

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16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 立 松 正 衛

平成19（2007）年4月

平成16～18年度

総合研究報告書

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た。平成 16-18 年度の 3 年間の主たる成果は以下のものである。

(a) 消化器がんでは(1) 胃がんの腹膜転移は大網乳斑に選択的に初発（微小）転移巣を形成する早期と、播種性に進展する後期の 2 段階から成り、前者は化学療法感受性があり、後者は TNF- $\alpha$  により抑制できること、(2) 胃、大腸がんのリンパ節転移にはリンパ管新生と腫瘍のリンパ管浸襲能の両者が重要であり、がん細胞とリンパ管の相互作用を *in vitro* 解析できるツールとして、不死化ヒトリンパ管内皮細胞株とリンパ節転移性ヒト大腸がん細胞からなる解析システムを構築した。(3) 胃がん肝転移巣から HER2 高発現細胞株を樹立、これらが gefitinib、Trastuzumab に対して高感受性を示すこと、前者には活性化された PI3K/Akt シグナルの抑制が、後者にはシグナル抑制に加えて ADCC が関与することを示し、胃がん肝転移に対する分子標的治療の可能性を明らかにした。(b) 造血器腫瘍では粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常 *API2-MALT1* について解析を進め、(1) 胃 MALT リンパ腫においては、ピロリ菌除菌反応症例の半数に *API2-MALT1* キメラ遺伝子が認められることを明らかにした。(2) また、*API2-MALT1* キメラ遺伝子を細胞株に導入し、抗アポトーシス機能を有することを明らかにした。(3) アレイ CGH 法を確立し、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)の ABC type と GCB type、マンツル細胞リンパ腫、T/NK リンパ腫、急性前骨髄球性白血病に特徴的なゲノム異常を見出した。胃 MALT リンパ腫も検討したところ、除菌療法抵抗性の半数を占める *API2-MALT1* キメラ遺伝子のない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した。(4) 遺伝子発現解析で、CD5 陽性 DLBCL(CD5+DLBCL)に特徴的な発現様式(CD5 signature)を見出し、予後予測が可能であることを明らかにした。(c) 肺がんでは、(1) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) classII HDAC9 の酵素活性部位欠失型アイソフォーム 3 が主に発現し、その高発現は予後不良因子であった。HDAC5 を強制発現させると肺がん細胞の増殖が抑制された。DNA メチル化標的遺伝子群の網羅的同定のため MCA アレイ法による解析を行い、メチル化 DNA 認識抗体を用いた Dip-chip 法と比較検討した結果、MCA アレイ法は検出遺伝子数が多く、また感度に優れ、網羅的解析法として極めて有用であることを明らかにした。(2) クロマチン構

造維持に RNAi 機構が関与することが示唆されており、この RNAi 機構の重要な因子である RNA 分解酵素 Dicer が低発現の肺癌症例は非常に予後不良であることを明らかにした。一方、クロマチン構造制御への関与が示唆されている小 RNA 分子の中で microRNA (miRNA) について検討した結果、小細胞肺癌を中心に高発現を示す miRNA 群を見出し、miRNA 異常の組織型特異性が示唆された。更にその miRNA が肺癌の増殖を促進することを明らかにした。(d) がん細胞の増殖・浸潤に関わる細胞骨格の研究では、(1) 分裂期キナーゼ群の発がん過程における関与に関し、Aurora-B の結合パートナーである INCENP および中間径フィラメント構成タンパク質ピメンチンが Cdk1 によってリン酸化されること、Plk1 が INCENP またはピメンチンに Cdk1 によるリン酸化反応依存性に結合すること、さらに、これらタンパク質と Plk1 の結合により、分裂中期から後期への進行および中間径フィラメントの均等分配が制御されていることを明らかにし、Cdk1 の基質のリン酸化反応を通じて、Plk1 の機能が制御されていることを示した。(2) 新規ケラチン結合蛋白質の同定および解析では、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、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を明らかにした。

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
長田啓隆	愛知県がんセンター研究所	室長
	(平成 16~17 年度)	
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長
	(平成 18 年度)	
稲垣昌樹	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) 胃がん腹膜転移の初期および進展過程の分子基盤の解明とそれに基づく治療法の開発、(2) 大腸がんのリンパ節転移と腫瘍リンパ管新生の分子機構の解析。(3) 胃がん肝転移巣由来 HER2 高発現細胞の HER 標的治療薬に対する感受性および耐性機構の解析とそれに基づいた新しい分子標的治

療法の開発。(4)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の解明。

(b) 造血器腫瘍では、(1) 粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫に関与する特徴的染色体遺伝子 API2-MALT1 の意義について特に胃 MALT リンパ腫症例について検討する。

(2) API2-MALT1 キメラ遺伝子を用いて発現ベクターを構築し、腫瘍化に関与する機能を調べる。(3) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子を発現解析を用いて明らかにする。

(4) API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍化機能を調べるために、種々の欠失変異体を作成し、蛋白レベルの解析を行う。(5) 独自に確立したアレイ CGH 法を用いて、種々の造血器腫瘍に特徴的なゲノム異常の有無を明らかにする。

(6) 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。(7) 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)ヒストン修飾によりクロマチン構造を制御する因子群の中で HDAC class II 遺伝子群の肺がん発症への関与の分子機序の解明。DNA メチル化異常を網羅的に検出するためのアッセイ法の確立。個別の遺伝子のエピジェネティクス異常の検討による不活化メカニズムの解明と臨床・病理学的意義の検討。(2)RNAi・microRNA 機構に必須な RNA 分解酵素遺伝子である Dicer・Drosha の遺伝子異常による肺がんの発症・進展への関与の解明。肺がんにおける miRNA の異常の有無と、その異常による肺癌発症・進展及びクロマチン構造制御への関与を解明。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究では (1)染色体の不安定性は、がんの悪性化のみならず、発がんの過程そのものにも深く関与していると考えられており、それを引き起こすメカニズムの一つとして、分裂期の制御異常が想定されている。分裂期の制御には、分裂期開始に必須な Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1, Cdc2) キナーゼに加えて、Aurora-B、Plk1 (Polo-like kinase 1)などの分裂期キナーゼ群が重要な役割を担っている。近年の研究の集積により、これら個々の分裂期キナーゼの役割は徐々に解明されつつある。しかし、分裂期キナーゼ群の相互関係は依然として不明な点が多く、まだ、未解明な点が多いのが現状といえる。我々は、この Cdk1 と Plk1 のシグナル伝達のクロストーク機構の解明を通じて、発がん過程における分裂期キナーゼの役割を明らかにするとともに、そのクロストーク機構を標的とした新たな作用機序の抗がん剤の開発に役立てることを本研究の目的とする (研究方法および結果 1-3)。

(2) 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。本研究では、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 (研究方法および結果 4-5)。

## 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と臨床応用

(1) 胃がん腹膜転移の初期および進展過程の分子基盤の解析

GFP-遺伝子導入腹膜転移モデルを用いて微小転移の化学療法感受性を検討し、再発予防に最も効果的な化学療法を確立する。また TNF- $\alpha$  ノックアウトマウス、グリーンマウスとの骨髄キメラマウスなどを用いて腹膜転移の播種性進展過程における TNF- $\alpha$  の役割を解析し、治療への応用を試みる。

(2) 大腸がんのリンパ節転移と腫瘍リンパ管新生の *in vivo*、*in vitro* 解析

リンパ管内皮に対する特異抗体を用いた免疫組織化学により、ヒト大腸がん臨床例 61 例およびヌードマウスヒト大腸がんリンパ節転移におけるリンパ管新生の実態を解析する。さらに HPVE6,E7 遺伝子および HTERT 遺伝子を導入し作成した不死化ヒトリンパ管内皮細胞株と上記大腸がんリンパ節転移株とを用いて *in vitro* の解析システムを構築し、リンパ管新生の制御機構を *in vitro* で解析する。

(3) 胃がん肝転移に対する分子標的治療法の開発

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。また HER2 高発現胃がん細胞株の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 *in vivo* におけ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。

(4) MCA (Methylated CpG islands Amplification) Microarray (MCA-アレイ) 法を用い、大腸がん症例の良性病変とがん組織から 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詳細に検討する。

(b) 造血器腫瘍の遺伝子異常の解析

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の意義の確立：多数症例の胃 MALT リンパ腫症例を解析し、API2-MALT1 キメラ遺伝子の存在と除菌療法に対する反応性などの病態と比較検討する。

(2) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析： API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入細胞株を樹立し、アポトーシスに関する機能を検討する。

(3) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索： MALT リンパ腫発症に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子導入細胞株と親株との間で発現差異のある遺伝子を遺伝子発現解析法で明らかにし、そのプロモーター領域を解析し、真の標的遺伝子あることを確認する。

(4) API2-MALT1 の蛋白レベルの解析： API2-

MALT1 の蛋白レベルの研究を進めるために、欠失変異体を含む種々の発現ベクターを構築し、細胞内での局在を調べる。

(5) アレイ CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析： 独自に確立したアレイ CGH 法を用いて、種々の造血器腫瘍を解析し、病型特異的なゲノム異常を明らかにする。

(6) 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を用いる。

(7) 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と発がんとの関連

(1) 肺がん組織より RNA を抽出し HDAC9 isoform3 発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。PCR は 2 回施行して平均値を解析に用い、定量性は 18S ribosomal RNA の発現で補正した。臨床及び病理データと遺伝子発現量との関連を統計解析した。HDAC5/ HDAC10 の発現ベクターを作成し、HDAC5/ HDAC10 低発現の肺癌細胞株に遺伝子導入して細胞増殖を検討した。

MCA アレイ解析に関しては、まずヒト固形腫瘍よりゲノム 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 XmaI 切断断片を選択的に 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、複数の遺伝子の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) 比較検討を行った。

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 MSP 法等にて検討した。肺がん細胞株に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肺がん患者の予後解析を行い log-rank test にて検定を行った。

(2) 非小細胞肺がん組織の RNA を用いて、Dicer 及び Drosha の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。臨床病理データと遺伝子発現量との関連をフィッシャー直接法・Cox 比例ハザードモデル法等にて解析した。Dicer 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド内の DNA メチル化をゲノム DNA を bisulfite

処理後に、PCR 増幅してシーケンス法にて解析した。

がん関連遺伝子群・クロマチン構造制御遺伝子群を標的候補遺伝子とする miRNA 21 種を、miRNA の標的を予想するアルゴリズムを用いて選択し、発現を Northern blot 法、及びリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。リアルタイム RT-PCR の際は、pre-miRNA 領域を増幅し 18S ribosomal RNA の発現で補正した。強発現を示した miRNA に関して発現ベクターを作成し、肺がん細胞へ導入して細胞増殖等の変化を検討した。強発現を示した miRNA に関して肺がん検体 RNA を用いて発現を検討した。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

(1) Cdk1 による INCENP リン酸化部位の同定および同部位に対する抗リン酸化ペプチド抗体の作製

a) Cdk1 のリン酸化部位のコンセンサスから、リン酸化されうる部位 (計 18 個) をそれぞれリン酸化されないアミノ酸に置換した INCENP 変異体を作製し、それらを Cdk1 によってリン酸化した後、2次元リン酸化ペプチドマップ法を用いて、リン酸化部位の同定を行った。

b) INCENP の各部位のリン酸化状態をモチーフとするリン酸化ペプチドを免疫することで、それぞれの部位のリン酸化状態を特異的に認識するラットモノクローナル抗体 (抗リン酸化抗体) を作製した。

(2) Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義の解析

a) RNA 干渉法 (RNAi) によって INCENP または Aurora-B の発現を低下させたとき、Plk1 の動原体局在がどのように変化するかを解析した。

b) マウス INCENP の野生型 (WT) およびそれぞれのリン酸化部位をリン酸化されない

アラニンに置換した変異体をレトロウイルスの系で導入した HeLa 細胞株をそれぞれ樹立した。その後、ヒトに特異的な ds RNA を用いて、内因性の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの分裂期の表現型を観察した。

(3) Cdk1 によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義の解明

a) Cdk1 リン酸化ビメンチンと Plk1 の結合を Far-Western 法および GST-pull down 法で確認した。

b) また、ビメンチンとの結合によって、Plk1 のキナーゼ活性が変化するか、また、その際、ビメンチンのどの部位をリン酸化するかについて、*in vitro* アッセイで検討した。

c) 上記の結合およびリン酸化反応が引き起こされているか確認するため、Cdk1 のリン酸化部位をアラニンしたビメンチンの発現した際、および、Plk1 を RNAi した際の、Plk1 によるビメンチンリン酸化反応の変化を検討した。

d) 上記の Plk1 のリン酸化反応の生理的意義を解明するため、Plk1 のビメンチンリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を細胞に発現し、その表現型を検討した。

(4)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

a) 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。

b) 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、主にショ糖密度勾配遠心法を用いて調整し、免疫プロットングにより検討した。

c) 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) 細胞の細胞間接着装置複合体付近へのラベリングを

観察した。

(5)トリコプレインおよびアルバトロスの細胞内機能の解析

a) 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、トリコプレインの発現を減弱させた。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コントロールと比較した。

b) アルバトロスについては、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、アルバトロスの発現が減弱した細胞を作成した。その状態で、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。

## 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と臨床応用

(1) 胃がん腹膜転移の初期および進展過程の分子基盤の解析

GFP-遺伝子を導入して作成した複数の胃がん腹膜微小転移モデルを用いて胃がん腹膜微小転移の化学療法感受性を検討した。パクリタタキセル (PTX、毎週 1 回、8 週間) の腹腔内投与群は静脈内投与群に比べ生存率が有意に延長すること、早期腹腔内投与治療群では 7 匹中 7 匹すべてのマウスで腹膜転移が退縮ないし消失し、生存したのに対し、後期治療群ではマウスは全匹腹膜転移で死亡し、対照群と差が認められず、腹膜微小転移の化学療法感受性が高いことが明らかとなった。

一方、マウス Lewis 肺がん細胞の TNF- $\alpha$  KO マウスにおける腹膜転移は野生型マウスと比べ初期転移巣形成率に有意な差異は認められなかったが、腹壁腹膜など乳斑の存在しな

い腹腔内組織への播種性進展が抑制され、また生存日数の有意な延長が認められた。逆に TNF- $\alpha$ KO マウスに野生型マウス骨髄を導入したキメラマウスにおいては播種性進展の再促進と生存の短縮が認められた。これらの結果から TNF- $\alpha$  は転移腫瘍の増殖には影響せず、宿主側の TNF- $\alpha$ 、特に腹腔内炎症細胞の産生する TNF- $\alpha$  が腫瘍の腹膜播種性進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに上記マウス腫瘍モデルで得られた知見がヒト胃癌においても成り立つか否かを明らかにするため、GFP-遺伝子を導入して作成したヒト胃癌腹膜微小転移ヌードマウスモデルを用いて、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体(infliximab, Remicade)を用いた抗サイトカイン療法の腹膜転移抑制効果を検討した。その結果、対照群に比べて infliximab 腹腔内投与群(週2回、5週間)では腹水貯留率の減少と生存率の有意な延長が認められた。以上の結果はヒト胃癌腹膜転移モデルにおいても、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を用いた抗サイトカイン療法により腹腔内播種性進展が抑制されうることを示唆している。

## (2) 大腸がんのリンパ節転移と腫瘍リンパ管新生機構の in vivo および in vitro 解析

リンパ管内皮特異抗体である D2-40 のエピトープが Podoplanin である事を我々は明らかにしているが、この D2-40 抗体を用いて大腸癌臨床例 61 例のリンパ管新生の検討をおこなった。その結果、リンパ管新生は血管新生とは異なり腫瘍辺縁部で起こり、繊維性間質の豊富な腫瘍組織内ではむしろ正常組織に比べ減少していることが明らかとなった。またがん細胞のリンパ管侵襲は腫瘍先進部の新生リンパ管領域で起きる事を示唆する所見が得られた。

これら臨床例の腫瘍リンパ管新生に関する観察事例を実験的に検証するために GFP や DsRed 遺伝子を導入した大腸癌リンパ節転移細胞株 (COLM-5)を樹立し、FITC-Dextran

などを用いた micro lymphangiography を組み合わせてヒト大腸がんの腫瘍リンパ管新生をヌードマウスモデルで解析した。その結果、臨床材料における観察結果と同様に、腫瘍リンパ管は腫瘍組織内ではなく腫瘍周囲の既存のリンパ管から新生され、腫瘍のリンパ管侵襲も腫瘍辺縁部で起きていることを示唆する所見を確認した。

腫瘍細胞とリンパ管との相互作用を in vitro で解析するために HPVE6, E7 遺伝子および hTERT 遺伝子を導入して作成したヒト不死化リンパ管内皮細胞株(HuTLEC)および上記大腸がんリンパ節転移細胞株、COLM-5 を組み合わせた in vitro 解析システムを確立した。本系を用いて COLM-5 細胞の培地中に VEGF-C 刺激に比べ数倍高いリポーター活性を検出し、VEGF-C 以外の新しい管腔形成促進因子が存在する可能性を見出した。腫瘍のリンパ管侵襲機序の一つの可能性を示すものとして興味深い。

## (3) 胃癌 HER2 高発現細胞株の HER 標的治療薬に対する感受性・耐性機構の解析と分子標的治療法の開発

肝転移巣から独自に樹立した HER2 高発現胃癌細胞株 3 株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) 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 高発現胃癌細胞株はその生存(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。

一方、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 <sup>51</sup>Cr 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。

(4) 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、

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) 造血器腫瘍の遺伝子異常の解析

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の意義の確立：胃 MALT リンパ腫症例 115 例を解析し、API2-MALT1 キメラ遺伝子を調べた。21 症例にキメラ遺伝子が存在し、すべて除菌無効症例であった。72 症例は除菌療法有効症例であったが、このなかには API2-MALT1 キメラ遺伝子は証明されなかった。22 症例は API2-MALT1 遺伝子が認められなかったが、除菌療法無効症例であった。すなわち、除菌療法無効症例の半数は API2-MALT1 遺伝子の存在が原因と考えられるが、キメラ遺伝子の無い除菌療法無効が半数存在することが明らかとなった。

(2) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の機能の解析：MALT リンパ腫に認められる t(11;18)(q21;q21)は API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することをこれまでに明らかにした。機能を明らかにする目的で、Hela 細胞株にキメラ遺伝子を導入し、紫外線照射によるアポトーシス抑制効果を持つことを明らかにした。そこで、レトロウイルスベクターで細胞株に導入し、抗アポトーシス作用を検討した。HeLa 細胞およびマウス IL3 依存性細胞株 Ba/F3 に導入し、紫外線照射によるアポトーシスに関する影響を調べたところ、アポトーシスを抑制することが明らかとなった。また、doxorubicin によるアポトーシスに関してもアポトーシスの抑制効果が認め

られた。しかし、IL3 除去によるアポトーシスの誘導に関しては抑制効果が認められなかった。

(3) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索：MALT リンパ腫発症に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子導入細胞株を HeLa 細胞株を樹立した。親株との間で発現差異のある遺伝子を遺伝子発現解析法で解析したところ、キメラ遺伝子の一方の遺伝子 *API2* のものが標的遺伝子であることが明らかとなった。そのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェレースをマーカーに転写活性を検討したところ、確かに標的であることが明らかとなった。プロモーター領域に存在する 3 つの NF- $\kappa$ B 結合サイトを点突然変異を入れて、解析したところ、第一番目と第 3 番目の結合モチーフが主要な役割を担っていることが明らかとなった。

(4) API2-MALT1 の蛋白レベルの解析：MALT リンパ腫発症に関与するキメラ遺伝子 API2-MALT1 の蛋白レベルの研究では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質と核を往復することが明らかとなった。種々の欠失変異体を作成し、検討したところ、その分子機構は、MALT1 に存在する Nuclear Exporting Signal (NES) が機能していることを明らかにした。また、BCL10 の細胞内局在にも NES シグナルが重要な働きを示していることを明らかにした。

(5) アレイ CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析：DLBCL について、ゲノム異常をより詳細に検討するために、約 2304 個の BAC clone を用いたアレイ CGH 法を確立した。我々はこれまでに CD5+DLBCL は CD5-DLBCL に対し予後不良群を形成することを報告していたが、DLBCL70 症例 (CD5+DLBCL, 26 例; CD5-DLBCL, 44 症例) に対しアレイ CGH 法で解析した。20%以上の症

例に認められる両方に共通する異常は、増幅領域としては 1q21-q31, 1q32, 3p25-q29, 5p13, 6p21-p25, 7p22-q31, 8q24, 11q23-q24, 12q13-q21, 16p13, 18 が見出され、欠失領域としては 1p36, 3p14, 6q14-q25, 6q27, 9p21, 7p11-p13 が見出された。また、CD5+DLBCL に特徴的な遺伝子異常として、10p14-p15 と 19q13 領域の増幅、および、1q43-q44 と 8p23 領域の欠失を見出した。また、予後不要因子として、CD5+DLBCL で 13q21-q34 の増幅あるいは 1p34-p36 の欠失を見出した。両群に共通する 13q31 増幅領域からは新規遺伝子 *C13orf25* を見出し、また、3p21 欠失領域の責任遺伝子は *FHIT* 遺伝子であることを報告した。

マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)の亜型(GCB 型と ABC 型)、T/NK リンパ腫・白血病、TEL-AML1 キメラ型小児白血病について解析を進めた。

マントル細胞リンパ腫では従来法 CGH で報告されていたとおり 11q22,13q21,13q34 の欠失が高頻度に認められた。その検出頻度は従来法の CGH よりも頻度が高かった。さらに、2q13 領域にホモ欠失を認め、その責任遺伝子が *BCL2* 蛋白と拮抗する機能を有する *BIM* 遺伝子であることを見出した。

DLBCLの発現解析による細分類であるGCB型とABC型について、それぞれに特徴的なゲノム異常が見出されるかを検討したところ、GCB型DLBCLとABC型DLBCLのゲノム異常様式は大きく異なっていることを明らかにした。ABC型DLBCLは3q,18q と19qの増幅、6q と9p21の欠失を特徴とし、GCB型DLBCLは1q, 2p, 7q と12qの増幅を特徴としていた。また、CD5+DLBCLはABC型とよく似ており、CD5-CD10+DLBCLはGCB型とよく似ていることが明らかとなった。

T/NKリンパ腫・白血病については、Aggressive type の aggressive NK cell leukemiaとExtranodal NK/T細胞リンパ腫(鼻

型)は共にEBウイルスが関連するaggressive型として認識されており、類似性が指摘されていたが、27症例を用いたアレイCGH解析により両者はゲノム異常様式が異なることが明らかとなった。

また、30症例のAPLについてアレイCGHを行ったところ、約60%の症例で特徴的なゲノム異常が認められたが、40%程度の症例ではゲノム異常が認められず、リンパ腫とは異なり、APLではゲノム異常の数が少ないことが明らかになった。また、現在用いているアレイでは検出できない異常があるのか、あるいはアレイ技術では見出せない点突然変異などの異常があるのか現時点では不明である。

(6) 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。

(7) 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。

(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) HDAC9 の isoform の発現を RT-PCR で検討した結果、肺癌細胞株では catalytic domain の欠失した HDAC9 isoform 3 が主に発現していた。肺がん組織での HDAC9 isoform 3 発現をリアルタイム RT-PCR で検討したところ、ほとんどの症例で正常肺に比し

て高発現を示した。HDAC9 の発現値により肺がん患者症例を 4 分割すると、最も高発現群の予後が不良である傾向が認められた。そこで、高発現群(1/4)と中程度発現群(3/4) とで予後解析すると、HDAC9 isoform3 高発現群の生存率が有意に低下していることが判明した (log-rank  $p=0.035$ )。次に HDAC9 isoform3 の高発現が予後不良因子になるか Cox 比例ハザードモデル法による多変量予後因子解析を行ったところ、腫瘍サイズ (T 値) (Hazard ratio (H.R.)= 7.87,  $p=0.009$ )と共に、腫瘍サイズと独立した強い予後因子 (H.R.= 4.17,  $p=0.012$ ) となることが明らかにされた。また、発現低下が非常に強い予後不良因子となる HDAC class II HDAC5・HDAC10 を低発現細胞株 A549・Calu6 に遺伝子導入して強制発現させた結果、両細胞共に HDAC5 により細胞増殖がベクターコントロールの約 40%へと減少した。一方、HDAC10 では増殖抑制効果は得られなかった。

MCA アレイ法による網羅的解析研究では、ヒト悪性腫瘍株 ACC-MESO-1 を用い制限酵素 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 法を用いて同一細胞株・同じアレイを用いて検討した結果、メチル化陽性遺伝子数は 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。

RhoB 遺伝子に関しては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クス異常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 CpG 領域のメチル化はほとんど検出されなかった。一方、RhoB 発現の減弱が認められた細胞株にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 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 名の非小細胞肺がん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。

(2) Dicer の発現は、正常肺の 1/2 の発現量を境にヒストグラムで二峰性の発現パターン (高発現群・低発現群) を示した。一方、Drosha は明瞭な二峰性を示さなかったために発現中央値で高発現群・低発現群に二分して解析した。臨床病理データとの関連を検討すると、Dicer の低発現群で低分化型を示す症例が多かった ( $p=0.01$ )。一方 Drosha では著明な相関は見られなかった。予後との関連では、Dicer 低発現群の予後は高発現群に比して著明に不良であり ( $p=0.0001$ )、多変量解析では病期 (H.R.=11.3,  $p=0.001$ )と共に、独立した強い予後因子 (H.R.=17.6,  $p=0.001$ ) であった。一方、Drosha では低発現群で予後不良の傾向が認められた。Dicer の発現低下が promoter 領域の DNA メチル化によるものかを明らかにするために、低発現群 15 症例・高発現群 10 症例・正常肺を解析したが、DNA メチル化の存在を示す結果は得られなかった。

miRNA に関しては、選択した miRNA の mature form の発現を Northern blot にて検討しところ、一部の miRNA が小細胞肺がんを中心に強発現パターンを示した。強発現が検出された miRNA は類縁 miRNA を構成成

分とする 3 個のパラログ miRNA クラスター由来の miRNA であった。miRNA mature form は 22 残基程度と非常に短くクロスハイブリしやすいために、miRNA 発現ベクター導入細胞の RNA を用いた Northern blot 解析及び特異性の高い pre-miRNA を増幅する定量 RT-PCR 解析を行い、さらに、クラスター内でクロスハイブリがほとんど無い miRNA プロブを選んで Northern blot 解析を行った結果、染色体 13 番の miRNA クラスター miR-17-92 が強発現していることを確認した。小細胞肺癌組織の全例でこのクラスター由来 miRNA の強発現が見られた。このクラスターは C13orf25 遺伝子上に存在し、肺癌細胞株 2 株に C13orf25 遺伝子の著明な増幅が認められた。C13orf25 遺伝子自体も miR-17-92 と同様に強発現をしていたため、どちらの強発現が肺癌発症進展へ関与しているか検討する目的で、C13orf25 の ORF 発現ベクター及び miR-17-92 クラスター発現ベクターを肺癌細胞へ導入して細胞増殖に対する作用を検討した。その結果、miR-17-92 は肺癌細胞の増殖を促進し、C13orf25ORF は促進効果を示さなかった。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

(1) Cdk1 による INCENP リン酸化部位の同定

Cdk1 が INCENP を直接リン酸化しうるかについて検討したところ、INCENP が Cdk1 によってリン酸化を受けた後、分裂期で認められるようなバンドシフトを引き起こすことが明らかになった。さらに、このリン酸化部位が T59 および T388 であることを同定した。

(2) Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義

INCENP が Plk1 と結合しうるかを Far-Western 法を用いて検討したところ、INCENP は Cdk1 によるリン酸化反応依存性に INCENP と結合しうることが判明した。こ

の結合は T388A の場合では認められないことから、Plk1 は Cdk1 によってリン酸化された T388 を認識して INCENP に結合していることが判明した。また、これらの現象は免疫沈降法によっても確認された。さらに、INCENP の発現を RNAi で低下させたとき、Plk1 の中心体局在は保たれるものの、動原体への局在は阻害されていた。この現象は、Aurora-B の RNAi では認められないことから、INCENP の RNAi によって認められている表現型は、Aurora-B の活性を低下させたことによるものではなく、結合蛋白質としての INCENP が減少したことによるものと考えられた。

さらに、INCENP の T59 または T388 のリン酸化反応の生理的意義を検索するため、マウス INCENP の WT、T59A、または、T388A を導入した HeLa 細胞株において、ヒト由来（内因性）の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの細胞の表現型を観察した。その結果、WT および T59A を導入した細胞においては、Plk1 の動原体局在の回復が認められたが、T388A を導入した細胞では約半分ほどしか回復が認められなかった。また、T388A を導入した細胞では、WT および T59A を導入したものに比べて、分裂中期から後期への進行が遅くなっていることが判明した。以上のことから、Cdk1 は INCENP のリン酸化反応を通じて、Plk1 の動原体局在を制御していること、動原体の Plk1 は、分裂中期から後期への進行に重要な役割を担っていることが判明した。

(3) Cdk1 によるピメンチンリン酸化反応の生理的意義

我々は、これまでに Rho キナーゼおよび Aurora-B が、分裂後期から終期にかけてピメンチンなどの中間径フィラメント構成蛋白質を分裂溝特異的にリン酸化し、中間径フィラメントの娘細胞への均等分配および細胞質分裂を制御していることを示してきた。また、

我々は、Cdk1 についても、分裂前中期から中期までビメンチンをリン酸化することを明らかにしてきたが、その生理的意義は不明のままであった。

我々は、Plk1 が、Cdk1 によってリン酸化されたビメンチンのセリン 55 と直接結合し、そのキナーゼ活性を著しく上昇させることを明らかにした。この活性化 Plk1 は、さらに、ビメンチンのセリン 82 をリン酸化することから、Cdk1 による分裂期特異的なビメンチンのリン酸化反応は、Plk1 をビメンチンへと集積させることを介して、Plk1 によるビメンチンのリン酸化反応を制御していることが判明した。さらに、この Plk1 によるリン酸化反応は、細胞質分裂における Rho キナーゼや Aurora-B によるビメンチンのリン酸化反応と協調的に働き、ビメンチンフィラメントの娘細胞への分配に関与していることを明らかにした。

#### (4) 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。

#### (5) 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、 $\beta$ -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・転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃がん腹膜転移の発生・進展の分子基盤の解析と臨床応用

GFP-遺伝子を導入して作成した胃がん腹膜微小転移マウスモデルを用いた *in vivo* の解析から胃がんの初期の腹膜転移は腹腔内のどこにでも起こる訳ではなく、乳斑に限局して選択的に起こること、腫瘍の増大に伴い乳斑以外の組織にも播種性進展することを示した。すなわち、胃がんの腹膜転移は節外性リンパ組織である乳斑に選択的に初発（微小）転移巣を形成する早期と、微小転移の増殖から腹腔内に播種性に進展する後期の2段階から成るものと考えられる。

微小転移の治療感受性の検討から腹膜微小転移は化学療法に感受性が高く、早期治療により微小転移はコントロールが可能であり、治療の格好の標的となりうるものと考えられた。我々は腹腔洗浄液の遺伝子診断 (CEA を指標とするリアルタイム RT-PCR 法) により腹膜微小転移の検出法を確立しており、この遺伝子診断による微小転移の検出とハイリスク患者に対する早期治療による腹膜再発の予防を目指した治療戦略を提唱し、臨床試験を行っている。

一方、TNF- $\alpha$ KO マウス、KO マウスと野生型マウスの骨髓キメラマウスを用いた解析から腹膜転移後期の播種性進展に TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが関与することを明らかにした。実際、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体によりヌードマウスモデルにおけるヒト胃癌細胞の腹膜転移の播種性進展が抑制された。ただし、この場合用いた抗体は抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体でありそれでもマウスへの移植腫瘍の播種性進展を抑制することから、この場合の転移抑制は腫瘍の分泌する TNF- $\alpha$  によるケモカインおよびケモカイン受容体の発現を抑制することにより間接的に腹腔炎症細胞の TNF- $\alpha$  分泌を抑制するためと考えられた。しかし、腫瘍に対する増殖促進作用や免疫抑制作用などの可能性から抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体を癌患者に治療薬として実際に投与することは現在、基本的には許可されておらず、上記抗サイトカイン療法の実用化に際しては TNF- $\alpha$  抗体の代わりに NF- $\kappa$ B 阻害剤などシグナル伝達阻害薬の投与の可能性も考えられる。

## (2) 大腸がんにおけるリンパ節転移と腫瘍リンパ管新生の分子機構の解析

リンパ節転移能を有する胃、大腸がん細胞はいずれも VEGF-C を高発現し、VEGF-C 産生とリンパ節転移能は相関するが、VEGF-C 低発現がん細胞に VEGF-C を強制発現させただけではリンパ節転移は有意には促進されず、リンパ管新生と腫瘍のリンパ管浸襲能の両者がリンパ節転移にとって重要であるものと考えられた。実際、大腸がん臨床例の免疫組織

学的解析からリンパ管新生は腫瘍組織内では正常組織のリンパ管に比べむしろ少なく、腫瘍辺縁部において増加が認められ、腫瘍先進部において簇出性に浸潤するがん細胞が同部の新生リンパ管に侵入する所見が観察された。

これら臨床例の観察から得られた可能性を検証するために、不死化ヒトリンパ管内皮細胞株とヒト大腸癌リンパ節転移細胞株を組み合わせた *in vitro* 解析システムを確立し、このシステムを用いて管腔形成促進因子の存在を検出した。本システムは今後促進因子だけでなく、未知のリンパ管阻害因子の同定にも応用可能と考えられる。

## (3) 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 高発現胃癌細胞に対しては *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 高発現胃癌に対する 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癌の再発様式の中で最も頻度の高い腹膜転移由来の HER2 高発現胃癌細胞株 (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。胃癌肝転移の約半分は 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 を高発現する胃癌肝転移は胃癌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癌肝転移に対し、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。

#### (b) 造血器腫瘍の遺伝子異常の解析

(1) 胃 MALT リンパ腫における API2-MALT1 キメラ遺伝子の意義の確立：多数症例の胃 MALT リンパ腫を解析し、除菌療法無効症例の半数に API2-MALT1 遺伝子が見出されたことは重要であるが、約半数近くには API2-MALT1 のようなマーカーがない。これまで 3 年間の解析によって、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。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) MALT リンパ腫における API2-MALT1 キ

メラ遺伝子の機能の解析：レトロウイルス法を用いて上皮細胞 HeLa、リンパ球細胞 Ba/F3 へ API2-MALT1 融合遺伝子を導入し、発現させることができた。この系を用いて、API2-MALT1 は、HeLa 細胞において紫外線誘導性のアポトーシスに対し、また、Ba/F3 細胞においては紫外線及び doxorubicin 誘導性のアポトーシスに対して抑制的に働くことを示した。このことから、API2-MALT1 の抗アポトーシス作用はリンパ系細胞に限ってみられるものではなく、普遍的な現象である可能性が示唆された。造血器細胞株では初めて、API2-MALT1 キメラ遺伝子の抗アポトーシス作用が明らかとなった。また、Ba/F3 細胞株は紫外線及び doxorubicin 誘導性のアポトーシスに対して抑制的に働くものの、IL3 除去によるアポトーシスは抑制しなかったため、API2-MALT1 の抗アポトーシス作用は刺激の種類により異なると考えられた。

(3) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索：API2-MALT1 キメラ遺伝子導入細胞株を Hela 細胞株を樹立した。親株との間で発現差異のある遺伝子を遺伝子発現解析法で解析したところ、約 50 個程度の遺伝子が有意に発現上昇していることを見出し、その中に転座に加わる API2 遺伝子そのものが見出された。そのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェレースをマーカーに転写活性を検討したところ、確かに標的であることが明らかとなった。プロモーター領域に存在する 3 つの NF- $\kappa$ B 結合サイトを点突然変異を入れて、解析したところ、第一番目と第 3 番目の結合モチーフが主要な役割を担っていることが明らかとなった。ゲルリターゲーションアッセイでもその結合が確認された。これらのことは、キメラ遺伝子そのものが autocrine 機構によって発現が持続されるだけでなく、API2 も刺激するので、抗アポトーシス機能が増強することが考えられる。

(4) API2-MALT1 の蛋白レベルの解析：

MALT リンパ腫発症に関与するキメラ遺伝子 API2-MALT1 の蛋白レベルの研究では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質と核を往復することが明らかとなった。これはレプトマイシン B の添加により、核内に MALT1 および API2-MALT1 が貯留することを見出したことによる。この核、細胞質間のシャットリングは機能を考える上で重要な意義がある。事実、MALT1 蛋白は BCL10 を核外に搬出するが、API2-MALT1 にはその機能がないことが明らかとなった。この発見は、これまでに予想されていたことではなく、機能を考察する上で、まったく新しい概念を導入する必要性を示唆する。また、種々の欠失変異体による検討で、Nuclear Exporting Signal (NES) を見出し、機能していることを明らかにしたことは重要である。また、BCL10 の細胞内局在にも NES シグナルが重要な働きを示していることを明らかにしたが、キメラ遺伝子には BCL10 を核外に運び出す能力が欠けていることが明らかとなり、症例における BCL10 免疫染色とキメラ遺伝子の有無とがよく相関することが始めて明らかとなったことは、BCL10 の病的意義を確認する上で重要な発見である。

(5) アレイ CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析：

a) これまで CGH 法により、CD5+DLBCL と CD5-DLBCL の各々の群に特異的な染色体遺伝子の異常を明らかにし、CD5+DLBCL の疾患単位としての分子基盤を確立してきた。今年度は、さらに詳細にゲノム異常を解析するために、アレイ CGH 法を確立し、これら欠失又は増幅しているゲノム領域を解析した。その結果、新しい異常領域が複数見出されており、そのうちの 2 領域については、比較的短期間に責任遺伝子を確定することができた。

b) マントル細胞リンパ腫ではこれまでの方法と比較し、より高頻度に 11q22,13q21, 13q34

の欠失を検出することができた。また、新たな責任遺伝子として、2q13 領域のホモ欠失領域の責任遺伝子として、BCL2 蛋白と拮抗する機能を有する BIM 遺伝子を見出した。マン托ル細胞リンパ腫の発祥機構を考察する上で重要な発見である

c) DLBCLの発現解析による細分類であるGCB型とABC型について、それぞれに特徴的なゲノム異常が見出されることを見出し、発現解析による分類がゲノム異常の観点からも妥当な分類であることを示唆したことは、意義が高い。また、CD5+DLBCLはABC型とよく似ており、CD5-CD10+DLBCLはGCB型とよく似ていることが明らかとなったが、今後、両疾患単位の関係についてより明確な検討が必要であると考えられる。

d) T/NKリンパ腫・白血病の解析では、Aggressive type の aggressive NK cell leukemiaとExtranodal NK/T細胞リンパ腫(鼻型)は共にEBウイルスが関連するaggressive型として認識されており、類似性が指摘されていたが、両者は異なるゲノム異常様式を有しており、異なる疾患単位であると考えられる。

e) APL のゲノム異常の解析ではアレイ CGH では、約 60%の症例で特徴的なゲノム異常が認められたものの、40%程度の症例ではゲノム異常が認められず、今後の検討が必要である。現在用いているアレイでは検出できない異常があるのか、あるいはアレイ技術では見出せない点突然変異などの異常があるのかについて検討する必要がある。

(6)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 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。

(7) 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 マーカー以外によりマーカーがなく、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と発がんとの関連

(1) HDAC9 isoform 3 の高発現が予後不良因子となることが示唆された。HDAC9 は染色体 7p21 に存在し、がんで遺伝子増幅がある領域として知られており、遺伝子増幅に伴い HDAC9 isoform3 の発現が増強している可能性が示唆された。HDAC9 isoform3 は他の isoform に見られない特異な核内分布を示し、特異な機能を持つことも考えられた。HDAC5 では細胞増殖抑制作用が見られ、HDAC5 発現低下が予後不良因子となるという臨床的検討結果に沿う実験結果であった。HDAC10 ではこのような抑制効果は見られず、HDAC5 と HDAC10 は遺伝子構造上差異があり、機能的に異なると考えられていて、HDAC10 は増殖以外の点で肺がん発症に関与することが示唆された。これらの研究成果は、HDAC class II 発現異常が肺がん発症に深く関与することを示唆した。

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た。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。

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。

(2) ヒトがんにおける Dicer の異常は報告がなく、今回の検討結果が最初であった。Dicer は RNAi や microRNA 機構に必須であるが、遺伝子改変マウス等の検討では、Dicer 欠損により、重篤な ES 細胞の分化障害・血管形成障害、及び、セントロメアのヘテロクロマチン構造・インプリンティング等の障害等、非常に重篤な異常が報告されている。一方、我々の検討では肺がん細胞では高頻度に M 期チェックポイント異常・インプリンティング異常が認められた。このような多彩な異常と Dicer 発現量との関連を今後検討して、Dicer 低発現が予後不良因子となる機構を検討していく必要があると考えられた。Dicer の発現低下に DNA メチル化を伴わないクロマチン構造異常も考えられるため、さらなる検討が必要であると考えられた。

肺がんで強発現を示す miRNA クラスタール miR-17-92 が見出され、がん細胞の増殖制御に関与する可能性が示唆された。このクラスターに含まれる miRNA は、PTEN や RB ファミリー等のがん抑制遺伝子を標的遺伝子としていることが当初予想されたが、現在、miRNA は非常に多数の標的遺伝子を制御すると思われるので、この miRNA クラスタールの標的も種々のシグナル伝達系に係わる遺伝子群やクロマチン構造を制御する遺伝子群等の多数の遺伝子が含まれると考えられた。したがって miRNA クラスタール強発現により非