

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目) p53経路が規定する難治がんの分子標的と治療抵抗性の解析

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 江成 政人

平成27(2015)年 3月

目 次

I . 委託業務成果報告（総括）		
p53経路が規定する難治がんの分子標的と治療抵抗性の解析	-----	3
江成政人		
II . 委託業務成果報告（業務項目）		
1 . ALK阻害剤抵抗性メカニズムの解析	-----	8
江成政人		
2 . p53標的遺伝子PHLDA3の機能解析	-----	11
大木理恵子		
III . 学会等発表実績	-----	13
IV . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15

p53 経路が規定する難治がんの分子標的と治療抵抗性の解析

業務主任者 江成 政人 国立研究開発法人国立がん研究センター ユニット長

研究要旨

肺腺がんの約 5%は ALK 遺伝子の融合が認められ、ALK 阻害剤クリゾチニブが ALK 融合陽性肺腺がんに対する治療薬として承認されているが、その治療後の再発も問題として残っている。近年、ALK 阻害剤耐性となる ALK 二次的変異に対する低分子化合物アレクチニブも治療薬として承認されたが、他のがん遺伝子の活性化などによる耐性機構も存在し、ALK 阻害剤耐性のバイパス経路や宿主由来がん間質細胞の関与なども考慮に入れた包括的な解析が必要である。一方、PHLDA3 は細胞生存シグナルの主役である Akt の新規抑制因子であり、肺がんや膵内分泌腫瘍の臨床検体において、PHLDA3 遺伝子の高頻度な機能喪失を発見した。本研究では、ALK 融合陽性肺腺がん患者由来のがん組織から細胞株やがん幹細胞を樹立し、ALK 阻害剤抵抗性に関わる因子を網羅的に探索・同定すること、新規がん抑制遺伝子である PHLDA3 の機能解析を通じて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解明し、新規治療標的分子を同定することを目的として研究を進めている。現在、患者由来の ALK 融合陽性肺腺がん細胞株を樹立し、その細胞を用いて解析を行ったところ、p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウス作製に成功した。更に、膵内分泌腫瘍の症例を収集し、計 70 症例を集めた。p53 経路に着目して ALK 融合陽性肺腺がんや膵内分泌腫瘍を解析した報告はなく、本研究は学術的にも臨床応用的にも大変有意義である。本研究により、ALK 融合陽性肺腺がんの ALK 阻害剤耐性機構が明らかとなり、そのがん種における治療法の選択肢が広がることが予測されること、膵内分泌腫瘍患者の個別化医療に貢献できること、PHLDA3 をベースとした全く新しい分子標的薬を創出できることなどが期待できる。

A. 研究目的

肺腺がんの約 5%は ALK 遺伝子の融合が認められ、ALK 阻害剤クリゾチニブが ALK 融合陽性肺腺がんに対する治療薬として承認されている一方で、クリゾチニブに対する治療抵抗性が問題である。近年、ALK 阻害剤耐性となる ALK 二次的変異に対する低分子化合物アレクチニブも治療薬として承認されたが、他のがん遺伝子の異常活性化亢進などの耐性機構も存在し、ALK 阻害剤耐性のバイパス経路や宿主由来がん間質細胞の関与なども包括的に解析する必要がある。私達は ALK 融合陽性肺腺がん患者のがん組織において、がん抑制因子 p53 の変異がほとんど認められず、ALK 融合蛋白質が p53 を直接チロシンリン酸化し、p53 機能を不活化することを見出した。また、がん随伴線維芽細胞中の TSPAN12 が肺がんの進展を助長

することも発見した。一方、PHLDA3 は細胞生存シグナルの主役である Akt の新規抑制因子であり、肺がんや膵内分泌腫瘍の臨床検体において、PHLDA3 遺伝子の高頻度な機能喪失を発見した。

このような背景のもと、本研究では、本研究では、ヒト臨床検体から ALK 融合陽性肺腺がん細胞株の樹立を試み、ALK 阻害剤や p53 活性化剤の薬剤抵抗性とがん幹細胞様形質との関連性を明らかにするとともに ALK 阻害剤抵抗性に関わる因子を網羅的に探索・同定することを目的とする。また、PHLDA3 の機能解析を通じて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解明し、新規治療標的分子の同定も目指す。

B. 研究方法

(1) ALK 阻害剤抵抗性メカニズム解明に関わるアッセイ系の開発

・外科的及び内科的に得られた33症例のALK融合陽性肺腺がん患者由来のがん組織や胸水から細胞株やがん幹細胞を樹立する。

(2) p53 活性化剤併用処理によるALK阻害剤抵抗性への効果

・樹立したALK融合陽性肺腺がん細胞及びがん幹細胞様分画の細胞をp53活性化剤Nutlin-3a単独、クリゾチニブ単独とその両方を併用した際のALK融合陽性肺腺がんの細胞生存率を測定する。

(3) 膵内分泌腫瘍患者の治療成績とPHLDA3遺伝子異常との関連を調べる。

・膵内分泌腫瘍サンプルの収集

・代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子遺伝子異常の解析

・PHLDA3遺伝子異常と治療経過・予後との関連を解析

(4) 膵内分泌腫瘍の疾患モデルを用いて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解析し、新規治療標的分子の同定を目指す。

(倫理面への配慮)

肺がん組織における遺伝子発現・変異を解析する場合には「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮する。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」そして「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

(1) 肺腺がん患者由来の臨床検体33症例のうち、5例がALK融合陽性であり(河野、清野との共同研究)、その内1症例のALK融合陽性でありかつp53遺伝子に変異を持たない細胞株の樹立に成功している。ただし、細胞の増殖能が悪

く、薬剤抵抗性の実験やがん幹細胞の濃縮実験には使えていない。現在、更なる肺腺がん患者由来のから細胞株やがん幹細胞の樹立を試みている。

(2) 上記、患者由来の樹立したALK融合陽性肺腺がん細胞株を用いて解析を行ったところ、p53活性化剤がALK阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。

(3) 膵内分泌腫瘍の症例を収集し、計70症例を集めた。集めた症例について、PHLDA3遺伝子に加え、代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子に異常があるか解析を進めている。

(4) 膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウスとなる、PHLDA3遺伝子とMEN1遺伝子双方を欠損するマウスの作製に成功し、詳細な解析を進めている。

D. 考察

本研究において、p53活性化剤であるNutlin-3aがALK融合陽性肺腺がんのALK阻害剤耐性を軽減させることがわかった。しかしながら、ALK融合陽性肺腺がん患者由来の臨床検体から細胞株の樹立を試みているが、ALK融合陽性肺腺がん患者由来の臨床検体からp53遺伝子に変異のない細胞株が今のところ1症例のみである。摘出直後のALK融合陽性肺腺がん細胞では、p53遺伝子の変異はほとんど認められず、おそらく、細胞株樹立の際、酸化ストレスや培養ストレスによってp53遺伝子に変異が入り、p53遺伝子に変異を持つがん細胞が優先的に増殖している可能性がある。それを回避するため、低酸素での培養や他の培養条件等(線維芽細胞等の間質細胞との共培養等)の検討も今後必要であろう。

また、ALK融合陽性肺腺がんにおいて、ALK阻害剤とp53活性化剤との併用処理がなぜ有効なのかについての分子メカニズムやALK融合陽性肺腺がんにおけるALK阻害剤耐性の分子メカニズム等理解に乏しく、今後の解析が必要不可欠であろう。

一方、膵内分泌腫瘍における様々な遺伝子の

異常の有無を解析しており、今後、重要な情報を得ることができると考えられる。また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウス作製に成功しており、PHLDA3 に着目して膵内分泌腫瘍を解析した報告もないことから、本研究は学術的にも臨床応用的にも大変有意義である。

E. 結論

以上の結果、p53 活性化は、ALK 融合陽性肺腺がんの ALK 阻害剤耐性を軽減させ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が ALK 融合陽性肺腺がんに対し、きわめて有効的な治療法になり得ることが期待できる結果を導き出した。

一方、これまでに非常に希少ながんである膵内分泌腫瘍のサンプルを計 70 サンプル収集すること、膵内分泌腫瘍のモデルマウスの作成することに成功しており、今後詳細に解析することで、膵内分泌腫瘍の個別化医療に資する成果が期待される。

F. 健康危険情報

本研究では、健康を脅かす有害な事象はなく、安全かつ健康に配慮し研究を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

1) Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ochiya, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya, and *Masato Enari (corresponding author): TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014.

- 2) 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 Nanno, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, 20, 3087-3093, 2014.
- 3) 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 (corresponding author): TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. **Cell Reports**, 7, 527-538, 2014.
- 4) Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. **PNAS**, 111 (23), E2404-E2413, 2014.

日本語論文

1) 山口 陽子, 斉藤 梢, 陳 ㄋ, 大木 理恵子.

新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* による Akt 経路の制御機構と治療への展開 – 隣神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して –

実験医学、2014 年 7 月 増刊号: 135-143.

