

伝子の同定を行い、診断や治療方針の決定に役立つようなマーカー遺伝子の単離に努めたい。病理組織学的に複雑な集団である胃癌についてはゲノム構造異常という側面から胃癌を分類できるかどうかの検討を続け、胃癌の発生過程を理解していきたい。また予後不良の再発群と再発のない（5年間）群の比較から、胃癌の予後不良を規定するゲノム領域の特定を行いたいと考えている。

E. 結論

ゲノムワイドの高密度BACアレイを用いたCGH解析により、胃癌および乳がん臨床検体のDNAコピー数異常検出を行い、がんゲノムの構造の全体像の把握と個別症例における異常の蓄積の多様性を観察した。新規の微細な構造異常領域を多数検出したので、今後これらの領域から責任遺伝子の同定を進めていくとともに、ゲノム構造異常と臨床病理像との相関を検討し、臨床上に役立つ情報を見出していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

食道扁平上皮がんLOH領域からの新規がん抑制遺伝子候補の同定：大木操、赤羽

努、佐々木博己、青柳一彦、中西幸浩、広橋説雄、北林一生、太田力、細田文恵：第63回日本癌学会学術総会

アレイ CGH を用いた胃癌、乳がん、白血病のゲノム構造異常の解析：細田文恵、井本逸勢、新井康仁、崎山徳起、佐々木博己、柴田龍弘、中西幸浩、松野吉宏、直江知樹、広橋説雄、稲澤譲治、大木操：第63回日本癌学会学術総会

ゲノムアレイ解析による胃癌染色体異常の特徴：新井康仁、細田文恵、崎山徳起、大木操、中西幸浩、松野吉宏、片井均、広橋説雄、井本逸勢、稲澤譲治：第63回日本癌学会学術総会

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 |

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

ヒト多段階発がん過程における遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明と
その臨床応用に関する研究

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。我々は肺がんのがん抑制蛋白質 TSLC1 の関わる腫瘍抑制経路を解析し、TSLC1 の結合蛋白質として同定した DAL-1/4.1B の遺伝子プロモーターのメチル化が原発性非小細胞肺がんの 57% に認められ、患者の無再発生存期間、全生存期間と逆相関することを示した。一方、TSLC1 が成人 T 細胞白血病 (ATL) で異所性発現を示し、ATL の早期診断マーカーとなる可能性があることを見出した。

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蛋白質 TSLC1 を含む分子経路の、ヒトがんにおける異常の実態とその機能を検討する。

B. 研究方法

1. ヒト腫瘍におけ DAL-1/4.1B

遺伝子の異常の検索：

原発性肺非小細胞がん 103 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。DAL-1/4.1B 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 14 箇所の CpG 配列を含む 92 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。DAL-1/4.1B 遺伝子の位置する第 18 染色体 q11.3 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無は、DAL-1/4.1B 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。

2. ATL におけ TSLC1 遺伝子の異常の検索：

ヒト原発性 ATL 細胞、ATL 培養細胞、HTLV-1 感染細胞等について、ノーザン・ブロット解析、RT-PCR 解析、*TSLC1* 遺伝子プロモーター領域の bisulfite SSCP 解析を行った。

(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、法的見地から、患者の利益にならないように十分に配慮した。

C. 研究結果

1. ヒト腫瘍における *DAL-1/4.1B* 遺伝子の異常の検索：

原発性 NSCLC 103 例中 59 例 (57%) に *DAL-1/4.1B* 遺伝子のプロモーターメチル化が認められた。この中の 37% は *DAL-1/4.1B* 遺伝子の位置する第 18 染色体 p11.3 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) を示したが、残りの症例では両アレルのメチル化が生じていると考えられた。肺扁平上皮がんでは、*DAL-1/4.1B* 遺伝子のメチル化は臨床病期 I の腫瘍でも 10 例中 9 例に認められ、かなり早期から不活化することが示された。一方、肺腺がんでは、臨床病期 I, II, III, IV の腫瘍のそれぞれ 36%, 33%, 86%, 100% に *DAL-1/4.1B* 遺伝子のメチル化が認められ、腫瘍の進展に伴い、*DAL-1/4.1B* の不活化が生じることが示された。また、腺が

んでは *DAL-1/4.1B* 遺伝子のメチル化を示す腫瘍患者の無再発生存率、全生存率が、メチル

化のない症例と比較して、有意に短いことが示され、予後不良のマーカーとなる可能性が示された。

また、以前の *TSLC1* の解析結果と合わせて、原発性 NSCLC の 81% で *TSLC1* - *DAL-1/4.1B* のいずれか、あるいは両方の不活化が認められることが明らかとなった。

2. ATL や他の腫瘍における *TSLC1* 遺伝子の異常の検索：

TSLC1 の位置する第 11 染色体長腕 23 領域の LOH は、非小細胞肺癌以外の様々ながんでも認められる。本年度は、悪性髄膜腫、鼻咽頭がんにおいても *TSLC1* の不活化が認められることを共同研究により報告した。即ち、123 例の髄膜腫の免疫組織染色解析では、*TSLC1* の発現欠如がグレード 1, 2, 3 の腫瘍の、それぞれ 48%、69%、85% で認められた。また *TSLC1* の発現欠如が患者の生存率と有意に逆相関した。一方、中国香港の鼻咽頭がんにおける解析でも、*TSLC1* のプロモーターのメチル化が高頻度で認められた。従って、*TSLC1* 遺伝子の不活化が髄膜腫、鼻咽頭がんの進展にも関わっていることが示唆された。

また、TSLC1 の発現はリンパ球では全く認められないが、原発性 ATL 芽球では 8 例全例で TSLC1 の異所性発現が認められることを共同研究で見出し、ATL 培養細胞においては、TSLC1 遺伝子の低メチル化が高発現と相関することを明らかにした。さらに TSLC1 の高発現は ATL 培養細胞 12 例中 10 例、HTLV-1 感染細胞 5 例中 4 例でも認められたが、HTLV-1 感染と関連のない T-ALL 細胞 5 例、その他の白血病 20 例、また健常人の正常 CD4+ 細胞 10 例では、全く TSLC1 の発現が認められなかった。このことから TSLC1 の発現が、ATL の疾患特異的診断の標的分子となる可能性が強く示唆される。さらに TSLC1 の発現亢進により、T-ALL 細胞が内皮細胞や線維芽細胞への接着、浸潤を亢進することを実験的に確認した。

D. 考察

本年度の研究により TSLC1 - DAL-1/4.1B の経路の異常が 原発性 NSCLC の 80% 以上の症例で認められ、細胞接着、細胞骨格に関わるこの分子経路が NSCLC の進展に極めて重要であることが明らかになった。また、TSLC1 が上皮、神経由来のさまざまな腫瘍で、特にその進展に伴い、LOH、並びにプロモーターの

メチル化により不活化し、がん抑制遺伝子として機能することが、さらに確認された。これまでに TSLC1 のメチル化が 30% 程度以上の頻度で報告された腫瘍は、非小細胞肺癌、鼻咽頭がん、食道がん、肝細胞がん、膵がん、乳がん、前立腺がん、子宮頸がん、髄膜腫と極めて多岐にわたる。この事実は、第 11 染色体長腕の LOH が多くのがんで見出されることとも符合すると考えられるが、また、TSLC1 の機能欠損が、がんの浸潤・転移といった大部分の進行がんに通じる形質に関わることを強く示唆するものである。今後、免疫グロブリン・スーパーファミリー接着分子としての活性をもつ TSLC1 が、細胞接着を介して細胞のどのような機能を制御して上皮性形質の維持と腫瘍抑制、或いは浸潤、転移抑制に働くのか、分子細胞生物学的見地からも明らかにしている必要がある。

一方、接着分子である TSLC1 が、血球系の細胞で発現しないことは極めて妥当な現象であると考えてきた。しかし、極めて予想外の知見であるが、TSLC1 が ATL で疾患特異的に異所性高発現を示すことを宮崎大学医学部の森下教授らが見出した。TSLC1 が ATL の特異的診断マーカーとなる可能性が強く示唆される。さらにその後の共同研究により、

ATL においては、TSLC1 の過剰発現が、自らの凝集活性や、繊維芽細胞や血管内皮細胞への接着、浸潤活性を高めることが実験的に示された。このことから、TSLC1 を介する細胞接着が、ATL 細胞では組織浸潤や腫瘍形成といった ATL に特徴的な病態の形成に関与する可能性が示唆される。このように上皮や神経のがんとは異なり、ATL では TSLC1 は一種のがん遺伝子として働き、特異的診断の標的分子としてのみならず、治療標的分子としても働く可能性が示唆される。今後、この点に関して、さらに研究を発展させる予定である。

E. 結論

TSLC1 - DAL-1/4.1B の分子経路は、NSCLC の進展に深く関与する重要な経路であることを明らかにした。また、TSLC1 が ATL では特異的に異所性発現を示し、疾患の早期診断マーカーや、治療の分子標的となる可能性があることを共同研究により示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi, S., Yamada, D., Fukami, T., Masuda, M., Sakurai-Yageta, M.,

Williams, Y.N., Maruyama, T., Asamura, H., Matsuno, Y., Onizuka, M., Murakami, Y. Promoter methylation of the *DAL-1/4.1B* predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, in press.

2. Sasaki, H., Nishikata, I., Shiraga, T., Akamatsu, E., Ishida, Y., Fukami, T., Hidaka, T., Kubuki, Y., Okayama, A., Hamada, K., Okabe, H., Murakami, Y., Tsubouchi, H. and Morishita, K. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute type of adult T-cell leukemia. *Blood*, 105: 1204-1213, 2005.
3. Surace, E.I., Murakami, Y., Scheithauer, B.W., Perry, A., Gutmann, DH. Tumor Suppressor in Lung Cancer-1 (TSLC1) expression is lost in sporadic meningioma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63: 1015-1027, 2004.
4. Lung, H. -L., Cheng, Y., Kumaran, M. K., Liu, E. T.-B., Murakami, Y., Chan, C. Y., Yau, W. L., Stanbridge, E. J., Lung, M. L. Fine mapping of 11q22-23 tumor suppressive region and involvement of *TSLC1* in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 112: 628-635, 2004.

5. Saino, M., Maruyama, T., Sekiya, T., Kayama, T., Murakami, Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, *GUCY1A3* and *GUCY1B3*. *Oncol. Rep.*, 12: 7-52, 2004.
 6. Murakami, Y., Isogai, K., Tomita, H., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Hidaka, A., Nose, K., Sugano, K., Kaneko A. Detection of allelic imbalance in the gene expression of *hMSH2* or *RBI* in lymphocytes from pedigrees of hereditary non-polyposis colorectal cancer and retinoblastoma by an RNA difference plot. *J. Hum. Genet.*, 49: 635-641, 2004.
2. 学会発表
1. AACR Special Conference in Cancer Research “Molecular Pathogenesis of Lung Cancer: Opportunities for Translation to the Clinic.” 平成17年2月23日—27日、Identification and Characterization of a Novel Tumor Suppressor Cascade Including *TSLC1* and *DAL-1/4.1B* in Human Non-small Cell Lung Cancer: Murakami, Y., Kikuchi, S., Sakurai-Yageta, M., Fukami, T., Yamada, D., Masuda, M., Williams, Y.N., Maruyama, T., Asamura, H., Matsuno, Y.
 2. 第27回日本分子生物学会年会、平成16年12月8—11日、アレル間の遺伝子発現の高度定量的比較法による塩基配列多型・表現型相関の解析：村上善則、磯貝香奈、富田裕之、丸山智子、日高章雄、野瀬清、菅野康吉、金子明博
 3. 第27回日本分子生物学会年会、平成16年12月8—11日、成人T細胞性白血病(ATL)における細胞接着分子 *TSLC1* の運動性への関与：増田万里、八下田美佳、名手祐子、伊藤彰彦、星野洪郎、増田道明、森下和広、村上善則
 4. 第27回日本分子生物学会年会、平成16年12月8—11日、がん抑制蛋白質 *TSLC1*, protein 4.1, MAGuK 蛋白質の三者複合体による細胞間接着形成機構の解析：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
 5. The 10th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer. 平成16年11月4日—7日、Identification of a candidate tumor suppressor gene on 11q23 in human non-small cell lung cancer: Murakami, Y., Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Maruyama, T., Sekiya, T., Ghosh H. P., R. H. Reeves
 6. International Symposium on Nucleic Acids, Membranes and Signal Transduction – Symposium in Honor of

- Professor H. Ghobind Khorana, 2004、平成16年10月21-21日、Identification and characterization of a novel tumor suppressor gene, TSLC1, in human cancer: Murakami, Y., Masuda, M., Sakurai-Yageta, M., Fukami, T., Williams, Y.N., Kikuchi, S., Yamada, D., Maruyama,
7. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム、平成16年10月21日、遺伝子解析によるテーラーメイド治療の可能性：村上善則
 8. 第50回日本人類遺伝学会年会、平成16年10月12-15日、アレルの遺伝子発現の量的差異を指標とした網膜芽細胞腫の病態解析：村上善則、磯貝香奈、富田裕之、丸山智子、前沢浩司、菅野康吉
 9. 第50回日本人類遺伝学会年会、平成16年10月12-15日、乳がんリスク要因の網羅的SNP解析：鈴木孝洋、長幡武光、江面陽一、村上善則、江見充
 10. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、細胞接着分子 TSLC1 のヒト腫瘍化における両面的機能—上皮でのがん抑制と ATL の腫瘍促進：村上善則、増田万里、八下田美佳、名手祐子、菊池慎二、山田大介、丸山智子、薄井慎吾、森下和広
 11. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、成人T細胞性白血病 (ATL) における細胞接着分子 TSLC1 の運動性・浸潤性への関与：増田万里、櫻井美佳、名手祐子、丸山智子、森下和広、村上善則
 12. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、がん抑制蛋白質 TSLC1, protein 4.1, MAGuK 蛋白質が形成する三量体による細胞間接着形成メカニズムの解析：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
 13. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、がん関連遺伝子 *TSLC1* の組織特異的転写制御の解析：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
 14. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、非小細胞肺癌における *DAL-1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化による不活化：菊池慎二、山田大介、深見武史、増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、薄井真悟、松野吉宏、鬼塚正孝、村上善則
 15. 第64回日本癌学会年会、平成16年9月29日-10月1日、原発性腎癌における *DAL-1* 遺伝子プロモーター領域の高メチル化：山田大介、

- 菊池慎二、丸山智子、名手祐子、櫻井美佳、増田万里、金井弥栄、北村唯一、村上善則
16. 第 64 回日本癌学会年会、平成 16 年 9 月 29 日—10 月 1 日、神経細胞で認められる TSLC1 の多様なスプライシングと遺伝子産物の解析：丸山智子、増田万里、深見武史、櫻井美佳、名手祐子、村上善則
17. 第 64 回日本癌学会年会、平成 16 年 9 月 29 日—10 月 1 日、成人 T 細胞性白血病 (ATL) における分子マーカーとしての細胞接着因子 TSLC1 遺伝子の高発現とその機能解析：佐々木秀法、西片一朗、白神俊幸、日高智徳、山下清、久富木庸子、岡山昭彦、村上善則、坪内博仁、森下和広
18. 第 64 回日本癌学会年会、平成 16 年 9 月 29 日—10 月 1 日、PKC α アデノウイルスベクターによる食道癌細胞に対する抗腫瘍効果：大場基、村上善則、河野葉子、藤井輝彦、黒木登志夫
19. 第 64 回日本癌学会年会、平成 16 年 9 月 29 日—10 月 1 日、プール DNA を用いた PLACE-SSCP 法による乳がん遺伝子多型の相関解析：宮城亮、田平知子、村上善則、
- 浜島信之、中地敬、田島和雄、林健志
20. The 6th Cold Spring Harbor Meeting, Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes. 平成 16 年 8 月 18 日—22 日、Dual roles of a cell adhesion molecule, TSLC1, in human oncogenesis: a tumor suppressor in carcinomas and a possible oncoprotein in adult T-cell leukemia. Murakami, Y., Sakurao-Yageta, M., Masuda, M., Fukami, T., Williams, Y.N., Kikuchi, S., Yamada, D., Maruyama, T., Morishita, T.
21. 第 57 回日本細胞生物学会年会、平成 16 年 5 月 26—28 日、TSLC1 は HGF によって誘導される上皮細胞の運動性を抑制する：増田万里、八下田美佳、名手祐子、丸山智子、村上善則
22. 第 57 回日本細胞生物学会年会、平成 16 年 5 月 26—28 日、TSLC1 類似免疫グロブリン様細胞接着分子 TSLL2 による細胞接着と腫瘍抑制：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
- 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（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

MS-RDA 法によるエピジェネティックな発がん機構の解明

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部長

研究要旨：エピジェネティックな情報は、本来、体細胞分裂時に高い忠実度で娘細胞に伝達される。CpG アイランドのメチル化を多数持つ胃癌細胞株の一部では、各 CpG 部位に *de novo* のメチル化が高頻度に発生すること、各 CpG 部位のメチル化の多発は低率ながら CpG アイランド全体のメチル化を誘発することを見いだした。この機構は、突然変異を促進するゲノム不安定性と同様に、がんの発生やプログレッションに重要である可能性がある。一方、神経芽細胞腫での正確な予後予測は、適切な治療の施行のために、重要である。MS-RDA 法により、神経芽細胞腫の予後予測に極めて有用な CpG アイランドを見いだした。これらの CpG アイランドがメチル化された神経芽細胞腫症例は、されない症例に比べて、22 倍予後が不良であった。これらの CpG アイランドのメチル化は、現在、臨床的に汎用される *N-myc* 増幅よりも、予後診断における信頼性が高かった。今後、臨床的に利用可能な予後マーカーとなる可能性がある。

A. 研究目的

DNA の CpG メチル化状態は、DNA メチル基転移酵素の働きにより、DNA 複製時に、高い忠実度で複製される。また、プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化は、ヒストン脱アセチル化などと協調し、クロマチン構造の変化を通じて、遺伝子転写を抑制する。近年、*p16*, *RB*, *VHL*, *BRCA1* などの重要ながん抑制遺伝子が、プロモーター領域の CpG アイランドの過剰メチル化により、不活化される（サイレンシング）ことが知られるようになった。

分担研究者は、ゲノム内の DNA メチル化の変化を網羅的に検索するために、methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を開発した。本法を利用することにより、(a)新しいがん抑制遺伝子の単離、(b)がんの存在を検出したり、予後や治療効果と関連するマーカーの分離、(c)ゲノム全体のメチル化変化を解明することにより、がんでのエピジェネティックな異常の基礎的情報を得る

ことが可能になる。

(1) メチル化状態複製の忠実度の解析

昨年度までに、CpG 部位がメチル化された、または、メチル化されない状態は、正常細胞では、高い忠実度をもって複製されることを明らかにした。遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドでは、99.85-99.92%/CpG 部位/細胞分裂程度の高い忠実度を、プロモーター領域以外の CpG アイランドでは、99.56-99.83%の忠実度を示した。

これに対し、一部のがんでは、高頻度に CpG アイランドのメチル化を認め、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)と呼ばれる。正常細胞と同様の高い忠実度があれば、CIMP が起きることは考えにくく、CIMP をもつがん細胞では、メチル化状態複製の忠実度が低下している可能性がある。CIMP をもつ胃癌細胞株を用いて、そのような現象が実在するのか否かを明らかにすることを目的とした。

(2) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

神経芽細胞腫は、小児固形腫瘍の中では、脳腫瘍に次ぐ罹患率を示す。本腫瘍の中には、治療に抵抗して進行するものと、場合によっては自然退縮を示す悪性度が低いものがある。現在、年齢、病期、*N-myc* 増幅、*TrkA* の発現、染色体の倍数性などをマーカーにリスクを判定、治療方針の決定に役立っているが、必ずしも十分ではない。

今回、MS-RDA 法を用いて、神経芽細胞腫の予後判定に役立つマーカーを分離することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 材料

胃がん細胞株は、ATCCから購入または柳原五吉博士から供与を受けた。神経芽細胞腫細胞株は、ATCCまたはJCRBから購入した。神経芽細胞腫臨床材料は、千葉県がんセンターとの共同研究により、中川原章博士から供与を受けた。DNA は Phenol/chloroform 法により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) メチル化状態複製の忠実度の測定

細胞 1 個を 10^6 個まで増殖させ、DNA を回収した。得られた DNA について、bisulfite シークエンス法により DNA メチル化模様を決定した。10-20 分子の DNA メチル化模様について、最初の 1 個の細胞での DNA メチル化模様からの変異を計測した。変異数は、観察した CpG 部位の数で標準化した。6 回の細胞培養を繰り返し、観察した細胞の世代数から、DNA メチル化状態複製の変異率 (CpG 部位あたり、世代あたり)、及び、忠実度を求めた。

(3) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化し、アダプターを接着後、PCR を行うことで、amplicon を作成した。テスター及びドライバーの amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。最終 PCR 産物全体をプラスミドにクローン化し、サイクル

シークエンス法により、塩基配列を決定した。独立な配列については、データベース検索を行い、その DNA 断片が CpG アイランドに由来しているか否かを検討した。CpG アイランドは、Takai と Jones の基準により判定した。

(4) 定量的 RT-PCR 法

全 RNA 1-3 μg を用いて、Superscript reverse transcriptase により逆転写を行った。SYBR Green 及び iCycler を用いた定量的 Real-Time PCR を行った。被験遺伝子及び *GAPDH* の cDNA 分子数を測定し、*GAPDH* 分子数に対する被験遺伝子の分子数を算出した。

(5) Bisulfite シークエンス法

DNA 500 ng を NaOH により変性した後、3.1N, pH 5.0 の bisulfite 液中で、95 度 30 秒、50 度 15 分の反応を 15 サイクル行った。カラムで脱塩後、NaOH により脱スルホン化を行った。

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

(6) MSP 法、及び、定量的 MSP 法

Methylation-specific PCR (MSP) 法には、bisulfite 処理した DNA を鋳型に、メチル化された DNA またはメチル化されていない DNA に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

定量的 MSP では、メチル化された DNA 分子数及び非メチル化 DNA 分子数を、それぞれに特異的なプライマーと iCycler を用いて測定した。得られたそれぞれの分子数から、全体の分子数及びメチル化された DNA の比率を算出した。

(7) 倫理面への配慮

神経芽細胞腫臨床材料は、国立がんセンター及び千葉がんセンターの倫理審査委員会の承認を得て、使用した。

C. 研究結果

(1) メチル化状態複製の忠実度の解析

CIMP をもつ胃がん細胞株 2 系統 (KATOIII, AGS)、CIMP をもたない胃がん細胞株 2 系統 (HSC39 と HSC57) について、*ba305P22.2.3*, *FLJ32130*, *RIKEN2210016* のホモログ (*RIKEN2210016*), *E-cadherin* 及び *Cyclophilin A* のプロモーター領域 CpG アイランドについて、CpG 部位メチル化状態複製の忠実度を測定した。HSC39 と HSC57 は、すべての CpG アイランドで 99.90-100 % と、正常乳腺上皮細胞と同等の忠実度を示した。一方、KATOIII は *RIKEN2210016* (1.9 倍) で、AGS は *ba305P22.2.3* (3.2 倍)、*RIKEN2210016* (5.7 倍) 及び *E-cadherin* (1.6 倍) で、有意にメチル化状態複製のエラーが増加していた。ほとんどすべてのエラーは、*de novo* メチル化であった。

更に、この忠実度の低下が、CpG アイランド全体のメチル化を誘発するか否かを、全体がメチル化された DNA 分子を MSP 法により高感度に検出することで検討した。*RIKEN2210016* の CpG アイランド全体がメチル化された DNA 分子は、KATOIII 及び AGS では、散発的に検出されたのに対し、HSC39 と HSC57 では、決して検出されなかった。従って、KATOIII と AGS での CpG 部位メチル化状態複製の忠実度の低下 (*de novo* メチル化の増加) は、CpG アイランド全体のメチル化を、低頻度ながら誘発していると考えられた。

以上より、正常状態では、CpG アイランド内の CpG 部位は *de novo* メチル化から保護されているが、一部のがん細胞では、その機構が破綻し、*de novo* メチル化が増加、CpG アイランド全体のメチル化も誘発されやすくなっていると考えられた。

(2) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

予後良好な神経芽細胞腫 5 例の DNA をプールしたものをテスターに、不良な神経芽細胞腫由来の細胞株 5 系統の DNA をプールしたものをドライバーに用いて、

MS-RDA 法を行った。その結果、予後不良な神経芽細胞腫で特異的にメチル化されている可能性がある CpG アイランド 7 個が分離された。テスター及びドライバーでのメチル化状態を MSP により確認したところ、*PCDHB* ファミリー (5q31), *PCDHA* ファミリー (5q31), *HLP* (3p21), *DKFZp4511127* (5q14)、及び、*CYP26C1* (10q23) の 5 個については、テスターとドライバーとで、明瞭なメチル化状態の違いを認めた。

臨床材料でのメチル化の違いを確認し、さらに、臨床的有用性を検討するため、新たな 140 例の臨床材料を定量的 MSP により解析した。これら 5 個の CpG アイランドのメチル化レベルは互いに強く相関し、これらの CpG アイランドのメチル化を多発する神経芽細胞腫 (CIMP 陽性) と、多発しない神経芽細胞腫の 2 種類に群別可能であった。更に、CIMP をもつ神経芽細胞腫症例は、非常に予後不良であった (ハザード比 25.4)。しかし、*PCDHB* ファミリーの CpG アイランド群のみのメチル化を用いて CIMP の判定をした場合でも、ハザード比 22.1 ($P < 0.0001$) と、5 個の CpG アイランドのメチル化を用いて判定した CIMP と同等に有用であった。

CIMP の有無が予後に及ぼす影響は、病期、染色体の倍数性、*TrkA* の高発現とは独立であった。一方、*N-myc* 増幅をもつ神経芽細胞腫のほぼ全例が CIMP をもち (37/38)、*N-myc* 増幅を持たない神経芽細胞腫の中にも CIMP をもつものも存在した (30/102)。予後予測が重要な *N-myc* 増幅(-) の病期 3 及び 4 の症例 ($n=44$) でも、CIMP の有無は予後との関連を示した (ハザード比 4.8, $P < 0.01$)。

PCDHB ファミリーの CpG アイランドは、各遺伝子の体部にあり、そのメチル化は遺伝子発現やクロマチン構造とは関連しなかった。CIMP をもつ神経芽細胞腫では、既知のがん抑制遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化も高頻度に認め、がんの悪性化や細胞分化に重要な遺

伝子の不活化が予後不良の機構の一つであると考えられた。今後、CIMPの標的として不活化されているがん関連遺伝子の同定が必要である。

D. 考察

(1) メチル化状態複製の忠実度の解析

CIMPの存在自体が、複数の研究グループにより論争される中、細胞分裂あたりのCpG部位メチル化状態複製のエラーを計測することで、CIMPの存在を明確に示した。用いたCpGアイランドも、遺伝子プロモーター領域に存在するもので、各CpGアイランドの中のもっともメチル化されにくいであろうと予測される領域について、解析した。

遺伝子ごとに、忠実度の低下の程度が異なった理由は不明である。遺伝子発現量、ヒストン修飾との相関を検討したが、明確な関連は認められなかった。また、忠実度低下の原因として、DNAメチル基転移酵素の高発現を解析したが、少なくとも*DNMT1*、*DNMT3A*の発現量との相関は認めなかった。*DNMT3B*については相関を認めており、今後の解析が必要である。

(2) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

CIMPの有無により、神経芽細胞腫の予後は大きく異なり、あたかも異なる二つの疾患の様であった。また、*N-myc*増幅の陽性例がほぼ全例CIMP陽性であったことは、CIMPが*N-myc*増幅に先行することを示唆していると思われる。

神経芽細胞腫の予後判定には、プロモーター領域よりも、それ以外のCpGアイランドの方が良いマーカーであった。プロモーター領域以外のCpGアイランドの方が、容易にメチル化され、CIMPを鋭敏に検出できるのではないかと考えられる。

CIMPが神経芽細胞腫の予後不良を誘発する機構としては、分化や増殖抑制に重要な遺伝子が、異常メチル化によりサイレンシングされることが考えられる。実際、*RASSF1A*及び*BLU*は、CIMP陽性の神経芽細胞腫症例で、より高頻度にメチル化され

ていた。今後、その具体的遺伝子を明らかにしていくこと、脱メチル化剤の治療における有用性を検討することが、必要である。

E. 結論

CpG部位メチル化状態複製の忠実度の低下は、CpGアイランド全体のメチル化を誘発し、CIMPの原因の一つと考えられた。忠実度の低下は、エピジェネティックな不安定性を誘発し、発がん重要な役割を果たしている可能性がある。また、CIMPの有無は、神経芽細胞腫の非常に強力な予後因子であり、今後、その有用性に関する臨床治験が必要である。

F. 健康危険情報

特に該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1 Miyamoto, K, Fukutomi, T, Akashi-Tanaka, S, Hasegawa, T, Asahara, T, Sugimura, T and Ushijima, T. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer*, in press.
- 2 Abe, M, Ohira, M, Kaneda, A, Yagi, Y, Yamamoto, S, Kitano, Y, Takato, T, Nakagawara, A and Ushijima, T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res*, 65: 828-834, 2005.
- 3 Ushijima, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 5: 223-231, 2005.
- 4 Ushijima, T, Watanabe, N, Shimizu, K, Miyamoto, K, Sugimura, T and Kaneda, A. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res*, 65: 11-17, 2005.
- 5 Furuta, J, Umebayashi, Y, Miyamoto, K, Kikuchi, K, Otsuka, F, Sugimura, T and Ushijima, T. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci*, 95: 962-968, 2004.

- 6 Hagihara, A, Miyamoto, K, Furuta, J, Hiraoka, N, Wakazono, K, Seki, S, Fukushima, S, Tsao, MS, Sugimura, T and Ushijima, T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, 23: 8705-8710, 2004.
 - 7 Kaneda, A, Wakazono, K, Tsukamoto, T, Watanabe, N, Yagi, Y, Tatematsu, M, Kaminishi, M, Sugimura, T and Ushijima, T. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res*, 64: 6410-6415, 2004.
 - 8 Okochi-Takada, E, Ichimura, S, Kaneda, A, Sugimura, T and Ushijima, T. Establishment of a detection system for demethylating agents using an endogenous promoter CpG island. *Mutat Res*, 568: 187-194, 2004.
 - 9 Takada, T, Yagi, Y, Maekita, T, Imura, M, Nakagawa, S, Tsao, SW, Miyamoto, K, Yoshino, O, Yasugi, T, Taketani, Y and Ushijima, T. Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist *SFRP1* gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci*, 95: 741-744, 2004.
- (2) 学会発表
1. Ushijima T. Fidelity in inheriting the methylation pattern of the genome in normal cells and its decrease in cancer cells. 6th Joint Conference of AACR and JCA, Hawaii. January, 2004.
 2. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Kitano Y, Oishi S, Takato T, Nakagawara A, Sugimura T, and Ushijima T. Extensive methylation of multiple CpG islands in neuroblastomas with poor prognosis. 6th Joint Conference of AACR and JCA, Hawaii. January, 2004.
 3. Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Seki S, Ushijima T, and Fukushima S. Methylation-associated silencing of four genes in human pancreatic cancers. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orlando, April, 2004.
 4. Furuta J, Kaneda A, Umehayashi Y, Otsuka F, Sugimura T and Ushijima T. Silencing of the Thrombomodulin gene in human melanomas. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orlando, April, 2004.
 5. Okochi E, Ichimura S, Kaneda A, Sugimura T and Ushijima T. Development of a detection system for demethylating agents using an endogenous CpG island. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orlando, April, 2004.
 6. Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T and Kaneda A. Decreased fidelity in replicating methylation patterns in cancer cells. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orlando, April, 2004.
 7. Ushijima T, Abe M, Ohira, M, Kaneda A, Yagi Y, Kitano Y, Sugimura T, and Nakagawara A. Methylation of multiple CpG islands in neuroblastomas with poor prognosis. *Advances in Neuroblastoma Research*, Genoa, June, 2004.
 8. Miyamoto K, Hagihara A, Furuta J, Sugimura T, and Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. 14th Hiroshima Cancer Seminar, Hiroshima, October, 2004
 9. Ushijima T. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. 9th Korea-Japan Cancer Research Workshop. Gyeongju, December, 2004.
 10. Ushijima T. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. Ventura, Gordon Research Conference, January, 2005.
 11. 牛島俊和 胃癌とエピジェネティクス—胃粘膜に蓄積したエピジェネティックな異常と発がんリスク 第4回胃癌のリスクファクター研究会 2004年6月
 12. 阿部雅修、大平美紀、金田篤志、八木由紀子、北野良博、高戸毅、杉村隆、中川原章、牛島俊和 予後不良な神経

芽細胞腫での複数の CpG アイランド
の顕著なメチル化 第 63 回日本癌学
会総会シンポジウム 2004 年 9 月

13. 宮本和明、福富隆志、明石-田中定子、
長谷川匡、杉村隆、牛島俊和 ヒト乳
がんでメチル化異常を示す CpG アイ
ランド 28 個の同定：乳がんバイオマ
ーカーの候補として 第 63 回日本癌
学会総会 2004 年 9 月
14. 牛島俊和、阿部雅修、大平美紀、中川
原章 CpG アイランドメチル化形質
(CIMP)は神経芽細胞腫の強力な予後
因子である 第20回小児がん学会WS
2004 年 11 月
15. 牛島俊和、渡邊直子 DNA メチル化
模様伝達の忠実度の正常細胞での測定
とがんでの低下 第 27 回分子生物学
会年会ワークショップ 2004 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

哺乳動物の神経芽細胞腫の予後を判定す
る方法 (特願 2004-6867)
(千葉県との共願)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器の前がん状態ならびにがんにおけるDNAメチル化異常の
網羅的解析

分担研究者 金井 弥栄 国立がんセンター研究所部長

研究要旨：DNAメチルトランスフェラーゼDNMT1の発現は、尿中の発がん物質に暴露され前がん段階にある可能性のある膀胱がん症例より得られた非がん移行上皮において、細胞増殖活性の亢進に先行して亢進し、異形成上皮・移行上皮がんでさらに亢進した。DNMT1の蛋白発現亢進は、CpGアイランドにおけるDNAメチル化の蓄積に帰結する可能性がある。移行上皮がんにおいて、傍セントロメアサテライト領域のDNAメチル化の減弱が、染色体不安定性に結びつく可能性がある。DNMT3bのスプライスバリエントであるDNMT3b4を培養細胞に強制発現すると、増殖速度が亢進し、signal transducer and activator of transcription 1とその下流でインターフェロンシグナルに寄与する分子群の発現が亢進した。肝多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体においても、同様の遺伝子発現の変化が観察された。DNMT3b4の過剰発現は、染色体不安定性の惹起のみならず特定の遺伝子の発現変化を介しても、多段階発がん過程に前がん段階から寄与する可能性がある。

A. 研究目的

本研究は、ヒト多段階発がん過程において、DNAメチル化の変化が惹起される機構の理解をすすめることを目的とする。具体的には、発がんにおけるフィールド効果が顕著な膀胱移行上皮がんや、肝炎ウイルスの持続感染を伴う前がん状態を背景として発生する肝細胞がん症例の組織検体において、DNAメチルトランスフェラーゼの発現・スプライス等の異常の有無を解析し、DNAメチル化の亢進あるいは減弱ががん関連遺伝子の不活化や染色体不安定性に帰結する経

路を示すことを目指す。

B. 研究方法

ヒトDNMT1に対するウサギポリクローナル抗体を作製し、直腸がんに対する骨盤内臓全摘術標本ならびに膀胱がん以外の死因による剖検例の組織標本より得られた正常移行上皮61検体、膀胱移行上皮がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮89検体、異形成上皮78検体および移行上皮がん174検体において、免疫組織化学的検討を施行した。ここで、膀胱がん

症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮は、尿中にある発がん物質等に暴露され、既に前がん段階にある可能性がある。同じ組織検体において、PCNA 標識率を評価した。さらに、これらの組織検体をマイクロダイセクション法に供し、p16・death-associated protein kinase 遺伝子ならびに methylated in tumor (MINT)-2, -12, -25, -31 クロソンの CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態をバイサルファイト変換によって評価した。移行上皮がん検体において、傍セントロメアサテライト領域 (サテライト 2 ならびにサテライト 3) における DNA メチル化の状態を、サザン法によって評価した。第 9 染色体におけるヘテロ接合性喪失 (LOH) の有無を、マイクロサテライトマーカー (D9S775, D9S925, D9S304, D9S303, D9S283 および D9S747) を用いた PCR 法によって検討した。DNMT1 発現・DNA メチル化の状態およびアリの状態と、移行上皮がんの臨床病理学的因子との相関を詳細に解析した。

ヒト胎児腎上皮由来 293 細胞に、DNMT3b4 のスプライスバリエントである DNMT3b4 全長 cDNA を安定的に強制発現させた。DNMT3B4 強制発現細胞の増殖速度を評価し、増殖能が亢進するとき、DNMT3B4 強制発現細胞において対照細胞に比し発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によって網羅的に同定した。同定した遺伝子の発現を、特異プライマーを用いた定量 RT-PCR 法によって確認した。同定した遺伝子の発現は、大腸がん肝転移症例より得られた正常肝組織 8 検体・前がん状態にあると考えられる慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非

がん肝組織 45 検体・肝細胞がん 56 検体においても、定量 RT-PCR 法によって評価した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。病理組織標本作成後の残余の組織を採取することなどにより、患者への不利益を生じさせなかった。連結可能匿名化して解析をおこない、患者のプライバシーを遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

膀胱移行上皮がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、正常移行上皮に比し既に有意に高頻度に、細胞核における抗 DNMT1 抗体に対する反応性を認めた。異形成上皮においてはさらに有意に高頻度に抗 DNMT1 抗体に対する反応性を認め、移行上皮がんにおける反応強度は異形成上皮に比してさらに亢進していた。DNMT1 の蛋白発現亢進は、膀胱がんの多段階発生に前がん段階から寄与する可能性があると考えられた。

膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮においては、PCNA 標識率は正常移行上皮に比して全く亢進しておらず、前がん段階において DNMT1 の蛋白発現亢進の有無と PCNA 標識率は相関しなかった。DNMT1 の蛋白発現亢進は、細胞増殖活性の亢進に付随する事象ではなく、細胞増殖活性の亢進に先行すると考えられた。

DNMT1の蛋白発現亢進は、移行上皮がんの組織学的悪性度と有意に相関したが、深達とは逆相関する傾向が見られたので、膀胱がん特有の組織構築に着目した。膀胱がんは、表在性乳頭状がんと結節状浸潤がんとの2分することができる。表在性乳頭状がんは、頻回の再発と経尿道的切除を繰り返しながらも、膀胱壁に深く浸潤することなく予後良好である。これに対し、広汎進展上皮内がんは、悪性度の高い結節状浸潤がんの前駆病変であると理解されている。DNMT1の蛋白発現亢進は、悪性度の高い結節状浸潤がんに至る経路のうち、特に広汎進展上皮内がんの成立に寄与する可能性があると考えられた。

次に、DNMT1の蛋白発現亢進が実際にDNAメチル化の変化に結びついているかどうかを確認した。3箇所以上のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の蓄積は、正常移行上皮には認められなかったが、膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において既に高頻度に観察された。膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮においては、DNMT1の蛋白発現亢進と同時に、実際にDNAメチル化の変化が起こっていることがわかった。移行上皮がんにおけるCpGアイランドメチル化形質の頻度は、DNMT1の蛋白発現亢進と同様、膀胱がんの異型度と有意に相関したが、深達とは単純に相関せず、悪性度の高い結節状浸潤がんに至る経路に寄与する可能性があると考えられた。全検体において、DNMT1の蛋白発現亢進の有無と3箇所以上のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の蓄積は有意に相関した。DNMT1の蛋白発現亢進が、膀胱がんの

多段階発生過程において、実際に多数のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の亢進に帰結する可能性があると考えられた。

傍セントロメアサテライト領域のDNAメチル化の減弱は、移行上皮がんの44%に検出され、異型度ならびに深達と有意に相関した。サテライト配列は傍セントロメアヘテロクロマチン領域に位置し、この領域のDNAメチル化の減弱はセントロメアのクロマチン脱凝縮や染色体組み換えを促進することが知られている。そこで、サテライト配列が豊富である第9染色体の複数の部位におけるアリの状態を検討したところ、移行上皮がんの56%にLOHを検出した。移行上皮がんにおいては染色体アーム単位の大きな欠失が高頻度に見られた。第9染色体のLOHは、移行上皮がんの異型度と有意に相関し、表在性乳頭状がんに比して結節状浸潤がんにおいてより高頻度に認められた。傍セントロメアサテライト領域におけるDNAメチル化の減弱と第9染色体のLOHとの間に、有意な相関があることがわかった。これらの領域におけるDNAメチル化の減弱が、染色体不安定性に結びついている可能性が示唆された。

DNMT3b4導入から比較的早期、すなわち染色体不安定性が未だ蓄積していないと考えられる段階で、DNMT3b4強制発現細胞の増殖速度が対照細胞の2倍程度に亢進していた。このような増殖速度の亢進が、遺伝子発現の変化により惹起されている可能性を考慮し、マイクロアレイ解析を行った。DNMT3b4強制発現細胞の複数のクローンに共通して対照細胞の複数のクローンに比して3倍以上に発現が亢進している12遺伝子中8遺伝子が、インターフェロンシグナルに関与す

る分子群であったが、インターフェロン自体の過剰発現が確認されなかったため、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 遺伝子がインターフェロンシグナルに関与する一群の下流遺伝子の発現を誘導している可能性を考慮した。特異プライマーを用いた定量 RT-PCR 法によっても、STAT1 ならびにインターフェロンシグナルに関与する分子群の発現が、DNMT3b4 強制発現細胞の複数のクローンにおいて亢進していることを確認した。次に、DNMT3b4 mRNA 発現量と STAT1 mRNA 発現量が、肝細胞がん検体において実際に有意に相関することを、定量 RT-PCR 法により確認した。STAT1 とインターフェロンシグナルに寄与する分子群の mRNA 発現はともに、正常肝組織に比して慢性肝炎ないし肝硬変症の段階で有意に亢進していた。肝細胞がんの中では STAT-1 は、門脈侵襲を伴わない肝細胞がんにおいて門脈侵襲を伴う肝細胞がんに対して高発現していることが分かった。インターフェロンシグナルに関与する分子群は、同様に、高分化ないし中分化な肝細胞がんにおいて低分化な肝細胞がんに対して高発現しており、さらに門脈侵襲を伴わない肝細胞がんにおいて門脈侵襲を伴う肝細胞がんに対して高発現していた。STAT-1 の mRNA 発現量とインターフェロンシグナルに関与する分子群の mRNA 発現量が、正常肝組織・慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織および肝細胞がんを合わせた全検体において、相互に有意に相関することを確認した。

D. 考察

DNMT1 の蛋白発現亢進は、多数の

CpG アイランドにおける DNA メチル化の亢進を介して、膀胱がんの多段階発生過程に早期から寄与する可能性があると考えられた。がん克服戦略研究事業において、DNMT3b4 が慢性肝炎ないし肝硬変症の段階で過剰発現し、正常肝組織に発現する主たるスプライスバリエントである DNMT3b3 と競合して傍セントロメアサテライト領域を標的とし、同領域における DNA メチル化の減弱を惹起する可能性を提唱した。実際本年度には、傍セントロメアサテライト領域における DNA メチル化の減弱と、サテライト配列が豊富である第9染色体における LOH の有意な相関も、膀胱がん検体において見出している。ヒト多段階発がん過程における DNMT3b4 の意義の理解をさらにすすめるために、DNMT3b4 過剰発現により惹起される遺伝子発現変化について検討し、DNMT3b4 強制発現細胞におけるのと同様の遺伝子発現変化を、肝多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体においても確認し得た。DNMT3b4 の過剰発現は、染色体不安定性の惹起のみならず、特定の遺伝子の発現変化を介しても、ヒト多段階発がん過程に前がん段階から寄与する可能性があると考えられた。

E. 結論

DNMT1 の発現亢進や DNMT3b のスプライスバリエントである DNMT3b4 の過剰発現が、de novo メチル化亢進・染色体不安定性の惹起・遺伝子発現変化に結びついて発がん早期に寄与する可能性を示した。DNA メチルトランスフェラーゼの異常を伴う DNA メチル化の変化は多段階発がん過程に伴って見出されるので、DNA メチル化の変化に着目した発がんリスクの評価・がんの早期診断・病態診断の実

用化が期待される。今後は、DNAメチルトランスフェラーゼをはじめとするDNAメチル化制御機構の構成分子の中に、がんの予防・治療標的分子の候補を挙げることを目指して研究を進める。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am. J. Pathol.*, 164: 689-699, 2004.
- 2) Nam J-S, Ino Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Exp. Metas.*, 21: 49-56, 2004.
- 3) Kanai Y, Saito Y, Ushijima S, Hirohashi S. Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130: 636-644, 2004.
- 4) Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions

significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J. Urol.*, 173: 243-246, 2005.

- 5) Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J. Urol.*, in press.
- 6) Chihara Y, Sugano K, Kobayashi A, Kanai Y, Yamamoto H, Nakazono A, Fujimoto H, Kakizoe T, Fujimoto K, Hirao Y, Hirohashi S. Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab. Invest.*, in press.

H. 知的財産権の出願・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（第3次対がん総合戦略研究事業）
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) について大腸がんを対象に、genetic、epigeneticな異常を系統的に解析した。また食道がんの進展に関わる遺伝子発現の網羅的解析結果から細胞外基質分解酵素に注目し、その役割を検討した。MSI陽性大腸がんにおける遺伝性の有無および遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) における生殖細胞変異の違いにより、蓄積する遺伝子異常に特徴があることをRAS/RAF/MAPK pathwayを中心に明らかにした。さらに、大腸がんにおいて、MSIの有無により、遺伝子発現プロファイルに特徴があり、がんのphenotypeと関連していることを明らかにした。また、食道がんの進展に細胞外基質分解酵素が重要な働きをしていることを明らかにした。いずれの知見も診断に加え、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、HNPCC、散发性の胃・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対がん総合戦略のひとつとして極めて重要である。本研究においては、散发性の大腸がん、HNPCCを対象に、genetic、epigeneticな異常を系統的に解析し、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。難治性の食道扁平上皮がん

(以下、食道がん) においてはMSIを認めないため、その進展に関わる遺伝子発現の網羅的解析結果から細胞外基質分解酵素 (matrix metalloproteinase; MMP) に注目し、その役割の解明を目的とした。

B. 研究方法

1. 大腸がんにおけるMSI、遺伝子解析
HNPCC患者および散发性大腸がん患者のがん部および隣接非がん部組織より、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) を用いて検討した。RASSF1A遺伝子のDNAメチル化をmethylation-specific PCR (MSP) を用いて解析した。