

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590720
 研究課題名（和文） 核内受容体および受容体型チロシンキナーゼを標的分子とした癌化学予防に関する研究
 研究課題名（英文） Strategy for chemoprevention of digestive cancers by targeting abnormalities in receptor tyrosine kinases and nuclear receptors
 研究代表者
 森脇 久隆 (MORIWAKI HISATAKA)
 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50174470

研究成果の概要：

我々は本研究で、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) /Ras/MAPK によるレチノイド核内受容体 RXR のリン酸化修飾を阻害することで、リン酸化 RXR を高発現しているヒト肝癌細胞に、レチノイド依存性に相乗的な増殖抑制効果とアポトーシスの誘導が起こることを明らかにした。今回の研究結果は、RTK やその下流シグナルを阻害し、RXR のリン酸化修飾に伴う機能異常を修復することが、肝発癌予防に結びつく可能性を示唆するものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：核内受容体、受容体型チロシンキナーゼ、大腸癌、肝臓癌、レチノイド

1. 研究開始当初の背景

肝癌を代表とするある種の悪性腫瘍において、核内受容体の発現・機能異常を回復することで、前癌細胞にアポトーシスや分化誘導をおこし、それらの細胞を生体から排除する発癌予防法（薬）の開発は、重要な研究課題である。また受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、受容体自体が有するチロシンキナーゼ活性の上昇を介して、Ras/MAPK をはじめとする細胞の分化・増殖に関わる細胞内シグナルを活性化するが、RTK の発現・機能異常もヒト癌の発症進展に重要な役割を果た

している。そこで我々は、RXR が RTK/Ras/MAPK により恒常的にリン酸化される可能性に注目し、「核内受容体異常」、「RTK の発現・機能異常」と発癌の関連についてより検討し、これらを分子標的とした癌予防法・治療法の実現を目指すべく、研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、核内受容体の修飾・転写活性の変化と RTK の発現・機能の変化との関連を明らかにし、これらの異常がヒト消化器癌、特に肝臓癌、大腸癌および膵癌発癌に及

ぼす影響を明らかにすること、さらに核内受容体と RTK の機能を正常化 (回復) することによって腫瘍細胞にアポトーシスと細胞分化を誘導し、臨床的に有益な発癌予防法の開発を目指すことにある。

我々は今まで、細胞の分化・増殖・死といった幅広い領域に影響をおよぼす核内受容体の、消化器領域の固形癌における異常修飾 (特にリン酸化) に主眼をおき研究を進めてきたが、特にヒト肝癌において、レチノイド核内受容体 RXR がリン酸化され機能不全に陥ることが、発癌における主要なメカニズムであることが明らかとなった (Cancer Res, 2001, Carcinogenesis, 2003)。具体的には、細胞にリン酸化型 mutant RXR を発現させることにより RAR/RXR の転写活性が喪失すること、対照的に非リン酸化型 mutant RXR を発現させることで同転写活性が著明に亢進 (回復) していること、また RXR はリン酸化されることによって他の核内受容体との間のヘテロ二量体形成能が低下することが、最近の我々の研究で証明された。ヒト肝癌臨床検体でも RXR 遺伝子の mutation は認められないものの、蛋白レベルでは正常肝組織と比較し恒常的にリン酸化されていることが確認されており、これらの発見は、肝癌を含めたある種の発癌が核内受容体の機能不全による「核内受容体病」として捉えられる可能性を示唆している。この疾患概念はまったく新しい独創的なものであり、この概念に基づいた治療メカニズムの解明は癌化のプロセス、ひいては正常細胞の分化・増殖・死の過程の解明にまで深く結びつくものと期待される。実際に我々は、この新たな疾患概念に基づいて新規に開発したレチノイド誘導體 (非環式レチノイド) による肝発癌再発予防を試み、臨床の第 2 相試験において有効な成績を示した (N Eng J Med, 1996 & 1999)。我々は RXR のリン酸化が Ras/ERK/MAPK の活性により引き起こされることを報告してきたが、興味深い研究結果として、非環式レチノイドがこの細胞内シグナル伝達経路の上流に位置する RTK の活性を阻害し、結果として MAPK を抑制する可能性が近年明らかになってきている (Clin Cancer Res, 2004, Carcinogenesis 2005)。しかしながら、RXR は種々の核内受容体とヘテロ二量体を形成しその下流転写シグナルを制御する核内受容体の中で最も重要な「master regulator」であるにも関わらず、肝癌以外の他消化器癌におけるこの核内受容体の発現・機能異常に関しては未だ不明な点が多い。また RTK の異常が核内受容体の発現・修飾・機能異常に及ぼす影響に関しても、未だ詳細な研究は進んでいない。そこで我々は本研究において、肝癌以外の消化器固形癌、特に近年増加の著しい大腸癌と未だ最も予後不良の癌の一つである膵癌における

RXR を始めとした各種核内受容体の発現・修飾・機能異常と RTK の発現・機能異常の関連について検討し、これらを「分子標的」とした新たな発癌予防法および治療法の開発に取り組むことを目的とする。

3. 研究の方法

平成 19 年度

1) ヒト大腸癌および膵癌細胞株、およびヒト大腸癌および膵癌組織 (検体) における各種核内受容体 (特に RXR) の発現・修飾状態のスクリーニング (清水・森脇担当)

まず始めにヒト大腸癌および膵癌細胞、およびこれらの腫瘍のヒト検体における各種核内受容体の蛋白および遺伝子レベルの発現状態についてスクリーニングを行う。特に RXR 蛋白の異常修飾 (リン酸化) について確認する。具体的な実験手技としては、Western Blot (免疫沈降)、Northern Blot、RT-PCR 等を用い、最終的には大腸癌および膵癌細胞株における各種核内受容体異常を網羅した「Map」を作成する。また、ヒト大腸癌および膵癌細胞株における各種 RTK の発現、リン酸化状態、およびそれらに対するリガンド (増殖因子) の発現状態のスクリーニングも合わせて行い、核内受容体の修飾異常と RTK の発現・機能異常が密接に関係している細胞を同定していく。代表的 RTK である EGFR ファミリーに属する EFRF、HER2 に対しては既に特異的分子標的薬剤が開発されていること (Gefitinib、Trastuzumab、etc)、また非環式レチノイドがその活性阻害に関与している可能性を踏まえ (Clin Cancer Res, 2004, Carcinogenesis 2005)、特にこれらの分子の発現・機能異常に注目する。

2) リン酸化型・非リン酸化型の RXR を発現する大腸癌および膵癌細胞株を用いた研究 (清水・森脇担当)

我々は既にリン酸化型・非リン酸化型の RXR を定常発現する肝癌細胞株の樹立に成功しているが、この手技 (mutant) を用いて、リン酸化型・非リン酸化型の RXR を定常発現する大腸癌および膵癌細胞株を新たに作成し、その生物学的特徴について検討する。具体的には、細胞増殖能、浸潤能、各種核内受容体リガンドに対する感受性、転写活性の変化と分化誘導・アポトーシス誘導能の変化の違いを検討する。またリン酸化型・非リン酸化型 RXR を発現する細胞間の遺伝子解析の比較から、RXR の下流にあって細胞の分化誘導・増殖抑制を制御している実行遺伝子を明らかにしていく (マイクロアレイ)。また、RTK の分子標的薬剤に対する感受性、特にこれによって動く細胞内シグナルの変化についてこれらの細胞間で比較検討する。特に注目すべき核内受容体、RTK、あるいは細胞内シグナルが同定された場合は、RNAi によるノ

ックダウンを試み、その細胞学的変化について検討する。

平成20年度

3) 核内受容体リガンドおよびRTKを分子標的とする薬剤による大腸癌および膵癌細胞株におけるRXRリン酸化の抑制効果、および標的転写活性に及ぼす効果の検討 (清水・森脇担当)

上記のスクリーニング、Map 作成の結果に基づきながら、大腸癌および膵癌細胞 (リン酸化型・非リン酸化型 RXR 定常発現細胞株を含む) をレチノイド等特異的な核内受容体リガンドで処理し、これらリガンドによる転写活性の変化について検討する。また、RTK を分子標的とする薬剤と併用処理することによって、特定の細胞内シグナル伝達経路に起こりうる活性化あるいは不活化を明らかにし、相乗的な効果が認められる場合はそのメカニズムについて明らかにする。

4) 遺伝子操作動物 (特にRXR) を用いた核内受容体リガンドおよびRTKを分子標的とする薬剤の生体内における効果、相互作用の検討 (山田・清水担当)

RXR は RAR や PPAR といった多数の核内受容体とヘテロダイマーを形成し、相互作用を及ぼす「master regulator」である。我々が樹立した、リン酸化型・非リン酸化型 mutant RXR を発現する肝癌細胞株は様々な *in vitro* の実験を可能にしているが、今後は *in vivo* においてこれらの蛋白機能異常の意義を実際に再現していく必要があると考えられる。具体的には、リン酸化型・非リン酸化型 mutant RXR を組織特異的に発現するトランスジェニックマウスの作成、あるいは RXR のコンディショナルノックアウトマウスを作成する。臨床ヘトランスレートする前に、これらの遺伝子操作動物を用いて核内受容体や RTK をターゲットとする薬剤の発癌予防・抗腫瘍効果について検討し、ひいては生体内における特異的シグナル、他の核内受容体および RTK 間における相互作用について観察していくことで「核内受容体病と発癌」の関連はより明らかになるものと予想される。

本研究の究極的な目標は、有効な発癌予防・治療法の開発である。現在進行中の非環式レチノイド単独の臨床試験に加え、我々はレチノイド同様に肝発癌抑制効果が臨床で証明されているビタミンKにRXRリン酸化抑制作用があること、また非環式レチノイドとビタミンKの同時投与によって相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果が起こることを確認した (Cancer Sci, in press)。我々は既に非環式レチノイドとインターフェロンの併用 (Hepatology, 2002)、非環式レチノイドとサリダグク誘導体の併用 (Clin Cancer Res, 2004) によっても相乗的な癌細胞増殖抑制効

果が認められることを肝癌細胞において明らかにしてきており、レチノイドあるいは PPAR リガンド等核内受容体蛋白を標的とする薬剤とその他の作用機序を有する薬剤、特に Ras/ERK/MAPK をはじめとする細胞内シグナル伝達あるいはその上流に位置する RTK に対する分子標的治療の併用は、今後は肝癌のみならず様々な癌の発癌発癌予防・治療法の実現にむけて重要なアプローチになりうると考えられる。

4. 研究成果

我々は現在までの研究で、レチノイド核内受容体 RXR は、異常なリン酸化修飾を受けることで、その二量体形成能と転写活性を低下させ、結果として腫瘍細胞にアポトーシス抵抗性と増殖亢進が惹起されること、また RTK とその下流分子である Ras/MAPK の活性が、RXR のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。また、RXR のリン酸化修飾を阻害するとともにレチノイドを併用投与することで、リン酸化 RXR を高発現しているヒト肝癌細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞、レチノイド耐性白血病細胞に増殖抑制とアポトーシスの誘導が起こることを報告した。更には、代表的な RTK である EGFR と HER2、およびリン酸化 RXR を強発現する肝癌細胞を、RXR のリガンドである 9-cis レチノイン酸または非環式レチノイドと、抗 HER2 モノクローナル抗体である Trastuzumab で併用処理することによって、相乗的なアポトーシスの誘導と、腫瘍細胞の増殖抑制効果が発揮されることを明らかにしたが、この相乗効果のメカニズムとして、レチノイドと Trastuzumab による協調的な RXR のリン酸化抑制が重要であることを報告した。これらの研究結果は、RTK やその下流シグナル (Ras/MAPK) を阻害し、RXR のリン酸化修飾に伴う機能異常を修復することが、様々な発癌予防に結びつく可能性を示唆するものであり、今後、発癌予防研究を進めていく上で重要かつ有意義な研究結果と考えられた。

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8件)

1. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. Clin Cancer Res 14: 2806-2812. 2008. (査読有)
2. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Tatebe H, Nakagawa T, Hara Y,

- Weinstein IB, Moriwaki H. ECGG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 262: 10-18. 2008. (査読有)
3. Kanemura N, Tsurumi H, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Shimizu M, Moriwaki H. Retinoid X receptor alpha is highly phosphorylated in retinoic acid-resistant HL-60R cells and the combination of 9-cis retinoic acid plus MEK inhibitor induces apoptosis in the cells. *Leuk Res* 32:884-892. 2008. (査読有)
 4. Yoshimura K, Muto Y, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Takano Y, Tsurumi H, Kojima S, Okano Y, Moriwaki H. Phosphorylated retinoid X receptor α loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor β . *Cancer Sci* 98: 1868-1874. 2007. (査読有)
 5. Moriwaki H, Shimizu M, Okuno M, Nishiwaki-Matsushima R. Chemoprevention of liver carcinogenesis with retinoids: Basic and clinic aspects. *Hepatol Res* 37 (Suppl. 2): S299-S302. 2007. (査読有)
 6. Yamazaki K, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Kanemura N, Araki H, Tsurumi H, Kojima S, Weinstein IB, Moriwaki H. Synergistic effects of RXR α and PPAR γ ligands to inhibit growth in human colon cancer cells-phosphorylated RXR α is a critical target for colon cancer management-. *Gut* 56: 1557-1563. 2007. (査読有)
 7. Kanamori T, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Kojima S, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by acyclic retinoid and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 98: 431-437. 2007. (査読有)
 8. Ogiso T, Nagaki M, Takai S, Tsukada Y, Mukai T, Kimura K, Moriwaki H. Granulocyte colony-stimulating factor impairs liver regeneration in mice through the up-regulation of interleukin-1 beta. *J Hepatol* 47:816-825. 2007. (査読有)
- [学会発表] (計10件)
1. 清水雅仁, 森脇久隆. 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月29日 名古屋 シンポジウム 肝がん予防の総合戦略と化学予防
 2. 清水雅仁, 森脇久隆. JDDW2008 2008年10月1日 東京 シンポジウム6「肝癌の分子標的治療」 Retinoid核内受容体RXR α を標的分子としたAcyclic retinoidによる肝癌化学予防
 3. 建部英春、清水雅仁, 森脇久隆. 第44回日本肝臓学会総会 2008年6月5日 松山 レチノイドとTrastuzumabの併用処理による相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果の検討
 4. 森脇久隆. 第94回日本消化器病学会総会 2008年5月9日 福岡 パネルディスカッション8「肝癌再発進展阻止を目指して」 レチノイド核内受容体RXR α を標的分子とした肝細胞癌化学予防-非環式レチノイドとclonal deletion-
 5. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. 99th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2008年4月15日 サンディエゴ Synergistic growth inhibition by 9-cis- retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells.
 6. 山崎健路、清水雅仁, 西脇理英, 奥野正隆, 小嶋聡一, 森脇久隆. 日本レチノイド研究会第18回学術集会 2007年11月24日 東京 ヒト大腸癌におけるRXR α のリン酸化とRXR/PPAR γ リガンド併用処理による大腸癌細胞増殖抑制効果の検討
 7. 吉村光太郎、清水雅仁, 西脇理英, 奥野正隆, 小嶋聡一, 武藤吉徳, 森脇久隆. 日本レチノイド研究会第18回学術集会 2007年11月24日 東京 RXRのリン酸化修飾がRXR/RAR二量体形成能に及ぼす影響についての検討
 8. Shimizu M, Moriwaki H. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium 2007年8月11日 岐阜

Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma (HCC)- Phosphorylated RXR α might be a critical target for HCC chemoprevention-

9. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Moriwaki H. The 8th Japan-Korean Cancer and Ageing Symposium 2007 年 8 月 11 日 岐阜 Synergistic growth inhibition by 9-cis- retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells.
10. 金森 堂、清水雅仁、森脇久隆. 第 93 回日本消化器病学会総会 2007 年 4 月 21 日 青森 ワークショップ 5 「肝細胞癌根治療法後の再発抑制」 非環式レチノイドとビタミンK2 の併用処理による相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果の検討

〔図書〕 (計 2 件)

1. 森脇久隆. 日本病態栄養学会編. 「第 5 章 病態栄養と栄養療法、7 その他の疾患、(木がん)」: 改訂第 2 版 認定 病態栄養専門師のための病態栄養ガイドブック、東京: メディカルレビュー社; 2008 年: 248-249.
2. 清水雅仁, 森脇久隆. 非環式レチノイドによる肝発癌の予防: 西口修平編. 肝硬変のマネジメント. 東京: 医薬ジャーナル社; 2007 年: 84-89.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森脇 久隆 (MORIWAKI HISATAKA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50174470

(2) 研究分担者

清水 雅仁 (SHIMIZU MASAHIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90402198

山田 泰広 (YAMADA YASUHIRO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 70313872