

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：17016075

研究課題名（和文） DNA 損傷に対する癌細胞応答と新規分子標的の探索

研究課題名（英文） Cellular responses against DNA damage and search for novel molecular target

研究代表者

河野 公俊 (KOHNO KIMITOSHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：00153479

研究成果の概要（和文）：がんを既存の抗がん剤で治療して効果がない場合、耐性を獲得している。この耐性獲得機序と耐性そのものの機序を解析することで、如何にがん細胞の増殖を制御するかという創薬・治療に直結する一連の分子群（YB-1 等）の発見成果を報告した。一方、がん組織はがん細胞のみならず、間質新生を伴うことから、多面的な視点から治療方法の考案を行うことが求められる。概日リズムの破綻により加速する腫瘍増殖の機序として新しい血管・間質新生因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：Based on the analysis of drug resistant cells, we found several molecular targets such as YB-1, ZNF143, Clock and so on. These molecules are useful for cancer treatment. Molecular clocks in peripheral tissues control cell-proliferation rhythms by regulating the expression of cell-cycle genes. We also found the novel Wnt signaling pathway by which circadian disruption can induce malignant progression of tumor through angiostromagenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,000,000	0	9,000,000
2006年度	8,700,000	0	8,700,000
2007年度	8,700,000	0	8,700,000
2008年度	8,000,000	0	8,000,000
2009年度	8,000,000	0	8,000,000
総計	42,400,000	0	42,400,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：DNA 損傷, 遺伝子発現制御, YB-1, ZNF143, Clock, Tip60, Wnt10A, シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子、がん抑制遺伝子、細胞周期制御因子やアポトーシス制御分子等の細胞増殖や薬剤感受性への関与が報告されてきているが、一方でこれらが、がん化学療法の分

子標的として有用であることもわかってきた。一方、個々の抗がん剤により活性化されるシグナル伝達系の解析からのアプローチは、抗がん剤で誘導されたり耐性細胞で過剰発現している様々な遺伝子群の情報を提供

してきたが、その個々の機能解析や発現制御機序の解明は進んでいない。さらに、固形がんで最も有力な薬剤であるシスプラチンやオキサリプラチンを用いて DNA ダメージシグナル伝達が解析され始めてきたが、損傷 DNA を認識する DNA/クロマチン周辺分子からみた DNA ダメージサーベイランスシステムの解析は少ない。従って、この2つのアプローチは新規の分子標的を見い出せる研究課題と考える。

2. 研究の目的

抗がん剤の中でも DNA 障害を惹起するシスプラチンは、固形腫瘍のがん化学療法で現在、最も重要かつ必須の薬剤である。シスプラチンを用いた DNA 損傷のシグナル伝達の解析は、シスプラチンを基盤にした全てのがん化学療法の効果増強を考える上で大切であるだけでなく、アポトーシスを誘導できる新しい分子標的の発見につながると考えられる。

シグナル伝達による核内及びミトコンドリア内分子会合を解析することにより、がん細胞の持つ DNA ダメージサーベイランスシステムを DNA 損傷認識可能なクロマチン周辺分子から明らかにし、効果増強法の考案のみならず分子標的治療薬剤の開発に資する分子標的の探索を目指すものである。

3. 研究の方法

大きく2つの基礎研究から分子標的治療の可能性を検証し、最終的に有用性を評価する。

(1) DNA 損傷応答に関与するモデル遺伝子群の解析

耐性細胞及び薬剤処理細胞を用いたディファレンシャルディスプレイ法や DNA マイクロアレイ法により単離された遺伝子群の解析をさらに進める。特に損傷認識可能な DNA/クロマチン周辺の分子や新しい転写因子系を中心に機能解析を進める。抗体作製を行い、発現レベルと増殖や分化、アポトーシス、薬剤感受性との関連について解析し、転写因子についてはその標的遺伝子から発現意義を明らかにする。その他レドックス分子や pH 制御分子についても、強制発現や siRNA による増殖能、細胞死、薬剤感受性や浸潤・転移への影響を検討する。見い出された新規分子群については、薬剤により惹起されるシグナル伝達の標的かどうかについての検証も併せて行う。

(2) DNA ダメージサーベイランスシステムの基盤となる分子会合解析

DNA ダメージサーベイランスシステムに関与する分子の中で、特に損傷認識蛋白をコアとしたクロマチン複合体の分子会合を解析するためのベイト蛋白としてクロマチン蛋白、DNA 修復蛋白及び転写因子を用いる。DNA ダメージ (X 線、シスプラチン、オキサリプ

ラチン、トポイソメラーゼ阻害剤、紫外線照射を用いる)の有無により、会合するプレイ蛋白のゲルプロファイルの変化を検討し新しい会合分子を同定する。

方法として既知の DNA 損傷の認識に関与する蛋白群の cDNA をクローン化し、GST, ThioHis, Flag あるいは HA タグ融合蛋白の作製を行い、相互の *in vivo*, *in vitro* での分子会合を検証する。未知の会合分子の同定は、Flag-HA ダブルタグのベクターを用い共沈してくる会合分子のアミノ酸配列を決定していく。遺伝子を同定後、強制発現系やノックダウン等により細胞の生死を決定する DNA 損傷耐容のメカニズムへの関与と各々の会合分子の意義を検証し、分子標的としての評価を行う。

4. 研究成果

(1) シスプラチン耐性細胞で高発現している転写因子として Twist を見出した。さらに、YB-1 の発現制御は転写因子 Twist によることを明らかにした。また Twist によるがん細胞増殖が YB-1 の発現を介していること、すなわち、増殖に関わる Twist の主たる標的が YB-1 であることも示した。

(2) DNA 損傷のがん細胞応答に関わる転写関連分子として長年解析してきた YB-1 について新しい発見があった。がん細胞での高発現は数多くの報告があるものの、がん間質組織での発現に着目した報告はなかった。今回、がん間質組織に存在する新生血管内皮細胞に YB-1 が高発現していること見出した (Cancer Sci. *in press*)。すなわち、YB-1 はがん細胞からのシグナルに反応して、血管内皮細胞が増殖サイクルに入っていることを示すバイオマーカーとなる可能性を示している。さらにこの事実は、YB-1 ががん細胞のみならず、腫瘍血管をも標的にできる新しいタイプの分子標的であることを示唆している。

(3) ZNF143 転写因子はシスプラチン耐性に関わるだけでなく、多くの DNA 修復遺伝子群を制御するマスター遺伝子の可能性について報告した。さらに転写因子 ZNF143 の標的遺伝子については、これまでの *in silico* のデータとは実際は異なることがわかった。siRNA を用いた細胞周期解析から、発現抑制が G2/M 期停止を誘導すること、マイクロアレイ解析から、標的遺伝子の中に多くの DNA 合成・複製と細胞周期関連の遺伝子が含まれていることがわかった (現在投稿中)。その後の解析から、ZNF 転写因子は、その特徴的な DNA 結合配列と、標的遺伝子からがんやその他の増殖性疾患の創薬ターゲットになりうる可能性が高いと考えられた。正常組織と比べ、がん組織で発現が高いことも確認でき

たことから、ZNF143 は、がん細胞増殖のマスター遺伝子の可能性があり、有力な分子標的となると考え特許出願を行った。

(4) 概日リズム転写因子である Clock と ATF4 の転写制御系が酸化ストレスの防御システムとして重要なグルタチオン合成に関与することを示し報告した。このシステムが DNA 損傷シグナルを誘導する抗がん剤のみならず、多くの薬剤の感受性を規定することを明らかにした。このことは、人間の日内活動において発生する活性酸素に対する防御システムと概日リズムが密接に関わることを示すもので興味深い。また、薬剤のグルタチオン抱合が概日リズム制御を受けることに関連して、時間薬理学や治療学の面からも重要と考えている。Clock はヒストンアセチル化酵素活性を持ち、その標的遺伝子の1つである Tip60 と共働して、ヒストンのアセチル化に働くことから、クロマチンリモデリングが概日リズムで制御されることを示したものととも言える。

(5) 概日リズムに関連する転写因子が抗がん剤感受性に関わる分子機序について報告してきたが、さらにヒトがん細胞移植動物研究から、人工照明ストレスが腫瘍増殖と血管・間質新生を誘導することを見出した。その責任分子として、Wnt10A を同定した。その分子機序として、人工照明ストレスが酸化ストレスを惹起し、Wnt10A の発現が誘導され、血管内皮細胞と線維芽細胞の増殖を促し、血管新生を含む間質新生ががん細胞の増殖に有利に働くのではないかと考えられた。Wnt10A が血管・間質新生を標的とした新しい分子標的になる可能性を示唆している（投稿中）。

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 40 件）

- ① Shiota, M., Izumi, H., Tanimoto, A., Takahashi, M., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Masubuchi, D., Fukunaka, Y., Yasuniwa, Y., Naito, S., Nishizawa, S., Sasaguri, Y., Kohno, K.: Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth. *Cancer Res.*, 査読有, 69(7): 3148-3156, 2009.
- ② Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Naito, S., Kohno, K.: Twist and p53 reciprocally regulate target genes

via direct interaction. *Oncogene*, 査読有, 27(42): 5543-5553, 2008.

- ③ Miyamoto, N., Izumi, H., Noguchi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Shiota, M., Kidani, A., Tawara, A., Kohno, K.: Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 283(26): 18218-18226, 2008.
- ④ Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S., Kohno, K.: Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res.*, 査読有, 68(1): 98-105, 2008.
- ⑤ Wakasugi, T., Izumi, H., Uchiumi, T., Suzuki, H., Arao, T., Nishio, K., Kohno, K.: ZNF143 interacts with p73 and is involved in cisplatin resistance through the transcriptional regulation of DNA repair genes. *Oncogene*, 査読有, 26(36): 5194-5203, 2007.
- ⑥ Igarashi, T., Izumi, H., Uchiumi, T., Nishio, K., Arao, T., Tanabe, M., Uramoto, H., Sugio, K., Yasumoto, K., Sasaguri, Y., Wang, K.Y., Otsuji, Y., Kohno, K.: Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. *Oncogene*, 査読有, 26(33): 4749-4760, 2007.
- ⑦ Uchiumi, T., Fotovati, A., Sasaguri, T., Shibahara, K., Shimada, T., Fukuda, T., Nakamura, T., Izumi, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M., Kohno, K.: YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 281(52): 40440-40449, 2006.
- ⑧ Kohno, K., Uchiumi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Igarashi, T., Momii, Y., Yoshida, T., Matsuo, K., Miyamoto, N., Izumi, H.: Transcription factors and drug resistance. *Eur. J. Cancer*, 査読有, 41(16): 2577-2586, 2005.
- ⑨ Ise, T., Shimizu, T., Lee, E.L., Inoue, H., Kohno, K., Okada, Y.: Roles of volume-sensitive Cl⁻ channel in cisplatin-induced apoptosis in human epidermoid cancer cells. *J. Membr. Biol.*, 査読有, 205(3): 139-145, 2005.

〔学会発表〕（計 84 件）

- ① 河野公俊, 和泉弘人.: 概日リズムに制御されるがん細胞増殖と薬剤耐性. 第

32 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 2009.12.12, 横浜.

- ② Kohno, K.: MCT4 expression and tumor invasion. First International Symposium on Proton Transport and its Inhibition (PTI) in the etiopathogenesis, diagnosis and treatment of cancer (招待講演), 2009.04.28, Madrid, Spain.
- ③ 河野公俊: 抗がん剤耐性の分子機構: 基礎研究から治療研究に向けて. 第 60 回日本泌尿器科学会西日本総会 (招請講演), 2008.11.7, 北九州.
- ④ Kohno, K., Izumi, H.: Cisplatin resistance and transcription factors. The 12th Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy (招待講演), 2007.12.4, 東京.
- ⑤ 河野公俊: 転写因子と抗がん剤耐性. 第 16 回泌尿器科分子・細胞研究会 (特別講演), 2007.02.24, 福岡.
- ⑥ 河野公俊: 抗がん剤耐性の分子生物学からのアプローチ. 第 24 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 (特別講演), 2006.01.27, 福岡.
- ⑦ Kohno, K.: Transcription factors and cisplatin resistance. The Japan Society for Promotion of Science (JSPS) U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Program Seminar (招待講演), 2005.06.11, 大阪.

[図書] (計 1 件)

- ① 河野公俊, 和泉弘人, 中外医学社, がん化学療法・分子標的治療 update, 2009, 64-67

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞増殖阻害方法、増殖阻害剤及びスクリーニング方法

発明者: 河野公俊, 和泉弘人, 笹栗靖之

権利者: 産業医科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2008/073817

出願年月日: 2008 年 12 月 26 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 2 件)

名称: 胚細胞腫瘍の検出方法

発明者: 河野公俊, 笹栗靖之

権利者: 株式会社キューリン

種類: 特許

番号: 特許第 4395004 号

取得年月日: 2009 年 10 月 23 日

国内外の別: 国内

名称: 予後判定方法

発明者: 松尾憲一, 山田雄次, 河野公俊

権利者: 大鵬薬品工業株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 4253094 号

取得年月日: 2009 年 1 月 30 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/bunsei/intro_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 公俊 (KOHNO KIMITOSHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00153479