

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22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成24（2012）年5月

目 次

I. 総合研究報告

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	1
--	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
--------------------	----

I. 総 合 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）
総合研究報告書（平成22-23年度）

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、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。成人 T 細胞性白血病/リンパ腫(ATLL)患者で同一患者における末梢血検体とリンパ節検体を用いてアレイ CGH 解析をしたところ、患者の 70%に由来が共通する複数のサブクローンが存在し、これまで不明であった腫瘍増殖の場はリンパ節であることを明らかにした。消化器がんの分子標的治療は本邦においては数年前より大腸がんにおいて Cetuximab, Bevacizumab を用いた分子標的治療が始まり一定の成果を挙げている。しかし、胃がんにおいては HER2 陽性胃がんに対し昨年度からようやく Trastuzumab 療法が開始されたものの、頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)においてはいまだ行われておらず基礎的研究も大きく立ち遅れているのが現状である。本研究では腫瘍の悪性化の機構として重要な EMT(上皮間葉移行)に関し、分子標的治療により EMT を来たし耐性を獲得した頭頸部扁平上皮がん細胞、ならびに転移性が高く予後不良の HER2 陽性胃がんおよび低分化型大腸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細胞株を用いて解析し、以下の諸点を明らかにした。1) 頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)では新規に作成した gefitinib 耐性株が EMT を示すことを見だし、その機構を解析した。その結果、EGFR の発現低下と代償性の Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が EMT を引き起こす可能性を示唆し、同シグナル経路の阻害により、EMT が抑制されることを明らかにした。2) HER2 陽性胃がんでは独自に樹立した日本人由来株において親株と Trastuzumab 耐性株を比較し、耐性株における MUC4 の発現亢進と PI3K/Akt などの下流シグナルの活性

化ならびに **Lapatinib**、不可逆性チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)による有意な増殖抑制を見出し、耐性株に対する新しい **Trastuzumab** 耐性機構と耐性株に対する新しい治療法の可能性を明らかにした。3) **Gefitinib**, に対し高感受性を示す低分化型大腸がん細胞株 (**COLM-5**)における **HER3** 低発現の意義について検討した。**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、また **HER3** 強制発現によっても分化が誘導され、**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重要な役割を果たしている可能性を示唆した。悪性腫瘍は様々なジェネティック異常およびエピジェネティック変化の蓄積により発生・進展する。胸部腫瘍の中でも悪性胸膜中皮腫は標準的な化学療法、放射線療法に対して極めて抵抗性が高く、患者予後は不良である。悪性中皮腫細胞株に対して **TGF-beta** 刺激は悪性中皮腫細胞の細胞増殖を促進し、**TGF-beta** 阻害薬は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。一方、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すが、網羅的発現解析を行い **YAP** により正に制御される遺伝子の多くは細胞周期に関わる遺伝子であることを明らかにした。特に、**Cyclin D1 (CCND1)**、**Forkhead box M1 (FOXM1)** 遺伝子はプロモーター領域に **YAP-TEAD** が結合して転写が亢進され、中皮腫の細胞増殖が促進されることが明らかとなった。同様に **YAP** は **CTGF** の発現を誘導することが明らかとなり、**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にも関与することを明らかにした。さらに、細胞接着に係る **ALCAM** 分子が高発現し、悪性中皮腫の浸潤能、運動能などの悪性形質を促進することが明らかとなった。**ALCAM** のホモフィリック結合を阻害する可溶性アイソフォーム **sALCAM** を精製し細胞培養液中に添加したところ、中皮腫細胞の浸潤能、運動能を抑制した。中皮腫の細胞特性の解析研究の推進により悪性中皮腫の悪性化に関わる分子機構が明らかとなり、その新規分子標的としての可能性が示唆された。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る。このような分化と細胞増殖は相反する現象である。一方がんではこれらの分化の特徴がしばしば消失し、また無秩序な増殖に傾く。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** 分子であり、がん化の新たなメカニズムに関与し得る可能性を示している。当研究においてはこの 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着目してきた。その結果、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報告した。また、もう一つの機能として、トリコプレインは一次線毛形成を抑制するが、実はこれが円滑な細胞周期進行に必要であることを明らかにし、報告した。その分子機序として、トリコプレインがオーロラ A キナーゼと G1 期に結合しこれを活性化させることも、分子内ドメインのレベルで確認した。この成果の特徴は、分裂期キナーゼであるオーロラ A をトリコプレインが G1 期に活性化するという新知見と、もう一つはこの系を抑えると一次線毛が形成され細胞周期進行が止まるという新発見にある。つまりトリコプレインとオーロラ A キナーゼの結合を阻害するような薬剤が開発されれば、がん幹細胞に一次線毛形成を誘導することでがんを増殖停止へと導き得る可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

a) リンパ造血器腫瘍研究においては、

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

3. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) の急性型の末梢血腫瘍とリンパ腫型のリンパ節腫瘍のゲノム異常様式が異なっていることを報告していたが、急性型 ATLL の同一患者の末梢血検体とリンパ節検体を検討し、その本態を解明する

b) 消化器がん研究においては、

1. HNSCC 由来 gefitinib 抵抗性株を用いた EMT 発生機構の解析と治療法の開発
2. HER2 陽性 Trastuzumab 耐性胃がん細胞株を用いた Trastuzumab 耐性機構の解析と Lapatinib および不可逆性 TKI の抗腫

瘍効果

3. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構と gefitinib 感受性の関連

c) 悪性中皮腫の研究においては、

悪性中皮腫における新たなゲノム異常を同定し、その遺伝子産物が関わる細胞内シグナル伝達系や細胞膜表面蛋白を標的とした新規治療戦略を構築することを目的とする。同時に小分子化合物や既知の阻害剤に対する中皮腫細胞の感受性や細胞特性を検討する。これらのアプローチにより、より有効な治療標的分子・標的シグナル伝達系を見出し、悪性中皮腫に対する新たな治療戦略開発を試みる。

d) 細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析においては、

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。我々は、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。現在までに、TPHD 分子群が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する bi-player 分子であることを見出し、その機能的知見を増やしつつある。最終目標は、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であり、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。本研究では、トリコプレインの中心体での分化増殖制御機能に着目し、微小管係留と一次線毛形成制御に関わる部分に

焦点を置いた解析を行った。

B. 研究方法

a) リンパ造血器腫瘍研究においては、

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 AREBVLDP 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。

3. ATLL 症例のゲノム異常の解析

急性型 ATLL 症例 13 症例について、44K oligo-array CGH でゲノム異常を調べた。リンパ節については、そのまま DNA を生成した。末梢血検体については、腫瘍細胞の含有量を上げるため、CD4 陽性細胞をビーズ法で精製したものから DNA を精製した。また、ゲノム異常様式の再現性を確認するために、細胞株を用いて、様々な割合で混合し、遺伝子異常様式がどのように変化するかを検討した。

b) 消化器がん研究においては、

1. EGFR を高発現する複数の HNSCC 細胞株に in vitro で gefitinib を反復投与、耐性株を

作成し、このうち EMT 形質をしめし、繊維芽細胞様形態を示す細胞株を選別する。これを用いて EMT 形質をしめす gefitinib 細胞株における snail 発現制御機構を明らかにする。

2. HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株 (GLM-1) およびそれから In vivo 選択により作成した Trastuzumab 耐性株を用いてその耐性機序ならびに Lapatinib および不可逆性チロシキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果とその作用機序を明らかにする。

3. HER3 低発現を示す低分化型大腸がん細胞株 COLM-5 と HDAC 阻害剤を用いて HER3 の発現制御機構を明らかにし、さらに HER3 の強制発現により HER3 の分化および Gefitinib 感受性に及ぼす影響を明らかにする。

c) 悪性中皮腫の研究においては、

中皮腫細胞株は当部で樹立した中皮腫細胞株 (Y-MESO-9, Y-MESO-14, Y-MESO-27 など 14 株)、Dr. Adi F. Gazdar あるいは ATCC から供与を受けた中皮腫細胞株 (NCI-H290, MSTO-211H など 5 株) および不死化正常中皮細胞 (MeT-5A) を使用した。

アジレント社の 44K オリゴアレイを用いて網羅的発現解析、また 244K ヒト全ゲノムオリゴアレイを用いて comprehensive genomic hybridization (CGH) 解析を行った。遺伝子変異はシーケンシング法にて検討した。個々の遺伝子・蛋白発現およびリン酸化修飾は real-time RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫蛍光染色法などを用いた。外科的に切除された中皮腫切除標本を用いて免疫組織染色を施行した。

全長 ALCAM および可溶型 ALCAM の cDNA を作成し、pcDNA3.1 ベクターにクロ

ーニングした。可溶型 ALCAM 発現ベクターを HEK293FT 細胞にトランスフェクションして上澄みを回収し、His-タグ蛋白抽出キットを用いて抽出し、さらに透析して sALCAM 蛋白を精製した。

クロマチン免疫沈降法に関しては、CTGF, CCDN1, FOXM1 のプロモーター領域に対する PCR プライマーを作成し、細胞抽出物に対して抗 YAP 抗体、抗ヒストン H3 抗体等で免疫沈降を行った後、沈降物をテンプレートとして PCR を行った。リポーターアッセイに関しては、CTGF, CCDN1, FOXM1 のプロモーター領域をクローニングし、pGL3 ルシフェラーゼリポータープラスミド等に組み込んだ。

細胞内への遺伝子導入は、plasmid 発現ベクターおよびレンチウイルス (pLL3.7) を用いた。細胞増殖は細胞数カウントおよび MTT アッセイ法にて検討した。細胞の運動能、浸潤能は Boyden-Chamber 法を用い、後者においてはマトリジェルコートフィルターを使用した。足場非依存性増殖能はソフトアガロース寒天培地法を用いた。動物移植モデルは KSN/Scl ノードマウス (6-8 週、雌)を用いた。細胞株 5×10^6 個を皮下移植し、皮下腫瘍径は隔日に測定した。胸腔および腹腔へは同様に細胞株 5×10^6 個を移植し、隔日にマウスの体重および生存をモニターし、生存曲線は Kaplan-Meier 法にて記載し、log-rank 法にて有意差を検定した。

d) 細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析においては、

1. 中心体での局在解析

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) により確認した。また、分画を調整しそのイムノブロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。一次線毛形成は RPE1 細胞におい

て血清飢餓により誘導した。

2. 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。

3. 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。

4. 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。トリコプレイン機能欠失による一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。表現型の確認のためには適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

5. 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 IFT20 蛋白質のノックダウンにより確立し、これにトリコプレイン siRNA を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討した。

6. トリコプレイン変異体解析

分子内ドメイン解析のため、トリコプレインの断片を蛋白質および発現ベクターとして作製し、上述の実験系で適宜使用した。

(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の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、動物実験においては動物委員会の審査・承認を得て行った。

C. 研究結果

a) リンパ造血器腫瘍研究においては、

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

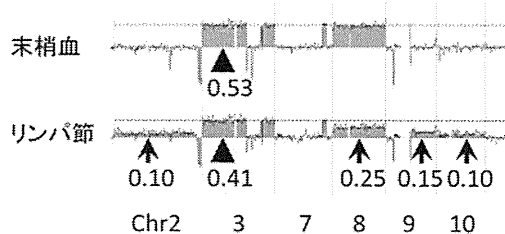
Age-related EBV+LPD については、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、まず、質のよい RNA が得られた 5 症例について遺伝子発現を行い、同じ分化段階である 8 症例の ABC 型 DLBCL との遺伝子発現比較相関を行った。その結果、発現差異の大きな遺伝子として IL6、TNFAIP3、HOPX や SLAMF1 が認められた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、AR-EBV+LPD に有意に発現の高い遺伝子群として

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- κ B の活性化の関与が示唆された。

3. ATLL 症例のゲノム異常の解析

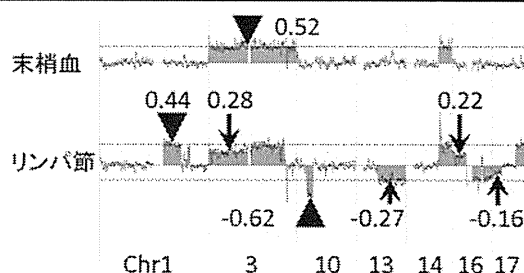
同一患者の末梢血検体とリンパ節検体を 44K oligo-array CGH でゲノム異常を調べたところ、両者でゲノム異常様式が異なっていることが明らかとなった(図 1)

図1. Log2 ratio imbalance



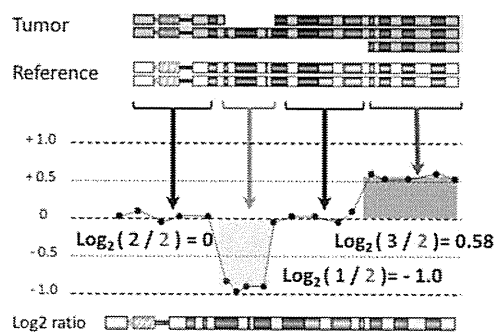
すなわち、同一患者でありながら、末梢血内腫瘍とリンパ節内腫瘍のゲノム異常様式が異なることが明らかとなった。このような末梢血腫瘍細胞とリンパ節内腫瘍のゲノム異常様式が異なるのは決して例外的ではなく、他の症例でも見いだされる(図 2)。

図2. Log2 ratio imbalance



リンパ節では、様々な値の log2 ratio が得られるが、これを Log2 ratio imbalance と呼ぶこととした。Log2 ratio は腫瘍細胞含有量と直線的な関係にあり、また、理論値(図 3)と実測値がほぼ一致する。

図3. Array CGH法 (Log2 ratio)



1 コピー欠失の場合は、理論的 log2 ratio が -1.0 となり、1 コピー増幅の場合は、+0.58 となる。Log2 ratio imbalance については、図 2 を例にすると、リンパ節での最大値は 0.44 であり、0.28 の値は腫瘍細胞が、 $0.28/0.44=0.64$ 、すなわち、64%の腫瘍細胞に 3p の増幅が認められることを意味する。このように、同一患者の中に、複数のクローンが存在することが明らかとなった。

b) 消化器がんの研究においては、

1. HNSCC 由来 gefitinib 抵抗性株を用いた EMT 発生機構の解析と治療法の開発

HNSCC 細胞株(UMSCC81)を用いて in vitro で gefitinib 暴露を反復、耐性細胞を作成し、繊維芽細胞様形態を示す細胞株(81-Fb)を選別した。81-Fb は EMT マーカーである vimentin 発現、Snail 発現、遊走性の亢進と同時に E-cadherin 発現消失など典型的な EMT 形質を示した。また親株である UMSCC81 細胞に比べてユビキチン化亢進による EGFR のダウンレギュレーション、細胞膜から細胞質へ局在の変化が認められた。またウエスタンブロットによる解析の結果、81-Fb 細胞では EGFR の発現低下と代償的に FBS 存在下では Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が見られ、この Snail 発現は PI3K 阻害剤である Ly294002 により有意に抑制されたことから 81-Fb 細胞の EMT 形質獲得に Akt/GSK3b/snail 経路が関与していること

が明らかとなった。

そこで次に EGFR の発現低下と EMT の因果関係を明らかにするために EGFR 発現ベクターを用いて 81-Fb 細胞に EGFR を強制発現させたところ、細胞膜の EGFR 発現の回復に伴い、E-cadherin の発現が上昇、上皮様形態も一部回復した。同時に gefitinib 感受性の有意な回復が見られた。

2. HER2 陽性 Trastuzumab 耐性胃がん細胞株を用いた Trastuzumab 耐性機構の解析と Lapatinib および不可逆性 TKI の抗腫瘍効果

HER2 陽性（遺伝子増幅）胃がん細胞株 (GLM-1) から Herceptin 耐性株 (GLM1-HerR2)を(in vitroではHerceptinは殆ど増殖抑制しないため)、in vivo selection により分離し、耐性機構について検討した。免疫組織およびウエスタンブロット、qRT-PCR による解析から耐性株 GLM1-R2 において膜結合型ムチンの一つである MUC4 の発現亢進が明らかとなった。MUC4 は EGF-like ドメインを介して HER2 と結合性を有し、シグナル伝達に関与することが乳がん細胞で知られている。そこで次に免疫沈降、ウエスタンブロット法により両者の結合性を検討したところ、HER2 は HER3 および MUC4 との複合体を形成すること、すなわち HER2/HER3 ヘテロダイマーに MUC4 が結合し、さらに下流(PI3K/Akt)シグナルが活性化されている可能性を見いだした。以上のことから HER2 陽性胃がん細胞の Trastuzumab 耐性に MUC4 のアップレギュレーションが関与する可能性が示された。

次に Trastuzumab 耐性株に対する可逆性、不可逆性 TKI の抗腫瘍効果を検討した。GLM-1 細胞ならびに耐性株 GLM1-HerR2 に対し、まず可逆性 EGFR/HER2 dual TKI

である 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 Trastuzumab との併用療法において additive な抗腫瘍効果を明らかにした。一方、不可逆性 TKI は in vitro では Lapatinib の IC50=2 に比べて、IC50=0.1 と有意に強い増殖抑制効果を示し、in vivo のヌードマウス移植腫瘍系でも Lapatinib に比べ強い抗腫瘍活性の傾向（ただし、統計的有為差はなし）が認められ、Trastuzumab 耐性株に対する有効性が示唆された。

3. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構と gefitinib 感受性の関連

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。

次に COLM-5 細胞を用いて HER3 低発現と Gefitinib 感受性との関連を検討した。上記、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 抵抗性への関与が示唆された。しかしながら、

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 Gefinitib 感受性増強は認められなかった。

c) 悪性中皮腫の研究においては、

1. TGF- β 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- β 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- β 投与により発現される遺伝子を網羅的に解析し、MMP-2, CTGF, Col1A1, TGF- β 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- β 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マウスの生存が延長した。

2. 悪性中皮腫における LATS2 遺伝子異常の同定

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。さらに詳細な変異解析により合計 20 細胞株中 7 株において LATS2 遺伝子の欠失・不活型変異を検出した。LATS2 遺伝子が不活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 蛋白は 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 がん遺伝子産物を制

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ーとして活性型) 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。

3. YAP の活性化による転写標的遺伝子の同定

YAP の恒常的活性化が認められた 3 つの悪性中皮腫細胞株に対して YAP のノックダウンを行い、網羅的発現解析を行った。共通して発現が低下した遺伝子 228 個の遺伝子に対して Gene Ontology および Gene pathway 解析を行ったところ、細胞周期に関わる遺伝子群が有意に低下していた。CCND1, FOXM1 のプロモーター領域に YAP-TEAD 結合モチーフが想定されたため、クロマチン免疫沈降法を行ったところ、YAP および TEAD は両遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、YAP および TEAD を発現させると CCND1, FOXM1 の転写能が上昇し、恒常的活性変異型 YAP をトランスフェクションすると、さらに転写能が増強されることが明らかとなった。RNA 干渉法を用いて中皮腫細胞における CCND1, FOXM1 をノックダウンしたところ、CCND1 抑制により G1 アレストが誘導された。しかし、YAP そのものに比べ、CCND1, FOXM1 それぞれ単独での細胞増殖抑制効果は顕著ではなかった。

4. TGF- β 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 SMAD 2 によって転写が亢進することが明らかとなった。

5. 悪性中皮腫細胞における ALCAM 発現解析

20 細胞株の中皮腫細胞株から抽出した RNA を用いて網羅的発現解析を行った。103 個の細胞接着に関わる遺伝子に着目したところ、ALCAM は 2 番目に発現スコアが高かった。定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法を用い、不死化正常中皮細胞株 MeT-5A に比べ中皮腫細胞株 20 株すべてにおいて ALCAM の高発現を確認した。さらに、免疫組織染色では 47 例中 26 例 (55%) において発現陽性であった。中皮腫細胞株 2 株を用いて RNA 干渉法による ALCAM ノックダウンを行い悪性形質の変化を検討したところ、増殖への影響は認めなかったが、運動能、浸潤能は 30-50% の低下を認めた。ALCAM のホモフィリック結合を阻害する可溶性 sALCAM 蛋白を作成、精製し、細胞株培養液中に添加したところ、中皮腫細胞株の運動能・浸潤能の低下を誘導した。さらに、中皮腫細胞に sALCAM を発現させマウス胸腔内に移植して経過を観察したところ、マウスの生存が有意に延長した。

6. 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、YM753 などのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤投与し、*in vitro* における腫瘍抑制効果を明らかにした。効果の認められた細胞株 (MSTO-211H および H290) 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。さらに右胸腔内への同所移植モデルを用いて、HDAC 阻害剤を用いマウスの生存への効果を観察した。*In vivo* における HDAC 阻害剤の腫瘍増殖抑制能およびマウス生存

能への寄与は限定的であることが明らかとなった。

d) 細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析においては、

1. トリコプレインの中心体機能の解析

1-1 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。

1-2 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。同時に細胞周期の休止を認めた。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。トリコプレインの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化かつ中心体局在・機能に必要な最小単位が、1-130 アミノ酸残基であることを確認した。特に 52 番目のアラニンと 54 番目のトリプトファンがオーロラ A キナーゼの活性化に重要であった。

1-3 細胞周期制御との関与

細胞周期進行中は一次線毛形成が抑えられることは知られているが、そのメカニズムは今まで不明であった。トリコプレイン機能抑制は細胞周期の休止を起こしたが、一次線毛を除去した系ではそれが見られなくなった。このことは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* 期の存在により確認した。つまり、トリコプレインは一次線毛形成を抑制することで円滑な *G1* 期細胞周期進行に寄与していると考えられる。まとめると、この成果の特徴は *Aurora-A* 分裂期キナーゼの活性化が実はトリコプレインによって *G1* 期の中心小体で起こるということと、もう一つはこの系を抑えると一次線毛が形成され細胞周期進行が止まるという新発見にある。

D. 考察

a) リンパ造血器腫瘍研究においては、

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、遺伝子発現と関連させることで、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で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* 遺伝子は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* も候補遺伝子と出るため、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考えられる。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。

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

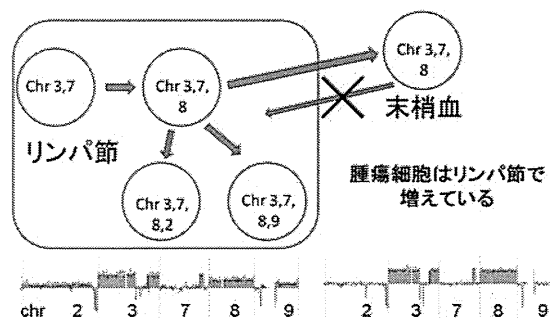
Age-related EBV+LPD については、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、これまで、臨床病理学的研究以外はほとんど解析が進められていない。今回、われわれの解析から Age-related EBV+LPD がほとんど ABC 型リンパ腫に属することが明らかとなったため (Liu et al., 未発表データ)、比較検討するものとして EBV 陰性 ABC 型 DLBCL8 症例との比較を行った。DLBCL は発現解析により、GCB 型と ABC 型に分けられることが知られているので、分化段階をそろえることは大変重要な判断であった。発現解析による比較の結果、発現差異の大きな遺伝子として 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- κ 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。

3. ATLL 症例のゲノム異常の解析

ATLL 症例において、同一患者内に複数のクローンが存在することが明らかとなったのは初めての発見である。これらのクローンは、HTLV-1 ウイルス挿入サイトあるいは T 細胞受容体を用いたクローナリティーの解析において共通するクローン由来であることが明らかとなった (Data not shown)。すなわち、共通するクローンが次々とゲノム異常を蓄積し、クローンが進化して行くことが明らかとなった (Clonal evolution)。しかしながら、末梢血腫瘍では、log2 ratio imbalance の頻度が低く、また、詳細な検討から、ATLL 腫瘍細胞はリンパ節で増殖し、クローンの進化を起こし、その一部が末梢血中に出ていることが推測された (図 5)

図5. アレイCGH解析による急性型ATLLの発展モデル



このようなクローンの進化は ATLL 症例 13 例中 9 例(70%)に認められた。これまで、PTCL-U のゲノム異常を有する一群は ATLL リンパ腫型と類似していることを報告してきたが、これらについてもクローンの存在の有無を検討する必要がある。

b) 消化器がん研究においては、

1. HNSCC 由来 gefitinib 抵抗性株を用い

た EMT 発生機構の解析と治療法の開発

EMT を獲得し、より悪性化する消化器がんは HNSCC に限らず胃がん、大腸がんなど臓器を超えて普遍的に見られる。今回の研究からこれらのがんは従来報告されてきた化学療法のみならず、EGFR を標的とする分子標的治療に対しても耐性機構として EMT を獲得する可能性が明らかとなった。今回、gefitinib 耐性の 81-Fb 細胞では EGFR の発現低下とそれと代償的な Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が見られた。この Snail 発現は PI3K 阻害剤である Ly294002 により有意に抑制されたことから 81-Fb 細胞の EMT 形質獲得に Akt/GSK3b/snail 経路が関与していることが明らかとなった。ただし、代償的に発現が亢進していると予想されるリガンドとその受容体は何であるかは現時点では不明である。可能性としては EGF リガンドの発現亢進、TGF-beta/Smad 経路の活性化および HRG/HER2 経路の活性化等が考えられる。このうち EGF が EMT を誘導することはこれまでに報告されているが、81-Fb 細胞では EGF リガンドの発現はむしろ低下しているので否定的である。また TGF-beta/Smad 経路は確かに 81-Fb 細胞において活性化が見られるが、TGFR1 受容体阻害剤である SD208 により TGF-beta/Smad 経路を阻害しても Snail 発現に変化が見られなかったことからやはり否定的である。HRG/HER2 経路の活性化に関しては HER3 リガンドである Neuregulin 2 (NRG2) と HER2 のアップレギュレーションが認められることから NRG2 により HER2/HER3 ダイマー形成が促進され、結果的に PI3K/Akt 経路が活性化された可能性が考えられるが、この点に関しては今後更なる詳細な検討が必要である。

2. HER2 陽性 Trastuzumab 耐性胃がん細胞株を用いた Trastuzumab 耐性機構の解析と

Lapatinib および不可逆性 TKI の抗腫瘍効果

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。本研究ではまず Lapatinib が 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りアポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止を誘導することを実験的に明らかにした。さらに不可逆性 TKI の HER2 陽性胃がんおよび Trastuzumab 耐性株に対する抗腫瘍効果を比較検討したところ、*in vitro* では有意に、*in vivo* (マウス移植モデル) でも前記 Lapatinib よりも高い増殖抑制ならびに抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。機序は Lapatinib 同様、アポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止であるが、Lapatinib に比べ低い濃度で HER2 下流の P-HER3, P-Akt および P-Erk1/2 シグナル経路のリン酸化 (殊に PI3K/Akt 経路) を阻害することがより高い抗腫瘍効果を示す原因と考えられる。

Trastuzumab 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が、さらに次世代型として不可逆性 TKI の HER2 陽性胃がんに対する臨床試験も今後必要になってくるものと思われる。HER2 陽性胃がんは分化型腺がんに圧倒的に多く、我々の臨床材料を用いた免疫組織学的検討では、とくに肝転移では 60% 以上が HER2 陽性と考えられ、

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** ならびに不可逆性 **TKI** などの作用機序の異なる分子標的薬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. 低分化型大腸がんにおける **HER3** 低発現の分子機構と細胞分化ならびに **gefitinib** 感受性との関連

低分化型大腸がん細胞株 **COLM-5** の **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。

次に **HER3** 低発現と **Gefitinib** 感受性との関連を検討した。**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なため、**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。これまでいくつかのがん種で **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** 経路が恒常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。

c) 悪性中皮腫の研究においては、

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、特に、細胞周期に関わる **CCDN1**, **FOXM1** 遺伝子さらに **CTGF** 遺伝子が重要な転写標的遺伝子であることが示唆された。一方、**CCDN1**, **FOXM1** それぞれの単独のノックダウンでは悪性中皮腫細胞の増殖能は一部抑制されるものの、**YAP** に比べて効果が少ないことが示唆された。このことは、**Merlin-Hippo** シグナル伝達系破綻の鍵となる分子は **YAP** 蛋白であり、**YAP** を中皮腫治療の分子標的としてとらえる重要性を強く示唆するものであると考えられた。

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がん間質の形成にも関わることが示唆された。**TGF-beta** シグナル伝達系の遮断が悪性中皮腫の治療戦略の一つになり得るものと考えられた。

さらに、悪性中皮腫細胞において細胞接着分子 **ALCAM** が高発現し、腫瘍細胞の悪性形質を増すことが明らかとなった。**ALCAM** は細胞外分子であり標的分子として様々な阻害剤のアプローチが行いやすいと考えられた。他のがん腫においても同様に **ALCAM** のがん促進性が報告されつつあり、本研究結果を支持するものであると考えられた。

d) 細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析においては、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。つまりトリコプレインとオーロラ A キナーゼの結合を阻害するような薬剤が開発されれば、がん幹細胞に一次線毛形成を誘導することでがんを増殖停止へと導き得る可能性がある。

E. 結論

a) リンパ造血器腫瘍研究においては、

1. **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。

2. **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。

3. **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-kB** 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。

4. **ATLL** には 70%の症例において複数のクローンが存在し、主としてリンパ節で腫瘍細胞が増殖していることが示唆された。

b) 消化器がん研究においては、

頭頸部扁平上皮がん(**HNSCC**)では新規に作成した **gefitinib** 抵抗性株から **EMT** 形質を示す亜株を樹立し、その機構を解析、**EGFR**

の発現低下と代償性の Akt/GSK3b/snail 経路の活性化が EMT を引き起こすことを明らかにし、また同シグナル経路の障害により、EMT が抑制されることを明らかにし、EMT に対する新規治療法の可能性を示唆した。

一方、日本人由来 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 Lapatinib と不可逆性 TKI の抗腫瘍効果を比較し、その主たる機構は PI3K/Akt 経路の遮断によるアポトーシス誘導であること、Lapatinib に比べ不可逆性 TKI がより効果的であることを明らかにし、HER2 陽性胃がんならびに Trastuzumab 耐性胃がんに対する新しい治療法となりうることを示唆した。

また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、また HER3 強制発現系でも分化誘導と COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性の有意な低下が見られることから HER3 が低分化型大腸がん細胞の細胞分化や EGFR 標的薬感受性に関与する可能性を示唆した。

c) 悪性中皮腫の研究においては、

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。YAP の活性化は CCND1, FOXM1 などの細胞周期促進に関わる遺伝子の発現を直接、亢進していることが明らかになった。CCND1, FOXM1 のノックダウンは中皮腫細胞の増殖等の抑制を引き起こすが、YAP に比べてその抑制能は顕著ではなく、YAP そのものをターゲットとして治療法の可能性を探ることが重要で

あることが示唆された。

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増殖・浸潤を抑制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。

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。

悪性中皮腫において細胞接着因子である ALCAM が発現し、中皮腫の悪性化に関与していることが示唆され、新規分子治療標的候補になりうる可能性が示唆された。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。

一連の研究により、悪性中皮腫細胞の分子特性が明らかとなり、新たな治療戦略の可能性が強く示唆された。

d) 細胞骨格・細胞分裂・細胞極性における分子機構の解析においては、

現時点での解析結果を統合すると、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ブレインは局在し、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。また、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、トリコブレインは微小管係留そして一次線毛形成抑制による円滑な細胞周期進行への寄与が明らかになりつつあ

る。これらの TPHD 分子群に見られるユニークな特徴は腫瘍化に関わる上皮細胞の分化増殖制御メカニズムとしても際立っている。

今後、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努め、がん化のメカニズムを解明できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Uchida M, Tsukamoto Y, Uchida T, Ishikawa Y, Nagai T, Hijiya N, Nguyen LT, 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.
4. 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.
5. 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.
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. 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.