

厚生労働科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生と憎悪に関わる
分子病態の解析とその臨床応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋利忠

平成16（2004）年4月

目 次

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. がん細胞の免疫学的解析 …… 11
高橋利忠（愛知県がんセンター研究所）
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 …… 15
瀬戸加大（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. 固形腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析 …… 19
高橋 隆（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）
4. がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …… 24
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生と増悪に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所所長

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

(a) (1)胃粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫において高頻度に認められるAPI2-MALT1 キメラ遺伝子を、細胞株に導入することにより、紫外線によるアポトーシス誘導を抑制することを示した。(2)API2-MALT1 蛋白に結合する蛋白を免疫沈降法と LC-MAS spectrometry を用いて解析し、アポトーシスの実行に関与する Smac, HtrA2、TRAF2 が結合することを示した。これらの結果により、キメラ遺伝子の抗アポトーシス活性がリンパ腫発生に関与していることが示唆された。(3)array CGH 法を用いた解析により、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DCBCL)において、約 30%に認められる 13q31 増幅領域の責任遺伝子として C13orf25 を同定した。(b) (4)ヒト肺がん細胞株 20 株の網羅的遺伝子発現解析を進め、14 種類の抗がん剤や分子標的薬に対する感受性に関連する遺伝子群の探索を進め、多剤耐性に関わる可能性を持つ遺伝子群を抽出した。現在さらにこれらの遺伝子の機能解析とともに薬剤感受性の予測法の開発を進めている。(5)ヒト肺小細胞がんを高頻度に見られる DNA ダメージ G2 チェックポイント異常が、DNA ダメージレスポンスの初期相に関わる遺伝子の機能異常による可能性を示唆する結果を得た。(c) (6)増殖・浸潤に関わる蛋白質の研究として、細胞骨格系の極性形成に関与している ERBIN が細胞間接着の形成を制御していることを示した。(7)セプチン MSF ファミリー(Sept9)の機能および性状解析を行い、Sept9 の結合蛋白質として新規 Rho 活性化因子(GEF)である SA-RhoGEF を同定した。更に、(8)がん細胞で発現異常が見られる Aurora-B キナーゼに関しては、スレオニン 232 (T232) が自己リン酸化されること、この自己リン酸化が Aurora-B の活性化に必須であること、また、このリン酸化は細胞分裂に重要な機能を持つこと、を示した。

分担研究者	所属施設名	職名	A. 研究目的
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長	(a)造血器腫瘍では、(1)粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に特徴的な API2-MALT1 キメラ遺伝子の発現ベクターを構築し、
高橋 隆	愛知県がんセンター研究所	部長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	

種々の細胞株に導入し、アポトーシスにおける役割を明らかにする。また、(2) API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白を明らかにし、腫瘍化における蛋白の役割を明らかにする。(3)複数の疾患単位からなると考えられるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) をゲノムワイドに遺伝子異常を解析するために array CGH 法を確立する。

(b) 肺がんでは、(4) 肺がん細胞の各種抗がん剤や分子標的薬に対する感受性に関わる遺伝子の探索を行なうとともに、(5) 肺小細胞がんの特徴的に見られる DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の分子機序の解明を目指す。

(c) 増殖・浸潤に関わる蛋白質の研究として、(6) 細胞骨格系の極性形成に関与している ERBIN と中間径フィラメントの結合蛋白質の機能解析を行うとともに、(7) セプチンの機能解析を行い、これら蛋白のがん細胞の浸潤・転移における役割を検討する。更に、(8) がん細胞で発現異常が見られる Aurora-B キナーゼの細胞分裂における役割を解明する。

B. 研究方法

(1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析

MALT リンパ腫に特徴的な t(11;18) 染色体転座の転座切断点の解析により同定した API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝子導入細胞株を樹立し、紫外線によるアポトーシス誘導に関する機能を検討した。

(2) API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

API2-MALT1 キメラ cDNA を発現ベクターに組み込み、293T 細胞に一過性発現させ、免疫沈降し、SDS-PAGE で分離後、特異的なバンドを切り出し、LC-MAS spectrometry により、結合蛋白を明らかにした。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) のゲノム異常の解析

DLBCL のゲノム異常を詳細に解析するために、2300 個の BAC clone を用いた array CGH 法を確立し、検体を用いて、遺伝子異常を解析した。また、13q31 増幅領域から責任遺伝子の単離を試みた。

(4) ヒト肺がん治療薬に対する感受性に関わる遺伝子群探索と薬剤感受性の予測法の開発

ヒト肺がん細胞株 20 株 (小細胞がん 5 株、扁平上皮がん 5 株、腺がん 7 株、大細胞がん 3 株) と約 10,000 遺伝子に対応するマイクロアレーを用いて得た網羅的遺伝子発現解析データと、肺がん治療に有用な 9 種類の抗がん剤 (Cisplatin (CDDP), Carboplatin (CBDCA), Etoposide (VP-16), Irinotecan (SN-38), Gemcitabine (GEM), Vinorelbine (VNR), Paclitaxel (TXL), Docetaxel (TXT), Amrubicin (SM-5887)) 及び 4 種類の分子標的薬 (COX2 阻害剤、celecoxib, JTE-522, nimesulide, R-109339; チロシンキナーゼ阻害剤、ZD1839) に対する IC₅₀ 値をもとに、階層的クラスタリング及び Pearson 相関解析などを施行した。

(5) DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の分子機序に関する検討

ヒト肺がん細胞株 10 株において、DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の有無について、1 Gy 放射線照射下における M 期への流入抑制を指標に検討を加えるとともに、G2 チェックポイントの上流及び下流に位置する分子の異常との関連性について、in vitro kinase アッセイ、Western ブロット、免疫蛍光染色などを用いた検討を加えた。さらに、関与の可能性が強く唆された遺伝子については直接塩基配列決定法による変異検索を行った。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

細胞骨格系の極性形成に関与する ERBIN を、培養上皮細胞で siRNA 法を用いてノックダウンし、細胞間接着の形成を観察した。

(7)セプチン Sept9 の性状と機能の解析

生化学・分子細胞生物学的手法を用いてセプチン MSF ファミリー(Sept9)の性状と機能解析を行い、さらにセプチン間の相互作用の分子機構を解析した。

(8)Aurora-B キナーゼの機能解析

Aurora-B キナーゼががんの細胞周期において果たす役割を解析するため、そのリン酸化部位を同定し、その部位に対する抗リン酸化抗体を用いて、解析を行った。更に、リン酸化部位のアラニン変異体を作成し、各部位の機能解析を試みた。

C. 研究結果

(1)MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能解析

MALT 型 B リンパ腫に認められる t(11;18)(q21;q21)転座は API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することをこれまでに明らかにした。機能を明らかにする目的で、Hela 細胞株にキメラ遺伝子を導入し、細胞株を樹立した。紫外線照射によるアポトーシス誘導効果について調べたところ、キメラ遺伝子導入細胞株では、有意にアポトーシスの誘導が抑制されていた。

(2)API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

蛋白レベルで API2-MALT1 の機能を明らかにする第一歩として、API2-MALT1 蛋白に結合する蛋白を免疫沈降法と LC-MAS spectrometry を用いて解析した。コントロール細胞には認められず、キメラ遺伝子導入細胞に特異的な蛋白を解析した結果、アポトーシスの実行に関与する Smac, HtrA2、TRAF2 が結合することが明らかとなった。

(3)びまん性びまん性大細胞型 B リンパ腫 (DLBCL) のゲノム異常の解析

DLBCL について、ゲノム異常をより詳細に検討するために、約 2300 個の BAC clone を用いた array CGH 法を確立した。細胞株 15 株と DLBCL70 症例の解析により見出された 13q31 増幅領域は、array CGH 法により、4Mb 内に限定することができた。その中に 65 種類の EST と GPC5 遺伝子が存在したが、増幅様式と一致して発現されるのは、新規責任遺伝子 C13orf25 であることが明らかとなった。

(4)ヒト肺がん治療薬に対する感受性に関わる遺伝子群探索と薬剤感受性の予測法の開発

ヒト肺がん細胞株 20 株が示す 9 種類の抗がん剤及び 5 種類の分子標的薬に対する IC₅₀ 値をもとに、階層的クラスタリング解析を行ったところ、作用機作の類似した抗がん剤が隣接してクラスタリングされる一方、分子標的薬は独立したクラスターを形成した。約 10,000 遺伝子を対象とする網羅的遺伝子発現解析によって得られたデータの各種フィルタリングによる前処理によって、感受性との関連性を解析するのに有用な遺伝子群として 340 個の遺伝子を選別した。これらの遺伝子群の発現と上述の薬剤に対する IC₅₀ 値との正(薬剤耐性遺伝子群)或いは負(薬剤感受性遺伝子群)の相関の強さにもとづいた階層的クラスタリング解析を行い、p450 遺伝子の一つであり、薬剤耐性との関連性が示唆されている CYP1B1 を含む既知遺伝子や未知の EST などの多剤耐性に寄与する可能性を持つ遺伝子群を同定した。また同様に、高感受性に寄与する可能性を持つ遺伝子も抽出した。現在、これら感受性との関連性が示唆された遺伝子群について、siRNA 法による遺伝子ノックダウンを行い、その直接的な機能的関与について解析を進めている。更にバイオインフォマティクス解析手法を駆使した薬剤感受性予測法の開発を試みている。

(5) DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の分子機序に関する検討

ヒト肺がん細胞株 10 株中 4 株 (40%) において、1 Gy 放射線照射による DNA ダメージに対する G2 期停止の不全を認めた。これらの DNA ダメージ G2 チェックポイント異常をもつ細胞株においては、放射線照射に呼応した cyclin B1/cdc2 複合体のキナーゼの不完全な活性低下が、M 期への流入の抑制と良く対応して検出された。DNA ダメージレスポンスの初期相に関連する 53BP1 や γ -H2AX によるフォーカス形成を検討したところ、DNA ダメージチェックポイント異常を持つ細胞株に特異的に H2AX 分子のリン酸化フォームである γ -H2AX のフォーカス形成の異常が見られた。さらに、これが H2AX 遺伝子自身の変異によらないことを直接的塩基配列決定法によって示した。現在さらに、 γ -H2AX のフォーカス形成異常の分子機序について詳細に検討しつつある。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

LAP (leucine-rich repeats and PDZ) 蛋白質ファミリーは細胞極性形成に関与していることが最近報告されており、ショウジョウバエの Scribble は、がん抑制機能をもつことが知られている。がん遺伝子産物である c-erbB-2 レセプターと結合する分子として同定された ERBIN は、c-erbB-2 レセプターを basolateral membrane (側基底面) に局在化させる機能をもつ。これまでに ERBIN の PDZ ドメインと結合する蛋白質として、p120 カテニン・サブファミリーに属し、アルマジロ蛋白質である p0071 蛋白質を同定している。培養上皮細胞において ERBIN を siRNA 法を用いてノックダウンすると細胞間接着の形成が遅延する傾向が認められ、ERBIN が細胞間接着の形成を制御していることが示された。

(7) セプチン Sept9 の性状と機能の解析

私共は、酵母 Two-hybrid 法を用い、Sept9

の結合蛋白質をスクリーニングした。その結果、新規 Rho 活性化因子 (GEF) を同定し、SA-RhoGEF と命名した。ノーザンブロット法により、この遺伝子は約 7.5 kb の mRNA として全身の種々の臓器で発現していた。次に、Sept9 と SA-RhoGEF の分子内のどの領域が相互作用に関わっているのかを酵母 Two-hybrid 法で検討した。その結果、Sept9 の N 末端を含む領域が SA-RhoGEF の C 末端近傍に結合することが示された。さらに、*in vivo* における種々のセプチンと SA-RhoGEF の結合の特異性を検討したところ、SA-RhoGEF が Sept9 と特異的に結合することが判明した。ついで、SA-RhoGEF に対する特異抗体を作成し、REF52 細胞から内在性の Sept9 を免疫沈降したとき、SA-RhoGEF の共沈が確認された。この結果は、REF52 細胞内で Sept9 と SA-RhoGEF は生理的な複合体を形成していることを示唆した。さらに REF52 で細胞染色を行ったところ、SA-RhoGEF は Sept9 と直接結合しながらアクチン繊維上に局在していた。

(8) Aurora-B キナーゼの機能解析

Aurora-B は細胞周期において染色体の分離や細胞質分裂の進行に重要な役割を果たしているキナーゼと考えられている。これまでに私共は III 型中間径フィラメント (IF) タンパク質であるビメンチン、デスミンと GFAP が Aurora-B によりリン酸化され、フィラメント形成能を失うことを見出している。私共はさらに、Aurora-B キナーゼは、スレオニン 232 (T232) が自己リン酸化されていることを見出した。そして、この自己リン酸化が Aurora-B の活性化に必須であること、また、Aurora-B によってリン酸化された INCENP は Aurora-B をより活性化すること、を示した。さらに、Aurora-B の T232A 変異体を発現させると多核の細胞の出現を認め、この部位のリン酸化は細胞分裂に重要な機能を持つことを明らかとした。

D. 考察

(1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析

API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、これまでに、IL3 依存性マウス細胞株 BaF3 に遺伝子導入し、細胞株を樹立し、増殖因子依存性のアポトーシスに関する機能を検討したが、明確な結果は得られなかった。そこで、増殖因子に依存しない Hela 細胞株を用いて、紫外線によるアポトーシスに関する機能を検討した。遺伝子導入細胞株 2 株ではともに、紫外線によるアポトーシス誘導が抑制された。また本結果により、増殖因子が関与するアポトーシスシグナル伝達系とは異なる系に関与していることが示唆された

(2) API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

API2-MALT1 キメラ遺伝子を 293T 細胞に一過性発現させ、LC-MAS spectrometry により、結合蛋白を解析したところ、アポトーシスの実行に関与する Smac, HtrA2, TRAF2 が結合することが明らかとなった。これらが、どのように、API2-MALT1 蛋白の抗アポトーシス機能に関与するのかは、今後の重要な研究課題である。

(3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫のゲノム異常の解析

これまで CGH 法により、CD5 陽性 DLBCL と陰性の各々の群に特異的な染色体遺伝子の異常を明らかにし、CD5 陽性 DLBCL の疾患単位としての分子基盤を確立した。さらに詳細にゲノム異常を解析するために、array CGH 法を確立し、現在解析中である。本過程で、両者に共通して認められる 13q31 領域の共通増幅領域から、新規遺伝子 Cl3orf25 を見出したが、臨床的意義については現在検討中である。

(4) ヒト肺がん治療薬に対する感受性に関わる遺伝子群探索と薬剤感受性の予測法の

開発

ヒト肺がんは依然として代表的な難治がんではあるが、近年開発された抗がん剤においてはある程度の奏功率が得られている。それ故、個々の症例において感受性を示す抗がん剤を各々の患者個別的に事前選択する手法を開発できれば、不要な副作用を回避しつつ十分な治療効果を得られる可能性がある。また、本研究を通じて同定した多剤耐性に関わる可能性がある遺伝子群の機能解析により、将来的に多剤耐性解除法の開発とその応用による飛躍的な治療成績の向上につながる可能性も期待される。

(5) DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の分子機序に関する検討

我々はこれまでにヒト肺小細胞がんが組織型特異的に高頻度に DNA ダメージ G2 チェックポイントの異常を示すことを報告してきた。今後の研究の進展によって、DNA ダメージ G2 チェックポイント異常の責任分子を明らかとすることができれば、極めて生物学的悪性度の高い肺小細胞がんの分子病因解明に寄与しえるのみならず、放射線治療や抗がん剤治療に対する感受性増強法の開発につながる可能性もあり、期待される。

(6) 細胞極性制御因子 ERBIN の機能解析

LAP ファミリー蛋白質群の一員である ERBIN が p0071 との相互作用を介して、細胞間接着制御に関与していることを見出した。最近、がん細胞における細胞極性の異常が注目されているが、ERBIN による細胞間接着制御をさらに解析することで、がんの浸潤・転移の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

(7) セプチン Sept9 の性状と機能の解析

これまでの遺伝学的・生化学的・細胞生物学的研究結果から、セプチンはアクチン・微小管などの細胞骨格の構造・機能と密接な関連があると推測されてきた。しか

し、セプチンとアクチンの相互連関の分子機構は殆ど不明であった。私共は、Sept9 結合蛋白質として Rho 特異的 GEF を同定し SA-RhoGEF と命名した。SA-RhoGEF は in vitro と in vivo で Sept9 と複合体を形成し、特異抗体を用いた REF52 細胞の蛍光染色ではアクチン繊維に沿った共局在を示した。また、Sept9 が SA-RhoGEF 依存性の Rho 活性化を特異的に抑制することを semi-in vivo の実験系で確認した。以上の結果より、SA-RhoGEF はセプチンフィラメントを足場としてアクチンの再構成を制御し、その破綻が白血病などの腫瘍発生に関与する可能性が示唆される。

(8) Aurora-B キナーゼの機能解析

これまでに細胞質分裂期に分裂溝で特異的に活性化され、中間径フィラメントをリン酸化する分裂溝キナーゼとして、Rho キナーゼを同定していた。そして、ビメンチン、GFAP、デスミンを用いて、Aurora-B キナーゼがもう一つの分裂溝キナーゼであることを明らかにした。本研究において、Aurora-B キナーゼの活性化機構の解析を行い、スレオニン 232 (T232) の自己リン酸化が Aurora-B の活性化に必須であることを見出した。このリン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化抗体は、がん細胞における Aurora-B の活性化状態を検出することに応用可能と考え、検討を進めている。また、この活性化機構の解明は、Aurora-B をターゲットとした分子標的薬の開発にも役立つものと期待される。

E. 結論

- (1) MALT リンパ腫に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子は、紫外線照射によるアポトーシスを抑制すること、また
- (2) API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白としてアポトーシスに関与する Smac、HirA2、TRAF2 が結合することを明らかとし、キメ

ラ遺伝子の抗アポトーシス作用が腫瘍化につながる可能性を示唆した。

(3) 2300 個の BAC clone からなる array CGH 法を用いての解析により、DLBCL に認められる遺伝子増幅部位の一つである 13q31 領域の新規責任遺伝子として C13orf25 を同定した。

(4) 網羅的遺伝子発現解析にもとづいて、ヒト肺癌治療薬に対する多剤耐性に関わる可能性を持つ遺伝子群の抽出に成功した。今後これらの遺伝子群の機能的解析を進めるとともに、バイオインフォマティクス解析手法を駆使して薬剤感受性予測法の開発を試みる。

(5) ヒト肺小細胞がんにおける高頻度の DNA ダメージ G2 チェックポイント異常が、DNA ダメージレスポンスの初期相に関わる分子である H2AX の機能異常による可能性を示唆する結果を得た。現在さらに分子機序の詳細に関し研究を展開しつつある。

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

(7) セプチン Sept9 とがん細胞浸潤・転移に関わる重要分子である Rho との接点を初めて見出した。

(8) がん細胞で発現異常が見られる Aurora-B キナーゼは、スレオニン 232 (T232) が自己リン酸化され、この自己リン酸化が Aurora-B の活性化に必須であること、また、このリン酸化は細胞分裂に重要な機能を持つことを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Nomura, K., Yoshino, T., Nakamura, S.,

- Akano, Y., Tagawa, H., Nishida, K., Seto, M., Nakamura, S., Ueda, R., Yamagishi, H. and Taniwaki, M.: Detection of t(11;18)(q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue sections by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 140: 49-54, 2003.
- 2) Ando, T., Suguro, M., Kobayashi, T., Seto, M., Honda, H.: Multiple fuzzy neural network system for outcome prediction and classification of 220 lymphoma patients on the basis of molecular profiling. *Cancer Sci.*, 94: 906-913, 2003.
 - 3) Ivasundram, K., Suzuki, H., Seto, M., Hosokawa, Y.: Mutational analysis of the ST7 gene in human myeloid tumor cell lines. *Oncology Reports*, 10: 1737-1739, 2003.
 - 4) Izumiyama, K., Nakagawa, M., Yonezumi, M., Kasugai, Y., Suzuki, R., Suzuki, H., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Asaka, M., Seto, M.: Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene*, 22: 8085-8092, 2003.
 - 5) Nakamura, T., Inagaki, H., Seto, M., Nakamura, S.: Gastric low-grade B-cell MALT lymphoma: treatment, response, and genetic alteration. *J. Gastroenterol.*, 38: 921-929, 2003.
 - 6) Suguro-Katayama, M., Suzuki, R., Kasugai, Y., Nakamura, T., Suzuki, H., Hosokawa, Y., Shiku, H., Nakamura, S., Seto, M.: Heterogeneous copy numbers of API2-MALT1 chimeric transcripts in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leukemia*, 17: 2508-2512, 2003.
 - 7) Karnan, S., Tagawa, H., Suzuki, R., Suguro, M., Yamaguchi, M., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Analysis of chromosomal imbalances in *de novo* CD5-Positive diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 39: 77-81, 2004.
 - 8) Matsuo, K., Hamajima, N., Suzuki, R., Andoh, S., Nakamura, S., Seto, M., Morishima, Y., Tajima, K.: Lack of association between DNA base excision repair gene *XRCC1* Gln399Arg polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 149: 77-80, 2004.
 - 9) Tagawa, H., Karnan, S., Kasugai, Y., Tuzuki, S., Suzuki R., Hosokawa, Y., Seto, M.: MASL1, a candidate oncogene found in amplification at 8p23.1, is translocated in immunoblastic B-cell lymphoma cell line OCI-LY8. *Oncogene*, in press
 - 10) Hosokawa, Y., Suzuki, H., Suzuki, Y., Takahashi, R., Seto, M.: Anti-apoptotic function of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;14)(q21;q21) MALT lymphoma *Cancer Res.*, in press.
 - 11) Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, Y., Karpas, S., Kira, S., Yoshida, Y., Seto, M.: Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma *Cancer res.*, in press.
 - 12) Tomida, S., Koshikawa, K., Yatabe, Y., Harano, T., Ogura, N., Mitsudomi, T., Some, M., Takahashi, T., Osada, H., and Takahashi, Ta.: Gene expression-based, individualized outcome prediction of surgically treated lung cancer patients. *Oncogene*, in press.

- 13) Masuda, A., Maeno, K., Nakagawa, T., Saito, T., and Takahashi Ta.: Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by antimicrotubule agents in human lung cancers. *Am. J. Pathol.*, 163: 1106-1119, 2003.
- 14) Osada H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta.: Reduced expression of class II HDAC genes are associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, in press.
- 15) Yatabe, Y., Koga, T., Mitsudomi, T., and Takahashi, Ta.: A subset of lung adenocarcinoma with CK20 and CDX20 expression, K-ras mutation and goblet cell morphology. *J. Pathol.*, in press.
- 16) Konishi, H., Sugiyama, M., Mizuno, K., Saito, H., Yatabe, Y., Takahashi, To., Osada, H. and Takahashi Ta.: Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene*, 22: 1892-1905, 2003.
- 17) Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi Ta. Cellular property-associated expression of maspin controlled by promoter DNA methylation in normal lung and non-small cell lung cancers. *Oncogene*, in press.
- 18) Endoh, H., Tomida, S., Yatabe, Y., Konishi, H., Osada, H., Tajima, K., Kuwano, H., Takahashi, Ta., and Mitsudomi, T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time RT-PCR. *J. Clin. Oncol.*, in press.
- 19) Okudera, K., Hayashi, H., Ito, T., Yazawa, T., Suzuki, T., Nakane, Y., Sato, H., Ishi, H., Keqin, X., Masuda, A., Takahashi, Ta., and Kitamura, H. K-ras gene mutation enhances motility of immortalized airway cells and lung adenocarcinoma cells via Akt activation (possible contribution to non-invasive expansion of lung adenocarcinoma). *Am. J. Pathol.*, in press.
- 20) Suzuki, T., Nakagawa, T., Endo, H., Mitsudomi, T., Masuda, A., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takahashi, Ta., and Hida, T. The sensitivity of lung cancer cell lines to the EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is not related to the expression of EGFR or HER-2 or to K-ras gene status. *Lung Cancer* 42: 35-41, 2003.
- 21) Koga T., Horio, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, Ta., and Yatabe, Y. A novel approach to identifying markers of tissue-specific expression: Use of MGB in the differential diagnosis of lung tumors in patients with a history of breast cancer. *J. Mol. Diag.*, in press.
- 22) Endoh, H., Yatabe, Y., Shimizu, S., Tajima, K., Kuwano, H., Takahashi, Ta., and Mitsudomi, T. RASSF1 gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Int. J. Cancer*, 106: 45-51 2003.
- 23) Iwafuchi, H., Mori, N., Takahashi, Ta., and Yatabe, Y. Phenotypic composition of salivary gland tumors; an application of principle component analysis to tissue microarray data. *Modern Pathol.*, in press.
- 24) Hashimoto, M., Ichihara, M., Watanabe, T., Kawai, K., Koshikawa, K., Yuasa, N., Takahashi, Ta., Yatabe, Y., Murakumo, Y., Zhang, J.M, and Nimura, Y. Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene*, in press.

- 25) Virmani, A., Rathi, A., Sugio, K., Sathyanarayana, U.G., Toyooka, S., Kischel, F.C., Tonk, V., Padar, A., Takahashi, Ta., Roth, J.A., Euhus, D. M., Minna, J.D., and Gazdar, A. Aberrant methylation of TMS1 in small cell, non-small cell lung cancer and breast cancer. *Int. J. Cancer* 106: 198-204, 2003.
- 26) Yokoi, S., Yasui, K., Iizasa, T., Takahashi Ta., Fujisawa, T., and Inazawa, J. Downregulation of SKP2 induces apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 94: 344-349, 2003.
- 27) Sithananda, G., Smith, G. T., Masuda, A., Takahashi, Ta., Anderson, L. M., and Fornwald, L. W. Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol3 kinase/Akt pathway. *Carcinogenesis*, 24: 1581-1592, 2003.
- 28) Hanai, T., Yatabe, Y., Nakayama, Y., Takahashi, Ta., Honda, H., Mitsudomi, T., Kobayashi, T. Prognostic models in patients with non-small-cell lung cancer using artificial neural networks in comparison with logistic regression. *Cancer Sci.*, 94: 473-477, 2003.
- 29) Tajima, K., Obata, Y., Tamaki, H., Yshida, M., Chen, Y. -T., Scanlan, M. J., Old, L. J., Kuwano, H., Takahashi, Ta., Takahashi, To., and Mitsudomi, T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*, 42: 23-33, 2003.
- 30) Cheng R. Y. S., Zhao, A., Alvord, W. G., Powell, D. A., Bare, R. M., Masuda, A., Takahashi, Ta., Anderson, L. M., and Kasprzak, K. S. Gene expression dose-response changes in microarrays after exposure of human peripheral lung epithelial cells to nickel(II). *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 191:22-39, 2003.
- 31) Virmani, A., Rathi, A., Sugio, K., Heda, S., Lewis, C., Tonk, V., Takahashi, Ta., Roth, J.A., Minna, J.D., Euhus, D.M., Gazdar, A.F. Aberrant methylation of the cyclin D2 promoter in primary small cell, non-small cell and breast cancers. *Int. J. Cancer*, 107: 341-345, 2003.
- 32) Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, H., Tatsuka, M., Takahashi, M., Nagata, K. and Inagaki, M.: Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow : Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. *Mol.Biol.Cell*, 14: 1489-1500, 2003.
- 33) Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K. and Inagaki, M.: Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem.* 278:8526-8530, 2003.
- 34) Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S.Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. and Kitamura, T.: Aurora B phosphorylates MgcRacGAP and induces PhoGAP activity during M phase: identification of a RhoGAP indispensable for cytokinesis. *Dev.Cell*, 4:549-560, 2003.
- 35) Nagata, K., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Siromizu, T., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T.J., Hotani, H. and Inagaki, M.: Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.*, 278: 18538-

- 18543, 2003.
- 36) Maeda, K., Mizuno, M., Wakabayashi, T., Takasu, S., Nagasaka, T., Inagaki, M. and Yoshida, J.: Morphological assessment of the development of multinucleated giant cells in glioma by using mitosis-specific phosphorylated antibodies. *J. Neurosurg.*, 98: 854-859, 2003.
- 37) Ahola, H., Heikkila, E., Astrom, E., Inagaki, M., Izawa, I., Pavenstadt, H., Kerjaschki, D. and Holthofer, H.: A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 1731-1737, 2003.
- 38) Zhong, S., Goto, H., Inagaki, M. and Dong, Z.: Phosphorylation at serine 28 and acetylation at lysine 9 of histone H3 induced by trichostatin A. *Oncogene*, 22: 5291-5297, 2003.
- 39) Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P. and Nishida, Y.: Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J. Cell Sci.*, 116: 3811-3823, 2003.
- 40) Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K., Takahashi, To., Izawa, I. and Inagaki, M.: Autophosphorylation of newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J. Biol. Chem.*, 279: 12997-13003, 2004.
- 41) Yoneda, K., Furukawa, T., Zheng, Y.J., Momoi, T., Izawa, I., Inagaki, M., Inakgaki, N. and Manabe, M.: An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J. Biol. Chem.*, 279: 7296-7303, 2004.
- H. 知的所有権の取得状況
なし

II. 分担研究報告書

がん細胞の免疫学的解析

分担研究者 高橋 利忠 愛知県がんセンター研究所 所長

研究要旨 マイナー抗原は同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型の違いによって移植片対宿主病（GVHD）や移植片対白血病（GVL）効果の標的となる抗原である。我々が同定した血液系細胞に特異的に発現する遺伝子 *BCL2A1* にコードされる HLA-A24 および HLA-B44 拘束性のエピトープは、移植後の造血器腫瘍に対する T 細胞療法に有用と予測された。HLA-A24 拘束性のエピトープの不適合が移植に及ぼす影響を統計学的に解析したところ、その不適合は重症 GVHD の発症に寄与していなかった。一方、不適合が存在するだけでは、移植後の再発を有意に抑える効果も認められなかったため、このマイナー抗原に特異的な細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を体外で増幅し患者に輸注することで、GVHD のリスクを回避しながら、GVL 効果を期待できると考えられる。*BCL2A1* 以外に Y 染色体上の *TMSB4Y* 遺伝子にコードされるマイナー抗原の同定にも成功しており、その臨床的意義等につき解析を継続している。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきた。しかし、難治性造血器腫瘍に対する移植成績は満足できるものではない。その大きな原因として移植後の再発が挙げられる。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対白血病（GVL）効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVL 効果においてドナー由来 T リンパ球の主要な標的となっているものがマイナー抗原である。マイナー抗原はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白断片（ペプチド）が HLA に提示されて抗原性を持ったものである。白血病・リンパ腫細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされるマイナー抗原は、

移植後の再発腫瘍に対する免疫療法に有用である。今回我々は、我々が最近同定した *BCL2A1* 遺伝子上の遺伝子多型部分にコードされるマイナー抗原（ACC-1）の不適合が移植後の成績に及ぼす影響を日本骨髄バンク（JMDP）を介して行なわれた非血縁者間骨髄移植症例を対象に解析を行なった。また、HLA-A33 によって提示される新規のマイナー抗原を同定したので報告する。

B. 研究方法

1) テトラマーを用いた ACC-1 特異 CTL の動態解析：

ACC-1 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）クローンを樹立した患者の移植後末梢血中の ACC-1 特異的 CTL の存在及び体外での増幅能について HLA-A24 分子に ACC-1 ペプチドを組み込んだテトラマーを用いて

検討した。

2) ACC-1 エピトープの移植に及ぼす影響：

1993年1月より1998年4月までの間にJMDPにおいて移植を受け、かつHLA-A, B, C, DR, DQがDNAレベルで一致していると確認された症例のうち、原疾患が造血器腫瘍であり、サイクロスポリンAが移植後の免疫抑制剤として投与されたHLA-A24陽性の320例を対象とした。なお、本研究は愛知県がんセンターの遺伝子倫理審査委員会の承認（許可番号：13愛がん第11-4号）を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して施行されたものである。

3) 新規マイナー抗原の同定：

女性ドナーより慢性骨髄性白血病（CML）に対してHLA一致同胞間移植を受けた男性患者より、CTLクローンを樹立した。クローンの特異性はさまざまな細胞からなるパネルを用いて行った。Y染色体上にコードされるマイナー抗原を認識していると判断したため、Y染色体部分欠損株を用いた検討により、遺伝子の局在を決定した。遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

C. 研究結果

1) テトラマーを用いたACC-1特異CTLの動態解析：

患者移植後末梢血中に少なくとも7ヶ月間はテトラマーで検出できるACC-1に特異的なCD8陽性細胞が存在し（0.2~0.07%/CD8細胞）、試験管内でACC-1ペプチドにて刺激することによりその割合を劇的に増加することが出来た（7.2~96%/CD8細胞）。また検体中の移植後43日目の末梢血中のテトラマー陽性Tリンパ球の絶対数は40個であったが、2週間の刺激で約10万倍に増

やすことが出来た。さらに試験管内で増幅したT細胞株は患者のBリンパ球細胞株を傷害できたため、体外で増幅したTリンパ球は細胞傷害能を保持していることが分かった。

2) ACC-1 エピトープの移植に及ぼす影響：

ドナー・患者間でACC-1の移植片対宿主病（GVHD）またはGVL方向の不適合が2度以上の重症急性GVHDの発症に与える影響を、ACC-1適合群と不適合群の2群に分けて多変量解析した。ACC-1のGVHD方向不適合は重症GVHDの発症に影響を与えなかった。また白血病の再発にも影響はなかった。

3) 新規マイナー抗原の同定：

女性ドナーより移植を受けたCML男性患者より樹立したCTLクローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。B-LCLパネルを用いた検討により、クローンはHLA-A33拘束性であり、男性由来の細胞のみを傷害することが判明した。Y染色体部分欠損B-LCLパネルを用いた検討により、マイナー抗原をコードする遺伝子はYq11.2領域に存在するTMSB4Yであることが判明した。また当該cDNAのdeletion mutant、minigeneを用いた実験等により、エピトープは11merのアミノ酸からなるペプチドと判明した。この遺伝子は定量PCRにより、比較的造血系細胞に強く発現するが、ACC-1をコードするBCL2A1遺伝子のように造血系細胞に局限した発現パターンは認められなかった。現在、造血器腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討している。

D. 考察

統計学的解析によりドナー・患者間におけるACC-1の不適合は重症GVHDの発症に寄与しないことが分かった。ただ今回の解析は対象が遺伝的バックグラウンドの多様な非血縁者間移植を対象としており、今後同

胞間の症例における解析が必要と思われる。また ACC-1 の不適合は再発予防効果にも寄与しなかった。しかし、テトラマー解析の結果より、ACC-1 特異的 CTL は患者の末梢血中に存在しており、適当な抗原刺激により増幅が可能であったことより、体外で増幅して白血病再発時に養子免疫療法の形で臨床応用が可能と思われる。既に本 ACC-1 を用いた養子免疫療法の臨床試験プロトコルは愛知県がんセンターの倫理委員会で承認されており、現在症例の登録を行いつつある。

HLA-A33 によって提示される Y 染色体上の新規マイナー抗原は、組織発現パターンが ACC-1 (BCL2A1) ほど血液性細胞に特異的ではないが、比較的血液系細胞に多く発現しており、造血器腫瘍の免疫療法に応用できる可能性が十分ある。実際患者は移植後に急性 GVHD を発症していない。現在、テトラマーを使って患者末梢血中での動態等の解析を行っている。

E. 結論

同種造血幹細胞移植におけるマイナー抗原 ACC-1 の不適合の意義を検討したところ、GVHD、再発の何れにも有意な影響を与えなかったが、養子免疫療法として積極的に移植後再発白血病の治療に使える可能性が示された。また HLA-A33 拘束性のマイナー抗原については、今後の臨床応用について検討する意義があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) Akatsuka, Y., Nishida, T., Kondo, E., Miyazaki, M., Taji, H., Iida, H., Tsujimura, K., Yazaki, M., Naoe, T., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K., Takahashi, T.:

Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.*, 197: 1489-1500, 2003.

2) Miyazaki, M., Akatsuka, Y., Nishida, T., Fujii, N., Hiraki, A., Ikeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Morishima, Y., Sato, S., Ueda, R., Takahashi, T.: Potential limitations in using minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells for targeting solid tumor cells. *Clin. Immunol.*, 107: 198-201, 2003.

3) Akatsuka, Y., Warren, E.H., Gooley, T.A., Brickner, A.G., Lin, M.T., Hansen, J.A., Martin, P.J., Madtes, D.K., Engelhard, V.H., Takahashi, T., Riddell, S.R.: Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling. *Br. J. Haematol.*, 123: 671-675, 2003.

4) Nishida, T., Akatsuka, Y., Morishima, Y., Hamajima, N., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Kodera, Y., Takahashi, T.: Clinical relevance of a newly identified HLA-A24- restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br. J. Haematol.*, 124: 629-635, 2004.

5) Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Kodera, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y., Takahashi, T.: Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood*, 103: 630-638, 2004.

6) Tajima, K., Obata, Y., Tamaki, H., Yoshida,

M., Chen, Y-T. Scanlan, M.J., Old, L.J.
Kuвано, H., Takahashi, Ta., Takahashi, To.,
Mitsudomi, T.: Expression of cancer/testis
(CT) antigens in lung cancer. Lung Cancer,
42: 23-33, 2003.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析

分担研究者 瀬戸 加大
愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部長

研究要旨：粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、(1)胃粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫においては、API2-MALT1 キメラ遺伝子を細胞株に導入し、紫外線によるアポトーシスを防ぐことを明らかにした。(2)API2-MALT1 蛋白に結合する蛋白を免疫沈降法と LC-MAS spectrometry を用いて解析し、その結果、アポトーシスに関与する Smac、HirA2、TRAF2 が結合することが明らかとなった。(3)びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DCBCL) において、array CGH 法による解析で、約 30% に認められる 13q31 増幅領域の責任遺伝子 C13orf25 を明らかにした。

A. 研究目的

1. 粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する特徴的染色体遺伝子 API2-MALT1 の腫瘍化における役割を検討する。
2. API2, MALT1, API2-MALT1 キメラを用いて発現ベクターを構築し、蛋白の生物学的性状を調べる。
3. 複数の疾患単位からなると考えられるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) を免疫組織学的、分子生物学的手法で解析し、臨床的に意義のある疾患単位を明らかにする。

B. 研究方法

- (1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析

MALT リンパ腫に特徴的な t(11;18) 染色体転座の転座切断点の解析により明らかにした API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝子導入細胞株を樹立し、紫外線によるアポトーシスに関する

機能を検討する。

- (2) API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

API2-MALT1 キメラ cDNA を発現ベクターに組み込み、293T 細胞に一過性発現させ、免疫沈降し、SDS-PAGE で分離後、特異的なバンドを切り出し、LC-MAS Spectrometry により、結合蛋白を明らかにする。

- (3) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫のゲノム異常の解析

DLBCL のゲノム異常を詳細に解析するために、2300 個の BAC clone を用いた array CGH 法を確立し、検体を用いて、遺伝子異常を解析する。また、ゲノム異常領域から責任遺伝子を単離する。

C. 研究結果

- (1) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析

MALT 型 B リンパ腫に認められる

t(11;18)(q21;q21)はAPI2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することをこれまでに明らかにした。機能を明らかにする目的で、Hela細胞株にキメラ遺伝子を導入し、細胞株を樹立した。紫外線照射によるアポトーシス抑制効果について調べたところ、キメラ遺伝子導入細胞株は、コントロールに比較し、有意にアポトーシスを抑制した。

(2)API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

蛋白レベルでAPI2-MALT1の機能を明らかにする一歩として、API2-MALT1蛋白に結合する蛋白を免疫沈降法とLC-MAS spectrometryを用いて解析した。コントロール細胞には認められず、キメラ遺伝子導入細胞に特異的な蛋白を解析した結果、アポトーシスに関与するSmac、HtrA2、TRAF2が結合することが明らかとなった。

(3)びまん性大細胞型B細胞リンパ腫のゲノム異常の解析

びまん性大細胞型Bリンパ腫(DLBCL)について、ゲノム異常をより詳細に検討するために、約2300個のBAC cloneを用いたarray CGH法を確立した。細胞株15株とDLBCL70症例の解析により見出された13q31増幅領域は、array CGH法により、4Mb内に限定することができた。その中に65種類野ESTとGPC5遺伝子が存在したが、増幅様式と一致して、発現されるのは、新規責任遺伝子C13orf25であることが明らかとなった。

D. 考察

(1)MALTリンパ腫におけるAPI2-MALT1キメラ遺伝子の機能の解析

MALTリンパ腫に特徴的なt(11;18)染色体転座の転座切断点の解析により明らかにしたAPI2-MALT1キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、これまでに、IL3依存性マウス細胞株BaF3に遺伝子導入し、細

胞株を樹立し、増殖因子依存性のアポトーシスに関する機能を検討したが、明確な結果は得られなかった。そこで、増殖因子に依存しないHela細胞株を用いて、紫外線によるアポトーシスに関する機能を検討した。2つの遺伝子導入細胞株はともに、紫外線によるアポトーシスの機能を抑制した。増殖因子依存性の細胞株では観察できないことから、増殖因子が関与するアポトーシスシグナル伝達系とは異なる系に関与することが示唆された

(2)API2-MALT1 キメラ蛋白に結合する蛋白の同定

API2-MALT1キメラ遺伝子はアポトーシスに関与することが、紫外線照射の実験から明らかとなった。293T細胞に一過性発現させ、LC-MAS spectrometerにより、結合蛋白を解析したところ、アポトーシスに関与するSmac、HtrA2、TRAF2が結合することが明らかとなった。これらが、どのように、API2-MALT1蛋白の抗アポトーシス機能に関与するのかは、今後の重要な課題である。

(3)びまん性大細胞型B細胞リンパ腫のゲノム異常の解析

これまでCGH法により、CD5陽性DLBCLと陰性の各々の群に特異的な染色体遺伝子の異常を明らかにし、CD5陽性DLBCLの疾患単位としての分子基盤を確立した。さらに詳細にゲノム異常を解析するために、これら欠失又は増幅している遺伝子をarray CGH法を確立し、解析した。現在解析中であるが、その過程で、両者に共通して認められる13q31領域の共通増幅領域が4Mbにまで狭めることができた。従来のCGH法では最小検出感度が10Mbであるので、不可能であったが、array CGHでは、明確にできることが明らかとなった意義は大きい。また、その責任領域から、新規遺伝子C13orf25を見出したが、臨床的意義につ