

20030140

厚生労働科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成16(2004)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明  
横田 淳

### II. 分担研究報告書

1. がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究  
横田 淳
2. 転移・浸潤の制御機構に関する研究  
堺 隆一
3. 細胞脱分化の制御機構に関する研究  
齋藤 政樹
4. プログラム細胞死の制御に関する研究  
北中 千史
5. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析  
神奈木 玲児
6. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析  
宮崎 香
7. 臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究  
久保田哲朗

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんで高率に不活性化している第 22 染色体長腕から単離した候補がん抑制遺伝子 MYO18B の発現抑制にはヒストンのアセチル化が関与していることを示した。MYO18B 大腸がん、卵巣がんでも高頻度に不活性化していることを明らかにした。マウス黒色腫の転移実験系で、活性化された Fyn チロシンキナーゼとそれによりリン酸化された基質蛋白質 Cortactin との安定した複合体形成が細胞の運動能・転移能を制御していることを明らかにした。ガングリオシド GM3 がミクロドメインを細胞内に形成し、その後、細胞表面、細胞外へ移動して機能発現する現象を見出し、「ガングリオソーム」と名付けた。神経芽腫の自然退縮に関わる Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死の制御に RhoA や Cdc42 などの Rho ファミリーメンバーが関与していることを明らかにした。がん細胞では硫酸基修飾に関する遺伝子の脱アセチル化による発現低下のためにシアリルルイス X 糖鎖の発現が誘導されることを明らかにした。細胞接着分子 angiomodulin はセリンプロテアーゼによって限定分解されるとシンデカン 1 への結合活性が増加し、IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することが分かった。チロシンキナーゼ受容体の ATP との結合阻害を介して血管新生を阻害する SU6668 は胃がん・大腸がんの転移実験モデルでそれぞれ腹膜播種と肝転移を抑制した。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 堺 隆一 国立がんセンター研究所 部長
3. 齋藤 政樹 明治薬科大学薬効学講座 教授
4. 北中 千史 国立がんセンター研究所 室長
5. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長
6. 宮崎 香 横浜国立大学木原生物学研究所 所長
7. 久保田哲朗 慶応大学医学部 助教授

A. 研究目的

がんは、細胞内に蓄積する遺伝子異常によって発生し、悪性化していくが、その過程で、増殖制御機構の破綻、細胞死からの回避、脱分化、さらには、浸潤能・転移能の獲得など、がん特有な様々な悪性形質を獲得していく。がん細胞内に起こっている遺伝子異常に関する研究はこの 20 年間で飛躍的に進み、多くのがんで複数のがん遺伝子・がん抑制遺伝子に異常があることが分かってきた。しかし、個々の遺伝子異常によってどのような悪性形質が獲得されるかは未だ不明の点が多く、また、現在までに同定された遺伝子の異常だけでは個々の悪性形

質を遺伝子異常との対応では十分に把握できない。

本研究の目的は、がん細胞に特有な悪性形質である、浸潤、転移、細胞死、脱分化などの分子機構を解明することにより、臨床で有用ながんの新たな診断法や制御法を開発することである。早期診断法などの進歩により多くのがんで根治が可能になってきた現在、がんの悪性化を阻止する治療法の開発、転移腫瘍に対する正確な診断法や分子標的療法の開発は、がんの治癒率や生存率のさらなる向上のために極めて重要な課題である。本研究では、がん細胞の浸潤・転移・不死化・脱分化の過程を、がん細胞内に起こっている遺伝子異常やがん細胞に特有な遺伝子発現プロファイル、細胞接着糖鎖、蛋白質リン酸化などとの関連で把握し、その制御法を検討していく。さらには、独自に開発された実験法や転移モデルを用いて、その診断・治療開発研究を進める。本研究によって、がん細胞内での診断・治療の標的分子が整理され、進行がんの治療法を改善する上での多くの情報が得られると期待される。本研究は、世界的にもその重要性は認識されているものの、研究の展開が遅れており、飛躍的な研究成果が望まれている分野である。以下に本年度の研究手法とその成果を、個々の研究項目ごとに列記した。

## B. 研究方法

### 1. がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

MYO18B 遺伝子のプロモーター周辺の CpG サイトを含む領域を増幅するプライマーセットとアセチル化ヒストン H3・H4 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法でプロモーター領域のヒストン H3\ H4 のアセチル化レベルを定量した。レトロウイルスベクターを用いて MYO18B 遺伝子を細胞に導入し、puromycin 存在下で培養することによりポリクローナルな MYO18B 発現細胞を樹立した。MYO18B 蛋白質の発現は、GST-MYO18B 蛋白質で免疫したウサギ血清をアフィニティクロマトグラフィーで精製して作製した anti-MYO18B 抗体を用いて Western blot 法で確認した。これらの細胞を用いて、trans-well chamber を用いた運動能・浸潤能やヌードマウス皮下への移植による造腫瘍能等を調べた。卵巣がん、大腸がんの細胞株および手術検体より DNA、RNA を抽出し、MYO18B 遺伝子の変異、欠失、発現、メチル化を解析した。変異の検索は WAVE 法で行い、欠失は遺伝子座内の 2 つのマイクロサテライトマーカーを用いて判定した。発現とメチル化については細胞株を 5-aza-deoxycytidine (5-Aza-dC) 及び trichostatin A (TSA) 存在下で培養した後、RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で MYO18B mRNA の変動を測定した。プロモーター CpG アイランドのメチル化は bisulfite sequencing 法で調べた。

### 2. 転移・浸潤の制御機構に関する研究

ShcC の Grb2 結合部位である CH1 部位の YYNS/YVNT の計 3 箇所のチロシンをフェニルアラニンに置換したドミナントネガティブ型および SH2 部位の欠損変異体を作製し、野生型の ShcC を過剰発現したものとともに、NB39-nu 細胞においてこれらの ShcC の変異体を発現する細胞株を樹立して、細胞運動能、浸潤能、足場非依存性増殖能、造腫瘍能などの解析を行った。

マウスメラノーマの細胞株群 K-1735 は、転移性の低い C10、C19 と転移性の高い X21、M2 を用いた。ヒト骨肉腫細胞株 HU-09 は、高転移性の群 (M112、M132) と低転移性の群 (L12、L13) を用いた。Boyden Chamber アッセイにより細胞運動能や細胞の接着能を、また、チロシンキナーゼ活性とチロシンリン酸化蛋白質の違いを比較検討することにより転移性に関わるチロシンキナーゼ経路を明らかにした。

### 3. 細胞脱分化の制御機構に関する研究

SAT-1 遺伝子の Exon 2 を含むクローンの制限酵素地図を作製、ターゲティングベクターを構築し、ES 細胞に導入してノックアウトマウスを作製した。ガングリオシド完全欠損マウス肺がん細胞株 3LL 細胞にガングリオシド GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し、GM3 発現株、GM3 及び GD3 発現株などを樹立した。ガングリオシドのマイクロドメイン形成の検索は、免疫蛍光染色法を使った光学顕微鏡下観察と共焦点レーザー顕微鏡下観察、さらに、1 次抗体反応後に金コロイド結合性 2 次抗体を使って免疫化学的染色後、走査電顕下及び透過電顕下の観察によって行った。抗がん剤抵抗性と GM3 合成酵素 SAT-1 遺伝子発現レベルとの相関関係の解析は 8 株のヒト肺がん細胞株 (LK-2, Lu99B, H23, LCSC#1,

LCSC#2, ABC-1, PC3, A549) を用いて、SAT-1 酵素 mRNA の発現量と Adriamycin, Cisplatin, Etoposide, Vincristine などの抗がん剤に対する抵抗性ととの相関を検索した。

### 4. プログラム細胞死の制御に関する研究

昨年度までに RhoA, Cdc42 の優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死に影響を与えないことを確認しているが、本年度はそれぞれの恒常活性化型変異体の発現が Ras 依存的細胞死にどのような影響を与えるかを調べた。昨年度までに PI3 キナーゼおよび Rac の活性が Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっている可能性を示してきた。そこで、PI3 キナーゼの産物である PIP3 によって活性化される Rac 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1 に着目し、Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死誘導への関与について検討した。検討項目としては、Tiam1 の活性型変異体の発現により Ras により誘導されるのと同様の細胞死が誘導されるかを調べた。また、野生型 Tiam1 の細胞内含量を上昇させたときに Ras 依存的細胞死に対する感受性も上昇するかどうか調べた。さらに、内因性の Tiam1 が Ras による細胞死誘導に必要かどうかを検討するため、Tiam1 の優性抑制変異体を作製して検討した。また、Tiam1 が Ras との直接結合により活性化されるといふ報告もあるため、Tiam1 の種々の優性抑制変異体を用いて Tiam1 が直接的あるいは間接的に Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっているかを調べた。

### 5. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

シアリルルイス x 糖鎖の発現ががん細胞で増大する機序を明らかにするために、シアリルルイス x 糖鎖にさらに硫酸基修飾が加わった一連の複雑な構造を持つ糖鎖群の発現を、独自に作製した特異的単クローン抗体による免疫組織学的方法で解析した。また、これらの糖鎖の硫酸基修飾に関わる酵素と硫酸トランスポーター分子の遺伝子発現を、大腸がん手術標本からがん組織と非がん上皮細胞を採取し、定量的リアルタイム PCR 法で検討した。がんが増減した硫酸基修飾関連遺伝子については、ヒト培養がん細胞株における遺伝子発現も調査した。また、ヒト培養がん細胞株をヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるトリコスタチン A や DNA のメチル化阻害剤である 5-aza-cytidine の存在下で培養し、その発現変動を、また、産物である硫酸化糖鎖の発現変動を RT-PCR 法およびフローサイトメトリー法で解析した。がんが発現が増加する硫酸基転移酵素遺伝子については基質特異性を解析し、他の硫酸基転移酵素遺伝子では産生されない特異的な糖鎖構造を調べた。また、そのような硫酸化糖鎖を特異的に検出する単クローン抗体を探索し、患者組織中での発現を調査した。また、患者糞便中에서도目的の糖鎖が検出可能かどうかをドットプロット法にて試みた。

### 6. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

多くのヒトがん細胞株による Angiomioculin (AGM)/IGFBP-rP1 の分泌とプロテアーゼによる分解を分析するとともに、精製 AGM を用いて生理活性の検定と受容体の同定を行った。また、腫瘍増殖に及ぼす AGM の作用を明らかにするために、大腸がん細胞に AGM を強制発現させた。ラミニン 5 (LN5)  $\alpha$  3 鎖 Gドメインの G3-G4 間の切断部位に変異を導入した cDNA を作製

