

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 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21791557

研究課題名（和文） 卵巣癌の染色体不安定性機構解明及び不安定性誘導因子を標的とした治療法の開発

研究課題名（英文） NAC1 is an actin-binding protein that is essential for effective cytokinesis in cancer cells.

研究代表者

中山 健太郎 (Nakayama Kentaro)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：70346401

研究成果の概要（和文）

サイレントキラーと呼ばれ国民に脅威をあたえている難治性卵巣癌の治療成績を向上させるためには、卵巣癌の分子生物学的特徴を明らかにし、その分子生物学的特徴にターゲットを絞った創薬が必要である。われわれは Digital Karyotyping を用いて、卵巣癌の新規増幅癌遺伝子 *NAC1* を発見し、*NAC1* の機能を抑制すると卵巣癌細胞株が死滅することを明らかにした。現在、*NAC1* の構造解析を基に *NAC1* の機能を阻害する新規リード化合物を *in silico* スクリーニングしている。また、*NAC1* 発癌モデルマウスを樹立し、動物個体レベルにおける化合物の評価方法を確認する。臨床でより実効的な化合物を探索し、基礎研究の成果を難治性卵巣癌の臨床に役立てる。

研究成果の概要（英文）：Ovarian cancer remains the most lethal gynecologic malignancy, largely due to the lack of effective chemotherapeutic agents in the setting of platinum resistant disease. Chemotherapeutic agents targeting critical molecular pathways hold promise for improving survival in these patients. Understanding the critical molecular pathways is central to the development of such agents. With digital karyotyping, we discovered a new amplified oncogene, *NAC1*. A subsequent clinicopathological and molecular biological analysis of *NAC1* suggested that *NAC1* could be a potential molecular target in ovarian cancer. Repression of *NAC1* induced apoptosis of ovarian cancer cells. Overexpression of *NAC1* in cells lacking endogenous *NAC1* results in taxane resistance. *NAC1* Knock down of *NAC1* in taxane resistant ovarian cancer cell lines restores taxane sensitivity. *NAC1* dimerization is integral to its function. Based on the structural analysis of the *NAC1* BTB domain, we screened candidate inhibitors of *NAC1* dimer formation. We have begun development on a carcinogenic mouse model of *NAC1* in which inhibitors will be tested prior to being introduced in the clinical setting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：外科系臨床

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：癌、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の死因の第1位である。腫瘍減量手術とプラチナ、タキサン製剤を併用した化学療法の進歩で5年生存率は飛躍的に向上した。しかしながら、殆どの症例が再発し、薬剤耐性を示し、10年生存率は30年前から改善されていない。今後、卵巣癌の治療成績を向上させるためには卵巣癌の分子生物学的特徴を解明し、その特徴にターゲットを絞った創薬が必要と考えられる。近年、申請者らは卵巣癌の約40%は染色体不安定の表現型を有する事を明らかにした。申請者らは、これまでの研究で新規癌関連遺伝子 NAC1 が卵巣癌の染色体不安定性誘導に関与している可能性、さらに NAC-1 を阻害した場合は細胞老化形態を生じ細胞死が誘導される事を発見した。本研究では① NAC-1 が卵巣癌の染色体不安定性誘導のマスター遺伝子であるかどうかを検討し、卵巣癌の染色体不安定性誘導の新機構解明を目指す事、② NAC1 を標的とし、NAC-1 を阻害した場合の細胞老化、細胞死誘導機構を解明し、染色体不安定性誘導因子を標的とした治療法の開発を目指す事とした。

2. 研究の目的

これまでの研究を総括すると、卵巣癌の約40%は CIN の phenotype を示し、NAC-1 発現が CIN の誘導に関連している事が示唆される。そこで、本研究では新規癌関連遺伝子 NAC-1 が染色体不安定性を誘導するかどうか、さらに誘導する場合その分子生物学的メカニズムを解明する事を目的とした。また、逆に NAC-1 を Knock down した際の Polyploidy 誘導のメカニズム、及び細胞老化、細胞死誘導のメカニズムについても解明する。

