

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390148

研究課題名(和文)新しいバイオマーカーを用いた癌の診断、治療法の構築

研究課題名(英文)Application of novel clinicopathological biomarkers to cancer treatment

研究代表者

岡部 英俊 (Okabe, Hidetoshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70079713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌症例において、RB1CC1が有効な予後指標バイオマーカーであることを実証した。頭頸部癌において、WRN, QL1 DNA helicaseが腫瘍細胞に特異的・効果的な細胞死をもたらす治療標的であることを証明した。また、頭頸部癌ではp62/SQSTM1が高発現になると、GSH誘導が惹起され、酸化ストレス細胞死抵抗性となり、このことが癌細胞に放射線療法抵抗性を誘発し、臨床的予後を悪化させていることを明らかにした。精巣腫瘍については、SOX2-siRNA in vivo治療実験で有意な腫瘍成長阻害効果を認め、近未来的な治療標的として有望であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In salivary gland cancers, RB1CC1 was demonstrated to be a useful prognostic predictor. In head and neck carcinomas, QL1 & WRN DNA helicase were therapeutic targeting molecules, and the siRNA silencing could result specifically cell death in the cancers. p62/SQSTM1 was highly expressed in head and neck carcinomas. p62/SQSTM1 could induce GSH, cause a resistance to oxidative stress, be associated with a resistance to radiation therapy, and finally predict the worse prognosis. In testicular embryonal carcinomas, SOX2-siRNA caused significant inhibition for the tumor growth in vivo, suggesting that it will be a promising therapeutic target in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床病理 分子標的治療 バイオマーカー siRNA 癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々はRB1CC1分子の同定(Chano, et al. Nature Genet 2002; Oncogene 2002; Gene 2002)以来、本分子の解析とともに種々の癌のバイオマーカー探索を行なってきました。RB1CC1はRB経路を増強し細胞増殖を抑制する癌抑制機能を持ち(Ikebuchi, et al. Int J Cancer 2009; Chano, et al. PLoS One 2010)、一方で、autophagy経路における必須分子としても特に注目されていました(Mizushima. Curr Opin Cell Biol 2010)。しかし、臨床応用に関しては十分に証拠が揃っているわけではなく、癌種によりそのマーカーとしての特徴が異なることも予想されていました。乳癌300余症例、10年に及ぶ解析の結果、RB1CC1の寡少は臨床的予後を悪化させる最大の因子であることが解りましたが、本RB1CC1の評価については、我々の研究も含め、更に継続的な研究が必要と思われます。

一方、各種癌のバイオマーカー探索の過程で頭頸部癌・骨肉腫におけるRecQ DNA helicase(QL1, WRN)、肺癌・口腔内癌におけるp62/SQSTM1、精巣腫瘍に対するDNMT3L(Clin Cancer Res 2010)等を同定してきました。これらの機能をsiRNA薬剤等で抑制することによって、癌細胞により特異的・効果的な細胞死を誘導することができ、これがin vivo治療に繋がることを検証することが必要でした。

## 2. 研究の目的

本研究ではオーダーメイド医療に即した癌の診断と治療適用を志向し、我々が独自に開発した各種癌の新しいバイオマーカーを用いた診断、そして、分子標的治療を試行することを目標とした。

診断については“汎用性”を一つのキーワードに、免疫組織化学的手法を中心に、RB1CC1, QL1-, WRN-DNA helicase,

p62/SQSTM1, DNMT3L等、新しいマーカーを用いて診断を行い、治療はこれら(QL1, WRN, DNMT3L)に対する分子標的治療をsiRNAにて試行することを企画した。早く、広く臨床適用がなされることを目標に、汎用性と易使用性を勘案した実験を行ない、実際の臨床適用が速やかに開始できることを目標に研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

本研究では、“汎用性”を一つのキーワードとして、免疫組織化学的手法で適用可能な、我々の開発した独自のバイオマーカーを用いて、癌の診断を施行し、診断に適応した分子標的治療を行いました。バイオマーカーは乳癌・唾液腺癌におけるRB1CC1、頭頸部癌・骨肉腫におけるQL1, WRNヘリカーゼ、肺癌・口腔内癌におけるp62/SQSTM1、そして、精巣腫瘍に対するDNMT3L等で、QL1, WRN, DNMT3Lはそのまま治療の標的分子となると考え、研究を進めました。

治療はsiRNAサイレンシング治療を試行し、in vivoマウス腫瘍の治療実験、及び、サルを用いたsiRNA製剤の安全性試験を併行して進めました。

### (1). 乳癌、唾液腺癌におけるRB1CC1の発現解析とバイオマーカー的評価

乳癌、唾液腺癌において、RB1CC1が核内で発現していることは長期生存を示唆し、再発、転移の無いことを意味する。より多くの乳癌、唾液腺癌症例において、RB1CC1が機能的に協同するp53やRBの発現とともに、これらの免疫組織化学的評価を行ない、臨床データとの関連を検証した。

### (2). 頭頸部癌におけるDNA helicaseの発現評価とin vivo治療実験

頭頸部癌では正常組織や乳癌組織以上に、WRN, QL1 DNA helicaseの発現が亢進して

いることが分かっていた（我々の未発表データ）。よって、臨床症例を使った検証を行った。一方、WRN-, QL1-siRNAによる発現阻害は腫瘍細胞により特異的・効果的な腫瘍細胞死をもたらす。咽頭癌、舌癌については、その解剖学的特徴より drug delivery 的優位性も元々既存していたので、早期に本治療を臨床適用することが可能と考えた。臨床適用時の基礎データになることも踏まえ、in vivo マウス腫瘍の治療実験、また、サルを用いた siRNA 製剤の安全性試験を併行して進めた。

### (3). 肺癌、口腔内癌における RB1CC1, p62/SQSTM1 のバイオマーカー的評価

肺癌症例、口腔内癌症例において RB1CC1 核内発現の良好なものはなく、予後は悪いと評価された。これは臨床データともよく合致していた。RB1CC1 が細胞質で発現する際は autophagy 必須因子として機能するが、autophagy の異常により蓄積する p62/SQSTM1 が、肺癌、口腔内癌において多く検出されると、再発、転移の頻度の高いことが解ってきていた（我々の未発表データ）。肺癌、口腔内癌、各症例において、これを検証した。肺癌については、Tissue Microarray を用いて、迅速に RB1CC1、p62 の発現評価を行い、これらのバイオマーカー的意義を検討した。

### (4). 精巣腫瘍における DNMT3L のバイオマーカー的評価と in vivo 治療実験

DNMT3L 分子は精巣腫瘍、特に胎児性癌に特異的に発現するバイオマーカーであり、siRNA による発現阻害によって、腫瘍細胞死を誘導することができる (Minami, et al. Clin Cancer Res 2010)。精巣腫瘍（胎児性癌）のマーカーとされている SOX2 や CD30 と比べて DNMT3L がより特異的かつ感度の高いバイオマーカーであるか更に検証を進めた。また一方、DNMT3L は精巣腫瘍特異的のマー

カーで正常細胞、成人期の精巣には全く発現して居らず、siRNA による発現阻害は特異的かつ効果的な腫瘍細胞死をもたらすことができる可能性があった、DNMT3L-siRNA は安全性が高く、理想的な、精巣腫瘍に対する分子標的薬となり得る。将来、化学療法抵抗性の精巣腫瘍治療薬とする為、in vivo マウス腫瘍の治療実験を進めた。

## 4. 研究成果

RB1CC1については、肺癌の場合と同様に、唾液腺癌症例においても、RB1CC1の発現を評価し、p53やRBの発現評価と併用することで、有効な予後指標バイオマーカーとなることを実証できた。本内容については論文報告を行った。

頭頸部癌症例において、WRN, QL1 DNA helicaseが高発現であり、WRN-, QL1-siRNAにより、in vitro, in vivoともに腫瘍細胞に特異的・効果的な細胞死をもたらすことが可能であることを実証した。本内容については論文報告を行うと共に、特許出願を行った。また、研究内容は2011年6-7月に新聞各紙で報道された。

また、頭頸部癌ではp62/SQSTM1が高発現になると、Nrf2よりもより優位にGSH誘導が惹起され、酸化ストレス細胞死抵抗性となる。このことが癌細胞に放射線療法抵抗性を誘発し、臨床的予後を悪化（再発、転移）させていることを明らかにできた。本内容については論文として報告を行い、2013年8-9月に新聞各紙でも報道された。

精巣腫瘍については、DNMT3L-siRNA in vivoマウス治療実験を行ったが有意な治療効果を認めなかった。一方で、SOX2-siRNA in vivoマウス治療実験では有意な腫瘍成長阻害効果を認め、将来的な治療標的として有望であることを証明できた。本内容についても論文報告を行った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transition-arrest and cell death in N-GlcNAc<sub>2</sub>-modified protein-producing renal carcinoma cells. **PLoS One**. 2014. 9(5): e96168. (査読有)
2. Inui T, Chano T, Takikita M, Nishikawa M, Yamamoto G, Okabe H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. **PLoS One**. 2013. 8(9): e74398. (査読有)
3. Isono T, Chano T, Okabe H, Suzaki M. Study of Global Transcriptional Changes of N-GlcNAc<sub>2</sub> Proteins-Producing T24 Bladder Carcinoma Cells under Glucose Deprivation. **PLoS One**. 2013. 8(4): e60397. (査読有)
4. Hama Y, Chano T, Inui T, Matsumoto K, Okabe H. Preparation of mouse monoclonal antibody for RB1CC1 and its clinical application. **PLoS One**. 2012. 7(3): e32052. (査読有)
5. Ushida H, Chano T, Minami K, Kita H, Kawakami T, Okabe H, Okada Y, Okamoto K. Therapeutic potential of SOX2 inhibition in embryonal carcinoma. **J Urology**. 2012. 187(5): 1876-1881. (査読有)
6. Tameno H, Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Arai A, Kishimoto M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. Prognostic significance of RB1-inducible coiled-coil 1 in salivary gland cancers. **Head Neck**. 2012. 34(5): 674-680. (査読有)
7. Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa T, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. **Cancer Lett**. 2012. 314(1): 82-91. (査読有)
8. Zhao L, Chano T, Morikawa S, Saito Y, Shiino A, Shimizu S, Maeda T, Irie T, Aonuma S, Okabe H, Kimura T, Inubushi T, Komatsu N. Hyperbranched Polyglycerol-Grafted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Functionalization, Size Separation, Magnetic Properties, and Biological Applications. **Adv Funct Mater**. 2012. 22(24): 5107-5117. (査読有)
9. Isono T, Matsumoto T, Wada A, Suzaki M, Chano T. A global transcriptome analysis of a dog model of congestive heart failure with the human genome as a reference. **J Card Fail**. 2012. 18(1): 872-878. (査読有)
10. 茶野徳宏. 診療における新規マーカーの探索と適用. **臨床病理**. 60(2): 167-173. 2012. (査読無)
11. Arai A, Chano T, Futami K, Furuichi Y, Ikebuchi K, Inui T, Tameno H, Ochi Y, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**. 2011. 71(13): 4598-4607. (査読有)
12. Ochi Y, Chano T, Ikebuchi K, Inoue H, Isono T, Arai A, Tameno H, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. RB1CC1 activates the p16 promoter through the interaction with hSNF5. **Oncol Rep**. 2011. 26(4): 805-812. (査読有)
13. Morselli E, Shen S, Ruckenstuhl C, Bauer MA, Mariño G, Galluzzi L, Criollo A, Michaud M, Maiuri MC, Chano

- T, Madeo F, Kroemer G. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. **Cell Cycle**. 2011. 10(16): 2763-2769. (査読有)
14. Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. RB1CC1 protein positively regulates transforming growth factor-beta signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. **J Biol Chem**. 2011. 286(37): 32502-32512. (査読有)
15. Nishimura I, Chano T, Kita H, Matsusue Y, Okabe H. RB1CC1 protein suppresses type II collagen synthesis in chondrocytes and causes dwarfism. **J Biol Chem**. 2011. 286(51): 43925-43932. (査読有)
16. Ushida H, Kawakami T, Minami K, Chano T, Okabe H, Okada Y, Okamoto K. Methylation profile of DNA repetitive elements in human testicular germ cell tumor. **Mol Carcinogen**. 2011. 51(9): 711-722. (査読有)
17. Nishimura I, Mori K, Matsusue Y, Okabe H, Chano T. Balance between S6K-S6 and 4E-BP1 depends on ERK activity in developing neurons. **Curr Signal Transd T**. 2011. 6(1): 82-87. (査読有)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1件)  
 名称: 頭頸部癌及び食道癌用抗癌剤及び増強剤  
 発明者: 茶野徳宏、島田剛敏、二見和伸、古市泰宏  
 権利者: 茶野徳宏、島田剛敏、二見和伸、古市泰宏  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2011-089089  
 出願年月日: 2011年4月13日  
 国内外の別: 国内  
 ○取得状況 (計 0件)

[その他]

新聞報道

2011年6月7日	中日新聞 (朝刊)
	京都新聞 (朝刊)
2011年6月10日	産経新聞 (朝刊)
2011年7月7日	朝日新聞 (朝刊)
2013年8月24日	中日新聞 (朝刊)
	産経新聞 (夕刊)
2013年8月27日	朝日新聞 (朝刊)
2013年8月30日	京都新聞 (朝刊)
2013年8月30日	毎日新聞 (朝刊)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡部 英俊 (OKABE Hidetoshi)  
 滋賀医科大学・医学部・教授  
 研究者番号: 70079713

(2)研究分担者

茶野 徳宏 (CHANO Tokuhiro)  
 滋賀医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号: 40346028  
 磯野 高敬 (ISONO Takahiro)  
 滋賀医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号: 20176259

(3)連携研究者

なし  
 研究者番号: