

厚生科学研究費

がん克服戦略研究事業

研究課題：ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析

平成11年度 総括研究報告書

主任研究者 高橋利忠

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

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)粘膜関連リンパ腫(MALT)に認められる染色体転座 t(11;18)では、新規遺伝子 MALT1(18q21)がアポトーシスに關与する API2 遺伝子(11q21)とキメラ遺伝子を形成することを示した。また、(2)び慢性大細胞型 B リンパ腫の主要な転座関連遺伝子である BCL6(3q27)がリンパ球分化のマスター遺伝子である Ikaros(7p12)ともキメラ遺伝子を形成する事を示した。(b)(3)肺がんより単離した変異型 Smad 遺伝子に關し、TGF- β による正常気道上皮増殖抑制能の喪失と FAST1/Smad 依存性転写活性化障害に相関性があることを示し、また、TGF- β II型受容体のメチル化による不活化を示した。また、(4)同一組織内に各種増悪段階が混在する肺がん組織を Microdissection 法を用いて解析し、増悪に關与する 3p と 17p の両染色体欠失領域の存在を示唆した。(c)(5)シアリル 6-スルホ Le^x が L-セレクチンの糖鎖リガンドであることを同定し、その発現には我々が単離した 2 種の (VII型フコース及び 6-硫酸基) 転移酵素遺伝子が關与していることを示した。更にリガンド能を不活化する特異な代謝経路が存在することを見出し、不活化に關与するシアル酸シクラーゼの特徴を明らかにした。

分担研究者

高橋 利忠	愛知県がんセンター研究所	副所長
瀬戸 加大	愛知県がんセンター研究所	部長
高橋 隆	愛知県がんセンター研究所	部長
神奈木玲児	愛知県がんセンター研究所	部長

型粘膜関連 B リンパ腫に見られる 18q21 染色体転座に關連する遺伝子の単離、及び(2)び慢性大細胞型 B リンパ腫の主要転座関連遺伝子である BCL6 の腫瘍発生に於ける役割、(b)肺がんでは(3)17p13.3 欠失と形態学的悪性度との關連性、及び(4) TGF- β シグナル伝達系異常の発症・進展における役割の検討、を試みる。(c) 浸潤・転移では、(5) リンパ系腫瘍細胞のリンパ節浸潤に關与する接着分子である L-セレクチンの新規糖鎖リガンドの同定と、その発現に關与する転移酵素遺伝子の単離を試みる。

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・浸潤に關する研究も進み、接着分子を含む多くの要因の關与が想定されているが、その制御に關する研究は、緒のついた所である。

本研究では、ヒト腫瘍の診断・治療の向上を目指し、(a) 造血器腫瘍では、(1) MALT

B. 研究方法

(1)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)転座を解析するため、本転座を示す症例に於いて 18q21 転座切断点領域を含む

PAC, BAC クローンの contig を用いた FISH 解析を行い、転座切断点を含むクローンを見出し、次いで Exon trapping 法により転写単位を見出す。転座陽性症例に於いて、サザン解析、ノーザン解析で遺伝子異常を検出するかどうかを検討することにより、原因遺伝子を解明する。更に 11q21 に位置する相手転座関連遺伝子の同定を試み、キメラ遺伝子の形成を検索する。

(2)び慢性大細胞型 B リンパ腫の主要転座関連遺伝子である BCL6 の解析

t(3;7)転座を有するび慢性リンパ腫症例に於て、BCL6 遺伝子(3q27)の新しい転座相手遺伝子(7p12)を同定し、腫瘍化機構を考察する一助とする。また、BCL6 遺伝子を誘導発現できる細胞株を樹立し、遺伝子発現差異検出法である Atlas cDNA array 法や cDNA microarray 法を用い、BCL6 遺伝子発現誘導の前後で変化する標的遺伝子を見出す。

(3)17p13.3 欠失及びその他の染色体欠失と形態学的悪性度との関連性

同一腫瘍内で前がん病変から浸潤がんに至る形態学的悪性度に Heterogeneity をしめす 10 例の非小細胞肺癌症例を用い、各々の腫瘍組織内に於ける形態学的悪性度と、17p13.3 を始めとする 9ヶ所の染色体領域の欠失との関連性について検討する。Microdissection によって腫瘍細胞のみを分離採取し、ゲノム DNA を抽出後、PCR 法によるヘテロ接合性の消失の有無を解析する。

(4)Smad 遺伝子変異による TGF- β シグナル伝達の障害機序の検索

肺癌より単離した 6 種類の変異 Smad 遺伝子を CMV プロモーター下流に組み込んだ発現ベクターを正常気管支上皮細胞株へ導入し、TGF- β 存在下で培養し、TGF- β による増殖抑制シグナル伝達に対する傷害の程度を検討する。また変異 Smad 遺伝子と Smad 結合因子である FAST1 を、両者の結合部位を持つ Luciferase レポーターと共に導入し、刺激伝達障害について解析する。さらに、ホモ及びヘテロオリゴマー形成能についても検討を加える。

(5)リンパ系腫瘍細胞のリンパ節浸潤に関する新規接着糖鎖の同定及びその発現に関

与する転移酵素遺伝子の単離

セレクトイン発現細胞、又は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腫瘍細胞との接着を検索する。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行う。各接着分子およびそのリガンドに対する特異的単クローン抗体を用いて接着阻止実験を行う。細胞接着分子セレクトインのリガンドとしては既知のシアリル Le^x、シアリル Le^a の他に多数の新規糖鎖が存在すると考えられ、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及びその関連遺伝子を同定し、新規なものについては単離を行う。これらの遺伝子の細胞への導入によって、糖鎖リガンドが発現し、細胞接着能が誘導されることを確かめる。重要な遺伝子についてはその 5'-調節領域を単離し、転写調節機構を検索する。

C. 研究結果

(1)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

t(11;18)転座を示す MALT リンパ腫症例の 18q21 切断点領域から新規遺伝子 MALT1 を単離した。本遺伝子は、814 アミノ酸からなる蛋白をコードし、CD22b に一部相同性のある免疫グロブリン様ドメイン構造と Laminin 5 α 3b に相同性のある領域を持ち、C. elegance の F22D3.6 の相同遺伝子と考えられるが、その機能は不明である。11q21 領域に位置する相手転座関連遺伝子としては、細胞死を抑制する機能を持つ API2 遺伝子を同定した。即ち転座を有する MALT リンパ腫では新規遺伝子 MALT1 が in frame で融合した API2-MALT1 キメラ遺伝子を発現することが遺伝子異常の本体であることを明らかにした。種々の primer を作製し、RT-PCR 法を確立し、症例を検討したところ、MALT 症例の約 30%程度にキメラ mRNA が見出された。

(2)び慢性大細胞型 B リンパ腫の主要転座関連遺伝子である BCL6 の解析

t(3;7)転座を有する症例を解析することにより、相手転座関連遺伝子としてリンパ球分化のマスター遺伝子と考えられている Ikaros

(7p12)を見出した。また、BCL6 遺伝子を発現誘導させることができるマウス細胞株 Ba/F3 を樹立し、cDNA atlas 法で発現が変化する遺伝子を4種類見出した。ノーザン解析により経時的变化を検討したところ、BCL6 の発現に応じて変化することを確認し、標的遺伝子候補であることを示した。

(3) 17p13.3 欠失及びその他の染色体欠失と形態学的悪性度との関連性

形態学的に多様で同一がん組織内に各種増悪段階が混在する肺がん組織を Microdissection 法を用いて解析した結果、3p と 17p13.3 の両染色体領域は形態学的悪性度の如何に関わらず検出され、早期より欠失が生じていることより、肺がんの発症に深く関わっていることが示唆された。一方、2q、9p、18q の各染色体領域には、しばしば同一腫瘍内でヘテロ接合性の保持或いは消失に差異が見られた。これらの染色体領域では、ヘテロ接合性消失の獲得は形態学的悪性度の進行とよく一致しており、各々の染色体領域に肺がんの増悪に関連するがん抑制遺伝子の存在が示唆された。

(4) Smad 遺伝子変異による TGF- β シグナル伝達の障害機序の検討

肺がんより単離した6種類の全ての変異 Smad (2種の Smad2 と4種の Smad4) は、正常気道上皮細胞株における TGF- β による増殖抑制に対して顕著な障害を示し、機能的不活化がみられることが明らかとなった。更に、これらの変異 Smad は、FAST-1 と Smad の結合配列を備えたプロモーターを組み込んだ Luciferase レポーターを用いた検討に於いても、全てが FAST1 と協調した刺激伝達能に異常を示した。一方、Smad が異なった様式で結合し機能することが示唆されている PAI-1 プロモーターを用いた転写活性化能の検討に於いては、変異 Smad 間に機能不活化の程度に差が検出された。特に、2種類の変異 Smad (Smad4 (R441P) 変異及び Smad2 (del434-6) 変異) は、殆ど PAI-1 プロモーター活性化能の低下を示さなかった。更にオリゴマー形成能に関する検討を行ったが、各々の変異 Smad のオリゴマー形成能と PAI-1 プロモーター活性化能の異常の間に関連性が見

られた。

(5) リンパ系腫瘍細胞のリンパ節浸潤に関与する新規接着糖鎖の同定及び発現に関与する転移酵素遺伝子の単離

セレクチンの新規糖鎖リガンドであるシアリル 6-スルホ Le^x の合成機構の研究：悪性リンパ腫等リンパ球系腫瘍細胞の一部は血行性にリンパ節の高内皮細静脈(HEV)を介してリンパ節に浸潤すると考えられる。この HEV を経由する浸潤の機序は、腫瘍細胞上の L-セレクチンと HEV 上の未知の糖鎖リガンドとの相互作用によって引き起こされ、健常人のリンパ球のホーミングの機序とも一部共通すると考えられている。我々は特異的単クローン抗体を用いた研究から、HEV 上の L-セレクチンリガンド分子をシアリル 6-スルホ Le^x と同定し、さらにその合成に関与すると見られる 6-硫酸基転移酵素の二種のアイソザイムの cDNA を単離した。これらの何れかの遺伝子と以前に単離した VII 型フコース転移酵素遺伝子とのコトランスフェクションによって、細胞膜上にシアリル 6-スルホ Le^x を再構成でき、しかもトランスフェクタント細胞が L-セレクチンと特異的に接着することを証明した。

セレクチンを介した細胞接着のシアル酸環状化による post-translational な調節機構：セレクチンのリガンド糖鎖であるシアリル 6-スルホ Le^x は、これまで知られていなかった独特の経路で代謝されることを明らかにした。この代謝経路では、シアリル 6-スルホ Le^x のシアル酸残基がまずデ-N-アセチルシアル酸に変えられ、さらにサイクリックシアル酸に変化する。この代謝経路の最終産物であるサイクリックシアリル 6-スルホ Le^x は、セレクチンとの結合能がないので、この経路は、細胞のセレクチンへの結合活性を不活化するネガティブ・フィードバック機構と思われる。サイクリックシアリル 6-スルホ Le^x を合成する酵素であるシアル酸シクラーゼは、中性領域の至適 pH をもち、細胞の刺激により活性化されることを明らかにした。

D. 考察

(1) 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 リンパ腫に特異的に認められる

t(11;18)(q21;q21) 転座の本体は API2-MALT1 キメラ遺伝子の形成であることを明らかにした。また、約 30%の症例にキメラ mRNA の発現を認めた。MALT リンパ腫はリンパ節以外から発症する(節外性)リンパ腫の主要な部分をしめ、発生臓器も多様である。これら発生母地の異なる MALT リンパ腫で、本遺伝子異常がどの程度認められるかを検討する必要がある。また、API2 遺伝子は抗アポトーシス機能を持っており、キメラ蛋白の機能を検討することは、発症機構を考察する上で極めて重要である。

(2)び慢性大細胞型 B リンパ腫の主要転座関連遺伝子である BCL6 の解析

BCL6 の新たな転座相手遺伝子として、リンパ球分化のマスター遺伝子である Ikaros が関与していることを明らかにした。BCL6 の主な転座相手遺伝子としては、免疫グロブリン重鎖、軽鎖が知られているが、これらの転座と同様に Ikaros 遺伝子の場合もその promoter 領域が BCL6 の 5' 調節領域に転座し、いわゆる Promotor substitution としてキメラ遺伝子を形成しており、BCL6 産物の質的異常は誘導されない。BCL6 遺伝子転座による腫瘍化機構は不明な点が多く、今後標的遺伝子を探索することが重要であると考えられる。

(3)17p13.3 欠失及びその他の染色体欠失と形態学的悪性度との関連性

これまでの検討は、異なった部位或いは個人に発生した肺がん組織の解析結果を統計学的に推定した成績であるが、本研究では、各々の腫瘍内における悪性化と分子生物学的異常の蓄積との関連について検討を加えた。その結果、我々は 3p と 17p13.3 上に肺がん発症の極めて早期より関与するがん抑制遺伝子が存在する可能性と、2q、9p、18q の各染色体領域には肺がんの形態学的悪性化に関与するがん抑制遺伝子が存在する可能性を示唆する結果を得た。17p13.3 領域に存在する標的がん抑制遺伝子の単離・同定は肺がんのみならず、高頻度の 17p13.3 欠失が報告されている乳がん等の他のヒト腫瘍の分子病態の理解を深める上でも大きな意義を持つと考える。

(4)Smad 遺伝子変異による TGF-β シグナル伝達の障害機序の検討

これまでに我々が肺がんにより検出した変異 Smad 遺伝子は、全て TGF-β によるヒト正常気道上皮細胞株の増殖抑制に異常を示す事が明らかとなった。また、FAST-1 を介するシグナル伝達系が気道上皮細胞増殖抑制シグナルの伝達に直接関与する可能性が示唆されたので、さらに検討を進めたい。また、Smad 遺伝子変異の頻度は肺がんにおける TGF-β 不応性に比して低頻度であり、他の分子の異常も関与していると考えられる。今後更に、TGF-β リセプターの異常等についても検討対象を広げていく計画である。

(5)リンパ系腫瘍細胞のリンパ節浸潤に関する新規接着糖鎖の同定及び発現に関する転移酵素遺伝子の単離

セレクチンの新規糖鎖リガンドであるシアリル 6-スルホ Le^x の合成機構の研究：シアリル 6-スルホ Le^x が L-セレクチンの特異的リガンドであることを証明した。これまで L-セレクチンのリガンドはシアリル Le^x 様糖鎖とされてきたが、VII型フコース転移酵素遺伝子の単独トランスフェクションによって発現する通常のシアリル Le^x は L-セレクチンとほとんど結合せず、シアリル 6-スルホ Le^x が本来のリガンドであることが判明した。また、L-セレクチンとの結合におけるコア蛋白質の意義については、今後は従来の定説にとらわれずに検索をすすめる必要がある。6-硫酸基転移酵素については、今年度第二番目のアイソザイムの cDNA が得られたが、このほかにさらに未知のアイソザイムが存在する可能性が高く、これらのアイソザイムの生理的意義については、今後の検討課題としたい。

セレクチンを介した細胞接着のシアル酸の特異的修飾による調節機構の研究：これまでセレクチンを介した細胞接着の調節機構として、VII型フコース転移酵素遺伝子の転写調節について研究を進めてきたが、今年度発見されたシアル酸シクラーゼ経路は、細胞のセレクチンへの結合活性を不活化する post-translational なネガティブ・フィードバック機構として重要な意義をもつと考えられる。こうしたセレクチンを介した細胞接着の調節

機構が、細胞の悪性化に際して、どのように変化するかを解明することが、今後の重要な研究課題である。

E. 結論

(1) MALT リンパ腫では API2-MALT1 キメラ遺伝子が形成され、約 30%の症例で本キメラ mRNA の発現がみとめられることを示した。MALT リンパ腫は、消化管、肺、等その組織起源が種々であり、t(11;18)転座の有無との関連性を明らかにする必要がある。また、API2 遺伝子はアポトーシス阻害タンパクをコードしており、今後、発がんにおける役割を明らかにして行きたい。

(2) BCL6 転座の新規の相手転座関連遺伝子として Ikaros を同定した。また、BCL6 遺伝子発現誘導系を用い、標的候補遺伝子を 4 種類見出した。び慢性大細胞型リンパ腫は、主要なリンパ腫であり、BCL6 によるリンパ腫発生機構の解明は重要な研究課題である。

(3) 17p13.3 領域の欠失は肺がん発生の早期から存在しており、腫瘍発生に重要な役割を担う標的がん抑制遺伝子の存在を示唆した。本領域の染色体欠失は、他の固型がんでも報告されており、微視的ホモ欠失を有する肺がん株を用い、遺伝子単離に向け努力して行きたい。

(4) 肺がんにおける TGF- β 不応答性の機序として Smad 遺伝子変異の存在を見出し、更にそれらの機能異常の解析を行った。TGF- β シグナル伝達系の不活化機序としては種々のレベルでの機能異常が考えられるが、それを明らかにすることは肺がんの新しい分子標的治療につながる可能性もあり、重要な研究と考えられる。

(5) 細胞接着分子である L-セレクチンの新規糖鎖リガンドとして、シアリル 6-スルホ Le^x を同定し、その合成に関与する、6-硫酸基転移酵素遺伝子を単離した。また、セレクチンの糖鎖リガンド発現の調節機構として、合成律速酵素である VII 型フコース転移酵素遺伝子の転写レベルでの調節機構と、シアリ酸の環状化という特異な調節機構の二種があることを明らかにした。本研究により、最も解明の遅れていたリンパ節浸潤における細胞接

着の分子機序について、関与する特異的な糖鎖リガンドを明らかにすることができ、更に、その発現の調節機構の解明も進んだ。これらの成果から、細胞の悪性化に伴う細胞接着能の異常を引き起こしている機構の更なる解析が可能となった。

F. 研究発表 (論文発表)

1. 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
2. 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.
3. Hosokawa, Y., Joh, T., Maeda, Y., Arnold, A. and Seto, M.: Cyclin D1/PRAD1/BCL-1 alternative transcript [B] protein product in B-lymphoid malignancies with t(11;14) (q13;q32) translocation. *Int. J. Cancer*, 81: 616-619, 1999.
4. Suzuki, R., Kuroda, H., Komatsu, H., Hosokawa, H., Kagami, Y., Ogura, M., Nakamura, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Ueda, R. and Seto, M.: Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia*, 13:1335-1342, 1999
5. Harada, S., Suzuki, R., Uehira, K., Yatabe, Y., Kagami, Y., Ogura, M., Suzuki, S., Oyama, A., Kodera, Y., Ueda, R., Morishima, Y., Nakamura, S. and Seto, M.: Molecular and immunological dissection of diffuse large B-cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia*, 13: 1441-1447, 1999
6. Yokoi T, Nakamura T, Kasugai K, Yatabe Y, Fujita M, Kuroda M, Akaza K, Nomura C,

- Hamajima E, Suchi T, Seto M, Hara K. and Nakamura S.: Primary low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma with polypoid appearance. Polypoid gastric MALT lymphoma: A clinicopathologic study of eight cases. *Pathol Int* 49:702-709, 1999
7. Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, M., Taniwaki, M. and Seto, M.: A novel gene, *MALT1* at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* 18: 5785-5794, 1999.
 8. Hosokawa, Y., Maeda, Y. and Seto, M.: Human Helios, an Ikaros-related zinc finger DNA binding protein: cDNA cloning and tissue expression pattern. *Immunogenetics* 50:106-108, 1999.
 9. Hosokawa, Y., Maeda, Y., Takahashi, E., Suzuki, M. and Seto, M.: Human Aiolos, an Ikaros-related zinc finger DNA binding protein: cDNA cloning, tissue expression pattern, and chromosomal mapping. *Genomics* 61:326-329, 1999.
 10. Suzuki, H., Motegi, M., Akagi, T., Hosokawa, Y., Seto, M., Marynen, P. and Baens, M.: API1-MALT1/MLT is involved in MALT lymphoma with t(11;18)(q21;q21). *Blood* 94: 3270-3271, 1999.
 11. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M. and Nakamura, S.: Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, in press
 12. Hosokawa Y, Maeda Y, Ishinohasama R, Miura I, Taniwaki M and Seto, M.: The *Ikaros* gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the *BCL6* gene as a result of t(3;7) (q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, in press.
 13. Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Nakamura, S. and Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogenous products. *Am. J. Pathol.*, in press
 14. Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, T., Takahashi, Ta. and Mitsudomi, T.: Somatic frameshift mutations in the TGF- β RII, IGF-IIIR, BAX, hMSH3, and hMSH6 gene are uncommon in lung cancer. *Carcinogenesis*, 20: 499-502, 1999.
 15. Achiwa, H., Yatabe, Y., Hida, T., Kuroishi, T., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Sugiura, T., Mitsudomi, T. and Takahashi, Ta.: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2(COX-2) expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1001-1005, 1999.
 16. Takahashi, T., Haruki, N., Nomoto, S., Masuda, A., Saji, S., Osada, H. and Takahashi, Ta.: Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene*, 18: 4295-4300, 1999.
 17. Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Takahashi, To., Fujii, Y., Osada, H. and Takahashi, Ta.: Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene*, in press.
 18. Kimura, N., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Hiraiwa, N., Uchimura, K., Muramatsu, T., Tamatani, T., Kansas, G.S. and Kannagi, R.: Reconstitution of functional L-selectin ligands on a cultured human endothelial cell line by co-transfection of α 1 \rightarrow 3 fucosyltransferase VII and newly cloned

- GlcNAc β : 6- sulfotransferase cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4530-4535, 1999.
19. 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.
 20. Bistrup, A., Bhakta, S., Lee, J.K., Belov, Y.Y., Gunn, M.D., Zuo, F.-R., Huang, C.-C., Kannagi, R., Rosen, S.D. and Hemmerich, S.: Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high- endothelial-cell ligands for L-selectin. J. Cell Biol., 145: 899-910, 1999.
 21. 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), 38: 1131-1133, 1999.
 22. 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*-sulfotransferase during mouse embryogenesis. Glycobiology, 9: 947-955, 1999.
 23. Kannagi, R., Mitsuoka, C., Ohmori, K., Kanamori, A., Khoo, K.-H. and Inoue, Y.: Cyclic sialic acid: a new regulatory mechanism of selectin ligand activity. In: Y. Inoue, Y.C. Lee and F.A. Troy (eds.), Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation, pp. 37-43, Osaka, Japan: Gakushin Publisher, 1999.
 24. Kannagi, R.: Monoclonal antiglycosphingolipid antibodies. In: Y.A. Hannun and A.H. Merrill, Jr. (eds.), Method in Enzymology, Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Part B, New York: Academic Press, in press.
 25. Kannagi, R. and Kanamori, A.: Glycobiology of sialyl 6-sulfo Lewis X, a new carbohydrate

ligand for selectins. Trends Glycosci. Glycotechnol., in press.

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分 担 研 究 報 告 書

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

がん遺伝子産物と接着分子の血清学的解析

分担研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所副所長

研究要旨 胃癌の免疫療法のターゲットとなるべき癌抗原を同定することを、近年開発された分子血清学的方法であるSEREX法(Serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning)を用いて試みた。これまでに、5症例の胃癌でSEREX法による癌抗原の検索を行い、癌患者の免疫系が認識する136種の抗原の中から、胃癌の免疫治療・診断に有用な抗原の選択を試みている。複数の癌患者で抗体が検出されるが、コントロール群では検出されない抗原群が有望と考えられるが、11種類の候補抗原を選び、解析を続けている。

A. 研究目的

胃癌は減少傾向にあるが、罹患率としては男女とも第1位に位置する。胃癌の治療は早期発見と外科的手術に頼らざるを得ないのが現状であり、進行・再発胃癌では有効な治療法が確立されておらず、免疫療法などの新しい治療方法の開発が望まれている。本研究の目的は、胃癌の診断・治療に有用な癌抗原を同定し、さらに臨床応用のための基礎的データを得ることである。

具体的には、胃癌患者の免疫系が認識する癌抗原をSEREX法を用いて同定する。SEREX法では、癌患者から抽出した癌組織由来のcDNA発現ライブラリーを患者の自家抗体を用いて検索し、反応する癌抗原を同定する。SEREX法の最大の利点は、癌細胞の培養株の樹立を必要としないことであり、あらゆる癌で癌抗原を検索することが可能となった。

B. 研究方法

組織型の異なる5症例の胃癌から作成したcDNA発現ライブラリーを検索し、癌患者の免疫系が認識する胃癌抗原を同定することを試みる。そのために、(1)5症例の胃癌患者の抗体が認識する抗原ならびに抗原遺伝子のリストを作成する。さらに、(2)抗原に対する胃癌患者群ならびに非癌患者群における抗体反応を指標に、診断・治療に有用な癌抗原を選択する。(3)同定した胃癌抗原の臨床応用の可能性を検討するため、

各抗原の発現様式ならびに遺伝子異常の有無を検索する。

C. 研究結果

(1)胃癌患者の免疫系が認識する抗原の同定
中分化型1症例、低分化型2症例、スキルス型2症例、合計5症例の胃癌cDNA発現ライブラリーを作成し、それぞれの患者自家血清を用いて検索した。各々の症例より約50クローンづつ、合計297クローンを単離し、すべてのクローンの塩基配列を決定し、それらが136種の遺伝子に由来することを明らかにした。癌患者の免疫系は、分泌蛋白、膜蛋白、細胞質蛋白さらに核内蛋白など多種多様の分子に予想以上に反応し、抗体を産生していた。抗原の6割強が既知の遺伝子の産物であり、残りが新規遺伝子の産物であった。また本研究で同定した抗原の3割は、SEREX法により胃癌もしくは他の癌で共通に検出される抗原であった。胃癌の発生・進展に関与したと推察される遺伝子異常(E-Cadherinと未知遺伝子との融合遺伝子やAKT癌遺伝子の発現増大)に起因する抗原も同定された。このことは、患者の免疫系が遺伝子異常の産物を抗原として認識できることが示したのみならず、SEREX法の高い検出能力をも示した。同じ遺伝子由来のクローンが、同一のcDNAライブラリーから複数個、また複数の異なるcDNAライブラリーから単離される場合があり、これらは免疫原性の強い抗原と考えられた。

(2) 癌抗原の選定

今回同定したすべての抗原が臨床的に価値のあるとは考えにくく、取捨選択する必要があった。最も重要な選択の基準は、癌特異的な発現もしくは遺伝子異常・発現異常である。まず Genbank と SEREX Database (<http://www-ludwig.unil.ch/SEREX.html>) で遺伝子解析を行い、癌遺伝子、癌抑制遺伝子など明らかに有望と考えられた抗原については、抗原の発現様式や遺伝子異常などの検索を進めている。しかし、100 を越える抗原の発現様式や遺伝子異常を解析するのは長時間を必要とし、非現実的であった。そこで、抗原に対する免疫反応が癌患者に特異的であるかを基準に選択することにした。136 種、各々の抗原に対する抗体の存在を、cDNA ライブラリーを作成した患者を含めた 44 名の胃癌患者群 (平均年齢 61 歳、ステージ I : 16 名、II : 5 名、III : 13 名、IV : 10 名) と 100 名の非癌患者コントロール群 (平均年齢 53 歳、既往症 : 胃炎 45 名、胃ポリープ 9 名、胃潰瘍 9 名、十二指腸潰瘍 7 名) で検索した。

① 複数の胃癌患者で抗体が検出されるが、コントロール群では抗体が検出されない抗原 : 11 種、② 抗原を同定した患者のみで抗体が検出される抗原 : 40 種、③ 癌患者のみならずコントロール群でも抗体が検出される抗原 : 85 種、以上の 3 種のグループに区別された。癌患者での反応特異性、臨床における有用性という点から、① のグループが最も期待される抗原である。② の単一患者のみで検出された抗原の中にも、複数個のクローンが単離されたものがある。そのような抗原はその患者では主要な抗原であり、発癌に関与する突然変異などに起因する抗原である可能性もある。興味深い抗原ではあるが、免疫療法のターゲットとしての有用性は少ないと考えている。さらに、③ のグループにも癌患者での抗体産生の頻度がコントロール群に比べ有意に高い抗原も 10 種以上あり、これらも今後の解析に値すると考えている。

D. 考察

胃癌では、癌の免疫治療の最適のターゲットの一つと考えられている CT (Cancer Testis) 抗原群の発現頻度が極めて低いことが、RT-PCR 法での検索から明らかになった。CT 抗原に代わ

るターゲット、例えば正常胃組織と胃癌組織に特異的に発現する分化抗原や胃癌に高頻度に起きる遺伝子異常に由来する抗原などを同定する必要がある。

上記の①のグループの 11 種と③のグループの約 10 種の抗原を選択し、現在発現様式と遺伝子異常を解析している。これらの抗原が患者の免疫反応を惹起した原因を解明することにより、診断・治療における有用性を検討して行く予定である。

E. 結論

近年開発された SEREX 法により、胃癌抗原の同定を試みており、複数の癌患者で抗体が検出されるが、コントロール群血清では検出されない抗原 11 種を同定した。これらは免疫診断・治療の有望な標的抗原と考え、検索を進めている。

F. 発表

1. Obata, Y., Takahashi, To., Tamaki, H., Tominaga, S., Murai, H., Iwase, T., Iwata, H., Mizutani, M., Chen, Y.-T., Old, L. J. and Miura, S.: Identification of cancer antigens in breast cancer by the SEREX expression cloning method. *Breast Cancer*, 6: 305-311, 1999.
2. 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 lymphocytes. *Bone Marrow Transplant.*, 24: 129-137, 1999.
3. Obata, Y., Takahashi, To., Sakamoto, J., Tamaki, H., Tominaga, S., Hamajima, N., Chen, Y.-T., and Old, L. J.: SEREX analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, in press, 2000.

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

ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析
分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所・化学療法部部长

研究要旨：リンパ造血器腫瘍発症機構を解析し、診断治療への応用をはかるために、MALT リンパ腫の染色体転座の解析、びまん性リンパ腫の分子基盤に基づいた亜分類、MLL 遺伝子の標的遺伝子の単離につき解析をすすめた。粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に特異的な染色体異常 t(11;18)(q21;q21)の 18q21 転座切断点領域から、新規遺伝子 MALT1 を単離し、遺伝子異常の本体は、11q21 領域の細胞死を阻害する機能を持つ API2 遺伝子と MALT1 遺伝子が融合し、API2-MALT1 キメラ蛋白を形成することを明らかにし、RT-PCR 法を確立した。また、複数の疾患単位を含むびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBL)は、臨床的に意義のある疾患単位がこの中に見いだせないことから、一つの疾患単位として扱われているが、分化段階に相当する細胞表面マーカーを用いて 3 つ疾患単位が存在する可能性を示唆した。さらに、乳児白血病、治療関連白血病の原因遺伝子 MLL の標的遺伝子の探索を、mRNA 発現差異検出法である cDNA array 法並びに Representational difference analysis 法を用いて行い、標的遺伝子の候補遺伝子を見いだした。

A. 研究目的

リンパ造血器腫瘍発症に関与する転座切断点領域遺伝子とそれらの標的遺伝子を明らかにし、抗体作製や遺伝子診断法を確立することで臨床応用をはかる。第一として、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に特異的な染色体異常 t(11;18)(q21;q21)の転座切断点から責任遺伝子を単離する。第二として、全悪性リンパ腫の 50%をしめるびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫(DLBL)に対しても MALT 責任遺伝子の異常を検索するとともに、リンパ腫発症にかかわる主要な責任遺伝子 BCL1, BCL2, BCL6、細胞表面マーカー、臨床病態を検討する。第三として、既に我々が明らかにしてきた転座切断点遺伝子を中心とし、これらの標的遺伝子を明らかにすることである。対象とする主な遺伝子は乳児白血病、治療関連白血病に関与する MLL 遺伝子である。

B. 研究方法

1. MALT リンパ腫の t(11;18)(q21;q21)転座切断点の解析：18q21 の異常を認識する YAC clone をこれまでに同定していたので、さらに詳細に検討するため、その YAC clone を用いて BAC 並びに PAC contig をより作製し、それらを用いた FISH 法にて異常を検出する BAC clone を同定し、さらに、plasmid contig を作製し、exon trapping 法にて転写単位を探索し、サザン法にて遺伝子再構成を見出し、候補遺伝子を単離する。

2. DLBL の解析：細胞分化段階に関する表面マ-

ーカーにより DLBL を 3 群(Group I: CD5+; Group II: CD5-, CD10; Group III: CD5-, 10-)に分け、予後との相関、cyclin D1、BCL2、BCL6 染色性並びに BCL2 遺伝子再構成、BCL6 遺伝子再構成等との相関を検討し、臨床的に意義のある疾患単位を形成するかを検討した。

3. MLL 遺伝子の標的遺伝子の探索：MLL キメラの発現により変化する遺伝子を単離するため、mRNA 差異検出法である RDA 法、cDNA microarray 法を用いて標的候補 cDNA の単離を試みる。

C. 研究結果

1. MALT リンパ腫の t(11;18)(q21;q21)転座切断点の解析：Plasmid contig を用いて、exon trapping により候補遺伝子 cDNA を単離した。その cDNA fragment から B 細胞腫瘍 cDNA library により cDNA walking を行い、塩基配列を決定したところ、新規転座切断点領域遺伝子であることが明らかとなった。本遺伝子は Genome nomenclature committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>)より MALT1(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1)と命名された。MALT1 遺伝子は 813 個のアミノ酸をコードし、B リンパ球に特異的に発現する glycoprotein CD22 β 、細胞外 matrix に関与する Lamin 5 α 3b subunit、線虫 *Caenorhabditis elegans* の遺伝子 F22D3.6 と同源性を持つ新規遺伝子であるが、機能は不明である。また、特徴的な leader sequence もないため、

細胞内局在も不明である。正常組織における発現は主としてリンパ造血系組織で発現されており、3.1 kb、4.5kb に強いシグナルがみられ、9.4kb に弱いシグナルがみられた。11;18 転座を有する患者検体を対象にノーザン解析したところ、6.4 kb から 9.7 kb と患者ごとにサイズの異なる異常シグナルを認め、転座により MALT1 遺伝子が異常をきたしていることが明らかとなった。この遺伝子異常は 11q21 に存在するすでに報告されていた細胞死を抑制する遺伝子 API2 と新規遺伝子 MALT1 の間で融合遺伝子が形成されていることによるものであった。種々の primer を作製し、キメラ mRNA を解析したところ、API2-MALT1 は形成されるものの、MALT1-API2 キメラ mRNA は形成されないことを明らかにし、転座による遺伝子異常の本体は API2-MALT1 キメラ mRNA が形成されることであることを明らかにした。また、患者検体のキメラ mRNA を解析したところ、検出されたすべての API2-MALT1 は in frame で結合していた。予想される API2-MALT1 蛋白は患者間で variation が認められたが、各患者では主として 1 種類のキメラ蛋白を作ることが予想された。転座切断点は API2 cDNA では 2ヶ所、MALT1 では 4ヶ所に認められ、予想される API2-MALT1 キメラ蛋白は 5 種類認められた。

2. DLBL の解析：DLBL としてひとまとめにされる B 細胞性リンパ腫は、その表面マーカーや病理組織学的検討でも、複数の疾患単位を含むことが指摘されている。しかし、病理組織学的診断の一致率が低いこと、各疾患単位間での予後が大きく異なるために、DLBL を細分化していない。そこで、細胞表面マーカーにより、pre-GC(Germinal center)段階に相当する CD5+群(Group I)、GC 段階に相当する CD5-,CD10+群(Group II)、post-GC 段階に相当する CD5-,CD10-群(Group III)の 3 群に分けて検討した。その結果、Group I である CD5+DLBL の予後が有意に悪く(p=0.016)、また、CD5-, CD10+群は BCL2 遺伝子発現が有意に弱いことが明らかとなりリンパ濾胞に由来する群であることが示唆された。すなわち、分化段階を規定するマーカーを用いた subtype の規定は臨床的に意義のある疾患単位を形成する事が示唆された。

3. MLL 遺伝子の標的遺伝子の探索：白血病型 MLL (MLL-N 端)を発現させた細胞株と vector control による RDA 法で class II PI-3K cDNA を得た。class II PI-3K 遺伝子発現は G-CSF 存在下で、truncated MLL 並びに full length MLL 発現で誘導されることが明らかとなり、白血病型キメラ MLL-

LTG9 でも同様に発現が誘導されたが、full length MLL でも誘導されることより、MLL 遺伝子の標的遺伝子ではあるが、白血病型 MLL に特異的ではなく、腫瘍化との関係については、不明である。また、cDNA microarray 法でも検討を進めており、他の候補 cDNA については現在検討中である。

D. 考察

MALT リンパ腫に特異的に認められる t(11;18)(q21;q21)転座の本体は API2-MALT1 であることを明らかにした。限られた症例数であるが、これまでの染色体解析による報告では、本転座は MALT 症例のうち約 30%程度であることが報告されている。そのため、多数例を検索することで MALT 症例にどの程度、本遺伝子異常が関与するかを検討することが、急務である。とくに、MALT リンパ腫はリンパ節以外から発症する(節外性)リンパ腫の主要な部分をしめ、発生臓器も多種である。これら発生母地の異なる MALT リンパ腫で、本遺伝子異常がどの程度認められるかを検討する必要がある。また、API2 遺伝子は抗アポトーシス機能を持っており、キメラ蛋白の機能はいかなるものかを検討することは、発症機構を考察する上で重用であり、今後、その機能について検討していく必要がある。

DLBL に関しては、分化マーカーにより、臨床的に有意な subtype を抽出することが出来ることが示唆されたが、CD5、CD10 は flow cytometry を用いており、また、その発現が必ずしも強くないため、一般的なマーカーとして適用するのは必ずしも容易ではない。そのため、これらに変わる分化マーカーを見いだすことが重要である。今後は CD5+細胞株、CD5-,10+細胞株、CD5-, CD10-細胞株を用いて、より強く発現され、かつ分化段階を規定するのに有用な遺伝子を見いだす必要がある。

MLL 遺伝子異常の標的遺伝子についてはこれまでに Hox 遺伝子群がその標的であることを明らかにしてきたが、今回 RDA 法で、発現差異のある cDNA を単離する事が出来た。しかし、これは MLL 遺伝子の標的であることは強く示唆されるが、白血病特異的ではない。今後は急速に蓄積されつつある genome 情報に基づいた cDNA array 法などが有効な方法であり、現在検討しつつある。

E. 結論

1. MALT リンパ腫に高頻度に認められる t(11;18)(q21;q21)転座に関与する 18q21 切断点領域から、新規遺伝子 MALT1 を見出し、転座の本体は apoptosis inhibitor 2 (API2) 遺伝子と、MALT1 が in frame で結合し、API2-MALT1 キメラ遺伝子

- 産物を産制することであることをあきらかにした。
2. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫は細胞分化段階の概念を取り入れて亜分類することが可能であり、臨床的にも意義のある疾患単位を形成することが示唆された。
 3. MLL 標的遺伝子の候補の一つとして PI-3 遺伝子が示唆された。

F. 発表

01. 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.
02. 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.
03. Hosokawa, Y., Joh, T., Maeda, Y., Arnold, A., **Seto, M.**: Cyclin D1/PRAD1/BCL-1 alternative transcript [B] protein product in B-lymphoid malignancies with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Int. J. Cancer*, 81: 616-619, 1999.
04. Satake, N., Maseki, N., Nishiyama, M., Kobayashi, H., Sakurai, M., Inaba, H., Katano, N., Horikoshi, Y., Eguchi, H., Miyake, M., **Seto, M.**, Kaneko, Y.: Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants. *Leukemia*, 13:1013-1017, 1999.
05. Suzuki, R., Hiroyuki Kuroda, H., Komatsu, H., Hosokawa, H., Yoshitoyo Kagami, Y., Ogura, M., Nakamura, S., Koder, Y., Morishima, Y., Ueda, R. and **Seto, M.**: Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia*, 13:1335-1342, 1999.
06. Harada, S., Suzuki, R., Uehira, K., Yatabe, Y., Kagami, Y., Ogura, M., Suzuki, S., Oyama, A., Koder, Y., Ueda, R., Morishima, Y., Nakamura, S., **Seto, M.**: Molecular and immunological dissection of diffuse large B-cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia*, 13:1441-1447, 1999.
07. Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, M., Taniwaki, M., **Seto, M.**: A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene*, 18: 5785-5794, 1999.
08. Suzuki, H., Motegi, M., Akagi, T., Hosokawa, Y., **Seto, M.**: API1-MALT1/MLT is involved in MALT lymphoma with t(11;18)(q21;q21). *Blood*, 94: 3270-3271, 1999.
09. Hanson, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van Der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., **Seto, M.** and Korsmeyer, S. J.: Mammalian trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14372-14377, 1999.
10. Hosokawa, Y., Maeda, Y., Ichinohasama, R., Miura, I., Taniwaki, M. and **Seto, M.**: The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* in press.
11. Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Koder, Y., Morishima, M., Nakamura, S. and **Seto, M.**: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogenous products. *Am. J. Pathol.*, in press
12. Yatabe, Y. *, Suzuki, R. *, Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., **Seto, M.** and Nakamura, S.: Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL): A clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, in press (* equal contribution)

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:

肺癌における形態学的悪性度の進行と、17p13.3 を含む9箇所の染色体欠失の蓄積との関連性について microdissection 法を用いた詳細な検討を加えた。その結果、3p と 17p13.3 上に肺癌発症過程において極めて早期より関与する癌抑制遺伝子が存在する可能性と、2q, 9p, 18q の各染色体領域には肺癌の形態学的悪性化に関与する癌抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。

ヒト肺癌において検出した Smad2 及び Smad4 遺伝子変異の生物学的及び生化学的意味について検討を加えた。その結果、6 種類の Smad 変異体は、全て TGF- β による肺正常上皮細胞の増殖抑制シグナルの伝達能を失っていたが、転写活性化能やオリゴマー形成能については変異体間に差異がみられるなど、その不活化機序に多様性が存在することを明らかとし得た。

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 遺伝子に加えて、17p13.3 領域にも存在する可能性を報告した。本年度は更に、肺癌における形態学的悪性度の進行と、17p13.3 欠失との関連性について、他の染色体領域の欠失と併せて microdissection 法を用いた検討を加えた。

また、我々はこれまでに TGF- β のシグナル伝達を司る Smad2 及び Smad4 遺伝子の肺癌における変異を最初に報告している。本年度は更に、Smad 遺伝子変異による TGF- β シグナル伝達の障害の機序について更に詳細な検討を加え、肺癌発症への関わりについての示唆を得ることを目指した。

B. 研究方法

(1) 17p13.3 欠失及びその他の染色体欠失と形態学的悪性度の進行との関連性に関する検討:

前癌病変から浸潤癌に至る形態学的悪性度に同一腫瘍内で heterogeneity をしめす10例の非小細胞肺癌症例を用い、夫々の腫瘍組織内における形態学的悪性化と、17p13.3 を始めとする9箇所の染色体領域の欠失との関連について検討を加えた。Microdissection によって腫瘍細胞のみを

分離採取し、ゲノム DNA を抽出後、PCR 法によるヘテロ接合性の消失の有無について、2q, 3p14.2, 3p21.3, 3p25, 9p, 17p13.1(p53), 17p13.3, 18q, 22q を対象に 10 種類の microsatellite marker を用いて解析を進めた。

(2) Smad 遺伝子変異による TGF- β シグナル伝達の障害の機序に関する検討:

肺がんより単離した 6 種類の変異 Smad 遺伝子を CMV プロモーター下流に組み込んだ発現 vector を、hygromycin 耐性遺伝子と共に正常気管支上皮細胞株 (BEAS2B) へ導入し、TGF- β と hygromycin 存在下で培養し、TGF- β による増殖抑制シグナル伝達に対する傷害の程度を検討した。また変異 Smad と Smad 結合因子である FAST1 を、両者の結合部位を持つ luciferase レポーターと共に導入し、刺激伝達障害について解析した。さらに、ホモ及びヘテロオリゴマー形成能についても検討を加えた。

C. 研究結果

(1) 17p13.3 欠失及びその他の染色体欠失と形態学的悪性度の進行との関連性に関する検討:

形態学的に多様で同一癌組織内に各種増悪段階が混在する肺癌腫瘍組織を microdissection 法を用いて解析した結果、3p と 17p の両染色体領域は形態学的悪性度の如何に関わらず検出され、早期より欠失が生じて肺がんの発症に深く関わっていることを示唆する結果を得た。一方、2q, 9p, 18q の各染色体領域には、しばしば同一腫瘍内

でヘテロ接合性の保持或いは消失に差異が見られた。これらの染色体領域では、ヘテロ接合性消失の獲得は形態学的悪性度の進行とよく一致しており、夫々の染色体領域に肺癌の増悪に関連するがん抑制遺伝子の存在することが示唆された。

(2) Smad 遺伝子変異による TGF- β シグナル伝達の障害の機序に関する検討:

肺癌より単離した6種類の全ての変異 Smad は、正常気道上皮細胞株 BEAS2B における TGF- β による増殖抑制に対して顕著な障害を示し、機能的不活化がみられることが明らかとなった。更に、これらの変異 Smad は、FAST-1 と Smad の結合配列を持つプロモーターを持つ luciferase レポーターを用いた検討に於いても、全例が FAST1 と協調した刺激伝達能に異常を示した。一方、Smad が異なった様式で結合し機能することが示唆されている PAI-1 プロモーターを用いた転写活性化能の検討に於いては、変異 Smad 間に機能不活化の程度に差が検出された。特に、2 種類の変異 Smad (Smad 4 (R441P) 変異 及び Smad2 (del434-6) 変異) は、殆ど PAI-1 プロモーター活性化能の低下を示さなかった。オリゴマー形成能に関する検討によって、各々の変異 Smad のオリゴマー形成能と PAI-1 プロモーター活性化能の異常の間に関連性が見られることが明らかとなった。

D. 考察

肺癌の発症・進展には複数の癌抑制遺伝子が関与していると考えられているが、これまでの検討は殆ど全て異なった部位或いは個人に発生した各種の悪性化段階にある腫瘍組織を解析した結果に基づく、統計学的な推定によるものであった。それに対して本研究は、個々の腫瘍内における肺癌の悪性化と分子生物学的異常の蓄積との関連を、腫瘍内における空間的及び形態学的進展との関連に於いて検討を加えたものである。その結果、我々は 3p と 17p 上に肺癌発症の極めて早期より関与する癌抑制遺伝子が存在する可能性と、2q, 9p, 18q の各染色体領域には肺癌の形態学的悪性化に関与する癌抑制遺伝子が存在する可能性を示唆する結果を得ることができた。

本年度の研究によって、これまでに我々が肺癌に検出した変異 Smad は、全て TGF- β によるヒト正常気道上皮細胞株の増殖抑制に異常を持つ事が明らかとなった。また、興味深いことに、転写活性化能の障害については用いたレポーターによって異なった結果が得られた。即ち、気道上皮細胞の増殖抑制シグナル伝達障害と同様に、全ての Smad 変異体に FAST-1 と協調した転写活性

化能異常が検出されたのに対して、Smad が異なった複合体を形成して機能すると考えられている PAI-1 プロモーターの活性化は必ずしも障害を受けていなかった。本研究結果より、FAST-1 を介するシグナル伝達系が、気道上皮細胞増殖抑制シグナルの伝達に直接関与或いは類似性を持つ可能性が示唆されたので、さらに検討を進めたい。また、Smad 遺伝子変異の頻度は肺癌における TGF- β 不応性に比して低頻度であり、他の分子の異常も関与していると考えられる。今後更に、TGF- β リセプターの異常等についても検討対象を広げていく予定である。

E. 結論

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、形態学的悪性度の進行に先立つものであることを示唆する。従って、その標的癌抑制遺伝子の単離・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のみならず、高頻度の 17p13.3 欠失が報告されている乳がん、卵巣癌、脳腫瘍等の他のヒト腫瘍の分子病因の理解を深める上でも大きな意義をもつ可能性がある。今後もさらに標的がん抑制遺伝子の探求を精力的に進める予定である。また、同一腫瘍内における形態学的悪性度の進展と染色体欠失の蓄積の関連性を追及する本年度の研究において用いた手法は、2q, 9p, 18q 等の如くに腫瘍の増悪に関わると考えられる癌抑制遺伝子の存在の可能性を明らかとするなど、極めて有意義であると考えられた。

本研究を通じてこれまでに、肺癌における TGF- β 不応性の機序の一つとして Smad 遺伝子変異の存在を明らかとし、その機能的役割について検討を進めてきた。TGF- β 不応性は肺がん細胞株において高頻度にみられ、その発症・進展に深く関与していると考えられるので、TGF- β 不応性の獲得に関わる Smad 遺伝子変異以外の機序についても、さらに検討を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Takahashi, T., Haruki, N., Nomoto, S., Masuda, A., Saji, S., Osada, H., and Takahashi, Ta. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, *hsMAD2* and *p55CDC*, in human lung cancers. *Oncogene* 18: 4295-300, 1999.
- 2 Achiwa, H., Yatabe, Y., Hida, T., Kuroishi, T., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Sugiura, T., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta.

- Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 (COX-2) expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* 5: 1001-5, 1999.
- 3 Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, To., Takahashi, Ta., and Mitsudomi, T. Somatic Frameshift Mutations in the TGF- β RII, IGF-IIR, BAX, hMSH3, and hMSH6 gene are uncommon in lung cancer. *Carcinogenesis* 20: 499-502, 1999.
 - 4 Nomoto, S., Tatematsu, Y., Takahashi, Ta., and Osada, H. Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene* 236: 259-271, 1999.
 - 5 Nakachi, K., Limtrakul P., Sonklin, P., Sonklin, O., Jarern, C. T., Lipigornngoson, S., Arai, K., Sone, Y., Imai, K., Suga, K., Matsuyama, S., Shimizu, H., Takahashi, Ta. and Suttajit, M. Risk factors for lung cancer among Northern Thai women: epidemiological, nutritional, serological, and bacteriological surveys of residents in high- and low-incidence areas. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 1187-1195, 1999.
 - 6 Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Takahashi, To., Fujii, Y., Osada, H., and Takahashi, Ta. Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, *hMAD1*, in human lung cancers. *Oncogene* 18: 7180-7183, 1999.
 - 7 Kozaki, K., Miyaishi, O., Tsukamoto, T., Tatematsu, Y., Hida, T., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. *In vivo* selected human lung cancer cell line H460-LNM35 consistently exhibits lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. *Cancer Res.* (in press).
 - 8 Yanagisawa, K., Uchida, K., Nagatake, M., Masuda, A., Sugiyama, M., Saito, T., Yamaki, K., Takahashi, Ta., and Osada, H. Heterogeneities in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. *Oncogene* (in press).
 - 9 Yatabe, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Nakamura, S., and Takahashi, Ta. Topographical distributions of allelic loss in individual non-small cell lung cancers. *Am. J. Pathol.* (in press).
 - 10 Nomoto, S., Haruki, N., Tatematsu, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Takahashi, To., and Takahashi, Ta. Frequent allelic imbalance suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 1p36 in the pathogenesis of human lung cancers. *Genes, Chrom., Cancer* (in press).
 - 11 Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M., and Takahashi, Ta. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* (in press).
 - 12 Haruki, N., Yatabe, Y., Travis, W. D., Nomoto, S., Osada, H., Nakamura, S., Nakao, A., Fujii, Y., and Takahashi, Ta. Characterization of high-grade neuroendocrine tumors of the lung in relation to *menin* mutations. *Jpn. J. Cancer Res.* (in press).
 - 13 Haruki, N., Saito, H., Harano, T., Nomoto, S., Takahashi, T., Osada, H., Fujii, Y., and Takahashi, Ta. Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes *BUB1*, *BUBR1* and *BUB3* in human lung cancers. *Cancer Lett.* (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、白血病細胞や悪性リンパ腫細胞のリンパ節浸潤に関連すると考えられるL-セレクトインの糖鎖リガンド、シアリル6-スルホLe^xが、その合成酵素6-スルホトランスフェラーゼとⅦ型フコシルトランスフェラーゼとのコトランスフェクションによって細胞膜上に再構成できる事を示し、このトランスフェクションによって細胞がL-セレクトインと特異的に接着するようになることを証明した。さらに、細胞には、刺激に応じて、この糖鎖のセレクトインとの結合能を不活化する新規の代謝経路を見だし、この不活化反応の律速酵素であるシアル酸シクラーゼの特徴を明らかにした。この不活化機構は細胞の悪性化に伴って変化し、これが悪性細胞のセレクトイン結合能の異常を引き起すと考えられる。

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と、それらの糖鎖リガンドを媒介した接着機構を解析し、悪性細胞に発現する新規の糖鎖リガンドを同定する。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、セレクトインリガンドの合成発現に関与する糖転移酵素などの関連遺伝子を同定し、細胞の悪性化に伴う発現誘導と調節にかかわる機構を検索する。

B. 研究方法

悪性細胞と血管内皮細胞との接着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、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悪性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およびその特異的リガンドを同定する。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。各接着分子およびそのリガンドに対する特異的単クローン抗体を作製し、これ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。

細胞接着分子セレクトインのリガンドとしてはこれまでシアリルLe^x、シアリルLe^a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およびその関連遺伝子を同定し、新規なものについてはクローニングを行う。これらの遺伝子の細胞への導入によって、糖鎖リガンドの発現が誘導されるかどうかを確認し、さらに細胞接着能が誘導されることを確かめる。

C. 研究成果

セレクトインの新規糖鎖リガンド、シアリル6-スルホLe^xの合成機構の研究：我々はこれまで、特異的単クローン抗体を用いた研究から、ヒト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関与するL-セレクトインリガンド分子をシアリル6-スルホLe^xと同定し、さらに昨年度その合成に関与すると見られる6-スルホトランスフェラーゼをクローニングした。本年度は、シアリル6-スルホLe^xが、この6-スルホトランスフェラーゼ遺伝子と、以前にクローニングしたⅦ型フコシルトランスフェラーゼとのコトランスフェクションによって細胞膜上に再構成できるか否かを検討し、この細胞がL-セレクトインと特異的に接着するようになるかどうかを検索した。

このふたつの糖転移酵素cDNAをCOS-7細胞およびECV304細胞にそれぞれ単独または重ねてトランスフェクションしたところ、それぞれ単独に

トランスフェクトした場合にはシアリル6-スルホLe^xは発現せず、両者をコトランスフェクションした場合にのみシアリル6-スルホLe^xが細胞膜上に発現することが判明した。このことから、L-セレクチンの糖鎖リガンド、シアリル6-スルホLe^xはこの両酵素のはたらきで合成されると考えられた。

また、両遺伝子をそれぞれ単独にトランスフェクトした場合にはL-セレクチンとの結合能は観察されず、両者をコトランスフェクションした場合にのみL-セレクチンと結合することが判明した。このことから、両酵素のはたらきは、L-セレクチンのリガンドの合成にとって必要にしてかつ十分であることが示された。

今年度はさらに、シアリル6-スルホLe^xの合成にかかわるヒト6-スルホトランスフェラーゼの新規アイソザイム(二番目に相当)をクローニングした。昨年度にクローニングした6-スルホトランスフェラーゼと、本酵素とのあいだには、基質特異性などの酵素学的性質には大きな差が見られないが、臓器分布が大きく異なっていた。

セレクチンを介した細胞接着のシアリル酸の特異的修飾による調節機構の研究:特異抗体を用いた検索から、シアリル6-スルホLe^xはリンパ節の高血管内皮細静脈のみならず、白血球系細胞や培養癌細胞にも発現している事が明かとなった。

白血球におけるシアリル6-スルホLe^xの研究の過程で、我々はこの糖鎖の発現がきわめて不安定で、細胞を操作することにより容易に消失することを見出した。検索の結果、これはシアリル6-スルホLe^xが、これまで知られていなかった独特の経路で代謝されるためであることが判明した。この代謝経路では、シアリル6-スルホLe^xのシアリル酸残基がまずデ-N-アセチルシアリル酸に変えられ、さらにサイクリックシアリル酸に変化する。サイクリックシアリル6-スルホLe^xを合成する酵素シアリル酸シクラーゼは、中性領域に至適pHをもち、細胞の刺激により活性化されることが判明した。

この代謝経路の最終産物であるサイクリックシアリル6-スルホLe^xは、セレクチンとの結合に最も大切とされるカルボキシル基が修飾を受けたため、リガンド活性をもたない。これに対し、デ-N-アセチルシアリル6-スルホLe^xやもとのシアリル6-スルホLe^xには、細胞接着活性が保持されている。このことから、シアリル酸シクラーゼ経路は、細胞のセレクチンへの結合活性を不活化するネガティブ・フィードバック機構としての意義をもつと思われる。

D. 考察

セレクチンの新規糖鎖リガンド、シアリル6-スルホLe^xの合成機構の研究:今年度の実験から、シアリル6-スルホLe^xがL-セレクチンの特異的リガンドであることが確定したと考えられる。これまでL-セレクチンのリガンドはシアリルLe^x様糖鎖とされてきたが、VII型フコシルトランスフェラーゼの単独トランスフェクションによって発現する通常のシアリルLe^xはL-セレクチンとほとんど結合せず、シアリル6-スルホLe^xが本来のリガンドであることが判明した。

これまでL-セレクチンのリガンドにおいては、糖鎖部分のみならず、その糖鎖を担うコア蛋白質にも特異性があるとされ、特異的コア蛋白質としてGlyCAM-1, CD34, PSGL-1などが候補としてあげられてきた。しかし今回の我々の結果では、これらの候補の蛋白質のいづれをも発現していない二種類の細胞で、二種の糖転移酵素遺伝子cDNAのトランスフェクションがL-セレクチンとの結合能の誘導にとって必要かつ十分な条件であることを示した。L-セレクチンとの結合におけるコア蛋白質の意義については、今後、従来の定説にとらわれずに検索をすすめる必要があると考えられる。

6-スルホトランスフェラーゼについては、今年度第二番目のアイソザイムのcDNAが得られたが、このほかにもさらに未知のアイソザイムの存在する可能性が高い。これらのアイソザイムの生理的意義については、今後の検討課題である。また、シアリル6-スルホLe^xが、L-セレクチンのみならず、E-、P-セレクチンのリガンドとしても機能し得るかどうか未解明であり、これらについても今後の検討が必要である。

セレクチンを介した細胞接着のシアリル酸の特異的修飾による調節機構の研究:これまで我々は、セレクチンを介した細胞接着の調節機構として、VII型フコシルトランスフェラーゼの転写調節について研究を進めてきたが、今年度発見されたシアリル酸シクラーゼ経路は、細胞のセレクチンへの結合活性を不活化するpost-translationalなネガティブ・フィードバック機構として重要な意義をもつと考えられる。こうしたセレクチンを介した細胞接着の調節機構が、細胞の悪性化に際して、どのように変化するかを解明することが、今後の重要な研究課題である。現在得られている予備的成績からは、この不活化機構は細胞の悪性化に伴って消失する傾向にある。これが悪性細胞のセレクチン結合能の異常な亢進を引き起こし、血行性転移を促進すると考えられる。