

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる  
分子病態の解析とその臨床応用

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 立 松 正 衛

平成21（2009）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用  
研究代表者 立松正衛 ..... 1

### II. 分担研究報告

1. 消化器がんの発生・発育・進展に関わる分子病態の解析 ..... 15  
立松正衛 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部)
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 ..... 19  
瀬戸加大 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究 ..... 23  
関戸好孝 (愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部)
4. 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 ..... 28  
稲垣昌樹 (愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部)

# I. 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

研究代表者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：本研究では、ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用をめざし(a) 消化器がんの進展・転移の分子病態、(b) 造血器腫瘍および(c) 肺がんなどの難治がんにおける遺伝子異常、ならびに(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解析を行い、本年度の主たる成果は以下のごとく得られた。

(a) 1) 大腸がん患者から高転移性の低分化型腺がん細胞株 (COLM-5) を樹立し、本株が EGFR, HER2 高発現、HER3 低発現を示し、Gefitinib 等に対し高感受性を示すことを明らかにした。2) COLM-5 細胞の Gefitinib 高感受性はアポトーシス誘導よりも P27<sup>Kip1</sup> (以下 P27) 誘導を介した細胞周期停止(G1 期)によること、3) この P27 誘導は Loss of HER3 による下流の PI3K/Akt シグナル低下が主たる原因であることを HER3 発現誘導により P27 発現が減少し、Gefitinib 感受性が低下することを証明することにより明らかにした。4) 低分化型大腸がん臨床症例 30 例の HER family の発現を検討し、EGFR+/HER2+/HER3-を示す低分化型大腸がんは全体の約 40% を占め稀ではないことを明らかにした。

(b) 眼付臓器 MALT リンパ腫に高頻度に認められる 6q23.3 欠失領域の責任遺伝子が TNFAIP3(A20)であることを明らかにし、他の悪性リンパ腫についても欠失の有無を検討したところマントル細胞リンパ腫(31%)、DLBCL(38%)など他の B 細胞性リンパ腫にも認められることを明らかにし、他の悪性リンパ腫の発症にも関与することを明らかにした。また、末梢性 T 細胞リンパ腫分類不能型(PTCL-U)の約半数にゲノム異常が存在し、ATLL リンパ腫型とよく似ていることを明らかにした。

(c) 胸部腫瘍における病理組織型や遺伝子異常の有無による DNA メチル化異常の違いを明らかにし、メチル化異常も標的に含めた分子標的治療法を開発する目的で非小細胞肺がんにおける DNA メチル化異常を網羅的に検討した。本年度は昨年度の 17 例に加え、新たに 31 例の肺がん臨床検体を MCA-マイクロアレイ法を用いて 6157 遺伝子のプロモーター領域を解析した。EGFR 変異 (-) 非小細胞肺がん群で DNA メチル化異常の高度な蓄積が認められ、EGFR 遺伝子異常の有無により DNA メチル化の違いが存在することが明らかになった。EGFR 変異 (-) の肺がんはエビジェネティクス治療薬の効果がより期待されることが示唆された。

(d)新規ケラチン結合タンパク質アルマトロスおよびトリコブレインの細胞間接着および中心体機能の解析について以下の進展を見た。アルマトロスは Par3 と複合体を作り、細胞間接着装置複合体および細胞ラテラル（側面）ドメインの形成・維持をしていた。ケラチンはアルマトロス蛋白質を安定化し、細胞間接着装置複合体の形成・維持に促進的に働くことがわかった。トリコブレインは細胞間にも局在するが、母中心小体遠位端ではナインを介した微小管の係留を行っていた。また、母中心小体遠位端からは一次線毛が休止期の細胞において生じる。トリコブレインはオーロラ-A キナーゼを直接活性化することで、増殖期における一次線毛の形成を抑制していることが明らかになった

分担研究者	所属施設名	職名
立松正衛	愛知県がんセンター研究所	副所長
瀬戸加太	愛知県がんセンター研究所	部長
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長

#### A. 研究目的

(a)低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)の樹立とその EGFR 標的薬感受性と Gefitinib 感受性の分子機構の解析

(b) 眼付属器 MALT リンパ腫に高頻度に認める 6q23.3 欠失領域責任遺伝子 NFAIP3 の他の病型の悪性リンパ腫における関与と末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式をアレイ CGH 法で検討し、疾患の分子病態を解明する

(c)非小細胞肺癌において増殖・進展に伴って多くの遺伝子が DNA メチル化によって不活化され異常が蓄積されていくことが示されている。一方、非小細胞肺癌では 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も明らかになっている。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、非小細胞肺癌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について解析を進め、

どのタイプの非小細胞肺癌がエピジェネティクス治療薬の単独あるいは併用療法による対象となりうるかについて検討を進める。

(d) 上皮細胞の極性形成・維持の調節機構の研究では、ケラチン（中間径フィラメント）細胞骨格系およびその結合蛋白質の視点から行われた研究が立ち遅れていた。新規ケラチン結合蛋白質分子群として、トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン（TPHD）を有するアルマトロス、トリコブレインを同定した。そこで、これらの分子の分化と増殖状態のそれぞれにおける細胞機能制御を検討し、さらに、TPHD 分子群の解析を通して得られる結果を既知の知見と統合し、細胞分化と増殖の二律背反を分子レベルで理解する。

#### B. 研究方法

(a) 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)を樹立し、in vivo の皮下腫瘍モデルおよび腹膜・肺転移モデルを作成し、これらを用いて Gefitinib, Cetuximab に対する感受性とその分子機構を明らかにし新しい分子標的治療法を構築する。さらに、低分化型大腸がん症例の原発巣 30 例と対照として分化



型大腸がん症例の原発巣 38 例のホルマリン、パラフィンブロックを用いて EGFR, HER2 および HER3 の発現を免疫染色により検討し、低分化型大腸がん症例における Loss of HER3 の頻度等を明らかにする。

(b) TNFAIP3 の他の病型の悪性リンパ腫における関与の検索のため、これまでに解析した 400 症例近くのアレイ CGH データにおいて、6q23.3 領域のゲノム異常を詳細に検討し、各疾患単位ごとに頻度を調べる。また末梢性 T 細胞リンパ腫分類不能型 (PTCL-U) 症例を、アレイ CGH 法によるゲノム異常様式、臨床病態、免疫病理組織学的解析結果と相関させ、臨床的に意義のある疾患単位の有無を検討する。

(c) 昨年度解析した肺腺がん 17 例に加え、新たに 31 例の非小細胞肺癌症例由来のゲノム DNA を用いた。計 48 例の非小細胞肺癌患者の臨床病歴的背景は、(1) 年齢 65 歳未満 23 例、65 歳以上 25 例、(2) 女性 13 例、男性 35 例、(3) 腺がん 37 例、扁平上皮がん 11 例、(4) 喫煙者 20 例、非喫煙者 28 例であった。腫瘍から抽出したゲノム DNA を用い、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 にラベル化した後、カスタマイズしたアジレント社のプロモーターアレ

イ (17K) にハイブリダイズさせそのシグナルを検出した。さらに、Epidermal growth factor receptor (EGFR) 上皮成長因子受容体遺伝子はエクソン 18-21 についての変異有無と DNA メチル化との関連について解析を行った。

(d) については以下の 4 項目について検索を進めた。

1. アルバトロスおよびトリコプレインの細胞内局在の解析では、それぞれに特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を確認した。また、細胞間接着装置あるいは中心体分画を調整しそのイムノプロットを用い、生化学的にも局在を検討した。
2. アルバトロス、トリコプレインおよびケラチンの細胞内機能の解析では、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 肺がん上皮細胞に導入し、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。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、アルバトロスの変化をイムノプロット、免疫染色および RT-PCR により検討した。また、トリコプレイン、ナイニン、OdF2、オーロラ-A キナーゼについては siRNA を用いた RNA 干渉法を HeLa あるいは RPE1 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検討した。一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。
3. 分子間結合の解析には、イーストハイブリッド法、免疫沈降法、リコンビナント精製蛋白質による *in vitro* 結合実験を適宜行った。
4. オーロラ-A キナーゼの検討には、HeLa 細胞を用い、トリコプレインとオー

ロラ-A の共発現によるオーロラ A リン酸化 (pT288) の変化を検討し、in vitro のキナーゼ活性変化はトリコブレインとオーロラ-A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン H3 を基質にすることで検討した。

#### (倫理面への配慮)

実験に用いた患者検体は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会および名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。またレトロウィルス等を用いた実験は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたプロトコルに基づき、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をとった。

### C. 研究結果

(a)については、以下の4項目の結果が得られた。

#### 1. 低分化型大腸がん細胞株の樹立とEGFR 標的薬感受性

大腸がん患者肝転移巣から系統的に多数の細胞株の樹立を行ない、この中から転移性を有する低分化型腺がん細胞株(COLM-5)を樹立した。本株はヌードマウスにおいて皮下腫瘍ならびに腹膜転移、実験的肺転移、リンパ節転移等多臓器転移能を有していた。次に本株の Gefitinib 感受性を in vitro, in vivo の両面から検討した。その結果、Gefitinib による in vitro における増殖抑制は比較的軽微で、有意なアポトーシス誘導は見られず、P27 誘導を介した細胞周期停止(G1期)が認められた。一方、ヌードマウスの皮下腫瘍、腹膜・肺転移は

Gefitinib により顕著に抑制され、腫瘍組織中のS期細胞の減少、P27 蛋白質の核移行像を認め、in vivo においても細胞周期G1期停止が高感受性の主たる要因であることが明らかとなった。

#### 2. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)を用いた gefitinib 感受性機構の解析と分子標的治療法の開発

COLM-5 細胞は EGFR+/HER2+/HER3- (Loss of HER3) という特徴的な HER 発現パターンを示し、このため下流の PI3K/Akt シグナルは弱く、Gefitinib により Akt シグナルは容易にブロックされた。P27 は Akt の基質として Akt により転写レベルならび翻訳後修飾レベルで negative に制御されていることが知られていることから、Loss of HER3 が Akt を介して P27 誘導に促進的に作用し、Gefitinib 感受性増強に関与している可能性が示唆された。そこで Sodium butyrate (NaBT) により HER3 発現を強制誘導したところ、Akt シグナルは活性化され、P27 発現は低下し、Gefitinib 感受性が低下した。このことから Loss of HER3 が COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性増強に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、上記の仮説が他の低分化型大腸がん細胞株にも当てはまるか否かを同じく Loss of HER3 を示す RKO 細胞を用いて検討した。しかし、予想に反して RKO 細胞は Gefitinib 抵抗性であった。そこで両細胞の HER family の発現の違いを検討したところ、RKO 細胞は COLM-5 細胞と異なり HER2 発現も著しく低下 (Loss of HER2) していることが明らかとなった。HER2 を強制的に高発現させると Gefitinib 感受性が増強されることは肺がん細胞で知られており、また HER2 過剰発現乳がん細胞は一般に Gefitinib 高感受性であることが知ら



れていることから、RKO 細胞の Gefitinib 抵抗性は HER2, HER3 同時欠損により HER2/HER3 のヘテロダイマー形成ができず、下流の PI3K/Akt シグナル経路が機能しないため Gefitinib による Akt を介した P27 誘導が起こらないことが原因と考えられる。このことから Gefitinib 感受性の獲得には HER2 の発現が必要であり、RKO 細胞の様に EGFR+/HER2-/HER3- ではなく、EGFR+/HER2+/HER3- パターンを示す低分化型大腸がん細胞が高感受性を示し、EGFR 薬の標的となる可能性が強く示唆された。

### 3. 低分化型大腸がん原発巣における HER family 発現の免疫組織学的解析

COLM-5 細胞の様に EGFR+/HER2+/HER3- パターンを示す低分化型大腸がん細胞が実際の臨床症例のなかでどれくらいの頻度で存在するのかを明らかにするために原発巣における EGFR, HER2, HER3 の発現を免疫組織染色により検討した。低分化型大腸がん症例 (PD) 30 例および分化型大腸がん症例 (WMD) 38 例の HER family の発現を検討したところ、EGFR の発現は WMD 症例が 78%、PD 症例が 71% でほぼ拮抗したが、強陽性例に限るとむしろ PD 症例の方が陽性率は 46% と高かった。一方、HER2 発現は WMD 症例が 84%、PD 症例が 46% と PD 症例が低く、また HER3 発現は WMD 症例が 70%、PD 症例が 12% で、PD 症例では HER3 陰性例が圧倒的に頻度が高かった。発現の組み合わせでは COLM-5 細胞と同じ EGFR+/HER2+/HER3- 形質を示す低分化型大腸がんは PD 症例全体の 37% を占め、決して minor なタイプではなく、むしろ major なサブタイプであることが明らかとなった。このことから EGFR+/HER2+/HER3- 形質を示す低分化型大腸がんが臨床的にも Gefitinib や

Cetuximab などの EGFR 標的薬の新たな治療のターゲットになりうる可能性が示唆された。

(b) については、以下の 2 項目の結果が得られた。

### 1. TNFAIP3 の他の病型の悪性リンパ腫における関与

これまでに解析した約 400 症例の悪性リンパ腫のアレイ CGH データを検討し、6q23.3 欠失の頻度を調べたところ、T 細胞性リンパ腫 (ATLL, PTCL-U) では 119 例中 11 症例 (9.2%) と低かったが、マンツル細胞リンパ腫 (MCL) では、29 症例中 9 例 (31%)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) では、102 症例中 38 例 (39%) と高頻度に認められた。このことは、MCL と DLBCL では TNFAIP3 ががん抑制遺伝子として機能していることを示唆する。DLBCL の中では、ABC 型 14/28 例 (50%) と、半数に欠失が認められ、GCB 型 4/18 例 (22%) の頻度とは異なることが明らかになった。

### 2. PTCL-U のゲノム異常様式の解析

PTCL-U 51 症例について、アレイ CGH 報を用いてゲノム異常様式を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が見出された。それらをまとめてゲノム異常の頻度を調べると、ATLL リンパ腫型のゲノム異常様式とよく似ていた。それらの病理形態学的特徴は、核は大型で異型性 (Pleomorphic) に富み、多くの症例が CCR4 陽性であった。一方、ゲノム異常が認められない症例は炎症性成分に富み、多くが CCR3 陽性であった。前者の組織像と免疫組織の結果は、ATLL リンパ腫型と良く似ており、HTLV-1 ウイルスの有無以外では区別がつかないことが明らかとなった。後者は、血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫 (Angio-immunoblastic T-cell lymphoma)



の組織像と良く似ていた。また、予後解析では PTCL-U のゲノム異常の認められる群は ATLL リンパ腫型と同様、予後不良であった。

(c) 昨年度に施行した非小細胞肺癌 17 例に加え、31 例を新たに解析した。網羅的 DNA メチル化解析は MCA-マイクロアレイ法を用い、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 6157 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。平均メチル化標的遺伝子数は 11 例の扁平上皮がん 738 個、37 例の腺がん 550 遺伝子であり、有意差をもって前者におけるメチル化遺伝子数が多かった ( $P=0.03$ )。また、EGFR 変異に関しては、EGFR 変異 (-) は 32 例、EGFR 変異 (+) は 16 例であった。37 例の肺腺がんに着目したところ、EGFR 変異(-)群 21 例で平均メチル化遺伝子数は 672 個、変異 (+) 群 16 例で遺伝子数は 389 個で前者の方で有意にメチル化遺伝子数が多かった ( $P<0.0001$ )。

(d)については、以下の成果が得られた。

#### 1. アルバトロスの細胞内機能の解析

上皮細胞において RNA 干渉法によりアルバトロスをノックダウンさせたところ、細胞間における接着装置複合体の構成分子および Par3 の局在化と接着能、ラテラルドメイン分子の局在化が障害されていた。しかしアピカルのエズリン、微絨毛は障害されなかった。Par3 とアルバトロスの結合は免疫沈降により示された。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、アピカル分子エズリンの局在化が障害された。さらに、SW13 ケラチン欠損上皮株ではアルバトロス、細胞間接着装置複合体分子および

Par3 の細胞間への集積が弱い、ケラチンの強制発現により、その回復およびアルバトロス蛋白質の安定化を確認できた。

#### 2. トリコブレインの細胞内機能の解析

トリコブレインの細胞内局在については、極性化した上皮細胞ではケラチンフィラメント上と細胞間接着部位にあるが、増殖中の細胞では母中心小体の遠位端に優位にあることを見出した。母中心小体の機能は、遠位端での微小管の保留と一次線毛形成が知られている。そこで、RNA 干渉法によりトリコブレインを HeLa 細胞でノックダウンし、免疫染色と微小管再生実験を行ったところ、母中心小体 appendage へのナイニンの局在化障害とそれによる微小管保留の障害が確認された。トリコブレインとナイニンの結合は、イーストハイブリッド法および免疫沈降法により示された。また、一次線毛が増殖停止により形成されると RPE1 細胞ではトリコブレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコブレインを強制発現すると、一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態でトリコブレインノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。この時オーロラ-A の活性化の指標である T288 のリン酸化は免疫染色およびイムノプロットで減弱した。この一次線毛形成はオーロラ-A ノックダウンでも見られた。さらに、トリコブレインとオーロラ-A キナーゼの直接結合が *in vitro* で確認され、*in vitro* キナーゼアッセイにより、トリコブレインがオーロラ-A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。

#### D. 考察

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用において、大腸がんの多くは分化型腺がんであり、多段階変異

により APC, beta catenin, K-Ras, p53 の変異や LOH、さらに MSI 等の種々の変異が積み重なって腺腫からがんさらに転移性がんへと進展してゆくものと考えられている。一方、低分化型大腸がんの発がん機構は分化型のそれとは異なることが報告されているが、胃がんと異なり頻度が低いため、発がん機構には不明な点が多い。しかし、低分化型大腸がんは一般に転移性が高く、化学療法抵抗性で、大腸がんの中で最も予後不良の疾患であり、また効果的な治療法がないのが現状であり、発がん機構の解明とならんで、低分化型大腸がんに対する新しい治療法の開発は大腸がんの重要な課題のひとつとなっている。大腸がん低分化型腺がんの研究が遅れている原因のひとつは低分化型腺がん細胞株が世界的にみてもたかだか数株しかなく、きわめて少ないことが挙げられる。今回、新たに樹立した低分化型大腸がん由来細胞株 COLM-5 細胞株で大腸低分化型腺がんの臨床的特徴をよく反映しており、しかも Gefitinib 感受性を有する点で世界初であり極めて有用性が高い細胞株といえる。

本株の Gefitinib 感受性を考えるうえで大きな特徴は HER3 の発現が極めて低レベルであり (Loss of HER3)、FACS や Western blot では殆ど痕跡程度しか検出できないことである。この原因に関して詳細は不明であるが、Sodium butyrate や 5-Aza cytidine により発現が誘導されることからメチル化による gene サイレンシングがすくなくとも一部は関与しているもの考えられる。HER3 は他の HER family メンバーと異なり、細胞内のチロシンキナーゼが不活性化のため、EGFR や HER2 とヘテロダイマーを形成し、Transphosphorylation を受けるなければ自分自身だけでは下流にシグナルを伝達することができない。しかし、

C 末端に PI3Kp85 に対するドッキングサイトを持ち、PI3K/Akt シグナル経路の活性化に極めて重要な役割を果たしている。これまでいくつかのがんで HER2 の過剰発現や HER3 の高発現が Gefitinib などの分子標的薬に対する耐性に関連するという報告がなされている。これは HER2/HER3 の高発現によりヘテロダイマーの形成が促進され、PI3K/Akt 経路が構成的に活性化されるため

Gefitinib 等による上記経路の効果的なブロックが困難であることに起因すると考えられる。これに対し、COLM-5 細胞では逆に HER3 の発現レベルが低いいため、Gefitinib 等による Akt シグナル経路の効果的なブロックが容易なため、Gefitinib により P27 が発現誘導され、G1 期に細胞周期が停止するものと考えられる。一方、HER3 とならんで HER2 の発現レベルも同時に低い RKO 細胞では HER2/HER3 ヘテロダイマーの形成が全くできないため、PI3K/Akt 経路は構成的に不活化されており、Gefitinib に不応性となり、P27 も発現誘導されず、従って Gefitinib 抵抗性を示すものと考えられる。以上のことから、Loss of HER3 は低分化型大腸がんの gefitinib 感受性の必要条件ではあるがこれのみでは十分ではなく、COLM-5 細胞の様に HER2/HER3 ヘテロダイマーの形成が可能な程度に HER2 が発現していることが必要と考えられる。言い換えると、低分化型大腸がんでは RKO 細胞の様な HER2-/HER3-パターンではなく、COLM-5 細胞の様な HER2+/HER3-パターンが Gefitinib の感受性予測マーカーになりうる可能性が高いものと考えられる。

一方、分化型大腸がんは HER3 の発現陽性頻度が極めて高く、EGFR+/HER2+/HER3+ パターンを示すがんが多い。このことが恒常的な



HER3/PI3K/Aktシグナル経路の活性化をもたらし、Gefitinib不応性のひとつの原因になっているものと考えられる。従って、HER3の発現を抗体等によりブロックすることによりCOLM-5細胞の様に感受性を獲得できる可能性がある。実際、一部のがんにおいてHER3抗体によりGefitinib感受性が亢進することが報告されており、この点について現在、予備的な検討を進めている。(b)造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割において、

#### 1. TNFAIP3 の他の病型の悪性リンパ腫における関与

眼付属器 MALT リンパ腫症例に高頻度に認められた 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った。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ことが知られていたが、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。

今回、他の病型の悪性リンパ腫で検討すると、T 細胞リンパ腫ではあまり異常が認められなかったものの、MCL と DLBCL で眼付属器 MALT リンパ腫と同程度に頻度高く 6q23.3 領域の欠失が認められ、TNFAIP3 遺伝子がこれらの悪性リンパ腫の発症や病態に関与していることが明らかになったのは意義が高い。DLBCL のうちの ABC 型でより頻度が高いのは、GCB 型と ABC 型で発症に関与する役割が異なることを示唆し、今後、治療方針の決定などに反省される可能性がある。

#### 2. PTCL-U のゲノム異常様式の解析

PTCL-U のうち、ゲノム異常がある群とゲノム異常の無い群では組織像が異なり、

疾患単位としては異なっていることが示唆された。また、ATLL リンパ腫型と PTCL-U ゲノム異常陽性群が良く似ていることは、T 細胞性リンパ腫の形成に同じ遺伝子異常が関与することが明らかとなった。また、PTCL-U 内での異なった疾患単位が存在することが示唆されたことは、治療方針が同一であることは必ずしも正しいことではなく、慎重に考慮されるべきであることが示唆された。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している。

(c) 肺がんなどの難治がんにおける遺伝子異常に関して、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・マイクロアレイ法を用いて非小細胞肺がんを解析し、そのメチル化異常の標的遺伝子数に関して、臨床病理学およびEGFR遺伝子変異の有無による比較検討を行った。解析の結果、非小細胞肺がんにおいて組織型、EGFR変異の有無によってメチル化遺伝子数に有意な差が認められた。特にEGFR変異をもつ肺腺がんではEGFR変異が発がんの初期において鍵となる遺伝子異常であると想定されるため、メチル化の蓄積はあまり顕著とならないのではないかと考えられた一方、EGFR変異のない肺がんではDNAメチル化の異常の蓄積が発がんの重要なファクターになることが強く示唆された。また、EGFR変異(-)群で不活化されている遺伝子の中には、EGFRのシグナル伝達経路の下流分子をコードしている遺伝子も複数見つかかり、肺腺がんの発生にはEGFR遺伝子そのもののジェネティック変異、あるいは下流遺伝子のエピジェネティック異常のどちらかのメカニズムでEGFRシグナル



伝達経路が活性化することが重要であることが示唆された。さらに、本研究結果により、EGFR変異のない非小細胞肺癌細胞に対してDNA脱メチル化剤等のエピジェネティクス治療薬による単独あるいは併用療法による治療効果がより期待されるのではないかと考えられた。

(d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割に関して、アルバトロス、トリコブレインは TPHD 分子群に属し、細胞の分化相と増殖相に応じて細胞間接着部位あるいは中心体に局在する。アルバトロスの細胞間接着部位における機能解析結果より、極性化した上皮ではアルバトロス/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 はアピカル極性を制御する。セラチンはアルバトロス蛋白質を安定化し、細胞間接着装置複合体の形成・維持に促進的に働くことがわかった。トリコブレインの中心体機能解析結果より、トリコブレインはナイニンを介して微小管の母中心小体への係留を制御している。また、オーロラ-A を直接活性化することで、増殖期における一次線毛形成を抑制していることが明らかになった。今後、TPHD 分子群による上皮細胞構築制御の詳細な分子機構を明らかにするために、これらの結合蛋白質を検索し、そのアルバトロス、トリコブレインとの相互作用を細胞内機能、キナーゼ活性も含め検討していく必要がある。

## E. 結論

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 大腸がん患者から高転移性の低分化型腺がん細胞株 (COLM-5) を樹立し、本株が EGFR, HER2 高発現、HER3 低発

現を示し、Gefitinib 等 に対し高感受性を示すことを明らかにした。

(2) COLM-5 細胞の Gefitinib 高感受性はアポトーシス誘導よりも P27 誘導を介した細胞周期停止(G1 期)によることを明らかにした。

(3) この P27 誘導は Loss of HER3 による下流の PI3K/Akt シグナル低下が主たる原因であることを HER3 発現誘導により P27 発現が減少し、Gefitinib 感受性が低下することを証明することにより明らかにした。

(4) 低分化型大腸がん臨床症例 30 例の HER family の発現を検討し、EGFR+/HER2+/HER3-を示す低分化型大腸がんは全体の約 40% を占め稀ではないことを明らかにした。

1. 眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的な 6q23.3 領域の責任遺伝子は、TNFAIP3 は、MCL や DLBCL 特 に ABC 型に 関与することが明らかとなった。

2. 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が示唆された。また、予後不良な点も良く似ており、HTLV-1 の関与以外に差異は見出しにくいことが明らかとなった。

非小細胞肺癌において DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析を行った結果、組織型・EGFR 変異の有無で標的メチル化遺伝子の数が異なることが明らかとなった。EGFR 変異を伴わない肺がん腫瘍組織で DNA メチル化が多数検出され、DNA メチル化異常の蓄積は EGFR 変異を伴わない肺がんの発生においては EGFR 変異を補完する異常である可能性が示唆された。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検討が必要であると考えられた。

発がんに関わりの深い上皮細胞の極性形成・維持の調節機構の研究では、アクチンや微小管細胞骨格系の視点によるものに比べ、ケラチン（中間径フィラメント）細胞骨格系およびその結合蛋白質の視点から行われた研究が立ち遅れていた。私どもは、新規ケラチン結合蛋白質分子群として、トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン（TPHD）を有するアルパトロス、トリコブレインを同定し、これらが分化と増殖の変換に伴って異なった上皮細胞機能を制御することを見出した。さらに、TPHD 分子群の解析を通して得られる結果を既知の知見と統合していくことは、細胞分化と増殖の二律背反を分子レベルで理解する一助なり、がん研究における新たな視点からの標的分子特定への1つの突破口を提供する可能性を持つと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ogasawara N, Tsukamoto T, Mizoshita T, Inada KI, Ban H, Kondo S, Takasu S, Ushijima T, Ito K, Ito Y, Ichinose M, Ogawa T, Joh T, Tatematsu M. RUNX3 expression correlates with chief cell

differentiation in human gastric cancers. *Histol Histopathol*, 24(1): 31-40. 2009

2. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T and Tatematsu M. Interleukin-2 potentiation of cetuximab anti-tumor activity for EGFR overexpressing gastric cancer xenografts via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci*, 99(7): 1471-1478, 2008
3. Nakanishi H., Kodera Y, Hara K, Yokoyama H, Matsui M, Tatematsu M, Ikehara Y, ErbB signaling in gastric and gastroesophageal junction cancers. (Review), *Targeted Proteins Database (TPdb)*, 1,[22640].10.2970/tpdb. 2009.219. 2008
4. Takasu S, Tsukamoto T, Cao XY, Toyoda T, Hirata A, Ban H, Yamamoto M, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Oshima M, Tatematsu M. Roles of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and beta-catenin activation in gastric carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea-treated K19-C2mE transgenic mice. *Cancer Sci*, 99(12):2356-2364. 2008
5. 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: 1-7, 2008.
6. 2. 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.
7. 3. Karube, K., Ying, G., Tagawa, H., Niino, D., Aoki, R., Kimura, Y., Hashikawa, K., Suefuji, N., Sugita, Y., Nomura, Y., Shimizu, K., Yoshida, S., Seto, M., Ohshima, K.: BCL6 gene amplification/3q27 gain is associated with unique clinicopathological characteristics among follicular lymphoma without BCL2 gene translocation. *Mod Pathol*, 21: 973-978, 2008.
  8. Tsukamoto, Y., Uchida, T., Karnan, S., Noguchi, T., Nguyen, LT., Tanigawa, M., Takeuchi, I., Matsuura, K., Hijiya, N., Nakada, C., Kishida, T., Ito, H., Murakami, K., Fujioka, T., Seto, M., Moriyama, M.: Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol*, 216: 471-482, 2008.
  9. Nakada, C., Matsuura, K., Tsukamoto, Y., Tanigawa, M., Yoshimoto, T., Narimatsu, T., Nguyen, LT., Hijiya, N., Uchida, T., Sato, F., Mimata, H., Seto, M., Moriyama, M.: Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant downregulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol*, 216: 418-427, 2008.
  10. Nakagawa, M., Nakagawa-Oshiro, A., Karnan, S., Tagawa, H., Utsunomiya, A., Nakamura, S., Takeuchi, I., Ohshima, K., Seto, M.: Array CGH analysis of PTCL-U reveals a distinct subgroup with genetic alterations similar to lymphoma-type ATLL. *Clin Cancer Res*, 15: 30-38, 2009.
  11. Takeuchi, I., Tagawa, H., Tsujikawa, A., Nakagawa, M., Katayama-Suguro, M., Guo, Y., Seto, M.: The potential of copy number gains and losses, detected by array-based comparative genomic hybridization, for computational differential diagnosis of B-cell lymphomas and genetic regions involved in lymphomagenesis. *Haematologica*, 94: 61-69, 2009.
  12. Lee, S-Y., Kumano, K., Nakazaki, K., Sanada, M., Matsumoto, A., Yamamoto, G., Nannya, Y., Suzuki, R., Ota, Satoshi., Ota, Y., Izutsu, K., Sakata-Yanagimoto, M., Hangaishi, A., Yagita, H., Fukayama, M., Seto, M., Kurokawa, M., Ogawa, S., Chiba, S: Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Science*, in press
  13. Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y: YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis*, 29: 2139-2146, 2008.
  14. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Natsume A, Goto Y, Ito M, Murakami H, Osada H, Zhang J, Issa JP, Sekido Y: Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*, 29: 1901-1910, 2008.
  15. Yamada T, Yano S, Ogino H, Ikuta K, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Kanematsu T, Taniguchi T, Sekido Y, Sone S: Lysophosphatidic acid stimulates the proliferation and motility of malignant pleural mesothelioma cells through lysophosphatidic acid receptors, LPA1 and LPA2. *Cancer Sci*, 99: 1603-1610, 2008.
  16. Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Bumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP:



- Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cell. *PLoS ONE*, 3: e2037, 2008.
17. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH, Issa JP: Gene silencing in cancer by Histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter methylation. *Nat Genet*, 40: 741-750, 2008.
  18. Shimizu J, Horio Y, Osada H, Hida T, Hasegawa Y, Shimokata K, Takahashi T, Sekido Y, Yatabe Y: mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. *Respirology*, 13: 510-517, 2008.
  19. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T: Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol*, 4: 5-11, 2009.
  20. Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Taniguchi T, Fujii M, Shinjo K, Kondo Y, Osada H, Shimokata K, Horio Y, Hasegawa Y, Hida T, Sekido Y: Activation of PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma. *Mol Med Reports*, in press.
  21. Li ZF, Wu X, Jiang Y, Liu J, Wu C, Inagaki M, Izawa I, Mizisin AP, Engvall E, Shelton GD. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J Neurol Sci*, 264: 77-86, 2008.
  22. Toyo-oka K, Mori D, Yano Y, Shiota M, Iwao H, Goto H, Inagaki M, Hiraiwa N, Muramatsu M, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A Hirotsune S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol*, 180: 1133-1147, 2008.
  23. Izawa I, Nishizawa M, Hayashi Y Inagaki M. Palmitoylation of ERBIN is required for its plasma membrane localization. *Genes Cells*, 13: 691-701, 2008.
  24. Lin YM, Chen YR, Lin JR, Wang WJ, Inoko A, Inagaki M, Wu YC, Chen RH. eIF3k regulates apoptosis in epithelial cells by releasing caspase 3 from keratin-containing inclusions. *J Cell Sci*, 121: 2382-2393, 2008.
  25. Sugimoto M, Inoko A, Shiromizu T, Nakayama M, Zou P, Yonemura S, Hayashi Y, Izawa I, 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.
  26. Ikegami Y, Goto H, Kiyono T, Enomoto M, Kasahara K, Tomono Y, Tozawa K, Morita A, Kohri K, Inagaki M. Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys Res Commun*, 377: 1227-1231, 2008.
- 2) 学会発表
1. 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- $\kappa$ B*. KeyStone Symposia NF-kappaB (B6), 2008, (カナダ) [ポスター (示説)] 2008.2.13-2.16

2. Nakagawa, M., Nakagawa-Oshiro, A., Tsuzuki, S., Utsunomiya, A., Seto, M: A Part of Acute-type ATLL Cases Has Genomic Imbalance in Common With Lymphoma-type ATLL. 第50回米国血液学会総会, 2008, (米国) [ポスター (示説)] 2008.12.6-12.9
3. Shinjo K, Kondo Y, Goto Y, An B, Fujii M, Murakami H, Osada H, Hasegawa Y, Sekido Y: Characteristic DNA methylation Profiling in Malignant Mesothelioma, AACR special conference in Cancer Research, Cancer Epigenetics, 2008 (Boston, MA, USA) (示説)
4. Kondo Y, Shen L, Cheng A, Ahmed S, Boumber Y, Sekido Y, Huang T, Issa JP: Gene Silencing in Cancer by Histone H3 Lysine 27 Tri-methylation Independent of Promoter DNA Methylation, AACR special conference in Cancer Research, Cancer Epigenetics, 2008 (Boston, MA, USA) (口演)
5. Shinjo K, Kondo Y, Goto Y, Yokoyama T, Yokoi K, Ito M, An B, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y: DNA Methylation Is Common Event in Non-small Cell Lung Cancer without EGFR Mutation. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases and The 3rd Annual Meeting of Asian Epigenome Alliance, 2008 (上海、中国) (示説)
6. Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kasahara K, Ikegami Y, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry. The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008, (San Francisc), [ポスター]
7. Inagaki M. Trichoplein regulates microtubule

anchoring and suppresses a cilia assembly program at the mother centriole. GCOE 国際シンポジウム, 2009, (名古屋), [シンポジウム]

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 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：12/068.434

公開日：2008年10月30日

公開番号：US-2008-026845-A1

出願国：米国

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)、

整理番号：03P00417US04

出願人：愛知県、日本ガイシ㈱

## II. 分 担 研 究 報 告 書



研究分担者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：大腸がんの多くは分化型腺がんであるが、5-10%の頻度で低分化型腺がんが存在する。本邦における大腸低分化型腺がんは一般に転移性が高く、従来の化学療法に抵抗性で予後不良な疾患であり、分子標的治療の開発が待たれている。本年度は EGFR 標的薬に対し高感受性を有する低分化型大腸がんの細胞株を世界に先駆けて樹立し、それを用いて抗腫瘍効果とその作用機構を解析し、以下の諸点を明らかにした。1) 大腸がん患者から樹立した低分化型腺がん細胞株 (COLM-5)は高転移性で EGFR, HER2 高発現、HER3 低発現(Loss of HER3)という特徴的な HER 発現パターンを示し、しかも Gefitinib, Cetuximab に対し高感受性を示すことを明らかにした。2) COLM-5 細胞の Gefitinib 高感受性はアポトーシス誘導よりも P27<sup>Kip1</sup>(以下 P27)誘導を介した細胞周期停止(G1 期)によること、3) また、HER3 を強制的に発現誘導させると Akt シグナルが増強、Gefitinib による P27 発現誘導が低下し、Gefitinib 感受性が低下することから、Loss of HER3 による下流の PI3K/Akt シグナル低下が Gefitinib による P27 発現誘導、すなわち高感受性の増強に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、4) 低分化型大腸がん臨床症例 30 例の HER family の発現を免疫組織学的に検討し、COLM-5 細胞と同じく EGFR+/HER2+/HER3- 発現パターンを示す低分化型大腸がんが全体の約 37%を占め、このタイプの大腸がんが低分化型大腸がんの主要なサブタイプのひとつであることを明らかにした。以上のことから EGFR+/HER2+/HER3- 発現パターンを示す低分化型大腸がんは EGFR 標的薬の新しい治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

1. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)の樹立と EGFR 標的薬感受性の検討
2. 上記、COLM-5 細胞株を用いた Gefitinib 感受性の分子機構の解析
3. 低分化型大腸がん臨床例の原発巣における HER family 発現の免疫組織学的解析

#### B. 研究方法

1. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)を樹立、*in vivo* の皮下腫瘍モデルおよび腹膜・肺転移モデルを作成し、これらを用いて Gefitinib, Cetuximab に対する感受性を検討する。
2. 上記 COLM-5 モデルを用いて Gefitinib に対する高感受性の分子機構を明らかにし、その分子基盤に基づき低分化型大腸がんに対する新しい分子標的治療法を構築する。
3. 低分化型大腸がん症例の原発巣 30 例と対照

として分化型大腸がん症例の原発巣 38 例のホルマリン、パラフィンブロックを用いて EGFR, HER2 および HER3 の発現を免疫染色により検討し、低分化型大腸がん症例における Loss of HER3 の頻度等を明らかにする。

### C. 研究結果

#### 1. 低分化型大腸がん細胞株の樹立と EGFR 標的薬感受性の検討

大腸がん患者肝転移巣から系統的に多数の細胞株の樹立を行ない、この中から転移性を有する低分化型腺がん細胞株(COLM-5)を樹立した。本株はヌードマウスにおいて皮下腫瘍ならびに腹膜転移、実験的肺転移、リンパ節転移等多臓器転移能を有していた。次に本株の Gefitinib 感受性を *in vitro*, *in vivo* の両面から検討した。その結果、Gefitinib による *in vitro* における増殖抑制は比較的軽微で、有意なアポトーシス誘導は見られず、P27 誘導を介した細胞周期停止(G1 期)が認められた。一方、ヌードマウスの皮下腫瘍、腹膜・肺転移は Gefitinib により顕著に抑制され、腫瘍組織中の S 期細胞の減少、P27 蛋白の移行像を認め、*in vivo* においても細胞周期 G1 期停止が高感受性の主たる要因であることが明らかとなった。

#### 2. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)を用いた gefitinib 感受性機構の解析と分子標的治療法の開発

COLM-5 細胞は EGFR+/HER2+/HER3- (Loss of HER3) という特徴的な HER 発現パターンを示し、

このため下流の PI3K/Akt シグナルは弱く、Gefitinib により Akt シグナルは容易にブロックされた。P27 は Akt の基質として Akt により転写レベルならび翻訳後修飾レベルで negative に制御されていることが知られていることから、Loss of HER3 が Akt を介して P27 誘導に促進的に作用し、Gefitinib 感受性

増強に関与している可能性が示唆された。そこで Sodium butyrate (NaBT) により HER3 発現を強制誘導したところ、Akt シグナルは活性化され、P27 発現は低下し、Gefitinib 感受性が低下した。このことから Loss of HER3 が COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性増強に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、上記の仮説が他の低分化型大腸がん細胞株にも当てはまるか否かを同じく Loss of HER3 を示す RKO 細胞を用いて検討した。しかし、予想に反して RKO 細胞は Gefitinib 抵抗性であった。そこで両細胞の HER family の発現の違いを検討したところ、RKO 細胞は COLM-5 細胞と異なり HER2 発現も著しく低下(Loss of HER2)していることが明らかとなった。HER2 を強制的に高発現させると Gefitinib 感受性が増強されることは肺がん細胞で知られており、また HER2 過剰発現乳がん細胞は一般に Gefitinib 高感受性であることが知られていることから、RKO 細胞の Gefitinib 抵抗性は HER2, HER3 同時欠損により HER2/HER3 のヘテロダイマー形成ができず、下流の PI3K/Akt シグナル経路が機能しないため Gefitinib による Akt を介した P27 誘導が起こらないことが原因と考えられる。このことから Gefitinib 感受性の獲得には HER2 の発現が必要であり、RKO 細胞の様に EGFR+/HER2-/HER3- ではなく、EGFR+/HER2+/HER3- パターンを示す低分化型大腸がん細胞が高感受性を示し、EGFR 薬の標的となる可能性が強く示唆された。

#### 3. 低分化型大腸がん原発巣における HER family 発現の免疫組織学的解析

COLM-5 細胞の様に EGFR+/HER2+/HER3- パターンを示す低分化型大腸がん細胞が実際の臨床症例のなかでどれくらいの頻度で存在するのかを明らかにするために原発巣における EGFR, HER2, HER3 の発現を免疫組織染色に



より検討した。低分化型大腸がん症例(PD)30例および分化型大腸がん症例(WMD)38例のHER familyの発現を検討したところ、EGFRの発現はWMD症例が78%、PD症例が71%でほぼ拮抗したが、強陽性例に限るとむしろPD症例の方が陽性率は46%と高かった。一方、HER2発現はWMD症例が84%、PD症例が46%とPD症例が低く、またHER3発現はWMD症例が70%、PD症例が12%で、PD症例ではHER3陰性例が圧倒的に頻度が高かった。発現の組み合わせではCOLM-5細胞と同じEGFR+/HER2+/HER3- 形質を示す低分化型大腸がんはPD症例全体の37%を占め、決してminorなタイプではなく、むしろmajorなサブタイプであることが明らかとなった。このことからEGFR+/HER2+/HER3- 形質を示す低分化型大腸がんが臨床的にもGefitinibやCetuximabなどのEGFR標的薬の新たな治療のターゲットになりうる可能性が示唆された。

#### D. 考察

大腸がんの多くは分化型腺がんであり、多段階変異によりAPC, beta catenin, K-Ras, p53の変異やLOH、さらにMSI等の種々の変異が積み重なって腺腫からがんさらに転移性がんへと進展してゆくものと考えられている。一方、低分化型大腸がんの発がん機構は分化型のそれとは異なることが報告されているが、胃がんとは異なり頻度が低いため、発がん機構には不明な点が多い。しかし、低分化型大腸がんは一般に転移性が高く、化学療法抵抗性で、大腸がんの中で最も予後不良の疾患であり、また効果的な治療法がないのが現状であり、発がん機構の解明とならんで、低分化型大腸がんに対する新しい治療法の開発は大腸がんの重要な課題のひとつとなっている。大腸がん低分化型腺がんの研究が遅れている原因のひとつは低分化型腺がん細胞株が世界的にみてもたかだか数株しかなく、きわめて少ないことが挙げられる。今回、新た

に樹立した低分化型大腸がん由来細胞株COLM-5は転移性を有し、悪性度の高い細胞株で大腸低分化型腺がんの臨床的特徴をよく反映しており、しかもGefitinib感受性を有する点で世界初であり極めて有用性が高い細胞株といえる。

本株のGefitinib感受性を考えるうえで大きな特徴はHER3の発現が極めて低レベルであり(Loss of HER3)、FACSやWestern blotでは殆ど痕跡程度しか検出できないことである。この原因に関して詳細は不明であるが、Sodium butyrateや5-Aza cytidineにより発現が誘導されることからメチル化によるgeneサイレンシングがすくなくとも一部は関与しているもの考えられる。HER3は他のHER familyメンバーと異なり、細胞内のチロシンキナーゼが不活性化のため、EGFRやHER2とヘテロダイマーを形成し、Transphosphorylationを受けるなければ自分自身だけでは下流にシグナルを伝達することができない。しかし、C末端にPI3Kp85に対するドッキングサイトを持ち、PI3K/Aktシグナル経路の活性化に極めて重要な役割を果たしている。これまでいくつかのがんでHER2の過剰発現やHER3の高発現がGefitinibなどの分子標的薬に対する耐性に関連するという報告がなされている。これはHER2/HER3の高発現によりヘテロダイマーの形成が促進され、PI3K/Akt経路が恒常的に活性化されるためGefitinib等による上記経路の効果的なブロックが困難であることに起因すると考えられる。これに対し、COLM-5細胞では逆にHER3の発現レベルが低いため、Gefitinib等によるAktシグナル経路の効果的なブロックが容易なため、GefitinibによりP27が発現誘導され、G1期に細胞周期が停止するものと考えられる。一方、HER3とならんでHER2の発現レベルも同時に低いRKO細胞ではHER2/HER3ヘテロダイマーの形成が全くできないため、PI3K/Akt経路は構成的に不活性化され