

平成22年度

金沢大学がん研究所  
共同研究成果報告書

2011.4

金沢大学がん研究所

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月18日提出

対象研究テーマ：HGF-Met系を中心とするがん転移・薬剤耐性のメカニズムと制がん研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：構造生物学を基盤とするHGF-Met系阻害の分子創薬研究

研究代表者：大阪府立大学大学院理学系研究科 准教授 木下誉富

研究成果の概要：

HGFβ・シード化合物複合体のX線構造に基づき、化合物の最適化を行った。相互作用が増すように設計しており活性向上が期待されたが、合成した約50誘導体はいずれも顕著な活性向上が認められなかった。そこで誘導体化合物を1つ選び、HGFβとの複合体のX線構造解析を行ったところ、シード化合物とは異なる相互作用様式で結合していることがわかった。この相互作用様式は、これら50誘導体に活性向上がなかったことを矛盾なく説明できる。さらに誘導体から4～5Å離れたところに、これまで注目していない正電荷及び負電荷サブポケットが存在していることがわかった。今後、これらのポケットを狙ったStructure-Based Drug Designを行い、高活性HGFアンタゴニストの創出を目指す。

研究分野：構造生物学、創薬化学

キーワード：X線結晶構造解析、Structure-Based Drug Design (SBDD)

## 1. 研究開始当初の背景

HGF (肝細胞増殖因子) はMet受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGFは肝臓をはじめ、腎臓、心血管系、脳神経系など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGFを投与・補充することが、肝硬変、急性・慢性腎不全、脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症、皮膚潰瘍など様々な疾患の治癒・改善につながる事が明らかにされている。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが癌細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGFは様々な癌に対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met受容体系は癌の浸潤・転移阻止につながる分子標的になると考えられている。したがって、HGF-Met受容体系を阻害する分子 (HGF-Metアンタゴニスト) は癌の浸潤・転移・成長阻害につながる新規制癌分子になる。

## 2. 研究の目的

タンパク質の結晶化技術やX線結晶構造解析技術の進歩がコンピュータの進歩と相まって、構造生物学とバイオインフォーマティクス技術を使用して新しい医薬を探索する手法が進展している。本研究では立体構造を基盤としたインシリコ創薬技術を駆使して、HGF-Met受容体系を阻害する低分子アン

タゴニストを創成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

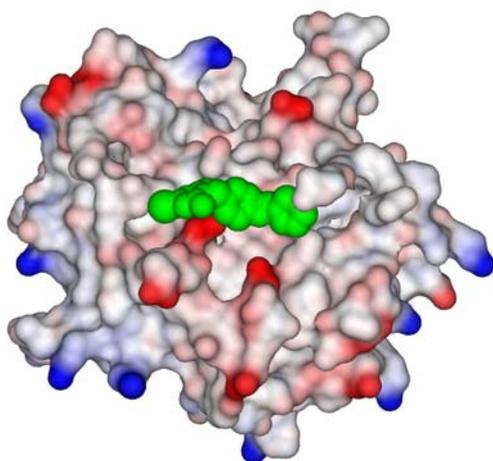
これまでの研究成果となるHGFβ-シード化合物複合体の立体構造に基づき、HGFβ鎖-Met相互作用面を遮断するHGFアンタゴニストを設計、合成した。得られた誘導体はHGFβ鎖-Metの結合阻害活性、HGF依存的細胞Scattering作用に対する阻害活性、HGF依存的Metリン酸化活性阻害、及びがん細胞の浸潤阻害活性により評価した。HGF分子内ドメインであるβ鎖の蛋白質サンプルを結晶化用を高純度精製し、誘導体化合物との複合体の結晶を調製した。この結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構においてX線回折データ測定を行い、構造解析を行った。

## 4. 研究成果

シード化合物のHGFβへの結合様式に基づき、新たに疎水性相互作用および水素結合を形成するように誘導体を設計した。ピロールを有する誘導体では活性が減弱するのみであった。一方、ベンゼン誘導体のいくつかは期待されたほどの活性向上を示さないものの、活性を保持していた。適切に相互作用が増加していれば、阻害活性は向上するはずである。そこで、ベンゼン誘導体とHGFβとの

複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ、この誘導体はシード化合物に比べて約 4 Å 離れた位置に結合していることが判明した (図 1)。この X 線構造は、ベンゼン誘導体が HGFβ 鎖と期待された相互作用を形成しておらず、そのために顕著な活性向上につながらなかったことを示唆している。ベンゼン骨格から 4 ~ 5 Å のところに正電荷サブポケットと負電荷サブポケットが見られる。これらはピロール誘導体の X 線構造では化合物から遠く離れていたためにこれまで注目してこなかった。これらのポケットで適切に相互作用するように、論理的創薬手法である Structure-Based Drug Design 研究を展開し、高活性化化合物の創出を目指す。

図 1 誘導体 (緑) と HGFβ の結晶構造



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Sakai, K., Nakamura, T., Kinoshita, T., Nakamura, T., and Matsumoto, K. HGF-Antagonists: Structure, Activities, and Anti-cancer Approach. *Current Signal Transduction Therapy*, in press, 2011.
2. Matsumoto, T., Kinoshita, T., Kirii, Y., Yokota, K., Hamada, K., Tada, T. Crystal structures of MKK4 kinase domain reveal that substrate peptide binds to an allosteric site and induces an auto-inhibition state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 369-373, 2010.

[学会発表] (計 17 件)

1. 肝細胞増殖因子 HGFβ 鎖 / 阻害剤複合体の X 線結晶構造解析、仲庭哲津子、木下誉富、福田一弘、早田大真、松本邦夫、日本結晶学会平成 22 年度年会 (2010 年、大阪)

[図書] (計 1 件)

1. X 線結晶構造解析から Structure-Based Drug Design への応用と展開、木下誉富 (著者分担)、実験薬理学・創薬研究のストラテジー、日本薬理学会編、金芳堂 (2011 年)、83-89.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. キナーゼ阻害剤、特願 2011-048325

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

1. シグナル伝達蛋白質の構造生物学と創薬研究、木下誉富、金沢大学がん研究所セミナー (2011 年、金沢)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授  
木下誉富

(2) 研究分担者

大阪府立大学大学院理学系研究科・ポスドク  
仲庭哲津子

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月28日提出

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：ケモカイン BRAK/CXCL14 トランスジェニックマウスによる発癌と転移の抑制機構の研究：副作用のない癌のドーマントセラピーを目指して

研究代表者：神奈川県立大学 特任教授 畑 隆一郎

研究成果の概要：

我々が作製したケモカイン CXCL14/BRAK トランスジェニックマウス(Tg)は移植腫瘍の抑制ばかりでなく B16 メラノーマ細胞および LLC 細胞の肺への実験的転移を抑制し、かつ、マウスの寿命の延長がみられた。Anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理することによりナチュラルキラー(NK)細胞を除去するとこの抑制はみられなくなることから、腫瘍抑制と転移抑制には NK 細胞が関与していることが示された。また、Tg マウスに  $\alpha$ -Galactosylceramide であらかじめ処理し、NKT 細胞を活性化すると、肺への転移抑制作用と寿命延長作用はさらに顕著となった。

研究分野：癌の分子標的治療

キーワード：癌抑制性ケモカイン・CXCL14/BRAK・転移抑制・寿命延長

## 1. 研究開始当初の背景

A. 従来の癌標的治療法では副作用が障害となっている：

癌の分子標的治療法が多く行われているが、これまでに開発された薬の殆どが副作用により臨床応用不可能となっている。この理由は、分子標的療法において、癌化で上昇あるいは活性化する分子を、抑制あるいは不活性化する薬剤の開発を目的としていたためと考えられる。即ち、癌化で上昇する、あるいは活性化する分子は正常にも存在し、重要な機能を持っているため、抗癌剤が正常細胞の活性を阻害するため、副作用を示すと考えられる。我々は頭頸部癌の分子標的治療法開発に当たって、発想を転換し、正常細胞は癌の進展を抑制する分子を合成していることを仮定して、癌の悪性化の条件で発現が低下する分子を探索し、正常細胞で合成され、癌細胞で合性が低下する分子としてケモカイン BRAK/CXCL14 (以降 BRAK) を見いだした。

B. BRAK は *in vivo* で癌進展抑制作用を示す：

癌では上皮増殖因子(EGF)受容体(EGFR)の異常な活性化が多く見られるので、癌進展の *in vitro* のモデルとして、舌癌由来の細胞(HSC-3)を無血清下で培養し、この細胞をEGFで刺激し、発現の低下する分子を遺伝子チップ法などにより検索した。その結果、白血球の遊走を促進するケモカインの一種である BRAK の発現が顕著に低下することを見いだした。BRAK は正常細胞で多く発現され、ヒト頭頸部癌において低下することから、最初に仮定した癌進展抑制因子に該当すると考えた。そこで、HSC-3細胞にBRAK遺伝子を導入して発現を高めた癌細胞(HSC-3 BRAK)を作成し、Tリンパ球機能を欠損したヌードマウス(Ozawa *et al.*, 2006)、あるいはTリンパ球およびBリンパ球機能を欠損したSCIDマウスに移植した(Ozawa *et al.*, 2009)。対照のHSC-3は大きな腫瘍を形成するのに対して、HSC-3 BRAK細胞の移植腫瘍は1ヶ月後には消滅した。このことからBRAKは我々の体内に存在する腫瘍進展抑制因子である可能性が考えられた。

C. BRAK遺伝子を導入したトランスジェニック

クマウスは腫瘍抑制作用を示す：

さらに、C57BL/6 マウスに BRAK 遺伝子を強制発現させ、血中 BRAK 値が野生型マウスの 10 倍高く発現するトランスジェニック (BRAK Tg) マウスを作製した。このマウスに Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞あるいはメラノーマ細胞を移植すると、癌の増殖・進展抑制が見られたので、BRAK は生体内に存在する腫瘍進展抑制因子であることが確認された。移植腫瘍の増殖・進展の抑制は 2 系統の BRAK Tg マウスで観察されたので、腫瘍の進展抑制は BRAK 遺伝子導入によるホストマウスの腫瘍進展促進因子遺伝子の破壊の結果ではなく、高い BRAK の発現が腫瘍の増殖・進展抑制に効いていると考えられる。また、我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、肺癌、メラノーマの癌進展抑制作用を示すことが明らかとなった

## 2. 研究の目的

本研究では、ケモカイン BRAK/CXCL14 を高発現する BRAK Tg マウスを用いて、移植癌の増殖抑制機構および癌転移抑制におけるナチュラルキラー (NK) 細胞の役割について検討する。

本共同研究は今後の“副作用のない新しい癌のドーマントセラピー”への展開のための基礎研究として非常に有用であると考え

## 3. 研究の方法

①ケモカイン CXCL14/BRAK トランスジェニックマウス(Tg)および、対照として野生型マウス(Wt)を用いて B16 メラノーマ細胞あるいはルイス肺癌細胞(LLC)の移植あるいは尾静脈からの注入後、移植癌の増殖速度及び肺の転移巣の数を測定する。

②一部のマウスについては癌細胞の移植あるいは注入前に anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理し NK 細胞欠損状態にして NK 細胞の役割を解析する。

③さらに、 $\alpha$ -Galactosylceramide でマウスを前処理することにより NKT 細胞を活性化してその効果を調べる。

## 4. 研究成果

① BRAKTg マウス及び Wt マウスの背部皮膚に B16 メラノーマ細胞あるいは LLC 細胞を移植後日数を追って腫瘍の大きさを比較すると、どちらの細胞においても Tg マウスにおいて腫瘍の増殖が遅かった。血中の CXCL14/BRAK 発現量が Wt マウスの 8 から 14 倍発現している 3 系統の Tg マウスについて同様な結果が得られたので、Tg マウスで観察された腫瘍増殖抑制作用は Tg における CXCL14/BRAK の高発現によるものと考え

られた。尾静脈から B16 メラノーマ細胞、あるいは LLC 細胞を注入後、肺の転移巣数を調べると、Tg マウスにおいて

Wt マウスよりも有意に転移巣数が少なく、Tg マウスにおいて腫瘍の増殖だけでなく、腫瘍の転移も抑制していることが示された。また、担癌マウスにおいて Tg マウスの方が寿命が長かった。

②移植腫瘍の増殖実験及び転移実験において anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理することによりナチュラルキラー(NK)細胞を除去すると、この抑制はみられなくなることから、腫瘍抑制と転移抑制には NK 細胞が関与していることが示された。

③Tg マウスに  $\alpha$ -Galactosylceramide であらかじめ処理し、NKT 細胞を活性化すると、肺への転移抑制作用と寿命延長作用はさらに顕著となった。この結果も CXCL14/BRAK が NK 細胞の活性化を介して腫瘍の増殖抑制、転移抑制をしている事を支持している。今後、CXCL14/BRAK による NK 細胞の活性化機構を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Toshiharu Yamamoto, Anzu Yamashita, Kentaro Yamada, Ryu-Ichiro Hata Immunohistochemical localization of chemokine CXCL14 in rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett.* **487(3)**: 335-340 2011, 2010 Oct 23. [Epub ahead of print].

2) Nahoko Fukunishi, Iyoko Katoh, Yoshiya Tomomori, Kenichi Tsukinoki, Ryu-Ichiro Hata, Atsuhito Nakano, Yoji Ikawa, Shun-ichi Kurata Induction of dNp63 by the newly identified keratinocyte-specific transforming growth factor b signaling pathway with smad2 and Ikb kinase a in squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **12(12)**: 969-979 2010.

3) Nobuyuki Yajima, Kazuhito Izukuri, Ryu-Ichiro Hata Production of conditional knockout mice for chemokine *BMAC/cxcl14* gene by Cre/loxP system.—Inflammation and Regeneration **30(6)**: 536-541 2010

4) Yojiro Maehata, Shigeyuki Ozawa, Kyo Kobayashi, Yasumasa Kato, Fumihiko Yoshino, Chihiro Miyamoto, Kazuhito Izukuri, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata, Masaichi-Chang-il Lee

Reactive Oxygen Species (ROS) Reduce the Expression of BRAK/CXCL14 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. Free Radical Res **44(8)**: 913-924 2010

5) Kazuhito Izukuri, Shin Ito, Naohito Nozaki, Nobuyuki Yajima, Mariko Iwamiya, Sachiko Kawahara, Kenji Suzuki, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata Determination of serum BRAK/CXCL14 level in healthy volunteers. LabMed **41(8)**: 478-482 2010

6) Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R. Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation *in vivo*. Biomedical Research **31**: 199-206, 2010

7) Izukuri K., Suzuki K., Yajima N., Ozawa S., Ito S., Kubota E., Hata R. Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. Transgenic Research **19(6)**: 1109-17 2010

8) Shigeyuki Ozawa, Shin Ito, Yasumasa Kato, Eiro Kubota, Hata R. Human p38delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. Biochem Biophys Res Commun **396(4)**: 1060-1064 2010

9) Komori R., Ozawa S., Kato Y., Shinji H., Kimoto S, Hata RI. Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. Biomedical Research **31(2)**: 123-31 2010 (Received, International Association of Dental Research (IADR) Hatton Travel Award)

10) Sato K., Ozawa S., Kato Y., Hata R. Expression of tumor-suppressing chemokine BRAK/CXCL14 reduces cell migration rate of HSC-3 tongue carcinoma cells and stimulates attachment to collagen and formation of elongated focal adhesions *in vitro*. Cell Biology Int. **348(5)**: 513-22 2010.

[学会発表] (計 16 件)

[特別講演]

畑 隆一郎 BRAK に魅せられて. 第 42 回結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 秋田、2010 8. 19-8. 20.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特願 2010-150125

畑 隆一郎

癌転移抑制剤及び医薬組成物

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神奈川歯科大学・特任教授 畑 隆一郎

(2) 研究分担者

神奈川歯科大学歯学部・助教 居作和人

(3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月7日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：分子イメージングによる組織幹細胞可視化法の開発

研究代表者：財団法人癌研究会癌研究所 部長 原 英二

## 研究成果の概要：

幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている Bmi-1 とその標的分子である p16<sup>INK4a</sup> との関係解明を目指した。p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現イメージングマウスと Bmi-1 ノックアウトマウスとを交配させることにより、Bmi-1 遺伝子を欠失させた場合に p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現動態がどのように変動するかを調べた。その結果、Bmi-1 遺伝子が欠失したマウスにおいては生後間もない時期から体の殆ど全ての組織において p16<sup>INK4a</sup> の発現が著しく上昇することを見出し、様々な組織において p16<sup>INK4a</sup> の発現が Bmi-1 によって抑制されていることが明らかとなった。また、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子及び p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 遺伝子の両遺伝子を欠失したダブルノックアウトマウスにおいては未分化性の維持に重要な Oct3/4 遺伝子の発現が高い皮膚癌が発生し安くなることを見出し、p16<sup>INK4a</sup>/p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 経路の下流に Oct3/4 が存在している可能性が示唆された。そこで、Oct3/4 遺伝子の発癌及び老化における役割を明らかにするために Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスの作成を試み、成功した。

研究分野：がん生物学

キーワード：p16<sup>INK4a</sup>, Bmi-1, 可視化、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞に発癌の危険性のある異常が生じると、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子や p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 遺伝子の発現レベルが上昇し、細胞老化が誘導される。細胞老化は異常細胞の増殖を防ぐ重要な癌抑制機構として働いている一方で、組織幹細胞において細胞老化が起こると生体機能の衰え、即ち個体老化を起こすことが明らかになりつつある。これまで主に培養細胞を用いた研究から p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現はポリコム・グループ転写因子の一つである Bmi-1 により精密に制御されていることが示されてきた。しかし、発癌や個体老化の過程において Bmi-1 が生体内のどこで、いつ、どのように p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現を制御しているのかについては殆ど明らかにされていない。

これらの問題を解決するために我々は一昨年度から金沢大学がん研究所の平尾 敦教授との共同研究を進めてきた。p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現をインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスを作成し、更に Bmi-1 遺伝子ノックアウトマウスと交配させることで生体内における Bmi-1 による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現調節様式を解析するためのシステムの構築が完了しつつある状況で

あった。

また、幹細胞性の維持に重要な役割を果たしている Oct3/4 遺伝子の発現を蛍光及び発光の両方で可視化出来るマウスの必要性も生じていた。

## 2. 研究の目的

発癌や個体老化の過程において Bmi-1 が生体内のどこで、いつ、どのように p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現を制御しているのかを明らかにするために Bmi-1 遺伝子の発現と p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現をマウスの生体内でリアルタイムに測定できるイメージングマウスの開発を行ってきた。本年度はこれらのマウスに加えて幹細胞性の維持に重要な働きをしていることが知られている Oct3/4 遺伝子の発現を発光および蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るマウスモデルの開発を行い、それらのマウスモデルを組み合わせることで様々な組織幹細胞又はがん幹細胞における幹細胞性の獲得、維持又は喪失がどのような関係で起こるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 昨年度までに作成した p16<sup>INK4a</sup> 可視化マウスと Bmi-1 ノックアウトマウスを交配させることで、Bmi-1 を欠損した p16<sup>INK4a</sup> 可視化マウスを作成した。このマウスにおける p16<sup>INK4a</sup> の発現動態を発癌過程や加齢の過程で解析することにより、生体内での Bmi-1 による p16<sup>INK4a</sup> の発現調節様式を解析した。
- (2) 上記の Bmi-1 を欠損した p16<sup>INK4a</sup> 可視化マウスを用いた解析により Bmi-1 が生体内のどの組織で、いつ、p16<sup>INK4a</sup> の発現を制御しているかを調べ、次に Bmi-1 と p16<sup>INK4a</sup> の両方を欠損したマウスを用いた解析と組み合わせることで Bmi-1 による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現制御の役割を解析した。
- (3) Oct3/4 遺伝子プロモーターの下流に GFP と luciferase の融合タンパクをコードする遺伝子を導入したマウスを作製し、Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るマウスの作製を試みた。

### 4. 研究成果

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現イメージングマウスと Bmi-1 ノックアウトマウスを交配させ、Bmi-1 遺伝子を欠失した状態で p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現をイメージング出来るマウスの作製に成功した。更にそのマウスを用いて生体内のどの臓器において p16<sup>INK4a</sup> の発現が Bmi-1 によって制御されているのかを解析した結果、興味深いことに、生後間もない状態から殆ど全ての臓器や組織において p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が著しく上昇していることを見出した。また、一部の組織においては加齢とともに p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が更に上昇することを見出した。これらの結果から、Bmi-1 は生体内の殆ど全ての臓器や組織において p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現を負に調節しているが、加齢の過程では Bmi-1 非依存的なメカニズムによっても p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が正に調節されていることを示唆する結果も得られた。

また、興味深いことに、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子及び p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 遺伝子の両方を欠失したダブルノックアウトマウスにおいては未分化性の高い皮膚癌が発生しやすくなり、その皮膚癌においては Oct3/4 遺伝子の発現が著しく高くなることを見出した。

更に、Oct3/4 遺伝子の発癌及び老化における役割を明らかにするために Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスの作成を試み、成功した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kitajima, S., Miki, T., Takegami, Y., Kido, Y., Noda, M., Hara, E., Shamma, A. & Takahashi, C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interferes with epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. *Oncogene* 30, 737-750 (2011)

2. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.* 70, 9381-9390 (2010)

[学会発表] (計 7 件)

1. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Imai, Y., Ohtani, N. & Hara, E.

DNA damage dependent degradation of histone methyltransferase in cellular senescence. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.) 2010 年 9 月 28 日-10 月 2 日

2. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.) 2010 年 9 月 28 日-10 月 2 日

3. 田島丈子、杉田千鶴、近江谷克祐、中尾和貴、柳茂、深見希代子、原 英二、大谷直子 蛍光・発光融合プローブを用いた Oct4 遺伝子イメージングシステムの開発  
日本分子生物学会・日本生化学会合同年会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日

4. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Ohtani, N., & Hara, E.

Backup tumor suppressor role for p16<sup>INK4a</sup> in the event of p53 inactivation  
日本分子生物学会・日本生化学会合同年会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日

5. 今井良紀、高橋暁子、八尾良司、大谷直子、広田 亨、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、原 英二

細胞老化において発癌を促進する因子の探索  
日本癌学会（大阪）2010年9月22日～24日

6. Eiji Hara

Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging

Asian aging core for longevity research (Jeju, Korea) 2010年8月22日～24日

7. 原 英二

細胞老化の分子メカニズムとその役割

日本炎症・再生医学会（東京）

2010年8月5日～6日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

財団法人癌研究会癌研究所・部長 原 英二

(2) 研究分担者

財団法人癌研究会癌研究所・主任研究員

大谷直子

財団法人癌研究会癌研究所・研究員

高橋暁子

財団法人癌研究会癌研究所・嘱託研究員

山越貴水

財団法人癌研究会癌研究所・嘱託研究員

吉本 真

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月22日提出

対象研究テーマ：in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：SMS抑制による細胞死誘導セラミド・シグナル増強を介したATM遺伝子欠損マウスにおけるリンパ腫発症機構の制御

研究代表者：鳥取大学医学部 教授 岡崎俊朗

研究成果の概要：

ataxia telangiectasia mutated (ATM)遺伝子欠損による腫瘍発生時のセラミド・シグナルの関与を申請し検討した。ATM欠損マウスにp16/Ink4a欠損マウスを交配することでダブルKOマウスを作成し悪性リンパ腫発生を試みたが、発生効率が非常に低く、このダブルKOMマウスにSMS1-KOマウスを掛け合わせて、トリプルKOMマウスを作成することが困難なことが判明した。その後、マウス腫瘍発生モデルとしてRb遺伝子欠損マウスにおいて、効率的に腺癌が発症するモデルを作成できたため、今後、このマウスの系に関してSMS1欠損マウスを掛け合わせることで、セラミド産生の抑制が誘導され腺癌腫瘍細胞の増大を阻害できるかについて検討したい。

研究分野：脂質生化学 癌増殖抑制

キーワード：スフィンゴミエリン セラミド ATM

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質セラミドは細胞死誘導脂質として、細胞膜の解剖学的成分として機能するのみでなく細胞機能を制御するメディエーターであることが、Hanuun並びに岡崎らのグループにより初めて報告された (Okazaki T., et al. *J. Biol. Chem.*, 264: 19076-19080, 1989)。

一方、ataxia telangiectasia mutated (ATM)遺伝子はATの原因遺伝子として同定され、その欠損はDNA二重鎖切断(DSBs)を中心とするDNA損傷の修復機構の破綻を生じることが知られている。放射線によりATM欠損細胞は細胞死誘導を亢進し、その際にセラミド・シグナルが活性化することが報告され、そのセラミド量増加機構としてATMによるセラミド産生酵素(CS)抑制の解除が示されている(Oncogene (2003) 22, 8645-8652)。しかしながら、腫瘍増殖におけるATMを介したセラミド制御については不明の点が多い

## 2. 研究の目的

今回、より病態モデルに近づいてATMと細胞死誘導セラミド・シグナルの関係につい

て解析するために、セラミド産生抑制効果のあるSMS欠損状態がATM/INK4a欠損マウスにおける悪性リンパ腫発症を抑制できるかについて検討し、その分子機構についてはATM/INK4a欠損マウス胎児線維芽細胞(MEF)を用いてATMの下流シグナルにおけるセラミド産生機構(SMSやCS)の制御について解析する

## 3. 研究の方法

(1) ATMノックアウトマウスの作成とその表現型

(2) p16/Ink4a欠損マウスの作成とその表現型

(3) ATM-p16/Ink4aダブルノックアウトマウスの作成とその予想表現型

これらの知見と予測から、細胞老化とDNA損傷応答の双方が抑制されるp16/Ink4a-ATMダブルノックアウトマウスでは、ATM欠損が原因となる胸腺リンパ腫の頻度が上昇し、悪性度も高まると予想している。結果として、このマウスは、悪性リンパ腫発症のモデルマウスとしての応用が期待される。

(4) SMS1, 2KOマウスとp16/Ink4a-ATM

ダブルノックアウトマウスのトリプル KO マウスの作成と悪性リンパ腫発症における SMS 欠損によるセラミド産生増強の影響

(5) p16/Ink4a-ATM ダブルノックアウトマウス由来 MEF を用いてセラミド産生機構の分子制御

#### 4. 研究成果

ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子欠損による腫瘍発生時のセラミド・シグナルの関与を申請し検討した。ATM 欠損マウスに p16/Ink4a 欠損マウスを交配することでダブル KO マウスを作成し悪性リンパ腫発生を試みたが、発生効率が非常に低く、このダブル KO マウスに SMS 1-KO マウスを掛け合わせて、トリプル KO マウスを作成することが困難なことが判明した。今後、異なる遺伝子改変マウスを用いて腫瘍形成を促進して、その条件似おいて、SMS-KO によるセラミドシグナル増加が腫瘍増生抑制に寄与するかについて検討することが必要と思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Elodie Lafont, K. Kitatani, Bruno Ségui and Okazaki T. Regulation of death and growth signal on the plasma membrane by sphingomyelin synthesis in hematological malignancy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2010 in press

Huang C.R., Jin Z., S., Dong L., Tong X., P, Yue S., Kaminami T., Sawaki T., Sakai T., Miki M., Iwao H., Nakajima A., Masaki Y., Fukushima Y., Tanaka M., Fujita Y., Nakajima H., Okazaki T. and Umehara H. Cisplatin Augments FAS-mediated Apoptosis through Lipid Rafts. *Anticancer Res.* 30: 2065-2072, 2010

Fujiwara K., Kitatani K., Fukushima K., Yazama H., Kikuchi M., Igarashi Y., Kitano H., and Okazaki T. Inhibitory effects of dietary glucosylceramide on squamous cell carcinoma of the head and neck in NOD/SCID mice. *Int. J. Clin. Oncol.* DOI: 10.1007/s10147-010-0141-y, 2010

Lafont R., Milhas D, Carpentier S, Garcia V, Jin Z.X., Umehara H., Okazaki T.

Schulze-Osthoff K., Levade T., Benoist H. and Ségui B. Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FASL-triggered cell death. *Cell Death Diff.* 17(4):642-54, 2010

[学会発表] (計 2 件)

Okazaki T., SMS1, but not SMS2, regulates intracellular traffic and recycling pathway in cell death and proliferation. Gordon Conference, Glycolipid and sphingolipid, Ventura, USA, Feb. 6-10, 2010 (invited)

Okazaki T., Abo Bakr Abdel Shakor, Taniguchi M., Asano S., Hashimoto M, Sasaki E., Umehara H. and Kitatani K. Sphingomyelin and cellular trafficking: role of sphingomyelin synthase 1 (SMS1) in the transferrin itinerary and the proliferation of lymphoma cells. The 27<sup>th</sup> Naito Conference, Sapporo, Japan, Jun 29-July 2, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

小野薬品工業 (株) との共願

「sphingomyelin synthase 阻害剤の拘束スクリーニング法」

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥取大学医学部・教授 岡崎俊朗

(2) 研究分担者

鳥取大学医学部・助教 北谷和之

鳥取大学医学部・研究員 谷口真

鳥取大学医学部・研究員 橋本真由美

鳥取大学医学部・研究員 浅野智志

(3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月26日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：転写因子 Runx3 の胃がん発がんの分子機序における役割

研究代表者：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授 伊藤公成

研究成果の概要：

Runx3 遺伝子欠損マウスの胃上皮と、Runx3 遺伝子欠損マウスから樹立した胃上皮細胞株を解析した結果、胃がん発がん過程には、Runx3 の不活性化によって惹起される Wnt のがん化シグナルが必須で、その過程で Cdx2 の発現が誘導され、胃上皮細胞に腸型化がもたらされるものと考えられた。ヒト胃がん検体より見出された RUNX3 の点変異体 RUNX3(R122C)は、 $\beta$ -catenin/TCFs と相互作用できず、Wnt のがん化シグナルを抑制できない変異体であることが判明した。

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：RUNX3、胃がん、Wnt 経路、Cdx2、SPEM

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 RUNX3 は胃がんにおけるがん抑制遺伝子であり、「がん抑制シグナル伝達系」と呼ばれる TGF- $\beta$ /BMP シグナル伝達系の下流で、転写因子として機能することが知られている。これまでに研究代表者は、Runx3 遺伝子欠損マウスおよびヒト臨床検体を用いて、その胃がんにおけるがん抑制遺伝子としての機能を解析し報告してきた。研究代表者は最近になって、腸がんの解析から新たな RUNX3 の作用機序を報告した。すなわち、RUNX3 は、 $\beta$ -catenin および TCFs と直接結合し、その 2 量体の DNA 結合能を阻害することによって、Wnt のがん化シグナルを負に制御する因子であることが判明した。これらの解析結果から、多くのヒトがんにおいて共通してみられる発がんの作用点、すなわち、「がん抑制シグナル伝達系」である TGF- $\beta$ /BMP シグナルと、「がん化シグナル伝達系」である Wnt シグナルの「接点」で、RUNX3 はがん抑制遺伝子として機能していることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

胃がんが、どの細胞からどのように出現してくるのかは未だ不明である。研究代表者の所有する Runx3<sup>-/-</sup>マウスの胃を経時的に詳細に観察すると、SPEM (Spasmolytic Polypeptide Expressing Metaplasia) と呼ばれる、

ヒト胃がんおよびマウス胃がん発がんモデルで特徴的な前がん病変が出現していた。さらに化学発癌剤 *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を低濃度で投与すると、野生型マウスでは発がんが観察されなかったが、Runx3<sup>-/-</sup>マウスでは、SPEM を呈する細胞群のある種の細胞ががん化して、粘膜筋板を越えて筋層にまで浸潤した。低濃度 MNU 投与 Runx3<sup>-/-</sup>マウスの胃に出現した「胃がんの発生母地」と思われる細胞群を詳細に解析した結果、以下のことが判明した。

1. 発生母地は SPEM を呈する細胞である。
2. 腸上皮分化のマスターレギュレーターである Cdx2 を発現する。
3. Wnt シグナルの典型的なターゲット遺伝子の発現が亢進している。

そこで本研究の目的は、胃がん発がん過程における、Runx3 の不活性化がもたらす Wnt シグナルの亢進の重要性を、マウスモデルおよびマウス胃上皮細胞を用いて検証することとした。

## 3. 研究の方法

マウスの胃上皮から樹立した Runx3<sup>+/+</sup>および Runx3<sup>-/-</sup>胃上皮細胞 (GIF 細胞) を用いて、Wnt のがん化シグナルの重要性を、ヌードマウス皮下における造腫瘍性にて評価した。さらに Cdx2 の発現調節機構を解析する目的で、レポーターアッセイ、ChIP アッセイを行い、Wnt シグナルと Runx3 による Cdx2 調節機

構を解析した。研究代表者らがヒト胃癌検体より見出した RUNX3 の点変異体 RUNX3(R122C)の意義を、同じく GIF 細胞を用いて検討した。

加えて、胃上皮で Wnt シグナルを特異的に亢進させるマウスラインと Runx3 遺伝子欠損マウスを交配し、胃癌発がん過程における、Runx3 の不活性化と Wnt のがん化シグナルの重要性を、マウスレベルで検証することにした。

#### 4. 研究成果

GIF細胞を用いて検討した結果、以下の事実が判明した。

1. Cdx2のプロモーターにはTcfs結合部位が存在し、Wntの活性化によりβ-catenin/Tcfs依存的にCdx2の発現が誘導される。

2. Runx3は、β-catenin/TcfsのDNA結合能を阻害することによって、間接的にCdx2の発現を抑制する。

3. Runx3<sup>-/-</sup>GIF細胞は、ヌードマウス皮下において造腫瘍性を有するが、その造腫瘍性は異所的に発現が亢進したCdx2によるものではない。

4. Runx3<sup>-/-</sup>GIF細胞の造腫瘍性は、Wntのがん化シグナルに依存する。

5. RUNX3 (R122C) は、β-catenin/TCFsと相互作用できず、Wntのがん化シグナルを抑制できない。

これらの解析結果から、Runx3 の不活性化による前がん病変の出現とそこからの胃癌発がん過程には、Runx3 の不活性化によって惹起される Wnt のがん化シグナルが必須で、その過程で Cdx2 の発現が誘導され、胃上皮細胞に腸型化がもたらされると結論づけた。

そこで、これらの機構の重要性をさらに検証する目的で、Runx3 遺伝子欠損マウスと、胃上皮で Wnt シグナルを特異的に亢進させるマウスライン、K19-Wnt1 マウスおよびK19-Wnt1/C2mE マウスの交配を開始し、それらの胃上皮病変の観察を開始したところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

Ito, K., Chuang, L.S.H., Ito, T., Chang, T.L., Fukamachi, H., Salto-Tellez, M., Ito, Y.  
Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach.  
*Gastroenterology* (2011) in press

Ito, K.

RUNX3 in oncogenic and anti-oncogenic signaling in gastrointestinal cancers.

*Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 1243-1249 (2011)

[学会発表] (計2件)

Ito, K., Chuang, L.S.H., Ito, Y. RUNX3(R122C) does not attenuate oncogenic Wnt in gastric epithelial cells.

International RUNX 2010 Meeting, July 11, 2010.

伊藤公成、深町博史、伊藤嘉明

「がん抑制遺伝子 RUNX3 の点変異体 RUNX(R122C)は、胃上皮細胞において Wnt によるがん化シグナルを抑制できない」  
第 69 回 日本癌学会学術総会  
2010 年 9 月 23 日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
伊藤公成

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月21日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：スーパークルクミン誘導体を用いた胃がんの治療、予防法の開発に関する基礎的検討

研究代表者：秋田大学大学院医学系研究科 教授 柴田浩行

## 研究成果の概要：

新規クルクミン誘導体を合成し、抗腫瘍活性を指標にスクリーニングした。GO-Y030, 031, 078などに強い抗腫瘍活性が認められた。それらはNF- $\kappa$ Bなどを介してCOX2の発現を阻害した。*in silico*のADME予想から、*in vivo*における抗腫瘍活性の増強が示唆されたが、GO-Y078は実際、胃がんの癌性腹膜炎モデルで生存期間の延長を認めた。また、マウスにおける毒性について評価した。胃がんモデルにおけるGO-Y031の抗腫瘍活性について解析を行っている。

研究分野：新規抗腫瘍性薬剤の開発

キーワード：クルクミン、COX2

### 1. 研究開始当初の背景

食用されるウコンに含まれるクルクミンは、多くの癌関連分子を制御する分子標的化合物である。その多機能性と低毒性は抗腫瘍性化合物としてのポテンシャルが高い。しかし、吸収が悪いなど生体内有用性が低く、臨床応用に問題を有する。そこでクルクミンの誘導体を新たに合成し、抗腫瘍活性が増強した化合物をスクリーニングし、臨床応用可能な誘導体の創薬を目指している。これまでに100種類近い誘導体をスクリーニングし、新たに数種類の活性が増強された誘導体（スーパークルクミン）を見いだしている。

### 2. 研究の目的

*in vitro*で抗腫瘍活性の増強が認められたスーパークルクミンについて、標的分子制御メカニズムや生体内での抗腫瘍活性について検証を行う。

### 3. 研究の方法

スーパークルクミンの抗腫瘍活性について *in silico*でADMEを予測し、動物モデルを用いた *in vivo*の検証を行う。とくに大島教授らが樹立した胃がんモデルマウス *K19-Wnt1/C2mE* マウスを用いて胃がんの発生、進展に与える影響を解析する。

スーパークルクミンを投与した *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がんについて免疫組織化学的な解析を行い、標的分子制御が行われているかについて検証する。

スーパークルクミンの安全性についても

併せて評価する。

### 4. 研究成果

GO-Y030, 031, 078などの誘導体は *in vitro*の抗腫瘍活性の増強が認められ、とくにGO-Y078は水溶性も改善しており、胃がんの癌性腹膜炎モデルで生存期間の延長を示した。GO-Y030はNF- $\kappa$ Bなどの阻害活性を介してCOX2の発現を阻害することが示された。*K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がん抑制については解析中である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Sato A, Kudo C, Yamakoshi H, Uehara Y, Ohori H, Ishioka C, Iwabuchi Y, Shibata H. Curcumin analog GO-Y030 is a novel inhibitor of IKKB that suppresses NF- $\kappa$ B signaling and induces apoptosis. *Cancer Sci.* 2001, 102, 1045-51.