3. 研究の方法

網羅的に遺伝子 copy 数を検索できる Digital Karyotyping を用いて卵巣癌におけ

る新規増幅遺伝子を検索した。新規増幅領域は FISH 法で症例数を追加して確認した。また、卵巣癌細胞株で NAC1 を siRNA でノックダウン後に細胞遊走能、浸潤能を検討した。また、これまでの基礎的研究の結果、新規癌遺伝子 NAC1 は卵巣癌に対して、新たな分子標的となり得ることから、NAC1 を標的とした創薬のスクリーニングを開始した。NAC1 の構造解析のデータを基に、共同研究者が開発したアルゴリズムを用いて、スーパーコンピューターにてリード化合物の in silico スクリーニングを行っている。さらに、NAC1 の DNA 結合部位、NAC1 の核移行シグナルの同定を行い、新たな創薬への可能性を検討した。

4. 研究成果

難治性卵巣癌の治療成績を向上させるためには、その分子生物学的特徴にターゲットを絞った創薬が必要と考えられる。我々は、網羅的に遺伝子 copy 数を検索できる Digital Karyotyping を用いて、卵巣癌における新規増幅遺伝子 NAC1 を発見した。

臨床病理学的解析の結果、NAC1 は卵巣漿液性腺癌の20%で遺伝子増幅しており、遺伝子増幅症例、タンパク質高発現症例は予後不良であった。遺伝子導入等の実験から NAC1 は Oncogenic な機能を有する事、siRNA やドミナントネガティブな作用を持つ Deletion mutant の投与で細胞死が誘導される事を発見した。また、NAC1 はプラチナ製剤、タキサン製剤使用後の再発卵巣癌で過剰発現している事を発見した。内在性 NAC1 の発現していない卵巣癌細胞株に NAC1 を過剰発現させるとタキサン製剤の耐性が誘導された。また、タキサン耐性卵巣癌細胞株の内在性 NAC1 を遺伝子サイレンシングするとタキサン製剤に対する耐性が解除された。すなわち NAC1 阻害剤の開発はタキサン製剤に対する耐性克服に寄与する可能性がある。

NAC1 阻害剤については、ホモ二量体で機能す

る NAC1 の、ダイマー形成を阻害することで、NAC1 の機能を抑制出来ることを発見した。さらに、ダイマー形成ドメインである BTB ドメイン内の、ホモダイマー形成に最も重要なアミノ酸を同定した。現在、このアミノ酸残基を標的とした創薬開発を進めている。また、NAC1 タンパクは、コンピュータ検索により最近同定された BEN 領域を有する。試験管内結合実験により、BEN 領域を介して NAC1 タンパクは直接 DNA と結合することを証明した。PCR を利用したランダムオリゴ DNA 結合スクリーニング法により、BEN 領域依存的に NAC1 タンパクに結合する DNA 配列を決定した。この DNA 配列は *GADD45GIP1* 遺伝子のプロモーター領域に 4 カ所存在した。試験管内結合実験により NAC1 タンパクは BEN 領域を介して *GADD45GIP1* 遺伝子のプロモーターに直接結合する事を発見した。現在、BEN 領域については構造解析中であり、その結果を基に DNA 結合能を阻害する低分子化合物のスクリーニングを予定している。また、新たな創薬のストラテジーとして、NAC1 の核移行シグナルに着目した。NAC1 は核移行シグナルでインポーチンと結合し核移行していることを同定した。核移行シグナルに変異を入れた NAC1 を癌細胞株に遺伝子導入し、NAC1 の機能が核移行依存性か否か検討した。内在性の NAC1 を siRNA 処理すると *GADD45GIP1* の発現が見られるが、siRNA 耐性の NAC1 を遺伝子導入すると、*GADD45GIP1* 発現は見られず、NAC1 の機能はレスキューされた。さらに、siRNA 耐性でかつ核移行シグナルに変異を入れた NAC1 は、siRNA による内在性 NAC1 の機能阻害をレスキューできなかつた。即ち、核移行シグナルの機能が無い NAC1 は、核移行が出来ず、下流遺伝子である *GADD45GIP1* の発現を抑制できなかつた。以上の結果、NAC1 の核移行阻害は創薬へ繋がる可能性が示された。

