

200500455A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成18（2006）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%でホモ欠失している新規候補がん抑制遺伝子として PTP-RD を同定した。肺がんのがん抑制遺伝子として単離したMYO18Bは筋線維のZ-lineに存在し、A-bandに存在する通常の筋型ミオシンとは異なった機能を有することが示唆された。p16/RB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化により、子宮内膜がん、卵巣がん、子宮頸がんの多段階発がんモデルを作製した。E6 の発現により、p53 の分解を介して、扁平上皮の分化に関わるNotch1 の発現が低下することを明らかにした。ヒト間葉系幹細胞を肝細胞へ分化させることに成功した。ラット ES 細胞の樹立に向けて、ES 細胞の培養法と相同組み換えの条件検討が終了した。Fyn 蛋白質に対する親和性とチロシンリン酸化の2つの特性から、ヒト肺がん細胞株の足場依存性増殖を制御する新規分子を同定した。ヒト大腸がん細胞株の低酸素培養によってシアル酸トランスポーター遺伝子の発現が上昇し、その結果、N-グリコリル型シアル酸を持つ GM2 ガングリオシド(N-グリコリル GM2)が増加することを見出した。

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、個々のがんにも最も適した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、まだ多くのがんでは、個々のがんの個性を分子レベルで把握するには至らず、治療の標的となる分子も同定されていない。

一方、近年、全ヒトゲノム配列の決定、網羅的な遺伝子・蛋白質解析技術の確立など、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。

本研究では、各班員によって独自に単離された遺伝子や解析法を中心にがんの生物学的特性の分子基盤に関する研究を進めるとともに、がん化との関連では研究が遅れている蛋白質リン酸化や細胞接着糖鎖にも着目して研究を進める。特に、細胞不死化や幹細胞培養の技術に優れた研究者とゲノム解析技術に優れた研究者が共同で多段階的な発がん過程の再現による分子基盤の解明を試みるとともに、ゲノム解析では解決できないリン酸化や糖鎖構造に関して優れた解析技術を持つ構成員によるがんの新たな制御法の開発も進める。本研究は、世界的にもその重要性が認識されているものの、研究の展開が遅れている分野であり、ゲノム解析、細胞不死化、幹細胞解析、リン酸化蛋白質、細胞接着糖鎖など、細胞がん化機構解明に重要な各分野で独自の研究歴を持つ本研究班の構成員による飛躍的な研究の発展が望まれるものである。2年目の今年は、それぞれの研究の基盤整備が整いつつあり、また、がん細胞の特性を規定する新規分子もいくつか同定されたので、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

1) MYO18B 遺伝子ノックアウトマウス(-/-)の作製とその胎児期致死性の要因解析

nlsLacZ 遺伝子と NeoR 遺伝子を挿入したマウス MYO18B 遺伝子のジーンターゲットベクターを作製した。ベクターの導入による遺伝子の破壊はサザンブロット法およびゲノム PCR 法を用いた。ヘテロマウスにおける発現解析は RT-PCR 法や LacZ 染色法を用い、細胞内の局在解析などには抗 MYO18B 抗体を作製して免疫蛍光染色を行った。遺伝子プロモーター領域の解析はゲノム断片を組み込んだルシフェラーゼアッセイを行った。組織学的解析は通常の光学顕微鏡で観察する他、透過型電子顕微鏡を用いた解析も行った。

2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

ヒト肺がん細胞株を対象に、ゲノム網羅的に約 10,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip, Mapping 10k array を用いて染色体のホモ欠失領域を探索した。ホモ欠失は Multiplex genomic PCR 法で確認した。第 9 染色体短腕の PTP-RD 遺伝子の領域にホモ欠失を検出したので、遺伝子内やその周辺のプライマーを用いたゲノム PCR 法でホモ欠失領域の詳細な解析を行なった。また、肺がん細胞株より RNA を抽出し、発現解析を行った。

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

正常ヒト細胞を TERT 単独あるいはこれに加え HPV16 E7 や E6 あるいは bmi-1, p16-shRNA の導入により不死化を進めている。また、これまでに不死化した種々のヒト細胞を用いて、各がんが高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入やがん抑制遺伝子の RNA 干渉法を用いた発現抑制により導入し、そのがん化過程を in vitro で再現した。正常初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入可能な組換えレトロウイルスを用いることにより遺伝子挿入部位に依存しない細胞がん化過程をモニターした。組換えレトロウイルスは G418, hygromycin B, puromycin, blasticidin S, zeocin 耐性遺伝子を持つものを組み合わせ複数の遺伝子発現に用いた。導入遺伝子としては hTERT, bmi-1, HPV16 E6, 変異 E6 シリーズ, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性型 Akt (myr-Akt), erbB2, c-myc などを用いた。short hairpin RNA (shRNA) は H1 promoter を用い puromycin 耐性レトロウイルスで導入した。がん特性の解析方法としては、不死化機構から、細胞増殖、足場非依存性増殖、ヌードマウスでの造腫瘍性など、古典的な細胞トランスフォーメーション検出法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾の変化などを DNA マイクロアレイや Western blotting 法などで解析した。

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

すでに確立したマウス 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基にして、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞を分化誘導する系を開発した。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 を準備完了し、ヒト肝がん培養細胞株を用いた細胞増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の絞込みを行った。また、LIF を用いてラ

ット ES 細胞の候補となる複数の細胞株の樹立と、遺伝子改変に必要な遺伝子導入条件と相同組換え技術の確立さらに胚操作などの基盤技術の整備を行った。

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

1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

肺がん細胞株を材料に用いて、足場非依存性増殖に関わるリン酸化蛋白質群の解析を行った。具体的には非接着性のプレートの上で増殖させた場合と、接着性のプレートの上で培養した場合に見られるチロシンリン酸化蛋白質群を比較し、非接着状態でインテグリンシグナルを遮断した場合にもチロシンリン酸化が残存する蛋白質群を精製し、質量分析により同定した。浮遊状態で OFF にならないシグナルを媒介するチロシンリン酸化蛋白質の役割を RNAi 法などによる機能解析で検討した。

2) 神経芽腫進展における ShcC の役割

神経芽腫の分化・増殖制御における ShcC の役割を明らかにするため、ShcC 全長及びその変異体の発現や RNAi 法による発現抑制が、神経芽腫細胞の増殖能、運動能、足場非依存性などの特性に与える影響を解析した。また、神経芽腫細胞において ShcC の各ドメインに結合する蛋白質群を同定した。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した。

3) 骨肉腫細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨肉腫細胞株 Hu-O9 の運動能や接着能を制御している鍵となる分子を、チロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにする。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。

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、細胞表面に糖鎖変化が誘導されるかどうかを検索した。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糖鎖の合成に関与する遺伝子について DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法にて検索した。低酸素による発現誘導が明らかになった遺伝子については、その遺伝子の導入によって当該の糖鎖の発現が誘導されることを確認した。

予備実験の結果、N-グリコリル型のシアル酸(NeuGc)を含有する糖鎖が低酸素下のがん細胞で増加することが分かったので、NeuGc 残基を含有する GM2 ガングリオシドと NeuAc 残基を含有する GM2 ガングリオシドのそれぞれに対する特異抗体を用いて患者手術材料および培養がん細胞における発現を検討した。

(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、個人情報の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

1) MYO18B 遺伝子ノックアウトマウス(-/-)の作製とその胎児期致死性の要因解析

昨年までの本研究で、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。そこで昨年より個体における MYO18B 遺伝子の生物学的機能を解析するため、(-/-)マウスの作製を始めていたが、本年度は、(-/-)マウスが致死性であることが分り、(-/-)マウス胎児の解析と(+/-)マウスを用いた MYO18B の発現解析を行った。

ジーンターゲットベクターを用いてマウス MYO18B 遺伝子のプロモーターの下流にβ-gal 遺伝子を挿入したので、(+/-)マウスを用いた LacZ 染色により、MYO18B の発現細胞の解析を行った。その結果、MYO18B は骨格筋、心筋などの筋肉細胞で強発現することが分った。そこで、MYO18B 遺伝子の発現調節に関わるプロモーター領域の解析を行ったところ、MYO18B 遺伝子は筋肉細胞の分化とともに発現誘導され、その誘導には転写因子 myocyte-specific enhancer factor-2 (MEF-2) が関与していることが示唆された。

(+/-)マウス同士の掛け合わせにより得られる胎児の解析により、MYO18B (-/-)マウスは受精後 10~12 日目に致死性になることが分った。さらに、死亡した胎児を病理解剖した結果、心嚢液の貯留や動静脈の拡張などが見られ、心不全が原因で胎生期に死亡したと考えられた。発現解析の結果では、特に胎児期には心筋細胞での発現が顕著だったので、さらに心筋の構造異常について形態学的解析を行った。電子顕微鏡での観察の結果、左心室における心筋細胞のザルコメア構造に異常が見られた。即ち、筋線維の分布や走行性が正常と比べると不均一であり、MYO18B が心筋線維の形成あるいはその構造維持に必須であることが強く示唆された。

そこで、心筋細胞や骨格筋細胞の中での局在を、MYO18B に対する抗体を用いた免疫蛍光染色法で調べた。その結果、通常の II 型 (筋型) ミオシンが筋線維上で A-band と言われる部位に存在するのに対して、MYO18B 蛋白質は a-actinin などと同様に Z-line 上に存在することが分った。A-band 上に存在する II 型 (筋型) ミオシンは筋細胞の収縮に必須の蛋白質だが、MYO18B はそれとは全く違う機能を有していることが示唆された。

2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

Affymetrix 社から発売された「Mapping 10k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 210-kb 間隔で調べることのできるマイクロア

レイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、29 例のヒト肺がん細胞株におけるホモ欠失(homozygous deletion)の分布状態をゲノム網羅的に解析した。チップ解析で 4 連続してハイブリダイゼーションのシグナルが検出されない領域を候補欠失領域としたところ、染色体上の 34 領域が候補として選択された。この方法は全ゲノムを約 1-Mb 間隔でホモ欠失についてスクリーニングしたことになる。

次に、この 34 領域について、multiplex genomic PCR 法を用いてホモ欠失の有無について確認した。その結果、18 領域でホモ欠失が実際に存在することが確認された。そこで、細胞株をさらに 49 例増やし、78 例におけるこれら 18 領域の欠失の頻度を調べた。その結果、2q24、3p14、5q11、9p21、9p23、11q14、21q21 の 7ヶ所の欠失が 2 つ以上の細胞株で検出された。9p21 の CDKN2A を含む領域の欠失が最も高頻度に検出され(20/78、26%)、この欠失は非小細胞がんのみに検出された。9p23 の PTPRD を含む領域の欠失が次に高頻度に検出され (8/78、10%)、この欠失は小細胞がんと非小細胞がんの両方で検出された。さらに、これら 2 領域の欠失は連続した同一の欠失ではなかったので、それぞれ独立して起こった欠失と考えられた。

9p21 の欠失は p16 がん抑制遺伝子の失活を促す重要なゲノム異常であることが知られているが、9p23 領域の欠失に関しては、PTPRD がその標的遺伝子であるかどうかは定かでない。そこで、PTPRD 遺伝子の全ゲノム構造を決め、上記 8 例のホモ欠失領域を詳細にマップした。その結果、8 例全例の欠失は PTPRD の遺伝子内に存在することが分った。しかし、1 例を除き、欠失は非翻訳領域に存在したので、PTPRD 遺伝子が欠失の標的遺伝子ではあるが、欠失によって変異蛋白質が発現するのではなく、発現量が低下すると予想された。そこで、さらに定量的 RT-PCR 法を用いて 54 例の肺がん細胞株における PTPRD 遺伝子の発現量について調べた。その結果、欠失のある細胞株では欠失のない細胞株に対して有意に発現量が低下していることが分った。この結果より、PTPRD 遺伝子が 9p23 領域の欠失によって失活しているがん抑制遺伝子の強力な候補であると結論した。

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

1) 子宮内膜がんモデル

TERT+HPV16 E6E7 の導入で不死化した子宮内膜上皮細胞に活性型 ras(KrasV12)、活性型 Akt(myr-Akt)を導入すると、細胞増殖は亢進、形態変化が見られ、非依存性増殖能を獲得していた。また、KrasV12 被導入細胞はヌードマウスに腫瘍を形成した。一方、PTEN 特異的 shRNA (PTEN-shRNA) の導入により内因性 PTEN 量は 1/2 に減少したが、増殖能の亢進、足場非依存性増殖、造腫瘍性は見られなかった。

2) 上皮性卵巣がんモデル

卵巣表層上皮細胞に TERT の他、HPV16 E7、E6、bmi-1 などを種々の組み合わせで導入し、延命効果を観察した。TERT 単独では延命効果が見られずサイトケラチン陰性の間葉系の細胞のみが増殖した。HPV16 E7、E6、bmi-1 などでは延命効果が見られたが、TERT+bmi-1 や E6 による延命効果は弱くサイトケラチン陽性の細胞群は得られなかった。TERT+E7 あるいは TERT+E6E7

では導入直後から強い延命効果が見られ 100PDs を超え事実上不死化した。これらの細胞の染色体を調べた結果、TERT+E7 で不死化したものだけが正常 2 倍体を維持しており、他の細胞群では 4 倍体近くになったもの等多くの染色体異常が認められた。TERT+E7 で不死化した細胞は正常 p53 がやや高発現しており、この活性が染色体異常を排除している可能性が示唆された。

3) 子宮頸がんモデル

TERT のみで不死化した子宮頸部上皮細胞(HCK1T)は 120 population doublings 後もほぼ正常 2 倍体を維持していた。この細胞に HPV16 E6E7 を導入すると、分化抵抗性を獲得し、3 次元培養により CIN3 様構造を取るようになった。また、軟寒天培地中で微小コロニーを作ったが、ヌードマウスにおける腫瘍原性はなく、SV40 small T と rasV12 を導入しても腫瘍は形成しなかった。子宮内膜上皮では rasV12 を導入直後に細胞増殖が促進されたのに対し、子宮頸部上皮細胞では rasV12 の導入直後に細胞死が誘導されることを見つけ、その差を規定する機構を解析している。一方、HCK1T に E6, E6E7, 種変異 E6 などを導入し、マイクロアレイ法で遺伝子発現変化を解析した結果、扁平上皮の分化誘導に関わる Notch1 発現は E6 の導入により減少し、初期分化マーカーである Involucrin の発現も強く抑制された。この活性は E6 による p53 の分解を介していることを明らかにした。また、E6E7 により、Aurora A, B, Plk1, INCENP など、G2/M 期特異的な蛋白質群の発現が 10-20 倍増加することを明らかにした。

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

1) 昨年度までの研究で、HIFC 分化誘導システムを用いて、骨髓組織由来のヒト間葉系幹細胞からヒト肝細胞を作製する系を確立した。本年度は、この肝細胞が、形態的、機能的にヒト成熟肝細胞の特徴と酷似しており、肝細胞の増殖分化やがん化の研究を行う上で良いモデルとなることを明らかにした。

2) ヒト肝がんでは特異的に発現している遺伝子ライブラリーを独自のアテロコラーゲン・セルトランスフェクションアレイによって解析し、ヒト肝細胞がん培養細胞の細胞増殖やアポトーシスに関与する遺伝子を選別した。

3) ラット ES 細胞を用いた遺伝子改変ラットの作製を目指して、エレクトロポレーションの条件を設定し、ターゲットベクターによる相同組換えの頻度を明らかにした。さらにキメララット作製に向けて、ラットの胚操作およびマイクロインジェクションの条件検討や、胚の培養条件などの環境設定を行った。

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

12 種類の肺がん細胞株を、ソフトアガーアッセイによる足場非依存性増殖能と浮遊・接着状態におけるチロシンリン酸化蛋白質の違いにより 4 つのグループに分類した。A549 細胞を含むグループでは、浮遊状態においてチロシンリン酸化が増強する 135kD と 80kD の特徴的なチロシンリン酸化蛋白質を観察し、Src キナーゼの阻害剤や、Src ファミリーの RNAi により、この細胞の足場非依存性増殖能が落ちるとこの 2 つの蛋白質のチロシンリン酸化が著明に低下することがわかった。これらの蛋白質は Fyn と細胞内で強く結合していたため、Fyn

に対する親和性とチロシンリン酸化の 2 つの特性から精製することに成功し、質量分析で同一蛋白質の全長とプロセスされた形であることが明らかになった。RNAi を用いてこの分子の発現を抑えると、浮遊状態におけるアポトーシスが亢進することから足場非依存性に関わる新たな分子であることが示唆された。

神経芽腫において、ShcC の Grb2 結合部位を欠損した変異体で下流シグナルをブロックすると、Erk 経路や PI3K-Akt 経路が抑制され、細胞増殖能には有意な変化はなく、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。また、正常型 ShcC の過剰発現により造腫瘍能や足場非依存性増殖能が著明に抑制され、この作用に Src ファミリーの活性の抑制が関わることを示された。このような ShcC の腫瘍に対する抑制作用は ShcA や 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 ShcC 特有の作用であることが示唆された。

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 の蛋白質パキシリンは、活性が上昇した Fyn と協調して骨肉腫細胞の運動能・転移能を制御していることを明らかにした。

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

1) ヒトが合成酵素を欠くシアル酸分子種、NeuGc の患者ががん組織における発現

N-グリコシル型のシアル酸(NeuGc)は、その合成酵素を欠くヒトではほんらい合成されず、ヒト以外のほとんどの動物種で合成されるシアル酸分子種である。我々は NeuGc 残基を含有する GM2 ガングリオシドに対する特異抗体を用いて、大腸がん組織 16 例中 6 例(37.5%)、乳がん組織 12 例中 6 例(50.0%)に NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドが発現することを明らかにした。正常上皮細胞にはほとんど発現が認められなかった。

2) NeuGc のがん細胞への取り込みと NeuGc 含有異常糖鎖の発現誘導

通常の培養条件下で NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドを発現するヒト大腸がん細胞を培養液に NeuGc を含まない合成培地で飼うと、NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドが消失し、NeuGc を加えて培養すると再び復活することから、NeuGc は細胞外から取り込まれることが明らかになった。

3) 低酸素培養による NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドの発現誘導と、シアル酸輸送体 *sialin* の転写誘導

通常の培養条件下では NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドを発現しないヒト大腸がん細胞 CaCo-2 あるいは乳がん細胞 ZR-75-1 を低酸素下で培養すると、細胞表面に NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドの発現が誘導された。このとき、並行してシアル酸トランスポーター *sialin* の mRNA が著明に上昇した。低酸素培養による NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドの発現は、シアル酸トランスポーター *sialin* の転写が増大するためと考えられた。これを確認するため、CaCo-2 細胞に *sialin* 遺伝子を導入して安定発現細胞を作製したところ、*sialin* 高発現細胞は、通常酸素濃度下の培養において NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドを発現するようになった。

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

本年度は MYO18B 遺伝子のノックアウトマウスの解析により、その発現が心筋細胞における筋線維の形成あるいは維持に必須であることを示すことができた。MYO18B 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死を示したので、上皮細胞における MYO18B 遺伝子の機能やその失活による細胞がん化における役割はこの解析結果からは分らない。しかし、筋細胞において Z-line 上に存在するという結果から、上皮細胞においても通常のみオシンとは異なった役割を担っていることが強く予想された。Z-line は筋線維の構造維持に重要な役割をになっている領域なので、MYO18B は上皮細胞においてはアクチンファイバーの形成などにおいて機能していることが予想される。今後は上皮細胞における MYO18B の役割を明らかにするとともに、本研究で作製したノックアウトマウスのヘテロ欠損マウスを用いて発がん実験を行い、細胞がん化における MYO18B 遺伝子不活性化の意義を明らかにしていきたい。

肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析では、新規の候補がん抑制遺伝子として PIPRD を同定することができた。この遺伝子の産物は膜型のチロシン脱リン酸化酵素なので、細胞の増殖・分化・死のシグナルを伝える分子である可能性が高い。今後は生物学的機能解析を行うことにより、細胞がん化の意義を明らかにしていきたい。

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

不死化した正常ヒト細胞を用い、in vitro がん化モデルの作製を始めた。子宮内膜がんでは、p53 経路と RB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化により不死化した細胞に KrasV12 を導入することにより、ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得することが示された。活性型 Akt の導入では足場非依存性増殖が誘導されたが、造腫瘍性は誘導されなかった。また、PTEN 特異的 shRNA の導入では内因性 PTEN の発現を抑えたものの、調べたアッセイでは悪性形質は認められなかった。子宮内膜がんでは Kras の変異と PTEN の異常がよく知られているが、今回の KrasV12 による結果は in vivo の結果をよく反映していると考えられた。しかし、内膜がんにおける p53 の変異は他のがんと比べて少ない。RB 経路の異常は p16 の不活化も見つかるが cyclinD の高発現によることが多い。子宮内膜上皮細胞は E7+TERT では不死化できなかったことから、今回のモデルに用いた細胞には E6 が導入されており、p53 が不活化されている。最近、PTEN が p53 の安定化に関わるなど、相互作用が報告されているので、子宮内膜がんでは PTEN の異常が p53 の不活化に替わって不死化に関与している可能性も考えられる。E7+TERT により卵巣表層上皮細胞(HOSE1)の不死化に成功した。この細胞は上皮性卵巣がんモデルだけでなく子宮内膜症のモデルとしても重要である。今後、内膜症や類内膜腺がんによく見られる KrasV12 や PTEN の異常を導入し、そのがん化過程を明らかにしてゆきたい。卵巣表層上皮細胞は中皮由来の細胞で通常のがん化で見られる上皮間葉変換 (EMT) とは逆の MET が見られるので、その過程と意義を明らかにする上でも貴重な試料

と考えられる。不死化子宮頸部上皮細胞(HCK1T)を用いた発現モデルでは、rasV12 に対する反応の特異性が示された。HCK1T などケラチノサイトは無血清、低カルシウム培地という特殊培地で培養されており、この特異性は細胞種に依るのか、培地など培養環境によるのかを確かめる必要がある。

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

本年度の成果であるヒト肝細胞を骨髄の間葉系幹細胞から分化誘導する系と、ゲノムワイドな研究を可能にする RNAi ライブラリーを組み合わせることで、がんの分子生物学的特徴を把握するための reverse genetics にもとづく新規解析システムの構築の準備が整った。

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。本年度の研究成果で既にラット ES 細胞の培養法と相同組換えの条件検討は終了し、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の条件の確立に努める。

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

今回の研究は、チロシンリン酸化蛋白質の変化に焦点を絞り、それぞれの臓器特異的に腫瘍細胞の足場非依存性増殖能や転移能などの特性異常に関わる新規分子や、パキシリン、ShcC などの既知のキナーゼ基質の関わりを明らかにしたことで、チロシンリン酸化の腫瘍進展への関与をさらに鮮明にした。腫瘍における異常なチロシンリン酸化のシグナルを総合的に理解することにより、腫瘍の増殖以上の本体に迫ることが可能であり、さらには新たにこのような分子の恒常的なチロシンリン酸化の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制できる可能性がある。

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

ヒトでは本来合成されないはずの NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドなどの NeuGc 含有糖鎖(Hanganutziu-Deicher 抗原)がヒトのがんに出現するのは、がん細胞では NeuGc の細胞内への輸送が亢進しているためであり、その背景には、低酸素によるシアル酸トランスポーター *sialin* の転写誘導があることが判明した。このため、NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドなどの NeuGc 含有糖鎖は、低酸素抵抗性を獲得して悪性度の増大したがん細胞のよいマーカーであると考えられる。本研究で対象とした GM2 ガングリオシドは、もともとシアル酸分子種が正常な通常の NeuAc 含有 GM2 ガングリオシドもすでにがん関連糖鎖であることが明らかにされており、これをターゲットとしたワクチン療法が米国で、またヒト化抗体を用いた抗体療法が本邦で試みられている糖鎖抗原である。今回明らかになったのは、低酸素によって GM2 の構成単糖のうちシアル酸の分子種が、ヒトには本来合成されない異常分子種である NeuGc となる点である。このため NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドは、低酸素下の正常細胞には発現されず、低酸素下のがん細胞に特異的に発現し、治療のターゲットの候補として優れていると考えられる。

E. 結論

肺がんの候補がん抑制遺伝子として単離した MYO18B のノックアウトマウスの解析により、MYO18B は筋線維やアクチンファイバーの構造維持に重要な役割を担っていることが分かった。上皮細胞においてもアクチンとの結合を介して細胞の骨格維持や運動能などにおいて機能を持っていることが示唆されたので、今後は上皮細胞における生物学的機能解析を進める予定である。また、ヒト肺がんの新規候補がん抑制遺伝子として PTPRD を同定した。今後の更なる生物学的機能解析により、MYO18B および PTPRD の異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていきたい。

ヒト正常細胞の不死化には 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 p53 の不活化が必要であった。これまでに不死化した細胞を用いて in vitro 発がんモデルの作製を始めた。その結果、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが示唆された。実際のがん細胞では多数の異常が蓄積しているため、どれかががん化に重要な異常かを見極めることが困難である。正常細胞に限られた数の特定の異常を導入することでがん化を再現することは、多段階発がんの複雑なステップを単純化することが出来る。分子標的薬剤の開発においても有効なツールとなることが期待される。

様々な ES 細胞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、これをヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化に応用することに成功した。この系を元に siRNA ライブラリーと組み合わせることで、肝細胞の分化と増殖に関わる遺伝子を検索し、ヒト肝臓がんにて特異的に発現する遺伝子群との関連性を検討するための準備が整った。また、ラット ES 細胞による発がんモデル動物の作製に向けて、遺伝子改変のための基礎データや胚操作の基本技術が整備されつつある。

腫瘍におけるチロシンリン酸化蛋白質の研究から、腫瘍の組織系に対応して特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせが、その腫瘍細胞の転移・浸潤能、足場非依存性増殖能に関わっていることが明らかになった。骨肉腫における Fyn-パキシリン経路、悪性黒色腫における Fyn-コルタクチン経路といった、特定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、腫瘍の組織系に合わせた分子標的治療の絶好のターゲットとなり得る。治療への応用の前段階としてマウスの尾錠脈注射による転移能の測定やウイルスベクターを併用した局所発現で既に生成された腫瘍組織に対する効果などのデータをとっていくことにより、現在開発中のチロシンキナーゼ阻害剤よりも腫瘍の組織系と腫瘍の特性に照準を合わせた副作用の少ない治療に応用可能であると考ええる。

低酸素抵抗性の獲得はがん悪性化の重要な要因である。今年度の成果は、低酸素がシアル酸のトランスポーター *sialin* 遺伝子の転写を誘導し、その結果、がん細胞において NeuGc 含有 GM2 ガングリオシドをはじめとする NeuGc 含有糖鎖の発現が誘導されることを示した。この

ことは、低酸素抵抗性を獲得した、より悪性度の高いがん細胞では、必然的に NeuGc 含有糖鎖が強く発現することを示す。とくに NeuGc 含有 GM2 は、これまでがんの免疫治療のターゲットと考えられてきたこと、この GM2 骨格がさらに上記のメカニズムで異常なシアル酸分子種 NeuGc を含有するに至ったものであることから、より特異性の高い低酸素抵抗性がん細胞の治療の良いターゲットと考えられる。

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) 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.
- 2) 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, 43:162-171, 2005.
- 3) Sato, M., Takahashi, K., Nagayama, K., Arai, Y., Ito, N., Okada, M., Minna, J.D., Yokota, J., Kohno, T. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. Genes Chromosomes Cancer, 44:405-414, 2005.
- 4) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E., Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. Int. J. Cancer, in press.
- 5) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N., Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. Int. J. Oncol., 28:321-328, 2006.
- 6) Nakamura, N., Kobayashi, K., Nakamoto, M., Kohno, T., Sasaki, H., Matsuno, Y., Yokota, J. Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma. Oncogene, in press.
- 7) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E., Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. Int. J. Cancer, in press.
- 8) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J., Sutoh, K. MYO18B interacts

- with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 9) Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kiyono, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Ishizaki, K., Tsurumi, T. Activation of ATM DNA damage checkpoint signal transduction elicited by Herpes simplex virus infection. *J. Biol. Chem.*, 280:30336-41, 2005.
 - 10) Maeda, T., Tashiro, H., Katabuchi, H., Begum, M., Ohtake, H., Kiyono, T., Okamura, H. Establishment of an immortalised human ovarian surface epithelial cell line without chromosomal instability. *Br. J. Cancer*, 93: 116-123, 2005.
 - 11) Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., and Umezawa, A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 5183-5195, 2005.
 - 12) 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*, 92: 290-293, 2005.
 - 13) 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*, 16: 1491-1499, 2005.
 - 14) 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.
 - 15) Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano T., Furukawa, K., Nigg, E.A., Inagaki, M. Complex Formation of Plk1 and INCENP Required for Metaphase-Anaphase Transition. *Nat. Cell Biol.*, 8:180-7,2006.
 - 16) Mizumoto, Y., Kyo, S., Ohno, S., Hashimoto, M., Nakamura, M., Maida, Y., Sakaguchi, J., Takakura, M., Inoue, M., Kiyono, T. Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene*, in press.
 - 17) Kurokawa, Y., Honma, K., Takemasa, I., Nakamori, S., Kita-Matsuo, H., Motoori, M., Nagano, H., Dono, K., Ochiya, T., Monden, M., Kato, K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int. J. Oncol.*, in press.
 - 18) Fukasawa, M., Morita, S., Kimura, M., Horii, T., Ochiya, T., Hatada, I. Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice. *Cytogenet. Genome Res.* in press.
 - 19) Banas, A., Quinn, G., Yamamoto, Y., Teratani, T., Ochiya, T. "Stem cells into liver"-Basic research and potential clinical application. *Adv. Exp. Med. Mol. Biol.* in press.
 - 20) Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A., Ochiya, T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 12177-12182, 2005.
 - 21) Yanagihara, K., Takigahira, M., Tanaka, H., Komatsu, T., Fukumoto, H., Koizumi, F., Nishio, K., Ochiya, T., Ino, Y., Hirohashi, S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.*, 96: 323-332, 2005.
 - 22) Saito, S., Honma, K., Kita-Matsuo, H., Ochiya, T., Kato, K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol. Genomics*, 22: 8-13, 2005.
 - 23) 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.*, 14: 629-635, 2005.
 - 24) Yamamoto, Y., Teratani, T., Yamamoto, H., Quinn, G., Murata, S., Ikeda, R., Kinoshita, K., Matsubara, K., Kato, T., Ochiya, T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Hepatology*, 42: 558-567, 2005.
 - 25) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Sasaki, H., Terada, M., Ochiya, T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 41: 836-846, 2005.
 - 26) Miyake, I., Hakomori, Y., Misu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M., Sakai, R. Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 24: 3206-3215, 2005
 - 27) 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*, 24: 4754-4764, 2005
- 28) Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R., Mori, N. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 25: 1826-1835, 2005
 - 29) Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A., Sakai, R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.*, 167: 213-222, 2005
 - 30) Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S., Hirai, H. Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J. Immunol.*, 175: 3492-3501, 2005
 - 31) Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contract formation. *EMBO J.*, 24: 3700-3711, 2005.
 - 32) Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.*, 280: 42375-42382, 2005
 - 33) Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G.-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F.-L., Lin, C.-H., Sato, C., Kitajima, K., Kannagi, R. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.*, 66: 2937-2945, 2006.
 - 34) Ohmori, K., Fukui, F., Kiso, M., Imai, T., Yoshie, O., Hasegawa, H., Matsushima, K., Kannagi, R. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo Lewis x, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, in press.
 - 35) Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S. Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J. Biol. Chem.*, in press.
 - 36) Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., Kiso, M. Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1-6GalNAc α core structure. *Tetrahedron Asymmetry*, 16: 1321-1327, 2005.
 - 37) Satoh, T., Kanai, Y., Wu, M.H., Yokozeki, H., Kannagi, R., Lowe, J.B., Nishioka, K. Synthesis of α (1,3)fucosyltransferases IV- and VII-dependent eosinophil selectin ligand and recruitment to the skin. *Am. J. Pathol.*, 167: 787-796, 2005.
 - 38) Tjew, S.L., Brown, K.L., Kannagi, R., Johnson, P. Expression of N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferases (GlcNAc6STs) -1 and -4 in human monocytes: GlcNAc6ST-1 is implicated in the generation of the 6-sulfo N-acetylglucosamine/Lewis x epitope on CD44 and is induced by TNF- α . *Glycobiol.*, 17: 7C-13C, 2005.
 - 39) Uchimura, K., Gauguier, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., Von Andrian, U.H., Rosen, S.D. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat. Immun.*, 6: 1105-1113, 2005.
 - 40) Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Uchimura, K., Kannagi, R., Kato, K. Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods. *Glycobiol.*, 15: 1051-1060, 2005.
 - 41) Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Kiso, M. 6-O-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: Synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconj. J.*, 22: 95-108, 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
出願中：「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」
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
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

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

肺がんを高率に欠失している第22染色体長腕から単離した候補がん抑制遺伝子 MYO18B のノックアウトマウスを作製した。(-/-)マウスは受精後10~12日後に胎生致死を起こし、心筋細胞の筋線維構造異常を伴う心不全が死因と考えられた。また、ヘテロマウスや抗 MYO18B 抗体を用いた解析で、MYO18B 蛋白質は筋細胞の筋繊維上で Z-line 上に存在し、線維構造の形成あるいは維持に必須の蛋白質と考えられた。ヘテロマウスを用いた発がん実験は現在進行中である。また、Mapping 10k array を用いて約 1Mb 間隔で全ゲノムに亙りホモ欠失のスクリーニングを行い、肺がん細胞株では p16 遺伝子を含む 9p21 領域に続いて 9p23 領域も 9p21 とは独立に高頻度にホモ欠失していることを明らかにした。さらに、ホモ欠失領域より、肺がんの約 10%で欠失している新規候補がん抑制遺伝子として PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type D)を同定した。本遺伝子は欠失によって発現が有意に低下していたことから、発現低下によって細胞をがん化する遺伝子と考えられた。現在、その生物学的機能解析を進めている。

A. 研究目的

我が国で最も死亡率の高い肺がんを対象に、がん細胞でゲノム異常を起こしている遺伝子を同定し、その異常によって発現するがん細胞の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。がん抑制遺伝子を標的とし、肺がん細胞で高頻度に見られる染色体欠失領域から遺伝子を単離して、変異や発現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。また、正常肺上皮細胞を用いて候補遺伝子の失活を再現し、その異常により発現する悪性形質を確認する。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 の生物学的機能解析を進めることにより、その不活性化とがん細胞の特性との関連性を検討した。また、種々の 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9染色体短腕に存在する PTP-RD 遺伝子を新たな候補がん抑制遺伝子として同定した。MYO18B 遺伝子と PTP-RD 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) MYO18B 遺伝子ノックアウトマウス(-/-)の作製とその胎児期致死性の要因解析

マウス MYO18B 遺伝子のジーンターゲッティングベクターを作製した。ベクターには nlsLacZ 遺伝子と NeoR 遺伝子を挿入し、発現解析や薬物に

よる選択を可能にした。ベクターの導入による遺伝子の破壊はサザンブロット法およびゲノム PCR 法を用いた。ヘテロマウスにおける発現解析は RT-PCR 法や LacZ 染色法を用い、細胞内の局在解析などには抗 MYO18B 抗体を作製して免疫蛍光染色を行った。遺伝子プロモーター領域の解析はゲノム断片を組み込んだルシフェラーゼアッセイを行った。組織学的解析は通常のヘマトキシリン・エオジン染色の切片を光学顕微鏡で観察する他、透過型電子顕微鏡を用いた解析も行った。

2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

29 例のヒト肺がん細胞株を対象に、ゲノム網羅的に約 10,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip、Mapping 10k array を用いて染色体のホモ欠失領域を探索した。ホモ欠失の可能性が示されたゲノム領域は、Multiplex genomic PCR 法を用いてホモ欠失の有無を確認した。第9染色体短腕の PTP-RD 遺伝子を含む領域に 8 例の細胞株でホモ欠失を検出したので、さらに、PTP-RD 遺伝子内やその周辺のプライマーを用いたゲノム PCR 法でホモ欠失領域の詳細な解析を行なった。また、肺がん細胞株より RNA を抽出し、発現解析を行った。

(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. 研究結果

1) MYO18B 遺伝子ノックアウトマウス(-/-)の作製とその胎児期致死性の要因解析

昨年までの本研究で、肺がんを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。そこで昨年より個体における MYO18B 遺伝子の生物学的機能を解析するため、(-/-)マウスの作製を始めていたが、本年度は、(-/-)マウスが致死性であることが分り、(-/-)マウス胎児の解析と(+/-)マウスを用いた MYO18B の発現解析を行った。

ジーンターゲットベクターを用いてマウス MYO18B 遺伝子のプロモーターの下流に β -gal 遺伝子を挿入したので、(+/-)マウスを用いた LacZ 染色により、MYO18B の発現細胞の解析を行った。その結果、MYO18B は骨格筋、心筋などの筋肉細胞で強発現することが分った。そこで、MYO18B 遺伝子の発現調節に関わるプロモーター領域の解析を行ったところ、MYO18B 遺伝子は筋肉細胞の分化とともに発現誘導され、その誘導には転写因子 myocyte-specific enhancer factor-2 (MEF-2) が関与していることが示唆された。

(+/-)マウス同士の掛け合わせにより得られる胎児の解析により、MYO18B (-/-)マウスは受精後 10~12 日目に致死性になることが分った。さらに、死亡した胎児を病理解剖した結果、心嚢液の貯留や動静脈の拡張などが見られ、心不全が原因で胎生期に死亡したと考えられた。発現解析の結果では、特に胎児期には心筋細胞での発現が顕著だったので、さらに心筋の構造異常について形態学的解析を行った。電子顕微鏡での観察の結果、左心室における心筋細胞のザルコメア構造に異常が見られた。即ち、筋線維の分布や走行性が正常と比べると不均一であり、MYO18B が心筋線維の形成あるいはその構造維持に必須であることが強く示唆された。

そこで、心筋細胞や骨格筋細胞の中での局在を、MYO18B に対する抗体を用いた免疫蛍光染色法で調べた。その結果、通常の II 型 (筋型) ミオシンが筋線維上で A-band と言われる部位に存在するのに対して、MYO18B 蛋白質は a-actinin などと同様に Z-line 上に存在することが分った。A-band 上に存在する II 型 (筋型) ミオシンは筋細胞の収縮に必須の蛋白質だが、MYO18B はそれとは全く違う機能を有していることが示唆された。

2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

Affymetrix 社から発売された「Mapping 10k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 210-kb 間隔で調べることでできるマイクロアレイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、29 例のヒト肺がん細胞株にお

けるホモ欠失(homozygous deletion)の分布状態をゲノム網羅的に解析した。チップ解析で 4 連続してハイブリダイゼーションのシグナルが検出されない領域を候補欠失領域としたところ、染色体上の 34 領域が候補として選択された。この方法は全ゲノムを約 1-Mb 間隔でホモ欠失についてスクリーニングしたことになる。

次に、この 34 領域について、multiplex genomic PCR 法を用いてホモ欠失の有無について確認した。その結果、18 領域でホモ欠失が実際に存在することが確認された。そこで、細胞株をさらに 49 例増やし、78 例におけるこれら 18 領域の欠失の頻度を調べた。その結果、2q24、3p14、5q11、9p21、9p23、11q14、21q21 の 7ヶ所の欠失が 2 つ以上の細胞株で検出された。9p21 の CDKN2A を含む領域の欠失が最も高頻度に検出され(20/78、26%)、この欠失は非小細胞がんのみに検出された。9p23 の PTPRD を含む領域の欠失が次に高頻度に検出され (8/78、10%)、この欠失は小細胞がんと非小細胞がんの両方で検出された。さらに、これら 2 領域の欠失は連続した同一の欠失ではなかったので、それぞれ独立して起こった欠失と考えられた。

9p21 の欠失は p16 がん抑制遺伝子の失活を促す重要なゲノム異常であることが知られているが、9p23 領域の欠失に関しては、PTPRD がその標的遺伝子であるかどうかは定かでない。そこで、PTPRD 遺伝子の全ゲノム構造を決め、上記 8 例のホモ欠失領域を詳細にマップした。その結果、8 例全例の欠失は PTPRD の遺伝子内に存在することが分った。しかし、1 例を除き、欠失は非翻訳領域に存在したので、PTPRD 遺伝子が欠失の標的遺伝子ではあるが、欠失によって変異蛋白質が発現するのではなく、発現量が低下すると予想された。

そこで、さらに定量的 RT-PCR 法を用いて 54 例の肺がん細胞株における PTPRD 遺伝子の発現量について調べた。その結果、欠失のある細胞株では欠失のない細胞株に対して有意に発現量が低下していることが分った。この結果より、PTPRD 遺伝子が 9p23 領域の欠失によって失活しているがん抑制遺伝子の強力な候補であると結論した。

D. 考察

本年度は MYO18B 遺伝子のノックアウトマウスの解析により、その発現が心筋細胞における筋線維の形成あるいは維持に必須であることを示すことができた。MYO18B 遺伝子は筋細胞で高発現し、そのノックアウトマウスは胎生致死を示したので、上皮細胞における MYO18B 遺伝子の機能やその失活による細胞がん化における役割はこの解析結果からは分らない。しかし、筋細胞において Z-line 上に存在するという結果から、上皮細胞においても通常のみオシンとは異なった役割を担っていることが強く予想された。Z-line は筋線維の構造維持に重要な役割を担っている領域なので、MYO18B は上皮細胞においてはアクチンファイバーの形成などにおいて機能していることが予想される。そこで、今後

は上皮細胞における MYO18B の役割を明らかにするとともに、本研究で作製したノックアウトマウスのヘテロ欠損マウスを用いて発がん実験を行い、細胞がん化における MYO18B 遺伝子不活性化の意義を明らかにしていきたい。

マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析では、新規の候補がん抑制遺伝子として PTPRD を同定することができた。この遺伝子の産物は膜型のチロシン脱リン酸化酵素をコードしているので、細胞の増殖や分化、死のシグナルを伝える分子である可能性が高い。今後は生物学的機能解析を行うことにより、細胞がん化の意義を明らかにしていきたい。また、本研究を迅速に行うため、本年度の補助金の追加交付を受けたので、本年度内に、生物学的機能解析に必要な発現ベクターの作製に着手し、内在性の PTPRD 遺伝子が発現していない細胞内で発現させられることを確認した。現在、細胞の増殖に対する抑制作用を検討しているので、次年度にはその結果を報告する予定である。

E. 結論

本研究で肺がんの候補がん抑制遺伝子として単離した MYO18B は非筋型ミオシンをコードしているが、その産物の生物学的機能に関しては全く分っていなかった。今年度のノックアウトマウスの解析により、筋線維やアクチンファイバーの構造維持に重要な役割を担っていることが分った。この結果は、上皮細胞においてもアクチンとの結合を介して細胞の骨格維持や運動能などにおいて重要な機能を持っていることを示唆しているので、今後は上皮細胞における生物学的機能解析を進める予定である。また、ヒト肺がんの約 10%でホモ欠失している新規候補がん抑制遺伝子として PTPRD を同定した。PTPRD 遺伝子も、欠失によって発現量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として機能していることが示唆された。今後の更なる生物学的機能解析により、MYO18B および PTPRD の異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hirama, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., Takenoshita, S. and Yokota, J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. Clin. Cancer Res., 11:512-519, 2005.
- 2) Nakano, T., Tani, M., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Ohwada, S. and Yokota, J. Genetic and epigenetic alterations of the MYO18B gene, a candidate tumor suppressor, on chromosome arm 22q in

colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer, 43:162-171, 2005.

- 3) Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y. and Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. Oncogene, 24:4754-4764, 2005.
- 4) Sato, M., Takahashi, K., Nagayama, K., Arai, Y., Ito, N., Okada, M., Minna, J.D., Yokota, J. and Kohno, T. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. Genes Chromosomes Cancer, 44:405-414, 2005.
- 5) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. Int. J. Cancer, in press.
- 6) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. Int. J. Oncol., 28:321-328, 2006.
- 7) Nakamura, N., Kobayashi, K., Nakamoto, M., Kohno, T., Sasaki, H., Matsuno, Y. and Yokota, J. Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma. Oncogene, in press.
- 8) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. Int. J. Cancer, in press.
- 9) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

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 ヒト子宮内膜がんのin vitroモデルの作製に成功した。ヒト子宮内膜腺上皮細胞は培養が数週間しか維持できないため、培養細胞を用いた研究は困難であった。しかし、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(TERT)+16型ヒトパピローマウイルス(HPV16)E6E7の導入で不死化した子宮内膜腺上皮細胞を用いることで可能となった。子宮内膜がんでは、多くの染色体異常の他、テロメラーゼの活性化、Krasの変異やPTENの異常が比較的高頻度に見られる。KrasV12被導入細胞は染色体異常をほとんど伴わないにも関わらず足場非依存性増殖だけでなく腫瘍原性も獲得した。また、卵巣がん、子宮頸がんのin vitroモデル作製も進めている。TERT+HPV16 E7の導入により上皮性卵巣がんの母体となる卵巣表層上皮細胞の不死化に成功した。この細胞は卵巣表層上皮のマーカーを発現しかつ正常2倍体を維持しており、理想的な発現モデル細胞と言える。子宮頸がんのin vitroモデル作製のため、TERTのみの導入で不死化した子宮頸部正常上皮を用いてがん化機構の解析を進めている。これまでに、rasV12の導入により細胞死が誘導されることが示され培養環境や細胞種による特異性が示唆された。

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こ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

がん細胞の母体となる正常ヒト細胞をTERT単独あるいはこれに加えHPV16 E7やE6あるいはbmi-1, p16-shRNAの導入により不死化を進めている。また、これまでに不死化した種々のヒト細胞を用いて、これにさらに各がんで高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入やがん抑制遺伝子のRNA干渉法を用いた発現抑制により導入し、そのがん化過程をin vitroで再現を試みた。正常初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入可能な組換えレ

トロウイルスを用いることにより遺伝子挿入部位に依存しない細胞がん化過程をモニターした。組換えレトロウイルスはG418, hygromycin B, puromycin, blasticidin S, zeocin耐性遺伝子を持つものを組み合わせ複数の遺伝子発現に用いた。導入遺伝子としてはhTERT, bmi-1, HPV16 E6, 変異E6シリーズ, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性型Akt (myr-Akt), erbB2, c-mycなどを用いた。short hairpin RNA (shRNA) はH1 promoterを用いpuromycin耐性レトロウイルスにより導入した。これまでに、子宮内膜腺上皮細胞並びに子宮頸部上皮細胞を用いてそれぞれ、子宮内膜がん、子宮頸がんの多段階発がんモデルの作製とその解析を進めてきた。また、これまで適当な培養細胞のなかった上皮性卵巣がんの母体となる正常卵巣表層上皮細胞の不死化も試みた。

解析方法としては、不死化機構から、細胞増殖、足場非依存性増殖、ヌードマウスでの造腫瘍性など古典的な細胞トランスフォーメーション検出法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾の変化などをDNAマイクロアレーやWesternブロッティング法などを用いた。

(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

[子宮内膜がんモデル]

TERT+HPV16 E6E7の導入で不死化した子宮内膜上皮細胞に活性型ras(KrasV12), 活性型Akt(myr-Akt)を導入することにより、細胞増殖は亢進、形態変化が見られた。これらの細胞は軟寒天培地中でコロニーを形成し、足場非依存性増殖能を獲得していた。また、KrasV12被導入細胞はヌードマウスに腫瘍を形成した。一方、PTEN特異的sh RNA (PTEN-shRNA)の導入により内因性PTEN量は1/2に減少したが、増殖能の亢進、足場非依存性増殖、造腫瘍性などは見られなかった。

[上皮性卵巣がんモデル]

上皮性卵巣がんの母地となる卵巣表層上皮細胞は培養が困難であり、これまでSV40により延命した細胞の報告があるものの、それだけで腫瘍原性を獲得したり、広範な染色体異常を伴ったりしており、in vitro発現モデルに適した細胞は存在しなかった。卵巣表層上皮細胞にTERTの他、HPV16 E7, E6, bmi-1などを種々の組み合わせで導入し延命効果を観察した。TERT単独では延命効果が見られずサイトケラチン陰性の間葉系の細胞のみが増殖した。HPV16 E7, E6, bmi-1などでは延命効果が見られたが、TERT+bmi-1やE6による延命効果は弱くサイトケラチン陽性の細胞群は得られなかった。TERT+E7あるいはTERT+E6E7では導入直後から強い延命効果が見ら

れ100PDsを超え事実上不死化した。これらの細胞の染色体を調べた結果、TERT+E7で不死化したものだけが正常2倍体を維持しており、他の細胞群では4倍体近くになったもの等多くの染色体異常が認められた。TERT+E7で不死化した細胞は正常p53がやや高発現しており、この活性が染色体異常を排除している可能性が示唆された。今後、この細胞を用い、卵巣がんのin vitroモデルを作製する。

[子宮頸がんモデル]

TERTのみで不死化した子宮頸部上皮細胞(HCK1T)は120 population doublings (PDs)後もほぼ正常2倍体を維持している。この細胞にHPV16 E6E7を導入すると、分化抵抗性を獲得し、3次元培養によりCIN3様構造を取るようになる。また、軟寒天培地中で微小コロニーを作るようになるが、ヌードマウスにおける腫瘍原性はない。乳腺上皮細胞ではこの組み合わせにさらにSV40 small TとrasV12を導入すると腫瘍原性を獲得することが報告されているが、HCK1Tでは1000万個の細胞を接種しても腫瘍を形成することとはなかった。子宮内膜上皮ではrasV12を導入直後に細胞増殖が促進されたのに対し、子宮頸部上皮細胞ではrasV12の導入直後に広範な細胞死が誘導されることを見つけその差を規定する機構を解析している。

一方、HCK1TにE6, E6E7, 種々の変異E6などを導入し、マイクロアレイ法で遺伝子発現変化を詳細に解析した。その結果、また、扁平上皮の分化誘導

に関わるNotch1発現はE6の導入により減少し初期分化マーカーであるInvolucrinの発現も強く抑制された。この活性はE6によるp53の分解を介していることを明らかにした。また、E6E7によりG2/M期特異的な蛋白質群の発現が10-20倍増加することが明らかになった。Aurora A, B, Plk1, INCENPなどG2/M期の進行に深く関わる遺伝子群の発現制御異常は染色体不安定性を誘導する可能性がありその機構を含め今後解析を進める予定である。

D. 考察

これまで不死化してきた正常ヒト細胞を用い、in vitroがん化モデルの作製を本格的に始めた。まず、子宮内膜がんのモデル作製を試みp53経路とRB経路の不活化と、テロメラーゼの活性化により不死化した細胞にKrasV12を導入する事により、ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得することが示された。活性型Aktの導入では足場非依存性増殖が誘導されたが、造腫瘍性は誘導されなかった。また、PTEN特異的shRNAの導入では内因性PTENの発現を抑えたものの、細胞増殖を始め調べたアッセイではトランスフォーム形質は認められなかった。子宮内膜がんではKrasの変異とPTENの異常がよく知られているが、今回のKrasV12による結果はin vivoの発現を良く反映していると考えられた。しかし、内膜がんにおけるp53の変異は他のがんと比べ少ない。Rb経路の異常はp16の不活化も見

つかるがcyclinDの高発現によることが多い。子宮内膜上皮細胞はE7+TERTでは不死化できなかったことから、今回のモデルに用いた細胞にはE6が導入されておりp53が不活化されている。最近PTENがp53の安定化に関わるなど相互作用が報告されている。実際の子宮内膜がんではPTENの異常がp53の不活化に替わって不死化に関与している可能性も考えられる。

E7+TERTにより卵巢表層上皮細胞(HOSE1)の不死化に成功した。この細胞は上皮性卵巢がんモデルだけでなく子宮内膜症のモデルとしても重要である。今後、内膜症や類内膜腺がんによく見られるKrasV12やPTENの異常を導入し、そのがん化過程を明らかにしてゆきたい。卵巢表層上皮細胞は中皮由来の細胞で通常のがん化で見られる上皮間葉変換(EMT)とは逆のMETが見られる。その過程と意義を明らかにする上でも貴重な試料と考えられる。

不死化子宮頸部上皮細胞(HCK1T)を用いた発現モデルでは、rasV12に対する反応の特異性が示された。HCK1Tなどケラチノサイトは無血清、低カルシウム培地という特殊培地で培養されており、この特異性は細胞種に依るのか、培地など培養環境によるのかを確かめる必要がある。

、がん化に至る遺伝子変異などの種類と獲得の順序はがん腫毎に異なることが示されており、その背景を明らかにする手段としてもin vitro発がんモデルは有用であろう。

E. 結論

種々のヒト正常細胞の不死化をさらに進め、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。これまでに不死化した細胞を用いてin vitro発がんモデルの作製を始めた。その結果、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが示唆された。実際のがん細胞では染色体異常を含め多数の異常が蓄積しているためどれががん化に重要な異常かを見極めることが困難である。正常細胞に限られた数の特定の異常を導入することでがん化を再現することは、多段階発がんの一見複雑に見えるステップを単純化することが出来る。

分子標的薬剤の開発においても有効なツールとなることが期待される。

今回、報告した3つの細胞種を用いた解析をさらに深く進めるとともに、他の細胞種でもin vitroがん化モデルを作製する事で細胞種間の特異的な共通性を明らかに出来るものと考え

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

Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi,

Y., Fujita, M., Kiyono, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Ishizaki, K., and Tsurumi, T. Activation of ATM DNA damage checkpoint signal transduction elicited by Herpes simplex virus infection. *J Biol Chem*, 280:30336-41, 2005.

Maeda, T., Tashiro, H., Katabuchi, H., Begum, M., Ohtake, H., Kiyono, T., and Okamura, H. Establishment of an immortalised human ovarian surface epithelial cell line without chromosomal instability. *Br J Cancer*, 93: 116-123, 2005.

Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., and Umezawa, A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol*, 25: 5183-5195, 2005.

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*, 92: 290-293, 2005.

Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X. K., Umezawa, A., and 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*, 16: 1491-1499, 2005.

Saito, M., Handa, K., Kiyono, T., Hattori, S., Yokoi, T., Tsubakimoto, T., Harada, H., Noguchi, T., Toyoda, M., Sato, S., and Teranaka, T. immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res*,

20: 50-57, 2005.

Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano T., Furukawa, K., Nigg, E.A., and Inagaki, M. Complex Formation of Plk1 and INCENP Required for Metaphase-Anaphase Transition. *Nat. Cell Biol.*, 8:180-7,2006.

Yasunari Mizumoto, Satoru Kyo, Shinichi Ohno, Manabu Hashimoto, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Maida, Junko Sakaguchi, Masahiro Takakura, and Masaki Inoue and Tohru Kiyono Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene*, 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：様々な ES 細胞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、これをヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化に応用することに成功した。この系を元にヒトゲノムワイドの siRNA ライブラリーと組み合わせることで、肝細胞の分化と増殖にかかわる遺伝子を検索し、ヒト肝臓がんの特異的に発現する遺伝子群との関連を検討するための準備が整った。またラット ES 細胞による発がんモデル動物の作成に向けて、遺伝子改変のための基礎データや胚操作の基本技術を整備した。

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。すでに確立したマウス 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もとにヒト間葉系幹細胞から肝細胞を分化誘導する系を完成させる。ヒト肝臓がんの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、ヒト肝がん培養細胞株を用いた細胞増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の絞込みを予備検討として行う。また、ラット ES 細胞を培養するために不可欠

な、リコンビナントラット LIF を用いてラット ES 細胞の候補となる複数の細胞株の樹立と、遺伝子改変に必要な遺伝子導入条件と相同組換え技術の確立さらに胚操作などの基盤技術の整備を行う。

C. 研究結果：

1) 昨年度までの研究成果から得られたHIFC分化誘導システムを用いて、骨髓組織由来のヒト間葉系幹細胞から、ヒト肝細胞を作成することに成功した。本年度はこの細胞の性状解析を詳細に行った結果、この肝細胞は、形態的、機能的にヒト成熟肝細胞の特徴と酷似しており、肝細胞の増殖分化やがん化の研究を行う上で良いモデルとなることが明らかとなった。

2) ヒト肝がんで特異的に発現している遺伝子ライブラリーを独自のアテロコラーゲン・セルトランスフェクションアレイによって解析し、ヒト肝細胞がん培養細胞の細胞増殖やアポトーシスに関与する遺伝子の候補を選別した。

3) ラット ES 細胞を用いた遺伝子改変ラットの作成を目指して、エレクトロポレーションの条件を設定し、ターゲティングベクターによる相同組換えの頻度を明らかにした。さらにキメララット作成に向けて、ラッ

トの胚操作およびマイクロインジェクションの条件検討や、胚の培養条件などの環境設定を行った。

D. 考察：

本年度の成果であるヒト肝細胞を骨髓の間葉系幹細胞から分化誘導する系と、ゲノムワイドな研究を可能にするRNAiライブラリーを組み合わせることで、がんの分子生物学的特徴を把握するためのreverse geneticsにもとづく新規解析システムの構築の準備が整った。

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。本年度の研究成果ですでにラット ES 細胞の培養法と相同組換えの条件検討は終了し、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の条件の確立に努める。

E. 結論：

様々な ES 細胞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、これをヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化に応用することに成功した。この系を元にヒトゲノムワイドの siRNA ライブラリーと組み合わせることで、肝細胞の分化と増殖にかかわる遺伝子を検索し、ヒト肝臓がんニ特異的に発現する遺伝子群との関連