

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22791293

研究課題名（和文）胃癌における新規癌抑制遺伝子CHFRの機能解明と診断・治療への応用

研究課題名（英文）Functional analysis of tumor suppressor CHFR and development of novel diagnostic and therapeutic strategies

研究代表者

鹿島 理沙（KASHIMA LISA）

北海道大学・大学院薬学研究院・博士研究員

研究者番号：30404750

研究成果の概要（和文）：新規癌抑制遺伝子CHFRは胃癌等様々な癌で不活性化が見られ、診断・治療の重要な標的でありながらその実態は不明な点が多い。本研究では、CHFRの機能を分子レベル、動物、臨床レベルで解明し、最終的には癌の新規診断・治療確立を目的として研究を行った。

CHFR新規結合分子としてPARP-1を同定、その相互作用により細胞周期を制御していることを明らかにした。また、Chfrノックアウトマウス及び胃癌臨床検体ではこの制御機構が破綻し、癌の発生に関与していることを見出した。更に、抗癌剤抵抗性の分子機構を明らかにし、新規治療抵抗性改善法を提唱するに至った。

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 target 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) 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 prophase, supporting that the cells expressing CHFR were resistant to microtubule inhibitors. By contrast, in CHFR-silenced cells, polyubiquitination was not induced in response to mitotic stress. Thus, PARP-1 protein levels did not decrease, and cells progressed into mitosis under mitotic stress, suggesting that CHFR-silenced cancer cells were sensitized to microtubule inhibitors. 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
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード： 癌、CHFR、PARP-1、細胞周期チェックポイント、ユビキチン化、タキサン系抗癌剤、PARP阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains)は細胞周期M期チェックポイントとして同定された(*Nature*, 2000)。我々は、CHFR遺伝子のプロモーター領域異常メチル化による不活性化が胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌など幅広い癌で高頻度に認められることを世界に先駆けて報告し(*PNAS*, 2003)、CHFRが重要な新規癌抑制遺伝子であることを提唱してきた(*Oncogene*, 2009)。また、我々は、CHFRの発現消失とタキサン系抗癌剤に対する感受性が相関を示すことから、CHFRの発現の有無が抗癌剤適応診断マーカーとなること(*Cancer Res*, 2003)、さらにCHFRのsiRNAとタキサン系抗癌剤の併用により腫瘍抑制効果を増強できることを見出しており(*Cancer Biol Ther*, 2005)、CHFRは癌の診断・治療法開発の有力な標的分子であると言える。

しかしながらCHFRの機能、制御機構は未知な点が多く、臨床応用を目指すにあたり大きなブラックボックスとして残されたままであった。CHFRが分子内にリングフィンガードメインを持つことから、E3ユビキチンリガーゼとして機能すると考えられており、近年の研究から、Aurora AやPlk1等の細胞周期制御因子やHDAC1のような転写制御因子が基質として単離されてきており、CHFRがいかんして癌抑制機能を発揮するかが明らかになりつつある一方で、CHFRがタキサン系抗癌剤等による微小管障害ストレスを感知し、活性化され、細胞周期進行を抑制するのかが等の制御分子機構については全く研究がなされていない。

臨床医療現場でタキサン系抗癌剤が広く使用されているながらその細胞死メカニズムについてはほとんど分かっておらず、CHFRがこのストレス応答の司令塔的役割を担っていると考えられた。従って、本研究がCHFRの機能解析という基礎科学的研究に留まらず、抗癌剤応答機構の全貌を明らかにすることで、予後予測因子や新規分子標的治療法の確立さらには、より精細な抗癌剤感受性マーカーの開発につながりうる可能性を秘めていると考えられた。

このような背景から、研究代表者は、CHFRの新規結合分子を探索/同定し、その相互作用からCHFRの機能及び制御の分子機構解明に迫り、さらには臨床応用へ橋渡しすることを計画した。

## 2. 研究の目的

左記現状に鑑み、本研究ではCHFRの機能及び制御機構を分子レベルで解明し、マウス、さらには胃癌臨床検体における実態を解析することにより、癌の新規診断法、分子標的治療法の開発基盤を築くことを目指し、以下の3点について焦点を絞った。

(1) CHFRの機能と制御の分子機構解明を目的とし、CHFR結合分子を探索、分子相互作用を手がかりに解析を行う。

(2) CHFRによる個体レベルでの発癌への寄与を明らかにすることを目的とし、Chfrノックアウトマウスを作製、マウス個体におけるChfrの機能と癌抑制効果を組織学的及び分子生物学的に解析を行う。

