

えてよい。一方、*Tslc1/Igsf4* 遺伝子ヘテロ欠失マウスでも、野生型マウスと比較して有意に高く肺腺腫、肺腺がんが発生することが明らかになれば、ヒト疾患のモデルという立場から *Tslc1/Igsf4* のヒト遺伝性腫瘍への関わりが推察されることになるので、現在 *Tslc1/Igsf4* 遺伝子ヘテロ欠失マウスでの腫瘍発生を月齢 22 ヶ月のマウスを用いて検討している。また、comparative genomic hybridization による全染色体領域の構造異常の有無の解析、並びにマイクロアレイ解析による遺伝子発現の網羅的解析を、得られたマウス腫瘍材料のゲノム DNA, mRNA を用いて行い、腫瘍に生じる共通の変化を検索する予定である。

しかし、以上の事実をもって、TSLC1/IGSF4 が、臓器特異性の見地から、第一に肺がんの抑制遺伝子であると結論づけることは早計であると思われる。その理由の第一は、最初に TSLC1/IGSF4 をヒトの肺がん細胞を用いて同定したとはいっても、悪性がん細胞のマウス皮下での腫瘍原性を指標とした実験であり、必ずしも肺組織での増殖の検定になっていないことが挙げられる。第二の理由は、ヒト腫瘍での不活化は他の様々な腫瘍でも見られ、NSCLC 以上の高頻度で不活化が報告されている腫瘍も、食道がんをはじめ幾つか知られていることである。第三に、ここで遺伝子欠損マウスの作成に用いた C57BL6 マウスは、他の系統のマウスと比較して、肺腫瘍の自然発生の頻

度は低いとされてはいるものの、C57BL6 マウスで発生する腫瘍として肺腺腫はリンパ腫について高く、*Tslc1/Igsf4* 遺伝子欠損マウスでは、単に肺腺腫の自然発生頻度が底上げされたという解釈も成り立つからである。この点に関しては、今後、様々なマウス系統への戻し交配や、ヒトの遺伝性腫瘍などの解析から突破口を開いて行きたい。

E. 結論

TSLC1-DAL-1 の分子経路は、NSCLC、RCCC の進展に深く関与する重要な経路である。また、遺伝子欠損マウスの解析から、TSLC1 が精子形成に必須であること、その異常が肺腺腫、肺腺がんの発生に重要であることが示され、遺伝学的にがん抑制遺伝子であることが証明された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Wakayama T, Sai Y, Ito A, Kato Y, Kurobo M, Murakami Y, Nakashima E, Tsuji A, Kitamura Y, Iseki S. Heterophilic binding of the adhesion molecules poliovirus receptor and immunoglobulin superfamily 4A in the interaction between mouse spermatogenic and Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, in press.

- Ito, A, Hagiwara, M, Oonuma, J, Murakami, Y, Yokozaki, H, Takaki, M. Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degradation of mesenteric mast cells. J Neuro Immunol, in press.
- Lung, HL, Kwok, A, Cheung, L, Xie, D, Cheng, Y, Murakami, M, Guan, X-Y, Sham, JS, Chua, D, Protopopov, AI, Zabarovsky, ER, Tsao, SW, Stanbridge, EJ, and Lung, ML. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res, 66, 9385-9392, 2006.
- Yamada, D, Yoshida, M, Williams, YN, Fukami, T, Kikuchi, S, Masuda, 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, 26, 3610-3624, 2006.
- 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, 26, 3595-3609, 2006.
- 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, 106, 1751-1758, 2006.
- 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, 25, 1446-1453, 2006.
- 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.
2. 学会発表
村上善則、第11染色体q23上の新規がん

抑制遺伝子 TSLC1/IGSF4。第9回神経芽腫（基礎）研究会。口演。東京、2007年3月24日。

Murakami Y, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Kikuchi S, Tsuboi Y, Usui S, Nagata M, Obana T, Maruyama T, Ichihara H. Involvement of TSLC1/IGSF4 and its cascade in lung carcinogenesis. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. シンポジウム口演。名古屋、2007年3月12-14日。

Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Murakami Y. Analysis of TSLC1/IGSF4-interacting proteins in epithelial cell. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 示説。名古屋、2007年3月12-14日。

Usui S, Maruyama T, Sugano K, Murakami Y. Quantitative analysis of allele specific mRNA expression by an RNA difference plot. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 示説。名古屋、2007年3月12-14日。

Goto A, Niki T, Ishikawa Y, Murakami Y, Fukayama M. Loss of TSLC1/IGSF4 expression in lung adenocarcinoma: relationships with gender and prognostic significance. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 示

説。名古屋、2007年3月12-14日(予定)。

Yamada D, Nagata M, Obana T, Masuda M, Ichihara H, Maruyama M, Tsuboi Y, Usui S, Yoshida M, Murakami Y. Spontaneous development of lung adenoma and adenocarcinoma in mice lacking the tumor suppressor gene, Tslc1/Igsf4. The 7th JCA-AACR Joint Conference. 示説。米国ハワイ州、2007年1月21-25日。

村上善則、薄井真悟、丸山智子。アレル特異的遺伝子発現の定量による塩基配列多型の意義の解析。日本人類遺伝学会第51回大会。シンポジウム口演。米子市、2006年10月17日-20日。

村上善則、増田万里、山田大介、菊池慎二、名手祐子、坪井裕見、桜井美佳、薄井真悟、丸山智子。がんの進展に関わる細胞接着分子 TSLC1/IGSF4。第65回日本癌学会。シンポジウム口演。横浜市、2006年9月28日-30日。

坪井裕見、八下田美佳、増田万里、村上善則。がん抑制蛋白質 TSLC1/IGSF4 の上皮細胞における結合因子の解析。第65回日本癌学会。示説。横浜市、2006年9月28日-30日。

増田万里、菊池慎二、丸山智子、坪井裕美、薄井真悟、村上善則。成人T細胞白血病(ATL)において細胞接着分子 TSLC1

が惹起する低分子量Gタンパク質Racの活性化とその下流分子の解析。第65回日本癌学会。示説。横浜市、2006年9月28日-30日。

薄井真悟、丸山智子、坪井裕見、増田万里、鬼塚正孝、村上善則。DNA修復に関わる遺伝子群のアレル間における発現の量的不均衡のRDP法による解析。第65回日本癌学会。示説。横浜市、2006年9月28日-30日。

Murakami Y, Masuda M, Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M, Usui S, Maruyama T, Ichihara H. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4 in human oncogenesis. The 55th Fujihara International Seminar, シンポジウム口演、苫小牧、2006年7月10-13日。

Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, Murakami Y, TSLC1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. The 55th Fujihara International Seminar, 口演、苫小牧、2006年7月10-13日。

Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, 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. The 55th Fujihara International Seminar, 口演、苫小牧、2006年7月10-13日。

Goto A, Niki T, Ishikawa Y, Murakami Y, Fukayama M. Loss of TSLC1/IGSF4 expression in lung adenocarcinoma: relationships with gender and prognostic significance. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。

Shimada Y, Ito T, Hashimoto Y, Murakami Y, Downstream mechanisms of TSLC1 in esophageal cancer. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。

Enomoto Y, Tsutsumi M, Murakami Y. Correlation of TSLC1 gene expression with inflammatory activity in colon of ulcerative colitis patients. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。

Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Kanai Y, Murakami Y,

- Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。
- Kikuchi S, Fukami T, Yamada D, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Murakami Y, Identification and characterization of a novel tumor suppressor cascade including TSLC1/IGSF4 and DAL-1/4.1B in human non-small cell lung cancer. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。
- Williams YN, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y, Cell adhesion and prostate tumor suppressor activity of TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily molecule homologous to TSLC1/IGSF4. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。
- Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Fukuhara H, Ito A, Shibuya M, Murakami Y, Involvement of the tumor suppressor protein, TSLC1/IGSF4 in the epithelial cell structure with DAL-1/4.1B and MPP proteins. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。
- Usui S, Maruyama T, Isogai K, Sugano K, Murakami Y. Quantitative detection of allele imbalance in the gene expression by an RNA difference plot. The 55th Fujihara International Seminar, 示説、苫小牧、2006年7月10-13日。
- Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, 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. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBBM Congress, 示説、京都、2006年6月18-23日。
- Murakami Y, Yamada D, Williams YN, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Shibuya M, Kanai Y. Inactivation of a tumor suppressor cascade mediated by TSLC1/IGSF4, TSLC2/IGSF4C and DAL-1/4.1B in human renal cell cancer and prostate cancer. The 7th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. 示説。米国ワシントン

DC, 2006年4月1-5日。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

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

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

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

研究要旨 神経芽細胞腫では CpG アイランドメチル化形質(CIMP)の有無が予後と密接に関連すること、*N-myc* 遺伝子増幅をもつ症例はほぼ全例 CIMP(+)であり、増幅がない症例の中でも CIMP は予後因子であることを見出ししてきた。本年度は、ドイツ人神経芽細胞腫 145 例を解析し、日本人症例同様、CIMP(+)群は相対死亡危険度 9.5 (95%CI = 3.2-28)と極めて予後不良であること、CIMP と *N-myc* 遺伝子増幅との関係は日本人同様であること、更に、再発危険度は CIMP の有無のみで決まり *N-myc* 遺伝子増幅には関係しないことを見出した。一方、ヒトメラノーマで、33 個のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化と、PDGF シグナル抑制作用が知られる *PRDX2* 遺伝子のサイレンシングを見出した。ヒト大腸がんで、ユビキチン化の調節に関わる遺伝子 *UCHL1* がサイレンシングされることを見出した。

A. 研究目的

DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与する。本研究では、ゲノム網羅的な解析により、様々なヒト腫瘍について、DNA メチル化異常、また、それによりサイレンシングされる遺伝子を同定し、新規がん抑制遺伝子の同定や、がんの存在・病態・リスクマーカーを分離する基盤を作成する。

(1) 神経芽細胞腫における予後マーカーの同定

神経芽細胞腫は治癒または急速な悪性化という全く異なる臨床経過をとりうる。従って、個々の症例の予後診断は、治療の強度を決定するために極めて重要である。昨年度までに、まず、予後良好であった日本人神経芽細胞腫 5 例と予後不良であった神経芽細胞腫由来の細胞株 5 系統を用いて、methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法によるゲノム網羅的解析を行い、*PCDHB* 群遺伝子を含む 5 個の CpG アイランドメチル化が予後と一致することを見出した。

更に、別の日本人神経芽細胞腫 140 例について、これら 5 個の CpG アイランドのメチル化レベルを定量的に解析した。その結果、1) 5 個の CpG アイランドのメチル化は相互に関連し、予後不良の神経芽細胞腫は CpG アイランドメチル化形質(CIMP)をもつこと、2) CIMP(+)症例の相対死亡危険度は 22 (95%CI = 5.3-93)と非常に高いこと、3) CIMP の有無は、年齢・病期・*TrkA* 高発現・DNA 倍数性とは独立な予後因子であること、4) *N-myc* 遺伝子増幅(+)の症例はほぼ全例 CIMP(+)で、*N-myc* 遺伝子増幅(-)の症例の中でも CIMP の有無は予後と関連することなど、多くの臨床的有用性が強く示唆された。

今年度は、ドイツ人神経芽細胞腫症例を用いて、

CIMP の予後マーカーとしての有用性を確立する。

(2) メラノーマでのサイレンシング遺伝子の同定

メラノーマは予後不良の悪性腫瘍であるが、その分子機構は限定的にしか解明されていない。メラノーマ発生には紫外線の関与が大きいことから、従来、エピジェネティックな異常の関与はあまり検討されていなかった。しかし、最近、メラノーマにおいても DNA メチル化異常によるがん抑制遺伝子の不活化が存在することが知られるようになった。

そこで、ヒトメラノーマでサイレンシングされる遺伝子を同定するために、3 系統のメラノーマ細胞株 MeWo, WM-266-4 及び MMAc での MS-RDA 解析を行った。

(3) 大腸がんでのサイレンシング遺伝子の同定

大腸がんは分子機構が比較的よく解明されているが十分ではない。また、大腸がんではエピジェネティックな異常の関与が大きく、より多くのサイレンシング遺伝子を同定する必要がある。そこで、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を脱メチル化剤で処理、発現が誘導される遺伝子をオリゴヌクレオチドマイクロアレイにより検索し、サイレンシング遺伝子を探索した。

B. 研究方法

(1) 材料

神経芽細胞腫細胞株、メラノーマ細胞株、大腸がん細胞株は、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から、メラノーマ臨床材料は筑波大学から、大腸がん臨床材料は国立がんセンター中央病院及び和歌山県立医科大学から供与を受けた。DNA は phenol/chloroform 法

により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) 脱メチル化剤処理

脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) は、各細胞株に応じて、70%程度の増殖抑制を来す濃度を用いて処理した。

(3) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII*、*SacII* または *NarI* で消化し、アダプターを接着後、PCR により 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。

(4) Bisulfite シークエンス法、MSP 法、及び、定量的 MSP 法

断片化した DNA を NaOH により変性した後、3.1N, pH 5.0 の bisulfite 液中で、95°C 30 秒、50°C 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。

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 DNA 及び非メチル化 DNA をそれぞれに特異的なプライマーを用いて増幅、増幅速度を分子数既知の標準 DNA と比較することで検体中の分子数を測定した。得られた各分子数から、メチル化 DNA の比率を算出した。

(5) 定量的 RT-PCR 法

全 RNA から Superscript II 逆転写酵素により cDNA を合成した。定量的 PCR を行い、被検遺伝子及び *GAPDH* の cDNA 分子数を測定した。*GAPDH* 分子数により補正した被検遺伝子の分子数を算出した。

(6) オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析

Affymetrix 社 U133A アレイを用いて、14,500 個の遺伝子発現を解析した。

(7) 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。

(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。メラノーマ及び大腸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) 神経芽細胞腫における予後マーカーの同定

ドイツ人神経芽細胞腫 152 例について、日本人症例で確立した方法により、*PCDHB* 群遺伝子、*HLP* 及び *CYP26C1* について DNA メチル化レベルを定量した。臨床情報にはブラインドで、日本人症例で確立した基準を用いて判定したところ、95 例が CIMP(-)、50 例が CIMP(+) と判定され、残り 7 例は中間型となった。

その後、CIMP について判定可能であった 145 例について、臨床因子との関連を解析した。単変量解析では、CIMP(+) の症例は相対死亡危険度 9.5 (95%CI = 3.2-28) と、極めて予後不良であることが確認された。また、*N-myc* 遺伝子増幅(+)であった 23 例は全例 CIMP(+) であり、*N-myc* 遺伝子増幅(-)の 122 例の中でも、CIMP の有無は生命予後、及び、再発予後に影響した。特に再発は CIMP の有無でのみ決まり、*N-myc* 遺伝子増幅の有無は影響しなかった。多変量解析では、*N-myc* 遺伝子増幅または CIMP の有無は年齢・病期とは独立な予後因子だった。

ドイツ人症例に日本人症例で確立した基準を適用した場合でも CIMP の有用性が確認されたことで、CIMP による予後診断は実用性が極めて高いことが示された。

(2) メラノーマでのサイレンシング遺伝子の同定

3 系統のヒトメラノーマ細胞株のどれかでメチル化され、正常メラノサイトではメチル化されない DNA 断片を MS-RDA 法により分離した。合計 864 個のクローンの塩基配列を決定し、54 個の遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドを分離した。これらのメチル化状態を MSP により解析し、34 個の CpG アイランドは、メラノーマ細胞株 13 系統のうちのどれかでメチル化されていることを確認した。34 個のうち 18 個は、CpG アイランドがメチル化されている場合、必ず下流遺伝子の発現が消失しており、遺伝子サイレンシングの原因と考えられた。さらに、18 個のうち 6 個は、正常メラノサイト 2 系統で発現しており、メラノーマ発生へ関与している可能性も考えられた。

6 個のうちの 1 個である *PRDX2* は、PDGF のシグナルを抑制することが知られており、そのサイレンシングは細胞増殖を誘導すると考えられた。そこで、メラノーマ臨床材料についても、*PRDX2* のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化を 36 個中 3 個で認め、bisulfite シークエンス法により確認した。メチル化されたメラノーマではタンパク発現も低下していることを、免疫染色により確認した。

(3) 大腸がんでのサイレンシング遺伝子の同定

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を 0.5 μ M の 5-aza-dC で処理、8 倍以上の発現上昇を示し、かつ処理後のシグナル強度が十分に強い(全遺伝子平均の 2

倍以上) 遺伝子をオリゴヌクレオチドマイクロアレイにより検索した。その結果、7個の遺伝子が見出され、うち5個はプロモーター領域 CpG アイランドを有した。5個のうち1個が、脱ユビキニン化酵素として同定され、最近、E3 ユビキニン化酵素活性も見出された ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*)であった。Bisulfite シークエンス法により、*UCHL1* のプロモーター領域 CpG アイランドが高度にメチル化されること、5-aza-dC による脱メチル化誘発により発現が誘導されることが確認された。また、臨床材料では17個のうち8個と高頻度にメチル化が検出された。

D. 考察

神経芽細胞腫の予後予測における CIMP の有用性が、その同定に用いた日本人症例とは全く異なるドイツ人症例でも確認された。近年のゲノム網羅的な解析で頻発する false positive ではないこと、異なる人種でも有用であることを示しており、今後の臨床応用にむけて重要な成果である。また、*N-myc* 遺伝子増幅を示す症例は全例 CIMP(+)であったことから、CIMP が *N-myc* 遺伝子増幅の誘因となっていることも示唆された。

メラノーマでのサイレンシングが見出された *PRDX2* によりコードされる Prx II は、thioredoxin peroxidase であり、PDGF による PDGF 受容体のリン酸化を抑制する。従って、その不活化は、PDGF シグナルを増強し、細胞増殖を誘導すると考えられる。また、メラノーマや膀胱がんの進展に伴い、*PRDX2* の発現が低下することも知られている。従って、*PRDX2* は新たなメラノーマ抑制遺伝子の候補と考えられる。

大腸がんで見出された *UCHL1* のサイレンシングは膵がん、頭頸部がんでも報告されている。また、食道がんでは、*UCHL1* のメチル化が予後不良と相関することも報告されている。がんでのユビキニン-プロテアソーム系の機能異常は知られているが、その原因となる遺伝子異常・エピジェネティック異常はほとんど知られておらず、*UCHL1* サイレncing が関与している可能性もある。

E. 結論

神経芽細胞腫の予後予測における既存の臨床マーカーを上回る CIMP の有用性が確認された。メラノーマ抑制遺伝子の候補として *PRDX2*、及び大腸がん抑制遺伝子の候補として *UCHL1* を同定した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuta, J, Nobeyama, Y, Umehayashi, Y, Otsuka, F, Kikuchi, K and Ushijima, T. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res*, 66: 6080-6086, 2006.
2. Imura, M, Yamashita, S, Cai, LY, Furuta, JI, Wakabayashi, M, Yasugi, T and Ushijima, T. Methylation and expression analysis of 15 genes and three normally-methylated genes in 13 ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett*, 241: 213-220, 2006.
3. Okochi-Takada, E, Nakazawa, K, Wakabayashi, M, Mori, A, Ichimura, S, Yasugi, T and Ushijima, T. Silencing of the *UCHL1* gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer*, 119: 1338-1344, 2006.
4. Hatada, I, Fukasawa, M, Kimura, M, Morita, S, Yamada, K, Yoshikawa, T, Yamanaka, S, Endo, C, Sakurada, A, Sato, M, Kondo, T, Horii, A, Ushijima, T and Sasaki, H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, 25: 3059-3064, 2006.
5. Abe, M, Westermann, F, Nakagawara, A, Takato, T, Schwab, M and Ushijima, T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*, 247: 253-258, 2007.
6. Nobeyama, Y, Okochi-Takada, E, Furuta, J, Miyagi, Y, Kikuchi, K, Yamamoto, A, Nakanishi, Y, Nakagawa, H and Ushijima, T. Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas. *Int J Cancer*, in press.
7. Cai, L-y, Abe, M, Izumi, S-i, Imura, M, Yasugi, T and Ushijima, T. Identification of *PRTFDC1* silencing and aberrant promoter methylation of *GPR150*, *ITGA8* and *HOXD11* in ovarian cancers. *Life Sci*, in press.

2. 学会発表

1. Abe, M., Westermann, F., Nakagawara, A., Takato, T., Schwab, M. and Ushijima, T. The CpG island methylator phenotype is a strong and reproducible prognostic marker for neuroblastoma cases, including those without *N-myc* amplification. *Advances in Neuroblastoma Research*, Los Angeles, May, 2006.
2. Ushijima, T. DNA methylation to tell the past and future. IARC workshop, "Epigenetics and Cancer." Lyon, June, 2006.
3. Ushijima, T. DNA methylation as a marker for past exposure to carcinogens and future risk of cancers. 13th Seoul International Cancer Symposium on

“Gastric Cancer Update in 2006.” Seoul, August, 2006.

4. Ushijima, T., and Abe, M. The CpG island methylator phenotype is a strong prognostic factor in neuroblastomas. 11th Korea-Japan Cancer Research Workshop. Busan, December, 2006.
5. 牛島俊和 DNA メチル化異常のインパクトと起源 第3次対がんシンポジウム 2006年2月
6. 牛島俊和 DNA メチル化：基礎研究から内視鏡生検材料での活用へ 消化器内視鏡学会ワークショップ基調講演 2006年5月
7. 阿部雅修、中川原章、高戸毅、牛島俊和 ドイツ神経芽細胞腫における CIMP と予後の強力な相関 日本癌学会 65 回総会 2006年9月
8. 牛島俊和 エピジェネティックな異常の起源と加速 Helicobacter pylori による DNA メチル化異常誘発と CpG アイランド特異性 日本癌学会 65 回総

会シンポジウム 2006年9月

9. 牛島俊和 Helicobacter pylori による胃粘膜での DNA メチル化異常誘発 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月
10. 大河内(高田)江里子、若林美香、森明子、三輪佳宏、杉村隆、牛島俊和 哺乳動物細胞を用いた高感度 DNA 脱メチル化剤検出系の開発 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

分担研究報告書

諸臓器の前がん状態ならびにがんにおけるDNAメチル化異常の網羅的解析

分担研究者 金井 弥栄 国立がんセンター研究所病理部長

研究要旨

従来腎における前がん状態が論じられることは少なかったが、DNAメチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても既に前がん段階にあると認識された。CpGアイランドにおける局所的なDNAメチル化の蓄積を含むゲノム網羅的なDNAメチル化の変化は、腎腫瘍の多段階発生過程に前がん状態から悪性進展に至るまで継続して寄与する可能性があり、腎腫瘍症例の予後不良因子となった。ゲノム網羅的なDNAメチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんを生じ、前がん状態におけるDNAメチル化異常が症例の予後まで規定する可能性がある。DNAメチル化異常が予後予測の指標になり得るのに加え、前がん状態におけるDNAメチル化異常の解析を諸臓器に展開しDNAメチル化診断ミニチップ等を作製することにより、発がんリスク評価を実用化し得ると考えられた。

A. 研究目的

本年度は、腎腫瘍の多段階発生過程におけるDNAメチル化異常の意義の解明を目的とした。CpGアイランドにおける局所的なDNAメチル化の変化、ゲノム規模のDNAメチル化の変化およびDNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)1の蛋白発現の変化を、前がん状態から腎細胞がんの悪性進展に到るまでの諸過程に対応する組織検体において解析し、DNAメチル化異常の臨床病理学的意義の理解を進めた。

B. 研究方法

94例の腎腫瘍症例（腎細胞がん87例・集合

管がん5例・オンコサイトーマ2例）より得られた腫瘍組織および非腫瘍部腎組織、ならびに16例の非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織を検討の対象とした。

p16遺伝子・hMLH1遺伝子・VHL遺伝子・THBS-1遺伝子・methylated in tumor (MINT) 1クローン・MINT2クローン・MINT12クローン・MINT25クローンおよびMINT31クローンの9箇所のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の状態を、メチル化特異的PCR法およびパイサルファイト制限酵素処理法で評価した。DNMT1蛋白発現を、免疫組織化学的に評価した。

さらに、本研究班で開発されたBACアレイ

を基盤とするメチル化CpGアイランド増幅法 (BAMCA法)により、DNAメチル化状態をゲノム網羅的に解析した。本法において、はじめに、検体ならびに対照となるゲノムDNAをDNAメチル化感受性制限酵素SmaIで消化し、非メチル化CpG部位に平滑末端を生じさせた。次に、DNAメチル化非感受性XmaIで消化し、メチル化CpG部位に突出末端を生じさせた。突出末端にのみアダプターを付加し、アダプターにアニールするプライマーを用いて蛍光標識ならびにPCR増幅を施行した。これを、本研究班において国立がんセンターと東京医科歯科大学の稲沢譲治教授が共同で開発したWhole Genome Array-4500にハイブリダイズした。Cy3とCy5の蛍光強度の比較によって、検体と対照のCpGメチル化の程度の差を読み取った。

DNAメチル化の状態ならびにDNMT1の発現と、腎腫瘍の臨床病理学的因子ならびに症例の予後との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得(課題番号16-33「ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化に関する研究」研究代表者:金井弥栄)、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織等の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理され、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

C. 研究結果

メチル化されたCpGアイランド数は、腎腫瘍症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織において、非腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して既に有意に増加し ($P=0.0040$)、腎腫瘍において更に有意に増加した ($P=0.0044$)。非腫瘍部腎組織におけるメチル化されたCpGアイランド数は、その症例に生じた通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した ($P=0.0172$)。腎腫瘍におけるDNAメチル化の状態について、各組織型間で大きな差異を認めなかった。通常型腎細胞がんにおけるメチル化されたCpGアイランド数は、がんの肉眼型(浸潤性・転移性とよく相関することが知られている, $P=0.0107$)・組織学的異型度 ($P=0.0165$)・進展様式 ($P=0.0377$)・静脈侵襲の有無 ($P=0.0282$)と有意に相関した。通常型腎細胞がん症例のうち、がん部においてCpGアイランドのDNAメチル化の蓄積のみられた症例は、みられなかった症例に比して無再発生存率が有意に低かった ($P=0.0002$)。

DNMT1蛋白発現は、腎腫瘍症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織の近位尿細管において、正常腎組織の近位尿細管より既に高い傾向にあり、異型度G1の通常型腎細胞がんでは有意な亢進となった ($P=0.0011$)。DNMT1蛋白発現は、通常型腎細胞がんが紡錘細胞がんへ悪性進展を遂げる過程でさらに亢進していた。

正常腎組織検体間では、BAMCA法に用いた少数のBACクローンにおいて、DNAメチル化状態に個体差や加齢に基づくばらつきが見られた。通常型腎細胞がん症例より得られた非がん部腎組織では既に、正常腎組織に見られた個体差や加齢の範囲を越えて、多くのBACクローンがDNAメチル化の減弱あるいは亢進を示した。通常型腎細胞がん組織では、DNAメチル化の減弱あるいは亢進を示すBACクロー

ンがさらに増加し、DNAメチル化の減弱あるいは亢進の程度も亢進した。

通常型腎細胞がん組織においてDNAメチル化減弱あるいは亢進を示したBACクローン数は、通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した($P=0.0095$)。通常型腎細胞がん組織においてDNAメチル化減弱を示したBACクローン数が200以上の症例($P=0.0418$)ならびにDNAメチル化亢進を示したBACクローン数が300以上の症例($P=0.0054$)は、そうでない症例に比較して有意に予後不良であった。

通常型腎細胞がんの背景にある非がん部腎組織においてDNAメチル化亢進を示したBACクローン数は、その症例に生じた通常型腎細胞がんの肉眼型($P=0.0118$)ならびに組織学的異型度($P=0.0164$)と有意に相関した。通常型腎細胞がんの背景にある非がん部腎組織においてDNAメチル化亢進を示したBACクローン数が300以上の症例は、300未満の症例に比し、有意に予後不良であった($P=0.0310$)。

D. 考察

CpGアイランドにおけるDNAメチル化の状態に着目して正常腎組織と腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織を組織学的に特記すべき所見を示さなくても区別できたことから、DNAメチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織は既に前がん状態にあると考えられた。ウイルスの持続感染や慢性炎症等の明確な背景を伴わず組織学的に認識し難いことから、前がん状態が従来ほとんど議論されてこなかった腎においてすら、DNAメチル化に着目すれば前がん状態の存在を認識し得ることは注目される。いいかえると、局所的なDNAメチル化の亢進は、腎における多段階発がん過程に、前がん段階から寄与する可能性があると考えられた。

メチル化されたCpGアイランド数が、通常型腎細胞がんの臨床病理学的悪性度と有意に

相関したことから、局所的なDNAメチル化の亢進は、腎における多段階発がん過程の早期のみならず、悪性進展に至るまで継続して寄与する可能性があると考えられた。

通常型腎細胞がんの背景にある組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織におけるメチル化されたCpGアイランド数が、その症例に生じた通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した。本知見は、諸臓器の多段階発がん過程における解析で従来から分担研究者等が提唱していた、「DNAメチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんが生じる」という考えを、より直接的に支持するものである。

BAMCA法によりゲノム網羅的に解析しても、DNAメチル化異常の観点から、通常型腎細胞がん症例より得られた非がん部腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても、既に前がん状態にあると考えられた。ゲノム規模のDNAメチル化の変化は前がん状態において既に起こり、多段階発がん過程の進展に伴い更に変化することが分かった。がんにおけるDNAメチル化減弱についての従来の解析は、限られた反復配列や組織特異的に発現する遺伝子等に概ね終始しており、その臨床病理学的意義も十分には知られていなかった。本研究の結果より、発がん過程における全染色体上のDNAメチル化の変化は、DNAメチル化減弱・亢進の双方向とも臨床病理学的に重要であると考えられた。ゲノム網羅的に解析しても、DNAメチル化の変化を伴う前がん状態からは、より悪性度の高いがんを生じると考えられた。前がん状態におけるゲノム規模のDNAメチル化の変化が、症例の予後すら反映する可能性があると考えられた。

E. 結論

従来腎における前がん状態が論じられることは少なかったが、DNAメチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組

織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても既に前がん段階にあると認識された。CpGアイランドにおける局所的なDNAメチル化の蓄積を含むゲノム網羅的なDNAメチル化の変化は、腎腫瘍の多段階発生過程に前がん状態から悪性進展に至るまで継続して寄与する可能性があると考えられた。ゲノム網羅的なDNAメチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんを生じ、前がん状態におけるDNAメチル化異常が症例の予後まで規定する可能性があると考えられた。

今後、がんの悪性度・症例の予後・特定の治療（免疫療法等）への反応性と相関するBACクローンをバイオインフォマティクス手法で抽出し、ミニチップを作製するなどして、病態診断ツールの開発につなげ得ると期待される。DNAメチル化異常のゲノム網羅的解析を、諸臓器の前がん状態にある組織に展開し、発がんリスク評価の指標となるBACクローンを抽出すれば、発がんリスク評価ミニチップ等を開発し得ると期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer*, 119: 288-296, 2006.
2. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*, 27: 1160-1168, 2006.
3. Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett*, in press, 2006.
4. Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Kanai Y, 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.
5. 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.
6. Kanai Y, Arai E, Etoh T. Role of immunohistochemical expression of DNA methyltransferase 1 protein in gastric carcinoma. In: *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*. Vol. 4: Molecular Genetics, Gastrointestinal Carcinoma, and Ovarian Carcinoma, ed. Hayat, M. A. Elsevier, CA, pp. 257-261, 2006.
7. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
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

がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学学長

研究要旨

がん克服に向けた臨床応用への展開を念頭に、発がんおよび進展に関連する遺伝子異常であるマイクロサテライト不安定性（microsatellite instability; MSI）について多段階消化器発がんにおけるジェネティック・エピジェネティックな異常を網羅的、系統的に解析した。MSI陽性胃がんにおけるEphB2遺伝子およびHLA class I関連遺伝子の高頻度な変異を明らかにした。さらに、HLA class I関連遺伝子のエピジェネティックな異常を網羅的に検出し、胃がんの免疫逃避機序を明らかにした。また、胃がんにおいてMSIの有無によるVEGFを含めた血管新生関連遺伝子の異常の相違を明らかにした。本研究成果はMSI陽性がんの多段階発がんの分子機構の解明に有用なだけでなく、診断や分子標的治療の効果予測等、臨床応用が可能である。他にも、診断・治療に直結する遺伝子異常候補を多数明らかにしており、今後、一層の飛躍的研究成果が期待できる。

A. 研究目的

DNAの複製エラーを修復するDNAミスマッチ修復系の異常による単純繰り返し配列の遺伝子不安定性つまりマイクロサテライト不安定性（microsatellite instability; MSI）は、Lynch症候群（遺伝性非ポリポーシス大腸がん; HNPCC）、散発性の胃・大腸・子宮体がん、重複・多発がんなどの発がん・進展機構として極めて注目されている。

MSIの有無によりがんの病態は大きく異なることから、MSI陽性発がん機構の解明は、ヒト多段階発がん過程における遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明に欠かせないものである。さらに高齢者の右側大腸がんの増加とともに、MSI陽性がんの発生頻度は増加している他、MSIと重複・多発がんとの関連、治療に伴う二次発がん、Lynch症候群の効果的なスクリーニング法の必要性などを考慮すると、MSI陽性発がん機構の解明は、厚生労働

行政における対がん総合戦略のひとつとして極めて重要である。

本研究課題では、多数のMSI陽性がんにおいて、ジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常を網羅的、系統的に解析し、MSI陽性がんの多段階発がん分子病態を明らかにすることを目的とする。発がんおよび進展機構の解明を通じて、明らかにした重要な分子異常を糸口に、がんの予防・診断・治療に亘り臨床医学における新局面を拓くことおよびがん制御を展望する。

B. 研究方法

1. 消化器がんにおけるMSI解析

散発性消化器がんおよび子宮体がんのがん部と隣接非がん部組織より、DNAを抽出し、国際ガイドラインに基づき、マイクロサテライトマーカーを用いて、MSIを検索した。

2. 胃がんにおける免疫逃避機序とMSI

の関連

半定量的RT-PCRを用いたmRNA発現の検討、Loss of heterozygosity (LOH) 解析、MSP法によるHLA-A、-B、-C遺伝子プロモーター領域のメチル化解析、遺伝子変異解析、免疫組織化学染色、Interferon (IFN) 処理後の細胞表面HLA発現の解析により、系統的に解析した。

3. 胃がんにおける血管新生関連遺伝子発現とMSIの関連

免疫組織化学染色、p53遺伝子変異解析、MSP法によるTHBS1遺伝子プロモーター領域のメチル化解析、半定量的RT-PCRを用いたmRNA発現の検討、5-aza-2' deoxycytidine 処理後のTHBS1再発現実験により、系統的に解析した。

4. 胃がんにおけるEphB2遺伝子変異の解析

MSI陽性胃がん64症例およびMSI陽性子宮体がん56症例を対象とした。EphB2遺伝子の(A)9領域における遺伝子変異をPCRおよびDNAシーケンスにより解析した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針に関する倫理指針」を遵守した。すなわち、提供者から十分なインフォームド・コンセントを得ることとし、人間の尊厳及び人権を尊重し、実施試料等提供者やその家族、血縁者の人権を科学的、社会的な利益より優先し、適正に研究を行った。

C. 研究結果

1. 胃がんにおける免疫逃避機序とMSIの関連

胃がん60例中、HLA-A、-B、-Cの発

現低下を26例(43%)、27例(45%)、19例(32%)でそれぞれ認めた。HLA-Aの発現低下はMSI陽性胃がん有意に頻度が高かった。LOHは、HLA-A近傍のD6S306で16%(5/32例)、D6S258で13%(4/32例)、HLA-B近傍のD6S273で12%(4/33例)、HLA-C近傍のD6S1666で13%(4/30例)に認めた。HLA-A、-B、-Cのメチル化を23例(38%)、24例(40%)、17例(28%)でそれぞれ認めた。HLA-Aのメチル化はMSI陽性胃がん有意に頻度が高かった。

LMP2、LMP7、LMP10、TAP1、TAP2の発現低下を17例(28%)、16例(27%)、18例(30%)、28例(47%)、23例(38%)でそれぞれ認めた。 β 2m、LMP-7、TAP-1、TAP-2、tapasin、calnexin、SEC63、SEC31、P4HB(p55)各遺伝子のフレームシフト変異をMSI陽性胃がん30例中13例(43%)、1例(3%)、3例(10%)、3例(30%)、1例(3%)、7例(23%)、14例(47%)、8例(27%)、9例(30%)でそれぞれ認めた。26例(87%)で1遺伝子以上の変異を認めた。一方MSI陰性胃がん30例では変異を検出しなかった。

13例の β 2m遺伝子変異陽性MSI陽性胃がんでは、全例 β 2mの染色陰性であった。この他、 β 2m遺伝子変異陰性MSI陽性胃がん5例および30例中8例のMSI陰性胃がん症例においても β 2mの染色陰性であった。胃がん細胞株SNU-1において、IFN α およびIFN γ で24時間処理後、細胞表面HLA-ABC、HLA-A、HLA-B、HLA-B/C、 β 2mの発現亢進を認めた。

2. 胃がんにおける血管新生関連遺伝子発現とMSIの関連

VEGF発現は、200例中46%に認めた。VEGF発現は静脈侵襲、リンパ節および遠隔転移、病理学的TNMステージと相関した。Microvessel count (MVC)はVEGF陽性群で有意に高値であった。

MSI陽性症例におけるVEGF発現の頻度は、MSI陰性症例と比較して有意に低頻度であった。

FGF2発現は、200例中54%に認められた。FGF2発現は低分化度および深達度と相関した。MVCはFGF2陽性群で有意に高値であった。MSI陽性症例におけるFGF2発現の頻度は、MSI陰性症例と比較して有意に低頻度であった。

THBS1メチル化は、200例中44%に認められた。THBS1メチル化は前庭部、静脈侵襲、遠隔転移と相関した。MVCはTHBS1メチル化陽性群で有意に高値であった。THBS1メチル化はp53変異を認めない症例で有意に頻度が高かった。MSI陽性症例におけるTHBS1メチル化の頻度は、MSI陰性症例と比較して有意に高頻度であった。

MSI陽性症例の予後は、MSI陰性症例と比較して有意に良好であった。VEGF発現陽性かつTHBS1メチル化陽性症例は、各ステージおよび全ステージを対象にした解析において、他の症例に比べ予後が最も不良であった。MSI陰性症例を対象とした解析においても同様の結果であった。VEGF発現陽性かつTHBS1メチル化陽性の組み合わせは、多変量解析においても有意な予後不良因子であった。

3. 胃がんにおけるEphB2遺伝子異常の解析

EphB2遺伝子(A)9領域の変異を解析し、MSI陽性胃がん64症例中25症例(39%)に変異を検出したが、正常組織では変異を検出しなかった。変異と臨床病理学的因子との相関を認めなかった。一方、MSI陽性子宮体がんでは、8症例(14%)においてのみ変異を検出し、胃がんに比べ頻度が低かった。変異と臨床病理学的因子との相関を認めなかった。

D. 考察

がんに関連する遺伝子異常のひとつとしてMSIについて胃がんを対象に、ジェネティックおよびエピジェネティックな異常を系統的に解析した。

HLA-A、-B、-Cの発現低下は比較的高頻度で認められ、転写レベルでの発現抑制の重要性が示唆された。MSI陽性胃がんではHLA-Aの発現低下が高頻度であった。大腸がんでは、HLA-Aの発現低下例の予後が良好であることが報告されており興味深い。

胃がん組織におけるHLA-A、-B、-C遺伝子部位近傍のLOHの頻度は12-16%と低頻度であり、発現低下の主要な機序ではないと考えられた。一方、メチル化は、HLA mRNA発現の不活化の重要な機序であると考えられた。両アレルのメチル化は、LOHのselective pressureを減じている可能性も考えられた。いわゆる過剰メチル化機序とMSI陽性との関連が胃がんにおいても報告されている。本研究では、HLA-Aのメチル化のみがMSI陽性胃がんでは有意に高頻度であったが、アセチル化も含めたエピジェネティック機構とともにさらなる検討が必要である。

LMP2、LMP7、LMP10、TAP1、TAP2などのAPM遺伝子のmRNA発現の低下が27%-47%で認められ、HLAと併せて、これらのAPM遺伝子の不活化が胃がんにおいて重要であることが示唆された。

$\beta 2m$ 遺伝子の繰り返し配列は(A)5など短いにもかかわらず、高率に変異を認めたことから強いselective pressureがかかっていると考えられた。 $\beta 2m$ 変異陰性例においても $\beta 2m$ 染色陰性例を認めたことから、変異以外の不活化機序に関して、今後解析が必要である。MSI陽性胃がんにおいては、LMP7、TAP1、TAP2、tapasin、calnexin、

SEC63、SEC31、P4HB (p55) 遺伝子の繰り返し配列においても変異を検出した。変異頻度の高い遺伝子に関しては、強いselective pressureがかかっていると考えられた。

以上、本研究成果は、MSIの有無によるimmune escape phenotypeの相違の理解を通じて、胃がん進展機序の解明に有用であり、今後、診断や治療への応用も期待できるものと考えられた。

MSI陽性症例におけるVEGF発現の頻度は、MSI陰性症例と比較して有意に低頻度であることを明らかにした。MSI陽性症例でp53遺伝子変異やCOX-2発現が低頻度であることが、VEGF発現の頻度の低さに関連しているものと考えられた。FGF2の発現に関しても、VEGF発現類似の発現調節機序が示唆された。

胃がんにおいてTHBS1遺伝子の不活化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。THBS1遺伝子メチル化はMSI陽性症例で有意に頻度が高かった。THBS1遺伝子はwild-type p53遺伝子により活性化されることから、wild-type p53遺伝子を認めることが多いMSI陽性症例では、THBS1遺伝子メチル化のselective pressureがかかっていることが示唆された。

胃がん症例の予後解析では、VEGF発現陽性かつTHBS1メチル化陽性の組み合わせは、多変量解析においても有意な予後不良因子であり、予後判定や将来的に分子標的治療の選択に有用であることが示唆された。

以上、本研究成果は、MSIの有無による胃がん進展機序の相違の解明に有用であり、また今後、診断や治療への応用も期待できるものと考えられた。

最近、エフリンリセプターEphB2の不活化が大腸がんにおいて極めて重要であることが報告され (Nature 2005) 注目されているが、本研究では、EphB2が散発性MSI陽性胃がんにおいて、(A)9の繰り返し配列の変異により高頻度で検出した。リン酸化によりkinase活性を調節していると考えられるS1048、S1052が、全ての変異で、不活化されていたことから、この遺伝子変異の重要性が示唆された。

本研究成果の意義及び今後の発展性として、MSI陽性がんの多段階発がん分子病態の解明において大きな意義があり、予後予測、最適な分子標的治療薬の選択などの臨床応用が期待できる。重複・多発がんの病態解明にも発展しうる。今後さらなる分子診断や分子標的治療法の開発、他のがん種の多段階発がん機構の解明へと発展性が期待でき、がんの予防・診断・治療に亘り臨床医学における新局面が拓かれることが期待できる。

がん克服、国民福祉の向上、医療費の抑制など厚生労働行政に与えるインパクトは極めて大きいと考えられる。これまでに、MSI陽性胃がん、大腸がんを中心に発がん・進展に深く関わるジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常を明らかにしてきたが、今後さらにMSI陽性がんを中心として消化器がんの多段階発がん・進展機構の全貌の解明およびがんの予防・診断・治療応用への展開が期待できる。

E. 結論

MSI陽性の有無によって胃がんにおける免疫逃避機序に特徴があることを示し、ミスマッチ修復異常によるMSI陽性胃がんにおいてより強い免疫

逃避機序が働いていることを明らかにした。

MSI陽性の有無によって胃がんにおける血管新生関連遺伝子の発現やメチル化異常の関与が異なることを示し、このことが胃がんの進展や予後などに影響を及ぼしていることを明らかにした。

MSI陽性胃がんにおけるエフリンリセプターEphB2のフレームシフト変異による不活化を明らかにした。

以上の研究成果はヒト多段階発がん機構の解明において大きな意義がある。診断や分子標的治療への臨床応用や他のがん種の多段階発がん機構の解明へと発展性が期待でき、がん克服へ向けた重要な新知見であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirata T, Yamamoto H, Taniguchi H, Horiuchi S, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Characterization of immune escape phenotype of human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *J Pathol*, 211: 516-523, 2007.

2) Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* (in press).

3) Davalos V, Dopeso H, Velho S, Ferreira AM, Cirnes L, Díaz-Chico N, Bilbao C, Ramírez R, Rodríguez G, Falcón O, León L, Niessen R, Keller G, Dallenbach-Hellweg G, Espín E, Armengol M, Perucho M, Imai K, Yamamoto H, Gebert JF, Díaz-Chico JC, Hofstra RM, Woerner SM, Seruca R,

Schwartz S Jr, Arango D. High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability. *Oncogene*, 26: 308-311, 2007.

4) Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Takahashi T, Adachi Y, Imamura A, Imai K, Shinomura Y. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer*, 42: 2374-2381, 2006.

5) Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, 106: 1467-1479, 2006.

6) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 2006 Nov 3; [Epub ahead of print].

7) Mikami M, Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Maehata T, Taniguchi H, Adachi Y, Imamura A, Fujita M, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Mutational analysis of β -catenin and the RAS-RAF signaling pathway in early flat-type colorectal tumours. *Eur J Cancer*, 42: 3065-3072, 2006.

8) Takahashi T, Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Miyamoto N, Adachi Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Flat-type colorectal advanced adenomas (laterally spreading tumors) have different genetic and epigenetic alterations from protruded-type advanced adenomas. *Mod Pathol*, 20: 139-147, 2007.

9) Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T,