

平成21年 6月19日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18380187
研究課題名（和文） 細胞周期調節タンパクを分子標的とする造血系悪性腫瘍増殖制御法の開発
研究課題名（英文） Development of a new therapeutic strategy against hematopoietic cell malignancy by modulating cell cycle regulatory proteins as molecular targets.
研究代表者 田中 あかね（TANAKA AKANE） 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授 研究者番号：80418673

研究成果の概要：

本研究計画における細胞周期研究では、有糸分裂制御メカニズムを分子レベルで解析することによって、造血系細胞腫瘍の増殖および拡大を制御する新たな標的分子を探索し、腫瘍性増殖を誘導する新たなカスケードを提唱することができた。特に、伴侶動物の肥満細胞腫やリンパ腫・白血病細胞の有糸分裂における G1/S チェックポイント調節タンパクの発現動態やその相互作用を分子レベルで解析、細胞増殖の抑制に重要な標的分子を見出すとともに、新規薬物による治療効果を検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床

キーワード：癌・シグナル伝達・獣医学・動物・臨床

1. 研究開始当初の背景

ヒトと同様にイヌなどの伴侶小動物でも、腫瘍によって個体死がもたらされる主たる原因は、（1）腫瘍細胞の無秩序な増殖による正常組織の構造変化や機能の破壊、（2）腫瘍細胞の周辺浸潤による正常組織の破壊、（3）遠隔転移に伴う他臓器機能の障害、（4）腫瘍由来の液性因子による全身状態の悪化、である。小動物臨床における悪性腫瘍への対応策としては、早期の外科手術による切除が最初に選択されるべきである。しかし、

発見が遅れることが多い動物症例において、化学療法により根治を目指すことは副作用や費用の点からもきわめて難しいことから、腫瘍細胞の増殖・浸潤・転移を抑制し、苦痛を軽減しながら、当該器官や臓器を温存して腫瘍と共存する「休眠療法」の開発が望まれる。悪性腫瘍の増殖や浸潤を抑える休眠治療では、腫瘍の根治はできなくとも、副作用を限りなく軽減し、腫瘍組織の拡大を押さえ込む適切な治療標的の探索が重要である。本研究においては、細胞の増殖に必須の細胞周期

調節因子に着目し、有糸分裂の制御メカニズムを分子レベルで解析することにより、ガン細胞の増殖や拡大を抑制することのできる新たな治療標的を探索しようとした。特に、代表者のこれまでの研究実績に立脚し、肥満細胞腫やリンパ腫・白血病などの、造血系細胞腫瘍を主たる研究対象とした。白血病やリンパ腫における細胞周期調節因子の相互作用や制御メカニズムは、現在でも盛んに研究されており、重要な創薬の対象となっている。

2. 研究の目的

本研究計画における細胞周期研究の目的は、有糸分裂制御メカニズムを分子レベルで解析することによって、ガン細胞の増殖および拡大を制御する方法を検討・開発することであった。研究代表者によるこれまでのガン細胞増殖における細胞周期調節タンパクの発現動態に関する研究成果を基盤として、本研究計画では、さらに有糸分裂における G1/S チェックポイント調節タンパクの発現動態やその相互作用を分子レベルで解析し、細胞増殖を抑制することによって、新たな造血系腫瘍の制御法を開発することを目的とした。また、近年、腫瘍化と腫瘍抑制遺伝子の機能不全との因果関係が指摘されていることから、Cip/Kip ファミリータンパクおよび p53 などのガン抑制遺伝子の発現動態を解析すると共に、それらの機能不全の可能性を造血系腫瘍で分析し、ガン化のメカニズムを解析しようとした。伴侶動物に多い造血系細胞の悪性腫瘍としては、肥満細胞腫・リンパ腫・白血病を解析対象とし、中心的役割を果たす細胞周期調節タンパクの発現に連動する分子を抑制することで、細胞増殖を制御する新たな造血系悪性腫瘍の治療標的となる分子を探索した。

3. 研究の方法

造血系腫瘍における細胞周期調節タンパクの発現制御機構およびガン抑制遺伝子の発現動態の解析を進めた。具体的には、ウェスタンブロット法、PCR法、免疫沈降法、フローサイトメトリー法、ELISA法、免疫組織化学法などを用いて、細胞周期調節因子やその抑制性因子、アポトーシス関連因子などの発現を詳細に検討した。また、転写因子の発現について、レポーター法や EMSA法などを用いて検討した。さらに、標的分子のノックダウンに関し、*in vitro* および *in vivo* の評価系を用いて新規治療法としての臨床応用の可能性を検証した。特に、特異的阻害剤（低分子化合物）を用いた分子標的治療法あるいは遺伝子治療法の確立へ向けて、広くデータを集積した。

(1) 造血系腫瘍細胞株における G1/S チェックポイント制御機構の解析

サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ、それらの抑制性因子を中心に、前述の方法で発現解析を進めた。異なる造血系腫瘍細胞株において、D型サイクリンと特異的に結合するサイクリン依存性キナーゼを共役免疫沈降法によって探索した。

(2) D型サイクリン発現制御因子のプロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA メチル化の解析

D型サイクリンの機能は、主として Cip/Kip ファミリーサイクリン依存性キナーゼ阻害因子によって制御されていることから、これらの因子の発現動態を細胞株ならびに臨床材料において検索・評価した。

(3) 候補分子を阻害する低分子化合物および siRNA の薬効評価

D型サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼに対して特異的な阻害効果を有する化合物または siRNA について、細胞株および臨床材料から樹立した培養系において、その薬効を評価する。また、転写因子 NF- κ B が D 型サイクリンの発現誘導に強く関与していることから、NF- κ B 阻害による細胞増殖抑制効果を検討した。

(4) 造血系腫瘍細胞株における G1/S チェックポイント制御機構の解析

D型サイクリンと特異的に結合するサイクリン依存性キナーゼなどの細胞周期促進因子の発現を特異的阻害剤や遺伝子サイレンシングにより抑制し、腫瘍性増殖が制御できるかどうかについて *in vitro* および *in vivo* モデルにおいて検証した。

(5) G1/S チェックポイント制御機構に関する転写因子の解析

転写因子 NF- κ B が D 型サイクリンの発現誘導に強く関与していることから、低分子化合物により NF- κ B を特異的に阻害し、細胞増殖抑制効果を検討した。

(6) アポトーシス関連 Bcl-2 ファミリータンパクの発現および相互作用の解析

アポトーシス関連タンパクの中でも、特に内因性アポトーシスの制御に重要なミトコンドリア由来 Bcl-2 ファミリータンパクについて、前述の方法で発現動態を調べるとともに、結合や相互作用、転写因子による制御について解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 造血系腫瘍細胞株における G1/S チェックポイント制御機構の解析

造血系腫瘍細胞株では D 型サイクリンの発現が強発現しており、細胞周期の進行に関与していることを明らかにした。サイクリンは、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) と結合することで、細胞周期を促進する転写因子の活性化を誘導する。そこで、白血病および肥満細胞腫細胞株において、D 型サイクリンと特異的に結合するサイクリン依存性キナーゼを共役沈降法によって探索し、G1/S チェックポイントにおける細胞周期の進行に関する CDK-D 型サイクリン複合体を明らかにした。肥満細胞腫では、D 型サイクリンの中でも特にサイクリン D2 と D3 の発現が亢進しており、それらは CDK2、-4、-6 と複合体を形成して機能を発揮していた。リンパ腫・白血病細胞では、サイクリン D1 と D2 の発現が亢進しており、それらは CDK4 および 6 と複合体を形成して機能を発揮していた。CDK2 はサイクリン E と結合して、細胞周期の進行を促進していた。特に、肥満細胞腫において得られた知見は、世界で初めての報告であり、2008 年の BBRC 誌および Vet. Immunol. Immunopathol. 誌に掲載された。また、成果は、国内外の学会にて発表するとともに、国際的学術雑誌に論文投稿中である。

