

厚生労働科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的
把握によるがんの特徴の解明と診療への応用
(H14-がん-001)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広橋 説雄

平成15(2003)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

- ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的把握によるがんの特徴の解明と
診療への応用 _____ 1
主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)

II. 分担研究報告書

1. 発がん浸潤・転移への細胞接着系異常の関与 _____ 18
広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)
2. MS-RDA 法によるエピジェネティックな発がん機構の解析 _____ 23
牛島 俊和 (国立がんセンター研究所発がん研究部)
3. 発がんのエピジェネティック機構 _____ 27
白石 昌彦 (国立がんセンター研究所
DNA メチル化とゲノム機能プロジェクト)
4. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握に関する研究 _____ 32
清野 透 (国立がんセンター研究所ウイルス部)
5. ゲノム解析を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____ 37
細田 文恵 (国立がんセンター研究所分子腫瘍学部)
6. 染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____ 41
村上 善則 (国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト)
7. がん関連遺伝子異常の診断への応用 _____ 46
菅野 康吉 (栃木県立がんセンター研究所
がん遺伝子研究室・がん予防研究室)
8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究 _____ 50
今井 浩三 (札幌医科大学内科学第一講座)
9. 膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構 _____ 55
坂元 享宇 (慶應義塾大学医学部病理学教室)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的把握によるがんの特徴の解明と
診療への応用
(H14-がん-001)

主任研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：食道扁平上皮がんにおける 11q13 共通欠失領域からがん抑制遺伝子候補を見いだし、食道扁平上皮がんにおいて実際にアミノ酸置換を伴う突然変異を同定した。本遺伝子産物は細胞骨格の構築に機能するアクチン結合蛋白コルタクチンに結合する蛋白質のひとつであった。昨年度までに腫瘍原性の抑制活性を指標として同定した 11q23.2 領域上の新規がん抑制遺伝子 TSLC1 が、諸臓器のがんにおいてプロモーター領域のメチル化を含む 2 ヒットにより不活化されることを示した。TSLC1 は細胞内ドメインを介して、原発性肺がんが発現の低下する DAL-1 蛋白質と結合し、細胞骨格に作用することを見出した。安定化βカテニンの発現誘導前後で大規模な発現プロファイルを解析し、βカテニン-Tcf/Lef 標的遺伝子を網羅的に同定した。昨年度までに同定したカドヘリン機能を不活化させる新規分子ディスアドヘリンの発現と、諸臓器のがんの遠隔転移の有無・分化度・予後などの臨床病理学的な因子との有意な相関を示した。がん細胞株へのディスアドヘリンの強制発現により、細胞の運動性と移植モデルにおける肝転移性が亢進することを示した。ヒト正常細胞の多段階発がんの過程を ex vivo で再現し、がん関連遺伝子の機能解析をすすめるため、種々の正常ヒト細胞を不死化した。前がん状態から発現亢進する DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT3b の不活性型バリエーション DNMT3b4 が、傍セントロメアサテライト領域において活性型バリエーションと競合し、同領域の DNA メチル化が減弱して染色体不安定性に帰結する可能性を示した。がんにおいてゲノム包括的・網羅的な DNA メチル化の変化を解析した。昨年度までにヒト乳がんプロモーター領域のメチル化により不活化されることを明らかにしていた Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase 遺伝子について、血漿中 DNA におけるメチル化の状態を解析して早期乳がん症例を高頻度に検出できることを示した。全身性の hMLH1 遺伝子の広汎なメチル化が、家族歴のない MSI 陽性の 40 才以下の大腸がんの発症原因となり、異時性の多重発がんのリスクを高める可能性を見出した。cDNA アレイシステムを用いて消化器がんなどにおける遺伝子発現プロファイルを作製し、がんの転移性などと相関して発現が変化する遺伝子群を特定した。LI-カドヘリンの発現が代表的な難治がんである膵がんの独立した予後因子であることを示し、ガレクチン-3 が LI-カドヘリンと相互作用する可能性を示した。

分担研究者

- | | | |
|----------|-------------------------------|---|
| 1. 広橋 説雄 | 国立がんセンター研究所
所長 | 部長 |
| 2. 牛島 俊和 | 国立がんセンター研究所
部長 | 5. 細田 文恵
国立がんセンター研究所
主任研究官 |
| 3. 白石 昌彦 | 国立がんセンター研究所
プロジェクトリーダー（室長） | 6. 村上 善則
国立がんセンター研究所
プロジェクトリーダー（室長） |
| 4. 清野 透 | 国立がんセンター研究所 | 7. 菅野 康吉
栃木県立がんセンター
研究所 副主幹兼医長 |

8. 今井 浩三 札幌医科大学
教授
9. 坂元 亨宇 慶應義塾大学
教授

A. 研究目的

がんへの罹患・がんによる死亡は今後さらに増加すると予想されており、その対策は急務となっている。がん遺伝子・がん抑制遺伝子そのほかのがん関連遺伝子の同定・診断技術の進歩などにより、がん化のメカニズムの解明とその対策は徐々に進んでは来ているが、未だその本態は十分には解明されていない。加えて、たとえ同一臓器のがんであっても、個々の症例により病態や予後は様々であり、有効な診断・治療法の開発を困難にしている。従って、がんの様々な病態を反映する病理組織像と、その背景にある機能分子の発現異常・遺伝子異常を包括的に明らかにすることは、がん研究の中でも極めて重要である。ヒトがんの悪性進展の過程の正確な把握が、個々の症例に最適な診断・治療法の選択に結びつくことが期待される。本研究は、新たながんの診断・制御法開発のための基盤として、多段階発がんの全体像の理解を遺伝子・分子・細胞レベルで総合的に推進することを目的とする。

昨年度までの研究により、ジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常をゲノム網羅的に解析する方法が確立され、新たながん関連遺伝子が同定されつつある。本年度は特に食道がんなどで高頻度に染色体部分欠失の見られる11q13領域に注目し、領域内に想定されるがん抑制遺伝子の単離ならびにがんにおける異常の解明をめざす。腫瘍抑制活性を指標として同定した新規がん抑制遺伝子 TSLC1 の、ヒトがんにおける異常の実態と、遺伝子産物の機能を多角的に解明する。 β カテニン-Tcf/Lef転写因子群の標的となる遺伝子群の、大腸早期発がんへの機能的関与を明らかにする。昨年度までにカドヘリン機能を不活化する新規糖蛋白として同定したディスアドヘリン発現の臨床病理学的な意義を

明らかにするとともに、ディスアドヘリンががん転移能亢進に寄与する分子機構の理解をすすめる。種々のヒト正常細胞を不死化してその不死化機構を解析するとともに、不死化した細胞を用い多段階発がん過程を再現してがん関連遺伝子の機能を解析できるex vivoモデルを確立する。

DNAメチル化の異常の背景にあるDNAメチルトランスフェラーゼの異常と染色体不安定性の関係の理解をすすめる。培養がん細胞などにおいてDNAメチル化・ヒストン修飾によるがん関連遺伝子不活性化機構を解析し、がんにおけるエピジェネティックな異常の実態を明らかにする。独自に開発した方法で、メチル化により不活性化されている遺伝子を網羅的に検索し、同定された遺伝子に関して、発がんへの関与を検討する。DNAメチル化の状態に着目した遺伝子診断を実用化するために必要な解析技術の開発につとめ、これをマイクロサテライト不安定性を示す散発性大腸がんにおけるhMLH1遺伝子のプロモーター領域のメチル化のプロファイル解析に適用して、大腸発がんにおけるhMLH1遺伝子のメチル化の意義を示す。

食道がん・胃消化管間葉系腫瘍 (GIST)・大腸がん・膵管内乳頭腫瘍を対象に、遺伝子発現・DNAメチル化の異常を系統的に解析し、発がんおよびがんの悪性進展機構の理解をすすめ、異常遺伝子を標的としたがん制御の可能性を展望する。

代表的な難治がんである膵がん手術材料の解析から、膵がんの臨床病理学的特性を一層明らかにする。さらに、その基盤となる分子・細胞機構を、実際のがんの浸潤・転移性をよく模倣する膵がん組織のマウス同所性移植モデルを用いて解明し、膵がんの早期診断ならびに標的治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

1. がん関連遺伝子の把握

ヘテロ接合性喪失 (LOH)解析によって、子宮体がんでは11q23領域に、食道扁平上皮がんでは11q13と11q22-23領域に

染色体部分欠失が蓄積していることを見出した。それぞれのがんについてさらに詳細な LOH 解析を行うことにより、最小の共通欠失領域を同定した。その結果をもとに 11q13 の食道扁平上皮がん領域 1 Mb について、領域内遺伝子の検索と cDNA の単離をおこなった。同定された領域内の遺伝子については、SSCP 解析またはヘテロデュプレックス解析およびシークエンス解析を行い、遺伝子変異の有無を検討した。がん細胞株における遺伝子発現の異常を RT-PCR 法により検討した。

2. がん関連遺伝子の機能解析

諸臓器のヒトのがんならびに培養がん細胞において、TSLC1 遺伝子の構造異常の有無を PCR-SSCP 法により解析し、LOH の有無ならびにバイサルファイト処理によるプロモーター領域のメチル化の有無の解析をあわせておこなった。TSLC1 遺伝子発現はノーザンブロット法ならびに RT-PCR 法により評価した。TSLC1 遺伝子産物の細胞内局在は、緑色蛍光色素標識蛋白質 GFP との融合蛋白質や、特異的ポリクローナル抗体を用いて、共焦点顕微鏡により観察した。免疫沈降法ならびに免疫ブロット法には、GFP・HA・V5 融合蛋白質に対する抗体や、TSLC1 特異抗体を用いた。マウス cDNA ライブラリー・ゲノム DNA ライブラリーを用いて、マウス TSLC1 遺伝子を単離・同定した。

テトラサイクリン調節性プロモーターによる発現誘導システムを用い、非腫瘍性の不死化腸上皮由来細胞 IEC-6 よりリン酸化部位を欠き安定化した β -カテニン Δ N89 を発現誘導できる IEC6 Tet-0FF β -カテニン Δ N89 を樹立した。この細胞のテトラサイクリン誘導前後の大規模な遺伝子の発現プロファイル解析をおこない、 β -カテニンの下流で発現の変化する分子を網羅的に同定した。

ヒト乳腺上皮、皮膚角化細胞および皮膚線維芽細胞に加え、内皮細胞やリンパ球など、種々のヒト正常細胞初代培養の不死化を試みた。TERT の導入のみで不死化でき

るか、Rb を不活化するウイルスがん遺伝子 HPV16 E7 や p16 の発現を抑制すると報告されている bmi1 の導入で延命できるか、さらにマウスの胎仔線維芽細胞の不死化において重要な p53 の不活化を引き起こす HPV16 E6 遺伝子の導入により延命できるかを解析した。

3. 発がんのエピジェネティック機構

大腸がん肝転移症例の手術材料より得られた正常肝組織・肝細胞がん症例の手術材料より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織・肝細胞がん組織において、DNMT3b 遺伝子全22コーディングエクソンにおける変異の有無を PCR-SSCP法により検討した。エクソン-エクソン境界を含む特異プライマーを作成し、リアルタイム検出システムによる DNMT3b スプライスバリエーション特異的定量 RT-PCR 法を施行した。DNMT3b3・DNMT3b4 の mRNA 発現と、同じ検体における傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の状態との相関を検討した。ヒト胎児腎上皮由来 293 細胞に DNMT3b4 全長 cDNA を安定的に強制発現させた。293 細胞は DNMT3b3 を正常肝組織と同等レベルに発現しているが、内因性の DNMT3b4 はトレースレベルである。遺伝子導入から約 50 日後にサテライト 2 における DNA メチル化の状態をサザン法で検討した。

肺腺がん組織由来の高分子 DNA を制限酵素 Tsp509I で切断した後、メチル化 DNA 結合 (MBD) カラムクロマトグラフィーで高度にメチル化された DNA 断片を単離した。この断片をクローン化した後、昨年度までに開発した CpG アイランド単離技術 SPM 法で解析し、メチル化 CpG アイランドに由来する DNA を単離した。その後これらの配列が肺がん臨床症例の DNA でどのようにメチル化されているかをバイサルファイト修飾法で解析した。ヒト培養がん細胞における E-カドヘリン (CDH1) 遺伝子不活性化に関し、DNA メチル化様式を MBD カラムクロマトグラフィーおよびバイサルファイト修飾法で、ヒストン修飾およびメ

チル化DNA結合蛋白質の結合をクロマチン免疫沈降法で解析した。さらにCDH1遺伝子の発現が抑制されている培養がん細胞を、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で処理し、遺伝子発現回復の有無を検討した。

がんでDNAメチル化を受ける遺伝子およびそのCpGアイランドをmethylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法によりゲノム網羅的に検索した。CpGアイランドは、Gardiner-GardenおよびTakaiの基準により判定した。同定された遺伝子の組織検体における発現は定量的RT-PCR法によって評価し、DNAメチル化の状態をパイサルファイトシークエンス法あるいはMSP法および定量的MSP法により評価した。DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤処理により培養細胞における発現の回復を確認した。Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase (3-OST-2)遺伝子を指標とした血漿診断のためには、MSPプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物の中間部に設定したTaqManプローブにより、メチル化されたDNAまたは非メチル化DNAの増幅を測定した。プラスミドに組みこんだメチル化DNAと非メチル化DNAを同時に測定し、検体中のDNAコピー数を算出した。

hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を効率よく解析するため、開始コドンの上流-755 から下流+86 までの CpG アイランドを 5ヶ所の領域に分割して MSP-SSCP 法を確立した。本法を用いて、散発性大腸がん症例を対象として、hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の状態と、マイクロサテライト不安定性、K-ras 遺伝子変異、p53 遺伝子の欠失などとの関連を解析した。hMLH1 遺伝子のプロモーターの全領域で広汎なメチル化が認められた症例を対象として、-93 の部位にある G/A の一塩基置換型多型を利用して、プロモーター部位に生じたメチル化のアリル特異性あるいは LOH の有無を検討した。

HNPCC が疑われる症例の末梢血リンパ球より抽出した DNA を対象として、hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無を解析した。

4. がん関連遺伝子を標的としたがん制御を目指した研究

食道扁平上皮がん、高悪性および低悪性胃 GIST、各病期の大腸がんおよびその肝転移組織を対象に、病変部位をレーザー捕捉組織マイクロダイセクション法で採取し、cDNA アレイにより遺伝子発現プロファイルを解析した。クラスタリング解析から得られたいくつかの遺伝子をプローブに、がん組織から合成した cDNA をアレイ化したがん組織アレイを用いて解析し、さらに組織マイクロアレイを用いて免疫組織化学的検討をおこなった。

5. 難治がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構の解明

代表的な難治がんである膵がんの腫瘍組織あるいは膵がん細胞株を、SCIDマウスの膵臓に移植し、膵がんの増殖・浸潤・転移を模倣するモデルを作成した。同所性移植モデルは、膵がん手術材料を洗浄後1~2mm角に細切し、3~5匹のSCID マウス(5週令、雄)の膵臓に縫着した。3~4か月後に犠牲死させ、病理学的検索および他のSCID マウスへ同様に継代をおこなった。これら腫瘍細胞・組織を免疫して、モノクローナル抗体を網羅的に作製し、その認識する分子の膵がん発生における意義を解析した。同様に、これら細胞・組織において網羅的遺伝子発現解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

厚生科学審議会により制定された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題などに対応するための指針」および科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守する。手術材料の残余の組織の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得る。患者の治療方針決定のための

病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせないようにした。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程では無記名として検体番号のみで取り扱うなどの細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守した。

C. 研究結果

1. がん関連遺伝子の把握

食道扁平上皮がん 55 症例について 11 番染色体全域の LOH 解析を行い、長腕部 q13.3 領域と q21-23 領域に欠失の集積があることを見出した。11q13.3 領域に注目し、周辺に高密度にマイクロサテライトマーカーを設計して欠失領域の特定をおこなった。その結果、11q13 のサイクリン D1 遺伝子を含む遺伝子増幅領域の下流に隣接した約 1 Mb 領域が、43 症例 (78%) において増幅とは無関係に共通欠失していることがわかった。ゲノムドラフトシーケンスから本領域内に 11 個の遺伝子あるいは cDNA を見出したので、遺伝子の単離・同定をおこなった。その結果、既知の 5 遺伝子と新規の 3 遺伝子を確認した。注目した新規遺伝子においては、5 症例でアミノ酸置換を伴う体細胞突然変異を検出した。体細胞突然変異を検出した新規遺伝子は、500 kb 以上のゲノム領域にまたがる大きな遺伝子であり、その遺伝子の 5'側半分が最小共通欠失領域に含まれる。ノザンプロット法により脳、腎臓、大腸、胎盤、前立腺、胃などで検出される mRNA サイズは主には 10 kb で、脳においては 8.5 kb サイズのものも検出された。cDNA の構造から本遺伝子の最長産物はアンキリンリピート、SH3 ドメイン、PDZ ドメインをもつ 1849 アミノ酸から成る蛋白質であるが、アンキリンリピート、あるいはアンキリンリピートと SH3 ドメインが欠けた産物、またはアンキリンリピート領域のみを有す

る産物など、少なくとも 4 種類以上のサブライスバリエントが存在することがわかった。本産物のうち、N 末領域のアンキリンリピートと SH3 ドメインが欠けた産物は、11q13 増幅に伴ってサイクリン D1 遺伝子とともに発現亢進することが多い遺伝子として知られる EMS1 遺伝子産物、コルタクチンに結合することが知られている。また、N 末アンキリンリピートのみを欠いた産物は、シナプス後細胞において N-メチル-D-アスパラギン酸受容体複合体と代謝共役型グルタミン酸受容体複合体を架橋するアンカリング (足場) 蛋白質として知られてきた。最長産物の機能は未知である。食道がん 12 株・乳がん 20 株・肺がん 33 株・胃がん 12 株などの細胞株を用いて、本遺伝子産物の発現異常が見られるかどうかを RT-PCR 法によって調べたところ、いずれのがん種でも約 1-2 割の株で最長産物の発現減弱が見られた。

2. がん関連遺伝子の機能解析

ヒトの諸臓器のがん 61 例の 54% で TSLC1 の発現の欠如が認められ、高頻度に LOH ならびにプロモーターメチル化による 2 ヒットの不活化が認められた。TSLC1 が膜蛋白質でアルギニン部位に糖鎖付加を受けること、ホモ 2 量体を形成すること、細胞間接着部位の側壁に発現することを見出した。また、TSLC1 を発現させたサル腎臓細胞では細胞凝集活性が上昇した。一方、TSLC1 の細胞内領域に存在する FERM 結合モチーフに注目し、TSLC1 が、肺がんの抑制遺伝子候補である細胞裏打ち蛋白質 DAL-1 と結合し、細胞骨格に作用することを示した。DAL-1 が TSLC1 とともに不活化している肺がんが多く見出された。ヒト TSLC1 cDNA の細胞内領域に相当する塩基配列を指標として、マウスデータベースを検索し、類似 cDNA 配列を同定した。この配列をもとにマウス脳 cDNA ライブラリーを検索し、mTslc1 cDNA を単離した。次にマウスゲノム DNA ライブラリーを検索して、その遺伝子構造を決定した。mTslc1 もヒト

TSLC1 同様、末梢血リンパ球を除くほぼすべての臓器で発現が認められた。マウス *Tslc1* 遺伝子産物は、ヒト TSLC1 とアミノ酸レベルで 98%の相同性を示した。また、データベースの検索により、TSLC1 遺伝子は脊椎動物間で高度に保存されていることがわかった。

不死化腸上皮由来細胞における安定化 β -カテニン発現誘導による β -カテニン下流遺伝子の網羅的単離の試みにより、*Axil*、*MDR1* など既に β -カテニン/TCF4 の標的遺伝子と知られている分子も同定されたが、 β -カテニンの細胞内蓄積による大腸発がんとの関連を従来指摘されていなかった分子が多数含まれていた。このうち、定量的 RT-PCR 法にて *Min* マウスの腫瘍組織で実際に遺伝子発現変化が確認できる 10 数分子を、 β -カテニンの細胞内蓄積による大腸発がんの候補分子として選択した。

ディスアドヘリンを特異的に認識する抗体を新たに樹立して、ディスアドヘリン発現の意義を臨床症例の切除材料にて検討した。膵がん組織中の高分化のがん腺管と比較して、がんの浸潤部分や低分化部分で有意な発現の上昇を認めた。また、ディスアドヘリンの過剰発現と膵がんの遠隔転移・分化度とのあいだに有意な相関を認め、過剰発現を示す症例の予後は不良であった。ディスアドヘリン過剰発現の意義を明らかにするために、膵がん細胞株の中で発現の低い細胞である *Capan-1* に遺伝子導入し、安定的高発現株を樹立した。高発現株 3 株・対照 2 株・親株のあいだで同所性移植モデルにおける転移能を検討したところ、ディスアドヘリン高発現株では、リンパ節転移能・肝転移能の何れもが亢進していることがわかった。転移能亢進のメカニズムを知るために細胞運動性を検討したところ、ディスアドヘリン高発現株では対照に比して細胞運動性の亢進を認めた。

種々のヒト正常細胞の不死化を試みた。これまでに皮膚・気管支・食道・子宮頸部、子宮内膜・卵巣表層・歯根由来の上皮細胞・臍帯静脈・胸管由来の内皮細胞・大網由来の中皮細胞・筋芽細胞・骨髄間葉系幹細胞・

各臓器由来の線維芽細胞などの不死化に成功している。線維芽細胞を除き調べたヒト初代培養細胞は全て継代するに従い、p16 の発現上昇がみられ一部の細胞では p21 の発現上昇も見られた。これらの増加に伴い、RB のリン酸化が阻害され、増殖が停止することを明らかにした。また、種々の臓器由来の線維芽細胞を調べたところ、皮膚由来の線維芽細胞では p16 の発現が極めて低いのに対し、他の臓器由来の線維芽細胞は全て継代と共に p16 の発現が上昇することが分かった。また、がん遺伝子 *bmi-1* は p16 の発現を抑制し TERT との組み合わせで乳腺上皮細胞・皮膚角化細胞・気管支上皮細胞・子宮頸部上皮細胞など複数の細胞種を不死化できることが示された。

3. 発がんのエピジェネティック機構

肝細胞がんにおいて DNMT3b の体細胞遺伝子変異は認められなかった。メチルトランスフェラーゼモチーフ IX ならびに X を欠くスプライズバリエーションである DNMT3b4 の発現が、慢性肝炎ならびに肝硬変症を呈する非がん肝組織ならびに肝細胞がんにおいて亢進し、傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の減弱の程度と有意に相関した。傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の減弱を示す検体においては、正常肝組織に発現する主たるスプライズバリエーションでメチルトランスフェラーゼモチーフ I, IV, VI, IX および X を保持している DNMT3b3 の発現と比較したとき、DNMT3b4 が特に有意に高発現していた。そこで、DNMT3b4 をヒト腎上皮由来 293 細胞に強制発現した。親株・対照株ならびに DNMT3b4 の発現が著しく低レベルの株においては、サテライト 2 が DNA メチル化を受けていた。これに対し DNMT3b4 を十分に発現している株においては、DNMT3b4 の発現量に依存してサテライト 2 における DNA メチル化の有意な減弱が誘導された。

CDH1 遺伝子の発現が抑制されている複数のがん細胞株において、CpG アイランドのメチル化の状態、メチル化 DNA 結合蛋

白質MeCP2およびMBD1・MBD2の結合の有無、ヒストンH3・H4のアセチル化状態、ヒストンH3の4番目のリジン残基(H3K4)・9番目のリジン残基(H3K9)のメチル化を解析したところ、発現抑制細胞間でDNAメチル化・ヒストン修飾の実態は多様であったが、共通してプロモーター領域が不活性クロマチンを構成し、転写因子の結合が阻害されていることがわかった。DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤・ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する応答性にも細胞間に相違がみられた。

MBDカラムクロマトグラフィー-SPM法で同定した約6000個のプラスミドクローンの塩基配列を決定した。重複を除いた660個の配列が塩基配列上CpGアイランドの特徴を有しており、このうち約200個が正常体細胞DNAでメチル化されていなかった。これらの塩基配列に関し、肺がん臨床症例のDNAでどのようにメチル化されているかを解析した結果、がんにおいてメチル化されているCpGアイランドの数は患者により大きく異なることがわかった。また多くの肺がんではメチル化されているCpGアイランドの数は全ゲノム中のCpGアイランドの総数の約1-2%と推定された。

正常乳腺組織由来DNAをテスター・乳がん組織をドライバーにしたMS-RDA法により、がんで過剰にメチル化されたDNA断片およびメチル化が低下したDNA断片を多数同定した。このうち、3-OST-2遺伝子の発現は乳がんにおいて低下しており、3-OST-2遺伝子のエクソン2のCpGアイランドは、乳がんではメチル化が低下しているのに対し、プロモーター領域のCpGアイランドは、乳がんでは過剰メチル化されていた。同様にMCT1遺伝子の発現も低下していることを見出した。3-OST-2遺伝子ならびにMCT1遺伝子の5'領域が強くメチル化されている乳がん細胞株を、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤により処理した。両遺伝子とも、5'領域が脱メチル化され、それに伴い遺伝子発現が回復した。従って、両遺伝子とも、5'領域のメチル化が原因で不活化されていることが確認された。細

胞株での人工産物を観察している可能性を排除するために、乳がん手術材料について、各遺伝子の5'領域のメチル化を、MSP法により検討した。3-OST-2遺伝子のメチル化は88%で、MCT1遺伝子のメチル化は20%で認められた。3-OST-2遺伝子の5'領域のメチル化異常が乳がんでは高頻度に認められることを利用し、早期乳がん症例の診断への応用可能性を検討した。早期乳がん症例(平均年齢53才)と、健康人ボランティア(平均年齢50才)の血漿2 mlからDNAを抽出、5'領域がメチル化された3-OST-2遺伝子のコピー数を測定した。乳がん症例43例中11例で血漿中のDNAにメチル化異常が認められたのに対し、健康者ボランティアでは50例中1例のみが陽性となった。同遺伝子のメチル化を指標にした早期乳がんの血清診断実用化の可能性が期待された。

大腸がん組織の解析で、hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のすべてのCpG配列がメチル化を受ける例(16%)、プロモーターの最上流部の-755から-574の領域を中心とした部分的なメチル化を生じる例(30%)、メチル化を認めない例(55%)に分けられた。広汎なメチル化を生じた全例がマイクロサテライト不安定性を示し、hMLH1 蛋白の発現の消失は高率であった。このような症例は女性の右側結腸がんが多く、平均発症年齢が75.4±8.4才と高齢で、K-ras がん遺伝子の点突然変異やp53 遺伝子の欠失を認めないなどの特徴が見出された。広汎なメチル化が認められたマイクロサテライト不安定性陽性大腸がんのうち、hMLH1 遺伝子のプロモーター領域-93に認められるG/Aの一塩基置換型多型がヘテロ接合であった症例について、多型部位周辺のメチル化の状態とLOHの有無を解析したところ、全例でhMLH1 遺伝子のメチル化は両アリル性に生じており、LOHは認められなかった。広汎なメチル化が認められた大腸がん症例の約3割で背景粘膜にもhMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が認められたが、いずれも部分的なメチル化であった。メチル化はマイクロ

サテライト不安定性陰性腫瘍の34%でも認められたが、すべて部分的なメチル化であった。免疫組織化学的に検討したところ、hMLH1 遺伝子の発現は、広汎なメチル化を示す症例の85%で消失していた。一方、部分的なメチル化を認めた大腸がんあるいはその背景粘膜では発現は保たれていた。40才以下の若年発症のHNPCCが疑われる症例で、末梢血リンパ球・正常大腸粘膜・正常胃粘膜・子宮内膜・骨髄細胞などで全身的にhMLH1 遺伝子のプロモーターの広汎なメチル化が認められた症例を4例経験した。これらの症例ではいずれもhMSH2, hMLH1 などのミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異を認めず、メチル化はプロモーターの片方のアリルにのみ生じており、異時性の多重発がん発症の頻度が高かった。

4. がん関連遺伝子を標的としたがん制御を目指した研究

cDNAアレイ解析により、消化管がんにおいて予後などの臨床病理学的因子と相関する遺伝子群の発現変化が明らかになった。食道がんでは、個々のデータに加えて、クラスタリング解析により、リンパ節転移とよく相関するプロテアーゼなどの遺伝子群の発現変化を明らかにすることができた。がん組織アレイを併用することで、リンパ節転移の程度に比例するメタロプロテアーゼなどの遺伝子発現変化も明らかになった。胃GISTのcDNAアレイ解析で得られた遺伝子発現データよりクラスター解析をおこなったところ、高悪性GISTにおいて発現の上昇(VEGFなど)や低下が顕著な遺伝子群を同定することができた。がん組織アレイを併用した解析により、大腸がんでは、特に肝転移をはじめ、がんの進展と相関する接着分子などの遺伝子発現変化を明らかにすることができた。p53の核内過剰発現はがんの38%(5/13)に認めたが、過形成や腺種では認めなかった。p16の部分的発現消失は、腺種の56%(9/16)、がんの92%(12/13)に認め、腺種では低異型の病変においても認めた。SMAD4の部分的発現消

失は、腺種の38%(6/16)、がんの92%(12/13)に認め、腺種では低異型の病変においても認めた。がんにおいては、非浸潤性がん比べ、浸潤性がんではSMAD4発現陰性率は有意に高かった。

5. 難治がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構の解明

マウスに同所性移植した膵がん組織を免疫し、LI-カドヘリンを特異的に認識する抗体を得た。そこでLI-カドヘリン発現の意義について膵がん切除材料で検討したところ、LI-カドヘリン発現は中分化・低分化型やステージpIVa, pIVb 症例よりも高分化型やステージpI, pII, pIII 症例の方で高頻度に陽性となった。またLI-カドヘリン陽性例は陰性例に比し有意に生存期間の延長を認めた。このLI-カドヘリンについては、その機能は十分明らかにされていないため、膵がん細胞においてLI-カドヘリンと相互作用する分子を解析した。樹立した抗体を用いた免疫沈降法を施行し、LI-カドヘリン陽性細胞であるAsPC-1細胞においてのみLI-カドヘリンと共同沈降し、陰性細胞であるPanc-1細胞では共同沈降しなかったに30-kdの蛋白についてアミノ酸解析をおこなった。その結果この分子はガレクチン-3であることが判明した。さらにこの結合が、ガレクチン-3のレクチンドメインを介しているかどうかを知るために阻害実験をおこなったところ、この結合はラクトース濃度依存性に阻害されるが、シュークロースでは阻害されないことが示された。膵がん組織を直接移植し樹立した株12例を対象に、約45000遺伝子の発現を網羅的に解析した。正常膵組織に比して共通に高発現している遺伝子65個、移植モデルにおけるリンパ節高転移株8株で高発現し非転移株4株のあいだで発現亢進していない遺伝子40個を同定した。現在定量RT-PCR法や免疫組織化学的検討を付加し、これらの候補遺伝子の中から膵がんの発生と生物学的特性の決定に寄与する遺伝子の絞り込みを行っている。

D. 考察

1. がん関連遺伝子の把握

食道扁平上皮がんの 11q13 の LOH 領域から本研究で新規に同定したがん抑制候補遺伝子は、これまで 11q13 増幅に伴ってサイクリン D1 遺伝子とともに発現亢進することが多い遺伝子として知られる EMS1 遺伝子産物コルタクチンと物理的に結合し、協調して機能する可能性が高い。現在までに食道扁平上皮がんで見出したアミノ酸置換を伴う本遺伝子の突然変異の頻度は 11% であるが、最終的にどの程度の頻度で本遺伝子に体細胞突然変異が見出されるかを他の臓器がんも含め臨床検体数を増やして検討する予定である。本遺伝子産物のがん化における役割を検証するために、まず本遺伝子の発現がない細胞株に遺伝子導入し、細胞の変化を観察することを予定している。今回見出した全長遺伝子産物の機能は未知であるが、スプライスバリエーションについての知見から細胞運動やがんの浸潤・転移能に関与すると推測される。RT-PCR 法で検討したところ、消化器がんにおいて各スプライスバリエーションが発現しており発現レベルに差は見られなかったが、今後抗体を用いて蛋白質レベルを確認することを予定している。N 末領域の特異的なドメイン構造を欠いたスプライスバリエーションがどのように機能を分担しているのか、拮抗的に働く可能性があるのかなど、スプライスバリエーション間の機能的な関係を明らかにする必要がある。そのためには、コルタクチンなどのこれまでに同定された結合蛋白質のほかに、N 末アンキリンリピート領域に結合する蛋白質を明らかにしていくことも重要と考える。

2. がん関連遺伝子の機能解析

本年度の研究により TSLC1 の異常が肺非小細胞がんのみならず、他の多くのがんでも認められることが明らかになった。このことは、本遺伝子単離の端緒となったヌードマウス皮下での培養がん細胞の腫瘍形成抑制という表現型が、多くのがんの進展に共通に関与する機構の破綻の上に成り

立っていることを示している。特異抗体を用いた免疫組織化学解析がある程度可能となったことから、がんの進行度や浸潤先端面での変化など、さらに詳細な病理学的意義の解明が可能になると思われる。

一方、TSLC1 蛋白質の機能の解析により、TSLC1 が免疫グロブリン様接着分子としての性質を示すことを明らかにした。少なくとも大部分の分子はシス・ホモ 2 量体を形成し隣接細胞の TSLC1 とともにトランスに作用していると考えられる。E-カドヘリンのように、その発現欠如ががんの浸潤、転移に結びつく可能性が示唆された。さらに TSLC1 発現細胞では腫瘍形成や転移形成が強く抑制されることから、TSLC1 は細胞接着を介した増殖抑制機能をもつのではないかと推定される。そこで TSLC1 を介した細胞内伝達経路が重要となるが、本年度の研究により、TSLC1 が細胞の裏打ち蛋白質 DAL-1 と結合して、アクチンに作用することがわかった。DAL-1 が別途単離された肺腺がんの抑制遺伝子候補であることは興味深い。DAL-1 の属する 4.1 群蛋白質スーパーファミリーの分子群には、エズリン・ラディキシン・モエシン・マーリンなどが含まれ、いずれもアクチン結合性を示す。特にマーリンは遺伝性腫瘍である多発性神経線維腫症 II 型の原因遺伝子の産物である。また TSLC1, DAL-1 がアクチンと共に細胞膜のせり上がり (membrane ruffling) 部位に集積する事実を見出したことから、細胞の運動性への関与も示唆され、今後、がんの浸潤・転移との関係を検討する必要がある。TSLC1 の分子機能を個体レベルで知るためには、遺伝子欠失マウス作製が鍵となる。この目的でマウス *Tslc1* 遺伝子を単離し、遺伝子欠失マウスも作成中である。

不死化腸上皮由来細胞における安定化 β -カテニン発現誘導による β -カテニン下流遺伝子を網羅的に単離したが、この系で β -カテニンの直接の転写標的遺伝子として同定された遺伝子の中には、Minマウスの腫瘍組織で発現変化のみられない分子や、Wntシグナルを負に制御すると推測される

分子が含まれていた。そこで、大腸発がん
に真に機能的な寄与をなす遺伝子を見極め
るために、Minマウスの腫瘍組織で遺伝子
発現変化が確認できる10数分子から、さ
らに絞り込みが必要と考えられた。候補遺
伝子を不死化腸上皮由来細胞に導入して機
能を解明し、大腸発がん予防の標的となる
分子を選択する計画である。

ディスアドヘリンは、すでにカドヘリン
の機能を抑制する新規糖蛋白として研究し
てきた分子であり、過剰発現によりがん細
胞の接着を抑制すると考えられている。ま
た、乳がん症例ではディスアドヘリンと予
後との相関が認められ、肝がん細胞株に対
する遺伝子導入により、血行性転移に関わ
っていることが示されてきた。今回ディス
アドヘリンの膵がんでの発現が病理学的評
価で浸潤や転移に有意に相関していたこと
から、膵がん細胞におけるディスアドヘリ
ンの機能や役割について検討した。そして、
膵がん細胞株でも直接転移性に関わってい
ることが示されたが、その機序として、細
胞運動性の亢進を介していることが示唆さ
れた。細胞運動性の亢進のメカニズムは明
らかでないが、カドヘリンの修飾を介して
いる可能性、アクチンとの相互作用による
可能性などにつき、今後解析を継続するこ
とが必要と考えられた。

種々のヒト細胞の不死化を試みることで
ヒト細胞の不死化機構とがん化との関連が
明らかになってきた。TERTの導入のみで
効率よく不死化できたのは皮膚の線維芽細
胞のみであった。皮膚以外の臓器由来の線
維芽細胞を含む他の細胞種はTERTによる
テロメラーゼの活性化のみでは不死化でき
ない。これらの細胞では全て継代と共に
CDKインヒビターであるp16の発現上昇が
見られた。一部の細胞種ではp21の発現上
昇も見られた。これらの細胞ではCDKイ
ンヒビターの発現上昇が初代培養細胞の寿
命を決定していることが示唆される。継代
に伴うCDKインヒビターの発現上昇は細
胞老化の内因性プログラムではなく、培養
条件が至適でないことによるストレスある
いは“culture shock”がその原因である

とする考え方が有力である。がん細胞も浸
潤・転移などにより本来あるべき組織構築
上の位置から異なる場所で増殖しており、
この環境の変化も一種のストレスととらえ
られる。E7によるpRb/p16経路の不活化
とTERTの導入によるテロメラーゼの活性
化だけでは不死化できない細胞種も多く見
つかった。これらの多くは細胞は増殖する
ものの細胞死が多く見られ、培養の維持が
困難であることが経験された。これらの細
胞はp53を不活化するE6の追加導入により
不死化することができた。これは、pRb経
路の不活化がp14ARFを介してp53経路を
活性化しアポトーシスを引き起こした可能
性に合致し、in vivoにおける発がん過程
を反映していると考えられる。

3. 発がんのエピジェネティック機構

前がん状態ならびに肝細胞がんにおいて、
傍セントロメアサテライト領域における
DNAメチル化の減弱が高頻度に認められ
たが、同領域におけるDNAメチル化の減
弱は一般にクロマチン不安定性に帰結する
と考えられている。さらにDNAメチルト
ランスフェラーゼのひとつである
DNMT3bはマウス初期胚において同領域
のメチル化に必須であることが知られてい
る。そこで本年度はDNMT3b遺伝子の変
異の有無やスプライスバリエーションの発
現に着目した。DNAメチルトランスフェ
ラーゼ活性を欠くバリエーションであるDN
MT3b4は、傍セントロメアサテライト領
域へのtargetingについて、正常肝組織に
おける主要な活性型バリエーションである
DNMT3b3と競合すると考えられる。DN
MT3b4の発現亢進が傍セントロメアサテ
ライト領域のDNAメチル化の減弱に帰結
し、染色体不安定性の惹起を介して、ヒト
多段階発がん過程に前がん状態から寄与
する可能性が示唆された。本知見は、DNA
メチル化マシナリー中に発がんの予防・
がんの治療のための分子標的の候補を特
定し得るかどうかの考察の端緒を開くと
期待される。

ある特定のがん関連遺伝子などに関し、
これらがどのように修飾されて不活性化ク

ロマチンを構成しているかは重要な問題でありながらこれまでほとんど不明であった。今回の解析で、同じ遺伝子であっても、CpGアイランドのメチル化様式・ヒストンの修飾・メチル化DNAに結合する蛋白質の種類に多様性があることが明らかとなった。この結果は不活性化クロマチンの形成経路は単一ではなく、個々の細胞株で異なる機構で形成されていることを示唆している。またDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤に対する反応性の細胞間での差異の分子機構を解明することにより、DNAメチル化による遺伝子発現抑制機構の理解のてがかりが得られると考えられる。

MBDカラムクロマトグラフィーとSPM法の組み合わせによりヒト肺腺がんではメチル化されている約200個のCpGアイランドを単離したが、この中にはヒト乳がんではCpGアイランドのメチル化により不活性化されることが知られているHOXA5遺伝子なども含まれており、ほかに新規がん抑制遺伝子に由来するCpGアイランドが存在すると期待される。がんにおけるCpGアイランドのメチル化は多くの場合個々の遺伝子単位でおきていたが、HOXA、HOXD遺伝子群領域はメチル化CpGアイランドが数多く存在していた。またこのメチル化はがん部のみならず一部の患者では非がん部肺組織由来のDNAでも見られたことから、これらの部位が体細胞におけるメチル化に感受性が高いことが示唆された。これはこれらの領域のクロマチン構造がメチル化を受けやすい構造をしていること、あるいはDNAメチルトランスフェラーゼが近傍に結合しやすい状況にあることなどを反映したものと考えられる。

MS-RDA法によるゲノム網羅的な解析により、3-OST-2遺伝子及びMCT1遺伝子がヒト乳がんでは不活性化されることを見出した。3-OST-2遺伝子産物は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸化修飾に関与し、その基質特異性に影響する。3-OST-2遺伝子の不活性化により、周囲の増殖因子への応答性などが、乳がん細胞で変化している可能性も考えられる。増殖速度と足場依存

性に関しては、乳がん細胞株の性質に変化を認めなかったが、現在、ヌードマウスでの造腫瘍性に変化がないか否かを検討している。MCT1遺伝子は、ブチレートを含む monocarboxylateの細胞内輸送に関与する。ブチレートは細胞の分化誘導作用を持つことが知られ、その細胞内への輸送が阻害されることで、分化が抑制される可能性もある。MCT1が不活性化された乳がん細胞株とされていない乳がん細胞株とで、ブチレートへの反応性の違いを検討している。血漿DNAのメチル化異常を用いた診断は、乳がん以外の腫瘍の診断にも応用できる可能性がある。MS-RDA法によりメチル化異常を検索しその異常を血漿DNAで検出するというアプローチは、膵がん・卵巣がんなどの従来の画像診断などで診断が困難ながんへも応用が可能であると期待される。一般に、加齢や前がん状態でもDNAメチル化異常が認められることが知られている。3-OST-2遺伝子のメチル化も、がんのみではなく、前がん状態でも認められる可能性がある。非担がん患者のDNAメチル化陽性例で発がんリスクが実際に亢進しているかどうかを明らかにすることが、今後重要な課題であると思われた。

hMLH1遺伝子の発現が消失しているマイクロサテライト不安定性陽性腫瘍では、プロモーター領域中に存在する約1kbのCpGアイランドに存在するCpG配列のほとんどすべてがメチル化されていることが明らかとなった。広汎なメチル化は高齢女性の右側結腸がんが多いという特徴を示し、その発症にはなんらかのホルモン環境の影響などが関与している可能性が考えられる。広汎なメチル化を示す症例ではhMLH1遺伝子のプロモーター部位のLOHは認められず、両アリルに生じた広汎なメチル化によって不活性化が生じているものと考えられた。部分的なメチル化はマイクロサテライト不安定性陽性大腸がんの正常大腸粘膜あるいはマイクロサテライト不安定性陰性大腸がんでも高頻度に認められ、hMLH1遺伝子のメチル化の早期に生じる変化と考えられる。しかし、これだけではhMLH1遺

伝子の不活化を生じることはなく、病的な意義は認められない。一方、正常大腸粘膜のみならず末梢血リンパ球・胃・子宮内膜・骨髄などで全身的に広汎なメチル化を生じている症例の存在が明らかになった。いずれも明らかな家族歴を認めず、40才以下の若年で発症する大腸がんであり、全例がマイクロサテライト不安定性陽性であった。この疾患の本態は全身的に生じたhMLH1遺伝子のプロモーター領域の片アリルに限局したメチル化であり、その遺伝形式は通常のメンデル遺伝とは考えられず、インプリンティングの可能性も疑われるが、その機序は現在のところ不明である。しかし、個体のがんに対する易罹患性を高め、若年発症の散发性マイクロサテライト不安定性陽性腫瘍の一因となっているものと考えられる。

4. がん関連遺伝子を標的としたがん制御を目指した研究

cDNAアレイとがん組織アレイによる遺伝子発現解析は、特に食道がんのリンパ節転移診断・胃GISTの悪性度診断・大腸がんの進展・肝転移機構の解明に有用である可能性が示唆された。発現の変化が明らかとなった遺伝子については、分子標的治療への応用が期待される。COX-2遺伝子の過剰メチル化を伴う一群の胃がんは、他の胃がんとは異なる機構により発がん・進展し、COX-2阻害剤が化学予防剤として期待できない可能性がある。今後、この一群の胃がんの詳細な検討が、COX-2遺伝子の発現を要しない新たな胃がんの発がん・進展機構の解明につながるものと期待される。膵管内乳頭腫瘍の進展において、p16の不活化は早期の変化であり、p53の変異は後期の変化であると考えられた。一方、SMAD4の不活化は、早期の変化であるとともに、非浸潤性がんと浸潤性がんではSMAD4発現陰性率の有意な差を認めたことから、がんの浸潤性増殖にも関わっていることが示唆される。これらの遺伝子変化の蓄積とともに膵管内乳頭腫瘍の多段階発生過程が進行すると理解される。

5. 難治がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構の解明

LI-カドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーに属し、構造的にユニークなカドヘリンである。E・P・N-カドヘリンのようないわゆる古典的カドヘリンでは細胞外ドメインに5つのカドヘリンリピートを有するのに対し、LI-カドヘリンは7つ有する。また、細胞内ドメインが約20アミノ酸と古典的カドヘリン（約150~160アミノ酸）に比し極端に短い。機能に関しては、他のカドヘリン同様、細胞間接着能を有することが報告されているが、LI-カドヘリンの細胞内ドメインには、 β -カテニン結合ドメインが存在せず、これまで結合しうる分子は報告されていない。そこで、LI-カドヘリンの機能を解明する意味で結合しうる分子の同定を試み、ガレクチン-3が同定された。ガレクチン-3は、膵がん組織においてLI-カドヘリンと類似の発現パターンを示すことを既に報告しており、その意味からも両分子の相互作用が、実際の膵がん組織において何らかの役割を有している可能性が示唆される。さらに、両者の結合は、レクチンドメインを介していることが示されたが、この相互作用の意義についてさらに検討が必要である。網羅的遺伝子発現解析は、新しい診断マーカー・疾患関連遺伝子・疾患カテゴリーの同定に有用な方法であり、多くのがんを対象に解析が進んでいる。しかし膵がんでは、組織検体が入手困難で間質の混入が多いことなどにより、これまでの報告は少ない。この問題を克服するためにここでは、腫瘍組織を直接免疫不全マウスの膵臓に移植し、臨床像を模倣する膵がん移植株を樹立して解析をおこなった。現在解析は進行中であるが、膵がんを高発現する遺伝子、膵がんのリンパ節転移に関わる遺伝子の候補が得られつつある。その中には既に膵がんにおける発現の変化が報告されている遺伝子も含まれている。今後、新規遺伝子を含めてさらに解析を継続して行う。

E. 結論

本研究は、ヒトがんの悪性進展の過程を正確に把握し、個々の症例に最適な診断・治療法を選択できるようにすることを目的としている。食道扁平上皮がんの共通欠失領域 11q13 から、がん抑制遺伝子候補を見いだし、がんにおける突然変異を同定するとともにその機能を解明した。昨年度までに腫瘍原性の抑制活性を指標として同定した 11q23.2 領域上の新規がん抑制遺伝子 TSLC1 が、諸臓器のがんにおいてプロモーター領域のメチル化を含む 2 ヒットにより不活化されることを示し、その機能解析をすすめた。大腸発がん早期に機能的に寄与する遺伝子を明らかにするために、 β カテニン-Tcf/Lef 標的遺伝子を網羅的に同定した。昨年度までに同定したカドヘリン機能を不活化させる新規分子ディスアドヘリンの発現と、諸臓器のがんの臨床病理学的な因子との有意な相関を示すとともに、ディスアドヘリンががん細胞の運動能・転移能を亢進させる可能性を示した。ヒト正常細胞の多段階発がんの過程を *ex vivo* で再現し、がん関連遺伝子の機能解析をすすめるため、種々の正常ヒト細胞を *ex vivo* で不死化するとともに、その不死化機構を解析した。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT3b の不活性型バリエーション DNMT3b4 の発現が前がん状態から亢進し、傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化減弱を介して染色体不安定性に帰結する可能性を示した。MS-RDA 法によりゲノム包括的・網羅的な DNA メチル化を解析した。3-OST-2 遺伝子の血漿中 DNA におけるメチル化の状態を解析することにより、早期乳がん症例を高頻度に検出しうることを示した。全身性の hMLH1 遺伝子の広汎なメチル化が、家族歴のない MSI 陽性の 40 才以下の大腸がんの発症原因となり、異時性の多重多発がんのリスクを高める可能性を見出した。cDNA アレイシステムを用いて消化器がん組織における遺伝子発現プロファイルを作製し、がんの転移性などと相関して発現が変化する遺伝子群を特定した。LI-カドヘリンの発現が隣が

んの独立した予後因子であることを示し、ガレクチン-3 が LI-カドヘリンと相互作用する可能性を示した。今後さらに、がんの病理像と遺伝子・分子・細胞レベルの変化との対応を明らかにし、新しいがん治療の標的になるような多段階発がんの分子機構の解明を重点的に推進する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ino, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 365-370, 2002.
- 2) Niki, T., Hirohashi, S., et al., Frequent co-localization of cox-2 and laminin-5 γ 2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.*, 160: 1129-1141, 2002.
- 3) Katoh, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Correlation between laminin-5 γ 2 chain expression and epidermal growth factor receptor expression and its clinicopathological significance in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncology*, 62: 318-326, 2002.
- 4) Nam, J-S, Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.*, 8: 2430-2436, 2002.
- 5) Saito, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA, 99: 10060–10065, 2002.
- 6) Sekine, S., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Target disruption of the mutant β -catenin gene in colon cancer cell line HCT116: preservation of its malignant phenotype. *Oncogene*, 21: 5906–5911, 2002.
 - 7) Nam, J-S, Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Ras farnesylation inhibitor FTI-277 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1020–1028, 2002.
 - 8) Aoki, S., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Prognostic significance of laminin-5 γ 2 chain expression in colorectal carcinoma: Immunohistochemical analysis of 103 cases. *Dis. Colon Rectum*, 45: 1520–1527, 2002.
 - 9) Sekine, S., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor β -catenin gene mutations. *Am. J. Pathol.*, 161: 1997–2001, 2002.
 - 10) Aoki, S., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 88: 726–732, 2003.
 - 11) Yamada, T., Hirohashi, S., et al., Suppression of intestinal polyposis in *Mdr1*-deficient *Apc*^{min/+} mice. *Cancer Res.*, 63: 895–901, 2003.
 - 12) Sekine, S., Hirohashi, S., et al., β -catenin mutations in pulmonary blastomas: association with morule formation. *J. Pathol.*, in press.
 - 13) Miyamoto, K., Ushijima, T., et al., Methylation-associated silencing of *heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2)* in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene*, 22: 274–280, 2003.
 - 14) Asada, K., Ushijima, T., et al., Reduced expression of *GNA11* and silencing of *MCT1* in human breast cancers. *Oncology*, in press.
 - 15) Ushijima, T., et al., Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.*, in press.
 - 16) Shiraishi, M., et al., *HOX* gene clusters are hotspots of *de novo* methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas. *Oncogene*, 21: 3659–3662, 2002.
 - 17) Shiraishi, M., et al., A comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes. *Oncogene*, 21: 3804–3813, 2002.
 - 18) Shiraishi, M., et al., An overview of the analysis of DNA methylation in mammalian genomes. *Biol. Chem.*, 383: 893–906, 2002.
 - 19) Shiraishi, M., et al., Variable estimation of genomic DNA methylation: a comparison of methyl-CpG binding domain column chromatography and bisulfite genomic sequencing. *Anal. Biochem.*, 308: 182–185, 2002.
 - 20) Koizume, S., Hirohashi, S., Shiraishi, M., et al., Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human *CDH1* gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res.*, 30: 4770–4780, 2002.
 - 21) Koizume, S., Shiraishi, M., et al., Treatment with histone deacetylase inhibitors results in altered recruitment of methyl-CpG binding proteins to a methylated CpG island in cancer cells.

Biol. Chem., in press.

- 22) Sawada, M., Kiyono, T., et al., Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp. Cell Res.*, 273: 157-168, 2002.
- 23) Fujita, M., Kiyono, T., et al., Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 10354-10361, 2002.
- 24) Okamoto, T., Kiyono, T., et al., Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295: 354-61, 2002.
- 25) Handa, K., Kiyono, T., et al., Cementum matrix formation in vitro by cultured dental follicle cells. *Bone*, 31: 606-11, 2002.
- 26) Kudoh, A., Kiyono, T., et al., Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication. *J. Virol.*, 77: 851-861, 2003.
- 27) Fujita, M., Kiyono, T., et al., Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant β -actin. *Oncogene*, 22: 627-631, 2003.
- 28) Imabayashi, H., Kiyono, T., et al., Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp. Cell Res.*, in press.
- 29) Nagata, K.I., Kiyono, T., et al., Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.*, in press.
- 30) Murakami, Y. Functional cloning of a tumor suppressor gene, *TSLC1*, in human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 21: 6936-6948, 2002.
- 31) Yageta, M., Murakami, Y., et al., Direct association of *TSLC1* and *DAL-1*, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res.*, 62: 5129-5133, 2002.
- 32) Honda, T., Murakami, Y., et al., Hyper-methylation of the *TSLC1* gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 857-860, 2002.
- 33) Masuda, M., Murakami, Y., et al., The tumor suppressor protein *TSLC1* is involved in cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, 277: 31014-31019, 2002.
- 34) Fukami, T., Murakami, Y., et al., Identification of the *Tslc1* gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor *TSLC1* gene. *Gene*, 295: 7-12, 2002.
- 35) Fukuhara, H., Murakami, Y., et al., Promoter methylation of the *TSLC1* and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 605-609, 2002.
- 36) Kondo, K., Hosoda, F., et al., A pediatric case of secondary leukemia associated with t(16;21)(q24;q22) exhibiting the chimeric *AML1-MTG16* gene. *Leukem. Lymph.*, 43: 415-420, 2002.
- 37) Maekawa, M., Sugano K., et al., Electrophoretic variant of a lactate dehydrogenase isoenzyme and selective promoter methylation of the *LDHA* gene in human retinoblastoma cell line. *Clin. Chem.*, 48: 1938-1945, 2002.
- 38) Miyakura, Y., Sugano, K., et al., Methylation profile of the *MLH1*

promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Gene Chromosome Cancer*, 36: 17-25, 2003.

39) Kikuchi, T., Imai, K., et al., Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene*, 21: 2741-2749, 2002.

40) Yamamoto, H., Imai, K., et al., Differential involvement of the hypermethylator phenotype in hereditary and sporadic colorectal cancers with high-frequency microsatellite instability. *Gene Chromosome Cancer*, 33: 322-325, 2002.

41) Kikuchi, T., Imai, K., et al., Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *Int. J. Cancer*, 97: 272-277, 2002.

42) Takahashi, H., Imai, K., et al., Mucin phenotype and microsatellite instability in multiple early gastric cancers. *Int. J. Cancer*, 100: 419-424, 2002.

43) Sasaki, Y., Imai, K., et al., Increased expression of T-fimbrin gene after DNA damage in CHO cells and inactivation of T-fimbrin by CpG methylation in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 97: 211-216, 2002.

44) Satoh, A., Imai, K., et al., DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. *Br. J. Cancer*, 86: 1817-1823, 2002.

45) Yamamoto, H., Imai, K., et al., Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Adv. Cancer Res.*, in press.

46) Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Overexpression

of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with β -catenin mutations. *Hepatology*, 37: 528-533, 2003.

47) Shimamura, T., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Dysadherin overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma reflects tumor aggressiveness: relationship to E-cadherin expression. *J. Clin. Oncol.*, 21: 659-667, 2003.

48) Yamazaki, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*, 22(6): 847-852, 2003.

49) Chuma, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 37: 198-207, 2003.

50) Okusaka, T., Sakamoto, M., et al., Satellite lesions in patients with small hepatocellular carcinoma with reference to clinicopathologic features. *Cancer*, 95: 1931-1937, 2002.

51) Shimamura, T., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.*, 8: 2570-2575, 2002.

52) Nakanishi, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer. *Cancer Res.*, 62: 2971-2975, 2002.

53) Yachida, S., Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Implications of peritoneal washing cytology in patients

with potentially resectable pancreatic cancer. Br. J. Surg., 89: 573-578, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：新規タンパク質、それをコードする遺伝子及び新規モノクローナル抗体

発明者：石川義典、後藤政広、坂元亨宇、広橋説雄

出願日：平成13年12月12日
特願 2001-378395

出願人：国立がんセンター

2) 発明の名称：がん細胞において過剰発現するタンパク質及びそれをコードする遺伝子

発明者：山本義也、坂元亨宇、広橋説雄

出願日：平成14年1月17日

特願 2002-008212

出願人：国立がんセンター

3) 3-OST-2遺伝子のヒト乳がんにおける診断的応用

(住友化学工業との共同研究に基づく共願)

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

発がん・浸潤・転移への細胞接着系異常の関与

分担研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨： 不死化腸上皮細胞に安定化した β -カテニン発現を誘導した系を用い、 β -カテニン-Tcf/Lef 転写複合体の新しい標的遺伝子を網羅的に同定した。大腸発がん・早期から機能的に寄与する遺伝子の把握の飛躍的な進展が期待される。昨年度までに同定したカドヘリン機能を不活化する新規分子ディスアドヘリンの発現亢進が、大腸がん・甲状腺がん・舌がんにおいてがんの浸潤能・転移能を反映する臨床病理学的因子と有意に相関し、予後不良因子となることを示した。がんにおいてDNAメチル化の変化をもたらすDNAメチルトランスフェラーゼの異常に着目した。前がん状態から発現亢進するDNAメチルトランスフェラーゼDNMT3bの不活性型バリエントDNMT3b4が、傍セントロメアサテライト領域において活性型バリエントと競合し、同領域のDNAメチル化が減弱して染色体不安定性に帰結する可能性を示した。

A. 研究目的

本研究はヒトがんの発生・増悪の過程を正確に把握して個々の症例に最適な診断・治療法を選択できるようにするとともに、新たな診断・制御法開発のための基盤として、多段階発がんのメカニズムの理解を遺伝子・分子・細胞レベルで総合的に推進することを目的とする。

現在までに、少なくとも一部のがんにおいては、異形成・腺腫から上皮内がんそして浸潤・転移能を有する進行がんへと多段階的に発生・増悪する過程が明らかになり、その過程で、いわゆる古典的ながん抑制遺伝子の不活化、がん遺伝子の活性化以外に、カドヘリン細胞接着系をはじめとする様々な機能分子の異常が生じていることが明らかになってきた。

昨年度までに、細胞接着分子の不活化機構ならびに細胞接着分子とがん遺伝子・がん抑制遺伝子産物との相互作用の解明が進み、既にその下流で働くと考えられる新たな発がん・転移関連遺伝子の候補が得られつつある。具体的には、カドヘリン-カテニン細胞接着系の不活化機構として、遺伝子突然変異、遺伝子発現調節領域のDNA

メチル化による発現低下、さらに増殖因子からのシグナルによる β カテニンのチロシンリン酸化に加えて、がん細胞に高発現し細胞膜からカドヘリン分子を排除する働きをする新しい細胞膜糖蛋白ディスアドヘリンを発見した。同分子が過剰発現することによりがんの転移性が亢進するのみならず、その高発現は、発がん早期の高度異形成の段階でも認められ、その重要性は極めて高いと考えられる。よって、多くのがんにおけるディスアドヘリン発現の実際の臨床的意義を明らかにすることが急務である。一方、増殖因子受容体やがん抑制遺伝子産物APC蛋白とも相互作用する β カテニンは、Tcf/Lef 転写因子複合体の活性化を起こし、増殖や細胞死に関わる遺伝子群の発現を誘導すると考えられる。この転写複合体の下流で働く標的遺伝子の同定と、それらの発がん・転移への関与を明らかにすることがのぞまれている。

本年度は、これまでに着目した上記のような多段階発がん過程に寄与をなす事象を、がんの病理像と対応させて把握することにより、がんの予防・診断・治療に結びつく知見を得ることを目指す。