

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390519

研究課題名 (和文) 細胞分裂制御遺伝子 *CHFR* の機能解明および口腔癌の診断・分子標的薬の開発への応用研究課題名 (英文) Functional analysis of *CHFR*: Diagnostic and therapeutic application for oral squamous cell cancer

研究代表者

時野 隆至 (TOKINO TAKASHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：40202197

研究成果の概要 (和文)：癌抑制遺伝子 *CHFR* は細胞周期 M 期チェックポイント機能を有し、E3 ユビキチンリガーゼをコードするが、その標的基質分子および制御機構は不明な点が多い。本研究では、*CHFR* 結合分子として *PARP-1* を同定し、*CHFR* がこの標的分子である 1 本鎖切断 DNA 結合性の DNA 修復関連タンパク *PARP-1* のポリユビキチン化およびタンパク分解を介して M 期チェックポイントを制御していることを突き止めた。また *Chfr* 欠損マウスおよびヒト口腔癌由来の細胞において *PARP-1* タンパクレベルが有意に上昇していることを確認した。本研究はタキサン系抗癌剤抵抗性メカニズムの解明に貢献し、この抵抗性を示す口腔癌細胞において微小管阻害剤と *PARP* 阻害剤とが有効な併用効果をもたらす分子機序を提唱する。

研究成果の概要 (英文) : The mitotic checkpoint gene *CHFR* is silenced by promoter hypermethylation or mutated in various human cancers, suggesting that *CHFR* is an important tumor suppressor. Recent studies have reported that *CHFR* functions as an E3 ubiquitin ligase, resulting in the degradation of these proteins. To better understand how *CHFR* suppresses cell cycle progression and tumorigenesis, we sought to identify *CHFR*-interacting proteins using affinity purification combined with mass spectrometry. Herein, we showed poly(ADP-ribose) polymerase-1 (*PARP-1*), which catalyzes polyADP-ribosylation, to be a novel *CHFR* interacting protein. In *CHFR* expressing cells, mitotic stress induced the autoPARylation of *PARP-1*, resulting in an enhanced interaction between *CHFR* and *PARP-1* and an increase in the polyubiquitination/degradation of *PARP-1*. The decrease in *PARP-1* protein levels promoted cell cycle arrest at antephasis, suggesting that the cells expressing *CHFR* were resistant to microtubule inhibitors. By contrast, in *CHFR*-silenced cells, polyubiquitination following autoPARylation of *PARP-1* was not induced in response to mitotic stress. Thus, *PARP-1* protein levels did not decrease, and cells progressed into mitosis under mitotic stress. Furthermore, we found that cells from *Chfr* knockout mice and *CHFR*-silenced primary gastric cancer tissues expressed higher levels of *PARP-1* protein, strongly supporting our data that the interaction between *CHFR* and *PARP-1* plays an important role in cell cycle regulation and cancer therapeutic strategies. Based on our studies, we demonstrate a significant advantage for use of combinational chemotherapy with *PARP* inhibitors for cancer cells resistant to microtubule inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌・歯学・トランスレーショナル リサーチ・細胞周期・微小管阻害剤・CHFR・PARP-1 阻害剤

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌においては根治性の向上のみならず、咀嚼、嚥下、言語および呼吸道としての口腔機能を温存することが重要である。現在の課題は、術前化学療法の術前予測と効果不良の難治性癌の治療法の開発である。

(2) 口腔癌において細胞分裂期(M 期)チェックポイント制御に關与する CHFR 遺伝子の発現消失が高頻度に検出されることを我々は見出した。さらに、CHFR 発現消失した口腔癌細胞株ではタキサン系微小管阻害剤に対する感受性が高いことを報告した。しかしながら、CHFR は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つことがわかっているが、その機能の詳細については不明な点が多い。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、この新規癌抑制遺伝子 CHFR の機能と制御を解明し、新たな診断法の確立および分子標的治療の開発の研究基盤を築き、臨床研究への橋渡しをするを目的とする。

(2) CHFR は口腔癌の新しい診断・治療法開発の有力な分子標的と考えられるが、その機能、制御機構は未知な点が多い。このため、相互作用分子を手がかりに CHFR の機能とその制御メカニズムを解明し、臨床への応用を目的として結合分子を探索する。

