

厚生科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒト腫瘍の分子病態の解析と
臨床応用のための基盤研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋利忠

平成13(2001)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の分子病態の解析と臨床応用のための基盤研究 1
主任研究者 高橋利忠

II. 分担研究報告

1. がん関連遺伝子産物の血清学的解析と研究の総括 11
高橋利忠（愛知県がんセンター研究所）
2. 造血器腫瘍の発生に関わる遺伝子異常の解析 15
瀬戸加太（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. 固型がんの発生に関わる遺伝子異常の解析 19
高橋 隆（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）
4. がん細胞の増殖・浸潤に関わる細胞骨格の研究 23
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒト腫瘍の分子病態の解析と臨床応用のための基礎研究

主任研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所副所長

研究要旨 本研究では、(a)造血器腫瘍と(b)肺がん等の難治がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割、並びに(c)がんの浸潤・転移における細胞骨格分子の役割の解明を試みている。本年度の主たる成果は以下の様である。

(a) (1) MALT型Bリンパ腫に於いてはAPI2-MALT1 キメラ遺伝子が形成される。遺伝子診断に応用すべく染色体 DNA を用いた LA-PCR 法を開発し、従来の RT-PCR 法により検出された 16 症例の全例の検出に成功した。(2) キメラ蛋白を解析した結果、API2(アポトーシス阻害蛋白)と MALT1 蛋白に比して、キメラ蛋白の半減期は延長しており、アポトーシス阻害の増強による腫瘍化への関与が推定された。(b) (3) Cyclooxygenase-2 (COX-2) 特異的阻害剤の添加により、肺がん細胞株のアポトーシスを伴う増殖抑制が惹起可能なことを示した。更に、COX-2 阻害剤と肺がん用いられている各種抗がん剤との併用によって、抗がん剤の IC₅₀ 濃度を著減しえることを示した。(4) 肝がん細胞株 Hep3B から、TGF-β 依存性アポトーシス誘導に対する感受性と抵抗性の亜株を樹立・解析することにより、TNF ファミリー群と増殖因子群の遺伝子発現と各々の亜株との関連性を示唆する結果を得た。(c) (5) 単層上皮に特異的に発現している中間系フィラメントであるケラチン 18 と結合する蛋白質として、Mrj 及び TRADD を見出した。Mrj は DnaJ/Hsp40 ファミリーに属するシャペロンとしてケラチン 8/18 フィラメント構築を制御していること、また、TNF レセプターのアダプター蛋白である TRADD がケラチンと結合しているため、上皮細胞においては、TNF によるアポトーシス誘導が減弱していることを見出した。

分担研究者	所属施設名	職名	
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長	(2)API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍発生における役割を明らかにする。(b) (3) 難治性固型がんの代表たる肺がんでは、Cyclooxygenase-2 (COX-2) を分子標的とした特異的阻害剤による治療の可能性について検討を加える。また(4)肺がんと並ぶ代表的難治がんである肝がんにおける TGF-β 刺激伝達異常及びアポトーシス誘導能異常を検討し、肝がんの発症への関与及び治療への応用の可能性を検討する。(c) 浸潤・転
高橋 隆	愛知県がんセンター研究所	部長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	

A. 研究目的

(a) 造血器腫瘍では、(1) 粘膜関連型 (MALT) B リンパ腫に特徴的な t(11;18) 転座の結果、形成される API2-MALT キメラ遺伝子を標的にした遺伝子診断、並びに

移では、細胞骨格系蛋白質との関連を検索するために、(5) がんの発生母地である肝細胞や腸上皮細胞などの単層上皮で特異的に発現している中間径フィラメントであるケラチン 18 と結合する新規の蛋白質の同定と、その機能解析を試みる。

B. 研究方法

1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子を標的とした遺伝子産物

MALT リンパ腫の t(11;18)染色体転座切断点より原因遺伝子 MALT1 を単離し、さらに転座相手遺伝子がアポトーシスを抑制する機能のある API2 であることを示し、転座の結果 API2-MALT キメラ遺伝子が形成されることを以前明らかにした。それぞれの cDNA 塩基配列に基づき、種々のプライマーを設定し、RT-PCR 法によるキメラ mRNA の検出を試みる。また、Exon-Intron 構造に基づいて染色体 DNA を用いた Long and accurate (LA)-PCR 法を開発し、遺伝子診断への応用を計る。

2) トランスフェクタントを用いた API2-MALT1 キメラ蛋白の解析

API2, MALT1 及びキメラ遺伝子を発現ベクターに組み込み、COS 細胞をトランスフェクションし、蛋白の発現を経時的に解析した。その際、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用い、蛋白の安定性に与える効果を検討した。

3) 肝がんにおける TGF- β シグナル伝達異常及びアポトーシス誘導能異常に関する検討

肺がん細胞株 (7 株) 並びに中枢及び末梢気道上皮細胞株 (2 株) を対象に、COX-2 特異的阻害剤 (ニメスライド) による増殖抑制は MTT 法を用い、また、アポトーシス惹起の有無は TUNEL 法を用いて検討する。更に、ヒト肺がん治療に用いられる 5 種類の抗がん剤と COX-2 特異的阻害剤との併用効

果についても検討を加える。相乗効果の有無については、イソボログラムを作成し解析を行う。

4) COX-2 を分子標的とした肺がん治療に関する基礎的検討

肝がん細胞株 (7 株) における TGF- β 反応性及びアポトーシス誘導性を検討する。また、肝がん細胞株 Hep3B を限外希釈し、アポトーシス誘導に関する感受性亜株と抵抗性亜株を得る。TGF- β による刺激伝達の有無について、PAI-1 レポーター及び、FAST-1 と Smad の結合配列を持つ FBE・SBE レポーターを用いて検討する。また、アポトーシス関連遺伝子等がスポットされた cDNA アレイを用いて、TGF- β 刺激前後の発現プロファイルの比較解析を行う。

5) 単層上皮で発現している細胞骨格蛋白質ケラチン 18 と結合する蛋白質の同定とその機能解析

肝細胞、腸上皮細胞などの単層上皮で特異的に発現している中間径フィラメント蛋白質であるケラチン 8/18 と結合する蛋白質を酵母 Two-hybrid 法を用いて同定する。Bait 側プラスミド (pYTH) にケラチン 8 あるいは 18 の全長 cDNA を組み込み、GAL4 DNA 結合領域との融合蛋白質を発現させるベクターを作製、これを酵母 Y190 株に導入してトリプトファンで選択する。得られたクローンに Prey 側ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを導入し、ロイシン、ヒスチジンでコロニーを選択する。さらに得られたコロニーに対して、 β ガラクトシダーゼアッセイを行い結合を確認する。陽性クローンのプラスミドを大腸菌に移して調製し、cDNA インサートの DNA 塩基配列を決定する。ホモロジー解析等を行い、既知蛋白質との関連を検索する。

C. 研究結果

1) MALT リンパ腫における API2-MALT キメ

ラ遺伝子を標的にした遺伝子診断

MALT 型 B リンパ腫に認められる t(11;18)(q21;q21) はアポトーシス阻害蛋白群の一員である API2 と新規遺伝子 MALT1 がキメラ遺伝子を形成することを以前明らかにした。RT-PCR 法による検索により、69 症例中 16 例(24%)にキメラ mRNA が検出された。胃では 43 例中 5 例にみとめられ、いずれの症例も抗生物質による治療に反応しない症例であり、治療の良い指針となることが明らかとなった。また、MALT リンパ腫との鑑別診断に用いる節外性び慢性大細胞型リンパ腫 16 例では、全くキメラ mRNA は検出されなかった。

キメラ cDNA の解析により、API2 の転座切断点が 2 ヶ所、MALT1 の転座切断点が 4 ヶ所あり、5 種類のキメラ mRNA が形成されることを明らかにし、更に、Exon-Intron 構造と API2 のゲノムシーケンスを利用して、染色体 DNA を用いての LA-PCR 法を確立した。3 組のプライマーを用いることにより、従来の RT-PCR 法により検出された 16 例の全例を検出可能であった。

2) トランスフェクタントを用いた API2-MALT1 キメラ蛋白の解析

API2, MALT1, API2-MALT1 の発現ベクターを構築し、その蛋白レベルでの解析を行った所、API2, MALT1 とともにその半減期は短い、API2-MALT1 では安定した強い発現が認められた。プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたところ、API2, MALT1 とともに安定した発現が認められ、発現制御には本蛋白分解酵素系が関与することが明らかとなった。本結果により、キメラ蛋白を形成することにより、プロテアソーム系による発現制御機構から回避することで、安定発現し、腫瘍化に関与する可能性が示唆された。

3) COX-2 を分子標的とした肺がん治療に関する基礎的検討

COX-2 特異的阻害剤(ニメスライド)は肺がん細胞株(7株)に対して、濃度依存的増殖抑制効果を示した。また、ノザン解析で高い COX-2 発現を示した肺がん細胞株は、より高い感受性を示した。一方、ヒト中枢及び末梢気道上皮細胞株においては COX-2 の発現は低く、増殖抑制を示さなかった。さらに、TUNEL 法による検討によって、ニメスライドによる増殖抑制にはアポトーシスの誘導が関与していることも明らかとした。尚、ニメスライドによる増殖抑制効果は、p53 遺伝子変異の有無に関わらず観察された。

更に、ニメスライドの併用によって、抗がん剤の IC₅₀ 値を顕著に低減しえること(例えば、CPT-11 活性型の SN38 では 77% 減)が明らかとなった。更に、イソボログラムによる検討によって、これらの効果は、相乗効果であることも示された。

4) 肝がんにおける TGF-β シグナル伝達異常及びアポトーシス誘導能異常に関する検討

PAI-1 レポーター解析において TGF-β 刺激による転写活性化能が保たれている一方で、TGF-β 刺激によるアポトーシス誘導に関しては、肝がん細胞株 7 株中 4 株が抵抗性を示した。次いで、Hep3B 株から感受性亜株と抵抗性亜株を樹立し、解析を更に進めた。感受性亜株(#7及び#8)では、TGF-β 処理 48 時間後には約 70% の細胞がアポトーシスを起こし細胞死に至るのに対し、アポトーシス誘導に抵抗性の亜株(#2及び#11)では、約 10% しかアポトーシスが誘導されなかった。一方、PAI-1 レポーター及び、FAST-1 と Smad の結合配列を持つ FBE・SBE レポーターを用いて検討したところ、何れの亜株も正常な転写活性化を示し、亜株間では差異が無いことが確認された。アポトーシス関連遺伝子等がスポットされた cDNA アレイを用いた発現プロファイル

の比較解析を進めつつあるが、TNF ファミリー群と増殖因子群の遺伝子発現と感受性亜株と抵抗性亜の各々との関連性を示唆する結果を得ている。

5) 単層上皮で発現している細胞骨格蛋白質ケラチン 18 と結合する蛋白質の同定とその機能解析

ケラチン 18 と結合する蛋白質をヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いて酵母 two-hybrid 法で探索した。得られた陽性クローンのうち 2 クローンは、DnaJ/Hsp40 ファミリーに属する Mrj 蛋白質の C 末端側をコードし、1 クローンは、TNF レセプター TRADD の C 末端側をコードしていた。

Mrj は 242 アミノ酸からなる蛋白質 (分子量約 28kDa) で、その N 末端側に J ドメインを持つが、DnaJ/Hsp40 ファミリー蛋白質は、この J ドメインを介して Hsp70 と結合する。Mrj は、調べた中間径フィラメントの中で、ケラチン 18 のみに特異的に結合し、その C 末端側で結合していた。内在性の Mrj を検討していくために、抗 Mrj 抗体を作製し、免疫沈降を行い、Mrj とケラチン 18 が、細胞内で結合していることを確認した。また、免疫蛍光染色により、Mrj がケラチン 8/18 フィラメント上に局在していることを示した。HeLa 細胞に抗 Mrj 抗体をマイクロインジェクションすると、ケラチン 8/18 フィラメントの崩壊が認められた。これらの結果より、Mrj は、Co-chaperone として、ケラチン 8/18 フィラメント構築の制御に関与していることが示唆された。Wound healing assay により、Mrj は細胞の leading edge に濃縮している所見が得られ、細胞が運動する際のケラチン 8/18 フィラメントのダイナミックなモデリングに Mrj が関わっている可能性が示唆された。

TRADD は、TNF が TNF レセプター-1 (TNFR1) に結合すると、TNF レセプターの細胞内ド

メインにリクルートされ、さらに TRADD に他の分子が結合し、TNF のシグナルを伝えていく分子である。TRADD は、その C 末端側に death domain をもつが、その death domain の C 末端側でケラチン 18 およびケラチン 14 (Type 1 ケラチン) に特異的に結合している。内在性の TRADD を検討するために、抗 TRADD 抗体を作製し、免疫沈降を行い、細胞内でケラチン 18 と TRADD が結合していることを確認した。また、免疫蛍光染色により、上皮細胞において、TRADD がケラチン 8/18 フィラメント上に局在していることを示した。ケラチン 18 と TRADD の結合の生理学的意義を検討するために、ケラチンやビメンチンなどの中間径フィラメントを発現していない SW13 細胞に、ケラチン 8/18 やケラチン 18 の N 末端 (TRADD 結合部位) を強制発現させ、TNF によるアポトーシス誘導への影響を観察すると、TNF によるアポトーシス誘導が有意に減弱していた。これらの結果により、上皮細胞では、ケラチンは、TRADD との結合を介して、TNF-TNFR1 によるアポトーシス誘導を減弱させていることが示唆された。

D. 考察

1) MALT リンパ腫の API2-MALT1 キメラ遺伝子を標的とした遺伝子診断

今回の多数症例の解析から、API2-MALT1 キメラ遺伝子は、発生臓器により関与が異なり、肺と腸管の MALT リンパ腫でもっとも頻度が高く、胃 MALT では 14%にのみ認められた。胃 MALT リンパ腫で、API2-MALT1 遺伝子異常を有するものは、ピロリ菌に対する抗生物質治療に反応しなかった。API2-MALT1 の遺伝子異常をもたない MALT リンパ腫については、真の腫瘍として存在するの否か、今後注意深く検討していく必要がある。

2) トランスフェクタントを用いた

API2-MALT1 キメラ蛋白の解析

キメラ遺伝子形成の MALT リンパ腫発症における役割を検討する第一歩として、トランスフェクタント作成による蛋白レベルでの解析を試みた。その結果、キメラ蛋白はプロテアソーム抵抗性であり、強い発現がみられた。API2 はアポトーシス阻害活性があることが知られており、キメラ蛋白の安定化によるアポトーシス阻害作用の増強が腫瘍化につながっている可能性が示され、他の造血器腫瘍におけるキメラ遺伝子の役割との類似性が示唆された。本研究を進めるとともに、より直接的に腫瘍発生における機能を検討するため、トランスジェニックマウスの樹立を試みている。

3) COX-2 を分子標的とした肺がんの治療に関する基礎的検討

肺がんにおいて過剰発現している COX-2 を分子標的とした、COX-2 特異的阻害剤 (ニメスライド) による新たな肺がん治療法の可能性を示唆する結果を得た。p53 遺伝子変異の有無に関わらず COX-2 特異的阻害剤によるアポトーシスの誘導が検出された点も、高頻度の p53 遺伝子異常を持つ肺がんの治療への応用上有利と考えられた。COX-2 特異的阻害剤は単独でもある程度の抗腫瘍効果を示したが、特に注目すべき点は副作用が軽微な COX-2 特異的阻害剤の併用によって、現在肺がん治療に用いられつつある各種抗がん剤の IC₅₀ 値を著減し得る点である。今後益々増加が予想される予備力の少ない高齢者肺がんに対しても、クオリティオブライフを損なわずにより高い治療効果を得られる可能性も示唆された。現在更に、ヒト肺がん患者への応用を目指し、SCID マウス移植ヒト肺がん細胞株を用いて、*in vivo* における治療効果を確認しつつある。

4) 肝がんにおける TGF- β シグナル伝達異常及びアポトーシス誘導能異常に関する検討

肝がん細胞株は多くの肺がん細胞株と異なり、TGF- β 刺激伝達系に全般的な刺激伝達障害がみられるのではなく、TGF- β によるアポトーシス誘導に対する感受性が選択的に低下していることが明らかとなった。現在 cDNA アレイの解析によって、感受性の異なる亜株間で異なる制御を受けている遺伝子群の同定を進めつつあるが、これまでのところアポトーシス誘導とアポトーシス抑制の夫々に関わると考えられる遺伝子群に制御の差異を見出している。従って、今後の研究の発展によって、アポトーシス誘導或いは抑制に関わる分子を分子標的とした肝がんに対する新たな治療への応用が開ける可能性が期待される。

5) 単層上皮で発現している細胞骨格蛋白質ケラチン 8/18 と結合する蛋白質の同定とその機能解析

中間径フィラメントの構築は、これまで我々が解析を押し進めてきたリン酸化・脱リン酸化によって全体的に制御されているが、新しく見出された Mrj-Hsp70 による制御は、ケラチン 8/18 に特異的な制御システムである。ケラチン 8/18 が特異的に発現している肝細胞や腸上皮細胞由来のがん細胞の浸潤・転移の機構を明らかにしていくためには、この Mrj-Hsp70 によるケラチン 8/18 特異的制御機構について詳細に検討していく必要がある。細胞が運動する際に、ケラチン 8/18 フィラメントがダイナミックに再構築され、その課程に Mrj が関与している可能性が示唆された。肝細胞がんやアルコール性肝障害などの肝臓疾患では、病理組織学的にマロリー体と呼ばれるケラチン 8/18 を含む細胞内凝集物を認めることが知られている。最近、細胞内の不溶物形成とシャペロンとの関係が注目されており、Mrj-Hsp/c70 シャペロンとケラチン 8/18 の不溶化との関係を明らかにして行きたい。また、以前から熱ショックにより中

間径フィラメントの Collapse が引き起こされることが知られているが、ケラチン 8/18 フィラメント構築変化に Mrj-Hsp70 シャペロンがどのような役割を演じているかについても今後検討していく必要がある。

ケラチン 18 結合蛋白質として同定した TRADD は、TNF が結合すると TNFR1 の細胞内ドメインと結合し、さらに、FADD、TRAF2、RIP をリクルートすることによってシグナルを伝達する分子である。本研究により、ケラチン 8/18 を発現している単層上皮系の細胞では、ケラチン 18 と TRADD が結合しているために TRADD が TNFR1 にリクルートされるのを阻害し、TNF によるアポトーシスが減弱していることを見出した。Type 1 ケラチンに特異的に結合する TRADD を介して、ケラチンフィラメントが TNF-TNFR1 の細胞内シグナル経路に影響を与える可能性があることは、上皮系のがん細胞における細胞骨格と細胞内シグナル伝達経路の関係を解析していく新しい糸口となりうると考えられる。ケラチン 8/18 フィラメントが足場となり、これに結合した TRADD が、FADD や TRAF2 をリクルートすることにより、シグナルをケラチン 8/18 フィラメント上から直接発信しているのではないかという仮説も現在考えており、細胞形態・細胞接着状態の情報がケラチンフィラメントをセンサーとして TRADD の下流へ伝達される可能性について検討していく。

E. 結論

1) MALT リンパ腫に関与する遺伝子異常である API2-MALT1 キメラ遺伝子の形成について詳細に解析を進め、RT-PCR 法を確立し、MALT リンパ腫の約 20~30% に遺伝子異常が認められること、また、発生臓器により、遺伝子異常の関与が異なることを示した。さらに、染色体 DNA を用いた LA-PCR 法も確立し、遺伝子診断への有用性を示した。

2) API2 はアポトーシス阻害蛋白の一員であるが、一方、MALT1 遺伝子は、パラカスパーゼの一員であることがホモロジー解析から示されているが、その機能は明らかでない。本研究により API2-MALT1 キメラ蛋白はプロテアソームに抵抗性があり、アポトーシス阻害機能を示すキメラ蛋白の安定化が腫瘍発生につながっている可能性が示された。

3) 我々は、肺がんにおいて COX-2 が過剰発現していることを始めて報告し、その浸潤・転移への関与の可能性や、外科切除後の予後との相関等を報告してきた。それらの知見を元に、COX-2 特異的阻害剤を用いて検討を加えた本研究結果は、COX-2 を肺がん治療の新たな分子標的として用いる可能性を示唆した。特に、各種抗がん剤との併用によって、相乗効果が得られることが明らかとなった点は、特記に値する。

4) 肝がんでは、肺がんと同様に TGF- β 刺激に対する反応性の異常を示すが、肺がんとは異なり、アポトーシス誘導に関わる刺激伝達系に選択的に伝達異常が起こっている可能性が示唆された。このアポトーシス誘導経路の異常に関わる分子の更なる解析は、アポトーシス誘導の回復による新たな肝がん治療法の開発につながる可能性がある。現在、肺がんで高頻度に見られる全般的な TGF- β 不応性機構の解明を目指した検討も平行して進めつつあり、二つの代表的な難治がんの類似点と相違点を浮き彫りにし、それぞれに適した革新的治療法へと結び付けていきたい。

5) 単層上皮で特異的に発現している中間径フィラメント蛋白質であるケラチン 18 と結合する蛋白質として Mrj および TRADD を新たに見出した。Mrj は、DnaJ/Hsp40 ファミリーに属する Co-chaperone としてケラチン 8/18 フィラメント構築の制御に関与していることを明らかにし、細胞運動時

のケラチン 8/18 フィラメント構築のダイナミックなモデリングに参与している可能性を認めた。また、上皮細胞において、TRADD がケラチン細胞骨格と結合しているために TNF によるアポトーシス誘導が減弱していることを認め、TRADD を介するケラチン 8/18 細胞骨格と TNF シグナリングとのクロストークがある可能性を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Takeyama, K., Seto, M., Uike, N., Hamajima, N., Ino, T., Mikuni, C., Kobayashi, T., Maruta, A., Muto, Y., Maseki, N., Sakamaki, H., Saito, H., Shimoyama, M. and Ueda, R. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: a large-scale Japanese study of clinical and cytogenetic features as well as prognostic factors. *Int. J. Hematol.*, 71: 144-152, 2000.
- 2) Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Nakamura, S. and Seto, M. API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogenous products. *Am. J. Pathol.*, 156: 807-812, 2000.
- 3) Nakamura, T., Nakamura, S., Yonezumi, M., Suzuki, T., Matsuura, A., Yatabe, Y., Yokoi, T., Ohashi, K. and Seto, M. Helicobacter pylori and the t(11;18)(q21;q21) translocation in gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 301-309, 2000.
- 4) Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., and Nakamura, S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95: 2253-2261, 2000.
- 5) Hosokawa, Y., Maeda, Y., Ishinohasama, R., Miura, I., Taniwaki, M. and Seto, M. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 95: 2719-2721, 2000.
- 6) Takahashi, H., Maeda, Y., Seto, M. and Hosokawa, Y. Nucleotide insertions and deletions with the homopolymeric runs of adenines and thymidines of BCL10 cDNAs in normal peripheral blood leukocytes. *Blood*, 95: 2728-2729, 2000.
- 7) Nakamura, T., Nakamura, S., Yonezumi, M., Seto, M. and Yokoi, T. The t(11;18)(q21;q21) translocation in H. pylori-negative low-grade gastric MALT lymphoma. *Am. J. Gastroenterol.*, 95: 3314-3315, 2000.
- 8) Chung, D.C., Brown, S.B., Graeme-Cook, F., Seto, M., Warshaw A.L., Jensen, R.T., and Arnold, A. Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic

- endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85: 4373-4378, 2000.
- 9) Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M. and Takahashi, Ta. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 6: 2006-2011, 2000.
- 10) Yanagisawa, K., Uchida, K., Nagatake, M., Masuda, A., Sugiyama, M., Saito, T., Yamaki, K., Takahashi, Ta. and Osada, H. Heterogeneity in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. *Oncogene*, 19: 2305-2311, 2000
- 11) Kozaki, K., Miyaishi, O., Tsukamoto, T., Tatematsu, Y., Hida, T., Takahashi, To. and Takahashi, Ta. In vivo selected human lung cancer cell line H460-LNM35 consistently exhibits lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. *Cancer Res.*, 69: 2535-2540, 2000
- 12) Yatabe, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Nakamura, S. and Takahashi, Ta. Topographical distributions of allelic loss in individual non-small cell lung cancers. *Am. J. Pathol.*, 157: 985-993, 2000.
- 13) Haruki, N., Saito, H., Tatematsu, Y., Konishi, H., Harano, T., Masuda, A., Fujii, Y. and Takahashi, Ta. Histological type-selective, tumor-predominant expression of a novel CHK1 isoform and infrequent in vivo somatic CHK2 mutation in small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 60: 4689-4692, 2000.
- 14) Nomoto, S., Haruki, N., Tatematsu, Y., Konishi, H., Mitsudomi, T., Takahashi, To. and Takahashi, Ta. Frequent allelic imbalance suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 1p36 in the pathogenesis of human lung cancers. *Genes Chrom. Cancer*, 28: 342-346, 2000.
- 15) Haruki, N., Yatabe, Y., Travis, W.D., Nomoto, S., Osada, H., Nakamura, S., Nakao, A., Fujii, Y. and Takahashi, Ta. Characterization of high-grade neuroendocrine tumors of the lung in relation to menin mutations. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 317-323, 2000.
- 16) Shimizu, S., Yatabe, Y., Koshikawa, T., Haruki, N., Hatooka, S., Shinoda, M., Suyama, M., Ogawa, M., Hamajima, N., Ueda, R., Takahashi, Ta. and Mitsudomi, T. High frequency of clonally related tumors in cases of multiple synchronous lung cancers as revealed by molecular diagnosis. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3994-3999, 2000.
- 17) Mitsudomi, T., Hamajima, N., Ogawa, M. and Takahashi, Ta. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin. Cancer Res.*, 6: 4055-4063, 2000.
- 18) Masuda, A., Osada, H., Yatabe, Y., Kozaki, K., Tatematsu, Y., Takahashi, T., Hida, T., Takahashi, To. and Takahashi, Ta. Protective function of p27KIP1 against apoptosis in small cell lung cancer cells in unfavorable microenvironments. *Am. J. Pathol.*, in press.
- 19) Haruki, N., Saito, H., Harano, T.,

- Nomoto, S., Takahashi, T., Osada, H., Fujii, Y. and Takahashi, Ta. Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes. BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer Lett.*, in press.
- 20) Goto, H., Kosako, H. and Inagaki, M. Regulation of intermediate filament organization during cytokinesis; Possible roles of Rho-associated kinase. *Microsc. Res. Tech.*, 49: 173-182, 2000.
- 21) Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Ohtsuka, K., Inada, H. and Inagaki, M. Identification of Mrj, a Dnal/Heat shock protein 40 family protein, as a keratin 8/18 filament-regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, 275: 34521-34527, 2000.
- 22) Togashi, H., Nagata, K., Takagishi, M., Saitoh, N. and Inagaki, M. Function of a Rho-specific guanine nucleotide-exchange factor, in neurite retraction: Possible involvement of proline-rich motif of KIAA0380 in the localization. *J. Biol. Chem.*, 275: 29570-29578, 2000.
- 23) Izawa, I. and Inagaki, M. p21-activated kinase PAK phosphorylates desmin at the different sites from those for Rho-associated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 712-716, 2000.
- 24) Goto, H., Fukusho, E., Mori, H., Kashiwagi, Y., Kudo, T., Inagaki, M. and Takeda, M. Localized phosphorylation of vimentin by Rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells*, 5: 823-837, 2000.
- 25) Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S. and

Inagaki, M. Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezirin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*, in press.

F. 知的所有権の取得状況
なし

II. 分担研究報告書

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

がん関連遺伝子産物の血清学的解析

分担研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所 副所長兼腫瘍免疫学部長

研究要旨：タイプ III 変異 EGFR を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、抗体遺伝子を単離・組み換え、大腸菌発現系を用いることにより、単鎖抗体(scFv)を作製することに成功した。産生された scFv 抗体のアフィニティーは親マウスモノクローナル抗体の 1/4 であることを Biacore biosenser により明らかにした。また ELISA、MHA、免疫染色による血清学的反応性の検討では、親抗体とほぼ同様の特異性を保っていた。

A. 研究目的

腫瘍に特異的に発現する抗原を認識する組み換え型単鎖抗体 (scFv) を作製し、臨床応用のための基礎的検討を行うことが本研究の目的である。そのモデルとしてヒトグリオブラストーマを選択した。グリオブラストーマには EGFR (Epidermal growth factor receptor) の過剰発現が認められるが、この遺伝子の一部を欠損している腫瘍があり、この欠損部の再構成の結果、正常な分子内には無い新しいアミノ酸が発現する。この分子は腫瘍特異的に発現しているため治療等の標的分子として有望と思われる。そこでこの変異 EGFR を認識するマウスモノクローナル抗体 (3C10) を作製し、scFv 抗体の作製を試み、以下のような臨床応用のための基礎的検討を行う。

- 1) 単離した抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌を用いた scFv の産生法、および精製法について検討を行う。
- 2) 得られた scFv の反応特異性を、免疫染色法、MHA 法、ELISA 法を用いて元のモノクローナル抗体と比較する。

B. 研究方法

1) scFv の作製

3C10 抗体の可変領域遺伝子は、ハイブリドーマの cDNA に、VH, VL primary amplification primers (VH1, 2, VL1, 2) を用いた RT-PCR を施行し、得られた。VH1, VL1 は 3C10 抗体の G2b (H鎖), κ (L鎖) 両鎖の N 末アミノ酸配列をもとに、VH2, VL2 は Kabat's data base 上の CH1, CL をもとに設計し、さらに、(Gly4, Ser)3 リンカー導入等の操作には re-amplification primers (VH3, 4, VL3, 4) を用いて PCR を行い、配列を確認後、pRSET B 発現ベクターに組み込み、scFv 遺伝子を構築した。発現ベクターは宿主大腸菌 JM109 内へ導入し、scFv 蛋白は His-tag 付き蛋白として、cytoplasmic inclusion body の形で発現した。形質導入後 JM109 は 1L の SOB 培地に移され、対数増殖期に 1 mM IPTG を加えた後、MOI = 5 pfu/cell での M13/T7 ファージ感染し、30°C, 5h 培養した。菌体は氷冷下 40ml の sonication buffer (Tris-HCl pH 5.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) に溶解され、80 W 150 sec. の破碎を 5 回受けた。得られた

inclusion bodyは45 mlの8M Urea solution (8M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)で溶解し、His-tag カラム精製した。溶出液 (8 M urea, 50mM Tris-HCl pH 3.5, 1 mM EDTA)で溶出した蛋白を希釈液 (8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM EDTA)にて 0.3 mg/ml に濃度調整した後、redox solution (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM 還元型グルタチオン, 0.5 mM 酸化型グルタチオン)にて 3 倍に急速希釈を行い、5 日間 4℃, 10 rpm の速度で攪拌した。さらに、透析液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA)で 2 日間透析後、活性 scFv を得た。

2) 産生された scFv の活性測定

scFv と親抗体の活性評価には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), mixed hemadsorption assay (MHA), fluorescence activated cell sorter (FACS) と免疫組織染色を用いた。ELISA では抗原をコートしたプレートに各濃度の一次抗体が、また FACS では ERM5 細胞を標的にし 20 ug/ml の一次抗体が反応に用いられた。免疫組織染色では、III 型欠失変異 EGFR の発現が確認されたグリオブラストーマ凍結切片を用い染色した。正常 EGFR のみを認識する Ab-1 抗体をコントロール抗体として用い、scFv の場合には二次抗体 (RGS-His Antibody, QIAGEN)を反応後、peroxidase または fluoresceine isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス抗体で測定した。ELISA, FACS も同様の組合せで測定を行った。抗体の結合定数測定には Biacore biosensor を用い、センサーチップ上に固定された抗原に対して 1.37~1000 nM の親抗体と scFv を用いた。

C. 研究結果

1) scFv の作製

3C10 抗体は Kabat' s data base により、mouse H 鎖は class IIc, L 鎖 κ は class II

の subgroup に分類された。scFv 抗体は SDS-PAGE により、分子量約 26KD の蛋白として確認された。

2) 産生された scFv の活性測定

ELISA により、親抗体と scFv 抗体の Pep3 変異ペプチドとコントロールペプチドに対する反応性を比較した所、後者にも反応したが、前者に選択性を示した。FACS により、scFv 抗体と親抗体の ERM5 細胞株への反応を検討した所、scFv は親抗体より活性は落ちるが、ほぼ同様の反応性を保持していることが明らかとなった。MHA 反応における競合阻害での抗体活性比較によっても、同様の結果が得られた。また、scFv 抗体は、免疫染色にも使用可能であることが明らかとなった。Biacore でのアフィニティーの測定では、scFv 抗体の反応強度 (K_d 値) は親抗体のおよそ 1/4 であった。

D. 考察

Lormier により作成された MR1 抗体は、同様に Pep3 ペプチドを抗原とするが、ファージディスプレイ法により得られており、CDR 部分のアミノ酸配列が異なる。抗体蛋白として MR1 は periplasmic inclusion body として得られているが、3C10 scFv は s-s 結合を生じない cytoplasmic inclusion body として産生しており、収量も多い。s-s 結合は蛋白の高次構造形成に不可欠であり、3C10 scFv の抗体活性を得るためには refolding の過程が極めて重要であった。3C10 scFv はこれまでに報告された還元的条件下での refolding では活性が得られず、酸化的条件下での refolding によって初めて活性が得られた。MOPC315 scFv は 3C10 scFv と同様に酸化的条件下でのみ活性が得られた抗体であり、両者の特長は Chou-Fasman second structure prediction model により、ともに直鎖として二次構造が予測される蛋白ドメインを持つことであ

る。この結果は、抗体関連蛋白の refolding の条件予測に利用できる可能性がある。3C10 scFv は親抗体とほぼ同様の反応性特異性を保持しており、Pep3 に対する K_A 値は $2.45\text{--}2.48 \times 10^7/\text{M}$ で MR1 scFv 抗体ともほぼ変わらないものであった。

cancer antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46: S37-S43, 2000.

E. 結論

3C10 scFv は大腸菌で効率的に産生できる。活性はやや落ちるが、親抗体と同様な特異性を保持していることから、今後のグリオーマ治療への応用のための基礎研究を進めて行く必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakayashiki, N., Yoshikawa, K., Nakamura, K., Hanai, N., Okamoto, K., Okamoto, S., Mizuno, M., Wakabayashi, T., Saga, S., Yoshida, J. and Takahashi, T.: Production of a single-chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91 : 1035- 1043, 2000.
- 2) Yazaki, M., Takahashi, T., Ito, Y., Mori, C. and Wada, Y.: Generation of HLA-A2 subtype specific T lymphocytes from cord blood used for cord blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 26: 451-454, 2000.
- 3) Obata, Y., Takahashi, T., Sakamoto, J., Tamaki, H., Tominaga, S., Hamajima, N., Chen, Y.-T. and Old, L.J.: SEREX analysis of gastric

厚生省科学研究費補助金(がん克服戦略事業)
分担研究報告書

造血器腫瘍の発生に関わる遺伝子異常の解析

分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部 部長

研究要旨: 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、RT-PCR 法を確立し、MALT リンパ腫の約 20~30%に遺伝子異常が認められること、また、発生臓器により、遺伝子異常の関与が異なることを示した。さらに、genomic DNA を用いた Long and accurate(LA)-PCR 法も確立した。乳児白血病の原因遺伝子である MLL の標的遺伝子として PI-3kinase の subtype と EST を見出した。また、び慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫に関与する BCL6 の標的として CXCR4 を見出した。

A. 研究目的

リンパ造血器腫瘍発症に関与する転座切断点領域遺伝子とそれらの標的遺伝子を明らかにし、抗体作成や遺伝子診断法を確立することで臨床応用を図る。第一に、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する特徴的染色体遺伝子の本態を解明することである。また、これまでに単離解析してきた乳児白血病に関与する MLL、ならびにび慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫に関与する BCL6 遺伝子の標的遺伝子を解析し、腫瘍化機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 の関与:

MALT リンパ腫に特徴的な t(11;18)染色体転座の転座切断点より positional cloning で原因遺伝子 MALT1 を単離した。さらに解析を進め、転座相手遺伝子が細胞死を抑制する機能のある API2 であることを明らかにした。それぞれの cDNA 塩基配列に基づき、種々の primer を設定し、RT-PCR 法にてキメラ mRNA の構造を明らかにする。また、Exon-Intron 構造に基づいて genomic DNA を用いた Long and accurate (LA)-PCR 法を施行する。

2) MLL 遺伝子ならびに BCL6 遺伝子の標的遺伝子の探索:

IPTG で誘導可能なベクターにてマウス骨髓球由来細胞株に導入し、発現誘導がかかることを確認し、遺伝子発現の前後で mRNA を採取し、MLL 遺伝子については、RDA 法と cDNA microarray 法にて検討した。BCL6

遺伝子については、Atlas cDNA 法(クローニング)と cDNA microarray 法で検討した。

C. 研究結果

1) MALT リンパ腫に認められる API2-MALT1 キメラ遺伝子の解析:

API2-MALT1 キメラ遺伝子には、API2 遺伝子には 2ヶ所、MALT1 遺伝子には 4ヶ所転座切断点が存在する。キメラ遺伝子はすべて in-frame で結合し、API2 のアポトーシス抑制に関与する 3つの BIR ドメインがすべて保たれていた。RT-PCR 法にて多数症例で調べたところ、70 症例中 17 例(24%)に API2-MALT1 キメラ mRNA が検出された。胃では 43 例中 5 例にみとめられ、いずれの症例も抗生物質による治療に反応しないものであり、治療の良い指針として用いることができることが明らかとなった。また、MALT リンパ腫と関連する節外性び慢性大細胞型リンパ腫 16 例では、全くキメラは検出されなかった。

2) API2-MALT1 遺伝子以上を検出するための Long and accurate (LA)-PCR 法の確立と RT-PCR 法による検出率との比較:

API2 での転座切断点は 2ヶ所、MALT1 での転座切断点が 4ヶ所あり、5種類のキメラ蛋白が形成されることが明らかにしていたが、Exon-Intron 構造と API2 のゲノムシーケンスを利用して、genome DNA を用いての long and accurate-PCR(LA-PCR)法を確立した。3種類の組み合わせの primer を用いることで RT-PCR 法にてキメラ mRNA が検出された 16 例中 16 例が LA-PCR 法にて t(11;18)(q21;q21)転座を検出することが可能となり、臨床応用への摘要が広がった。

3) API2-MALT1 の蛋白レベルでの腫瘍化機構の解析

MALT リンパ腫に関与する API2, MALT1, API2-MALT1 の発現ベクターを構築し、その蛋白レベルでの解析をおこなったところ、API2, MALT1 とともにその半減期は短い、API2-MALT1 では安定した強い発現がみとめられた。API2, MALT1 とともに proteasome inhibitor である MG132 を加えたところ、安定した発現が認められたため、発現制御に proteasome 系が関与することが明らかとなった。そして、キメラ蛋白を形成することにより、proteasome system による発現制御機構から回避することで、安定発現し、腫瘍化に関与する可能性が示唆された。

D. 考察

1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 遺伝子の役割

MALT リンパ腫はび慢性大細胞型リンパ腫 (DLBL) について、高頻度に見とめられる悪性リンパ腫である。DLBL は複数の疾患単位を含むことが明らかとなっている現在、MALT リンパ腫は、独立した疾患単位としては最も高頻度のリンパ腫である。本リンパ腫に特異的な遺伝子異常を明らかにしたことは重要である。RT-PCR 法で多数症例を対象に検索したところ、約 30% の症例に本遺伝子異常があることが明らかとなった。発生臓器別では、肺由来の MALT リンパ腫の約 60% に遺伝子異常が認められた。H. Pylori による胃炎に関連して認められる MALT リンパ腫は 15% 程度に遺伝子異常が認められ、かつ、抗生物質治療に反応しない MALT リンパ腫にその異常が認められたため、胃 MALT に置いては、API2-MALT1 遺伝子異常が、真の腫瘍であることを意味していることが示唆される。

2) API2-MALT1 遺伝子異常の検出法の意義 :

これまで、瀬戸らは API2-MALT1 遺伝子異常について、FISH 法、RT-PCR 法を用いて検出できることを示して来た。今回、遺伝子構造に基づいて primer を設定し、RT-PCR 法とほぼ同率で検出できる LA-PCR 法を確立することができたことは、RNA のえられない検体に関しても遺伝子異常を検討できるため、今後の応用面においてその意義は高い。

3) API2-MALT1 の蛋白レベルでの腫瘍化機構の解析

API2 遺伝子は、アポトーシスを抑制する

遺伝子としてその機能が知られていたが、今回、MALT1 遺伝子と融合蛋白を作ることによって安定化することが明らかになったため、MALT リンパ腫発祥における融合遺伝子の意義の端が明らかとなった。今後、MALT1 遺伝子そのものの機能と共に、考察をしていくことが必要である。また、特異性の高い抗体を作成することも、今後の研究を進めていく上で重要である。

E. 結論

1. 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、RT-PCR 法を確立し、MALT リンパ腫の約 20~30% に遺伝子異常が認められること、また、発生臓器により、遺伝子異常の関与が異なることを示した。さらに、genomic DNA を用いた Long and accurate(LA)-PCR 法も確立した。
2. 胃 MALT リンパ腫において API2-MALT1 が存在するものは抗生物質による治療に反応しないことが明らかとなり、治療方針の決定に重要なマーカーになることが示唆された。
3. MLL の標的遺伝子として PI-3kinase の subtype と EST を見出した。また、BCL6 の標的として CXCR4 を見出した。これらの標的遺伝子が直接的作用によるのかについて、標的遺伝子のプロモーター領域をクローニングして解析を進める必要がある。

F. 発表

1. Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Nakamura, S. and Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogenous products. *Am. J. Pathol.*, 156: 807-812, 2000.
2. Nakamura T, Nakamura S, Yonezumi M, Suzuki T, Matsuura A, Yatabe Y, Yokoi T, Ohashi K, Seto, M.: Helicobacter pylori and the t(11;18)(q21;q21) translocation in gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Jpn J Cancer Res.*, 91:301-309, 2000.
3. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto,

- M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., Nakamura, S.: Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma, MCL: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95:2253-2261, 2000.
4. Hosokawa Y, Maeda Y, Ishinohasama R, Miura I, Taniwaki M and Seto, M.: The *Ikaros* gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the *BCL6* gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 95:2719-2721, 2000.
 5. Takahashi H, Maeda Y, Seto, M., Hosokawa Y.: Nucleotide insertions and deletions within the homopolymeric runs of adenines and thymidines of BCL10 cDNAs in normal peripheral blood leukocytes. *Blood.*, 95:2728-2729, 2000.
 6. Suzuki, R., Kagami Y, Takeuchi K, Kami M, Okamoto M, Ichinohasama R, Mori N, Kojima M, Yoshino T, Yamabe H, Shiota M, Mori S, Ogura M, Hamajima N, Seto, M., Suchi T, Morishima Y, Nakamura S.: Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood*, 96:2993-3000, 2000.
 7. Inagaki H, Okabe M, Seto, M., Nakamura S, Ueda R, Eimoto T.: API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Multiplex RT-PCR detection using formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Am J Pathol.* 158 699-706, 2001.
 8. Kagami Y, Choi YS, Nakamura S, Takeuchi T, Maeda S, Eisei Kondo E, Taji H, Ogura M, 1 Manabu Ando M, Kobayashi T, Morishima Y, Seto, M.: Establishment of follicular lymphoma cell line, FLK-1 which is dependent on follicular dendritic cell like cell line HK. *Leukemia* in press

固型がんの発生に関わる遺伝子異常の解析

分担研究者 高橋 隆 愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部

研究要旨 我々がこれまでにヒト肺がんにおける過剰発現の存在を明らかとした cyclooxygenase-2 (COX-2)を分子標的とした治療の開発を念頭においた検討を加えた。その結果、ヒト肺がん細胞株において臨床的到達可能と考えられる濃度の COX-2 特異的阻害剤の添加によって、アポトーシスを伴う増殖抑制が惹起可能なことを明らかとし得た。更に、COX-2 特異的阻害剤とヒト肺がん治療に用いられる各種抗がん剤との併用によって、抗がん剤の IC₅₀ 濃度を最大77%低減しえることを明らかとした。

TGF-β依存性アポトーシス誘導に対する感受性の異なる、ヒト肝がん細胞 Hep3B から単離した亜株を用いた解析により、肝がん細胞では TGF-βリセプターからの刺激伝達のうち、アポトーシス誘導経路が特に異常を来している可能性を示唆する結果を得た。更に、肝がん細胞におけるアポトーシス誘導機構の解明を目指し、cDNA アレイによる発現プロファイル解析を開始した。

A. 研究目的

難治性固形がんの代表たる肺がん並びに肝がんの分子病態を明らかにすべく、種々のがん遺伝子、がん抑制遺伝子の異常の関与について検討を加えてきた。我々は既に、肺がんに高頻度に cyclooxygenase-2 (COX-2)の過剰発現が検出され、外科切除後の生存期間の短縮との有意な相関を報告している。本年度は更に、COX-2 を分子標的とした特異的阻害剤による肺がん治療の可能性について検討を加えた。

また我々はこれまでに、肺がんにおける TGF-β 刺激伝達異常を検討し、Smad2 および Smad4 遺伝子変異を見出し、その変異 Smad 遺伝子が実際に TGF-βによる細胞増殖抑制作用を阻害することを示してきた。本年度は、肺癌と並ぶ代表的難治がんである肝がんにおける TGF-β刺激伝達異常及びアポトーシス誘導能異常を検討し、肝がんの発症への関わり及び肝がん治療への応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1)ヒト肺がん治療における分子標的としての COX-2 に関する検討:

ヒト肺がん細胞株(腺がん2株、扁平上皮がん1株、大細胞がん2株、小細胞がん2株、計7株)並びにヒト中枢及び末梢気道上皮細胞株(2株)を対象に、COX-2 特異的阻害剤(ニメスライド)による増殖抑制について MTT 法を用いて検討した。また、アポトーシス惹起の有無について、TUNEL 法を用いて検討した。更に、ヒト肺がん治療に用いられるアムルピシン、イリノテカン、タキソテール、シスプラチン、エトポシドと COX-2 特異的阻害剤

との併用効果についても検討を加えた。相乗効果の有無については、イソボログラムを作成し解析を行った。

(2)ヒト肝がんにおける TGF-βシグナル伝達異常及びアポトーシス誘導能異常に関する検討:

ヒト肝がん細胞株(7株)における TGF-β反応性及びアポトーシス誘導性を検討した。更に、TGF-βによるアポトーシス誘導に最も感受性を示した Hep3B を用いて、アポトーシス誘導機構の解明を目指した以下の検討を加えた。まず、Hep3B を限外希釈によりクローニングし、アポトーシス誘導に関する感受性亜株と抵抗性亜株を得た。TGF-βによる刺激伝達の有無について、PAI-1 レポーター及び、FAST-1 と Smad の結合配列を持つ FBE・SBE レポーターを用いて検討した。また、亜株間で異なる制御を受ける遺伝子群を同定するため、アポトーシス関連遺伝子がスポットされた cDNA アレイを用いて、TGF-β刺激前後の発現プロファイルの比較解析を行った。

C. 研究結果

(1)ヒト肺がん治療における分子標的としての COX-2 に関する検討:

ヒト肺がん細胞株(7株)に対する COX-2 特異的阻害剤(ニメスライド)による増殖抑制効果について MTT 法を用いて検討を加えたところ、肺がん細胞株において濃度依存的効果を認めた。また、Northern blot 解析において高い COX-2 発現を示した肺がん細胞株に、より高い感受性が検出された。一方、ヒト中枢及び末梢気道上皮細胞株(2株)は COX-2 の低発現と増殖抑制に対する抵抗性を示した。さらに、TUNEL 法による検討によっ