

いてしばしば遺伝子増幅が見られることで知られる領域である。食道がん12株の他、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。その結果、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。発現の亢進は確認できなかった。一方、隣接遺伝子EMS1の発現は細胞株によって強弱の差は見られるものの、発現減弱は観察されなかった。

D. 考察

食道扁平上皮がんの11q13 LOH領域から同定したがん抑制遺伝子候補は、これまでの知見からがん遺伝子として知られるEMS1遺伝子産物cortactinと物理的に結合し、協調して機能する可能性が高い。このような両者の機能的関連性は、有名な11q13領域の染色体増幅と我々が見出した11q13欠失とを、がん化の機構に結びつけて考察する上で大変興味深い事例になると考えられる。しかもそれは食道扁平上皮がんに限らず、他のがんでも起こっている可能性がある。現在までに見出した遺伝子突然変異の頻度（アミノ酸置換を伴うもの）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、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系を作る。今回見出した全長遺伝子産物の機能は未知であるが、splice variantについての知見から細胞の形態や運動などに関わり、がんでは浸潤転移能に

関与すると推測される。RT-PCR検出レベルでは調べた組織（主に消化器系）において各splice variantsが発現しており、特に差は見られなかったが、今後抗体を用いてタンパク質レベルで確認する。N末領域の特異的なドメイン構造を欠いたsplice variants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等、splice variants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、cortactinやHomer, Dynamin-2などこれまでに同定された結合タンパク質のほかに、N末アンキリンリピート領域に結合するタンパク質を明らかにしていくことも重要であると考えられる。

E. 結論

11q13.4領域に食道扁平上皮がんにおいて、11%の頻度で体細胞突然変異を起こしている新規遺伝子を見出した。本遺伝子産物のsplice variantのひとつは、がん遺伝子として知られるcortactinに結合するタンパク質である。本遺伝子産物の不活化は食道扁平上皮がんのみならず、乳がん、肺がん、その他のがんにおいても起きている可能性があり、がんの悪性化に関与しているのではないかと推測される。4種類以上のsplice variantsが存在すると考えられ、それぞれの機能の解明が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Kondo, Y. Nakata, T. Furuta, F. Hosoda, T. Gamou, Y. Kurosawa, A. Kinoshita, M. Ohki, Y. Tomita, and T. Mori: 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.

2. 学会発表

1) ANR (Advances in Neuroblastoma Research) 2002 Paris

Y. Arai, T. Kubo, T. Gamou, F. Hosoda, T. Sakiyama, A. Toyoda, M. Hattori, Y. Sakaki, M. Ohira, A. Nakagawara, M. Ohki: Identification of a 500 kb consensus region of deletion at 11q23.3 in non-MYCN amplified neuroblastoma.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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

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

分担研究者 村上 善則 国立がんセンター研究所・室長

研究要旨

我々が昨年度同定した肺非小細胞がん (NSCLC) の新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* のがん化、進展における意義を解明する目的で、ヒトがんにおける異常の実態と遺伝子産物の機能を検討した。その結果、*TSLC1* 遺伝子のプロモーターメチル化を含む2ヒットの不活化が、ヒト NSCLC、肝細胞がん、膵がん、前立腺がん、胃がんで高頻度に認められること、*TSLC1* が前立腺がん細胞のヌードマウス皮下での腫瘍形成や、NSCLC 細胞の脾臓から肝臓への転移を強く抑制することを見出した。また *TSLC1* が膜に分布する糖蛋白質でホモ2量体を形成し細胞接着活性をもつこと、細胞内ドメインを介して、原発性肺がんで発現の低下する分子として単離されていた 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。さらに *TSLC1* のマウス相同遺伝子を単離し、遺伝子欠失マウスの作製を試みている。*TSLC1* は多くのがんの進展に関わる新たな腫瘍抑制経路を担う分子であり、がんの診断、治療標的となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトがんの腫瘍形成の分子機構を解明し、がんの進展に対する診断、治療の標的分子を明らかにする目的で、我々が腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制遺伝子 *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検討する

B. 研究方法

1. ヒト腫瘍における *TSLC1* の異常の検索：

原発性腫瘍、並びに培養がん細胞における *TSLC1* 遺伝子の構造異常の有無を、ヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無の解析、SSCP 解析、bi-sulfite 処理塩基配列決定法、並びに Bi-sulfite SSCP 解析を行った。遺伝子発現は Northern blot 解析、RT-PCR 解析により行った。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、国立がんセンターの諸規約を遵守し、倫理的、社会的、法的見地から、患者の不利益にならないように十分に配慮している。

2. TSLC1 遺伝子産物の機能解析:

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検討した。免疫沈降法、並びに免疫プロット法には、GFP, HA, V5 融合蛋白質に対する抗体や、TSLC1 特異抗体を用いた。

3. マウス TSLC1 遺伝子の同定:

マウス cDNA ライブラリー、ゲノム DNA ライブラリーを用いて、相同遺伝子を単離、同定した。

C. 研究結果

1. ヒト腫瘍における TSLC1 の異常の検索:

Northern blot 解析により、NSCLC、肝細胞がん、膵がんのみならず、前立腺がん、胃がん等由来の細胞を含む様々ながん細胞 61 例中 33 例 (54%) で TSLC1 の発現の欠如が認められた。原発性腫瘍では、NSCLC 48 例中 21 例 (44%)、肝細胞がん 14 例中 4 例 (29%)、膵がん 12 例中 3 例 (25%)、前立腺がん 22 例中 7 例

(32%) に、LOH 並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。

2. TSLC1 遺伝子産物の機能解析:

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 は肺腺がんが発現が低下する肺がんの抑制遺伝子候補として単離されていた分子であり、我々の解析でも肺がん細胞で高頻度に発現が欠如し、TSLC1 とともに不活化している例が多く見出された。

3. マウス TSLC1 (mTslc1) 遺伝子の単離:

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 10 種以上同定した。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

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を示した。

D. 考察

本年度の研究により TSLC1 の異常が NSCLC 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。他のグループからも胃がんの 16%、乳がんの 33%、膵がんの 27% で TSLC1 のメチル化が報告されている。このことは、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 とトランスに作用していると考えられる。E-

cadherin の様に、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る。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を示した。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。また 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、ezrin, radixin, moesin, merlin などが含まれ、いずれもアクチン結合性を示す。特に merlin 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ことから、腫瘍抑制の分子経路の中の未知の重要な経路が明らかにされることが強く期待される。

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・転移との関係を含めて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、抗体を用いた病理

学的解析とともに、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、遺伝子欠失マウスを作成中である。

E. 結論

TSLC1 はヒトの多くのがんの進展に関与する膜の糖蛋白質であり、細胞接着と細胞骨格とを共役して腫瘍形成や転移形成を抑制すると考えられる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami, Y. Functional cloning of a tumor suppressor gene, *TSLC1*, in human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 21, 6936-6948, 2002.
2. Yageta, M., Kuramochi, M., Masuda, M., Fukami, T., Fukuhara, H., Maruyama, T., Shibuya, T., Murakami, Y. Direct association of *TSLC1* and *DAL-1*, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res.*, 62, 5129-5133, 2002.
3. Honda, T., Tamura, G., Waki, T., Jin, Z., Sato, K., Motoyama, T., Kawata, S., Kimura, W., Nishizuka, S., Murakami, Y. Hyper-methylation of the *TSLC1* gene promoter in primary gastric

cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 857-860, 2002.

4. Masuda, M., Yageta, M., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Maruyama, T., Nomoto, A. & Murakami, Y. The tumor suppressor protein *TSLC1* is involved in cell-cell adhesion. *J Biol. Chem.*, 277, 31014-31019, 2002.
5. Fukami, T., Satoh, H., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T. & Murakami, Y. Identification of the *Tslc1* gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor *TSLC1* gene. *Gene*, 295, 7-12, 2002.
6. Fukuhara, H., Kuramochi, M., Fukami, T., Kasahara, K., Furuhashi, M., Nobukuni, T., Maruyama, T., Isogai, K., Sekiya, T., Shuin, T., Kitamura, T., Reeves, R.H. & Murakami, Y. Promoter methylation of the *TSLC1* and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 605-609, 2002.
7. Tamura, K., Miwa, W., Maruyama, T., Sekiya, T. & Murakami, Y. Homozygous deletion on the chromosomal region 5q12.3 in human lines of small-cell lung cancers. *J Hum. Genet.*, 47, 348-354, 2002.

2. 学会発表

1. 八下田美佳、増田万里、倉持雅己、福原浩、深見武史、丸山智子、渋谷正史、村上善則：がん抑制遺伝子 *TSLC1* の細胞内ドメインに結合する分子の解析。第 25 回日本分子生物学会年会。
2. Murakami, Y., Fukami, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Maruyama, T., Isogai, K., Sakamoto, M., Reeve, R.H.: Promoter methylation of the *TSLC1* gene in advanced lung cancer. The 52nd Annual Meeting of American Society of Human Genetics.
3. 村上善則、深見武史、増田万里、八下田美佳、丸山智子、磯貝香奈、福原浩、倉持雅己、信國宇洋：機能的相補法によるがん抑制遺伝子 *TSLC1* の同定と機能解析。第 61 回日本癌学会年会。
4. 増田万里、八下田美香、福原浩、倉持雅己、丸山智子、野本明男、村上善則：がん抑制遺伝子産物 *TSLC1* の細胞接着因子としての機能解析前立腺癌における新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の不活化と腫瘍形成の抑制。第 61 回日本癌学会年会
5. 深見武史、福原浩、倉持雅己、丸山智子、磯貝香奈、坂元亨宇、村上善則：がん抑制遺伝子 *TSLC1* のプロモーターメチル化にがん化における意義前立腺癌における新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の不活化と腫瘍形成の抑制。第 61 回日本癌学会年会。
6. 八下田美佳、増田万里、倉持雅己、福原浩、深見武史、丸山智子、渋谷正史、村上善則：がん抑制遺伝子 *TSLC1* の細胞内ドメインに結合する分子の解析。第 61 回日本癌学会年会。
7. 磯貝香奈、深見武史、丸山智子、菅野康吉、野瀬清、村上善則：網膜芽細胞腫における変異 *RBI* 遺伝子の発現量の解析。前立腺癌における新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の不活化と腫瘍形成の抑制。第 61 回日本癌学会年会。
8. Murakami, Y. Identification and characterization of a tumor suppressor gene *TSLC1* in human non-small cell lung cancer. The 9th Charles Heidelberger International Symposium on Cancer.
9. 村上善則、深見武史、倉持雅己、福原浩、磯貝香奈、丸山智子：新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の様々な腫瘍における異常の検索:第 8 回家族性腫瘍研究会学術集会
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）なし。

がん関連遺伝子異常の診断への応用

分担研究者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所副主幹・医長・特別研究員

研究要旨

非遺伝性のマイクロサテライト不安定性(MSI)陽性大腸がんにおける hMLH1 遺伝子のプロモーター領域の CpG 配列のメチル化を Na-bisulphite PCR/SSCP 法により解析した。hMLH1 蛋白の発現が消失している MSI 陽性大腸がんでは hMLH1 遺伝子の約 1kb のプロモーター領域の CpG 配列の広範なメチル化が両アレル性に生じていることが認められた。一方、hMLH1 プロモーターのメチル化は MSI 陽性大腸がんの正常粘膜、あるいは MSI 陰性大腸がんでも認められるが、これらはいずれもプロモーターの上流に局限する部分的なメチル化であり、hMLH1 蛋白の発現は保たれていた。以上の結果より、hMLH1 プロモーター領域の広範なメチル化は MSI 陽性大腸がんの発症に関与する重要な要因と考えられた。さらに、若年発症大腸がんの一部で全身的に hMLH1 遺伝子のプロモーター領域に広範なメチル化が生じている症例を 4 例見出した。これらはいずれも 40 才以下で発症した家族歴のない若年性大腸がんであり、正常細胞で hMLH1 遺伝子のプロモーター領域に片側のアレルに局限した広範なメチル化が生じた結果、個人のがん発症に対する易罹患性が高められたものと推測される。

A.研究目的

本研究ではがんの遺伝子診断を実用化するために必要な遺伝子解析技術の開発と臨床検体の解析を通じてその臨床的意義を明らかにすることを目的とする。本年度はマイクロサテライト不安定性(MSI)を示す散发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ィールを解析し、大腸発がんにおける hMLH1 遺伝子のメチル化検出の意義について検討した。

B.研究方法

1) hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析するため、開始コドンの上流-755 から下流+86 までの CpG island を 5 ケ所の領域に分割し、Na-bisulphite 処理した DNA を鋳型として、PCR-SSCP 法によりメチル化 DNA 断片と非メチル化 DNA 断片を分離検出する方法を開発した。本法を用いて、明らかな家族歴を示さない散发性大腸がん 88 例 (MSI 陽性大腸がん

18 例、MSI 陰性大腸がん 70 例を含む)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、MSI、K-ras 遺伝子変異、p53 遺伝子の欠失等との関連を解析した。

2) hMLH1 遺伝子のプロモーターの全領域で広範なメチル化が認められた症例 (Full methylation)を対象として、-93 の部位にある G/A の一塩基置換型多型 (SNP)を利用してプロモーター部位に生じたメチル化のアレル特異性、あるいはヘテロ接合性の消失(LOH)等を検討した。

3) 遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC)が疑われる 87 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。対照として健常成人 100 名の末梢血 DNA も同時に解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の内容がヒトゲノム・遺伝子解析研究に関与すると考えられる場合には、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指

針』を遵守して行われる。体細胞変異についての解析は過去に遺伝子解析を目的として収集された DNA を使用して行う場合、検体はコード化された試料として取り扱われる。遺伝子解析のために新たな検体の採取が必要な場合には、施設倫理委員会の承認した研究計画に基づき、被験者に対する説明と同意を得た後に行なわれる。

C. 研究結果

1) 大腸がん組織の解析では *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 Full methylation が 14 例(15.9%)、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 Partial methylation 26 例(29.5%)、メチル化を認めない No methylation が 48 例(54.5%)であった。Full methylation を生じた 14 例は全例が MSI 陽性を示し、Partial methylation, No methylation 症例に比較して *hMLH1* 蛋白の発現の消失は有意に高率であった。その他の特徴として Full methylation 症例は女性、右側結腸がんが多い、平均発症年齢が 75.4 ± 8.4 才と Partial methylation 63.9 ± 10.7 才あるいは No methylation 61.0 ± 12.0 才に比べ、有意に高齢である事、*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等の特徴が見出された。

2) Full Methylation が認められた MSI 陽性大腸がん 14 例のうち、*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(SNP)がヘテロ接合であった 8 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レル性に生じており、LOH は認められなかった。

3) Full Methylation 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 Partial methylation であった。メチル化は MSI 陰性腫瘍の 70

例中 24 例(34%)でも認められたが、すべて Partial methylation であった。免疫染色による検討では *hMLH1* 遺伝子の発現は、全メチル化症例の 85%で消失していた。一方、部分的なメチル化を認めた MSI 陽性大腸がんあるいは MSI 陰性大腸がんの背景粘膜では発現は保たれていた。

4) HNPCC が疑われる 87 症例の末梢血リンパ球における *hMLH1* 遺伝子のプロモーターのメチル化の状態を解析したところ、Full methylation 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* 等のミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異を認めず、その特徴として(i)第一度近親内に明らかな HNPCC 関連腫瘍の家族歴を認めない MSI 陽性大腸がん、(ii)40 才以下の若年発症であること、(iii)末梢血リンパ球、正常大腸粘膜、あるいは胃、子宮内膜、骨髄細胞等で全身的に *hMLH1* 遺伝子の Full methylation が認められる、(iv) -93 の多型部位がヘテロ接合であった症例では、メチル化はプロモーターの片方のアレルにのみ生じていること、(v)4 例中 2 例で大腸がん、子宮内膜がんなど異時性の多重発がんが発症していること等が挙げられる。一方、対照として健常成人由来の末梢血リンパ球 100 例を解析したところ、*hMLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は 1 例も認められなかった。

D. 考察

MSI は大腸がん、子宮体がん、胃がん等の固形腫瘍の約 10-20%程度に認められる。HNPCC 症例の大腸がん組織の解析では MSI が 80-90%と高率に認められることが報告されている。しかし、MSI 陽性大腸がんの中で HNPCC が占める割合は比較的少ないものと推測され、MSI 陽性大腸がんの 80-90%の症例では *hMLH1* 遺伝子のプロモーター領域の CpG 配列のメチル化が生じており、エピジェネティック変異による *hMLH1* 遺伝子の不活化が非遺伝性の MSI 陽性大腸がんの主要な原因

と考えられている。今回の検討で、hMLH1 遺伝子の発現が消失している MSI 陽性腫瘍では、プロモーター領域中に存在する約 1kb の CpG island 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 (Full methylation) ことが明らかとなった。Full methylation 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等が関与している可能性が考えられる。さらに-93 の多型部位の解析により、Full methylation 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、両アレルに生じた Full methylation によって不活化が生じているものと考えられた。Partial methylation は MSI 陽性大腸がんの正常大腸粘膜あるいは MSI 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 silencing 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、骨髄等で全身的に Full methylation 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、MSI を検索しえた 3 例では全例が MSI 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レ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、若年発症の散発性 MSI 陽性腫瘍の一因となっているものと考えられる。

E. 結論

hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化のプロフィールを解析した。プロモーターの部分的なメチル化 (Partial methylation) は MSI 陽性大腸がんの正常

粘膜あるいは MSI 陰性大腸がんでも認められるが、MLH1 蛋白の発現は保たれており、病的な意義は認められない。MSI 陽性大腸がんでは hMLH1 遺伝子のプロモーターの広範囲な領域にメチル化が生じており (Full methylation)、両アレルに生じた Full methylation が hMLH1 遺伝子の不活化を生じているものと考えられる。一方、一部の若年発症大腸がんでは hMLH1 遺伝子の Full methylation が全身的に生じていることが明らかとなった。この Full methylation は片アレルにのみ生じているものと推測され、若年性の散発性 MSI 陽性腫瘍の発症原因のひとつと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nomoto K., Sugano K. et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the *p16* gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. *Jpn J Clin Oncol* 32: 3-8, 2002

Matsumura Y., Sugano K. et al. Effect of a 3-hour interval between methotrexate and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32: 9-13, 2002

Gonda K., Sugano K. et al. A novel germline mutation of hMLH1 in a patient with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32: 215-218, 2002

Miyakura Y., Sugano K. et al. Concurrent mutations of K-ras oncogene at codons 12 and 22 in colon Cancer. Jpn J Clin Oncol 32: 219-221, 2002

Ishida H., Sugano K. et al. The novel germline mutation of hMSH2 gene in a case of colon cancer patient without family history. Jpn J Clin Oncol 32: 266-269, 2002

Nakagawa H., Sugano K. et al. Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. Anticancer Res 22:1655-1660, 2002

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

Miyakura Y., Sugano K. et al. Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. Genes Chromosomes & Cancer 36:17-25, 2003

2.学会発表

Sensitive allelotyping using capillary gel electrophoresis and clinical application to cancer diagnosis: Sugano K., Ichikawa A, Ozawa, S, Fukayama, N, Fukuzono S. (April 4th, 2002) The 3rd Cherry Blossom Symposium (in

Hamamatsu)

体細胞変異変異解析 -研究と診療についての倫理的問題- : 菅野康吉 (平成 14 年 5 月 23 日) 日本遺伝カウンセリング学会第 26 回大会 (長崎)

遺伝性非ポリポーシス大腸癌家系における血縁者の保因者診断: 菅野康吉, 吉田輝彦, 和泉秀子, 藤井理恵, 石川和代, 高田タキ子, 児玉哲郎, 藤田伸, 赤須孝之, 森谷宜皓, 固武健次郎, 小山靖夫 (平成 14 年 6 月 14 日) 第 8 回家族性腫瘍研究会学術集会 (京都)

p53 遺伝子異常の検出とがんの分子診断: 菅野康吉 (平成 14 年 10 月 1 日~10 月 3 日) 第 61 回日本癌学会総会シンポジウム『p53 研究の最前線』 (東京)

遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC) の遺伝子診断と血縁者の保因者診断における臨床的意義: 菅野康吉 (平成 14 年 10 月 18 日) 第 40 回日本癌治療学会総会ワークショップ (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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
がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究
分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学内科学第一講座教授

研究要旨

がん克服に向けた臨床応用への展開を念頭に、発がんおよび進展に関連する遺伝子異常について食道扁平上皮がん、胃消化管間葉系腫瘍、大腸がん、膵管内乳頭腫瘍（IPMT）を対象に、特にアレイによる網羅的遺伝子発現解析、DNAメチル化の異常を中心に系統的に解析した。アレイ解析により、食道扁平上皮がん、胃消化管間葉系腫瘍、大腸がんの発生・進展に関わるさまざまな遺伝子発現変化を明らかにした。また、胃がんにおいて、COX-2 遺伝子の過剰メチル化およびヒストン脱アセチル化と COX-2 発現消失との関連を明らかにした。IPMT の進展と p53、p16、SMAD4 などがん抑制遺伝子の不活性化との関連を明らかにした。いずれの知見も診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、今後はさらにこの点の応用を進めていきたい。

A. 研究目的

がんは多くの遺伝子の異常が多段階にわたって蓄積することにより発生、進展することが明らかになっている。我々も、これまでに消化器がんを対象にがん関連遺伝子として増殖関連遺伝子、DNA修復遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、免疫関連遺伝子等について、系統的に検索を進めてきた。近年、遺伝子発現の網羅的解析法としてアレイ解析が注目されている他、発がん機構として、DNAメチル化によるがん抑制遺伝子の不活性化が注目されている。本研究においては、食道扁平上皮がん、胃消化管間葉系腫瘍、大腸がん、膵管内乳頭腫瘍（IPMT）を対象に、特にアレイによる網羅的遺伝子発現解析、DNAメチル化の異常を中心に系統的に解析した。これにより、発がんおよび進展機構の解明を通し、異常遺伝子を標的とした診断、分子標的治療、さら

にはがん制御を展望することを目的とした。

B. 研究方法

1. cDNAアレイ解析

食道扁平上皮がん組織30例（うちリンパ節転移陰性例6例）、転移や他臓器浸潤を認めた臨床的に高悪性胃GIST10例とそれらを認めない低悪性胃GIST20例の計30例、各病期の大腸がん組織およびその肝転移組織の計40例を対象とした。cDNAアレイ解析は、laser capture microdissection(LCM)を併用し、cDNAのラベリング、ハイブリダイゼーション、化学発光による検出を行い、得られた画像は解析ソフトを用い検討した。興味ある発現変化を示した遺伝子についてはsemiquantitative RT-PCR法を用いて検討した。

また、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た。さらにtissue microarrayを用いて免疫組織学的検討も行った。得られた結果から、いくつかの遺伝子を対象に大腸がん細胞株を用いて治療実験を行った。

2. 胃がんにおけるCOX-2遺伝子メチル化およびヒストンアセチル化異常の検討

8種の胃がん細胞株、93症例の胃がん組織よりDNAおよびRNAを抽出した。COX-2遺伝子の5'領域のメチル化をcombined bisulfite restriction analysis (COBRA)、bisulfite-SSCPおよびbisulfite sequencingにより解析した。ヒストンアセチル化をクロマチン免疫沈降法により解析した。COX-2発現を、RT-PCRおよび免疫組織化学染色により検討した。

3. 膵管内乳頭腫瘍 (IPMT) の進展におけるがん抑制遺伝子不活化

IPMT38例 (過形成9例、腺種16例、がん13例) を対象にp53、p16、SMAD4の発現を免疫組織化学的に検討した。p53は、発現陽性がん細胞の割合をpositive index (PI)、p16およびSMAD4は、発現陰性の割合をnegative index (NI)として、定量化した。

(倫理面への配慮)

研究内容の性質上、ヒトの生体試料を用いることが多いので、遺伝子の検索、成果の発表においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。すなわち、提供者から十

分なインフォームド・コンセントを得ることとし、人間の尊厳及び人権を尊重し、実施試料等提供者やその家族、血縁者の人権を科学的、社会的な利益より優先し、適正に研究を行った。

C. 研究結果

1. cDNA アレイ解析では、各消化管腫瘍において、予後などと相関する様々な遺伝子 (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。リンパ節転移陰性 (n0) と診断されたが、遺伝子発現パターンより、転移が示唆された1例においては、micrometastasis が検出された。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行ったところ、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。さらに、大腸がん細胞株を対象に、インスリン様増殖因子受容体などいくつかの遺伝子の dominant negative form の Tet-off 発現システムおよびアデノウイルスベクターを用いた実験により、それぞれの遺伝子が治療の標的となりうることも明らかにした。

2. 8種の細胞株中2種（MKN28およびKATOIII）、93症例中11例（12%）にCOX-2遺伝子の過剰メチル化を認め、COX-2遺伝子の過剰メチル化と遺伝子発現の消失あるいは減弱は相関しており、細胞株の脱メチル化剤5-deoxy-2'-azacytidine処理により、遺伝子発現が回復した。また、MKN28およびKATOIIIにおいて、COX-2遺伝子プロモーターのヒストン脱アセチル化と遺伝子発現消失との相関を明らかにした。

3. 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 NIは有意に高かった。

D. 考察

cDNA アレイとがん組織アレイによる遺伝子発現解析は、今回の検討では、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。明らかとなった各遺伝子は、診断や分子標的治療への応用が期待でき、今後、遺伝子情報に基づく新しい医療の展開をも可能にすると考えられた。

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、進展すると考えられる。この一群には、COX-2

阻害剤が chemoprevention として期待できない可能性がある。今後、この一群の胃がんを詳細に検討することにより、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。さらに、本研究成果は、効果的な chemoprevention に応用可能であると考えられる。

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る。一方、SMAD4の不活化は、早期の変化であるとともに、非浸潤性がん浸潤性がんでは SMAD4 NI 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。膵管内乳頭腫瘍の進展過程において、これらの遺伝子変化が蓄積していくと考えられ、LOH study の結果と合致する。今後、genetic および epigenetic な異常との関連を明らかにし、膵管内乳頭腫瘍の進展機構の解明、さらにはヒト多段階発がんの把握による診療への応用をめざしたい。

E. 結論

アレイ解析により、食道扁平上皮がん、胃消化管間葉系腫瘍、大腸がん、の発生・進展に関わるさまざまな遺伝子発現変化を明らかにした。COX-2 遺伝子の過剰メチル化とヒストン脱アセチル化を胃がんでは明らかにした。IPMTの進展とp53、p16、SMAD4などががん抑制遺伝子の不活性化との関連を明らかにした。以上、いずれも発がんおよび進展機構の解明に有用であり、更に、診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、がん克服へ向けた重要な知見であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, H., Imai, K. and Perucho, M. Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Adv. Cancer Res.*, in press.
- 2) Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa J.-P. J., Tokino, T., and Imai, K. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene*, 21: 2741-2749 (2002).
- 3) Yamamoto, H., Min, Y., Itoh, F., Imsumran, A., Horiuchi, S., Yoshida, M., Iku, S., Fukushima, H. and Imai, K. Differential involvement of the hypermethylator phenotype in hereditary and sporadic colorectal cancers with high-frequency microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer*, 33: 322-325 (2002).
- 4) Kikuchi, T., Itoh, F., Toyota, M., Suzuki, H., Yamamoto, H., Fujita, M., Hosokawa, M. and Imai, K. Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *Int. J. Cancer*, 97: 272-277 (2002).
- 5) Takahashi, H., Endo, T., Yamashita, K., Arimura, Y., Yamamoto, H., Sasaki, S., Itoh, F., Hirata, K., Imamura, A., Kondo, M., Sato, T., and Imai, K. Mucin phenotype and microsatellite instability in multiple early gastric cancers. *Int. J. Cancer*, 100: 419-424 (2002).
- 6) Sasaki, Y., Itoh, F., Kobayashi, T., Kikuchi, T., Suzuki, H., Toyota, M. and Imai, K. 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).
- 7) Satoh, A., Toyota, M., Itoh, F., Kikuchi, T., Obata, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yawata, A., Kusano, M., Fujita, M., Hosokawa, M., Yanagihara, K., Tokino, T., and Imai, K. DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. *Br. J. Cancer*, 86: 1817-1823 (2002).
- 8) Yamamoto, H., Imsumran, A., Fukushima, H., Adachi, Y., Min, Y., Iku, S., Horiuchi, S., Yoshida, M., Shimada, K., Sasaki, S., Itoh, F., Endo, T., and Imai, K. Gene expression analysis of human colorectal cancer tissues by cDNA array. *J. Gastroenterol.*, 37: 83-86 (2002).
- 9) Sasaki, S., Yamamoto, H., Kaneto, H., Ozeki, I., Adachi, Y., Takagi, H., Matsumoto, T., Itoh, H., Nagakawa, T., Miyakawa, H., Muraoka, S., Fujinaga, A., Suga, T., Satoh, M., Itoh, F., Endo, T., and Imai, K. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncol.*

Reports, 10: 21-25, (2003).

2. 学会発表

1) Yoshida, M., Yamamoto, H., Fukushima, H., Horiuchi, S., Noshio, K., Taniguchi, H., Sasaki, S., Adachi, Y., Arimura, Y., Itoh, F., Endo, T. and Imai, K. cDNA array analysis of gene expression involved in lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. The 61st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2002, Tokyo.

2) Kakiuchi, H., Yamamoto, H., Fukushima, H., Horiuchi, S., Yoshida, M., Noshio, K., Taniguchi, H., Sasaki, S., Adachi, Y., Arimura, Y., Itoh, F., Endo, T. and Imai, K. Genetic and

epigenetic alterations and gene expression analysis using cDNA array in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the stomach. The 61st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2002, Tokyo.

3) Horiuchi, S., Yamamoto, H., Min, Y., Itoh, F., Imsumran, A., Yoshida, M., Iku, S., Fukushima, H. and Imai, K. Differential involvement of the hypermethylator phenotype in hereditary and sporadic colorectal cancers with high-frequency microsatellite instability. The 30th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2002, Boston.

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

膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室教授

研究要旨：外科切除された膵がんの腫瘍組織あるいは膵がん細胞株を、SCID マウスの膵臓に同所性に移植し、膵がんの増殖・浸潤・転移を模倣するモデルを作成した。これら細胞、腫瘍組織を免疫して、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における意義を解析した。同様に、遺伝子発現解析に供して、膵がんの増殖・浸潤・転移に關与する遺伝子を解析した。Dysadherin に対するモノクローナル抗体を樹立し、その発現は遠隔転移、分化度、予後と有意な相関を認めたが、さらに、膵がん細胞株への Dysadherin の過剰発現により、細胞の運動性と肝転移性が亢進することを示した。LI-cadherin の発現も独立した予後因子であることを示したが、免疫沈降法にて、Galectin-3 が LI-cadherin と相互作用する可能性を示した。

A. 研究目的

膵がんは日本におけるがん死亡原因の第五位に位置し、最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。これは、膵の解剖学的位置に加えて、膵がん自体が高い悪性度を有し、早期より浸潤・転移をきたすことや、早期発見が困難であることが原因と考えられている。よって膵がんの浸潤・転移機構の解明と早期に発見できる新しい診断法の開発を進めることで予後の改善が可能になると期待される。

以上をふまえ、本研究では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と共に、その基盤となる分子・細胞機構の解析を、実際のがんをよく模倣する同所性移植モデル等を用いて行う。具体的には、多数の膵がん細胞株に加えて、切除された膵がん組織を直接移植して作成したモデルを用いて、がんで発現している遺伝子、蛋白、あるいはシグナル伝達の変化などと、モデルにおける増殖、浸潤・転移性との対応を解析することで、膵がんの増殖、浸潤・転移に關与する分子を明らかにする。そしてこれらの成果を基に、早期診断法ならびに新しい標的治療法を開発することを目標とする。

B. 研究方法

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。腫瘍の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行った。これら細胞、腫瘍組織を免疫して、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における意義を解析した。同様に、これら細胞、組織から RNA を抽出して、Gene Chip にて網羅的遺伝子発現解析を行った。

(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。又、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。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」を遵守して行った。

C. 研究結果

1. **Dysadherin** : 膵がん cell line(HS766T) を免疫し、Dysadherin を特異的に認識する抗体を得た。そこで Dysadherin 発現の意義を、切除材料にて検討したところ、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に発現の上昇を認めた。また、Dysadherin の過剰発現は遠隔転移、分化度と有意な相関を認め、予後も不良であった。この Dysadherin 過剰発現の意義を直接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、コントロール 2 株、親株の間で同所性移植モデルにおける転移能を検討し、Dysadherin 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示された。転移能亢進の一つのメカニズムとして、細胞運動性を検討したところ、同様に、Dysadherin 高発現株では、コントロールに比して細胞運動性の亢進を認めた。

2. **LI-cadherin** : 上記の移植モデルの No. 1 を免疫し、LI-cadherin を特異的に認識する抗体を得た。そこで LI-cadherin 発現の意義について膵がん切除材料で検討し、LI-cadherin の陽性例は中分化・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 症例の方で多かった。また LI-cadherin 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-cadherin については、その機能は十分明らかにされていないため、膵がんにおいて LI-cadherin と相互作用する分子を解析した。免疫沈降法にて、LI-cadherin 陽性細胞である AsPC-1 細胞のみに 30-kd のバンドを認め、陰性細胞である Panc-1 細胞に認めなかったことから、このバンドを切り出しアミノ酸解析を行った。その結果、

この分子は galectin-3 であることが判明し、ウエスタンブロットにて確認された。さらにこの結合が、galectin-3 のレクチンドメインを介しているかを解析するために阻害実験を行ったところ、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。

3. 遺伝子発現解析

腫瘍組織を直接移植し樹立した株 12 例を対象に、HG-U133A&B を用いて、約 45000 遺伝子の発現を解析した。これらの中から、正常膵組織に比して共通に高発現している遺伝子、リンパ節高転移株 (8 株) と非転移株 (4 株) の間で発現に差がある遺伝子のリストアップを行った。共通に高発現する遺伝子約 65 個、高転移群で高発現する遺伝子約 40 個が同定され、RT-PCR、免疫染色等によりさらに遺伝子の絞り込みを行っている。

D. 考察

1. **Dysadherin** は、すでに Cadherin の機能を抑制する新規糖タンパク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、乳がん患者症例では Dysadherin と予後との相関が認められ、膵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 Dysadherin 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 Dysadherin 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、今後解析を続けて行う。

2. **LI-cadherin** は cadherin superfamily に属し、構造的にユニークな cadherin である。E-、P-、N-cadherin のようないわゆる classic cadherin では細胞外ドメインに 5 つの cadherin repeat を有するのに対し、LI-

cadherin は7つ有する。また、細胞内ドメインが約 20 アミノ酸と classic cadherin (約 150~160 アミノ酸) に比し極端に短い。機能に関しては、他の cadherin 同様、細胞間接着能を有することが報告されているが、LI-cadherin の細胞内ドメインには、 β -catenin 結合ドメインが存在せず、かつこれまで結合しうる分子は報告されていない。そこで、LI-cadherin の機能を解明する意味で結合しうる分子の同定を試み、galectin-3 が同定された。Galectin-3 は、膵がん組織において LI-cadherin 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。

3. 遺伝子発現解析

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、サンプルが得にくいことや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行った。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り、その中には既に膵がんでは報告されている遺伝子も含まれており、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、現在最も難治とされる膵臓がんを対象に、実際の臨床がんの病理像を一層明らかにすると共に、それを良く模倣する *in vivo*、*in vitro* モデルを最新の分子細胞生物学的手法を用いて解析し、早期診断ならびに転移・浸潤能の正確な診断を可能とし個々の症例に現時点における最適の治

療法を選択可能とすると同時に、今後の新たな治療法開発のための治療標的を明らかにしようとするものである。本年度は、独自に樹立したモノクローナル抗体が認識する Dysadherin, LI-cadherin の膵がん細胞における発現の意義を解析し、Dysadherin は、直接的に転移性に関与していること、膵がんと同様に過剰発現する LI-cadherin と Galectin-3 が相互作用する可能性を示した。また、遺伝子発現解析からも、候補分子が得られてきており、今後さらに、これら分子の膵がんにおける生物学的意義、診断への意義につき解析を行う。そして、浸潤、転移機構の解明、早期診断・悪性度診断に有用な分子の同定を進める。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, Sato Y, Shimada K, Kosuge T, Sekihara H, Hirohashi S. Dysadherin overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma reflects tumor aggressiveness: relationship to E-cadherin expression. *J Clin Oncol.* 2003, 21(4): 659-67.
- 2) Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, Kanai Y, Ohki M, Hirohashi S. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2003, 22(6):847-52.
- 3) Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2003, 37(1):198-207.
- 4) Okusaka T, Okada S, Ueno H, Ikeda M, Shimada K, Yamamoto J, Kosuge T, Yamasaki S, Fukushima N, Sakamoto M. Satellite lesions in patients with small hepatocellular carcinoma with reference to clinicopathologic features. *Cancer.* 2002, 95(9):1931-7.
- 5) Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, Shimada

K, Kosuge T, Sato Y, Tanaka K, Sekihara H, Hirohashi S. Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 2002, 8(8):2570-5.

6) Nam J-S., Ino Y., Sakamoto M., Hirohashi S. Src Family Kinase Inhibitor PP2 Restores the E-Cadherin/Catenin Cell Adhesion System in Human Cancer Cells and Reduces Cancer Metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8: 2430-2436.

7) Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M., Saito H, Ishii H, Hirohashi S. 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* 2002, 99(15): 10060-10065.

8) Nakanishi K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S. and Hirohashi S. Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in

anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer. *Cancer Res.* 2002, 62(10): 2971-2975.

9) Gotoh M., Sakamoto M., Kanetaka K., Chuuma M. and Hirohashi S. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma. *Pathol. Int.* 2002, 52(1): 19-24.

10) Yachida S., Fukushima N., Sakamoto M., Matsuno Y., Kosuge T. and Hirohashi S. Implications of peritoneal washing cytology in patients with potentially resectable pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* 2002, 89: 573-578.

11) Ino Y., Gotoh M., Sakamoto M., Tsukagoshi K. and Hirohashi S. Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99(1): 365-370.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。