(3) 本研究の分子生物学的解析結果を、予後診断への応用及び新規治療法開発へとつなげることを目的とし、胃癌臨床検体を用いて実際の臨床所見を解析し、新規診断法を確立、また、癌細胞株を用いて抗癌剤への感受性を検討し、新規治療

## 3. 研究の方法

上記目的に沿い、本研究は次に示す方法で進めた。

(1) HEK293T細胞にFLAGタグ付きのCHFRを強制発現させ、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降し、CHFR結合分子を回収し、質量分析を用いて、探索/同定した。CHFRはその分子構造からE3ユビキチンリガーゼ活性を有すると考えられているため、基質となる分子についても回収するために、E3酵素活性を欠損させた変異体についても同様の解析を行った。単離された分子の中で、野生型と比較して結合に増強が見られたPARP-1 (poly[ADP-ribose] polymerase-1)に特に着目して解析を進め、*in vitro*及び*in vivo*における結合を詳細に解析した。次に、CHFRがE3活性を持つことから、*in vitro*及び*in vivo*のユビキチン化アッセイを行い、PARP-1が基質となるか調べた。また、今回同定した分子間相互作用が細

(2) Chfrノックアウトマウスを作製し、病理組織学的異常を調べた。また、Chfrノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞(MEF)を作製し、PARP-1の発現量及び微小管ストレスに応答した細胞周期制御を野生型マウスのMEFと比較、解析した。

(3) 胃癌及び健常胃臨床検体におけるCHFRのDNAメチル化による不活性化とPARP-1の発現量の相関を病理組織学的に解析し、発癌とCHFR及びPARP-1の相関関係を調べた。さらに、CHFRが正常又は不活性化している様々な癌細胞株をタキサン系抗癌剤及び新規抗癌剤として注目されているPARP-1阻害剤で処理し、細胞周期制御及び細胞死誘導をマイトディック・インデックス及びFACSにより定量解析し、抗癌剤感受性の予測マーカーとしての可能性、また、両薬剤併用による新規治療法の可能性について検討した。

#### 4. 研究成果

CHFR新規結合分子探索の結果、PARP-1を単離し、*in vitro*及び*in vivo*での結合を確認し、さらに結合部位を同定した。PARP-1はCHFRと結合することによりポリユビキチン化、分解された。また、この結合は、PARP-1の自己ポリADPリボシル化修飾により制御されるものであり、更に、微小管ストレスによりこの自己修飾は増強され、CHFRとPARP-1の結合が促進された。PARP阻害剤を用いPARP-1のポリADPリボシル化活性を阻害すると、CHFRとの結合が減弱しただけでなく、CHFR依存的な細胞周期抑制能が阻害された。興味深いことに、ノックダウンによるPARP-1の量的減少はそれだけで細胞周期抑制につながらることが見出された。これらのことから、微小管ストレスに応答して、PARP-1の自己ポリADPリボシル化依存的にCHFRとPARP-1の結合が促進され、PARP-1がポリユビキチン化/分解されることで細胞周期が制御されている、という新規細胞周期制御機構が同定された。CHFRによる細胞周期抑制機能が、PARP-1の酵素活性と量的制御による負のフィードバックにより巧妙に制御されていることが見出された。

次に、Chfrノックアウトマウスにおける解析を行ったところ、Chfrノックアウトマウスは正常に発生することが分かった。出生後も野生型と同様に成長し、成体は野生型に比べ体重が増加傾向がみられたが、自然発癌は特に観察されなかった。Chfrノックアウト及び野生型マウス胎児よりMEFを作製し、PARP-1の発現量を解析したところ、ノックアウトマウスでPARP-1タンパク質が増加しており、一方、mRNAレベルに差は見られなかったことから、CHFRがPARP-1をタンパク質レベルで制御していることが、マウスにおいても確認された。

PARP-1は様々な癌において過剰発現が報告されていることから、CHFRの発現消失とPARP-1の過剰発現の相関関係を胃癌臨床検体を用いて病理学的に解析したところ、正の相関が見出された。Chfrノックアウトマウス及び胃癌臨床例を用いた解析から、CHFRの不活性化がPARP-1の過剰発現の原因となり、発癌に結びついている可能性が示された。

