

- tumor activity for EGFR overexpressing gastric cancer xenografts via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci.*, in press (2008)
2. 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*, 6449; 644910-1-9 (2007)
 3. 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*, 24: 179-89 (2007)
 4. 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.* 22: 911-917 (2007)
 5. 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.* 27(4C): 2769-77 (2007)
 6. 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.* 36(5): 281-9 (2007)
- 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：悪性リンパ腫の病因・病態に関与する遺伝子の単離、及びその診断への応用を図るため、アレイ CGH 法を用いて解析を進めた。胃 MALT リンパ腫について、除菌抵抗性 API2-MALT1 陰性群にはゲノムコピー数の異常が多いこと、眼付属器 MALT リンパ腫には胃 MALT リンパ腫に認められるような API2-MAT1 キメラ遺伝子は認められないかわりに特徴的な 6q23.3 領域の欠失があり、TNFAIP3 遺伝子はその責任遺伝子であることを明らかにした。また、末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U)についてもアレイ CGH 解析ならびに免疫病理学組織学検討を行い、PTCL-U の中に ATL とよく似た疾患単位が存在する可能性を示唆した。

A. 研究目的

4. ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態を明らかにする。
5. 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式をアレイ CGH 法で解析し、特徴的ゲノム異常の有無を調べる。
6. 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式を調べ、分子疾患単位を確立する。

B. 研究方法

1. ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明
ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫症例については、API2-MALT1 キメラ遺伝子のあるものを 10 症例、キメラ遺伝子がないものを 10 症例ずつ、除菌療法有効症例も同程度集め、ゲノム異常様式をアレイ CGH 法を用いて調べ、病態に特徴的なゲノム異常様式を見出す。
2. 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常

様式の解析

眼付属器 MALT リンパ腫 24 症例についてアレイ CGH 解析し、特徴的なゲノム異常領域については、contig アレイ CGH グラスを作成し、詳細に検討することで、責任遺伝子を探索する。

3. 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析

これまでに確立した array CGH 法を用いて、末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U(Unspecified))症例を解析し、病型特異的なゲノム異常の有無を調べ、臨床病態、免疫病理組織学的解析結果と関連させることで、臨床的に意義のある疾患単位を見出せるかどうかを検定する。

C. 研究結果

1. ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明
ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リン

パ腫症例は、全体の約 30%を占める。その半数には、API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することをこれまでに報告してきたが、キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗性の MALT リンパ腫については、特徴が明らかではなかった。そこで、API2-MALT1 陽性症例を 10 症例、キメラ遺伝子陰性症例 10 症例、比較対象として除菌療法有効症例 9 症例について、ゲノム異常様式をアレイ CGH 法を用いて調べた。アレイ CGH 法の検出感度は、X 染色体をマーカーにして、種々の割合で混合した DNA を用いて、検出限界検討した。その結果、20%の腫瘍成分があれば、1 コピーのゲノムコピー数の以上を検出することができることが明らかとなった。その検出限界レベルで、胃 MALT リンパ腫症例をアレイ CGH 解析したところ、API2-MALT1 キメラ遺伝子を有する群には、ゲノムコピー数の変化はほとんど認められなかった。キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗群では、10 症例中 7 症例にゲノムコピー数の異常が認められた。除菌療法反応症例では、9 症例中 1 症例にのみゲノムコピー数の異常を認めた。キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗症例群のゲノムコピー数異常頻度は有意差が認められる(p=0.02)。

2. 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析

眼付属器 MALT リンパ腫 24 症例についてアレイ CGH 解析したところ、24 症例中 9 例において、6q23.3 領域の欠失が認められた。この欠失は、胃 MALT リンパ腫、肺 MALT リンパ腫、節性 MZBCL(MALT リンパ腫と同じ分化段階の B 細胞性リンパ腫でリンパ節で増殖する型)において認められず、眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的なゲノム異常であることが判明した。

この領域について、約 3 Mb について、連続する BAC クローンを購入し、contig アレイ CGH グラスを作成し、詳細に検討したところ、共通欠失領域を約 600 kb にまで、狭めることができた。その領域には、TNFAIP3, PERP 遺伝子と 4 つの EST が存在していた。そこで、RT-PCR、ついで、Real Time RT-PCR で発現様式を検討したところ、ゲノムの欠失と相関して発現の減弱が認められたものは TNFAIP3 のみであり、この欠失領域の責任遺伝子であることが判明した。