#### 3. 研究の方法

##### (1) CHFR 結合分子の同定

CHFR は E3 ユビキチンリガーゼに属し、複数の基質となるタンパク質の分解を制御していると考えられるが、現在基質としては polo-like kinase 1(Plk1)および aurora A kinase が報告されているのみである。本研究では、Flag-CHFR および HA-ubiquitin を 293T 細胞で共発現させ、免疫沈降後に共沈殿された分子群を LC-MS/MS および MASCOT を利用した質量分析によるプロテオミクス解析を試行し、CHFR E3 ユビキチンリガーゼ基質タンパクの同定を行った。さらに分子生物学的手法を用いて、そのタンパク分解制御を解析した。

##### (2) CHFR によるタキサン系抗癌剤抵抗性メカニズムの解明

我々は既に CHFR 遺伝子の活性化がタキサン系抗癌剤抵抗性に關与していること、さらに CHFR 発現消失させることでこれら抗癌剤への感受性を改善できることを報告している。本研究で同定した新規 CHFR 基質 PARP-1 のタンパク分解制御を介した細胞周期 M 期の調節機構の解析を行った。

##### (3) Chfr ノックアウトマウスおよび臨床検体における CHFR とその基質タンパク PARP-1 の発現解析

口腔癌をはじめ乳がん、胃癌、大腸癌や白血病において、プロモーター領域の DNA メチル化により CHFR 遺伝子は発現消失し、不活性化していることが多い。本研究では、この DNA メチル化を PCR により高感度に検出する系を確立する。次に、Chfr 遺伝子欠損マウスを作成し、そのマウスおよび正常マウス由来の線維芽細胞(MEF)における PARP-1 タンパクの発現解析を行った。また、免疫組織化学的解析により、口腔癌や胃癌の臨床検体における PARP-1 タンパク発現量を検討し、CHFR のメチル化との相関関係を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) CHFR 結合分子としての PARP-1 タンパクの同定

タンパク免疫沈降法および質量分析を利用したプロテオミクス解析によって CHFR 結合分子を探索し、ポリ(ADP-リボシル)化(PAR 化)酵素 PARP-1 タンパクを新規に同定した。次に、CHFR と PARP-1 が結合することを *in vitro* および *in vivo* で確認した。CHFR は PARP-1 をポリユビキチン化し、一方、PARP-1 は CHFR を PAR 化することを見出した。次に、CHFR/PARP-1 の相互作用は PARP-1 の PAR 化活性により制御されていることを明らかにした。

##### (2) CHFR と PARP-1 の相互作用による細胞周期 M 期制御機構の解明

CHFR は微小管阻害剤に応答して活性化されるチェックポイント遺伝子であることから、細胞周期 M 期に焦点を絞り、さらに分子生物学的な解析を行った。微小管阻害剤に応答して、PARP-1 は自己 PAR 化され、PAR 化された PARP-1 は CHFR 依存的にポリユビキチン化され、その結果タンパク分解が促進されることを明らかにした。したがって、微小

管ストレスに応答して、CHFR は自己 PAR 化された PARP-1 と結合して PARP-1 をポリユビキチン化する。その結果、PARP-1 がプロテアソーム経路でタンパク分解されることにより、細胞周期を M 期で停止させるチェックポイントとして機能するという新しい分子メカニズムを提唱することができた。

### (3) Chfr ノックアウトマウスおよび臨床検体における CHFR とその基質タンパク PARP-1 の発現解析

口腔癌細胞において CHFR 遺伝子を siRNA によりノックダウンすると、微小管阻害剤依存的な PARP-1 の分解が抑制された。この結果は、CHFR の発現消失が PARP-1 の過剰発現の原因の 1 つであることを強く示唆している。本研究で作成した Chfr ノックアウトマウス由来の線維芽細胞(MEF)における PARP-1 タンパクの発現解析を行い、正常型 Chfr マウス由来 MEF と比較してノックアウト MEF において PARP-1 が過剰に発現していることを確認した。この結果は、PARP-1 が E3 ユビキチンリガーゼ CHFR によってポリユビキチン化される標的タンパクであることを強く示唆している。

さらに、口腔癌および胃癌臨床検体における CHFR のメチル化状況と PARP-1 タンパク発現を解析したところ有意に相関関係がある知見を得た。今後は予後、ステージ分類、治療感受性、再発率等の臨床病理学的因子との相関関係について明らかにし、予後診断への臨床応用を目指す予定である。

### (4) PARP 阻害剤併用による CHFR 依存的なタキサン系抗癌剤抵抗性の改善

本研究の CHFR 機能解析から、細胞周期 M 期チェックポイントが PARP 阻害剤によって抑制されることが予測できる。この仮説を実証するために、タキサン系抗癌剤に抵抗性を示す口腔癌細胞において、PARP 阻害剤との併用により CHFR 依存的な抗癌剤抵抗性を改善できうるかどうかの可能性の検討を行った。その結果、複数の口腔癌細胞株においてタキサン系抗癌剤/PARP 阻害剤の相乗効果による抗癌剤抵抗性の減少がみられ、エビデンスに基づく新しい治療法の可能性が示唆された。

### (5) 本研究成果の国内外における位置づけとインパクト

現在の課題は、術前化学療法の前予測と効果不良の難治性口腔癌の治療法

の開発である。本研究は、細胞周期 M 期チェックポイント CHFR と 1 本鎖切断 DNA 結合タンパク PARP-1 の相互作用を明らかにし、CHFR/PARP-1 がタキサン系抗癌剤効果予測分子となりうるだけでなく、治療標的分子にしても重要であることが明らかになった。本研究で E3 ユビキチンリガーゼ CHFR の新たな基質分子として同定された PARP-1 は発癌への関与が強く示唆されており、近年、PARP 阻害剤は最も有力な抗癌剤候補として注目され、現在 9 種類の PARP 阻害剤の臨床試験が行われている。特に、BSI-201 (Sanofi-Aventis) は Phase III での有効性が報告されており、その作用機序の解明、効果予測、効果的な治療法の確立は世界が関心を寄せている。

### (6) 今後の展望

本研究により、CHFR と PARP-1 の分子相互作用に着目し解析することによって、これまで未知であった CHFR の機能と制御の分子機構や、タキサン系抗癌剤および PARP 阻害剤に対する応答機構の解明の突破口を開く可能性がある。タキサン系抗癌剤が臨床医療において広く使用されているにもかかわらず、その細胞死誘導メカニズムは未知の点が多い。本研究結果は、新規分子標的治療法や予後予測診断法の確立のみならず、より有効な抗癌剤効果予測や治療抵抗性改善薬の開発という大きな貢献につながる有意義な研究であると確信できる。

我々はこれまで CHFR を分子標的としたトランスレーショナルリサーチを目指した研究を行ってきた実績がある。本研究も基礎的研究にとどまらず、臨床応用への橋渡しの研究であるという点で社会への高い波及効果が期待できる展望が開けることが大いに期待できる。

### 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 26 件)

- ① Yokota I, Sasaki Y, Kashima L, Idogawa M, Tokino T: Identification and characterization of early growth response 2, a zinc-finger transcription factor, as a p53-regulated proapoptotic gene. *Int J Oncology* 査読有 Vol.37, No.6, 2010, pp.1407-1416.
- ② Fujikane T, Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Ashida M, Ohe-Toyota M, Kai M, Nishidate T, Sasaki Y, Ohmura T, Hirata K, Tokino T: Genomic screening for genes upregulated by demethylation revealed novel targets of epigenetic silencing in breast cancer.

- Breast Cancer Res Treat** 査読有 Vol.122, No.3, 2010, pp.699-710.
- ③ Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Nojima M, Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y: A novel correlation between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors. **Clin Cancer Res** 査読有 Vol.16, No.21, 2010, pp. 5114-5123.
- ④ Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa J-P J, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M: IGFBP7 is a p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. **Carcinogenesis** 査読有 Vol.31, No.3, 2010, pp.342-349.
- ⑤ Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T, Itoh F: DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. **Cancer Sci** 査読有 Vol.101, No.7, 2010, pp.1708-1716.
- ⑥ Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, Tokino T: CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF-kB. **Oncogene** 査読有 Vol.28, No.29, 2009, pp.2643-2653.
- ⑦ Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells. **Clin Cancer Res** 査読有 Vol.15, No.11, 2009, pp.3725-3732.
- ⑧ Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, Mita H, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene. **J Biol Chem** 査読有 Vol.284, No.2, 2009, pp. 872-883.
- ⑨ Mita H, Toyota M, Aoki F, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Kashima L, Yanagihara K, Fujita M, Hosokawa M, Kusano M, Sabau SV, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. **BMC Cancer** 査読有 Vol.9, No.198, 2009, on line.
- ⑩ Tokino T: A novel biomarker for cervical cancer. **Cancer Biol Ther** 査読有 Vol.8, No.12, 2009, pp.1154-1155.
- ⑪ Nojima M, Maruyama R, Yasui H, Suzuki H, Maruyama Y, Tarasawa I, Sasaki Y, Asaoku H, Sakai H, Hayashi T, Mori M, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y: Genomic Screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. **Clin Cancer Res** 査読有 Vol.15, No.13, 2009, pp.4356-4364.
- ⑫ Tomita M, Toyota M, Ishikawa C, Nakazato T, Okudaira T, Matsuda T, Uchiyama JN, Taira N, Ohshiro K, Senba M, Tanaka Y, Ohshima K, Saya H, Tokino T, Mori N: Overexpression of Aurora A by loss of CHFR gene expression increases the growth and survival of HTLV-1-infected T cells through enhanced NF-kappaB activity. **Int J Cancer** 査読有 Vol.124, No.11, 2009, pp.2607-2615.
- ⑬ Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. **Cancer Sci** 査読有 Vol.100, No.5, 2009, pp.787-791.
- ⑭ Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Hiratsuka H, Tokino T: Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci** 査読有 Vol.99, No.5, 2008, pp.958-966.
- ⑮ Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H, Tokino T: Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncology** 査読有 Vol.32, No.6, 2008, pp.1253-1261.
- ⑯ Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and BTG4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. **Cancer Res** 査読有 Vol.68, No.11, 2008, pp.4124-4132.

- ⑰ Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T: The histone deacetylase inhibitor FK228 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. **Mol Cancer Ther** 査読有 Vol.7, No.4, 2008, pp.779-787
- ⑱ Sasaki Y, Oshima Y, Koyama R, Maruyama R, Akashi H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T: Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of the p53 family members. **Mol Cancer Res** 査読有 Vol.6, No.3, 2008, pp.395-406.
- ⑲ Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T: Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. **Br J Cancer** 査読有 Vol.98, No.6, 2008, pp.1147-1156.
- ⑳ Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka H, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Cytoplasmic RASSF2A is a pro-apoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. **Carcinogenesis** 査読有 Vol.29, No.7, 2008, pp.1312-1318.
- ㉑ Ting AH, Suzuki H, Cope L, Schuebel KE, Lee BH, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB: Requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. **Cancer Res** 査読有 Vol.68, No.8, 2008, pp.2570-2575.
- ㉒ Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T: DNA hypermethylation causes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. **Gastroenterology** 査読有 Vol.135, No.1, 2008, pp.142-151.
- Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M: DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. **Pharmacogenomics** 査読有 Vol.9, No.12, 2008, pp.1917-1928.
- Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Muruyama R, Nojima M, Ashisa M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in Helicobacter pylori-related enlarged-fold gastritis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 査読有 Vol.17, No.10, 2008, pp.2555-2564.
- ㉓ Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y: Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol** 査読有 Vol.43, No.5, 2008, pp.378-389.
- ㉔ Kawasaki H, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Oshima H, Sasaki Y, Tokino T, Kokai Y, Miyazaki J, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K: In vitro transformation of adult rat hepatic progenitor cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 査読有 Vol.15, No.3, 2008, pp.310-317.

[学会発表] (計3件)

- ① Tokino T, Kashima L, Toyota M, Sasaki Y. CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF- $\kappa$ B. 101st American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. 2010 April, Washington D.C.
- ② Tokino T, Idogawa M, Sasaki Y. A single adenovirus expressing p53 protein and p21-targeting artificial microRNAs improves therapeutic outcome in cancer. 8th AACR-JCA Joint International Conference. 2010, February, Waikoloa, Hawaii.
- ③ Tokino T, Sasaki Y. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of the p53 family members. American Association of Cancer Research (AACR) Annual meeting. 2008 April, San Diego, USA.

[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]

ホームページ等  
<http://web.sapmed.ac.jp/canmol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

時野 隆至 (TOKINO TAKASHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40202197

### (2) 研究分担者

平塚 博義 (HIRATSUKA HIROYOSHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50165180

荻 和弘 (OGI KAZUHIRO)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40433114