

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

ヒト多段階発がん過程における  
遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明と  
その臨床応用に関する研究  
(H16-3次がん-001)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広橋 説雄

平成18(2006)年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ヒト多段階発がん過程における遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明と その臨床応用に関する研究 _____	1
主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	

## II. 分担研究報告

1. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる蛋白発現異常の網羅的解析 研究の総括 第3次対がん総合戦略研究事業の重点的推進 _____	27
広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	
2. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる遺伝子発現異常の網羅的解析 _____	34
坂元 亨宇 (慶應義塾大学医学部病理学教室)	
3. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 _____	37
稲澤 譲治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)	
4. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 _____	43
細田 文恵 (国立がんセンター研究所ゲノム構造解析プロジェクト)	
5. 染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____	47
村上 善則 (国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト)	
6. MS-RDA法によるエピジェネティックな発がん機構の解明 _____	56
牛島 俊和 (国立がんセンター研究所発がん研究部)	
7. 諸臓器の前がん状態ならびにがんにおけるDNAメチル化異常の網羅的解析 _____	62
金井 弥栄 (国立がんセンター研究所病理部)	
8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究 _____	68
今井 浩三 (札幌医科大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	74
---------------------------	----

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

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

主任研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

**研究要旨：** 高密度BACアレイによる比較ゲノムハイブリダイゼーション解析により、諸臓器のがんで高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を新規に多数見出し、新規がん関連遺伝子を複数同定した。諸臓器のがんの臨床病理学的因子とよく相関し、病態診断・治療法選択の指針となる可能性のあるゲノム構造異常プロファイルを同定した。TSLC1-DAL-1の分子経路が、非小細胞肺癌の進展に関与すること、TSLC1 が実験的上皮間葉転換を抑制すること、TSLC1類似蛋白質TSL2が前立腺がん抑制遺伝子の可能性があることを示した。 $\beta$ -カテニンが核内でFUS (fusion/TLS: translocated in liposarcoma)と相互作用し、pre-mRNAスプライシングに関わる可能性を示した。ディスアドヘリン等細胞接着・運動能に関与する複数の機能分子の抗体パネルにより、大腸がんの肝転移を予測しうる新しいスコアシステムを確立した。マイクロサテライト不安定性陽性大腸がん発生の分子機構の理解を進めた。

Methylation-sensitive-representational difference analysis法により、あるいは新規に開発したBACアレイを基盤とするメチル化CpGアイランド増幅法により、がんにおいてDNAメチル化によって不活化される新規がん関連遺伝子候補等を同定した。PCDHB遺伝子を指標として含むCpGアイランドメチル化形質が神経芽細胞腫症例の強い予後予測因子であることを示した。DNAメチルトランスフェラーゼDNMT1発現亢進が、がん関連遺伝子のDNAメチル化蓄積と相関し、難治がんである膵がんの予後予測因子となることを示した。

分担研究者

- |          |                    |          |                     |
|----------|--------------------|----------|---------------------|
| 1. 広橋 説雄 | 国立がんセンター<br>研究所 所長 | 3. 稲澤 譲治 | 東京医科歯科大学<br>難治疾患研究所 |
| 2. 坂元 亨宇 | 慶應義塾大学             |          | 教授                  |

4. 細田 文恵 国立がんセンター  
研究所 室長
5. 村上 善則 国立がんセンター  
研究所 プロジェクト  
リーダー (室長)
6. 牛島 俊和 国立がんセンター  
研究所 部長
7. 金井 弥栄 国立がんセンター  
研究所 部長
8. 今井 浩三 札幌医科大学  
学長

#### A. 研究目的

本研究は、諸臓器のがんにおいて遺伝子の発現異常ならびにジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの個性を新しい視点から分類・整理できるようにするとともに、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにしてヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を解明することを目的とする。基礎医学・病理学・臨床医学を背景とする研究者が、協調して本研究課題を推進する。もって、がんの予防・診断・治療に亘り新局面を拓いて患者個々人に最適な医療の実現を図り、高齢化社会におけるがんの罹患率と死亡率の激減に向けて有意義な貢献をなすことを目指す。

具体的には、以下の各項について研究を進める。

##### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

独自に開発してきた高密度ゲノムアレイシステムを用いて多数のがん臨床検体を解析し、潜在的がん特異的ゲノム構造異常を探索することで、がん細胞のジェネティックな変化を網羅的に俯瞰し、新規がん関連遺伝子の単離を目指す。個々のがんにおける多様なゲノム構造異常プロファイルを病態に対応づけて整理し、病態診断・予後予測・治療法選択の指針とすることを目指す。

##### 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

がん克服戦略研究事業においてゲノム構造異常を示す領域から腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制蛋白質 TSLC1 を含む分子経路の、ヒトがんにおける異常の実態とその機能を検討する。

大腸の発がん機構の全体像を把握し、治療や予防の標的となる候補分子を同定することを目的とし、 $\beta$ -カテニンを含む核内複合体構成蛋白をプロテオーム解析技術を用いて網羅的に探索する。大腸がんの既知の分子生物学的な予後因子の抗体パネルにより、大腸がんの肝転移を予測しうる新しいスコアシステムを確立する。シグナル伝達系に関与する遺伝子を中心に

ジェネティック・エピジェネティックな異常を網羅的に解析し、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) 陽性発がん機構の理解を進める。諸臓器のがんの臨床病理学的特性と対応させた網羅的遺伝子発現解析を行い、個々のがんの多彩な病理像をもたらす分子基盤を明らかにする。遺伝子発現プロファイルを病態診断・予後予測・治療法選択の指針とし、治療標的分子を挙げることを目指す。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

昨年度までに開発した methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法ならびに本年度新規に開発した BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅 (BAMCA) 法により、神経芽細胞腫ならびに乳がんにおける DNA メチル化の変化をゲノム網羅的に検索して、DNA メチル化で不活化されがんの発生に寄与する新規がん関連遺伝子の単離を試みる。その DNA メチル化状態が、がんの存在診断・治療効果判定の指標となるような遺伝子を同定する。昨年度、PCDHB 遺伝子体部の CpG アイランドのメチル化を指標とする CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) が神経芽細胞腫の生存予後とよく相関することを見

出したが、本年度ドイツ人神経芽細胞腫症例について CIMP と予後の関係を検討し、CIMP の予後マーカーとしての普遍的な有用性を確立する。膵がん多段階発生の諸過程に対応する臨床検体において、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現・複数のがん関連遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積の程度を解析し、難治がんである膵がんの発生における、DNA メチル化の変化の意義ならびに DNA メチル化の変化が惹起される機構の理解を進める。

## B. 研究方法

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

各種のがんにおいて微細ゲノム構造異常をゲノム規模で検出するため、昨年度までに BAC DNA を配したがん関連遺伝子を網羅的に含むゲノムアレイ (MCG Cancer Array 800) ならびにヒトゲノム全体を高密度に検索できる高密度ゲノムアレイ (MCG Whole Genome Array- 4500) を開発してきた。これらを用い、本年度は肝がん・膵がん・肺がん (腺がん・扁平上皮がん・内分泌性腫瘍)・大腸がん等多数症例の臨床検体において、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法を施行した。得られた結果と臨床病理像との相関を詳細に解析し、がんの臨床病理学的特性と相関するゲノム構造

異常プロファイルの抽出を行った。更に、高度増幅・ホモ欠失領域から複数のがん関連遺伝子候補を同定した。昨年度までに胃がん・浸潤性乳管がん症例において MCG Whole Genome Array-4500 を用いて施行したアレイ CGH 法によって 137 箇所の高増幅・41 箇所のホモ欠失を見出していたが、同アレイの解像限界が平均 0.7 Mb であるため、これらの候補領域は最低 1.5 Mb の物理距離を有していた。そこで本年度は、上記候補領域中既知のがん関連遺伝子を含まない 60 箇所を選択し、BAC が間断なく敷き詰められるようにデザインした BAC タイピングアレイを作製し、これらの領域からも新規がん関連遺伝子を単離できるよう候補領域の絞り込みを行った。

## 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

原発性非小細胞肺癌組織と同一患者の非がん部において、TSLC1/IGSF4, DAL-1/4, 1B 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランド内の転写開始点近傍のそれぞれ 6 箇所ならびに 14 箇所の CpG 配列の DNA メチル化の状態を、バイサルファイトシーケンス法ならびにメチル化特異的 PCR (MSP) 法により評価した。ノザン法・RT-PCR 法により mRNA 発現を、ウエスタン法・免疫組織化学により蛋白発現を評価

した。TSLC1 の全コード領域断片・細胞内領域欠失断片を各々イヌ腎由来 MDCK 細胞に強制発現させ、通常の条件ならびに 3 次元コラーゲンゲルで培養して各々接着細胞塊・嚢胞を形成させ、これに肝細胞増殖因子 (HGF) を加えて、遊走性・管腔形成を観察するとともに、Rac・Rho の活性を測定した。TSLC2 は TSLC1 との強い構造類似性から 2001 年に分担研究者らが同定した分子で、脳・腎・尿路上皮・大腸等で mRNA の発現が認められる。本年度は、TSLC2 のポリクローナル抗体を作成して蛋白発現を評価した。N-グリコシダーゼ処理・ツニカマイシン処理・O-グリコシダーゼ処理後のウエスタン法により、TSLC2 分子の糖鎖修飾の有無を解析した。TSLC2 強制発現前立腺がん細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を評価した。

大腸がん細胞より、核蛋白質を抽出し、抗  $\beta$ -カテニン抗体を用いた免疫沈降法と質量分析により、 $\beta$ -カテニンを含む核内複合体の構成蛋白質を網羅的に同定した。

大腸がん肝転移予測システムを確立するため、Dukes B/C 期大腸がん 150 症例の手術検体 (学習セット)・同施設で異なる時期に切除された 190 症例 (第 1 検証セット)ならびに他施設で切除された 99 症例 (第 2 検証セット)の手術検体において、従来大腸がんの予

後因子であるとの報告のあるβ-カテニン・シクロオキシゲナーゼ-2・ディスアドヘリン・E-カドヘリン・Ki-67・マトリライシン・p53・ラミニン5γ2鎖・MUC-1の9分子の発現を評価した。腫瘍浸潤最深部を含む腫瘍最大断面のホルマリン固定パラフィン包埋標本において、免疫組織化学的検討を施行した。

MSI陽性発がんの分子機構の理解を進めるため、遺伝性非ポリポーシス大腸がん(HNPCC)患者の大腸がんおよび大腸腺腫・散発性大腸がん・胃がん・食道扁平上皮がん・膵臓がんにおいて、国際ガイドラインに基づき、マイクロサテライトマーカーを用いてMSIを検索した。各種がん細胞株においてもMSIを評価した。更に、BRAF遺伝子の変異をsingle strand conformation polymorphism(SSCP)-シーケンス法により、RASSF1A遺伝子のDNAメチル化をMSP法により、RASSF2-6遺伝子のDNAメチル化をバイサルファイト変換制限酵素処理(COBRA)法・バイサルファイトシーケンス法により解析した。また、RT-PCR法を用いてmRNA発現を解析した。EphB2遺伝子の(A)9領域における遺伝子変異を直接シーケンス法により、EphB2遺伝子のDNAメチル化をMSP法により解析した。SW620大腸がん細胞株を脱メチル化剤である5-アザ-2'-デオキシシチジン

で処理し、ウェスタン法で蛋白発現の変化を評価した。

がんの臨床病理学的特性と対応させた網羅的遺伝子発現解析には、DNAマイクロアレイを用いた。同定された候補がん関連分子について、組織切片上での発現・局在・病理像との対応を免疫組織化学的に詳細に検討し、病態との関連を絞り込んだ。免疫不全マウスにがん細胞ないしがん組織を同所移植し、病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖・転移モデルを開発し、網羅的遺伝子発現解析で同定された候補がん関連分子を強制発現あるいは発現抑制し、in vivoでの機能解析を行った。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

アレイ上でDNAメチル化領域をゲノム規模でスクリーニングする新たな方法であるBACアレイを基盤とするメチル化CpGアイランド増幅法

(BAMCA法)、ならびに蛋白結合DNA領域を染色体規模で検出するBACアレイを基盤とするChIP法確立した。これらの方法を実用に用いて、DNAメチル化によって不活化され神経芽細胞腫の発生に寄与する遺伝子の同定を進めた。MS-RDA法施行に当たっては、ゲノムDNAをメチル化感受性の制限酵素HpaIIで消化し、アダプターを接着

後、PCR を行ってアンプリコンを作成した。テスターおよびドライバーのアンプリコンを用いて、常法に従い競合的ハイブリダイゼーションと選択的増幅を行った。最終 PCR 産物全体をクローニングシーケンスに供し、その DNA 断片が Takai と Jones の基準による CpG アイランドに由来しているか否かを判定した。MS-RDA 法により同定した CpG アイランドをプロモーター領域等に含む遺伝子等の発現は、定量 RT-PCR 法により、DNA メチル化の状態はバイサルファイトシーケンス法・MSP 法・定量的 MSP 法により評価した。

ドイツから供与された神経芽細胞腫 152 症例において、日本の症例で昨年度までに確立した診断基準を用いて CIMP を判定した。具体的には、PCDHB 遺伝子の DNA メチル化レベルを定量的に評価し、60%以上を CIMP 陽性、40%以下を陰性、40%と 60%の間の症例については HLP 遺伝子と CYP26C1 遺伝子の DNA メチル化の有無で CIMP を判定した。更に、CIMP と症例の予後の関係を詳細に検討した。

膵管がん切除標本中の、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮・炎症性背景を伴う末梢膵管上皮・前がん病変 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) ・浸潤性膵管がんにおいて、

DNMT1 発現を免疫組織化学的に評価した。浸潤リンパ球を内部標準として用い、各検体の上皮性細胞 500 個に対し核における染色性を示した細胞の比率を算出して、DNMT1 蛋白発現陽性率とした。更にマイクロダイセクション法により周囲の腺房細胞・浸潤リンパ球・間質細胞の混入を排除して標的とする組織を採取した。微小なマイクロダイセクション検体において DNA メチル化の状態を解析するためにアガロースビーズ封入 MSP 法を採用し、p14・p15・p16・p73・APC・hMLH1・MGMT・BRCA1・GSTP1・TIMP-3・CDH1・DAPK-1 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を評価した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせないようにした。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程では無記名として検体番号のみで取り扱う等の細心の注意を払い、患者のプライバシー

一を遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守し、所属施設の動物倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

肝がんにおけるゲノム構造異常とDNAメチル化異常の蓄積の関係について検討し、B型・C型肝炎ウイルスの感染とジェネティック・エピジェネティックな異常には有意な相関があること、ゲノム構造異常とエピジェネティックな異常は必ずしも相補的ではないこと、ジェネティックな異常よりもむしろエピジェネティックな異常の程度が強い一群の腫瘍があること、エピジェネティックな異常と強く相関するゲノム構造異常があること、等を見いだした。

膵がん臨床検体におけるゲノム構造異常の探索で、多数の構造異常領域を同定した。遺伝子増幅領域については、遺伝子発現プロファイルとの比較により、増幅領域に含まれるがん関連候補遺伝子の絞り込みを行った。

極めて予後不良であることが知られている肺の内分泌性腫瘍（小細胞がんならびに内分泌性大細胞がん）におけるゲノム構造異常の全体像を明らか

にした。患者の予後と有意に相関する特徴的なゲノム構造異常を見いだしたので、ミニゲノムアレイが開発できれば予後診断法として実用に供せる可能性があると考えられた。非小細胞肺癌細胞株のアレイCGH解析で検出した9q33の新規ホモ欠失領域から、ホモ欠失あるいはプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化により高頻度に発現消失を認める肺がん特異的抑制遺伝子候補 DBC1 を同定した。また、非小細胞肺癌細胞株 20 株のスクリーニングで、新規 13q21.2 ホモ欠失を検出し、標的遺伝子プロトカドヘリン 20 (PCDH20) を明らかにした。

大腸がん原発巣と同一患者の肝転移巣の間でのゲノム変化の差をサブトラクティブ CGH 法で比較し、6p 過剰を見出した。次にアレイ CGH 法により大腸がん細胞株のゲノム構造異常をスクリーニングし、2 細胞株で 6p21 の高度増幅を検出し、同領域の標的遺伝子がサイクリン D3 であることを明らかにした。

胃がん細胞株 32 例のアレイ CGH 解析を行い、新規増幅領域 7q21.2 に CDK6 を同定した。新規の 2q33.3 ホモ欠失を見出し、標的遺伝子 ADAM23 を明らかにした。胃がん手術材料でも ADAM23 遺伝子のホモ欠失を確認し、ADAM23 胃がん抑制遺伝子候補であることを示した。

昨年度までに胃がん・浸潤性乳管がんのCGH解析で同定した候補領域のうち、既知のがん関連遺伝子を含まない新規領域を中心に60箇所を選択し、ゲノムシーケンス情報に基づき、当初の候補領域を間断なくカバーするようにBACクローンの収集を行った。おおよそ1 Mbあたり10個、総領域200 Mbに対して2100個のBACを配置したタイリングアレイを作製した。例えばMCG Whole Genome Array-4500によって中分化胃がん1症例で1つのBACにおける増幅を検出していた染色体1p36.2の候補領域は、両隣に配置されたBACの位置より3.1 Mbと推定されていたが、この3.1 Mbの中に15個のBACを配置したタイリングアレイを用いた再解析で、9 BAC分約1.6 Mbの増幅であることがわかった。他方、未分化がん1症例が同じ領域に3 BAC分約0.7 Mbの増幅を示したことから、共通増幅領域として0.7 Mbの範囲を特定することができた。更に隣接する2 BAC (0.6 Mb)においては未分化がん2症例がホモ欠失を示した。したがって1p36.2の3.1 Mb領域内に増幅部位と新規のホモ欠失部位をそれぞれ0.7 Mb, 0.6 Mbと同定することができた。このような解析から、他に1p34.2, 1p32, 1p13.1, 2q12, 3p24.1, 5q22.2, 6p24, 6p21.3-p21.1, 7q31, 9p21.3, 9q32, 10q24.3, 11p12, 11q12,

11q13.1, 11q13.3, 11q13.4, 12p12.1, 12q15, 13q34, 16q23.1-23.3, 17p13.1-p12, 17p11.2, 17q21.1, 18p11.3-p11.2, 18q11.2, 19p13.2, 19q13.11, 19q13.13, 20p11.2, 20q13.2の計33領域において1.3 Mbから7.6 Mbあった候補領域を0.1 Mbから1.5 Mbの間までに狭めることができた。この中には新規の24箇所の増幅部位と新規の7箇所のホモ欠失部位が含まれていた。各領域に含まれる遺伝子数は1個から18個となり、個別に遺伝子発現解析が施行できる数まで絞り込めたといえる。

## 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

原発性非小細胞肺がんの44%にTSLC1/IGSF4遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化が認められた。DNAメチル化は扁平上皮がん(54%)、腺がん(43%)、腺扁平上皮がん(50%)、大細胞がん(14%)のすべての組織型に認められた。DNAメチル化の頻度は男性患者において有意に高く、重度喫煙者に高い傾向を反映するものと考えられた。DNAメチル化は、喫煙者の中ではパックイヤーならびに1日当りのシガレット数と正に相関した。TSLC1/IGSF4遺伝子にDNAメチル化を認めた肺腺がん症例は、無再発生存期間・全生存期間が有意に短縮すること

から、予後予測の指標になる可能性が示唆された。

他方、DAL-1/4. 1B 遺伝子の DNA メチル化は原発性非小細胞肺がんの 57% に認められた。扁平上皮がんでは比較的早期に、腺がんでは臨床病期の進行に伴って認められた。腺がんでは DAL-1/4. 1B 遺伝子の DNA メチル化を示す腫瘍患者の無再発生存率・全生存率が、DNA メチル化のない症例と比較して有意に短縮することが示され、予後予測の指標になる可能性が示唆された。更に、TSLC1 の解析結果と合わせて、原発性非小細胞肺がんの 69% で TSLC1/IGSF4, DAL-1. 4. 1B のいずれか、あるいは両方の不活化が認められることがわかった。

イヌ腎細胞 MDCK は通常の培養下では接着の強い平面状細胞塊を、コラーゲンゲル 3 次元培養では内腔を尖側・外側を底側とする嚢胞を形成する。これに HGF を添加すると、2 次元培養では細胞が遊走 (scattering) し、3 次元培養では嚢胞から管腔形成を伴う突起を生じるが、この遊走能・管腔形成能が細胞の上皮間葉転換のモデルと認識されている。そこで、MDCK 細胞に全長 TSLC1・細胞内領域を欠如した TSLC1・ベクターをそれぞれ導入すると、全長 TSLC1 を導入した細胞のみ HGF による細胞遊走・管腔形成が強く抑制されたが、細胞内領域を欠如

した TSLC1・ベクターをそれぞれ導入した細胞では、この抑制効果が失われた。HGF 投与により、MDCK 細胞では上皮細胞のマーカーとなる E-カドヘリン・ $\beta$ -カテニンの発現が消失し、間葉細胞のマーカーであるフィブロネクチン・ビメンチンの発現が認められるようになるが、全長 TSLC1 発現細胞では、HGF 投与後も、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニンの発現が持続し、フィブロネクチン・ビメンチンの発現は認められなかった。更に、HGF 投与によって誘導される MDCK 細胞の Rac の一時的活性化と Rho の持続活性化とが全長 TSLC1 発現細胞では認められず、Rac が持続的に活性化し、Rho は活性化されない傾向を示した。

TSLL2 に対するポリクローナル抗体を作製してウエスタン法を施行し、TSLL2 が分子量約 55kD の糖蛋白質であることを示した。つぎに免疫組織化学的検討を行い、TSLL2 が腎では近位尿細管にのみ発現すること、腎盂・尿管・膀胱の移行上皮や前立腺の腺上皮にも発現することを見出した。TSLL2 遺伝子の位置する第 19 染色体長腕 13.2 領域は、前立腺がんでヘテロ接合性が共通して消失する部位である。そこで、前立腺がん細胞 PPC-1 に TSLL2 遺伝子を導入しヌードマウスに移植したところ、親細胞やベクター導入細胞と比較して、TSLL2 導入細胞の腫瘍

形成が有意に抑制されていた。

ヒト大腸がん細胞の核抽出物の免疫沈降により、 $\beta$ -カテニン/TCF-4 複合体には FUS (fusion/TLS:

translocated in liposarcoma)等の種々の RNA 結合蛋白質が含まれ、 $\beta$ -カテニン/TCF-4 複合体がプレ mRNA スプライシングの制御に関わることが明らかになった。これに関連して、大腸がん細胞に  $\beta$ -カテニンを過剰発現させると、一般型のエストロゲン受容体- $\beta$  に対しドミナントネガティブに転写活性を抑制する新規スプライスバリエントが発現することを示した。

肝転移予測システム構築のための免疫組織化学的検討では、大腸がん学習セット 150 例における単変量解析で、ディスアドヘリン・E-カドヘリン・マトリライシン・ラミニン 5 $\gamma$ 2 鎖の発現が肝転移再発と有意な相関を示した。多変量解析では、ディスアドヘリン・E-カドヘリンが肝転移再発と有意な相関を示した。ロジスティック回帰分析を用いた変数選択では、ディスアドヘリン・E-カドヘリン・マトリライシンの 3 分子が選択された。ロジスティック回帰分析に基づき肝転移再発予測式；肝転移再発

(Immunohistochemical Metastatic Point)=3x ディスアドヘリン+ 4 x E-カドヘリン+ 2 x マトリライシンを確立した。5 点以上を高危険群、4 点以

下を低危険群とした時、肝転移予測の感度は 85.7%・特異度は 58.9% であった。第 1 検証セットでは感度 87.0%・特異度 66.5%、第 2 検証セットでは感度 80%・特異度 59.6%であった。

大腸がんによく発する BRAF 遺伝子変異はコドン 600 のバリンからグルタミン酸へのミスセンス変異 (V600E 変異) であるが、hMSH6 遺伝子生殖細胞変異陽性例・アムステルダム基準 II を満たすが hMLH1・hMSH2・hMSH6 遺伝子いずれにも変異を認めない症例・更にベセスダ基準のみ満たす臨床的 HNPCC 症例のいずれにおいても BRAF 遺伝子変異を検出しなかった。RASSF1A 遺伝子の DNA メチル化は、散发性 MSI 陽性大腸がんでは 52%・HNPCC では 30%で陽性であった。散发性 MSI 陽性大腸がんの 36%で、RASSF1A 遺伝子の DNA メチル化と K-ras あるいは BRAF 遺伝子変異を認めた。他方、HNPCC では、8%においてのみ RASSF1A 遺伝子の DNA メチル化と K-ras 遺伝子変異を認め、2 つ以上の分子異常を認める頻度は、散发性 MSI 陽性大腸がんに比べ有意に低かった。また、RASSF1A 遺伝子の DNA メチル化は腫瘍の分化度と相関した。

RASSF 遺伝子ファミリーについて検討したところ、RASSF2 遺伝子・RASSF5 遺伝子の DNA メチル化を大腸がんのそれぞれ、42%および 8%に検出したが、

RASSF3 遺伝子・RASSF4 遺伝子・RASSF6 遺伝子の DNA メチル化を認めなかった。RASSF2 遺伝子の DNA メチル化は、mRNA 発現低下と相関した。

検討した MSI 陽性大腸がん細胞株の 38%に、EphB2 遺伝子(A)9 領域の 1bp の欠失を検出した。同様に、MSI 陽性大腸がん症例の 41%に変異を検出した。リン酸化によりキナーゼ活性を調節していると考えられる S1048・S1052 が、検出された全ての変異により不活化されていた。MSI 陽性大腸腺種での変異は 21%で、MSI 陽性大腸がんにおいて有意に高頻度であった。大腸がんの 53%で EphB2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を検出した。MSI 陽性がんの 50%で変異と DNA メチル化の両方が陽性、37%で変異のみ陽性、5%でメチル化のみ陽性、8%でともに陰性であった。検討の対象とした大腸がん細胞株の 25%で EphB2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を認め、DNA メチル化陽性 SW620 細胞株の 5-アザ -2' -デオキシシチジン処理により EphB2 の再発現を認めた。

基底細胞がんはソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の異常により生じることが示されているが、そのシグナル伝達経路の下流より発現する遺伝子を同定する目的で DNA マイクロアレイ解析を施行し、基底細胞がんにおいて有意に高発現する遺伝子 X を同定した。

検討に供した基底細胞がん全例において、この遺伝子の mRNA 発現が正常皮膚に対して約 10~650 倍亢進していることを確認した。本遺伝子の各検体における発現パターンは、既にソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の下流より発現するとされている遺伝子の発現パターンと比較的類似していた。

肝細胞がんの多くは慢性肝炎・肝硬変を背景に、腺腫様過形成・早期肝細胞がん(早期型)から、結節内結節型肝細胞がん(結節内結節型：早期型の内部に脱分化した進行がん結節を有する結節)そして進行がんへと多段階の発がん様式を示すことがあるが、結節内結節型肝細胞がん症例において DNA マイクロアレイ解析を施行し Cyclase-associated protein 2 (CAP2) の発現ががんの進行に伴って亢進することを見出した。同分子に対する抗体を作製して免疫組織化学的に検討したところ、非腫瘍部・腺腫様過形成ではほとんど発現は認められず早期肝細胞がんから進行肝細胞がんへの進展に伴い強い陽性所見を認め、CAP2 は肝多段階発がんに関連した分子であることが示された。診断に苦慮することのある早期肝細胞がんの病理診断に、有用な補助診断手段になり得ると考えられた。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

BAMCA 法を用いて第 I・II 病期と第 III・IV 病期の神経芽細胞腫間で DNA メチル化の差を検索し、予後不良群において特異的に DNA メチル化を受けるがん抑制遺伝子候補である核内受容体型転写因子 NR1I2 を同定した。NR1I2 遺伝子の DNA メチル化が、神経芽細胞腫の悪性度・分化誘導療法薬剤感受性の良い指標となることを示した。

乳がん細胞株 MDA-MB-468 で、正常乳腺上皮の初代培養 HMEC に比べ過剰にメチル化されている DNA 断片を、MS-RDA 法により分離した。合計 288 個の DNA 断片を解析、73 個の独立な DNA 断片を得た。うち、31 個はプロモーター領域 CpG アイランドに由来していた。これらの CpG アイランドのコアの部分の DNA メチル化の状態を乳がん細胞株と HMEC において解析したところ、TSPAN-2・AK5・LOC284999・HOXD11・FLJ25161・XT3・PCDH10・PCDHGB6・SIM1・LOC346978・COE2・TDH (FLJ25033)・LOC346419・FLJ33790・GJB2・AMN・LOC201164・DLX4・DCC・FOXA2 の 20 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドが乳がん細胞株特異的にメチル化されていた。FOXA2 および XT3 遺伝子は HMEC で発現しているのに対し、完全にプロモーター領域の CpG アイランドが DNA メチル化を受

けた細胞株では発現しておらず、少なくとも一部の乳がんでは、これらの遺伝子は DNA メチル化により不活化されていると考えられた。診断マーカーとしての有用性を検討するため、乳がん症例の手術材料を用いて DNA メチル化の状態を検討した。LOC316419・AMN・LOC201164・DLX4 遺伝子は非がん部でも DNA メチル化が検出され、GJB2 については細胞株特異的な DNA メチル化であると考えられたが、LOC346978・HOXD11・SIM1・PCDHGB6・FLJ25161 遺伝子は 10 症例以上でがん特異的に DNA メチル化されていた。

日本人の神経芽細胞腫症例の解析で樹立した DNA メチル化の変化に基づく予後判定基準を日本人症例に適用することにより昨年度過度に良好な成績が得られていた可能性を排除するため、本年度はドイツから供与された神経芽細胞腫 152 症例において日本の症例で確立した診断基準を用いて CIMP を判定した。50 例が CIMP 陽性・95 例が陰性・7 例が判定保留となった。単因子解析の結果、CIMP 陽性群は、CIMP 陰性群に比べて有意に高い死亡危険率を示した。同様に、N-myc 遺伝子増幅群は、非増幅群に比べて有意に高い死亡危険率を示した。CIMP はハザード比 5.4、N-myc 増幅はハザード比 3.1 の再発危険率の増加を示した。N-myc 増幅を示した全例が、CIMP 陽性

であった。N-myc 増幅を示さない症例の中で、CIMP 陽性例が CIMP 陰性例に比べて、有意に高い死亡危険率および再発危険率を示した。多因子解析においては、CIMP は年齢・病期と独立な予後因子であった。無病生存期間に関しては、N-myc を含む解析においても、CIMP が最も強い独立な予後因子であった。

膵多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体における免疫組織化学的検討で、DNMT1 蛋白発現陽性率は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮において、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮に比して既に有意に亢進していた。DNMT1 蛋白発現陽性率は PanIN において更に有意に亢進し、PanIN I から PanIN II へとその異型度が亢進するとともに更に有意に亢進した。DNMT1 蛋白発現陽性率は PanIN に比し浸潤性膵管がんにおいて更に有意に亢進し、浸潤性膵管がんの中でも腫瘍が低分化になるとともに更に有意に亢進した。DNMT1 発現レベルは年齢と相関せず、わが国の膵がん取り扱い規約において周囲臓器への進展の程度を反映する t カテゴリー・診断時の病期と有意に相関した。DNMT1 高発現例が有意に予後不良であることがわかった。検討に供した 12 のがん関連遺伝子のうち 1 遺伝子以上の DNA メチル化を認める頻度は、炎症性背景

を伴う末梢膵管上皮 (60%) において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮 (15%) に比して既に有意に亢進しており、PanIN (68%) から浸潤性膵管がん (98%) へと更に有意に亢進していた。DNA メチル化されたがん関連遺伝子の数は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮 ( $0.85 \pm 0.88$ ) において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮 ( $0.15 \pm 0.38$ ) に比して既に有意に増加しており、PanIN ( $0.95 \pm 0.85$ ) から浸潤性膵管がん ( $2.50 \pm 1.35$ ) において更に有意に増加していた。マイクロダイセクション法によって採取した領域が低分化であるほどがん関連遺伝子の DNA メチル化が蓄積していることがわかった。浸潤性膵管がんにおいては、BRCA1・APC・p16・TIMP-3 遺伝子の DNA メチル化を高頻度に認めた (各々 60%・59%・39%・31%)。同一のがんからマイクロダイセクション法によって採取した複数の領域間での DNA メチル化の heterogeneity は APC 遺伝子において最も少なく、APC 遺伝子が DNA メチル化を受けるとサブクローナルな悪性進展過程で優位性を保持しやすい等の可能性があると考えられた。DNMT1 の蛋白発現レベルとがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積の間に、有意な相関があることがわかった。

## D. 考察

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がんの特異的なゲノム構造異常の網羅的スクリーニングを可能にする高精度・高密度ゲノムアレイの開発・改良を継続した。本技術により従来法では検出困難であった、数 100kb レベルの欠失や重複を検出できるようになり、諸臓器のがんの臨床検体等におけるゲノム構造異常の全体像を俯瞰し得た。予後を含む臨床病理像とよく相関するゲノム構造異常プロファイルを同定することができ、発がん過程におけるゲノム構造異常の蓄積過程について理解が進んだ。今後、ゲノム構造異常に基づくがんの個性診断アレイの作成・実用化を目指したい。

更に、標的領域に含まれる候補がん関連遺伝子のいくつかは、既に同定し得た。これらが治療標的分子となることが期待される。但し、候補領域に高密度に遺伝子が存在する場合、新規がん関連遺伝子単離のためには BAC アレイの解像度 (平均 0.7 Mb) では不十分である。本年度作製したタイリングアレイにより、MCG Whole Genome Array-4500 で異常が検出できなかった症例でも異常を検出できた。解像度を上げたタイリングアレイは、増幅領域やホモ欠失領域を特定するために有用であることがわかり、今

後予定している遺伝子発現定量による候補遺伝子スクリーニングの効率を向上させることができた。

他方、ゲノムアレイによる潜在的ゲノム異常のスクリーニングにより、数 10kb~Mb レベルの比較的大きなサイズのゲノム DNA の挿入・重複多型が少なからぬ頻度で存在することが判明した。これら大きなサイズのゲノム DNA の挿入・重複多型の日本人における正確な頻度・存在領域・ゲノム機能性を明らかにすることは、がんの罹病性を理解する上で極めて重要な研究課題と考えられた。

### 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

TSLC1-DAL-1 の経路の異常が原発性非小細胞肺癌の約 70% の症例で認められ、細胞接着・細胞骨格に関わるこの分子経路が肺癌の進展に重要であることが確認された。TSLC1 遺伝子の DNA メチル化による不活化や発現欠如は、肺癌・鼻咽頭がん・食道がん・胃がん・肛門扁平上皮がん・肝臓がん・膵がん・乳がん・前立腺がん・子宮がん・髄膜腫等で 30-60% に認められることが、分担研究者を始め内外の研究により既に明らかにされているが、DAL-1/4. 1B 遺伝子の DNA メチル化は今までに報告がなかった。本年度非小細胞肺癌の 57% に DAL-1/4. 1B

遺伝子の DNA メチル化を認め、DAL-1/4. 1B ががん抑制遺伝子の候補であり、DAL-1/4. 1B 遺伝子の DNA メチル化が予後因子となることを見出した。細胞接着・細胞骨格の異常は浸潤・転移等がんの進展に関わると推測されること、多くのがんで TSLC1 遺伝子の不活化が臨床病期の進行に従って増加すること、肺腺がんでは浸潤性と相関することが示されている。そこで、がん細胞の浸潤・転移に関わる分子機構の一つとして、上皮間葉転換に注目した。培養細胞 MDCK に対する HGF の活性に基づいた実験的上皮間葉転換の系を用いて、TSLC1 がこれを抑制することを見出し、TSLC1 の作用の一部が低分子量 G 蛋白質の活性制御に関わることを示した。

分担研究者らは、質量分析機を低流速多次元液体クロマトグラフィーと直接接続して蛋白質の高感度検出を可能にし、蛋白質の機能複合体の構成成分の網羅的な同定や発現解析等に応用している。免疫沈降法と質量分析法を用いた結合蛋白質の検索は、2 ハイブリッド法等の人工的な結合を検出する方法に比べ、特異的な結果が得られる可能性が高いと考えられる。大腸の前発がん病変である腺腫の形成予防は、大腸がん予防の現実的な戦略であるが、本年度プレ-mRNA スプライシングに関わることを示したように、

$\beta$ -カテニンの腺腫形成への寄与は TCF/LEF の転写活性化以外にも数多くあると考えられる。今後も、多様な創薬標的の同定のため、 $\beta$ -カテニン結合蛋白の同定を効率的に継続する予定である。

従来までの報告には見られない多数の症例と複数のマーカーを用いて、大腸がん根治術後の肝転移再発予測式を確立した。学習セット・第1検証セットおよび第2検証セットいずれにおいても、従来のリンパ節転移の有無に基づく肝転移再発予測よりも高精度な結果が得られた。臨床検体においてマイクロアレイ解析を施行し肝転移再発を予測しようとするような他の研究者の試みとことなり、本予測式に用いた免疫染色法は、確立された手技で広く一般の病院の臨床検査部において安価で施行が可能であることから、術後化学補助療法施行の指標としてあるいは定期外来経過観察の期間を考慮する際に有用と期待される。

昨年度までに、BRAF 遺伝子変異は、HNPCCにおいて検出されず、散发性 MSI 陽性大腸発がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、HNPCC (hMLH1 あるいは hMSH2 遺伝子異常例) で変異を検出しないことから散发性 MSI 陽性大腸発がんとの鑑別診断に応用できる可能性を示してきた。今年度は、hMSH6 遺伝

子変異陽性例やベセスダ基準のみ満たす臨床的HNPCC等遺伝性が示唆される症例においても BRAF 遺伝子変異を認めないことを明らかにし、これまでに開発した新規HNPCCスクリーニングプロトコールが有用であることを示した。現在は、BRAF 遺伝子変異検出による血清診断の実用化を目指している。RASSF1A 遺伝子の DNA メチル化が、K-ras および BRAF 遺伝子変異とは無関係に、散发性 MSI 陽性大腸がんに多いことを示した。RASSF2 遺伝子の DNA メチル化による不活化も明らかにした。RASSF2 遺伝子の DNA メチル化は、K-ras および BRAF 遺伝子変異を有する腫瘍において高頻度に認められたことから、Ras シグナルの活性化に加えて、Ras を負に制御する RASSF ファミリーの不活化も大腸発がんにおいて重要であることが示唆された。

最近、エフリンリセプターEphB2の不活化が大腸発がんにおいて重要であることが報告され注目されているが、本研究では、EphB2 が HNPCC および散发性 MSI 陽性大腸がんにおいて、(A)9 の繰り返し配列の変異と DNA メチル化により不活化されていることを示した。MSI 陽性大腸腺種に比べ大腸がんにおいて変異の頻度が高かったことから、EphB2 遺伝子変異は、大腸発がん早期からの役割に加え、悪性進展の段階で重要であることが示唆

された。

ソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の異常により生じると考えられている基底細胞がんを高発現する遺伝子 X が、実際にソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の下流より発現している可能性を検証している。肝細胞がんを高発現することを見出した CAP2 について、遺伝子導入・RNA 干渉等により *in vitro*, *in vivo* での機能解析を行い、がん細胞の生物学特性に如何に関わっているのか、あわせてがんにおいてどの様な分子と相互作用するのかを今後明らかにする予定である。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

昨年度までの解析では、CIMP の有無により神経芽細胞腫の予後は大きく異なった。また、N-myc 増幅を示す症例はほぼ全例 CIMP 陽性であり、CIMP が N-myc 増幅に先行することが示唆されていた。本年度の、ドイツの異なる症例を用いた検証でもこれらの知見は忠実に再現され、CIMP は新規予後マーカーとして臨床応用に値すると考えられた。今後、CIMP と N-myc 増幅の関連を明らかにすることが重要である。非プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化は、遺伝子不活化の原因とならないために、従来あまり解析さ

れてこなかった。本研究で、神経芽細胞腫でのCIMPの検出の指標としては、プロモーター領域よりもそれ以外の領域のCpGアイランドの方が優れている示された。プロモーター領域以外のCpGアイランドは容易にメチル化されるので、CIMPを鋭敏に検出できると考えられた。

浸潤性膵管がんはしばしば慢性膵炎に引き続いて発生するので、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮の少なくとも一部は、前がん段階にある可能性がある。炎症性背景を伴う末梢膵管上皮において、DNMT1の蛋白発現が組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮に比して既に有意に亢進し、がん関連遺伝子のDNAメチル化が既に蓄積していた。DNMT1の発現亢進を背景とする領域的なDNAメチル化亢進は、膵がんの多段階発生過程に極めて早期から寄与する可能性があると考えられた。PanINから浸潤性膵管がんへと、DNMT1蛋白発現は更に段階的に亢進し、がん関連遺伝子のDNAメチル化が更に蓄積していた。DNMT1蛋白発現ならびにがん関連遺伝子のDNAメチル化蓄積は膵管がんの分化度と有意に相関し、DNMT1蛋白発現は膵管がんの浸潤性増殖とも有意に相関したことから、DNAメチル化の変化は前がん段階から浸潤性膵管がんの悪性進展に到るまで、膵がんの多段階発生過程に

継続して寄与する可能性があると考えられた。DNMT1蛋白発現は膵管がん症例の予後と有意に逆相関したので、予後予測マーカーになり得ると考えられた。DNMT1蛋白発現亢進は、がん関連遺伝子のDNAメチル化の蓄積とよく相関したので、DNMT1の蛋白発現亢進が領域的なDNAメチル化亢進に寄与する可能性があると考えられた。

## E. 結論

諸臓器のがんにおいて遺伝子の発現異常ならびにジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにして、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を解明することを目的として研究を進めた。ゲノムアレイをプラットフォームにした諸臓器のがんのゲノム構造異常の網羅的研究により、種々の新規のがん関連遺伝子を同定し得た。BACアレイの解像度が不十分な領域についてタイリングアレイを作製し、更に多数のがん関連遺伝子の同定を効率的に進め得られるようにした。がんの臨床病理学的因子とよく相関するゲノム構造異常プロファイルを同定し、病態診断・予後予測・治療選択の指針として

の意義の検証を進めた。TSLC1-DAL-1の分子経路は、非小細胞肺癌の進展に関与すること、TSLC1が実験的上皮間葉転換を抑制すること、TSLC1類似蛋白質 TSL2が前立腺がん抑制遺伝子の可能性があることを示した。 $\beta$ -カテニンが核内でFUS等のRNA結合蛋白質と相互作用し、細胞間接着や遺伝子転写制御といった従来知られている $\beta$ -カテニンの機能以外に、プレ mRNA スプライシングやDNA損傷修復等にも関わることを示した。がんの生物学的特性の決定に寄与する複数の機能分子の免疫組織化学的発現結果の組み合わせにより、大腸がん術後の肝転移再発を高精度で予測する新しいスコアシステムを確立した。BRAF 遺伝子変異解析を組み込み開発したHNPCCスクリーニング法の有用性、大腸がんにおけるRASSFファミリー遺伝子のエピジェネティックな異常の重要性、EphB2遺伝子不活化の分子機序を明らかにした。皮膚基底細胞がんで過剰発現しソニックヘッジホッグの下流で発現すると考えられる新規遺伝子ならびに肝細胞がんの悪性化に伴って発現亢進する遺伝子CAP2を同定した。神経芽細胞腫において、CIMPの有無は非常に強力な予後因子であることを示した。DNAメチル化によって不活化され乳がんの発生・進展に寄与するがん関連遺伝子の同定を進めつつある。

DNMT1の発現異常を背景とするがん関連遺伝子のDNAメチル化の蓄積が、難治がんである膵がんに対する前がん段階から悪性進展に到るまで、継続して寄与する可能性を示した。DNAメチル化の変化に着目した発がんリスクの評価・がんの早期診断・病態診断の実用化が期待される。

今後更に、がんの病理像と遺伝子・分子・細胞レベルの変化との対応を明らかにし、革新的ながん診断の指標あるいは新しいがん予防・治療の標的の同定に結びつくよう、諸臓器における多段階発がん過程の分子機構の全貌の解明を推進する予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Shibata T, Uryu S, Kokubu A, Hosoda F, Ohki M, Sakiyama T, Matsuno Y, Tsuchiya R, Kanai Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathological features.