

- 2) 特願 2006-078787 「がんの検出方法および抑制方法」 2006. 3. 22
- 3) 特願 2006-109312 「がん関連欠失遺伝子マーカーを用いたがんの診断方法」 2006. 4. 12
- 4) 特願 2006-118030 「VLDLR 遺伝子の検出による胃がんの検出方法」 2006. 4. 21
- 5) 特願 2006-204601 「がん抑制剤」 2006. 7. 27
- 6) 特願 2006-255155 「多発性骨髄腫の検出方法および制御方法」 2006. 9. 21
- 7) 特願 2006-303331 「食道がんの検出方法」 2006. 11. 8
- 8) 特願 2006-342462 「がんの診断マーカーならびに治療の標的分子 OSLC1」 2006. 12. 20
- 9) 出願番号：特願 2005-266127 (日本)
 発明者：村上善則、増田万里
 発明の名称：がんの診断、処置および／または予防、および／または浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法。
 出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、出願日：2005年9月13日、
 国際特許分類：A61K、国内優先権出願、出願日：2006年9月13日、出願番号：2006-248753
- 10) 出願番号：特願 2005-380332、発明者：村上善則、発明の名称：小細胞肺がんの診断のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法、出願人：国立がんセンター、出願日：2005年12月28日、PCT 出願
 発明の名称：小細胞肺がんの診断のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法
 優先日：2005/12/28 (2005-380332)
 PCT 出願：PCT/JP2006/325937 号
 (2006/12/26 出願)、国内移行期限：2008/06/28、伺い予定：2008/02/28
 指定国：全、法域：PCT、日本指定の取り下げ予定：なし、出願人：国立がんセンター総長、発明者：村上善則、優先権主張：2005/12/12 *JP2005-380332
- 11) 「がんにおける転写異常活性の抑制法」、特許出願準備中
- 12) 消化管間質悪性腫瘍 (GIST) を処置するための医薬組成物、ならびに消化管間質悪性腫瘍を患う患者の予後を予測するためのキットおよび方法
- 13) 出願：Hedgehog シグナル活性調節剤、細胞増殖調節剤及びその使用方法。坂元亨 宇他 2 名、2006. 11. 24、特願 2006-317576
2. 実案新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

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

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

分担研究者 廣橋 説雄 国立がんセンター研究所長

研究要旨

本研究班で独自に開発した高密度 BAC アレイを用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション法により、肝・膵等における多段階発がん早期のゲノム構造異常を網羅的に明らかにした。ゲノム構造異常の蓄積過程が複数の組み合わせで並立し、多段階発がん過程が進展していることを示した。ゲノム構造異常を高頻度に認める染色体領域に位置する遺伝子の解析から、治療標的候補の同定を進めた。

ゲノム構造異常は最終的にはプロテオームに翻訳されるので、本研究では、蛍光二次元電気泳動法を改良したり、質量分析機を低流速の多次元液体クロマトグラフィーに直接接続することで、プロテオーム解析技術の革新を図ってきた。がん組織の蛋白質プロファイルと臨床病理情報と結びつけ、がんの個性に対応する蛋白質を同定し、個別化医療のためのバイオマーカー開発を目指してきた。本年度は、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移を高い精度で予測できる蛋白質として、フェチンを特定した。

TCF-4 の結合蛋白としてポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) と Ku70 を同定した。PARP-1 は TCF-4/ β -カテニンの転写活性を増強し、未分化な腸上皮細胞や大腸腺腫では、 β -カテニンと共に強発現していた。RNA 干渉による Ku70 の発現抑制は、TCF-4/ β -カテニン間の結合と転写活性を増強し、その標的遺伝子の発現量を増加させた。PARP-1 と Ku70 が協調して Wnt シグナルの作用を制御し、早期大腸発がんに寄与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

独自に開発してきた高精度なゲノム解析技術を用い、諸臓器のがんにおけるジェネティックな遺伝子異常を網羅的に把握し、がんの個性を新しい視点から分類・整理することを目指した。独自に開発してきたプロテオーム解析技術を用い、本年度は、消化管間葉系悪性腫瘍の術後再発を予測するバイオマーカーの開発を目指した。 β -カテニンと TCF-4 の転写複合体には大腸がんの治療標的の候補分子を含む可能性が高いと考え、プロテオーム解

析技術を用い、その構成蛋白を網羅的に探索することを目指した。

B. 研究方法

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) を用いて、比較ゲノムハイブリダイゼーション法によるゲノム構造異常の網羅的な探索を行った。肝がん 87 症例・膵がん 44 症例の手術

検体を検討の対象とした。全症例でレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を施行し、組織標本からがん細胞のみを選別し、解析に供した。得られたゲノム異常プロファイルを経典病理像と照合し、がんの病理組織像や症例の臨典的な特性と相関するゲノム構造異常の抽出を行った。

手術後1年以内に転移を来した消化管間葉系悪性腫瘍8症例と、2年以上転移を来さなかった9症例について、原発巣の蛋白質発現プロファイルを経典二次元電気泳動法で調べた。症例ごとに得られた蛋白質発現プロファイルを数値情報に変換し、種々のバイオインフォマティクス手法を用いて、術後再発した症例を無再発の症例と区別するに有用な蛋白質スポットを検出した。ゲルから蛋白質を回収して質量分析を行い、データベースと照合して蛋白質を同定した。mRNAの発現をDNAマイクロアレイ解析ならびに定量的RT-PCR法で、蛋白質発現を特異抗体を用いたウェスタン法で、それぞれ確認した。追加した210症例について、蛋白質発現を免疫組織化学的に評価し、術後転移および生存との相関を調べた。

FLAG エピトープタグを結合したTCF-4を一過性に培養大腸がん細胞に発現させ、免疫沈降を行い、質量分析を用いて共同沈降する複合体に含まれる蛋白質を網羅的に同定した。

C. 研究結果

肝がん臨床検体87症例における染色体構造異常の全体像を明らかにし、構造異常の組み合わせに基づく肝がんの分類を行なった。構造異常に基づく肝がんの亜分類から、8qの増幅、1q・16qの増幅、17qの増幅といった各群に特徴的な染色体異常が抽出された。発現解析の結果と照合し、17qの増幅の標的のひとつとして、mTOR経路で作用するS6キナーゼを同定した。培養肝がん細胞において、17qの増幅とmTOR経路の阻害剤であるラパマイシンに対する感受性に有意な相関を認め

