

20000/20

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明
横田 淳

II. 分担研究報告書

1. がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

横田 淳

2. 細胞脱分化の制御機構に関する研究

齋藤 政樹

3. プログラム細胞死の制御に関する研究

口野 嘉幸

4. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

神奈木 玲児

5. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

宮崎 香

6. 臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

久保田哲朗

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部長

第22染色体の候補がん抑制遺伝子 SEZ6L を単離した。ヒト細胞で8-ヒドロキシグアニンは特異的にGT変異を誘導し、OGG1蛋白質はこの変異を特異的に抑制した。ラミニン-5は肺非小細胞がんが高発現し、小細胞がんではほとんど発現していなかった。ラミニン-5 γ 鎖がMT1-MMPで限定分解されると細胞接着促進型から細胞運動促進型に変化した。GM3合成酵素遺伝子の転写活性化部位には2つのSp1結合部位が存在した。紫外線照射や抗がん剤によってASK1-JNK/p38MAPK伝達経路が活性化されるとc-MycのSer62とSer71がリン酸化されて生物学的機能が亢進した。大腸がんではUDP-ガラクトーストランスポーターmRNAが上昇し、この遺伝子の発現によってシアリルLe^xなどの発現が上昇してセレクチンへの接着能が亢進した。マトリライシンは細胞膜表面に結合して大腸がん細胞の凝集性や転移能を増強させた。MMP阻害剤marimastatは胃がんの腹膜播種モデルにおいて、腫瘍結節数、微小血管密度を減少させ、マウスの生存期間を延長した。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 齋藤 政樹 国立がんセンター研究所 部長
3. 口野 嘉幸 国立がんセンター研究所 部長
4. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長
5. 宮崎 香 横浜市立大学木原生物学研究所 教授
6. 久保田哲朗 慶応大学医学部 講師

A. 研究目的

がんは、細胞内に蓄積する遺伝子の異常によって発生し、その悪性化の過程で、増殖制御機構の破綻、細胞死からの回避、脱分化、さらには、浸潤能・転移能の獲得など、がん細胞に特有な様々な悪性形質を獲得していく。がん細胞内に起こっている遺伝子の異常に関する研究はこの20年間で飛躍的に進み、多くのがんで複数のがん遺伝子・がん抑制遺伝子に異常があることが分かってきた。しかし、個々の遺伝子異常によってどのような悪性形質が獲得されるかは未だ不明の点が多く、また、現在までに同定された遺伝子の異常だけでは個々の悪性形質を遺伝子異常との対応では十分に把握できない。

本研究の目的は、がん細胞に特有な悪性形質である、浸潤、転移、細胞死、脱分化の分子機構を解明することにより、臨床の場で有用ながんの新たな制御法を開発することである。がんの早期診断法などの進歩により多くのがんで根治が可能になってきた

現在、がんの悪性化を阻止する新しい治療法の開発、あるいは、転移腫瘍に対する正確な診断法と適切な治療法の開発は、がんの治癒率や生存率のさらなる向上を目指すために極めて重要な研究課題である。そのためには、がん細胞に特有な悪性形質がどのように獲得されるかを分子レベルで把握することが必須であり、さらに、その結果に基づいた新たながんの制御法を開発していく必要がある。本研究では、がん細胞の浸潤・転移・不死化・脱分化の過程を、がん細胞内に起こっている遺伝子異常との関連で把握し、その制御法を検討していく。さらには、独自に開発された胸腔内転移や腹膜播種の動物モデルを用いて、その治療開発研究を進め、適切な臨床試験デザインを作製していく。本研究によって得られる成果は、がんの臨床病態を把握する上での新たな情報となるのみでなく、制御が最も困難ながんの浸潤や転移に対する新たな治療法の開発にも繋がる。従って、今後のがん制御へ向けて、実際に生体内での標的分子が整理され、進行がんの治療法を改善する上での多くの新たな情報が得られると期待される。本研究は、がんの本態が解明されつつある現在、その臨床応用を目指すために極めて重要である。一方、世界的にもその重要性は認識されているものの、研究の展開が遅れている分野でもあり、飛躍的な研究成果が望まれている。以下に本年度の研究成果を列記する。

B. 研究方法

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

本年度は以下の3課題について研究を進めた。

1) 肺がんの組織型を規定する遺伝子を同定する目的で、mRNA Differential Display法を用いて、小細胞がん、腺がん、扁平上皮がん、それぞれ特異的に発現している遺伝子を探索した。

2) 肺がんの悪性化に伴って蓄積する第22染色体欠失の標的となって失活しているがん抑制遺伝子を同定する目的で、58ヶ所のSTS(sequence tag site)マーカーを用いて肺がん細胞株46例におけるホモ欠失の有無をPCR法で検討した。検出されたホモ欠失領域から遺伝子を探索し、変異・発現について検討した。

3) DNA修復酵素蛋白質OGG1のヒト細胞内における8-ヒドロキシグアニンに対する酵素活性と突然変異抑制能を確認し、定量化するために、8-ヒドロキシグアニンを含有するシャトルベクターを用いて8-ヒドロキシグアニンのヒト細胞内含量を増加し、突然変異の誘導と、OGG1蛋白質による突然変異抑制能について検討した。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

1) これまでの研究で、マトリライシン(MMP-7)が大腸がんで高率に高発現すること、マトリライシンのアンチセンスオリゴヌクレオチドがヌードマウスでの大腸がん細胞の肝転移を抑制することを明らかにしてきた。本年度はマトリライシンとヒト大腸がん細胞との相互作用を調べた。大腸菌を用いて組み換え型マトリライシンを大量に調製し、数種のヒト大腸がん細胞に作用させた後、細胞へのマトリライシンの結合、細胞形態の変化、およびヌードマウスにおける脾臓から肝臓への転移性の変化を調べた。細胞へのマトリライシンの結合は、種々の時間で培養した後、細胞膜分画を調製し、そこに存在するマトリライシンを免疫プロットングで分析した。

2) ラミニン-5の3つのサブユニット($\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$)のうち、 $\alpha 3$ と $\gamma 2$ 鎖が分泌後プロテアーゼによって限定分解されることが報告されている。 $\alpha 3$ 鎖の切断部位を決定するために、ラミニン-5産生細胞の培養液上清から切断断片を精製し、そのN末端配列および細胞接着活性と運動活性を測定した。 $\gamma 2$ 鎖のプロセシングに関しては、非切断型のラミニン-5に対し

て組み換え型MT1-MMPやMMPインヒビターを用いさせ、 $\gamma 2$ 鎖の切断と生理活性の変化を調べた。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

細胞接着分子セレクチンの新規の糖鎖リガンドであるシアリル6-スルホリスxに対する特異抗体を作成し、大腸がん症例についてがん組織および周囲非がん組織での発現を比較検討した。また、従来からがんが増加することが知られている通常のシアリルリスxの分布を検索し、シアリル6-スルホリスxの分布と対比した。さらに、シアリル酸を持たない6-スルホリスxに対しても特異抗体を作成し、大腸がん症例組織について同様の検索を行った。

次に、シアリル6-スルホリスxの発現を導く機序を明らかにするために、培養細胞に候補糖転移酵素遺伝子を導入し、この糖鎖の合成に関与する糖転移酵素遺伝子の同定を試みた。また、細胞の刺激に伴うシアリル6-スルホリスx発現の変化および異化代謝の過程を、ヒト培養大腸がん細胞株をカルシウムイオノフォアであるionomycinで刺激して解析した。この刺激により生じる異化代謝産物の構造を決定した。異化代謝産物のうち、中間代謝産物として同定されたN-デアセチルシアリル6-スルホリスx、および最終代謝産物として同定されたサイクリックシアリル6-スルホリスxに対して特異抗体を作成し、これらの代謝産物の大腸がん組織における発現を解析した。

また、これらの糖鎖の重要な担体であるムチンのコアタンパク質MUC1に対する患者の自己細胞障害性T細胞応答を、自己腫瘍細胞を標的として解析した。自己腫瘍細胞におけるMUC1の発現と、細胞障害性T細胞応答の程度との間の相関を調査した。また、MUC1を発現しない腫瘍細胞を持つ患者について、その腫瘍細胞にMUC1遺伝子を強制発現させ、細胞障害性T細胞の応答の変化を解析した。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

Rat-1細胞にCMVプロモーターの制御下で恒常的発現できるc-myc遺伝子を、またヒトグリオーマ細胞にtet-off systemの制御下で発現を誘導できる野生型H-ras、活性型rasV12、優性抑制型rasN17遺伝子を導入した細胞株を樹立した。細胞死の判定はトルイジンブルーを用いたdye-exclusion assayで行った。またアポトーシスはアクリジンオレンジ染色法、

TUNEL法および顕微鏡による細胞形態観察などの手法を用いて判定した。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

