

白金製剤による細胞応答としてのクロマチン複合体解析と概日リズム制御

《研究の概要》

これまで、がん細胞の組織特異性やがん遺伝子・抑制遺伝子 status の違いで薬剤感受性が変わることが数多く報告されている。その原因や本態に迫るには抗がん剤に対する初期細胞応答のみならず、後期のゲノム応答の理解が大切と考えている。しかし、ゲノム応答としては遺伝子発現に関して多くの報告があるものの、その反応の基盤を支えるクロマチン複合体の解析は全くといってよい程なされていない。本研究は固形がん治療に有力な白金製剤の細胞反応性に重要な蛋白の同定とその機能解明を目指す。白金製剤は固形がん化学療法における中心的薬剤として認知されており、その薬剤反応性の解析は感受性／耐性診断や副作用の解明に大切である。白金製剤の細胞内標的の1つはDNAであり、DNA損傷シグナルを誘導する。この時の入力処理基盤の本態はシグナル伝達分子群や解毒・薬剤排出システムである。一方、最終的な薬剤反応性の出力基盤は、ゲノムすなわちクロマチンに帰結する。

白金製剤は現在固形がんのがん化学療法には必要不可欠の抗がん剤であり、白金製剤は治療効果も高いことから現在も新薬が開発されている。オキサリプラチンは大腸がんなどの固形がん治療薬として最近臨床導入され、シスプラチン耐性にも対応可能とされている。シスプラチンの細胞レベルでの制がん作用に関わる分子機序は大きく2つに分類できる。1つはDNAに形成されるシスプラチン付加体の認識と修復に関連し、もう1つはDNA損傷ストレスに対する細胞応答のシグナル伝達に関連するものである。この2つの機序に関わる最終的なキープレイヤーは転写因子を中心としたクロマチン複合体と考えられる。個々の分子とその相互会合を対象とした創薬に向けた分子標的としての評価を含めて研究を提案した。転写因子のなかに時計遺伝子も含まれており、個体レベルで制がん作用を制御する機序として概日リズムとの関連も合わせて解析することとした。

本研究により、白金製剤に対するがん細胞の感受性が多くの転写因子とその標的遺伝子により制御されていることが、耐性細胞の解析などから判明した。さらに耐性細胞で高発現している転写因子のプロモーター解析から新たな転写因子の関与も明らかになった。さらにシスプラチン付加体の認識分子としてのHigh Mobility Group(HMG)蛋白の新たな役割も解明できた。これらの分子群は基本的に薬剤による増殖抑制・細胞死からの回避に関連することから、がん細胞の増殖を支えており、有力な分子標的と考えられ、一部については特許申請した。細胞内時計分子は転写因子でもあり、その発現と薬剤感受性を個体レベルで解析するために担がんマウス実験を開始した。その過程で概日リズムの破綻が移植HeLa細胞の腫瘍増殖とVEGF非依存性の血管・間質新生を促進することを見出した。病理学的解析は、概日リズム破綻ストレスによる血管新生の機序として、既存のがん周囲正常組織より同時に発生する血管新生を内包する間質新生が基盤となっており、責任分子がWNT10Aであることを明らかにした。すなわち、概日リズム破綻によるがん増殖には血管新生を内包した間質新生という概念の分子基盤の本態が明らかになっただけでなく、さらにこの結果から時間治療を含む間質新生を標的とした新しいがん治療の新戦略開発に基盤となる情報の提供が出来た。

和泉 弘人	産業医科大学医学部 分子生物学准教授	会合分子の同定と機能解析
笹栗 靖之	産業医科大学医学部 第2病理学教授	抗体による免疫組織染色解析と分子標的評価

研究報告

I. 研究目的

薬剤感受性の本態に迫るには、抗がん剤に対する初期細胞応答のみならず、後期のゲノム応答の理解が大切と考えている。しかし、ゲノム応答としての遺伝子発現に関して多くの報告があるものの、その反応の基盤を支えるクロマチン複合体の解析の報告は少ない。本研究は、固形がん治療に有力な白金製剤の細胞反応性に重要な転写制御蛋白の同定とその機能解明を目指す。白金製剤は固形がん化学療法における中心的薬剤として認知されており、その薬剤反応性の解析は感受性／耐性診断や副作用の解明に大切である。また、概日リズム制御分子のClockやPer2がシスプラチン耐性やDNAダメージシグナリングに関与することが我々を含め最近報告された。そこで、個体レベルでも概日リズム制御を受けている臨床腫瘍の時間治療学的解析のための基礎情報も提供するため、耐性細胞株の樹立、新規分子会合とクロマチンの複合体解析に加えて、ヌードマウス移植系で、飼育環境での腫瘍増殖の違い、その腫瘍での遺伝子発現プロファイルの違いについて検討を目指した。

本研究を進めるにあたって、まず白金製剤により損傷されたDNAを認識する蛋白群や耐性細胞で高発現している転写因子に着目し解析する。この中にヒストンアセチル化活性をもつ概日リズム転写因子Clockも含まれる。これらの蛋白をコアとするクロマチン複合体の薬剤処理前後における会合分子解析を行い、新しい分子の同定も進める。

本研究により、薬剤設計の基盤となる分子標的の同定だけでなく、がんの診断治療のバイオマーカーの発見につながる。勤労者の健康維持は医療費抑制だけでなく国力に密接に関わることから、重要な行政課題である。産業医科大学での研究目的は勤労者の健康維持に向けた産業医学研究である。本研究は、交替勤務者(Shift Worker)の健康維持や疾病予防、特にがんの増殖と概日リズムの関連と新しい間質新生という概念の分子基盤を明らかにするだけでなく、がんに対応する患者のための生活・治療指針の確立にも関連するもので社会的貢献度の高い研究と考えている。

II. 研究計画および材料と研究方法

【耐性細胞株の樹立と解析方法】

培養がん細胞を用いて、制がん剤の濃度を徐々に増加して樹立する。前立腺がんPC3、膀胱がんT24、大腸がんDLD1等を使用する。制がん剤としてまずオキサリプラチン耐性細胞の樹立を進める。コントロールとしてGCバインダーであるミスラマイシン耐性細胞株も樹立する。薬剤感受性はWST法とコロニー形成法を用いる。これまでの研究成果から既知の分子群についての発現解析は市販抗体や作成したオリジナル抗体を用いてウエスタンブロットを行う。発現プロファイルの変化はDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析を行う。発現遺伝子についてはレポーターアッセイによりプロモーター解析も合わせて行う。

【会合分子の単離とその解析方法】

既知及び新規の薬剤応答に関与する転写因子群、ヒストンH1および損傷DNA認識蛋白群、さらに薬剤不応性を獲得した新しい耐性細胞で高発現している転写制御蛋白群について市販のcDNAライブラリーからPCR法で全長cDNAをクローン化しGST融合蛋白として発現させる会合する分子はプルダウンアッセイで解析する。次に動物細胞発現系に移し共免疫沈降法を行う。ベイト蛋白候補としてYB-1, ZNF143, Tip60, Twist, HMGB蛋白群を用いる。

【遺伝子発現の制御方法】

GFPおよびFlag-HAを融合した発現プラスミドを作製し、培養がん細胞に導入して過剰発現細胞を樹立する。タグ抗体による二重免疫沈降で会合分子をSDS-PAGEによるゲルプロファイルの比較から、ゲル内トリプシン消化、ペプチド抽出、質量分析により新しい会合分子と離脱分子を同定する。会合分子のアミノ酸配列から候補遺伝子をデータベースから検索し、cDNAのクローン化と抗体作製を行う。抗体については臨床試料を用いての免疫組織染色可能なものを作り、検証する。発現抑制（ノックダウン）はsiRNAを用いる。

【遺伝子導入細胞の機能解析】

強制発現系、ノックダウン系を用いて細胞増殖や抗がん剤感受性を検討する。核酸結合ドメインをもつ蛋白についてはDNA損傷認識能をゲルシフト法で行う。強制発現細胞を用いて薬剤ストレスによる細胞内局在変化等を焦点レーザー顕微鏡で観察描出する。細胞分画を行い、細胞内局在様式をウエスタンブロットでも解析する。転写因子関連分子場合はその標的遺伝子の解析のために、強制発現系、ノックダウン系を用いてDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析を行う。

【新規分子の臨床腫瘍での発現解析と評価法】

白金製剤の感受性が異なる腫瘍での発現を耐性細胞株や種々の臨床試料（主に大腸がんなどの消化器がん）を用いて網羅的に免疫組織染色法で比較解析する。上皮系・非上皮系腫瘍による発現の違いも明らかにする。浸潤・転移さらには予後による違いも明らかにする。

【概日リズム環境の違いと腫瘍増殖・遺伝子発現解析と評価法】

p53の正常及び異常のがん細胞株を用いてヌードマウス移植系で腫瘍増殖の違いを見る。飼育環境として、まずBlack/Light（普通の環境・L/B）、Light/Light（24時間明環境・L/L）で行う。腫瘍での発現プロファイル解析をDNAマイクロアレイで行う。細胞増殖に関わる責任分子の発現について抗体作成し免疫組織染色を行う。強制発現細胞を樹立し、再移植で再現性を確認する。増殖因子の可能性については、初代培養系で評価する。腫瘍での血管新生レベル、ヒト臨床組織の等での発現評価も同時に行う。

III. 研究成果

オキサリプラチン耐性細胞株を2つの大腸がん細胞株から別個に樹立した。DNAマイク

ロアレイで発現プロファイルの変化を解析した。DNA 修復との関連はみられなかった。いくつかのオキサリプラチン耐性細胞は弱いながらもシスプラチンに交差耐性を示した。発現プロファイル解析から転写因子 NF-IB が共通に過剰発現していること、その強制発現と発現抑制の実験から、NF-IB が新しいオキサリプラチン耐性のバイオマーカーであることを証明した。ミスラマイシン耐性細胞を膀胱がん細胞株より樹立した。耐性細胞は酸化ストレスに応答する転写因子 Foxo3a が高発現していることを見出している。シスプラチン耐性細胞のさらなる解析から、高発現しているクロマチン関連分子として、ヒストンアセチル化酵素として概日リズム転写因子 Clock と Tip60 を見出した。さらに Tip60 が Clock の標的遺伝子であることも明らかにした。

ヒストンアセチル化酵素として概日リズム転写因子 C と Tip60 と分子会合する分子について解析をすすめた。現在まで報告されていない2つの DNA 修復酵素との分子会合を見出している。ヒストン脱アセチル化酵素として Sirt1 との会合分子についても解析をすすめている。この Sirt1 はシスプラチン耐性細胞で高発現している。そして、転写因子 Twist, DNA 修復酵素やクロマチン再構成複合体分子との会合が新たに確認された。現在その詳細について解析中である。ミトコンドリア転写因子 mtTFA とチオレドキシン 2 の分子会合を報告した。大変興味があることに、mtTFA が核内でクロマチンに強固に結合して複合体形成に関わっていることがわかりその検証を進めた。核内発現が抗アポトーシス分子のサイバインの発現を制御していること、さらにがん細胞の増殖のアクセル機能を持つことを明らかにした。すなわち、mtTFA の役割はがん細胞の増殖と細胞死からの回避というがんのホールマークを支える分子と考えられた。臨床腫瘍での mtTFA の発現と予後や治療反応性等その意義についても同時に解析し報告した。

現在白金製剤の耐性克服はまだ有効な手段がない状況である。オキサリプラチン及びシスプラチン耐性細胞の両方で過剰発現しているクロマチン結合タイプのオーロラキナーゼの阻害剤が白金製剤の作用増強すること、耐性細胞がオーロラキナーゼ阻害剤に高感受性であることを発見したので近々報告予定である。

時計遺伝子で制御されている転写因子 ATF4 はグルタチオン代謝と ABC トランスポーター発現に関与し、その過剰発現細胞は、多剤耐性形質を示すが、この転写因子 ATF4 が酸化ストレスで Nrf2 依存性の転写レベルと 5' 非翻訳領域依存性の翻訳レベルで二重に制御されていることを明らかにした。シスプラチン耐性細胞で過剰発現しているリボフラビンキナーゼは酸化ストレス耐性とシスプラチン耐性に関わることを報告した。

概日リズムの乱れとがんとの関連性を分子生物学的に検討した報告はほとんどなく、概日リズムの乱れによって生じるがん発症率上昇やがん患者の生存期間の短縮の分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、概日リズムの乱れと腫瘍増殖との関連性を検討することを目的とし、ヌードマウスを用い分子生物学的検討を行った。ヒトがん細胞を移植したヌードマウスを常時明環境で飼育する場合 (L/L) と、12 時間周期で明環境と暗環境を交替して飼育する場合 (L/D) とでマウスを飼育し、腫瘍増殖の評価およびがん微小環境(血管新生、間質新生)の評価を行った。新規血管、間質新生因子として示唆された WNT10A の機能、局在、発現解析を行った。機能解析の結果、WNT10A は血管新生亢進作用・間質新生亢進作用を有することが示された。次にヒト腫瘍における WNT10A 局在解析では、WNT10A はがん細胞自身には発現しておらずがんの間質に発現していることが示された。また、ケ

ロイド組織の間質には正常皮膚組織の間質と比較して WNT10A が過剰に発現していることが示された。機能解析と局在解析の結果から、WNT10A はがんの間質細胞の増殖を促していることが示唆され、また創傷治癒においても WNT10A 重要な因子として機能している可能性が考えられる。WNT10A の発現解析では、WNT10A は酸化ストレスによって誘導されることが示された。

IV. 考察

本研究は結果的に創薬をめざす分子標的の探索研究に非常にプラスになったと考えている。がん細胞やがん幹細胞は抗がん剤の増殖抑制作用に対していかに生存シグナルを維持または増幅して生き残るかをゲノム応答で対応する。シスプラチン等の白金製剤に対する耐性細胞には DNA 損傷シグナルに対する多くのゲノム応答の変化が維持されており、鍵をにぎる転写因子を発現レベルの変化として捉えられるよいモデル細胞といえる。多くの転写因子が薬剤耐性形質の発現に関わるだけでなく、細胞の増殖に必須の転写システムに組み込まれていることが多いことがわかってきた。

すでにかかなりの数の分子標的薬が臨床応用されている。いわゆる Oncogene Addiction を対象に、活性化しているがん遺伝子産物を標的に創薬され、がん細胞特異的に作用し正常細胞には作用せず、殺細胞効果も副作用も少ないと思われていた。しかし、その使用は特異ながんを対象に限られるだけでなく、中には、殺細胞効果も示すこともあり、思わぬ副作用が出現することもわかってきた。一方、耐性の出現も既存の抗がん剤と同様にみられ、すべてが夢の新薬とはいかない。最近新しい概念が注目されている。がん遺伝子ではなく、正常細胞の生存には必須ではないものの、がん細胞の増殖には必須の分子もよい分子標的になる。すなわち Non Oncogene Addiction を対象にした創薬もはじまっている。では、転写因子は創薬対象として適切な分子だろうか？基本的には転写因子は遺伝子発現を制御する重要な分子であることから副作用の回避が難しいとされ、創薬対象としては過去も現在でもリスクが高いことから敬遠されてきている。例外的にホルモン依存性の増殖をするがんに対してホルモン受容体作用薬があるものの、それ以外に転写因子が標的の薬剤はない。創薬対象としてとりあげられた代表的な転写関連分子として、NF- κ B や Myc などがあげられる。これらもがん遺伝子であり、対象となるがんは限られてくる可能性が高い。

がん遺伝子ではないが、細胞増殖・細胞周期に関わる重要な分子群はすべてのがんを対象にした分子標的と考えられる。これらの分子群の中で、個々の分子に対する正常細胞とがん細胞の増殖に対する依存度、またがん細胞間の増殖に対する依存度は異なることが予想される。これが創薬の難しい点である。

細胞増殖・細胞周期に関わる重要な分子の核内発現量は、ユビキチン・プロテオソーム経路の蛋白分解系からの検討が先行しているが、その制御機構の特異性は少ないと思われる。一方、転写レベルでの合成系の解析は全くわかっていない。細胞増殖・細胞周期に関わる分子に対する依存度の違いを回避し、殺細胞作用も少なく、効果的に広範ながんを対象にするには、細胞増殖・細胞周期に関わる重要な分子の核内発現量を制御できるマスター遺伝子を探索しその制御をすることが望まれる。我々はシスプラチン耐性で高発現している転写因子のなかに細胞増殖・細胞周期に関わる重要な分子群の転写制御に関わるマスター遺伝子候補 ZNF143 を見出した。そこでこれを標的とした創薬をめざしてスクリーニン

グ系を立ち上げ、国際特許の取得を進めた。さらにシスプラチン耐性で高発現している細胞増殖・細胞周期に関わる重要な分子オーロラキナーゼの阻害剤が白金製剤の感受性増強や耐性克服に有用であることがわかり、今後の *in vivo* 研究での検証が待たれる。

YB-1 が各種がん細胞だけでなくその腫瘍血管で発現しているということを明らかにした。培養血管内皮細胞において YB-1 の発現を抑制すると、G1 cell cycle arrest による細胞増殖抑制がおこることから、YB-1 は内皮細胞においても細胞周期制御に関わっていると考えられる。YB-1 陽性細胞は増殖の cell cycle に入っていることを意味していると考えられる。YB-1 を抑制することにより、がん細胞だけでなく腫瘍血管内皮細胞の制御も同時にできる可能性があり、分子標的治療に向けた研究を進めていきたい。現在臨床応用されている分子標的治療薬として、チロシンキナーゼ阻害 (TKI, EGFR) があるが、これは単純にチロシンキナーゼを阻害する薬剤である。一方 YB-1 は非常に多機能であるために、どの機能を阻害すると有効であるかは予想しにくい。このような場合、RNA 製剤が有効と考えられる。今後は有効な DDS を用いてマウスへの投与実験などを行っていく必要があると考える。

腫瘍内におけるがん細胞の増殖・浸潤・転移といった性質は、がん細胞周囲の栄養状態、低酸素状態といった腫瘍内環境 (tumor microenvironment) による影響に加え、血液中の生理活性物質や免疫機構、神経細胞の活動などの生体内環境によっても影響を受け日光や気温、生活する場所といった生体外環境によっても影響を受けると考えられる。近年 Cao L らは、ヒトの腫瘍を移植したマウスを通常のゲージよりも広くかつマウスの遊び道具を多く設置し低ストレス条件下にて飼育した場合腫瘍の増殖が抑えられ、そのメカニズムとして視床下部から分泌される BDNF の上昇とそれに付随して生じる白色脂肪組織からの Adiponectin の分泌上昇および Leptin の分泌減少によることを報告した。近年、科学技術の発達により夜間にも『光』を使用できるという生体外環境の変化が生じた。照明器機などの発達が人類の文明発展に寄与した一方、夜間に光を浴びることにより生じる概日リズムの乱れが様々な問題を引き起こしている。それら問題の 1 つにがんの発症率上昇や、がん患者の生存期間の短縮といった報告がなされている。しかしながら、概日リズムの乱れとがんとの関連性を分子生物学的に検討した報告はほとんどなく、概日リズムの乱れによって生じるがん発症率上昇やがん患者の生存期間の短縮の分子メカニズムは不明であった。そこで今回、概日リズムの乱れと腫瘍増殖との関連性を検討し、新しい血管・間質新生の責任分子の一つとして WNT10A を明らかにした。時計転写因子で制御される転写因子 ATF4 が酸化ストレスで誘導されることから、今後概日リズムのリセットと酸化ストレスの関連を明らかにすることが重要な研究課題となる。

