

## 学術奨励賞受賞講演

## 2) 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

島根大学 中山 健太郎

## 【研究の背景】

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の死因の第一位であり、発生頻度は30年間で約3倍に増加している。卵巣癌は早期診断が難しく、約60%は進行期III、IV期で発見される。腫瘍減量手術とプラチナ製剤、タキサン製剤を併用した術後化学療法の進歩で5年生存率は飛躍的に向上した。しかしながら、多くの症例が再発し、化学療法耐性となり10年生存率は30年前から改善されていない。近年の分子生物学的研究により卵巣癌発生のメカニズムが解明されつつあるが、その多くは依然として不明である。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。

Digital KaryotypingはVogelsteinグループより報告された新しい手法で、従来のCGH法では同定困難であった非常に狭い領域の遺伝子増幅、欠失が同定できることが特徴である。この手法を用い、我々は現在までに卵巣癌における複数の新規癌遺伝子、癌抑制遺伝子を同定してきた。特に新規増幅遺伝子 *Rsf-1*, *Notch3*, *NACCI* は遺伝子導入した細胞を用いた機能解析にて癌遺伝子としての機能がある事、また siRNA や gamma-secretase inhibitor を用いた発現制御解析で *in vitro*, *in vivo* の両面で分子標的となりうることを発見した。また、Digital Karyotyping, SNP array, Dual-Color FISH, マイクロサテライトマーカー解析を用いた実験にて卵巣癌の約40%はChromosomal instability (以下CIN)のphenotypeを示しており、CIN phenotypeは予後不良であることを見いだした。

【新規癌遺伝子 *NACCI* の発見】

漿液性卵巣癌のDigital Karyotypingの結果、1/7(14.3%)にCh19p13.2の遺伝子増幅を認めた。The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータベース解析により漿液性卵巣癌の18%にCh19p13.2の遺伝子増幅があることを明らかにした。Ch19p13.2領域では*NACCI*を含む7つの遺伝子がmRNA発現と遺伝子copy数に相関を認めた

( $R > 0.54$ )。我々は以前から*NACCI*がOncogenicな機能を有する事を報告してきたため、*NACCI*がDriver geneであると想定し、Dual-Color FISHでValidationした。Dual-Color FISHでは20/175(20%)に*NACCI* locusの遺伝子増幅が認められた。また、*NACCI* 遺伝子増幅は6ヵ月以内の再発と相関していた。免疫染色による*NACI*タンパク質発現とFISHによる*NACCI* 遺伝子増幅には正の相関が認められた。

【新規癌遺伝子 *NACCI* の機能解析】

我々が発見した新規癌遺伝子*NACCI*は再発卵巣癌で過剰発現し、タキサン製剤の耐性を誘導する事を明らかにした。一方、子宮頸癌では*NACCI* 過剰発現は放射線治療症例では独立した予後因子であった。*NACCI*は膵臓癌、大腸癌、乳癌等の各種癌においても正常組織に比較して癌組織で発現が亢進していた。現在、病理学、消化器外科の研究者と共同で他癌腫での*NACI*発現と臨床病理学因子との解析を進めている。*NACCI*はBTB domainをもつ遺伝子であり、白血病の癌遺伝子である*BCL6*の類似遺伝子である。*NACCI*を正常細胞に過剰発現させると、Abnormal mitosisの頻度を有意に増加させ、染色体不安定性を誘導する可能性が示された。これらの*NACCI*導入細胞株は足場非依存性増殖能、ヌードマウスでの腫瘍産生能を獲得していた。正常細胞の癌化には複数の癌遺伝子導入が必要と報告されており、*NACCI* 遺伝子の単独導入での、この結果は驚きに値する。しかし、近年の研究では染色体不安定をもった細胞は腫瘍産生能を獲得すると報告されており、*NACCI* 過剰発現による腫瘍産生能獲得はこの報告をサポートするものとなる。すなわち、*NACCI*はCIN誘導遺伝子でありCIN誘導の後、付随の遺伝子変化が生じて正常細胞が癌化した事が示唆される。また、*NACCI*は*BCL6*と同様にBTB domainにてhomodimerを形成している事を発見した。*NACCI*のsiRNAやDominant negativeな作用をもつ*NACCI*のN末領域のdeletion mutantを作成し、*NACCI*が過剰発現しているSKOV3細胞に発現させると、細

胞死を引き起こす事を発見した。NACCI を強制発現させた細胞株において遺伝子レベルが低下する遺伝子群を網羅的に検索し、NACCI の下流の標的遺伝子として GADD45GIP1 を同定した。GADD45GIP1 はアポトーシスを誘導し、NACCI は GADD45GIP1 遺伝子の転写を抑制的に制御していると考えられた。

NAC1 は BEN 領域を有するファミリータンパク質である NACC2 とはヘテロ二量体を形成できるが、BEN 領域を有しない他の BTB 領域タンパク質とはヘテロ二量体を形成できなかった。NAC1 タンパク質は、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 タンパク質は直接 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 タンパク質に結合する 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 カ所存在する。試験管内結合実験により NAC1 タンパク質は 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ことを発見した。

緑色蛍光タンパク質 (GFP) あるいは赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を融合させた NAC1 タンパク質発現 HeLa 細胞を作製し、コンフォーカル顕微鏡を用いた FRAP および FLIP 解析により詳細な NAC1 の細胞内動態を検討した。GFP 単独には及ばないまでも NAC1 の流動性は高く、BEN 領域欠損や二量体形成能を有しない変異体ではさらに流動性は亢進していた。一方、二量体形成能を有しない変異体では DNA 結合能の有無にかかわらず、その流動性は同じであった。つまり、二量体形成能を有しなければ、DNA 結合能も有しないと考えられる。

#### 【NAC1 阻害剤を応用した

#### 卵巣癌新規治療法開発への展開】

以上まとめると、我々は卵巣癌（再発卵巣癌を含む）や膀胱癌をはじめとする各種がんにおいて高発現している転写制御因子 NACCI を同定し、さらに NAC1 の細胞内機能を抑制することで癌細胞株を死滅させることができることをこれまでに明らかにした。現在、国内 4 施設との共同研究で 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の *in silico* スクリーニングを進めている。さらに独自に開発した細胞アッセイ系により検証実験を行い、細胞レベルで NAC1

の機能を抑制するリード化合物の絞り込みを行う予定である。また、NACCI 発がん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立中である。

#### 1) NAC1 の構造解析

His タグ-TEV 認識部位を有する融合タンパク質として NAC1 タンパク質の全長 (1~527)、N 末端 (1~250) および C 末端 (251~527) を大腸菌から大量精製し、TEV 酵素により切断後、構造解析を行う。結晶安定化のため、全長および C 末端に関しては、我々が同定した結合 DNA 配列、あるいはモノクローナル抗体（樹立したモノクローナル抗体はすべて C 末端を認識）と共結晶化して現在構造解析を進めている。

#### 2) *in silico* スクリーニング

NAC1 の構造解析のデータを基に、共同研究者ら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（日立）を利用した *in silico* スクリーニングを行う。昨年夏にヒト NAC1 (1-124) の構造解析 (PDB 3GA1) が他の研究者から報告された。この情報を基に、先行してスクリーニング中である。

#### 3) 細胞アッセイ系による検証

NAC1 の細胞内動態観察中に、NAC1 のある点突然変異体が核内でドット状となることに気付いた。詳細に検討した結果、動的な構造体で NAC1 の二量体化を阻害すると構造体が消失することが判明した。すなわち、この変異体を有する細胞株を用いれば、機能発現に必須である NAC1 の二量体化の阻害を可視化できる。この細胞アッセイ系を用いて、候補化合物の更なる絞り込みを行う予定である（現在、特許申請準備中）。

#### 4) 評価用モデル動物の確立（トランスジェニックマウスの樹立）

我々の研究により、NACCI が卵巣癌の発癌に関与することは示唆されているが、NACCI が直接卵巣癌を引き起こすというデータはまだない。そこで NACCI による発がんモデル動物を作製し、直接証明する試みを行っている。また、同時に候補化合物の評価にも使用する予定である。我々は既に Cre recombinase を卵巣特異的に発現させ、強力な  $\beta$ -actin のプロモーター CAG で誘導する系を構築した。Cre recombinase を発現するウイルスを直接マウス卵巣へ導入し、卵巣において CAG プロモーターにより NACCI を強力に誘導する。既に数系統のトランスジェニックマウスの樹立に成功し、解析を進めている。