

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. 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。

2. N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離

蛋白質相互作用を検知する Far-western 法を用いて、N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離を試みた。N 末を欠いた human β -catenin を大腸菌内にて GST 融合蛋白質として作製精製し、in vitro において ^{32}P γ -ATP と bovine protein kinase A を用いて標識し、プローブとして用いた。 λ gt-11 を用いて作製した Human brain cDNA library をスクリーニングし、再現性の見られるクローンを単離した。更に、得られたクローンについて解析を進めた。

3. 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なら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。

(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。又、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、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. 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。

2. N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離

2×10^6 クローンをスクリーニングした結果、4 つの陽性クローンを得た。そのうちわけは、がん抑制遺伝子産物 APC, 新規 cadherin family 分子、細胞骨格関連分子、新規分子であった。得られた分子の中で、PDZ domain を持つ分子について検討した。Tag を用いた免疫沈降と Western blot により、 β -catenin との結合を確認した。また luciferase reporter assay により、この分子は TCF/ β -catenin 複合体の転写活性を更に増強することを示した。

3. 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 (NeuAc 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。

D. 考察

1. 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癌に至る家族性大腸腺腫症患者

者や大腸癌の高危険群での発症予防への応用が期待できる。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す機構に関わっている可能性がある。

2. N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離

β -catenin は大腸がん、子宮内膜がん、肝がんなど複数の腫瘍で遺伝子異常が報告されており、その機能の解明はがんの発生あるいは悪性化の機構の理解に重要と考えられる。既に、N 末を欠いた β -catenin が胃がんならびに大腸がん細胞株の形態変化と腹膜播種の抑制を来たすことを報告しており、その機構の解明の為に結合分子の単離を試みた。今回検討した PDZ domain を持つ分子は、免疫沈降法により細胞内でも結合していることが確認された。この分子は、細胞骨格と膜分子を繋ぐ分子であり、膜突起部に局在していることが報告されている。 β -catenin も、細胞運動時あるいは接着初期には膜突起部に局在することが知られており、今回単離された分子を含めた複合体を形成している可能性が考えられた。また APC も膜突起部に局在し、細胞形態あるいは運動の調節に関与しているとの報告もあり、これらの複合体がどのようにがん細胞の浸潤転移の際に見られる細胞形態変化あるいは運動性亢進に関与しているかについて今後さらに研究を進めていく予定である。また、臨床検体におけるこの分子の発現を調べることで、がんの悪性化における役割を検討する。

3. 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化の機序を明らかにするために、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。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さらに検討を行う。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。

E. 結論

本研究は、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、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、 β -catenin/TCF4 転写複合体の標的遺伝子の検索、N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離、新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析を行った。今後さらに、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) 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.

15) Nishimoto, A., Murakami, Y., Hirohashi, S., et al., Evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene*, 20: 828-835, 2001.

16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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

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

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部長

ゲノム包括的・網羅的な DNA メチル化の解析法である methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法により、ヒト乳がん過剰にメチル化された DNA 断片 17 個を分離し、それらに近接する CpG アイランド及び遺伝子を探索した。その結果、三量体 G 蛋白質の α サブユニットの一つをコードする *GNA11* 遺伝子のイントロン 1 の CpG に富む領域が、ヒト乳がん 16 例中 9 例で過剰メチル化されていることを見いだした。そのうち 8 例で、RT-PCR 法及び免疫組織染色法により、発現低下を認めた。しかし、*GNA11* 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにはメチル化は認められず、同遺伝子のイントロン 1 領域のメチル化は、発現低下に伴うものと考えられた。*GNA11* 遺伝子は、乳がん細胞の増殖抑制作用をもつ gonadotropin releasing hormone のシグナルを伝達すると考えられる。現在、乳がん細胞株に *GNA11* 遺伝子を導入し、*GNA11* 遺伝子の発現が乳がん細胞の増殖に及ぼす影響を検討中である。本年度までに確立したメチル化異常の解析手順により、プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化が原因で発現が低下している遺伝子を、来年度以降、検索する。

A. 研究目的

DNA メチル化は、DNA メチル基転移酵素の働きにより、DNA 複製後も保存される。また、CpG アイランドのメチル化は、ヒストンアセチル化やクロマチン構造の変化を通じて、遺伝子の転写を抑制する。近年、*p16*, *RB*, *VHL*, *BRCA1* などの重要ながん抑制遺伝子が、CpG アイランドの過剰メチル化により、サイレンシングを受ける場合があることが知られるようになった。分担研究者らは、1997 年、未知の遺伝子も含め、ゲノム内の DNA メチル化の変化を網羅的に検索する methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法を開発した。

乳がんは、増加傾向にあり、日本人女性では、胃がん、肺がんに次ぐ、第三位のがん死の原因である。乳がんでは、*p53* 遺伝子の突然変異による不活化、*p16* 遺伝子の過剰メチル化によるサイレンシングが、それぞれ、20-30%程度認められる。しかし、多くの乳がんでは、その原因となる遺伝子・エピジェネティック異常は不明である。そこで、本研究では、MS-RDA 法を活用し、ヒト乳がん、発現とメチル化が変化した遺伝子を同定することを目的とする。

メチル化を指標に、発がんに関与する遺伝子をクローニングする手法は、生理的な発現量が少ない遺伝子でも、その発現の変化の制御にメチル化が関与していれば容易に同定できる点で、cDNA に基づく各種の網羅的方法よりも優れている。また、メチル化により発現が制御される遺伝子は、細胞の分化と

密接に関連しているものが多く、メチル化を指標にすることで、サイレンシングを受けたがん抑制遺伝子、もしくは、その発現低下が発がんに重要な役割を果たす遺伝子を同定できると期待される。

B. 研究方法

(1) 材料

ヒト乳がんの手術材料について、インフォームドコンセントを得た後、病理学的検索に不要な、腫瘍及び正常部分を採取した。現在まで、16 症例について、検体を収集した。DNA は Phenol/chloroform 法により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) MS-RDA 法

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”を作成した。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。

(3) 塩基配列の決定とデータベースの解析

塩基配列は、サイクルシーケンシング法により、決定した。GenBank の検索は、web site にて、ヒト

ゲノムドラフト配列を対象に行った。

(4) RT-PCR

イントロンを挟むプライマーを設計し、GAPDH またはβ-actin を対照に、最小限のサイクル数の PCR を行った。

(5) 免疫組織染色

ウサギ抗ヒト *GNAI1* 抗体は Santa Cruz 社から購入し、マウスモノクローナル抗ヒト *CalDAG-GEFI* 抗体は、九州大学川寄博士から供与を受け、ABC 法により組織染色を行った。

(6) 倫理面への配慮

手術材料は、インフォームドコンセントを取得し、採取した。

C. 研究結果

(1) MS-RDA 法

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 (表)。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 例の乳がん検討の結果、多くのクローンは過半数の乳がん検討で異常を認められた。

(2) 発現レベルの変化の検討

近傍に既知の遺伝子が存在した *Selenoprotein N*, *GNAI1*, *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。

GNAI1 及び *CalDAG-GEFI* について、乳がん検討で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、*GNAI1* 及び *CalDAG-GEFI* について、免疫組織染色を行った。*GNAI1* に関しては、正常な乳腺上皮で発現しているが、乳がん検討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。

(3) *GNAI1* 遺伝子のメチル化と発現低下の相関

MS-RDA 法により得られた DNA 断片は、*GNAI1* 遺伝子のイントロン 1 の CpG に富む領域由来であった (図 1)。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、*GNAI1* 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、過剰メチル化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 (図 2)。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 症例の乳がん検討で、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、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

表 MS-RDA 解析により得られた DNA 断片の一覧

Clone	Sequence of the clone				Result of database search			Map position	Incidence of hyper-methylation
	Length (bp)	CpG score	GC (%)	Repetitive sequence	Genomic sequence	CpG islnad	cDNA		
Y0IA5*	737	0.37	67.0	-	AC015557(1)	-	-	15	9/14
Y0IC6*	538	0.40	67.5	-	AL020996	Bordedine	<i>SelenoproteinN</i>	1p36	11/14
Y0IC10	670	0.27	61.5	-	AL356753	No	-	10	6/14
Y0ID4	447	0.61	65.1	-	AC009042	Yes	-	16q13*	6/14
Y0ID8*	313	0.93	64.9	-	AC026020	Yes	-	3p24*	8/14
Y0IE1*	579	0.74	65.7	-	-	Yes	-	1q24*	8/14
Y0IE7*	491	0.62	67.5	-	AL365356	Yes	-	10p14*	9/14
Y0IFI	240	0.68	61.5	-	AC003002	Yes	<i>Putative exons</i>	19q13.4	5/14
Y0IF2	233	0.05	57.1	LINE/L2	AP002354	No	-	11q14	3/14
Y0IF6*	750	0.71	67.5	DNA/MER	AC005262	Bordedine	<i>GNAI1</i>	19p13.3	9/16 ^b
Y0IF7	289	0.86	66.1	-	AL158844	Yes	<i>MCT1</i>	1p12	6/14
Y0IG2	433	0.87	66.0	-	AC025569	Yes	<i>KCNMB4</i>	12q13*	5/14
Y0IG10	541	0.64	66.8	-	AL138846	Yes	-	1p	5/14
Y0IG12	288	0.18	56.6	-	AC012118	No	-	17	6/14
Y0IH7	417	0.28	49.5	LINE/L2	AL021395	No	-	20q12-13	6/14
Y0IH12	575	0.37	53.8	-	-	-	<i>EST (T09139)</i>	17q12-21*	6/14
Y0IK6*	318	0.65	70.5	-	AC000134	Yes	<i>CalDAG-GEFI</i>	11q13	8/16 ^b

(1) 1083bp fragment

*: Clones with half or more incidence

†: mapped using a radiation hybrid panel

^b: Y0IF6 and Y0IK6 were analyzed in 16 cases since they were flanked by *GNAI1* and *CalDAG-GEFI*

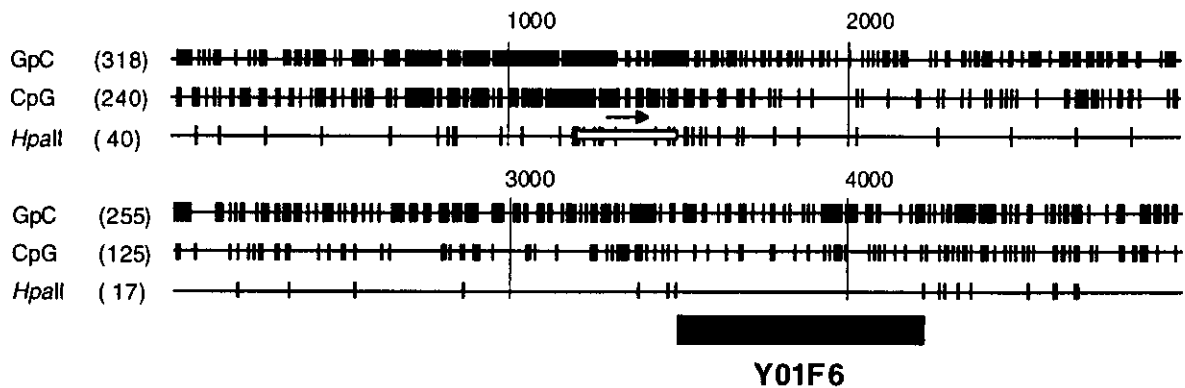


図1 *GNA11* 遺伝子の構造と MS-RDA 法により分離された DNA 断片 Y01F6

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。

D. 考察

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

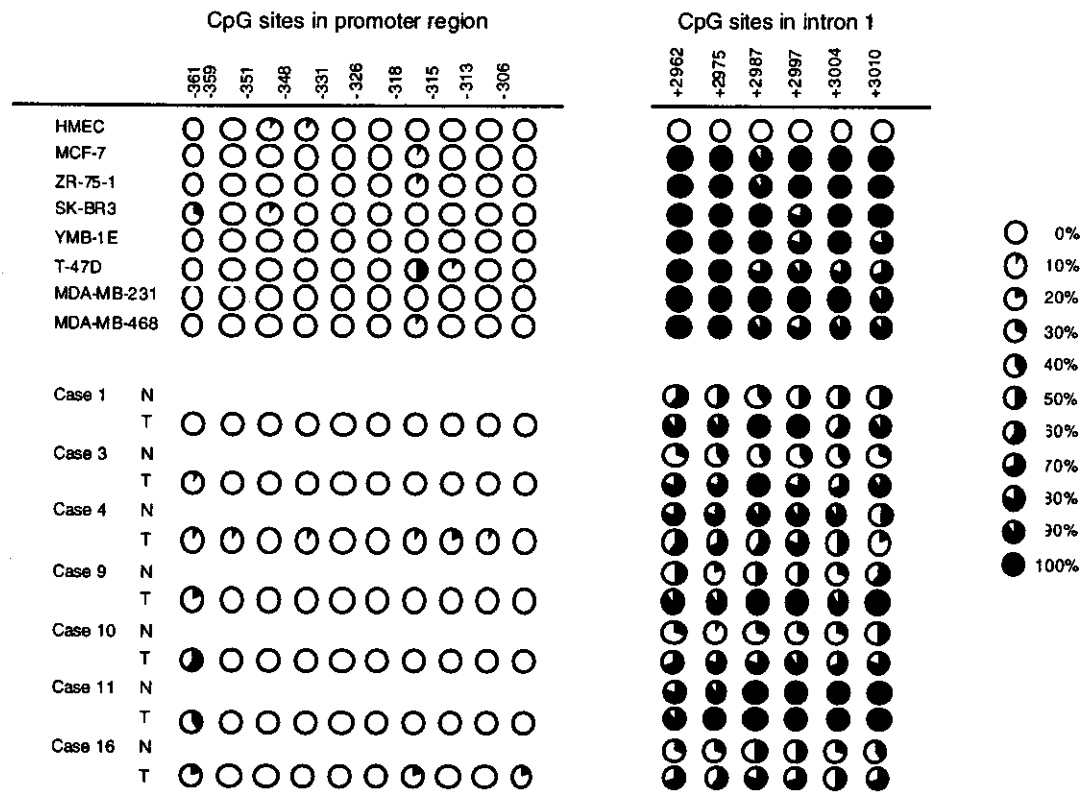


図2 *GNA11* 遺伝子プロモーター領域とイントロン 1 領域のメチル化

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。

E. 結論

ゲノム網羅的なメチル化変化の検索法である MS-RDA 法により、ヒト乳がんでは *GNA11* 遺伝子のイントロン 1 領域がメチル化されていること、それと相関して発現が低下していることを見いだした。

F. 健康危険情報 特に該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Ushijima, T., Yamamoto, M., Suzui, M., Kuramoto, T., Yoshida, Y., Nomoto, T., Tatematsu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res.*, 60: 1092-1096 (2000).
2. Higo, K., Ushijima, T., Oyabu, A., Ye, C., Yagyu, S., Takahashi, H. and Matsuyama, M. 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).
3. Yamashita, S., Yoshida, Y., Kurahashi, A., Sugimura, T., and Ushijima, T. Construction of a high-throughput rat genetic mapping system with 474 arbitrarily primed-representational difference analysis markers. *Mamm. Genome*, 11: 982-988 (2000).
4. Niwa, T., Yamashita, S., Nakamura, A., Shiojiri, N. and Ushijima, T. 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).
5. Kuramoto, T., Kitada, K., Inui, T., Sasaki, Y., Ito, K., Hase, T., Kawaguchi, S., Ogawa, Y., Nakao, K., Barsh, G. S., Nagao, M., Ushijima, T. and Serikawa, T. Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 559-564 (2001).
6. Watanabe, N., Okochi, E., Hirayama, Y., Shimada, Y., Yanagihara, K., Yoshida, M. C., Takahashi, S., Mochizuki, M., Sugimura, T., Nagao, M. and Ushijima, T. Single nucleotide instability without micro-satellite instability in rat mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 61:2632-40 (2001).

(2) 学会発表

1. 高井大哉、若園邦子、杉村隆、牛島俊和 ヒト非小細胞肺癌における endothelin-1 の過剰なメチル化および発現の低下 第 59 回日本癌学会ミニシンポジウム、2000 年 9 月
2. 吉田幸成、稲田健一、八木由紀子、立松正衛、杉村隆、今井浩三、牛島俊和 胃の腸上皮化生における integrin $\alpha 6$ の脱メチル化と異常な発現 第 59 回日本癌学会ミニシンポジウム、2000 年 9 月
3. 牛島俊和 単クローナル、他クローナルな疾患でのメチル化異常 第 23 回日本分子生物学会年会、ワークショップ、2000 年 12 月
4. Ushijima, T. Genome scanning for aberrant CpG methylations in human breast cancers. 15th Workshop on France-Japan Cooperative Cancer Research Program, Strasbourg, France. October, 2000.
5. Asada, K., Miyamoto, K., Takai, D., Yagi, Y., Wakazono, K., Sugimura, T., and Ushijima, T. Genome-scanning for aberrantly methylated genes in human cancers. 31st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo. November, 2000.
6. Ushijima, T. A genomic scanning method

for differential methylation: "Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)" Genomic Imprinting Workshop, Osaka. January, 2001.

H. 知的所有権の出願・登録状況
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

発がんのエピジェネティクスに関する研究

分担研究者 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

研究要旨

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、ヒト肺腺がんではメチル化されている CpG アイランド約 200 個を単離した。特定の染色体にメチル化 CpG アイランドが集中していることはなかったが、HOXA、HOXD 遺伝子群領域にはメチル化 CpG アイランドが数多く存在した。ヒト培養がん細胞における E-カドヘリン遺伝子の CpG アイランドメチル化による不活性化の分子機構について解析した。発現が抑制されている細胞間で、メチル化様式、ヒストンアセチル化様式、メチル化 CpG 結合蛋白質の結合に多様性が存在し、同じ遺伝子の不活性化でも、メチル化様式に対応した複数の抑制機構が存在することを示した。

A 研究目的

メチル化 CpG アイランドの網羅的単離、CpG アイランドのメチル化による遺伝子発現抑制機構の解明を通し、ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の実体を明らかにする。

B 研究方法

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。

ヒト培養がん細胞における E-カドヘリン (*CDH1*) 遺伝子のメチル化を MBD カラムクロマトグラフィーおよび重亜硫酸修飾法で解析した。クロマチン構造の変化は DNase 感受性部位の有無の解析により、また転写因子の結合の有無は *in vivo* フットプリント法により行った。CpG アイランド中の特定塩基配列へのアセチル化ヒストン、メチル化 CpG 結合蛋白質の結合は、それぞれの蛋白質に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により行った。

C 研究結果

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では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 *HOXA5* 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。更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つ

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。

CDH1 遺伝子の発現が抑制されている培養がん細胞で、CpG アイランドはさまざまな状態にメチル化されていた。膀胱がん細胞 T24 では高密度なメチル化、胃がん細胞 HSC41 では低密度なメチル化、肝がん細胞 Li21 ではプロモータ領域を含まない CpG アイランドの 3' 領域が密度高くメチル化されていた。

ヒストンのアセチル化は、T24、HSC41 は共に H3、H4 とも脱アセチル化されていた。Li21 では H3 は低アセチル化状態にあったが、H4 はアセチル化されていた。

T24、HSC41 ではメチル化 CpG 結合蛋白質 MeCP2 が結合していたが、Li21 では MeCP2、MBD1 が結合していた。

このような相違にもかかわらず、結果として T24、HSC41、Li21 全てプロモータ領域のクロマチン構造の変化により転写因子が結合できない状況が生じ、発現抑制がおきていることが明らかになった。

D 考察

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、ヒト肺腺がんでは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、さまざま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。

同じ遺伝子であっても、発現抑制と関連した CpG アイランドのメチル化、ヒストンアセチル化、メチル化 CpG 結合蛋白質の結合には多様性があった。メチル化の程度に応じ、異なる転写抑制複合体がどのように使い分けられているかを明らかにすることは、今後の重要課題である。

E 結論

ヒト肺腺がんにおいてがん特異的にメチル化されている CpG アイランドを約 200 個単離した。このうちのいくつかは染色体上の特定領域に集中して存在した。

CpG アイランドのメチル化を介した遺伝子の不活性化には、メチル化の程度と関連した異なる機構が存在することを明らかにした。

G 研究発表

1 論文発表

1. Shiraishi, M., Lerman, L. S., Oates, A. J., Xu, L., Chuu, Y. H., Sekiguchi, A., and Sekiya, T. 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.

2 学会発表

1. Shiraishi, M. Segregation of partly melted molecules and its application to the isolation of methylated CpG islands in human cancer cells. *Gene Therapy & Molecular Biology Conference*, 2000.
2. 小井詰史郎、関谷剛男、広橋説雄、白石昌彦 遺伝子発現の抑制と関連した CpG アイランドのメチル化とヒストンアセチル化の多様性 第 59 回日本癌学会総会、2000.
3. 白石昌彦、関口あづみ、関谷剛男 ヒト肺がんにおいてメチル化されている CpG アイランドの網羅的単離 第 59 回日本癌学会総会、2000.
4. Shiraishi, M. Comprehensive isolation of CpG islands methylated in human cancer and molecular mechanism of gene

silencing by CpG island methylation. The 31st Internal Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. 2000.

5. 白石昌彦、関口あづみ、Michael Terry、Adam Oates、宮本裕二、Ying Chuu、関谷剛男 ヒト肺がんにおいてメチル化されている CpG アイランドの網羅的単離 第 23 回日本分子生物学会年会、2000.
6. 小井詰史郎、関谷剛男、白石昌彦 CpG アイランドのメチル化およびヒストンアセチル化の多様性と関連した遺伝子発現抑制 第 23 回日本分子生物学会年会、2000.

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 大木 操 国立がんセンター研究所 腫瘍ゲノム解析・情報研究部長

研究要旨：11番染色体長腕部について子宮体がん、神経芽細胞腫を対象として詳細なLOH解析を行い、共通欠失領域を11q23.3のそれぞれ0.3 Mb、0.6 Mb領域に限定した。子宮体がんの欠失領域は肺がんにて検出された欠失領域に含まれていた。これらの領域を含む3.5 Mb、および乳がんの共通欠失領域である11q23.1の2.5 Mbについてゲノムシーケンス解析を含めた徹底的なゲノム解析を行った。その結果、乳がん領域から30遺伝子、子宮体がん領域から2遺伝子、神経芽細胞腫領域から19遺伝子を同定した。子宮体がんについては体細胞突然変異を1遺伝子内に見い出した。

A. 研究目的

がん発生の第一次標的となる遺伝子異常に関する知見の蓄積に比べて、がんの進展や悪性度、治療効果など個々のがん症例により性質が大きく異なる原因については未解明な点が多い。本研究では特にがんの進展や悪性化の機構解明を目指して、神経芽細胞腫、乳がん、肺がん、子宮がん、卵巣がんなど多くのがんにおいて高頻度に欠失の見られる11q23領域に注目し、領域内に想定されるがん抑制遺伝子の単離、解明を目的とした。

B. 研究方法

我々は以前から行ってきた11番染色体のゲノム解析に基づき、11番染色体に異常をもつがんを中心に研究を進めてきた。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て、共通欠失領域をより細かく同定する目的で、神経芽細胞腫についてはよく知られているN-myc増幅や1p36領域の染色体欠失が見られない患者試料69例を選択し、さらにq23領域より新規に多型マーカーを分離することによって共通欠失領域を狭めることができるかどうか検討した。また、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。

これらLOH解析の結果をもとに、q23.1の乳がん領域、q23.2の子宮体がん領域（肺がん領域に含まれる）、q23.3の神経芽細胞腫領域それぞれについて、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ープレックス解析およびシークエンス解析を行い、遺伝子変異の有無を検討した。

本研究を行うにあたって、手術標本からの組織採取に際しては、「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究」により検討される基準に従い患者への説明と同意を得ると共に、患者のプライバシーを厳守する。

C. 研究結果

1. 乳がん領域の解析

乳がんのLOH領域は11q22-23のかなり広範囲な領域に渡っており、限定することが困難な状態にある。我々が今回対象とした乳がん領域はq23.1のD11S927-D11S1347間の2.5 Mb領域である。全領域をカバーするPAC, BACクローンコンテイングを作製し、それらの上に35個のESTをPCRマッピングした。未同定ESTより全長cDNAの単離を行い、既知遺伝子11個とノーザンブロットでシグナルが検出される新規遺伝子として9個の計20遺伝子を同定した。またゲノムシークエンスデータベースの解析から別個に4遺伝子を見い出した。これらのうちラディキシン (RDX) 遺伝子、KIAA0781 (セリンスレオニンプロテインキナーゼ) 遺伝子、KIAA1391 (RhoGAP類似タンパク質) 遺伝子および新規遺伝子であるhM3/LI6、LI4、LI5遺伝子については乳がん試料128例または96例用いてのSSCP解析を行った。アミノ酸置換を伴う1塩基置換がラディキシン 遺伝子を除く他の遺伝子内に見つかったが、いずれも頻度が低く、正常組織からの試料と比較した結果、胚細胞変異であることがわかっ

た。

2. 神経芽細胞腫領域の解析

N-myc遺伝子増幅や1p領域のLOHが認められない神経芽腫患者試料69例を対象として18種の多型マーカーを用いてLOH解析を行った。その結果、38例に共通してq23領域のLOHが観察された。さらにマーカーを増やしてNot I地図上にマッピングするとともに、それを用いた詳細なLOH解析を行った。その結果、悪性度の高い症例を中心にq23.3領域内に1.3 Mbの共通欠失領域を同定した。そこでこの1.3 Mb領域のBACコンテイング地図を作製し、ほぼ完全なゲノムシークエンスを決定した。決定したシークエンスから新規のマイクロサテライトマーカーを探索してLOH解析の新しいマーカーとした。また、遺伝子予測プログラムとcDNAライブラリースクリーニングを併用することにより、1.3 Mb領域中に30遺伝子を同定した。新規のマイクロサテライトマーカーによるLOH解析により、最小の共通欠失領域は500 kbと同定され、この領域には19の遺伝子が存在することが判明した。現在、これら遺伝子についてdirect sequencingの方法によって遺伝子変異の検索を進めている。

3. 子宮体がん領域の解析

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ヶ所 (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クエンスに基づき、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。この遺伝子の各エキ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。

D. 考察

11q23領域にはataxia telangiectasiaの原因遺伝子であり、マント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、大腸がんや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頸がんではこれらの遺伝子の変異は見つかっていない。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、子宮体がんが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たい。乳が

ん領域、神経芽細胞腫領域については同定した遺伝子についての網羅的な突然変異のスクリーニングが必要であると考えられるが、乳がんについては最近発現について異常の見つかる場合が多く報告されてきているので、領域内の遺伝子についての発現解析を積極的に進めたい。

E. 結論

本研究において、多くのがんで染色体部分欠失が見られる11q23領域内に、子宮体がんが体細胞遺伝子変異を起こしている新規の遺伝子を見い出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Shimizu, I. Kitabayashi, N. Kamada, T. Abe, N. Maseki, K. Suzukawa, M. Ohki.: AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *Blood*, 96, 288-296, 2000.

2) H. Shimada, H. Ichikawa, S. Nakamura, R. Katsu, M. Iwasa, I. Kitabayashi, M. Ohki.: 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.

2. 学会発表

1) 第59回日本癌学会総会

新井康仁、久保 崇、細田文恵、豊田 敦、服部正平、榊 佳之、添田栄一、中川原章、大木 操：ヒト11番染色体q23がん抑制遺伝子領域のゲノム解析。

2) 第 59 回日本癌学会総会

久保 崇、新井康仁、中川原 章、大木
操：神経芽腫における11q領域のヘテロ
接合性消失の解析.

3) 第 23 回日本分子生物学会年会

赤羽 努、細田文恵、福島美智代、新井
享子、桑原泰子、新井康仁、津田 均、
広橋説雄、添田栄一、大木 操：ヒト11
番染色体q23.1の癌抑制遺伝子領域コンティ
グ作製と遺伝子変異の検索.

厚生科学研究費補助金（がん克服研究事業）

（総括・分担）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に関する研究

分担研究者 村上 善則 国立がんセンター研究所・室長

研究要旨

第 11 染色体 q23 領域に存在するヒト肺非小細胞がん (NSCLC) 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。*TSLC1* cDNA をヒト NSCLC 細胞 A549 に導入すると腫瘍原性を著明に抑制し、また 11q23 のヘテロ接合性の消失を示す原発性 NSCLC、肝細胞がん、膵がんの 85% で *TSLC1* のプロモーター領域のメチル化、または塩基配列変異による 2 ヒットの不活化が認められたことから、その異常は多くのヒトのがんの進展に関わると考えられ、遺伝子産物は、アミノ酸構造から細胞接着に関与すると考えられる。

A. 研究目的

YAC、PAC クローンのヒト細胞への移入等の技術を用いた遺伝的相補実験による腫瘍原性抑制と、ゲノムの構造解析を組合せることにより、他の方法では同定が不可能な、非遺伝性肺非小細胞がんの 11q23 に存在するがん抑制遺伝子を単離、同定し、その機能解析を行う。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. 新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の同定：
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。

2. ヒト腫瘍における *TSLC1* 遺伝子の異常の検索：

原発性腫瘍における *TSLC1* 遺伝子の構造異常の有無を、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、並びに 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。なおヒト組織の使用に当たっては、国立がんセンターの諸規約を遵守し、

倫理的、社会的、法律の見地から、患者の不利益にならないように十分に配慮している。

3. 遺伝子産物の機能の解析：

TSLC1 遺伝子産物の細胞内局在は、緑色蛍光色素標識蛋白質の細胞への発現により検討した。糖鎖付加の有無は、イヌ臍臓ミクロソーム膜画分の添加による *in vitro* の転写、翻訳により検討した。

C. 研究結果

1. がん抑制遺伝子 TSLC1 の同定：

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、並びに 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。

2. ヒトがんにおける異常の解析：

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、或いは停止コドンを、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. TSLC1/IGSF4 遺伝子産物の解析：

全長 TSLC1、または Δ TSLC1 と HA または GFP との融合蛋白質を COS 細胞で発現させたところ、TSLC1 蛋白質は、細胞膜と、粗面小胞体膜等核周辺の膜構造に局在することが示された。一方、N 端のシグナルペプチドを欠如した Δ TSLC1 蛋白質は核周辺の膜構造にのみ停留し、細胞膜局在は示さなかった。

全長 TSLC1、または Δ TSLC1 cDNA を *in vitro* で転写、翻訳したところ、前者では約 50 kD の蛋白質が得られた。翻訳時にイヌ臍臓ミクロソーム膜画分を加えると、糖鎖附加による分子量の増大を認めたが、 Δ TSLC1 蛋