

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 淳

平成21(2009)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 誠治
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

研究代表者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

ゲノム網羅的に解析できる種々のアレイを用いて、肺がんでホモ欠失している 176 個の遺伝子を同定した。特に高頻度にホモ欠失していた PIPRD 遺伝子は遺伝子内の変異を持つ細胞もあり、強力ながん抑制遺伝子候補であると考えられた。肺がんで高頻度に増幅している候補がん遺伝子 SOX4 遺伝子を同定した。ZEB1/TCF8 遺伝子は成人 T 細胞白血病(ATL)における 10p11.2 の共通欠失領域に存在し、欠損マウスでは CD4 陽性 T リンパ腫が発生し、発現低下により ATL 細胞は TGFβ の増殖抑制作用に抵抗性になったので、ATL ではがん抑制遺伝子として機能していると考えられた。細胞接着分子 TSLC1/CADMI 欠損マウスは 15 月齢で 33%、18 月齢で 37%に肺腺腫、肺腺がんを生じ、野生型マウスより有意に高頻度であった。急性型 ATL で高発現している遺伝子としても同定されている TSLC1 遺伝子の高発現は ATL 細胞の接着能を亢進させ、マウス皮下への移植では腫瘍形成を促進し、静注では肝、肺への臓器浸潤が著明であった。正常子宮頸部上皮細胞に HPV16 の E6/E7、活性化 H-rasG12V を導入すると、100 万個の細胞でヌードマウス皮下に腫瘍を造った。さらに c-Myc を導入すると、200 個の細胞で造腫瘍性を示し、c-Myc が、がん幹細胞性の維持に関わっていることが示唆された。正常卵巣表面上皮細胞から、ウイルス遺伝子を用いずに 2 倍体不死化細胞株を樹立し、さらに 3-4 個のがん遺伝子導入により造腫瘍能を示す細胞株を得た。肺がん、頭頸部がんにおける新規がん遺伝子 NRF2 と胆嚢がんにおける新規がん抑制遺伝子 KEAP1 を同定し、胆道がんにおける MET 遺伝子の異常とキナーゼ阻害剤による治療の可能性を示した。口腔扁平上皮がんにおいて、メチル化によって発現抑制され、がん抑制遺伝子機能を有する miR-137 と miR-193a を見出した。骨髄異形成症候群における 11 番染色体長腕の片親性二倍体(UPD)で特徴づけられる病型の標的遺伝子として c-Cbl を同定した。

研究分担者

- | | | |
|----------|-------------|-----|
| 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 譲治 | 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、個々のがんにも最適な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ががんの診断、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、高精度な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が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

「Human CGH 185-k array」を用いて、27 例の肺がん細胞株を対象にゲノムコピー数の変化を解析した。昨年度までに「Mapping 100k array」を用いて検出した染色体ホモ欠失領域と合わせ、その領域内の遺伝子エクソプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失遺伝子の詳細な解析を行った。小児肺腺がん 72 例を対象としてレーザーキャプチャーダイセクション法による腫瘍細胞の採取及び DNA の抽出を行ない、「10k SNP array」を用いて染色体欠失のゲノム網羅的解析を行った。

2) 口腔扁平上皮がん

自作ゲノムアレイにより各種がんのゲノムコピー数異常を体系的に解析し、がん特異的ゲノム構造異常のデータを得た。新規に見出された増幅や欠失などをランドマークに新規がん関連遺伝子を同定し、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、同定することが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を解明するとともに、エピジェネティクスの側面からも難治性がんの病態解明に

アプローチした。

3) 肺がん、頭頸部がん、膵がん、胆道がんなど

難治がん・転移性がんを中心としたがん臨床検体からレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞を選別し、4500 個の BAC クローンを搭載した BAC アレイあるいは 25 万個のオリゴプローブを搭載した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行った。同定した増幅領域並びにホモ欠失領域から候補がん遺伝子・がん抑制遺伝子を同定し、変異検索を行った。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討した。

4) 骨髄異形成症候群 (MDS)

171 例の MDS 検体のゲノム DNA について、SNP アレイ (GeneChip50K XbaI) 上でアレイシグナルを検出し、独自に開発した CNAG/AsCNAR ソフトウェアで解析してゲノムコピー数異常およびアレル不均衡をゲノムワイドに同定した。11 番染色体長腕に集積する aUPD の共通領域に存在した c-Cbl 遺伝子については PCR-direct sequencing 法で変異解析を行った。同定された変異 c-Cbl を安定発現させた NIH3T3 細胞を作製し、コロニー形成能と造腫瘍能を検討した。また、変異 c-Cbl 遺伝子を導入した造血前駆細胞の replating アッセイを行った。

5) 成人 T 細胞白血病 (ATL)

Spectral karyotyping (SKY)/FISH 法で同定した染色体切断点集中領域 10p11.2、14q32、14q11 について、Realtime-PCR 法により領域に存在する遺伝子群の発現解析を行い、10p11.2 領域から TCF8/ZEB1 をがん抑制遺伝子候補として同定した。DNA メチル化を 5-Aza-dC 処理/Bisulfite 法、TrichostatinA 処理/アセチル化ヒストン抗体による CHIP 法で解析し、PCR-direct sequencing 法で変異を検索した。また、過剰発現系/発現抑制系による増殖分化アポトーシスの検討を行った。さらに、抗体作製による蛋白質発現解析、NOG マウスを用いた白血病細胞移植実験、TCF8 欠損マウスの作製並びに腫瘍発症機構の解析を行った。

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 hTERT、HPV16 E6/E7、cdk4、cyclin D1、bmi-1、p16-shRNA などでも不死化した。次に、KrasV12、HrasV12、活性型 Akt、erbB2、PI3K、変異β-catenin、c-myc、PTEN-shRNA、p53-shRNA などを導入した。これまでに、子宮内臓上皮細胞、子宮頸部角化細胞、卵巣表面層上皮細胞を用いて、子宮内臓がん、子宮頸がん、卵巣がんの多段階発がんモデルを作製している。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変化を細胞生物学的に解析し、遺伝子発現、蛋白質修飾などの変化を RT-PCR 法、Western ブロットング法で調べた。

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

15 ヶ月、18 ヶ月、22 ヶ月の *Cadm1^{+/+}*、*Cadm1^{-/-}*、*Cadm1^{-/-}* マウスを 20-30 匹ずつ解剖し、腫瘍発生、異常の有無を肉眼的、組織学的に解析した。肺腫瘍における CADM1、CADM4、4.1N、EGFR、cerB2、MET の発現を免疫組織染色法で、*Kras2*、*Egfr*、*Tp53* 遺伝子の変異

を PCR 塩基配列決定法で、*Cadm1* 遺伝子のメチル化を重亜硫酸・塩基配列決定法で解析し、DNA チップを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。

(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認を得て進めている。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がん機構の解明

1) 肺がん

27 例の肺がん細胞株を対象にゲノムコピー数の変化を解析した。そして、75 例の肺がん細胞株を用いて、ホモ欠失が想定されたゲノム部位に存在する遺伝子のエクソプライマーを用いて、Multiplex PCR 法により遺伝子レベルでのホモ欠失の有無を確認し、頻度と特異性を検討した。その結果、176 遺伝子がホモ欠失していることが確認された。これらのうち、171 個は蛋白質をコードする遺伝子で、他の 5 個は microRNA 遺伝子であった。ホモ欠失の頻度は、*CDKN2A/p16*、*p14ARF*、*CDKN2B/p15* を含む 9p21 領域で最も高く、25%の細胞株で欠失していた。次に頻度が高かったのは *P1PRD* 遺伝子で、11%(8/75)の細胞株でホモ欠失が見られた。その他、*LRP1B*、*FHIT*、*KEAP1* など、いくつかのがん抑制遺伝子や候補がん抑制遺伝子も高頻度に欠失していた。*P1PRD* 遺伝子のホモ欠失が高頻度に検出されたので、さらにこの遺伝子のがん抑制遺伝子としての可能性を追求するため、すべてのエクソン領域の変異について、ダイレクトシーケンシング法で解析した。その結果、75 例中 8 例の肺がん細胞株、95 例中 4 例の手術検体で変異が検出された。また、*P1PRD* 遺伝子の発現は細胞株の 96%以上、臨床検体の 85%(51/60)で減少していた。これらの結果から、*P1PRD* 遺伝子は強力ながん抑制遺伝子候補と考えられた。更に、この結果は、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であることを示唆したので、現在、それらの遺伝子についても更に詳細な解析を進めている。

がん抑制遺伝子の局在を明らかにするもう一つの手法として、「Mapping 10k array」を用いて小空肺腺がんを用いた染色体ヘミ欠失のゲノム網羅的解析を行った。染色体ヘミ欠失は上皮内がんより浸潤がんでは有意に多く検出された。最も頻度の高かった欠失領域は 13q13 (58%)で、上皮内がんでは最も高頻度であり(53%)、また浸潤がんでも欠失頻度は高かった(60%)。11p、17p、18p には上皮内がんより浸潤がんでは有意に頻度が高い欠失領

域があり、浸潤がんより上皮内がんでは有意に頻度の高い欠失領域はみられなかった。また、8p21、11p11-p12、17p12-p13 の欠失は病期の進んだがんでは、8p21 の欠失は予後不良群で有意に頻度が高かった。

2) 口腔扁平上皮がん

口腔扁平上皮がん(OSCC)関連がん抑制 miRNA 遺伝子の単離・同定を目指して、18 株の OSCC 細胞株および正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 における 148 種の miRNA の定量的発現解析に DNA メチル化解析を組み合わせた絞り込みによって、OSCC 細胞株で高頻度に発現低下を認め、且つメチル化異常のパターンと発現抑制が完全に一致する 4 種類の miRNA (*miR-34b*、*miR-137*、*miR-193a*、*miR-203*)を選出した。選出した 4 種類の候補 miRNA 遺伝子について OSCC 患者 11 例のがん部・非がん部組織を用いた DNA メチル化解析と定量的発現解析を進め、OSCC 関連がん抑制 miRNA 遺伝子の候補として *miR-137* と *miR-193a* を見出した。さらに、*in vitro* 実験系を用いた詳細な機能解析の結果、*miR-137* ならびに *miR-193a* は OSCC においてがん特異的 DNA 過剰メチル化によって発現が抑制されるがん抑制 miRNA 遺伝子であること、また、細胞増殖に重要ながん遺伝子として知られている *CDK6* と *E2F6* が、*miR-137* ならびに *miR-193a* 各々の標的分子であることも明らかにした。

3) 肺がん、頭頸部がん、膵がん、胆道がんなど

肺がん並びに頭頸部がんの臨床検体を用いた変異解析により、新規のがん遺伝子 *Nrf2* を同定した。臨床的に *Nrf2* の変異を認める症例は有意に予後不良であり、また *Nrf2* が活性化しているがん細胞は、シスプラチンといった抗がん剤に抵抗性を示し、*Nrf2* 分子の発現を抑制することで薬剤反応性が亢進することを明らかにした。膵がん細胞株並びに臨床検体を用いた CGH 解析から、新規の染色体増幅領域を見だし、*TGFβ* 経路を抑制することが知られている E3 ユビキチンリガーゼ *Smurf1* を新規がん遺伝子として同定した。がん抑制遺伝子 *p53* の下流標的遺伝子の探索から、細胞の生存に必須な *Akt* キナーゼを負に制御する新規分子 *PHLDA3* を同定した。*PHLDA3* は *p53* によって直接転写制御され、また肺内分泌性がん臨床検体において高頻度に遺伝子欠損と発現低下を示した。胆道がんに対する分子標的薬として、*EGFR/VEGFR* dual kinase inhibitor について検討した。*In vitro* では *EGFR* 遺伝子増幅を認める胆道がん細胞株では増殖低下、細胞死誘導等の著明な抗腫瘍効果を認め、*KRAS* 遺伝子変異のある細胞株では治療抵抗性であること、*in vivo* では *EGFR* 増幅がん細胞に加えて *EGFR* 非増幅がん細胞でも *VEGFR* の阻害による腫瘍血管の減少を介した増殖抑制効果があることを見出した。

4) 骨髄異形成症候群

高密度 SNP アレイを用いたゲノム解析では、MDS に特徴的な多数の染色体異常が同定された。代表的な異常としては、従来染色体解析においても報告されてきた、+8、1q,19q,21q の gain、5q、7q/-7,12p,13q,17p,20q の loss などであるが、SNP アレイでは染色体分析に比してより高い感度でこれらの異常が同定された。すなわち、染色体分析で 43.3%を占める正常核型(異常なし)と判定

される症例は、SNP アレイでは28.1%と明らかに少なく、染色体分析で正常核型と判定された75例のうち43例でSNP アレイ解析による異常が同定された。また各染色体別にみた異常の検出率は、SNP アレイによる解析が平均で2.59倍となっており、またすべての染色体でSNP アレイの検出率が従来の核型分析を上回っていた。もっとも顕著な相違はaUPDの検出で、従来の各型分析では原理的に同定不可能な異常であるが、SNP アレイによる解析では、aUPDが30%の症例で検出された。一方、SNP アレイでは原理的に同定不能の相互転座型の異常は、染色体分析によって1.8%の症例に認められたのみであった。これらのaUPDは特定の染色体に集積する傾向がみとめられ、1pにおけるc-MPL変異ないしNRAS変異、9pにおけるJak2変異、13qにおけるFLT3変異、17pにおけるp53変異、21qにおけるRunx1変異など、既知の遺伝子変異との強い相関が確認された。一方、我々は11qに集積する9例のaUPDの標的遺伝子変異としてc-Cblの変異を新たに同定した。変異はすべてc-CblのE3ユビキチンリガーゼ活性の中心を担うlinkerドメインとRINGフィンガードメインに集積していた。変異c-CblをNIH3T3ないし造血前駆細胞分画に強制的に発現させることにより、その発がん活性を評価した。変異c-Cblを恒常的に発現させてNIH3T3細胞は、軟寒天培地中で足場非依存性の増殖活性の亢進がみとめられ、また免疫不全マウスに接種することにより腫瘍の形成が認められた。また、変異c-Cblを導入した造血前駆細胞では明かなreplating capacityの亢進が確認された。

5) 成人T細胞白血病(ATL)

成人T細胞白血病(ATL)の白血病発症に関わるゲノム異常を同定するため、DNAマイクロアレイ遺伝子発現解析、高密度SNPアレイ解析、SKY法染色体分析等を組み合わせて発症因子の単離を行っている。急性型ATLの染色体切断点集中領域として10p11、14q11、14q32領域を同定し、それぞれから候補遺伝子を単離し機能解析を行っている。10p11.2胸膈欠失領域より単離したTCF8遺伝子の欠損マウスは約80%にCD4陽性Tリンパ腫を発症させるためがん抑制遺伝子候補となった。TCF8はsmad3に結合しTGFβ情報伝達系を正に制御し、ATLのTGFβ抵抗性に対して、TCF8遺伝子発現の低下はその原因となっていた。TGFβ欠損マウスにおいてもCD4陽性細胞の増加が報告されており、CD4陽性Tリンパ球がTGFβにより排除される機構に対して、TCF8遺伝子発現が関係することが示唆された。

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

異なるドナー由来の初代培養細胞(HCK1,4,8,12)を用いて再現性の確認を進めた。いずれの場合もHCK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た。HrasG12Vの導入によりc-Myc蛋白の半減期は延長し増加していた。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、少なくとも200個の細胞を皮下移植によって腫瘍を形成した。これらの細胞にE6やE7をノックダウンすると平皿上での増殖すら困難になった。E6とE7を導入せずにHrasG12Vやc-mycを導入すると細胞死が誘導され、生き残った細胞も造腫瘍性を示さなかった。皮下移植時に細胞外基質(ECM)であるMatrigel™を混ぜることでこれらの強い造腫瘍性は得られるが、

HCK/E6E7/HrasG12V細胞単独では100万個の細胞を移植しても腫瘍を形成できなかった。また、培地をEGF濃度の高いInvitrogen社のK-SFMに替えると非アポトーシスによる細胞死が誘導され、生き残った細胞はHrasG12V, c-Mycの発現が低く、100万個の細胞をMatrigel™と共に移植しても腫瘍を形成できなかった。逆に細胞を血清入りのDMEM培地で培養しておく造腫瘍性はさらに亢進するが、培地を元に戻すと造腫瘍性は戻った。

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やhTERT+変異cdk4+cyclin Dにより不死化卵巣表層上皮細胞株(HOSE1, HOSE2)を樹立した。これらは大部分の細胞が染色体異常の全くない正常2倍体を維持している。hTERT+変異cdk4+cyclin Dで不死化したHOSEに、変異p53+KrasG12V+活性化Akt、あるいは変異p53+KrasG12V+c-myc+hct-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、後者の細胞はSCIDマウス腹腔内でヒト卵巣がんを思わせる腹腔播種病変像を呈した。c-mycの導入によってBcl-2の発現が低下し、低血清培地中でアポトーシスが誘導されるが、このアポトーシスはBcl-2の導入によりほぼ完全に抑制された。

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

Cadml遺伝子ホモ欠損、ヘテロ欠損マウスで高率に肺腺腫、肺腺がんの自然発生を認めた。Cadml^{+/+}, Cadml^{+/-}, Cadml^{-/-}マウス各々の肺腫瘍発生頻度(担がんマウス数/解析マウス数)は、15月齢で3/31(10%)、1/21(5%)、10/30(33%)、18月齢で2/30(7%)、5/18(28%)、13/35(37%)であり、Cadml^{-/-}マウスでは15月齢と18月齢、Cadml^{+/-}マウスでも18月齢において、Cadml^{+/+}と比較して有意に高い発生頻度であり、また腫瘍サイズにも顕著な差が認められた。病理組織学的解析では肺腺腫に加えて、15月齢と18月齢のCadml^{-/-}マウスの一部、並びに18月齢のCadml^{+/-}マウスの一部に肺腺がんが認められた。また免疫組織染色により、Cadml^{+/+}マウスに生じた腫瘍においてもCADM1蛋白質の発現が欠如し、Cadml遺伝子が結果的に2ヒットの不活化を起こしていると考えられた。Cadml遺伝子欠損マウスに肺腫瘍が生じる分子機構を明らかにするために、種々の既知分子の異常の有無を検討した。その結果、肺腫瘍ではKras2, Egrf, Tp53遺伝子の異常は全く認められなかった。一方、免疫組織染色により、CADM4、並びに4.1N蛋白質の発現欠如を、各々、9腫瘍中7腫瘍(78%)で認めた。さらに培養肺がん細胞の解析から、CADM4は蛋白質の発現が欠如していること、一方、4.1N蛋白質は発現するが細胞膜への局在が損なわれていることが予想された。

D. 考察

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

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で 176 個のホモ欠失遺伝子を同定し、小型肺腺がんにおけるヘミ欠失領域のゲノム網羅的解析で様々な染色体ヘミ欠失の共通領域を同定した。これらの共通ヘミ欠失領域内にはいくつものホモ欠失遺伝子が存在していたので、これらの遺伝子をがん抑制遺伝子の強力な候補として、現在、発現や変異の解析を進めている。まだ高頻度に変異している遺伝子は同定されていないが、来年度中にいくつかの標的遺伝子を同定することを目指して研究の速度を上げているところである。また、分担研究者の小川等は、SNP array のデータからゲノムコピー数を算出できるソフトウェアを開発しているため、これまでに得られた多くの肺がん細胞の SNP array の解析データを彼らの手法で解析し、染色体転座などを起こしている新たな標的遺伝子の同定も試みる予定である。

2) 口腔扁平上皮がん

がんの発症・進展過程における miRNA の直接的あるいは間接的な関与は既に知られていたが、近年、一部のがん抑制遺伝子型 miRNA による RNA サイレンシングが腫瘍特異的な DNA メチル化異常による遺伝子サイレンシングを受けること、さらに、がん細胞での DNA メチル化の制御機序やがん幹細胞の形質維持などへの miRNA の関与も明らかにされた。今後も miRNA 研究が飛躍的に進展し、発がん・進展過程の新たな分子メカニズムの解明のみならず、miRNA の発現プロファイルやメチル化プロファイルによるがんの個別診断法や予後予測法の開発、あるいは新たな抗がん剤としてのアンチセンス核酸医薬などへの臨床応用も期待される。

3) 肺がん、頭頸部がん、膵がん、胆道がんなど

肺がん、胆道がん、膵がんについては、網羅的な染色体構造異常解析を進め、ゲノム構造異常を起点とした新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定について研究を進めた。肺がん・頭頸部がん・胆道がんにおける Keap1-Nrf2 経路の高頻度なゲノム異常については、その異常が抗がん剤に対する耐性獲得と密接に関係していることを見出し、今後更にその分子経路の解析によって、既存の抗がん剤の感受性を増幅できるような新たな治療法の開発に向けて研究を進める。本研究において独自に樹立した胆道がんの in vivo マウス移植モデルは、増殖・転移を指標とした様々な分子標的化合物の検証に有用であると考えられる。今年度は EGFR/VEGFR 阻害剤に加えて、新たに MET 阻害剤についても検討を進めている。

4) 骨髄異形成症候群

SNP アレイを用いたゲノム解析の結果、比較的大きな染色体領域の異常の同定においてすら、従来の染色体解析には大きな問題があることが明らかとなった。現在 MDS の予後予測・治療法の選択に用いられている IPSS 分類は染色体解析の結果に強く依存していることから、今後 SNP アレイを用いた臨床診断技術の開発とこれに基づく新規予後予測分類の検討が必要と考えられる。特に aUPD は従来の解析技術では同定不可能な変化だが、今回の解析から、これらがしばしば特異的な遺伝子標的を有しており、MDS の病態とも密接に関わっていることが示唆された。特に、11q に集積する aUPD の遺伝子標的として c-Cbl を同定した。c-Cbl は 11qUPD を有する症例のほぼ全例で変異しており、これらの変異 c-Cbl は

NIH3T3 細胞において強いトランスフォーミング活性を示したことから、MDS の病態への強い関与が示唆された。

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、既に感染しているキャリアに対する対処法や治療法が確立されていない。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、多段階発がん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。今回 TSLC1 に引き続き、固形がんの多くでがんの転移機構 (EMT) を促進する転写因子である TCF8/ZEB1 が、ATL においてはゲノム異常、エピジェネティックな異常により転写抑制を受け、ATL のがん抑制遺伝子候補として働いていることを明らかにした。TCF8 欠損マウスの解析は CD4+T リンパ腫を発症しており、末梢型 T リンパ腫白血球の発症に重要な役割を有することが示唆される。

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

子宮頸がんモデルにおいては正常細胞に E6E7+HrasV12 を導入するだけで造腫瘍性を誘導できた。c-myc の追加導入により著しい造腫瘍能の増加が見られ、少なくとも 200 個の細胞移植により腫瘍を形成したことから、腫瘍形成細胞 (PIC: tumor initiating cell) に富んだ幹細胞様の細胞集団が培養皿上で維持されていることになる。c-Myc の高発現ががん幹細胞性の維持に重要であることが示唆され、c-Myc ががん幹細胞を標的とした治療の良い分子標的であると考えられた。また、移植前の培地や移植時の ECM の有無が造腫瘍性に大きな影響を与えたことから、がん幹細胞を直接標的とした治療の他に、がん幹細胞の微環境あるいは Niche を標的とした治療も有効であることが示唆された。

卵巣がんモデルにおいては c-myc の発現により Bcl-2 レベルが低下しアポトーシス感受性になること、Bcl-2 の導入によりアポトーシス抵抗性になること、多くの上皮性卵巣がんでは Bcl-2 が高発現していることから Bcl-2 は上皮性卵巣がんの良い分子標的であることが示唆された。

一方、ゲノム異常の細胞生物学的意義を明らかにする目的で、不死化肺上皮細胞を用いて多段階的な肺がんの進展過程を再現する研究は、2種の不死化細胞を用いて、変異 KRAS 導入細胞、p53 あるいは LKB1 のノックダウン細胞の作製を終了している。今後は、がん幹細胞化や上皮・間葉移行の観点から、細胞の性状の変化を検討するとともに、それぞれのゲノム異常に特異的な治療の分子標的を探索して行く予定である。

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

ヒト肺がんが高率に異常が認められる分子の遺伝子改変マウスに肺腫瘍が自然発生した例は、KRAS2, TP53, PTEN などごく一部に過ぎず、肺特異的に腫瘍発生が認められるのはさらに珍しい。また、*Cadml*^{-/-} マウスに生じた腫瘍由来の培養肺がん細胞も樹立し、その旺盛な

造腫瘍性を確認した。今後、これらのモデルを用いて、肺がんの発生や浸潤、転移の分子機構、並びに治療薬の基礎研究を進めていく予定である。現在、他のモデル系との交配や、様々なマウス系統への戻し交配を進めている。

一方、共同研究で、神経芽細胞腫の予後予測の指標として CADM1 発現欠如が有用であることを報告したが、これは神経芽細胞腫で以前より予測されていた第 11 染色体長腕上の予後因子の同定につながる研究成果であり、興味深い。頭頸部がんにおいても一部で CADM1 遺伝子のメチル化を認めており、その意義を解析中である。

E. 結論

肺がんでホモ欠失している 176 個の遺伝子を同定した。高頻度にホモ欠失している PTPRD 遺伝子は遺伝子内の変異を持つ細胞もあり、強力ながん抑制遺伝子候補であると考えられた。予後不良肺腺がんで高頻度にヘミ欠失している第 8 染色体短腕領域を同定した。

肺がん・膵がん・胆道がんの新たながん関連遺伝子を多数同定し、抗がん剤耐性や細胞増殖における機能解析と治療標的としての可能性についての検討を進めた。マウス移植モデルを作製し EGFR/VEGFR dual kinase inhibitor について、分子標的治療の有効性評価について検討した。乳がんの転移分子機構の解明に向けたゲノム解析を開始した。

口腔扁平上皮がんにおいて、メチル化によって発現抑制され、がん抑制遺伝子機能を有する miR-137 と miR-193a を見出し、CDK6 と E2F が miR-137 と miR-193a の標的分子であることを明らかにした。

骨髄異形成症候群(MDS)の網羅的なゲノム解析により、11 番染色体長腕の片親性二倍体(UPD)で特徴づけられる病型の標的遺伝子として c-Cbl を同定した。MDS における c-Cbl 変異はドミナントネガティブに c-Cbl の活性を抑制することから、c-Cbl はがん抑制遺伝子として MDS の発症に関与していると考えられた。

難治性白血病は、そのゲノム異常の複雑さのため、その原因となる遺伝子群がまだ単離されておらず、原因遺伝子の単離と有効な診断治療法の開発が急がれている。今回 ATL のゲノム解析から TCF8/ZEB1 遺伝子のがん抑制遺伝子候補として単離できた。また、ATL 特異的発現マーカーとして同定した 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を持っている。

ヒト子宮頸がんの多段階発がんモデルでは、c-myc を導入することで著しい造腫瘍性の亢進が見られ、がん幹細胞様の性質を獲得した。c-myc の高発現が幹細胞性の維持に重要であることが示唆され、がん幹細胞を標的とした治療の良い分子標的候補であることが示唆された。卵巣がんのモデル作製では活性化 Ras と Myc のみでは造腫瘍性が得られず、さらに Bcl-2 が必要であった。多くの上皮性卵巣がんでは Bcl-2 が高発現していることから c-Myc に加え Bcl-2 は上皮性卵巣がんの良い分子標的であることが示唆された。

遺伝子欠損ホモマウス、ヘテロマウスに肺腺腫、肺腺がんが有意に高頻度に生じたことから、CADM1/TSLC1

が強力ながん抑制遺伝子であること、特に肺腺がんに深く関与することが結論された。マウスで肺腺がんを発生する系は貴重であり、今後の肺がん分子機構、並びに治療薬の研究に有用なモデルとなると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Medina PP, Romero OA, Kohno T, Montuenga LM, Pio R, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. Frequent BRG1/ SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, 29:617-622, 2008.
- 2) 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 to Cells*, 13:483-495, 2008.
- 3) 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.
- 4) 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*, 68:3193-3203, 2008.
- 5) 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*, 27:4788-4797, 2008.
- 6) 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*, 14:3746-3753, 2008.
- 7) Hidaka T, Nakahara S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult-T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112:383-393, 2008.
- 8) Ajima R, Akazawa H, Kodama M, Takeshita F,

- Otsuka A, Kohno T, Komuro I, Ochiya T, Yokota J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes to Cells*, 13:987-999, 2008
- 9) Yoneda M, Suzuki T, Nakamura T, Ajima R, Yoshida Y, Kakura S, Sudo K, Iwakura Y, Shibutani M, Mitsumori K, Yokota J, Yamamoto T. Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 100:225-232, 2009.
 - 10) Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Watanabe S, Goto K, Nishiwaki Y, Shimada Y, Hirose H, Saito I, Kuchiba A, Yamamoto S, Yokota J. Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis*, 30:65-70, 2009.
 - 11) Nakanishi H, Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T, Suzuki K, Tsuta K, Matsuno Y, Noguchi M, Shimizu E, Yokota J. Whole genome comparison of allelic imbalance between noninvasive and invasive small-sized lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 69:1615-1623, 2009.
 - 12) Medina PP, Castillo SD, Blanco S, Sanz-Garcia M, Largo C, Alvarez S, Yokota J, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Clevers HC, Cigudosa JC, Lazo PA, Sanchez-Cespedes M. The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum Mol Genet*, in press, 2009.
 - 13) Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, Karam R, Carrico R, Serz J, Kaurah P, Xiaogang W, Yokota J, Carneiro F, Huntsman D, Seruca R. Quantification of epigenetic and genetic second hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterol*, in press, 2009.
 - 14) Blance R, Iwakawa R, Tang M, Kohno T, Angulo B, Pio R, Montuenga LM, Minna JD, Yokota J, Sanchez-Cespedes, M. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2009.
 - 15) Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, Motimoto Y, Kuroiwa T, Mizukami J, Umeda T, Noguchi T, Naguro I, Nishitoh H, Saegusa K, Tobiume K, Homma T, Shimada Y, Tsuda H, Aiko S, Imoto I, Inazawa J, Chiba K, Karnei Y, Kozuma S, Taketani Y, Matsuzawa A, Ichijo H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J*, 2009 [Epub ahead of print]
 - 16) Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer. a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol*. 2009 [Epub ahead of print]
 - 17) Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of akt. *Cell* 136:535-550, 2009
 - 18) Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis* 99:1940-1949, 2009.
 - 19) Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 284:3334-3344, 2008.
 - 20) Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Jaeduk Yoshimura Noh, Ito K, Imoto I, Inazawa J. *ITCH* is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 99:1940-1949, 2008.
 - 21) Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization. its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*, 14:5531-5539, 2008
 - 22) Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res*, 14:5348-5356, 2008.
 - 23) Katsuki Y, Nakada S, Yokoyama T, Imoto I, Inazawa J, Nagasawa M, Mizutani S. Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes. *Cancer Sci*, 99:1539-1545, 2008.
 - 24) Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Inazawa J, Okanoue T. Activation of B-Myb

- by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 38:886-895, 2008.
- 25) Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K. Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 37:1047-1053, 2008.
 - 26) Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res*, 68:5067-5075, 2008.
 - 27) 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 (MINRLA) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99:1390-1400, 2008.
 - 28) Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 68:2094-2105, 2008.
 - 29) Suzuki A, Shibata T, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 99:986-994, 2008.
 - 30) Tanaka S, Arii S, Yasen M, Moqushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg*, 95:611-619, 2008.
 - 31) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez BVJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF-(kappa)B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*, 111:5118-5129, 2008.
 - 32) 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.
 - 33) Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, Hirohashi S. Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in Gallbladder Cancer. *Gastroenterol*, 135:1358-1368, 2008.
 - 34) Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, Asamura H, Yamamoto M, Hirohashi S. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promotes malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:13568-13573, 2008.
 - 35) Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*, 14:5531-5539, 2008.
 - 36) Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H, Taya Y. Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular changes that are characteristic of the epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Cancer Res*, 68:5104-5112, 2008.
 - 37) Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuiji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Shibata T, Yamamoto Y, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*, 68:1303-1309, 2008.
 - 38) Suehara Y, Kondo T, Seki K, Shibata T, Fujii K, Gotoh M, Hasegawa T, Shimada Y, Sasako M, Shimoda T, Kurosawa H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S. Pftin, as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res*, 14:1707-1717, 2008.
 - 39) 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. *Br J Cancer*, 98: 418-425, 2008.
 - 40) Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 99:986-994, 2008.
 - 41) Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koefler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 94:213-223, 2008.
 - 42) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi

- T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, 455:971-974, 2008.
- 43) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, 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. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:11921-11926, 2008.
 - 44) Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*, 111:3286-3294, 2008.
 - 45) Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H, Scoles DR, Pavelka JC, Tran H, Miller CW, Kawamata N, Ginther C, Dering J, Sanada M, Nannya Y, Slamon DJ, Koeffler HP, Karlan BY. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. *J Clin Oncol*, 26:2952-2958, 2008.
 - 46) Dewan MZ, Takamatsu T, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Harutaka Katano H, Yamamoto N and Morishita K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ of Adult T-cell leukemia. *J Virol*, 82:11958-11963, 2008.
 - 47) Hidaka T, Nakahata S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112:383-393, 2008.
 - 48) Ishida YI, Yamashita K, Sasaki H, Takajou I, Kubuki Y, Morishita K, Tsubouchi H, Okayama A. Activation of complement system in adult T-cell leukemia (ATL) occurs mainly through lectin pathway: A serum proteomic approach using mass spectrometry. *Cancer Lett*, 271:167-177, 2008.
 - 49) Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem*, Epub 2008 Dec 1.
 - 50) 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*, 27:2583-2593, 2008.
 - 51) Tsuruga Y, Kivono T, Matsushita M, Takahashi T, Kasai N, Matsumoto S, Todo S. Effect of intrasplenic transplantation of immortalized human hepatocytes in the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure SCID mice. *Transplant Proc*, 40:617-619, 2008.
 - 52) Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kivono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. *Stem Cells*, 26:1695-1704, 2008.
 - 53) Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kivono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res*, 68:5699-5705, 2008.
 - 54) Tatsumi Y, Ezura K, Yoshida K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kivono T, Ohta S, Obuse C, Fujita M. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres. *Genes Cells*, 13:1045-1059, 2008.
 - 55) Sugimoto M, Inoko A, Shiromizu T, Nakayama M, Zou P, Yonemura S, Hayashi Y, Iizawa Y, Sasoh M, Uji Y, Kaibuchi K, Kivono T, Inagaki M. The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. *J Cell Biol*, 183:19-28, 2008.
 - 56) Oni H, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Saito M, Kivono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Med*, 23:229-236, 2009.
 - 57) Yugawa T, Kivono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*, in press, 2009.
 - 58) Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kivono T. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis*, in press, 2009.
 - 59) Hagiwara M, Ichihayashi N, Kimura BK, Murakami Y, Ito A. Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite

outgrowth. Am J Pathol, in press.

- 60) Ando K, Ohira M, Ozaki T, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. TSLC1 mapped top 11q23 is a candidate tumor suppressor in neuroblastoma. Int J Cancer, 123:2087-2094, 2008.
- 61) Overmeer RM, Snijders PJF, Claassen-Kramer D, Helmerhorst TJM, Berkhof J, Heideman DAM, Wiltink SM, Murakami Y, Ito A, Meijer CJLM, Steenbergen RDM. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC. J Pathol, 215:388-397, 2008.
- 62) Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF5 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. Cancer Sci, 99:986-994, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得
 - 1) 「口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法」、特願 2007-143110。
 - 2) 「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、特願 2007-143111。
 - 3) 「神経芽腫の悪性度を含めた検出方法、及び抑制方法」、特願 2007-169875。
 - 4) 「癌抑制剤」、特願 2005-309921。
 - 5) 「新規がん遺伝子 NRF2」、特願 2008-192876。
 - 6) 「PHLDA gene family は癌抑制能を持つ遺伝子である」、出願中。
 - 7) 「成人T細胞白血病診断薬」、特許第 4227881。
 - 8) 「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」、出願中。
 - 9) 「(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 2007-314466。
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

ゲノム網羅的に解析できる種々のアレイを用いて、肺がんでホモ欠失している 176 個の遺伝子を同定した。特に高頻度にホモ欠失していた PTPRD 遺伝子は遺伝子内の変異を持つ細胞もあり、強力ながん抑制遺伝子候補であると考えられた。また、予後不良な小型肺腺がんで高頻度にヘミ欠失している第 8 染色体短腕領域を同定した。SOX4 遺伝子が肺がんで高頻度に増幅している候補がん遺伝子であることを明らかにした。

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ホモ欠失領域やヘミ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、その機能や遺伝子増幅領域から候補遺伝子を絞り込み、発現・変異検索を行っている。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) 小型肺腺がんにおける染色体ヘミ欠失領域のゲノム網羅的解析、3) 肺がんの発生と進展に関与する新規遺伝子の同定、の3課題について研究を進めたので、それぞれの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

「Human CGH 185-k array」を用いて、27 例の肺がん細胞株を対象にゲノムコピー数の変化を解析した。昨年度までに「Mapping 100k array」を用いて検出した染色体ホモ欠失領域と合わせ、その領域内の遺伝子エクソンプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失遺伝子の詳細な解析を行った。

2) 小型肺腺がんにおける染色体ヘミ欠失領域のゲノム網羅的解析

小型肺腺がん 72 例を対象としてレーザーキャプチャーダイセクション法による腫瘍細胞の採取

及び DNA の抽出を行ない、「10k SNP array」を用いて染色体欠失のゲノム網羅的解析を行った。

3) 肺がんの発生と進展に関与する新規遺伝子の同定

cDNA microarray を用いて 8 例の肺がん細胞株における遺伝子増幅領域を探索し、増幅領域に存在した SOX4 遺伝子に関しては更に発現・変異解析を行った。更に種々のベクターを作製し、NIH3T3 細胞を用いてフォーカス形成アッセイを行なった。(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

昨年度までの本研究では、Affymetrix 社から発売された「Mapping 100k array」という DNA チップを用いて、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、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を明らかにした。本年度は、更に、「Human CGH 185-k array」を用いて、27 例の肺がん細胞株を対象にゲノムコピー数の変化を解析した。そして、75 例の肺がん細胞株を用いて、ホモ欠失が想定されたゲノム部位に存在する遺伝子のエクソンプライマーを用いて、Multiplex PCR 法により遺伝子レベルでのホモ欠失の有無を確認し、頻度と特異性を検討した。その結果、176 遺伝子がホモ欠失していることが確認された。これらのうち、171 個は蛋白質をコードする遺伝子で、他の 5 個は microRNA 遺伝子であった。また、これらの遺伝子は 17 の異なる染色体上の 45 のホモ欠失領域内

に存在した。ホモ欠失の頻度は、CDKN2A/p16、p14ARF、CDKN2B/p15を含む9p21領域であり、25%の細胞株で欠失していた。次に頻度が高かったのはPTPRD遺伝子で、11%(8/75)の細胞株でホモ欠失が見られた。その他、LRP1B、FHIT、KEAP1など、いくつかのがん抑制遺伝子や候補が抑制遺伝子も高頻度に欠失していた。

PTPRD遺伝子のホモ欠失が高頻度に検出されたので、さらにこの遺伝子のがん抑制遺伝子としての可能性を追求するため、すべてのエクソン領域の変異について、ダイレクトシーケンシング法で解析した。その結果、75例中8例の肺がん細胞株、95例中4例の手術検体で変異が検出された。また、PTPRD遺伝子の発現は細胞株の96%以上、臨床検体の85%(51/60)で減少していた。これらの結果から、PTPRD遺伝子は強力ながん抑制遺伝子候補と考えられた。更に、この結果は、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であることを示唆したので、現在、それらの遺伝子についても更に詳細な解析を進めている。

2) 小型肺腺がんにおける染色体ヘミ欠失領域のゲノム網羅的解析

がん抑制遺伝子の局在を明らかにするもう一つの手法として、「Mapping 10k array」を用いて臨床検体を用いた染色体ヘミ欠失のゲノム網羅的解析を行った。本研究では、様々な病態を示す肺腺がんのゲノム異常を組織型や浸潤性との関連で明らかにする目的で、72例の小型肺腺がんを対象とした。72例の内訳は、野口分類のA 6例、B 9例、C 40例、D 17例であり、タイプCは、浸潤や予後との関連を検討するため、進行がんや予後不良がんを多く選択した。染色体ヘミ欠失は上皮内がんより浸潤がん有意に多く検出された($p < 0.05$)。最も頻度の高かった欠失領域は13q13(58%)で、上皮内がんでは最も高頻度であり(53%)、また浸潤がんでも欠失頻度は高かった(60%)。11p、17p、18pには上皮内がんより浸潤がん有意に頻度が高い欠失領域があり($p < 0.01$)、浸潤がんより上皮内がん有意に頻度の高い欠失領域はみられなかった。また、8p21、11p11-p12、17p12-p13の欠失は病期の進んだがん、8p21の欠失は予後不良群で有意に頻度が高かった($p < 0.05$)。10k SNP arrayで検出した8p21の欠失は、同領域内の2つのマーカーに対するマイクロサテライト解析によっても確認され、40症例の追加によっても予後との相関は保たれていた。

3) 肺がんの発生と進展に関与する新規遺伝子の同定

新規肺がん関連遺伝子を単離・同定する目的で、スペインのDr. Sanchez-Cespedes等のグループと数年前より共同研究を行っている。昨年度の本研究では、LKB1遺伝子と同様に第19染色体短腕に存在するBRG1/SMARCA4遺伝子の失活変異が非小細胞がんの35%(13/37)、小細胞がんの5%(1/19)に存在することを明らかにした。本年度

は、7657遺伝子を搭載したcDNA microarrayを用いて、8例の肺がん細胞株における遺伝子増幅領域の探索を行った。その結果、5p13、6q21-22、17q21、19q13などに増幅領域を見出し、中でも6qの増幅が臨床検体でも高頻度に見られた。その領域内で増幅とともに発現上昇している標的遺伝子としてSry-HMG box gene SOX4 (sex-determining region Y box 4)を同定し、その発現上昇はNIH3T3細胞のコロニー形成能を増強することを明らかにした。

D. 考察

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で176個のホモ欠失遺伝子を同定し、小型肺腺がんにおけるヘミ欠失領域のゲノム網羅的解析で様々な染色体ヘミ欠失の共通領域を同定した。これらの共通ヘミ欠失領域内にはいくつかのホモ欠失遺伝子が存在していたので、これらの遺伝子のがん抑制遺伝子の強力な候補として、現在、発現や変異の解析を進めている。まだ高頻度に変異している遺伝子は同定されていないが、来年度中にいくつかの標的遺伝子を同定することを目指して研究の速度を上げているところである。

また、分担研究者の小川等は、SNP arrayのデータからゲノムコピー数を算出できるソフトウェアを開発しているので、これまでに得られた多くの肺がん細胞のSNP arrayの解析データを彼らの手法で解析し、染色体転座などを起こしている新たな標的遺伝子の同定も試みる予定である。

一方、ゲノム異常の細胞生物学的意義を明らかにする目的で、不死化肺上皮細胞を用いて多段階的な肺がんの進展過程を再現する研究は、分担研究者の清野等から2種の不死化細胞を供与していただき、変異KRAS導入細胞、p53あるいはLKB1のノックダウン細胞の作製を終了している。今後は、がん幹細胞化や上皮・間葉移行の観点から、細胞の性状の変化を検討するとともに、それぞれのゲノム異常に特異的な治療の分子標的を探索して行く予定である。

E. 結論

肺がんでホモ欠失している176個の遺伝子を同定した。高頻度にホモ欠失しているPTPRD遺伝子は遺伝子内の変異を持つ細胞もあり、強力ながん抑制遺伝子候補であると考えられた。予後不良肺腺がんを高頻度にヘミ欠失している第8染色体短腕領域を同定した。SOX4遺伝子が肺がんで高頻度に増幅している候補がん遺伝子であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, 29:617-622, 2008.
- 2) 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*, 13:483-495, 2008.
 - 3) Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, 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.
 - 4) 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.*, 68:3193-3203, 2008.
 - 5) 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*, 27:4788-4797, 2008.
 - 6) 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.*, 14:3746-3753, 2008.
 - 7) Hidaka, T., Nakahara, S., Hatakeyama, K., Hamasaki, M., Yamashita, K., Kohno, T., Arai, Y., Taki, T., Nishida, K., Okayama, A., Asada, Y., Yamaguchi, R., Tsubouchi, H., Yokota, J., Taniwaki, M., Higashi, Y., and Morishita, K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult-T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112:383-393, 2008.
 - 8) Ajima, R., Akazawa, H., Kodama, M., Takeshita, F., Otsuka, A., Kohno, T., Komuro, I., Ochiya, T., and Yokota, J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes to Cells*, 13:987-999, 2008.
 - 9) Yoneda, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Ajima, R., Yoshida, Y., Kakura, S., Sudo, K., Iwakawa, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K., Yokota, J. and Yamamoto, T. Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, 100:225-232, 2009.
 - 10) Shiraiishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Watanabe, S., Goto, K., Nishiwaki, Y., Shimada, Y., Hirose, H., Saito, I., Kuchiba, A., Yamamoto, S. and Yokota, J. Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis*, 30:65-70, 2009.
 - 11) Nakanishi, H., Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Tsuta, K., Matsuno, Y., Noguchi, M., Shimizu, E., and Yokota, J. Whole genome comparison of allelic imbalance between noninvasive and invasive small-sized lung adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 69:1615-1623, 2009.
 - 12) Medina, P. P., Castillo, S. D., Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Largo, C., Alvarez, S., Yokota, J., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Clevers, H. C., Cigudosa, J. C., Lazo, P. A., and Sanchez-Cespedes, M. The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum. Mol. Genet.*, in press, 2009.
 - 13) Oliveira, C., Sousa, S., Pinheiro, H., Karam, R., Carrico, R., Senz, J., Kaurah, P., Xiaogang, W., Yokota, J., Carneiro, F., Huntsman, D., and Seruca, R. Quantification of epigenetic and genetic second hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology*, in press, 2009.
 - 14) Blance, R., Iwakawa, R., Tang, M., Kohno, T., Angulo, B., Pio, R., Montuenga, L. M., Minna, J. D., Yokota, J. and Sanchez-Cespedes, M. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2009.
- G. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
癌の予後を予測するためのバイオマーカー、
特願 2008-311481、出願中
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
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 正常子宮頸部上皮細胞を用い子宮頸がんの*in vitro*多段階発がんモデルを作製し、子宮頸がん幹細胞様細胞株を樹立した。ヒト正常子宮頸部上皮細胞（HCK）にHPV16のE6とE7、活性型H-rasG12Vを導入すると、100万個の細胞移植でヌードマウス皮下に腫瘍を造った。さらに、c-mycを追加導入すると、少なくとも200個の細胞で造腫瘍性を示した。6人のヒト検体より得た独立のHCKで再現性が確認され、c-mycががん幹細胞性の維持に関わっていることが示唆された。次いで、卵巣がんの*in vitro*多段階発がんモデルを作製した。hTERT+変異CDK4+Cyclin D1により不死化した卵巣表層上皮細胞株に、変異p53, KrasG12V, c-myc, bcl-2を導入すると、ヌードマウス皮下で造腫瘍性を獲得し、SCIDマウス腹腔内で卵巣がんと同様の腹膜播種病変を生じた。特に、c-mycとbcl-2の協調の重要性が示唆された。

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あるいはレンチ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、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、種々の固形がんの多段階発がんモデル作製準備のため、培養皿上での増殖すら困難な細胞への遺伝子導入が可能な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解析法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾などの変化をWesternブロッティング法にて調べた。

(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。

マウスを用いた動物実験においては5Rの精神に基づき、国立がんセンター実験動物倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

ヒト子宮頸がん、ヒト上皮性卵巣が

んのin vitro多段階発がんモデルを作製し、その解析を進めた。ヒト子宮頸がんモデルは当初、hTERTのみで不死化した正常子宮頸部上皮細胞株

(HCK1T)を用いて解析したが、異なるドナー由来の初代培養細胞(HCK4, 7, 8, 9, 12)を用いて再現性の確認を進めた。いずれの場合もHCK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。HrasG12Vの導入によりc-Myc蛋白の半減期は延長し増加していた。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、少なくとも200個の細胞を皮下移植によって腫瘍を形成した。これらの細胞にE6やE7をノックダウンすると平皿上での増殖すら困難になった。E6とE7を導入せずにHrasG12Vやc-mycを導入すると細胞死が誘導され、生き残った細胞も造腫瘍性を示さなかった。皮下移植時に細胞外基質(ECM)であるMatrigel \square を混ぜることでこれらの強い造腫瘍性は得られるが、HCK/E6E7/HrasG12V細胞単独では100万個の細胞を移植しても腫瘍を形成できなかった。また、無血清・低Ca培地であるEpiLife \square 培地を類似の培地であるInvitrogen社のK-SFM \square に替えると非アポトーシスによる細胞死が誘導され、生き残った細胞はHrasG12V, c-Mycの発現が低く、100万個の細胞をMatrigel \square と共に移植しても腫瘍を形成できなかった。逆にHCK/E6E7/HrasG12VあるいはHCK/E6E7/HrasG12V/c-Myc細胞を血清

入りのDMEM培地で培養しておくことと造腫瘍性はさらに亢進すること、EpiLifeに返すと造腫瘍性も元に戻った。

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。これらは大部分の細胞が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+KrasG12V+活性型Akt、あるいは変異p53+KrasG12V+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、後者の細胞はSCIDマウス腹腔内でヒト卵巣がんを思わせる腹膜播種病変像を呈した。c-mycの導入によってBcl-2の発現が低下し、低血清培地中でアポトーシスが誘導されるが、このアポトーシスはBcl-2の導入によりほぼ完全に抑制された。

D. 考察

4人のドナー由来の子宮頸部角化細胞を用いることで、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再現良く確かめられた。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。いずれの場合も200個の細胞移植により腫瘍を形成したことから、腫瘍形成細胞(TIC: tumor initiating cell)に富んだ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。c-Mycの高発現ががん幹細胞性の維持に重要であることが示唆され、c-Mycががん幹細胞を標的とした治療の良い分子標的であると考えられた。また、移植前の培地や移植時のECMの有無が造腫瘍性に大きな影響を与えたことから、がん幹細胞を直接標的とした治療の他に、がん幹細胞の微少環境あるいはNicheを標的とした治療も有効であることが示唆された。今後ECMががん幹細胞性の維持に関わる機構を明らかにすることでNicheを標的とした治療の分子標的が同定できると考えられる。

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に成功した。hTERT+変異cdk4+cyclin Dで不死化した卵巣表層上皮細胞(HOSE1, HOSE2)に変異p53+KrasG12V+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+KrasG12V+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。c-mycの発現によりBcl-2レベルが低下しアポトーシス感受性になること、Bcl-2の導入によりアポトーシス抵抗性になること、多くの上皮性卵巣がんではBcl-2が高発現していることからBcl-2は上皮性卵巣がんの良い分子標

的であることが示唆された。子宮頸がんの起源細胞である扁平重層上皮の基底細胞ではBcl-2が高発現していること、E6にはp53非依存性のアポトーシスを抑制する活性が知られており、これらが、子宮頸がんと卵巣がんにおいて必要ながん遺伝子の種類と数の特異性を規定している可能性が推測された。

現在、HPV陽性ならびに陰性の口腔がんや食道がん、肺がんの*in vitro*発がんモデル作製を進めている。また、これまで困難であった消化管上皮の不死化にも取り組み始めており、今後、異なる細胞種間での多段階発がん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が、今年度の研究においても有効性の一端が示された。

E. 結論

子宮内膜がん、子宮頸がんにおいて上皮性卵巣がんの*in vitro*多段階発がんモデルを作製し、その解析を進めた。ヒト子宮頸がんの*in vitro*多段階発がんモデルでは、hTERTのみで不死化した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(HCK4, 7, 8, 9, 12)を用いて確認した。いずれもHPV16のE6, E7に加えHrasG12Vを導入すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得した。さらにc-mycを導入することで著しい造腫瘍能の亢進が見られ、がん幹細胞様の性質を獲得した。c-mycの高発現が幹細胞

性の維持に重要であることが示唆され、がん幹細胞を標的とした治療の良い分子標的候補であることが示唆された。

卵巣がんの*in vitro*モデル作製ではp53経路、pRb経路の不活化に加え活性化RasとMycのみでは造腫瘍性が得られず、さらにBcl-2が必要であった。多くの上皮性卵巣がんではBcl-2が高発現していることからc-Mycに加えBcl-2は上皮性卵巣がんの良い分子標的であることが示唆された。

これらのモデルではヒト正常細胞を出発点にすることで、マウスではできない、実際のヒトがんにも極めて近い解析・評価が可能である。これまでに得られた3つのがんの*in vitro*モデル作製の結果からも、本研究計画の有効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

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*. 27:2583-93, 2008.

Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, Takahashi T, Kasai N, Matsumoto S, Todo S. Effect of intrasplenic transplantation of immortalized human hepatocytes in the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure SCID mice. *Transplant Proc*. 40:617-9, 2008.

Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. *Stem Cells*. 26:1695-704, 2008.

Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res*. 68: 5699-705, 2008.

Tatsumi Y, Ezura K, Yoshida K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Ohta S, Obuse C, Fujita M. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres. *Genes Cells*. 13:1045-59, 2008.

Sugimoto M, Inoko A, Shiromizu T, Nakayama M, Zou P, Yonemura S, Hayashi Y, Izawa Y, Sasoh M, Uji Y, Kaibuchi K, Kiyono T, Inagaki M. The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. *J. Cell Biol*. 183: 19-28, 2008.

Omi H, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Saito M, Kiyono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation *Int J Mol Med* 23: 229-236, 2009.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*. In press.

Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis*. in press, 2009.

2. 学会発表

Kiyono T. An in vitro multi-step carcinogenesis model for HPV-associated human cancer. International Symposium on Tumor Biology (Kanazawa), 2009.

Kiyono T. An in vitro multi-step carcinogenesis model for HPV-associated human cancers. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research (Guangzhou), 2008.

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