

平成22年6月21日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2008～2009
課題番号：20015047
研究課題名（和文） テロメア・細胞老化システムを標的としたがん分子治療法の開発
研究課題名（英文） Development of cancer molecular therapeutics directed to telomeres and cellular senescence systems
研究代表者 清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI) 財団法人癌研究会・癌化学療法センター分子生物治療研究部・部長 研究者番号：50280623

研究成果の概要（和文）：テロメアは染色体末端のキャップ構造であり、細胞老化の時限装置として機能する。がん細胞の不老不死性を支えるテロメア維持機構をがん治療の分子標的と捉え、その解析基盤としてテロメアの構造的多様性を描出したデータベースを構築した。これを利用し、テロメア・老化制御因子と抗がん剤感受性の機能連関やテロメラーゼ阻害剤の制がん機序を明らかにした。一方、細胞の分裂異常に対するテロメア因子の病理学的寄与を発見した。

研究成果の概要（英文）：Telomeres, the capping structures of chromosome ends, work as a timing device for cellular senescence. We focused on the telomere maintenance system, which supports the immortality of human cancer cells, as a molecular target for cancer therapy. First, we constructed a profiling database of structural diversity in telomeres as an analytic platform of this study. By utilizing this database, we demonstrated the functional linkages between telomere/ageing regulators and sensitivities to anticancer drugs, and molecular mechanisms for the anticancer efficacy of a telomerase inhibitor. Furthermore, we discovered a pathological involvement of telomeric factors in mitotic abnormalities of a cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：分子細胞生物学、がん化学療法

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：がん、分子標的治療、テロメア、細胞老化、細胞分裂、染色体、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

DNAポリメラーゼを介した複製機構は、直鎖DNAの最末端部を完全に合成しきることが出来ない。このため、細胞は本来、増殖とともに

に染色体末端配列であるテロメアを徐々に失ってゆく。テロメアの過度な消失は、細胞老化 (replicative senescence) を誘導することにより、発がん抑制に寄与する。がん細

胞はテロメラーゼ (telomerase) と呼ばれる酵素を活性化してテロメアを再生するため、無限の分裂が可能である。テロメラーゼの働きを阻止されたがん細胞は、正常体細胞同様、テロメアを徐々に失い、細胞老化や細胞死を起こすことから、テロメアおよびテロメラーゼは有望な制がん標的分子であると期待されている。また、ポリ(ADP-リボシル)化酵素 (PARP) ファミリーのメンバーであるタンキラーゼ 1 (tankyrase-1) は、テロメア結合蛋白質 TRF1 をテロメアから遊離させ、テロメラーゼによるテロメア伸長を促進する働きを持つ。我々はこれまでに、テロメアの維持機構を標的とした新たながん治療法の開発を目的として、テロメラーゼおよびタンキラーゼ 1 の本態解明および阻害剤開発、これらに立脚したがん分子標的治療モデルの構築などに成果を上げてきた。一方、細胞老化はがん遺伝子の異常な活性化やがん抑制遺伝子の失活などによっても誘導されることが近年示され (oncogene-induced senescence)、これに関与する因子群が明らかになりつつある。がん細胞では、これらの細胞老化システムのみならず、個体レベルの老化制御因子の機能もしばしば破綻していることが知られており、これらを矯正・修飾することにより、がん細胞の悪性形質を制御することが出来るものと期待されている。しかしながら、これら個々の因子の本来の生理機能や病態への寄与に対する基礎生物学的理解は未だ不十分であり、また、これらの因子の機能を修飾する手段も十分には確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を踏まえ、テロメラーゼやタンキラーゼ 1 によるテロメアの過度な再生をはじめとする、細胞老化機構の破綻あるいはこれらの制御因子の異常が、がん細胞の悪性形質や薬剤反応性にどのような影響を与えるか、その分子機序も含めて解明することを目的とする。さらには、これらを人為的に修飾する手法 (化合物) を開発し、がん治療に応用することを最終目標とする。2 年間の具体的な達成目標は以下の 4 点である。

