

ト12 厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
総合研究報告書

がん発生に関与する遺伝子産物の機能の把握とゲノム不安定性に解明に関する研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

**研究要旨** (I) がん関連遺伝子産物の機能：①ヒトトランスフォーミング遺伝子であるhst-1/FGF4が精巣、脳・神経系に発現していることを見出した。②H-, N-, K-rasの遺伝子欠失マウスを作成し、さらに交配により2重、3重欠損マウスを得、表現型を解析した。これらのマウスには、小腸のリンパ管形成不全による乳糜腹水の発症という表現型があり、H-, N-, K-ras遺伝子の数が減るにしたがって重症であった。③成長ホルモンやプロラクチン刺激により活性化されたJAK2キナーゼが、EGF受容体やerbB2のGrb2結合部位をチロシンリン酸化しMAPキナーゼカスケードを活性化するという新しいcross-talk経路を同定した。④ガングリオシドGM3合成酵素遺伝子のゲノム構造解析、発現及び機能解析を行った。⑤一酸化窒素によるVEGF誘導がHIF-1活性化を通じておこること、一酸化窒素がcaspase 3の活性化阻害を通して、抗がん剤によるアポトーシスを抑制することを明らかにした。また、一部の膵がん細胞では一酸化窒素産生や低酸素処理によらなくても既に栄養飢餓状態に耐性となっているものがあること、栄養素欠乏によりPI3キナーゼ依存的にAktが磷酸化されていることを見出した。⑥Drosophilaの系を用いた解析から、ポリADP-リボース合成酵素 (PARP) はRhoAを介したシグナル伝達経路との機能的相互作用により細胞質、細胞膜での現象に関与することを明らかにした。⑦食道がん・胃がん等のがん部特異的に、Streptococcus anginosusのDNAが高頻度に存在することを見出した。⑧経胎盤遺伝子導入法を改善し、アテロコラーゲンを用いた遺伝子導入法の開発を行った。また、ラットLIF cDNAの分離・同定を行った。

(II) ゲノム不安定性：⑨発がん重要なゲノム不安定性の結果起きる遺伝子増幅について11q13、17q12及び10q26の増幅ユニットの構造とその特徴を明らかにした。また、これらの増幅ユニットに存在する新しい遺伝子やプロモーターや転写産物を同定した。中にはスキルス型胃がんの特異的に発現する転写産物もあった。⑩ヒトがんでミニサテライト (MN) の変異が高率に見出されること、DNA-依存性蛋白質リン酸化酵素がMN安定性に関与することを明らかにした。精製した6種類のMN結合蛋白質の5種類についてcDNAの全塩基配列を決定した。このうちMNBP-AとBはhnRNPであること、さらにMNBP-Bの存在下で(GGCAG)<sub>n</sub>配列のとり同一鎖内の4重鎖構造が破綻することを明らかにした。⑪ヒト胃がん組織においてTRF1、TRF2、tankyraseがテロメア長およびテロメラーゼ活性を制御している可能性が示唆された。ヒト3番、10番染色体上にはテロメラーゼ触媒サブユニットhTERTを抑制する老化誘導遺伝子が、2番染色体上にはテロメラーゼ非依存的な老化誘導遺伝子が存在することを示し、これら老化誘導遺伝子領域を物理地図上にマップし、単離を試みた。

分担研究者

【平成9年度】

寺田雅昭	国立がんセンター研究所	所長
長尾美奈子	国立がんセンター研究所	部長
田原栄一	広島大学医学部	教授
押村光雄	鳥取大学医学部	教授
勝木元也	東京大学医科学研究所	教授
矢崎義雄	東京大学医学部	教授
三輪正直	筑波大学基礎医学系	教授
江角浩安	国立がんセンター研究所	支所長

【平成10年度】

寺田雅昭	国立がんセンター研究所	所長
中釜斉	国立がんセンター研究所	部長
田原栄一	広島大学医学部	教授
押村光雄	鳥取大学医学部	教授
勝木元也	東京大学医科学研究所	教授
三輪正直	筑波大学基礎医学系	教授
矢崎義雄	東京大学医学部	教授
江角浩安	国立がんセンター研究所	支所長

## 分担研究者 (続き)

【平成11年度】

吉田 輝彦	国立がんセンター研究所	部長
中釜 斉	国立がんセンター研究所	部長
田原 榮一	広島大学医学部	教授
勝木 元也	東京大学医科学研究所	教授
押村 光雄	鳥取大学医学部	教授
門脇 孝	東京大学大学院	教授
斎藤 政樹	国立がんセンター研究所	部長
三輪 正直	筑波大学基礎医学系	教授

### A. 研究目的

臨床的に問題となるがんはそれぞれの組織に特異的な複数の遺伝子変化の蓄積の結果発生する。また、背景にあるゲノムの不安定性が発がん進展に極めて重要な役割をしている。このようながんの本態に関する基本概念は、過去十数年間の研究の結果確立した。しかし、がんの発生・進展に必要な遺伝子は未知のものがまだ多く、既知のがん関連遺伝子の機能やゲノム不安定性の機序も不明なものが多い。

本研究では浸潤性・転移能を有する臨床的に問題となるがんの発生に必要な遺伝子の同定とそれら遺伝子の機能、特に個体レベルにおける機能を把握し、さらにゲノムの不安定性の機序の解明を行う。すなわち、本研究の目的は以下の2つに大別される。「(I) がん関連遺伝子産物の機能の把握」では、がん関連遺伝子産物の機能を分子・細胞レベルのみでなく、臓器・個体レベルで明らかにして、がんの発生・進展の機序を正しく理解する。「(II) ゲノム不安定性の解明」では、遺伝子増幅やミニサテライトの不安定性等で検出される異常を指標とし、またテロメアの制御等の機能を追求することにより、ゲノム不安定性の分子機構を明らかにする。以上の研究を通して、発がんの過程の機構を正しく理解し、これらの研究の結果、がんの新しい予防、診断、治療の開発に役立つ基盤情報を提供し、がん克服に貢献することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

(I) がん関連遺伝子産物の機能の把握：

①hst-1遺伝子特異的な高感度RT-PCR法を確立し、マウスの各臓器におけるhst-1遺伝子の発現を解析した。さらに、in situハイブリダイゼーションにて、組織局在について詳細に調べた。

②H-, N-, K-ras各遺伝子についてES細胞を用いた遺伝子欠失マウスを作成し、さらに2重もしくは3重に遺伝子を欠失したマウスを自然交配及び発生工学的手法を用いて作製した。また、これらのうち胎生致死マウスについてはヒトH-ras遺伝子導入トランスジェニックマウスとの交配によって回復を試みた。ゲノム型H-ras遺伝子に人工的に活性型点突然変異を導入し、さらに、プロモーター領域と、コード領域との間にloxP配列で挟んだ約1.3kbのスペーサー配列を導入したトランスジェニックマウスを作成した。

③培養細胞と成長ホルモン (GH) の生理的標的器官である肝臓を用いて、GH刺激によりチロシンリン酸化される蛋白質を検討した。乳がん切除標本を用い、プロラクチン発現及びc-erbB-2の発現と細胞増殖能との関係を明らかにした。また、プロラクチン受容体を過剰発現したCHOにEGF受容体やc-erbB-2を発現させ、プロラクチンによるEGF受容体やc-erbB-2のチロシンリン酸化の機構を検討した。4種のヒト乳がん細胞株、活性化プロラクチンの中和抗体やドミナントネガティブのJAK2を用いてプロラクチンによる蛋白チロシンリン酸化の活性化と乳がんの細胞増殖における意義を検討した。また、c-erbB-2が過剰発現している乳がん培養細胞株でc-erbB-2のチロシンリン酸化やgrb2結合、MAPキナーゼ活性化が起きているかを追求し、この抑制されるか、細胞増殖が抑制されるか否かを検討した。

④マウス及びヒトガングリオシドGM3合成酵素遺伝子 (sialyltransferase-1: SAT-1) を単離し、FISH法により染色体座位を決定した。RT-PCR法及びRNA blot法により、発現解析を行った。ガングリオシドGD3合成酵素遺伝子のアンチセンス・ヌクレオチドを悪性度の高いヒトメラノーマ細胞に導入することによって、細胞増殖と形態への影響を解析した。

⑤ヒトのVEGF遺伝子の転写調節の種々の領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結して種々の細胞に導入し、一酸化窒素 (NO) 発生剤の有無でルシフェラーゼ活性を測定し、hypoxia response elementが必要であるか検討した。さらに、このelementに結合するHIF-1の活性化機序を追求した。またタキソールやビンクリスチン等の抗がん剤で起きるアポトーシスを阻害する物質を追求した。NO産生や低酸素処理により、腫瘍細胞の栄養欠乏による細胞死を抑制する分子機構の解明と、この細胞死抑制を阻害する薬剤の探索を行った。関連する遺伝子産物として、Aktのリン酸化を生化学的に解析した。

⑥ショウジョウバエでPARPの存在する第3染色体81F10-65欠損固体、およびこの領域へのP因子挿入による表現型の変化を追求した。ショウジョウバエの複

眼特異的にポリADP-リボース合成酵素 (PARP) を発現する系を確立し、RhoAシグナル伝達経路に関わる変異体を用いた遺伝学的解析により、その阻害の影響について解析した。

⑦Streptococcus anginosusのプロープを用いたサザンブロット法と、この細菌に特異的に設計したプライマーを用いたPCR法により、食道がん、胃がん、非がん組織、肺がん、膀胱がん、腎臓がんのDNA中にStreptococcus anginosusのDNAが存在するか検討した。日本人の食道がんのみならず中国、欧米の食道がんにおいても同様な検索を行った。また食道がんよりこの細菌の培養を試みた。

⑧経胎盤遺伝子胎児導入法の改善を目的として、多くのリボソームを検討し、ロットが変わっても再現性よく経胎盤で胎児に遺伝子を導入するものを選択し、この方法を用いてアルブミンプロモーター支配下にあるβガラクトシダーゼを母親マウスより胎児に遺伝子を導入し、その発現組織を検討した。hst-1 cDNAをアデノウイルスに組み込み、アテロコラーゲンに混ぜ、シスプラチン投与または放射線照射マウスに1回腹腔内投与し、血中のhst-1蛋白質、血小板の上昇を測定し、さらに小腸の粘膜の顕微鏡検討を行った。また、hst-1 cDNA発現プラスミドをウイルスベクターを用いずアテロコラーゲンに混入したhst-1 DNA製剤を作製し、筋肉内に1回投与し、血中hst-1蛋白質濃度と血小板数を測定した。抗CEA単鎖variable fragmentとウイルスのenvelope蛋白の融合蛋白質を発現するレトロウイルスを構築し、このウイルスにHSVのTK遺伝子またβガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、CEA産生・非産生の細胞に感染させた。ラットLIF cDNAをラット胎児より分離し、このcDNAを発現ベクターに組み込み細胞で発現させ、ラットのES細胞の未分化状態、維持能力、MI細胞分化誘導能力を検討した。

## (II) ゲノム不安定性の解明：

⑨ゲノム不安定性の代表例として、cyclin D1の存在する11q13、c-erbB-2の存在する17q12、K-samの存在する10q26の共通増幅領域（増幅コア領域）を決定し、その増幅ユニットの構造と塩基配列解析を行った。さらにFISH法により11q13と17q12の増幅ユニットの染色体上の増幅領域を解析した。特に、10q26のK-samは低分化型胃がんで増幅が見られるが、増幅したK-samの構造を詳細に解析し、C末端のエクソンの欠損をRT-PCR法で検出する方法を確立、各種胃がん細胞に対する検索を行った。また組換えホットスポットと考えられる配列に関しては特にがん化に伴うDNA複製異常、その後におこるDNA組換え反応に

よって生じると考えられる遺伝子増幅の分子機序を中心に解析した。塩基配列の規則性を検索するコンピュータソフトの開発も進めた。

⑩NIH3T3をオカダ酸存在下で培養し、MN不安定性を測定し、培養後の細胞の造腫瘍性を追求した。さらにSCIDマウスより分離した線維芽細胞のMN不安定性を分析し、DNA依存性蛋白質リン酸化酵素のサブユニット (DNA-PKcs) が存在するヒト染色体8番長腕を導入し、MN不安定性の有無を解析した。大腸がんとうがんでMN変異をlow stringentのサザンブロットで検索した。プロープとしてはヒトMNの33.6と33.15、マウスMNのPc-1の3種類を用いた。マウスMN配列Pc-1の反復ユニット (G: 5'-GGCAG-3') の高次構造についてNMR解析および円偏光二色性解析を行った。また、Gの12回繰り返し配列を組み込んだphagemidを作成し、これを鋳型として、種々のDNA合成酵素によるin vitro DNA合成能を検討した。マウスNIH3T3細胞をオカダ酸存在下で数日間培養したのち細胞の核画分を分取、Pc-1を構成する1本鎖DNA配列をプローブとしたゲルシフトによるDNA結合能を指標として精製し、アミノ酸配列の決定を行った。その配列情報を元に、マウスcDNAのクローニングを行い、大腸菌にて組換え蛋白質を合成した。

⑪肝がん20例、胃がん20例、大腸がん40例の腫瘍組織におけるテロメラーゼの解媒サブユニットであるhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現とテロメラーゼ活性をTRAP法で分析した。大腸がん67例、大腸腺腫18例とそれぞれの正常組織のテロメラーゼ活性とテロメア結合蛋白質TRF1の発現、マイクロサテライト不安定性との比較について検討した。ヒト胃がん組織を用いて、RT-PCR法を用いてテロメアに関連する遺伝子群、TRF1、TRF2と他のテロメラーゼ構成因子TERT、TERC、TEP1、tankyrase等の発現を解析し、同時にテロメラーゼ活性、テロメア長との相関を調べた。腎細胞がん細胞株KC12に3番染色体を移入して細胞の老化と分裂停止を誘導する際、出現するリバートクローンにおける移入染色体の脱落領域を特定した。ヒト子宮頸部がん由来細胞株SiHaはヒト2番染色体の移入により細胞老化するが、この2番染色体上の細胞老化遺伝子を長腕2q37領域にマッピングし、候補となるBACクローンを同定した。

(倫理面への配慮) ここに報告する研究は、各分担研究者の施設における倫理規程やヘルシンキ宣言の精神に則ったものである。同様に、動物実験も各研究機関の定める実験動物取扱規定に従い、十分な動物愛護の配慮の元に行われた。

## C. 研究結果

### (I) がん関連遺伝子産物の機能の把握:

①hst-1遺伝子は成体組織では発現していないと考えられたが、新たに高感度RT-PCR法により、精巣や、中枢神経系に発現していることがわかった。さらにin situ hybridizationにより、小脳プルキニエ細胞など、発現が限局している細胞を同定できた。

②H-, N-, K-ras欠損マウスを作製し、それぞれの掛け合わせ実験の結果、H-ras(-/-)およびN-ras(-/-)、またH-ras(-/-)でN-ras(-/-)の二重欠損マウスはそれぞれ全く正常であったが、K-ras(-/-)は胎児期致死であり、心筋の菲薄化と脊髄の腹側領域のアポトーシスの増加が見られた。H-, N-, K-ras遺伝子の多重欠損マウスには、小腸のリンパ管形成不全による乳糜腹水の発症という表現型があり、H-, N-, K-ras遺伝子の数が減るにしたがって重症であった。さらに、ヒトプロト型H-ras遺伝子導入マウスとの交配によって、H-ras遺伝子を導入した結果、三重ras遺伝子欠損マウスH(-/-)N(-/-)K(-/-)が生存し、H-ras導入遺伝子によって救われることが解った。

③成長ホルモンやプロラクチン刺激により活性化されたJAK2キナーゼが、EGF受容体やc-erbB-2のgrb2結合部位をチロシンリン酸化しMAPキナーゼカスケードを活性化するという新しいcross-talk経路を同定した。このc-erbB-2のチロシンリン酸化やMAPキナーゼの活性化、乳がん細胞の増殖は、プロラクチンに対する抗体やJAK2キナーゼのドミナントネガティブ変異体、あるいはMAPキナーゼ阻害剤により抑制されることを見出した。また乳がんの72例のうち、c-erbB-2の発現を認める51例はc-erbB-2発現のない乳がん比べて細胞増殖能が高く、リンパ節転移を起こすものの率も高かった。特にc-erbB-2の発現とともにプロラクチンの発現があるものはc-erbB-2単独発現例より細胞増殖能も高く、予後も悪かった。

④ガングリオシドGM3合成酵素遺伝子の転写産物は、ヒトでは1種類のmRNAとして同定され、ほぼ全ての組織・臓器で発現されているが、そのレベルは臓器ごとに異なっていた。遺伝子は、ヒトでは全体として50kb以上で、そのコード領域は6個のエクソンに渡っていた。ガングリオシドGD3合成酵素遺伝子のアンチセンス・ヌクレオチドを悪性度の高いヒトメラノーマ細胞に導入することによって、細胞増殖抑制と形態変化を誘導し、ヌードマウスへの造腫瘍性を低下させることを明らかにした。

⑤NOによるVEGF誘導は、低酸素に反応しNOで活性化される転写因子であるHIF-1がVEGF遺伝子のプロモーターにあるHREに結合しておこること、HREにはHIF-1結合部位とともにその約10bp下流に存在し、多

くのhypoxia response遺伝子にも保存されているHIF-1 binding site ancillary siteが必須であることを示した。腫瘍血管がきわめて乏しい脾臓がん細胞と、その対極である肝臓がん細胞、正常細胞とで、飢餓耐性(austerity)を比較した。その結果、培養液からブドウ糖を除去すると正常細胞では24時間後に死滅し、4種類の肝臓がん細胞でも36時間以内には死滅することがわかった。ところが、脾臓がん細胞では6種類のうち2種は120時間以上生存し、他のものも大部分の細胞が60時間以上生存した。脾臓がん細胞株PANC-1では、ブドウ糖のみならずアミノ酸、血清、脂肪酸を含む全エネルギー源の欠乏にも耐性であった。これらの反応にPKB/Aktが関与している可能性を調べたところ、ブドウ糖や、アミノ酸欠乏によりPI3キナーゼ依存的にAktが磷酸化されていることがわかった。また、ブドウ糖欠乏に感受性の高い肝臓がん細胞HepG2にAktの発現ベクターを導入すると、脾臓がんほどではないが耐性となった。その機構としてPKBに加えてAMPキナーゼが関与していることが示唆された。また、ある種のPI3キナーゼ阻害剤が治療薬として使える可能性が示された。

⑥ポリADP-リボース合成酵素(PARP)を欠失するショウジョウバエを作出したところ、一令幼虫で致死であった。また、PARPの複眼特異的過剰発現、及び全身での過剰発現が様々な表皮組織において細胞骨格アクチン繊維の重合阻害を伴う細胞・組織の極性及び形態形成の異常を引き起こすこと、PARPがRhoAを介したシグナル伝達経路との機能的相互作用により細胞質、細胞膜での現象に関与することを明らかにした。さらにRhoA、Rac、Cdc42などの一連のRhoファミリー分子の恒常活性型及び優勢抑制型変異遺伝子の遺伝子導入体を用いた遺伝学的解析を行ったところ、PARP過剰発現による影響はRhoA特異的であることが示唆された。

⑦食道がんの90%、胃がんの30%に、がん部に特異的にStreptococcus anginosus DNAを検出した。肺がん、腎臓がん、膀胱がんでもこの細菌のDNA配列は検出できなかった。また、中国や欧米の食道がんにもこの細菌のDNAが頻度高く見出された。

⑧個体におけるがん関連遺伝子産物の機能解明に有用な複数の技術を確立した。まず、経胎盤遺伝子胎児導入法の用いるため、多くの種類のリボソームをテストし、そのうちの一つ、DMRIE-Cが再現性よく胎児に遺伝子を導入することを示した。この方法を用いて、アルブミンのプロモーターにβガラクトシダーゼ遺伝子をつなぎ妊娠マウス母親に投与すると、17日目胎児では肝臓で特異的にこの遺伝子が発現することができた。また、生体親和物質を用いた

遺伝子導入・発現制御技術を開発した。すなわち、hst-1遺伝子をアテロコラーゲンと混ぜマウスに腹腔内投与すると、アテロコラーゲンをうけない場合より長時間にわたる血中HST蛋白質の上昇が見られ、血小板上昇も長期間にわたって持続した。しかも野性マウスを用いてのこのアテロコラーゲン混入法による投与では反復投与が可能であり、剤形としても様々な型が考えられる。hst-1 cDNAをアデノウイルスベクターに組み込みコラーゲンゲルに混入してマウスに1回投与した後に致死量の放射線を照射しても全てのマウスは生存し、血小板、白血球などの低下を防止するのみならず小腸の粘膜も保護することがわかった。遺伝子導入の標的化のため、抗CEA単鎖variable fragmentとenvelopeの融合蛋白質をもったレトロウイルスHSV TKまたは $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、感染することによりCEA産生細胞に特異的に導入することが出来た。ラットLIF cDNAを分離・同定し、その塩基配列を決定した。このLIFはラット胎児期12日から15日目で発現していた。また、LIF cDNAを発現ベクターに組み込み細胞に導入すると、その上清はラットES細胞を未分化の状態に維持することが出来、MI細胞分化誘導能があった。このラットES細胞の未分化状態維持能はマウスLIFでは極めて小さかった。

## (II) ゲノム不安定性の把握：

⑨17q12遺伝子増幅ユニットの連結部位を解析し、組換えホットスポットを同定した。17q12の増幅ユニットの末端がpallindromeを形成し、Chi配列に近い配列があることを示唆する結果を得た。また胃がん細胞株においてc-erbB-2遺伝子がこの領域でhead to tailに増幅している事を見出した。この領域における増幅遺伝子として、新たにc-erbB-2の新規エクソンとそのプロモーター配列、および新規がん遺伝子の候補となる増幅遺伝子cab2、さらにgrb7遺伝子の近傍から新たに胃と食道に限局して発現するGasdermin遺伝子を同定した。染色体10q26領域の増幅ユニットの解析から、この増幅ユニットにはK-sam/FGFR2遺伝子以外の遺伝子は存在せず、原因遺伝子はK-sam/FGFR2であることを明らかにした。また、K-sam遺伝子の増幅にはC末端領域の欠失を伴う場合があることを明らかにした。これらのがん細胞においては、新しいC末端をもつ転写産物が認められ、いずれも780、784、813番目のチロシン残基をもたないK-samをコードするmRNAであった。新しい6種類のC末端エクソンの場所を決定した結果、少なくとも4つのエクソンは、従来から知られているエクソンの200kb以上下流に存在していた。これらの新しいK-sam

mRNAおよび従来から知られているC3型mRNAは22種の正常組織では発現せず、胃がんの中でもスキルス型に特異的に発現することを見出した。染色体11q13領域に関しては、cyclin D1から約300kbpセントロメア側及び680kbpテロメア側までの完全なコンテグを作成した。Cyclin D1と、そのセントロメア側110kbpに位置するbcl-1との間、及びint-2のテロメア側のBACクローンの中に、break point、amplification junctionが密集していることが明らかとなった。染色体17q12及び10q26の増幅ユニットの解析からも、amplification junctionを起こしている位置ではdeletion junctionやtranslocation junctionになっている場合もあり、増幅・転座・欠失は二本鎖切断を介して起こる同様の機構により可能性が示唆された。また、ユニット間の連結はhead to tailまたはhead to headで起こるが、この連結は一塩基も違わずに行われている事を見出した。

⑩オカダ酸存在下でNIH3T3細胞を培養するとMN不安定性を誘導し、細胞は造腫瘍性を示した。また、SCIDマウスより線維芽細胞を得て、これらの細胞がMN不安定性を示すこと、逆にこれらの細胞にヒトのDNA-PKcsを含む染色体8番長腕を導入するとMN不安定性がなくなることを明らかにした。ヒト大腸がんの56%、胃がんの25%にMNの変異を認めたが、変異と予後、組織型、進行度との関係は見出せなかった。MN配列は、一般にG/C塩基に富んだ配列であるが、DNA合成酵素による伸長反応が5'-GGG-3'の繰り返し部位で阻害されていることが判った。NMR解析およびCD解析によると、DNA濃度非依存性の同一DNA鎖内の逆平行4重鎖構造(G4'-quartet)であることが判った。オカダ酸処理したNIH3T3細胞の核粗抽出画分より、MNコア配列に結合する6種類の蛋白質(MNBP-A、-B、-D、-E、-F、-G)をゲルシフト法にて同定し、そらの蛋白質を精製、部分アミノ酸配列の決定に成功した。さらに、6種類のMNBPのうちMNBP-Dを除く5種類については、cDNAの全塩基配列を決定した。精製したMNBP-Bの存在化でMNコア配列の高次構造を解析した結果、加える蛋白質量を増加させると用量依存的に4重鎖構造破綻の程度が強くなることが判り、MNBP-BがMN配列の安定化に関わっていることが示唆された。さらにMNBP-Gは、転写のco-activatorと考えられているp100蛋白質のマウスホモログであること、アミノ酸配列上、細菌のヌクレアーゼとも部分的相同性を有することから、体細胞におけるゲノム組み換え機構への関与が示唆される。大腸菌にて組換え蛋白質MNBP-Gを作成し、DNA結合の配列特異性について検討した結果、MNBP-GのDNA結合にはdCが必須であり、dCの数が多いほど結合力

が強いことが判った。

⑩ヒト胃がん組織においてTRF1、TRF2、tankyraseがテロメア長およびテロメラーゼ活性を制御している可能性が示唆された。また、症例をテロメア長が2kbよりも長い群、短い群に分けて比較すると、長テロメア群ではテロメラーゼ活性は低く、TRF1は低発現、tankyraseは高発現、一方、短テロメア群ではその逆の関係を認めた。ヒト肝、食道、胃、大腸がんの大部分の腫瘍細胞の核にhTERTが局在し、TERTの発現とテロメラーゼ活性はよく相関した。テロメア長とTERT、TERC、TEP1発現との間には明らかな相関は見られなかった。TERT導入線維芽細胞あるいは乳腺上皮細胞の分裂寿命の延長が見られたが、不死化あるいは形質転換は見られなかった。腎がん3番染色体を導入して細胞の老化・増殖停止を誘導する系において出現した復帰体クローンのゲノム欠失領域を検索したところ、3p21.2-p21.3領域内に存在するD3S1481、D3S1581マーカーが共通に欠失していることを見だし、3番染色体上に存在するテロメラーゼ活性抑制遺伝子は3p21.2-p21.3領域の約3.3cM内に存在することが示唆された。また、子宮頸部がん細胞SiHaにおいてテロメラーゼ非依存的に老化を誘導する2番染色体上の遺伝子については、TARクローニング法により318個のクローンを得、さらに12個のBACクローンを候補として抽出した。

#### D. 考察

臨床的に問題となるがんはそれぞれの組織型に特徴的ながん関連遺伝子の変化の蓄積の結果発生し、ゲノム不安定性が背後にあって、発がん過程の推進に重要な役割を果たす。がんの本態に関する基本概念は対がん10ヵ年総合戦略やがん克服新10ヵ年戦略の研究成果を含む内外の研究により、過去約20年間に確立された。ヒトゲノム解析計画の急速な発展により、多くの遺伝子が次々と分離されている。本研究では個々のがん関連遺伝子の産物の機能、特に遺伝子組換えマウスやDrosophilaなどを用いて、様々な系における個体レベルでの機能追求や、それを可能にする技術の確立にも重点をおいた。

##### (I) がん関連遺伝子産物の機能の把握：

①従来成体組織では発現していないと考えられていたhst-1遺伝子が、中枢神経系やspermatogenesisにおいて何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、hst-1遺伝子欠失マウスは初期胚で致死であり、個体発生においてhst-1遺伝子は胚芽発生以外にも重要な働きをしていることが考えられた。

②ras群がん遺伝子の生体における機能とがん化と

の関係を調べる目的で、H-ras、N-ras、K-ras遺伝子をそれぞれ欠失したマウス、及び2重および3重欠損マウスを作成した。その結果、H-およびN-ras遺伝子は、マウスの個体発生や成長や成熟に必要なものと結論された。一方K-ras欠失マウスは胎生期12.5日目から心筋の菲薄化によって死亡する。これはK-rasが個体発生に伴う細胞の増殖と分化に組織特異的に関わっていることを示すものと考えられた。しかし、2重遺伝子欠損マウスを作成した結果、H-およびN-ras遺伝子は、マウスの個体発生や成長、成熟に必要な遺伝子であるが、K-ras遺伝子と機能的にはお互いに補完的に働くものと推定された。さらに、ヒトのプロト型H-ras遺伝子導入マウスとの交配により、H-(-/-)N-(-/-)K-ras(-/-)トランスジェニックマウスが生まれ、かつ成長することが確認されたことから、これら3種類の遺伝子が相互に機能的に補完できることが示唆された。

③GHやプロラクチンによりJAK2キナーゼを介しEGF受容体やc-erbB-2のgrb2結合部位をチロシンリン酸化しMAPキナーゼを活性化するという新しい経路を同定した。このようなcross-talk経路による細胞増殖や遺伝子発現の制御が細胞内では機能しており、乳がんの新たな細胞増殖維持機構として、プロラクチンの自律性分泌と、JAK2キナーゼの活性化、c-erbB-2のチロシンリン酸化とgrb2の結合、更にはMAPキナーゼの活性化という経路の存在が明らかにされた。最近、c-erbB-2に対するモノクローナル抗体が乳がん治療の上で有効性の高いことが報告されたが、本研究の成果を併せて考えると、このモノクローナル抗体はc-erbB-2を抑制することによって作用している可能性がある。また、プロラクチンからMAPキナーゼに至るそれぞれのステップでの障害が乳がん治療の有効性を高めることが期待される。

④SAT-1は、がん細胞の顔とも言うべき表面膜の糖鎖の発現に関与する遺伝子の一つであり、本研究により、この遺伝子の構造・機能に関する基礎的情報が提供された。糖鎖に関する分子レベルでの解明は、がんを統一された細胞社会の乱れ、細胞-細胞間相互作用の異常、と捉えた研究の促進という視点から極めて重要であるが、立ち遅れている分野であり、今後さらにこの観点からのがんの悪性度の抑制や転移、浸潤の制御機構への発展性が望まれる。

⑤がんの進展の過程で一部のがんにおいては栄養欠乏に耐性を獲得している。血管新生は女性生殖器等を除いて、正常成人組織においてはあまり大きな役割をしていないと考えられ、腫瘍特異的な治療標的と考えられている。しかし脾がんなど、血流の必ずしも多くないがん腫が現に存在し、そこでは栄養

欠乏耐性が顕著であることが明らかになった。血管新生と同様に、正常の成人体内では血流が極端に欠乏している組織は存在しない。このことを考えると栄養欠乏耐性のメカニズムが明らかになれば腫瘍組織特異的な治療法の開発ができるはずである。本研究ではその分子機構の一端が明らかになっただけであるが、一方、栄養欠乏特異的毒性反応を引き起こす薬品も見いだされ、これらの薬品は必ずや新しいがん治療の領域を開くものになると確信している。

⑥シヨウジョウバエの系では、がん関連遺伝子が多数知られており、それらの遺伝子の変異体では極めて高頻度に形態形成の異常として表現形質が現れる。また、シヨウジョウバエの系を用いて明らかにされたこれらの遺伝子の機能は、様々な生物種において高度に保存されており、ヒトにおける発がん機構の解明にも多大な役割を果たしている。PARP過剰発現により細胞骨格形成異常が引き起こされたことやRhoAとPARPとの機能的相互作用が明らかになったことは、PARPが様々な刺激に対して核内だけでなく、細胞質・細胞膜の現象にも関与する事を示す。また、PARP過剰発現はアクチン線維の重合に影響を及ぼすことから、がんの浸潤・転移における細胞の形態形成や運動性に、PARPが何らかの形で関与している可能性も考えられる。

⑦Streptococcus anginosusのDNAを食道がんの約90%、胃がん約30%に検出したが、この細菌のDNAは対応する非がん部の殆どと肺、腎臓、膵臓がんなどでは見出せなかった。この細菌のDNAは中国、欧米の食道がんにも存在することが明らかとなった。さらに他の研究室との共同研究で食道がんからこのStreptococcus anginosusの培養に成功したので抗菌剤の選択などが可能となった。その結果により、今後食道がん発生への介入研究等も検討する。⑧ウイルスベクターやプラスミドDNAを生体親和物質であるアテロコラーゲンに包埋することにより徐放による長期発現と、宿主免疫系からの保護、さらに必要に応じて外科的な摘出による発現停止操作が可能になった。11q13上の増幅遺伝子の一つであるhst-1を中心に研究を行い、hst-1 cDNAをアデノウイルスに組み込みアテロコラーゲンに入れて1回マウスに投与することにより、放射線を致死量照射しても血小板、白血球減少を大きく阻止し、マウスを生存させることが出来た。この際、小腸粘膜の損傷もほとんど防止できた。さらにウイルスベクターを用いることなくHST1 cDNAをプロモーターにつなぎアテロコラーゲンに混入したDNA製剤を作製し、筋肉内に1回投与することにより、血中のHST1蛋白質及び血小板の2ヶ月にわたる上昇を見ることが出来た。この方

法は増殖因子の個体レベルでの機能を把握する目的のみならず、新しい遺伝子治療の道を開くものと考えられる。in vivoでの遺伝子の機能を知るため、経胎盤胎児への遺伝子の導入、ノックアウトラット作製のためのラットLIF cDNA同定とマウスLIFとの違いなどを明らかにしてきている。これらの方法を用いて、in vivoにおける個体レベルでの遺伝子産物の機能を追求していく予定である。

## (II) ゲノム不安定性：

⑨遺伝子増幅は発がん過程におけるゲノム不安定性の典型的な例である。これまで本研究で得られた増幅ユニットの特徴は次の通りである。増幅する遺伝子はがんの種類によって特異性があり、1つのがん細胞で複数の増幅ユニットがしばしば存在し、1つの増幅ユニットのコア領域は約500Kbで複数の遺伝子が含まれる。胃がんにおける染色体17q12領域の遺伝子増幅部位において、組換えホットスポット領域の同定とその塩基配列の特徴を明らかにしたが、これががんにおける遺伝子増幅領域に共通して見られるか否かについて今後明らかにする。本研究で新たに同定されたc-erbB-2遺伝子の新規エクソンにより、N末端の構造が異なる蛋白質がコードされ、Herceptinなどの既存の中和抗体では阻害されない可能性がある。17q12の共通増幅領域から新たに同定したGasdermin遺伝子の組織における発現パターンは極めてユニークであり、胃と食道でのみ発現する遺伝子は両性類のイモリで1つだけ知られているのみである。Gasdermin遺伝子は胃がん、食道がん、乳がんなどのヒトのがん組織では全く発現せず、がん抑制遺伝子である可能性がある。また消化管組織の発生に重要な働きを持つ可能性が高い。K-sam/FGFR2でみつかった新たな転写物をRT-PCR法で検出すれば、細胞診では判定できない腹膜播種の早期発見に役立つ可能性がある。染色体11q13の増幅領域約1Mbの構造解析を行った。染色体17q12、10q26の増幅領域の塩基配列と照らし合わせて特徴の検索、及び組換えの場であるnuclear matrix attachment siteの塩基配列や複製・組換え・修復に関与する塩基配列の分布をコンピューターにより解析する。組換えホットスポット領域に、積極的に遺伝子増幅を起こさせるような機能があるかも今後の検討課題である。

⑩多くのヒト腫瘍においてMN配列の変異が高頻度に認められ、このMN配列におけるゲノムの不安定化が、発がん過程に重要な役割を果たしている可能性がある。しかしMNの変異に伴ってp53、DNA-PK、ミスマッチ修復酵素、PARPの異常の有無を調べたが、認められなかった。MN変異誘発の分子機構の一つとし



て、G-richなMN配列のコア配列の一つと考えられる(5'-GGCAG-3')の反復配列が、特異的なDNAの高次構造、即ち同一鎖内の逆平行4重鎖構造を取ることが判った。この特異的な高次構造のために、DNAの合成反応が(GGG)の配列部分で阻害されると考えられた。これにより特にlagging鎖のDNA合成の際にギャップが生じることが予想され、このことがMN配列における高頻度の変異誘発の原因の一つになっている可能性が考えられた。さらに、本研究で新たに同定したMN結合蛋白質の解析から、MNBP-BはMN反復配列(G8)との共存下で、G8の4重鎖構造を一部破壊することが判った。即ち正常状態において、MNBP-BがMN配列に結合することにより4重鎖構造の形成に抑制的に作用し、in vivoにおけるDNA合成反応を円滑にしている可能性が考えられる。MNBP-Gに関しては、遺伝的に不安定なMN配列に直接結合することが示されたことで、遺伝子の変異機構に関わる新たな機能を持つ可能性が示唆された。また、MNBP-Gのアミノ酸配列が、一部細菌のヌクレアーゼとの相同性を示したことから、MNBP-GあるいはMNBP-Gを含む複合体がDNA組換え機構に関与している可能性が示唆された。ParpはDNA依存性蛋白キナーゼ(DNA-PKcs)と機能的に相互作用することが知られている。既に、DNA-PKcsがMN配列の安定化に関与する分子種の一つであることを見出したが、今後、Parpの遺伝子欠失マウス等を用いて、MN配列安定化に果たすParpの役割についても検討する。

⑪ヒト胃がん組織においてテロメア構成因子の発現を解析し、テロメラーゼ活性、テロメア長との相関を調べた結果、がん細胞においてTRF1、TRF2、tankyraseがテロメア長ならびにテロメラーゼ活性を制御している可能性が考えられた。細胞の不死化へ関与しているものと思われる。また、ヒト3番染色体上には独立に2つのテロメラーゼリプレッサーが存在していることが示唆された。一方、2番染色体上のテロメラーゼ非依存的に老化を誘導する遺伝子については、12個の候補となるBACクローンに対して、クローンの整列化と、トランスフェクションによる機能的解析が進行中である。このように、生体は複数の老化に関わる経路と、それを構成する遺伝子群を持っており、がん細胞におけるそれらの経路の異常も複数存在することが示唆された。

#### E. 結論

「(I) がん関連遺伝子産物の機能の把握」に関する研究は、がん関連遺伝子の産物の機能を、分子・細胞のレベルのみならず、遺伝子組換え生物などの有力な系も活用して臓器・個体レベルで解析し、がん

の発生・進展の機序を正しく理解する上で有用な基礎的情報を提供した。「(II) ゲノム不安定性の解明」に関する研究からは、発がんに必要な複数遺伝子変化の蓄積に重要な役割を演じ、がん細胞の大きな特徴となっているゲノムの不安定性の機序について、遺伝子増幅、ミニサテライト不安定性、またテロメア長や老化の制御に関する分子機構の解明が進んだ。これらの研究を進める上で必要な技術も複数、開発したが、その中には遺伝子導入・発現制御系など、バイオ研究の基盤的技術として広い範囲の有用性を示すものも少なくない。本研究が目的とするがんにおけるゲノム不安定性の機序の解明と、がん関連遺伝子産物の機能の把握とは、いわば発がん過程の出発点と完成点にあり、がん研究の最重要研究課題の一つである。がんの本態解明のさらなる推進に並んで、今後引き続きがんの新しい予防・診断・治療法の開発に活用していく。

#### F. 研究発表

本報告書が添付される本体である様式A(5)厚生科学研究費補助金総合研究報告書に記載された通り。

#### G. 知的所有権の取得状況

本報告書が添付される本体である様式A(5)厚生科学研究費補助金総合研究報告書に記載された通り。