

厚生労働科学研究費補助金

第 3 次対がん総合戦略研究事業

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

平成 2 5 年度 総括・分担研究報告書

代表研究者 北林 一生

平成 2 6 (2 0 1 4) 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	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 . 幹細胞を標的とした白血病根治療法の開発	12
赤司 浩一	
3 . 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	14
早川 文彦	
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	21
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

研究代表者 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)幹細胞には表面抗原 Tim-3 及び M-CSFR が特異的に高発現する。白血病幹細胞を含む AML 細胞が TIM-3 のリガンドである galectin-9 を autocrine 機構により分泌し、自身の細胞表面の TIM-3 分子と結合させてシグナルを生じている事を見出した。さらに TIM-3 シグナルの標的として NF-kB 経路を同定した。本研究事業においてスクリーニングされ、抗腫瘍活性を確認した STAT 阻害剤 OPB-31121 は広範な造血器腫瘍において上流キナーゼを阻害する事なく STAT3 及び STAT5 を抑制し、その腫瘍抑制効果は、STAT シグナルへの依存性の強い事が確立されている癌遺伝子 (BCR-ABL、FLT3/ITD など) を持つ腫瘍において特に顕著でそれはマウスモデルにおいても示された。また、リンパ球分化に重要な転写因子 PAX5 の異常による初めての白血病モデルとして PAX5-PML を導入した proB 細胞を移植したマウスによる白血病モデルを作製し、このモデルにおいては数多い PAX5 の転写標的の中でも、BLNK、CD23、CD72 の発現低下が顕著である事を発見した。転移性がんの多くで高発現やリン酸化の見られる CDCP1 の発現は Ras が活性化した腫瘍で有意に高く、Ras-Erk 経路の下流で CDCP1 が誘導されることが示された。同時に活性型 Ras で誘導される浸潤能は CDCP1 経路の抑制でキャンセルされ、活性型 Ras のもたらす悪性形質の少なくとも一部は CDCP1 に依存していることが明らかになった。さらに CDCP1 における足場非依存性の獲得はオートファジーの抑制を伴い、CDCP1 を抑制した時に誘導される浮遊状態での細胞死 (アノキス) はオートファジーを抑制すると減少することが示された。また、乳がんの浸潤モデルにおいては、CDCP1 は細胞外マトリックス分解を伴う invadopodia という構造体の形成に関わることが明らかになった。受容体型チロシンホスファターゼである 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、p90 は SAP-1 と同様に腸上皮細胞に高度に発現し微絨毛に局在し、その細胞質内領域に会合するチロシンキナーゼを介して炎症に重要なシグナルを刺激し、ケモカインの誘導を促進することを明らかにした。細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 の結合分子 SIRP はマクロファージによる貪食を抑制的に調節している。がん細胞株に対する分子標的薬の腫瘍抑制を、抗 SIRP 抗体がさらに増強することを明らかにした。

研究分担者

赤司 浩一 (九州大学大学院・医学系研究科・教授)

早川 文彦 (名古屋大学大学院・医学系研究科・助教)

堺 隆一 (国立がん研究センター研究所・転移浸潤シグナル研究分野・分野長)

的崎 尚 (神戸大学大学院医学研究科・シグナル統合学分野・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が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 及び STAT5 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、STAT3/5 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、以下の事を確認してきた。本薬剤は *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ち、中でも BCR-ABL、FLT3/ITD、JAK2V617F といった STAT シグナルを活性化する事が知られている癌遺伝子を持つ白血病細胞株で効果が高い。ヒト腫瘍細胞株内で STAT3 のリン酸化を強力に抑制し、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。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）においても本薬剤は高い抗腫瘍効果を示す。一方ヒト臍帯血細胞を移植したモデルで検討すると、本薬剤は正常造血細胞に対してはほとんど増殖抑制効果を示さない。STAT3 と並ぶ重要な増殖シグナル因子である STAT5 に対する本薬剤の効果を検証し、また分子標的薬においてしばしば起こるエスケープシグナルの発生による治療抵抗性が本薬剤に対しても起こるかどうかを検証した。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、作成したマウスモデルを用いてアポトーシス誘導因子 PML の機能抑制の有無、亜ヒ酸の効果の有無、白血病化に関わる遺伝子発現の変化などについて検証した。

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關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 の活性化型遺伝子変異が 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 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 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 抗体が抑制することを明らかにしている。また、SIRP 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 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 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 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/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。FLAGtag 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。約 3×10^8 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、SDS-PAGE、銀染色、SYPRO Ruby 染色で Glis2 が免疫沈降されてきていることを確認した後、THP1-glis2 に特異的なバンドを切り出し、マスマイクロメトリーによる解析を行った。

マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて、正常ヒト造血幹細胞および前駆細胞の純化方法を確立した。この手法により高純度で単離された正常造血幹細胞および AML 幹細胞 (CD34⁺CD38⁻Lin⁻分画) を用いて、microarray により AML 幹細胞に特異的に高発現する分子を網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較して AML 幹細胞に約 13 倍高発現する細胞表面抗原 TIM-3 を同定した。FACS による解析では、TIM-3 は正常造血幹細胞には発現していないが、AML 幹細胞に高発現していた。AML 幹細胞の特異的 surface 抗原と報告されている CD123 や CD33 が正常造血幹細胞においても弱陽性であるのに対し、TIM-3 は AML 幹細胞にのみ発現していることから、理想的な抗体治療の標的分子候補と考えられた。そこで、高い細胞傷害活性を有するヒト TIM-3 に対するマウスモノクローナル抗体を樹立し治療モデルを作成した。さらに TIM-3 の白血病幹細胞における機能解析を行った。

JAK2 V617F 変異を持ち JAK2、STAT3、STAT5 が恒常的に活性化している白血病細胞株 HEL に対し

本薬剤 $1 \mu\text{M}$ を添加し、経時的に JAK2、STAT3、STAT5 のリン酸化を調べた。FLT3/ITD を持つ白血病細胞株 MOLM13 に対し、FLT3 リガンド (FL) 100 ng/ml を添加した状態と非添加の状態、FLT3 阻害剤 sunitinib あるいは本薬剤を使用し、そのシグナル阻害、細胞増殖抑制に与える FL の影響を検討した。PAX5-PML 陽性白血病細胞における PML nuclear body (PML NB) の破壊の状態を免疫染色で調べた。またこの白血病に対する亜ヒ酸の効果を検討するためにマウスに亜ヒ酸を腹腔内投与し、腫瘍細胞の減少及び延命効果を検討した。PAX5-PML 陽性白血病細胞の mRNA を抽出し、PAX5 転写標的遺伝子の発現量の変化を定量 RT-PCR で検討した。また、正常脾臓細胞と白血病細胞の mRNA をマイクロアレイで比較、検討し白血病化に関わる遺伝子発現変化を探索した。

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。

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

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 3×10^8 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。

TIM-3の白血病幹細胞における機能を解明すべく研究を遂行した。我々は、TIM-3のリガンド分子であるgalectin-9に着目した。AML患者血清中のgalectin-9濃度をELISA法にて測定したところ、AML症例において健康人および他の造血器疾患症例の10倍以上の高いgalectin-9濃度をしめす事を見出した。この所見から、我々はAML細胞自身がgalectin-9を分泌する仮説をたてた。この仮説を検証するために、ヒトAML細胞を移植して、ヒトAMLを免疫不全マウス内に再構築し、マウス血清中のヒトgalectin-9濃度を測定した。正常ヒト造血や急性リンパ球性白血病を再構築したマウス血清中には、ヒトgalectin-9はほとんど検出されないが、AMLを再構築したマウス血清中からは、患者血清同様に高いレベルのヒトgalectin-9が検出された。即ち、白血病幹細胞を含むAML細胞がgalectin-9をautocrine機構により分泌し、自身の細胞表面のTIM-3分子に作用させている事が明らかになった。さらに我々は、患者血清中の

galectin-9濃度と同レベルの生理的条件下で、患者AML細胞を刺激し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変化を解析した。発現が刺激前後で変化した遺伝子群に対してpathway enrichment analysisを行なった、その結果、我々はNF- κ B標的遺伝子群の有意な変化を認めることを見出した。次に実際に患者AML細胞において、TIM-3刺激がNF- κ B活性化を生じているか検討を行ったところ、TIM-3刺激によりIKBの分解とp65のリン酸化の亢進が確認された。即ち、白血病幹細胞を含むTIM-3+AML細胞は、autocrine機構により、galectin-9を分泌し、TIM-3シグナルを介してNF- κ B経路を活性化していることが明らかとなった。

OPB-31121はHEL細胞株において投与30分後からSTAT3, STAT5のリン酸化を減弱させた。一方JAK2リン酸化の減弱は24時間後からであった。これらにより本薬剤がSTAT5に対しても阻害効果があり、その阻害はJAK2のキナーゼ活性阻害によらない事が示された。MOLM13細胞ではFL非添加の状態ではSTAT5のみがリン酸化していたが、FL添加によりSTAT3のリン酸化も起こった。Sunitinib(100 nM)はSTAT5のリン酸化は阻害したが、STAT3のリン酸化は阻害できず、FLの添加によりSunitinibの増殖抑制効果は減弱した。これはFLT3阻害剤患者投与において問題となるオートクライン/パラクラインによるエスケープシグナルによる治療抵抗性を模したモデルと考えられる。このモデルに対し、OPB-31121(100 nM)はFLの有無に関わらずSTAT3、STAT5のリン酸化を阻害し、増殖抑制効果も影響を受けなかった。PAX5-PML陽性白血病細胞ではPML NBは破壊されていなかった。これは同じPML関連の融合癌遺伝子であるPML-RARとは異なる結果であった。PML-RARにより破壊されたPML NBを再構成する作用のある亜ヒ酸を本マウスモデルに投与したが、腫瘍細胞のPML NBは変化せず、腫瘍細胞の減少も認めず、マウスの延命効果もなかった。PML NBの破壊はこのモデルにおける白血病の発症には寄与していないと考えられた。PAX5はBリンパ球分化の推進のために多彩な遺伝子の発現を促進する。PAX5-PML陽性白血病細胞におけるそれら遺伝子の発現を調べると、CD19、CD79aの発現は軽度抑制されているのみだったが、BLNK、CD23、CD72の発現は強く抑制されていた。PAX5-PMLはPAX5の転写活性を抑制し、これら3つの遺伝子の発現を低下させる事でB細胞分化を抑制し白血病

化に關与すると考えられた。また正常 B 細胞と白血球細胞の mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイで比較すると *CDKN2B* の発現低下が重要な変化として抽出された。

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

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

や Fyn が重要であり、SAP-1 の強制発現により脱リン酸化されることが分かった。さらに、pp90 の強制発現により、MAP キナーゼの活性化や複数のシグナル分子のチロシンリン酸化が誘導されることが明らかとなった。マウス B16 メラノーマにおいても、SIRP 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 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 KO マウスなどを用いて検討中である。

D . 考察

Glis2 の結合タンパク質として SAMH1(SAM domain and HD domain-containing 1)、CTPS1(CTP synthase 1)、KCTD5(BTB/POZ domain-containing protein KCTD5)等を同定した。これらのタンパク質について文献を調べた結果、CTPS1 に関連したものであるとして細胞内における CTP の濃度が下がると白血球細胞が分化されるとの報告がなされていたため(Mol. Pharmacol. 62 463 2002, Leukemia 18 1857 2004)、GLIS2 が CTPS1 に結合し酵素活性を阻害することで CTP 濃度が低下し白血球細胞の分化が誘導されるのではないかと仮説をたてた。今後それを確かめるために、CTP 阻害剤等を用いて Glis2 による白血球細胞の分化誘導に CTP 濃度が関与しているのかどうかを調べていきたいと考えている。また、GLIS2 の機能解析として、Glis2 により発現制御されるターゲット遺伝子の同定を目的とした実験も併せて行っている。マウス骨髄細胞から cKit 陽性細胞を分離し、MOZ-TIF2 遺伝子を発現させることで白血球細胞を作成し、その細胞に NGFR 発現ベクターに Glis2 を組み入れたベクターをウイルス感染により導入し、その後細胞から mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行うという流れで実験を行っている。今後、マイクロアレイの結果をもとに詳細な機能解析を行い Glis2 による分化制御の詳細なメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

本研究において、Ring1A/B による白血球幹細胞を制御する 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球細胞

