

6) ゲノムアレイの応用技術開発

ゲノムアレイ上でDNAメチル化領域のゲノムワイドスクリーニングを実施する新たな方法BAC array-based MCA method (BAMCA法)を確立した。

(Inazawa et al., Cancer Sci, 2004, Misawa et al., Cancer Res, 2005) 続き、蛋白結合DNA領域の染色体ワイド検出法ChIP on BAC-arrayの確立した。

D. 考察

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・高密度のゲノムアレイを開発した。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のゲノムコピー数異常を検出できるようになった。この結果、新規の遺伝子増幅領域、あるいはホモ欠失領域を各種病型のがん細胞株に検出することができた。一方、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(insertion/deletion)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・重複多型の正確な日本人頻度、存在領域、ゲノム機能性を明らかにすることは、がんを含む疾患の罹病生を理解する上で極めて重要な研究課題と考える。

E. 結論

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明らかにすることができた。さらに、これら探索研究は国立がんセンター研究所病理部との連携研究によって、大規模ながん患者バイオリソースを利用した臨床病理学的データとの相関解析も可能になり、実地のがん医療において、悪性度診断、治療分子標的、予防方策を見出すためのバイオマーカーとしての意義の検証も円滑に進んでおり、がんの患者を視野に入れた成果の進展に一層の期待がかかる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imoto I, Izumi H, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Hosoda F, Ohki M, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small cell lung cancers. Cancer Res, in press.
2. Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, Mizutani S. Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. J Clin Invest, 116: 80-89, 2006.

3. Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene*, 24: 8051-8060, 2005.
 4. Misawa A, Inoue J, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa J. Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 1I2 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *Cancer Res*, 65: 10233-10242, 2005.
 5. Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Ohno K, Imoto I, Inazawa J. Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Sci*, 96: 676-683, 2005.
 6. Tanami H, Tsuda H, Okabe S, Iwai T, Sugihara K, Imoto I, Inazawa J. Involvement of cyclin D3 in liver metastasis of colorectal cancer, revealed by genome-wide copy-number analysis. *Lab Invest*, 85: 1118-1129, 2005.
 7. Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. *Hum Molec Genet*, 14: 997-1007, 2005.
 8. Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Ichikura T, Mochizuki H, Okanoue T, Inazawa J. Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 96: 100-110, 2005.
2. 学会発表
1. 菊池良子、井本逸勢、千石一雄、石川睦男、稲澤譲治、CGHアレイによる卵巣癌の網羅的ゲノム解析、第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月14日
 2. 鈴木江美奈、井本逸勢、井上純、中川貴之、Atiphan Pimkhaokham、細田文恵、大木操、天笠光雄、稲澤譲治、高密度・高精度ゲノムアレイにより発見された新規口腔癌関連遺伝子候補の解析、第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月14日

3. 干衛、井本逸勢、音田正光、江見充、稲澤譲治、甲状腺未分化がんの新規癌遺伝子 NATA1 の同定と機能解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
4. 中川貴之、横井左奈、井上純、鈴木江美奈、Atiphan Pimkhaokham、鎌田伸之、小村健、井本逸勢、稲澤譲治、口腔癌における BAC-array を用いた DNA メチル化領域の網羅的探索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
5. 坂本宙子、水口真希、横井左奈、和泉宏幸、井本逸勢、稲澤譲治、X-tiling アレイの構築および同アレイによる癌における X 染色体コピー数異常領域の探索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
6. 細田文恵、新井康仁、柴田龍弘、中西幸浩、松野吉宏、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄、大木操、アレイ CGH を用いた胃がん、乳がんの網羅的ゲノム構造異常の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
7. 田中浩司、井本逸勢、井上純、鈴木江美奈、横井左奈、嶋田裕、河野辰幸、岩井武尚、稲澤譲治、BAMCA (BAC-array based MCA) 法による食道癌 DNA メチル化領域の網羅的探索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
8. 三枝邦康、井本逸勢、井上純、青柳傑、大野喜久郎、稲澤譲治、ヒトグリオーマ高頻度 13q 欠失領域から同定した新規癌抑制遺伝子候補 TSGL1、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
9. 杉野由里子、井上純、降旗あき子、細井創、杉本徹、井本逸勢、稲澤譲治、BAMCA (BAC array-based MCA) 法を用いた新規癌抑制遺伝子候補 TSGL1、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌 2005 年 9 月 15 日
10. 趙晨、井上純、大槻剛巳、井本逸勢、稲澤譲治、多発性骨髄腫における B 細胞特異的転写共役因子 BOB1 増幅による活性化、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
11. 井上純、降旗あき子、杉野由里子、細井創、杉本徹、井本逸勢、稲澤譲治、神経芽腫における 1p35-p36 候補癌抑制遺伝子 TSNB1 のエピゲノム解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 15 日
12. 篠田康夫、井本逸勢、三木恒治、稲澤譲治、CGH アレイ法による新規の膀胱癌関連遺伝子の探索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 16 日
13. 高田久、井本逸勢、津田均、中西幸浩、細田文恵、広橋説雄、大木操、稲澤譲治、高密度 CGH アレイにより検出された新規胃癌抑制遺伝子候補の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 16 日
14. 和泉宏幸、井本逸勢、井上純、横井左奈、高橋隆、細田文恵、大木

操、稲澤譲治、高密度 CGH マイクロアレイにより発見された新規肺癌抑制遺伝子候補の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 16 日

15. 鈴木文香、横井左奈、井上純、堀井明、白鳥敬子、井本逸勢、稲澤譲治、BAMCA 法と CHIP on chip 法を用いた膀胱癌の異常メチル化領域の網羅的探索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特願 2005-309921 「癌抑制剤」
2005. 10. 25、発明人：稲澤譲治・井本逸勢・三沢あき子・井上純、
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

分担研究者 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 室長

研究要旨：ゲノムワイドBACアレイ(MCG Whole Genome Array-4500)を用いたCGH解析によって昨年度までに収集した、胃がんおよび乳がんのゲノム構造異常プロファイルから高度増幅領域、ホモ欠失領域、ヘミ欠失集積領域、低度の重複集積領域の60箇所を選択し、BACタイリングアレイを作製した。これにより増幅およびホモ欠失領域の限局化を行い、対象とする候補遺伝子の絞り込みを図る目的である。胃がん128症例の再解析を行った結果、33領域において対象領域を半分から10分の1の範囲に特定することができた。またMCG Whole Genome Array-4500では見つからなかった異常が検出された症例もあった。BACタイリングアレイは胃がんにおける構造異常領域の絞り込みに有効であった。

A. 研究目的

本研究ではアレイCGH (comparative genomic hybridization)法を用いたゲノム解析によってがん細胞の遺伝的変化を特定し、がんの性質を規定する因子、特に新規がん関連遺伝子の単離を目指す。がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定は発がん機構の解明につながるのみならず、個々のがんにおける多様な遺伝的変化を病態に対応づけて整理することにより、病型診断や予後予測、治療法の

選択等に役立つ可能性がある。

B. 研究方法

アレイCGH法はゲノムのコピー数異常を探索するための手法のひとつであり、アレイに載せるプローブの高密度化によりゲノム中の微細領域のコピー数変化をも検出できる系である。我々は東京医科歯科大学、稲澤譲治教授グループとの共同研究により作製した、BAC DNAを配したMCG Cancer Array-800、MCG Whole

Genome Array-4500 を用いて CGH 解析を行ってきたが、本年度はそれらの成果に基づき、がんにおける異常領域の絞り込みを目的として BAC タイリングアレイを作製し解析に応用した。胃がん、乳がんの解析から高度増幅、ホモ欠失が検出されたゲノム領域および、ヘミ欠失、低度の重複が集積しているゲノム領域の中で、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、それぞれの場所のシーケンス情報に基づき BAC が間断なく敷き詰められるようにデザインした。胃がん、乳がん臨床検体については、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によってがん組織切片よりがん細胞の分離を行い、DNA を抽出、アダプターライゲーション法による DNA の増幅を行った。Cy3 標識したがん細胞 DNA (T) と Cy5 標識した正常細胞 DNA (N) を等量混ぜてアレイ上の BAC DNA とハイブリダイズさせた後、結合した蛍光色素量を測定することによって、T/N シグナル比を算出する。T/N 比が 1.3 以上を重複、0.7 未満を欠失として取り扱った。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたって、手術標本からの組織採取に際しては、「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究」により検討される基準に従い患者への説明と同意を得ると共に、患者のプライ

バシーを厳守した。また、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。

C. 研究結果

。昨年度までに MCG Whole Genome Array-4500 を用いた胃がん 135 症例、浸潤性乳管がん 46 症例の CGH 解析から、がん関連ゲノム領域として 137 箇所の高増幅、41 箇所のホモ欠失を見出した。これらの候補領域は MCG Whole Genome Array-4500 の解像限界 (平均 0.7 Mb) によって小さくとも 1.5 Mb の物理距離を有する。そこに含まれる遺伝子数が少ない場合は問題ないが、遺伝子が高密度に存在する領域では候補遺伝子を効率良くリストアップするために、まず候補領域を絞り込むステップが必要であると考えた。そこで 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 個の BAC を配置することとした。60 箇所、総領域 200 Mb に対して 2100 クローン DNA を準備し、アレイスライドを作製した。

このタイリングアレイを用いて胃がん 128 検体の CGH 解析を行った。以下に解析の実例を記す。MCG Whole Genome Array-4500 において染色体 1p36.2 の 1 つの BAC が中分化がん 1 症例で増幅を示した。両隣に配置された BAC の位置より対象となる候補領域は 3.1 Mb と推定され

た。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使用して再解析したところ、本症例は9 BAC 分約1.6 Mb の広範囲に増幅を示した。しかし未分化がん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。さらに隣接する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 として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、既知のがん関連遺伝子に帰結したものが6箇所あった。各領域に含まれる遺伝子数は1個から18個となり、十分に個別に遺伝子発現解析等の対象として扱える数になったと考える。

残りの約30箇所の評価は、コピー数が

リモルフィズムを反映した領域と考えられるものが4箇所ある他は、主にヘミ欠失や低度重複が蓄積している領域であるが、タイリングアレイによる再解析でも対象領域を狭めることができなかった箇所である。

D. 考察

ゲノムワイドのMCG Whole Genome Array-4500 およびがん関連遺伝子アレイMCG Cancer Array-800が、がんにおける全体的なゲノムコピー数異常プロファイルを取得するのに大変有効であることはさまざまな臓器がんにおいて実証されてきた。しかし、新規のがん関連遺伝子を単離する目的にはその解像度(平均0.7 Mb)では不十分であり、次の手法が必須である。がん細胞株を対象とする場合にはFISH法で調べることが可能であるが、がん臨床検体の場合はFISH法の適用が難しいため、タイリングアレイの作製が必要であった。2100のBACクローンを選択し、DNA調製からPCR増幅、アレイスライド作製までは1年以上の歳月と多大な費用がかかるため、なかなか手軽に研究計画を立てるわけにはいかないが、タイリングアレイの有効性は実感することができた。増幅領域やホモ欠失領域を特定する上で大変効果的であり、MCG Whole Genome Array-4500では異常が検出できなかった症例でも解像度を上げたタイリングアレイでは

異常が検出された例が存在した。胃がんはゲノム異常に雑多性が高く、かつ比較的小さいゲノム領域に突発的な異常を多様にもつがん種であるからかもしれない。そのような増幅、ホモ欠失に比べて、ヘミ欠失や低度の重複領域を狭める目的にはあまり有効性を見出せなかった。対象領域内に新たにホモ欠失や高度増幅が見つかることを期待したが、実際にはそのような例はほとんどなかった。

MCG Whole Genome Array-4500 による解析時点で候補領域が数 Mb 以上あったものを数 100 kb 以下に狭めることができた利点は非常に大きい。単純に候補遺伝子数が 10 分の 1 になっただけで、その後の発現解析等による絞り込みの作業も 10 分の 1 に軽減されるからである。現在候補遺伝子スクリーニングの方法として、胃がんまたは乳がん細胞株を用いての遺伝子発現解析を半定量的 RT-PCR 法にて進めており、また来年度には胃がん、乳がん臨床検体の網羅的発現プロファイルも取得して情報を取り入れる計画であるが、ゲノム面から対象領域をしっかりと絞り込んでおくことが候補遺伝子探索にとって重要であると確信している。

E. 結論

ゲノムワイドの BAC アレイ CGH 解析結果から抽出した 60 箇所ゲノムコピー数異常領域 (総計 200 Mb) について 2100

BAC クローンを敷き詰めたタイリングアレイを作製し、胃がん 128 症例の再解析を行った。高度増幅およびホモ欠失を示した 33 領域についてはタイリングアレイによって、ゲノム領域の狭小化に成功し、候補領域を数 100 kb 以下に特定した。新規の増幅部位 24 箇所と新規のホモ欠失部位 7 箇所を明らかにし、そこに含まれる遺伝子数をほぼ 10 個以内に特定した。今後、遺伝子情報、発現情報等を組み合わせて標的遺伝子の絞り込みを進める計画である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

アレイ CGH を用いた胃がん、乳がんの網羅的ゲノム構造異常の解析：細田文恵、新井康仁、柴田龍弘、中西幸浩、松野吉宏、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄、大木 操：第 64 回日本癌学会学術総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

分担研究者 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

研究要旨

固形がんの浸潤・転移抑制の分子機構を解明する目的で、我々は肺がん抑制蛋白質 TSLC1/IGSF4 とその細胞内結合蛋白質 DAL-1/4.1B の分子経路を解析し、TSLC1、DAL-1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が原発性非小細胞肺がんの各々44%、57%に認められ、腺がん患者の予後と逆相関することを示した。また、TSLC1 蛋白質が実験的に上皮間葉転換を抑制すること、また、TSLC1 と類似性を示す TSL2 が前立腺がんの抑制蛋白質として機能する可能性を示した。

A. 研究目的

ヒトがんの腫瘍形成の分子機構を解明し、がんの進展に対する診断、治療の標的分子を明らかにする目的で、我々が腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制蛋白質 TSLC1 を含む分子経路の、ヒトがんにおける異常の実態とその機能を検討する。

プロモーター領域のメチル化は、CpG アイランド内の転写開始点近傍の各々6箇所、14箇所の CpG 配列を含む断片に関して、bi-sulfite 処理塩基配列決定法、並びに bi-sulfite SSCP 解析により検討した。遺伝子発現は Northern blot 解析、RT-PCR 解析、蛋白質の発現は Western blot 解析、免疫組織染色により行った。

B. 研究方法

1. ヒト腫瘍における TSLC1/IGSF4, DAL-1/4.1B 遺伝子の異常の検索：
原発性肺非小細胞がん 103 例と同一患者の非がん部について DNA, poly(A) RNA を抽出し解析した。TSLC1/IGSF4, DAL-1/4.1B 遺伝子のプ

2. TSLC1 蛋白質による細胞遊走性、管腔形成：

イヌ腎細胞由来の MDCK を、通常のプレート、並びに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 Hepatocyte Growth Factor (HGF) を加えて、遊走性、管腔形成を検討した。TSLC1 の全コード

領域断片、細胞内領域欠失断片、ベクターのみを各々MDCK 細胞にトランスフェクションし、安定細胞を分離した。Rac、Rho の活性は、各々p21 活性化キナーゼ、ロテキンを基質とする反応により測定した。細胞形態は共焦点顕微鏡解析で行った。

3. TSL2 の解析 :

TSL2 蛋白質の C 端に対するウサギポリクローン性抗体を作成した。糖鎖修飾の有無は N-グリコシダーゼ処理、ツニカマイシンン処理、O-グリコシダーゼ処理後の Western blot 解析により行った。化学架橋は、BS3 により行った。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、国立がんセンターの諸規約を遵守し、倫理的、社会的、法律の見地から、患者の不利にならないように十分に配慮した。

C. 研究結果

1. ヒト腫瘍における TSLC1/IGSF4、DAL-1/4.1B 遺伝子のメチル化の解析 :

原発性 NSCLC 103 例中 45 例 (44%) に TSLC1/IGSF4 遺伝子のプロモーターメチル化が認められた。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。メチル化頻度は男性患者に有意に高

く ($P=0.027$)、重度喫煙者 (喫煙指数 800 以上の患者) に高い傾向 ($p=0.0054$) を反映するものと考えられた。メチル化は、喫煙者の中ではパックイヤー ($P=0.034$)、並びに 1 日当りのシガレット数 ($P=0.021$) と正に相関した。さらに、肺腺がん 68 例の解析により、TSLC1/IGSF4 にメチル化を認めた症例は、無再発生存期間、全生存期間が有意に短縮する (各々 $P=0.049$, $p=0.038$) ことから、予後の指標になる可能性が示唆された。

一方、DAL-1/4.1B 遺伝子のメチル化は原発性 NSCLC 103 例中 59 (57%) に認められた。この場合もすべての組織型に認められ、扁平上皮がんでは、比較的早期に、一方腺がんでは臨床病期の進行に伴って認められた。また、腺がんでは DAL-1/4.1B 遺伝子のメチル化を示す腫瘍患者の無再発生存率、全生存率が、メチル化のない症例と比較して有意に短縮する (各々 $P=0.0011$, $P=0.045$) ことが示され、予後不良のマーカーとなる可能性が示された。

さらに、TSLC1 の解析結果と合わせて、原発性 NSCLC 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明らかとなった。

2. TSLC1 による実験的上間葉転換の抑制 :

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、またコラーゲンゲルでの 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。そしてこの遊走能、管腔形成能が、細胞の上皮間葉転換のモデルとなることが知られている。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 を導入した細胞でのみ 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指標となる E-カドヘリン、 β -カテニンの発現が消失し、間葉細胞の指標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、 β -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。

さらに、低分子量 G 蛋白質である Rac, Rho の活性の変化を検討したところ、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、この点からも上皮・間葉転換抑制を支持する結果が得られた。

3. TSL2 の尿路上皮における発現と前立腺がん抑制遺伝子としての可能性：

TSL2 は TSLC1 との強い構造類似性から、2001 年に我々が同定した分子である。脳に加えて、腎、尿路上皮、大腸などで mRNA の発現が認められる。我々は TSL2 に対するポリクローン性抗体を用いて Western blot 解析を行い、TSL2 が分子量約 55 キロダルトンの糖蛋白質であることを明らかにした。つぎに免疫組織染色を行い、TSL2 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。これに対して TSLC1 は腎では遠位尿細管特異的に発現していた。TSL2 は極性培養した大腸がん細胞 Caco-2 では細胞側面に沿って発現する。そして、ホモ 2 量体を形成し、トランス・ホモ結合によって細胞凝集活性を示すが、脳や尿路移行上皮で同一細胞に発現する TSLC1 とのヘテロ結合は極めて弱かった。

TSL2 遺伝子の位置する第 19 染色体長腕 13.2 領域は、前立腺がんではヘテロ接合性が共通して消失する部位である。そこで、TSL2 が前立腺がん

で抑制遺伝子として機能する可能性を明らかにする目的で、前立腺がん細胞 PPC-1 に TSL2 遺伝子を導入し、そのヌードマウスにおける腫瘍原性を検討した。この結果、TSL2 導入細胞は、親細胞やベクター導入細胞と比較して、有意に腫瘍形成が抑制されることが示された。以上の結果から TSL2 は前立腺がん抑制遺伝子として機能することが示唆された。

D. 考察

本年度の研究により TSLC1-DAL-1 の経路の異常が 原発性 NSCLC 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 NSCLC の進展に極めて重要であることが再確認された。TSLC1 のメチル化による不活化や、免疫組織染色による発現欠如は、これまでに、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、髄膜腫などで 30-60% に認められることが、我々自身や共同研究、その他の研究により明らかにされている。一方、DAL-1/4.1B のメチル化は今までに報告がなかったが、我々は NSCLC の 57% にそのメチル化を認め、これらが、がん抑制遺伝子の候補であること、また予後因子となることを見出した。

TSLC1, DAL-1 のメチル化が予後因

子となることに関しては 2通りの解釈が考えられる。第一は、この遺伝子産物の機能が NSCLC の進展、特に浸潤、転移に重要であり、このことから臨床病期では判断できないがんの悪性形質を反映しているという考えである。第二は、TSLC1, DAL-1 をがんにおけるメチル化異常の指標として捉え、メチル化傾向の強いがんが、有意に予後が悪いと解釈する考えである。我々は、このどちらも正しいと考えている。ただ、がん細胞におけるメチル化異常の指標としてならば、もっと発現量が低く、その遺伝子産物の細胞における機能が不明、あるいは無視しても良いような遺伝子 DNA 断片であっても用いることができ、実際そのような指標も多く取られている中で、TSLC1, DAL-1 は、その遺伝子産物の機能が肺がんの進展に深く関わっていると考えられる分子群である。今後、この経路の解析をさらに続ける必要があると思われる。

また、これまでの研究から、TSLC1-DAL-1 の分子経路は細胞接着、細胞骨格の制御にかかわり、その異常は、浸潤、転移など、がんの進展に関わること、大部分のがんでは TSLC1 の不活化が臨床病期の進行に従って増加すること、また肺腺がんでは浸潤性と相関することが示されている。我々の基礎的研究からも、TSLC1 が上皮様細胞

形態の形成、維持に関わることが推測されてきた。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、HGF の培養細胞 MDCK に対する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報告した。TSLC1 は膜蛋白質であるので、過剰発現することにより、HGF の受容体である MET 蛋白質の機能を阻害するという非生理的効果の可能性も考えられたが、TSLC1 の細胞内領域を欠如した分子には、この上皮間葉転換抑制能が認められなかったことから否定できると考える。いずれにしても、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す知見である。

最近、TSLC1 が、がんと上皮以外の系においても重要な働きをすることが相次いで明らかにされた。まず、成人 T 細胞白血病では T S L C 1 が異所性発現を示し、疾患のマーカーとなるとともに、ATL 細胞の血管内皮細胞や線維芽細胞への接着能の亢進を介して、ATL に特徴的な臓器浸潤や腫瘍形成を促進する可能性を示す結果が、宮崎大学と我々との共同研究により明らかにされた。TSLC1 が膜蛋白質として、上皮ではがん抑制、ATL では腫瘍促進に働くということになり、この一見相反する機能を説明する分子機

構を現在解析中である。

第二は、免疫の研究で、活性化 NK 細胞や CD8+細胞に特異的に発現する免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 (IgCAM) として Class 1-restricted T-cell associated molecule (CRTAM) が同定され、これと特異的に反応する上皮 (がん) 細胞側の分子として TSLC1 が同定されたことである。このことは、TSLC1 がある種のがん抗原として機能することを示しており、TSLC1 の発現のないがん細胞は免疫監視機構から逃れ、浸潤、転移しやすいという仮説が立てられる。TSLC1 と CRTAM との相互作用は TSLC1 の N 端の免疫グロブリン様第 1 ループで十分である。したがって、我々が明らかにしてきた TSLC1 の細胞内結合蛋白質を介する上皮様形態の形成・維持の機能と、免疫応答からの回避という 2 重の意味で、TSLC1 はがん抑制遺伝子として働いていると考えられる。この重要な経路を修飾して、がん治療に応用する戦略が今後期待される。

E. 結論

TSLC1-DAL-1 の分子経路は、NSCLC の進展に深く関与する重要な経路であること、また TSLC1 類似蛋白質 TSLC2 も前立腺がん抑制遺伝子の可能性があることを示した。さらに TSLC1 が

実験的上皮間葉転換を抑制した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, Murakami Y. TSLC (tumor suppressor in lung cancer)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. *J Biol Chem*, 280: 42164-42171, 2005.
2. Sussan TE, Pletcher MT, Murakami Y., Reeve, RH. Tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) alters tumorigenic growth properties and gene expression. *Mol Cancer*, 4: 28, 2005.
3. Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci*, 96: 543-552, 2005.
4. Goto A, Niki T, Chi-pin L, Matsubara D, Murakami Y., Funata N, Fukayama M. Loss of TSLC expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, gender, and prognostic significance. *Cancer Sci*, 96: 480-486, 2005.
5. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of the DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 2954-2961, 2005.
6. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Ishida Y, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y., Tsubouchi H, Morishita K. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute type of adult T-cell leukemia. *Blood*, 105: 1204-1213, 2005.
7. Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Murakami Y. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear

- cell carcinoma. *Int J Cancer*, 118: 916-923, 2006.
8. Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi, S, Masuda M, Maruyama M, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, in press.
 9. Weyden LVD, Arends MJ, Chausiaux OE, Lange UC, Surani MA, Affara N, Murakami Y. Adams DJ, Bradley A. Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis. *Mol Cell Biol*, in press.
 10. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer*, in press.
 11. Williams YN, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Cell adhesion and prostate tumor suppressor activity of TSLC2/IGSF4C, an immunoglobulin superfamily molecule homologous to TSLC1/IGSF4. *Oncogene*, in press.
2. 学会発表
 1. Yoshinori Murakami, Mari Masuda, Mika Sakurai-Yageta, Yuko N. Williams, Shinji Kikuchi, Daisuke Yamada, Yumi Tsuboi, Tomoko Maruyama. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. The 11th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Phitsanulok, Thailand, 平成 18 年 1 月 25 日—29 日
 2. 村上善則、増田万里、櫻井美佳、名手祐子、菊池慎二、山田大介、坪井裕見、丸山智子、薄井真悟、森下和広、細胞接着分子 TSLC1/IGSF4 によるがん進展の抑制、並びに促進機構、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日
 3. 増田万里、長岡正人、八下田美佳、

- 丸山智子、名手祐子、菊池慎二、赤池敏宏、村上善則、がん抑制蛋白質 TSLC1 の上皮細胞間接着における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性制御、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日
4. 菊池慎二、山田大介、深見武史、増田万里、名手祐子、丸山智子、浅村尚生、松野吉宏、鬼塚正孝、村上善則、非小細胞肺癌における TSLC1/IGSF4 遺伝子、並びに DAL-1/4.1B 遺伝子プロモーター領域のメチル化、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日
 5. 山田大介、吉田緑、名手祐子、深見武史、丸山智子、中江大、前川昭彦、北村唯一、村上善則、細胞接着分子 TSLC1/IGSF4 の遺伝子欠損マウスにおける精細胞接着障害、第 28 回日本分子生物学会年会。福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日
 6. 名手祐子、増田万里、丸山智子、渋谷正史、村上善則、P19 細胞のレチノイン酸による分化誘導に伴う TSLC1/IGSF4 遺伝子の転写制御の解析欠損マウスにおける精細胞接着障害、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日
 7. Yoshinori Murakami, Shinji Kikuchi, Takeshi Fukami, Daisuke Yamada, Mari Masuda, Mika Sakurai-Yageta, Yuko N. Williams, Tomoko Maruyama, Hisao Asamura, Yoshihiro Matsuno. Epigenetic inactivation of the TSLC1/IGSF4 and DAL-1/4.1B genes involving a novel tumor suppressor cascade in human non-small cell lung cancer. The 55th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. Salt Lake City, USA, 平成 17 年 10 月 25 日—28 日
 8. 村上善則、薄井真悟、丸山智子、前沢浩司、菊池慎二、山田大介、菅野康吉、アレル間の遺伝子発現量の差異を指標とした遺伝子多型、変異の病的意義の解析、第 50 回日本人類遺伝学会大会、倉敷、平成 17 年 9 月 19 日—22 日
 9. 村上善則、薄井真悟、菊池慎二、山田大介、丸山智子、がん細胞、正常細胞におけるアレル間の遺伝子発現の量的不均衡の RDP 法による解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日—16 日
 10. 増田万里、長岡正人、八下田美佳、丸山智子、名手祐子、菊池慎二、

赤池敏宏、村上善則、がん抑制蛋白質 TSLC1 の上皮細胞間接着における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性制御。第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 7 日—10 日

11. 菊池慎二、山田大介、深見武史、名手祐子、浅村尚生、松野吉宏、鬼塚正孝、村上善則、非小細胞肺癌における TSLC1/IGSF4 遺伝子プロモーター領域のメチル化の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日—16 日
12. 山田大介、吉田緑、名手祐子、深見武史、丸山智子、中江大、前川昭彦、北村唯一、村上善則、がん抑制遺伝子 TSLC1/IGSF4 の遺伝子欠損マウスにおける精細胞接着障害、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日—16 日
13. 名手祐子、増田万里、八下田美佳、丸山智子、渋谷正史、村上善則、がん抑制遺伝子 TSLC1/IGSF4 のレチノイン酸による転写制御の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日—16 日
14. 丸山智子、薄井真悟、菊池慎二、山田大介、菅野康吉、村上善則、

RDP 法による家族性腫瘍保因者における変異アレル発現量と病態との相関、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日—16 日

15. Shinji Kikuchi, Daisuke Yamada, Mari Masuda, Mika Sakurai-Yageta, Yuko N. Williams, Tomoko Maruyama, Hisao Asamura, Yoshinori Matsuno, Masataka Onizuka, Yoshinori Murakami. Promoter methylation of the DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. The 11th World Conference on Lung Cancer, Barcelona, Spain, 平成 17 年 7 月 10 日—15 日
16. Yoshinori Murakami, Kana Isogai, Hiroyuki Tomita, Koji Maezawa, Tomoko Maruyama, Kokichi Sugano. Detection of allelic imbalance in the expression of disease-associated genes by an RNA difference plot, Human Genome Meeting 2005, Kyoto, 平成 17 年 4 月 18 日—21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

MS-RDA 法によるエピジェネティックな発がん機構の解明

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部長

神経芽細胞腫では、PCDHB ファミリーのメチル化は、ゲノム内の複数の CpG アイランドがメチル化される性質（CpG アイランドメチル化形質；CIMP）をよく反映し、神経芽細胞腫の予後予測に極めて有用であることを、昨年度までに見いだした。本年度は、新たにドイツの神経芽細胞腫症例 145 例を用いて、CIMP が予後に強力な影響を及ぼすこと、N-myc 増幅を示す症例はほぼ全て CIMP 陽性であること、N-myc 増幅を示さない症例の中でも CIMP 陽性群は予後不良であること、生存予後に関しては N-myc 増幅の方が CIMP よりも強い影響力をもつが、再発予後に関しては CIMP の方が強い影響力をもつことを、明らかにした。一方、乳がんで異常にメチル化される DNA 断片を MS-RDA 法によりゲノム網羅的に分離し、乳がん特異的にメチル化されるプロモーター領域 CpG アイランド 20 個を見出した。

A. 研究目的

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

分担研究者は、ゲノム内の DNA メチル化の変化を網羅的に検索するために、methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法を開発した。本法を利用することにより、(a) 新しいがん抑制遺伝子の単離、(b) がんの存在を検出のためのマーカーや、予後や治療効果を判定するためのマーカーの分離、(c) 同定された DNA メチル化変化を手掛かりに、がんでのエピジェネティックな調節機構の異常を明らかにすることが可能になる。

(1) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

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

そこで、昨年度までに、予後良好な神経芽細胞腫と予後不良な神経芽細胞腫について、MS-RDA 法による解析を行い、5 個の CpG アイランドが予後不良症例で特異的にメチル化されることを見出した。140 症例の追加解析により、特に PCDHB 遺伝子の遺伝子体部の CpG アイランドのメチル化が、生存予後と非常に密接に相関することを見出した（ハザード比 HR = 22, $P < 0.0001$ ）。この領域のメチル化は転写を抑制せず、予後不良の原因は転写抑制ではないと考えられた。むしろ、予後不良には、ゲノム内の複数の CpG アイランドがメチル化されてしまうこと（CpG アイランドメチル化形質；

CIMP)が重要であり、PCDHB 遺伝子のメチル化は CIMP のマーカーとして優れていると考えられた。

既知のマーカーとの比較では、CIMP は、年齢、病期、TrkA の過剰発現、染色体倍倍数性と独立な予後因子であった。一方、N-myc 増幅を示した 38 例中 37 例は CIMP 陽性で、この群は予後不良であった。N-myc 増幅を示さない 102 例中 30 例が CIMP 陽性で、72 例の CIMP 陰性群よりも、有意に死亡危険率が高かった (HR = 12.4, $P < 0.001$)。

そこで、本年は、CIMP の予後マーカーとしての有用性を確立するため、ドイツ Schwab 博士との共同研究により、ドイツ人神経芽細胞腫 152 例について、CIMP と予後の関係を検討した。

(2) 乳がんでのメチル化異常とサイレンシング

ヒト乳がんの分子機構としては、ERBB2, c-MYC 遺伝子の遺伝子増幅、BRCA1 遺伝子の DNA メチル化による不活化、p53 遺伝子の突然変異による不活化が知られるが、全体像は未だ不明である。また、術後化学療法の選択に、センチネルリンパ節への転移の有無が重要であることが提唱されており、高感度な乳がん細胞の検出も重要である。

本研究では、DNA メチル化によりサイレンシングされるがん抑制遺伝子候補を同定すること、また、乳がん細胞の検出に活用しうる乳がん特異的な DNA メチル化異常を同定することを目的に、ヒト乳がん細胞株を用いて MS-RDA 法を行った。

B. 研究方法

(1) 材料

乳がん細胞株及び神経芽細胞腫細胞株は、ATCC または JCRB から購入した。神経芽細胞腫臨床材料は、ドイツがんセンターとの共同研究により Schwab 博士から供与を受けた。DNA は Phenol/chloroform 法により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 HpaII で消化し、アダプターを接着後、PCR を行うことで、amplicon を作成した。テスター及びドライバーの amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。最終 PCR 産物全体をプラスミドにクローン化し、サイクルシーケンス法により、塩基配列を決定した。独立な配列については、データベース検索を行い、その DNA 断片が CpG アイランドに由来しているか否かを検討した。CpG アイランドは、Takai と Jones の基準により判定した。

(3) 定量的 RT-PCR 法

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

(4) Bisulfite シークエンス法

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

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

(5) MSP 法、及び、定量的 MSP 法

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

定量的 MSP では、メチル化された DNA 分子数及び非メチル化 DNA 分子数を、それぞれに特異的なプライマーと iCycler を用いて測定した。得られたそれぞれの分子数が

ら、全体の分子数及びメチル化された DNA の比率を算出した。

(6) 予後解析

SPSS を用いて、Kaplan-Meier 解析、Cox 比例ハザードモデルに基づく多因子解析を行った。

(7) 倫理面への配慮

神経芽細胞腫臨床材料の解析は、国立がんセンター及び千葉がんセンターの倫理審査委員会の承認を得た。乳がん臨床材料の解析は、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

一般的に、ゲノム網羅的な解析により得られたマーカーは、マーカー分離に用いた集団に適応する様にして分離されており、擬陽性、また、過度に良好な成績を示すことが多い。本研究でも、日本人症例で樹立した判定基準を使用することにより、過度に良好な成績が得られている可能性がある。そこで、ドイツから送られた 152 例分の DNA について、臨床情報にはブラインドで、かつ、日本の症例で確立した診断基準を用いて、CIMP を判定した。実際には、PCDHB のメチル化レベル 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 と CYP26C1 のメチル化の有無で、CIMP を判定した。その結果、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 (HR = 9.5; 95% CI=3.2-28.1; $P < 0.0001$)。同様に、N-myc 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 (HR = 11.8; 95%CI = 4.9-28.7; $P < 0.0001$)。ドイツの症例では、無病生存期間の情報も得られたので、再発危険率も計算した。CIMP は HR = 5.4 (95%CI = 2.9-10.3; $P < 0.0001$)、N-myc 増幅は、HR = 3.1 (95%CI = 1.6-6.0; and $P = 0.0007$) の再発危険率の増加を示した。

N-myc 増幅と CIMP の関係については、N-myc 増幅を示した 23 例全てが、CIMP 陽性であった。N-myc 増幅を示さない 122 例の中では、27 例が CIMP 陽性、95 例が CIMP 陰性では、前者は後者に比べて、有意に高い死亡危険率 (HR=4.5; 95% CI=1.3-16.1; $P = 0.02$)、及び、再発危険率 (HR=5.2; 95% CI=2.6-12.2; $P < 0.0001$) 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 (HR=3.0; 95 % CI=1.3-6.9; $P = 0.009$)。

(2) 乳がんでのメチル化異常とサイレンシング

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ので、乳がん細胞株 8 系統と HMEC を用いて、CpG アイランドのコア部分のメチル化を検討した。その結果、TSPAN-2, AK5, LOC284999, HOXD11, FLJ25161, XT3, PCDH10, PCDHGB6, SIM1, LOC346978, COE2, TDH (FLJ25033), LOC346419, FLJ33790, GJB2, AMN, LOC201164, DLX4, DCC, 及び FOXA2 の 20 個の遺伝子のプロモーター領域 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。

乳がん細胞検出に用いるマーカーとしての有用性を検討するため、21 個の乳がん手術材料を用いて、メチル化を検討した。LOC316419, AMN, LOC201164, 及び DLX4 の 4 遺伝子は、非がん部でもメチル化が検出され、マーカーとしては不適切と考えられた。また、GJB2 については、全くメチル化が認められず、細胞株特異的なメチル化であると考えられた。残りの 15 遺伝子については、手術材料の 1 個以上でメチル化されていた。特に、LOC346978, HOXD11, SIM1, PCDHGB6, 及び FLJ25161 は、10 個以上の