(2) D 型サイクリン発現制御因子のプロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA メチル化の解析

D 型サイクリンを抑制する Cip/Kip ファミリーサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の白血病および肥満細胞腫細胞における発現抑制を明らかにするとともに、これら因子の DNA メチル化解析を進めた。p27Kip1 に関し、急性骨髄生白血病細胞株における NA メチル化とこれに連動する機能不全が検出されたが、多くは機能不全ではなく発現低下に陥っていることを明らかにした。また、転写因子 NF- κ B の活性を阻害することで、p27Kip1 の発現が亢進すること、造血系細胞腫瘍では p21Cip1 は検出限界以下であることを見出した。これらの知見は、国内外の学会にて発表し、論文は、2006 年に米国癌学会誌に掲載された。

(3) NF- κ B 活性を阻害する低分子化合物および D 型サイクリンに対する siRNA の薬効評価

D 型サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼに対して特異的な阻害効果を有する siRNA について、細胞株および臨床材料から樹立した培養系において、腫瘍性増殖抑制効果を検証した。また、転写因子 NF- κ B が D 型サイクリンの発現誘導に強く関与してい

ることを証明するとともに、NF- κ B 活性の阻害による細胞周期の停止と細胞増殖抑制効果を明らかにした。また、Cyclin D3 に対する siRNA の抑制効果を確認し、細胞周期進行への関与を解析するとともに、CDK に対する低分子阻害薬の抑制作用も確認した。今後更なる検討が必要であるが、これらの分子が造血系細胞悪性腫瘍の治療標的としてきわめて有用であることが示唆された。これらの知見は国内外の学会にて発表し、論文は、現在国際的学術雑誌に投稿中である。

(4) アポトーシス関連 Bcl-2 ファミリータンパクの発現および相互作用の解析

内因性アポトーシスの制御に重要なミトコンドリア由来 Bcl-2 ファミリータンパクについて、発現動態を調べたところ、造血系細胞腫瘍では Mcl-1 の発現がきわめて亢進していることを見出した。一方、アポトーシス抑制因子の阻害機能を有する Bim や Bad などの発現が低下していること、NF- κ B の活性を抑制することで前述の因子の発現が亢進することを明らかにした。これらの知見は、世界で初めての報告であり、国内外の学会にて発表するとともに、国際的学術雑誌に論文投稿中である。

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 11 件)

Tanaka A, Jung K, Benyacoub J, Prioult G, Ohmori K, Blum S, Mercenier A, Matsuda H: Prevention of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice by oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724. *Exp. Dermatol.* 2009, In press. 査読有り

Tanaka A, Fukushima Y, Benyacoub J, Blum S, Matsuda H: Prophylactic effect of oral administration of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) during the weaning period on atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *Eur. J. Dermatol.* 18: 136-40, 2008. 査読有り

Ohmori K, Kawarai S, Yasuda N, Tanaka A, Matsuda H, Nishimura R, Sasaki N, Tsujimoto H, Masuda K: Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126: 43-53, 2008. 査読有り

Amagai Y, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H: Establishment of a novel

high-affinity IgE receptor-positive canine mast cell line with wild-type c-kit receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 857-61, 2008. 査読有り

Tanizaki H, Kambe N, Nakamura Y, Tanaka A, Matsuda H, Miyachi Y: Oral administration of bepotastine besilate suppressed scratching behavior of atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145: 277-82, 2008. 査読有り

Kawashima H, Tateishi N, Shiraiishi A, Teraoka N, Tanaka T, Tanaka A, Matsuda H, Kiso Y: Oral administration of dihomo-gamma-linolenic acid prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Lipids.* 43: 37-43, 2008. 査読有り

Karasawa K, Matsuda H, Tanaka A: Superficial keratectomy and topical mitomycin C as therapy for a corneal squamous cell carcinoma in a dog. *J. Small. Anim. Pract.* 4: 208-10, 2008. 査読有り

Tanaka A, Muto S, Jung K, Itai A, Matsuda H: Topical application with a new NF-kappaB inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J. Invest. Dermatol.* 127:855-863, 2007. 査読有り

