

厚生労働科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生と憎悪に関わる
分子病態の解析とその臨床応用

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高 橋 利 忠

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析とその臨床応用 …… 1
主任研究者 高橋利忠

II. 分担研究報告

1. がん関連遺伝子産物の血清学的解析 …… 10
高橋利忠（愛知県がんセンター研究所）
2. 造血器腫瘍発症機構の解析とその臨床応用の研究 …… 14
瀬戸加太（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. 固形腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析 …… 18
高橋 隆（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）
4. がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …… 22
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）

I. 総括研究報告書

厚生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

ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所所長

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

(a) (1)胃粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫においては、API2-MALT1 キメラ遺伝子の発現が見られる症例ではピロリ菌除去療法に対する反応性が見られないことを示した。(2)API2-MALT1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立により、キメラ遺伝子のリンパ腫発生における関与を示唆した。(3)びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DCBCL)において、細胞表面マーカーである CD5 陽性群は予後が悪い疾患単位を形成することを示し、それを裏付ける染色体遺伝子異常の検出にも成功した。(b) (4) 抗がん剤感受性の予測法の開発を目指し、ヒト肺がん細胞株 20 株を用い、9 種類の抗がん剤に対する IC_{50} 値(感受性試験)の決定と、約 1 万個の遺伝子を対象とした網羅的発現解析を進めた。現在、パイオインフォマティクス解析を行い、感受性予測に有用な遺伝子の抽出を進めつつある。(5)M 期チェックポイントに異常が認められるヒト肺がん細胞株は微小管作用性抗がん剤(Vinorelbine, Docetaxel 等)によるアポトーシス誘導に対し抵抗性を示すことを示した。(c) (6)増殖・浸潤に関わる蛋白質の研究として、細胞骨格系の極性形成に関与している ERBIN が、p120 カテニン類似蛋白質である p0071 と結合し、細胞間接着の制御に関与している可能性を示した。(7)セプチン MSF ファミリー(Sept 9)の機能および性状解析を行い、乳腺由来不死化細胞の分裂に果たす役割を明らかにした。更に、(8)がん細胞で発現異常が高頻度に見られる Aurora キナーゼが細胞分裂時において中間系フィラメント等の分配に重要な役割を果たすことを示した。

分担研究者	所属施設名	職名	組織(MALT)リンパ腫に特徴的な API2-MALT1 キメラ遺伝子の mRNA レベルでの発現を指標にし、症例を検討し、その病態を解析する。また、(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成し、経過観察することにより、キメラ遺伝子の腫瘍化における役割を検討する。(3)
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長	
高橋 隆	愛知県がんセンター研究所	部長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	

A. 研究目的

(a)造血器腫瘍では、(1)粘膜関連リンパ

複数の疾患単位からなると考えられるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) を免疫組織学的、分子生物学的手法で解析し、臨床的に意義のある疾患単位を明らかにする。(b) 難治性固型がんの代表たる肺がんでは、(4) 細胞株パネルを用い、遺伝子発現プロファイルに基づいた抗がん剤感受性予測法の樹立へむけた検討を開始すると共に、(5) 肺がんを高頻度に検出される M 期チェックポイント異常と、肺がん治療にしばしば用いられる微小管作用性抗がん剤に対する感受性との関連性について検討を加える。(c) 増殖・浸潤に関わる蛋白質の研究として、(6) 細胞骨格系の極性形成に参与している ERBIN と中間径フィラメントの結合蛋白質の機能解析を行うとともに、(7) セプチンの機能解析を行い、これら蛋白質のがん細胞の浸潤・転移における役割を解明する。更に、(8) がん細胞で発現異常が見られる Aurora キナーゼの細胞分裂における役割を解明する。

B. 研究方法

(1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子を標的にした遺伝子診断

MALT リンパ腫に特徴的な t(11;18) 染色体転座の転座切断点の解析により明らかにした API2-MALT1 キメラ遺伝子の mRNA レベルでの発現を胃 MALT リンパ腫症例を対象にして検討し、臨床病態と比較検討した。

(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立

API2-MALT1 キメラ cDNA を E μ (免疫グロブリンエンハンサー)-SV 発現ベクターに組み込み、トランスジェニックマウスを作成し、BALB/c マウスに Backcross することにより、マウス系を樹立し、長期間観察することにより、腫瘍化能を検討した。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の疾患多様性の解析

DLBCL について BCL6 転座の有無と臨床病態とは相関しないことが明らかとなったので、分化マーカーである CD5 抗原の発現に着目し、CD5 陽性群と陰性群の臨床病態を検討した。

(4) ヒト肺がん治療薬に対する感受性予測法の開発

ヒト肺がん細胞株 20 株 (小細胞がん 5 株、扁平上皮がん 5 株、腺がん 7 株、大細胞がん 3 株) から RNA を抽出し、9,238 遺伝子を対象にマイクロアレー法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。肺がん治療にしばしば用いられる Cisplatin (CDDP), Carboplatin (CBDCA), Etoposide (VP-16), Irinotecan (SN-38), Gemcitabine (GEM), Vinorelbine (VNR), Paclitaxel (TXL), Docetaxel (TXT), Amrubicin (SM-5887) の 9 種類の抗がん剤に対し、これらの肺がん細胞株が示す IC₅₀ 値を、MTT 変法によって求めた。

(5) M 期チェックポイント異常と微小管作用性抗がん剤感受性との関連性の検討

ヒト肺がん細胞株 10 株において、M 期チェックポイント異常の存在を、微小管重合阻害剤である Nocodazole 投与 18 時間後の mitotic index 及び抗ヒストン H3 抗体陽性細胞数を計測することにより検討した。アポトーシスの誘導は、anexin V による染色陽性細胞数及び DAPI 染色によりフラグメンテーションが観察された細胞核数を計測することによって判定した。また、Z-VAD 等の Caspase 阻害剤や各種酵素阻害剤を用い、アポトーシス誘導に関わる経路を検討した。抗 Bcl-2 抗体による Western blot 解析は常法に従って行った。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

細胞骨格系の極性形成に参与する ERBIN と結合する蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いて同定した。ERBIN に対する抗体及び ERBIN 結合蛋白質に対する抗体を作製し、

ERBIN がどのように細胞極性を制御しているかを検討した。

(7)セプチン MSF-A の性状と機能の解析

生化学・分子細胞生物学的手法を用いてセプチン MSF ファミリー (Sept 9) の性状と機能解析を行い、さらにセプチン間の相互作用の分子機構を解析した。また、種々のがん細胞における発現異常を検索した。

(8)Aurora キナーゼの機能解析

Aurora キナーゼががんの細胞周期において果たす役割を、中間径フィラメントやヒストンのリン酸化の観点から、生化学・細胞生物学的方法を用い解析した。

C. 研究結果

(1)MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子を標的にした遺伝子診断

MALT 型 B リンパ腫に認められる t(11;18) (q21;q21) 転座の結果 API2-MALT1 キメラ遺伝子が形成されることをこれまでに明らかにした。RT-PCR 法にて胃 MALT リンパ腫を検討したところ、約 15 % の症例に API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することが明らかとなったが、これら API2-MALT1 陽性症例はすべて、抗生物質によるピロリ菌除菌療法に反応性を示さず、腫瘍退縮が認められなかった。

(2)API2-MALT1 キメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立

Eμ-SV ベクターに組み込んだ API2-MALT1 キメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを樹立し、約 2 年間の観察した所、75 匹中 4 匹にリンパ腫の発症がみられ、API2-MALT1 遺伝子が腫瘍発生に関わっている可能性が高いことが示唆された。腫瘍の発症のみられないマウスも観察したところ、脾臓において明らかな B 細胞領域の過形成が観察された。

(3)びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の疾患多様性の解析

びまん性大細胞型 B リンパ腫 (DLBCL) 70 症例の検索により、CD5 陽性群は CD5 陰性群に比較し予後がわるいことを以前報告した。今回大規模研究により、109 例の CD5 陽性 DLBCL と 384 例の CD5 陰性 DLBCL とを比較検討したところ、CD5 陽性 DLBCL は有意に予後が悪く、節外病変も多いことを明らかにした。

(4)ヒト肺がん治療薬に対する感受性予測法の開発

20 種類のヒト肺がん細胞株のそれぞれについて、9 種類の抗がん剤に対する IC₅₀ 値をもとめ、合計 180 組のデータを採取した。得られた IC₅₀ 値は、それぞれ CDDP, 0.13-40.2 μM; CBDCA, 1.84-430 μM; VP16, 0.14- >256 μM; SN-38, 0.68- >256 nM; GEM, 0.002- >64 μM; VNR, 0.11- >256 nM; TXL, 0.25- >256 nM; TXT, 0.07- >256 nM; SM-5887, 0.01-8.99 μM の範囲に分布していた。また、これら 20 株のヒト肺がん細胞株を用い、9,238 遺伝子を対象とし網羅的遺伝子発現解析を進め、すべてのデータ採取を終了した。現在、これらの実験によって得られたデータについてバイオインフォマティクス解析を行い、感受性予測に有用な遺伝子の抽出を進めつつある。

(5)M 期チェックポイント異常と微小管作用性抗がん剤感受性との関連性の検討

ヒト肺がん細胞株 10 株において、M 期チェックポイント異常は 4 株 (40%) に検出され、ヒト肺がんの治療にしばしばもちいられる TXL, TXT, VNR などの抗がん剤や、Nocodazole などの微小管作用性薬剤によるアポトーシス誘導への抵抗性との関連性を検討した。その結果、M 期チェックポイントに異常を持つ肺がん細胞株は、微小管の重合阻害能を持つ VNR や Nocodazole 及び、微小管の脱重合阻害を促す TXL や TXT のいずれに対しても、顕著にアポトーシス誘導への抵抗性を示した。さらに、微小管作用

性薬剤によるアポトーシス誘導には、Caspase に非依存性の経路が主として関与していることを示唆する結果を得た。なお、これらの肺がん細胞株パネルにおいて、M 期チェックポイント異常の存在は、DNA 作用性薬剤である CDDP によるアポトーシス誘導には全く関連性を示さず、微小管作用性抗がん剤の作用に特異的に見られる現象であることも明らかとなった。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

LAP (leucine-rich repeats and PDZ) 蛋白質ファミリーは細胞極性形成に関与していることが最近報告されており、ショウジョウバエの Scribble は、がん抑制機能をもつことが知られている。がん遺伝子産物である c-erbB-2 レセプターと結合する分子として同定された ERBIN は、c-erbB-2 レセプターを basolateral membrane (側基底面) に局在化させる機能をもつ。本研究では、細胞極性形成機構の解明のための手がかりとして、ERBIN と結合する蛋白質の探索を開始した。その結果、ERBIN の PDZ ドメインと結合する蛋白質として、p120 カテニン・サブファミリーに属し、アルマジロ蛋白質である p0071 蛋白質を同定した。MDCK 細胞において ERBIN は p0071 と共に細胞間接着部位に存在した。さらに、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーのドミナントアクティブ型を発現させると、ERBIN が細胞間接着部位に濃縮することを世界に先駆けて報告した。

(7) セプチン MSF-A の性状と機能の解析

特異抗体を作成して種々の培養細胞における MSF ファミリー (Sept 9) (MSF-A, MSF, MSF-B) の発現を検討したところ、ヒト乳がん細胞 HMEC には MSF-A のみが発現していた。この細胞における細胞内局在を検討したところ、間期において微小管に沿った局在が、また分裂期には紡錘体・分裂溝への濃縮が観察された。生化学的解析により MSF

の GTP 水解領域を含む中心領域が微小管と直接結合することが示された。また、コルセミドで微小管構築を崩壊させると MSF-A の繊維状構造も観察されなかった。RNAi で HMEC 細胞中の MSF-A の発現量を減少させると、細胞質分裂の障害が認められた。これらの結果により、MSF が微小管の機能や細胞質分裂に関与することが示唆された。

(8) Aurora キナーゼの機能解析

Aurora-B は細胞周期において染色体の分離や細胞質分裂の進行に重要な役割を果たしているキナーゼと考えられている。我々は III 型中間径フィラメント (IF) タンパク質であるビメンチン、デスミンと GFAP が *in vitro* において Aurora-B によりリン酸化され、フィラメント形成能を失うことを見出した。これらの IF 蛋白質における Aurora-B によるリン酸化部位を生化学的に同定した。これらのリン酸化部位には Rho-キナーゼなどと共通のリン酸化部位が存在した。また、我々はビメンチンの 72 番目のセリンとデスミンの 59 番目のセリンが *in vitro* における Aurora-B 特異的リン酸化部位であることを示した。更に、両リン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作成し免疫染色を行ったところ、細胞質分裂時の分裂溝特異的な染色が観察された。さらに Aurora-B、Rho-キナーゼまたは両キナーゼによるリン酸化部位をアラニンまたはグリシンに置換したデスミン変異体を作成し細胞内に導入したところ、細胞質分裂時の娘細胞間にフィラメントが完全に分離分配できないフィラメントのブリッジ様構造が観察された。

D. 考察

(1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子を標的にした遺伝子診断

胃 MALT リンパ腫の約 15% をしめる API2-MALT1 陽性症例はすべて、抗生物質に

よる治療に反応しなかった。即ち、キメラ遺伝子の発現の有無は、治療の良い指針となることが示された。

(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立

トランスジェニックマウスの観察から MALT リンパ腫の発症における API2-MALT1 の役割が示唆された。API2 と MALT1 の欠失変異体を用いた蛋白の安定性に関する実験より、API2-MALT1 キメラ蛋白から失われる領域が、蛋白不安定性に関与することを以前明らかとしており、これらの実験成績も考慮し、腫瘍発生のメカニズムを研究して行きたい。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の疾患多様性の解析

多施設大規模研究により CD5 陽性 DLBCL が CD5 陰性 DLBCL に比較し、予後が悪いことが確認された。また、病態も明らかに異なることも示された。CGH 法による染色体解析により、CD5 陽性と陰性の各々の群に特異的な染色体遺伝子の異常を観察しており、今後これら欠失又は増幅している遺伝子をアレイ CGH 法を開発することにより同定し、CD5 陽性 DLBCL の疾患単位としての分子基盤を確立したい。

(4) ヒト肺がん治療薬に対する感受性予測法の開発

ヒト肺がんは依然として代表的な難治がんであり、その抗がん剤治療は決して十分な効果を得られていない。しかしながら、近年開発された抗がん剤においてはある程度の奏功率が得られている。したがって、個々の症例において感受性を示す抗がん剤が個別的に事前に選択可能であれば、不要な副作用を回避しつつ十分な治療効果を得られる可能性があり、現在遂行中のバイオインフォマティクス解析により、本目的に適した遺伝子の抽出を試みたい。

(5) M 期チェックポイント異常と微小管作用

性抗がん剤感受性との関連性の検討

これまでに、ヒト肺がんでは高頻度に M 期チェックポイントの異常が認められることを報告してきた。今後は、M 期チェックポイント異常の分子機序解明と、微小管作用性抗がん剤に対する感受性回復法の開発を目指し、研究を展開したい。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

LAP ファミリー蛋白質群の一員である ERBIN が p0071 との相互作用を介して、細胞間接着接着に関与していることを見出した。この結果は、LAP 蛋白質は、細胞間接着の制御を通して、細胞極性に影響を与えていることを示唆した。また、がん細胞で、ERBIN による細胞間接着制御がどのような異常をきたしているかが、今後の検討課題である。

(7) セプチン MSF-A の性状と機能の解析

ある種の哺乳動物セプチンは細胞内でアクチン線維とよく一致した局在を示し、細胞質分裂の際には分裂溝近傍に集積することから細胞質分裂における役割が示唆されている。本研究では、乳腺細胞において MSF-A が微小管と相互作用することと、その機能阻害が細胞質分裂異常を引き起こすことを示した。臨床的には、MSF は急性骨髄性白血病遺伝子の転座に関連するとの報告がある一方、乳がんや子宮がんでは遺伝子欠失が報告されている。これらの知見は MSF ががん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として機能するという一見矛盾する可能性を提示しており、機能解析によりこの謎を明らかにして行きたい。

(8) Aurora キナーゼの機能解析

これまでに我々は細胞質分裂期に分裂溝で特異的に活性化され、IF をリン酸化する分裂溝キナーゼとして、Rho キナーゼを同定していた。本研究では、ピメンチン、GFAP、デスミンを用いて、Aurora-B キナーゼがもう一つの分裂溝キナーゼであることを明ら

かにした。Aurora-B キナーゼは *in vitro* においてこれらの中間径フィラメント (IF) 構成蛋白質をリン酸化するが、これらのリン酸化部位は細胞内において分裂後期の分裂溝で特異的にリン酸化されており、Aurora-B キナーゼは分裂溝キナーゼの特徴を有していた。次に、これらのリン酸化部位に変異を導入することによって、Aurora-B キナーゼが分裂溝における IF の局所的な断裂に重要であることを示した。さらに、Aurora-B キナーゼと Rho キナーゼのリン酸化部位に変異を導入することによって、これらのキナーゼがお互いに協調的に働いていることも明らかとなった。

E. 結論

(1) 胃 MALT リンパ腫では、約 15% の症例に API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することを明らかにし、臨床病態と比較検討したところ、API2-MALT1 陽性胃 MALT リンパ腫症例はすべて、抗生物質による治療に反応しないことが明らかとなった。

(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子導入トランスジェニックマウスの観察により、キメラ遺伝子には腫瘍化能があることが示唆された。

(3) CD5 陽性 DLBCL が CD5 陰性 DLBCL に比較し、予後が悪いことが多施設大規模研究により確認された。更に CGH 法での解析により、CD5 陽性 DLBCL と CD5 陰性 DLBCL では、異なる遺伝子異常が関与していることを示唆する結果を得た。

(4) 各々の症例に個別的に最適な抗がん剤の選択を可能とする予測法の開発を目指し、ヒト肺がん細胞株 20 株を用いた検討を行った。肺がん治療にもちいられる 9 種類の抗がん剤に対する IC_{50} 値の決定と、9,238 遺伝子を対象とした網羅的遺伝子発現解析を終了した。

(5) ヒト肺がん細胞株 10 株を用い、ヒト肺がんにおける高頻度の M 期チェックポイント

異常が、肺がん治療にもちいられる微小管作用性抗がん剤によるアポトーシス誘導に対する抵抗性と、特異的に関連していることを明らかとした。

(6) 細胞極性の制御に関与している分子である ERBIN が、p120 カテニン類似蛋白質である p0071 と相互作用し、細胞間接着の制御に関与していることを見出した。

(7) セプチン MSF-A の機能解析を試み、本蛋白質が細胞がん化とそれに伴う微小管異常に関連している可能性を示唆した。

(8) がん細胞で発現異常が報告されている Aurora キナーゼの機能解析を試みた。その結果、Aurora-B キナーゼは Rho キナーゼとともに、細胞質分裂時に協調的に中間径フィラメント蛋白質をリン酸化し、その構築制御を行っていることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Nomura, K., Yoshino, T., Nakamura, S., Akano, Y., Tagawa, H., Nishida, K., Seto, M., Nakamura, S., Ueda, R., Yamagishi, H. and Taniwaki, M.: Detection of t(11;18)(q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue sections by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 140: 49-54, 2003.
- 2) Yamaguchi, M., Seto, M., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Nakamura, N., Yoshino, T., Suzumiya, J., Murase, T., Miura, I., Akasaka, T., Tamaru, J., Suzuki, R., Kagami, Y., Hirano, M., Morishima, Y., Ueda, R., Shiku, H. and Nakamura, S.: De nove CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*, 99: 1-7, 2002.
- 3) Tagawa H., Miura I., Suzuki R., Suzuki H.,

- Hosokawa Y, Seto M: Molecular cytogenetic analysis of the breakpoint region at 6q21-22 in T-cell lymphoma/leukemia cell lines. *Genes Chrom. Cancer*, 34: 175-185, 2002.
- 4) Nakamura, T., Nakamura, S., Yokoi, T., Suzuki, H., Ohashi, K. and Seto M: Clinicopathologic comparison between the API2-MALT1 chimeric transcript-positive and -negative gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 677-684, 2002.
 - 5) Ito, M., Iida, S., Inagaki, H., Tsuboi, K., Komatsu, H., Yamaguchi, M., Nakamura, N., Suzuki, R., Seto, M., Nakamura, S., Morishima Y. and Ueda, R.: MUM1 / IRF4 expression is an unfavorable prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) / small lymphocytic lymphoma (SLL). *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 685-694, 2002.
 - 6) Ando, T., Suguro, M., Hanai, T., Kobayashi, T., Honda, H. and Seto, M: Fuzzy neural network applied to gene expression profiling for prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1207-1212, 2002.
 - 7) Konishi, H., Sugiyama, M., Mizuno, K., Saito, H., Yatabe, Y., Takahashi, To., Osada, H. and Takahashi Ta.: Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene*, in press.
 - 8) Kammouni, W., Ramkrishna, G., Sithanandam, G., Smith G. T., Fornwald, L. W., Masuda, A., Takahashi, Ta. and Anderson, L. M.: Increased K-ras protein and activity in mouse and human lung epithelial cells at confluence. *Cell Growth & Differentiation*. in press.
 - 9) Konishi, H., Nakagawa, T., Harano, T., Mizuno, K., Saito, H., Masuda, A., Matsuda, H., Osada, H., and Takahashi, Ta.: Identification of frequent G2 checkpoint impairment and a homozygous deletion of 14-3-3 ϵ at 17p13.3 in small cell lung cancers. *Cancer Res.*, 62: 271-276, 2002.
 - 10) He, Y., Kozaki, K., Karpanen, T., Koshikawa, K., Yla-Herttuala, S., Takahashi, Ta., Alitalo, K.: Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 785-787, 2002.
 - 11) Mizuno, K., Osada, H., Konishi, H., Tatematsu, Y., Fujii, Y., and Takahashi, Ta.: Aberrant hypermethylation of the *CHFR* prophase checkpoint gene in human lung cancers. *Oncogene*, 21: 2328-2333, 2002.
 - 10) Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Tezel, E., and Takahashi, Ta.: Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 ϵ in human lung cancers. *Oncogene*, 21: 2418-2424, 2002.
 - 12) Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Tezel, E., and Takahashi, Ta. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 σ in human lung cancers. *Oncogene* 21: 2418-2424, 2002.
 - 13) Koshikawa, K., Osada, H., Kozaki, K., Konishi, H., Masuda, A., Tatematsu, Y., Nakao, A., and Takahashi, Ta.: Significant up-regulation of a novel gene, *CLCPI*, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers *in vivo*. *Oncogene*, 21: 2822-2828, 2002.
 - 14) Yatabe, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta.: Decreased expression of 14-3-3 ϵ in neuroendocrine tumors is independent of origin and malignant potential. *Oncogene*, 21: 8310-8319, 2002.
 - 15) Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta.: TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 26: 767-773, 2002.

- 16) Hamajima, N., Ito, H., Matsuo, K., Saito, T., Tajima, K., Ando, M., Yoshida, K., and Takahashi, Ta.: Positive association between smoking habits and dopamine receptor D2 TaqI A polymorphism in Japanese males. *J. Epidemiol.* 12: 297-304, 2002.
- 17) Hida, T., Kozaki, K., Ito, H., Miyaishi, O., Tatematsu, Y., Suzuki, M., Seito, T., Matsuo, K., Sugiura, T., Ogawa, M., Takahashi, To., and Takahashi, Ta.: Significant growth inhibition of human lung cancer cells both *in vitro* and *in vivo* by the combined use of a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents. *Clin. Cancer Res.*, 8: 2443-2447, 2002.
- 18) Martinez, J. M., Afshari, C. A., Bushel, P. R., Masuda, A., Takahashi, Ta., and Walker, N.: Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 69: 409-423, 2002.
- 19) Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, T., Tatsuka, M., Takahashi, M., Nagata, K. and Inagaki, M.: Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow : Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
- 20) Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K. and Inagaki, M.: Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem.*, in press.
- 21) Minoshima, Y., Kawashima T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W. S. Jr. Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. and Kitamura, T.: Aurora B phosphorylates MgcRacGAP and induces PhogAP activity during M phase: Identification of a RhoGAP indispensable for cytokinesis. *Dev. Cell* in press.
- 22) Nagata, K., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Siromizu, T., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T. J., Hotani, H. and Inagaki, M.: Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.* in press.
- 23) Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. and Inagaki, M.: Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes to Cells*, 7: 11-17, 2002.
- 24) Goto, H., Tanabe K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y. and Inagaki, M.: Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes to Cells*, 7: 91-97, 2002.
- 25) Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K. and Inagaki, M.: Densin-180 interacts with δ -catenin/ neural plakophilin-related armadillo-repeat protein at synapses. *J. Biol. Chem.*, 277: 5345-5350, 2002.
- 26) Izawa, I., Nishizawa, M., Tomono, Y., Ohtakara, K., Takahashi, To. and Inagaki, M.: ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes to Cells*, 7: 475-485, 2002.
- 27) Ohtakara, K., Nishizawa, M., Izawa, I., Hata, Y., Matsushi, S., Taki, W., Inada, H., Takai, Y. and Inagaki, M.: Densin-180 directly interacts with MAGUIN-1 and forms a ternary complex with MAGUIN-1 and PSD-95 at synapses. *Genes to Cells*, 7: 1149-1160, 2002.
- 28) Morisaki, T., Hirota, T., Iida, S., Marumoto, T., Hara, T., Nishiyama, Y., Kawasaki, M., Hiraoka, T., Mimori, T., Araki, N., Izawa, I., Inagaki, M. and Saya, H.: WARTS tumor

suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis. FEBS Letters, 529: 319-324, 2002.

29) Chan, W., Kozma, R., Yasui, Y., Inagaki, M., Leung, T., Manser, E.d. and Lim, L.: Vimentin intermediate filament reorganization by Cdc42: Involvement of PAK and p70 S6 kinase. Eur. J. Cell Biol., 81: 1-10, 2002.

30) Driessens, M.H.E., Olivo, C., Nagata, K., Inagaki, M. and Collard, J.G.: B plexins activate Rho through PDZ-RhoGEF. FEBS Letters, 529: 168-172, 2002.

H. 知的所有権の取得状況
なし

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

がん関連遺伝子産物の血清学的解析

分担研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所 所長

研究要旨 神経膠腫の一部には Type III mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現が認められ、正常細胞には発現が確認されていないため cell targeting の標的分子として適していると考えられる。これまでに Type III mutant EGFR を特異的に認識する、3C10 monoclonal antibody (mAb) の作製に成功しているが、今回、本抗体の臨床応用の可能性を検討することを目的として、Type III mutant EGFR を強発現する細胞を皮下または脳内に移植し、腫瘍を形成したヌードマウスを対象として、^{99m}Tc 標識した 3C10 mAb の体内動態を検討した。その結果皮下移植モデルだけでなく、脳内移植モデルにおいても著明な集積が観察された。また、シンチグラフィーにおいても、脳内移植腫瘍に特異的に標識抗体の集積する画像が得られた。

A. 研究目的

Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子は、ヒト第 7 染色体上にあり、いくつかの癌腫で増幅、過剰発現が認められる。神経膠芽腫では、約 40 から 60% で過剰発現が認められると報告されている。このような増幅とともに、EGFR 遺伝子の再配列による 3 種類に分類される欠失変異の発現が認められ、その 90% が Type III (EGFRvIII) と分類される変異で、801 塩基の遺伝子の欠失に伴ってドメインの一部が欠失し、glycine に置き換わるという特徴的な構造をしている。

EGFRvIII は、神経膠芽腫の約 20% で発現が認められ、さらに、肺癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌でも発現が報告されている。その一方、正常細胞では発現が認められていないため、腫瘍特異的な分子標的療法のよいターゲットとなりえる。

これまでに、EGFRvIII を特異的に認識す

る 3C10 monoclonal antibody (mAb) を作製し、さらにこの抗体の臨床応用を目指して組み換え型抗体として単鎖抗体の作製に成功している。本年度では、whole 抗体としての臨床応用の可能性を検討するため、EGFRvIII を発現する腫瘍を移植したヌードマウスを用いて、^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の体内動態を調べた。

B. 研究方法

1) 標的細胞における EGFRvIII の発現と 3C10 mAb の反応性の検討

ヒト神経膠腫細胞株で、wild type EGFR を発現している U87MG、および U87MG に EGFRvIII の cDNA を導入した U87MG-ΔEGFR に対して、3C10 mAb、続いて FITC 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ、Flow cytometry で評価した。コントロールとして腎癌の細胞表面抗原と反応する RCS-1 mAb を用いた。

2) 標的細胞の腫瘍形成と生体内での

EGFRvIII 発現の検討

U87MG.ΔEGFR および U87MG をヌードマウスの右大脳半球に移植し、それぞれ 2 週後、6 週後に腫瘍の大きさと EGFRvIII 発現を検討した。組織は、10%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、HE 染色を行って観察した。また、凍結切片を用いた免疫染色も行って観察した。

3) ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の標的細胞に対する反応性の検討

3C10 および RCS-1 mAb に ^{99m}Tc を標識し、標的細胞との反応性を調べた。標識した抗体を標的細胞 (2×10^6 cell) と反応させ、上清と細胞に分離し、それぞれの放射線量を測定した。

4) ヌードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルでの 3C10 mAb の体内動態の検討

U87MG.ΔEGFR または U87MG を用いて、皮下または脳内に腫瘍を形成させたヌードマウスに、 0.37 MBq ($1 \mu\text{g}$) の ^{99m}Tc 標識 3C10 または RCS-1 mAb を静脈内投与し、24 時間後に腫瘍および各臓器の放射線量を測定した。

5) ヌードマウス脳内移植腫瘍の ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb による画像化の検討

ヌードマウス脳内移植モデルに、 ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb を 11.1 MBq ずつ静脈内投与し、3、6、24 時間後のシンチグラフィーを撮像した。

C. 研究結果

1) 標的細胞における EGFRvIII の発現と 3C10 mAb の反応性

3C10 mAb は、U87MG.ΔEGFR に対してのみ反応性が認められ、U87MG には反応しなかった。3C10 mAb の EGFRvIII に対する反応性と、U87MG.ΔEGFR における EGFRvIII 抗原の発現が確認できた。

2) 標的細胞の腫瘍形成と生体内での EGFRvIII 発現

U87MG.ΔEGFR の増殖は極めて早く、

U87MG が同等の大きさの腫瘍を形成するのに 3 倍の日数を要した (図 2)。また、3C10 mAb による免疫染色で、U87MG.ΔEGFR の腫瘍での EGFRvIII 発現を確認した。

3) ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の標的細胞に対する反応性

U87MG.ΔEGFR に対しては、 ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の 41% が細胞に結合したが、RCS-1 mAb では、1% 未満しか結合が認められなかった。U87MG に対しては、3C10 mAb、RCS-1 mAb とともに細胞への結合は 1% 未満だった。

4) ヌードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルでの 3C10 mAb の体内動態

各臓器 1g あたりに集積した投与放射線量の比較により、投与抗体の体内分布および腫瘍への集積性を検討した。また、腫瘍:血液比および正常組織:血液比を算出し、抗体の反応の特異性を検討した。

U87MG.ΔEGFR 皮下移植モデルに 3C10 mAb を投与した場合では、腫瘍:血液比は、 10.30 ± 0.90 と高い値を示した。他の正常組織では、組織:血液比が 1 を超える組織はなく、また、U87MG 皮下移植モデルに 3C10 mAb を投与した場合は 0.50 ± 0.26 、U87MG.ΔEGFR 皮下移植モデルに RCS-1 mAb を投与した場合は 0.97 ± 0.01 と、腫瘍:血液比は 1 未満であった。

U87MG.ΔEGFR 脳内移植モデルに 3C10 mAb を投与した場合、正常脳における組織:血液比は 0.06 ± 0.02 と非常に低い値であったが、腫瘍:血液比は 4.01 ± 0.84 を示し、腫瘍への明らかな集積を示した。どのグループでも正常組織:血液比は 1 未満であった。また、U87MG 脳内移植モデルに 3C10 mAb を投与した場合は 0.43 ± 0.13 、U87MG.ΔEGFR 脳内移植モデルに RCS-1 mAb を投与した場合は 0.72 ± 0.32 と、腫瘍:血液比は、いずれも 1 未満で、腫瘍の局在に関わらず、3C10 mAb の標的細胞への特異的な集積が観察され

た。

5) ノードマウス脳内移植腫瘍の ^{99m}Tc 標識 3C10 mAbによる画像化

U87MG- ΔEGFR 脳内移植モデルでは、3 時間後より脳内移植片への集積が認められ、時間とともに腫瘍への集積が増強した。24 時間後では、他臓器への集積が減少し、腫瘍への集積が際立つ画像が得られた。

D. 考察

EGFRvIII は、神経膠芽腫をはじめいくつかの癌腫に発現し、正常細胞には発現が認められないため、分子標的療法のよいターゲットとして期待されている。3C10 mAb は、EGFRvIII を発現する細胞を皮下あるいは脳内に移植した腫瘍に対し、腫瘍:血液比でおよそ 10 あるいは 4 と強い集積性が観察され、脳内にあっては、腫瘍:正常脳組織の比でおよそ 67 と極めて強い腫瘍特異的な集積が観察された。

他の研究グループでも、EGFRvIII を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、同様にマウスでの体内動態を検討しているが、何れも腫瘍:血液比で 1 前後の値であり、腫瘍への集積性の点で問題があると考えられた。しかし、既にこれらの抗体を用いた臨床研究を始めており、治療効果を示す報告もある。3C10 mAb は、他の抗体と比較して、明らかに優れた腫瘍への集積を示し、腫瘍の画像化も可能であった。これらの結果から、3C10 mAb の臨床応用が期待される。

E. 結論

ノードマウス皮下移植モデルおよび脳内移植モデルにおいて、 ^{99m}Tc 標識 3C10 mAb の生体内での体内動態を検討したが、U87MG- ΔEGFR 移植腫瘍への特異的な集積が認められた。また、シンチグラフィーにおいて、腫瘍への集積が認められる画像を得ることができた。3C10 mAb のキメラ抗体化による、神経膠芽腫の診断、治療への応用が期待さ

れる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yazaki, M., Takahashi, T., Mizutani, K., Ito, Y., Wakiguchi, H., Inoue, M., Kawa, K., Kato, K., Kato, T., Saito, H., Togari, H.: Generation of HLA-Cw specific cytotoxic T-lymphocytes from cord blood used for cord blood stem cell transplantation. *Brit. J. Haematol.*, 117: 893-898, 2002.
- 2) Akatsuka, Y., Goldberg, T.A., Kondo, E., Martin, E.G., Obata, Y., Morishima, Y., Takahashi, T. and Hansen, J.A.: Efficient cloning and expression of HLA class I cDNA in human B-lymphoblastoid cell lines. *Tissue Antigens*, 59: 502-511, 2002.
- 3) Kondo, E., Topp, M.S., Kiem, H-P., Obata, Y., Morishima, Y., Kuzushima, K., Tanimoto, M., Harada, M., Takahashi, T. and Akatsuka, Y.: Efficient generation of antigen- specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40- activated B cells. *J. Immunol.*, 169: 2164-2171, 2002.
- 4) Akatsuka, Y., Kondo, E., Taji, H., Morishima, Y., Yazaki, M., Obata, Y., Koder, Y., Riddell, S.R. and Takahashi, T.: Targeted cloning of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens restricted by HLA class I molecules of interest. *Transplantation*, 74: 1773-1780, 2002.
- 5) Miyazaki, M., Akatsuka, Y., Nishida, T., Fujii, N., Hiraki, A., Ikeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Morishima, Y., Sato, S., Ueda, R., and Takahashi, T.: Potential

limitations in using minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells for targeting solid tumor cells, Clin. Immunol., in press.

- 6) Akatsuka, Y., Nishida, T., Kondo, E., Miyazaki, M., Taji, H., Iida, H., Tsujimura, K., Yazaki, M., Naoe, T., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K., and Takahashi, T.: Identification a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigen. J. Exp. Med., in press.

2. 学会発表

- 1) 高須俊太郎、吉川和宏、村松秀樹、林毅志、河田陽一、中原紀元、若林俊彦、水野正明、宮石 理、樋口徹也、織内昇、遠藤啓吾、上田龍三、佐賀信介、吉田 純、高橋利忠 : ^{99m}Tc を標識した Type III mutant EGFR を特異的に認識する 3C10 抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの画像化。第 6 回基盤的癌免疫研究会総会 2002. 7. 17 久留米
- 2) 高須俊太郎、吉川和宏、中原紀元、若林 俊彦、水野正明、宮石理、樋口徹也、織内昇、遠藤啓吾、上田龍三、佐賀信介、吉田純、高橋利忠 : type III mutant EGFR を特異的に認識する ^{99m}Tc 標識 3C10 モノクロナル抗体によるヌードマウス脳内移植モデルでの画像診断。第 61 回日本癌学会総会 2002. 10. 1 東京
- 3) 高須俊太郎、吉川和宏、中屋敷典久、中原紀元、藤井正純、若林俊彦、水野正明、宮石理、織内昇、樋口徹也、遠藤啓吾、佐賀信介、高橋利忠、吉田純 : Type III mutant EGFR を特異的に認識する 3C10 抗体によるヌードマウ

ス脳内移植モデルでの targeting。第 61 回日本脳神経外科学会総会 2003. 10. 3 松本

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

造血器腫瘍発症機構の解析とその臨床応用の研究

分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部長

研究要旨：粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、胃 MALT リンパ腫においては、キメラ遺伝子の存在がピロリ菌除去療法に対する反応性を反映することを明らかにした。また、API2, MALT1 の発現ベクターを用いて、API2 と MALT1 はともに API2-MALT1 キメラ蛋白に比較し、きわめて不安定な蛋白であることを明らかにした。さらに、それぞれの欠失変異体を作成し、API2 の C 端と MALT1 の N 端側のキメラ蛋白から除去される部分に蛋白不安定化を担う責任領域が存在することを明らかにした。また、API2-MALT1 トランスジェニックマウスの経過観察により、コントロールに比較し、明らかなリンパ腫発生を観察したので、API2-MALT1 遺伝子の腫瘍化能が明らかとなった。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) は BCL6 遺伝子が主要な転座関連遺伝子であるが、BCL6 転座では特徴的な疾患単位を規定することはできないことを明らかにしていたが、細胞表面マーカーである CD5 陽性の DLBCL は予後の悪い疾患単位を形成することを明らかにした。

A. 研究目的

1. 粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する特徴的染色体遺伝子 API2-MALT1 によるキメラ mRNA をマーカーに症例を検討し、その病態を解析する。
また、
2. API2, MALT1, API2-MALT1 キメラを用いて発現ベクターを構築し、蛋白の生物学的性状を調べる。
3. API2-MALT1 トランスジェニックマウスを作成し、経過観察することにより、API2-MALT1 遺伝子の腫瘍化能を検討する。
4. 複数の疾患単位からなると考えられるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫

(DLBCL) を免疫組織学的、分子生物学的手法で解析し、臨床的に意義のある疾患単位を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 の関与：
MALT リンパ腫に特徴的な t(11;18) 染色体転座の転座切断点の解析により明らかにした API2-MALT1 キメラ mRNA を検出する手法により胃 MALT リンパ腫症例を検討し、臨床病態と比較検討する。
- 2) MALT リンパ腫発症に関与する遺伝子 API2, MALT1, API2-MALT1 キメラの蛋白の

解析：

各遺伝子 cDNA を発現ベクターに組み込み、蛋白の安定性について検討し、その生物学的性状を明らかにする。また、欠失変異体を作成し、安定化にかかわる領域を詳細に検討する。

3) API2-MALT1 トランスジェニックマウスの解析：

API2-MALT1 キメラ cDNA を Eμ-SV 発現ベクターに組み込み、トランスジェニックマウスを作成し、BALB/c マウスと掛け合わせたマウスを長期間観察し、その腫瘍化能を検討する。

4) DLBCL の疾患多様性の解析：

DLBCL について BCL6 転座の有無と臨床病態とは相関しないことが明らかとなったので、分化マーカーである CD5 抗原の発現に着目し、臨床病態との相関を検討した。

C. 研究結果

1) MALT 型 B リンパ腫に認められる t(11;18)(q21;q21) はアポトーシス阻害蛋白群の一員である API2 と新規遺伝子 MALT1 がキメラ遺伝子を形成することをこれまでに明らかにした。RT-PCR 法にて胃 MALT リンパ腫を検討したところ、約 15% の症例に API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することが明らかとなった。臨床病態と比較検討したところ、API2-MALT1 陽性症例はすべて、抗生物質による治療に反応しないものであった。また、ピロリ菌陰性症例の MALT 症例でも、API2-MALT1 キメラ遺伝子が 3 例中 2 例に検出された。

2) MALT リンパ腫に関与する API2, MALT1, API2-MALT1 の発現ベクターを構築し、その蛋白レベルでの解析をおこない、API2,

MALT1 とともにその半減期は短い、API2-MALT1 では安定した強い発現がみとめられることを明らかにし、さらに、API2, MALT1 とともに proteasome inhibitor である MG132 を加えたところ、安定した発現が認められたため、発現制御に proteasome 系が関与することを明らかにしてきた。今年度は、欠失変異体を作成し、詳細に解析したところ、API2 の C 端と MALT1 の N 端側のキメラ蛋白形成により失われる部分に、蛋白安定化に関与する領域が存在することが明らかとなった。すなわち、キメラ蛋白を形成することにより、proteasome system による発現制御機構から回避することで、安定発現し、腫瘍化に関与する可能性が示唆された。

3) Eμ-SV ベクターにより作成した API2-MALT1 トランスジェニックマウスは 7 匹の Founder が得られた。トランスジーンが子孫に伝わったマウス 4 系統のうちの 1 系統のみに明らかなキメラ mRNA の発現を認めた。そこで、そのマウスを掛け合わせるにより、API2-MALT1 陽性マウス 75 匹、陰性マウス 72 匹を作成し、1 年から 2 年の間観察した、現在も観察中であるが、これまでに陽性マウスのうち 6 匹にリンパ腫が発生し、陰性マウスからは 700 日の時点でリンパ腫が発生し、API2-MALT1 遺伝子の腫瘍化能が強く示唆された。そこで、途中経過も観察したところ、秘蔵において明らかな B 細胞領域の家計清華観察された。

4) びまん性大細胞型 B リンパ腫について、70 症例の検索により、CD5 陽性 DLBCL は、CD5 陰性 DLBCL に比較し予後がわるいことを明らかにしていたが、大規模研究により、109 例の CD5 陽性 DLBCL を 384 例の CD5 陰性 DLBCL と比較検討

したところ、CD5 陽性 DLBCL は有意に予後が悪く、節外病変も多いことが明らかとなった。

D. 考察

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

RT-PCR 法にて胃 MALT リンパ腫を検討したところ、約 15% の症例に API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することが明らかとなったが、API2-MALT1 陽性症例はすべて、抗生物質による治療に反応しないものであったため、治療の良い指針として用いることができることが明らかとなったことは、臨床的に重要な意義がある。ピロリ菌陰性症例の MALT 症例でも、API2-MALT1 キメラ遺伝子が検出されるため、API2-MALT1 キメラ遺伝子の形成に、ピロリ菌による慢性炎症が必ずしも関与しているとはいえないことが明らかとなった。トランスジェニックマウスの観察から MALT リンパ腫発症における API2-MALT1 の役割が明らかになった。今後、腫瘍化に至る経過を詳細に観察する必要がある。

2) API2-MALT1 蛋白の安定性と腫瘍化能：

API2 と MALT1 の欠失変異体を用いた蛋白の不安定性における実験より、API2-MALT1 キメラ蛋白から失われる領域が、蛋白不安定性に関与することが明らかとなった。最近、MALT リンパ腫のごく一部に t(14;18) 転座があることが示され、この遺伝子異常は Ig-MALT1 の転座であり、キメラ型蛋白ではない MALT1 の制御異常が本態であることが報告された。このことは、MALT リンパ腫形成には MALT1 遺伝子が重要な働きを担っていることを示唆する。今後、MALT1 蛋白の制御を解析することで、リンパ腫発生の機序を明らかにす

る必要がある。

3) DLBCL の疾患単位について：

これまで CD5 陽性 DLBCL が CD5 陰性 DLBCL に比較し、予後が悪いことが示唆されていたが、多施設大規模研究により確認された。また、病態も明らかに異なることも示された。我々がこれまでに明らかにしていた CD10 陽性の DLBCL については、種々のマーカーから CD5 陽性 DLBCL とは異なり、また、一般の DLBCL とも異なることを報告していた。しかし、予後については明らかな差は認められないことも報告していたが、他グループの遺伝子発現解析により、CD10 陽性 DLBCL は予後が良いことが報告された。その後の多数症例の解析では、予後の良さが不明確となったことが報告された。今後、CD5 陽性 DLBCL の疾患単位としての分子基盤を確立する必要がある。CD10 陽性 DLBCL も同様である。その第一歩として CGH 法により検討しつつあるが、CD5 陽性群と陰性群の間で明らかに異なる遺伝子異常が見出されつつあり、今後の詳細な検討を必要とする。

E. 結論

1) 粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、RT-PCR 法にて胃 MALT リンパ腫を検討したところ、約 15% の症例に API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することを明らかにした。

2) 臨床病態と比較検討したところ、API2-MALT1 陽性胃 MALT リンパ腫症例はすべて、抗生物質による治療に反応しないものであった。

3) ピロリ菌陰性症例の MALT 症例でも、