

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋利忠

平成14（2002）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 …………… 11
高橋利忠（愛知県がんセンター研究所）
2. 造血器腫瘍発症機構の解析とその臨床応用の研究 …………… 15
瀬戸加大（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. 固形腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析 …………… 21
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・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …………… 25
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盤研究

主任研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所所長

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 リンパ腫に認められる t(11;18)転座の結果、数種類の API2-MALT1 キメラ mRNA の発現が認められた。遺伝子診断に応用するため、これらキメラ mRNA を1回の検査で検出できる multiplex RT-PCR 法を開発した。(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子産物の機能解析により、MALT1 蛋白は BCL10 蛋白と結合し、NF- κ B 転写因子を活性化するが、API2-MALT1 キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化することを示した。(b) (3) ヒト肺がんにおける過剰発現を明らかとした cyclooxygenase-2 (COX-2) に対する特異的阻害剤 (tiracoxib) が、単独投与或いは抗がん剤との併用投与により SCID マウス移植ヒト肺がん細胞株の増殖を有意に抑制することを示した。(4) TGF- β 感受性肝がん細胞系における TGF- β によるアポトーシス誘導は、TGF- β 刺激により TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導が起こり、TNF ファミリー受容体による caspase-8 の切断活性化によって惹起されていることが示された。本結果に基づき、肝がん細胞株の TGF- β 不応答性の解析を進めている。(c) (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であるケラチン 18 と結合する蛋白質として、TNF レセプターのアダプター蛋白である TRADD を同定し、上皮細胞においては、TRADD がケラチンと結合しているため、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。(6) 細胞極性の制御に関与している分子である ERBIN が、p120 catenin 類似蛋白質である p0071 と結合し、細胞間接着の制御に関与している可能性を示した。

分担研究者	所属施設名	職名	
瀬戸加大	愛知県がんセンタ-研究所	部長	座により形成される API2-MALT キメラ遺伝子を簡便に検出出来る方法を確認し、遺伝子診断に応用するとともに、キメラ mRNA を指標にし、病態解析を試みる。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ため、キメラ遺伝子及びキメラ遺伝子産物の機能解析のために発現ベクターを構築し、検討を行う。(b) (3) 難治性固
高橋 隆	愛知県がんセンタ-研究所	部長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンタ-研究所	部長	

A. 研究目的

(a) 造血器腫瘍では、(1) 粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に特徴的な t(11;18) 転

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する。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・転移では、細胞骨格系蛋白質との関連を検索するために、(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である 8/18 と結合する新規の蛋白質の同定とその機能解析、及び(6)細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する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診断

MALT リンパ腫における t(11;18) 転座に関与する API2 及び MALT1 遺伝子の転座切断点はそれぞれ 4 種類認められる。そのため、形成されるキメラ遺伝子 mRNA が複数存在し、すべての転座型を一度に検出することが困難であった。そこで、種々のプライマーを用いて multiplex RT-PCR 法を開発し、一回の検査で特異的なキメラ mRNA を検出できるアッセイ系の確立を試みた。また、リアルタイム PCR 法も確立し、患者腫瘍検体中にある API2-MALT キメラ mRNA のコピー数を検討し、病態解析を行った。

2) トランスフェクタントを用いた API2-MALT1 キメラ蛋白の機能解析

MALT1 蛋白は BCL10 蛋白と結合することが明らかとなったので、種々の発現ベクターを構築し、MALT1 蛋白が BCL10 蛋白の NF- κ B 活性化に対してどのような効果を及ぼすかを検討した。

3) 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

COX-2 特異的阻害剤 (JTE522, tiracoxib) の単独或いは抗がん剤との併用投与による肺がんに対する増殖抑制について、COX-2 を発現しているヒト肺がん細胞株 ACC-LC-319 をマウスの背部に 1×10^7 個皮下移植し検討した。移植とともに tiracoxib を混餌飼料として投与 (100mg/kg/day) を開始し、2週間後に 5mg/kg の抗がん剤 (docetaxel, amrubici 或いは vinorelbine) を尾静脈より一回投与した。さらに2週間 tiracoxib の投与を続けた後、マウスを屠殺し、腫瘍重量を計測した。また、腫瘍血管抑制効果に関しては、血管内皮を抗 CD31 抗体による免疫染色で検出することによって算定した。

4) 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

アポトーシス誘導機構を詳細に検討するため、TGF- β によるアポトーシス誘導に感受性を示す肝がん細胞株 Hep3B 由来の亜株を TGF- β (2.5 ng/ml) を用いて刺激し、経時的 (2, 5, 12, 24, 48, 72 時間) に以下のように解析を試みた。1) FACS にて DNA 量を解析し細胞周期の変化とアポトーシスの割合を検討した。2) RNA を採取し、リアルタイム RT-PCR 法にて遺伝子発現の変化を検討した。また、3) 同時に可溶化細胞分画を調整し、細胞内のアポトーシス誘導に関わる主たる経路を同定するため、カスパーズの活性化について検討した。

5) 単層上皮で発現しているケラチン 8/18 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 法を用いて同定した。まず、bait 側プラスミドにケラチン 8 またはケラチン 18 の 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。得られたクローンと prey 側 cDNA ライブラリーを導入した酵母を接合させ、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導入して調製し、cDNA インサートの DNA 塩基配列を決定した。ホモロジー解析等を行い、既知蛋白質、あるいは新規蛋白質としてケラチン 8/18 との結合を検討した。

6) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する蛋白質の同定とその機能解析

ERBIN と結合しうる蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いて同定した。そして、ERBIN が細胞極性を制御する分子メカニズムを明らかにし、がんの浸潤・転移との関連を探究した。

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

粘膜関連リンパ組織リンパ腫 (MALT) に認められる数種類の API2-MALT1 キメラ mRNA を 1 回の実験で検出出来る方法の開発に成功した。センスプライマー 3 種類と 1 種類のアンチセンスプライマーを同時に使用する multiplex RT-PCR 法に 65°C~60°C での touchdown-PCR 法 (annealing 温度を 1°C につき 2 回ずつ行い、順次 1 度ずつ温度を下げていき、60°C に達したところで 25 サイクル反応させる方法) を導入することにより、5 種類の異なったキメラ mRNA を全て特異的に増幅することに成功した。その感度は 5 μ g cDNA あたり 100 コピーであった。

もっとも高頻度に認められる API2-MALT1 キメラ mRNA を対象にし、1 コピーを検出することが出来るリアルタイム PCR 法を確立した。患者腫瘍検体中にあるキメラ mRNA を

検討したところ 5 μ g cDNA あたり 40 コピーから 10,000 コピーと幅広いコピー数を示すことが明らかとなり、MALT リンパ腫の病態の多様性が示唆された。

2) トランスフェクタントを用いた API2-MALT1 キメラ蛋白質の機能解析

転座関連遺伝子産物である MALT1 と BCL10 が結合することが示されたので、一過性発現系で NF- κ B に対する機能を調べたところ、MALT1 蛋白質は BCL10 蛋白質と結合後、NF- κ B を活性化するが、API2-MALT1 キメラ蛋白質は単独で NF- κ B を活性化すること、また MALT1 の C 末端側に存在する CLD ドメインを欠失するとその活性は失われることを明らかとした。MALT リンパ腫の少数例では、t(1;14) 転座が認められ、BCL10 遺伝子が免疫グロブリン重鎖遺伝子との転座により、活性化されることが知られているが、本研究結果により、MALT リンパ腫に認められる何れのキメラ遺伝子も NF- κ B 転写因子を活性化し、同じ pathway を通してリンパ腫形成を誘導する可能性が示唆された。

3) 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

COX-2 特異的阻害剤による *in vivo* におけるヒト肺がん増殖抑制について、COX-2 を発現しているヒト肺がん細胞株 ACC-LC-319 株を SCID マウスに移植し検討した結果、100mg/kg/day の COX-2 特異的阻害剤 (JTE-522, tiracoxib) の単独投与によって、消化管出血や有意な体重減少等の副作用を伴わずに、腫瘍重量は非投与群に対し 36% の減少をみた (P<0.005)。さらに、抗がん剤である docetaxel に tiracoxib を併用することによって、抗がん剤単独治療時に比して 65% (P<0.0001) の有意な腫瘍重量の減少が観察され、また vinorelbine に tiracoxib を併用することによって 55% (P<0.05) の減少が得られた。一方、amrubicin との併用群においては、有意な

効果増強は得られなかった。

4) 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

TGF- β 処理後のアポトーシス誘導を経時的に検討し、次の様な結果を得た。1) 細胞周期は TGF- β 処理後 12~48 時間には G1/G2 停止を示すが、72 時間後には著明なアポトーシスが誘導された。2) 昨年度の cDNA array 解析で予測された TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導は TGF- β 処理後 12 時間でおこり、その後持続した。3) TNF ファミリー受容体により直接的に活性化されると考えられる caspase-8 の切断は、24 時間後から軽度に見られるが、48 時間後に著明に増加し、72 時間後にアポトーシスを引き起こしていると考えられた。一方ミトコンドリアの障害によるチロクローム C の遊離により誘導されることが考えられている caspase-9 の切断活性化はみられなかった。TGF- β によるアポトーシス誘導は、TGF- β 刺激により TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導がおこり、TNF ファミリー受容体による caspase-8 の切断活性化によって引き起こされていることが示唆された。しかし、TNF ファミリー誘導からアポトーシス誘導まで比較的経過が長く、アポトーシス阻害機構の関与も考える必要があると思われた。

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

我々はこれまでに、酵母 two-hybrid 法を用いて、ケラチン 18 と結合する蛋白質として DnaJ/Hsp40 ファミリーに属する Mrj 蛋白質及び TNF リセプター関連のアダプター蛋白質である TRADD を同定している。TRADD は、TNF が TNF リセプター-1 に結合すると、リセプターの細胞内ドメインにリクルートされ、TNF のシグナルを伝える分子である。TRADD は、その C 末端側に death domain をもつが、我々は、TRADD 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 I ケラチン) に特異的に結合することを認めている。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、これらのトランスフェクタントでは、TNF によるアポトーシス誘導が有意に減弱し、活性型 caspase-8 の出現が低下していた。本結果より、上皮細胞では、ケラチンが TRADD との結合しているために、TRADD が TNF リセプター-1 にリクルートされる過程が阻害され、その結果 caspase-8 の活性化が低下することによって、アポトーシス誘導を減弱させていることが示唆された。

6) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する蛋白質の同定とその機能解析

ERBIN は、c-erbB-2 レセプターを basolateral membrane に局在化させる蛋白質として同定された分子である。我々は、ERBIN の PDZ ドメインを含む C 末端を bait とする two-hybrid アッセイを行い、ERBIN と結合する蛋白質として p120 catenin サブファミリーに属する armadillo 蛋白質である p0071 を同定した。MDCK 細胞において ERBIN はアドヘレンス・ジャンクションおよびデスモソームに存在し、p0071 と共局在した。我々はこれまでに、ERBIN とよく似たドメイン構造をもつ LAP (leucine-rich repeats and PDZ) 蛋白質である densin-180 の PDZ ドメインと結合する蛋白質として p120 catenin サブファミリーに属する δ -catenin を同定している。densin-180 は、 δ -catenin 及び N-cadherin と複合体を形成しており、海馬神経細胞初代培養の神経シナプスで δ -catenin 及び N-cadherin と共局在する。これらの結果より、LAP ファ

ミリー蛋白質の一員である ERBIN および densin-180 は各々、p120 catenin サブファミリーに属する p0071 と δ -catenin と結合することにより、細胞間接着の制御の関与している可能性が示唆された。

D. 考察

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 リンパ腫に認められる t(11;18) 転座に関与する API2 及び MALT1 遺伝子の転座切断点はそれぞれ、4 種類認められることが知られている。そのため、形成されるキメラ mRNA が複数存在し、これらすべての転座型を一度に検出することが困難であり、これまでは 2 種類のプライマーの組み合わせをいくとおりか用意し、実験を複数回行う必要があった。今回、増幅される断片の長さを 700bp 以内に抑えるように考案した multiplex-PCR 法に touchdown PCR 法を導入することにより、1 回の実験で種類の異なるキメラ mRNA を検出することができた。その検出限界は 5 μ g cDNA あたり約 100 コピーであった。検討した臨床検体すべてについて、検出が可能であったので、臨床的に有用な検査法となることが示された。

リアルタイム PCR 法により、患者腫瘍検体由来の産物を検討したところ 5 μ g cDNA 中に 40 から 10,000 コピーと幅広いキメラ mRNA コピー数を検出し、MALT リンパ腫では、腫瘍細胞と反応性の細胞が混在した病型を形作っていることが示唆された。

2) トランスフェクタントを用いた API2-MALT1 キメラ蛋白の機能解析

MALT1 蛋白は BCL10 蛋白と結合し、NF- κ B を活性化すること、また、API2-MALT1 キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化することを明らかにした。MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割の一端が明らかとなった。

3) 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

我々は、肺がんにおいて COX-2 が過剰発現していること初めて報告し、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、本年度は COX-2 特異的阻害剤による新たな肺がん治療法の開発が可能であることを示唆する *in vivo* における実験結果を得ることが出来た。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、注目すべきことに現在肺がん治療に用いられつつある各種抗がん剤と、副作用が軽微な COX-2 特異的阻害剤との併用によって、相乗的治療効果が得られたことである。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、QOL 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。

4) 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

肝がん細胞株は多くの肺がん細胞株と同様に、TGF- β に不応性を示すことを既に報告した。本年度はその機序の解析を試みた。その結果、ヒト TGF- β 感受性肝がん細胞株を用いた cDNA アレイ解析とそれに基づく生化学的解析によって、TGF- β 刺激により TNF ファミリー遺伝子群の転写誘導が起こり、TNF ファミリー受容体からのシグナルによって caspase-8 の切断活性化を生じることによってアポトーシスが引き起こされていることが示唆された。一方、TNF ファミリー誘導からアポトーシス誘導までには比較的時間を要することも同時に明らかとなり、アポトーシス阻害機構の関与についても、さらに検討を加える必要が示された。肺がんで見られる TGF- β 不応性には、TGF- β II 型リセプターのクロマチン構造異常による不活化が関与していることを示唆するデータを既に

得ているが、本研究により、肝がんでは、さらに下流の刺激伝達系にアポトーシス誘導に関連した選択的な伝達異常が起こっている可能性が示唆された。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を目指し、研究を進めていきたい。

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

ケラチン 18 結合蛋白質として同定した TRADD は、TNF リセプター1 (TNFR1) に 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が示された。これらの結果は、細胞骨格蛋白質ケラチン 8/18 がアポトーシスのシグナルに影響をもつことを示唆し、がん細胞における細胞骨格蛋白質の働きを考える上での新しい視点となると考えられる。

6) 細胞の極性形成に関与する ERBIN と結合する蛋白質の同定とその機能解析

ERBIN は、最近その存在が明らかとなった LAP 蛋白質ファミリーに属する。LAP 蛋白質のひとつであるショウジョウバエの Scribble は、Lgl 及び Dlg と同一のシグナル経路で上皮細胞の細胞極性形成に重要な役割を果たしており、がん抑制機能をもつとされる。本研究により、ERBIN が p120 catenin サブファミリーに属する p0071 と結合して、細胞間接着部位に局在していることを明らかにした。これらの結果は LAP 蛋白質が armadillo 蛋白質との相互作用を介して細胞極性を制御している可能性を示唆していると考えられた。ERBIN がヒトの

がんにおいてがん抑制遺伝子として働いている可能性について今後検討していきたいと考えている。

B. 結論

1) MALT リンパ腫に認められる t(11;18) 転座の結果、複数の転座切断点が生じ、複数の API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成する。その結果、複数のキメラ mRNA が形成されるが、それらを一度の実験で検出することが出来る multiplex RT-PCR 法を確立した。その検出感度は 5 μ g cDNA あたり 100 コピーであり、遺伝子診断への応用が示唆された。また、1 コピーを検出できるリアルタイム PCR 法を確立し、患者腫瘍検体を検討したところ、40 から 10,000 コピーと幅広いコピー数を示すことが明らかとなった。MALT リンパ腫腫瘍細胞と反応性の細胞が混在した病型を形作っていることが示唆された。

2) API2-MALT1 キメラ遺伝子産物の機能解析により、MALT1 蛋白質は BCL10 蛋白質と結合し、NF- κ B 転写因子を活性化するが、API2-MALT1 キメラ蛋白質は単独で NF- κ B を活性化することを示した。本研究結果により、MALT リンパ腫に認められる API2-MALT1 と BCL10-IgH の何れのキメラ遺伝子も NF- κ B 転写因子を活性化し、同じ pathway を通してリンパ腫形成を誘導する可能性が示唆された。

3) 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について、COX-2 特異的阻害剤を用いて検討を加えた本研究結果は、今後の臨床応用への展開に期待を抱かせるものといえる。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) 肺がんで高頻度に見られる TGF- β 不応性には、TGF- β II 型リセプターの不活化が寄与しているが、肝がんでは、さらに下流の刺激伝達系にアポトーシス誘導に関連した

選択的な伝達異常が起こっている可能性を示唆する結果を得た。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ケラチン 18 と結合する蛋白質として TRADD を見出し、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明らかにし、さらに、これが caspase-8 の活性化より上流のレベルでの阻害によることを示した。

6) 細胞極性の制御に関与している分子である ERBIN は LAP 蛋白質ファミリーの一員であるが、p120 catenin 類似蛋白質である p0071 と結合し、細胞間接着部位に局在し、接着の制御に関与してい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) Kagami, Y., Jung, J., Choi, Y. S., Osumi, K., Nakamura, S., Morishima, Y. and Seto, M.: Establishment of a follicular lymphoma cell line (FLK-1) dependent on follicular dendritic cell-like cell line HK. *Leukemia*, 15: 148-56, 2001.
- 2) Inagaki, H., Okabe, M., Seto, M., Nakamura, S., Ueda, R. and 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.
- 3) Matsuo, K., Suzuki, R., Hamajima, N., Ogura, M., Kagami, Y., Taji, H., Kondoh, E., Maeda, S., Asakura, S., Kaba, S., Nakamura, S., Seto, M., Morishima, Y. and Tajima, K.: Association between polymorphisms of folate-and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood*, 97: 3205-3209, 2001
- 4) Sugiyama, T., Saka, K., Nakamura, S., Yonezumi, S. and Seto, M.: API2-MALT1 chimeric transcript is a predictive marker for the responsiveness of H. pylori eradication treatment in low-grade gastric MALT lymphoma. *Gastroenterology*, 120: 1884-1889, 2001.
- 5) Hosokawa, Y., Maeda, Y. and Seto, M.: Target genes downregulated by the BCL-6/LAZ3 oncoprotein in mouse Ba/F3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 563-568, 2001.
- 6) Lucas, P. C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L. M., Abazeed, M. E., Chen, F. F., Yamaoka, S., Seto, M. and Nunez, G.: Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in MALT lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 19012-19019, 2001.
- 7) Matsuo, K., Hamajima, N., Suzuki, R., Nakamura, S., Seto, M., Morishima, Y. and Tajima, K.: No substantial difference in genotype frequencies of interleukin and myeloperoxidase polymorphisms between malignant lymphoma patients and non-cancer controls. *Haematologica*, 86: 602-608, 2001.
- 8) Suzuki, R., Takemura, K., Tsutsumi, M., Nakamura, S., Hamajima, N. and Seto, M.: Detection of cyclin D1 overexpression by real-time reverse-transcriptase-mediated quantitative polymerase chain reaction for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol.*, 159: 425-429, 2001.
- 9) Eguchi, M., Eguchi-Ishimae M., Seto, M., Morishita, K., Suzuki, K., Ueda, R., Ueda, K.,

- Kamada, N. and Greaves, M. GPHN, a novel partner gene fused to MLL in a leukemia with t(11;14)(q23;q24). *Genes, Chromos. Cancer*, 32: 212-221, 2001.
- 10) Suzuki, R., Seto, M., Nakamura, S., Nakagawa, A., Hara, K. and Takeuchi, K. Sarcomatoid variant of anaplastic large cell lymphoma with cytoplasmic ALK and alpha-smooth muscle actin expression: a mimic of inflammatory myofibroblastic tumor. *Am. J. Pathol.*, 159: 383-384, 2001.
 - 11) Tamura, A., Miura, I., Iida, S., Yokota, S., Horiike, S., Nishida, K., Fuji, H., Nakamura, S., Seto, M., Ueda, R. and Taniwaki, M.: Interphase detection of immunoglobulin heavy chain gene translocations with specific oncogene loci in 173 patients with B-cell lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 129: 1-9, 2001.
 - 12) Oyama, T., Kagami, Y., Seto, M. and Morishim, Y. Mechanism of action on B cell lymphoma by chimeric anti-CD20 monoclonal antibody. *Leukemia*, 15: 1667, 2001.
 - 13) Yatabe, Y., Suzuki, R., Matsuno, Y., Tobinai, K., Ichinohazama, R., Tamaru, J., Mizoguchi, Y., Hashimoto, Y., Yamaguchi, M., Kojima, M., Uike, N., Okamoto, M., Isoda, K., Ichimura, K., Morishima, Y., Seto, M., Suchi, T. and Nakamura, S. Morphological spectrum of cyclin D1-positive mantle cell lymphoma: Study of 168 cases. *Pathol. Internat.*, 51: 747-761, 2001.
 - 14) Yonezumi, M., Suzuki, R., Suzuki, H., Yoshino, T., Oshima, K., Hosokawa, Y., Asaka, M., Morishima, Y., Nakamura, S. and Seto, M. Detection of API2-MALT1 chimaeric gene in extranodal and nodal marginal zone B-cell lymphoma by reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) and genomic long and accurate PCR analyses. *Br J. Haematol.*, 115: 588-594, 2001.
 - 15) Koshikawa K, Osada H, Kozaki K, Konishi H, Masuda A, Tatematsu Y, Nakao A, and Takahashi Ta. Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo. *Oncogene*, in press.
 - 16) Yatabe Y, Mitsudomi T, and Takahashi Ta. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, in press.
 - 17) Mizuno K, Osada H., Konishi H, Tatematsu Y, Fujii Y, and Takahashi Ta. Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. *Oncogene*, in press.
 - 18) Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Tezel, E. and Takahashi, Ta. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 σ in human lung cancers. *Oncogene*, in press.
 - 19) Konishi, H., Nakagawa, T., Harano, T., Mizuno, K., Saito, H., Masuda, A., Matsuda, H., Osada, H. and Takahashi, Ta. Identification of frequent G2 checkpoint impairment and a homozygous deletion of 14-3-3 σ at 17p13.3 in small cell lung cancers. *Cancer Res.*, 62: 271-276, 2002.
 - 20) Masuda, A., Osada, H., Yatabe, Y., Kozaki, K., Tatematsu, Y., Takahashi, T., Hida, T., Takahashi, To. and Takahashi Ta. Protective function of p27^{KIP1} against apoptosis in small cell lung cancer cells in unfavorable microenvironments. *Am. J. Pathol.* 158: 87-96, 2001.
 - 21) Yoshida, K., Hamajima, N., Kozaki, K., Saito, H., Maeno, K., Sugiura, T., Ookuma, K. and Takahashi, Ta. Association between the dopamine D2 receptor A2/A2 genotype and smoking behavior in the Japanese. *Cancer Epidemiol. Biomark. & Prev.* 10: 403-405, 2001.
 - 22) Kozaki, K., Koshikawa, K., Tatematsu, Y., Miyaiishi, O., Saito, H., Hida, T., Osada, H. and Takahashi, Ta. Multi-faced analyses of a highly metastatic human lung cancer cell line

- NCI-H460-LNM35 suggest mimicry of inflammatory cells in metastasis. *Oncogene*, 20: 4228-4234, 2001.
- 23) Haruki, N., Harano, T., Masuda, A., Kiyono, T., Tatematsu, Y., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Konishi, H., Osada, H., Fujii, Y. and Takahashi, Ta. Persistent increase in chromosome instability in lung cancer: possible indirect involvement of p53 inactivation. *Am. J. Pathol.*, 159: 1345-1352, 2001.
- 24) 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.*, 162: 201-205, 2001.
- 25) Matsuoka, S., Nakagawa, T., Masuda, A., Haruki, N., Elledge, S. J. and Takahashi, Ta. Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer. *Cancer Res.*, 61: 5362-5365, 2001.
- 26) Dammann, R., Takahashi, Ta. and Pfeifer, G. P. The CpG island of the novel tumor suppressor gene *RASSF1A* is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene*, 20: 3563-3567, 2001.
- 27) Osada, H., Tatematsu, Y., Masuda, A., Saito, T., Sugiyama, M., Yanagisawa, K. and Takahashi, Ta. Heterogeneous TGF- β unresponsiveness and loss of TGF- β RII expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 61: 8331-8339, 2001.
- 28) Izawa, I., Nishizawa, M., Tomono, Y., Ohtakara, K., Takahashi, T., and Inagaki, M.: ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells*, in press.
- 29) Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A. and Inagaki, M. Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells*, 7:11-17, 2002.
- 30) Goto, H., Tanabe K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y. and Inagaki, M. Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells*, 7:91-97, 2002.
- 31) Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K. and Inagaki, M. Densin-180 interacts with δ -catenin/neural plakophilin-related armadillo-repeat protein at synapses. *J. Biol. Chem.*, 277:5345-5350, 2002.
- 32) Tsuiki, H., Nitta, M., Tada, M., Inagaki, M., Ushio, Y. and Saya, H. Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene*, 20: 420-429, 2001.
- 33) Yasui, Y., Goto, H., Matsui, S., Manser, E., Lim, L., Nagata, K. and Inagaki, M. Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process. *Oncogene*, 20: 2868-2876, 2001.
- 34) Zhong, S., Zhange, Y., Jansen, C., Goto, H., Inagaki, M. and Dong, Z. MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28. *J. Biol.Chem.*, 276: 12932-12937, 2001.
- 35) Gohara, R., Tang, D., Inada, H., Inagaki, M., Takasaki, Y. and Ando, S. Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements. *FEBS Lett.*, 489: 182-186, 2001.
- 36) Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, To., Momoi, T. and Inagaki, M. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J. Cell Biol.*, 155: 415-425, 2001.
- 37) Nagata, K., Izawa, I. and Inagaki, M. A decade of site-and phosphorylation state-specific antibodies: recent advances in studies of spatiotemporal protein phosphorylation. *Genes Cells*, 6: 653-664, 2001.
- 38) Zhong, S., Jansen, C., She, Q. B., Goto, H.,

Inagaki, M., Bode, A.M., Ma, W.Y. and Dong, Z. Ultraviolet B- induced phosphorylation of histon H3 at serine 28 is mediated by MSK1. J. Biol.Chem., 276: 33213-33219, 2001.

H. 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 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し、組み換え型単鎖抗体を作製した。本年度は単鎖抗体の臨床応用のための抗体の修飾として lipid tag を付加した単鎖抗体を作製し、得られた抗体の活性について検討した。産生された抗体の ELISA 法による反応特異性の検討では、親抗体、及び lipid tag の付加されていない初代単鎖抗体とはほぼ同様の反応性が保たれていることを示した。この抗体のリポソームへの結合能を検討したところ、残念ながら結合は観察されなかった。また、初代単鎖抗体をヌードマウス腫瘍移植系を用いてイメージングを行ったところ、腫瘍と共に腎臓への高い集積が認められた。この腎臓への集積について免疫組織学的に検討したところ、単鎖抗体は集合管に集積していることが認められた。

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細胞があり、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）を産生するハイブリドーマを樹立し、本抗体の組み換え型単鎖抗体、及び lipid-tag 付加修飾単鎖抗体を作製し、以下の基礎的検討を行った。

- 1) すでに得られた単鎖抗体より抗体遺伝子を単離し、lipid tag との融合蛋白作用ベクターに組み込み、大腸菌を用いて単鎖抗体を産生させた。産生された抗体蛋白より、初代単鎖抗体と同様に、親抗体作製時に免疫源として用いたペプチドによるアフィニティーカラムを用いて活性ある抗体を精製した。
- 2) 得られた単鎖抗体の反応特異性を、ELISA 法を用いて、親抗体であるモノクローナル抗体、初代単鎖抗体と比較した。
- 3) 得られた lipid-tag 付加単鎖抗体のリポソームへの結合能を検討した。
- 4) 単鎖抗体へのアイソトープ（^{99m}Tc）標識法について検討を行う。また標識された抗体を用いて、ヌードマウス移植腫瘍を標的として腫瘍への集積性を検討する。
- 5) 初代単鎖抗体の腎臓組織における分布を免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

1) lipid-tag 付加単鎖抗体の作製

初代単鎖抗体発現用ベクターより、抗体遺伝子を分離し、lipid-tag との融合蛋白作製用ベクター (pMAL3.7) に組み込んだ。発現は初代単鎖抗体と同様に IPTG 誘導により行い、菌体を回収した。lipid-tag 抗体は、大腸菌の細胞外膜脂質層に結合した形で産生されるため、回収した菌体より Triton X-100 を用いて菌体膜の可溶化を行い脂質層より分離を行い、不溶成分を超速心で除いた後、可溶化分画よりアフィニティーカラムを用いて活性ある抗体分子を精製した。精製された抗体は SDS-PAGE による分子量、および精製度の確認を行った。

2) 産生された単鎖抗体の活性測定

初代単鎖抗体、lipid-tag 単鎖抗体と親抗体であるモノクローナル抗体の活性評価には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 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反応に用いられた。単鎖抗体の検出には二次抗体 (抗 3C10 scFv ウサギ抗体) を反応させ、次いで peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

3) 抗体のリポソームへの結合能の検討
lipid-tag 単鎖抗体及び初代単鎖抗体をリポソームと一晚混合後、遠心によりリポソームと可溶成分を分離した。それぞれの成分を SDS-PAGE 後、抗 3C10 scFv ウサギ抗体、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより抗体の検出を行い、結合能を検討した。

4) 抗体の腫瘍集積性の検討

抗体への ^{99m}Tc の標識は、Mather, Ellison の方法に準じて行った。先ず親マウス抗体、単鎖抗体のそれぞれ $100\mu\text{g}$ を 2-メルカプトエタノールを用いて -S-S 結合を解離し、この解離部分にジェネレーターより溶出した新鮮 ^{99m}Tc (1mCi) を結合させた。未標識の

^{99m}Tc をカラムで分離し、抗体への標識量、標識率を計測した。抗体 $500\mu\text{Ci}$ を、変異 EGFR を発現する ERM5 (直径が $0.5\sim 1\text{cm}$) 腫瘍を持つヌードマウスに静注し、24 時間後に組織内の分布を測定した。

5) 単鎖抗体の腎臓への集積性の検討

^{99m}Tc 標識抗体を用いた単鎖抗体の生体内分布を検討した際、腎臓組織への集積が観察された。そこで、今回未標識初代単鎖抗体 $100\mu\text{g}$ を心臓より投与し、24 時間後に腎臓を摘出し、パラフィン切片作成後、抗 3C10 scFv ウサギ抗体と、peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を用い、単鎖抗体の検出、観察を行った。

C. 研究結果

1) lipid-tag 単鎖抗体は大腸菌により産生し、ペプチドを用いたアフィニティーカラムにより、活性ある抗体の精製を行うことができた。

2) ペプチド抗原を用いた ELISA の結果、親抗体、初代単鎖抗体と同様の反応特異性を保っていた。

3) 今回用いたリポソームとの結合能については、残念ながら観察できなかった。

4) ^{99m}Tc を scFv に容易に標識出来ることが確認できたため、 ^{99m}Tc 標識抗体を用いて生体内の腫瘍 (変異 EGFR 発現 ERM5 腫瘍) への集積性を検討した。その結果 24 時間後の腫瘍/血液比は、およそ親抗体が 16、単鎖抗体が 4 を示し、腫瘍への集積が確認できた。しかしながら腎肝への集積性は単鎖抗体で 70 であり、親抗体の 12 に比して極めて高い値を示した。

5) 単鎖抗体は腎臓組織内では、糸球体、尿管にはほとんど検出されず、集合管に観察された。

D. 考察

親抗体とほぼ同様の反応性ある単鎖抗体、

lipid-tag 付加単鎖抗体が作製できた。しかしながら、本修飾抗体はリボソームに結合性を示さず、本目的には不適切であるという結果に終わった。しかし、この結果は初代単鎖抗体が作製された後は、容易に各種修飾抗体を作製できる可能性を示したという点で、十分に研究は進展したと考えられる。

イメージングに関しては腫瘍とともに腎への高い集積性が認められ、主に集合管に観察された。この様な現象が本単鎖抗体に特異な現象なのか、また単鎖抗体に共通しているのか明らかにする必要がある。更に、腎集積を示さない抗体作成が可能かどうか検討していく必要がある。

E. 結論

3C10scFv は大腸菌で効率的に産生でき、また、この抗体を元として、各種修飾抗体の作製が可能であることが明らかとなった。この結果、今後のグリオーマ治療への応用のための様々な修飾抗体の作製が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoki, M., Mizuno, M., Natsume, A., Tsugawa, T., Tsujimura, K., Takahashi, T. and Yoshida, J.: Dendritic cells pulsed with tumor extract-cationic liposome complex increase the induction of cytotoxic T lymphocytes in mouse brain tumor. *Cancer Immunol.Immunother.*, 50: 463-468, 2001.
- 2) Yazaki, M., Takahashi, T., Mizutani K., Ito, Y., Wakiguchi, H., Inoue, M., Kawa, K., Kato, K., Kato, T., Saito, H. and Togari,

H.: Generation of HLA-Cw specific cytotoxic T-lymphocytes from cord blood used for cord blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.*, (in press)

2. 学会発表

- 1) 高須俊太郎、岡本健太、中屋敷典久、吉川和宏、水野正明、若林俊彦、佐賀信介、吉田純、高橋利忠：99mTc を標識した Type III mutant EGFR を認識する単鎖抗体による神経膠腫の画像診断への応用。第 60 回日本癌学会総会 2001.9.28
- 2) 小幡裕一、高橋利忠：SEREX 法によるがん抗原の同定（シンポジウム）第 60 回日本癌学会総会 2001.9.26
- 3) Takasu, S., Okamoto, K., Mizuno, M., Wakabayashi, T., Yoshikawa, K., Takahashi, T., Yoshida, J.: Specific targeting of glioma xenografts by 99m Technetium-labeled single chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. The American Association of Neurological Surgeons 69th Annual Meeting (Toronto, Canada) 2002.4.23

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

造血器腫瘍発症機構の解析とその臨床応用の研究

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。MALT リンパ腫において特異的に認められる API2-MALT1 キメラ mRNA は多様であるが、一度の検査で検出が可能である Multiplex-RT-PCR 法を確立した。さらにリアルタイム PCR 法を確立し、患者検体でのキメラ mRNA のコピー数を検討したところ、cDNA 100 ng あたり 40～10,000 コピーと患者間でかなりの差があり、リンパ腫内に存在する腫瘍細胞と背景の炎症性細胞とがさまざまな割合で混在している病態が明らかになった。MALT1 は BCL10 と結合し、NF- κ B を活性化することを明らかにした。また、API2-MALT1 キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化することが明らかとなり、MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割の一端が明らかになった。また、これまでに研究対象としてきた MLL、BCL6 遺伝子についてもその標的遺伝子を探索し、PI-3kinase の subtype のひとつとケモカインに関与する CRCX4 が、それぞれの標的候補遺伝子のひとつであることが明らかとなった。

A. 研究目的

1. 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、ならびに、
2. 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に特徴的な t(11;18)転座により形成される API2-MALT1 キメラを標的にしたより簡便な検出法を確立するとともに、
3. API2-MALT1 キメラ mRNA をマーカーに症例を検討し、その病態を解析する。また、
4. API2, MALT1, API2-MALT1 キメラ、BCL10

を用いて発現ベクターを構築し機能を調べる。

5. これまでに単離解析してきた MLL、BCL6 遺伝子の標的遺伝子を解析し、腫瘍化機構について検討する。

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。MALT リンパ腫における t(11;18) 転座に関与するキメラ mRNA は患者ごとに異なり、複数存在する。その結果すべての転座型を一度に検出することが困難であった。そこで、種々のプライマーを用いて multiplex-RT-PCR 法を開発し、一回の検査で特異的なキメラ産物を検出できるアッセイ系の確立を試みた。また、われわれが単離、クローニングしたキメラ cDNA をスタンダードにして、リアルタイム PCR 法も確立し、患者腫瘍検体中にある API2-MALT1 キメラ遺伝子産物のコピー数を検討し、その病態の解析をおこなった。転座関連遺伝子 BCL10 と MALT1 が結合することがわかったので、API2, MALT1, API2-MALT1 キメラ、BCL10 を用いて発現ベクターを構築し機能を調べる。

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(クロンテック)と cDNA microarray 法で検討した。

C. 研究結果

1) 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 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 を用いることで解析可能であった 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、臨床への応用が広がった。

3) 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。

4) 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に認められる API2-MALT1 キメラ mRNA の検出において、センスプライマー3種類とひとつのアンチセンスプライマーを同時に使用することにより行う multiplex-RT-PCR 法において、65℃～60℃での touchdown-PCR 法(annealing 温度を 1℃につき 2 回ずつおこない、順次 1 度ずつ温度を下げていき、60℃に達したところで 25 サイクル反応させる方法)を行うことにより、今回試すことができた 5 種類の異なったキメラ

遺伝子産物をすべて特異的に増幅することができた。その感度は 5・g cDNA あたり 100 コピーであった。

5) もっとも高頻度に認められる API2-MALT キメラ mRNA に対し、1 コピーを検出することができるリアルタイム PCR 法を確立し、患者腫瘍検体中にある API2-MALT1 キメラ遺伝子産物を検討したところ 5・g cDNA 40 コピーから 10,000 コピーと幅広いコピー数を示すことが明らかとなった。

6) API2, MALT1, API2-MALT1 キメラ, BCL10 を用いて発現ベクターによる一過性発現系で NF- κ B に対する機能を調べたところ、MALT1 は BCL10 と結合し、NF- κ B を活性化することを明らかにした。また、API2-MALT1 キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化すること、MALT1 の C 末端即存在する CLD ドメインを欠失するとその活性は失われることが明らかとなり、MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割の一端が明らかになった。

7) MLL 遺伝子の標的遺伝子として PI-3kinase の subtype のひとつが候補遺伝子として明らかとなった。また、それとは異なる EST が候補遺伝子として明らかとなり、その解析を進めている。BCL6 遺伝子の候補遺伝子のひとつに CXCR4 があることを見出した。

D. 考察

1) MALT 型 B リンパ腫に認められる t(11;18)(q21;q21) のリンパ腫発症における役割：

MALT リンパ腫は悪性リンパ腫のなかで、単一疾患としては、もっとも頻度の高い悪性リンパ腫である。そのリンパ腫に認められる特徴的な染色体異常から見出された API2-MALT1 キメラ遺伝子は、腫瘍マーカーとしての位置付けが明確ではなかった。今回の多数症例の解析から、発生臓器により関与が異なり、肺 MALT1 リンパ腫、腸管 MALT リンパ腫でもっとも頻度が高く、胃 MALT では 14% に認められた。

しかし、これら胃 MALT リンパ腫で、API2-MALT1 遺伝子異常を有するものは、抗生物質治療に反応せず、真の腫瘍であることが示唆された。すなわち、少なくとも胃リンパ腫においては、臨床的に意義の高い腫瘍マーカーとして確立できることが示唆された。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。そのためにも、特異性の高い抗体の作成が必要である。

MALT リンパ腫に認められる t(11;18) 転座により形成される融合遺伝子産物が複数存在し、その結果すべての転座型を一度に検出することが困難であり、これまでは 2 種類のプライマーの組み合わせをいくとおりか用意し、実験を複数回行う必要があった。今回、増幅される断片の長さを 700bp 以内に抑えるように考案した 3 つのセンスプライマーとひとつのアンチセンスプライマーを用い、かつ touchdown PCR 法を行うことで、1 回の実験で種類の異なるキメラ mRNA を検出することができた。その検出限界は約 100 コピーであった。これは、検討した臨床検体すべてについて、検出が可能であったので、臨床的に有用な検査法となることが明らかとなった。さらに、リアルタイム PCR 法により、患者腫瘍検体中にある API2-MALT1 キメラ遺伝子産物を検討したところ 5・g cDNA 中、40 コピーから 10,000 コピーと幅広いコピー数を示すことが明らかとなったが、ヘテロな細胞集団からなると考えられている MALT リンパ腫から、さまざまなコピー数が検出されたことにより、分子レベルにおいても MALT リンパ腫では、腫瘍細胞と反応性の細胞が混在した病型を形作っていることが示唆された。

MALT1 は BCL10 と結合し、NF- κ B を活性化すること、また、API2-MALT1 キメラ蛋白は単独で NF- κ B を活性化すること、MALT1 の C 末端即存在する CLD ドメインを欠失するとその活