- (1) ヒトがん細胞のテロメア動態制御ネットワークと各種薬剤反応性の相関関係および因果関係を明らかにする。
- (2) 我々が開発した合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312 による、がん細胞の早期形質変化および *in vivo* 制がん効果を明らかにする。
- (3) テロメア伸長因子タンキラーゼ 1 とその結合蛋白質 TRF1 の新たな生理機能とその分子機序を解明する。
- (4) 早老症ウェルナー症候群の責任遺伝子 WRN ヘリカーゼの発現と抗がん剤感受性の因

果関係を解明する (本項目は、上記(1)の進展に付随して設定されたものである)。

本研究により、がん分子標的としてのテロメア・細胞老化関連因子に関する基盤情報が得られることが予想され、既存の抗がん剤の効果増強法や耐性克服法も含め、がん化学療法革新戦略が開拓されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) がん細胞におけるテロメア動態制御ネットワークと薬剤反応性:

様々なヒト臓器由来のがん細胞パネル JFCR39 について、種々のテロメア関連因子・細胞老化制御因子の蛋白質発現量・酵素活性、テロメア 2 本鎖 DNA 部分の長さ・テロメア G-tail の長さなどを数値定量化し、これらのバイオパラメータのフィンガープリント (= 細胞株ごとの定量値の差異) データベースを構築した。これを用いてテロメア関連因子群の制御ネットワーク地図を作成するとともに、それぞれのテロメア関連因子のフィンガープリントと有意な相関を示す化合物・細胞内因子を *in silico* にて包括解析した。

(2) テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん効果と分子機序:

がん細胞のテロメアを人為的に伸長させ、合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312 (図 1) の急性制がん効果の変化や DNA 損傷応答因子の挙動変化を調べた。また、このときの遺伝子発現変化を、GeneChip マイクロアレイを用いて包括解析した。さらに、動物レベルでの薬効検証としてヌードマウスの皮下に移植したヒト腫瘍系を用い、MST-312 の *in vivo* 制がん効果を検討した。

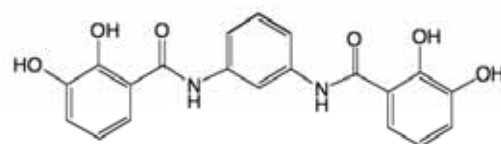


図1:合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312

(3) テロメア伸長因子タンキラーゼ 1 の新機能とその分子機序:

分裂期キナーゼ Aurora-A の過剰発現による細胞分裂異常に対し、タンキラーゼ 1 の過剰発現がどのような影響を与えるかを解析した。さらに、このときの分子メカニズムについて検討した。途中経過により、タンキラーゼ 1 によってポリ(ADP-リボシル)化される TRF1 が本形質に重要な役割を果たすことが判明したため、以降は細胞分裂期における TRF1 の機能の解析に注力した。一方、近年明らかとなった PARP 阻害剤による合成致死性 (synthetic lethality) に注目し、タンキ

ラーゼ 1 およびがん抑制遺伝子産物 BRCA1 もしくは BRCA2 を二重阻害したときのがん細胞の増殖・形質変化を解析した。

(4) 早老症責任遺伝子 WRN ヘリカーゼの発現と抗がん剤感受性：

上記(1)の相関解析より得た知見を踏まえ、WRN 遺伝子を欠損したウェルナー患者由来の不死化細胞を用いて、テロメア結合蛋白質の発現を変化させたときの微小管標的薬剤に対する感受性の変化を解析した。対照として野生型 WRN 遺伝子を導入した細胞株についても解析した。

4. 研究成果

(1) がん細胞におけるテロメア動態制御ネットワークと薬剤反応性：

構築した様々なテロメア関連フィンガープリントを二次元階層クラスター解析した結果、物理的相互作用や機能的関連性が強いパラメータ群がクラスター地図上で互いに近位に配座することが明らかとなった。この結果から、本データベースはバイオパラメータ間の未知の物理的・機能的相互作用を系統的に予見する基盤ツールとして利用できる可能性が示唆された。また、これらのテロメア関連バイオパラメータのフィンガープリントと様々な抗がん剤感受性のフィンガープリントのパターン類似性を *in silico* 解析した結果、興味深いことに、早老症ウェルナー症候群の責任遺伝子産物である WRN ヘリカーゼおよびテロメア 1 本鎖 DNA 結合蛋白質である POT1 の蛋白質発現がいずれも低いがん細胞は、微小管標的薬剤に対して高感受性を示す傾向にあることを見出した。この結果を踏まえ、以下の(4)の検討を実施することとした。

