

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22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 北林 一生

平成26(2014)年 5月

目 次

I . 総合研究報告		
造血器悪性腫瘍及び転移性がんで高頻度に異常を来している遺伝子を標的とした 新たな治療法の開発に資する研究	-----	1
北林一生		
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	8
III . 研究成果の刊行物・別刷	-----	10

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）
総合研究報告書

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)幹細胞に特異的に高発現する表面抗原 Tim-3 および M-CSFR を同定した。Tim-3 および M-CSFR は大多数の AML 幹細胞に高発現しているが、正常造血幹細胞に発現を認めず、理想的な標的候補と考えられた。M-CSF 受容体特異的チロシンキナーゼ阻害剤が発症を抑制することを見出した。Tim-3 陽性細胞株に殺細胞効果を有する抗 Tim-3 抗体を作成し、AML を再構築させたマウスで有効性を検証している。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。TIM-3 の機能としては AML 細胞自体がリガンドである galectin-9 を autocrine 様式で分泌、作用させていることを見出した。シグナル阻害剤の開発として企業と共同研究中の抗腫瘍薬 OPB-31121 が JAK/Src キナーゼ活性を阻害する事なく STAT3、STAT5 のリン酸化を阻害すること、種々の造血器悪性腫瘍細胞株に対し増殖抑制効果が高いが、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細胞株、ヒトプライマリ白血病細胞およびヒト正常臍帯血を移植したマウスモデルを用いて発見した。亜ヒ酸の新たな治療標的の検証のため PAX5-PML 陽性白血病のマウスモデルを作成し、PML 機能の障害の有無、亜ヒ酸の効果について検討した。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きており、実際に転移浸潤にかかわるいくつかの分子の機能を明らかにした。胃がん細胞からは新たに腹膜播種を抑制する ARAP3 を見出して、チロシンリン酸化がその機能に必要であることを明らかにした。また固形腫瘍の足場非依存性と転移性に関わる膜蛋白質 CDCP1 は予後不良群で発現が高いことを見出していたが、その発現制御に Ras-Erk 経路に関わること、足場非依存性の獲得の際にオートファジーの抑制を伴うことなどの重要な知見を得た。CDCP-1 とそのエフェクター分子 PKC の結合を阻害するペプチドを設計し、腫瘍細胞の足場非依存性や造腫瘍能を抑制することを示した。

研究分担者

赤司 浩一（九州大学大学院・医学系研究科・教授）

直江 知樹（名古屋大学大学院・医学系研究科・教授、平成 22-24 年度）

早川 文彦（名古屋大学大学院・医学系研究科・助教、平成 25 年度）

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で生存率が上昇したが、難治性がんに対しては長期生存率に大きな改善が見られていない。これは、このような難治性がんでは再発や転移が頻繁に生じることが最大の原因である。再発の主な要

因は治療耐性を示すがん幹細胞が残存するためであると考えられ、また、転移・浸潤能の獲得にチロシンリン酸化シグナルが関与することが示されている。本研究では、特に再発や転移に深く関与するがん幹細胞やチロシンリン酸化シグナルの制御に関わる分子を標的とした造血器腫瘍や転移性がんに対する新たな治療法の開発を目指す。

重症免疫不全マウス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実現が可能となる。

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、多彩な腫瘍で恒常的活性化が認められている。STAT 阻害剤は有用な抗腫瘍薬となりうると予想されるが、臨床試験まで進んだ薬剤はほとんどない。大塚製薬より抗腫瘍薬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 は細胞株で強い STAT3 リン酸化抑制効果と多彩な腫瘍細胞株に対し強い抗腫瘍効果を持つ事、また動物実験で臓器障害など示さず高い安全性が期待できる化合物であったが、STAT リン酸化阻害の機序、本剤による治療対象とする適合癌種、ヒトプライマリ腫瘍細胞に対する効果などが不明の状態であった。本研究では本薬剤の作用機序を明らかにし、proof of concept を確立する事、造血器腫瘍における本薬剤の適合癌種を明らかにし、プライマリ白血病細胞に対する効果を確認し、日本発の抗癌剤開発に寄与する事を目的として研究を行った。亜ヒ酸は急性前骨髄性白血病 (APL) の強力な治療薬で APL の原因遺伝子である PML-RAR により破壊された PML nuclear body (PML NB) の再構成を誘導する事で APL 細胞にアポトーシスをもたらすと考えられているが、その作用機序には不明な点が多い。我々は細胞株に PAX5-PML 発現ベクターを導入する事で PAX5-PML が PML NB を破壊する事、亜ヒ酸が破壊された PML NB の再構成をもたらし、及び PAX5-PML が PAX5 の転写活性化能を阻害する事を示してきた。今回は PAX5-PML を正常造血細胞に導入する事で白血病を発症させられるかを試みる事で PAX5-PML の発癌性を検証すると共に、得られたマウスモデルを用いて、PML NB の破壊が白血病化に関与するのか、破壊された PML NB を亜ヒ酸で再構成させる事が白血病細胞にアポトーシスを誘導する事につながるのかを検証する事で、PML NB の機能を明らかにし、亜ヒ酸による治療の対象として PML-RAR 陽性でなくとも PML 機能が障害されている腫瘍であればその対象となりうるのかを検証した。

腫瘍の増殖異常や転移浸潤能に関わるチロシンリン酸化シグナルを明らかにして、それを媒介す

るチロシンキナーゼの基質分子の腫瘍における機能の詳細を明らかにするとともに、これらの分子のシグナルをブロックする系を確立する。このシグナルのブロックが *in vitro* の培養細胞系と *in vivo* のマウス転移モデルにおいて癌細胞に与える影響を解析することにより、腫瘍特異的な効果をもたらす分子標的治療のモデルを開発する。

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。このために、TIM-3 リガンドである galectin-9 に着目して研究を進めた。

細胞株を用いて OPB-31121 を添加後の STAT3/5 を含む各種シグナル伝達因子のリン酸化状態の変化を経時的にウエスタンブロットで確認した。種々の造血器悪性腫瘍細胞株に対して本薬剤増殖抑制効果を検討し IC₅₀ を算出し比較した。ヒトプライマリ白血病細胞及びヒト正常臍帯血を重度免疫不全マウスである NOG マウスに移植しヒト白血病、あるいはヒト正常造血モデルマウスを作成した。これに対し本薬剤を使用し、プライマリ白血病細胞及び正常造血細胞に対する効果、副作用を検討した。マウス胎児肝臓細胞から pro B 細胞分画を収集し、これに PAX5-PML 発現ベクターをレトロウイルスを用いて導入し、この細胞を放射線照射したマウスに移植し、白血病の発症を観察した。白血病を発症したマウスの白血病細胞を免疫染色して PML NB の破壊を観察し、マウスに亜ヒ酸を投与し、PML NB の変化、腫瘍細胞の減少、マウスの

生存延長の有無を観察した。マウスの白血病細胞より mRNA を抽出し PAX5 転写活性化標的遺伝子の発現を正常 B 細胞と比較し、マイクロアレイで遺伝子発現プロファイルを解析し、これを正常 B 細胞と比較した。

固形腫瘍の転移浸潤に関わるチロシンキナーゼの基質分子について、これまでの解析で見出した Cas、CDCP1、Ossa などの標的分子としての有用性の評価を進めるとともに、解析の進んでいない他の基質分子についても転移能などの関わりで機能解析を進めた。ヒト腫瘍組織や腫瘍細胞株を用い、これらの基質分子の腫瘍における発現上昇やリン酸化の亢進が、どのような遺伝子変化や活性化シグナルの獲得に伴って誘導されるかを明らかにし、分子標的治療の有効なサブグループを絞り込む。またこのような転移性がんがリン酸化の亢進する分子群の細胞内シグナルをブロックする系を樹立した。特にリン酸化した CDCP1 が PKC と結合することにより足場非依存性やプロテアーゼ分泌など転移・浸潤に関わる性質をもたらすことを *in vitro* の系で明らかにしたので、CDCP1 と PKC のリン酸化依存的結合を阻害する膜透過性ペプチドを用いて CDCP1 のシグナルを抑える系を樹立し、マウスの *in vivo* モデルで固形腫瘍の転移に対する効果を評価した。

C. 研究結果

平成 22 年度から平成 23 年度にかけては、白血病幹細胞特異的表面抗原としての TIM-3 の同定と、強力な細胞傷害活性を有するモノクローナル抗体の樹立および抗体を用いたヒト AML 治療モデルの確立を行った。平成 24 年度は、TIM-3 の AML 以外のヒト造血器腫瘍、特に慢性骨髄増殖性疾患における CD34⁺CD38⁻ 幹細胞分画における発現を中心に検討した。この結果、慢性骨髄増殖性疾患の造血幹細胞分画内にも AML における白血病幹細胞同様の TIM-3 陽性の異常表面形質を有する幹細胞が存在し、疾患の進展とともにその割合が増加することを見出した。さらに、平成 25 年度は TIM-3 の白血病幹細胞における機能解析を中心に行い、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、NF- κ B を含むいくつかの転写因子群を動かしていることを見出した。

OPB-31121 添加後の経時的なウエスタンブロットによる検討では、HEL 細胞株 (JAK2 に恒常的活

性化変異があり、これにより STAT3、STAT5 が恒常的にリン酸化されている) では薬剤添加後 JAK2 のリン酸化に変化のない時点から STAT3、STAT5 のリン酸化が消失し、本薬剤の作用機序はキナーゼ阻害ではないと考えられた。35 種類の造血器腫瘍細胞株で本薬剤の感受性を検討した所、多発性骨髄腫 (3 株中 3 株)、バーキットリンパ腫 (3 株中 3 株) における IC₅₀ は 10 nM 以下で感受性が高かった。白血病の細胞株では感受性にバラツキがあったが、BCR-ABL、FLT3 変異、JAK2 変異を持つ細胞株では 7 株全てで IC₅₀ が 100nM 以下と感受性が高く、それ以外の細胞株では IC₅₀ が 100nM 以上の非感受性株を 5 株 (12 株中) 認める等感受性は一定しなかった。上記の変異はそれが引き起こす細胞増殖シグナルに STAT3/5 の活性化が重要であることがこれまでの多くの報告で確立されている oncokinase であり、我々はこれを STAT addictive oncokinase (SAO) と名付け、SAO 陽性白血病は本薬剤の適合癌種と考えられた。SAO 陽性白血病のヒト白血病細胞マウスモデルを作成した。AML (FLT3/ITD 陽性) 1 例、ALL (BCR-ABL 陽性) 3 例、CML 1 例である。これらに対し OPB-31121 を経口投与し、治療群では腫瘍細胞割合がコントロール群に対し 4~58% に減少していた。OPB-31121 投与群では腫瘍細胞が減少するだけでなく、マウスの正常造血細胞が増加して骨髄の造血細胞の総数が治療群とコントロール群でほとんど変化が無くっており、OPB-31121 の増殖抑制が腫瘍特異的である事を示唆していた。そこで本剤の正常造血への影響を検討するために CD34 陽性ヒト臍帯血細胞を NOG マウスに移植したモデルを作成し、これに本薬剤を投与してヒト臍帯血細胞に対する増殖抑制効果を調べた所、ほとんど増殖抑制効果を認めなかった (T/C:99%)。この結果は本薬剤のヒト正常造血細胞に対する安全性を示していると考えられた。一方 PAX5-PML 白血病マウスの作成では、コントロールとして GFP 遺伝子のみを導入された pro B 細胞は、移植後 3 週間で mature B 細胞までの分化が確認された後、移植マウス骨髄、脾臓内からほぼ消失したのに対し、PAX5-PML 発現ベクターを導入された pro B 細胞は 56 日を経ても pro B 段階で分化停止し、マウス骨髄内に残存し続けた。更に移植後約 150 日あまり経過した頃から急性リンパ性白血病 (ALL) を発症

して死亡するマウスを認めるようになった。この白血病細胞を別のマウスに移植するとより早期に白血病を発症するようになり、継代可能であった。PAX5-PML 陽性白血病細胞においては PML NB は破壊されていなかった。亜ヒ酸をこの白血病マウスに投与したが、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認められなかった。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。

腫瘍の進展過程でチロシンリン酸化を受ける蛋白質を多面的に解析して質量分析による同定を進めた。多くの新規分子が同定されたが、胃がんの腹膜播種部位に発現するチロシンリン酸化タンパク質群の解析から新たに腹膜播種を抑制する *ARAP3* を見出して、チロシンリン酸化がその機能に必要であることを明らかにした。また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も示された。

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しただけでも誘導された。この段階ではアノ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。

また、治療モデルとして CDCP1 と PKC の結合を阻害する「遮断ペプチド」に膜透過ペプチドを付加する形で合成し、その腫瘍に対する効果を解析した。PKC のリン酸化チロシン結合ドメインである C2 ドメインの理想結合配列 (C2B) および実際の CDCP1 の PKC 結合部位の配列 (p762) を用いた結果では、実際に CDCP1 と PKC の結合を阻害し、足場非依存性増殖を抑制し、マウスモデルにおける腹膜播種の抑制 (data not shown) および延命効果が認められ、このシグナルの遮断が転移や腹膜播種の治療に有効であることが示唆された。

D . 考察

本研究結果により白血病幹細胞特異的な表面抗原 TIM-3 を同定し、その機能として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、種々の非造血系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。

今回の結果から OPB-31121 の作用機序の一部が明らかにされ、適合癌種が判明し、ヒト造血細胞への安全性が支持された。これらのデータをまとめて論文を作成し、Blood Cancer Journal 誌に掲載された。適合癌種に関しては、STAT の恒常的活性化を認める腫瘍の中にも本薬剤に感受性のものと、そうでないものがあり、判別が難しいものが多かった。これは STAT の活性化が腫瘍の増殖・生存に関わる一次的なものとして起きている腫瘍と、他に腫瘍の増殖に関わる一次的なシグナルの活性化があり、それに伴い二次的に STAT が活性化しているだけの腫瘍があるからであろうと予想された。その違いを個々の腫瘍で判定するのは困難で、過去の研究により STAT シグナルの増殖への関与が確立されている癌遺伝子、すなわち SAO を持つ腫瘍を標的に本剤で治療するのが現実的な戦略であると考えられた。本研究の成果などをもとに大塚製薬では本薬剤の第一相臨床試験を開始した (NCT1406574)。また今回の研究で PAX5-PML が白血病の発症を誘導できる癌遺伝子であることが示された。白血病発症までに 150 日と比較的長い時間がかかるのは PAX5-PML による分化障害に加えて、おそらくは細胞増殖を誘導する何らかの遺伝子異常が入ることが白血病発症に必要なからと考えられた。そのセカンドヒットとしては *CDKN2B* の

発現低下が有力な候補であるが、それを検証していくのは今後の課題である。本白血病における PAX5-PML の発現量は極めて低く、それがこの白血病において PAX5-PML が PML NB を破壊できなかった理由と考えられた。本モデルでは PML NB を破壊する以外の方法で腫瘍細胞の生存を維持する機序が働いていると考えられ、PML の機能を評価するには適さない系であった。むしろ B 細胞分化障害が起こる機序を解析するのに適した系で、今後はその研究を進めていく予定である。

CDCP1 は Src 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・浸潤に関わっており、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。一方、Ras の活性化は固形腫瘍において高頻度に見られ、その発生のみならず進展にも深く関わるが、そのメカニズムや制御分子については実はいまだに明らかになっていないことが多い。CDCP1 が活性化した Ras の下流のエフェクターとして転移・浸潤など腫瘍の悪性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。また転移に深く関わる足場非依存性という性質とオートファジーの抑制との関わりを CDCP1 の解析から明らかに出来たので、今後転移浸潤過程におけるオートファジーの意味について更に検討していきたい。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。

E . 結論

AML 白血病幹細胞特異的な表面抗原 M-CSFR 及び TIM-3 を同定した。急性骨髄性白血病において特に予後が不良であることが知られる MLL 融合遺伝子や MOZ 融合遺伝子が関与する白血病 M-CSF 受容体の発現が高い細胞が白血病幹細胞であり、M-CSF 受容体の阻害剤や抗体医薬による治療が期待される。AML 以外の慢性骨髄増殖性疾患においても TIM-3 を異常発現する細胞が CD34+CD38- 幹細胞分画に存在し、疾患の進行にともないその発現率が増加することを見出した。さらに、TIM-3 の白血

病幹細胞における機能についても検討を行い、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主要な転写因子群の発現を誘導することで白血病幹細胞の生存、自己複製等を強化している可能性が示された。

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 SAO 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分化障害から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。

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、ヒトの多く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-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も明らかになった。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介することが示された。これらの知見に加え CDCP1 と PKC の結合を阻害する「遮断ペプチド」にがん転移や腹膜播種の治療に有効であることが *in vivo* の系で示され、CDCP1 の転移性がんの治療のための標的分子としての有効性をその作用機構の詳細とともに示すことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med*, 16: 580-585, 2010.

Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem

cells. *Cell Stem Cell* 7, 708-717. 2010

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

Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120, 4058-4067. 2012

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

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

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.

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.

Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood.* 2011;118(6):1600-1609

Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T. PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene.* 2011; 30: 1822-30.

Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B Cell Receptor-ERK1/2 Signal Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1 through PAX5 Phosphorylation: A Mechanism of Antigen-Triggering Plasma Cell Differentiation. *J Immunol.* 2012; 188: 6127-6134.

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;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

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

Uekita T & Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 12: 1943-1948, 2011

Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y & Sakai R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 30 :1413-1421, 2011

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

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
Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I.	PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2.	Nat Med	16	580-585	2010
Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K	TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells.	Cell Stem Cell	7	708-717	2010
Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K.	Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.	Cancer Cell	20	246-259	2011
Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T.	Missense mutations in PML-RARA critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment.	Blood	118	1600-1609	2011
Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T.	PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML.	Oncogene	30	1822-1830	2011
Uekita T & Sakai R.	Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis.	Cancer Sci.	102	1943-1948	2011
Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y & Sakai R.	ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion.	Oncogene	30	1413-1421	2011
Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T., Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K.	Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis.	Blood	120	4058-4067	2012
Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T.	B Cell Receptor-ERK1/2 Signal Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1 through PAX5 Phosphorylation: A Mechanism of Antigen-Triggering Plasma Cell Differentiation.	Journal of Immunology	188	6127-6134	2012
Kaneko T, Saito Y, Kotani T, Okazawa H, Iwamura H, Sato-Hashimoto M, Kanazawa Y, Takahashi S, Hiromura K, Kusakari S, Kaneko Y, Murata Y, Ohnishi H, Nojima Y, Takagishi K, Matozaki T.	Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity.	J Immunol	88	5397-5407	2012

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
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
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
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 Journal	3	e166	2013
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
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
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
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
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
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