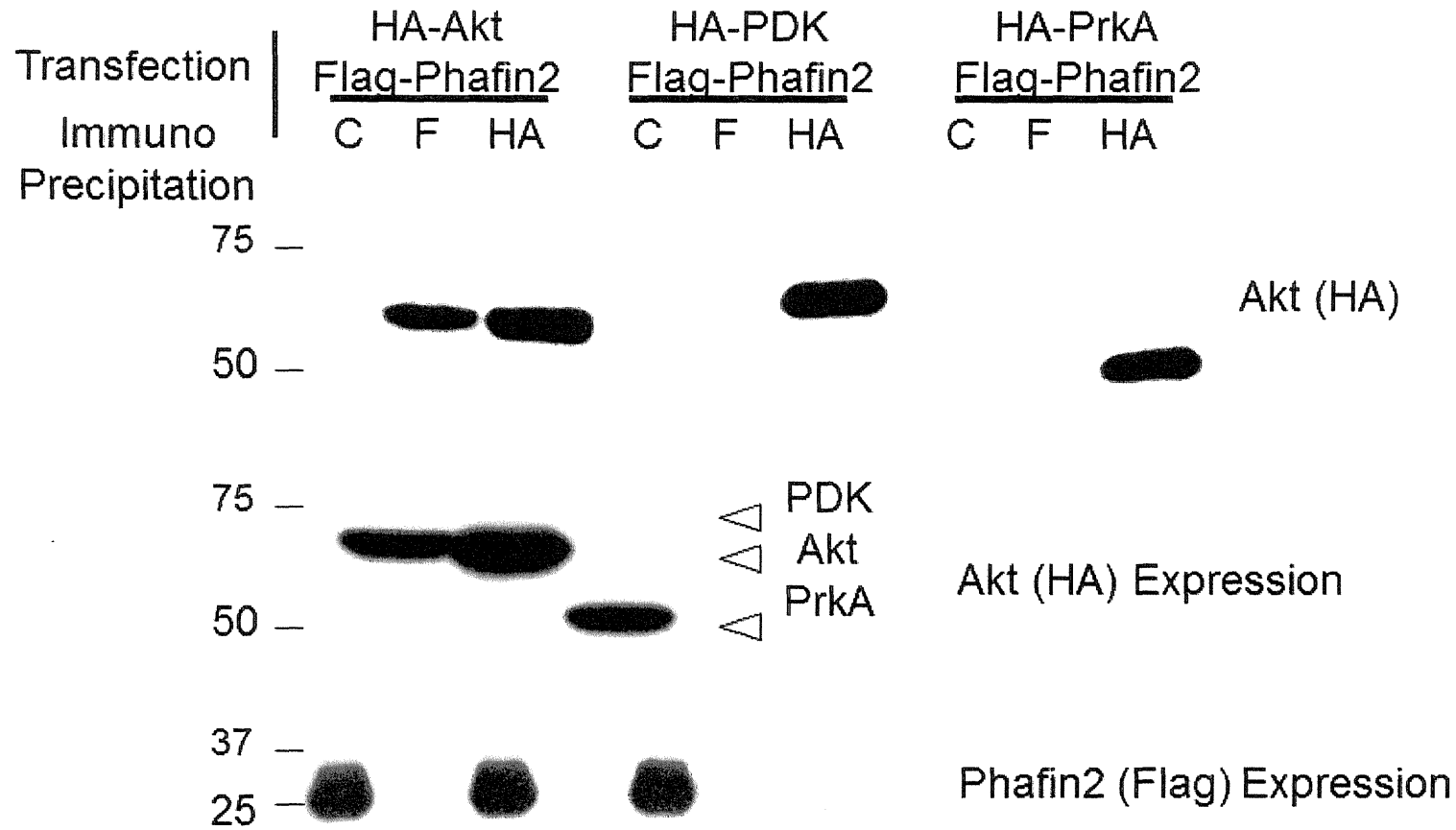
シンポジウム2013 金沢市 金沢エクセルホ
テル東急 2013.11.19

Lysosomal Protein Phafin2

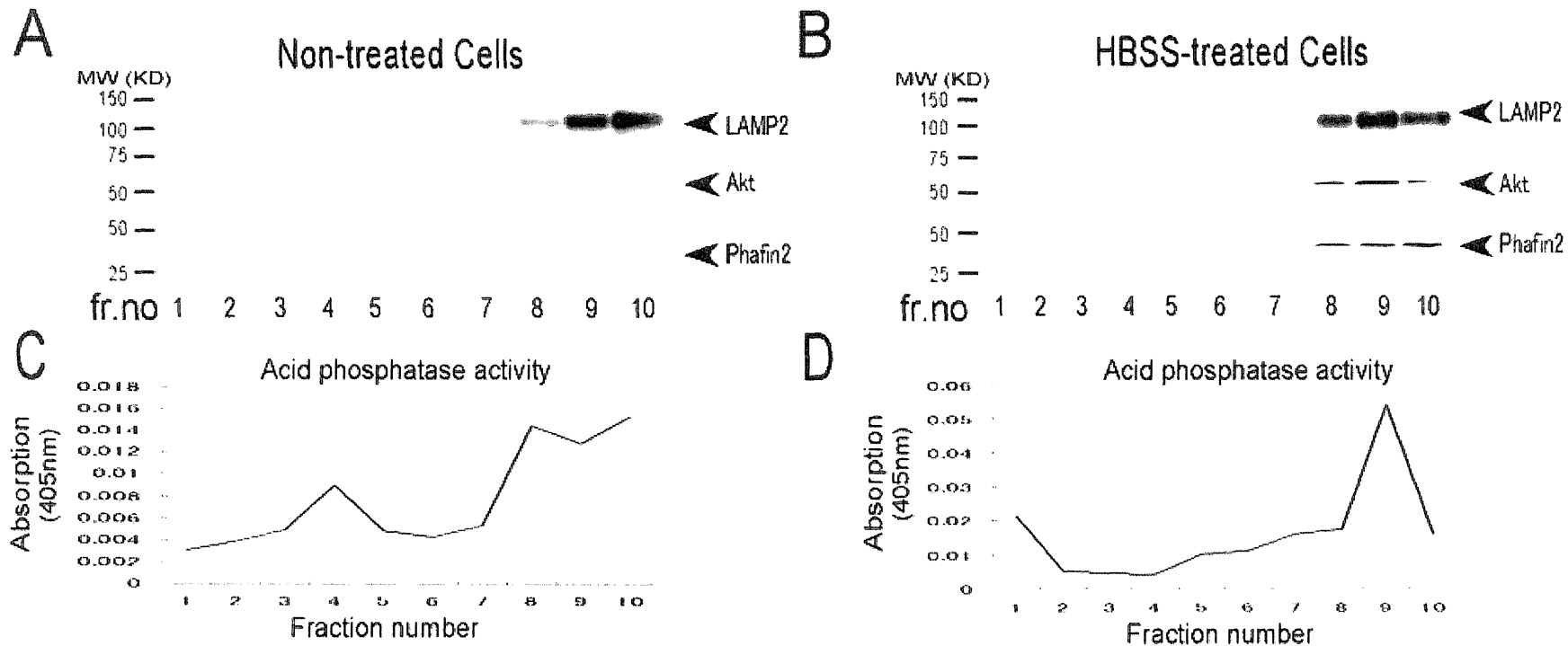


- Phafin2 is an endosome-lysosome associated protein consists of 249 amino acids with N-terminal Pleckstrin-homology domain and C-terminal FYVE domain.
- FYVE domain is known to function membrane traffic and formation of autophagosome via binding to PI(3)P.
- Phafin2 modulates the biogenesis and function of endosomes
- Phafin2 mediates epidermal growth factor receptor degradation by promoting endosome fusion.

Phafin2 Associates with Akt in 293T Cells



Sucrose Fractionation After Induction of Autophagy.



Akt-Phafin2 Complexes are Accumulated at Lysosome