最後に、CHFRの活性化が抗癌剤抵抗性に関与することから、PARP-1の活性を阻害することによりCHFRの機能を抑制し、抗癌剤抵抗性を改善できるかを検討した。CHFR依存的にタキサン系抗癌剤に抵抗性を示す胃癌細胞に、PARP阻害剤を併用することで有意に細胞死を誘導できることを見出された。PARP阻害剤は現在、最も有力な抗癌剤候補として注目されており、本研究から微小管阻害剤との併用による相乗効果を狙った新規治療法提唱された。

本研究は、CHFRの機能と制御の分子機構や、タキサン系抗癌剤やPARP阻害剤に対する応答機構の解明の突破口が開いたものであり、基礎医学的にも臨床応用的にも重要な結果が得られた(図)。本研究は、新規細胞周期制御機構を同定したに留まらず、最終的にはトランスレーショナル・リサーチを見据えたものであり、薬剤感受性マーカーとしての応用や新規癌治療法の開発等の方向性を示すに至り、今後さらなる研究の発展が期待できるものである。

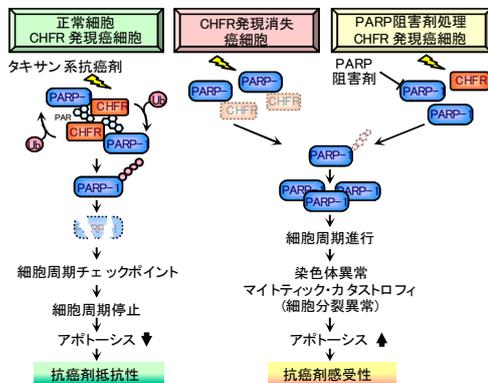


図. CHFRは細胞周期及び抗癌剤感受性を制御するタキサン系抗癌剤など微小管ストレスに応答し、PARP-1はPAR化によりCHFR/PARP-1の結合を制御する。CHFRはPARP-1をユビキチン(Ub)化/分解することで細胞周期進行を抑制しチェックポイントとして機能する。CHFR発現癌細胞では、細胞周期が遅延するため抗癌剤抵抗性を示す(左)。CHFR発現消失癌細胞では、チェックポイント機能が消失により細胞分裂異常が起き、アポトーシスが誘導され抗癌剤感受性を示す(中央)。また、タキサン系抗癌剤とPARP阻害剤の併用によりCHFR

## 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3件)

① Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y, Tokino T. CHFR Protein Regulates Mitotic Checkpoint by Targeting PARP-1 Protein for Ubiquitination and Degradation. J Biol Chem, 287(16), 12975-84, 2012. 査読有  
DOI: 10.1074/ibc.M111.321828

② Cheung AK, Ko JM, Lung HL, Chan KW, Stanbridge EJ, Zabarovsky E, Tokino T, Kashima L, Suzuki T, Kwong DL, Chua D, Tsao SW, Lung ML. Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF- $\kappa$ B-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. PNAS, 108, 8390-95, 2011. 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1101747108

③ Yokota I, Sasaki Y, Kashima L, Idogawa M and Tokino T. Identification and characterization of early growth response2, a zinc-finger transcription factor, as a p53-regulated proapoptotic gene. Int J Oncol, 37, 1407-16, 2010. 査読有  
DOI: 10.3892/ijo\_00000792

[学会発表] (計5件)

① Kashima L. CHFR regulates the mitotic checkpoint by targeting PARP-1 for ubiquitination and degradation. JSPS Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2011, Session 3, New Otani in Sapporo (Hokkaido), July, 2011.

② Kashima L. The functional relationship between CHFR and PARP-1 controls the antephasis checkpoint and tumor development. 102nd AACR Annual Meeting, #2968, Orange County Convention Center (USA), April, 2011.

③ 鹿島理沙. The functional relationship between CHFR and PARP-1 controls the mitotic checkpoint and tumor development. 第33回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド(兵庫), 12月, 2010.

④ 鹿島理沙. Functional association between CHFR and PARP-1 controls the mitotic checkpoint. 第69回日本癌学会総会. 大阪国際会議場(大阪), 10月, 2010.

⑤ Lisa Kashima. CHFR, a potent tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF- $\kappa$ B. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Hilton Waikoloa Village (USA), February, 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

研究の成果をホームページ上 (<http://web.sapmed.ac.jp/canmol/aisatsu.html>) で随時、公開している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿島 理沙 ( Kashima Lisa )  
北海道大学・大学院薬学研究院・博士研究員  
研究者番号：30404750

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし