

リンパ腫の発生に関わる分子病態の解析

研究分担者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所 副所長 兼 遺伝子医療研究部長

研究要旨：胃 MALT リンパ腫のうち、API2-MALT1 キメラ遺伝子陰性で除菌療法抵抗性症例は、約半数を占め、約 70%の症例に何らかのゲノムコピー数異常がある。一方、除菌療法反応性症例では約 1/3 の症例に、何らかのゲノムコピー数異常が認められた。すなわち、ゲノムコピー数異常は除菌療法抵抗性群に統計的に有意に多いが、除菌療法反応性群にもある程度認められるため、必ずしも良いマーカーとはなりえないことが判明した。皮膚のみに主症状を有する皮膚型 ATLL 22 症例についてのアレイ CGH 解析により、皮膚型 ATLL 症例では、1p36 の増幅もしくは 13q33 の欠失は予後不良と関連していることが明らかになった。また、全体としてのゲノム異常様式では、リンパ腫型 ATLL 症例のゲノム異常様式とパターンが似ていたが、皮膚のみに主症状を有する皮膚型 ATLL は、他の臨床病型の ATLL とは異なった独立した疾患単位である可能性が示唆された。

A. 研究目的

1. 胃 MALT リンパ腫において、除菌療法抵抗性症例のゲノム異常に関する探索を行い、その意義を確立する。
2. 皮膚型成人 T 細胞性白血病リンパ腫 (ATLL) のアレイ CGH によるゲノム異常の解析と臨床的意義について探索する。

B. 研究方法

1. 胃 MALT リンパ腫除菌療法抵抗性症例のゲノム異常探索とその意義の確立  
除菌療法抵抗性胃 MALT リンパ腫症例において API2-MALT1 キメラ遺伝子の無い症例を 10 症例を対象とする。また、除菌反応症例においても、症例数を増やし、合計 24 症例で検討する。
2. 皮膚型 ATLL 症例のゲノム異常の解析と臨床病態との相関の解析

皮膚のみに主症状を有する皮膚型 ATLL 22 症例について、アレイ CGH を行い、臨床病態と相関させ、皮膚型 ATLL のゲノム異常について検討する。その結果を他の臨床病型の ATLL と比較し、皮膚型 ATLL の疾患単位としての意義を検討する。

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

C. 研究結果

1. 胃 MALT リンパ腫除菌療法抵抗性症例のゲノム異常探索とその意義の確立  
胃 MALT リンパ腫のうち、除菌療法抵抗性症例の半数には API2-MALT1 キメラ遺伝

子遺伝子があることを明らかにしていたが、今年度は、キメラ遺伝子陰性で除菌療法抵抗性症例について検討したところ、7症例に何らかのゲノムコピー数異常が見出された。一方、除菌療法反応性症例、9症例について調べると、1症例にゲノムコピー数異常が見出された。統計学的にはゲノムコピー数異常は、除菌療法抵抗性のマーカーになりうることを示しているが、確認のため15症例増やし、合計24症例にして検討したところ、8症例に何らかのゲノム異常があることが判明した(1/3の症例)。

## 2. 皮膚型 ATLL 症例のゲノム異常の解析と臨床病態との関連の解析

皮膚のみに主症状を有する皮膚型 ATLL 22 症例について、アレイ CGH を行い、臨床病態と関連させたところ、皮膚型 ATLL 症例では、1p36 の増幅もしくは 13q33 の欠失は予後不良と関連していた。また、紅斑丘疹形成群と結節腫瘍形成群ではゲノム異常様式が異なっていることを明らかにした。後者のほうが、ゲノム異常を示す症例が多かった。また、全体としてのゲノム異常様式では、リンパ腫型 ATLL 症例のゲノム異常様式とパターンが似ていた。

## D. 考察

### 1. 胃 MALT リンパ腫除菌療法抵抗性症例のゲノム異常探索とその意義の確立

胃 MALT リンパ腫除菌療法抵抗性症例のうち、API2-MALT1 キメラ遺伝子のある症例は半数を占めるが、キメラ遺伝子のない症例群の訳 70%にはゲノムコピー数の異常が認められた。ゲノムコピー数の異常が除菌療法抵抗性のマーカーになるかを検討するために、除菌療法反応性症例、24 症例について検討したところ、8 症例(30%)に、何らかのゲノムコピー数異常が認められた。すなわち、ゲノムコピー数異常は除菌療法

抵抗性群に統計的に有意に多いが、除菌療法反応性群にもある程度認められるため、必ずしも良いマーカーとはなりえないことが判明した。今後、よりゲノム異常を高密度に検討できるアレイグラスを用いて、詳細に検討する必要がある。

## 2. 皮膚型 ATLL 症例のゲノム異常の解析と臨床病態との関連の解析

皮膚のみに主症状を有する症例は、臨床病型分類としてはくすぶり型 ATLL に分けられる。今回、皮膚のみに主症状を有する皮膚型 ATLL 22 症例について、アレイ CGH を行ったところ、全体のゲノム異常様式はリンパ腫型 ATLL に似ていたことは、皮膚型 ATLL を理解する上で重要である。しかし、皮膚に主症状がある群の 50%生存率は 5.4 年と、リンパ腫型に比較し、予後が良い。臨床病態と関連させたところ、皮膚型 ATLL 症例では、1p36 の増幅もしくは 13q33 の欠失は予後不良と関連していることや、紅斑丘疹形成群と結節腫瘍形成群ではゲノム異常様式が異なっていることは、皮膚型 ATLL が他の臨床病型とは独立した臨床病態を持つことを示唆する。ATLL は約半数に皮膚症状を持つので、それらと比較し、今回明らかにした皮膚型 ATLL とはどのように異なるかを今後、明らかにする必要がある。

## E. 結論

1. ゲノムコピー数異常は除菌療法抵抗性群に統計的に有意に多いが、除菌療法反応性群にもある程度認められるため、必ずしも除菌療法抵抗性の良いマーカーとはならない。
2. 皮膚のみに主症状を有する症例は、臨床病型分類としてはくすぶり型 ATLL に分けられるが、皮膚型 ATLL は他の臨床病

型とは独立した臨床病態を持つ可能性がある。  
ある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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*, 100:920-926, 2009.
4. Honma, K, Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M.: *TNFAIP3/A20* functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 114:2467-2475, 2009.
5. Kato, H., Taji, H., Ogura, M., Kagami, Y., Oki, Y., Tsujimura, A., Fuwa, N., Kodaira, T., Seto, M., Yamamoto, K., Morishima, Y.: Favorable consolidative effect of high-dose melphalan and total-body irradiation followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation after rituximab-containing induction chemotherapy with in vivo purging in relapsed or refractory follicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 9:443-118, 2009.
6. Miyata, T., Yonekura, K., Utsunomiya, A., Kanekura, T., Nakamura, S., Seto, M.: Cutaneous type adult T-cell leukemia/lymphoma is a characteristic subtype and includes erythema/papule and nodule/tumor subgroups. *Int J Cancer*, 126: 1521-1528, 2010.
7. Tsukamoto, Y., Nakada, C., Noguchi, T., Tanigawa, M., Nguyen, L T., Uchida, T., Hijiya, N., Matsuura, K., Fujioka, T., Seto, M., Moriyama, M.: MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res.*, 70: 2339-2349, 2010.
8. Uchida, M., Tsukamoto, Y., Uchida, T., Ishikawa, Y., Nagai, T., Hijiya, N., Nguyen, L T., Nakada, C., Kuroda, A., Okimoto, T., Kodama, M., Murakami, K., Noguchi, T., Matsuura, K., Tanigawa, M., Seto, M., Ito, H., Fujioka, T., Takeuchi, I., Moriyama, M.: Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based

comparative genomic hybridization.  
Journal of Pathology, in press

9. Kato, H., Yamamoto, K., Matsuo, K., Oki, Y., Taji, H., Kuwatsuka, Y., Seto, M., Kagami, Y., Morishima, Y.: Clinical impact and predisposing factors of delayed-onset neutropenia after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for B-cell non-Hodgkin lymphoma: association with an incremental risk of infectious events. Ann Oncol., in press

## 2. 学会発表

1. Nakagawa, M., Umino, A., Nakagawa-Oshiro, A., Utsunomiya, A., Nakamura, S., Takeuchi, I., Ohshima, K., Seto, M.: Distinct genome profiles of acute and lymphoma type ATLL: an indication for two subtypes in acute type ATLL. 14th International Conference on Human Retrovirology. 2009. (ブラジル) (口演)
2. 都築 忍, 瀬戸 加大: 急性リンパ性白血病の前白血病期におけるTEL-AML1の役割. 第68回日本癌学会学術総会, 2009. (横浜) (ポスター)
3. 中川 雅夫, 海野 啓, 竹内 一郎, 中川 綾, 宇都宮 與, 塚崎 邦弘, 瀬戸 加大: 急性型成人T細胞性白血病/リンパ腫症例はリンパ腫型に特徴的な遺伝子発現プロファイルを用いると複数のグループに分類できる. 第68回日本癌学会学術総会, 2009. (横浜) (ポスター)
4. 加留部 謙之輔, 中川 雅夫, 都築 忍, 清水 則夫, 中村 栄男, 高田 尚良, 瀬戸 加大: NK/T細胞性腫瘍の遺伝子発現プロファイル. 第68回日本癌学会学術総会, 2009. (横浜) (ポスター)
5. 本間 圭一郎, 瀬戸 加大, 都築 忍: 悪性リンパ腫におけるTNFAIP3/A20. 第68回日本癌学会学術総会, 2009. (横浜) (ポスター)
6. 海野 啓, 中川 雅夫, 塚崎 邦弘, 宇都宮 與, 瀬戸 加大: アレイCGHにより明らかになった急性型ATLの多クローン性. 第68回日本癌学会学術総会, 2009. (横浜) (口演)
7. 鏡味 良豊, シバスンドラム カルナン, 加藤 春美, 大城 一郁, 中川 綾, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: IL-4存在下で樹立しえたATL腫瘍細胞株の性状. 第71回日本血液学会学術集会, 2009. (京都) (ポスター)
8. Asano, N., Tamaru, J., Ishida, F., Yoshino, T., Suzuki, R., Kagami, Y., Morishima, Y., Kinoshita, T., Seto, M., Nakamura, S.: Cytotoxic molecule (CM)-positive classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathologic study in comparison with nodal peripheral T-cell lymphoma of not otherwise specified type possessing CM expression 第51回米国血液学会総会. 2009. (米国) (ポスター)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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：悪性腫瘍の発生および進展にはゲノム DNA 上の点突然変異や増幅・欠失などのジェネティックな変異とゲノム DNA の変異を伴わない DNA メチル化やヒストン修飾によるエピジェネティックな変化の両者が重要である。肺がん細胞の発生や増殖・浸潤におけるジェネティックな変化の本態が明らかにされつつあるが、エピジェネティックな変化の本態および各種の遺伝子変異との関係の詳細は未だ明らかではない。非小細胞肺がん 95 例に対し Methylated CpG island Amplification (MCA)-マイクロアレイ法を用いた 6157 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化解析結果から高メチル化が観察された遺伝子群、および他の腫瘍で CpG island methylator phenotype (CIMP) マーカーと考えられている遺伝子に対して定量的メチル化解析法を用いて検討した。その結果、p16 遺伝子や MINT1 遺伝子などが非小細胞肺がんの CIMP マーカーとして利用可能であることを明らかにした。さらに非小細胞肺がんの高メチル化群は臨床的に予後不良であることを明らかにした。また、メチル化状態や EGFR 遺伝子変異の異なる肺がん細胞株を用い in vitro において各種阻害薬の単独および併用投与を行ったところ DNA メチル化阻害剤による EGFR 変異 (-) 細胞株での顕著な細胞増殖抑制効果を明らかにした。

A. 研究目的

進行非小細胞肺がん患者の 5 年生存率は極めて不良であり、肺がんは本邦における男性のがん死原因の 1 位である。肺がんに対する新たな治療法を開発するためには、肺がん細胞の発生・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有効な戦略であると考えられる。近年、EGFR に対するゲフィチニブやエルロチニブなど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。

他の悪性腫瘍と同様に、非小細胞肺がんにおいても DNA メチル化異常が早期から検出され、腫瘍の増殖・進展に伴ってさらに多くの遺伝子が DNA メチル化によって不活化されメチル化異常が蓄積されていくことが示されている。DNA メチル化異常は肺がんの前がん病変からも検出され、多くの遺伝子の発現異常に係っているため、診断指標および治療標的としての活用が期待されている。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異なることも明らかになっている。従って、個々の非小細胞肺がんでの DNA メチル化異常および EGFR などの遺伝子の異常の情報に基づき、EGFR 阻害剤などの分子標的薬とエピジェネティクス治療薬との単独および併用投与により、より有効な治療戦略が展開できるものと考えられる。本年度は、DNA メチル化異常をさらに定量的な手法で解析し、肺がんにおける CIMP マーカーとしての有用性を検証するとともに、遺伝子異常との相関について検討した。さらに、肺がん細胞株を用い、分子標的薬とエピジェネティクス治療薬の抗腫瘍効果について検討した。

## B. 研究方法

95 例の非小細胞肺がん外科手術検体から抽出したゲノム DNA を用い、パイロシーケンシング法を用いて 11 個の遺伝子のプロモーター領域の定量的な解析を施行した。11 個の遺伝子の内訳は、昨年度、48 例の肺がんにおける網羅的なメチル化解析で高メチル化を同定した CCNA1 遺伝子を始めとする 6 遺伝子、および大腸がんなどで古典的な CIMP マーカーとして考えられている p16, hMLH1 などの 5 遺伝子であった。非小細胞肺がんの組織型は腺がん 66 例、扁平上皮がん 28 例、腺扁平上皮がん 1 例であった。ジェネティックな異常としては、EGFR、KRAS、p53 の遺伝子変異状態との相関を検討した。また、12 株の肺がん細胞株を用いて同様にパイロシーケンシング法による定量的なメチル化異常の検討および遺伝子異常との相関に関する検討を行った。

非小細胞細胞株 3 株に対して EGFR 阻害剤および DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤を単独および併用投与によりその増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて *in vitro* にて検討した。

## (倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会および共同研究機関である名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

パイロシーケンシング法で 11 遺伝子のプロモーター領域のメチル化レベルを定量的に検討し、メチル化レベルが 15%以上であるものをメチル化陽性とした。古典的 CIMP マーカーである hMLH1 および MINT2 は検討した非小細胞肺がんのほぼ全例でメチル化レベルが低かったが、他の遺伝子は高メチル化している症例が認められ、お互いにメチル化状態が相関していた。大腸がんでは知られている標準的な CIMP マーカー 5 つのうち、2 個以上メチル化しているものを CIMP 陽性と判定したところ全体で 95 例中 16 例 (17%) が CIMP 陽性と判断された。腺がん/EGFR 変異 (+) では 31 例中 2 例 (2.1%)、腺がん/EGFR 変異 (-) では 35 例中 8 例 (8.4%) および扁平上皮がんでは 28 例中 6 例 (6.3%) が CIMP 陽性と判定され、腺がん/EGFR 変異 (+) の非小細胞肺がんでは CIMP マーカー陽性例が

低いことが確認された。さらに、これらの症例を用い外科手術後の予後解析を行ったところ、高メチル化群は予後不良であることを明らかにした。

細胞株レベルでの DNA メチル化状態を明らかにするため 12 株の非小細胞肺癌細胞株のゲノム DNA を用いて同様に検討したところ、CIMP マーカー 2 個以上メチル化しているものを陽性としたクライテリアではほとんど全ての細胞株が CIMP 陽性と判定され、細胞培養状態が DNA メチル化状態に強く影響することが示唆された。DNA メチル化阻害剤および EGFR 阻害剤の単独および併用投与を行って細胞増殖抑制効果を検討したところ、DNA メチル化阻害剤投与による EGFR 変異(-)細胞株での細胞増殖抑制効果を明らかにした。

#### D. 考察

前年度までに DNA メチル化異常を迅速かつ網羅的に検出する MCA-マイクロアレイ法を用いて非小細胞肺癌を解析し、メチル化異常のレベルが肺癌の病理組織型および遺伝子変異の有無により違いがあることを明らかにした。本年度、これらの MCAM 法で抽出された DNA メチル化標的遺伝子および大腸がんでは知られている CIMP マーカーを用いてメチル化レベルを定量的に検討したところ、これらのマーカーの解析を行えば、肺癌においてもメチル化状態を簡便に判定することが可能であることが明らかとなった。特に、大腸がんにおける古典的な CIMP マーカーを用いても肺癌における CIMP 陽性の判定が可能であることが示唆された。

#### E. 結論

非小細胞肺癌における DNA メチル化異常のレベルは病理組織型・EGFR 変異の有無で標的メチル化遺伝子の数が異なるが、それらはいくつかの代表的な遺伝子のプロモーター領域を定量的に解析することにより検出可能であることが明らかとなった。これらの遺伝子としては網羅的 DNA メチル化解析で抽出された遺伝子、および大腸がんなどで用いられている遺伝子（古典的 CIMP マーカー）が利用可能であることが明らかとなった。さらに、非小細胞肺癌患者において DNA メチル化が高レベルである群は予後不良であることが明らかとなった。非小細胞肺癌細胞株を用いた *in vitro* の検討では、EGFR 変異を伴わない細胞株において DNA メチル化阻害剤の著明な抗腫瘍活性が検出され、今後の肺癌治療において、分子標的薬との単独および併用に関する合理的な選択にとって有用な知見になりうることを示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Horio Y, Osada H, Shimizu J, Ogawa S, Hida T, Sekido Y: Relationship of mRNA expressions of RanBP2 and topoisomerase II isoforms to cytotoxicity of amrubicin in human lung cancer cell lines. *Cancer Chem Pharm* (in press)
2. Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, Gao W, An B, Fujii

- M, Murakami H, Osada H, Taniguchi T, Usami U, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K, Matsuo K, Hida T, Fujimoto N, Takumi Kishimoto T, Issa JP, Sekido Y: Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 69:9073-82, 2009.
3. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y, Sone S, Yano S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. 16:174-83. 2010
4. An B, Kondo Y, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Sawaki A, Tajika M, Nakamura T, Yamao K, Yatabe Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Tani T, Matsuo K, Shen L, Issa JP, Sekido Y: A characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. *Int J Cancer* (in press)
2. 学会発表
1. Shinjo K, Kondo Y, Goto Y, Yokoyama T, An B, Okamoto Y, Yokoyama H, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y: Genomewide analysis of non-small cell lung cancer reveals high frequency of DNA methylation in adenocarcinoma without epidermal growth factor receptor mutation. 100th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2009.(Denver, USA) (ポスター)
2. Shinjo K, Kondo Y, An B, Okamoto Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y: Integrated epigenetic and genetic analysis reveals the characteristic profile in malignant pleural mesothelioma and lung adenocarcinoma. 2009. (Singapore) (ポスター)
3. 堀尾芳嗣, 清水淳市, 朴智栄, 朴将哲, 小川紫都, 吉田公秀, 樋田豊明, 関戸好孝. 肺癌細胞株におけるトポイソメラーゼ II 阻害剤アムルビシンの感受性と RanBP2 とトポイソメラーゼ II 遺伝子発現。日本呼吸器学会 2009 (東京) (ポスター)
4. 長田啓隆, 立松義朗, 谷田部恭, 有馬千夏, 藤井万紀子, 村上秀樹, 近藤豊, 堀尾芳嗣, 柳澤聖, 関戸好孝, 高橋隆。肺癌の転移関連遺伝子 CLCP1 の機能解析 第 68 回日本癌学会総会 2009. (ポスター)
5. 新城恵子, 後藤康洋, 近藤豊, 安柄九, 岡本泰幸, 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特異的なエピジェネティクスプロファイル。第 68 回日本癌学会総会 2009 (横浜) (口演)
6. 長田啓隆, 立松義朗, 谷田部恭, 有馬千夏, 藤井万紀子, 村上秀樹, 近藤豊, 堀尾芳嗣, 柳澤聖, 関戸好孝, 高橋隆。肺癌の転移関連遺伝子 CLCP1 の機能解析。第 32 回日本分子生物学会年会 2009. (横浜) (ポスター)



7. 山田忠明, 竹内伸司, 西岡安彦, 曾根三郎, 関戸好孝, 矢野聖二。肝細胞増殖因子(HGF)は EGFR 遺伝子変異 T790M を有する肺腺癌の Irreversible EGFR 阻害剤の耐性を誘導する。 日本肺癌学会 2009. (東京) (ポスター)

8. Shinjo K, Okamoto Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y, Kondo Y: Significance of CpG island methylator phenotype in human lung cancers An AACR Special Conference on Cancer Epigenetics. 2010. (Puerto Rico, USA) (ポスター)

9. 新城恵子、後藤康洋、近藤豊、安柄九、岡本泰幸、藤井万紀子、村上秀樹、長田啓隆、関戸好孝。 Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. 第2回 NAGOYA グローバルリトリート 2010 (大府) (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

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：正常上皮細胞の分化の特徴は、はっきりした極性や細胞間接着などに見られ、またこのような分化と増殖は背反関係にある。一方がんではこれらの分化の特徴がしばしば消失し、また無秩序な増殖が起こる。ケラチンは分化上皮細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白質であるにも関わらず、がんに関わりの深い上皮分化制御についての研究は立ち遅れていた。私どもは、ケラチン結合蛋白質アルバトロスとトリコプレインの解析を通じてケラチンおよびこれらの分子が上皮細胞の分化制御に関わるという新知見を増やしつつある。この2つの分子をそのアミノ酸配列から **TPHD**（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン）分子群と名付けた。**TPHD** 分子群の特徴は、分化状態では主に細胞間接着部位に、そして増殖中は主に中心体に局在を変えることである。このことは、**TPHD** 分子群が分化と増殖の両方の分子メカニズムに関わる **bi-player** 分子であることを示唆している。つまり個々のメカニズムの解析と統合により、がん化に関わる新たなメカニズムの解明が期待できる。本年はこの **TPHD** 分子群の主に中心体機能解析について、以下の進展を見た。トリコプレインは中心体、詳細には母中心小体遠位端ではナイニンを介した微小管の係留を行っていた。またトリコプレインはオーロラ A キナーゼを直接活性化することで、増殖期の同部位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。またアルバトロスは細胞間接着部位で細胞間接着装置複合体および極性の制御をする一方で、中心体では紡錘体形成にも必要となる微小管の重合核を制御していた。

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、

**TPHD**（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン）を有するアルバトロス、トリコプレインを同定した。**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・機能する **bi-player** 分子であることが明らかになりつつある。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

機構の解明を目指す。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し、がん化に関わる新たなメカニズムの解明を目指す。本年は、特にトリコプレインとアルバトロスの中心体機能の解析に焦点を置いた。

## B. 研究方法

### 1. トリコプレインとアルバトロスの中心体局在の解析

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、分画を調整しそのイムノプロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。

### 2. トリコプレインとアルバトロスの中心体機能の解析

siRNA による機能欠失、すなわちノックダウンを 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により解析必要な分子の検討をした。一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。また、表現型の確認のため、適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

### 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) の変化を検討した。また *in vitro* のキナーゼ活性変化はトリコプレインとオーロラ 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. トリコプレインの中心体機能の解析

トリコプレインの細胞内局在については、極性化すなわち分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、増殖中の細胞では中心体、詳細には母中心小体にもあることを見出した。母中心小体の機能は、その付属器への微小管の係留と増殖休止期における一次線毛形成が知られている。

そこで、微小管係留との関連について検討した。RNA 干渉法によりトリコプレインを 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、母中心小体付属器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。

トリコプレインとナイニンの結合は、イーストハイブリッド法、免疫沈降法および *in vitro* 結合実験により示された。また、このトリコプレインの局在化は Odf2 に依存することと、トリコプレイン、ナイニン、Odf2 は複合体を形成することを同様に確認した。

一次線毛形成との関連については以下のような結果を得た。血清飢餓による増殖停止で一次線毛が形成されると RPE1 細胞ではトリコプレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコプ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プ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。同時に細胞周期の停止を認めた。この時オーロラ A キナーゼ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、トリコプレインとオーロラ A キナーゼの直接結合を *in vitro* で確認し、*in vitro* キナーゼアッセイではトリコプレインがオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。また、この一次線毛形成が Odf2 依存的であることをトリコプレインと Odf2 のダブルノックダウンにより確認した。

## 2. アルバトロスの中心体局在と機能解析

増殖状態の HeLa 細胞で免疫染色を行ったところ、アルバトロスの局在は中心体に強く認められた。詳細な画像解析ではアルバトロスは Pericentrin2 と共局在することから、その局在は Pericentriolar material (PCM)にあるものと思われる。PCM には  $\gamma$ -tubulin ring complex が存在し、その機能としては微小管重合核となることが知られている。そこで同細胞を用いて中心体のアルバトロスをノックダウンし、微小管重合核としての機能を検討したところ、中心体における  $\gamma$ -tubulin の減少、紡錘体形成の異常を認めた。また、微小管再構成条件下では、重合核形成障害を認めた。またタグ免疫沈降によりアルバトロスが  $\gamma$ -tubulin および  $\gamma$ -tubulin complex protein と複合体を形成する可能性が示唆された。

## 3. アルバトロスが細胞間接着装置を制御する分子メカニズム

今までにアルバトロスと極性化分子

Par3 の複合体が細胞間接着装置を制御することを報告したが、イーストハイブリッド法により ARFIP2 を結合蛋白質の候補としてさらに得た。ARFIP2 は低分子量 GTP 結合蛋白質のひとつである ARF6 に結合する蛋白質である。ARF6 は Par3 と共に分化上皮細胞の細胞間接着に関わる報告が出てきている。

## D. 考察

今回、トリコプレインの中心体機能は一次線毛形成抑制を含めた分化・増殖制御に関わる可能性を認めた。また、オーロラ A キナーゼの機能は活性化因子に依存して多様で、細胞分裂に伴う紡錘体形成のための中心体成熟に加え、非対称分裂や一次線毛形成抑制等、様々な分化・増殖制御との関連が示されつつある。よって、トリコプレインとオーロラ A キナーゼの細胞増殖における機能相違点を明らかにしていくことは、より特異性の高いがん関連増殖機構の解明につながる。またアルバトロスは増殖状態で中心体に局在し、微小管構築を介した重要な細胞増殖機能に関わる可能性がある。

これまでの私どもの研究では、分化上皮細胞の細胞間接着部位にアルバトロスとトリコプレインは局在し、そのうちアルバトロスは極性化分子 Par3 と複合体を形成し、細胞極性を制御していた。また、ケラチンはこの機能に対し促進的に働いていた。今後、これらの結合分子をさらに検索し、その分子メカニズムの相違点を明らかにしていくことで、TPHD 分子群およびケラチンによる背反的な上皮細胞分化増殖制御機構の解明が期待できる。

## 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、TPHD分子群として新規ケラチン結合蛋白質アルバトロス、トリコプレインを同定し、これらおよびケラチンが上皮細胞の分化制御に関わるという新知見を増やしつつある。さらにTPHD分子群は分化状態では主に細胞間接着部位に、そして増殖中は主に中心体に局在を変え機能する、すなわち分化と増殖の両方の分子メカニズムに関わるbi-player分子であることが明らかになりつつある。今後、個々のメカニズムを解析し相違点を明らかにすることで、分化と増殖という相反する現象の相互関係を新たに示し、がん化に関わる新たなメカニズムの解明が期待できる。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawase, T., Matsuo, K., Suzuki, T., Hirose, K., Hosono, S., Watanabe, M., Inagaki, M., Iwata, H., Tanaka, H., Tajima, K. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci.* in press

2. Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M., Mizutani, S., Teraoka, H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5: e8821, 2010
3. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Dimova, N., Trucchi, B., Srinivasan, C., Elliott, G.I., Zhan, C.G., Lau, D.L., Zhu, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Cambi, F., Mohan, R. Withaferin A targets intermediate filaments GFAP and vimentin in A model of retinal gliosis. *J. Biol. Chem.* 285:7657-7669, 2010
4. Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T., Inagaki, M. Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* 284: 34223-34230, 2009

### 2. 学会発表

1. 猪子誠人, 杉本昌彦, 白水崇, 中山雅敬, 鄒鵬, 米村重信, 林裕子, 井澤一郎, 佐宗幹夫, 宇治幸隆, 貝淵弘三, 清野透, 稲垣昌樹: ケラチン結合蛋白質アルバトロスは上皮細胞極性を制御する. 第61回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ワークショップ]
2. 猪子誠人, 杉本昌彦, 白水崇, 中山雅敬, 鄒鵬, 米村重信, 林裕子, 井澤一郎, 佐宗幹夫, 宇治幸隆, 貝淵弘三, 清野透, 稲垣昌樹: ケラチン結合蛋白質アルバトロスは上皮細胞極性を制御する. 第61回日本細胞生物学会大会, 2009, (名

- 古屋), [ポスター]
3. 衣斐美歩, 鄒鵬, 猪子誠人, 大室 (松山) 有紀, 松山誠, 白水崇, 林裕子, 森大輔, 広常真治, 米村重信, 月田早智子, 稲垣昌樹: ケラチン結合蛋白質 Trichoplein は微小管の anchoring を制御し, Primary cilia 形成を抑制する. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ポスター]
  4. 井澤一郎, 林裕子, 稲垣昌樹: ERBIN の形質膜局在にはパルミトイル化が必要である. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ポスター]
  5. 白水崇, 猪子誠人, 米村重信, 清野透, 稲垣昌樹: 新規ケラチン結合蛋白質 Trichoplein の細胞間接着部位における機能解析. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ポスター]
  6. 榎本将人, 後藤英仁, 友野靖子, 笠原広介, 池上要介, 辻村邦夫, 清野透, 稲垣昌樹: G2/M 期における Cdk1 による Chk1 の制御機構の解析. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ポスター]
  7. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 友野靖子, 清野透, 稲垣昌樹: The association between autophosphorylated Chk1 and 14-3-3 $\gamma$  is required for Chk1 function in DNA damage checkpoint. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009, (名古屋), [ポスター]
  8. Inagaki, M.: Cell cycle and architecture. Regulation and Manipulation of Information Flow within Dynamic Protein and Lipid Environments (SFB 645 Workshop Cell Architecture and Cell Signalling), 2009, (Bonn), [シンポジウム]
  9. Inagaki, M.: Signaling and cell architecture. Receptor Program Ad Hoc Seminar, 2009, (Turku), [シンポジウム]
  10. Inagaki, M.: Anti-phospho peptide antibodies - a tool to address the regulatory function of intermediate filaments and cell cycle progression in astrocytes. the 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease, 2009, (Sweden), [シンポジウム]
  11. Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuyama, M., Shiromizu, T., Hayashi, Y., Mori, D., Hirotsune, S., Yonemura, S., Tsukita, S., Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin-binding protein, maker of microtubule-organization and breaker of cilia assembly. the 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease, 2009, (Sweden), [ポスター]
  12. 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 polarization of epithelial cells. the 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease, 2009, (Sweden), [ポスター]
  13. 笠原広介, 後藤英仁, 稲垣昌樹: 多彩なリン酸化によってチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) は機能修飾される. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009, (横浜), [シンポジウム]
  14. Izawa, I., Hayashi, Y., Inagaki, M.: Possible

- involvement of ERBIN in the regulation of PI3K-Akt signaling pathway. 第68回日本癌学会学術総会, 2009, (横浜), [ポスター]
15. 榎本将人, 後藤英仁, 友野靖子, 笠原広介, 辻村邦夫, 清野透, 稲垣昌樹: G2/M期における Cdk1 による Chk1 の制御機構の解析. 第82回日本生化学大会, 2009, (神戸), [ワークショップ]
  16. 榎本将人, 後藤英仁, 友野靖子, 笠原広介, 辻村邦夫, 清野透, 稲垣昌樹: G2/M期における Cdk1 による Chk1 の制御機構の解析. 第82回日本生化学大会, 2009, (神戸), [ポスター]
  17. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Inagaki, M.: 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage. Global COE Program The Second International Symposium, 2009, (名古屋), [ポスター]
  18. Matsuyama, M., Ibi, M., Ohmuro-Matsuyama, Y., Inoko, A., Zou, P., Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin-binding protein, maker of microtubule-organization and breaker of cilia assembly. Global COE Program The Second International Symposium, 2009, (名古屋), [ポスター]
  19. Kasahara, K., Goto, H., Tomono, Y., Enomoto, M., Kiyono, T., Inagaki, M.: 14-3-3  $\gamma$  participates in DNA damage checkpoint through bridging Chk1 signal to Cdc25A. 第32回日本分子生物学会年会, 2009, (横浜), [ポスター]
  20. Goto, H., Kasahara, K., Tomono, Y., Enomoto, M., Kiyono, T., Inagaki, M.: 14-3-3g mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage. The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, (San Diego, CA), [ポスター]
  21. Matsuyama, M., Zou, P., Inoko, A., Ibi, M., Ohmuro-Matsuyama, Y., Inagaki, M.: Trichoplein regulates cilia assembly and microtubule organization. The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, (San Diego, CA), [ポスター]
  22. Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T., Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation by Cdk1 is required for the adequate activation of Cdk1. The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, (San Diego, CA), [ポスター]
  23. Inagaki, M.: Trichoplein regulates microtubule anchoring and suppresses a cilia assembly program at the mother centriole. GCOE 第一回国際シンポジウム, 2009, (名古屋), [シンポジウム]
  24. Inoko, A., Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin-binding protein, maker of microtubule-organization and breaker of cilia assembly. Cell Cycle and Cell Architecture, 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。

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

消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

研究分担者 中西速夫 愛知県がんセンター研究所 腫瘍病理学部 室長

研究要旨：大腸がんの多くは分化型腺癌であるが、5-10%の頻度で低分化型腺癌が存在する。本邦における大腸低分化型腺癌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。本年度は昨年度樹立した 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(COLM-5)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) 大腸癌患者から樹立した低分化型腺癌細胞株(COLM-5)は高転移性で Gefitinib, Cetuximab に対し高感受性を示し、さらに EGFR, HER2 高発現、HER3 低発現という特徴的な HER family 発現パターンを示すことを明らかにした。2) COLM-5 細胞に特徴的な HER3 低発現は sodium butyrate やトリコスタチンなどの HDAC 阻害剤で発現誘導され、それに伴い E-cadherin 発現などの上皮分化が誘導されること、3) 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、また4) 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、HER3 低発現が COLM-5 細胞の Gefitinib 高感受性に重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。COLM-5 細胞の様に EGFR+/HER3- 発現パターンを示す低分化型大腸癌症例は稀ではなく、Gefitinib などの EGFR 標的薬の新しい治療標的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)における HER3 低発現の生理的意義の検討
2. 上記、COLM-5 細胞株を用いた Gefitinib 感受性機構の解析
3. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の Gefitinib 感受性における役割の解析

B. 研究方法

1. Sodium butyrate やトリコスタチンなどの HDAC 阻害剤や 5-azacytidine などの脱メチル化剤を用いて HER3 発現誘導ならびに分化誘導の有無を検討する。
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



対する新しい分子標的治療法を構築する。

3. HER3 低発現の COLM-5 細胞株に HER3 を強制的に発現させた安定発現株を作成し、Gefitinib 感受性に及ぼす影響を明らかにする。

### C. 研究結果

#### 1. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)における HER3 低発現の生理的意義の検討

COLM-5細胞はFlow cytometry, Western blotならびに免疫染色のいずれの測定法でもほとんど発現が認められなかった。しかし、Sodium butyrate やトリコスタチンなどのHDAC阻害剤で発現が誘導されることを見いだした。別の低分化型大腸がん細胞株 (RKO)でも HDAC 阻害剤により HER3の発現は誘導され、低分化型大腸がん細胞ではHER3発現がヒストンの脱アセチル化によってエピジェネチックに制御されていることが明らかとなった。一方、分化型大腸がん細胞株はHER3を高発現し、HDAC阻害剤によるHER3の発現増強は見られなかった。また興味あることにHDAC阻害剤により低分化型大腸のHER3発現を誘導すると、E-cadherinならびにMUC2などの上皮分化マーカーの発現誘導が認められたことから、HER3が大腸がん細胞の分化制御に関係している可能性が示唆された。

#### 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新しい治療標的

COLM-5のGefitinibによる増殖抑制のメカニズムとしてアポトーシス誘導よりも、P27を介した細胞周期停止(G1期)であることが前年度の検討で明らかとなっている。

COLM-5細胞ではHER3発現が著しく低下しているため下流の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おり、HER3低発現が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。

上記、COLM-5細胞の様にEGFR+/HER3-パターンを示す低分化型大腸癌は実際の臨床症例のなかで30-40%存在することからEGFR+/HER3-形質を示す低分化型大腸がんは臨床的にもGefitinibなどのEGFR標的薬の新たな治療標的になりうる可能性が示唆された。

#### 3. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の Gefitinib 感受性における役割の解析

Sodium butyrate(NaBT)により HER3 発現を誘導したところ、Akt シグナルが活性化され、Gefitinib 感受性は軽度ながら低下した。NaBT などの HDAC 阻害剤ではこのように HER3 発現が誘導されるが、同時に分化も誘導されるため COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性に HER3 低発現が関与しているか否か明らかではない。そこでトランスフェクションにより COLM-5 細胞に HER3 を強制的に発現させたところ、in vitro において Gefitinib による増殖抑制が低下し、また in vivo においても Gefitinib のヌードマウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果が有為に低下した。一方、HER3 強制発現により Akt シグナルは増強、Gefitinib による P27 発現誘導が低下

することから、HER3 低発現による下流の PI3K/Akt シグナルの低下が Gefitinib による P27 発現誘導、すなわち高感受性の増強に一定の役割を果たしている可能性を示した。

#### D. 考察

大腸がんの多くは分化型腺癌であり、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癌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癌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、発癌機構には不明な点が多い。しかし、本邦の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、発癌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癌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癌の研究が遅れている原因のひとつは低分化型腺癌細胞株が世界的にみてもたかだか数株しかないことが挙げられる。我々が樹立した日本人由来の低分化型大腸がん細胞株 COLM-5 は本邦の大腸低分化型腺癌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。

低分化型大腸がん細胞株 COLM-5 の大きな特徴は HER3 の発現が極めて低レベルであり、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。HER3 低発現の原因に関しては、Sodium

butyrate や トリコスタチン により発現が誘導されることからヒストン脱アセチル化による 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と考えられる。上記処理により同時に分化も誘導されるので HER3 が上皮分化制御に関与している可能性が考えられる。実際、他の低分化型大腸がん細胞株である RKO 細胞でもトリコスタチン処理により HER3 と同時に腸分化マーカーである MUC2 の発現誘導がおこることを確認している。ただし、HER3 それ自身が一種の分化マーカーである可能性も否定できないため、現在、Transfection により作成した HER3 の安定発現株における分化誘導の有無を *in vitro*, *in vivo* の両面から詳細に検討を行っている。

一方、HER3 高発現と Gefitinib 抵抗性の関連に関してはこれまでに肺がんモデルでの報告はあるが、大腸がんではほとんど報告されていない。HER3 は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、HER3 は 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癌で 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の発現レベルが著しく低く、Gefitinib等によるAktシグナル経路の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。しかし、HER3とならんでHER2の発現レベルも同時に低い低分化型大腸癌細胞株RKOはGefitinibに不応性である。この原因として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、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。現在、この点を検討するためHER2、HER3のダブル強制発現系を作成中である。

以上のことから、HER3は大腸がんの分化およびgefitinib抵抗性の両面に関与し、両者が関連している可能性が示唆される。実際、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+パターンを示す癌が多い。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抵抗性のひとつの原因になっている可能性が考えられる。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Gefitinibに対して感受性を亢進させることができる可能性がある。一部の癌において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、分化型大腸がん細胞のHER3をノックダウンする実験系の構築を進めている。

#### E. 結論

(1) 日本人大腸癌患者から樹立した高転移

性の低分化型大腸癌細胞株 (COLM-5)を用いて、本株の特徴である HER3 低発現がヒストン脱アセチル化による gene サイレンシングによること、また脱分化 (低分化) と相関する可能性を示唆した。

(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)によるが、この P27 誘導は HER3 低発現による下流の PI3K/Akt シグナル低下が原因である可能性を示唆し、EGFR+/HER3-が大腸癌の新しい感受性予測因子となりうることを明らかにした。

(3) COLM-5 細胞に HER3 を強制的に発現させたところ、in vitro において Gefitinib による増殖抑制が低下し、また in vivo においても Gefitinib のヌードマウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果の低下が認められ、HER3 低発現が Gefitinib 感受性に関与する可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Iwatsuki, M., Fukagawa, T., Mimori, K., Nakanishi, H., Ito, S., Ishii, H., Yokobori, T., Sasako, M., Baba, H., Mori, M. Bone Marrow and Peripheral Blood Expression of ID1 in Human Gastric Carcinoma Patients Is a Bona Fide Indicator of Lymph Node and Peritoneal Metastasis. Br J cancer, 100,1937-1942, 2009
2. Kodera, Y., Nakanishi, H., Ito, S., Mochizuki, Y., Nakayama, G., Koike, M.,

Fujiwara, M., Yamamura, Y., Nakao, A.  
Expression of L1 Cell Adhesion Molecule  
is a Significant Prognostic Factor in pT3-  
stage Gastric Cancer. *AntiCancer Res.*  
29(10):4033-9, 2009

3. Ito Y, Nakanishi H, Kodera Y, Hirai T,  
Nakao A and Kato,T. Characterization of a  
novel lymph node metastasis model from  
human colonic cancer and its preclinical  
use for comparison of anti-metastatic  
efficacy between oral S-1 and UFT/LV.  
*Cancer Science.* in press, 2010
4. Matsui M, Shimizu, Y Ikehara Y,  
Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H.  
Targeted delivery of oligomannose-coated  
liposome to the omental micrometastasis  
by peritoneal macrophages from patients  
with gastric cancer. *Cancer Science*, in  
press, 2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし