

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591116  
 研究課題名（和文） ATL の発症・進展における DNA 修復阻害因子 hnRNP B1 の作用と治療への応用  
 研究課題名（英文） The role of hnRNP B1, an inhibitor of DNA repair, in leukemogenesis and disease progression on adult T cell leukemia  
 研究代表者 末岡 栄三朗(SUEOKA EIZABURO)  
 佐賀大学・医学部・准教授  
 研究者番号 00270603

## 研究成果の概要：

## （1）ATL 細胞における DNA 修復阻害因子 hnRNP B1 の過剰発現とその意義

肺がんの早期から過剰発現することを見出した hnRNP B1 タンパク質は、細胞内で DNA 依存性キナーゼ複合体に結合することを見出している。hnRNP B1 は ATL の 70% 以上の症例において過剰発現していた。その発現は慢性期から増加し、急性期、リンパ腫型においては約 8 割の症例において発現亢進することが明らかになった。ATL 細胞を用いた解析では hnRNP B1 は DNA 依存性キナーゼに結合しその酵素活性を阻害すること、hnRNP B1 の量と非相同末端修復（NHEJ）の活性は逆相関の傾向にあることを明らかにした。

## （2）新規抗がん剤 SMS-06 による ATL 細胞に対する抗腫瘍効果の解析

SMS-06 は  $IC_{50}$  として 50-100nM の濃度で種々の ATL 細胞の増殖を抑制した。その機序として G2/M 停止とその後のアポトーシスの誘導によることを明らかにした。また SMS-06 はトポイソメラーゼ II の阻害作用に加えて hnRNP B1 の存在下において放射線照射による DNA 修復を阻害する作用を持つことを見出した。さらに SCID マウスへの ATL 細胞の移植系において腫瘍の増殖を抑制作用を確認した。複数の分子標的を有する SMS-06 は ATL の治療薬剤開発のためのリード化合物として臨床応用への検討を進めている。

## 交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞性白血病・リンパ腫 (ATL) は HTLV-1 感染から数十年の経過を経て発症する予後

不良性疾患であるが、これまでウイルス由来転写因子、Tax を中心とする発癌・進展のメカニズムについて様々な研究がなされてき

た。ATL は種々の遺伝子変異とエピジェネティックな変化の蓄積によりキャリアから多段階発がん過程を経て発症すると考えられているが、その特徴は 遺伝子変化が多様であること、 変異頻度も高いことである。我々は最近、RNA スプライシング制御因子のひとつである hnRNP B1 が DNA 修復酵素である DNA 依存性キナーゼ(DNA-PK)に結合しその活性を阻害すること (Iwanaga et al, BBRC, 2005)、ATL で慢性型から急性・リンパ腫型に至るまで段階的に過剰発現することを見出している (Tomimasu et al, 論文投稿中)。また、SMS-06 (仮称) は培養細胞を用いた検討では種々のがん細胞株に対しアドリアマイシンと同等の細胞増殖抑制作用をもつ新規抗がん剤であり、臨床試験が進行中である。この抗がん剤の標的分子の解析から hnRNP B1 に特異的に結合することが明らかになっている (論文準備中)。この結果は hnRNP B1 の制御が ATL の治療に応用できる可能性を示している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は ATL の発症・進展における遺伝子変異の蓄積に hnRNP B1 がどのように関与するか細胞および臨床検体を用いた解析から明らかにする。 hnRNP B1 を標的とする新規抗癌剤が ATL の新規治療薬としての有用性を細胞および動物実験レベルで検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ATL 細胞を用いた hnRNP B1 による DNA 依存性キナーゼ活性の阻害メカニズムの解析: hnRNP B1 と DNA 依存性キナーゼとの介合様式および責任領域を各種欠失体を用いたプルダウン法により解析する。また hnRNP B1 による DNA 依存性キナーゼ阻害作用を in vitro キナーゼアッセイおよび host reactivation アッセイにより検討する。

(2) 臨床検体における hnRNP B1 の発現と臨床病理学的特徴について検討する。

(3) SMS-06 による ATL 細胞に対する抗腫瘍効果の解析: HTLV-1 関連細胞株に対する SMS-06 の細胞増殖抑制作用とその作用機序を検討する。また siRNA により hnRNP B1 および DNA-PK をノックダウンし SMS-06 の細胞増殖抑制効果への影響を検討する。患者由来 ATL 細胞の短期培養系に対する SMS-06 の効果を検討する。SCID マウスに HTLV-1 関連細胞株を移植し、SMS-06 の抗腫瘍効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1) ATL 細胞を用いた hnRNP B1 による DNA 依存性キナーゼ活性の阻害メカニズムの

解析: ATL 細胞を用いた解析では hnRNP B1 は DNA 依存性キナーゼに結合しその酵素活性を阻害すること、 hnRNP B1 の量と非相同末端修復 (NHEJ) の活性は逆相関の傾向にあることを明らかにした。(図 1)

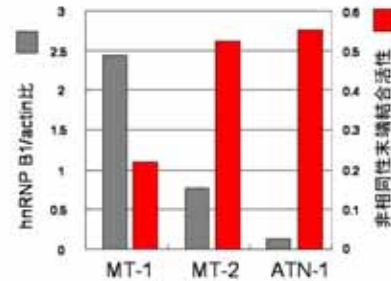


図1 ATL細胞株におけるhnRNP B1量と非相同性末端結合活性 (non-homologous end joining activity)との関連

## (2) 臨床検体における hnRNP B1 の発現と臨床病理学的特徴

hnRNP B1 タンパク質が、ATL の 70% 以上の症例において過剰発現し、その発現亢進は慢性期から認められた。また hnRNP B1 の発現と可溶性 IL-2 レセプターとの間に正の相関が認められた(表 1)。また hnRNP B1 トランスジェニックマウスにおいて放射線照射により胸腺の腫大と肺へのリンパ球の浸潤傾向が認められた。(データ解析中)

表1 ATLにおける免疫組織染色によるhnRNP B1発現と臨床背景との関連

|                 | hnRNP B1               |                  | p-value |
|-----------------|------------------------|------------------|---------|
|                 | Positive               | Negative         |         |
| Age ± SD (yrs)  | 63.7 ± 6.13            | 62.3 ± 8.4       | p=0.56  |
| Sex             |                        |                  |         |
| Male (n=25)     | 16 (69.6%)             | 7 (30.4%)        | p=0.60  |
| Female (n=23)   | 19 (76.0%)             | 4 (24.0%)        |         |
| Subtype         |                        |                  |         |
| Acute (n=23)    | 19 (67.9%)             | 9 (32.1%)        | p=0.72  |
| Lymphoma (n=18) | 16 (80.0%)             | 4 (20.0%)        |         |
| sIL-2R (U/ml)   | 18030.42 ± 16334(n=19) | 4740 ± 3337(n=7) | p=0.045 |
| Total (n=48)    | 35 (73.0%)             | 13 (27.0%)       |         |

## (3) SMS-06 による ATL 細胞に対する抗腫瘍効果の解析

SMS-06 は IC<sub>50</sub> として 50-100nM の濃度で種々の ATL 細胞の増殖を抑制した、その機序として G2/M 停止とその後のアポトーシスの誘導によることを明らかにした。細胞内標的分子として SMS-06 はトポイソメラーゼ II と PI-3 キナーゼ経路を阻害する作用があることを明らかにした。現在直接の標的分子の同定を行っている。また SCID マウスへの ATL 細胞 (MT1) の移植系において SMS-06 の腹腔内投与は移植腫瘍の増殖を抑制した。副作用については、一過性の骨髄抑制以外には明らかなものは認められなかった。(図 2)

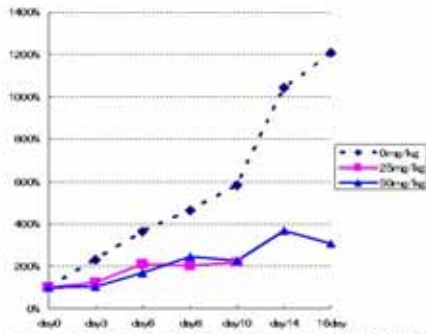


図2. SMS-06による移植ATL細胞の腫瘍増殖抑制効果

## 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9件)

1. Yuki take M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, Saito M, Osame M, Izumo S, Kuroda Y., Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis., J Neurovirol, (査読有), 14, 2, 130-135, 2008

2. Sueoka-Aragane N, Imai K, Komiya K, Sato A, Tomimasu R, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E, Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1, Cancer Sci, (査読有), 99, 6, 1080-1087, 2008

3. K Tobinai, K Takeyama, F Arima, T Kobayashi, S Hanada, M Kasai, S Ogura, E Sueoka, K Mukai, K Tajima, H Fukuda, S Shirakawa, T Hotta, S Masanori, Phase II study of chemotherapy and stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma: Japan Clinical Oncology Group study 9004. Cancer Sci, (査読有), 98, 9, 1350- 1357, 2007

4. M Ide, N Fukushima, T Hisatomi, N Tsuneyoshi, M Tanaka, M Yokoo, R Tomimasu, N Funai, E Sueoka, Non-germinal cell phenotype and bcl-2 expression in primary adrenal diffuse large B-cell lymphoma., Leukemia Lymphoma, (査読有), 48, 11, 2244-2246, 2007

5. K Teye, N Arima, Y Nakamura, K Sakamoto, E Sueoka, H Kimura, M Tsuneoka, Expression of Myc target gene mina53 in subtypes of human lymphoma. Oncol Rep. (査読有), 18, 4, 841- 848, 2007

6. Sadakane Y, Zaitzu M, Nishi M, Sugita K, Mizutani S, Matsuzaki A, Sueoka E, Hamasaki Y, Ishii E, Expression and production of aberrant PAX5 with deletion of exon 8 in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia of children., Br J Haematol, (査読有), 136, 2, 297- 300, 2007

7. Sueoka-Aragane N, Sato A, Eguchi H, Komiya K, Sakuragi T, Mitsuoka M, Satoh T, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E, Mutation profile of EGFR gene detected by denaturing high-performance liquid chromatography in Japanese lung cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol, (査読有), 133, 2, 93-102, 2007

8. 船井典子、末岡榮三朗, 多発性骨髄腫における貧血, 治療, (査読無), 89, 8, 2450-2455, 2007

9. Sato A, Sueoka-Aragane N, Saitoh J, Komiya K, Hisatomi T, Tomimasu R, Hayashi S, Sueoka E, Establishment of a new method, transcription-reverse transcription concerted reaction, for detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a biomarker of lung cancer, J Cancer Res Clin Oncol, (査読有), 134, 11, 1191-1197, 2007

[学会発表](計23件)

1. Sueoka E, Sueoka-Aragane N. DNA repair a molecular target of cancer prevention and treatment 韓国がん学会 2008/11/6, ソウル

2. Sueoka E, Sueoka-Aragane N. hnRNP B1;a key modulator of DNA repair in carcinogenesis 韓国がん学会 2008/11/6, ソウル

3. 久富崇, 富栴りか, 荒金尚子, 佐藤明美, 小宮一利, 岡本一也, 末岡榮三朗, DNA修復阻害を標的としたATLの新たな治療法開発の試み, 第67回日本癌学会, 2008.10.28-30, 名古屋

4. 小宮一利, 荒金尚子, 佐藤明美, 富栴りか, 久富崇, 林真一郎, 常岡誠, 末岡榮三朗, Myc 標的遺伝子 *mina53* の肺発がんにおける役割, 第 67 回日本癌学会, 2008.10.28-30, 名古屋
5. 末岡榮三朗, 島川明子, 萬年孝太郎, 桑原伸夫, 船井典子, 福島伯泰, 水田敏彦, 藤本一真, 同種造血幹細胞移植 4 年後に非肝硬変性食道静脈瘤を発症した未分化大細胞性リンパ腫の 1 例, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
6. 福島伯康, 田中麻里子, 横尾眞子, 出勝, 久富崇, 富栴りか, 船井典子, 末岡榮三朗, 佐賀大学病院における後期高齢者悪性リンパ腫の現状, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
7. 船井典子, 田中麻里子, 横尾眞子, 出勝, 久富崇, 富栴りか, 福島伯泰, 末岡榮三朗, 水田敏彦, HTLV-I 抗体陽性慢性 C 型肝炎患者に対する peg-IFN + リバビリン療法における HTLV-I provirus 量の変化第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
8. 久富崇, 富栴りか, 荒金尚子, 佐藤明美, 田中麻里子, 横尾眞子, 出勝, 福島伯泰, 船井典子, 岡本一也, 末岡榮三朗 DNA 修復阻害を標的とした ATL の新たな治療法開発の試み, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
9. 出勝, 福岡麻美, 中島由佳里, 田中麻里子, 横尾眞子, 久富崇, 富栴りか, 福島伯泰, 船井典子, 末岡榮三朗, 佐賀大学血液内科における *Clostridium difficile* 関連下痢症についての臨床疫学的検討, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
10. 田中麻里子, 出勝, 福島伯康, 富栴りか, 横尾眞子, 船井典子, 佐野雅之, 末岡榮三朗, 非ホジキンリンパ腫を合併し、R-CHOP が有効であった自己免疫性溶血性貧血の一例, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都

