

平成22年3月31日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17013076  
 研究課題名（和文） 疾患モデル動物を用いた多段階発がん研究：腎発がんの遺伝情報システム  
 研究課題名（英文） The study of multistep carcinogenesis using unique animal models  
 研究代表者  
 樋野興夫 (HINO OKIO)  
 順天堂大学・医学部・教授  
 研究者番号： 90127910

## 研究成果の概要（和文）：

遺伝性ラット (*Tsc2* および *Bhd*変異体)腎発がんの研究から、その過程で発見された*ERC*遺伝子が、ヒト「アスベスト・中皮腫」の診断・腫瘍マーカーの開発に進み、抗体治療を含めた、新規治療法の開発へと展開した。さらに、ヒト結節性硬化症の原因遺伝子産物であるtuberin(*Tsc2*産物)は、ラパマイシン感受性mTOR経路を抑制する機能を持つ。この経路の遮断による結節性硬化症の臨床治験が試みられているが、必ずしも著効を示す結果は得られていない。我々はtuberinの機能の全体像を明らかにした。新たな治療・予防法の標的となる経路の解明に資する。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the unique animal models for the study of problems in carcinogenesis; eg., multistep carcinogenesis, cancer prevention and the development of the therapeutic treatments which can be translated into human patients. We discovered the *ERC* gene in Eker rat model (*Tsc2* gene mutant). We developed a novel ELISA system for human asbestos-related mesothelioma. We have started a large-scale prospective study on building construction workers using our ELISA system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,700,000	0	9,700,000
2006年度	9,700,000	0	9,700,000
2007年度	9,700,000	0	9,700,000
2008年度	9,700,000	0	9,700,000
2009年度	9,700,000	0	9,700,000
総計	48,500,000	0	48,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：遺伝情報システム異常と発がん

キーワード：1) 遺伝性がん 2) 癌化遺伝子 3) 多段階発がん 4) 分子標的治療 5) *Niban* 遺伝子 6) *TSC* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

「発がんの連盟的首位性」の概念を提唱し、発がんの起始遺伝子を起点とした遺伝子ネットワークの異常として捉えた。

## 2. 研究の目的

「がんの原因論」を明確にし、「がんの制御」の根拠を示し、「がん進展阻止」の実際を示すことを目的とする。具体的には、個体レベルで、リファインされたユニークな疾患モデルを用いて、「遺伝情報システム異常と発がん」を発がんの起始遺伝子を起点とした遺伝子ネットワークの異常ととらえ（発がんの連盟的首位性の分子機構の解明）、その特異点の分子を解析し、ヒトがんの治療に資する。

## 3. 研究の方法（平成17年度-21年度）

以下に「研究の方法」の要点をまとめる。「発がんの連盟的首位性」を発がんの起始遺伝子を起点とした遺伝子ネットワークの異常と捉え解析した。

1. TSC 遺伝子変異におけるmTOR以外の signal pathwayの同定
2. 新規のERストレス蛋白であるNibanの発がんにおける役割
3. 新規の腎がん抑制遺伝子Bhdの遺伝子機能解析
4. Erc 遺伝子産物の機能の解析

## 4. 研究の成果

### 17年度

「発がんの連盟的首位性」を発がんの起始遺伝子を起点とした遺伝子ネットワークの異常と捉え解析した。まず *Tsc2* mutant rat の腎発がんに対する rapamycin (mTOR 阻害剤)の制御を確認した。また、発がん過程の初期に高発現してくる *Niban* 遺伝子の knockout マウスを作製し解析を行った。

### 18年度

*Tsc2* mutant 腎発がん過程には、mTOR とは異なる制御が存在することを示した。また、発がん過程に発現してくる、*Erc* 遺伝子の knockout マウスの解析を進めた。さらに腫瘍マーカーとしての ELISA 測定系を開発した。野生型 *Bhd* トランスジェニックラットの系統を樹立し、導入遺伝子により、*Bhd* ヘテロ変異体の腎発がんとホモ変異体の胎生致死が完全に抑制されることを確認した。