(2) テロメラゼ阻害剤 MST-312 の制がん効果と分子機序：

我々は、合成テロメラゼ阻害剤 MST-312 が、非致死性の低濃度ではがん細胞のテロメアを徐々に短縮させ、最終的に細胞老化およびアポトーシスを誘導することをすでに実証している。今回、MST-312 は、がん細胞のテロメアのなかでも特に短いテロメアにおいて、すみやかに DNA 損傷応答 (telomere dysfunction-induced foci: TIF) を誘導することを見出した。テロメラゼ触媒サブユニット hTERT を過剰発現させてテロメアを人工的に伸長させたがん細胞では、MST-312 による TIF の形成が抑制された。これらの結果は、MST-312 ががん細胞のテロメラゼを阻害し、染色体末端のキャップ構造を崩壊させるとする作業仮説を支持するものである。さらに、MST-312 は染色体腕部での DNA 鎖切断も誘導すること、この鎖切断はテロメアの伸長では抑制されず、核内膜 (inner nuclear

membrane) 蛋白質ラミン A の発現が低いがん細胞ほど顕著に生じることを見出した。ラミン A は核膜の正常な構造と機能の維持に必須であり、ハッチンソン・ギルフォード早老症候群 (HGPS) の責任遺伝子でもある。GeneChip アレイを用いた包括的遺伝子発現解析では、MST-312 は細胞周期および細胞分裂に関連する遺伝子群の発現変化を促すことが明らかとなった。

一方、ヌードマウスの皮下に移植したヒト腫瘍に対し、MST-312 は様々な投与形態 (腫瘍内・尾静脈・経口) のいずれにおいても制がん効果を示すことを見出した。これらの結果から、MST-312 は有望な制がん分子標的創薬シードとなる可能性が期待される。

(3) テロメア伸長因子タンキラーゼ 1 およびテロメア結合蛋白質 TRF1 の新機能の解明：

分裂期キナーゼ Aurora-A は細胞分裂期への進入および分裂過程の進行に必須の役割を果たすが、その発現・機能が過剰に亢進すると細胞分裂に異常が起こり、発がんの契機となる四倍体 (tetraploid) 細胞が生じる。我々は、タンキラーゼ 1 の過剰発現がテロメア結合蛋白質 TRF1 のユビキチン分解を引き起こし、これによって Aurora-A による細胞分裂異常が抑制されることを見出した。これと一致し、TRF1 ノックダウン細胞では Aurora-A の過剰発現による微小管・動原体捕捉の異常とそれに伴う細胞質分裂の失敗が回避された (図 2)。Aurora-A は TRF1 と複合体を形成し、TRF1 の Ser-296 をリン酸化することが明らかとなった。TRF1 ノックダウン細胞に野生型 TRF1 を導入すると Aurora-A による細胞分裂異常が復帰したが、Ser-296 を Ala に置換した非リン酸化変異型 TRF1 では同異常が復帰しなかった。以上より、TRF1 は Aurora-A によるリン酸化を通じて細胞分裂の異常を媒介する可能性が示唆された。

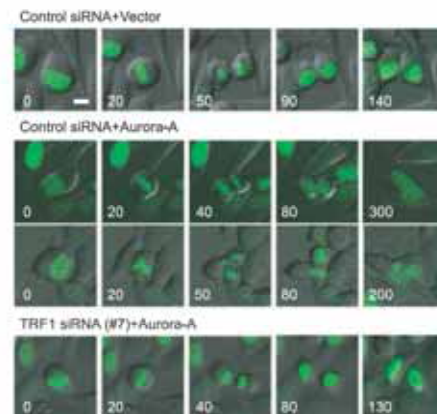


図2: Aurora-Aによる細胞分裂異常を媒介するテロメア結合蛋白質TRF1

一方、タンキラーゼ 1 のノックダウンもしくは優勢不活変異体発現を BRCA1 もしくは BRCA2 のノックダウンと組み合わせることに

より、がん細胞の synthetic lethality が誘導されることを見出した (図 3)。BRCA1/2 は乳がん・卵巣がんなどでしばしば失活の認められるがん抑制遺伝子であり、これらを欠失したがんでは、タンキラーゼ阻害剤が単剤で奏効する可能性が示唆された。この合成致死性の分子メカニズムは現時点では明らかでないが、タンキラーゼも BRCA1/2 も分裂期の中心体に集積することから、細胞分裂過程に何らかの影響が出ている可能性も考えられる。

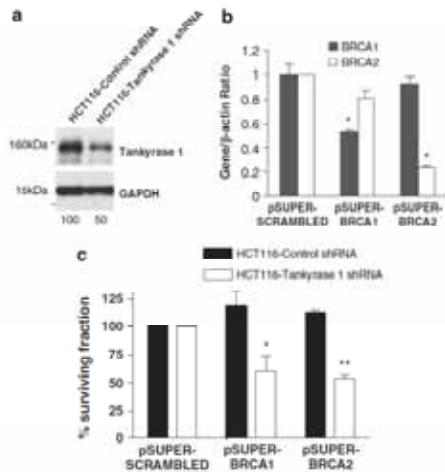


図3:タンキラーゼ1とBRCA1/2の阻害による synthetic lethality

(4) 早老症責任遺伝子 WRN ヘリカーゼの発現と抗がん剤感受性:

前述(1)の解析結果を踏まえ、ウェルナー早老症候群患者由来の不死化細胞 W-V においてテロメア 1 本鎖結合蛋白質 POT1 の発現をノックダウンしたところ、微小管標的薬剤ビンブラスチンの感受性が増強されることが明らかとなった。対照として、正常 WRN 蛋白質を発現するヒト肺がん A549 細胞で POT1 をノックダウンした場合、ビンブラスチンの効果増強は認められなかった。さらに、W-V 細胞に正常 WRN 遺伝子を導入した細胞株では、POT1 をノックダウンしてもビンブラスチンの効果増強は僅かしか認められなかった。以上の結果から、WRN および POT1 の二重阻害は、ビンブラスチンの薬効を高めることが明らかとなった。WRN を阻害し、かつ POT1 をテロメアから遊離する可能性のある化合物としては、テロメア 1 本鎖 DNA によって形成される高次構造 G-quadruplex を標的とした化合物群が知られている。一般に、古典的な抗がん剤は特異性が低いために副作用が強い。これらの薬剤と新たな化合物による、すぐれた併用療法が開発されれば、個々の薬剤の投与量を低減させることが出来、ひいては抗がん剤の副作用の低減につながるものと期待される。

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 11 件)

- ① Ohishi, T., Hirota, T., Tsuruo, T. and Seimiya, H. TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora-A overexpression. *Cancer Res*, 70: 2041-2052, 2010 (査読有)
- ② Tera, M., Iida, K., Ikebukuro, K., Seimiya, H., Shin-Ya, K. and Nagasawa, K. Visualization of G-quadruplexes by using a BODIPY-labeled macrocyclic heptaoxazole. *Org Biomol Chem*, 8: 2749-2755, 2010 (査読有)
- ③ Yashiroda, Y., Okamoto, R., Hatsugai, K., Takemoto, Y., Goshima, N., Saito, T., Hamamoto, M., Sugimoto, Y., Osada, H., Seimiya, H. and Yoshida, M. A novel yeast cell-based screen identifies flavone as a tankyrase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 394: 569-573, 2010 (査読有)
- ④ Migita, T., Narita, T., Asaka, R., Miyagi, E., Nagano, H., Nomura, K., Matsuura, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Seimiya, H. and Ishikawa, Y. Role of insulin-like growth factor binding protein 2 in lung adenocarcinoma: IGF-independent antiapoptotic effect via caspase-3. *Am J Pathol*, 176: 1756-1766, 2010 (査読有)
- ⑤ Kobayashi, Y., Sato, K., Kibe, T., Seimiya, H., Nakamura, A., Yukawa, M., Tsuchiya, E. and Ueno, M. Expression of mutant RPA in human cancer cells causes telomere shortening. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74: 382-385, 2010 (査読有)
- ⑥ McCabe, N., Cerone, M. A., Ohishi, T., Seimiya, H., Lord, C. J. and Ashworth, A. Targeting Tankyrase 1 as a therapeutic strategy for BRCA-associated cancer. *Oncogene*, 28: 1465-1470, 2009 (査読有)
- ⑦ Mashima, T., Seimiya, H. and Tsuruo, T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer*, 100: 1369-1372, 2009 (査読有)
- ⑧ Mashima, T., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T. and Seimiya, H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*, 28: 9-19, 2009 (査読有)
- ⑨ Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., Sugimoto, Y.,