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 は白血病細胞増殖に重要な STAT3 と STAT5 のリン酸化を直接 (少なくとも上流のキナーゼ阻害によるのではなく) 阻害していると考えられた。またエスケープシグナルによる薬剤耐性は FLT3 阻害剤だけでなく、ABL キナーゼ阻害剤、EGFR 阻害剤などでも生じる問題であるが、多くは白血病細胞自身、あるいは周辺間質細胞が分泌するサイトカインによる別のキナーゼシグナルの活性化によるものである。しかしもともとのキナーゼが STAT を活性化するキナーゼの場合、エスケープシグナルも最終的には STAT を活性化することになるため、これを下流で阻害する本薬剤に対してはエスケープシグナルが生じにくく、薬剤耐性が起こりにくいと予想された。これらの結果を論文にまとめ、Blood Cancer Journal 誌に掲載された。亜ヒ酸は急性前骨髄球性白血病においては PML-RAR により破壊された PML NB に再構成をもたらす、白血病細胞に強いアポトーシスを起こす事が知られており、PAX5-PML 陽性白血病においても同様の効果が得られる事が期待されたがそうはならなかった。この白血病細胞における PAX5-PML の発現量は極めて低く、それが PML NB を破壊できない理由であると考えられた。PAX5 の転写活性化能は一部抑制されているので PAX5-PML は PAX5 の機能を抑制し、リンパ球分化障害を起こす事では白血病化に関与しているが、PML NB を破壊して抗アポトーシス効果を与える事では白血病化に関与していないと考えられた。白血病化に必要な増殖・生存の形質は PAX5-PML 以外のセカンドヒットとして生じた遺伝子異常から得られたものと考えられ、腫瘍抑制因子である *CDKN2B* の発現低下はその有力な候補と考えられた。

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。スキルス胃がんに関与する 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することが明らかになり、これまでの Src に基質としての CDCP1 の働きの解析と併せて CDCP1 は2つのがん蛋白質 Ras と Src をリンクして、これらの活性化に応じて足場非依存性を含めた複数の悪性形質を固形腫瘍に付与することにより、腫瘍の転移・浸潤に関わっていることが示された。CDCP1 は膜蛋白質であることとも併せて、転移・浸潤をターゲットとした分子標的の良い候補となりうることが示唆された。ARAP3 は Src キナーゼの基質分子としては例外的に腹膜播種に対して抑制的に働く分子であり、その作用にリン酸化が必要なこととも併せて、ARAP3 ないしそのアゴニストが腫瘍特異的な作用を発揮し、腹膜播種などの治療標的分子になる可能性がある。

SAP-1 はヒト胃がんや大腸がんに高度に発現する PTP であり、大腸がんモデルにおいて SAP-1 ががんの発生を促進的に制御することを見出していたが、その分子基盤は不明であった。すでに、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質として膜貫通型糖化分子である pp90 を同定しており、今年度はこの pp90 の性状を詳細に解析した。pp90 は腸上皮細胞に高度に発現し微絨毛に局在することから、この分子が in vivo における SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質である可能性がより高まった。また、pp90 のチロシンリン酸化の機序や下流の細胞内シグナルが一部明らかとなった。今後は、pp90 の生理機能や SAP-1 による発がん機序への関与につき検討する必要がある。すでに、SIRP 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 抗体を用いて CD47-SIRP 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 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 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 抗体単独の効果、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

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 白血病幹細胞特異的表面抗原 TIM-3 を同定した。さらに AML 細胞自体が TIM-3 リガンドである galectin-9 を autocrine 様式にて分泌し、TIM-3 を介したシグナルを生じることを見出した。白血病幹細胞を含む AML 細胞において、TIM-3 は NF- κ B 経路を含むいくつかの重要な転写因子群をコントロールしていることを明らかにした。

OPB-31121 は STAT3、STAT5 のリン酸化を抑制するが、その阻害は上流のキナーゼ阻害にはよらない。この作用により BCR-ABL、FLT3/ITD、JAK2 V617F 陽性の白血病など多くの悪性腫瘍細胞に対し抗腫瘍効果があると期待できる。PAX5-PML は PAX5 の機能を阻害し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。PML 機能の阻害については今回の実験モデルでは明らかにされなかった。

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ことを示された。

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

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

Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, Kitabayashi I. The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. *Cancer Sci.* 2014, 105:315-323, 2014.

Shima H, Yamagata K, Aikawa Y, Shino M, Koseki H, Shimada H, Kitabayashi I. Bromodomain-PHD finger protein 1 is critical for leukemogenesis associated with MOZ-TIF2 fusion. *Int. J. Hematology* 9: 21-31, 2014.

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 U S A.* 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 U S A.* 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* 34:1670-1678, 2013.

Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I. Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RARA inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs. *Cancer Res.* 73:4278-4288, 2013.

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.* 104: 1033-1038, 2013.

Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, Cleary ML. MLL Becomes Functional through Intra-Molecular Interaction Not by Proteolytic Processing. *PLoS One.* 2013 Sep 10;8(9):e73649.

Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013

- Kamimura T, Miyamoto T, Yokota N, Takashima S, Chong Y, Ito Y, Akashi K. Higher incidence of injection site reactions after subcutaneous bortezomib administration on the thigh compared with the abdomen. *Eur J Haematol* 90: 157-161, 2013
- Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316-1325, 2013
- Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo. *PLoS One* 8: e62506, 2013
- Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol* 42: 163-171, 2014
- 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
- Hayakawa F, Sugimoto K, Harada Y, Hashimoto N, Ohi N, Kurahashi S, Naoe T. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinasases. *Blood Cancer J*. 2013 Nov 29;3:e166
- Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res*. 2014 in press
- Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and fibroblast growth factor receptor inhibitors. *Cancer Sci*. 105:528-536, 2014
- Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One* 9: e85485, 2014
- Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res*. 11 :628-637, 2013
- Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci*. 104: 1189-1197, 2013
- Kasuga M, Ueki K, Tajima N, Noda M, Ohashi K, Noto H, Goto A, Ogawa W, Sakai R, Tsugane S, Hamajima N, Nakagama H, Tajima K, Miyazono K, Imai K. Report of the Japan Diabetes Society/Japanese Cancer Association Joint Committee on Diabetes and Cancer. *Cancer Sci*. 104: 965-976, 2013

Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M, Sakai R. Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci.* 104: 865-870, 2013

Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood.* 121:1316-1325, 2013.

Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Matozaki T, Liu Y. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP α cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat Commun.* 4:2436, 2013.

Yamashita H, Kotani T, Park J, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One.* 9:e92904, 2014.

H . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

【職務発明番号】2013-18

【発明の名称】マウスAMLモデルを用いたイソクエン酸デヒドロゲナーゼ変異体活性の評価システム

【発明者】北林一生、小川原陽子

【出願日】2013/11/6

【出願番号】特願2013-230472

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

難治性白血病治療薬の開発に関する研究

研究分担者 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 Glis2 遺伝子の発現が MOZ-TIF2 誘導の白血病発症に必要である Ring1A/B（ポリコーム群複合体構成因子）によって負に制御されていることが明らかとなった。さらに、MOZ-TIF2 誘導白血病細胞へ Glis2 を強制発現させると白血病細胞の分化が誘導されたことから、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示唆されていた。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ことを目的として、まず白血病細胞内で Glis2 とともに複合体を形成する結合タンパク質を同定した。

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

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。FLAGtag 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。約 3×10^8 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、SDS-PAGE、銀染色、SYPRO Ruby 染色で Glis2 が免疫沈降されていることを確認した後、THP1-glis2 に特異的なバンドを切り出し、マスペクトロメトリーによる解析を行った。

C．研究結果

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 3×10^8 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

Glis2 の結合タンパク質として SAMH1(SAM domain and HD domain-containing 1)、CTPS1(CTP synthase 1)、KCTD5(BTB/POZ domain-containing protein KCTD5)等を同定した。これらのタンパク質について文献を調べた結果、CTPS1 に関連したものとして細胞内における CTP の濃度が下がると白血病細胞が分化されるとの報告がなされていたため(Mol. Pharmaco.62 463 2002, Leukemia 18 1857 2004)、

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た。今後それを確かめるために、CTP 阻害剤等を用いて Glis2 による白血病細胞の分化誘導に CTP 濃度が関与しているのかどうかを調べていきたいと考えている。

また、Glis2 の機能解析として、Glis2 により発現制御されるターゲット遺伝子の同定を目的とした実験も併せて行っている。マウス骨髄細胞から cKit 陽性細胞を分離し、MOZ-TIF2 遺伝子を発現させることで白血病細胞を作成し、その細胞に NGFR 発現ベクターに Glis2 を組み入れたベクターをウイルス感染により導入し、その後細胞から mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行うという流れで実験を行っている。今後、マイクロアレイの結果をもとに詳細な機能解析を行い Glis2 による分化制御の詳細なメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

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

Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, Kitabayashi I. The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. *Cancer Sci.* 2014, 105:315-323, 2014.

Shima H, Yamagata K, Aikawa Y, Shino M, Koseki H, Shimada H, Kitabayashi I. Bromodomain-PHD finger protein 1 is critical for leukemogenesis associated with MOZ-TIF2 fusion. *Int. J. Hematology* 9: 21-31, 2014.

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 U S A.* 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 U S A.* 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* 34:1670-1678, 2013.

Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I. Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RAR α inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs. *Cancer Res.* 73:4278-4288, 2013.

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.* 104: 1033-1038, 2013.

Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, Cleary ML. MLL Becomes Functional through Intra-Molecular Interaction Not by Proteolytic Processing. *PLoS One.* 2013 Sep 10;8(9):e73649.

H . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

【職務発明番号】2013-18

【発明の名称】マウスAMLモデルを用いたイソクエン酸デヒドロゲナーゼ変異体活性の評価システム

【発明者】北林一生、小川原陽子

【出願日】2013/11/6

【出願番号】特願2013-230472

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

研究分担者 赤司 浩一 九州大学大学院 医学研究院 教授

研究要旨 我々は、ヒト急性骨髄性白血病(AML)の幹細胞に特異的に発現する表面抗原TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3)を同定した。TIM-3はAML-M3を除く全症例のAML幹細胞に高発現しているが、正常造血幹細胞には発現を認めなかった。またTIM-3陽性細胞を移植したマウスのみAMLを再構築することから、AML治療の理想的な標的分子候補と考えられた。TIM-3陽性細胞株に対して高い殺細胞効果を有する抗ヒトTim-3マウス抗体の作製に成功した。AML幹細胞特異的に発現するTIM-3抗体による効果的な新規分子標的療法の開発が期待される。

A．研究目的

重症免疫不全マウス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命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・フローサイトメトリーを用いて、正常ヒト造血幹細胞および前駆細胞の純化方法を確立した。この手法により高純度で単離された正常造血幹細胞およびAML幹細胞(CD34⁺CD38⁻Lin⁻分画)を用いて、microarrayによりAML幹細胞に特異的に高発現する分子を網羅的に探索した。その結果、正常造血幹細胞と比較してAML幹細胞に約13倍高発現する細胞表面抗原TIM-3を同定した。FACSによる解析では、TIM-3は正常造血幹細胞には発現していないが、AML幹細胞に高発現していた。AML幹細胞の特異的表面抗原と報告されているCD123やCD33が正常造

血幹細胞においても弱陽性であるのに対し、TIM-3はAML幹細胞にのみ発現していることから、理想的な抗体治療の標的分子候補と考えられた。そこで、高い細胞傷害活性を有するヒトTIM-3に対するマウスモノクローナル抗体を樹立し治療モデルを作成した。さらにTIM-3の白血病幹細胞における機能解析を行った。

C．研究結果

平成25年度は、TIM-3の白血病幹細胞における機能を解明するべく研究を遂行した。我々は、TIM-3のリガンド分子であるgalectin-9に着目した。AML患者血清中のgalectin-9濃度をELISA法にて測定したところ、AML症例において健常人および他の造血器疾患症例の10倍以上の高いgalectin-9濃度をしめす事を見出した。この所見から、我々はAML細胞自身がgalectin-9を分泌する仮説をたてた。この仮説を検証するために、ヒトAML細胞を移植して、ヒトAMLを免疫不全マウス内に再構築し、マウス血清中のヒトgalectin-9濃度を測定した。正常ヒト造血や急性リンパ球性白血病を再構築したマウス血清中には、ヒトgalectin-9はほとんど検出されないが、AMLを再構築したマウス血清中からは、患者血清同様に高いレベルのヒトgalectin-9が検出された。即ち、白血病幹細胞を含むAML細胞がgalectin-9をautocrine機構により分泌し、自身の細胞表面のTIM-3分子に作用させている事が明らかになった。さらに我々は、患者血清中のgalectin-9濃度と同レベルの生理的条件下で、患者AML細胞を刺激し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変化を解析した。発現が刺激前後で変化した遺伝

