

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390370  
 研究課題名（和文） プロテインホスファターゼを標的とした、肺癌の診断・治療開発のための研究  
 研究課題名（英文） Development of genetic diagnosis and drugs for lung cancer, based on protein phosphatase targeting  
 研究代表者  
 佐藤 雅美（SATO MASAMI）  
 宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・特任研究員  
 研究者番号：30250830

## 研究成果の概要（和文）：

（1）プロテインホスファターゼによる、mRNA スプライシング、KIF3 モーターを介した細胞内輸送、および細胞増殖（ERK）経路における制御機構に関して重要な知見を得た。  
 （2）肺癌サンプルにおけるプロテインホスファターゼ遺伝子発現の異常に関して重要な知見を得た。

## 研究成果の概要（英文）：

(1) Regulation of mRNA splicing, intracellular transport using KID3 motor, and ERK activation by protein phosphatases has been revealed.  
 (2) Expression of protein phosphatase genes in lung tumor tissues has been analyzed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科

キーワード：呼吸器外科学、プロテインホスファターゼ、スプライシング、細胞内トランスポート、KIF3 モーター、MAPK 経路、遺伝子発現異常、遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

タンパクのリン酸化レベルは、キナーゼ（リン酸化酵素）と、ホスファターゼ（脱リン酸化酵素）の拮抗する作用によって調節される。キナーゼに対する阻害剤として開発された抗癌剤の、グリベック（BCR/ABL阻害剤）

やイレッサ（EGFレセプター阻害剤）の登場で、細胞内タンパク質のリン酸化制御による癌治療は、極めて有望かつ現実的な治療法となった。

肺癌におけるキナーゼの研究は先行しており、例えば非小細胞癌でEGFレセプターの

増幅や変異が認められ、イレッサ治療が現実となった。一方ホスファターゼ側からの研究は、その重要性にも関わらず、基礎研究そのものが遅れていたこともあり、肺癌の発生や悪性化に関して、その詳細はほとんど不明であった。

現在主に開発されている分子標的抗癌剤がキナーゼに対する阻害剤であとから、次の世代の抗癌剤の標的が、ホスファターゼとなることは自明の理である。現在、世界中の基礎研究者や製薬会社が、この新しいこの分野に参入しつつある。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の4つの研究からなる。このうち(1)(2)(3)はホスファターゼの基礎研究を癌診断・治療への発展させる試みである。一方(4)は、臨床サンプルを用いて肺癌組織におけるホスファターゼの異常の有無を調べる研究である。これら4つの研究により、ホスファターゼを標的とした全く新しい診断および治療の開発を目的としている。

### (1) ホスファターゼによるスプライシングの制御を標的とした新規癌治療法の開発

我々は、以前マイクロアレイの手法を用いて、肺癌細胞培養株においてスプライシングの異常があることを報告した。最近の他のグループからの報告も含めると、スプライシングは、新たな治療標的としての可能性が高いと考える。

我々は、主要なPP1(セリンスレオニンホスファターゼ1型)とその制御タンパクNIPP1からなるPP1/NIPP1複合体が、遺伝子発現におけるスプライシング調節に、重要な役割を果たすことを示唆するデータを得ていた。本研究においては、PP1/NIPP1によるスプライシング制御機構に関して、新たな治療標的としての可能性を探る。

### (2) ホスファターゼによる細胞内輸送制御を標的とした新規癌治療・診断法の開発

我々は、酵母2ハイブリッドスクリーニングにより、DUSP26(2重基質ホスファ

ーゼ26)がKif3A(キネシンモータータンパク)と結合することを見出していた。本研究においては、DUSP26によるKif3Aの制御機構、およびその異常と癌化との関係を明らかにする。

### (3) ホスファターゼによる、増殖制御の新しい分子機構の解明

MKP7(MAPKホスファターゼ7)は、我々が同定したJNK特異的ホスファターゼであるが、他方でERKとも強い結合活性をもつことがわかっていた。本研究においては、基質ではないERKとの結合のもつ意義を明らかにし、新たな増殖制御機構および発癌との関係を解明する。

### (4) 肺癌組織における、ホスファターゼ分子の異常の有無の検討

癌におけるタンパクのリン酸化に関して、初期の段階では、キナーゼ=癌化因子、ホスファターゼ=癌化抑制因子、と想定されていた。しかし、個々のホスファターゼ分子の機能が明らかにされ、むしろ悪性化に働く場合があることも示されてきた。

本研究では、先ず、宮城県立がんセンターにおいて肺癌組織バンクおよび肺癌のcDNAバンクを作製する。次に、我々の過去約20年の基礎研究によって癌との関係が示唆されたPTP(ホスホチロシンホスファターゼ)、DSP(2重基質性ホスファターゼ)およびPP(セリン/スレオニンホスファターゼ)それに加えて、文献的に報告された癌関連PTP,DSP,PPから選んだ分子種に焦点を当て、肺癌cDNAバンクにおける、これら分子の異常の有無を体系的に調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) ホスファターゼによるスプライシングの制御を標的とした新規癌治療法の開発

PP1/NIPP1複合体と結合するタンパク質を同定する。

PP1の新規基質タンパクを同定する。

NIPP1の過剰発現・発現抑制により、スプライシングあるいは翻訳に異常を示す遺伝

子を同定する。

複合体に含まれる mRNA の種類、他のタンパク質の同定を行う。NIPP1 のノックダウンによりリン酸化状態の変化するタンパクの同定を行う。

(2) ホスファターゼによる細胞内輸送制御を標的とした新規癌治療・診断法の開発

DUSP26 が結合する、KIF モーター (Kif3A/KIF3B/KAP3) 複合体に含まれるタンパクとして、APC、フォドリン、SmgGDS、PAR3、N-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンがある。我々の見いだした LDP4 ダイマーとこれらのタンパクとの関係・他の未知の構成タンパクの有無を解析する。

DUSP26 の基質を明らかにする。

DUSP26 の活性を持たない変異体を細胞内に発現させ、細胞 細胞の接着、細胞の運動への影響を解析する。

(3) ホスファターゼによる、増殖制御の新しい分子機構の解明

MKP7 存在下による、ERK のリン酸化・局在の変化、転写活性 (SRE と AP1 依存性) への影響を調べる。

(4) 肺癌組織における、ホスファターゼ分子の異常の有無の検討

リアルタイム PCR で PTP, DSP, PP に属する各種ホスファターゼ遺伝子群の発現量 (mRNA レベル) を定量的に測定する。

HRM を用いて、上記の遺伝子の変異の有無を調べる。

特に記したもの (タンパクの安定性が癌によって異常になっている可能性があるもの) に関しては、特異的抗体により、タンパク量をウエスタンブロットで解析する。

#### 4. 研究成果

基礎研究 -我々が見出したホスファターゼと癌との新しい接点-

(1) ホスファターゼによるスプライシン

グの制御を標的とした新規癌治療法の開発

PP1 が、NIPP1 により核内 (特にスプライシングのマシナリー) にターゲットされることを見出した。

「PP1/NIPP1」酵素が、SAP155 を脱リン酸化することを明らかにした。

「PP1/NIPP1」酵素が、共発現させたベータグロビン遺伝子のスプライシングを阻害することを見出した。NIPP1 の C 末端欠損体を用いるとこの阻害作用が著しく増大することがわかった。

「PP1/NIPP1」酵素の脱リン酸化活性を増強させることにより、スプライシングを阻害し、細胞死を誘導することが明らかとなった。

SAP155 のリン酸化サイトにうち、PP1/NIPP1 によって脱リン酸化される残基の一部の同定に成功した。

以上の研究は、「PP1/NIPP1」という脱リン酸化酵素がスプライシングに重要であること、またこの「PP1/NIPP1」酵素の働きを人為的に変化させることによりスプライシングが止まり、がん細胞が自ら死ぬように仕向ける事、即ちこの作用を用いた新しい癌治療の可能性が示された。一連の仕事は論文 7 に発表された。

(2) ホスファターゼによる細胞内輸送制御を標的とした新規癌治療・診断法の開発

低分子量 2 重基質性ホスファターゼの新しい分子種である DUSP26 の機能を探るために 2 ハイブリッドスクリーニングをし、KIF3A を結合することを明らかとした

DUSP26 が KIF3 複合体に含まれることがわかった。

DUSP26 が、KAP3 が脱リン酸化されことを明らかとした。即ち、Dusp26 が、KIF3A を介して KAP3A と結合しかつ脱リン酸化することを見いだした。

KIF3A の脱リン酸化により、N-cadherin、catenin の細胞膜への輸送が障害され、細胞接着が抑えられることを見いだした。

以上の結果は、Dusp26 は、細胞接着に重要なホスファターゼであり、その発現低下により細胞の播種や転移につながることを示唆された。Dusp26 の発現低下は様々な癌組織で

認められることから、Dusp26の発現制御、またはKAP3のリン酸化制御を標的とした新しい治療への開発がつながることが期待された。この研究は論文2として発表された。

### (3) ホスファターゼによる、増殖制御の新しい分子機構の解明

MKP7存在下において、細胞のERKの活性化はむしろ増大し遅延することがわかった。さらに、この現象はMKP7のホスファターゼ活性に依存しないことがわかった。

MKP7は、リン酸化したERKの核移行を阻害し、細胞質の留めておく働きがあることがわかった。

MKP7は、AP-1を介した転写活性は、酵素活性依存性に、SREを介した酵素活性非依存的に阻害することを明らかとした。

以上の所見は、ホスファターゼが、タンパクタンパク結合を介してシグナル伝達を負に制御する稀有な例であった。従来ストレス制御にみに働くと考えられていたMKP7が細胞増殖制御にも働くことを始めて報告した(論文1)。

### (4) 肺癌組織における、ホスファターゼ分子の異常の有無の検討

前癌病変、早期肺癌、進行癌の生検、手術検体、胸水、気管ブラシ洗浄液に関して、凍結保存を行った。

上記サンプルからトータルRNAの抽出を行い、cDNAのバンク化を行った。サンプルは、匿名化され、組織バンクとして管理するシステムを作製した。

PTP, DSP, PPに属する全部で50のホスファターゼ遺伝子発現の解析のため、TaqManプローブを用いてリアルタイムPCRの条件を設定した。

遺伝子変異を簡便・安価・短時間にスクリーニングするために、high resolution melting (HRM)システムを導入することとした。注目している分子に関する条件設定を行った。

以上の解析により、ホスファターゼ遺伝子のうち、肺癌でその発現の異常亢進が認められるもの、異常減少が認められるものがある

ことがわかった。現在、さらに症例数を増やしてその普遍性を検討しているところである。EGFRを脱リン酸化し、その活性を負に制御するホスファターゼであるPTPRT, PTPRZ, LAR, PTPN13, PTPN18の活性ドメインにおける変異の有無をスクリーニングしたが、50の症例において、変異は認められなかった。

### 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13件)

Masuda K, Katagiri C, Nomura M, Sato M, Kakumoto K, Akagi T, Kikuchi K, Tanuma N, Shima H. MKP-7, a JNK phosphatase, blocks ERK-dependent gene activation by anchoring phosphorylated ERK in the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 393:201-206, 2010

Tanuma N, Nomura M, Ikdea M, Kusugai I, Tsubaki Y, Takagaki K, Kawamura T, Yamashita Y, Sato I, Sato M, Katakura R, Kikuchi K, Shima H. Protein phosphatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Oncogene* 28:752-76, 2009

Sagawa M, Endo C, Sato M, Saito Y, Sobue T, Usuda K, Aikawa H, Fujimura S, Sakuma T, Four year experience of the survey on quality control of lung cancer screening system in Japan. *Lung Cancer* 63:291-294, 2009

Endo C, Honda M, Sakurada A, Sato M, Saito Y, Kondo T, Immunocytochemical evaluation of large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, *Acta Cytol*, 2009 53:36-40

Yamanaka S, Gu Z, Sato M, Fujisaki R, Inomata K, Sakurada A, Inoue A, Nukiwa T, Kondo T, Horii A, siRNA targeting against EGFR, a promising candidate for a novel therapeutic application to lung adenocarcinoma *Pathobiology* 75:2-8,2008.

Gu Z, Mitsui H, Inomata K, Honda M, Endo C, Sakurada A, Sato M, Okada Y, Kondo T,

Horii A, The methylation status of FBXW7 beta-form correlates with histological subtype in human thymoma, Biochem Biophys Res Commun 377: 685-688, 2008.

Tanuma N, Kim SE, Buellens M, Tsubaki Y, Mitsuhashi S, Nomura M, Kawamura T, Isono K, Koseki H, Sato M, Bollen M, Kikuchi K, Shima H, Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1(PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle(snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155). J Biol Chem 285,52:35805-35814,2008.

Yamanaka S, Gu Z, Sato M, Fujisaki R, Inomata K, Sakurada A, Inoue A, Nukiwa T, Kondo T, Horii A, siRNA targeting against EGFR, a promising candidate for a novel therapeutic application to lung adenocarcinoma. Pathobiology 75(1):2-8, 2008

〔学会発表〕(計 35 件)

Miyuki Nomura, Nobuhiro Tanuma, Isao Kasugai, Masami Sato, Hiroshi Shima, Dusp26 Associates with KIF3 Motor and Promotes Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion EUROPHOSPHATASE 2009, Protein phosphatases in development and disease, Egmond aan Zee, The Netherlands, 2009.07.16

佐藤雅美、高橋里美、前田寿美子、阿部二郎、前門戸任、松原信行、シンポジウム2、気管支鏡による肺門部画像診断の最先端、Optical biopsy の時代へ-OCT による上皮層から軟骨層までの画像観察- 第 32 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、東京、2009/5/29

Yoshikazu Nishino, Masami Sato, Yuko Minami, Ichiro Tsuji, Trends in incidence of lung cancer by histological type in Miyagi, Japan IACR meeting, Sydney, 2008/11

前田寿美子、野津田泰嗣、高橋里美、小池加保児、佐藤雅美：肺切除術後における血清トロンボモジュリン値の変化 第 25 回日本呼吸器外科学会総会、2008/5/29 宇都宮

高橋里美、佐藤雅美、一ノ瀬高志、佐川元保、遠藤千顕、佐藤 徹、鈴木弘行、千田雅行、佐久間 勉、佐藤信之、谷田達男、中村好宏、羽隅 透、菅野隆三、近藤 丘：マレイン酸イルソグラジンを用いた原発性肺癌完全切除術後治療の無作為化比較試験 第 48 回日本肺癌学会総会、名古屋、2007/11/9

〔図書〕(計 1 件)

佐藤雅美、他、呼吸器症候群(第 2 版)III - その他の呼吸器疾患も含めて - VIII 腫瘍性疾患、E. その他の腫瘍性病変、重複癌、p246-249. 日本臨床社

〔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  
<http://www.pref.miyagi.jp/mcc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雅美 (SATO MASAMI)  
宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・特任研究員  
研究者番号：30250830

(2) 研究分担者

島 礼 (SHIMA HIROSHI)  
宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・部長  
研究者番号：10196462

(3)研究分担者

田沼 延公 (TANUMA NOBUHIRO)  
宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学  
部・研究員  
研究者番号：40333645

(4)研究分担者

野村 美有樹 (NOMURA MIYUKI)  
宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学  
部・技師  
研究者番号：40390893

(5)研究分担者

佐々木 希 (SASAKI NOZOMI)  
宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学  
部・臨時職員  
研究者番号：50467429