

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

網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明と
その臨床応用に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成20(2008)年4月

目 次

I. 総括研究報告

網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明と
その臨床応用に関する研究
横田 淳

II. 分担研究報告

1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明
横田 淳
2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握
清野 透
3. がんの網羅的なゲノム異常解析並びに臨床病態との相関解析
柴田 龍弘
4. がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析
稲澤 譲治
5. 新規腫瘍抑制経路の解明
村上 善則
6. ATLを含む難治性白血病の多段階発がん機構の解析
森下 和広
7. がんのゲノム網羅的解析
小川 誠司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

総括研究報告書

網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明と
その臨床応用に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんでホモ欠失している113個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中にはRB、p16など、既知のがん抑制遺伝子に加え、多くの新規遺伝子が含まれており、新たな候補がん抑制遺伝子と考えられた。p16遺伝子のホモ欠失は、メチル化と同様、発がんの早期に起こるが、喫煙が主要因ではないことが分った。神経芽腫細胞株で高頻度にDNAメチル化をおこすProstaglandin D2受容体遺伝子(*PTGDR*)ならびにProstaglandin E受容体2型遺伝子(*PTGER2*)を同定し、*PTGER2*発現は細胞の増殖能を低下させることを明らかにした。肝がん・肺がん・膵がん・胆道がんにおけるゲノム異常の全体像を明らかにし、臨床病態と相関するゲノム異常パターンの組み合わせが存在することを明らかにした。高密度SNPアレイによる小児急性リンパ性白血病検体の解析により、9番染色体短腕の染色体転座によって、*PAX5*遺伝子が種々の遺伝子と融合遺伝子を形成していることを明らかにした。成人T細胞白血病のゲノム解析により特異的発現マーカーとして*TSLC1*遺伝子を同定した。上皮性卵巣がんの*in vitro*多段階発がんモデルを作製して、変異*p53*、*KrasV12*、*c-myc*、活性型*Akt*、*bcl-2*などを種々の組み合わせで導入し、ヌードマウスの皮下で造腫瘍性を獲得し、*SCID*マウス腹腔内で腹膜播種病変を生ずる組み合わせを同定した。*TSLC1*が肺がんの強力ながん抑制遺伝子であることを遺伝的に証明した。

分担研究者

- | | | |
|----------|-------------|-----|
| 1. 横田 淳 | 国立がんセンター研究所 | 部長 |
| 2. 清野 透 | 国立がんセンター研究所 | 部長 |
| 3. 柴田 龍弘 | 国立がんセンター研究所 | 室長 |
| 4. 稲澤 謙治 | 東京医科歯科大学 | 教授 |
| 5. 村上 善則 | 東京大学医科学研究所 | 教授 |
| 6. 森下 和広 | 宮崎大学医学部 | 教授 |
| 7. 小川 誠司 | 東京大学大学院 | 助教授 |

A. 研究目的

本研究の目的は、発がんの分子機構および多様性のあるがんの生物学的特性を、がん細胞内に蓄積しているゲノム異常との対応で把握し、個々のがんに最適の治療法を提供する予知医療の実現へ向けて、がんの分子診断や分子標的療法に有用な新たな情報を集約することである。がんは細胞内に遺伝子異常が蓄積することにより発生、進展していく病気なので、がんの罹患率・死亡率を減少させるためには、ゲノム異常を中心とした発がんの分子基盤を明らかにし、得られた情報を臨床へ導入していくことが必須である。

近年、一部のがんでは、がんの分子情報に基づいた診断法や治療法の開発により、予後の改善が見られている。しかし、まだ多くのがんでは、がんの特性である浸潤・転移や脱分化、ゲノム不安定性などの機構に関して、がん細胞内に蓄積している遺伝子異常との対応では把握されておらず、治療の標的となる特定の分子も同定されて

いない。一方、ヒトゲノムの情報も充実してきており、ゲノム網羅的な遺伝子の解析技術が急速に進歩している。また、ヒト不死化上皮細胞や各種幹細胞など、細胞生物学的な解析技術も進歩が目覚ましい状況にある。そんな背景の中、ヒトがんにおけるゲノム異常に関して、全ゲノムに亘って網羅的に把握することが必須であると世界的にも認識されており、我が国でも申請者や研究分担者等らのグループを中心に積極的にゲノム研究が展開されてきた。本研究班は、国内でリーダーシップを取るがんのゲノム研究者を中心に構成し、情報、技術、材料など、すべてにおいて、世界に先駆けた研究を展開できる体制を整えている。また、ヒト細胞を用いた細胞生物学的解析や新規がん関連遺伝子の単離研究においても優れた研究歴を持つ研究者を加えたことにより、本研究で同定された新たな遺伝子の機能に関しても迅速に結果を集積でき、がん細胞の特性を制御する新たな手法の開発を進めることも可能である。さらには、分子病理学研究者の参加により、がんの臨床病理学的な所見との関連性についても解析を進め、臨床への応用研究を展開できる体制を整えている。本研究は、世界的にもその重要性が認識されているものの、研究の展開が遅れている分野であり、ゲノム解析、細胞不死化など、細胞がん化機構解明に重要な各分野で独自の研究歴を持つ本研究班の構成員による飛躍的な研究の発展が望まれるものである。

本研究では、特に難治がんを中心とした種々のがんの網羅的なゲノム異常解析を行い、その結果の中から実際

にがんの診断、治療に役立つ標的分子を同定し、がんの臨床応用開発へ向けた分子基盤を構築していく。第一に、高精度なゲノム解析技術を駆使して、死亡率や発生頻度の高い肺がん、膵がん、白血病、神経芽腫などのゲノム異常に関して網羅的な解析を行い、がん細胞のゲノム異常の全容を明らかにする。また、独自に解析技術の開発も進める。第二に、高頻度にゲノム異常を起こしている遺伝子に関しては、整備された臨床検体を用いた解析から臨床病理学的所見との関連性を明らかにする。第三に、正常上皮細胞やがん細胞株を用いて、細胞のがん化過程の再現とがん形質の抑制法の検討を行い、ゲノム異常を起こしている遺伝子の生物学的機能とがん特性発現における分子経路を明らかにし、その制御法を追求する。第四に、これらの研究成果を統合して、がんの新たな診断法、治療法の開発に向けた研究を展開する。がんのゲノム解析に基づいて新たな分子診断法や分子標的療法の開発が進みつつある現在、ゲノム網羅的な解析によりがんのゲノム異常の全容を明らかにすることは、今後の更なる開発に向けて必須の情報となる。

B. 研究方法

1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明

1) 肺がん

43 例のヒト肺がん細胞株から DNA を抽出し、ゲノム網羅的に約 100,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip、Mapping 100k array を用いて染色体ホモ欠失領域を探索した。欠失が示唆された領域に関しては、さらに、その領域のプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失領域の詳細な解析を行なった。多くのヒト肺がん細胞株と様々な病期の肺腺がん臨床検体における LKB1 遺伝子の欠失と変異について解析し、その臨床病理学的意義や他の遺伝子異常との関連性を検討した。BRG1 遺伝子に関しては 59 例の細胞株を用いて変異・欠失の解析を行った。p16 遺伝子のホモ欠失に関しては、マイクロダイセクションした小型肺腺がんと肺腺がんの脳転移腫瘍から DNA を抽出して、MRC-Holland 社の P024B キットを用いた MLPA 法で解析し、定量的ゲノム PCR 法でゲノムコピー数の確認を行った。また、免疫染色法で p16 蛋白質の発現解析を行った。

2) 神経芽腫

BAMCA 法により、悪性度の高い小児神経芽腫を対象として、メチル化 DNA 領域のゲノムワイド探索や特定タンパク結合 DNA 領域を探索し、エピジェネティクスの側面から新規がん関連遺伝子の同定を進め、がん悪性度診断のバイオマーカーとしての有用性を検討した。さらに、同定できたがん関連遺伝子の機能を解析し、その破綻によって起きるがん病態の解明を試みた。

3) 肝がん、膵がん、胆道がん

難治がんを中心とした諸臓器がん（早期病変を含む）臨床検体を用いて、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞のみを選別し、高密度 BAC アレイあるいはオリゴプローブアレイによる網羅的なゲノム異常の解析を進めた。また必要に応じて遺伝子発現異常についても網羅的に検索し、各臓器がんにおけるゲ

ノム異常の全体像を明らかにした。

4) 小児急性リンパ性白血病（小児 ALL）

解析に用いた試料は、初診時腫瘍検体および寛解時正常骨髓検体由来のゲノム DNA、399 ペアである。ゲノム DNA を XbaI で消化した制限酵素断片を単一アダプターによる PCR により増幅後、DNaseI 処理と蛍光色素標識を行い、Affymetrix 社製 SNP アレイ (GeneChip50K XbaI) 上でハイブリダイズし、専用スキャナでアレイシグナルを検出した。得られたシグナルを独自に開発した CNAG/AsCNAR ソフトウェアを用いて解析し、ゲノムコピー数異常およびアレル不均衡のゲノムワイドな同定を行った。ゲノムコピー数解析で転座切断点が集積していた 9 番染色体短腕の PAX5 遺伝子について、予測される融合遺伝子の転座切断点をまたぐように設定したエクソプライマーセットを用いて RT-PCR を行い、融合遺伝子の存在を確認した。確認された融合遺伝子については、融合遺伝子全長のクローニングを行った。同定された PAX5 関連融合遺伝子を正常 PAX5 遺伝子に対して競合的に 293T 細胞に遺伝子導入し、PAX5 感受性の CD19 プロモーター配列の下流に luciferase cDNA を配置したレポーター遺伝子を用いた luciferase アッセイにより、PAX5 融合産物の正常 PAX5 に対する効果を解析した。

5) 成人 T 細胞白血病 (ATL)

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、高密度 SNP アレイを用いたゲノム解析、Spectral karyotyping (SKY)/FISH 法を用いた染色体分析を組み合わせて、ATL 及び 7 番染色体欠失型骨髄性白血病のゲノム解析を行った。DNA プロモーターのメチル化は、5-Aza-dC 処理並びに Bisulfite 法、TrichostatinA 処理並びにアセチル化ヒストン抗体による CHIP 法により確認した。同定した白血病関連遺伝子について、遺伝子発現ベクターの導入による過剰発現系もしくは siRNA 導入による発現抑制による遺伝子機能解析を行った。さらに、抗体作製によるタンパク質発現解析、NOG マウスを用いた白血病細胞移植実験を行った。次年度に渡り TG マウス、KO マウスを作製している。TSLC1 に関しては、Phage display 法で抗体を作製し、細胞染色、FACS 解析、病理免疫組織染色、血清中可溶性 TSLC1 の同定、ELISA の開発に用いた。さらに、抗体療法開発として、完全ヒト型抗体への変換、ADCC 活性、細胞障害性の検討、ATL モデルマウス・NOG マウス白血病移植系への投与実験にて効果判定を行った。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

正常ヒト細胞を TERT 単独あるいはこれに加え HPV16 E7 や E6 あるいは bmi-1, p16-shRNA の導入により不死化した。また、不死化したヒト細胞に、各がんが高頻度に見つかる異常を、がん遺伝子の強制発現やがん抑制遺伝子の RNA 干渉法を用いた発現抑制を行い、がん化過程を in vitro で再現した。導入遺伝子としては hTERT, bmi-1, HPV16 E6, 種々の変異 E6, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性化 Akt (myr-Akt), erbB2, c-myc などを用いた。shRNA は puromycin 耐性レトロウイルスにより、H1 promoter 制御下に発現し、p16, PTEN, p53 などの各遺伝子をノックダウンした。多段階発がんモデルの解析方法としては、不死化から、細胞増殖能、足場

非依存性増殖能、ヌードマウスでの造腫瘍能などの細胞トランスフォーメーション検出法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾の変化などを DNA マイクロアレイや Western ブロットング法などを用いて解析した。

3.細胞接着分子 TSLC1/CADM1 の細胞がん化における役割に関する研究

CADM1 遺伝子ホモ、ヘテロ欠失マウス、並びに野生型(+/+) マウスを長期間飼育、観察し、月齢 15 ヶ月、及び 22 ヶ月間にて病理解剖に供した。病理解剖では、体重、並びに主要臓器の重量や、腫瘍発生の有無、その他の異常の有無を検索した。また、腫瘍臓器のホルマリン固定あるいは凍結保存を行った。パラフィンブロックより組織切片を切り出し、HE 染色により腫瘍や炎症性病変、変性病変などの有無を検討した。抗 CADM1、抗 TSLC2/CADM4、抗 DAL-1、抗 4.1N ポリクローナル抗体は独自に作製した。EGFR、erbB2 等に対する抗体は購入、或いは他から分与を受けた。K-ras 遺伝子エクソン 1,2、EGFR 遺伝子エクソン 21、TP53 遺伝子エクソン 5-8 を、エクソン-イントロン接合部を含む周囲のイントロンとともに PCR により増幅し、SSCP 法を用いて変異の有無を検索した。CADM1、CADM3、CADM4 分子の異常の有無を検索する目的で各々、特異抗体を作製した。

(倫理面への配慮)

手術で得られたヒト正常細胞の使用は、倫理審査委員会の承認を得て、提供者に不利益の生じないよう、また、同意を確認して行っている。ヒトがん組織の使用に当たっては、「臨床研究に関する倫理指針」に従い、個人情報の保護に十分に配慮し、必要に応じて倫理審査委員会の承諾を得て進めている。動物の操作は、各施設の動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮のもとに進めている。

C. 研究結果

1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明

1)肺がん

Affymetrix 社から発売された「Mapping 100k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 25-kb 間隔で調べることのできるマイクロアレイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、43 例のヒト肺がん細胞株における染色体ホモ欠失の領域をゲノム網羅的に探索した。その結果、51 ゲノム領域にホモ欠失を検出し、これらの領域内には 113 個の遺伝子が存在することが分った。それらの遺伝子の中には、既知のがん抑制遺伝子である RB と p16、候補がん抑制遺伝子である PTPRD と LRP1B も含まれていた。また、3つのマイクロ RNA 遺伝子、let-7c、hsa-mir-99a、hsa-mir-125b-2 も第 21 染色体のホモ欠失領域内にマップされた。これらの領域のホモ欠失について 74 のヒト肺がん細胞株を用いて解析したところ、最も高頻度に欠失が検

出されたのは 9p21 の p16 遺伝子領域(19/74, 26%)で、次いで、9p23 の PTPRD 領域(8/74, 11%)、2q22 の LRP1B 遺伝子領域(7/74, 9%)、3p14 の FHIT 遺伝子領域(7/74, 9%)であった。これらの結果から、他のホモ欠失領域に存在する遺伝子も強力ながん抑制遺伝子候補と考えられ、現在、それらの遺伝子について、更に詳細な解析を進めている。

昨年度の本研究で、LKB1 の変異あるいは欠失が肺がん細胞株の約 30%(21/70)に起こり、その異常は KRAS 変異と共存することが多いことを明らかにした。また、多くの肺腺がん臨床検体における変異の検索では、変異は男性喫煙者のみで検出され、女性あるいは非喫煙者には全く検出されず、組織学的には、低分化型で有意に多かった。以上より、LKB1 遺伝子の変異は喫煙によって誘導され、低分化型腺がんの形成に関わっていると考えられた。本年度は、LKB1 遺伝子と同様に第 19 染色体短腕に存在する BRG1/SMARCA4 遺伝子の変異・欠失について、59 の細胞株を用いて解析し、他のゲノム異常との関連性について検討した。変異は非小細胞がんの 35%(13/37)、小細胞がんの 5%(1/19)に検出され、すべて失活型の変異であった。また、変異は KRAS、LKB1、p16、p53 と共に起こっていたが、myc 遺伝子群の増幅とは共存していなかった。以上より、第 19 染色体の欠失は LKB1 と BRG1 の両者を失活させる染色体異常であり、また、myc 遺伝子群と BRG1 遺伝子が機能的に重複している可能性が示唆された。p16 遺伝子は、変異・メチル化・ホモ欠失など、種々の以上によって失活することが知られているが、ホモ欠失の起こる時期については不明である。そこで、近年、開発された MLPA 法を用いて小型肺腺がんと肺腺がん脳転移腫瘍におけるホモ欠失の頻度と特異性を解析した。ホモ欠失は原発腫瘍の 29%(8/28)、脳転移腫瘍の 26%(5/22)に検出され、KRAS 変異、EGFR 変異とも共存しており、喫煙歴とは相関がなかった。また、上皮内がんでも 25%(2/8)で検出され、発がんの早期に起こるゲノム異常と考えられた。

肺がんにおける EGFR 遺伝子変異と相関する遺伝子発現プロファイルの解析や CT 画像診断との比較解析から、EGFR 遺伝子変異を示す肺がんは特徴的な遺伝子発現や画像所見を示すことを明らかにした。複数のサイトカインの発現パターンの解析から、早期肺がんの予後因子となるサイトカイン遺伝子発現セットを同定した。

2)神経芽腫

神経芽腫 (NB) は、未治療経過観察で自然退縮する stage-1, 2 の非進行型および stage-4S と、致死的な stage-3,4 の進行型 NB に大別される。stage-3,4 NB ではがん遺伝子 MYCN の増幅と第 1 番染色体短腕(1p)欠失が高頻度に検出される。加えて、NB の悪性化には DNA メチル化の関与が報告されてきている。このような背景から、BAMCA 法により、進行型 NB において優先的にメチル化を受けるゲノム DNA 領域をゲノムアレイ上に検出し、これをランドマークにがん抑制遺伝子候補の探索を行った。その結果、NB 細胞株で高頻度に DNA メチル化をおこす Prostaglandin D2 受容体遺伝子 (PTGDR)ならびに Prostaglandin E 受容体 2 型遺伝子 (PTGER2)を見出した。PTGER2 プロモーター領域の CpG island メチル化は MYCN 増幅陽性の NB 細胞株で

高頻度に生じ、かつ遺伝子発現の消失をともなっていた。*PTGER2* 発現消失はヒストンH3の脱アセチル化、H3K9のメチル化と強い相関を示した。*PTGER2* 発現陰性 NB 株から作製した *PTGER2* 安定発現株は細胞増殖能の低下が起こり、これに、*PTGER2* の選択的 agonist である butaprost を作用させると cAMP の細胞内増加ならびに細胞増殖抑制と細胞死が起きた。また、*PTGER2* の有無に影響を受けない 8-Bromo-cAMP を処理すると細胞増殖抑制が確認され、NB における *PTGER2* 介在の細胞増殖抑制/細胞死経路の重要性が確認された。

3) 肝がん、膵がん、胆道がん

肝がんの臨床検体を用いた CGH 解析により、染色体構造異常の基づく新たな肝がんの分類を提唱し、また特徴的な遺伝子増幅領域から新規の治療標的を同定した。更に、早期肝がんと進行肝がんの両成分が共存する臨床検体を用いて、それぞれの成分における染色体構造異常を比較することで、肝発がん過程におけるゲノム異常の蓄積過程の詳細を明らかにした。膵がん臨床検体を用いた CGH 解析から、新規の異常を含む多数の染色体構造異常を明らかにした。その中で TGF β 経路に関係するユビキチンリガーゼを新規がん遺伝子候補として見いだした。胆道がん検体について高密度 CGH 解析並びに遺伝子変異解析を行ない、ホモ欠失領域を更に詳細に検索することで、新規がん抑制遺伝子として E3 ユビキチンリガーゼを同定した。当該分子の機能喪失が抗がん剤に対する抵抗性獲得に寄与していることを明らかにした。

胆道がん臨床検体において、EGFR の高発現は独立した予後因子となること、VEGF の発現は肝内胆管がんにおいて肝内転移と有意に相関することを見いだした。更にマウス移植モデルを用いて、EGFR/VEGFR 低分子阻害剤による増殖抑制について検討した結果、EGFR 遺伝子増幅を認める胆道がん細胞株では著明な抗腫瘍効果を認めたと、KRAS 遺伝子変異のある細胞株では治療抵抗性であった。

4) 小児急性リンパ性白血病

高密度 SNP アレイによる 399 検体の解析により、小児 ALL はゲノムコピー数異常の観点から、多倍体を示す症例、低倍数体を示す症例、CDKN2 ないし ETV6 の欠失を伴う症例、およびその他の近二倍体の症例に大きく分類できた。多倍体の症例で高頻度に増加する染色体は、4,6,8,10,14,17,18,21 番染色体に限られており、特に 21 番染色体の増加は小児 ALL で最も高頻度に認められる異常の一つであった。また、17 番および 18 番染色体の増加を伴わない多倍体症例の予後は有意に不良であった。

ゲノム全体にほぼ均等に配置された数万個の probe を用いた高解像度な解析から、通常の染色体分析では同定不可能な微細な領域における異常が多数同定され、複数の症例で異常が集積する領域から、従来報告されてきた遺伝子異常に加えて、KIF9, CCDC12, HypB (3p), NR3C2 (4q), Ikaros (7p), PAX5 (9p), PI3KAP1 (10q) などを含む多数の標的遺伝子の候補が同定された。特に興味深いのは、9p に認められた PAX5 遺伝子内にマップされる転座切断点の集積領域であった。PAX5 内に転座切断点が予測された 14 症例について SNP アレイ解析から予測される他の転座切断点の解析により、PAX5 が

ETV6 (12p), AUTS2 (7q), FOXP1 (3p), C20orf112 (20q) を含む様々な遺伝子と融合遺伝子を形成することが明らかとなった。実際、これらの融合遺伝子と正常 PAX5 を競合的に発現させることにより、異常な PAX5 融合遺伝子はドミナントネガティブに正常 PAX5 の転写活性化能を抑制することが明らかとなった。

5) 成人 T 細胞白血病 (ATL)

ATL に対して行った DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、ATL 特異的遺伝子発現マーカーとして TSLC1 を同定した。急性型 ATL のほぼ全ての症例で TSLC1 の高発現がみられ、慢性型やくすぶり型リンパ腫型など各種 ATL 細胞でも同様に発現が認められた。TSLC1 の高発現は *in vitro* 実験により自己細胞接着能の亢進、血管内皮細胞への接着能亢進をきたした。さらに、*in vivo* 白血病細胞マウス移植実験により臓器浸潤性の亢進や早期死亡、さらに NOG マウス皮下移植系で腫瘍の増大など、固形がんで示されているがん抑制遺伝子としてではなくがん遺伝子様の働きを示した。

ATL 細胞における接着因子 TSLC1 高発現を用いて新規診断及び抗体療法を開発するために、Phage display 法を用いてヒト型抗体を 30 種以上作製した。抗 TSLC1 抗体を用いた FACS 解析により、ATL 白血病細胞はその多くが CD4+/TSLC1+ に分画され、CD4+/CD25+ と重なることから Treg の一部を認識していることが示唆された。HTLV-1 キャリアにおいて 20-30% が陽性となり、その一部に高発現が見られることから TSLC1 発現解析は発症前診断としての可能性が示唆された。また血清中に可溶性 TSLC1 蛋白質を同定できたので、さらに ELISA 法の開発を行っている。また TSLC1 抗体の一部に高 ADCC 活性を有する抗体を同定したので、完全ヒト型抗体を作製し抗体療法の基礎実験を行った。NOG マウスへの ATL 細胞移植実験系に抗体投与することにより、肝臓や卵巣への臓器浸潤が抑えられたことから、*in vivo* において接着阻害効果が示された。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

一昨年度のヒト子宮内膜がん、昨年度のヒト子宮頸がんに続き、ヒト上皮性卵巣がんの *in vitro* 多段階発がんモデルの作製に成功した。また、ヒト子宮頸がんモデルは hTERT のみで不死化した正常子宮頸部上皮細胞株 (HCKIT) を用いてさらに解析を進めると共に、初代培養細胞 (HCK12) を用いて再現性の確認を進めた。HCK12 に HPV16 E6, E7 及び HrasV12 を導入すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3 次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-myc を追加導入すると非常に強い造腫瘍性を示した。HCK12/E6E7/HrasV12 細胞のテロメラーゼ活性は強くなく、hTERT の導入により造腫瘍性を増した。一方、HCK12/E6E7/HrasV12/c-myc 細胞のテロメラーゼ活性は十分強く、僅か 200 個の皮下移植によって造腫瘍性を示し、hTERT の追加導入によるさらなる造腫瘍性の増加は見られなかった。

卵巣がんの *in vitro* モデル作製のため、手術材料 2 検体から、hTERT+E7 または hTERT+cdk4+cyclin D により不死化した卵巣表層上皮細胞株 (HOSE1, HOSE2) を樹立した。これらは染色体異常の全くない正常 2 倍体を維持していた。hTERT+cdk4+cyclin D で不死化した卵

巢表層上皮細胞(HOSE2)に変異 p53+KrasV12+c-myc を導入した細胞は子宮頸部角化細胞と同様に、強い造腫瘍性を示すことを期待したが、100 万個の細胞移植によっても造腫瘍性は見られなかった。一方、変異 p53+KrasV12+ 活性型 Akt あるいは変異 p53+KrasV12+c-myc+bcl-2 を導入した細胞では造腫瘍性を示すことが明らかになった。活性型 Akt や bcl-2 など apoptosis の抑制に関与する遺伝子導入が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、これらの細胞を SCID マウス腹腔内に移植するとヒト卵巣がん転移像に近い腹膜播種病変を形成した。腫瘍の中には漿液性腺がん類似した上皮用細胞の配列を示すものや sarcoma 用の組織像を示すものがあり、現在、導入遺伝子と組織像との関連を検討中である。

3. 細胞接着分子 TSLC1/CADM1 の細胞がん化における役割に関する研究

CADM1 ホモ欠損マウスでは精子形成障害に加え、15 月齢以降、肺腺種、肺腺癌を高率に生じた。すなわち 15 月齢で肺腫瘍を生じたマウスは、*Cadm1*^{+/+}、*Cadm1*^{+/-}、*Cadm1*^{-/-} マウスで各々 1/29 (3%)、0/19 (0%)、10/30 (33%)、平均腫瘍容積は各々 2.7、0、0.005 mm³であった。*Cadm1*^{-/-} マウスでは腺腫 10 個に加え、腺がん 1 個が生じていた。他にリンパ腫が生じたが同系マウスと同等の頻度であった。*Cadm1*^{+/+} マウス、*Cadm1*^{+/-} マウス(22 ヶ月)の肺腫瘍はいずれも正常肺胞構造が全く失われ、異常増殖した細胞で置換されていた。大部分は肺腺腫と診断されたが、一部は核の異型性が極めて強く肺腺がんと診断された。しかし、浸潤、転移、全身症状は認められなかった。14 個の腫瘍より抽出した DNA を用いて *K-ras2*、*EGFR*、*TP53* の遺伝子異常を PCR-SSCP 解析により検索したが、構造異常は認めなかった。一方、免疫組織染色では、まず *Cadm1*^{+/-} マウスに生じた肺腺腫では、CADM1 タンパク質の発現が欠如することを見出した。また *Cadm1*^{+/-}、*Cadm1*^{-/-} マウスに生じたすべての腫瘍で、CADM1 の類似分子 CADM4 や、CADM1 と結合する 4.1N タンパク質の発現が著明に減少することを見出した。

Cadm1^{-/-} マウスは精子形成障害を起こすが、CADM1 の発現欠如がヒト男性不妊にも関わる可能性を共同研究により見出した。また、精子細胞で発現する CADM1 は、セルトリ細胞で発現する Necl3 蛋白質と結合する可能性、さらに腹膜マスト細胞の接着と生存に CADM1 が関与する可能性を共同研究により報告した。

D. 考察

1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階がん機構の解明

1) 肺がん

染色体ホモ欠損領域は、がん抑制遺伝子を探索する上で貴重な情報となり、これまでの研究でも RB、p53、p16 などのがん抑制遺伝子として位置づける強力な証拠となった。本年度の研究で欠失している 113 個の遺伝子を同

定できたが、近年、更に詳細に解析できるアレイが開発されてきているので、すべての遺伝子について欠失があるかどうかの解析を進め、候補がん抑制遺伝子を網羅的に同定したい。また、一方では、同定できた遺伝子について発現や変異の解析を進め、がん抑制遺伝子であるかどうか、結論を出して行きたい。

肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異に関しては、高頻度に変異している重要な遺伝子であることを確認するとともに、男性喫煙者に多く、低分化型腺がんの形成に関わっていることを示すことができた。肺腺がんの悪性度を規定する遺伝子のひとつであると考えられるので、今後は生物学的機能解析を進めるとともに、診断・治療の標的分子としての可能性も追求していきたい。また、BRG1 遺伝子の異常も肺がんの特性に関連している可能性が高いので、その機能解析も同時に進めたい。p16 遺伝子のメチル化は発がんの早期に起こり、喫煙と関連していることが知られているが、ホモ欠失の発生時期や要因は不明であった。本研究でメチル化と同時期に起こるが、喫煙が主要因ではないことが分った。今後は欠失の要因を明らかにし、肺発がんの予防へ繋がる研究を発展させたい。

2) 神経芽腫

神経芽腫は小児固形腫瘍の中で最も高頻度に発症する。未治療経過観察で自然退縮するタイプと、強力な化学療法に抵抗し致死となる NB に大別される。その病態を明らかにすることは治療や予防法の解明に繋がるだけでなく、神経細胞分化の分子機構の理解にも大きく貢献する。これまでの研究で、BAMCA 法により進行 NB で優先的に DNA メチル化を受けるゲノム領域の染色体ワイド探索を糸口に NB がん抑制遺伝子の候補として *NR1I2* を見出したが、今回、これに続き、同様に進行 NB のがん抑制遺伝子候補 *PTGER2* を同定した。今回の研究アプローチががん関連遺伝子探索に有効であることが示された。

3) 肝がん、膵がん、胆道がん

多数の肝がん臨床検体における解析から、ゲノム構造異常による腫瘍の層別化が臨床病態と関連することが判明し、更に個々の亜群における治療標的の同定が個別化医療において重要であると考えられた。組織学的に早期肝がんと診断される病変でもそのゲノム異常像は多彩であり、肝発がん過程の比較的早期の段階から多様な異常が起こっていることが判明した。今後、肝発がん初期における重要なゲノム異常の同定や新たな分子診断マーカー候補の単離を目指す。胆道がんで同定したがん抑制遺伝子は、抗がん剤耐性に関連することから、耐性克服に向けた新たな治療法に結びつく可能性がある。今後、その分子機構について詳細な解析を進めると共に、新規がん関連遺伝子の同定を継続する。胆道がんにおいて、EGFR 阻害剤の奏効性と相関する分子マーカーをモニタリングしていくことで効果的な治療成績が得られる可能性が得られ、今後臨床試験についても提案していきたい。

4) 小児急性リンパ性白血病

高密度 SNP アレイによるゲノムコピー数の網羅的な解析は、小児 ALL の発症に関わる遺伝子変異を同定する上で極めて有効なツールであることが示された。多数例の解析により、標的遺伝子の同定を可能とする微細な異常の集積領域が明確に同定され、当該領域より小児 ALL の

発症への関与が示唆される遺伝子が複数同定された。特に、9番染色体短腕に存在する PAX5 遺伝子が種々の遺伝子と遺伝子再構成を生ずることにより、従来知られていなかった PAX5 を共通のパートナーとする種々の融合遺伝子が形成されていることが明らかとなった。PAX5 遺伝子は、B 細胞の分化に必須の機能を有することが示されているが、本研究により、これらの融合遺伝子産物が正常 PAX5 の転写活性化能をドミナントネガティブに抑制することによって B 細胞の正常の分化を阻害することが、ALL の発症に重要である可能性が示唆された。

5) 成人 T 細胞白血病(ATL)

日本の難治性白血病の代表として ATL が存在するが、HTLV-1 キャリアは未だ 100 万人以上存在し、年間 100 人を超える患者が死亡している。南米を中心に世界ではその 20 倍以上の HTLV-1 キャリアが存在しているが、すでに感染しているキャリアに対する対処法や治療法が未だ確立されていない。今回の統合的ゲノム解析により ATL 発症に関わる遺伝子群が複数個単離でき、多段階発癌機構が明らかになってくれば、新規診断治療法の開発に繋がる可能性が高い。本研究でがん抑制遺伝子 TSLC1 が ATL において高発現していることを発見し、またその発現様式から ATL の有用な表面マーカーになり得ることが判ったことは、診断治療法開発の意味から重要である。また、TSLC1 高発現は細胞接着能の亢進、in vivo 腫瘍形成能の亢進に繋がり、ATL の特徴の一つである臓器浸潤性に重要な働きを持つことが判り、この TSLC1 を標的とした治療法の開発も重要と考えられた。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

昨年度、不死化子宮頸部角化細胞(HCK1T)で得られた結果を、独立の初代培養細胞(HCK12)を用いることで、子宮頸部角化細胞に E6E7+HrasV12 を導入するだけで造腫瘍性を誘導できることが示された。さらに c-myc の追加導入により著しい造腫瘍能の増加が見られた。HCK1T では 20 個の細胞接種によっても 6/6 で腫瘍を形成し、HCK12 でも 200 個の細胞移植により 3/6 で腫瘍を形成したことから、がん幹細胞様の細胞集団が培養皿上で維持されていることが示唆された。今後、がん幹細胞の理解や、同細胞を標的とした治療における標的分子の同定に有効であると考えられる。

卵巣表層上皮細胞を用いて、上皮性卵巣がんの多段階発がんモデル作製を進めた。子宮頸がんモデルでは E6E7 に加え種々のがん遺伝子を導入しているため、同じ遺伝子の組み合わせはなく細胞種によるがん遺伝子に対する感受性の違いを直接比較することはできない。E6E7 が hTERT+変異 cdk4 +cyclin D+変異 p53 より強いがん原性を持っているのか、卵巣表層上皮がん遺伝子に抵抗性が高いのかは、今後の検討課題である。今後、HPV 陽性ならびに陰性の口腔がんや食道がんや、肺がんの in vitro 発がんモデル作製を進める事で異なる細胞種間での特異性や共通性を明らかに出来るものと考ええる。また、分子標的薬剤の開発においても有効なツールとなることが期待される。

3. 細胞接着分子 TSLC1/CADMI の細胞がん化における役割に関する研究

遺伝子欠損マウスで肺がんが生じる例は TP53, PTEN, STK11 など限られており、肺がん抵抗性の C57BL6 系統に生じた点、ヘテロマウスの腫瘍でも不活化する点からも、強い肺がん抑制遺伝子と考えられる。CADM1 はヒト進行肺がんで不活化し、ヒト肺がんに極めて類似した変異 K-ras マウスモデルでも肺がんの進行に伴い発現が欠如することが示されていることから、ヒト肺がんの発生、進展に重要な新たな分子経路であると考えられ、肺がんの分子機構の解明、並びに創薬モデルとして極めて興味深い。現在、肺がん感受性マウスへの戻し交配や K-ras 変異マウスとの交配を開始している。今後、この肺発がんモデルを用いて、肺がんの発生、進展に関わる分子経路、シグナル伝達経路を、プロテオームなどの網羅的解析法を用いて明らかにし、治療モデルとしても応用していく予定である。

E. 結論

肺がんでホモ欠失している 113 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には RB, p16 など、既知のがん抑制遺伝子に加え、多くの新規遺伝子が含まれており、新たな候補がん抑制遺伝子と考えられた。LKB1 遺伝子と同じ第 19 染色体短腕に存在する BRG1 遺伝子が肺がんで高頻度に失活していることを見出した。p16 遺伝子のホモ欠失はメチル化と同様、発がんの早期に起こるが、喫煙が主要因ではないことが分った。

高密度の in-house BAC アレイを作製し、微細ゲノムコピー数異常の検出を可能とする高精度アレイ CGH 解析システムとその応用法を開発した。神経芽腫をはじめ各種の難治がんを対象にゲノム異常・エピゲノム変化をスクリーニングし、見出された新規の遺伝子増幅やホモ欠失領域をランドマークに標的となるがん関連遺伝子を同定している。これらががん関連遺伝子はその機能からも新しいがんの診断、治療、予防法の開発に資するシーズとして期待できる。

肝がん・肺がん・膵がん・胆道がんにおける網羅的なゲノム異常解析によって、その全体像を明らかにし、また臨床病態と相関するようなゲノム異常パターンを組み合わせが存在することが分かった。ゲノム異常を標的とする分子標的治療について、担がん動物モデルを用いて、その効果や奏功性予測因子の同定を行なった。

高密度 SNP アレイによる小児 ALL 検体の解析により同定されたゲノム異常についてその標的遺伝子の候補が多数同定された。特に、9 番染色体短腕を含む染色体転座によって、B 細胞の分化に必須の機能を有する PAX5 遺伝子が種々の遺伝子と融合遺伝子を形成していること、また、融合遺伝子は正常 PAX5 に対してドミナントネガティブに作用することを明らかにした。

ATL を中心としたゲノム解析により、3 箇所の染色体切断点集中領域ならびに ATL 特異的発現マーカーとして TSLC1 遺伝子を同定した。TSLC1 遺伝子は診断治療のターゲットとして臨床応用出来る可能性がある。

子宮内膜がん、子宮頸がん、続いて上皮性卵巣がんの in vitro 多段階発がんモデルの作製に成功した。ヒト子宮頸がんのモデルでは、HPV16 の E6, E7 に加え HrasV12 や erbB2/neu を追加導入すると、ヌードマウスでの造

腫瘍能を獲得した。一方、c-myc の追加導入では腫瘍形成までに数ヶ月を要した。E6, E7, HrasV12, c-myc の組み合わせでは、hTERT の導入なしで高いテロメラーゼ活性を示し、極めて強い造腫瘍性を示した。卵巣がんのモデルでは、hTERT+変異 cdk4+cyclin D により不死化した卵巣表層上皮細胞株(HOSE2)に、変異 p53, KrasV12, c-myc, 活性化 Akt, bcl-2 などを種々の組み合わせで導入し、ヌードマウス皮下で造腫瘍性を獲得し、SCID マウス腹腔内で腹膜播種病変を生ずる組み合わせを同定した。

CADM1 が肺がんの強力ながん抑制遺伝子であることが遺伝的に実証された。また、CADM1 はヒト肺がん、マウス肺がんの進展に関わる重要な経路を担う分子であることが明らかにされた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin Cancer Res*, 13:111-120, 2007.
- 2) Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57:103-108, 2007.
- 3) Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, Suzuki K, Nakamoto M, Shimizu E, Minna JD, Yokota J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, 26:5911-5918, 2007.
- 4) Ajima R, Kajiya K, Inoue T, Tani M, Shiraishi-Yamaguchi Y, Maeda M, Segawa T, Furuichi T, Sutoh K, Yokota J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 356:851-856, 2007.
- 5) Yokota J, Matsumoto S, Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int J Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
- 6) Nagayama K, Kohno T, Sato M, Arai Y, Minna JD, Yokota J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chromosomes Cancer*, 46:1000-1010, 2007.
- 7) Seike M, Yanaiharu N, Bowman ED, Zanetti KA, Budhu A, Kumamoto K, Mechanic LE, Matsumoto S, Yokota J, Shibata T, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Wang XW, Harris CC. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst*, 99:1257-1269, 2007.
- 8) Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, Sakai, R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol Cell Biol*, 27:7649-7660, 2007.
- 9) Medina PP, Romero OA, Kohno T, Montuenga L M, Pio R, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2008.
- 10) Inoue T, Kon T, Ohkura R, Yamakawa H, Ohara O, Yokota J, Sutoh, K. BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes Cells*, in press, 2008.
- 11) Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuiji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*, 68:1303-1309, 2008.
- 12) Kumamoto K, Spillare E, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris, CC. Nutlin-3a activates the p53 tumor suppressor to both down-regulate ING2 and up-regulate mir-34a, b and c expression and induce senescence. *Cancer Res*, in press, 2008.
- 13) Ogiwara H, Kohno T, Nakanishi H, Nagayama K, Sato M, Yokota J. Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in human lung cancer. *Oncogene*, in press, 2008.
- 14) Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Noguchi M, Suzuki K, Matsuno Y, Mishima K, Nishikawa R, Tashiro F, Yokota J. Association of p16 homozygous deletions with clinicopathological characteristics and EGFR/KRAS/p53 mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, in press, 2008.
- 15) Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer*, 120: 594-604, 2007.
- 16) Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M,

- Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kivono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16^{INK4a}-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci*, 98:147-154, 2007.
- 17) Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kivono T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J Virol*, 81:1379-1389, 2007.
 - 18) Shima Y, Okamoto T, Aoyama T, Yasura K, Ishibe T, Nishijo K, Shibata KR, Fukiage K, Otsuka S, Uejima D, Nakayama T, Nakamura T, Kivono T, Toguchida J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasV12. *Biochem Biophys Res Commun*, 353:60-66, 2007.
 - 19) Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kivono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, 26: 2988-2996, 2007.
 - 20) Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kivono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 27:3732-3742, 2007.
 - 21) Kivono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Biol Ther*. 11:1623-1637, 2007.
 - 22) Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, Stagliano KE, Anderson MA, Deb D, Crane BM, Kivono T, Windle B, Deb SP, Deb S. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene*, in press.
 - 23) Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Kosuge T, Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol*, 133:1475-1486, 2007.
 - 24) Shibata T, Hanada S, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Ohta T, Sakamoto M, Hirohashi S. Gene expression profiling of EGFR/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 98:985-991, 2007.
 - 25) Yoshida Y, Kokubu A, Suzuki K, Kuribayashi H, Tsuta K, Matsuno Y, Kusumoto M, Kanai Y, Asamura H, Hirohashi S, Shibata T. Molecular markers and changes of computed tomography appearance in lung adenocarcinoma with ground-glass opacity. *Japan Journal of Clinical Oncology*, in press, 2008.
 - 26) Fukui T, Tsuta K, Furuta K, Watanabe S, Asamura H, Ohe Y, Maeshima AM, Shibata T, Masuda N, Matsuno Y. EGFR mutation status and clinicopathological features of combined small cell carcinoma with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Sci*, 98:1714-1719, 2007.
 - 27) 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. *Cancer Sci*, 98:392-400, 2007.
 - 28) Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *British J Cancer*, in press, 2008.
 - 29) Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A(MTNRLA) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008(in press).
 - 30) Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, in press, 2008.
 - 31) Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iidab S, Ueda R, Inazawa J. POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth of multiple myeloma cells by directly regulating expression of a B-cell maturation factor, TNFRSF17. *Oncogene* 27:63-75,2008.
 - 32) Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res*, 67:7095-7105,2007.
 - 33) Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham P, Nakagawa T, Kamata N, Kozaki Ken-ichi, Amagasa T, Inazawa J. PRIFDC1, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene*, 26:7921-32, 2007.
 - 34) Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. *Oncogene*, 26:7401-13, 2007.
 - 35) Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-

- cell carcinoma. *Oncogene* 26: 6456–6468, 2007.
- 36) Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J. Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Sci*, 98:1078–1086, 2007.
 - 37) Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki K, Aida S, Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J. BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci*, 98:1070–1077, 2007.
 - 38) Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J. RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and result in G2/M arrest. *Oncogene* 26: 1110–1121, 2007
 - 39) Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J. A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene* 26:1178–1187, 2007
 - 40) Mitsui F, Dobashi Y, Imoto I, Inazawa J, Kono K, Fujii H, Ooi A. Non-incident coamplification of Myc and ERBB2, and Myc and EGFR, in gastric adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 20:622–631, 2007.
 - 41) Yamamoto S, Tsuda H, Kita T, Maekawa K, Fujii K, Kudoh K, Furuya K, Tamai S, Inazawa J, Matsubara O. Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 451:27–35, 2007.
 - 42) Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Matsui Y, Watanabe J, Ito N, Kamoto T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Imoto I, Inazawa J, Nishiyama H, Ogawa O. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*, 97:260–266, 2007.
 - 43) Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y. The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 3:1331–1340, 2007.
 - 44) Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol*, 27:1730–1744, 2007.
 - 45) 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 Reprod*, 76:1081–1090, 2007.
 - 46) Ito A, Hagiwara M, Onuma J, Murakami Y, Yokozaki H, Takaki M. Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degradation of mesenteric mast cells. *J Neuro Immunol*, 184:209–213, 2007.
 - 47) Morishita K. Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. *Int J Hematol*. 85: 279–286, 2007.
 - 48) Yamasaki M, Fujita S, Ishiyama E, Mukai A, Madhyastha H, Sakakibara Y, Suiko M, Hatakeyama K, Nemoto T, Morishita K, Kataoka H, Tsubouchi H, Nishiyama K. Soy-derived isoflavones inhibit the growth of adult T-cell leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 98:1740–1746, 2007.
 - 49) Takajo I, Umeki K, Morishita K, Yamamoto I, Kubuki Y, Hatakeyama K, Kataoka H, Okayama A. Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from human T-lymphotropic virus Type 1 carriers in NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Int J Cancer*. 121:2205–11, 2007.
 - 50) Suzuki M, Kato M, Chen J, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano K, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci*, in press, 2008.
 - 51) Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticcioni M, Bastard C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, in press, 2008.
 - 52) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*, 111:776–784, 2008.
 - 53) Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism

genotyping microarrays. *Am J Hum Genet.* 81:114-126, 2007.

- 54) Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. *Leukemia*, 21:992-997, 2007.
- 55) Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*, 16:3494-3505, 2007.
- 56) Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Szuhai K, Karsten T, Nanya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas. *J Pathol*, 212:269-277, 2007.
- 57) Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res*, 67:2544-2551, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」出願中

「(抗HPV16 E6) モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマ およびキット」特開2007-314476

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんでホモ欠失している 113 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には RB、p16 など、既知のがん抑制遺伝子に加え、多くの新規遺伝子が含まれており、新たな候補がん抑制遺伝子と考えられた。LKB1 遺伝子と同じ第 19 染色体短腕に存在する BRG1 遺伝子が肺がんで高頻度に失活していることを見出した。我々が新規がん抑制遺伝子として報告した MYO18B 遺伝子の産物は中心体に存在する蛋白質の一つであることを見出した。

A. 研究目的

我が国で最も死亡率の高い肺がんを対象に、ゲノム網羅的な解析に基づいて異常を起している遺伝子を網羅的に同定し、細胞株や臨床検体を用いてその異常の臨床病理学的意義を明らかにし、さらにその産物の生物学的機能解析を行うことによって、肺がん細胞の生物学的特性をゲノム異常の蓄積との関連で明らかにし、肺がんの多段階発がん機構を解明することを目的として研究を進めている。がん抑制遺伝子とがん遺伝子を標的とし、肺がん細胞で高頻度に見られる染色体欠失領域から遺伝子を単離して、変異や発現の検討により候補がん抑制遺伝子を同定する手法を取っている。がん遺伝子に関しては、その機能などから候補遺伝子を絞り込み、変異検索を行っている。また、肺がんでゲノム異常が報告された遺伝子に関しては、その臨床病理学的意義を追求している。今年度は、1) 肺がん細胞株におけるホモ欠失のゲノム網羅的探索、2) 肺がんにおける LKB1、BRG1、p16 遺伝子の異常と臨床病理学的特性の関連性に関する研究、3) 我々の研究室で単離した MYO18B 候補肺がん抑制遺伝子の生物学的機能解析、の3課題について研究を進めた。それぞれの課題について研究方法とその結果を列記する。

B. 研究方法

1) ヒト肺がん細胞株におけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

43 例のヒト肺がん細胞株から DNA を抽出し、ゲノム網羅的に約 100,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip、Mapping 100k array を用いて染色体ホモ欠失領域を探索した。欠失が示唆された領域に関しては、さらに、その領域のプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失領域の詳細な解析を行なった。

2) 肺がんの発生と進展における p16、LKB1、BRG1 がん抑制遺伝子の不活性化の時期と特異性に関する研究

多くのヒト肺がん細胞株と様々な病期の肺腺がん臨床検体における LKB1 遺伝子の欠失と変異について解析し、その臨床病理学的意義や他の遺伝子異常との関連性を検討した。BRG1 遺伝子に関しては 59 例の細胞株を用いて変異・欠失の解析を行った。p16 遺伝子のホモ欠失に関しては、マイクロダイセクションした小型肺腺がんと肺腺がんの脳転移腫瘍から DNA を抽出して、MRC-Holland 社の P024B キットを用いた MLPA 法で解析し、定量的ゲノム PCR 法でゲノムコピー数の確認を行った。また、免疫染色法で p16 蛋白質の発現解析を行った。

3) MYO18B がん抑制遺伝子の生物学的機能解析

ヒト MYO18B 蛋白質の種々の発現ベクターと抗体を作製して、免疫細胞化学法で細胞内局在部位を調べた。中心体への局在は抗 γ -tubulin 抗体との共染色により確認した。

(倫理面への配慮)

手術検体を用いた研究は、倫理委員会での承認を得て、臨床病理学的診断の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。

C. 研究結果

1) ヒト肺がん細胞株におけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

Affymetrix 社から発売された「Mapping 100k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 25-kb 間隔で調べることのできるマイクロアレイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、43 例のヒト肺がん細胞株における染色体ホモ欠失の領域をゲノム網羅的に探索した。その結果、51 ゲノム領域にホモ欠失を検出し、これらの領域内には 113 個の遺伝子が存在することが分った。それらの遺伝子の中には、既知のがん抑制遺伝子である RB と p16、候補がん抑制遺伝子である PTPRD と LRP1B も含まれていた。また、3 つのマイクロ RNA 遺伝子、let-7c、hsa-mir-99a、

has-mir-125b-2 も第 21 染色体のホモ欠失領域内にマップされた。これらの領域のホモ欠失について 74 のヒト肺がん細胞株を用いて解析したところ、最も高頻度に欠失が検出されたのは 9p21 の p16 遺伝子領域(19/74, 26%)で、次いで、9p23 の PTPRD 領域(8/74, 11%)、2q22 の LRP1B 遺伝子領域(7/74, 9%)、3p14 の FHIT 遺伝子領域(7/74, 9%)であった。これらの結果から、他のホモ欠失領域に存在する遺伝子も強力ながん抑制遺伝子候補と考えられ、現在、それらの遺伝子について、更に詳細な解析を進めている。

2) 肺がんの発生と進展における p16, LKB1, BRG1 がん抑制遺伝子の不活性化の時期と特異性に関する研究

昨年度の本研究で、LKB1 の変異あるいは欠失が肺がん細胞株の約 30%(21/70)に起こり、特に非小細胞肺がんで頻度が高く(39%,20/51)、その異常は KRAS 変異と共存することが多いことを明らかにした。また、多くの肺腺がん臨床検体における変異の検索では、変異は男性喫煙者のみで検出され、女性あるいは非喫煙者には全く検出されず、組織学的には、低分化型で有意に多かった。以上より、LKB1 遺伝子の変異は喫煙によって誘導され、低分化型腺がんの形成に関わっていると考えられた。

本年度は、LKB1 遺伝子と同様に第 19 染色体短腕に存在する BRG1/SMARCA4 遺伝子の変異・欠失について、59 の細胞株を用いて解析し、他のゲノム異常との関連性について検討した。変異は非小細胞がんの 35%(13/37)、小細胞がんの 5%(1/19)に検出され、すべて失活型の変異であった。また、変異は KRAS, LKB1, p16, p53 と共に起こっていたが、myc 遺伝子群の増幅とは共存していなかった。以上より、第 19 染色体の欠失は LKB1 と BRG1 の両者を失活させる染色体異常であり、また、myc 遺伝子群と BRG1 遺伝子が機能的に重複している可能性が示唆された。

p16 遺伝子は、変異・メチル化・ホモ欠失など、種々の以上によって失活することが知られているが、ホモ欠失の起こる時期については不明である。そこで、近年、開発された MLPA 法を用いて小型肺腺がんと肺腺がん脳転移腫瘍におけるホモ欠失の頻度と特異性を解析した。ホモ欠失は原発腫瘍の 29%(8/28)、脳転移腫瘍の 26%(5/22)に検出され、KRAS 変異、EGFR 変異とも共存しており、喫煙歴とは相関がなかった。また、上皮内がんでも 25%(2/8)で検出され、発がんの早期に起こるゲノム異常と考えられた。

3) MYO18B がん抑制遺伝子の生物学的機能解析

これまでの本研究で、肺がんを高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕から候補がん抑制遺伝子として MYO18B を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の約 50%で変異、欠失、過メチル化等により失活していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにしてきた。さらに MYO18B のがん抑制遺伝子としての生物学的機能を明らかにするために、免疫

細胞化学的解析により、MYO18B 蛋白質の細胞内局在部位を解析した。その結果、その一部は中心体蛋白質である γ -tubulin の周囲に存在することが分かった。中心体は細胞の極性などを規定する細胞小器官で、分裂期には染色体の均衡分配に重要な役割を持つ。そこで、さらに詳細な解析を行い、アクチン結合部位ではない MYO18B 蛋白質の C 末端が中心体への局在に必須で、N 末端を欠失した変異 MYO18B 蛋白質を強制発現させると中心体の異常増幅が起こることを見出した。中心体の異常はしばしば染色体の異数性を誘導するので、MYO18B 遺伝子の失活と染色体不安定性の関連性について、更なる解析を行っている。

D. 考察

3 課題の結果について、それぞれ個別に考察する。

1) ヒト肺がん細胞株におけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

染色体ホモ欠失領域は、がん抑制遺伝子を探索する上で貴重な情報となり、これまでの研究でも RB, p53, p16 などのがん抑制遺伝子として位置づける強力な証拠となった。そこで、本研究では多くのヒト肺がん細胞株を用いてゲノム網羅的なホモ欠失領域の探索を進めている。本年度の研究で欠失している 113 個の遺伝子を同定できたが、近年、更に詳細に解析できるアレイが開発されてきているので、すべての遺伝子について欠失があるかどうかの解析を進め、候補がん抑制遺伝子を網羅的に同定したい。また、一方では、同定できた遺伝子について発現や変異の解析を進め、がん抑制遺伝子であるかどうか、結論を出して行きたい。

2) 肺がんの発生と進展における p16, LKB1, BRG1 がん抑制遺伝子の不活性化の時期と特異性に関する研究

肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異に関しては、高頻度に変異している重要な遺伝子であることを確認するとともに、男性喫煙者に多く、低分化型腺がんの形成に関わっていることを示すことができた。肺腺がんの悪性度を規定する遺伝子のひとつであると考えられるので、今後は生物学的機能解析を進めるとともに、診断・治療の標的分子としての可能性も追求していきたい。また、BRG1 遺伝子の異常も肺がんの特性に関連している可能性が高いので、その機能解析も同時に進めたい。

p16 遺伝子のメチル化は発がんの早期に起こり、喫煙と関連していることが知られているが、ホモ欠失の発生時期や要因は不明であった。本研究でメチル化と同時期に起こるが、喫煙が主要因ではないことが分かった。今後は欠失の要因を明らかにし、肺がんの予防へ繋がる研究を発展させたい。

3) MYO18B がん抑制遺伝子の生物学的機能解析

これまでの研究で、MYO18B の失活が足場非依存性増殖抑制能を増強することを明らかにしているが、本研究で、更に染色体不安定性にも関わっている可能性を見出した。MYO18B はミオシン蛋白質の一つなので、多機能であることが予想される。今

後は中心体における機能も明らかにして、肺がんにおける MYO18B 遺伝子の失活の意義を明らかにして行きたい。

E. 結論

肺がんでホモ欠失している 113 個の遺伝子を同定した。BRG1 遺伝子が肺がんで高頻度に失活していることを見出した。p16 遺伝子のホモ欠失は発がんの早期に起こるが、喫煙が主要因ではないことを明らかにした。MYO18B 蛋白質が中心体に存在する蛋白質の一つであることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13:111-120, 2007.
- 2) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57:103-108, 2007.
- 3) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D. and Yokota, J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, 26:5911-5918, 2007.
- 4) Ajima, R., Kajiyama, K., Inoue, T., Tani, M., Shiraiishi-Yamaguchi, Y., Maeda, M., Segawa, T., Furuichi, T., Sutoh, K. and Yokota, J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 356:851-856, 2007.
- 5) Yokota, J., Matsumoto, S. and Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int. J. Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
- 6) Nagayama, K., Kohno, T., Sato, M., Arai, Y., Minna, J. D. and Yokota, J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 46:1000-1010, 2007.
- 7) Seike, M., Yanaihara, N., Bowman, E. D., Zanetti, K. A., Budhu, A., Kumamoto, K., Mechanic, L. E., Matsumoto, S., Yokota, J., Shibata, T., Sugimura, H., Gemma, A., Kudoh, S., Wang, X. W. and Harris, C. C. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J. Natl. Cancer Inst.*, 99:1257-1269, 2007.
- 8) Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T. and Sakai, R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol. Cell. Biol.*, 27:7649-7660, 2007.
- 9) Medina, P. P., Romero, O. A., Kohno, T., Montuenga, L. M., Pio, R., Yokota, J. and Sanchez-Cespedes, M. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2008.
- 10) Inoue, T., Kon, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O., Yokota, J. and Sutoh, K. BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes to Cells*, in press, 2008.
- 11) Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsui, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.*, 68:1303-1309, 2008.
- 12) Kumamoto, K., Spillare, E., Fujita, K., Horikawa, I., Yamashita, T., Appella, E., Nagashima, M., Takenoshita, S., Yokota, J. and Harris, C. C. Nutlin-3a activates the p53 tumor suppressor to both down-regulate ING2 and up-regulate mir-34a, b and c expression and induce senescence. *Cancer Res.*, in press, 2008.
- 13) Ogiwara, H., Kohno, T., Nakanishi, H., Nagayama, K., Sato, M., and Yokota, J. Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in human lung cancer. *Oncogene*, in press, 2008.
- 14) Iwakawa, R., Kohno, T., Anami, Y., Noguchi, M., Suzuki, K., Matsuno, Y., Mishima, K., Nishikawa, R., Tashiro, F., and Yokota, J. Association of p16 homozygous deletions with clinicopathological characteristics and EGFR/KRAS/p53 mutations in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, in press, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録情報
特になし

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）

（総括・分担）研究報告書

正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所ウイルス部 部長

研究要旨 ヒト子宮頸がんのin vitro多段階発がんモデルを作製した。hTERTのみで不死化した2倍体正常子宮頸部角化細胞株（HCK1T）を用いて得られた結果を、初代子宮頸部角化細胞（HCK12）を用いて確認した。HPV16のE6, E7に加えHrasV12またはerbB2/neuの追加導入により、強い造腫瘍能を獲得した。c-mycの追加導入でも極めて弱い造腫瘍性を示した。E6, E7, HrasV12, c-mycの組み合わせでは、高いテロメラーゼ活性と極めて強い造腫瘍性を示し、hTERTの導入は不要であることが示された。同様に卵巣がんのin vitroモデル作製のため、hTERT+変異CDK4+Cyclin D1により不死化した卵巣表層上皮細胞株（HOSE2）を用い、変異p53, KrasV12, c-myc, 活性型Akt, bcl-2などを種々の組み合わせで導入し、ヌードマウス皮下で造腫瘍性を獲得し、SCIDマウス腹腔内で腹膜播種病変を生ずる組み合わせを同定した。

A. 研究目的

本研究の目的は、多段階発がんの分子機構をより正確に把握することである。そのため、ヒト正常細胞を用い不死化からがん化に至る過程をできるだけin vivoに近い形で再現したin vitro発がんモデルを作製する。このモデルを使うことで、多段階発がんの各ステップを人為的に再現することができ、各ステップで起きている現象を詳細に解析することが可能となる。さらには、がん化の予防や治療法の開発につながる分子標的の同定にも有用である。

B. 研究方法

まず、固形がんの母体となる正常ヒト細胞をhTERT, HPV16 E6やE7, cdk4, cyclin D1, bmi-1, p16-shRNAなどの

導入により不死化する。次に不死化した種々のヒト細胞に対応する各がんを高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入やがん抑制遺伝子のRNA干渉法を用いた発現抑制により導入し、そのがん化過程のin vitroでの再現を試みた。正常初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入可能な組換えレトロウイルスを用いることにより遺伝子挿入部位に依存しない細胞不死化・がん化過程をモニターした。組換えレトロウイルスはG418, hygromycin B, puromycin, blasticidin S, zeocin耐性遺伝子を持つものを組み合わせ複数の遺伝子発現に用いた。導入遺伝子としてはhTERT, bmi-1, HPV16 E6, 種々の変異E6, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性型Akt (myr-Akt1,2,3), erbB2, PI3K, 変異β-catenin, c-mycなどを用いた。

short hairpin RNA (shRNA)はpuromycin耐性レトロウイルスにより、H1 promoter制御下に発現し、p16, PTEN, p53などの各遺伝子をノックダウンした。これまでに、子宮内膜腺上皮細胞、子宮頸部角化細胞、卵巣表層上皮細胞を用いてそれぞれ、子宮内膜がん、子宮頸がん、卵巣がんの多段階発がんモデルの作製とその解析を進めている。また、培養すら困難な細胞を不死化するため種々の遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを作製した。

解析方法としては、不死化から、細胞増殖能、足場非依存性増殖能、ヌードマウスでの造腫瘍能など古典的な細胞生物学的アッセイ法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾などの変化をWesternブロッティング法を用いて調べた。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

C. 研究結果

一昨年度のヒト子宮内膜がん、昨年度のヒト子宮頸がんにつきヒト上皮性卵巣がんのin vitro多段階発がんモデルの作製に成功した。また、ヒト子宮頸がんモデルはhTERTのみで不死化した正常子宮頸部上皮細胞株 (HCK1T)を用いてさらに解析を進めると共に、

初代培養細胞 (HCK12)を用いて再現性の確認を進めた。HCK12にHPV16 E6, E7及びHrasV12を導入すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-mycを追加導入すると非常に強い造腫瘍性を示した。HCK12/E6E7/HrasV12細胞のテロメラーゼ活性は強くなくhTERTの導入により造腫瘍性を増した。一方、HCK12/E6E7/HrasV12/c-myc細胞のテロメラーゼ活性は十分強く、僅か200個の皮下移植によって造腫瘍性を示し、hTERTの追加導入によるさらなる造腫瘍性の増加は見られなかった。

同様に卵巣がんのin vitroモデル作製のため、手術材料2検体から、hTERT+E7やhTERT+cdk4+cyclin Dにより不死化した卵巣表層上皮細胞株 (HOSE1, HOSE2)を樹立した。これらは染色体異常の全くない正常2倍体を維持している。hTERT+cdk4+cyclin Dで不死化したHOSE2に、変異p53+KrasV12+活性型Akt、あるいは変異p53+c-myc+bcl-2の追加導入によりヌードマウス皮下において造腫瘍性を認めた。また、SCIDマウス腹腔内でヒト卵巣がん転移に近い腹膜播種病変を形成した。

D. 考察

昨年度、不死化子宮頸部角化細胞 (HCK1T)で得られた結果を、独立の初代培養細胞(HCK12)を用いることで、子宮頸部角化細胞にE6E7+HrasV12を導入するだけで造腫瘍性を誘導できることが示された。さらにc-mycの追

加導入により著しい造腫瘍能の増加が見られた。HCK1Tでは20個の細胞接種によっても6/6で腫瘍を形成し、HCK12でも200個の細胞移植により3/6で腫瘍を形成したことから、がん幹細胞様の細胞集団が培養皿上で維持されていることが示唆された。今後、がん幹細胞の理解や、同細胞を標的とした治療における標的分子の同定に有効であると考えられる。

卵巣表層上皮細胞を用いて、上皮性卵巣がんの多段階発がんモデル作製を進めた。hTERT+cdk4+cyclin Dで不死化した卵巣表層上皮細胞(HOSE2)に変異p53+KrasV12+c-mycを導入した細胞は子宮頸部角化細胞と同様に、強い造腫瘍性を示すことを期待したが、100万個の細胞移植によっても造腫瘍性は見られなかった。一方、変異p53+KrasV12+活性型Aktあるいは変異p53+KrasV12+c-myc+bcl-2を導入した細胞では造腫瘍性を示すことが明らかになった。活性型Aktやbcl-2などapoptosisの抑制に関与する遺伝子導入が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。子宮頸がんモデルではE6E7に加え種々のがん遺伝子を導入しているため、同じ遺伝子の組み合わせはなく細胞種によるがん遺伝子に対する感受性の違いを直接比較することはできない。E6E7がhTERT+cdk4+cyclin D+変異p53より強いがん原性を持っているのか、卵巣表層上皮がん遺伝子に抵抗性が高いのかは、今後の検討課題である。今後、HPV陽性ならびに陰性の口腔がんや

食道がんや、肺がんのin vitro発がんモデル作製を進める事で異なる細胞種間での特異性や共通性を明らかに出来るものとする。また、分子標的薬剤の開発においても有効なツールとなることが期待される。

E. 結論

子宮内膜がん、子宮頸がんについて上皮性卵巣がんのin vitro多段階発がんモデルの作製に成功した。これまでに得られた複数のがんのin vitroモデル作製の結果から、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが改めて確認できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Morishima S., Akatsuka Y., Nawa A., Kondo E., Kiyono T., Torikai H., Nakanishi T., Ito Y., Tsujimura K., Iwata K., Ito K., Kodera Y., Morishima Y., Kuzushima K., and Takahashi T., Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer*, 120: 594-604, 2007.

Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA and Kiyono T Efficient immortalization of primary human cells by p16^{INK4a}-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci*, 98: 147-154, 2007.

Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M,

Ohno S, Fujita M, and Kiyono T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J. Virol*, 81:1379-89, 2007.

Shima Y, Okamoto T, Aoyama T, Yasura K, Ishibe T, Nishijo K, Shibata KR, Fukiage K, Otsuka S, Uejima D, Nakayama T, Nakamura T, Kiyono T, Tóguchida J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem Biophys Res Commun*, 353:60-6, 2007.

Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, and Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, 26: 2988-96, 2007.

Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M and Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 27:3732-42, 2007.

Uekita T., Jia L., Narisawa-Saito M., Yokota J., Kiyono T. and Sakai R. Cdc1 Is A Novel Regulator Of Anoikis Resistance In Lung Adenocarcinoma. *Mol Cell Biol.*, 27:7649-60, 2007.

Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Biol Ther*. 11:1623-1637, 2007.

Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, Stagliano KE, Anderson MA, Deb D, Crane BM, Kiyono T, Windle B, Deb SP, Deb S. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene*, in press.

2. 学会発表

Yugawa T., Handa K., Narisawa-Saito M.,

Ohno, S., Fujita M., Kiyono T. Down-regulation of Notch1 tumor suppressor and inhibition of keratinocyte differentiation by HPV-16 E6. 24th Int. Papillomavirus Conference (Beijing), 2007.

Narisawa-Saito M.; Kakuta Y., Yugawa T., Fujita M., Kiyono T. Analysis of HPV-induced multistep carcinogenesis of cervical cancer using normal human cervical keratinocytes. 24th Int. Papillomavirus Conference (Beijing), 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」 出願中

「(抗HPV16 E6) モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマ およびキット」 特開2007-314476

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

がんの網羅的なゲノム異常解析並びに臨床病態との相関解析

分担研究者 柴田 龍弘 国立がんセンター研究所

ゲノム構造解析プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨

肝がん・肺がん・膵がん・胆道がんにおける網羅的なゲノム異常解析によって、その異常全体像を明らかにすると共に、臨床病態と相関するゲノム異常パターンを抽出し、ゲノム異常像に基づくがんの層別化の可能性を明らかにした。抗がん剤耐性や細胞増殖に働く新たながん関連遺伝子を同定し、その治療標的としての可能性についての検討を進めた。ゲノム異常を標的とする分子標的治療について、分子イメージングを導入した担がん動物モデルを用いて、その効果や奏功性予測因子の同定を行なった。遺伝子に乏しいテロメア領域並びにセントロメア領域における染色体構造異常を検索するための新たなツールを開発した。

A. 研究目的

本研究では、これまで独自に開発し、蓄積してきた高精度なゲノム解析技術を駆使して、諸臓器がんにおけるジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を統合的に明らかにすることで、がんの個性を新しい視点から分類・整理し、分子診断や個別化医療の基盤となる新たながんの層別化を試みる。また発がんにおける重要な分子機構の解明を通して、諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を明らかにし、画期的な分子治療法や予防法の開発に向けた研究の基盤構築を進める事を旨とする。

B. 研究方法

1) 難治がんにおける染色体構造異常の網羅的な解析に関する研究

難治がんを中心とした諸臓器がん臨床検体を用いて、レーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞のみを選別し、高純度のがんゲノムバンクを構築し、ヒトゲノム全体をカバーする4500個のBACクローンを搭載した高密度BACアレイあるいは25万個のオリゴプローブを搭載した高密度オリゴゲノムアレイによる網羅的な染色体コピー数異常の解析を進めた。同時に同一症例における網羅的な遺伝子発現解析についても検索した。

2) 新規がん抑制遺伝子の同定とその機能解析に関する研究

染色体コピー数異常解析から新たに同定した増幅領域並びにホモ欠失領域を更に詳細に検索し、新規がん遺伝子並びにがん抑制遺伝子を同定した。多数の臨床検体を用いて変異検索を行なった。当該分子のゲノム異常を持つがん細胞株を用いて、細胞増殖や抗がん剤抵抗性などについて検索を行なった。

3) 胆道がん移植モデルの作製とそれを用いた分子標的治療の評価に関する研究

胆道がんにおける分子標的候補の検索のため、200例を超える臨床検体について免疫染色による発現と臨床病理学的因子との相関について検索した。更に分子イメージングを導入した胆道がんマウス移植モデルを作製し、EGFR/VEGFR 低分子阻害剤を用いた治療効果について検討した。

4) 乏遺伝子領域における染色体不安定性の検索を目指した新規ゲノムアレイの開発作製

染色体の複製、細胞分裂に関連する遺伝子群や各染色体のテロメア領域、セントロメア領域を含むBACクローンを配した独自の染色体不安定性解析アレイを作製した。

（倫理面への配慮）

本研究内容については所属研究機関の倫理審査委員会の承認を得ており、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、倫理面に十分配慮して研究を進めた。また解析に用いる組織は、十分な病理学的検索がなされ、患者の治療方針決定には全く影響がない残余の固定標本だけを用い、患者への不利益を生じさせないよう留意する。動物を用いた実験は「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行った。

C. 研究結果

1) 肝がんにおけるゲノム異常探索

肝がんの臨床検体を用いたCGH解析により、染色体構造異常の組み合わせから、肝がんを大きく6群に分ける分類を提唱した。これらの分類は肝炎ウイルスの種類や予後などと相関し、またそれぞれ特徴的な染色体増幅領域を共通して持っていた。更に遺伝子発現解析と組み合わせることで、mTOR経路に関係するS6キナーゼを新規の増幅標的として同定した。mTOR経路の阻害剤であるRapamycinに