

## 15-2 がん生物学に基づく新しい治療法の開発に関する研究

主任研究者 財団法人癌研究会 癌化学療法センター 富田 章 弘

### 研究成果の要旨

本研究はがん組織特異的生物学的变化を利用し、がん細胞あるいは組織に特異性の高い治療法の開発を目標とした。本年度は、体系的遺伝子発現解析により、栄養飢餓環境下で選択的な versipelostatin の作用機序や細胞死誘導と関連する遺伝子群、特に小胞体ストレス応答と関連する遺伝子群を明らかにした。栄養飢餓耐性解除作用を有する化合物として、新たにミトコンドリア呼吸鎖を阻害するジフェニレンヨードニウムクロリド、伝統薬の中から新規化合物を含む 24 種の化合物などの同定に成功した。メタボローム解析によって、キガマイシンの作用機序の生化学的な特徴を明らかにした。一方、がん特異的な組織環境の診断法開発を目標に、低酸素診断薬剤 Cu-ATSM の開発研究や弱酸性環境蛍光プローブとがん特異的抗体の組み合わせによるインビボイメージング法の研究を進めた。また、GSK3β 阻害剤の治療実験を継続し、消化器がんの新しい治療標的としての検証を進めた。膵がんの診断マーカーの同定研究やがん細胞のアノイクス誘導を標的とした化合物、骨髄腫における接着細胞に有効な化合物の探索研究を行った。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
江 角 浩 安	* <sup>1</sup> 国立がんセンター東病院	がん生物学に基づく新しい治療法に関する研究
富 田 章 弘	* <sup>2</sup> 財団法人癌研究会 癌化学療法センター ゲノム研究部 部長	固形がん内部環境に対する細胞応答を標的とした治療法の開発
深 澤 秀 輔	国立感染症研究所 生物活性物質部 室長	がん細胞に anoikis 感受性を誘導する分子標的治療薬開発に関する研究
源 利 成	金沢大学がん研究所 教授	細胞調節システム破綻の解明と大腸がん制御への応用
松 永 卓 也	札幌医科大学医学部 講師	VLA4 を分子標的とした急性白血病の微少残存病変に対するアノイクス誘導療法の開発研究
畑 裕 之	熊本大学医学部附属病院 講師	がん生物学に基づく血液腫瘍の治療法の開発
門 田 重 利	富山医科薬科大学 和漢薬研究所 教授	悪性癌の治療に有用な伝統薬物の活性物質に関する研究
曾 我 朋 義	慶應義塾大学 環境情報学部 先端 生命科学研究所 教授	がんメタボローム
藤 林 康 久	福井大学高エネルギー医学研究 センター 教授	超小型サイクロトロン産生 Cu-64 による内用放射線治療に関する研究
浦 野 泰 照	東京大学大学院薬学系研究科 准教授	がん診断を可能にする新規蛍光イメージングプローブの開発

深町 勝己	名古屋市立大学大学院医学研究科 助教	Ras トランスジェニックラットを用いた膵がんモデルおよび治療モデルの開発
藤井 誠志	国立がんセンター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理部 室長	遺伝子発現メモリー機構に関わるポリコム遺伝子群のがん化への関与とそれに対する治療法に関する研究
土原 一哉	国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 室長	がん生物学に基づく新しい治療法に関する研究
波多江利久	国立循環器病センター研究所 室長	PPAR $\delta$ リガンドとヒト細胞の生死制御機構に関する研究
山口 壹範	宮城県立がんセンター研究所 副主任研究員	がんにおける NEU3 シアリダーゼ機能の解析とがん治療応用への可能性
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第三室長	アネキシン A3 を標的とした癌治療に関する基礎的研究

\*1：平成18年3月31日まで（前主任研究者）

\*2：平成18年4月1日から主任研究者

## 研究報告

### 1 研究目的

本研究では、がん細胞特異的な分子変化の特徴に加え極めて特殊ながんの微小環境に着目した治療法の開発と臨床導入を目標とする。本年度は、1. がん組織の微小環境に立脚した生物学の創薬への応用、2. ヒトのがんの微小環境から見た適切なモデル系の開発評価、3. ヒトがん組織の微小環境評価に向けた測定法、画像化技術の開発、4. これまでに得られた具体的候補薬剤の臨床応用へ向けた取り組みを中心に行うこととした。

### 2 研究方法

本研究は依然として探索的な研究であり、統一的方法を採用はしていない。しかし何人かの研究者の間では、この班で確立した新しい薬物の探索系を共通で用いスクリーニングを行っている。アクチゲニン等はその結果見出されたものである。また、がんメタボロミクスや各薬物の作用機構解析は、この班の共同研究として具体的な成果に結びついたものである。

### 3 研究成果

本年度の研究成果を以下に簡潔にまとめて述べる。1) 栄養飢餓環境下で選択的な細胞毒性を示す化合物群の作用機序解析や POC (Proof of concept) 研究等のための基盤情報を得るため、マイクロアレイによる体系的な遺伝子発現解析を行った。その結果、グルコース飢餓環境下での小胞体ストレス応答に伴い誘導される遺伝子群を

約 140 個同定することに成功した。そして同環境下で選択的にストレス応答を抑制し細胞毒性・抗腫瘍活性を示す versipelostatin (VST) を用い、VST により誘導が抑制され、化合物の作用機序や細胞死誘導と関連する遺伝子約 100 個（上記約 140 個のうち）を明らかにした。2) VST 様活性を示す化合物として新たにミトコンドリア呼吸鎖阻害剤を見出した。興味深いことに、グルコース飢餓を再現する 2-デオキシグルコース存在下では、細胞の生存率を著しく減少させ、小胞体分子シャペロン GRP78 の誘導を抑制するが、糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン存在下ではほとんど効果がないことが明らかになった。現在、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行っている。3) フラビンタンパク質に結合しミトコンドリア呼吸鎖を阻害するジフェニレンヨードニウムクロリド (DPI) による栄養飢餓耐性解除について検討し、栄養飢餓耐性を示すヒト膵がん細胞株 (PANC-1, PSN1, KP3) に対して DPI はグルコース不含培地で約 100 倍の選択毒性を示すことを見出した。4) ヒト膵がん株の栄養飢餓耐性解除を指標としたアッセイ系で、ミャンマー産の薬用植物 Seikphu から 4 種の新規化合物を含む 24 種の化合物の単離に成功した。作用メカニズムや動物実験について検討中である。5) 栄養飢餓状態でのみ毒性を発揮する Kigamicin と Pyrvinium pamoate について、グルコース欠乏培地で培養した細胞の培養液および細胞サンプルを経時的に採取し、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) によりメタボローム解析を行った。詳細は解析中であるが、ATP や GTP の枯渇やヒポキサンチン量の増加など両化合物で同様に変化する代謝系が明らかになっ

てきた。6) 活性型 HrasV12 コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250) に発生した膵がんで、正常膵に比較し高発現する遺伝子群をマイクロアレイを用いて同定した。7) がん細胞のアノキス誘導を目指し、上皮系がん細胞株を用いた探索から resorcyclic acid lactone polyketide を見出し作用機序解析を進めた。また骨髄腫における cancer stem cell と思われる接着細胞に有効な化合物を探索し有望なサンプルを得た。8) GSK3 $\beta$  阻害剤の治療実験を継続し、制がん効果を細胞から個体レベルで検証することにより、本酵素が消化器がんの新しい治療標的であることを確定した (指定国 [日米英独仏] 特許出願, 2007)。9) 弱酸性環境蛍光プローブとがん特異的抗体の組み合わせによるインビボイメージング法を検討し良好な結果を得た。10) 低酸素診断薬剤 Cu-ATSM の開発研究を進めるとともに、低酸素状況におけるがん細胞の生存機序を解析する目的で培養液中への排泄代謝物の網羅的解析を行い、正常細胞とは異なる代謝物の存在を見出した。

