

p53を介した転写選択機構の解明とその応用

その他のタイトル	Study on the mechanism of p53-mediated transcriptional selectivity and its application
著者	宮崎 允
学位授与年月日	2017-03-23
URL	http://doi.org/10.15083/00076150

博士論文（要約）

p53 を介した転写選択機構の解明とその応用

（ Study on the mechanism of p53-mediated
transcriptional selectivity and its application ）

宮崎 允

目次

要旨	2
略語一覧	7
第一章 序論	8
第二章 NuMA を介した p53 転写選択機構の解析	14
実験方法と材料	
結果	
考察	
第三章 神経芽腫における ALK と p53 を標的とした新規治療法の開発	16
実験方法と材料	
結果	
考察	
第四章 総括	18
参考文献	20
謝辞	26

要旨

p53 は代表的ながん抑制因子の 1 つであり、ヒトがんの約半数で変異が認められている。また p53 遺伝子に異常がない場合においても、p53 の負の制御因子である MDM2 の遺伝子増幅等が起こっており、ほとんどのがんにおいて p53 経路は失活していると考えられている。細胞内において p53 は主に転写因子として働き、細胞周期停止関連遺伝子やアポトーシス誘導関連遺伝子の発現制御を介してがん抑制に寄与している。p53 は通常 MDM2 等の E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、ユビキチン化された p53 は速やかにプロテアソーム系によって分解され、細胞内 p53 の蛋白質レベルは低く保たれている。DNA 損傷等を含む様々な細胞内外のストレスによって、細胞内での p53 蛋白質が安定化し活性化される。現在開発されている p53 活性化剤である Nutlin-3a や RG7112 は、p53-MDM2 相互作用を阻害し、ユビキチン化を介した蛋白質分解を抑制することで p53 蛋白質の安定化させる。p53 経路はがん抑制における最も重要な経路の 1 つであり、p53 経路の再活性化は様々ながん腫に応用可能な治療戦略であると考えられる。

p53 を活性化する様々な薬剤が開発されているが p53 を標的とした治療法は成功しておらず、未だ承認薬は存在していない。この原因の 1 つとしては、p53 が標的遺伝子の活性化を介して細胞周期停止とアポトーシスの両方を制御していることが考えられる。つまりがん細胞において p53 を活性化させるとアポトーシスにより死に至る細胞もあるが、一部の細胞では細胞周期停止が惹起され生存してしまう可能性がある。このような問題を解決するためには、p53 を介した標的遺伝子の選択的な活性化機構の解明が必須である。これまでに p53 による標的遺伝子の選択的活性化に関連する翻訳後修飾や結合パートナーが多数報告されているが、その全体像については未だ不明な点が多い。

本研究では、まず p53 の転写コファクターである Clathrin heavy chain (CLTC) の結合因子として同定された Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) に着目し機能解析を行った。NuMA は細胞周期 M 期においては紡錘体極に局在し、紡錘体極に微小管を係留する役割を持つ。一方で、NuMA は G1 期には核内に局在するがその機能については不明であった。本研究によって、NuMA と p53 が核内で結合し、NuMA-p53 複合体が DNA 損傷依存的に増加することがわかった。さらに、NuMA の発現抑制は、p53 を介した細胞周期停止関連遺伝子 p21 や p53 の負の調節因子 MDM2 遺伝子の転写を減弱させる一方で、PUMA や PIG3 といったアポトーシス促

進遺伝子の転写には影響がないことがわかった。また、NuMAの発現抑制はアクチノマイシンDによって誘導される細胞周期停止をキャンセルすることも判明した。続いてクロマチン免疫沈降法による解析を行ったところ、NuMAの発現抑制は*CDKN1A(p21)*遺伝子プロモーター領域におけるp53の結合に影響しないが、p53を介したp21に転写活性化の際に重要な転写メディエーター複合体の構成因子である*CDK8*の*p21*遺伝子プロモーター領域への結合が減弱していることがわかった。まとめると、NuMAは*p21*遺伝子プロモーター領域への*CDK8*の結合を促進させることで、p53を介した細胞周期停止関連遺伝子の選択的転写に寄与していると結論付けた。

次に小児がんの1つである神経芽腫におけるp53とALKを標的とした新規治療法の開発を行った。約25%の神経芽腫において*ALK*遺伝子に変異や遺伝子増幅等により活性化していることが知られていることから、ALKを標的とした治療法が注目されている。一方で、ALK阻害剤を始め多くのTKIに対する耐性機構が細胞には備わっており、その耐性克服が今後の分子標的治療に重要であると考えられる。本研究では、高リスクグループに属する*ALK*遺伝子増幅を持つ神経芽腫に着目し、ALK阻害剤の有効性について調べた。この結果、*ALK*遺伝子増幅を持つ神経芽腫細胞は*ALK*遺伝子変異を持つ神経芽腫細胞に比べ、より低濃度のALK阻害剤により増殖抑制されることがわかった。さらに、ALK阻害剤はALK陽性神経芽腫細胞をG1期で停止させることで増殖を抑制するが、細胞死の誘導はほとんどなくがん細胞は生存しており、その後ALK阻害剤を除去すると再増殖し始めることが判明した。次に、マイクロアレイ解析によりALK阻害剤処理によって誘導される遺伝子発現変化を調べた結果、細胞周期関連遺伝子であるCyclin D1、Cyclin D3、E2F1の発現減少やCDKインヒビターp27^{Kip1}の発現上昇が誘導されていることが判明した。さらに、pRb蛋白質の脱リン酸化も誘導されており、ALK阻害剤がG1期での細胞周期停止を誘導していることと一致している。以上の結果から、ALK活性を有する神経芽腫に対し、ALK阻害剤での完全な治療は難しく、がんが再発してしまう可能性が考えられる。つまり、細胞の増殖抑制だけでなく細胞死を誘導することが、薬剤耐性の獲得および再発を抑制するために重要であることを示唆している。

そこで、神経芽腫においてp53変異が非常に稀なことに着目し、p53活性化剤とALK阻害剤の併用について検討した。また、比較としてシスプラチンとALK阻害剤との併用についても調べた。この結果、p53活性化剤単独ではALK阻害剤単独と同様にALK活性を有する神経芽腫細胞において細胞周期停止が誘導される一方で、ALK阻害剤との併用により非常に効率的に細胞死が誘導すること、さらに薬剤除去後の再増殖も抑制することがわかった。興味深いことにp53活性化剤とALK阻害剤

の併用は、シスプラチンと ALK 阻害剤の併用に比べより強い相乗効果を示すことがわかった。次に、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用について *in vivo* で検証を行った。ここではヌードマウスに神経芽腫細胞を皮下移植し、腫瘍形成後 14 日間薬剤を経口投与し、腫瘍体積の比較を行った。この結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単剤投与群ではコントロール群と比べて腫瘍の増殖にほとんど影響を与えないのに対して、ALK 阻害剤と p53 活性化剤併用投与群では腫瘍の強い増殖抑制効果が認められた。これらの結果から、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用により ALK 活性を有する神経芽腫に対する有効な治療法となることが示唆された。

次に、ALK 阻害剤と p53 活性化剤により誘導される細胞死がどのような種類の細胞死なのか調べた。この結果、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用によりミトコンドリアからのシトクロム C の流出、カスパーゼ-9 及びカスパーゼ-3 の切断、カスパーゼ-3 の基質である PARP の切断が起こっていることから、内因性のアポトーシス経路が活性化していることが示唆された。さらにカスパーゼ阻害剤で処理すると、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用により誘導される細胞死が抑制された。また、p53 を発現抑制した際にも同様に細胞死が抑制されたことから、ALK 阻害剤と p53 活性化剤により誘導される細胞死は、p53 を介した内因性のアポトーシスであることが判明した。

続いて、p53 は PUMA、BAX や NOXA といったアポトーシス促進性の標的遺伝子を介して内因性のアポトーシス経路を制御していることから、ALK 阻害剤と p53 活性化剤を併用した際のこれら遺伝子の発現を調べた。この結果、非常に興味深いことに PUMA の発現が p53 活性化剤単剤処理に比べ ALK 阻害剤との併用により亢進していた。さらに、PUMA を発現抑制すると併用による細胞死が抑制されることから、PUMA の選択的な転写活性化が ALK 阻害剤と p53 活性化剤により誘導されるアポトーシスに重要であることが示唆された。またマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行い p53 転写選択に関与すると予想される遺伝子を探索したところ、ALK の下流で制御され p53 と協調的に働くことが示唆される転写因子 SOX4 を候補遺伝子として同定した。SOX4 の遺伝子発現抑制は、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用によって誘導される PUMA の発現亢進が起らず、アポトーシスも抑制されることが明らかになった。これらの結果をまとめると、ALK 遺伝子増幅を有する神経芽腫に対して ALK 阻害剤と p53 活性化剤を併用すると、p53 と SOX4 を介してアポトーシス促進性因子である PUMA の発現が亢進し、アポトーシスが強く誘導されることが明らかになった。

総括すると、本研究の結果 p53 を介した標的遺伝子の選択的転写活性化に関与する因子として NuMA と SOX4 という 2 つの因子を同定することが出来た。NuMA は細胞周期停止関連因子である p21 の選択的転写活性化に関与し、SOX4 はアポトーシス促進因子である PUMA の選択的転写活性化に関与する。さらに、ALK 遺伝子増幅を有する神経芽腫に対し ALK 阻害剤単独では細胞周期停止が惹起されるのに対し、p53 活性化剤を併用することでアポトーシスが効率的に誘導されることがわかった。これは p53 活性化剤と ALK 阻害剤の併用の結果、PUMA の選択的転写活性化が起こるためである。p53 活性化剤と受容体チロシンキナーゼ阻害剤の併用により p53 の転写選択性を制御することでより効率的にアポトーシスを誘導できる可能性が示唆された。これは幅広いがんに応用可能な有効な治療戦略になると考えられる。

略語一覽

- ALK ; Anaplastic lymphoma kinase
- BAX ; Bcl-2-associated X protein
- CDK8 ; Cyclin-dependent kinase 8
- ChIP ; Chromatin immunoprecipitation
- CLTC ; Clathrin heavy chain
- ERK1/2 ; Extracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2
- GST ; Glutathione S-transferase
- MAPK ; Mitogen-activated protein kinase
- MEK1/2 ; MAPK-ERK kinase 1 and 2
- MDM2 ; Mouse double minute 2
- NuMA ; Nuclear mitotic apparatus protein
- PARP ; Poly ADP ribose polymerase
- PIG3 ; Tumor Protein P53 Inducible Protein 3
- pRb ; Retinoblastoma protein
- PUMA ; p53 upregulated modulator of apoptosis
- RTK ; Receptor tyrosin kinase
- SOX4 ; SRY-related HMG-box 4
- TKI ; Tyrosin kinase inhibitor

第一章

序論

がん抑制因子 p53

p53 は代表的ながん抑制因子の 1 つであり、ヒトがんの約半数で変異が認められている。また p53 遺伝子に異常がない場合においても、p53 の負の制御因子である MDM2 の遺伝子増幅等が起こっており、ほとんどのがんにおいて p53 経路は失活していると考えられている¹⁻³。ヒト p53 は 393 アミノ酸からなる蛋白質で、DNA 結合ドメインを持つ転写因子である。C 末端側に存在する 4 量体化ドメインを介して 4 量体を形成し、標的遺伝子エンハンサー領域の p53 結合配列(RRRCWWGYYY [R はプリン、P はピリミジン、W は A 又は T を示す])に結合することで遺伝子発現を制御する^{2,4,5}。p53 は細胞周期停止関連遺伝子(CDKN1A 等)やアポトーシス誘導関連遺伝子(BBC3, BAX, PMAIP1 等)の発現制御を介してがん抑制に寄与している。また近年では、ネクロトーシスやフェロトーシス等アポトーシス以外のプログラム細胞死やオートファジー、代謝、浸潤・転移など様々な細胞プロセスに関与していることが報告されている⁶⁻¹¹。

p53 は通常 MDM2 等の E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、ユビキチン化された p53 は速やかにプロテアソーム系によって分解されるため、細胞内 p53 の蛋白質レベルは低く保たれている。DNA 損傷等を含む様々な細胞内外のストレスによってストレス応答性キナーゼの活性化がおこると、p53 の N 末端がリン酸化される。このリン酸化は p53 と MDM2 の結合を阻害するため、細胞内で p53 蛋白質が蓄積し、これにより標的遺伝子の転写活性化が誘導される¹²。

現在開発されている p53 活性化剤は、p53 と MDM2 の結合を阻害することで p53 蛋白質の蓄積を誘導する。代表的な p53 活性化剤である Nutlin-3a や RG7112 は、MDM2 の p53 結合ポケットに結合することで p53-MDM2 相互作用を阻害する^{13,14}。RG7112 については現在臨床試験が行われている。さらに近年では、変異型 p53 を標的とした p53 活性化剤の開発も進んでいる。がんで多く見られる変異型 p53 は細胞内で正しいフォールディングが行われず細胞内に蓄積する。PRIMA-1 や APR-246 と変異型 p53 を標的とした薬剤は、p53 蛋白質に直接結合しリフォールディングを促進することで p53 を再活性化させる¹⁵。p53 経路はがん抑制における最も重要な経路の 1 つであり、p53 経路の再活性化は様々ながん腫に応用可能な治療戦略であると考えられる。

