

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592518

研究課題名(和文) 難治性卵巣がんの新規増幅遺伝子NAC1を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel ovarian cancer molecular target therapy against cancer related transcriptional factor, NAC-1

研究代表者

中山 健太郎 (Nakayama, Kentaro)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：70346401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：サイレントキラーと呼ばれ国民に脅威をあたえている難治性卵巣癌の治療成績を向上させるためには、卵巣癌の分子生物学的特徴を明らかにし、その分子生物学的特徴にターゲットを絞った創薬が必要である。我々はDigital Karyotypingを用いて、卵巣癌の新規増幅癌遺伝子NAC1を発見し、NAC1の機能を抑制すると卵巣癌細胞株が死滅することを明らかにした。現在、NAC1の構造解析を基にNAC1の機能を阻害する新規リード化合物をin silicoスクリーニングしている。また、NAC1発癌モデルマウスを樹立し、動物個体レベルにおける化合物の評価方法を確立する。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer remains the most lethal gynecologic malignancy, largely due to the lack of effective chemotherapeutic agents in the setting of platinum resistant disease. Chemotherapeutic agents targeting critical molecular pathways hold promise for improving survival in these patients. Understanding the critical molecular pathways is central to the development of such agents. With digital karyotyping, we discovered a new amplified oncogene, NAC-1. Repression of NAC-1 induced apoptosis of ovarian cancer cells. NAC-1 dimerization is integral to its function. Based on the structural analysis of the NAC-1 BTB domain, we screened candidate inhibitors of NAC-1 dimer formation. We have begun development on a carcinogenic mouse model of NAC-1 in which inhibitors will be tested prior to being introduced in the clinical setting.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：卵巣癌 分子標的治療 がん遺伝子 遺伝子増幅

## 1. 研究開始当初の背景

申請者がこれまでに行ってきた研究を総括すると、

- 卵巣がん組織と正常卵巣上皮での遺伝子発現を比較した結果、16個のBTBファミリー遺伝子が卵巣がん組織で有意に上昇していた。発現が亢進していたBTBファミリー遺伝子のうち、発現が最も高かったものがNAC1(下図参照)であった。Digital KaryotypingによりNAC1は増幅遺伝子である事も同定した。(Nakayama, et al. PNAS, 2006) (Shih, Nakayama, et al. Mod Pathol., 2011)



- NAC1 遺伝子の発現は、卵巣がんの悪性度が高いものでより亢進しており、また原発巣に比べ再発卵巣がんではさらに亢進していた。

- 原発巣でNAC1の高発現を認めた症例は、認めない症例に比べ1年以内の再発率が有意に高かった。これらの結果、NAC1は卵巣がんの再発に関与しており、NAC1の発現が早期再発の予測マーカーとして有効であることが示唆された。また、子宮頸がんでもNAC1の高発現は独立予後因子であり、分子標的の可能性が示された。

(Yeasmin, Nakayama, et al. Clin. Cancer Res., 2008)

- NAC1 発現陰性細胞株にNAC1 遺伝子を安定導入すると、細胞増殖能の亢進を認めた。またヌードマウスにNAC1を安定導入した細胞株を皮下注すると腫瘍形成を認めた。その腫瘍はNAC1 タンパク質が高発現していた。これらの結果からNAC1は卵巣癌の発がんに関与することが示唆された。
- NAC1 高発現細胞株にBEN領域を含むC末端を欠損した変異型NAC1 遺伝子導入するとアポトーシスが誘導された。NAC1 高発現細胞株にsiRNAを投与しNAC1 遺伝子の発現を抑制するとアポトーシスが誘導された。
- NAC1 を強制発現させた細胞株において遺伝子レベルが低下する遺伝子群をマイクロアレイ法により

検討し、NAC1 の下流の遺伝子としてGADD45GIP1を同定した。GADD45GIP1はアポトーシスを誘導し、NAC1はGADD45GIP1遺伝子の転写を抑制的に制御していると考えられた。(Nakayama, et al. Cancer Res., 2007)

- 卵巣がんにおいて現行化学療法の第一選択剤であるタキソールに抵抗性を示す卵巣がん細胞株では、タキソール感受性細胞株と比較して有意にNAC1が高発現していた。また、siRNA投与によりNAC1遺伝子の発現を抑制するとタキソールに対する感受性が回復した。(Ishibashi, Nakayama, et al. Clin. Cancer Res., 2008)

平成21年度より島根大学 重点研究プロジェクトのサポートを受け、共同研究マッチングにより、産科婦人科学講座と病態生化学講座(浦野 健 教授)との共同研究を開始した