#### 4 倫理面への配慮

本研究では、臨床材料の遺伝子発現解析などが含まれるため、各研究施設において倫理審査委員会の承認を得て行った。動物実験においては、動物実験の倫理指針に従った。今後は、臨床試験を目指すため、プロトコールを各施設の倫理審査委員会に提出する予定である。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1. Tsukumo, Y., Tomida, A., et al., Nucleobindin 1 controls the unfolded protein response by Inhibiting ATF6 activation. *J Biol Chem*, 282:29264-29272, 2007.
2. Hasegawa, T., Tomida, A., et al., Structure-activity relationships of some taxoids as multidrug resistance modulator. *Bioorg Med Chem Lett*, 17:1122-1126, 2007.
3. Li, N., Tomida, A., et al., Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. *J Nat Prod*, 70:544-548, 2007.
4. Hasegawa, T., Tomida, A., et al., Synthesis and structure-activity relationships of taxuyunnanine C derivatives as multidrug resistance modulator in MDR cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 17:3722-3728, 2007.
5. Li, N., Tomida, A., et al., Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. *J Nat Prod*, 70:998-1001, 2007.
6. Zhao, M., Tomida, A., et al., Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*. *J Nat Prod*, 70:1098-1103 2007.
7. Huang, L., Tomida, A., et al., Functional interaction of DNA topoisomerase II $\alpha$  with  $\beta$ -catenin and T-cell factor-4 complex. *Gastroenterology*, 133:1569-1578, 2007.
8. Hwang, J.H., Tomida, A., et al., Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator. *J Cell Physiol*, 215:243-250, 2008.
9. Noguchi, K., Fukazawa, H., et al., Gamma-herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies., *Cancer Sci*, 98:1288-1296, 2007.
10. Asano, R., Fukazawa, H., et al., Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells. *J Biol Chem*, 282:27659-27665, 2007.
11. Urano, E., Fukazawa, H., et al., Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. *AIDS*, in press
12. Yamashita, K., Minamoto, T., et al., Adjuvant immunochemotherapy with protein-bound polysaccharide K for colon cancer in relation to oncogenic  $\beta$ -catenin activation. *Dis Colon Rectum*, 50:1169-81, 2007.
13. Shakoori, A., Minamoto, T., et al., Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci*, 98:1388-93, 2007.
14. Iacopetta, B., Minamoto, T., et al., Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci*, 98:1454-60, 2007.
15. Motoo, Y., Minamoto, T., et al., Gemcitabine changes the gene expression in human pancreatic cancer cells: search for new therapeutic molecular

- target. Proceedings of the NATO Advanced Workshop on Pancreatology in Tashkent, in press
16. Matsunaga, T., et al., Combination therapy of an anti-cancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion mediated-drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, in press
  17. Kuribayashi, K., Matsunaga, T., et al., Essential role of protein kinase C {zeta} in transducing a motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide, fMLP. *J Cell Biol*, 176:1049-1060, 2007.
  18. Takayama, T., Matsunaga, T., Phase I study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. *Br J Cancer* 97: 851-856, 2007.
  19. Durie, B.G.M., Hata, H., et al., Use of Bisphosphonates in Multiple Myeloma: IMWG Response to Mayo Clinic Consensus Statement. *Mayo Clin Proc*, 82:516-522, 2007.
  20. Tatetsu, H., Hata, H., et al., Downregulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer Res*, 67:5328-36, 2007.
  21. Idate-Murakami, Y., Hata, H., et al., c-Maf expression in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Am J Surgical Pathol* 31:1695-1702, 2007.
  22. Murakami, H., Hata, H., et al., Low-dose thalidomide plus low-dose dexamethasone therapy in patients with refractory multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 79:234-239, 2007.
  23. Asou, N., Hata, H., et al., Oral melphalan, dexamethasone, and thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma. *Int J Hematol*, 86:69-71. 2007.
  24. Nakamura, M., Hata, H., et al., Induction of necrosis in human myeloma cells by kigamicin. *Anticancer Res*, in press
  25. Win, N.N., Kadota, S., et al., Panduratinins D—I, novel secondary metabolites from rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Chem Pharm Bull*, in press
  26. Awale, S., Kadota, S., et al., Constituents of Brazilian Red Propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient deprived condition. *Bioorg Med Chem*, 16:181-189, 2008.
  27. Win, N.N., Kadota, S., et al., Bioactive secondary metabolites from *Boesenbergia pandurata* of Myanmar and their preferential cytotoxicity against human pancreatic cancer PANC-1 cell line under nutrient deprived condition. *J Nat Prod*, 70:1582-1587, 2007.
  28. Shi, L., Kadota, S., et al., Inhibitory effect of constituents of Bu-Shen-Jian-Gu-Tang on osteoclast-like cell formation. *J Trad Med*, 24:19-23, 2007.
  29. Li, J.X., Kadota, S., et al., Triterpenoids from *Cimicifugae rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. *Maturitas*, 58:59-69, 2007.
  30. Widyawaruyanti, A., Kadota, S., et al., New prenylated flavones from *Artocarpus champeden*, and their antimalarial activity in vitro. *J Nat Med*, 61:410-413, 2007.
  31. Subehan, Kadota, S., et al., Inhibition on human liver cytochrome P450 3A4 by constituents of fennel (*Foeniculum vulgare*): identification and characterization of a mechanism-based inactivator. *J Agr Food Chem*, 55:10162-10167, 2007.
  32. Soga, T., Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis mass spectrometry using silanol mask technique. *J Chromatogr A*, 1159:125-133, 2007.
  33. Monton, M.R.N., Soga, T., Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1168:237-246, 2007.
  34. Baran, R., Soga, T., et al., Visualization of three-way comparisons of omics data. *BMC Bioinformatics*, 8:72, 2007.
  35. Toya, Y., Soga, T., Direct measurement of the isotope distribution of intracellular metabolites using CE-TOFMS for efficient metabolic flux analysis, *J Chromatogr A*, 1159:134-141, 2007.
  36. Fujibayashi, Y., et al., Non-standard radionuclide production for positron emission tomography in Japan. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2007 Nov 28; [Epub ahead of print]
  37. Kamiya, M., Urano, Y., et al., An enzymatically

- activated fluorescence probe for targeted tumor imaging. *J Am Chem Soc*, 129:3918-3929, 2007.
38. Sunahara, H., Urano, Y., et al., Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J Am Chem Soc*, 129:5597-5804, 2007.
39. Kobayashi, T., Urano, Y., et al., Highly activatable and rapidly releasable caged fluorescein derivatives. *J Am Chem Soc*, 129:6696-6697, 2007.
40. Kenmoku, S., Urano, Y., et al., Development of a highly specific, rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis. *J Am Chem Soc*, 129:7313-7318, 2007.
41. Koide, Y., Urano, Y., et al., Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells. *J Am Chem Soc*, 129:10324-10325, 2007.
42. Komatsu, K., Urano, Y., et al., Development of an iminocoumarin-based zinc sensor suitable for ratiometric fluorescence imaging of neuronal zinc. *J Am Chem Soc*, 129:13447-13454, 2007.
43. Hama, Y., Urano, Y., et al., A target-cell specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched avidin-rhodamine conjugate. *Cancer Res*, 67:2791-2799, 2007.
44. Hama, Y., Urano, Y., et al., Activatable fluorescent molecular imaging of peritoneal metastases following pretargeting with a biotinylated monoclonal antibody. *Cancer Res*, 67:3809-3817, 2007.
45. Ohnishi, T., Fukamachi, K., et al., Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Toxicol Pathol*, 35:436-443, 2007.
46. Tsuda, H., Fukamachi, K., et al., Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food Chem Toxicol*, 45:1013-1019, 2007.
47. Fujii, S., et al., Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cell. *Cancer Sci.* in press
48. Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., et al., Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res*, 67:9677-84, 2007.
49. Ishii, G., Fujii, S., et al., Presence of human circulating progenitor cells for cancer stromal fibroblasts in the blood of lung cancer patients. *Stem Cells*, 25:1469-77, 2007.
50. Tsuchihara, K., Fujii, S., et al., Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. *Cancer Sci.* in press
51. Hirai, G., Yamaguchi, K., et al., Stereocontrolled and convergent entry to CF2-sialosides: synthesis of CF2-linked ganglioside GM4. *J Am Chem Soc*, 129:15420-15421, 2007.
52. Wada, T., Yamaguchi, K., et al., A crucial role of plasma membrane-associated sialidase in the survival of human cancer cells. *Oncogene* 26:2483-2490, 2007.
53. Yoshizumi, S., Yamaguchi, K., et al., Increased hepatic expression of gangliosides-specific sialidase, NEU3, improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice. *Metabolism*, 56:420-429, 2007.
54. Miyagi, T., Yamaguchi, K., et al., Roles of plasma membrane associated sialidase NEU3 in human cancers. *Biochim Biophys Acta*, in press
55. Miyagi, T., Yamaguchi, K., *Sialic Acids*, in comprehensive glycoscience, Amsterdam, Elsevier, 2007.
56. Harashima, M., Niimi, S., et al., Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration. *J Biochem*, in press
57. Ito, T., Niimi, S., et al., Annexin A3-expressing cellular phenotypes emerge from the necrotic lesion at pericentral area in 2-acetylaminofluoren/carbon tetrachloride-treated rat livers. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71:3082-3089, 2007.
58. Niimi, S., et al., Study of hepatocytes using RNA interference. *J Disfunction*, 3:164-182, 2007.