

200400438A

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

研究分野2：がんの臨床的特性の分子基盤に関する研究
「がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究
横田 淳

II. 分担研究報告書

1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究
横田 淳
2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握
清野 透
3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究
落谷 孝広
4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明
堺 隆一
5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明
神奈木 玲児

総括研究報告書

がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

ヒト肺がんの約10%で欠失・変異している新規遺伝子としてCBP 転写調節因子を同定し、CBP 蛋白質は変異によって転写活性化能が有意に低下していたことから、肺がんのがん抑制遺伝子のひとつと考えられた。肺がんのがん抑制遺伝子として単離した MYO18B は大腸がんでも低頻度ではあるが失活していることを明らかにした。種々のヒト正常細胞の不死化によって、ヒト細胞の不死化には p16/RB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要であることを確認した。テロメラーゼの活性化機構には NFX-91 のように転写抑制因子の不活化も関与していることを示した。E6/E7 は染色体不安定性を誘導することが知られているが、cyclin E の高発現や p53 の不活化に加えて hWAPL の発現誘導を介した経路の存在が示唆された。マウス ES 細胞、霊長類のカニクイザル ES 細胞などから単層培養のみで肝細胞を分化誘導する系を開発し、分化した細胞の遺伝子発現プロファイルは生体内の肝細胞と酷似していることを確認した。3系統のラット胚盤胞から ES 細胞を樹立し、幹細胞としての性質の維持を確認した。悪性黒色腫における Fyn-コルタクチン経路、骨肉腫における Fyn-パキシリン経路といった、腫瘍の組織系に対応した特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせが、その細胞の運動能・浸潤能に関わっていることを明らかにした。大腸がんの血行性転移においてがん細胞が血管内皮細胞上のセレクチンに接着するための特異的なりガンドであるシアリルルイス x/a 糖鎖の発現は低酸素により亢進することを発見した。さらに、低酸素状態で発現する転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) は一連の糖鎖関連遺伝子の転写を誘導し、その結果、シアリルルイス x/a 糖鎖の発現が亢進することが分った。また、これらの糖鎖関連遺伝子は実際の大腸がん細胞でも転写が増大しており、新規腫瘍マーカーの候補と考えられた。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 清野 透 国立がんセンター研究所 部長
3. 落谷 孝広 国立がんセンター研究所 室長
4. 堺 隆一 国立がんセンター研究所 部長
5. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長

A. 研究目的

細胞内に遺伝子異常が蓄積して発生・進展していくがんの罹患率と死亡率を減少させるためには、がんの生物学的特性の分子基盤を解明し、その情報を臨床へ導入していく必要がある。本研究の目的は、多様性のあるがんの生物学的特性を細胞内に蓄積した遺伝子異常との対応で把握し、がんの体質診断、個性診断や分子標的療法の開発に有用な分子情報を得ることである。本研究は、がんの本態解明をさらに推し進めて、がんの多様性の分子基盤解明までを目指すもので、個々人や個々のがんにも最も適した予防法や治療法を提供する予知医療の実現へ向けて、必須の、且つ、極めて重要な研究課題である。この20余年のがん研究によりがんの本態が解明されつつある。そして、その情報はがん患者の予後診断やがん細胞への分子標的療法などへ応用され始め、一部のがんでは予後の改善が見られている。しかし、まだ、個々のがんの個性を分子レベルで把握するには至らず、多くのがんでは治療の標的となる分子も同定されていない。一方では、ヒトゲノム配列の決定、網羅的な遺伝子・蛋白質解析が可能な分子生物学的手法の確立など、様々な分子情報が充実し、解析技術も急速に進歩している。従って、近い将来、個々のがん細胞内に蓄積した遺伝子異常を網羅的に解析できるような診断技術の開発が予想される。また、近年、ヒト不死化細胞や各種幹細胞の樹立法の進歩により、がんの生物学的機能解析に有用な手法や材料も充実してきており、がんの生物学的特性を分子レベルで解明できる情報、材料、技術が整ってきた時期と言える。そんな背景の中で、がんの本態解明研究をさらに推進することは極めて重要であり、今後の研究により、がん細胞で特異的に起こっている遺伝子異常に関して、その生物学的意義が解明され、その制御法が開発されれば、新たながんの予防法・診断法・治療法の開発へ繋がり、がんの罹患率や死亡率の激減へ大きく貢献できる。本年度は初年度なので、それぞれの研究の基盤作りを中心に進めた。以下に本年度の研究手法とその成果を列記する。

B. 研究方法

1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

種々のヒト肺がん細胞株を対象に、ゲノム網羅的に約300ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Array を用いて CGH (Comparative Genomic Hybridization) 解析を行い、染色体のホモ欠失領域を探索した。第16染色体短腕の CBP 遺伝子を含む領域に小細胞がん細胞株の1例でホモ欠失を検出したので、さらに、CBP 遺伝子内のプライマーを用いたゲノム PCR 法でホモ欠失の詳細な検討を行った。また、肺がん細胞株と手術検体より DNA と RNA を抽出し、変異と発現の解析を行った。CBP 蛋白質の発現は N 末と C 末を認識する2つの市販の抗体を用いた Western blot 法で確認した。ヒストンアセチル化酵素領域に検出されたアミノ酸置換変異に関しては、GAL4 のアッセイ系を用いて in vivo での CBP の転写活性化能の変動を検討した。

大腸がんの細胞株および手術検体より DNA と RNA を抽出し、MYO18B 遺伝子の変異、欠失、発現、メチル化、アセチル化を解析した。変異の検索は WAVE 法で行い、direct sequencing 法で確認した。欠失は遺伝子座内の2つのマイクロサテライトマーカーを用いて判定した。発現とメチル化・アセチル化については細胞株を 5-aza-deoxycytidine (5-Aza-dC)・trichostatin A (TSA) 存在下で培養した後、RNA を回収し、Real time RT-PCR 法で MYO18B mRNA 量の変動を測定した。プロモーター領域のメチル化は bisulfite sequencing 法で、アセチル化は CHIP 法で調べた。レトロウイルスベクターを用いて MYO18B 遺伝子を大腸がん細胞株に導入し、puromycin 存在下で培養してポリクローナルな MYO18B 発現細胞を樹立した。MYO18B 蛋白質の発現は、recombinant GST-MYO18B 蛋白質をウサギに免疫して作製した anti-MYO18B 抗体を用いて、Western blot 法で確認した。これらの細胞を用いて、細胞の増殖能を、足場依存性と足場非依存性の条件下で検討した。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

hTERT のみの導入で不死化した種々の細胞や hTERT に加え p16/RB 経路を不活化できる bmi-1 や HPV16 の E7 を導入して不死化した骨髄由来間葉系幹細胞、卵巣表面層上皮細胞などを長期培養し、その形質の変化を調べるとともに、染色体の安定性を G-banding および SKY 解析によって調べた。また、p16 特異的 shRNA 発現レトロウイルスベクターと TERT の導入による細胞不死化法を検討した。さらに、不死化された子宮頸部上皮細胞などに HPV16 の E6 と E7 を導入して、形質の変化、遺伝子発現の変化を調べた。また、E6、E7 の新たな標的候補として NFX-1、hWAPL を解析した。

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

マウス ES 細胞、霊長類のカニクイザル ES 細胞を単層培養のみで肝細胞に分化誘導する系を開発し、各種幹細胞から得られた肝細胞を生化学的、分子生物学的に解析し、正常肝細胞としての性状を検討した。また、間葉系幹細胞の肝細胞分化を検討し、ヒトへの応用が可能であるか検討した。ラット ES 細胞を培養するために、ラット LIF 遺伝子をクローニングし、リコンビナント LIF を準備して、ラット ES 細胞の候補となる複数の細胞株を

樹立した。細胞への遺伝子導入の方法を、アテロコラーゲン・セルトランスフェクションアレイを中心に検討した。さらに、各種がん細胞や肝細胞分化誘導系に発がん・転移関連の各遺伝子群を導入、発現させることで、細胞の分化・増殖、遺伝子不安定性などに関する遺伝子の同定を行うための実験系を確立した。

4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

骨肉腫細胞株 Hu-O9 は、高転移群、低転移群の亜株がそれぞれ複数樹立されており、二群の間には細胞運動能や接着能に大きな違いがある。この骨肉腫細胞の運動能や接着能を制御している分子を、それぞれの細胞群のチロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにする。Western blot 法、キナーゼアッセイ、細胞免疫染色法などの手法を用いてこれらの蛋白質のリン酸化に関わるチロシンキナーゼを推定するとともに、過剰発現や RNAi による発現抑制の系を用いてこれらの分子の接着・運動能への関わりを明らかにする。ShcC ドッキング蛋白質は、正常組織では神経系に特異的に発現し、固形腫瘍では神経芽腫を中心とする神経系腫瘍細胞株の多くで発現のみならず顕著なチロシンリン酸化を認める。ShcC の神経芽腫に対する作用を検討するため、ShcC の全長及びその変異体を神経芽腫細胞に発現させた安定株を樹立し、増殖能、運動能、足場非依存性などの腫瘍特性に対する生物学的影響を解析すると同時に、下流シグナルや Src ファミリーの活性などの影響を生化学的に解析する。腫瘍における役割がこれまで解析されてきた ShcA と ShcC の間での相違を明らかにするとともに、ShcC のシグナルを介して神経芽腫の進展を抑制するモデルを樹立する。

5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

低酸素(1% O₂)下で上皮細胞を培養することによって、細胞表面にシアリルルイス x 系糖鎖やシアリルルイス a 系糖鎖の発現が誘導されるかどうかを検討した。また、低酸素によって発現が増加する糖鎖について、その増加の分子生物学的背景を明らかにするために、低酸素によって転写が誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法にて検索した。DNA マイクロアレイによって低酸素発現誘導が明らかになった遺伝子については、その背景に転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) が働いているかどうかを検索した。またその転写増大が、実際の臨床例においても引き起こされているかどうかを明らかにするため、大腸がん臨床例20例についてリアルタイム RT-PCR 法によりその転写発現を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト正常細胞の一部とヒト間葉系幹細胞は市販のものを用いている。手術で得られたヒト正常細胞の使用は、倫理審査委員会の承認を得て、提供者に不利益の生じないよう、また、同意を確認して行っている。ヒトがん組織の使用に当たっては、「臨床研究に関する倫理指針」に従い、個人情報保護に十分に配慮し、必要に応じて倫理審査委員会の承諾を得て進めている。動物の操作は、各施設の動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに進めている。

C. 研究結果

1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

DNA Array CGH 法を用いて、肺がんにおける新規ホモ欠失領域を探索し、第 16 染色体短腕に存在する CBP 遺伝子を候補がん抑制遺伝子として同定した。CBP は発がんに関与することが知られているが、どんながんで CBP 遺伝子に変異があるか、また、がん抑制遺伝子として機能するかは分かっていない。そこで、肺がん細胞株 59 例と手術検体 95 例について、CBP 遺伝子の欠失・変異の有無を調べた。CBP 遺伝子のホモ欠失は 59 例の細胞株中、H209、H1963、LK-2 の 3 例(5.1%)にみられた。H1963 では CBP mRNA、CBP 蛋白質とも検出されず、H209 と LK-2 では CBP mRNA は検出されたが、異なる大きさの CBP 蛋白質が発現していた。遺伝子変異は細胞株 59 例中 6 例(10.2%)、手術検体 95 例中 5 例(5.3%)に検出された。また、変異細胞株における CBP mRNA と CBP 蛋白質の発現量は変異のない細胞株と同程度であった。これらの結果から、CBP 遺伝子の変異は一部の肺がんにおいて、その発生あるいは悪性化に関与していることが示唆された。そこで、ヒストンアセチル転移酵素領域にアミノ酸置換を伴う 3 つの変異体と酵母の Gal4DBD との融合蛋白質発現ベクターを作製し、293T 細胞を用いて転写活性化能を比較検討したところ、3 つの変異体では正常の CBP に対して有意に減弱していた。この結果から、欠失あるいは変異による CBP 機能の減弱が発がんあるいはがんの悪性化に関与していることが示唆された。以上より、CBP 遺伝子は肺がんの約 10% で機能低下しているがん抑制遺伝子のひとつと考えられた。

第 22 染色体長腕の欠失は大腸がんでは 20-40% と高頻度に検出されるが、この領域に存在する既知のがん抑制遺伝子の異常は稀である。そこで、MYO18B 遺伝子が大腸がんにおいてもがん抑制遺伝子として機能している可能性を検証するため、大腸がんにおける MYO18B 遺伝子異常の有無について検討した。その結果、細胞株 11 例中 2 例 (18%)、手術検体 47 例中 1 例 (2%) で変異が、手術検体 43 例中 16 例 (40%) で欠失が認められた。発現低下は細胞株 11 例中 9 例 (82%)、手術検体 12 例中 5 例 (42%) で認められ、発現が低下した細胞株 9 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 9 例中全例で発現が回復したが、これらの細胞株では遺伝子プロモーター CpG アイランドの過メチル化は認めなかった。これまでの研究で、MYO18B 発現が肺がん細胞株におけるヒストンアセチル化の程度と相関することを示してきたので、大腸がんにおける発現制御にもヒストンアセチル化が関与していると考え、プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを ChIP 法で測定した。その結果、MYO18B mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルが有意に相関していることが分かった。さらに、レトロウイルスベクターを用いてヒト大腸がん細胞株 DLD-1、HT29 に MYO18B 遺伝子を導入し、MYO18B 蛋白質を強制発現させた結果、*in vitro* での足場依存性増殖に変化を認めなかったが、soft agar 内での足場非依存性増殖が有意に抑制された。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

hTERT のみの導入で不死化した種々の細胞や hTERT

に加え p16/RB 経路を不活化できる bmi-1 や HPV16 の E7 を導入して不死化した骨髄由来間葉系幹細胞、卵巣表面層上皮細胞などを長期培養した結果、ほぼ初代培養細胞の形質、ほぼ正常 2 倍体を維持していることが明らかとなった。TERT 単独で不死化した子宮頸部上皮細胞に HPV16 の E6 と E7 を導入した細胞は既に軟寒天培地中での増殖能を獲得していた。E6 は hTERT の転写抑制因子 NFX-1 91 kDa 蛋白質の分解促進を介してテロメラーゼを活性化していることを示した。ヒト正常角化細胞に E6 あるいは E7 を発現させることで子宮頸がんがかなり特異的に発現増加しており染色体の不安定性を誘導する hWAPL の発現が増加した。

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

独自に開発したマウス、カニクイザル ES 細胞から肝細胞を分化誘導する系をもとに、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞をつくりだすことに成功し、がんの生物学的特徴を規定する分子基盤の基礎的情報を明らかにするシステムの構築を完了した。DNA チップ解析により幹細胞から分化誘導した肝細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、それらは生体内の肝臓の遺伝子発現と酷似していることが明らかとなった。ラット ES 細胞を複数のストレインから樹立することに成功し、がん研究に有用な遺伝子改変ラット作製のための基礎準備が順調に進んだ。これらのラット ES 細胞は、Oct3/Oct4、Nanog などの幹細胞の未分化維持に必要な遺伝子が発現していること、胚葉体を形成する能力があること、未分化マーカーを発現していること、さらにテラトーマを形成し、そこには三胚葉由来の細胞分画を含んでいることなどの点から、ES 細胞としての性格を満たしていることが判明した。がんに関連する遺伝子機能を解析するための新しいツールとして、細胞レベルで遺伝子の機能を迅速に解析することが可能なセルトランスフェクションアレイを開発し、本研究に特化したリバースジェネティクスによる解析が可能な siRNA による解析方法を整備した。

4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

細胞の転移能の異なる同系の骨肉腫細胞株についてのチロシンリン酸化の異なる蛋白質を解析したところ、転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質はパキシリンであった。パキシリンは発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた。また同じく Src キナーゼの基質として知られる 130kD の Cas 蛋白質もチロシンリン酸化の亢進した蛋白質として検出された。これらの細胞における Src ファミリーのキナーゼ活性は上昇しており、Fyn の自己リン酸化の上昇が観察された。RNAi により高転移性の腫瘍株のパキシリンの発現量を抑制すると細胞の運動能も抑制された。逆に低転移性の細胞にパキシリンを過剰発現すると、細胞の運動能が亢進したが、3ヶ所のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体ではこのような効果は見られなかった。さらに Fyn とパキシリンを共発現させると細胞運動能が相乗的に増加し、Fyn を介したパキシリンのリン酸化が骨肉腫細胞の運動を制御していると考えられた。神経芽腫における ShcC の役割の解析では、ShcC の Grb2 結合部位である 3 箇所のチロシンをフェニルアラニンに置換したドミナントネガティブ型を過剰発現す

る細胞株では、細胞増殖能に有意な変化が見られない一方で、Erk 経路や PI3K-Akt 経路が抑制されており、細胞運動能・浸潤能の低下やレチノイン酸による分化誘導後の突起形成能の消失などが認められた。一方、正常型 ShcC の過剰発現によりヌードマウスの造腫瘍能や足場非依存性増殖能に対し著明な抑制効果を持つことが明らかになった。同時に ShcC が神経芽腫細胞の浮遊状態における Src ファミリーの活性を著明に抑制することが示された。このような ShcC の腫瘍に対する抑制的な作用は SH2 ドメインを欠損した ShcC では見られず、SH2 ドメインを介した新規的作用であることが示唆された。

5.細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

低酸素下で上皮細胞を培養することによって、細胞表面にシアリルルイス x 系糖鎖やシアリルルイス a 系糖鎖の発現が誘導されることが判明した。この発現誘導は可逆的であり、細胞を正常酸素濃度に戻して培養するとこれらの糖鎖は消退した。このとき低酸素によって転写が誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法にて検索したところ、糖鎖発現に深く関連する遺伝子として四種の遺伝子(*FUT7*, *ST3O*, *UGT1*, *GLUT1*) が得られた。これらの遺伝子の 5'-調節領域について luciferase を用いたリポーターアッセイを行ったところ、低酸素による転写誘導が認められた。この転写誘導は、リポーターアッセイにおいて転写因子 HIF のドミナントネガティブ体の同時移入によって阻害されたことから、HIF の下流で起こっていることが明らかになった。上記の 4 種の遺伝子の転写は大腸がん患者 20 例の手術材料から採取したがん細胞においても、非がん部粘膜細胞に比して統計的に有意に増加していた(*FUT7*, $p < 0.0002$; *ST3O*, $p < 0.0001$; *UGT1*, $p < 0.02$; *GLUT1*, $p < 0.0005$ 、いずれも $n=20$)。これらの遺伝子の転写増大は、Dukes A, B よりも、Dukes C, D の進行がんにおいて著明であった。上皮細胞を低酸素下で培養すると上記のほかに細胞接着分子の遺伝子 *SDC4*, *ITGA5* が有意に増加していたが、これらも実際の患者の手術材料から採取したがん細胞においても有意に増加していた(*SDC4*, $p < 0.0001$; *ITGA5*, $p < 0.002$ 、いずれも $n=20$)。

D. 考察

1.がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

肺がんの新規がん抑制遺伝子の候補として CBP 遺伝子を単離した。CBP は白血病でも転座している遺伝子のひとつであり、また、p53 などのがん抑制遺伝子の転写調節にも関わっている。さらに、構造、機能とも類似性を示す p300 遺伝子もヒトがん細胞で変異していることが知られている。以上の結果は、CBP 遺伝子の異常が肺がんの発生あるいは進展に関わっていることを強く支持している。今後、更なる遺伝子解析と機能解析を進めることによって、ヒストンアセチル転移酵素蛋白質をコードする CBP 遺伝子の異常と肺がん細胞の特性との関連性を明らかにし、肺がんの診断や治療の標的となり得るかを検討していきたい。

MYO18B 遺伝子は大腸がんにおいても比較的高頻度で不活化していたことから、肺がんのみならず、種々のヒ

トがんの発生・進展に関与するがん抑制遺伝子であることが示唆された。さらに、MYO18B 遺伝子導入による形質の変化から、MYO18B 遺伝子は、大腸がんを高頻度で失活している p53 や APC とは異なり、細胞のアポトーシスや細胞周期の制御に直接関与するのではなく、生体内において、大腸がんの悪性化、特に浸潤や転移への関与が示唆された。今後、この遺伝子の更なる機能解析を進めることにより、また、各種組織亜型、進行度のヒトがんにおける発現動態・ゲノム異常の解析を進めることにより、がんの発生・進展における MYO18B 遺伝子失活の意義を明らかにしていくとともに、治療の標的としての可能性を追求していく予定である。

2.正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

正常不死化細胞を用いた多段階発がんの解析はまだ始まったばかりであるが、このシステムの有用性を改めて確認することができた。今後は、子宮頸がんの多段階発がんモデルの構築を優先的に進めると共に、多くの臓器由来正常細胞の不活化も検討し、その共通性を解析すると共に、臓器特異的な発がん過程の解析モデルの作製を進めたい。

3.幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

ヒト肝細胞をstem細胞から分化誘導する系と、ヒトの肝がん中で特異的に発現が上昇している遺伝子群の siRNA とセルトランスフェクションアレイを組み合わせることで、肝がんの分子生物学的特徴を把握するための reverse genetics に基づく新規解析システムの構築が可能となった。このシステムは独創性が高く、がん関連遺伝子の機能を培養細胞レベルで迅速に把握し、その解析結果をがんの分子基盤を解明するために役立てることが期待できる。ラット ES 細胞の樹立は、マウスとは異なる全く新しいがんのモデル動物の作製に結びつく可能性がある。今後は樹立したラット ES 細胞を用いたキメララット作製およびラット胚操作の技術確立への展開をはかることが必要だと考える。

4.蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

腫瘍進行や転移に伴うチロシンキナーゼの活性化は広く認められているが、一般にチロシンキナーゼの活性化は多くの蛋白質のリン酸化を引き起こすため、実際どの下流シグナルがチロシンキナーゼ活性化の情報を受け渡すのかについては整理された情報が未だ得られていない。今回、腫瘍細胞の転移能・足場非依存性増殖能などの特性異常が、パキシリンや ShcC などのキナーゼ基質を介したシグナルで制御されていることを明らかにしたことにより、正常細胞においてはインテグリンを介した細胞外基質との接着情報を伝える分子や、増殖因子受容体にコントロールされる細胞増殖情報を伝える分子の、リン酸化制御の破綻が腫瘍の無秩序な増殖や転移をもたらすと考えることが出来る。これまで特に、足場非依存性増殖能に関しては PI3 キナーゼ-Akt 経路の重要性が強調されてきたが、新たにこのような分子の恒常的なチロシンリン酸化のもたらすシグナルをブロックすることによって腫瘍の異常な特性のみを効果的に抑えられる可能性がある。

5.細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

シアリルルイスx/a糖鎖の発現はがんの早期に誘導され、その後もがんのプログレッションに伴ってさらに亢進する。がんの早期におけるシアリルルイスx/a糖鎖の発現誘導は「糖鎖合成不全」の機構によることを我々は以前より提唱している。低酸素による発現亢進を解明した今年度の成果は、進行がんにおいて起こる、がんのプログレッションに伴うシアリルルイスx/a糖鎖発現の更なる亢進の背景にある分子機構であると考えられる。今年度の結果は、低酸素抵抗性を獲得した悪性度のより高いがん細胞では、必然的にシアリルルイスxおよびシアリルルイスa糖鎖が強く発現することを示す。この治療には HIF が重要なターゲット分子であると考えられる。また、これらの糖鎖の発現に関与する一連の遺伝子は実際の患者がん細胞でも増加しており、がんの分子診断のターゲットであると考えられる。

E. 結論

ヒト肺がんの約10%で欠失・変異している新規遺伝子としてCBPを同定した。CBP遺伝子も、その変異によって転写活性化能が減弱していたことから、肺がんのがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。今後の更なる機能解析により、CBPの異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていく予定である。また、肺がんのがん抑制遺伝子として単離したMYO18Bが、大腸がんでも稀ではあるが失活していることを明らかにした。さらに、肺がん細胞株と同様に、MYO18B遺伝子の発現は大腸がん細胞の足場非依存性増殖を抑制することから、MYO18B遺伝子は、種々のがんにおいて、がん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。

種々のヒト正常細胞の不死化によって、ヒト細胞の不死化にはp16/RB経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要であることが確認された。テロメラーゼの活性化機構は転写因子Mycの高発現がよく知られているが、今回明らかになったNFX-91のように転写抑制因子の不活化も重要であることが示唆された。E6E7は染色体不安定性を誘導することが知られているがcyclin Eの高発現やp53の不活化以外にhWAPLの発現誘導を介した経路の存在が示唆された。

マウスES細胞、霊長類のカニクイザルES細胞などから単層培養のみで肝細胞を分化誘導する系を世界に先駆けて開発した。ヒト肝臓がんでは特異的に発現の変化する遺伝子群の完全長cDNAはすでにクローニングされたものを準備完了した。siRNAライブラリーの作製にも着手している。さらに幹細胞への遺伝子導入と迅速な機能解析に最適な独自のセルトランスフェクションアレイ解析技術も本研究用に整備した。また3系統のラット胚盤胞からES細胞をそれぞれ樹立し、幹細胞としての性質を明らかにした。

これまでの研究結果より、悪性黒色腫におけるFyn-コルタクチン経路、骨肉腫におけるFyn-パキシリン経路といった、腫瘍の組織系に対応した特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせがその細胞の運動能・浸潤能に関わっていることが明らかになってきている。このチロシンキナーゼと基質の結合を阻害するあるいは基質のリン酸化部位をマスクするような分子は、キナーゼ活性

化が伝える多くのシグナルのうち特定のものを特異的にブロックするため、転移・浸潤といった腫瘍の特性に照準を合わせた治療に応用可能であり、従来のキナーゼ阻害薬などよりさらに特異的な分子標的治療薬の開発にも結びつくものと期待される。

血行性転移においてがん細胞が血管内皮に接着する際にセレクトインファミリーの接着分子が重要な役割を演じる。がんの悪性度の増大に伴い、セレクトインの特異的なリガンドであるシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖の発現が亢進する。本年度は、低酸素によりシアリルルイスx/a糖鎖の発現が亢進することを発見した。低酸素抵抗性の獲得は進行がんにおいてがんのプログレッションを起こす要因のひとつであり、がん細胞は転写因子HIF (hypoxia-inducible factor) の恒常的発現によって低酸素抵抗性を獲得する。DNAマイクロアレイの結果からHIFは一連の糖鎖関連遺伝子の転写を誘導し、その結果、シアリルルイスx/a糖鎖の発現が亢進することが明らかになった。また低酸素で転写が誘導される一連の糖鎖関連遺伝子はいずれも実際の患者がん細胞でも正常粘膜細胞に比べて転写が増大しており、新規腫瘍マーカーの候補と考えられた。

F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換えDNA安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
- 2) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
- 3) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, 23:3089-3096, 2004.
- 4) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 40:146-151, 2004.
- 5) Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka,

- A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 112:150-154, 2004.
- 6) Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., Yokota, J. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cells in vivo. *Carcinogenesis*, 25:1689-1694, 2004.
 - 7) Shimada, H., Shimizu, K., Mimaki, S., Sakiyama, T., Mori, T., Shimasaki, N., Yokota, J., Nakachi, K., Ohta, T., Ohki, M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genet.*, 115:372-376, 2004.
 - 8) Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hiramata, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., Takenoshita, S., Yokota, J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:512-519, 2005.
 - 9) Nakano, T., Tani, M., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Ohwada, S., Yokota, J. Genetic and epigenetic alterations of the MYO18B gene, a candidate tumor suppressor, on chromosome arm 22q in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes, Cancer*, in press, 2005.
 - 10) Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., Umezawa, A. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp. Cell Res.*, 288:35-50, 2003.
 - 11) Bruemmer, D., Yin, F., Liu, J., Kiyono, T., Fleck, E., Van Herle, A. J., Law, R. E. Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent. *Exp. Cell Res.*, 290:28-37, 2003.
 - 12) Kyo, S., Nakamura, M., Kiyono, T., Maida, Y., Kanaya, T., Tanaka, M., Yatabe, N., Inoue, M. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am. J. Pathol.*, 163:2259-2269, 2003.
 - 13) Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., Kiyono, T., Nishiyama, Y., Tsurumi, T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J. Virol.*, 78:104-115, 2004.
 - 14) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A. Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.*, 6:833-45, 2004.
 - 15) Sawada, M., Kiyono, T., Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., Sakai, N. Molecular mechanisms of TNF- α -Induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ.*, 11:997-1008, 2004.
 - 16) Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., Sakai, N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11: 853-861, 2004.
 - 17) Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., Mukai, K. Expression of a novel human gene, hWAPL, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 64:3545-3549, 2004.
 - 18) Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H., Fujita, M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.*, 279:19691-19697, 2004.
 - 19) Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., Kiyono, T., and Imamura, M. Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells. *Life Sci.*, 75:21-34, 2004.
 - 20) Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Sakai, N. Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol. Rep.*, 12:119-123, 2004.
 - 21) Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway, D. A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.*, 18:2269-2282, 2004.
 - 22) Kuroda, M., Kiyono, T., Oikawa, K., Yoshida, K., Mukai, K. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. *Br. J. Cancer Res.*, 92:290-293, 2005.
 - 23) Saito, M., Handa, K., Kiyono, T., Hattori, S., Yokoi, T., Tsubakimoto, T., Harada, H., Noguchi, T., Toyoda, M., Sato, S., Teranaka, T. Immortalization of cementoblast progenitor cells

- with Bmi-1 and TERT. *J. Bone Miner. Res.*, 20:50-57, 2005.
- 24) Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X. K., Umezawa, A., Kiyono, T. Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, in press.
 - 25) Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., Umezawa, A. Combination of hTERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell Biol.*, in press.
 - 26) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, H., Sasaki, H., Quinn, G., Sasaki, H., Asari, A., Terada, M., Ochiya, T. Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells. *Hepatology*, in press.
 - 27) Honma, K., Miyata, T., Ochiya, T. Atelocollagen-based cell transfection array allows high-throughput screening of gene functions and drug discovery. *Current Drug Discovery Technologies*, 1:287-294, 2004.
 - 28) Teratani, T., Quinn, G., Yamamoto, Y., Sato, T., Yamanokuchi, H., Asari, A., Ochiya, T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.*, in press.
 - 29) Sasaki, H., Hirai, K., Yamamoto, Y., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., Takahashi, T., Terada, M., Ochiya, T. HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene*, 23:3681-3688, 2004.
 - 30) Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, T., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M., Ochiya, T. Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucl. Acids Res.*, 32:e109, 2004.
 - 31) Hirai, K., Sasaki, H., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Kubota, Y., Kakizoe, T., Terada, M., Ochiya, T. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp. Cell Res.*, 294:77-85, 2004.
 - 32) Kai, E., Ochiya, T. A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan. *Pharm. Res.*, 21:838-843, 2004.
 - 33) Hanai, K., Kurokawa, T., Minakuchi, Y., Maeda, M., Nagahara, S., Miyata, T., Ochiya, T., Sano, A. Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum. Gene Ther.*, 15:263-272, 2004.
 - 34) Nakamura, M., Ando, Y., Nagahara, S., Sano, A., Ochiya, T., Maeda, S., Kawaji, T., Ogawa, M., Hirata, A., Terazaki, H., Haraoka, K., Tanihara, H., Ueda, M., Uchino, M., Yamamura, K. Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 11:838-846, 2004.
 - 35) Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura, K., Kamo, T., Sakai, R., Sugimura, H. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J.*, 23:1075-1088, 2004.
 - 36) Azuma, K., Horie, K., Inoue, S., Ouchi, Y., Sakai, R. Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Lett.*, 577:339-344, 2004.
 - 37) Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R., Mori, M. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 25:1826-1835, 2005.
 - 38) Miyake, I., Hakomori, Y., Musu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M., Sakai, R. Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, in press.
 - 39) Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y., Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, in press.
 - 40) Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A., Sakai, R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.*, in press.
 - 41) Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, M., Yamamoto, H., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Kannagi, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells—a missing link between Warburg effect and induction of selectin ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:8132-8137, 2004.
 - 42) Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., Kannagi, R. Loss of disialyl Lewis^x, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor Siglec-7, associated with increased sialyl Lewis^x expression on human colon cancers. *Cancer Res.*, 64:4498-4505,

- 2004.
- 43) Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 95:377-384, 2004.
- 44) Kannagi, R., Goto, Y., Fukui, F. In search of the carbohydrate structures on CD44 critical for hyaluronic acid binding - roles of sialylation and sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 16:211-223, 2004.
- 45) Kannagi, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression - the Warburg effect revisited. *Glycoconjugate J.*, 20:353-364, 2004.
- 46) Suzuki, A., Yoshioka, S., Sekine, M., Yonekawa, H., Takenaka, M., Kannagi, R. Core 2 GlcNAc transferase and kidney tubular cell-specific expression. *Glycoconjugate J.*, 20:151-156, 2004.
- 47) Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B.G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O., Miyasaka, M. Human PSGL-1 interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J. Biol. Chem.*, 279:51775-51782, 2004.
- 48) Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., Kimata, K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.*, 279:18679-18687, 2004.
- 49) Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., Itano, N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.*, 279:33281-33289, 2004.
- 50) Uchimura, K., Kadomatsu, K., El-Fasakhany, F.M., Singer, M.S., Izawa, M., Kannagi, R., Takeda, N., Rosen, S.D., Muramatsu, T. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.*, 279:35001-35008, 2004.

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

出願中：「ヒト肝細胞様細胞及びその利用」特許出願番号
2005-042364

出願中：「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」

がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんが高率に欠失している第22染色体長腕から単離した遺伝子 MYO18B は肺がんの約50%で失活しているがん抑制遺伝子である。今年度の解析で、第22染色体長腕の欠失が高頻度に報告されている卵巣がん、大腸がんでも MYO18B 遺伝子が比較的高頻度に失活していたことから、この遺伝子は種々のがんでがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。さらに、レトロウイルスベクターを用いて MYO18B 蛋白質を大腸がん細胞株に発現させたところ、*in vitro* での足場依存性増殖能には変化を認めなかったが、soft agar 内での足場非依存性増殖が有意に抑制され、MYO18B 遺伝子は、肺がんのみならず、大腸がんにおいても悪性化、特に浸潤や転移に関与していることが示唆された。また、DNA array CGH 解析により、肺がんの約10%で欠失ないし変異を起している新規遺伝子として CBP を同定した。変異型 CBP 遺伝子では、その転写活性化能が低下していたことから、CBP も肺がんの一部で失活しているがん抑制遺伝子と考えられた。

A. 研究目的

我が国で死亡率の最も高い肺がんを対象に、がん細胞の悪性度を規定する遺伝子を同定し、その異常により発現する生物学的特性を明らかにすることを目的として研究を進めている。標的とする遺伝子はがん抑制遺伝子で、肺がん細胞で高頻度に見られる染色体欠失領域からの遺伝子単離、変異や不活化の検討により候補遺伝子を同定する。同定された遺伝子に関しては、主に肺がん細胞株を用いて、遺伝子操作により、正常遺伝子の発現によって消失するがん細胞の悪性形質を検討し、その異常とがん細胞の生物学的特性の関連性を明らかにする。さらに、その情報に基づいて、肺がんの診断・治療の新たな標的遺伝子とその手法の開発を目指す。今年度は、以前に我々が単離した肺がんの候補がん抑制遺伝子 MYO18B の不活化に関して、大腸がん・卵巣がんを検討し、さらに、その不活化とがん細胞の特性との関連性を遺伝子導入実験により検討した。また、DNA Array CGH 法を用いて、肺がんにおける新規ホモ欠失領域を探索し、第16染色体短腕に存在する CBP 遺伝子を候補がん抑制遺伝子として同定した。MYO18B 遺伝子と CBP 遺伝子に関する本年度の研究成果を報告する。

B. 研究方法

1) 卵巣がん、大腸がんの細胞株および手術検体より DNA と RNA を抽出し、MYO18B 遺伝子の変異、欠失、発現、メチル化、アセチル化を解析した。変異の検索は WAVE 法で行い、direct sequencing 法で確認した。欠失は遺伝子座内の2つのマイクロサテライトマーカーを用いて判定した。発現とメ

チル化・アセチル化については細胞株を 5-azadeoxycytidine (5-Aza-dC) 及び trichostatin A (TSA) 存在下で培養した後、RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で MYO18B mRNA の変動を測定した。プロモーター CpG アイランド領域のメチル化は bisulfite sequencing 法で、アセチル化は CHIP 法で調べた。

2) レトロウイルスベクターを用いて MYO18B 遺伝子を大腸がん細胞株に導入し、puromycin 存在下で培養してポリクローナルな MYO18B 発現細胞を樹立した。MYO18B 蛋白質の発現は、recombinant GST-MYO18B 蛋白質で免疫したウサギ血清をアフィニティクロマトグラフィーで精製した anti-MYO18B 抗体を用いて、Western blot 法で確認した。これらの細胞を用いて、細胞の増殖能を、足場依存性と足場非依存性の条件下で検討した。3) 種々のヒト肺がん細胞株を対象に、ゲノム網羅的に約300ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Array を用いて CGH (Comparative Genomic Hybridization) 解析を行い、染色体のホモ欠失領域を探索した。第16染色体短腕の CBP 遺伝子を含む領域に小細胞がん細胞株の1例でホモ欠失を検出したので、さらに、CBP 遺伝子内のプライマーを用いたゲノム PCR 法でホモ欠失の詳細な検討を行った。また、肺がん細胞株と手術検体より DNA と RNA を抽出し、変異と発現の解析を行った。CBP 蛋白質の発現は N 末と C 末を認識する2つの市販の抗体を用いた Western blot 法で確認した。ヒストンアセチル化酵素領域に検出されたアミノ酸置換変異に関しては、GAL4 のアッセイ系を用いて *in vivo* での CBP の転写活性化能の変動を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

1) 卵巣がん・大腸がんにおける MYO18B 遺伝子の異常

昨年までの研究で、悪性度の高い肺がんで高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) 上に同定されたホモ欠失領域より新規遺伝子 MYO18B を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の約 50% で変異、欠失、過メチル化等により失活していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにした。そこで本年度は、肺がんと同様に 22q の欠失が高頻度に報告されている卵巣がん、大腸がんでの MYO18B 遺伝子異常の解析を行なった。

第 22 染色体長腕の欠失は卵巣がんで 50-70%、大腸がんで 20-40% と高頻度に検出されるが、この領域に存在する既知のがん抑制遺伝子の異常は稀である。そこで、MYO18B 遺伝子がこれらのがんにおいてもがん抑制遺伝子として機能している可能性を検証するため、卵巣がん、大腸がんにおける MYO18B 遺伝子異常の有無について検討した。卵巣がんにおいては細胞株 4 例中 1 例 (25%)、手術検体 17 例中 1 例 (6%) で変異が検出された。発現低下は細胞株 4 例中 4 例 (100%)、手術検体 17 例中 12 例 (71%) で認められ、発現が低下した細胞株 4 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 3 例で発現が回復した。これらの細胞株 3 例中 2 例、及び手術検体 15 例中 2 例 (13%) で遺伝子プロモーター CpG アイランドが過メチル化していた。一方、大腸がんでは細胞株 11 例中 2 例 (18%)、手術検体 47 例中 1 例 (2%) で変異が、手術検体 43 例中 16 例 (40%) で欠失が認められた。発現低下は細胞株 11 例中 9 例 (82%)、手術検体 12 例中 5 例 (42%) で認められ、発現が低下した細胞株 9 例を 5-Aza-dC 及び TSA で処理すると 9 例中全例で発現が回復したが、これらの細胞株では遺伝子プロモーター CpG アイランドの過メチル化は認めなかった。これまでの研究で、MYO18B 発現が肺がん細胞株におけるヒストンアセチル化の程度と相関することを示してきたので、大腸がんにおける発現制御にもヒストンアセチル化が関与していると考え、プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを ChIP 法で測定した。その結果、MYO18B mRNA の発現量とヒストン H3、H4 のアセチル化レベルが有意に相関していることが分かった。

2) MYO18B 遺伝子発現による大腸がんの足場非依存性増殖の抑制

MYO18B 遺伝子産物はミオシンスーパーファミリーに属する蛋白質であることから、他のミオシン

スーパーファミリー蛋白質と同様に、細胞分裂、細胞運動、細胞形態の維持・変化、分子の細胞内輸送やシグナル伝達などに関与することが予想された。そこで、レトロウイルスベクターを用いてヒト大腸がん細胞株に MYO18B 遺伝子を導入し、遺伝子発現の影響が予想されるがん関連形質・転移関連形質の変化を検討した。MYO18B 遺伝子を強制発現させたヒト大腸がん細胞株 DLD-1、HT29 では、*in vitro* での足場依存性増殖に変化を認めなかったが、soft agar 内での足場非依存性増殖が有意に抑制された。

3) 肺がんにおける CBP 遺伝子の異常

DNA Array CGH 法を用いて、肺がんにおける新規ホモ欠失領域を探索し、第 16 染色体短腕に存在する CBP 遺伝子を候補がん抑制遺伝子として同定した。CBP は発がんに関与することが知られているが、どんながんで CBP 遺伝子に変異があるか、また、がん抑制遺伝子として機能するかは分かっていない。そこで、肺がん細胞株 59 例と手術検体 95 例について、CBP 遺伝子の欠失・変異の有無を調べた。CBP 遺伝子のホモ欠失は 59 例の細胞株中、H209、H1963、LK-2 の 3 例 (5.1%) にみられた。H1963 では CBP mRNA、CBP 蛋白質とも検出されず、H209 と LK-2 では CBP mRNA は検出されたが、異なる大きさの CBP 蛋白質が発現していた。遺伝子変異は細胞株 59 例中 6 例 (10.2%)、手術検体 95 例中 5 例 (5.3%) に検出された。また、変異細胞株における CBP mRNA と CBP 蛋白質の発現量は変異のない細胞株と同程度であった。これらの結果から、CBP 遺伝子の変異は一部の肺がんにおいて、その発生あるいは悪性化に関与していることが示唆された。

そこで、ヒストンアセチル転移酵素領域にアミノ酸置換を伴う 3 つの変異体と酵母の Gal4DBD との融合蛋白質発現ベクターを作製し、293T 細胞を用いて転写活性化能を比較検討したところ、3 つの変異体では正常の CBP に対して有意に減弱していた。この結果から、欠失あるいは変異による CBP 機能の減弱が発がんあるいはがんの悪性化に関与していることが示唆された。以上より、CBP 遺伝子は肺がんの約 10% で機能低下しているがん抑制遺伝子のひとつと考えられた。

D. 考察

MYO18B 遺伝子は卵巣がん、大腸がんにおいても比較的高頻度に不活化していたことから、肺がんのみならず、種々のヒトがんの発生・進展に関与するがん抑制遺伝子であることが示唆された。さらに、ヒト大腸がん細胞株への MYO18B 遺伝子導入による形質の変化から、MYO18B 遺伝子は、大腸がんで高頻度に失活している p53 や APC とは異なり、細胞のアポトーシスや細胞周期の制御に直接関与するのではなく、生体内において、大腸がんの悪性化、特に浸潤や転移への関与が示唆された。今後、この遺伝子の更なる機能解析を進めることにより、また、各種組織亜型、進行度のヒトがんにおける発現動

態・ゲノム異常の解析を進めることにより、がんの発生・進展における MYO18B 遺伝子失活の意義を明らかにしていくとともに、治療の標的としての可能性を追求していく予定である。

肺がんの新規がん抑制遺伝子の候補として CBP 遺伝子を単離した。CBP は白血病でも転座している遺伝子のひとつであり、また、p53 などのがん抑制遺伝子の転写調節にも関わっている。さらに、構造、機能とも類似性を示す p300 遺伝子もヒトがん細胞で変異していることが知られている。以上の結果は、CBP 遺伝子の異常が肺がんの発生あるいは進展に関わっていることを強く支持している。今後、更なる遺伝子解析と機能解析を進めることによって、ヒストンアセチル転移酵素蛋白質をコードする CBP 遺伝子の異常と肺がん細胞の特性との関連性を明らかにし、肺がんの診断や治療の標的となり得るか否かを検討していきたい。

E. 結論

当研究室で、肺がんの候補がん抑制遺伝子として単離した MYO18B が、卵巣がん、大腸がんでも比較的高頻度に失活していることを明らかにした。さらに、大腸がん細胞株では、肺がん細胞株と同様に、MYO18B 遺伝子の発現が、足場依存性増殖には影響を与えないが、足場非依存性増殖を抑制することから、MYO18B 遺伝子は、種々のがんにおいて、がん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。また、ヒト肺がんの約 10% で欠失・変異している新規遺伝子として CBP を同定した。CBP 遺伝子も、その変異によって転写活性化能が減弱していたことから、肺がんのがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。今後の更なる機能解析により、MYO18B あるいは CBP の異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
- 2) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
- 3) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with

type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, 23:3089-3096, 2004.

- 4) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 40:146-151, 2004.
- 5) Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 112:150-154, 2004.
- 6) Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., Yokota, J. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cells in vivo. *Carcinogenesis*, 25:1689-1694, 2004.
- 7) Shimada, H., Shimizu, K., Mimaki, S., Sakiyama, T., Mori, T., Shimasaki, N., Yokota, J., Nakachi, K., Ohta, T., Ohki, M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genet.*, 115:372-376, 2004.
- 8) Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hirama, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., Takenoshita, S., Yokota, J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:512-519, 2005.
- 9) Nakano, T., Tani, M., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Ohwada, S., Yokota, J. Genetic and epigenetic alterations of the MYO18B gene, a candidate tumor suppressor, on chromosome arm 22q in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes, Cancer*, in press, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所ウイルス部 部長

研究要旨 ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(TERT)のみの導入で不死化した子宮頸部上皮細胞、乳腺上皮細胞、気管支上皮細胞、細気管支上皮細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞を長期培養し、その形質の維持、染色体の安定性を確認した。より効率の良い不死化法として、RNA干渉法によるp16^{Ink4a}の抑制とTERTの導入によって乳腺上皮細胞を高率に不死化出来ることを確認した。また、E6はTERTの転写抑制に働くNFX-1 91 kDaアイソフォームの特異的分解を促進し、TERTの転写を活性化することを明らかにした。子宮頸がん多段階発がんにおけるE6,E7の新たな機能として、子宮頸がんでは特異的に強発現が見られ、また染色体の不安定性を誘導するhWAPLがE6,E7により発現誘導されることを見いだした。

A. 研究目的

ヒト細胞の不死化はがん化の重要なステップであると考えられておりテロメア長の維持はその必要条件である。約85%のがんにおいてはテロメラーゼの活性化によってその必要条件を満たしている。テロメラーゼの触媒サブユニットのTERT遺伝子を用いることによってそれまで困難であったヒト細胞の不死化も可能となってきた。本研究の目的は、種々のヒト正常細胞を不死化しその不死化機構を解析すると共に、不死化した細胞を用いさらにがん化に至る過程をできるだけ *in vivo* に近い形で再現し多段階発がんの分子機構を詳細に解析することである。

B. 研究方法

ヒト乳腺上皮、皮膚角化細胞および皮膚線維芽細胞の不死化機構の解析結果 (Kiyono et al. Nature 1998) に基づき、これらの上皮細胞の不死化にはテロメラーゼの活性化とRB/p16経路の不活化の両方が必要であるが、皮膚線維芽細胞はテロメラーゼの活性化のみで不死化されることが示された。これを元に種々の臓器由来の上皮細胞や線維芽細胞を不死化すると共に不死化に必要な条件を検討し不死化機構を推測した。TERTのみの導入で不死化した子宮頸部上皮細胞、乳腺上皮細胞、気管支上皮細胞、細気管支上皮細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞やTERTに加えp16/RB経路を不活化できるbmi-1やHPV16のE7を導入して不死化した骨髄由来間葉系幹細胞、卵巣表層上皮細胞などを長期培養し、そ

の形質の変化を調べるとともに、染色体の安定性をG-bandingおよびSKY解析によって調べた。また、不死化に伴うp16^{Ink4a}の発現の変動を調べた。さらに上記結果を基に、shRNA発現レトロウイルスベクターを用いたRNA干渉法によるp16^{Ink4a}の抑制とTERTの導入によって不死化した乳腺上皮細胞でp16^{Ink4a}の抑制機構をプロモーターのメチル化状態、脱メチル化剤に対する反応を見ることによって明らかにした。

不死化した子宮頸部上皮細胞などにHPV16のE6とE7を導入し形質の変化、遺伝子発現の変化を調べた。

また、酵母 two hybrid 法を用いて得られた新たな標的 NFX-1 を解析し、TERT の転写抑制因子として働いているか否か、E6/E6AP による分解の促進を受けるか否か、その結果 TERT の転写を活性化するかなど、E6 によるテロメラーゼの活性化機構との関連を明らかにした。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

C. 研究結果

TERTのみの導入で不死化した子宮頸部上皮細胞、乳腺上皮細胞、気管支上皮細胞、細気管支上皮細胞、臍帯血

由来間葉系幹細胞やTERTに加えp16/RB経路を不活化できるbmi-1やHPV16のE7を導入して不死化した骨髄由来間葉系幹細胞、卵巣表層上皮細胞などを長期培養した結果、ほぼ初代培養細胞の形質を維持していることが示された。TERTのみで不死化した細胞ではp16の発現がいずれも低下していたが、p16プロモーターのメチル化の見られたものと見られないものがあった。これらの不死化細胞の染色体はほぼ正常2倍体を維持していることが明らかとなった。また、E7+TERTで不死化した骨髄間葉系幹細胞、卵巣表層上皮細胞もほぼ正常2倍体を維持していた。

TERT単独で不死化した子宮頸部上皮細胞にHPV16のE6とE7を導入した細胞は既に軟寒天培地中での増殖能を獲得していた。また、raft cultureにより重層化させると高度異形成に相当する組織像が獲られ、E6E7の高発現により子宮頸がん多段階発がんのかなりのステップを通過していることが示唆された。しかし、ヌードマウスでの造腫瘍性はみられず、がん化にはさらに遺伝子変異の蓄積が必要であることが確認された。また、扁平上皮の分化誘導に関わるNotch1発現はE6E7の導入により消失し接触阻止により発現誘導される初期分化マーカーであるInvolucrinの発現も強く抑制された。現在、子宮頸がん細胞で検出される遺伝子変異や遺伝子発現異常を再現するため活性化ras*、erbB2などを導入し造腫瘍性を獲得するか

どうかを調べている。

酵母two-hybrid法により分離された新たなE6の標的であるNFX-1にはスプライシングの違いにより123kDa (NFX-123)と91kDa (NFX-91)の2つの蛋白質があり、TERTプロモーターに対してNFX-123はMycと協調し転写促進するのに対し、NFX-91は抑制することが示された。このうち、E6はNFX-91を特異的に分解促進することが明らかになった。また、NFX-91特異的なshRNA発現によるRNA干渉法により皮膚正常角化細胞のテロメラーゼ活性が誘導され、E6によるテロメラーゼの活性化機構の少なくとも一部が解明された。

hWAPLの高発現は染色体の不安定性を誘導するが、子宮頸がんでかなり特異的に発現増加している。ヒト正常角化細胞にE6あるいはE7を発現させることでhWAPLの発現が増加することが観察された。

D. 考察

ヒトがん細胞ではp53経路とRB経路という2つのがん抑制経路の異常が高頻度に見つかり、また、テロメラーゼの活性化も約85%のがんで観察されている。また、DNAマイクロアレー解析や質量分析装置などの進歩によりがん細胞で起きている遺伝子、蛋白発現異常は比較的簡単に得られるようになってきた。今後は、蓄積された多数の異常がどの順番で起き、それぞれのステップが細胞にどのような形質を与えるかを詳しく解析する必要

がある。

ヒト正常細胞の不死化機構はかなり明らかになってきており、*in vivo*におけるがん細胞の不死化を良く反映したシステムであることが示された。正常不死化細胞を用いた多段階発がんの解析はまだ始まったばかりであるが、このシステムの有用性をあらためて確認することができた。不死化に至る過程のみ取っても、p53経路の不活化を必要とするものとしらないものp16プロモーターがメチル化されやすいものとされにくいものがある。今後は、子宮頸がんの多段階発がんモデルの構築を優先的に進めると共に、多くの臓器由来正常細胞の不死化も検討し、その共通性を解析すると共に、臓器特異的な発がん過程の解析モデルの作製をすすめたい。

E. 結論

種々のヒト正常細胞の不死化によって、ヒト細胞の不死化にはp16/RB経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要であることが確認された。また、細胞種によっては同時にp53の不活化が必要であった。また、RB経路の不活化はRB自身の異常よりはp16プロモーターのメチル化やcyclin/cdkの過剰発現などによる場合が多いが、短期間の培養期間中にp16プロモーターのメチル化が比較的高頻度に観察される乳腺上皮細胞や前立腺上皮細胞とp16プロモーターのメチル化が起きにくい皮膚角化細胞などがあり、短期間の培養期間中に各種がん化機構の

差違も反映することが確認された。テロメラーゼの活性化機構は転写因子 Myc の高発現がよく知られているが、今回明らかになった NFX-91 のように転写抑制因子の不活化も重要であることが示唆された。

E6E7 は染色体不安定性を誘導することが知られているが cyclin E の高発現や p53 の不活化以外に hWAPL の発現誘導を介した経路の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

G. 研究発表

Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., **Kiyono, T.**, Nishiyama, Y., and Tsurumi T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J. Virol.*, 78:104-115, 2004.

Takeda, Y., Mori, T. Imabayashi, H., **Kiyono, T.**, Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A. Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.*, 6:833-45, 2004.

Sawada, M., **Kiyono, T.**, Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., and Sakai, N. Molecular mechanisms of TNF- α -Induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ.*, 11:997-1008, 2004.

Hara, S., Nakashima, S., **Kiyono, T.**, Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11: 853-61, 2004.

Oikawa, K., Ohbayashi, T., **Kiyono, T.**, Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K. Expression of a novel human gene, *hWAPL*, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 64:3545-9, 2004.

Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, **Kiyono T.**, Nishitani H, Fujita M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem*, 279:19691-7, 2004.

Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., **Kiyono, T.**, and Imamura, M. Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells. *Life Sci* 75: 21-34, 2004.

Hara S, Nakashima S, Kiyono T, Sawada M, Yoshimura S, Iwama T, Sakai N. Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol Rep.*, 12:119-23, 2004.

Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway D.A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.*, 18:2269-2282, 2004.

Kuroda, M., Kiyono, T, Oikawa, K., Yoshida, K., and Mukai, K. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, *hWAPL*, exhibits potential as a therapeutic target. *Br. J. Cancer Res.*, 92:290-293, 2005.

Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T. Immortalization of Cementoblast Progenitor Cells With Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res.* 20:50-7, 2005.

Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of Human Fetal Cells: The Life Span of Umbilical-Cord-Blood-derived Cells Can Be Prolonged without Manipulating p16INK4a/RB Braking Pathway. *Mol Biol Cell*, in press.

Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A. Combination of TERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol.*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株
及びその作製方法」 出願中

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

幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室・室長

研究要旨：マウス ES 細胞、霊長類のカニクイザル ES 細胞などから単層培養のみで肝細胞を分化誘導する系を世界に先駆けて開発した。ヒト肝臓がんで特異的に発現の変化する遺伝子群の完全長 cDNA はすでにクローニングされたものを準備完了した。siRNA ライブラリーの作成にも着手している。さらに幹細胞への遺伝子導入と迅速な機能解析に最適な独自のセルトランスフェクションアレイ解析技術も本研究用に整備した。また3系統のラット胚盤胞から ES 細胞をそれぞれ樹立する方法を検討し幹細胞としての性質を明らかにした。

A. 研究目的

間葉系幹細胞、胚性幹細胞(ES 細胞)などの幹細胞を用いた肝細胞の分化・増殖モデルを開発し、発がんや転移に係わる遺伝子群の発現がその分化・増殖に及ぼす影響を解析することで、がんの生物学的特徴を規定する分子基盤の基礎的情報を明らかにする。また幹細胞やそれから分化させた細胞のがん治療への応用に関する基礎検討を行う。さらにラット ES 細胞を樹立し、発がん・がん転移に関係する遺伝子群に焦点を絞って遺伝子改変ラットを作成し、がん研究に有用なモデル動物の作製をめざす。

B. 研究方法

幹細胞からの肝細胞の分化は多くの研究室から多々報告されているが、我々のめざす間葉系幹細胞や ES 細胞からの *in vitro* 単層培養での肝細胞分化の報告と、それらを用いた発がんや転移に関する分子生物学的研究は類をみない。

我々はすでにマウス ES 細胞、霊長類のカニクイザル ES 細胞から肝細胞を単層培養のみで肝細胞に分化誘導する系を世界に先駆けて開発した。ヒト肝臓がんで特異的に発現の変化する遺伝子群の完全長 cDNA はすでにクローニングされたものを準備完了している。また、ラット ES 細胞を培養するために不可欠な、ラット自身の LIF 遺伝子のクローニングとリコンビ

ナント LIF の開発に成功し、ラット ES 細胞の候補となる複数の細胞株の樹立をめざす。さらに幹細胞への遺伝子導入と迅速な機能解析に最適な独自の解析技術も開発済みである。

初年度はこれまでに樹立した各種幹細胞から得られた肝細胞の生化学的、分子生物学的情報を蓄積し、正常肝細胞としての性状解析を中心に検討した。また将来の幹細胞移植の有力候補である間葉系幹細胞の肝細胞分化を検討し、ヒトへの応用が可能であるかどうかの基礎情報を獲得する。

細胞への遺伝子導入の方法を、アテロコラーゲン・セルトランスフェクションアレイを中心に検討、確立する。さらに各種がん細胞や肝細胞分化誘導系に発がん・転移関連の各遺伝子群を導入、発現させることで、細胞の分化・増殖、遺伝子不安定性などに関与する遺伝子の同定を行うための準備をした。

C. 研究結果：

1) 独自に開発したマウス、カンクイザル ES 細胞から肝細胞を分化誘導する系をもとに、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞をつくりだすことに成功し、がんの生物学的特徴を規定する分子基盤の基礎的情報を明らかにするシステムの構築を完了した。DNA チップ解析によりステム細胞から分化

誘導した肝細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、それらは生体の肝臓の遺伝子発現と酷似していることが明らかとなった。

2) ラット ES 細胞を複数のストレインから樹立することに成功し、がん研究に有用な遺伝子改変ラット作製のための基礎準備が順調に進んだ。これらのラット ES 細胞は, Oct3/4, rat Nanog などのステム細胞の未分化維持に必須な遺伝子を発現していること、胚葉体を形成する能力があること、未分化マーカーを発現していること、さらにテラトーマを形成し、そこには三胚葉由来の細胞分画を含んでいることなどの点から、ES 細胞としての性格を満たしていることが判明した。

3) がんに特有な遺伝子機能を解析するための新しいツールとして、細胞レベルで遺伝子の機能を迅速に解析することが可能なセルトランスフェクションアレイを開発し、本研究に特化したリバースジェネティクスによる解析が可能な siRNA による解析方法を整備した。

D. 考察：

ヒト肝細胞をステム細胞から分化誘導する系と、ヒトの肝がんで特異的に発現が上昇している遺伝子群の siRNA とセルトランスフェクション