## 2. 研究の目的

- 1) NAC1 の機能を阻害する新規リード化合物をin silicoスクリーニングする。
- 2) 細胞レベルでNAC1の機能を抑制するリード化合物の絞り込みを行う。
- 3) NAC1 発がんモデルマウスを樹立し、動物個体レベルにおける化合物の評価方法を確立する。

## 3. 研究の方法

### 1) NAC1 の構造解析(横浜市立大学 朴三用教授との共同研究で進行中)

His タグ-TEV 認識部位を有する融合タンパク質としてNAC1 タンパク質の全長(1-527)、N末端(1-250)およびC末端(251-527)を大腸菌から大量精製し、TEV 酵素により切断後、構造解析を行う。結晶安定化のため、全長およびC末端に関しては、申請者が同定した結合DNA配列と、あるいはモノクローナル抗体(樹立したモノクローナル抗体はすべてC末端を認識)と共結晶化して構造解析する。

### 2) NAC1 の下流遺伝子群の網羅的解析

開発したNAC1阻害剤の副作用予測、治療効果の予測などのため、申請者らが作成した抗NAC1モノクローナル抗体を用いて染色体免疫沈降後次世代シーク

エンサー解析を行い、NAC1 が制御している下流遺伝子を網羅的に検索する。

### 3) in silico スクリーニング (産業技術総合研究所 広川貴次チームリーダーとの共同研究)

NAC1 の構造解析のデータを基に、広川博士が開発したアルゴリズムを用いて、スーパーコンピューター (日立) を利用した in silico スクリーニングを行う。昨年夏にヒト NAC1 (1-124) の構造解析 (PDB 3GA1) が他の研究者から報告された。この情報を基に、先行してスクリーニングを行う。

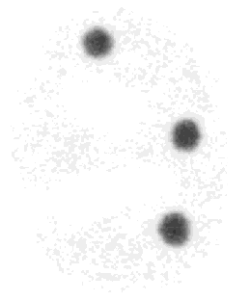
#### 平成 25 年度以降

### 1) in silico スクリーニング (産業技術総合研究所 広川貴次チームリーダーとの共同研究)

NAC1 の構造解析のデータを基に、さらに in silico スクリーニングを行う。

### 2) 細胞アッセイ系による検証 (本学 浦野 健教授との共同研究)

NAC1 の細胞内動態観察中に、NAC1 のある点突然変異体が核内でドット状となることに気付いた (右図参照、白黒反転させている)。詳細に検討した結果、動的な構造体で NAC1 の二量体化を阻害すると構造体が消失することが判明した。すなわち、この変異体を有する細胞株を用いれば、機能発現に必須である NAC1 の二量体化の阻害を可視化できる。

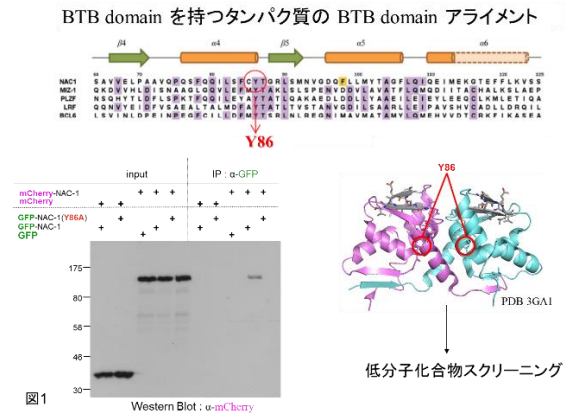


#### 4. 研究成果

##### 1. NAC1 のホモダイマー阻害

ホモ二量体で機能する NAC1 の、ダイマー形成を阻害することで、NAC1 の機能を抑制出来ることを発見した。さらに、ダイマー形成ドメインである BTB ドメイン内の、ホ

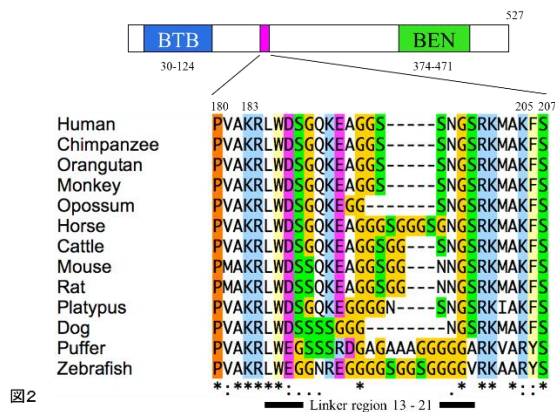
モダイマー形成に最も重要なアミノ酸を同定した (図 1)。このアミノ酸をアラニンに置換したものはホモダイマー形成が完全に阻害されることから、このアミノ酸残基をターゲットとした創薬開発を進めている。



## 2. NAC1 の核移行シグナルの阻害

また、新たな創薬のストラテジーとして、NAC1 の核移行シグナルに着目した。NAC1 には種を超えて核移行シグナル (NLS) が存在し、NLS 依存的に核移行することを発見した (図 2)。さらに NAC1 の機能発現が核移行に依存していることも発見した。内在性の NAC1 を siRNA 処理すると *GADD45GIP1* の発現が見られるが、siRNA 耐性の NAC1 を遺伝子導入し、NAC1 siRNA で処理しても、*GADD45GIP1* 発現は見られず、NAC1 の機能はレスキューされた。さらに、siRNA 耐性でかつ核移行シグナルに変異を入れた NAC1 は、siRNA による内在性 NAC1 の機能阻害をレスキューできなかった (図 3)。即ち、核移行シグナルの変異体 NAC1 は核移行が出来ず、下流遺伝子である *GADD45GIP1* の発現を抑制できなかった。以上の結果より NAC1 の核移行シグナル阻害は創薬へ繋がる可能性が示された。

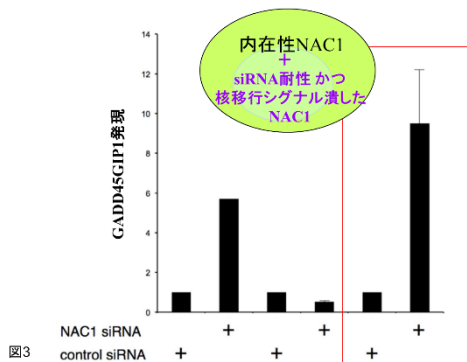
## NAC1は核移行シグナルを持つ



### 3. NAC1 の DNA 結合阻害

NAC1 タンパク質は、2008 年にコンピュータ解析により同定された機能未知のドメイン、BEN ドメインを有する。試験管内結合実験により

NAC1の核移行シグナルは、創薬ターゲットになり得る



り、BEN ドメインを介して NAC1 タンパクは直接 DNA と結合することを証明した。PCR を利用したランダムオリゴ DNA 結合スクリーニング法により、NAC1 が BEN ドメイン特異的に認識する塩基配列を決定した。この DNA 配列は *GADD45GIP1* 遺伝子のプロモーター領域に 4 カ所存在した。試験管内結合実験により NAC1 タンパクは BEN ドメインを介して *GADD45GIP1* 遺伝子のプロモーター配列に直接結合する事を発見した。現在、BEN ドメインについては構造解析中であり、その結果を基に DNA 結合能を阻害する低分子化合物のスクリーニングを予定している。

### 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 20 件)

- 20 Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K.: Biological and clinical significance of NAC1 expression in cervical carcinomas: a comparative study between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas. *Hum Pathol.*, 43: 506-519, 2012
- 19 Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Nakayama N, Ishikawa M, Ishibashi T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Loss of ARID1A expression is related to shorter progression-free survival and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma. *Mod Pathol.*, 25: 282-288, 2012
- 18 Jones S, Wang TL, Kurman RJ, Nakayama K, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW, Papadopoulos N, Shih IeM.: Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol.*, 226: 413-420, 2012
- 17 Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Nakayama N, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Shih IeM, Miyazaki K.: Prognostic and therapeutic impact of the chromosome 20q13.2 ZNF217 locus amplification in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer*, 118: 2846-2857, 2012
- 16 Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Ishikawa M, Ishibashi T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.:

