

- Metastasis, 21(1): 39-47, 2004.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Inada, K. : Stem cells and gastric cancer : Role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. Gann Monograph on Cancer Res. 52, 41-54, 2004.
 6. 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
 7. 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.
 8. 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): 165-174, 2004.
 9. 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.
 10. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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、ピロリ菌除菌反応症例の半数に API2-MALT1 キメラ遺伝子が認められることを明らかにした。(2)また、API2-MALT1 キメラ遺伝子を細胞株に導入し、抗アポトーシス機能を有することを明らかにした。(3)array CGH 法を確立し、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に特徴的なゲノム異常を見出した。

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 の意義について特に胃 MALT リンパ腫症例について検討する。
2. API2-MALT1 キメラを用いて発現ベクターを構築し、腫瘍化に関与する機能を調べる。
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)のゲノム異常を明らかにし、臨床的に意義のある疾患単位を規定するマーカーを明らかにする。

B. 研究方法

(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

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。

(2) 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、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。(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。

C. 研究結果

(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

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。

(2)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。

(3)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。

D. 考察

(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

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。

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

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 へ API2-MALT1 融合遺伝子を導入し、発現させることができた。この系を用いて、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ので、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。

(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+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。

E. 結論

- (1) 胃 MALT リンパ腫でピロリ菌除菌療法無効症例のうち、半数に API2-MALT1 キメラ遺伝子が見出された。
- (2) 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ことが明らかとなったが、IL3 除去によるアポトーシスは抑制しないことが明らかとなった。
- (3) 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。

G. 研究発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Seto, M.: Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci.*, 95: 704-710, 2004.
8. 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.
9. Zhang, X., Karnan, S., Tagawa, H., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genetic aberrations in CD10⁺ diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci.*, 95: 809-814, 2004.
10. Hosokawa, Y., Seto, M.: Nuclear Factor KB Activation and Antiapoptosis in Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Int. J. Hematol.* 80: 215-223, 2004.
11. 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.
12. 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.

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

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

がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

分担研究者 稲垣 昌樹 愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨

Aurora-B、Plk1 (Polo-like kinase 1)は、がん細胞において活性が上昇する分裂期リン酸化酵素（キナーゼ）であり、発がん過程に重要な役割を担っている可能性が指摘されているが、その詳細は不明である。我々は、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、および、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明らかにした。この研究は、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り、がんにおける染色体不安定性のメカニズムを解明するうえで有用な知見といえる。

A. 研究目的

近年、染色体の不安定性が、がんの悪性化のみならず、発がんの過程そのものにも深く関与している可能性が指摘されている。染色体の不安定性を引き起こすメカニズム一つとして、分裂期における染色体分配システムの異常が想定されている。分裂期の制御には、分裂期開始に必須な Cdk1 キナーゼに加えて、Aurora-B、Plk1 などの分裂期キナーゼ群が重要な役割を担っているが、染色体不安定性における分裂期キナーゼの役割の研究はまだ端緒についたばかりである。最近、我々は、Aurora-B の結合蛋白質である INCENP が Aurora-B 以外にも分裂期開始に必須な Cdk1 によってリン酸化されていることを明らかにした。我々は、この Cdk1 による INCENP のリン酸化反応の生理的意義の解析を通じて、がんにおける染色体不安定性のメカニズムの一端を明らかにし、新たな作用機序の抗がん剤

開発に役立てることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

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
 - 1) 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。
 - 2) 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

- 1) 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、Pik1 の動原体局在がどのように変化するかを解析した。
- 2) 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 dsRNA 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は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会で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

1. Cdk1 による INCENP リン酸化部位の同定

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。

2. Cdk1 による INCENP リン酸化反応の細胞内局在

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。

3. Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義

INCENP が Pik1 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、Pik1 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、Pik1 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、Pik1 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、Pik1 の動原体局在を制御していること、動原体の Pik1 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

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、

Pik1 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 Pik1 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

本年度、1) 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、2) そのリン酸化反応によって、INCENP と Pik1 が結合し、Pik1 が動原体に局在するようになること、および、3) 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

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Kawajiri, A. and Inagaki, M.: Approaches to study phosphorylation of intermediate filament

- proteins using site-specific and phosphorylation state-specific antibodies. *Methods in Cell Biol.* 78: 353-371, 2004.
10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Izawa, I. and Inagaki, M.: Cleavage furrow kinases and cell division. *Signal Transduction of Cell Division.* in press.
 2. Inoko, A., Nishizawa, M., Izawa, I., Nagata, K. and Inagaki, M.: Identification and characterization of a novel keratin binding protein, Trichoplein (Trichohyalin and Plectin like protein), as a desmosomal protein. Gordon Conference on Intermediate Filaments (イギリス)[ポスター] 2004.
 3. Inoko, A., Nishizawa, M., Izawa, I., Nagata, K. and Inagaki, M.: Identification and characterization of a novel keratin binding protein, trichoplein (trichohyalin and plectin binding protein), as a desmosomal protein. 第 57 回日本細胞生物学会 (大阪) [ポスター] 2004
 4. Nagata, K. and Inagaki, M.: Identification of a novel Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. 第 57 回日本細胞生物学会 (大阪) [ポスター] 2004.
 5. 稲垣昌樹: サイクリン依存性キナーゼカスケイド。平成 16 年度特定領域研究「細胞周期制御」全体進捗会議 (大沼) [セミナー] 2004.
 6. 稲垣昌樹: Aurora-B キナーゼによる細胞骨格、ヒストンのリン酸化。大阪大学蛋白研セミナー (大阪) [招待口演] 2004.
 7. 稲垣昌樹: リン酸化による細胞骨格蛋白質の制御機構の解明。病態代謝研究会研究報告会 (東京) [招待口演] 2004
 - H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)現在のところ、予定も含め、ない。

2. 学会発表

1. Inagaki, M.: Identification and characterization of cleavage furrow kinases. Gordon Conference on Intermediate Filaments (イギリス) [招待口演] 2004.

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

肺がんの発生に関わる分子病態の解析

分担研究者 長田 啓隆 愛知県がんセンター研究所
分子腫瘍学部室長

研究要旨 本研究では、(1) HDAC class II の肺がん発症への関与の検討を進めた。HDAC class II 中の HDAC9 は、酵素活性部位欠失型アイソフォームの isoform 3 が肺がんで主に発現し、HDAC9 isoform3 高発現が予後不良因子になることが判明した。又、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が判明した。これらの研究成果は、HDAC class II が肺がん発症に深く関与することを示唆した。

(2) RNAi 機構がクロマチン構造維持に関与することが示唆され注目されているが、この RNAi 機構の重要な因子である RNA 分解酵素 Dicer の肺がんでの発現を検討すると、低発現症例は非常に予後不良であることが判明した。この成果は、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ことを示唆した。これらの検討結果は、肺がんにおけるエピジェネティック異常発症の分子機序の解明及び、エピジェネティック異常を標的としたがん治療法の開発に非常に重要な示唆を与えると考えられる。

A. 研究

目的

難治性固形腫瘍であるヒト肺がんの発生・進展の分子病態を解明すべく、がん遺伝子・がん抑制遺伝子・転移関連遺伝子について検討を進めている。これらの遺伝子異常にはエピジェネティックな機序が関与することが注目されているが、本年度の研究の目的は、このエピジェネティック異常を引き起こす分子機序の解明を目指した。特にクロマチン構造の制御に関わる因子として、注目されている以下の遺伝子群について検討した。

(1) ヒストン修飾によりクロマチン構造を制御する因子群の中で HDAC class II の発現ががんで低下し予後不良因子となることを世界で初めて見出した。これらの HDAC class II 遺伝子群の肺がん発症への関与の

分子機序を解明することを目的として検討を進めた。多くの isoform を発現することが特徴的で、以前の検討に加えていなかった HDAC9 について今回検討した。又、以前の検討で最も強い予後不良因子となった HDAC5・HDAC10 について更に検討を進めた。

(2) RNAi 及び microRNA が遺伝子の (mRNA・蛋白レベルの) 発現制御だけでなく、クロマチン構造の制御にも関与することが示唆されている。Dicer・Drosha は、この RNAi・microRNA 機構に必須な RNA 分解酵素遺伝子である。この遺伝子の異常が、肺がんの発症・進展に関与するか解明することを目的に検討を進めた。

B. 研究方法

(1) 愛知県がんセンター病院の患者より

同意の下に採取した肺腺がん 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 で解析した。定量の際は 18S ribosomal RNA の発現で補正した。real-time PCR は 2 回施行して平均値を解析に用いた。定量の際は 18S ribosomal RNA の発現で補正した。予後を含む臨床病理データと遺伝子発現量との関連を統計解析した。

又、最も予後不良因子となる HDAC5・HDAC10 の肺がん発症への関与を検討するために、各全長 ORF を含む cDNA を RT-PCR で増幅し、発現ベクターを作成し、HDAC5/HDAC10 低発現の肺がん細胞株に遺伝子導入して、細胞増殖を検討した。

(2) 愛知県がんセンター病院の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 で解析した。予後を含む臨床病理データと遺伝子発現量との関連を、フィッシャー直接法・Cox 比例ハザードモデル法等にて解析した。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した。

(倫理面への配慮)

愛知県がんセンターの一般倫理審査委員会、及び遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたプロトコールに基づき、腫瘍等の患者検体は本研究に使用されている。

C. 研究結果

(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 Cox 比例ハザードモデル法による多変量予後因子解析を行うと、腫瘍サイズ (T 値) (Hazard ratio (H. R.) = 7.87, $p = 0.009$) 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

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 $p = 0.0001$)。Cox 比例ハザードモデル法による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. 考察

(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 で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た。

(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、重篤な 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等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。

E. 結論

HDAC9 isoform3 は発現亢進が予後不良因子になることが判明した。又、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が判明した。これらの研究成果は、HDAC class II の発現異常が肺がん発症に深く関与することを示唆した。RNA 分解酵素 Dicer の発現低下が予後不良因子であることが判明した。この成果は、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ことを示唆した。肺がんの発症進展にエピジェネティックな異常

やインプリンティング異常が関与するが、その異常の発症機序は不明な点が多い。今回の解析結果は、エピジェネティック異常の分子機序の解明に役立つことが期待されると共に、エピジェネティック異常を標的としたがん治療法の開発を進める上で非常に重要な示唆を与えると期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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):111-115, 2005.
2. 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.
3. 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: 811-819, 2004.
4. 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: 5360-5370, 2004.

5. 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: 3753-3756, 2004.
6. 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: 4826-4832, 2004.

2. 学会発表

長田啓隆・立松義朗・谷田部恭・高橋隆 肺がんの分子病態特性に基づく ASCL1 に対する新規癌治療法の検討 第 63 回日本癌学会学術総会 (口演)

中川拓・林下陽二・前野健・増田彰・杉戸伸好・長田啓隆・柳澤聖・衣斐寛倫・下方薫・高橋隆 肺癌細胞株における decatenation G2 checkpoint の検討 第 63 回日本癌学会学術総会 (口演)

高見澤潤一・小西裕之・柳澤聖・富田秀太・長田啓隆・遠藤秀紀・原野知子・谷田部恭・棚野正人・二村雄次・光富徹哉・高橋隆 ヒト肺癌におけるマイクロ RNA *let-7* の発現と各種臨床因子との相関の解析 第 63 回日本癌学会学術総会 (口演)

柳澤聖・小西裕之・富田秀太・谷田部恭・光富徹哉・長田啓隆・高橋隆 高転移性ヒト肺癌細胞株(LNM35)における、遺伝

子・蛋白の発現プロファイル解析による転移関連因子の探求 第 63 回日本癌学会学術総会（図説）

富田秀太・越川克己・谷田部恭・原野知子・小倉信彦・光富徹哉・染真人・柳澤聖・高橋利忠・長田啓隆・高橋隆 遺伝子発現プロファイル解析に基づく肺がん患者の予後予測モデルの構築 第 63 回日本癌学会学術総会（図説）

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得

出願特許

出願番号： 特願2004-288979

出願日： 2004年 9月 30日

発明の名称： 肺癌治療剤

出願人： 愛知県

発明者： 長田 啓隆、高橋 隆、谷田部 恭

2. 実用新案登録

3. その他