

20030138

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
(H15-がん-001)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広橋 説雄

平成16(2004)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 _____ 14
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 _____ 21
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 _____ 26
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 _____ 29
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 _____ 35
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. がん抑制遺伝子 p53 によるがん抑制機序の解明とその応用によるがん治療法の開発
荒川 博文 (国立がんセンター研究所生物物理部) _____ 47
8. がん関連遺伝子異常の診断への応用 _____ 51
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)
9. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究 _____ 55
今井 浩三 (札幌医科大学内科学第一講座)
10. 膵がんの臨床病理学的特性の基盤となる分子・細胞機構 _____ 59
坂元 亨宇 (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 _____ 63

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

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：

高密度 BAC DNA アレイ CGH 法でがんにおけるゲノム構造異常を網羅的に解析し、多数の共通欠失領域を同定した。昨年度までに腫瘍原性抑制活性を指標として同定したがん抑制遺伝子 TSLC1 が、実際に肺がんや食道がんで DNA メチル化を受け不活化されることがわかった。TSLC1 産物が、ショウジョウバエがん抑制蛋白のヒト相同分子 MPP3 と結合し細胞極性の決定に関わることを見出した。アクチン結合蛋白質アクチニン-4 が、大腸がん細胞の運動能を亢進させ、がんの浸潤・転移に寄与する可能性を示した。p53 標的遺伝子を同定し、その機能の解明を試みた。膵がんにおいて DNA メチル化によってサイレンシングをうける複数の遺伝子を同定した。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現亢進が、諸臓器における発がん過程に早期から寄与し、CpG アイランドメチル化形質と有意に関連して症例の予後不良因子となることを示した。ヒトの諸臓器由来の非がん上皮細胞を不死化し、多段階発がんの分子機構の解析に適した ex vivo モデル系を構築した。散发性と遺伝性のマイクロサテライト不安定性 (MSI)陽性大腸がんで、BRAF 遺伝子変異の関わりが異なることを示した。尿や組織検体に適用できる高効率遺伝子診断システムを開発した。

分担研究者

- | | | | |
|----------|-------------------------------------|-----------|-----------------------------|
| 1. 広橋 説雄 | 国立がんセンター
研究所 所長 | 7. 荒川 博文 | 国立がんセンター
研究所 部長 |
| 2. 牛島 俊和 | 国立がんセンター
研究所 部長 | 8. 菅野 康吉 | 栃木県立がんセン
ター研究所
副主幹兼医長 |
| 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) | 9. 今井 浩三 | 札幌医科大学
教授 |
| 4. 清野 透 | 国立がんセンター
研究所 部長 | 10. 坂元 亨宇 | 慶應義塾大学
教授 |
| 5. 細田 文恵 | 国立がんセンター
研究所室長 | | |
| 6. 村上 善則 | 国立がんセンター | | |

A. 研究目的

がん遺伝子・がん抑制遺伝子などの同定によりがん化のメカニズムの解明は徐々に進んでいるが、その本態は未だ十分には理解されていない。加えて、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る。従って、がんの病態の多様性を反映する病理組織像と機能分子の発現異常・遺伝子異常の相関を、包括的に明らかにすることが重要である。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、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。具体的には、以下の各項の研究を進める。

1. ゲノム構造異常の網羅的解析

アレイ CGH (comparative genomic hybridization)法によりゲノム構造異常を網羅的に解析し、新規がん関連遺伝子の単離を目指す。

2. がん関連遺伝子の機能の解析

昨年度までに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。アクチン結合たんぱく質アクチニン-4 が、浸潤性増殖と転移の分子機構にいかに関わるかを明らかにする。p53 標的遺伝子の全単離と機能解析を試みる。

3. 発がんのエピジェネティクス

昨年度までに DNA メチル化の変化をゲノム網羅的に検索する手法として開発した methylation-sensitive-representational difference

analysis (MS-RDA)法を駆使し、難治がんである膵がんにおいて DNA メチル化によりサイレンシングされる遺伝子を同定する。膵がんの同所性移植モデルを構築し、膵がんの増殖・浸潤・転移に関与する分子を明らかにする。DNA メチルトランスフェラーゼの異常が、諸臓器の多段階発がん過程のいかなる段階に寄与し、DNA メチル化の変化やがんの臨床病理学的特性の決定に結びついているかの理解を進める。

4. 遺伝子解析の臨床応用

マイクロサテライト不安定性陽性大腸がん発生機構の理解を進め、発がん経路に即した診断基準の確立につなげる。がんの遺伝子診断の実用化に必要な遺伝子解析技術を開発し、臨床検体の解析を通じて遺伝子診断の有用性を示す。

B. 研究方法

1. ゲノム構造異常の網羅的解析

FISH マッピングされた BAC クロームから、800 個のがん関連遺伝子を含むがん 800 アレイと 4500 個の BAC クロームを配したゲノムワイド 4500 アレイを作成した。解析の対象とする胃がん・乳がん細胞を、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によって分離した。

2. がん関連遺伝子の機能の解析

原発性非小細胞肺癌と非がん肺組織において、TSLC1 遺伝子 CpG アイランドの DNA メチル化の状態を検討し、遺伝子発現を評価した。酵母 2 ハイブリッド法により TSLC1 結合蛋白質を解析した。アクチニン-4 蛋白質の発現量と局在を、がんならびに正常組織で解析した。アクチニ

ン-4 強制発現細胞において、超微形態・蛋白質の細胞内局在・運動能・転移能を解析した。p53 依存性の発現誘導を示す遺伝子群をマイクロアレイ法によって同定した。アポトーシス制御に関わる p53 標的遺伝子は、アデノウイルスベクターに組み込み抗腫瘍効果を評価した。諸臓器由来の上皮細胞などに、テロメラーゼの触媒サブユニット TERT・ヒトパピローマウイルス蛋白 E6・E7などを導入し不死化した。

3. 発がんのエピジェネティクス

膀胱がん細胞などにおいて MS-RDA 法を施行し、同定された遺伝子の DNA メチル化と発現が実際に相関するかどうかを確認した。遺伝子発現を欠く膀胱がん培養細胞を脱メチル化剤処理し、発現が回復することを確認した。膀胱がん組織を SCID マウスに同所性移植して臨床病態を模倣するモデルを作成し、マイクロアレイ法によって移植された腫瘍における網羅的遺伝子発現解析を行った。培養がん細胞を脱メチル化剤処理し、E-カドヘリン遺伝子の発現が回復したときの DNA メチル化の状態・ヒストン修飾の変化を解析した。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の蛋白発現を諸臓器のがんで免疫組織学的に検討し、多数の CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態・がんの臨床病理像・症例の予後との相関を検討した。

4. 遺伝子解析の臨床応用

多数の大腸がん臨床検体などにおいて、MSI 検索・k-ras・BRAF 遺伝子変異検索を行い、hMLH1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の状態を解析した。マルチアレーキャピ

ラリー電気泳動装置を用いた一本鎖 DNA 高次構造多型解析法 (SSCP) を開発し、膀胱がん組織および尿中のがん細胞から染色体欠失を検出する遺伝子診断法の有用性について検討した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、所属施設の倫理審査委員会などの承認を得て、患者のプライバシーを厳守し倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術で摘出した標本を診断と治療方針決定のために検索した後に、残余の試料を研究に使わせていただくことに関して、患者に説明の上文書で同意を得た。病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、残余の組織を研究に用いるので患者に不利益は及ばない。臨床情報のうち本研究に必要なものはあらかじめ診療録より調査しておき、解析は連結可能匿名化して行った。動物実験は、所属施設の動物倫理委員会などの承認を得て、所属施設における動物実験に関する指針などを遵守し、動物に対する十分な苦痛軽減措置を講じて実施した。

C. 研究結果

1. ゲノム構造異常の網羅的解析

がん 800 アレイにより、染色体 4q, 5q, 9p, 18q のヘミ欠失や 1q21, 8q, 17q21, 20 の増加など胃がんに通ずる異常が認められた反面、分化度によって異なる染色体領域に特徴的な構造異常が蓄積していた。浸潤性乳がんでは、1q, 8q, 17q, 19, 20q の増加と 8p, 11q22-qter, 16q, 17p の欠失が高頻度に見られ、染色体腕

単位の大きな変化が特徴であった。ゲノムワイド 4500 アレイを用いた解析により、従来法で検出し得なかった微小な共通欠失領域を同定し、がん抑制候補遺伝子を絞り込みつつある。

2. がん関連遺伝子の機能の解析

諸臓器のがんに高頻度に TSLC1 遺伝子プロモーターメチル化が認められ、非小細胞肺癌の腫瘍径の増大に伴って不活化の頻度が亢進した。細胞膜裏打ち蛋白質 MPP3 が、TSLC1 の PDZ 結合モチーフを介して TSLC1 と直接結合し、細胞膜に沿って共局在することを示した。アクチニン-4 の発現亢進は、大腸がんの特に浸潤先進部で亢進していた。大腸がん細胞株にアクチニン-4 の発現を誘導すると、周囲に突起が進展し、細胞の運動能が著しく亢進した。アクチニン-4 強制発現がん細胞を SCID マウスの盲腸間膜に注入すると、臨床症例の転移様式を模倣するように所属腸間膜リンパ節に高頻度に転移を来たした。p53 標的遺伝子として同定した p53RDL1 遺伝子は、p53 依存性アポトーシスを正と負に制御することがわかった。アポトーシス誘導活性優位な変異体として知られる p53-121F によって特異的に発現誘導される STAG1 遺伝子を同定した。p53AIP1 の *in vivo* における顕著な抗腫瘍効果を報告した。子宮頸部上皮細胞などを、E7・TERT などで高率に不死化し得た。hPSD95 が E6 によって不活化される新たながん抑制遺伝子産物である可能性を示した。

3. 発がんのエピジェネティクス

MS-RDA 法により膵がん細胞株で

DNA メチル化されていることが分かった遺伝子のうち、p53 の過剰発現により発現誘導される PRG2 遺伝子や ras のシグナル伝達に関与する RASGRF2 遺伝子をはじめとする 12 遺伝子は、膵がん手術材料でも実際にメチル化によりサイレンシングされていた。マウスへ同所性移植した膵がん組織における発現解析から、がんで共通に高発現している遺伝子・リンパ節高転移群と非転移群の間で発現に差がある遺伝子を同定した。CpG 部位メチル化状態伝達の忠実度を測定できる実験系を確立した。CDH1 遺伝子の発現が抑制されている複数の培養がん細胞を脱メチル化剤で処理したところ、発現回復の程度・DNA メチル化の状態・ヒストン修飾様式が多様であることが分かった。DNMT1 の蛋白発現亢進は、肝細胞がんの分化度や門脈侵襲の有無と有意に相関し、症例の予後不良因子となった。DNMT1 発現亢進は、EBウイルス感染を伴う低分化胃癌などに高頻度に認められ、CpG アイランドメチル化形質と有意に相関した。DNMT1 の蛋白発現亢進は、細胞増殖活性の亢進に先行して前がん段階にある尿路上皮に既に認められ、悪性度の高い結節状浸潤がんの前駆病変である広汎進展上皮内がんにおいて特に高頻度であった。

4. 遺伝子解析の臨床応用

MSI 陽性大腸がんにおいて高頻度に BRAF 遺伝子のホットスポット変異を認め、BRAF 遺伝子変異と hMLH1 遺伝子メチル化との有意な相関を認めた。157 例の遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC) を解析したところ、散发性 MSI 陽性大腸がんとは対照的に BRAF 遺伝子変異を

検出しなかった。新規に開発したマルチアレーキャピラリー電気泳動装置を用いた SSCP 法により、従来のスラブゲル電気泳動装置で 1000 分かかっていたモデル解析を 60 分以内に完了できるようになった。遺伝子診断による表在性膀胱がんの悪性度診断と尿検体からの再発の早期発見を目的として、平成 14 年 4 月から多施設共同研究を開始した。これまでに 9p,9q, 17p 染色体欠失が、再発時に尿中で検出されることが確認されている。

D. 考察

1. ゲノム構造異常の網羅的解析

がん 800 アレイを用いたアレイ CGH 解析で、胃がん・乳がんの特徴的なゲノム構造異常プロファイルを示し得た。ゲノム構造異常の側面から胃がんを分類し、胃がん発生過程の理解を進められる可能性がある。ゲノムワイド 4500 アレイで微小な構造異常領域を特定することで、新規のがん関連遺伝子同定しうると期待される。

2. がん関連遺伝子の機能の解析

TSLC1 の DNA メチル化による不活化が実際に多くの臓器がんで生じていることが明らかになった。TSLC1 の関わる細胞内伝達経路が、細胞接着を介して細胞骨格と細胞極性を制御する機能がわかってきた。アクチニン-4 の発現亢進は、がんの浸潤・転移予測のマーカーとなり、転移抑制治療薬の分子標的となる可能性がある。p53/AIP1 遺伝子の導入により顕著な抗腫瘍効果を示し得たように、遺伝子治療において効果的ながん増殖抑制作用を発揮させるために p53 依存性アポトーシス経路の実行分子

の導入が有効と考えられた。ヒトの諸臓器由来の不死化非がん上皮細胞は、多段階発がんの分子機構の解析に適した *ex vivo* モデル系を提供すると期待される。

3. 発がんのエピジェネティクス

膀胱がんで DNA メチル化によりサイレンシングされる遺伝子の中に、膀胱がんの発生・進展に関与し、診断・治療の標的として有用となる遺伝子が含まれる可能性がある。同所性移植モデルを用いることにより、難治がんである膀胱がんにおいて網羅的遺伝子発現解析を効率的に進められるようになった。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現亢進が、諸臓器における発がん過程において細胞増殖活性の亢進に先行して早期から寄与し、CpG アイランドメチル化形質と有意に関連して症例の予後不良因子となることがわかった。

4. 遺伝子解析の臨床応用

BRAF 遺伝子変異は、k-ras 遺伝子変異の頻度の低い MSI 陽性大腸発がん重要な寄与をなすと考えられた。散発性症例とは対照的に HNPCC では BRAF 遺伝子変異を認めず、HNPCC の除外診断などへの応用が可能と考えられる。本年度開発したキャピラリー電気泳動 SSCP 法を、臨床検査室での使用が可能なシステムとして普及・実用化することを目指している。

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。本年度は、がんにおけるゲノム構造異

常を網羅的に解析した。がん関連遺伝子 TSLC1・アクチニン-4・p53 標的遺伝子群などの機能を解明した。発がん過程での DNA メチル化異常の意義の理解を進めた。遺伝子異常の検出をがんの早期診断や病態診断として実用化することをめざしている。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の理解が進んだので、本研究の成果を基に新しいがんの標的治療などが実現することが充分期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T, Mori Y, Hayashi R, Takada M, Ino Y, Naishiro Y, Kondo T, Hirohashi S.
Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient Apc^{min/+} mice. *Cancer Res*, 63: 895-901, 2003.
- 2) Aoki S, Shimamura T, Shibata T, Nakanishi Y, Moriya Y, Sato Y, Kitajima M, Sakamoto M, Hirohashi S.
Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer*, 88: 726-732, 2003.
- 3) Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S.
Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Lett*, 192: 75-82, 2003.
- 4) Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S.
Increased protein

expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*, 105: 527-532, 2003.

5) Sekine S, Shibata T, Matsuno Y, Maeshima A, Ishii G, Sakamoto M, Hirohashi S.
 β -catenin mutations in pulmonary blastomas: association with morule formation. *J Pathol*, 200: 214-221, 2003.

6) 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*, 21: 659-667, 2003.

7) Tsuji H, Takasaki S, Sakamoto M, Irimura T, Hirohashi S.
Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion. *Glycobiology*, 13: 521-527, 2003.

8) Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S.
EBP50, a β -catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 38: 178-186, 2003.

9) Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*, 94: 575-581, 2003.

- 10) Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, Yamada T, Maeshima A, Asamura H, Hayabuchi N, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: Clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol*, 27: 937-951, 2003.
- 11) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized β -catenin. *Cancer Res*, 63: 4641-4647, 2003.
- 12) Sato H, Ino Y, Miura A, Abe Y, Sakai H, Ito K, Hirohashi S. Dysadherin: expression and clinical significance in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4407-4412, 2003.
- 13) Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics*, 3: 1758-1766, 2003.
- 14) Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, Shibata T, Kanai Y, Hirohashi S. β -catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cysts, but rare in ameloblastomas. *Am J Pathol*, 163: 1707-1712, 2003.
- 15) Nakagawa T, Kanai Y, Saito Y, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 170: 2463-2466, 2003.
- 16) Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol*, 164: 689-699, 2004.
- 17) Nam JS, Ino Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Exp Metas*, in press.
- 18) Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin deficient breast cancer. *Am J Pathol*, in press.
- 19) Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*, in press.
- 20) Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics*, in press.

- 21) Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*, in press.
- 22) Asada K, Miyamoto K, Fukutomi T, Tsuda H, Yagi Y, Wakazono K, Oishi S, Fukui H, Sugimura T, Ushijima T. Reduced expression of GNA11 and silencing of MCT1 in human breast cancers. *Oncology*, 64: 380-388, 2003.
- 23) Kaneda A, Takai D, Okochi E, Kaminishi M, Ushijima T. Methylation-sensitive-representational difference analysis and its application to cancer research. *Ann N Y Acad Sci*, 983: 131-141, 2003.
- 24) Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, 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.
- 25) Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res*, 13: 868-874, 2003.
- 26) Koizume S, Sekiya T, Shiraishi M. 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, 2003.
- 27) Koizume S, Tachibana K, Shiraishi M. Treatment of tumor cells with histone deacetylase inhibitors results in altered recruitment of methyl-CpG binding proteins to a methylated CpG island. *Biol Chem*, 384: 787-790, 2003.
- 28) Shiraishi M. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to detect methylation changes in DNA. *Methods Mol Biol*, in press.
- 29) Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, Terry MJ, Miyamoto Y, Sekiya T. Methyl-CpG binding domain column chromatography for the analysis of genomic DNA methylation. *Anal Biochem*, in press.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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*, 278: 18538-43, 2003.
- 33) Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Yatabe N, Inoue M. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol*. 163: 2259-2269. 2003.
- 34) Kudoh A, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Fujita M, Kiyono T, Nishiyama Y, Tsurumi T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J Virol*, in press.
- 35) Sawada M, Kiyono T, Nakashima S, Shinoda J, Naganawa T, Hara S, Iwama T, Sakai N. Molecular mechanisms of TNF- α -induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ*, in press.
- 36) Hara S, Nakashima S, Kiyono T, Sawada M, Yoshimura S, Yamada J, Iwama T, Banno Y, Shinoda J, Sakai N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, in press.
- 37) Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M, Mukai K. Expression of a novel human gene, hWAPL, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*, in press.
- 38) Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol Rep*, in press.
- 39) Fukami F, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer*, 107: 53-59, 2003.
- 40) Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y. Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg. *Oncogene*, 22: 6160-6165, 2003.
- 41) Fukami T, Satoh H, Williams YN, Masuda M, Fukuhara H, Maruyama T, Yageta M, Kuramochi M, Takamoto S, Murakami Y. Isolation of the mouse Tsl1 and Tsl2 genes, orthologues of the human TSLC1-like genes 1 and 2 (TSL1 and TSL2). *Gene*, 323: 11-18, 2003.
- 42) Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, Imamura M. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal

- squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 63: 6320-6326, 2003.
- 43) Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP. The cytoplasmic domain is critical to the tumour suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 63: 7979-7985, 2003.
- 44) Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet*, in press.
- 45) Anazawa Y, Arakawa H, Nakagawa H, Nakamura Y. Identification of STAG1 as a key mediator of p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, in press.
- 46) Yoshida K, Monden M, Nakamura Y, Arakawa H. Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors. *Cancer Sci*, 95: 91-97, 2004.
- 47) Kimura T, Takeda S, Sagiya Y, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet*, 34: 440-445, 2003.
- 48) Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene*, 22: 5586-5591, 2003.
- 49) Ng CC, Arakawa H, Fukuda S, Kondoh H, Nakamura Y. p53RFP, a p53-inducible RING-finger protein, regulates the stability of p21(WAF1). *Oncogene*, 22: 4449-4458, 2003.
- 50) Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci*, 94: 431-436, 2003.
- 51) Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5: 216-223, 2003.
- 52) Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H. Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Gene Chrom Cancer*, 36: 17-25, 2003.
- 53) Sumitsuji I, Sugano K, Matsui T, Fukayama N, Yamaguchi K, Akasu T, Fujita S, Moriya Y, Yokoyama R, Nomizu S, Yoshida T, Kodama T, Ogawa M. Frequent genomic disorganisation of MLH1 in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) screened by RT-PCR on puromycin treated samples. *J Med Genet*, 40: pe30, 2003.
- 54) Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, Yamamoto H, Nakazono M, Fujimoto H, Kanai Y, Hirohashi S, Kakizoe T, Habuchi T, Kato T. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder

- comprising carcinoma in situ. *J Urol*, 169: 1541-1545, 2003.
- 55) Maekawa M, Inomata M, Sasaki M, Kaneko A, Ushiana M, Sugano K, Takayama J, Kanno T. Promoter hypermethylation in cancer silences LDHB, eliminating lactate dehydrogenase isoenzymes 1-4. *Clin Chem*, 49: 1518-1520, 2003.
- 56) Hirasawa A, Aoki D, Inoue J, Imoto I, Susumu N, Sugano K, Nozawa S and Inazawa J. Unfavorable prognostic factors associated with high frequency of microsatellite instability and comparative genomic hybridization analysis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 5675-5682, 2003.
- 57) Tomita N, Fukunaga M, Ohzato H, Tamura S, Sugimoto K, Aihara T, Miki H, Takatsuka Y, Matsuura N, Iwanaga T, Fukayama N, Sugano K. The novel germline mutation of hMSH2 gene in a case of a hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) patient who meets the revised Amsterdam criteria. *Jpn J Clin Oncol*, 33: 486-489, 2003.
- 58) Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2: 147-156, 2004.
- 59) 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, Imai K. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncol Rep*, 10: 21-25, 2003.
- 60) Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Adachi Y, Imai K. BRAF at the frontline of HNPCC diagnostics. *Gastroenterology*, in press.
- 61) Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Adachi Y, Imai K. Activated BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair. *Oncogene*, in press.
- 62) Yamamoto H, Noshio K, Taniguchi H, Adachi Y, Imai K. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Gene Chrom Cancer*, in press.
- 63) Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Ito H, Itoh F, Lee CT, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res*, 63: 6432-6441, 2003.
- 64) Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Noshio K, Min Y, Horiuchi S, Yoshida M, Itoh F, Imai K. Association of trypsin expression with tumor

progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. *J Pathol*, 199: 176-184, 2003.

65) Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumor progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol*, 200: 568-576, 2003.

66) Matsuno K, Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Goto A, Arimura Y, Endo T, Imai K. Matrix metalloproteinase matrilysin expression represents the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol*, 38: 348-354, 2003.

67) Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, Imai K. Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, in press.

68) Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, Kanai Y, Ohki Y, Ohki M, Hirohashi S. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*, 22: 847-852, 2003.

69) 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, 37: 198-207, 2003.

70) Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kanetaka K, Asaka M, Hirohashi S.

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

71) Takamura M, Sakamoto M, Ino Y, Shimamura T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S.

Expression of liver-intestine cadherin and its possible interaction with galectin-3 in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Sci*, 94: 425-430, 2003.

72) Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi Y, Taketani Y, Hirohashi S. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: Identification of hepatocyte nuclear factor-1 β as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*, 163: 2503-2512, 2003.

73) Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Takamura M, Kanematsu T, Hirohashi S. Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. *J Gastroenterol Hepathol*, 18: 1309-1314, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
- 1) 広橋説雄・坂元亨宇
発明名称: 卵巣明細胞癌の検査、
治療、および治療薬のスクリー
ニングのための、HNF-1 β の
利用
特許出願2003-306818)
- 2) 牛島俊和
発明の名称: 脱メチル化剤のス
クリーニング方法
特許出願2003-297782
- 3) 牛島俊和
発明の名称: 哺乳動物由来の検
体の癌化度を評価する方法
特許出願2003-322821、
322822、322823、322824、
322825、322826、322827
- 4) 白石昌彦
発明の名称: 核酸の脱アミノ化
試薬組成物およびメチル化 DNA
の検出方法
特許出願準備中
- 5) 清野透
発明の名称: 不死化子宮内膜腺
上皮細胞株及びその作製方法
特許出願中
- 6) 菅野康吉
発明の名称: 核酸塩基配列デー
タベース、核酸塩基配列情報の
記録方法及び核酸塩基配列決定
方法
特願 2003-273599
- 7) 菅野康吉
発明の名称: 膀胱癌検査法およ
び装置
特願 2003-151397
- 8) 菅野康吉
発明の名称: 電気泳動装置
特願 2003-126307
- 9) 菅野康吉
発明の名称: 核酸塩基配列決定
方法

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： 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。アクチン結合蛋白質アクチニン-4 が、大腸がん細胞の運動能を亢進させ、がんの局所浸潤とリンパ節転移に寄与する可能性を示した。アクチニン-4 の発現亢進は、がんの浸潤や転移予測のマーカーとなり、転移抑制治療薬の分子標的となり得ると考えられた。DNAメチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現亢進が、諸臓器における発がん過程において細胞増殖活性の亢進に先行して早期から寄与し、CpG アイランドメチル化形質と有意に相関して症例の予後不良因子となることを示した。

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ってきた。諸臓器における多段階発がんの過程で、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、様々な機能分子をコードする遺伝子のジェネティックならびにエピジェネティックな異常が蓄積されることが知られるようになった。

具体的には、昨年度までに、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・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膜貫通型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能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る。諸臓器のがんにおいて、ディスアドヘリン発現の臨床的意義を明らかにすることが急務である。

他方で、アクチン細胞骨格の改変によるがん細胞の運動性能の変化は、がんの局所浸潤および転移の過程で重要である。アクチン結合蛋白質アクチニン-4 の細胞内局在が、乳がんの浸潤性増殖や乳がん患者の予後と相関し、新しい転移予測の指標となることを昨年度までに報告した。さらにアクチニン-4 の発現亢進が非小細胞肺がんの予後と関係することも示しているが、アクチニン-4 の転移における役割は明らかではなかった。そこで、アクチニン-4 の浸潤性増殖や転移への寄与の分子機構の解明が望まれている。

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。

B. 研究方法

1. 細胞接着を制御しがんの浸潤・転移能を亢進させる分子ディスアドヘリン

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膜貫通型糖蛋白ディスアドヘリンの発現を、大腸がん・甲状腺がん・舌がんにおいて免疫組織化学的に検討した。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の検討を進めた。

2. 細胞運動能を亢進させるアクチン結合分子アクチニン-4

定量的な蛍光免疫組織染色により、アクチニン-4 蛋白質の発現量と局在を、がんならびに正常組織で解析した。テトラサイクリン制御システムを使用し、アクチニン-4 蛋白質の発現を誘導できる大腸がん由来細胞株とその対照細胞を樹立した。アクチニン-4 発現細胞の超微形態を走査型電子顕微鏡で、アクチニン-4 蛋白質の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。アクチニン-4 発現細胞の運動能の解析には、創傷治癒試験を用いた。アクチニン-4 発現細胞の転移能を解析するため、SCID マウスの脾臓あるいは盲腸間膜に移植後5週目に剖検を行い、実体顕微鏡にて転移巣の数を検討した。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

ヒトの主要な DNA メチルトランスフェラーゼをコードする DNMT1 遺伝子の全コーディングエクソンと 5'領域における遺伝子変異の有無を、大腸がん・胃がん・肝細胞がんにおいて、PCR-SSCP 法によって検索した。

肝細胞がんにおいて DNMT1 の蛋白発現を免疫組織学的に検討した。胃がんにおいて、DNMT1・E-カドヘリンなどの蛋白発現を免疫組織化学的に検討し、PCNA 標識率を評価した。p16・hMLH1・E-カドヘリン・THBS-1 遺伝子ならびに MINT

クローンなどの CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を、パイサルファイト変換によって評価した。尿路上皮における多段階発がんの諸過程に対応すると考えられる、正常移行上皮・膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮・異形成上皮・移行上皮がんにおいても同様の解析を行った。以上より、DNA メチルトランスフェラーゼの発現と DNA メチル化の状態・がんの臨床病理像・症例の予後との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術で摘出した標本を、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、患者に説明の上、文書で同意を得た。臨床症例の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した。組織サンプルの由来する患者の臨床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、解析は連結可能匿名化して行った。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。動物実験は、国立がんセンター動物倫理委員会の承認を得て、「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、動物に対する十分な苦痛軽減措置を講じて実施した。

C. 研究結果

1. 細胞接着を制御しがんの浸潤・転移能を亢進させる分子ディスアドヘリン

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 期の大腸がんにおいて、高頻度に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、ディスアドヘリン発現亢進を呈する症例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て予後不良因子となることがわかった。

2. 細胞運動能を亢進させるアクチン結合分子アクチニン-4

大腸がんにおいて、同一切片上の正常粘膜上皮に比べ、高頻度にアクチニン-4 の発現が亢進していた。アクチニン-4 の発現亢進は、特に浸潤先進部で顕著であった。比較的運動性の乏しい大腸がん由来細胞株にアクチニン-4 の発現を誘導すると、周囲に突起が進展し運動性が著しく高まることが分かった。アクチニン-4 蛋白質はこれらの突起のリーディングエッジに局在した。アクチニン-4 発現を誘導した大腸がん由来細胞株を SCID マウスの脾臓に注入すると、対照細胞に比べ有意に高頻度に胃腸周囲のリンパ節への転移を来した。また盲腸間膜に注入した場合、臨床症例の転移様式を模倣するように、所属腸間膜リンパ節に転移を来した。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

DNMT1 遺伝子変異を大腸がん低頻度に検出した。これには触媒ドメインの完全欠失に帰結するような変異も含まれていたが、胃がんならびに肝細胞がんには遺伝子変異は認められなかった。いずれのがんにおいても、5'領域の遺伝子変異は検出されなかった。

昨年度までに、DNMT1 の mRNA 発現が、正常肝組織に比し、肝細胞がんに対する前がん状態と考えられる慢性肝炎ないし肝硬変の段階ですでに有意に亢進し、肝細胞がんにおいて更に亢進することを示している。本年度行った免疫組織化学的検討では、DNMT1 の蛋白発現亢進と肝細胞がんの分化度や門脈侵襲の有無との間に有意な相関があることがわかった。肝細胞がん症例の無再発生存率は、DNMT1 の蛋白発現亢進を示す肝細胞がん症例において有意に低かった。DNMT1 発現亢進は、低分化胃がんを高頻度に認められ、hMLH1・THBS-1 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化亢進・E-カドヘリン発現低下ならびに CpG アイランドメチル化形質（高頻度に C 型 CpG アイランドにおける DNA メチル化亢進を示すがんの形質）と有意に相関した。DNMT1 発現は胃がんにおける PCNA 標識率と相関せず、EB ウイルス感染例全例で DNMT1 発現亢進が見られた。膀胱がん症例より得られた非がん移行上皮は、未だ組織学的に特記すべき所見を示さなくても、尿中にある発がん物質等に既に暴露されている可能性がある。膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、DNMT1 の蛋白発現が PCNA 標識率の亢進に先行して既に有意に亢進し、異形成上皮・移行上皮がんにおいて更に亢進していた。DNMT1 の蛋白発現亢進は、膀胱がんの異型度と有意に相関し、乳頭状がん比し非乳頭状がん（結節状浸潤がんならびに広汎進展上皮内がん）において有意に高頻度に認められた。

D. 考察

1. 細胞接着を制御しがんの浸潤・転移能

を亢進させる分子ディスアドヘリン

ディスアドヘリンが、カドヘリンの機能を抑制する分子で、その過剰発現によりがん細胞の接着を抑制することを昨年度までに示している。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も示してきた。さらに今回、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。

2. 細胞運動能を亢進させるアクチン結合分子アクチニン-4

アクチニン-4 の発現亢進が、大腸がん細胞の運動能を亢進させ、局所浸潤とリンパ節転移に寄与する可能性が示された。アクチニン-4 の発現亢進はがんの浸潤や転移予測のマーカーとなるだけでなく、積極的に大腸がんの浸潤・転移の分子機構に関わると考えられた。アクチニン-4 は、転移抑制治療薬の分子標的となる可能性がある。

3. 多段階発がんにおける DNA メチル化の変化

DNMT1 遺伝子変異をヒトのがんにおいて初めて証明したが、DNMT1 の遺伝子変異によるゲノム規模の DNA メチル化の変化はヒトの発がん過程における主要な事象ではなかった。

DNMT1 の発現は前がん状態から既に亢進し、肝細胞がんの悪性進展に至るまで、肝多段階発がん過程に継続して寄与する可能性があると考えられた。実際の診療の現場において診断確定のために採取される針生検材料や手術材料において抗 DNMT1 抗体を用いた免疫組織化学的検討を施行することにより、症例の予後の予測に有益な情報が得られる可能性があると考えられた。胃がんの発生過程において、DNMT1 の蛋白発現亢進は必ずしも細胞増殖活性の亢進

に付随する事象ではなく、EB ウイルス感染等の発がん要因に関連して、低分化腺がんなどの発生に特に寄与する可能性があると考えられた。DNMT1 の発現亢進は胃がんの CpG アイランドメチル化形質の獲得に結びつく可能性があり、hMLH1 遺伝子・THBS-1 遺伝子・E-カドヘリン遺伝子が発現亢進した DNMT1 の標的となる可能性が示唆された。膀胱移行上皮がん発生に関して、DNMT1 発現の段階的亢進は細胞増殖活性の亢進に先行し、前がん段階から寄与する可能性がある。DNMT1 の発現亢進は、特に、悪性度の高い結節状浸潤がんの前駆病変と考えられている広汎進展上皮内がんの発生に寄与する可能性がある。

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、細胞接着を制御し転移を亢進する分子ディスアドヘリンの臨床病理学的意義の解明、細胞運動能を亢進させるアクチン結合分子アクチニン-4 の浸潤・転移への寄与の解明、DNA メチルトランスフェラーゼの異常を伴う DNA メチル化の変化の解析を行った。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・病理像との対応が直接明らかにされ、新しいがん治療の標的になるようながんの発生・増悪の分子機構が解明されることが望まれる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T, Mori Y, Hayashi R, Takada M, Ino Y, Naishiro Y, Kondo T, Hirohashi S. Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient Apc^{min/+} mice. *Cancer Res*, 63: 895-901, 2003.
- 2) Aoki S, Shimamura T, Shibata T, Nakanishi Y, Moriya Y, Sato Y, Kitajima M, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer*, 88: 726-732, 2003.
- 3) Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Lett*, 192: 75-82, 2003.
- 4) Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*, 105: 527-532, 2003.
- 5) Sekine S, Shibata T, Matsuno Y, Maeshima A, Ishii G, Sakamoto M, Hirohashi S. β -catenin mutations in pulmonary blastomas: association with morule formation. *J Pathol*, 200: 214-221, 2003.
- 6) Tsuiji H, Takasaki S, Sakamoto M, Irimura T, Hirohashi S. Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion. *Glycobiology*, 13: 521-527, 2003.
- 7) Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S. EBP50, a β -catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 38: 178-186, 2003.
- 8) Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*, 94: 575-581, 2003.
- 9) Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, Yamada T, Maeshima A, Asamura H, Hayabuchi N, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: Clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol*, 27: 937-951, 2003.
- 10) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized β -catenin. *Cancer Res*, 63: 4641-4647, 2003.
- 11) Sato H, Ino Y, Miura A, Abe Y, Sakai H, Ito K, Hirohashi S. Dysadherin: expression and clinical significance in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4407-4412, 2003.
- 12) Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics*, 3: 1758-1766, 2003.
- 13) Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, Kudo T, Hirohashi S, Ochiai A, Tohnai I, Ueda M, Kimata K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncology Reports*, 10: 1919-1924, 2003.
- 14) Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, Shibata T, Kanai Y, Hirohashi S. β -catenin mutations are frequent in calcifying