11. 富栴りか, 田中麻里子, 横尾眞子, 出勝, 久富崇, 福島伯泰, 船井典子, 末岡榮三朗, 低侵襲的同種骨髄移植が著効した治療抵抗性 Lymphoplasmacytic lymphoma(LPL) の一例, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
12. 塚崎邦弘, 渡辺隆, 吉村健一, 末岡榮三朗 (16 番目), 他, 多施設共同臨床試験併合解析による末梢 T/NK 細胞リンパ腫の新たな予後予測モデル(JCOG0108A), 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
13. 高田由香, 金地泰典, 諸井将明, 関律子, 奥英二郎, 佐野雅之, 中里幸恵, 緒方秀章, 吉本幸治, 薬師寺和昭, 橋口道俊, 今村理恵, 大崎浩一, 大坪惟範, 森重聡, 出原賢治, 末岡榮三朗, 今村豊, 岡村孝, Bernard-Soulier 症候群 (GPIX W126X) の機能解析, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
14. 崔日承, 塚崎邦弘, 鷗池直邦, 末岡榮三朗 (11 番目), 他, 成人 T 細胞リンパ腫 (ATL) における微小残存病変 (MRD) 検査法の臨床応用についての検討, 第 70 回日本血液学会 第 50 回日本臨床血液学会 合同総会 2008.10.12, 京都
15. Hisatomi T, Tomimasu R, Aragane N, Sato A, Komiya K, Okamoto K, Sueoka E, NK314 as a new therapeutic agent of adult T cell leukemia America Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.16 サンディエゴ, USA
16. 木下麻悠子 船井典子 田中麻里子 横尾眞子 出勝 久富崇 富栴りか 福島伯泰 末岡榮三朗, 同種骨髄移植を施行した若年発症 ATL の一例, 第 69 回日本血液学会 第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 2007.10.11, 横浜市
17. 出勝, 福島伯康, 田中麻里子, 横尾眞子, 久富崇, 富栴りか, 常吉直子, 船井典子, 末岡榮三朗, 同種骨髄移植を施行した若年発症 ATL の一例, 第 69 回日本血液学会 第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 2007.10.11, 横浜市

18. Komiya K, Aragane N, Satoh A, Tomimasu R, Hisatomi T, Hayashi S, Tsuneoka M, Sueoka E, Myc target gene, mina53, a role in lung carcinogenesis and its prognostic significance, 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.10.3, 横浜

19. Sato A, Aragane N, Iwanaga K, Tomimasu R, Hisatomi T, Komiya K, Sueoka E, Overexpression of hnRNP B1 inhibits DNA repair system by interfering DNA-PK complex assembly in lung cancer cells, 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.10.3, 横浜

20. E Sueoka, Carcinogenesis mediated through hnRNP B1: Molecular target for early detection and treatment. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2007.8.10, Gifu, Japan

21. E Sueoka, R Tomimasu, N Aragane, A Sato, T Hisatomi, K Komiya, N Fukushima, N Funai, N Kuwahara, M Ide, Inhibition of Double-strand DNA Break Repair by hnRNP B1 Mediated through interaction with DNA-dependent Protein Kinase Complex in Adult T-cell Leukemia, 13th Int ' l Conference on Human Retrovirology HTLV and related VIRUSES, 2007.5.22, Hakone, Japan

22. A Sato, N Sueoka-Aragane, K Iwanaga, R Tomimasu, T Hisatomi, K Komiya, E Sueoka, Inhibition of DNA repair system by hnRNP B1, an early detection marker for lung cancers, mediated through direct interaction with DNA-dependent protein kinase complex, American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2007.4.14, Los Angeles USA

23. N Sueoka-Aragane, A Sato, K Iwanaga, K Komiya, T Kuzu, E Sueoka, Autoregulation of hnRNP A2/B1 gene promoter by hnRNP B1 protein, an early detection marker for lung cancer, and down regulation by DNA-PK complex in lung cancer cells., American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2007.4.14, Los Angeles USA

〔その他〕

佐賀大学ホームページ ; [http://syllabus.dl.saga-u.ac.jp/res/jp/res\\_search\\_light\\_jp.html](http://syllabus.dl.saga-u.ac.jp/res/jp/res_search_light_jp.html)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

末岡栄三郎 (SUEOKA EIZABURO)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号 00270603

### (2) 研究分担者

荒金尚子 (ARAGANE NAOKO)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号 20321846

久富 崇 (HISATOMI TAKASHI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号 10398125

### (3) 連携研究者

なし