し、 $\beta 3$  鎖と  $\gamma 2$  鎖に対する cDNA とともにヒト腎細胞 HEK293 に導入し、非切断型の LN5 を発現させた。非切断型 LN5 を調製し、プロテアーゼによるプロセシングの効果を調べた。一方、LN5 には通常の  $\alpha 3A$  鎖に比べて約 2 倍のサイズの  $\alpha 3B$  鎖をもつアイソフォームである ラミニン 5 (LN5B:  $\alpha 3B/\beta 3/\gamma 2$ ) の存在が示唆されているが、生理活性や機能に関しては全く知られていない。そこで  $\alpha 3B$  鎖の cDNA 全長をクローニングし、組換え型ヒト LN5B の大量発現系を確立した。

#### 7. 臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

SU6668 の直接細胞障害性をヒト胃がん細胞株 (TMK-1, MKN-45, MKN-74) および HUVEC を対象として MTT アッセイと bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み阻害試験によって行い、VEGF が抗腫瘍効果に与える影響を検討した。TMK-1 細胞をヌードマウスの腹腔内に播種し、翌日から SU6668 (200 mg/kg) を 2 週間に渡って一日二回経口投与した。腫瘍播種結節数と重量により SU6668 の播種阻害効果を評価した。(3) 肝転移阻害実験: Day 0 に  $10^5$  個の HT-29, WAV-I 腫瘍細胞 suspension  $50 \mu\text{l}$  を脾臓の被膜下に投与し、SCID マウスを対照群と治療群に群分けし Day 1 より治療を開始した。SU6668 は 1 日 200 mg/kg を分 2 で強制経口投与し、Day 29 にマウスを sacrifice して肝転移を肝臓重量により評価した。(4) DAS 法: Dorsal air sac 法では HT-29, WiDr-meta, WAV-I を BALB/cA 雄性マウス (7-8 週齢) 各群 4~5 匹の背部皮下に、 $2 \times 10^7$  個の細胞を含む PBS cell suspension (0.2 ml) を注入し、chamber (内径 10 mm, 厚さ 2 mm) を移植して 6 日間連日経口投与 (治療群には SU006668 200 mg/kg/day, 対照群には vehicle を分 2 で強制投与) を行った。Day 6 にエーテル麻酔下にマウス背部皮膚を chamber ごと剥皮し、実体顕微鏡にて chamber の接触していた範囲における 3 mm 以上の蛇行血管数を計数した。スコア (angiogenesis index) は、蛇行血管数に応じて 0-5 までの 6 段階で評価し、蛇行血管数が 5 本以上のものはすべてスコア 5 とした。

(倫理面への配慮)

手術標本を用いた研究は、病理学的検査の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物を用いた実験は各施設における「動物実験に関する指針」に従い、動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行った。

### C. 研究結果

#### 1. がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

昨年までの本研究で、悪性度の高い肺がんで高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) 上に同定されたホモ欠失領域より新規遺伝子 *MYO18B* を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の 50% 以上で変異、欠失、過メチル化等により不活化していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにした。そこで本年度は、(1) がん細胞における *MYO18B* 遺伝子不活化の機構、特にヒストンアセチル化との関連性の解析、(2) *MYO18B* 遺伝子の発現が

がん関連形質・転移関連形質に及ぼす影響についての解析をさらに進めるとともに、(3) 肺がんと同様に 22q の欠失が高頻度に報告されている卵巣がん、大腸がんでの *MYO18B* 遺伝子異常の解析を行なった。

*MYO18B* 遺伝子の不活化は変異、欠失、過メチル化による発現抑制だけでは説明することはできない。これまでの研究で、*MYO18B* 発現が低下している肺がん細胞株のほとんどで脱アセチル化阻害剤 TSA によって *MYO18B* 発現が誘導されたことから、プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを ChIP 法で測定した。8 種類のヒト肺がん細胞株中、*MYO18B* 発現が低下または消失している 7 細胞株中 6 細胞株において、*MYO18B* が高発現している H82 と比較して、ヒストン H3、H4 のアセチル化レベルが低かった。また、TSA 処理によって *MYO18B* 発現が誘導される 6 細胞株すべてで TSA 処理後にヒストン H3 及び H4 アセチル化レベルが上昇していた。そこで、相関係数を求めて検定を行なったところ、*MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの間に有意な相関を認めた。

*MYO18B* 遺伝子産物は他のミオシンスーパーファミリー蛋白質と同様に、細胞分裂、細胞運動、細胞形態の維持・変化、分子の細胞内輸送やシグナル伝達などに関与することが予想された。そこで、ヒト肺がん細胞株に *MYO18B* 遺伝子を導入し、がん関連形質・転移関連形質の変化を検討した。*MYO18B* 遺伝子を強制発現させたヒト肺がん細胞株 H322, H1299 では、*in vitro* での細胞増殖能に変化を認めなかったが、足場非依存性増殖およびヌードマウスを用いた *in vivo* での腫瘍形成が有意に抑制された。また、trans-well chamber を用いた *in vitro* での運動能・浸潤能が有意に低下し、この運動能・浸潤能の抑制は RNAi による *MYO18B* 発現ノックダウンにより減弱した。

第 22 染色体長腕の欠失は卵巣がんで 50-70%、大腸がんで 20-40% と高頻度に検出されるので、これらのがんにおける *MYO18B* 遺伝子異常の有無について検討した。卵巣がんにおいては細胞株 4 例中 1 例 (25%)、手術検体 17 例中 1 例 (6%) で変異が検出された。発現低下は細胞株 4 例中全例 (100%)、手術検体 17 例中 12 例 (71%) で認められ、発現が低下した細胞株 4 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 3 例で発現が回復した。これら細胞株 3 例中 2 例、及び手術検体 15 例中 2 例 (13%) で遺伝子プロモーター CpG アイランドが過メチル化していた。一方、大腸がんにおいては細胞株 11 例中 2 例 (18%)、手術検体 47 例中 1 例 (2%) で変異が、手術検体 43 例中 16 例 (40%) で欠失が認められた。発現低下は細胞株 11 例中 9 例 (82%)、手術検体 12 例中 5 例 (42%) で認められ、発現が低下した細胞株 9 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 9 例中全例で発現が回復した。これらの細胞株ではプロモーター CpG アイランドの過メチル化は認めなかったが、*MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの間に有意な相関を認めた。またヒト大腸がん細胞株 DLD-1、HT29 へ *MYO18B* 遺伝子を導入したところ、足場非依存性増殖が有意に抑制された。

#### 2. 転移・浸潤の制御機構に関する研究

これまでに神経芽腫細胞株およびヒト神経芽腫組織の

約 10%において、遺伝子増幅によって受容体型チロシンキナーゼである ALK が活性化して、下流のドッキング分子 ShcC の過度のリン酸化および ALK-ShcC の安定した複合体形成がおり、最終的に MAPK 経路の活性化がおこるというメカニズムを見出した。ALK-ShcC 経路の活性化により EGF や NGF など増殖因子刺激に対して MAP キナーゼが不応性となっていた。このような細胞に、ShcC のドミナントネガティブ型を発現させるとチミジン取り込み能や MAP キナーゼの活性には大きな変化が見られなかったが、PI3K-Akt 経路や MAPK 経路は明確に抑制され、細胞運動能・浸潤能の低下やレチノイン酸による分化誘導後の突起形成能の消失などが認められた。それに対し、ShcC 過剰発現では細胞の運動能は亢進しており、ヌードマウスの造腫瘍能や足場非依存性増殖能はむしろ著明に抑制され、このような効果はすべて SH2 領域を欠損する ShcC では認められないことから、ShcC は SH2 を介して、報告されている ShcA の機能とは異なる形質転換に対する抑制的效果を持つことが示唆された。

マウスメラノーマ K-1735 の高転移株群において、Fyn チロシンキナーゼの活性化と、強くリン酸化された 85kD の蛋白質 Cortactin と Fyn との複合体形成が検出された。低転移株と比較すると、Cortactin はリン酸化だけでなく発現量も著明に上昇していた。高転移株ではフィブロネクチン上への接着刺激の後、約 1 時間から Cortactin 蛋白質の発現誘導がみられ、2-5 時間をピークとした Fyn の活性化と Cortactin の強いリン酸化が認められた。これらの変化は *de novo* の蛋白質合成を阻害すると消失し、また低転移株では観察されなかった。Cortactin ないし他のドッキング分子の誘導に伴う Fyn の活性化が、細胞の転移能に関わる可能性を考えている。

### 3. 細胞脱分化の制御機構に関する研究

ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-1 遺伝子欠損マウスの作製を進め、ホモマウスの作製に成功した。ホモマウスの予備的検索で、病理学的にはランゲルハンス島の減少が疑われ、耐糖能の鈍化、インスリン感受性の増加などが認められた。また、SAT-1 遺伝子の double allele 欠損の ES 細胞を作成し、その性格付けを進めているが、形態や増殖能には変化は認められなかった。

ガングリオシドは細胞膜においてダイナミックな機能性マイクロドメインを形成し、細胞増殖・分化、細胞相互認識に重要な機能を発揮していると言われる。ガングリオシド欠損マウス肺癌 3LL 細胞株に GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し、ガングリオシド GM3 発現性の安定変異株を樹立したところ、ガングリオシド GM3 が集ぞくした直径 50-100nm の GM3 ミクロドメインが細胞内に形成されることが認められた。このマイクロドメインは細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子状態で放出される現象が、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に観察された。これを「ガングリオソーム gangliosomes」と名付け、ガングリオシドの機能発現機構の一つとして提唱した。

8 株のヒト肺癌細胞株 (LK-2, Lu99B, H23, LCSC#1, LCSC#2, ABC-1, PC3, A549) について、SAT-1 酵素 mRNA の発現量と Adriamycin, Cisplatin, Etoposide, Vincristine などの抗癌剤に対する抵抗性とを相関を検索したところ、SAT-1 mRNA の発現レベル

が高い細胞ほど抗癌剤に対する抵抗性が高いこと、薬剤排出蛋白遺伝子の発現レベルとは相関しないこと等が判明した。

### 4. プログラム細胞死の制御に関する研究

RhoA については恒常活性型 RhoA の発現により Ras 依存的細胞死誘導が強力に抑制されることが判明した。また恒常活性型 RhoA 変異体のみならず野生型 RhoA の発現も弱いながら Ras による細胞死を抑制する傾向が認められた。Cdc42 については、恒常活性型 Cdc42 を発現させると単独ではごく軽度の細胞死が誘導されるのみであったが、活性型 Cdc42 とともに単独ではほとんど細胞死を誘導しない低いレベルで Ras を発現させると顕著な細胞死が誘導された。また、このような Cdc42 活性化による Ras 依存的細胞死の促進現象が Rac に依存するものか否かを明らかにするため、Ras と Cdc42 により協調的に誘導される細胞死に対する優性抑制 Rac 変異体の発現の効果を調べたところ、効率よく細胞死が抑制されることが判明した。2) 活性型 Tiam1 を神経芽腫細胞内で発現させたところ、Ras を発現させた場合と同様に不規則な大きさへの断片化を伴う細胞死が誘導された。また、活性型 Tiam1 による細胞死誘導はカスパーゼ阻害剤による影響を受けなかった。次いで野生型 Tiam1 を外来性に発現させて細胞内 Tiam1 レベルを上昇させてもそのみでは細胞死は誘導されなかったが、ここに単独ではほとんど細胞死を誘導しない低いレベルで Ras を同時に発現させると顕著な細胞死誘導が認められた。さらに内因性の Tiam1 の Ras 依存的細胞死における役割を明らかにするために Tiam1 の優性抑制変異体を用いて検討を行なった。まず Tiam1 の優性抑制変異体として N 末端断片 (a.a.393-854) を用いて Ras と同時に神経芽腫細胞内に発現させると Ras による細胞死誘導が効率よく抑制された。この Tiam1 の N 末端断片には Ras と直接結合する領域が存在するため、その領域が Ras に対して dominant-negative に機能している可能性が考えられた。そこでさらに優性抑制変異体のコンストラクト (a.a.393-760, a.a.760-854) を作製し検討を行なったところ、a.a.393-760 断片が抑制効果を示したのに対して、Ras による Tiam1 の直接活性化を抑制することが知られている a.a.760-854 断片には抑制効果が見られなかった。

### 5. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

正常大腸の上皮細胞に、シアリルルイス x 糖鎖にさらに硫酸基が結合した複雑な構造の糖鎖が有意に発現されている事を見いだした。癌細胞でシアリルルイス x 糖鎖の発現が増加するのは、癌化に伴って硫酸化が低下するためと考えられる。大腸の主要な 6-硫酸基転移酵素である I-GlcNAc6ST の mRNA は、非癌上皮細胞に比べて大腸癌細胞では有意に発現が低下していた。これ以外の 6-硫酸基転移酵素の mRNA には有意の減少は見られなかった。また、細胞膜における硫酸基トランスポーターの mRNA は非癌上皮細胞に比べて大腸癌細胞では有意に発現が低下していた。一方、活性化硫酸を細胞質からゴルジ装置に汲み込む PAPS トランスポーター mRNA には、有意の減少は見られなかった。I-GlcNAc6ST の mRNA については癌の進行の比較的初期 (Dukes A および B) ですですら有意の低下が見られた。培養大腸癌細胞をトリコスタチン A 処理すると I-GlcNAc6ST の mRNA

の誘導が見られ、癌における硫酸基転移酵素の mRNA 発現低下の背景にはヒストンの脱アセチル化があると考えられた。

上記の大腸がんの硫酸化糖鎖を研究する過程で、むしろ癌で増加すると思われる特殊な硫酸化糖鎖を見いだした。これは、癌で発現が増加する 6-硫酸基転移酵素、HEC-GlcNAc6ST の産物であると考えられた。この硫酸化糖鎖は非癌上皮細胞にはほぼまったく検出されず、大腸がんの約 32% に検出され、とくに右半大腸がんでは頻度が高かった(60%)。また、腺腫性ポリープでも陽性となった。糞便を用いたスクリーニング診断への応用を考えて糞便の PBS 抽出物中のこの硫酸化糖鎖を測定したところ、大腸がんおよび大腸ポリープの患者検体で陽性者が見られた。

#### 6. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

多数のヒトがん細胞株による angiomodulin (AGM) の分泌を分析した結果、約 40% の細胞株で分泌が確認された。胃がん細胞や卵巣がん細胞では 33kDa の AGM 分子が一箇所切断されて 25kDa と 8kDa の二本鎖型となった AGM が高い割合で検出された。さらに、この AGM の切断は細胞膜に結合したセリンプロテアーゼによって起こることが確認された。切断型および非切断型 AGM を単離し、生理活性を比較した結果、プロテアーゼによる切断に伴い細胞接着活性が増加するが、IGF/insulin 結合活性ならびに IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することが分かった。また、AGM の細胞表面受容体として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるシンデカン 1 が同定された。一方、腫瘍増殖における AGM の作用を明らかにするため、大腸がん細胞株 DLD-1 に AGM を強制発現させたところヌードマウス腹腔および皮下での腫瘍増殖が著明に抑制されることが明らかになった。

ラミニン 5 (LN5) の  $\alpha 3$  鎖 Gドメインの G3-G4 間の切断部位に変異を導入することによって、Gドメインが切断されない LN5 を調製した。その生理活性を、通常の切断型 LN5 と比較した結果、非切断型は切断型に比べて細胞接着活性と細胞運動活性が共に低いこと、すなわち G4-G5 の切断によって LN5 が低活性型から高活性型に変換することが明らかになった。また、非切断型は切断型に比べて効率的にマトリックスに沈着することが判明した。一方、 $\alpha 3$  鎖の cDNA 全長 (10 kbp) をクローニングし、HEK293 細胞を用いて組換え型ヒトラミニン 5A (LN5B) を調製した。LN5B は LN5 よりもさらに高い細胞接着活性と細胞運動活性を示し、また様々な正常上皮細胞の増殖を促進することが判明した。さらに、 $\alpha 3$  鎖の N 末端部位がプロテアーゼによる切断を受け、145 kDa の切断型  $\alpha 3$  鎖を持つ LN5B と 190 kDa の  $\alpha 3$  鎖 N 末端断片が産生されること、この 190 kDa 切断断片もインテグリン  $\alpha 3 \beta 1$  を介して細胞の接着、運動、増殖を促進できることが明らかになった。

#### 7. 臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

MTT アッセイでは SU6668 は 3 種類の胃がん細胞株に対して軽度の細胞障害性を示し、50% 抑制濃度 (IC50) は 22.6 mg/ml (TMK-1)、31.8 mg/ml (MKN-45)、

and 26.7 mg/ml (MKN74) であった。一方、HUVEC は SU6668 に対して感受性が高く、IC50 は 8.9 mg/ml と 2 倍以上の感受性を示した。BrdU アッセイでは、VEGF は HUVEC の DNA 合成を促進したが、胃がん株の増殖は促進されなかった。SU6668 は VEGF によって誘導された HUVEC の DNA 合成を阻害したが、胃がん細胞に対する影響は VEGF の存在に関係せず一定であった。

ヌードマウスに腹腔播種された TMK-1 の播種結節数、播種湿重量はいずれも、SU6668 により推計学的に有意に阻害された ( $P < 0.05$ )。HT-29 における対象群の肝重量は  $1.238 \pm 0.05$  mg、治療群の重量は  $1.096 \pm 0.03$  mg で、SU6668 の強制経口投与は HT-29 の肝転移重量を推計学的に有意に抑制した ( $P = 0.03$ )。一方、WAV-1 における肝重量は対象群  $1.36 \pm 0.05$  mg、SU6668 群  $1.13 \pm 0.02$  mg であり両者の間には推計学的に有意 ( $P = 0.001$ ) な差が認められ、2 種類の大腸がん肝転移モデルにおいて SU6668 は肝転移を推計学的に有意に抑制した。DAS 法では 3 株共に SU6668 で腫瘍血管新生阻害が認められ、その危険率は HT-29,  $P = 0.03$ ; WiDr,  $P = 0.003$ ; WAV-1,  $P = 0.0007$  であった。大腸癌肝転移モデルにおける転移阻害が血管新生阻害を介していることが示唆された。腹腔播種モデル、肝転移モデル、DAS 法の実験期間中に本剤によるマウスの毒性死や体重減少は認められなかった。

#### D. 考察

##### 1. がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

本研究で明らかとなった *MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの有意な相関は、ヒストンの脱アセチル化が *MYO18B* の発現低下の一因となっていることを示唆し、今後、他の遺伝子同様、ヒストン脱アセチル化による遺伝子発現低下の分子機構を明らかにしていく必要がある。ヒト肺がん細胞株への *MYO18B* 遺伝子導入による形質の変化から、*MYO18B* 遺伝子は、肺がんを高頻度に失活している p53 や p16/RB とは異なり、細胞のアポトーシスや細胞周期の制御に直接関与するのではなく、生体内において腫瘍形成能や運動能・浸潤能を抑制すると考えられ、肺がんの悪性化、特に浸潤や転移への関与が示唆された。また、*MYO18B* 遺伝子は卵巣がん、大腸がんにおいても比較的高頻度に不活化していたことから、肺がんのみならず、種々のヒトがんの発生・進展に関与するがん抑制遺伝子であることが示唆された。今後、この遺伝子の機能解析を進めることにより、また、各種組織亜型、進行度のヒトがんにおける発現動態・ゲノム異常の解析を進めることにより、がんの発生・進展における *MYO18B* 遺伝子失活の意義を明らかにしていく予定である。

##### 2. 転移・浸潤の制御機構に関する研究

ALK-ShcC 経路の活性化により EGF や NGF など増殖因子刺激に対して MAP キナーゼが不応性となっており、この経路がこれらの細胞の生存や運動を支配していることが予想された。ShcC の変異体を用いた実験により ShcC のリン酸化部位から Grb2 を介するシグナルが腫瘍細胞の運動や分化を正に制御しているのに対し、足場非依存性増殖能や造腫瘍能などといった形質には ShcC

の発現自体が負に制御していることが示唆され、腫瘍の個々の特性を選択的に阻害する分子の候補として興味を持たれる。また繊維芽細胞においては Cas も Fyn キナーゼの基質となって細胞の腫瘍化に関わることを以前示したが、今回、マウスメラノーマ細胞では Fyn-Cortactin の複合体がその高転移性に関連して形成されること、通常のインテグリン刺激による即時型のリン酸化ではなく、蛋白質合成を介した遅延型の活性化を見せることは、細胞運動を制御する新しい機構の存在を示唆すると同時に、Src ファミリーキナーゼの使い分けを考える上で興味深く、両者の結合阻害の方向で研究を進めていく。

### 3. 細胞脱分化の制御機構に関する研究

本年度の研究結果により、ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-1 遺伝子、発現酵素タンパク、最終産物ガングリオシド GM3、それぞれの生物機能、病態生理学的意義等が徐々に明らかになりつつあり、近い将来、統合的に理解され、実用化へ向けての研究開発が期待される。とくに、これらの遺伝子、酵素、産物が、細胞増殖の基盤機構に関わるインスリンの機能調節に基本的に関与していることは、今後とも注目に値すると思われる。

### 4. プログラム細胞死の制御に関する研究

恒常活性型 RhoA および弱引ながら野生型 RhoA も Ras 依存的細胞死を抑制したことから、RhoA の活性化は Ras による細胞死誘導に対して抑制的に機能していると考えられた。また恒常活性型 Cdc42 の発現が単独では細胞死をほとんど誘導せず Ras による細胞死誘導に対して促進作用を示した点は Rac と同様であった。しかしながら Cdc42 の優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死を抑制しないのに対して Rac の優性抑制変異体が Cdc42 による Ras 依存的細胞死の促進を抑制したことから、Cdc42 は Rac と同等の働きをしているのではなく、おそらく Rac の上流で Rac 依存的に機能しているものと考えられた。Tiam1 については活性型が単独で細胞死を誘導し、野生型発現が Ras による細胞死誘導を促進し、かつ優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死を抑制したことから、Tiam1 は Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっていると考えられた。さらに種々の優性抑制変異体を用いた詳細な解析から Ras から Tiam1 活性化に至るシグナルが Ras との直接会合によるものではなく、おそらく PI3 キナーゼを介した間接的なものであると考えられた。

### 5. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

これまでがんにおけるシアリルルイス x 発現亢進の機構としては、合成酵素の発現亢進によるとの仮説にたった研究がさかんに進められてきたものの、シアリルルイス x 発現亢進を十分に説明できる結果は得られていなかった。今回の検討結果は、正常上皮細胞にはシアリルルイス x 糖鎖の合成に必要な酵素はすでに全て備わっており、ただ正常細胞においては合成系路がさらに複雑な硫酸化糖鎖の合成へと進行するが、がんではその段階がブロックされていることを示している。合成酵素の発現亢進を考える仮説から転移治療法として合成酵素の阻害剤などが検討されているが、そのようなアプローチは再考を要する。従来の大腸がんスクリーニングである便潜血反応は、右半より左半の大腸がんの検出に優れているので、右半大腸がんによく出現するこの硫酸化糖鎖は、糞

便中の酵素によってあまり分解せず排出されると考えられ、便潜血反応を良く補完するスクリーニング法に発展する可能性がある。

### 6. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

これまでの予想と異なり、AGM が腫瘍増殖を抑制することが明確になった。また、AGM がプロテアーゼにより限定分解されるとシンデカン 1 に対する結合性が増大し、一方で細胞増殖活性が消失することが判明した。AGM は IGF や insulin を細胞周囲に集積することによって増殖を促進すると考えられる。恐らくプロテアーゼによる AGM の機能変換が腫瘍増殖抑制作用に関係すると予測される。AGM はがん治療の標的分子として有望であり、今後 AGM の腫瘍増殖抑制機構を明確にしたい。

LN5 の  $\alpha 3$  鎖 G ドメインのプロセッシングによって LN5 が低活性型から高活性型に変換されることが明らかになった。LN5 の  $\gamma 2$  鎖 N 末端領域のプロセッシングが周囲の因子によって調節されているのに対して、 $\alpha 3$  鎖のプロセッシングは恒常的に起こる。恐らく後者は正常組織の基底膜における LN5 の本質的な機能調節に関係すると考えられる。一方、今回 LN5B の生物学的性質を初めて明らかにした。LN5B は多数の既知 ECM 分子の中で、最も効率よく細胞を接着させ、運動を促進し、また細胞増殖を促進する。今後、がんとの関係に注目し、生体内での挙動を検討したい。

### 7. 臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

血管新生は生理的条件下では月経や創傷治癒にしか発現せず、腫瘍増殖における腫瘍血管新生阻害は局所増殖制御や転移の抑制に重要な役割をしめる。実際 2003 年の ASCO ではキメラ型抗 VEGF モノクローナル抗体である Avastin が大腸癌化学療法に有意の上乗せ効果を示すことが報告され大きな反響を呼んだ。腫瘍は遺伝子多型を背景とし容易に耐性を獲得するが、血管内皮細胞自身は腫瘍細胞ではなく耐性獲得も起こしにくく、抗癌治療の標的として適切であることから、多くの血管新生阻害剤の臨床応用が検討されてきている。Tyrosine kinase receptor (TKR) inhibitor である SU6668 は TKR のうち VEGF, b-FGF, PD-EGF などのレセプターを阻害して、それ以降の signal 伝達を阻止して血管新生を抑制する。選択的血管新生阻害剤 SU6668 は副作用が軽微で経口投与による抗腫瘍・抗転移作用を発現することから、今後臨床応用に有用と考えられる。

### E. 結論

本研究で単離された肺がんの候補がん抑制遺伝子 MYO18B は、(1) プロモーター領域周辺のヒストンアセチル化レベルが mRNA の発現量と相関すること、(2) 発現によって肺がん細胞の足場非依存性増殖、腫瘍形成、運動・浸潤能を抑制すること、(3) 卵巣がん、大腸がんでも比較的高頻度に不活化していることを明らかにした。

今年度の研究結果より、腫瘍の組織系に対応して特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせがその細胞の運動能・浸潤能に関わっていることが一層明らかになってきている。このチロシンキナーゼと基質の結合を阻害す



るあるいは基質のリン酸化部位をマスクするような分子は、キナーゼ活性化が伝える多くのシグナルのうち特定のものを特異的にブロックするため転移・浸潤といった腫瘍の特性に照準を合わせた治療に応用可能であると考えられる。実際の転移浸潤のプロセスには、癌細胞の足場非依存的増殖能、接着能を含む多くの特性が影響を与える可能性があるため、マウスの尾錠脈注射による転移能の測定やウイルスベクターを併用した局所発現で既存の腫瘍組織に対する効果などのデータをとっていくことが必須である。この方向で進めることによりキナーゼ阻害薬などよりさらに特異的な分子標的治療薬の開発にも結びつくものと期待する。

遺伝子導入法でガングリオシド GM3 強制発現性の安定変異株を樹立し、直径 50-100nm の GM3 ミクロドメインが細胞内に形成されることを実証、このミクロドメインは細胞表面へ移動、さらに細胞外へ粒子状態で放出される現象を、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に観察した。これを「ガングリオソーム」と名付け、ガングリオシドの機能発現機構の一つとして提唱した。また、ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-1 遺伝子欠損マウスの作成を進め、ヘテロ型マウスのペアリングによりホモマウスの作成に成功した。ホモマウスの予備的検索で、病理学的にランゲルハンス島の減少が疑われ、耐糖能の鈍化、インスリン感受性の増加などが認められた。SAT-1 遺伝子の double allele 欠損の ES 細胞を作成して性格付けを進めた。一方、ヒト肺がん細胞の抗癌剤抵抗性と SAT-1 遺伝子発現レベルの間に相関性を認め、SAT-1 mRNA 発現レベルが高い細胞ほど抗癌剤に対する抵抗性が高い傾向があり、薬剤排出タンパク遺伝子の発現レベルとは相関しないこと等が判明した。

昨年度の検討結果より Rho ファミリーメンバーである Rac が Ras 依存的細胞死の制御に関与していることがすでに明らかになっており、一方本年度の結果として他の Rho ファミリーメンバーである RhoA ならびに Cdc42 も Ras 依存的細胞死の制御に関わっていることがわかった。Rho ファミリー・ネットワークはこれまで主に細胞骨格の制御における働きが知られていたが、今回はじめてこのようなネットワークが non-apoptotic なプログラム細胞死の制御にも関与していることが明らかになり、Rho ファミリーの新たな生物学的機能が見出されたことになる。また Tiam1 が Ras との直接結合を介さないかたちで Ras 依存的細胞死に関与していることが示され、Ras →PI3 キナーゼ→Tiam1→Rac のように細胞死シグナルが流れている可能性が示唆されるようになった。

がん細胞ではシアリルルイス x 糖鎖の発現の亢進は、正常細胞で行われていた複雑な糖鎖の合成が、癌化に伴って障害され、合成不全の結果として引き起こされていることを強く示唆する結果が得られた。硫酸基修飾に関与する数種の遺伝子の転写発現が、非癌上皮細胞に比べてがん有意に減少していることが判明した。この合成不全の背景には硫酸基修飾に関与する遺伝子のヒストン脱アセチル化による発現低下があると考えられた。がん細胞において特定の遺伝子に選択的にヒストン脱アセチル化をもたらす機構について今後の研究が必要であると考えられる。また一部の特定の硫酸化糖鎖にはがんで増

加するものも認められた。この硫酸化糖鎖は、右半大腸がんを高率に出現し、大腸がんのスクリーニングに役立つ可能性のある新規腫瘍マーカーの候補であると考えられた。

2種の基底膜分子のプロテアーゼによる限定分解と、その生理的意義、およびがん細胞の浸潤・転移への関与について研究を行い、以下の結果を得た。腫瘍血管基底膜に蓄積する IGF 結合蛋白質様分子である angiomodulin (AGM) が膜結合型セリンプロテアーゼにより限定分解されること、これに伴い AGM のシンデカン1に対する結合性が増大し、IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することなどが判明した。一方、大腸がん細胞での AGM の発現は腫瘍増殖を抑制することが判明した。上皮基底膜の主要成分であるラミニン5 (LN5) は細胞の接着と運動を効率的に促進する。LN5 の  $\alpha$ 3 鎖 Gドメインの切断によって LN5 が低活性型から高活性型に変換されることが明らかになった。また今回初めて  $\alpha$ 3B 鎖をもつラミニン5B (LN5B) を単離した。LN5B は既知の ECM 分子の中で、最も効率よく細胞を接着させ、運動を促進した。また、他の ECM 分子と異なり、LN5B が細胞の増殖を促進する、増殖因子としての作用をもつことも明らかになった。以上のように、AGM と LN5 の生理活性はプロテアーゼによるプロセッシングによって大きく変換する。このようなプロテアーゼによる機能調節ががんの増殖、浸潤、転移にも関与すると考えられる。

SU6668 は VEGF によって促進される HUVEC の増殖を抑制し、血管新生に対する選択的な抑制を示した。DAS 法によって本剤の血管新生阻害効果が確認された。SU6668 は単独で胃癌腹膜播種モデル、大腸癌肝転移モデルにおいて播種・転移の形成を阻害した。本剤は転移阻害薬剤として有用と考えられた。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Park, M. J., Shimizu, K., Nakano, T., Park, Y. B., Kohno, T., Tani, M., Yokota, J. Pathogenetic and biological significance of TP14ARF alterations in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 141: 5-13, 2003.
- 2) Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Yokota, J., Harris, C. C. A novel PHD-finger protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene*, 22: 343-350, 2003.
- 3) Wang, Y., Song, J.-P., Ikeda, M., Shimura, K., Yokota, J., Sugimura, H. Ile-Leu substitution (I415L) in germ line E-cadherin gene (CDH1) in a Japanese familial gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33: 17-20, 2003.
- 4) Onishi, Y., Tsukada, T., Yokota, J., Ryz, A. Overexpression of autocrine motility factor

- receptor (AMFR) in NIH-3T3 fibroblasts induces cell transformation. *Clin. Exp. Metastasis*, 20: 51-58, 2003.
- 5) Ohgaki, H., Yasui, W., Yokota, J. Genetic pathways to human cancer. In: *Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention* (Harri U. Vainio and Eino K. Hietanen, eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.25-39, 2003.
  - 6) Yokota, J., Nishioka, M., Tani, M., Kohno, T. Genetic alterations responsible for metastatic phenotypes of lung cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 20:189-193, 2003.
  - 7) Sasaki, S., Kitagawa, Y., Sekido, Y., Minna, J. D., Kuwano, H., Yokota, J., Kohno, T. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene*, 22: 3792-3798, 2003.
  - 8) Shiseki, M., Nagashima, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Y., Appella, E., Yokota, J., Harris, C. C. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res.*, 63: 2373-2378, 2003.
  - 9) Suriano, G., Mulholland, D., de Wever, O., Ferreira, P., Mateus, A. R., Bruyneel, E., Nelson, C. C., Mareel, M. M., Yokota, J., Huntsman, D., Seruca, R. The intracellular E-cadherin germline mutation V832M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion. *Oncogene*, 22: 5716-5719, 2003.
  - 10) Nakano, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Kimura, K., Park, Y. B., Imaizumi, N., Tsuda, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ohwada, S., Yokota, J. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis*, 20: 665-674, 2003.
  - 11) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
  - 12) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
  - 13) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, in press.
  - 14) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, in press.
  - 15) Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, in press.
  - 16) Ueno, H., Sakita-Ishikawa, M., Morikawa, Y., Nakano, T., Kitamura, T., Saito, M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nature Immunol.*, 4: 457-463, 2003.
  - 17) Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura K., Kamo, T., Sakai, R., Sugimura, H. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J.*, 23: 1075-1088, 2004.
  - 18) Huang, J., Asawa, T., Takato, T., Sakai, R. Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J. Biol. Chem.*, 278: 48367-48376, 2003.
  - 19) Otsuki, Y., Tanaka, M., Kamo, T., Kitanaka, C., Kuchino, Y., Sugimura, H. Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c-Myc and interferes with c-Myc-mediated apoptosis in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 278: 5132-5140, 2003.
  - 20) Sugiyama, A., Miyagi, Y., Komiya, Y., Kurabe, N., Kitanaka, C., Kato, N., Nagashima, Y., Kuchino, Y., Tashiro, F. Forced expression of antisense 14-3-3beta RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 24: 1549-1559, 2003.
  - 21) Sunayama, J., Ando, Y., Itoh, N., Tomiyama, A., Sakurada, K., Sugiyama, A., Kang, D., Tashiro, F., Gotoh, Y., Kuchino, Y., Kitanaka, C. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death. Differ.*, in press.
  - 22) Hiraiwa, N., Yabuta, T., Yoritomi, K., Hiraiwa, M., Tanaka, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., Kannagi, R. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 tax through a variant cAMP-responsive element. *Blood*, 101: 3615-3621, 2003.
  - 23) Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., Furukawa, K. Synthesis of disialyl Lewis a structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase ST6GalNAc VI responsible for the synthesis of a-series gangliosides. *J. Biol. Chem.*, 278: 22787-22791,

- 2003.
- 24) Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Kiso, M. Studies on the endogenous L-selectin ligands: systematic and highly efficient total synthetic routes to lactamized-sialyl 6-O-sulfo Lewis X and other novel gangliosides containing lactamized neuraminic acid. *Carbohydr. Res.*, 338: 2793-2812, 2003.
  - 25) Hamada, T., Hirota, H., Yokoyama, S., Yamaguchi, M., Ohtsu, Y., Ishida, H., Kiso, M., Kanamori, A., Kannagi, R. NMR structure elucidation of cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x, a biologically dormant form of L-selectin ligand. *Tetrahedron Lett.*, 44: 1167-1170, 2003.
  - 26) Kannagi, R. Carbohydrate blood group antigens and tumor antigens. In: S.Y.C. Wong and G. Arsequell (eds.), *Immunobiology of Carbohydrates*, pp. 1-33, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
  - 27) Kannagi, R. Carbohydrate-based treatment of cancer metastasis. In: C.H. Wong (ed.), *Carbohydrate-based Drug Discovery*, pp. 803-829, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2003.
  - 28) Kannagi, R. Carbohydrate recognition systems in cell-cell interactions and signaling. In: Y. Baba (ed.), *Biomolecular Chemistry, A Bridge for the Future*, pp. 88-91, Tokyo: Maruzen Co., Ltd., 2003.
  - 29) Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., Kimata, K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.*, in press.
  - 30) Murata, K., Miyoshi, E., Ihara, S., Kameyama, M., Ishikawa, O., Doki, Y., Fukuoka, H., Tarui, T., Takada, Y., Kannagi, R., Taniguchi, N., Imaoka, S. Attachment of colon cancer cells onto vascular endothelial cells is enhanced by N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V). *Oncology*, in press.
  - 31) Kannagi, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression - the Warburg effect revisited. *Glycoconjugate J.*, in press.
  - 32) Kannagi, R., Goto, Y. and Fukui, F. In search of the carbohydrate structures on CD44 critical for hyaluronic acid binding - roles of sialylation and sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, in press.
  - 33) Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, in press.
  - 34) Kariya, Y., Tsubota, Y., Hiroaki, T., Mizushima, H., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y., Miyazaki, K. Differential regulation of cellular adhesion and migration by laminin-5 variants with structural changes in the G3 domain of  $\alpha 3$  chain. *J. Cell. Biochem.*, 88: 506-520, 2003.
  - 35) Higashi, S., Miyazaki, K. Identification of a region of  $\beta$ -amyloid precursor protein essential for its gelatinase A-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.*, 278: 14020-14028, 2003.
  - 36) Higashi, S., Miyazaki, K. Novel processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein catalyzed by membrane type 1 matrix metalloproteinase releases a fragment lacking the inhibitor domain against gelatinase A. *Biochemistry*, 42: 6514-6526, 2003.
  - 37) Kioi, S., Yamamoto, K., Higashi, S., Koshikawa, N., Fujita, K., Miyazaki, K. Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse model. *Oncogene*, 22: 8662-8670, 2003.
  - 38) Ahmed, S., Yamamoto, K., Sato, Y., Ogawa, T., Herrmann, A., Higashi, S., Miyazaki, K. Proteolytic processing of IGFBP-related protein-1 (TAF/angio-modulin/mac25) modulates its biological activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310: 612-618, 2003.
  - 39) Kariya, Y., Yasuda, C., Nakashima, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., Miyazaki, K. Characterization of laminin-5B ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) and N-terminal proteolytic fragment of  $\alpha 3$ B chain: Promotion of cellular adhesion, migration and proliferation. *J. Biol. Chem.*, in press.
  - 40) Koshikawa, N., Schenk, S., Moeckel, G., Sharabi, A., Miyazaki, K., Gardner, H., Zent, R., Quaranta, V. Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial morphology. *FASEB J.*, in press.
  - 41) Kariya, Y., Miyazaki, K. The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Exp. Cell Res.*, in press.
  - 42) Ogawa, T., Tsubota, Y., Maeda, M., Kariya, Y., Miyazaki, K. Regulation of biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of  $\gamma 2$  chain. *J. Cell. Biochem.*, in press.
  - 43) Kubota, T., Egawa, T., Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Yoshida, M., Watanabe, M. Kitajima, M. Cancer chemotherapy chemosensitivity testing is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stages III/IV gastric cancers without peritoneal dissemination. *Anticancer Res.*, 23: 583-588, 2003.
  - 44) Kubota, T. Is gastric cancer decreasing? *Jpn. Med. Assoc. J.*, 46: 246-250, 2003.
  - 45) Kubota, T. 5-Fluorouracil and

- dihydropyrimidine dehydrogenase. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 127-131, 2003.
- 46) Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Hasegawa, T., Watanabe, M., Kitajima, M. Chemosensitivity testing - Present and future in Japan. *Chemosensitivity Testing in Oncology*, Reinhold, U. and Tilgen, W., eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 231-241, 2003.
- 47) Saikawa, Y., Akasaka, Y., Kanai, T., Otani, Y., Kumai, K., Kubota, T., Kitajima, M. Preoperative combination chemotherapy with S-1 and low dose cisplatin against highly advanced gastric carcinoma. *Oncol. Rep.*, 10: 381-386, 2003.
- 48) Egawa, T., Kubota, T., Suto, A., Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Watanabe, M., Kumai, K., Kitajima, M. Antitumor activity of doxorubicin in combination with docetaxel against human breast cancer xenografts. *In Vivo*, 17: 23-28, 2003.
- 49) Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Ishii, Y., Tatematsu, H., Yamamoto, K., Kubota, T., Kitajima, M. The potential for a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the prevention on liver metastasis in human colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 23: 245-250, 2003.
- 50) Saikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Kitajima, M., Modlin, I. M. Alteration of DNA methylation status induced by epidermal growth factor in gastric cancer cell line, MKN-74. *Anticancer Res.*, 23: 143-148, 2003.
- 51) Suganuma, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Abe, S., Otani, Y., Furukawa, T., Kumai, K., Hasegawa, H., Watanabe, M., Kitajima, M., Nakayama, H., Okabe, H. Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by cDNA microarray. *Cancer Sci.*, 94: 355-359, 2003.
- 52) Sugiura, T., Saikawa, Y., Kubota, T., Suganuma, K., Otani, Y., Watanabe, M., Kumai, K., Kitajima, M. Combination chemotherapy with JTE-522, a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and cisplatin against gastric cancer cell lines in vitro and in vivo. *In Vivo*, 17: 229-234, 2003.
- 53) Yoshinare, K., Kubota, T., Watanabe, M., Wada, N., Nishibori, H., Hasegawa, H., Kitajima, M., Takechi, T., Fukushima, M. Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: A study of 88 surgical specimens. *Cancer Sci.*, 94: 633-638, 2003.
- 54) Koh, J., Kubota, T., Koyama, T., Migita, T., Hashimoto, M., Hosoda, Y., Kitajima, M. Combined antitumor activity of 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) and tamoxifen against human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Breast Cancer*, 10: 260-267, 2003.
- 55) Maeda, S., Saikawa, Y., Kubota, T., Aoki, M., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., Kitajima, M. No cross-resistance of taxotere and taxol to conventional chemotherapeutic agents against gastric cancers as detected by MTT assay. *Anticancer Res.*, 23: 3147-3150, 2003.
- 56) Yoshimizu, N., Saikawa, Y., Kubota, T., Akiba, Y., Yoshida, M., Otani, Y., Kumai, K., Hibi, T., Kitajima, M. Complete response of a highly advanced gastric carcinoma to preoperative chemoradiotherapy with S-1 and low-dose cisplatin. *Gastric Cancer*, 6: 185-190, 2003.
- 57) Wada, N., Otani, Y., Kubota, T., Kimata, M., Minagawa, A., Yoshimizu, N., Kameyama, K., Saikawa, Y., Yoshida, M., Furukawa, T., Fujii, M., Kumai, K., Okada, Y., Kitajima, M. Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin. Exp. Metast.*, 20: 431-435, 2003.
- 58) Isshiki, S., Kudo, T., Nishihara, S., Ikehara, Y., Togayashi, A., Furuya, A., Shitara, K., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M., Narimatsu, H. Lewis type 1 antigen synthase (bsGal-T5) is transcriptionally regulated by homeoproteins. *J. Biol. Chem.*, 278: 36611-36620, 2003.
- 59) Suganuma, K., Otani, Y., Saikawa, Y., Yoshida, M., Kubota, T., Kumai, K., Kameyama, K., Mukai, M., Kitajima, M. Gastric carcinoid tumors with aggressive lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *Gastric Cancer*, 6: 255-261, 2003.
- 60) Takahashi, T., Saikawa, Y., Kubota, T., Akiba, Y., Shigematsu, N., Yoshida, M., Otani, Y., Kumai, K., Hibi, T., Kitajima, M. Histological complete response in a case of advanced gastric cancer treated by chemotherapy with S-1 plus low-dose cisplatin and radiation. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33: 584-588, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録情報  
特になし

がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんで高率に欠失している第 22 染色体長腕から単離した遺伝子 *MYO18B* は肺がんの 50% 以上で不活化しているがん抑制遺伝子である。今年度の解析で *MYO18B* mRNA の発現量とプロモーター領域のヒストンアセチル化レベルとの間に有意な相関がみられたことから、変異、欠失、過メチル化に加え、ヒストン脱アセチル化も *MYO18B* 遺伝子の発現低下の一因となっていることが示唆された。レトロウイルスベクターを用いて *MYO18B* 蛋白質をヒト肺がん細胞株に発現させたところ、*in vitro* での増殖能に変化を認めなかったが、足場非依存性増殖およびヌードマウスを用いた *in vivo* での腫瘍形成が有意に抑制されたこと、trans-well chamber を用いた *in vitro* での運動能・浸潤能が有意に低下したことから、*MYO18B* 遺伝子が肺がんの悪性化、特に浸潤や転移に関与していることが示唆された。さらに、第 22 染色体長腕の欠失が高頻度に報告されている卵巣がん、大腸がんでも *MYO18B* 遺伝子が比較的高頻度に不活化していたことから、この遺伝子は種々のがんでがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。

A. 研究目的

がんの臨床で最も大きな問題のひとつは、がんが転移・再発を起こすことである。そこで、本研究では、転移・再発を最小限に食い止めるがんの新たな制御法の開発を目的として研究を進めている。がんの発生と進展には多くのがん抑制遺伝子が関与していると考えられており、新たな遺伝子が同定され、その機能が明らかになれば、がんの悪性度の診断や分子標的療法の開発に有用である。

B. 研究方法

- 1) *MYO18B* 遺伝子のプロモーター周辺の CpG サイトを含む領域を増幅するプライマーセットとアセチル化ヒストン H3、アセチル化ヒストン H4 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法でプロモーター領域のヒストン H3、H4 のアセチル化レベルを定量した。
- 2) レトロウイルスベクターを用いて *MYO18B* 遺伝子を細胞に導入し、puromycine 存在下で培養することによりポリクローナルな *MYO18B* 発現細胞を樹立した。*MYO18B* 蛋白質の発現は、recombinant GST-*MYO18B* 蛋白質で免疫したウサギ血清をアフィニティクロマトグラフィーで精製して作製した anti-*MYO18B* 抗体を用いた Western blot 法で確認した。これらの細胞を用いて、trans-well chamber を用いた運動能・浸潤能やヌードマウス皮下への移植による造腫瘍能等を調べ、*MYO18B* 発現ががん関連形質・転移関連形質に及ぼす影響について検討した。
- 3) 卵巣がん、大腸がん細胞株および手術検体より

DNA, RNA を抽出し、*MYO18B* 遺伝子の変異、欠失、発現、メチル化を解析した。変異の検索は WAVE 法で行い、direct sequencing 法で確認した。欠失は遺伝子座内の 2 つのマイクロサテライトマーカーを利用して判定した。発現とメチル化については細胞株を 5-aza-deoxycytidine (5-Aza-dC) 及び trichostatin A (TSA) 存在下で培養した後、RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で *MYO18B* mRNA の変動を測定した。プロモーター CpG アイランドのメチル化は bisulfite sequencing 法で調べた。

(倫理面への配慮)

手術検体を用いた研究は、臨床病理学的診断の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物を用いた実験は「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行った。

C. 研究成果

昨年までの本研究で、悪性度の高い肺がんで高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) 上に同定されたホモ欠失領域より新規遺伝子 *MYO18B* を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の 50% 以上で変異、欠失、過メチル化等により不活化していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにした。そこで本年度は、(1) がん細胞における *MYO18B* 遺伝子不活化の機構、特にヒストンアセチル化との関連性の解析、(2) *MYO18B* 遺伝子の発現ががん

関連形質・転移関連形質に及ぼす影響についての解析をさらに進めるとともに、(3) 肺がんと同様に 22q の欠失が高頻度に報告されている卵巣がん、大腸がんでの *MYO18B* 遺伝子異常の解析を行なった。

前述のように *MYO18B* 遺伝子の不活化には変異、欠失、過メチル化による発現抑制が関与しているが、これらの機序だけでは不活化の原因をすべて説明することはできない。これまでの研究で、*MYO18B* 発現が低下している肺がん細胞株のほとんどで脱アセチル化阻害剤 TSA によって *MYO18B* 発現が誘導されたことから、発現制御にヒストンアセチル化が関与していると考え、プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを ChIP 法で測定した。8 種類のヒト肺がん細胞株を解析したところ、*MYO18B* 発現が低下または消失している 7 細胞株中 6 細胞株において、*MYO18B* が高発現している H82 と比較して、ヒストン H3、H4 のアセチル化のレベルが低い傾向にあった。次に TSA 処理によるヒストンアセチル化の変化を解析したところ、TSA 処理によって *MYO18B* 発現が誘導される 6 細胞株すべてで TSA 処理後にヒストン H3 及び H4 アセチル化レベルが上昇していた。以上の結果から、*MYO18B* の発現量とヒストン H3、H4 アセチル化レベルとの相関を予想し、相関係数を求めて検定を行なったところ、*MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの間に有意な相関を認めた。

*MYO18B* 遺伝子産物はミオシンスーパーファミリーに属する蛋白質であることから、他のミオシンスーパーファミリー蛋白質と同様に、細胞分裂、細胞運動、細胞形態の維持・変化、分子の細胞内輸送やシグナル伝達などに関与することが予想された。そこで、レトロウイルスベクターを用いてヒト肺がん細胞株に *MYO18B* 遺伝子を導入し、遺伝子発現の影響が予想されるがん関連形質・転移関連形質の変化を検討した。*MYO18B* 遺伝子を強制発現させたヒト肺がん細胞株 H322、H1299 では、*in vitro* での細胞増殖能に変化を認めなかったが、足場非依存性増殖およびヌードマウスを用いた *in vivo* での腫瘍形成が有意に抑制された。また、trans-well chamber を用いた *in vitro* での運動能・浸潤能が有意に低下し、この運動能・浸潤能の抑制は RNAi による *MYO18B* 発現ノックダウンにより減弱した。

第 22 染色体長腕の欠失は卵巣がんでは 50-70%、大腸がんでは 20-40% と高頻度に検出されるが、この領域に存在する既知のがん抑制遺伝子の異常は稀であることから、*MYO18B* 遺伝子がこれらのがんにおいてもがん抑制遺伝子として機能しているのではないかと予想し、卵巣がん、大腸がんにおける *MYO18B* 遺伝子異常の有無について検討した。卵巣がんにおいては細胞株 4 例中 1 例 (25%)、手術検体 17 例中 1 例 (6%) で変異が検出された。発現低下は細胞株 4 例中全例 (100%)、手術検体 17 例中 12 例 (71%) で認められ、発現が低下した細胞株 4 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 3 例で発現が回復した。これら細胞株 3 例中 2 例、及

び手術検体 15 例中 2 例 (13%) で遺伝子プロモーター CpG アイランドが過メチル化していた。一方、大腸がんにおいては細胞株 11 例中 2 例 (18%)、手術検体 47 例中 1 例 (2%) で変異が、手術検体 43 例中 16 例 (40%) で欠失が認められた。発現低下は細胞株 11 例中 9 例 (82%)、手術検体 12 例中 5 例 (42%) で認められ、発現が低下した細胞株 9 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 9 例中全例で発現が回復した。これらの細胞株では遺伝子プロモーター CpG アイランドの過メチル化は認めなかったが、*MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの間に有意な相関を認めた。またヒト大腸がん細胞株 DLD-1、HT29 ヘルトロウイルスベクターを用いて *MYO18B* 遺伝子を導入したところ、足場非依存性増殖が有意に抑制された。

#### D. 考察

近年、ヒストンの脱アセチル化ががん関連遺伝子を含むいくつかの遺伝子の発現制御に関与していると報告されている。本研究で明らかとなった *MYO18B* mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルとの有意な相関は、ヒストンの脱アセチル化が *MYO18B* の発現低下の一因となっていることを示唆し、今後、他の遺伝子同様、ヒストン脱アセチル化による遺伝子発現低下の分子機構を明らかにしていく必要がある。

ヒト肺がん細胞株への *MYO18B* 遺伝子導入による形質の変化から、*MYO18B* 遺伝子は、肺がんでは高頻度に失活している p53 や p16/RB とは異なり、細胞のアポトーシスや細胞周期の制御に直接関与するのではなく、生体内において腫瘍形成能や運動能・浸潤能を抑制すると考えられ、肺がんの悪性化、特に浸潤や転移への関与が示唆された。

また、*MYO18B* 遺伝子は卵巣がん、大腸がんにおいても比較的高頻度に不活化していたことから、肺がんのみならず、種々のヒトがんの発生・進展に関与するがん抑制遺伝子であることが示唆された。

今後、この遺伝子の機能解析を進めることにより、また、各種組織亜型、進行度のヒトがんにおける発現動態・ゲノム異常の解析を進めることにより、がんの発生・進展における *MYO18B* 遺伝子失活の意義を明らかにしていく予定である。

#### E. 結論

本研究で単離された肺がんの候補がん抑制遺伝子 *MYO18B* は、(1) プロモーター領域周辺のヒストンアセチル化レベルが mRNA の発現量と相関すること、(2) 発現によって肺がん細胞の足場非依存性増殖、腫瘍形成、運動・浸潤能を抑制すること、(3) 卵巣がん、大腸がんでも比較的高頻度に不活化していることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1: 論文発表

- 1) Park, M. J., Shimizu, K., Nakano, T., Park, Y. B., Kohno, T., Tani, M., Yokota, J. Pathogenetic and biological significance of TP14ARF alterations in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 141: 5-13, 2003.
- 2) Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Yokota, J., Harris, C. C. A novel PHD-finger protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene*, 22: 343-350, 2003.
- 3) Wang, Y., Song, J.-P., Ikeda, M., Shinmura, K., Yokota, J., Sugimura, H. Ile-Leu substitution (I415L) in germ line E-cadherin gene (CDH1) in a Japanese familial gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33: 17-20, 2003.
- 4) Onishi, Y., Tsukada, T., Yokota, J., Raz, A. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation. *Clin. Exp. Metastasis*, 20: 51-58, 2003.
- 5) Ohgaki, H., Yasui, W., Yokota, J. Genetic pathways to human cancer. In: *Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention* (Harri U. Vainio and Eino K. Hietanen, eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.25-39, 2003.
- 6) Yokota, J., Nishioka, M., Tani, M., Kohno, T. Genetic alterations responsible for metastatic phenotypes of lung cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 20:189-193, 2003.
- 7) Sasaki, S., Kitagawa, Y., Sekido, Y., Minna, J. D., Kuwano, H., Yokota, J., Kohno, T. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene*, 22: 3792-3798, 2003.
- 8) Shiseki, M., Nagashima, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Y., Appella, E., Yokota, J., Harris, C. C. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res.*, 63: 2373-2378, 2003.
- 9) Suriano, G., Mulholland, D., de Wever, O., Ferreira, P., Mateus, A. R., Bruyneel, E., Nelson, C. C., Mareel, M. M., Yokota, J., Huntsman, D., Seruca, R. The intracellular E-cadherin germline mutation V832M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion. *Oncogene*, 22: 5716-5719, 2003.
- 10) Nakano, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Kimura, K., Park, Y. B., Imaizumi, N., Tsuda, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ohwada, S., Yokota, J. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis*, 20: 665-674, 2003.
- 11) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
- 12) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
- 13) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, in press.
- 14) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, in press.
- 15) Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, in press.

## H. 知的財産権の出願・登録情報 特になし

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

転移・浸潤の制御機構に関する研究

分担研究者 堀 隆一 国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部 部長

**研究要旨** Shc ファミリーのドッキング蛋白質 ShcC は神経芽腫細胞で頻繁に強いチロシンリン酸化が観察される。我々は、その中の複数の細胞でチロシンキナーゼ ALK が遺伝子増幅により活性化し、ShcC のリン酸化を介して下流の Erk1/2 や Akt の恒常的活性化を引き起こしていることを見いだした。ShcC の幾つかの変異体を神経芽腫細胞に発現させることにより、この ALK-ShcC 経路が、神経芽腫細胞の分化誘導能、運動能、および足場非依存的増殖能を、微妙に異なる形で制御していることが明らかになった。一方、マウスメラノーマ K-1735 の高転移株群において、Fyn チロシンキナーゼの活性化と、それに伴い強くリン酸化された 85kD の蛋白質 Cortactin と Fyn との複合体形成が検出された。フィブロネクチン上への接着刺激の後、約1時間から Cortactin 蛋白質の発現誘導とそれに引き続く Fyn の活性化が高転移株のみでみられ、Fyn-Cortactin 経路による癌細胞の運動能・接着能の制御により転移能に影響を与える可能性を示唆している。

A. 研究目的

腫瘍が転移・浸潤能を獲得する際に特定の受容体型・非受容体型チロシンキナーゼの活性化が観察される。またこれらによりチロシンリン酸化を受ける基質分子は細胞レベルで運動能や足場非依存的増殖などのシグナルに深く関わることを示唆されている。これらの基質分子の腫瘍の転移・浸潤における役割を解析すると同時に、チロシンリン酸化を介したシグナル伝達経路を標的にして、これを人為的に変えた時に、腫瘍細胞の接着・運動能にどのような影響を与えるかを解析することにより、腫瘍の転移シグナル伝達におけるチロシンリン酸化の役割を明らかにするのを本研究の目的とする。

B. 研究方法

(1) 神経芽腫における ShcC ドッキング分子の機能

神経芽腫細胞株の多くで、ShcC ドッキング蛋白質の顕著なチロシンリン酸化が認められるが、ShcC のリン酸化の特に亢進した2種類の異なる細胞株 (NB39-nu, Nagai) において活性の著明に亢進した Anaplastic lymphoma kinase (ALK) が特異的に ShcC と複合体を形成していた。ShcC の Grb2 結合部位である CH1 部位の YYNS/YVNT の計3箇所のチロシンをフェニルアラニンに置換したドミナントネガティブ型および SH2 部位の欠損変異体を作製し、野生型の ShcC を過剰発現したものとともに、NB39-nu 細胞においてこれらの ShcC の変異体を発現する細胞株を樹立して、細胞運動能、浸潤能、

足場非依存的増殖能、造腫瘍能などの解析を行った。

(2) 転移に関わるチロシンリン酸化分子の網羅的解析

マウスメラノーマの細胞株群 K-1735 は、転移性の低い C10、C19 などの亜株に対して、転移性の高い X21、M2 亜株が樹立されている。また最近樹立されたヒト骨肉腫細胞株 HU-09 の転移性に基づいて、高転移性の群 (M112、M132) と低転移性の群 (L12、L13) が既に樹立されており、今回のチロシンリン酸化蛋白質の解析に用いることができる。これらの細胞株群では高転移性群で Boyden Chamber アッセイなどによる細胞運動能や細胞の接着能が低転移群に比べ著明に上昇していることが確認できた。チロシンキナーゼ活性とチロシンリン酸化蛋白質の違いを比較検討することにより転移性に関わるチロシンキナーゼ経路を明らかにした。

ヒト試料の解析研究を行うにあたっては国立がんセンターの倫理委員会の承認を得、資料等の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて充分配慮する。動物実験は国立がんセンター研究所の動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をともなう実験への充分な配慮のもとに、慎重に進めている。

C. 研究結果

これまでに神経芽腫細胞株およびヒト神経芽腫組織の約10%において、遺伝子増幅によって受容体型チロシンキナーゼである ALK が活性化して、下流のドッキング分子 ShcC の過度のリン酸化および



び、ALK-ShcC の安定した複合体形成がおり、最終的に MAPK 経路の活性化がおこるというメカニズムを始めて見出した。ALK-ShcC 経路の活性化により EGF や NGF など増殖因子刺激に対して MAP キナーゼが不応性となっていた。このような細胞に、ShcC の Grb2 結合部位を変異させたドミナントネガティブ型を発現させるとチミジン取り込み能や MAP キナーゼの活性には大きな変化が見られなかった一方、PI3K-Akt 経路や MAPK 経路は明確に抑制され、細胞運動能・浸潤能の低下やレチノイン酸による分化誘導後の突起形成能の消失などが認められた。それに対し ShcC 過剰発現では細胞の運動能は亢進しており、ヌードマウスの造腫瘍能や足場非依存性増殖能はむしろ著明に抑制され、このような効果はすべて SH2 領域を欠損する ShcC では認められないことから、ShcC は SH2 を介して、報告されている ShcA の機能とは異なる形質転換に対する抑制的効果を持つことが示唆された。

マウスメラノーマ K-1735 の高転移株群において、Fyn チロシンキナーゼの活性化と、それに伴い強くリン酸化された 85kD の蛋白質 Cortactin と Fyn との複合体形成が検出された。同系の低転移株と比較すると、Cortactin はリン酸化だけでなく発現量も著明に上昇していた。高転移株ではフィブロネクチン上への接着刺激の後、約 1 時間から Cortactin 蛋白質の発現誘導がみられ、2-5 時間をピークとした Fyn の活性化と Cortactin の強いリン酸化が認められた。これらの変化は de novo の蛋白質合成を阻害すると消失し、また同系の低転移株では観察されなかった。Cortactin ないし他のドッキング分子の誘導に伴う Fyn の活性化が、細胞の転移能に関わる可能性を考えている。

#### D. 考察

ALK-ShcC 経路の活性化により EGF や NGF など増殖因子刺激に対して MAP キナーゼが不応性となっており、この経路がこれらの細胞の生存や運動を支配していることが予想された。ShcC の変異体を用いた実験により ShcC のリン酸化部位から Grb2 を介するシグナルが腫瘍細胞の運動や分化を正に制御しているのに対し、足場非依存性増殖能や造腫瘍能などといった形質には ShcC の発現自体が負に制御していることが示唆され、腫瘍の個々の特性を選択的に阻害する分子の候補として興味を持たれる。

また繊維芽細胞においては Cas も Fyn キナーゼの基質となって細胞の腫瘍化に関わることを以前示したが、今回、マウスメラノーマ細胞では Fyn-Cortactin の複合体がその高転移性に関連し

て形成されること、通常のインテグリン刺激による即時型のリン酸化ではなく、蛋白質合成を介した遅延型の活性化を見せることは、細胞運動を制御する新しい機構の存在を示唆すると同時に、Src ファミリーキナーゼの使い分けを考える上で興味深く、両者の結合阻害の方向で研究を進めていく。

#### E. 結論

今年度の研究結果より、腫瘍の組織系に対応して特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせがその細胞の運動能・浸潤能に関わっていることが一層明らかになってきている。このチロシンキナーゼと基質の結合を阻害するあるいは基質のリン酸化部位をマスクするような分子は、キナーゼ活性化が伝える多くのシグナルのうち特定のものを特異的にブロックするため転移・浸潤といった腫瘍の特性に照準を合わせた治療に応用可能であると考えられる。実際の転移浸潤のプロセスには、癌細胞の足場非依存的増殖能、接着能を含む多くの特性が影響を与える可能性があるため、マウスの尾錠脈注射による転移能の測定やウイルスベクターを併用した局所発現で既存の腫瘍組織に対する効果などのデータをとっていくことが必須である。この方向で進めることによりキナーゼ阻害薬などよりさらに特異的な分子標的治療薬の開発にも結びつくものと期待する。

F. 健康危険情報  
特になし。

#### G. 発表

##### 論文発表

Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura K., Kamo, T., Sakai, R. & Sugimura, H. Tiaml mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23, 1075-1088, 2004  
Huang, J., Asawa, T., Takato, T & Sakai, R. Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma *J. Biol. Chem.* 278; 48367-48376 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

細胞脱分化の制御機構に関する研究

分担研究者 齋藤 政樹 明治薬科大学教授

シアロスフィンゴ糖脂質ガングリオシド GM3 は、細胞内で生成されると直径 50-100nm の顆粒状マイクロドメインを形成する。このマイクロドメインは細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子状態で放出される。これを「ガングリオソーム」と名付け、ガングリオシドの機能発現機構の一つとして提唱した。一方、ガングリオシド GM3 合成酵素 (SAT-1) 遺伝子欠損マウスの作成を進め、ヘテロ型マウスのペアリングによりホモマウスの作成に成功した。ホモマウスの予備的検索で、病理学的にランゲルハンス島の減少が疑われ、耐糖能の鈍化、インスリン感受性の増加などが認められた。SAT-1 遺伝子の double allele 欠損の ES 細胞を作成して性格付けを進めた。また、ヒト肺がん細胞の抗癌剤抵抗性と SAT-1 遺伝子発現レベルの間に相関性を認め、SAT-1 mRNA 発現レベルが高い細胞ほど抗癌剤に対する抵抗性が高い傾向があり、薬剤排出蛋白遺伝子の発現レベルとは相関しないことを明らかにした。

A. 研究目的

生体膜複合糖質分子・脂質分子はそれ自体で生体超分子を形成し、さらに細胞内の癌遺伝子産物やシグナル伝達蛋白分子と機能複合体マイクロドメインを形成して細胞間相互認識・情報伝達に関わっている。細胞の悪性形質獲得や分化の阻害、脱分化の現象は、相互認識や情報伝達の異常が基盤になっていると想定される。この側面から本年度は、糖脂質合成酵素（ガングリオシド GM3 合成シアル酸転移酵素：SAT-1）欠損マウスを作成し、その病態生理を解析することによって、複合糖質分子の悪性化のしくみへの関与を明らかにし、その機能制御を基盤とする制がん法を目指したい。

B. 研究方法

(1) ターゲッティングベクターの構築、ES 細胞への導入：ガングリオシド GM3 合成酵素 (SAT-1) 遺伝子を完全欠損した (null 変異体) マウスを得るため、推定上の開始コドンのある exon2 を欠損させた。ポジティブセレクションマーカーとして Neo 耐性遺伝子、ネガティブセレクションマーカーとしてジフテリア毒素遺伝子 (DT-A) を利用した。SAT-1 遺伝子の exon2, exon3 を含む 6 kbp の Hind III-Hind III を単離し、Sca I および Sma I で消化し exon2 を含まない領域を精製した。これと MC1-neo<sup>r</sup> カセットを連結し、さらに 3'-末端に MC1-DT-A カセットを連結しターゲッティングベクターとした。ES 細胞は STO 細胞上で培養し、ベクター導入は電気穿孔法で行い、ターゲッティングベクター導入 ES 細胞はネオマイシン (175 µg/ml) で選別した。抽出した DNA を制限酵素 Sac I で消化しサザンブロットハイブリダイゼーションのサンプルとした。プローブはターゲッティングベクターよりも 5'-側もしくは 3'-側の断片を単離し利用した。クローン化した 230 個のコロニーについてサザンブ

ロットングを行い、4 個のクローン (1.7%) でターゲッティングベクターと正しく相同的組み換えが起こっていることが確認できた。(2) 変異マウスの作出：単離した 4 個の ES クローンのうち 1 つについてキメラマウスが作成でき、キメラ率は毛色から判断して 75% だった。このキメラマウスを野生型マウスと交配しヘテロ型マウスを得た。さらにヘテロ型マウスのペアリングによりホモマウスの作成を試み最近成功した。(3) ガングリオシド・マイクロドメインの解析：ガングリオシド完全欠損マウス肺癌細胞株 3LL 細胞にガングリオシド GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し、GM3 発現株、GM3 及び GD3 発現株、などの安定変異株を樹立した。ガングリオシド (GM3 並びに GD3) のマイクロドメイン形成の検索は、免疫蛍光染色法を使った光学顕微鏡下観察並びに共焦点レーザー顕微鏡下観察、さらに、1 次抗体反応後に金コロイド結合性 2 次抗体を使って免疫化学的染色後、走査電顕下及び透過電顕下の観察によって行った。(4) ヒト肺がん細胞において抗癌剤抵抗性と GM3 合成酵素 SAT-1 遺伝子発現レベルとの相関関係の解析：8 株のヒト肺がん細胞株 (LK-2, Lu99B, H23, LCSC#1, LCSC#2, ABC-1, PC3, A549) について、SAT-1 酵素 mRNA の発現量と Adriamycin, Cisplatin, Etoposide, Vincristine などの抗癌剤に対する抵抗性ととの相関を検索した。

C. 研究結果

(1) ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-1 の遺伝子ノックアウトマウス及びノックアウト ES 細胞の樹立とその病態生理学的解析：SAT-1 遺伝子欠損マウスの作成を進め、ヘテロ型マウスのペアリングからホモマウスの作成に成功した。ホモマウスの予備的検索ではあるが、病理学的にはランゲルハンス島の減少が疑われ、一方、耐糖能の鈍化、インスリン感受性の増加などが

認められた。病理的な精査を進めると共に相互関係などを明らかにしたい。また、SAT-I 遺伝子の double allele 欠損の ES 細胞を作成し、その性格付けを進めているが、形態や増殖能には変化は認められなかった。

**(2) ガングリオシド GM3 の生物機能発現機構の解析:** ガングリオシドは細胞膜においてダイナミックな機能性マイクロドメインを形成し、細胞増殖・分化、細胞相互認識に重要な機能を発揮していると言われる。ガングリオシド欠損マウス肺癌 3LL 細胞株に GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し、ガングリオシド GM3 発現性の安定変異株を樹立したところ、ガングリオシド GM3 が集ぞくした直径 50-100nm の GM3 ミクロドメインが細胞内に形成されることが認められた。このマイクロドメインは細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子状態で放出される現象が、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に観察された。これを「ガングリオソーム gangliosomes」と名付け、ガングリオシドの機能発現機構の一つとして提唱した。

**(3) ヒト肺がん細胞の抗癌剤抵抗性とガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-I 遺伝子発現レベル:** 8 株のヒト肺がん細胞株について、SAT-I 酵素 mRNA の発現量と Adriamycin, Cisplatin, Etoposide などの抗癌剤に対する抵抗性との相関を検索したところ、SAT-I mRNA の発現レベルが高い細胞ほど抗癌剤に対する抵抗性が高いこと、薬剤排出タンパク遺伝子の発現レベルとは相関しないこと等が判明したが、さらに細胞株数を増やし、且つ癌患者から採取した癌細胞について精査する必要がある。

#### D. 考察

本年度の研究成果により、ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-I 遺伝子、発現酵素タンパク、最終産物ガングリオシド GM3、それぞれの生物機能、病態生理学的意義等が徐々に明らかになりつつあり、近い将来、統合的に理解され、実用化へ向けての研究発展が期待される。とくに、これらの遺伝子、酵素、産物が、細胞増殖の基盤機構に関わるインスリンの機能調節に基本的に関与していることは、今後とも注目に値すると思われる。

#### E. 結論

遺伝子導入法でガングリオシド GM3 強制発現性の安定変異株を樹立し、直径 50-100nm の GM3 ミクロドメインが細胞内に形成されることを実証、このマイクロドメインは細胞表面へ移動、さらに細胞外へ粒子状態で放出される現象を、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に観察した。これを「ガングリオソーム」と名付け、ガングリオシドの機能発現機構の一つとして提唱した。また、ガングリオシド GM3 合成酵素 SAT-I 遺伝子欠損マウスの作成を進め、ヘテロ型マウスのペアリングによりホモマウスの作成に成功した。ホモマウスの予備的検索で、病理学的に

ランゲルハンス島の減少が疑われ、耐糖能の鈍化、インスリン感受性の増加などが認められた。SAT-I 遺伝子の double allele 欠損の ES 細胞を作成して性格付けを進めた。一方、ヒト肺がん細胞の抗癌剤抵抗性と SAT-I 遺伝子発現レベルの間に相関性を認め、SAT-I mRNA 発現レベルが高い細胞ほど抗癌剤に対する抵抗性が高い傾向があり、薬剤排出タンパク遺伝子の発現レベルとは相関しないこと等が判明した。

#### F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hiroo Ueno, Mao Sakita-Ishikawa, Yoshihiro Morikawa, Toru Nakano, Toshio Kitamura, Masaki Saito: A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*, 4(5): 457-463, 2003.

##### 2. 学会発表

(国際学会発表)

1) Rho-Associated Kinase Activation Is Required for the Sustained Phase of  $K^+$ -Induced Contraction of Rat Caudal Arterial Smooth Muscle: Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M and Walsh MP<sup>a</sup> (<sup>a</sup>University of Calgary, Canada), XIVth World Congress of Pharmacology, 2003/7, San Francisco, U.S.A.

(国内学会発表)

1) ヒト・アストロサイトーマ細胞におけるヒスタミン  $H_1$  受容体の細胞内移行に対するイオノマイシンの作用: 佐藤祐子、菱沼 滋、齋藤政樹、第 76 回日本薬理学会年会、2003/3、福岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきこと無し。

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

プログラム細胞死の制御に関する研究

分担研究者 北中 千史 国立がんセンター研究所生物学部室長

研究要旨

これまでにアポトーシスとは異なった(non-apoptotic)プログラム細胞死が、神経芽腫の自然退縮過程で見られるように、生体内でがん細胞の排除にかかわっていることを明らかにしてきた。このような生理的に備わった、アポトーシスとは異なるがん排除機構を理解するため、その in vitro モデルである神経芽腫細胞の Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死の制御機構につき検討を加えた。昨年度までに PI3 キナーゼや Rac GTPase が Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、今年度もこれらの知見に基づきさらに制御に関わる分子の同定をすすめた。その結果 Rac と同じく Rho ファミリーに属する RhoA と Cdc42 が、RhoA は抑制的に Cdc42 は促進的に Ras 依存的細胞死の制御に関わっていることが明らかになった。また、PI3 キナーゼから Rac へのシグナル伝達に Rac 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1 が関与していることも明らかになり、Ras 依存的 non-apoptotic プログラム細胞死制御の上流域の概容がわかってきた。

A. 研究目的

プログラム細胞死は生体の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その制御機構の破綻はがんを含めた種々の疾患の発生を招く。多くのがんはその進展の過程においてプログラム細胞死に対する耐性能を獲得し、悪性度を高め、転移・浸潤を図っていると考えられている。このようなことから本研究ではプログラム細胞死の実体解明を主な目的としており、研究成果はがんの発生の仕組みやがんの細胞死に対する弱点を知る上で非常に重要で、がんの治療法の開発にも有効利用できるものと期待される。

B. 研究方法

今年度も昨年度に引き続き我々が独自に開発した in vitro モデル実験系を用いてがん細胞における non-apoptotic プログラム細胞死の制御機構を分子レベルで理解することを目指した。1) 昨年度までに RhoA, Cdc42 の優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死に影響を与えないことを確認しているが、本年度はそれぞれの恒常活性化型変異体の発現が Ras 依存的細胞死にどのような影響を与えるかを調べた。2) 昨年度までに PI3 キナーゼおよび

Rac の活性が Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっている可能性を示してきた。そこで本年度は PI3 キナーゼと Rac を結びつけるシグナル伝達分子について探索を行った。Tiam1 は PI3 キナーゼの産物である PIP3 によって活性化される Rac 特異的グアニンヌクレオチド交換因子であり、また神経系細胞に高発現していることが知られている。そこで Tiam1 にまず着目し、Ras 依存的 non-apoptotic 細胞死誘導への関与について検討を行った。検討項目としては、Tiam1 の活性型変異体の存在が知られているので、その発現により Ras により誘導されるのと同様の性質をもった細胞死が誘導されるかを調べた。また、野生型 Tiam1 を外来性に発現させることにより Tiam1 の細胞内含量を上昇させた場合に Ras 依存的細胞死に対する感受性も上昇するかどうか調べた。さらに内因性の Tiam1 が Ras による細胞死誘導に必要であるかどうかを検討するため、Tiam1 の優性抑制変異体を作成し、検討を行った。また、Tiam1 が Ras との直接結合により活性化されるという報告もあるため、Tiam1 の種々の優性抑制変異体を用いて比較検討することにより Tiam1 が直接的あるいは間接的メカニズムのいずれによ