

27 の足場非依存性増殖能を抑制することがわかってきた。現在細胞の運動能に対する影響を検討中であるが、今後は両者の機能的な違いや cortactin との関係を明らかにする必要がある。N 末領域のアンキリンリピートや SH3 ドメイン、PDZ ドメインはおそらく細胞外からのシグナルを受け取ってアクチン系に伝達する役割を担っていると想像され、本遺伝子のがんの浸潤転移能に対する関与について検討したいと考える。

胃がんおよび乳がんのゲノム構造異常は、がん 800 アレイを用いたアレイ CGH 解析によってそれぞれ特徴的なプロファイルを示すことが明らかになった。従来の染色体 CGH 法によっても構造異常プロファイルは示されており、乳がんではそれらの知見とよく一致していた。しかし、胃がんについては欧米での研究が進んでいないこともあり、また臨床検体を用いて大量に解析した報告も少ないので、病理学的組織分類と対応させてゲノム構造異常を観察したプロファイリング取得結果は独自性の高いものとして評価できる。また今回の解析を通して、がん細胞株を用いて研究されてきたがん関連遺伝子に関する従来の成果が実際の臨床検体での実態を必ずしも反映していないのではないか、との見方が生まれ

てきた。がん関連遺伝子についてはその発現も同時に観察する必要があるが、例えば胃がんの増幅遺伝子として有名な FGFR2 (K-sam) や MET (c-met) 遺伝子の増幅の頻度は臨床検体において意外なほど低く、がん化における重要性や遺伝子活性化の機構を考え直す必要があるかもしれない。今後、胃がんについてはゲノム構造異常という側面から胃がんを分類する試みを行い、胃がんの発生過程を整理していきたいと考える。またゲノムワイド 4500 アレイを用いて、より微小な構造異常領域を検出特定し、新規のがん関連遺伝子探索につなげたいと計画している。

E. 結論

食道扁平上皮がんにおいて 11% の頻度で体細胞突然変異を起こしている新規遺伝子は、胃がん細胞株 HGC-27 の足場非依存性増殖能を抑制することがわかった。本遺伝子の不活化は食道扁平上皮がんのみならず、肺がん、乳がん、胃がん等においても起きていると思われ、がんの浸潤転移能の増強に関与しているのではないかと推測される。cortactin、その他の協調作用分子との機能的関係を明らかにすることにより、がん悪性化の機構解明につながると期待される。

本年度より新しいゲノム解析法として導入したアレイ CGH 法は、胃がんおよび乳がんの臨床検体のゲノム構造異常検出に大きな威力を発揮し、多検体を迅速に解析することを可能にした。各種のがんにおけるゲノム構造異常プロファイルの取得はそれぞれのがんの成り立ちや進展過程を分類、整理することに役立ち、発がん機構の解明のみならず、臨床上、病型診断や予後予測、治療法の選択等にも応用の可能性がある重要な研究となるはずである。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析

分担研究者 村上 善則 国立がんセンター研究所・室長

研究要旨

固形がんの進展の分子機構を解明することは、浸潤・転移の制御を考える上で重要である。我々が本研究で同定した肺非小細胞がん (NSCLC) の新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* は、培養肺がん細胞のマウス皮下での腫瘍形成や、脾臓から肝臓への転移形成を抑制する。そこで *TSLC1* のがん化、進展における意義を解明する目的で、ヒトがんにおける異常の実態と遺伝子産物の機能を検討した。その結果、*TSLC1* 遺伝子のプロモーターメチル化による不活化が、ヒト NSCLC の 44% で認められること、特に腫瘍径が 3cm を越える進行がんでは有意に高く生じることを見出した。*TSLC1* のメチル化と発現欠如は、NSCLC 以外にも肺小細胞がん、食道がんをはじめ様々ながんでも認められた。一方 *TSLC1* が細胞内 C 端の PDZ 結合モチーフを介して、極性形成に関与するショウジョウバエのがん抑制蛋白質 Dlg のヒト構造類似体である MPP3 と直接結合することを明らかにした。*TSLC1* を含む分子経路は、多くのがんの進展に関わる新たな経路であり、がんの診断、治療標的となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトがんの腫瘍形成の分子機構を解明し、がんの進展に対する診断、治療の標的分子を明らかにする目的で、我々が腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制遺伝子 *TSLC1* の、ヒトがんにおける異常の実態と、遺伝子産物の機能を検討する。

B. 研究方法

1. ヒト腫瘍における *TSLC1* 遺伝子の異常の検索：

原発性肺非小細胞がん 48 例と同一患者の非がん部について DNA, poly(A) RNA を抽出し解析した。*TSLC1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、CpG アイランド内の転写開始点近傍の 6 箇所 CpG 配列を含む 93 塩基対の断片に関して、bi-sulfite 処理塩基配列決定法、並

びに Bi-sulfite SSCP 解析により検討した。TSLC1 の位置する第 11 染色体 q23 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無は、TSLC1 遺伝子近傍の 5 箇所のマイクロサテライト多型マーカーを用いて検討した。遺伝子発現は Northern blot 解析、RT-PCR 解析により行った。

(倫理面への配慮)

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

2. TSLC1 遺伝子産物の機能解析:

TSLC1 蛋白質の細胞内領域に相当する断片を用いて酵母 2 ハイブリッド法により結合蛋白質を解析した。

TSLC1 遺伝子産物の細胞内局在は、緑色蛍光色素標識蛋白質 (GFP) との融合蛋白質や、特異的ポリクローナル抗体を用いて、共焦点顕微鏡により検討した。免疫沈降法、並びにウエスタン・プロット法には、GFP, HA, V5 融合蛋白質に対する抗体や、抗 TSLC1 特異抗体を用いた。

3. マウス *TSL1*, *TSL2* 遺伝子の同定:

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

C. 研究結果

1. ヒト腫瘍における TSLC1 の異常の検索:

原発性 NSCLC 48 例中 21 例 (44%) にプロモーターメチル化が認められた。メチル化を示す NSCLC は、腫瘍径 3cm 以下の pT1a の腫瘍では 15 例中 2 例 (13%) であったが、腫瘍径 3cm を越える pT1b 以上の腫瘍では 33 例中 19 例 (58%) で、がんの進展に伴って TSLC1 の不活性化が生じることが示された ($p < 0.005$)。また、肺小細胞がん細胞 10 例中 2 例でも TSLC1 のメチル化と発現欠如が認められた。

2. TSLC1 遺伝子産物の機能解析:

TSLC1 蛋白質の細胞内領域に相当する断片を用いて酵母 2 ハイブリッド法を行い、TSLC1 の結合蛋白質候補として、膜の裏打ち蛋白質である Membrane Protein Palmitoylated 3 (MPP3) を同定した。そこで、V5 タグをつけた MPP3 を細胞に発現し、内在性の TSLC1 と結合することを免疫沈降・ウエスタンプロット法により確認した。また、TSLC1 の様々な細胞内断片を GFP と融合し、GST-pull down 法により MPP3 との結合能を検討し、MPP3 が TSLC1 の C 端に存在する PDZ 結合モチーフを介して直接結合することを示した。さらに、TSLC1 と MPP3 と

が細胞膜に沿って共局在することを、共焦点顕微鏡による解析で明らかにした。さらに、肺非小細胞がん細胞 12 例中 1 例で、MPP3 の発現が欠如していることを示した。この細胞は TSLC1, DAL-1 の発現が正常に認められることから、MPP3 の発現欠如により、TSLC1 の経路が不活化していると考えられる。

3. マウス *TSL11*, *TSL12* (*mTslc1*, *mTsl12*) 遺伝子の単離:

TSLC1 の構造類似遺伝子であるヒト *TSL11*, *TSL12* cDNA の塩基配列を指標として、マウスデータベースを検索し、類似 cDNA 配列を 10 種以上同定した。この配列をもとにマウス脳 cDNA ライブラリーを検索し、*mTsl11*, *mTsl12* cDNA を単離した。次にマウスゲノム DNA ライブラリーを検索して、その遺伝子構造を決定した。マウス *Tsl11*, *Tsl12* 遺伝子産物は、ヒト *TSL11*, *TSL12* とアミノ酸レベルで、それぞれ 95%, 98% の相同性を示した。*mTsl11* はヒト *TSL11* と同様に、脳、脊髄特異的な発現を示し、マウス neuroblastoma cell の 4 例中 1 例で発現欠如を示した。一方、*mTsl12* はヒト *TSL12* と同様に、脳、脊髄に加え、腎臓、肝臓などでも発現が認められたが、マウスの腎がん、肝がん細胞の一部で発現欠如を示した。

また、データベースの検索により、*TSLC1* 遺伝子同様、*TSL11*, *TSL12* 遺伝子が脊椎動物間で高度に保存されていることを示した。

D. 考察

本年度の研究により TSLC1 の異常が NSCLC の進展に伴って認められることが明らかになった。また、胸膜浸潤陽性例に TSLC1 の不活化の頻度が高い傾向を示したが、解析症例中の胸膜浸潤陽性例が極端に少なかったために、統計学的有意差は認められなかった。一方、共同研究により、TSLC1 の発現欠如が原発性食道がんでも、その 50% で認められ、粘膜下層を越える深達例、遠隔転移陽性例でその頻度が高く、また TSLC1 発現欠如例では 5 年生存率が有意に低いことが示された。これらの結果は、TSLC1 の不活化が、多くのがんで、その進展に伴って生じていることを示唆しており、培養がん細胞で見られたヌードマウス皮下での腫瘍形成抑制や、脾臓から肝臓への転移抑制と対応するものと思われる。特異抗体を用いた免疫組織化学解析も並行して進めている。

また TSLC1 を介した細胞内伝達経路に関しては、昨年度、TSLC1 が肺腺がんが発現低下が報告されている DAL-1/4.1B と結合し、さらに

細胞骨格に作用することを示した。今年度、新たに TSLC1 結合蛋白質として MPP3 を同定し、細胞極性形成に関与する可能性が示唆された。TSLC1 は当初から、培養がん細胞の *in vitro* の増殖を抑制せず、ヌードマウス皮下での腫瘍抑制を顕著に抑制することが特徴で、細胞間相互作用に関わる機能が示唆されてきた。今年度の研究によって、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明らかになってきたことにより、TSLC1 は固形がんの進展にとって重要な新しい経路を担っているものと推定される。今後、この経路の解析を通じて、腫瘍抑制の分子機構を明らかにし、その病理学的意義を検討するとともに、固形がんの新たな診断、治療の分子標的を探索する方向へ研究を展開したいと思っている。

E. 結論

TSLC1 は、肺がん、食道がんの進展に関与する接着分子であり、その細胞内領域を介してアクチン結合性蛋白質 DAL-1/4.1B や極性形成に関わる MPP3 と直接結合し、細胞接着を介して細胞骨格や極性の形成を制御すると考えられる。TSLC1, DAL-1/4.1B, MPP3 は、肺非小細胞がん、並びに多くの固形がんの診

断、治療の標的分子となる可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Fukami, T., Satoh, H., Williams, YN., Masuda, M., Fukuhara, H., Maruyama, T., Yageta, M., Kuramochi, M., Takamoto, S., Murakami, Y. Isolation of the mouse *Tsll1* and *Tsll2* genes, orthologues of the human *TSLC1-like genes 1 and 2* (*TSL1* and *TSL2*). *Gene*, 323, 11-18, 2003.
- 4) 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.

5) Mao, X., Seidlitz, E., Ghosh, K., Murakami, Y., Ghosh, H.P. The Cytoplasmic Domain is Critical to the Tumour Suppressor Activity of TSLC1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.*, 63, 7979-7985, 2003.

2. 学会発表

1) 村上善則、増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、深見武史、森下和広：上皮、並びに ATL 細胞における TSLC1 蛋白質による細胞接着と細胞死の誘導。第 27 回日本分子生物学会年会。

2) 増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、村上善則：がん抑制蛋白質 TSLC1 による上皮細胞運動能の制御。第 27 回日本分子生物学会年会。

3) 八下田美佳、増田万里、名手祐子、丸山智子、澁谷正史、村上善則：がん抑制蛋白質 TSLC1, protein 4.1, MAGuK 蛋白質による三量体形成とその細胞間接着形成への関与。第 27 回日本分子生物学会年会。

4) 名手祐子、八下田美佳、増田万里、丸山智子、澁谷正史、村上善則：TSLC1 類似接着分子 TSLC2 によ

る前立腺がん細胞の腫瘍原性の抑制。第 27 回日本分子生物学会年会。

5) Yoshinori Murakami: Identification and functional analysis of the novel tumor suppressor gene, TSLC1. The 10th Congress of Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists

6) 村上善則：がん抑制遺伝子 TSLC1 の異常のヒト腫瘍における意義。第 49 回日本人類遺伝学会年会。

7) Yoshinori Muakami, Mari Masuda, Mika Yageta, Takeshi Fukami, Yuko Nate, Tomoko Maruyama: Tumor suppressor protein, TSLC1, is involved in cell adhesion and cytoskeletal organization. The 8th World Congress of Advanced Oncology.

8) 村上善則、増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、福原浩、倉持雅己、森下和広：肺非小細胞がん抑制遺伝子 TSLC1 の分子経路の解析とメチル化による不活化。第 63 回日本癌学会年会。

9) 増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、村上善則：がん抑制蛋白質 TSLC1 による上皮細胞運動能の制御。第 63 回日本癌学会年会。

10) 八下田美佳、増田万里、名手祐子、丸山智子、澁谷正史、村上善則：がん抑制蛋白質 TSLC1, protein 4.1, MAGuK 蛋白質による三量体形成と

その細胞間接着形成への関与。第 63 回日本癌学会年会。

11) 名手祐子、増田万里、八下田美佳、丸山智子、澁谷正史、村上善則：TSLC1 類似接着分子 TSL2 による前立腺がん細胞の腫瘍原性の抑制。第 63 回日本癌学会年会。

12) 深見武史、佐藤均、丸山智子、増田万里、名手祐子、福原浩、八下田美佳、倉持雅己、村上善則：ヒトがん抑制遺伝子 *TSLC1*、並びに類似遺伝子 *TSL1*, *TSL2* のマウス相同遺伝子の単離と解析。第 63 回日本癌学会年会。

13) 森下和広、佐々木秀法、日高智徳、久富木庸子、岡山昭彦、浜田健

嗣、岡部尚文、村上善則、坪内博仁：マイクロアレー解析による ATL 細胞遺伝子発現。第 63 回日本癌学会年会。

14) 佐々木秀法、日高智徳、久富木庸子、岡山昭彦、浜田健嗣、岡部尚文、深見武史、村上善則、坪内博仁、森下和広：急性型 ATL 患者細胞における TSLC1 遺伝子の高発現。第 63 回日本癌学会年会。

15) Yoshinori Murakami: Tumor Suppression and cell-death induction by TSLC1: International Symposium of Dependence Receptor.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) なし。

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

がん抑制遺伝子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の開発

分担研究者 荒川 博文 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨：がん抑制遺伝子p53は、ほぼすべてのがんの半数以上に
変異の認められる遺伝子であり、配列特異的な転写因子をコードし
ている。従って、その標的遺伝子の転写活性化を通してその機能を
発揮すると考えられているが、生理機能の全貌は未だ明らかとなっ
てはいない。p53の生理機能の全貌解明のためにその標的遺伝子の
単離と機能解析を行った。本年度はp53RDL1遺伝子、DUSP5遺伝
子、ALDH4遺伝子、hCDC4b遺伝子、p53RFP遺伝子を単離し、
その機能を明らかとした。p53の生理機能の全貌解明のためには、
p53標的遺伝子の全単離が不可欠であると考えられる。また、p53
の生理機能の正確な理解は、p53を用いた遺伝子治療を劇的に改善
しうるとともに、新しいがん治療法の開発につながると考えられる。

A. 研究目的

がん化のメカニズムは未だ十分に
は解明されておらず、一旦発症した
個体における疾患としてのがんにつ
いての対策も改善されるべき点がか
なり多い状況である。p53については
既に遺伝子治療が臨床応用されてい
るが未だそのがん抑制機序の全貌は
明らかとなっておらず、その標的遺
伝子の全単離と機能解析は、p53の機
能解明を格段に前進させ、さらには
それを応用した治療法を改善・開発

しうると予想される。

B. 研究方法

アデノウイルスに組み込んだp53遺
伝子の導入により顕著なアポトーシ
スが誘導される3種類のp53変異細胞
株（グリオーマ細胞株・大腸癌細胞
株・肺癌細胞株）を用い、p53依存性
の発現誘導を示す遺伝子群について
マイクロアレイ法によって解析した。
p53依存性に強く発現誘導される遺伝
子群を抽出し、それらの遺伝子につ

いてDNA損傷刺激により活性化した内因性p53による発現誘導の有無をRT-PCRおよびノザンプロットにて確認した。p53依存性の発現誘導が確認された遺伝子については、さらにヒトゲノムDNAデータ・ベースから対応するゲノムDNAの塩基配列を引用してp53結合配列の有無を検索し、クロマチン免疫沈降法・EMSA法・レポーターアッセイ法によって、候補標的遺伝子を同定・機能解析を行う。中でも、アポトーシス制御に関わる標的遺伝子は、アデノウイルスベクターに組み込み、ヌードマウスに作成した皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を積極的に評価してゆく。

C. 研究結果

本年度は、p53RDL1遺伝子、DUSP5遺伝子、ALDH4遺伝子、hCDC4b遺伝子、p53RFP遺伝子について論文発表した。この中で、p53RDL1遺伝子はp53依存性アポトーシスを正と負に制御する全く新しいアポトーシス制御標的遺伝子であることを明らかとした。また、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遺伝子を論文発表した。p53R2の機能解析においては、そのノックアウトマウスの詳細な解析から、p53R2のin vivoに

おけるDNA修復のためのdNTP供給の働きを明らかとできた。p53AIP1のin vivoにおける顕著な抗腫瘍効果を報告し、その遺伝子治療への応用の可能性を示唆した。

D. 考察

転写因子p53の標的遺伝子群は、その癌抑制機能を遂行する大変重要な役割を担っているが、その総数は100を越えると予想されている。その中でも、本年度報告したアポトーシス制御分子としてのp53RDL1、サイクリンE蛋白質の分解に関わるhCDC4b、p21蛋白質の分解に関わるp53RFP、MAPキナーゼの脱リン酸化に関わるDUSP5、アポトーシスの負の制御因子ALDH4など、その機能は多岐にわたっている。特にp53R2のノックアウトの解析から、p53はこの分子の制御を介して、DNA修復に密接に関わっている事実が明らかとなった。このように、p53はかなり多くの標的遺伝子を様々な状況に応じて使い分け、その多彩な生理機能を巧妙に制御することで細胞の安全な生存を維持しているものと考えられる。おそらく、p53は状況に応じた生理機能を発揮するために、様々な機能を有する標的遺伝子を使い分け、細胞の生死の運命をチェックポイント分子として決定している可能性が高い。これら標

的遺伝子群のp53結合配列とp53蛋白質の修飾（リン酸化・アセチル化など）との組み合わせは、おそらくp53による多彩な機能の使い分け機序を可能とするであろう。このことはp53遺伝子治療におけるp53遺伝子導入が、必ずしも癌治療のために期待されたアポトーシス誘導や細胞増殖抑制作用のみを誘導することが出来ない可能性を示唆している。p53遺伝子治療において効果的な癌増殖抑制作用を発揮させるためには、p53依存性アポトーシス経路を特異的に活性化するp53の修飾型を癌細胞に導入することや、p53依存性アポトーシス経路の実行分子であるp53AIP1遺伝子やp53RDL1遺伝子の導入を考慮する必要があると思われる。事実、アデノウイルスベクターを用いたp53AIP1遺伝子の腫瘍への導入は、顕著な抗腫瘍効果を示した。

E. 結論

p53の生理機能の全貌解明のためには、p53標的遺伝子の全単離が不可欠であると考えられる。また、p53の生理機能の正確な理解は、p53を用いた遺伝子治療を劇的に改善しうるとともに、新しいがん治療法の開発につながると思われる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

Yoon, K.A., Nakamura, Y., Arakawa, H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. J. Hum. Genet., in press.

Anazawa, Y., Arakawa, H., Nakagawa, H., Nakamura, Y. Identification of STAG1 as a key mediator of p53-dependent apoptotic pathway. Oncogene, in press.

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.

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.

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.

Ng, C.C., 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.

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.

Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., Arakawa, H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 5: 216-223, 2003.

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

がん関連遺伝子異常の診断への応用

分担研究者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所副主幹・医長・特別研究員

研究要旨：膀胱がんの悪性度診断と TUR 術後の膀胱内再発の早期診断を目的として、マルチアレーキャピラリー電気泳動と SSCP 法を応用した遺伝子診断システムを開発した。表在性膀胱がんを対象に TUR で得られた切除組織と尿中からの 9p, 9q, 17p 等の LOH 検出の診断的有用性を評価する臨床試験を開始した。膀胱がんで高頻度に LOH が認められる 9q34.1 領域に存在し、血液型糖鎖を合成する糖転移酵素である ABO 遺伝子に着目し、腫瘍組織における ABO 遺伝子の A 型アレルの欠失あるいはプロモーター部位のメチル化と膀胱がん組織および背景粘膜における A 型抗原の発現異常を解析した。膀胱がんでは A 型抗原の発現消失が高率に認められ、表在性膀胱がんでは ABO 遺伝子のメチル化と、浸潤性膀胱がんでは A 型アレルの欠失と有意な相関を示した。しかし、膀胱上皮の異形成ではその発現は保たれており、9q34.1 領域の欠失は膀胱がんに特異的な遺伝子異常と考えられた。

A.研究目的

本研究ではがんの遺伝子診断の実用化に必要な遺伝子解析技術の開発と臨床検体の解析を通じてその臨床的意義を明らかにすることを目的とする。染色体欠失は各種の固形腫瘍でもっとも高頻度に認められる遺伝子異常であり、その検出は臨床検体を用いたがんの遺伝子診断に有用と考えられる。本年度は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、膀胱がんおよび尿中から染色体欠失を検出する遺伝子診断法の臨床応用について検討した。

B.研究方法

1) 蛍光標識プライマーとスラブゲル電気泳動装置を使用して従来行ってきた blunt-end SSCP 法をマルチアレーキャピラリー電気泳動法で実施するための専用キャピラリーの開発、泳動用緩衝液の組成、泳動条件等についての基礎的検討を行った。
2) 上記研究で開発したマルチアレーキャピラリー電気泳動装置を使用して、表在

性膀胱がん 200 例を対象に TUR 術後 3 年間の経過観察を行い、切除組織と尿中からの 9p, 9q, 17p 等の LOH 検出の診断的有用性を評価する臨床試験を開始した。

3) 膀胱がんで高頻度に LOH が認められる 9q34.1 領域の異常を細胞レベルで免疫組織学的に検出するために、同領域に存在する血液型糖鎖を合成する糖転移酵素である ABO 遺伝子に着目し、腫瘍組織における ABO 遺伝子の A 型アレルの欠失およびプロモーター部位のメチル化を blunt-end SSCP 法と Methylation specific PCR (MSP) 法により解析し、さらに膀胱がん組織、背景粘膜および異形成上皮における A 型抗原の発現の異常を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究の内容がヒトゲノム・遺伝子解析研究に関与すると考えられる場合には、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』を遵守して行われる。体細胞変異についての解析は過去に遺伝子解析を目的として収集された DNA を使用して行う場合、検体はコード化された試料として取り扱わ

れる。遺伝子解析のために新たな検体の採取が必要な場合には、施設倫理委員会の承認した研究計画に基づき、被験者に対する説明と同意を得た後に行なわれる。

C. 研究結果

1) キャピラリー電気泳動装置で SSCP 解析を行うために、キャピラリーの内径、電気泳動用緩衝液の組成等を変更し検討を重ねた結果、従来の変成ゲル電気泳動法よりも高濃度のポリマーを充填することが可能であり、しかも泳動時の発熱量を減少させることが可能となった。本法を用いて SSCP 法を行い、p53 遺伝子内部の 3ヶ所の SNP の分離を試みたところ、従来のスラブゲル電気泳動装置で 1000 分かかっていた SSCP 解析を 60 分以内に終了させることが可能であった。また一度に 16 検体の泳動が可能であり、試料の充填から解析までをすべて自動的に行うことが可能なため、従来法に比べて高いスループットが実現された。

2) 遺伝子診断による表在性膀胱がんの悪性度診断と尿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、平成 15 年 12 月までに 109 例が登録された。本試験に登録された膀胱がん症例は TUR-bt 施行後 3 年間経過観察され、TUR 施行時の腫瘍組織および尿からの 9p, 9q, 17p の欠失の有無が表在性膀胱がんの再発の予測に有用かどうかを判定し、さらに術後の尿を経時的に解析し、尿中からの遺伝子欠失の検出による膀胱がん再発の早期診断の可能性について検討する予定である。最終的な結果判定には未だ時間を要するが、術前尿および組織で 9p, 9q, 17p 等の欠失が認められていた症例の多くで、術後 1 ヶ月以内に欠失が陰性化し、再発時に尿中に欠失が再び検出されることがこれまでの研究で確認されている。

3) A 型抗原の発現消失は血液型が A 型あるいは AB 型である表在性膀胱がん症例の

48.9% (23/47 例) および浸潤性膀胱がんの 48.7% (18/37 例) で認められた。これらの症例を対象として、A 型アレルの欠失の有無と ABO 遺伝子のプロモーター部位のメチル化の有無を解析したところ、A 型抗原の発現の異常は、表在性膀胱がんでは ABO 遺伝子のメチル化と、浸潤性膀胱がんでは A 型アレルの欠失と有意な相関を示した。しかし、背景粘膜および膀胱上皮の異形成ではその発現は保たれており、9q34.1 領域の欠失が膀胱がん発生の early event である可能性は少ないものと考えられた。

D. 考察

Blunt-end SSCP 法をキャピラリー電気泳動で行うための泳動装置を開発した。本装置を使用することにより、短時間での解析と自動化が可能となった。本機の開発による遺伝子検査の高スループット化がなければ、大量の検体を測定する臨床試験の実施は不可能であったと考えられ、将来的には臨床検査室での使用が可能なシステムとして臨床応用することを目指している。膀胱がんを高頻度に認められる 9 番染色体の欠失が膀胱がんの組織発生上、どの時期に生じた異常であるかを明らかにすることは、尿を用いた膀胱がんの遺伝子診断の特異性を明らかにするために重要である。9 番染色体の欠失が膀胱上皮の異形成でも認められるものであるとすれば、TUR 術後でも、膀胱の背景粘膜に存在する病変から遺伝子異常が尿中に持続的に検出されることになり、尿を用いた遺伝子診断のがん特異性を低下させる可能性がある。今回の検討で、膀胱がん組織における A 型抗原の発現消失は血液型が A 型あるいは AB 型である膀胱がん症例の約半数で認められ、表在性膀胱がんにおいては ABO 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、浸潤性膀胱がんにおいては ABO 遺伝子の A 型アレルの欠失が A 型抗原の発現の消失と有意な相関を示した。しかし、腫瘍における A 型抗原の発現消失の有無に関わらず、膀胱

がん症例の背景粘膜に認められた異形成では A 型抗原の発現は保たれていることが示され、9q34.1 領域の欠失あるいは ABO 遺伝子のプロモーター領域のメチル化等の変化は膀胱がん発生の早期の段階では生じていないものと考えられた。以上の結果は、膀胱がんにおける 9 番染色体の欠失が膀胱がんの特異的なマーカーとして利用可能であることを示しているものと考えられた。

E. 結論

マルチアレーキャピラリー電気泳動により SSCP 法を行うための泳動装置を開発し、本装置を用いて膀胱がんの遺伝子診断の有用性を評価する臨床試験を開始した。膀胱がんを高頻度に認められる 9 番染色体の欠失と A 型抗原の発現消失との関連性について検討し、がん組織における A 型抗原の発現消失は 9q34.1 に存在する ABO 遺伝子の欠失あるいはプロモーター領域のメチル化と有意な相関が認められた。しかし、膀胱がんの背景粘膜に認められた異形成上皮では A 型抗原の発現は保たれており、9 番染色体の欠失は膀胱がんの特異的な遺伝子異常と考えられた。マルチアレーキャピラリー電気泳動を用いた SSCP 法の開発は企業との共同研究であり、本研究の研究成果に基づき、2003 年度に 4 件の特許出願を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Sumitsuji I, Sugano K, et al., 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.

Horikawa Y, Sugano K, et al., 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.

Maekawa M, Sugano K, et al., Promoter hypermethylation in cancer silences *LDHB*, eliminating lactate dehydrogenase isoenzymes 1-4. *Clin Chem*, 49: 1518-1520, 2003.

Hirasawa A, Sugano K, et al., 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.

Tomita N, Sugano K, et al., 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.

Miyakura Y, Sugano K, et al., 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.

Sugano K, et al., Outpatient clinic for genetic counseling and gene testing of retinoblastoma. Int J Clin Oncol, 9: 25-30, 2004.

2.学会発表

菅野康吉：p53 遺伝子の生殖細胞系列変異によって生じる遺伝性腫瘍の特徴 第9回家族性腫瘍研究会学術集会（平成15年6月13日）（東京）

菅野康吉、宮倉安幸、小林歩、深山紀子、市川明、吉田輝彦、藤田伸、赤須孝之、野水 整、斉藤 聡、森谷宜皓：若年発症大腸癌に認められた MLH1 遺伝子プロモーター領域の全身的なメチル化 第62回日本癌学会総会（平成15年9月25日）（名古屋）

菅野康吉：ワークショップ7 眼部悪性腫瘍治療における最近の進歩、網膜芽細胞腫の遺伝子診療 第41回日本癌治療学会総会（平成15年9月16日）（札幌）

菅野康吉：ワークショップ14 家族性腫瘍を取り巻く諸問題、遺伝子診断は研究か診療か？－遺伝相談外来の目指すところ－第41回日本癌治療学会総会（平成15年9月16日）（札幌）

菅野康吉：癌検診の方法論-エビデンスと展望「癌検診と遺伝子診断（腫瘍マーカー）」 日本総合健診医学会第32回大会 平成16年1月30日 （東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）

特願 2003-273599 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（2003.7.11）

特願 2003-151397 膀胱癌検査法および装置（2003.5.28）

特願 2003-126307 電気泳動装置（2003.5.1）

特願 2003-001950 核酸塩基配列決定方法（2003.1.8）

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学内科学第一講座教授

研究要旨：がん克服に向けた臨床応用への展開を念頭に、発がんおよび進展に関連する遺伝子異常であるマイクロサテライト不安定性（microsatellite instability、MSI）について胃がん、大腸がんを対象に、ヒト多段階発がん機構の中心をなすRAS/RAF/MAPK pathwayの異常との関連を中心に系統的に解析した。胃がんと大腸がんにおいて、MSIの有無および発生部位により、標的となる遺伝子変異に特徴があることを明らかにした。さらに、従来、識別が困難であった散発性と遺伝性MSI陽性大腸がんの分子異常において、BRAF遺伝子変異の関わりが両者で大きく異なることを初めて明らかにした。いずれの見聞も診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、今後はさらにこの点の応用を進めていきたい。

A. 研究目的

DNAの複製エラーを修復するDNAミスマッチ修復系の異常によるMSIは、遺伝性非ポリポーシス大腸癌（HNPCC）、散発性の胃・大腸・子宮体がん、重複・多発がんなどの発がんおよび進展機構として極めて注目されている。高齢者の右側大腸がんの増加とともに、MSI陽性がんの発生頻度は増加している他、MSIと重複・多発がんとの関連、治療に伴う二次発がん、HNPCCの効果的なスクリーニング法の必要性などを考慮すると、MSI陽性発がん機構の解明は、厚生労働行政におけるがん克服課題において極めて重要である。本研究においては、胃がん、大腸がん、HNPCCを対象に、ヒト多段階発がん機構の中心をなすRAS/RAF/MAPK pathwayの異常との関連を中心に系統的に解析し、発がんおよび進展機構の解明を通じて、診断、分子標的治療、さらにはがん制御を展望することを目的とした。

B. 研究方法

1. 胃がんにおけるMSI、遺伝子解析
散発性胃がん組織より、DNAを抽出し、国際ガイドラインに基づき、マイクロサテライトマーカーを用いて、MSIを検索した。全例に対して、K-rasおよびBRAF遺伝子の変異をsingle strand conformation polymorphism(SSCP)やdenaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)にて検討した。MSI陽性例に対してはさらに標的遺伝子のフレームシフト変異をPCRにて解析した。
2. 大腸がんにおけるMSI、遺伝子解析
胃がんと同様にMSI、K-ras、BRAF遺伝子解析を行った。さらに、APC遺伝子の変異をSSCPおよびprotein truncation testにて、Axin-2、p53遺伝子変異をSSCPで解析した。また、hMLH1遺伝子プロモーター領域のメチル化をmethylation-specific PCRにて検討した。

HNPCC症例においては、BRAF遺伝子変異の他に、DNAミスマッチ修復遺伝子 (hMLH1、hMSH2) の変異をSSCP、sequencingで解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子の検索、成果の発表においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。すなわち、提供者から十分なインフォームド・コンセントを得ることとし、人間の尊厳及び人権を尊重し、実施試料等提供者やその家族、血縁者の人権を科学的、社会的な利益より優先し、適正に研究を行った。

C. 研究結果

BRAF遺伝子変異は、MSI陽性胃がん37例で検出せず、MSI陰性124例中1例にのみ、hot spot変異であるコドン599のバリンからグルタミン酸へのミスセンス変異(V599E変異)を認めた。一方、K-ras遺伝子変異の頻度は、MSI陽性例(28%)で、MSI陰性例(0%)に比べ有意に高かった。

大腸がんでは、MSI陽性74例中25例(34%)においてBRAF遺伝子変異を検出した。いずれもhot spot変異であった。一方、MSI陰性例では、142例中7例(5%)においてのみBRAF遺伝子変異を検出し、V599E変異4例の他に、D593K変異2例とK600E変異1例を認めた。従って、BRAF遺伝子変異はMSI陽性大腸がん有意に頻度が高かった。K-ras遺伝子変異の頻度は、MSI陽性例(18%)が、MSI陰性例(38%)に比べ有意に低かった。

従って、MSI陽性胃がん大腸がん、BRAF遺伝子とK-ras遺伝子の変異の頻度に大きな違いを認めたが、標的遺伝子フレームシフト変異に有意な差を認めなかった。

2. BRAF遺伝子変異の有無とMSI陽性大腸がんの特徴

BRAF遺伝子変異とphenotypeとの関連では、BRAF遺伝子変異陽性例は全例右側大腸であり、陰性例では、33%が左側大腸であった。従って、BRAF遺伝子変異と右側大腸との有意な相関を認めたが、性別との相関は認めなかった。

BRAF遺伝子変異とhMLH1遺伝子メチル化との関連では、BRAF遺伝子変異陽性例の83%でhMLH1遺伝子メチル化を認め、陰性例では33%のみメチル化陽性であった。従って、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。BRAF遺伝子変異とgenotypeとの比較では、APC、Axin-2、p53遺伝子変異との関連を認めなかった。

右側大腸がん左側大腸がん比較すると、右側大腸がんhMLH1遺伝子メチル化およびBRAF遺伝子変異との有意な相関を認めた。

3. HNPCCにおけるBRAF遺伝子変異

157例のHNPCCを解析した。112例で、hMLH1あるいはhMSH2のgermline変異を検出した。残り、45例では、hMSH2の染色異常を認めた。散发性MSI陽性大腸がんとは対照的に157例中BRAF遺伝子変異を検出できなかった。

D. 考察

がんに関連する遺伝子異常のひとつとしてMSIについて系統的に検索し、特にRAS/RAF/MAPK pathwayについて詳細な検討を行った。BRAF遺伝子変異は、RAS遺伝子変異との相補性が示唆されており、K-ras遺伝子変異の低いMSI陽性大腸がんにおける関わりが注目された。実際、散

発性大腸がんでは、MSI陰性例の5%に対して、MSI陽性例の34%で変異を検出し、有意に頻度が高かった。従って、BRAF遺伝子変異は、MSI陽性大腸発がんにおいて重要な役割を果たしていると考えられた。

一方、MSI陽性胃がんにおけるBRAF遺伝子変異の関与は低いと考えられた。しかしながら、従来胃がんではほとんど変異が認められないといわれるK-ras遺伝子変異がMSI陽性胃がんでは約30%に認められることが明らかになった。従って、多段階発がんにおけるフレームシフト変異の標的遺伝子など多くの共通性を有するMSI陽性大腸および胃発がんにおいて、BRAFおよびK-ras遺伝子変異の関わりについて有意な差を認めたことは興味深い。

さらに、BRAF遺伝子変異と右側大腸およびhMLH1遺伝子メチル化との有意な相関を認めた。また、散发性症例とは対照的にHNPCCでは、BRAF遺伝子変異を検出しなかった。散发性MSI陽性大腸がんの右側と左側の比較、散发性MSI陽性大腸がんとHNPCCの比較、さらにMSI陽性大腸がんとうがいの比較においてBRAF遺伝子変異の他に、遺伝子異常で大きな差を認めることはなく、発がんにおけるBRAF遺伝子変異の特異的な役割が示唆された。今後、上記の違いを生ずる分子機構の解析やRAS/RAF/MAPK pathwayの他の分子の異常を解析する予定であり、また、解析を更に前がん病変へと拡げるにより発がん機構の詳細が一層明らかになり、効果的なchemopreventionの開発等への発展性も期待できる。

本研究成果は、DNA修復遺伝子の異常によりMSIを呈する点では共通

しているMSI陽性がんにおいて、RAS/RAF pathwayの異常が、その後の多段階発がん過程の進展を規定している可能性を初めて示したものであり、重要な新知見である。HNPCCの除外診断をはじめとする診断や治療への応用が可能であり、がん克服、国民福祉の向上、医療費の抑制など厚生労働行政に与えるインパクトは極めて大きいと考えられる。

E. 結論

胃および大腸がんにおいてMSIの有無、発生部位、遺伝性の有無によるRAS/RAF/MAPK pathwayの標的遺伝子変異の差異を明らかにした。ヒト多段階発がん機構の解明において大きな意義がある。診断や分子標的治療への臨床応用や、他のがん種の多段階発がん機構の解明へと発展性が期待でき、がん克服へ向けた重要な新知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Adachi Y, Imai K. BRAF at the frontline of HNPCC diagnostics. Gastroenterology, in press.

2) 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.

3) Yamamoto H, Noshio K, Taniguchi H, Adachi Y, Imai K. Activated BRAF targets proximal

colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer*, in press.

4) 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.

5) Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Nosho 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

2. 学会発表

1) Horiuchi S, Yamamoto H, Nosho K, Taniguchi H, Yoshida M, Adachi Y, Sasaki S, Yoshida Y, Arimura Y, Itoh F, Endo T, Imai K. BRAF and K-ras mutations and frameshift mutations of target genes in gastric and colorectal cancers with MSI-H. The 62nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2003, Nagoya.

2) Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Yoshida M, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. The 31st Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2003, Edinburgh.