

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

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる  
分子病態の解析とその臨床応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 立 松 正 衛

平成17(2005)年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用 …… 1  
主任研究者 立松正衛

## II. 分担研究報告

1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析…………… 13  
立松正衛（愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部）
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 …………… 18  
瀬戸加太（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …………… 22  
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）
4. 肺がんの発生に関わる分子病態の解析 …………… 26  
長田啓隆（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）

# I. 総括研究報告書

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）  
総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：本研究では (a) 消化器がん転移の分子病態の解明とその臨床応用、(b) 造血器腫瘍および (c) 肺がんなど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、ならびに (d) がんの浸潤や悪性化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ようである。(a) (1) 胃がんの腹膜転移は大網の節外性リンパ組織である乳斑に選択的に初発転移巣を形成すること、この微小転移巣は化学療法感受性があり、腹膜再発予防のための治療標的となりうること。(2) HPV16E6, E7遺伝子導入により不死化したリンパ管内皮細胞株はPodoplaninを発現し、VEGF-C刺激により転写が活性化される機能的にもリンパ管内皮の性質を保持した細胞であること、この細胞系を用いてリンパ節転移性ヒト大腸がん細胞の条件付き培地中にVEGF-C以外のリンパ管内皮細胞の管腔形成刺激因子が存在することを明らかにした。(b) (1) 除菌療法抵抗性の胃MALTリンパ腫は、半数がAPI2-MALT1キメラ遺伝子陽性であること、さらにキメラ遺伝子陰性症例の約2割に18q領域の増幅異常が存在すること。(2) API2-MALT1キメラ遺伝子をレトロウイルス発現ベクターにて細胞株に導入し、種々のアポトーシス刺激を加えると上皮、血液細胞共にアポトーシスに抵抗性を示すこと、すなわちキメラ遺伝子は普遍的な抗アポトーシス機能を持っていることを明らかにした。(c) (1) HDAC classIIの中のHDAC9 isoform 3の高発現が予後不良と相関すること、及び、肺がんで発現低下傾向のあるHDAC5が肺がん細胞に対し増殖抑制作用を持つこと、(2) ゲノムのクロマチン構造制御に関わるRNAi機構に必須なRNA分解酵素Dicerの低発現が肺がんの強い予後不良因子となることを明らかにした。(d) (1) Aurora-Bと複合体を形成しているINCENPについて解析を行い、新たにCdc2キナーゼによって、INCENPが分裂期前期から中期にかけてリン酸化されていること。(2) このリン酸化反応は、がん細胞でその機能異常が報告されており、分裂期キナーゼでもあるAurora-B・Plk1の細胞内局在に重要な役割を担っている可能性を明らかにした。

分担研究者	所属施設名	職名
瀬戸加大	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
長田啓隆	愛知県がんセンター研究所	室長

A. 研究目的

(a) 消化器がんでは(1)胃がん腹膜転移の初期および進展過程の分子基盤の解明とそれに基づく治療法の開発、(2)大腸がん臨床症

例におけるリンパ管新生の実態の解明と大腸がんのリンパ節転移性細胞株およびヒト不死化リンパ管内皮細胞株を組み合わせた腫瘍リンパ管新生の *in vitro* 解析システムの確立、およびそれを用いた大腸がんにおける腫瘍リンパ管新生の分子機構の解明。

(b) 造血器腫瘍では(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 の意義の解明、(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍化における機能の解明、および(3)びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)のゲノム異常の解明と臨床的に意義のある疾患単位を規定するマーカーの同定。

(c) 肺がんでは(1)ヒストン修飾によりクロマチン構造を制御する HDAC class II 遺伝子 isoform 群の肺がん発症への関与とその分子機序の解明、(2)クロマチン構造制御への関与が示唆されている RNAi・microRNA 機構に必須な RNA 分解酵素遺伝子である Dicer・Drosha の遺伝子異常の同定と肺がんの発症・進展への関与の解明。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解析では(1)細胞分裂期の制御に必須な Aurora-B の結合蛋白質である INCENP の分裂期開始期キナーゼ Cdk1 によるリン酸化の生理的意義の解明、(2)染色体不安定性における分裂期キナーゼ群の役割の解明と新たな作用機序の抗がん剤開発への応用。

## B. 研究方法

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析

(1) 胃がん腹膜転移の初期および進展過程のノックアウトマウスを用いた解析

$\gamma$   $\delta$  TCR や炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  などを欠失したノックアウトマウスを用いて腹膜転移の初期・進展過程を観察し、各遺伝子の役割を解析、分子基盤を明らかにす

る。また GFP-遺伝子導入腹膜転移モデルを用いて微小転移の化学療法感受性を検討し、それに対する至適投与法を決定する。

(2) 大腸がん腫瘍リンパ管新生の *in vivo*、*in vitro* 解析

リンパ管内皮に対する特異抗体を用いた免疫組織化学により、ヒト大腸がん臨床例 61 例およびヌードマウスにおけるヒト大腸がんリンパ節転移モデルのリンパ管新生の実態を解析する。さらに不死化リンパ管内皮細胞株と大腸がんリンパ節転移株とを用いてリンパ管内皮細胞の増殖や管腔形成の制御機構を *in vitro* で解析する。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の解析

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の臨床的意義の確立ならびにキメラ遺伝子の機能の解析

多数症例の胃 MALT リンパ腫症例を解析し、API2-MALT1 キメラ遺伝子の存在と除菌療法に対する反応性などの病態と比較検討する。また API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入細胞株を樹立し、アポトーシスに関する機能を検討する。

(2) 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。

(c) 肺がんにおける遺伝子異常の解析

(1) HDAC9 isoform3 の解析

肺腺がん 60 検体(及び対照の正常肺)より、RNA を採取し、HDAC9 isoform3 の発現を real-time PCR で定量、予後を含む臨床病理データと遺伝子発現量との関連を解析する。

(2) Dicer の解析

非小細胞肺がん患者 67 症例の手術検体(及び対照の正常肺)の RNA を用いて、Dicer 及び Drosha の発現を real-time PCR で定量、

予後を含む臨床病理データと遺伝子発現量との関連を解析する。さらに Dicer 低発現へのエピジェネティックな異常の関与を検討するために、Dicer 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド内の DNA メチル化の有無を、患者ゲノム DNA を bisulfite 処理後に、PCR 増幅してシーケンスにて解析する。(d) 細胞分裂期の制御に必須な分裂期キナーゼ群の機能解析

(1) Cdk1 による INCENP リン酸化部位の同定および同部位に対する抗リン酸化ペプチド抗体の作製

Cdk1 のリン酸化部位のコンセンサスから、リン酸化されうる部位 (計 18 個) をそれぞれリン酸化されないアミノ酸に置換した INCENP 変異体を作製し、それらを Cdk1 によってリン酸化した後、2次元リン酸化ペプチドマップ法を用いて、リン酸化部位の同定を行った。次に INCENP の各部位のリン酸化状態をモチーフとするリン酸化ペプチドを免疫することで、それぞれの部位のリン酸化状態を特異的に認識するラットモノクローナル抗体 (抗リン酸化抗体) を作製した。

(2) Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義の解析

RNA 干渉法 (RNAi) によって INCENP または Aurora-B の発現を低下させたとき、Plk1 の動原体局在がどのように変化するかを解析した。またマウス INCENP の野生型 (WT) およびそれぞれのリン酸化部位をリン酸化されないアラニンに置換した変異体をレトロウィルスの系で導入した HeLa 細胞株をそれぞれ樹立した。その後、ヒトに特異的な ds RNA を用いて、内因性の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの分裂期の表現型を観察した。

(倫理面への配慮)

実験に用いたレトロウィルス等は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会

承認されたプロトコールに基づき、指定を受けた研究領域のみで使用しており、ヒトへの感染防御等十分な対策がとられている。

## C. 研究結果

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析と腹膜微小転移の化学療法感受性

Lewis 肺がん細胞の腹膜転移は TNF- $\alpha$  KO マウスでは野生型マウスに比べ初期転移巢形成率が低い傾向が見られると共に、組織学的に腹壁腹膜や横隔膜など乳斑の存在しない腹腔内組織への播種性進展が抑制され、また生存日数の有意な延長が認められた。この結果は TNF- $\alpha$  などのサイトカインによる腹膜中皮細胞の退縮とその結果露出した細胞外マトリックスへのがん細胞の接着が TNF- $\alpha$  KO マウスにおいて抑制された結果と考えられた。

次に GFP-遺伝子を導入して作成した複数の胃がん腹膜微小転移モデルを用いて胃がん腹膜微小転移の化学療法感受性を検討した。パクリタキセル (PTX、毎週 1 回、8 週間) の腹腔内投与群は静脈内投与群に比べ生存率が有意に延長すること、腹腔内投与方法による早期治療群では 7 匹中 7 匹すべてのマウスで腹膜転移が消失し生存したのに対し、後期治療群ではマウスは全匹腹膜転移で死亡し、対照群と差が認められず腹膜微小転移の化学療法感受性が高いことが明らかとなった。

(2) 大腸がんにおける腫瘍リンパ管新生の in vivo および in vitro 解析

リンパ管内皮特異マーカーであるヒト Podoplanin の C 末端のオリゴペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を作製した。この抗体は組み替えヒト Podoplanin を導入したマウス細胞の可溶化物の western blott により 40kd のバンドを検出するが、近年リ

リンパ管特異抗体として市販されているモノクローナル抗体 D2-40 も同じバンドを検出することから D2-40 抗体のエピトープが Podoplanin である事が明らかとなった。この D2-40 抗体を用いて深達度 sm - mp の大腸がん臨床例 61 例のリンパ管新生の検討をおこなった。その結果、リンパ管新生は血管新生とは異なり腫瘍周囲で起こり、繊維性間質の豊富な腫瘍組織内ではむしろ正常組織に比べ減少していることが明らかとなった。またがん細胞のリンパ管侵襲は腫瘍先進部の新生リンパ管で起きる可能性が強く示唆された。

これら臨床例の腫瘍リンパ管新生に関する観察事例を実験的に検証するために GFP や DsRed 遺伝子を導入した大腸がんリンパ節転移細胞株 (COLM-5) を独自に樹立し、さらに FITC-Dextran などを用いた micro lymphangiography の技術を組み合わせて大腸がんの腫瘍リンパ管新生を *in vivo* において解析した。その結果、臨床材料の観察結果と同様に、腫瘍リンパ管は腫瘍組織内ではなく腫瘍周囲の既存のリンパ管から新生され、腫瘍のリンパ管侵襲も同部で起きることを動物モデルでも確認した。

また HPVE6, E7 および hTERT 遺伝子を導入して作成したヒト不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) および上記大腸がんリンパ節転移細胞株、COLM-5 を組み合わせた *in vitro* 解析システムを用いて、リンパ節転移性大腸がん細胞株 (COLM-5) 培地中に VEGF-C 刺激に比べ数倍高いリポーター活性を検出し、VEGF-C 以外の新しい管腔形成促進因子が存在する可能性を見出した。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の意義の確立と機能解析

胃 MALT リンパ腫症例 115 例を解析し、API2-MALT1 キメラ遺伝子を調べた。21 症例

にキメラ遺伝子が存在し、すべて除菌無効症例であった。72 症例は除菌療法有効症例であったが、このなかには API2-MALT1 キメラ遺伝子は証明されなかった。22 症例は API2-MALT1 遺伝子が認められなかったが、除菌療法無効症例であった。すなわち、除菌療法無効症例の半数は API2-MALT1 遺伝子の存在が原因と考えられるが、キメラ遺伝子の無い除菌療法無効が半数存在することが明らかとなった。

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、紫外線照射によるアポトーシス抑制効果を持つことを報告した。今年度はレトロウイルスベクターで細胞株に導入し、抗アポトーシス作用を検討した。HeLa 細胞およびマウス IL3 依存性細胞株 Ba/F3 に導入し、紫外線照射によるアポトーシスに関する影響を調べたところ、アポトーシスを抑制することが明らかとなった。また、doxorubicin によるアポトーシスに関してもアポトーシスの抑制効果が認められた。しかし、IL3 除去によるアポトーシスの誘導に関しては抑制効果が認められなかった。

(2) 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。我々はこれまでに CD5+DLBCL は CD5-DLBCL に対し予後不良群を形成することを報告していたが、DLBCL70 症例 (CD5+DLBCL, 26 例; CD5-DLBCL, 44 症例) に対し array CGH 法で解析した。20%以上の症例に認められる両方に共通する異常は、増幅領域としては 1q21-q31, 1q32, 3p25-q29, 5p13, 6p21-p25, 7p22-q31, 8q24, 11q23-q24, 12q13-q21, 16p13, 18 が見出され、欠失領域としては 1p36, 3p14, 6q14-q25, 6q27, 9p21, 7p11-p13 が

見出された。また、CD5+DLBCL に特徴的な遺伝子異常として、10p14-p15 と 19q13 領域の増幅、および、1q43-q44 と 8p23 領域の欠失を見出した。また、予後不要因子として、CD5+DLBCL で 13q21-q34 の増幅あるいは 1p34-p36 の欠失を見出した。両者に共通する 13q31 増幅領域からは新規遺伝子 C13orf25 を見出し、また、3p21 欠失領域の責任遺伝子は FHIT 遺伝子であることを報告した。

(c) 肺がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) HDAC9 の各 isoform の発現を RT-PCR で検討すると、肺がん細胞株では catalytic domain の欠失した HDAC9 isoform 3 が、主に発現していることが判明した。そこで、この HDAC9 isoform 3 の肺がん症例での発現を real-time PCR で検討した。すると、殆どの症例で正常肺に比して高発現を示した。HDAC9 の発現値により症例を 4 分割すると、最も高発現群の予後が不良である傾向が見られた。そこで、高発現群(1/4)と中程度発現群(3/4)とで予後解析すると、HDAC9 isoform3 高発現群の生存率が有意に低下していることが判明した (log-rank  $p = 0.035$ )。

次に HDAC9 isoform3 の高発現が予後不良因子になるか否かを多変量解析すると、腫瘍サイズ (T 値) と共に、腫瘍サイズと独立した強い予後因子 (H.R. = 4.17,  $p = 0.012$ ) となることが判明した。

又、発現低下が非常に強い予後不良因子となる HDAC class II HDAC5・HDAC10 を強制発現させることで、肺がん細胞の増殖が影響を受けるか検討した。HDAC5・HDAC10 低発現細胞株 A549・Calu6 に遺伝子導入して細胞増殖を検討したところ、両細胞共に、HDAC5 により細胞増殖がベクターコントロールの約 40%へと減少した。一方、HDAC10 では、増殖抑制効果は得られなかった。

(2) Dicer と Drosha の発現を検討したところ、Dicer は、正常肺の 1/2 の発現量を境に、ヒストグラムで二峰性の発現パターンが見られた。そこで正常肺の 1/2 の発現値に基づき、症例を Dicer 高発現群・低発現群の二群に分けて解析した。一方、Drosha は、明瞭な二峰性を示さなかった。そのために、発現の中央値で、症例を高発現群・低発現群に二分し解析した。

臨床病理データとこれら高発現群・低発現群との関連を検討すると、Dicer の低発現群で低分化型を示す症例が多かった ( $p = 0.01$ )。病期・組織型等に相関は無かった。一方 Drosha では著明な相関は見られなかった。予後との関連を検討すると、Dicer 低発現群の予後は高発現群に比して著明に不良であることが判明した (log-rank test  $p = 0.0001$ )。多変量予後因子解析を行うと、病期 (Hazard ratio (H.R.)=11.3,  $p = 0.001$ ) と共に、病期と独立した強い予後因子 (H.R.=17.6,  $p = 0.001$ ) となることが判明した。一方、Drosha では、低発現群で予後不良の傾向があったが、有意ではなかった。

Dicer の発現低下が肺がん予後に強く関与することから、この Dicer の発現低下の原因を検討した。Dicer の promoter 領域に CpG アイランドが存在するために、DNA メチル化による発現低下の可能性を検討した。低発現群 15 症例・高発現群 10 症例・正常肺で DNA メチル化の有無を検討したが、正常肺を含めどの検体からも DNA メチル化の存在を示す結果は得られなかった。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明

(1) Cdk1 による INCENP リン酸化部位の同定とリン酸化 INCENP の細胞内局在

Cdk1 が INCENP を直接リン酸化しうるかについて検討したところ、INCENP が Cdk1 によってリン酸化を受けた後、分裂期で認めら



れるようなバンドシフトを引き起こすことが明らかになった。さらに、このリン酸化部位が T59 および T388 であることを同定した。次に INCENP の各部位に対する抗リン酸化抗体を用いて、HeLa 細胞を免疫細胞染色した。その結果、Aurora-B によるリン酸化反応は分裂期を通じて認められるのに対し、Cdk1 によるリン酸化反応は、分裂前期から中期、つまり INCENP が動原体に局在する時期においてのみ認められることが判明した。(2) Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義

INCENP が Plk1 と結合しうるかを Far-Western 法を用いて検討したところ、INCENP は Cdk1 によるリン酸化反応依存性に INCENP と結合しうるということが判明した。この結合は T388A の場合では認められないことから、Plk1 は Cdk1 によってリン酸化された T388 を認識して INCENP に結合していることが判明した。また、これらの現象は免疫沈降法によっても確認された。さらに、INCENP の発現を RNAi で低下させたとき、Plk1 の中心体局在は保たれるものの、動原体への局在は阻害されていた。この現象は、Aurora-B の RNAi では認められないことから、INCENP の RNAi によって認められている表現型は、Aurora-B の活性を低下させたことによるものではなく、結合蛋白質としての INCENP が減少したことによるものと考えられた。

さらに、INCENP の T59 または T388 のリン酸化反応の生理的意義を検索するため、マウス INCENP の WT、T59A、または、T388A を導入した HeLa 細胞株において、ヒト由来（内因性）の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの細胞の表現型を観察した。その結果、WT および T59A を導入した細胞においては、Plk1 の動原体局在の回復が認められたが、T388A を導入した細胞では約半分ほどしか回復が認められなかった。また、T388A を導入した細胞では、WT およ

び T59A を導入したものに比べて、分裂中期から後期への進行が遅くなっていることが判明した。以上のことから、Cdk1 は INCENP のリン酸化反応を通じて、Plk1 の動原体局在を制御していること、動原体の Plk1 は、分裂中期から後期への進行に重要な役割を担っていることが判明した。

#### D. 考察

(a) 消化器がん転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析と腹膜微小転移の化学療法感受性

GFP-遺伝子を導入して作成した胃がん腹膜微小転移モデルを用いた *in vivo* の解析からマウスにおいては胃がんの初期の腹膜転移は腹腔内のどこにでも起こる訳ではなく、乳斑に限局して選択的に起こること、腫瘍の増大に伴い乳斑以外の組織にも播種性進展することを示した。また TNF- $\alpha$  KO マウスを用いた解析からこの播種性進展には TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが促進的に関与することを明らかにした。従って、中和抗体などを用いた TNF- $\alpha$  活性阻害により腹膜転移の播種性進展を抑制できる可能性があり現在、検討を進めている。

一方、微小転移の治療感受性の検討から腹膜微小転移は分布が限局的で、数も限られること、また高い化学療法感受性を有することから治療の格好の標的となりうるものと考えられた。我々は腹腔洗浄液の遺伝子診断（CEA を指標とするリアルタイム RT-PCR 法）により腹膜微小転移が検出可能であり、これを検出することにより腹膜再発ハイリスク患者の選別が可能であることを 300 例以上の胃がん症例を用いて既に明らかにしている。これらのことから遺伝子診断による微小転移の検出とハイリスク患者に対する早期治療による治療戦略を提唱し、腹膜再発の予防を目指した臨床試験を開始している。

## (2) 大腸がん腫瘍リンパ管新生の分子機構の解析とその臨床応用

大腸がん症例の免疫組織学的解析およびヌードマウスにおける腫瘍リンパ管新生の解析からリンパ管密度は腫瘍組織内では正常組織のリンパ管に比べむしろ少なく、腫瘍周囲において増加が認められた。このことからリンパ管新生は血管新生のように腫瘍発育にとって必須ではないこと、リンパ管新生は血管新生とは別の機序で制御されていることが強く示唆される。腫瘍組織内でリンパ管新生が乏しい理由として腫瘍間質細胞がリンパ管新生を阻害する物質を産生している可能性なども考えられる。

これら臨床例の観察から得られた可能性を検証するために、不死化ヒトリンパ管上皮細胞株とヒト大腸がんリンパ節転移細胞株を組み合わせた *in vitro* 解析システムを確立した。今年度はこのシステムを用いて管腔形成促進因子の存在を検出したが、本システムは今後促進因子だけでなく、阻害因子の同定にも応用可能であり、現在解析を進めている。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の意義の確立ならびにキメラ遺伝子の機能

多数症例の胃 MALT リンパ腫を解析し、除菌療法無効症例の半数に API2-MALT1 遺伝子が見出されたことは重要であるが、約半数近くには API2-MALT1 のようなマーカーがないので、今後どのような特徴があるのかについての解析を進める必要がある。

レトロウイルス法を用いて上皮細胞 HeLa、リンパ球細胞 Ba/F3 に API2-MALT1 融合遺伝子を導入、発現させ MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能解析を行なった。API2-MALT1 は、HeLa 細胞において紫外線誘導性のアポトーシスに対し、また、

Ba/F3 細胞においては紫外線及び doxorubicin 誘導性のアポトーシスに対して抑制的に働くことを示した。このことから、API2-MALT1 の抗アポトーシス作用はリンパ系細胞に限ってみられるものではなく、普遍的な現象である可能性が示唆された。造血器細胞株では、今回初めて、API2-MALT1 キメラ遺伝子の抗アポトーシス作用が明らかとなった。また、Ba/F3 細胞株は紫外線及び doxorubicin 誘導性のアポトーシスに対して抑制的に働くものの、IL3 除去によるアポトーシスは抑制しなかったため、API2-MALT1 の抗アポトーシス作用は刺激の種類により異なると考えられた。

(2) 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+DLBCL と CD5-DLBCL 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+DLBCL の疾患単位としての分子基盤を確立してきた。今年度は、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、これら欠失又は増幅しているゲノム領域を解析した。その結果、新しい異常領域が複数見出されており、そのうちの 2 領域については、比較的短期間に責任遺伝子を確定することができた

(c) 肺がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) HDAC9 isoform 3 の高発現が予後不良因子となることが示唆された。今後、更に症例数を増やして確認する必要がある。HDAC9 は染色体 7p21 に存在し、がんで遺伝子増幅がある領域として知られており、遺伝子増幅に伴い HDAC9 isoform3 の発現が増強している肺がん症例があるかも今後検討していく。HDAC9 isoform3 は他の isoform に見られない特異な核内分布を示し、特異な機能を持つことが考えられ検討を進めたい。

HDAC5 に関しては細胞増殖抑制作用が見ら

れ、HDAC5 発現低下が予後不良因子となるという臨床的検討結果に沿う実験結果であった。今後この分子機序を更に検討していく必要がある。HDAC10 ではこのような抑制効果は見られず、HDAC5 と HDAC10 は遺伝子構造上差異があり、機能的に異なると考えられていて、HDAC10 は増殖以外の点で肺がん発症に関与することが示唆される。これらの研究成果は、HDAC class II 発現異常が肺がん発症に深く関与することを示唆している。

(2) Dicer のヒトがんにおける異常は今まで報告が無く、我々の検討結果が最初である。Dicer は RNAi や microRNA 機構に必須であるが、遺伝子改変マウス等の検討では、Dicer 欠損により、ES 細胞の分化障害・血管形成障害、及び、セントロメアのヘテロクロマチン構造・インプリンティングの障害等非常に重篤な異常が報告されてきている。一方、我々の検討では肺がん細胞では高頻度に M 期チェックポイント異常・インプリンティング異常がみられる。このような異常と Dicer 発現量との関連を今後検討して、Dicer 低発現が予後不良因子となる機構を検討していく必要がある。

Dicer の発現低下に DNA メチル化の関与は否定されたが、DNA メチル化を伴わないクロマチン構造異常も考えられる。又、Dicer は染色体 14q に位置し、肺がんを含む種々のがんで欠失が報告されており、Dicer 遺伝子の構造異常の検討も必要である。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明

これまでの研究で、Aurora-B・INCENP 複合体は両極から伸びた微小管によって生ずる張力を監視している可能性が指摘されており、Plk1 は中心体および動原体で bipolar spindle の形成に重要な役割を担っていると考えられている。今回、我々が得た知見は、Aurora-B および Plk1 が同じ結合

蛋白質 INCENP を介して、協調的に分裂期の染色体動態を制御している可能性を示すものである。今後、この制御機構ががんにおける染色体不安定性に及ぼす影響についても検討を加えていき、将来的には、これら分裂期キナーゼを標的とした新しい抗がん剤の開発に役立てる予定である。

## E. 結論

(a) 胃がんの腹膜微小転移は化学療法高感受性であり、これを標的とする治療（腹腔内化学療法）により再発の予防が可能である事を実験的に明らかにした。またノックアウトマウスを用いた解析から胃がんの腹膜転移の播種性進展に TNF- $\alpha$  が関与することを明らかにした。

また大腸がん臨床例および大腸がんリンパ節転移マウスモデルの観察から腫瘍リンパ管新生は主として腫瘍外の既存のリンパ管からおこることを明らかにし、その制御機構の一つとして VEGF-C 以外の新しいリンパ管新生促進因子の存在を *in vitro* 解析系を用いて示唆した。

(b) 胃 MALT リンパ腫においてピロリ菌除菌療法無効症例のうち、半数に API2-MALT1 キメラ遺伝子を見出した。MALT リンパ腫に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子は、造血器細胞株においても紫外線照射や抗がん剤によるアポトーシスを抑制するが、IL3 除去によるアポトーシスは抑制しないことを明らかにした。

DLBCL リンパ腫のゲノム異常を解析するために、2300 個の BAC clone を用いた array CGH 法を確立した。従来法の CGH 法よりも感度が高く、詳細な検討ができることを明らかにした。Array CGH 法で、13q31 増幅と 3p21 欠失の領域からそれぞれの責任遺伝子 *C13orf25* と *FHIT* 遺伝子を確定した。

(c) HDAC9 isoform3 は発現亢進が予後不良因子になること、また HDAC5 を強制発現さ

せることで肺がん細胞の増殖が抑制されることを明らかにし、HDAC class II の発現異常が肺がん発症に深く関与する可能性を示唆した。

また RNA 分解酵素 Dicer の発現低下が予後不良因子であることを明らかにし、RNAi を介したクロマチン構造制御の破綻が肺がん発症に関与する可能性を示唆した。

(d) Aurora-B の結合パートナーである INCENP が分裂期開始キナーゼである Cdk1 によってリン酸化されること、そのリン酸化反応によって、INCENP と Plk1 が結合し、Plk1 が動原体に局在するようになること、またこの現象が分裂中期から後期への進行を制御していることを見出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 発表論文

1. Nakanishi H., Yasui K., Ikehara Y., Yokoyama H., Munesue S., Kodera Y., Tatematsu M.: Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. Clin. Exp. Meta. in press, 2005
2. Mochizuki Y, Nakanishi H, Kodera Y, Ito S, Yamamura Y, Kato T, Hibi K, Akiyama S, Nakao A, Tatematsu M.: TNF-alpha promotes progression of peritoneal metastasis as demonstrated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. Clin. Exp. Metastasis, 21(1): 39-47, 2004
3. Nakanishi, H, Ito, S, Mochizuki, Y, Tatematsu, M.: Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein-tagged tumor models in mice. In Chemosensitivity for Methods in Molecular Medicine [Blumenthal, R. D., ed.], Humana Press, Totowa, NJ. 111: 351-362, 2004
4. Nakanishi, H, Kodera, Y, Tatematsu, M.: Molecular method to quantitatively detect micrometastases and its clinical significance. (Review) In Advances in Clinical Chemistry [Makowski G, ed.], Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 38: 87-103, 2004
5. Tsukamoto, T., Inada, K., Tanaka, H., Mizoshita, T., Mihara, M., Ushijima, T., Yamamura, Y., Nakamura, S., Tatematsu, M.: Down regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: Inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. J Cancer Res Clin Oncol, 130: 135-145, 2004.
6. Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Inada, K. : Stem cells and gastric cancer : Role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. Gann Monograph on Cancer Research 52: 41-54, 2004
7. Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M: Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. Cancer Research. 64: 6410-6415, 2004
8. Hirata, A., Inada, K., Tsukamoto, T., Sakai, H., Mizoshita, T., Yanai, T., Masegi, T., Goto, H., Inagaki, M., Tatematsu, M. :Characterization of a Monoclonal Antibody, HTA28, Recognizing a Histone H3 Phosphorylation Site as a Useful Marker of M-phase Cells. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 52(11): 1503-1509, 2004
9. Yoshitomi Y, Nakanishi H, Kusano Y, Munesue S, Oguri K, Tatematsu M., Yamashina I, Okayama M.: Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically-modified heparin with reduced anti-coagulant activity. Cancer Letters, 207(2): 165-74, 2004
10. Kaneda, A., Tsukamoto, T., Takamura-Enya, T., Watanabe, N., Kaminishi, M., Sugimura, T., Tatematsu, M., Ushijima, T.: Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. Cancer Sci, 95(1): 58-64, 2004.
11. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide

- array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 24: 1348-1358, 2005.
12. 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.
  13. 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*, 23: 2576-2581, 2004.
  14. 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.*, 64: 3084-3095, 2004.
  15. Hosokawa, Y., Suzuki, H., Suzuki, Y., Takahashi, R., Seto, M.: Anti-apoptotic function of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Cancer Res.*, 64: 3452-3457, 2004.
  16. Tagawa, H., Tsuzuki, S., Suzuki, R., Karnan, S., Ota, A., Matsuo, K., Yamaguchi, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Gnome-Wide Array-based Comparative Genomic Hybridization of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between CD5-Positive and CD5-Negative Cases. *Cancer Res.*, 64: 5948-5955, 2004.
  17. Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M., Enver, T.: Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101: 8443-8448, 2004.
  18. Seto, M.: Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci.*, 95: 704-710, 2004.
  19. Kameoka, Y., Tagawa, H., Tsuzuki, S., Karnan, S., Ota, A., Suguro, M., Suzuki, R., Yamaguchi, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Contig array CGH at 3p14.2 points to the FRA3B/FHIT common fragile region as the target gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene*, 23: 9148-9154, 2004.
  20. Zhang, X., Karnan, S., Tagawa, H., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genetic aberrations in CD10<sup>+</sup> diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci.*, 95: 809-814, 2004.
  21. Hosokawa, Y., Seto, M.: Nuclear Factor KB Activation and Antiapoptosis in Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Int. J. Hematol.* 80: 215-223, 2004.
  22. Inagaki, H., Nakamura, T., Chunmei, Li., Sugiyama, T., Asaka, M., Kodaira, J., Iwano, M., Chiba, T., Okazaki, K., Kato, A., Ueda, R., Eimoto, T., Okamoto, S., Sasaki, N., Uemura, N., Akamatsu, T., Miyabayashi, H., Kawamura, Y., Goto, H., Niwa, Y., Yokoi, T., Seto, M., Nakamura, S.: Gastric MALT Lymphomas Are Divided into Three Groups Based on Responsiveness to Helicobacter Pylori Eradication and Detection of API2-MALT1 Fusion. *Am. J. Surg. Pathol.*, 28: 1560-1567, 2004.
  23. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of *Dicer* associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96(2):111-5, 2005
  24. Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of class II HDAC genes are associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int. J. Cancer.* 112: 26-32, 2004.
  25. Endoh, H., Tomida, S., Yatabe, Y., Konishi, H., Osada, H., Tajima, K., Kuwano, H., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Onco.* 22: 811-9, 2004
  26. Tomida, S., Koshikawa, K., Yatabe, Y., Harano, T., Ogura, N., Mitsudomi, T., Some, M., Takahashi, T., Osada, H., and Takahashi, T. Gene expression-based,

- individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* 23: 5360-70, 2004.
27. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64: 3753-6, 2004.
  28. Nakagawa, T., Hayashita, Y., Maeno, K., Masuda, A., Sugito, N., Osada, H., Yanagisawa, K., Shimokata, K., and Takahashi, T. Identification of Decatenation G2 Checkpoint Impairment Independently of DNA Damage G2 Checkpoint in Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 64: 4826-32, 2004.
  29. Izawa, I. and Inagaki, M. Cleavage furrow kinases and cell division. Signal Transduction of Cell Division. in press
  30. Nagata, K. and Inagaki, M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene* 24: 65-76, 2005
  31. Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Usukura, J. and Inagaki, M. Identification of Trichoplein, a novel keratin filament-binding protein. *J.Cell Sci.* 118: 1081-1090, 2005
  32. Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: Possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* 10: 127-137, 2005
  33. Tsui, J., Inagaki, M. and Schulman, H. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 280: 9210-9216, 2005
  34. Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K., Takahashi, T., Izawa, I. and Inagaki, M. Autophosphorylation of newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J.Biol.Chem.* 279: 12997-13003, 2004
  35. Yoneda, K., Furukawa, T., Zhengll, Y.J., Momoi, T., Izawa, I., Inagaki, M., Manabe, M. and Inagaki, N. 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.
  36. Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S. and Inagaki, M. Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Letter*, 568: 83-88, 2004
  37. Takami, A., Iwakubo, M., Okada Y., Kawata, T., Odai, H., Takahashi, N., Shindo, K., Kimura, K., Tagami, Y., Miyake, M., Fukushima, K., Inagaki M., Amano, M., Kaibuchi, K. and Iijima, H. Design and synthesis of Pho kinase inhibitors (I). *Bioorg. Med. Chem.* 12: 2115-2137, 2004
  38. Hirata, A., Inada, K., Tsukamoto, T., Sakai, H., Mizoshita, T., Yanai, T., Masegi, T., Goto, H., Inagaki, M. and Tatematsu, M. Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells. *J. Histochem Cytochem.* 52: 1503-1509, 2004
  39. Nagata, K., Asano, T., Nozawa, Y. and Inagaki, M. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J.Biol.Chem.* 279: 55895-55904, 2004
  40. Abe, T., Takano, K., Suzuki, A., Shimada, Y., Inagaki, M., Sato, N., Obinata, T. and Endo, T. Myocyte differentiation generates nuclear invaginations traversed by myofibrils associating with sarcomeric protein mRNAs. *J.Cell Sci.* 117: 6523-6534, 2004
  41. Fujita, M., Mizuno, M., Nagasaka, T., Wakabayashi, T., Maeda, K., Ishii, D., Arima, T., Kawajiri, A., Inagaki, M. and Yoshida, J. Aurora-B dysfunction of multinucleated giant cells in glioma detected by site-specific phosphorylated antibodies. *J. Neurosurg.* 101: 1012-1017, 2004
  42. Kawajiri, A. and Inagaki, M. Approaches to study phosphorylation of intermediate filament proteins using site-specific and phosphorylation state-specific antibodies.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 国際特許出願中

名称：リンパ腫の病型及び予後診断方法

国際出願番号：PCT/JP2004/014305

出願日：2004年 9月 22日

出願人：愛知県、日本ガイシ

発明者：瀬戸加大、他3名

2. US特許仮出願中（PCT仮出願）

名称：Method for prognosis of mantle cell lymphoma

仮出願番号：未定

出願日：2004年 12月 3日

出願人：愛知県、日本ガイシ

発明者：瀬戸加大、他3名

3. 特許出願中

名称：肺癌治療剤

出願番号：特願2004-288979

出願日：2004年 9月 30日

出願人：愛知県

発明者：長田啓隆、高橋 隆、谷田部恭

## II. 分担研究報告書



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

消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

分担研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：消化器がん患者の予後を左右する胃がんの腹膜転移および大腸がんのリンパ節転移の機構解析のためのモデル系を確立、その分子基盤の解析を行い、以下の諸点を明らかにした。1) 胃がんの腹膜転移は大網の節外性リンパ組織である乳斑に選択的に初発転移巣を形成すること、この微小転移は化学療法感受性があり、胃がんの腹膜再発予防のための治療標的となりうること。腹腔内化学療法が腹膜転移抑制の最適治療法であること、2) 胃がんが初期転移巣から乳斑の存在しない腹膜に播種性に進展するのに TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが重要な関与をすること、3) Podoplanin 抗体を用いた大腸がん臨床症例の免疫組織学的解析によりリンパ管新生は腫瘍内ではなく、腫瘍周囲に見られ、血管新生とは異なる制御機構が存在すること、4) ヒトリンパ管内皮の初代培養細胞に HPV16E6, E7 遺伝子を導入することにより不死化リンパ管内皮細胞株を作成し、これらが LYVE-1, Podoplanin を発現し、VEGF-C 刺激により転写が活性化されるリンパ管内皮細胞であること、5) また上記不死化細胞を用いてリンパ管新生の *in vitro* 解析系を確立し、リンパ節転移性ヒト大腸がん細胞の条件付き培地中に VEGF-C 以外のリンパ管内皮細胞の管腔形成刺激因子が存在すること、などを明らかにした。

A. 研究目的

1. 胃がん腹膜転移の初期および進展過程の分子基盤の解明。
2. 上記分子基盤に基づいた胃がん腹膜転移に対する新しい治療法の開発。
3. ポドプラニン抗体を用いた免疫組織染色による大腸がん臨床例における腫瘍リンパ管新生の実態の解明と大腸がんリンパ節転移マウスモデルの確立。
4. ヒト不死化リンパ管内皮細胞株および大腸がんリンパ節転移性細胞株を用いた腫瘍リンパ管新生の *in vitro* 解析システムの確立と同モデルを用いた大腸がん腫瘍リンパ管新生の分子機構の解

明。

B. 研究方法

1 大網の節外リンパ組織である乳斑の構成細胞と考えられる  $\gamma\delta$ T 細胞の TCR やそれらのエフェクター分子である TNF- $\alpha$  などのサイトカインを欠失したノックアウトマウスと同系マウス (C57BL) 由来の GFP-遺伝子導入 Lewis 肺がん細胞モデル (P29-GFP) を用いて腹膜転移の初期・進展過程に及ぼす両分子の役割を検討する。2 腹膜転移をマウス体外からリアルタイムにモニターできる GFP 遺伝子導入腹膜微小転移モデルを用いて、微小転移の化学療法感受性を検討し、それに対する至

適投与法を決定する。

3 リンパ管内皮に対する特異抗体を用いた免疫組織化学によりヒト大腸がん臨床例 61 例におけるリンパ管新生の実態を解析する。また *in vivo* においてリンパ節転移を可視化できる GFP 遺伝子を導入したヒト大腸がんリンパ節転移モデルを確立する。

4 HPV E6, E7 および hTERT 遺伝子導入して作成した不死化リンパ管内皮細胞株の VEGF-C によるシグナル伝達の有無など機能を保持した細胞であるか否かをリポーターアッセイにより検討する。またこの不死化リンパ管内皮細胞株と大腸がんリンパ節転移株とを用いてリンパ管内皮細胞の増殖や管腔形成の制御機構を *in vitro* で解析する。

### C. 研究結果

(1) ノックアウトマウスを用いた胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析  
Lewis 肺がん細胞の腹膜転移は  $\gamma\delta$  TCR ノックアウトマウス (KO マウス) と野生型マウスにおいてその初期転移巣形成率および腹膜転移重量に有意差はなく、生存日数では KO マウスの方がやや短い傾向が見られた。このことから  $\gamma\delta$  T 細胞欠損は乳斑の萎縮 (軽度) には関係するが、腹膜転移の発生・進展自体には大きく関与しない事が明らかとなった。一方、TNF- $\alpha$  KO マウスでは初期転移巣形成率が低い傾向が見られると共に、組織学的に腹壁腹膜や横隔膜など乳斑の存在しない腹腔内組織への播種性進展が抑制され、また生存日数の有意な延長が認められた。この結果は以前報告した胃がんヌードマウス腹膜転移モデルで明らかにした TNF- $\alpha$  の腹膜転移促進作用を支持するものであり、TNF- $\alpha$  などのサイトカインによる腹膜中皮細胞の退縮とその結果露出した細胞外マトリックスへのがん細胞の接着が TNF- $\alpha$  KO マウスにおいて抑制された結果と考

えられた。

(2) 胃がん腹膜微小転移の化学療法感受性と微小転移を標的とする治療法の開発

GFP-遺伝子を導入して作成した複数の胃がん腹膜微小転移モデルを用いて、1) 腹腔内投与群と静脈内投与群、2) 肉眼では識別できない微小転移段階から治療する早期投与群と進行転移段階から治療する後期投与群を設定し、パクリタキセル (PTX、毎週 1 回、8 週間) の転移抑制効果を比較検討した。その結果、腹腔内投与群は静脈内投与群に比べ生存率が有意に延長すること、腹腔内投与法による早期治療群では 7 匹中 7 匹すべてのマウスで腹膜転移が消失し生存したのに対し、後期治療群ではマウスは全匹腹膜転移で死亡し、対照群と差が認められなかった。次に微小転移巣と肉眼転移巣の血管新生、PTX の組織内濃度を比較検討したところ腹腔内投与の場合、血管新生のまだ起こっていない微小転移巣では肉眼転移巣に比べて 2-3 倍高値を示すことが明らかになった。以上の結果は腹膜微小転移は化学療法感受性が高く、治療の効果的な標的となりうること、腹腔内投与が腹膜微小転移に対する至適投与法であることを示唆している。

(3) 大腸がん臨床例における腫瘍リンパ管新生の免疫組織学的解析とヒト大腸がんリンパ節転移モデルの確立

上記リンパ管内皮特異マーカーであるヒト Podoplanin の C 末のオリゴペプチドに対するポリクロナール抗体を作製した。この抗体は組み替えヒト Podoplanin を導入したマウス細胞の可溶化物の western blott により 40kd のバンドを検出するが、近年リンパ管特異抗体として市販されているモノクロナール抗体 D2-40 も同じバンドを検出することから D2-40 抗体のエピトープが Podoplanin である事が明らか

となった。我々の抗体は western blott には適しているが、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片の免疫組織染色には市販の D2-40 抗体の方がすぐれているため後者を用いて深達度 sm - mp の大腸がん臨床例 61 例のリンパ管新生の検討をおこなった。その結果、リンパ管新生は血管新生とは異なり腫瘍周囲で起こり、繊維性間質の豊富な腫瘍組織内ではむしろ正常組織に比べ減少していることが明らかとなった。またがん細胞のリンパ管侵襲は腫瘍先進部の新生リンパ管で起きる可能性が強く示唆された。

これら臨床例の腫瘍リンパ管新生に関する観察事例を実験的に検証するためには再現性の高い大腸がんリンパ節転移モデルを用いた動物実験が必須である。我々は大腸がん肝転移巣から 100% の頻度でリンパ節に自然転移する細胞株 (COLM-5) を独自に樹立した。これに GFP (緑色蛍光蛋白) や DsRed (赤色蛍光蛋白) などのリポーター遺伝子を導入し、リンパ節転移を微小転移の段階から高感度かつリアルタイムに可視化できるモデルを作成、さらに FITC-Dextran や Rhodamin-Dextran を用いた micro lymphangiography の技術を組み合わせて大腸がんの腫瘍リンパ管新生を in vivo において解析できるシステムを確立した。その結果、臨床材料の観察結果と同様に、腫瘍リンパ管は腫瘍組織内ではなく腫瘍周囲の既存のリンパ管から新生され、腫瘍のリンパ管侵襲も同部で起きることを動物モデルでも確認した。またリンパ節に転移が起きると輸入リンパ管が容易に閉塞、バイパス路が形成されるなど腫瘍リンパ管新生の興味ある動態も明らかとなった。

(4) ヒト不死化リンパ管内皮細胞株および大腸がんリンパ節転移細胞株を用いた

in vitro 解析システムの確立と、それを用いた腫瘍リンパ管新生の分子機構の解析

HPVE6, E7 および hTERT 遺伝子を導入して作成したヒト不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) は CD31, FLT-4 および Podoplanin が陽性で、分化形質を保持した細胞であるが、VEGF-C によるシグナル伝達が起こるか否かについてはこれまで不明であった。今回、リポーターアッセイの結果、VEGF-C 刺激により AP1 および Sre 活性が 4-5 倍上昇する事を明らかにし、HuTLEC 細胞が機能的なシグナル伝達経路を保持した細胞であることを明らかにした。今回、この in vitro 解析システムを用いて、リンパ節転移性大腸がん細胞株 (COLM-5) 培地中に VEGF-C 刺激に比べ数倍高いリポーター活性を検出し、VEGF-C 以外の新しい管腔形成促進因子が存在する可能性を見出した。

#### D. 考察

##### (1) 胃がん腹膜転移発生・進展の分子基盤の解析とその臨床応用

GFP-遺伝子を導入して作成した胃がん腹膜微小転移モデルを用いた in vivo の解析からマウスにおいては胃がんの初期の腹膜転移は腹腔内のどこにでも起こる訳ではなく、乳斑に限局して選択的に起こること、腫瘍の増大に伴い乳斑以外の組織にも進展する事、すなわち胃がん腹膜転移の発生・進展は 2 段階からなる事を示唆した。また TNF- $\alpha$  KO マウスを用いた解析から TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが腹膜転移を進展することを明らかにした。従って、抗体などを用いた TNF- $\alpha$  活性阻害により腹膜転移の播種性進展を抑制できる可能性があり現在、検討を進めている。一方、 $\gamma \delta$  TCR KO マウスを用いた解析から  $\gamma \delta$  TCR 欠損はがん細胞の初期定着、進展に殆ど影響を及ぼさなかった。この結果は乳斑の萎縮は認

められたものの、 $\gamma\delta$  TCR のみの欠損では萎縮の程度は軽度に留まり、リンパ組織としての基本構築が保持されているためと考えられた。今後、 $\alpha\beta$  TCR KO マウスとのダブルノックアウトマウスなどを用いて乳斑欠損マウスを作成し、腹膜転移が起こらなくなるか否かなど腹膜転移の乳斑依存性とその分子基盤をさらに明らかにする必要がある。

一方、微小転移の治療感受性の検討から腹膜微小転移は分布が限局的で、数も限られること、また高い化学療法感受性を有することから治療の格好の標的となりうるものと考えられた。我々は腹腔洗浄液の遺伝子診断 (CEA を指標とするリアルタイム RT-PCR 法) により腹膜微小転移が検出可能であり、これを検出することにより腹膜再発ハイリスク患者の選別が可能であることを 300 例以上の胃癌症例を用いて既に明らかにしている。これらのことから遺伝子診断による微小転移の検出とハイリスク患者に対する早期治療により腹膜再発を予防する治療戦略を提唱し、臨床試験を開始している。

#### (2) 大腸がん腫瘍リンパ管新生の分子機構の解析とその臨床応用

大腸がん症例の腫瘍リンパ管新生の免疫組織学的解析からリンパ管は腫瘍組織内では正常組織のリンパ管に比べむしろ少なく、腫瘍周囲においてリンパ管密度 (LVD) の増加が認められた。この事実は腫瘍リンパ管新生は腫瘍周囲の既存のリンパ管から起こるが、血管新生と異なり腫瘍内部まで到達しない事を示している。このことからリンパ管新生は血管新生のように腫瘍発育にとって必須ではないこと、リンパ管新生は血管新生とは別の機序で制御されていることが強く示唆される。腫瘍組織内でリンパ管新生が乏しい理由として腫瘍間質細胞がリンパ管新生

を阻害する物質を産生している可能性なども考えられる。

これら臨床例の観察から得られた可能性を検証するためにはリンパ管新生の *in vitro* 解析システムが必須である。我々の確立した不死化ヒトリンパ管内皮細胞株とヒト大腸がんリンパ節転移細胞株を組み合わせた *in vitro* 解析システムは上記解析を可能にした世界初のシステムである。今年度はこのシステムを用いて管腔形成促進因子の存在を検出したが、本システムは今後促進因子だけでなく、阻害因子の同定にも応用可能であり、現在解析を進めている。

#### E. 結論

- (1) 胃癌腹膜転移の初期は乳斑に依存的事であること、進展過程に TNF- $\alpha$  が関与することを明らかにした。
- (2) 胃癌の腹膜微小転移は化学療法高感受性であり、これを標的とする治療 (腹腔内化学療法) により再発の予防が可能である事を実験的に明らかにした。
- (3) 大腸がん臨床例および大腸がんリンパ節転移マウスモデルの解析から腫瘍リンパ管新生は主として腫瘍外の周囲組織でおこることを明らかにした。
- (4) 腫瘍リンパ管新生の *in vitro* 解析システムを用いて、新たなリンパ管新生促進因子の存在を明らかにした。

#### G. 研究発表

1. Mochizuki Y, Nakanishi H, Kodera Y, Ito S, Yamamura Y, Kato T, Hibi K, Akiyama S, Nakao A, Tatematsu M.: TNF-alpha promotes progression of peritoneal metastasis as demonstrated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. Clin. Exp.