た。mTOR経路が、肝がんの新しい治療標的となる可能性が示唆された。

肝がんにおけるジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常の相互の関係を理解する目的で、染色体不安定性とDNAメチル化不安定性の相関について検討を行なった。9箇所のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の状態を評価し、染色体不安定性との相関を検討した。染色体不安定性の少ない肝がんの一部に、DNAメチル化不安定性が強いグループが見られた。肝炎ウイルス感染とゲノム不安定性の間に有意な相関を認めた。

結節内結節型肝がんの解析により、5qの非常に狭い領域が肝がんの悪性進展に伴い欠損することを見いだした。5qの当該領域にあるAPC (adenomatous polyposis coli)がん抑制遺伝子の体細胞遺伝子変異を、肝がんにおいて初めて報告した。

膵がん44症例の手術検体の染色体構造異常を網羅的に解析し、さらにはがん組織の免疫不全マウス移植株における網羅的な発現解析の結果と照合することで、高頻度に増幅を認める領域に位置する膵がんの治療標的候補分子の同定をすすめた。膵がんの悪性度や患者生命予後と相関する、染色体構造異常を同定した。

蛍光二次元電気泳動法により、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移と発現が相関する43個の蛋白質スポットを同定した。質量分析の結果、これら43個の蛋白質スポットは、25個の異なる遺伝子産物であることが分かった。このうちのひとつであるフェチンの発現が術後転移と逆相関することを、ウェスタン法・免疫組織化学にて確認した。mRNAレベルでもフェチンは転移陽性・陰性の2群間で発現差を示した。210症例を対象とする免疫染色を追加し、術後転移や生存と有意な逆相関があることを確認した。

Ku70・ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1)などの核蛋白質が、TCF-4と複合

体を形成することが分かった。PARP-1の発現亢進は、 β -カテニンによるTCFの転写活性を増強したが、その酵素活性は必要としなかった。RNA干渉によりPARP-1の発現を低下させると、その転写活性および細胞増殖が抑制された。アルキル化剤によるDNA損傷で起こるPARP-1の自己修飾は、TCF-4との結合を阻害した。家族性大腸腺腫症（FAP）およびその実験モデルであるMinマウスの腺腫では、PARP-1の発現は β -カテニンと共に増加していた。

RNA干渉によるKu70の発現抑制は、TCF-4/ β -カテニン間の結合と転写活性を増強し、その標的遺伝子の発現量を増加させた。アルキル化剤であるブレオマイシン処理によってDNA切断が生じると、PARP-1は自己ポリADPリボシル化されTCF-4から乖離したが、Ku70の結合は逆に増強し、相乗的にTCF-4/ β -カテニンの転写活性を抑制すると考えられた。

D. 考察

高密度ゲノムアレイによる網羅的な染色体構造異常解析を多数の臨床検体に対して進め、それぞれの臓器がんにおける特徴的なゲノム構造異常の蓄積過程を示した。ウイルス感染などの発がん要因とゲノム構造異常の関係を示すとともに、分子治療標的候補を同定することができた。腫瘍の悪性度や予後といった臨床病態と相関するゲノム構造異常の同定も進み、病態診断への基盤が整備された。

消化管間葉系悪性腫瘍には、チロシンリン酸化酵素阻害剤のイマチニブ（グリベック）が奏効することが報告されている。しかし、消化管間葉系悪性腫瘍の治療は手術が第一選択であり、グリベックは手術不能症例に適用されている。再発・転移に対する外科手術の治療効果は必ずしも高くないことから、再発・転移症例にもグリベックの適用が検討されている。他方、グリベックには腫瘍出血などの重篤な副作用も報告され、補助化学療法と

してのグリベックの使用についてのエビデンスは国内外で確立していない。したがって、再発・転移を予測し適応症例を正しくみきわめることが、グリベックによる治療プロトコルの確立・治療成績の向上に貢献するとき対される。本研究で同定したフェチンは、蝸牛に発現するカリウムイオンチャンネル蛋白質である。フェチンの発現は、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移と高い逆相関を示すことから、術後転移の予測マーカーとなり得ると考えられた。術後転移が予測される症例に早期からグリベックを投与することで、治療成績を向上させる得る可能性がある。

TCF-4は腸上皮の分化を制御する転写因子であり、Wntシグナル伝達のエフェクター分子 β -カテニンの結合で活性化され、その標的遺伝子の発現異常が大腸発がんに寄与する。 β -カテニンとTCF-4の転写複合体には、大腸がんの治療標的の候補分子を含む可能性が高いと考えられたので、複合体構成蛋白の網羅的同定を試みた。TCF-4が、核内で、PARP1やKu70のようなDNA損傷の認識や修復に係わる分子と相互作用することが分かったので、Wntシグナル伝達機構が、従来知られている遺伝子転写制御の機能以外に、DNA損傷にも関わる可能性があると考えられた。

E. 結論

諸臓器における多段階発がん過程早期のゲノム構造異常を明らかにするとともに、がんの発生・進展においてゲノム異常蓄積過程が複数の組み合わせで並立していることを見いだした。がんにおけるジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常の相関の理解が進んだ。

フェチンの臨床応用に向けた取り組みとして、モノクローナル抗体の作製と大規模なスクリーニングを行うための多施設共同研究体制の構築を目指している。

本研究で改良・開発を進めてきた蛍光二次

元電気泳動法ならびに質量分析機と低流速多次元液体クロマトグラフィーの直接接続により、蛋白質の高感度な検出が可能となった。本研究で実施したように、最新のプロテオーム解析技術を、内因性蛋白の特異的な結合を高感度に検出し得る免疫沈降法と組み合わせることにより、シグナルクロストークに関わるがん関連蛋白の同定を効率的に進め得ると期待される。最新のプロテオーム解析技術を、諸臓器の悪性腫瘍の多数の臨床検体に適用することで、臨床的に重要なバイオマーカーをさらに開発し得ると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Kosuge T, Kanai Y, Hirohashi S. Genetic inactivation of the APC gene contributes to the malignant progression of sporadic hepatocellular carcinoma: A case report. *Gene Chrom Cancer*, 45: 1050-1057, 2006.
2. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Fukayama M, Kanai Y, Hirohashi S. Epigenetic instability and Chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 168: 1375-1384, 2006.
3. Okano T, Kondo T, Kakisaka T, Fujii K, Yamada M, Kato H, Nishimura T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 6: 3938-3948, 2006.
4. Suehara Y, Kondo T, Fujii K, Hasegawa T, Kawai A, Seki K, Beppu Y, Nishimura T, Kurosawa H, Hirohashi S. Proteomic signatures corresponding to histological classification and grading of soft-tissue sarcomas. *Proteomics*, 6: 4402-4409, 2006.
5. Fujii K, Kondo T, Yamada M, Iwatsuki K, Hirohashi S. Toward a comprehensive quantitative proteome database: proteome expression map of lymphoid neoplasms by 2-D DIGE and MS. *Proteomics*, 6: 4856-4876, 2006.
6. Hatakeyama H, Kondo T, Fujii K, Nakanishi Y, Kato H, Fukuda S, Hirohashi S. Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. *Proteomics*, 6: 6300-6316, 2006.
7. Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzuki H, Hirohashi S, Yamada T. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 5: 1338-1347, 2006.
8. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: Identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98: 392-400, 2007.

9. Kondo T, Hirohashi S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor Saturation Dye) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat Protocol*, 1: 2940-2956, 2007.
10. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Matsuno Y, Gemma A, Kato H, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 799-805, 2007.
11. Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Involvement of Splicing Factor-1 in β -Catenin/T Cell Factor-4-mediated Gene Transactivation and Pre-mRNA Splicing. *Gastroenterology*, in press.
12. Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, in press.
13. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate β -catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
 - ・消化管間質悪性腫瘍 (GIST) を処置するための医薬組成物、ならびに消化管間質悪性腫瘍を患う患者の予後を予測するためのキットおよび方法 (特許出願準備中)
 - ・がんにおける転写異常活性の抑制法 (特許出願準備中)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

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

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室教授

研究要旨：本研究では膵がん、肺がん、肝がんそして卵巣がん、皮膚がんなどを対象として、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、各臓器がんの多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにするとともに、新しい診断・治療法への応用の可能性につき検討した。平成18年度の具体的な成果としては、G蛋白共役型受容体 Gpr49 が皮膚基底細胞がんでは過剰発現し、SHh シグナル伝達系の下流で発現が制御されていること、基底細胞がんの増殖に関与していることを明らかにした。さらにこの Gpr49 は肝細胞がんにおいても過剰発現を認めるが、肝細胞がん株では、Wnt- β カテニン系のターゲット分子であることを示した。転写因子 HNF1 β の発現は卵巣がんの中で明細胞腺がん特異的診断マーカーであるのみならず予後因子としても有用であることを示した。

A. 研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な病理像を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。本研究では、臓器がんにおける網羅的遺伝子発現解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的とする。具体的には、厚生労働行政上も緊急の課題である難治がんの代表である膵がん、肺がん、肝がんそして卵巣がん、皮膚がんなどを対象として、個々の臨床病理学的特性と対応させた遺伝子発現異常の解析を行い、その本態の解明と、得られた成果の診断・治療への応用を目指す。DNA マイクロアレイに代表される網羅的遺伝子発現解析技術は、医学の診断や治療に大きな影響をもたらすことが期待されているが、病理診断との対応のみに留まる結果が多く、実際の臨床に応用されている成果は極めて少ない。本研究が目指す、個々の臓器がんの特有な病理像に着目した遺伝子発現解析研究は、新しい疾患概念の確立、病態の理解に留まらず、診断・治療の標準化、臨床応用可能な新しい診断・治

療法の開発につながるものと期待され、今後国家レベルで推進が期待されるトランスレーショナルリサーチの基盤となると考えられる。

B. 研究方法

多彩なヒトの病理材料を対象に、がんの病態解明を目指す本研究課題にあっては、以下の3つのアプローチを統合的に行う。(1)病理材料に発現する遺伝子の網羅的解析。(2)病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖転移モデル開発と、それを用いた発現解析ならびに機能解析(3)臨床材料におけるレトロスペクティブ・プロスペクティブな大規模検討による有用性の検証。

(1)の遺伝子発現解析には、DNA マイクロアレイを用いるが、得られた遺伝子群は、in situ hybridization、免疫組織化学による組織での発現の局在、病理像との対応を詳細に検討し病態との関連を絞り込む。臨床材料では、検体量が十分得られず、機能解析が行えない等の欠点もあるため、それを補う手段として(2)モデル系の開発は不可欠であり、免疫不全マウスを用いたがん細胞ないしがん組織の同所移植による

増殖転移モデルを開発する。モデルの腫瘍組織を用いて(1)と同様に網羅的遺伝子発現解析を行う。また(1)で同定された遺伝子を導入あるいは knock-down し、in vitro と in vivo での機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。このモデルを用いた転移の抑制などの治療実験は、前臨床試験として有用であるのみならず、分子の病態への関与をより明らかにすることが期待される。以上の解析で同定された分子群について病態の解明と診断・治療への応用の検討を行うために、(3) 実際の臨床材料を用いた大規模解析を行う。最終的にヒトがんの病態への関与が示された新規分子については、その分子生物学的解析を進め、その生物学的機能を一層解明する。また臨床的意義が確認されたものについては、実際の臨床応用を目指す。治療への応用としては、遺伝子操作以外に、特異的阻害剤、抗体などの利用につき検討する

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化を解析することを目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する。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」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C. 研究結果

1. 基底細胞がんの遺伝子発現解析

1) 基底細胞がんは主として中高年者の顔面領域の皮膚に生じ、皮膚がんの中では最

も発症率が高いとされているがんである。基底細胞がんは Sonic Hedgehog シグナル伝達経路の異常により生じる事が明らかとなっているが、そのシグナル伝達経路の下流より発現する遺伝子については未解明なものが多い。そこで、DNA マイクロアレイにより基底細胞がん有意に発現する遺伝子を解析し、新規遺伝子 G protein coupled receptor 49 (Gpr49) を同定した。定量的 PCR にて Gpr49 は基底細胞がん手術検体にも有意に高発現していた。in situ hybridization 法では、GPR49 が腫瘍細胞内に特異的に発現している事が示された。マウス基底細胞がんの細胞株 ASZ001 を入手し、細胞株に Hedgehog signaling pathway を抑制する化学物質である cyclopamine を投与することにより、Gpr49 の発現の低下を認めた。一方不死化ヒト表皮細胞株 HaCaT に Gli1 発現ベクターを導入する事により、Gpr49 の発現増強を認めた。Hedgehog signaling pathway に易反応性の胎児マウス線維芽細胞株 NIH3T3 に hedgehog の agonist である purmorphamine を作用させる事あるいは Gli1 発現ベクターを導入する事によっても Gpr49 の発現量の増加を認めた。機能解析として ASZ001 に対して Gpr49 に対する RNA interference を施行し、Gpr49 の発現低下とともに細胞増殖が低下することを示した。一方 HaCaT 細胞に対して Gpr49 の発現ベクターを導入し、GPR49 を過剰発現させた細胞は mock 発現ベクターを導入した細胞に比して有意に細胞増殖が亢進することを確認した。さらに GPR49 を過剰発現させた HaCaT 細胞を免疫不全マウスに移植したところ、有棘細胞がん様の病理を呈する腫瘍形成が認められた。

2. 肝細胞がんの遺伝子発現解析

これまでの研究で、肝細胞がん (HCC) における β -catenin の変異と G-蛋白共役受容体 Gpr49 の発現が強い相関関係にあることを報告した。今回は Gpr49 の HCC における高発現機序を検討した。Gpr49 の発現は Glycogen synthase kinase-3 β 阻害剤による Wnt シグナルの活性化により強く促進され、その作用は阻害剤の濃度および時間依存的であった。また、Wnt シグナルの特異的阻害物質により Gpr49 の発現が抑制された。Gpr49 の転写制御領域には TCF/LEF コンセンサス配列が存在し luciferase reporter assay によりプロモーターの活性化が認められた。

3. 卵巣明細胞腺がんの遺伝子発現解析
卵巣がん細胞株の遺伝子発現解析から、HNF1 β が卵巣明細胞腺がんの分子マーカーならびに治療標的として有用であることを示し、細胞診断にも有用であることを示してきた。今回、その発現の意義、予後因子としての有用性を検討した。163 例の各種組織型腺がんの組織標本を対象に免疫組織化学的に HNF1 β タンパク発現を、glycogen 消化試験で glycogen 発現を評価した。明細胞腺癌では、他組織型と比較し HNF1 β タンパクおよび glycogen が高発現しており ($P < 0.01$)、HNF1 β と glycogen の発現量との間に正の相関を認めた ($P < 0.01$)。さらに HNF1 β あるいは glycogen の高発現群は低発現群と比較して予後良好であり ($P < 0.01$)、中発現群はその中間であった。多変量解析によって glycogen 発現量は独立した予後因子であることが判明した ($P < 0.01$, hazard ratio=0.729, 95%CI=0.573 to 0.928)。

D. 考察

1. 基底細胞がんの遺伝子発現解析

今回の結果から、Gpr4 が Sonic Hedgehog signaling pathway の標的遺伝子として発現し、がん遺伝子としての機能を有する可能性が示唆された。本遺伝子は膜蛋白質をコードすることから、治療標的としても興

味深いと考えられる。また、肺小細胞がん、前立腺がん、膵管がんなかでも前がん病変 (PanIN) においても SHh 経路が亢進していることが報告され、他のがんの発生にも関わっていることが示唆されることから、これらのがんにおける意義も合わせて解析する。

2. 肝細胞がんの遺伝子発現解析

Wnt シグナル伝達系は多くの癌の発生過程において重要な働きをしていることが報告されているが、HCC においては 20-40% に Wnt シグナルの活性化が認められ注目されている。Gpr49 は TSH や hCG などの糖蛋白ホルモン受容体ファミリーに属し、高発現により腫瘍原性を示すものが報告されていることから、Gpr49 の特性を明らかにすることは HCC の発生機序を解明する上で極めて重要と考えられる。今回の結果は、Gpr49 が Wnt シグナル伝達系のターゲット遺伝子のひとつであることを示している。今後 Gpr49 の発現抑制による HCC への作用を検討し、肝発がんにおける Gpr49 の役割を明らかにする。

3. 卵巣明細胞腺がんの遺伝子発現解析

肝臓では glycogen 産生調節を司る転写因子 HNF1 β の明細胞腺がんにおける発現を検討して予後関連因子としての有用性を検討した。その結果、HNF1 β が glycogen 量と相関しつつ明細胞腺がんにて特異的な高発現を示したことから、HNF1 β は肝臓と同様の機序によって明細胞腺がんの特徴の一つである glycogen 発現を規定している可能性が考えられた。HNF1 β および glycogen の発現量は明細胞腺がんの分化の程度を示していると考えることが出来、発現が増加するにつれ予後が有意に良好になることから、これまで明細胞腺がんにはなかった Grade 分類への応用が考えられる。

E. 結論

本研究では膵がん、肺がん、肝がんそして卵巣がん、皮膚がんなどを対象として、網

羅的遺伝子発現解析を行うことで、各臓器がんの多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的としている。18年度までの研究で、初期肺腺がん特異的な発現を示す分子の同定、卵巣明細胞腺がん分子マーカーの細胞診断への応用と臨床的意義の解析、膵がんで過剰発現する新規分子の同定に加えて皮膚基底細胞がんで過剰発現しSHhの下流で発現すると考えられる新規遺伝子 Gpr49 の同定・機能解析、肝細胞がんの悪性化に伴って発現亢進する分子の同定・解析を行った。今後も、個々の臨床病理学的特性と対応させた遺伝子発現異常の解析を継続して行い、その本態の解明と、得られた成果の診断・治療への応用を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, Sakamoto M: Establishment of Perineural Invasion Models and Analysis of Gene Expression Revealed an Invariant Chain (CD74) as a Possible Molecule involved in Perineural Invasion in Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res 12(8):2419-2426, 2006.
- 2) Takaysu K, Muramatsu Y, Mizuguchi Y, Okusaka T, Shimada K, Tkayama T, Sakamoto M: CT Evaluation of the Progression of

Hypoattenuating Nodular Lesions in Virus-Related Chronic liver Disease. AJR 187: 454-463, 2006.

3) Shibata R, Mori T, Du W, Chuma M, Gotoh M, Shimazu M, Ueda M, Hirohashi S, Sakamoto M: Overexpression of cyclase-associated protein 2 in multistage hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res 12(18):5363-5368, 2006.

4) Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M: Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. Cancer Gene Therapy 14: 74-81, 2007

5) Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T: Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. Cancer Sci 98: 147-154, 2007.

6) Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M: Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis. Cancer Sci, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願: Hedgehog シグナル活性調節剤、細胞増殖調節剤及びその使用方法。坂元亨宇、他2名。

2006. 11. 24、特願 2006-317576。

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に関する研究

分担研究者 稲澤 譲治 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究要旨

微細ゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出するゲノム解析ツールとして高密度・高精度のin-house CGHアレイシステムを確立した。さらに、DNAメチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法であるBAC array-based MCA (BAMCA)法や、特定DNA配列に結合する蛋白の解析ツールとしてクロマチン免疫沈降法とゲノムアレイを組み合わせたChIP-on-chip法を開発した。これらの技術を駆使することにより、種々の病型のがんに関連するがん遺伝子、がん抑制遺伝子候補を同定した。これらはがんの個性診断のバイオマーカーならびに分子標的治療の標的分子としても期待できる。

A. 研究目的

ポストゲノム時代に入り、ゲノム情報に基づいてがんの分子病態を包括的に理解し、がん医療に資する成果を上げることが強く望まれている。このことから、高精度ゲノムアレイシステムによる潜在的がん特異的ゲノム異常の探索研究を実施して、新規のがん関連遺伝子を同定するとともに難治性がんの画期的診断、治療、予防法を開発することを目的に研究を実施する。

B. 研究方法

各種のがんにおいて微細ゲノム構造異常や機能的DNAエレメントをゲノムワイドに検出するシステムを開発し、これを用いて潜在的ゲノム構造異常や機能的DNAエレメントの探索を行う。併せて遺伝子の網羅的発現解析を行い、これら統合的解析結果に基づき、各種がんにおいて「phenotype/genotype correlation」を包括的に理解する。特に治療法開発に直結する難治性がんの病態解明を目的とする。今年度は、ゲノムアレイの応用により、DNAメチル化領域の探索法や特定タンパクの結合DNAエレメントの検出などの方法を確立する。

（倫理面への配慮）

今回の研究の遂行にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」（2004年12月28日文科科学省、厚生労働省、経済産業省、倫理指針ならびに個人情報保護ガイドライン）を遵守すると共に、東京医科歯科大学をはじめ各研究機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施する体制を整えている。

C. 研究結果

1. 高精度CGHアレイと応用法の開発

高精度のアレイCGHを開発した。具体的には、① MCG Whole Genome Array-4500：4523個のBACクローンを配置した全ゲノムをカバーする高密度ゲノムアレイ、② MCG 1p36 Contig Array：染色体1p36の20Mbを間断なくカバーしたアレイ、③ MCG Cancer Array-800：がん関連遺伝子800種類の解析を可能とする「がん個性診断」用アレイなどである。これらのゲノムアレイは、わずか数10kbのヘミ欠失を検出する精度であり、がんの特異的な染色体コピー数異常の解析の強力なツールとなっている。さらに、これらアレイを用いたDNAメチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法であるBAC array-based MCA (BAMCA)法や特定蛋白結合DNA領域の探索法であるChIP onBAC-array法を開発した。(Inazawa J et al., Cancer Sci. 2004, review)

1) 消化器癌の癌関連遺伝子の同定

胃癌：胃癌は日本人での発生頻度の高い癌である。胃癌細胞株のアレイCGH解析で見出したホモ欠失をランドマークに胃癌抑制遺伝子の同定を進めている。昨年2q33.3ホモ欠失よりADAM23がgenetic/epigeneticな機構により機能消失する胃癌抑制遺伝子の候補であることを明らかにした。(Takada et al., Oncogene 2005) 引き続き、2006年は9p24.2ホモ欠失の標的遺伝子がVLDLRであることを明らかにした。VLDLRプロモーターはメチル化により高頻度に不活化されていた。臨床検体においても高頻度にメチル化を検出し、またVLDLR type Iを胃癌細胞株に強制発現すると増殖抑制効果を示したことから、本遺伝子は胃癌抑制遺伝子候補と考えられた。(Takada et al., Oncogene 2006)

食道癌：当研究室ではBACアレイを用いてDNAメチル化領域をゲノムワイドに探索する手法であるBAMCA法を開発し神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子候補NR1I2を同定した。(Misawa, Inoue et al., *Cancer Res* 2005)

今回、このBAMCA法を用いて食道扁平上皮癌細胞株をスクリーニングしてDNAメチル化領域を探索し、異常DNAメチル化の標的遺伝子候補としてCRABP1を同定した。CRABP1のプロモーター領域のメチル化は臨床検体でも認められ、発現低下は遠隔リンパ節転移と関連していた。さらにCRABP1強制発現による細胞増殖抑制作用から、食道癌抑制遺伝子候補と考えられた。(Tanaka et al., *Oncogene* 2007)

2) 口腔癌の癌関連遺伝子解析

すでに食道扁平上皮癌でホモ欠失またはプロモーターのメチル化により不活化される癌抑制遺伝子候補として同定したLRP1Bの口腔癌での異常とその意義を検討した。口腔癌では細胞株、臨床検体において高頻度にメチル化で不活化された。LRP1Bのメチル化と臨床病理学的因子との関連は明らかでなかったが、口腔癌発生に関与する可能性がある。

(Nakagawa et al., *Cancer Sci.* 2006)

体系的な遺伝子シーケンスにより肺癌や大腸癌でPIK3CAの遺伝子変異が比較的高頻度に見つかっており、分子標的治療の標的としても注目をあびつつある。今回、口腔扁平上皮癌でPIK3CA遺伝子変異ならびにPI3K-AKTシグナル伝達系の活性化の状態を調べたところ、その遺伝子変異を約10%に見出した。また、その異常は口腔扁平上皮癌の発症進展過程の後期に起こり、PIK3CAの遺伝子変異が遺伝子増幅に比して優位であること、さらに、PIK3CAを癌治療の分子標的とするには同遺伝子変異に特異的な阻害剤の開発が必須であることを明らかにした。

(Kozaki et al., *Cancer Sci.* 2006) 本研究成果はCancer Scienceのハイライトで紹介された。

3) 肺癌の新規癌関連遺伝子の同定

Whole Genome Array-4500を用いてNSCLCの20細胞株のゲノム異常スクリーニングを行い、1例で新規13q21.2ホモ欠失を検出し、Protocadherin 20(PCDH20)が標的遺伝子であることを明らかにした。PCDH20のmRNAレベルでの発現は細胞株の52.6%(10/19)で消失し、これがPCDH20遺伝子プロモーターのメチル化に起因することを明らかにした。さらにNSCLC臨床検体59例の解析で、その54.2%(32/59)にメチル化を検出し、PCDH20メチル化陽性例は有意に予後不良であり、多変量解析の結果、他の臨床病理学的諸因子とは独立のバイオマーカーで

あることを示した。(Imoto et al., *Cancer Res* 2006) 本研究成果は日経新聞朝刊(2006年10月16日)の科学覧でも紹介された。

4) 甲状腺未分化癌の新規癌関連遺伝子の同定
甲状腺未分化癌(Anaplastic thyroid carcinoma, ATC)は全ての癌の中で最も予後不良であり発症の分子機構の詳細は不明である。有効な治療法も確立されていない。ATC細胞株のアレイCGH解析を行い

検出した8p12共通増幅領域から標的癌遺伝子候補のDUSP26を同定した。DUSP26は機能ドメイン構造予測よりdual specificity phosphatase domainを有する脱リン酸化酵素であると考えられる。ATC細胞株でのDUSP26強制発現とノックダウンにより細胞増殖促進と抑制効果が認められ、この効果はp38MAPKを基質としたアポトーシス抑制作用に起因する可能性が示唆された。(Yu et al., *Oncogene* 2007)

5) グリオーマの新規癌抑制遺伝子の発見

アレイCGHと網羅的発現の統合解析よりグリオーマの高頻度13q欠失の標的遺伝子候補としてRGC32を同定した。RGC32は臨床検体でも進行かつp53点突然変異例で発現が低下していた。RGC32は転写因子p53の直接標的であることを明らかにした。細胞分裂期に中心体に局在し、Plk1と結合して細胞周期進行を抑制することで細胞増殖の抑制作用を持つ癌抑制遺伝子の可能性が示唆された。本研究成果は掲載紙Oncogeneのハイライトで紹介された。(Saigusa et al., *Oncogene* 2007)

2. その他の癌関連の共同研究成果

① 国立がんセンター研究所柴田龍弘博士、広橋説雄所長らとの共同研究により膵癌臨床検体44例のアレイCGH解析により検出した増幅・欠失領域から、治療や予後予測に有用な遺伝子候補が明らかになった。(Loukopoulos et al., *Cancer Sci* 2007)

② SeparaseのKOマウスの線維芽細胞は分裂期において染色体の離のみが異常になり、染色体の濃縮や細胞質分裂あるいは細胞周期の他の時期の細胞機能に影響を与えないことを癌研・野田哲生博士らとの共同研究で明らかにした。(Kumada K et al., *J Cell Biol* 2006)

③ 食道扁平上皮癌においてオーロラキナーゼの発現亢進が遠隔リンパ節転移や予後不良予測のバイオマーカーになることを京大・嶋田裕博士との共同研究で明らかにした。(Tanaka E et al., *Clin Cancer Res* 2007)

3. ゲノムアレイの応用技術開発

ポストシーケンス以降のゲノム研究である ENCODE (Encyclopedia of DNA functional element) プロジェクトを視野に、現在、ゲノムアレイを解析のプラットフォームにした応用技術開発を進めている。

1. メチル化 DNA 領域の解析法 BAMCA の開発

DNA メチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法として、BAC アレイ上で MCA (methylated CpG island amplification) 法を展開する BAC array-based MCA method (BAMCA 法) を確立した。(Inazawa et al., Cancer Sci, 2004, review) 現在、この BAMCA 法により、口腔・食道扁平上皮癌をはじめとする各種の病型で癌特異的メチル化 DNA 領域のゲノムワイドスクリーニングを行い、幾つかの癌抑制遺伝子候補を同定している。

2. 蛋白結合 DNA 領域の染色体ワイド検出法 ChIP on BAC-array の開発

当研究室において BAC アレイとクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を組み合わせた “ChIP on BAC-array” 法を確立し、癌や発生に関与する転写因子結合領域の染色体ワイド解析を進めている。

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り、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. 研究発表

1. 論文発表

1. Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J. RGC32, a Novel p53-inducible Gene, is Located on Centrosomes during Mitosis and Results in G2/M Arrest. *Oncogene* 26: 1110-1121, 2007
2. Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J: A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene* 26:1178-87, 2007
3. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: Identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci.* 98:392-400. 2007
4. Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y. The Suppression of Aurora-A/STK15/BTAK Expression Enhances Chemosensitivity to Docetaxel in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13:1331-1340, 2007
5. Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced Levels of ATF-2 Predispose Mice to Mammary Tumors. *Mol Cell Biol.* 27:1730-44. 2006
6. Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J: PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 97: 1351-8, 2006
7. Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Sakakura C, Mitsufuji S, Hirohashi S, Inazawa J: Genomic loss and epigenetic silencing of very low density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis. *Oncogene* 25:6554-62, 2006
8. Nakagawa T, Pimkhaokham, A, Suzuki E, Omura K, Inazawa J, Imoto I: Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 97:1070-4, 2006

9. 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.* 66:4617-26, 2006
10. Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T: The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol.* 172:835-46, 2006
11. 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.* 116:80-9, 2006

2. 学会発表

1. Inazawa J: Cancer genomic and epigenomic analyses on a BAC-array platform. 7th AACR/JCA Joint International Conference (Hawaii, USA) 22/January/2007
2. Inoue J, Misawa A, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Hosoda F, Ohki M, Issei Imoto I, Inazawa J: Methylation-associated silencing of NR112 in advanced-type neuroblastomas, identified by BAC array-based methylated CpG island amplification (BAMCA). 97th annual meeting of American Association for Cancer Research 2006 (Washington D.C. USA) 2/April/2006
3. Imoto I, Izumi H, Takada H, Tanaka K, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, 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. 97th annual meeting of American Association for Cancer Research 2006 (Washington D.C. USA) 2/April/2006
4. Yokoi S, Inoue J, Imoto I, Inazawa J: Identification of novel E2F1 target genes detected on a BAC-array platform. 97th annual meeting of American Association for Cancer Research 2006 (Washington D.C. USA) 2/April/2006
5. Kozaki K, Suzuki E, Pimkhaokham A, Imoto I, Inazawa J: *PIK3CA* mutations in oral squamous cell carcinoma. 97th annual meeting of American Association for Cancer Research 2006 (Washington D.C. USA) 4/April/2006
6. 稲澤譲治: ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム、エピゲノム解析. 第3次対がん10か年総合戦略第1回合同シンポジウム. 東京. 2006年2月6日
7. 稲澤譲治: ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんと遺伝疾患のゲノム、エピゲノム解析. 第42回日本肝臓学会総会. 特別講演. 京都. 2006年5月25日
8. 稲澤譲治: ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム、エピゲノム解析. 札幌医科大学医学部附属がん研究所50周年記念講演会. 札幌. 2006年7月7日
9. 稲澤譲治: 分子細胞遺伝学的アプローチによるがん関連遺伝子の探索. JCA-Mauverney Award受賞講演 (Clinical). 第65回日本がん学会学術総会. 横浜. 2006年9月29日
10. 井本逸勢、稲澤譲治: In-house BACアレイを用いたがんのゲノム構造・機能異常解析からの分子標的探索. 第65回日本がん学会学術総会. 横浜. 2006年9月30日
11. 稲澤譲治: ゲノムアレイプラットフォームで展開するがんのゲノム・エピゲノム解析. 第44回日本がん治療学会総会. 東京. 2006年10月19日
12. 稲澤譲治: 染色体異常症の最新の知見. 第4回COE国際ワークショップ 遺伝子・染色体病の診断治療の最前線. 名古屋. 2006年12月4日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許申請

1. 特願2006-078786 「がん抑制剤」 2006. 3. 22.
2. 特願2006-078787 「がんの検出方法および抑制方法」 2006. 3. 22
3. 特願2006-109312 「がん関連欠失遺伝子マーカーを用いたがんの診断方法」 2006. 4. 12.
4. 特願2006-118030 「VLDLR遺伝子の検出による胃がんの検出方法」 2006. 4. 21.
5. 特願2006-204601 「がん抑制剤」 2006. 7. 27
6. 特願2006-255155 「多発性骨髄腫の検出方法および制御方法」 2006. 9. 21.
7. 特願2006-303331 「食道がんの検出方法」 2006. 11. 8.
8. 特願2006-342462 「がんの診断マーカーならびに治療の標的分子OSLC1」 2006. 12. 20 :

2. 実用新案登録 特記事項なし

3. その他 特記事項なし

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

研究要旨

胃がんにおける多段階発がん過程の解明と新規がん関連遺伝子同定を目的として、BAC アレイ CGH 法によるゲノム構造異常の網羅的解析を行ってきた。本年度はびまん性未分化型胃がん 53 症例の解析を追加し、胃がん全体の構造異常プロファイル进行分析した。また、胃がんの網羅的発現解析を実施し、これまでに絞り込んできたゲノム構造異常領域内で遺伝子コピー数と発現が相関するがん関連候補遺伝子を抽出した。

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網羅的に収集し、がんの性質を規定するゲノム構造異常の抽出と、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多段階発がん過程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。本年度は胃がんのゲノム解析に重点をおき、胃がん全体の構造異常プロファイルを明らかにすること、また胃がんの高頻度ゲノム構造異常領域からがん遺伝子、がん抑制遺伝子の候補をリストアップ

することを目的とした。

B. 研究方法

びまん性未分化型胃がん 53 症例の DNA 調製に際して病理専門医の手によりレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を実施し、がん組織切片よりがん細胞の分離を行った。アレイ CGH 解析は MCG Cancer Array-800 を用いて行った。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、0.75 未満を欠失として取り扱った。

胃がんの発現解析は 59 症例の分化型がん

の凍結試料から RNA を調製し、Affymetrix 社製 GeneChip を用いて行った。アレイ CGH 解析データ (MCG Cancer Array-800, MCG Whole Genome Array-4500, 領域特異的タイリングアレイ) を取得ずみの検体であるので、ゲノムコピー数と発現量の相関を調べる事が可能である。

(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

胃がん全体のゲノム構造異常プロファイルをまとめる目的で、びまん性未分化型がん 53 症例の MCG Cancer Array-800 データを新たに取得した。以前に調製した未分化型がんの DNA 試料は腫瘍含量が 30-50% と低いことが問題であったが、今回調製したものは腫瘍含量 50% 以上に改善されていることがわかった。50% 以上の腫瘍含量を達成できれば、ヘミ欠失も十分に検出が可能である。これまでに取得していた分化型 (高分化、中分化) 胃がん 76 症例のデータと併せて全体の解析を行った。800 遺伝子プローブの中から 20% 以上の症例で 1.3 倍以上の重複または 0.75 未満の欠失を示した 186 プローブを抽出し、

unsupervised のクラスター分類を行った。全 129 症例はゲノムコピー数異常の少ない群 (67 症例、平均異常部位 81 ヶ所) と多い群 (62 症例、平均異常部位 219 ヶ所) の 2 群に分かれた。異常の少ない群は臨床病理学的に女性に多い、分化度が低い、腫瘍サイズが大きい、脈管侵襲、神経浸潤がある、間質スキルス、組織型タイプ 4 と有意に相関が認められた。またステージ IIIA, IIIB, IV の症例に限ると、異常の少ない群のほうが予後不良であるとの結果を得た。

新規がん関連遺伝子の同定を目指してゲノムコピー数の増加に相関して発現量が増加している遺伝子のリストアップを行った。これまでに胃がん 135 症例の BAC アレイ CGH 解析から、95 ヶ所の高度ゲノム増幅領域 (3 倍以上) を検出してきた。分化型がん 59 症例について網羅的発現解析を実施し、領域内遺伝子ごとにゲノム増幅をもつ症例の発現量とゲノム増幅をもたない症例の発現量を比較した。ゲノム増幅症例で顕著な発現亢進が見られることを基準として選別した結果、95 ヶ所の増幅領域からターゲット遺伝子候補を 600 遺伝子リストアップした。

D. 考察

胃がんのゲノムコピー数異常を分析するにあたって、これまでびまん性未分化型の解析が不十分であったが、今年度解消することができた。ヘミ欠失検出可能な純度に腫瘍含量を上げてもお、ゲノムコピー数の変化に乏しい群が存在し、高分化と中分化の分化型

がんの4割、未分化型がんの7割がゲノムコピー数異常の少ない群に分類された。分化度とゲノムコピー数異常数が相関しないこと、ゲノム構造異常の少ない群に予後不良の傾向があることなどから、胃がんの発生や進展には発生母地の影響や進展様式に複数の経路があるのではないかと推測される。ゲノム構造異常に基づくクラスター分類の結果からは染色体領域 6p21, 7p, 8q24, 11q13, 12p12, Y などでは異常発生頻度に差が見られた。この差が原因なのか、結果なのかは不明であるが、ゲノムコピー数に異常が少ないがんではどのような異常が起きているのか(エピジェネティックな変化、発がんの鍵となる遺伝子の変異、転写因子の異常、など)を明らかにすることは今後の課題である。

胃がんにおける新規のがん関連遺伝子単離に向けて、本年度は発現情報を追加し、ゲノムコピー数と相関する発現亢進遺伝子のリストアップに注力した。95ヶ所の増幅領域から600の候補遺伝子というのはまだ数が多いが、これに優先順位をつけて今後機能解析に進めていきたいと考えている。すなわち、ゲノム増幅の頻度、発現量亢進の程度、発現亢進症例の多さ、などを指標とする。機能解析の第一段階として遺伝子のRNA干渉実験を行い、細胞増殖に影響を与えるような遺伝子を見つける計画である。

E. 結論

胃がんの分化型76症例、未分化型53症例のMCG Cancer Array-800データを揃えてゲ

ノムコピー数異常に基づくクラスター分類を行った。分化度とは一致しない新しい分類基準であり、主にゲノムコピー数異常の多少を反映したものであるが、臨床病理学的因子との相関が見られた。胃がんの新規がん関連遺伝子の単離についてはゲノムの異常と遺伝子発現量の異常が相関するものを候補として600遺伝子を取りあげた。この中から細胞増殖に影響を与えるような機能遺伝子を見出していく計画である。

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 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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、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/IGSF4* 遺伝子プロモーター領域のメチル化が非小細胞肺がんの 44%、また *DAL-1/4.1B* のメチル化が腎明細胞がんの 55%に認められ、各々予後不良因子となることを示した。また、*Tslc1/Igsf4* 遺伝子欠損マウスが精子の接着障害による優性不妊を示し、肺腺腫、肺腺癌を高率に自然発生することを見出した。

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。

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 (NSCLC) 103 例、腎明細胞がん (RCCC) 55 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、bisulfite 処理塩基配列決定法、並びに bisulfite 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。

2. *Tslc1/Igsf4* 遺伝子欠損マウスの作成と解析：

Tslc1/Igsf4 遺伝子のエクソン1を欠失させ、ネオマイシン耐性遺伝子と LacZ 遺伝子とに置換した全身欠損マウスを作成し、自家繁殖させた。適当な時期にマウスを解剖し、精巣、肺を含む各臓器の固定標本を作成し、HE 染色、抗 *TSLC1* 抗体等で染色した。肺腫瘍については、ゲノム DNA, mRNA を抽出し、*K-ras2*, *Tp53*, *Egfr* 遺伝子の変異の有無を PCR-SSCP 法

にて解析した。

(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、患者の不利益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%) のすべての組織型で認められた。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キヤー (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、発現の有無を原発性 RCCC 55 例について検討し、その中の 25 例 (45%) に遺伝子プロモーター領域のメチル化を認めた。RCCC の *DAL-1/4.1B* 遺伝子のメチル化は、

臨床病期 pT1a の腫瘍においても 40% に認められることから、比較的早期の変化であると考えられた。またメチル化は腫瘍の核異型度と相関し (p=0.017)、患者の無病生存期間とは逆相関し (p=0.0036)、独立した予後因子 (p=0.038, 相対危険度 10.5) と考えられた。

2. *Tslcl/Igsf4* 遺伝子欠損マウスの作成と解析：

Tslcl/Igsf4 遺伝子の全身欠損マウスの自家繁殖の過程で、*Tslcl*^{-/-}オスマウスが不妊であることを見出した。11 週齢の *Tslcl*^{-/-}マウスの精巣重量は野生型 (*Tslcl*^{+/+}) マウスのその 88% に低下していた。精液検査では *Tslcl*^{-/-}マウスの精子数は、野生型マウスのその 0.01% 程度に低下し、しかも運動率が 1% で、無精子症に対応することが明らかになった。組織学的解析では、精細管上皮の円形精子細胞やパキテン精母細胞とセルトリ細胞との接着が障害され、未熟な状態で精細管管腔内に滑脱していることが示された。野生型マウスの精細管の解析では、*TSLC1* 蛋白質が精粗細胞から早期パキテン精子細胞に至る時期と、精子細胞のステップ 7 以降、成熟精子に至る時期の二期に分かれて発現することを確認した。以上の結果から *TSLC1* 蛋白質は、精母細胞、精子細胞のセルトリ細胞への接着を介して、精子の正常な成熟、分化に必須であることが示された。

一方、*Tslcl*^{-/-}マウスを長期間飼育した

結果、12ヶ月を越える頃から肺腫瘍が高率に自然発生することを見出した。月齢15ヶ月のマウスを解剖して腫瘍の有無を検討した結果、現在までに、*Tslc1*^{-/-}マウスでは30匹中10匹に肺腺腫、このうちの1匹では別に肺腺がんが生じていたが、*Tslc1*^{+/-}マウスでは20匹中1匹に顕微鏡レベルでの微小な肺腺腫が認められたのみであり、また *Tslc1*^{+/-}マウスでも19匹中全く肺腺腫を認めず、*Tslc1*^{-/-}マウスにおける肺腺腫の発生が有意に高いことが示された (p=0.33)。このことから、*Tslc1/Igsf4* 遺伝子の不活化が、肺腫瘍発生の抑制に決定的な役割を果たしていることが示された。一方 *Tslc1*^{+/-}マウスについては、16ヶ月以上長期飼育した場合に肺腺腫、肺腺がんが高率に自然発生することを予備的に見出しているため、その腫瘍発生率が野生型マウスと比較して有意に上昇するかどうかの検討をさらに続けている。

これらの肺腫瘍の中で容積の大きい7例については、組織の一部を凍結し、ゲノムDNAを抽出し、*K-ras2*, *Tp53*, *Egfr* 遺伝子の変異の有無を予備的に解析したが、現時点では変異を示す腫瘍は見出せなかった。

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 のみならず、RCCC においても、その発生、進展に深く関わっていることが示された。また、遺

伝子不活化の分子機構としては、ヘテロ接合性の消失 (LOH) とメチル化、並びに両アレルのメチル化が主たる機構であることが示された。また、TSLC1/IGSF4 の発現欠如は、鼻咽頭がんにおいても67例中43例 (64%) に認められ、特にリンパ節転移巣において高頻度であることを、香港の研究者との共同研究で明らかにした。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、これ以外にも、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おり、第11染色体23領域の代表的がん抑制遺伝子として認識されるようになってきている。

TSLC1/IGSF4 遺伝子は元々、非遺伝性である NSCLC のがん抑制遺伝子として、機能的相補法により同定された。ヒトの様々な腫瘍の摘出手術組織でも高頻度に不活化が認められたことは、この遺伝子のがん抑制遺伝子として機能する強力な傍証を与えてきた。しかし、遺伝学的にがん抑制遺伝子であることの直接の証明は、遺伝子欠損マウスにおいて腫瘍が発生するか否かが重要なポイントであると認識されてきた。本年度の研究により、少なくとも *Tslc1/Igsf4* 遺伝子ホモ欠失マウスでは、肺腺腫、肺腺がんが野生型と比較して有意に高く発生することが明らかとなり、この遺伝子のがん抑制遺伝子として機能することが結論されたと考