

の発生・浸潤・転移の過程において、p53-Mieap 経路の不活性化が、不良ミトコンドリアの蓄積と活性酸素種の発生増加を招き、がんにも有利な酸化ストレスシグナルを活性化している可能性が示唆された。今後は、臨床がんにおける解析や、がんにおける不良ミトコンドリアからの酸化ストレスシグナルの解析を行う必要があり、そのことから、全く新しいがんの予防・診断・治療法の開発が可能になると期待される。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照のこと。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, Arakawa H. Possible existence of lysosome-like organella and its role in mitochondrial quality control. PLoS ONE 6: e16054, 2011

2. Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, Arakawa H. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. PLoS ONE 6: e16060, 2011

3. Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. Int J Oncol 37: 1133-1141, 2010

4. Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain. Oncol Rep 24:

1193-1200, 2010

5. Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. Int J Oncol 36: 1253-1260, 2010

2. 学会発表

1. 荒川博文 第 69 回日本癌学会学術総会シンポジウム S16 がんオートファジー 演題「p53 誘導性因子である Mieap は不良ミトコンドリアを修復あるいは排除することでミトコンドリアの品質を管理する」

2. 宮本嵩史、尾野雅哉、喜多村憲章、中村康之、吉田将紀、篠木大輔、合田オルガ、荒川博文 第 69 回日本癌学会学術総会ポスター4-1 p53 関連遺伝子(1) 演題「IP-2DICAL による Mieap 結合タンパク質の同定」

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

がん間質の免疫微小環境に関する研究

分担研究者 平岡 伸介 国立がん研究センター研究所・分子病理分野・ユニット長

研究要旨：本研究は、ヒト膵がん間質の免疫微小環境に関わる形態学的変化、がん間質に浸潤する免疫担当細胞、がん間質で発現される分子の免疫微小環境における意義を検討し、抗腫瘍性の免疫微小環境の形成に関わる分子機序に迫ろうとするものである。平成22年度の具体的な成果は、1) がん組織内の壊死が好腫瘍性微小環境に関連し、膵がん患者の独立した予後因子になること、その組織学的診断が簡便かつ再現性の高い予後予測手段になることを明らかにした。2) 膵がん間質に浸潤する免疫担当細胞の中で、M2マクロファージ・好中球・制御性T細胞浸潤が好腫瘍性免疫微小環境に、M1マクロファージ・CD4⁺T細胞・CD8⁺T細胞浸潤が抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連すること、マクロファージと好中球と制御性T細胞、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の浸潤の間にそれぞれ有意な相関のあることを明らかにした。3) 免疫担当細胞の浸潤様式の変化から、膵多段階発がん過程の進行に伴い免疫微小環境を抗腫瘍性から好腫瘍性に向かうこと、腺腫までの段階ではケモカインCXCL17と接着分子ICAM2が抗腫瘍免疫形成に関わることを明らかにした。これらの知見を元に、今後さらに免疫微小環境の遺伝子発現の特徴付けを行うことで、免疫微小環境形成の分子機序に迫っていけるものと期待される。

A. 研究目的

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性は、がん細胞、がん間質、また両者の相互作用によって規定されている。免疫担当細胞はがん間質を構成する一員であり、がんの微小環境に与える影響は大きい。未だ有効な治療法として確立されていないがんに対する免疫療法にとって、その問題点を克服し、効果的な治療を確立することは急務である。それにはヒトがんで実際に起こっている、がんとヒト免疫系を含めたがん間質との相互作用を深く理解することは不可欠である。本研究では、厚生労働行政上にも緊急の課題である難治性膵がんに注目して、ヒトがん間質の免疫微小環境の理解を深めることを目指し、それに関わる形態学的変化、腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞、腫瘍間質で発現される分子について臨床病理学的検討を元に、それら遺伝子発現や浸潤様式の内何が、抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)といった免疫微小環境を特徴付けているのかを検討し、次いで

それらの分子発現や細胞浸潤がどのような分子機序で各微小環境の形成に寄与しているのかを、*in vitro*解析や動物モデルを用いて解析する。本研究により、がん間質において抗腫瘍免疫を惹起し、宿主免疫に対する抑制を解除する分子機構が見出され、効果的な免疫療法の開発や分子標的治療の開発、がんの予後予想に資する知見を得ることが期待される。膵がんの治療選択肢が広がるようになれば、国民の保険・医療に寄与するところが大変に大きい。

B. 研究方法

免疫微小環境は、抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)に大別でき、がん間質ではそれらが種々の程度に混在した状況と考えられる。また好腫瘍性環境の中には、がんの浸潤・転移等に有意な関係を示す亜環境もあると推測される。そこで、まず抗腫瘍性と好腫瘍性の免疫微小環境がどのような形態学的変化、免疫担当細胞の浸潤様式や分子の発現により特徴付けられるのかを検討し、次いでそれらの分子発現や細胞