Tsuruo, T. and Seimiya, H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci*, 100: 1556-1562, 2009 (査読有)

- ⑩ Muramatsu, Y., Tahara, H., Ono, T., Tsuruo, T. and Seimiya, H. Telomere elongation by a mutant tankyrase 1 without TRF1 poly(ADP-ribosyl)ation. *Exp Cell Res*, 314: 1115-1124, 2008 (査読有)
- ⑪ Migita, T., Narita, T., Nomura, K., Miyagi, E., Inazuka, F., Matsuura, M., Ushijima, M., Mashima, T., Seimiya, H., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K. and Ishikawa, Y. ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 68: 8547-8554, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 42 件)

代表的なもの 10 件を以下に記載する。

- ① Seimiya, H., Ohishi, H., Hirota, T. and Tsuruo, T. TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora-A overexpression. AACR Special Conference on the Role of Telomerase and Telomeres in Cancer Research • 2010 年 2 月 27 日 • Fort Worth, USA
- ② Seimiya, H., Telomere maintenance systems as anticancer targets. The 14th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy • 2009 年 12 月 2 日 • Tokyo, Japan
- ③ Seimiya, H., Telomere fingerprinting for global prediction of anticancer drug sensitivities, Japanese-German Cancer Workshop • 2009 年 9 月 17 日 • Hamburg, Germany
- ④ 清宮啓之、村松由起子、田原栄俊、矢守隆夫、鶴尾隆 • Telomere Fingerprint Database の構築と薬剤反応性研究への応用 • 第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会 • 平成 21 年 6 月 25 日 • 徳島
- ⑤ Seimiya, H., Muramatsu, Y., Tokunaga, S., Tahara, H., Ueno, M., Yamori, T. and Tsuruo, T. Telomere fingerprinting for global prediction of anticancer drug sensitivities. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Telomeres & Telomerase. 2009 年 4 月 30 日 • Cold Spring Harbor, USA
- ⑥ Seimiya, H. Telomere fingerprinting and its application to drug sensitivity studies, The 9th Korea-Japan Symposium

on Cancer and Ageing Research. 2009 年 3 月 12 日 • Damyang, Korea

- ⑦ 清宮啓之・テロメア動態制御ネットワークの解明と薬剤反応性研究への応用・岩手医科大学・化学療法基盤情報支援班共催シンポジウム「抗がん剤創薬の新たな展開」・2009 年 1 月 16 日・岩手
- ⑧ 清宮啓之、村松由起子、田原栄俊、上野勝、矢守隆夫、鶴尾隆 • Construction of the Telomere Fingerprint Database, a novel platform for telomere dynamics and drug sensitivity studies. 第 67 回日本癌学会学術総会 • 2008 年 10 月 28 日 • 横浜
- ⑨ Seimiya, H., Ohishi, T. and Tsuruo, T. Tankyrase 1 suppresses oncogene-induced mitotic abnormalities. EMBO Conference on Telomeres and the DNA Damage Response • 2008 年 9 月 18 日 • Villars-sur-Ollon, Switzerland
- ⑩ 清宮啓之・細胞分裂におけるテロメア結合蛋白質の新たな機能 • 第 26 回日本ヒト細胞学会学術集会 • 2008 年 8 月 30 日 • 東京

[図書] (計 6 件)

代表的なもの 3 件を以下に記載する。

- ① Seimiya, H., Tsuruo T. Tankyrase 1, telomere-binding proteins, and inhibitors. In: Hiyama, K., editor. *Telomeres and Telomerase in Cancer*. Humana Press; 281-292, 2009.
- ② Seimiya, H. Tankyrases. In: Schwab, M., editor. *Encyclopedia of Cancer*. 2nd ed. Springer; 2899-2901, 2009.
- ③ 清宮啓之、医学書院、テロメア長の制御機構、生体の科学 59: 398-399, 2008.

[その他]

ホームページ:

和文:

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/ccc/molecularbiotherapy/index.html>

英文:

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/english/ccc/molecularbiotherapy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)
財団法人癌研究会・癌化学療法センター
分子生物治療研究部・部長
研究者番号: 50280623

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし