

厚生科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的
把握によるがんの特徴の解明と診療への応用
(H12-がん-001)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広橋 説雄

平成13(2001)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的把握によるがんの特徴の解明と 診療への応用 _____	1
主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	

II. 分担研究報告書

1. 発がん浸潤・転移への細胞接着系異常の関与 _____	18
広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	
2. 発がんのエピジェネティック機構 _____	24
牛島 俊和 (国立がんセンター研究所発がん研究部)	
3. 発がんのエピジェネティック機構 _____	29
白石 昌彦 (国立がんセンター研究所 DNAメチル化とゲノム機能プロジェクト)	
4. ゲノム構造異常を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____	33
大木 操 (国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部)	
5. 染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____	37
村上 善則 (国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト)	
6. がん関連遺伝子異常の診断への応用 _____	42
菅野 康吉 (栃木県立がんセンター研究所 がん遺伝子研究室・がん予防研究室)	
7. がん関連遺伝子を標的としたがん抑制に関する研究 _____	46
今井 浩三 (札幌医科大学内科学第一講座)	
8. 肺がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構 _____	49
坂元 亨宇 (国立がんセンター研究所病理部)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的把握によるがんの特徴の解明と
診療への応用
(H12-がん-001)

主任研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：多くのがんで染色体部分欠失が見られる 11q23 領域内における詳細な LOH 解析を子宮体がんで行い、共通欠失領域を 0.3 Mb 領域に限定し、その中に体細胞遺伝子変異を起こしている新規の遺伝子を見出した。第 11 染色体 q23 領域に存在するヒト肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子 *TSLC1* を、ヌードマウス皮下の腫瘍原性の抑制を指標として単離した。methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法ならびにメチル化 DNA 結合カラムクロマトグラフィーと CpG アイランド単離技術 SPM 法を用いて、ヒトがんで過剰にメチル化された DNA 断片、CpG アイランドを網羅的に単離した。ヒト乳がんでは過剰にメチル化されている遺伝子として、三量体 G 蛋白質の一つである *GNA11* 遺伝子を同定した。ヒトがん組織における Wnt シグナル系の発がん転移への関与を示してきたが、 β -catenin と TCF/LEF の転写複合体の新しい標的遺伝子の一つとして、Multidrug resistance gene-1 (MDR1)を同定した。さらに大腸上皮細胞における β -catenin /TCF4 経路の活性化が、細胞極性の喪失に関わっていることを示した。がんで発現が亢進し、カドヘリン機能を不活化することで転移を更新する新規分子 Dysadherin につき、細胞外糖鎖構造の解析ならびに細胞内領域と結合する分子の解析を行った。Blunt-End SSCP 法を用いて allelotyping を行い、17p の欠失は膵がんの約 75%に認められ予後因子として有用であること、表在性膀胱がんでは約 70%で尿および組織中の 9 番染色体の欠失が認められ、TUR 術後の再発の予測に有用であることを示した。DNA 修復遺伝子の異常を示す消化器がん、beta 2 microglobulin 等の異常を見出し、この群では、生命予後が悪いことを示した。浸潤性膵管がんの中で、腫瘍結節内部に膵管内乳頭状成分を認める症例は、良好な予後を示すことを見出した。

分担研究者

- | | | | |
|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|
| 1. 広橋 説雄 | 国立がんセンター研究所
所長 | 4. 大木 操 | 国立がんセンター研究所
部長 |
| 2. 牛島 俊和 | 国立がんセンター研究所
部長 | 5. 村上 善則 | 国立がんセンター研究所
プロジェクトリーダー (室長) |
| 3. 白石 昌彦 | 国立がんセンター研究所
プロジェクトリーダー (室長) | 6. 菅野 康吉 | 栃木県立がんセンター
研究所 副主幹兼医長 |

7. 今井 浩三 札幌医科大学
教授
8. 坂元 亨宇 国立がんセンター研究所
部長

A. 研究目的

ヒトがんの発生・増悪の過程を正確に把握して個々の症例に最適な診断・治療法を選択可能とすると同時に、新たな診断・制御法開発のための基盤として、多段階発がんのメカニズムの研究を遺伝子・分子・細胞レベルで総合的に推進する。これまでの研究で、少なくとも一部のがんにおいては、異形成・腺腫から上皮内がんそして浸潤・転移能を有する進行がんへと多段階的に発生・増悪する過程が明らかになり、その過程で、いわゆる古典的ながん抑制遺伝子の不活化、がん遺伝子の活性化以外に、カドヘリン細胞接着系をはじめとする様々な機能分子の異常が生じていることを明らかにしてきた。本研究では、このような多段階発がん過程における、ジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常をさらに解明するとともに、発がん初期過程における細胞極性の喪失や浸潤過程での原発巣からの離脱に深く関与すると考えられる細胞接着系の異常が、そのような様々な遺伝子異常と如何に連携してがん化・悪性化に関与しているか解明する。

第二期までの研究により、ジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常を広く解析する方法が確立され、新たながん関連遺伝子が同定されつつある。第三期では特に 11 番染色体長腕部 q23 領域に染色体欠失を伴う乳がん、子宮体がん、神経芽細胞腫を対象に、欠失領域から候補遺伝子の探索を行い、遺伝子変異や発現異常の有無を調べる。同領域から既に同定した新規肺非小細胞がん抑制遺伝子

TSLC1/IGSF4 に関しては、その腫瘍抑制機能を多角的に解析する。また、独自に開発した方法で、メチル化により不活性化されている遺伝子を網羅的に検索、同定された遺伝子に関して、発がんへの関与を検討する。既にヒト乳がんの一部で、過剰なメチル化により不活化される G タンパク質を同定しており、その機能を解明する。

一方、細胞接着分子の不活化機構ならびに同分子とがん遺伝子・がん抑制遺伝子産物との相互作用の解明が進み、既にその下流で働くと考えられる新たな発がん・転移関連遺伝子の候補が得られつつある。具体的には、カドヘリン-カテニン細胞接着の不活化機構として、遺伝子突然変異、遺伝子発現調節領域の DNA メチル化による発現低下、さらに増殖因子からのシグナルによる β カテニンのチロシンリン酸化に加えて、がん細胞に高発現し細胞膜からカドヘリン分子を排除する働きをする新しい細胞膜糖蛋白 dysadherin を発見した。同分子が過剰発現することによりがんの転移性が亢進するのみならず、その高発現は、発がん早期の高度異形成の段階でも認められ、その重要性は極めて高く、今後多くのがんにおける dysadherin の臨床的意義、がん細胞における発現亢進の機序そしてカドヘリン排除の機構につき研究する。

一方、増殖因子受容体やがん抑制遺伝子産物 APC 蛋白とも相互作用する β カテニンは Tcf/Lef 転写因子群の活性化を起こし、増殖や細胞死に関わる遺伝子群の発現を誘導すると考えられるが、この下流で働く標的遺伝子の同定とそれらの発がん・転移への関与を明らかにする。

以上の研究で同定される多くの遺伝子の構造異常と発現の変化を、実際の臨床がん手術材料を対象にがん細胞と間質細胞を正

確に分離して解析するとともに、病理像と対応させ臨床的意義を明らかにし、診断・治療への応用につき検討する。

B. 研究方法

1. ゲノム解析を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析

これまでの乳がん、肺がん、神経芽細胞腫の LOH 解析からこれらにおいては 11q23 の広い範囲に欠失が認められることがわかっていた。子宮体がん試料を用いて同じく q23 領域内に最小の共通欠失領域を同定するための解析を行った。この LOH 解析の結果をもとに、q23.2 の子宮体がん領域（肺がん領域に含まれる）について、PAC、BAC クローンコンティグの作製、EST マッピングと cDNA クローンの単離、一部領域についてはゲノムシーケンスの決定を行った。また、単離同定された領域内の遺伝子については、SSCP 解析またはヘテロデュプレックス解析およびシーケンス解析を行い、遺伝子変異の有無を検討した。

2. ヒト肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子の単離と解析

前年度までに単離した新規候補遺伝子 *TSLC1* の遺伝子産物の腫瘍原性抑制活性を、肺腺がん培養細胞 A549 に *TSLC1* cDNA をプラスミドを用いて導入した細胞を使って検討した。原発性腫瘍における *TSLC1* 遺伝子の構造異常の有無を、肺非小細胞がん (NSCLC)、肝細胞がん (HCC)、膵がん (PaC) 等の手術材料から得られた DNA を用いて、ヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無の解析、SSCP 解析、ならびに bi-sulfite 処理による遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無の解析を行った。

3. MS-RDA 法によるエピジェネティックな乳腺発がん機構の解析

MS-RDA 法は、ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化し、アダプターを接着後、PCR を行うことで、"*HpaII* amplicon" を作製した。テスター DNA 由来の amplicon と、ドライバー由来の amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。2 サイクル目の PCR 産物全体をプラスミドにクローニングし、各クローンの独立性を検討した。独立な各クローンについて、amplicon の dot blot hybridization により、テスターとドライバーとの違いを検出するか否かをスクリーニングした後、*HpaII* 消化したゲノム DNA の Southern blot 解析により確認した。得られたクローンについて塩基配列の決定とデータベースの解析、さらに免疫組織染色を行った。

4. 発がんのエピジェネティクスに関する研究

9 人のヒト男性肺腺がん由来の高分子 DNA を制限酵素 *Tsp509I* で切断した後、メチル化 DNA 結合カラム (MBD カラム) クロマトグラフィーにより高度にメチル化された DNA 断片を濃縮した。この DNA 断片をクローン化した後 CpG アイランド単離技術 SPM 法により、CpG アイランドに由来する DNA 断片を単離した。単離された DNA 断片をプラスミドベクターにクローン化した後塩基配列を決定した。さらに、単離された CpG アイランドががん特異的にメチル化されているかどうか、および個々の患者におけるメチル化の状態がどのようになっているかについて解析した。またメチル化 CpG アイランドがゲノム上でどのように分布しているかについても解

析した。

5. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

β -catenin と TCF4 転写複合体形成により発現される標的遺伝子群を同定し、大腸発がんの分子生物学的な機構を解明するために、テトラサイクリン調節性プロモータによる発現誘導システムを用い、テトラサイクリンの添加で β -catenin との結合部位を欠き dominant-negative に TCF4 の転写活性を抑制する TCF4 Δ N30 を発現誘導できる大腸がん細胞 DLD-1 Tet-ON TCF4 Δ N30 を樹立した。2色蛍光プローブによる cDNA microarray hybridization 法で約 5,600 遺伝子についてテトラサイクリン誘導前後での発現変化を解析した。また TCF4 Δ N30 を発現誘導にてもたらされる細胞生物学的な変化を形態学的に検討した。

6. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

多くのヒトがんで発現亢進し、E-cadherin による細胞接着を不活化することでがん転移能を高める新規膜糖蛋白 dysadherin の細胞接着抑制機構の解明を細胞外糖鎖構造並びに細胞内領域について進めた。PLC/PRF/5 肝がん細胞株の産生する dysadherin に付加した糖鎖構造を解析するため、可溶性キメラ分子を作製精製し、加水分解後 HPAEC-PAD による chromatography を行った。また、Two-hybrid 法を用いて細胞内領域に結合する分子の同定と、得られた分子の解析を進めた。

7. がん関連遺伝子異常の診断への応用 Blunt-End SSCP 法は遺伝子多型部位

を蛍光標識プライマーを用いて増幅後、得られた PCR 産物を平滑末端化し、蛍光シーケンサーを用いた高濃度非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により対立アレルを単一のピークとして分離検出する方法である。膵がん切除組織の解析では、17p, 18q, 9p について 11 カ所の多型マーカーを用いて解析をおこなった。また経尿道的切除術(TUR)を施行した初発膀胱がん組織および術前および術後に得られた尿を対象として 9p, 9q について合計 8 カ所、17p について 6 カ所の多型マーカーを用いて解析を行い、予後因子としての有用性を検討した。

8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

散发性胃がん 397 例、大腸がん 503 例、HNPCC64 例のがんの組織より、DNA を抽出し、マイクロサテライトマーカーを用いて、マイクロサテライト不安定性 (MSI) を検索した。続いて、MSI 陽性腫瘍を対象に、BAX 遺伝子、beta 2 microglobulin 遺伝子など、様々な遺伝子におけるフレームシフト変異を PCR、電気泳動を用いて検討した。胃、十二指腸、大腸、直腸の消化器がんの多発がん、重複がん患者 22 人の計 57 例のがん組織より、DNA を抽出し、MSI を検索した。また、標的遺伝子のフレームシフト変異を検索した。さらに、DNA 修復遺伝子異常として、hMLH1、hMSH2 遺伝子のタンパク発現を免疫組織学的に検討した。肝細胞がん、ウイルス性慢性肝疾患（肝硬変、慢性肝炎）、非ウイルス性肝疾患（原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、薬剤性肝障害、脂肪肝）、正常肝組織より、DNA を抽出した。

Methylation-specific PCR (MSP)を用いて p16 遺伝子、Bisulfite-SSCP 法を用

いて 14-3-3 sigma 遺伝子の DNA メチル化異常を検討した。14-3-3 sigma 遺伝子は、同様にして胃がん 60 例においても検討した。両遺伝子ともに、各臨床組織を用いて、免疫染色によるタンパク発現の検討を行った。14-3-3 sigma 遺伝子に関しては、さらに Bisulfite-sequencing、培養肝がん細胞株を用いた脱メチル化剤処理実験を行った。

9. 膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構

1990～1996 年に切除された浸潤性膵管がん 67 例（膵管内乳頭腺がん由来の浸潤がん等の特殊型は除外）の肉眼ならびに組織学的所見と、生存率などの臨床病理学的因子について、特に腫瘍結節内の IDPC の有無に着目して検討した。IDPC(+)は「膵管内乳頭状発育を示すがん成分が腫瘍結節内に複数あるもの」とした。IDPC 疑いは IDPC(+/-)とした。膵がんの腫瘍組織あるいは膵がん細胞株を、SCID マウスの膵臓に移植し、膵がんの増殖・浸潤・転移を模倣するモデルを作製した。同所性移植モデルは、膵がん手術材料を洗浄後 1～2mm 角に細切し、3～5 匹の SCID マウス (5 週令、雄) の膵臓に縫着した。3～4 か月後に犠牲死させ、病理学的検索および他の SCID マウスへ同様に継代を行った。

(倫理面への配慮)

手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残った組織を研究に用いることにより患者への不利益はないように行った。組織サンプルの由来する患者の臨床的情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめカルテより調査しておき、研究の過程ではサンプルは無

記名で番号でだけで扱い、患者の個人を特定していない。また、本研究の結果を組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することは行わないことにより、患者のプライバシーは厳守されている。さらに手術にて摘出した標本を、診断のために検索した後には、残りの試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくことに関しては、平成 11 年より、患者に説明の上、同意を得て実施している。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

1. ゲノム解析を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析

11q23.1-q23.3 領域内の多型マーカー 14 種を用い、子宮体がん試料 95 例を対象とした LOH 解析の結果、31 例で 11q23 領域の一部欠失が観察された。最小共通欠失領域として 2 ケ所 (NCAM 近傍と D11S29 近傍) を同定した。NCAM 領域は乳がんの LOH 領域の端に位置し、D11S29 は肺がんの LOH 領域の端に位置していることがわかった。D11S29 近傍については詳細な LOH データとゲノムのドラフトシーケンスに基づき、共通欠失領域が 300 kb であることを推定した。この領域内に存在する遺伝子を検索した結果、2 遺伝子が見い出された。うち 1 遺伝子はこの共通欠失領域全体にまたがるような大きな遺伝子であった。この遺伝子の各エクソンについてヘテロデュプレックス解析法による遺伝子変異の検索と異常を示した試料についてのシーケンス解析を行った。現在までにマイクロサテライト不安定性を示さない子宮体がん試料 72 例のうち、5 例において 8 種類の体細胞遺伝子変異 (ア

ミノ酸置換 7 種、ナンセンス変異 1 種) が見い出されている。

2. ヒト肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子の単離と解析

A549 細胞では、TSLC1 mRNA の発現は、正常肺組織の約 15% 以下に低下していた。そこで TSLC1 の全長 cDNA、ならびに N 端を欠如した蛋白質をコードする cDNA (Δ TSLC1) を発現ベクターにクローン化し A549 細胞に導入し、腫瘍原性を検討した。その結果全長 cDNA を導入した 3 例の細胞では A549 細胞と比較し腫瘍形成頻度が 21%、平均腫瘍容積が 11% に低下し、著明な抑制を認めた。TSLC1 の発現は、この中の 1 例では正常肺の約 7 倍程度 (過剰発現) であったが、他の 2 例では正常肺組織相当量であった。一方、 Δ TSLC1 cDNA を導入した細胞は A549 細胞と同程度の腫瘍原性を示し、抑制活性は認められなかった。Northern blot 解析により、ヒト肺 NSCLC 培養細胞 12 例中 4 例で TSLC1 mRNA の欠如を、A549 を含む 2 例で正常肺組織の 10% 以下の低下を認め、また HCC 8 例中 3 例、PaC 11 例中 8 例で mRNA の低下、欠如を認めた。また、肺 NSCLC 手術材料の 40% 程度で 11q23 の LOH を認めた。LOH を示した 20 例の NSCLC、HCC、PaC のうち、2 例ではフレームシフト、あるいは停止コドン、また残りの 15 例ではプロモーター領域のメチル化を認め、合わせて 85% で 2 ヒットによる不活化を認めた。

3. MS-RDA 法によるエピジェネティックな乳腺発がん機構の解析

1 症例の正常乳腺 DNA をテスター、腫瘍をドライバーにした MS-RDA 法により、

腫瘍で過剰にメチル化された DNA 断片 17 個を分離した。これらのうち 14 個についてゲノム上の由来が判明し、10 個は CpG アイランドに近接した。これらのクローンのメチル化異常の頻度を、14-16 例の乳がんを以て検討した結果、多くのクローンは過半数の乳がんを以て異常を認めた。近傍に既知の遺伝子が存在した *Selenoprotein N*, *GNA11*, *KCNMB1*, *CalDAG-GEFI* について、RT-PCR 法により、発現レベルの変化を検討した。*GNA11* および *CalDAG-GEFI* について、乳がんを以て発現が低下していることを確認した。乳腺上皮で発現している遺伝子が、がん化に伴い発現低下していることを確認するため、*GNA11* および *CalDAG-GEFI* について、免疫組織染色を行った。*GNA11* に関しては、正常な乳腺上皮で発現しているが、乳がんでは発現が極度に低下していることが確認された。*CalDAG-GEFI* については、正常組織中の乳腺筋上皮で発現しており、腫瘍にはその混入がないために、発現が低下したように見えたことが判明した。MS-RDA 法により得られた DNA 断片は、*GNA11* 遺伝子のイントロン 1 の CpG に富む領域由来であった。Southern blot 解析により、この領域は 16 例中 9 例で、過剰メチル化されていた。過剰メチル化を認めた 9 例中 8 例で、*GNA11* の発現低下を認めた一方、過剰メチル化を認めなかった 7 例では、発現低下は認められなかった。遺伝子発現制御に重要とされるプロモーター領域の CpG アイランドに関して、メチル化の有無を、bisulfite 処理後塩基配列を決定することにより、検討した。プロモーター領域は、正常な乳腺由来の培養細胞 HMEC、乳がん細胞株 7 種、7 症例の乳がんを以て、過剰メチル化を認めなかった。イントロン 1 領域に関しても、同様に、bisulfite 処理後、

塩基配列を決定した。HMEC ではほぼ全くメチル化を認めなかったのに対し、乳がん細胞株 7 種では、過剰メチル化を認めた。7 症例の解析では、正常な乳腺組織でもある程度のメチル化を認め、乳がんでは、更にメチル化が強くなることを認めた。

4. 発がんのエピジェネティクスに関する研究

約 6,700 個のプラスミドクローンの塩基配列を決定した結果、約 1,300 個が塩基配列上 CpG アイランドの特徴を有していた。独立な配列は約 600 個であった。このうち約 200 個ががん特異的にメチル化されている CpG アイランド由来のクローンであった。この中にはヒト乳がんメチル化により不活性化されることが報告されている *HOXA5* 遺伝子の CpG アイランドに由来する DNA 断片も含まれていた。既知遺伝子と関連する CpG アイランドとしては、*HOX*、*PAX*、*SOX*、*TBX* 等の転写制御因子の遺伝子の CpG アイランドが数多く見出された。遺伝子によってメチル化の様式は異なり、*HOXA5* 遺伝子のメチル化は両アレルでみられ、*PAX1* 遺伝子のメチル化は片方のアレルでみられた。また *HOX5* 遺伝子のメチル化はがん部 DNA のみならず、多くの患者の非がん部肺組織由来の DNA でも両アレルでみられた。ヒトゲノムのドラフト塩基配列をもとにメチル化 CpG アイランドの染色体上の位置を決定したところ、Y 染色体以外の全ての染色体上にヒト肺腺がんにおけるメチル化 CpG アイランドが存在した。個々の染色体におけるメチル化 CpG アイランドの分布は、多くの場合特定領域に集中していることはなかった。しかし第 7 染色体では *HOXA* 遺伝子群領域に、約 100 キロ塩基対 (kb) 離れて 2 つのメチル化 CpG アイ

ランドが位置し、第 2 染色体では *HOXD* 遺伝子群領域に、約 50kb 離れて 2 つのメチル化 CpG アイランドが位置した。がんにおける CpG アイランドのメチル化が領域単位でおきているかどうかをみるために、*HOXA5* 遺伝子近傍の遺伝子に関し CpG アイランドのメチル化の有無を解析した。その結果、約 10kb 離れたところにある *HOXA4* 遺伝子でもがんにおける CpG アイランドのメチル化および非がん部肺組織由来の DNA において CpG アイランドのメチル化が見出された。さらに離れたところに存在する *HOXA1*、*HOXA9*、*HOXA13* 遺伝子などではがん部 DNA における CpG アイランドのメチル化が見出されたが、非がん部肺組織におけるメチル化はみられなかった。全体として、約 120kb にわたる *HOXA* 遺伝子群領域に存在する 10 個の CpG アイランドは、すべてヒト肺腺がんにおけるメチル化が見出された。また *HOXA5* 遺伝子の CpG アイランドのメチル化がみられなかった症例では、近傍の遺伝子でも CpG アイランドのメチル化はみられなかった。このように *HOXA* 遺伝子群では CpG アイランドのメチル化が集中しておきていた。しかしこの現象は必ずしもその他の領域でもみられるものではなく、例えば第 11 染色体 *PAX6* 遺伝子のエクソン 1A を含む CpG アイランドのメチル化は多くの患者でみられたが、近傍に位置する *PAX6* 遺伝子のエクソン 1B を含む CpG アイランド、*RCN1* 遺伝子の CpG アイランドのメチル化はほとんどみられず、また非がん部肺組織由来の DNA におけるメチル化もみられなかった。個々の患者におけるメチル化 CpG アイランドの数には大きな差があった。ある患者では、単離された CpG アイランドのうちメチル化されていたものは 10%未満であったが、別の患者

では70%以上のCpGアイランドがメチル化されていた。

5. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

Dominant-negative TCF4の誘導にて発現抑制される遺伝子として Multidrug resistance gene-1 (MDR1)を同定した。MDR1 遺伝子のプロモーター領域には複数の β -catenin/TCF4 応答部位があり、実際に家族性大腸腺腫症患者の腺腫組織で β -cateninの細胞内蓄積と相応したMDR1 遺伝子産物 p-glycoproteinの発現亢進を証明した。MDR1 遺伝子は大腸上皮細胞において β -cateninとTCF4の転写複合体の直接の標的遺伝子の一つであると結論した。Dominant-negative TCF4の誘導にてDLD-1細胞の多層化が抑制され、細胞極性の回復がみられた。細胞極性の回復にともない微絨毛の形成とtight junctionタンパク質ZO-1の細胞膜への局在化が観察された。

6. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

PLC/PRF/5肝がん細胞株の産生するdysadherinの全糖組成および糖鎖構造のうち約7割を正確に決定した。NueAc α 2-3 Gal β 1-3 (NueAc α 2-6) GalNAc-Ser/Thr、あるいはNueAc α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 (NueAc α 2-3 Gal β 1-3) GalNAc-Ser/Thrをはじめとする、シアル酸を含みフコースを含まない短い糖鎖抗原、およびそれらからシアル酸の外れた構造が主であった。残りの3割は珍しい構造であるか新規の構造であった。Two-hybrid法を用いて細胞内領域に結合する分子を2つ単離した。そのうち1つは新規セリンスレオニンキナーゼであった。

7. がん関連遺伝子異常の診断への応用

膵がん切除組織27例の解析で9p, 17pおよび18qにおけるLOHの頻度はそれぞれ58%、72.0%、および76.0%であった。欠失群と非欠失群の術後5年生存率は20.0% vs.40.0% (9p, p=0.682), 5.5% vs.83%(17p, p=0.002)および21% vs. 60% (18q, p=0.103)であった。初発膀胱がん37例の解析では、腫瘍組織において24例(65%)、術前尿において25例(68%)の症例で9番あるいは9番+17pの欠失が認められた。9番染色体の欠失はStageあるいは組織学的異型度に関わらず認められる異常であるのに対して、17pの欠失は浸潤性膀胱がんで高率に認められた。このうち、表在性膀胱がんと診断された24例について術後最長約30ヶ月の経過観察を行ったところ、膀胱内再発率は術前尿で染色体欠失を認めなかった群では10例中1例(10%)であったのに対して、欠失を認めた群では14例中11例(78.6%)と有意に高率であった(p=0.048)。

8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

MSIは、散发性胃がん53例(13%)、大腸がん62例(12%)、HNPCC41例(81%)において検出された。様々な遺伝子の中で特に、BAX遺伝子とbeta 2 microglobulin 遺伝子の変異が高率(それぞれ約50%と約40%)に検出された。さらに、両遺伝子の変異とも、いずれのがん種においても予後不良因子であることが明らかになった。一方、他の遺伝子変異は、予後等との相関を認めなかった。消化器がんの多発がん、重複がん患者22例中16例(73%)、57病変中29病変(51%)と散发性単発がん症例に比べ、高率にMSIが

検出された。さらに、多発がん特に多発胃癌において MSI の頻度が高いことを明らかになった。TGFβRII 遺伝子、BAX、IGF1R 遺伝子の変異が検出され、hMLH1、hMSH2 のタンパク発現消失例もみられた。p16 遺伝子のメチル化は、肝細胞がん 22 例中 16 例 (73%)、ウイルス性肝硬変 17 例中 5 例 (29%)、慢性肝炎 17 例中 4 例 (24%) でそれぞれ認められた。一方、非ウイルス性肝疾患、正常肝では認めなかった。免疫染色による検討では、メチル化陽性肝細胞がん全例でタンパク発現消失を認め、メチル化陽性肝硬変、慢性肝炎では、部分的タンパク発現消失を認めた。14-3-3 sigma 遺伝子のメチル化は、肝細胞がん 19 例中 17 例 (89%) において認め、全例タンパク発現が消失していた。一方、肝硬変、慢性肝炎 19 例中 7 例 (37%) において、部分的メチル化を認めた。胃癌 60 例中 26 例 (43%) においてもメチル化が検出された。メチル化陽性培養肝がん細胞株に対する脱メチル化剤処理により、14-3-3 sigma 遺伝子の再活性化、タンパク発現を認めた。

9. 膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構

切除例 67 例の内訳は、男 42/女 25 例、平均 62.1 (44-82) 歳。腫瘍平均径 4.3 (1.5-11.0) cm。IDPC(+) 21 例、IDPC(+/-) 11 例。3~5 年生存例の 80%、5 年以上の 75% は IDPC (+, +/-) 症例であり、IDPC (+, +/-) 症例は他に比べ有意に生存期間が長かった ($p=0.004$)。膵がん細胞株 10 種類を、SCID マウスの膵臓に注入し、造腫瘍性ならびに浸潤・転移性の評価を行った。10 種類全てで、膵局所における造腫瘍性を認めた。その組織像は、高分化型の腺がんから未分化ながんまで様々で、間

質反応を伴い浸潤性の増殖を示すとともに神経周囲浸潤や、リンパ管浸潤の所見もみられ、膵がんの病理像をよく反映したモデルであることが示された。肝転移は、その頻度から、3 グループに分かれ、高転移性が 4 株、中転移性が 4 株、低転移性が 2 株であった。高転移性 4 株の内 2 株では、高率に肺転移も認めた。また膵がん手術材料 10 症例の移植を行い、評価したマウスの腫瘍形成は 100% (10/10) でありかつ全例継代可能であった。リンパ管浸潤や神経周囲浸潤に加えて腹膜播種やリンパ節転移を来すものもみられた。肝転移を来したものは 1 症例のみであったが、この症例は術後早期に肝転移が出現した症例であった。これらのモデルと臨床病理学的因子を比較検討したところ、モデルにおいてリンパ節転移が認められない症例は、手術時のリンパ節転移が認められないか極めて軽度であった。

D. 考察

1. ゲノム解析を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析

11q23 領域には ataxia telangiectasia の原因遺伝子であり、マンツル細胞リンパ腫のがん抑制遺伝子であることが明らかになった ATM 遺伝子や白血病で有名な MLL 遺伝子が存在する。また、大腸がんと肺がんにおいて遺伝子変異が見つかった PPP2R1B (プロテインフォスファターゼサブユニット) 遺伝子や肺がんのがん抑制遺伝子として TSLC1/IGSF4 遺伝子が報告されている。しかしながら、同じく q23 領域に LOH が見られる卵巣がんや子宮がんではこれらの遺伝子の変異は見つからない。本領域にはまだ他にもがんの発生や進展に関与する遺伝子が存在すると考えられる。今回、子宮体がん突然変異を見

い出した遺伝子はがんの悪性化に関与している可能性がある。がん抑制遺伝子としての機能を検討していくとともに、この遺伝子領域は肺がんの LOH 領域にも含まれているため、肺がんにおいても遺伝子変異が検出されるかどうか、また発現が変化していないかどうかを調べる。

2. ヒト肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子の単離と解析

ヌードマウスの腫瘍原性は、当初から肺腺がんに限定された形質とは考えていなかったが、実際に同定した *TSLC1* の異常は、肝細胞がん、膵がんでも認められることが明らかになり、これらのがんの進展に重要な経路を担う分子であると推察される。第 11 染色体 q23 領域の LOH は、上記以外にも、乳がん、大腸がん、子宮がん、神経芽細胞腫等で報告されていることから、他の様々なヒトのがんにも関与していることが示唆される。さらに、A549 細胞は、*TSLC1* 遺伝子以外にも *K-ras*, *p53*, *p16* 等、多数の遺伝子異常が蓄積された悪性度の高い細胞であるが、*TSLC1* 遺伝子を単独で補うのみで有意にヌードマウスの腫瘍原性の低下が認められるということは、この遺伝子産物、ないしその経路が、進行がんの悪性形質を抑える可能性を示唆しており、興味深い。*TSLC1* 遺伝子産物は膜に局在し細胞外ドメインが NCAM に類似することから、細胞接着に関与する可能性が示唆される。N 端を欠如し膜に局在しない Δ *TSLC1* が抑制活性を示さないことは、この考えを支持する。一方、細胞内ドメインは短く、構造類似性から機能を予測することはできない。新たながん抑制経路の発見につながることも期待される。

3. MS-RDA 法によるエピジェネティッ

クな乳腺発がん機構の解析

MS-RDA 法によるゲノム網羅的な解析により、CpG アイランドに近接し、メチル化が変化した DNA 断片を分離した。既知の遺伝子を認めたものに関して、発現の変化を検討、*GNA11* の発現低下を RT-PCR 法及び免疫組織染色で確認した。*GNA11* 遺伝子は、乳がん細胞の増殖抑制作用が知られている gonadotropin releasing hormone (GnRH) のシグナルを伝達すると考えられ、乳腺上皮の増殖抑制作用を持つことが推測される。GnRH アゴニストは乳がんの治療に臨床的に使用されており、治療反応性の予測に役立つ可能性がある。MS-RDA 法により分離された Y01F6 は、*GNA11* 遺伝子のイントロン 1 に由来した。この領域は、CpG に富み、計算上は CpG アイランドの基準を満たした。しかし、bisulfite 処理による詳細なメチル化解析の結果、正常な乳腺でもある程度のメチル化が認められ、腫瘍では、更に強いメチル化を受けることが判明した。従って、イントロン 1 領域は CpG 配列に富むものの、積極的に脱メチル化された状態が保たれる CpG アイランドではないと考えられた。一方、*GNA11* のプロモーター領域の CpG アイランドは、腫瘍でも脱メチル化された状態が保たれていた。*GNA11* のイントロン 1 領域の過剰メチル化は、遺伝子の発現低下によるものである可能性が高い。メチル化異常のゲノム網羅的検索から、遺伝子の同定、その機能解析までの手順が確立した。今後は、一定のプロトコールに従い、メチル化異常が原因で発現が低下した遺伝子の同定が期待できる。

4. 発がんのエピジェネティクスに関する研究

今回の解析で単離されたクローンの中

に既知がん抑制遺伝子が含まれていたことから、ライブラリー全体には、ヒト肺腺がんがメチル化されている多くの未知がん抑制遺伝子およびがん関連遺伝子に由来するDNA断片が含まれていると予想される。また転写因子の遺伝子のCpGアイランドのメチル化が数多く見出されたが、メチル化が発現抑制と関連しているとする、これらの遺伝子の不活性化により、様々な遺伝子の発現異常がおきると考えられる。HOXA5遺伝子の近傍領域はCpGアイランドのメチル化を受けやすい状態にあり、加齢あるいはその他の要因により、CpGアイランドをメチル化から守っている機構の活性低下あるいはDNAメチル化活性の上昇によりCpGアイランドの*de novo*メチル化が進行しがん化の引き金になる可能性が示唆された。

5. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

MDR1遺伝子産物p-glycoproteinの発現抑制、あるいは機能阻害により大腸腺腫形成を抑制し、特に外科的切除を行わなければ確実に発がんに至る家族性大腸腺腫症患者や大腸がんの高危険群での発症予防への応用の可能性があり、今後の検討を要する。細胞極性の消失は腺腫細胞の病理形態学的な特徴の一つであることが古くから知られているが、これが β -cateninとTCF4転写複合体形成による転写活性化によりもたらされていることを初めて明らかにした。細胞極性の消失が腸上皮からの腺腫形成をもたらし機構に関わっている可能性がある。

6. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

Dysadherin分子の細胞接着系の不活性化の機序を明らかにするために、細胞外糖鎖

構造の解析並びに細胞内領域と結合する分子の解析を行った。可溶性キメラ分子を用いて、細胞外ドメインが直接的に細胞間接着を制御している可能性につき更に検討を行う。また血管内皮細胞や扁平上皮の基底細胞の産生する本抗原の糖鎖修飾はPLC/PRF/5細胞株とは異なっており、糖鎖修飾の変化が上皮細胞の悪性化に伴って変化する可能性も考えられるため、様々な細胞の産生する本抗原の糖鎖構造を解析する予定である。細胞内領域と結合するタンパクの存在が示されたが、現在それぞれの分子に対する抗体を作製するとともに、各々の細胞接着抑制機構における役割の解析を行っている。

7. がん関連遺伝子異常の診断への応用

膀胱がんは間質の豊富な腫瘍であり、従来法では正常細胞の混入のため臨床材料を用いた遺伝子欠失の判定は困難であった。Blunt-End SSCP法は正常細胞が80-90%混入した検体からもLOHの解析が可能であり、本法を用いることで膀胱がん切除組織あるいは膀胱がん患者の尿等の臨床検体から直接遺伝子欠失の解析が可能となった。今回の検討で切除膀胱がんの28%で17pが保持されており、このような症例では5年生存率は83%と高率であることが明らかとなった。今回の検討より、17pの欠失の有無は膀胱がんの予後因子として応用可能と考えられる。膀胱がんの多くは表在性で、TURにより切除可能であるが、表在性膀胱がんの約50%は再発し、10%は浸潤性膀胱がんに移行し膀胱摘出術を余儀なくされることが知られている。従って、TUR術後の再発の有無と浸潤性膀胱がんへの悪性進展の有無を予知することは膀胱がんの術後経過観察と治療方針選択のうえで重要である。今回、尿中からの染色体欠失の検出

は術後再発のリスクを判定する予後因子として有用であることが明らかとなった。本法は尿から非侵襲的に染色体欠失の有無を判定することが可能であり、尿細胞診の補助診断法としての有用性が期待される。

8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

MSI 陽性がんにおける BAX 遺伝子変異、beta 2 microglobulin 遺伝子変異の発見、予後との相関は、MSI 陽性腫瘍の標的遺伝子のフレームシフト変異を中心とする発がん・進展機構の理解において大きな意義がある。本知見は、抗がん剤や放射線療法の効果の予測や、さらには、免疫治療や遺伝子治療などへの応用など発展性が期待できる。臨床的にも注目されている多発がん、重複がんにおける MSI さらに DNA 修復遺伝子の異常を明らかにした意義は大きく、今後、さらなる標的遺伝子の発見など研究の発展により多発がん、重複がんの制御が可能となることも期待される。p16 遺伝子の肝発がんの早期におけるメチル化の検出は、慢性肝疾患患者のリスク判定や効果的なフォローアップを可能とする点で臨床的にも意義があり、また、14-3-3 sigma 遺伝子も含め、診断応用に加えて、メチル化を標的とした新しい治療法の開発などへの発展性も期待される。

9. 膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構

浸潤性膵管がんは、浸潤性が強く高度の間質増生を伴うため硬い境界不明瞭な結節を形成することが多いが、腫瘍の結節内に膵管枝内腫瘍成分が残存する症例も少なからず見られる。そこで、膵がん結節内の膵管内乳頭状成分 (IDPC) の存在に注目し、予後との比較を含めその意義について検討

した。IDPC の認められる症例は良好な予後を示すことから、IDPC の存在は浸潤性膵管がんの中で、悪性度の低さを示唆する所見であると考えられた。IDPC は肉眼で microcysts として認識できる場合も多く、画像診断にも応用できる可能性がある。また、これら良好な予後を示す症例の分子生物学的背景につきさらに解析を行う。過去に報告されている転移モデルの多くはヒト由来の膵がん細胞培養株が用いられており、手術材料を用いた転移モデルの報告は数少ない。膵がんの組織像は、豊富な間質を含むことが特徴であることから、手術材料を同所に移植する方法は膵がん本来の転移能を評価するのに適当な方法だと考えられる。今回の検討ではリンパ節転移が高度に認められた症例においてモデルでもリンパ節転移が認められ、実際の症例をよく模倣していると思われた。また組織学的にも実際の症例の病理像とよく対応しており、このモデルは膵がんの浸潤・転移機構の解明を行う上で有用なモデルと思われた。また、培養細胞株を用いた検討でも、多数の株を同時に比較することで、様々な病理像を反映する系が確立できた。今後は、これらの増殖・転移モデルを用いて、浸潤・転移関連分子の同定と同機構の解明、早期診断に有用なマーカーの同定を目指して研究を行う。

E. 結論

本研究は、多段階発がん過程における、ジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常をさらに解明するとともに、発がん初期過程における細胞極性の喪失や浸潤過程での原発巣からの離脱に深く関与すると考えられる細胞接着系の異常が、そのような様々な遺伝子異常と如何に連携してがん化・悪性化に関与しているか解明し、

ヒトがんの発生・増悪の過程を正確に把握して個々の症例に最適な診断・治療法を選択可能とするものである。本年度は、11q23領域内に存在する子宮体がん、肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子の単離、独自に開発した方法によるヒトがんで過剰にメチル化されたDNA断片、CpGアイランドの網羅的単離、 β -catenin/TCF4転写複合体の標的遺伝子の検索、新規転移関連遺伝子dysadherinの機能解析、Blunt-End SSCP法を用いたLOHの予後因子としての有用性の検討、DNA修復遺伝子の異常を有する消化器がんにおける標的遺伝子変異の検討、膵がんの臨床病理学的特性とその分子機構の検討等を行った。今後さらに、遺伝子・分子・細胞レベルでの変化とがんの発生初期から浸潤・転移性増殖を示すに至る臨床・病理像との対応を直接明らかにするとともに、新しいがん治療の標的になると考えられるがんの発生・増悪の分子機構の研究を重点的に行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada, T., Hirohashi, S., et al., Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/ β -catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 60(17): 4761-4766, 2000.
- 2) Naishiro, Y., Imai, K., Hirohashi, S., et al., Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of β -catenin/TCF4-mediated gene transactivation. *Cancer Res.*, 61(6): 2751-2758, 2001.
- 3) Ishii, Y., Hirohashi, S., et al., Integrin β 4 as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, 118(3): 497-506, 2000.
- 4) Maruyama, K., Hirohashi, S., et al., Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology*, 59(4): 302-309, 2000.
- 5) Zhu, X-D, Hirohashi, S., Aberrant expression of β -catenin and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in renal and urothelial carcinomas. *Path. Int.*, 50 (12): 945-952, 2000.
- 6) Sato, H., Hirohashi, S., et al., Expression of cadherins and their undercoat proteins (α -, β -, γ -catenin and p120) and accumulation of β -catenin with no gene mutations in synovial sarcoma. *Virchows Archiv*, 438(1): 23-30, 2001.
- 7) Niki, T., Hirohashi, S., et al., Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 6(6): 2431-2443, 2000.
- 8) Tokunou, M., Hirohashi, S., et al., c-MET expression in myofibroblasts: Role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, 158(4): 1451-1463, 2001.
- 9) Tokunou, M., Hirohashi, S., et al., Altered expression of the ERM proteins in lung adenocarcinoma. *Lab. Invest.*, 80(11): 1643-1650, 2000.

- 10) Moriya, Y., Hirohashi, S., et al., Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in lung adenocarcinomas of small size: an immunohistochemical analysis of 102 cases. *Cancer*, 91(6): 1129-1141, 2001.
- 11) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett.*, 148(1): 73-80, 2000.
- 12) Kondo, Y., Hirohashi, S., et al., Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis - a comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 32(5): 970-979, 2000.
- 13) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CpG islands and pericentromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int. J. Cancer*, 91(2): 205-212, 2001.
- 14) Nishimoto, A., Murakami, Y., Hirohashi, S., et al., Evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene*, 20: 828-835, 2001.
- 15) Niki, T., Hirohashi, S., et al., Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 in blood and lymphatic vessels of lung adenocarcinoma. *J. Pathol.*, in press.
- 16) Ushijima, T., et al., Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res.*, 60: 1092-1096, 2000.
- 17) Higo, K., Ushijima, T., et al., Generation of a polymorphic marker linked to thymoma susceptibility gene of rat 1 by genetically-directed representational difference analysis. *Exp. Anim.*, 49: 189-195, 2000.
- 18) Yamashita, S., Ushijima, T., et al., Construction of a high-throughput rat genetic mapping system with 474 arbitrarily primed-representational difference analysis markers. *Mamm. Genome*, 11: 982-988, 2000.
- 19) Niwa, T., Ushijima, T., et al., Isolation of a genetic marker linked to the *Bh* gene by genetically directed representational difference analysis of closed colony Japanese quails. *Zoological Science*, 18: 37-41, 2001.
- 20) Kuramoto, T., Ushijima, T., et al., Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 559-564, 2001.
- 21) Watanabe, N., Ushijima, T., et al., Single nucleotide instability without microsatellite instability in rat mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 61: 2632-2640, 2001.
- 22) Shiraishi, M., et al., Segregation of partly melted molecules and its application to the isolation of methylated CpG islands in human cancer cells. *Gene Ther. Mol. Biol.*, in

press.

23) Shimada, H., Ohki, M., et al., Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21)

fusion protein AML1-MTG8:

Overexpression of the *TIS11b* (*ERF-1*, *cMG1*) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood*, 96: 655-663, 2000.

24) Shimizu, K., Ohki, M., et al., AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the upregulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *Blood*, 96: 288-296, 2000.

25) Murakami, Y., et al., Construction of human-rodent hybrids containing fragments of human chromosome 10p. *J. Hum. Genet.*, 45: 370-373, 2000.

26) Kanamori, M., Sugano, K., Murakami, Y., et al., Microsatellite instability and the *PTEN1* gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the *hMLH1* gene. *Oncogene*, 19: 1564-1571, 2000.

27) Kuchiki, H., Murakami, Y., et al., Detection of amplification of a chromosomal fragment at 6p21 including the *Cyclin D3* gene in a glioblastoma cell line by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer*, 85: 113-116, 2000.

28) Fukuhara, H., Murakami, Y., et al., Functional evidence for the presence of tumor suppressor gene on chromosome 10p15 in human prostate cancers. *Oncogene*, 20: 314-319, 2001.

29) Kuramochi, M., Murakami, Y., et al., *TSLC1* is a tumor suppressor gene in human non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.*, in press.

30) Kanbe, T., Murakami, Y., et al., Four single-nucleotide polymorphisms in the human *BUB1* gene. *J. Hum. Genet.*, in press.

31) Sugano, K., et al., Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissues and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 89: 329-336, 2000.

32) Nomura, S., Sugano, K., et al., Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of hMSH2 and hMLH1 in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271: 120-129, 2000.

33) Shigyo, M., Sugano, K., et al., Molecular follow-up of newly diagnosed bladder cancer using urine samples. *J. Urol.*, in press.

34) Maekawa, M., Sugano, K., et al., Heterogeneity of DNA methylation status analyzed by bisulfite-PCR-SSCP and correlation with clinicopathological properties in colorectal cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.*, in press.

35) Ichikawa, A., Sugano, K., et al., DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, in press.

36) Takekawa, T., Imai, K., et al., p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a

negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.*, 19: 6517-6526, 2000.

37) Yamashita, K., Imai, K., et al., Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut*, 46: 790-794, 2000.

38) Iwata, N., Imai, K., et al., Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 19: 5298-5302, 2000.

39) Suzuki, H., Imai, K., et al., Inactivation of 14-3-3 sigma gene is associated with 5'CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.*, 60: 4353-4357, 2000.

40) Kaneto, H., Imai, K., et al., Detection of hypermethylation of the p16INK4A gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut*, 48: 372-377, 2001.

41) Yamamoto, H., Imai, K., et al., Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathological and prognostic significance of matrix metalloproteinase expression. *J. Clin. Oncol.*, 19: 1118-1127, 2001.

42) Shirakawa, K., Imai, K., et al., Gene targeting Flt-1 and Tie2 inhibits tumor growth and metastases on WIBC-9, a human inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.*, in press.

43) Yamamoto, H., Imai, K., et al., Somatic mutation of the $\beta 2$ -microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology*, in press.

44) Genda, T., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab. Invest.*, 80(3): 387-394, 2000.

45) Saito, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 33(3): 561-568, 2001.

46) Takamura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*, 33(3): 577-581, 2001.

47) Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Cloning and characterization of a novel gene, *DRH1*, down-regulated in advanced human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7(2): 297-303, 2001.

48) Fukushima, N., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Expression of laminin-5 gamma 2 chain in intraductal papillary-mucinous tumors of the

pancreas. Mod. Pathol., in press.

49) Fukushima, N., Sakamoto, M.,
Hirohashi, S., et al., Intraductal
papillary components in invasive ductal
carcinoma of the pancreas are

associated with long-term survival of
patients. Hum. Pathol., in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

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

発がんと浸潤・転移への細胞接着系異常の関与

分担研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：ヒトがん組織における Wnt シグナル系の発がん転移への関与を示してきたが、今回 β -catenin と TCF/LEF の転写複合体の新しい標的遺伝子の一つとして、Multidrug resistance gene-1 (MDR1) を同定した。MDR1 遺伝子のプロモーター領域には複数の β -catenin/TCF 4 応答部位があり、実際に家族性大腸腺腫症患者の腺腫組織で β -catenin の細胞内蓄積と相応した MDR1 遺伝子産物 p-glycoprotein の発現亢進を証明した。さらに大腸上皮細胞における β -catenin /TCF4 経路の活性化が、細胞極性の喪失に関わっていることを示した。また N 末を欠いた β -catenin に結合する分子として、膜突起部に局在する PDZ domain を持つ分子を同定し、この分子は TCF/ β -catenin 複合体の転写活性を増強することを示した。がんにおけるカドヘリン細胞接着系の不活化の様々なメカニズムを明らかにし、それらが、がんの病態、浸潤・転移性とよく相関することを見出してきた。本年度は、がんで発現が亢進し、カドヘリン機能を不活化することで転移を更新する新規分子 Dysadherin につき、細胞外糖鎖構造の解析ならびに細胞内領域と結合する分子の解析を行った。

A. 研究目的

ヒトがんの発生・増悪の過程を正確に把握して個々の症例に最適な診断・治療法を選択可能とすると同時に、新たな診断・制御法開発のための基盤として、多段階発がんのメカニズムの研究を遺伝子・分子・細胞レベルで総合的に推進する。これまでの研究で、少なくとも一部のがんにおいては、異形成・腺腫から上皮内がんそして浸潤・転移能を有する進行がんへと多段階的に発生・増悪する過程が明らかになり、その過程で、いわゆる古典的ながん抑制遺伝子の不活化、がん遺伝子の活性化以外に、カドヘリン細胞接着系をはじめとする様々な機能分子の異常が生じていることを明らかにしてきた。本研究では、発がん初期過程における細胞極性の喪失や浸潤過程での原発

巣からの離脱に深く関与すると考えられる細胞接着系の異常が、このような多段階発がん過程における、ジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常と如何に連携してがん化・悪性化に関与しているか解明する。

これまでの研究により、細胞接着分子の不活化機構ならびに同分子とがん遺伝子・がん抑制遺伝子産物との相互作用の解明が進み、既にその下流で働くと考えられる新たな発がん・転移関連遺伝子の候補が得られつつある。具体的には、カドヘリン-カテニン細胞接着の不活化機構として、遺伝子突然変異、遺伝子発現調節領域の DNA メチル化による発現低下、さらに増殖因子からのシグナルによる β カテニンのチロシンリン酸化に加えて、がん細胞に高発現し