2. Kochi M, Ichikawa W, Meguro E, Shibata H, Fukui T, Nagase M, Hoshino Y, Takeuchi M, Fujii M, Nakajima T.

[学会発表] (計8件)

1. 第107回日本内科学会総会・講演会, 2010年4月10日, ポスター発表, 柴田浩行, 大塚和令, 秋田大学医学部における臨床腫瘍

学教育への取り組み

2. 第15回日本緩和医療学会学術大会, 2010年6月18日, ポスター発表, 廣川 誠, 丸山起誉幸, 片寄喜久, 佐藤圭子, 豊島 至, 柴田浩行, 医学生に対する悪い知らせのコミュニケーション・スキルの教育とその効果に関する検証
3. 第14回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2010年7月8日, ポスター発表, 近藤久恵, 室井 誠, 山越博幸, 叶 直樹, 柴田浩行, 岩濑好治, 長田 裕之  
2D-DIGEを用いたプロテオーム解析によるクルクミンの標的分子同定
4. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月24日, 一般口演, Kudo, C., Yamakoshi, H., Sato, A., Ohori, H., Ishioka, C., Iwabuchi, Y., Shibata, H. Novel curcumin analogs have anti-tumor potentials against myeloma cells through the suppression of IRF4/MUM1 function.
5. 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月28日, 加藤俊介, 森 隆弘, 柴田浩行, 下平秀樹, 角道祐一, 大塚和令, 高橋 信, 高橋雅信, 大塚久詔, 秋山聖子, 佐々木 徹, 古山美智子, 本間とし子, 原沙絵, 石岡千加史, 東北大学病院腫瘍内科のセカンドオピニオン外来の現状と役割
6. 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月29日, 本山 悟, 丸山起誉幸, 宇佐美修悦, 大西洋英, 神 万里夫, 眞嶋浩聡, 松橋 保, 安倍 明, 石山公一, 古賀 誠, 柴田浩行, 大塚和令, 比内雄大, 小川純一、秋田大学病院食道癌 Cancer Board の現状と課題
7. 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月30日, 大塚和令, 南條 博, 宮澤秀彰, 打波 宇, 吉岡政人, 渡辺 剛, 阿部ゆき, 山本雄造, 柴田浩行, 個別症例における大腸癌原発巣/転移巣別のEGFRシグナル伝達系遺伝子変異の解析
8. 第135回東北大学加齢医学研究所集談会, 2011年1月28日, 工藤千枝子, 山越博幸, 大塚久詔, 佐藤温子, 石岡千加史, 岩濑好治, 柴田浩行, 新規クルクミン類縁体による抗腫瘍効果の増強とそのメカニズムの検討

[図書] (計4件)

1. 柴田浩行, 消化器がん治療最前線—秋田大学医学部の挑戦、秋田魁新報社, 2010.

4. 28.

2. 柴田浩行, 消化器がん治療最前線—秋田大学医学部の挑戦 「秋田県消化器がんフォーラム」秋田魁新報社, 2010. 4. 28., pp127-139.
3. 柴田浩行, 50音順・商品名でひける治療薬事典 (分担執筆), 総合医学社, 2010. 6. 30.
4. 柴田浩行, EBM がん化学療法・分子標的治療法 2011-2012 (分担執筆), 中外医学社, 2010. 11. 1. pp11-15.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田大学大学院医学系研究科・教授  
柴田浩行

(2) 研究分担者

東北大学大学院薬学研究科・教授 岩濑好治  
東北大学大学院薬学研究科・助教 上原芳彦

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月25日提出

対象研究テーマ：Wntをはじめとするがん化シグナル制御の分子機構

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：増殖因子シグナルの破綻が導くがん化シグナル制御の分子機構

研究代表者：熊本大学発生医学研究所 助教 鈴木堅太郎

研究成果の概要：

Wnt/b-catenin シグナルをマウス胎児皮膚で特異的に活性化させる (K5cre Catnb<sup>(ex3)fl/+</sup>マウス) と、EMT 亢進の指標である E-cadherin の発現低下がみられるが、がんの発生には至らない。K5cre Catnb<sup>(ex3)fl/+</sup>マウスの皮膚を用いて、EMT に関与する遺伝子の発現変化をマイクロアレイにより網羅的に調べた結果、Snail など EMT マーカーの発現が亢進している一方、Wnt/b-catenin シグナルのアンタゴニストの発現亢進および Tgfb シグナルの活性化が起こっていることがわかった。組織 in situ、免疫染色でこれらの発現を調べたところ、真皮層で発現が亢進していた。Tgfb シグナルは EMT に対し抑制的に働くことでも知られている。本研究より、胎児皮膚形成過程において Wnt/b-catenin シグナルが活性化するとそれを抑制するシグナルカスケード (ネガティブフィードバック機構) も同時に活性化され、この機構の存在が胎児器官においてがんが発生しにくい理由の1つである可能性が示唆された。

研究分野：器官発生学

キーワード：増殖因子、Wnt/・-catenin、EMT、発癌

## 1. 研究開始当初の背景

胎児器官形成期において上皮-間葉相互作用なくして器官を形成することはできない。がん発生過程においてもがん細胞 (上皮系細胞) とその周辺を取巻く微小環境 (間葉系細胞) との相互作用が重要である。また胎児器官形成とがん発生には細胞増殖の亢進や EMT (上皮間葉転換) など共通のプロセスを有している。しかし、胎児器官形成過程においてがんが発生することは極めて稀である。なぜ、胎児器官ではがんは発生しにくいのか? 胎児器官形成過程にはがんの発生を抑制するメカニズムがドミナントに機能している可能性が考えられる。これまでのがん発生に関する研究は、培養細胞系や様々な遺伝子改変マウスを作製しアダルトでの解析が中心であった。これまでとは異なった切り口すなわち発生生物学的観点から、その発生メカニズムを捉えることにより、新たな知見が得られることが期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

K5cre Catnb<sup>(ex3)fl/+</sup>マウスの皮膚において、EMT のポジティブ因子の他に発現が亢進している遺伝子を同定するとともに、その発現変化を、組織 in situ、免疫染色で調べる。

## 3. 研究の方法

K5cre Catnb<sup>(ex3)fl/+</sup>マウスの皮膚を用いて、発現が変化している遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に調べた。発現に変化があった遺伝子について、さらに発現細胞および発現変化を組織 in situ、免疫染色で確認した。

## 4. 研究成果

K5cre Catnb<sup>(ex3)fl/+</sup>マウスの皮膚では、真皮層における Tgfb シグナルの活性化および Wnt/b-catenin のアンタゴニストの発現が亢進していることがわかった。Tgfb シグナルは EMT に対し抑制的に働くことでも知られている。つまり胎児器官形成過程において、Wnt/b-catenin シグナルが活性化するとそれを抑制するシグナルが誘導されるというネガティブフィードバック機構が存在している可能性が示唆された。さらに本研究の結果は、Wnt/b-catenin シグナルが癌抑制因子としても機能しうる可能性を示唆していると思われる。現在、Tgfb の特異的レセプターとのダブルコンパウンド遺伝子改変マウス、さらに Wnt/b-catenin のアンタゴニストとのダブルコンパウンド遺伝子改変マウスをそれぞれ作成し、発現が亢進した意義について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Omori A., Harada M., Ohta S., Villacorte M., Sugimura Y., Shiraishi T., Suzuki K., Nakagata N., Ito T., Yamada G.

Epithelial Bmp (Bone morphogenetic protein) signaling for bulboethral gland development; A mouse model for the congenital syndromes of cystic dilation. *Congenital Anomalies*, in press (2011)

Ohta S., Yukiko O., Suzuki K., Kamimura M., Tachibana K., Yamada G.

Sonoporation for gene transfer into embryos.

*Cold Spring Harb Protoc.* in press (2011)

Villacorte M., Suzuki K., Hayashi K., de Sousa Lopes SC., Haraguchi R., Taketo MM., Nakagata N., Yamada G.

Antagonistic crosstalk of Wnt/beta-catenin /Bmp signaling within the Apical Ectodermal Ridge (AER) regulates interdigit formation.

