

108. 和田守正、原田大志、桑野信彦. 遺伝子再編成とMDR1遺伝子発現亢進 第3回がん分子標的治療研究会総会 1999
109. Kawab T., Wada M., Nakamura T., Uchiumi T., Ono M., Chen Z-s., Akiyama, S-i.. Transfection of human cMOAT/MRP2 cDNA induces altered sensitivity to anticancer agents and membrane transport of glutathione conjugates. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster Discussion) 1999
110. Harada T., Nagayama J., Nakayama M., Mickley L., Fojo, T. Wada M. Kuwano, M. Identification of the junction sequence of rearrangements in Alu repeats at human multidrug resistance 1(MDR1) 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session) 1999 upstream region and its upstream promoter activation.
111. Nagayama J., Harada T., Nakayama M., Kusaba H., Kiue A., Iino M., Wada M. Kuwano M. Activation of mouse mdr3 gene by inserted murine leukemia virus on early stage of acquirement of multidrugresistance in vincristine-selected p388 cells. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session) 1999
112. Haga S., Uchiumi T., Hinoshita E., Wada M., Ikezaki K., Fukui M. Kuwano M. Expression of cMOAT/MRP3 and cisplatin resistance in human glioma cell. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session) 1999
113. Chen Z. S., Kawabe T., Ono M., Sumizawa T., Furukawa T., Uchiumi T., Wada M., Kuwano M., Akiyama S. Effect of multidrug resistance reversing agents on the transporting activity of human canalicular multispecific organic anion Transporter (cMOAT). AACR-NCI-EORTC Conference (Molecular Target and Cancer Therapeutics) 1999
114. 河邊毅、陳哲生、内海健、小野真弓、和田守正、秋山伸一、桑野信彦. ヒトABCトランスポータ遺伝子cMOAT/MRP2が制御する抗癌剤感受性 第3回がん分子標的治療研究会総会 1999
115. 永山淳、飯野真由美、木上昭、原田大志、中山雅晴、和田守正、桑野信彦. マウス白血病細胞の多剤耐性の獲得過程におけるmdr-3遺伝子活性化-マウス白血病ウイルス (MuLV) ゲノム挿入による遺伝子再編成 第3回がん分子標的治療研究会総会 1999
116. 内海健、田中聡也、日下英司、和田守正、野本実、河野公俊、桑野信彦. ヒトABCスーパーファミリーcMOAT/MRP2遺伝子の発現制御 第58回日本癌学会総会 1999
117. 芳賀整、内海健、日下英司、和田守正、桑野信彦. 血管脳関門におけるABCトランスポーターファミリー遺伝子群MRPfamilyの発現とその局在 第58回日本癌学会総会 1999
118. 日下英司、内海健、西江昭弘、芳賀整、中村崇規、大野真司、前原喜彦、和田守正、杉野圭藏、桑野信彦. ヒト大腸癌におけるABCスーパーファミリーMDR1、MRP1、cMOAT/MRP2、MRP3の発現と抗癌剤感受性 第58回日本癌学会総会 1999
119. 多田靖弘、中山雅晴、原田大志、永山淳、内藤誠二、中川昌之、高木幸一、和田守正、桑野信彦. 膀胱および大腸腫瘍におけるヒト多剤耐性MDR1遺伝子の発現と5'-制御領域のDNAメチル化と遺伝子再編成 第58回日本癌学会総会 1999
120. 永山淳、飯野真由美、木上昭、名和田新、原田実根、岡村純、和田守正、桑野信彦. ヒトマウス造血器腫瘍におけるMDR遺伝子再編成と発現誘導 第58回日本癌学会総会 1999
121. 桑野信彦、和田守正、内海健、小野真弓、河野公俊. がんの血管新生と薬剤感受性の分子

122. 日下英司、内海健、橋本健吉、中村崇規、芳賀整、Scheffer GL、和田守正、桑野信彦。ABCトランスポータ遺伝子ヒトMRP3の基質特異性と細胞内局在 第22回日本分子生物学会年会 1999
123. 原田大志、西江昭弘、大坪路弘、鳥越清之、庄野貞久、池崎清信、和田守正、桑野信彦。ヒト脳組織と脳腫瘍におけるADAMファミリー遺伝子、MDC2スプライシングバリエントの発現様式 第22回日本分子生物学会年会 1999
124. 定永倫明、田原光一郎、長嶋秀樹、白石 猛、田中真二、洪田健二、佐藤浩一、森正樹。BRMの新しい展開と癌免疫療法 第20回癌免疫外科研究会 1999
125. 田原光一郎、定永倫明、長嶋秀樹、秋吉 毅、森正樹。HLA-A 24拘束性MAGE-2 特異的CTLの誘導とcell susceptibility の解析 第20回癌免疫外科研究会 1999
126. 長嶋秀樹、定永倫明、田原光一郎、吉河康二、森正樹。ヒト胃癌におけるFas ligand(FasL)発現と腫瘍の進展 第20回癌免疫外科研究会 1999。
127. 定永倫明、田原光一郎、長嶋秀樹、藤江達郎、田中文明、田中真二、森正樹、秋吉 毅。腫瘍拒絶抗原(MAGE)遺伝子を用いた消化器癌の癌特異的免疫療法 第53回日本消化器外科学会総会 1999
128. 定永倫明、長嶋秀樹、増野浩二郎、田原光一郎、井上 裕、森正樹、竹迫一任、秋吉 毅。進行再発消化器癌症例に対する自己樹状細胞を用いたMAGEペプチドワクチン療法 第3回基盤の癌免疫研究会総会 1999。
129. 長嶋秀樹、定永倫明、増野浩二郎、白石 猛、宇都宮徹、洪田健二、佐藤浩一、井上 裕、森正樹。消化器癌におけるMAGE-B family発
130. 定永倫明、増野浩二郎、長嶋秀樹、田原光一郎、白石 猛、宇都宮徹、洪田健二、佐藤浩一、井上 裕、森正樹、竹迫一任、秋吉 毅。第37回日本癌治療学会総会 消化器癌に対するMAGEペプチドワクチン療法 1999
131. 長嶋秀樹、定永倫明、吉河康二、田原光一郎、増野浩二郎、井上 裕、森正樹。CD95ligand(CD95L)の胃癌での発現と腫瘍進展 第58回日本癌学会総会 1999
132. 長嶋秀樹、定永倫明、増野浩二郎、井上 裕、森正樹。食道扁平上皮癌におけるMAGE-Bの発現 第12回日本バイオセラピー学会学術集会総会 1999
133. 定永倫明、増野浩二郎、長嶋秀樹、井上 裕、森正樹。癌特異的免疫療法の標的MAGE-3蛋白の発現 胃癌原発巣とリンパ節転移巣における検討 第12回日本バイオセラピー学会学術集会総会 1999
134. 定永倫明、長嶋秀樹、田原光一郎、藤江達郎、洪田健二、佐藤浩一、森正樹、秋吉毅。消化器癌症例に対する腫瘍拒絶抗原MAGEペプチドを用いた癌ワクチン療法 第99回日本外科学会総会 1999
135. 長嶋秀樹、定永倫明、田原光一郎、南原 繁、狩峰 信也、原口 勝、森正樹。胃癌におけるFas ligand (Fas-L)の発現と腫瘍の進展 第99回日本外科学会総会 1999
136. 藤江達郎、田原光一郎、定永倫明、田中文明、長嶋秀樹、上尾裕昭、竹迫一任、秋吉毅、森正樹。HLA-A24拘束性MAGE-Iペプチドの同定 第99回日本外科学会総会 1999
137. 田原光一郎、定永倫明、長嶋秀樹、松山歩、藤江達郎、秋吉毅、森正樹。HLA-A24拘束性MAGE-2ペプチドの同定 第99回日本外科学会総会 1999

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

- 1) 放射線・抗がん剤の効果増強のための Manganese superoxide dismutase を標的とした遺伝子治療
- 2) 癌転移関連遺伝子 *mta1* の機能解析に関する研究

分担研究者 藤 也寸志 国立病院九州がんセンター・外科医師

研究要旨

(1) 活性酸素消去系酵素の一つ manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) が大腸がんの治療耐性克服のための遺伝子治療の標的となりうるかを明らかにするため、大腸がん細胞株 HCT116 (p53 wild-type) と DLD1 (p53 mutant-type) に Mn-SOD Antisense (AS) RNA 発現 plasmid を導入し、Mn-SOD 活性が低下した HCT116 AS clone、DLD1 AS clone を樹立した。HCT116 AS clone は doxorubicin、放射線、温熱に対する感受性が有意に増強（ともに $p < 0.05$ ）しており、ミトコンドリアの膜電位の変化を伴いアポトーシスに陥る細胞が増加していた。DLD1 AS clone では抗がん剤・放射線感受性、アポトーシスの程度ともに変化がなかった。以上より p53 正常型大腸がんにおいて、Mn-SOD の発現抑制がアポトーシス誘導に基づいた抗がん剤・放射線の効果増強や増殖抑制をもたらし、Mn-SOD が大腸がん克服のための遺伝子治療の標的となりうる可能性が示唆された。

(2) 我々が単離し報告した全く新しい癌転移関連遺伝子 *mta1* は、高転移性乳癌細胞で高発現し、さらに食道癌・胃癌・大腸癌のいずれにおいても、その高発現と壁深達度や脈管侵襲、リンパ節転移と間に有意な相関を示す。また、アンチセンスオリゴによる *MTA1* の発現抑制は *MTA1* 高発現乳癌細胞の増殖を抑制する。今回、さらにヒト *mta1* homolog (*MTA1*) を単離し、その機能を分子生物学的に解析した。*mta1/MTA1* のアミノ酸配列中には Src homology domain 3 (SH3)-binding motif、GATA 型 Zinc-finger motif、Leucine-zipper motif、転写因子で転写活性化に重要な酸性アミノ酸領域や myb の DNA 結合領域類似の配列などが見られた。これらは *mta1/MTA1* が転写調節因子であることを強く示唆している。細胞内局在は核であり、核移行シグナルを含む C 末端側のみでも核移行が見られた。ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) を flag-tagged タンパクとして発現させ myc-tagged *MTA1* との結合を検討すると、抗 myc 抗体による免疫沈降 complex に HDAC1 が存在し、逆に抗 flag 抗体による免疫沈降 complex に *MTA1* が存在していた。このことは HDAC1 と *MTA1* が直接的または間接的に結合することを示している。*MTA1* は癌の増殖や浸潤転移に関連する遺伝子である。今回、*MTA1* の機能は HDAC1 との結合によるクロマチンの構造変化に関連した転写調節に関わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

(1) 放射線療法、化学療法、温熱療法はがん治療の大きな柱であるが、消化器がん、特に胃がんや大腸がんにおいてそれらへの自然耐性、獲得耐性の存在は治療上の大きな問題である。抗がん剤耐性に関しては MDR や MRP などの耐性因子が明らかに成っているが、全ての耐性を説明することは出来ず、また温熱や放射線の耐性因子は明らかになっていないとは言いがたい。これらの治療法の効果

増強のためには、各々また共通の治療耐性因子を明らかにし、それを克服することが重要である。昨年の本研究でヒト消化器がんにおける Mn-SOD の発現を検索し、治療耐性因子としての Mn-SOD 発現の意義を明らかにし、それに基づき Mn-SOD が治療耐性克服の標的となる可能性を示した。本年は、Mn-SOD 発現抑制による各種がん治療への感受性の増強につきさらに詳細に検討した。

(2) 現在までに我々は、高転移性乳癌細胞・

非転移性乳癌細胞間で発現に差のある遺伝子を同定するため differential hybridization 法を行い、癌転移関連遺伝子の候補を10ヶ単離した。さらに未知の cDNAのうち1つを *mta1* と命名し分子生物学的に解析して報告した (Y.Toh et al., J. Biol. Chem. 1994; Y.Toh et al., Gene 1995)。また、胃癌・大腸癌・食道癌において *mta1* 発現と浸潤・転移との臨床病理学的な相関を明らかにした (Y. Toh et al., Int. J. Cancer 1997; Y. Toh et al., Br. J. Cancer 1999)。本研究では、*mta1* に関する分子生物学的解析をさらに進め癌転移の分子機構を解明すること、さらに *mta1* 遺伝子を標的とした遺伝子治療の可能性を模索することを目的としている。

B. 研究方法

(1) Mn-SODを標的とした遺伝子治療 (In vitro) : 大腸がん細胞株 HCT116 (p53 wild-type) と DLD1 (p53 mutant-type) に Mn-SOD Antisense (AS) RNA 発現プラスミドを導入し、Mn-SOD AS RNA 安定発現クローン (ASクローン) を樹立した。ASクローンを各種抗がん剤や種々のdoseの放射線で処理し、MTT assay、colony formation により抗がん剤・放射線感受性の変化を検討し、さらに治療効果増強の機構について検討する。

(2) (1) human MTA1 cDNA の単離と解析 : ラット *mta1* cDNA をプローブとしてヒト melanoma cDNA library をスクリーニングした。full-length cDNA を単離し塩基配列を決定し、ラット cDNA の配列と比較した。さらにアミノ酸配列に含まれるモチーフを詳細に検討し、*mta1*/MTA1 の機能を推定した。(2) 細胞内局在の検討 : myc-tagged タンパクとして MTA1 の全長や一部分を遺伝子導入により COS-7 細胞において強制発現させ、蛍光免疫細胞染色により MTA1 タンパクの細胞内局在を明らかにした。(3) MTA1 とヒストンデアセチラーゼ1との結合 : myc-tagged MTA1 および FLAG-tagged HDAC1 (Histone Deacetylase 1) (S. Schreiber 博士より分与) 発現プラスミドを COS-7 に導入し強制発現させ、抗myc抗体9E10、抗Flag抗体M2を用いて免疫沈降ウェスタンブロットを行った。

C. 研究結果

(1) Mn-SODを標的とした遺伝子治療 (In vitro) : (1) Mn-SOD AS クローン HCT116-AS16 (H-AS16)、HCT116-AS22 (H-AS22)、DLD1-AS10 (D-AS10)、DLD1-AS22 (D-AS22) を樹立した。いずれも Mn-SOD 活性はコントロールに比べ各々59%、33%、57%、27%に低下していた。(2) 放射線、温熱および抗癌剤感受性の変化 : 放射線3Gy照射後のHCT116、DLD1 Mn-SODアンチセンス安定発現クローンおよびコントロール細胞の生存率を比較した。HCT116 ASクローンはコントロールと比較して生存率が減少し有意に感受性が増強していたのに対し、DLD1 ASクローンは感受性の変化を認めなかった。また、HCT116 ASクローンの放射線による感受性増強は線量依存性の傾向を示し、感受性増強と Mn-SOD活性抑制の程度は比例関係にあった。温熱に対しても二つのHCT116 ASクローンはコントロールに比べ有意な生存率の低下を認めた。DLD ASクローンは感受性の亢進を認めなかった。抗癌剤においては、検討した4つの薬剤(DOX, MMC, 5-FU, PTX)のうち、DOX に対してHCT116 ASクローンが有意な感受性の亢進を認めた。(3) HCT116 Mn-SODアンチセンスRNA安定発現株の放射線照射後の変化 (アポトーシス誘導の増強) : この様な各種治療に対する感受性増強の機序を明らかにするため、放射線照射後を中心にアポトーシスの引き金となる細胞内の変化と、実際のアポトーシス誘導の程度を比較検討した。Mn-SODの存在するミトコンドリアの膜電位の変化を検討した。放射線3Gy照射後、HCT116 ASクローンはコントロール細胞に比べ、明かな膜電位の低下を認めた。膜電位低下の程度は放射線感受性と相関を示した。放射線照射後のアポトーシスの誘導の差異をPI染色によるDNA量にて検討したところ、HCT116 ASクローンはアポトーシス細胞を示すsub-G1 populationが明らかに増大しており、その割合はコントロール細胞に比べ約2-3倍となっていた。また温熱によってもHCT116 ASクローンは同様なアポトーシスの増強を認めた。フローサイトメーターの結果を追証するため、放射線照射した細胞よりDNAを抽出し、等量のDNAをアガロース電気泳動した。ここでもHCT116 ASクローンはコントロール細胞

と比較しDNA断片化が明らかに増強していた。

(2) (1) MTA1の一次構造：MTA1は714アミノ酸よりなるタンパクをコードし、ラットmta1とアミノ酸レベルで97%のhomologyを示した。両者の配列は重要な機能モチーフとしてsrc-homology domain 3 (SH3)-結合モチーフ、Znフィンガーモチーフ、ロイシンジッパーモチーフ、SANTドメイン、核移行シグナル、酸性アミノ酸領域を有していた。。以上の構造より、MTA1は転写調節に関わるタンパクであることが推定された。(2) MTA1の細胞内局在の決定：MTA1タンパクの細胞内局在を明らかにするために、MTA1タンパクをmyc-taggedタンパクとして発現させ、蛍光免疫染色を行った。全長のMTA1を発現させると、明らかに核内に局在した。この核内局在は、核移行シグナルを含むMTA1のC末端側100アミノ酸のみを発現させた時にも観察され、推定された核移行シグナルが機能しているものと考えられた。(3) MTA1タンパクのヒストン脱アセチル化酵素との結合：MTA1をmyc-taggedタンパクとして、HDAC1をFLAG-taggedタンパクとしてCOS-7細胞で強制発現させ、抗myc抗体、抗FLAG抗体を用いて、免疫沈降-ウェスタンブロットを行った。その結果、抗myc抗体による免疫沈降物に抗FLAG抗体に反応するタンパクが存在し、逆に抗FLAG抗体による免疫沈降物に抗myc抗体に反応するタンパクが存在していた。この結果は、MTA1とHDAC1が、直接的または間接的に結合する、すなわち同一のタンパク複合体に含まれていることを示している。

D. 考察

(1) 放射線、温熱、ある種の抗がん剤などによる細胞傷害にはsuperoxideが重要な役割を果たし、実際superoxideの消去酵素Mn-SODを過剰発現させたがん細胞ではこれらに耐性になる。このことよりMn-SODを高発現している大腸がんにおいてMn-SODが治療耐性因子になっている可能性がある。本研究では、p53正常型の大腸がんにおいて、Mn-SODを抑制することで各種治療によるミトコンドリアPTの増強（同時にチトクロームcの放出も増加）させ、アポトーシスの誘導を

亢進させることを示した。また、活性酸素は古くから指摘されているように、それ自体もDNAや膜脂質などに傷害を与える。そのためミトコンドリアを介した系のみならず、傷害されたDNAなどよりp53などが活性化され、アポトーシスを生じることなども考えられる。いずれにせよMn-SODが治療耐性克服のための遺伝子治療の標的となりうる可能性が示唆された。p53 mutationの有無で感受性が相反することは、Reactive oxygen species (ROS)を介した細胞障害活性にp53が何らかの関与をしている可能性が示唆されたものと思われる。

(2) mta1/MTA1は、その構造から転写調節に関わること、また以前よりの我々の研究で、アンチセンスによる発現抑制実験から細胞増殖に関わること、さらに消化器癌の臨床病理学的検討から、浸潤や転移に関連する遺伝子であると推定される。MTA1の発現抑制により細胞増殖の有意な抑制が見られることは、MTA1が癌の遺伝子治療の標的となりうる可能性を示唆している。さらに本年度の研究でMTA1タンパクが、クロマチンの構造変化をもたらす重要な酵素であるヒストン脱アセチル化酵素と結合することが明らかになったことは、mta1/MTA1の機能を推定する上で極めて重要な発見である。すなわち、mta1/MTA1の機能の本態はヒストン脱アセチル化を介する遺伝子転写の抑制にあると推定される。この研究分野は癌の研究において極めて新しく、トピックとして脚光を浴び始めたばかりであり、mta1/MTA1の機能をさらに解析することは、「癌とクロマチンの構造変化」という新しい研究分野に大きな貢献をなしうるものと期待される。実際、mta1がHDAC1とのcomplexに含まれることは、我々以外にもCell誌やMolecular Cell誌など超一流誌に昨年末に報告され、mta1は世界的に強い注目を浴びている遺伝子の一つになってきている。

E. 結論

(1) 大腸がんにおいて、Mn-SODの発現抑制はミトコンドリアを介したアポトーシス誘導に基づいた抗がん剤・放射線の効果増強をもたらし、Mn-SODが大腸がんの克服のため

の遺伝子治療の標的となりうる可能性が示唆された。

(2) *mta1*/*MTA1*の機能の本態はヒストン脱アセチル化を介する遺伝子転写の抑制にあると推定され、新しい研究分野として注目され、また、*MTA1*は癌の浸潤、転移や増殖に重要な役割を果たしている可能性が高く、癌治療の有望な標的遺伝子となりうるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Toh Y., Kuninaka S., Mori H., Nicolson G. L., Sugimachi K.: Overexpression of metastasis-associated *MTA1* mRNA in invasive oesophageal carcinomas. *Br J Cancer* 79: 1723- 1726, 1999

2. Toh Y., Kuninaka S., Endo K., Oshiro T., Ikeda Y., Nakashima H., Baba H., Kohnoe S., Okamura T., Nicolson G.L., Sugimachi K.: Molecular analysis of a candidate metastasis-associated *MTA1*: possible interaction with histone deacetylase1. *J Exp Clin Cancer Res* 2000 in press

3. Toh Y., Kuninaka S., Oshiro T., Ikeda Y., Nakashima H., Baba H., Kohnoe S., Okamura T., Sugimachi K. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2000 in press

4. Sumiyoshi K., Kuwano H., Watanabe M., Kitamura M., Toh Y., Sugimachi K.: HLA-DR antigen expression in squamous epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus : an immunohistochemical study. *Oncology Reports* 6: 301- 306, 1999

5. Watanabe M., Kuwano H., Tanaka S., Toh Y., Masuda H., Sugimachi K.: A significant morphological transformation is recognized

in human esophageal cancer cells with amplification/overexpression of the cyclin D1 gene. *Int J Oncol* 15: 1103- 1108, 1999

6. Watanabe M., Kuwano H., Tanaka S., Toh Y., Sadanaga H., Sugimachi K.: Flow cytometric DNA analysis is useful in detecting multiple genetic alterations in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 85: 2322- 2328, 1999

2. 学会発表

1. 藤 也寸志、國仲慎治、大城辰雄、中島秀彰、馬場秀夫、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村健、森正樹. 消化器癌における MnSOD発現の意義の検討とMnSOD 発現抑制 による抗がん剤の効果増強の試み 第53回日本消化器外科学会 1999

2. 大城辰雄、馬場秀夫、鴻江俊治、中島秀彰、藤 也寸志、泉公一、石尾哲也、高江洲亨、伊地隆晴、瀬尾洋介、岡村健. 胃悪性リンパ腫に対する集学的治療の成績 第53回日本消化器外科学会 1999

3. 馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村健. Borrmann4型胃癌長期生存例の検討--多変量解析および増殖活性の観点から-- 第53回日本消化器外科学会 1999

4. 中島秀彰、森正樹、上尾裕昭、大城辰雄、藤 也寸志、馬場秀夫、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村健. 消化器癌における遺伝子不安定性の臨床的意義 第53回日本消化器外科学会 1999

5. 石尾哲也、馬場秀夫、鴻江俊治、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、瀬尾洋介、岡村健. 進行・再発胃癌に対する Low dose CDDP/5-FU 療法 (抗腫瘍効果と予後に関する因子の評価) 第53回日本消化器外科学会 1999

6. 鴻江俊治、石尾哲也、大城辰雄、中島秀彰、

- 馬場秀夫、藤 也寸志、瀬尾洋介、岡村健. 大腸癌の肝・肺重複転移切除例の解析 第53回日本消化器外科学会 1999
7. 泉公一、馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村健、清成秀康. 早期胃癌における内視鏡的胃粘膜切除術 (EMR) 施行症例の検討 第53回日本消化器外科学会 1999
8. 井口東郎、藤 也寸志、井村穰二、尾形佳郎. 膵癌における転移関連遺伝子 (KAI1, MTA1) の発現とその意義 第8回がん転移研究会 1999
9. 馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村 健. スキルス胃癌における細胞接着分子からみた癌化機構の解明と治療戦略 第99回日本外科学会 1999
10. 藤 也寸志、國仲慎治、大城辰雄、中島秀彰、馬場秀夫、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村 健、森正樹. WORKSHOP Manganese superoxide dismutase; 消化器癌における発現の意義とその発現抑制 による抗癌剤の効果増強 第99回日本外科学会 1999
11. 鴻江俊治、馬場秀夫、大城辰雄、石尾哲也、中島秀彰、藤 也寸志、瀬尾洋介、岡村 健. 進行・再発胃癌に対する Low dose CDDP/5-FU療法 (予後因子の評価と投与方法の改良) 第99回日本外科学会 1999
12. 大城辰雄、馬場秀夫、鴻江俊治、中島秀彰、藤 也寸志、瀬尾洋介、岡村 健、J.M.C.Bull. Hyperthermia の腫瘍内血管および血管新生因子 (VEGF) に及ぼす影響第99回日本外科学会 1999
13. 中島秀彰、森正樹、大城辰雄、藤 也寸志、馬場秀夫、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村 健. 消化器癌における遺伝子不安定性の臨床応用の検討 第99回日本外科学会 1999
14. 泉 公一、馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村 健、清成秀康. 早期胃癌に対する内視鏡的胃粘膜切除術 (EMR) における局所再発危険因子 第99回日本外科学会 1999
15. 國仲慎治、澤田秀智、藤 也寸志. 乳癌転移関連遺伝子mta1 のヒトホモログMTA1 cDNAの単離とアンチセンスオリゴによる乳癌細胞増殖の抑制 第99回日本外科学会 1999
16. 高江洲 享、馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、瀬尾洋介、岡村 健、友田博次. 機器吻合器による消化管吻合の問題点と術後合併症に関する検討第99回日本外科学会 1999
17. Toh Y, Mori M, Kuninaka S, Oshiro T, Nakashima H, Baba H, Kohnoe S, Seo Y, Okamura T, Sugimachi K. Expression of manganese superoxide dismutase mRNA in esophageal, gastric and colorectal carcinomas. American Association for Cancer Research 1999
18. 國仲慎治、藤 也寸志. 大腸癌細胞におけるMn-SOD発現抑制 による抗癌剤および放射線の感受性増強の試み 第3回がん分子標的治療研究会総会 1999
19. 中島秀彰、藤 也寸志、大城辰雄、池田泰治、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 高齢者の高度進行食道癌に対する治療法についての検討第9回がん臨床研究フォーラム 1999
20. 藤 也寸志、國仲慎治. 消化器癌におけるmanganese superoxide dismutase (Mn-SOD) の発現とMn-SODを標的とした遺伝子治療の試み 第7回DMB研究会 1999
21. 石尾哲也、池田泰治、横田昌樹、田嶋強、八反田洋一、大城辰雄、藤 也寸志、中島秀彰、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村健. C型慢性肝炎に対してINFが奏功してHCV-RNAが陰性化その後6年目に肝癌が発生した一例 第21回九州肝臓外科研究会 1999
22. 藤 也寸志、國仲慎治、大城辰雄、中島

- 秀彰、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 大腸癌細胞におけるMnSOD発現抑制剤による抗癌剤および放射線の感受性増強に試み 第54回日本消化器外科学会 1999
23. 伊地隆晴、馬場秀夫、石尾哲也、泉 公一、高江洲享、大城辰雄、藤 也寸志、中島秀彰、鴻江俊治、岡村 健. 胃癌症例における腹腔内洗浄中CA125測定の臨床的意義 第54回日本消化器外科学会 1999
24. 大城辰雄、馬場秀夫、中島秀彰、藤 也寸志、泉 公一、高江洲享、石尾哲也、伊地隆晴、鴻江俊治、岡村 健. 当院消化器外科病棟におけるMRSA検出症例およびMRSA感染症例の現況 第54回日本消化器外科学会 1999
25. 馬場秀夫、高江洲享、泉 公一、伊地隆晴、石尾哲也、大城辰雄、藤 也寸志、中島秀彰、鴻江俊治、岡村 健. 胃癌術後縫合不全に対するフィブリン網による瘻孔閉鎖法の有用性 第54回日本消化器外科学会 1999
26. 中島秀彰、齋藤貴生、藤 也寸志、大城辰雄、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 術前治療として化学・放射線併用療法を行ったA3進行食道癌症例の検討 第53回日本食道疾患研究会1999
27. 藤 也寸志、中島秀彰、伊地隆晴、泉 公一、桐野泉、石尾哲也、大城辰雄、池田泰治、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 高齢者食道癌症例の検討 第27回九州食道癌合併療法談話会 1999
28. 中島秀彰、藤 也寸志、大城辰雄、池田泰治、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 高度進行食道癌に対する化学放射線併用療法についての検討 第27回九州食道癌合併療法談話会 1999
29. 藤 也寸志、中島秀彰、澤田秀智. 癌転移関連遺伝子mtalの分子生物学的解析-ヒストン脱アセチル化酵素との結合 第10回日本消化器癌発生学会総会 1999
30. 國仲慎治、一瀬行幸人、藤 也寸志. MnSOD発現抑制 による大腸癌細胞に対する放射線・温熱・化学療法への感受性増強の試み---アポトーシスの誘導による耐性克服 第58回日本癌学会総会 1999
31. 藤 也寸志. 新規癌転移関連遺伝子mtalの解析;ヒストン脱アセチル化酵素と結合 第 回福岡がん懇話会 1999
32. 松末公彦、瀧口総一、藤 也寸志、河野彬. マウスmtal-L1遺伝子のクローニングと遺伝子構造の決定 第22回日本分子生物学会総会 1999
33. 藤 也寸志、大城辰雄、池田泰治、中島秀彰、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 高齢者食道癌症例の特徴と治療上の問題点 第37回日本癌治療学会総会 1999
34. 鴻江俊治、馬場秀夫、大城辰雄、中島秀彰、藤 也寸志、池田泰治、遠藤和也、岡村健. 進行・再発胃癌に対するLow dose CDDP+5-FU療法(5投2休法から隔日投与法へ) 第37回日本癌治療学会総会 1999
35. 大城辰雄、鴻江俊治、馬場秀夫、中島秀彰、藤 也寸志、池田泰治、遠藤和也、岡村健. 進行・再発消化器癌に対するCPT-11+MMC併用療法の第I-II相試験 第37回日本癌治療学会総会 1999
36. 馬場秀夫、遠藤和也、大城辰雄、池田泰治、中島秀彰、藤 也寸志、鴻江俊治、岡村健. 癌性腹膜炎に対する診断と治療戦略-特にスキルス胃癌を中心に- 第37回日本癌治療学会総会 1999
37. 中島秀彰、藤 也寸志、大城辰雄、池田泰治、馬場秀夫、鴻江俊治、齋藤貴生、岡村 健. 食道癌に対するchemoradiotherapyの有用性と問題点 第37回日本癌治療学会総会 1999
38. 鴻江俊治、大城辰雄、馬場秀夫、中島秀彰、藤 也寸志、瀬尾洋介、岡村 健. 遠隔郭清からみた直腸癌に対する側方郭清の適応

と意義 第50回大腸癌研究会 1999

39. 鴻江俊治、大城辰雄、馬場秀夫、中島秀彰、藤也寸志、瀬尾洋介、岡村 健. 切除不能進行・再発消化器癌に対するCPT-11/MMC併用療法のPhase I / II Study
第32回制癌剤適応研究会 1999

40. 大城辰雄、泉 公一、馬場秀夫、中島秀彰、藤也寸志、鴻江俊治、岡村 健. 早期胃癌内視鏡的切除（EMR）後の局所再発の検討 第71回日本胃癌学会総会 1999

41. 鴻江俊治、大城辰雄、馬場秀夫、中島秀彰、藤也寸志、岡村 健. 隔日投与によるLow dose CDDP/5-FU併用療法が著効を示した進行再発胃癌の症例 第71回日本胃癌学会総会 1999

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

多重がんにおけるミスマッチ遺伝子異常の解析と治療への応用

分担研究者 齋藤 貴生 佐賀県立病院好生館・館長

研究要旨

がん発生におけるミスマッチ遺伝子異常の関与について解析し、その異常 (Replication Error: RER) をがん、特に多重がんの治療戦略に役立てることを目的として、九州がんセンターの臨床各科の参加の下、各種臓器がんの切除症例に対して蛍光法によるmicrosatellite instability (RER) の検索を行いフォローする prospective study を開始した。330例に対する検索を行ったところ、RER を認めた症例は 12.3%であった。臓器別では大腸癌 10.9%、胃癌 20.0%、肺癌 9.4%、膵癌 25%、肝癌 0%であった。重複がんの有無別にRERの頻度を見ると、重複・多発がん43症例では 9.3%であったのに対して、単発がん症例では 13.0%と差はなかった。2 loci 以上でも RERを認めた症例に限っても重複・多発がん症例では 4.7%であったのに対して、単発がん症例では 8.8%と、差がなかった。本遺伝子診断は、多重癌発生の予知指標としての意義は少ないと考えられた。

A. 研究目的

近年、多重がんは増大する傾向にあり、genetic な背景を考慮に入れた治療体系の確立が必要と思われる。がん細胞では遺伝子の安定性を司る DNA 修復遺伝子そのものが、突然変異や染色体の異常により機能を喪失している場合があることが明らかにされ、これまでのところ遺伝性の修復遺伝子欠損疾患とミスマッチ修復系の遺伝子異常について研究が進められている。本研究は、がん発生におけるミスマッチ遺伝子異常の関与について解析し、その異常 (Replication Error: RER) をがん、特に多重がんの治療戦略に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

各種がんの手術摘出臓器の凍結標本より DNA を抽出し、当センターで確立した DNA 自動シーケンサーと蛍光プライマーを用いて、各症例 5 loci (D2S123, D3S, D10S, D11S, D13S) の microsatellite instability を検索した。今回、特に多発がんや多臓器重複がんにおけるミスマッチ修復異常の関与について注目し、prospective studyとしての検討を始めた。対象として、九州がんセンターにおける種々の癌の切除症例 330例（大腸癌 110例、胃癌 75例、肺癌 127例ほか）の

microsatellite instability を検討した。

C. 研究結果

九州がんセンターの切除症例に対し microsatellite instability (RER) の検索を行った。

5 loci 中、1 locus 以上で RERを認めた症例は 330 例中 12.4%であった。臓器別では大腸癌 110 例中 12 例 (10.9%)、胃癌 75例中 15例 (20.0%)、肺癌 127 例中 12 例 (9.4%)、膵癌 4 例中 1 例 (25%)、肝癌 7 例中 0 例 (0%)であった。一方、2 loci 以上でRERを認めた症例は大腸癌3 例 (2.7%)、胃癌 9 例 (12.0%)、肺癌1例 (0.7%)であった。

重複がんの有無別にRERの頻度を見ると、重複・多発がん症例では 43例中 4 例 (9.3%)であったのに対して、単発がん症例では 260 例中 33例 (12.0%)と差はなかった。2 loci 以上でも RERを認めた症例に限っても重複・多発がん症例では全く差がなかった。

D. 考察

ミスマッチ修復異常は遺伝性の癌ばかりでなく、一部の非遺伝性の癌の発生にも関与しており、特に多発がんや多臓器重複がんにおいて高率に関与していることが示唆されてきた。我々は遺伝子診断の臨床応用を目指して、

放射性同位元素を用いた従来の検出法ではなく、蛍光法による microsatellite instability の検出を行っているが、本方法は簡便・安全なだけでなく、データがより客観的で正確な解析が可能であることが分かっている。各臓器の症例数は必ずしも充分ではなく、また術後経過の短い症例が大部分であるが、今回のデータでは、単発例、重複・多発がん症例ともに RER 陽性率は従来報告されているよりも低かった。その原因は検査法による相違なのかは不明である。今後より多症例の検討、また RER 陽性症例の重点的フォローアップを行っていくことで本検査法の臨床的意義が明らかになっていくものと考えられが、現時点では、一般に報告されているように、本解析は多重癌の発生の予知指標になる可能性は少ないと思われた。

E. 結論

九州がんセンターの各種臓器がんの切除症例に対して蛍光法による microsatellite instability の頻度を検討した。本遺伝子診断による結果を蓄積し、がん発生におけるミスマッチ遺伝子異常の意義や多重がん発生の予知指標としての意義を検討し、重点的フォローアップ体制を含めた多重がんの治療戦略に役立てることを目指したが、本解析は多重癌の発生の予知指標になる可能性は少ないと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 斎藤貴生. 21世紀における食道癌治療と生体防御、外科学 次代への展開：97-99, 1999

2. 学会発表

1. 斎藤貴生、米村智弘、鴻江俊治、中島秀彰、馬場秀夫. 非切除食道癌に対する低用量CDDP・5FU放射線併用療法 第99回日本外科学会総会 1999.3.25 (福岡)
2. 斎藤貴生. 「医療および病院管理面から見た検査科運営」臨床検査の未来-次世代への懸け橋となるため、今何をなすべきか- 第38回全国自治体病院集会 (シンポジウム) 1999.10.22 (福岡)

3. 斎藤貴生. 臓器・核酸バンクの確立とミスマッチ修復異常の検索：3年間のまとめ「がんに伴う遺伝子変化を標的とした治療法の開発」班 1999.12.18
4. 中島秀彰、斎藤貴生、大城辰雄、藤 也寸志、馬場秀夫、鴻江俊治、岡村 健. 術前治療として化学・放射線療法を行ったA3進行食道癌症例の検討 第53回日本食道疾患研究会 1999.6.18 (大分)
5. 斎藤貴生、米村智弘、鴻江俊治、中島秀彰、馬場秀夫. A3食道癌に対する低用量CDDP・5FU放射線併用療法の有用性 第53回日本食道疾患研究会 1999.6.18 (大分)
6. 中島秀彰、藤 也寸志、大城辰雄、池田泰治、馬場秀夫、鴻江俊治、斎藤貴生、岡村 健. 食道癌に対するchemo-radiationの有用性と問題点 第37回日本癌治療学会総会 1999.10.12-14 (岐阜)

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

癌治療におけるDNA修復酵素の発現異常の影響評価

分担研究者 中別府 雄作 九州大学生体防御医学研究所・教授

研究要旨

本研究においては、癌の化学療法および放射線療法に対する個体レベルの感受性を規定する因子としてDNA修復酵素に注目し、その発現異常の影響をそれぞれの遺伝子を欠損する変異マウスを樹立して解析した。その結果、*MGMT*、*MLH1*、*MTH1*遺伝子が発癌抑制と抗癌剤に対する感受性を決定する因子として重要である事を明らかにした。さらに、肝細胞癌患者において*MGMT*遺伝子の発現喪失がその予後不良と関連する事を明らかにした。*MGMT*の発現喪失を伴う癌においては、術後の予後改善にアルキル化抗癌剤を併用した化学療法が効果をもたらす可能性が示唆される。

A. 研究目的

最近のヒト癌や癌細胞における遺伝子発現の研究から、種々の化学物質や放射線照射により生じるDNA損傷の修復に関わるDNA修復遺伝子の発現が低下あるいは亢進している癌細胞さらに癌組織がかなりの割合で存在することが明らかにされてきた。また、正常人の各臓器におけるDNA修復遺伝子の発現レベルにも大きな個体差が存在することが示唆されつつある。個体レベルでのDNA修復遺伝子の発現低下は特定の抗癌剤や放射線に対して全身性に感受性を増強すると考えられ、投与する抗癌剤の選択時に考慮する必要があると思われる。一方、癌細胞でのDNA修復遺伝子の発現の低下や上昇は、癌細胞の抗癌剤や放射線に対する感受性を変化させるために、より効果的な治療法を選択する上で重要なファクターとなる。このような考えから、種々のDNA修復遺伝子の発現をヒト個体および癌組織で検索することが重要と考えている。さらに、それぞれの修復遺伝子の発現異常が抗癌剤や放射線に対する感受性をどのように変化させるのかを正確に評価できるモデル動物を樹立することが急務である。

B. 研究方法

本研究では、アルキル化剤と活性酸素によるDNA損傷の修復に関わる種々の修復酵素についての基礎的な解析を行い、その研究成果をもとに、それぞれの修復酵素遺伝子に機能

欠損型の変異を持つマウスを作製し、それぞれのマウスの修復欠損の影響を、細胞レベル、個体レベルで抗癌剤等に対する感受性と発癌に注目して解析する。さらに、各ヒト修復酵素に特異的な抗体を作製し、これらを用いて癌患者の正常組織および癌組織におけるそれぞれの酵素の発現を免疫染色やウェスタンブロット法等で定量的に解析し、その発現の変化と臨床データとを詳細に比較検討する。

C. 研究成果

(1) アルキル化剤に対する個体レベルの感受性を規定する修復遺伝子 (*MGMT*) : 今年度は、抗癌剤としてよく用いられるアルキル化剤によるDNA損傷とその修復酵素、O6-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ (*MGMT*) に注目して解析を進めた。*MGMT*を欠損するマウスは、アルキル化剤に高感受性であるが、ミスマッチ修復遺伝子 (*MLH1*) をヘテロに欠損するだけでもアルキル化剤による細胞死に対して抵抗性を獲得し、さらに発癌頻度が上昇することを明らかにした。また、ヒト肝細胞癌組織における*MGMT*発現の異常を新たに作成した抗体を用いて免疫染色法によりスクリーニングした。その結果、*MGMT*を発現する肝細胞癌患者と発現が見られない患者の比較から、外科手術後の5年生存率が95.0%と60.8%と後者において有意 ($p<0.05$) に低いことが明らかになった。

MGMT発現が見られない患者においては肝炎ウイルスの感染が有意に高かった。

(2) 活性酸素の産生に依存して作用する化学物質や放射線に対する抵抗性を規定する遺伝子群：我々は、アルキル化剤に加えて放射線照射による細胞死の実行分子である活性酸素により生ずる酸化的DNA損傷（主に8-オキソグアニン関連）の修復酵素群（*MTH1*、*OGG1*、*MYH*）についても解析を進めた。今年度は、8-oxo-dGTPを分解する酵素8-oxodGTPaseをコードする*MTH1*遺伝子に機能欠損変異を持つマウスにおける自然発癌の解析を終了した。通常のSPF飼育条件下で1年半を経過した時点のマウス個体（*MTH1*^{-/-}: ♂42, ♀51と*MTH1*^{+/+}: ♂46, ♀44）について剖検を行い腫瘍を中心に解析を行ったところ、野生型、*MTH1*遺伝子欠損マウスともにおもに肺、肝臓、胃に腫瘍（アデノーマ、カルシノーマ）や過形成などの増殖性病変を認めた。野生型の雄ではこれら3つの臓器の病変が28.3%の個体で観察されたが、*MTH1*遺伝子欠損マウスでは57.1%に上昇していた。一方、野生型の雌では4.5%の個体に何らかの増殖性病変を認め、*MTH1*遺伝子欠損マウスでは25.5%の個体に同様の病変を認めた。特に*MTH1*遺伝子欠損マウスの雌の場合、上記3つ以外の臓器（子宮や皮膚）にも病変を認めた。この結果は、雌雄ともに有為に*MTH1*遺伝子欠損マウスで増殖性病変の自然発生が増加していることを示す。さらに、DNA中の8-オキソグアニンを除去する8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ（*OGG1*）、8-オキソグアニンに誤って対合したAアデニンを除去するアデニンDNAグリコシラーゼ（*MYH*）の2つの酵素の機能欠損変異遺伝子を持つマウスを樹立した。2つの変異マウスは全て変異遺伝子をホモに持つ場合でも生存可能で、その変異遺伝子の遺伝はメンデルの法則に従った。現在までに14ヶ月齢以上のマウスで自然発癌を解析し、*OGG1*欠損マウスで肺癌の発生頻度が野生型の2倍に上昇する結果を得たが、発症ケースが少なく、 $p=0.06$ で統計的に有為と結論するには至らない状況である。*MYH*欠損マウスにおいても野生型マウスより、発癌頻度が高い傾向を得られつつある。また、それぞれのヒト修復酵素に対する特異的な抗体の作製に成功し、現在特異的かつ定量的な

発現スクリーニング系の確立を進めている。

D. 考察

(1) MGMTおよび*MLH1*遺伝子と化学療法：*MGMT*遺伝子欠損マウスにおけるミスマッチ遺伝子（*MLH1*）修復欠損の影響は、発癌感受性に2つの修復遺伝子が相乗的に作用する事を明確に示した最初のケースである。特に、*MLH1*遺伝子欠損がヘテロでもアルキル化剤に対して抵抗性を獲得し発癌頻度が上昇することは、家族性非腺腫症大腸癌患者における癌の化学療法や放射線療法の選択に重要な示唆を与えるものと位置付けており、今後このような観点からの研究が望まれる。(2) MGMT発現喪失と肝細胞癌の予後：ヒト肝細胞癌患者において見られたMGMT発現の喪失は、肝炎ウイルスの感染によく相関することから、肝炎ウイルスによりMGMT遺伝子の発現を始め多くの遺伝子発現が影響を受け、その結果として予後不良に相関していると考えられる。従来、肝細胞癌においては化学療法にニドランなどのアルキル化剤の摘要は全く考慮されていなかったが、今回の結果はMGMT発現（-）のケースに関しては、ニドランの投与がこのような患者に特異的な予後不良を改善する可能性を強く示唆するものである。(2) *MTH1*、*OGG1*、*MYH*遺伝子：これらの3つの8-オキソグアニンの修復に関する遺伝子の全ての機能欠損マウスを世界に先駆けて樹立し、自然発癌抑制において特に*MTH1*遺伝子が重要である事を明らかにすることができた。今後は二重、三重遺伝子変異マウスの樹立を目指し、それぞれの変異マウスを用いて、発癌感受性ととも化学療法、放射線療法に対する感受性を検討する計画である。現在、樹立したマウスの戻し交配とコロニーの拡大を進めている。さらに、ヒト癌患者でのこれらの修復酵素の発現レベルと放射線照射あるいは抗癌剤投与に対する応答を詳細に比較解析することでより安全で効率的な治療法の開発が期待される。

E. 結論

(1) MGMT遺伝子と*MLH1*遺伝子がアルキル化剤に対する個体レベルでの致死感受性と発癌感受性の両方を規定する事を明らかにした。

(2) ヒト肝細胞癌においてMGMT発現の喪失が外科手術後の予後不良と相関する事を明らかにした。

(3) 8-オキソグアニン関連の修復遺伝子 *MTH1*、*OGGI*、*MYH*の変異マウスの解析から、*MTH1* 遺伝子が自然発癌抑制に重要である事を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGGI* mRNAs. *Mol. Biol. Cell.* 10, (5),1637-1652. 1999

2. Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., and Kasai, H. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.* 274 (26), 18201-18205. 1999

3. Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., and Yamamoto, K. JSAP1, a novel JNK-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, (11) 7539-7548. 1999

4. Oda, H., Taketomi, A., Maruyama, I., Itoh, R., Nishioka, K., Yakushiji, H., Suzuki, T., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. Multi-forms of Human MTH1 Polypeptides Produced by Alternative Translation Initiation and Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acid Res.* 27, (22), 4335-4343. 1999

5. Fujii, Y., Shimokawa, H., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. Functional significance of the conserved residues for the 23 residue module among MTH1 and MutT

family proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 (53), December 31, 38251-38259. 1999

6. Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y. and Mizuno, Y. Increased 8-oxo-dGTPase in the Mitochondria of Substantia Nigral Neurons in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.*, 46(6), 920-924. 1999

7. Kalinichev, M., Rosenblatt, J. S., Nakabeppu, Y., and Morrell, J. Induction of c-Fos- and FosB-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations differentially involved in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 416 (1), 45-78. 2000

8. Ohyagi, Y., Yamada, T., Nishioka, K., Clarke, N. J., Tomlinson, A. J., Naylor, S., Nakabeppu, Y., Kira, J. Younkin S. G. Selective increase in cellular Ab42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuro report*, 11 (1), 167-171. 2000

9. Kawate, H., Itoh, R., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Ide, F., Ishikawa, T., Noda, T., Nawata, H., Sekiguchi, M. (2000) A defect in a single allele of the Mth1 gene causes dissociation of killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis*, 21 (2), 301-305.

10. Inoue, R., Abe, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Mori, T., and Suzuki, T. Characterization of Human Polymorphic DNA Repair Methyltransferase. *Pharmacogenetics*, 10, 59-66. 2000

11. Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. Identification of human MutY homologue (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and

detection of multi-forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acid Res. Nucleic Acids Res.*, 28(6):1355-1364. 2000

12) Morifuji, M., Taniguchi, S., Sakai H., Nakabeppu, Y., and Ohishi, M. Differential Expression of Cytokeratin in Newly Established Human Tongue Cancer Cell Lines of Defined Metastatic Ability with Orthotopic Implantation. *Am. J. Pathol.* (In press). 2000

2. 学会発表

1. 中別府雄作：活性酸素によるゲノム傷害とその防御機構。第25回日本医学会総会（シンポジウム），1999.
2. Nakabeppu, Y. Molecular Genetics and Structural Biology of Human MutT Homolog, MTH1. The First Fujihara International Seminar, 1999.
3. Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Oda, H., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. Human MYH protein possesses a novel repair activity for 2-hydroxyadenine in DNA, The 2nd 3R Symposium, 1999.
4. 中別府雄作。活性酸素によるゲノム傷害とその防御機構。第25回日本医学会総会（シンポジウム），1999.
5. 中別府雄作。活性酸素によるDNA損傷。平成11年度文部省特定領域研究「神経細胞死制御」ワークショップ。1999.
6. 中別府雄作。「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構：発癌から神経変性疾患まで」。平成11年度 変異・発癌抑制機構研究会。1999.
7. 大坪俊夫，西岡憲一，今磯泰幸，富永洋平，岩井成憲，下川英俊，中別府雄作。DNA中の2-ハイドロキシアデニンを除去するヒト修復酵素。第72回日本生化学会（シンポジウム）。1999.
8. 富永洋平，平野世紀，一戸晶元，大坪俊夫，中別府雄作。アデニンDNAグリコシラーゼをコードする哺乳動物MYH遺伝子の発現とその制御。第22回日本分子生物学会（ワークショップ）。1999.
9. 中別府雄作，西岡憲一，大坪俊夫，土本大介，富永洋平，作見邦彦，古市正人，康東天，岩井成憲，藤原俊幸。ミトコンドリアにおける核酸の酸化とその修復機構。第22回日本分子生物学会（ワークショップ）。1999.
10. 酒井康成，小田尚伸，古市正人，中別府雄作。ヒトMTH1蛋白質の細胞内局在とその制御。第22回日本分子生物学会（ワークショップ）。1999.
11. 藤川勝義，紙谷浩之，薬師寺浩之，藤井喜充，中別府雄作，葛西宏。2-hydroxy-dATP，8-hydroxy-dATPのヒトMTH1蛋白質による分解。第58回日本癌学会。1999.
12. 伊藤紀幸，三島正規，池上貴久，山懸ゆり子，中別府雄作，白川昌宏。NMRによるhuman MTH1タンパク質の立体構造解析。第22回日本分子生物学会。1999.
13. 葛西宏，紙谷浩之，平野雄，中別府雄作。活性酸素によるDNA損傷，変異誘発およびその防御。第22回日本分子生物学会。1999.
14. 作見邦彦，富永洋平，古市正人，續輝久，関口睦夫，中別府雄作。MTH1，OGG1ダブルノックアウトマウスの作製とその解析。第22回日本分子生物学会。1999.
15. 藤川勝義，紙谷浩之，薬師寺浩之，藤井喜充，中別府雄作，葛西宏。ヒトMTH1による2-OH-dATPの分解。第22回日本分子生物学会。1999.
16. 西岡智子，作見邦彦，中別府雄作。Δ FosBによる細胞分化の誘導。第22回日本分子生物学会。1999.

17. 田原一樹, 富永洋平, 中別府雄作. DFosBによる遅延型アポトーシスの誘導. 第22回日本分子生物学会, 1999.
18. 末松佐知子, 中別府雄作, 渡邊武. B細胞の抗原受容体を介するシグナル伝達と *fosB* 遺伝子の発現. 第22回日本分子生物学会, 1999.
19. Nakabeppu, Y. Structural Analysis of Human MTH1 revealed that Biological Significance of an Oxidized Form of Adenine, 2-Hydroxyadenine. Gordon Research Conference on Mutagenesis and Carcinogenesis, 2000.
20. Nakabeppu, Y., Nishioka, T., and Sakumi, K. FosB and DFosB encoded by alternatively spliced *fosB* mRNAs initiate cell differentiation. 10th Annual Winternational Symposium on GENES AND DEVELOPMENT (Canadian Society of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology), 2000.
21. Nakabeppu, Y. Regulation of Intracellular Localization of Human MTH1, OGG1 and MYH Proteins for Repair of Oxidative DNA Damages. DNA Base Excision Repair Workshop, 2000.
22. 中別府 雄作. 「活性酸素による核酸の酸化障害とその防御機構：発癌と神経変性への関わり」. 原子力基盤クロスオーバー研究ワークショップ「放射線損傷の修復機構」に放射線損傷の可視化を目指して-, 2000.

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

mta1 遺伝子を欠損したマウスの作成とその生理・生物学的解析

分担研究者 河野 彬 国立病院九州がんセンター・室長

研究要旨

がん転移関連遺伝子として発見され、最近ヒストンデアセチラーゼと複合体を形成し転写制御に関与しているのではないかとされている mta1 遺伝子がコードするタンパクの生物学的機能を明らかにする目的で mta1 遺伝子ノックアウトマウス作成を試みている。現在までにノックアウト遺伝子を構築するために必須であるマウス mta1 遺伝子をクローニングし、その全塩基配列と遺伝子構造を決定した。mta1 遺伝子は 21 のエクソンに分かれて、全長約 20 K の大きさであった。この遺伝子構造を基にノックアウト遺伝子を構築するため、mta1 タンパクの DNA 結合部位をコードすると思われるエクソンを neo カセットに置換した遺伝子を構築した。このノックアウト遺伝子をマウス ES 細胞に導入し、ノックアウト遺伝子をヘテロに持つ ES 細胞を樹立した。この細胞を導入した胚盤胞をキメラマウスを作成した。

A. 研究目的

mta 1 は転移性が高いがん細胞に高発現する転移関連遺伝子として cDNA が単離された。最近この mta 1 のホモログ遺伝子も発見され、mta 2 (mta1L1) と名づけられた。さらにこれら mta 遺伝子にコードされるタンパクは、遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていると考えられているヒストンデアセチラーゼ (HDAC) と複合体を形成している事実が次々に確認された。これらのことを総合すると、mta 関連タンパクは、生物学的に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、mta 遺伝子の生物学的役割、がん増殖・転移における働きなどの mta タンパクの機能を明確に知るため、遺伝子ノックアウト細胞およびマウスを作成し、解析することを目的にする。

B. 研究方法

129SJ マウスの遺伝子ライブラリーから先に決定した mta 1 および mta 2 それぞれの cDNA を用いてスクリーニングし、マウス mta 1, mta 2 それぞれの全遺伝子構造とその塩基配列を決定する。各遺伝子タンパクの核移行、DNA 結合に関与すると考えられる塩基配列を Neo 耐性遺伝子に置換する。この様に構築した mta 1, mta 2 の変異遺伝子をマウス

ES 細胞に導入し、neo 耐性細胞を選択する。neo 耐性細胞の DNA を解析し、正常 mta 遺伝子がノックアウトされた mta 遺伝子に置換したヘテロ ES 細胞を選択する。樹立した ES 細胞を胚盤胞に導入しキメラマウス作成する。キメラマウスを C57Black6 の野生マウスと交配させ F1 マウスを作成する。F1 マウスの兄妹交配により F2 マウスを作成する。得られた F2 マウスの mta1 遺伝子を解析し、ホモ、ヘテロ、ワイルドを決定する。得られた F2 マウスの生物学的解析を行う。

C. 研究結果

マウス mta 1, mta 2 それぞれの遺伝子構造を決定した。すなわち mta1 は 21 のエクソンに分かれており、全長約 20 K 塩基の遺伝子であった。mta2 は 18 エクソンから構成され全長約 15 K の塩基配列を有していた。それぞれのキャップサイトを定めることで mRNA への転写開始点を決定した。次にそれぞれのタンパクの核内 DNA 結合配列と思われる部位をコードすると思われるエクソンを neo カセットに置換したマウス mta1, mta2 遺伝子のノックアウト遺伝子を構築した。

次に mta1, または mta2 ノックアウト遺伝子を導入したヘテロ ES 細胞を樹立した。

それぞれのノックアウト遺伝子を持ったキ

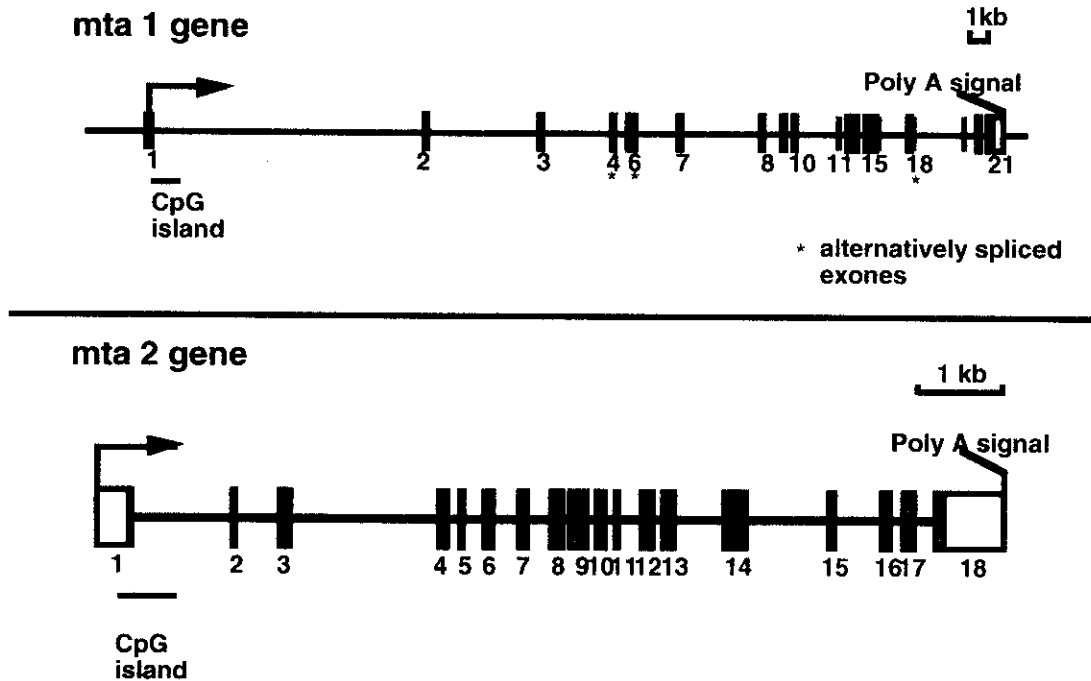
メラマウスを作出した。現在、キメラマウスを用いてF1 マウスを作成中である。

D. 考察

ノックアウトマウスの作成を試みているが、

mta 遺伝子をホモ欠損したマウスが産出するか否かはまだ不明であるが、ホモ欠損マウスの産出状態、ヘテロ欠損マウス産出状態を知り、後にさらに進んだmta 遺伝子がコードするタンパクの機能解析が進むと考えられる。

マウス m t a 遺伝子構造



E. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimihiko Matsusue., Soichi Takiguchi., Yutaka Takata., Akihiko Funakoshi., Kyoko Miyasaka., Akira Kono. Expression of Cholecystinin Type A Receptor Gene Correlates with DNA Demethylation during Postnatal Development of Rat Pancreas Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 29-32, 1999
2. Kyoko Miyasaka., Hirotsugu Shinozaki., Shinji Suzuki., Yuko Sato., Setsuko Kanai., Masao Masuda., Atsuo Jimi., Aki Nagata., Toshimitsu Matsui., Tetsuo Noda., Akira Kono., Akihiko

Funakoshi. Disruption of Cholecystinin(CCK)-B Receptor Gene Did Not Modify Bile or Pancreatic Secretion or Pancreatic Growth: A Study in CCK-B Receptor Gene Knockout Mice Pancreas 19, 114-118, 1999

2. 学会発表

1. 瀧口総一、美野輪治、小林智子、高田豊、宮坂京子、船越顕博、河野 彬、野田哲生 コレシストキニンA型受容体欠損マウスの作製と解析 第22回日本分子生物学会年会 1999.12.7 (福岡)
2. 松末公彦、瀧口総一、藤也寸志、河野 彬 マウスmtal like 1遺伝子のクローニ

ングと遺伝子構造の決定 第22回日本
分子生物学会年会 1999.12.7 (福岡)

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

増殖因子およびシグナル伝達系阻害による治療法の開発

分担研究者 真柴温一 国立病院九州がんセンター・室長

研究要旨

チロシンキナーゼ阻害剤として、大黃由来のエモジンを用い、グリチルリチン(GL)との併用によるヒト癌細胞株、A431癌細胞に対する増殖抑制とその機序について検討した。エモジン(5-15ug/ml)およびGL(200-1000ug/ml)の併用添加により著明な増殖抑制効果を得た。植物由来のトキシンであるサポリンまたはホルマリン弱毒化ジフテリア毒素(fDT)とエレクトロポレーション(EP)を併用することによりトキシンを、直接、癌細胞内に移入させ細胞障害効果を増強させることを目的とした。細胞外では殆ど毒性を示さないサポリンまたは弱毒化により細胞膜への結合活性が低下したジフテリア毒素(fDT)を用い、トキシン存在下でEP処理することにより各種癌細胞の細胞内に、直接、移入させることにより、癌細胞に対してin vitroおよびin vivoで選択的に、しかも、高度の障害効果を得、癌治療への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

癌細胞では、細胞の増殖に密接に関与しているシグナル伝達系の異常が指摘されており、増殖因子レセプター発現の増加および遺伝子増幅が数多くの癌で認められている。このような癌遺伝子異常および癌遺伝子産物は、癌治療の選択的な標的と考えられている。チロシンキナーゼ阻害活性を有する大黃由来のエモジングリチルリチン(GL)を併用することにより各種癌細胞に対する増殖抑制効果と作用機序を検討した。また、細胞内に存在する標的に対する作用物質の移入の方法として、近年、遺伝子の導入、制癌剤の細胞内移入などに広く用いられているエレクトロポレーション(EP)を用い、今回、植物由来の毒素であるsaporinまたはホルマリン弱毒化ジフテリア毒素(fDT)とEPを併用することにより効果的な癌治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

EGFレセプターを高密度に発現しているヒト癌細胞株、A431(epidermoid carcinoma cell line)を用いて、CDDP,エモジンとグリチルリチン(GL)との併用による増殖抑制効果をinvitroおよびinvivoで検討した。A431癌細胞2x10(4)/wellを96-wellplateに培養し、24時間後、CDDP(1ug/ml)とエモジン

(5-15ug/ml)とグリチルリチン(GL)

(200-1000ug/ml)併用添加した。72時間後、neutral redで染色後、plate readerを用いて増殖抑制効果を判定した。A431癌細胞1x10(6)をBalb/cヌードマウスの側腹部皮下に接種し、腫瘍径が4mmに達した7日後よりエモジン(2mg 腹腔内投与)およびグリチルリチン(GL)(4mg 腹腔内投与)を単独または併用し連日、6日間投与し、CDDP(100ug)は、週1回腹腔内投与した。同投与方法を3週間繰り返す、経時的に腫瘍径を計測した。

C. 研究結果

A431癌細胞の増殖は、加えたエモジンの濃度依存的に抑制された。また、グリチルリチン(GL)(500-1000ug/ml)を併用することにより、増殖抑制効果の増強が認められ、CDDPの添加により、さらに、増強した。A431癌細胞ヌードマウスに対して単独投与群では、増殖抑制効果はみられなかったが、3者併用投与により2日後より、有意の増殖抑制効果を認めた。単独では細胞障害効果のないsaporin濃度で、EPとの併用により著明な効果(90%以上)を得た。また、弱毒化ジフテリア毒素では、細胞膜との結合親和性は低下したが、EPと併用により著明な細胞障害効果が得られた。さらに、EPとの併用後、抗ジフテ