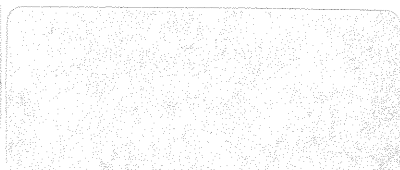


199800123A

# ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析

主任研究者  
高橋利忠



分野 1 : 発がんの分子機構に関する研究  
研究テーマ ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析

主任研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所副所長

研究要旨 本研究では、(a)造血器腫瘍と(b)肺がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割、並びに(c)がん浸潤・転移に於ける細胞接着分子の役割を明らかにするため研究を進めている。本年度の主たる成果は以下の様である。

(a)1)MLL転座関連遺伝子(11q23)による発がん機構を解析するため、MLLキメラ遺伝子をマウス白血病細胞株に導入後、IPTGを用い、発現誘導した所、ホメオボックス遺伝子であるHox-a7, b7, c9の発現が抑制された。即ち、これらHox遺伝子が、MLLの標的遺伝子となっている可能性が示唆された。2)MALT型粘膜関連Bリンパ腫に高頻度に認められるt(11;18)(q21;q21)転座の18q21切断点領域を含むYACクローンを単離した。次いで、BACクローンを単離し、候補遺伝子の転写単位の一部を同定した。

(b)3)肺がんにおける17p13.3欠失領域の標的がん抑制遺伝子候補とし、Rox/Mnt遺伝子を検索したが、変異を認めなかった。一方、STSマーカーを用いた検索より、17p13.3にホモ欠失を示す肺がん細胞株を得た。4)肺がんにおけるTGF- $\beta$ 情報伝達系の異常を既に報告したが、正常気道上皮細胞株において、TGF- $\beta$ 刺激によりSmad3遺伝子の発現が抑制されること、またTGF- $\beta$ 刺激とSmad3強制発現によりアポトーシスが誘導されることを示した。

(c)5)NCC-ST-439単クローン抗体の認識抗原は腫瘍マーカーとして用いられているが、本抗原が特殊なムチン型糖鎖に担われたシアリルLe<sup>a</sup>であり、E-セレクトインとの結合能を持つ細胞接着糖鎖であることを示した。6)ヒトリンパ節高内皮細静脈に発現しているL-セレクトインのリガンドが、シアリル6-スルホLe<sup>a</sup>であることを見出し、さらに、この糖鎖を合成する6-スルホトランスフェラーゼの遺伝子単離に成功した。

#### 分担研究者

1. 愛知県がんセンター研究所副所長 高橋 利忠
2. 愛知県がんセンター研究所 部長 瀬戸 加大
3. 愛知県がんセンター研究所 部長 高橋 隆
4. 愛知県がんセンター研究所 部長 神奈木玲児

#### A. 研究目的

ヒト腫瘍の分子病態の研究は近年急速に進み、造血器腫瘍では転座関連遺伝子が、また、固型がんでは、がん遺伝子、がん抑制遺伝子が既に多く単離されてはいるが、現時点で未知の重要遺伝子の存在も予想されている。また、転移・浸潤に関する研究も進み、接着分子を含む多くの要因の関与が想定されているが、その制御に関する研究は、緒のついた所である。

本研究では、ヒト腫瘍の診断・治療の向上を目指すし、(a)造血器腫瘍では(1)MLL等転座関連遺伝子から成るキメラ遺伝子の腫瘍発生に於ける役割、

及び(2)MALT型粘膜関連Bリンパ腫に見られる18q21染色体転座に関連する遺伝子の単離、(b)肺がんでは(3)17p13領域に想定されるp53以外のがん抑制遺伝子の単離と発現異常の解析、及び(4)樹立した不死化ヒト末梢肺上皮細胞株を用いてのTGF- $\beta$ 情報伝達系の解析、(c)浸潤・転移では(5)セレクトインの新規糖鎖リガンドの同定とこれら分子の発現に関与する酵素の同定及び遺伝子単離を試みる。

#### B. 研究方法

(1)11q23に位置するMLL転座関連遺伝子の白血病発症における役割

t(9;11)転座により形成されるMLL-LTG9/AF9キメラ遺伝子を発現する造血器細胞株の樹立を以前試みたが、成功しなかった。本年度は、IPTG誘導発現ベクターにより発現制御できる造血器細胞株の樹立を試みる。また、MLL転座切断点のN端側(MLL-Zf(-))に関しても同様に誘導発現系を樹立する。ウエスタ

ン解析で、IPTG添加による発現誘導を確認した後、標的遺伝子を探索する。樹立細胞株でMLL-LTG9あるいはMLL-Zf(-)を誘導発現させ、MLLノックアウトマウスでMLLとの関与が示唆されているHox遺伝子群について発現の変化を検討する。

#### (2)MALTリンパ腫にみられるt(11;18)転座関連遺伝子の単離・解析

MALTリンパ腫に高頻度に認められるt(11;18)転座切断点を解析するために、18q21領域に位置するYACクローンを用いて、FISH解析を行う。転座切断点を認識するYACを同定した後、PAC並びにBACコンテイングを作製し、転座切断点を認識するPACあるいはBACを同定することで同領域からの遺伝子単離のための基点とする。さらに、同領域からexon trapping法により標的遺伝子の同定を試みる。

#### (3)肺がんにおける17p13.3領域の未知のがん抑制遺伝子の単離・同定

我々が17p13.3に同定した共通欠失領域内にマップされたRox/Mnt遺伝子に関し、肺がん症例における遺伝子変異検索をPCR-SSCP法及びサザン法を用いて行う。また、ポジショナルクローニング法による遺伝子同定を進めるべく、17p13.3の共通欠失領域内にマップされた多数のSTSマーカーを用い、肺がん細胞株を検索し、ホモ欠失の存在部位の限定化を計る。

#### (4)固型がんの発症・進展におけるTGF- $\beta$ シグナル伝達系異常の検討

我々が昨年度樹立した正常肺上皮細胞株等を用い、EGF、TGF- $\beta$ 、血清等の刺激によるSmad2、Smad3、及びSmad4遺伝子の発現の変化と細胞生物学的影響との関連性について検討する。

また、肝細胞がんにおけるTGF- $\beta$ シグナル伝達系の異常について、Smad2、Smad3、Smad4遺伝子のRT-PCR-SSCP法による検索をヒト肝細胞がん株を用いて行う。

#### (5)がん細胞と血管内皮細胞との接着に関する新規の糖鎖構造同定及びその発現機序の検索

細胞接着分子であるセレクチンのリガンドとしてはシアリルLe<sup>a</sup>、シアリルLe<sup>x</sup>以外にも新規糖鎖が存在すると考えられる。糖鎖抗原に対する単クローン抗体であるNCC-ST-439抗体を指標に認識抗原を同定する。その際、糖鎖の発現に関わる酵素による処理並びに酵素遺伝子導入による抗原の変化を検索し、更に純品糖鎖との反応性を検討する。また、培養血

管内皮細胞を用い、各種培養がん細胞との接着を観察し、各接着分子に特異的な単クローン抗体を用いて接着阻止実験を行う。リコンビナントLセレクチン蛋白を用いた結合実験を行い、新規糖鎖リガンドを検索する。更にこれら新規の糖鎖リガンドの発現を調節する転移酵素を同定し、新規なものについては遺伝子単離を行う。

### C. 研究結果

#### (1)11q23に位置するMLL転座関連遺伝子の白血病発症における役割

MLL-LTG9とMLL-N端側(MLL-Zf(-))をIPTGで誘導発現が可能な発現ベクターに組み込み、32Dc13マウス白血病細胞株に導入し、細胞株を樹立した。IPTG添加後、約6時間から、蛋白の発現が認められ、48時間後にも発現が維持されていることをウエスタン法で確認した。また、32Dc13で発現されているHox遺伝子群を検索した所、Hox-a7, b7, c9が発現していたが、MLL-LTG9あるいはMLL-N端側(MLL-Zf(-))を誘導発現させた所、これらHox-a7, b7, c9はともに発現が抑制された。本成績により、これらのHox遺伝子がMLL遺伝子異常の標的遺伝子であることが明らかとなった。

#### (2)MALTリンパ腫にみられるt(11;18)転座関連遺伝子の単離・解析

18q21領域に位置するYACクローンを用い、t(11;18)(q21;q21)を有するMALTリンパ腫症例を対象にしFISH解析を行い、18q21領域の転座切断点を認識するYACを同定した。詳細に解析するために本クローンを用いてBAC及びPACライブラリーをスクリーニングし、コンテイングを作製した。これらを用いて患者検体でFISH解析を行った所、18q21転座切断点領域に欠失が認められることが明らかとなった。さらに2症例を追加し、検討した所、これら2症例にも欠失が認められ、MALTリンパ腫3症例すべてに共通する欠失領域として約200kbを同定することに成功した。また、転座切断点を認識するBACクローンも同定した。現在、本領域から転写単位を検出することで遺伝子の同定を進めつつある。

#### (3)肺がんにおける17p13.3領域の未知のがん抑制遺伝子の単離・同定

最近単離されたmycアンタゴニストであるRox/Mnt遺伝子は、我々が同定した共通欠失領域内にマップされ、機能的にみても良い標的遺伝子候補である。

そこで、PCR-SSCP法及びサザン法を用いて52例の肺がん症例について変異検索を行った。その結果、3種類のポリモルフィズムを新たに見出したが、体細胞変異を認めず、Rox/Mnt遺伝子は、17p13.3欠失の標的がん抑制遺伝子ではないと考えられた。そこで、ポジショナルクローニング法による探求を進めるため、共通欠失領域内に位置する12個のSTSマーカーと78例の肺がん細胞株を用いてスクリーニングを施行した。STSマーカーの1つが肺がん細胞株においてホモ欠失の存在を示し、標的遺伝子の存在部位を共通欠失領域内のさらに狭い領域に限定化することに成功した。

#### (4) 固型がんの発症・進展におけるTGF- $\beta$ シグナル伝達系異常の検討

正常肺上皮細胞株においてSmad3遺伝子の発現はSmad2或いはSmad4遺伝子と異なり、TGF- $\beta$ 刺激自身によって抑制されること、また、その負の制御は転写レベルで行われている可能性を明らかとした。さらにテトラサイクリンによる発現調節可能なベクターシステムを用い、TGF- $\beta$ 存在下において、Smad3の構成的発現を誘導した所、肺上皮細胞にはアポトーシスが誘導された。

肝がん細胞株には、TGF- $\beta$ によるアポトーシス誘導が顕著なものと抵抗性を示すものが存在する。そこで、TGF- $\beta$ 抵抗性の獲得における細胞内シグナル伝達系の異常の関与について検討した。7株においてSmad2, Smad3, Smad4遺伝子変異をRT-PCR-SSCP法により検索したが、いずれの細胞株においてもSmad遺伝子の変異を認めなかった。

#### (5) がん細胞と血管内皮細胞との接着に関与する新規の糖鎖構造の検索

NCC-ST-439抗体の認識抗原は、消化器がんや乳がんの腫瘍マーカーとしてすでに臨床応用されているにもかかわらず、認識糖鎖は長年不明であったが、我々は認識抗原が、特殊な構造のシアリルLe<sup>x</sup>であることを見出した。本抗原はシアリダーゼ感受性であり、また陰性細胞にフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を強制発現させることにより発現することから、シアリル酸とフコースがエピトープに関与すると考えられ、シアリルLe<sup>x</sup>にきわめて近縁の糖鎖であると推定された。さらに、純品糖鎖との反応性を検索した所、NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Rと極めて強く反応し、ムチン型糖鎖の二型ないし四型母核構造に担われたシ

アリルLe<sup>x</sup>であることが明らかとなった。本抗体は通常のシアリルLe<sup>x</sup>とは反応せず、ムチン型糖鎖のうちでも、GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 母核上のシアリルLe<sup>x</sup>とのみ反応する。従って、通常の抗シアリルLe<sup>x</sup>抗体よりも狭い特異性を持つ。本糖鎖もE-セレクトインとの結合性を持つことを、抗体を用いた接着阻害実験により明らかとした。

#### (6) セレクトインの糖鎖リガンドの合成発現の調節機構の検索

リンパ節の高内皮細静脈のL-セレクトインリガンド分子がシアリル6-スルホLe<sup>x</sup>であること、さらに本糖鎖は培養白血病細胞やがん細胞株の一部にも発現が認められたことを示した。これまでにこの糖鎖に存在するような、GlcNAc残基の6位を硫酸化する酵素は報告されておらず、遺伝子の単離を試みた。以前に報告されているコンドロイチン6-硫酸転移酵素の配列をもとに相同性のある配列情報を得、その内の一つの配列をもとにプローブを作成し、マウス7.5日胚cDNAライブラリーよりcDNAクローンを得た。ORFは483アミノ酸残基より成るII型の膜タンパク質をコードしており、IV型フコース転移酵素、Fuc-T IV cDNAとコトランスフェクションしたCOS-7細胞は抗6-硫酸化Le<sup>x</sup>抗体に陽性となり、また、VII型フコース転移酵素、FucT VII cDNAとのコトランスフェクションでは抗シアリル6-スルホLe<sup>x</sup>抗体に陽性となった。本成績により、本cDNAクローンは6-スルホトランスフェラーゼをコードしていることが示された。更に、きわめて高いホモロジーを有するヒト遺伝子の単離にも成功している。

#### D. 考察

##### (1) 11q23に位置するMLL転座関連遺伝子の白血病発症における役割

これまで、MLL遺伝子の標的遺伝子として、MLLノックアウトマウスの解析により、Hox遺伝子群が示唆されていたが、本研究で樹立した誘導系を用いた解析により、MLLキメラ遺伝子の発現がHox-a7, b7, c9の発現抑制を誘導することを明らかにし、これらHox遺伝子が標的遺伝子であることをより直接的に示した。これまでHox遺伝子群は造血器細胞の分化、増殖に関与していることが示唆されていたが、MLL遺伝子異常が、これらの発現制御異常を誘導し、白血病発症につながる可能性が示唆された。今後、誘導発現系を利用し、Hox遺伝子群の他にも複数あ

ると考えられるMLL遺伝子異常の標的遺伝子を明らかにして行きたいと考えている。

#### (2)MALTリンパ腫にみられるt(11;18)転座関連遺伝子の単離・解析

我々はこれまでにMALTリンパ腫に特徴的に認められるt(11;18)転座の18q21転座切断点領域を解析してきたが、FISH解析することで約200kbまでに切断点を限定した。更に、転座に伴う共通欠失領域の存在を示した。これらの成績はがん抑制遺伝子の存在を推測させるが、一方、特定の領域との相互転座によるがん遺伝子活性化機構の可能性も示唆している。また、exon trapping法により部分的な転写単位の検出に成功している。今後、標的遺伝子を同定し、本転座による遺伝子異常の本体を明らかにしたい。また、11q21領域にある相手転座関連遺伝子を解析する手がかりを確立することも重要な課題である。

#### (3)肺がんにおける17p13.3領域の未知のがん抑制遺伝子の単離・同定の試み

Rox/Mnt遺伝子はその存在部位からも、また機能面からも良い標的がん抑制遺伝子候補と考えられたが、本研究により、他の未知の標的遺伝子の存在が示唆された。今後は、肺がん細胞株の解析によって共通欠失領域内に見出した微視的ホモ欠失を主たる研究対象とし、標的遺伝子の単離・同定を目指したい。現在ホモ欠失領域をカバーするBAC、YACコンテイングを作成し、検討を進めつつある。

#### (4)固型がんの発症・進展におけるTGF- $\beta$ シグナル伝達系異常の検討

正常肺上皮細胞においてTGF- $\beta$ のシグナル伝達分子であるSmad3がネガティブフィードバックによる制御を受けていること、またTGF- $\beta$ 存在下におけるSmad3の構成的発現はアポトーシスを誘導し得ることを明らかとした。本研究により、TGF- $\beta$ によるSmad3の発現抑制が過剰な負のシグナルの回避機構である可能性が示唆された。予備実験により小細胞性肺がんにおいてはSmad3の発現低下がみられることを観察しており、その発症・進展への関わりについて更に検討を進めつつある。

また、肝細胞がん株にSmad遺伝子変異を認めなかったが、Smad3遺伝子にのみTGF- $\beta$ 刺激によるmRNA発現レベルの変動を観察している。現在、本現象とアポトーシス誘導との関連性について検討を進めつつある。

#### (5)がん細胞と血管内皮細胞との接着に關与する

#### 新規の糖鎖構造の検索

NCC-ST-439抗体の認識抗原が、特殊なムチン型糖鎖に担われたシアリルLe<sup>x</sup>であることを明らかにした。従来、認識抗原の検索は、糖脂質抗原をスクリーニングすることにより、進められてきたが、このムチン型糖鎖の母核は、天然の糖脂質には見出されないで、長年同定できなかつたと考えられる。

また、認識抗原の母核構造GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ に関しては、我々は以前Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Rに対して特異抗体F1 $\alpha$ -75を作成し、胃がんなど消化器がんを高頻度に発現することを観察しており、これとNCC-ST-439抗体との関連を今後検索して行きたい。

#### (6)セレクチンの糖鎖リガンドの合成発現の調節機構の検索

高内皮細静脈に発現しているL-セレクチンリガンドとして同定したシアリル6-スルホLe<sup>x</sup>を合成する酵素である6-スルホトランスフェラーゼの遺伝子単離に成功した。我々は1994年にVII型フコシルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングしており、本硫酸化糖鎖リガンドの合成に必要な2つの転移酵素遺伝子を単離したことになる。

この糖鎖は、リンパ球系細胞のリンパ節へのホーミングに關与するので、L-セレクチンが強発現する非ホジキンリンパ腫の一部等のリンパ系腫瘍では、リンパ節浸潤に關与している可能性が高く、今後検索して行きたい。

#### E. 結論

乳児白血病、二次性白血病に關与する11q23転座関連遺伝子、MLLの白血病発症機構を解析するため、キメラ型産物であるMLL-LTG9と分断型遺伝子であるMLL-Zf(-)の発現を試みた。マウス白血病細胞株32Dc13に導入して発現誘導可能な細胞株を樹立し、解析することにより、ノックアウトマウスでMLL遺伝子との関連が示唆されていたHox遺伝子群が、MLL遺伝子異常の標的であることを明らかとした。

MALTリンパ腫に認められる特異的な染色体転座t(11;18)(q21;q21)の18q21転座切断点をFISH解析し、約200kbの共通欠失領域が存在していることを示した。転座切断点を認識するBACクローンを同定しており、また、転写単位をexon trapping法にて解析しつつある。

肺がんにおいて17p13.3領域が高頻度に欠失を示

すことを昨年度明らかとしたが、その標的がん抑制遺伝子の単離・同定を候補遺伝子探索法とポジショナルクローニング法の両面から試みた。その結果、後者により共通欠失領域内に微視的ホモ欠失を見出し、存在部位の限定化に成功した。

TGF- $\beta$ 刺激による正常気道上皮細胞及び肝細胞がんにおけるアポトーシス誘導と抵抗性獲得に関し、検索を行い、情報伝達系のうちSmad3遺伝子が関わっている可能性を示唆する結果を得た。

糖鎖系細胞接着分子は、腫瘍細胞の血行性転移・胸腹膜播種・リンパ節浸潤のいずれにおいても重要な役割を演ずることが明らかにされつつある。本研究ではリンパ節高内細静脈にL-セレクトリンリガンドとして発現している新規の接着性糖鎖、シアリル6-スルホLe<sup>x</sup>を同定し、本糖鎖の合成に関与する6-スルホトランスフェラーゼの遺伝子単離に成功した。また、長年明らかにできなかったNCC-ST-439抗体の認識抗原がムチン型糖鎖に担われたシアリルLe<sup>x</sup>であり、かつ接着性糖鎖であることを示した。本成績により、これら新規のセレクトリンリガンドも転移・浸潤に関与している可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yatabe, Y., Nakamura, S., Nakamura, T., Seto, M., Ogura, M., Kimura, M., Kuwahara, H., Kobayashi, T., Taniwaki, M., Morishima, Y., Koshikawa, T., Suchi, T.: Multiple polyploid lesions of primary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of colon. *Histopathology*, 32: 116-125, 1998.
2. Miura, I., Ohshima, A., Chubachi, A., Nimura, T., Komatsuda, A., Utsumi, S., Saito, M., Machii, T., Nakamura, S., Seto, M., Miura, A. B.: BCL6 rearrangement in a patient with mantle cell lymphoma. *Ann. Hematol.*, 74: 247-250, 1997.
3. Kimura, N., Yoshida, T., Nagano, M., Tamura, K.; Suzuki, R., Seto, M., Morishima, Y., and Nakamura, S.: Importance of T-cell receptor  $\delta$ -chain gene analysis on CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia. *Blood* 91: 2622-2624, 1998.
4. Hosokawa, Y., Suzuki, R., Joh, T., Maeda, Y., Nakamura, S., Kodera, Y., Arnold, A. and Seto, M.: A small deletion at the 3'-untranslated region of cyclin D1/PRAD1/BCL1 oncogene in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer*, 76: 791-796, 1998.
5. Harada, S., Komatsu, H., Seto, M., Ni, H., Xu, J.H., Hayami, Y., Tsuboi, K., Wakita, A., Nitta, M., Kato, T., Ueda, R.: Microsatellite instability is rare in the clinical course of myelo-dysplastic syndrome studied with DNA from fresh and paraffin-embedded tissues. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124: 231-235, 1998.
6. Kitazawa, J., Umenai, T., Ito, E., Arai, K., Otomo, H., Toki, T., Seto, M., Ueda, R., Yokoyama, M.: Progression from myelo-dysplastic syndrome with monosomy 7 to acute monoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *Int. J. Hematol.*, 67:23-26, 1998.
7. Takizawa, J., Suzuki, R., Kuroda, H., Kagami, Y., Joh, T., Aizawa, Y., Ueda, R. and Seto, M.: Expression of the *TCL1* gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 712-718, 1998.
8. Taji, H., Kagami, Y., Okada, Y., Andou, M., Nishi, Y., Saito, H., Seto, M. and Morishima, Y.: Growth inhibition of CD20 positive B lymphoma cell lines by IDEC-C2B8 anti-CD20 monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 748-756, 1998.
9. Kubonishi, I., Seto, M., Murata, N., Kamioka, M., Taguchi, H., Miyoshi, I.: Translocation (10;11)(p13;q23) and MLL gene rearrangement in a case of AML(M5a) with aggressive leukemia cutis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104:28-31, 1998.
10. Tomita, A., Watanabe, T., Kosugi, H., Ohashi, H., Uchida, T., Kinoshita, T., Mizutani, S., Hotta, T., Murate, T., Seto, M., and Saito, H.: Truncated c-Myb expression in the human leukemia cell line TK-6. *Leukemia*, 12: 1422

- 1429,1998.
11. Tamura, A., Akagi, T., Nakazawa, N., Kashima, K., Nakamura, S., Karpas, A., Silverman, G.A., Morishima, Y., Taniwaki, M. and Seto, M.: Molecular cytogenetic delineation of the breakpoint at 18q21.1 in a NHL cell line (Karpas 1106) derived from mediastinal B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 78: 100-105, 1998.
  12. Akao, Y., Mizoguchi, H., Misiura, K., Stec, W J., Seto, M., Ohishi, N., Yagi, K. : Antisense oligodeoxyribonucleotide against the MLL-LTG19 chimeric transcript inhibits cell growth and induces apoptosis in cells of an infantile leukemia cell line carrying the t(11;19) chromosomal translocation. *Cancer Res.*, 58:3773-3776, 1998.
  13. Kagami, Y., Nakamura, S., Suzuki, R., Iida, I., Yatabe, Y., Okada, Y., Kobayashi, T., Tsurumi, T., Seto, M., Ogura, M., Taguchi, O., Morishima, Y.: Establishment of an IL-2 dependent cell line derived from nasal-type NK/T-cell lymphoma of CD2+, sCD3-, CD3ε+, CD56+ phenotype and associated with the Epstein-Barr virus. *Brit. J. Haematol.*, 103:669-677, 1998.
  14. Ariyama, Y., Fukuda, Y., Okuno, Y., Seto, M., Date, K., Abe, T., Nakamura, Y., Inazawa, J.: Amplification on double-minute chromosomes and partial-tandem duplication of the MLL gene in leukemic cells of a patient with acute myelogenous leukemia. *Genes, Chrom. & Cancer*, 23: 267-272, 1998.
  15. Joh, T., Hosokawa, Y., Suzuki, R., Takahashi, To., and Seto, M.: Establishment of an inducible expression system of chimeric MLL-LTG9 protein and inhibition of Hox a7, Hox b7 and Hox c9 expression by MLL-LTG9 in 32Dcl3 cells. *Oncogene*, 18:1125-1130, 1999.
  16. Takizawa, J. and Seto, M.: The TCL1 oncogene is not overexpressed in patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 13:314, 1999.
  17. Akagi, T., Tamura, A., Motegi, M., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M., and Taniwaki, M.: Molecular cytogenetic delineation of the breakpoint at 18q21.1 in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Genes, Chrom. & Cancer* , 24: 315-321, 1999.
  18. Konishi, H., Takahashi, T., Kozaki, K., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Fujii, Y., Sugiura, T., Matsuda, H., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene*, 17: 2095-100, 1998.
  19. Takahashi, T., Konishi, H., Kozaki, K., Osada, H., Saji, S., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Molecular analysis of a myc antagonist, Rox/Mnt, at 17p13.3 in human lung cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 347-351, 1998.
  20. Yanagisawa, K., Osada, H., Masuda, A., Kondo, M., Saito, T., Yatabe, Y., Takagi, K., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-β in human normal lung epithelial cells. *Oncogene*, 17: 1743-1747, 1998.
  21. Kondo, M., Osada, H., Uchida, K., Yanagisawa, K., Masuda, A., Takagi, K., Takahashi, To. and Takahashi, Ta. Molecular cloning of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer. *Int. J. Cancer*, 75: 559-563, 1998.
  22. Yatabe, Y., Masuda, A., Koshikawa, T., Nakamura, S., Kuroishi, T., Osada, H., Takahashi, To., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta. p27<sup>kip1</sup> in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. *Cancer Res.*, 58: 1042-1047, 1998.
  23. Nomoto, S., Haruki, N., Kondo, M., Konishi, H., Takahashi, T., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res.*, 58: 1380-1383, 1998.

24. Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., and Takahashi, Ta. Increased expression of cyclooxygenase 2 frequently occurs in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 58: 3761-3764, 1998.
25. Mitsudomi, T., Suzuki, S., Yatabe, Y., Nishio, M., Kuwabara, M., Gotoh, K., Hatooka, S., Shinoda, M., Suyama, M., Ogawa, M., Takahashi, To., Ariyoshi, Y., and Takahashi, Ta. Clinical implications of p53 autoantibodies in the sera of patients with non-small-cell lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1563-1568, 1998.
26. Takagi, Y., Osada, H., Kuroishi, T., Mitsudomi, T., Kondo, M., Niimi, T., Saji, S., Gazdar, A.F., Takahashi, To., Minna, J. D., and Takahashi, Ta. p53 mutations in non-small cell lung cancers occurring in individuals without a past history of active smoking. *Brit. J. Cancer*, 77: 1568-1572, 1998.
27. Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Takahashi, To., Takahashi, Ta., and Mitsudomi, T. Frequency of MAGE 3 gene expression in HLA-A2 positive patients with lung cancer, *Lung Cancer*, 20: 117-125, 1998.
28. Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, Ta., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. Somatic Frameshift Mutations in the TGF- $\beta$  RII, IGF-IIR, BAX, hMSH3, and hMSH6 gene are uncommon in lung cancer. *Carcinog*, in press, 1999.
29. Kannagi, R. CD15s cluster report. In: T. Kishimoto, H. Kikutani, E.G.Kr. von dem Borne, S.M. Goyert, D.Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T.A. Springer, K. Sugamura and H. Zola (eds.), *Leukocyte Typing VI*, pp. 352-355, New York: Garland Publishing Inc., 1998.
30. Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Izawa, M., Kimura, N., Otsubo, N., Ishida, H., Kiso, M., Yamada, T., Hirohashi, S., and Kannagi, R. Specific detection of sialyl Lewis x determinant carried on the mucin GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$  core structure as tumor-associated antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 514-517, 1998.
31. Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M., and Kannagi, R. Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis x. *J. Biol. Chem.*, 273: 11225-11233, 1998.
32. Uchimura, K., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., Fan, Q.W., Kurosawa, N., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., and Muramatsu, T. Molecular cloning and characterization of an *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, 273: 22577-22583, 1998.
33. Hosono, J., Narita, T., Kimura, N., Sato, M., Nakashio, T., Kasai, Y., Nonami, T., Nakao, A., Takagi, H., and Kannagi, R. Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J. Surg. Oncol.*, 67: 77-84, 1998.
34. Kurane, S., Krauss, J.C., Watari, E., Kannagi, R., Chang, A.E., and Kudoh, S. Targeted gene transfer for adenocarcinoma using a combination of tumor-specific antibody and tissue-specific promoter. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 1212-1219, 1998.
35. Matsuura, N., Narita, T., Hiraiwa, N., Hiraiwa, M., Murai, H., Iwase, T., Funahashi, H., Imai, T., Takagi, H., and Kannagi, R. Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewis<sup>x</sup>, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 12: 1157-1164, 1998.
36. Narita, T., Kimura, N., Sato, M., Matsuura, N., and Kannagi, R. Altered expression of



- integrins in adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 18: 257-262, 1998.
37. Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., Yamamura, K., Ozaki, T., Nakagawara, A., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. Human *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 124: 670-678, 1998.
38. Yamashita, Y., Chung, Y.S., Sawada, T., Horie, R., Saito, T., Murayama, K., Kannagi, R., and Sowa, M. Fl $\alpha$ : A novel mucin antigen associated with gastric carcinogenesis. *Oncology*, 55: 70-76, 1998.
39. Mitsuoka, C., Ohmori, K., Kimura, N., Kanamori, A., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M., and Kannagi, R. Regulation of selectin binding activity by cyclization of sialic acid moiety of carbohydrate ligands on human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1597-1602, 1999.
40. Fan, Q.W., Uchimura, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. Spatially and temporally regulated expression of *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfo transferase during mouse embryogenesis. *Glycobiology*, in press, 1999.
41. Komba, S., Galustian, C., Ishida, H., Feizi, T., Kannagi, R., and Kiso, M. First total synthesis of 6-sulfo de-*N*-acetyl-sialyl Lewis x ganglioside: a superior ligand for human L-selectin. *Angew. Chem. (Engl)*, in press, 1999.

厚生科学研究費補助金(がん克服戦略事業)  
分担研究報告書

がん遺伝子産物と接着分子の血清学的解析と研究の総括

分担研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所副所長兼免疫学部部长

**研究要旨:** 二つの代表的な難治癌である肺癌と肝細胞癌を対象とし、TGF- $\beta$  シグナル伝達系異常の果たす役割に関する検討を加えた。ヒト正常肺上皮細胞株において TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子である Smad3 がネガティブフィードバックによる制御を受けていること、また TGF- $\beta$  存在下における Smad3 の構成的発現はアポトーシスを誘導することを明らかとした。肝細胞癌細胞株の PCR-SSCP 法による検索を行ったが、TGF- $\beta$  不応性の肝細胞がん細胞株にも Smad 遺伝子変異を認めず、他の要因を検討する必要性が示唆された。

### A. 研究目的

最近胃癌を抜いて本邦における癌死亡原因の第一位となった肺癌は、残念ながら依然として難治癌の代表例の一つである。我々は、肺癌の発症と進展の分子機構を解明し、一つの『疾患』として総合的に理解することを目指した多角的な研究を行ってきた。その過程において、ヒト正常肺上皮細胞が TGF- $\beta$  に対して示す顕著な増殖抑制等の反応性が、肺癌細胞株の多くにおいて失われており、肺癌の発症・進展に密接に関与している可能性が示唆された。

肺癌及びもう一つの代表的な難治癌である肝細胞癌を対象とした本研究の目的は、これまでの研究成果を踏まえ、TGF- $\beta$  シグナル伝達系異常の発症・進展における役割に関する詳細な検討を行うことにある。

### B. 研究方法

我々が初めて樹立に成功したヒト正常末梢肺上皮細胞株 (HPL1) 及び Harris らによって樹立されたヒト正常中枢気道上皮細胞株 (BEAS2B) を用いて、TGF- $\beta$  シグナル伝達に関わる Smad2, Smad3, 及び Smad4 遺伝子発現の EGF, TGF- $\beta$  及び血清に対する反応性の差異とその細胞生物学的意義に関する検討を加える。

また、ヒト肝細胞癌の発症・進展における TGF- $\beta$  シグナル伝達系異常の関与について検討を開始する。そのために、まずヒト肝細胞がん細胞株を用いた Smad2, Smad3, Smad4 遺伝子異常の検索を RT-PCR-SSCP 法、Southern blot 法によって行う。

### C. 研究結果

正常ヒト肺上皮細胞株において、Smad3 遺伝子の発現は特異的に TGF- $\beta$  の添加によって抑制されることを明らかとした。さらに、その Smad3 遺伝子の発現抑制は、転写レベルによる可能性を示唆する結果を得た。一方、Smad3 遺伝子と異なり、Smad2 及び Smad4 遺伝子の発現は正常肺上皮細胞株において TGF- $\beta$  添加による影響を受けないことが明らかとなった。さらに、テトラサイクリンによる発現調節可能なシステムを用いた検討によって、Smad3 の構成的過剰発現は TGF- $\beta$  存在下で肺上皮細胞にアポトーシスを誘導することも明らかとした。

肝細胞がんの発症・進展における TGF- $\beta$  シグナル伝達系異常の役割について検討を開始し、肝細胞癌細胞株は TGF- $\beta$  によるアポトーシス誘導が顕著なものと抵抗性を示すものに大別し得ることを見出した。TGF- $\beta$  抵抗性の獲得における細胞内シグナル伝達系の異常の関与についてさらに検討を進めた。7 種類のヒト肝細胞がん細胞株において Smad2, Smad3, Smad4 遺伝子の RT-PCR-SSCP 法による検討を行ったが、いずれの細胞株においても Smad 遺伝子の変異を認めず、その他の機序によるものと考えられた。

### D. 考察

肺上皮細胞において TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子である Smad3 がネガティブフィードバックによる制御を受けていること、また TGF- $\beta$  存在下における Smad3 の構成的発現はアポトー

シスを誘導することを始めて明らかとした。したがって本研究結果は、TGF- $\beta$ による Smad3 の発現抑制が過剰な負のシグナルの回避機構である可能性を示唆する。興味深いことに我々の予備的実験結果は、小細胞性肺癌において Smad3 の発現低下がみられることを示しており、その発症・進展への関わりについて更に検討を進める必要性を示唆している。

本年度に検討を開始した肝細胞癌の発症・進展における TGF- $\beta$ 刺激伝達系の異常が果たす役割に関しては、TGF- $\beta$ 不応性の細胞株においても、PCR-SSCP 法等による検索において Smad 遺伝子は検出されず、他の要因をさらに検討する必要性が示唆された。興味深いことに、Smad2 及び Smad4 遺伝子と異なり、Smad3 遺伝子にのみ特異的に TGF- $\beta$ 刺激による mRNA 発現レベルの変動が観察されることを見出している。現在、TGF- $\beta$ による Smad3 発現誘導の有無と肝細胞がんにおけるアポトーシス誘導との関連性及びその分子機序についてさらに検討を加えつつある。

#### E. 結論

TGF- $\beta$ シグナル伝達系の気道上皮細胞及び肝細胞がんにおけるアポトーシス誘導とそれに対する抵抗性獲得において、特に Smad3 遺伝子が深く関わっている可能性を示唆する結果を得た。今後更に詳細な検討を加えることによって、代表的な難治癌である肺癌と肝細胞癌の発症・進展において TGF- $\beta$ シグナル伝達系の異常が果たす役割について、さらに統合的な理解を得ることができると期待される。

#### F. 研究発表

- 1 Yanagisawa, K., Osada, H., Masuda, A., Kondo, M., Saito, T., Yatabe, Y., Takagi, K., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF- $\beta$  in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* 17: 1743-7, 1998.
- 2 Kondo, M., Osada, H., Uchida, K., Yanagisawa, K., Masuda, A., Takagi, K., Takahashi, To. and Takahashi, Ta. Molecular cloning of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer. *Int. J. Cancer* 75: 559-563, 1998.
- 3 Tsujimura, K., Takahashi, To., Iwase, S., Matsudaira, Y., Kaneko, Y., Yagita, H., Obata, Y. Two types of anti-TL CTL clones

with distinct target specificities: Differences in cytotoxic mechanisms and accessory molecule requirements. *J. Immunol.*, 160: 5253-5261, 1998.

- 4 Takeuchi, M., Kezuka, T., Inoue, H., Sakai, J., Usui, M., Takahashi, To., and Taguchi, O. Suppression of spontaneous uveoretinitis development by non-immunopathogenic peptide immunization. *Eur. J. Immunol.*, 28: 1578-1586, 1998.
- 5 Mitsudomi, T., Suzuki, S., Yatabe, Y., Nishio, M., Kuwabara, M., Gotoh, K., Hatooka, S., Shinoda, M., Suyama, M., Ogawa, M., Takahashi, To., Ariyoshi, Y., and Takahashi, Ta. Clinical implications of p53 autoantibodies in the sera of patients with non-small-cell lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1563-1568, 1998.
- 6 Takagi, Y., Osada, H., Kuroishi, T., Mitsudomi, T., Kondo, M., Niimi, T., Saji, S., Gazdar, A.F., Takahashi, To., Minna, J.D., and Takahashi, Ta. p53 mutations in non-small cell lung cancers occurring in individuals without a past history of active smoking. *Brit. J. Cancer* 77: 1568-1572, 1998.
- 7 Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Takahashi, Ta., Takahashi, To., and Mitsudomi, T. Frequency of MAGE 3 gene expression in HLA-A2 positive patients with lung cancer, *Lung Cancer* 20: 117-125, 1998.
- 8 Doi, T., Marino, M.W., Takahashi, To., Yoshida, T., Sakakura, T., Old, L.J., and Obata, Y. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, in press.
- 9 Yazaki, M., Takahashi, To., Andho, M., Akatsuka, Y., Ito, T., Miyake, Y., Ito, Y., Nakamura, S., and Wada, Y. A novel minor histocompatibility antigen recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T-lymphocytes generated from HLA identical bone marrow donor lymphocytes. *Bone Marrow Transplant.*, in press.

厚生科学研究費補助金(がん克服研究事業)  
分担研究報告書

造血器腫瘍の発症に関わる遺伝子異常の解析

分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター化学療法部長

研究要旨：乳児白血病、二次性白血病に関与する 11q23 転座切断点領域遺伝子 MLL の白血病発症機構を解析することを目的として、IPTG 発現誘導ベクターを用いて、白血病型キメラ MLL 遺伝子産物 MLL-LTG9/AF9 の誘導発現できるマウス造血器細胞株を樹立し、Hox 遺伝子群が標的遺伝子の一つであることを明らかにした。MALT 型リンパ腫に高頻度に認められる t(11;18)転座切断点を解析するため、FISH を施行し、染色体 18 番 q21 領域の転座切断点を含む YAC clone を見出した。詳細に解析するため、YAC clone より、BAC 並びに PAC contig を作製し、転座切断点領域を約 200 kb まで限定した。同領域から部分的な転写単位を得ており、MALT リンパ腫における役割を検索しつつある。

A. 研究目的

多くの造血器腫瘍においては染色体転座が特定の病型に強く相関するために、転座切断点領域遺伝子を解明することは腫瘍化機構の解明に直結するだけでなく、診断治療のよい標的分子としても機能しうる。

本研究の目的は、11q23 転座切断点領域遺伝子 MLL の白血病発症における役割を検討するとともに、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に高頻度に認められる t(11;18)転座切断点を解析することにより、新たな転座切断点領域遺伝子を単離、解析し、腫瘍化機構並びに臨床応用を検討することである。

B. 研究方法

1) MLL 遺伝子の白血病発症における役割

MLL 遺伝子が関与する転座により、活性化あるいは抑制される標的遺伝子を明らかにするために、t(9;11)転座により形成される MLL-LRG9/AF9 キメラ遺伝子を発現する造血器細胞株の樹立を試みたが、発現に成功しなかったため、IPTG 誘導発現ベクターにより発現制御できる造血器細胞株の樹立を試みる。また、すべての MLL に共通する領域である MLL-N 端側(MLL-Zf(-))も同様に誘導発現系を樹立する。Western 解析で、IPTG 添加による発現誘導を確認した後、標的遺伝子を探索する。mRNA 発現差異検出法を試みるとともに、MLL ノックアウトマウスで MLL との関与が示唆されている Hox 遺伝子群について検討するため、まず、樹立細胞株で、Hox 遺伝子群の発現様式を調べ、MLL-LTG9/AF9 あるいは MLL-Zf(-)を誘導発現させ、Hox 遺伝子群の発現変化を検討する。

2) MALT リンパ腫に関連する転座切断点領域

遺伝子の単離、解析

MALT リンパ腫に高頻度に認められる t(11;18)転座切断点を解析するために、18q21 領域に存在する YAC clone を用いて、FISH 法を行う。転座切断点を認識する YAC を同定した後、その YAC clone を用いて PAC 並びに BAC contig を作製し、転座切断点領域をさらに詳細に限定し、転座切断点を認識する PAC あるいは BAC を同定することで同領域からのからの遺伝子単離のための基点を確定する。さらに、同領域から Exon trapping 法により責任遺伝子を同定する。

C. 研究成果

1) MLL 遺伝子の白血病発症における役割

MLL キメラ安定発現細胞株を樹立することができなかったため、IPTG で誘導発現が可能発現ベクターを構築し、32Dcl3 細胞株に導入したところ、MLL-LTG9 と MLL-N 端側(MLL-Zf(-))を誘導発現をさせることができる細胞株を樹立することができた。IPTG 添加後、約 6 時間から、蛋白の発現が認められ、24 時間、48 時間後にも発現が維持されていることを Western blot で確認した。キメラ MLL 遺伝子を細胞株に安定発現させることに成功したのは、我々が世界で始めてである。

また、32Dcl3 で発現されている Hox 遺伝子群は Hox-a7, b7, c9 であったので、MLL-LTG9 あるいは MLL-N 端側(MLL-Zf(-))を誘導発現させたところ、Hox-a7, b-7, c9 とも発現が抑制され、これらの遺伝子が MLL 遺伝子異常の標的遺伝子であることが明らかとなった。

2) MALT リンパ腫に関連する転座切断点領域遺伝子の単離、解析

18q21 領域に位置する YAC clone を用いて t(11;18)(q21;q21) を有する MALT リンパ腫症例に対し FISH 解析を行い、18q21 領域の転座切断点を認識する YAC clone を同定した。詳細に解析するために同 YAC clone を用いて BAC 及び PAC library を screening し、contig を作製した。これらを用いて患者検体で FISH を行ったところ、18q21 転座切断点領域に欠失が認められることが明らかとなった。さらに 2 症例を追加し、検討したところ、これら 2 症例でも欠失が認められ、3 症例すべてに共通する欠失領域として約 200 kb を同定した。また、転座切断点を認識する BAC clone も同定した。現在、本領域から転写単位を検出しており、患者検体を検討することで、責任遺伝子の同定を進めつつある。

#### D. 考察

##### 1) MLL 遺伝子の白血病発症における役割

これまで、MLL 遺伝子の標的遺伝子として、MLL ノックアウトマウスで Hox 遺伝子群が示唆されていた。そこで、我々が樹立した発現誘導系を用いて、Hox-a7, b7, c9 が MLL キメラ遺伝子の誘導発現により、発現が抑制されることを明らかにした。すなわち、MLL 遺伝子破壊マウスで示唆されていた Hox 遺伝子が、MLL の標的遺伝子となっていることを直接的に証明できた。これまで、Hox 遺伝子群は造血器細胞の分化系統により発現差異が認められていることが報告されており、造血器細胞の分化、増殖に Hox 遺伝子が関与していることが示唆されていたが、MLL 遺伝子異常が、これらの発現制御に関与し、白血病発症につながる可能性を示唆するものと考え。今後、Hox 遺伝子群のみならず、誘導発現系を利用し、複数あると考えられる MLL 遺伝子異常の標的遺伝子を明らかにしたい。

##### 2) MALT リンパ腫に関連する転座切断点領域遺伝子の単離、解析

MALT リンパ腫は節外性リンパ腫の主要な部分を占める。我々はこれまでに MALT リンパ腫に特徴的に認められる t(11;18) 転座の 18q21 転座切断点領域を解析してきたが、切断点を含む YAC clone を同定し、ついで PAC 並びに BAC contig を作製し、FISH 解析することで約 200 kb までに切断点領域を限定した。転座に伴う共通する欠失領域の存在はがん抑制遺伝子の存在を推測させるが、一方、特定の領域との相互転座は転座によるがん遺伝子活性化機構の存在も示唆する。現在、転座切断点を認識する BAC clone を用いて plasmid contig を作製し、転座

切断点を検出するサザン解析に有用な probe の作製を試みている。現在、exon trapping 法により部分的な転写単位を明らかにしている。今後、遺伝子を同定し、本転座による遺伝子異常の本体を明らかにしたい。また、11q21 領域にある転座切断点領域遺伝子を解析する手がかりを確立することも重要な課題である。

#### E. 結論

乳児白血病、二次性白血病に関与する 11q23 転座切断点領域遺伝子 MLL の白血病発症機構に関して、発現誘導発現ベクターを用いてキメラ型産物である MLL-LTG9/AF9 と分断型遺伝子産物である MLL-Zf(-) の発現を試みた。マウス造血器細胞株 32Dcl3 を用いて発現誘導可能な細胞株を樹立し、ノックアウトマウスで MLL 遺伝子との関連が示唆されていた Hox 遺伝子群が、本誘導系によって、MLL 遺伝子異常の標的であることが明らかとなった。また、本誘導系を用いて、新しい標的遺伝子の探索を行うことが可能となった。

MALT リンパ腫に認められる特異的な染色体転座 t(11;18)(q21;q21) の 18q21 転座切断点を認識する YAC clone を同定した。さらに、PAC 並びに BAC contig を作製し、FISH 解析したところ、18q21 領域には約 200 kb の共通欠失領域が存在していた。現在転座切断点を認識する BAC clone を同定しており、転座によるがん遺伝子の可能性並びにがん抑制遺伝子の可能性を考慮しつつ、転写単位を exon trapping 法にて解析しつつある。また、BAC clone から plasmid contig を作製し、より詳細に検討を進め、サザン解析に有用な probe を開発しつつある。また、11q21 領域の転座切断点への手がかりも得た。

#### F) 文献

##### 1. 論文発表

- Yatabe, Y., Nakanwra, S., Nakamura, T., Seto, M., Ogura, M., Kimura, M., Kuwahara, H., Kobayashi, T., Taniwaki, M., Morishima, Y., Koshikawa, T., Suchi, T.: Multiple polyploid lesions of primary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of colon. *Histopathology*, 32: 116-125, 1998.
- Miura, I., Ohshima, A., Chubachi, A., Nimura, T., Komatsuda, A., Utsumi, S., Saito, M., Machii, T., Nakamura, S., Seto, M., Miura, A.B.: BCL6 rearrangement in a patient with mantle cell lymphoma. *Ann. Hematol.*, 74: 247-250, 1997.
- Kimura, N., Yoshida, T., Nagano, M.,

- Tamura, K.; Suzuki, R., Seto, M., Morishima, Y., and Nakamura, S.: Importance of T-cell receptor delta-chain gene analysis on CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia. *Blood* 91: 2622-2624, 1998.
- Hosokawa, Y., Suzuki, R., Joh, T., Maeda, Y., Nakamura, S., Kodera, Y., Arnold, A. and Seto, M.: A small deletion at the 3'-untranslated region of cyclin D1/PRAD1/BCL1 oncogene in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer*, 76: 791-796, 1998.
- Harada, S., Komatsu, H., Seto, M., Ni, H., Xu, J.H., Hayami, Y., Tsuboi, K., Wakita, A., Nitta, M., Kato, T., Ueda, R.: Microsatellite instability is rare in the clinical course of myelodysplastic syndrome studied with DNA from fresh and paraffin-embedded tissues. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124: 231-235, 1998.
- Kitazawa, J., Umenai, T., Ito, E., Arai, K., Otomo, H., Toki, T., Seto, M., Ueda, R., Yokoyama, M.: Progression from myelodysplastic syndrome with monosomy 7 to acute monoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *Int. J. Hematol.*, 67:23-26, 1998.
- Takizawa, J., Suzuki, R., Kuroda, H., Kagami, Y., Joh, T., Aizawa, Y., Ueda, R. and Seto, M.: Expression of the *TCL1* gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-Cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 712-718, 1998.
- Taji, H., Kagami, Y., Okada, Y., Andou, M., Nishi, Y., Saito, H., Seto, M. and Morishima, Y.: Growth inhibition of CD20 positive B lymphoma cell lines by IDEC-C2B8 anti-CD20 monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 748-756,, 1998.
- Kubonishi, I., Seto, M., Murata, N., Kamioka, M., Taguchi, H., Miyoshi, I.: Translocation (10;11)(p13;q13) and MLL gene rearrangement in a case of AML(M5a) with aggressive leukemia cutis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104:28-31,,1998.
- Tomita, A., Watanabe, T., Kosugi, H., Ohashi, H., Uchida, T., Kinoshita, T., Mizutani, S., Hotta, T., Murate, T, Seto, M., and Saito, H.: Truncated c-Myb expression in the human leukemia cell line TK-6. *Leukemia*, 12: 1422-1429,1998.
- Tamura, A., Akagi, T., Nakazawa, N., Kashima, K., Nakamura, S., Karpas, A., Silverman, G.A., Morishima, Y., Taniwaki, M. and Seto, M.: Molecular cytogenetic delineation of the breakpoint at 18q21.1 in a NHL cell line (Karpas 1106) derived from mediastinal B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 78: 100-105, 1998.
- Akao, Y., Mizoguchi, H., Misiura, K., Stec, WJ., Seto, M., Ohishi, N., Yagi, K. : Antisense oligodeoxyribonucleotide against the MLL-LTG19 chimeric transcript inhibits cell growth and induces apoptosis in cells of an infantile leukemia cell line carrying the t(11;19) chromosomal translocation. *Cancer Res.*, 58:3773-3776, 1998
- Kagami, Y., Nakamura, S., Suzuki, R., Iida, I., Yatabe, Y., Okada, Y., Kobayashi, T., Tsurumi, T., Seto, M., Ogura, M., Taguchi, O., Morishima, Y.: Establishment of an IL-2 dependent cell line derived from "nasal-type" NK/T-cell lymphoma of CD2+, sCD3-, CD3ε+, CD56+ phenotype and associated with the Epstein-Barr virus. *Brit. J. Haematol.*, 103:669-677, 1998.
- Ogura, S., Kamachi, T., Seto, M., Okura, I.: Preparation of new phthalocyanine-immunoconjugate and its effect for photodynamic therapy. *Porphyrins*, 7: 389-394, 1998.
- Ariyama, Y., Fukuda, Y., Okuno, Y., Seto, M., Date, K., Abe, T., Nakamura, Y., Inazawa, J.: Amplification on double-minute chromosomes and partial-tandem duplication of the MLL gene in leukemic cells of a patient with acute myelogenous leukemia. *Genes, Chrom. & Cancer*, 23: 267-272, 1998.
- Joh, T., Hosokawa, Y., Suzuki, R., Takahashi, T., and Seto, M.: Establishment of an inducible expression system of chimeric MLL-LTG9 protein and inhibition of Hox a7, Hox b7 and Hox c9 expression by MLL-LTG9 in 32Dcl3 cells. *Oncogene*, 18:1125-1130, 1999
- Takizawa, J. and Seto, M.: The *TCL1* oncogene is not overexpressed in patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 13:314, 1999
- Akagi, T., Tamura, A., Motegi, M., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M., and Taniwaki, M.: Molecular cytogenetic delineation of the breakpoint at 18q21.1 in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Genes, Chrom. & Cancer* , 24: 315-321, 1999.

## 2. 学会発表

竹山邦彦、瀬戸加太: 二次性白血病の臨床病態 (シンポジウム“二次性造血器腫瘍”). Int. J. Hematol., 67:p19, 1998.

細川好孝、鈴木律朗、城達郎、中村栄男、小寺良尚、瀬戸加太: 慢性リンパ性白血病における BCL1 遺伝子内の小さな欠失. Int. J. Hematol., 67:p19, 1998.

城達郎、鏡味良豊、瀬戸加太: 11q23 転座領域遺伝子 MLL 及び転座相手遺伝子との融合遺伝子産物の細胞内局在と機能解析. Int. J. Hematol., 67: p.91, 1998.

原田信助、鈴木律朗、上平和孝、中村栄男、鏡味良豊、小椋美知則、森島泰雄、上田龍三、瀬戸加太: Diffuse large B-cell lymphoma における BCL2 と BCL6 遺伝子再構成頻度の検討. Int. J. Hematol., 67:p159, 1998.

細川好孝、鈴木律朗、前田由美子、城達郎、中村栄男、瀬戸加太: 慢性リンパ性白血病における BCL-1/cyclin D1 遺伝子内の欠失. 第 57 回日本癌学会総会記事, p134, 1998.

赤木智昭、田村明子、細川好孝、鈴木律朗、中村栄男、森島泰雄、谷脇雅史、瀬戸加太: 節外性リンパ腫に認められる 18q21 転座切断点領域の解析. 第 57 回日本癌学会総会記事, p424, 1998.

原田信助、鈴木律朗、久米正晃、赤木智昭、上田龍三、森島泰雄、谷田部恭、中村栄男、瀬戸加太: cyclinD1 陰性マントル細胞リンパ腫における免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子変異の検討. 第 57 回日本癌学会総会記事, p425, 1998.

城達郎、細川好孝、鈴木律朗、鈴木裕子、瀬戸加太: 誘導発現ベクターを用いた 11q23 転座領域遺伝子 MLL の機能解析. 第 57 回日本癌学会総会記事, p427, 1998.

鈴木裕子、久米正晃、細川好孝、瀬戸加太: Differential Display 法にて成人 T 細胞性白血病細胞株から単離した新しい遺伝子 HAG-1 の遺伝子構造の解析. 第 57 回日本癌学会総会記事, p384, 1998.

瀬戸加太、城達郎、細川好孝: 11q23 転座領域遺伝子 MLL による白血病発症機構. 第 57 回日本癌学会総会記事, P60, 1998.

厚生科学研究費補助金(がん克服戦略事業)  
分担研究報告書

がん発生に於ける遺伝子異常の解析

分担研究者 高橋隆 愛知県がんセンター研究所・超微形態学部

研究要旨: 肺がんにおいて 17p13.3 領域が高頻度に欠失を示すことを始めて明らかとした昨年度の研究成果に基き、さらにその標的がん抑制遺伝子の単離・同定を候補遺伝子探索法とポジショナルクローニング法の両面から試みた。候補遺伝子探索法については、myc antagonist である ROX/Mnt 遺伝子が、我々が同定した共通欠失領域内にマップされ、機能的にも良い候補標的遺伝子であると考えられたが、詳細な検索にもかかわらず体細胞変異を認めず、標的がん抑制遺伝子ではないと考えられた。一方、ポジショナルクローニングを目指した検討において、D17S379 と D17S695 に境された共通欠失領域内に位置する多数の STS マーカーと肺がん細胞株を用いることによって、肺がん細胞株における微視的ホモ欠失を示すことを見出し、標的遺伝子の存在部位を共通欠失領域内の更に狭い領域に限定化することに成功した。

A. 研究目的

難治性固形がんの代表たる肺がん並びに肝がんの分子病態を明らかにすべく、種々のがん遺伝子、がん抑制遺伝子の異常の関与について検討を加えてきた。我々は既に、肺癌に高頻度に検出される第 17 染色体短腕(17p)欠失の標的がん抑制遺伝子が 17p13.1 領域に存在する p53 遺伝子以外にも、17p13.3 領域に存在する可能性を報告した。本年度の研究においては、17p13.3 領域に存在することが示唆された未知の標的がん抑制遺伝子の単離・同定を、候補遺伝子探索法とポジショナルクローニング法の両面より試みる。

B. 研究方法

(1) 候補遺伝子探索法による標的がん抑制遺伝子の探索: 我々が 17p13.3 に同定した共通欠失領域内にマップされた ROX/Mnt 遺伝子は、myc antagonist であり、機能面からも存在部位からも良い候補遺伝子探索法の対象であるので、肺がんにおける変異検索を PCR-SSCP 法及び Southern blot 法を用いて行う。

(2) ポジショナルクローニング法による標的がん抑制遺伝子の単離・同定の試み: 17p13.3 領域にこれまでに同定した共通欠失領域内のセントロメア側は D17S379 に、テロメア側は D17S695 によって境されている。そこで、本年度は同共通欠失領域内にマップされている多

数の STS マーカーを用いて、我々が樹立した細胞株を含む数十株に上る肺がん細胞株を対象にしたホモ欠失の探索を行い、標的がん抑制遺伝子の存在部位の限定化を計る。

C. 研究結果

(1) 候補遺伝子探索法による標的がん抑制遺伝子の探索: 最近単離された myc antagonist である ROX/Mnt 遺伝子は、我々が同定した共通欠失領域内にマップされ、機能的にも良い候補標的遺伝子である。そこで、PCR-SSCP 法及び Southern blot 法を用いて 52 例の肺がん症例について変異検索を行った。その結果、3種類のポリモルフィズムを新たに見出したが体細胞変異を認めず、ROX/Mnt 遺伝子は 17p13.3 欠失の標的がん抑制遺伝子ではないと考えられた。

(2) ポジショナルクローニング法による標的がん抑制遺伝子の単離・同定の試み: D17S379 と D17S695 に境された共通欠失領域内に位置する 12 個の STS マーカーと 78 例の肺がん細胞株を用いてスクリーニングを施行し、STS マーカーの一つが肺がん細胞株においてホモ欠失を示すことを見出し、標的遺伝子の存在部位を共通欠失領域内のさらに狭い領域に限定化することに成功した。現在、ホモ欠失領域をカバーする BAC、YAC コンティグを作成し、さらに検討を進めつつある。



#### D. 考察

17p 欠失は肺癌において極めて高頻度に検出されるが、その標的がん抑制遺伝子が p53 遺伝子である事を我々は既に明らかとしている。さらに我々はこれまでに、17p13.3 領域にも p53 遺伝子以外の未知の標的がん抑制遺伝子が存在する可能性を示唆する結果を得ている。

さて、肺癌においてはしばしばmyc遺伝子の増幅と過剰発現が検出され、myc遺伝子が肺癌の発症・増悪に重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、最近単離されたmyc antagonist である ROX/Mnt 遺伝子のがん抑制遺伝子として機能しており、その機能的な不活化がmyc遺伝子の増幅と過剰発現を示さない肺癌症例において、myc遺伝子の活性化と生物学的に同等の役割を果たしている可能性が考えられる。ROX/Mnt 遺伝子が 17p13.3 にマップされたことから、良い標的候補がん抑制遺伝子と考えられたので、その変異の解析を詳細に行った。しかしながら、未報告のポリモルフィズムが得られたのみで、体細胞変異は検出されず、他の未知の標的がん抑制遺伝子の存在が示唆された。

一方、昨年度の本研究によって同定した共通欠失領域を対象としたホモ欠失の探索を行い、標的がん抑制遺伝子の存在部位の限定化を計った。その結果、STS マーカーの一つが肺がん細胞株においてホモ欠失を示すことを見出し、標的遺伝子の存在部位を共通欠失領域内のさらに狭い領域に限定化することに成功した。今後は、本研究によって見出した微視的ホモ欠失を主たる研究対象に絞り込み、標的遺伝子の単離・同定を目指したい。既に、一ヶ所のギャップを除いてホモ欠失領域をカバーする BAC、YAC コンティグの作成を完了し、さらに同領域内の遺伝子の単離・同定を進めつつある。

#### E. 結論

肺がんにおいて 17p13.3 領域が高頻度に欠失を示すことを始めて明らかとした昨年度の研究結果に基き、さらにその標的がん抑制遺伝子の単離・同定を候補遺伝子探索法とポジショナルクローニング法の両面から試みた。その結果、共通欠失領域内に微視的ホモ欠失を見出し、存在部位の限定化に成功した。

我々のこれまでの研究結果は、17p13.3 領域に存在する標的がん抑制遺伝子の異常が癌

化の早期段階で生じる可能性を示唆しており、その単離同定は、肺癌の発症と進展のより深い理解に極めて重要な情報をもたらす端緒となると考えられる。また、乳がん、卵巣癌、脳腫瘍等の他のヒト腫瘍においても高頻度の 17p13.3 欠失が報告されており、これらの腫瘍においても肺癌の発症と進展に関与するものと同一の標的がん抑制遺伝子が関与している可能性もあり、その単離同定のもつ重要性は極めて大きいと考えられる。今後さらに標的がん抑制遺伝子の探求を精力的に進めたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Konishi, H., Takahashi, T., Kozaki, K., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Fujii, Y., Sugiura, T., Matsuda, H., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene* 17: 2095-100, 1998.
- 2 Takahashi, T., Konishi, H., Kozaki, K., Osada, H., Saji, S., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Molecular analysis of a myc antagonist, Rox/Mnt, at 17p13.3 in human lung cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 347-351, 1998.
- 3 Yatabe, Y., Masuda, A., Koshikawa, T., Nakamura, S., Kuroishi, T., Osada, H., Takahashi, T., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta. p27<sup>KIP1</sup> in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. *Cancer Res.* 58: 1042-1047, 1998.
- 4 Nomoto, S., Haruki, N., Kondo, M., Konishi, H., Takahashi, To., Takahashi, T., and Takahashi, Ta. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res.* 58: 1380-1383, 1998.
- 5 Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., and Takahashi, Ta. Increased expression of cyclooxygenase 2 frequently occurs in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58: 3761-3764, 1998.
- 6 Takagi, Y., Osada, H., Kuroishi, T., Mitsudomi, T., Kondo, M., Niimi, T., Saji, S., Gazdar, A.F., Takahashi, To., Minna,

- J.D., and Takahashi, Ta. p53 mutations in non-small cell lung cancers occurring in individuals without a past history of active smoking. *Brit. J. Cancer* 77: 1568-1572, 1998.
- 7 Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, To., Takahashi, Ta., and Mitsudomi, T. Somatic Frameshift Mutations in the TGF- $\beta$  RII, IGF-IIR, BAX, hMSH3, and hMSH6 gene are uncommon in lung cancer. *Carcinog.* (in press).

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

がん増悪に関わる接着分子の解析

分担研究者 神奈木 玲児 愛知県がんセンター病理学第二部部長

研究要旨：本分担研究は、がんの浸潤と転移で重要な役割を演じる細胞接着分子を研究する事を目的とする。本年度は、これまで乳癌・消化器癌の腫瘍マーカーとして臨床的に用いられてきたNCC-ST-439の認識抗原が、特殊なムチン型糖鎖に担われたシアリルLe<sup>x</sup>であり、セレクトインとの結合能を持つ細胞接着糖鎖であることを見出した。この糖鎖は、既知の糖鎖リガンドとともに、癌の血行性転移に関与すると考えられる。また、リンパ球のリンパ節へのホーミングの際にはたらく、ヒトのリンパ節高血管内皮細静脈のL<sup>x</sup>-セレクトインリガンドが、シアリル6-スルホLe<sup>x</sup>であることを見出した。さらに、この糖鎖を合成する6-スルホトランスフェラーゼの候補をクローニングした。この糖鎖は、リンパ球系の悪性細胞の浸潤などに関連すると考えられる。

A. 研究目的

がんの浸潤・転移においては、細胞接着分子が重要な役割を演じる。本研究の目的は、悪性細胞の血行性転移およびリンパ節浸潤に関与する細胞接着分子を同定し、分子レベルで解析する事である。特に、細胞接着分子セレクトインおよびCD44と、それらの糖鎖リガンドを媒介した接着機構を解析し、これと協調して作用するサイトカインとインテグリン分子種についての研究を進める。このうち、がん細胞の接着能の鍵を握る糖鎖について、細胞のがん化にともなう異常合成の機構を明らかにするために、接着活性を持つセレクトインリガンドであるシアリルLe<sup>x</sup>系統の糖鎖の構造を解析し、合成発現に関与する糖転移酵素遺伝子を同定し、細胞の悪性化に伴う誘導機構を検討する。

B. 研究方法

がん細胞の血行性転移およびリンパ節浸潤の機構を解明するため、これらに関与する細胞接着分子を同定する。さらにその接着の分子機序を明らかにするために、培養血管内皮細胞を用い、単層細胞接着実験によって各種培養癌細胞との接着を観察し、この接着を媒介する細胞接着分子を同定する。また、細胞接着分子のリコンビナント蛋白を用いた結合実験をも行う。各接着分子に特異的な単クローン抗体を用いて接着阻止実験を行う。これにより判明した諸分子について、特異的抗体を用いた測定系を作成し、患者検体の測定に応用して、症例におけるこれらの分子の関与を評価する。これまで細胞接着分子セレクトインのリガンドとしてはシアリルLe<sup>a</sup>、シアリルLe<sup>x</sup>が知られているが、さらに多数の新規糖鎖が存在すると考えら

れるので、これらを同定する。これらの糖鎖の発現を誘導・調節する糖転移酵素を同定し、新規なものについてはクローニングを行う。また、すでに遺伝子の得られた糖転移酵素については、その5'-調節領域を単離し、レポーターコンストラクトを作成し、各種がん遺伝子、がん抑制遺伝子によるその転写調節への影響を検索する。

C. 研究成果

がん細胞と血管内皮細胞との接着に関与する新規の糖鎖構造の研究：これまでに知られたセレクトインのリガンド糖鎖であるシアリルLe<sup>a</sup>やシアリルLe<sup>x</sup>は、それぞれ腫瘍マーカーCA19-9あるいはシアリルSSEA-1 (SLX)として良く研究されてきた糖鎖である。これらの抗原は、単クローン抗体を作成して腫瘍抗原を検出するという当時の腫瘍抗原研究の方法の応用の結果見いだされたものである。癌細胞に対して作成した単クローン抗体の認識抗原を検索して、抗体がこれらの糖鎖を認識することが判明したのである。しかし、抗体の一部は、糖鎖を認識する事までは分かっているが、認識抗原糖鎖の構造が不明のまま残されている。たとえば、NCC-ST-439は、消化器癌や乳癌の腫瘍マーカーとしてすでに長期間臨床応用されているにもかかわらず、認識糖鎖は不明とされている。我々は今年度、このNCC-ST-439の抗体の認識抗原が、特殊な構造のシアリルLe<sup>x</sup>であることを見出した。本抗原はシアリダーゼ感受性であり、また、陰性細胞にフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を強制発現させることにより出現することから、シアル酸とフコースが抗原エピトープに関与すると考えられる。この成績から、認識抗原はシ

アリルLe<sup>x</sup>にきわめて近縁の糖鎖であると推定された。さらに、純品糖鎖との反応性を確かめたところ、NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Rと極めて強く反応することが判明した。これはムチン型糖鎖の二型ないし四型母核構造に担われたシアリルLe<sup>x</sup>である。本抗体は通常のアリルLe<sup>x</sup>とは反応せず、ムチン型糖鎖のうちでも、GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 母核上のシアリルLe<sup>x</sup>とのみ反応する。従って、通常のアリルLe<sup>x</sup>抗体よりも狭い特異性を持つ。これが本抗体を用いた腫瘍マーカー測定が、他のシアリルLe<sup>x</sup>の測定系とはやや異なる成績を与える理由と考えられた。この糖鎖もまた、E-セレクトインとの結合性を持つことは、接着阻害実験から明らかになった。

セレクトインの糖鎖リガンドの合成発現の調節機構の研究：昨年度の研究において我々は、リンパ節の高血管内皮細静脈を介したリンパ球のホーミングに關与するE-セレクトインリガンド分子をシアリル6-スルホLe<sup>x</sup>であると同定した。本年度、さらに特異抗体を用いて検索したところ、シアリル6-スルホLe<sup>x</sup>糖鎖はリンパ節の高血管内皮細静脈の内皮細胞のみならず、培養白血病細胞や癌細胞株の一部にも発現が認められた。

この糖鎖は、その構造から見て、フコシルトランスフェラーゼと6-スルホトランスフェラーゼの共同作用によって合成されると考えられる。フコシルトランスフェラーゼについては、我々は既に1994年に白血球系細胞でシアリルLe<sup>x</sup>を合成する主要酵素であるFuc-TVIIのクローニングを行った。しかし、このシアリル6-スルホLe<sup>x</sup>糖鎖に存在するような、GlcNAc残基の6位を硫酸化する酵素は、まだ全くクローニングされていない。

そこで、以前に報告のあるコンドロイチン6-硫酸転移酵素の配列をもとにexpressed sequence tag (EST)データベースより相同性のある配列情報をいくつか得た。その内の一つのクローン配列をもとにマウス7.5日胚cDNAライブラリーよりopen reading frame (ORF)を含むcDNAクローンを得た。ORFは483アミノ酸残基より成るII型の膜タンパク質をコードしていた。ORF部分とフコース転移酵素Fuc-TIV cDNAをコトランスフェクションしたCOS-7細胞は抗6-硫酸化Le<sup>x</sup>抗体に陽性となり、FucT VII cDNAとのコトランスフェクションでは抗シアリル6-スルホLe<sup>x</sup>抗体に陽性となった。このことから、この糖鎖を合成するスルホトランスフェラーゼのクローニングに成功したと考えられる。このマウス酵素のcDNAをもとに、これと合わせて高いホモロジーを有するヒトの6-スルホトランスフェラーゼのクローニングにも成功した。

ヒトの酵素のメッセージは、MOLT-4、Jurkat、Raji、K-562などの白血病細胞株で強く発現していた。

#### D. 考察

がん細胞と血管内皮細胞との接着に關与する新規の糖鎖構造の研究：NCC-ST-439の認識抗原が、特殊なムチン型糖鎖に担われたシアリルLe<sup>x</sup>であることが判明した事については、抗体の作成後10年以上の歳月を経てはじめて抗原が同定されたこと自体が驚きである。これまで、癌細胞に対して作成された抗糖鎖単クローン抗体の認識抗原は、糖脂質抗原でスクリーニングするのが通常であった。しかし、このムチン型糖鎖の母核は、天然の糖脂質には見出されない。これが本抗体の認識抗原の解明をこんにちまで遅らせた原因と考えられる。

今回判明したNCC-ST-439の認識抗原の母核構造GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ に関しては、我々は以前Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Rに対して特異抗体F1 $\alpha$ -75を作成し、これが胃癌などをはじめとする消化器癌に高頻度に発現することを観察している。この糖鎖とNCC-ST-439とのがん化にともなう発現誘導の機構を今後検索する必要がある。

また、この母核構造は、Core 2 GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6転移酵素あるいはCore 4 GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6転移酵素で合成される。このうちCore 2 GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6転移酵素については、他の研究室から大腸癌でこの酵素のmRNAが増加していること、また本酵素の出現は患者の予後と順相関していることが最近報告されている。この酵素とNCC-ST-439との関連性も今後検索する必要がある。

NCC-ST-439抗体は、NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Rと反応するが、NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ Rとは反応しない。この点で、ムチン糖鎖のGlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ 母核に担われたシアリルLe<sup>x</sup>に特異的であり、これと枝分れポリラクタミン基幹のGlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6Gal $\beta$ に担われたシアリルLe<sup>x</sup>とを鑑別できる特異性を持っている。このため、本抗体を用いれば、シアリルLe<sup>x</sup>を担っている糖鎖コア部分の構造について、さらに立ち入った研究が可能になった。

しかし、NCC-ST-439抗体は、ムチン母核上のシアリルLe<sup>x</sup>と分枝型ポリラクタミン上のシアリルLe<sup>x</sup>とを区別するものの、ムチン母核のうち2型母核と4型母核とは区別しないと見られる。細胞のがん化にともなって誘導されるのが、2型母核であるのか、それとも4型母核であるのか、