

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20590391

研究課題名(和文)「分裂破局死」を癌細胞に誘導する分子創薬へ向けたアプローチ

研究課題名(英文) Approach to Molecular Development of the Drug that induces
“Mitotic Catastrophe” in Cancer cells.

研究代表者

瀧本 将人 (TAKIMOTO MASATO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：30179585

研究成果の概要(和文)：D40 遺伝子に特異的な合成二重鎖 RNA (D40 siRNA) を用いて複数のヒト培養がん細胞株に RNA 干渉を惹起させ D40 蛋白の発現を特異的に抑制することで、その増殖を抑制することに成功した。D40 siRNA はがん細胞に p53 非依存的な細胞死「分裂破局死」を誘導することを明らかにした。さらに、D40 siRNA は実験動物に移植されたがん細胞に対しても増殖抑制効果を示した。D40 分子に対する RNA 干渉を利用した分子標的療法は将来のがんの治療に有望である。

研究成果の概要(英文)：Synthetic double-stranded RNA specific to D40 gene (D40 siRNA) human cancer cell lines. D40 siRNA caused a p53 independent cell death, “Mitotic Catastrophe”. Further, D40 siRNA treatment to tumor-burden experimental animals induced inhibitions of the tumor growth. The molecular therapy targeting to D40 protein is encouraging in human cancer treatment in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：基礎医学・実験病理

キーワード：分裂破局死、D40、がん、細胞死、増殖抑制、RNA 干渉、p53

1. 研究開始当初の背景

(1) 「分裂破局死」とは、広義には細胞分裂期に分裂異常を伴って細胞死が起こる現象を指すが、狭義には分裂異常を伴い p53 に依存しない細胞死を指す。本研究では「分

裂破局死」を後者の意味で用いる。

(2) 申請者はヒトゲノム中に新しい遺伝子 D40 (別名 CASC5, AF15q14, KIAA1570) を見出し、その cDNA をクローニング後、この遺伝子・蛋白の性状と機能について研究して

きた。(Br. J Cancer 86, 1757, 2002)

(3) D40遺伝子は、正常では精巣にのみ高発現する一方で、種々の臓器・組織由来のヒト癌培養細胞株及び肺癌を初めとする多くのヒト原発癌に発現する。

(4) RNA干渉法を用いてD40分子の発現を抑制すると、培養ヒト癌細胞HeLa細胞の増殖が著

明しく抑えられるという予備的結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に、以下の事を明らかにする。即ち

(1) D40に対するRNA干渉法(D40 RNAi)を用いてD40分子の発現を抑制することで、多くのヒト培養癌細胞に「分裂破局死」を誘導し、その増殖を抑制できること。

(2) p53の発現が全く認められない癌細胞(p53 null細胞)においても、D40 RNAiが細胞死と増殖抑制効果を示すか否か。

(3) 担癌動物を用いた個体レベルの実験においても、D40 RNAiが腫瘍の増殖抑制効果を示すこと。

これらの実験により、ヒト癌に対する優れた分子標的療法を開発することを目指す。

3. 研究の方法

D40分子の発現を抑制するため、D40遺伝子に対するRNA干渉法を用いることにより、培養ヒト癌細胞株に「分裂破局死」を誘導すること、およびこの方法は複数の癌細胞に対する増殖抑制効果を示すことを明らかにする。さらに、本研究ではこの効果が培養系のみならず、担癌動物の個体レベルにおいても有効であることを示す。

(1) D40遺伝子に対するRNA干渉を起こすために、化学合成した21塩基対二重鎖RNAよりなるshort inhibitory RNA (siRNA)を用いる。このD40 siRNAを用いたRNA干渉によって、複数のヒト培養癌細胞の増殖が抑制され、細胞死

が起こること、さらに、この細胞死がp53に依存しないことを明かにする。

(2) この目的のため、ヒト癌培養株の中でも、p53遺伝子の両Alleleが変異欠失を起こしたためp53蛋白の発現が全く認められないp53 null細胞(前立腺がんPC-3M)を用いて実験を行なう。

(2) D40 siRNAによるRNA干渉により、PC-3M細胞内におけるD40蛋白の発現が減少することを、Western Blot法により示す。

(4) 細胞増殖抑制効果の検討のために、D40 siRNAをリポフェクション法を用いて、PC-3M細胞にtransfectionし、その後経時的に細胞数をコントロールと比較算定し、それぞれの増殖曲線を求める。細胞増殖曲線の作成には、Luciferase活性を指標する(恒常的にLuciferaseを発現するPC-3M細胞の亜株PC-3M-Luc-C6を用いる)。

(5) 細胞死のassayには、Hoechst33342により核染色を行い、核の凝縮、断片化を検討した。さらに、Propidium Iodine核染色によりFACSを用いた定量的な細胞周期解析を行い、subG1期の細胞の有無を検討した。ミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの漏出をELISA法(Quantikine, Human Cytochrome c Immunoassay, R&D System Inc.)を用いて測定し、caspase 3の活性化は(Apo-One Homogenous Caspase 3/7 Assay, Promega)を用いて測定した。

(6) p53 null細胞においてもD40 siRNAが増殖抑制効果を示し、分裂期においてcaspase 3の活性化を伴う細胞死を誘導するならば、D40 siRNAによる細胞死はp53非依存的な「分裂破局死」と考える。

(7) 担癌状態の実験動物に対し、D40遺伝子の塩基配列に対する二重鎖RNA(D40 siRNA)を、生体への導入効率の良いDrug Delivery

System(DDS)と共に投与することで、治療実験を行なう。

DDSとしては、アテロコラーゲンを用い、これとD40 siRNAとの至適な複合体を作製する。これを経静脈的全身投与することで、PC-3M-Luc-C6細胞が左心室腔へ注入され全身に播種(転移)した担癌ヌードマウスの治療を行なう。

(8)治療効果の判定には、ヌードマウスの腹腔にluciferinを投与した後、PC-3M-Luc-C6細胞の持つluciferaseによってluciferinから生ずる光子を体外からImaging測定する。

ImagingにはIVIS imaging system (Xenogen)を用いる。

以上の実験により、D40に対するsiRNAのin vitro, in vivoにおける有効性を示し、D40分子を標的とした新しい分子標的剤の創薬を目指す。

4. 研究成果

(1)D40 siRNA を子宮頸癌 HeLa 細胞, 肺癌 PC-10 細胞に Transfection し、D40 蛋白が減少するかを検討した。コントロールの合成二重鎖 RNA (control siRNA) を導入された細胞と比較し、D40 siRNA 導入された細胞では control siRNA を導入された細胞に比べ、transfection 後 2 日目、3 日目において、明らかな D40 蛋白の発現の減少が認められた。

(2) HeLa 細胞, PC-10 細胞に D40 siRNA transfection し、その後経時的に trypan blue dye exclusion 法により生細胞数を算定した。control siRNA を導入された細胞と比較し、それぞれの増殖曲線を求めた。その結果、D40 siRNA を導入された細胞では、コントロールに比べ、明らかな細胞増殖の抑制が認められた。

(3) HeLa 細胞に於いて、Hoechst33342 により核染色を行ったところ、D40 siRNA を導入された細胞では、control siRNA を導入された

細胞に比べ、核の凝縮、断片化した細胞の増加を認めた。さらに、Propidium Iodine 核染色の後の細胞を FCM を用いた定量的な細胞周期解析したところ、D40 siRNA を導入された細胞では control siRNA を導入された細胞に比べ、subG1 期の細胞の増加を認めた。

またD40 siRNAを導入されたHeLa細胞では、ミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの漏出とcaspase 3の活性化を検出した。これらの結果からD40 siRNAはHeLa細胞に細胞死を誘導することで、細胞の増殖を抑制していることが、明かになった。

(3) p53 null細胞である前立癌PC-3M細胞においても、D40 siRNAを導入することにより、細胞増殖の抑制が認められた。また、ミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの漏出とそれによりcaspase 3の活性が上昇していることを明らかにした。これらの結果から、D40 siRNAはp53非依存性に細胞死(分裂破局死)を誘導することが示された。

(4) 動物レベルの実験において、D40 siRNA ががん細胞の増殖を抑制できるか検討した。ヌードマウスに PC-3M-Luc-C6 細胞を移植(左心室注入)し、D40siRNA/アテロコラーゲン複合体を数回静注投与した。その結果、D40siRNA が PC-3M 細胞の増殖(転移)を抑制した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Takumi Sasao, Masato Takimoto, Naoki Itoh, Toshihiro Maeda, Toshiaki Tanaka, Naoya Masumori and Taiji Tsukamoto. Testis cancer gene D40 expression and its relationship with clinicopathological features in infertile men. *International Journal of Urology* 査読有 18, 2011,175-179.DOI: 10.1111/j.1442-2042.2010.02692.x

② Bogdanov K. and Masato Takimoto. The Involvement of c-Abl and D40 (AF15q14/CASC5) protein in the regulation and cell proliferation in cancer. *Cell and Tissue Biology* 査読有 2(4), 2008,354-359.

DOI:10.1134/S1990519X08040020

〔学会発表〕(計 6 件)

① Masato Takimoto, Hiroki Tanaka, Urata Yuri. Analyses on the mechanism of the cell death of human cancer cell line induced by short inhibitory RNA specific to D40 gene. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)

② Masato Takimoto, Yuri N. Urata. Apoptotic Cell Death and Growth Inhibition of Human Cancer Cell line by Depletion of D40 protein expression with siRNA. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日、大阪リーガロイヤルホテル (大阪)

③ Masato Takimoto, Takumi Sasao, Naoki Itoh, Hiroko Takano, Satoshi Watanabe, Gang Wei, Peizhong Mao, Taiji Tsukamoto. Pre-acrosomal outer membrane-associating protein D40 is overexpressed in human cancers 第 30 回札幌国際がんシンポジウム, 2010 年 6 月 28 日、北海道大学学術交流会館 (札幌)

④ Urata Yuri, Masato Takimoto 他 2 名, Growth inhibition and Apoptotic Cell death of Cancer cells by Inhibition of D40 protein expression. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日～12 日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑤ Masato Takimoto et al. Induction of cell death and growth inhibition of cancer cell by the inhibition of expression of D40/AF15q14 gene product. 2008 年 10 月 28 日～11 月 1 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

⑥ 瀧本将人、Yuri Urata, 田中宏樹、

Konstantin Bogdanov, 高岡晃教. D40/AF14q15 遺伝子産物の発現抑制による癌細胞の細胞死の誘導と増殖抑制. 日本分子生物学会 第 8 回春期シンポジウム「躍動する分子生物学—北の大地から」2008 年 5 月 26 日、京王プラザホテル (札幌)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

① 名称: 「D40 あるいは CASC5、又は、該癌・精巢

抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子、及び、該遺伝子産物をターゲットとした癌細胞の増殖・分裂阻止及び細胞死の誘導方法、及び、該増殖・分裂阻止及び細胞死を誘導する物質のスクリーニング方法」

発明者: 瀧本将人、ユリ ウラタ、葛巻 暹

権利者: 北海道大学

種類: 特許登録

番号: 特許第 4848512 号

取得年月日: 平成 23 (2011) 年 10 月 28 日

国内外の別: 国内

② 名称: 「新規ヒト癌・精巢抗原及びその遺伝子」

発明者: 瀧本 将人、葛巻 暹、佐藤昇志、

佐原弘益

権利者: 科学技術振興財団

種類: 特許登録

番号: 特許第 4503801 号

取得年月日: 平成 22 (2010) 年 4 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧本 将人 (TAKIMOTO MASATO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号: 30179585

(2)研究分担者

落谷 孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)

国立がんセンター研究所・分子細胞治療

研究分野・分野長

研究者番号：60192530

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：