

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の奏効率は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。この点に関して今後、PI3K/Akt経路とMAPK経路を同時に阻害できるdual kinase inhibitorなどを用いて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のか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である。

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、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。

E. 結論

- (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。
- (2) 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。
- (3) 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Nakanishi H, Hara H, Ikehara Y, Tatematsu M. Non-invasive and real-time monitoring of molecular targeting therapy for lymph node and peritoneal

metastasis in nude mice bearing xenografts of human colorectal cancer cells tagged with GFP and DsRed, Proceeding of SPIE, in press (2007)

2. Hara M, Nakanishi H, Jun Q, Hirai T, Kanemitsu K, Ito S, Mochizuki Y, Kodera Y, Tatematsu M., Yamamura Y and Kato T. Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR. Possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. Clin Exp Metastasis, in press (2007)
3. Hara M, Hirai T, Nakanishi H, Kanemitsu K, Komori K, Tatematsu M., Kato T. Isolated tumor cell in lateral lymph node has no influences on the prognosis of rectal cancer patients, Int. J. Colorectal Dis. in press (2007)
4. Ohashi N, Nakanishi H, Kodera, Y, Mochizuki Y, Ito S, Koike M, Fujiwara M, Yamamura Y, Tatematsu M., Nakao A, Kato T. Intraoperative quantitative detection of CEA mRNA in the peritoneal lavage of gastric cancer patients with transcription reverse-transcription concerted (TRC) method. A comparative study with real-time quantitative RT-PCR. Anticancer Res. in press (2007)
5. Ohno F, Nakanishi H., Abe A., Seki Y., Kinoshita A. Hasegawa Y., Tatematsu M., Kurita K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody. An analysis in comparison with angiogenesis. J. Oral Pathol. Med. in press (2007)
6. Yokoyama H., Ikehara Y., Kodera Y., Ikehara S., Yatabe Y., Mochizuki Y., Koike M., Fujiwara M., Nakao A., Tatematsu M., Nakanishi H. Molecular basis for sensitivity and acquired resistance to gefitinib in HER2-overexpressing human gastric cancer cell lines derived from liver metastasis. Br. J. Cancer, 95:1504-13 (2006)

7. 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)
8. Ikehara Y., Sato T., Niwa, T., Nakamura S., Gotoh M., Ikehara S, Kiyohara K., Aoki C., Iwai T., Nakanishi H., Hirabayashi J., Tatematsu M., Narimatsu H. Apical Golgi localization of N, N'-diacetyllactosidamine synthase, {beta}4GalNAc-T3, is responsible for LacdiNAc expression on gastric mucosa. *Glycobiology*, 16(9): 777-785 (2006)
9. Ikehara S.K, Ikehara Y., Matsuo K., Hirose K., Niwa T., Ito H., Ito S., Kodera Y., Yamamura Y., Nakanishi H., Tatematsu M., Tajima K. A polymorphism of C-to-T substitution at -31 IL1B is associated with the risk of advanced gastric adenocarcinoma in a Japanese population. *J. Hum. Genet.*, Sep 28, (2006)
10. Kodera Y., Nakanishi H., Ito S., Mochizuki Y., Ohashi N., Yamamura Y., Fujiwara M., Koike M., 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: 231-236 (2006)
11. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, Goto Y, Gao W, Ueda Y, Yokoi K, Minna J.D, Osada H, Kondo Y., Sekido Y. RHOB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer* 120 : 543-551, (2006)
12. Tabe Y, Konopleva M, Kondo Y., Contractor R, Jin L, Ruvolo V, Tsutsumi-Ishii Y, Miyake K, Miyake N, Ohsaka A, Nagaoka I, Issa JP, Andreeff M. PML-RARalpha and AML1-ETO translocations are rarely

associated with methylation of the RARbeta2 promoter. *Ann Hematol.* 85: 689-704 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部長

研究要旨：粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫のうち、胃 MALT リンパ腫の臨床病態とゲノム異常の関連をアレイ CGH 法で検討した。ピロリ菌除菌療法に抵抗性の症例のうち、半数は *API2-MALT1* キメラ遺伝子が存在することを明らかにしてきたが、今年度の検討で、除菌療法抵抗性の残り半数の症例には多様なゲノムコピー数変化が認められることを明らかになり、除菌療法反応性予測のよいマーカーとなることが判明した。遺伝子発現解析で、CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(CD5+DLBCL)に特徴的な発現様式(CD5 signature)を見出し、CD5 signature を用いると、DLBCL の予後予測が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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. 研究結果

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 は予後の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の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。

D. 考察

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意味し、意義が高い。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 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。そのゲノム異常をアレイCGH法で解析して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った。

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。

E. 結論

(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。

F. 研究発表

1. Kaman, 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.
2. Oshiro, A., Tagawa, H., Ohshima, K., Karube, K., Uike, N., Tashiro, Y., Utsunomiya, A., Masuda, M., Takasu, N., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M. : Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 107:4500-4507, 2006.
3. Fukuhara, N., Tagawa, H., Kameoka, Y., Kasugai, Y., Kaman, S., Kameoka, J., Sasaki, T., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.*, 97:499-504, 2006.
4. Suguro, M., Tagawa, H., Kagami, Y., Okamoto, M., Ohshima, K., Shiku, H., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Expression profiling analysis of the CD5(+) diffuse large B-cell lymphoma subgroup: Development of a CD5 signature. *Cancer Sci.*, 97:868-874, 2006.

- 5 Nakagawa, M., Seto, M., Hosokawa, Y.: Molecular pathogenesis of MALT lymphoma: two signaling pathways underlying the antiapoptotic effect of API2-MALT1 fusion protein. *Leukemia*. 20: 929-936, 2006.
6. Karube, K., Guo, Y., Suzumiya, J., Sugita, Y., Nomura, Y., Yamamoto, K., Shimizu, K., Yoshida, S., Komatani, H., Takeshita, M., Kikuchi, M., Nakamura, N., Takasu, O., Arakawa, F., Tagawa, H., Seto, M., Ohshima, K.: CD10(-) MUM1(+) follicular lymphoma lacks BCL2 translocation and shows characteristic biological and clinical features. *Blood*, 2006. in press

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

DLBCL と MCL, あるいは DLBCL subtype である ABC 型と GCB 型の判別方法と解析方法

発明の名称：生物体のタイプを判別するためのマーカーの選択方法及び選択されたマーカーの利用

出願番号：特願 2006-229798

発明者：瀬戸加太（愛知県），竹内一郎（三重大学），吉田安子（日本ガイシ）

出願日：2006年8月25日

出願人：愛知県，三重大学，日本ガイシ(株)

エピジェネティクス異常と発がんとの関連

分担研究者 関戸好孝 愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 本研究では(1) DNA メチル化標的遺伝子群の網羅的同定のため共同開発した MCA-アレイ法を用いヒト固形腫瘍の DNA メチル化異常を解析した。メチル化 DNA 認識抗体を用いた Dip-chip 法との比較実験では、MCA-アレイ法はより多数の遺伝子が検出可能であり、さらにシーケンシング法にて個別遺伝子のメチル化状態を検討したところ陽性感度が高く、網羅的解析法として極めて優れていることを明らかにした。(2) 肺がん細胞株の染色体 2p24 ホモザイガス欠失領域に存在することを明らかにした RhoB 遺伝子に着目し、肺がんにおいて RhoB 遺伝子が染色体欠失およびヒストンの脱アセチル化により高頻度に発現低下していることを明らかにし、肺がん患者予後との関連を検討した。本研究はエピジェネティクス異常を肺がん等のヒト固形腫瘍における関与を明らかにし、分子標的療法や診断法に臨床応用する上で非常に重要な知見になると考えられる。

A. 研究目的

肺がん等の難治性固形腫瘍の発生・進展の分子病態を解明すべく、がん遺伝子・腫瘍抑制遺伝子・転移関連遺伝子についての検討を進めている。これらの遺伝子異常に関してはゲノム上の点突然変異、増幅、欠失といったジェネティックな異常に加えて DNA メチル化やヒストン修飾の異常などのエピジェネティックな遺伝子発現制御の異常が極めて重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。特に DNA メチル化異常による腫瘍抑制遺伝子の不活化は多くの固形腫瘍発生の早期から検出され、進行するに従い鍵となる多くの遺伝子が不活化され、異常が蓄積されていくことが示されている。本年度の研究の目的は、DNA メチル化異常をより網羅的かつ迅速に検出する方法を開発すること、発現の低下が腫瘍の発生・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ク

異常の関与を明らかにし、その臨床的な意味を検討することにあつた。

(1) ヒト固形腫瘍の組織由来あるいは細胞株を用い、網羅的な DNA メチル化異常を検出するために複数の方法を用いた。Methylated CpG islands Amplification (MCA) Microarray (MCA-アレイ) 法および DNA immunoprecipitation (Dip) -Chip 法において検出された個別の遺伝子についてプロモーター領域のメチル化の有無を DNA メチル化の定量的解析法であるシーケンシング法にて検討した。

(2) 肺がん細胞株 H2882 株の染色体 2p24 上のホモザイガス欠失領域に存在する RhoB 遺伝子に関し、RhoB 遺伝子の肺がんにおけるエピジェネティック異常による不活化メカニズムに対して詳細に検討を加え、腫瘍における RhoB 発現低下の患者予後に対する影響を検討した。

B. 研究方法

(1) ヒト固形腫瘍組織あるいは細胞株よりゲノム DNA を抽出後、制限酵素 SmaI(メチル化感受性)によって DNA を切断し非メチル化状態の制限酵素サイトに平滑末端を入れ、次に制限酵素 XmaI(メチル化非感受性)によってメチル化状態の制限酵素サイトに突出末端を作り出した。突出末端に相補的なアダプタープライマーをライゲーションし、アダプター特異的なプライマーを用い SmaI/XmaI 切断断片(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。腫瘍組織由来の増幅産物を Cy5、正常組織由来の増幅産物を Cy3 にてラベル化した後、アジレント社の human proximal promoter (88K) アレイにハイブリダイズさせそのシグナルを検出した。DNA メチル化陽性遺伝子を検出する最適なシグナル比(Cy5/Cy3)を決定するため、複数の遺伝子に関して個別にメチル化レベルをシーケンシング法で確認した。一方、ゲノム DNA を超音波処理で断片化した後、DNA メチル化抗体を用いた免疫沈降法にてメチル化 DNA を回収し、同様に PCR 増幅、ラベル化、アレイへのハイブリダイズを行い(Dip-Chip 法)、MCA-アレイ法との比較検討を行った。

(2) 肺がん細胞株における RhoB の遺伝子発現をノーザンブロット法およびリアルタイム RT-PCR 法にて検討し、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学的検討にて蛋白発現を検討した。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 combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法、methylation specific PCR (MSP)法およびシーケンシング法にて検討した。コントロールとして SssI メチラーゼで処理したゲノム DNA を用いた。複数の肺がん細胞株に対しヒストン脱アセチル化酵素阻害

剤(HDAC 阻害剤)である TSA を添加し RhoB の再発現の有無を検討した。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。

(倫理面への配慮)

本研究は、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。

C. 研究結果

(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($5 > \text{Cy5/Cy3} \text{ 比} > 2$)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 の非小細胞肺がん株を含む)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ッ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つ

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. 考察

(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。

E. 結論

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、肺癌における 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-アレイ法で肺癌等のヒト難治性腫瘍を解析し、肺癌に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癌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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagai H, Sugito N, Matsubara H, Tatematsu Y, Hida, T, Sekido Y, Nagino M, Nimura Y, Takahashi T, Osada H. CLCP1 interacts with semaphoring 4B and regulates motility of lung cancer cells. *Oncogene*, (in press)
2. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, Ueda Y, Mitsudomi T, Horio Y, Hida T, Yatabe Y, Seto M, Sekido Y. Genomic profiling of malignant pleural

mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent nonrandom chromosomal alteration regions including *JUN* amplification on 1p32. *Cancer Sci*, 98 : 438-446, 2007

3. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, Goto Y, Gao W, Ueda Y, Yokoi K, Minna J.D, Osada H, Kondo Y, Sekido Y. RHOB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*, 120 : 543-551, 2006.
4. Yokoyama T, Kondo M, Goto Y, Fukui T, Yoshioka H, Yokoi K, Osada H, Imaizumi K, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y. *EGFR* point mutation in non-small cell lung cancer is occasionally accompanied by a second mutation or amplification. *Cancer Sci*, 97:753-759, 2006.
5. Maeda O, Kondo M, Fujita T, Usami N, Fukui T, Shimokata K, Ando T, Goto H, Sekido Y. Enhancement of *GLI1*-transcriptional activity by β -catenin in human cancer cells. *Oncol Rep* 16: 91-96, 2006.
6. Usami N, Fukui T, Kondo M, Taniguchi T, Yokoyama T, Mori S, Yokoi K, Horio Y, Shimokata K, Sekido Y, Hida T. Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci* 97: 387-394, 2006.

2. 学会発表

1. 長田啓隆、立松義朗、竹内俊幸、富田秀太、堀尾芳嗣、樋田豊明、谷田部恭、光富徹哉、関戸好孝、高橋隆。神経内分泌分化誘導因子 *ASH1* による *Wnt* シグナル制御因子

DKK1 の発現抑制 第 65 回日本癌学会学術総会 (口演)

2. 佐藤尚他、福井高幸、谷口哲郎、横山俊彦、横井香平、長田啓隆、近藤豊、関戸好孝。非小細胞肺癌における *RhoB* の発現解析。第 65 回日本癌学会学術総会 (示説)
3. 林下陽二、長田啓隆、立松義朗、山田英貴、柳澤聖、富田秀太、谷田部恭、川原克信、関戸好孝、高橋隆。肺癌細胞において過剰発現を示す *miRNA* クラスター *miR-17-92* の同定と機能解析。第 65 回日本癌学会学術総会 (示説)
4. 村上秀樹、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝。ClassIIa HDACs による転写因子 *MITF* の転写制御機構の解析 第 65 回日本癌学会学術総会 (示説)
5. 後藤康洋、近藤豊、横山俊彦、谷口哲郎、長田啓隆、鈴木拓、時野隆至、豊田実、今井浩三、長谷川好規、下方薫、関戸好孝。悪性胸膜中皮腫において *DNA* メチル化により制御されるがん抑制遺伝子の網羅的解析 第 65 回日本癌学会学術総会 (示説)
6. 近藤豊、長田啓隆、村上秀樹、関戸好孝。ヒストン *H3-K27* メチル化によるがん関連遺伝子の発現制御について 第65回日本癌学会学術総会 (口演)
7. 関戸好孝 肺癌の分子生物学的研究の進歩。第47回日本肺癌学会総会 (口演)

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

分担研究者 稲垣 昌樹 愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨

ケラチンは、がんの発生母地となりうる上皮細胞でのみ発現する細胞骨格蛋白質である。その機能は単に細胞を機械的ストレスから守るだけではなく、増殖シグナルやアポトーシスを含む様々ながん関連の細胞内現象を修飾することが明らかになってきている。今回我々は、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および機能について検討した。その結果、各々が中心体および細胞間接着装置複合体近傍にも局在していることを確認した。さらに RNA 干渉法を用いてこれらの分子の機能欠失実験を行ったところ、トリコプレインは微小管の安定化に必要なことが、またアルバトロスは細胞間接着装置複合体と呼ばれるタイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモソームより成る複合体の形成・維持に特異的に必要なことがわかった。このように細胞骨格・細胞間接着の構造物を特異的に制御する分子の報告はまだ少ない。よってこれらの新規ケラチン結合蛋白質に見出された特性は、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を検索していく上で有用な知見といえる。

A. 研究目的

がん細胞は、互いの細胞間接着および組織構築を破壊することによって、他組織に浸潤または転移すると考えられている。これに対し、ケラチンはがんの発生母地となりうる上皮細胞でのみ発現する細胞骨格蛋白質としてこれら細胞間接着及び組織構築を支えている。また、ケラチンは増殖シグナルやアポトーシスを含む様々ながん関連の細胞内現象を修飾する。我々はこれまでケラチンに結合する蛋白質の同定・解析を進めてきた。その目的はケラチンを介した新しいがん診断・治療の標的となる蛋白質を検索することである。本年度は、新規ケラ

チン結合蛋白質トリコプレインおよびアルバトロスの細胞内局在・細胞内機能の解明を目指した。

B. 研究方法

1. トリコプレインおよびアルバトロスの細胞内局在の解析

1) 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、これらの蛋白質の組織あるいは細胞内分布を調べた。

2) 分画法を用いてそれぞれの局在を検討した。トリコプレインに関しては HeLa 細胞の中心体画分を、アルバトロスに関してはマウス肝臓の毛細胆管画分および AJ

(Adherens Junction)画分を、主にシヨ糖密度勾配遠心法を用いて調整し、免疫ブロットングにより検討した。

さらに免疫電顕法を用い、トリコプレインに関しては HeLa 細胞の中心体を、アルバトロスに関しては A549 (ヒト肺腺がん) 細、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。また、細胞間接着能を検討するために、アグリゲーションアッセイを用いた。その際、トリプシン処理で一度分離させた細胞をカルシウム入りのバッファにサスペンドした状態で旋回培養し、アグリゲーションを作らせた。

(倫理面への配慮)

実験に用いたレトロウイルスは愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理委員会で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ており、ヒトへの感染防御等十分な対策がとられている。

C. 研究結果

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免疫ブロット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)画分の免疫ブロット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

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探索・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らかに、診断・治療に役立てる予定である。

E. 結論

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

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 Biol.* 8: 180-187, 2006.
2. 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* 11: 477-485, 2006.

3. 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*, 11: 531-540, 2006
4. Izawa, I. and Inagaki, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 97: 167-174, 2006
5. Goto, H., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Functional analyses for site-specific phosphorylation of a target protein in cells. *Nature Protocols* in press.

2. 学会発表

1. Inagaki, M.: Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. Gordon Research Conference on Intermediate Filaments, 2006, (ボストン), [招待口演]
2. Inoko, A., Sugimoto, M., Zou, P., Hayashi, Y., Izawa, I., Sasoh, M., Uji, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Fbf-1, a novel keratin filament-binding protein, is needed to form apical junctions and apical-basal cell polarity. Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2006, (ボストン), [ポスター]
3. Zou, P., Inoko, A., Kiyono, T., Hayashi, Y., Izawa, I., Hirosune, S. and Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin filament-binding

- protein, is a functional component of centrosomes. Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2006, (ボストン), [ポスター]
4. Inoko, A., Sugimoto, M., Zou, P., Hayashi, Y., Izawa, I., Sasoh, M., Uji, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Fbf-1, a novel keratin filament-binding protein, is needed to form apical junctions and apical-basal cell polarity. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006, (名古屋), [ポスター]
 5. Zou, P., Inoko, A., Kiyono, T., Hayashi, Y., Izawa, I., Hirotsune, S. and Inagaki, M. : Trichoplein, a keratin filament-binding protein, is a functional component of centrosomes. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006, (名古屋), [ポスター]
 6. 後藤英仁、山口知也、稲垣昌樹: 分裂期キナーゼ群による中間径フィラメントの分配制御。日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006, (名古屋), [シンポジウム]
 7. 後藤英仁、白水崇、山口知也、辻村邦夫、猪子誠人、中西真、稲垣昌樹: Cdk1 による分裂期特異的な Chk1 リン酸化反応。第 65 回日本癌学会学術総会, 2006, (横浜), [口頭発表]
 8. 井澤一郎、西澤美和子、稲垣昌樹: 細胞極性制御分子 ERBIN の形質膜移行メカニズムの解析。第 65 回日本癌学会学術総会, 2006, (横浜), [ポスター]
 9. 猪子誠人、鄒鵬、井澤一郎、林裕子、清野透、稲垣昌樹: 新規 keratin 結合蛋白質として Fbf-1 の同定とその機能解析。第 65 回日本癌学会学術総会, 2006, (横浜), [ポスター]
 10. 後藤英仁、河尻愛恵、清野透、友野靖子、浦野健、古川鋼一、Nigg, E.A.
- 稲垣昌樹: Cdk1 による INCENP リン酸化反応を介した分裂期キナーゼ群間のクロストーク。第 4 回 21 世紀 COE 若手研究フォーラム「名古屋大学発のブレイクスルーをめざして」, 2006, (名古屋), [ポスター]
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
現在のところ、予定も含め、ない。