### 19年度

*Niban* は PERK/eIF2 $\alpha$  と mTOR/S6K1/4E-BP1 の二つの翻訳制御系に関わり、翻訳を促進することを明らかにした。HeLa 細胞で *Niban* の発現抑制により、細胞死が促進された。*Niban* はストレス環境下において細胞の生存に重要であることが示唆された。*Bhd* 欠損腎癌細胞株への *Bhd* 導入、および siRNA による抑制を利用し *Bhd* 産物の機能解析を進めた。*Bhd* に結合する新規の分子を同定した。

### 20年度

*TSC* 遺伝子 N525S (mTOR 経路を抑制する活性を保持する) 変異と G1556S (mTOR 経路を抑制する能力を失う) 変異を持つ導入遺伝子 (Tg) のトランスジェニック・ラットの作製を進めたところ、G1556S 型変異 Tg ラットでは腎発がんを抑制する知見を得た。新たな分子標的経路の存在を明らかにした。*Tsc2* KO マウスの腎腫瘍の増殖が *Erc* のホモ変異との交配により著しく抑制されたことより *Erc* が腫瘍増殖に役割を果たすことが示唆された。

### 21年度

in vitro キナーゼアッセイを行い、ラット *Bhd* タンパクが AMP キナーゼの基質となること、そのリン酸化部位は 199 番目から 385 番目のアミノ酸の間にあることを見出した。その部位の最終的な決定を進める。RNAi 法による *Tsc2* 抑制実験と *Tsc2* 欠損細胞への *Tsc2* 発現導入実験を用いて、*Tsc2* が発現している

場合 Bhd のリン酸化が抑制されていること、リン酸化は JNK の阻害剤である SP600125 によって阻害されることがわかった。Erc 産物に対する抗体を作製、抗体治療を試みた。

#### 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 38 件)

1. Ishii T., Yasuda K., Akatsuka A., Hino O., Hartman P.S. and Ishii N.: A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res*, 65: 203-209, 2005
2. Ma L., Teruya-Feldstein J., Behrendt N., Chen Z., Noda T., Hino O., Cordon-Cardo C. and Pandolfi P.P.: Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor. *Genes & Development*, 19: 1779-1986, 2005
3. Togashi Y., Kobayashi T., Momose S., Ueda M., Okimoto K., and Hino O.: Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Nihon rat model by introduction of a wild-type Bhd gene. *Oncogene* 25: 2885-2889, 2006
4. Kouchi M., Okimoto K., Matsumoto I., Tanaka K., Yasuba M. and Hino O.: Natural history of the Nihon (*Bhd* gene mutant) rat, a novel model for human Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Virchow Archives* 448: 463-471, 2006
5. Shiomi K., Miyamoto H., Segawa T., Hagiwara Y., Ota A., Maeda M., Takahashi K., Masuda K., Sakao Y. and Hino O.: Novel ELISA system for detection of "N-ERC/mesothelin" in the sera of

mesothelioma patients. *Cancer Sci*, 97: 928-932, 2006

6. Matsumoto F., Fujii H., Abe M., Kajino K., Kobayashi T., Matsumoto T., Ikeda K. and Hino O.: A novel tumor marker, Niban, is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto's thyroiditis. *Human Pathology*, 37: 1592-1600, 2006
7. Chano T., Saji M., Inoue H., Minami K., Kobayashi T., Hino O. and Okabe H.: Neuromuscular abundance of RB1CC1 contributes to the non-proliferating enlarged cell phenotype through both RB1 maintenance and TSC1 degradation. *Int. J. Molecular Medicine* 18: 425-432, 2006
8. Cao Y., Kamioka Y., Yokoi N., Kobayashi T., Hino O., Onodera M., Mochizuki N. and Nakae J.: Intraction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of the mammalian target of rapamycin/p70 S6K pathway. *J. Biological Chemistry* 281: 40242-40251, 2006
9. Maeda M., and Hino O.: Blood tests for Asbestos-related mesothelioma. *Oncology*, 71: 26-31, 2006
10. Watanabe R., Tambe Y., Inoue H., Isono T., Haneda M., Isobe K., Kobayashi T., Hino O., Okabe H. and Chano T.: GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *Int. J. Molecular Medicine* 19: 475-483, 2007
11. Momose S., Kobayashi T., Tada N., Itoyama S. and Hino O.: N-terminal hamartin-binding and C-terminal GAP domain of tuberin can separate in vivo N-terminal hamartin-binding and C-termin.

- Biochem. Biophys. Res. Commun, 356: 693-698, 2007
12. Sun G.D., Kobayashi T., Abe M., Tada N., Adachi H., Shiota A., Totsuka Y. and Hino O.: The endoplasmic reticulum stress-inducible protein Niban regulates eIF2 $\alpha$  and S6K1/4E-BP1 phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun, 360: 181-187, 2007
13. Jiang W., Fujii H., Matsumoto T., Ohtsuji N., Tsurumaru M. and Hino O.: Birt-Hogg-Dubé (BHD) gene mutations in human gastric cancer with high frequency microsatellite instability. Cancer Letters, 248: 103-111, 2007
14. Nakaishi M., Kajino K., Ikesue M., Hagiwara Y., Kuwahara M., Mitani H., Horikoshi Y., Segawa T., Kon S., Maeda M., Baiyin T., Abe M., Yokoyama M. and Hino O.: Establishment of the ELISA system to detect the amino terminal secretory form of rat Erc/ Mesothelin. Cancer Sci., 98: 659-664, 2007
15. Hino O., Shiomi K. and Maeda M.: A diagnostic biomarker of Asbestos-related mesothelioma - Example of translational research-. Cancer Sci., 98 : 1147-1157, 2007
16. Minami K., Tambe Y., Watanabe R., Isono T., Haneda M., Isobe K., Kobayashi T., Hino O., Okabe H., Chano T. and Inoue H.: Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. J. Virology, 81: 11106-11115, 2007
17. Suzuki T., Das S.K., Inoue H., Kazami M., Hino O., Kobayashi T., Yeung R.S., Kobayashi K., Tadokoro T. and Yamamoto Y.: Tuberos sclerosis complex 2 loss-of-function mutation regulates reactive oxygen species production through Rac1 activation. Biochem. Biophys. Res. Commun, 368: 132-137, 2008
18. Shiomi K., Hagiwara Y., Sonoue K., Segawa T., Miyashita K., Maeda M., Izumi H., Masuda K., Hirabayashi M., Moroboshi T., Yoshiyama T., Ishida A., Natori Y., Inoue A., Kobayashi M., Sakao Y., Miyamoto H., Takahashi K. and Hino O.: Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. Clinical Cancer Res., 14: 1431-1437, 2008
19. Segawa T., Hagiwara Y., Ishikawa K., Aoki N., Maeda M., Shiomi K. and Hino O.: Mesomark kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. BBRC, 369: 915-918, 2008
20. Hino O. and Maeda, M.: Diagnostic tumor marker of asbestos-related mesothelioma. Environmental Health and Preventive Medicine, 13: 71-74, 2008,
21. Imamura O., Okada H., Takashima Y., Zhang D., Kobayashi T. and Hino O.: siRNA-mediated *Erc* gene silencing suppresses tumor growth in *Tsc2* mutant renal carcinoma model. Cancer Letters, 268: 278-285, 2008
22. Takagi Y., Kobayashi, T., Shiono M., Wang L., Piao X., Sun G., Zhang D., Abe M., Hagiwara Y., Takahashi K. and Hino O.: Interaction of folliculin (Birt-Hogg-Dubé gene product) with a novel Fnip1-like (FnipL/Fnip2) protein. Oncogene, 27:

5339-5347, 2008

23. Inami K., Kajino K., Abe M., Hagiwara Y., Maeda M., Suyama M., Watanabe S. and Hino O. : Secretion of N-ERC/mesothelin and expression of C-ERC/mesothelin in human pancreatic ductal carcinoma. *Oncology Reports* 20: 1375-1380, 2008
24. Hagiwara Y., Hamada Y., Kuwahara M., Maeda M., Segawa T., Ishikawa K. and Hino O. : Establishment of a Novel Specific ELISA system for rat N- and C-ERC/Mesothelin.-Rat ERC/Mesothelin in the body fluids of mice bearing mesothelioma-. *Cancer Sci.*, 99: 666-670, 2008.
25. Shigeyama Y., Kobayashi T., Kido Y., Hashimoto N., Asahara S., Matsuda T., Takeda A., Inoue T., Shibutani Y., Koyanagi M., Uchida T., Inoue M., Hino O., Kasuga M. and Noda T. : Biphasic response of pancreatic  $\beta$  cell mass to ablation of TSC2 mice. *Mol. Cell. Biology* 28: 2971-2979, 2008.
26. Shiono M., Kobayashi T., Takahashi R., Sun G., Abe M., Zhang D., Wang L., Piao X., Takagi Y., Mineki R., Taka H., Tada N., Sonobe S., Momose S., Ueda M. and Hino O. : The G1556S-type tuberlin variant suppresses tumor formation in tuberous sclerosis 2 mutant (Eker) rats despite its deficiency in mTOR inhibition. *Oncogene*, 27: 6690-6697, 2008
27. Tajima K., Hiramama M., Shiomi K, Ishiwata T., Yoshioka M., Iwase A., Iwakami S., Yamazaki M., Toba M., Tobino K., Sugano K., Ichikawa M., Hagiwara Y., Takahashi K. and Hino O. : ERC/mesothelin as a marker for chemotherapeutic response

in patients with mesothelioma. *Anticancer Research* 28: 3933-3936, 2008

28. Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M. and Hino O. : Establishment of novel monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* 59:161-166, 2009
29. Piao X., Kobayashi T., Wang L., Shiono M., Takagi Y., Sun G., Abe M., Hagiwara Y., Zhang D., Okimoto K., Kouchi M., Matsumoto I. and Hino O. : Regulation of folliculin (the BHD gene product) phosphorylation by Tsc2-mTOR pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389 : 16-21, 2009.
30. Matsumoto I., Kouchi M., Okimoto K., Kijima K., Ueda T., Hirayama Y., Inoue T. and Hino O. : Establishment and characterization of renal carcinoma cell lines from a *Bhd* gene mutant (Nihon) rat. *Tumor Biology*, 30: 249-256, 2009
31. Wang L., Kobayashi T., Piao X., Shiono M., Takagi Y., Mineki R., Taka H., Zhang D., Abe M., Son G., Hagiwara Y., Okimoto K., Matsumoto I., Kouchi M., Hino O. ; Serine 62 is phosphorylation site in folliculin, the Birt-Hogg-Dube gene product. *FEBS Letters*, 584: 39-43, 2010
32. Fukamachi K., Tanaka H., Hagiwara Y., Ohara H., Joh T., Iigo M., Alexander D.B., Xu J., Long N., Takigahira M., Yonagihara K., Hino O., Saito I. : An animal model of precilical diagnosis of pancreatic ductal carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009
33. Ito S., Fujii H., Matsumoto T., Abe M., Ikeda K. and Hino O. : Frequent

expression of Niban in head and neck squamous cell carcinoma and squamous dysplasia. *Head Neck* 32: 96-103, 2010.

34. Inoue H., Uyama T., Suzuki T., Kazami M., Hino O., Kobayashi T., Kobayashi K., Tadokoro T.: Phosphorylated hamartin-Hsp70 complex regulates apoptosis via mitochondrial localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391: 1148-1153, 2010

35. Kunogi M., Kurihara M., Shigihara-Ikegami T., Kobayashi T., Shindo N., Kumasaka T., Gunji Y., Kikkawa M., Iwakami S., Hino O., Takahashi K., Seyama K.: Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dubé syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature. *J. Med. Genetics*, in press

36. Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O., Shimada Y.: Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model. *Cancer Sci.*, 101: 616-623, 2010.

37. Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101: 969-974, 2010

38. Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.; Development of positron emission tomography imaging by <sup>64</sup>Cu-labeled Fab for detecting

ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. *Nuclear Medicine Communications*, in press.

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 「中皮種診断剤、中皮種診断キットおよび中皮種診断方法」

発明者: 樋野興夫、清藤 勉

権利者: 株式会社免疫生物研究所

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2007/001373 (出願日: 2007/12/7)

基礎出願: 特願 2006-331409 (2006/12/8)

取得年月日: 係属中

国内外の別 (出願番号): 国内および各国移行済み、係属中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋野 興夫 (HINO OKIO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 90127910

(2) 研究分担者

小林 敏之 (KOBAYASHI TOSHIYUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 40260070

梶野 一徳 (KAJINO KAZUNORI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 80260066

百瀬 修二 (MOMOSE SHUJI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 70360344

(3) 連携研究者: なし