

平成 22年 6月 7日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17015009

研究課題名（和文） ゲノム情報に基づいたがんの新たな診断・治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new diagnostic and therapeutic approaches based on information of the human genome

研究代表者

古川 洋一 (FURUKAWA YOICHI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20272560

研究成果の概要（和文）：

大腸癌、肝癌、胃癌、肝内胆管癌のゲノムワイドな遺伝子発現解析から、これらの癌の治療標的となる分子を複数同定した。これらの分子の機能解析によって、癌化に関わる新たなメカニズムの一部が解明されたとともに、新規治療法開発に役立つ知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Genome-wide gene expression profile analyses of human colorectal, hepatocellular, and gastric carcinomas have identified candidate genes for targeted cancer therapies against these tumors. Through the functional analyses of these genes, we have elucidated a part of mechanism(s) underlying these tumors, and obtained useful information for the development of the therapeutic approaches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,000,000	0	9,000,000
2006年度	8,800,000	0	8,800,000
2007年度	8,800,000	0	8,800,000
2008年度	8,300,000	0	8,300,000
2009年度	8,300,000	0	8,300,000
総計	43,200,000	0	43,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医科学・病態医化学

キーワード：ゲノム・癌・マイクロアレイ・診断・治療

1. 研究開始当初の背景

(1) がんは日本人の死亡原因の第一位を占め、3分の1の人ががんで亡くなっている。がんに対する医療の開発は、日本のみならず世界の人々の健康と福祉の為に、最も重要な課題のひとつである。早期に発見すれば手術で治療しうるがんが増加しつつあり、しかも分子標的治療薬などの新しい治療薬も開発

されているが、早期発見の為のマーカーや、副作用の少なく効果の高い治療薬はまだまだ不足している。

(2) マイクロアレイ法の開発により、一度に多数の遺伝子発現を解析できるようになった。我々は先行研究でヒト大腸癌、肝癌、胃癌のゲノムワイドな遺伝子発現解析を行

い、これらの腫瘍の遺伝子発現プロファイルをすでに入手していた。

2. 研究の目的

がんの早期発見、転移や予後の予測など診断に役立つ可能性のある遺伝子や、分子標的治療薬やワクチン開発のターゲットとなる候補遺伝子を抽出し、それらの機能解析から、新たな診断薬開発、抗がん剤やワクチン開発に資する新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌、肝癌、胃癌の遺伝子発現情報から、同一患者の正常組織と比較して腫瘍組織で高頻度に（50%以上の症例で）発現が2倍以上増加している、心臓、肺、腎臓、肝臓の正常組織の中で発現の低く、しかもがんの標的としての報告がない遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子の腫瘍組織における発現を半定量 RT-PCR または Real Time PCR で確認し、正常臓器での発現をノーザンブロットにて確認した。これらが確認された分子はすべて低分子化合物の標的として解析を行うが、特に膜タンパクもしくは分泌タンパクに関しては診断薬や抗体薬の標的として、がんと精巣以外での発現の低い遺伝子はワクチン開発の標的としても解析を行った。

(2) それぞれの分子に対する抗体を作成し、腫瘍組織における発現上昇をタンパクレベルで解析した。血清中にタンパクが認められれば、診断薬としての解析を継続した。細胞内の局在なども検討した。

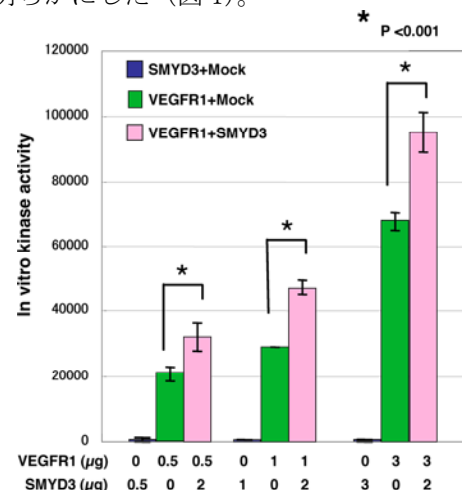
(3) 癌細胞において候補遺伝子発現を特異的な siRNA によってノックダウンした際に、癌細胞の増殖が阻害されるか調べた。また、強制発現によって形質転換を細胞に起こすかどうかを検討した。

(4) 標的候補分子の機能に応じた機能解析を行った。それぞれの分子の機能（酵素活性など）を測定できるかどうか、あるいは結合タンパクを同定して機能を評価できるかどうか調べた。

4. 研究成果

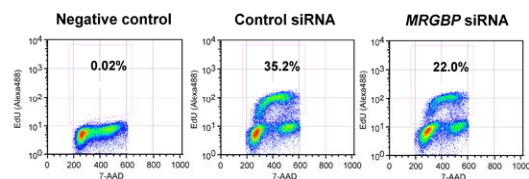
(1) 肝癌・大腸癌の網羅的遺伝子発現プロファイルから、これらの癌で特異的に発現上昇している遺伝子 *SMYD3* に着目し研究を行った。そのプロモーター領域を解析したところ、転写因子 E2F1 の結合配列があり、E2F1 がこの領域に直接結合して発現亢進を引き起こすことを明らかにした。 *SMYD3* に対するポリクローナル抗体を作製して免疫染色を行ったところ、乳癌でも発現上昇していることを