- Frequent loss of tumor suppressor ARID1A protein expression in adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas of the uterine cervix.  
**Int J Gynecol Cancer**, 22: 208-212, 2012
- 15 Rahman MT, **Nakayama K**, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Nakayama S, **Miyazaki K**.: Fatty acid synthase expression associated with NAC1 is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas.  
**Br J Cancer**, 107: 300-307, 2012
  - 14 Okazaki K, Nakayama N, Nariai Y, **Nakayama K**, **Miyazaki K**, Maruyama R, Kato H, Kosugi S, Urano T, Sakashita G.: Nuclear localization signal in a cancer-related transcriptional regulator protein NAC1.  
**Carcinogenesis**, 33: 1854-1862, 2012
  - 13 Rahman M, **Nakayama K**, Rahman MT, Nakayama N, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Shih IeM, Miyazaki K.: Clinicopathologic and biological analysis of PIK3CA mutation in ovarian clear cell carcinoma.  
**Hum Pathol.**, 43: 2197-2206, 2012
  - 12 Rahman MT, **Nakayama K**, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Gene amplification of ZNF217 located at chr20q13.2 is associated with lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma.  
**Anticancer Res.**, 32: 3091-3095, 2012
  - 11 Rahman MT, **Nakayama K**, Ishikawa M, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Yamada T, **Miyazaki K**.: NAC1, a BTB/POZ protein overexpressed in uterine sarcomas.  
**Anticancer Res.**, 32: 3841-3845, 2012
  - 10 Rahman MT, **Nakayama K**, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Nakayama S, Otsuki S, **Miyazaki K**.: Notch3 overexpression as potential therapeutic target in advanced stage chemoresistant ovarian cancer.  
**Am J Clin Pathol.**, 138: 535-544, 2012
  - 9 Yap KL, Fraley SI, Thiaville MM, Jinawath N, **Nakayama K**, Wang J, Wang TL, Wirtz D, Shih IeM.: NAC1 is an actin-binding protein that is essential for effective cytokinesis in cancer cells.  
**Cancer Res.**, 72: 4085-4096, 2012
  - 8 Kuhn E, Wu RC, Guan B, Wu G, Zhang J, Wang Y, Song L, Yuan X, Wei L, Roden RB, Kuo KT, **Nakayama K**, Clarke B, Shaw P, Olvera N, Kurman RJ, Levine DA, Wang TL, Shih IeM.: Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses.  
**J Natl Cancer Inst.**, 104: 1503-1513, 2012
  - 7 Nishi T, Maruyama R, Urano T, Nakayama N, Kawabata Y, Yano S, Yoshida M, **Nakayama K**, **Miyazaki K**, Takenaga K, Tanaka T, Tajima Y.: Low expression of nucleus accumbens-associated protein 1 predicts poor prognosis for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.  
**Pathol Int.**, 62: 802-810, 2012
  - 6 Rahman M, **Nakayama K**, Rahman MT, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, **Miyazaki K**.: Clinicopathological analysis of loss of AT-rich interactive domain 1A expression in endometrial cancer.  
**Hum Pathol.**, 44: 103-109, 2013
  - 5 Katagiri H, **Nakayama K**, Rahman MT, Rahman M, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, **Miyazaki K**.: Is ATP7B a predictive marker in

patients with ovarian carcinoma treated with platinum-taxane combination chemotherapy?

**Int J Gynecol Cancer**, 23: 60-64, 2013

- 4 Rahman M, **Nakayama K**, Rahman MT, Nakayama N, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, **Miyazaki K**.: PPP2R1A mutation is a rare event in ovarian carcinoma across histological subtypes.  
**Anticancer Res.**, 33: 113-118, 2013

- 3 Rahman MT, **Nakayama K**, Ishikawa M, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, **Miyazaki K**.: Fatty acid synthase is a potential therapeutic target in estrogen receptor-/progesterone receptor-positive endometrioid endometrial cancer.  
**Oncology**, 84: 166-173, 2013

- 2 Rahman MT, **Nakayama K**, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N, **Miyazaki K**.: KRAS and MAPK1 gene amplification in type II ovarian carcinomas.  
**Int J Mol Sci.**, 14: 13748-13762, 2013

- 1 Rahman MT, **Nakayama K**, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N, **Miyazaki K**.: ESR1 gene amplification in endometrial carcinomas: A clinicopathological analysis.  
**Anticancer Res.**, 33: 3775-3781, 2013

[学会発表] (計 3 件)

1. **中山健太郎**、中山真美、石川雅子、片桐浩、片桐敦子、佐藤絵美、飯田幸司、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、**宮崎康二**  
卵巣癌における NAC1 pathway に基づいた創薬への展開、(婦人科がんにおけるトランスレーショナルリサーチ、シーズの探索から臨床応用まで)  
第 72 回 日本癌学会学術総会、2013 年

10 月 3 日、パシフィコ横浜、横浜市

2. **中山健太郎**、石川雅子、片桐 浩、片桐敦子、石橋朋佳、佐藤絵美、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、飯田幸司、中山真美、**宮崎康二**  
新規癌関連転写因子 NAC1 を標的とした卵巣癌治療法の開発、(卵巣癌の Molecular Medicine)、  
第 54 回 日本婦人科腫瘍学会、2013 年 7 月 20 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京

3. **中山健太郎**、  
卵巣癌における NAC1/Gadd45/MKK4 経路を介した腹膜播種機構の解明と阻害剤開発による臨床応用、(婦人科癌の浸潤・転移機構の解明と臨床応用)  
第 65 回 日本産科婦人科学会学術講演会、2013 年 5 月 10 日、ロイトン札幌 (札幌市)  
[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山健太郎 (Kentaro Nakayama)

島根大学・医学部・講師

研究者番号 : 70346401

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :