

1. 研究概要

がん細胞の標的治療のための先端基盤技術の開発に関する研究

(H11年～H13年、第Ⅱ期)

H13年度予算額：1.5億円（前年度 1.9億円）

研究代表者：田矢 洋一（国立がんセンター研究所放射線研究部）

1. 目的・必要性

近年の分子遺伝学や細胞生物学の進歩により、がん細胞には複数のがん遺伝子・がん抑制遺伝子の異常が集積し、その結果として正常な細胞周期やDNA複製修復機構を逸脱した増殖が見られること、及び、がん細胞のみならず宿主の細胞・間質との相互作用により、がん細胞の増殖の特徴である腫瘍形成・浸潤転移性増殖が制御されていることが明らかになりつつある。これらの知見の集積により、がん細胞の生物的特質に基づいて特定の細胞・分子等を標的とする技術を確立することにより、既存の治療法では限界が見えてきた難治がん、進行がんの克服に向けた新しい概念に基づくがん治療戦略が可能となる。

本研究はこのような観点に立ち、第Ⅰ期の成果及びそれに対する評価をふまえ、第Ⅱ期においてはがん細胞に特徴的な増殖制御機構や信号伝達系、細胞間・細胞間質間相互作用、プログラム細胞死の信号伝達経路等の分子標的について焦点を絞り、がん細胞の増殖・細胞死の制御機構や浸潤・転移能を標的とした治療法の開発に向けた基盤的研究を行う。

2. 研究項目・概要

がん細胞の特性に基づいて特定の細胞・分子等を標的することにより、生体の中でがん細胞のみを増殖抑制あるいは死滅させるための技術を開発するために、がん細胞の生体内細胞標的技術、細胞死誘導技術を開発することを目標として研究を実施する。

(1) 細胞周期とシグナル伝達の制御技術の開発

細胞周期やDNA傷害チェックポイントの中心をなす2つの経路（RB経路、p53経路）の周辺にターゲットを絞り、がん細胞の増殖を抑制あるいはがん細胞を死滅させる技術を開発する。また、アポトーシスの班との連携も密接に行う。

(2) 浸潤性・転移性がんの治療を目指した組織制御技術の開発

悪性がん細胞の浸潤・転移は、細胞と周囲の組織との間の協調的な関係が破綻することによって起こる。正常な組織を構築するために必要な因子と悪性のがん組織における分子機構の制御異常や血管新生等の組織制御に関わる分子に焦点を絞り、これらを標的として治療に応用するための基盤技術を開発する。

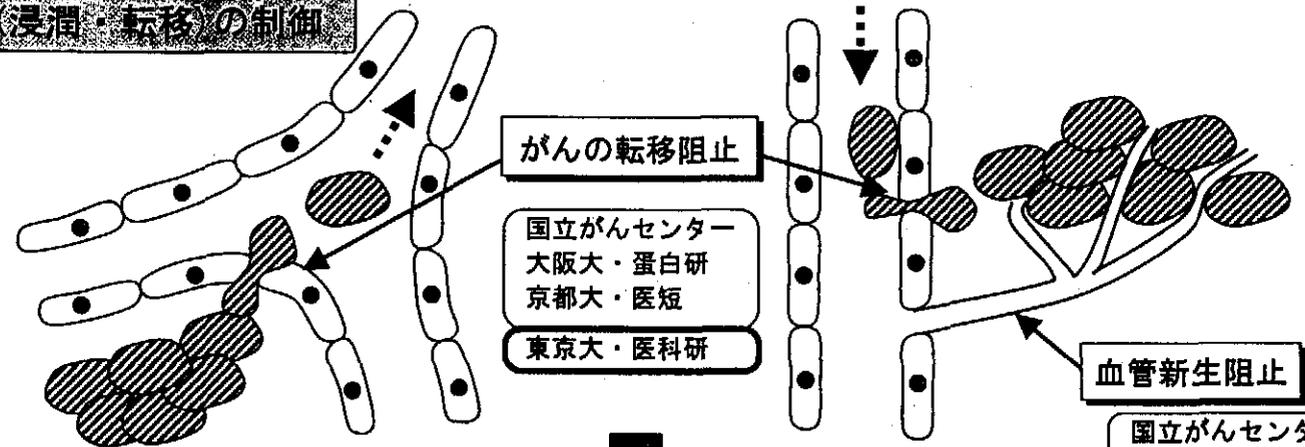
(3) がん治療を目的としたプログラム細胞死

アポトーシス誘導因子を用いてがん細胞に細胞死を誘導するための基盤技術を開発を目的とする。また、アポトーシスに対して抵抗性を示すがん細胞の分子機構を明らかにし、これらのがん細胞をも死滅させる技術の開発をめざす。

がん細胞の標的治療のための先端基盤技術の開発に関する研究

医薬品開発のターゲットとなる分子・遺伝子等を選定する（第Ⅱ期）。

2. がん組織(浸潤・転移)の制御



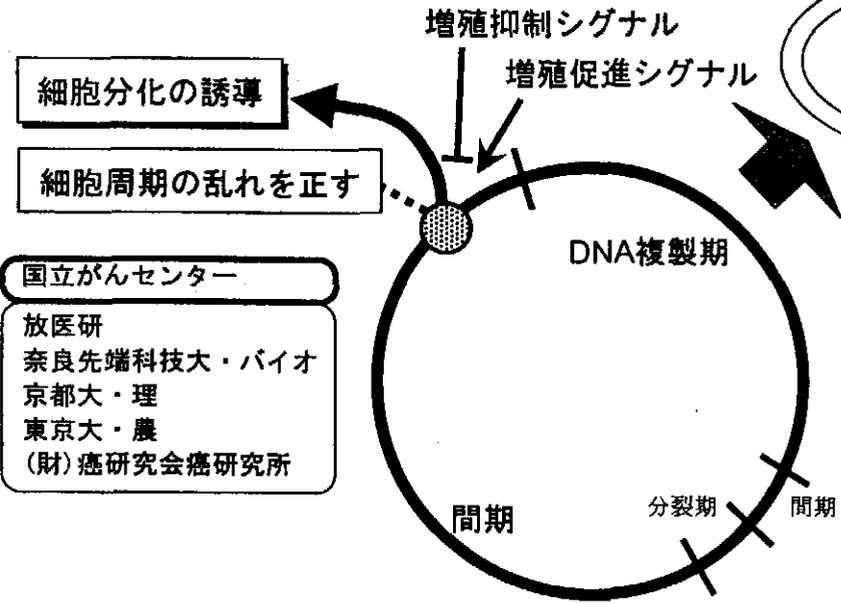
がんの転移阻止

国立がんセンター
大阪大・蛋白研
京都大・医短
東京大・医科研

血管新生阻止

国立がんセンター
東京大・医科研

1. 細胞周期とシグナル伝達の制御



細胞分化の誘導

細胞周期の乱れを正す

国立がんセンター
放医研
奈良先端科技大・バイオ
京都大・理
東京大・農
(財) 癌研究会癌研究所

増殖抑制シグナル

増殖促進シグナル

DNA複製期

間期

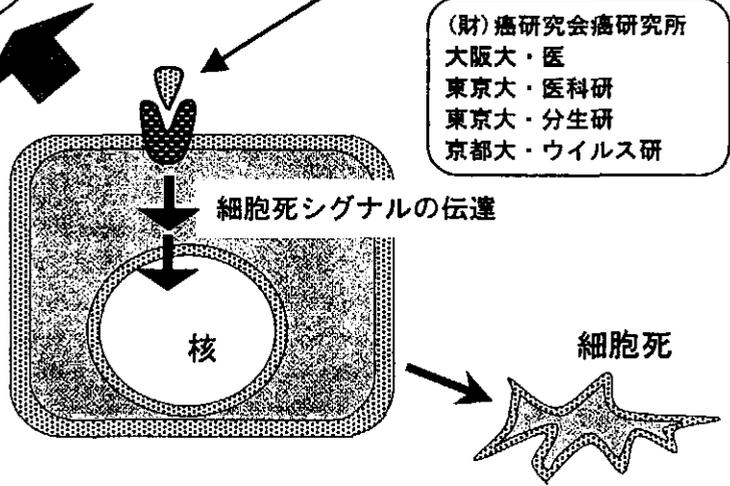
分裂期

間期

がん細胞を標的とした治療技術の開発

3. プログラム細胞死の誘導

がん細胞にアポトーシスを誘導



(財) 癌研究会癌研究所
大阪大・医
東京大・医科研
東京大・分生研
京都大・ウイルス研

細胞死シグナルの伝達

核

細胞死

2. 所要経費

(単位：千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	H11 年度	H12 年度	H13 年度	所用 経費
1. 細胞周期とシグナル伝達の制御技術の開発						
(1) p53リン酸化の生理的意義の解析とがん治療法開発への応用	厚生労働省国立がんセンター研究所	田矢洋一	20,060	17,957	15,863	53,880
(2) CDKインヒビターを標的としたがん細胞抑制法の開発	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科	加藤順也	9,552	8,491	6,869	24,912
(3) サイクリン分解系異常を標的にした増殖抑制技術の開発	京都大学大学院理学研究科	柳田充弘	10,000	9,095	7,345	26,440
(4) DNA PKが支配する情報伝達系の解析	文部科学省研究振興局(独)放射線医学総合研究所(委託)	安倍真澄	10,311	10,189	10,349	30,849
(5) ヒストンデアセチラーゼを標的にしたがん細胞抑制法の開発	東京大学大学院農学生命科学研究科	吉田 稔	9,091	9,089	7,155	25,335
(6) TGFβのシグナル伝達機構を利用した制御技術の開発	文部科学省研究振興局(財)癌研究会癌研究所(委託)	宮園浩平	9,924	9,818	8,506	28,248
2. 浸潤性・転移性がんの治療を目指した組織制御技術の開発						
(1) がん組織制御技術の開発						
① 上皮細胞接着制御機構の解析に基づく浸潤抑制技術の開発	厚生労働省国立がんセンター研究所	落合淳志	10,152	10,046	8,062	28,260
② 細胞外基質による細胞機能制御の解析とがん治療への応用技術の開発	大阪大学蛋白質研究所	関口清俊	10,106	9,890	7,460	27,456
③ 細胞接着分子を介した情報伝達機構の解析とがん治療への応用技術の開発	京都大学医療技術短期大学部	月田早智子	8,090	8,045	6,349	22,484
④ 細胞外基質分解機構の解析とがん治療への応用技術の開発	東京大学医科学研究所	梁幾勇	15,204	14,741	11,050	40,995
(2) 腫瘍血管制御技術の開発						
① 血管内皮細胞を標的とした腫瘍血管制御技術の開発	厚生労働省国立がんセンター研究所	吉田輝彦	9,994	10,077	8,542	28,613
② 血管新生因子のシグナル伝達機構の解析と腫瘍血管制御技術の開発	東京大学医科学研究所	丸 義朗	10,000	9,562	7,024	26,586
3. がん治療を目的としたプログラム細胞死						
(1) WNTシグナルによるアポトーシス誘導機構の解明	文部科学省研究振興局(財)癌研究会癌研究所(委託)	野田哲生	10,222	11,089	9,035	30,346
(2) Bcl-2ファミリーによる細胞死の抑制	大阪大学大学院医学系研究科バイオメカニクス教育センター	辻本賀英	9,865	9,813	8,662	28,340
(3) サイトカインからのシグナルを負に制御する分子機構	大阪大学大学院医学系研究科	仲 哲治	10,326	11,339	8,726	30,391
(4) 細胞死関連遺伝子のがん細胞への導入	東京大学医科学研究所	斎藤 泉	10,530	9,603	7,406	27,539
(5) 抗がん剤による細胞死の分子機構	東京大学分子細胞生物学研究所	内藤幹彦	10,521	9,925	7,583	28,109
(6) FasとFLASHによるアポトーシス誘導の制御機構	京都大学ウイルス研究所	米原 伸	8,531	7,408	5,705	21,645
4. 研究推進	文部科学省研究振興局		189	189	189	567
合計			192,668	186,366	151,880	530,996

3. 研究成果の概要

課題名（研究代表者）：がん細胞の標的治療のための先端基盤技術の開発に関する研究
（田矢洋一）

【研究目標の概要】

我が国の死亡原因の約3割を占めるがんの克服は、国民の健康の維持増進のための最大の課題である。がんの発生率が今後も高齢化等により益々高まると推定されている中で、「対がん10カ年総合戦略」（昭和59年度～平成5年度）及び「がん克服新10か年戦略」（平成6年度～）により、がんの本態解明・克服に向けた研究の推進について政府全体が取り組んでいるところである。

一方、近年の分子遺伝学や細胞生物学の進歩により、がん細胞には複数のがん遺伝子がん抑制遺伝子の異常が集積し、その結果として正常な細胞周期やDNA複製修復機構を逸脱した増殖が見られること、及び、がん細胞のみならず宿主の細胞・間質との相互作用により、がん細胞の増殖の特徴である腫瘍形成・浸潤転移性増殖が制御されていることが明らかになりつつある。これらの知見の集積により、がん細胞の生物的特質に基づいて特定の細胞・分子等を標的とする技術を確立することにより、既存の治療法では限界が見えてきた難治がん、進行がんの克服に向けた新しい概念に基づくがん治療戦略が可能となる。

本研究はこのような観点に立ち、第I期においては、がん細胞に特徴的な増殖制御機構や信号伝達系、細胞間・細胞間質間相互作用、プログラム細胞死の信号伝達経路等の解明について研究を進めた。その結果、p53のリン酸化部位の同定やTGF- β シグナル伝達系の解明、細胞表面のプロテアーゼの制御機構の解明、細胞死に関するFasリガンドやカスパーゼの関与等、がん治療の分子標的について多くの基礎的成果が得られた。このような第I期の成果及びそれに対する評価をふまえ、第II期においてはこれらの分子標的について焦点を絞り、がん細胞の増殖・細胞死の制御機構や浸潤・転移能を標的とした治療法の開発に向けた基盤的研究を行う。

【研究成果の概要】

1. 細胞周期とシグナル伝達の制御技術の開発

田矢はp53のSer46がリン酸化されるとミトコンドリアのアポトーシス誘導蛋白質p53AIP1の発現が起こり、アポトーシスが誘導されるという新しいメカニズムを発見した。さらに、このSer46キナーゼの精製と同定を進めた結果、p53によって誘導される蛋白質p53DINP1を含み、カゼインキナーゼ2と他の転写のメディエーターとからなる蛋白質複合体であることがわかった。

p53はC末端側にアセチル化も受けるし、ヒストンアセチラーゼであるp300やCBPとも結合することが知られている。一方のRB蛋白質もヒストンデアセチラーゼ（HDAC）と間接的に複合体形成することが知られている。吉田は強力な抗がん活性により現在第2相試験が行われているFK228がHDACの強力な阻害剤であること、分子内を架橋するS-S結合が細胞内で還元されることで活性化し、活性中心亜鉛と相互作用できることを示した。このことは、酸化還元を利用したプロドラッグのデザインが可能であることを示している。また、HDACには10種類以上のアイソザイムが存在し、個々の酵素が異なる機能を持つことが推定されており、発がんに関与する酵素のみを阻害する阻害剤の開発が望まれている。彼らは阻害基としてTSAの持つヒドロキサム酸を、構造多様性を与える骨格構造としてTPXの環状テトラペプチドを選び、ハイブリッド化合物CHAPを合成し、HDAC6に比べ、HDAC1を特異的に阻害する合成阻害剤の作製に成功した。さらにCHAPの誘導体を100種類以上合成し、新しい選択的阻害剤探索のライブラリーの作製に

成功した。この中で最強の CHAP31 について抗がん活性を確認し、現在前臨床試験が進行中である。

宮園は TGF- β のシグナル伝達分子 Smad が PEBP2/Runx などの転写因子と結合することによって多彩な作用を発揮することを示した。Runx1 は白血病、また Runx3 は胃癌の発症に深く関わっており、Runx が TGF- β superfamily のシグナル伝達経路における核内 target として機能していると結論した。また、Smad が c-myc のプロモーターに結合して転写を抑制することも明らかにした。彼らは、c-myc プロモーター領上で Smad が直接転写抑制に関与している領域 (TGF- β Inhibitory Element; TIE) を同定した。TGF- β による増殖抑制のみられない癌細胞において、TGF- β による TIE 領域を介した c-myc の転写抑制の消失(減弱)がみられ、癌細胞での TGF- β による c-myc 抑制消失のメカニズムのひとつに同領域を介したシグナル伝達の異常があると思われた。

2. 浸潤性・転移性がんの治療を目指した組織制御技術の開発

「癌組織制御技術の開発」では落合班員が、浸潤の初期過程での細胞間接着制御に着目した研究を行い、カドヘリンを介した細胞接着装置と増殖因子受容体との間のクロストークの詳細を解明した。また、病理組織を用いて、実際に浸潤性のがん細胞では接着を弱めるシグナルが亢進していることを明らかにした。関口班員は基底膜成分によるがん細胞の浸潤能制御について解析し、ラミニンとフィブロネクチンがインテグリンを介して異なるシグナルを送ることを明らかにした。月田班員は悪性がん細胞で変化している細胞骨格、極性制御に着目した研究を行った。細胞接着依存性にアクチンを制御する ERM タンパク質のひとつであるラディキシンの KO マウスの解析から、薬剤耐性にかかわるトランスポータータンパク質の局在制御に ERM が関与することを明らかにし、耐性克服への新たな標的として ERM の可能性を提示した。梁班員(岡田より引継ぎ)は細胞外基質を分解することにより浸潤の原動力となる細胞表層のプロテアーゼとして MT1-MMP に着目し、浸潤に際して細胞運動と連動して MT1-MMP が制御される仕組みを始めて明らかにした。このことによって、従来の酵素活性阻害剤以外の浸潤にかかわるプロテアーゼ阻害剤開発の可能性を提示した。

「腫瘍血管制御技術の開発」では丸班員は血管内皮細胞における主要な VEGF 受容体としての KDR と対をなす Flt-1 を介したシグナルに着目し、Flt-1 を介したシグナルも管腔形成を制御すること、Flt-1 特異的リガンドである PlGF 産生腫瘍における血管新生に関与することを示し、KDR だけでなく Flt-1 も血管新生阻害の標的分子となりうる可能性を示した。

Fas リガンドが Fas に結合するとアポトーシスが誘導される。この際、Fas に FADD、カスパーゼ 8 が結合し DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体を形成する。米原らは種々の癌細胞における DISC の形成を検討した結果、Ras/Raf/ERK によって活性化される CREB 転写因子からのシグナルがこの抑制に関与していること、この CREB からの経路は HTLV-1 Tax による Fas シグナルの抑制にも関与していることを示唆した。また、JNK の活性化が FADD のリン酸化を介して Fas のシグナル系を正に制御することも示唆された。一方、仲らは IL-6 等のサイトカインのシグナルを抑制する分子として単離された SOCS が TNF によるアポトーシスのシグナル系にも抑制的に作用することを示した。TNF からのアポトーシスを伝達するどの分子がその標的になっているか興味深い。ところで、抗がん剤によるアポトーシスは p53 分子を介して Bcl-2 ファミリーに属する「BH3 only」グループの分子を活性化する。この「BH3 only」分子がミトコンドリアに作用し、ミトコンドリアからチトクローム C の放出を引き起こす。ついで、チトクローム C は APAF-1 を介してカスパーゼ 9、カスパーゼ 3 を活性化しアポトーシスへと導く。辻本はチトクローム C のミトコンドリアからの放出機構を解析し、ミトコンドリアのチャネル VDAC がチトクローム C の放出に関与している可能性を指摘した。彼らのモデルでは、アポトーシスに正に作用する Bax, Bak は VDAC の開孔を促し、アポトーシスに負に作用する Bcl-2, Bcl-xL は VDAC

チャンネルを閉じることによりチトクロームCのミトコンドリアからの遊離を制御する。ところでカスパーゼを阻害する分子として IAP (inhibitor of apoptosis) が知られている。内藤らは IAP に類似した分子を単離し、これを Apollon と命名した。Apollon はグリオーマで高発現しており、この分子がグリオーマのがん化、抗癌剤耐性の一因となっていることが示唆された。

3. がん治療を目的としたプログラム細胞死

野田らは、コンディショナル・ジーンターゲット法を用いてがん抑制遺伝子 APC の不活化を行った。そのマウスの解析から、APC が広汎な組織で Wnt シグナルを負に制御していること、Wnt からのシグナルは、神経堤由来組織、表皮や心筋においてアポトーシスを誘導することを明らかにした。このアポトーシス系にカスパーゼが関与しているかどうかなど興味深い。最後に、癌細胞にアポトーシス関連遺伝子を効率良く導入するため、斉藤らはアデノウイルスの遺伝子のほぼ全長を目的の遺伝子と置換したベクターを開発した。また、Cre/loxP 系を用いた「遺伝子置換反応」により、効率良く癌細胞でだけ、目的とする遺伝子を発現させる新しいアデノウイルスベクターの開発にも成功した。

4. 研究成果公表等の状況

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国内	20 件	64 件	134 件	227 件
国外	314 (+7) 件	30 件	97 件	441(+7) 件
合計	334 (+7) 件	94 件	231 件	668 (+7) 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載)

① 研究発表等

原著論文による発表 577件 (国内 20件、国外 557件)

その他の誌上発表 211件 (国内 163件、国外 48件)

口頭発表 978件 (国内 780件、国外 198件)

【特許出願等】 14 件 (国内 12 件、国外 2 件)

【受賞等】 8 件 (国内 7 件、国外 1 件)

平成13年度 高松宮妃癌研究基金学術賞 (平成14年2月)

田矢 洋一 (国立がんセンター研究所)

第40回 東レ科学技術賞 (平成12年3月) 柳田充弘 (京大・理)

第71回 朝日賞 (平成13年1月) 柳田充弘 (京大・理)

英国王立協会 (Royal Society) 外国人会員 (平成12年7月)

柳田充弘 (京大・理)

平成11年度高松宮妃癌研究学術賞 (平成12年2月)

宮園 浩平 (癌研究会癌研究所)

大阪科学賞 (平成11年) 辻本賀英 (大阪大学医学部)

日本アレルギー学会アストラ賞 (平成13年11月) 仲 哲治 (大阪大学医学部)

日本アレルギー学会、北陸製薬アレルギー学術奨励賞 (平成14年11月)

仲 哲治 (大阪大学医学部)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	合計
	Factor	1	2	3	
Cell	36.24	3	0	2	5
Nature	29.49	2	0	4	6
Science	24.60	1	0	2	3
Immunity	20.56	0	0	1	1
Genes Dev.	19.22	7	0	0	7
Mol. Cell	18.14	2	0	0	2
Neuron	16.78	0	0	1	1
J. Exp. Med.	15.65	0	0	2	2
EMBO J.	13.97	3	3	0	6
J. Cell Biol.	12.88	2	3	3	8
Nat. Cell Biol.	11.94	1	0	0	1
PNAS	10.26	7	0	8	15
Mol. Cell. Biol.	9.87	7	0	0	7
Blood	8.78	0	0	1	1
Current Biol.	8.73	5	1	0	6
Cancer Res.	8.61	6	5	5	16
J. Biol. Chem.	7.67	26	9	9	44
Mol. Biol. Cell	7.53	1	2	2	5
J. Immunol.	7.15	1	0	4	5
Oncogene	6.52	13	3	9	25
主要雑誌小計		91	25	53	169
発表論文合計		134	57	143	334

第 I 期の研究論文等研究成果

① 研究発表等

原著論文による発表	577件	(国内 20件、国外	557件)
その他の誌上発表	211件	(国内 163件、国外	48件)
口頭発表	978件	(国内 780件、国外	198件)

② 特許出願等 3件 (国内 3件、国外 0件)

③ 受賞等 12件 (国内 10件、国外 2件)

- ・ Prix Laccasagne (フランス)
- ・ Mellon Prize (米国)
- ・ 朝日賞
- ・ ベーリング北里賞
- ・ 高松宮妃癌研究基金学術賞
- ・ 日本癌学会 奨励賞 (2件)
- ・ 日本生化学会 JB論文賞
- ・ 科学技術庁業績表彰
等