見出した。 *SMYD3* タンパクはアミノ末端が切断されて活性化すると高い活性を示すこと、大腸癌・肝癌・乳癌で切断されたタンパクが高発現していることを報告した。このことは *SMYD3* を標的とする治療法開発において、 *SMYD3* の切断を阻害することによっても、酵素活性を抑制する可能性を示している。さらに *SMYD3* の基質となる非ヒストンタンパクの探索を行なったところ、 *VEGFR1* が *SMYD3* によってメチル化されることを示した。さらにそのメチル化部位は 831 番目のリジンであることを証明した。そのメチル化によって、 *VEGFR1* の自己リン酸化が促進されることを明らかにした（図 1）。



(図 1) メチル化による *VEGFR1* の自己リン酸化の促進

(2) 大腸癌で発現の増加している遺伝子、 *SP5*, *C10orf3*, *PPIL1*, *TOMM34*, *MRGBP* を同定した。さらに *SP5* は大腸腫瘍の発生にかかわる Wnt シグナルで調節される遺伝子であること、 *C10orf3* は *TSG101* と、 *PPIL1* は *Stathmin* と、 *MRGBP* は *BRD8* と結合することを発見した。 *C10orf3* や *PPIL1*, *TOMM34*, *MRGBP* の発現を抑制すると、がん細胞の増殖が阻害されることから、これらの分子は大腸癌の治療標的候補であることが示された。また *MRGBP* は細胞周期の S 期で DNA 合成に関与していること（図 2）、 *BRD8* の核への移行を制御することを明らかにし、 *BRD8* との結合に必須な領域も同定した。 *C10orf3*, *PPIL1*, *MRGBP* の相互分子との結合を阻害することが癌細胞の増殖抑制を誘導すれば、結合阻害する低分子化合物が新たな分子標的治療薬となる可能性がある。

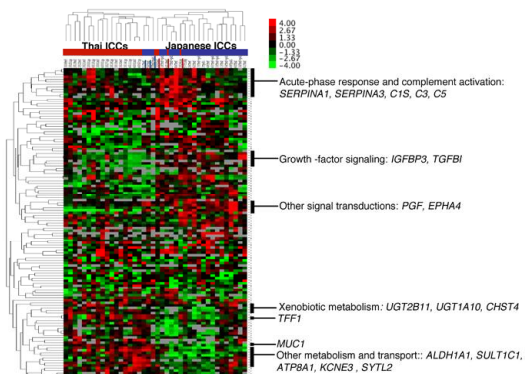


(図 2) *MRGBP* のノックダウンは癌細胞の DNA 合成を抑制した。

(3) 胃癌の遺伝子発現プロファイルから、腫瘍で特異的に発現上昇している遺伝子 *IGSF11* と *SCRNI* を同定した。それぞれを標的としたがんワクチン療法開発の為、細胞障害活性(CTL)を誘導できるペプチド配列を同定した。これらのペプチドが、*IGSF11* や *SCRNI* を発現する腫瘍細胞に対して、殺細胞能を誘導することを明らかにした。

(4) 肝癌で発現増加している遺伝子 *TIPUHI* を同定した。*TIPUHI* の発現を siRNA を用いて抑制すると癌細胞の増殖が阻害されることから、新たな治療標的候補分子であることが示された。また *TIPUHI* に結合する分子として、*TIF1β*, *hnRNPU*, *hnRNPF*, *Nucleolin* を同定した。

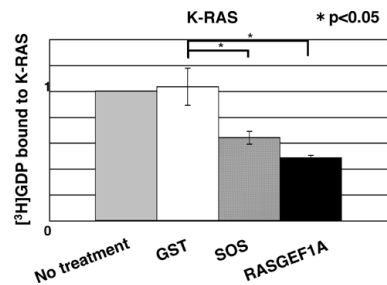
(5) 肝内胆管癌の遺伝子発現プロファイル解析を行った。肝内胆管癌の網羅的遺伝子発現情報から、癌で発現増加している遺伝子 *RAD51AP1* を同定した。*RAD51AP1* に対する抗体を作成し、免疫染色で発現を検討したところ、約 61% の肝内胆管癌組織において腫瘍細胞の核で発現が亢進していた。*RAD51AP1* の発現を、siRNA を用いて抑制すると癌細胞の増殖が阻害されたことから、*RAD51AP1* が新たな治療標的候補であることが示された。またタイの東北地方の肝吸虫によって引き起こされた肝内胆管癌の遺伝子発現プロファイルも解析し、日本の肝内胆管癌の発現プロファイルと比較をおこなった。この比較から、共通した発癌機構に関係する分子や、肝吸虫によって起こる肝内胆管癌特異的な遺伝子群を同定することができた(図3)。



(図3) 肝内胆管癌の発現プロファイル

また共通して発現上昇する遺伝子 *RASGEF1A* に着目し、この遺伝子の発現を siRNA により抑制すると癌細胞の増殖を阻害することを見だし、*RASGEF1A* が新たな治療の分子標的候補であることを示した。また *RASGEF1A* は K-RAS, N-RAS, H-RAS をいずれも活性化することを *in vitro* で証明した(図4)。*RASGEF1A* を介した RAS シグナルを抑制は、肝

内胆管癌だけでなく RAS ファミリー遺伝子が活性化されている腫瘍の治療法開発に役立つ可能性を秘めている。



(図4) *RASGEF1A* による K-RAS の制御

(6) 遺伝性大腸癌である 2 例の HNPCC 患者の血液に、原因遺伝子のイントロン領域の点変異を同定した。これらの変異が病的変異かどうか検討するアッセイ法を樹立し、このアッセイ法がイントロン領域の異常の診断に役立つことを証明した。

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 25 件)

- ① Yamaguchi K, Sakai M, Shimokawa T, Yamada Y, Nakamura Y, & Furukawa Y. C20orf20 (MRG-binding protein) as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 102:325-31, 2010.
- ② Moriwaki K, Noda K, Furukawa Y, Ohshima K, Uchiyama A, Nakagawa T, Taniguchi N, Daigo Y, Nakamura Y, Hayashi N, & Miyoshi E. Deficiency of GMD leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Gastroenterology* 137: 188-198, 2009.
- ③ Obama K, Satoh S, Hamamoto R, Sakai Y, Nakamura Y, & Furukawa Y. Enhanced expression of *RAD51AP1* is involved in the growth of intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 14(5): 1333-1339, 2008.
- ④ Kunisaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, & Furukawa Y. The lysine 831 of VEGFR1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res*, 67(22): 10759-10765, 2007.
- ⑤ Jinawath N, Chamgramol Y,

Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Sripa B, Pairojkul C, & Nakamura Y. Comparison of gene expression profiles between opisthorchis viverrini and non-opisthorchis viverrini associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 44(4): 1025-1038, 2006

- ⑥ Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, & Nakamura Y. VNTR Polymorphism of E2F-1 binding element in the 5' flanking region of *SMYD3* is a risk factor for human cancers. *Nature Genet* 37(10): 1104-1107, 2005.

[学会発表] (計 25 件)

招待講演 The 8th Joint Conference of AACR and JCA (Hawaii), Feb 8, 2010, Genome-wide expression analysis identified MRG-binding protein (MRGBP) as a gene involved in colorectal carcinogenesis

口演、第 68 回日本癌学会総会、シンポジウム (横浜), Oct 3, 2009, Application of global expression analyses of colon cancer for the clinics

口演 The 14th. East Asia Joint Symposium (東京), Nov 14, 2007. The lysine 831 of VEGFR1 is a novel target of methylation by SMYD3 histone methyltransferase.

口演 The 97th Annual meeting of American Association for Cancer Research (Washington DC) Apr 03, 2006. A repeat polymorphism of E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers

[図書] (計 1 件)

Tetsuichiro Muto, Hidetaka Mochizuki, Tadahiko Masaki, Yoichi Furukawa 他, Nova Publishers, Tumor Budding in Colorectal Cancer, Horizons in Cancer Research volume 8, Chapter III: Molecular Mechanisms Underlying Colorectal Carcinogenesis, 2006

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: Colon cancer related gene TOM34
発明者: 中村祐輔、古川洋一、角田卓也、田原秀晃、松島敏志

権利者: オンコセラピーサイエンス社
種類: 特許
番号: 米国仮出願 / 60/703, 265
出願年月日: 2005/07/27
国内外の別: 国際

名称: CXADRL1 または GCUD1 タンパク質を発現する胃癌または結腸直腸癌の治療のためのペプチドワクチン

発明者: 中村祐輔、古川洋一、角田卓也、田原秀晃、松島敏志

権利者: オンコセラピーサイエンス社

種類: 特許

番号: 特願 2005-211289

出願年月日: 2005/07/21

国内外の別: 国内

名称: METHODS OF MODULATING SMYD3 FOR TREATMENT OF CANCER

発明者: 中村祐輔、古川洋一、中鶴修一、浜本隆二

権利者: オンコセラピーサイエンス社

種類: 特許

番号: 米国仮出願 / 60/695, 957

出願年月日: 2005/07/01

国内外の別: 国際

名称: Cancer related gene RASGEF1A 発明者: 中村祐輔、古川洋一、中鶴修一

権利者: オンコセラピーサイエンス社

種類: 特許

番号: 米国仮出願 / 60/704, 054

出願年月日: 2005/07/28

国内外の別: 国際

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/furukawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 洋一 (FURUKAWA YOICHI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 20272560

(2) 研究分担者

浜本 隆二 (HAMAMOTO RYUJI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 80321800