子群に対して pathway enrichment analysis を行いった、その結果、我々は NF-kB 標的遺伝子群の有意な変化を認めることを見出した。次に実際に患者 AML 細胞において、TIM-3 刺激が NF-kB 活性化を生じているか検討を行ったところ、TIM-3 刺激により IKB の分解と p65 のリン酸化の亢進が確認された。即ち、白血病幹細胞を含む TIM-3 + AML 細胞は、autocrine 機構により、galectin-9 を分泌し、TIM-3 シグナルを介して NF-kB 経路を活性化していることが明らかとなった。

D . 考察

本研究結果により白血病幹細胞を含む AML 細胞が、autocrine 機構により galectin-9 を分泌し自身の TIM-3 分子にシグナルを生じている事が明らかになった。癌幹細胞自身が、積極的に autocrine 機構を用いている知見はこれまでに報告がなく、癌幹細胞の生物学的理解を深める上で新しいモデルになるものと考えられる。さらに、近年では我々の AML における TIM-3 発現報告に引き続いて、種々の非造血器悪性腫瘍においても腫瘍細胞自身が TIM-3 を異所性に発現し、病理学的に TIM-3 の高発現症例は予後が不良であることが次々に報告されており、腫瘍細胞における TIM-3 の機能解析に関して、非常に注目を集めている。本研究により TIM-3 分子の癌幹細胞を含む腫瘍細胞における機能を明らかにすることは、AML のみではなく、複数の悪性腫瘍における新規治療標的分子の同定につながる可能性が高く、発展性の高い研究であると考えられる。

E . 結論

AML 白血病幹細胞特異的表面抗原 TIM-3 を同定した。さらに AML 細胞自体が TIM-3 リガンドである galectin-9 を autocrine 様式にて分泌し、TIM-3 を介したシグナルを生じることを見出した。白血病幹細胞を含む AML 細胞において、TIM-3 は NF-kB 経路を含むいくつかの重要な転写因子群をコントロールしていることを明らかにした。

G . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013

Kamimura T, Miyamoto T, Yokota N, Takashima S, Chong Y, Ito Y, Akashi K. Higher incidence of injection site reactions after subcutaneous bortezomib administration on the thigh compared with the abdomen. *Eur J Haematol* 90: 157-161, 2013

Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316-1325, 2013

Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo. *PLoS One* 8: e62506, 2013

Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol* 42: 163-171, 2014

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

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

研究分担者 早川 文彦 名古屋大学医学部附属病院 血液内科 助教

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、STAT5 のリン酸化を阻害し、種々の造血器悪性腫瘍細胞株およびプライマリ白血病細胞に対し増殖抑制効果が高く、一方ヒト正常臍帯血を移植したマウスを用いた検討では正常造血細胞に対する増殖抑制作用は認められないことを見いだしてきた。今年度は、分子標的薬に起こりがちなエスケープシグナルによる治療抵抗性の発生が本薬剤に対しては起こりにくいことを検証し、これらのデータをまとめて論文を投稿、採択された。また本研究で、PAX5-PML を正常骨髄に導入する事で白血病を発症する事に成功したモデルマウスを用いて、アポトーシス誘導因子としての亜ヒ酸の効果を検証し、また白血病化につながる遺伝子発現変化を検討した。

A．研究目的

STAT3 及び STAT5 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、STAT3/5 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、以下の事を確認してきた。本薬剤は *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ち、中でも BCR-ABL、FLT3/ITD、JAK2V617F といった STAT シグナルを活性化している癌遺伝子を持つ白血病細胞株で効果が高い。ヒト腫瘍細胞株内で STAT3 のリン酸化を強力に抑制し、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。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）においても本薬剤は高い抗腫瘍効果を示す。一方ヒト臍帯血細胞を移植したモデルで検討すると、本薬剤は正常造血細胞に対してはほとんど増殖抑制効果を示さない。

今年度は STAT3 と並ぶ重要な増殖シグナル因子である STAT5 に対する本薬剤の効果を検証し、また分子標的薬においてしばしば起こるエスケープシグナルの発生による治療抵抗性が本薬剤に対しても起こるかどうかを検証した。

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、作成したマウスモデルを用いてアポトーシス誘導因子 PML の機能抑制の有無、亜ヒ酸の効果の有無、白血病化に関わる遺伝子発現の変化などについて検証した。

B．研究方法

JAK2 V617F 変異を持ち JAK2、STAT3、STAT5 が恒常的に活性化している白血病細胞株 HEL に対し本薬剤 1 μ M を添加し、経時的に JAK2、STAT3、STAT5 のリン酸化を調べた。

FLT3/ITD を持つ白血病細胞株 MOLM13 に対し、FLT3 リガンド（FL）100 ng/ml を添加した状態と非添加の状態、FLT3 阻害剤 sunitinib あるいは本薬剤を使用し、そのシグナル阻害、細胞増殖抑制に与える FL の影響を検討した。

PAX5-PML 陽性白血病細胞における PML nuclear body（PML NB）の破壊の状態を免疫染色で調べた。またこの白血病に対する亜ヒ酸の効果を検討するためにマウスに亜ヒ酸を腹腔内投与し、腫瘍細胞の減少及び延命効果を検討した。

PAX5-PML 陽性白血病細胞の mRNA を抽出し、PAX5 転写標的遺伝子の発現量の変化を定量 RT-PCR で検討した。また、正常脾臓細胞と白血病細胞の mRNA をマイクロアレイで比較、検討し白血病化に関わる遺伝子発現変化を探索した。

C．研究結果

本薬剤は HEL 細胞株において投与 30 分後から

STAT3, STAT5 のリン酸化を減弱させた。一方 JAK2 リン酸化の減弱は 24 時間後からであった。これらにより本薬剤が STAT5 に対しても阻害効果があり、その阻害は JAK2 のキナーゼ活性阻害によらない事が示された。

MOLM13 細胞では FL 非添加の状態では STAT5 のみがリン酸化していたが、FL 添加により STAT3 のリン酸化も起こった。Sunitinib (100 nM) は STAT5 のリン酸化は阻害したが、STAT3 のリン酸化は阻害できず、FL の添加により Sunitinib の増殖抑制効果は減弱した。これは FLT3 阻害剤患者投与において問題となるオートクライン/パラクラインによるエスケープシグナルによる治療抵抗性を模したモデルと考えられる。このモデルに対し、OPB-31121 (100 nM) は FL の有無に関わらず STAT3, STAT5 のリン酸化を阻害し、増殖抑制効果も影響をうけなかった。

PAX5-PML 陽性白血病細胞では PML NB は破壊されていなかった。これは同じ PML 関連の融合癌遺伝子である PML-RAR とは異なる結果であった。PML-RAR により破壊された PML NB を再構成する作用のある亜ヒ酸を本マウスモデルに投与したが、腫瘍細胞の PML NB は変化せず、腫瘍細胞の減少も認めず、マウスの延命効果もなかった。PML NB の破壊はこのモデルにおける白血病の発症には寄与していないと考えられた。

PAX5 は B リンパ球分化の推進のために多彩な遺伝子の発現を促進する。PAX5-PML 陽性白血病細胞におけるそれら遺伝子の発現を調べると、*CD19*, *CD79a* の発現は軽度抑制されているのみだったが、*BLNK*, *CD23*, *CD72* の発現は強く抑制されていた。PAX5-PML は PAX5 の転写活性を抑制し、これら 3 つの遺伝子の発現を低下させる事で B 細胞分化を抑制し白血病化に関与すると考えられた。また正常 B 細胞と白血病細胞の mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイで比較すると *CDKN2B* の発現低下が重要な変化として抽出された。

D . 考察

今回の結果から OPB-31121 は白血病細胞増殖に重要な STAT3 と STAT5 のリン酸化を直接 (少なくとも上流のキナーゼ阻害によるのではなく) 阻害していると考えられた。またエスケープシグナルによる薬剤耐性は FLT3 阻害剤だけでなく、ABL キナーゼ阻害剤、EGFR 阻害剤などでも生じる問題であるが、多くは白血病細胞自身、あるいは周辺間質細胞が分泌するサイトカインによる別のキナーゼシグナルの活性化によるものである。しかしもともとのキナーゼが STAT を活性化するキナーゼの場合、エスケープシグ

ナルも最終的には STAT を活性化することになるため、これを下流で阻害する本薬剤に対してはエスケープシグナルが生じにくく、薬剤耐性が起こりにくいと予想された。これらの結果を論文にまとめ、*Blood Cancer Journal* 誌に掲載された。

亜ヒ酸は急性前骨髄球性白血病においては PML-RAR により破壊された PML NB に再構成をもたらし、白血病細胞に強いアポトーシスを起こす事が知られており、PAX5-PML 陽性白血病においても同様の効果が得られる事が期待されたがそうはならなかった。この白血病細胞における PAX5-PML の発現量は極めて低く、それが PML NB を破壊できない理由であると考えられた。PAX5 の転写活性化能は一部抑制されているので PAX5-PML は PAX5 の機能を抑制し、リンパ球分化障害を起こす事では白血病化に関与しているが、PML NB を破壊して抗アポトーシス効果を与える事では白血病化に関与していないと考えられた。白血病化に必要な増殖・生存の形質は PAX5-PML 以外のセカンドヒットとして生じた遺伝子異常から得られたものと考えられ、腫瘍抑制因子である *CDKN2B* の発現低下はその有力な候補と考えられた。

E . 結論

OPB-31121 は STAT3, STAT5 のリン酸化を抑制するが、その阻害は上流のキナーゼ阻害にはよらない。この作用により BCR-ABL, FLT3/ITD, JAK2 V617F 陽性の白血病など多くの悪性腫瘍細胞に対し抗腫瘍効果があると期待できる。

PAX5-PML は PAX5 の機能を阻害し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。PML 機能の阻害については今回の実験モデルでは明らかにされなかった。

G . 研究発表

論文発表

1. 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
2. Hayakawa F, Sugimoto K, Harada Y, Hashimoto N, Ohi N, Kurahashi S, Naoe T. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokineses. *Blood Cancer J*. 2013 Nov 29;3:e166.

学会発表

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Sugimoto K, <u>Hayakawa F</u>, and Naoe T. Drug Targeting Microenvironment for Malignant Lymphoma. 第72回日本癌学会腫瘍別シンポジウム、2013年10月3日、横浜 2. Naoto Imoto, Shingo Kurahashi, <u>Fumihiko Hayakawa</u>, Takahiko Yasuda, Keiki Sugimoto, Shinobu Tsuzuki, Tomoki Naoe. PAX5-PML induces pro B acute lymphoblastic leukemia in mice. 第75回日本血液学会総会、2013年10月11日、札幌 3. Fumihiko Hayakawa, Keiki Sugimoto, Shingo Kurahashi, Tomoki Naoe. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant | <p>anti-tumor effect on STAT-dependent leukemia. 第75回日本血液学会総会、2013年10月11日、札幌</p> <p>H. 知的所有権の出願・登録状況</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 特許取得
なし 2. 実用新案登録
なし 3. その他
なし |
|--|--|

チロシンリン酸化シグナルによる転移・浸潤の制御

研究分担者 堺 隆一 国立がん研究センター研究所 転移浸潤シグナル研究分野 分野長

研究要旨 転移性がんの多くで高発現やリン酸化の見られる CDCP1 は、がんが足場非依存性に生存する遠隔転移や腹膜播種の過程に必要であり、ヒトの幾つかの固形腫瘍においてその予後を規定する分子の一つであることを示してきた。CDCP1 の発現は Ras が活性化した腫瘍で有意に高く、Ras-Erk 経路の下流で CDCP1 が誘導されることが示された。同時に活性型 Ras で誘導される浸潤能は CDCP1 経路の抑制でキャンセルされ、活性型 Ras のもたらす悪性形質の少なくとも一部は CDCP1 に依存していることが明らかになった。さらに CDCP1 における足場非依存性の獲得はオートファジーの抑制を伴い、CDCP1 を抑制した時に誘導される浮遊状態での細胞死（アノキス）はオートファジーを抑制すると減少することが示された。また、乳がんの浸潤モデルにおいては、CDCP1 は細胞外マトリックス分解を伴う invadopodia という構造体の形成に関わることが明らかになった。

A．研究目的

腫瘍の進展過程でチロシンリン酸化を受ける蛋白質を精力的に解析しており、複数の候補分子を見出しているが、その中で腫瘍の足場非依存性や遠隔転移に関わる CDCP1 の治療標的分子としての有用性を *in vitro* の解析に加え、臨床サンプルにおける発現解析やマウス *in vivo* イメージングなども含めて検討して、転移性がんの革新的治療法の開発を目指す。

B．研究方法

非小細胞肺がんの組織・細胞株を用いて種々の活性化変異の有無と CDCP1 発現の関連から CDCP1 が実際に転移形質に関わっているサブグループを明らかにし、*in vitro* の系で検証する。また CDCP1 の発現抑制で誘導される浮遊状態での細胞死の本態を細胞生物学的解析から明らかにする。

C．研究結果

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 は、多くの固形腫瘍において活性化した Src ファミリーによりリン酸化されて、エフェクター分子 PKC を膜にリクルートすることで固形腫瘍の運動能や浸潤能をも制御することがわかった。その制御メカニズムについては CDCP1 及び PKC がコルタクチンと複合体をつくることで細胞運動に関わり、さらに PKC との協調作用によって MMP9 などのメタロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。ヒト組織を用いた

発現解析では、これまでの肺がんに加えて膵がんの系で、CDCP1 高発現群が低発現群と比較して統計学的に有意に予後が不良であることが明らかになった。肺がんの細胞株や腫瘍組織の解析では、CDCP1 は Ras の活性型変異が存在する場合に Ras の変異がない場合に比べて有意に高い発現が認められた。活性型 Ras を強制発現させると CDCP1 の発現が誘導され、活性型 Ras によって引き起こされた運動能や浸潤能の更新は CDCP1 の発現を抑えることによりキャンセルされた。Ras の下流のシグナルの阻害などの実験で、CDCP1 は Ras-Erk 経路の活性化により発現が誘導され、Ras による転移・浸潤能の獲得は CDCP1 の発現誘導に依存することが確認された。一方、Ras による増殖異常は CDCP1 の発現の明らかな影響を受けないことも確認された。CDCP1 は Ras 経路の活性化による発現制御と Src 経路の活性化によるリン酸化制御の両者によって転移能・浸潤能獲得をもたらすが、がん遺伝子の共通標的分子であることが示され、更にその重要性が浮き彫りになった。また、乳がんの浸潤モデルにおいては、CDCP1 は細胞外マトリックス分解を伴うアクチンの突起である「invadopodia」という構造体の近くに局在し、この形成に関わることとともに示された。

CDCP1 を siRNA によって抑制すると足場非依存性に増殖するがん細胞にアノキスが誘導されるが、この浮遊に伴う細胞死は Caspase 非依存性であった。さらなる解析でアノキスの誘導とともに LC3-I からオートファゴソーム結合型の LC3-II への変換が

観察され、LC3 陽性小胞が誘導された。このような変化はもともと足場依存性の H322 細胞を浮遊状態で培養ただけでも誘導された。この段階ではアノイキス誘導という一種のストレスに抵抗するためにがん細胞がオートファジーという反応を示したとも考えられたが、オートファジーの阻害剤である 3MA で処理すると、予想に反して浮遊状態による細胞死が抑制されることが観察された。このことは足場非依存性に増える A549 細胞で CDCP1 の発現を抑制した場合でも、元々 CDCP1 の発現が低く足場依存性の H322 細胞でも観察され、がん細胞に起こる浮遊状態の細胞死誘導にオートファジーが積極的に関わっていることが示唆された。

D . 考察

形質の獲得に関わる機構を示したことで、現在開発中の CDCP1 のシグナル経路を阻害する低分子化合物が、Ras が活性化した多くの固形腫瘍に対して効果を示す可能性が示唆された。CDCP1 のリン酸化を抑える Src 阻害剤や下流のシグナルを抑える PKC の阻害剤などを使うことにより、このような腫瘍の転移を抑えるモデル系の開発に進めていきたい。がんは同じ組織由来でも極めて多様であり、そこが治療薬開発のネックになっているが、がんの共通特性を直接制御する CDCP1 のような分子群にスポットを当てれば、広い腫瘍に効果のある治療法が開発できる可能性があり、精力的に研究を進めている。

E . 結論

転移性がんの多くで高発現やリン酸化の見られる CDCP1 の発現は Ras-Erk 経路の下流で誘導され、活性型 Ras のもたらす悪性形質の少なくとも一部は CDCP1 に依存していることが明らかになった。CDCP1 における足場非依存性の獲得はオートファジーの抑制を介することが示された。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1 Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 2014 in press

2 Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and fibroblast growth factor receptor inhibitors. *Cancer Sci.* 105:528-536, 2014

3 Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One* 9: e85485, 2014

4 Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res.* 11 :628-637, 2013

5 Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci.* 104: 1189-1197, 2013

6 Kasuga M, Ueki K, Tajima N, Noda M, Ohashi K, Noto H, Goto A, Ogawa W, Sakai R, Tsugane S, Hamajima N, Nakagama H, Tajima K, Miyazono K, Imai K. Report of the Japan Diabetes Society/Japanese Cancer Association Joint Committee on Diabetes and Cancer. *Cancer Sci.* 104: 965-976, 2013

7 Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M, Sakai R. Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci.* 104: 865-870, 2013

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

チロシンホスファターゼの異常と発がん、浸潤・転移

研究分担者 的崎 尚 神戸大学大学院医学研究科 シグナル統合学分野 教授

研究要旨 チロシンリン酸化シグナルの制御には、チロシンキナーゼと共にチロシンホスファターゼ(PTP)が重要である。しかし、PTPの異常が発がんやがんの浸潤・転移にどのように関わっているかについては不明の点が多い。前年度までに、受容体型PTPであるSAP-1の脱リン酸化基質pp90を見出していたが、pp90が炎症性ケモカインの誘導を促進しSAP-1とは拮抗的に作用することで腸管免疫系を制御する可能性を示した。一方、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はマクロファージによる貪食を抑制的に調節している。今年度は、がん細胞株に対する分子標的薬の抗腫瘍効果を抗SIRP抗体がさらに増強することを明らかに出来、抗SIRP抗体を新たな作用機序を有するがんの分子標的薬としてとして利用できる可能性を示せた。

A．研究目的

チロシンリン酸化シグナルは、生理的な細胞の増殖・分化・運動の制御に重要なシグナル系であり、一方、がんの発生、浸潤・転移の分子機構にこのシグナル系の異常が深く関与していることが示されている。チロシンリン酸化シグナルの制御には、チロシンキナーゼと共にチロシンホスファターゼ(PTP)が重要であるが、PTPの異常が発がんやがんの浸潤・転移にどのように関わっているかについては未だ不明な点が多い。分担研究者が見出した受容体型PTPであるSAP-1は、ヒト胃がんや大腸がんに高度に発現するPTPであり、大腸がんモデルにおいて、SAP-1ががんの発生を促進的に制御することを見出している。一方、SAP-1は腸上皮細胞の微絨毛に特異的に発現するがその生理機能は未だ不明である。そこで、本研究では、SAP-1の生理機能と発がんにおける役割を明らかにすることを目的とする。前年度までに、SAP-1の脱チロシンリン酸化基質分子として、pp90を見出している。さらに、pp90の組織発現を検討したところ、腸上皮細胞の微絨毛に局在すること、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が重要であることが分かった。そこで、本年度はさらに、pp90の機能解析を中心に行った。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を高度に発現するヒトメラノーマ細胞のin vitroでの細胞遊走を抗SIRP抗体が抑制することを明らかにしている。また、SIRP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。本研究では前年度までに、マウス悪性黒色腫細胞株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系を利用した、新たながん治療法開発の基礎的検討を行った。

B．研究方法

(1) SAP-1の脱チロシンリン酸化基質分子として前年度までに同定しているpp90の生理機能につき、主に培養細胞系を用いて解析した。また、pp90の細胞内チロシンリン酸化部位への結合分子の探索を行うと共に下流シグナルの解析を行った。

(2) 前年度に引き続き、CD47とSIRPの結合を阻害する抗SIRP抗体、あるいは結合を阻害できない抗SIRP抗体のがん細胞株への抗体医薬の増強効果を比較検討した。これらに平行して、SIRPを高度に発現するマウスあるいはヒトがんの検索を行った。

C . 研究結果

(1) pp90の細胞内領域がチロシンリン酸化され、これにはSH2ドメインを有する細胞質型チロシンキナーゼが結合することを見出した。さらに、pp90の強制発現により、炎症を誘導するシグナル系の活性化やケモカインの発現が誘導されることが明らかとなった。

(2) 血液系のがん細胞株に対する分子標的薬の腫瘍抑制を、CD47とSIRP の結合を阻害する抗SIRP抗体がさらに増強することを明らかに出来た。マウス悪性黒色腫細胞株ではSIRP の発現が高度であるが、その他の固形がんや血液系のがんでSIRPの高度な発現を示す細胞株が見出された。

D . 考察

SAP-1はヒト胃がんや大腸がんに高度に発現するPTPである。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。前年度までに、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、pp90がSAP-1と同様に腸上皮細胞に高度に発現し微絨毛に局在することも示した。今年度は、pp90がSH2ドメインを有する細胞質型チロシンキナーゼに会合して、炎症惹起に重要なシグナルを活性化することを明らかにした。従って、pp90がSAP-1とは拮抗的に作用することで腸管免疫系を制御する可能性が考えられた。また、CD47とSIRP の結合を阻害する抗SIRP抗体が、血液系のがん細胞株に対する分子標的薬の腫瘍抑制をさらに増強することを明らかに出来た。また、メラノーマ以外のがんにおいてもSIRP が高度に発現することから、今後、これらのがんにおいても抗SIRP抗体の効果を検討する必要性がでてきた。

E . 結論

本研究により、受容体型PTPであるSAP-1の機能には、膜型分子であるpp90が重要である可能性が示された。また、SIRP抗体はがんの分子標的薬として利用できる可能性が示された。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood*. 121:1316-1325, 2013.

Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Matozaki T, Liu Y. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP α cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat Commun*. 4:2436, 2013.

Yamashita H, Kotani T, Park J, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PloS One*. 9:e92904, 2014.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, Kitabayashi I.	The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia.	Cancer Sci.	105	315-323	2014
Shima H, Yamagata K, Aikawa Y, Shino M, Koseki H, Shimada H, Kitabayashi I.	Bromodomain-PHD finger protein 1 is critical for leukemogenesis associated with MOZ-TIF2 fusion.	Int. J. Hematology	9	21-31	2014
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 U S A.	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 U S A.	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	34	1670-1678	2013
Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I.	Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RARa inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs.	Cancer Res.	73	4278-4288	2013
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.	103	1033-1038	2013
Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, Cleary ML.	MLL Becomes Functional through Intra-Molecular Interaction Not by Proteolytic Processing.	PLoS One.	8	e73649	2013
Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K	Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Blood	121	840-848	2013
Kamimura T, Miyamoto T, Yokota N, Takashima S, Chong Y, Ito Y, Akashi K.	Higher incidence of injection site reactions after subcutaneous bortezomib administration on the thigh compared with the abdomen.	Eur J Haematol	90	157-161	2013

Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K.	Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment.	Blood	121	1316-1325	2013
Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K.	Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo.	PLoS One	8	e62506	2013
Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K.	The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment.	Exp Hematol	42	163-171	2014
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	2	21-25	2013
Hayakawa F, Sugimoto K, Harada Y, Hashimoto N, Ohi N, Kurahashi S, Naoe T.	A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinases.	Blood Cancer J	3	e166	2013
Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R.	Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and fibroblast growth factor receptor inhibitors.	Cancer Sci.	105	528-536	2014
Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R.	Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells.	PLoS One	9	e85485	2014
Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, Sakai R.	CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells.	Mol Cancer Res.	11	628-637	2013
Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M.	Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes.	Cancer Sci.	104	1189-1197	2013
Kasuga M, Ueki K, Tajima N, Noda M, Ohashi K, Noto H, Goto A, Ogawa W, Sakai R, Tsugane S, Hamajima N, Nakagama H, Tajima K, Miyazono K, Imai K.	Report of the Japan Diabetes Society/Japanese Cancer Association Joint Committee on Diabetes and Cancer.	Cancer Sci.	104	965-976	2013

Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M, Sakai R.	Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells.	Cancer Sci.	104	865-870	2013
Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Matozaki T, Liu Y.	Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP α cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state.	Nat Commun	4	2436	2013
Yamashita H, Kotani T, Park J, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T.	Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium.	PloS One	9	e92904	2014