p53 標的遺伝子の転写選択性制御

現在、多数の p53 標的遺伝子が報告されており、細胞周期停止やアポトーシスなど様々なシグナル伝達経路の制御に関与する。例えば、細胞周期停止関連遺伝子の代表

は、p21 である。p21 はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)の阻害因子であり、DNA 損傷際に p53 の働きによって誘導され、細胞周期は停止する¹⁶。一方で、アポトーシス関連遺伝子の代表としては PUMA、BAX、NOXA が挙げられる。これら 3 つの遺伝子は Bcl-2 ファミリー蛋白質であり、ミトコンドリア膜に局在しミトコンドリアからのシトクロム C の流出を促進する機能を持つ¹⁷。シトクロム C は Apaf-1 とともにアポトソームを形成し、下流のカスパーゼ-9、カスパーゼ-3 を活性化させ、これによりアポトーシスが進行する。PIG3 は酸化還元酵素であり、活性酸素種産生を促進することで、アポトーシス誘導に関与する¹⁸。また MDM2 も p53 の標的遺伝子であり、p53 を抑制するネガティブ・フィードバック経路の役割を果たしている^{5,12}。

p53 は標的遺伝子の転写活性化を介して細胞周期とアポトーシス、つまり細胞の生死の運命決定を行っている。これにはそれぞれの標的遺伝子の p53 を介した選択的転写活性化が重要である¹⁹⁻²²。現在報告されている p53 転写選択性制御の重要な要因は、主に p53 の翻訳後修飾と結合因子である。例えば 46 番目セリンのリン酸化や 373 番目リジンのアセチル化はアポトーシス促進に関与し、320 番目リジンのアセチル化は細胞周期停止に関与する^{19,23-25}。また、p53 結合因子である HZF、ASPP はそれぞれ細胞周期停止関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の選択的転写に関与する^{19,26,27}。これらの翻訳後修飾や結合因子は、p53 の DNA 結合能や基本転写因子等の誘引に作用することで、転写選択性を制御していると考えられている。p53 転写選択性制御機構は複雑であるため、さらなる詳細な研究が必要である。

核内クラスリン重鎖(CLTC)による p53 を介した転写の調節

ヒト CLTC は 1675 アミノ酸からなる小胞輸送関連蛋白質であり、クラスリン軽鎖と共にクラスリン被覆小胞の被覆構造を形成する²⁸。一方で CLTC は核内にも存在し、p53 を介した転写に必須であることが報告されている²⁹⁻³¹。CLTC は p53 とアセチル基転移酵素 p300 の結合を安定化することで、p53 を介した転写に寄与している。p53 との結合には CLTC の 1288 番目のアスパラギン残基が重要であり、この残基に変異を入れると p53 との結合が減弱する。一方でこの変異はクラスリン軽鎖との結合には影響しないことから、核内 CLTC による p53 転写調節は細胞質での機能と独立していると考えられている。さらに国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野では核内 CLTC の結合因子探索を行い、この結果 NuMA 蛋白質を同定した。

Nuclear Mitotic Apparatus protein (NuMA 蛋白質)

ヒト NuMA は 2115 アミノ酸からなる巨大な蛋白質で、N 末端球状領域、コイルドコイル領域、C 末端球状領域の 3 つのドメインからなる (Radulescu and Cleveland, 2010; Yang and Snyder, 1992)^{32,33}。細胞周期により局在を変えるのが特徴的で、M 期には紡錘体極、G1 期には核に局在する。M 期では NuMA は Dynin/dynactin、Rae1 との結合を介して微小管を束ね紡錘体極に係留することで、紡錘体の安定化維持に寄与している。一方、G1 期では転写因子ある GAS41、HMG-I/Y、ヘテロクロマチンのマーカーである H4K20me と共局在することが報告されている^{34,35}。また *in vitro* の実験において NuMA は多量体を形成することから、核内で骨格のような役割を果たすのではないかと予想されている^{36,37}。しかしながら、G1 期 NuMA の機能を直接的に示した研究例はほとんど無く、未だ詳細は不明である。また NuMA は DNA 損傷応答性キナーゼである ATM によりリン酸化を受けること、アポトーシスの際にカスパーゼ-3 により C 末端側が切断されることが報告されていることから、DNA 損傷時にも機能することが予想されている^{38,39}。

転写メディエーター複合体と CDK8

転写メディエーター複合体は遺伝子発現の際に、遺伝子のエンハンサー領域に結合した転写因子とプロモーター領域に結合した基本転写因子と RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の複合体を蛋白質-蛋白質相互作用を介して直接的に繋ぐ巨大な蛋白質複合体である⁴⁰。転写メディエーター複合体は、ヒトでは 26 個のサブユニットからなる Core mediator と CDK8 を含む 4 つのサブユニットからなる Kinase module により構成される。Kinase module は Core mediator と可逆的に結合し、転写メディエーター複合体の機能を変化されることで遺伝子発現制御に関与していると考えられている。

CDK8 はセリン・トレオニンキナーゼであり、酵母からヒトまで幅広く保存されている。CDK8 は RNAPII の C 末端ドメイン、ヒストン H3、基本転写因子など様々な基質をリン酸化することで、遺伝子発現の制御に関与していると考えられている^{40,41}。CDK8 は当初、様々な遺伝子の転写抑制に関与すると考えられてきたが、近年様々な遺伝子の転写活性化にも関与することが示唆されている⁴²⁻⁴⁵。特に p53 標的遺伝子 p21 の転写活性化と CDK8 のプロモーターへの結合は強く相関すると報告されている。このことから、CDK8 は p53 転写選択性制御因子の 1 つと考えられている⁴²。

本研究では、核内 CLTC 結合因子として同定された NuMA に着目し、NuMA が p53 の機能にどのような影響を与えるか調べた。さらに NuMA が特定の p53 標的遺伝子の制御に関与していることが示唆されたため、その詳細なメカニズムについて解析を行った。その際に、p53 標的遺伝子プロモーターにおける CDK8 の結合に着目し解析を行った。

神経芽腫と ALK

神経芽腫は小児がんの 1 つであり脳腫瘍について多い小児固形腫瘍である。日本では 320 人前後が新たに診断される⁴⁶⁻⁴⁸。神経芽腫では診断時には約半数で転移が起こっており、約 4 割がステージ 4 である⁴⁹。神経芽腫の起源は交感神経節前駆細胞である神経堤細胞と考えられており、実際副腎や背側の交感神経節等で多く発生する^{49,50}。また代表的ながん抑制因子である p53 の変異が 1%以下と非常に稀なことも特徴である(図 25)。神経芽腫は年齢や転移の有無、染色体異常などの指標により 3 つのリスクグループに分類される⁵¹。低リスク、中間リスクグループは比較的予後が良好であるのに対し、高リスクグループでは非常に予後が不良であることが知られている。高リスクグループの神経芽腫の特徴は、MYCN 遺伝子の増幅、1 番・11 番染色体長腕の欠損、17 番染色体長腕の増幅、テロメラーゼの高発現が挙げられる。現在の高リスクグループの神経芽腫に対する治療法は抗がん剤の多剤併用療法であり、5 年生存率は 50%以下である⁴⁹。さらにがんが治癒した場合でも 2 次がんや晩期副作用により苦しむ患者が存在しており、新規治療法の開発が望まれている⁵²。

2008 年に Anaplastic lymphoma kinase (ALK) の遺伝子変異が神経芽腫のドライバー変異として同定され、現在では神経芽腫の約 25%において ALK が遺伝子変異・増幅等により活性化していることがわかっている⁵³⁻⁵⁷。特に ALK 遺伝子増幅を有する神経芽腫では 5 年生存率が 23%と非常に予後不良である。受容体チロシンキナーゼ (RTK) である ALK は神経芽腫の増殖に寄与しているため、ALK 標的とした治療法に期待が高まっている⁵⁸⁻⁶¹。しかしながら、これまでに ALK の活性化を有する神経芽腫に対し ALK 阻害剤の有効性を示す示唆的な報告がなされていたが、ALK 阻害剤を始め多くのチロシンキナーゼの阻害剤(TKI)に対する耐性機構が細胞には備わっており、その耐性克服が今後の分子標的治療に重要であると考えられる^{62,63}。実際、EML4-ALK 陽性肺腺がんの治療に用いられている Crizotinib の臨床試験においては、神経芽腫 11 症例中 1 症例のみでしか効果が認められなかった⁶⁰。このことから単純に ALK を標的とした薬剤のみでの治療は難しく、併用療法等の新たな治療戦略を検討する必要があることが示唆されている。

本研究では、ALK 遺伝子増幅を有する神経芽腫に着目し ALK 阻害剤の有効性の検証を行った。さらに神経芽腫においては p53 変異が稀であることに着目し、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用効果についても検討した。また、ALK 阻害剤と p53 活性化剤を併用により誘導される細胞死の機構を明らかにするために、p53 標的遺伝子に着目しその発現変化についても調べた。

第二章

NuMA を介した p53 転写選択機構の解析

本章は共著者(物故)からの承認が得られないため非公開とする。

第三章

神経芽腫における ALK と p53 を標的とした新規治療法の開発

本章の内容は5年以内に出版予定であるため非公開とする。
論文が出版され次第本章の内容は公開予定である。

第四章

総括

本章の内容は5年以内に出版予定であるため非公開とする。
論文が出版され次第本章の内容は公開予定である。

参考文献

- 1 Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, doi:10.1101/cshperspect.a001008 (2010).
- 2 Toledo, F. & Wahl, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer* **6**, 909-923, doi:10.1038/nrc2012 (2006).
- 3 Petitjean, A., Achatz, M. I., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P. & Olivier, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**, 2157-2165, doi:10.1038/sj.onc.1210302 (2007).
- 4 Goldstein, I. *et al.* Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer gene therapy* **18**, 2-11, doi:10.1038/cgt.2010.63 (2011).
- 5 Kruse, J.-P. P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609-622, doi:10.1016/j.cell.2009.04.050 (2009).
- 6 Montero, J., Dutta, C., van Bodegom, D., Weinstock, D. & Letai, A. p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death and Differentiation* **20**, 1465-1474, doi:10.1038/cdd.2013.52 (2013).
- 7 Jiang, L. *et al.* Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* **520**, 57-+, doi:10.1038/nature14344 (2015).
- 8 Crighton, D. *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**, 121-134, doi:10.1016/j.cell.2006.05.034 (2006).
- 9 Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107-120, doi:10.1016/j.cell.2006.05.036 (2006).
- 10 Otomo, R. *et al.* TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 18691-18696, doi:10.1073/pnas.1412062112 (2014).
- 11 Otsubo, C. *et al.* TSPAN2 is involved in cell invasion and motility during lung cancer progression. *Cell reports* **7**, 527-538, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.027 (2014).
- 12 Pei, D., Zhang, Y. & Zheng, J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget* **3**, 228-235 (2012).
- 13 Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848, doi:10.1126/science.1092472 (2004).

- 14 Tovar, C. *et al.* MDM2 Small-Molecule Antagonist RG7112 Activates p53 Signaling and Regresses Human Tumors in Preclinical Cancer Models. *Cancer Research* **73**, 2587-2597, doi:10.1158/0008-5472.can-12-2807 (2013).
- 15 Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304-317, doi:10.1016/j.ccr.2014.01.021 (2014).
- 16 Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* **9**, 400-414, doi:10.1038/nrc2657 (2009).
- 17 Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**, 19, doi:10.1038/onc.2009.39 (2008).
- 18 Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-305, doi:10.1038/38525 (1997).
- 19 Beckerman, R. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, doi:10.1101/cshperspect.a000935 (2010).
- 20 Gomes, N. P. & Espinosa, J. M. Differential regulation of p53 target genes: it's (core promoter) elementary. *Genes & development* **24**, 111-114, doi:10.1101/gad.1893610 (2010).
- 21 Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 402-412, doi:10.1038/nrm2395 (2008).
- 22 Sullivan, K. D., Gallant-Behm, C. L., Henry, R. E., Fraikin, J.-L. L. & Espinosa, J. M. The p53 circuit board. *Biochimica et biophysica acta* **1825**, 229-244, doi:10.1016/j.bbcan.2012.01.004 (2012).
- 23 Oda, K. *et al.* p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**, 849-862, doi:10.1016/S0092-8674(00)00073-8 (2000).
- 24 Roy, S. & Tenniswood, M. Site-specific acetylation of p53 directs selective transcription complex assembly. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 4765-4771, doi:10.1074/jbc.M609588200 (2007).
- 25 Knights, C. D. *et al.* Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *Journal of Cell Biology* **173**, 533-544, doi:10.1083/jcb.200512059 (2006).
- 26 Das, S. *et al.* Hzf determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation. *Cell* **130**, 624-637, doi:10.1016/j.cell.2007.06.013 (2007).
- 27 Samuels-Lev, Y. *et al.* ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Molecular Cell* **8**, 781-794, doi:10.1016/s1097-2765(01)00367-7 (2001).

- 28 Royle, S. J. The cellular functions of clathrin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1823-1832, doi:10.1007/s00018-005-5587-0 (2006).
- 29 Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. & Taya, Y. Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & development* **20**, 1087-1099, doi:10.1101/gad.1381906 (2006).
- 30 Ohata, H. *et al.* Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation. *Journal of molecular biology* **394**, 460-471, doi:10.1016/j.jmb.2009.09.029 (2009).
- 31 Ohmori, K. *et al.* Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene* **27**, 2215-2227, doi:10.1038/sj.onc.1210854 (2008).
- 32 Radulescu, A. E. & Cleveland, D. W. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends in cell biology* **20**, 214-222, doi:10.1016/j.tcb.2010.01.003 (2010).
- 33 Yang, C. H. & Snyder, M. The nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. *Molecular biology of the cell* **3**, 1259-1267, doi:10.1091/mbc.3.11.1259 (1992).
- 34 Abad, P. C. *et al.* NuMA influences higher order chromatin organization in human mammary epithelium. *Molecular biology of the cell* **18**, 348-361, doi:10.1091/mbc.E06-06-0551 (2007).
- 35 Harborth, J., Weber, K. & Osborn, M. GAS41, a highly conserved protein in eukaryotic nuclei, binds to NuMA. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31979-31985, doi:10.1074/jbc.M000994200 (2000).
- 36 Simon, D. N. & Wilson, K. L. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 695-708, doi:10.1038/nrm3207 (2011).
- 37 Yu, W. & Moreno Díaz de la Espina, S. The plant nucleoskeleton: ultrastructural organization and identification of NuMA homologues in the nuclear matrix and mitotic spindle of plant cells. *Experimental cell research* **246**, 516-526, doi:10.1006/excr.1998.4334 (1999).
- 38 Matsuoka, S. *et al.* ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 1160-1166, doi:10.1126/science.1140321 (2007).
- 39 Stokes, M. P. *et al.* Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19855-19860,

- doi:10.1073/pnas.0707579104 (2007).
- 40 Allen, B. L. & Taatjes, D. J. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 155-166, doi:10.1038/nrm3951 (2015).
- 41 Clark, A. D., Oldenbroek, M. & Boyer, T. G. Mediator kinase module and human tumorigenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **50**, 393-426, doi:10.3109/10409238.2015.1064854 (2015).
- 42 Donner, A. J., Szostek, S., Hoover, J. M. & Espinosa, J. M. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Molecular cell* **27**, 121-133, doi:10.1016/j.molcel.2007.05.026 (2007).
- 43 Donner, A. J., Ebmeier, C. C., Taatjes, D. J. & Espinosa, J. M. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature structural & molecular biology* **17**, 194-201, doi:10.1038/nsmb.1752 (2010).
- 44 Galbraith, M. D., Donner, A. J. & Espinosa, J. M. CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* **1**, 4-12, doi:10.4161/trns.1.1.12373 (2010).
- 45 Poss, Z. C., Ebmeier, C. C. & Taatjes, D. J. The Mediator complex and transcription regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **48**, 575-608, doi:10.3109/10409238.2013.840259 (2013).
- 46 Louis, C. U. & Shohet, J. M. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annual Review of Medicine, Vol 66* **66**, 49-63, doi:10.1146/annurev-med-011514-023121 (2015).
- 47 Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-2120, doi:10.1016/s0140-6736(07)60983-0 (2007).
- 48 Maris, J. M. Medical Progress: Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* **362**, 2202-2211, doi:10.1056/NEJMra0804577 (2010).
- 49 Haupt, R. *et al.* Improved Survival of Children With Neuroblastoma Between 1979 and 2005: A Report of the Italian Neuroblastoma Registry. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 2331-2338, doi:10.1200/jco.2009.24.8351 (2010).
- 50 Jiang, M. R., Stanke, J. & Lahti, J. M. THE CONNECTIONS BETWEEN NEURAL CREST DEVELOPMENT AND NEUROBLASTOMA. *Cancer and Development* **94**, 77-127, doi:10.1016/b978-0-12-380916-2.00004-8 (2011).
- 51 Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 289-297, doi:10.1200/jco.2008.16.6785 (2009).
- 52 Oeffinger, K. C. *et al.* Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer.

- New England Journal of Medicine* **355**, 1572-1582, doi:10.1056/NEJMsa060185 (2006).
- 53 Bresler, S. C. *et al.* ALK Mutations Confer Differential Oncogenic Activation and Sensitivity to ALK Inhibition Therapy in Neuroblastoma. *Cancer Cell* **26**, 682-694, doi:10.1016/j.ccell.2014.09.019 (2014).
- 54 Chen, Y. Y. *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-U956, doi:10.1038/nature07399 (2008).
- 55 Janoueix-Lerosey, I. *et al.* Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **455**, 967-U951, doi:10.1038/nature07398 (2008).
- 56 Mosse, Y. P. *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-U922, doi:10.1038/nature07261 (2008).
- 57 George, R. E. *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**, 975-978, doi:10.1038/nature07397 (2008).
- 58 Carpenter, E. L. & Mosse, Y. P. Targeting ALK in neuroblastoma-preclinical and clinical advancements. *Nature Reviews Clinical Oncology* **9**, 391-399, doi:10.1038/nrclinonc.2012.72 (2012).
- 59 Krytska, K. *et al.* Crizotinib Synergizes with Chemotherapy in Preclinical Models of Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* **22**, 948-960, doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-0379 (2016).
- 60 Mosse, Y. P. *et al.* Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncology* **14**, 472-480, doi:10.1016/s1470-2045(13)70095-0 (2013).
- 61 Hallberg, B. & Palmer, R. H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nature Reviews Cancer* **13**, 685-700, doi:10.1038/nrc3580 (2013).
- 62 Katayama, R., Lovly, C. M. & Shaw, A. T. Therapeutic Targeting of Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer: A Paradigm for Precision Cancer Medicine. *Clinical Cancer Research* **21**, 2227-2235, doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-2791 (2015).
- 63 Toyokawa, G. & Seto, T. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data. *Oncology Research and Treatment* **38**, 291-298, doi:10.1159/000430852 (2015).
- 64 Kivinen, K., Kallajoki, M. & Taimen, P. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Experimental Cell Research* **311**, 62-73, doi:10.1016/j.yexcr.2005.08.006 (2005).

- 65 Sakamoto, H. *et al.* CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. *Cancer Cell* **19**, 679-690, doi:10.1016/j.ccr.2011.04.004 (2011).
- 66 Chou, T. C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* **70**, 440-446, doi:10.1158/0008-5472.can-09-1947 (2010).
- 67 Riedl, S. J. & Shi, Y. G. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 897-907, doi:10.1038/nrm1496 (2004).
- 68 Obrador-Hevia, A. *et al.* RG7112, a Small-Molecule Inhibitor of MDM2, Enhances Trabectedin Response in Soft Tissue Sarcomas. *Cancer Investigation* **33**, 440-450, doi:10.3109/07357907.2015.1064534 (2015).
- 69 Verreault, M. *et al.* Preclinical Efficacy of the MDM2 Inhibitor RG7112 in MDM2-Amplified and TP53 Wild-type Glioblastomas. *Clinical Cancer Research* **22**, 1185-1196, doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-1015 (2016).
- 70 Jang, S. M. *et al.* Transcription factor Sox4 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor, TSA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **438**, 445-451, doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.099 (2013).
- 71 Liu, P. B. *et al.* Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Research* **66**, 4011-4019, doi:10.1158/0008-5472.can-05-3055 (2006).
- 72 Vervoort, S. J., van Boxtel, R. & Coffey, P. J. The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe? *Oncogene* **32**, 3397-3409, doi:10.1038/onc.2012.506 (2013).
- 73 Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. & Niland, J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Research* **26**, 3453-3459, doi:10.1093/nar/26.15.3453 (1998).
- 74 Potzner, M. R. *et al.* Sequential requirement of Sox4 and Sox11 during development of the sympathetic nervous system. *Development* **137**, 775-784, doi:10.1242/dev.042101 (2010).

謝辞

本研究は多くの方のご助力のもと遂行する事ができました。まず始めに、このような素晴らしい環境において研究を行う機会を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 松田浩一教授並びに渡邊俊樹教授に厚く御礼申し上げます。

第二章の研究につきましては様々なお助言を頂きました国立がん研究センター研究所がん分化制御解析分野 大畑広和博士、腫瘍生物学分野 荒川博文分野長、ゲノム生物学分野 横田淳分野長、難治がん研究分野 中釜斉分野長に感謝致します。また cDNA を提供頂いたかずさ DNA 研究所 長瀬隆弘博士に感謝致します。

第三章の研究につきましては様々なお助言や実験材料の提供、実験手技の指導を頂いた難治進行がん研究分野 堺隆一分野長、千葉県立がんセンター中川原章博士並びに上條岳彦博士に感謝致します。

また日々の研究において実験の補助や技術指導、活発な討論をして頂いた国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野 大友亮博士、日比谷優子博士、鈴木英暢氏、中島綾奈氏、荘司知子氏、水田真由美氏、大坪千裕氏に深く感謝致します。皆様のお陰で素晴らしい6年間の研究生活を送ることが出来ました。

最後に6年間指導の指導を通して研究の指導して頂き、また様々な面で支えて頂いた国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野 江成政人ユニット長に深く御礼申し上げます。これから研究者として生きていくために大切なことをたくさん教えて頂きました。ありがとうございます。