

B. 研究方法

1. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

テトラサイクリン調節性プロモータ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 89を発現誘導できる IEC6 Tet-OFF 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ィール解析を Affymetrix 社製の GeneChip™ 法により行い、 β -カテニンの下流で発現の変化する遺伝子を同定した。さらに ABI Prism7000 にてリアルタイム PCR を行い、同定した遺伝子の発現を IEC6 Tet-OFF β -カテニン Δ N89 およびコントロールの細胞でテトラサイクリン誘導前後で確認した。

2. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

昨年度までに同定した、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認識する特異抗体を用い、大腸がん・甲状腺がん・舌がんの臨床症例において免疫組織化学的検討を行った。In vivo の組織標本上でディスアドヘリンとカドヘリンの発現の相関を検討するとともに、ディスアドヘリン発現レベルとがんの分化度・転移の有無・予後などの臨床病理学的因子との相関を検討した。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

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ならびに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ならびに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、同様の組織検体を、リアルタイム

検出システムによるスプライスバリエーション特異的定量 RT-PCR 法に供した。

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、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。

(倫理面への配慮)

手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残った組織を研究に用いることにより患者への不利益はないように行った。組織サンプルの由来する患者の臨床的情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめカルテより調査しておき、研究の過程ではサンプルは無記名で番号でだけで扱い、患者の個人を特定していない。本研究の結果を組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することは行わないことにより、患者のプライバシーは厳守されている。さらに手術にて摘出した標本を、診断のために検索した後に、残りの試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくことに関しては、患者に説明の上、文書で同意を得て実施している。

C. 研究結果

1. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

不死化腸上皮細胞 IEC6 細胞への β -カテニン Δ N89 の誘導で発現の亢進する遺伝子として、2 つの未知遺伝子を含む 8 遺伝子、発現の低下する遺伝子として 5 遺伝子を、GeneChip 法をもちいた網羅的な遺伝子発現解析にて同定した。さらに遺伝子発現の変化を IEC 細胞から抽出した RNA を用い、RT-PCR にて確認した。これらの中には Axil の様に既に β -カテニン-Tcf/Lef の標的遺伝子と知られている分子や、secreted-frizzled related protein

(SFRP)-4 の様に、標的遺伝子ではないが Wnt シグナル伝達に関与する事が知られている分子が含まれていたが、それ以外の 11 遺伝子は β -カテニンの細胞内蓄積による大腸発がんとの関連を指摘されていないものであった。さらに遺伝子および蛋白質の発現変化が Min マウスの腫瘍組織で RT-PCR にて確認でき、家族性大腸腺腫症患者の大腸腫瘍組織の免疫染色にて確認できる 6 遺伝子が、 β -カテニンの細胞内蓄積による大腸発がんの実行候補分子として選択された。これらの内、insulin-like growth factor-2 (IGFBP-2) はプロモーター領域に 2 カ所の Tcf/Lef 転写因子結合部位が同定され、 β -カテニンの直接の標的遺伝子であると考えられた。

2. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

正常大腸粘膜上皮の細胞膜にディスアドヘリン発現を認めなかったが、検討の対象とした第 II 期ならびに第 III 期の大腸がんの 51% において、組織切片上の 50% 以上のがん細胞の細胞膜に抗ディスアドヘリン抗体による染色性がみられた。ディスアドヘリン発現亢進は、肺転移の有無と有意に相関し、ディスアドヘリン陽性腫瘍を伴う患者の予後は有意に不良であった。特に、ディスアドヘリン発現亢進と E-カドヘリン発現低下をともに伴う症例において、予後はもっとも不良であった。甲状腺がんにおける免疫組織化学的検討では、ディスアドヘリン発現は乳頭がん・濾胞がんに比し未分化がんにおいて有意に亢進しており、同一がん細胞におけるディスアドヘリン発現レベルは E-カドヘリン発現レベルと逆相関する傾向にあった。ディスアドヘリン発現亢進は腫瘍の大きさ・乳頭がんから未分化がんへの悪性進展・リンパ節転移あるいは肺転移の有無と有意に相関し、予後不良因子となった。舌扁平上皮がんにおいては、ディスアドヘリン発現レベルと E-カドヘリン発現レベルのあいだに有意な逆相関があり、ディスアドヘリン発現亢進は浸

潤性増殖ならびに TNM 分類と有意に相関し予後不良因子となることがわかった。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

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 を欠くスプライスバリエントである 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スバリエント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。DNMT3b4 を強制発現したところ、親株 293 細胞・対照株ならびに DNMT3b4 の発現が著しく低レベルであった株においては、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。

D. 考察

1. 発がん・転移に関わる遺伝子変異ならびに遺伝子発現変化

腸上皮細胞 IEC6 で β -カテニンの蓄積によって発現の誘導された axil と発現の低下した SFRP-4 はともに Wnt シグナル伝達を負に制御する事が知られている。 β -カテニンの細胞内蓄積にて Wnt シグナルが様々なレベルで増幅あるいはフィードバックを受けているものと考えられる。今回 β -カテニンの直接の標的遺伝子として同定された IGFBP2 は大腸発がんの早期から発現の亢進が見られ、発がん予防の標的あるいは早期診断のマーカーとして有用で

ある可能性がある。Min マウスの腫瘍組織で発現変化が確認できた6遺伝子からさらに絞り込みが必要であり、今後レトロウイルスベクターを用い、個々の遺伝子をIEC6細胞に発現させ機能解析を行う計画である。

2. 発がん・転移に関わる細胞接着制御分子

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、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、ヒトの諸臓器のがんの臨床症例において、ディスアドヘリンの発現が実際にがんの浸潤能や転移能を反映するような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が確かめられた。ディスアドヘリン発現レベルが、がんの悪性度の生物学的な指標となると考えられた。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

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 DNMT3b4 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。DNMT3b4 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

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。

E. 結論

本研究は、発がん初期過程における細胞極性の喪失や浸潤過程での原発巣からの離脱に深く関与すると考えられる細胞接着系の異常が、多段階発がん過程における、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と如何に連携してがん化・悪性化に関与しているか解明し、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ことを目指している。本年度は、 β -カテニン-Tcf/Lef 転写複合体の標的遺伝子の網羅的探索、新規転移関連遺伝子ディスアドヘリンの臨床病理学的意義の解明、ヒトのがんにおいて 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の解析を行った。今後さらに、遺伝子・分子・細胞レベルでの変化とがんの発生初期から浸潤・転移性増殖を示すに至る臨床・病理像との対応を直接明らかにするとともに、新しいがん治療の標的になるようながんの発生・増悪の分子機構の解明を重点的に行う予定である。

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

①発明者：石川義典、後藤政広、坂元亨宇、広橋説雄

②出願日：平成13年12月12日
特願2001-378395

③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

①発明者：山本義也、坂元亨宇、広橋説雄

②出願日：平成14年1月17日
特願2002-008212

③出願人：国立がんセンター

MS-RDA 法によるエピジェネティックな発がん機構の解析

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部長

ゲノム包括的・網羅的な DNA メチル化の解析法である methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法により、*heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2)*及び *Monocarboxylate transporter 1 (MCT1)*遺伝子がヒト乳がんで、メチル化異常によりサイレンシングされることを見いだした。3-OST-2 及び MCT1 遺伝子がメチル化された乳がん細胞株を脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine で処理すると、5'領域の脱メチル化とそれに伴う発現回復を認めた。乳がん手術材料では、3-OST-2 遺伝子は 75/85 (88%)で、MCT1 遺伝子は 4/20 (20%)で、5'領域が過剰にメチル化されていた。過剰メチル化が認められたがんでは、それぞれの遺伝子発現に低下傾向が認められた。更に、3-OST-2 遺伝子の過剰メチル化を、早期乳がん症例の血漿中 DNA で検討したところ、43 例中 11 例で検出された。

A. 研究目的

DNA のメチル化状態は、DNA メチル基転移酵素の働きにより、DNA 複製後も保存される。また、プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化は、ヒストン脱アセチル化などと協調し、クロマチン構造の変化を通じて、遺伝子転写を抑制する。近年、*p16*, *RB*, *VHL*, *BRCA1* などの重要ながん抑制遺伝子が、プロモーター領域の CpG アイランドの過剰メチル化により、サイレンシングを受けることが知られるようになってきている。そこで、分担研究者らは、1997 年、未知の遺伝子も含め、ゲノム内の DNA メチル化の変化を網羅的に検索する methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法を開発した。

乳がんは、増加傾向にあり、日本人女性の重要ながん死の原因である。その分子機構として、*p53* 遺伝子の突然変異による不活化、*p16* 遺伝子の過剰メチル化によるサイレンシングが、それぞれ、20-30% 程度認められる。しかし、多くの乳がんでは、その原因となる遺伝子・エピジェネティック異常は不明である。そこで、本研究では、MS-RDA 法を活用し、ヒト乳がんでサイレンシングされる遺伝子を同定することを目的とする。

メチル化を指標に、発がんに関与する遺伝子をクローニングする手法は、生理的な発現量が少ない遺伝子でも、その発現の変化の制御にメチル化が関与していれば容易に同定できる点で、cDNA に基づく各種のゲノム網羅的方法よりも優れている。また、メチル化により発現が制御される遺伝子は、細胞の分化と密接に関連しているものが多く、メチル化を

指標にすることで、サイレンシングを受けたがん抑制遺伝子、もしくは、その発現低下が発がん重要な役割を果たす遺伝子を同定できると期待される。

B. 研究方法

(1) 材料

手術材料は、インフォームドコンセントを得た後、病理学的検索後の腫瘍及び正常部分を採取した。血液検体は、ステージ I 及び II の早期乳がん症例から 10 ml 末梢血を採取した。健康人ボランティアからも、同様に 10 ml 末梢血を採取した。乳がん細胞株は ATCC から購入、又は、JCRB から分与を受けた。正常乳腺上皮細胞 HMEC は、Clonetics 社から購入した。

DNA は Phenol/chloroform 法により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化し、アダプターを接着後、PCR を行うことで、“*HpaII* amplicon”を作成した。テスター DNA 由来の amplicon と、ドライバー由来の amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。

2 サイクル目の PCR 産物全体をプラスミドにクローニングし、各クローンの独立性を検討した。独立な各クローンについて、amplicon の dot blot hybridization により、テスターとドライバーとの違いを検出するか否かをスクリーニングした後、*HpaII* 消化したゲノム DNA の Southern blot 解析によ

り確認した。

(3) 塩基配列の決定とデータベースの解析

塩基配列は、サイクルシーケンス法により、決定した。GenBank の検索は、ヒトゲノムドラフト配列を対象に行った。CpG アイランドは、Gardiner-Garden 及び Takai の基準により判定した。

(4) RT-PCR 法

Superscript を用いて逆転写を行った。その後、最小限のサイクルを用いた PCR による半定量的解析、または、iCycler を用いた定量的 Real-Time PCR を行った。被験遺伝子についてはイントロンを挟むプライマーを設計し、*GAPDH* または β -actin を対照に用いた。

(5) Bisulfite シークエンス法

DNA 500 ng を NaOH により変性した後、3.1N, pH 5.0 の bisulfite 液中で、95 度 30 秒、50 度 15 分の反応を 15 サイクル行った。カラムで脱塩後、NaOH により脱スルホン化を行った。

Bisulfite シークエンスには、メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA に共通のプライマーで PCR を行い、PCR 産物をクローン化した。各検体 10 クローンについて塩基配列を決定した。

(6) MSP 法及び定量的 MSP 法

Methylation-specific PCR (MSP) 解析には、メチル化された DNA または非メチル化 DNA に特異的なプライマーで PCR を行った。その際、*SssI* メチル化酵素でメチル化した DNA をメチル化された DNA のコントロール、HMEC の DNA を非メチル化 DNA のコントロールとして用いた。

3-OST-2 遺伝子を用い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。

(7) 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理

3×10^5 個の細胞を 10cm-dish に播種後、1 日目、3 日目に、MDA-MB-486 の場合、 $0.5 \mu\text{M}$ 及び $1 \mu\text{M}$ の 5-aza-dC を、MDA-MB-231 の場合、 $5 \mu\text{M}$ 及び $10 \mu\text{M}$ の 5-aza-dC を添加した。4 日目に細胞を回収、DNA 及び RNA を抽出した。

(8) 倫理面への配慮

手術材料は、インフォームドコンセントを取得し、採取した。血液検体を用いた診断的利用については、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を経て、実施した。

C. 研究結果

(1) *3-OST-2* 及び *MCT1* 遺伝子のメチル化異常

症例 1 の MS-RDA 法により、乳がんで過剰にメチル化された DNA 断片 16 個、及び、メチル化が低下した DNA 断片 18 個を分離した。それぞれ、8 個、及び、5 個が CpG アイランドに近接、7 個の既知遺伝子と 5 個の EST とを認めた。発現を検討したところ、*3-OST-2* 遺伝子の発現が低下していることを見出した。*3-OST-2* 遺伝子のエクソン 2 の CpG アイランドは、乳がんで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、乳がんで過剰メチル化されていた。

症例 2 の MS-RDA 法により、乳がんで過剰にメチル化された DNA 断片 17 個を分離した。それらのうち 7 個が CpG アイランドに近接、2 個が遺伝子 5' 領域の CpG アイランドであった。この 2 個について発現を検討したところ、*MCT1* 遺伝子の発現が低下していることを見出した。

(2) *3-OST-2* 及び *MCT1* 遺伝子のサイレンシング

3-OST-2 遺伝子の 5' 領域は乳がん細胞株 MDA-MB-468 で、*MCT1* 遺伝子の 5' 領域は MDA-MB-231 で、強くメチル化されていた。そこで、これらの細胞株を脱メチル化剤 5-aza-dC により処理した (図 1)。

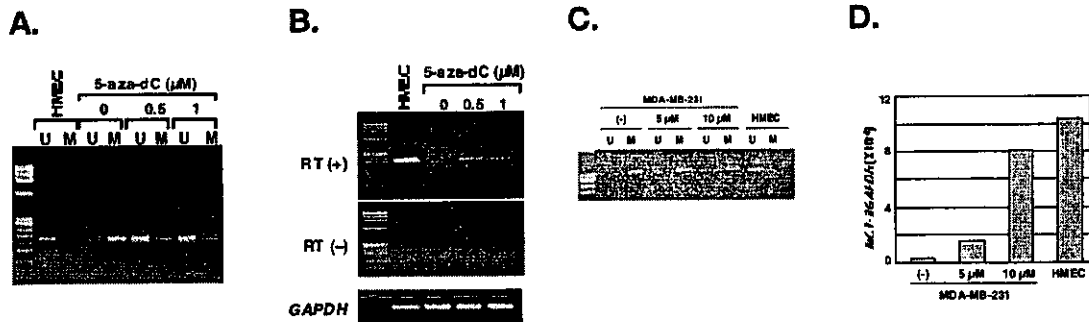


図1 *3-OST-2* 及び *MCT1* 遺伝子のサイレンシング

3-OST-2 遺伝子(A, B)及び *MCT1* 遺伝子(C, D)がメチル化された乳がん細胞株を、5-aza-dC で処理し、脱メチル化(A, C)及び発現回復(B, D)を検討した。

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、サイレンシングされていることが確認された。

(3) 乳がん手術材料でのメチル化の確認

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遺伝子は85例中75例(88%)で、MCT1遺伝子は20例中4例(20%)で、認められた。

(4) 3-OST-2遺伝子メチル化の診断的応用

3-OST-2遺伝子の5'領域のメチル化異常が乳がんを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43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2ml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。

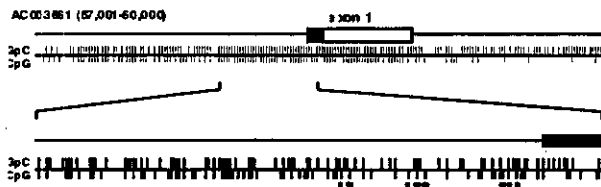


図2 3-OST-2遺伝子5'領域の構造
メチル化されたDNAを特異的に増幅するためのMSPプライマーの認識部位を●で、TaqManプローブの認識部位を○で、示す。

当初、MSPプライマーのみで定量化を行ったが、健康者でも偽陽性が認められた。そこで、○部にTaqManプローブを設置し、MSPプライマーの部位2箇所とあわせて、合計3箇所がメチル化されたDNAのみを定量した。その結果、乳がん症例43例

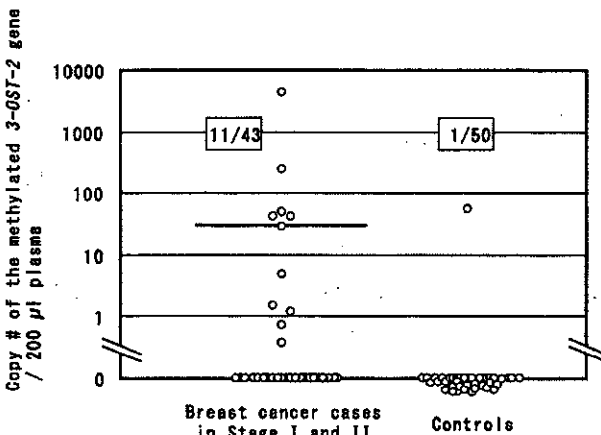


図3 3-OST-2遺伝子5'領域メチル化の診断応用
ステージI及びIIの乳がん症例のうち、43例中11例では血漿中のDNAにメチル化異常が認められた。健康者ボランティアでは、50例中1例のみが陽性であった。

中11例では血漿中の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。

血漿DNAでの3-OST-2遺伝子5'領域のメチル化異常と、病期、組織型、進達度、大きさ、リンパ節転移の有無等とは、相関しなかった。

(5) 3-OST-2サイレンシングの役割の検討

3-OST-2遺伝子をテトラサイクリン依存性のプロモーターの下流に連結したコンストラクトを、乳がん細胞株MCF7に導入した。導入細胞2クローンでは、3-OST-2遺伝子の発現誘導前に正常乳腺上皮細胞と同程度の発現量、テトラサイクリンによる発現誘導により10-50倍の発現上昇を認めた。

現在まで、増殖速度、足場依存性に関する解析を終えたが、3-OST-2遺伝子発現による影響は認められなかった。

D. 考察

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サイレンシングされることを見出した。乳がん細胞株では、5'領域のCpGアイランドが過剰メチル化、発現が消失しており、脱メチル化剤による処理で、脱メチル化と発現回復が認められた。更に、乳がん手術材料でも、3-OST-2遺伝子では高率に、MCT1遺伝子では20%で、5'領域の過剰メチル化とそれに伴う発現低下を認めた。

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遺伝子のサイレンシングにより、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、butyrateを含むmonocarboxylateの細胞内輸送に関与する。Butyrate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がサイレンシングされた乳がん細胞株とされていない乳がん細胞株とで、butyrate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、他の難治性腫瘍にも応用可能性をもつ。MS-RDA法によりメチル化異常を検索、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、卵巣がんなどの診断困難ながんへも応用可能である。

健康人ボランティアのうちの陽性例については、

臨床医に連絡、同意書に基づき、本人に通知した。本人の希望により乳がんを含む腫瘍を精査したが、negativeであった。一般に、加齢や前がん状態でもメチル化異常が認められることが知られる。3-OST-2 遺伝子のメチル化も、がんのみではなく、がんに predispose した状態でも、認められる可能性がある。その場合、ある程度の偽陽性例がでることは止むを得ず、むしろ、陽性例では発がんリスクが高くないのか否かを明らかにすることが、今後、重要な研究課題であると思われた。

E. 結論

MS-RDA 法により、ヒト乳がんでは 3-OST-2 及び MCT1 遺伝子のサイレンシングを見いだした。3-OST-2 遺伝子のメチル化異常を血漿 DNA で定量することにより、早期乳がんを検出し得た。

F. 健康危険情報 特に該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

- Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Wakazono, K., Tsuda, H., Asahara, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. Presence of promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanisms responsible for reduced BRCA1 immunoreactivity. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 32, 79-84 (2002).
 - Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. 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).
 - Kaneda, A., Takai, D., Okochi, E., Kaminishi, M. and Ushijima, T. Methylation-sensitive-representational difference analysis and its application to cancer research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press.
 - Asada, K., Miyamoto, K., Fukutomi, T., Tsuda, H., Yagi, Y., Wakazono, K., Oishi, S., Fukui, H., Sugimura, T. and Ushijima, T. Reduced expression of *GNA11* and silencing of *MCT1* in human breast cancers. *Oncology*, in press.
 - Ushijima, T., Watanabe, N., Okochi, E., Kaneda, A., Sugimura, T. and Miyamoto, K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* in press.
- (2) 学会発表
- Ushijima, T. A Genome-wide picture of aberrant methylations in human cancers. NIH conference "Epigenetics and human diseases." Bethesda, May, 2002
 - Abe, M., Okochi, E., Yamashita, S., Kuramoto, T., Kaneda, A., Takato, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. Cloning of the 5' upstream region of the rat p16 gene and its role in silencing. 14th International Workshop on Genetic Systems in the Rat, Kyoto, October, 2002.
 - Ushijima, T. High incidence of OST silencing in human breast cancers and its application to cancer diagnosis using plasma DNA. Gordon Research Conference, Ventura, January, 2003.
 - 宮本和明、浅田潔、福富隆志、若園邦子、八木由紀子、牛島俊和 乳癌における *Guanine nucleotide-binding protein, alpha-11 (GNA11)* 遺伝子の発現低下 第10回日本乳癌学会総会 2002年7月
 - 阿部雅修、大河内江里子、山下聡、森村圭一朗、庫本高志、金田篤志、福島昭治、杉村隆、牛島俊和 ラット p16 遺伝子 5'上流域のクローニング及びサイレンシングにおける役割 第17回発癌病理研究会 2002年8月
 - 牛島俊和 ヒト乳がんではサイレンシングされる遺伝子の同定とその診断応用 第61回日本癌学会総会シンポジウム 2002年10月
 - 宮本和明、山下 聡、古田淳一、萩原淳司、宮本晴子、大河内江里子、杉村 隆、牛島俊和 ヒト肺および膵がん細胞株における *Heparan Sulfate d-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase* 遺伝子(3-OST)のサイレンシング 第61回日本癌学会総会ワークショップ 2002年10月
 - 高田恭臣、宮本和明、福富隆志、明石定子、杉村隆、牛島俊和 血漿中のがん由来 DNA を利用した乳がん診断 第61回日本癌学会総会ワークショップ 2002年10月
 - 牛島俊和、金田篤志、宮本和明、宮本晴子 がんでの DNA メチル化異常のゲノム網羅的な解析 第25回分子生物学会年会シンポジウム 2002年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

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

発がんのエピジェネティック機構

分担研究者 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

研究要旨 ヒト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ために、肺がんにおいてメチル化されている CpG アイランドの網羅的単離および培養がん細胞における *CDH1* 遺伝子不活性化クロマチンの構造に関する解析を行った。約 200 個単離された CpG アイランドには既知がん抑制遺伝子が含まれ、今回の解析が新規がん抑制遺伝子単離のための有用な情報を提供することが示された。また *CDH1* 遺伝子不活性化クロマチンの構造は細胞ごとに DNA メチル化、ヒストンの修飾などが異なり、同じ遺伝子であっても不活性化クロマチンの構成因子には多様性が存在することを明らかにした。

A. 研究目的

ヒト肺がんにおいてメチル化されている CpG アイランドの網羅的単離および培養がん細胞における DNA メチル化による遺伝子不活性化機構の解析などにより、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。

B. 研究方法

9 例の男性肺腺がん患者由来の高分子 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我々が開発した 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元の患者由来の DNA でどのようにメチル化されているかを MBP カラムクロマトグラフィーおよび重亜硫酸修飾法で解析した。ま

たがん細胞における DNA メチル化状態の正確な把握を目的として、DNA メチル化解析法としての重亜硫酸修飾法およびメチル化 DNA 結合カラムクロマトグラフィーの比較を行った。

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 MBP カラムクロマトグラフィーおよび重亜硫酸修飾法で、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 メチル基転移酵素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。

（倫理面への配慮）

患者由来の検体は番号化して扱い、個人が特定されないよう配慮している。またヒト由来の培養細胞は樹立者によって匿名化されており、個人を特定できない

ようになっている。

C. 研究結果

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、もとの 9 例の患者由来の DNA でどのようにメチル化されているかを解析した。その結果、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明らかとなった。また多くの肺がんで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。

がんにおける CpG アイランドのメチル化は一般に個々の遺伝子単位で起きていることが明らかとなった。すなわち、あるメチル化 CpG アイランドの近傍に存在する CpG アイランドはメチル化されていないことがほとんどであった。しかしがん細胞でメチル化 CpG アイランドが密度高く存在するゲノム領域が見出された。*HOXA*、*HOXD* 遺伝子群領域は約 300 キロ塩基対の間に十数個の CpG アイランドが存在するが、解析した肺がんのすべてでこれらの CpG アイランドがメチル化されていた。またこれらの CpG アイランドのメチル化は一部の患者ではがん部のみならず非がん部肺組織由来の DNA でも見出された。

がん細胞におけるさまざまな CpG アイランドのメチル化の状態を、メチル化 DNA 結合カラムクロマトグラフィーおよび重亜硫酸修飾法で解析した。その結果、多くのヒト肺がんにおいて高度にメ

チル化されている *ZNF75A* 遺伝子及び *PCDHAC1* 遺伝子の CpG アイランドの重亜硫酸修飾法による解析では、PCR プライマーによっては、非メチル化アレルおよびメチル化アレル由来の DNA 断片が混在している条件下で、非メチル化アレル由来の DNA 断片が選択的に増幅されることを見出した。

膀胱がん細胞株 T24、胃がん細胞株 HSC41、肝がん細胞株 Li21 では *CDH1* 遺伝子の発現が抑制されている。T24 細胞では *CDH1* 遺伝子 CpG アイランド全体の高度なメチル化、メチル化 DNA 結合蛋白質 MeCP2 および MBD2 の結合が見出され、ヒストンは H3、H4 とも低アセチル化状態であった。HSC41 では *CDH1* 遺伝子 CpG アイランド全体の中程度のメチル化が見出され、メチル化 DNA 結合蛋白質 MeCP2 および MBD2 の結合、ヒストン H3、H4 の低アセチル化が見出された。一方 Li21 では、*CDH1* 遺伝子 CpG アイランド 3' 領域の高度なメチル化が見出され、プロモータ部位を含む CpG アイランド 5' 領域はほとんどメチル化されていなかった。メチル化 DNA 結合蛋白質としては MeCP2 および MBD1 の結合が見出された。ヒストンは H3 は低アセチル化状態にあったものの、H4 は高度にアセチル化されていた。またヒストン H3 の 4 番目のリジン残基(H3K4)のメチル化は遺伝子発現と、また 9 番目のリジン残基(H3K9)のメチル化は発現抑制と関連していることが示唆されている。*CDH1* 遺伝子を発現している大腸がん細胞株 SW1116 では H3K4 のみのメチル化、T24 細胞では H3K9 のみのメチル化が見出されたが、HSC41、Li21 細胞では H3K4、H3K9 両方のメチル化が見出された。こ

のように発現抑制細胞間で 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た。

これらの細胞を DNA メチル基転移酵素阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンで処理すると、Li21 細胞では発現回復が見られたが、その他の細胞では発現回復は見られなかった。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A 処理では発現は回復しなかった。

D. 考察

CpG アイランドは多くのヒト遺伝子の 5' 領域に存在するメチル化されていない CpG 配列に富む領域であり、プロモータなどの遺伝子発現制御領域が含まれる。CpG アイランドのメチル化により遺伝子が不活性化されることが知られている。またいくつかの既知がん抑制遺伝子ではがんにおいて CpG アイランドのメチル化がおきていることが報告されている。これらのことから CpG アイランドのメチル化を指標としてがんにおいてメチル化により発現が抑制されている遺伝子を網羅的に単離することにより、新規がん抑制遺伝子単離のための有用な情報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 法の組み合わせは、従来用いられてきた特定の制限酵素の認識部位の存在およびそのメチル化様式に依存せず、網羅的解析に適した方法である。こ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 CpG アイランドの網羅的単離を行った。単離された約 200 個の CpG アイランド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* 遺伝子が含まれていた。このことから今回単離された CpG アイランドの中には新規がん抑制遺伝子に由来するものが存在すると期待される。

がんにおける CpG 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 メチル基転移酵素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。このような知見は、がんに対する感受性のエピジェネティックな面の解析をする上で重要な情報を提供すると考えられる。

重亜硫酸修飾法は DNA メチル化解析に欠かせない方法となっているが、解析に PCR を用いるため特定の塩基配列が偏って増幅される場合があることが示唆されている。今回の解析でも同様の結果が示され、DNA メチル化状態の正確な把握には、原理の異なる複数の方法を併用することが有用であることが示された。

CpG アイランドのメチル化による遺伝子不活性化にはクロマチン構造の変化が重要であると考えられている。クロマチンの構成要素は DNA、ヒストン、およびいくつかの核蛋白質である。ある特定の遺伝子に関し、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。また発現抑制細胞がんで DNA メチル基転移酵素阻害剤に対する反応性が異なっていた。感受性細胞と非感受性細胞間で何が異なるかをさらに解析することにより、DNA メチル化による遺伝子発現抑制機構の解明への手掛かりが得られると考えられる。

F. 結論

1. ヒト肺腺がんにおいてメチル化されている CpG アイランドを約 200 個単離した。この中には既知がん抑制遺伝子である *HOXA5* 遺伝子が含まれており、今回の解析結果は、新規がん抑制遺伝子単離のための有用な情報を提供する。
2. *HOXA*、*HOXD* 遺伝子群が体細胞におけるメチル化に関して感受性が高い部位であることを明らかにした。
3. メチル化 DNA 結合カラムクロマトグラフィーと重亜硫酸修飾法の併用が、がんにおける CpG アイランドメチル化状態の解析に有効であることを示した。
4. 同じ不活性化遺伝子であっても細胞が異なれば、不活性化クロマチンを構成する DNA メチル化様式、ヒストン修飾、メチル化 DNA 結合蛋白質の結合に多様性が存在するこ

とを明らかにした。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A. J., Terry, M. J., and Miyamoto, Y. *HOX* gene clusters are hotspots of *de novo* methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas. *Oncogene*, 21, 3659-3662.

Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Terry, M. J., Oates, A. J., Miyamoto, Y., Chuu, Y. H., Munakata, M., and Sekiya, T. A comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes. *Oncogene*, 21, 3804-3813.

Shiraishi, M., Oates, A. J., and Sekiya, T. An overview of the analysis of DNA methylation in mammalian genomes. *Biol. Chem.*, 383, 893-906.

Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A. J., Terry, M. J., Miyamoto, Y., Tanaka, K., and Sekiya, T. (2002) Variable estimation of genomic DNA methylation: a comparison of methyl-CpG binding domain column chromatography and bisulfite genomic sequencing. *Anal. Biochem.*, 308, 182-185.

Koizume, S., Tachibana, K., Sekiya, T., Hirohashi, S., and Shiraishi, M. (2002) 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.

Koizume, S., Sekiya, T., and Shiraishi, M. (2003) Specific methylation status of the entire CpG island is not a prerequisite for the formation of an inactive chromatin at the promoter region in cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 127-128.

Koizume, S., Tachibana, K., and Shiraishi, M. (2003) 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.

2. 学会発表

Masahiko Shiraishi. Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human *CDH1* gene in cancer cells. Spanish National Cancer Centre Cancer Conference. Cancer Epigenetics: DNA Methylation and Chromatin. 2002

斉藤麻希、小井詰史朗、白石昌彦 ヒトがん細胞においてメチル化されているCpGアイランドに結合するメチル化DNA結合蛋白質及びヒストンメチル化の多様性 第61回日本癌学会総会、2002.

Masahiko Shiraishi. CpG island methylation, histone modification, and human cancer. Toxicogenomics International Forum 2002. 2002.

大塚晋、前川真治、目黒牧子、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 ヒト19番染

色体上の新規インプリントドメインの同定 第24回日本分子生物学会年会、2002.

斉藤麻希、立花研、田中久美子、白石昌彦 ヒト肺がん細胞でのエピジェネティックな遺伝子発現制御におけるDNAメチル化およびヒストン修飾の多様性 第24回日本分子生物学会年会、2002.

立花研、武田健、白石昌彦 ヒトがん細胞における5-アザ-2'-デオキシシチジン処理による*CDH1*遺伝子発現回復の分子機構 第24回日本分子生物学会年会、2002.

Masahiko Shiraishi, Maki Saito, Adam Oates. Heterogeneity in DNA methylation and histone modification of CpG islands associated with genes silenced in human lung cancer cell lines. Keystone Symposia. Chromatin: Organizing the genome for patterns of gene expression in health and disease. 2003

J. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

（総括（分担））研究報告書

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
分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所ウイルス部 部長

研究要旨 ヒト細胞の多段階発がんモデルは種々の前がん病変やがん細胞における遺伝子変異などの異常を発見することにより作られてきた。本研究はヒト正常細胞の多段階発がんの過程を *ex vivo* で再現し、その分子機構をより詳細に把握することを目的としている。そのために今年度は種々の細胞を *ex vivo* で不死化（株化）するとともに、その不死化機構を解析した。今後、不死化細胞にさらにはがん遺伝子などを導入することにより腫瘍原性獲得に必要な条件を明らかにする。

A. 研究目的

マウスはヒトに比べはるかにがん化しやすく発がんモデル動物として多用されている。また培養細胞レベルでも不死化（株化）しやすく、造腫瘍能も獲得しやすい。そのためこれまで多くの発がん研究では NIH3T3 などのげっ歯目の培養細胞株が用いられてきた。しかしヒト細胞はげっ歯目の細胞と異なり不死化（株化）やがん化しにくく生物学的にかなり異なることも分かってきた。ヒト細胞の不死化はがん化の重要なステップであると考えられており大多数のがんにおいてはテロメラーゼの活性化がその必要条件であると考えられている。テロメラーゼの触媒サブユニットの TERT 遺伝子がクローニングされてからこれまで困難であったヒト細胞の不死化も可能となってきた。ヒト正常細胞が不死化（株化）しがん化に至る過程を *ex vivo* で再現することができればヒ

トがんの特性をより詳細に解析することが可能となる。そこで本研究では種々のヒト正常細胞を不死化しその不死化機構を解析すると共に、不死化した細胞を用いさらにはがん化に至る過程をできるだけ *in vivo* に近い形で再現し多段階発がんの分子機構を詳細に解析できる *ex vivo* モデル系を確立するのが本研究の目的である。

B. 研究方法

ヒト乳腺上皮、皮膚角化細胞および皮膚線維芽細胞の不死化機構の解析結果（Kiyono et al. Nature 1998）に基づき、これらの上皮細胞の不死化にはテロメラーゼの活性化と Rb/p16 経路の不活化の両方が必要であるが、皮膚線維芽細胞はテロメラーゼの活性化のみで不死化されることが示された。種々の臓器由来の上皮細胞や線維芽細胞の不死化条件も同じであるかどうか、さらには内皮細胞やリンパ球な

ど他の細胞種はどうであるかを知るために種々の初代培養細胞の不死化を試みた。すなわち種々のヒト初代培養細胞が1) TERTの導入のみで不死化できるか？ 2) 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？ 3) 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？を中心に解析をすると共にこれらのヒト正常細胞の不死化を試みた。また不死化に至る過程で重要だと思われる p16, p53, p21, pRb などの蛋白質の挙動を調べると共にテロメラーゼの活性化を TRAP アッセイを用いてモニターした。不死化に成功した細胞については種々のがん遺伝子の導入による細胞の増殖能の変化を調べる。遺伝子導入にはヒト初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入できるレトロウイルスベクターを用いた。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。すな

わち、これらの細胞ではテロメアの短縮ではなく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。現時点で皮膚の線維芽細胞だけがなぜ通常の培養条件でこのストレスに強いのかは不明である。発がんとの関係を考えると、がん細胞は浸潤、転移などにより細胞が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る事ができる。培養皿上での単層培養法というのは細胞に与えるストレスによりがん化に必要な条件を人工的に作り出した実験系と言えるかも知れない。実際、線維芽細胞をfeederとして使うことにより表皮角化細胞などではストレスが減り継代によるp16の発現上昇が見られなくなるという報告もある。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。またこれらの細胞は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すという

考え方によく合致する。この過程もまた、in vivoにおける発がん過程をよく反映していると考えている。

E. 結論

多くの正常ヒト細胞の不死化はテロメラーゼの活性化だけでは達成できず、p16などのCDKインヒビターの増加によるpRbの活性化を防ぐ必要がある。また、pRb経路の不活化はp53依存性のアポトーシスを引き起こす可能性がありそのような細胞ではp53経路の不活化も効率の良い不死化に必要であると考えられた。このことは多段階発がんの最も重要なステップの1つである不死化においてテロメラーゼの活性化だけでなくpRb経路の不活化はほとんどの細胞で、またp53経路の不活化が同時に必要な細胞種も多くあることが示された。これらの細胞種による不死化条件の違いは多段階発がんにおける遺伝子変異の順番や頻度の差の少なくとも一部を説明できる可能性がある。

F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換えDNA安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Yamada, J., Hara, S., Nakagawa, M.,

- Shinoda, J., Sakai, N. 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.
- Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., **Kiyono, T.**, Tsurumi, T. Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 277:10354-10361, 2002
- Okamoto, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Nakamata, T., Hosaka, T., Nakayama, T., Nakamura, T., **Kiyono, T.**, and Toguchida, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295:354-61, 2002.
- Nakamura, H., Fukami, H., Hayashi, Y., **Kiyono, T.**, Nakatsugawa, S., Hamaguchi, M., Ishizaki, K. Establishment of Immortal Normal and Ataxia Telangiectasia Fibroblast Cell Lines by Introduction of the *hTERT* Gene. *J Radiat. Res.* 43: 167-174, 2002.
- Handa, K., Saito, M., Yamaguchi, M., **Kiyono, T.**, Sato, S., Teranaka, T., Narayanan, A.S. Cementum matrix formation in vitro by cultured dental follicle cells. *Bone*, 31: 606-11, 2002.
- Kudoh, A., Fujita, M., **Kiyono, T.**, Kuzushima, K., Sugaya, Y., Izuta, S., Nishiyama, Y. Tsurumi, T. 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.
- Fujita, M., Ichinose, S., **Kiyono, T.**, Tsurumi, T., Omori, A. Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant β -actin. *Oncogene*, 22: 627-631, 2003.
- Bruemmer, D, Yin, F., Liu, J., **Kiyono, T.**, Fleck, E., van Herle, A., Graf, K., Law, R. E. Atorvastatin inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.* 462:15-23, 2003.
- Bruemmer D, Yin F, Liu J, **Kiyono T**, Fleck E, Van Herle AJ, Law RE. Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303:251-258, 2003.
- Hideaki Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., **Kiyono, T.**, Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., Umezawa, A. 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.
- Nagata KI, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, **Kiyono T**, Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with

microtubules. *J. Biol. Chem.*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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

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

分担研究者 細田 文恵 国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部主任研究官

研究要旨：11番染色体長腕部についての詳細なLOH解析から11q13.4領域に食道扁平上皮がんのがん抑制遺伝子候補を同定した。本領域にLOHを示す43症例中、5症例でアミノ酸置換を伴う突然変異が検出された。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タンパク質cortactinに結合するタンパク質のひとつである。cortactin遺伝子は同じく11q13領域にあり、乳がんや食道、頭頸部の扁平上皮がん等での遺伝子増幅がよく知られ、がんの浸潤転移能を高めるがん遺伝子である。食道扁平上皮がんにおける11q13領域のLOHと増幅は独立した事象であると考えられ、cortactin遺伝子の増幅とは異なる機構で本がん抑制遺伝子候補の不活化が起こり、がん細胞の悪性化に寄与する可能性がある。

A. 研究目的

がん細胞の発生や進展の過程は必ずしも一定の道筋で起こるものではない。由来する組織、細胞が異なればもちろんのこと、同じ種類のがんでも個々の症例において悪性度や治療効果が違うなど、がんとしての性質が大きく異なる場合がある。本研究ではゲノム解析的手法を駆使してがん細胞の遺伝的変化を特定し、がんの性質を規定する因子、特に新規がん関連遺伝子の単離を目指す。現在対象としているがんは、神経芽細胞腫、子宮体がん、食道がんなどで、これらのがんで高頻度に染色体部分欠失の見られる11q23、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、解明を目的とした。

B. 研究方法

我々は以前から行ってきた11番染色体のゲノム解析に基づき、11番染色体に異常をもつがん数種類を対象に研究を進めてきた。LOH解析によって、子宮体がんと神経芽細胞腫では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。食道扁平上皮がんの11q13領域について詳細なLOH解析を行うことにより、11q13.4に1 Mbの最小の共通欠失領域を同定した。

1 Mb領域内に存在する遺伝子を明らかにし、SSCP解析およびシーケンス解析によって遺伝子変異の有無を検討した。ま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。

本研究を行うにあたって、手術標本から

の組織採取に際しては、「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究」により検討される基準に従い患者への説明と同意を得ると共に、患者のプライバシーを厳守する。

C. 研究結果

1. 11q13.4の食道扁平上皮がんにおける共通欠失領域

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行った。その結果、11q13.3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/cDNAを見出したので、遺伝子の単離同定を行った。その結果、既知の5遺伝子と新規の3遺伝子を確認した。

2. 遺伝子変異の検索

単離同定した8遺伝子のうち、白血病において融合遺伝子形成が知られるNUMA1遺伝子と、新規の1遺伝子について、SSCP解析による遺伝子変異の検索を行った。11q13領域にLOHを示す43症例の食道扁平上皮がんを用いた結果、NUMA1遺伝子においては胚細胞突然変異としてイントロン領域の塩基置換とSNPsが検出されたのみであった。一方、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。

3. 新規遺伝子産物の構造

低頻度 (11 %) ながら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アミノ酸から成るタンパク質であるが、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splice variants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、cortactin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、NMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプター複合体と代謝共役型グルタミン酸レセプター複合体を架橋するアンカリング (足場) タンパク質として知られてきた。しかしながら、最長産物についての報告例はなく、機能も未知である。

4. がん細胞株における発現

隣接する11q13.3領域は各種のがんにお