V. 研究成果の発表

1. Kidani, A., Izumi, H., Yoshida, Y., Kashiwagi, E., Ohmori, H., Tanaka, T., Kuwano, M., Kohno, K.: Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction. *Int. J. Oncol.*, 35(6): 1435-1440, 2009.

2. Takahashi, M., Shimajiri, S., Izumi, H., Hirano, G., Kashiwagi, E., Yasuniwa, Y., Ying, W., Han, B., Akiyama, M., Nishizawa, S., Sasaguri, Y., Kohno, K.: Y-box binding protein-1 is a novel molecular target for tumor vessels. **Cancer Sci.**, 101(6):1367-1373, 2010.

3. Hirano, G., Izumi, H., Kidani, A., Yasuniwa, Y., Han, B., Kusaba, H., Akashi, K., Kuwano, M., Kohno, K.: Enhanced expression of PCAF endows apoptosis resistance in cisplatin-resistant cells. **Mol. Cancer Res.**, 8(6):864-872, 2010.

4. Izumi, H., Wakasugi, T., Shimajiri, S., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Kashiwagi, E., Yasuniwa, Y., Akiyama, M., Han, B., Wu, Y., Uchiumi, T., Arao, T., Nishio, K., Yamazaki, R., Kohno, K.: Role of ZNF143 in tumor growth through transcriptional regulation of DNA replication and cell-cycle-associated genes. **Cancer Sci.**, 101(12):2538-2545, 2010.

5. Yasuniwa, Y., Izumi, H., Wang, K-Y., Shimajiri, S., Sasaguri, Y., Kawai, K., Kasai, H., Shimada, T., Miyake, K., Kashiwagi, E., Hirano, G., Kidani, A., Akiyama, M., Han, B., Wu, Y., Ieiri, I., Higuchi, S., Kohno, K.: Circadian disruption accelerates tumor growth and angio/stromagenesis through a Wnt signaling pathway. **PLoS ONE**, 5(12):1-12, 2010.

6. Miyamoto, N., Izumi, H., Bin, H., Miyamoto, R., Kondo, H., Tawara, A., Sasaguri, Y., Kohno, K.: Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 under oxidative stress in retinal pigment epithelial ARPE-19/HPV-16 cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 52(3):1226-1234, 2011.

7. Miyamoto, N., Izumi, H., Miyamoto, R., Kondo, H., Tawara, A., Sasaguri, Y., Kohno, K.: Quercetin induces the expression of Peroxiredoxins 3 and 5 *via* the Nrf2/NRF1 transcription pathway. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 52(2):1055-1063, 2011.

8. Kashiwagi, E., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Baba, R., Doi, Y., Kidani, A., Arao, T., Nishio, K., Naito, S., Kohno, K.: Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines. **Cancer Sci.**, in 102(2):382-386, 2011.

9. Hirano, G., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Shimajiri, S., Wang, K.Y., Sasaguri, Y., Kusaba, H., Matsumoto, K., Hasegawa, T., Akimoto, M., Akashi, K., Kohno, K.: Involvement of riboflavin kinase expression in cellular sensitivity against cisplatin. **Int. J. Oncol.**, 38(4): 893-902, 2011.

10. Izumi, H., Takahashi, M., Uramoto, H., Nakayama, Y., Oyama, T., Wang, K.Y., Sasaguri, Y., Nishizawa, S., Kohno, K. : Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. **Cancer Sci.**, 102(5):1007-1013, 2011.

11. Han, B., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Akiyama, M., Yamaguchi, T., Fujimoto, N., Matsumoto, T., Wu, B., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Kohno, K. : Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 408(1): 45-51, 2011.