

200924005B

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる  
分子病態の解析とその臨床応用

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成22(2010)年5月

# 目 次

## I. 総合研究報告

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 37

# I. 総合研究報告書

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

研究代表者 瀬戸加大 愛知県がんセンター研究所副所長

研究要旨：胃がんにおいて、分子標的治療は本邦においては未だ行われておらず、基礎的研究も立ち遅れている。本研究では EGFR あるいは HER2 を高発現する胃がんならびに頻度は低いものの転移性が高く、従来の化学療法に抵抗性で予後不良な HER3 低発現の大腸低分化型腺がんを標的とする分子標的治療の前臨床における抗腫瘍効果とその分子機構について独自に樹立した日本人由来の胃がん・大腸がん細胞株を用いて解析した。HER3 を強制的に発現誘導させると Akt シグナルが増強、Gefitinib による P27 発現誘導が低下し、Gefitinib 感受性が低下することから、HER3 低発現が COLM-5 細胞の Gefitinib 高感受性に関与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がん症例は稀ではなく、EGFR 標的薬の新しい治療標的となりうる可能性を示唆した。悪性リンパ腫の病因・病態に関与する遺伝子の単離及びその臨床応用を図るため、アレイ CGH 法を用いて解析を進め、除菌療法抵抗性 API2-MALT1 陰性群にはゲノムコピー数の異常が多いこと、眼付属器 MALT リンパ腫には胃 MALT リンパ腫に認められるような API2-MAT1 キメラ遺伝子は認められないかわりに特徴的な 6q23.3 領域の欠失があり、TNFAIP3 遺伝子はその責任遺伝子であることを明らかにした。末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U)についてもアレイ 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 ATLL 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、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。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、肺がん細胞の発生や増殖・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詳細は未だ明らかではない。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ところ、病理組織型および遺伝子変異の違いによってメチル化パターンに大きな差があることが

明らかになった。定量的メチル化解析法を用いてメチル化レベルを 11 種類の代表的遺伝子について個別に 95 例の肺がんを解析検討したところ、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が明らかになった。また、メチル化状態や EGFR 遺伝子変異の異なる複数の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 メチル化酵素阻害剤による 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。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、肺がん治療のために各種の分子標的薬およびエピジェネティクス治療薬を選択する際に、合理的に選択するための指標となりうることが明らかとなった。ケラチン結合蛋白質アルバトロスとトリコプレインの 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ので、TPHD 分子群が分化と増殖の両方の分子メカニズムに関与することを示している。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。

研究分担者	所属施設名	職名	と分子標的治療法の開発
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	副所長	3) 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
中西速夫	愛知県がんセンター研究所	室長	4) 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
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	

#### A. 研究目的

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析       | 2. リンパ腫の発生に関わる分子病態の解析   |
| 1) HER2 高発現胃がんに対する新しい分子標的治療法の開発 | 1) ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態を明らかにする。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 |
| 2) EGFR 高発現胃がんの増殖機構の解析          |   |

行い、その意義を確立する。

- 2) 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式をアレイ CGH 法で解析し、特徴的ゲノム異常の有無を調べる。
  - 3) 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。
  - 4) 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。
  - 5) 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。
3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究
    - 1) 本研究は肺がんにおける DNA メチル化異常の詳細な解析
    - 2) DNA メチル化異常と発現異常との相関についての解明
    - 3) 肺がん患者に対するエピジェネティクス治療薬および分子標的治療薬の合理的な治療戦略への応用開発
  4. ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索
    - 1) 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

- 2) アルバトロスの細胞間接着部位での機能、トリコプレインとアルバトロスの中心体機能の解析

## B. 研究方法

### 1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

- 1) 独自に樹立した HER2 遺伝子増幅胃がん細胞株 (GLM-1,-4) の *in vivo* 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Trastuzumab, Gefitinib に対する感受性を *in vivo* で明らかにし、その分子機序を明らかにする。
- 2) EGFR 高発現胃がん細胞株 (MKN-28) の *in vivo* 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Cetuximab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子機序を明らかにする。
- 3) 低分化型大腸がん細胞株 COLM-5 モデルを用いて Gefitinib に対する高感受性の分子機構を明らかにし、その分子基盤に基づき低分化型大腸がんに対する新しい分子標的治療法を構築する。
- 4) 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、HER3 の Gefitinib 感受性に及ぼす影響を明らかにする。

### 2. リンパ腫の発生に関わる分子病態の解析

- 1) ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明: ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫症例については、API2-MALT1 キメラ遺伝子

のあるものを 10 症例、キメラ遺伝子が  
ないものを 10 症例ずつ、除菌療法有効  
症例も同程度集め、ゲノム異常様式を  
アレイ CGH 法を用いて調べ、病態に  
特徴的なゲノム異常様式を見出す。

- 2) 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常  
様式の解析: 眼付属器 MALT リンパ腫  
24 症例についてアレイ CGH 解析し、特  
徴的なゲノム異常領域については、  
contig アレイ CGH グラスを作成し、  
詳細に検討することで、責任遺伝子を  
探索する。
- 3) 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様  
式の解析: これまでに確立した array  
CGH 法を用いて、末梢性 T 細胞リン  
パ腫(PTCL-U(Unspecified))症例を解  
析し、病型特異的なゲノム異常の有無  
を調べ、臨床病態、免疫病理組織学的  
解析結果と相関させることで、臨床的  
に意義のある疾患単位を見出せるかど  
うかを検定する。
- 4) 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。
- 5) 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相関させ、  
臨床的に意義のある疾患単位の有無を

検討する。その結果と ATLL とを比較  
し、差異を検討する。

3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的  
治療研究
- 1) 非小細胞肺癌患者 48 例の外科手術標  
本を用いて遺伝子プロモーター領域の  
DNA メチル化状態を網羅的に解析した。  
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)。
- 2) 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。
- 3) MCAM 法にて高メチル化の存在を同定

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 遺伝子のメチル化をパイロシークエンシング法を用いて定量的な解析を施行した。検討した肺がんは MCAM に用いた 48 例にさらに 47 例の肺がんを加え、合計 95 例を用いた。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。

- 4) さらに上皮成長因子受容体 (EGFR), KRAS, p53 の遺伝子変異との相関を確認した。また、12 株の肺がん細胞株を用いて同様にメチル化異常および遺伝子異常の解析を行った。
- 5) 非小細胞肺がん細胞株 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 アッセイ法を用いて in vitro にて検討した。

#### 4. ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

- 1) トリコプレインとアルバトロス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、細胞間装置複合体および中心体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細胞内機能の解析: RNAi 干渉法による機能欠失、すなわちノックダウンを A549、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る。

- 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 結合実験を適宜行う。

- 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。

#### C. 研究結果

##### 1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

- 1) HER2 高発現胃がんに対する分子標的治療: 肝転移巣から独自に樹立した HER2 高発現胃がん細胞株 3 株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) および既存の肝転移巣由来胃がん細胞株 NCI-N87 では HER family 下流のシグナル伝達経路として PI3K/Akt 経路が恒常的に活性化されており、HER2 高発



現胃がん細胞株はその生存を HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路に依存している事を明らかにし、Gefitinib はこのシグナルをブロックすることによりアポトーシスを誘導することを明らかにした。

HER2 高発現胃がん細胞株に対する Trastuzumab 感受性: In vitro において軽〜中等度の増殖抑制とアポトーシスを誘導および Akt のリン酸化抑制が認められた。またヌードマウス腹腔内接種による腹膜転移に対しては抗体単独で顕著な転移抑制が認められた。

ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞を Effector 細胞とした Trastuzumab による抗体依存性細胞障害活性 (ADCC): 51Cr release assay により検討したところ、HER2 低発現胃がん細胞に比べて、HER2 高発現胃がん細胞では ADCC 活性が高い傾向が認められた。以上のことから腹膜転移に対する抗腫瘍効果には HER2 高発現胃がん細胞の生存に必須な PI3K/Akt 経路の抑制と抗体依存性細胞障害(ADCC)の両者が関与する可能性が示唆された。

2) EGFR 高発現胃がんに対する分子標的治療: EGFR 標的薬である Cetuximab, gefitinib の EGFR 高発現細胞株 MKN-28 (遺伝子変異、増幅を伴わない)に対する抗腫瘍効果: 両者とも Erk1/2 のリン酸化は軽度に抑制するものの、in vitro においては HER2 増幅胃がんにおいて見られるような有意な増殖抑制およびアポトーシスを誘導を示

さなかった。一方、in vivo においては Cetuximab がヌードマウス皮下移植腫瘍および腹膜転移に対し有意な抗腫瘍効果を示し、これは IL-2 によって増強され、抗アジアロ GM-1 抗体により抑制された。ヒト健常人末梢血単核細胞を effector 細胞として Cetuximab による抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を検討したところ、有意な ADCC 活性を認め、これも IL-2 によって増強された。以上のことから Cetuximab は遺伝子変異、増幅を伴わない EGFR 高発現胃がん細胞に対し有意な抗腫瘍効果を示し、これには主として ADCC が関与すること明らかにした。

3) 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分子標的治療: 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。

4) COLM-5 細胞と同様の EGFR+/HER3-

パターンを示す低分化型大腸がん：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。

- 5) 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)などの HDAC 阻害剤により 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 などによる HER3 発現誘導では、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意に低下した。また、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 低発現は下流の PI3K/Akt シグナルの低下を介して Gefitinib による P27 発現誘導、すなわち高感受性に一定の役割を果たしている可能性を示した。

## 2. リンパ腫の発生に関わる分子病態の解析

- 1) ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明：ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫症例は、全体の約 30%を占める。その半数には、API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することをこれまでに報告してきたが、キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗性の MALT リンパ腫については、特徴が明らかではなかった。そこで、API2-MALT1 陽性症例を 10 症例、キメラ遺伝子陰性症例 10 症例、比較対象として除菌療法有効症例 9 症例について、ゲノム異常様式をアレイ CGH 法を用いて調べた。アレイ CGH 法の検出感度は、X 染色体をマーカーにして、種々の割合で混合した DNA を用いて、検出限界検討した。その結果、20%の腫瘍成分があれば、1 コピーのゲノムコピー数の以上を検出することができることが明らかとなった。その検出限界レベルで、胃 MALT リンパ腫症例をアレイ CGH 解析したところ、API2-MALT1 キメラ遺伝子を有する群には、ゲノムコピー数の変化はほとんど認められなかった。キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗群では、10 症例中 7 症例にゲノムコピー数の異常が認められた。除菌療法反応症例では、9 症例中 1 症例にのみゲノムコピー数の異常を認めた。キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗症例群のゲノムコピー数異常頻度は有意差が認められる( $p=0.02$ )。
- 2) 2 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析：眼付属器 MALT リンパ

腫 24 症例についてアレイ CGH 解析したところ、24 症例中 9 例において、6q23.3 領域の欠失が認められた。この欠失は、胃 MALT リンパ腫、肺 MALT リンパ腫、節性 MZBCL (MALT リンパ腫と同じ分化段階の B 細胞性リンパ腫でリンパ節で増殖する型)において認められず、眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的なゲノム異常であることが判明した。この領域について、約 3 Mb について、連続する BAC クローンを購入し、contig アレイ CGH グラスを作成し、詳細に検討したところ、共通欠失領域を約 600 kb にまで、狭めることができた。その領域には、TNFAIP3, PERP 遺伝子と 4 つの EST が存在していた。そこで、RT-PCR、ついで、Real Time RT-PCR で発現様式を検討したところ、ゲノムの欠失と相関して発現の減弱が認められたものは TNFAIP3 のみであり、この欠失領域の責任遺伝子であることが判明した。

3) 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析: これまでに確立した array CGH 法を用いて、末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U(Unspecified)) 症例を解析し、病型特異的なゲノム異常の有無を調べ、臨床病態、免疫病理組織学的解析結果と相関させることで、臨床的に意義のある疾患単位を見出せるかどうかを検定する。

4) 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)。

5) 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瘤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。

3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

1) 非小細胞肺癌患者 48 例の外科手術標

本を用いた遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を網羅的検討：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( $P<0.0001$ )。

2) 非小細胞肺がん 95 例を用いパイロシーケンシング法で 11 遺伝子 (5 遺伝子は今回の MCAM 解析で抽出された高メチル化遺伝子、6 遺伝子は古典的 CIMP マーカー) 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た。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とんどの症例でメチル化レベルが一樣に低かったが、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

にメチル化状態は相関していた。大腸がんで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 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が明らかになった。

3) 細胞株レベルでの DNA メチル化状態の検討：12 株の非小細胞肺がん細胞株のゲノム DNA を用いて同様にパイロシーケンシング法にて検討したところ、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、細胞培養が DNA メチル化状態に強く影響することが示唆された。さらに 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により、EGFR 変異状態の異なる細胞株を用いて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(-)細胞株での顕著な増殖抑制効果を明らかにした。

#### 4. ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

- 1) アルバトロスの細胞間接着部位での機能解析:A549 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、極性化する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ブロットで減弱した。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 依存的事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。

- 3) 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ロックダウンし、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。
- 4) アルバトロスが細胞間接着装置を制御する詳細な分子メカニズム: 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

##### 1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子

##### 病態の解析

- 1) HER2高発現胃がんに対する新しい分子標的治療法の開発: Trastuzumabは遺伝子増幅を伴うHER2高発現胃がん細胞に対してはin vitroでは軽度-中等度の増殖抑制、アポトーシス誘導を示し、in vivoの腹膜転移に対しては単独でも顕著な転移抑制効果を有すること、これにHER2の Down regulationを介したPI3K/Aktシグナル伝達経路の抑制と抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者が関与する可能性を明らかにした。後者のADCC活性はNK細胞のFcR-III阻害により減弱することからNK細胞を介したものと考えられる。一方、遺伝子増幅がない腹膜転移由来のHER2高発現胃がん細胞株 (NUGC-4)に対して、GefitinibおよびTrastuzumabは単独ではアポトーシスを誘導せず、in vivoの腹膜転移に対しても単独では有意な効果はなく、両者併用で軽度の転移抑制を示すに過ぎなかった。従って、同じくHER2高発現胃がんであっても遺伝子増幅を伴う肝転移由来細胞と伴わない腹膜転移由来の細胞では感受性が異なることが判明した。HER2高発現進行胃がんに対し、現在、化学療法にTrastuzumabを併用する群としない群でRCT臨床試験が国際共同の大規模な第III相試験 (TOGA study)として進められている。本スタディではFISH陽性を適格要件としているが上記の我々の結果からも利にかなった選別と思われる。その結果が待たれるところである。胃

がん肝転移の約半分はHER2高発現と考えられ、そのうちかなりの症例がHER2遺伝子増幅を有すると予想されることから、HER2を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、GefitinibやTrastuzumab、さらにLapatinibなどの新しいHER family標的薬など作用機序の異なる薬剤を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待できる。

- 2) EGFR高発現胃がんの増殖・転移機構の解析と分子標的治療: Cetuximab, gefitinibともEGFR高発現胃がんに対しin vitroにおいて有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかったにも関わらず、ヌードマウス移植腫瘍に対してはCetuximabとIL-2の併用が有意な抗腫瘍効果を示すことから、抗体依存性細胞障害(ADCC)活性が主としてCetuximabの抗腫瘍効果に関与することが明らかとなった。Cetuximabを用いた胃がんに対する分子標的治療法として現在化学療法との併用が臨床試験により検討されているが、IL-2矢IL-12などNK細胞を活性化させるサイトカインとの併用は胃がんに関してはこれまでに報告はなく、EGFRもIL-2と併用にすることでHER2同様に胃がんに対する新しい分子標的治療法となりうる可能性を示した。

- 3) 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HER3低発現のGefitinib感受性における役割の解析: 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中である。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なため、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サブユニット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とが知られている。これまでいくつかのがんでHER2の過剰発現やHER3の高発現がGefitinibなどの分子標的薬に対する耐性に関連するという報告がなされているが、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がん細胞株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抵抗性を示す可能性が考えられる。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、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。

## 2.リンパ腫の発生に関わる分子病態の解析

1) ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解析:われわれはこれまで、MALT リンパ腫に特徴的な染色体転座 t(11;18)(q21;q21)を解析し、新規遺伝子 MALT1 を見出した。また、転座の本態が API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することであることも明らかにし、本キメラ遺伝子を有する胃 MALT リンパ腫症例は、ピロリ菌除菌療法抵抗群であることを明らかにした。その後の検索で、除菌療法抵抗群のうち、約半数にはキメラ遺伝子があることが判明した。しかし、キメラ遺伝子のない除菌療法抵抗性群については、その分子基盤が明確ではなかった。今



回の解析で、この群に有意にゲノムコピー数異常が多いことを見出したことは、除菌療法反応性のよいマーカーとなる可能性がある。しかし、現実の診療としては、まず除菌が第一選択であり、実地医療としての意義は少ない。むしろ、これらのゲノム異常から得られる今後の情報は、他の悪性度の高いリンパ腫について考察する上で、重要な手がかりを与え、意義が高い。すなわち、除菌抵抗性の胃 MALT リンパ腫に認められたゲノム異常領域は、リンパ腫の悪性度とはあまり関与せず、むしろ腫瘍化の初期変化である可能性が高い。事実、除菌療法有効症例で、ゲノムコピー数異常の認められる症例が 1 例あり、このゲノム異常は無効症例でも認められた。今後、除菌有効症例数を増やすことで、胃 MALT リンパ腫におけるゲノムコピー数異常の意義を確立する必要がある。

- 2) 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析: 眼付属器 MALT リンパ腫症例 24 症例中 9 例において認められた 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る。しかし、びまん性大細胞型リンパ腫をはじめ、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と考えられてきたが、今回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。この遺伝子が他のリンパ腫においても同様に腫瘍化に関与するかどうかは、重要な問題であり、今後、検討していく必要がある。

- 3) 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析: 末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U (Unspecified))51 症例を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が認められ、22 症例にはまったくゲノム異常が認められなかった。ゲノム異常の有無と臨床病態とを比較したところ、ゲノム異常のある群は ATL リンパ腫型と同程度に極めて予後が悪く、ゲノム異常のない群は、予後が比較的良好であった。また、形態学的には核が多型で、CCR4 陽性である。これらの特徴は ATL リンパ腫型に認められる特徴であり、PTCL-U ゲノム異常型と ATL との意義付けが今後必要となってくる。すなわち、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する。事実、PTCL-U ゲノム異常陽性群のゲノム異常様式は、ATL リンパ腫型ときわめてよく似ている。今回の研究結果は、ATL の腫瘍化機構においても重要な示唆を与えるものである。
- 4) 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。

- 5) 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。

- 6) 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。
- 7) 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瘤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。

### 3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

1) 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癌を解析し、そのメチル化異常の標的遺伝子数に関して、臨床病理学および EGFR、KRAS, p53 遺伝子変異の有無による比較検討を行った。解析の結果、非小細胞肺癌において組織型、EGFR などの遺伝子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。

- 2) 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。
- 3) 数個の遺伝子を DNA メチル化異常のマーカーとして検査すれば、肺がんにおいてもメチル化異常のレベル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がんにおける CIMP 陽性の判定が可能であることが示唆された。このような DNA メチル化異常を検出するマーカーによるエピジェネティクス異常、EGFR などの遺伝子異常、さらには病理組織型との情報を組み合わせることにより複数の分子標的治療薬やエピジェネティクス治療薬が個別の肺がん患者に対して合理的に選択できる可能性が示唆された。

#### 4. ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

- 1) アルバトロスの細胞間接着部位における機能は、アルバトロス/Par3 複合体による細胞間接着装置複合体およびラテラルドメインの制御、すなわち上皮細胞極性として現れる分化の制御であった。また、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。トリコプレインも極性化すなわち分化した上皮細胞では細胞間接着部位とケラチンフィラメント上にあるが、その機能解析については進行中である。
- 2) 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。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

##### 1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

- 1) 遺伝子増幅を伴う HER2 高発現肝転移由来胃がん細胞に対する Trastuzumab の強い抗腫瘍効果は HER2 の down regulation による PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制と ADCC の両者が関与する可能性を明らかにした。一方、遺伝子増幅を伴わない HER2 高発現腹膜転移由来細胞株では抗腫瘍効果は弱く、遺伝子増幅の有無が Trastuzumab 感受性に強く影響することを明らかにした。
- 2) EGFR 高発現胃がん細胞に対しては Cetuximab が IL-2 との併用により有意な抗腫瘍効果を示し、これにはシグナル伝達阻害よりも NK 細胞を介した ADCC がより積極的に関与することを明らかにした。
- 3) 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-が大腸がんの新しい感受性予測因子となりうる可能性を明らかにした。
- 4) 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