*Biochem Biophys Res Commun.* 391(4):1653-1657 (2010)

〔学会発表〕(計1件)

第50回日本先天異常学会学術集会

「胎児皮膚分化決定過程におけるマスターレギュレーターとしてのWnt/beta-cateninシグナリング」

鈴木堅太郎、山口裕史、Villacorte Mylah、秋山真志、清水宏、武藤誠、中瀧直己、築山忠維、Yamaguchi Terry、Birchmeier Walter、加藤茂明、山田源

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本大学発生医学研究所・助教 鈴木堅太郎

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月5日提出

対象研究テーマ：MT1-MMPの機能解析と分子標的治療法の開発

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：悪性脳腫瘍におけるMT1-MMPとCD133との相互作用の解析

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域医学系 助教 中田光俊

## 研究成果の概要：

本研究では、CD133をマーカーとする幹細胞様グリオーマ細胞の高い浸潤能を規定する分子を探索した。グリオーマ組織中のCD133陽性細胞において普遍的にMT1-MMPとintegrin  $\alpha 3$ が高発現していることを見出した。ヒト膠芽腫組織において、浸潤グリオーマ細胞にMT1-MMPとintegrin  $\alpha 3$ の局在を認めた。Integrin  $\alpha 3$ の発現とグリオーマ細胞の浸潤能は正の相関を示し、その下流のシグナルとしてextracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2が示された。integrin  $\alpha 3$ はERK1/2の活性を介して幹細胞様グリオーマ細胞の遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ、幹細胞、浸潤、MT1-MMP、integrin

### 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は浸潤性増殖が顕著で、手術で全部摘出することは不可能である。悪性神経膠腫の治療開発を考える場合、浸潤に寄与する分子の同定は必須と考えられる。一方で近年、悪性神経膠腫に内在する腫瘍幹細胞が分離され脳腫瘍研究領域が新たな局面を迎えている。悪性神経膠腫幹細胞は脳内への浸潤能が極めて高くかつ放射線、抗がん剤に抵抗性を示すため、これが腫瘍再発の原因になっていると推測される。悪性神経膠腫幹細胞の浸潤メカニズムを明らかにすることは悪性脳腫瘍の治療開発を行う上で急務であると言える。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性神経膠腫において、腫瘍幹細胞を分離抽出し浸潤能に関与する分子の探索を行い、候補分子の機能解析を行うとともに腫瘍組織における発現と局在を検討し、真の浸潤関連分子を同定することから治療標的分子を探ることにある。

### 3. 研究の方法

本研究では、グリオーマ細胞株および手術検体を使用し、neurosphere法およびCD133陽性細胞磁気分離法により幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を得た。グリオーマ細胞株および手術検体よりCD133陽性細胞と陰性細胞とを分離し、定量的RT-PCRを行うことで、CD133陽性細胞において普遍的に発現してい

る幹細胞様グリオーマ細胞浸潤関連分子の同定を試みた。次に免疫組織学的にヒトグリオーマ組織における候補分子の発現を検討した。複数のグリオーマ細胞株を用いて候補分子が細胞の遊走・浸潤能、および増殖能に与える影響を検証し、そのメカニズムを検討した。候補分子の細胞遊走・浸潤を亢進させるメカニズムを解明するために下流のシグナル伝達を解析した。

### 4. 研究成果

グリオーマ手術検体並びに細胞株より幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を抽出し、その集団の接着分子に関し検討を行うことにより幹細胞様グリオーマ細胞の特徴の一端として下記の2点を明らかにした。

1. CD133陽性細胞磁気分離法により得た幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団では、全ての細胞種においてCD133陰性細胞分画と比較しMT1-MMPとintegrin  $\alpha 3$ のmRNAの発現が高かった。
2. ヒトグリオーマ組織において浸潤グリオーマ細胞および、幹細胞様グリオーマ細胞がプールの存在するとされる腫瘍血管周囲に存在するグリオーマ細胞にintegrin  $\alpha 3$ の局在を認めた。

続いてグリオーマ細胞株を用いintegrin  $\alpha 3$ の遊走・浸潤・増殖能を検討し、さらにそのシグナル伝達を解析し下記の3点の知見を得た。

1. Integrin  $\alpha 3$  を強制発現させた全ての細胞の遊走能および浸潤能は有意に亢進し、内因性 integrin  $\alpha 3$  の発現を低下させた細胞では低発現株以外の細胞株において遊走能および浸潤能は有意に低下した。
2. integrin  $\alpha 3$  の発現上昇に伴い細胞増殖能が有意に亢進し、発現量の低下によって増殖能は有意に低下した。
3. Integrin  $\alpha 3$  の発現量を上昇させることで ERK1/2 の活性は上昇し、Integrin  $\alpha 3$  の発現を低下させると ERK1/2 の活性も低下した。

以上より、integrin  $\alpha 3$  は幹細胞様グリオーマ細胞において強く発現し、主として ERK1/2 の活性上昇を介して遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法が模索されている。Integrin  $\alpha 3$  の制御により幹細胞様グリオーマ細胞の浸潤を阻害することで画期的なグリオーマ治療につながる可能性があると考えられる。同様に幹細胞様グリオーマ細胞に高発現する MT1-MMP について、その機能を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada JI. Target signaling pathways in glioma. *Cancers* in press 査読有
2. Misaki K, Nakada M, Mohri M, Hayashi Y, Hamada JI. MGMT promoter methylation and temozolomide response in choroid plexus carcinoma. *Brain Tumor Pathol* Mar 26, 2011 [Epub ahead of print] 査読有
3. Tanaka S, Nakada M, Hayashi Y, Nakada S, Kitamura-Sawada S, Furuyama N, Suzuki T, Kamide T, Hayashi Y, Yano S, Hamada JI. Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma: the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence. *Brain Tumor Pathol* 28:59-64, 2011 査読有
4. Suzuki T, Nakada M, Yoshida Y, Nambu E, Furuyama N, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Hamada JI. The correlation between promoter methylation status and the expression level of  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. *Jpn J*

*Clin Oncol* 41:190-6, 2011 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Hamada JI. Integrin alpha3 is involved in the invasive behavior of glioma stem-like cells. Society for Neuro-Oncology 15th Annual Meeting 2010, November 18-21, 2010, Le Centre Sheraton Hotel (Canada・モントリオール)
2. Nakada M, Hayashi Y, Miyashita K, Kita D, Hayashi Y, Uchiyama N, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Targeting glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in adult recurrent glioblastomas. 7<sup>th</sup> Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, June 10-12, 2010, JW Marriott Hotel (韓国・ソウル)

[図書] (計 1 件)

1. Nakada M, Minamoto T, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. The pivotal role of GSK3 $\beta$  in glioma biology. *Brain Tumor/Book 2*, ed. Miklos Garami, InTech, 2011 in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 脳腫瘍治療用キット及び脳腫瘍治療方法  
 発明者: 中田光俊、源利成、林裕、濱田潤一郎  
 権利者: 金沢大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2010-18569  
 出願年月日: 2010 年 8 月 22 日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢大学医薬保健研究域医学系・助教  
 中田光俊

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月28日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：消化器がんの悪性化におけるがん抑制遺伝子 p53 の役割

研究代表者：国立がん研究センター研究所 研究員 大木理恵子

研究成果の概要：

大島正伸教授が作製した消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究ではこのマウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、胃がんにおいて p53 遺伝子が持つ機能を解明する。p53 喪失により、がんの悪性化が予測されるが、その悪性化にどのような p53 標的遺伝子群が関わるのか、明らかにしたいと考えている。これまでに消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)及び p53 欠損マウスを導入し、現在、マウスの掛け合わせを行っている所である。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：消化器がん、p53、癌の悪性化

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第一位は「癌」であり、癌の克服を目指した研究は大きな社会貢献につながる。分子生物学やゲノム解析の進展を足場に、癌化のメカニズムの解明を目指した癌関連遺伝子(癌抑制遺伝子、癌遺伝子)の研究は大きく進み、多くの重要な遺伝子が明らかにされてきた。しかしながら、肺癌や乳癌のように、研究の比較的進んでいるものでさえ、これまでに明らかにされた遺伝子異常などで説明できるのは一部にとどまっており、大部分のものについては未解決のままである。これからも地道な研究が必要とされるゆえである。

癌抑制遺伝子 p53 は、ヒトの癌で最も高頻度に変異が認められており、p53 による癌抑制機能の解明と p53 研究の癌治療及び診断への応用は、癌克服を考えた上でも、最も重要な到達目標の一つである。p53 は転写因子であり、標的遺伝子を転写誘導することにより、細胞にアポトーシスや細胞周期停止、DNA 修復などを引き起こし、癌化を抑制している。癌では高頻度に p53 の DNA 結合ドメインに変異が検出され、発癌過程において、p53 の転写因子としての機能欠損が重要である事を物語っている。転写因子としての p53 の機能を解明することは癌研究のさらなる進展につながると考え、研究を進めている。

申請者はこれまでに Noxa、Reprimo、AEN や PHLDA3 という新規 p53 標的遺伝子を同定

した。機能未知であったそれぞれの遺伝子の機能を初めて明らかにする事により、p53 がいかにして癌化を抑制するのか明らかにしてきた。p53 機能喪失はがんの悪性化と関わる事が知られるが、その分子的なメカニズムは明らかにされていない。また、特に胃がんにおいて p53 機能喪失がどのような悪性質の獲得につながるのかは未解明である。

## 2. 研究の目的

大島正伸教授が作製した消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究ではこのマウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、胃がんにおいて p53 遺伝子が持つ機能を解明する。p53 喪失により、がんの悪性化が予測されるが、その悪性化にどのような p53 標的遺伝子群が関わるのか、明らかにしたいと考えている。

本研究により、p53 標的遺伝子群の中から、がんの悪性化を抑制する遺伝子を同定する事で、それらの遺伝子を標的とした癌治療や診断への応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

1. 消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)と p53

欠損マウスを掛け合わせる。p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取する。

2. 生じたがん組織を解析し、p53 喪失に伴ったがんの性質の変化を明らかにする。

3. 得られた癌組織より、mRNA を精製し、マイクロアレイ発現解析により、p53 依存性に発現する遺伝子群を同定する。

4. 申請者は、ゲノムワイドな p53 結合部位を ChIP-chip 解析により同定している。そこで、p53 依存性に発現する遺伝子の中から、p53 結合が認められる遺伝子、すなわち p53 の直接の標的遺伝子を同定する。

5. 同定した遺伝子が、胃がんの発生及び悪性化とどのように関わるか解析する。

#### 4. 研究成果

これまでに消化器がんモデルマウス (K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse) 及び p53 欠損マウスを導入し、現在、マウスの掛け合わせを行っている所である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Chikako Ozeki, Tatsuhiro Shibata, Takashi Kohno, Yuichiro Sawai, Koji Okamoto, Jun Yokota, Fumio Tashiro, Seiichi Tanuma, Ryuichi Sakai, Tatsuya Kawase, Issay Kitabayashi, Yoichi Taya and Rieko Ohki<sup>#</sup>. (**#corresponding author**) Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 286, pp. 18251-18260, 2011.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 1 件)