がん細胞の増殖抑制並びに分化誘導現象に関与する複合糖質ガングリオシド GM3 の合成酵素について、本年度は、ヒト GM3 合成酵素遺伝子の転写開始点上流領域約 11kbp をサブクローン化し、塩基配列を決定すると共に、段階的欠失変異クローンを作製し、ルシフェラーゼ活性をレポーターとしてプロモーター活性を測定した。宿主細胞として、本遺伝子発現の低いヒト大腸がん細胞 HCT116 と発現の高いヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC を用いた。さらに、ヌードマウスを使ったマウス肺がん細胞株 3LL 細胞の *in vivo* 腫瘍作成実験系並びに HCT116 細胞培養系において、FUGENE を使って本遺伝子を導入・強制発現させて、本遺伝子並びに産物の生物活性を解析した。また、本遺伝子ノックアウトマウス作製のため、エクソン 2 及び 3 を欠損したターゲッティングベクターを作成し、胎児性幹 (ES) 細胞の本遺伝子ハーフアリアル欠損株の樹立に成功した。現在、キメラマウスを産出中であり、ホモマウス作成後、*in vivo* における糖鎖リモデリングによる病態生理の解析と共に発がん性変化などを追究して、糖鎖機能を統合的に探る予定である。ガングリオシド (GM3 並びに GD3) のマイクロドメイン形成の検索は、免疫化学的染色後の光学顕微鏡下並びに電顕下観察、走査電顕及び共焦点レーザー顕微鏡下観察を行った。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

我々は matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤により胃がん腹膜播種が抑制されることを明らかにしてきたが、その機序については不明な点が多い。本年度は、MMP 阻害剤 marimastat を用いて、その血管新生阻害が腹膜播種抑制に与える影響について検討した。5 週齢のヌードマウスまたは SCID マウスに、胃の低分化型腺癌細胞株 TMK-1 1×10^6 を腹腔投与し腹膜播種モデルを作製した。約 1~2 mm 大の播種結節が形成される 7 日目に皮下植え込み型ポンプを用いて治療群 (n=5) には marimastat 27 mg/kg/day を、対照群 (n=5) には溶媒の DMSO を持続皮下投与した。21 日目に犠牲死させ、腹膜播種結節の検討を行った。血管新生の評価は、播種結節

内の微小血管密度で行った。なお、測定には両群とも約 5 mm 大の播種結節を用いた。さらに marimastat および mitomycin C の投与を行い、各群の生存期間を評価した。

(倫理面への配慮)

手術標本を用いた研究は、病理学的検査の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物実験は動物の生命や苦痛に対して十分な倫理的配慮を払って行なった。

C. 研究成果

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

1) 小細胞がんでは発現せず、非小細胞がんでは高発現している遺伝子として LAMB3 を同定した。この遺伝子はラミニン-5 の $\beta 3$ 鎖をコードしており、ラミニン-5 は $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ の 3 つのサブユニットからなっているので、さらに、 $\gamma 2$ 鎖をコードする LAMC2 遺伝子の発現を確認した。その結果、LAMB3 と LAMC2 は非小細胞がんの 66% (21/32) で共発現しているのに対し、小細胞がんでは 8% (1/13) でしか発現していなかった。この結果からラミニン-5 の発現動態が、転移や薬剤感受性など、肺の非小細胞がんと小細胞がんの生物学的性状を規定している一因子であると考えられた。

2) 小細胞がんの 1 例で D22S310 マーカー領域のホモ欠失を見出した。そこで、第 22 染色体の遺伝子配列情報を基にして欠失領域を検討した結果、この欠失は約 428 kb に及んでいることがわかった。この領域内の遺伝子を探索し、部分配列が決定されている SEZ6L 遺伝子を同定できたので、さらに、SEZ6L 遺伝子の全構造を決定し、肺がんにおける発現とゲノム異常について検討した。発現は肺がん細胞株の約 30% (14/46) に検出され、変異は細胞株 3 例と臨床検体 1 例で検出された。この結果は、肺がん細胞の一部で SEZ6L 遺伝子の異常が発生あるいは進展に関与していることを示唆している。

3) supF 遺伝子の 159 番目の塩基に 8-ヒドロキシグアニンを挿入したプラスミドベクターを作製し、ヒト肺がん細胞 NCI-H1299 における突然変異の頻度と特異性を検討した。その結果、変異の頻度は 130 倍増強し、その 90% 異常が 159 番目の GT 変異

であった。そこで、この細胞にOGG1 遺伝子を強発現させると、GT 変異が有意に抑制された。これらの結果は大腸菌や酵母の結果と同様であり、ヒトの細胞においても8-ヒドロキシグアニンは特異的にGT変異を誘導し、OGG1 蛋白質はこの変異を特異的に抑制することが明らかになった。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

1) 大腸がん細胞に外部から精製マトリライシンを処理すると、細胞が浮遊しながら大きな凝集体を形成した。また、このようにマトリライシンを処理したヒト大腸がん細胞をヌードマウスの脾臓に注射すると、未処理の細胞に比べて肝臓への転移能が顕著に亢進した。さらに、マトリライシンによる細胞凝集の促進はマトリライシンの細胞膜への結合によるものであることが判明した。これらの現象には活性型のマトリライシンが必要であり、MMPインヒビターはそれらを阻害した。

2) ラミニン-5 産生ヒトがん細胞では、分泌されたラミニン-5 の $\alpha 3$ 鎖のC末端部分に存在するG3とG4ドメインの境界で内在性プロテアーゼによって切断を受け、切断されたG4-G5断片はラミニン-5 から遊離し、切断型ラミニン-5 と協調的に細胞運動を促進した。インテグリン中和抗体やヘパリンを作用させた結果から、ラミニン-5 本体はインテグリンに結合するのに対して、G4-G5断片は細胞表面のヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合することが示唆された。一方、 $\gamma 2$ 鎖のN末端部分がMT1-MMPによって限定分解されると、その細胞運動促進活性が上昇することを見いだした。TIMP-2 や合成MMPインヒビターは $\gamma 2$ 鎖の切断とラミニン-5 の細胞運動促進活性を抑制した。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

大腸がんにおいてシアリル6-スルホリスxは、がん組織より非がん粘膜組織に有意に強く発現していた($n=23$, $p<0.001$)。一方、通常シアリル6-スルホリスxは、CSLEX-1 およびSNH-3 のいずれの抗体でも、がん組織に有意に発現しており($p=0.007$, $p=0.02$)、シアリル6-スルホリスxの分布と対照的であった。シアリル6-スルホリスxに対する特異抗体を用いて検索した所、これもシアリル6-スルホリスxと同じくがん組織より非がん粘膜組織に有意に強く反応していた($p<0.001$)。この結果から、大

腸ではがん化に伴い6-硫酸化が低下すると考えられた。

内因性の酸基転移酵素を有する細胞にフコース転移酵素遺伝子を導入した所、フコース転移酵素アイソザイムVIあるいはVIIの導入によってシアリル6-スルホリスxの発現が誘導され、アイソザイムIVあるいはVIの導入によってシアリル6-スルホリスxの発現が誘導された。大腸などの上皮系細胞には主としてアイソザイムのIII、IV、VIが発現されているので、大腸においてはフコース転移酵素VIが主要なシアリル6-スルホリスx合成酵素と推定された。

大腸がん細胞株のシアリル6-スルホリスxの発現はionomycin 刺激後数分以内に低下し、かわりにその代謝産物(サイクリックシアリル6-スルホリスx)の発現が誘導された。このサイクリックシアリル6-スルホリスxは、細胞接着分子セレクトインとの結合性を失っていた。代謝産物のうち、中間代謝産物N-デアセチルシアリル6-スルホリスxおよび最終代謝産物サイクリックシアリル6-スルホリスxに対する特異抗体を用いて大腸がん症例組織における発現を解析した所、いずれもがん組織より非がん粘膜組織に有意に発現していた($p<0.001$)。以上から、この異化代謝系はセレクトインとの接着を抑制する機構であり、しかも非がん粘膜組織で活発に働いていることが判明した。

また、乳がん細胞のムチンMUC1 に対する患者自己の細胞障害性T細胞応答は、自己樹状細胞の存在によって著しい増強を認めた。しかし実際の乳がん患者においては、抗原であるMUC1 のがん細胞での発現低下によって、免疫応答からがん細胞がエスケープしている例が少なくなかった。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

紫外線照射や抗がん剤処理によって細胞内のストレスキナーゼカスケードが活性化され、活性化されたJNKがc-MycのN末端から62および71番目のセリン残基を特異的にリン酸化し、c-Mycの安定性とその機能昂進をもたらしているということを明らかにした。さらにc-Myc 依存的アポトーシスに対して抑制的に働くがん遺伝子H-rasの発現によってグリオーマ細胞や胃がん細胞のようなヒトがん細胞にカスパーゼ非依存的にアポトーシスと異なった分子機

構で制御されるプログラム細胞死が誘導されることを見出した。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

ヒト・ガングリオシド GM3 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の情報制御を、本酵素を高発現する細胞株 SK-N-MC 及び低発現性の細胞株 HCT116 を使って解析し、Sp1 結合部位の重要性を示した。また、本遺伝子の強制発現系において、培養系で HCT116 大腸がん細胞にアポトーシスが誘導され、全ガングリオシド欠損マウス肺がん 3LL 細胞株から樹立した本遺伝子導入株で腫瘍性増殖が刺激されることが判明した。さらに、3LL 細胞株への遺伝子導入により、新たにガングリオシド GM3 及び GD3 を発現させると、これらの新規糖脂質はそれぞれ特異的な機能性マイクロドメインを形成して、シグナル蛋白分子 cSrc や FAK と複合体を作っていることを、形態学的並びに生化学的に明らかにした。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

結節総重量 (g/body) は治療群 0.16 ± 0.08 、対照群 0.40 ± 0.18 と治療群において有意 ($P=0.026$) な腹膜播種抑制がみられた。結節数 (count/body) についてもそれぞれ 9.4 ± 3.8 vs. 18.2 ± 6.8 と治療群が有意 ($P=0.036$) に少数であった。結節重量と結節中 marimastat 濃度に負の相関を認めた。MVD (count/mm²) は治療群で 61.2 ± 14.3 、対照群で 82.0 ± 8.8 と、治療群で有意 ($P=0.024$) に低値であった。生存期間はマリマスタット投与により延長し、また mitomycinC の併用でさらに延長した。

D. 考察

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

がん細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにすることは、がんの病態を遺伝子レベルで解明するために、また、遺伝子異常との対応で把握するために必須のことである。最近、ヒトの全ゲノム配列と遺伝子の数が明らかにされたので、今後は、この領域の研究が急速に展開すると予想される。我々はそれに先んじて mRNA Differential Display 法を用いた解析を進めてきたが、今年度は、がんの悪性度や組織的特異性を規定すると予想されるラミニン

-5 を、非小細胞がんが高発現している遺伝子として同定できた。ラミニン-5 は基底膜の主要蛋白質であり、がん細胞の浸潤や転移との関連性も以前から言われている。特に、上皮細胞が産生するユニークなラミニンなので、今後はその生物活性を、特に肺がん細胞の浸潤や転移との関連で追求していきたい。

肺がんにおける第 22 染色体の欠失は染色体解析や他の方法でも検出されており、この染色体上には肺がんの悪性化に関わるがん抑制遺伝子が存在すると考えられている。しかし、これまでの我々の検討でも既知のがん抑制遺伝子には変異が検出されず、未知のものがあると考えている。そこで、第 22 染色体のゲノム配列情報に基づいて、ホモ欠失の有無を全染色体に互って調べた。結果的には、1 例ではあるが小細胞がん細胞株で 22q12.1 領域にホモ欠失を検出した。この領域には少なくとも二つの遺伝子が存在するので、現在、これらの遺伝子について、肺がん細胞における変異や発現動態について検討している。変異が検出されれば、さらに、変異の生物学的意義を追求し、がん抑制遺伝子として機能しているかどうか、結論を出したい。

8-ヒドロキシグアニンは突然変異を誘発する酸化的 DNA 傷害であり、その発生と修復の機構をヒトがんの発生・進展過程における遺伝子変異の蓄積との関連で把握することは重要である。しかし、本研究の多くは大腸菌や酵母を用いたものであり、ヒト細胞における遺伝子変異にどの程度関与しているか、また、OGG1 修復酵素遺伝子が実際に変異を抑えているかは明らかでなかった。そこで、本研究ではヒト細胞での 8-ヒドロキシグアニンの変異原性と OGG1 の変異抑制能を明らかにすることを目的とした。その結果、予想以上に明白な結果が得られた。今後は、OGG1 遺伝子の変異や多型による活性の差が変異抑制能にどのように影響しているか検討し、細胞のがん化やがん細胞の悪性化を引き起こす遺伝子変異の効率が DNA 修復酵素の活性によって規定されているか明らかにしたい。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

活性型のマトリライシンががん細胞の細胞膜に結合すると、細胞の凝集性と動物体内での転移性が上昇することが明らかになった。マトリライシンの受容体はまだ同定されていないが、カベオラのような

特殊な膜構造にマトリライシンが結合することが示唆された。細胞凝集能の上昇は、マトリライシンが直接細胞間接着因子として機能する結果、あるいはマトリライシンがある種の細胞内シグナルを誘導する結果起こると考えられる。いずれにしてもこの細胞凝集の上昇は、血管内でのがん細胞の着床効率を高め、転移を増大させると推測される。このような作用機構はこれまでにどのMMPでも知られていない。今後細胞膜上の受容体や標的蛋白質を同定することが、マトリライシンを標的とする抗転移剤の開発にも役立つと考えられる。

一方、LN5の $\alpha 3$ と $\gamma 2$ 鎖がMT1-MMPや他のプロテアーゼによって特異的なプロセッシングを受け、細胞運動促進活性を変化させることが明らかになった。がん細胞はIV型コラーゲンなどを分解しながら基底膜を浸潤する。この際、LN5の $\gamma 2$ 鎖が限定分解されることにより、その活性が細胞接着促進型から細胞運動促進型に変化する。このような変化はがん細胞の運動性を刺激し、浸潤を促進すると考えられる。このような機構も、マトリライシンの作用機構と同様に、マトリックスプロテアーゼの新しい転移促進機構である。今後これらをさらに検証する必要がある。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

大腸がんでのシアリル6-スルホルイスxの消退と硫酸基を持たないシアリルルイスxの出現は、がん化にともなう6-硫酸化の低下が原因と考えられ、今後、この原因遺伝子を同定する必要がある。候補としては、6-硫酸基転移酵素や、活性化硫酸基すなわちPAPSの合成酵素やトランスポーターの変化などが考えられる。また、がん細胞におけるセレクチン接着能のフィードバック抑制機序の欠如は、がん細胞と血管内皮との接着の亢進を引きおこし、血行性転移を促進すると考えられるので、このフィードバックの分子機構を解明する。特に、このフィードバック抑制機構に特徴的なサイクリックシアル酸の形成機構を解析する。

MUC1をターゲットとした免疫治療については、今後、樹状細胞の前駆細胞の特異マーカーを見出し、患者末梢血中からの自己樹状細胞の効率よい回収を可能にする必要がある。また、樹状細胞のホーミング機構を解析し、腫瘍巣への選択的リクルート法を探る予定である。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

c-Myc依存性アポトーシスに関する研究成果はこれまでに我々が明らかにしたカスパーゼカスケードより下流のシグナル伝達機構に関する情報と相俟って、がんの発生や進展におけるc-Myc依存性アポトーシスの役割を考えていく上で非常に重要で意義深い。またH-Rasにカスパーゼ非依存的非アポトーシス性細胞死を誘導する能力が備わっているということを示せたことは、ヒト細胞に分子機構を異にする2種類の細胞死プログラムが存在していることを示しており、プログラム細胞死の研究に新たな一頁を加えるものである。また、これらの発見は、細胞のがん化やがん細胞における悪性形質獲得の分子機構の解明を図っていく上で多くの情報をもたらすとともに、アポトーシス耐性を獲得している多くのヒトがんに対する新たな治療法の開発を可能にするものとしても期待される。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

酸性スフィンゴ糖脂質ガングリオシド生合成代謝系のキー酵素をコードするGM3合成酵素遺伝子の分子構造とその発現制御機構が徐々に明らかになりつつあり、また、本遺伝子欠損マウスの産出成功も時間の問題となり、糖脂質糖鎖及びそれを合成する糖転移酵素の生物学的意義の解明もそれほど遠くない将来に達成されるものと期待される。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

marimastatの抗腫瘍効果には血管新生阻害が関与しており、marimastatがtumor dormancy therapyに用いうる可能性が示唆された。

E. 結論

肺がんの悪性度を規定する遺伝子として、発現レベルで変動しているものはラミニン-5を同定できた。ラミニン-5は基底膜の主要構成蛋白質であり、浸潤・転移との関連が強く示唆される。悪性化の過程で変異を起こして遺伝子としてはSEZ6Lを同定したが、変異の頻度が低いので、第22染色体には他に標的遺伝子がある可能性がある。細胞内での8-ヒドロキシグアニンの産生ががん化へのリスクを上昇させていることが示唆された。これらの情報を基にして、が

ん化・がんの悪性を阻止・予防できるような新たな手段を検討していきたい。

活性型マトリライシンを大腸がん細胞に作用させると細胞膜表面に結合し、細胞の凝集性と動物体内での転移性が上昇した。この転移促進作用はマトリライシンが細胞膜に結合することによって起こる細胞の凝集性の増加によるものと考えられるが、その分子機構についてはさらに検討する必要がある。ヒトがん細胞が分泌するラミニン-5に関しては、プロテアーゼによるプロセッシングによって機能変換が起こることが明らかになった。

セレクチンの糖鎖リガンドは、CA19-9、SLX、NCC-ST-439といった名称で既に広く腫瘍マーカー検査に応用されており、多くの患者がこの検査を受けている。これらは、当初は患者体内での腫瘍の有無を調べることを目的とした検査であった。しかし、最近、これらの糖鎖がセレクチンと結合能を持ち、転移と深く関連する分子であることが判明した。今回の結果は、がん細胞のセレクチンへの接着の異常亢進が、がん化にともなう硫酸化の低下によって引き起こされる可能性を示している。正常細胞において硫酸化糖鎖が持っている細胞接着の調節機能が、がん化によって失われることがその大きな要因と考えられる。

c-Myc 依存性アポトーシスにおけるカスパーゼカスケードの上流域でのシグナル伝達機構が解明されたことで、c-Myc 依存性アポトーシスのシグナル伝達系の全容を理解できるようになった。またヒト細胞にアポトーシスとは異なった分子機構で制御される細胞死プログラムが存在していることが明らかとなった。

ガングリオシド生合成代謝系のキー酵素（シアリルトランスフェラーゼ-1/ガングリオシドGM3合成酵素/ST3GalV）の遺伝子構造とそのプロモーター領域の解析から本酵素遺伝子の発現制御機序が徐々に明らかになりつつある。また、全ガングリオシドが欠損したマウス肺癌3LL細胞に本遺伝子を強制発現させることにより、新規に発現させた最終産物ガングリオシドGM3が特異的な機能性マイクロドメインを形成することを、初めて形態学的に明示することができた。

転移モデルを用いた研究では胃がんの腹膜播種に対する抗転移治療法の研究が進んでいる。本研究を

さらに発展させ、臨床への応用を目指したい。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
論文発表

- 1) Hamada, K., Koyama, T., Shimizu, K., Ikawa, S., Kawate, S., Yokota, J., Ohwada, S. and Morishita, Y. Absence of p51 mutations in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 148:161-164, 2000.
- 2) Hamada, K., Kohno, T., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Sugawara, C., Ohwada, S., Sekido, Y., Minna, J. and Yokota, J. Two regions of homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000.
- 3) Shimizu, S., Suzukawa, K., Kodera, T., Nagasawa, T., Abe, T., Taniwaki, M., Yagasaki, F., Tanaka, H., Fujisawa, S., Johansson, B., Ahlgren, T., Yokota, J. and Morishita, K. Identification of breakpoint cluster regions at 1p36.3 and 3q21 in hematological malignancies with t(1;3)(q36;q21). *Genes Chromosomes Cancer*, 27:229-238, 2000.
- 4) Saito, M., Okamoto, A., Kohno, T., Takakura, S., Shinozaki, H., Isonishi, S., Yasuhara, T., Yoshimura, T., Ohtake, Y., Ochiai, K., Yokota, J. and Tanaka, T. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 85:160-165, 2000.
- 5) Yokota, J. Tumor progression and metastasis (REVIEW). *Carcinogenesis*, 21:497-503, 2000.
- 6) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Res.*, 24:255-262, 2000.

- 7) Yamada, T., Kohno, T., Navarro, J. M., Ohwada, S., Perucho, M. and Yokota, J. Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 120:11-17, 2000.
- 8) Takakura, S., Kohno, T., Shimizu, K., Ohwada, S., Okamoto, A. and Yokota, J. Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers. *Oncogene*, 19:836-840, 2000.
- 9) Takita, J., Hayashi, Y., Takei, K., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K. and Yokota, J. Allelic imbalance on chromosome 18 in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 36:508-513, 2000.
- 10) Manda, R., Kohno, T., Hamada, K., Takenoshita, S., Kuwano, H. and Yokota, J. Absence of hSNF5/INI1 mutation in human lung cancer. *Cancer Lett.*, 153:57-61, 2000.
- 11) Shinmura, K., Kohno, T., Takeuchi-Sasaki, M., Maeda, M., Segawa, T., Kamo, T., Sugimura, H. and Yokota, J. Expression of the OGG1-type Ia (nuclear form) protein in cancerous and non-cancerous human cells. *Int. J. Oncol.*, 16:701-707, 2000.
- 12) Shimizu, K., Nagamachi, Y., Tani, M., Kimura, K., Shiroishi, T., Wakana, S. and Yokota, J. Molecular cloning of a novel NF2/ERM/4.1 superfamily gene, Ehm2, that is expressed in high-metastatic K1735 murine melanoma cells. *Genomics*, 65:113-120, 2000.
- 13) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Morishita, K., Takita, J., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Alterations of the PPP1R3 gene in hematological malignancies. *Int. J. Oncol.*, 17:717-721, 2000.
- 14) Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J. and Morishita, K. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*, 96:3209-3214, 2000.
- 15) Kohno, T., Sato, T., Takakura, S., Takei, K., Inoue, K., Nishioka, M. and Yokota, J. Mutation and expression of the DCC gene in human lung cancer. *Neoplasia*, 2:300-305, 2000.
- 16) Manda, R., Kohno, T., Niki, T., Yamada, T., Takenoshita, S., Kuwano, H. and Yokota, J. Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275:440-445, 2000.
- 17) Kimura, K., Shinmura, K., Yoshimura, K., Shimizu, K., Katai, H., Beppu, Y., Moriya, H. and Yokota, J. Absence of germline CHK2 mutations in familial gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91:875-879, 2000.
- 18) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Takeuchi-Sasaki, M., Kim, S.-R., Nohmi, T. and Yokota, J. Adenine excisional repair function of the MYH protein on the adenine:8-hydroxyguanine base-pair in double-strand DNA. *Nucl. Acids Res.*, 28:4912-4918, 2000.
- 19) Nishioka, M., Kohno, T., Takahashi, M., Niki, T., Yamada, T., Sone, S. and Yokota, J. Identification of a 428-kb homozygously deleted region disrupting the SEZ6L gene at 22q12.1 in a lung cancer cell line. *Oncogene*, 19:6251-6260, 2000.
- 20) Sunaga, N., Kohno, T., Kolligs, F. T., Fearon, E. R., Saito, R. and Yokota, J. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (b-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 30:316-321, 2001.
- 21) Yanaihara, N., Kohno, T., Takakura, S., Takei, K., Otsuka, A., Sunaga, N.,

- Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Hagiwara, K., Tanaka, T. and Yokota, J. Physical and transcriptional map of a 311-kb segment of chromosome 18q21, a candidate lung tumor suppressor locus. *Genomics*, 72:169-179, 2001.
- 22) Shinozaki, H., Okamoto, A., Shimizu, K., Saito, M., Yokota, J. and Ochiai, K. Absence of p51 alterations in human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, in press, 2001.
- 23) Shinmura, K. and Yokota, J. The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*, in press, 2001 (August issue).
- 24) Takakura, S., Kohno, T., Manda, R., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J. Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers. *Int. J. Oncol.*, 18:817-824, 2001.
- 25) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Kohno, T. and Yokota, J. Somatic mutations and single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Cancer Lett.*, in press, 2001.
- 26) Saitoh, T., Shinmura, K., Yamaguchi, S., Tani, M., Seki, S., Murakami, H., Nojima, Y. and Yokota, J. Enhancement of OGG1 protein APLyase activity by increase of APEX protein. *Mutation Res.*, in press, 2001.
- 27) Ikeda, M., Nozaki, A., Sugiyama, K., Tanaka, T., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K., Saito, M., Kato, N. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.*, 66:51-63, 2000.
- 28) Ikeda, M., Sugiyama, K., Tanaka, K., Nozaki, A., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K., Saito, M. and Kato, N. Antiviral activity of lactoferrin against HCV infection in human cultured cells. In: *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, edited by K. Shimazaki et al., Elsevier Science B.V., pp225-232, 2000.
- 29) Matsuda, K., Li, J.-L., Ichinose, S., Harasawa, R., Saito, M. and Yamamoto, N. Monoclonal antibody against mycoplasma fermentans-specific aminoglycoglycerolipid. *Microbiol.Immunol.*, 44:695-702, 2000.
- 30) Matsuda, K., Fukuda, I., Saito, M. and Yamamoto, N. HIV induction from latently infected cells by phosphoglycolipid antigens of mycoplasmafermentans. *Infect. Immun.*, in press, 2001.
- 31) Ishii, A., Makino, K., Nakamura, C., Matsuda, K., Ohta, M. and Saito, M. Molecular characterization of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 (CMP-NeuAc:Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer α 2,3-sialyltransferase): Its expression characteristics and genomic structure in humans and mice. *Eur. J. Biochem.*, in press, 2001.
- 32) Matsumoto, S., Kamei, D., Ishii, A., Sakai, R., Nishimura, S. and Saito, M. Expression and characterization of the active form of human ganglioside GM3 synthase in Escherichia coli as MBP-fusion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2001.
- 33) Mogi, H., Ishii, A., Inokuchi, J., Saito, M., and Nojiri, H. Introduction of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 gene induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press, 2001
- 34) Matsuda, K., Matsuda, S., Saito, M., Ito, Y. Separation of phospholipids and glycolipids using analytical toroidal-coil Counter-current Chromatography (I): Separation of Human Brain Lipids and Standards. *J.Chromatogr. A*, in press, 2001.
- 35) Ishii, A., Kamei, D., Nakamura, C., Ishiyama, T., and Saito, M. Promoter region analysis of human GM3 synthase gene. *J. Biol. Chem.*,

- in press, 2001.
- 36) Matsuda, K., Ichinose, S., Sato, Y., Inokuchi, J., Ishii, A. and Saito, M. Dynamism and ultrastructure of ganglioside GM3-enriched extracellular particles budding from GM3-enriched rafts in GM3-deficient murine lung cancer 3LL cells transfected with GM3 synthase cDNA. *FEBS Lett.*, in press, 2001.
- 37) Noguchi, K., Yamana, H., Kitanaka, C., Mochizuki, T., Kokubu, A. and Kuchino, Y. Differential Role of the JNK and p38 MAPK Pathway in c-Myc- and s-Myc-Mediated Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:221-227, 2000.
- 38) Narita, Y., Asai, A., Kuchino, Y. and Kirino, T. Actinomycin D and staurosporine, potent apoptosis inducers in vitro, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45:149-156, 2000.
- 39) Liang, A., Brunen-Nieweler, C., Muramatsu, T., Kuchino, Y., Beier, H. and Heckmann, K. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. *Gene*, 262:161-168, 2001.
- 40) Muramatsu, T., Heckmann, K., Kitanaka, C. and Kuchino, Y. Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. *FEBS Lett.*, 488:105-109, 2001.
- 41) Noguchi, K., Kokubu, A., Kitanaka, C., Ichijo, H. and Kuchino, Y. ASK1-signaling promotes c-Myc protein stability during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281:1313-1320, 2001.
- 42) Izawa, M., Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Ohmori, K., Ishida, H., Nakamura, S., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T. and Kannagi, R. Expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is inversely correlated with conventional sialyl Lewis x expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 60:1410-1416, 2000.
- 43) Ohmori, K., Kanda, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T., Tamatani, T. and Kannagi, R. P- and E-Selectins recognize sialyl 6-sulfo Lewis X, the recently-identified L-selectin ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278:90-96, 2000.
- 44) Kannagi, R. Sphingolipid metabolism and cell signaling - monoclonal anti-glycosphingolipid antibodies. *Method Enzymol.*, 312:160-179, 2000.
- 45) Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Hiraiwa, N., Sawai, S., Hanaoka, J., Ichinose, M., Tezuka, N., Inoue, S., Fujino, S. and Kannagi, R. Autologous dendritic cells or cells expressing both B7-1 and MUC1 can rescue tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from MUC1-mediated apoptotic cell death. *J. Leukocyte Biol.* 68:225-232, 2000.
- 46) Futamura, N., Nakamura, S., Tatematsu, M., Yamamura, Y., Kannagi, R. and Hirose, H. Clinicopathologic significance of sialyl Lex expression in advanced gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 83: 1681-1687, 2000.
- 47) Kannagi, R. Transcriptional regulation of expression of carbohydrate ligands for cell adhesion molecules in the selectin family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 491:267-278, 2001.
- 48) Sekine, M., Taya, C., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Takenaka, M., Mitsuoka, Y., Imai, E., Izawa, M., Kannagi, R. and Suzuki, A. Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase. *Eur. J. Biochem.*, 268:1129-1135, 2001.
- 49) Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Izawa, M., Hiraiwa, N., Zenita, K., Takeuchi, T., Murai, H., Miura, S. and Kannagi, R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br. J.*

- Cancer in press.
- 50) Ohmori, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Adachi, K., Kameyama, A., Nonoyama, S. and Kannagi, R. Novel anti-CD15 antibodies with distinct specificity towards Lewis X determinants carried by mucin core carbohydrates. In Mason, D.Y. (ed.): *Leukocyte Typing VII*. Oxford, Oxford University Press, in press, 2001.
 - 51) Kannagi, R. Fucosyltransferase VI. In Taniguchi, N. (ed.): *Handbook of Glycosyltransferases and Their Related Genes*. Springer-Verlag, in press, 2001.
 - 52) Ichikawa, Y., Koshikawa, N., Hasegawa, S., Ishikawa, T., Momiyama, N., Kunizaki, C., Takahashi, M., Moriwaki, Y., Akiyama, H., Yamaoka, H., Yanoma, S., Tsuburaya, A., Nagashima, Y., Shimada, H. and Miyazaki, K. Marked increase of trypsin(ogen) in serum of linitis plastica (gastric cancer, Borrmann 4) patients. *Clin. Cancer Res.*, 6:1385-1388, 2000.
 - 53) Miyata, S., Koshikawa, N., Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. Trypsin stimulates integrin $\alpha 5 \beta 1$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.*, 275:4592-4598, 2000.
 - 54) Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., and Quaranta, V. Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell Biol.*, 148:615-624, 2000.
 - 55) Kishibe, J., Yamada, S., Okada, Y., Sato, J., Ito, A., Miyazaki, K., and Sugahara, K. Structural requirements of heparan sulfate for the binding to the tumor-derived adhesion factor/angiomodulin that induces cord-like structures to ECV-304 human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275:15321-15329, 2000.
 - 56) Kato, Y., Frankenne, F., Noel, A., Sakai, N., Nagashima, Y., Koshika, S., Miyazaki, K., Foidart, J.-M. High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol. Oncol. Res.*, 6:24-26, 2000.
 - 57) Ebihara, N., Mizushima, H., Miyazaki, K., Watanabe, Y., Ikawa, S., Nakayasu, K., and Kanai, A.: The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 71: 69-79 (2000).
 - 58) Hirotsaki, T., Mizushima, H., Tsubota, Y., Moriyama, K., and Miyazaki, K. Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin $\alpha 3$ chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J. Biol. Chem.*, 275:22495-22502, 2000.
 - 59) Watanabe, K., Takahashi, H., Habu, Y., Kamiya-Kubushiro, N., Kamiya, S., Nakamura, H., Yajima, H., Ishii, T., Katayama, T., Miyazaki, K., and Fukui, F. Interaction with heparin and matrix metalloproteinase-2 cleavage expose a cryptic anti-adhesive site of fibronectin. *Biochemistry*, 39:7138-7144, 2000.
 - 60) Tsubota, Y., Mizushima, H., Hirotsaki, T., Higashi, S., Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. Isolation and activity of proteolytic fragment of laminin-5 $\alpha 3$ chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278:614-620, 2000.
 - 61) Kagesato, Y., Mizushima, H., Koshikawa, N., Kitamura, H., Hayashi, H., Ogawa, N., Tsukuda, M. and Miyazaki, K. Sole expression of laminin $\gamma 2$ chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:184-192, 2001.
 - 62) Adachi, Y., Itoh, F., Yamamoto, H., Arimura, Y., Kikkawa-Okabe, Y., Miyazaki, K., Carbone, D. P. and Imai, K. Expression of angiomodulin (TAF/Mac 25) in invading tumor cells and blood vessels correlates with tumor progression and poor prognosis

- in human colorectal cancers. *Int. Cancer Res.*, in press, 2001.
- 63) Wada, N., Seki, M., Saikawa, Y., Satoh, M., Toizumi, A., Tamura, Y., Kageyama, T., Otani, Y., Kubota, T., Kumai, K. and Kitajima, M. Jejunal limb obstruction caused by a cholesterol stone 15 years after a total gastrectomy and 20 years after a cholecystectomy. *Surg. Today*, 30:181-184, 2000.
- 64) Ishikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Watanabe, M., Teramoto, T., Kumai, K., Takechi, T., Okabe, H., Fukushima, M. and Kitajima, M.: Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: Possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91:105-112, 2000.
- 65) Otani, Y., Ohgami, M., Igarashi, N., Kimata, M., Kubota, T., Kumai, K., Kitajima, M. and Mukai, M. Laparoscopic wedge resection of gastric submucosal tumor. *Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Technique*. 10:19-23, 2000.
- 66) Kimata, M., Kubota, T., Otani, Y., OHGAMI, M., Ishikawa, Y., Yokoyama, T., Isshiki, S., Abe, S., Egawa, T., Tokuyama, J., Wada, N., Kumai, K., Kitajima, M and Mukai, M.: Gastrointestinal stromal tumors treated by laparoscopic surgery: Report of three cases. *Surg. Today*, 30: 177-180, 2000.
- 67) Otani, Y., Kubota, T., Kumai, K., Ohgami, M., Hayashi, N., Ishikawa, Y., Wada, N. and Kitajima, M. Gastric carcinoma in elderly patients: Surgery for gastric carcinoma in patients more than 85 years of age. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15:507-511, 2000.
- 68) Kondo, T., Kubota, T., Tanimura, T., Yamaue, H., Akiyama, S., Maehara, Y., Tanigawa, T., Kitajima, M., Takagi, H., and Japan Research Society for Appropriate Cancer Chemotherapy: Cumulative results of chemosensitivity tests for antitumor agents in Japan. *Anticancer Res.*, 20:2389-2392, 2000.
- 69) Inada, T., Ogata, Y., Kubota, T., Tomikawa, M., Yamamoto, S., Andoh, J., Ozawa, I., Hishinuma, S., Shimizu, H., and Kotake, K. 5-Fluorouracil sensitivity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in advanced gastric cancer. *Anticancer Res.*, 20:2547-2462, 2000.
- 70) Furukawa, T., Kubota, T., Tanino, H., Oura, S., Yuasa, S., Murate, H., Morita, K., Kozakai, K., Yano, T., and Hoffman, R.M.: Chemosensitivity of breast cancer lymph node metastasis compared to the primary tumor from individual patients tested in the histoculture drug response assay. *Anticancer Res.*, 20:3657-3658, 2000.
- 71) Egawa, T., Kubota, T., Otani, Y., Kurihara, N., Abe, S., Kimata, M., Tokuyama, J., Wada, N., Suganuma, K., Kuwano, Y., Kumai, K., Sugino, Y., Mukai, M., and Kitajima, M. Surgically treated Cronkheit-Canada syndrome associated with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 3:156-160, 2000.
- 72) Kitago, M., Inada, T., Igarashi, S., Mizutani, S., Ogata, Y., and Kubota, T. Multiple gastric carcinoid tumors with type A gastritis concomitant with gastric cancer: A case report. *Oncol. Rep.*, 8:343-346 2001.
- 73) Abe, S., Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., Akiyama, T., Acing, S., and Kitajima, M. UCN-01(7-Hydroxystaurosporine) Inhibits *in vivo* Growth of Human Cancer Cells through Selective Perturbation on G1 Phase Checkpoint Machinery. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press, 2001.

がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部部長

研究要旨

mRNA Differential Display 法で、肺小細胞がんでは発現せず、肺非小細胞がんでは高発現している遺伝子としてラミニン-5 の $\beta 3$ 鎖をコードする LAMB3 を同定した。ラミニン-5 の発現動態が、転移や薬剤感受性など、肺の非小細胞がんと小細胞がんの生物学的性状の違いを規定している一因子であると考えられた。肺非小細胞がんの悪性度を規定している新規の候補がん抑制遺伝子として、進行肺がんでは高頻度に欠失している第 22 染色体長腕から SEZ6L 遺伝子を単離した。ヒトの細胞において酸化 DNA 傷害である 8-ヒドロキシグアニンは特異的に GT 変異を誘導し、OGG1 蛋白質はこの変異を特異的に抑制することを明らかにした。DNA 中の 8-ヒドロキシグアニン含量とその修復機能が細胞がん化やがんの悪性化の要因となる遺伝子変異効率を規定していることを示す結果である。

A. 研究目的

がんの臨床上最も大きな問題はがんが転移・再発を起こすことである。そこで、本研究では、転移・再発を最小限に食止めるがんの新たな制御法の開発を目指して以下の研究を行なっている。(1) 早期肺がんの再発・予後を規定する遺伝子の同定、(2) 肺がん細胞あるいは正常肺上皮細胞で特異的に発現している遺伝子の同定、(3) 肺がんの悪性度を規定している遺伝子の同定、(4) がんの悪性化過程で蓄積する染色体欠失と点突然変異の分子機構の解明、(5) 肺がんの同所移植モデル、骨肉腫の血行性肺転移モデルの作製。がんの早期診断法などの進歩により多くのがんが根治が可能になってきた現在、がんの悪性化を阻止する新しい治療法の開発、あるいは、転移・再発に対する正確な診断法と適切な治療法や予防法の開発は、がんの治癒率や生存率のさらなる向上のために極めて重要な研究課題である。今年度は上記(2)、(3)、(4)に関して、以下のような研究成果が得られた。

B. 研究方法

1) mRNA Differential Display 法を用いて、小細胞がん、腺がん、扁平上皮がんなど、組織型の異なる肺がんそれぞれ特異的に発現している遺伝子を探索した。
2) 肺がんの悪性化に伴って蓄積する第 22 染色体欠失の標的となって失活しているがん抑制遺伝子を同定する目的で、58ヶ所の STS(sequence tag site) マーカーを用いて肺がん細胞株 46 例における

ホモ欠失の有無を PCR 法で検討した。検出されたホモ欠失領域から遺伝子を探索し、変異・発現について検討した。

3) DNA 修復酵素蛋白質 OGG1 のヒト細胞内における 8-ヒドロキシグアニンに対する酵素活性と突然変異抑制能を確認し、定量化するために、8-ヒドロキシグアニンを含有するシャトルベクターを用いて 8-ヒドロキシグアニンのヒト細胞内含量を増加し、突然変異の誘導と、OGG1 蛋白質による突然変異抑制能について検討した。

(倫理面への配慮)

手術標本を用いた研究は、病理学的検査の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物実験は動物の生命や苦痛に対して十分な倫理的配慮を払って行なった。

C. 研究結果

1) mRNA Differential Display 法で、小細胞がんでは発現せず、非小細胞がんでは高発現している遺伝子として LAMB3 を同定した。この遺伝子はラミニン-5 の $\beta 3$ 鎖をコードしており、ラミニン-5 は $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ の 3 つのサブユニットからなっているので、さらに、 $\gamma 2$ 鎖をコードする LAMC2 遺伝子の発現を確認した。その結果、LAMB3 と LAMC2 は非小細胞がんの 66%(21/32) で共発現しているのに対し、小細胞がんでは 8%(1/13) でしか発現していなかった。この結果からラミニン-5 の発現動態が、転移や薬剤感受性など、肺の非小細胞がんと小細胞

がんの生物学的性状を規定している一因子であると考えられた。

2) 46例の肺がん細胞株を対象に、22q11.2-q13.3にマップされた58個のSTSマーカーを用いて、PCR法でホモ欠失の有無について検討した。その結果、小細胞がんの1例でD22S310マーカー領域のホモ欠失を見出した。そこで、第22染色体の遺伝子配列情報を基にして欠失領域を同定した。その結果、この欠失は約428kbに及んでいることがわかった。そこで、この領域内の遺伝子を探索し、部分配列が決定されているSEZ6L遺伝子を同定した。そこで、さらに、SEZ6L遺伝子の全構造を決定し、肺がんにおける発現とゲノム異常について検討した。発現は肺がん細胞株の約30%(14/46)に検出され、変異は細胞株3例と臨床検体1例で検出された。この結果は、肺がん細胞の一部でSEZ6L遺伝子の異常が発生あるいは進展に関与していることを示唆している。

3) supF遺伝子の159番目の塩基に8-ヒドロキシグアニンを挿入したプラスミドベクターを作製し、ヒト肺がん細胞NCI-H1299における突然変異の頻度と特異性を検討した。その結果、変異の頻度は130倍増強し、その90%異常が159番目のGT変異であった。そこで、この細胞にOGG1遺伝子を強発現させると、GT変異が有意に抑制された。これらの結果は大腸菌や酵母の結果と同様であり、ヒトの細胞においても8-ヒドロキシグアニンは特異的にGT変異を誘導し、OGG1蛋白質はこの変異を特異的に抑制することが明らかになった。

D. 考察

1) がん細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにすることは、がんの病態を遺伝子レベルで解明するために、また、遺伝子異常との対応で把握するために必須のことである。最近、ヒトの全ゲノム配列と遺伝子の数が明らかにされたので、今後は、この領域の研究が急速に展開すると予想される。我々はそれに先んじてmRNA Differential Display法を用いた解析を進めてきたが、今年度は、がんの悪性度や組織的特異性を規定すると予想されるlaminin-5を、非小細胞がんを高発現している遺伝子として同定できた。laminin-5は基底膜の主要蛋白質であり、がん細胞の浸潤や転移との関連性も以前から言われている。特に、上皮細胞が産生するユニークなlamininなので、今後はその生物活性を、特に肺がん細胞の浸潤や転移との関連で追求していきたい。

2) 肺がんにおける第22染色体の欠失は染色体解析や他の方法でも検出されており、この染色体上には肺がんの悪性化に関わるがん抑制遺伝子が存在すると考えられている。しかし、これまでの我々の検討でも既知のがん抑制遺伝子には変異が検出されず、未知のものがあると考えている。そこで、第22染色体のゲノム配列情報に基づいて、ホモ欠失の有無を全染色体に亘って調べた。結果的には、1例ではあるが小細胞がん細胞株で22q12.1領域にホモ欠失を検出した。この領域には少なくとも二つの遺伝子が存在するので、現在、これらの遺伝子について、肺がん細胞における変異や発現動態について検討している。変異が検出されれば、さらに、変異の生物学的意義を追求し、がん抑制遺伝子として機能しているかどうか、結論を出したい。

3) 8-ヒドロキシグアニンは突然変異を誘発する酸化的DNA傷害であり、その発生と修復の機構をヒトがんの発生過程を遺伝子変異の蓄積との関連で把握することは極めて重要である。しかし、本研究の多くは大腸菌や酵母を用いたものであり、ヒト細胞における遺伝子変異にどの程度関与しているか、また、OGG1修復酵素遺伝子が実際に変異を抑えているかは明らかでなかった。そこで、本研究ではヒト細胞での8-ヒドロキシグアニンの変異原性とOGG1の変異抑制能を明らかにすることを目的とした。その結果、予想以上に明白な結果が得られた。今後は、OGG1遺伝子の変異や多型による活性の差が変異抑制能にどのように影響しているか検討し、細胞のがん化やがん細胞の悪性化を引き起こす遺伝子変異の効率がDNA修復酵素の活性によって規定されているか明らかにしたい。

E. 結論

肺がんの悪性度を規定する遺伝子として、発現レベルで変動しているものはラミニン-5を同定できた。ラミニン-5は基底膜の主要構成蛋白質であり、浸潤・転移との関連が強く示唆される。悪性化の過程で変異を起こして遺伝子としてはSEZ6Lを同定したが、変異の頻度が低いので、第22染色体には他に標的遺伝子がある可能性がある。細胞内での8-ヒドロキシグアニンの産生ががん化へのリスクを上昇させていることが示唆された。これらの情報を基にして、がん化・がんの悪性化を阻止・予防できるような新たな手段を検討していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamada, K., Koyama, T., Shimizu, K., Ikawa, S., Kawate, S., Yokota, J., Ohwada, S. and Morishita, Y. Absence of p51 mutations in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 148:161-164, 2000.
- 2) Hamada, K., Kohno, T., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Sugawara, C., Ohwada, S., Sekido, Y., Minna, J. and Yokota, J. Two regions of homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000.
- 3) Shimizu, S., Suzukawa, K., Kodera, T., Nagasawa, T., Abe, T., Taniwaki, M., Yagasaki, F., Tanaka, H., Fujisawa, S., Johansson, B., Ahlgren, T., Yokota, J. and Morishita, K. Identification of breakpoint cluster regions at 1p36.3 and 3q21 in hematological malignancies with t(1;3)(q36;q21). *Genes Chromosomes Cancer*, 27:229-238, 2000.
- 4) Saito, M., Okamoto, A., Kohno, T., Takakura, S., Shinozaki, H., Isonishi, S., Yasuhara, T., Yoshimura, T., Ohtake, Y., Ochiai, K., Yokota, J. and Tanaka, T. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 85:160-165, 2000.
- 5) Yokota, J. Tumor progression and metastasis (REVIEW). *Carcinogenesis*, 21:497-503, 2000.
- 6) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Res.*, 24:255-262, 2000.
- 7) Yamada, T., Kohno, T., Navarro, J. M., Ohwada, S., Perucho, M. and Yokota, J. Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 120:11-17, 2000.
- 8) Takakura, S., Kohno, T., Shimizu, K., Ohwada, S., Okamoto, A. and Yokota, J. Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers. *Oncogene*, 19:836-840, 2000.
- 9) Takita, J., Hayashi, Y., Takei, K., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K. and Yokota, J. Allelic imbalance on chromosome 18 in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 36:508-513, 2000.
- 10) Manda, R., Kohno, T., Hamada, K., Takenoshita, S., Kuwano, H. and Yokota, J. Absence of hSNF5/INI1 mutation in human lung cancer. *Cancer Lett.*, 153:57-61, 2000.
- 11) Shinmura, K., Kohno, T., Takeuchi-Sasaki, M., Maeda, M., Segawa, T., Kamo, T., Sugimura, H. and Yokota, J. Expression of the OGG1-type 1a (nuclear form) protein in cancerous and non-cancerous human cells. *Int. J. Oncol.*, 16:701-707, 2000.
- 12) Shimizu, K., Nagamachi, Y., Tani, M., Kimura, K., Shiroishi, T., Wakana, S. and Yokota, J. Molecular cloning of a novel NF2/ERM/4.1 superfamily gene, Ehm2, that is expressed in high-metastatic K1735 murine melanoma cells. *Genomics*, 65:113-120, 2000.
- 13) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Morishita, K., Takita, J., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Alterations of the PPP1R3 gene in hematological malignancies. *Int. J. Oncol.*, 17:717-721, 2000.
- 14) Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J. and Morishita, K. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVII gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*, 96:3209-3214, 2000.
- 15) Kohno, T., Sato, T., Takakura, S., Takei, K., Inoue, K., Nishioka, M. and Yokota, J. Mutation and expression of the DCC gene in human lung cancer. *Neoplasia*, 2:300-305, 2000.
- 16) Manda, R., Kohno, T., Niki, T., Yamada, T., Takenoshita, S., Kuwano, H. and Yokota, J. Differential expression of the LAMB3 and

- LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275:440-445, 2000.
- 17) Kimura, K., Shinmura, K., Yoshimura, K., Shimizu, K., Katai, H., Beppu, Y., Moriya, H. and Yokota, J. Absence of germline CHK2 mutations in familial gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91:875-879, 2000.
- 18) Dragani, T. A., Hirohashi, S., Juji, T., Kawajiri, M., Kihara, M., Ono-Kihara, M., Manenti, G., Nomoto, T., Sugimura, H., Genka, K., Yokota, J., Takahashi, T., Mitsudomi, T. and Nagao, M. Population-based mapping of pulmonary adenomasusceptibility 1 locus. *Cancer Res.*, 60:5017-20, 2000.
- 19) Park, J. G., Yang, H. K., Kim, W. H., Caldas, C., Yokota, J. and Guilford, P. J. Report on the First Meeting of the International Collaborative Group on Hereditary Gastric Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:1781-1782, 2000.
- 20) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Takeuchi-Sasaki, M., Kim, S.-R., Nohmi, T. and Yokota, J. Adenine excisional repair function of the MYH protein on the adenine:8-hydroxyguanine base-pair in double-strand DNA. *Nucl. Acids Res.*, 28:4912-4918, 2000.
- 21) Nishioka, M., Kohno, T., Takahashi, M., Niki, T., Yamada, T., Sone, S. and Yokota, J. Identification of a 428-kb homozygously deleted region disrupting the SEZ6L gene at 22q12.1 in a lung cancer cell line. *Oncogene*, 19:6251-6260, 2000.
- 22) Sunaga, N., Kohno, T., Kolligs, F. T., Fearon, E. R., Saito, R. and Yokota, J. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (b-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 30:316-321, 2001.
- 23) Yanaihara, N., Kohno, T., Takakura, S., Takei, K., Otsuka, A., Sunaga, N., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Hagiwara, K., Tanaka, T. and Yokota, J. Physical and transcriptional map of a 311-kb segment of chromosome 18q21, a candidate lung tumor suppressor locus. *Genomics*, 72:169-179, 2001.
- 24) Shinozaki, H., Okamoto, A., Shimizu, K., Saito, M., Yokota, J. and Ochiai, K. Absence of p51 alterations in human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, in press, 2001.
- 25) Shinmura, K. and Yokota, J. The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*, in press, 2001 (August issue).
- 26) Takakura, S., Kohno, T., Manda, R., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J. Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers. *Int. J. Oncol.*, 18:817-824, 2001.
- 27) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Kohno, T. and Yokota, J. Somatic mutations and single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Cancer Lett.*, in press, 2001.
- 28) Saitoh, T., Shinmura, K., Yamaguchi, S., Tani, M., Seki, S., Murakami, H., Nojima, Y. and Yokota, J. Enhancement of OGG1 protein APLyase activity by increase of APEX protein. *Mutation Res.*, in press, 2001.

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

細胞脱分化の制御機構に関する研究

分担研究者 齋藤 政樹 国立がんセンター研究所部長

研究要旨：ヒト・ガングリオシド GM3 合成酵素遺伝子について、ゲノムの単離と構造解析、染色体上の局在決定、遺伝子発現状態を明らかにすると共に、ゲノム解析から得られるプロモーター領域の情報制御を解析した。本遺伝子導入によって新たに合成されたガングリオシド GM3 が細胞表面でマイクロドメインを形成し、細胞外放出（エクソサイトosis/Budding-Out）を受ける現象を形態学的及び免疫化学的に捉えることに成功した。ヒト大腸癌細胞 HCT116 に本遺伝子を導入すると、アポトーシスが誘導されることが判明した。ES 細胞（胎児性幹細胞）の本遺伝子 Half-allele 欠損株の樹立に成功した。

A. 研究目的

生体膜複合糖質・脂質分子（とくに糖脂質及びスフィンゴ脂質）はそれ自体で生体超分子を形成し、さらに細胞内の癌遺伝子産物やシグナル伝達蛋白分子と機能複合体マイクロドメインを形成して細胞間相互認識・情報伝達に関わっている。この側面から悪性化のしくみを明らかにし、その制御を介して制がんを目指す。

B. 研究方法

癌細胞の増殖抑制並びに分化誘導現象（脱分化からの脱却）に深く関与する複合糖質ガングリオシド GM3 の合成酵素について、本年度は、ヒト GM3 合成酵素遺伝子の転写開始点上流領域約 11kbp をサブクローン化し、塩基配列を決定すると共に、段階的欠失変異クローンを作製し、ルシフェラーゼ活性をレポーターとしてプロモーター活性を測定した。宿主細胞として、本遺伝子発現の低いヒト大腸癌細胞 HCT116 と発現の高いヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC を用いた。さらに、ヌードマウスを使ったマウス肺癌細胞株 3LL 細胞の In vivo 腫瘍作成実験系並びに HCT116 細胞培養系において、FUGENE を使って本遺伝子を導入・強制発現させて、本遺伝子並びに産物の生物活性を解析した。また、本遺伝子ノックアウトマウス作成のため、エクソン 2 及び 3 を欠損したターゲティングベクターを作成し、胎児性幹（ES）細胞の本遺伝子ハーフアリアル欠損株の樹立に成功した。現在、キメラマウスを産出中であり、ホモマウス作成後、in vivo における糖鎖リモデリングによる病態生理の解析と共に発癌性変化などを追究して、糖鎖機能を統合的に探る予定である。ガングリオシド（GM3 並びに GD3）のマイクロドメイン形成の検索は、免疫化学的染色後の光学顕微鏡下並びに電顕下観察、走査電顕及び共焦点レーザー顕微鏡下観察を行った。

C. 研究結果

ヒト・ガングリオシド GM3 合成酵素遺伝子につい

て、ゲノムの単離と構造解析、染色体上の局在決定、遺伝子発現状態の検索に引き続き、本年度は、ゲノム解析から得られるプロモーター領域の情報制御を、本酵素を高発現するヒト Neuroblastoma 細胞株 SK-N-MC 及び低発現性のヒト大腸癌細胞株 HCT116 を使って解析し、Sp1 結合部位の重要性を示した。また、本遺伝子の強制発現系において、培養系でヒト HCT116 大腸癌細胞にアポトーシスが誘導され、全ガングリオシド欠損マウス肺癌 3LL 細胞株から樹立した本遺伝子導入株の In vivo 腫瘍作成実験系で、腫瘍性増殖が刺激されることが判明した。さらに、3LL 細胞株への遺伝子導入により、新たにガングリオシド GM3 及び GD3 を発現させると、これらの新規糖脂質はそれぞれ特異的な機能性マイクロドメインを形成して、シグナル蛋白分子 cSrc や FAK と複合体を作っていることを形態学的並びに生化学的に明らかにした。

D. 考察

酸性スフィンゴ糖脂質ガングリオシド生合成代謝系のキー酵素をコードする本糖鎖遺伝子の分子構造とその発現制御機構が徐々に明らかになりつつあり、また、本遺伝子欠損マウスの産出成功も時間の問題となり、糖脂質糖鎖及びそれを合成する糖転移酵素の生物学的意義の解明もそれほど遠くない将来に達成されるものと予想される。また本遺伝子は、その受容（癌）細胞によって、発現する機能が顕著に異なるので、制癌への応用に関しては、個々の癌細胞でその作用を詳細に検討し、担癌生体（担癌動物や癌患者）への応用を目指すべきであることが判明した。

E. 結論

ガングリオシド生合成代謝系のキー酵素（シアリルトランスフェラーゼ-1/ガングリオシド GM3 合成酵素/ST3GalV）の遺伝子構造とそのプロモーター領域の解析から本酵素遺伝子の発現制御機構が徐々に明らかになりつつある。また、全ガングリオ

シドが欠損してマウス肺癌 3LL 細胞に、本遺伝子を強制発現させることにより、新規に発現させた最終産物ガングリオシド GM3 が特異的な機能性マイクロドメインを形成することを、初めて形態学的に明示することができた。一方、本遺伝子は、その受容（癌）細胞によって、発現する機能が顕著に異なることが明らかになった。これは、同一機能性分子の機能発現過程、即ちシグナル伝達機構、において明確な相違、いわば「枝分かれ現象」があるものと予想された。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Masanori Ikeda, Nozaki A, Sugiyama K, Tanaka T, Naganuma A, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Saito M, Kato N.: Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res*, 66: 51-63, 2000.

2) Masanori Ikeda, Sugiyama, K., Tanaka, K., Nozaki, A., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekihara, H., K. Shimotohno, K., Saito M. and Kato, N.: Antiviral activity of lactoferrin against HCV infection in human cultured cells. In: *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, edited by K. Shimazaki et al., Elsevier Science B.V., pp225-232, 2000.

3) Torahiko Tanaka, Sugiyama, K., Ikeda, M., Naganuma, A., Nozaki, A., Saito M., Shimotohno, K. and N. Kato: Hepatitis C Viruses NS5B RNA Replicase Specifically Binds Ribosomes. *Microbiol. Immunol.*, 44 (6): 543-550, 2000.

4) Kazuhiro Matsuda, Li, J.-L., Ichinose, S., Harasawa, R., Saito M. and Yamamoto, N.: Monoclonal Antibody against *Mycoplasma fermentans*-Specific Aminoglycoglycerolipid. *Microbiol. Immunol.*, 44 (8): 695-702, 2000.

5) Kazuhiro Matsuda, Fukuda, I., Saito M. and Yamamoto, N.: HIV Induction from Latently Infected Cells by Phosphoglycolipid Antigens of *Mycoplasma fermentans*. *Infect. Immun.*, in press, 2001.

6) Atsushi Ishii, Makino, K., Nakamura, C., Matsuda, K., Ohta, M. and Saito M.: Molecular characterization of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 (CMP-NeuAc:Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer α 2,3-sialyltransferase): Its expression characteristics and genomic structure in humans and mice. *Eur. J. Biochem.*, in press, 2001.

7) Matsumoto, S., Kamei, D., Ishii, A., Sakai, R., Nishimura, S. and Saito, M. Expression and characterization of the active form of human ganglioside GM3 synthase in *Escherichia coli* as

MBP-fusion protein.

Biochem. Biophys. Res. Commun., in press, 2001.

8) Mogi, I.I., Ishii, A., Inokuchi, J., Saito M., and Nojiri, H. Introduction of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 gene induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2001

9) Kazuhiro Matsuda, Matsuda, S., Saito M., Ito, Y.: Separation of Phospholipids and Glycolipids Using Analytical Toroidal-coil Counter-current Chromatography (I): Separation of Human Brain Lipids and Standards. *J. Chromatogr. A*, in press, 2001.

10) Atsushi Ishii, Kamei, D., Nakamura, C., Ishiyama, T., and Saito M. Promoter region analysis of human GM3 synthase gene. *J. Biol. Chem.*, in press, 2001.

11) Matsuda, K., Ichinose, S., Sato, Y., Inokuchi, J., Ishii, A., and Saito, M. Dynamism and ultrastructure of ganglioside GM3-enriched extracellular particles budding from GM3-enriched rafts in GM3-deficient murine lung cancer 3LL cells transfected with GM3 synthase cDNA. *FEBS Lett.*, in press, 2001.

2. 学会発表

1) Masaki Saito, Ohta, M. and Ishii, A.: Molecular Cloning and Characterization of cDNA (Gene) of Human Ganglioside GM3 Synthase (Sialyltransferase-1: SAT-1). Gordon Research Conference on Glyco and Sphingolipid Biology, II Ciocco (Barga) Italy, May 14 - 19, 2000

2) Masaki Saito, Ishiyama, T., Nakamura, C., Hamanaka, Y., Matsuda, K. and Ishii, A.: GENOMIC STRUCTURES AND EXPRESSION CHARACTERISTICS OF GANGLIOSIDE GM3 SYNTHETIC SIALYLTRANSFERASE IN HUMANS AND MICE. *Glycosyltransferases 2nd International Symposium*, Toronto, Canada, May 12-14, 2000

3) Masaki Saito: Molecular characterization of ganglioside GM3 synthetic sialyl-transferase: Its expression characteristics and genomic structure in humans and mice. *Japan-The Netherlands 400 Years Symposium on "Recent Advances in Glycobiology"*, The United Nations University, Tokyo, April 24-27, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ガングリオシド GM3 合成酵素遺伝子については、その産物の酵素蛋白の機能並びに最終産物ガングリオシド GM3 の機能等の応用法を含めて、日本国内、米国・カナダ並びに欧州における特許を既に 1998 年に取得している。