浸潤がどのような分子機序で各微小環境の形成に寄与しているのかを解析する。以下に本年度に実施した研究の方法を記す。

1. 膵がん組織変化と患者予後との関係：がんの悪性度と病理組織学的変化との相関を解析するために国立がん研究センター中央病院にて外科的に切除された約350症例の膵がん症例を用い、多様な組織学的因子を含む臨床病理学的因子について、特に患者予後との関係について検討した。

2. 膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境：免疫微小環境を特徴付ける遺伝子、免疫担当細胞の同定する為、免疫微小環境に関わる可能性のある様々な遺伝子のがん組織での発現およびがん組織に浸潤する免疫担当細胞の浸潤様式を、各々定量的RT-PCR法、免疫組織化学にて解析し、それらと臨床病理学的な患者情報とを比較検討することで、目的の遺伝子や免疫担当細胞浸潤様式を同定した。選出された免疫担当細胞については、さらにその中の特定のサブセットや活性化状態についても検討した。

3. 膵多段階発がん過程における腫瘍への免疫担当細胞浸潤と免疫微小環境の変化：免疫微小環境の変化を膵多段階発がん過程における変化として検討するために、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)症例を用いて、2.の方法と同様に検討した。

倫理面への配慮

平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」ならびに平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に十分配慮して研究をすすめる。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に対して予め説明し文書で包括的同意を得る。患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作成して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせない。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程では連結可能匿名化して取り扱うなどの細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守する。本研究に関し

て、所属施設の倫理委員会の承認を既に得ている(国立がん研究センター倫理審査委員会課題番号17-77)。動物実験は動物愛護の立場に立ち、動物愛護管理法(環境省)、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省)、カルタヘナ法(文部科学省)等の法令、指針に基づく国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針に則って実施する。

C. 研究結果

1. 膵がん組織変化と患者予後との関係

膵がん組織の病理形態学的変化について、それと患者予後との関係を含めて、臨床病理学的に検討した。単変量解析で予後に有意に寄与する因子について、さらに多変量解析を実施した結果、リンパ節転移が有ること、切離断端にがん進展の有ること、リンパ管侵襲が有ること、膵内神経浸潤が有ること、がん組織内に壊死が有ること、以上が予後不良となる独立した予後因子であることがわかった。これらの中でもがん組織内の壊死は強い因子であり、広範囲な壊死のみならず、微小な壊死の存在も重要であり、壊死部はがん組織内にあって局所的に低酸素状態にある領域に一致した。腫瘍壊死を組織学的に同定することは簡便であり、判定の再現性や観察者間の一致率も高かった(カッパ値=0.87)。

2. 膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境

膵がん組織に浸潤するリンパ球の中で、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の各浸潤が多い症例は、疾患特異的生存率(disease-specific survival, DSS)および無病生存率(disease-free survival, DFS)が有意に高く、細胞浸潤は腫瘍浸潤先端部近傍に多かった。膵がん組織に浸潤するマクロファージを検討すると、CD68⁺マクロファージ、CD163⁺あるいはCD204⁺M2マクロファージ浸潤の多い症例は、DSSとDFSが共に有意に短かった。逆にがん間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率の高い症例は、DSS、DFSが共に有意に長かった。がん間質に浸潤するマクロファージはM2が多く、慢性膵炎組織に浸潤するマクロ

ファージは多くがM1であり、また壊死組織に浸潤するマクロファージは大部分がM2であった。がん間質に浸潤するM1とM2の頻度は同じ症例であっても、部位により不均一であった。がん間質に浸潤する好中球が多い症例は少ない症例に比して、有意にDFS、DFSが短かった。多変量解析の結果、がん間質に浸潤するCD163⁺M2マクロファージ、がん間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率、がん間質に浸潤するCD4⁺T細胞、同CD8⁺T細胞、リンパ節転移、切離端へのがん浸潤、リンパ管侵襲がDSSの独立した予後因子であり、またがん間質に浸潤するCD163⁺M2マクロファージ、がん間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率、がん間質に浸潤するCD8⁺T細胞、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、遠隔転移、静脈侵襲がDFSの独立した予後因子であった。がん間質に浸潤するCD68⁺マクロファージ数、同M2マクロファージ数、同好中球数、CD4⁺FOXP3⁺制御性T細胞(Treg)のCD4⁺T細胞に占める割合は、お互いに有意な正の相関を示し、がん間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率と負に相関した。がん間質に浸潤するCD4⁺T細胞は、同CD8⁺T細胞と正に相関し、TregのCD4⁺T細胞に占める割合と負に相関した。これ以外の組み合わせで、有意な相関は見られなかった。さらに腭がん間質の大小の壊死は生命予後に重要な因子であり、様々な種類の免疫細胞浸潤や静脈侵襲と関連性が高かった。

3. 腭多段階発がん過程における免疫担当細胞浸潤の変化とその分子機序

腭乳頭粘液性腫瘍を用いて、発がん過程の進行と免疫担当細胞浸潤を検討すると、発がん過程の進行に従って、腫瘍細胞間に浸潤するCD8⁺T細胞数、骨髄性未熟樹状細胞(DC)細胞数、腫瘍間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率は、段階的に有意に減少した。逆に、腫瘍間質に浸潤するCD163⁺M2マクロファージ数、同好中球数、Tregの

CD4⁺T細胞に占める割合は、段階的に有意に増加した。次にIPMA細胞間へのDC浸潤を促進する分子機序を明らかにするために、発がん過程各段階の上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。正常上皮に比してIPMAで発現が上昇し、IPMCで発現が低下する遺伝子として、ケモカインCXCL17と接着分子ICAM2を得た。マウス腫瘍を用いた同種同系移植モデルを用いて、CXCL17とICAM2の免疫応答性の制御を検討した結果から、CXCL17とICAM2の発現が腫瘍局所への効率的なDC浸潤を誘導し、継いで細胞性免疫が惹起され、さらにICAM2発現によりT細胞の標的腫瘍細胞障害の効率がよくなること、これらが相乗的に働いて抗腫瘍免疫能が誘導されると考えられた。

D. 考察

1. 腭がん組織変化と患者予後との関係

腭がん組織における腫瘍壊死同定は、臨床場においても簡便かつ再現性高く、患者予後予測可能な有効な手段になることが実証された。さらにがん組織の低酸素状態やHIF-1 α を標的とした治療の対象となる患者選択に有用な手段になると考えられる。

2. 腭がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境

腭がん間質に浸潤するM2マクロファージ、好中球、Treg浸潤は好腫瘍性免疫微小環境を、M1マクロファージ、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞浸潤のある微小環境は抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連すると考えられた。これら免疫微小環境を特徴付ける、一連の細胞浸潤を誘導する分子機序の解明することが出来れば、免疫微小環境をコントロールし、免疫微小環境を抗腫瘍性に転換させる治療の開発を考える上で極めて重要である。そこで、M1マクロファージとM2マクロファージが浸潤する各がん間質の免疫微小環境を特徴付ける遺伝子発現を調べるために、現在は各々の組織を採取して網羅的遺伝子発現解析を実施している。今後、両微小環境を特徴付ける遺伝子発現を同定し、それら遺伝子発現から微小環境形成の分子機序について検討していく予定である。

3. 膵多段階発がん過程における免疫担当細胞浸潤の変化とその分子機序

多段階発がん過程の進行に伴い、免疫微小環境は抗腫瘍性から好腫瘍性に向かっていくことが示唆された。一方、多段階発がん過程の中で、前がん病変初期、腺腫段階までは異常細胞(腫瘍細胞)を除去するある種の生体防御機序の一つとして、異常細胞自らがDC浸潤を誘導し、細胞性免疫を惹起する分子機序が存在することがわかり、さらにその機構は発がん過程の進行により失われていくことが示唆された。

E. 結論

本研究では、ヒト膵がん間質の免疫微小環境の理解を深めることを目的として、それに関わる形態学的変化、腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞、腫瘍間質で発現される分子について、それらがいかに抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)といった免疫微小環境を特徴付けているのかを検討している。免疫微小環境の意味づけとして、患者予後を指標にしている。本年の研究では、形態学的変化と腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞に主眼をおいて検討を実施し、それらの中で免疫微小環境を特徴付ける因子を捉えることが出来た。今後の研究により、既に得られた所見を活かし、さらに遺伝子発現の特徴付けを行うことで、免疫微小環境形成の分子機序に迫っていけるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiraoka N., Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Yoshida M, Yamada K, Koyama T, Kanai Y. Tumor necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. *Br J Cancer*, 2010;103:1057-65.
2. Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N., Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, Saki R. CUB Domain-Containing Protein 1,

a prognostic factor of human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res*. 2010;70:5136-46.

3. 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*. 2010;101:882-8.
4. Hiraoka N. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: Molecular biology. *Int J Clin Oncol*. 2010;6:544-51.
5. Hiraoka N., Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2011;140:310-321.
6. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dicitus C, Ahmadi R, Grau S, Hiraoka N., Eckstein V, Ecker R, Korff T, von Deimling A, Unterberg A, Beckhove P, Herold-Mende CC. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived transforming growth factor-beta. *Clin Cancer Res*. in press.