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 10 件)

1. Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Nakayama N, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Shih IeM, Miyazaki K.: Prognostic and therapeutic impact of amplification of the chr20q13.2 *ZNF217* locus in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer*, 118:2846-2857, 2012
2. Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Ishikawa M, Ishibashi

T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Loss of ARID1A expression is related to patient shorter progression-free survival and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma. *Mod Pathol.*, 25, 282-288, 2012

3. Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Ishikawa M, Ishibashi T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Frequent loss of tumor suppressor ARID1A protein expression in adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*, 22: 208-212, 2012
4. Shih IeM, Nakayama K, Nakayama N, Zhang J, Wu G, Cope L, Wang TL.: Amplification of the chr19p13.2 *NACCI* locus in ovarian high-grade serous carcinoma. *Mod Pathol.* 25, 282-228, 2011
5. Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama N and Miyazaki K.: Loss of MKK4 expression in ovarian cancer: A potential role for the epithelial to mesenchymal transition. *Int J Cancer*, 128, 94-104, 2011
6. Jones S, Wang TL, Shih IM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler K W, Velculescu VE, Papadopoulos N.: Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Science*. 330:228-231, 2010
7. Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K.: Biological role and prognostic significance of NAC1 in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*, 119:469-478, 2010
8. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Miyazaki K.: Gene amplification *CCNE1* is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer*, 116, 2621-2634, 2010

9. Ishikawa M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K.: NAC1, a potential stem cell pluripotency factor expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. Int J Oncol., 36:1097-1103, 2010
10. Kuo KT, Mao TL, Chen X, Feng Y, Nakayama K, Wang Y, Glas R, Ma MJ, Kurman RJ, Shih IeM, Wang TL.: DNA copy numbers profiles in affinity-purified ovarian clear cell carcinoma. Clin Cancer Res., 16: 1997-2008, 2010

[学会発表] (計6件)

1. 中山健太郎、卵巣癌における NAC1/Gadd45/MKK4 経路を介した腹膜播種機構の解明と阻害剤開発による臨床応用 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム 1 腫瘍 (婦人科癌の浸潤・転移機構の解明と臨床応用) 2013 年 5 月 10 日、札幌
2. 中山健太郎、静かなる殺人者 (サイレントキラー) の驚異 ～難治性卵巣がんの解明に挑む～ 第 43 回島根大学サイエンスカフェ (市民公開講座) 2012 年 8 月 17 日、松江テルサ (松江)
3. 中山健太郎、Siân Jones、Ie-Ming Shih、Tian-Li Wang、Bert Vogelstein、Kenneth W. Kinzler、Victor E. Velculescu、Nickolas Papadopoulos、宮崎康二、卵巣明細胞腺癌における新規遺伝子異常の発見～新規癌抑制遺伝子 ARID1A の mutation 及び癌遺伝子 ZNF217 の遺伝子増幅～、第 8 回 婦人科がん会議 特別講演、モーニングセミナー 2011 年 11 月 12 日、琉球大学 (沖縄)
4. 中山健太郎、卵巣癌の分子生物学的特性を利用した新規治療法の開発 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 学術奨励賞受賞講演 2011 年 8 月 29 日 リーガロイヤルホテル (大阪)
5. 中山健太郎、Siân Jones、Ie-Ming Shih、Tian-Li Wang、Bert Vogelstein、Kenneth W. Kinzler、Victor E. Velculescu、Nickolas Papadopoulos、宮崎康二、卵巣明細胞腺癌における 新規遺伝子異常の発見、第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会 特別講演 Meet the expert 2011 年 6 月 25 日 京都国際交

流会館 (京都)

6. 中山健太郎、石川雅子、片桐敦子、飯田幸司、宮崎康二 卵巣癌における SAGE を用いた新規分子標的の検索—転写因子 NAC1 の分子標的としての可能性— 第 69 回日本癌学会学術総会 シンポジウム 婦人科がん治療標的の最前線 2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 健太郎 (NAKAYAMA KENTARO)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：70346401