

がん克服戦略研究事業
平成 11 年度 総括／分担研究報告書

千葉県がんセンター研究局

崎山 樹

分野 1 : 発がんの分子機構に関する研究
研究テーマ ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析

主任研究者 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局長

研究要旨 DANの機能解析のために、DANのアンタゴニストと考えられるBMPのシグナル伝達系の構築、DANとBMPの結合反応の解析を行った。DANの形態形成における機能を明らかにするために、ニワトリ胚におけるDAN発現の解析を行った。DANノックアウトマウス作成の前段階としてヘテロマウスの作成を行った。p53のホモログであるp73αのC末端側領域(アミノ酸549-636)はp73αの転写活性化能およびDNA結合能には抑制的に働き、細胞増殖抑制には必須の役割を担っていることが判明した。ヒト1番染色体短腕1p36.2-p36.3領域で、神経芽細胞腫における約0.5Mbのホモ欠失を見いだした。PACコンテイングを作成後、これまでに約60%のシーケンスを終了し、その領域内に6個の候補遺伝子の存在を明らかにした。高転移性の腫瘍における低酸素下での血管新生亢進の要因として、VEGF遺伝子の転写因子であるHIF-1αの安定化の重要性が示唆された。また、転移を正並びに負に制御する遺伝子として新たに*epithelin*、*ST1/T1/Fit1*を同定した。

分担研究者

1. 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局 局長
2. 尾崎俊文 千葉県がんセンター研究局 研究員
3. 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 部長
4. 竹永啓三 千葉県がんセンター研究局 研究員
5. 古関明彦 千葉大学大学院医学研究科 教授

A. 研究目的

がんの発生ならびに転移に対して抑制的に関与する遺伝子を単離し、その構造解析、産物の機能を解明する。これら遺伝子の発現や存在様式をがんの組織型や悪性度との関連で把握することにより、各遺伝子産物の役割を明らかにし、それらを指標にして、がんの診断、治療、予後の判定や転移の予知および抑止をすることを最終目的とする。11年度の具体的な目的は以下の通りである。

- 1) 細胞の増殖ならびにがん化を抑制する機能を持った分泌蛋白質であるDANの役割を分子レベルで解明する。
- 2) DANノックアウトマウスを作成しその表現型を解析する。
- 3) p53のホモログであるp73のC-末端側の転写活性調節機構を解明する。
- 4) 神経芽細胞腫をはじめとする数多くのがんで複数のがん抑制遺伝子が多数存在することが推測されている1番染色体短腕遠位領域(1p34-pter)におけるがん抑制遺伝子の同定を行う。
- 5) 高転移性がん細胞における腫瘍血管新生の機構を解明する。転移能獲得に伴いエピジェネティックに発現量の変化する遺伝子の検索を行う。

B. 研究方法

- 1) BMPシグナリングに対するDANの影響を解析する

ためにマウス胚性がん細胞(P19)中でのpTLx-ルシフェラーゼレポーター系を作成した。BMP添加により誘導されるP19細胞のSmad-1のリン酸化を解析した。*in vitro*でのBMPとDANの結合活性を免疫沈降-ウエスタン法により解析した。

- 2) DAN遺伝子がターゲットされたR1ES細胞株をマウス初期胚とアグリゲーションさせ、キメラマウスを作成した。ニワトリDAN cDNAを単離し、これを用いてニワトリ1-5日胚のwhole mount *in situ* hybridization法による解析を行った。
- 3) p73、C末端側からの欠損変異体を作成し、Saos-2細胞へ導入後、p21, Bax, Mdm2のプロモーター領域を用いたりポーターアッセイ、コロニー形成能などの方法で夫々の機能を比較検討した。また、神経芽細胞腫で見い出された同領域に点変異を持つp73についても同様の解析を行った。
- 4) 神経芽細胞腫、大腸がん、肝がんについて1p34-pter 領域のLOH検索を行い、得られた3つの共通欠失領域の内、1p36.2-p36.3についてPACまたはBACライブラリーのスクリーニングによりコンテイングを作成した。また、部分ゲノムシーケンスから得られたESTをもとにcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長cDNAをクローニングした。
- 5) 転移能の異なる腫瘍細胞血管新生能をマウス背部皮下法で調べた。VEGF遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。VEGF遺伝子の転写因子Hif-1αの発現量をRNA, タンパク質レベルで解析した。マウスLewis肺がん由来の低転移性細胞(P29)と、これをDMSO処理により高転移

性に転換させた細胞との間でPCR-based cDNA subtraction法を行った。

C. 研究成果

- 1) P19細胞にヒトBMP-4 cDNAをトランスフェクトするとpTLx-レポーターの活性化が見られるが、DANを同時に発現させるとそれが抑制されることを見出した。P19細胞へのrhBMP-2の添加により、Smad-1のリン酸化が惹起される系を確立した。*in vitro*においてDANとBMP-2が結合することを確認した。マウス骨芽細胞(MC3T3E1)の骨分化の開始後の初期(4日目)からDANの発現が誘導されてくることが判明した。
- 2) DAN遺伝子をコードするゲノムDNAをクローン化し、エクソン領域のマッピングを行った後、置換型ベクターを作成し、R1ES細胞に導入した。G418耐性クローン240の内、2クローンについて相同組換え体であることが確認された。これら2クローンを用いて、キメラマウスを作成し、内1クローンから生殖系列のキメラが作成された。ニワトリ初期胚におけるDANの発現は1日胚では原始索条前部とヘンセン結節、20体節胎児では脊索、体節中胚葉、眼胞等で強い発現が見られた。3-4日胚では脊索の後肢芽より後方、皮筋、硬節等で高発現していた。
- 3) 1p36.3領域にマップされているがん抑制候補遺伝子であるp73について解析し、次の点を明らかにした。神経芽細胞腫と肺がんで見られた変異(P405RとP425L)が存在する、p53にはないp73のCOOH-末端領域の機能を知るために、p73 α の種々の変異体を作製し、それらの機能を調べた。p21, Mdm2, Baxの各プロモーターを持つシフェラーゼレポーターを用いたアッセイの結果、p73 α のCOOH-末端領域(アミノ酸549-636)を欠失した変異体では、野生型のp73 α に比べて顕著な転写活性化能の増強が観察された。さらに、機能的なp53を欠くSaos-2細胞を用いたコロニー形成実験を行った結果、p73 α の同領域を欠失した変異体では、野生型のp73 α に比べて顕著な細胞増殖抑制能の阻害が観察された。また、P405RまたはP425Lの変異をもつp73 α を同様の系で解析したところ、p73 α (P425L)で転写活性化能の抑制とアポトーシス誘導能の低下が見られた。
- 4) 神経芽細胞腫株における共通欠失領域(1p36.2-p36.3)に0.5Mbのホモ欠失を見出し、800 kbに及ぶPACコンティグを作成した。現在までに約60%のシーケンスを完了し、ホモ欠失が500 kbであること、その中に少なくとも6つの遺伝子が存在し、その内の3つは神経芽腫の予後良好なものでは高く発現し予後不良なもの

では低くなっていることを明らかにした。さらに、大腸がんのLOH解析から共通欠失領域と同定された1p35領域(約3 Mb)のBACコンティグを作成した。

- 5) マウスメラノーマ細胞B16由来で低転移性(F1)と高転移性(BL6)の細胞株間で血管新生能とその調節機構を検討し、以下の知見を得た。腫瘍血管新生能、低酸素下におけるVEGF mRNAの発現量、VEGFプロモーターを用いたレポーターの活性の何れにおいてもBL6で高値を示した。さらに、低酸素下におけるHIF1 α の発現量がBL6において顕著に亢進していることが判明した。P29細胞をDMSO処理し(2%, 5日間)、転移能の亢進した細胞で高発現または抑制される遺伝子として夫々*epithelin*, *ST1/T1/Fit1*を同定した。

D. 考察

- 1) DANは哺乳動物の成体各組織で高発現していることから、アフリカツメガエルの初期胚におけるBMPのアンタゴニスト以外の役割を担っていることが推察される。今後は成体におけるDANの作用機序を特に細胞増殖抑制能の観点から究明する必要がある。
- 2) DANのホモ欠失マウスを作成することにより、生体内におけるDANの機能が明らかになるものと期待される。ニワトリ胚発生の初期においてDANは様々な組織においてダイナミックに発現していることが示され、BMPファミリーの実行濃度を滴定して細胞機能を制御する可能性が示唆された。
- 3) p73 α のCOOH-末端領域(アミノ酸549-636)は、p73 α の転写活性化能およびDNA結合能を抑制する一方、p73 α の細胞増殖抑制能に必須の機能を担っている可能性が示唆された。今後、この領域に存在するSAMドメインに結合するタンパク質の同定を含め、この領域の機能解析を進める必要がある。
- 4) 今回1番短腕のホモ欠失領域から同定された6ヶのcDNAについては、全長cDNAをクローニングし、がん抑制化能を持つかどうかの検定を行うためにウイルスベクターに組み込む等の準備を進めている。また、この領域のゲノムシーケンスを完成し、新規の遺伝子の同定とその評価を早急に行う必要がある。1p35のコンティグについては、部分シーケンスからESTを同定し、候補遺伝子の同定作業を進めている。
- 5) 高転移性のマウス肺がんやメラノーマ細胞では低酸素下でのVEGF遺伝子の発現が亢進しており、その理由のひとつとしてVEGFの転写因子であるHIF1 α の安定化が考えられた。最近、VHLがHIF1 α の安定化に関与していることが報告され、BL6細胞においてもVHLが関わっている可能性がある。一方、低転移性細胞を

DMSO処理し高転移能を誘導する系を導入した。この系の特徴は、単一クローンで転移能の変化のみを指標としているため、他の転移能比較実験系において問題となる遺伝子レベルでの差を無視できる点にある。*epithelin*, *ST1/T1/Fit1* 遺伝子発現の挙動はすでに樹立されている各種の高及び低転移性細胞株でも同様であった。今後、遺伝子導入法等により、これら遺伝子の転移能への関与を検討していく予定である。

E. 結論

本研究事業の中で発見されたDAN遺伝子の役割は依然として不明ではあるが、生物学的にかなり多彩であることが想定されるに至った。その機能を解明するのに必須のDANノックアウトマウスの作成とその解明の結果が間もなく得られる段階となった。ヒト1番染色体短腕に座位するがん抑制候補遺伝子の検索のため、同領域でのホモ欠失の同定、コンティグの作成を行った。同領域で同定された遺伝子の変異の検索、機能解析が進行中である。がん細胞の転移能獲得の機序の解明とその阻止法の開発のために、新規の候補分子を同定することができた。

F. 研究発表

論文発表

1. Ozaki, T., Hanaoka, E., Naka, M., Nakagawara, A. and Sakiyama, S. Cloning and characterization of rat BAT3 cDNA. *DNA Cell Biol*, 18: 503-512, 1999.
2. Shishikura, T., Ichimiya, S., Ozaki, T., Nimura, Y., Kageyama, H., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Miyauchi, M., Yamamoto, N., Suzuki, M., Nakajima, N. and Nakagawara, A. Mutational analysis of the p73 gene in human breast cancer. *Int J Cancer*, 84:321-325, 1999.
3. Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, Y. and Nakagawara, A. Mutational Analysis of p51A/Tap63g, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene*, 18: 3761-3765, 1999.
4. Takada, N., Ozaki, T., Ichimiya, S., Todo, S. and Nakagawara, A. Identification of a transactivation activity in the carboxy-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastoma. *Cancer Res*, 59: 2810-2814, 1999.
5. Ozaki, T., Naka, M., Takada, T., Tada, M., Sakiyama, S. and Nakagawara, A. Deletion of COOH-terminal region of P73 α enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res*, 59: 5902-5907, 1999.
6. Ikawa, S., Nakagawara, A. and Ikawa, Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ*, 6: 1154-1161, 1999.
7. Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R. and Ishioka, C. Effects of p51/p63 missense mutations on transcriptional activities of p53 downstream gene promoters. *Cancer Res*, 59: 5908-5911, 1999.
8. Seki, N., Hattori, A., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Muramatsu, M., Hori, T. and Saito T. A novel human gene whose product shares significant homology with the bovine brain-specific protein p25 on chromosome 5p15.3. *J Hum Genet*, 44: 121-122, 1999.
9. Hirai, M., Yoshida, S., Kashiwagi, H., Kawamura, T., Ishikawa, T., Kaneko, M., Ohkawa, H., Nakagawara, A., Miwa, M. and Uchida, K. 1q23 gain is associated with progressive neuroblastoma resistant to aggressive treatment. *Gene Chromosome Cancer*, 25: 261-269 1999.
10. Han, S., Semba, S., Abe, T., Makino, N., Furukawa, T., Fukushige, S., Takahashi, H., Sakurada, A., Sato, M., Shiiba, K., Matsuno, S., Nimura, Y., Nakagawara, A. and Horii A. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol*, 25: 194-198, 1999.
11. Nishio, S., Hamada, Y., Nakagawara, A., Haga, S., Suzuki, S. and Fukui, M. Thoracic paravertebral ganglioneuroma with high immunohistochemical expression of TrkA. *Neuropathol*, 19: 51-56, 1999.
12. Yang, H.W., Ikeda, H., Kato, K., Nakagawara, A., Choi, S.H., Hayashi, Y., Obana, K., Hemmi, H. and Tsuchida, Y. Development of a polyclonal antibody with defined specificity against synthetic peptides from the N-myc oncoprotein using multiple antigen peptide and hemocyanin conjugation methods. *J Pediatr Surg*, 34: 454-460, 1999.
13. Sugimoto, N., Fukuda, Y., Saito-Ohara, F., Kamiyama, R., Nakagawara, A., Mukae, N., Nagata, S. and Inazawa, J.

- The human caspase-activated DNase gene (hCAD): genomic structure, exonic single nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the hCAD locus. *J Hum Genet*, 44: 408-11, 1999.
14. Miyauchi, M., Shimada, H., Kadomatsu, T., Muramatsu, T., Matsubara, S., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, A., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Frequent expression of midkine gene in esophageal tumors suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy. *Jpn J Cancer Res*, 90: 469-475, 1999.
 15. Kimura, M., Yoshida, Y., Takenaga, K., Takenouchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Acquired immunity in nude mice induced by the expression of IL-2 or IL-4 gene in human pancreatic carcinoma cells and antitumor effect generated by in vivo gene transfer using retrovirus. *Int J Cancer*, 82: 549-555, 1999.
 16. Duarte, W. R., Imamura, T., Takenaga, K., Ohya, K., Ishikawa, I. and Kasugai, S. Extracellular role of S100A4 calcium binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Comm*, 255: 416-420, 1999.
 17. Takenaga, K. Suppression of metastasis-associated S100A4 gene expression by γ -interferon in human colon adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 80: 127-132, 1999.
 18. Takasu, M., Tada, Y., Wang, J., Kagawa, M. and Takenaga, K. Resistance to apoptosis induced by microenvironmental stresses is correlated with metastatic potential in Lewis lung carcinoma. *Clin Expt Meta*, 17: 409-416, 1999.
 19. Duarte, W. R., Mikuni-Takagi, Y., Kawase, T., Iimura, T., Oida, S., Ohya, K., Takenaga, K., Ishikawa, I. and Kasugai, S. Effects of mechanical stress on the mRNA expression of S100A4 and cytoskeletal components by periodontal ligament cells. *J Med Dent Sci*, 46: 117-122, 1999.
 20. Furumoto, T., Miura, N., Akasaka, T., Mizutani-Koseki, Y., Sudo, H., Fukuda, K., Maekawa, M., Yuasa, S., Fu, Y., Moriya, H., Taniguchi, M., Imai, K., Dahl, E., Balling, R., Pavlova, M., Gossler, A. and Koseki, H. Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral Column development. *Dev Biol*, 210: 15-29, 1999.
 21. Hiraoka, S., Furumoto, Y., Koseki, H., Takagaki, Y., Taniguchi, M., Okumura, K. and Ra, C. Fc receptor β subunit is required for full activation of mast cells through Fc receptor engagement. *Int Immunol*, 11:199-207, 1999
 22. Yoshida, T., Fukuda, T., Hatano, M., Koseki, H., Okabe, S., Ishibashi, K., Kojima, S., Arima, M., Komuro, I., Ishii, G., Miki, T., Hirose, S., Miyasaka, N., Taniguchi, M., Ochiai, T., Isono, K., and Tokuhisa, T. The role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovas Res* 42: 670-679, 1999.
 23. Nakano, H., Sakon, S., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., Kobata, T., Santee, S. M., Ware, C. F., Rennert, P.D., Taniguchi, M., Yagita, H. and Okumura, K. Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 9803-9808, 1999.
 24. Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M. and Nakayama, T. Inhibition of Th2 cell differentiation and IgE response by ligand-activated V α 14 NKT cells. *J Extl Med*, 190: 783-792, 1999.
 25. Ariga, J., Mizugishi, K., Koseki, H., Imai, K., Balling, R., Noda, T., and Mikoshiba, K. Zic1 regulates the patterning of vertebral arches in cooperation with Gli3. *Mech Dev*, in press, 2000.
 26. Matsubara, H., Kimura, M., Sugaya, M., Koide, Y., Gunji, Y., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Isono, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of wild-type p53 gene confers increased sensitivity to radiation and chemotherapeutic agents in human esophageal carcinoma cells. *Int J Oncol*, 14: 1081-1085, 1999.
 27. Yoshida, H., Tanabe, M., Miyauchi, M., Kawamura, K., Takenaga, K., Ohnuma, N., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Induced immunity by expression of interleukin-2 or GM-CSF gene in murine neuroblastoma cells can generate antitumor response to established tumors. *Cancer Gene Ther*, 6: 395-401, 1999.

28. Mochizuki, S., Iwadate, Y., Namba, H., Yoshida, Y., Yamaura, A., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Homozygous deletion of the p16/MTS-1/CDKN2 gene in malignant gliomas is infrequent among Japanese patients. *Int J Oncol*, 15: 983-989, 1999.
29. Maeda, T., Matsubara, H., Sugaya, M., Miyazawa, Y., Gunji, Y., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Loss of tumorigenicity of human breast cancer cells generated to produce IL-2, IL-4 or GM-CSF in nude mice. *Int J Oncol*, 15: 943-947, 1999.
30. Kuroiwa, N., Yusa, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Hiwasa, T., Lin, L., Moriyama, Y. and Fujimura, S. Regulation of the activity and polymerization status of recombinant human cytosolic thymidine kinase by thiols and ATP. *Int J Oncol*, 16:305-313,2000.
31. Tasaki, K., Yoshida, Y., Maeda, T., Miyauchi, M., Kawamura, K., Takenaga, K., Yamamoto, H., Kouzu, T., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18 which activate Th1-type helper T cells. *Cancer Gene Ther*, in press, 2000.
32. Tasaki, K., Yoshida, Y., Miyauchi, M., Maeda, T., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M.: Transduction of murine colon carcinoma cells with interleukin - 15 gene induces antitumor effect in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Cancer Gene Ther*, in press, 2000.
33. Yoshida, Y., Narita, M., Tasaki, K., Miyauchi, M., Takenaga, K., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S. and Kagawa, M. Impaired tumorigenicity of human pancreatic cancer cells retrovirally transduced with interleukin-12 or interleukin-15 gene. *Cancer Gene Ther*, in press, 2000.
34. Matsubara, H., Kawamura, K., Koide, Y., Gunji, Y., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Differential efficacy of suicide gene therapy by herpes simplex virus thymidine kinase gene reflects the status of p53 gene in human esophageal cancer cells. *Anticancer Res*, in press, 2000.
35. Kawamura, K., Tasaki, K., Hamada, H., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of Esherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumor effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Ther*, in press, 2000.
36. Narita, M., Takenaga, K., Yoshida, Y., Goto, S., Sash, H., Sakiyama, S. and Kagawa, M. Poly-adenylation signals facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res*, in press, 2000.
37. Namba, H., Tagawa, M., Miyagawa, T., Iwadate, Y., and Sakiyama, S. Treatment of rat experimental brain tumor by herpes simplex virus thymidine kinase gene-transduced allogenic tumor cells and ganciclovir. *Cancer Gene Ther*, in press, 2000.

分担研究報告書
新規がん抑制遺伝子の単離とその構造解析

分担研究者 尾崎俊文 千葉県がんセンター研究所 生化学研究部 研究員

研究要旨 本研究では、マウス胚性癌細胞 (P19) における DAN 蛋白質の BMP シグナリングに対する阻害効果の検討、マウス骨芽細胞(MC3T3E1)の分化過程における DAN 遺伝子の発現パターンの解析、および DAN 結合蛋白質の一つとして同定された DA41 に対するヒト cDNA のクローニングを行った。P19 細胞を用いたレポーターアッセイを試みたところ、DAN による BMP4 シグナリングの阻害が観察された。MC3T3E1 細胞の分化に伴い、DAN 遺伝子の発現亢進、および DAN 蛋白質の分泌量の増大が認められた。また、ヒト DA41 遺伝子は染色体上 9q21.2-q21.3 にマップされた。

A. 研究目的

DAN は、ラットの繊維芽細胞に対する強制発現の実験から、細胞の増殖ならびにがん化を抑制する機能を持つ新規の分泌蛋白質であることが示されている。また、レチノイン酸によるヒト神経芽腫細胞の分化誘導に伴って、DAN 遺伝子の発現亢進が観察されることから、DAN が細胞の分化誘導に積極的な役割を担っている可能性が想定される。一方、カエルの初期胚を用いた実験から、DAN は BMP 2/4 と直接結合することによって、そのシグナルを阻害することが示された。本研究では、BMP シグナリング、および細胞分化に対する DAN の役割を検討する目的で、マウス胚性癌細胞 (P19) における DAN の BMP シグナリングに対する阻害効果の検討、およびマウス骨芽細胞(MC3T3E1)の分化過程における DAN 遺伝子の発現パターンの解析を試みた。また、DAN 結合蛋白質の一つとして同定された DA41 に対するヒト cDNA のクローニングを行うとともに、FISH 法による染色体マッピングを試みた。

B. 研究方法

P19 細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム沈澱法を用いて行った。ルシフェラーゼレポーターアッセイは Promega 社のシステムを用いて行った。MC3T3E1 細胞の分化に伴う DAN 遺伝子の発現パターンの解析は、ノーザン法およびウエスタン法を用いて行った。また、ヒト DA41 cDNA のクローニングは通常のリブラリースクリーニング法で行った。染色体マッピングはピオチン標識による FISH 法で行った。

C. 研究結果

- 1) マウス胚性癌細胞 (P19) に、ヒト BMP4 cDNA およびラット DAN cDNA をリン酸カルシウム沈澱法で導入し、24 時間後の細胞抽出液に対してルシフェラーゼによる発光量を定量した。その結果、DAN による BMP4 シグナリングの阻害が観察された。
- 2) マウス骨芽細胞(MC3T3E1)では、分化開始後 8 日目から骨分化の初期マーカーの一つであるアルカ

リフォスファターゼ活性の顕著な亢進が観察された。一方、DAN 遺伝子の発現誘導が RNA レベルで分化開始直後から認められ、さらに分化開始後 4 日目から培養液中への DAN の分泌が検出された。

- 3) ヒト正常肺由来の cDNA ライブラリーに対して、ラット DA41 cDNA をプローブとして用いたスクリーニングを試み、完全長の ORF (open reading frame) を同定した。ヒト DA41 は、ラット DA41 に対してアミノ酸レベルで 86% の相同性を示した。DA41 遺伝子の発現は、ほぼ全てのヒト組織で観察された。また、PCR 法によるスクリーニングによって得られたヒト DA41 遺伝子を含む PAC クローンをプローブとして用いた染色体マッピングによって、DA41 遺伝子はヒト染色体上 9q21.2-q21.3 に局在することが示された。

D. 考察

P19 細胞におけるルシフェラーゼレポーターアッセイの結果は、DAN がカエルの初期胚のみならず哺乳動物由来の細胞においても、BMP 2/4 に由来するシグナルを阻害する可能性を示唆している。MC3T3E1 細胞の分化過程において、アルカリフォスファターゼ活性の上昇に先んじて DAN 遺伝子の発現誘導が観察されたことより、DAN は極めて早期の新規骨分化マーカーである可能性が想定される。DA41 が CDK2 活性低下を伴う増殖抑制を誘導すること、DA41 類似蛋白質であるカエルの XDRP1 が細胞分裂を阻害すること、さらにヒト DA41 遺伝子が膀胱癌の candidate suppressor locus の近傍にマップされたことから、DA41 は細胞周期や細胞分裂の制御に深く関与している可能性が示唆される。

E. 結論

今回得られた実験結果は、DAN が哺乳動物由来の細胞においても、BMP 2/4 に由来するシグナルを阻害すること、ならびに骨分化過程において重要な役割を担っている可能性を強く示唆している。さらに、細胞増殖抑制能を持つ DA41 と膀胱癌との関連が指摘された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada,N., Ozaki,T., Ichimiya,S., Todo,S., and Nakagawara,A. (1999) Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Res.*, **59**, 2810-2814.
- 2) Ozaki,T., Naka,M., Takada,N., Tada,M.,Sakiyama,S., and Nakagawara,A. (1999) Deletion of the COOH-terminal region of p73 α enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res.*, **59**, 5902-5907.
- 3) Hanaoka,E., Ozaki,T., Ohira,M., Nakamura,Y., Suzuki,M., Takahashi, E., Moriya,H., Nakagawara,A., and Sakiyama,S. (2000) Molecular cloning and expression analysis of the human *DA41* gene and its mapping to chromosome 9q21.2-q21.3. *J.Hum.Genet.*, in press.
- 4) Nagai,M., Ichimiya,S., Ozaki,T., Seki,N., Mihara,M., Furuta,S., Ohira,M., Tomioka, M., Nomura,N., Sakiyama,S., Kubo,O., Takakura,K., Hori,T., and Nakagawara,A. (2000) Identification of the full-length *KIAA0591* gene encoding a novel kinesin-related protein which is mapped to the neuroblastoma suppressor locus at 1p36.2. *Int.J.Oncol.*, in press.
- 5) Ichimiya,S., Nimura,Y., Seki,N., Ozaki,T., Nagase,T., and Nakagawara,A. (2000) Down-regulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Eur.J.Cancer*, in press.
- 6) 尾崎俊文, 中川原章 p53 ファミリー、実験医学、印刷中

2. 学会発表

- 1) 日和佐隆樹、尾崎俊文、中村洋子、崎山樹、大越基弘 ONO-3403 処理や *DAN* 遺伝子の発現による細胞の増殖抑制に伴う 180kDa のリン酸化チロシンを含む蛋白質の減少。 第58回日本癌学会総会、1999
- 2) 仲昌彦、高田尚幸、尾崎俊文、多田光宏、中川原章 p73 蛋白質のアミノ酸置換を伴う点突然変異の生物学的意義の検討 第58回日本癌学会総会、1999
- 3) 磯貝恵理子、中村洋子、尾崎俊文、崎山樹、中川原章 神経芽腫細胞における、神経堤細胞の発生、分化に関する遺伝子発現の解析 第58回日本癌

学会総会、1999

- 4) 河本竹正、宍倉朋胤、高橋将人、高田尚幸、尾崎俊文、中川原章 神経芽腫細胞株における癌抑制遺伝子 *p53* の変異と *p53* 標的遺伝子タンパクの解析 第58回日本癌学会総会、1999
- 5) 尾崎俊文、高田尚幸、仲昌彦、多田光宏、中川原章 p53 関連蛋白質 p73 のカルボキシ末端領域の機能解析 第58回日本癌学会総会、1999
- 6) 中村洋子、尾崎俊文、花岡英二、高田尚幸、磯貝恵理子、宮内基博、中川原章、崎山樹 *DAN* 蛋白質の生物学的機能の検討 第58回日本癌学会総会、1999
- 7) 花岡英二、尾崎俊文、中村洋子、高田尚幸、中川原章、崎山樹 骨軟部腫瘍細胞株を用いた *DAN* 遺伝子産物の機能解析 第58回日本癌学会総会、1999

1 番染色体短腕に座位する新規がん抑制遺伝子の単離

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所 生化学研究部 部長

研究要旨 1p35-p36 に座位する新規がん抑制遺伝子の同定を目的として、前年度までに明らかにした3つの領域について解析を進めた。まず、1p36.3 (約2～3Mb) では、最大の候補遺伝子である p73 について解析を行い、p53 とは異なる新たな機能を見出した。次に、1p36.2-p36.3 には、神経芽腫細胞株において0.5 Mbのホモ欠失を見出し、PAC コンティグ作成後これまでに約60%のシーケンスを終了し、その領域内に6個の候補遺伝子の存在を明らかにした。また、1p35 には、大腸がんで約6cMの共通欠失領域を見出し、現在PAC/BAC コンティグを作成中である。

A. 研究目的

1 番染色体短腕遠位領域 1p34-pter には、神経芽細胞腫をはじめとする多数のヒト腫瘍の抑制遺伝子が複数存在することが推測されている。我々はこれまでに、神経芽細胞腫、大腸がん、肺がん、肝がんなどを対象としてヘテロ接合性の消失 (LOH) を検索し、3つの共通欠失領域を決定した。そこで、それぞれの領域について候補遺伝子を絞り込む作業を行った。なかでも、1p36.2-p36.3領域にはホモ欠失を見出し、そのPAC コンティグ作成とシーケンスから候補遺伝子の同定を試みた。また、最も遠位領域の有力候補遺伝子である p73 については、p53 と異なる構造上の機能について解析を行った。

B. 研究方法

コンティグ作成はPACまたはBACライブラリーのスクリーニングによった。また、部分ゲノムシーケンスから得られたESTをもとにcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長cDNAをクローニングした。p73の機能解析には、ゲルシフトアッセイ、リポーターアッセイ、コロニー形成能などの方法を用いた。

C. 研究結果

前年度までに同定した1番染色体短腕遠位部の3カ所の共通欠失領域について、以下に述べる結果を得た。

(1) 1p36.3 領域 (約2～3Mb) : この領域内にマップされている有力ながん抑制遺伝子候補である p73 について解析し、次の点を明らかにした。A) 神経芽腫と肺がんで見られたP405RとP425Lの変異が存在するp53にはない p73 の COOH-末端領域の機能を知るために、p73 α の種々の変異体を作製し、それらの機能を調べた。まず、p21, Mdm2, Bax のプロモーターを持つ各ルシフェラーゼレポーターを用いたアッセイの結果、p73 α の COOH-末端領域 (アミノ酸 549-636) を欠失した変異体では、野生型の p73 α に比べて顕著な転写活性化能の増強が観察された。次に、p53 の標的配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイの結果、p73 α の COOH-末端領域 (アミノ酸 549-636) を欠失した変異体では、野生型の p73 α に比べて顕著な DNA 結合能の増強が見られた。さらに、機能的な p53 を欠く Saos-2 細胞を用いたコロニー形成実験を行った結果、p73 α の COOH-末端領域 (アミノ酸 549-636) を欠失した変異

体では、野生型の p73 α に比べて顕著な細胞増殖抑制能の阻害が観察された。これらの結果から、p73 α の COOH-末端領域 (アミノ酸 549-636) は、p73 α の転写活性化能およびDNA結合能を抑制すること、しかしながら、この領域は p73 α の細胞増殖抑制能に必須の機能を担っている可能性が示唆された。また、P405R またはP425Lの変異をもつ p73 α を同様の系で解析したところ、p73 α (P425L) で転写活性化能の抑制とアポトーシス誘導能の低下が見られた。

(2) 1p36.2-p36.3 領域 (0.5 Mb ホモ欠失領域) : 神経芽腫細胞株において、この共通欠失領域内にホモ欠失を見出し、800 kb に及ぶ PAC コンティグを作成した。現在までに約60%のシーケンスを完了し、ホモ欠失が500 kb であること、少なくとも6つの遺伝子が存在し、そのうちの3つは神経芽腫の予後良好なものでは高く発現し予後不良なものでは低くなっていることを明らかにした。これらの遺伝子については、全長cDNAをクローニングし、機能解析のためにウイルスベクターに組み込んだ。

(3) 1p35 領域 (約3 Mb) : 大腸がんの LOH 解析から、この領域を約3 Mb に狭小化し、BAC コンティグを作成した。現在、部分シーケンスからESTを同定し、候補遺伝子の同定作業を進めている。

D. 考察

最近の内外の知見から、p53 ファミリー遺伝子である p53, p73, p51/p63 は互いに異なる構造的機能と生理機能を有することが明らかになってきた。今回の我々の解析結果からも、p73 の COOH-末端領域は自己の機能をアロステリック的に制御し、NH₂-末端領域の転写活性化能を負に、アポトーシス誘導能を正に調節する機能を有することが明らかになった。今後は、この COOH-末端領域に存在する SAM ドメインに結合するタンパク質の同定を含むこの領域の機能解析を進める必要がある。また、ホモ欠失領域については、6個の遺伝子のがん抑制遺伝子としての評価をさらに詳細に行うことが急務である。また、この領域のゲノムシーケンスを完成し、未知の新規遺伝子の同定とその評価を早急に行う必要がある。

E. 結論

1p36.3 にマップされ、がんで変異が見られたp73のCOOH末端領域の機能が明らかになってきた。また、1p36.2-p36.3のホモ欠失領域から6個の候補遺伝子をクローニングし、がん抑制遺伝子としての同定を進める段階に達した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takada, N., Ozaki, T., Ichimiya, S., Todo, S., and Nakagawara, A. Identification of a transactivation activity in the carboxy-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 59:2810-2814, 1999.
 2. Ozaki, T., Naka, M., Takada, N., Tada, M., Sakiyama, S., and Nakagawara, A. Deletion of the COOH-terminal region of p73 α enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res.* 59:5902-5907, 1999.
 3. Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, S., Ikawa, Y., and Nakagawara, A. Mutational analysis of p51A/TAp63 γ , a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene* 18:3761-3765, 1999.
 4. Ichimiya, S., Nimura, Y., Kageyama, H., Takada, N., Sunahara, M., Shishikura, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Seki, N., Ohira, M., Kaneko, Y., McKeon, F., Caput, D., and Nakagawara, A. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 18:1061-1066, 1999.
 5. Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R., and Ishioka, C. Transcriptional activities of p51/p63 missense mutations on the p53-downstream gene promoters. *Cancer Res.* 59:5908-5911, 1999.
 6. Ikawa S., Nakagawara A., and Ikawa Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ.* 6:1154-1161, 1999.
 7. Kaneko, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Nakagawara, A., and Sakurai, M. Disomy 1 with terminal 1p deletion was frequent in mass screening-negative/late presenting neuroblastomas in young children, but not in mass screening-positive neuroblastomas in infants. *Int. J. Cancer* 80:54-59, 1999.
 8. Han, S., Semba, S., Abe, T., Makino, N., Furukawa, T., Fukushige, S., Takahashi, H., Sakurada, A., Sato, M., Shiiba, K., Matsuno, S., Nimura, Y., Nakagawara, A., and Horii, A. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25:194-198, 1999.
 9. Shishikura, T., Ichimiya, S., Ozaki, T., Nimura, Y., Kageyama, H., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Miyuchi, M., Yamamoto, N., Suzuki, M., Nakajima, N., and Nakagawara, A. Mutational analysis of the p73 gene in human breast cancers. *Int. J. Cancer* 84:321-325, 1999.
 10. Mihara, M., Nimura, Y., Ichimiya, S., Sakiyama, S., Kajikawa, S., Adachi, W., Amano, J., and Nakagawara, A. Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 79:164-167, 1999.
 11. Ichimiya, S., Nimura, Y., Kageyama, H., Takada, N., Sunahara, M., Shishikura, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Seki, N., Ohira, M., Kaneko, Y., McKeon, F., Caput, D., and Nakagawara, A. Genetic analysis of p73 localized at chromosome 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Eur. J. Cancer* (in press).
- ### 2. 学会発表
1. 宍倉朋胤、高橋将人、中川原 章、宮内 充、山本尚人、本田一郎、渡辺 敏、木村秀樹、武内利直、広瀬正義 癌と正常組織におけるp73の発現とp53遺伝子変異との相関性に関する解析、第3回がん分子標的治療研究会総会、1999.
 2. 三原基弘、大平美紀、町田泰一、古田繁行、砂原正男、中川原 章 大腸癌における1p36.1共通欠失領域の同定とそのcontig作製、第58回日本癌学会総会、1999.
 3. 古田繁行、三原基弘、大平美紀、高橋将人、中田幸之介、中川原 章 神経芽腫におけるDFF45/ICAD遺伝子のmappingと変異解析、第58回日本癌学会総会、1999.
 4. 仲 昌彦、高田尚幸、尾崎俊文、多田光宏、中川原 章 p73蛋白質のアミノ酸置換を伴う点突然変異の生物学的意義の検討、第58回日本癌学会総会、1999.
 5. 宍倉朋胤、高橋将人、中川原 章 癌と正常組織におけるp73の発現様式とp53遺伝子変異との相関性に関する解析、第58回日本癌学会総会、1999.
 6. 尾崎俊文、高田尚幸、仲 昌彦、多田光宏、中川原 章 p53関連蛋白質p73のカルボキシ末端領域の機能解析、第58回日本癌学会総会、1999.
 7. 高安 肇、影山 肇、アシュラフル・イスラム、金子安比古、橋都浩平、中川原 章 神経芽腫における1p-pterヘテロ接合性消失の解析、第15回日本小児がん学会、1999.
 8. 堀井 明、林 泰秀、稲澤譲治、中川原 章、添田栄一 ゲノム解析に基づく1p36のがん関連遺伝子の単離・解析、第22回日本分子生物学会年会、1999.

分担研究報告書

がん細胞の転移を制御する遺伝子の検索と解析

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター化学療法研究部研究員

研究要旨 マウスB16メラノーマ由来で転移能の異なる細胞株（低転移性F1と高転移性BL6）における血管新生能とvascular endothelial growth factor (VEGF)産生能を比較した。その結果、BL6細胞の方が血管新生能が高く、また腫瘍内微小血管密度も高いことが判明した。さらに、BL6細胞の方が低酸素下において高いVEGF産生能を示すことが判った。この結果は、VEGF遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによっても確認された。そこで、この差の原因を解析したところ、低酸素下におけるHIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) の発現量がBL6細胞で高いためであることが明らかになった。一方、マウスルイス肺癌由来の低転移性P29細胞はdimethylsulfoxide (DMSO)処理によりエピジェネティックに高転移性へと変化することが知られているので、この際に発現の変化する遺伝子の検索をcDNAサブトラクション法を用いて行った。その結果、DMSO処理P29細胞で発現の高い遺伝子としてepithelin遺伝子が、P29細胞で発現の高い遺伝子としてST1/T1/Fit1遺伝子が見い出された。Epithelin およびST1/T1/Fit1 mRNAの発現をルイス肺癌やcolon26大腸癌から樹立されている低転移性と高転移性細胞株で検討したところ、前者は高転移性細胞株で、後者は低転移性細胞株で発現が高いことも判明した。従って、これらの遺伝子の発現と転移能との間の関連が示唆された。

A. 研究目的

マウスルイス肺癌より樹立した低転移性 および高転移性細胞株の様々な性状の比較により、高転移性細胞の方が血管新生能が高く、これは低酸素下におけるVEGFの発現量が多いためであることを昨年度の研究で明らかにした。そこで本年度は、この現象が他の腫瘍でも同様に認められるのかどうかをB16メラノーマ由来の低転移性F1細胞と高転移性BL6細胞を用いて検討した。

さらに、ルイス肺癌由来の低転移性P29細胞がDMSO処理により高転移性に変化することを利用し、転移関連遺伝子の検索を行った。

B. 研究方法

血管新生能はマウス背部皮下法を用いて調べた。皮下腫瘍内微小血管密度は、抗CD31抗体を用いた免疫組織化学的方法により検討した。低酸素状態はガスバクパウチ中で細胞を培養することにより維持した。VEGFおよびHIF-1 α mRNAの発現は、それぞれのcDNAをプローブに用いたノーザンブロット法により調べた。HIF-1 β mRNAの発現はRT-PCR法により検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは、VEGFプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドを作製し、これを細胞中に遺伝子導入した後、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。HIF-1 α の発現量は、核抽出液と抗HIF-1 α 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。cDNAサブトラクションは、PCR-based cDNA subtraction法により行った。

C. 研究成果

(1) F1およびBL6細胞の血管新生能を調べたところ、BL6細胞の方が血管新生能が高いことが判った。さらに、F1およびBL6細胞の形成した皮下腫瘍中における微小血管密度をCD31染色により調べた。その結果、BL6皮下腫瘍中において血管密度が顕著に高いことが判明した。次に、低酸素によるVEGF mRNAの発現誘導の程度を両細胞間で比較したところ、BL6細胞においてより強く誘導されることが判明した。そこで、この低酸素応答性のVEGF発現の差がどのような機序によるのかを検討するために、VEGFプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、BL6細胞では、F1細胞と比較して、低酸素下におけるVEGFプロモーター活性が顕著に高いことが明らかになった。VEGF遺伝子の活性化には低酸素応答性の転写因子であるHIF-1が関与しており、HIF-1は α と β サブユニットから成ることが知られている。そこで、常酸素および低酸素下におけるHIF-1 α およびHIF-1 β mRNAの発現量を調べたところ、両細胞間でその発現量に差は認められなかった。しかし、蛋白質レベルでの発現を検討したところ、低酸素下におけるHIF-1 α の発現がBL6細胞において顕著に高いことが判明した。

(2) P29細胞と2% DMSOを5日間作用させたP29細胞よりmRNAを調製し、cDNAライブラリーを作製した。次に、PCR-based cDNA subtraction法により、P29細胞で発現の高い遺伝子あるいはDMSO処理

P29細胞で発現の高い遺伝子をスクリーニングした。その結果、P29細胞で発現の高い遺伝子としてST1/T1/Fit1遺伝子を、DMSO処理P29細胞の方で発現の高い遺伝子としてepithelin遺伝子を見出した。これらの遺伝子の発現が本当に転移能と関連しているのかどうかを検討するために、すでにルイス肺癌より樹立されている複数の低転移性および高転移性細胞株における発現を調べた。その結果、ST1/T1/Fit1遺伝子の発現は低転移性細胞株で高く、epithelin遺伝子の発現は高転移性細胞株で高いことが判明した。さらに、大腸癌Colon26由来の低転移性と高転移性細胞株における発現も同様な傾向であることが判った。

D. 考察

F1細胞と比較してBL6細胞の方が低酸素下でのVEGF産生能が高いが、この差はBL6細胞内ではVEGFプロモーターがより活性化されるためであることが判った。そこで、低酸素によるVEGF遺伝子の発現誘導に係わるHIF-1のサブユニットであるHIF-1 α の発現を検討したところ、RNAレベルでは両細胞株間で発現に差は認められなかった。しかし、蛋白質レベルではBL6細胞において発現誘導が高いことが判明した。これらのことより、BL6細胞では、低酸素下でHIF-1 α がより安定に存在しうる機構があることが示唆された。最近、HIF-1 α の安定性にvon Hippel-Lindau (VHL)因子の関与が報告された。従って、F1とBL6細胞においてVHL因子の発現量に差がある可能性も考えられ、今後の検討が必要である。以上の結果より、BL6細胞では、低酸素下でHIF-1 α が安定化されるためにVEGF遺伝子発現が高まり、このことが血管新生の促進さらには転移の亢進の一つの原因になっているのではないかと推察された。

ルイス肺癌由来の低転移性P29とDMSO処理により高転移性に変化したP29細胞で発現の異なる遺伝子を検索したところ、DMSO処理P29細胞で発現の高い遺伝子としてepithelin遺伝子が見出された。Epithelinは増殖因子として発見され、細胞のがん化にも関与することが示唆されているが、その作用機序や転移との関連に関しては全く不明である。一方、P29細胞で発現の高い遺伝子としてST1/T1/Fit1遺伝子を見出した。ST1/T1/Fit1遺伝子産物はインターロイキン1レセプターとホモロジーを示し、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する増殖因子反応性遺伝子産物であるが、これもまた転移との関連については全く不明である。興味深いことに、ルイ

ス肺癌および大腸癌Colon26より樹立されている低転移性細胞株と高転移性細胞株におけるepithelinとST1/T1/Fit1遺伝子の発現を調べたところ、epithelin遺伝子は高転移性細胞株で、ST1/T1/Fit1遺伝子は低転移性細胞株でそれぞれ発現が高いことが明らかになった。このことは、これらの遺伝子発現と転移能との間に相関があることを強く示唆している。今後、より直接的な方法によりこれらの遺伝子の転移への関与を検討するとともに、ヒト腫瘍におけるこれらの遺伝子の発現を調べることが必要であろう。

E. 結論

BL6メラノーマ由来の低転移性F1細胞と比較して、高転移性BL6細胞において血管新生能およびVEGF産生能が高いことが判明した。また、この差はHIF-1 α の発現量の差に起因することが判った。さらに、ルイス肺癌およびColon26由来の低転移性細胞株においてST1/T1/Fit1遺伝子、高転移性細胞株においてepithelin遺伝子の発現がそれぞれ高いことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takenaga, K. Suppression of metastasis-associated S100A4 gene expression by gamma-interferon in human colon adenocarcinoma cells. *Brit. J. Cancer*, 80, 127-132, 1999.
2. Takasu, M., Tada, Y., Wang, J. O., Tagawa, M., Takenaga, K. Resistance to apoptosis induced by micro-environmental stresses is correlated with metastatic potential in Lewis lung carcinoma. *Clin. Expt. Metastasis*, 17, 409-416, 1999.
3. Duarte, W. R., Mikuni-Takagaki, Y., Kawase, T., Jimura, T., Oida, S., Ohya, K., Takenaga, K., Ishikawa, I., Kasugai, S. Effects of mechanical stress on the mRNA expression of S100A4 and cytoskeletal components by periodontal ligament cells. *J. Med. Dent. Res.*, 46, 117-122, 1999.
4. Matsubara, H., Kimura, M., Sugaya, M., Koide, Y., Gunji, Y., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Isono, K., Sakiyama, S., Tagawa, M. Expression of wild-type p53 gene confers increased sensitivity to radiation and chemotherapeutic agents in human esophageal carcinoma cells. *Int. J. Oncology*, 14, 1081-1085, 1999.
5. Miyachi, M., Shimada, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Ikematsu, S., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., Tagawa, M. Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer

suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy. Jpn. J. Cancer Res., 90, 469-475, 1999.

6. Kimura, M., Yoshida, Y., Narita, M., Takenaga, K., Takenouchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S., Tagawa, M. Acquired immunity in nude mice induced by expression of the IL-2 or IL-4 gene in human pancreatic carcinoma cells and antitumor effect generated by in vivo gene transfer using retrovirus. Int. J. Cancer, 82, 549-555, 1999.

7. Yoshida, H., Tanabe, M., Miyauchi, M., Kawamura, K., Takenaga, K., Ohnuma, N., Sakiyama, S., Tagawa, M. Induced immunity by expression of interleukin-2 or GM-CSF gene in murine neuroblastoma cells can generate antitumor response to established tumors. Cancer Gene Ther., 6, 395-401 1999.

8. Duarte, W. R., Iimura, T., Takenaga, K., Ohya, K., Ishikawa, I., Kasugai, S. Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 416-420, 1999.

9. Matsubara, H., Kawamura, K., Sugaya, M., Koide, Y., Gunji, Y., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., Tagawa, M. Differential efficacy of suicide gene therapy by herpes simplex virus-thymidine kinase gene reflects the status of p53 gene in human esophageal cancer cells. Anticancer Res., 19, 4157-4160, 1999.

10. Kawamura, K., Tasaki, K., Hamada, H., Takenaga, K., Sakiyama, S., Tagawa, M. Expression of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyl-transferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumor effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. Cancer Gene Ther., in press.

11. Tasaki, K., Yoshida, Y., Maeda, T., Miyauchi, M., Kawamura, K., Takenaga, K., Yamamoto, H., Kouzu, T., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., Tagawa, M. Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18 which activate Th1-type helper T cells. Cancer Gene Ther., in press.

12. Tasaki, K., Yoshida, Y., Miyauchi, M., Maeda, T., Takenaga, K., Kouzu, T., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., Tagawa, M. Transduction of murine colon carcinoma cells with interleukin-15 gene induces antitumor effect in immunocompromised hosts. Cancer Gene Ther., in press.

13. Yoshida, Y., Tasaki, K., Miyauchi, M., Narita, M., Takenaga, K., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S., Tagawa, M. Impaired tumorigenicity

of human pancreatic cancer cells retrovirally transduced with interleukin-12 or interleukin-15 gene. Cancer Gene Ther., in press.

14. Lee, J-Y., Nakane, Y., Koshikawa, N., Nakayama, K., Hayashi, M., Takenaga, K. Characterization of a zinc finger protein ZAN75: Nuclear localization signal, transcriptional activator activity, and expression during neuronal differentiation of P19 cells. DNA Cell Biol., in press.

2. 学会発表

1. 越川信子、竹永啓三. 転移能の異なるルイス肺癌細胞における低酸素状態でのVEGF発現能の差の検討. 第8回がん転移研究会講演要旨集、p46、1999.

2. 竹永啓三、越川信子. 転移能およびVEGF産生能が異なる肺癌細胞株におけるVEGFプロモーター活性とHIF-1 α 発現量の差異. 第58回日本癌学会総会記事、p608、1999.

3. 多田裕司、王継陽、竹永啓三、滝口裕一、栗山喬之、崎山樹、田川雅敏. TNFファミリー遺伝子導入ルイス肺癌細胞株における転移形成能の検討. 第58回日本癌学会総会記事、p650、1999.

4. 越川信子、竹永啓三、田川雅敏、崎山樹. VEGF遺伝子プロモーターにより低酸素応答性発現調節を受けるHSV-TK遺伝子による高転移性肺癌細胞の治療効果. 第58回日本癌学会総会記事、p727、1999.

5. 前田智子、松原久裕、宮澤幸正、舟波裕、軍司祥雄、落合武徳、竹永啓三、崎山樹、田川雅敏. 肺癌培養細胞におけるc-erbB-2遺伝子のプロモーター領域の解析. 第58回日本癌学会総会記事、p608、1999.

6. 中根ゆう子、李周洋、越川信子、中山耕造、林正男、竹永啓三. 新規Znフィンガー蛋白質ZAN75の転写活性化能とマウス胎児性がん細胞の神経細胞への分化過程における一過性発現. 第22回日本分子生物学会講演要旨集、p136、1999.

7. Kawamura, K., Tasaki, K., Hamada, H., Takenaga, K., Sakiyama, S., Tagawa, M. Expression of *E. coli* uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumor effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. 第5回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p74、1999.

8. Maeda, T., Matsubara, H., Ochiai, T., Takenaga, K., Sakiyama, S., Tagawa, M. A minimal promoter region of the c-erbB-2 gene preferentially drives the transcription of a reporter gene in human breast cancer cells. 第5回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p98、1999.

分担研究報告書

DAN 欠損マウスの作成とその解析

分担研究者 古関明彦 千葉大学大学院医学研究科教授

研究要旨 DAN 遺伝子は、細胞のがん化にともない発現が抑制される遺伝子として同定される分泌タンパクであり、培養細胞の細胞増殖を負に調節する。最近、DAN 遺伝子産物は BMP ファミリータンパクのアンタゴニストのひとつとして機能することが明らかとなった。DAN の形態形成における機能を明らかにするために、ニワトリ胚における DAN の過剰発現実験と遺伝子欠損マウスの作成を試みた。本年度は、過剰発現実験に先立ち、正常ニワトリ胚における DAN の発現を調べるために、ニワトリ DAN 遺伝子の単離とその発現の解析を行い、そのダイナミックな発現ドメインを明らかにした。また、DAN 遺伝子を欠損したマウス系統の樹立に成功した。

A. 研究目的

DAN 遺伝子産物の個体形成や臓器における機能を明らかにするためにニワトリ胚における DAN の過剰発現実験と遺伝子欠損マウスの作成を試みた。正常ニワトリ胚における DAN の発現を調べるために、ニワトリ DAN 遺伝子の単離とその発現の解析を行った。また、DAN 遺伝子を欠損したマウス系統の樹立に成功した。

B. 研究方法

1) ニワトリ DAN 遺伝子の単離とその発現

マウス DAN 全長 cDNA をプローブとして、ニワトリ HH ステージ 2.2 胚 cDNA λZAP ライブラリを常法に従ってスクリーニングした。得られたクローンのうち 3 クロンについて塩基配列を決定した。ニワトリ DAN 全長 cDNA をチゴキシゲニンを用いてラベルし、1 日胚から 5 日胚を用いてホールマウント in situ ハイブリダイゼーションを行い観察し、その後、パラフィン包埋して切片とし、観察を行った。

2) DAN 遺伝子欠損マウスの作成

常法に従い、129ゲノムライブラリより、DAN

遺伝子座をコードするゲノム DNA をクローン化した。エクソン領域のマッピングを行った後、置換型ターゲットベクターを作成し、R1ES 細胞に導入した。

C. 研究成果

1) ニワトリ DAN 遺伝子の単離とその発現

ニワトリ DAN 全長 cDNA の塩基配列を決定した。ニワトリ DAN とマウス DAN は極めて相同性が高いことが明らかになった。1 日胚では、原始索条の前方部分、ヘンセンの結節に相当する部分での発現が見られた。その後、原腸陥入が始まると、体節中胚葉と脊索に強い発現が見られる。20 体節の胎児では、脊索、体節中胚葉、眼胞、耳胞、表皮外胚葉、内胚葉において強い発現が見られる。また、分化した体節においては、その発現は皮筋節に強く局在し、硬節ではあまり発現していない。3 日胚においては、脊索での DAN の発現は後肢芽より後方でのみ観察された。体節中胚葉での発現は、皮筋節で強い発現が見られる他、硬節でも発現が見られ始める。側板中胚葉においては、表面外胚葉直下の領域に発現が

見られ、肢芽においても表面外胚葉とその直下の間充細胞で発現が見られる。この時期になると、神経管においても、roof plate での発現が見られる。また、眼胞と耳胞においても強い発現は続いている。また、前腸においては、咽頭部では、内胚葉背側部分、胃原基では、間充細胞において強い発現が見られる。顔原基においては、やはり表面外胚葉とその直下の間充細胞で発現が見られる。4日胚においては、基本的には3日胚とほぼ同様の発現が見られる。

2) DAN 遺伝子欠損マウスの作成

遺伝子導入を行い、G418耐性クロンを240クロン単離し、サザンブロット法によりについてスクリーニングを行い、2クロンについて相同組み換え体であることが示された。これら2クロンを用いて、キメラマウスを作成し、うち1クロンから生殖細胞系列のキメラが作成された。

C. 考察

ニワトリ DAN は、様々な組織においてダイナミックに発現していることが示され、BMP ファミリーの発現と同様に、それぞれの組織において限局した発現を示す。おそらく、ニワトリ DAN は、BMP ファミリーの実効濃度を滴定することにより、細胞の機能のコントロールに寄与する可能性がある。このような発現ドメインの詳細な解析により、過剰発現実験の解釈が可能になる。DAN 遺伝子欠損マウスについては、現在ホモ接合体の作成とその表現型の解析を行っている。

D. 結論

ニワトリ DAN 全長 cDNA を単離し、そのダイナ

ミックな発現ドメインを明らかにした。また、DAN 遺伝子を欠損したマウス系統の作出に成功した。

E. 研究発表

1. Furumoto, T., Miura, N., Akasaka, T., Mizutani-Koseki, Y., Sudo, H., Fukuda, K., Maekawa, M., Yuasa, S., Fu, Y., Moriya, H., Taniguchi, M., Imai, K., Dahl, E., Balling, R., Pavlova, M., Gossler, A. and Koseki, H. (1999) Notochord-Dependent Expression of MFH1 and PAX1 Cooperates to Maintain the Proliferation of Sclerotome Cells during the Vertebral Column Development. *Dev. Biol.* 210:15-29
2. Hiraoka, S., Furumoto, Y., Koseki, H., Takagaki, Y., Taniguchi, M., Okumura, K. and Ra, C. (1999) Fc receptor β subunit is required for full activation of mast cells through Fc receptor engagement. *Int. Immunol.* 11:199-207
3. Yoshida, T., Fukuda, T., Hatano, M., Koseki, H., Okabe, S., Ishibashi, K., Kojima, S., Arima, M., Komuro, I., Ishii, G., Miki, T., Hirose, S., Miyasaka, N., Taniguchi, M., Ochiai, T., Isôno, K., and Tokuhisa, T. (1999) The role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* 42: 670-679
4. Nakano, H., Sakon, S., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., Kobata, T., Santee, S. M., Ware, C. F., Rennert, P. D., Taniguchi, M., Yagita, H. and Okumura, K. (1999) Targeted Disruption of Traf5 gene Causes Defects in CD40- and CD27-mediated Lymphocyte Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9803-9808.
5. Cui, J., Watanabe, N., Kawano, T., Yamashita, M., Kamata, T., Shimizu, C., Kimura, M., Shimizu, E., Koike, J., Koseki, H., Tanaka, Y., Taniguchi, M. and Nakayama, T. (1999) Inhibition of Th2 cell differentiation and IgE response by ligand-activated V α 14 NKT cells. *Journal of Experimental Medicine* 190:783-792.
6. Ariga, J., Mizugishi, K., Koseki, H., Imai, K., Balling, R., Noda, T., and Mikoshiba, K. (1999) Zic1 regulates the patterning of vertebral arches in cooperation with Gli3. *Mechanisms of Development* (in press)