

20092400/A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

第3次総合戦略研究事業

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 淳

平成22(2010)年 5月

研究報告書目次

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. がんのゲノム異常の網羅的解析

稲澤 譲治

5. 新規腫瘍抑制経路の解明

村上 善則

6. ATLを含む難治性白血病の多段階発がん機構の解析

森下 和広

7. がんのゲノム網羅的解析

小川 誠司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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

新規肺腺がん感受性遺伝子としてHLA-DQA1を同定し、早期肺腺がんの術後の再発予後を規定する遺伝子としてMYCを同定した。舌がんのin vitro多段階発がんモデルの作製に成功した。また、膵がん、大腸がんのモデル作製のための正常不死化細胞株を樹立した。高密度アレイCGH解析に加えて、遺伝子発現解析データやsiRNA libraryを用いた包括的な機能解析等を組み合わせて、難治がんにおける新規のがん関連遺伝子を複数同定した。肝細胞がん抑制遺伝子型miR-124とmiR-203を同定し、前者はVIM, IQGAP1, SMYD3が、後者はABCE1がそれぞれ新規ターゲットであることを見出した。CADM1が、肺がんなどの上皮性腫瘍ではがん抑制蛋白質、ATLでは浸潤促進因子として相反する機能を示すことを明らかにした。変異CBLは造血前駆細胞のサイトカインに対する感受性を亢進することで造血器腫瘍の発症に関与していることを見出し、サイトカインシグナルの伝達経路の遮断がCBL変異陽性腫瘍の治療に有用である可能性を提示した。ATLでは、白血病特異的な転写因子異常と同時に、固形がんで見られる情報伝達系異常が存在することを見出し、これらの異常を踏まえた治療法の開発が必要であることを示した。

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 謙治 東京医科歯科大学 教授
5. 村上 善則 東京大学医科学研究所 教授
6. 森下 和広 宮崎大学医学部 教授
7. 小川 誠司 東京大学医学部 特任准教授

A. 研究目的

本研究の目的は、多段階発がん過程および多様性のあるがんの臨床病態を、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、個々のがんに適した治療法を提供する個別医療・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必要がある。

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解析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関して解析を進め、臨床への応用研究を展開できる体制を整えてある。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構成研究者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、難治がんを中心とした種々のがんの網羅的なゲノム異常解析を行い、その結果の中から実際にがんの診断、治療に役立つ標的分子を同定し、がんの臨床応用開発に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、死亡率の高い肺がん、膵がん、白血病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を進める。第二に、高頻度にゲノム異常を起こしている遺伝子に関しては、整備された臨床検体を用いた解析から臨床病理学的所見との関連性を明らかにし、診断法の開発に結び

付ける。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・誘導の検討を行い、ゲノム異常を起こしている遺伝子の生物学的機能とがん特性発現における分子経路を明らかにし、その制御法を追求する。第四に、これらの研究成果を統合して、がんの新たな診断法、治療法の開発に向けた研究を展開する。がんのゲノム解析に基づいて新たな分子診断法や分子標的療法の開発が進みつつある現在、ゲノム網羅的な解析によりがんのゲノム異常の全容を明らかにすることは、今後の更なる開発に向けて必須の情報となる。

## B. 研究方法

### 1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明

#### 1) 肺がん

23,206 個のマイクロサテライトマーカーを用いて3段階の肺腺がん感受性遺伝子座の探索を行った。同定された染色体領域の SNP 解析を行って標的遺伝子を同定した。同定された HLA-DQA1 遺伝子内の多型について、1,656 例の肺腺がん症例群と 1,173 例の対照例群を用いて肺腺がんへのリスクを算出した。これらの症例と対照については、他のグループによって同定された肺がん感受性遺伝子 TERT, CLPTMIL, CHRNA の SNP とリスクとの関連性も検討し、複数の遺伝子で規定される日本人の肺腺がんリスクを算出した。

最大径 2cm 以下の小型肺腺がんの手術組織標本 63 例からマイクロダイセクション法による腫瘍細胞の採取及び DNA の抽出を行い、10K SNP アレイを用いて遺伝子過増幅(>5 copies)領域の全ゲノム網羅的解析を行った。また、40 例の肺腺がん細胞株について 250K SNP アレイ解析を行い、小型腺がんにおける 10K SNP アレイのデータと併せて CNAG (Copy Number Analyzer for GeneChip) software を用いて解析し、共通して過増幅している領域と遺伝子を同定した。定量的ゲノム PCR 法で MYC 遺伝子のゲノムコピー数を算出した。148 例の病理学的病期 I 期の肺腺がんにおける MYC 遺伝子過増幅と臨床病理学的所見、他の遺伝子異常との関連性を解析した。

#### 2) 肝細胞がん

高精度の自作ゲノムアレイとその応用技術を確立し、これら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集積した。特に悪性度の高い肝細胞がんなどの生命予後が不良で有効な治療法が確立されていない難治がんを研究の主たる対象とした。新規に見出された病型特異的な増幅や欠失、さらにはがん特異的 DNA メチル化などをランドマークに、新規がん関連遺伝子やマイクロ RNA 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。同定し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検討した。また、ゲノムアレイによるがん個性診断システムの確立と実用化に向けての開発研究を行った。

#### 3) 内分泌性肺がん、低分化腺がん

難治がん臨床検体を用いて、レーザーマイクロダイセ

クションにより腫瘍細胞のみを選別し、高純度のがんゲノムバンクを構築し、ヒトゲノム全体をカバーする 4500 個の BAC クローンを搭載した高密度 BAC アレイあるいは 25 万個のオリゴプローブを搭載した高密度オリゴゲノムアレイによる網羅的な染色体コピー数異常の解析を行った。更に多数の臨床検体を用いて、候補遺伝子あるいはキナーゼ遺伝子群について包括的な塩基解読を行った。

当該分子のゲノム異常を持つがん細胞株を用いて、細胞増殖能、造腫瘍能測定や薬剤感受性などについて検討した。免疫染色による臨床検体での発現解析を行った。

#### 4) 骨髄異形成症候群(MDS)

CBL をホモに欠失するマウスを作製することにより、CBL のがん抑制遺伝子としての成体での機能の評価を行うとともに、正常および変異 CBL を種々の造血細胞株および NIH3T3 細胞に遺伝子導入することにより、変異 CBL のシグナル伝達における生化学的活性の評価を行った。また正常および CBL 欠失マウス由来の造血前駆細胞への遺伝子導入実験により、変異 CBL が造血前駆細胞のサイトカイン感受性に及ぼす効果を検討した。

#### 5) 成人 T 細胞白血病(ATL)

これまでの ATL 細胞のゲノム解析によって 10p11.2 領域より転写因子 ZEB1 と 14q11 領域より情報伝達因子 NDRG2 を、網羅的遺伝子発現解析により細胞接着因子 TSLC1 を同定しているため、それぞれの遺伝子の機能解析を行った。また、ATL-14q32 領域、AML-7 番染色体に存在すると思われる新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子を探索した。さらに、各遺伝子異常による白血病発症の機構を明らかにするため、マウスあるいはヒト骨髄細胞に遺伝子導入もしくは shRNA 発現ベクターの導入によって起る増殖・分化・アポトーシスの解析を行った。また、in vivo マウスモデル系を用いて白血病発症機構、さらには発がん機構の検討を行った。

### 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

まず、ヒト正常細胞に TERT, CDK4, Cyclin D1 などの遺伝子を導入して不死化細胞を作製した。次に不死化した種々のヒト細胞に対応するがんを高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入による高発現やがん抑制遺伝子の RNA 干渉法を用いた発現抑制によって再現し、造腫瘍性など様々ながん特性の発現を検討した。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、舌角化細胞、膝管上皮細胞、大腸上皮細胞の不死化とがん化を行った。

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

CADM1 高発現細胞 HEK293, Caco-2 に siRNA をトランスフェクションして CADM1 発現を抑制し、細胞形態、アクチンフィラメント、結合タンパク質の変化を共焦点顕微鏡観察により、また、分子の量的変化をウェスタン・ブロット法により検討した。ATL では、患者由来の腫瘍細胞、HTLV-1 感染細胞における CADM1 結合タンパク質候補を、モチーフ解析により Tiam1 に限定し、免疫沈降法、GST プルダウン法により結合を実証した。さらに ATL 患者リンパ節組織を用いた免疫組織染色により、ATL 症例における Tiam1 の発現を検討した。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. 網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん機構の解明

#### 1) 肺がん

3段階のスクリーニングにより、肺腺がんのリスクを規定する第6染色体短腕の6p21.31領域を同定した( $p=2.4 \times 10^{-7}$ )。さらに、この領域を含む450-kbの領域に存在するSNPの解析により、HLA-DQA1遺伝子が標的の肺腺がん感受性遺伝子で、DQA1\*03がリスクアレルであることを明らかにした。既存の肺がん感受性遺伝子の中ではTERTとCHRNAの多型も日本人の肺腺がんリスクを規定していることが確認されたので、これら3つの遺伝子で規定される肺腺がんリスクを算出した結果、HLA-DQA1とTERTのリスクアレルをホモ接合体として持つ人は全く持たない人の4.76倍、肺腺がんへのリスクが高いことが分かった。

小型肺腺がんでは第5, 7, 8, 14染色体上の11領域が高頻度(>10%)に過増幅を起こしていた。一方、細胞株における250K SNPアレイのデータでも、やはり第5, 7, 8, 14染色体上の13領域に高頻度の過増幅が認められた。そこで、両者の結果を併せて解析した結果、第8染色体の5領域が共通領域として同定され、それらの領域内ではMYC遺伝子のみが蛋白質をコードする遺伝子として同定された。MYC遺伝子の過増幅は、年齢、性別、喫煙歴との関連はなく、小型肺腺がん患者の予後と有意に相関した。また、EGFR型、KRAS型、非EGFR/KRAS型のいずれにも存在し、病理学的病期I期からも、非浸潤がんであるタイプBからも検出されたことから、MYC過増幅は肺腺がん発生の早期から起こっていることが分かった。次に、市販の定量的リアルタイムPCR法キットを用いて過増幅の確認を行った結果、SNPアレイの結果とPCR法の結果がよく一致した。そこで、小型肺腺がん60例、I期の肺腺がん148症例に対して定量的リアルタイムPCR法を用いて検討したところ、いずれの症例群においてもMYC過増幅は術後の再発予後と有意に相関し、早期肺腺がんの予後予測因子として有用であることが強く示唆された。

#### 2) 肝細胞がん

肝細胞がん(HCC)においてCpG island 過剰メチル化をスクリーニングすることでエピゲノム制御によって発現抑制されるがん抑制性型miRNAの探索を行った。miRNAの456種においてUCSCゲノムデータベース検

索からCpG island近傍に存在している43個のmiRNAに着目した。COBRA法でメチル化解析を行い、正常肝と比してHCC細胞株で過剰DNAメチル化されている11個のmiRNAを特定した。このうち3種のmiRNAは過剰DNAメチル化と同時に発現抑制を認めた。これらのうち、miR-124とmiR-203はHCC臨床検体においても高頻度にがん部特異的DNA過剰メチル化と発現低下を認めた。一方、これらの候補miRNAの過剰発現は細胞増殖の抑制を惹起した。FACS解析でmiR-124はG1停止、miR-203はアポトーシスを起こした。miR-124はVIM, IQGAP1, SMYD3を、miR-203ではABCE1をそれぞれ標的にすることを発見した。以上の結果から、miR-124とmiR-203は腫瘍特異的DNA過剰メチル化で機能を喪失する肝がん抑制型miRNAであることが明らかになった。

#### 3) 内分泌性肺がん、低分化腺がん

p53がん抑制遺伝子の下流標的遺伝子として細胞の生存に必須なAktキナーゼを負に制御する新規肺がん抑制遺伝子PHLDA3を同定した。PHLDA3は内分泌性肺がん及び肺内分泌腫瘍における高頻度の遺伝子欠損と発現低下を認めた。胃がんにおける新規染色体増幅領域から機能解析によってがん遺伝子候補を複数同定した。中でも、ある解糖系酵素が他のがん遺伝子と協調的に機能し、その活性化ががん細胞の代謝異常の原因となる可能性を見出した。

レーザーキャプチャー法を用いて低分化腺がん(低分化胃がん及び肺がん)におけるキナーゼ遺伝子群の体細胞変異を網羅的に解析し、新たながん遺伝子候補を同定した。低分化胃がんの新規増幅領域からがん遺伝子候補KLF12を同定した。内分泌性肺がんにおいて、治療標的として有望なPIK3CAの変異の同定とがん幹細胞性と関連するがん遺伝子DEKの機能解析を進めた。

#### 4) 骨髄異形成症候群

CBLをホモに欠失するマウスでは骨髄および脾臓における造血前駆細胞、即ち、Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>(LSK)細胞およびCD34<sup>+</sup>LSK細胞の増加が認められ、造血前駆細胞プールの拡大が示唆された。CBL<sup>-/-</sup>マウスではbcr/ablトランスジーンによるCML発症モデルにおいて急性転化の促進がみとめられ、さらに長期観察において全例に悪性腫瘍の発症が認められた。以上より、CBL遺伝子が本来はがん抑制遺伝子として機能することが示された。一方、CBLはそのE3ユビキチンリガーゼ活性によりチロシンキナーゼの負の制御に関与することが知られているが、変異CBLではこの活性が認められず、また正常CBLのE3ユビキチンリガーゼを抑制することが示された。このことと一致して、変異CBLを造血細胞に遺伝子導入することにより、サイトカイン刺激後の受容体なしJAK2キナーゼのリン酸化が亢進することが示された。さらに、変異CBLは、種々のサイトカインに対する造血前駆細胞の感受性を亢進すること、この効果は正常CBL非存在下で顕著となることが分かった。

#### 5) 成人T細胞白血病(ATL)

10p11.2領域のゲノム解析により同定したZEB1の機能解析により、ZEB1発現抑制はATL細胞におけるTGFβ不能性を増強することを見出した。また、同領域に存在するenhancer of polycomb 1(EPC1)遺伝子がAXSL2と融



合遺伝子を形成している症例があることを見出した。頻度は少ないもののPolycomb遺伝子のゲノム異常が見つかり、他のPolycomb遺伝子であるEZH2の高頻度高発現も同定したので、様々なPolycomb遺伝子群の異常がATLの発症に関与していることが示唆された。また、網羅的遺伝子発現解析から同定したTSLC1は、in vitro、in vivo解析により、ATLの有する臓器浸潤能に寄与することを明らかにした。

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  
舌がんのin vitroモデル作製のため、舌角化細胞(HTK1, HTK3)を分離培養し、E6E7またはhTERT+変異cdk4+cyclin Dにより不死化した舌角化細胞株(HTK/K4DT)を樹立した。HTK/K4DTに、変異p53+HrasG12V+c-mycあるいはHrasG12Vの代わりにErbB1の追加導入により造腫瘍性を誘導した。同様にE6E7導入により不死化したHTK1,HTK3に変異HrasG12V+c-mycあるいはErbB1+c-mycを導入するとヌードマウス皮下において造腫瘍性を認めた。

また、これまで困難であった膵管上皮細胞ならびに大腸上皮細胞の不死化を試み成功した。興味深いことに、これらの細胞でもE6E7+活性型Ras+Mycの発現によりヌードマウスにおいて造腫瘍性を獲得するという予備的結果を得た。

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

まず、CADMIの上皮における新たな結合蛋白質として、MPP1, MPP2, 4.1Nを同定した。次に、CADMIを高発現する培養上皮細胞HEK293, Caco-2にsiRNAを加えCADMIの発現を抑制したところ、成熟した細胞接着と上皮様整列が失われ、同時にE-カドヘリンや4.1B, MPP2などの結合蛋白質の細胞膜への局在が失われた。この結果から、CADMIが上皮様形態形成に必須であることが示された。一方、ATLではCADMIの過剰発現が認められるが、上皮とは異なり、CADMIの細胞内PDZ結合モチーフを介してTiam1蛋白質がCADMIと結合することを見出した。また、ATL細胞のin vitroでの浸潤が、RACの優性欠変異体により阻害されることから、Tiam1がRACの活性化を介してATL細胞の運動性を高め、臓器浸潤を促進する可能性を見出した。

#### 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

最近、ゲノム網羅的なSNP解析でCHRNAやTERTなど幾つかの肺がん感受性遺伝子が同定されたが、HLA-DQA1はSNPアレイ解析では検出できず、マイクロサテライトマーカーを用いたゲノム網羅的な解析で初めて同定された遺伝子で、発見の意義は大きい。さらに、TERTの多型と組み合わせることにより日本人の肺がん感受性が個々人で5倍程度異なっていることが分り、今後、個々人の体質に基づいた肺がん予防法を開発

する上で有用な研究成果が得られたと考えている。

第8染色体長腕に位置するMYC遺伝子の過増幅を呈する小型肺腺がん及び病理学的病期I期の肺腺がんが有意に予後不良であったことから、このような症例に対しては術後化学療法等の併用による予後の改善を検討する必要性が示唆された。早期肺腺がんにおける術後補助療法の適応を決めるマーカーとして有用か、今後は前向き試験などで確認していきたい。

##### 2) 肝細胞がん

今後、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、あるいは新規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) 内分泌性肺がん、低分化腺がん

PHLDA3は肺がんを含め複数のがんにおいて異常を同定した。代謝関連がん遺伝子は、ゲノム異常とメタボローム異常を結びつける新たな分子として興味深い。がん幹細胞性関連がん遺伝子は、薬剤抵抗性や生命予後と関連する分子で、分子マーカーとしても有望である。

##### 4) 骨髄異形成症候群

CBLは本来チロシンキナーゼの負の制御を担う遺伝子であるが、本研究の結果は、本遺伝子が、変異によって獲得される新たな機能によって、種々のサイトカインシグナルに対する造血前駆細胞の感受性の増強を惹起するがん遺伝子へと変化することを示すもので、造血器腫瘍の発症機構とその治療を考える上で興味深い結果である。

##### 5) 成人T細胞白血病(ATL)

ATLのゲノム解析から白血病化に係わるATL特異的なゲノム異常を幾つか同定してきたが、その中でNDRG2は口腔がんにおいてもがん抑制遺伝子として働いており、白血病と固形がんに共通の発がん機構があると考えられた。

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

これまで、多くの異なる細胞種でE6E7+活性型Ras+Mycの発現により造腫瘍性を誘導できるとの結果を得ており、異なる細胞種間でもがん化に必要な経路はかなり共通性が高いことが示唆された。種々のin vitro発がんモデルを作製、比較することで、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考えられる。

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

CADMIは、上皮性腫瘍では4.1群、MPP群蛋白質と結合し、その発現欠如が浸潤、転移を促進し、ATLでは、下流の分子経路の違いにより、Tiam1を介して浸潤促進因子として働くと考えられた。

#### E. 結論

新規肺腺がん感受性遺伝子としてHLA-DQA1を同定し、TERTの多型と組み合わせることにより、個々人の肺がんリスクの違いを推定できることを明らかにした。早期肺腺がんの術後の再発予後を規定する遺伝子としてMYCを同定し、術後の補助療法などの適応である可能性

を示した。

これまでの、子宮内膜がん、子宮頸がん、上皮性卵巣がんのin vitro多段階発がんモデルに続き、新たに舌がんモデルの作製に成功した。また、膵がん、大腸がんのモデル作製のための正常不死化細胞樹立に成功した。Mycはがん幹細胞性の維持に重要であり良い分子標的候補であることが示唆された。

高密度アレイCGH解析に加えて、遺伝子発現解析データやsiRNA libraryを用いた包括的な機能解析等を組み合わせ、難治がんにおける新規のがん関連遺伝子を複数同定し、メタボローム異常やがん幹細胞性といった特性の原因に迫り、また新たな治療法や診断法開発の基盤を構築できた。

前年度の口腔がん抑制遺伝子型miR-137とmiR-193a遺伝子同定に続き、今年度は肝細胞がん抑制遺伝子型miR-124とmiR-203を同定した。さらに、前者はVIM, IQGAP1, SMYD3が、後者はABCE1がそれぞれ新規ターゲットであることを見出した。

CADM1が、肺がんなどの上皮性腫瘍ではがん抑制蛋白質、ATLでは浸潤促進因子として相反する機能を示すことの分子機構を示した。上皮腫瘍では診断マーカー、ATLでは浸潤抑制治療の標的分子となると考えられた。

変異CBLによる白血病発症のメカニズムの一端を解明した。即ち、変異CBLは造血前駆細胞のサイトカインに対する感受性を亢進させることで造血器腫瘍の発症に関与すると考えられた。従って、サイトカインによるシグナル伝達経路の遮断がCBL変異陽性腫瘍の治療に有用であることが示唆された。

ATLでは、白血病特異的な転写因子の異常と同時に、固形がんで見られる情報伝達系異常も存在し、両者が発がんに関与していることを示唆した。従って、これらの病態を踏まえた治療法の開発が必要と考えられた。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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*, 18:1343-1352, 2009.
- 4) Blanco 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. *Hum Mutat*, 30:1199-1206, 2009.
- 5) Anami Y, Iijima T, Suzuki K, Yokota J, Minami Y, Kobayashi H, Satomi K, Nakazato Y, Okada M, Noguchi M. Bronchioloalveolar carcinoma (lepidic growth) component is a more useful prognostic factor than lymph node metastasis. *J Thoracic Oncol*, 4:951-958, 2009.
- 6) Kumamoto K, Fujita K, Kurotani R, Saito M, Unoki M, Hagiwara N, Shiga H, Bowman ED, Yanaihara N, Okamura S, Nagashima M, Miyamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int J Cancer*, 125:1306-1315, 2009.
- 7) Ohata, H, Ota N, Shirouzu M, Yokoyama S, Yokota J, Taya Y, Enari M. Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation. *J Mol Biol*, 394:460-471, 2009.
- 8) Suizu F, Hiramuki Y, Okumura F, Matsuda M, Okumura AJ, Hirata N, Narita M, Kohno T, Yokota J, Bohgaki M, Obuse C, Shigetsugu H, Obata T, Noguchi M. The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell*, 17:800-810, 2009.
- 9) Kohno T, Otsuka A, Girard L, Sato M, Iwakawa R, Ogiwara H, Sanchez-Cespedes M, Minna JD, Yokota J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer*, 49:342-252, 2010.
- 10) Kodama M, Otsubo C, Hirota T, Yokota J, Enari M, Taya Y. Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol Cell Biol*, 30:1620-1633, 2010.
- 11) Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, Shiraishi K, Ishii Y, Goto K, Ohe Y, Nishiwaki Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Hirose H, Oka A, Yanagitani N, Saito R, Inoko H, Yokota J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*, 31:834-841, 2010.
- 12) Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in

- epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, in press, 2010.
- 13) Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papilloma virus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, in press.
  - 14) 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.
  - 15) 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*, 30:423-431, 2009.
  - 16) Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*, 19:97-113, 2009.
  - 17) Sugimoto N, Yoshida K, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Waga S, Kiyono T, Fujita M. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of re-replication in normal human cells. *J Cell Sci*, 122:1184-91, 2009.
  - 18) Yuan H, Ito S, Senga T, Hyodo T, Kiyono T, Kikkawa F, Hamaguchi M. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. *Int J Oncol*, 35:309-14, 2009.
  - 19) Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M, Kyo S. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression. *Mol Hum Reprod*, 15:693-701, 2009.
  - 20) Kawai K, Egawa N, Kiyono T, Kanekura T. Epidermodysplasia- verruciformis-like eruption associated with gamma-papillomavirus infection in a patient with adult T-cell leukemia. *Dermatology*, 219:274-8, 2009.
  - 21) Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. A novel positive feedback loop between Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. *J Biol Chem*, 284:34223-30, 2009.
  - 22) Ibrahim HR, Kiyono T. Novel Anticancer Activity of the Autocleaved Ovotransferrin against Human Colon and Breast Cancer Cells. *J Agric Food Chem*, 57:11383-90, 2009.
  - 23) Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J Cell Sci*, 123:225-35, 2010.
  - 24) Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes*, in press 2010.
  - 25) Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura M, 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.
  - 26) Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubu A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30:1857-1864, 2009.
  - 27) Kubo T, Kuroda Y, Kokubu A, Hosoda F, Arai Y, Hiraoka N, Hirohashi S, Shibata T. Resequencing analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 2009, e200-6, 2009.
  - 28) Nakamura Y, Migita T, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K, Imoto I, Katai H, Yamaguchi T, Inazawa J, Hirohashi S, Ishikawa Y, Shibata T. Kruppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer*, 125:1859-1867, 2009.
  - 29) Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Hirohashi S. Oncogenic mutation of *PIK3CA* in small cell lung carcinoma: A potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Letters*, 283:203-211, 2009.
  - 30) Yoshikawa D, Ojima H, Kokubu A, Ochiya T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Vandatinib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signaling, as a novel molecular target therapy against cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 100:1257-1266, 2009.
  - 31) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 125:2854-2862, 2009.
  - 32) Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N,



- Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci*, in press, 2010.
- 33) Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiating activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene*, in press, 2010.
- 34) Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, in press, 2010.
- 35) Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K. DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2009 Dec 22. [Epub ahead of print]
- 36) Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arai S. Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. *Surgery*. 147:405-414. 2009.
- 37) Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arai S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009 [Epub ahead of print].
- 38) Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. *PLoS One*, 4:e7099, 2009.
- 39) Begum A, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Amagasa T, Inazawa J. Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*, 100:1908-16, 2009.
- 40) Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki K, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 30:1139-46, 2009.
- 41) Fujita K, Sanada M, Harada H, Mori H, Niikura H, Omine M, Inazawa J, Imoto I. Molecular cloning of t(2;7)(p24.3;p14.2), a novel chromosomal translocation in myelodysplastic syndrome-derived acute myeloid leukemia. *J Hum Genet*, 54:355-9, 2009.
- 42) Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arai S. Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular-invasion-negative hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg*, 208:368-74, 2009.
- 43) 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, Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y, Matsuzawa A, Ichijo H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO Journal*, 28:843-53, 2009.
- 44) 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*, 22:499-507, 2009.
- 45) Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells. *J Biol Chem*, in press, 2010.
- 46) Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Ito A, Murakami Y. Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:977-982, 2009.
- 47) Hagiwara M, Ichianagi 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*, 174:2278-89, 2009.
- 48) Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka K, 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*, 285:3334-3344, 2009.
- 49) Nakahata S, Saito Y, Hamasaki M, Hidaka T, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to

- development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 48:768-776, 2009.
- 50) Furuta H, Kondo Y, Nakahata S, Hamasaki M, Sakoda S, Morishita K. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 391:1785-1791, 2010.
  - 51) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*, in press, 2010.
  - 52) Villalobos I, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, in press, 2010.
  - 53) Shiba N, Kato M, Myoung-ja P, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia, but not in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, in press, 2010.
  - 54) Ogawa S, Shih L, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*, in press, 2010.
  - 55) Asaoka Y, Toda M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. Gastric Cancer Cell Line Hs746T Harbors a Splice Site Mutation of c-Met Causing Juxtamembrane Domain Deletion. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2010.
  - 56) Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, in press, 2010.
  - 57) Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoennissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistant chronic myeloid leukemia (CML) identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood*, in press, 2010.
  - 58) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*, in press, 2010.
  - 59) Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood*, 113:6584-6592, 2009.
  - 60) Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, Ruckert C, Huynh T, Liu G, Kato M, Sanada M, Jauch A, Dugas M, Black KL, Koeffler HP. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res*, 7:665-677, 2009.
  - 61) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*, 460:904-908, 2009.
  - 62) Nowak D, Le Toriellec E, Stern MH, Kawamata N, Akagi T, Dyer MJ, Hofmann WK, Ogawa S, Koeffler HP. Molecular allelotyping of T-cell prolymphocytic leukemia cells with high density single nucleotide polymorphism arrays identifies novel common genomic lesions and acquired uniparental disomy. *Haematologica*, 94:518-527, 2009.
  - 63) Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2009.
  - 64) Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, 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 Sci, 100:920-926, 2009.
- 65) Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood*, 113:2851-2858, 2009.
- 66) Kawamata N, Zhang L, Ogawa S, Nannya Y, Dashti A, Lu D, Lim S, Schreck R, Koeffler HP. Double minute chromosomes containing MYB gene and NUP214-ABL1 fusion gene in T-cell leukemia detected by single nucleotide polymorphism DNA microarray and fluorescence in situ hybridization. *Leuk Res*, 33:569-571, 2009.
- 67) Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*, 34:1603-1612, 2009.
- 68) Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, Chang A, Nabavi-Nouis S, Megrabian N, Siebert R, Martinez-Climent JA, Koeffler HP. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol*, 37:937-946, 2009.
- 69) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459:712-716, 2009.
- 70) Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood*, 113:5041-5048, 2009.
- 71) Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. *J Immunol*, 182:6168-6178, 2009.
- 72) Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerstl J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, Koeffler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*, 94:1301-1306, 2009.
- 73) Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koeffler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. *Blood*, 113:1741-1748, 2009.
- 74) Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 94:213-223, 2009.
- 75) Akagi T, Ito T, Kato M, Jin Z, Cheng Y, Kan T, Yamamoto G, Olaru A, Kawamata N, Boulton J, Soukiasian HJ, Miller CW, Ogawa S, Meltzer SJ, Koeffler HP. Chromosomal abnormalities and novel disease-related regions in progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 125:2349-2359, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
- 1) 「(抗HPV16 E6) モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーム およびキット」 特開 2007-314476
- 2) 「PHLDA family 遺伝子は癌抑制能を持つ遺伝子である」 出願日：平成 21 年 2 月 2 日、出願番号：2009-22048
- 3) 「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・井上純、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フイルム株式会社、2009.9.28、12/568,569、特願2008-275176
- 4) 「甲状腺がんの検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・石原孝也・津田均、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フイルム株式会社、2009.7.15、12/503,434、特願2008-184982
- 5) 「がんの検出方法およびがん抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フイルム株式会社、2009.1.22、12/357,894、特願2008-012256
- 6) 「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・稲澤譲治・井本逸勢、富士フイルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2009.5.27、特願2009-128162
- 7) 「核酸マイクロアレイを用いた解析方法」、氏原大・

金原秀行・稲澤譲治・井本逸勢、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2009.5.26、特願2009-126780

- 8) 「核酸アレイ及び核酸アレイの識別方法」、石井靖幸・吉田淳哉・氏原大・三好隼人・岩木義英・稲澤譲治・井本逸勢、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2009.5.26、特願2009-126894
- 9) 「薬剤耐性マーカーおよびその利用」、井上純・稲澤譲治、稲澤譲治・富士フィルム株式会社、特願2009-111725
- 10) 森下和広、山川哲生: 細胞接着阻害剤およびその用途、特願2009-41204
- 11) 森下和広、中畑新吾、濱崎誠: PI3K/AKT情報伝達系に関連する疾病の予防薬、進展抑制薬、または治療薬、特願2009-95147

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
CNAGver3.0 (ゲノム解析ソフトウェア)(発明)

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

研究分担者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺腺がんの感受性を規定する新規遺伝子として HLA-DQA1 を同定した。同遺伝子と TERT 遺伝子のリスクアレルをホモ接合体として持つ人は持たない人の 4.76 倍肺腺がんへのリスクが高いことを明らかにした。MYC 遺伝子の過増幅が小型肺腺がん、I 期の肺腺がんの術後の再発予後を規定する因子であることを明らかにした。不死化肺上皮細胞において p53 の発現を抑制すると運動能・浸潤能が上昇することを明らかにした。p53 の失活によって発現上昇し、運動能・浸潤能を制御する細胞膜蛋白質を同定した。

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こしている遺伝子を網羅的に同定し、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、その結果を肺がんの診断・治療に役立てることを目的として研究を進めている。また、肺がん患者が共有する遺伝子多型をゲノム網羅的に解析し、肺がんのリスクを規定している肺がん感受性遺伝子を同定して個々人の体質に応じた肺がんの新たな予防法を開発することも目的としている。今年度は、1)ゲノム網羅的な関連解析による新規肺がん感受性遺伝子の同定、2)ゲノム網羅的な遺伝子過増幅領域の解析による肺腺がんの予後因子の同定、3)ゲノム網羅的な p53 制御遺伝子の探索とその機能解析、の3課題について研究を進めた。それぞれの課題について研究方法とその結果を列記する。

B. 研究方法

1)ゲノム網羅的な関連解析による新規肺がん感受性遺伝子の同定

23,206 個のマイクロサテライトマーカーを用いて3段階の肺腺がん感受性遺伝子座の探索を行った。同定された染色体領域の SNP 解析を行って標的遺伝子を同定した。同定された HLA-DQA1 遺伝子内の多型について、1,656 例の肺腺がん症例群と 1,173 例の対照例群を用いて肺腺がんへのリスクを算出した。これらの症例と対照については、他のグループによって同定された肺がん感受性遺伝子 TERT, CLPTMIL, CHRNA の SNP とリスクとの関連性も検討し、複数の遺伝子で規定される日本人の肺腺がんリスクを算出した。

2)ゲノム網羅的な遺伝子過増幅領域の解析による肺腺がんの予後因子の同定

最大径 2cm 以下の小型肺腺がんの手術組織標本 63 例からマイクロダイセクション法による腫瘍細胞の採取及び DNA の抽出を行い、10K SNP アレイを用いて遺伝子過増幅(>5 copies)領域の全ゲノム網羅的解析を行った。また、40 例の肺腺がん細胞株について 250K SNP アレイ解析を行い、小型肺腺がんにおける 10K SNP アレイのデータと併せて CNAG (Copy Number Analyzer for GeneChip) software を用いて解析し、共通して過増幅している領域と遺伝子を同定した。定量的ゲノム PCR 法で MYC 遺伝子のゲノムコピー数を算出した。148 例の病理学的病期 I 期の肺腺がんにおける MYC 遺伝子過増幅と臨床病理学的所見、他の遺伝子異常との関連性を解析した。

2)ゲノム網羅的な p53 制御遺伝子の探索とその機能解析

p53siRNA を用いて不死化肺上皮細胞における p53 発現の発現抑制を行い、マトリゲルチャンパー法で細胞の運動能・浸潤能を測定した。マイクロアレイ解析で p53 発現抑制により発現上昇する遺伝子を探索した。候補遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認し、確認できた遺伝子の発現ベクター導入、siRNA 導入による運動能・浸潤能の変動をマトリゲルチャンパー法で測定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1)ゲノム網羅的な関連解析による新規肺がん感受性遺伝子の同定

3段階のスクリーニングにより、肺腺がんのリスクを規定する第6染色体短腕の領域を同定した。この領域は 6p21.31 に存在し、その関連は  $p=2.4 \times 10^{-7}$



と統計学的に有意であった。そこで、この領域を含む 450-kb の領域に存在する SNP を解析し、HLA-DQA1 遺伝子を肺腺がん感受性遺伝子として同定し、さらに、DQA1\*03 をリスクアレル出あることを明らかにした。この遺伝子は腺がんのみならず、扁平上皮がんや小細胞がんのリスクも規定していることが示唆された。既存の肺がん感受性遺伝子の中では TERT と CHRNA の多型も日本人の肺腺がんリスクを規定していることが確認されたので、さらに、これら3つの遺伝子で規定される肺腺がんリスクを算出した。その結果、HLA-DQA1 と TERT のリスクアレルをホモ接合体として持つ人は全く持たない人の 4.76 倍、肺腺がんへのリスクが高いことが分った。

2)ゲノム網羅的な遺伝子過増幅領域の解析による肺腺がんの予後因子の同定

小型肺腺がんでは第 5, 7, 8, 14 染色体上の 11 領域が高頻度 (>10%)に過増幅を起こしていた。一方、細胞株における 250K SNP アレイのデータでも、やはり第 5, 7, 8, 14 染色体上の 13 領域に高頻度の過増幅が認められた。そこで、両者の結果を併せて解析した結果、第 8 染色体の 5 領域が共通領域として同定され、それらの領域内では MYC 遺伝子のみが蛋白質をコードする遺伝子として同定された。そこで、臨床所見や遺伝子変異との関連性を検討したところ、MYC 遺伝子の過増幅は年齢、性別、喫煙歴に関連なく、小型肺腺がん患者の予後と有意に関連することが分かった。また、病理学的病期 I 期から、そして非浸潤がんであるタイプ B から検出されたことから、MYC 過増幅は肺腺がん発生の早期に起こることが示唆された。さらに、EGFR 型、KRAS 型、非 EGFR/KRAS 型のいずれにも存在し、p53 変異の有無とも関連を示さなかった。次に、他の簡便な手法で MYC 過増幅を検出することができるかを検討するために、市販の定量的リアルタイム PCR 法キットを用いて過増幅の確認を行った結果、CNAG software の結果と PCR 法の結果がよく一致した。そこで、SNP アレイ解析に用いた 33 例を含む 60 例に対して定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討したところ、MYC 過増幅は有意に予後と関連することが確認された。さらに、I 期の肺腺がん 148 症例でも MYC 過増幅は術後の再発予後と有意に相関し、早期肺腺がんの予後予測因子として有用であることが強く示唆された。

3)ゲノム網羅的な p53 制御遺伝子の探索とその機能解析

末梢肺上皮細胞を変異 CDK4 と TERT の導入で不死化し、p53siRNA で p53 の発現を抑制すると、運動能及び浸潤能が有意に上昇した。そこで、この細胞を用いて、p53 の発現抑制により発現上昇する細胞膜蛋白質をコードする遺伝子をマイクロアレイ法でゲノム網羅的に探索し、10 個の候補遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子の肺腺がん細胞株における発現を RT-PCR 法で解析し、変異 p53 を持つ細胞株で有意に発現が高い 2 つの遺伝子 (仮名: CSP1, CSP2) を同定した。これらの遺伝子を

発現抑制すると、肺がん細胞株の運動能が低下し、発現ベクターを導入すると肺上皮細胞の浸潤能が上昇した。以上より、CSP1 と CSP2 は、通常は p53 によって発現抑制され、p53 が失活すると発現上昇することにより細胞の運動能や浸潤能に寄与する遺伝子であることが示唆された。

#### D. 考察

3 課題の結果について、それぞれ個別に考察する。

1)ゲノム網羅的な関連解析による新規肺がん感受性遺伝子の同定

最近、ゲノム網羅的な SNP 解析で CHRNA や TERT など幾つかの肺がん感受性遺伝子が同定された。HLA-DQA1 はマイクロサテライトマーカーを用いたゲノム網羅的な解析で同定された新規遺伝子で、SNP アレイ解析では検出できなかった遺伝子であり、発見の意義は大きい。さらに、TERT の多型と組み合わせることにより日本人の肺腺がん感受性が個人で 5 倍程度異なっていることが分り、今後、個人個人の体質に基づいた肺がん予防法を開発する上で有用な研究成果を得たと考えている。

2)ゲノム網羅的な遺伝子過増幅領域の解析による肺腺がんの予後因子の同定

これまでの研究で、p53 変異と第 17 染色体欠失が非浸潤がん比べて浸潤がん有意に高頻度に見られたことから、これらのゲノム異常が検出された肺腺がん症例は手術で摘出するべきであると考えられた。本研究では、第 8 染色体長腕に位置する MYC 遺伝子の過増幅を呈する小型肺腺がん及び病理学的病期 I 期の肺腺がんが有意に予後不良であったことから、このような症例に対しては術後化学療法等の併用による予後の改善を検討する必要性が示唆された。早期肺腺がんにおける術後補助療法の適応を決めるマーカーとして有用か、今後は前向き試験などで確認していきたい。

3)ゲノム網羅的な p53 制御遺伝子の探索とその機能解析

将来的に p53 変異がんの治療標的になり得る分子として、p53 失活により発現上昇する細胞膜蛋白質の探索を開始したが、候補として 2 つの蛋白質 CSP1 と CSP2 を同定することができた。両者とも細胞の運動能や浸潤能を制御することが分ったので、今後はその制御機構を更に解析するとともに、p53 が失活した細胞の運動能や浸潤能を特異的に抑制する抗体や低分子化合物を探索し、肺がんを中心とする p53 変異がんを対象とする新たな分子標的治療の開発へと発展させていきたい。

#### E. 結論

新規肺腺がん感受性遺伝子として HLA-DQA1 を同定した。早期肺腺がんの術後の再発予後を規定する遺伝子として MYC を同定した。p53 の失活によって発現上昇し、運動能・浸潤能を制御する細胞膜蛋白質を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.*, 18:1343-1352, 2009.
- 4) Blanco, 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*, 30:1199-1206, 2009.
- 5) Anami, Y., Iijima, T., Suzuki, K., Yokota, J., Minami, Y., Kobayashi, H., Satomi, K., Nakazato, Y., Okada, M., and Noguchi, M. Bronchioloalveolar carcinoma (lepidic growth) component is a more useful prognostic factor than lymph node metastasis. *J. Thoracic Oncol.*, 4:951-958, 2009.
- 6) Kumamoto, K., Fujita, K., Kurotani, R., Saito, M., Unoki, M., Hagiwara, N., Shiga, H., Bowman, E. D., Yanaihara, N., Okamura, S., Nagashima, M., Miyamoto, K., Takenoshita, S., Yokota, J., and Harris, C. C. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int. J. Cancer*, 125:1306-1315, 2009.
- 7) Ohata, H., Ota, N., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yokota, J., Taya, Y., and Enari, M. Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation. *J. Mol. Biol.*, 394:460-471, 2009.
- 8) Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A. J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Shigetsugu, H., Obata, T., and Noguchi, M. The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Developmental Cell*, 17:800-810, 2009.
- 9) Kohno, T., Otsuka, A., Girard, L., Sato, M., Iwakawa, R., Ogiwara, H., Sanchez-Cespedes, M., Minna, J. D., and Yokota, J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes, Chromosomes, Cancer*, in press, 2010.
- 10) Kodama, M., Otsubo, C., Hirota, T., Yokota, J., Enari, M., and Taya, Y. Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol Cell Biol.*, 2010 Feb 1. [Epub ahead of print]
- 11) Kohno, T., Kunitoh, H., Shimada, Y., Shiraiishi, K., Ishii, Y., Goto, K., Ohe, Y., Nishiwaki, Y., Kuchiba, A., Yamamoto, S., Hirose, H., Oka, A., Yanagitani, N., Saito, R., Inoko, H., and Yokota, J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*, in press, 2010.
- 12) Roy, B. C., Kohno, T., Iwakawa, R., Moriguchi, T., Kiyono, T., Morishita, K., Sanchez-Cespedes, M., Akiyama, T., and Yokota, J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, in press, 2010.
- 13) Iwakawa, R., Kohno, T., Enari, M., Kiyono, T. and Yokota, J. Prevalence of human papilloma virus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, in press.

G. 知的財産権の出願・登録情報  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所ウイルス部 部長

研究要旨 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において、子宮頸がん幹細胞様細胞株を樹立しその成立維持機構を解析した。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、少なくとも200個の細胞で造腫瘍性を示した。c-mycを追加導入するとさらに造腫瘍性が強くなり、Mycの機能を阻害する変異型Mycを導入すると造腫瘍性は著減し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。また、この多段階発がんモデルにおいてE6のC末端にあるPDZドメイン結合モチーフが細胞がん化に極めて重要であることを示し、標的候補蛋白質を絞り込むことに成功した。新たに、正常舌角化細胞を用いHPV陽性あるいはHPV陰性の舌がんのin vitro多段階発がんモデルを作製した。また、これまで不死化が困難であったヒトの正常膵管細胞ならびに大腸上皮細胞の不死化に成功し、in vitro多段階発がんモデルの作製を試みている。

#### 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し、各ステップで起きている現象を詳細に解析する。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を試みる。

#### 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, ErbB1, 活性型 ErbB1, PI3K, 変異 $\beta$ -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、舌角化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、舌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

子宮頸がん、上皮性卵巣がんについて、舌がんの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では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するという結果を得ていた。しかし、c-Mycを追加導入しなくても200個の細胞を皮下移植によって腫瘍を形成することが明らかとなった。HPV16 E6, E7及びHrasV12の導入による造腫瘍性の獲得は安定化したc-Myc蛋白の活性に依存している可能性を考え、Mycの活性を抑制する変異Myc (Omomyc) を導入して造腫瘍性を調べた。OmomycはMycの配列の一部をMaxの配列に置き換えることでMyc/Omomycのヘテロダイマーを形成するがDNA結合能を持たないため、Mycの機能を阻害する。Omomycを発現しても平皿上での増殖能には影響がなかったが、造腫瘍能は著しく低下した。また、HeLaなど子宮頸がん細胞株にOmomycを発現させても造腫瘍能が低下することが示された。

同様に舌がんのin vitroモデル作製のため、手術材料2検体から、舌角化細胞 (HTK1, HTK3) を分離培養し、E6E7またはhTERT+変異cdk4+cyclin Dにより不死化した舌角化細胞株を樹立し

た。hTERT+変異cdk4+cyclin Dで不死化したHTK1, HTK3に、変異p53+ HrasG12V+c-mycあるいは変異p53+ (活性型または野生型) ErbB1+c-myc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。同様にE6E7導入により不死化したHTK1, HTK3に変異HrasG12V+c-mycあるいは(活性型または野生型) ErbB1+c-mycを導入することにより造腫瘍性を獲得した。HCKの場合と異なり、E6E7+HrasG12VあるいはhTERT+変異cdk4+cyclin D+変異p53+HrasG12Vのみでは造腫瘍性は弱いか認められず、c-mycの追加導入が必要であった。同じ角化細胞でありながら異なる感受性を示す背景についてMycの発現量を中心に解析中である。

また、これまで困難であった腭管上皮細胞ならびに大腸上皮細胞の不死化を試み成功した。興味深いことにこれらの細胞でもE6E7+活性型Ras+Mycの発現によりヌードマウスにおいて造腫瘍性を獲得するという予備的結果を得た。

#### 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が、c-mycの導入なしでも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。Mycの機能抑制により造腫瘍能が著しく低下したことから、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。

これまで、多くの異なる細胞種でE6E7+活性型Ras+Mycの発現によりヌードマウスにおいて造腫瘍性を獲得するとの予備的結果が得られており、異なる細胞種間でもがん化に必要な経路はかなり共通性が高いことが示唆された。今後、種々のin vitro発がんモデルを作成比較することで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考えられる。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示された。

#### E. 結論

子宮内膜がん、子宮頸がん、上皮性卵巣がんのin vitro多段階発がんモデルに続き、新たに舌がんモデルの作製に成功した。また、腭がん、大腸がんのモデル作製のための正常不死化細胞樹立に成功した。ヒト子宮頸がんのin vitro多段階発がんモデルでは、HPV16のE6, E7に加えHrasG12Vを導入するだけで、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得すること、さらにc-mycを導入することで造腫瘍能の亢進が見られた。逆にc-Mycの活性をOmomycにより抑制すると造腫瘍性は著しく低下しMycの活性が幹細胞性の維持に重要であることが示唆された。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。

新たに作製した舌がんモデルにおいてはHPV陽性の舌がんモデルとHPV陰性の舌がんモデルを樹立した。ここでもE6E7に加え、活性化RasまたはEGFR+c-mycが造腫瘍性獲得に重要であることが示された。また、E6E7の活性はhTERT+変異cdk4+cyclin D+変異p53でほぼ代替され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、実際のヒトがんに近い解析・評価が可能である。これまでに得られた4つのがんのin vitroモデル作製の結果からも、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが改めて確認できた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

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*. 30:423-431, 2009.

Yugawa, T., and Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel

functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 19:97-113, 2009.

Sugimoto N, Yoshida K, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Waga S, Kiyono T, Fujita M. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of re-replication in normal human cells. *J Cell Sci*. 122:1184-91, 2009.

Yuan H, Ito S, Senga T, Hyodo T, Kiyono T, Kikkawa F, Hamaguchi M. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. *Int J Oncol*. 35:309-14, 2009.

Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M, Kyo S. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression. *Mol Hum Reprod*. 15:693-701, 2009.

Kawai K, Egawa N, Kiyono T, Kanekura T. Epidermodysplasia- verruciformis-like eruption associated with gamma-papillomavirus infection in a patient with adult T-cell leukemia. *Dermatology* 219(3):274-8, 2009.

Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. A novel positive feedback loop between Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. *J Biol Chem*. 284, 34223-30, 2009.

Ibrahim HR, Kiyono T. Novel Anticancer Activity of the Autocleaved Ovotransferrin against Human Colon and Breast Cancer Cells. *J Agric Food Chem*. 57:11383-90. 2009.

Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. J Cell Sci. 123:225-35, 2010.

Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. Virus Genes. 2010

## 2. 学会発表

Saito-Narisawa M, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Ohno S-I, Zushi Y, Fujita M, Kiyono T. An in vitro multi-step carcinogenesis model for HPV-associated cancers. (Malmo, Sweden), 2009.

Yugawa T, Saito-Narisawa M, Fujita M, Kiyono T. Down-modulation of the p53-Notch1 pathway by HPV16 E6. (Malmo, Sweden), 2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

「(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