

白質では糖鎖附加が起こらなかった。これは粗面小胞体膜への局在の障害が原因と考えられる。一方、HA タグを附加した全長 *TSLC1* cDNA を COS 細胞内で転写、翻訳させ、抗 HA 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE により検討した場合も、糖鎖附加による分子量増大が認められた。

D. 考察

非遺伝性腫瘍で LOH を示す染色体領域は数多く、領域内の遺伝子の発現低下の報告もなされている。しかし 2 ヒット目の構造変異を示すものがまれで、機能も不明であることから、がん抑制遺伝子の「候補」の一つとして報告されるのみであった。我々はこの点を克服するために、遺伝的相補実験による腫瘍原性の抑制活性を指標として、がん抑制遺伝子を単離した。即ちヒト NSCLC で LOH を認める 5 cM の領域上の YAC、断片化 YAC、PAC の各クローンを順次ヒト細胞に導入する方法を確立、改良しながら、約 100 kb の領域に活性を限定化し、遺伝子同定に成功した。正常肺組織相当の発現量で抑制活性を示す *TSLC1* 遺伝子が単離できたことは、内因性のプロモーターからの 1 コピーの遺伝子発現を再現できる YAC 移入の系の有用性を示すものであり、遺伝子の用量

効果の重要性を示す知見である。

がん細胞に実験的にがん抑制遺伝子を導入し相補した場合、3 種の抑制様式が見られる。(1) アポトーシスを生じるもの。例 *p53*。(2) *in vitro* で増殖が低下するもの。例 *RB*, *p16*。(3) 腫瘍原性が低下するもの。例 *KAI-1*。*TSLC1* は、がんの進展に関わる他の数種の抑制遺伝子とともに (3) に属するが、この群の遺伝子は 2 ヒット目の DNA の構造変異を示す頻度が一般に低いため、構造解析のみから同定することは困難である。我々の方法は、このような遺伝子群を単離、同定するのに適した方法であり、ポストゲノム時代にも必要とされる手法である。

また、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、HCC, PaC 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、細胞接着に参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。

E. 結論

TSLC1 は、肺非小細胞がんの新規抑制遺伝子である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Reeves, R.H. & Murakami, Y. *TSLC1* is a tumor suppressor gene in human non-

small cell lung cancer. Nat. Genet., in press.

2. Kanbe, T., Nobukuni, T., Kawasaki, H., Sekiya, T. & Murakami, Y. Four single-nucleotide polymorphisms in the human *BUB1* gene. J Hum. Genet., in press

Nishimoto, A., Miura, N., Horikawa, I., Kugoh, H., Murakami, Y., Hirohashi, S., Kawasaki, H., Barrett, C.J., Gazdar, A.F., Shay, J.W. & Oshimura, M. Evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. Oncogene, in press.

3. Fukuhara, H., Maruyama, T., Nomura, S., Oshimura, M., Kitamura, T., Sekiya, T. & Murakami, Y. Functional Evidence for the Presence of Tumor Suppressor Gene on Chromosome 10p15 in Human Prostate Cancers. Oncogene, 20, 314-319, 2001.

4. Murakami, Y., Uejima, H., Fukuhara, H., Maruyama, T., Oshimura, M., & Sekiya, T. Construction of Human-Rodent Hybrids Containing Fragments of Human Chromosome 10p. J Hum. Genet., 45, 370-373, 2000.

5. Kanamori, M., Kon, H., Nobukuni, T., Nomura, S., Sugano, K., Mashiyama, S., Kumabe, T., Yoshimoto, T., Meuth, M., Sekiya, T. & Murakami, Y. 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.

6. Kuchiki, H., Saino, M., Nobukuni, T., Yasuda, J., Maruyama, T., Kayama, Y., Murakami, Y. & Sekiya, T. 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.

2. 学会発表

1. 村上善則、倉持雅己、福原浩、信國宇洋、丸山智子、大木操、関谷剛男 新規肺非小細胞がん抑制遺伝子 *TSLC1* の単離と解析。第 59 回日本癌学会年会。

2. 村上善則、富田裕之、金森政之、神戸雅貴、野村幸男、菅野康吉、坂元亨宇、関谷剛男 がん細胞における、アレルの間の遺伝子発現の量的不均衡の解析。第 59 回日本癌学会年会。

3. 村上善則、倉持雅己、福原浩、信國宇洋、神戸貴雅、丸山智子、関谷剛男 第 11 染色体 q23 上の新規肺非小細胞がん抑制遺伝子の機能的相補法による同定。第 45 回日本人類遺伝学会年会。

4. Y. Murakami, M. Kuramochi, H. Fukuhara, T. Nobukuni, T. Maruyama, T. Sekiya, H. P. Ghosh &

R. H. Reeves. Identification of a candidate tumor suppressor gene on 11q23 in human non-small cell lung cancer. The 2000 meeting on Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes in Cold Spring Harbor Laboratory.

5. M. Kuramochi, H. Fukuhara, T. Nobukuni, T. Kanbe, T. Fukami, T. Maruyama, H. P. Ghosh, M. Pletcher, T. Sekiya, R. H. Reeves & Y. Murakami. Identification and characterization of a tumor suppressor gene *TSLC1* in human non-small cell lung cancer. The 5th Joint Meeting of American Association of Cancer Research and Japanese Cancer Association.

6. Y. Murakami, M. Kuramochi, H. Fukuhara, T. Nobukuni, T. Maruyama, T. Sekiya, H. P. Ghosh & R. H. Reeves. Identification and Characterization of a Tumor Suppressor Gene *TSLC1* in Human Non-Small Cell Lung Cancer. The 92nd Annual Meeting of American Association of Cancer Research.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

がん関連遺伝子異常の診断への応用

分担研究者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所 副主幹・医長・特別研究員

研究要旨

膀胱がんおよび膀胱がんを対象として切除組織、あるいは尿から各染色体座位の欠失(LOH)の有無を Blunt-End SSCP 法により検出し、予後因子としての意義を検討した。17p の欠失は膀胱がんの 72%に認められ、欠失群の 5 年生存率は非欠失群に比べ 5.5% vs 83% ($p=0.002$)と有意に不良であり、膀胱がんの予後因子として有用と考えられた。経尿道的切除術(TUR)を施行した初発表在性膀胱がん患者の尿を対象とする 9p,9q,17p の欠失の解析では、尿中の染色体欠失は 70%の症例で認められ、欠失群では非欠失群に対して TUR 術後の表在性膀胱癌の再発率は 78.6% vs 10% ($p=0.048$)と有意に高率であった。膀胱がん患者尿からの遺伝子欠失の検出は、尿細胞診の補助診断法としても有用と考えられる。上皮内進展を示す pTis 膀胱がんでは E-cadherin 遺伝子のプロモーター部位のメチル化が高率に認められ、カドヘリン分子を介した細胞接着能の異常が膀胱がんの上皮内進展の機序としても関与していることが示唆された。

A. 研究目的

遺伝子異常の検出法の開発と臨床検体の解析を通じてその臨床的意義を明らかにすることは、がんの遺伝子診断を実際の医療として実用化するために重要である。本年度は染色体欠失の高感度検出法である Blunt-End SSCP 法を用いて膀胱がん、膀胱がん等の解析を行い、染色体欠失の予後因子としての意義を検討するとともにエピジェネティックな遺伝子異常を臨床診断に応用するための試みとして、膀胱がんにおける E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の解析を行なった。

研究方法

1) 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。膀胱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。

2)膀胱がん組織より抽出したゲノム DNA を Na-bisulphite 処理後、E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域についてメチル化アレル特異的プライマーを使用した PCR 増幅を行い、CpG 配列のメチル化の有無を検討した。

C. 研究結果

1) 膀胱がん切除組織 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。

2)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 9p, 9q および 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は高率に認められた。このうち、表在性膀胱がんとして診断された 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 ($p=0.048$)。

3) E-cadherin 遺伝子のプロモーター部位のメチル化は膀胱がん 71 例中 34 例 (48%) に認められた。臨床病理学的因子との比較でステージ、組織学的異型度との相関は認められず、上皮内進展 (pTis) の有無と有意な相関をしめした。即ち、病理組織学的検討で pTis(+) と診断された症例では 93% (13/14 例) に異常が認められたのに対して、pTis(-) の症例では 37% (21/57 例) と低率であった ($p=0.0001$)。一方 E-cadherin 遺伝子の存在する 16q22.1 の LOH は pTis(+) では 58.3% (7/12 例) vs. 50% (25/50 例) であり、有意差は認められなかった ($p=0.6$)。

D. 考察

膀胱がんは最も高頻度に遺伝子異常を認める腫瘍のひとつであり、これまで報告されている異常として、K-ras がん遺伝子の点突然変異、9p, 17p, 18q, 1q 等の染色体欠失 (LOH) およびこれらの染色体座位に存在するがん抑制遺伝子として p16, p53, DPC4 等の点突然変異、プロモーター領域のメチル化等が報告されている。しかし、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。我々のこれまでの研究で 9p, 9q の欠失は比較的早期の膀胱がんでも認められる early event であること、一方、17p の欠失は浸潤性膀胱がんのほぼ全例で認められる late event であることが明らかにされている。今回、尿中からのこれ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。

一方、表在性膀胱がんの中で特殊な病態を示すものとして上皮内進展型 (pTis) の膀胱がんが挙げられる。pTis 膀胱がんに対しては膀胱内への BCG 注入等の補助療法が行われるが、根治困難であり、膀胱摘出が必要となる症例も多い。今回の検討で pTis 膀胱がんにおいて E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が高率に生じていることが明らかとなった。カドヘリン分子を介した細胞接着の異常はこれまで胃がん、乳がん、肝臓がん等で報告されているが、上皮内進展を示す膀胱がんにおいても同様の異常が関与していることが推測され、さらに詳細な検討を続けている。

E. 結論

染色体欠失は各種固形腫瘍においてもっとも高率に認められる遺伝子異常であり、特定の染色体座位の欠失の検出は多種類のがんの遺伝子診断に応用可能な技術と考えられる。今回の検討で臨床検体からの染色体欠失の解析は膀胱がん、膵がん等の予後因子として応用可能であることが明らかとなった。今後、全染色体を対象として、網羅的に遺伝子欠失を解析可能なシステムを開発する予定である。E-cadherin 遺伝子のプロモーター部位のメチル化は膀胱がんの上皮内進展に関与している可能性が示され、新しい治療法の開発等に有用な知見と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 (1): 120-129 (2000)

Kanamori, M., Sugano, K. 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 (12):1564-1571 (2000)

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 89 (4):329-336 (2000).

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

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)

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

2. 学会発表

腫瘍マーカーと遺伝子診断：萱野康吉（平成 12 年 1 月 12 日）がん研究助成金によるシンポジウム 膵がんの基礎と臨床（東京）

Sensitive detection of allelic loss on Chr 9p, 17p and 18q by blunt-end SSCP analysis is useful as a new prognostic indicator of pancreatic adenocarcinoma. Sugano, K. et al. 91st Annual meeting of American Association for Cancer Research (April 1- 5, 2000, San Francisco, USA)

網膜芽細胞腫の遺伝相談と遺伝子診断：萱野康吉、他（平成 12 年 5 月 26 日）日本臨床遺伝学会大 24 回大会（大阪）

家族性腫瘍における遺伝子診療：萱野康吉、
他（平成 12 年 6 月 15 日）第 7 回日本遺
伝子診療学会大会 シンポジウム 1-4（浜
松）

がんの遺伝相談：萱野康吉（平成 12 年 6
月 17 日）第 6 回家族性腫瘍研究会サテラ
イトシンポジウム（札幌）

乳がん組織抽出液および血清 ErbB-2 蛋白
測定 of 腫瘍マーカーとしての有用性：萱野
康吉、牛尼美年子、福富隆志、津田均、木
藤孝、大倉久直（平成 12 年 10 月 3 日）
第 20 回日本分子腫瘍マーカー研究会 シ
ンポジウム（横浜）

遺伝性非ポリポーシス大腸がんの遺伝子診
断：萱野康吉、藤田伸、野村幸男、深山紀
子、谷口高広（平成 12 年 10 月 6 日）第
59 回日本癌学会総会（横浜）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）
なし

がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学内科学第一講座教授

研究要旨

がん克服に向けた分子標的療法への展開を念頭に、DNA 修復遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、免疫関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、細胞外基質分解酵素の各がん関連遺伝子のgenetic、epigeneticな異常を消化器がんを対象に系統的に研究を進めた。患者予後など臨床検体の特徴と極めて相関する分子異常として、DNA 修復遺伝子に異常を有するがんにおけるアポトーシス関連遺伝子BAX、免疫関連遺伝子beta 2 microglobulinの異常の他、細胞周期関連のp16遺伝子および14-3-3 sigma遺伝子のメチル化の異常を明らかにした。いずれの分子も診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、今後はさらにこの点を推し進めると共に、新規遺伝子についても検索を進めたい。

A. 研究目的

多段階発がん機構が明らかになるにつれ、がん克服に向けては、単一の分子の検索ではなく、多角的アプローチが必要である。本研究においては、DNA 修復遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、免疫関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、細胞外基質分解酵素（MMP；matrix metalloproteinase）の各がん関連遺伝子のgenetic、epigeneticな異常を消化器がんを対象に系統的に解析し、がん関連遺伝子を標的とした分子標的治療、がん制御を展望することを目的とする。

B. 研究方法

1. DNA 修復遺伝子に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

散発性胃がん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、さまざま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。

2. 消化器多発がん、重複がんにおけるMSI、DNA 修復遺伝子異常の検討

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。

3. 消化器がんにおける細胞周期関連遺伝子のDNAメチル化異常の検討

肝細胞癌、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、培養肝癌細胞株を用いた脱メチル化剤処理実験を行った。

(倫理面への配慮)

研究内容の性質上、ヒトの生体試料を用いることが多いので、遺伝子の検索、成果の発表においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。すなわち、提供者から十分なインフォームド・コンセントを得ることとし、人間の尊厳及び人権を尊重し、実施試料等提供者やその家族、血縁者の人権を科学的、社会的な利益より優先し、適正に研究を行う。

C. 研究結果

1. MSIは、散発性胃がん53例(13%)、大腸がん62例(12%)、HNPCC41例(81%)において検出された。さまざま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。

2. 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%)と散発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がんにおいて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。

3. 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。胃がん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癌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。

D. 考察

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、抗癌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。

E. 結論

DNA修復遺伝子に異常を有するがんにおけるBAX、beta 2 microglobulin遺伝子変異の他、p16遺伝子および14-3-3 sigma遺伝子のメチル化の異常等が、患者予後など臨床検体の特徴と極めて相関することが明らかになった。いずれの分子も診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、がん克服へ向けた重要な知見であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takekawa T, Adachi M, Nakahata A, Itoh F, Taya Y and Imai K. 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.

2) Yamamoto H, Yamashita K, Imai K and Perucho M. Somatic mutation of the $\beta 2$ -microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology*, 2001, in press.

3) Yamashita K, Itoh F, Arimura Y, Kurokawa S, Endo T, Hirata K, Imamura A, Kondo M, Sato T and Imai K. Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut* 46: 790-794, 2000.

4) Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Ozeki I, Iwata N, Ohmura T, Endo T and Imai K. 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.

5) Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Endo T and Imai K. 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.

6) Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H and Imai K. Inactivation of 14-3-3 sigma gene is associated with 5'CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 60: 4353-4357, 2000.

7) Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K and Imai K. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathological and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol* 19: 1118-1127, 2001.

8) Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Shimizu A, Tsuda H, Goldman CK, Imai K and Wakasugi H. Gene targeting Flt-1 and Tie2 inhibits tumor growth and metastases on WIBC-9, a human inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res*, in press, 2001.

2. 学会発表

1) Imai K, Yamamoto H, Adachi Y, Fukushima H, Arimura Y, Endo T and Itoh F. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the progression of gastrointestinal cancers. Fifth Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. 2001, Hawaii.

2) Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Kikuchi T, Kakiuchi H and Imai K. Inactivation of 14-3-3 sigma gene is associated with 5'CpG island hypermethylation in human cancers. Fifth Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. 2001, Hawaii.

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

膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構

分担研究者 坂元 亨宇 国立がんセンター研究所病理部部長

研究要旨：浸潤性膵管がん 67 例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検討し、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示した。膵がんの腫瘍組織 10 例あるいは膵がん細胞株 10 種類を、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。この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り、実際の臨床像をよく反映していることが示された。

A. 研究目的

膵がんは日本におけるがん死亡原因の第五位に位置し、最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。これは、膵の解剖学的位置に加えて、膵がん自体が高い悪性度を有し、早期より浸潤・転移をきたすことや、早期発見が困難であることが原因と考えられている。よって膵がんの浸潤・転移機構の解明と早期に発見できる新しい診断法の開発を進めることで予後の改善が可能になると期待される。

以上をふまえ、本研究では膵がん手術材料の解析から、膵がんの臨床病理学的特性を一層明らかにするとともに、その基盤となる分子・細胞機構の解析を、実際のがんをよく模倣する同所性移植モデル等を用いて行う。具体的には、多数の膵がん細胞株に加えて、切除された膵がん組織を直接移植して作製したモデルを用いて、がんで発現している遺伝子、蛋白、あるいはシグナル伝達の変化などと、モデルにおける増殖、浸潤・転移性との対応を解析することで、膵がんの増殖、浸潤・転移に関与する分子を明らかにする。そしてこれらの成果を基

に、早期診断法ならびに新しい標的治療法を開発することを目標とする。

B. 研究方法

1. 膵がんの臨床病理学的特性とその分子機構

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。

2. 膵がんの増殖・浸潤・転移の分子・細胞機構

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、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. 膵がんの臨床病理学的特性とその分子機構

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 ($p=0.004$)。

2. 膵がんの増殖・浸潤・転移の分子・細胞機構

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。

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. 膵がんの臨床病理学的特性とその分子機構

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癌の中で、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。

2. 膵がんの増殖・浸潤・転移の分子・細胞機構

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、現在最も難治とされる膵臓がんを対象に、実際の臨床がんの病理像を一層明らかにすると共に、それを良く模倣する *in vivo*、*in vitro* モデルを最新の分子細胞生物学的手法を用いて解析し、早期診断ならびに転移・浸潤能の正確な診断を可能とし個々の症例に現時点における最適の治療法を選択可能とすると同時に、今後の

新たな治療法開発のための治療標的を明らかにしようとするものである。本年度は、膵がん結節内における膵管内乳頭状成分の意義の検討、膵がんの腫瘍組織、膵がん細胞株を用いた同所性移植モデルの作製を行った。今後さらに、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良好な予後を示す症例の分子生物学的背景につき解析を行う。さらに膵がんの増殖・浸潤・転移を模倣するモデルを用いて、転移関連分子の発現の解析、モノクローナル抗体の作成、遺伝子発現プロファイリング等を行い、浸潤、転移機構の解明、早期診断に有用な分子の同定を進める。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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。