2. 学会発表

1. 猪野義則、山崎理恵、島田和明、金井弥栄、平岡伸介。腫瘍浸潤リンパ球およびマクロファージは膵がん患者の予後因子となる。第69回日本癌学会学術総会 大阪市。2010年9月。
2. 平岡伸介。多段階発がん過程における抗腫瘍免疫機構に関する研究。第56回日本病理学会秋期特別総会。A演説(学術研究賞)。北九州市。2010年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発

分担研究者 神奈木 玲児 愛知医科大学・先端医学医療研究拠点・客員教授

研究要旨：シアリルルイスX糖鎖は癌に高頻度に出現する糖鎖であり、血管内皮の細胞接着分子E-セ렉チンと結合して癌の血行性転移に関与するが、癌化に伴うこのシアリルルイスX糖鎖の発現誘導機構の詳細はこれまで不明であった。我々は今回、大腸癌におけるシアリルルイスX糖鎖の発現誘導機構を解析した。その結果、正常大腸の上皮細胞には硫酸基で修飾された硫酸化シアリルルイスX糖鎖が存在し、癌化に伴って硫酸トランスポーター*DTDST*遺伝子の転写が低下するために、癌細胞では硫酸基を欠いたシアリルルイスX糖鎖の発現が誘導されるに至ることを明らかにした。癌化に伴う*DTDST*遺伝子の転写低下は、ヒストンH3K27のトリメチル化を介したエピジェネティック・サイレンシングであることも明らかにした。また、*DTDST*遺伝子が細胞増殖抑制作用を持つ癌抑制遺伝子であり、癌化に伴うこの遺伝子の転写低下によって癌細胞の増殖が亢進する事も明らかになった。また、頭頸部扁平上皮癌の症例において、一部のケモカイン受容体の統計的に有意な発現亢進を認め、扁平上皮細胞におけるこれらケモカイン受容体の発現誘導機構を解析した。

A.研究目的

癌細胞表面には正常細胞と大きく異なる糖鎖が発現する。癌細胞に出現する糖鎖の一部には生理的機能があり、癌細胞の運動性や浸潤能、転移能に深く関与する。一部の糖鎖は糖鎖認識分子と相互作用して細胞接着を引き起こし、癌細胞と間質細胞（血管内皮細胞・免疫細胞・線維芽細胞など）の相互作用を媒介する。癌細胞の糖鎖異常はこうした上皮細胞と間質細胞で構成される微小環境に大きな変化をもたらす。本研究はこの相互作用の分子機構を明らかにして臨床応用可能な新しい診断・治療法の開発につなげることを研究目的としている。

今年度は特に大腸癌におけるシアリルルイスX糖鎖の発現誘導機構を解析し、発癌を促進する分子機構と、この糖鎖の発現を誘導する機構との関連性を解明することを目標として研究を行った。あわせて、頭頸部扁平上皮癌の患者症例におけるケモカイン受容体の発現変化を検索し、扁平上皮細胞におけるケモカイン受容体の発現誘導機構についても検討を加えた。

B.研究方法

シアリルルイスX糖鎖の発現は大腸癌をはじめ各種臓器の癌細胞で亢進しているが、我々は以前に、正常の上皮細胞においてはこのシアリルルイスX糖鎖がさらに硫酸基で修飾された硫酸化シアリルルイスX糖鎖が強く発現していることを明らかにした。癌化に伴って硫酸化シアリルルイスXの発現は消滅し、これと交替してシアリルルイスXの発現が誘導されることから、癌化に伴う糖鎖硫酸化機構の何らかの障害がこの糖鎖変化の背景にあると考えられた。このことから、大腸癌症例より採取した癌細胞および非癌上皮細胞について、糖鎖硫酸化に関与する可能性のある遺伝子の発現をreal-time RT-PCR法にて調べ、癌細胞で転写が有意に低下する遺伝子を探索した。有意の低下をみた遺伝子については*in vitro*で遺伝子導入細胞を作成して各種の解析を行い、その低下の生理的意義の解明を試みた。また、頭頸部扁平上皮癌の患者症例についてケモカイン受容体の発現をRT-PCR法によって検索し、統計的に有意な発現亢進を認めたものについては、培養扁平上皮癌細胞株および正

常初代培養ケラチノサイトを用いた細胞生物学的実験を行い、これらケモカイン受容体の発現誘導機構を解析した。

(倫理面への配慮)

研究に使用する臨床材料は、材料を得る各施設での倫理委員会を経たものを用いた。

C. 研究結果

1) 大腸癌における糖鎖硫酸化の低下の原因となる遺伝子の同定

大腸癌症例より採取した癌細胞および非癌上皮細胞について、糖鎖硫酸化に関与する可能性のある遺伝子として硫酸基転移酵素(五種)、活性化硫酸輸送体(二種)、活性化硫酸合成酵素(二種)、硫酸基トランスポーター(一種)、硫酸基分解酵素(二種)の発現をreal-time RT-PCR法にて調べたところ、硫酸基トランスポーター遺伝子*DTDST*に最も著明な低下が観察された($p < 0.0001$)。この転写低下は進行期の症例ではもちろん有意であり($p < 0.01$)、比較的早期の症例でも有意($p < 0.02$)であった。*DTDST*遺伝子の転写低下は大多数の培養大腸癌細胞株にも認められ、HDAC阻害剤であるTrichostatin A (TSA)などの添加培養により転写レベルの回復が認められた。クロマチン免疫沈降法で検索したところ、発現の低下をみる培養大腸癌細胞株では*DTDST*遺伝子にヒストンH3K9のアセチル化が認められず、H3K27のトリメチル化が観察された。TSAの添加により*DTDST*遺伝子の転写回復と平行してH3K27のトリメチル化が低下し、H3K9のアセチル化が誘導された。

2) 癌細胞における*DTDST*遺伝子の転写抑制の病態生理学的意義の解析

癌における*DTDST*遺伝子の生理学的意義を解析する目的で遺伝子導入細胞の作成を試みたところ、樹立に成功しなかった。その原因として*DTDST*遺伝子の導入により細胞増殖が抑制される可能性を考え、Tet-offシステムを用いた遺伝子導入細胞の樹立を行った。Tet-off遺伝子導入細胞では、DOX不添加では*DTDST*遺伝子の転写が起り、細胞表面には

硫酸化シアリルルイスXが発現し正常上皮細胞の表面糖鎖形質となった。DOXを培地に添加すると*DTDST*遺伝子の転写が抑制され、細胞表面では硫酸化シアリルルイスXの発現が消退してシアリルルイスXの発現が誘導され、癌細胞の表面糖鎖形質となった。これにより、*DTDST*遺伝子がシアリルルイスX糖鎖の発現を規定することが明らかとなった。また、*DTDST*遺伝子の転写が抑制され、シアリルルイスX陽性となった状態では細胞は平常通りよく増殖するのに対して、*DTDST*遺伝子が転写され硫酸化シアリルルイスX陽性となった状態では細胞増殖が著明に抑制された。このことから、*DTDST*遺伝子には細胞増殖を抑制する機能があることが明らかとなった。

3) 頭頸部扁平上皮癌におけるケモカイン受容体の発現の解析

頭頸部扁平上皮癌においてケモカイン受容体の発現をRT-PCR法によって検索したところ、CCR7とCXCR4に統計的に有意な発現亢進を認めた(それぞれ $p < 0.02$ および $p < 0.05$)。培養扁平上皮癌細胞株および正常初代培養ケラチノサイトを用いてこれらケモカイン受容体の発現誘導機構を細胞生物学的実験により解析したところ、CCR7の発現は細胞分化に依存し、未分化のケラチノサイトに発現し分化とともに消退すること、高分化型に比して未分化型の癌で有意に高発現することが明らかとなった。一方、CXCR4の発現は細胞の分化度に依存せず、低酸素により誘導され、その誘導はnitrous oxideを介することが明らかとなった。いずれも癌で増加するケモカイン受容体でありながら、その誘導機構は互いに異なり、臨床診断上の意義が異なることが示唆された。

D. 考察

1) 大腸癌における糖鎖硫酸化の低下の原因となる遺伝子の同定と転写抑制の病態生理学的意義の解析

癌に高頻度に出現するシアリルルイスX糖鎖は、これまで癌細胞と血管内皮細胞との接着を媒介し、癌の血行性転移を促進する意義を持つことが判明していた。今回の成果から、癌

におけるシアリルルイスX糖鎖の出現は、細胞の癌化に伴う一連の癌抑制性遺伝子のエピジェネティック・サイレンシングの一環であることが明らかとなった。また今回の成果から、癌におけるシアリルルイスX糖鎖の出現は、細胞増殖抑制能を持つ癌抑制遺伝子*DTDST*の転写低下の結果であり、糖鎖変化が細胞の発癌機構と深く関連していることが明らかとなった。治療への展望としては、*DTDST*の転写レベルの回復が、癌治療の目標の候補になり得ると考えられた。*DTDST*の転写レベルの回復によって、増殖能を抑制でき、かつ、血行性転移促進糖鎖の発現も抑制できる可能性があると考えられる。

2) 頭頸部扁平上皮癌におけるケモカイン受容体の発現の解析

我々はこれまで、低酸素により、がん細胞には、血管内皮への細胞接着能を持つ糖鎖が出現し、これが転移浸潤を促進することを明らかにしてきた。今回は、一部のケモカイン受容体も低酸素によって誘導され、細胞接着糖鎖と継起的に働いて転移浸潤を促進することを示唆する成績が得られた。これにより、低酸素によるがんの形質変化をターゲットとしたがん治療法の有効範囲がさらに明らかになったと考えられる。

E. 結論

癌化に伴って細胞表面の糖鎖が大きく変化し、癌細胞に特有の糖鎖は癌マーカーとして役立つことはすでによく知られている。しかし、糖鎖の変化がほんとうに細胞の癌化機構と関連しているのかどうかは、これまであまり明確になっていないとは云えなかった。今年度のシアリルルイスX糖鎖の癌における発現誘導機構の解析結果から、糖鎖変化が細胞の発癌機構と深く関連していることが明らかとなった。また今後治療へ応用することが可能なターゲット分子も見いだされた。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M., and Kannagi, R. Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene *DTDST* induces sialyl Lewis^x expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.*, **70**: 4064-4073, 2010.
2. Kannagi, R., Sakuma, K., Miyazaki, K., Lim, K-T., Yusa, A., Yin, J., and Izawa, M. Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumor markers. *Cancer Sci.*, **101**: 586-593, 2010.
3. Igarashi, Y. and Kannagi, R. Glycosphingolipids as mediators of phenotypic changes associated with development and cancer progression. *J. Biochem.*, **147**: 3-8, 2010.
4. Inoue, T., Taguchi, I., Abe, S., Li, G., Hu, R., Nakajima, T., Hara, A., Aoyama, T., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Node, K. Sulfatides are associated with neointimal thickening after vascular injury. *Atherosclerosis*, **211**: 291-296, 2010.
5. Ueda, M., Shimada, T., Goto, Y., Tei, K., Nakai, S., Hisa, Y., and Kannagi, R. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, **37**: 488-495, 2010.
6. Yin, J., Miyazaki, K., Shaner, R.L., Merrill, A.H., Jr., and Kannagi, R. Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas of glycolipid tumor markers. *FEBS Lett.*, **584**: 1872-1878, 2010.
7. Fujii, M., Yusa, A., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Tsunoda, N., Oda, K., Nagino, M., Ishimaru, T., Shimoyama, Y., Utsunomiya, H., Iwata, H., Itoh, Y., Itoh, J., Kannagi, R., and Kyogashima, M. Cy-

toplasmic expression of the JM403 antigen GlcA-GlcNH₃⁺ on heparan sulfate glyco-saminoglycan in mammary carcinomas-a novel proliferative biomarker for breast cancers with high malignancy. *Glycoconj. J.*, **27**: 661-72, 2010.

2.学会発表

1. 神奈木玲児: 糖鎖と腫瘍マーカー (Carbohydrate tumor markers). 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22-24日, 2010.
2. Kannagi R: Sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan, July 27-30, 2010.
3. Tanaka K, Yamada M, Yamazaki Y, Eaton A, Aoyama T, Hara A, Kannagi R, Kyogashima M: A novel method for analysis of diversities in ceramides and glycosphingolipids by MALDI-TOFMS and MS2 equipped with high-energy CID. 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, Utah, May 23-27, 2010.
4. Takematsu H, Naito Y, Tanaka K, Kyogashima M, Kannagi R, Kozutsumi Y: Genetic understanding of biosynthetic pathway branching regulation by a novel phenotype-genotype correlation analysis, CIRES. 2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology, St Pete Beach, FL, November 7-10, 2010.
5. 河村由紀, 豊田 実, Phongsisay V, 岡田俊彦, 山崎元美, 河村 裕, 小西文雄, 矢野秀明, 斉藤幸夫, 鈴木拓, 松本誉之, 神奈木玲児, 土肥多恵子: IL-6 induces ectopic expression of DNA methyltransferases followed by aberrant glycosylation in ulcerative colitis (IL-6はDNAメチル基転移酵素の異所性発現を介して潰瘍性大腸炎における糖鎖発現異常を誘導する). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日

-24日, 2010.

6. 遊佐亜希子, 井澤峯子, 近藤 豊, 関戸好孝, 神奈木玲児: Role of histone H3 trimethylation in induction of sialyl Lewis x expression in colon cancer (大腸癌のシアリルルイスX発現誘導におけるヒストンH3トリメチル化の役割). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.
7. 佐久間圭一朗, 神奈木玲児: Growth factor-induced EMT enhances expression of E-selectin ligand glycans on colorectal cancer cells (増殖因子によるEMTは大腸癌細胞に E-セレクチンリガンド糖鎖の発現を誘導する). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.
8. 田中広治, 小泉恵子, 萩原和美, 村上真史, 村手 隆, 神奈木玲児, 京ヶ島守: ATRA down-regulates neutral ceramidase and induces neuronal differentiation in SH-SY5Y cells (全トランスレチノイン酸は中性セラミダーゼ発現を抑制しSH-SY5Y細胞に分化を誘導する). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.
9. 遊佐亜希子, 藤井正宏, 後藤嘉子, 小田高司, 宇都宮洋才, 京ヶ島守, 神奈木玲児: 陽性荷電ヘパラン硫酸糖鎖の増殖・分化・アポトーシスにおける発現. 第83回日本生化学会大会 (BMB2010), 神戸, 12月7日-10日, 2010.
10. 山口真範, 石田秀治, 安藤弘宗, 宮崎敬子, 神奈木玲児: シアル酸構造修飾プローブを用いた高次生命機能の精査. 第83回日本生化学会大会 (BMB2010), 神戸, 12月7日-10日, 2010.

H.知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

Ⅲ 研究成果に関する一覧表

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamane Y, Ishii G, Goto K, Kojima M, Nakao M, Shimada Y, Nishiwaki Y, Nagai K, Kohroggi H, <u>Ochiai A.</u>	A Novel Histopathological Evaluation Method Predicting the Outcome of Non-small Cell Lung Cancer Treated by Neoadjuvant Therapy: The Prognostic Importance of the Area of Residual Tumor.	J Thorac Oncol.	5	49-55	2010
Mitsunaga S, Fujii S, Ishii G, Kinoshita T, Hasebe T, Aoyagi K, Sasaki H, <u>Ochiai A.</u>	Nerve invasion distance is dependent on laminin gamma2 in tumors of pancreatic cancer.	Int J Cancer.	15;127	805-819	2010
Kimura T, Kuwata T, Ashimine S, Yamazaki M, Yamauchi C, Nagai K, Ikehara A, Feng Y, Dimitrov DS, Saito S, <u>Ochiai A.</u>	Targeting of Bone-Derived Insulin-Like Growth Factor-II by a Human Neutralizing Antibody Suppresses the Growth of Prostate Cancer Cells in a Human Bone Environment.	Clin Cancer Res Jan	1;16	121-129	2010
Sano M., Aoyagi K. Takahashi H., Kawamura T., Mabuchi T., Igaki H., Tachimori Y., Kato H., <u>Ochiai A</u>	Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis.	Int J Oncol.	36	321-330	2010
Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Nishizawa Y, Saito N, <u>Ochiai A.</u>	CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy.	Cancer Sci.	101	906-912	2010
Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Oda I, Nonaka S, Omori T, Sugiura H, Goda K, Kaise M, Inoue H, Ishikawa H, <u>Ochiai A.</u> Shimoda T, Watanabe H, Tajiri H, Saito D.	Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial.	J Clin Oncol.	28	1566-15	2010
Fujii S, Yamazaki M, Muto M, <u>Ochiai A.</u>	Microvascular irregularities are associated with composition of squamous epithelial lesions and correlate with subepithelial invasion of superficial-type pharyngeal squamous cell carcinoma	Histopathology,	56	510-522	2010
Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, Aokage K, Yanagi S, Nagai K, Nishiwaki Y, <u>Ochiai A.</u>	Histopathological features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: Tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness.	J Thorac Oncol.		[Epub ahead of print]	2010
Ishii G, Hashimoto H., Asada K., Ito, TK, Hoshino A., Harigaya K., Nagai K., Ushijima T., <u>Ochiai A.</u>	ibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: A novel character of tumor educated fibroblasts.	F Int J Oncol.	37	317-25	2010
Yamazaki M, Fujii S, Murata Y, Hayashi R, <u>Ochiai A.</u>	High expression level of geminin predicts a poor clinical outcome in salivary gland carcinomas.	Histopathology.	56	883-92	2010
Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, Yamaguchi Y, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, <u>Ochiai A.</u>	Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation.	Int J Cancer.	128	1585-95	2011

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kojima M, Nakajima K, Ishii G, Saito N, <u>Ochiai A.</u>	Peritoneal elastic laminal invasion of colorectal cancer: the diagnostic utility and clinicopathologic relationship.	Am J Surg Pathol.	34	1351-60.	2010
Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi I, <u>Ochiai A.</u>	Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma.	J Thorac Oncol.	5	1507-15	2010
Yamauchi C, Fujii S, Kimura T, Kuwata T, Wada N, Mukai H, Matsumoto N, Fukayama M, <u>Ochiai A.</u>	E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through KLRG1 on NK cells.	J Thorac Oncol	128	2125-37	2011
Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, <u>Ochiai A.</u>	E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through KLRG1 on NK cells.	Int J Oncol.	38	345-53.	2011
Hishida T, Ishii G, Kodama T, Tsuta K, Nara M, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, <u>Ochiai A.</u>	Centrally located adenocarcinoma with endobronchial polypoid growth: Clinicopathological analysis of five cases.	Pathol Int.	61	73-9.	2011
Mochizuki, S., Tanaka R., Shimoda M., Onuma J., Fujii Y., Jinno H. and <u>Okada Y.</u>	Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	402	651-657	2010
Kuroda H., Mochizuki S., Shimoda M., Chijiwa M., Kamiya K., Izumi Y., Watanabe M., Horinouchi H., Kawamura M., Kobayashi K. and <u>Okada Y.</u>	ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers.	Int. J. Cancer	127	1844-1856	2010
Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, <u>Sakamoto M.</u>	Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer.	Cancer Sci	101(7)	1731-7	2010
Masugi Y, Yamazaki k, Hibi T, Aiura K, Kitagawa Y, <u>Sakamoto M.</u>	Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer.	Hum Pathol	41	1061-1068	2010
Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, <u>Sakamoto M.</u>	Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) expression.	Cancer Sci	101	666-672	2010
Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, <u>Sakamoto M.</u>	Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway.	Biochem Biophys Res Commun	391:01:00	486-49	2010
Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Itoh F, <u>Kato M.</u>	Requirement of TCF7L2 for TGF- β -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene.	J Biol Chem	285	38023-38033	2010

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, <u>Kato M</u> , Komiyama K, Abiko Y, Ito K, Otsuka K, Kappen K.	TGF-β Signaling in Gingival Fibroblast-Epithelial Interaction.	J Dent Res	89	1315-1321	2010
Kashiwagi Y, Horie K, Konno C, Inomata M, Imamura T, <u>Kato M</u> , Yamamoto Tm Yamashita H.	Trichostatin A-Induced TGF-β Type II Receptor Expression in Retinoblastoma Cell Lines.	IOVS	51	679-685	2010
Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, <u>Arakawa H</u>	Possible existence of lysosome-like organella and its role in mitochondrial quality control	PLoS ONE	6 (1)	e16054	2011
Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, <u>Arakawa H</u>	Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria	PLoS ONE	6 (1)	e16060	2011
Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, <u>Arakawa H</u>	Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53	Int J Oncol	37 (5)	1133-1141	2010
Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, <u>Arakawa H</u> , Futamura M	Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain	Oncol Rep	24 (5)	1193-1200	2010
Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, <u>Arakawa H</u>	Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis	Int J Oncol	36 (5)	1253-1260	2010
<u>Hiraoka N</u> , Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Yoshida M, Yamada K, Koyama T, Kanai Y.	Tumor necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation.	Br J Cancer	103	1057-65	2010
Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, <u>Sakai R</u> .	CUB Domain-Containing Protein 1, a prognostic factor of human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation.	Cancer Res.	70	5136-46	2010

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	101	882-8	2010
Hiraoka N	Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: Molecular biology.	Int J Clin Oncol.	6	544-51	2010
Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y.	CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis.	Gastroenterology	140	310-21	2011
Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, Grau S, Hiraoka N, Eckstein V, Ecker R, Korff T, von Deimling A, Unterberg A, Beckhove P, Herold-Mende CC.	Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived transforming growth factor-betas.	Clin Cancer Res.			in press
Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M. and Kannagi, R.	Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene DTDST induces sialyl Lewisx expression and accelerates proliferation of colon cancer cells	Cancer Res.	70	4064-4073	2010
Kannagi, R., Sakuma, K., Miyazaki, K., Lim, K-T., Yusa, A., Yin, J. and Izawa, M.	Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumor markers	Cancer Sci.	101	586-593	2010
Igarashi, Y. and Kannagi, R.	Glycosphingolipids as mediators of phenotypic changes associated with development and cancer progression	J. Biochem.	147	39148	2010
Inoue, T., Taguchi, I., Abe, S., Li, G., Hu, R., Nakajima, T., Hara, A., Aoyama, T., Kannagi, R., Kyogashima, M. and Node, K.	Sulfatides are associated with neointimal thickening after vascular injury	Atherosclerosis	211	291-296	2010
Ueda, M., Shimada, T., Goto, Y., Tei, K., Nakai, S., Hisa, Y. and Kannagi, R.	Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma	Auris Nasus Larynx	37	488-495	2010
Yin, J., Miyazaki, K., Shaner, R.L., Merrill, A.H., Jr. and Kannagi, R.	Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas of glycolipid tumor markers	FEBS Lett.	584	1872-1878	2010

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujii, M., Yusa, A., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Tsunoda, N., Oda, K., Nagino, M., Ishimaru, T., Shimoyama, Y., Utsunomiya, H., Iwata, H., Itoh, Y., Itoh, J., <u>Kannagi,</u> <u>R.</u> and Kyogashima, M.	Cytoplasmic expression of the JM403 antigen GlcA-GlcNH3+ on heparan sulfate glycosaminoglycan in mammary carcinomas-a novel proliferative biomarker for breast cancers with high malignancy	Glycoconj. J.	27	661-672	2010