Sawada J, Morita H, Tanaka A, Salminen S, He F, Matsuda H: Ingestion of heat-TREATED *Lactobacillus rhamnosus* GG Prevents Development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy* 37: 296-303, 2007. 査読有り

Kobie K, Kawabata M, Hioki K, Tanaka A, Matsuda H, Mori T, Maruo K: The tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) induces regression of xenografted canine mast cell tumors in SCID mice: *Res. Vet. Sci.* 2:239-241, 2007. 査読有り

Tanaka A, Muto S, Konno M, Itai A, Matsuda H: A new IkappaB kinase beta inhibitor prevents human breast cancer progression through negative regulation of cell cycle transition. *Cancer Res.* 66: 419-26, 2006. 査読有り

[学会発表](計15件)

松田彬、肥満細胞腫におけるアポトーシス耐性獲得機構の解析、第147回日本獣医学会学術集会臨床分科会シンポジウム 2009/04/04、宇都宮

古阪徹、S-1少量維持療法 - その奏効と完遂について - 第46回日本癌治療学会総会、2008/10/30、名古屋

Tanaka A., Does a strategy that interferes with the NF-kappa B pathway brings a new insight into the hematopoietic tumor therapy?, 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, 2008/10/10, Creta.

田中あかね、Bcl-2 ファミリータンパクの肥満細胞腫細胞増殖への関与、第146回日本獣医学会学術集会、2008/09/24、宮崎

松田彬、NF-kappaB 阻害剤によるイヌ白血病細胞の増殖抑制効果、第146回日本獣医学会学術集会、2008/09/24、宮崎

種田久美子、ヒト乳がん細胞株における腫瘍化抑制標的分子の検討、第146回日本獣医学会学術集会、2008/09/24、宮崎

田中あかね、人とペットが快適に暮らすために - 犬の気持ちを知ろう -、田無タワー 第一回講演会、2008/09/21、東京

田中あかね、アトピー性皮膚炎治療標的としての IKK-NFkappaB 経路の可能性

The 7th Cell Biology Summer Meeting (CBSM2008) 2008/07/05、千葉

Tanaka A., Bathing in ultra-pure soft water improves skin barrier functions both in patients with atopic dermatitis and in atopic NC/Nga mice. XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 2008/06/08, Barcelona.

田中あかね、アトピー性皮膚炎治療標的としての IKKbeta-NFkappaB 経路の可能性、生体機能と創薬シンポジウム 2007、2007/09/13、金沢

雨貝陽介、犬肥満細胞腫における腫瘍抑制標的分子の検討、第144回日本獣医学会学術集会、2007/09/03、北海道

田中あかね、ヒト白血病細胞に対する NF-kappaB 阻害剤 IMD-0354 の細胞増殖抑制効果、第44回日本癌治療学会総会、2006/10/20、横浜

田中あかね、イヌ肥満細胞腫の先端的治療法確立に向けて、第142回日本獣医学会臨床分科会シンポジウム、2006/09/23、山口

蛇島武久、白血病細胞の増殖機構における転写因子 NF-kappaB の役割、第142回日本獣医学会学術集会、2006/09/22、山口

雨貝陽介、イヌ肥満細胞腫の腫瘍性増殖における PI3K シグナル伝達系の役割、第142回日本獣医学会学術集会、2006/09/22、山口

[その他]

ホームページ

http://www.tuat.ac.jp/mol_path/

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/11/0001076/profile.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 あかね (TANAKA AKANE)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・准教授
研究者番号 : 80418673

(2)研究分担者 (2006 ~ 2007 年度)

松田 浩珍 (MATSUDA HIROSHI)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・教授
研究者番号 : 80145820
新井 克彦 (ARAI KATSUHIKO)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・准教授
研究者番号 : 60175940

(3)連携研究者 (2008 年度)

松田 浩珍 (MATSUDA HIROSHI)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・教授
研究者番号 : 80145820
新井 克彦 (ARAI KATSUHIKO)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・教授
研究者番号 : 60175940