2. 学会発表

- 1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日
- 2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日
- 3) CD74-NRG1 はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日
- 4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日
- 5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜、2014年9月27日
- 6) INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop、ポスター発表、Sweden、2014年6月16日
- 7) Akt の新規抑制因子をコードする *PHLDA3* 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である。ポスター 基礎研究 P1-1 大木理恵子 第2回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会。2014 年 9 月 20 日。於：東京都文京区 国内
- 8) PH domain-only protein *PHLDA3* is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. シンポジウム発表 SS-6 大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日。於：神奈川県横浜市 国内
- 9) *PHLDA3* は隣神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である。ポスター発表 P-3295 山口陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日。於：神奈川県横浜市 国内
- 10) Akt の新規抑制因子をコードする *PHLDA3* 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である。口頭発表 大木理恵子 アステラス病態代謝研究会 2014 年 10 月 18 日。於：東京都中央区 国内
- 11) PH domain-only protein *PHLDA3* is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日独がんワークショップ 2014 年 11 月 15 日。於：ドイツベルリン 国外
- 12) PH domain-only protein *PHLDA3* is a novel

p53-regulated repressor of Akt and a novel
tumor suppressor of neuroendocrine tumors
口頭発表 大木理恵子 日韓がんワークショ
ップ 2014年11月29日 .於:韓国濟州島 国
外

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

ALK 阻害剤抵抗性メカニズムの解析

業務主任者 江成 政人 国立研究開発法人国立がん研究センター ユニット長

研究要旨

肺腺がんの約 5%は ALK 遺伝子の融合が認められ、ALK 阻害剤クリゾチニブが ALK 融合陽性肺腺がんに対する治療薬として承認されているが、その治療後の再発も問題として残っている。近年、ALK 阻害剤耐性となる ALK 二次的変異に対する低分子化合物アレクチニブも治療薬として承認されたが、他のがん遺伝子の活性化などによる耐性機構も存在し、ALK 阻害剤耐性のバイパス経路や宿主由来がん間質細胞の関与なども考慮に入れた包括的な解析が必要である。本研究では、ALK 融合陽性肺腺がん患者由来のがん組織から細胞株やがん幹細胞を樹立し、ALK 阻害剤抵抗性に関わる因子を網羅的に探索・同定することを目的として研究を進めている。現在、患者由来の ALK 融合陽性肺腺がん細胞株を樹立し、その細胞を用いて解析を行ったところ、p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。

A. 研究目的

肺腺がんの約 5%は ALK 遺伝子の融合が認められ、ALK 阻害剤クリゾチニブが ALK 融合陽性肺腺がんに対する治療薬として承認されている一方で、クリゾチニブに対する治療抵抗性が問題である。近年、ALK 阻害剤耐性となる ALK 二次的変異に対する低分子化合物アレクチニブも治療薬として承認されたが、他のがん遺伝子の異常活性化亢進などの耐性機構も存在し、ALK 阻害剤耐性のバイパス経路や宿主由来がん間質細胞の関与なども包括的に解析する必要がある。私達は ALK 融合陽性肺腺がん患者のがん組織において、がん抑制因子 p53 の変異がほとんど認められず、ALK 融合蛋白質が p53 を直接チロシンリン酸化し、p53 機能を不活化することを見出した。また、がん随伴線維芽細胞中の TSPAN12 が肺がんの進展を助長することも発見した。

このような背景のもと、本研究では、本研究では、ヒト臨床検体から ALK 融合陽性肺腺がん細胞株の樹立を試み、ALK 阻害剤や p53 活性化剤の薬剤抵抗性とがん幹細胞様形質との関連性を明らかにするとともに ALK 阻害剤抵抗性に関わる因子を網羅的に探索・同定することを目的とする。

B. 研究方法

(1) ALK 阻害剤抵抗性メカニズム解明に関わるアッセイ系の開発

・外科的及び内科的に得られた 33 症例の ALK 融合陽性肺腺がん患者由来のがん組織や胸水から細胞株やがん幹細胞を樹立する。

(2) p53 活性化剤併用処理による ALK 阻害剤抵抗性への効果

・樹立した ALK 融合陽性肺腺がん細胞及びがん幹細胞様分画の細胞を p53 活性化剤 Nutlin-3a 単独、クリゾチニブ単独とその両方を併用した際の ALK 融合陽性肺腺がんの細胞生存率を測定する。

（倫理面への配慮）

肺がん組織における遺伝子発現・変異を解析する場合には「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮する。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」

そして「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

(1) 肺腺がん患者由来の臨床検体 33 症例のうち、5 例が ALK 融合陽性であり(河野、清野との共同研究) その内 1 症例の ALK 融合陽性でありかつ p53 遺伝子に変異を持たない細胞株の樹立に成功している。ただし、細胞の増殖能が悪く、薬剤抵抗性の実験やがん幹細胞の濃縮実験には使えていない。現在、更なる肺腺がん患者由来のから細胞株やがん幹細胞の樹立を試みている。

(2) 上記、患者由来の樹立した ALK 融合陽性肺腺がん細胞株を用いて解析を行ったところ、p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。

D. 考察

本研究において、p53 活性化剤である Nutlin-3a が ALK 融合陽性肺腺がんの ALK 阻害剤耐性を軽減させることがわかった。しかしながら、ALK 融合陽性肺腺がん患者由来の臨床検体から細胞株の樹立を試みているが、ALK 融合陽性肺腺がん患者由来の臨床検体から p53 遺伝子に変異のない細胞株が今のところ 1 症例のみである。摘出直後の ALK 融合陽性肺腺がん細胞では、p53 遺伝子の変異はほとんど認められず、おそらく、細胞株樹立の際、酸化ストレスや培養ストレスによって p53 遺伝子に変異が入り、p53 遺伝子に変異を持つがん細胞が優先的に増殖している可能性がある。それを回避するため、低酸素での培養や他の培養条件等(線維芽細胞等の間質細胞との共培養等)の検討も今後必要であろう。また、ALK 融合陽性肺腺がんにおいて、ALK 阻害剤と p53 活性化剤との併用処理がなぜ有効なのかについての分子メカニズムや ALK 融合陽性肺腺がんにおける ALK 阻害剤耐性の分子メカニズム等理解に乏しく、今後の解析が必要不可欠で

あろう。

E. 結論

以上の結果、p53 活性化は、ALK 融合陽性肺腺がんの ALK 阻害剤耐性を軽減させ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が ALK 融合陽性肺腺がんに対し、きわめて有効的な治療法になり得ることが期待できる結果を導き出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ochiya, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya, and *Masato Enari (corresponding author): TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014.
- 2) 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 Nanno, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, 20, 3087-3093, 2014.
- 3) 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 (corresponding author): TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. **Cell Reports**, 7,527-538, 2014.

2. 学会発表

- 1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日
- 2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日
- 3) CD74-NRG1はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日
- 4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida,

Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日

- 5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜、2014年9月27日
- 6) INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop、ポスター発表、Sweden、2014年6月16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

p53 標的遺伝子 PHLDA3 の機能解析

研究分担者 大木理恵子 国立がん研究センター研究所 主任研究員

研究要旨：p53 の標的遺伝子であり、新規がん抑制遺伝子である PHLDA3 の機能解析を通じて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解明し、新規治療標的分子を同定することを目指して研究を進めている。現在、膵内分泌腫瘍における様々な遺伝子の異常の有無を解析しており、膵内分泌腫瘍の本態解明につながる成果を得ることができると考えられる。また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウス作製に成功している。PHLDA3 に着目して膵内分泌腫瘍を解析した報告はなく、本研究は学術的にも臨床応用的にも大変有意義である。本研究により、膵内分泌腫瘍患者の個別化医療に貢献できること、PHLDA3 をベースとした全く新しい分子標的薬を創出できることなどが期待できる。

A．研究目的

大木らが同定した新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能解析を通じて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解明し、新規治療標的分子の同定を目指す。本研究により、膵内分泌腫瘍患者の個別化医療に貢献できること、PHLDA3 をベースとした全く新しい分子標的薬を創出できることなどが期待できる。

B．研究方法

(1) 膵内分泌腫瘍患者の治療成績と PHLDA3 遺伝子異常との関連を調べる。

- ・膵内分泌腫瘍サンプルの収集
- ・代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子遺伝子異常の解析
- ・PHLDA3 遺伝子異常と治療経過・予後との関連を解析

(2) 膵内分泌腫瘍の疾患モデルを用いて、膵内分泌腫瘍発生のメカニズムを解析し、新規治療標的分子の同定を目指す。

C．研究結果

(1) 膵内分泌腫瘍の症例を収集し、計 70 症例

を集めた。集めた症例について、PHLDA3 遺伝子に加え、代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子に異常があるか解析を進めている。

(2) 膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウスとなる、PHLDA3 遺伝子と MEN1 遺伝子双方を欠損するマウスの作製に成功し、詳細な解析を進めている。

D．考察

膵内分泌腫瘍における様々な遺伝子の異常の有無を解析しており、今後、重要な情報を得ることができると考えられる。また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵内分泌腫瘍の疾患モデルマウス作製に成功している。PHLDA3 に着目して膵内分泌腫瘍を解析した報告はなく、本研究は学術的にも臨床応用的にも大変有意義である。

E．結論

これまでに非常に希少ながんである膵内分泌腫瘍のサンプルを計 70 サンプル収集すること、膵内分泌腫瘍のモデルマウスの作成することに成功しており、今後詳細に解析することで、膵内分泌腫瘍の個別化医療に資する成果が期待される。

G . 研究発表

1 . 論文発表

外国語論文

Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiko Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. **PNAS**, 111 (23), E2404-E2413, 2014.

日本語論文

山口 陽子, 斉藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子. 新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* による Akt 経路の制御機構と治療への展開 - 膵神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して- . **実験医学**, 2014 年 7 月増刊号: 135-143.

2 . 学会発表

1. Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である . ポスター 基礎研究 P1-1 大木理恵子 第 2 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 . 2014 年 9 月 20 日 . 於 : 東京都文京区 国内
2. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors . シンポジウム発表 SS-6 大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日 . 於 : 神奈川県横浜市 国内
3. PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である . ポスター発表 P-3295 山口 陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日 . 於 : 神奈川県横浜市 国内
4. Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である 口頭発表 大木理恵子 アステラス病態代謝研究会 2014 年 10 月 18 日 . 於 : 東京都中央区 国内
5. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日独がんワークショップ 2014 年 11 月 15 日 . 於 : ドイツベルリン

国外

6. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日韓がんワークショップ 2014 年 11 月 29 日 . 於 : 韓国済州島 国外

H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
該当せず
- 2 . 実用新案登録
該当せず
- 3 . その他
該当せず

III. 学会等発表実績

1. 論文発表

外国語論文

- 1) Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ochiya, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya, and *Masato Enari (corresponding author): TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014.
- 2) 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 and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, 20, 3087-3093, 2014.
- 3) 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 (corresponding author): TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility

during Lung Cancer Progression. **Cell Reports**, 7,527-538, 2014.

- 4) Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. **PNAS**, 111 (23), E2404-E2413, 2014.

日本語論文

- 1) 山口 陽子, 斉藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子. 新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* による Akt 経路の制御機構と治療への展開 – 隣神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して – . **実験医学**, 2014 年 7 月 増刊号: 135-143.

2. 学会発表

- 1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日
- 2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014 年 11 月 25 日

- 3) CD74-NRG1はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日
- 4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日
- 5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜、2014年9月27日
- 6) NACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop、ポスター発表、Sweden、2014年6月16日
- 7) Aktの新規抑制因子をコードするPHLDA3遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である。ポスター 基礎研究P1-1大木理恵子 第2回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会。2014年9月20日。於：東京都文京区 国内
- 8) PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. シンポジウム発表 SS-6 大木理恵子 日本癌学会年会 2014年9月27日。於：神奈川県横浜市 国内
- 9) PHLDA3 は隣神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である。ポスター発表 P-3295 山口 陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木理恵子 日本癌学会年会 2014年9月27日。於：神奈川県横浜市 国内
- 10) Aktの新規抑制因子をコードするPHLDA3遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である。口頭発表 大木理恵子 アステラス病態代謝研究会 2014年10月18日。於：東京 都中央区 国内
- 11) PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日独がんワークショップ 2014年11月15日。於：ドイツベルリン 国外
- 12) PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日韓がんワークショップ 2014年11月29日。於：韓国済州島 国外
- 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

研究成果の刊行に関する一覧表

委託業務題目 「p53経路が規定する難治がんの分子標的と治療抵抗性の解析」

機関名 国立がん研究センター研究所

学会誌・雑誌等における論文掲載(刊行物)

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion	Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ochiya, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya, and Masato Enari	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	2014 Dec 30; 111(52):18691-18696	国外
Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma	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 Nanno, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno	Clinical Cancer Research	2014 Jun 15; 20(12):3087-3093	国外
TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression	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	Cell Reports	2014 Apr 24; 7(2):527-538	国外
PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors	Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Iyoko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H.	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	2014, May 111(23):E2404-2413	国外
新規がん抑制遺伝子PHLDA3によるAkt経路の制御機構と治療への展開ー脳神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指してー	山口 陽子, 斉藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子	実験医学	2014; 7月増刊号: 135-143	国内