川瀬竜也、大木理恵子 PHLDA3 は新規 Akt 抑制因子であり、癌化を抑制する因子である細胞工学 Special Review, vol. 29, pp. 599-605, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

国立がん研究センター研究所・研究員  
大木理恵子

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月11日提出

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化に関わる新しいがん関連遺伝子の単離

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：ウイルス挿入変異によって同定されたがん関連遺伝子 *Jmjd5* の血液・血管の発生における機能解析

研究代表者：東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員 原 孝彦

研究成果の概要：

リンパ腫瘍のがん関連遺伝子として同定された *Jmjd5* の正常細胞での機能を解析するために、*Jmjd5* の遺伝子改変マウスを用いて研究を行った。*Jmjd5* null マウスでは、胎生 9.5-10.5 日において、成長阻害とともに、卵黄囊の血管新生の異常が認められた。また、卵黄囊、および AGM 領域(Aorta-Gonad-Mesonephros 領域)での造血活性の低下が認められたことから、*Jmjd5* が血液・血管内皮細胞の発生に重要な働きを持つことが明らかとなった。さらに詳細な解析を進めるため、血液・血管内皮細胞特異的 *Jmjd5* 欠損マウス (Tie2-Cre; *Jmjd5*<sup>lox/lox</sup>) の作製に取り組み、これを完了した。

研究分野：分子生物学

キーワード：*Jmjd5*, 造血幹細胞, 血管内皮細胞, 発生

## 1. 研究開始当初の背景

がん発症・悪性化の分子メカニズムを解析するためには、その原因となる遺伝子を同定することが重要である。レトロウイルス感染発がんモデルマウスでは、ウイルスがゲノムへ挿入することで、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の発現異常を引き起こし、がんを発症する。そのため、ウイルス挿入部位を解析することで、原因遺伝子を容易に同定することができる。ウイルス挿入変異の標的として高頻度に同定される宿主因子として、これまでに、ヒストンのメチル化を制御する酵素の多くが同定されてきた。そのうち、*Jmjd5* はヒストン脱メチル化酵素ファミリーの一つである。*Jmjd5* をはじめとするヒストン脱メチル化酵素の正常細胞での機能は未だ不明な点も多いため、その解析を行うことは極めて重要である。

## 2. 研究の目的

白血病・リンパ腫などのがん発生に関わる遺伝子として、AML/RUNX1,SCL/Tal1, Lmo2 などの多くの遺伝子が報告されている。これらの遺伝子は、がんの原因遺伝子となるとともに、血液・血管内皮細胞の分化、発生において、重要な役割を担うことが明らかにされてきた。リンパ腫から同定されたがん関連遺伝子 *Jmjd5* においても、同様の機能を持つ可能性がある。本研究は *Jmjd5* の *in vivo* での血液・血管内皮細胞発生への関与を明らかにす

ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

*Jmjd5* の exon4 を欠失させた *Jmjd5* null マウスは、著しい成長阻害を伴い、胎生 11 日目前後に胚性致死となる。このマウスを胎生 9.5-10.5 日で回収し、卵黄囊や AGM 領域(Aorta-Gonad-Mesonephros 領域)での造血活性をコロニーアッセイやフローサイトメトリーによって検討した。また、*Jmjd5* コンディショナル KO マウスを用いて、血液・血管内皮細胞特異的 *Jmjd5* 欠損マウス (Tie2-Cre; *Jmjd5*<sup>lox/lox</sup>) の作製を試みた。

## 4. 研究成果

*Jmjd5* の exon4 を欠失させた *Jmjd5* null マウスの表現型解析の結果、この欠損マウスは出産されることが無く、胎生 11 日目前後に胚性致死となることが観察された。また、*Jmjd5* null マウスは著しい成長阻害を伴っていた。成長阻害を細胞レベルで解析するために、*Jmjd5* null マウスから、Mouse embryonic fibroblast (MEF)を樹立することを試みたが、樹立することができなかった。しかし、*Jmjd5* 遺伝子座に Neo カセットを持つ *Jmjd5* Neo/Neo マウスは、胚性致死となるものの、それ由来の MEF を樹立することができた。この *Jmjd5* hypomorphic 変異 MEF を用いて解析したところ、細胞増殖能の著しい低下が観察された。

次に、胎生 9.5-10.5 日の *Jmjd5* null マウスを観察したところ、成長阻害と同時に、卵黄膜上の血管網の消失が見られ、血管新生が著しく抑制されていることがわかった。この卵黄嚢から血液細胞を採取し、その造血活性を検討したところ、赤血球コロニーをはじめとする、造血前駆細胞の減少が認められた。また、成体型造血幹細胞が発生することが知られている AGM 領域のコロニーアッセイの結果でも、造血前駆細胞の減少が認められた。

すなわち、*Jmjd5* は血液細胞・血管内皮細胞の共通前駆細胞であるヘマンジオブラストを経由する血液・血管内皮細胞の発生に重要な働きを持つことが示唆された。そのため次に、*Jmjd5* コンディショナル KO マウスと *Tie2-Cre* マウスを掛け合わせ、*Jmjd5* 遺伝子を血液・血管内皮細胞特異的に欠損させる実験を計画した。本年度は、血液・血管内皮細胞特異的 *Jmjd5* 欠損マウス (*Tie2-Cre; Jmjd5<sup>fllox/fllox</sup>*) の作製が完了したので、今後さらに詳細な解析を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, and Hara T. Antibody-assisted enhancement of biological activities of CXCL14 in human monocytic leukemia-derived THP-1 cells and high fat diet-induced obese mice. *Exp. Cell Res.*, **316**, 1263-1270, 2010.

Ohbayashi K, Tanaka K, Kitajima K, Tamura K, and Hara, T. A novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of *cyclin-D2*, *E-cadherin*, and integrin- $\alpha$  family genes in mouse spermatocyte-derived cells. *Genes to Cells.*, **15**, 699-710, 2010.

Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, and Hara T. *In vitro* generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor *Lhx2*. *Blood*, **117**: 3748-3758 2011.

[学会発表] (計 4 件)

Kitajima K, Zheng J, Minehata K, Nakano T, and Hara T. Long-term repopulation of adult hematopoiesis by *in vitro* differentiated blood cells from ESCs/iPSCs by LIM homeobox transcription factor, *Lhx2*. 第 8 回幹細胞シンポジウム, 2010.5.13-15, 淡路島.

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T

and Suzuki T. The role of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis: Analysis of *Jmjd5*-deficient mice. The Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> International Symposium of Institutes Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute. 2010. 6. 金沢.

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T and Suzuki T. The physiological role of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 大阪.

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T and Suzuki T. The physiological function of *Jmjd5*, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 平成 22 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2011. 2. 大津.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員  
原 孝彦

(2)研究分担者

東京都臨床医学総合研究所・主席研究員  
峯畑健一

(3)本研究所担当者

機能ゲノミクス・教授 鈴木健之

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月22日提出

対象研究テーマ：肺がんの分子標的薬耐性機構の解明とその克服に関する研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：骨転移能を有する癌細胞と骨芽細胞の接触による相互作用の検討

研究代表者：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授 上原久典

## 研究成果の概要：

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の相互作用に関しては多くの報告があるが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものであり、癌細胞と骨芽細胞が直接接触することによって起きる相互作用に関しては不明な点が多い。我々はこれまでに溶骨性増殖を示す前立腺癌細胞と骨芽細胞が接触することによって破骨細胞誘導が促進されることを明らかにしてきたが、今回は前立腺癌細胞と骨芽細胞の接触による骨芽細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、不死化したヒト骨芽細胞が PC-3 ヒト前立腺癌細胞と接触することによって脂肪細胞の分化マーカーである FABP4 や PPAR $\gamma$  の発現上昇がみられること、及びマウスの骨芽細胞と PC-3 細胞の接触培養によって骨芽細胞の ALP 活性が低下することが明らかになった。以上より、成熟骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触により骨芽細胞の分化抑制が起こる可能性が示唆された。成熟骨芽細胞骨は骨基質形成に重要な役割を果たすが、前立腺癌細胞はその機能を低下させ、骨を脆弱化することにより浸潤を容易にしている可能性がある。

## 研究分野：癌の転移

キーワード：骨転移、細胞接触、網羅的遺伝子発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

癌の骨転移は重篤な臨床症状を惹起し患者の QOL を低下させる重要な病態である。しかし、そのメカニズムの解明や治療法の確立は十分なされていない。申請者はこれまでにヒト前立腺癌細胞株をヌードマウスの脛骨に接種するモデルを用いて骨転移形成において platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体や epidermal growth factor (EGF) 受容体が関与していること (J Natl Cancer Inst. 2003 95(6): 458-470, Clin Cancer Res. 2003 9(14):5161-5170)、および可溶性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体を用いてプロスタグランジン E<sub>2</sub> を中和することにより、破骨細胞の誘導が阻害され、骨における前立腺癌細胞の増殖が抑制されること (Mol Cancer Ther. 7(9): 2807-16, 2008) を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の相互作用に関しては多くの報告があるが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものであり、癌細胞と骨芽細胞が直

接接触することによって起きる相互作用に関しては不明な点が多い。

我々は昨年度の金沢大学腫瘍内科矢野聖二教授との共同研究において、前立腺癌、肺癌、乳癌などの細胞株を用いて癌細胞と骨芽細胞の直接接触による相互作用を検索するための共培養モデルを確立し、癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、PC3 ヒト前立腺癌細胞では骨芽細胞と接触することによって IL-1 $\beta$ , COX-2, IL-6 など代表的な破骨細胞誘導関連遺伝子の発現が上昇し、これに cadherin-11 が部分的に関与していることが明らかになった。

本研究では上記の共培養モデルを用いて癌細胞との接触による骨芽細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析し、骨での癌細胞の増殖、生存への関与とその機序を明らかにすることを目的とし、これによって骨転移に対する新しい分子標的治療の開発に貢献できると考えられる。

### 3. 研究の方法

1) cDNA マイクロアレイを用いた癌細胞との接触による骨芽細胞の遺伝子発現の網羅的

## 解析

不死化したヒト骨芽細胞(hFOB 1.19) と骨転移巣から樹立されたヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を用い、それぞれの細胞を異なる蛍光色素でラベルした後、cell culture insert を用いた癌細胞と骨芽細胞の二層培養（癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子のみ）、および癌細胞と骨芽細胞を混合して培養する接触培養（癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子と直接接触の2つ）を行った。培養は無血清状態で48時間行い、接触培養については培養終了後にソーティングを行い、骨芽細胞と癌細胞を分離した。コントロールとして単独で培養した骨芽細胞を用いた。

培養終了後に得られた骨芽細胞から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ (Affimetrix 社) を行った。遺伝子発現が3倍以上異なるものを有意とした。アレイの結果は RT-PCR で確認した。

### 2) 癌細胞との接触が骨芽細胞の分化に及ぼす影響

マウス新生児の頭蓋骨から得られた骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で7日間培養し、1) と同様の方法で PC-3 細胞と共培養を行った。

培養終了後に得られた骨芽細胞のライセートを用いて alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。

### 3) Fatty acid binding protein 4 (FABP4) が破骨細胞の骨吸収活性に及ぼす影響

今回行ったマイクロアレイにおいて二層培養と比較して接触培養で最も高い発現上昇率を示したのは FABP4 であった。そこで FABP4 が破骨細胞の骨吸収活性に及ぼす影響について検討した。

実験には PG リサーチ社の骨吸収活性評価キットを用いた。まず、RANKL により破骨細胞に分化することが知られているマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を蛍光標識リン酸化カルシウム固層化プレートに播種し、培地に RANKL (100ng/ml) と FABP4 (0, 1, 10, 100ng/ml) を添加した。7日後に骨吸収作用により培地中に溶出した蛍光を測定した。

## 4. 研究成果

1) ヒト前立腺癌細胞 PC-3 とヒト骨芽細胞 (hFOB 1.19) を用いて二層培養、および接触培養を行い、単独で培養した骨芽細胞をコントロールとした。それぞれの培養システムにおける骨芽細胞の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて比較したところ、単独培養と二層培養間で有意な差は認められなかったが、二層培養と接触培養間では、接触培養で発現が上昇している遺伝子が 12 個あった。一方有意に発現が低下している遺伝子はなかった。最も高い発現上昇を示したのは分化した脂肪細胞に高発現することが知られ

ている FABP4 で 5.02 倍であった。抗 FABP4 抗体を用いてヌードマウス脛骨への PC-3 細胞移植モデルにおける FABP4 発現を検索すると、正常部の骨芽細胞と比べて腫瘍に接する部分の骨芽細胞で FABP4 の発現が高いことがわかった。

2) マイクロアレイでは、FABP4 と同様に脂肪細胞に高発現している PPAR- $\gamma$  も 2.5 倍と発現が上昇していた。骨芽細胞は骨髄間質幹細胞由来だが、この細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への多分化能を有しており、骨芽細胞が分化誘導によって脂肪細胞に変わることが報告されている。われわれは今回の結果から骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触が骨芽細胞の分化に影響を及ぼすのではないかと考え、マウス新生児の頭蓋骨から得られた骨芽細胞と PC-3 細胞との共培養を行った。その結果、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性は単独培養と二層培養間で有意な差は認められなかったが、二層培養と接触培養間では、接触培養で有意に低下することが分かった。

3) FABP4 存在下での骨吸収活性を調べたところ、有意差はなかったが、FABP4 の用量に依存して骨吸収活性が上昇傾向を示した。FABP4 の細胞外での働きについてはほとんどわかっていないが、以前の検討で骨芽細胞との接触培養により前立腺癌細胞においても FABP4 発現が上昇することがわかっており、FABP4 が骨吸収に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されるが、これについてはさらなる検討を要する。

以上より、成熟骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触により骨芽細胞の分化抑制が起こる可能性が示唆された。成熟骨芽細胞骨は骨基質形成に重要な役割を果たすが、前立腺癌細胞はその機能を低下させ、骨を脆弱化することにより浸潤を容易にしている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計1件)

Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K, Uehara H. Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. Br J Cancer. 2011 Feb 1;104(3):505-13.

〔学会発表〕 (計1件)

Hongchao Shan, 上原 久典, 泉 啓介  
Osteoblast differentiation is interferred by direct contact with osteolytic prostate cancer cells 第19回日本がん転移学会学術総会

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部・  
准教授 上原 久典

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野 聖二

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月1日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：消化器がんにおけるCD44の発現意義および治療抵抗性の分子機構

研究代表者：慶應義塾大学医学部 教授 佐谷秀行

研究成果の概要：

癌幹細胞表面マーカーである接着分子 CD44 がシスチントランスポーターxCT と結合することで癌細胞内の活性酸素の蓄積を抑制し、腫瘍の増大と治療抵抗性を促進する分子機構について胃癌自然発症モデル K19-Wnt1/C2mE トランスジェニックマウスを用いて解明した。今回の研究成果により、治療抵抗性を有する CD44 陽性癌幹細胞をターゲットとした新たな治療法の開発が期待できると考えられる。

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：胃癌、癌幹細胞、CD44

## 1. 研究開始当初の背景

CD44 は、乳癌や大腸癌などの固形癌における癌幹細胞の表面マーカーであり、近年胃癌においても CD44 が癌幹細胞表面マーカーとして注目されている。しかしながら、癌幹細胞における CD44 の発現意義およびその機能については、ほとんど明らかにされていない

## 2. 研究の目的

CD44 陽性の胃癌幹細胞に着目し、その性質ならびに CD44 の機能解析を行う。

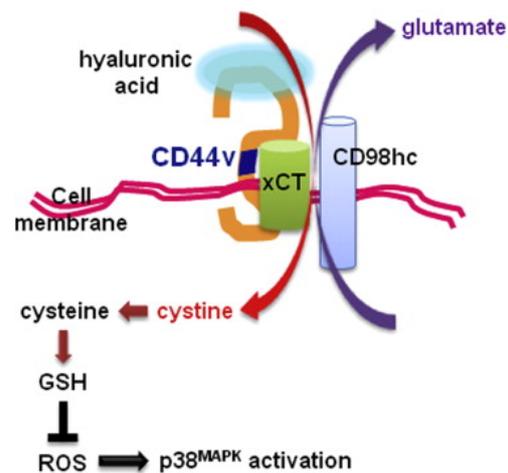
## 3. 研究の方法

K19-Wnt1/C2mE 胃癌モデルマウスを用いて CD44 遺伝子欠失による表現型を解析する。また、胃癌幹細胞様細胞の生体内における拡大に CD44 がどのようなシグナルを介して促進するのかについて分子レベルで明らかにする。

## 4. 研究成果

胃癌自然発症モデル K19-Wnt1/C2mE トランスジェニックマウスを用いて幹細胞様胃癌細胞における CD44 の機能的役割について検討を行った。その結果、CD44 が活性酸素の制御を行うことで CD44 陽性幹細胞様胃癌細胞は、酸化ストレスに対して抵抗性を獲得し、腫瘍の増大に繋がっていることを見出した。また、その分子メカニズムとして、CD44 バリエントアイソフォームがシスチントランスポーターxCT を細胞膜上で安定化

し、その機能を亢進させるとともに抗酸化物質グルタチオンの生成を誘導することが分かった（下図）。さらに、CD44 バリエント-xCT ヘテロ二量体の阻害が、がん治療のターゲットになりうるかを xCT に特異的な阻害剤であるスルファサラジンを用いて検討したところ、スルファサラジンは腫瘍の抑制効果を有し、また一般的な抗がん剤であるシスプラチンの効果を増強させる作用があることを見出した。以上の解析結果から、CD44 バリエント-xCT ヘテロ二量体を介した細胞内での活性酸素の制御機構は腫瘍の形成および治療への抵抗性に寄与していることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc<sup>-</sup> and thereby promotes tumor growth.

**Cancer Cell, 19, 387-400 (2011)**

Takatsugu Ishimoto, Osamu Nagano, Toshifumi Yae, Mayumi Tamada, Takeshi Motohara, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima, Tatsuya Ikeda, Rika Asaba, Hideki Yagi, Takashi Masuko, Takatsune Shimizu, Tomoki Ishikawa, Kazuharu Kai, Eri Takahashi, Yu Imamura, Yoshifumi Baba, Mitsuyo Ohmura, Makoto Suematsu, Hideo Baba, Hideyuki Saya

[学会発表] (計1件)

第69回日本癌学会学術総会 (International Sessions) 「The role of CD44 in the expansion of gastric stem-like tumor cells」  
永野 修、石本崇胤、佐谷秀行

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

出願番号：特許出願 2011-005311

出願日：2011年1月13日

出願人：学校法人慶應義塾、学校法人近畿大学、リンク・ジェノミクス(株)

発明者：佐谷 秀行、永野修、益子高、丹羽眞一郎

発明の名称：抗腫瘍剤

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

慶應義塾大学医学部・教授 佐谷秀行

(2) 研究分担者

慶應義塾大学医学部・助教 永野修

熊本大学医学部・共同研究員 石本崇胤

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