

Nara Women's University

DNA複製初期プロセスおよび新規抗がん剤の増殖抑制作用メカニズムの解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-06-21 キーワード (Ja): DNA複製, がん, ヒトがん細胞株, ヒト臨床腫瘍, 細胞周期, 増殖抑制作用 キーワード (En): 作成者: 永瀬, 亜希子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10935/4723

博士学位論文

DNA 複製初期プロセスおよび
新規抗がん剤の増殖抑制作用メカニズムの解析

2018年3月

永瀬 亜希子

本学位論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

Zembutsu A, Waga S. (2006)

De novo assembly of genuine replication forks on
an immobilized circular plasmid in *Xenopus* egg extracts.

Nucleic Acids Res. 34(13):e91. [第 2 章]

Waga S, **Zembutsu A**. (2006)

Dynamics of DNA binding of replication initiation proteins during *de novo*
formation of pre-replicative complexes in *Xenopus* egg extracts.

J Biol Chem. 281(16):10926-34. [第 3 章]

Nagase-Zembutsu A, Hirotsu K, Yamato M, Yamaguchi J, Takata T,
Yoshida M, Fukuchi K, Yazawa M, Takahashi S, Agatsuma T. (2016)

Development of DS-5573a: A novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with
potent antitumor activity.

Cancer Sci. 107(5):674-81. [第 4 章]

目次

略語一覧.....	4
第1章 総合序論.....	6
第2章 真核生物における DNA 複製初期プロセス解明のための 新規 <i>in vitro</i> DNA 複製系の検討.....	21
第1節 序論.....	22
第2節 材料と方法.....	25
第3節 結果.....	31
第4節 考察.....	47
第3章 真核生物における DNA 複製初期プロセスの解明 ～multiple MCM loading モデルの提唱～.....	50
第1節 序論.....	51
第2節 材料と方法.....	53
第3節 結果.....	56
第4節 考察.....	73
第4章 DNA 複製機構の制御が破綻した癌細胞に対する新たな抗がん剤の検討 ～脱フコース抗ヒト B7-H3 抗体 DS-5573a の増殖抑制作用メカニズムの解析～.....	78
第1節 序論.....	79
第2節 材料と方法.....	83

第3節 結果.....	90
第4節 考察.....	111
第5章 総括・今後の展望.....	115
謝辞.....	122
参考文献.....	123

略語一覧

a.a. : amino acid

ADC : antibody-drug conjugate

ADCC : antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADCP : antibody-dependent cellular phagocytosis

APC : allophycocyanin

CDC6 : cell division cycle 6

CDK : cyclin-dependent kinase

CDT1 : cdc10 dependent transcript 1

CHO : Chinese hamster ovary

DS-5573a : 脱フコース化 Hu-M30

EGFR : epidermal growth factor receptor

FACS Buffer : 5% FBS 入り phosphate buffered saline

FBS : fetal bovine serum

FITC : fluorescein isothicyanate

GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulation factor

HER2 : human epidermal growth factor receptor type2

Hu-M30 : ヒト化抗ヒト B7-H3 抗体

LSS : low speed supernatant

M-CFS : macrophage colony-stimulation factor

MCM : mini-chromosome maintenance

NK : natural killer

ORC : origin recognition complex

PBMC : **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ell (ヒト末梢血単核細胞)

PBS : **p**hosphate **b**uffered **s**aline

PCNA : **p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen

RFC : **r**eplication **f**actor **C**

Pola : **p**olymerase **α**

Pol δ : **p**olymerase **δ**

Pol ϵ : **p**olymerase **ϵ**

RPA : **r**eplication **p**rotein **A**

Pre-RC : **p**re-**r**eplicative **c**omplex

SD : **s**tandard **d**eviation (標準偏差)

SE : **s**tandard **e**rror of the mean (標準誤差)

VEGF : **v**ascular **e**ndothelial cell **g**rowth **f**actor

第1章

総合序論

DNA 複製・細胞周期制御の破綻と癌の関連性

高齢化や環境要因などにより癌関連死は年々増え続け、世界全体での癌発症人数は 2012 年時点で 1410 万人、癌関連死は 820 万人にまで膨れ上がり (Stewart and Wild, 2014)、いまや世界全体で死因のトップとなっている。癌を発症する原因は多岐に渡るが、これまでの臨床および非臨床研究により、ヒト臨床腫瘍およびヒト癌細胞株では、本来は高度に保たれている DNA 複製や細胞周期の制御が破綻しており、その結果、細胞増殖が亢進することが示唆されている (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015; reviewed in Wasylshen and Lozano, 2016)。

通常、真核生物における DNA 複製は、一回の細胞周期の中でたった一度だけ複製が行われるよう高度な制御を受けていることが、出芽酵母、分裂酵母およびアフリカツメガエル卵抽出液 *in vitro* 系などを用いた解析により明らかになっている (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。以下に、現在考えられている DNA 複製メカニズムを簡単に述べる。DNA 複製が開始するためには、まず 6 つのサブユニットから構成される複製開始点認識複合体 ORC (origin recognition complex) が DNA に結合することが必須である。次に、DNA 複製が正確に 1 回だけ行われることを保証するライセンス化制御因子 CDC6 (cell division cycle 6)、CDT1 (cdc10 dependent transcript 1)、さらに DNA 複製の際に DNA 二重鎖をほどくヘリカーゼ活性を有すると考えられている MCM (mini-chromosome maintenance) 2-7 が ORC 周辺ヘリクルートされて DNA 複製前複合体 pre-RC (pre-replicative complex) が形成される (G1 期、Figure 1-1)。その後、pre-RC は細胞周期の制御に関与する CDK (cyclin-dependent kinase) など様々な因子の作用により活性化され、細胞周期は G1 期から S 期へと移行する。S 期移行後、MCM 2-7 複合体の作用により DNA 二重鎖が開くと、その周辺には一本鎖 DNA 結合タンパクである RPA (replication protein A)、DNA ポリメラーゼ α /プライマーゼ複合体 Pol (polymerase) α 、さらに DNA ポリメラーゼ Pol δ 、Pole がリクルートされる。このう

ち Pol α /primase がプライマーを合成し、Pol δ と Pol ϵ がそのプライマーから DNA 鎖を伸長すると考えられている。また、DNA ポリメラーゼの補助因子である RFC (**r**eplication **f**actor **C**)、PCNA (**p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) などがリクルートされ、DNA 合成/伸長が開始する (Figure 1-1, Figure 1-2)。

この際、S 期における DNA 再複製を阻害するため、geminin というタンパクが出現し、CDT1 と強固に結合することで機能的な MCM loading を阻害し、pre-RC 再形成が抑制される。また ORC、CDT1、CDC6、MCM2-7 複合体は S 期にリン酸化を受け不活性化状態となり、最終的に MCM2-7 複合体以外の因子はユビキチン化により分解・消失する (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。さらに、DNA に異常が感知された場合、G1 期から S 期への移行を停止させる G1 チェックポイント (ATM-Chk2-p53 経路) もしくは G2 期から M 期への移行を停止させる G2 チェックポイント (ATR/M-Chk1/2-Cdc25A 経路) が作用して細胞周期を一旦停止させ、DNA 修復が行われる (Figure 1-3)。仮にそのダメージが広範囲に及び、DNA 修復が不能と判断された場合は、その細胞ではアポトーシスが誘導される (reviewed in Wasylishen and Lozano, 2016)。

このように、正常細胞では様々なプロセスで DNA 複製機構および細胞周期が高度に制御されている。一方、臨床腫瘍および癌細胞株では、pre-RC 形成分子である ORC、CDC6、CDT1、MCM2-7 複合体が正常細胞と比較して高発現しており、それらが DNA 再複製・ゲノム不安定化を誘発する要因の一つとなることが示唆されている (Vaziri *et al.*, 2003; Tatsumi *et al.*, 2006; reviewed in Borlado and Méndez, 2008; Kwok *et al.*, 2014)。すなわち、DNA 複製機構が高度に制御されるためには、これらの DNA 複製関連タンパクの発現量や発現バランスが正しく保たれていることが重要と考えられる。

しかしその一方で、正常細胞においても MCM2-7 複合体と ORC が DNA 上で共局在せず、しかも ORC の 10~20 倍程度の MCM2-7 複合体が DNA 上に散在して存在するように見える「MCM paradox」と称される一見矛盾する現象も認められており

(Mahbubani *et al.*, 1997; Walter and Newport, 1997; Edwards *et al.*, 2002)、DNA 複製初期プロセスについては未だ説明しきれない部分も残されており、DNA 複製制御の理解にはこれら未解明の点の詳細な解析が必要と考えられる。

DNA 複製・細胞周期移行を阻害する抗がん剤の登場とその課題点

DNA 複製機構や細胞周期が破綻している癌細胞に対して、これらを人工的に制御して癌の増殖を抑制するのが一つの良い戦略と考えられ、その制圧方法についてこれまで多くの研究が行われてきた。その中で、幅広い癌種で増殖抑制効果を期待出来ると考えられているのが「化学療法剤」と称される抗がん剤である。

これまでの研究により、二重鎖 DNA を架橋して DNA 合成を阻害するアルキル化剤 cyclophosphamide (Arnold *et al.*, 1958)、M 期における微小管重合を阻害する vinblastine (Hertz *et al.*, 1960) や微小管脱重合阻害剤 paclitaxel (Wani *et al.*, 1971)、S 期における複製フォーク伸長で生じた DNA のひずみを解消する topoisomerase I の機能を阻害する irinotecan (CPT-11) (Kunimoto *et al.*, 1987) といった「化学療法剤」が数多く研究・開発された。現在広く普及している主な化学療法剤を Table 1-1 に示す。癌細胞は細胞分裂が活発であるため、これらの薬剤に対して高い感受性を示しやすく、また様々な癌種の治療に用いることが出来るという特徴がある。しかし、正常細胞でも造血幹細胞、口腔粘膜、消化管粘膜、毛根細胞などは増殖性が高いため、化学療法剤の影響を受けやすく、赤血球・白血球数低下による貧血・感染症、口内炎、下痢や嘔吐、脱毛などの強い副作用を伴うことが多い。化学療法剤による癌治療は、治療効果は得られるものの、強い副作用のため日常生活の質が劇的に低下することが多く、途中で減薬あるいは服用を中断するケースも少なくない。

この課題を解決するため、最近では DNA 複製機構や細胞周期の制御が破綻した癌細胞で高発現あるいは制御不能となった原因タンパクの機能を選択的に阻害することで、

癌細胞へより特異的に働く「分子標的薬」の研究が盛んになってきている。1980年代後半頃から EGFR (epidermal growth factor receptor, Gusterson *et al.*, 1985)、HER2 (human epidermal growth factor receptor type 2, Tal *et al.*, 1988) などの癌細胞増殖に関する重要な分子が次々と同定され、1990年代後半からこれらの機能を抑制する分子標的薬 (EGFR 阻害剤 gefitinib [Sirotnak *et al.*, 2000]、EGFR/HER2 阻害剤 lapatinib [Xia *et al.*, 2002] など) の研究開発が精力的に進められた。また最近では、G1 期から S 期への移行を選択的に阻害する CDK4/6 阻害剤 palbociclib (Fry *et al.*, 2004) が承認された。これらはいずれも、分子標的薬の中でも分子量が小さい「低分子化合物」のカテゴリーに位置づけられる (Figure 1-4)。低分子化合物は分子量が小さく、経口投与で体内に吸収されること、癌細胞増殖に関与する細胞表面タンパク質の細胞内ドメインや細胞内タンパク質を標的にできることが大きな特徴である (Table 1-2)。しかし、一旦奏効しても、すぐに耐性が出現して無効化することが多く、化学療法剤および低分子化合物だけでは癌の根治は目指せないのが現状であり、新たな薬剤開発が求められている。

新たな分子標的薬：抗体医薬の登場とその課題点

「分子標的薬」には「低分子化合物」以外に「抗体医薬」というカテゴリーが存在する (Figure 1-4)。抗体医薬は、疾患関連分子に対して特異的に結合する抗体を遺伝子組み換え技術などを応用して作製したヒト免疫グロブリン型の医薬品である。前述した EGFR を標的とした cetuximab (Prewett *et al.*, 1996)、HER2 を標的とした trastuzumab (Baselga *et al.*, 1998)、さらに腫瘍環境における血管新生に重要な役割を果たす VEGF (vascular endothelial cell growth factor) を標的とした bevacizumab (Presta *et al.*, 1997) などが、その代表例として挙げられる。ヒト免疫グロブリンには、IgG、IgE、IgD、IgA、IgM という 5 つのクラスが存在するが (Figure 1-5)、これ

までに承認されている抗体医薬品の大半は、ヒト体内に存在する免疫グロブリンのうち約 75%程度を占める IgG 由来の配列を持つものである。ヒト IgG はヒト免疫グロブリンの中では最小であるが、それでも分子量が約 15 万と医薬品としては非常に大きい。抗体医薬はその分子量の大きさから、標的は細胞表面タンパク質の細胞外ドメインや分泌タンパク質に限定される (Table 1-2) もの、近年、非常に注目されている薬剤であり、全世界における 2015 年医薬品年間売り上げランキングトップ 10 の半数を占めている (Table 1-3)。しかし、抗体医薬品は生産コストが高く、従来の抗体医薬 (第一世代タイプ : cetuximab、trastuzumab など) は抗原が高度に過剰発現している腫瘍に限って薬効が認められる傾向がある (Slamon *et al.*, 2001; Coiffier *et al.*, 2002)。これらの課題点を解決するため、より低用量で、より強い薬効が期待できる次世代型抗体が次々に開発されてきているが、それらは既に標的妥当性が確認された HER2 など限られた標的に対して集中しており、その恩恵を受ける患者は限定されている。そのため、十分な治療法がない難治性癌に対しても有効な、新たな抗原を標的とした抗体医薬品の開発が強く望まれている。

本研究の目的とアプローチ

先述のとおり、ヒト臨床腫瘍およびヒト癌細胞株では、本来は高度に保たれている DNA 複製機構や細胞周期の制御が破綻していることが示唆されている (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015; reviewed in Wasylishen and Lozano, 2016)。「癌を制御する」という目的を達成するためには、まずこれらの機構が破綻する原因を突き止めることが必要であり、そのためには正常細胞における DNA 複製初期プロセスや制御機構を理解することが重要である。これまでの研究により、DNA 複製に関与する様々な因子のクロマチン結合における相互作用性や、因子間の相互作用などは少しずつ明らかになってきているが、複製開始の初期プロセスにおける各因子の機能の実体は未だ明らかになって

いない。そこで私は、各 pre-RC 形成タンパクの量的な関係や「MCM paradox」が起こるメカニズムを解き明かし、将来的にはがん細胞における治療対象としての応用も目標として、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた新規 *in vitro* DNA 複製系を構築し、基礎科学的な解析を進めることにした。

その後、私は「癌を制御する」という目的を達成するため、「新規抗がん剤によって癌細胞の増殖を抑制する」というより直接的な研究アプローチをとることにした。その研究題材として、私は抗原発現と予後不良の関連性が報告されている B7-H3 タンパクに着目し、既存の治療薬に抵抗性を示す癌患者に対しても有効性が期待出来る、ヒト B7-H3 を標的とする次世代型抗体医薬 DS-5573a の創出、およびその増殖抑制作用メカニズムの解析を試みた。

Table 1-1 癌治療で広く用いられる化学療法剤の一覧

種類	作用機序	主な薬剤
アルキル化剤	DNA に直接結合 DNA 構造を異常化させ、 DNA 合成を阻害	Cyclophosphamide
代謝拮抗剤	DNA 合成材料と類似構造 DNA 合成時に取り込まれ、 DNA 伸長を阻害	Gemcitabine Fluorouracil (5-FU)
抗がん性抗生物質	抗がん作用のある抗生物質 薬剤によって作用機序は異なるが、 一般的に DNA に対して悪影響を 及ぼし、DNA 合成を阻害	Actinomycin D Amrubicin Doxorubicin
微小管脱重合阻害剤	微小管を安定化させ、腫瘍細胞の 細胞分裂を M 期で阻害	Paclitaxel Docetaxel
微小管重合阻害剤	微小管重合を阻害し、腫瘍細胞の 細胞分裂を M 期で阻害	Vinblastine Eribulin
Topoisomerase 阻害剤	Topoisomerase I もしくは II の 機能を阻害し、DNA 複製を阻害	Irinotecan (CPT-11) (Topo I 阻害剤) Etoposide (Topo II 阻害剤)
プラチナ製剤	DNA のプリン塩基 (A もしくは G) に結合し、DNA 合成を阻害	Cisplatin Carboplatin

Table 1-2 低分子化合物と抗体医薬の特徴

	低分子化合物	抗体医薬（第一世代）
分子量	小さい（500 以下）	大きい（15 万程度）
主な投与ルート	経口	静脈、皮下
標的分子	・細胞表面タンパク質 （細胞内ドメイン）や 細胞内タンパク質も幅広く狙える	・細胞表面タンパク質 （細胞外ドメイン）や 分泌タンパク質に限定
課題点	・早期耐性が出やすい	・生産コストが高い ・標的が高発現した腫瘍のみ 奏効する傾向あり
代表例	・ Gefitinib （EGFR キナーゼ阻害剤） ・ Lapatinib （EGFR/HER2 キナーゼ阻害剤） ・ Palbociclib （CDK4/6 阻害剤）	・ Cetuximab （抗 EGFR 抗体） ・ Trastuzumab （抗 HER2 抗体） ・ Bevacizumab （抗 VEGF 抗体）

Table 1-3 全世界における 2015 年医薬品年間売り上げランキング

(LePro PharmaCompass OPC Private Limited HP 参照・一部改変)

<http://www.pharmacompass.com/radio-compass-blog/top-drugs-by-sales-revenue-in-2015-who-sold-the-biggest-blockbuster-drugs> (2017 年 12 月 25 日アクセス)

黄色でハイライトされた製品が抗体医薬品である。

順位	製品名 (一般名)	薬効分類	会社(国名)	2015 年売上高 (単位:百万米ドル)
1	ヒュミラ Adalimumab	抗リウマチ薬	AbbVie (アメリカ)	14,012
2	ハーボニー Ledipasvir and Sofosbuvir	C型肝炎治療薬	Gilead Sciences (アメリカ)	13,864
3	エンブレル Etanercept	抗リウマチ薬	Amgen/Pfizer (アメリカ)	8,697
4	レミケード Infliximab	抗リウマチ /クローン薬	Johnson & Johnson /Merck (アメリカ)	8,355
5	リツキサン Rituximab	抗悪性腫瘍剤	Roche (スイス)	7,115
6	ランタス Insulin Glargine	インスリン製剤	Sanofi (フランス)	7,029
7	アバスタチン Bevacizumab	抗悪性腫瘍剤	Roche (スイス)	6,751
8	ハーセプチン Trastuzumab	抗悪性腫瘍剤	Roche (スイス)	6,603
9	レブラミド Lenalidomide	抗悪性腫瘍剤	Celgene (アメリカ)	5,801
10	ソバルデイ Sofosbuvir	C型肝炎治療薬	Gilead Sciences (アメリカ)	5,276

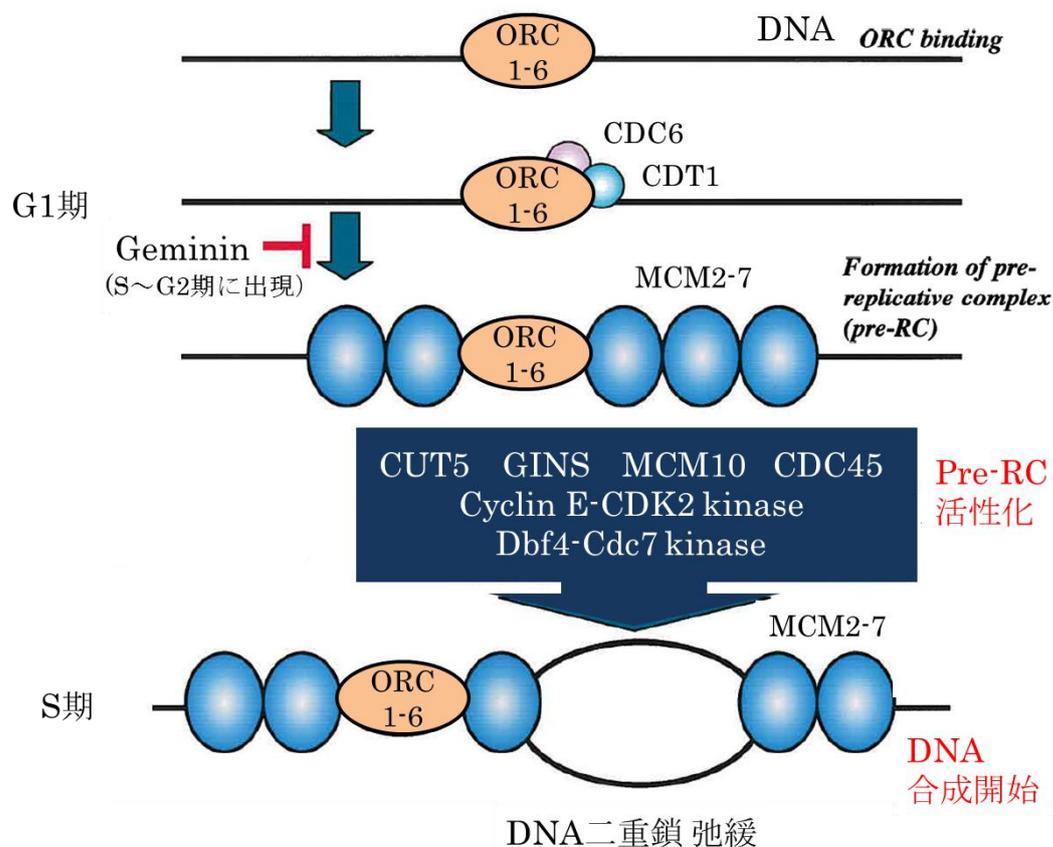


Figure 1-1 DNA複製開始モデル

DNA複製が開始するためには、まずORC1-6がDNAに結合することが必須である。その後、CDC6、CDT1依存的にMCM2-7複合体がloadingされ、pre-RCが形成される。このMCM loadingのステップはgemininによって阻害されることが知られている。形成されたpre-RCはCUT5、GINS、MCM10、CDC45、cyclin E-CDK2 kinase、Dbf4-Cdc7 kinaseなどの作用により活性化され、DNA二重鎖が開くと考えられている。

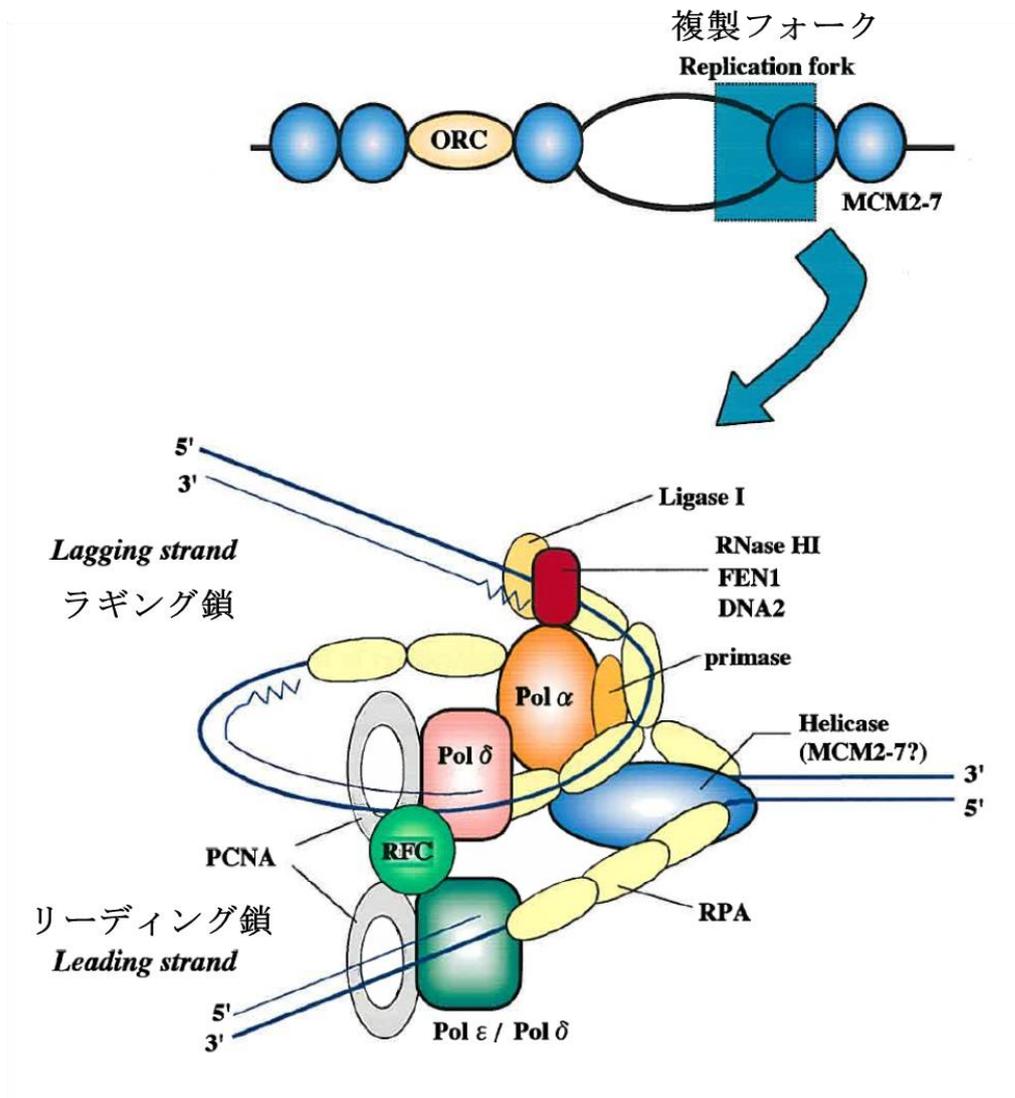


Figure 1-2 真核生物複製フォークのモデル

Pre-RC 活性化後に DNA 二重鎖が開くと、一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA や DNA ポリメラーゼを中心とした複製フォークで機能する因子が結合する。真核生物の DNA 複製に関わる主要な DNA ポリメラーゼとして Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ の 3 種類が存在する。Pol δ 、Pol ϵ が DNA 鎖伸長を行う際、DNA ポリメラーゼの補助因子として RFC と PCNA が機能する。

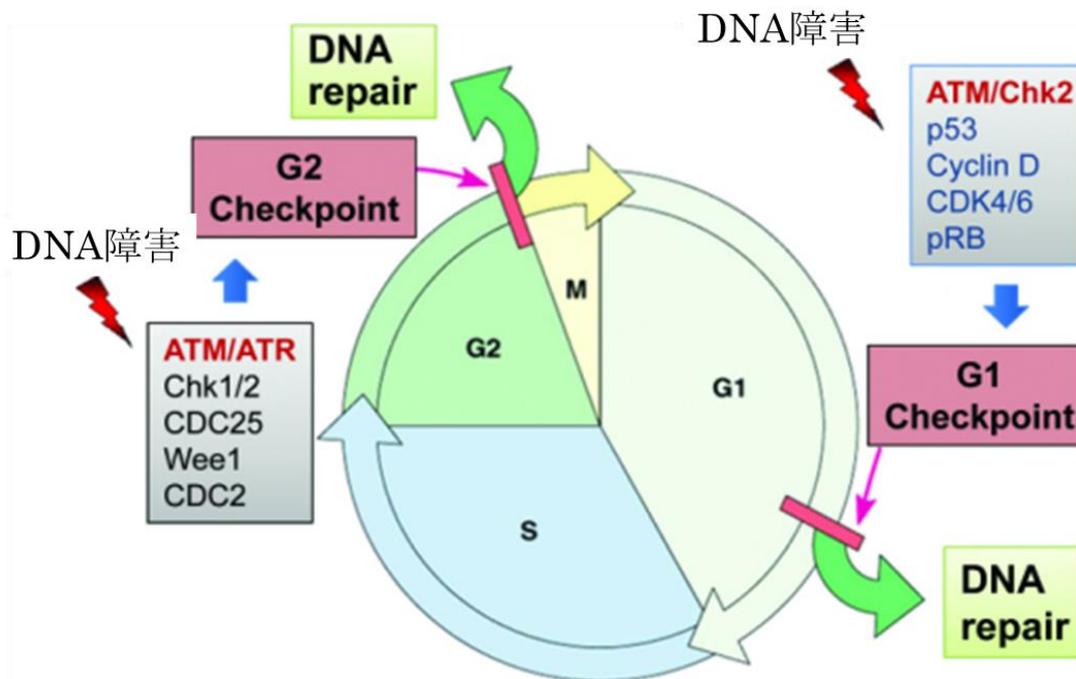


Figure 1-3 主な細胞周期チェックポイント

(Hein AL *et al.*, 2014 より抜粋・一部改変)

DNA 障害チェックポイントは主に、G1 から S 期への移行を停止させる G1 チェックポイント (ATM-Chk2-p53 経路)、G2 期から M 期への移行を停止させる G2 チェックポイント (ATR/M-Chk1/2-Cdc25A 経路) の二つによって制御されている。これらのチェックポイントに異常が生じると、正常なチェック機能が働かなくなり、その結果、遺伝子の変異が蓄積され、最終的には細胞が癌化・悪性化する要因となる。実際、多くのがんにおいて G1 チェックポイントが障害されており、厳密に制御されるはずの細胞周期システムが破綻していることが知られている。

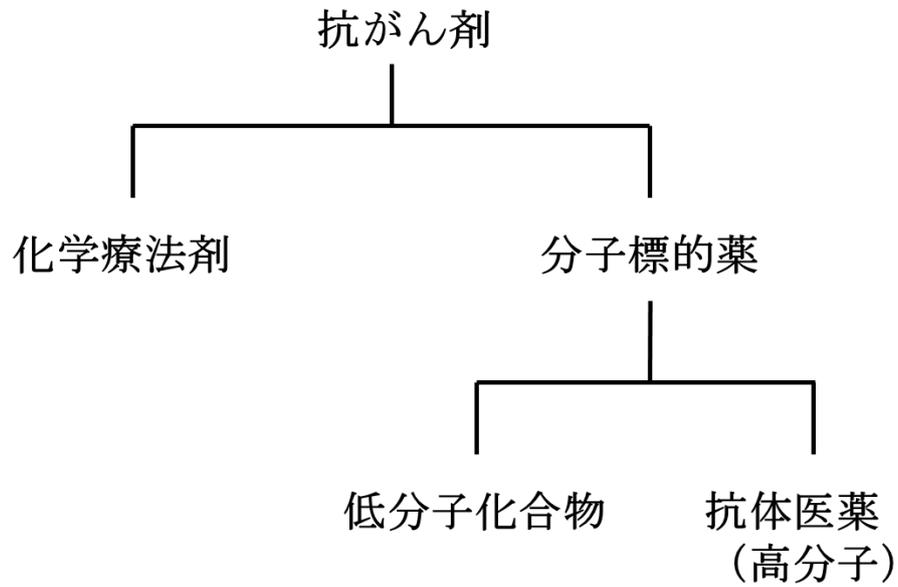


Figure 1-4 抗がん剤の分類

抗がん剤は、化学療法剤と分子標的薬の二つに分類される。分子標的薬は、その性状によって、さらに低分子化合物と抗体医薬に分類される。

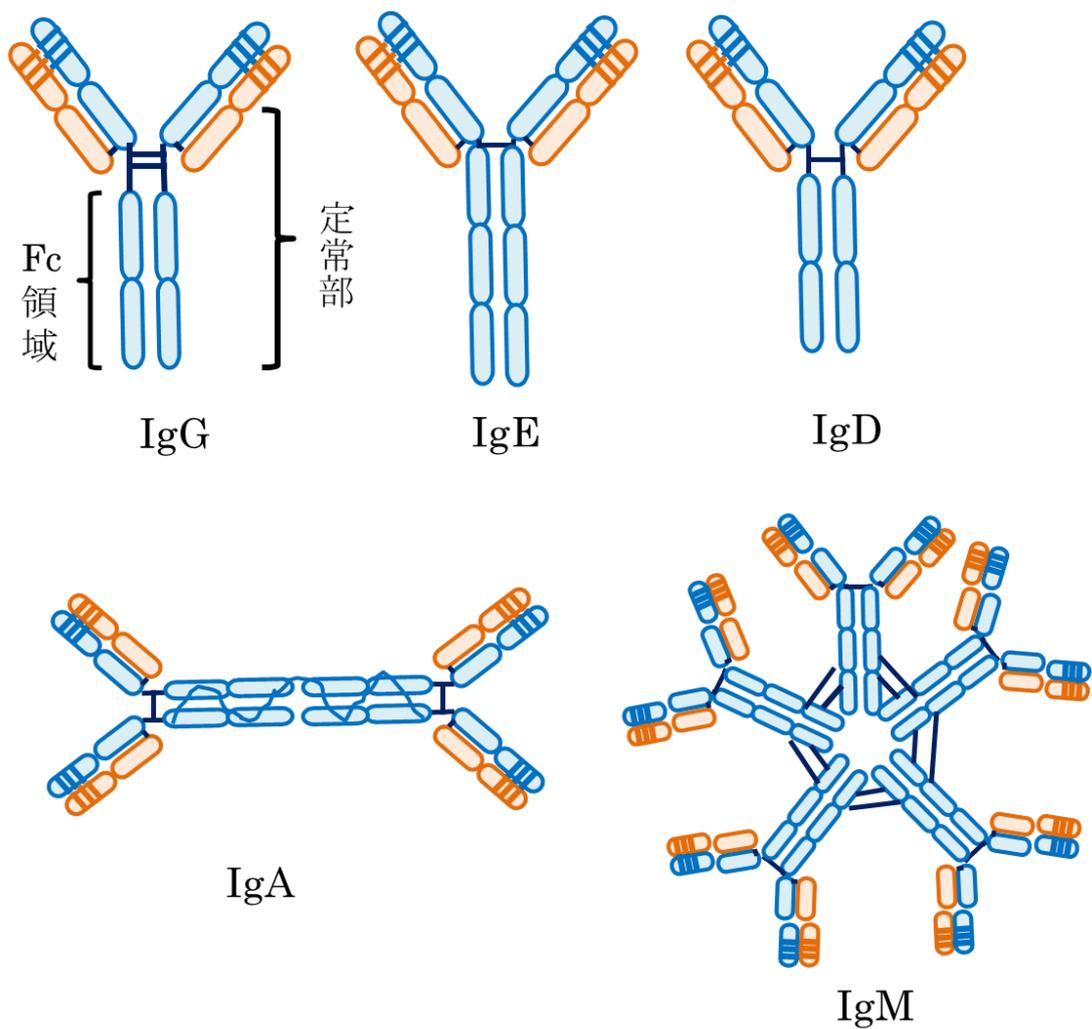


Figure 1-5 ヒト体内に存在する5種類の免疫グロブリン

ヒト体内には、5種類の免疫グロブリンが存在する。免疫グロブリンの重鎖を青、軽鎖を茶色で示した。どの重鎖定常部を持っているかによって、IgG、IgE、IgD、IgA、IgMの5種類のクラスに分類される。ヒト体内に最も多く存在するのはIgGであり、血中や組織中に広く分布し、生体防御を担う。抗体医薬品として上市されているものは、IgGタイプが大半を占める。

第2章

真核生物における DNA 複製初期プロセス解明のための
新規 *in vitro* DNA 複製系の検討

第1節 序論

真核生物 DNA 複製のメカニズム

DNA 複製が開始するためには、6つのサブユニットから構成される ORC が DNA に結合することが重要であると考えられている (Bell and Stillman, 1992; Carpenter *et al.*, 1996; Rowles *et al.*, 1996) が、ORC が結合する DNA 領域の構造は種によって異なることが知られている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、複製の開始に必要な DNA 配列として約 200 bp の ARS (autonomously replication sequence) が同定され、複製開始点として機能することが明らかになっている (reviewed in Bell, 1995)。一方、アフリカツメガエルやショウジョウバエの初期胚では、DNA 配列に関係なく ORC が DNA へ結合し、ランダムな領域から複製が開始することが知られている (Mahbubani *et al.*, 1992)。また、ヒトやアフリカツメガエルの ORC が DNA に結合する上で AT-rich 配列が重要な役割を持っていると考えられているが (Kong *et al.*, 2003)、出芽酵母の ARS のような特定の配列は見出されていない。このように、高等真核生物の ORC の DNA 結合については不明な点が多いが、基本的な DNA 複製メカニズムや ORC をはじめとする複製因子およびその機能は、種を越えて高度に保存されていると考えられている (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。

ORC が DNA に結合した後、CDC6 (Coleman *et al.*, 1996) および CDT1 (Nishitani *et al.*, 2000; Maiorano *et al.*, 2000) 依存的に MCM2-7 複合体がクロマチンに loading されて、pre-RC が形成される (Figure 1-1, reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。この ORC の DNA 結合から MCM2-7 複合体の loading の過程には、複数の因子による ATP 結合および ATP 加水分解が関与する (Bell and Dutta, 2002; reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。ヒトやアフリカツメガエルなどでは、MCM loading のステップは geminin によって特異的に阻害される。Geminin は細胞周期の S 期、G2 期、M 期を通じて pre-

RC 形成を阻害するタンパク質として同定され、細胞周期における pre-RC 形成の調節因子として機能する (McGarry and Kirschner, 1998; Blow and Dutta, 2005)。

G1 期に形成された pre-RC はその後、MCM10 (Homesely *et al.*, 2000; Wohlschlegel *et al.*, 2002)、CDC45 (Aparicio *et al.*, 1997; Mimura and Takisawa, 1998)、Cut5 (Hashimoto and Takisawa, 2003)、GINS (Takayama *et al.*, 2003; Kubota *et al.*, 2003) 等の因子や、CDK と Ddf4-Cdc7 kinase の作用により活性化され、DNA 二重鎖が開くと考えられている (Figure 1-1, Jares and Blow, 2000; Walter, 2000; Walter and Newport, 2000; Bell and Dutta, 2002; reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。

DNA 二重鎖が開くと、一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA や DNA ポリメラーゼを中心とした複製フォークで機能する因子が結合する (Figure 1-2, reviewed in Fragkos *et al.*, 2015)。真核生物の DNA 複製に関わる主要な DNA ポリメラーゼとして、Pola/primase、Pol δ および Pole の 3 種類が存在する。このうち、Pola/primase がプライマーを合成し、Pol δ と Pole がそのプライマーから DNA 鎖を伸長すると考えられている。一方、DNA 伸長が進行していく上で、複製フォークの前方にある DNA 二重鎖を解かなければいけないが、その役割を担う主要な DNA ヘリカーゼとして MCM2-7 複合体が機能すると考えられている (Ishimi, 1997; Laskey and Madine, 2003)。また、Pola/primase によるプライマー合成に CDC45 も関与すると推測されている (Mimura and Takisawa, 1998)。

Pol δ や Pole が DNA 鎖伸長を行う際、DNA ポリメラーゼの補助因子として RFC と PCNA が機能する。また、Pol δ はラギング鎖合成において重要な役割を持つことが示唆されているが (Waga and Stillman, 1994; Fukui *et al.*, 2004)、リーディング鎖、ラギング鎖の合成における Pol δ および Pole の役割についての詳細は未だ不明である。このように真核生物の DNA 複製の開始に関わる数多くの因子が同定されているが、各々の因子の機能の実態に関しては未だ不明な点も多い。

アフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製系

DNA 複製に関与する因子の詳細な解析には、生化学的手法が有効である。高等真核生物の染色体 DNA 複製の生化学的解析でよく利用されている系の一つとして、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製系がある (Leno and Laskey, 1991)。この系では、アフリカツメガエルの未受精卵に対し、受精刺激を模倣するため細胞内カルシウム濃度を増加させる活性化処理を行った後、細胞周期 S 期の性質を持った卵抽出液を調製し、そこに鋳型としてアフリカツメガエル精子クロマチンを導入すると DNA が高効率で複製される。この *in vitro* DNA 複製系は、Blow と Laskey により確立された (Blow and Laskey, 1986)。アフリカツメガエルの複製因子はヒトの複製因子とも相同性が高く、ORC を含むいくつかのヒトの複製因子がこの系で機能することが知られており (Vashee *et al.*, 2003)、この *in vitro* 系で見られる複製メカニズムは、ヒトの複製メカニズムと共通していると推察されている。この *in vitro* DNA 複製系では、複製反応後から鋳型回収までに 5 分程度がかかるが、pre-RC は反応開始から数分程度で形成されると考えられており、各 pre-RC 形成タンパクの挙動を初期段階から継時的に解析するのが難しいという課題点がある。

そこで私はこの課題点を克服するため、環状 plasmid を magnetic beads に固定したものを鋳型として用い、反応後、迅速に磁石で鋳型を回収できるよう工夫をほどこすことにした。本章では、環状 plasmid 固定化 beads をアフリカツメガエル卵抽出液とインキュベーションした際に検出される DNA 合成が、真正の DNA 複製を反映するものであることを複数の検証実験で確認した。

第2節 材料と方法

Plasmid DNA の作製

本研究では、plasmid DNA (以下、plasmid と記載) として pG5λ6.6 (11 kb)、pKS-EX (5 kb)、pEXλ6.6 (12 kb)、pBluescript SK (-) (3 kb) (Stratagene) を使用した。pG5λ6.6 は pGEM-7Zf (+) (Promega) に Gal4 結合配列、アデノウイルスの major late プロモーター、λDNA/HindIII 断片 6.6 kb を挿入して構築した。pKS-EX は pBluescript KS に Epstein-Barr ウイルス ori P 配列 2.2 kb を挿入して構築した (東京医科歯科大 白形正樹先生より分与)。pEXλ6.6 は、pKS-EX に λDNA の HindIII 断片 (6.6 kb) を挿入して構築した。これらの plasmid は Genopure plasmid kit (Roche) を用いて調製した。

Plasmid の biotin 化と plasmid 固定化 beads の調製

1) 環状 plasmid の biotin 化

環状 plasmid は photoprobe (S-S) biotin (Vector Laboratories) を用いたフォトカップリングにより biotin 化された。なお、この光反応性 biotin 架橋化合物にはリンカーアーム内に還元剤によって切断可能なジスルフィド結合が含まれている。biotin 化処理は取扱い説明書に従って実施した。簡単に述べると、100 μg の plasmid に 0.5 μg の photoprobe (S-S) biotin を添加し、365 nm UV ランプ (8W) を 10 分間照射した。その後、反応液と等量の 0.1 M Tris-HCl (pH9.5) を添加し、さらに 2-ブタノールを加えて抽出処理を行った (この操作により、フリー体の biotin を除去)。Biotin 化した plasmid はエタノール沈殿して精製し、plasmid 固定化 beads の調製に用いた。

2) 直鎖状 plasmid の biotin 化

Biotin 化直鎖状 pG5λ6.6 は、次のように調製した。環状 plasmid を SacI で切断し、100 μM biotin-16-dUTP (Roche) および 200 μM dATPαS (GE Healthcare Bio-Sciences) 存在下で T4 DNA ポリメラーゼによるヌクレオチド交換反応を行い、biotin-16-dUMP を片方の plasmid 末端に、dAMPαS をもう片方の plasmid 末端に付加することで調製した。Biotin 化直鎖状 pEXλ6.6 については、環状 plasmid を KpnI 切断し、biotin-16-dUTP と dCTP 存在下での T4 DNA ポリメラーゼによる交換反応により調製した。両 biotin 化直鎖状 plasmid も、環状 plasmid と同様の操作で精製した後、以下に述べる plasmid 固定化 beads の調製に用いた。

3) plasmid 固定化 beads の調製法

Biotin 化 plasmid は、Dynabeads kilobase BINDER kit (DynaL Biotech) の取扱説明書に従い、60 ng 以下の plasmid DNA と 10 μg streptavidin-Dynabeads M-280 (DynaL Biotech) を混ぜ、ローテーターを用いて室温で 3 時間程度反応させて結合させた。

ウエスタンブロット用抗体

抗アフリカツメガエル ORC1 および ORC2 抗体は、大腸菌で発現させたヒスチジンタグ付き組換えタンパク質をウサギに免疫して取得した。ウサギ由来の抗アフリカツメガエル MCM3、MCM6、CDC45 抗体は大阪大学 滝澤温彦先生より、ウサギ由来の抗 CDC6、RPA 抗体は Harvard Medical School Dr. Johannes Walter より、ウサギ由来の抗 RCC1 抗体は九州大学 西谷秀男先生より分与、マウス由来の抗 PCNA 抗体 (PC10) はシグマ社より購入した。ウサギ由来の抗アフリカツメガエル Pola p180、Pola p70、

Pol δ p125、Pole p60 抗体の入手先は論文 (Fukui *et al.*, 2004) に記載したとおりである。

組換えタンパク質の調製 (アフリカツメガエル *geminin* および p21 タンパク質)

ヒスチジンタグ付きアフリカツメガエル *geminin* (N 末端側領域の一部を切除) は大腸菌で発現させ、Nickel-charged Chelating Sepharose column chromatography (GE Healthcare Bio-Sciences) で精製した。Glutathione S-transferase 融合 p21 タンパク質 (GST-p21) は大腸菌で発現させ、glutathione-Sepharose column chromatography (GE Healthcare Bio-Sciences) で精製した。

アフリカツメガエル卵抽出液 (LSS : Low speed supernatant) の調製

1) 通常の LSS 調製方法

ヒト絨毛性ゴナトトロピン (日本全薬工業、コリホルモン) (500 U/匹) をメスのアフリカツメガエルに注射し、一晩放置して未受精卵を産卵させた。集めた卵について 2% (w/v) システインで脱ゼリー化を行った。その後、室温において (1 x) MMR (0.1 M NaCl, 5 mM HEPES-KOH [pH7.7], 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA) で 3 回卵を洗い、シャーレに卵を移し、終濃度 0.5 μ g/mL の calcium ionophore (A23187) を加えて 5 分程度反応させ、卵を M 期 (第二減数分裂中期) から S 期に移行させた (卵の活性化処理)。その後、氷冷した XB buffer (0.1 M KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH [pH7.7]) で 5 回洗った。活性化させた卵は、あらかじめ XB buffer (各 10 μ g/mL aprotinin, leupeptin, chymostatin および 100 μ g/mL cytochalasin B を含む) 1 mL を入れておいた SW55 チューブ (Beckman) に移し、170 g、1 分間で遠心して卵をパックした後、できるだけ buffer を除いた。そして、cycloheximide を終濃度 100 μ g/mL で加えた後、SW55Ti ローター

(Beckman) にセットして 13,500 g、15 分間、4°C 設定で遠心した (crushing spin)。遠心後、細胞質画分を別チューブに移し、さらに cycloheximide を終濃度 250 µg/mL になるよう加えて良く混ぜ、再度、上記条件で遠心した (clarifying spin)。この遠心で得られたクリアな卵抽出液画分に各 10 µg/mL cytochalasin B、aprotinin、leupeptin および chymostatin を添加したものを LSS とし、すぐに各実験に使用した。

2) その他の LSS 調製法 (核膜成分除去 LSS、PEG-B、ORC-depleted LSS)

核膜成分を部分的に除去した LSS は、上記 LSS 調製段階の clarifying spin をさらに 84,500 g、15 分間、4°C で遠心することで取得した。ORC を含むタンパク質画分 PEG-B は、Chong らの研究 (Chong *et al.*, 1997) を参考に LSS 画分から調製し、buffer LFB1/50 mM KCL で透析して調製した。ORC-depleted LSS は、抗 ORC1 抗体と抗 ORC2 抗体を固定した Protein A-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences) で LSS を 2 回処理して調製した。この抗体固定化樹脂による ORC 除去反応は 1 回あたり 30 分間かけて実施した。

Plasmid 固定化 beads を鋳型とした *in vitro* DNA 複製解析

実験中において、plasmid 固定化 beads を失わないよう細心の注意を払った。特に、LSS インキュベーション後の plasmid 固定化 beads は、マイクロピペットチップで懸濁すると beads がチップに吸着して回収不能となり、正確な結果が得られないため、洗浄操作にはピペットマンは使用せず、タッピングで洗浄した。

1) ³²P ラベル DNA 複製産物の解析

40 µg の plasmid 固定化 beads (240 ng plasmid in 4 µL) を 0.002% NP-40 入り XB buffer (wash buffer) 100 µL で 1 回洗浄した後、LSS 25 µL (0.002% NP-40、ATP-

regenerating system [20 mM creatine phosphate、2 mM ATP、6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ creatine phosphokinase]、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP 0.1 μL [37 kBq] [110 tBq/mmol; GE Healthcare Bio-Science]を含む) に懸濁し、時々穏やかに攪拌して 23°C で 3 時間もしくは 6 時間インキュベーションした。反応後、wash buffer 150 μL を加えて希釈し、beads はマグネット台を使ってできるだけ速やかに分離し、上清を全て取り除いた。さらに wash buffer 100 μL で plasmid 固定化 beads を 3 回洗浄後、DNA 解離反応液 (25 mM Tri-HCl [pH7.5]、7 mM EDTA、0.7% SDS、50 mM DTT、1 mg/mL proteinase K) 100 μL に懸濁し、37°C で 2 時間反応させた。この操作により、biotin リンカーアーム内のジスルフィド結合を切断し、plasmid 固定化 beads から plasmid を遊離させた。反応後、マグネット台を使って beads を分離し、回収した溶液 (DNA を含む) からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により DNA を精製した。精製した DNA は 0.8% アガロースゲル電気泳動 (Tris/acetate/EDTA buffer) で分離し、泳動後にゲルを 10% メタノール、10% 酢酸で 30 分間固定、さらに水で 30 分間洗浄した。その後、Whatman 3MM paper 上でゲルを乾燥させた後、イメージ解析装置 Image analyzer (BAS, Fuji Film) で解析した。複製産物の放射活性量は、Multi Gauge software (version 3.0, Fuji Film) で定量した。

2) 複製因子のクロマチン結合解析

40 μg の plasmid 固定化 beads (240 ng plasmid in 4 μL) を wash buffer 100 μL で 1 回洗浄した後、LSS 25 μL (0.002% NP-40、ATP-regenerating system [20 mM creatine phosphate、2 mM ATP、6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ creatine phosphokinase]を含む) に懸濁し、時々穏やかに攪拌して 23°C で継時的にインキュベーションした。反応後、wash buffer 150 μL で希釈し、plasmid 固定化 beads はマグネット台を使ってできるだけ速やかに分離し、上清を全て取り除いた。さらに wash buffer 100 μL で plasmid 固定化

beads を 3 回洗浄後、SDS sample buffer に懸濁して 100℃で 3 分間処理して SDS-PAGE でタンパク質を分離した。泳動後、ゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、各複製因子に対する抗体を反応させた。ウエスタンブロット法による検出には、Chemi-Lumi One detection kit (ナカライテスク) を使用した。

第3節 結果

直鎖状および環状 plasmid 固定化 beads の鋳型としての妥当性検討

DNA 複製研究において、塩基配列の決まっている plasmid を鋳型とした *in vitro* DNA 複製系は詳細な解析に有効である。しかし plasmid の複製効率は、従来用いられているアフリカツメガエル精子クロマチンを鋳型とした場合と比べて極端に低い (Blow and Laskey, 1986)。一方、plasmid を beads に固定化させると複製効率が上がること (Crowe and Barton, 1999)、直鎖状 plasmid を paramagnetic beads に固定して LSS 中でインキュベーションすると、beads が核膜に覆われ、DNA 合成が起こること (Heald *et al.*, 1996; Crowe and Barton, 1999) が報告されている。ところが、この条件下での DNA 複製メカニズムの詳細な解析はされてこなかった。そこで私は、より詳細な DNA 複製メカニズム解析ができる、新規 *in vitro* DNA 複製系の構築を目指し、研究を開始した。

まず、ランダムに biotin 化した環状 plasmid、および末端をビオチン化した直鎖状 plasmid を streptavidin-coated magnetic beads (streptavidin-Dynabeads M-280) に固定させたものを作製し、それらが鋳型として適切かどうかを検討した。なお、この検討には複数種類の plasmid を使用した。

Figure 2-1 A では、超らせん型の biotin 化環状 plasmid が、beads に固定させた後も DNA がきちんと元の形態を保っているかどうかを確認した。超らせん型環状 plasmid は I、ニックが入り弛緩した環状 plasmid は II の位置にバンドが検出されるが、beads への結合前後で plasmid の形態は変わらず、どちらも I (超らせん型) がメインであることが電気泳動法で示された。すなわち、beads に固定した後も環状 plasmid は超らせん型を保っていることが示された。

次に、環状 plasmid および直鎖状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした際、真正の DNA 複製が行われるかどうかを調べるため、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ と ATP-regenerating system を加えた LSS 内で各鋳型を 3 時間あるいは 6 時間インキュベーションした。その後、 ^{32}P 標識された DNA 合成産物をアガロースゲルで分離し、オートラジオグラフィーで解析した。この操作により、いずれを鋳型とした場合も ^{32}P ラベル DNA 合成産物が検出されることが確認された (Figure 2-1 B, lanes 1-2 および lanes 5-6)。なお、本実験で複製産物のバンドが複数検出されたが、I は超らせん型、II はニックが入り弛緩した環状 plasmid、III は直鎖状 plasmid を示している。

検出された標識 DNA 合成産物が、DNA 複製に由来するものであるかを確認するため、私は DNA 複製に必須な因子の一つである MCM2-7 複合体の DNA loading を阻害し、pre-RC 形成を抑制する geminin を添加して同様の実験を行った。その結果、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした場合は、geminin の添加によって DNA 合成産物量が顕著に低下することが示された (Figure 2-1 B, lanes 7-8)。すなわち、この際に得られた DNA 合成産物は、pre-RC 形成に依存した DNA 複製由来の産物であることが示唆された。

一方、直鎖状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした際の DNA 合成産物は、geminin の影響をほとんど受けなかった (Figure 2-1 B, lanes 3-4)。LSS を用いた *in vitro* DNA 複製系において、鋳型として広く使われているアフリカツメガエル精子クロマチンでは、同程度の geminin 存在下で DNA 複製が強く阻害されることが確認されたことから (data not shown)、添加した geminin 量が十分ではなかったとは考えにくい。すなわち、直鎖状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした際は、pre-RC 形成には依存しない DNA 合成が起こったことを示唆している。以上の結果より、同じ plasmid を固定化した beads であっても、plasmid の形状によって LSS の中で行われる DNA 合成の様式は

異なり、環状 plasmid を使用した時に、pre-RC 形成に依存した DNA 複製が行われることが示唆された。

さらに、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型にした場合の DNA 合成が DNA 複製に由来するものであることを確かめるため、pre-RC 活性化に必須である CDK のキナーゼ活性を阻害する p21 タンパク質を LSS に添加して同様の実験を行った。この際、Figure 2-1 B で用いた環状 pEXλ6.6 (11 kb) 固定化 beads に加え、環状 pKS-EX (5 kb) 固定化 beads も鋳型として用いた。その結果、いずれの環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした場合でも、p21 タンパク質添加により ³²P ラベルされた DNA 合成産物量は検出限界以下にまで抑制された (Figure 2-1 C)。すなわち、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした場合、LSS の中で CDK 依存的な DNA 複製が行われることが示唆された。

以上の結果から、LSS を用いた *in vitro* DNA 複製系では、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした時に pre-RC 形成依存的、CDK 依存的な真正の DNA 複製が起こっていると考えられる。よって以後の実験では、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型として、より詳細な解析を実施することにした。

環状 plasmid 固定化 beads を用いた継時的な DNA 複製産物の解析

次に、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした際、どのくらいのタイムスパンで DNA 複製が起こるのかを調べることにした。その検証実験として、環状 pG5λ6.6 固定化 beads を鋳型として LSS 中でインキュベーションし、³²P ラベル DNA 合成産物量の変化を継時的に観察した (Figure 2-2)。この際、インキュベーション開始後 30 分から 2 時間程度の間は、ほとんどバックグラウンドと変わらない程度の検出レベルであったが (Figure 2-2 A, lanes 1-3)、それ以降は急激に ³²P ラベル DNA 合成産物が増加することが明らかになった (Figure 2-2 A, lanes 4-7)。また、6 時間以上インキュベーションしても、それ以上に DNA 合成産物量は増えなかったことから (data not shown)、6 時

間でほぼ全ての DNA 複製が完了していると推察された。一方、この複製系に *geminin* を添加して 6 時間インキュベーションすると、Figure 2-1 B と同様、 ^{32}P ラベル DNA 合成産物量は大幅に減少することが確認された (Figure 2-2 A, lane 8)。すなわち、本実験で得られた ^{32}P ラベル DNA 合成産物は、pre-RC 形成依存的な DNA 複製によるものであることが改めて示された。

Figure 2-2 A で得られた ^{32}P ラベル DNA 合成産物量を定量し、グラフ化したものが Figure 2-2 B である。このグラフにおいても、インキュベーション開始から 2 時間程度は、ほとんど DNA 合成産物は得られておらず、3 時間以降から急激に増加し、6 時間でほぼ飽和していることが改めて示された。なお、plasmid 固定化 beads を鋳型とした際に得られた DNA 合成産物を BrdU でラベルし、CsCl 密度勾配遠心法による解析を実施したが、その実験において、DNA が半保存的に複製されていることも確認された (data not shown)。

環状 plasmid 固定化 beads に対する DNA 複製関連タンパク質結合の継時的解析

環状 plasmid 固定化 beads を鋳型として用いる利点として、LSS 中の beads を磁石で寄せ集めることにより、plasmid へ結合した DNA 複製関連タンパク質を容易にかつ迅速に分離して解析できることが挙げられる。これにより、従来鋳型として使用されてきた精子クロマチンでは解析できなかつた、より初期の DNA 複製プロセスを明らかにできる可能性があると考えた。そこで、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした *in vitro* DNA 複製系において、真正の DNA 複製が起こっているかどうか、また DNA 複製関連タンパク質が鋳型にリクルートされてくるかどうか、継時的に解析することにした。

1) Pre-RC 形成における ORC の重要性

まず、環状 plasmid 固定化 beads を用いて LSS 中でインキュベーションした際、従来から言われているとおり、DNA 複製開始点認識複合体 ORC に依存する形で pre-RC が形成されるかどうかを調べた (Figure 2-3 A)。この検証実験では、環状 pBluescript 固定化 beads を鋳型とし、各種 LSS 中で 30 分間インキュベーションした後、鋳型に結合したタンパク質をウエスタンブロット法で解析した。その結果、mock-depleted LSS を用いた場合は、インキュベーション開始から 30 分以内に ORC2 と MCM3 が鋳型へ結合することが確認された (Figure 2-3 A, lane 1)。しかし、あらかじめ ORC を deplete した LSS を用いた場合は、ORC2 も MCM3 も plasmid に結合していないことが明らかになった (Figure 2-3 A, lane 2)。一方、この ORC-depleted LSS に ORC を含むタンパク質画分 PEG-B を添加すると、ORC2 と MCM3 の plasmid への結合が認められた (Figure 2-3 A, lane 3)。これらの結果は、ORC が pre-RC 形成に必須であり、ORC の存在なくして MCM2-7 複合体が DNA に結合できない、という従来の説と一致しており、この新規 *in vitro* DNA 複製系でも真正の pre-RC 形成が行われることを示唆している。

2) 各種 DNA 複製関連タンパク質の plasmid への結合の解析

次に、もう少し解析する時間範囲を広げ、真正 pre-RC 形成から DNA 複製がほぼ完了する 6 時間インキュベーションの間において、pre-RC 形成タンパク質 ORC や MCM3 に加え、複製フォーク形成タンパク質である CDC45、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA、各種 DNA ポリメラーゼ (Pola、Pol δ 、Pol ϵ)、および Pol δ のコファクターである PCNA についての継時的な解析を行った。また、クロマチン形成の指標として、クロマチン結合タンパク質である RCC1 を調べた (Figure 2-3 B)。この検証実験では、環状 pG5 λ 6.6 固定化 beads を鋳型として用いた。その結果、ORC1 と MCM3 の結合量はインキュベ

ーション開始から 30 分で飽和すること、ORC1 はその後、徐々に鋳型から解離する傾向があることが明らかになった (Figure 2-3 B, lanes 2-8)。また、クロマチン結合タンパク質である RCC1 もインキュベーション開始から 30 分後には検出された。一方、DNA 複製フォーク形成に必要とされる CDC45、RPA、DNA ポリメラーゼ、PCNA はインキュベーション 2~3 時間後から結合が認められ、pre-RC 形成タンパク質とは鋳型へリクルートされるタイミングに差があることが確認された。さらに、これらの DNA 複製フォーク形成タンパク質が DNA にリクルートされるタイミングは、Figure 2-2 で示した DNA 合成産物が検出され始めるタイミングと一致していた。なお、plasmid を固定化していない beads を LSS と 6 時間インキュベーションしても各タンパク質は検出されなかった (Figure 2-3, lane 1) ことから、本実験で検出された各タンパク質は beads ではなく、鋳型 DNA に結合したものであることが示された。

また、この *in vitro* DNA 複製系に、pre-RC 活性化を阻害する p21 タンパク質を添加すると、G1 期にリクルートされる ORC1 や MCM3 の結合量にはほとんど影響は見られないが、S 期移行後にリクルートされる CDC45、RPA、DNA ポリメラーゼ、PCNA については、鋳型への結合量が減少することが確認された (Figure 2-3 B, lanes 9-15)。これらの結果は、この新規 *in vitro* DNA 複製系でも、pre-RC 形成後、CDK 依存的な仕組みで pre-RC 活性化が起こってから複製フォークが形成され、DNA が合成されるという本来の順番で、DNA 複製の一連のプロセスが進行していることを改めて示唆している。その上で、Figure 2-3 で得られた結果は、この新規 *in vitro* DNA 複製系を用いて生化学的な DNA 複製メカニズム解析を行うことの妥当性を示す、重要なデータと考えられる。

3) DNA 複製における核形成の重要性

ところで、この新規 *in vitro* DNA 複製系では pre-RC 形成と DNA 合成産物検出に 2 時間程度のタイムラグが認められているが、その要因の一つとして、beads の周囲に核膜を形成する時間を要している可能性が挙げられる。この仮説を検証するため、私は通常の LSS と、遠心分離により核膜成分を部分的に除去した LSS を用いて、DNA 複製関連タンパク質が鋳型へリクルートされるタイミングおよび鋳型への結合量をウエスタンブロット法で比較解析した。その結果、どちらの LSS を用いた場合も、pre-RC 形成因子 ORC1、MCM3 およびクロマチン結合タンパク質 RCC1 については、plasmid へリクルートされるタイミングおよび結合量に大きな差は認められなかった (Figure 2-4 A)。一方、核膜形成後にリクルートされることが知られる DNA 複製フォーク形成タンパク質 Polα と PCNA の鋳型への結合量は、通常の LSS (Figure 2-4 A, lanes 2-6) と比較して、核膜成分を部分的に除去した LSS を用いた場合に明確に減少した (Figure 2-4 A, lanes 8-12)。なお、それぞれの LSS に含まれる Polα と PCNA の量はほぼ同等であることが確認されている (Figure 2-4 A, lane 1 および lane 7)。以上のことから、精子クロマチンを鋳型として用いた *in vitro* DNA 複製系で考えられているように、核膜形成が阻害されると、複製フォーク形成に関わるタンパク質の一部が核内に十分なレベルにまで濃縮されないために、複製フォークが形成されないことが示唆された。

核形成の重要性をさらに確かめるため、核膜孔を介した核内輸送を阻害することが知られている WGA (**w**heat **g**erm **a**gglutinin) というレクチンを LSS に添加した際の各タンパク質の鋳型への結合量を比較した (Figure 2-4 B)。その結果、WGA 未添加 (-) (lanes 1-2) / 添加 (+) (lanes 3-4) に関わらず、鋳型への ORC2、MCM3、RCC1 結合量は同程度検出された。すなわち、pre-RC 形成とクロマチン形成は、核内輸送に依存せずに起こることが示唆された。一方、RPA や PCNA は WGA 添加 (+) でほとん

ど検出されなくなった (Figure 2-4 B, lanes 3-4)。これらの結果から、DNA 複製フォーク形成タンパク質の鋳型への結合には、核膜形成および核内へのタンパク質輸送が必要であることが強く示唆された。

環状および直鎖状 plasmid 固定化 beads における pre-RC 形成タンパク質の結合比較

Figure 2-1 で示したとおり、直鎖状 plasmid では geminin 添加により DNA 合成が阻害されず、pre-RC 非依存的な DNA 合成が認められた。そのため、これまでの解析において、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型として用いてきた。しかし、pre-RC 形成自体は、直鎖状 DNA を用いても正常に起こることが報告されている (Edwards *et al.*, 2002)。そこで、直鎖状 plasmid 固定化 beads を鋳型として用いた際の pre-RC 形成について詳細を解析することにした。本実験では、環状の pG5λ6.6 (11 kb) もしくは pBluescript (3 kb)、およびそれらを直鎖状にしたものを magnetic beads に固定したものを鋳型として使用した (Figure 2-5 A)。解析の結果、いずれを鋳型とした際も、geminin 添加 (+) LSS 中に 30 分間インキュベーションした場合、geminin 未添加 (-) LSS を用いた場合と比較して、ORC1、CDC6 結合量は増加するが、一方で MCM3、MCM6 結合量は明確に減少することが明らかになった (Figure 2-5 B)。すなわち、環状 plasmid だけでなく直鎖状 plasmid でも geminin 添加による pre-RC 形成阻害が起こることが示された。これにより、直鎖状 plasmid を鋳型とした際に認められた ³²P ラベル DNA 合成産物は、pre-RC 形成に依存しない DNA 修復などによるものであると推測される。なお、geminin 添加による ORC1、CDC6 結合量の増加についての詳細な解析は、第 3 章で述べる。

ところで、geminin 未添加 (-) LSS において、直鎖状 plasmid を鋳型とした場合 (Figure 2-5 B, lane 3 および lane 7) は、環状 plasmid を鋳型とした場合 (Figure 2-5 B, lane 1 および lane 5) と比較して MCM3 および MCM6 結合量が少ない傾向が認

められた。この理由について私は、MCM2-7 複合体は DNA ヘリカーゼとして DNA 上を移動するため、直鎖状 plasmid では末端から MCM2-7 複合体が抜け落ちるのに対し、環状 plasmid ではそのようなことが起こらず、構造上、MCM2-7 複合体が安定的に結合できるからではないかと考え、さらに解析を進めることにした。具体的には、環状 pBluescript 固定化 beads を LSS 中で 30 分間インキュベーションした後、DNA を XbaI 処理 (+) / 未処理 (-) し (Figure 2-5 C)、処理前後で pre-RC 形成タンパク質の plasmid への結合量に変化があるかどうかをウエスタンブロット法で調べた。その結果、インキュベーション後に XbaI 処理を 15 分あるいは 30 分間行った後の plasmid に対しても、未処理サンプルと同程度の ORC1、ORC2、MCM3、MCM6 が結合していることが明らかになった (Figure 2-5 D)。すなわち、直鎖状 plasmid では pre-RC 形成後、DNA に結合した MCM2-7 複合体が DNA 末端から抜け落ちて結合量が減少しているのではなく、そもそも pre-RC 形成効率が環状 plasmid を用いた時よりも低いことが示唆された。この解析結果より、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした場合の方が、生命現象をより効率的に、よりの確に示すことができることが改めて示された。

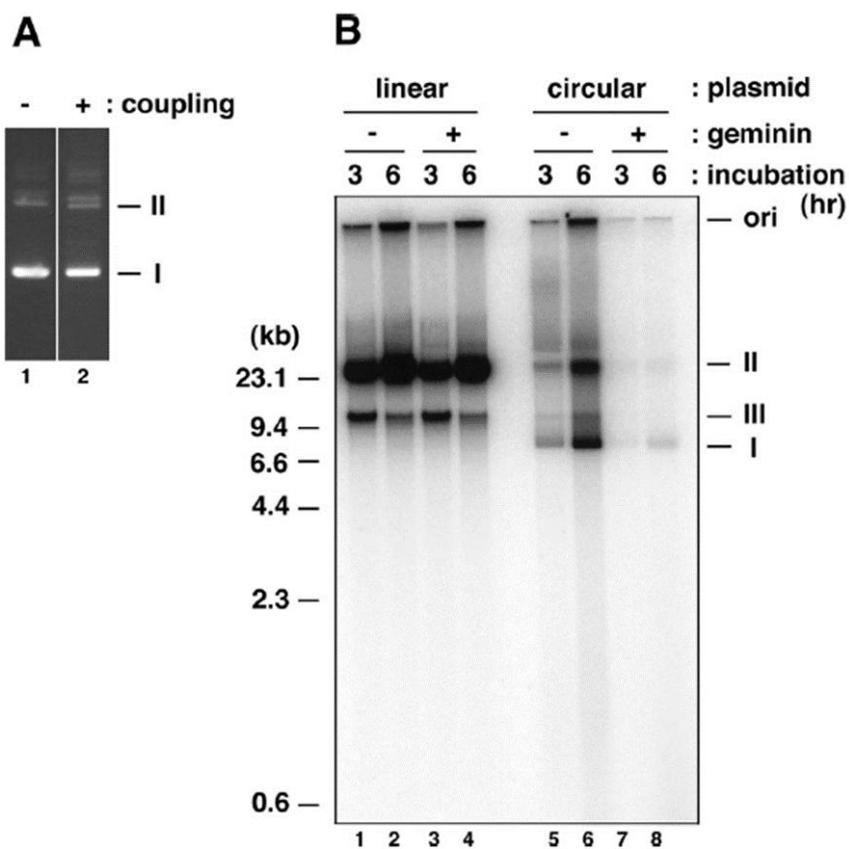


Figure 2-1 Plasmid 固定化 beads を LSS 内でインキュベーションした際の DNA 合成産物の解析

A : Beads 固定前の環状 pBluescript SK (lane 1) と beads 固定後に解離処理した pBluescript SK (lane 2) をアガロース電気泳動法で分離し、EtBr 染色した。

B : 直鎖状 pG5λ6.6 (lanes 1-4) もしくは環状 pG5λ6.6 (11 kb) (lanes 5-8) 固定化 beads を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を加えた LSS と 3 時間あるいは 6 時間インキュベーションした。

さらに、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geminin 添加 (+) LSS でも同様の操作を行い、未添加 (-) LSS を用いた場合と比較した。DNA 合成産物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、オートラジオグラフィ解析した。

I は超らせん型環状 plasmid、II はニック入り環状 plasmid、III は直鎖状 plasmid。

Lanes 1-4 では、鋳型として用いた plasmid の 2 倍量 (23 kb) の直鎖状複製産物が主要バンドとして検出され、II よりわずかに早く泳動された。(次ページに続く)

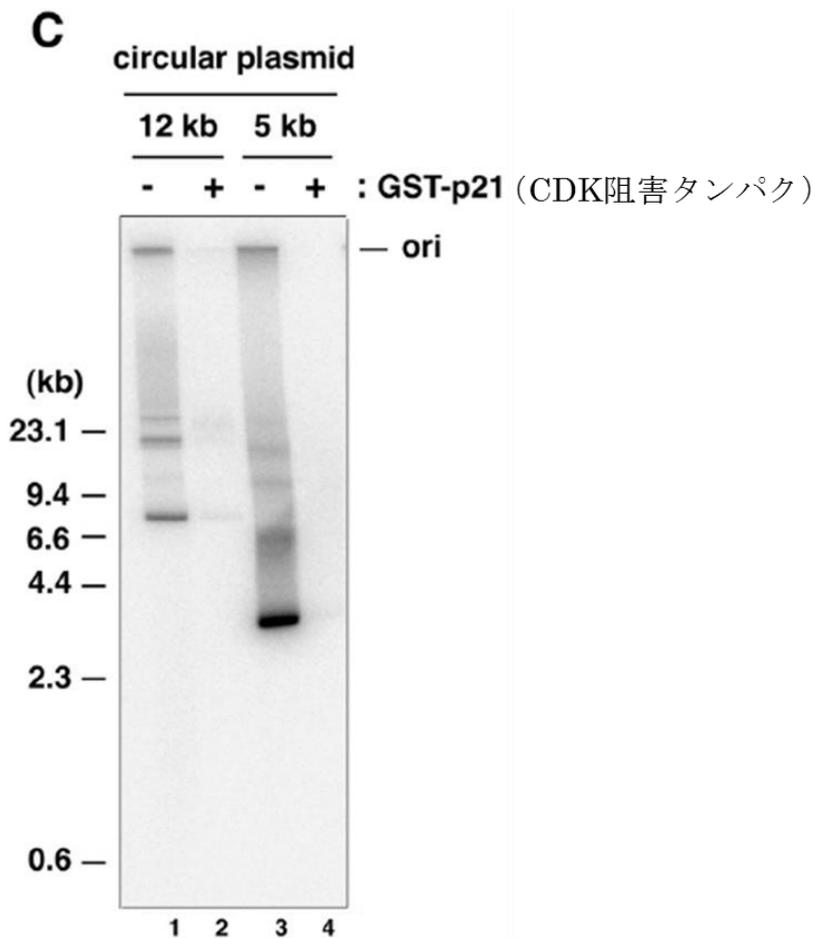
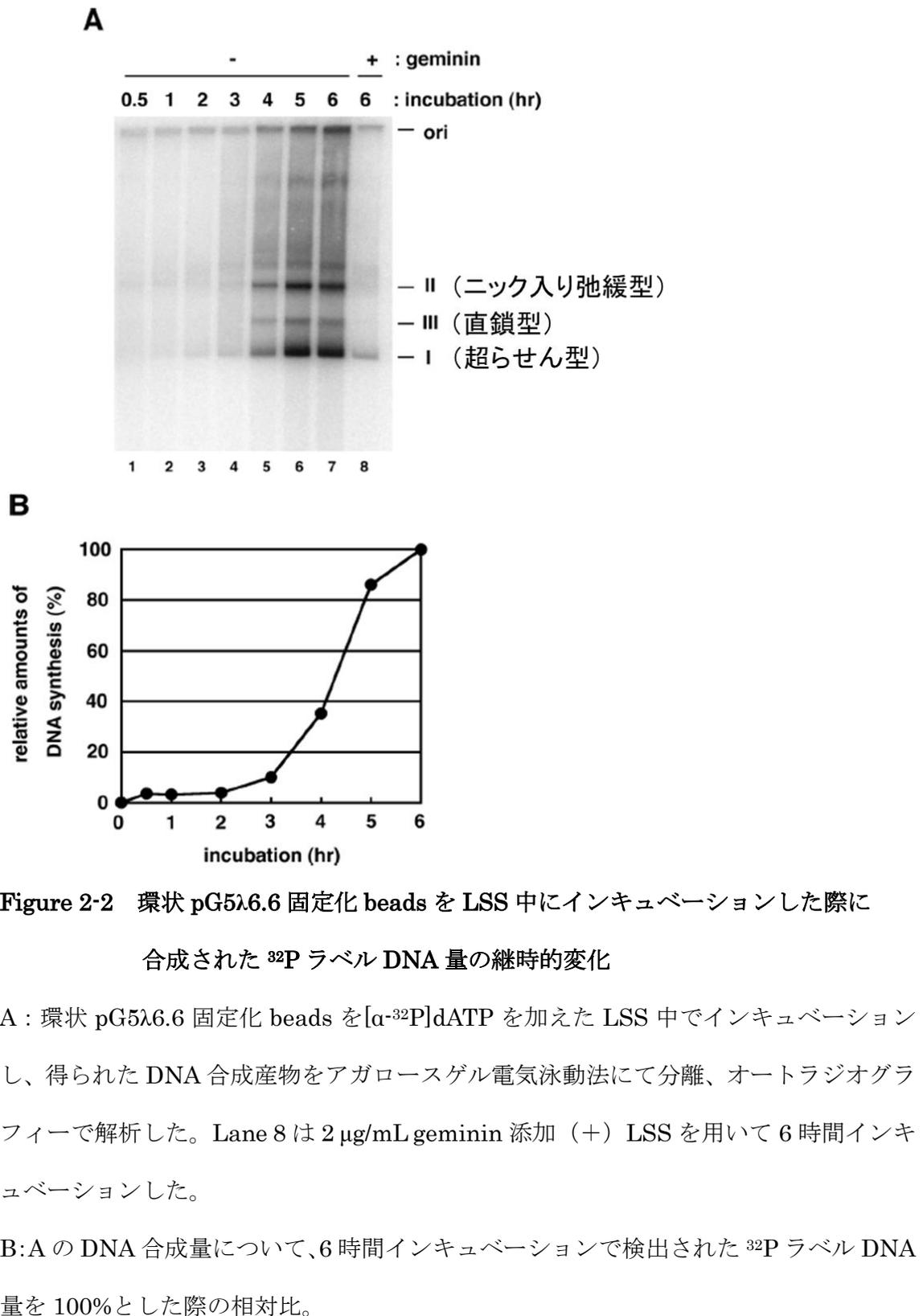


Figure 2-1 Plasmid 固定化 beads を LSS 内でインキュベーションした際の

DNA 合成産物の解析

C : 環状 pEXλ6.6 (12 kb) (lanes 1-2) もしくは環状 pKS-EX (5 kb) (lanes 3-4) 固定化 beads を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を加えた LSS と 4 時間インキュベーションした。さらに、pre-RC 活性化を阻害する 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GST-p21 タンパク質添加 (+) LSS でも同様の操作を行い、未添加 (-) LSS を用いた場合と比較した。DNA 合成産物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、オートラジオグラフィーで解析した。



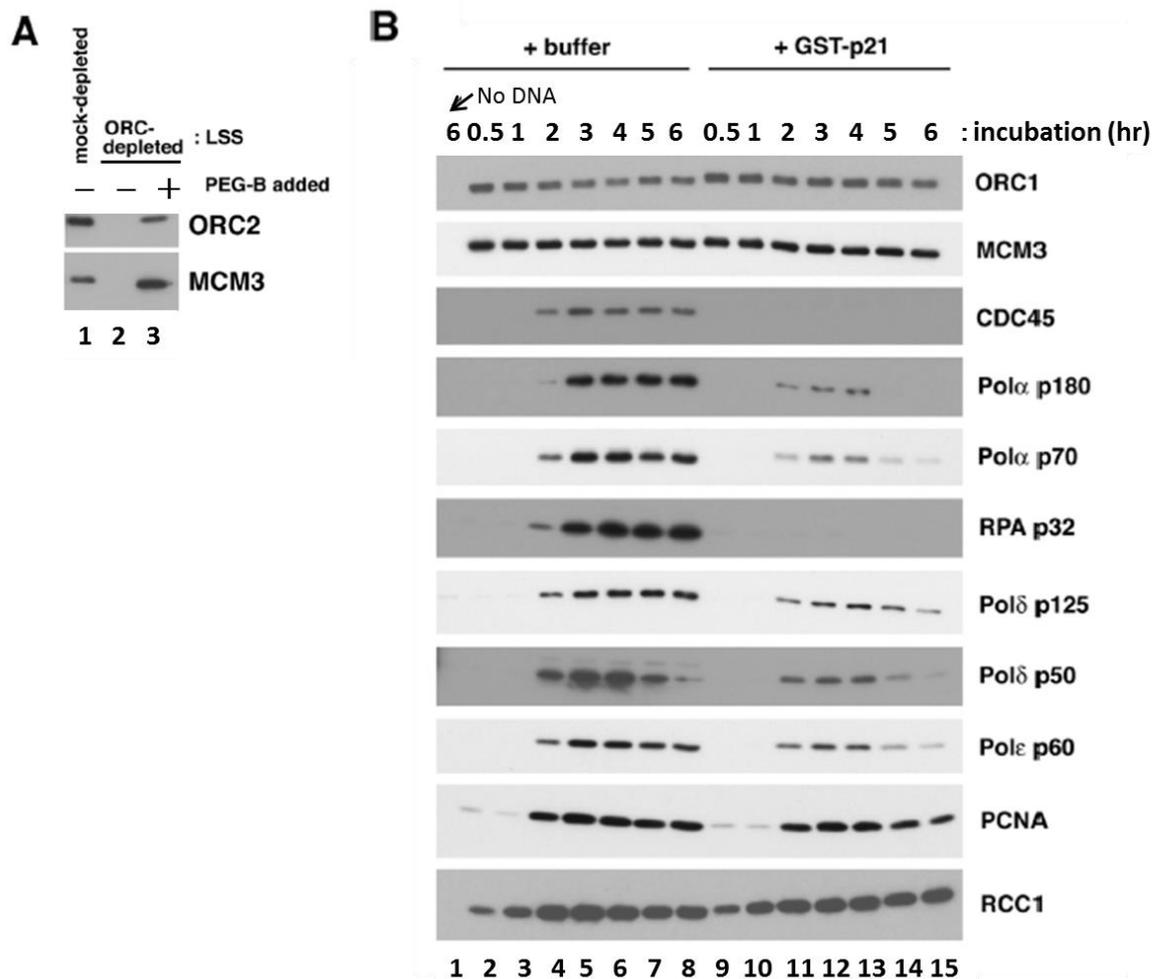


Figure 2-3 環状 plasmid 固定化 beads を LSS 中でインキュベーションした際に
 鋳型ヘリクルートされた DNA 複製関連タンパク質の解析

A: 環状 pBluescript 固定化 beads を mock-depleted LSS (lane 1)、ORC-depleted LSS (lane 2)、もしくは ORC-depleted LSS に ORC を含むタンパク質画分 PEG-B を添加したもの (lane 3) と 30 分間インキュベーションした際に、鋳型へ結合した ORC2 および MCM3 をウエスタンブロット法で検出した。

B: 環状 pG5λ6.6 固定化 beads もしくは beads 単体を、13 μg/mL GST-p21 タンパク質添加 (+) /非添加 (-) LSS 中でインキュベーションした際、鋳型ヘリクルートされた各タンパク質の継時的変化をウエスタンブロット法で検出した。

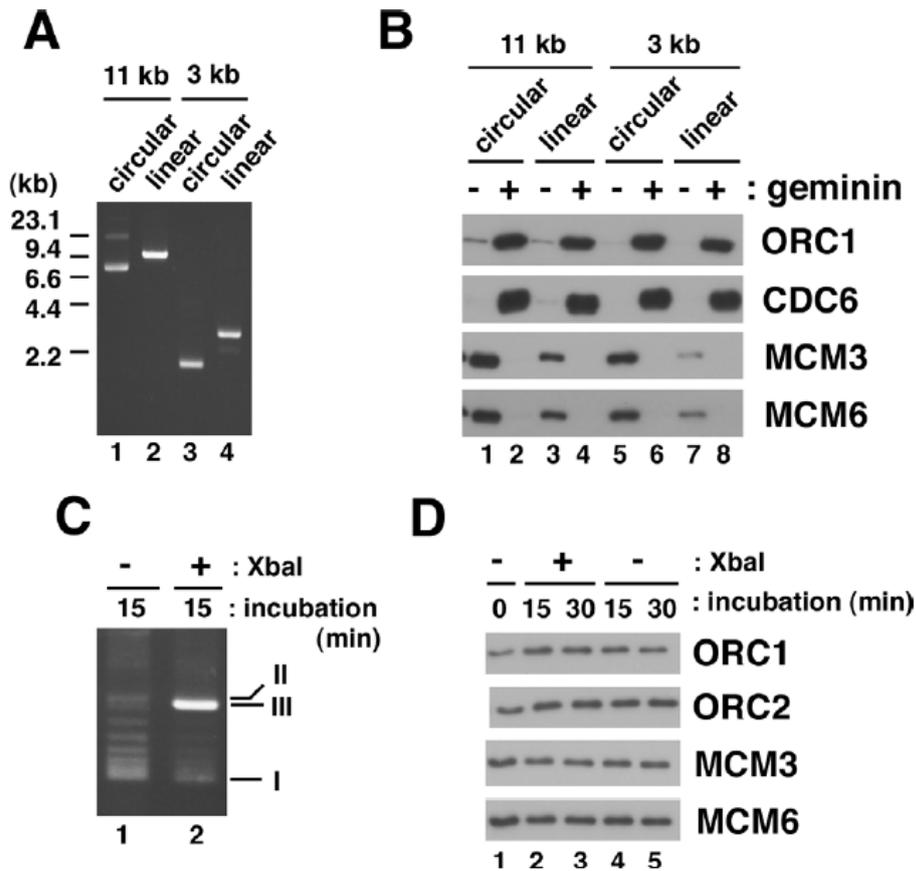


Figure 2-5 直鎖 plasmid 固定化 beads および環状 plasmid 固定化 beads における pre-RC 形成の比較

A : 環状 pG5λ6.6 (11 kb) もしくは環状 pBluescript (3 kb) を固定化した beads を制限酵素 XbaI で前処理したもの (lanes 2, 4)、もしくは制限酵素を含まない control buffer で前処理したもの (lanes 1, 3) から、それぞれ plasmid を解離・回収したものをアガロース電気泳動法で分離し、EtBr 染色で検出した。

B : A と同様の処理を行った鑄型を 2 μg/mL geminin 添加 (+) (lanes 2, 4, 6, 8) もしくは未添加 (-) (lanes 1, 3, 5, 7) LSS 中で 30 分間インキュベーションした際、鑄型ヘリクルートされた pre-RC 形成タンパク質をウエスタンブロット法で検出した。

C : 環状 pBluescript (3 kb) 固定化 beads を LSS 中で 30 分間インキュベーションした後、beads を単離し、さらに buffer で洗浄してから制限酵素 XbaI で 15 分間処理し

た (lane 2)。その後、beads から plasmid を回収し、アガロース電気泳動法で分離し、EtBr 染色で検出した。I は超らせん型、II はニック入り弛緩型、III は直鎖型 plasmid。

Lane 1 は、XbaI を含まない buffer で 15 分間処理したコントロール。

D : C と同様に LSS 中で 30 分間インキュベーション後、XbaI 処理を 15 分間もしくは 30 分間行った (lanes 2, 3)。その後、鋳型に結合した pre-RC 形成タンパク質をウエスタンブロット法で検出した。Lanes 4, 5 は、XbaI を含まない buffer で処理したコントロール。Lane 1 は、LSS 中で 30 分間インキュベーションした直後の鋳型サンプル。

第4節 考察

私は本章において、環状 plasmid および直鎖状 plasmid を magnetic beads に結合させたものを鋳型とした新規 *in vitro* DNA 複製系の構築を検討した。直鎖 plasmid 固定化 beads を鋳型として LSS 中でインキュベーションした場合、pre-RC 形成阻害タンパク質である geminin 添加により、鋳型への MCM3 および MCM6 の結合が阻害された (Figure 2-5 B) にも関わらず、DNA 合成が認められた (Figure 2-1)。これは、pre-RC に依存しない DNA 修復などによる DNA 合成が起こっており、そのプロセスの中で ³²P ラベルが取りこまれたものと推察される。そのため、直鎖 plasmid 固定化 beads を鋳型として DNA 複製メカニズムの詳細解析を行うことは不適と判断した。

一方で、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型として LSS 中でインキュベーションした際には、1) MCM3 は ORC 依存的に鋳型へ結合すること (Figure 2-3 A)、2) geminin や p21 タンパク質により DNA 合成が阻害され、pre-RC 形成および CDK 依存的な DNA 複製が起こっていること (Figure 2-1, Figure 2-2, Figure 2-3)、3) DNA 合成の開始 (Figure 2-2) と鋳型への複製フォーク形成タンパク質 (CDC45、RPA、各種 DNA ポリメラーゼ、PCNA) の結合タイミング (Figure 2-3 B) が一致し、p21 タンパク質添加により、これらのタンパク質結合が阻害されること、4) 鋳型への複製フォーク形成タンパク質結合および DNA 合成が機能的な核膜形成に依存していること (Figure 2-4)、5) 半保存的 DNA 複製が行われていること (data not shown) が確認された。また、DNA 合成の過程で、pre-RC 形成後の核膜形成および複製フォーク形成タンパク質の核内輸送が重要であることも示唆された (Figure 2-4)。DNA 合成の核膜形成およびタンパク質の核内輸送が重要であることは Walter らの報告とも一致する (Walter *et al.*, 1998)。以上のデータより環状 DNA 固定化 beads を鋳型とした場合には、真正の DNA 複製が起こることが示された。

ところで、環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした際、直鎖状 plasmid 固定化 beads よりも pre-RC が効率的に形成されることが示唆されたが (Figure 2-5)、その一方で、DNA と beads を biotin-streptavidin で結合させることが、DNA 複製プロセス、特に複製フォークの伸長プロセスに影響を与えるリスクも懸念された。例えば、複製フォークが biotin-streptavidin 結合部位に遭遇した際、伸長が滞るリスクは容易に想像できる。今回の研究で用いた各環状 plasmid において、plasmid 1 分子あたりに何箇所の biotin-streptavidin リンクが形成されているのか、私は全てを具体的に数値化することはできなかった。しかし、Figure 2-1 で示されたとおり、超らせん型の複製 DNA がはっきりと産生されており、少なくとも DNA 合成には大きな影響を与えない程度の挿入量 (plasmid 1 分子あたり biotin-streptavidin リンク 1 つ程度) であると考えられる。これらの状況を踏まえると、DNA 複製起点から両方向に伸長した二つの複製フォークは、それぞれどこかで biotin-streptavidin リンクに出くわすが、beads に直接結合していない DNA 鎖の方で DNA 複製を完全に完了し、閉環した超らせん型 plasmid が産生されると推察される。もし仮に、環状 plasmid の複数サイトに biotin-streptavidin リンクが入ってしまった場合、複製が容易に完了できず、また beads から plasmid を解離させる操作を実施しても、大半の plasmid が beads に結合したままになり、効率良く回収できない。そのため、このアッセイ系では biotin-streptavidin リンク挿入数のコントロールが、非常に重要と考えられる。

ところで、アフリカツメガエル精子クロマチンを用いて LSS 中で DNA 複製を行わせた場合、DNA 合成の進行とともに、クロマチンから MCM2-7 複合体が解離し、鋳型への MCM 結合量が減少することが知られている (Walter *et al.*, 1998)。しかし、今回構築した plasmid 固定化 beads を用いた *in vitro* DNA 複製系においては、DNA 複製がほぼ完了した 6 時間後においても、鋳型への MCM3 結合量の顕著な減少は認められなかった (Figure 2-3 B)。予備実験データにはなるが、この *in vitro* DNA 複製系にお

ける PCNA 量の定量結果から、plasmid 固定化 beads 上で形成された pre-RC はそのほとんどが活性化され、最終的には複製フォークが形成されていると推察される (data not shown)。しかしながら、LSS 中における plasmid 固定化 beads で形成された pre-RC の活性化が同調せず、長時間に渡ってバラバラに DNA 合成が開始・完了することから、ある一定のタイミングにおける MCM 量の劇的な減少が認められないのかもしれない。DNA 複製のタイミングが同調しない理由については、plasmid 固定化 beads 上で効率的に核膜構造が構成できていない、あるいは、核内に beads が存在することで、pre-RC 活性化タンパク質が効率的に集積しにくくなっている、などの可能性が考えられる。

Plasmid 固定化 beads を鋳型とした際の DNA 複製効率は、従来のアフリカツメガエル精子クロマチンを鋳型とした *in vitro* DNA 複製系よりも相対的に低い。しかしながら、私はこの plasmid 固定化 beads を用いた新規 *in vitro* DNA 複製系は、真核生物の DNA 複製、特に鋳型に結合した複製タンパク質の解析には有用であると考えている。Plasmid 固定化 beads を用いた *in vitro* DNA 複製系の最大の利点は、magnetic beads をつかうことで、鋳型を迅速かつ簡単に回収できることである。アフリカツメガエル精子クロマチンを鋳型とするよりも、より早い、より細かいタイミングでの鋳型の回収が可能となり、また比較的不安定なタンパク質-DNA 複合体も、その構造を壊さずに回収することが可能である。この利点を活かし、私はより詳細な pre-RC 形成メカニズムを解析することにした (第 3 章)。

第3章

真核生物における DNA 複製初期プロセスの解明

～multiple MCM loading モデルの提唱～

第1節 序論

第1章および第2章でも述べたとおり、DNA複製開始には ORC が必須であり、DNA に ORC が結合した後、さらに CDC6、CDT1、MCM2-7 複合体がリクルートされ pre-RC が形成される。臨床腫瘍および癌細胞株では、ORC、CDC6、CDT1、MCM2-7 複合体が正常細胞と比較して高発現しており、それらが DNA 再複製・ゲノム不安定化を誘発する要因の一つとなることが示唆されている。すなわち、DNA 複製機構が高度に制御されるためには、これらの DNA 複製関連タンパクの発現量や発現バランスが正しく保たれていることが重要と考えられる。

しかしその一方で、正常細胞においても MCM2-7 複合体と ORC が DNA 上で共局在せず、しかも ORC の数十倍程度の MCM2-7 複合体が DNA 上に散在して存在するように見える「MCM paradox」と称される一見矛盾する現象も認められている。出芽酵母を用いた免疫沈降法では、MCM2-7 複合体は複製開始点および複製フォークへ特異的に結合していることが示されている (Apericio *et al.*, 1997) が、ヒト細胞およびアフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* 解析では、クロマチン全体において、DNA 複製が開始する前から MCM2-7 複合体が散在していること (Madine *et al.*, 1995; Krude *et al.*, 1996; Dimitrova *et al.*, 1999)、また MCM 結合領域が DNA 複製領域と共局在していないこと (Krude *et al.*, 1996; Dimitrova *et al.*, 1999; Laskey and Madine, 2003) が報告されている。さらに、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* 解析では、DNA 複製が開始する前にクロマチンへ結合する MCM 量がモル比で ORC 結合量の 20~40 倍であることが示されている (Mahbubani *et al.*, 1997; Walter and Newport, 1997; Edwards *et al.*, 2002)。

高等真核生物でみられるこの MCM2-7 複合体の挙動は、MCM が単純な DNA へリカーゼとしてだけでなく、他にも何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

しかし未だに、どのようにして数多くの MCM2-7 複合体が、ヌクレオソームが存在する DNA 上に load できるのか、そしてどのようにして MCM2-7 複合体はクロマチンの広範囲にわたり散在するようになるのかは明らかになっていない。そこで私は本章において、第 2 章で確立した環状 plasmid 固定化 beads を鋳型とした新規 *in vitro* DNA 複製系を利用し、この「MCM paradox」の謎を解き明かすべく、DNA 複製初期プロセスである pre-RC 形成のメカニズムにフォーカスして詳細な解析を行うことにした。

第2節 材料と方法

Plasmid の作製

pG5λ6.6 (11 kb)、pBluescript SK (−)、pKS-EX は第2章 第2節で記載したとおりに準備し、鋳型として使用した。pBlueλ2.0 (5 kb) は pBluescript SK (−) (Stratagene) にファージλDNA の HindIII 断片 (2.0 kb) を挿入して構築した。pKSλ7.2 (10 kb) は pBluescript KS (−) の BamHI サイトにλDNA の BamHI 断片 (7.2 kb) を挿入して構築した。pEXλ6.6 (12 kb) は、pKS-EX の HindIII サイトにλDNA の HindIII 断片 (6.6 kb) を挿入して構築した。

Plasmid の biotin 化と plasmid 固定化 beads の調製

環状 plasmid は Photoprobe (S-S) biotin (Vector Laboratories) を用いたフォトカップリングにより、第2章 第2節で記載した手順で biotin 化し、−20°Cで保存した。Biotin 化 plasmid は、Dynabeads kilobase BINDER kit (DynaL Biotech) の取扱説明書に従い、60 ng 以下の plasmid と 10 μg streptavidin-Dynabeads M-280 (DynaL Biotech) を混ぜ、ローテーターを用いて室温で一晩反応させて結合させた。

各種 LSS の調製

LSS および ORC-depleted LSS は、第2章 第2節で記載した手順で調製した。MCM2-7 複合体を含むタンパク質画分 PEG-M は、過去の論文 (Chong *et al.*, 1997; Gillespie and Blow, 2000) を参考に調製した。

組換えタンパク質の作製 (アフリカツメガエル *geminin* および MCM2-7 複合体)

ヒスチジンタグ付きアフリカツメガエル *geminin* (N 末端の一部を除去) は第 2 章 第 2 節で記載した手順で調製した。N 末端にヒスチジンタグが付いたアフリカツメガエル MCM2 は論文 (Furukohri *et al.*, 2003) を参考に調製した。アフリカツメガエル卵抽出液からの MCM2-7 複合体の精製は、論文 (Kubota *et al.*, 1997; Oehlmann *et al.*, 2004) を参考に、抗 MCM2 抗体を用いて次のように精製した。抗 MCM2 抗体を Protein A-Sepharose beads に結合させたものを LSS と混合し、4°C で 1 時間インキュベーションした。Beads は LFB1 buffer (40 mM HEPES-KOH [pH8.0]、20 mM potassium phosphate [pH8.0]、2 mM MgCl₂、1 mM EGTA、10% sucrose、50 mM KCl) で 4 回洗浄した後、600 mM KCl 入り LFB1 buffer (4°C) で MCM2-7 複合体を溶出し、さらに LFB3 buffer (20 mM HEPES-KOH [pH8.0]、2 mM dithiothreitol、10% sucrose、10 mM KCl) で透析した。この画分に精製 MCM2-7 複合体を構成する 6 種全ての MCM subunit が含まれていることを、ウエスタンブロット法にて確認した (data not shown)。

Plasmid 固定化 beads を鋳型とした *in vitro* DNA 複製解析

実験中において、plasmid 固定化 beads を失わないよう細心の注意を払った。特に、LSS 中でのインキュベーション後の plasmid 固定化 beads は、マイクロピペットチップで懸濁すると beads がチップに吸着してしまい、正確な結果が得られないため、洗浄操作にはピペットマンは使用せず、タッピングで洗浄した。ウエスタンブロット法による DNA 複製タンパク質の結合解析は、第 2 章 第 2 節で記載した手順で実施した。

定量解析に使用する組換え ORC1 および ORC2 タンパク質は、大腸菌で発現させて精製した。組換え CDC6 および MCM2 タンパク質はバキュロウイルスで発現させて精製した。精製したタンパク質の定量は、BSA をコントロールとして使用して、SDS-PAGE/Coomassie Brilliant Blue staining 法で決定した。これらのタンパク質は、

plasmid 固定化 beads を用いた *in vitro* 系のウエスタンブロット解析で、定量用スタンダードとして使用された。

アフリカツメガエル精子クロマチンを鋳型とした *in vitro* 複製系でのタンパク質解析は、論文 (Furukohri *et al.*, 2003) を参照して実施した。

第3節 結果

新規 *in vitro* DNA 複製系の汎用性確認

1) pG5λ6.6 とそれ以外の plasmid における MCM 結合パターンの違い

私はまず、第2章で確立した新規 *in vitro* DNA 複製系の汎用性を確認するため、前章で主に使用した環状 pG5λ6.6 (11 kb) だけでなく、環状 pKS-EX (5 kb) および pBlueλ2.0 (5 kb) を固定化した beads も鋳型として用い、geminin による pre-RC 形成阻害が認められるかどうかを調べた。これらの plasmid を geminin 添加 (+) LSS と反応させた場合、いずれの plasmid 固定化 beads においても第2章 (Figure 2-5 B) で示された通り ORC および CDC6 結合量の増加が認められた (Figure 3-1 A)。しかし予想外にも、MCM3 および MCM6 の DNA 結合阻害が認められたのは pG5λ6.6 固定化 beads のみであり (Figure 3-1 A, lanes 1-6)、pKS-EX 固定化 beads (lanes 7-12) および pBlueλ2.0 固定化 beads (lanes 13-18) では、LSS に添加する geminin の濃度を上げてても MCM 結合量に大きな変化は認められなかった。この違いは、鋳型として用いた plasmid の鎖長の違いに起因する可能性があると考えられたため、私は pG5λ6.6 とほぼ同等の鎖長の環状 plasmid である pKSλ7.2 (10 kb)、pEXλ6.6 (12 kb) を beads に固定したものを鋳型として同様の実験を行った。しかし、いずれの plasmid 固定化 beads においても CDC6 結合量の増加は認められたが (Figure 3-1 B)、MCM 結合阻害が認められたのは pG5λ6.6 固定化 beads のみであり (Figure 3-1 B, lanes 1-6)、pKSλ7.2 固定化 beads (lanes 7-12) や pEXλ6.6 固定化 beads (lanes 13-18) では、LSS に添加する geminin の濃度を上げてても MCM3 および MCM6 結合量に変化は認められなかった。なお、いずれの plasmid においても geminin 存在下での DNA 合成は阻害されており (data not shown)、この際に認められた MCM loading は DNA 合成に関与しないものと推察される。この実験により、MCM loading には、これまでに知

られていないプロセスが存在する可能性が示唆されたことから、この現象が起こるメカニズムについて、さらに詳しく解析を調べることにした。

2) Geminin 添加 (+) /未添加 (-) LSS 中における鑄型への MCM 結合力の比較

Geminin を添加しても MCM loading が阻害されない現象に関して、さらに解析を進めていく中で、私は plasmid 固定化 beads を洗浄する wash buffer の温度の違いにより plasmid への MCM 結合量に差が生じる、という現象を見出した。具体的には、室温で洗浄した場合は、geminin 添加により MCM3 および MCM6 結合量は顕著に減少した (Figure 3-2, lanes 3-4)。ところが、氷冷 wash buffer (0°C、室温より洗浄力が弱い条件) を用いた場合は、geminin を添加しても plasmid への MCM3、MCM6 結合量はほとんど減少しなかった (Figure 3-2, lanes 1-2)。この結果は、geminin 添加 (+) LSS 中で plasmid に load された MCM2-7 複合体の結合が geminin 未添加 (-) LSS 中での pre-RC 形成とは異なる様式であり、pre-RC 形成時よりも結合力が弱い可能性を示唆する。

そこで次に、wash buffer に終濃度が 0.25%になるよう Triton X-100 を加えた Triton X-100 添加 (+) wash buffer (0°Cあるいは 23°C、より洗浄力が強い条件) を用いて、plasmid 固定化 beads の洗浄操作を行った。すると、geminin 添加 (+) LSS と plasmid 固定化 beads を混合してインキュベーションしたサンプルでは、0°C、23°Cいずれの洗浄条件下においても、ORC1、ORC2、CDC6、CDT1 は検出されたものの、MCM3 および MCM6 は検出されなかった (Figure 3-2, lanes 6, 8)。一方、geminin 未添加 (-) LSS 中で pre-RC を形成させた場合は、Triton X-100 添加 (+) wash buffer の温度に依存せず、ORC1、ORC2、CDC6、CDT1 と共に MCM3、MCM6 が検出された (Figure 3-2, lanes 5, 7)。これらの結果より、geminin 添加 (+) LSS で plasmid 固定化 beads

へ load された MCM2-7 複合体の結合は、pre-RC 形成における結合とは異なる様式であり、pre-RC 形成時よりも結合力が弱いことが示された。

3) Geminin 添加 (+) /未添加 (-) LSS 中における鋳型への ORC、CDC6、CDT1 結合力の比較

前述のように、geminin 添加 (+) LSS 中では geminin 未添加 (-) LSS 中よりも鋳型に対する ORC1、ORC2、CDC6、CDT1 結合量が増加する現象が認められた (Figure 2-5 B, Figure 3-1, Figure 3-2)。これらのタンパク質は、Triton X-100 添加 (+) wash buffer で室温下にて洗浄しても、pre-RC 形成時よりも高いレベルで plasmid 固定化 beads 上に安定的に維持されたことから、plasmid に強く結合していることが示された。この結果は、geminin 添加 (+) LSS 中で認められる鋳型に対する ORC1、ORC2、CDC6、CDT1 結合量の増加は非特異的なものではなく、pre-RC 形成過程の途中段階の状態を反映する可能性であることを示唆する。

鋳型に結合した pre-RC 形成タンパク質の定量的解析

1) Geminin 添加 (+) /未添加 (-) LSS 中における鋳型への pre-RC 形成

タンパク質結合量の解析

上記の解析により、geminin 添加 (+) LSS 中で鋳型に対する ORC1、ORC2、CDC6 および CDT1 結合量が劇的に変化することが再現性をもって示された。これが、どの程度の変化なのかを明らかにするため、私は各条件下で plasmid 固定化 beads に結合した各 pre-RC 形成タンパク質をウエスタンブロット法で定量した。この定量的解析には、鎖長の異なる 2 種類の plasmid (pG5λ6.6 [11 kb] および pKS-EX [5 kb]) 固定化 beads を使用した。その定量的ウエスタンブロット解析の一例を Figure 3-3 に示す。これらの解析により、通常の LSS を用いた場合、1 分子の plasmid 固定化 beads あた

り 10~20 分子の MCM2 (おそらく MCM2-7 複合体として) が結合していると算出された。一方、ORC と CDC6 は 1 分子の plasmid 固定化 beads あたり 1~数分子程度であることがわかった (Table 3-1)。これらのモル比は、鋳型として用いた plasmid の大きさには左右されず、ほぼ同程度の値であった。また、この解析で算出された MCM : ORC 分子数の比はアフリカツメガエル精子クロマチン (Mahbubani *et al.*, 1997) や直鎖 DNA 固定化 beads (Edwards *et al.*, 2002) を用いたときに報告された約 20 : 1 とほぼ一致した (Table 3-1)。すなわち、本研究で用いている環状 plasmid 固定化 beads における pre-RC 形成は、アフリカツメガエル精子クロマチンを用いた場合と似た現象が起きていると推察される。

興味深いことに、geminin 添加によって pre-RC 形成が阻害される条件下で plasmid に結合したタンパク質を定量した結果、1 分子の plasmid あたり 10 分子以上の ORC および CDC6 が結合していると算出された (Table 3-1)。これは、ORC および CDC6 の DNA 結合が、MCM loading の前後で変化する可能性を示唆している。この結合の変化は、ORC のクロマチン結合の安定性が pre-RC 形成の前後で変化するという報告と関連すると考えられる (Harvey and Newport, 2003)。そこで私は、geminin 未添加 (–) LSS を用いて、さらに詳細に plasmid 固定化 beads への pre-RC 形成タンパク質の結合を調べることにした。

2) 低温条件下での鋳型に対する pre-RC 形成タンパク質の結合量の解析

私は解析の過程で、geminin 未添加 (–) LSS であっても、氷上にて plasmid 固定化 beads を混合し、そのまま 0°C でインキュベーションすると、鋳型に対して ORC、CDC6、CDT1 が結合することを見出した (Figure 3-4 A, lanes 3, 7, 11)。さらに、その結合量は 23°C インキュベーションで pre-RC 形成時に観察される量 (Figure 3-4 A, lanes 1, 5, 9) よりも明らかに多く、さらに重要なこととして、0°C インキュベーショ

ンでは MCM3 および MCM6 の結合はほとんど見られなかった (Figure 3-4 A, lanes 3, 7, 11)。また、増加した ORC、CDC6 および CDT1 結合量は、geminin 添加 (+) LSS 中で 23°C インキュベーションした場合に認められた結合量 (Figure 3-4 A, lanes 2, 6, 10) とほぼ同じであった (例えば lane 2 と 3 を比較)。なお、geminin 添加 (+) LSS を用いて氷上インキュベーションした場合も同様の ORC、CDC6 および CDT1 結合量増加が認められた (Figure 3-4 A, lanes 4, 8, 12)。

一方、ORC-depleted LSS を用いた際は、geminin 添加 (+) LSS 中で 23°C インキュベーションした場合、あるいは geminin 未添加 (-) LSS 中で氷上インキュベーションした場合、いずれにおいても ORC1 はもちろんのこと、CDC6 と CDT1 の DNA 結合はほとんど認められなかった (Figure 3-4 B)。以上の結果は、0°C インキュベーションおよび geminin 添加 (+) LSS 中で 23°C インキュベーションした際に認められた CDC6、CDT1 の plasmid 上での蓄積が、ORC 依存的に起こっていることを示している。

前述のように、0°C インキュベーションで認められた ORC、CDC6、CDT1 結合量の増加は、geminin 添加 (+) LSS 中で 23°C インキュベーションした場合と類似していた (Figure 3-4 A, Table 3-1)。このことは、0°C 条件下での反応でも、geminin 添加により MCM loading が阻害される条件下での反応でも、同様の安定的な ORC-CDC6-CDT1-DNA 複合体が形成される可能性を示唆する。

また、geminin 添加で MCM loading を阻害した場合、ならびに 0°C インキュベーションで MCM loading を阻害した場合でのクロマチンへの ORC、CDC6、CDT1 結合量の増加が、アフリカツメガエル精子クロマチンにおいても認められた (Figure 3-4 C)。したがって、ORC などの pre-RC 形成タンパク質の plasmid への結合安定化 (結合量増加) は、plasmid 固定化 beads 特異的に認められる現象ではなく、MCM loading 阻害に付随した一般的な現象であると考えられる。これらの結果は、MCM-depleted LSS

において、クロマチンへの ORC 結合量が増加するという報告と一致している (Harvey and Newport, 2003)。

鋳型に対する pre-RC 形成タンパク質結合の継時的解析

次に、0°C インキュベーションにおける各タンパク質の鋳型に対する結合量の変化を継時的に解析した。その結果、インキュベーション開始から 1 分後には、ORC、CDC6、CDT1 が plasmid 固定化 beads へ集積することが示された (Figure 3-5 A, lanes 5-7)。これらのタンパク質の結合量が増加した状態は、少なくともインキュベーション開始から 30 分間は維持されていた。この現象は、DNA が結合していない beads のみでは認められなかった (Figure 3-5 A, lanes 2-4) ことから、ORC、CDC6、CDT1 の集積は plasmid に依存していると考えられる。

興味深いことに、plasmid 固定化 beads を 0°C で 30 分間、通常 LSS とインキュベーションした後、直ちに 23°C に移行させると ORC、CDC6、CDT1 が徐々に plasmid から解離していった (Figure 3-5 B, lanes 2-5)。特に CDC6 は、23°C インキュベーション開始 1 分後から解離し始めた。その一方で、23°C へ移行後、MCM3 が急速に plasmid へ集積し始めた (Figure 3-5 B, lanes 2-5)。plasmid への MCM3 結合量は、23°C 移行から 15 分後には飽和に達し、その時点では CDC6 は検出されなくなった (Figure 3-5 B, lane 4)。これらの結果は、pre-RC 形成の過程で plasmid に対する ORC、CDC6、CDT1 結合量が劇的に変化することを示唆している。

これらの解析により、私は 0°C で plasmid 上に形成される ORC-CDC6-CDT1 複合体は、MCM2-7 複合体を plasmid 上へ load するために必要とされる中間体である、と考えた。この仮説を検証するため、plasmid 固定化 beads を LSS と 0°C で 30 分間インキュベーションして ORC-CDC6-CDT1 複合体を plasmid 上に形成させ、plasmid 固定化 beads を洗浄した後、MCM2-7 複合体を含むタンパク質画分 PEG-M (ただし ORC1、

CDC6、CDT1 を含まない) もしくは buffer と plasmid 固定化 beads を混合して 23°C で継時的にインキュベーションした。この際の各タンパク質の plasmid への結合量の変化を継時的に解析した結果、buffer を添加したサンプルでは、特に変化は認められなかったが (Figure 3-6 A, lanes 3-6)、PEG-M を添加したサンプルでは、時間依存的な MCM 結合量増加が認められた (Figure 3-6 A, lanes 7-10)。この結果は、plasmid 上に形成された ORC-CDC6-CDT1 複合体が、MCM2-7 複合体を plasmid へ load する活性を有していることを示している。

さらに、PEG-M に含まれる未知のタンパク質が MCM loading に関与している可能性を排除するため、私は PEG-M の代わりに精製 MCM2-7 複合体を使用して、同様の実験を実施した (Figure 3-6 B)。その結果、PEG-M を使用した場合と同様の結果が得られた (Figure 3-6 B, lane 3)。一方、精製 MCM2-7 複合体とのインキュベーションの際、geminin を添加すると予想通り MCM loading が阻害され (Figure 3-6 B, lane 5)、また、MCM loading に必要な ATP を添加しなかったサンプル (lane 4) や、MCM2-7 複合体の中で親和性の低い MCM2 のみ選択的に除去したサンプル (lane 6) でも MCM loading は認められなかった。すなわち、MCM loading には ATP と MCM2-7 複合体が必要であることが示された。このことから、この pre-RC 形成の再構成反応系でも真正 pre-RC 形成が行われたと考えられる。その一方で、PEG-M や精製 MCM2-7 複合体を用いた際には、Figure 3-5 B で認められたような MCM loading に伴う ORC、CDC6、CDT1 の plasmid からの解離は認められなかった。この結果から、ORC、CDC6、CDT1 の plasmid からの解離は、MCM loading のみでは不十分であり、他の何らかの因子の関与が必要とであることが示唆された。

**Table 3-1 Plasmid 固定化 beads を LSS 中でインキュベーションした際に
結合した pre-RC 形成タンパク質の定量**

	Geminin addition				Incubation temperature			
	pKS-EX		pG5λ6.6		pKS-EX		pG5λ6.6	
	Geminin (-)	Geminin (+)	Geminin (-)	Geminin (+)	23°C	0°C	23°C	0°C
ORC1	2	>10	1	10	2	14	3	19
ORC2	2	14	1	6	ND ^a	ND	ND	ND
CDC6	ND	ND	3	15	(-) ^b	7	(-)	11
MCM2	9	9 ^c	12	(-)	17	(-)	19	(-)

Geminin addition : geminin (-) LSS もしくは geminin (+) LSS (いずれも 23°C)

Incubation temperature : 23°C もしくは 0°C (いずれも geminin [-] LSS)

a. ND, not determined

b. (-) , ウェスタンブロットのシグナルが検出限界以下

c. MCM の plasmid への結合が弱く不安定で、通常の pre-RC 形成時の結合とは異なる
と考えられる。

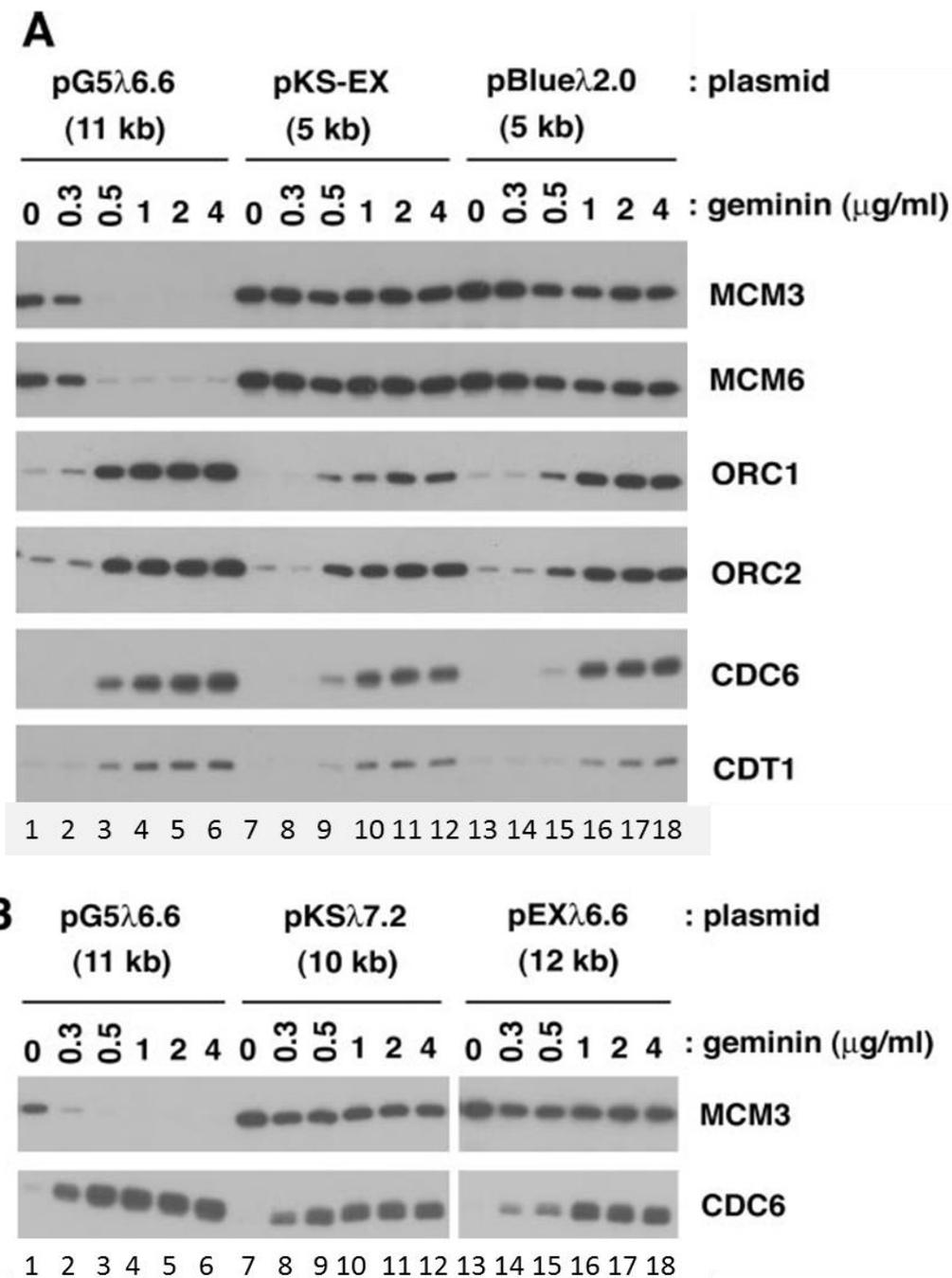


Figure 3-1 各 plasmid 固定化 beads に対する複製タンパク質の結合解析

A: pG5λ6.6 (lanes 1-6)、pKS-EX (lanes 7-12)、pBlueλ2.0 (lanes 13-18) 固定化 beads を、表示濃度の geminin を添加した LSS と 30 分間インキュベーションした。その際に鑄型へ結合した各複製関連タンパク質をウエスタンブロット法で検出した。

(次ページに続く)

B : 長さがほぼ同等の pG5λ6.6 (lanes 1-6)、pKSλ7.2 (lanes 7-12)、pEXλ6.6 (lanes 13-18) を固定した beads を、表示濃度の geminin を添加した LSS と 30 分間インキュベーションした。その際に鋳型へ結合した各複製関連タンパク質をウエスタンブロット法で検出した。

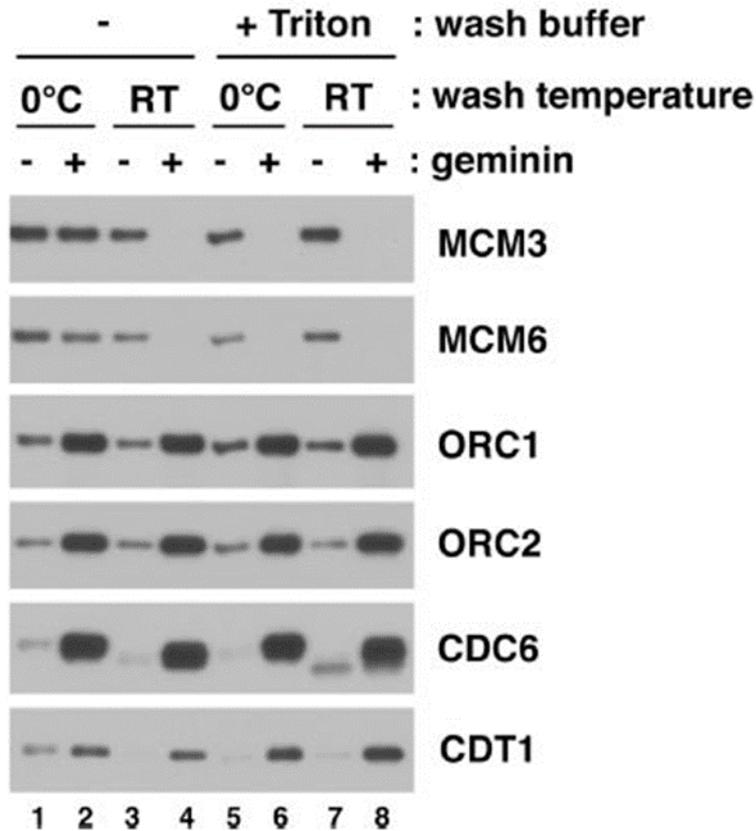
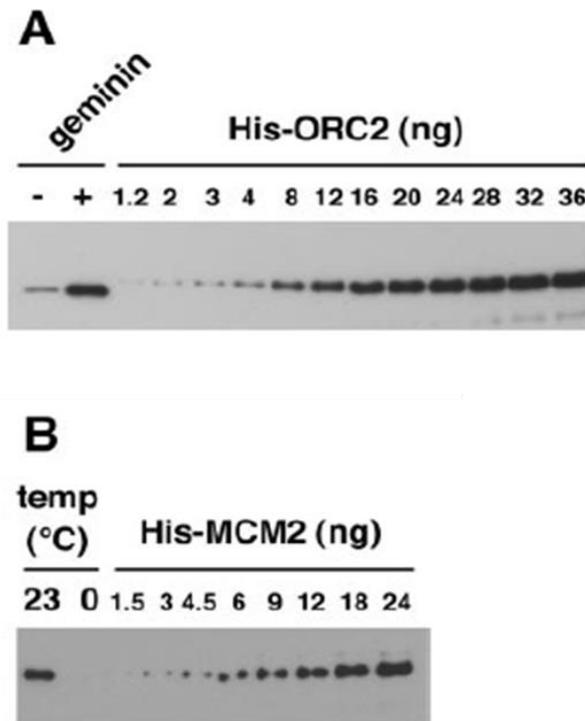


Figure 3-2 各条件下で鋳型へ結合した各 pre-RC 形成タンパク質の結合力比較

pBluescript 固定化 beads を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geminin 添加 (+) および未添加 (-) LSS と 23°C で 30 分間反応させた後、0°C もしくは室温の 0.25% Triton-X 100 (+) wash buffer、あるいは 0°C もしくは室温の通常 wash buffer で洗浄した。各条件下における鋳型に対する各タンパク質の結合量をウエスタンブロット法で解析した。



**Figure 3-3 Plasmid 固定化 beads に結合した各タンパク質の定量的
ウエスタンブロット解析**

pKS-EX 固定化 beads を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geminin 添加 (+) および未添加 (-) LSS で 23°C (A) あるいは geminin 未添加 (-) LSS で 23°C もしくは 0°C (B) にて 30 分間インキュベーションした。その後、beads を氷冷 buffer で洗い、plasmid 固定化 beads に結合したタンパク質量をウエスタンブロット法で定量した。

A では 4 μL , B では 1 μL beads 相当分を、表記量のヒスチジンタグ付き組換え ORC2 (His-ORC2) もしくはヒスチジンタグ付き組換え MCM2 (His-MCM2) とともに泳動した。

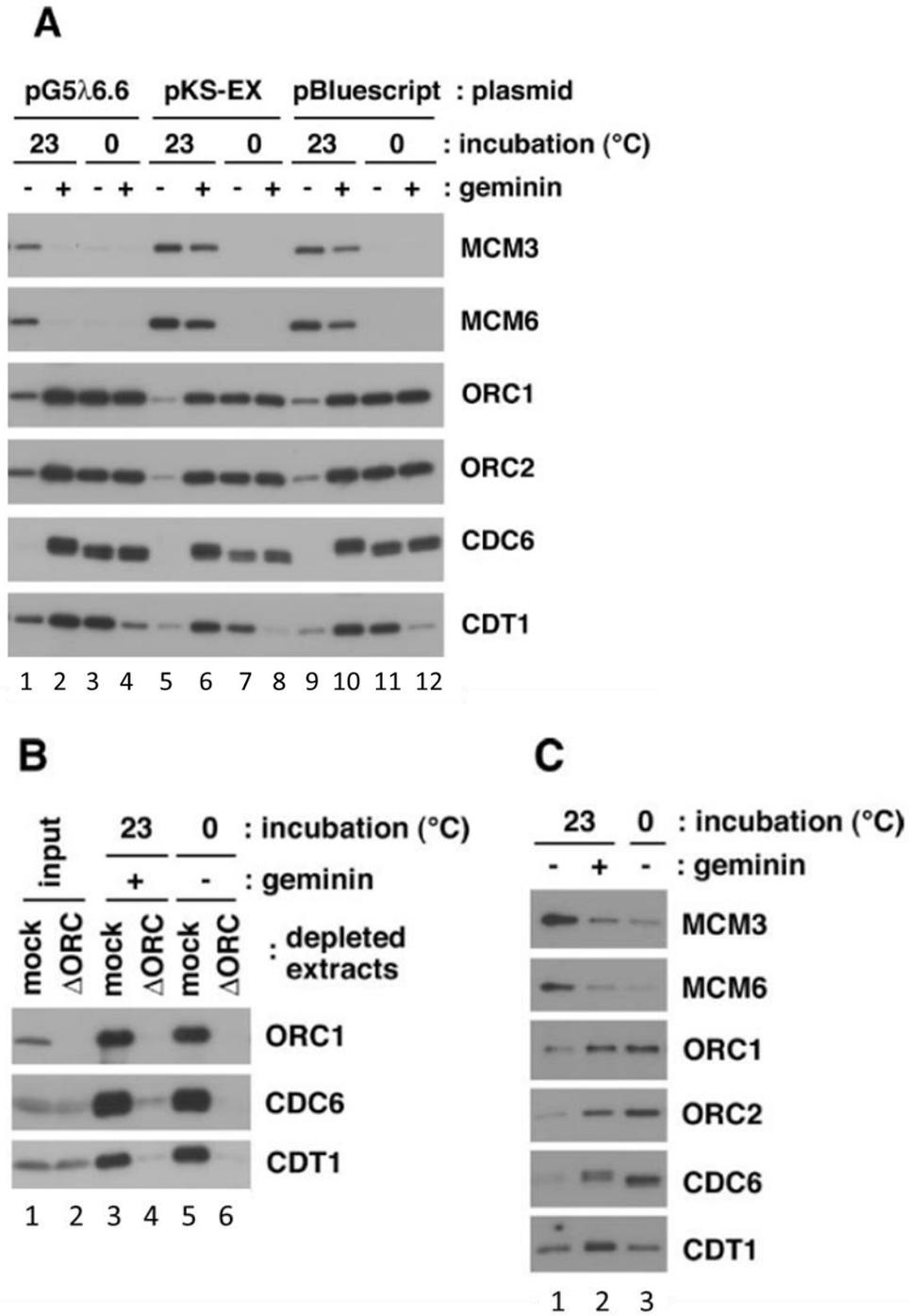


Figure 3-4 各条件下における鋳型への pre-RC 形成タンパク質の結合量解析

A : pG5λ6.6 (lanes 1-4)、pKS-EX (lanes 5-8) もしくは pBluescript (lanes 9-12) 固定化 beads を 2 μg/mL geminin 添加 (+) および未添加 (-) LSS と 0°Cあるいは 23°C

で 30 分間インキュベーションした。その後、氷冷 wash buffer で洗浄し、plasmid 固定化 beads に結合した各タンパク質量をウエスタンブロット法で解析した。

B : pBluescript 固定化 beads を mock-depleted あるいは ORC-depleted LSS と 23°C あるいは 0°C で 30 分間インキュベーションした。この際、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geminin 添加 (+) もしくは未添加 (-) LSS の両条件下で反応させた。その後、氷冷 wash buffer で洗浄し、plasmid 固定化 beads に結合した各タンパク質をウエスタンブロット法で解析した。

C : 脱核膜処理したアフリカツメガエル精子核を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geminin 添加 (+) もしくは未添加 (-) LSS で 23°C あるいは 0°C で 30 分間インキュベーションした。その後、氷冷 wash buffer で洗浄し、精子クロマチンに結合した各タンパク質をウエスタンブロット法で解析した。

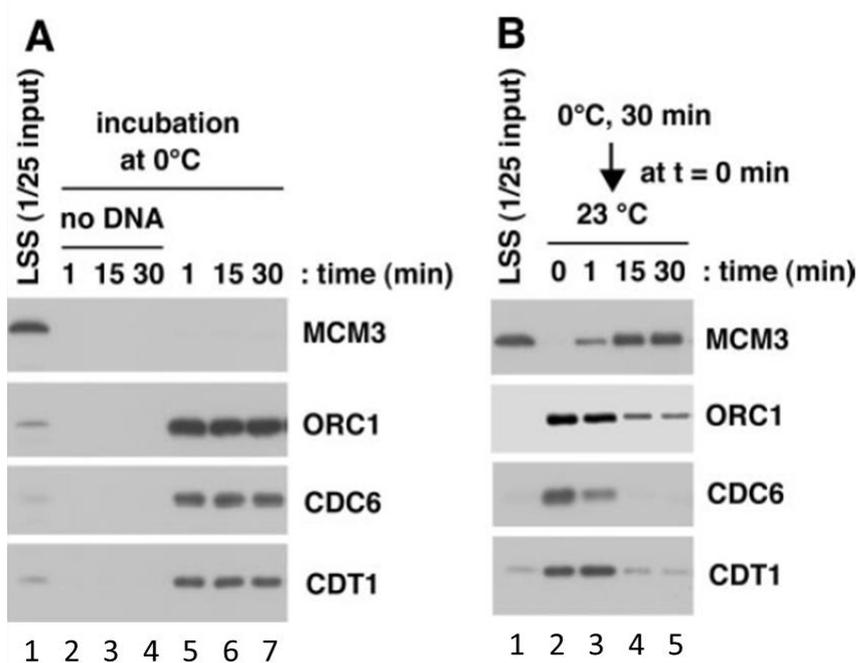


Figure 3-5 Pre-RC 形成タンパク質結合量の継時的変化

A: pBluescript 固定化 beads (lanes 5-7) もしくは beads 単体のみ (lanes 2-4) を LSS と混合し、0°Cにて表記時間インキュベーションした。その際に鋳型へ結合した各タンパク質をウエスタンブロットで解析した。

B: pBluescript 固定化 beads を LSS に添加し、0°Cで 30 分間インキュベーションした後、23°Cにて表記時間でインキュベーションした (lanes 2-5)。その際のタンパク質の継時的変化をウエスタンブロットで解析した。

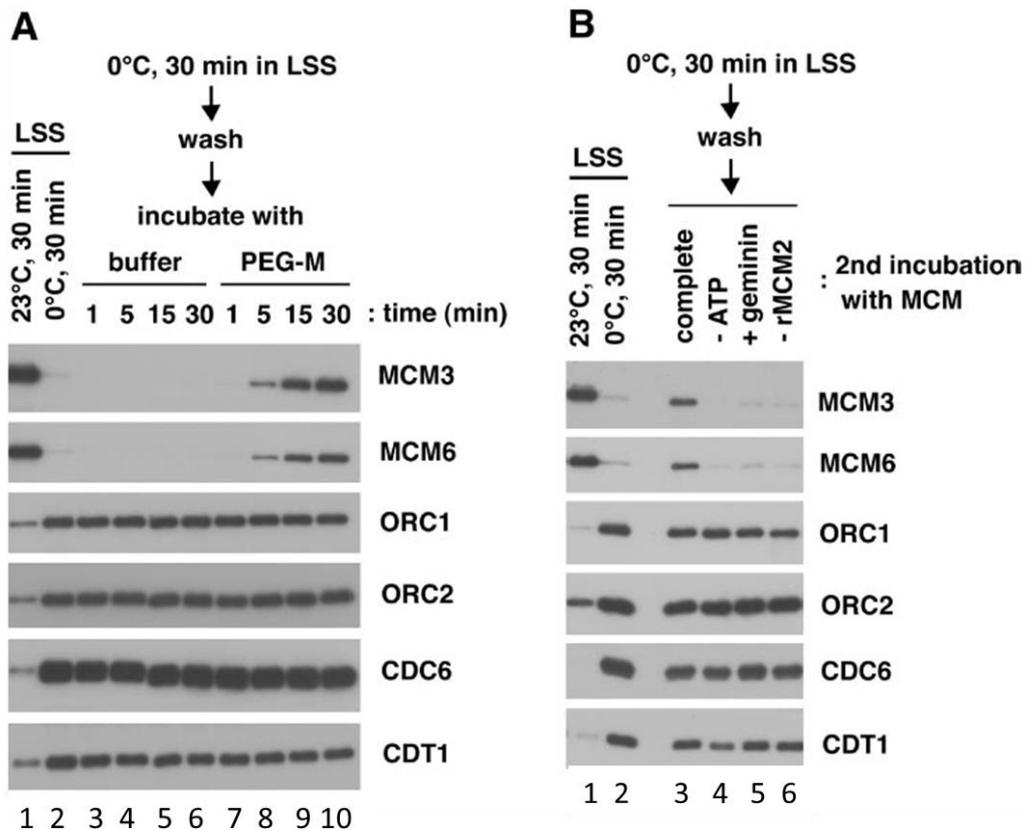


Figure 3-6 MCM loading における ORC-CDC6-CDT1 複合体の寄与

A: pG5λ6.6 固定化 beads を LSS に添加し、0°C で 30 分間インキュベーションした後、beads を氷冷 wash buffer で洗浄し、MCM2-7 複合体を含むタンパク質画分 PEG-M (lanes 7-10) あるいは buffer (lanes 3-6) を添加して 23°C で表記時間インキュベーションした。

B: pG5λ6.6 固定化 beads を LSS に添加し、0°C で 30 分間インキュベーションした後、氷冷 wash buffer で洗浄し、精製 MCM2-7 複合体と ATP を添加して 23°C で 30 分間インキュベーションした (lane 3)。対照実験として、精製 MCM2-7 複合体のみ添加 (ATP 未添加) (lane 4)、2 μg/mL geminin 添加 (lane 5)、精製 MCM2-7 複合体から親和性の低い MCM2 のみ除去して添加 (lane 6) という条件下でのインキュベーションも行った。その後、pG5λ6.6 固定化 beads を氷冷 buffer で洗浄し、結合した各タンパク質をウエスタンブロットで解析した。

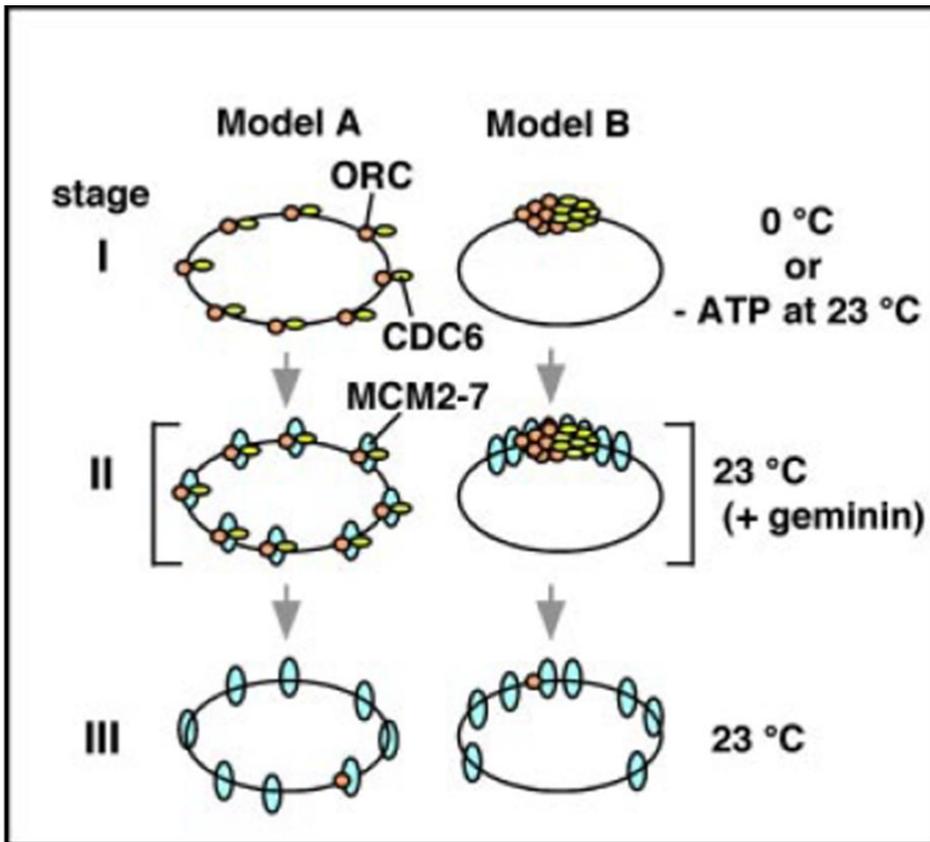


Figure 3-7 Multiple MCM loading モデル

Stage I : multiple ORC-CDC6-CDT1 複合体が plasmid 上にランダムに (model A)、あるいは plasmid 上の限られた数の特定部位 (model B) に形成される。この複合体は、MCM loading が阻害される条件下で安定化される。

Stage II : geminin 添加 LSS で 23°C インキュベーションした際、MCM2-7 複合体は各 ORC-CDC6-CDT1 複合体と弱く相互作用する。MCM2-7 複合体の plasmid への結合は弱いと考えられる。

Stage III : MCM2-7 複合体が plasmid 上に loading すると、大半の ORC-CDC6-CDT1 複合体は plasmid から解離し、1 つもしくは数個の ORC しか plasmid 上に残らない。

第4節 考察

複製開始の起点に結合する ORC と比べて MCM2-7 複合体がクロマチンに load される分子数が明らかに多いことは、以前から知られていた (Mahbubani *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2002)。さらに、ヒト細胞核の免疫染色による解析およびアフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製系の解析において、DNA 複製が開始する前から、MCM はクロマチンのほぼ全域に load されていることも示されている (Madine *et al.*, 1995; Krude *et al.*, 1996; Dimitrova *et al.*, 1999)。これらの現象は、MCM2-7 複合体が複製フォークにおける DNA ヘリカーゼとして機能するという働きだけからは説明できないものであり、高等動物の MCM に関して未だ解明されていない仕組みの存在を暗示させるものである。

本研究において、MCM loading が抑制される条件下、すなわち geminin 存在下あるいは低温条件下のいずれかの条件下で、ORC、CDC6、CDT1 の DNA 結合は顕著に安定化することが示された (Figure 3-1, Figure 3-2, Figure 3-4, Figure 3-5)。この安定化は MCM-depleted LSS を用いて精子クロマチンへの ORC、CDC6 結合を調べた解析結果と一致している (Harvey and Newport, 2003)。また、本研究のウエスタンブロット法による定量解析から、MCM loading を阻害する条件下では、各 plasmid 分子に ORC と CDC6 はそれぞれ 10~20 分子結合していることが示された (Table 3-1, Figure 3-7 の stage I)。出芽酵母における研究では、ORC と CDC6 が 1 分子ずつ結合してリング状の複合体を形成するというモデルが提唱されている (Speck *et al.*, 2005)。この ORC と CDC6 がモル比 1 : 1 で結合して複合体を形成する点は、本研究で MCM loading が阻害される条件下で plasmid に集積した ORC と CDC6 のモル比がおおよそ 1 : 1 だった点と一致している (Table 3-1, Figure 3-7 の stage II)。しかしながら、出芽酵母とは異なり、ORC の DNA 結合が塩基配列に関してランダムに起こるアフリカ

ツメガエル卵抽出液 *in vitro* DNA 複製系では、10 分子以上の ORC-CDC6 複合体が plasmid に結合していると予想される (Figure 3-7, model A の stage I)。あるいは、plasmid 上の限られた領域に、数多くの ORC-CDC6 複合体が集積している可能性も考えられる (Figure 3-7, model B の stage I)。

不思議なことに、ORC-CDC6 複合体の plasmid への結合数は、plasmid のサイズには影響を受けず、geminin 添加 (+) LSS もしくは低温インキュベーション条件下において、10~20 分子の ORC-CDC6 複合体が結合することが示された (Table 3-1)。ORC-CDC6 複合体の plasmid への結合数が DNA サイズに依存しないという点は、DNA の限られた領域に多数の ORC-CDC6 が集積するというモデルを支持する (Figure 3-7, model B の stage I)。また、今回の結果は、アフリカツメガエル卵抽出液と直鎖 DNA を用いた解析において、DNA の長さが 0.35 kb 以上であれば、DNA に結合する ORC の量は DNA の鎖長が長くなってもあまり変化しない、という他グループの報告と一致している (Edwards *et al.*, 2002)。高等生物における ORC-CDC6 の DNA 結合は、未知のメカニズムにより調節されているのかもしれない。

本研究において、私は CDT1 の結合量は算出しなかったが、CDT1 は MCM に加えて CDC6 や DNA とともに作用することが示されていることから (Yanagi *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2004)、おそらく CDT1 も ORC-CDC6-DNA 複合体に定量的に結合していると推測される。

ところで、geminin 添加 (+) LSS 中で 23°C インキュベーションした際、MCM が plasmid 上に形成された ORC-CDC6-CDT1 複合体と弱いながらも相互作用した (Figure 3-1, Figure 3-7 の stage II)。その際の MCM と ORC-CDC6-CDT1 複合体の分子数の比はおよそ 1 : 1 であった。ORC-CDC6-CDT1 複合体と MCM2-7 複合体との相互作用には CDT1 が関与すると考えられるが、MCM との結合には CDT1 の中の特定のドメインが関与する。一方、そのドメインは geminin が結合する CDT1 のドメイ

ンとは異なることが報告されている (Yanagi *et al.*, 2002)。したがって、geminin 存在下で、MCM2-7 複合体が ORC-CDC6-CDT1 複合体と相互作用することには構造上、不可能ではない。

興味深いことに、この弱く相互作用した MCM2 の数は、pre-RC 形成後に認められる MCM2 の数とほぼ一致していた (Table 3-1)。この一致性は、ORC-CDC6-CDT1 複合体と MCM との複合体形成が実際に pre-RC 形成の中間体を表すものかどうかは現時点では明らかではないが、中間体と思われる複合体形成は非特異的なものではなく、意味のあるものであることを暗示させる。

本研究において、通常の LSS の中で plasmid 固定化 beads を 0°C インキュベーションした際にも plasmid 上に多くの ORC-CDC6-CDT1 複合体が形成され (Figure 3-4, Figure 3-5)、さらに、その ORC-CDC6-CDT1-DNA 複合体が MCM2-7 複合体を load する活性を有することが示された (Figure 3-6)。このことから、個々の ORC-CDC6-CDT1 複合体が MCM2-7 複合体を load し、結果的に数多くの MCM2-7 複合体が各 plasmid に load されたと推察される。すなわち、DNA 上に形成した個々の ORC-CDC6-CDT1 複合体は、1 分子もしくは数分子という限られた数の MCM2-7 複合体しか DNA 上に load できない可能性が考えられる。

また、MCM2-7 複合体が plasmid 上に load されると ORC、CDC6、CDT1 の大半が解離し、10~20 分子の MCM2-7 複合体に対して、わずか 1~数分子の ORC しか plasmid 上に残されないことも示された (Table 3-1, Figure 3-7 の stage III)。アフリカツメガエル卵抽出液と精子クロマチンの *in vitro* DNA 複製系を用いた研究において、クロマチン上での ORC : MCM の比率は~1 : 20 であると報告されているが (Mahbubani *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2002)、それは Figure 3-7 の stage III の状態を反映していると考えられる。クロマチンにおける ORC や CDC6 の結合の不安定性については、アフリカツメガエル卵抽出液と精子クロマチンを用いた DNA 複製解析でもすでに報告さ

れている (Coleman *et al.*, 1996; Rowles *et al.*, 1999)。本章で私が実施した継時的解析においても、ORC、CDC6、CDT1 の plasmid からの解離が認められ、特に CDC6 は MCM loading に伴い plasmid から迅速に解離することが示された (Figure 3-5 B)。0°C インキュベーションで形成された ORC-CDC6-CDT1 複合体のうち、plasmid 上に残されたごく一部が数多くの MCM2-7 複合体を繰り返し load するという可能性も完全に排除することは出来ないが、この場合では、本研究で見出されたような MCM loading に伴う ORC、CDC6、CDT1 の plasmid からの解離という関係にはならないと推測される。したがって、ORC-CDC6-CDT1 複合体が 1~数分子の MCM2-7 複合体を DNA 上に loading させた後、DNA から迅速に解離すると考えるのが妥当と思われる。

ORC、CDC6 が DNA から解離する原因として、CDC6 および ORC1-5 サブユニットは AAA+ファミリーに属するタンパク質であるため、MCM loading の過程で起こる ATP 結合や加水分解により ORC もしくは CDC6 に構造変化が生じ、plasmid に対する ORC と CDC6 の親和性が低下した可能性が考えられる。タンパク質の構造変化は、AAA+ファミリータンパク質である MCM2-7 複合体についても起こっていると考えられる。しかしながら、Figure 3-6 で示されたとおり、MCM loading が ORC、CDC6、CDT1 の plasmid からの解離を起こすための十分条件ではないことから、pre-RC 形成の過程において、なにか別のメカニズムが働いて ORC、CDC6、CDT1 が plasmid から解離すると推察される。

本研究を進めている過程で、ヒト細胞における ORC のクロマチン結合に関する FLIP (**f**luorescence **l**oss **i**n **p**hotobleaching) 解析によって、間期の間を通じて、ORC はクロマチンへの集積・解離を迅速に繰り返すことが他グループにより明らかにされた (McNarin *et al.*, 2005)。この結果は、高等生物の ORC の DNA 結合は、それまで想定されていたよりも、よりダイナミックに起こっていることを示している。すなわち、pre-RC 形成が可能な条件下において、ORC がクロマチンに結合する度に 1~数分子の

MCM2-7 複合体を DNA 上に load し、その後直ちにクロマチンから解離する、そしてこの結合と解離を状況が許す限り繰り返している可能性を示唆するデータである。これらのダイナミックな挙動が、DNA 複製開始前に ORC の数十倍程度の MCM2-7 複合体が DNA 上に散在して存在するように見える「MCM paradox」の主な要因となっているのかもしれない。

私が本研究で得た結果は、高等動物における pre-RC 形成と ORC の機能の解明に向けての大変重要な知見であると考えている。高等真核生物で認められるクロマチン全体に配置された MCM の機能、および DNA 複製起点の決定メカニズムについては、まだ明らかにされていない。しかし、私が確立した plasmid 固定化 beads を用いた *in vitro* DNA 複製系を用いて、高等真核生物 ORC の DNA 結合や MCM loading のメカニズム、そしてそれらの調節機構に関する解析を更に進めることが、これらの解明に繋がると期待される。実際、本研究内容を論文発表後、複数の研究グループがこの鋳型システムを採用して、複製初期プロセスや G1 期から S 期への移行に関与する分子の機能解析を行い、新たな知見を発表している (Chowdhury *et al.*, 2010; Thomae *et al.*, 2011; Sanuki *et al.*, 2015)。また、私が提唱した multiple MCM loading が、線虫胚においても起こっていることが新たに示されている (Sonneville *et al.*, 2012)。このように、本研究内容は DNA 複製研究の発展に寄与しており、価値の高い研究内容であると考えている。

第4章

DNA複製機構の制御が破綻した癌細胞に対する新たな抗がん剤の検討
～脱フコース抗ヒト B7-H3 抗体 DS-5573a の増殖抑制作用メカニズムの解析～

第1節 序論

抗体医薬の作用機序

第1章でも述べたとおり、抗体医薬品は近年、非常に注目されている薬剤である。その作用機序はいくつか存在するが、最近ではヒト体内に存在するNK細胞等のエフェクター細胞を介したADCC (**antibody-dependent cellular cytotoxicity**) 活性や、マクロファージを介したADCP (**antibody-dependent cellular phagocytosis**) 活性を主な作用機序とする抗体医薬の開発が増えてきている。

ADCC活性は、標的細胞に結合した抗体のFc領域が、NK細胞などのエフェクター細胞上のFcγRIIIaと結合することで誘導される標的細胞傷害活性である。標的細胞-抗体-エフェクター細胞の連結により、活性化されたエフェクター細胞からグランザイムBやパーフォリンという細胞傷害物質が放出されることで、標的細胞が傷害を受ける (Figure 4-1)。ADCC活性の重要性については、trastuzumabやcetuximabなどの非臨床研究のみならず、これらの臨床研究でも既に明らかにされている (Cartron *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Musolino *et al.*, 2008)。

ADCP活性は、標的細胞に結合した抗体のFc領域が、マクロファージ細胞などのエフェクター細胞上のFcγRIIaと結合することで、抗体依存的に誘導される標的細胞貪食活性である (Richards *et al.*, 2008)。抗体が認識した癌細胞をマクロファージが認識し、貪食することにより癌細胞を死滅させる (Figure 4-2)。前述したtrastuzumabやcetuximabもADCP活性を有しており、この活性を増強させることで抗腫瘍効果が増強することが非臨床研究で明らかになっている (Chao *et al.*, 2010; Weiskopf *et al.*, 2013)。これを踏まえ、臨床におけるADCP活性の寄与も期待されている。

抗体医薬品の課題点とその対応策

第1章で述べたとおり、抗体医薬には生産コストおよび耐性獲得などに関する課題点が存在する。これらの問題を解決するため、Fc 領域改変技術により第一世代の抗体医薬よりも低用量でより強い ADCC 活性を誘導する次世代型抗体医薬の研究が進められている。これまでの研究により、抗体 Fc 領域を構成する 297 番目のアスパラギン (Asp-297) に対する糖鎖 (フコース) の付加を出来るだけ低減させることにより、抗体の Fc 領域とエフェクター細胞の FcγRIIIa の親和性が向上し、ADCC 活性が増強されることが明らかになっている (Niwa *et al.*, 2004, Figure 4-3)。このメカニズムを利用して ADCC 活性を増強させた抗 CCR4 抗体 mogamulizumab (Niwa *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2010) は、非臨床研究のみならず臨床研究でも顕著な薬効を示し、次世代型抗体医薬として大きな注目を集めた。また、低発現標的に対しても低用量から強い薬効が認められるため、今までよりも幅広い患者を対象にできる可能性があり、生産コストを比較的安価に抑えられる可能性もある。すなわち、抗体医薬の脱フコース化は ADCC 活性を増強する重要な技術であり、この技術を応用した次世代型抗体医薬の拡大が期待されている。

しかしながら、次世代型抗体医薬は、第一世代抗体医薬で既に標的妥当性が確認された HER2 など限られた標的に対して集中的に開発されている傾向があり、その恩恵を受ける患者は限定されている。そのため、十分な治療法がない難治性癌に対しても有効な、新たな抗原を標的とした抗体医薬品の開発が強く望まれている。

ヒト B7-H3 タンパクについて

ヒト B7-H3 タンパク質は alternative splicing により 4IgB7-H3 (57 kDa : 細胞外に IgV1-IgC1-IgV2-IgC2 domain を有する) と 2IgB7-H3 (25 kDa : 細胞外に IgV1-IgC2 domain を有する) の2つのバリエーションが生み出されることが知られており、いずれも

一回膜貫通型タンパク質として細胞膜表面上に局在する (Figure 4-4)。最初に同定されたのはヒト 2IgB7-H3 で、T 細胞の活性化促進および interferon- γ 産生に寄与する新規 B7 ファミリー分子として報告された (Chapoval *et al.*, 2001)。しかし、T 細胞免疫調節に関するヒト B7-H3 タンパク質の機能については、活性化および抑制化の相反する内容が多数報告されている。また、ヒト B7-H3 タンパク質に対するリガンドは同定されておらず、免疫調節に関する機能は未だに不明な点が多い分子である (reviewed in Wang *et al.*, 2014)。

ヒト B7-H3 タンパク質は、ヒト癌組織や癌細胞株で発現が亢進していることが知られているが、癌における B7-H3 タンパク質発現は 4IgB7-H3 がその大半を占めることが明らかにされている (Duan and Huang, 2012)。複数の臨床研究により、B7-H3 タンパク質は、大腸癌、肺癌、腎癌、子宮体癌、前立腺癌、肝臓癌など、ヒト腫瘍組織において幅広く高発現しており (Sun *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2007; Crispen *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015)、腫瘍内の B7-H3 発現量亢進は、リンパ節転移 (Sun *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2015)、予後不良 (Roth *et al.*, 2007; Crispen *et al.*, 2008; Brunner *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015)、病理学的ステージ (Sun *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2012) と正の相関性、腫瘍内の T 細胞浸潤と負の相関性 (Sun *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2012) が示されている。

非臨床研究では、肝癌細胞株、乳癌細胞株、前立腺癌細胞株において B7-H3 遺伝子をノックダウンすると、細胞接着、移動、浸潤が減少することが *in vitro* で示されている (Chen *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2015)。また B7-H3 mRNA は、様々なヒト正常組織で発現が認められているが (Chapoval *et al.*, 2001)、ヒト正常組織における B7-H3 タンパク質発現量はヒト臨床腫瘍における発現量より低く、かつ、発現域もより限定的であると報告されている (Xu *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015)。すなわち、腫瘍におけるヒト B7-H3 タンパク質の発現亢進は予後不良因

子であり、正常組織では発現量が低く、発現域も限定的であるタンパク質であることから、新規癌治療標的になる可能性を秘めていると考えられる。そこで私は、ヒト **B7-H3** に対する次世代型抗体医薬品の開発を目標として、創薬研究をすすめることにした。

第2節 材料と方法

細胞株

ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1975、ヒト腎臓癌細胞株 786-O、ヒト胃癌細胞株 NCI-N87、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 および DU-145、ヒト子宮内膜癌細胞株 RL95-2、ヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3、ヒト赤白血病細胞株 TF-1 α 、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 および MCF-7、ヒト大腸癌細胞株 COLO205、ヒトTリンパ球性白血病由来細胞株 CCRF-CEM、チャイニーズハムスター由来細胞株 CHO-K1、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8U.1 は American Type Culture Collection より購入した。ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H322 は European Collection of Cell Cultures より購入した。ヒト子宮内膜癌細胞株 HEC-1 は Japanese Collection of Research Bioresources より購入した。いずれの細胞株についても、説明書に従って適切に培養し、アッセイに用いた。

マウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 の作製

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を皮下移植および尾静脈投与し、免疫反応を惹起させたメスの GANP マウス (Transgenic 社、Sakaguchi *et al.*, 2005) の脾臓を採取した。脾臓をすりつぶして脾臓細胞とした後、PEG4000 (株式会社 免疫生物研究所) を用いてマウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8U.1 と細胞融合させ、抗体産生ハイブリドーマを作製した。取得した抗体産生ハイブリドーマのうち、NCI-H322 移植ヌードマウスに対して抗腫瘍効果を示したマウス IgG2a 抗体 (M30) に着目した。M30 の抗原はヒト B7-H3 であることが質量分析法により明らかにされた (Takahashi *et al.*, 2012)。

Hu-M30 および DS-5573a の作製

マウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 の可変領域をコードする軽鎖および重鎖の cDNA は RT-PCR 法にて取得した。ヒト化 M30 抗体 Hu-M30 は、ヒト化抗体のフレームにマウス抗体由来の CDR (**c**omplementarity **d**etermining **r**egion) 配列を導入する CDR 移植法でデザインし、軽鎖および重鎖発現用ベクターを 293-F 細胞 (Life Technologies) に一過性発現させ、抗体産生させた培養上清から精製・取得した。DS-5573a は、抗体 Fc 領域への糖鎖付加に寄与する α 1, 6-Fucosyltransferase (FUT8) 遺伝子を knock out させた POTELLIGENT® CHOK1SV 発現システム (BioWa、Lonza) を用い、Hu-M30 の Fc 領域にフコースが付加されない脱フコース化抗体として産生・精製した。

エピトープマッピング

全長ヒト B7-H3 タンパク質 (NCBI Reference Sequence、NP_001019907.1 : a.a.27-534)、ヒト B7-H3 IgV1 (a.a. 27-139)、IgC1 (a.a. 140-244)、IgV2 (a.a. 245-357)、IgC2 (a.a. 358-456) の各 domain 発現ベクター (いずれも N 末端には FLAG タグを、C 末端にはヒト B7-H3 タンパクの膜貫通/細胞内 domain [a.a. 457-534] を有する) を Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて CHO-K1 細胞に transfection し、一過性発現させた。これらの細胞に対し、DS-5573a もしくは human IgG1 isotype control (Enzo Life Sciences) (いずれも 1 μ g/mL) を 4°C で 30 分間反応させた後、FACS buffer (5% FBS 入り phosphate buffered saline) で 200 倍に希釈した FITC (**f**luorescein **i**sothi**o**cyanate) 標識抗ヒト抗体 (Jackson ImmunoResearch) を 4°C で 1 時間反応させた。各プラスミド一過性発現細胞における各 B7-H3 タンパク質の発現レベルを確認するため、上記反応とは別に、抗 FLAG 抗体 (mouse IgG1、Sigma-Aldrich) もしくは mouse IgG1 isotype control (BD Pharmingen) (いずれも 1 μ g/mL) を 4°C で 30 分間反応させ、さらに FACS buffer で 1000 倍希釈した FITC 標識抗マウス抗体

(Cappel) を 4°C で 1 時間反応させた。各抗体反応後、非特異的結合を排除するため、FACS buffer で各細胞を 2~3 回洗浄した。

上記の通り調製した各サンプルの抗体結合性は Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter) にて測定し、データ解析には FlowJo (Tree Star, Inc., version 7.2.5) を使用した。

抗原-抗体 結合親和性解析 (Biacore assay)

組換えヒト B7-H3 タンパク質 (4IgB7-H3 もしくは 2IgB7-H3) は R&D systems から購入した。これらの組換えタンパク質に対する DS-5573a および Hu-M30 の結合親和性は、Biacore 3000 あるいは 4000 (GE Healthcare) を用いた表面プラズモン共鳴により解析された。DS-5573a あるいは Hu-M30 を human antibody capture kit (GE Healthcare) を用いてセンサーチップに固定化し、各組換えヒト B7-H3 タンパク質を注入した。各結合親和性 (K_D 値) は Biacore 3000 あるいは 4000 Evaluation Software (GE Healthcare、version 4.1.1 あるいは version 1.0) を用いて算出した。

フローサイトメーターによる抗原発現解析

細胞表面上に発現している抗原タンパク質の定量は、QIFIKIT (Dako) を用いて実施した。各細胞株は飽和濃度 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以上のマウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 (mouse IgG2a) もしくは mouse IgG2a isotype control (BD あるいは eBioscience) を 4°C で 30 分間以上反応させた。その後、FACS buffer でよく洗浄して非特異的な抗体結合を排除し、FACS buffer にて 50 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Dako : kit 付属品) を 4°C で 30 分間以上反応させた。検量線作成用の calibration beads および control beads も FACS buffer でよく洗った後、50 倍希釈 FITC 標識抗マウス抗体を 4°C で 30 分以上反応させた。各サンプルを FACS buffer で十分に洗浄した後、Cytomics

FC500 MPL (Beckman Coulter) にて測定した。1細胞あたりの抗体結合量 (=抗原発現数) は kit の説明書に従い、算出した。

血液ドナー

血液ドナーは第一三共株式会社 品川研究開発センターにて登録された健常人ボランティアの中から、ランダムに選択された。全てのドナーは第一三共株式会社 研究倫理審査委員会に承諾書を提出した。

ADCC assay

10%FBS 入り RPMI 培地をアッセイ培地、96-well round bottom plate (Corning) をアッセイ用 plate として使用した。Chromium-51 (^{51}Cr) (PerkinElmer) を取り込ませた標的細胞 (1×10^4 cells/50 μL) に対して、アッセイ培地を用いて 0.04、0.4、4、40、400、4000 ng/mL に段階希釈した DS-5573a, Hu-M30, human IgG1 isotype control (Enzo Life Sciences) もしくはアッセイ培地を 50 μL ずつ添加し、4°C で 30 分間反応させた。その後、健常人血液から分離したヒト末梢血単核細胞 (PBMC [peripheral blood mononuclear cell]) (3×10^5 cells/100 μL)、アッセイ培地あるいは 2% Triton-X 100 を 100 μL ずつ添加した (抗体最終濃度は 0.01、0.1、1、10、100、1000 ng/mL、Triton 最終濃度は 1%)。アッセイ plate を 1200 rpm、3min で遠心し、37°C、4 時間で反応させた後、各 well から上清 50 μL を回収して Luma plate (Perkin Elmer) に分注した。50°C 設定インキュベーターにて、一晩かけて上清を完全に乾燥させた後、Luma plate の各 well に存在する ^{51}Cr 量を TopCount-NTN (PerkinElmer) で測定した。1% Triton-X 100 添加 well の ^{51}Cr 放出量を 100% とし、各 well の ADCC 活性 (%) は以下の計算式で算出した。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = (\text{S}-\text{B}) / (\text{M}-\text{B}) \times 100$$

S : 各サンプル well における ^{51}Cr 放出量 (標的細胞+抗体+ヒト PBMC)

B : 標的細胞から自然放出される ^{51}Cr 量 (標的細胞のみ)

M : 標的細胞が 100%破壊された時の ^{51}Cr 放出量 (1% Triton-X 100 入り標的細胞)

全ての実験は、独立した 3 つの well で実施し、上記計算式で得られた数値の平均値および SD 値をグラフに反映した。

ADCP assay

10%FBS 入り RPMI 培地をアッセイ培地として使用した。健康人血液由来ヒト PBMC を 10 ng/mL 組換えヒト GM-CSF (PeproTech) および M-CSF (PeproTech) を含むアッセイ培地で 13 日間処理した。培地は週 2 回の頻度で交換し、ヒト PBMC からマクロファージを誘導した。アッセイ前日、250 U/mL 組換えヒト interferon- γ (PeproTech) と 10 ng/mL M-CSF で処理し、マクロファージを活性化させた。アッセイ当日、段階希釈した DS-5573a、Hu-M30、human IgG1 isotype control (Enzo Life Sciences) とあらかじめ反応させた PKH26 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 標識癌細胞株 (5×10^4 cells) を、活性化マクロファージ (1×10^5 cells) と混合し、37°C、3 時間で反応させた。その後、FACS buffer を用いて反応サンプルをピペットマンで力強く洗浄し、非特異的結合を排除した後、FACS buffer にて 10 倍に希釈した APC (allophycocyanin) 標識抗ヒト CD11b 抗体 (BD Pharmingen) と反応させた。4°C、20 分間反応させた後、FACS buffer および PBS を用いてピペットマンで力強く洗浄し、非特異的結合を低減させた各サンプルを、PBS で 1%に希釈したパラフォルムアルデヒド (和光純薬) にて一晩固定した。各サンプルを FACSCanto™ II (BD) にて測定した。ADCP 活性 (%) は、以下の計算式で算出した。

ADCP 活性 (%) =

$$\frac{\text{PKH26}^+\text{APC}^+\text{細胞}}{[\text{PKH26}^+\text{APC}^-\text{細胞} + \text{PKH26}^+\text{APC}^+\text{細胞}]} \times 100$$

全ての実験は、独立した 3 つの well で実施し、上記計算式で得られた数値の平均値および SD 値をグラフに反映した。

***In vivo* 薬効評価**

全ての実験は、第一三共株式会社 動物実験委員会のガイドラインに従って実施された。DS-5573a の *in vivo* 薬効評価では、メスの SCID マウス (CB17/Icr-Prkdc^{scid}/CrlCrlj、日本チャールズリバー) の右脇腹に対し、マトリゲル (BD) で懸濁した MDA-MB-231 細胞株を 5×10^6 cells ずつ皮下移植して使用した。移植後 35 日目に腫瘍体積が 220 mm³ 程度まで成長したマウスを 10 匹ずつ群分けし、DS-5573a (0.003、0.03、0.3 もしくは 3 mg/kg) あるいは PBS を週 1 回、5 週間腹腔内投与した。

DS-5573a の薬効がエフェクター作用によるものであるかどうかを確認するため、免疫不全度が異なる SCID マウス (NK 細胞、マクロファージ細胞が正常に機能) および NOG マウス (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO、インビボサイエンス) (NK 細胞欠損、マクロファージ機能低下、Ito *et al.*, 2002) を用いて *in vivo* 薬効評価および薬効比較した。各マウスの右脇腹に対し、マトリゲル (BD) 懸濁 MDA-MB-231 細胞株を皮下移植し (SCID : 5×10^6 cells、NOG : 1×10^6 cells)、腫瘍体積が 220 mm³ 程度まで成長したマウスを群分けした (SCID : n = 10、NOG : n = 6)。群分け後、DS-5573a、human IgG1 isotype control (Eureka Therapeutics) (いずれも 3 mg/kg) もしくは PBS を週 1 回、5 週間腹腔内投与した。ポジティブコントロールとして irinotecan (第一三共) (60 mg/kg) を週 2 回、2 週間静脈内投与した群も設けた。いずれの実験においても、継続的に腫瘍径を測定し、以下の計算式で推定腫瘍体積を算出した。

$$\text{推定腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{腫瘍長径 (mm)} \times (\text{腫瘍短径 [mm]})^2$$

統計解析

SCID マウスを用いた DS-5573a 用量反応性実験では、PBS 投与群と各 DS-5573a 投与群間における、最終投与から 7 日目の推定腫瘍体積を Dunnett 検定により有意差検定した。SCID マウスと NOG マウスにおける薬効比較実験では、1) PBS 投与群と irinotecan 投与群、2) human IgG1 isotype control 投与群と DS-5573a 投与群における最終投与から 7 日目の推定腫瘍体積を Student's t 検定により有意差検定した。全ての統計解析には、SAS System Release 9.2 (SAS Institute Inc.) を使用した。

第3節 結果

これまでの研究において、マウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 は、i) ヒト B7-H3 高発現肺癌細胞株 NCI-H322 移植ヌードマウスに対して抗腫瘍効果を示すこと、ii) *in vitro* において抗体単独での殺細胞活性は示さないこと、iii) NK 細胞を介した ADCC 活性を有すること、などが明らかにされている (Takahashi *et al.*, 2012)。その後、治療用抗体としての可能性を探るため、ヒト化抗ヒト B7-H3 抗体 Hu-M30 を作製し、マウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 と同様の薬理活性が維持されていることを確認した (Data not shown)。これらの知見より、ADCC 活性が Hu-M30 の薬理活性の一つであり、この活性を高めることが Hu-M30 の薬効増大につながると考えられた。そこで本研究では、抗体 Fc 領域へのフコース付加を排除することで NK 細胞の FcγRIIIa への結合親和性を高め、ADCC 活性を増強させる BioWa および Lonza 社の POTELLIGENT®技術を用い、Hu-M30 をもとに次世代型抗体医薬 DS-5573a を作製し、作用メカニズムの解析および医薬品としてのポテンシャルを見極めることにした。

ヒト B7-H3 タンパク質における DS-5573a の結合 domain 確認

全長ヒト B7-H3 タンパク質は、細胞外に IgV1、IgC1、IgV2、IgC2 domain を有する。私はまず、ヒト B7-H3 タンパク質における DS-5573a の結合 domain を確認するため、全長および各 domain 発現 plasmid をそれぞれ作製し、これらを一過性発現させた CHO-K1 細胞に対する DS-5573a の結合性をフローサイトメトリー解析にて評価した。各 plasmid を CHO-K1 細胞へ transfection した際の一過性発現される各 B7-H3 タンパク質の概略図を Figure 4-5 に示す。各発現タンパク質とも N 末端には FLAG タグが付けられており、抗 FLAG 抗体の反応性を確認することで、タンパク質の発現を

確認することが可能となっている。Isotype control と比較して、DS-5573a および抗 FLAG 抗体の蛍光強度が明らかに強い場合、結合性ありと判定した。

この実験により、DS-5573a は isotype control と比較して全長ヒト B7-H3 タンパク質、ヒト B7-H3 IgC1 および IgC2 domain 発現 CHO-K1 細胞に対して結合性を示すが、ヒト B7-H3 IgV1 および IgV2 domain 発現 CHO-K1 細胞に対して結合性を示さないことが明らかになった (Figure 4-6 A)。各 plasmid 一過性発現細胞において、細胞外にタンパク質が十分に発現しているかどうかを確認するため、私は抗 FLAG 抗体の結合性も評価したが、いずれの細胞についても isotype control と比較して十分な結合性が認められた (Figure 4-6 B)。また、別クローン由来の抗ヒト B7-H3 抗体がヒト B7-H3 IgV1 もしくは IgV2 domain 発現 CHO-K1 細胞に対して結合性を示したことから (data not shown)、DS-5573a がヒト B7-H3 IgV1 および IgV2 domain 発現 CHO-K1 細胞に対して結合性を示さなかったのは、標的タンパク質の発現量不足によるものではないことが示された。以上の結果より、DS-5573a はヒト B7-H3 IgC1 および IgC2 domain に結合すると結論付けた。なお、ヒト B7-H3 IgC1 および IgC2 domain のアミノ酸配列は一部を除いてほぼ一致しており、DS-5573a は両 domain に共通する配列を認識していると考えられる。

組換えヒト B7-H3 タンパク質に対する DS-5573a および Hu-M30 の結合親和性評価 (Biacore assay)

前述のとおり、Hu-M30 の作用機序の一つが ADCC 活性であり、その活性を増強させることを目的として、今回作製した脱フコースヒト化 IgG1 抗体が DS-5573a である。この Fc 領域の脱フコース化が、抗原親和性 (K_D 値) に与える影響を調べるため、組換えヒト B7-H3 タンパク質に対する Hu-M30 と DS-5573a の K_D 値を Biacore assay にて解析・比較した。

まず、ヒト癌組織において高発現していると報告されているヒト 4IgB7-H3 タンパク質に対する DS-5573a と Hu-M30 の K_D 値を測定したところ、それぞれ 1.8 nM、1.6 nM とほぼ同等であることがわかった (Table 4-1)。すなわち、Fc 領域の脱フコース化は、抗原親和性に影響を与えないことが示された。さらに、機能は未だ不明な部分が多いものの、DS-5573a のエピトープである IgC1 domain を有するヒト 2IgB7-H3 タンパク質に対しても DS-5573a と Hu-M30 が結合するかどうかを調べるため、私は同様の評価を実施した。その結果、両抗体ともヒト 2IgB7-H3 タンパク質に対しても結合性を示し、その K_D 値はそれぞれ 11 nM、16 nM であった (Table 4-1)。なお、この実験において、2IgB7-H3 に対する Hu-M30 と DS-5573a の結合親和性は 4IgB7-H3 より一桁程度弱いこと、すなわち Hu-M30 と DS-5573a は 4IgB7-H3 へより選択的に結合しやすいことが明らかになった。

様々な癌種由来細胞株におけるヒト B7-H3 タンパク質の発現評価

前述のとおり、B7-H3 タンパク質は大腸癌、肺癌、腎癌、子宮体癌、前立腺癌、肝臓癌など、ヒト腫瘍組織において幅広く高発現している (Sun *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2007; Crispen *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015)。そこで私は、非臨床研究で用いる市販の癌細胞株についても、B7-H3 タンパク質の発現が認められるかどうかを確認するため、マウス型抗ヒト B7-H3 抗体 M30 を用いて QIFIKIT による定量的フローサイトメトリーを実施した。

解析の結果、ヒト非小細胞肺癌株 NCI-H322 および NCI-H1975、ヒト腎臓癌細胞株 786-O、ヒト胃癌細胞株 NCI-N87、ヒト前立腺癌細胞株 DU145 および PC-3、ヒト子宮内膜癌細胞株 HEC-1 および RL95-2、ヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231、ヒト大腸癌細胞株 COLO205、ヒト赤白血病細胞株 TF-1 α では、B7-H3 タンパク質の発現が認められた (Table 4-2)。一方で、ヒト T リンパ球性白血病由

来細胞株である CCRF-CEM における B7-H3 タンパク質の発現量は、検出限界以下であった。これらの結果より、B7-H3 タンパク質は、臨床癌組織だけでなく、非臨床研究で用いる様々な癌細胞株においても発現していることが示された。

私はこれらの細胞株の中から、B7-H3 タンパク質高発現株 (1×10^5 分子/細胞以上) の代表として NCI-H322、中発現株 (5×10^4 分子/細胞程度) の代表として MDA-MB-231、低発現株 (1×10^4 分子/細胞程度) の代表として COLO205、B7-H3 タンパク質陰性株として CCRF-CEM を選抜し、以後の *in vitro* アッセイに用いることにした。

Hu-M30 および DS-5573a の ADCC 活性評価・比較

脱フコースヒト化 B7-H3 抗体 DS-5573a の ADCC 活性が、親抗体である Hu-M30 よりも増強しているかどうかを確認するため、私は上記で選抜した 4 種類の細胞株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCC 活性を測定・比較した。ターゲット細胞としては ^{51}Cr 標識した各種癌細胞株、エフェクター細胞としては社内ボランティア採血から調製したヒト PBMC を用いた。ADCC 活性により細胞死が誘導された際、培養上清中に遊離される ^{51}Cr 量を指標として、各サンプルにおける ADCC 活性 (%) を算出した。ネガティブコントロールとしては、市販の human IgG1 isotype control を使用した。

この実験により、各 B7-H3 発現株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCC 活性は、いずれも用量反応性を示すが、その濃度域と最大活性値が異なることが確認された (Figure 4-7)。ヒト B7-H3 タンパク質高～中発現株である NCI-H322 や MDA-MB-231 に対する Hu-M30 の ADCC 活性は、10～1000 ng/mL で濃度依存性が認められた (NCI-H322: 6.7% [10 ng/mL]～28.4% [1000 ng/mL]、MDA-MB-231: 4.4% [10 ng/mL]～21.2% [1000 ng/mL]) のに対し、DS-5573a では 0.1～100 ng/mL で濃度依存性が認められた (NCI-H322 : 6.2% [0.1 ng/mL]～53.6% [100 ng/mL]、MDA-MB-231 : 3.6%

[0.1 ng/mL]~58.3% [100 ng/mL])。すなわち、DS-5573a では Hu-M30 の 100 倍程度低い濃度域から、ADCC 活性が誘導されることが明らかになった。また、1000 ng/mL で得られた活性値についても、Hu-M30 より DS-5573a の方が 2~3 倍程度高いことが示された (NCI-H322 : 28.4% [Hu-M30] vs 55.6% [DS-5573a]、MDA-MB-231 : 21.2% [Hu-M30] vs 60.3% [DS-5573a])。さらに、Hu-M30 ではほとんど ADCC 活性が誘導出来なかった B7-H3 タンパク質低発現株 COLO205 に対しても、DS-5573a は高い ADCC 活性を誘導することが示された (8.7% [Hu-M30] vs 45.3% [DS-5573a]、いずれも 1000 ng/mL)。この際、human IgG1 isotype control は、いずれの細胞株に対しても、ADCC 活性を誘導しなかった (NCI-H322 : 1.7~2.6%、MDA-MB-231 : 1.1~1.9%、COLO205 : 1.6~2.4%、いずれも 0.01~1000 ng/mL)。また、B7-H3 タンパク質発現陰性株である CCRF-CEM では、いずれの抗体においても ADCC 活性は誘導されなかった (Hu-M30 : 6.1~10.4%、DS-5573a : 7.9~10.3%、isotype control : 7.0~10.3%、いずれも 0.01~1000 ng/mL)。以上の結果より、DS-5573a は B7-H3 タンパク質依存的な ADCC 活性を、低濃度域から強く誘導することが示された。

Hu-M30 および DS-5573a の ADCP 活性評価・比較

最近、腫瘍内マクロファージが重要な免疫エフェクターとして機能していることが示され、注目を集めている (reviewed in Weiskopf and Weissman, 2015)。ADCP 活性は、マクロファージを介した抗腫瘍作用機序の一つとして注目されつつあるが、ADCP 活性を有する抗 B7-H3 抗体の報告はない。これを踏まえ、私は Hu-M30 および DS-5573a が ADCP 活性を有するかどうか、その活性値に差が認められるかどうかを確認するため、ADCC assay で使用した B7-H3 タンパク質発現量が異なる 4 株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCP 活性を評価することにした。ターゲット細胞としては PKH26 色素で染色した各癌細胞株、エフェクター細胞としてはヒト PBMC を

GM-CSF、M-CSF およびヒト interferon- γ 処理して誘導させたヒトマクロファージを使用した。抗体処理ターゲット細胞をマクロファージと反応させ、37°Cで3時間反応させた後、マクロファージを APC 標識抗ヒト CD11b 抗体で染色し、全 CD11b⁺細胞（全マクロファージ）における PKH26⁺CD11b⁺細胞（標的細胞を貪食したマクロファージ）の比率を ADCP 活性 (%) として算出した。ネガティブコントロールとしては、市販の human IgG1 isotype control を使用した。

この実験により、Hu-M30 では B7-H3 タンパク質発現細胞株である NCI-H322、MDA-MB-231、COLO205 に対して抗体濃度依存的な ADCP 活性を示すことが確認された (Figure 4-8) (NCI-H322 : 10.5% [1ng/mL]~43.6% [10,000 ng/mL]、MDA-MB-231 : 9.8% [10 ng/mL]~40.4% [10,000 ng/mL]、COLO205 : 5.7% [10 ng/mL]~19.9% [10,000 ng/mL])。また DS-5573a においても、Hu-M30 とほぼ同等の ADCP 活性が確認された (NCI-H322 : 10.2% [1 ng/mL]~42.9% [10,000 ng/mL]、MDA-MB-231 : 10.1% [10 ng/mL] ~ 39.3% [10,000 ng/mL]、COLO205 : 6.3% [10 ng/mL] ~ 19.7% [10,000 ng/mL])。一方で、human IgG1 isotype control は、いずれの B7-H3 タンパク質発現細胞に対しても ADCP 活性は示さず (NCI-H322 : 9.4~10.3%、MDA-MB-231 : 5.7~10.1%、COLO205 : 5.1~6.0%、いずれも 1~10,000 もしくは 10~10,000 ng/mL)、B7-H3 タンパク質発現陰性株である CCRF-CEM に対しても DS-5573a、Hu-M30、isotype control はいずれも ADCP 活性を示さなかった (DS-5573a : 5.2~6.2%、Hu-M30 : 5.4~6.6%、isotype control : 5.5~6.3%、いずれも 10~10,000 ng/mL)。以上の結果より、Hu-M30 および DS-5573a は B7-H3 タンパク質依存的な ADCP 活性を誘導することが示された。また、DS-5573a の ADCP 活性は Hu-M30 と同程度であったことから、Fc 領域の脱フコース化が ADCP 活性に影響を与えないことも確認された。

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 移植 SCID マウスを用いた *in vivo* 薬効評価

ヒト腫瘍の形態は、高分化型と低分化型に分類される。高分化型腫瘍は抗がん剤が効きやすい一方、低分化型は抗がん剤が効きにくく、新規薬剤のニーズが高いとされている。そこで私は、DS-5573a が有する治療用抗体としてのポテンシャルを見極めるため、B7-H3 発現癌細胞株の中で、予後不良な低分化型腫瘍を形成する MDA-MB-231 を移植した SCID マウスを用いて *in vivo* 薬効評価を実施することにした。

最初に、DS-5573a の *in vivo* における用量反応性を確認するため、私は SCID マウスの推定腫瘍体積が均等になるよう群分けした後、DS-5573a (0.003、0.03、0.3 もしくは 3 mg/kg) もしくは PBS を週 1 回、5 週間、腹腔内投与した。各個体における腫瘍長径と短径を継続的に測定し、材料と方法に記載した計算式を用いて、推定腫瘍体積 (mm³) を算出した。

移植後 70 日目における推定腫瘍体積(平均値)を比較すると、PBS 投与群: 834 mm³、DS-5573a 0.003 mg/kg 投与群: 615 mm³、0.03 mg/kg 投与群: 506 mm³、0.3 mg/kg 投与群: 309 mm³、3 mg/kg 投与群: 292 mm³ と DS-5573a 投与群では用量反応性が認められ、特に DS-5573a (0.03、0.3 および 3 mg/kg) 投与群では、PBS 投与群と比較して統計学的に有意な差が認められた (Figure 4-9) (DS-5573a 0.03 mg/kg 投与群, $P = 0.043$ 、0.3 および 3 mg/kg 投与群, $P < 0.001$)。

免疫不全度が異なる 2 種類のマウス (SCID マウス、NOG マウス) を用いた *in vivo* 薬効比較実験

次に、DS-5573a の薬効がエフェクター細胞を介したものであるかどうかを *in vitro* だけでなく *in vivo* でも確認するため、私は免疫不全度が異なる 2 種類のマウス (SCID マウス [正常な NK 細胞やマクロファージを保有]、NOG マウス [NK 細胞欠損、機能

低下したマクロファージを保有]) に MDA-MB-231 細胞株を移植し、DS-5573a の *in vivo* 薬効を比較することにした。具体的には、各 MDA-MB-231 移植マウスを推定腫瘍体積の平均値が 220 mm³ 程度になるよう群分けした後、DS-5573a あるいは human IgG1 isotype control (いずれも 3 mg/kg)、もしくは PBS を週 1 回、5 週間、腹腔内投与した。ポジティブコントロールとしては、転移性乳癌の標準治療に用いられる irinotecan (60 mg/kg) を採用し、週 2 回、2 週間、静脈内投与した。各個体における腫瘍長径と短径を継続的に測定し、材料と方法に記載した計算式を用いて、推定腫瘍体積を算出した。

その結果、Figure 4-10 に示したとおり、いずれのマウスにおいても、irinotecan 投与群は、PBS 投与群と比較して強い薬効が認められ (SCID : PBS 投与群 453 mm³ vs irinotecan 投与群 188 mm³、NOG : PBS 投与群 1289 mm³ vs irinotecan 投与群 628 mm³)、統計学的に有意な抗腫瘍効果が確認された (いずれも $P < 0.001$)。すなわち、irinotecan のような化学療法剤は、マウスの免疫不全度に関わらず薬効を示すことが確認された。さらに、SCID マウスでは、isotype control 投与群と DS-5573a 投与群でも統計学的に有意な差が認められた (Figure 4-10 A, isotype control 投与群 408 mm³ vs DS-5573a 投与群 166 mm³, $P < 0.001$) が、一方で NOG マウスでは同群間で有意な差は認められなかった (Figure 4-10 B, isotype control 投与群 1106 mm³ vs DS-5573a 投与群 964 mm³, $P = 0.173$)。これらの結果より、DS-5573a は機能的なエフェクター細胞が存在しない *in vivo* 条件下では、統計学的に有意な抗腫瘍効果を示さないことが確認された。

Table 4-1 組換えヒト 4IgB7-H3 および 2IgB7-H3 タンパク質に対する DS-5573a と Hu-M30 の結合親和性 (K_D 値)

	4IgB7-H3	2IgB7-H3
DS-5573a	1.8 nM	11 nM
Hu-M30	1.6 nM	16 nM

Table 4-2 各癌細胞株におけるヒト B7-H3 タンパク質発現数

由来	細胞株	ヒト B7-H3 タンパク質 発現数 (1細胞あたり)
ヒト非小細胞肺癌	NCI-H322	3.4E+05
	NCI-H1975	1.9E+05
ヒト腎臓癌	786-O	1.5E+05
ヒト胃癌	NCI-N87	1.4E+05
ヒト前立腺癌	DU145	1.2E+05
	PC-3	7.1E+04
ヒト子宮内膜癌	HEC-1	1.3E+05
	RL95-2	6.2E+04
ヒト膵臓癌	BxPC-3	5.0E+04
ヒト乳癌	MDA-MB-231	4.8E+04
ヒト赤白血病	TF-1 α	3.7E+04
ヒト大腸癌	COLO205	1.7E+04
ヒトTリンパ球性白血病	CCRF-CEM	検出限界以下

ADCC活性誘導の概略

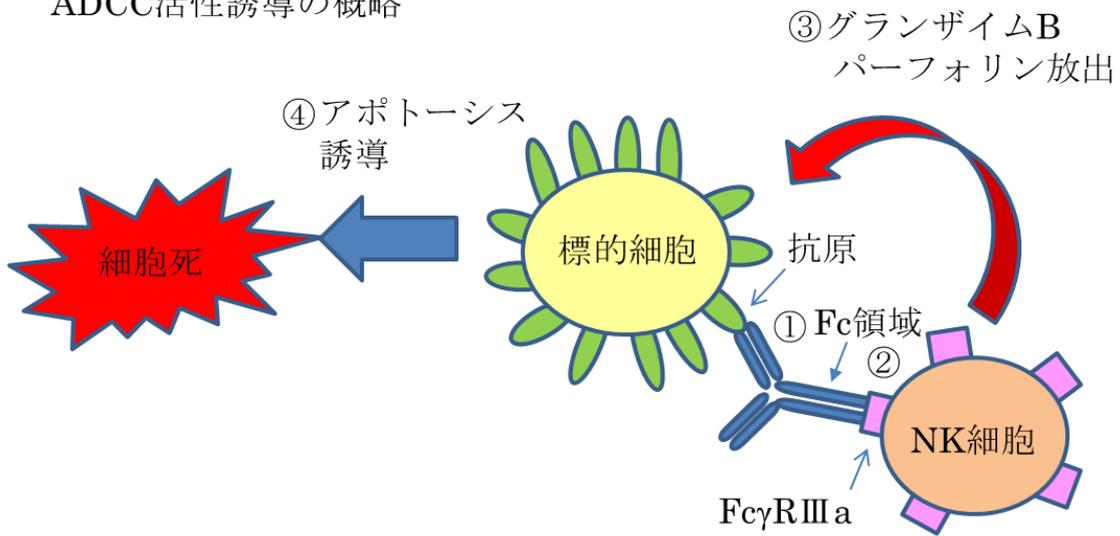


Figure 4-1 ADCC 活性誘導の概略図

ADCC 活性は、以下のプロセスで誘導される。①抗体が抗原を発現する標的細胞を認識する、②標的細胞に結合した抗体の Fc 領域と NK 細胞の Fc γ RIIIa が結合する、③標的細胞-抗体-NK 細胞複合体が形成されると、NK 細胞が活性化され、グランザイム B やパーフォリンが放出される、④標的細胞でアポトーシスが誘導され、細胞死に至る。

ADCP活性誘導の概略

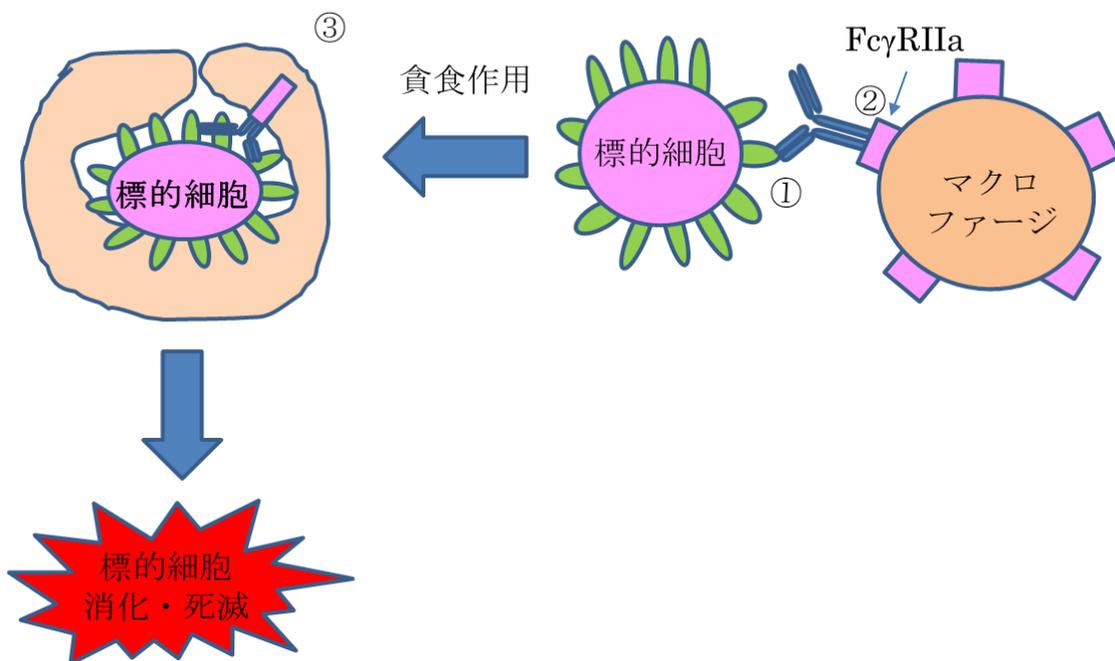
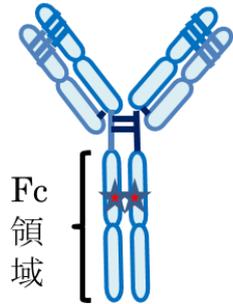


Figure 4-2 ADCP 活性誘導の概略図

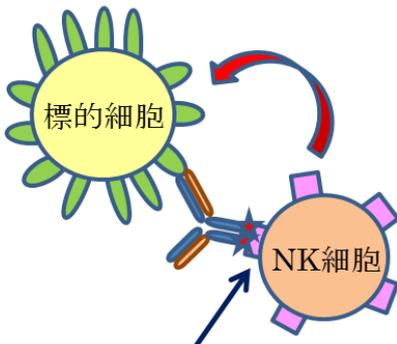
ADCP 活性は以下のプロセスで誘導される。①抗体が抗原を発現する標的細胞を認識、②標的細胞に結合した抗体の Fc 領域とマクロファージの FcγRIIIa が結合、③標的細胞-抗体-マクロファージ複合体が形成されると、マクロファージが標的細胞を貪食・消化。

一般的な
ヒト化IgG1抗体



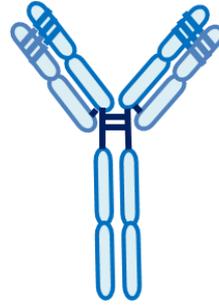
ADCC活性：低

グランザイムB
パーフォリン
放出量：少



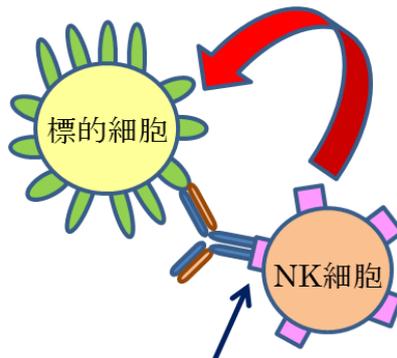
抗体のFc領域と
NK細胞のFcγRIIIa
親和性：低

脱フコース
ヒト化IgG1抗体



ADCC活性：高

グランザイムB
パーフォリン
放出量：多



抗体のFc領域と
NK細胞のFcγRIIIa
親和性：高

Figure 4-3 一般的なヒト化 IgG1 と脱フコースヒト化 IgG1 の比較

一般的なヒト化 IgG1 では、Fc 領域の 297 番目を構成するアスパラギンに糖鎖（フコース）が付加されている。脱フコースヒト化 IgG1 抗体は、この部位のフコースが付加されていないもので、抗体の Fc 領域と NK 細胞に発現する FcγRIIIa の親和性が向上する。結果として、一般的なヒト化 IgG1 よりも ADCC 活性を増強されることが知られている。赤色に塗られた☆マークはフコースを示している。

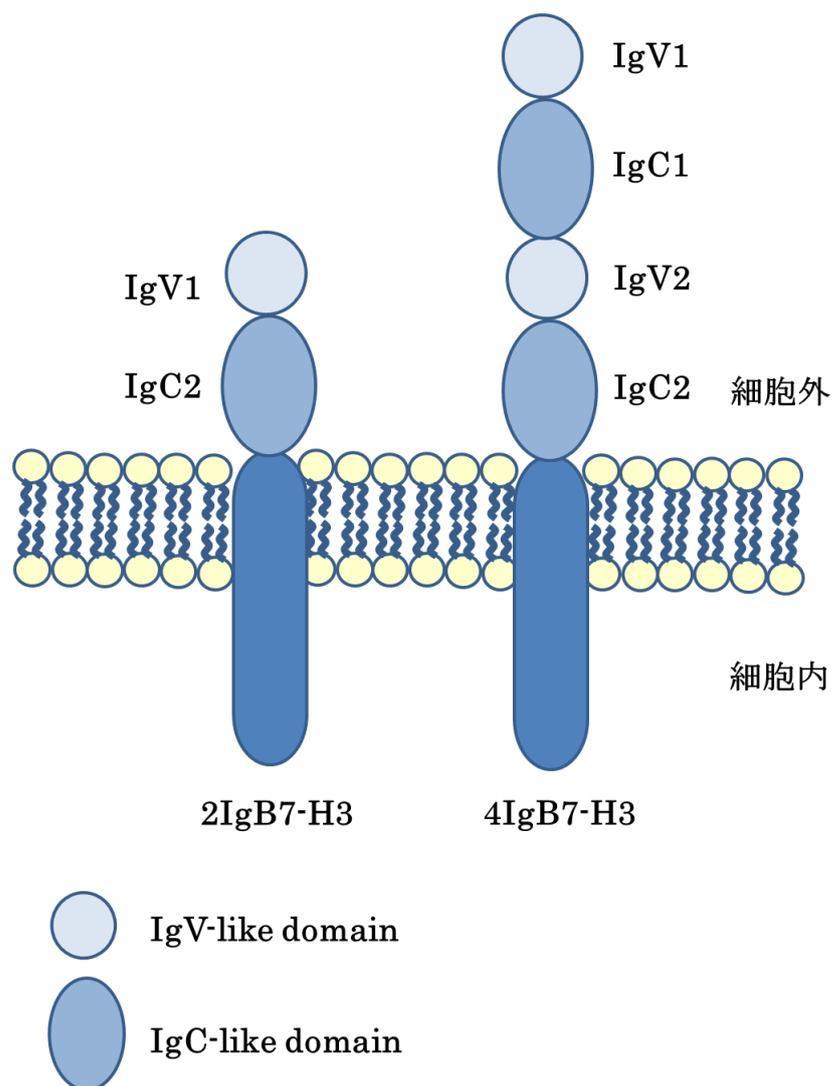


Figure 4-4 ヒト B7-H3 タンパク質の構造模式図

ヒト B7-H3 タンパク質には 2IgB7-H3 と 4IgB7-H3 の 2 種類のバリエントが存在する。いずれも細胞外に IgV-like domain と IgC-like domain を有しており、2IgB7-H3 は IgV1-IgC2 domain、4IgB7-H3 は IgV1-IgC1-IgV2-IgC2 domain で構成されている。

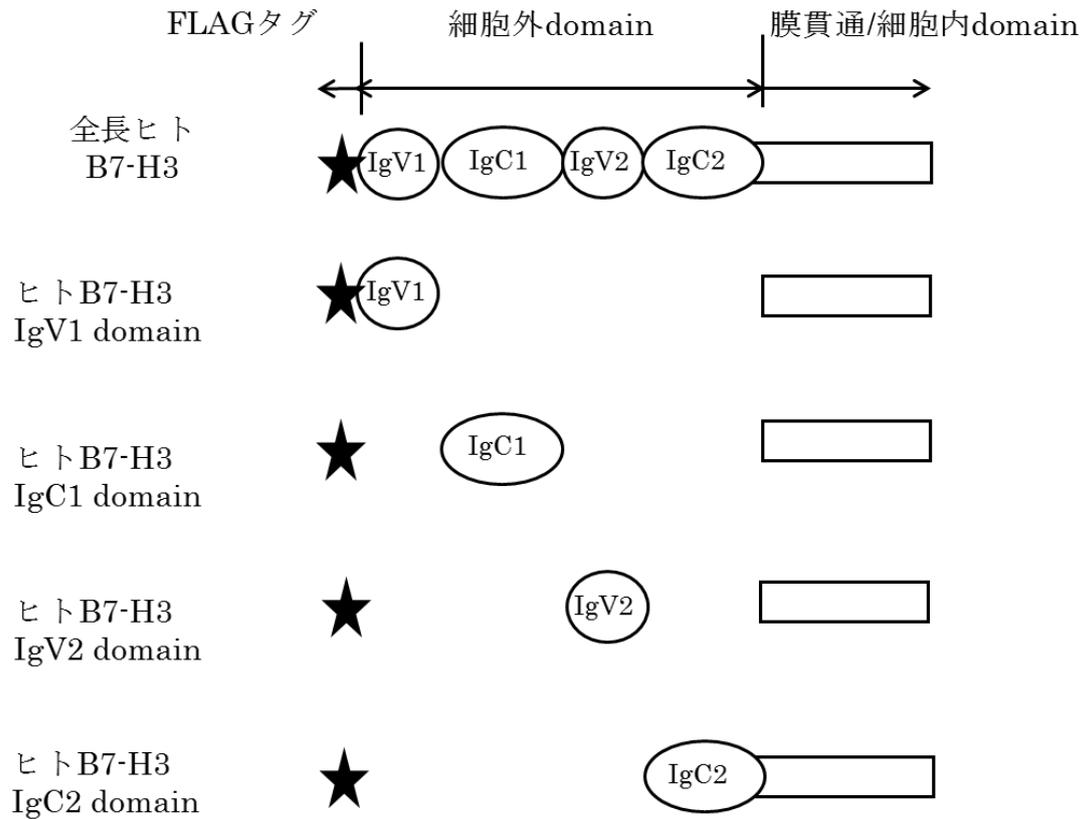


Figure 4-5 各 plasmid から発現される各ヒト B7-H3 タンパク質の模式図

各ヒト B7-H3 タンパク質とも N 末端に FLAG タグ、C 末端に膜貫通/細胞内 domain を有する。

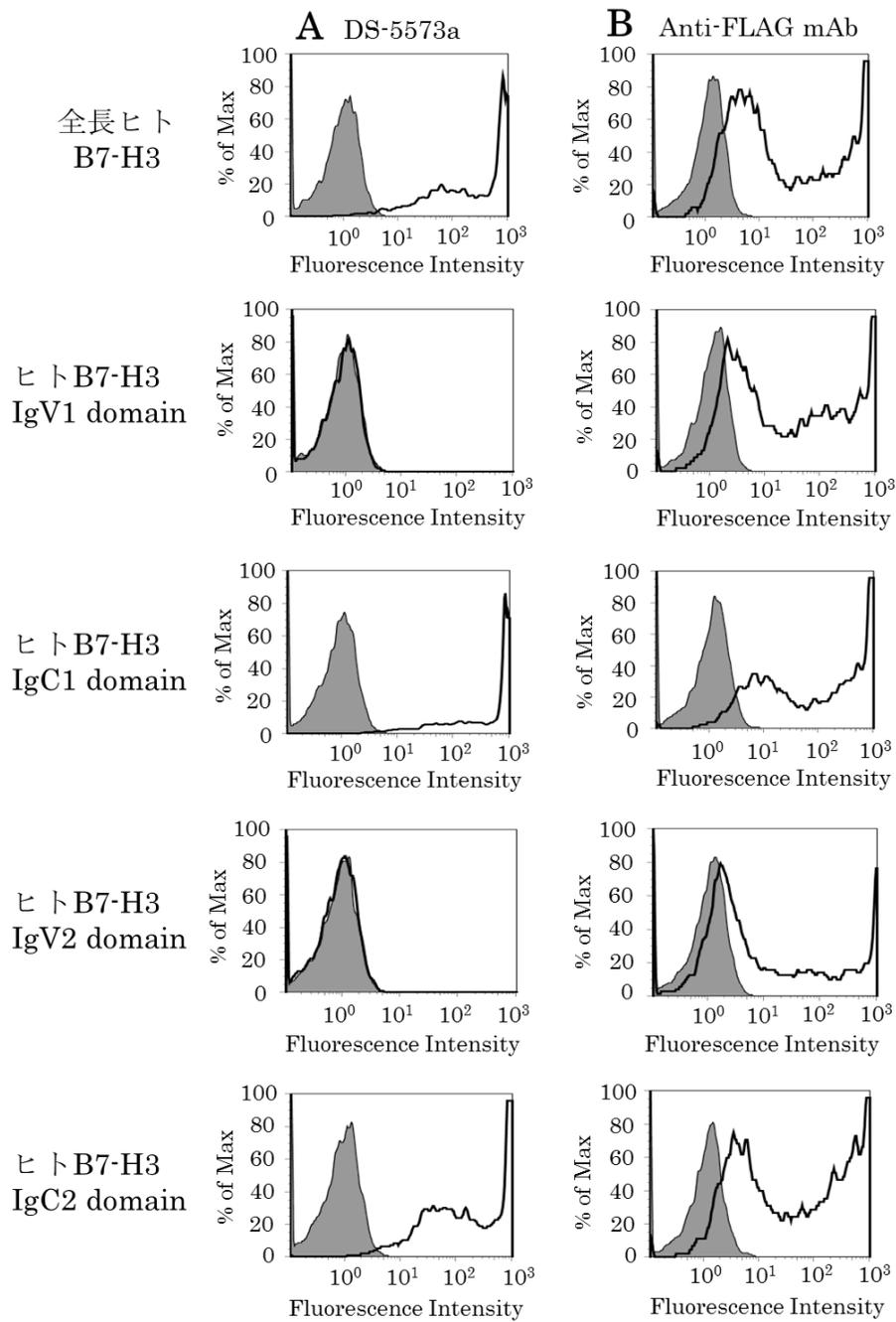


Figure 4-6 DS-5573a はヒト B7-H3 IgC1 および IgC2 domain に結合性を示す

A : DS-5573a (黒線、塗りつぶしなし)、human IgG1 isotype control (灰色塗りつぶし) 処理サンプル (いずれも 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

B : Anti-FLAG mAb (黒線、塗りつぶしなし)、mouse IgG1 isotype control (灰色塗りつぶし) 処理サンプル (いずれも 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

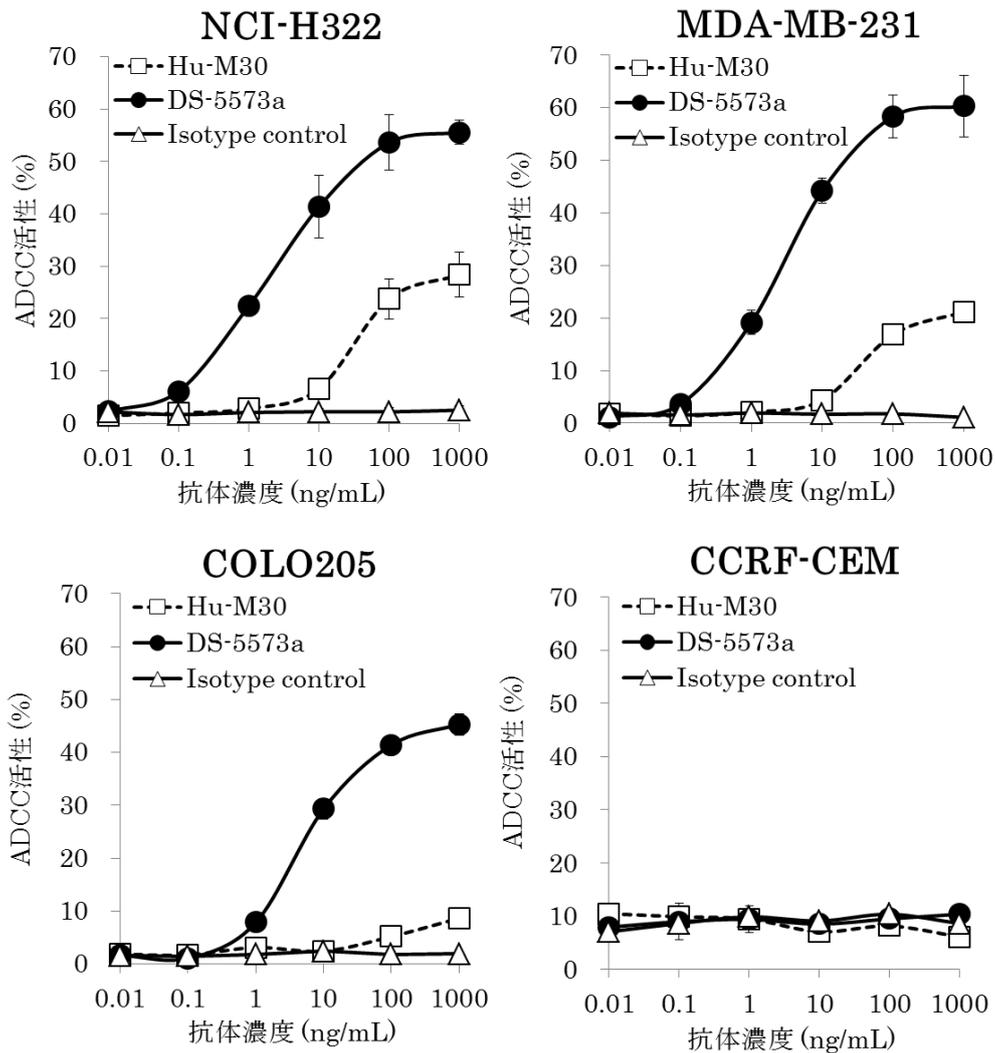


Figure 4-7 ヒト PBMC を介した各癌細胞株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCC 活性評価

B7-H3 タンパク質発現量が異なる各癌細胞株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCC 活性を ^{51}Cr ラベル法にて測定した (Effector/Target ratio = 30/1)。ネガティブコントロールとして isotype control も評価した。各サンプルとも独立した 3 well で評価し、その平均値と標準偏差 (SD) をグラフに示した。

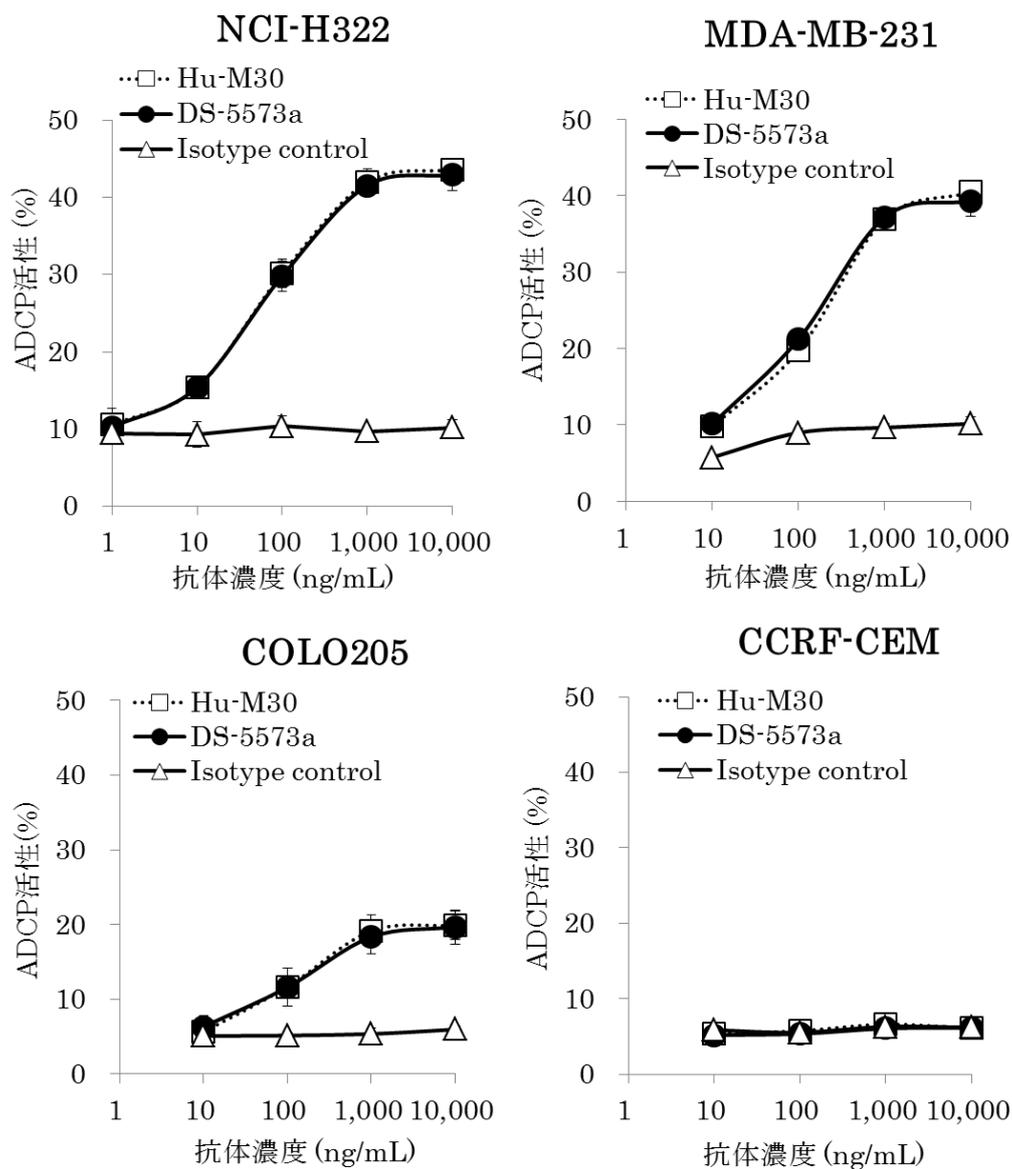


Figure 4-8 ヒトマクロファージを介した各癌細胞株に対する Hu-M30 および

DS-5573a の ADCP 活性評価

B7-H3 発現量が異なる癌細胞株に対する Hu-M30 および DS-5573a の ADCP 活性を PKH26 ラベル法にて評価した (Effector/Target ratio = 2/1)。ネガティブコントロールとして isotype control も評価した。各サンプルとも独立した 3 well で評価し、その平均値と標準偏差 (SD) をグラフに示した。

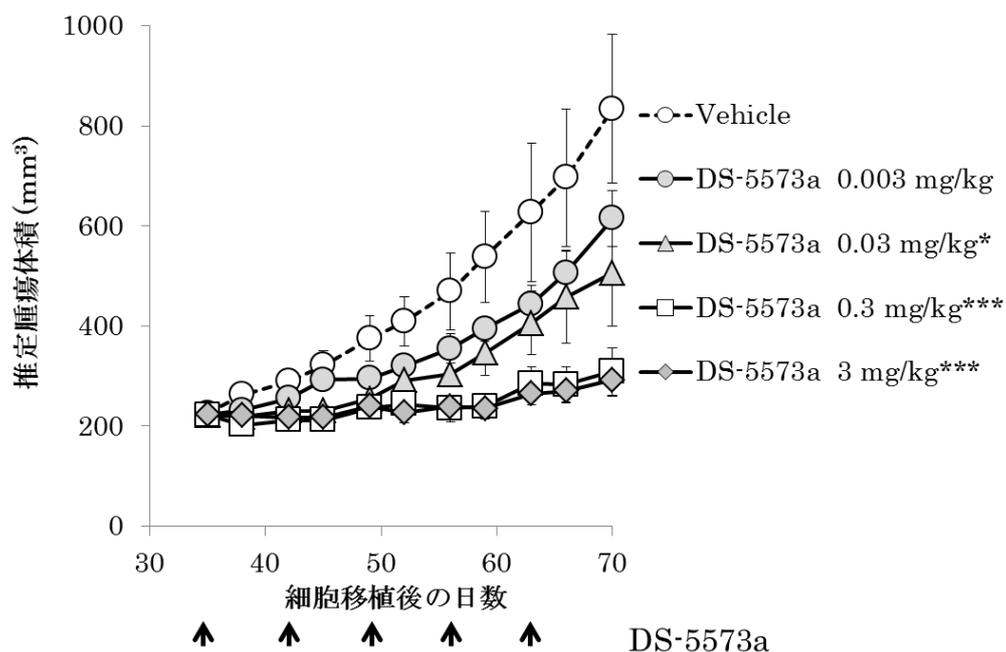


Figure 4-9 MDA-MB-231 移植 SCID マウスにおける DS-5573a の *in vivo* 薬効評価
(用量反応性確認)

MDA-MB-231 移植 SCID マウスに対し、DS-5573a (0.003~3 mg/kg) もしくは PBS を週 1 回、5 週間、腹腔内投与した (N = 10)。推定腫瘍体積の推移について、各群の平均値と標準誤差 (SE) をグラフに示した。最終投与日から 7 日後における PBS 投与群と各 DS-5573a 投与群の推定腫瘍体積を、Dunnett 検定により統計解析した。矢印は薬剤投与タイミングを示す。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

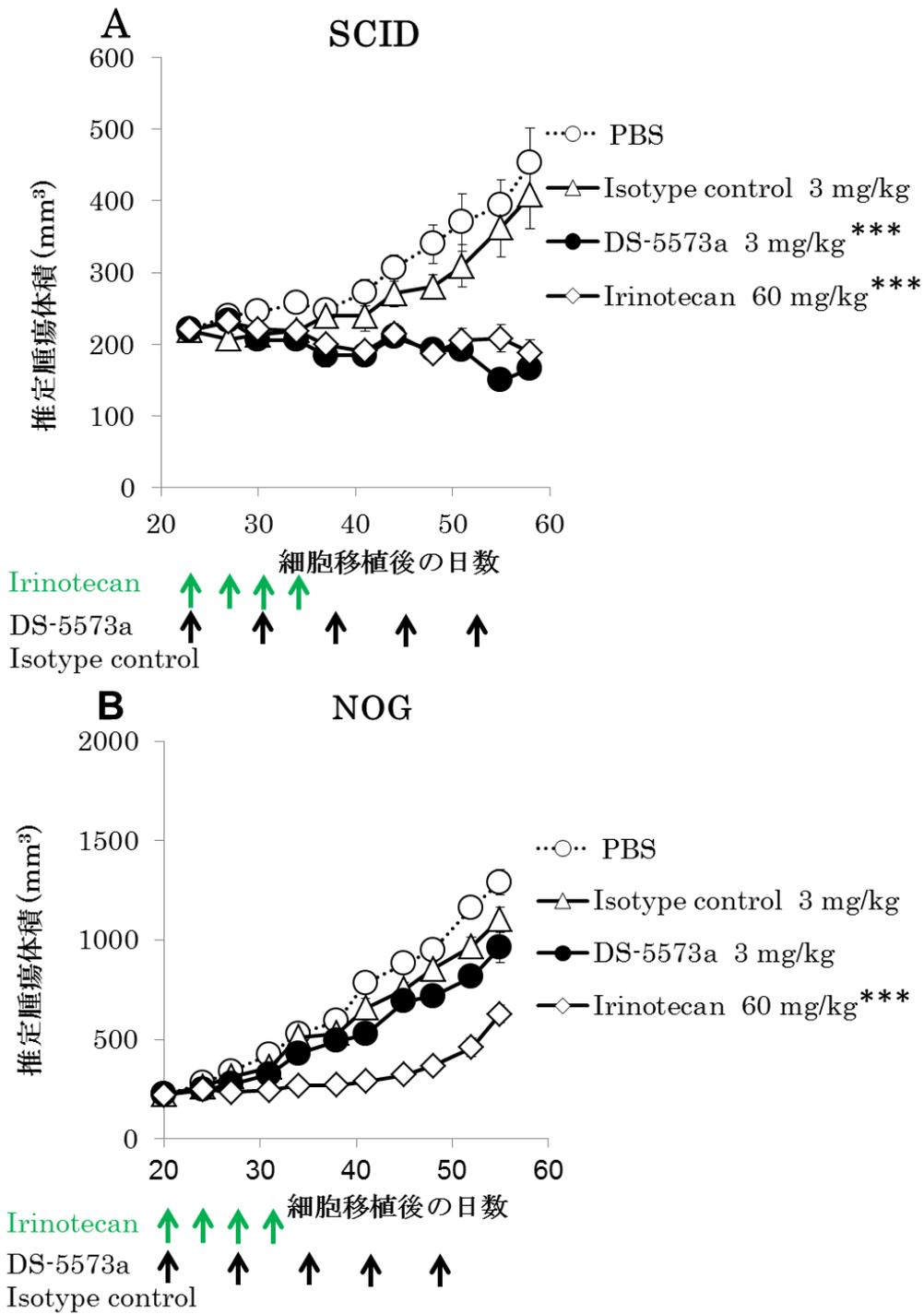


Figure 4-10 MDA-MB-231 移植 SCID および NOG マウスにおける
 DS-5573a の *in vivo* 薬効評価

MDA-MB-231 移植 SCID マウス (A) および NOG マウス (B) に対し、DS-5573a、isotype control (いずれも 3 mg/kg) もしくは PBS を週 1 回、5 週間、腹腔内投与した。またポジティブコントロールとして、irinotecan (60 mg/kg) を週 2 回、2 週間、静脈内投与した (SCID : N = 10、NOG : N = 6)。推定腫瘍体積の推移について、各群の平均値と標準誤差(SE)をグラフに示した。緑矢印は irinotecan、黒矢印は isotype control、DS-5573a および PBS 投与タイミングを示す。最終投与日から 7 日後における PBS 投与群と irinotecan 投与群、isotype control と DS-5573a 投与群の推定腫瘍体積を、それぞれ Student's t 検定を用いて統計解析した。*** $P < 0.001$

第4節 考察

これまで多くの非臨床および臨床研究により、ADCC 活性が抗体医薬において重要な役割を果たすことは示されているが、抗原発現量の不足や FcγRⅢa の遺伝子多型などにより、既存の抗体医薬では ADCC 活性を十分に誘導できない患者が存在することも明らかになっている。

ADCC 活性を有する多くの治療用抗体はヒト IgG1 タイプであるが、FcγRⅢa-158V をホモタイプで有する NK 細胞は、FcγRⅢa-158F をホモタイプあるいはヘテロタイプで有する NK 細胞よりヒト IgG1 の Fc 部分に対して強い親和性を示すこと (Koene *et al.*, 1997)、第一世代の抗体医薬 rituximab、trastuzumab、cetuximab など、ADCC 活性を有する抗体医薬を投与された患者では、FCGR3A 遺伝子多型が、奏効率や無増悪生存期間に影響を与えることが明らかになっている (Cartron *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Musolino *et al.*, 2008)。しかしながら、人種間で多少比率は異なるものの、どの人種においても FCGR3A-158F 遺伝子保有者の方が FCGR3A-158V 遺伝子保有者よりも多い (Koene *et al.*, 1997; Lehrnbecher *et al.*, 1999; Leppers-van *et al.*, 2000)。具体的には、日本人の場合、FCGR3A-158V タイプは 26%、FCGR3A-158F タイプは 74%、ドイツ人の場合、FCGR3A-158V タイプは 34%、FCGR3A-158F タイプは 66% と報告されている (Leppers-van *et al.*, 2000)。これらの報告は、第一世代の抗体医薬が、多くの臨床癌に対して効率良く ADCC 活性を誘導しにくいことを示唆している。

一方で、Fc 領域へのフコース付加レベルを低減させたタイプの rituximab は、FcγRⅢa-158V タンパク質だけでなく FcγRⅢa-158F タンパク質に対しても結合活性が飛躍的に向上すること、FCGR3A 遺伝子多型に関わらず、従来型高フコース化 rituximab に比べて 10 倍から 100 倍ほど低濃度領域で ADCC 活性が誘導されることが示されている (Niwa *et al.*, 2004)。また定量性解析により、低フコース化 IgG1 は従来型高フコ

ース化 IgG1 より 3 倍から 10 倍ほど抗原数が少なくても同程度の ADCC 活性を誘導できることも示されている (Niwa *et al.*, 2005)。実際に、脱フコースヒト化 IgG1 抗体の先駆けとして承認された抗 CCR4 抗体 mogamulizumab では、臨床において極めて低濃度域 (0.1 mg/kg) から薬効が認められるケースが報告されている (Yamamoto *et al.*, 2010)。本研究データおよびこれらの報告を踏まえると、DS-5573a は幅広いヒト B7-H3 タンパク発現臨床癌に対して、FcγRIIIa の遺伝子多型に関係なく、低濃度から薬効を示すことが期待される。また、第一世代の抗体医薬に比べて治療に必要な薬用量を大幅に低減させられる可能性も期待され、その場合は生産コストを比較的安価に抑えられる可能性にも繋がると考えられる。

本研究で最も重要な知見の一つが、Hu-M30 および DS-5573a が様々な B7-H3 発現癌細胞株に対して ADCP 活性を有するということである (Figure 4-8)。ADCC 活性のみならず ADCP 活性を有する抗ヒト B7-H3 抗体に関する報告は、私が知る限り他にない。マクロファージが腫瘍内に多く存在することは一般的に知られているが、最近では、このマクロファージが抗体治療の際のエフェクター細胞として重要な機能を果たすことが明らかになってきている (reviewed in Weiskopf and Weissman, 2015)。例えば、新規抗体医薬抗 CD47 抗体 (Chao *et al.*, 2010) や高親和性 SIRPα-Fc 融合タンパク質 (Weiskopf *et al.*, 2013) などは、マクロファージ貪食反応を抑制する CD47-SIRP シグナルを遮断することが可能である。これらは、rituximab 処理非ホジキンリンパ腫細胞や trastuzumab 処理乳癌細胞株との併用で、マクロファージによる貪食作用を増強させ、強い相乗効果を示すことが *in vitro* および *in vivo* で示されている。DS-5573a もこれらの生物製剤と併用することで、より効率的に ADCP 活性を誘導することが可能となるかもしれない。

また私は、DS-5573a の B7-H3 発現癌細胞株に対する ADCP 活性が、Hu-M30 と同程度であることを示した (Figure 4-8)。ADCP 活性の誘導に最も寄与する Fcγ 受容体

は、マクロファージに発現している FcγR II a であると考えられており (Richards *et al.*, 2008)、低フコース IgG1 は FcγR III a への親和性が劇的に向上する一方、FcγR II a への親和性はほとんど変化がないことも明らかにされている (Niwa *et al.*, 2004)。また、他研究グループにおいても、脱フコースヒト化 IgG1 抗体は、従来型高フコース抗体に比べて 20 倍程度 ADCC 活性を強く誘導することができるが、ADCP 活性には差が認められてないことが報告されており (Silence *et al.*, 2014)、これらは本研究データと一致している。

さらに私は、予後不良な低分化型腫瘍を形成する MDA-MB-231 移植 SCID マウスにおいて、DS-5573a の用量反応的かつ有意な抗腫瘍効果が認められること (Figure 4-9)、また免疫不全度が異なる MDA-MB-231 移植 SCID マウスおよび NOG マウスにおける薬効比較では、DS-5573a はエフェクター細胞が存在しない *in vivo* 条件下では統計学的に有意な抗腫瘍効果を示さないこと (Figure 4-10) を明らかにした。すなわち、本研究において私が取得した *in vitro* および *in vivo* データは、DS-5573a が NK 細胞やマクロファージ細胞を含む B7-H3 発現腫瘍に対して薬効が期待できる可能性を示している。また、ヒト PBMC 内に含まれる NK 細胞率がフコース付加レベルを低減させたタイプの rituximab の ADCC 活性強度と相関性があるとの報告もあり (Niwa *et al.*, 2004)、DS-5573a の抗腫瘍効果を効率良く誘導するためには、PBMC 中の NK 比率も重要な要素の一つとなるかもしれない。

以上をまとめると、私は本研究において、Hu-M30 および DS-5573a は ADCC 活性と ADCP 活性という二つの作用機序を有するユニークな抗体であり、特に脱フコース化した DS-5573a では、Hu-M30 より 100 倍程度低濃度域から高い ADCC 活性が飛躍的に増強されることを明らかにした。また DS-5573a は B7-H3 中発現株 MDA-MB-231 移植 SCID マウスに対して強い抗腫瘍効果を *in vivo* でも示した。その際、機能的なエフェクター細胞が存在しない NOG マウスでは、統計学的に有意な抗腫瘍活性が認めら

れなかったことから、DS-5573a が抗腫瘍効果を発揮するためには、エフェクター細胞の存在が重要と考えられた。

また私は本研究により、様々な癌種由来細胞株で高レベルの B7-H3 タンパク質発現が検出されることを示したが、他研究グループによる臨床癌サンプルを用いた免疫染色研究でも、B7-H3 タンパク質は大腸癌、前立腺癌、子宮体癌、肝臓癌などにおいて 50% 以上の確率で中～高発現していることが報告されている (Sun *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2007; Brunner *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015)。これは、抗 HER2 抗体 trastuzumab が適応となる HER2 高発現乳癌患者の比率 (20~25%) よりも高い。また私達の研究グループでは、DS-5573a を連続投与したカニクイザルが良好な耐容性を示すことも確認している (data not shown)。これらの報告および本研究成果は、十分な治療法が確立されていない難治性癌の中で、B7-H3 陽性患者に対して DS-5573a が新規治療用抗体のポテンシャルを有することを示唆している。

第5章

総括・今後の展望

総括

癌を発症する原因は多岐に渡るが、これまでの臨床および非臨床研究により、ヒト臨床腫瘍およびヒト癌細胞株では、本来は高度に保たれている DNA 複製や細胞周期の制御が破綻しており、その結果、細胞増殖が亢進することが示唆されている (reviewed in Fragkos *et al.*, 2015; reviewed in Wasylshen and Lozano, 2016)。「癌を制御する」ためには、まずこれらの機構が破綻する原因を突き止めることが必要であり、そのためには、正常細胞における DNA 複製初期プロセスや制御機構を理解することが重要であると考えられる。しかし、従来の解析方法では、技術的な課題点によりこれらの解析が困難であった。そこで私は、DNA 複製初期プロセスの解析が可能な新規 *in vitro* 系の確立およびそれを用いた解析を目標とし、検討を実施した。第 2 章で私が確立した環状 plasmid 固定化 magnetic beads を鋳型とした新規 *in vitro* DNA 複製系では、従来法で用いられる精子クロマチンと同様、真正の DNA 複製が起こっていることが示された。これを踏まえ、第 3 章では環状 plasmid 固定化 magnetic beads を迅速かつ簡単に磁石で回収できることという利点を活かし、今まで困難であった、より早いタイミングでの各複製関連タンパクの挙動について解析を試みた。

その結果、1 つの ORC-CDC6-CDT1 複合体はたった 1 つもしくは数個の MCM2-7 複合体しか DNA 上に loading せず、ORC-CDC6-CDT1 複合体は MCM loading 後に DNA から解離し、また新たな場所で pre-RC 形成を行うことを何度も繰り返し、数多くの MCM2-7 複合体を DNA 上に loading している可能性が示唆された。私は、geminin 添加および 0°C インキュベーションに認められた pre-RC 形成中間体の存在、ならびに pre-RC 形成プロセスにおける各分子のダイナミックな結合変化は、本研究の大きな成果と考えている。

私の研究成果および先行研究を踏まえると、本来、正常な真核生物においては、G1期にのみ ORC-CDC6-CDT1 複合体形成、およびそれらによる MCM loading が起こり、S 期になると ORC、CDC6、CDT1 は速やかに DNA から解離するが、ORC、CDC6、CDT1、MCM2-7 複合体が高発現している細胞では、geminin による pre-RC 形成阻害が機能せず、S 期においても ORC-CDC6-CDT1 複合体形成、およびそれらによる MCM loading が何度も繰り返し誘導されることが可能となり、DNA 再複製・不安定化、そして癌化に繋がっていると推察される。すなわち、癌細胞における CDT1、CDC6、MCM2-7 複合体は新たな創薬標的になりうる可能性を秘めていると考えられる。実際、癌細胞株における MCM7 を siRNA でノックダウンすると、*in vitro* 細胞増殖や *in vivo* 造腫瘍性が低下するという報告もでてきており (Shi *et al.*, 2010)、今後もこれらの分子を標的とした治療薬の検討が進むことが期待される。

第4章では、「癌を制御する」という目的を「新規抗がん剤によって増殖を抑制させる」という、より直接的なアプローチで研究することにした。従来から抗がん剤として広く使われてきた DNA 複製・細胞周期移行を阻害する「化学療法剤」は、幅広い癌種で増殖抑制効果が期待出来るものの、増殖性の高い正常細胞にも作用することから強い副作用を伴うことから、患者の生活の質を著しく低下させる。そのため、最近では癌で発現亢進している分子を標的とした「分子標的薬」の研究が盛んに行われている。しかし近年、「分子標的薬」として非常に注目されている抗体医薬は、生産コストの高さ、第一世代の抗体医薬への耐性獲得、一部の標的に集中した開発競争、などが課題点として挙げられる。そこで、私はこれらの問題を解決するため、より低用量で、より強い薬効が期待できる、十分な治療法がない難治性癌に対しても有効な新たな抗原を標的とした抗体医薬品の創出を目指した。その中で私はヒト臨床癌における高発現と予後不良に相関性が認められる B7-H3 タンパクに着目し、次世代型抗体である脱フコースヒト化 IgG1 抗体 DS-5573a を作製し、その臨床応用性を見極めることにした。

DS-5573a は、私の期待通りに親抗体である Hu-M30 と比較してより低用量から、より強い ADCC 活性を誘導すること (Figure 4-7)、さらに ADCP 活性も有すること (Figure 4-8) を示した。さらに、予後不良な低分化型腫瘍を形成する MDA-MB-231 移植 SCID マウスにおいて、DS-5573a は用量反応的かつ統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められること (Figure 4-9)、また免疫不全度が異なる MDA-MB-231 移植 SCID マウスおよび NOG マウスにおける薬効比較では、DS-5573a の薬効の大半がエフェクター細胞を介したものであることを明らかにした (Figure 4-10)。すなわち、本研究において作製された DS-5573a は、NK 細胞やマクロファージ細胞を介し、B7-H3 発現腫瘍に対して薬効が期待できる可能性が示された。また、DS-5573a を連続投与したカニクイザルが良好な耐容性を示すことも確認している (data not shown)。本研究成果は、十分な治療法が確立されていない難治性癌の中で、B7-H3 陽性患者に対して DS-5573a が新規治療用抗体のポテンシャルを有することを示唆しており、大きな研究成果と考えている。

今後の展望

私は本研究において、「癌を制御する」という目的を達成するために、正常細胞の DNA 複製機構の初期プロセスの詳細を解明するというアプローチと、実際に癌化した細胞の増殖を阻害する抗体医薬を探索・創出するというアプローチで癌研究を進めた。最近ではさらに技術が進歩し、抗体医薬に DNA 複製や細胞周期を制御する抗がん剤を結合させることで、癌細胞特異的に抗がん剤を送り込み、効率的に癌細胞を死滅させる ADC (antibody drug conjugate) という新たな次世代型抗体医薬品の研究開発が盛んに行われている。

ADC は、①癌細胞上に発現する標的抗原に対して ADC が結合する、②ADC-抗原複合体が細胞に内在化する、③細胞内のリソソームと会合して ADC が分解され、結合薬物が抗体から遊離・放出される、④細胞が薬剤作用により死滅する、というプロセスで作用する (Figure 5-1)。

2017 年 6 月現在、上市された ADC は、抗 CD33 抗体に DNA アルキル化剤を搭載した gemtuzumab ozogamicin (Bross *et al.*, 2001; Petersdorf *et al.*, 2013)、抗 CD30 抗体に微小管重合阻害剤 MMAE (monomethyl auristatin E) を結合させた brentuximab vedotin (Gopal *et al.*, 2012; Younes *et al.*, 2012; Ogura *et al.*, 2014)、抗 HER2 抗体である trastuzumab に微小管重合阻害剤 DM1 を結合させた trastuzumab emtansine (Burris *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012; Krop *et al.*, 2014) の 3 品目である。ADC は様々な癌種に対して適応拡大が期待される次世代抗体医薬の一つとして非常に注目を集めており、現在では 60 種類以上の ADC について臨床試験が行われている。ADC に搭載される薬剤について、現在臨床段階にあるものは MMAE や DM1 のような微小管重合阻害剤が大半を占めるが、最近では DNA 複製時に機能する Topoisomerase I の作用を阻害する DXd (DX-8951 derivative, Ogitani *et al.*, 2016) や DNA に直接結合して DNA 合成を阻害する作用を有する PBD (pyrrolobenzodiazepine, Kung *et al.*, 2013) などの新たな薬剤が注目を浴びている。

興味深いことに、ADC として強い薬効を示す薬剤は、いずれも DNA 複製や細胞周期を阻害するものであり、抗体医薬開発と DNA 複製・細胞周期制御の研究分野は非常に密接していることが明らかである。より詳細な DNA 複製メカニズムが明らかになれば、それを標的とした新たな作用機序を有する強力な ADC 用薬剤の開発、ひいてはその薬剤を搭載した新規 ADC 開発に繋がる可能性も秘められている。

また、ADC が効率良く機能するためには、薬剤の殺細胞活性の強さのみならず、抗体の内在化率、リソソーム移行率なども重要なファクターと考えられおり、最近では、同一標的の複数エピトープを認識する結合部位を持たせることで、内在化率を向上させた biparatopic 抗体 (Li *et al.*, 2016) や、リソソーム移行率の良い標的と癌標的の両方を認識させることで、内在化後のリソソーム移行率を向上させた bispecific 抗体 (Andreev *et al.*, 2017) など、ADC に特化した抗体研究も進められている。このように、ADC 研究はまだ発展の余地が残されている。

現在、第一三共株式会社において ADC 研究に従事している私は、今後もこの二つの研究分野の融合とシナジーを期待し、新たな ADC 創出を目指して、創薬研究を精力的に続けて行きたい。

ADC = 抗体 + 薬剤

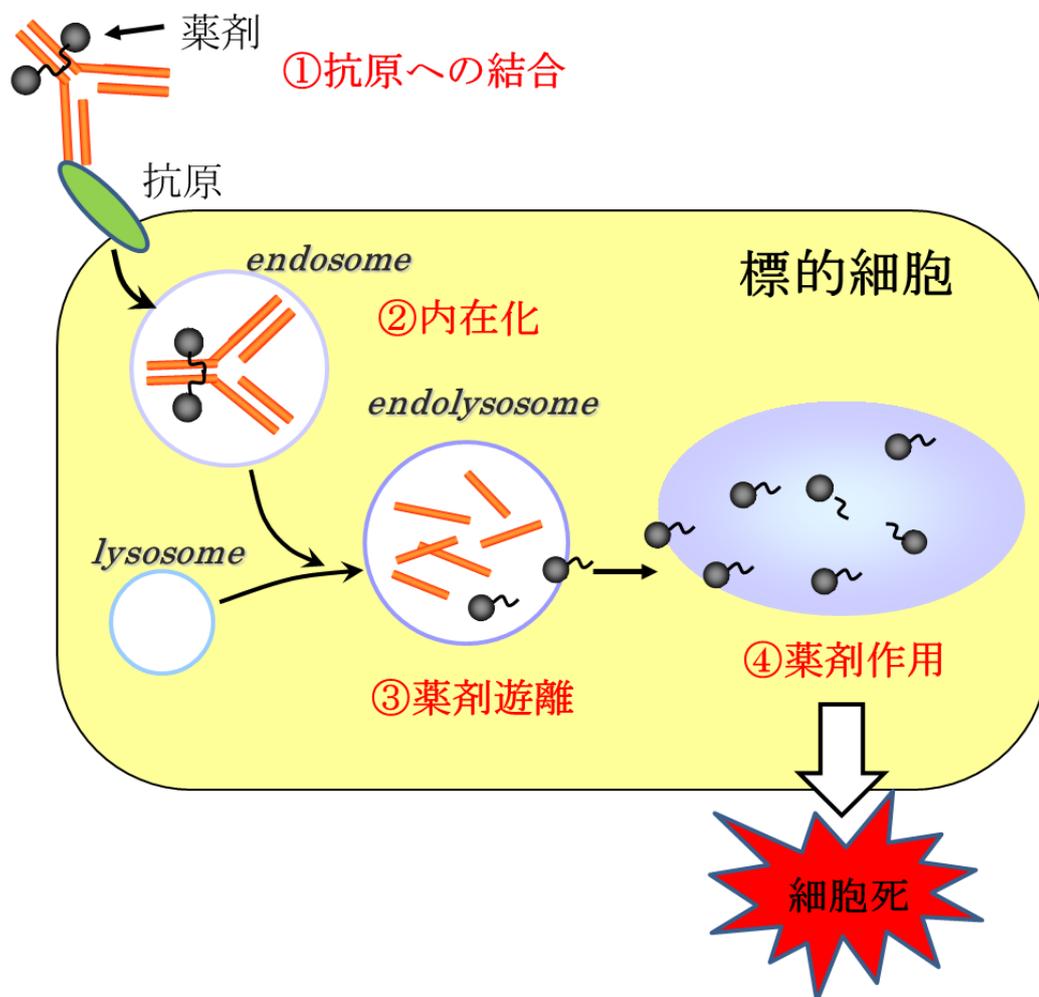


Figure 5-1 標的細胞に対する ADC の作用メカニズム

ADC は、①癌細胞上に発現する標的抗原に対して ADC が結合する、②ADC-抗原複合体が細胞に内在化する、③細胞内のリソソームと会合して ADC が分解され、結合薬物が抗体から遊離・放出される、④細胞が薬剤作用により死滅する、のプロセスで殺細胞活性を示す。

謝辞

本研究を学位論文にまとめるにあたり、多大なるご指導を頂いた奈良女子大学研究院自然科学系 生物科学領域 鍵和田 聡 教授、安田 恵子 教授、渡邊 利雄 教授に対して深く感謝申し上げます。

また、本学位論文の第2章ならびに第3章の研究を推進するにあたり、私がお阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻在籍中から熱心にご指導下さった、現日本女子大学理学部 物質生物科学科 分子生物学研究室 和賀 祥 教授に対しても深く感謝申し上げます。

さらに、本学位論文の第4章の研究を推進するにあたり、本研究および論文執筆の機会を与えて下さった第一三共株式会社 バイオ・癌免疫ラボラトリーの我妻 利紀 ラボラトリー長、阿部 有生 グループ長、本プロジェクトの立案や非臨床研究を共に実施、サポート頂いた福地 圭介 博士、矢澤 光弘 博士、高橋 秀 博士、山口 淳子 様、吉田 真 様、廣谷 賢志 様、高田 武彦 博士、大和 美智子 様、北村 道子 様、大久保 暁 様、ならびに論文執筆を手厚くサポートして下さった岩垂 勇人 博士をはじめとする DS-5573a publication subteam の皆様に対しても深く感謝申し上げます。

最後に、論文執筆や学位論文作成に理解を示し、サポート・応援して下さい下さった夫の両親および私の両親、いつも温かく見守り励ましてくれた夫 永瀬 弘之、そしていつも愛くるしい笑顔で私を応援し、私の働く原動力となってくれた最愛の息子達 永瀬 遙真と永瀬 篤弥に対しても深い感謝の意を表して謝辞といたします。

参考文献

Andreev J, Thambi N, Perez Bay AE, Delfino F, Martin J, Kelly MP, Kirshner JR, Rafique A, Kunz A, Nittoli T, MacDonald D, Daly C, Olson W, Thurston G. (2017)

Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Bridging HER2 and Prolactin Receptor Improve Efficacy of HER2 ADCs.

Mol Cancer Ther. 16(4):681-693.

Apericio OM, Weinstein DM, Bell SP. (1997)

Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase.

Cell. 91(1):59-69.

Arnold H, Bourseaux F, Brock N. (1958)

Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat.

Nature. 181(4613):931.

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. (1998)

Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts.

Cancer Res. 58(13):2825-31.

Bell SP, Stillman B. (1992)

ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex.

Nature. 357(6374):128-34.

Bell SP. (1995)

Eukaryotic replicators and associated protein complexes.

Curr Opin Genet Dev. 5(2):162-7.

Bell SP, Dutta A. (2002)

DNA replication in eukaryotic cells.

Annu Rev Biochem. 71:333-74.

Blow JJ, Laskey RA. (1986)

Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs.

Cell. 47(4):577-87.

Blow JJ, Dutta A. (2005)

Preventing re-replication of chromosomal DNA.

Nat Rev Mol Cell Biol. 6(6):476-86.

Borlado LR, Méndez J. (2008)

CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis.

Carcinogenesis. 29(2):237-43.

Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. (2001)

Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia.

Clin Cancer Res. 7(6):1490-6.

Brunner A, Hinterholzer S, Riss P, Henize G, Brustmann H. (2012)

Immunoexpression of B7-H3 in endometrial cancer: relation to tumor T-cell infiltration and prognosis.

Gynecol Oncol. 124(1):105-11.

Burriss HA 3rd, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S, Amler L, Zheng M, Chu YW, Klencke B, O'Shaughnessy JA. (2011)

Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy.

J Clin Oncol. 29(4):398-405.

Carpenter PB, Mueller PR, Dunphy WG. (1996)

Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication.

Nature. 379(6563):357-60.

Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. (2002)

Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene.

Blood. 99(3):754-8.

Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha AC, Chan CK, Tan BT, Park CY, Zhao F, Kohrt HE, Malumbres R, Briones J, Gascoyne RD, Lossos IS, Levy R, Weissman IL, Majeti R. (2010)

Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma.

Cell. 142(5):699-713.

Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. (2001)

B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production.

Nat Immunol. 2(3):269-74.

Chen YW, Tekle C, Fodstad O. (2008)

The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion.

Curr Cancer Drug Targets. 8(5):404-13.

Chong JP, Thommes P, Rowles A, Mahbubani HM, Blow JJ. (1997)

Characterization of the *Xenopus* replication licensing system.

Methods Enzymol. 283:549-64.

Chowdhury A, Liu G, Kemp M, Chen X, Katrangi N, Myers S, Ghosh M, Yao J, Gao Y, Bubulya P, Leffak M. (2010)

The DNA unwinding element binding protein DUE-B interacts with Cdc45 in preinitiation complex formation.

Mol Cell Biol. 30(6):1495-507.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. (2002)

CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma.

N Engl J Med. 346(4):235-42.

Coleman TR, Carpenter PB, Dunphy WG. (1996)

The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts.

Cell. 87(1):53-63.

Cook JG, Chasse DA, Nevins JR. (2004)

The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells.

J Biol Chem. 279(10):9625-33.

- Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Thompson RH, Boorjian SA, Dong H, Leibovich BC, Blute ML, Kwon ED. (2008)
Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma.
Clin Cancer Res. 14(16):5150-7.
- Crowe A.J, Barton M.C. (1999)
In vitro reconstitution of nuclei for replication and transcription.
Methods Enzymol. 304:63-76.
- Dimitrova DS, Todorov IT, Melendy T, Gilbert DM. (1999)
Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex.
J Cell Biol. 146(4):709-22.
- Duan H, Huang M. (2012)
Genome-wide identification and evolutionary analysis of B7-H3.
Int J Data Min Bioinform. 6(3):292-303.
- Edwards MC, Tutter AV, Cvetic C, Gilbert CH, Prokhorova TA, Walter JC. (2002)
MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts.
J Biol Chem. 277(36):33049-57.
- Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Méchali M. (2015)
DNA replication origin activation in space and time.
Nat Rev Mol Cell Biol. 16(6):360-74.
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK, Toogood PL. (2004)

Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts.

Mol Cancer Ther. 3(11):1427-38.

Fukui T, Yamauchi K, Muroya T, Akiyama M, Maki H, Sugino A, Waga S. (2004)

Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts.

Genes Cells. 9(3):179-91.

Furukohri A, Sato N, Masai H, Arai K, Sugino A, Waga S. (2003)

Identification and characterization of a *Xenopus* homolog of Dbf4, a regulatory subunit of the Cdc7 protein kinase required for the initiation of DNA replication.

J Biochem. 134(3):447-57.

Gillespie PJ, Blow JJ. (2000)

Nucleoplasmin-mediated chromatin remodelling is required for *Xenopus* sperm nuclei to become licensed for DNA replication.

Nucleic Acids Res. 28(2):472-80.

Gopal AK, Ramchandren R, O'Connor OA, Berryman RB, Advani RH, Chen R, Smith SE, Cooper M, Rothe A, Matous JV, Grove LE, Zain J. (2012)

Safety and efficacy of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma recurring after allogeneic stem cell transplantation.

Blood. 120(3):560-8.

Gusterson B, Cowley G, McIlhinney J, Ozanne B, Fisher C, Reeves B. (1985)

Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas.

Int J Cancer. 36(6):689-93.

Hashimoto Y, Takisawa H. (2003)

Xenopus Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication.

EMBO J. 22(10):2526-35.

Harvey KJ, Newport J. (2003)

Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis.

J Biol Chem. 278(49):48524-8.

Heald R, Tournebise R, Blank T, Sandaltzopoulos R, Becker P, Hyman A, Karsenti E. (1996)

Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extract.

Nature. 382(6590):420-5.

Hein AL, Ouellette MM, Yan Y. (2014)

Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review).

Int J Oncol. 45(5):1813-9.

Hertz R, Lipsett MB, Moy RH. (1960)

Effect of vincalurekoblantine on metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women.

Cancer Res. 20:1050-3.

Homesley L, Lei M, Kawasaki Y, Sawyer S, Christensen T, Tye BK. (2000)

Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins.

Genes Dev. 14(8):913-26.

Ishimi Y. (1997)

A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex.

J Biol Chem. 272(39):24508-13.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. (2002)

NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse:

an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells.

Blood. 100(9):3175-82.

Jares P, Blow JJ. (2000)

Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading.

Genes Dev. 14(12):1528-40.

Kang FB, Wang L, Jia HC, Li D, Li HJ, Zhang YG, Sun DX. (2015)

B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway.

Cancer Cell Int. 15:45

Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. (1997)

FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype.

Blood. 90(3):1109-14.

Kong D, Coleman TR, DePamphilis ML. (2003)

Xenopus origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC.

EMBO J. 22(13):3441-50.

Krop IE, Kim SB, González-Martín A, LoRusso PM, Ferrero JM, Smitt M, Yu R, Leung AC, Wildiers H; TH3RESA study collaborators. (2014)

Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial.

Lancet Oncol. 15(7):689-99.

Krude T, Musahl C, Laskey RA, Knippers R. (1996)

Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication.

J Cell Sci. 109 (Pt 2):309-18.

Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Masuda T, Nojima H, Takisawa H. (1997)

Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs.

EMBO J. 16(11):3320-31.

Kubota Y, Takase Y, Komori Y, Hashimoto Y, Arata T, Kamimura Y, Araki H, Takisawa H. (2003)

A novel ring-like complex of *Xenopus* proteins essential for the initiation of DNA replication.

Genes Dev. 17(9):1141-52.

Kung Sutherland MS, Walter RB, Jeffrey SC, Burke PJ, Yu C, Kostner H, Stone I, Ryan MC, Sussman D, Lyon RP, Zeng W, Harrington KH, Klussman K, Westendorf L, Meyer D, Bernstein ID, Senter PD, Benjamin DR, Drachman JG, McEarchern JA. (2013)

SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML.

Blood. 122(8):1455-63.

Kunimoto T, Nitta K, Tanaka T, Uehara N, Baba H, Takeuchi M, Yokokura T, Sawada S, Miyasaka T, Mutai M. (1987)

Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors.

Cancer Res. 47(22):5944-7.

Kwok HF, Zhang SD, McCrudden CM, Yuen HF, Ting KP, Wen Q, Khoo US Chan KY. (2014)

Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer.

Am J Cancer Res. 5(1):52-71.

Laskey RA, Madine MA. (2003)

A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks.

EMBO Rep. 4(1):26-30.

Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. (1999)

Variant genotypes of the low-affinity Fc γ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc γ receptor polymorphisms in control and disease populations.

Blood. 94(12):4220-32.

Leno GH, Laskey RA. (1991)

DNA replication in cell-free extracts from *Xenopus laevis*.

Methods Cell Biol. 36:561-79.

Leppers-van de Straat FG, van der Pol WL, Jansen MD, Sugita N, Yoshie H, Kobayashi T, van de Winkel JG. (2000)

A novel PCR-based method for direct Fcγ receptor IIIa (CD16) allotyping.

J Immunol Methods. 242(1-2):127-32.

LePro PharmaCompass OPC Private Limited. (2017)

Top drugs by sales revenue in 2015: Who sold the biggest blockbuster drugs?

(Accessed Dec. 25, 2017) Available from URL:

<http://www.pharmacompass.com/radio-compass-blog/top-drugs-by-sales-revenue-in-2015-who-sold-the-biggest-blockbuster-drugs>

Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, Hinrichs MJ, Bezabeh BZ, Fleming RL, Dimasi N, Feng H, Toader D, Yuan AQ, Xu L, Lin J, Gao C, Wu H, Dixit R, Osbourn JK, Coats SR. (2016)

A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy.

Cancer Cell. 29(1):117-29.

Madine MA, Khoo CY, Mills AD, Musahl C, Laskey RA. (1995)

The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts.

Curr Biol. 5(11):1270-9.

Mahbubani HM, Paull T, Elder JK, Blow JJ. (1992)

DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts.

Nucleic Acids Res. 20(7):1457-62.

Mahbubani HM, Chong JP, Chevalier S, Thommes P, Blow JJ. (1997)

Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor.

J Cell Biol. 136(1):125-35.

Maiorano D, Moreau J, Méchali M. (2000)

XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*.
Nature. 404(6778):622-5.

McGarry TJ, Kirschner MW. (1998)

Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis.
Cell. 93(6):1043-53.

McNairn AJ, Okuno Y, Misteli T, Gilbert DM. (2005)

Chinese hamster ORC subunits dynamically associate with chromatin throughout the cell-cycle.
Exp Cell Res. 308(2):345-56.

Mimura S, Takisawa H. (1998)

Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk.
EMBO J. 17(19):5699-707.

Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. (2008)

Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer.
J Clin Oncol. 26(11):1789-96.

Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P. (2000)

The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast.
Nature. 404(6778):625-8.

Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Yokoi H, Nakamura K, Shitara K. (2004)

Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 Is independent of FcγRIIIa functional polymorphism.

Clin Cancer Res. 10(18 Pt 1):6248-55.

Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, Nakamura K, Shitara K. (2005)

Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density.

Clin Cancer Res. 11(6):2327-36.

Oehlmann M, Score AJ, Blow JJ. (2004)

The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation.

J Cell Biol. 165(2):181-90.

Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, Yamaguchi J, Ishii C, Harada N, Soma M, Okamoto H, Oitate M, Arakawa S, Hirai T, Atsumi R, Nakada T, Hayakawa I, Abe Y, Agatsuma T. (2016)

DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1.

Clin Cancer Res. 22(20):5097-5108.

Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Ishizawa K, Uike N, Uchida T, Suzuki T, Aoki T, Watanabe T, Maruyama D, Yokoyama M, Takubo T, Kagehara H, Matsushima T. (2014)

Phase I / II study of brentuximab vedotin in Japanese patients with relapsed or refractory CD30-positive Hodgkin's lymphoma or systemic anaplastic large-cell lymphoma.

Cancer Sci. 105(7):840-6.

Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, Willman C, Nevill T, Brandwein J, Larson RA, Erba HP, Stiff PJ, Stuart RK, Walter RB, Tallman MS, Stenke L, Appelbaum FR. (2013)

A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia.

Blood. 121(24):4854-60.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. (1997)

Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders.

Cancer Res. 57(20):4593-9.

Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, Goldstein NI. (1996)

The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma.

J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 19(6):419-27.

Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. (2008)

Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells.

Mol Cancer Ther. 7(8):2517-27.

Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Inman BA, Krambeck AE, McKenney ME, Karnes RJ, Blute ML, Cheville JC, Sebo TJ, Kwon ED. (2007)

B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy.

Cancer Res. 67(16):7893-900.

Rowles A, Chong JP, Brown L, Howell M, Evan GI, Blow JJ. (1996)

Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*.

Cell. 87(2):287-96.

Rowles A, Tada S, Blow JJ. (1999)

Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins.

J Cell Sci. 112(Pt 12):2011-8.

Sakaguchi N, Kimura T, Matsushita S, Fujimura S, Shibata J, Araki M, Sakamoto T, Minoda C, Kuwahara K. (2005)

Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in the Ganp gene-transgenic mouse.

J Immunol. 174(8):4485-94.

Sanuki Y, Kubota Y, Kanemaki MT, Takahashi TS, Mimura S, Takisawa H. (2015)

RecQ4 promotes the conversion of the pre-initiation complex at a site-specific origin for DNA unwinding in *Xenopus* egg extracts.

Cell Cycle. 14(7):1010-23.

Shi YK, Yu YP, Tseng GC, Luo JH. (2010)

Inhibition of prostate cancer growth and metastasis using small interference RNA specific for minichromosome complex maintenance component 7.

Cancer Gene Ther. 7(10):694-9.

Silence K, Dreier T, Moshir M, Ulrichs P, Gabriels SM, Saunders M, Wajant H, Brouckaert P, Huyghe L, Van Hauwermeiren T, Thibault A, De Haard HJ. (2014)

ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade.

MAbs. 6(2):523-32.

Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. (2000)

Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase.

Clin Cancer Res. 6(12):4885-92.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. (2001)

Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.

N Engl J Med.344(11):783-92.

Sonneville R, Querenet M, Craig A, Gartner A, Blow JJ. (2012)

The dynamics of replication licensing in live *Caenorhabditis elegans* embryos.

J Cell Biol. 196(2):233-46

Speck C, Chen Z, Li H, Stillman B. (2005)

ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA.

Nat Struct Mol Biol. 12(11):965-71.

Stewart BW and Wild CP. (2014)

World Cancer Report

World Health Organization, p.630

Sun J, Chen LJ, Zhang GB, Jiang JT, Zhu M, Tan Y, Wang HT, Lu BF, Zhang XG. (2010)

Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma.

Cancer Immunol Immunother. 1163-71

Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. (2006)

B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer.

Lung Cancer. 53(2):143-51.

Takahashi S, Matsuoka T, Murakami K, Takizawa T, Hitorani K, Urano A, Fukuchi K, Yazawa M. (2012)

ANTI-B7-H3 ANTIBODY.

WO 2012/147713

Takayama Y, Kamimura Y, Okawa M, Muramatsu S, Sugino A, Araki H. (2003)

GIN5, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast.

Genes Dev. 17(9):1153-65.

Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deutch A, Gutman M, Assaf D, Kris R, Shiloh Y, Givol D, Schlessinger J. (1988)

Sporadic amplification of the HER2/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues.

Cancer Res. 48(6):1517-20.

Tatsumi Y, Sugimoto N, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. (2006)

Deregulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability.

J Cell Sci. 119(Pt 15):3128-40.

Thomae AW, Baltin J, Pich D, Deutsch MJ, Ravasz M, Zeller K, Gossen M, Hammerschmidt W, Schepers A. (2011)

Different roles of the human Orc6 protein in the replication initiation process.
Cell Mol Life Sci. 68(22):3741-56.

Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ, Walter JC. (2003)

Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex.

Genes Dev. 17(15):1894-908.

Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A. (2003)

A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication.

Mol Cell. 11(4):997-1008.

Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K; EMILIA Study Group. (2012)

Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer.

N Engl J Med. 367(19):1783-91.

Waga S, Stillman B. (1994)

Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*.

Nature. 369(6477):207-12.

Walter J, Newport JW. (1997)

Regulation of replicon size in *Xenopus* egg extracts.

Science. 275(5302):993-5.

Walter J, Sun L, Newport J. (1998)

Regulated chromosomal DNA replication in the absence of a nucleus.

Mol Cell. 1(4):519-29.

Walter JC. (2000)

Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts.

J Biol Chem. 275(50):39773-8.

Walter J, Newport J. (2000)

Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha.

Mol Cell. 5(4):617-27.

Wang L, Kang FB, Shan BE. (2014)

B7-H3-mediated tumor immunology: Friend or foe?

Int J Cancer. 134(12):2764-71.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. (1971)

Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.

J Am Chem Soc. 93(9):2325-7.

Wasylishen AR, Lozano G. (2016)

Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End.

Cold Spring Harb Perspect Med. 6(8).

Weiskopf K, Ring AM, Ho CC, Volkmer JP, Levin AM, Volkmer AK, Ozkan E, Fernhoff NB, van de Rijn M, Weissman IL, Garcia KC. (2013)

Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies.

Science. 341(6141):88-91.

Weiskopf K, Weissman IL. (2015)

Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer.

MAbs. 303-10.

Wohlschlegel JA, Dhar SK, Prokhorova TA, Dutta A, Walter JC. (2002)

Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45.

Mol Cell. 9(2):233-40.

Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL. (2002)

Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways.

Oncogene. 21(41):6255-63.

Xu H, Cheung IY, Guo HF, Cheung NK. (2009)

MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors.

Cancer Res. 69(15):6275-81.

Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. (2010)

Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma.

J Clin Oncol. 28(9):1591-8.

Yanagi K, Mizuno T, You Z, Hanaoka F. (2002)

Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity.

J Biol Chem. 277(43):40871-80.

Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, Ramchandren R, Bartlett NL, Cheson BD, de Vos S, Forero-Torres A, Moskowitz CH, Connors JM, Engert A, Larsen EK, Kennedy DA, Sievers EL, Chen R. (2012)

Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma.

J Clin Oncol. 30(18):2183-9.

Yuan H, Wei X, Zhang G, Li C, Zhang X, Hou J. (2011)

B7-H3 over expression in prostate cancer promotes tumor cell progression.

J Urol. 186(3):1093-9.

Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, Chang HM, Borucka E, Lurje G, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. (2007)

FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab.

J Clin Oncol. 25(24):3712-8.