

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25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300321

研究課題名（和文） 紡錘体形成を標的としたがん分子標的の探索

研究課題名（英文） Identification of molecular target for cancer therapy involved in the spindle assembly.

研究代表者

八尾 良司 (YAO RYOUJI)

公益財団法人がん研究会・がん研究所細胞生物部・主任研究員

研究者番号：80291095

研究成果の概要（和文）：紡錘体は有効ながん治療標的であるが、既存の抗がん剤は、間期細胞の微小管機能阻害による副作用を生じる事が知られている。本研究課題では、紡錘体制御に関わる因子のヒトがん組織での詳細な発現解析と *in vitro* および *in vivo* での機能解析を行い、その機能阻害により腫瘍発生が抑制される遺伝子として、TACC3 を含む複数の遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、有望ながん治療標的分子であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although the mitotic spindle is an established target for the cancer chemotherapy, current anti-cancer drugs led to the serious side-effects caused by the disturbance of the microtubule functions in post-mitotic cells. In this study, by the extensive expression study as well as the functional analysis, we identified the genes that were highly expressed in human cancers and the tumor growth were suppressed when their functions were inhibited. Our analysis demonstrated that these genes were potential targets for the cancer chemotherapy

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の紡錘体は、有効ながん治療標的であり、現在、パクリタキセル、ビンブラスチン、ビンクリスチン等の微小管阻害剤が臨床応用されている。これらの薬剤は微小管に直接結合し、その動的不安定性（dynamic instability）を阻害する事により抗がん活性を示す。しかし、これらの薬剤は、間期細胞の微小管にも作用し、末梢神経障害等の副

作用を引き起こすため、新たながん治療分子標的の同定が重要な課題となっている。微小管阻害剤ががん細胞の細胞分裂を特異的に阻害するという事実は、がん細胞の紡錘糸形成における動的不安定性が、正常細胞とは異なる制御を受けている事を示唆している。紡錘体の動的不安定性の制御には、モータータンパク質をはじめとする数多くの分子が関わるが、近年のマイクロアレイを用い

た発現解析等により、これらの分子群ががん細胞において発現異常を生じている事が、相次いで報告された。しかしながらその生理的意義は分かっていないことから、このような制御因子のがん細胞における機能を明らかにする事は、それぞれの分子のがん治療の分子標的としての妥当性を知る上で重要である。

Transforming acidic coiled-coil 3 (TACC3) は、種を超えて保存されている紡錘体制御因子 TACC ファミリーに属し、ヒトでは多発性骨髄腫の染色体ブレイクポイント 4p16 にマップされ、かつ様々ながんで過剰発現するがん関連遺伝子である。申請者は、TACC3 コンディショナルノックアウトマウスの作製、解析を行い、TACC3 が細胞種依存的な機能を有しており、発生過程においては、mesenchymal sclerotome の増殖に必須の機能を果たしている事を示した (Yao et al. Cancer Sci. 98, 552 (2007))。これらの結果から、種を超えて保存されている紡錘体制御因子が、哺乳動物個体では、がん組織特異的な機能を有している可能性が考えられ、そのような分子は、新たながん治療分子標的となる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、紡錘体制御に関わる遺伝子のがん組織での発現プロファイリングと *in vitro* での遺伝子機能抑制実験により、がん細胞特異的に紡錘体形成過程に関わる分子を同定し、それぞれの紡錘体形成に関わる機能を明らかにする事を目的とする。またノックアウトマウスを作製し、個体発生過程や成体正常組織での機能を明らかにするとともに、がんモデルマウスとの交配により、自然発症腫瘍における機能を個体レベルで明らかにする事により、がん治療分子標的としての妥当性と治療対象となるがん種を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 つの方法で、がん細胞に選択的に機能する細胞分裂制御因子を同定しその機能解析を行う。

(1) ヒトがん発現解析データベースを用いた、紡錘体制御分子の個別遺伝子発現プロファイリング解析
がん研究会ゲノムセンターではこれまでに多くのヒトがん組織を用いた発現解析を行ってきた。がん組織で過剰発現している遺伝子は、がん細胞の 'addiction' となっている可能性がある。そこで、紡錘体制御に関わる個々の因子について発現量を詳細に検討することにより、がん組織で発現亢進する遺伝子を抽出する。すなわち、個別プロファイリングにより、網羅的な解析では見落とされていた遺伝子の抽出を行う。

(2) 培養細胞を用いた *in vitro* での機能解析
発現プロファイリングにより抽出した紡錘体制御因子についてのがん細胞における機能解析を行う。具体的には、siRNA や shRNA 発現により遺伝子ノックダウンを行い、生化学的解析、免疫蛍光染色法や EGFP-tubulin 発現細胞を用いたタイムラプス顕微鏡により解析を行なう。

(3) ノックアウトマウスを用いた紡錘体形成制御因子の個体レベルでの解析

上記で得られたがん選択的細胞分裂制御因子のがん組織特異的な機能について、個体レベルで解析する。具体的には、コンディショナルノックアウトマウスを作製し、個体レベルでの機能解析を行なうとともに、がんモデルマウスと交配することにより、がん組織での機能解析を行い、がん治療分子標的としての妥当性を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒトがん発現解析データベースを用いた、紡錘体制御分子の個別遺伝子発現プロファイリング解析

がん細胞に特異的な細胞分裂機構を同定するために、紡錘体や中心体等の制御に関わる 141 個の遺伝子について、ヒトのがん組織における発現解析を行なった。乳がん、膵臓がん、卵巣がん、大腸がんを含む 7 種のがんについて、正常組織とがん組織との発現変動を調べた結果、がん組織で二倍以上の発現亢進が見られた遺伝子は、7 種すべてのがん組織での亢進が 9 個、6 種のがんでの亢進が 10 個、5 種のがんでの亢進が 5 個であった。これらの 24 個の中には 8 個のキネシンモーターと 6 個のチェックポイントタンパク質を含む動原体タンパク質が含まれていた。

同定された遺伝子の中には、TACC3 が含まれ、特に乳がんで 10.8 倍、卵巣がんで 6.7 倍という高い発現亢進が明らかになった。さらにヒトリンパ腫の tissue microarray 解析では、調べたすべての T リンパ腫および B リンパ腫で、高発現していた。

(2) 培養細胞を用いた *in vitro* での機能解析
上記で同定されたがん組織で過剰発現する遺伝子について、ノックダウン実験を行った。TACC3 の細胞分裂における機能解析のために、2 種類のヒトパーキットリンパ腫と 2 種の T-ALL 細胞で shRNA の発現によるノックダウンを行うと、細胞分裂の遅延の後、アポトーシスを誘導した。興味深い事に、蛍光免疫染色により紡錘体を観察したところ、多極紡錘体が観察された (図 1)。

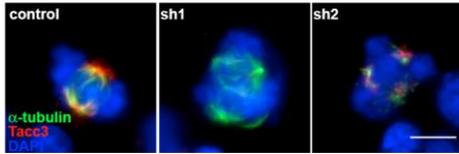


図 1. ヒトリンパ腫細胞における TACC3 ノックダウンによる多極紡錘体形成。ヒトリンパ腫細胞に TACC3 を標的とする二種類の shRNA (sh1, sh2) を発現させ、細胞を固定後、標記の抗体を用いて免疫染色を行なった。

がん細胞パネルを用いた固形がん細胞でのノックダウンでは、一部の卵巣がん細胞で同様の多極紡錘体が観察された。TACC3 をノックダウンすると、約 60% の細胞で、リンパ腫細胞同様の多極紡錘体が観察され、さらに 20% 程度の細胞で、二極の紡錘体にも関わらず、紡錘体の形態が異常であり、かつ染色体が赤道面に整列していない異常な分裂細胞が観察された (図 2)。

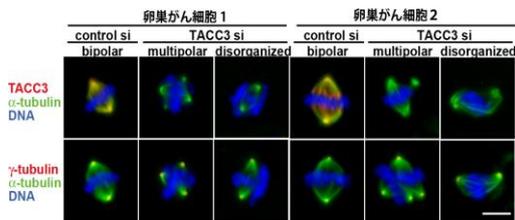


図 2. 卵巣がん細胞における TACC3 ノックダウンによる紡錘体形成異常。二種のヒト卵巣がん細胞に control もしくは TACC3 に対する siRNA のトランスフェクションを行い、細胞を固定後、標記の抗体で免疫蛍光染色を行なった。

興味深い事に、TACC3 の発現が低い正常細胞では、TACC3 をノックダウンしても細胞分裂に顕著な異常は観察されなかった (図 3)。これらの結果は、TACC3 が、一部のがん細胞選択的に、中心体微小管の重合に必須の機能を果たしており、その阻害により、細胞増殖が著しく障害される事を示している。

TACC3 ノックダウンにより生じる多極紡錘体がどのようにして作られるのかを検討するために、EGFP-tubulin を発現する卵巣がん細胞を作製し、タイムラプス顕微鏡による紡錘体形成過程の観察を行った。その結果、TACC3 ノックダウン細胞では、中心体近傍の微小管重合が選択的に阻害されるのに対し、染色体

近傍では、微小管重合が進行し、異所性に紡錘体極が形成された (図 4)。

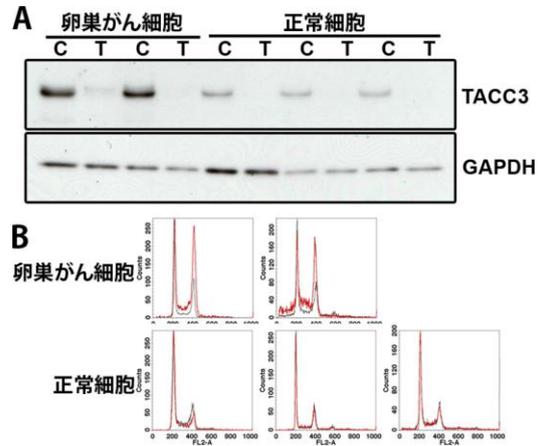


図 3. TACC3 遺伝子ノックダウンによるがん細胞選択的細胞分裂停止。A. 二種のヒト卵巣がん細胞と三種のヒト正常細胞に control (C) もしくは TACC3 (T) に対する shRNA を発現させ、イムノブロットにより TACC3 タンパク質の減少を確認した。B. 二種のヒト卵巣がん細胞と三種のヒト正常細胞に control (黒線) もしくは TACC3 (赤線) に対する shRNA を発現させ、FACS により細胞周期を解析した。

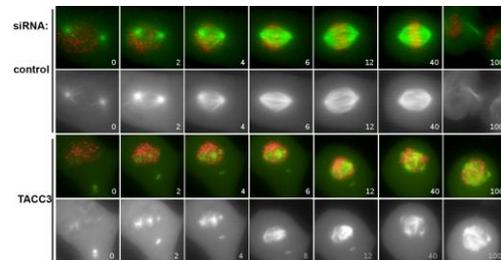


図 4. TACC3 ノックダウンによる中心体微小管選択的重合阻害。EGFP-tubulin と mCherry-CENPA を発現させた卵巣がん細胞に、標記の siRNA のトランスフェクションを行ない、細胞分裂期の紡錘体形成をタイムラプス顕微鏡で観察した。

さらに、ヒトがん組織における発現プロファイリングにより、がん組織で過剰発現している遺伝子の中から、がん細胞の紡錘体形成に必須の機能を果たしている 3 つの遺伝子をピックアップした。これらの中には動源体に局在し、キネトコア微小管の形成に必須の機能を持つ遺伝子が含まれていた。

(3) ノックアウトマウスを用いた紡錘体形

成制御因子の個体レベルでの解析
TACC3 の個体レベルでの機能解析を行なうために、コンディショナルノックアウトマウスを作製し、p53 欠損マウスとの交配を行ない、さらに deleter アリルとして ROSA26-CreERT2 アリルを導入した。得られたマウスは、MRI を用いて経時的に腫瘍の発生を調べ、胸腺リンパ腫を発生したマウスは、タモキシフェン投与により、TACC3 を欠損させた。その結果、TACC3 を欠損しないコントロール群では、腫瘍量が明らかに増加したのに対し、TACC3 を欠損した腫瘍は退縮した。興味深い事に、TACC3 を欠損した胸腺リンパ腫では、有意なアポトーシスの誘導が観察されたのに対し、正常胸腺では、顕著な異常は見られなかった。これらの結果は、TACC3 ががん組織選択的に必須の機能を有しており、がん治療の分子標的となりうる事を示している。

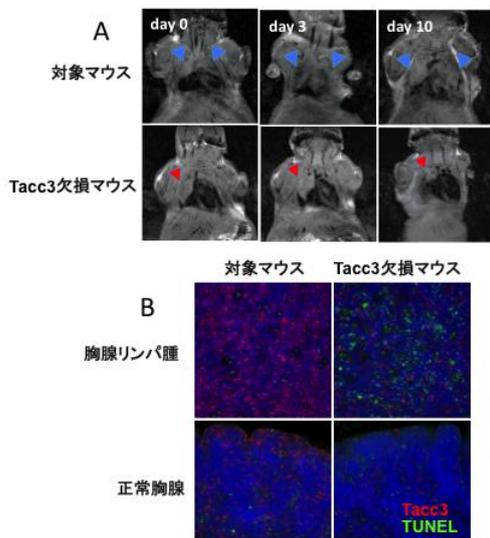


図 5. TACC3 遺伝子破壊による胸腺リンパ腫の退縮。A. 対象マウスでは、10 日間で胸腺リンパ腫が増大するが、タモキシフェン投与により Tacc3 を欠損すると、腫瘍量が減少する。B. 胸腺リンパ腫では Tacc3 タンパク質(赤)が高発現しており、タモキシフェン投与により Tacc3 を欠損させるとアポトーシス(緑)が誘導される(上段)。しかし正常胸腺では、Tacc3 を欠損してもアポトーシスは誘導されない(下段)。

TACC3 以外の遺伝子については、3 つのノックアウトマウスが樹立された。これらは、これまでにノックアウトマウスの報告がない遺伝子である。ヘテロ接合体同士の交配では、2 遺伝子が胎生致死であったが、一つの遺伝子は、ホモ接合体が生まれ、外見上の異常も観察されず、また雄雌ともに妊性を有していた。これらの結果は、正常組織では、体細胞、生殖細胞ともに必須の機能を有していない

事を示している。LacZ を発現マーカーとして挿入したアリルを作製し、発現解析を行なったところ、成体では、精巣、気管、毛のうで発現している事が明らかになった。(図 6)

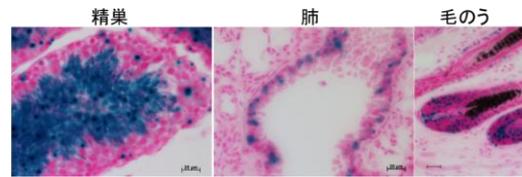


図 6 紡錘体制御遺伝子の正常組織における発現。LacZ を導入したマウスを作製し、β-ガラクトシダーゼ染色を行なった。

この遺伝子は、ヒト大腸がんでの過剰発現していたことから、Apc 遺伝子変異マウスを用いて解析を行なった。LacZ を指標とした発現解析では、正常消化管では、基底部分の一部の細胞で弱い発現が認められた。一方、腫瘍組織においては、腫瘍全体に発現が観察され、特に大腸腫瘍での発現細胞の割合が多かった(図 7A)。

そこで Apc 変異マウスとの交配を行い、腫瘍数を検討した所、この遺伝子が欠損することにより、有意に腫瘍数が減少した(図 7B)。以上の結果は、この遺伝子が消化管腫瘍の分子治療標的として有望である可能性を示唆している。

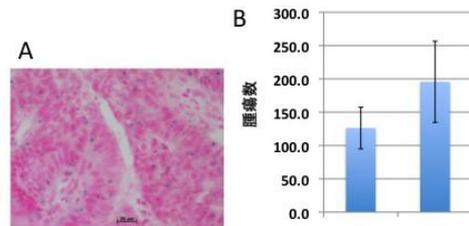


図 7. 遺伝子欠損による腫瘍抑制。A. Apc 変異マウスの消化管腫瘍における遺伝子発現。マーカーとして挿入された LacZ 遺伝子をβ-ガラクトシダーゼ染色により検出した。B. 遺伝子欠損による腫瘍抑制効果。遺伝子欠損マウス(KO)と正常マウス(WT)での Apc 変異により生じる消化管腫瘍数を計測した。

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 2 件)

1. Yao, R., Natsume, Y., Saiki, Y., Shioya, H., Takeuchi, K., Yamori, T., Toki, H., Aoki, I., Saga, T. & Noda, T. Disruption of Tacc3 function leads to in vivo tumor regression. *Oncogene* 31, 135-48 (2012).
2. Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Kyono, K., Yao, R., Noda, T. & Toshimori, K. Appearance of an oocyte activation-related substance during spermatogenesis in mice and humans. *Hum Reprod* 25, 2734-44 (2011).

[学会発表] (計 9 件)

1. 八尾良司、夏目康子、矢守隆夫、野田哲生 がん細胞の紡錘体形成において TACC3 と TOGp は時間的・空間的に異なる役割を担う 第 35 回分子生物学会 (福岡) 2012 年 12 月
2. 八尾良司、矢守隆夫、野田哲生 TACC3 と TOGp は、紡錘体形成において時間的・空間的に異なる機構を持つ 第 71 回日本癌学会 (札幌) 2012 年 9 月
3. 八尾良司、矢守隆夫 がん細胞紡錘体形成における TACC3 の機能とがん分子治療標的への応用 日本がん分子標的治療学会 (北九州市) 2012 年
4. 八尾良司 細胞分裂の基礎研究と臨床応用への展開 第三次対がん 10 カ年総合戦略・文部科学省がん支援活動 合同公開シンポジウム (東京) 2012 年
5. Ryoji Yao and Tetsuo Noda Disruption of TACC3 leads to in vivo tumor regression by targeting spindle assembly The 16th Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy Jan. 25-26, (Tokyo) 2012 年
6. 八尾良司、夏目康子、矢守隆夫、野田哲生 TACC3 による中心体紡錘体とキネトコア紡錘体の選択的制御 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011 年
7. Ryoji Yao Disruption of Tacc3 function leads to tumor regression in vivo 13th Japanese-German Cancer Workshop (Hiroshima) 2011 年
8. 八尾良司、塩谷尚志、齋木由利子、野田哲生 がんモデルマウスを用いた Tacc3 を標的としたがん治療法の開発 第 70 回日本癌学会 (名古屋) 2011 年
9. 八尾良司、野田哲生 がん分子治療標的としての TACC3 第 69 回日本癌学会 (大阪) 2010 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八尾 良司 (YAO RYOJI)
がん研究会・がん研究所・主任研究員
研究者番号：80291095

(2) 研究分担者

長崎 光一 (NAGASAKI KOICHI)
がん研究会・ゲノムセンター・研究員
研究者番号：90250208