

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる
分子病態の解析とその臨床応用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 立 松 正 衛

平成19（2007）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用 …… 1
主任研究者 立松正衛

II. 分担研究報告

1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析…………… 15
立松正衛（愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部）
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 …………… 20
瀬戸加大（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. エピジェネティクス異常と発がんとの関連 …………… 24
関戸好孝（愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部）
4. がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究 …………… 28
稲垣昌樹（愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部）

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生と進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所・副所長

研究要旨：本研究では (a) 消化器がんの進展・転移の分子病態の解明とその臨床応用、(b)造血器腫瘍および (c) 肺がんなどの難治がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割、ならびに (d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明を試みている。本年度の主たる成果は以下のようである。

(a) (1) 胃がん肝転移巣由来HER2高発現細胞の Gefitinib感受性は活性化されたPI3K/Akt経路の遮断によるアポトーシス誘導に起因すること、耐性はEGFR/Ras/MAPK経路の代償性の活性化によること、さらに Trastuzumabの腹膜転移に対する顕著な抗腫瘍効果はHER2の発現低下によるPI3K/Akt経路の抑制および抗体依存性細胞障害活性(ADCC)に起因する可能性を示唆した。また(2) 大腸がんのDNAメチル化により制御されるがん関連遺伝子の同定を目指し、消化器がんの細胞株、臨床検体を使用してMCA-アレイ法を確立した。(b) ピロリ菌除菌治療抵抗性胃MALTリンパ腫のうちAPI2-MALT1キメラ遺伝子陽性群にはキメラ遺伝子以外のゲノム異常は認めなかった。これに対し、キメラ遺伝子が存在しない症例ではアレイCGH法による解析の結果、多様なゲノム異常の存在が認められ、このゲノム異常が除菌治療反応性を予測するよいマーカーとなりうる可能性を明らかにした。(c)(1) MCA-アレイ法を用いヒト固形腫瘍株のDNAメチル化異常を網羅的に解析した。解析可能19,500領域中1,837遺伝子がメチル化を示した。メチル化DNA抗体を用いたDip-chip法により多数の遺伝子が検出でき、シーケンシング法による個別遺伝子のメチル化状態との比較検討にて陽性感度が高いことを明らかにした。(2) 肺がん細胞株染色体2p24ホモザイガス欠失領域に存在するRhoB遺伝子に着目し、肺がんではRhoBが染色体欠失およびヒストン脱アセチル化により高頻度に不活化し、さらにヒストン脱アセチル化酵素阻害薬にて再発現することを明らかにした。RhoB低発現の肺がんでは患者予後不良の傾向を認めた。(d) がん細胞の骨格・細胞間接着を制御するシステムとして、上皮間葉転換は転写レベルでの広範な形質の変化であり、特異的な構造物を制御する分子の報告は少ない。今回我々は新規ケラチン結合蛋白質のうち、トリコプレインが母中心小体の遠位端にも存在し、その機能として微小管の安定化に必要であること、アルマトロスが細胞間接着装置複合体の近傍に分布し、細胞間接着装置複合体の構築および強固な接着に必須であることを見出し、これらケラチン結合蛋白質ががんにおけるいまだ未知の細胞骨格・接着異常に関与している可能性を示唆した。

分担研究者	所属施設名	職名
立松正衛	愛知県がんセンター研究所	副所長
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長

A. 研究目的

- (a) 消化器がんでは (1)胃がん肝転移巣由来 HER2高発現細胞の分子標的薬感受性・耐性機構の解析とそれに基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法を開発する。(2) 大腸がんのがん関連遺伝子の病期特異的DNAメチル化の解析と多段階発がん過程に於けるその役割を解明する。
- (b) 造血器腫瘍では (1)胃MALTリンパ腫の除菌療法に対する治療反応性とゲノム異常との関連をアレイCGHで調べ、治療反応性を規定するゲノム異常を調べる。(2) CD5+DLBCLは治療抵抗性で予後不良群であることをこれまでに明らかにしてきたが、遺伝子発現解析を行い、特徴的な発現様式を見出す。
- (c) 肺がんでは (1) DNAメチル化異常をより網羅的かつ迅速に検出できる方法を開発する。(2) 発現の低下が肺腫瘍の発生・進展に関与すると考えられる個別の遺伝子について、発現制御機構におけるエピジェネティック異常の関与を明らかにし、その臨床的な意味を解明する。
- (d)がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究では、上皮性のがんに特異的に発現する新規ケラチン結合蛋白質として同定したトリコプレインおよびアルバトロスの細胞内局在・細胞内機能を解明し、新しいがん診断・治療の標的と成りうるか否かを検討する。

B. 研究方法

- (a) 消化器がんの進展・転移における分子病態の解析：

(1)胃がん肝転移巣から樹立したHER2高発現細胞株を用いて Gefitinib (Iressa) や Trastuzumab (Herceptin)など HERファミリーを標的とする分子標的治療薬に対するin vitroにおける感受性機構および耐性機構を明らかにする。(2) HER2高発現胃がん細胞株のin vivo皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いてTrastuzumab, Gefitinibに対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法を構築する。(3) MCA (Methylated CpG islands Amplification) Microarray (MCA-アレイ) 法を用い、肝細胞がん症例の背景肝組織(肝硬変)と肝細胞がん組織からDNAを抽出し、メチル化の検出された個別の遺伝子についてDNAメチル化の定量的解析法であるパイロシークエンシング法で精細に検討する。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の解析：

- (1) 胃MALTリンパ腫除菌療法反応性とゲノム異常との関連の解析。胃MALTリンパ腫症例のうち、除菌療法有効群(グループA) 9症例、除菌療法無効症例でAPI2-MALT1キメラ遺伝子の認められない群(グループB) 10症例およびAPI2-MALT1陽性群(グループC) 10症例のゲノム異常様式をアレイCGH法で調べる。各症例はHE染色にて、あらかじめ25%以上の腫瘍細胞成分を含むことを確認したものを用いる。
- (2) CD5発現に基づいたDLBCLの遺伝子発現解析。CD5+DLBCL 22症例、CD5-DLBCL 26症例の計48症例について、Agilent 22K発現解析アレイで、遺伝子発現解析を行う。両群で発現差の大きい遺伝子を選択し、それらをCD5 signatureとして、本データセットおよび、他グループがすでに報告しているデータセットにも適用し、一般化できるかどうかを確認し、有用性を検討する。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析：

(1)ゲノムDNAを制限酵素SmaI、次にXmaIで切断し、XmaI末端相補的アダプターを結合し、メチル化されたサイトに囲まれたDNA断片を選択的にPCR増幅した。次に腫瘍由来増幅産物をCy5、正常由来産物をCy3でラベルしproximal promoterアレイにハイブリダイズ、DNAメチル化陽性遺伝子を検出した。(2)肺がん細胞株におけるRhoBの遺伝子発現をqRT-PCR法等で、外科手術標本における発現は抗RhoB抗体を用いた免疫組織染色で、RhoBの遺伝子プロモーター領域におけるメチル化の異常をmethylation specific PCR (MSP)法およびシーケンシング法等にて検討した。またRhoB発現の有無で層別化した112人の肺がん患者の予後解析を行いlog-rank testにて検定を行った。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究：

(1)新規ケラチン結合蛋白質トリコプレインおよびアルマトロスの細胞内局在の解析

まずそれぞれの特異的抗体を作成し、蛍光抗体染色法を用い、また分画法さらに免疫電顕法を用いてこれらの蛋白質の組織あるいは細胞内分布を調べた。

(2)トリコプレインおよびアルマトロスの細胞内機能の解析

トリコプレインについてはsiRNAを用いたRNA干渉法をHeLa細胞に対して行い、その状態において寒冷刺激後の微小管再形成における変化を観察した。またアルマトロスについては、レトロウイルスを用いたRNA干渉法の系でshRNAをA549細胞に導入し、アルマトロスの発現が減弱した細胞を作成し、各種細胞間接着装置の構成蛋白質および極性マーカーの局在変化を観察した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた患者検体は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会および名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。またレトロウイルス等を用いた実験は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会承認されたプロトコールに基づき、指定を受けた研究領域のみで使用した。

C. 研究結果

(a) 消化器がんの進展・転移における分子病態の解析：

(1) 胃がん肝転移巣由来HER2高発現細胞株の分子標的治療薬に対する感受性および耐性機構の解析

肝転移巣から独自に樹立したHER2高発現胃がん細胞株3株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) および既存の肝転移巣由来胃がん細胞株NCI-N87では HER family下流のシグナル伝達経路としてRas/MAPK経路ではなく、PI3K/Akt経路が恒常的に活性化されており、各種シグナル伝達阻害剤を用いた実験からHER2高発現胃がん細胞株はその生存 (アポトーシス回避) をHER2過剰発現によって活性化されたPI3K/Akt経路に依存している事を明らかにしてきた。一方、これらの細胞を gefitinib存在下で長期培養して分離した耐性株ではPI3K/Akt経路の恒常的活性化に加えて、EGFRの発現亢進、Erk1/2の恒常的リン酸化が認められた。このことからPI3K/Akt経路を代償するEGFR/Ras/MAPK経路の新たな活性化が gefitinibに対する獲得耐性に関与していることを明らかにした。

(2) 上記分子基盤に基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発

これらHER2高発現胃癌細胞株に対するTrastuzumab感受性を調べたところ、*in vitro*において軽度の増殖抑制は認めるものの、Trastuzumabによる有意なアポトーシス誘導は認められず、ヌードマウス皮下移植腫瘍においてもgefitinibに比べごく軽度の抗腫瘍効果しか示さなかった。しかし、興味ある事として上記細胞の腹腔内接種による腹膜転移に対しては殆ど転移が消失するほどの顕著な転移抑制が認められた。そこでTrastuzumabによるシグナル伝達経路への影響を検討したところ、HER2のdown regulationおよびAktリン酸化の抑制が認められた。また、ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞をEffector細胞としてTrastuzumabによる抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を⁵¹Cr release assayにより検討したところ、HER2低発現胃癌細胞に比べて、HER2高発現胃癌細胞ではADCC活性が高い傾向が認められた。以上のことから腹膜転移に対する抗腫瘍効果にはHER2高発現胃癌細胞の生存に必須なPI3K/Akt経路の抑制と抗体依存性細胞障害(ADCC)の両者が関与する可能性が示唆された。

(3) 大腸がんのがん関連遺伝子の病期特異的DNAメチル化の解析

MCA-アレイ上で異なったシグナル比を示す遺伝子を選び、各検体における各遺伝子のアレイ上のシグナル比と、パイロシーケンス法により得られたDNAメチル化レベルを比較した。シグナル比2.0以上を陽性にした場合に、DNAメチル化陽性遺伝子を検出する最適な感度・特異度が得られることを確認した。肝細胞がん6症例でシグナル比2.0以上を示すspotは、背景肝(肝硬変)部、がん部それぞれ平均して686、2798 spotsであった。また、背景肝部でのDNAメチル化陽性遺伝子はがん部でも80%以上が共通して陽性であった。これらの遺伝子群に関して38症例の肝細胞がん

のがん部・背景肝部でDNAメチル化レベルをパイロシーケンス法により定量した結果、P16やCyclin A1に代表されるがん部特異的にメチル化する遺伝子や、RASSF1AやPRDM14など背景肝部からがん部に進行するに従いメチル化レベルの上昇する遺伝子等、遺伝子ごとにメチル化する時期の異なることが見出された。以上の予備的検討結果をもとに大腸がん症例に関して、各病期(0~IV期)で、がん部、正常粘膜、肝転移巣(IV期)からサンプリングを行ない、MCA-アレイ法による解析を開始した。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割:

(1) 胃MALTリンパ腫除菌療法反応性とゲノム異常との関連の解析

グループAである除菌治療有効症例9症例のうち1例に染色体コピー変化が認められたが、他の症例にはゲノム異常が認められなかった。治療抵抗性でAPI2-MALT1キメラ遺伝子のないグループBでは10症例のうち、7例にゲノム異常が認められた。3症例以上に共通して認められたゲノム異常は染色体3番の増幅であった。API2-MALT1陽性の除菌治療抵抗性のグループCでは、アレイCGH法で見出されるゲノム異常はなく、API2-MALT1が除菌抵抗性に責任ある原因遺伝子であることが推測された。

(2) CD5発現に基づいたDLBCLの遺伝子発現解析

CD5+DLBCL 22症例とCD5-DLBCL 26症例の両群間で発現差のある遺伝子を選び出した。その方法は、発現解析データの中から、まず、約20000スポットのシグナルで、両群ともに値が300 digits以下の弱いスポットを解析から取り除き、約12000スポットを解析対象とした。両群で2.5倍以上の発現差のある遺伝子は、24個、発現差が2倍以上の遺伝子数は70個

あった(CD5 signature)。2.5倍以上の差のある遺伝子を用いて、クラスター解析したところ、CD5+ 症例 22 例のうち 20 症例と、CD5-DLBCL 26 症例のうち 9 症例がひとつのクラスターを形成し、もうひとつのクラスターには CD5-DLBCL 17 症例と CD5+DLBCL 2 症例が集まった。前者は CD5+DLBCL 症例のほとんどを含み、後者のクラスターには CD5-DLBCL 症例の 2/3 を含んでおり、CD5 の発現による分類とよく相関した。クラスター解析による 2 つのグループの前者を CD5+ type DLBCL と定義し、後者を CD5- type DLBCL と定義した。

両群の生存曲線を Kaplan-Meyer 法で解析したところ、CD5+ type DLBCL は CD5- type DLBCL に比較し、有意に予後の悪いことが明らかとなった ($P=0.0006$)。CD5 signature を 2 倍以上の発現差のある遺伝子にしても同様な結果となった。

次に、これらの結果を検証するために公開されているデータセット (Rosenwald et al., *New Eng J Med*, 2002) を用いた。その結果、このデータセットでも、CD5+ type DLBCL は予後が悪いことが明らかとなった。発現解析で確立されている ABC DLBCL と GCB DLBCL subtype それぞれについて検討すると、ABC DLBCL では CD5+ type DLBCL は CD5-DLBCL に比較して有意に予後が悪かったが ($p=0.0037$)、GCB DLBCL では CD5+DLBCL は予後が悪い傾向が見られた ($p=0.076$)。これらの事実は他のデータセットでも同様な結果が得られたことを意味し、CD5 signature で規定される CD5+ type DLBCL は臨床的に意義のある疾患群を規定することができることが明らかになった。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常と発がんとの関連 :

(1) ヒト悪性腫瘍株 ACC-MESO-1 を用いた解析で、MCA アレイ法では、制限酵素 XmaI 配列を両端に有する CpG サイト 19,500 領域に関して検討を行った。509 遺伝子が高メチル化 (Cy5/Cy3 比が 5 以上) を、1,328 遺伝子が中等度メチル化 ($5 > \text{Cy5/Cy3 比} > 2$) を示した。そのうち 17 遺伝子をシーケンシング法で検討した結果、14 遺伝子 (82%) において DNA メチル化が確認された。一方、Dip-Chip 法で、同一の細胞株を用いて、同じアレイを用いて検討した結果、メチル化陽性であると検出された遺伝子数は MCA-アレイ法で検出された遺伝子数の 35% (461 遺伝子) であり、さらに同定された遺伝子のメチル化陽性の感度は 67% と低かった。他の複数のヒト悪性腫瘍株においても同様の結果を得た。

(2) ノーザンブロット法で 28 細胞株 (15 の非小細胞肺癌株を含む) 中 27 株において RhoB の発現低下を認めた。また免疫組織学的検討では 78 例の肺腺がん中 33 例、31 例の肺扁平上皮がん中 29 例でその発現の減弱を認めた。発現低下へのエピジェネティクスの関与を検討するため、プロモーター領域のメチル化の有無を COBRA 法、MSP 法のアッセイ法で検討したがメチル化の異常は認められなかった。シーケンシング法においても発現低下している細胞株のプロモーター領域のごく一部の CpG がメチル化されているのみであった。一方、発現の減弱が認められた 3 腫の細胞株 NCI-H1299, NCI-1666 および HCC193 に対してヒストン脱アセチル化酵素剤 TSA の処理を行い、RhoB の遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法にて検討したところ発現の増強を認めた。さらに RhoB 発現低下していた 64 名の非小細胞肺癌症例では有意ではなかったものの予後不良な傾向を認めた。

(d) がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研究 :

(1)トリコプレインの細胞内局在および細胞内機能の解析

トリコプレインの細胞内局在については、これが中心体にも濃縮することを蛍光抗体染色法および中心体画分のイムノプロットティングにより確認した。さらに免疫電顕法により、その中心体での局在は母中心小体の遠位端に限局していることを確認した。当部位には appendage と呼ばれる微小管のアンカリング部位が存在し、それが微小管を安定化させていると言われている。それで、機能解析としてトリコプレインの発現を減弱させた状態で微小管再形成実験を行ったところ、中心体への微小管のアンカリングが阻害されていることを見出した。以上のことから、トリコプレインは母中心小体の遠位端にも存在し、微小管の安定化に必要であることがわかった。

(2)アルバトロスの細胞内局在および細胞内機能の解析

アルバトロスの局在については、それがケラチンフィラメントの上にドット状にあるだけでなく細胞間接着部位にも濃縮することを、種々の上皮組織および上皮細胞を用いた蛍光抗体染色で確認した。このことはマウス肝臓の毛細胆管画分および AJ (Adherens Junction)画分のイムノプロットティングによっても確認された。さらに免疫電顕法により、アルバトロスが細胞間接着装置複合体の近傍に分布することを確認した。続いてアルバトロスの細胞内機能を解析するため、その発現を減弱させた状態で各種細胞間接着装置の構成蛋白質の局在変化を観察したところ、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモソームの全ての構成蛋白質が細胞間接着部位から減弱していることを見出した。しかし、このような状態でもアピカル極性のマーカーである Ezrin, 微絨毛の局在は正常であり、またバソラテラルマーカーである

E-カドヘリン、 β -カテニンは依然細胞膜に存在していた。さらにこの細胞でアグリゲーションアッセイを行ったところ、細胞間接着が不十分で遊離した細胞の増加が認められた。以上のことから、アルバトロスは細胞間接着装置複合体の近傍に分布し、細胞間接着装置複合体の構築および強固な接着に特異的に必要であることを見出した。

D. 考察

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用

(1)胃がん肝転移巣由来HER2高発現細胞の gefitinib、Trastuzumab感受性・耐性機構の解析と新しい分子標的治療法の開発

胃がんに対する gefitinib の臨床試験は国際共同の小規模な第 III 相試験がこれまでに 1 つ行われている。それによれば gefitinib の奏功率は 18%程度と低く、胃がんに対する適応は乏しいと結論されている。しかし今回の我々の結果は、有効な治療法に乏しい胃がん肝転移に対して少なくとも HER2 高発現胃がん症例を選別することにより gefitinib が有効な治療法になりうる可能性を示唆している。実際、リン酸化Akt抗体を用いた免疫染色による胃がん肝転移症例の検討では、HER2 高発現症例では肝転移巣においてリン酸化Aktの陽性率が高い傾向を認めている。

低分子のシグナル伝達阻害薬では耐性獲得が臨床的に課題とされている。今回、我々は PI3K/Akt 経路に対する EGFR/Ras/MAPK 経路の代償性の活性化が gefitinib 耐性獲得の一つの機序であることを明らかにした。この点に関しては今後、PI3K/Akt 経路と MAPK 経路を同時に阻害できる dual kinase inhibitor など HER2 高発現胃がん肝転移に対して耐性が獲得されにくく、より実効性の高い治療法のさらなる検討が必要である。

一方、HER2高発現乳がんに対して臨床的に有効性が確認されている Trastuzumab は HER2高発現胃がん細胞に対しては *in vitro* では軽度の増殖抑制効果を示すのみで、皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果も gefitinib と比較してはるかに弱かった。しかし、今回の検討により Trastuzumab は腹膜転移に対して顕著な転移抑制効果を有すること、これに HER2 の Down regulation を介した PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制と抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) の両者が関与する可能性を明らかにした。ADCC に関してはさらに、抗体の FC 領域を酵素的に除去し、Fab にした場合の細胞障害活性の低下の有無の検討や NK 細胞やマクロファージの機能が欠損 (低下) した NOD/SCID マウスなどを用いた *in vivo* の検証実験を現在進めている。また、皮下腫瘍と腹膜転移とでなぜ Trastuzumab に対する感受性に顕著な差異が存在するのも解明すべき重要な課題であるが、現在のところ不明である。皮下腫瘍と腹膜転移組織では ADCC に関わる Effector 細胞の種類や数に違いがある可能性や、Trastuzumab の腫瘍組織内濃度や動態に差異があるなどいくつかの可能性が考えられ、今後、これらの点について精細な解析が必要と考えられた。

HER2高発現胃がんに対する Trastuzumab の臨床試験として現在、国際共同の大規模な第III相試験が進められている。我々の予備的な結果では胃がんの再発様式の中で最も頻度の高い腹膜転移由来の HER2高発現胃がん細胞株 (NUGC-4) は遺伝子増幅がなく、Gefitinib および Trastuzumab に対する感受性も肝転移由来細胞に比べはるかに弱い。従って、経済的負担の大きい上記分子標的治療には適格症例のさらなる選別が必要と思われる、そのためには治療感受性を高精度に予測できる診断マーカーの開発と簡便な測定法の開発が重要で

ある。胃がん肝転移の約半分は HER2高発現と考えられ、そのうちかなりの症例が HER2 遺伝子増幅を有すると予想されることから、HER2 を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、Gefitinib や Trastuzumab、さらに新しい HER family 標的薬など作用機序の異なる薬剤を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待される。

(2) 大腸がんのがん関連遺伝子の病期特異的 DNAメチル化の解析

大腸がんのがんならびに前がん状態における DNAメチル化の網羅的解析として MCA-アレイ法の共同開発を行なった。同方法の利点としては、少量の DNA から開始するため、正常大腸粘膜からのバイオプシー検体のような場合でも解析が可能である。また、カスタムアレイを独自にデザインし、一枚のスライドガラスに複数のアレイ (現時点で4検体を1枚のスライドガラス上で解析可) を搭載できるため、1検体当たりの単価が大幅に削減可能となった。今後多くの固形腫瘍への適応の可能性が期待できる。予備的検討として、本年度は前がん病変として肝硬変組織を用いて検討を行なった結果、多数の DNAメチル化標的遺伝子が同一症例のがん部でも共通してメチル化されていることを確認した。MCA-アレイ法により大腸がんの発がん過程において早期から進行がんに至るまでの DNAメチル化異常の標的遺伝子の網羅的解析が今後可能であり、得られた遺伝子の DNAメチル化解析により、大腸がんの発がんリスク、がんの早期診断と予後予測因子となりうると考える。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) 胃MALTリンパ腫除菌療法反応性とゲノム異常との関連の解析

これまで我々の解析によって、胃MALTリンパ腫はピロリ菌除菌治療により完解するもの(グループA:約70%)、治療に反応せずかつ*API2-MALT1*キメラ遺伝子のないもの(グループB:約15%)および除菌治療抵抗性で*API2-MALT1*キメラ遺伝子を有するもの(グループC:約15%)が存在し、内視鏡学的所見もそれぞれに特徴が認められることを報告してきた。今回のアレイCGHによる解析で、グループBに多様なゲノム異常が認められたことは、臨床学的所見を支持するものであり、除菌療法抵抗性の分子基盤が得られたことを意味し、意義が高い。これらに共通する異常としては染色体3番の増幅が10症例中3症例に認められたが、この異常は造血器腫瘍に比較的多く認められる異常であり、胃MALTリンパ腫のグループBに特徴的なものではなく、腫瘍化にかかわるゲノム変化であると考えられる。また除菌療法有効群であるグループAの中の1症例に多様なゲノム異常を示したものがあつたものの、除菌療法に反応して完解しているのは、大変興味深い。本症例は再発の有無など、長期観察する必要がある。

(2) CD5発現に基づいたDLBCLの遺伝子発現解析

これまでの我々の解析からCD5+DLBCLは、治療抵抗性で予後不良であることが明らかとなっていた。またアレイCGH法による解析でも特徴的なゲノム異常が認められていた。しかし、CD5マーカー以外によいマーカーがなく、今回の遺伝子発現解析で、CD5+DLBCLとCD5-DLBCLの間で大きく発現差の異なる遺伝子群(CD5 signature)を見出したことは意義が高く、これまでの解析結果を強く支持するものであつた。

発現解析によって分類したCD5+ type

DLBCLの中にはほとんどのCD5+DLBCLが含まれていたが、CD5+ typeの中に含まれるCD5-DLBCLは、CD5-type DLBCLに比べて予後が悪く、本来、CD5+ type DLBCLを臨床的意義のある疾患群と捉えるほうがよいのかもしれないが、今後の検討が必要である。CD5 signatureを用いて他のデータセットを解析したところ、やはり、CD5+ type DLBCLは有意に予後が悪く、本研究結果が確認された。特に、ABC DLBCLでは予後の差が大きく、ABC DLBCLの中での予後予測の差異を明らかにできたことは重要である。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析

(1)DNAメチル化異常を迅速かつ高感度に網羅的に検出する方法としてMCA -アレイ法が極めて有用であり、今後多くの固形腫瘍への適応の可能性が期待できる。Dip-Chip法はメチル化したDNAに対する抗体を用いるため、制限酵素部位による制限がなく網羅性が高いと考えられているが、本研究では検出できる遺伝子数はMCA -アレイ法と比べてむしろ少なかった。一方でMCA -アレイ法は、解析する遺伝子のプロモーター領域にSmaI/XmaI制限酵素サイトが複数個存在することが必要であり、この条件のため、いくつかの遺伝子プロモーター領域は本アッセイ系では検討ができない。従って新たなメチル化感受性、非感受性の制限酵素サイトを利用したりするなどの改良を加え、より網羅的に解析するアッセイ系の確立が必要であると考えられた。

(2)Rhoファミリー遺伝子のRhoAおよびRhoCは各種のヒト悪性腫瘍で高発現し、腫瘍増殖能、浸潤・転移能などに対してDominantな性質を与えていると考えられている。一方、RhoBは発がんに係わる機能に関して逆にSuppressiveな性質を有するとの報告も散見さ

れる。本研究においてはRhoBが非小細胞肺癌において高頻度に欠失し、遺伝子レベル、蛋白レベルにおいて発現が抑制されていることを明らかにした。さらにこの遺伝子の発現制御異常は、プロモーター領域のDNAメチル化ではなくヒストン修飾による異常が原因であることが示唆された。

(d)がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研究

がん細胞の骨格・細胞間接着を制御するシステムとして、上皮間葉転換は転写レベルでの広範な形質の変化であり、特異的な構造物を制御する分子の報告はまだ少ない。今回我々は、微小管の安定化および細胞間接着装置複合体という特異的な細胞骨格・細胞間接着の制御を行う蛋白質として、トリコプレインおよびアルバトロスを同定した。これらの結果は、がんにおいて今だ未知な細胞骨格・接着異常の分子メカニズムが存在し、それにこれらのケラチン結合蛋白質が関与していることを示している。今後はこれらの分子の結合蛋白質をさらに検索・同定する。また、これらのノックアウトマウスを作成し腫瘍形成能を検討する。それらの結果をもとに、がんにおいて今だ未知な細胞骨格・接着異常の分子メカニズムを明かし、診断・治療に役立つ予定である。

E. 結論

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) HER2高発現胃がん細胞株のgefitinib高感受性はHER2過剰発現により恒常的に活性化されたPI3K/Aktシグナル伝達経路の遮断によるアポトーシス誘導に起因すること、耐性はEGFR/Ras/MAPK経路の代償性の恒常的活性化によることを明らかにした。

HER2高発現細胞株の腹膜転移が

Trastuzumabに対して高い感受性を示すこと、これがHER2のdown regulationを介したPI3K/Aktシグナル伝達経路の抑制および抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者に起因する可能性を明らかにした。

(2) MCA-アレイ法にてがんおよび前がん状態からDNAメチル化標的遺伝子を網羅的に解析し、同方法が前がん状態にも適応可能な極めて優れた方法であることが確認した。生検材料でのDNAメチル化検出マーカーとして大腸がん診断への応用が期待できる。

(b) 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析

(1) *API2-MALT1*キメラ遺伝子のない除菌療法抵抗性胃MALTリンパ腫には多様なゲノム異常が認められ、除菌抵抗性の原因のひとつであると考えられた。

(2) 除菌療法有効群の中にも1症例複数のゲノム異常を有するものが認められたが、ゲノム異常を有し、腫瘍性増殖が認められるものの中にも、ピロリ菌がなくなると増殖しなくなるものがあるということが明らかになったが、長期観察が必要である。

(3) *API2-MALT1*キメラ遺伝子のある胃MALTリンパ腫は他のゲノム異常が認められず、除菌治療抵抗性の原因遺伝子は*API2-MALT1*キメラ遺伝子であることが強く示唆された。

(4) CD5+DLBCLに特徴的な遺伝子発現様式(CD5 signature)を見出した。これらの遺伝子群でDLBCLを分類するとCD5+ type DLBCLはCD5- type DLBCLに比べ優位に予後が悪いことが明らかとなった。他のデータセットでも確認された。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析

ヒト固形腫瘍においてエピジェネティクス異常をMCA-マイクロアレイ法にて網羅的に検

出し、検出された個別の遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無は、シーケンシング法によって極めて高い相関性があることが確認された。一方、肺がんにおけるRhoBの遺伝子不活化はDNAメチル化ではなくヒストン修飾による機序が強く示唆された。

今回、確立したMCA-アレイ法で肺がん等のヒト難治性腫瘍を解析し、肺がんの特異的ながん関連遺伝子の同定が可能となり、喀痰や血液細胞中のDNAメチル化検出マーカーとして肺がん診断への応用が期待できる。さらに、DNAメチル化酵素阻害薬やヒストン脱アセチル化阻害薬等を用い新しい治療への展開が期待できる。

(d) がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研究
新規ケラチン結合蛋白質トリコプレインの中心体局在は母中心小体の遠位端に局限し、微小管の安定化に必要であることを見出した。また新規ケラチン結合蛋白質アルバトロスは細胞間接着装置複合体の近傍に分布し、細胞間接着装置複合体の構築および強固な接着に特異的に必要であることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 発表論文

1. Yokoyama H., Nakanishi H., Kodera Y., Ikehara Y., Ohashi N., Ito Y., Koike M., Fujiwara M., Tatematsu M., Nakao A., Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. Clin. Cancer Res. 12(2); 361-68, 2006.
2. Kodera Y., Nakanishi H., Ito S., Mochizuki Y., Ohashi N., Yamamura Y Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: Analysis of real time RT-PCR after 5 years of follow-up. J Am Coll Surg. 202(2); 231-6, 2006.
3. Ito S., Nakanishi H., Kodera Y., Mochizuki Y., Tatematsu M., Yamamura Y., Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. Br. J. Cancer, 93 (9); 986-92, 2005.
4. Ohashi N, Kodera Y, Nakanishi H, Yokoyama H, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M. Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice. Int. J. Oncol.27(3) ; 637-44, 2005.
5. Yamachika T, Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Niwa T, Wanibuchi H, Tatematsu M., Fukushima S. Establishment and characterization of a human colonic mucinous carcinoma cell line with predominant goblet-cell differentiation from liver metastasis. Pathol Int. 55(9): 550-7, 2005.
6. Futamura N, Nakanishi H, Hirose H, Nakamura S, Tatematsu M. The effect of storage on the survival of cancer cells in blood and efficient elimination of contaminating cancer cells by a leukocyte depletion filter. Am Surg. 71(7): 585-90, 2005.
7. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M., Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. Gastric Cancer. 8(3):142-8, 2005.

8. Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Yokoyama H, Munesue S, Kodera Y, Tatematsu M. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clin. Exp. Meta.* 22:137-147, 2005.
9. Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Tatematsu M. Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice. *Methods Mol Med.* 111:351-62, 2005.
10. Niwa T, Ikehara Y, Nakanishi H, Tanaka H, Inada K, Tsukamoto T, Ichinose M, Tatematsu M. Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation. *J Histochem Cytochem.* 53(1): 75-85, 2005.
11. Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. Helicobacter pylori-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci.* 96(3):170-5, 2005.
12. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 24: 1348-1358, 2005.
13. Fujii, A., Oshima, K., Hamasaki, M., Utsunomiya, H., Okazaki, M., Kagami, Y., Seto, M., Kikuchi, M.: Differential expression of cytokines, chemokines and their receptors in follicular lymphoma and reactive follicular hyperplasia: Assessment by complementary DNA microarray. *Oncol. Rep.*, 13: 819-824, 2005.
14. Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 106:1770-1777, 2005.
15. Hosokawa, Y., Suzuki, H., Nakagawa, M., Lee, TH., Seto, M.: API2-MALT1 fusion protein induces transcriptional activation of the API2 gene through NF-kappaB binding elements: evidence for a positive feed-back loop pathway resulting in unremitting NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 51-60, 2005.
16. Nakashima, Y., Tagawa, H., Suzuki, R., Karnan, S., Karube, K., Ohshima, K., Muta, K., Nawata, H., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of Natural killer cell lymphoma/leukemia: Different genomic alteration patterns of aggressive NK-cell leukemia and extranodal NK/T lymphoma, Nasal type. *Genes Chrom. Cancer*, 44: 247-255, 2005.
17. Tagawa, H., Seto, M.: A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia Correspondence*, 19: 2013-2016, 2005.
18. Sawa, M., Yamamoto, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Hishida, A., Kajiguchi, T., Seto, M., Kohno, A., Kitamura, K., Itoh, Y., Asou, N., Hamajima, N., Emi, N., Naoe, T.: BMI-1 Is Highly Expressed in M0-Subtype Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Hematol.*, 82:42-47, 2005.
19. Nakagawa, M., Hosokawa, Y., Yonezumi, M., Izumiyama, K., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Asaka,

- M., Seto, M.: MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10. *Blood*, 106:4210-4216, 2005.
20. Kasugai, Y., Tagawa, H., Kameoka, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Identification of CCND3 and BYSL as Candidate Targets for the 6p21 Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 11:8265-8272, 2005.
 21. Karnan, S., Tsuzuki, S., Kiyoi, H., Tagawa, H., Ueda, R., Seto, M., Naoe, T.: Genomewide array-based comparative genomic hybridization analysis of acute promyelocytic leukemia. *Genes Chrom. Cancer*, 45:420-425, 2006.
 22. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Onco* (in press).
 23. Maeno K, Masuda A, Yanagisawa K, Konishi H, Osada H, Saito T, Ueda R, and Takahashi T. Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers. *Oncogene* 25: 271-7, 2006
 24. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, and Takahashi T. The ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 65: 10680-5, 2005
 25. Osada H*, Hayashita Y*, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yasushi Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, and Takahashi T. A polycistronic miRNA cluster, *miR-17-92*, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65: 9628-32, 2005 (* equal contributors)
 26. Osada H, Tatematsu Y, Sugito N, Horio Y, and Takahashi T. Histone modification in the TGF β RII gene promoter and its significance for responsiveness to HDAC inhibitor in lung cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 44: 233-41, 2005
 27. Anumanthan G, Halder SK, Osada H, Takahashi T, Massion PP, Carbone DP, Datta PK. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. *Br J Cancer.* 93: 1157-67, 2005
 28. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of *Dicer* associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96: 111-5, 2005
 29. Nagata, K. and Inagaki, M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene* 24: 65-76, 2005
 30. Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Usukura, J. and Inagaki, M. Identification of trichoplein, a novel keratin filament-binding protein. *J.Cell Sci.* 118: 1081-1090, 2005
 31. Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* 10: 127-137, 2005
 32. Tsui, J., Inagaki, M. and Schulman, H. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase

- II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 280: 9210-9216, 2005
33. Dyson, M.H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S.J., Nightingale, K., Iborra, F.J. and Mahadevan, L.C. MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *J. Cell Sci.* 118: 2247-2259, 2005
34. Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K., Inagaki, M. and Wileman, T. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J. Virol.* 79: 11766-11775, 2005
35. Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J. and Kaibuchi, K. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell Biol.* 25: 9973-9984, 2005
36. Yamaguchi, T., Goto, H., Yokoyama, T., Silljé, H., Hanisch, A., Uldschmid, A., Takai, Y., Oguri, T., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol.* 171: 431-436, 2005
37. Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M. and Nosaka, T. Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell Biol.* 25: 10965-10978, 2005
38. Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, P.J. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24: 3834-3845, 2005
39. Izawa, I. and Inagaki, M. Cleavage furrow kinases and cell division. *Signal Transduction of Cell Division.* 73-92, 2005
40. 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. *Nature Cell Biology* 8: 180-187, 2006.
41. Izawa, I. and Inagaki, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science* in press
42. Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F. and Inagaki, M. Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* in press
43. Oguri, T., Inoko, A., Shima, H., Izawa, I., Arimura, N., Yamaguchi, T., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Kikuchi, K. and Inagaki, M. Vimentin-Ser82 as a memory phosphorylation site in astrocytes. *Genes Cells* in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

出願特許

仮出願番号：未定

出願日：2005年 4月 19日

発明の名称：リンパ腫の予後・病型診断法

出願人：愛知県、日本ガイシ㈱

発明者：瀬戸加大、田川博之、吉田安子、
吉良茂樹

II. 分担研究報告書

分担研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：胃がん肝転移に対する分子標的治療法に対する感受性とその分子機構ならびに大腸がんの DNA メチル化により制御されるがん関連遺伝子を解析し、以下の諸点を明らかにした。1) 胃がん肝転移巣から樹立した HER2 高発現細胞株 (GLM-1,-2,-3) の gefitinib 高感受性は HER2 過剰発現により恒常的に活性化された PI3K/Akt 経路の遮断によるアポトーシス誘導に起因すること、また gefitinib 耐性は EGFR/Ras/MAPK 経路の代償性の恒常的活性化によること、2) ヒト化抗 HER2 抗体、Trastuzumab は HER2 高発現細胞 (GLM) 株の皮下移植腫瘍に対しては有意な抗腫瘍効果を示さないが、腹膜転移に対し顕著な抗腫瘍効果を示すこと、これに HER2 の発現低下を介した PI3K/Akt 経路の抑制および抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者が関与する可能性を明らかにした。また大腸がんに関しては、3) 大腸がんの DNA メチル化により制御されるがん関連遺伝子の同定を目指し、今年度は MCA-アレイ法を確立し、同方法をまず肝細胞がんのがん部ならびに前がん病変から得られた検体に適応することで、発がん過程の早期から進行がんへの各期での DNA メチル化標的遺伝子の同定が可能か否かの予備的検討を行った。その結果、多数のがん部・非がん部共通メチル化標的遺伝子を検出し、同方法が感度・特異度ともに極めて優れた網羅的解析法であることを明らかにした。

A. 研究目的

- (1) 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞株の HER 標的治療薬に対する感受性および耐性機構の解析
- (2) 胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発。
- (3) 大腸がんの多段階発がん過程で各病期特異的に DNA メチル化により制御されるがん関連遺伝子の同定とプロファイリングを行い、DNA メチル化が大腸がんの発がんリスク、がんの早期診断と予後予測因子となりうるかを検討する。

B. 研究方法

- (1) 胃がん肝転移巣から樹立した HER2 高発現

細胞株を用いて Gefitinib (Iressa) や Trastuzumab (Herceptin) など HER ファミリーを標的とする分子標的治療薬に対する *in vitro* における感受性機構および耐性機構を明らかにする。

- (2) HER2 高発現胃がん細胞株の *in vivo* 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Trastuzumab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法を構築する。
- (3) 共同開発した MCA (Methylated CpG islands Amplification) Microarray (MCA-アレイ) 法を用い、肝細胞がん6症例の背景肝組織 (肝硬変) と肝細胞がん組織から DNA を抽出し、検出された個別の遺伝子について DNA メチル化の定量的

解析法であるパイロシークエンシング法で検討した。

C. 研究結果

(1) 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞株の分子標的治療薬に対する感受性および耐性機構の解析

肝転移巣から独自に樹立した HER2 高発現胃がん細胞株 3 株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) および既存の肝転移巣由来胃がん細胞株 NCI-N87 では HER family 下流のシグナル伝達経路として Ras/MAPK 経路ではなく、PI3K/Akt 経路が恒常的に活性化されており、各種シグナル伝達阻害剤を用いた実験から HER2 高発現胃がん細胞株はその生存 (アポトーシス回避) を HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路に依存している事を明らかにしてきた。一方、これらの細胞を gefitinib 存在下で長期培養して分離した耐性株では PI3K/Akt 経路の恒常的活性化に加えて、EGFR の発現亢進、Erk1/2 の恒常的リン酸化が認められた。このことから PI3K/Akt 経路を代償する EGFR/Ras/MAPK 経路の新たな活性化が gefitinib に対する獲得耐性に関与していることを明らかにした。

(2) 上記分子基盤に基づいた胃がん肝転移に対する新しい分子標的治療法の開発

これら HER2 高発現胃がん細胞株に対する Trastuzumab 感受性を調べたところ、in vitro において軽度の増殖抑制は認めるものの、Trastuzumab による有意なアポトーシス誘導は認められず、ヌードマウス皮下移植腫瘍においても gefitinib に比べごく軽度の抗腫瘍効果しか示さなかった。しかし、興味ある事に上記細胞の腹腔内接種による腹膜転移に対しては殆ど転移が消失するほどの顕著な転移抑制が認められた。そこで Trastuzumab によるシグナル伝達経路への影響を検討したところ、HER2 の down regulation および Akt リン酸化の抑制が認められた。また、

ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞を Effector 細胞として Trastuzumab による抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を ⁵¹Cr release assay により検討したところ、HER2 低発現胃がん細胞に比べて、HER2 高発現胃がん細胞では ADCC 活性が高い傾向が認められた。以上のことから腹膜転移に対する抗腫瘍効果には HER2 高発現胃がん細胞の生存に必須な PI3K/Akt 経路の抑制と抗体依存性細胞障害 (ADCC) の両者が関与する可能性が示唆された。

(3) アレイ上で異なったシグナル比を示す遺伝子を選び、各検体における各遺伝子のアレイ上のシグナル比と、パイロシークエンス法により得られた DNA メチル化レベルを比較した。シグナル比 2.0 以上を陽性にした場合に、DNA メチル化陽性遺伝子を検出する最適な感度・特異度が得られることを確認した。肝細胞がん 6 症例でシグナル比 2.0 以上を示す spot は、背景肝 (肝硬変) 部、がん部それぞれ平均して 686、2798 spots であった。また、背景肝部での DNA メチル化陽性遺伝子はがん部でも 80% 以上が共通して陽性であった。これらの遺伝子群に関して 38 症例の肝細胞がんのがん部・背景肝部で DNA メチル化レベルをパイロシークエンス法により定量した結果、遺伝子群には、P16 や Cyclin A1 に代表されるがん部特異的にメチル化する遺伝子や、RASSF1A や PRDM14 など背景肝部からがん部に進行するに従いメチル化レベルの上昇する遺伝子等、遺伝子ごとにメチル化する時期の異なることが見出された。以上の予備的検討結果をもとに大腸がん症例に関して、各病期 (0~IV 期) で、がん部、正常粘膜、肝転移巣 (IV 期) からサンプリングを行ない、MCA-アレイ法による解析を開始した。

D. 考察

(1) 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞の gefitinib、Trastuzumab 感受性・耐性機構の解析