

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) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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.

22) 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.

23) 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.

24) 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.

25) 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.

26) 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.

27) Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Gemma A, Kudoh S,

Hirohashi S. Proteomic signature of human cancer cells. Proteomics, in press.

28) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)

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

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

Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法により、膵がん細胞株での DNA メチル化異常をゲノム網羅的に解析した。膵がんではメチル化された DNA 断片のうち 168 個が CpG アイランドに由来し、うち、既知遺伝子 5'領域 CpG アイランドは 35 個であった。35 個のうち 27 個では、CpG アイランド全体のメチル化を認めた。メチル化されたがん細胞株での発現消失、及び、脱メチル化剤による発現回復を検討したところ、13 個についてメチル化による遺伝子サイレンシングが確認された。13 個のうち、12 個については、膵がん手術材料でもメチル化異常を認めた。一方、CpG 部位がメチル化された、または、されない状態は、高い忠実度をもって娘細胞に伝達されることが必要で、がんではその低下がある可能性がある。本年度は、正常乳腺上皮細胞を用いて、CpG 部位のメチル化状態複製の忠実度の測定法を開発、忠実度を測定した。非 CpG アイランドの CpG 部位がメチル化された状態は、99.95%程度の高い忠実度で伝達されたのに対し、CpG アイランドのメチル化されない状態は、誤ってメチル化されることが多かった。また、プロモーター領域 CpG アイランド(99.9%)の方が、非プロモーター領域 CpG アイランド (99.8%) よりも高い忠実度を示した。

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、遺伝子発現が消失（サイレンシング）することが知られるようになった。そこで、分担研究者らは、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、1997 年までに開発した。

膵がんは予後不良な腫瘍として知られる。その解剖学的な位置に加えて、染色体不安定性の存在や間質の巻き込みが強いことが予後不良に関与する。遺伝子異常として、*K-ras* 遺伝子の活性化(90-95 %)、*p16* の不活化(80 %)、*p53* の不活化(50-70 %)、*SMAD4/DPC4* の不活化(50 %)が認められる。しかし、膵がんの遺伝子異常が十分に解明されているわけではなく、DNA メチル化異常の関与を明らかにする必要がある。そこで、本年度は、膵がんにおける DNA メチル化異常及びサイレンシングされる遺伝子を、MS-RDA 法により検索した。

一方、CpG 部位のメチル化された、または、メチル化されない状態は、高い忠実度をもって複製さ

れる必要がある。その忠実度が低下すれば、CpG アイランド全体としてもメチル化状態が誤って複製され、がん抑制遺伝子の不活化や、がん遺伝子の活性化が誘発される可能性がある。がんでの CpG 部位メチル化状態複製の忠実度低下を検討する基盤を作成するため、本年度は、正常乳腺上皮細胞を用いて CpG 部位メチル化状態伝達の忠実度を測定する実験系を作成し、プロモーター領域 CpG アイランド、非プロモーター領域 CpG アイランド、非 CpG アイランドの各ゲノム領域について、忠実度を測定した。

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非腫瘍部分を採取した。膵がん細胞株は ATCC から購入、又は、JCRB から分与を受けた。正常膵管上皮細胞をパピローマウイルスにより不死化した HPDE-4/E6E7 及び HPDE6-E6E7c7 細胞は、トロント大学 Tsao 博士より供与を受けた。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*、*SacI* または *NarI* で消化し、アダプターを接着後、

PCRを行うことで、ampliconを作成した。正常膵管上皮由来のampliconと、膵がん細胞株HPAC由来のampliconを用いて、常法に従い、3サイクル(HpaII)または2サイクル(SacI及びNarI)のcompetitive hybridizationとselective amplificationを行った。

最終のPCR産物全体をプラスミドにクローン化し、サイクルシーケンス法により、塩基配列を決定した。独立な配列については、データベース検索を行い、そのDNA断片がCpGアイランドに由来しているか否か、また、CpGアイランドが遺伝子5'領域に位置しているか否かを検討した。CpGアイランドは、TakaiとJonesの基準により判定した。

(3) 定量的RT-PCR法

Superscript reverse transcriptaseを用いて逆転写を行った。SYBR Green及びiCyclerを用いた定量的Real-Time PCRを行った。被験遺伝子及びGAPDHのcDNA分子数を測定し、GAPDH分子数に対する被験遺伝子の分子数を算出した。

(4) Bisulfite シークエンス法及びMSP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 シークエンス法には、メチル化DNA及び非メチル化DNAに共通のプライマーでPCRを行った。PCR産物をクローン化、サイクルシーケンスにより各CpG部位のメチル化状態を決定した。

Methylation-specific PCR (MSP)法には、メチル化されたDNAまたはメチル化されていないDNAに特異的なプライマーを用いて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DNA特異的なプライマーで増幅した際にバンドが出現するサイクル数、及び、HPDE-4/E6E7細胞のDNAを非メチル化DNA特異的なプライマーで増幅した際にバンドが出現するサイクル数を決定し、検体の解析はこれらのサイクル数よりも4サイクル多いサイクル数を用いた。

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

6×10^5 個の細胞を10cm-dishに播種後、1日目、3日目に、 $0.5 \mu\text{M}$ 及び $1 \mu\text{M}$ 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。

(6) 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。

C. 研究結果

(1) 膵がん細胞株でのメチル化異常

HPAC膵がん細胞株と不死化膵管上皮細胞HPDE-4/E6E7細胞とを用いた3シリーズ(HpaII, SacI, NarI)のMS-RDA法により得た295個のクローンの塩基配列を決定した。168個がCpGアイランドに由来し、中でも40個が遺伝子5'領域CpGアイランドに由来した(表)。

既知遺伝子の5'領域CpGアイランド35個について、DNA断片が由来した制限酵素部位のみならず、CpGアイランド全体がメチル化されているか否かをMSP法により検討した。27個の5'領域CpGアイランドが、7種の膵がん細胞株のうち1個以上でメチル化されていることが判明した(図1)。

(2) 膵がん細胞株での遺伝子発現低下

メチル化が認められた27個の5'領域CpGアイランドの下流遺伝子について、7種の膵がん細胞株、2種的不死化膵管上皮細胞(HPDE-4/E6E7及びHPDE6-E6E7c7)を用いて、発現レベルを検討した。不死化膵管上皮細胞において、6遺伝子(RASGRF2, PRG2, FBN2, CDH2, NTSR1, 及びTHBD)は比較的豊富(GAPDH比 10^3 以上)に、11遺伝子(ADAM23, NEF3, OLIG3, FGF14, NKX2-8, HAND1, EGR4, CLIP2, SLC6A2, TLL1, 及びNPTX1)は比較的少量(GAPDH比 10^3 以下)発現していた。残る10遺伝子は全く発現していなかった。

発現を認めた17遺伝子について膵がん細胞株でのメチル化の状態と遺伝子発現とを比較検討した。CDH2とFGF14を除く15遺伝子は、メチル化された膵がん細胞株では、発現を全く認めないか、ごく少量の発現を認めるのみであった。CDH2は、CpGアイランドのメチル化状態がモザイク状であり、メチル化されていないCDH2を持つ細胞が存在したと考えられた。FGF14は発現量が少なく、リーキーな発現を観察しているためと思われた。

(3) 脱メチル化剤によるサイレンシングの検討

不死化膵管上皮細胞で発現を認めた17個の遺伝子について、メチル化された膵がん細胞株を脱メチル化剤により処理することで、発現が回復するか否かを検討した。不死化膵管上皮細胞での発現量が比較的多かった6遺伝子(RASGRF2, PRG2, FBN2, CDH2, NTSR1, 及びTHBD)すべてと、少なかった遺伝子のうち7遺伝子(ADAM23, NEF3, NKX2-8, HAND1, EGR4, TLL1, 及びNPTX1)について、発現回復を認めた。これら13遺伝子については、5'領域CpGアイランドのメチル化が原因で発現が消失している(サイレンシングされている)と結論された。

表 膵がん細胞株 HPAC の MS-RDA 解析で得られた DNA 断片の一覧

DNA fragments isolated by MS-RDA				Chromo- some	Genes in the downstream		Incidence of methylation	
Length (bp)	Accession No	From	To		Symbols	Full names or alternative names	Cell lines	Primary cancers
MS-RDA with Hpa II								
641	AC026427	170785	171426	5q14	<i>RASGRF2**†</i>	<i>Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2</i>	4/7	4/24
320	AC009225	22726	23046	2q33	<i>ADAM23**†</i>	<i>A disintegrin and a metalloprotease domain 23</i>	4/7	7/24
541	AC008011	24486	25027	12p12	<i>PTHrP</i>	<i>Human Parathyroid Hormone related Protein</i>	0/6	ND
434	AC096766	117247	117681	4q21	<i>NKX6A</i>	<i>NK6 transcription factor homolog A [Pancreatic Homeobox]</i>	0/6	ND
513	AL050336	55751	56264	6p12	<i>CLIC5</i>	<i>Chloride Intracellular Channel 5</i>	0/6	ND
MS-RDA with Sac II								
193	AF106564	29260	29453	8p21	<i>NEF3**†</i>	<i>Neurofilament 3</i>	7/7	15/24
299	AL023580	57007	57306	6q23	<i>OLIG3*</i>	<i>Oligodendrocyte transcription factor 3</i>	7/7	11/24
103	AL512629	48196	48299	13q34	<i>FGF14*</i>	<i>Fibroblast Growth Factor 14 [Fibroblast Growth Factor Homologue 4]</i>	7/7	4/24
221	AL132857	3059	3280	14q11	<i>NKX2-8**†</i>	<i>NK2 transcription factor related, locus 8</i>	7/7	3/24
402	AC008971	57542	57944	5p15	<i>SALPR</i>	<i>G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor</i>	6/7	11/24
322	AC067859	139116	139438	18q21	<i>RAX</i>	<i>Retina and anterior neural fold homeobox gene</i>	6/7	11/24
633	AL356963	32461	33094	6q25	<i>RGS17</i>	<i>Regulator of G-protein signalling 17</i>	5/7	9/24
574	AC005738	74725	75299	5q31	<i>NGN1</i>	<i>Neurogenin 1</i>	5/7	4/24
367	AC026688	24653	25020	5q33	<i>HAND1**†</i>	<i>Heart and neural crest derives expressed 1</i>	4/7	2/24
513	AC087312	101149	101662	12p11	<i>SOX5</i>	<i>Sex determining region Y-box 5</i>	3/7	3/24
222	AC113194	73722	73944	8q11	<i>RGS20</i>	<i>Regulator of G Protein Signaling 20</i>	3/7	5/24
517	AC010913	203551	204068	2p12	<i>EGR4**†</i>	<i>Early growth response 4</i>	2/7	1/24
681	AC106781	140502	141183	5q31	<i>ADAMTS19</i>	<i>A disintegrin and a metalloprotease domain, with thrombospondin motif, 19</i>	1/7	2/24
278	AC025483	84337	84615	15q25	<i>SH3GL3</i>	<i>Src homology 3 domain growth factor receptor-bound protein 2 like 3</i>	ND	ND
242	AL109653	144309	144551	Xq27	<i>KIAA1854</i>		ND	ND
MS-RDA with Nar I								
280	AC009471	114500	114780	2p25	<i>PRG2**†</i>	<i>p53-responsive gene 2 [PXN, MG50, PRG2, D2S448E, KIAA0230]</i>	7/7	15/24
194	AC113387	119915	120109	5q23	<i>FBN2**†</i>	<i>Fibrillin 2</i>	7/7	18/24
380	AF490843	33251	33631	12q13	<i>HOXC12</i>	<i>Homeo Box C12</i>	6/7	0/24
1000	AC011448	99517	100517	19p13	<i>CLIP-2*</i>	<i>Cartilage Intermediate Layer Protein-like Protein 2</i>	5/7	0/24
1361	AL160058	14299	15660	1q23	<i>LMX1A</i>	<i>LIM homeobox transcription factor 1 alpha</i>	4/7	3/24
189	AL121789	66583	66772	6q26	<i>PDE10A</i>	<i>Phosphodiesterase 10A</i>	4/7	2/24
724	AC026802	79331	80055	16q13	<i>SLC6A2*</i>	<i>Solute carrier family 6 neurotransmitter transporter noradrenalin member 2</i>	3/7	9/24
594	AC006249	154364	154958	18q11	<i>CDH2**†</i>	<i>Cadherin 2, N-cadherin</i>	3/7	7/24
968	AC097502	124187	125155	4q33	<i>TLL1**†</i>	<i>Toll-like 1</i>	3/7	3/24
138	AC120024	64774	64912	17q25	<i>NPTX1**†</i>	<i>Neuronal Pentraxin 1</i>	3/7	3/24
343	AL357033	72549	72892	20q13	<i>NTSR1**†</i>	<i>neurotensin receptor 1</i>	2/7	2/24
822	AL495471	3397	4219	20p11	<i>THBD**†</i>	<i>Thrombomodulin</i>	1/7	0/24
523	AC021220	43188	43711	4q11	<i>KDR</i>	<i>Kinase insert domain receptor [VEGFR]</i>	0/7	ND
331	AC015936	141349	141680	17q21	<i>CRF</i>	<i>CRF-related factor</i>	0/7	ND
353	AC092437	81034	81387	4p16	<i>MSX1</i>	<i>Muscle Segment Homeo Box 1 [HOX7(HOMEO BOX 7)]</i>	0/7	ND
375	AL159164	59633	60008	6q15	<i>BACH2</i>	<i>BTB [broad complex-tramtrack-bric-a-brac] and CNC [Cap'n collar] Homology 2</i>	0/7	ND
655	AL078594	65499	66154	6p22	<i>CHF1</i>	<i>Cardiovascular Basic-Loop-Helix Factor 1</i>	0/7	ND
543	AC012065	183388	183931	2p24	<i>LOC151449</i>	<i>Similar to growth/differentiation factor 7</i>	ND	ND
829	AC008735	35343	36172	19q13	<i>LOC51157</i>	<i>LDL induced EC protein</i>	ND	ND
531	AC018735	11753	12284	2q32	<i>LOC151112</i>		ND	ND

(4) 膵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、細胞株でメチル化異常を認めた 27 個の 5'領域 CpG アイランドについて、膵がん手術材料 24 個でのメチル化異常を検討した。27 個の 5'領域 CpG アイランドのうち 24 個で、膵がん手術材料でもメチル化異常を認めた (図 1)。サイレンシングされた遺伝子 13 個についてみると、12 個が膵がん手術材料でもメチル化されていた。*OLIG3* と *RAX* については、低頻度ながら、肉眼的非がん部膵組織でも DNA メチル化異常を認めた。

(5) CpG メチル化状態伝達忠実度測定系の構築

DNA メチル化のパターンは、正常細胞間でもバラツキがあり、「正常な」パターンは一定ではない。従って、DNA メチル化パターンの変動を解析する場合、もともとの DNA メチル化パターンを正確に推定する必要がある。そこで、正常乳腺上皮細胞を 1 個のみ播種し、 10^6 個まで増殖、DNA を抽出した。 10^6 個の細胞は 2 種類のみメチル化パターンをも

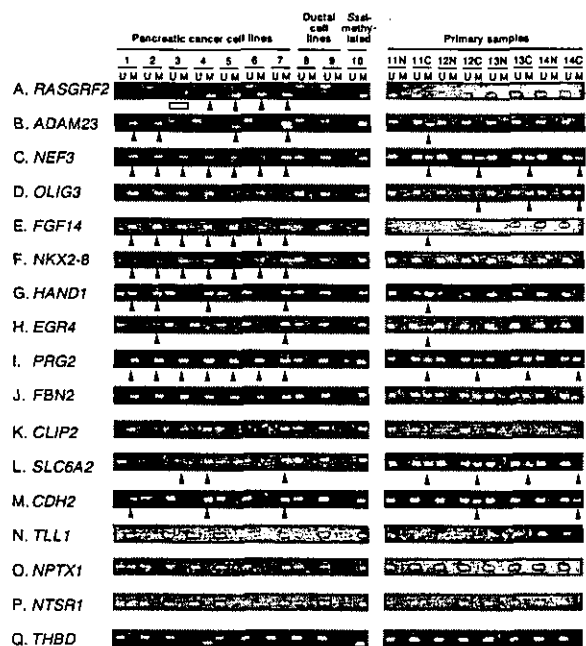


図 1 膵がん細胞株及び膵がん手術材料でのメチル化異常 矢頭はメチル化された DNA の検出、□はホモ欠失を示す。

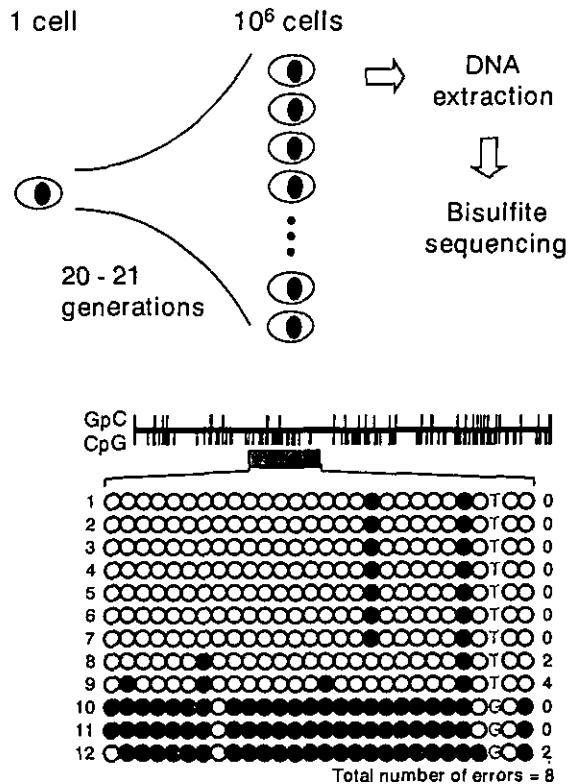


図2 CpG 部位メチル化状態伝達の忠実度の測定
H19 遺伝子の DMR について解析した。2 種類の DNA メチル化のパターンが、T/G 多型に一致して認められた。また、もともとの DNA メチル化のパターンも容易に推定出来た。合計 8 個の間違いが 12 クローンの 27 個の CpG 部位に認められたので、 $\text{error rate} = 8/12/27 = 0.025$ となる。6 回の培養の平均値を求めることで、各ゲノム領域の error rates を測定した。

つはずであり、実際、オリジナルのメチル化パターンを推定することが可能であった (図 2)。観察した CpG 部位数あたりの、オリジナルのメチル化パターンからの変異を測定し、error rate を算出した。

(6) 正常乳腺上皮細胞での忠実度

構築した測定系を用いて、正常乳腺上皮細胞のプロモーター領域 CpG アイランド (*E-cadherin*, *p41Arc*, *SIM2*, *3-OST-2*, 及び *Cyclophilin A* の 5 遺伝子)、非プロモーター領域 CpG アイランド (*E-cadherin*, *p41Arc*, 及び *SIM2* の 3 遺伝子)、非 CpG アイランド (*E-cadherin*, 及び *SIM2* の 2 遺伝子) の 3 種類のゲノム領域について、error rates を計測した。その結果、まず、生理的にメチル化されている非 CpG アイランドは error rate が極めて低い (0.004-0.017/CpG 部位/21 世代; 忠実度換算 99.95%/CpG 部位/細胞分裂程度) ことがわかった。また、プロモーター領域 CpG アイランド (0.018-0.032; 忠実度換算 99.9%) の方が、非プロモーター領域 CpG アイランド (0.037-0.091; 忠実度換算 99.8%) よりも error rates が低い (忠実度が高い) こと、が判明した。

D. 考察

MS-RDA 法によるゲノム網羅的な解析により、ヒト膀胱で異常にメチル化された 5'領域 CpG アイランドを 27 個、サイレンシングされた遺伝子を 13 個見いだした。サブトラクション及び DNA メチル化と発現の相関の解析には細胞株を用いたが、ほとんどの DNA メチル化異常及びサイレンシングは、膀胱がん手術材料でも確認された。今回、サイレンシングが同定された遺伝子の中には、*p53* の過剰発現によりその発現が誘導される *PRG2* 遺伝子や、*ras* のシグナル伝達に参与する *RASGRF2* 遺伝子が含まれた。サイレンシング遺伝子の中に、膀胱がんの発生・進展に参与するものが含まれる可能性があり、将来的には診断・治療の標的として有用となる可能性がある。

同時に、5'領域 CpG アイランドがメチル化された遺伝子には、不死化膀胱上皮細胞株で発現していないものが数多く含まれた。発現していない、もしくは、発現量が著しく低い遺伝子は、容易にメチル化される可能性が示唆された。遺伝子がメチル化されないためには、その発現が重要であることを示唆し、がんの予防に重要な可能性がある。

一方、CpG 部位のメチル化状態は、99.8%以上という高い忠実度で複製されていることが示された。生理的にメチル化されている領域の方が忠実度が高いことは、ゲノムは常にメチル化の方向に向かっていることを示唆している。また、メチル化が遺伝子発現に影響するのはプロモーター領域の場合のみである。従って、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化状態の方が、非プロモーター領域 CpG アイランドのものよりも高い忠実度で複製されることは、合目的的であると思われた。

今後、がんで、CpG 部位のメチル化状態複製の忠実度が変化している可能性を検討する必要がある。

E. 結論

膀胱がんメチル化された 5'領域 CpG アイランドを 27 個、サイレンシングされた遺伝子を 13 個見いだした。また、CpG 部位のメチル化状態複製の忠実度を測定する方法を開発し、99.8%/CpG 部位/細胞分裂という高い忠実度をもつこと、忠実度はゲノムの部位により異なることが判明した。

F. 健康危険情報

特に該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Asada, K., Miyamoto, K., Fukutomi, T., Tsuda, H., Yagi, Y., Wakazono, K., Oishi, S., Fukui, H., Sugimura, T. and Ushijima, T. Reduced expression of *GNAI1* and silencing of *MCT1* in human breast cancers. *Oncology*, 64: 380-388 (2003).
2. 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.*, 983: 131-141 (2003).
3. 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).
4. 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.*, 13: 868-874 (2003).

(2) 学会発表

1. 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.
2. Furuta, J., Yamashita, S., Otsuka, F. and Ushijima, T. Genome-wide Scanning for Aberrant CpG Methylations in Human Melanoma by Methylation-Sensitive-Representational Difference Analysis. International Investigative Dermatology Meeting 2003, Florida, April, 2003.
3. Ushijima, T. and Watanabe, N. Fidelity in inheriting the methylation pattern of the genome in normal cells and its decrease in cancer cells. 9th Japanese-German Workshop on "Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenesis", Essen (Germany), September, 2003.
4. Ushijima, T. and Watanabe, N. Fidelity in inheriting the methylation pattern of the genome in normal cells and its decrease in cancer cells. 8th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Okinawa, Dec. 2003.
5. Furuta, J., Kaneda, A., Umabayashi, Y., Otsuka, F., Sugimura, T., and Ushijima, T. Silencing of the *Thrombomodulin* gene in human malignant melanoma. 8th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Okinawa, Dec. 2003.
6. Ushijima, T. Fidelity in inheriting the methylation pattern of the genome in normal cells and its decrease in cancer cells. 6th Joint Conference of AACR and JCA, Hawaii, January, 2004.
7. 牛島俊和, 金田篤志, 若園邦子 発がんのエピ

ジェネティクス 獣医学会シンポジウム
2003年3月

8. 古田淳一、山下聡、大塚藤男、牛島俊和 MS-RDA法を用いたメラノーマにおいてサイレンシングされる遺伝子のゲノム網羅的探索 第102回日本皮膚科学会総会 2003年5月
9. 古田淳一、大塚藤男、牛島俊和 メラノーマ細胞株におけるメチル化プロファイルの解析 第19回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2003年6月
10. 宮本和明、福富隆志、高田恭臣、浅田潔、明石田中定子、浅原利正、杉村隆、牛島俊和 *Heparan Sulfate D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase-2 (3-OST-2)* 遺伝子の乳癌、肺癌、膵癌におけるサイレンシングとその血液診断への応用 日本外科学会総会 2003年6月
11. 宮本和明、渡邊直子、福富隆志、大河内江里子、長谷川匡、杉村隆、牛島俊和 遺伝子17個についてのヒト乳がんにおけるDNAメチル化異常の解析 第62回日本癌学会総会 2003年9月
12. 萩原淳司、牛島俊和 血漿中DNAのメチル化異常による膵がん診断のための遺伝子同定 消化器集団検診学会ワークショップ 2003年10月
13. 萩原淳司、古田淳一、宮本和明、関守一、福島昭治、杉村隆、牛島俊和 ゲノム網羅的メチル化異常検索によるヒト膵がん細胞株での *RASGRF2* 遺伝子サイレンシングの同定 第62回日本癌学会総会 2003年9月
14. 牛島俊和、渡邊直子、金田篤志、宮本和明、大河内江里子、杉村隆 正常細胞でのメチル化状態伝達の忠実度とがん細胞での低下 第62回日本癌学会総会シンポジウム 2003年9月
15. 阿部雅修、大平美紀、金田篤志、大石祥子、山下聡、高戸毅、杉村隆、中川原章、牛島俊和 DNAメチル化のゲノム網羅的解析による神経芽細胞腫の高精度予後マーカーの開発 第26回分子生物学会年会ワークショップ 2003年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法(特願2003-322821、322822、322823、322824、322825、322826、322827)

(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 E-カドヘリン遺伝子が不活性化されており、また E-カドヘリン遺伝子の CpG アイランドがメチル化されている培養がん細胞を用いて遺伝子再活性化と DNA 脱メチル化の関連について解析した。DNA メチル基転移酵素阻害剤の投与により E-カドヘリン遺伝子の発現が回復したがん細胞では E-カドヘリン遺伝子 CpG アイランドの脱メチル化はみられなかった。DNA 脱メチル化は E-カドヘリン遺伝子の再活性化に必須ではないことが示された。

A. 研究目的

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾が遺伝子活性を制御する機構を解析する。そのために培養がん細胞を DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 阻害剤で処理したときに DNA メチル化様式や遺伝子発現がどのように変化するかを明らかにする。

B. 研究方法

ヒト培養がん細胞を DNMT 阻害剤 5-aza-2'-デオキシシチジン (5-aza-dC) で処理し、E-カドヘリン (*CDH1*) 遺伝子の発現回復の有無を RT-PCR 法で解析した。また DNMT タンパク質の量の変化をウエスタンブロット法で、ヒストン修飾の有無をクロマチン免疫沈降法で解析した。DNA メチル化様式の解析は高分子 DNA を重亜硫酸処理した後解析対象領域を PCR で増幅し、プラスミドベクターにクローン化した後塩基配列を解析することにより行なった。

(倫理面への配慮)

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

肝がん細胞 Li21 では *CDH1* 遺伝子の発現が抑制されている。また *CDH1* 遺伝

子の CpG アイランドはメチル化されているが、プロモータ配列の存在する 5' 領域のメチル化の程度は低く、プロモータ配列から離れた 3' 領域のメチル化の程度は低かった。この細胞を 5-aza-dC で 5 日間処理すると 3 日目ぐらいから *CDH1* 遺伝子の発現が顕著に回復した。DNMT の一つである DNMT1 は 5-aza-dC 投与後 24 時間以内に枯渇した。しかし発現回復の前後で DNA メチル化様式に顕著な変化は見られず、またヒストン修飾様式にも大きな変化は見出されなかった。

一方肝がん細胞 Li7NM も *CDH1* 遺伝子の発現が抑制されているが、CpG アイランドは全体的に高度にメチル化されている。Li7NM 細胞を 5-aza-dC で処理しても DNMT1 タンパク質は枯渇せず、また *CDH1* 遺伝子の発現回復もほとんど見られなかった。しかし *CDH1* 遺伝子のプロモータ領域は顕著に脱メチル化された。

D. 考察

遺伝子発現抑制における DNA メチル化の役割については解析が進んでいるが、依然として不明な点が多い。発現抑制の直接の原因であることを示唆するデータもあれば、発現抑制の最後の段階での「錠」の役割であることを示す結果もある。

今回の解析では遺伝子発現回復と DNA メチル化状態の間に関連は見られなかった。これらの結果から、薬剤処理による CDH1 遺伝子の人工的な再活性化には DNA 脱メチル化は直接の原因となっていないと考えられる。CDH1 遺伝子発現制御には DNA メチル化、ヒストン修飾の変化を伴う経路と DNA メチル化、ヒストン修飾に依存しない経路の少なくとも二通りの経路があると考えられ、このうち Li21 細胞では後者が関与していたと考えられる。今回の解析結果は遺伝子活性の人工的な制御によるがんの治療への重要な情報を提供すると考えられる。

また通常 DNMT1 は DNA メチル化の維持にかかわっているとされている。しかし Li21 細胞では DNMT1 が枯渇しているのに CDH1 遺伝子 CpG アイランドのメチル化様式が維持されていること、また Li7NM 細胞では DNMT1 が枯渇していないのに CDH1 遺伝子 CpG アイランドの脱メチル化が起きていることから、少なくとも CDH1 遺伝子 CpG アイランドのメチル化様式は DNMT1 以外の DNMT によって維持されていることが示唆された。

5-aza-dC が脱メチル化剤として作用する機構は、DNA 中に取り込まれた 5-aza-dC に DNMT1 が非可逆的に結合し、そのために起こる DNA メチル化酵素の枯渇が原因であるとされている。しかし Li7NM 細胞では十分量の 5-aza-dC で処理したにもかかわらず DNMT1 の枯渇は見られなかった。この結果は 5-aza-dC によるゲノム DNA の脱メチル化には従来考えられている以外の反応経路が存在することを示唆している。

E. 結論

ヒト肝がん細胞において発現が抑制されている CDH1 遺伝子の再活性化には、DNA メチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティックな変化は必ずしも必要でないことが示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Shiraishi M. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to detect methylation changes in DNA. *Methods Mol Biol*, in press.

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.

2. 学会発表

Shiraishi M, Saito M, Oates AJ. 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

前川真治、白石昌彦、押村光雄 ヒトグリオーマ発生への関与が疑われる新規インプリンティング遺伝子の同定 第62回日本癌学会総会、2003.

大塚晋、前川真治、鷺野伸恵、板場則子、白石昌彦、押村光雄、難波栄二 DMR を指標としたヒト新規インプリンティン

グドメインの検索 第48回日本人類遺伝学会大会、2003.

立花研、田中久美子、武田健、白石昌彦
ヒト胃がん細胞における5-アザ-2'-デオキシシチジン処理による*CDHI*遺伝子発現回復の分子機構 第26回日本分子生物学会年会、2003.

板場則子、鷲野伸恵、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索：2番および5番染色体の解析 第26回日本分子生物学会年会、2003.

鷲野伸恵、板場則子、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索：22番染色体の解析 第26回日本分子生物学会年会、2003.

高見希、大澤佳代、白石昌彦、塩沢和子、塩沢俊一 第1染色体上に存在するRAの疾患遺伝子*DR3*のゲノムインプリンティングに関する研究 第26回日本分子生物学会年会、2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「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

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

正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

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 子宮頸部上皮細胞、子宮内膜腺細胞、肺（細）気管支上皮細胞などを不死化した。これらの細胞のがん化過程をex vivoで再現するよう試みた。いくつかの実験により、このex vivoモデル系は多段階発がんモデルの分子機構を解析するのにふさわしい系であることが確認できた。例として子宮内膜腺細胞にhTERT、HPV16のE6,E7を導入し不死化した細胞に活性型rasを導入すると増殖能は上がったが、肺細気管支上皮にhTERTとbmi-1を導入し不死化した細胞では活性型ras導入により細胞死が誘導された。また、子宮頸部上皮細胞をhTERTの導入で得られた不死化細胞を用いHPVのE6,E7導入による遺伝子発現の変化を調べた。特に、PDZドメイン含有蛋白質の挙動に関して新しい知見が得られた。さらに、不死化細胞のがん抑制遺伝子を不活化するためにRNA干渉ベクターを開発した。

A. 研究目的

ヒト（の細胞）がマウス（の細胞）に比べがん化しにくい原因の複数あるが、その一つは不死化のステップにあると考えられる。実際、ヒトの細胞はげっ歯目の細胞と異なり不死化（株化）しにくく不死化機構もかなり異なることが分かってきた。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それまで困難であ

ったヒト細胞の不死化も可能となってきた。本研究の目的は、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ことである。

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。これを元に種々の臓器由来の上皮細胞や線維芽細胞を不死化すると共に不死化に必要な条件を検討し不死化機構を推測した。実際には昨年度までの細胞不死化機構の解析から以下の方針を立て細胞不死化を試みた。まず、不死化したい細胞の p16 が継代により増加するか否かを調べ、増加のないものには TERT のみを導入して不死化を試みた。p16 の増加が見られたものに対しては p16/RB 経路の不活化するために E7, bmi-1 または今年度開発した p16RNAi ベクターのいずれかを導入し延命を試みた。延命できた場合にはさらに TERT を導入し不死化を試みた。p16/RB 経路の不活化のみでは延命が困難であった場合にはさらに p53 経路を不活化するために E6(今後は今年度開発した p53RNAi ベクター)を導入した。上記の方針で不死化した細胞を用い、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活性を TRAP アッセイにて調べた。

不死化に成功した子宮頸部上皮細胞、子宮内膜腺細胞、細気管支上皮細胞についてはさらに、その性状、E6,E7 や活性型 ras* の導入による形質の変化、遺伝子発現の変化を調べた。

(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

子宮頸部上皮細胞は3回以上の継代が困難であったため、p16の発現を調べる以前に遺伝子導入したが、E7+TERT, bmi-1+TERTで高率に不死化できたのに対し、TERT単独ではごく一部の細胞が不死化された。また、TERT単独で不死化した細胞集団の中にはp16を高発現し増殖を停止するものが自然に出現することから、この細胞の不死化にはp16/RB経路の不活化とテロメラーゼの活性化の両方が必要であることが強く示唆された。しかし、乳腺上皮細胞の場合と異なり、p16プロモーターのメチル化はほとんど見られず、不死化細胞でのp16/RB経路の不活化機構は異なることが示唆された。この細胞にHPV16あるいはHPV18由来の種々の変異E6を導入してPDZドメイン含有蛋白質の変動を詳細に調べた。その結果、この細胞ではhDLG, hScribなどのほかhPSD95が発現していること、このうちhPSD95が野生型HPV18のE6の導入により著減、HPV16のE6によっても減小することが初めて示された。この発見に基づき、HPV陽性子宮頸がん細胞株でのhPSD95発現を調べるとHeLa, SiHa, CaSkiと

も発現がほとんど見られず、HeLa細胞でE6の発現を抑えると発現が回復することが示された。そこで、HeLa, CaSki細胞にhPSD95を発現させ、その増殖能を検討した。培養皿上での増殖速度には差がなかったが、特にCaSki細胞では軟寒天培地でのコロニー形成能、ヌードマウスにおける造腫瘍能に大きな差が見られるとの予備的結果を得ており、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が示唆された。また、最近子宮頸がん発生とNotchの発現に関し興味深い報告がある。子宮頸部異形成ではNotchの高発現が見られるが子宮頸がんでは発現が消失するというものである。また、Notchの高発現はE6E7の転写を抑制するとの報告もある。そこでNotchの発現に関して不死化細胞を用いて検討したところ、E6がNotchの発現を抑制することが明らかとなった。現在、その機構と生物学的な意義を検討中である。

子宮内膜腺細胞はE6E7でのみ延命が可能であった。また乳腺上皮細胞などと異なりE6E7のみではテロメラーゼ活性を誘導できずE6によるTERTの転写活性化機構は報告されているほど単純でないことが示唆された。不死化細胞はサイトケラチンの他、エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体を発現していること、またマトリゲル内で腺管様構造を取ることなどが示され、子宮内膜腺細胞の形質を維持していることが示され

た。また、この細胞は活性型rasを導入すると培養皿上での増殖速度は増すもののヌードマウスにおける造腫瘍能は獲得しなかった。現在、子宮内膜がんにおいて高頻度に不活化されているPTENを不活化するRNAiベクターを開発し、導入を計画している。

細気管支上皮細胞は継代と共にp16が誘導された。E7, bmi-1により延命され、E7+TERT, bmi-1+TERT, E6E7により高率に不死化した。またTERT単独でも低頻度に不死化細胞が得られたため、p16プロモーターの解析を予定している。肺がん発生においては早期のp16プロモーターのメチル化や最近ではbmi-1の高発現も報告されており肺がん発生の理想的なex vivoモデル細胞であると考えている。これらの細胞に活性型rasを導入するとbmi-1+TERTで不死化した細胞では大部分の細胞に細胞死が誘導されたが、E6E7で不死化した細胞では細胞死の割合が少なかった。いずれの場合も生き残った細胞は増殖速度が速くなっていた。今後活性型rasによる細胞死誘導機構の検討を計画している。

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より明らかになってきた。ヒト体細胞の不死化には理論上テロメア長の維持が必須である。実際のがんの約85%では、テロメラーゼの活性化によりテロメア長が維持されており、残りはALTと呼ばれる

染色体外テロメア様配列との組み換え機構により維持されていると考えられている。一方、ほとんどの細胞の継代で観察されるp16の増加とそれに伴う細胞老化は、放射線照射、抗がん剤、H₂O₂、活性型rasの導入など種々のストレスによっても誘導されることからSIPS (stress-induced premature senescence)などと呼ばれている。SIPSはp53によるcheck機構と並ぶがん抑制機構であることが広く認められつつある。これまでにSIPSにおけるp16誘導機構にはMAPキナーゼカスケード、特にp38が中心的役割を果たしているとの報告があるが、正常細胞の継代におけるp16の誘導機構にもp38が中心的役割を果たしているか否かは明らかでない。今後、p53の活性化機構と並んでp16誘導機構の解析が重要なテーマになると考えている。また、がんにおけるp53経路の不活化がp53そのものの変異に加えHDM2、ARFなど広がりを見せているように、p16/RB経路の不活化ではRBそのものの変異は少なくCDK、サイクリンの高発現の他に、p16の変異、p16プロモーターのメチル化、bmi-1の高発現などp16発現抑制に関して広がりを見せている。がんの遺伝子治療は現在p53経路を利用したものが中心であるが、p16/RB経路も将来がん細胞を正常化するのに応用可能である。実際に、HPV陽性の子宮頸がんの増殖はp53を不活化しているE6よりRBを不活化しているE7に強く依存していることを明らかにしている。が

ん細胞は一部の例外を除いて多段階発がんのどこかで不死化しているはずであり、がんで起きているp16/RB経路の異常とその機構を明らかにすることは急務であると考えられる。

E. 結論

ヒト正常細胞の不死化機構はかなり明らかになってきており、in vivoにおけるがん細胞の不死化を非常に良く模倣したシステムであることが示された。不死化機構とそれに拮抗するp16の発現誘導機構の解析が重要であろう。正常不死化細胞を用いた多段階発がんの解析はまだ始まったばかりであるが、このシステムの有用性を確認するに十分な結果が得られた。DNAマイクロアレイ解析などの進歩によりがん細胞で起きている遺伝子発現異常は比較的簡単に得られるようになった。今後は、蓄積された多数の異常がどの順番で起き、それぞれのステップが細胞にどのような形質を与えるかを詳しく解析する必要がある。不死化に至る過程のみ取っても、p53経路の不活化を必要とするものとしらないものがある。また、活性型rasの導入はヒト正常細胞にSIPSを誘導したり、細胞死を誘導したりする。細胞ががん化するにはrasの変異に先行する異常が必要なはずである。今後さらに、胃、大腸などがん好発組織の正常細胞の不死化も検討し、その共通性を解析すると共に、臓器特異的な発がん過程の解析モデルの作製をすすめたい。

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

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.

Nagata, K.I., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Shiromizu, T., Saitoh, N., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T.J., 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.

Bruemmer, D., Yin, F., Liu, J., Kiyono, T., Fleck, E., Van Herle, A.J., Law, R.E. Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303: 251-258, 2003.

Bruemmer, D., Yin, F., Liu, J., Berger, J.P., Kiyono, T., Chen, J., Fleck, E., Van Herle, A.J., Forman, B.M., Law, R.E. Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol. Endocrinol.*, 17: 1005-1018, 2003.

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.*, 288: 35-50, 2003.

Bruemmer, D., Yin, F., Liu, J., Kiyono, T., Fleck, E., Van Herle, A.J., Law, R.E. Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent. *Exp. Cell Res.*, 290: 28-37, 2003.

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.

Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., Kiyono, T., Nishiyama, Y., and 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.

Takeda, Y., Mori, T. Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A. Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.*, in press.

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.

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 g-radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, in press.

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.

清野透 「新世紀の感染症学」下巻 ヒトパピローマウイルス、日本臨床社、pp562-567、2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況
「不死化子宮内膜腺上皮細胞株
及びその作製方法」 出願中

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 室長

研究要旨：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がん抑制候補遺伝子は、肺がん、乳がん、胃がん細胞株等の一部でも発現抑制が見られた。本遺伝子は、アクチン結合タンパク質 cortactin と協調作用して細胞骨格構築や細胞運動に機能すると推測され、その強制発現によりがん細胞の足場非依存性増殖能が低下することがわかった。

また本年度より BAC DNA マイクロアレイを用いたアレイ CGH 法によって、胃がん、乳がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析を開始した。それぞれのがんで特徴的なゲノム構造異常を見出したが、特に胃がんにおいては分化型によって大きく異なる構造異常プロファイルを示すことが明らかになった。

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した。がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定

は発がん機構の解明につながるのみならず、個々のがんにおける多様な遺伝的変化を病態に対応づけて整理することにより、病型診断や予後予測、治療法の選択等に役立つ可能性がある。新しいゲノム解析的手法として、本年度よりアレイ CGH (comparative genomic hybridization)法の導入を図った。昨年度までに解析を進めてきた食道扁平上皮がんのがん抑制遺伝子候補についてはそのがん化における役割を明らかにする目的で機能解析を行っ

た。

B. 研究方法

ゲノム構造異常の探索を目的としてアレイ CGH 法の導入を図り、効率化を目指した。高密度 BAC DNA アレイは東京医科歯科大学、稲澤譲治教授グループとの共同研究により開発を行った。FISH マッピングされた BAC クローン 5000 個から DNA を調製し、PRSG 法（アダプターライゲーション PCR 法）により DNA を増幅、ガラススライドにインクジェットプリント方式で DNA を duplicate で打ち固定化することにより作製した。4500 個の BAC クローンを配したゲノムワイド 4500 アレイと、がん関連遺伝子を含む 800 個の BAC クローンを配したがん 800 アレイの 2 種類を併用することにより、ヒトゲノムを平均 0.6 Mb 間隔でスキッピングできるようになった。アレイ CGH 解析の対象とする胃がん、乳がんについては、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション

(LCM) 法によってがん組織切片よりがん細胞の分離を行い、DNA を抽出、PRSG 法による DNA の増幅を行った。Cy3 標識したがん細胞 DNA (T) と Cy5 標識した正常細胞 DNA (N) を等量混ぜてアレイ上の BAC DNA とハイブリダイズさせた後、結合した

蛍光色素量を測定することによって、T/N シグナル比を算出する。予備実験において健常人 DNA を用いて CGH を行った場合、常染色体由来のすべての BAC DNA の Cy3/Cy5 シグナル比が、計測値として 0.8 - 1.2 の間に納まった。がん細胞含有率が 50 % であると仮定した場合、ゲノムコピー数変化が 1.5 倍 (diploid が triploid に増加) のとき T/N 比は 1.25、1/2 (diploid が haploid に減少) のとき T/N 比は 0.75 となるはずなので、十分にそれらの変化を検出できる系が確立できたと考えられた。

継続研究課題として 11 番染色体の LOH 解析から見出した食道扁平上皮がんのがん抑制遺伝子候補については、RT-PCR レベルで当該遺伝子発現のない胃がん細胞株における強制発現系を用いて、細胞に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

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した。また、「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。

C. 研究結果

1. 食道扁平上皮がんから見出したがん抑制遺伝子候補の機能に関する研究

食道扁平上皮がんについての 11 番染色体全域の LOH 解析から 11q13.4 領域に欠失の集積があることを見出し、共通欠失領域より 11% の頻度 (97 症例中 11 症例) でアミノ酸置換を伴う体細胞突然変異を起こしている新規遺伝子を同定した。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、C 末端に SAM ドメインをもつ 250 kD タンパク質であると推測された。本遺伝子領域より別個に転写される、N 末領域 (アンキリンリピートと SH3 ドメイン) が欠けた産物は、アクチン結合タンパク質 cortactin に結合することが知られている。頭頸部、食道、膀胱がんなどでしばしば見られる 11q13 増幅領域に cortactin 遺伝子 (EMS1) はサイクリン D1 遺伝子とともに含まれ、発がん遺伝子と考えられているが、本遺伝子はゲノム上これに隣接して存在する。11q13 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、両者の機能的関連性は非常に興味深い。

がん細胞株を用いた RT-PCR 解析から食道がんでは mRNA 発現量に変化は見られなかったが、乳がん、肺がん、胃がんなどでは約 1-2 割の株で本遺伝子産物の発現減弱が見られた。遺伝子の機能およびがん化への関与を明らかにする目的で、最長遺伝子産物および N 末欠失産物の強制発現系を用いて細胞に対する影響の観察を行った。

本遺伝子産物の発現が減弱している胃がん細胞株 HGC-27 に両者を安定に発現させたクローンを作製した。HGC-27 株は足場非依存性増殖能を有し、軟寒天中でコロニーを形成するが、これらを発現させたクローンではともにコロニー形成能が約 40% に抑えられた。それぞれの発現量で補正すると、最長遺伝子産物の抑制効果の方が強いと考えられた。なお細胞の増殖能には両者ともに影響を与えなかった。

2. アレイ CGH 解析を用いた胃がん、乳がんのゲノム構造異常の研究

LCM-PRSG 法により胃がん 200 症例、乳がん 90 症例について DNA の収集を行った。今年度は 800 のがん関連遺伝子を配したがん 800 アレイを用いて、アレイ CGH 解析を行った。胃がん 118 症例 (高分化型 tub1: 36 症例; 中分化型 tub2: 30 症例; 低分化充実型 por1: 16 症例; 低分化

非充実型 por2: 36 症例) を解析した結果、染色体 4q, 5q, 9p, 18q のヘミ欠失や 1q21, 8q, 17q21, 20 の増加など比較的共通する異常が認められた反面、分化型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ること、さらに高分化型 tub1 も 2 群 (A, B) に分かれることが明らかとなった。tub1 症例が 2 群に分かれる原因となったゲノム異常は 8q, 13q, 19p などのプロファイルで、一方が増加であるのに対して、他方は減少している、といった大きな違いが観察された。分化型ごとの特徴として、tub1-B 群と por1 のプロファイルが類似している、tub2 は tub1-A 群と似ている領域と tub1-B 群と似ている領域を合わせ持つ、por2 は異常が少ないことが観察された。特に T/N 比が 5 以上の増幅と考えられるがん遺伝子は、17q12 の ERBB2 は全分化型に共通していた (頻度 12%) が、19q11 の CCNE1 増幅 (頻度 4%) は tub1, tub2 でのみ見られた、またその他の増幅遺伝子の多くが tub2 でのみ見られた等の特徴があった。がん抑制遺伝子として知られる 9p21 の p16 遺伝子のホモ欠失 (T/N 比が 0.25 以下、頻度 5%) は tub1-A 群と tub2, por1 で見られた。

浸潤性乳管がん 46 症例を解析した結果では、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、染色体アーム単位の大きい変化が特徴であった。17q12 の ERBB2, PPARBP の増幅がそれぞれ頻度 11%、8p12 の FGFR1 増幅が 6.5% の頻度で見られた。ホモ欠失は 9p21 の p16、10q23 の PTEN などに 2% の頻度で見られた。

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、細胞骨格の構築や細胞運動に機能する可能性が高い。11q13 染色体増幅の結果 cortactin の過剰発現を来した場合に、乳がん細胞では骨への浸潤転移能が増したとの知見がある。一方、我々の LOH 解析から食道扁平上皮がんの本遺伝子領域欠失は 11q13 増幅とは無関係に独立して起こっていることがわかった。このことから本遺伝子の機能的欠損ががんにおいては cortactin の機能亢進と同じ結果を招くのではないかと推測された。それを証明するために、今回は最長遺伝子産物および N 末欠失産物のそれぞれについて強制発現系を作製し細胞に対する影響を調べたところ、特に最長遺伝子産物は胃がん細胞 HGC-