

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590324
 研究課題名(和文) ヒト Y-ボックス結合蛋白 1 の核内移行機序と癌増大と耐性獲得への役割
 研究課題名(英文) Human Y-box binding protein1(YB-1) : Mechanism for the nuclear translocation and its role of tumor growth and drug resistance?
 研究代表者
 桑野 信彦 (KUWANO MICHIIHIKO)
 九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授
 研究者番号：80037431

研究成果の概要：我々のがん治療後の P-糖蛋白質 (ABCB1) 依存性多剤耐性がんの発現に Y-ボックス結合蛋白-1 (YB-1) が深く関与することをはじめて発見した。本研究では、増殖シグナルによる YB-1 の核内移行に P13k/Akt による活性化が必要であり、多くのヒトがん細胞の増殖を制御し、YB-1 の核内局在がヒト卵巣癌、乳癌や軟部腫瘍などにおいて耐性および増殖関連遺伝子の発現や患者の予後と有意に相関することなどを見出した。以上、YB-1 はがん治療の有用なバイオマーカーであると確信している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：(1) YB-1 (2) YB-1 核内局在 (3) 多剤耐性 (4) EGF 受容体ファミリー

(5) 乳癌 (6) P-糖蛋白質 (7) MVP/LRP (8) エストラジオール受容体

1. 研究開始当初の背景

P-糖蛋白質/MDR1/ABCB1 は、抗がん剤のがん細胞からの排出ポンプ活性を示す代表的な ABC トランスポーターである。多くのヒト癌でがん化学療法後に出現してくる耐性がんには P-糖蛋白質の発現がしばしば上昇している。我々はこれまでに MDR1/ABCB1 遺伝子の発現上昇に YB-1 が関与していること(図

1)、および多くの癌で YB-1 の核内局在が P-糖蛋白質の発現と有意に相関すること、さらに患者の不良な生存率とも有意に相関すること(図 2)などを報告してきた。以上の研究成果を背景に、がんの悪性進展と関連する YB-1 核内移行のメカニズムと YB-1 の核内局在ががん細胞の耐性獲得だけでなく増殖制

御に關与する可能性について明らかにする必要があると考えた。

図1. YB-1は核内へ移行し、グローバルな薬剤耐性獲得や細胞増殖やラジカルスクベンジャー活性を著明に促進させる。

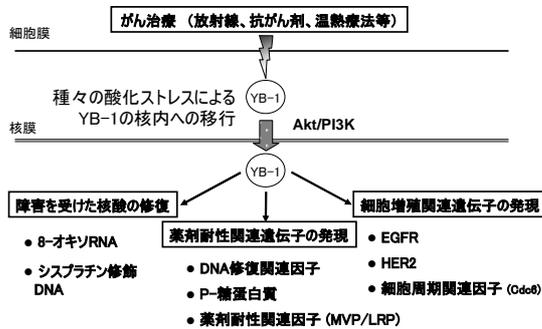
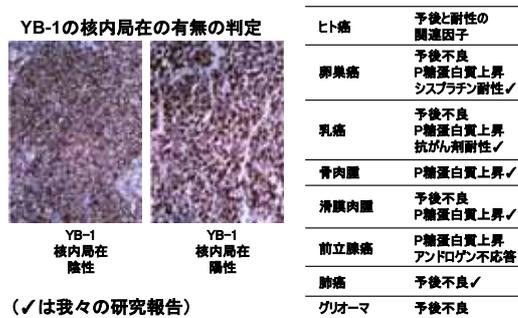


図2.がん患者を対象にした臨床研究からYB-1の核内局在は多くのがん患者の予後や薬剤耐性の鍵をにぎっている。



2. 研究の目的

本研究では、(1) YB-1 の核内移行はがんの悪性化やがん患者の予後不良へ深く関与している。そこで、YB-1 の核内移行に働いている分子メカニズムを明らかにする。(2) YB-1 は多剤耐性 P-糖蛋白質の発現を転写制御している。ヒト癌で YB-1 核内局在と ABCB1 や MVP/LRP の耐性関連遺伝子の発現と相関するか否か、また EGF 受容体などのがん増殖シグナル関連遺伝子の発現に關与するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵巣癌、肺癌、乳癌由来の数多くの樹立がん細胞株を培養系で使用した。(2) 抗がん剤の感受性や細胞増殖能は生存細胞数やコロニー形成能の有無で行なった。(3)

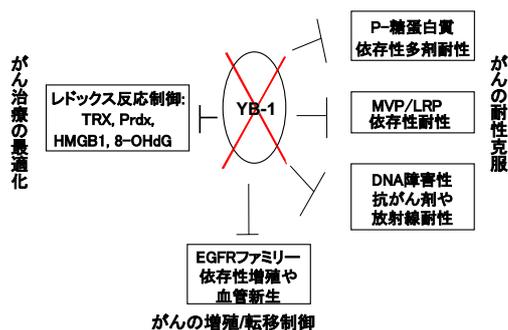
遺伝子やタンパク質発現レベルの測定には定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、ELISA 法などで行なった。(4) タンパク質の細胞内局在については核と細胞質の各分画を対象としたウエスタンブロット法と共焦点レーザー顕微鏡による細胞生物学的手法を進めた。(5) ヒト癌患者の病理材料を対象とした解析は大学倫理委員会の許可を受けて行なった。病理学的検索は各バイオマーカーに対する抗体を用いて免疫組織化学的染色法で行なった。(6) 動物実験は九州大学のアニマルセンターで行なった。

4. 研究成果

(1) がん細胞内での YB-1 の核内移行メカニズムに関して、血清による増殖刺激下の YB-1 の核内移行は、PI3K/Akt のリン酸化が重要であることを培養系と動物実験系で見出した(図 1)。(2) YB-1 のノックダウンにより発現が影響を受ける遺伝子群をマイクロアレイ法で検討した。その結果、EGF 受容体ファミリー遺伝子(EGFR, HER2, HER3 など)、サイトカイン受容体(CXCR4)、ホルモン受容体(ER α , ER β など)や細胞周期関連遺伝子などが多剤耐性関連遺伝子以外に有意に低下することが見出された(図 1)。(3) ヒト卵巣癌、横紋筋肉腫や乳癌患者において YB-1 の核内局在の有無と EGF 受容体ファミリーやホルモン受容体 ER α などの発現と有意に相関した。乳癌患者において YB-1 の核内局在と HER2/ErbB2 や ER α との相関が乳癌患者の予後不良と関連した(図 2)。(4) 肺癌患者においても YB-1 の核内局在が HER2 や HER3 発現ならびに予後不良と有意に相関した。(5) YB-1 をノックダウンすると乳癌や肺癌細胞において細胞増殖を著明に阻害し、その下流の細胞周期 G1/S 期に特異的な Cdc6 が密接に關与することを見出している。

本研究で我々は YB-1 ががんの悪性化に関連する“薬剤耐性”と“がんの増大”に密接に関与していることを本研究ではじめて明らかにした。YB-1 は耐性や腫瘍増大や転移を克服する有用なバイオマーカーとなることを期待される(図 3 参照)ので、今後 YB-1 をがん治療標的としてトランスレーショナル研究を進めていきたい。

図3.YB-1を標的とすることによって、がんの耐性克服やがん増殖/転移制御にむけての治療を発展させることができる。



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 23 件)

- (1) Hosoi, F., Izumi, H., Kawahara, A., Yuichi, M., Kinoshita, H., Kage, M., Nishio, K., Kohno, K., Kuwano, M., and Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of IKKbeta expression. *Cancer Res.*, 69: 4983-4991, 2009. (査読有)
- (2) Kawahara, A., Akagi, Y., Hattori, S., Mizobe, T., Shirouzu, K., Ono, M., Yanagawa, T., Kuwano, M. and Kage, M. Higher expression of deoxyuridinetriphosphatase (dUTPase) may predict the metastasis potential of colorectal cancer. *J. Clinic. Pathology*, 364-369, 62: 2009. (査読有)
- (3) Aoki, D., Oda, Y., Hattori, S., Taguchi, K., Ohishi, Y., Basaki, Y., Oie, S., Suzuki, N., Kono, S., Tsuneyoshi, M., Ono, M., Kuwano, M. Overexpression of class III β -tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Clinic. Cancer Res.*, 15: 1473-1480, 2009. (査読有)
- (4) Watari, K., Nakao, S., Fotovati, A., Basaki, Y., Hosoi, F., Bereczky, B., Higuchi, R., Miyamoto, T., Kuwano, M., and Ono. Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377: 826-831, 2008. (査読有)
- (5) Moriya, F., Ogasawara, S., Basaki, Y., Akiba, J., Kojiro, S., Fukahori, S., Ishizaki, H., Nishida, N., Matsuoka, K., Kojiro, M., Kuwano, M., and Yano, H. Growth inhibitory effects of pegylated IFN-alpha2b and 5-fluorouracil in combination on renal cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.*, 33: 647-655, 2008. (査読有)
- (6) Zhao, H., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X., Zhang, S., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., and Akiyama, S. Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor,

- thrombospondin-1, by 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 68 : 7035-7041, 2008. (査読有)
- (7) Zhao, H., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X., Iwashita, K., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., and Akiyama, S. Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer Lett.*, 270 : 156-163, 2008. (査読有)
- (8) Hiraoka, K., Zenmyo, M., Watari, K., Iguchi, H., Fotovati, A., Kimura, Y., Hosoi, F., Shoda, T., Nagata, K., Osada, H., Ono, M., and Kuwano, M. Inhibition of bone and muscle metastases of lung cancer cells by decrease in the number of monocytes/macrophages. *Cancer Sci.*, 99 : 1595-1602, 2008. (査読有)
- (9) Oda, Y., Kohashi, K., Yamamoto, H., Tamiya, S., Kohno, K., Kuwano, M., Iwamoto, Y., Tajiri, T., Taguchi, T., and Tsuneyoshi, M. Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Sci.*, 99 : 726-732, 2008. (査読有)
- (10) Fujii, T., Yokoyama, G., Takahashi, H., Toh, U., Kage, M., Ono, M., Shirouzu, K., and Kuwano, M. Preclinical and clinical studies of novel breast cancer drugs targeting molecules involved in protein kinase C signaling, the putative metastasis-suppressor gene Cap43 and the Y-box binding protein-1. *Current Medicinal Chem.*, 15: 528-537, 2008. (査読有)
- (11) Fujii, T., Yokoyama, G., Takahashi, H., Namoto, R., Nakagawa, S., Toh, U., Kage, M., Shirouzu, K., and Kuwano, M. Preclinical studies of molecular-targeting diagnostic and therapeutic strategies against breast cancer. *Breast Cancer*, 15 : 73-78, 2008. (査読有)
- (12) Shiota, M., Izumi, H., Miyamoto, N., Onitsuka, T., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Ono, M., Kuwano, M., Naito, S., Sasaguri, Y., and Kohno, K. Ets Transcription factors regulate peroxiredoxin1 and peroxiredoxin5 expression through their interaction with the high mobility group protein HMGB1. *Cancer Sci.*, 99: 1950-1959, 2008. (査読有)
- (13) Nishio, S., Tsuda, N., Takemoto, S., Kawano, K., Ushijima, K., Yamaguchi, T., Nishida, N., Kakuma, T., Tsuda, H., Kasamatsu, T., Sasajima, Y., Kage, M., Kuwano, M., and Kamura, T. Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Cancer Lett.*, 264: 36-43 , 2008. (査読有)
- (14) Koga, M., Kai, H., Egami, K., Murohara, T., Ikeda, A., Yasuoka, S., Egashira, K., Matsuishi, T., Kai, M., Kataoka, Y., Kuwano, M., and Imaizumi, T. Mutant MCP-1 therapy

- inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365 : 279-284, 2008. (査読有)
- (15) Fujii, T., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Nakashima, K., Nakano, K., Shirouzu, K., Kohno, K., Yanagawa, T., Yamana, H., Nishio, K., Ono, M., Kuwano, M., and Kage, M. Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer Res.*, 68 :1504-1512, 2008. (査読有)
- (16) Kimura, Y., Watari, K., Fotovati, A., Hosoi, F., Yasumoto, K., Izumi, H., Kohno, K., Umezawa, K., Iguchi, H., Shirouzu, K., Takamori, S., Kuwano, M., and Ono, M. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 98 : 2009-2018, 2007. (査読有)
- (17) Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M., and Tsuneyoshi, M. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology Rep.*, 18 : 769-774, 2007. (査読有)
- (18) Fukahori, S., Yano, H., Tsuneoka, M., Tanaka, Y., Yagi, M., Kuwano, M., Tajiri, T., Taguchi, T., Tsuneyoshi, M., and Kojiro, M. Immunohistochemical expression of Cap43 and Mina53 proteins in neuroblastoma. *J Pediatric Surgery*, 42 : 1831-1840, 2007. (査読有)
- (19) Nakao, S., Hata, Y., Miura, M., Noda, K., Kimura, Y., Kawahara, S., Kita, T., Hisatomi, T., Nakazawa, T., Jin, Y., Dana, R., Kuwano, M., Ono, M., Ishibashi, T. and Hafezi-Moghadam, A. Dexamethasone inhibits IL-1b-induced corneal neovascularization: role of NF-kB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 171: 1058-1065, 2007. (査読有)
- (20) Oie, S., Ono M., Fukushima, H., Hosoi, F., Yano, H., Maruyama Y., Kojiro, M., Terada, T., Hirano K., Kuwano M., and Yamada, Y. Alteration of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by interferon- γ affects the antiproliferative effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells. *Molec. Cancer Therapeut.*, 6: 2310-2318, 2007. (査読有)
- (21) Ohishi, Y., Oda, Y., Basaki, Y., Kobayashi, H., Wake, N., Kuwano, M., and Tsuneyoshi, M. Expression of beta-tubulin isotypes in human primary ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 105: 586-592, 2007. (査読有)
- (22) Oda, Y., Ohishi, Y., Basaki, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Wake, N., Ono, M, Nishio, K, Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. Prognostic implication of nuclear localization of the Y-box-binding protein-1 and CXC4 expression in ovarian cancer: Their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression.

Cancer Sci., 98: 1020-1026, 2007. (査読有)

- (23) Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Shimoyama, T., Nishio, K., and Kuwano M. Akt-dependent nuclear localisation of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. Oncogene, 26: 2736-2746, 2007. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 桑野信彦. 血管新生抑制剤：その歴史と将来. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会(教育講演). 2009年3月21日(名古屋)
- (2) 桑野信彦. 血管新生を標的としたがん治療の展開. 中国・四国広域がんプロ養成コンソーシアム. 2009年2月13日(徳島)
2008年10月28日(名古屋)
- (3) 桑野信彦. “がん治療の最前線と新しい時代”. 第11回メディカルサミット2008. 2008年9月21日(福岡)
- (4) 桑野信彦. がんのレドックス応答と発症から進展を標的とした診断・創薬のイノベーション研究. 第7回国際バイオフォーラム. 2008年7月2日(東京)
- (5) 桑野信彦. がんのバイオマーカーとしてのY-ボックス結合蛋白-1(YB-1)の核内局在. 第12回分子標的がん治療研究会. 2008年6月26日(東京)
- (6) 桑野信彦. 抗癌剤の感受性・耐性の分子機序と癌最適化医療. 第46回日本臨床細胞学会秋季大会. 特別講演. 2007年12月1日(宮城)
- (7) 桑野信彦. “がん化学療法のあり方” -

基礎医学の立場から. 日本癌治療学会総会. (合同シンポジウム) 2007年10月24日~26日(京都)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: EGF レセプターを標的とした薬剤の有効性の予測方法

発明者: 桑野信彦

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 米国仮出願

番号: 未定

出願年月日: 2009年1月26日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 信彦 (KUWANO MICHIIHIKO)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授

研究者番号: 80037431

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: