

201019023A

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・進展・悪性化に関わる分子病態の解析とその臨床応用

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成23（2011）年5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生・発育・悪性化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 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. リンパ腫の発生・進展・悪性化に関わる分子病態の解析 ..... 15  
瀬戸加大 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
2. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析 ..... 20  
中西速夫 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部)
3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究 ..... 25  
関戸好孝 (愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部)
3. 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 ..... 30  
稲垣昌樹 (愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 35

# I. 総括研究報告書

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

ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化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 兼 遺伝子医療研究部・部長

研究要旨：リンパ造血器腫瘍のうち、難治性である EB ウイルスが関与する節外性 NK/T リンパ腫鼻型(ENKTL)および EB ウイルス陽性びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)について分子遺伝学的研究を進めた。ENKTL に関してはゲノム異常領域解析と発現様式を相関させ、ゲノム異常領域 6q21 欠失領域からの責任遺伝子候補である FOXO3 遺伝子と PRDM1 遺伝子を見いだした。また、最近疾患単位が提唱された加齢性 EBV 関連 B 細胞リンパ増殖性疾患(Age-related EBV+LPD)について発現解析をして、背景に炎症性反応が存在することが明らかとなった。消化器がんの分子標的治療は本邦においては大腸がんで Cetuximab, Bevacizumab を用いた分子標的治療が行われ一定の成果を挙げている。しかし、胃がんにおいては本年度からようやく HER2 陽性胃がんに対する Trastuzumab 療法が行われる予定であるが、基礎的研究は大きく立ち遅れている。頻度は 10-20%と比較的低いものの、EGFR を高発現し、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ならびに転移性が高く予後不良の HER2 陽性胃がんを標的とする分子標的治療に関し、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。大腸がん患者から樹立した高転移性の低分化型腺がん細胞株 (COLM-5)は EGFR, HER2 を高発現するが、HER3 は著しい低発現を示し、EGFR 標的薬である Gefitinib に対し高感受性を示す。この低分化型大腸がん細胞株においては HDAC 阻害剤により HER3 発現亢進と E-cadherin などの分化誘導が見られること、HER3 強制発現によっても分化が誘導されること、さらに HER3 強制発現により Gefitinib 感受性が低下することを明らかにし、HER3 が大腸がん細胞の分化や分子標的薬感受性に関与する可能性を示唆した。一方、HER2 陽性胃がん細胞株から Trastuzumab 耐性株を分離し、耐性株に対する Dual EGFR/HER2 阻害剤 (Lapatinib)の抗腫瘍効果を明らかにした。悪性胸膜中皮腫の研究では悪性中皮腫細胞株に対して TGF-beta シグナル伝達系の刺激は悪性中皮腫細胞の細胞増殖を促進することを認め、TGF-beta 阻害薬は in vitro および in vivo にて悪性中皮腫細胞の増殖を抑制することを明らかにした。TGF-beta 刺激により結合組織成長因子 (CTGF)をはじめとする各種の細胞間基質に関わる遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。さらに、アレイ CGH 解析を行い、染色体 13q12 領域にホモザイガス欠失を同定した。欠失領域内に

Merlin (NF2 遺伝子産物)-Hippo シグナル伝達系の構成分子である LATS2 遺伝子が局在しており、中皮腫細胞株 20 株中 7 株において不活性化変異を認め LATS2 遺伝子は悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした。Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベーターであるがん遺伝子 YAP の恒常的活性化を引き起こし、同様に CTGF の発現を誘導した。これらの結果は悪性中皮腫細胞における TGF-beta シグナル伝達系の活性化と Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は共に中皮腫細胞の増殖や進展にポジティブに関与するだけでなく、協調して CTGF の転写を亢進し細胞間質における線維化の増強などにも関与することを強く示唆した。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、分化と増殖は相反する。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。我々はケラチン結合蛋白質アルバトロソ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ことを見出し、この2つの分子を 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ため、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 分子であることが示唆された。本年度はこの TPHD 分子群の主にトリコプレインの中心体機能解析について、トリコプレインは中心体、詳細には母中心小体遠位端で微小管の係留を行っており、その分子基盤はナイニン、Odf2 を介していることを明らかにした。これは分化を含めた細胞周期制御機構全体におけるトリコプレイン-Aurora-A キナーゼ活性系の特異性を示す重要な知見を得た。

#### A. 研究目的

本研究の目的は (a)造血器腫瘍においてはリンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及びその診断への応用、(b)消化器がんにおいては胃がんおよび大腸がんの分子病態の解明とその診断治療への応用、(c)悪性中皮腫においては細胞株を用いて増殖やアポトーシス等のシグナル伝達系の小分子阻害剤による増殖阻害効果を検討、(d)細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析等によるがんの発生・進展・悪性化に関わる分子機構と臓器特異性の解明である。

具体的には、

a)リンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及

びその診断への応用

b) 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析、特に新たな治療標的分子についての分子基盤の確立

c) 胸部腫瘍、特に中皮腫瘍のゲノム異常から見出した分子異常の解析と対する分子標的治療の研究

d) ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の解明

#### B. 研究方法

1.リンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及びその診断への応用

a) EB ウイルスが発症に関与すると考えられている節外性 NK/T リンパ腫鼻型のゲノ

ム異常解析と遺伝子発現解析の統合的解析による責任遺伝子の探索

b) EB ウイルス陽性 B 細胞リンパ増殖疾患、特に加齢性 EB ウイルス陽性リンパ増殖疾患の発現解析による分子病態の解析

2. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析、特に新たな治療標的分子についての分子基盤の確立

a) 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構とその意義の解析

c) 低分化型大腸がん細胞株を用いた HER3 低発現と Gefitinib 感受性との関連

d) HER2 陽性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

e) HER2 高発現、Trastuzumab 耐性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

3. 胸部腫瘍、特に中皮腫瘍のゲノム異常から見出した分子異常の解析と対する分子標的治療の研究

a) 悪性中皮腫細胞株に対する *in vitro* において TGF- $\beta$  阻害薬やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の抗腫瘍効果に関する検討

b) 染色体 13q12 領域にホモザイガス欠失から見出した Merlin (NF2 遺伝子産物) - Hippo シグナル伝達系の構成分子である LATS2 遺伝子関連シグナルの研究

4. ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の解明

a) トリコプレイン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高解像度顕微鏡 (デルタビジョン) により確認し、分画を調整し、イムノブロットを行うことによる生化学的な局在の検討

b) 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

c) 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。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

d) トリコプレイン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ることによる変化の免疫染色による解析

e) トリコプレインの細胞周期制御の検討

RPE1 細胞では一次線毛形成と細胞周期停止は同時に起こることが知られている。そこでトリコプレインの細胞周期への直接影響の有無をみるために、一次線毛を生じない系を 2mM 抱水クロラール 1 日間前処理により確立し、これに siRNA を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討

## C. 研究結果

1. リンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及びその診断への応用

a) ENKTL 症例の解析

400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べたところ、20%以上の症例でゲノム異常が認められた領域は、増幅領域として 1q31.2-44, 7q11.22-36.3, 16p13.3, 11p15.5 欠失領域として 6q16.1-27 and 7p15.3-22.2 が見いだされた。特に、6q21 欠失領域がもっとも高頻度に認められた領域であり、最小共通欠失領域 (36%の症例) には 7 個 (POPDC3, PREP, PRDM1, ATG5, AIM1, LACE1, FOXO3) の遺伝子が見いだされた。発現解析により正常 NK 細胞に比較して明



らかに発現抑制されていたものは POPDC3 と AIM1 を除く 5 個であった。また、6q21-23.3 領域から我々が見いだした TNFAIP3/A20 と他の研究グループから NK 腫瘍のがん抑制遺伝子として報告された HACE1 も加え、機能的検討に 7 遺伝子を検討したところ、これらの遺伝子のうち、著明な増殖抑制効果が認められたのは FOXO3 と PRDM1 遺伝子であった。

#### b) 加齢性 EB ウイルス陽性リンパ増殖疾患の遺伝子発現解析による分子病態の解明

Age-related EBV+LPD については、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、まず、質のよい RNA が得られた 5 症例について遺伝子発現を行い、同じ分化段階である 8 症例の ABC 型 DLBCL との遺伝子発現比較相関を行った。その結果、発現差異の大きな遺伝子として IL6、TNFAIP3、HOPX や SLAMF1 が認められた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、AR-EBV+LPD に有意に発現の高い遺伝子群として Cytokine-cytokine receptor interaction、NOD 様受容体経路、Toll 様受容体経路および JAK-STAT 経路などが上位に抽出され、炎症・免疫反応に関与する遺伝子セットが濃縮されていると考えられた。これら 3 つの pathways に共通して関連する NF- $\kappa$ B の活性化の関与が示唆された。

#### 2. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析、特に新たな治療標的分子についての分子基盤の確立

##### a) 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構とその意義の解析

HER3 低発現の COLM-5 細胞株を用いて Sodium Butyrate 等の HDAC inhibitor で処理したところ、HER3 発現誘導と同時に E-cadherin などの分化誘導がタンパクレベルでも mRNA レベルでも認められた。そこで HER3 発現誘導と分化誘導の因果関係を

明らかにするために HER3 発現ベクターを構築し、HER3 を COLM-5 細胞に強制発現させたところ、やはり分化が誘導されたことから HER3 が大腸がん細胞の分化や EMT に関与する可能性を示唆した。ただし、分化型大腸がんの shRNA による HER3 ノックダウン実験では一部の細胞で EMT 様形質の発現を認めたが、必ずしも有意ではなく、さらなる検討が必要と考えられた。

##### b) 低分化型大腸がん細胞株を用いた HER3 低発現と Gefitinib 感受性との関連の検討

Sodium butyrate (NaBT) などの HDAC 阻害剤による HER3 の発現誘導では、Akt シグナルが活性化され、COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性は軽度ながら低下した。HER3 発現ベクターの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 による増殖抑制が軽度ながら低下し、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ことから HER3 の Gefitinib 感受性への関与が示唆された。一方、逆に分化型大腸がん細胞株 (HT-29) を shHER3 発現ベクターにより HER3 をノックダウンしたが、明瞭な Gefitinib 感受性増強は見られなかった。

##### c) HER2 陽性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

HER2 陽性胃がん細胞株に対する Trastuzumab 感受性を調べたところ、*in vitro* における増殖抑制は極く軽度で、有為なアポトーシス誘導および Akt のリン酸化抑制は認められなかった。一方、ヌードマウス皮下腫瘍系および腹腔内接種による腹膜転移に対しては抗体単独でも有意な増殖抑制、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 細胞として Trastuzumab による抗体依存性細

胞障害活性(ADCC)を 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 活性が有意に高かった。以上のことから *in vivo* における抗腫瘍効果には主として抗体依存性細胞障害(ADCC)が関与する可能性が示された。

一方、Lapatinib (Dual EGFR/HER2阻害剤)は*in vitro*, *in vivo*ともに有為な抗腫瘍効果を示し、その機構としてPI3K/Aktシグナル経路の強力な遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期G1期停止が関与することを示し、Trastuzumabとは全く異なる機構によることを明らかにした。

#### d) HER2 高発現、Trastuzumab 耐性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

HER2 陽性 (遺伝子増幅) 胃がん細胞株 (GLM-1)は *in vitro* では Trastuzumab 抵抗性のため耐性株を得ることが困難である。そこで *in vivo* 選別により耐性株(GLM1-R1, -R2)を作成した。親株ならびにこの耐性株に対する Lapatinib の抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro*, *in vivo*ともに有為な抗腫瘍効果を示し、さらに併用療法において additive な抗腫瘍効果を明らかにした。また耐性機序の検討では GLM1-R2 耐性細胞において FACS でははっきりしなかったが、ウエスタンブロットでは HER2 タンパクのダウンレギュレーションが見られ、これが耐性に関与する可能性を示唆した。

### 3. 胸部腫瘍、特に中皮腫瘍のゲノム異常から見出した分子異常の解析と対する分子標的治療の研究

#### a) TGF- $\beta$ 阻害による悪性中皮腫細胞の腫瘍抑制効果

悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-14, Y-MESO-27, NCI-H290)および不死化正常中皮細胞 (MeT-5A) に対して、TGF- $\beta$  刺激により

SMAD2 のリン酸化が増強し、細胞増殖が誘導されることを明らかにした。TGF- $\beta$  投与により発現される遺伝子をアジレント社のオリゴアレイを用いて解析し、MMP-2, CTGF, Col1A1, TGF- $\beta$  など細胞間質に関わる遺伝子群が有意に発現誘導されることを明らかにした。一方、TGF- $\beta$  阻害剤 (SD208) を *in vitro* で細胞株に添加したところ中皮腫細胞株の増殖が抑制されることが明らかとなった。さらに、中皮腫細胞株をヌードマウスの胸腔内に移植し、SD208 を隔日経口投与したところ対象群に比べて有意に生存が延長した。

#### b) 悪性中皮腫における LATS2 遺伝子異常の同定

中皮腫細胞株を用いたアレイ CGH 解析により、染色体 13q11 領域のホモザイガス欠失を 3 株で同定し、欠失領域内に LATS2 遺伝子が局在することを明らかにした。さらにゲノム PCR およびシーケンシング法により複数の遺伝子変異を見出し、合計 20 細胞株中 7 株において LATS2 遺伝子の欠失・不活型変異が認められることを明らかにした。LATS2 遺伝子が不活性化していた中皮腫細胞株に対して LATS2 遺伝子を導入したところ、細胞増殖能、コロニー形成能および浸潤能を抑制することを確認し、LATS2 遺伝子が中皮腫における新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした。LATS2 遺伝子産物は Hippo 細胞内シグナル伝達系の構成分子であり、転写コアクチベータである YAP が遺伝子産物を制御することが知られている。LATS2 遺伝子が不活性化した細胞株では、細胞培養条件下で細胞密度が上昇しても YAP の低リン酸化 (転写コアクチベータとして活性型) および核内局在が保持され、細胞増殖が抑制されないことが明らかになった。

#### c) TGF- $\beta$ 系の活性化および Hippo シグ



ナル伝達系の不活性化による CTGF の発現増強

CTGF のプロモーター領域に YAP および SMAD2 が結合することをクロマチン免疫沈降法等によって明らかにした。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、CTGF は YAP および SMAD2 によって転写が亢進することが明らかとなった。

#### d) HDAC 阻害剤による中皮腫細胞抑制効果の検討

複数の中皮腫細胞株に対して SAHA などの HDAC 阻害剤を *in vitro* において投与してその増殖抑制能を検討した。効果の認められた細胞株をヌードマウスに皮下移植して HDAC 阻害剤を腹腔内投与して腫瘍体積の変化を観察した。その結果、*in vitro* に比べ *in vivo* において HDAC 阻害剤の腫瘍抑制効果は限定的であることが明らかになった。

#### 4. ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の解明

トリコプレインの中心体機能の解析において以下の結果を得た。

##### a) 微小管係留機能

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。

##### b) 一次線毛形成抑制機能

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。これらの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化および Odf2 機能抑制に必要なドメインが、少なくともトリコプレインの 1-130 アミノ酸残基内にあるところまで絞り込んだ。

##### c) 細胞周期制御との関与

一次線毛形成と細胞周期停止は同時に起こることが知られていたため、一次線毛を除去する系を確立し、その条件下でトリコプレイン機能抑制を行ったところ、細胞周期休止にはいたらないことが増殖マーカーすなわち Cyclin A の発現、BrdU の取り込み、FACS での S, G2/M 期の存在により明

らかになった。つまり、トリコブレイン機能抑制は一次線毛形成をおこすがそれは細胞周期休止に因らないことを示唆している。従来より **Aurora-A** の活性化は細胞周期制御において特に紡錘体形成のための中心体成熟に必要と言われてきたが、この度の結果はトリコブレイン-**Aurora-A** キナーゼ活性系による一次線毛形成抑制の特異性を表しており、分化と増殖の転換機構における新たな発見といえる。

#### D. 考察

1. リンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及びその診断への応用

##### a) ENKTL 症例の解析

NK/Tリンパ腫については、これまで2304個のBACクローンによる解析を行い、特徴的なゲノム異常様式があることをすでに報告していたが(Nakashima et al., *Genes Chrom. Cancer*, 2005)、ゲノム異常領域からの責任遺伝子の単離には至らなかった。今回、400Kすなわち、200倍の密度を持つ **oligo-array CGH** で検討したところ、これまで見いだせなかった狭い領域の欠失を特定の症例で見いだすことができた。この狭い領域に絞ることができたので、7つの候補遺伝子にまで絞ることができ、遺伝子発現と相関させることで、5つの候補遺伝子に絞ることができた。ENKTL検体のように、解析するための検体量がきわめて少ない症例が多い中、きわめて少ないmRNA量で検討できたことは本研究にとって大変重要であった。また、今回の研究で明らかになった重要な点は、今回の責任遺伝子は、発現解析による差異だけからは到達することができなかったことである。また、機能的な検討においても5つの遺伝子に絞ることができたのは、本研究の効率を大いに上げることになった。6q21-23.3領域はリンパ造血器腫瘍にとって、高頻度に欠失が見られる領域で

あり、代表的なものでは我々が世界に先駆けて単離したTNFAIP3/A20遺伝子のがん抑制遺伝子としてよく知られている。また、フランスの研究グループから提唱されていたHACE1も候補遺伝し出るため、機能的検索に加えたが、両者はNK細胞株の増殖を抑制しなかった。また、増殖抑制効果を示したものはFOXO3とPRDM1遺伝子のみであり、両者はNK/Tリンパ腫の6q21領域のがん抑制遺伝子であることを証明することができたのは意義が高く、機能的な証明をすることができたのは本研究が最初である。PRDM1に関してはB細胞の分化を促進する遺伝子として知られており、PRDM1遺伝子の発現抑制が分化の抑制に働き、腫瘍化に関与することが示された。しかしながら、NK/T細胞の文化に関与していることはこれまでの研究から知られておらず、NK/Tリンパ腫研究に新たな研究の観点をもたらすものとする。また、PRDM1欠失は分化の抑制がおこるため、分化促進剤のような薬剤が抗腫瘍効果を示すことが想定されるため、今後の研究の方向性において大変意義が高い。一方、FOXO3遺伝子に関してはその機能は不明であり、増殖抑制効果が認められる以外に明らかとはなっておらず、今後、発現解析などによる研究を進めていく必要がある。

##### b) 加齢性EBウイルス陽性リンパ増殖疾患の遺伝子発現解析による分子病態の解明

Age-related EBV+LPD については、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、これまで、臨床病理学的研究以外はほとんど解析が進められていない。今回、われわれの解析から Age-related EBV+LPD がほとんどABC型リンパ腫に属することが明らかとなったため(Liu et al., 未発表データ)、比較検討するものとしてEBV陰性ABC型DLBCL8症例との比較を行った。DLBCLは発現解析により、GCB型とABC型に分

けられることが知られているので、分化段階をそろえることは大変重要な判断であった。発現解析による比較の結果、発現差異の大きな遺伝子として **IL6**、**TNFAIP3**、**HOPX** や **SLAMF1** が認められた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、**AR-EBV(+)** **DLB** に有意に発現の高い遺伝子群として **Cytokine-cytokine receptor interaction**、**NOD** 様受容体経路、**Toll** 様受容体経路および **JAK-STAT** 経路などが上位に抽出された。これら 3 つの **pathways** に共通して関連する **NF- $\kappa$ B** の活性化の関与が示唆された。これらは、炎症・免疫反応に関与する遺伝子セットであり、**Age-related EBV+LPD** の発症背景であると考えられてきた加齢による何らかの免疫機能の異常がその背景にあると考えられてきたことと矛盾する。しかしながら、患者からの末梢血を用いた免疫機能の検討では、**EB** ウイルスに関する強い免疫機能が保たれていることも、学会等では報告されているので、**Age-related EBV+LPD** の発症機序に関しては、炎症性反応の観点からの検討も必要であることが強く示唆された。今後は、炎症性反応との観点からそのシグナル伝達機構の制御異常を中心に研究を進めていく必要がある。

## 2. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析、特に新たな治療標的分子についての分子基盤の確立

### a) 低分化型大腸がんにおける **HER3** 低発現の分子機構とその意義の解析

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た。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。そこで次に発現ベクターを用いて **HER3** を強制発現させたところ **HER3** 安定発現株では **E-cadherin**、**CK20** などの発現が亢進し、分化が誘導されることが明らかとなり、**HER3** が大腸がん細胞の分化や **EMT** に関与する可能性が示唆された。ただし、逆に分化型大腸がん細胞株 **HT-29** の **shRNA** による **HER3** ノックダウンでは **in vitro** において一部の細胞で **EMT** 様形質発現が認められたが、現在までの検討ではヌードマウス移植腫瘍において明らかな **EMT** は認められていない。この原因としては **HER3** のノックダウンが不十分である可能性が高く、今後新しいベクター系を用いて詳細な検討が必要である。

**HDAC** 阻害剤は大腸低分化型腺がん株 **COLM-5** 細胞に対して本研究で明らかにした分化誘導と同時に強いアポトーシスも誘導することも見いだしており、大腸低分化型腺がんに対する新しい治療法となる可能性も示唆された。

### b) 低分化型大腸がん細胞株 (**COLM-5**) を用いた **HER3** 低発現と **Gefitinib** 感受性との関連

**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、**Trans-phosphorylation** を受け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、細胞周期停止により抗腫瘍効果がもたらされるものと考えられる。

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、分化型大腸がんではHER3の発現陽性頻度が高く、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。そこで今回、分化型大腸がん細胞のHER3をノックダウンしてGefitinib感受性増強ならびに分化抑制がおこるか否かについて検討したが、現時点では有為な結果は得られていない。今後別のベクター系を構築してさらに詳細に検討を進める予定である。

### c) HER2 陽性胃がん、Trastuzumab 耐性 HER2 陽性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

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ではアポトーシス誘導を示さず、軽度の増殖抑制しか示さないが、in vivoの皮下腫瘍、腹膜転移に対しては単独でも有為な抗腫瘍効果、転移抑制効果を有することからシグナル伝達経路の抑制よりも抗体依存性細胞障害活

性(ADCC)が主として関与する可能性をこれまでに明らかにしている。

本研究では上記 Trastuzumab とは全く抗腫瘍効果の作用機序が異なり、PI3K/Akt シグナル経路の遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止を作用機序とする Lapatinib の単独あるいは Trastuzumab との併用療法が HER2 陽性胃がんならびに Trastuzumab 耐性胃がんに対して極めて有効であることを実験的に初めて明らかにした。

HER2 陽性進行胃がんに対しては、化学療法に Trastuzumab を併用する群としない群の 2 アームの国際共同の大規模な第 III 相試験 (TOGA study)の結果に続いて、現在、化学療法に Lapatinib を併用する群としない群の 2 アームの大規模な第 III 相試験 (LOGiC Trial)が進められている。今回の我々の前臨床試験の結果からも、Lapatinib の臨床試験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、Trastuzumab、Lapatinib などの分子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。

### 3. 胸部腫瘍、特に中皮腫瘍のゲノム異常から見出した分子異常の解析と対する分子標的治療の研究

悪性中皮腫細胞において新規の腫瘍抑制遺伝子 LATS2 を同定し、約 20%の細胞株で不活型変異を来していることを明らかにした。Merlin (NF2 腫瘍抑制遺伝子産物)が約 40-50%の症例で不活性化していることを考えると、Merlin-Hippo シグナル伝達系は中皮腫の 70-80%において不活性

化しており、中皮腫の発症・進展に極めて重要な役割を占めていることが明らかとなった。この不活性化により、転写コアクチベーターとして機能する YAP がん遺伝子産物が恒常的に活性化され、腫瘍細胞の増殖に関わる様々な遺伝子の転写に関わり、CTGF 遺伝子もその一つであることが示唆された。一方、TGF-beta シグナル伝達系は悪性中皮腫細胞の増殖にポジティブに働き、このシグナル伝達系を抑制することは悪性中皮腫の有力な治療戦略になるものと考えられた。TGF-beta 系は中皮腫細胞において細胞間質に関わる各種の遺伝子の転写に関わることが明らかとなったが、CTGF もその遺伝子の一つであることが明らかとなった。以上により、TGF-beta 系の活性化、Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は、それぞれ悪性中皮腫細胞の増殖を促進するだけでなく、協調して CTGF の発現を亢進し、悪性中皮腫の線維化などが間質の形成にも関わることが示唆された。

#### 4. ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の解明

トリコプレインの中心体機能の特異性が、一次線毛形成抑制を含めた分化・増殖制御との関わりにおいて示せつつある。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・増殖制御との関連の報告が増えつつあるが、トリコプレイン-オーロラ A 活性化経路による一次線毛形成抑制の特異性を示せることの意味は大きい。特に一次線毛は増殖シグナルが入るアンテナとしても機能しており、より特異性の高いがん関連増殖機構の解明にもつながり得るため、確証を得るための多角的検討が必要である。

#### E. 結論

1. リンパ腫の発生・進展・悪性化に関与する分子病態の解析と責任遺伝子の単離、及びその診断への応用

a) ENKTL 症例 39 検体について、400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べ、20%以上の症例でゲノム異常が認められた領域は、増幅領域として 1q31.2-44, 7q11.22-36.3, 16p13.3, 11p15.5 欠失領域として 6q16.1-27 and 7p15.3-22.2 を見いだした。

b) ENKTL 症例における最も高頻度なゲノム異常領域は 6q21 領域であり、5つの候補遺伝子のうち、FOXO3 と PRDM1 が責任遺伝子であることを発現解析との相関と機能的検討により明らかにできた。

c) Age-related EBV+LPD において、EBV 陰性 ABC 型 DLBCL との遺伝子発現の比較から、炎症性反応に関与するシグナルが有意に高く、共通する標的として NF- $\kappa$ B の活性化が腫瘍発生に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

2. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析、特に新たな治療標的分子についての分子基盤の確立

a) 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)において HDAC 阻害剤により HER3 発現亢進と分化誘導が見られること、HER3 強制発現により分化が誘導されることから HER3 が大腸がん細胞の分化や EMT に関与する可能性を示唆した。ただし、分化型大腸がんの HER3 ノックダウンにより一部の細胞に EMT 様形質が発現する傾向が見られたが必ずしも有意ではなく、今後更なる検討が必要と考えられた。

b) 当教室で樹立した日本人由来 HER2 陽性胃癌細胞株から Trastuzumab 耐性株を分離し、耐性株に対する Dual EGFR/HER2 阻害剤 (Lapatinib) の抗腫瘍効果ならびにその機構として PI3K/Akt 経路の遮断による

アポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止の関与を明らかにし、Lapatinib と Trastuzumab の併用療法が HER2 陽性がんならびに Trastuzumab 耐性がんに対する新しい治療法となりうることを示唆した。

### 3. 胸部腫瘍、特に中皮腫瘍のゲノム異常から見出した分子異常の解析と対する分子標的治療の研究

a) 悪性中皮腫において Merlin-Hippo シグナル伝達系に関わる LATS2 遺伝子が新規腫瘍抑制遺伝子であり、悪性中皮腫の約 20% で不活性化していることを明らかにした。NF2 遺伝子異常を含めると、Merlin-Hippo 伝達系は中皮腫の約 80% で不活性化し、YAP 転写コアクチベータの恒常的活性化が引き起こされていることを明らかにした。

b) TGF- $\beta$  系は中皮腫細胞の増殖促進に働き、TGF- $\beta$  阻害剤は *in vitro* および *in vivo* において中皮腫の細胞抑制を誘導することが明らかとなった。中皮腫細胞における TGF- $\beta$  系の活性化は細胞間質に関わる遺伝子群を有意に発現増強していることが明らかとなった。

c) CTGF 遺伝子は Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化および TGF- $\beta$  系の活性化による両者の協調によって発現が著しく増強され、悪性中皮腫の線維化を含むがん間質の形成に関与していることが示唆された。これらの知見を元に、両シグナル伝達系を制御することが悪性中皮腫の新たな併用分子標的治療法につながることを示唆された。

一方、HDAC 阻害剤は *in vitro* における細胞増殖抑制効果は認められたものの、*in vivo* における効果は限定的であることが明らかとなった。

### 4. ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の解明

a) 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る。

b) ケラチンはこの機能に対し促進的に働いている。中心体での分化増殖制御としては、アルバトロスは微小管重合核制御、トリコプレインは微小管係留そして細胞周期制御に因らない一次線毛形成抑制が明らかになりつつある。

c) これらの未解決な分子機構を結合分子の検索等も駆使して補完し、その分子メカニズムの相違点を明らかにし、統合していくことで、bi-player 分子群およびケラチンによる上皮細胞の新規分化増殖制御機構の全容解明につなげる必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. Kumar, V., Matsuo, K., Takahashi, A., Hosono, N., Tsunoda, T., Kamatani, N., Kong, SY., Nakagawa, H., Cui, R., Tanikawa, C., Seto, M., Morishima, Y., Kubo, M., Nakamura, Y., Matsuda K.: Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. J Hum Genet, in press.
2. Umino, A., Nakagawa, M., Utsunomiya, A., Tsukasaki, K., Taira, N., Katayama, N., Seto, M.: Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. Blood, in press
3. Kato, H., Kagami, Y., Kodaira, T., Oka, S., Oki, Y., Chihara, D., Taji, H., Yatabe, Y., Nakamura, T., Nakamura, S., Seto, M., Yamamoto, K., Morishima, Y.: Nodal relapse after helicobacter



- pylori eradication in a patient with primary localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 106: 549-551, 2011.
4. Sung, CO., Kim, SC., Karnan, S., Karube, K., Shin, HJ., Nam, DH., Suh, YL., Kim, SH., Kim, JY., Kim, SJ., Kim, WS., Seto, M., Ko, YH.: Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*. 117: 1291-1300, 2010.
  5. Iqbal, J., Weisenburger, DD., Greiner, TC., Vose, JM., McKeithan, T., Kucuk, C., Geng, H., Deffenbacher, K., Smith, L., Dybkaer, K., Nakamura, S., Seto, M., Delabie, J., Berger, F., Loong, F., Au, WY., Ko, YH., Sng, I., Armitage, JO., Chan, WC.: International peripheral T-cell lymphoma project.: molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*, 115: 1026-1036, 2010.
  6. Ko, YH., Karnan, S., Kim, KM., Park, CK., Kang, ES., Kim, YH., Kang, WK., Kim, SJ., Kim, WS., Lee, WY., Chun, HK., Seto, M.: Enteropathy-associated T-cell lymphoma-a clinicopathologic and array comparative genomic hybridization study. *Hum Pathol*, 41: 1231-1237, 2010.
  7. Kato, H., Kagami, Y, Nakagawa, M., Karnan, S, Yatabe, Y., Morishima, Y., Seto, M.: IL-4/CD40L Co-Stimulation Induces Long-Term Proliferation for CD10-Positive Germinal Center B Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The Open Leukemia Journal*. 3: 60-68, 2010.
  8. 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.*, 21: 1699-1705, 2010.
  9. 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. *J Pathol*, 221: 96-105, 2010.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Ito, Y., Nakanishi, H., Kodera, Y.,

- Hirai, T., Nakao, A. 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 Sci*, 101: 1853-1860, 2010.
13. 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 Sci*, 101: 1670-1677, 2010.
  14. Nakanishi, H., Ito, S, Matsui, M, Murakami, H, Kodera, Y.: "In Vivo Imaging" Methods and Protocols, Hoffman, R. M. (ed.), Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. Humana Press, Totowa, NJ. in press,
  15. Ali, AH., Takizawa, H., Kondo, K., Matsuoka, H., Toba, H., Nakagawa, Y., Kenzaki, K., Sakiyama, S., Kakiuchi, S., Sekido, Y., Sone, S., Tangoku, A.: 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor. *Lung Cancer*, in press.
  16. Murakami, H., Mizuno, T., Taniguchi, T., Fujii, M., Ishiguro, F., Fukui, T., Akatsuka, S., Horio, Y., Hida, T., Kondo, Y., Toyokuni, S., Osada, H., Sekido, Y.: LATS2 Is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma. *Cancer Res* 71:873-883. 2011.
  17. Hwang, J.H., Takagi, M., Murakami, H., Sekido, Y., Shin-Ya, K.: Induction of tubulin polymerization and apoptosis in malignant mesothelioma cells by a new compound JBIR-23. *Cancer Lett*, 300: 189-196, 2011.
  18. Tajima, K., Ohashi, R., Sekido, Y., Hida, T., Nara, T., Hashimoto, M., Iwakami, S., Minakata, K., Yae, T., Tahahashi, F., Saya, H., Takahashi, K.: Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. *Oncogene* 29: 1941-1951, 2010.
  19. Takemura, Y., Satoh, M., Satoh, K., Hamada, H., Sekido, Y., Kubota, S.: High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *BBRC* 394: 249-253, 2010.
  20. Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N. and Inagaki, M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci*, in press.
  21. Helfand, B.T., Mendez, M.G., Murthy, S.N., Shumaker, D.K., Grin, B., Mahammad, S., Aebi, U., Wedig, T., Wu, Y.I., Hahn, K.M., Inagaki, M., Herrmann, H. and Goldman, R.D. Vimentin Organization Modulates the Formation of Lamellipodia. *Mol Biol Cell*, in press.
  22. Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H. and Inagaki, M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome through its binding to centriolar proteins, Odf2 and ninein. *J Cell Sci*, 124: 857-864, 2011.
  23. Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M.

- Mizutani, S. and Teraoka, H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. PLoS ONE, 5: e8821, 2010.
24. 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. and Mohan, R. Withaferin A targets intermediate filaments glial fibrillary acidic protein and vimentin in a model of retinal gliosis. J Biol Chem, 285: 7657-7669, 2010.
25. Kawase, T., Matsuo, K., Suzuki, T., Hirose, K., Hosono, S., Watanabe, M., Inagaki, M., Iwata, H., Tanaka, H. and Tajima, K. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. Cancer Sci, 101: 1234-1240, 2010.
26. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 $\gamma$  mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. EMBO J, 29: 2802-2812, 2010.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 分担研究報告書

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

リンパ腫の発生・進展・悪性化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・部長

研究要旨：リンパ造血器腫瘍のうち、難治性である EB ウイルスが関与する節外性 NK/T リンパ腫鼻型(ENKTL)および EB ウイルス陽性びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)について分子遺伝学的研究を進めた。ENKTL に関しては、ゲノム異常領域解析と発現様式を相関させ、ゲノム異常領域 6q21 欠失領域からの責任遺伝子候補である FOXO3 遺伝子と PRDM1 遺伝子を見いだした。また、EB ウイルス陽性 B 細胞リンパの一つとして最近疾患単位が提唱された加齢性 EBV 関連 B 細胞リンパ増殖性疾患(Age-related EBV+LPD)について発現解析をして、加齢により免疫機能が低下することが発症に関与すると考えられていた本疾患の背景に炎症性反応が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

1. EB ウイルスが発症に関与すると考えられている節外性 NK/T リンパ腫鼻型(ENKTL)のゲノム異常解析と遺伝子発現解析の統合的解析による責任遺伝子の探索
2. EB ウイルス陽性 B 細胞リンパ増殖疾患、特に加齢性 EB ウイルス陽性リンパ増殖疾患(Age-related EBV positive lymphoproliferative disorder: AREBV+LPD)の発現解析による分子病態の解析

入し、細胞の増殖、分化、細胞死に及ぼす影響を検討する。

- 2.加齢性 EB ウイルス陽性リンパ増殖疾患の遺伝子発現解析による分子病態の解明  
凍結検体の得られた AREBVLPD 患者 8 検体から、RNA を抽出し、質のよい RNA が得られた 5 検体に対して、44K アレイを用いて遺伝子発現解析を行う。同じ分化段階の EBV 陰性 DLBCL8 症例との発現差異を調べ、特徴的な遺伝子を検出する。

B. 研究方法

1. ENKTL 症例の解析

ENKTL 症例 32 症例と 7 細胞株について、400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べるとともに、44K 発現解析アレイで遺伝子発現を調べ、両者を統合的に解析する。対照群としては末梢血から精製した正常ヒト NK 細胞と同細胞を IL2 で刺激した細胞も用いる。また、候補遺伝子が絞られたら、細胞株を用いて遺伝子導入法により候補遺伝子を導

C. 研究結果

1. ENKTL 症例の解析

400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べたところ、20%以上の症例でゲノム異常が認められた領域は、増幅領域として 1q31.2-44, 7q11.22-36.3, 16p13.3、11p15.5 欠失領域として 6q16.1-27 and 7p15.3-22.2 が見いだされた。特に、6q21 欠失領域がもっとも高頻度に認められた領域であり、最

小共通欠失領域(36%の症例)には7個(POPDC3, PREP, PRDM1, ATG5, AIM1, LACE1, FOXO3)の遺伝子が見いだされた。発現解析により正常NK細胞に比較して明らかに発現抑制されていたものはPOPDC3とAIM1を除く5個であった。また、6q21-23.3領域から我々が見いだしたTNFAIP3/A20と他の研究グループからNK腫瘍のがん抑制遺伝子として報告されたHACE1も加え、機能的検討に7遺伝子を検討したところ、これらの遺伝子のうち、著明な増殖抑制効果が認められたのはFOXO3とPRDM1遺伝子であった。

## 2. 加齢性EBウイルス陽性リンパ増殖疾患の遺伝子発現解析による分子病態の解明

Age-related EBV+LPDについては、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、まず、質のよいRNAが得られた5症例について遺伝子発現を行い、同じ分化段階である8症例のABC型DLBCLとの遺伝子発現比較相関を行った。その結果、発現差異の大きな遺伝子としてIL6、TNFAIP3、HOPXやSLAMF1が認められた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、AR-EBV+LPDに有意に発現の高い遺伝子群としてCytokine-cytokine receptor interaction、NOD様受容体経路、Toll様受容体経路およびJAK-STAT経路などが上位に抽出され、炎症・免疫反応に関与する遺伝子セットが濃縮されていると考えられた。これら3つのpathwaysに共通して関連するNF- $\kappa$ Bの活性化の関与が示唆された。

## D. 考察

### 1. ENKTL症例の解析

NK/Tリンパ腫については、これまで2304個のBACクローンによる解析を行い、特徴的なゲノム異常様式があることをすでに報

告していたが(Nakashima et al., *Genes Chrom. Cancer*, 2005)、ゲノム異常領域からの責任遺伝子の単離には至らなかった。今回、400Kすなわち、200倍の密度を持つoligo-array CGHで検討したところ、これまで見いだせなかった狭い領域の欠失を特定の症例で見いだすことができた。この狭い領域に絞ることができたので、7つの候補遺伝子にまで絞ることができ、遺伝子発現と相関させることで、5つの候補遺伝子に絞ることができた。ENKTL検体のように、解析するための検体量がきわめて少ない症例が多い中、きわめて少ないmRNA量で検討できたことは本研究にとって大変重要であった。また、今回の研究で明らかになった重要な点は、今回の責任遺伝子は、発現解析による差異だけからは到達することができなかつたことである。また、機能的な検討においても5つの遺伝子に絞ることができたのは、本研究の効率を大いに上げることになった。6q21-23.3領域はリンパ造血器腫瘍にとって、高頻度に欠失が見られる領域であり、代表的なものでは我々が世界に先駆けて単離したTNFAIP3/A20遺伝子のがん抑制遺伝子としてよく知られている。また、フランスの研究グループから提唱されていたHACE1も候補遺伝子出するため、機能的検索に加えたが、両者はNK細胞株の増殖を抑制しなかつた。また、増殖抑制効果を示したものはFOXO3とPRDM1遺伝子のみであり、両者はNK/Tリンパ腫の6q21領域のがん抑制遺伝子であることを証明することができたのは意義が高く、機能的な証明をすることができたのは本研究が最初である。PRDM1に関してはB細胞の分化を促進する遺伝子として知られており、PRDM1遺伝子の発現抑制が分化の抑制に働き、腫瘍化に関与することが示された。しかしながら、NK/T細胞の文化に関与していることはこれまでの研究から知られておらず、NK/Tリン