

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。

#### E. 結論

- (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

現が増加し、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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 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):1471-8, 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):2356-64. 2008

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究分担者 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：眼付属器 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は TNFAIP3 であることをこれまでに明らかにしていたが、マンツル細胞リンパ腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫にも関与することが明らかとなった。とくに ABC 型 DLBCL では半数に欠失が認められ、TNFAIP3 が腫瘍化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、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ったところ、PTCL-U の中に成人 T 細胞性白血病リンパ腫(ATLL)のリンパ腫型とよく似た疾患単位が存在する可能性を示唆した。また、PTCL-U の中には血管免疫芽球形 T 細胞性リンパ腫(AITL)と良く似た群と ATLL リンパ腫型と良く似た群の少なくとも 2 つの疾患単位が存在する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

1. 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 TNFAIP3 の他の病型の悪性リンパ腫における関与を解明する。
2. 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。

#### B. 研究方法

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 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。
2. 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析と病理組織学的検討

これまでに確立したアレイ CGH 法を用いて、末梢性 T 細胞リンパ腫分類不能型(PTCL-U)症例を解析する。臨床病態、免疫病理組織学的解析結果と関連させ、臨床的に意義のある疾患単位の有無を検討する。その結果と ATLL とを比較し、差異を検討する。

#### C. 研究結果

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 が癌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、血管免疫芽球形 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。

## D. 考察

### 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。

#### E. 結論

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。

#### F.健康危険情報

##### G. 研究発表

###### 1) 論文発表

1. 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.
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.
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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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
- 2) 学会発表
- 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
  - 加留部 謙之輔, 中川 雅夫, 都築 忍, 清水 則夫, 瀬戸 加大: NK/T細胞性腫瘍の遺伝子発現プロファイル. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ワークショップ] 2008.10.28
  - 都築 忍, 瀬戸 加大: TEL-AML1 白血病におけるTEL欠失の作用. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ポスター] 2008.10.28
  - 本間 圭一郎, 瀬戸 加大, 都築 忍, 中川 雅夫: リンパ腫発生進展におけるA20の機能解析. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ポスター] 2008.10.28
  - 塚本 善之, 内田 智久, カルナンシバ スンダラム, 野口 剛, 谷川 雅人, 竹内 一郎, 松浦 恵子, 中田 知里, Nguyen Tung, 泥谷 直樹, 井藤 久雄, 瀬戸 加大, 守山 正胤: 胃癌におけるゲノムコピー数異常と遺伝子発現異常の統合解析. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ポスター] 2008.10.28
  - 中川 雅夫, 中川 綾, 宇都宮 與, 瀬戸 加大: 急性型成人T細胞性白血病/リンパ腫症例の一部はリンパ腫型と同一のゲノム異常領域を持つ. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ワークショップ] 2008.10.29
  - 中田 知里, 松浦 恵子, 塚本 善之, 谷川 雅人, 吉本 多一郎, 泥谷 直樹, 内田 智久, 三股 浩光, 瀬戸 加大, 守山 正胤: 腎癌にむけるmiRNAの網羅的発現解析. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [ポスター] 2008.10.29
  - 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫発症の分子機構. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (名古屋) [シンポジウム] 2008.10.30
  - 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
- 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㈱

胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

研究分担者 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 腫瘍の発生にはジェネティックな変異とエピジェネティックな変化による遺伝子の変異・発現異常が重要であるが、肺がん細胞の発生・増殖・浸潤におけるエピジェネティクス変化の本態やその役割については未だ詳細は明らかではない。非小細胞肺がん 48 例に対し Methylated CpG Island Amplification (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の DNA メチル化状態について網羅的に解析した。さらに、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異の有無との比較検討を行った。EGFR の変異のない肺腺がんの平均メチル化遺伝子数は 672 個で、EGFR の変異のある肺腺がんの 389 個に比べ有意にメチル化遺伝子数が多かった ( $P<0.0001$ )。肺がんにおける DNA メチル化標的遺伝子数と EGFR 変異との負の相関は、遺伝子変異の有無によりエピジェネティクス変化のパターンに大きな差があることを示し、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

進行非小細胞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法を開発するためには、その発生・進展の分子病態を解明し、鍵となる異常に対する分子標的治療薬を開発・応用することが最も合理的な戦略の一つであると考えられる。近年、ゲフィチニ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治療成績は未だ満足するレベルに達していない。

非小細胞肺がんにおいては DNA メチル化異常が早期から検出され、腫瘍の増殖・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も明らかになっている。従って、非小細胞肺がんでの DNA 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になり、新たな治療戦略が展開できるものと考えられる。本年度は、昨年度に引き続き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、非小細胞肺がん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がん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た。

## B. 研究方法

昨年度解析した肺腺がん 17 例に加え、新たに 31 例の非小細胞肺がん症例由来のゲノム DNA を用いた。計 48 例の非小細胞肺がん患者の臨床病理的背景は、(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 にてラベル化した後、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。

### (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承認を得て行った。

## C. 研究結果

昨年度に施行した非小細胞肺がん 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 例の扁平上皮がんで 738 個、37 例の腺がんで 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. 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・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、臨床病理学のおよび 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され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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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)
2. 学会発表
1. 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)
  2. Kondo Y, Shen L, Cheng A, Ahmed S, Bumber 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)
  3. 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)
  4. 新城恵子、近藤豊、後藤康洋、安柄九、藤井万紀子、村上秀樹、長田啓隆、関戸好孝。悪性胸膜中皮腫における DNA メチル化標的遺伝子の解析とその診断への応用。第2回日本エピジェネティクス研究会年会 2008 (三島) (示説)
  5. 新城恵子、近藤豊、後藤康洋、近藤征史、長谷川好規、下方薫、関戸好孝。悪性胸膜中皮腫における DNA メチル化標的遺伝子とその診断への応用。第48回日本呼吸器学会学術講演会 2008 (神戸) (示説)
  6. 新城恵子、近藤豊、後藤康洋、横山俊彦、伊藤元一、安柄九、藤井万紀子、村上秀樹、長田啓隆、関戸好孝。DNA メチル化は EGFR 変異のない非小細胞性肺がんが高頻度に検出される。第67回日本癌学会学術総会 2008 (名古屋) (ワークショップ)
  7. 関戸好孝。肺がんの分子病因。第67回日本癌学会学術総会 2008 (名古屋)

(シンポジウム)

8. 近藤豊、関戸好孝。プロモーターアレイを用いたヒト腫瘍における DNA メチル化解析。第 67 回日本癌学会学術総会 2008 (名古屋) (シンポジウム)
9. 長田啓隆、立松義朗、冨田秀太、谷田部 恭、堀尾芳嗣、樋田豊明、藤井万紀子、村上秀樹、近藤豊、関戸好孝、高橋隆。新規遺伝子 ADw1 は上皮細胞間接着に関与し、肺癌で高頻度に発現低下する。第 67 回日本癌学会学術総会 2008 (名古屋) (口演)
10. 堀尾芳嗣、清水淳市、長田啓隆、樋田豊明、関戸好孝。肺癌細胞株において RanBP2 遺伝子発現はトポイソメラーゼ II 阻害剤アムルピシンの感受性と相関しない。第 67 回日本癌学会学術総会 2008 (名古屋) (示説)
11. 新城恵子、近藤豊、後藤康洋、横山俊彦、藤井万紀子、村上秀樹、長田啓隆、堀尾芳嗣、樋田豊明、関戸好孝。EGFR 変異のない非小細胞性肺癌で DNA メチル化は高頻度に検出される。第 49 回日本肺癌学会総会 2008 (北九州) (ワークショップ)

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

がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

研究分担者 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>

ケラチンは上皮細胞でのみ発現する細胞骨格蛋白質であるにも関わらず、発がんに関わりの深い上皮細胞極性形成や特性との関わりからの研究は立ち遅れていた。しかし近年、ケラチンの機能は単に細胞を機械的ストレスから守るだけではなく、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。私どもは新規ケラチン結合タンパク質として、トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン (TPHD) を有するアルバトロスおよびトリコブレインを見出していた。これらの局在する細胞間接着および中心体での機能について解析し、以下の進展を見た。アルバトロスは極性化分子 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。トリコブレインは細胞間にも局在するが、母中心小体遠位端ではナイニンを介した微小管の保留を行っていた。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。これら TPHD 分子群の解析結果を統合していくことは、細胞分化（上皮極性化）と増殖の二律背反を分子レベルで理解する一助となり、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。

A. 研究目的

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

するアルバトロス、トリコブレインを同定し得た。TPHD 分子群は、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。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の検討を目指す。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で、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とする。

## B. 研究方法

### 1. アルバトロスおよびトリコブレインの細胞内局在の解析

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ブロットを用い、生化学的にも局在を検討した。

### 2. アルバトロス、トリコブレインおよびケラチ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 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。

2) 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ブロット、免疫染色および RT-PCR により検討した。

3) トリコブレイン、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. 分子間結合実験

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 キナーゼアッセイ

HeLa 細胞を用い、トリコブレインとオーロラ-A の共発現によるオーロラ A リン酸化 (pT288) の変化を検討した。また *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)

遺伝子組み換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組み換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 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係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係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减弱した。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ブロットで减弱した。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

アルバトロス、トリコブレインは TPHPD 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。ケ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経由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。また同様のことを現在見出している他の TPHPD 分子についても行う。

#### E. 結論

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) を有するアルバトロス、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

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Izawa I, Nishizawa M, Hayashi Y, Inagaki M. Palmitoylation of ERBIN is required for its plasma membrane localization. *Genes Cells* 13: 691-701, 2008.
  4. 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.
  5. 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.
  6. 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. Enomoto M, Goto H, Ikegami Y, Kasahara K, Tomono Y, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks). International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, 2008, (Shima), [ポスター]
    2. Shiromizu T, Inoko A, Yonemura S, Kiyono T, Inagaki M. The novel keratin-binding protein trichoplein plays a role in the formation of apical junctional complex. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008, (横浜), [ポスター]
    3. Kasahara K, Goto H, Enomoto M, Ikegami Y, Tomono Y, Inagaki M. Autophosphorylation of Chk1 in checkpoint response. 第60回日本細胞生物学会, 2008, (横浜), [ポスター]
    4. Inoko A, Sugimoto M, 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 the polarization of epithelial cells. 第60回日本細胞生物学会, 2008, (横浜), [ポスター]
    5. 衣斐美歩、鄒騰、猪子誠人、大室(松山)有紀、米村重信、林裕子、森大輔、広常真治、田村淳、月田早智子、稲垣昌樹. ケラチン結合タンパク質 Trichoplein の中心体における機能解析. 第60回日本細胞生物学会, 2008, (横浜), [ポスター]
    6. Enomoto M, Goto H, Kasahara K, Ikegami Y, Tomono Y, Kiyono T, Inagaki M. Chk1 phosphorylation by Cdk1 controls mitotic entry. 第60回日本細胞生物学会, 2008, (横浜), [ポスター]
    7. Goto H, Inagaki M. Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks). 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (横浜), [シンポジウム]
    8. Inoko A, Inagaki M. Novel TPHPD proteins: keratin-binding proteins act as the regulator for the cell-cell adhesion. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, (横浜), [シ



- ンポジウム]
9. Izawa I, Hayashi Y, Inagaki M. Characterization of ERBIN palmitoylation. 第 67 回日本癌学会学術総会, (横浜), [ポスター]
  10. Kasahara M, Goto H, Enomoto M, Ikegami Y, Tomono Y, Inagaki M. Ser-296 phosphorylation of Chk1 in checkpoint response. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, (横浜), [ポスター]
  11. 稲垣昌樹. GCOE と愛知県がんセンター. GCOE 国内シンポジウム, 2008, (名古屋), [シンポジウム]
  12. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 池上要介, 友野靖子, 稲垣昌樹. Negative feedback regulation of Chk1 by its own kinase activity. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, (神戸), [ワークショップ] [ポスター]
  13. Ohmuro-Matsuyama Y, Zou P, Inoko A, Ibi M, Yonemura S, Hayashi Y, Mori D, Hirotsune S, Tamura A, Tsukita S, Inagaki M. Trichoplein, a keratin binding protein, is a functional component of centrosomes. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, (神戸), [ワークショップ] [ポスター]
  14. 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. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, (神戸), [ポスター]
  15. Pastuhov SI, 花房洋, 家村俊一郎, 夏目徹, 渋谷浩司, 稲垣昌樹, 松本邦弘. パーキンソン病原因遺伝子 LRRK2 による vimentin cage 形成. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, (神戸), [ポスター]
  16. 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 Francisco), [ポスター]
  17. 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]
  18. Inoko A, Inagaki M. Trichoplein, a keratin-binding protein, maker of microtubule-organization and breaker of cilia assembly. 特定領域「」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)
- 現在のところ、予定も含め、ない