3. 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析

末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U (Unspecified))51 症例を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が認められ、22 症例にはまったくゲノム異常が認められなかった。ゲノム異常の有無と臨床病態とを比較したところ、ゲノム異常のある群は ATL リンパ腫型と同程度に極めて予後が悪く、ゲノム異常のない群は、予後が比較的良好であった。

D. 考察

1. ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明

われわれはこれまで、MALT リンパ腫に特徴的な染色体転座 t(11;18)(q21;q21)を解析し、新規遺伝子 MALT1 を見出した。また、転座の本態が API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することであることも明らかにし、本キメラ遺伝子を有する胃 MALT リンパ腫症例は、ピロリ菌除菌療法抵抗群であることを明らかにした。その後の検索で、除菌療法抵抗群のうち、約半数にはキメラ遺伝子があることが判明した。しかし、キメラ遺伝子のない除菌療法抵

抗性群については、その分子基盤が明確ではなかった。

今回の解析で、この群に有意にゲノムコピー数異常が多いことを見出したことは、除菌療法反応性のよいマーカーとなる可能性がある。しかし、現実の診療としては、まず除菌が第一選択であり、実地医療としての意義は少ない。むしろ、これらのゲノム異常から得られる今後の情報は、他の悪性度の高いリンパ腫について考察する上で、重要な手がかりを与え、意義が高い。すなわち、除菌抵抗性の胃 MALT リンパ腫に認められたゲノム異常領域は、リンパ腫の悪性度とはあまり関与せず、むしろ腫瘍化の初期変化である可能性が高い。事実、除菌療法有効症例で、ゲノムコピー数異常の認められる症例が 1 例あり、このゲノム異常は無効症例でも認められた。今後、除菌有効症例数を増やすことで、胃 MALT リンパ腫におけるゲノムコピー数異常の意義を確立する必要がある。

2. 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析

眼付属器 MALT リンパ腫症例 24 症例中 9 例において認められた 6q23.3 領域の欠失は、他の臓器から発症する MALT リンパ腫には認められず、眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的なゲノム異常である。しかし、びまん性大細胞型リンパ腫をはじめ、6q 領域欠失は広く認められる異常である。この領域には少なくとも 3 箇所のゲノム異常領域があると考えられてきたが、今回我々が明らかにした 6q23.3 領域の責任遺伝子 TNFAIP3 は、6q 欠失領域から見出された初めてのがん抑制遺伝子である。この遺伝子が他のリンパ腫においても同様に腫瘍化に関与するかどうかは、

重要な問題であり、今後、検討していく必要がある。

3. 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析

末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U (Unspecified))⁵¹ 症例を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が認められ、22 症例にはまったくゲノム異常が認められなかった。ゲノム異常の有無と臨床病態とを比較したところ、ゲノム異常のある群は ATL リンパ腫型と同程度に極めて予後が悪く、ゲノム異常のない群は、予後が比較的良好であった。また、形態学的には核が多型で、CCR4 陽性である。これらの特徴は ATL リンパ腫型に認められる特徴であり、PTCL-U ゲノム異常型と ATL との意義付けが今後必要となってくる。すなわち、今回の研究が明らかにしたことは、ATL は HTLV1 ウイルスの感染の有無が診断の重要な判定要因となっているが、PTCL-U との違いはウイルスの有無だけであって、疾患としては同一という視点もありうることを示唆する。事実、PTCL-U ゲノム異常陽性群のゲノム異常様式は、ATL リンパ腫型ときわめてよく似ている。今回の研究結果は、ATL の腫瘍化機構においても重要な示唆を与えるものである。

E. 結論

1. 胃 MALT リンパ腫のうち、除菌抵抗性 API2-MALT1 陰性群にはゲノムコピー数の異常が多いことを明らかにした。
2. 眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的な 6q23.3 領域の欠失を見出し、その責任遺伝子は、TNFAIP3 であることを明らかにした。
3. 末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U)をアレ

イ CGH 解析、ならびに免疫病理学組織学検討を行い、PTCL-U の中に ATL とよく似た疾患単位が存在する可能性を示唆した。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 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*, 109: 3076-3079, 2007.
2. Tsuzuki, S., Karnan, S., Horibe, K., Matsumoto, K., Kato, K., Inukai, T., Goi, K., Sugita, K., Nakazawa, S., Kasugai, Y., Ueda, R., Seto, M.: Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: Analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci.*, 98:698-706 2007.
3. 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 non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Sci.*, 98:438-446, 2007.
4. Fukuhara, N., Nakamura, T., Nakagawa, M., Tagawa, H., Takeuchi, I., Yatabe, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Chromosomal imbalances are associated with outcome of *Helicobacter pylori* eradication in t(11;18)(q21;q21) negative gastric malt lymphomas. *Genes Chromosomes and Cancer*, 46: 784-790, 2007.
5. Kim, W-S., Honma, K., Karnan, S., Tagawa, H., Kim, Y-D., Oh, Y-L., Seto, M., Ko, Y-H.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of ocular marginal zone b cell lymphoma: comparison with pulmonary and nodal marginal zone b cell lymphoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 46:776-783, 2007.
6. Isaka, T., Nakamura, T., Tajika, M., Kawai, H., Imaoka, H., Okamoto, Y., Aoki, M., Inoue, H., Takahashi, K., Mizuno, N., Sawaki, A., Yamao, K., Seto, M., Yokoi, T., Yatabe, Y., Nakamura, S.: API2-MALT1 chimeric transcript-positive gastroduodenal MALT lymphoma with subsequent development of adenocarcinoma as a collision tumour over a clinical course of 7 years. *Histopathology*, 51:119-123, 2007.
7. Tagawa, H., Karube, K., Tsuzuki, S., Ohshima, K., Seto, M.: Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci.*, 98:1482-1490, 2007.
8. Tagawa, H., Karube, K., Guo, Y., Takeshita, M., Kikuchi, M., Morishima,

- Y., Nakamura, S., Ohshima, K., Seto M.: Trisomy 3 is a specific genomic aberration of t(14;18) negative follicular lymphoma. *Leukemia*, 21: 2549-2551, 2007.
9. Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Karnan, S., Aizawa, Y., Kim, WS., Kim, YD., Ko, YH., Seto, M.: TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in cular. Adnexal marginal zone B cell lymphoma. *Genes Chrom. Cancer*, 47:1-8, 2008.
 10. Nakamura, T., Seto, M., Tajima, M., Kawai, H., Yokoi, T., Yatabe, Y., Nakamura, S.: Clinical features and prognosis of gastric MALT lymphoma with special reference to responsiveness to H. pylori eradication and API2-MALT1 status. *Am J Gastroenterol*, 103:62-70, 2008.
- 2) 学会発表
- 1 福原 規子, 中村 常哉, 田川 博之, 中川 雅夫, 谷田部 恭, 森島 泰雄, 中村 栄男, 瀬戸 加大: 胃 MALT リンパ腫の H. pylori 除菌反応とゲノム異常. 第 47 回日本網内系学会総会, 2007, (淡路) [ポスター] 2007.5.24-5.26
 - 2 中村 常哉, 福原 規子, 瀬戸 加大: 胃 MALT リンパ腫の病態とゲノム異常. 第 13 回日本ヘリコバクター学会総会, 2007, (滋賀) [シンポジウム] 2007.6.21-6.22
 - 3 Tsuzuki, S., Seto, M: Functional analysis of the t(12; 21)-associated TEL-AML1 fusion gene. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜) [ポスター (示説)] 2007.10.2-5
 - 4 中川 雅夫, 中川 綾, シバスンダラン カルナン, 田川 博之, 中村 栄男, 竹内 一郎, 大島孝一, 瀬戸 加大: Comparison of PTCL-U and lymphoma-type ATLL in terms of genomic imbalance by using array CGH analysis. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 (横浜) [口演] 2007.10.2-5
 - 5 Honma, K., Karnan S., Tagawa, H., Masao Seto: Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma showed distinct genomic profile. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜) [ポスター (示説)] 2007.10.2-5
 - 6 Lee, S-Y., Kumano, K., Nakazaki, K., Sanada, M., Suzuki, R., Ota, S., Hangaishi, A., Yagita, H., Fukayama, M., Seto, M., Kurokawa, M., Ogawa, S., Chiba S.: Activating mutations and copy number gains of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜) [ワークショップ] 2007.10.2-5
 - 7 加留部 謙之輔, 郭 英, 田川 博之, 瀬戸 加大, 竹下 盛重, 大島 孝一: 濾胞性リンパ腫の臨床病態・分子病態. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007, (横浜) [シンポジウム] 2007.10.10-13
 - 8 鏡味 良豊, 中川 綾, 大城 一郁, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: HUVEC および IL-2 依存性 ATL 腫瘍細胞株の樹立. Growth of ATLL cells by HUVEC and IL-2. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007, (横浜) [シンポジウム] 2007.10.10-13
 - 9 中川 雅夫, 瀬戸 加大: アレイ CGH 解析による PTCL-U 再分類の可能性. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007, (横浜) [ポスター] 2007.10.10-13

- 10 Nakagawa, M., Nakagawa-Oshiro, A., Karnan, S., Tagawa, H., Nakamura, S., Takeuchi, I., Ohshima, K., Seto M.: Array CGH analysis for PTCL-U revealed a distinct subgroup with pathological and clinical relevance. 第 49 回米国血液学会総会, 2007, (米国) [誌上発表] 2007.12.8-12.11
- 11 Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Karnan, S., Kim, W-S., Ko, Y-H., Seto M.: Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma has characteristic deletion at chromosome band 6q23.3-24.1 whose target is TNFAIP3. 第 49 回米国血液学会総会, 2007, (米国) [ポスター (示説)] 2007.12.8-12.11
- 12 Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Karnan, S., Kim, WS., Kim, YD., Ko, YH., Seto, M.: Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma has characteristic deletion of *TNFAIP3*, *suppressor of NF- κ B*. KeyStone Symposia NF-kappaB (B6), 2008, (米国) [ポスター (示説)] 2008.2.13-2.16

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

国際特許出願審査請求中 (2007 年)

発明の名称：リンパ腫の病型および予後診断方法

出願番号：PCT/JP2004/014305

発明者：瀬戸加大(愛知県がんセンター)、田川博之(愛知県がんセンター)、吉田安子(日本ガイシ㈱)、吉良茂樹(日本ガイシ㈱)

出願人：愛知県、日本ガイシ㈱

出願日：2004 年 9 月 22 日

国際特許分類：C12N 15/11

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（平成19年度）

胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

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 本研究は受容体チロシンキナーゼを始めとする活性型がん遺伝子変異に対する分子標的薬と、がん抑制遺伝子群の発現・機能回復を目指したエピジェネティクス治療薬の併用療法が胸部腫瘍に対する新たな治療戦略になりうるかどうかを明らかにすることを目的としている。本年度は胸部腫瘍における病理組織型の違いとがん関連遺伝子の遺伝子異常の有無により、エピジェネティクス異常の一機構である DNA メチル化異常が個別の胸部腫瘍間でどのように異なるかを網羅的解析法にて検討した。肺腺がん 17 例、悪性胸膜中皮腫 20 例に関して我々が共同開発した MCA-アレイ法を用いて網羅的に解析して比較検討した結果、両組織型で多くの DNA メチル化標的遺伝子が共通していることを明らかにした。また肺腺がんの一部の症例では高頻度に DNA メチル化異常が蓄積しており、特に上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異の検出されない腫瘍で、より多くの遺伝子で DNA メチル化異常が存在していることが観察された。肺腺がんにおける DNA メチル化異常のレベルと EGFR 変異との負の相関は、肺腺がん発生・進展の分子機構に大きな違いが存在するのみならず、遺伝子変異の有無によりエピジェネティクス異常のパターンに大きな差があることを意味し、その違いによりエピジェネティクス治療薬に対する有効性・反応性に関して違いが生じる可能性を示唆した。

A. 研究目的

胸部悪性腫瘍の代表である肺がんは集学的治療によっても極めて難治であり、日本におけるがん死亡原因の上位を占めている。肺がんに対する新たな治療戦略を開発するためには、その発生・進展の分子病態の解明が急務である。進行肺がんに対する治療には化学療法が第1に選択されるが、抗腫瘍薬単独投与の有効性は限界があるため作用機序と副作用のスペクトラムが異なる複数の薬物を併用投与することにより相乗効果を狙うことが標準的な治療戦略となっている。最近では

ゲフィニチブ等の分子標的薬が開発され、EGFR 変異を有する一部の肺腺がんに対して高い有効性が証明されてきたが、2次獲得耐性の問題もあり未だ治療成績は満足するレベルに達していない。このような状況のもと、肺がんの悪性形質に関わる分子に対する新たな分子標的薬を開発することも極めて重要と考えられるが、一方において、併用療法を目的として標的の異なる分子標的薬をいかに組み合わせるかを合理的に実証することも、肺がんに対するより効果的な治療戦略の開発に直結するものと考えられる。本研究は、

受容体チロシンキナーゼを始めとする活性化型がん遺伝子産物に対する特異的阻害薬と、がん抑制遺伝子不活化に高頻度に関与するエピジェネティクス異常に対する治療薬との併用療法の有用性について、胸部腫瘍における可能性を明らかにすることを目的としている。特に標的がん細胞における遺伝子変異・エピジェネティクス異常、遺伝子発現を包括的に検討し、さらに、それぞれの阻害薬の単独投与や併用投与に対する細胞生物学的な反応や遺伝子発現を検討することにより、治療効果を規定するメカニズムを明らかにして合理的な治療戦略の開発につなげることを目的とする。

本年度はエピジェネティクスの一機構である DNA メチル化異常が、胸部腫瘍の病理組織型および遺伝子変異とどのように相関するかを中心に解析を進めた。肺がんにおいては DNA メチル化異常が早期から検出され、腫瘍が増殖・進展するに従って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が、同時に肺腺がんでは EGFR 変異の有無によりゲフィチニブに対する有効性が大きく違うことが明らかになっている。従って、特に肺腺がんでのメチル化異常および EGFR 遺伝子変異の詳細な比較検討を行えば、その結果にもとづいて既存の分子標的薬とエピジェネティクス治療薬とのさまざまな条件下による併用効果を検討することが可能となり、本研究の目的達成にとって最も妥当な研究戦略になりうるものと考えられる。さらに、未分化型肺腺がんと診断が時に困難な中皮腫を同時に検討することにより、胸部腫瘍発生のメカニズムのみならず効果的な鑑別診断・治療戦略確立のための包括的な理

解が得られるものと考えられる。さらに、これらの検討により DNA メチル化が高頻度に検出される症例の存在を網羅的解析から明らかにすることは、近年欧米において造血器腫瘍に対して開始されたエピジェネティクスを標的とする治療が、どのような胸部悪性腫瘍に対してより適切であるか、その基礎的知見を得ることにつながるものと考えられる。

B. 研究方法

胸部悪性腫瘍組織（肺腺がん 17 例、悪性胸膜中皮腫 20 例）由来のゲノム DNA を用いた。肺腺がん 17 例のうち EGFR の変異を伴う症例は 8 例、伴わない症例は 9 例であった。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(Methylated CpG island Amplification; MCA 法)。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、我々が MCA-アレイ用にカスタマイズしたアジレント社のプロモーターアレイ(21K) 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=腫瘍由来 DNA /正常組織由来 DNA) を決定するため、複数の遺伝子に関して個別にプロモーター領域のメチル化の有無を定性的アッセイ法である Methylation Specific PCR (MSP)法

等を用いて検討した。マイクロアレイの結果をクラスター解析により評価し、肺腺がん、中皮腫それぞれに特異的な DNA メチル化標的遺伝子を検討した。また、肺腺がんの EGFR 変異の有無と DNA メチル化との関連について解析を行った。

(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共同研究機関である名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター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

胸部悪性腫瘍のうち肺腺がん 17 例、中皮腫 20 例で網羅的 DNA メチル化解析および EGFR 遺伝子変異との比較検討を行った。MCA-アレイ法を用い、制限酵素 XmaI 配列を 2ヶ所以上プロモーター領域に有する 7702 遺伝子に関して検討を行った。Cy5/Cy3 (腫瘍由来 DNA /正常組織由来 DNA) 比が 2 以上とすると高い感度・特異度でメチル化陽性遺伝子が検出可能であった。メチル化標的遺伝子数は肺腺がんでは平均 494 遺伝子、また中皮腫では 377 遺伝子であった。興味深いことに約 70%の DNA メチル化標的遺伝子が両疾患に共通しており高い相関が認められた($R^2=0.82$)。また肺腺がん症例には、高頻度に DNA メチル化が検出される症例が存在し、教師なし法によるクラスター解析で独自のクラスターを形成した。肺腺がん症例では各症例間で同一の遺伝子がメチル化するのに対して、中皮腫では症例間で異

なった遺伝子がメチル化していた ($P=0.003$)。肺腺がんでは高頻度にメチル化が検出された群は、EGFR 変異を伴わない腫瘍群に属し、変異を伴う腫瘍と比較し DNA メチル化が有意に多数の遺伝子で検出された(683 遺伝子 vs 284 遺伝子、 $P=0.007$) また MCA-アレイにより肺腺がん、中皮腫それぞれで特異的にメチル化する遺伝子が検出され、これらの遺伝子に設計した MSP 法を用いることにより、DNA メチル化の有無で両組織型の鑑別が可能であった。

D. 考察

DNA メチル化異常を迅速かつ高感度に網羅的に検出する MCA-アレイ法を用いて肺腺がんと中皮腫を解析し、そのメチル化異常の標的遺伝子、頻度、レベル等に関する比較検討を行った。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 2 個以上存在することが必要であり、すべての遺伝子プロモーター領域の検討はできないが、7702 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が半定量的かつ多数例を同時に解析できる点で優れていた。解析の結果、肺腺がんと中皮腫では、DNA メチル化標的遺伝子が多数共通していた。両疾患は由来の異なる前駆細胞から発生した悪性腫瘍であるが、DNA メチル化により共通のがん関連遺伝子の不活化が関与しており、一般的な悪性形質獲得に関しては比較的共通した発がん経路が関与している可能性も示唆された。また EGFR 変異を伴う症例と比較し、EGFR 変異を伴わない肺腺がん症例で DNA メチル化が多数検出されたことから、DNA メチル化異常の蓄積は EGFR 変異を補完する発がん経

路である可能性が示唆された。MCA -アレイ法による解析から胸部腫瘍における病理組織型や遺伝子変異の違いにより特異的にメチル化する遺伝子が複数同定され、合理的な治療戦略の確立のためだけでなく、これらの遺伝子のメチル化異常の違いをもとにした新しい診断法への応用も期待できると考えた。

E. 結論

肺腺がんと中皮腫において DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析を行った結果、両者で比較的共通して DNA メチル化の標的となる遺伝子が数多く観察された。肺腺がんでは一部の症例で DNA メチル化異常が高頻度に集積する症例が観察され、また症例間で同一の遺伝子が標的となる傾向がみられた。特に、EGFR 変異を伴わない肺腺がん腫瘍組織で DNA メチル化が多数検出され、DNA メチル化異常の蓄積は肺腺がんにおいて EGFR 変異を補完する発がん経路であることも示唆された。今後、EGFR 変異のみならず各種の活性型がん遺伝子変異・増幅との比較解析を行い、DNA メチル化異常のレベル・頻度・標的遺伝子との関連の詳細をさらに明らかにするとともに、低分子化合物等による活性型遺伝子変異の抑制とエピジェネティクス治療薬によるがん抑制遺伝子不活化の発現・機能回復の相乗効果を検討し、分子標的治療薬の合理的な併用療法を目指した基礎的な検討が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. **Hepatol. Res.** 37:974-983, 2007
2. Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, Shimada Y, Osada H, Kosaka T, Matsubara H, Mitsudomi T, Sekido Y, Tanimoto M, Yatabe Y, Takahashi T. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. **Cancer Res.** 67:6007-11, 2007
3. Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F, Tokino T. PRDM5 identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. **Clin Cancer Res.** 13: 4786-94, 2007
4. Osada H, Tatematsu Y, Tomida S, Yatabe Y, Takeuchi T, Murakami H, Kondo Y, Sekido Y, Takahashi T. Roles of ASH1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. **Cancer Res.** 68:1647-55, 2008
5. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. **Int J Cancer** (in press)

2.学会発表

1. 近藤豊、関戸好孝。がん細胞におけるヒストン H3 メチル化修飾による遺伝子制御 第 66 回日本癌学会学術総会 (口演)
2. 安柄九、近藤豊、後藤康洋、村上秀樹、長田啓隆、佐野力、関戸好孝。肝細胞がん症例のがん部、背景肝部における DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析 第 66 回日本癌学会学術総会 (口演)
3. 横山俊彦、長田啓隆、村上秀樹、立松義朗、谷口哲郎、近藤豊、樋田豊明、下方薫、関戸好孝。がん遺伝子 YAP1 は悪性胸膜中皮腫の増殖に関与し、がん抑制遺伝子 NF2 で機能阻害される 第 66 回日本癌学会学術総会 (示説)
4. 村上秀樹、谷口哲郎、川口晃司、鈴木裕太郎、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝。Ectopic Merlin expression inhibits the growth of NF2-deficient cells with the distinct change of gene expression pattern 第 66 回日本癌学会学術総会 (示説)
5. 後藤康洋、近藤豊、新城恵子、谷口哲郎、近藤征史、今泉和良、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 48 回日本肺癌学会総会 (示説)
6. 鈴木裕太郎、村上秀樹、川口晃司、谷口哲郎、長谷川好規、下方薫、関戸好孝。悪性胸膜中皮腫における PI3K/AKT 経路、PTEN 遺伝子の変異の検討 第 48 回日本肺癌学会総会 (示説)

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

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

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。私どもは、ケラチン結合蛋白質アルバトロスが細胞間接着装置複合体の構築とラテラル（側面）ドメインの局在化に必要であることを見出した。この上皮細胞の極性化現象はアルバトロス/Par3（極性制御分子）複合体によって制御される。一方で、アルバトロスと複合体を形成しない Par3 はアピカル（頂部）ドメイン形成を制御する。ケラチン結合蛋白質トリコプレインを母中心小体の形成因子の一つとして同定した。その機能は微小管の母中心小体への係留であった。そのノックダウンでは母中心小体の **appendage** 部へのニナインの局在化が障害され、結果として微小管の係留が阻害されていた。また、ケラチンはトリコプレインを安定化し、母中心小体へのトリコプレインの安定供給に働くことがわかった。以上のことより、これらのケラチン結合蛋白質が細胞骨格・細胞間接着における構造物の特異的制御に寄与していることが明らかになった。またケラチンがそれらの機能を促進する可能性が示唆された。

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が細胞骨格・細胞間接着装置を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

B. 研究方法

1. アルバトロスおよびトリコプレインの細胞内機能の解析

- 1) アルバトロス、Par3 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、それぞれ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。
- 2) トリコプレイン、ニナインについては siRNA を用いた RNA 干渉法を HeLa 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色を行った。また両者の結合については、イーストハイブリッド法およびタグ免疫沈降法で検討した。
- 3) ケラチンについては、ケラチン欠損上皮細胞(SW13)にケラチンを発現させ、トリコプレインのイムノブロット、免疫染色および RT-PCR を行った。またケラチン 8 の siRNA を用いた RNA 干渉法を T24 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。

2. 分子間結合実験

これについては、COS 細胞への強制発現系を用いたタグ免疫沈降法、およびイーストハイブリッドの系を用いた。

(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. アルバトロスの細胞内機能の解析

ケラチン結合蛋白質アルバトロスが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は見出していた。今回さらに、E-カドヘリン、 β -カテニン、デスマグレイン 2 のラテラルドメ

インへの局在化が障害されていた。その際、Par3 の細胞間接着装置複合体への局在化も障害されていた。続いて、Par3 とアルバトロスの結合がタグ免疫沈降により示された。さらに Par3 ノックダウン細胞ではアルバトロスノックダウンと同様の表現型に加え、Ezrin のアピカルへの局在化が障害された。

2. トリコプレインの細胞内機能の解析

ケラチン結合蛋白質トリコプレインの細胞内局在については、母中心小体の遠位端に限局していること、また当部位の appendage に微小管を係留させていることがわかっていたが、そのノックダウンにより、同部位からニナインが消失していることが確認された。また、ニナインのノックダウンでも同様の微小管の係留が障害された。トリコプレインとニナインの結合は、イーストハイブリッド法およびタグ免疫沈降法により示された。さらにケラチン欠損上皮細胞にケラチンを発現させ、トリコプレインのイムノブロット、免疫染色および RT-PCR を行ったところ、その mRNA 量は変わることなく蛋白量が有意に増えた。また、ケラチン 8 をノックダウンした T24 細胞では、トリコプレインの蛋白量が減少していた。

D. 考察

アルバトロスが細胞間接着装置複合体を制御する分子メカニズムについては、まずアルバトロス/Par3 複合体は細胞間接着装置複合体およびラテラルドメインを制御する。一方で、アルバトロスと結合しない Par3 はアピカルドメイン形成を制御することがわかった。

トリコプレインが微小管の母中心小体への繫留を制御するメカニズムとしては、ニナインと協調している可能性が示され

た。また、ケラチンはトリコプレインを安定化し、母中心小体へのトリコプレインの安定供給に働くことがわかった。今後はアルバトロスについても、ケラチンが及ぼす影響を、ケラチン欠損上皮細胞およびノックダウンの系を用いて検討していく。また、アルバトロスの結合蛋白質をイーストハイブリッド法、免疫沈降法およびプルダウンアッセイなどにより検索・同定していく。トリコプレインについては、それが一次繊毛形成におよぼす影響を検討する。さらに、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し、将来的には診断・治療に役立てる予定である。

E. 結論

がん細胞の骨格・細胞間接着を制御するシステムに関して、特異的な構造物を制御する分子の報告はまだ少ない。我々は、アルバトロスおよびトリコプレインが細胞間接着装置複合体および微小管の安定化、つまり特異的な細胞骨格・細胞間接着の制御を行う上での分子メカニズムを明らかにした。またケラチンがそれらの機能を促進している可能性が示唆された。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のひとつを明らかにし、それにこれらのケラチン結合蛋白質およびケラチン自身が関与していることを示せたと言える。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B. and Pant. H.C. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* 313: 2098-2109, 2007
2. Tsuno, T., Natsume, A., Katsumata, S., Mizuno, M., Fujita, M., Osawa, H., Nakahara, N., Wakabayashi, T., Satoh, Y., Inagaki, M. and Yoshida, J. Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *J Neurooncol.* 83: 249-258, 2007
3. Goto, H. and Inagaki, M. Production of a site- and phosphorylation state-specific antibody. *Nature Protocols* 2: 2574-2581, 2007
4. Li, Z.F., Wu, X., Jiang, Y., Liu, J., Wu, C., Inagaki, M., Izawa, I., Mizisin, A.P., Engvall, E. and Shelton, G.D. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 264: 77-86, 2008
5. Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. and Hirotsune, S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* In press

2. 学会発表

1. Inoko, A. and Inagaki, M.: A keratin filament binding protein Albatross: an unexpected regulator of apical junctional complex. 第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会 合同大会,

- 2007, (福岡), [シンポジウム]
2. Inagaki, M. and Goto, H.: The role of novel Chk1 phosphorylation in carcinogenesis. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜), [シンポジウム]
 3. Izawa, I., Nishizawa, M. and Inagaki, M.: Palmitoylation is required for the plasma membrane localization of ERBIN. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜), [ポスター]
 4. 猪子誠人、井澤一郎、林裕子、清野透、稲垣昌樹: A keratin filament binding protein Albatross: an unexpected regulator of apical junctional complex. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜), [ポスター]
 5. 池上要介、後藤英仁、榎本将人、笠原広介、友野靖子、辻村邦夫、清野透、森田明理、郡健二郎、稲垣昌樹: Novel Chk1 phosphorylation occurred not only in early mitosis but also in DNA damage checkpoint. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, (横浜), [ポスター]
 6. 榎本将人、後藤英仁、笠原広介、池上要介、山口知也、白水崇、友野靖子、辻村邦夫、清野透、稲垣昌樹: Phosphorylation of Chk1 by Cdk in DNA damage response. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会 合同大会 2007, (横浜), [ポスター]
 7. 後藤英仁、榎本将人、池上要介、山口知也、友野靖子、清野透、稲垣昌樹: サイクリン依存性キナーゼによる Chk1 リン酸化反応第 40 回日本発生生物学会 第 59 回日本細胞生物学会 合同大会, 2007, (福岡), [ワークショップ]
 8. 後藤英仁、稲垣昌樹: サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) による Chk1 のリン酸化反応. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会 合同大会 2007, (横浜), [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。