

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590897

研究課題名（和文） 肺癌細胞の無限増殖を抑制する新たな分子標的の策定

研究課題名（英文） Exploration of the genes that repress indefinite proliferation of lung cancer cells

研究代表者

檜山 桂子 (HIYAMA KEIKO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：60253069

研究成果の概要： 肺癌細胞株の網羅的発現解析により、肺癌の無限増殖を抑制する新たな分子標的候補を絞り込むと同時に、遺伝子導入により、その評価に有用な正常と不死化がん細胞の中間に位置すると考えられる気道上皮細胞を樹立した。これらは癌幹細胞にも有効な無限増殖を抑制する新たな抗癌剤の開発への展開が期待された。さらに、p16/RB 経路の不活性化のないテロメラーゼ活性化が幹細胞に由来する肺癌のマーカーである可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌・不死化・分子標的・テロメラーゼ・抗癌剤・気道上皮・幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌の新たな分子標的治療が開発され、著効する症例がある一方 non-responder も多く普遍性に乏しいことが大きな問題となっている。それは、標的としている分子が、癌の発生・進展を普遍的に規定しているものではないからである。一方、ヒトがん細胞の無限増殖には、普遍的に逆転写酵素テロメラーゼの活性化がほぼ必須であり、肺癌も 85% でテロメラーゼが活性化されている。しかしヒトがん細胞の無限増殖にテロメラーゼはほぼ必須条件だが十分条件ではなく、不死化は未知の分子に制御されており、がん細胞においてはその分子制御の破綻がテロメラーゼの

活性化と共存して無限増殖能を獲得することを示してきた。ゆえに、がん細胞に不死化を賦与するこの分子は、がん細胞にはほぼ普遍的に作用するが、正常細胞のテロメラーゼ活性化に関与する遺伝子とは異なると考えた。

## 2. 研究の目的

がん細胞特異的に不死化を賦与する分子は、がん細胞特異的かつ普遍的な増殖制御戦略の標的になると期待され、このがん特異的不死化規定分子を同定することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 不死化気道上皮細胞の樹立: SV40EA および *TERT* 遺伝子を導入して増殖因子依存性の消失および延命した正常気道上皮の継代を繰り返し、無限増殖クローンを選択した。

(2) トランスフォーム気道上皮不死化規定遺伝子の特定: 既に抽出したがん細胞の普遍的不死化規定遺伝子候補遺伝子の発現ベクターを作製し、順次(1)の延命気道上皮に導入し、継代により無限増殖をもたらす遺伝子、colony formation assay により足場依存性を消失させる遺伝子を探索した。

(3) 幹細胞由来肺癌のマーカー探索: 肺癌細胞および肺癌臨床検体のさまざまな遺伝子変化・テロメラーゼ活性化の関係を調べ、肺癌幹細胞マーカーを探索した。

### 4. 研究成果

(1) 不死化気道上皮細胞の樹立: *TERT*・SV40EA 導入延命トランスフォーム気道上皮細胞を継代し続け、150 PDL を越える不死化したと思われるクローンを樹立した。

(2) トランスフォーム気道上皮不死化規定遺伝子の特定: 既に抽出したがん細胞の普遍的不死化規定遺伝子候補遺伝子のうち、12 遺伝子 13 種 (スプライスバリエント含む) の発現ベクターを構築し、コントロールベクターと合わせ、14 コンストラクトを(1)の延命気道上皮細胞に導入した。すべてにおいて複数個の導入クローンを樹立した。

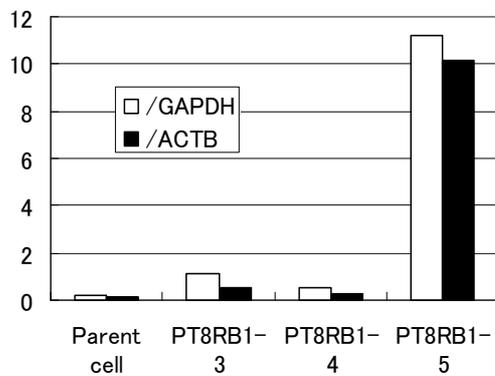


図1. real-time RT-PCRによる、導入遺伝子の発現レベル。

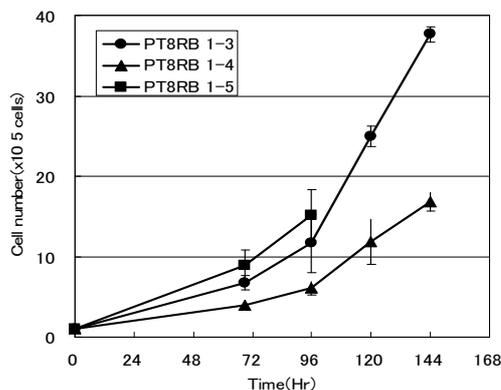


図2. 遺伝子導入クローンの増殖曲線。

その一つは、導入遺伝子の発現レベル (図1: GAPDH および ACTB いずれの補正においても、clone 5 > clone 3 > clone 4 の発現レベルを示す。値1は、さまざまながん細胞株における平均値を示す。) と相関して増殖速度 (図2: 増殖速度は clone 5 > clone 3 > clone 4) が亢進し、soft agarose にてわずかながらコロニーを形成した。この遺伝子は、トランスフォーム気道上皮の増殖能の亢進に関与していることが示され、目的とする不死化規定遺伝子の可能性が示された。

(3) 幹細胞由来肺癌のマーカー探索: 肺癌臨床検体の遺伝子解析結果より、扁平上皮癌および小細胞癌ではテロメラーゼ高活性の腫瘍では全例 Rb/p16 経路が不活化されていたが、肺腺癌のみ、テロメラーゼ高活性腫瘍の半数において、Rb/p16 経路が保たれていた。これは、肺腺癌には、元来不死化のポテンシャルを持つテロメラーゼ陽性幹細胞由来の癌と、テロメラーゼ陰性の分化した体細胞由来で p53, Rb/p16 経路を不活化して癌化した癌とが半々に存在するが、肺小細胞癌と扁平上皮癌は後者に属することを示唆する。すなわち、Rb/p16 経路が保たれテロメラーゼ高活性を示すことは、幹細胞由来のマーカーと考えられ、これを示す腫瘍は、従来の抗癌剤ではなく、本研究が開発を目的とするような不死化を標的とした分子標的治療薬が有効かもしれない。

### 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 17 件)

- 1) Fumoto S, Tanimoto K, Hiyama E, Noguchi T, Nishiyama M, Hiyama K. *EMP3* as a candidate tumor suppressor gene for solid tumors. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, in press. (査読有)
- 2) Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, Fukuda E, Kamei N, Hiyama K, Sueda T, Hiyama E. Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. *Pediatr Blood Cancer* 52:777-783, 2009. (査読有)
- 3) Fumoto S, Hiyama K, Tanimoto K, Noguchi T, Hiyama J, Hiyama E, Noguchi T, Nishiyama M. *EMP3* as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 274:25-32, 2009. (査読有)
- 4) Nakamura H, Tanimoto K, Hiyama K,

- Yunokawa M, Kawamoto T, Kato Y, Yoshiga K, Poellinger L, Hiyama E, Nishiyama M. Human mismatch repair gene, *MLH1*, is transcriptionally repressed by the hypoxia-inducible transcription factors, DEC1 and DEC2. *Oncogene* 27: 4200-4209, 2008. (査読有)
- 5) Hiyama K, Tanimoto K, Nishimura Y, Tsugane M, Fukuba I, Sotomaru Y, Hiyama E, Nishiyama M. Exploration of the genes responsible for unlimited proliferation of immortalized lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 34: 373-390, 2008. (査読有)
  - 6) Yunokawa M, Tanimoto K, Nakamura H, Nagai N, Kudo Y, Kawamoto T, Kato Y, Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M. Differential regulation of DEC2 among hypoxia-inducible genes in endometrial carcinomas. *Oncol Rep* 17: 871-878, 2007. (査読有)
  - 7) Arifin M, Hiyama K, Tanimoto K, Wiyono WH, Hiyama E, Nishiyama M. *EGFR* activating aberration occurs independently of other genetic aberrations or telomerase activation in adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep* 17: 1405-1411, 2007. (査読有)
  - 8) Fumoto S, Shimokuni T, Tanimoto K, Hiyama K, Otani K, Ohtaki M, Hihara J, Yoshida K, Hiyama E, Noguchi T, Nishiyama M. Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: a novel screening method using microarray and identification of *IFITM1* as a potent marker gene of CDDP response. *Int J Oncol* 32: 413-423, 2007. (査読有)
  - 9) Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 96: 1020-1024, 2007. (査読有)
  - 10) Otani K, Hiyama K, Satoh K, Shimamoto T, Mohamad D, Ando M, Tonda T, Kohda M, Okazaki Y, Nishiyama M, Hiyama E, Ohtaki M. A mathematical model for affymetrix genechip probe level data. *JP Journal of Biostatistics*. 1: 283-306, 2007. 11. (査読有)
- [学会発表] (計 63 件)
- 1) Hiyama K, Tanimoto K. A new concept of carcinogenesis. Symposium in University of Andalas, Padang, Indonesia 2009. 2. 16
  - 2) Hiyama K, Arifin M, Hiyama E. Oncogenic addiction in lung cancer. Plenary Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009. 2. 15.
  - 3) Tanimoto K, Hiyama K. Hypoxic signaling in cancers. Plenary Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009. 2. 15.
  - 4) Hiyama K, Arifin M, Tanimoto K. Interstitial Lung Diseases (ILD) update. Plenary Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009. 2. 14.
  - 5) Tanimoto K, Hiyama K. Diagnostic factors in cancers. Satellite Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009. 2. 14.
  - 6) Hiyama K, Tanimoto K, Hiyama E. Molecular basics of lung cancer. Workshop, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009. 2. 13.
  - 7) Hiyama K, Arifin M, Tanimoto K, Otani k, Ohtaki M, Hiyama E, Nishiyama M. Exploration of the genes associated with chemosensitivity and indefinite proliferation of lung cancer cells. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, Bangkok, Thailand, 2008. 11. 20.
  - 8) Arifin M, Tanimoto K, Budhi A, Hiyama E, Nishiyama M, Hiyama K. Telomere shortening and genetic variations in telomerase components and metabolic enzymes in Japanese patients with COPD. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, Bangkok, Thailand, 2008. 11. 20.
  - 9) Hiyama K, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. Genes commonly upregulated in immortal cancer cells are novel molecular targets for universal anti-cancer strategy. Ehrlich II- 2<sup>nd</sup> World Conference on Magic Bullets, Nurnberg, Germany, 2008. 10. 4.
  - 10) Hiyama E, Yamaoka H, Nishimura S, Hishiki T, Hiyama K, Sasaki F, Horie E, Ohnuma N. Effectiveness and complications of treatment childhood liver tumors—from the experience of JPLT (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor). Ehrlich II- 2<sup>nd</sup>

- World Conference on Magic Bullets, Nurnberg, Germany, 2008.10.4.
- 11) Hiyama K, Arifin M, Uchida A, Ozawa Y, Tanimoto K., Hirai Y, Yamanishi Y, Hiyama E, Nishiyama M. Telomere shortening and TERT/TERC genetic variations in patients with collagen diseases. Annual European Congress of Rheumatology, Paris, France, 2008. 6. 11.
  - 12) Fukuba I, Hiyama K, Kamimatsuse A, Yamaoka H, Fukuda E, Tazaki T, Hiyama E. *EMP3* may be a tumor suppressor gene in late stage of neuroblastoma development. Advances in Neuroblastoma Research 2008 (ANR), Chiba, Japan, 2008. 05. 22.
  - 13) Hiyama E, Yamaoka H, Fukuba I, Fukuda E, Kamimatsuse A, Kamei N, Onitake Y, Hiyama K, Sueda T. High-Resolution mapping of single nucleotide polymorphisms and DNA methylation in human neuroblastoma using oligonucleotide microarray. Advances in Neuroblastoma Research 2008 (ANR), Chiba, Japan, 2008. 05. 22.
  - 14) Kamei N, Hiyama E, Otani K, Hiyama K, Kamimatsuse A, Yamaoka H, Ohtaki M. Identification of candidate genes involving in Neuroblastoma Using a New Mathematical model for genechip data. Advances in Neuroblastoma Research 2008 (ANR), Chiba, Japan, 2008. 05. 22.
  - 15) Tanimoto K, Nakamura H, Fumoto S, Hiyama E, Yoshiga K, Eguchi H, Nishiyama M, Hiyama K. HIF-1-DEC pathway regulates expressions of DNA repair genes. Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res 2008, San Diego, CA, USA, 2008. 4. 14.
  - 16) Fumoto S, Tanimoto K, Arifin M, Noguchi T, Noguchi T, Hiyama E, Eguchi H, Nishiyama M, Hiyama K. *EMP3*, as a candidate of tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res 2008, San Diego, CA, USA, 2008. 4. 14.
  - 17) Tanimoto K, Nakamura H, Fumoto S, Hiyama E, Yoshiga K, Eguchi H, Nishiyama M, Hiyama K. Novel hypoxia inducible genes as molecular targets for anti-cancer therapy. The 5<sup>th</sup> International Symposium of Hiroshima University 21th Century COE Program, Radiation Casualty Medical Research Center. Hiroshima, Japan, 2008. 1. 19
  - 18) Tanimoto K, Nakamura H, Hiyama E, Nishiyama M, Hiyama K. Hypoxia-inducible transcription factors, DEC1 and DEC2, suppress expressions of DNA repair genes in cancer cells. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vancouver, Canada, 2008. 1. 19
  - 19) Arifin M, Hiyama K, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. Possible mechanism of lung adenocarcinoma development from telomerase-positive "stem cells" free from cellular senescence. The Fifth International Symposium of 21<sup>st</sup> Century COE Program. Hiroshima University Radiation Casualty Medical Research Center. Hiroshima, Japan, 2008. 1. 23.
  - 20) Fukuba I, Hiyama K, Kamimatsuse A, Tazaki T, Yamaoka H, Fukuda E, Arifin M, Fumoto S, Tanimoto K, Nishiyama M, Hiyama E. *EMP3* may be a tumor suppressor gene in late stage of neuroblastoma development. The Fifth International Symposium of 21<sup>st</sup> Century COE Program. Hiroshima University Radiation Casualty Medical Research Center. Hiroshima, Japan, 2008. 1. 23.
  - 21) Hiyama K, Arifin M, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. Development of Telomerase-Positive Lung Adenocarcinomas without Inactivation of p16/Rb Pathway. The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer Research, San Francisco, CA, USA, 2007. 12. 7.
  - 22) Hiyama E, Onitake Y, Fukuba I, Fukuda E, Sudo T, Sueda T, Sotomaru Y, Hiyama K. Immortalization and cancer formation of human mesenchymal stem cells. The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer Research, San Francisco, CA, USA, 2007. 12. 7.
  - 23) Arifin M, Hiyama K, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. Inactivation of P16/RB pathway is not a prerequisite for half of lung adenocarcinoma with high telomerase activity. The 15<sup>th</sup> Anniversary of Hiroshima Cancer Seminar Foundation. The 17<sup>th</sup> Internatl. Symposium. "Radiation Therapy for Cancer". Hiroshima, Japan, 2007. 11. 11.
  - 24) Ikeda R, Yoshida K, Takagane A, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sunouchi H, Matsukawa M, Tanimoto K, Hiyama K,

- Nishiyama M. Pharmacogenomic (PG) analysis for prediction of individual response to paclitaxel in 5-FU-refractory metastatic gastric cancer: Prediction formula of tumor response using novel marker genes and genotypes associated with the toxicity. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of Am. Soc. Clin. Oncol., Chicago, IL, USA, 2007. 6. 3.
- 25) Hiyama K, Nishimura Y, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. *POT1* transfection may cause shortening of telomere 3' overhang increasing chemoresistance and alternative lengthening of telomeres in cancer cell. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Telomeres & Telomerase, New York, USA, 2007. 5. 3.
- 26) Hiyama E, Onitake T, Fukuba I, Fukuda E, Sudo T, Sueda T, Hiyama K. Role of telomere and telomerase in human mesenchymal stem cells. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Telomeres & Telomerase, New York, USA, 2007. 5. 3.
- 27) Hiyama K, Tanimoto K, Hiyama E, Nishiyama M. Exploring genes that regulate cellular proliferation and immortalization of human somatic cells. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res., Los Angeles, CA, USA, 2007. 4. 15
- 28) Tanimoto K, Nakamura H, Yoshiga K, Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M. Mechanisms of transcriptional regulation of DNA repair genes under hypoxic conditions. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res., Los Angeles, CA, USA, 2007. 4. 15.
- 29) Fumoto S, Shimokuni T, Tanimoto K, Hiyama K, Noguchi T, Kawahara K, Otani K, Ohtaki M, Hiyama E, Nishiyama M. Interferon induced transmembrane protein 1 (*IFITM1*) gene is a novel candidate as a CDDP sensitivity marker in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). 98<sup>th</sup> Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res., Los Angeles, CA, USA, 2007. 4. 15.
- 30) Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, Nishiyama M., Reynolds CP, Sueda T. Genome-wide single nucleotide polymorphism microarray mapping for prediction of outcome of neuroblastoma patients. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res., Los

Angeles, CA, USA, 2007. 4. 16.

〔図書〕 (計 4 件)

- 1) Hiyama E and Hiyama K eds. Clinical application of molecular diagnosis in cancer, radiation effect, and human diseases”, Research Signpost, Kerala, India, in press.
- 2) Hiyama K ed. Telomeres and Telomerase in Cancer. Humana Press, Springer, New York, NY, pp.380, 2009.
- 3) Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase for the regulation of stem cells. *In: Rajasekhar VK, Vemuri MC (eds.), “Regulatory Networks in Stem Cells”*, Humana Press, Springer, New York, NY, pp123-133, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

- 1) 名称: イリノテカンの感受性判定方法及びその利用  
発明者: 西山正彦、檜山桂子、谷本圭司  
権利者: 学校法人埼玉医科大学  
種類: 特願  
番号: 2009-061455  
出願年月日: 2009年3月13日  
国内外の別: 国内
- 2) 名称: 食道癌の予後診断マーカー遺伝子およびその利用  
発明者: 西山正彦、檜山桂子、谷本圭司  
権利者: 国立大学法人広島大学  
種類: 特願  
番号: 2007-2086532007-208653  
出願年月日: 2007年8月9日  
国内外の別: 国内
- 3) 名称: ヒトがん細胞の不死化に関わる遺伝子およびその利用  
発明者: 西山正彦、檜山桂子、谷本圭司、増子尋郎  
権利者: 国立大学法人広島大学、大鵬薬品工業株式会社  
種類: 国際特許  
番号: 国際公開番号 W02007/142336 A1  
出願年月日: 2007年6月8日  
国内外の別: 国外

〔その他〕 (計 2 件)

- 1) 食道正常上皮・癌細胞のマイクロアレイプロファイルデータベース登録: GEO GES9982 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE9982>), 2007. 12. 19.
- 2) 不死化肺線維芽細胞のマイクロアレイプロファイルデータベース登録: GEO GES9077 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE9077>), 2007. 9. 18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜山 桂子 (HIYAMA KEIKO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：60253069

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者