

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14日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300341

研究課題名（和文） テロメア動態制御因子を標的としたがん分子治療薬の探索開発

研究課題名（英文） Development of cancer molecular therapeutics that targets telomere-regulating factors

研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

研究成果の概要（和文）：本研究はテロメアを標的としたがん治療法の創製を目指す。主な成果として、グアニン4重鎖リガンドが神経膠腫幹細胞のDNA損傷と転写異常を誘導し、制がん効果を発揮することを見出した。テロメア伸長因子タンキラーゼの自己凝集が自身の機能を抑制することを見出した。テロメア関連因子 WRN および POT1 が低発現のがん細胞は微小管標的薬に高感受性であることを見出した。これらの成果は新しいがん化学療法の開発に応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to design a telomere-directed cancer therapy. As main results, we found that G-quadruplex ligands induce DNA damage and transcriptional aberration and inhibit growth of glioma stem cells. We also found that self-assembly of tankyrase, a positive regulator of telomere elongation represses its function. Furthermore, we found that cancer cells that exhibit low expression of telomere-related factors, WRN and POT1, are sensitive to anti-microtubule drugs. These results would be applicable to development of new cancer chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：テロメア・テロメラーゼ・がん・不死化・細胞老化・分子標的治療・染色体

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、テロメア安定化機構を標的とした新たながん治療法の開発を目的とし、テロメラーゼとタンキラーゼの本態解明 (Seimiya et al. EMBO J, 2000; JBC, 2002;

MCB, 2004)、テロメラーゼ阻害剤の開発 (Naasani et al. Cancer Res, 1999; Seimiya et al. Mol Cancer Ther, 2002)、タンキラーゼの阻害によるテロメラーゼ阻害剤の効果増強 (Seimiya et al. Cancer Cell, 2005)

といった成果を上げてきた。さらに我々は、本邦で発見されたテロメア標的化合物テロメスタチンががん細胞のテロメアを即座に脱保護化し、細胞死を誘導することを報告してきた (Tahara et al. Oncogene, 2006)。これらの成果は、テロメア維持機構ががん治療の有望な標的となることを示している。さらに、DNA 損傷応答因子や早老症責任遺伝子産物など様々な因子がテロメア動態に関与することが国内外で報告されており、これらの因子群も標的候補分子と想定される。一方、ある種のテロメア因子はテロメア動態制御とは全く異なる機能も発揮する。例として、我々は本研究の開始当初、テロメア結合蛋白質 TRF1 が、がん遺伝子として知られる分裂期キナーゼ Aurora-A による細胞分裂異常を媒介する可能性を見出していた。テロメラーゼについても、テロメア伸長とは異なる作用でがんの生育を支持することが、主に海外の研究を通じて明らかにされている。このように、テロメア維持に関わる因子は様々なレベルでがんの生育に関与するとみられ、これらの働きを薬剤で制御することにより、がん細胞のアキレス腱を露出させ、あるいは直接攻撃し、制がん効果を引き出すことができると期待される。しかしながら、その実践手段および分子基盤は十分に確立されていないのが現状であった。米国で臨床試験が進行しているテロメラーゼ阻害剤の例を見ると、治療の適用対象としてどのような性質のがんが理想的であるかも定かでなく、併用に適した抗がん剤に関する研究も立ち遅れていた。

2. 研究の目的

(1) テロメラーゼ・テロメア標的薬剤の創製と制がん効果の評価：合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん作用メカニズムを明らかにする。また、テロメア DNA が形成するグアニン 4 重鎖 (G-quadruplex: G4) 構造を標的化したテロメスタチンおよび種々の新規化合物について、細胞レベルでの増殖抑制効果とその作用メカニズムを明らかにする。

(2) タンキラーゼ阻害剤の探索と制がん作用メカニズムの解明：テロメラーゼの機能促進因子であるタンキラーゼに対して、その阻害剤候補物質を探索し、陽性化合物の PARP アイソザイム選択性を検証する。また、同物質がテロメラーゼ陽性がん細胞のテロメア長に与える影響を明らかにする。

(3) 早老症責任遺伝子産物の発現と抗がん剤感受性の因果関係の解明：ヒトがん細胞パネルを用いて構築した Telomere Fingerprint Database を基軸に、早老症責任遺伝子である WRN ヘリカーゼの発現と抗がん剤感受性との因果関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) テロメラーゼ・テロメア標的薬剤の創製と制がん効果の評価

①合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん分子機構：MST-312 は、我々が開発した合成テロメラーゼ阻害剤である。これまでに、MST-312 はがん細胞のテロメアを脱保護化するばかりでなく、DNA 鎖切断を誘導し、制がん効果を示すことを見出してきた。この DNA 鎖切断がどのようなタイプのがん細胞で生じるか調べる。対照としてテロメラーゼ陰性細胞について検討する。

②テロメア標的薬剤の創製と制がん効果の評価：テロメスタチンは、テロメア DNA が形成する G4 構造を安定化し、制がん効果を示す。本研究では、テロメスタチンの詳細な作用機序の解明と、全合成可能でより優れた制がん効果を示す G4 リガンドの創製を目指す。新規 G4 リガンドの有機合成は、東京農工大・長澤和夫研究室にて実施する。神経膠腫幹細胞を用い、これらの G4 リガンドによるテロメア損傷の程度の変化を観察する。また、G4 構造形成の可能性が示唆されているがん遺伝子のプロモーター領域に着目し、これらの遺伝子発現への影響を検討する。

(2) タンキラーゼ阻害剤の探索と制がん作用メカニズムの解明

我々が構築した、タンキラーゼのテロメア機能可視化システムを用い、理化学研究所・吉田稔博士により同定されたタンキラーゼ阻害候補物質が細胞レベルで実際にタンキラーゼを阻害するかどうかを検定する。陽性化合物については、試験管内 PARP アッセイにより、タンキラーゼ PARP 活性に対する阻害効果とその PARP アイソザイム選択性を検討する。一方、標準阻害剤キットを用いてタンキラーゼ阻害物質を同定し、タンキラーゼのテロメア伸長活性に対する影響を調べる。

(3) 早老症責任遺伝子産物の発現と抗がん剤感受性の因果関係の解明

我々はこれまでに、ヒトがん細胞パネル 39 系について種々のテロメア因子の発現量・酵素活性、テロメア長などを定量数値化し、Telomere Fingerprint Database を構築した。このデータベースを用いた検討により、ウェルナー症候群 (WS) 責任遺伝子 WRN の発現と相関を示す抗がん薬をリストアップし、その因果関係を検証する。因果関係が認められた場合、その作用機序について検討する。

4. 研究成果

(1) テロメラーゼ・テロメア標的薬剤の創製と制がん効果の評価

①合成テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん

分子機構：我々は予備検討により、MST-312がDNAの2本鎖切断を誘導することを見出したが、今回、この鎖切断はテロメラーゼ陽性のがん細胞ばかりでなく、GM847などのテロメラーゼ陰性ALT (alternative lengthening of telomeres) タイプの不死化細胞でも生じることを見出した。興味深いことに、正常線維芽細胞ではMST-312を処理してもDNA鎖切断は観察されなかった。詳細なメカニズムの解明は今後の課題として残されたが、同化合物が不死化細胞に選択的な効果を発揮することが示唆された。

②テロメア標的薬剤の創製と制がん効果の評価：神経膠腫幹細胞およびこれを分化させた非幹がん細胞の比較検討により、神経膠腫幹細胞がテロメスタチンに、より高い感受性を示すことを見出した。これと一致し、テロメスタチンは神経膠腫幹細胞においてDNA損傷フォーカスを誘導することが確認された。同フォーカスのうち約4分の1がテロメアで生じ、残りはテロメア以外のゲノム領域で生じることが明らかとなった(図1)。テロメスタチンはがん遺伝子c-Mybの発現も低下させ、制がん効果を発揮していることが示された。これは、c-Mybプロモーター部位のグアニン四重鎖構造がテロメスタチンの標的部位となっていることを示唆する。一方、テロメスタチンと同様に細胞内でDNA損傷を誘導する合成G4リガンドを取得することが出来た。神経膠腫幹細胞は、がんの治療を狙う標的として近年国内外で注目されており、本研究はG4がその分子標的となり得ることを示している。

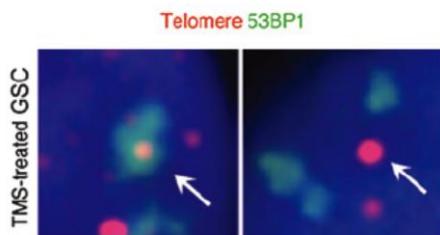


図1. テロメスタチンによる神経膠腫幹細胞のDNA損傷
赤:テロメア、緑:53BP1(DNA損傷マーカー).
テロメスタチンはテロメア(左)および非テロメア部位(右)においてDNA損傷を誘導した。

(2) タンキラーゼ阻害剤の探索と制がん作用メカニズムの解明
酵母ハイスループット探索で同定されたタンキラーゼ阻害物質フラボンが、がん細胞内

でもタンキラーゼを阻害し、同蛋白質の核内凝集を誘導することを見出した。フラボンは、PARP1よりもタンキラーゼに対して強い阻害活性を示した。標準阻害剤キットについてタンキラーゼ阻害物質をさらに探索したところ、複数のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がヒットした。これらはPARP活性を直接阻害するのではなく、CMVプロモーターに支配される外来性タンキラーゼ遺伝子の発現を顕著に増強し、同蛋白質のSAMドメインを介した自己凝集を誘導した。興味深いことに、自己凝集したタンキラーゼはテロメア伸長活性を減弱させていた。このことから、タンキラーゼのSAMドメインは同酵素の機能制御に関与していることが示唆された。

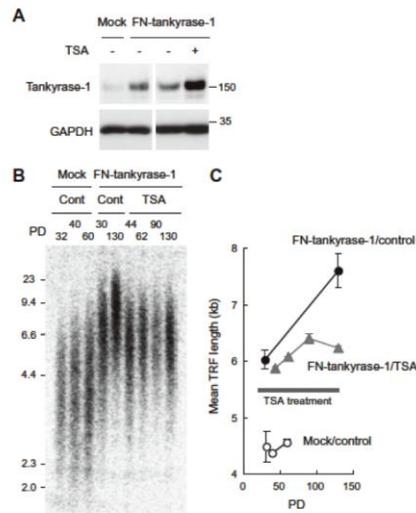


図2. タンキラーゼの自己凝集によるテロメア伸長作用の阻害

A: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TSAによる外来タンキラーゼの過剰発現. B: テロメアサザンブロット. C: Bの定量グラフ

タンキラーゼは、Wnt/ β カテニンシグナルの抑制因子であるアキシンを分解に導くことにより、大腸がん細胞の増殖を支えることが近年米国で報告された。タンキラーゼ阻害剤はテロメア以外の作用点を介した制がん効果を発揮することも期待され、その開発は今後世界で活発化すると予想される。

(3) 早老症責任遺伝子産物の発現と抗がん剤感受性の因果関係の解明

Telomere Fingerprint Database を用いた解析により、テロメア維持に重要なWRNヘリカーゼとテロメア結合蛋白質 POT1 の発現が低いがん細胞は微小管標的薬剤に対する感受性が高いことを見出した。これと一致し、WRNを欠損したがん細胞では、POT を枯渇させた

際に、微小管重合阻害剤の感受性が高まることを見出した。野生型 WRN 遺伝子を導入し、同蛋白質の機能を復帰させた細胞株では、POT1 枯渇による微小管標的薬剤への感受性化が減弱した。この現象については、分裂酵母で遺伝子破壊した実験系でも同様の所見が得られ、種を越えて保存された現象である可能性が示唆された。WRN などのヘリカーゼは前述の G4 を解消する働きがあると言われており、今後 G4 リガンド研究とも密接に関係してくると予想される。

これらの成果は、テロメアおよびタンキラーゼ等のテロメア動態制御因子のがん治療標的としての妥当性を支持するものであり、新薬の開発応用および従来のがん化学療法の成績改善につながると期待される。

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 20 件)

- (1) Hatsugai, K., Ohishi, T., Sugimoto, Y., Seimiya, H. Tankyrase-1 assembly to large protein complexes blocks its telomeric function. *FEBS Lett*, 584, 3885-3890 (2010), 査読有
- (2) Kobayashi, Y., Sato, K., Kibe, T., Seimiya, H., Nakamura, A., Yukawa, M., Tsuchiya, E., Ueno, M. Expression of mutant RPA in human cancer cells causes telomere shortening. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 382-385 (2010), 査読有
- (3) Mashima, T., Okabe, S., Seimiya, H. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth. *Mol Pharmacol*, 78, 846-854 (2010), 査読有
- (4) Migita, T., Narita, T., Asaka, R., Miyagi, E., Nagano, H., Nomura, K., Matsuura, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Seimiya, H., Ishikawa, Y. Role of insulin-like growth factor binding protein 2 in lung adenocarcinoma: IGF-independent antiapoptotic effect via caspase-3. *Am J Pathol*, 176, 1756-1766 (2010), 査読有
- (5) Ohishi, T., Hirota, T., Tsuruo, T., Seimiya, H. TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora-A overexpression. *Cancer Res*, 70, 2041-2052 (2010), 査読有
- (6) Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M., Fukuda, K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 7, 11-14 (2010), 査読有
- (7) Tera, M., Iida, K., Ikebukuro, K., Seimiya, H., Shin-Ya, K., Nagasawa, K. Visualization of G-quadruplexes by using a BODIPY-labeled macrocyclic heptaioxazole. *Org Biomol Chem*, 8, 2749-2755 (2010), 査読有
- (8) Yashiroda, Y., Okamoto, R., Hatsugai, K., Takemoto, Y., Goshima, N., Saito, T., Hamamoto, M., Sugimoto, Y., Osada, H., Seimiya, H., Yoshida, M. A novel yeast cell-based screen identifies flavone as a tankyrase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 569-573 (2010), 査読有
- (9) Mashima, T., Okabe, S., Seimiya, H. Molecular pharmacological approach reveals potential new strategies to suppress androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Cell Pharmacol*, 3, 7-12 (2011), 査読有
- (10) Takahashi, K., Imano, R., Kibe, T., Seimiya, H., Muramatsu, Y., Kawabata, N., Tanaka, G., Matsumoto, Y., Hiromoto, T., Koizumi, Y., Nakazawa, N., Yanagida, M., Yukawa, M., Tsuchiya, E., Ueno, M. Fission yeast pot1 and recQ helicase are required for efficient chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, 31, 495-506 (2011), 査読有
- (11) Mashima, T., Seimiya, H. Role of acyl-CoA synthetases in glioma cell survival and its therapeutic implication. *Tumors of the Central Nervous System*, 1, 337-340 (2011), 査読有
- (12) Ha, G. H., Kim, H. S., Go, H., Lee, H., Seimiya, H., Chung, D. H., Lee, C. W. Tankyrase-1 function at telomeres and during mitosis is regulated by Polo-like kinase-1-mediated phosphorylation. *Cell Death Differ*, 19, 321-332 (2012), 査読有
- (13) Miyazaki, T., Pan, Y., Joshi, K., Purohit, D., Hu, B., Demir, H., Mazumder, S., Okabe, S., Yamori, T.,

- Viapiano, M., Shin-ya, K., Seimiya, H., Nakano, I. Telomestatin impairs glioma stem cell survival and growth through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res*, 18, 1268-1280 (2012), 査読有
- (14) Nakamura, T., Iida, K., Tera, M., Shin-ya, K., Seimiya, H., Nagasawa, K. A caged ligand for a telomeric G-quadruplex. *Chembiochem*, 13, 774-777 (2012), 査読有
- (15) Kawahara, T., Hosoya, T., Tsukamoto, M., Okabe, S., Yamamura, H., Hayakawa, M., Seimiya, H., Takagi, M., Shin-ya, K. JBIR-120: a new growth inhibitor of hormone-refractory prostate cancer cells. *J Antibiot*, 65, 373-375 (2012), 査読有
- (16) Deardorff, M.A., Seimiya, H. (42人中29番目) et al., HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*, 489, 313-317 (2012), 査読有
- (17) Ushijima, M., Mashima, T., Tomida, A., Dan, S., Saito, S., Furuno, A., Tsukahara, S., Seimiya, H., Yamori, T., Matsuura, M. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci*, 104, 360-8 (2013), 査読有
- (18) Migita, T., Okabe, S., Ikeda, K., Igarashi, S., Sugawara, S., Tomida, A., Taguchi, R., Soga, T., Seimiya, H. Inhibition of ATP citrate lyase induces an anticancer effect via reactive oxygen species: AMPK as a predictive biomarker for therapeutic impact. *Am J Pathol*, 182, 1800-1810 (2013), 査読有
- (19) Iida, K., Majima, S., Nakamura, T., Seimiya, H., Nagasawa, K. Evaluation of the interaction between long telomeric DNA and macrocyclic hexaoxazole (60TD) dimer of a G-quadruplex ligand. *Molecules*, 18, 4328-4341 (2013), 査読有
- (20) Hirashima, K., Migita, T., Sato, S., Muramatsu, Y., Ishikawa, Y., Seimiya, H. Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol Cell Biol*, in press, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 清宮啓之, がん治療応用をめざしたテロメア研究の新展開, 東京大学医科学

研究所・学友会セミナー・GCOE 特別セミナー(東京), 平成22年7月26日, 招待講演

- (2) 清宮啓之, 細胞分裂の異常を媒介するテロメア蛋白質, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会・ワークショップ(神戸), 平成22年12月7-10日, 招待講演
- (3) Seimiya, H. Development of telomerase inhibitors and their application to anticancer therapeutics, Pacificchem 2010 (Hawaii, USA), 平成22年12月15-20日, 招待講演
- (4) 清宮啓之, テロメアを起点とした創薬シーズ開発と新たながん生物学研究への展開, 愛媛大学 第4回分子病態医学セミナー(松山), 平成23年9月7日, 招待講演
- (5) 清宮啓之, ポリ(ADP-リボシル)化酵素タンキラーゼ1の新たな分子機能, 第84回日本生化学会大会シンポジウム「ADP-リボシル化によるシグナル伝達制御」(京都), 平成23年9月21日, 招待講演
- (6) 清宮啓之, がん治療応用を目指したテロメア研究の現況, 医薬ライセンシング協会 第236回月例会(東京), 平成23年11月15日, 招待講演
- (7) Seimiya, H. Telomere fingerprinting for drug sensitivity studies and cancer cell biology, ニース大学招待セミナー(フランス・ニース), 平成23年11月21日, 招待講演
- (8) Seimiya, H. Regulation of chromosome segregation by a telomeric protein TRF1, 日仏がん研究ワークショップ(フランス・モンペリエ), 平成23年11月22日, 招待講演
- (9) Seimiya, H. Regulation of chromosome segregation by a telomeric protein, The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (Gyeongju, Korea), 平成24年7月5-7日, 招待講演
- (10) Seimiya, H. Targeting glioma stem cells by G-quadruplex ligands, 第71回日本癌学会学術総会 International Session(札幌), 平成24年9月19-21日, 招待講演
- (11) Seimiya, H. TRF1 regulates the microtubule-kinetochore attachment and contributes to proper chromosome segregation, EMBO Conference on Telomeres and the DNA Damage Response (L'Isle sur la Sorgue, France), 平成24年10月2-6日
- (12) 清宮啓之, ポリ(ADP-リボシル)化酵素

タンキラーゼによる細胞制御と阻害剤
開発, 慶應義塾大学先端医科学研究所
セミナー (東京), 平成 24 年 10 月 11
日, 招待講演

- (13) Seimiya, H. Targeting glioma stem cells by G-quadruplex ligands, 2nd Japanese-French Cancer Workshop (鳴門), 平成 24 年 11 月 28 日-12 月 1 日, 招待講演
- (14) Seimiya, H. TRF1 regulates the microtubule-kinetochore attachment and contributes to proper chromosome segregation, 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling (東京), 平成 25 年 2 月 1-2 日
- (15) Seimiya, H. Targeting glioma stem cells by G-quadruplex ligands, 第 9 回日米合同癌会議 (Ninth AACR-JCA Joint Conference, Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research) (Hawaii, USA), 平成 25 年 2 月 21-25 日

[その他]

ホームページ等

http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html

アウトリーチ活動・支援活動

- (1) 清宮啓之, がんとは何でしょう? 新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」青少年・市民公開講座～いま知っておきたい「がん」のこと～ (福島), 平成 23 年 9 月 17 日
- (2) 清宮啓之, がん研究基礎セミナー「新薬の原石をもとめて～抗がん剤・化合物スクリーニング～」, 平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ (蓼科), 平成 24 年 9 月 5-8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号: 50280623