

が、その遺伝子の変異が発がん過程における意義を明らかにするためには、より多くの変異について解析する必要がある。当時、このような変異の網羅的解析研究は国外では散見されたが、国内ではほとんど見られなかった。研究代表者らは、それまでにない独自の方法でがん関連遺伝子の網羅的変異導入法を開発し、個々の変異が既知の機能に及ぼす影響について調べた経験がある。したがって、他研究者よりも本研究計画を推進する上で優位性があると考えられた。そこで本研究では、既知の機能を指標にしたアッセイ系を開発し、がんに関わる遺伝子に見出される変異（とくにミスセンス変異）がその遺伝子産物に及ぼす影響（活性化、不活性化または新たな機能獲得）を網羅的に調べることで、その遺伝子産物のがんに関する機能を再評価し、さらに機能・構造・変異相関を明らかにすることを計画した。このような研究はこれまでに例がなく独創的である。この研究計画の結果を蓄積してデータベース化することにより、個々の変異の病的意義を他の研究者と共有することが可能になり、また、目的遺伝子産物と直接（または間接）的に作用する他のタンパク質やその情報伝達経路に関する情報が収集できるものと予測された。また、本研究計画では、特定遺伝子の変異によって引き起こされる細胞レベルの変化を解析することにより、これまで不明であった変異に伴う細胞内の変化を明らかにしうる意義も期待された。

2. 研究の目的

がん関連遺伝子のうち、遺伝子変異の頻度が高い、または高発癌リスクに関連する遺伝子に焦点を絞り、(1)その遺伝子の機能をモニターするためのアッセイ系を開発し、(2)遺伝子変異によるタンパク質（産物）の機能・構造異常を多角的に評価し、さらに(3)個々の遺伝子産物機能障害により引き起こされるタンパク質複合体異常や細胞内情報伝達経路異常について分子細胞生物学的意義を評価するとともに、(4)臨床病理組織学的因子や予後、発癌リスクに関する研究との情報交換による分子疫学的意義について研究する。

3. 研究の方法

(1)p53 機能と変異 p53 の機能異常 ①p53 欠損ヒト骨肉腫細胞株 Saos2 細胞にアデノウイルス発現系によって p53 変異ライブラリーから選択した 179 変異 p53 を発現し、アポトーシス誘導能の強い変異 p53 を単離する。②p53 の網羅的ミスセンス変異ライブラリーと出芽酵母の転写機能系を用いて、p53 の C 末端側の四量体形成ドメインの機能を評価する。③網羅的 p53 変異ライブラリーを用いて、腫瘍で高頻度に見つかる変異 p53cDNA 内に第 2 変異を任意に導入し、p53 の転写機能の回復を調べる。④p53 の発現誘導系 DNA マイクロ

アレイによる発現解析を用いて p53 の新規下流遺伝子を探査する。⑤網羅的 p53 変異ライブラリーによる p53 の転写機能データベース情報を国際共同研究により海外の 2 大 p53 変異データベースに提供しさらなる共同研究を行う。⑥p53 変異と予後の関係について乳癌および大腸癌について国際共同研究を行う。⑦DNA マイクロアレイによる発現解析により乳癌 p53 変異を予測できる遺伝子セットを抽出し、早期乳癌の予後予測を行う方法を開発する。(2)Lynch 症候群の原因遺伝子 MLH1 のミスセンス変異が機能に及ぼす影響を出芽酵母アッセイ系と大腸菌産生タンパク質を用いた試験管内 DNA 修復系で評価する。(3)乳癌関連遺伝子産物 BRCA1 のユビキチン化能や DNA 修復における機能を主に細胞内タンパク質発現で解析する。(4)新規クルクミン誘導体（東北大学・薬学研究科・岩淵好治研究室作成）のがん細胞増殖抑制能や Apc 遺伝子変異モデルマウスの発がん予防能を調べる。

4. 研究成果

(1)p53 機能と変異 p53 の機能異常 ①既知の S121F 変異以外でアポトーシス誘導能の強い変異 p53 を単離した。これらの変異体 (super p53 と呼称) の p53 下流遺伝子の転写活性とアポトーシス誘導能には相関がなかった。②C 末端側の四量体形成ドメインにおける網羅的変異 p53 の機能と構造の関係を明らかにした。③腫瘍で見つかる変異 p53 の機能を回復する intragenic および extragenic mutation を複数単離した。④新規 p53 下流遺伝子として CRYAB(alpha B-crystalline 遺伝子)を見だし、p53 によるアポトーシスとの関連を明らかにした。⑤海外の 2 大 p53 変異データベースに p53 の変異が転写機能に及ぼす影響についての情報が付加され公開されるようになった。さらに、タンパク質の機能と構造を予測するアルゴリズムの開発に関する共同研究に発展した。⑥乳癌に関しては、p53 変異は独立予後因子であることを示すことができたが、大腸癌に関しては予後因子となることは示すことができなかった。⑦乳癌 p53 変異を予測できる遺伝子セットを抽出し multiplex RT-PCR 法で早期乳癌の予後予測が可能になった。特許取得し企業に技術移転した。(2)Lynch 症候群に見発された MLH1 ミスセンス変異の大部分（当時）の機能評価を行い、海外データベースに情報を提供し結果を公開した。(3)BRCA1 は BARD1 と複合体を形成し RNA ポリメラーゼ II をユビキチン化すること、Ku80 と結合して DNA 二本鎖切断修復に関わること、乳癌に見つかる BRCA1 ミスセンス変異は BRCA1 の相補的 DNA 組換え機能を失わせること等が明らかになった。(4)新規クルクミン誘導体はがん細胞増殖抑制能や Apc 遺伝子変異モデルマウスの発がん予防能を有することが明らかになった。

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 133 件) 以下の主要論文は全て査読有り

- 1 Ransburgh, D. J., Chiba, N., Ishioka, C., Toland, A. E., Parvin, J. D. Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Res* 70: 988-95 (2010)
- 2 Watanabe, G., Kato, S., Nakata, H., Ishida, T., Ohuchi, N., Ishioka, C. alphaB-crystallin: A novel p53-target gene required for p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* 100: 2368-2375 (2009)
- 3 Shibata, H., Yamakoshi, H., Sato, A., Ohori, H., Kakudo, Y., Kudo, C., Takahashi, Y., Watanabe, M., Takano, H., Ishioka, C., Noda, T., Iwabuchi, Y. Newly synthesized curcumin analog has improved potential to prevent colorectal carcinogenesis in vivo. *Cancer Sci* 100: 956-60 (2009)
- 4 Naruse, H., Ikawa, N., Yamaguchi, K., Nakamura, Y., Arai, M., Ishioka, C., Sugano, K., Tamura, K., Tomita, N., Matsubara, N., Yoshida, T., Moriya, Y., Furukawa, Y. Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay. *Fam Cancer* 8: 509-517 (2009)
- 5 Wei, L., Lan, L., Hong, Z., Yasui, A., Ishioka, C., Chiba, N. Rapid Recruitment of BRCA1 to DNA Double-Strand Breaks Is Dependent on Its Association with Ku80. *Mol Cell Biol* 28: 7380-93 (2008)

- 6 Takahashi, S., Moriya, T., Ishida, T., Shibata, H., Sasano, H., Ohuchi, N., Ishioka, C. Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. *Cancer Sci* 99: 324-32 (2008)
- 7 Berglind, H., Pawitan, Y., Kato, S., Ishioka, C., Soussi, T. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines: a paradigm for cell line cross-contamination. *Cancer Biol Ther* 7: 699-708 (2008)
- 8 Takahashi, M., Shimodaira, H., Andreutti-Zaugg, C., Iggo, R., Kolodner, R. D., Ishioka, C. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res* 67: 4595-604 (2007)
- 9 Shibata, H., Takano, H., Ito, M., Shioya, H., Hirota, M., Matsumoto, H., Kakudo, Y., Ishioka, C., Akiyama, T., Kanegae, Y., Saito, I., Noda, T. Alpha-catenin is essential in intestinal adenoma formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18199-204 (2007)
- 10 Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., Olivier, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28: 622-9 (2007)
- 11 Otsuka, K., Kato, S., Kakudo, Y., Mashiko, S., Shibata, H., Ishioka, C. The screening of the second-site suppressor mutations of the common p53 mutants. *Int J Cancer* 121: 559-66 (2007)
- 12 Soussi, T., Rubio-Nevado, J. M.,

- Ishioka, C. MUT-TP53: a versatile matrix for TP53 mutation verification and publication. *Hum Mutat* 27: 1151-1154 (2006)
13. Soussi, T., Ishioka, C., Claustres, M., Beroud, C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer* 6: 83-90 (2006)
14. Soussi, T., Asselain, B., Hamroun, D., Kato, S., Ishioka, C., Claustres, M., Beroud, C. Meta-analysis of the p53 Mutation Database for Mutant p53 Biological Activity Reveals a Methodologic Bias in Mutation Detection. *Clin Cancer Res* 12: 62-69 (2006)
15. Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., (other authors), Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., Borresen-Dale, A. The Clinical Value of Somatic TP53 Gene Mutations in 1,794 Patients with Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1157-1167 (2006)
16. Otori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., Shibuya, M., Kakudo, Y., Takahashi, A., Takahashi, S., Kato, S., Suzuki, T., Ishioka, C., Iwabuchi, Y., Shibata, H. Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2006 5: 2563-2571 (2006)
17. Mathe, E., Olivier, M., Kato, S., Ishioka, C., Vaisman, I., Hainaut, P. Predicting the Transactivation Activity of p53 Missense Mutants Using a Four-Body Potential Score Derived From Delaunay Tessellations. *Hum Mutat* 27: 163-172 (2006)
18. Mathe, E., Olivier, M., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., Tavtigian, S. V. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 34: 1317-25 (2006)
19. Hamroun, D., Kato, S., Ishioka, C., Claustres, M., Beroud, C., Soussi, T. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat* 27: 14-20 (2006)
20. Iacopetta, B., Russo, A., Bazan, V., (other authors), Kato, S., Ishioka, C. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann Oncol* 17: 842-847 (2006)
21. Starita, L. M., Horwitz, A. A., Keogh, M. C., Ishioka, C., Parvin, J. D., Chiba, N. BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *J Biol Chem* 280: 24498-505 (2005)
22. Soussi, T., Kato, S., Levy, P. P., Ishioka, C. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* 25: 6-17 (2005)
23. Kawaguchi, T., Kato, S., Otsuka, K., Watanabe, G., Kumabe, T., Tominaga, T., Yoshimoto, T., Ishioka, C. The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation library. *Oncogene* 24: 6976-81 (2005)
24. Kakudo, Y., Shibata, H., Otsuka,

K., Kato, S., Ishioka, C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res* 65: 2108-14 (2005)

[学会発表] (計 224 件)

1. Yasuda, K., Kato, S., Sakamoto, Y., Watanabe, G., Kakudo, Y., Ishioka, C. : Cytoplasmically localized wild-type p53 and S121F super p53 still retains apoptosis inducible abilities. 2009 AACR Annual Meeting , April 19, 2009. (Denver Colorado USA. Poster)
2. Ishioka, C. : 大腸癌薬物療法の進歩、日本の標準と国際標準の違いと将来. 中日胃腸腫瘍総合治療学術シンポジウム, November 6, 2008. (北京・中日友好病院臨床研究所講学庁. 招聘講演)
3. Chiba, N., Ishioka, C. : Domain-dependent accumulation of BRCA1 at the sites of DNA damage. AACR-NCI-EORTC International conference Molecular targets and Cancer Therapeutics , October 23, 2007. (San Francisco ・U.S.A.. poster)
4. Shimodaira, H., Takahashi, M., Ishioka, C. : Functional evaluation of genetic variants in hereditary colon cancer predispose genes . The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association , October 5 , 2007 . (Yokohama ・ Pacifico-Yokohama . International Sessions)
5. Chiba, N., Yoshioka, T. , Takahashi, S., Shibata, H., Kato, S., Shimodaira, H., Otsuka, K., Kakudo, Y., Takahashi, M., Yasuda, K., Sakamoto, Y., Ishioka, C. : Two cases of breast cancer

responding to trastuzumab monotherapy. Asia Pacific Medical Education Initiative, 3rd Asia Pacific Workshop, Molecular targeted Therapy of Cancer, March 10, 2007. (Shanghai China).

6. Watanabe, G., Kato, S., Ishioka, C. : α B crystallin is a novel p53-target gene and required for p53-dependent apoptosis. The 98th American Association for Cancer Research Annual Meeting., April 16, 2007. (Los Angeles USA. Minisymposium)
7. Ishioka, C., Shibata, H., Takahashi, S. : Evaluation of prognostic significance of TP53 expression signature in breast cancer. The 11th International Congress of Metastasis Research Society Jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis Research (Plenary Sessions), September 6, 2006 (Tokushima Japan)
8. Takahashi, M., Shimodaira, H., Ishioka, C. : Functional characterization of hMLH1 missense mutations using yeast and in vitro assays. 11th International Congress of Human Genetics, August 9, 2006. (Brisbane, Australia. poster session)
9. Ishioka, C., Takahashi, S. : Expression signature of p53 status (p53 signature) for the prediction of TP53 mutation and prognosis in breast cancer. 42nd American Society of Clinical Oncology Annual Meeting , June 3, 2006. (Atlanta, GA. poster)
10. Shimodaira, H., Takahashi, M., Ishioka, C. : Interaction site of the mismatch repair protein PMS2 with the proapoptotic protein p73 . The 97th American Association for Cancer Research

Annual Meeting , April 4 , 2006 .
(Washington, DC,USA. poster)

11. Takahashi, M., Shimodaira, H., Kanamaru , R., Ishioka, C. : Functional analysis of hMLH1 mutations using yeast and in vitro mismatch repair assays. The 97th American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 3, 2006. (Washington, DC,USA. poster)

12. Kakudo, Y., Shibata, H., Otsuka, K., Kato, S., Ishioka, C. : Analysis of relationship between p53-dependent transcriptional activity and its ability to induce apoptosis . The 96th American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 19, 2005. (Anaheim U.S.A.. Poster Session)

〔図書〕 (計 19 件)

1 秋田弘俊, 石岡千加史, 田村和夫, 中川和彦, 原田実根, 南博信: 入門腫瘍内科学 (編集委員), 秋田弘俊, 石岡千加史, 田村和夫, 中川和彦, 原田実根, 南博信 編 入門腫瘍内科学(直腸,結腸癌), 篠原出版社, 148-154,2009年

2. 石岡千加史: がん分子標的治療薬開発におけるProof of concept 日本がん分子標的治療学会, 曾根三郎, 鶴尾隆 編 がん分子標的治療研究実践マニュアル, 金芳堂, pp.47-52, 2009年

3. 石岡千加史: 第5章 テーラーメイド医療の未来 がんの個性と個別化 帯刀益夫, 佐竹正延編 加齢医学 エイジング・ファイン, 東北大学出版, pp.244-257, 2007年

4. 石岡千加史: A. プロテインキナーゼ阻害薬 西條長宏編 抗悪性腫瘍薬マニュアル, 中外医学社, pp.386-416, 2007年

5. 石岡千加史: 4. がん薬物療法の分子標的 4) アポトーシス 西條長宏 編 治療の新たな試み 新編Ⅲ, 医薬ジャーナル社, pp.164-175, 2005年

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 2 件)

名称:ビス(アリールメチリデン)アセトン化合物、抗癌剤、発癌予防剤、Ki-Ras、ErbB2、c-Myc及びCyclinD1の発現抑制剤、β-カテニン分解剤並びにp53の発現増強剤
発明者:岩淵好治、柴田浩行
権利者:東北大学
種類:特許権
番号: WO 2007/000998 A1
国際公開年月日:2007年1月4日
国内外の別:国外

○取得状況 (計 1 件)

名称:がんの予後予測方法
発明者:石岡千加史、高橋 信
権利者:東北大学
種類:特許権
番号:特許第4370409号
取得年月日:2009年9月11日
国内外の別:国内

6. 研究組織
(1)研究代表者
石岡 千加史 (ISHIOKA CHIKASHI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号:60241577

(2)研究分担者
加藤 俊介 (KATO SHUNSUKE)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号:40312657

下平 秀樹 (SHIMODAIRA HIDEKI)
東北大学・病院・講師
研究者番号:70373214

千葉 奈津子 (CHIBA NATUKO)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号:50361192

柴田 浩行 (SHIBATA HIROYUKI)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号:50260071

(3)連携研究者 なし