

2. 研究所における研究（人当研究費）

所 長 室

研究課題

（主題） ヒト腫瘍抗原の血清学的解析

（副題） SEREX 法による肺がん抗原の同定

研究者氏名

田島公平¹⁾, 光富徹哉²⁾, 吉田雅博³⁾, 桑野博行⁴⁾, 葛島清隆¹⁾,
高橋利忠, 小幡裕一⁵⁾

[目的・概要・進捗状況]

進行肺がんに対する標準的治療法はまだ確立しておらず、新たな選択肢として免疫療法に期待が集まっている。そこで、肺がんの免疫療法のターゲットとなりうる新たな肺がん抗原の同定を SEREX 法を用いて試みた。

SEREX 法によるがん抗原の同定は65歳女性、肺がん(Adenocarcinoma, T3N0M0, Stage II) の手術材料より約200万個のクローンを含む cDNA 発現ライブラリー (ZAP Express Vector) を作成し、自家患者血清を用いて20万クローンを検索した。各クローンの塩基配列の決定と解析を行い、60種の遺伝子に由来する抗原であることが明らかとなった。その内訳は、既に SEREX 法で同定されている抗原35種、既知遺伝子由来の抗原24種、未知遺伝子由来の抗原1種であった。既に SEREX 法で同定されている35種の抗原の中で、肺がんでは報告されている抗原は、肺小細胞がんでは同定された Sox-2 (NY-SCLC-1) 1種のみであった。各抗原遺伝子の発現様式を UniGene Database で検索し、Sox-2 ならびに未知遺伝子1種以外は残念ながら広範な組織に発現することが示唆された。

ついで同定した抗原のがんの免疫診断における有用性を判断するために、抗原に対する免疫反応が肺がん患者特異的であるかどうかを検討した。各抗原に対する抗体産生の検索を行い、複数の肺がん患者で抗体が検出されるが、健常者では抗体が検出されない7種の有望な抗原が同定された。これらの抗原のうち L1013 は最も高率に抗体産生が認められ、肺がん患者では36% (18/50例), 胃がん22%, 乳がん17%, 前立腺がん26%であった。L1013は Ca^{++} -binding motif を有する既知遺伝子 SYTL 2 と相同性を持つが、5'側2000塩基は相同性が無かった。L1013のサブクローニングを行い、抗体反応性を検定した。主要な抗体認識部位は5'側2000塩基に存在することが、上記の抗体陽性肺がん血清18例中11例が反応することから示された。また5'-RACE を行い、延長された約700塩基の中に Initiation codon が同定された。

[今後の方向]

L1013クローンに関し、抗原決定領域のがん組織および正常組織における mRNA の定量を行い、抗体産生との関係を検索する。また、現時点では cDNA ライブラリーの約1/10のスクリーニングを行った所であり、残りのライブラリーのスクリーニングを今後進め、抗原発現が肺がんを含むがんに選択的に発

現している抗原遺伝子の同定を試みる。

¹⁾腫瘍免疫学部, ²⁾病・胸部外科, ³⁾病・整形外科, ⁴⁾群馬大・第1外科, ⁵⁾理研・バイオリソースセンター

疫学・予防部

研究課題 1

（主題） 愛知県におけるがんの罹患、死亡に関する記述疫学研究

（副題） 喫煙・飲酒習慣によるがんの発生部位別リスクの評価

研究者氏名

伊藤秀美, 柴田和顯¹⁾, 田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

愛知県の地域がん登録は県健康福祉部の直営事業として運営されており、がんセンター研究所疫学・予防部がその精度向上と活用に向けた技術支援を行っている。県民のがん予防に役立つ情報構築と一次予防対策を推進するため、1999年度新システム導入に伴い登録患者における喫煙・飲酒習慣の実態調査を再開した。これまで本実態調査の結果とその有効利用について疫学的に検討し、一般集団と比べて喫煙・飲酒習慣の率はやや低く誤分類されている可能性は否定できないものの、データ不明者の割合は10%強と比較的少なく、各部位のがんの相対リスクの検討には十分活用できることを確認した。

今回は県下で1999年から2001年に登録された20歳以上のがん患者45,664例の喫煙・飲酒習慣の情報を解析対象とした。喫煙習慣については非喫煙、禁煙、現在喫煙、不明の4カテゴリーに分け、飲酒習慣については週5回以上の非飲酒、禁酒、時々飲酒、飲酒常習者、不明と5カテゴリーに分けた。次に、がん登録症例全体を対象として、各部位のがんについて年齢調整したオッズ比（喫煙習慣の場合は飲酒習慣を調整、その逆についても調整）を算出し、各部位のがんの喫煙・飲酒習慣による相対的な危険度を評価した。

喫煙習慣は、非喫煙、禁煙、現在喫煙で、男では32.6%、20.2%、35.8%、女では78.1%、2.9%、8.7%、とそれぞれ分布していた。一方、飲酒習慣は、週5回以上の非飲酒、禁酒、時々飲酒、飲酒常習者で、男では44.2%、5.9%、14.4%、23.4%、女では62.0%、2.6%、12.0%、12.1%、とそれぞれ分布していた。これらの比率を一般集団と比較すると、今回の登録症例では喫煙、飲酒習慣ともに常習者の比率が低くなる傾向を示した。その要因として、がん罹患の結果として禁煙、禁酒した場合が含まれることが考えられる。一方、年齢カテゴリー別に比較すると、一般集団における喫煙・飲酒の常習者でも観察されるように、20代から50代では高くなり、高齢者では漸減していた。喫煙習慣は、男で口腔・咽頭がん、食道がん、

喉頭がん、肺がん、膀胱がんでは統計学的にも有意に相対リスクは高くなり、結腸がん、直腸がん、胆道がん、皮膚がん、前立腺がん、甲状腺がん、リンパ腫、白血病では統計学的に有意に低下していた。女では、食道がん、喉頭がん、肺がん、膀胱がんなどで高くなり、逆に結腸がん、乳がん、甲状腺がんでは低下していた。一方、飲酒習慣の場合は、男で口腔・咽頭がん、食道がん、喉頭がんが高くなり、リンパ腫、骨髄腫、白血病では低下していた。女では統計学的に有意な結果は得られなかった。

本研究の問題点はがん患者全体の危険度（一般に危険度は2倍程度）を基準としたため、喫煙・飲酒習慣の危険度は見かけ上低くなった。一方、3年間にわたるがん登録患者を用いて評価したため、喫煙・飲酒習慣の影響を総合的に評価でき、がん予防啓発に役立つ情報を構築できた。このように地域がん登録の情報を疫学的に評価し、がん予防推進のための情報として構築していくことは、地域がん登録事業への協力体制を啓発するためにも意義あることと考えられた。

[今後の方向]

喫煙習慣ががんの進行度に与える影響を評価し、さらにがん予防啓発のための情報を蓄積する予定である。また、地域がん登録の中に記載されている受診動機などに関する情報を利用してがん検診の評価にアプローチするなど、地域がん登録から得られる副産物としての情報をがんの一次、二次予防対策の推進に役立てていきたい。

¹愛知県健康福祉部健康対策課

研究課題 2—1

- （主題） 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
- （副題） 愛知県民の生活習慣特性からみたがんの要因探索的研究

研究者氏名

広瀬かおる，田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

愛知県民のがん予防対策の策定に有用ながん情報の構築を目指し、われわれは1988年から大規模病院疫学研究を展開してきた。過去16年間（1988年1月～2003年12月）に100,000人余りの新来患者の方々から研究協力を得ることが出来た。それらの集団から収集した食生活習慣に関する資料を用い、消化管（咽頭、食道、胃、大腸）や呼吸器（喉頭、肺）のがん、女性のがん（乳がん、子宮頸がん、子宮体がん、卵巣がん）、造血器腫瘍、泌尿器がんなどの危険要因や防御要因を疫学的に明らかにしてきた。

近年、肥満者の割合が増加しているが、肥満は食習慣や運動不足など多くの生活習慣と深く結びついている。肥満は多くの生活習慣病の危険要因であるが、がんでは結腸がん、閉経後の乳がんや子宮体がんの危険要因として重要である。一方で痩せ

のがんに対する影響も指摘されている。そこで、主要な生活習慣を考慮しながら痩せや肥満のがん罹患リスクへの影響を性・部位別に検討しわが国におけるがん対策に資することを目的として症例・対照研究を実施した。研究所疫学・予防部では1988年から全来患者を対象とした自記式生活歴調査（HERPACC）を実施している。今回は1989年から2000年までに来院し、当該調査票が回収された40～79歳を対象者とし、がんと診断された患者男性6,431名、女性6,953名を症例群、非がん患者男性9,629名、女性14,819名を対照群としてロジスティックモデルを用いオッズ比（OR）を算出した。身長と病気にかかる前（健康な時）の体重よりBody Mass Index（BMI）を算出し5分位に分類した。最小5分位を基準とし、年齢・受診年および主要生活習慣、女性については生殖歴関連要因で調整した。非がん患者群においてBMIの5分位別に生活習慣を比較してみると男性肥満者では重度喫煙者や常飲酒者の割合が高く、女性では逆に痩せの群で喫煙者、飲酒者の割合が高いなど痩せと肥満に関連する生活習慣特性が明らかになった。これらの要因を調整したオッズ比を算出してみると男性の食道がん、肺がんではBMIの大きい群で低いオッズ比が観察された。女性では子宮頸がんではBMIが高い群で低いオッズ比が観察される一方で、子宮体がんや閉経後女性における乳がんでは高いオッズ比が認められた。

[今後の方向]

がん専門病院を背景とした系統的な疫学研究を展開しながら、全国規模による多施設共同分子疫学コーホートに参画し、大規模な病院疫学研究を継続していく環境づくりを目指す。さらに、運動不足や肥満のがん罹患に与える影響は性・部位によって異なるので、今後も痩せや肥満者の生活習慣特性を考慮しながら効果的ながん予防対策を検討していく必要がある。

研究課題 2—2

- （主題） 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
- （副題） がんの要因探索を目指した血中脂肪酸構成成分の新規分析方法の開発

研究者氏名

栗木清典¹⁾，田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

大腸がんや乳がんは、食生活習慣の欧米化に伴って著しく増加している。脂肪、獣肉類や飽和脂肪酸の高摂取はリスク要因として、一方、魚やイコサペンタエン酸（IPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）などのn-3系多価不飽和脂肪酸（PUFA）は抑制的に作用すると考えられているが、最近のわが国の2つの大規模コーホート研究は、大腸がんリスクとこれらの食品や脂肪酸摂取との関連を見出すことができなかった。一方、高額の研究費を投資した血清中脂肪酸構成割合の測定は、n-3 PUFAレベルと大腸がんリスクの有意な負の関連を明らかにした。そこで、がんのリスク評価や、個人を対象にした一次予防方法の確

立には、問診や生活習慣調査だけでなく、脂質・脂肪酸摂取のバイオマーカーの測定が必要であると考えた。しかし、脂肪酸の分析は、1) 分析カラムの進歩によって測定できる種類や検出感度が向上したものの、未だに1970年代から非常に煩雑で時間と手間を要する手作業のため実用的ではなく、2) 検査会社の測定は非常に高額(一万数千円/1検体)であるため、脂肪酸をバイオマーカーとしたがんの診断や治療・予防の効果を評価した報告は極めて少ない。現在汎用の血液生化学検査には、中性脂肪、Total-, HDL-, LDL-コレステロールなどの項目があるが、食生活習慣要因と密接な関連がないため、このような評価は困難である。そこで、私どもは、独自のアイデアに基づき、高速溶媒抽出装置を用いて、微量で、簡便、迅速、安価で、高精度に、多くの生体試料(血漿・血清や赤血球膜など)から脂肪酸構成レベル[濃度(mg/mL)および構成割合(wt%)]を測定することを可能にした半自動化した脂肪酸の新規測定方法を開発した(田島&栗木, 平成17年3月, 特許出願)。

[今後の方向]

赤血球膜脂肪酸の構成割合や組成比とがんの罹患危険度、およびがん患者の長期予後などとの関連性を検討していく。

¹研修生

研究課題 2—3

(主題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究

(副題) 消化管がんの環境・宿主要因交互作用に関する分子疫学研究

研究者氏名

松尾恵太郎, 楊 春霞¹⁾, 伊藤秀美, 広瀬かおる, 若井建志, 斉藤敏子, 鈴木勇史¹⁾, 篠田雅幸²⁾, 波戸岡俊三³⁾, 田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

大量飲酒は食道がんのリスク要因である。大量飲酒者が全て食道がんになるわけではないことは、環境要因の影響に対して宿主要因が影響を与えていることを示唆する。我々は愛知県がんセンターにて治療を受けた食道がん患者165名、性・年齢を合わせた非がん対照者495名を対象として、症例対照研究を実施した。飲酒・喫煙、栄養素摂取量などの基本的な環境要因は質問票により調査した。また、提供された血液サンプルを用いて葉酸代謝酵素遺伝子 MTHFR の Ala222Val 多型の測定を行った。全ての参加者から血液提供ならびに遺伝子解析の同意を得ている。非大量飲酒者においては MTHFR 遺伝子多型の遺伝子型はなんらリスクに変化をもたらさなかったが、大量飲酒者における Ala/Ala, Ala/Val, Val/Val 遺伝子型の相対危険度は、非大量飲酒者で Ala/Ala 型の者と比べると、11.5倍, 8.4倍, 2.8倍と著しく異なった。この結果は、大量飲酒による食道がん発がんが、MTHFR 遺伝子型によって大きく影響をうけることを示唆すると考えられる。

[今後の方向]

飲酒と関連する遺伝的素因に関する検討を行うとともに、飲酒関連がんにおける同様の検討が必要である。

¹研修生, ²中央病院・緩和医療部, ³中央病院・胸部外科

研究課題 2—4

(主題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究

(副題) コーヒー摂取習慣と肥満関連がんの疫学的検討

研究者氏名

広瀬かおる, 岩田広治¹⁾, 遠山竜也¹⁾, 田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

コーヒーにはカフェインやポリフェノール類をはじめ無数の成分が含まれており、その薬効により人間の飲料用嗜好品として昔から常用されてきた。日本では、第二次世界大戦の終戦を契機に欧米文化の影響を受けながら一般の人々の間にコーヒー常用習慣が広く普及するようになり、その健康影響への関心度も高まってきた。最近になって日本では肥満に関連したがん、特に女性の乳がんと子宮体がんが著しい増加傾向を示している。これら増加しているがんに焦点を当て、コーヒー常用習慣が危険な、あるいは防御的な効果を示すか否かを検証することを目的とし症例・対照研究を実施した。

まず、病院疫学研究のデータベースから、病理学的診断の確定している女性のがん患者5,436例(乳がん2,122例, 子宮体がん229例),さらに、比較対照群として症例群と年齢分布(5歳階級)をマッチさせた12,425例(症例の約2倍)の非がん患者群を選び、それらを今回の解析対象とした。コーヒー常用者は若年群で多くなる傾向がある。40代では7割弱が毎日コーヒーを飲んでいるが、70代では3割と半減する。また、コーヒー常用者は他の食習慣、喫煙・飲酒習慣、嗜好習慣などのライフスタイルにも特性が見られる。一般に、コーヒー常用者の特徴としては、喫煙・飲酒習慣と関連し、朝食は米飯よりもパン食が多く、油脂の摂取を好む傾向が見られる。特に、一日に2杯以上のコーヒーを飲む人たちでは喫煙者の占める率が高くなる。一方、肥満とコーヒー摂取との関連性について検討したが、体格指数(BMI)の平均値はコーヒー常用者も全く飲まない集団でもほとんど同じであった。また、BMI25以上の肥満者群においてコーヒー摂取習慣に特徴はなくコーヒー摂取習慣が肥満防止に効果があるという傾向は見られなかった。

次に、主要臓器のがん(胃がん, 結腸がん, 直腸がん, 肝臓がん, 肺がん, 乳がん, 子宮頸がん, 子宮体がん)について肥満とコーヒー摂取習慣の影響について検討した。全部位のがんでは肥満による影響は見られなかったが、乳がんや子宮体がんでは肥満傾向の強いもので危険度が上昇しており、逆に消化管がんや肺がんでは低下していた。コーヒー常用習慣についても全がんでは防御・危険度に関する疫学的特徴は見られなかった。肥満との関連性が指摘されている子宮体がんではコーヒーを毎日1~2杯, 3杯以上摂取する集団でオッズ比はそれぞれ

0.64, 0.44と統計学的に有意に低く、その低下傾向も統計学的に有意であった。一方、乳がんではその傾向が明らかでなかった。

今回の研究結果から、コーヒー常用習慣は他の生活習慣とも関連しているが、コーヒー常用習慣による肥満防止効果は明らかでなかった。しかし、日本で最近になって増加しており肥満との強い関連性が指摘されている子宮体がんについては、コーヒー摂取習慣が危険度を低下させるという興味深い結果が得られた。

[今後の方向]

今後は、個々人の体質的特性、つまりは種々の酵素の遺伝子の多型性を考慮してリスク差を評価する分子疫学的研究、肥満に関連した血液中の脂質分画レベルを評価する代謝疫学的研究、などの手法を取り入れながら生活習慣としてのコーヒー常用習慣の肥満、がんへの影響をさらに詳細に評価していく必要がある。

¹⁾中央病院・乳腺外科

研究課題 2—5

- (主題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
(副題) 乳がんの血清疫学的、分子疫学的研究

研究者氏名

広瀬かおる、岩田広治¹⁾、遠山竜也¹⁾、田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

CYP19 (aromatase P450) は androstenedione から estrone へ、また testosterone から estradiol への変換を触媒する酵素であり、CYP17とともにエストロゲン合成に重要な役割を果たしている。この遺伝子の coding 領域にはいくつかの遺伝子多型、コドン80 (G (Val) to A (Val))、コドン264 (C (Arg) to T (Cys)) などが知られている。イントロン4にはTTTAの4塩基の繰り返し数が7から13までの多型が報告されている。今回われわれは、コドン39多型 (T (Trp) to C (Arg)) と乳がん易罹患性との関連を検討するため症例・対照研究を実施した。

2000年11月～2002年9月までに愛知県がんセンター病院乳腺外科を受診し研究参加同意の得られた乳がん患者248名を症例群、非がん患者603名を対照群とし、質問紙調査により得られた生活歴情報と併せて解析をおこなった。遺伝子多型をPCR-CTPP法により決定し、閉経前後別にロジスティックモデルを用い年齢調整オッズ比 (OR) を算出した。

多型分布は非がん患者群においてはTTタイプ93.0%、TCタイプ6.3%、CCタイプ0.7%であり、乳がん患者群ではそれぞれ91.5%、8.1%、0.4%であった。TC、CCタイプ群のTTタイプに対するORは閉経前・閉経後女性でそれぞれ1.63 (95%CI : 0.77-3.44)、0.83 (95%CI : 0.35-1.95) であり特に関連は認められなかった。閉経前女性では初産年齢が高齢 (26歳以上) 群においてC alleleを有する女性の乳がん罹患リスク

は有意に高かった (OR = 7.31, 95%CI : 1.88-28.5)。また、BMIの21以上の群においてC alleleを有する群のORは2.77 (95%CI : 1.12-6.87) と高い値を示した。一方、閉経後女性においては初潮年齢、出産経験、初産年齢、BMIなどの要因を層別化した解析で特に関連は認められなかった。乳がんの治療や予後に重要な影響を与えるエストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプターの陰性・陽性別に検討を行った結果では特に関連は認められなかった。

[今後の方向]

乳がん罹患率の比較的低率な日本人女性におけるCYP19多型のうちコドン39多型の乳がん易罹患性に与える影響は少ないことが推察される。エストロゲン代謝に関連する遺伝子多型は、個々の女性のホルモン環境を推測する客観的指標として重要であり、今後も遺伝子多型と疫学的リスクファクターを組み合わせた総合的評価を継続させていく必要がある。

¹⁾中央病院・乳腺外科

研究課題 2—6

- (主題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
(副題) 悪性リンパ腫に関する分析疫学研究

研究者氏名

松尾恵太郎、森島泰雄¹⁾、瀬戸加大²⁾、中村栄男³⁾、田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

近年、世界的に悪性リンパ腫の発生率の増加が認められている。しかしながら、本邦における悪性リンパ腫に対する疫学研究は十分に行われてきたとは言えない。我々は、悪性リンパ腫に対し、1) 従来の分析疫学的手法、ならびに2) 分子疫学的手法を用いた検討を行っている。以下に現在の進行状況をまとめる。1) 愛知県がんセンター病院疫学研究システムのデータベースを用いた以前の悪性リンパ腫患者と非がん対照者との間で症例対照研究による生活習慣の検討では、悪性リンパ腫リスクを明らかに変化させる生活習慣は見いだせなかった。そこで、新たな病院疫学研究データベースを用い、個人の既往歴、ならびに食物頻度摂取調査に基づく微量栄養素の意義を現在検討中である。2) 分子疫学的手法を用いた検討に関しては、新たに現在患者数の蓄積を行っている最中である。

[今後の方向]

生活習慣や微量栄養素の意義に関する成果を出し、予防などの可能性を検討する。

¹⁾中央病院・血液細胞・化学療法部、²⁾遺伝子医療研究部、³⁾中央病院・遺伝子病理診断部

研究課題 2 - 7

- (主 題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
(副 題) 大規模コホート研究による大腸がん・乳がんの要因探索

研究者氏名

若井建志¹⁾, 小嶋雅代¹⁾, 玉腰浩司²⁾, 伊達ちぐさ³⁾, 福井 充⁴⁾, 渡邊能行⁵⁾, 早川式彦⁶⁾, 鈴木康司⁷⁾, 橋本修二⁸⁾, 徳留信寛¹⁾, 小笹晃太郎⁹⁾, 鈴木貞夫¹⁾, 豊嶋英明²⁾, 伊藤宜則⁷⁾, 八谷 寛²⁾, 近藤高明⁹⁾, 林 櫻松¹⁰⁾, 西尾和子¹¹⁾, 丹羽慶光¹¹⁾, 山本昭夫¹²⁾, 玉腰暁子¹¹⁾

[目的・概要・進捗状況]

わが国で発生率が増加している大腸がん・乳がんの第一次予防に適用可能な危険因子を解明するため、文部科学省の助成する大規模コホート研究 (JACC Study) のデータを分析し、1) 食物繊維摂取と大腸がんリスクとの関連、2) 心理的要因と乳がんリスクとの関連を検討した。

1) では1988-1990年の JACC Study ベースライン調査参加者中、がん罹患が把握可能で、食物摂取頻度調査にて食物繊維摂取量を推定しえた40-79歳の男女43,115人を分析対象者とした。平均7.6年間の追跡中に443例の大腸がん罹患 (うち結腸がん291例) が同定された。エネルギー調整食物繊維摂取量の第1 (最低) 四分位に対する第2-4四分位の結腸がん相対危険度 (交絡要因を調整) は、男で1.18, 0.50, 0.68 (trend $p=0.049$), 女で0.69, 0.67, 0.59 (trend $p=0.061$) であり、食物繊維摂取が結腸がんリスクを低下させる可能性が示唆された。直腸がんを含む全大腸がんにおいても、有意ではないが結腸がんと同傾向の関連であった。2) では JACC Study の参加者中、がん罹患の把握が可能で、かつ心理的要因についての質問に回答した40-79歳の女性34,552人を分析対象とした。平均7.5年間の追跡中に149例の乳がん罹患が同定され、「生きがい」や「はり」をもって生活している、物事の判断が早い方である、生まれかわったら今までと同様の人生をもう一度歩みたい、といった質問への肯定的回答が、乳がんの相対危険度 (交絡要因を調整) 低下と関連する傾向がみられた (trend $p<0.05$)。ベースライン調査から2年間をリスク期間から除外した場合でも、ほぼ同様の関連が観察され、生きがい感や人生への満足度が、女性乳がんの罹患リスクに影響を与える可能性が示唆された。

[今後の方向]

本研究の成績を学会発表および論文として公表する。また大腸がんについては、脂質摂取、野菜・果物摂取などとリスクとの関連についても検討する。

¹⁾名古屋市大・医・健康増進・予防医学, ²⁾名大院・医・公衆衛生/医学ネットワーク管理学, ³⁾武庫川女子大・生活環境・食物栄養, ⁴⁾大阪市大・医・公衆衛生, ⁵⁾京都府立医大・地域保健医療疫学, ⁶⁾広島大原医研・疫学・社会医学, ⁷⁾藤田保健衛生大・衛生・公衆衛生, ⁸⁾藤田保健衛生大・医・衛生, ⁹⁾名大・医・検査技術科学, ¹⁰⁾愛知医大・公衆衛生学, ¹¹⁾名大院・医・予防医

学/医学推計・判断学, ¹²⁾兵庫健康環境科学研究セ・感染症部

研究課題 2 - 8

- (主 題) 主要部位のがんの環境・宿主要因に関する病院疫学研究
(副 題) 全国歯科医師集団のコホート研究：生活習慣とがんの関連性

研究者氏名

若井建志, 梅村長生¹⁾, 小島正彰²⁾, 川村 孝³⁾, 中垣晴男⁴⁾, 横田 誠⁵⁾, 内藤 徹⁶⁾, 内藤真理子⁷⁾

[目的・概要・進捗状況]

口腔の健康ががんなどの生活習慣病発生と関連するとの仮説があるが、これを証明するためには横断研究では不十分であり、大規模なコホート研究で検討する必要がある。しかし地域住民の場合、口腔状態のデータ収集には歯科検診が必要で多額の費用を要する。そこで自記式調査票によってもかなり正確な口腔状態の情報が得られる歯科医師を対象としたコホート研究を計画した。研究対象者は日本歯科医師会の会員とし、ベースライン調査は都道府県歯科医師会・8020推進財団の協力の下、自記式調査票により実施した。収集した情報は、性・年齢、既往歴・家族歴、口腔衛生習慣および口腔状況 (喪失歯数、歯周の状態など) 生活習慣 (とくに食習慣) 心理要因などである。研究参加者の追跡には、あらかじめ同意を得た上で、各県歯科医師会が共済事業などで把握した疾病罹患・死亡情報を利用する。

2005年3月末現在、43都道府県の歯科医師会でベースライン調査を実施済または実施中であり、これまでに約21,800名が研究に参加している。また一部の県歯科医師会では、疾病罹患・死亡状況の追跡調査も開始している。24県の県歯科医師会におけるベースライン調査データ (12,472人、平均年齢±標準偏差 51.8±12.1歳、女性887人) の分析では、平均喪失歯数、および歯周病 (歯石沈着または4mm以上の歯周ポケット) を持つ者の割合は、一般住民 (平成11年歯科疾患実態調査) より低かった。歯周病と統計学的に有意に関連、またはその傾向 ($p<0.10$) を示した要因は、喫煙、低いブラッシングおよび歯間清掃用具使用頻度、低い精神的健康度 (General Health Questionnaire による) 激しい運動をしないであり、歯牙喪失 (5本以上) と関連する要因は、喫煙、投薬を伴う糖尿病、低い歯間清掃用具使用および歯石除去頻度、高い収縮期血圧、低い精神的健康度、激しい運動をしないであった。また喪失歯数が多い群ほど、蛋白質、脂質、カルシウム、鉄、カリウム、カロテン、ビタミンA・CおよびE、食物繊維の推定摂取量は少なかった。逆に炭水化物については、喪失歯数が多い群ほど摂取量が多い傾向が認められた。

[今後の方向]

平成17年度にはベースライン調査とその集計を終了し、今後は長期の追跡調査を実施する。最終的にはベースライン時点での口腔状態と、がんなどの疾患罹患・死亡との関連を、コホー

ト研究の解析方法により分析する予定である。

¹愛知三の丸病院・歯科口腔外科, ²愛知県歯科医師会・調査室, ³京大保健管理セ, ⁴愛知学院大・歯・口腔衛生学, ⁵九州歯科大・歯・歯科保存学第二, ⁶福岡歯科大・総合歯科学, ⁷名大院・医・予防医学/医学推計・判断学

研究課題 3—1

(主題) アジア太平洋地域におけるがんの環境・宿主要因に関する民族疫学研究

(副題) 消化管がんの生活習慣要因に関する日中韓三国共同研究消化管がんの要因に関する日中韓三国共同研究

研究者氏名

田島和雄, 広瀬かおる, 若井建志, 松尾恵太郎, 伊藤秀美, 栗木清典¹⁾, 嶽崎俊郎²⁾, 高長明³⁾, Ahn Y-O⁴⁾, 曹佳⁵⁾, 李聡⁶⁾, 徳留裕子⁷⁾, 千葉仁志⁸⁾

[目的・概要・進捗状況]

文部科学省科研費特定研究「がんの疫学研究領域」の計画研究として, われわれは2000年度から東北アジア三国(韓国, 日本, 中国)に好発している消化管がんの要因探索と予防対策の策定を目指した三国共同による民族疫学研究(KOJACH研究)を展開してきた。研究対象地域はソウル市周辺(韓国)愛知県(日本)江蘇省淮安市, 四川省重慶市, 遼寧省本溪市, 広東省汕頭市(中国)の6か所で, 消化管がんの中でも特に大腸がんの環境・宿主要因に関する比較疫学的研究を継続実施している。今年度は最終年度として各地域で開発した半定量的食物頻度質問票(SQFFQ)の評価し, それを用いて各地域(日本の愛知県, 韓国のソウル市, 中国の南京市, 重慶市)で実施してきた大腸がんの症例・対照研究の結果をまとめた。中国の遼寧省本溪市, および広東省汕頭市ではSQFFQを完成したが, 症例対照研究に取りかかるのが遅れたので, 現在も調査を続行中である。

主な結果を上げると, 愛知県で実施された症例対照研究では大腸がんのリスクと結びつく食生活習慣を明示することはできなかったが, 中国や韓国では獣肉の頻回摂取など欧米型食嗜好習慣が大腸がんの危険要因に, 一方では緑葉野菜, 特に葉酸摂取が防御要因に結びついている可能性が示唆された。また, 分子疫学的解析結果から, 日本人のCD36遺伝子のA52C多型が頻回獣肉摂取によるリスク上昇を高める交互作用が見られた。

[今後の方向]

今後も大腸がんの症例対照研究の結果について詳細な解析を続け, 特に遺伝的特性などを考慮しながら多面的な検討, および各地域の情報を統合化した解析などを試みる。さらに, 大腸がんと共に三国で増加している乳がんの要因探索のための症例対照研究を同様に進めていく予定である。

¹研修生, ²鹿児島大学医学部, ³江蘇省腫瘍防治研究所, ⁴ソウ

ル大学医学部, ⁵重慶第三軍医大学, ⁶本溪鋼鉄公司総医院, ⁷名古屋文理大学, ⁸北海道大学医学部

研究課題 3—2

(主題) アジア太平洋地域におけるがんの環境・宿主要因に関する民族疫学研究

(副題) モンゴロイド集団におけるウイルス関連がんの民族疫学研究

研究者氏名

田島和雄, 若井建志, 嶽崎俊郎¹⁾, 園田俊郎¹⁾, 千葉仁志²⁾, 妹尾春樹³⁾, Steinar Trettli, Liliya Dobrodeeva

[目的・概要・進捗状況]

過去20年における環太平洋地域のモンゴロイド集団, およびアンデス高地に埋葬されている古モンゴロイド集団の先祖を対象としたヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)および同II型(HTLV-II)に関する民族疫学的, 免疫遺伝学的, 考古学的検索を重ねてきた。その延長として2003年度までに中国チベット高原やネパール高原のチベット族, 極北地域に居住するモンゴロイド集団と考えられているサメ族などにアプローチしてきたが彼らにHTLV-Iの流行は認められなかった。今年度は, ロシア科学アカデミーの許可のもと, アルハンゲリスク大学との共同研究として, ネネツ自治区の北部海岸地帯の中心に位置するナリヤンマル町の周辺地域で野外調査を実施した。クロスネ地区(気温は零下20~40度)において, 診療所訪問患者, あるいは診療所周辺居住者の中でInformed Consentを得た対象者109名から約10ccの血液を採取した。採血した血液は診療所において血漿とBuffy Coatに分離し, 全検体をアルハンゲリスク大学の実験室に持ち帰り, まずウイルス学的検索を実施した。HTLV-I, およびB型, C型肝炎ウイルスの感染状況を検索したが, 抗HTLV-I抗体は全員陰性, 抗HCV抗体は3例, 抗HBVs抗体については30例の陽性者(28%)を認めた。HBVs抗原は全例が陰性だったのでHBV亜型に関する検索は不可能であった。本研究からノルウェー北部や西北ロシア地域の極北モンゴロイド集団にHTLV-Iの流行は認めず, 以前にアジア大陸で実施された研究結果も合わせると, 日本列島の日本人以外にHTLV-Iを保有するモンゴロイド集団は認められない。

[今後の方向]

本研究は集結しつつあるが, 今後もモンゴロイド集団におけるHTLV-Iの流行軌跡を探るため, 極北極東地域のグリーンランド東海岸に居住するイヌイト族を対象とした野外調査, および南米アンデス高原砂漠地帯に埋葬されている8000~5000年前のミイラ集団におけるHTLV-Iの探索が残された課題と考えている。

¹鹿児島大学医学部, ²北海道大学医学部, ³秋田大学医学部, ⁴ノルウェーがん疫学研究所

研究課題 4—1

(主題) 「健康日本21あいち」に基づく愛知県民のための
がん予防啓発技術の開発研究

(副題) 喫煙習慣への依存性に関連する宿主要因の探索

研究者氏名

伊藤秀美, 松尾恵太郎, 田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

喫煙習慣は多くの癌の原因となり、予防できる最大の単一原因である。喫煙行動の分子機序の理解は喫煙予防や禁煙に有用な情報となりうる。MAO はドーパミンやセロトニンなど神経伝達物質を代謝する酵素で、喫煙により脳内活性が低下する。本研究で X 染色体上の MAO-A 遺伝子 promoter 領域 VNTR 多型、MAO-B A644G 多型と喫煙習慣との関連を検討した。対象は2001年4-6月に当センター病院を受診した18-79歳の初診患者1022名中、血液提供に同意した595名で、解析対象は初診時に癌既往のない喫煙情報が得られた504名(男217人、女287人)。男では喫煙習慣と有意な関係は認められなかったが、MAO-A 4 repeat アレルを有する男の喫煙者で平均 FTND スコアが有意に高かった(4 repeat; 5.8, その他; 4.7)。またこのアレルを有する男性喫煙者は持たない男性喫煙者に比べ FTND スコア 6 以上の年齢調整オッズ比(OR)は2.72(95%CI, 1.13-6.50)であった。このアレルを有する女はその他の女に比べ喫煙の OR は0.49(0.26-0.93)であった。本研究から MAO 4 repeat アレルは男のニコチンの高依存度に、女の方の喫煙の習慣に影響する可能性が示唆された。

[今後の方向]

喫煙行動の習慣化には精神的特質だけでなく、喫煙による気道炎症の強さなどの身体的特質が影響を及ぼす可能性もある。IL-8をはじめとする炎症性サイトカイン多型と喫煙習慣との関連について検討する。また、遺伝子多型通知による禁煙誘導研究に参加した禁煙者のうち、禁煙成功者と不成功者の宿主要因について検討し、これらの知見を元に、オーダーメイドの禁煙指導法の確立を目指す。

研究課題 4—2

(主題) 「健康日本21あいち」に基づく愛知県民のための
がん予防啓発技術の開発研究

(副題) がん予防を目指した生活習慣の是正に関する研究

研究者氏名

若井建志, 広瀬かおる, 田島和雄, 井上真奈美¹⁾, 津昌一郎¹⁾

[目的・概要・進捗状況]

生活習慣の是正によるがん予防可能性を確認するため、厚生労働科学研究費研究班「生活習慣改善によるがん予防法の開発と評価」では、わが国で実施された分析疫学研究成果をレビューしてきた。われわれは肺がんを担当し、1)肺がんと喫

煙・飲酒との関連、2)肺がんと野菜・果物摂取との関連について、わが国における研究をまとめた。

その結果、1)肺がんと喫煙の関連については、コホート研究が7研究、症例対照研究が14研究見出され、症例対照研究の1研究を除くすべての研究で、喫煙習慣による肺がんリスクの上昇が報告されていた。メタアナリシスによる全研究の統合推定値(現在喫煙者 vs. 非喫煙者)を算出したところ、男性で4.38(95%信頼区間3.90-4.91)、女性で2.69(同2.32-3.11)であった。肺がんと飲酒については、2つのコホート研究が報告されていたが一定の傾向は認められなかった。2)肺がんと野菜摂取の関連については、コホート研究6研究のうち、野菜摂取の肺がんリスクとの有意な負の関連を認めたのは2研究で、有意な関連は男性に限定されていた。症例対照研究では3研究中2研究において有意な負の関連を認めた。肺がんと果物摂取の関連については、コホート研究5研究のうち、果物摂取と肺がんリスクとの間に有意な負の関連を認めたのは2研究であり、症例対照研究では3研究中2研究において、男性で有意な負の関連がみられた。わが国においても、野菜・果物摂取による肺がんリスク低下を示さない大規模コホート研究が散見されることから、野菜・果物摂取によるがん予防効果について再検討が必要と思われる。また野菜・果物摂取と肺がんリスクとの間に負の関連を認めたのは、男性に多かったことから、野菜・果物摂取ががん予防に寄与するとすれば男性が主と考えられ、予防のための食事習慣への介入に際して考慮すべき点と考えられた。

[今後の方向]

上記研究班全体では食事の改善によるがんの予防可能性が示されたことから、愛知県がんセンター中央病院の患者を対象に、生活・運動習慣の改善を目指した介入研究を平成17年度から開始する。

¹⁾国立がんセンターがん予防・検診研究センター 予防研究部

腫瘍病理学部

研究課題 1

(主題) 人体剖検例の病理組織学的研究

研究者氏名

立松正衛, 中西速夫, 塚本徹哉, 池原 譲, 溝下 勤

[目的・概要・進捗状況]

本年度(平成16年4月~平成17年3月)は20体の病理解剖を行い、開所以来の総剖検数を2,542体とした。これらの症例は組織検査後、病理診断・解剖所見を付して担当医に報告されると同時に、日本病理学会の剖検報に掲載される。学問的に貴重な症例、臨床的(診断並びに治療)に重要で検討を要する症例に関しては、担当医との意見の交換は勿論であるが、適時行われるCPC(臨床病理検討会)に提出し相互討議を深め、当がんセンターの医療水準の向上の一役を担ってきた。本年度は

呼吸器内科の悪性胸膜中皮腫，呼吸器外科の肺癌（大細胞癌），血液・細胞療法部のマントル細胞リンパ腫およびNK細胞白血病の4症例についてCPCを開催した。

[今後の方向]

癌の診断技術，制癌手段（手術・照射・制癌剤・免疫療法）の進歩によって，根治例の増加は勿論，非根治例でも長期間寛解をもたらす機会が開かれつつある。悪性リンパ腫に対する幹細胞移植を組み合わせた超大量化学療法，食道癌，脳転移巣への分割照射の治療効果などがその代表で，剖検時腫瘍の顕著な縮小，癒痕治癒を認めることが少なくない。しかし一方で感染症を始め出血，血栓症などの合併症が死因となる例も決して稀ではない。かかる症例を疾患の自然史的立場から系統的な病理学的検討を行い，良好な予後に導く要因を引き出すのが今後の重要な課題である。また希有な症例，特異な経過を辿った症例についても臨床側と協力し，より積極的に症例報告を行うことが大切である。

研究課題 2—1

（主題） ヒト消化器癌発生の実験的研究

（副題） *N*-bis（2-hydroxypropyl）nitrosamine に対する p53ノックアウトマウスの発がん感受性—臓器による感受性の違いについて—

研究者氏名

塚本徹哉，平田暁大¹⁾，高須伸二²⁾，立松正衛

発がん性の正確な評価はがん予防に不可欠である。p53ノックアウト（KO）マウスは化学物質の発がん性を短期間に評価可能な遺伝子改変動物モデルとして注目されている。今回，p53KOマウスの*N*-bis（2-hydroxypropyl）nitrosamine（BHP）に対する発がん感受性を検討した。短期実験：低濃度群では野生型（+/+），ヘテロ変異体（+/-），ヌル変異体（-/-）マウスに20ppmで，高濃度群では（+/+）（+/-）に200ppmでBHPを15週間飲水投与した。長期実験：（+/+）（+/-）に20ppmで40週間投与した。遺伝子解析：発生腫瘍のp53遺伝子exon 5～8における変異をPCR-SSCP及びdirect sequenceにより検出した。（+/-）の腫瘍に変異を認めた場合，wild-type alleleのみをPCRにより選択的に増幅し，どちらのalleleに変異が生じているか検討した。（+/+）及び（+/-）と比較し，（-/-）に肺腫瘍，肝血管腫瘍が有意に高率に発生した。（+/+）と（+/-）の比較では，いずれの群においても，肺腫瘍発生率に有意な差はなかったが，肝血管腫瘍は（+/-）に有意に高率に発生した。p53遺伝子変異は，肺腫瘍と比較し，肝血管腫瘍で有意に高率に認め，確認できた変異は全てwild-type alleleに生じていた。（-/-）では臓器を問わず発がん感受性が亢進していた。（+/-）の発がん感受性は臓器により異なり，腫瘍発生過程でp53遺伝子変異が生じる場合，wild-type alleleに2nd hitが加わるため，（+/-）の感受性が上昇することが示唆された。

[今後の方向]

p53遺伝子の変異の頻度を規定する因子の同定が今後の課題である。

¹⁾研修生（岐大・生命セ・動物実験），²⁾研修生（岐大・農・家畜病理）

研究課題 2—2

（主題） ヒト消化器癌発生の実験的研究

（副題） *Helicobacter pylori* 感染スナネズミモデルにおける食塩の胃粘液への影響

研究者氏名

溝下 勤，塚本徹哉，田中晴就，加藤総介¹⁾，曹 雪源²⁾，立松正衛

[目的・概要・進捗状況]

【はじめに】我々は，食塩が*Helicobacter pylori*（*H. pylori*）感染スナネズミで用量依存性に胃発癌を促進することを明らかにしてきた。胃粘液は*H. pylori*が棲息可能なsurface mucous cell mucin（SM）と*H. pylori*抗菌作用を持つ幽門腺のgland mucous cell mucin（GM）から成り，胃発癌への関与が論議されている。今回，我々はHp感染及び高食塩食の胃粘液への影響を検討した。

【方法】16週齢雄*H. pylori*感染スナネズミを通常食群，2.5%，5%，10%食塩食群，飽和食塩水週1回胃内投与群に分け，40週後に屠殺し，血清抗Hp抗体価およびガストリン値の測定，slot blot法による胃粘液量の定量，realtime RT-PCR法でMUC5ACおよびMUC6 mRNAの定量を行った。

【結果】*H. pylori*感染群では抗体価と食塩摂取量とが有意に相関し，またガストリンも食塩食群で有意に高値であった。粘液量は，*H. pylori*感染によりGMが増加したが，高食塩食によりSMの増加とGMの減少が見られた。また，*H. pylori*感染によりMUC6 mRNAの発現亢進が見られた。

【結語】*H. pylori*感染に対して，MUC6 mRNAとGMの発現を亢進し，防御的に働くが，高食塩食はSM増加・GM減少作用を来すことにより*H. pylori*感染と胃発癌を促進する可能性が示唆された。

[今後の方向]

食塩の胃粘液ムチン（MUC5AC，MUC6など）あるいは*H. pylori*に対する影響をさらに分子生物学的・病理学的に解析する。

¹⁾研修生（北大・院医・第三内科），²⁾研修生（東大・院医・消化管外科）

研究課題 3

（主題） ヒト消化器癌の細胞分化

（副題） ヒト胃癌における内分泌細胞と上皮細胞の形質発

現の相関について

研究者氏名

竹中芳治¹⁾，塚本徹哉，溝下 勤，小笠原尚高²⁾，立松正衛

[目的・概要・進捗状況]

ヒト胃の腸上皮化生腺管では内分泌細胞とその他の上皮細胞が発現する形質は一致することが知られている。一方、ヒト胃癌ではその病変内に胃内分泌細胞をとまなう例がみられる。今回、ヒト胃癌における内分泌細胞と上皮細胞が発現する形質の相関について検討した。

粘膜内癌37例および進行癌73例の胃癌症例より一般内分泌細胞マーカーである Chromogranin A (CgA) による免疫染色で癌細胞数に対し、3%以上の内分泌細胞を有する症例を各々10例ずつ無作為に選択し、内分泌系マーカーの gastrin, somatostatin, glucagon-like peptide 1 (GLP-1), gastric inhibitory polypeptide (GIP), 上皮系マーカーの MUC 5, MUC 6, MUC 2, Villin による免疫組織化学的検索を施行した。病変内で内分泌細胞の形質発現が明らかな領域を同定し、この領域における上皮細胞の形質発現を解析した。

胃癌病変内に内分泌細胞の形質発現が明かであったのは9症例22領域で、内分泌細胞分化の観点から判定した形質は胃型7, 胃腸混合型1, 腸型14領域であった。このうち8領域(36.4%)で同部の上皮マーカー上の形質と一致した。胃癌の単クローン性の発生進展過程で上皮—内分泌細胞の形質の不一致が生ずることが示唆された。

[今後の方向]

ヒト胃内分泌腫瘍(カルチノイド, 胃内分泌細胞癌)症例を集積し、これらについても、病変部における上皮—内分泌細胞の形質の関連を解析する。これらにより、粘膜細胞由来である癌と内分泌細胞由来である内分泌腫瘍が、各々幹細胞からの分化におけるどの過程より発生するかについての検討を進めていく。

¹⁾リサーチレジデント, ²⁾研修生(名市大・院医・臨床機能内科)

研究課題 4—1

(主題) ヒトおよび動物癌転移の分子病理学的研究

(副題) 胃癌・大腸癌の微小転移に対する遺伝子診断法および治療法の開発

研究者氏名

中西速夫, 池原 譲, 伊藤誠二¹⁾, 望月能成¹⁾, 山村義孝¹⁾, 横山裕之²⁾, 大橋紀文²⁾, 安井健三¹⁾, 清水泰博¹⁾, 平井 孝¹⁾, 金光幸秀¹⁾, 加藤知行¹⁾, 立松正衛

[目的・概要・進捗状況]

胃癌の術後再発の約50%以上は腹膜再発である。この腹膜再発は腹腔内の遊離癌細胞あるいは目に見えない微小転移によるものと考えられることから、微小転移に対する効果的な診断法

・治療法の開発により再発の予防と生存率の大幅な改善が期待できる。我々はこれまでに微小転移の検出法としてリアルタイム RT-PCR 法を用いた腹腔洗浄液中 CEA mRNA の定量法を確立し、本法が術後の腹膜再発のリスクを評価するための優れた診断法であることを明らかにしてきた。本法は平成12年度より厚生労働省より高度先進医療として認可され、これまでに約300例以上の症例の収集をおこない、この前向き研究でもリスク評価法としての有用性を確認している。一方、GFP 遺伝子導入ヒト胃癌の腹膜微小転移モデルを用いて、微小転移は進行した転移に対して各種抗癌剤(経口フッ化ピリミジン製剤, タキソールの腹腔内投与)に対する化学療法感受性が高いことを明らかにしてきた。これらの結果に基づき、遺伝子診断により微小転移ハイリスク群を選別し、それらの患者に対して奏効率の高い化学療法を施すことにより従来困難とされてきた腹膜再発を予防する新しい診断・治療戦略を提唱し、実際に定量 PCR 法陽性症例に対し化学療法(経口)を施行する臨床第2相試験を消化器外科と共同で進めている。しかし、従来の化学療法では治療率の改善に限界があり、また副作用もあることから、腹膜転移の分子メカニズムにもとづいた微小転移に対する新しい治療法を開発する必要がある。本年度は、1) 腹膜播種性進展に関与する TNF-α などのサイトカインの阻害による転移抑制の可能性、2) 独自に樹立した Iressa 感受性胃癌細胞株を用いた EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 Gefitinib (Iressa) による胃癌に対する分子標的治療の可能性、を見出し、また3) 糖鎖の機能を利用した腹膜初期転移巣(大網乳斑)に選択的に抗癌剤を送達できるドラッグデリバリーシステムを構築し、その転移抑制効果の検証を行った(池原主任研究員との共同研究)。

[今後の方向]

リアルタイム CEA RT-PCR 法の診断精度をさらに改善するために、CEA を補完できる遺伝子を含む数十個の遺伝子よりなるオリゴマイクロアレーを作成し(民間との共同研究)新しい微小転移診断法の開発を試みる。一方、上記した腹膜転移の分子メカニズムにもとづいた新しい治療法に関する基礎的研究をさらに進め、臨床試験をめざして研究を進めて行く予定である。

¹⁾病院消化器外科, ²⁾研修生(名大病態制御外科)

研究課題 4—2

(主題) ヒトおよび動物癌転移の分子病理学的研究

(副題) 胃癌, 大腸癌のリンパ行性転移機構の解析

研究者氏名

中西速夫, 池原 譲, 横山祐之²⁾, 関 泰³⁾, 大野ふみ³⁾, 立松正衛

[目的・概要・進捗状況]

リンパ節転移は舌癌, 胃癌・大腸癌など消化器癌の最も重要な予後因子のひとつである。リンパ管新生はリンパ節転移成立の鍵を握る重要な要因であり、近年、このリンパ管新生の分子

機構が急速に明らかにされつつある。しかし、安定して増殖するリンパ管内皮細胞株が存在しないために血管新生のような再現性のある *in vitro* のアッセイ系に乏しいこと、リンパ管内皮特異マーカーが乏しいため、抗体を用いた免疫組織学的なリンパ管新生の評価が困難であること、などがこれまでリンパ管新生研究の障壁になっていた。我々は1番目の課題に関してこれまでに1) ヒト胸管内皮細胞および真皮毛細血管内皮細胞の初代培養細胞にHPV16のE6, E7およびテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(hTERT)を導入することによりLYVE-1, Podoplaninなどのリンパ管特異マーカーを発現する不死化リンパ管内皮細胞株(HuTLEC)を世界に先駆けて樹立、2) VEGF-C産生性大腸癌リンパ行性転移細胞株(COLM-5)を樹立し、両者の相互作用について解析が可能な *in vitro* の実験系を確立してきた。本年度はこのHuTLEC細胞が機能的にもVEGF-C刺激により転写が活性化されるリンパ管内皮細胞であること、またこの *in vitro* 解析系を用いてCOLM-5細胞がVEGF-C以外のリンパ管内皮細胞の管腔形成促進因子を分泌することを明らかにした。一方、上記2番目の課題に関して本年度は、1) リンパ管内皮特異マーカーであるPodoplaninに対する抗体を作成、これが市販のD2-40抗体と交差することからD2-40抗体のエピトープがPodoplaninであること、2) このD2-40抗体を用いた免疫組織染色により70例の大腸癌症例を検討した結果、リンパ管新生は腫瘍内(深部)ではなく、腫瘍辺縁部で起こり、浸潤先進部で腫瘍細胞がリンパ管を侵襲することを見出した。さらに3) ノードマウスにおける腫瘍リンパ管新生を可視化できるMicrolymphangiographyの手法を確立し、大腸癌細胞のリンパ管新生は腫瘍内ではなく、腫瘍周囲において起こること、VEGF-C遺伝子の強制発現によりリンパ管新生が誘導されることなどを実験的に確認した。

以上のことより腫瘍のリンパ管新生は腫瘍内部ではむしろ抑制されるなど血管新生とは異なっ調節機構が存在すること、VEGF-Cは確かにリンパ管新生性に関与するが、それ以外にも未知の調節因子が存在する可能性が示唆された。

[今後の方向]

上記 *in vitro*, *in vivo* のリンパ管新生評価システムを用いることにより新しいリンパ管新生調節因子の同定を行う。またリンパ節転移との関連についてさらに検討を行い、リンパ節転移に対する新しい治療法の開発を試みる予定である。

¹病院消化器外科, 研修生, ²名大・医・病態制御外科, ³愛知学院・歯・1口外

研究課題 5

(主題) がんの発生と進展における糖鎖の役割の解明とその治療への還元

(副題)

- 1) がん免疫担当細胞におけるシアル酸受容体シグレック7と9による負の制御機構
- 2) マクロファージの免疫応答能を活用するドラッグデリバリーシステムの構築とその技術応用の開拓

3) 胃発癌と進展における innate immunity の果たす役割の解析

研究者氏名

池原 謙, 小島直也¹⁾, 丹羽 徹²⁾, 池原早苗³⁾, 青木千尋⁴⁾, 中西速夫, 立松正衛

[目的・概要・進捗状況]

- 1) 癌免疫系で、T細胞受容体のシグナル伝達系はエフェクターとして働く細胞の活性化を担うが、この活性化はシアル酸とシアル酸受容体シグレック7や9によって負の制御を受けるという事を明らかにして報告した。(J.Biol.Chem. 279 (41) 43117-43125, 2004) この論文は、「癌に由来するシアル化糖鎖が、エフェクター細胞へ直接作用すること」に着目したもので、2005年のNature Review Immunology p 363-376に引用されている。現在は、癌関連糖鎖の関わる免疫活性の減弱は、エフェクター細胞への直接作用だけでなく、抗原提示のプロセスやRegulatory T細胞(Treg)への作用によってももたらされている可能性を明らかにすることをめざして行っている。
- 2) リボソームを糖鎖修飾して腹腔内に投与すると、非常に特異的かつ迅速に腹腔内常在性マクロファージによって取り込まれる。そして取り込んだマクロファージは、12時間から24時間という短時間で癌の初期腹腔内転移病巣である大網や腸管膜の節外性小リンパ組織に集積する。このリボソームとマクロファージの免疫応答を組み合わせる事で、効果的で新しいリンパ節へのドラッグデリバリーシステムの構築を行なった。この技術は、リボソームを媒体にワクチン抗原をマクロファージに送達・導入させ細胞性免疫を活性化誘導可能であることも確認できたので、癌ワクチン療法への応用を試みつつ、成果を知的財産として、2件の特許化を行った。(東海大小島助教授, 中西室長との共同研究)
- 3) 2つのフコース転移酵素の多型が、胃癌の原因であるヘリコバクターピロリ感染の危険度に関係する事をこれまでに明らかにしている。最近、IL1R-NFκB活性化の強度に関わる遺伝子多型が、胃癌の進展を促進する可能性を見いだした(投稿中)さらに、マウス胃癌由来培養細胞株をもちいて、IL1bやLPSによるシグナル制御機構を解析したところ、これらのシグナル伝達系を負に制御する分子とされてきたTollipの機能は、それをヘルプする分子の存在を必要とし、胃癌の進展とともにそれら負の制御機能の低下が関与していることを見いだした(中西室長との共同研究)さらに、Tollipをベイトとした酵母のツーハイブリッドスクリーニングを行い、パートナーとなる分子の全容解明を試みている。この研究では、Tollipと会合するパートナーとして、新規受容体と既知アダプター分子を見いだす事に成功した。さらにツーハイブリッドスクリーニングを進めて新規受容体のリガンドを検索するとともに、候補となるリガンドと新規受容体の関係についても解析を進めている。

¹東海大学工学部，²和歌山医科大学医学部大学院医学研究科，³名古屋大学医学部連携大学院疫学予防部，⁴中部大学生物工学部

分子腫瘍学部

研究課題 1

- (主 題) 肺癌等のヒト固形腫瘍の発症・進展機序の解明
(副 題) 肺癌症例における *Dicer* 発現異常とその臨床的意義

研究者氏名

効部陽子¹⁾，田中寿明¹⁾，長田啓隆，富田秀太，立松義朗，柳澤 聖，谷田部恭²⁾，高見澤潤一¹⁾，三好新一郎³⁾，光富徹哉⁴⁾，高橋 隆

[目的・概要・進捗状況]

近年 RNAi・microRNA 機構が，多くの遺伝子の発現制御やクロマチン構造の制御に関与することが示唆されて来ている。*Dicer*(*DICER1*) は，この RNAi・microRNA 機構に必須な RNA 分解酵素遺伝子である。この遺伝子の異常が，肺癌の発症・進展に関与するか検討した。非小細胞肺癌患者67症例の手術検体(及び対照の正常肺)の RNA を用いて，*Dicer* の発現を real-time PCR で定量し，予後を含む臨床病理データとの関連を解析した。すると，*Dicer* の発現は，正常肺の 1/2 の発現量を境に，ヒストグラムで二峰性の発現パターンが見られた。そこで正常肺の 1/2 の発現値に基づき，症例を *Dicer* 高発現群・低発現群の二群に分けて解析した。その結果，*Dicer* の低発現群で，病期・組織型等に相関はなかったが，低分化型を示す症例が多かった。更に *Dicer* 低発現群の予後は高発現群に比して著明に不良であることが判明した(log-rank test $p=0.0001$)。Cox 比例ハザードモデル法による多変量予後因子解析を行うと，病期(Hazard ratio (H.R.) = 11.3, $p=0.001$) と共に，病期と独立した強い予後因子(H.R. = 17.6, $p=0.001$) となることが判明した。尚，この *Dicer* の発現低下の原因として，DNA メチル化の関与を検討したが，DNA メチル化は見られなかった。*Dicer* と同様に microRNA 機構に必須な RNA 分解酵素遺伝子である *Drosha* (*RNASEN*) についても検討したが，このような結果は得られなかった。*Dicer* のヒト癌における異常は今まで報告が無く，我々の検討結果が最初である。

[今後の方向]

今回の成果は，RNAi・microRNA 機構が気道上皮細胞の増殖分化を制御し，その破綻が肺癌発症に関与する可能性を示唆した。今後，この *Dicer* 低発現が予後不良因子となる分子機構を詳細に検討していく。

¹研修生，²病院・遺伝子病理診断部，³独協医大・胸部外科，⁴病院・胸部外科

研究課題 2-1

- (主 題) 肺癌等のヒト固形腫瘍の分子病態解析に基づく臨床応用研究
(副 題) 神経内分泌分化を有する肺癌に対する新規癌治療法の検討

研究者氏名

長田啓隆，立松義朗，堀尾芳嗣¹⁾，谷田部恭²⁾，高橋 隆

[目的・概要・進捗状況]

昨年度に続き，神経内分泌分化を制御する basic-HLH 型の転写因子 *ASH1/ASCL1* 遺伝子が，肺癌治療の新規分子標的となるか検討を進めた。*ASH1*-RNAi-plasmid を肺癌細胞株に導入し，FACS 解析するとともに，細胞溶解を採取し，Caspase 切断・PARP 切断の有無を Western で検討した。*ASH1*-RNAi により *ASH1* 陽性肺癌特異的に G2/M 細胞周期停止と sub-G1 の増加が見られ，Caspase-9・-7 及び Caspase 基質である PARP の切断がみられ，アポトーシスが誘導されていることが示唆された。又，*ASH1*-RNAi-アデノウイルスベクターを作成し，*ASH1* 陽性大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 及び *ASH1* 陰性肺癌細胞株 A549・ACC-LC-176 を用いて，*in vitro* での細胞増殖抑制作用，及び *in vivo* での RNAi アデノウイルスの腫瘍内注入による xenograft 増殖抑制作用を検討した。*ASH1*-RNAi-アデノウイルスベクターは，*in vitro*・*in vivo* ともに *ASH1* 陽性肺癌細胞特異的に増殖を抑制した。又，アポトーシス誘導は *in vivo* でも検出された。以上の検討は，*ASH1* が肺癌細胞増殖や肺癌発症に関与し，肺癌治療において特異性の高い分子標的となり得ることを示唆する。

[今後の方向]

ASH1 発現誘導系と，RNAi による *ASH1* 発現抑制系を用いて，*ASH1* により転写制御される遺伝子群を同定し，肺癌発症進展への関与を更に検討する。

¹病院・呼吸器内科，²病院・遺伝子病理診断部

研究課題 2-2

- (主 題) 肺癌等のヒト固形腫瘍の分子病態解析に基づく臨床応用研究
(副 題) 肺癌のプロテオミクス解析

研究者氏名

柳澤 聖，富田秀太，高橋 隆

[目的・概要・進捗状況]

近年の蛋白発現解析機器の進歩は目覚しく，網羅的に蛋白の発現プロファイルを解析することが可能となりつつあり，ポストゲノムシーケンス研究の中心的地位を占めようとしている。我々は，ヒト肺癌組織を用いた網羅的蛋白発現解析を進めることによって，最終的に機能を担う蛋白のレベルでがんの個性を探求することを目指している。

これまでに MALDI-TOF 型のマスマススペクトロメトリーを用いて網羅的に直接腫瘍組織における蛋白発現プロファイルを解析するための手法を確立すべく基礎的検討を進めてきた。それによって網羅的な蛋白発現スペクトラム採取のための基礎的な実験条件をほぼ確立することが出来た。

[今後の方向]

平成16年6月末日をもって研究担当者が名古屋大学へ異動したため、分子腫瘍学部における本研究は実質的に終了となった。それに伴い平成16年7月以降は、当該研究者たちと愛知県がんセンターの関連臨床部門との協力のもとに、肺癌診断システム開発を目指した共同研究体制が再構築されることとなった。

遺伝子医療研究部

研究課題 1—1

- (主 題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究及び診断治療への応用
- (副 題) MALT リンパ腫関連キメラ遺伝子産物 API 2-MALT 1 による抗アポトーシス作用: API 2-MALT 1 は NF- κ B の活性化を介して API 2 アポトーシス抑制遺伝子の転写を促進する

研究者氏名

細川好孝, 鈴木裕子, 瀬戸加太

[目的・概要・進捗状況]

MALT リンパ腫に認められる特徴的な染色体異常として t (11; 18) (q21; q21) が知られており、我々を含めた複数のグループによって、その本態として API 2-MALT 1 キメラ遺伝子を生じることが明らかにされた。このキメラ産物は NF- κ B を活性化することが知られているが、その細胞内シグナル伝達経路や下流標的遺伝子はほとんど明らかになっていない。そこで、今回マイクロアレイと分子生物学的手法を組み合わせ、API 2-MALT 1 の下流標的遺伝子を同定することを目的とした。

API 2-MALT 1 キメラ遺伝子を安定発現する Hela 細胞を用いてマイクロアレイ法を実施し、下流標的遺伝子の同定を試みた結果、その一つは API 2 遺伝子そのものであることが示唆された。次いで、API 2 遺伝子プロモーターの欠失や変異導入したコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼ法を行った結果、二つの NF- κ B 結合部位が重要であることがわかった。さらに、変異導入オリゴや抗体を用いたゲルシフト法により、NF- κ B の p50, p65 が確かにこれらの部位に結合することが明らかになった。

t (11; 18) (q21; q21) マルトリンパ腫では、API 2-MALT 1 キメラ遺伝子の発現が API 2 遺伝子プロモーター下に制御されていることから、API 2-MALT 1 キメラが NF- κ B を介してキメラ自身を発現上昇させる positive feed-back loop pathway が働いているものと考えられた。私たちは、昨年 API 2-MALT

1 キメラによる抗アポトーシス作用を報告したが、今回の結果はその抗アポトーシス作用の分子基盤を明らかにしている。

[今後の方向]

今回、API 2-MALT 1 の下流標的遺伝子として API 2 を同定して、API 2-MALT 1 が NF- κ B の活性化を介してキメラ自身を発現上昇させる positive feed-back loop pathway が働いている機構を明らかにした。今後は、さらに包括的な解析によって、その他の下流標的遺伝子の同定を進め、API 2-MALT 1 キメラによる抗アポトーシス作用の分子機構をさらに詳細に明らかにしていきたい。最終的には MALT リンパ腫の診断、治療に役立つ知見を得たいと考えている。

研究課題 1—2

- (主 題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究および診断治療への応用
- (副 題) びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における t (1; 14) (p34; q32) 転座の責任遺伝子のクローニング

研究者氏名

鈴木律朗, 中村栄男¹⁾, 瀬戸加太

[目的・概要・進捗状況]

悪性腫瘍、特に白血病・リンパ腫などの造血器悪性腫瘍では、病型特異的な染色体異常が腫瘍化に重要な役割を担っている。本研究の目的は、造血器腫瘍における転座関連遺伝子の同定、腫瘍化における役割について検討すると同時に、臨床病態との関連の検討によりこれらの遺伝子の臨床診断の有用性を検証することである。また、その腫瘍化の機序を解明することにより、適切な診断法および治療法を確立させることを目的としている。

t (1; 14) (p34; q32) 転座は、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫で認められる染色体異常で、14q32 に局在する免疫グロブリン重鎖遺伝子が、1 番染色体上の遺伝子を活性化しているものと推測される。一般的に B 細胞性リンパ腫では、免疫グロブリンとの転座によって活性化される遺伝子が腫瘍化に関与するとされ、cyclin D1, BCL2, BCL6, c-Myc などがかれまでにがん遺伝子として指摘されてきている。しかしながら、1p34 に局在するがん遺伝子の報告はこれまでになく、我々はこの責任遺伝子を同定することを試みている。t (1; 14) (p33; q32) 転座例の腫瘍細胞より DNA を抽出し、long distance inverse PCR (LDI-PCR) 法で転座相手を増幅・同定した。免疫グロブリン重鎖の JH6 が 1p34 とキメラ DNA を形成していた。1p34 の切断点近傍には既存の遺伝子はなく、500kb 以内に存在する 1 つの遺伝子および 3 つの hypothetical gene の過剰発現は認めなかった。切断点から約 20kb 離れた部位に存在する EST の過剰発現を認め、3'-5'-RACE で遺伝子の全長をクローニングしたところ、約 20kb 長の ORF を持たない non-coding RNA が過剰発現していた。Non-coding RNA の発現意義は十分解明されていないが、配列中に micro RNA が存在する可能性

も考えられる。本症例の遺伝子異常は、これまでに報告のない転座様式であると考えられる。この配列中に、マイクロ RNA などの配列が存在し、それが腫瘍化に関与している可能性があるため、マイクロ RNA に関する解析を続けている。

¹⁾名古屋大学医学部附属病院・病理部

研究課題 1—3

(主題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究および診断への応用

(副題) Array CGH によるリンパ腫の疾患特徴的ゲノム構造異常の探索

研究者氏名

田川博之, 春日井由美子, 中村栄男¹⁾, 森島泰雄²⁾, 瀬戸加大

[目的・概要・進捗状況]

我々は、造血器腫瘍におけるゲノム構造変化を捉えるため、全ゲノムにわたって均等に配置された約2304個の人工ヒト DNA を貼り付けたスライドガラスを作成して、Comparative genomic hybridization (CGH) をする方法 = Array CGH 法を確立した。この手法を用いてリンパ腫のより詳細な DNA 増幅欠損を明らかにしつつある。

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は複数の疾患単位から構成される。疾患特異的なゲノム異常を明らかにする目的で99症例の DLBCL の Array CGH を行った。そのうち46症例は遺伝子発現解析を行い28症例の ABC type と18症例の GCB type に分けることができた。ABC type と GCB type でゲノム異常のパターンを比較すると ABC type では、3q, 18q の増幅, 9p21の欠損が、GCB type では、1q, 2p, 7, 12の増幅がそれぞれの疾患群に特徴的なゲノム異常であることが明らかとなった。ABC type 群は予後が悪いことからこれらのゲノム異常は疾患を分けることが出来るだけでなく、予後予測にも有用であることが明らかとなった。13q31増幅領域からは microRNA を含む C13orf25遺伝子を同定している。この遺伝子は最近造腫瘍性に深く関与している遺伝子であることが明らかとなっている。その他、6p21増幅標的遺伝子として CCND3, BCL2 を同定している。Mantle cell lymphoma の解析では2q13のホモ欠損から proapoptotic gene である BIM の欠損を見出している。現在、他の ATLL などの疾患単位にも適用を広げ、疾患特徴的なゲノム異常を明らかにし、リンパ腫診断可能なミニアレイの開発をするとともに、ゲノム増幅、欠損の標的遺伝子を探索している。

[今後の方向]

診断の確定している B 細胞性リンパ腫を対象にゲノムプロファイルを疾患ごとに作成する。統計的な解析によって疾患特異的なゲノム異常を明らかにする。ATLL などに対して行う予定である。ゲノム増幅、欠損領域の集中領域の責任遺伝子を明らかにする。

種々のリンパ腫に対してゲノム異常を詳細に研究し、臨床病

態とあわせて予後に影響を与えるような遺伝子異常を明らかにする。肺がん等の固形腫瘍にも適用を広げていく予定である。

¹⁾名古屋大学医学部附属病院・病理部, ²⁾血液細胞療法部

研究課題 2

(主題) 造血器細胞の分化・増殖に関与する遺伝子の血清学的、分子生物学的研究

(副題) TEL-AML 1 型 B 細胞性白血病の発症機能解析

研究者氏名

都築 忍, 瀬戸加大

[目的・概要・進捗状況]

TEL-AML 1 は、染色体転座 t(12;21) に伴って形成される異常融合遺伝子で、小児リンパ性白血病の原因として最も多いことが知られている。しかしながら、このタイプの白血病がどのような機序で発症するのかは不明である。われわれは、レトロウイルスシステムを用いて TEL-AML 1 を血液細胞に発現させることにより、TEL-AML 1 には B 細胞の分化に異常を起し、特にプロ B 細胞レベルで分化を著しく阻害する作用があることを明らかにした。骨髓球系・赤芽球系の分化には明らかな影響がなかったが、造血幹細胞の増加を伴うことも見出した。このことは TEL-AML 1 の作用により未分化細胞が増加し、B 細胞特異的に分化が阻害されることを示唆する。この未分化細胞は長期にわたって増加しつづけることを観察しており、この細胞が白血病性幹細胞である可能性がある。

[今後の方向]

TEL-AML 1 を発現することによって分化異常をきたした造血細胞は、どのようにして白血病に進展するのだろうか? 付加的な遺伝子異常が重要である可能性を考慮し、遺伝子の量的異常に注目して、現在臨床検体を用いたアレイ CGH 解析を進めている。

腫瘍免疫学部

研究課題 1

(主題) 腫瘍抗原の免疫学的、分子生物学的検索

(副題) mRNA 導入抗原提示細胞による EBV-LMP 1 特異的 CTL の誘導

研究者氏名

出町文子¹⁾, 伊藤嘉規, 西田敬子, 赤塚美樹, 辻村邦夫, 高橋利忠²⁾, 葛島清隆

[目的・概要・進捗状況]

Epstein-Barr virus (EBV) は、潜伏感染時の宿主となる細胞種により、発現する蛋白質が限定される。膜蛋白質 latent membrane protein 1 (LMP 1) は EBV 陽性の上咽頭癌、ホジキンリ

ンパ腫, NK/T リンパ腫の一部に発現しているため, これらの癌に対する免疫療法の標的抗原候補と考えられている。しかしながら, LMP 1 は免疫原性が弱く特異的 CTL の誘導はこれまで容易ではなかった。昨年度は *in vitro* transcription 法にて合成した mRNA を樹状細胞などの抗原提示細胞に導入し, 抗原特異的な CTL を効率よく樹立する系を確立した。この系を用いて, EBV 既感染成人末梢血 CD8 陽性 T リンパ球から, HLA-A*0206 拘束性の LMP 1 特異的 CTL クローン H7 を樹立した。

今年度は, H7 の認識するエピートープの同定およびその生成過程の検討を行った。さらに種々の EBV 陽性細胞に対する傷害活性の検討を行った。短縮した LMP 1 を発現するプラスミドを導入した細胞や種々の長さの合成ペプチドを用いて CTL クローン H7 が認識するエピートープ同定した。エピートープは LMP 1 蛋白 N-末端側の膜貫通疎水性部位に位置する 9 個のアミノ酸配列である事が判明した。

次に, エピートープの生成過程を詳細に検討するため, short interfering RNA を用いて免疫型プロテアソームの発現を抑制した LCL (EBV 持続感染 B リンパ芽球株) を作成した。活性サブユニット low molecular weight protein-7 の発現を抑制した LCL では, H7 が認識するエピートープの生成低下が見られたため, このサブユニットが必須である事が判明した。

H7 は, LCL およびリンパ腫患者より樹立した EBV 陽性 NK 細胞株の一部に対して HLA-A*0206 拘束性に傷害活性を示した。傷害に抵抗性であった EBV 陽性 NK 細胞株では, エピートープ部分に相当する LMP 1 遺伝子に変異を持つものが見られたが, 免疫型プロテアソームの発現は全ての NK 細胞株で認められた。

[今後の方向]

EBV 陽性の NK リンパ腫患者から分離された細胞株を, LMP 1 特異的 CTL が傷害したことから, LMP 1 をターゲットにした免疫療法の可能性が示唆された。今後は, mRNA 導入抗原提示細胞を用いて, 他の抗原に対する特異的 T リンパ球の誘導を検討する。また, 新規抗原提示システムの構築も検討する。

¹⁾リサーチレジデント, ²⁾所長

研究課題 2—1

- (主題) 免疫診断及び免疫治療の基礎的研究
(副題) mRNA 導入樹状細胞による EBNA 1 特異的 CTL の誘導および新規エピートープの同定

研究者氏名

伊藤嘉規, 出町文子¹⁾, 太田里永子¹⁾, 西田敬子, 赤塚美樹, 辻村邦夫, 高橋利忠²⁾, 葛島清隆

[目的・概要・進捗状況]

Epstein-Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1 (EBNA 1) は EBV 陽性癌のすべてに発現している。この EBNA 1 については, 蛋白内部にあるグリシン・アラニン繰返し配列が, プロテアソームでの EBNA 1 の分解を阻害することが知られてい

る。このため細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピートープの生成効率が低く, EBNA 1 は CTL の標的抗原になりにくいと考えられてきた。ところが, 最近, EBNA 1 を認識し, EBV 陽性細胞を傷害する CTL クローンが生体内に存在することが報告された。そこで, 私共は, mRNA 導入樹状細胞を用いて効果的に EBNA 1 特異的 CTL を誘導する系を確立し, EBNA 1 を標的とした免疫療法の可能性について検討した。

方法は, まず, T7 ポリメラーゼを用いた *in vitro* transcription にて mRNA を合成し, 電気穿孔法にて樹状細胞に導入した。EBV 既感染成人末梢血 T 細胞を mRNA 導入樹状細胞で 3 回刺激後, 限界希釈法にて EBNA 1 特異的 CTL クローンの樹立を試みた。拘束 HLA 分子の決定は EBV 陽性 B リンパ芽球株 (LCL) のパネルを用いて行った。オーバーラッピングペプチドを用いてエピートープ領域を同定した後, 種々の長さの合成ペプチドに対する CTL 応答性から minimal epitope を決定した。さらに, 定法に従い MHC-tetramer を合成した。EBV 陽性 B リンパ芽球株 (LCL) に対する増殖抑制能についても混合培養法にて検討した。

上記の方法で, HLA-B*3501 および Cw*0303 拘束性 EBNA 1 特異的 CTL クローンを樹立した。前者は既知の 11mer, 後者は今回新規に同定した 10mer ないし 11mer エピートープを認識していた。Cw*0303 拘束性 CTL クローンは 11mer よりも 10mer エピートープを含有する MHC-tetramer により強く染色された。また, このエピートープは HLA-Cw*0304 分子でも提示された (Cw*0303 と *0304 を合わせた日本人の頻度は約 40%)。樹立した 2 つの CTL は共に HLA 拘束性に LCL の増殖を抑制し, 生体内において EBNA 1 特異的 CTL は EBV 陽性細胞を制御している可能性が示された。

[今後の方向]

今回誘導した CTL クローンが HLA 拘束性に EBV 陽性がん細胞を傷害するかどうかを検討中である。さらに, HLA-A24 など, 日本人に高頻度にみられる HLA を中心に新規エピートープを同定し, EBV 陽性癌についての免疫モニタリングおよび免疫療法の応用を目指したい。

¹⁾リサーチレジデント, ²⁾所長

研究課題 2—2

- (主題) 免疫診断および免疫療法の基礎研究
(副題) 新規のヒトマイナー組織適合抗原の同定と養子免疫療法に向けての取り組み

研究者氏名

赤塚美樹, 鳥飼宏基¹⁾, 宮崎幹規¹⁾, 川瀬孝和²⁾, 森島聡子²⁾, 宮内英征¹⁾, 田地浩史³⁾, 森島泰雄³⁾, 葛島清隆, 高橋利忠⁴⁾

[目的・概要・進捗状況]

同種造血幹細胞移植は難治性造血器腫瘍に対する最後の治療法である。この移植後にはマイナー組織適合抗原 (mHA) を中心としたアロ免疫反応が起り, 残存する腫瘍細胞を排除し治

癒をもたらすと考えられている。しかし、依然として20～40%の患者で再発が起る。造血系細胞のみに発現している遺伝子に由来する mHA は、移植片対宿主病 (GVHD) を起こさず、選択的に移植片対腫瘍 (GVT) 効果をもたらさうる標的抗原であり、移植後再発腫瘍の治療への応用が期待されている。昨年度は HLA-A33 拘束性の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンが認識する TMSB4Y 遺伝子の 5' UTR 領域にコードされる新規 mHA (ACC-3) について報告したが、本年度は HLA-A33 および HLA-A31 に拘束性の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンが認識する新規 mHA を同定した。

【新規抗原の同定】2名の予後不良の急性骨髄性白血病の男性患者の移植後30日目前後の末梢血単核球より、それぞれ HLA-A*3303, HLA-A*3101 拘束性の CD8⁺ CTL を限界希釈法にて得た。CTL は造血系細胞は傷害するが、皮膚線維芽細胞や骨髄間質細胞は傷害しなかった。まず連鎖解析法を遺伝子同定に応用したところ、2つの CTL はともに15番染色体の q25 部分に存在する遺伝子の多型部位由来のエピトープを認識することが推定されたが、遺伝子の同定には至らなかった。そこで mHA 陽性の患者細胞より cDNA ライブラリーを作成し、CTL をプローブとして発現クローニングを施行した。この結果15q25に存在する *cathepsin H* (CTSH) 遺伝子が mHA をコードしている遺伝子であり、その最初の多型部位に mHA エピトープが存在することが判明した。うち HLA-A*3303 は10個のアミノ酸からなるペプチドを、HLA-A*3101 は9個のアミノ酸からなるペプチドを提示していた。テトラマーを用いた検討により、移植後の患者末梢血には半年以上にわたって本 mHA に特異的 CTL が存在することが分かった。今回同定した CTSH 遺伝子は、リアルタイム PCR での発現解析の結果、造血系細胞以外でも発現が認められ必ずしも造血系細胞特異的ではないが、CTSH は固形腫瘍の転移に関係する酵素をコードしていることから、今後移植片対腫瘍効果の標的抗原となりうるかどうか検討していきたい。

【養子免疫療法への取り組み】養子免疫療法にはクローン化した CTL を100億個程度まで増やす必要がある。この増幅した CTL を臨床応用するために、従来必要とされていた異種細胞由来のフィーダーなどを用いない CTL の増幅法をほぼ確立した。現在 GMP に準拠した細胞品質管理を行うための各種書類整備の完備を目指している。次いで、すでに IRB で承認された養子免疫療法のプロトコールに基づいて臨床研究を開始する。

[今後の方向]

過去に同定した造血系細胞特異的 mHA を認識する CTL による養子免疫療法を施行する (倫理委員会にて承認済)。既知の mHA が応用できる日本人患者は全体の合計で30%程度であり、さらに多くの患者が養子免疫療法の対象となるよう、新規の mHA の同定を進めてゆく。細胞調整設備運営に必要な書類等の完備と養子免疫療法の実施。

¹研修生、²名古屋大学・院・医・機能構築・細胞工学、³病・血液細胞療法、⁴所長

研究課題 2-3

(主題) 免疫診断および免疫療法の基礎研究
(副題) ヒトパピローマウイルス E6 産物に特異的な細胞傷害性 T 細胞が認識する抗原同定の試み

研究者氏名

赤塚美樹, 森島聡子¹⁾, 那波明宏²⁾, 中西 透²⁾, 葛島清隆, 高橋利忠³⁾

[目的・概要・進捗状況]

Human papillomavirus (HPV) 16型は子宮頸癌の約半数の症例で検出され、細胞の不死化に関与する HPV の初期遺伝子産物 E6 及び E7 蛋白は免疫療法の標的候補と考えられている。日本人に多い HLA-A24 によって提示される HPV16型の E6, E7 に由来する CTL エピトープの報告はこれまでになく、我々は新規エピトープの同定を試みた。HLA-A24 結合モチーフに基づいて HPV16型 E6, E7 上で候補ペプチドを推定し、CTL の誘導を試みた。

【新規抗原の同定】E6 上に3種類の HLA-A24 結合性ペプチドが推測され、このうち1種類のペプチドに特異的な CTL クローンが子宮頸部上皮内腫瘍患者の末梢血 CD8 陽性細胞から樹立された。この CTL は E6 と HLA-A24 を導入した 293T 細胞を傷害したが、HLA-A24 陽性子宮頸癌細胞株 SiHa を傷害できなかった。ところが、SiHa 細胞をプロテアソーム阻害剤である bortezomib (10 μ M, 5時間) と IFN- γ (100U/ml, 48時間) で併用処理したところ、高い傷害活性を認めるようになった。HLA-A24 を導入した他の4種類の子宮頸癌細胞株 (SKGIIIa, SKGI-IIb, BOKU, CaSki) を bortezomib と IFN- γ で同時処理したところ、CaSki を除く3種類の癌細胞株が CTL からの IFN- γ の放出を誘導するようになった。細胞株上の HLA-class I の発現は bortezomib 単独処理では低下したが、IFN- γ と併用することにより増強がみられた。他方、E6 mRNA の発現量は bortezomib 処理により低下し、IFN- γ を併用しても増強しなかった。これまで報告された HPV の CTL エピトープは E7 由来がほとんどで、E6 由来の報告は少ない。また報告されているエピトープ特異的な CTL は E6 導入細胞に対する傷害性を示しているが、子宮頸癌細胞株に対する傷害性は証明されていない。E6 が E7 と比較して CTL の標的抗原となりにくい理由の一つとして、E6 は蛋白の発現量が少なく、HLA 上にエピトープが提示されにくいと考えられている。今回同定したエピトープも癌細胞株では提示されにくい、bortezomib と IFN- γ の同時処理によってその提示が改善されることが明らかとなった。Bortezomib はプロテアソーム阻害剤の中で初めて臨床試験が行われ、特に多発性骨髄腫での有効性が報告されているので、今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の可能性を検討したい。

[今後の方向]

プロテアソーム阻害剤による効果の機序の解明。

E6 および E7 上における他の HLA-A24 結合性エピトープの検索。

プロテアソーム阻害剤と IFN- γ の併用免疫療法についての検

討。

¹⁾名古屋大学・院・医・機能構築・細胞工学,²⁾病・婦人科,³⁾所長

研究課題 2—4

(主題) 免疫診断および免疫療法の基礎研究

(副題) マウス TL 抗原を標的とした免疫療法モデルの開発

研究者氏名

辻村邦夫, 小幡裕一¹⁾, 松平康枝, 西田敬子, 岡南裕子²⁾, 赤塚美樹, 葛島清隆, 高橋利忠³⁾

[目的・概要・進捗状況]

マウス TL 抗原は非古典的 MHC クラス I (MHC クラス Ib) 群に属し, 正常組織ではすべてのマウスの腸上皮に発現するのに対し, 特定のマウス (A 系等) だけが胸腺 T 細胞に TL 抗原を発現する。しかし, 正常胸腺には TL 抗原を発現しないマウス (B6 や C3H) でも, T リンパ腫の発生に伴い TL 抗原を発現するため, 分化抗原のみならず腫瘍特異抗原としての特徴も合わせ持つ。

H-2 K^b プロモーターを用いて全身に TL 抗原を発現させたマウス (TL 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 [CTL] は自己と見なされ除去される) に, 化学発癌剤 (*N*-buthyl-*N*-nitrosourea [NBU]) を投与すると, その遺伝子導入宿主マウスにくらべて早期に T リンパ腫を発症する。この結果は, TL 抗原特異的なリンパ腫に対する免疫監視機構の存在を示しており, その免疫能を高めてやることで, T リンパ腫の発症をさらに抑制できる可能性を示唆している。私達は, 能動免疫および受動免疫により, 移植した TL 陽性 T リンパ腫の治療モデルを確立すると同時に, その解析によって得られた知識をリンパ腫の予防に応用することを目的として検索を続けている。

1. 能動免疫による抗腫瘍効果の検索

TL 遺伝子導入マウス由来の皮膚移植あるいは樹状細胞を用いた免疫により, TL 陽性 T リンパ腫の増殖が抑制される。しかしながら, (1) 樹状細胞による免疫効果は皮膚移植に劣ること, (2) 樹状細胞の増殖には限りがあることも明らかとなった。これらの問題点を克服すべく, 活性化 B 細胞を用いた免疫による抗腫瘍効果の検討を開始した。

2. 受動免疫による抗腫瘍効果の検索

TL 特異的 CTL を養子移入することで, TL 陽性 T リンパ腫の増殖が抑制される。また, その抑制効果は TL tetramer で強く染色される (高親和性 T 細胞レセプター (TCR) を発現する) CTL のみで有効であった。さらに, (1) TCR の co-receptor である CD8 との結合部位を改変した TL tetramer によるソーティング, (2) 抗 TL 抗体-TCR chimera 遺伝子の正常 CD8 陽性細胞への導入の 2 種類の方法で, TL 抗原に対してより高い親和性の抗原レセプターを発現する CTL の樹立を試みている。

[今後の方向]

上記の研究を継続し, より効率のよい免疫療法の確立を目指す。

¹⁾理研・バイオリソースセンター, ²⁾研修生, ³⁾所長

腫瘍ウイルス学部

研究課題 1—1

(主題) ヒトがんウイルス (Epstein-Barr virus) の増殖機構の解析

(副題) Epstein-Barr virus (EBV) 潜伏感染 B リンパ球における溶解感染誘導と細胞周期停止

研究者氏名

工藤あゆみ¹⁾, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

哺乳類細胞では DNA 損傷を検知し細胞周期停止や細胞死を誘起するチェックポイント機構が存在する。EBV 溶解感染を誘導すると宿主細胞内では EBV ゲノムに由来した遺伝子産物の発現とウイルス DNA 複製が起こる。EBV 溶解感染を誘導した細胞は S 期様環境を維持したまま宿主 DNA 複製が抑制され細胞周期停止を引き起こす。より詳細に細胞内環境を知るため EBV 溶解感染誘導後の宿主チェックポイント因子の挙動を解析した。EBV 溶解感染に伴い ATM が活性化され下流の histon H2AX, Chk2, Chk1, p53, NBS1 が活性化されていた。このとき ATM の下流である Chk2 や p53 の活性型は EBV 複製領域周囲に局在していた。しかし, p53 の下流の p21, MDM2 の発現量の増加は観察されなかった。また, 溶解感染誘導後サイクリン A/E が司る CDK 活性は経時的に増加する。免疫沈降による解析結果及び局在から活性化型 p53 に BZLF1 蛋白質が直接結合することによって p53 の下流へのシグナル伝達が抑制されると考えられる。このように EBV 溶解感染を誘導すると宿主チェックポイント機構が誘起されるが, 同時に p53 から下流への伝達を抑制することで宿主細胞内を EBV 複製に都合のよいように維持していることが明らかとなった。

[今後の方向]

EBV 溶解感染時における宿主 DNA 複製停止機構を探るため, EBV 溶解感染誘導後の宿主 DNA 複製関連因子および宿主複製停止にかかわる因子の生化学的解析を試みている。EBV 溶解感染の移行にともなった宿主細胞周期停止機構について新たな知見を得るために, EBV 溶解感染時に発現してくるウイルス蛋白質を細胞に強制発現させ, 宿主細胞周期および DNA 複製へ与える影響を検討する。溶解感染誘導した細胞において, ウイルス DNA 合成を抑制すると, 細胞はアポトーシスを引き起こした。溶解感染を誘導した細胞に於いて発現するウイルス因子が, アポトーシス抑制作用をもつことが疑われるため, 抗アポトーシス作用をもつ既知のウイルス蛋白質及び未知のウイルス因子のアポトーシス抑制機構を解明する。

¹⁾ 研修生

研究課題 1—2

(主題) ヒトがんウイルス (Epstein-Barr ウイルス) の増殖機構の解析

(副題) EBV BZLF 1 蛋白質と p53 との相互作用

研究者氏名

白田典子¹⁾, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

EB ウイルス (EBV) が潜伏感染しているがん細胞に溶解感染を誘導すると、DNA 損傷チェックポイント (ATM-Chk2 経路) が誘起されるが、そのシグナルは p53 より下流には伝達されない。本研究では、EBV BZLF 1 蛋白質の、p53 との相互作用および p53 の転写活性への影響について検討した。

まず、様々な領域を欠失させた p53 と BZLF 1 蛋白質の発現ベクターを SaOS-2 細胞にトランスフェクトし、免疫沈降法によって両者の結合領域を検討したところ、BZLF 1 蛋白質は p53 の DNA 結合ドメインを介して結合することが明らかとなった。次に BZLF 1 蛋白質が p53 の転写活性化能に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイで調べたところ、BZLF 1 蛋白質は p53 によって転写活性化されるレポーター遺伝子の発現を 1/10 以下に抑制することが示された。以上の結果から、BZLF 1 蛋白質は p53 と相互作用して転写活性化能を阻害し、下流の遺伝子発現を抑えることにより EBV の溶解感染に適した細胞内環境を整えていることが示唆された。

[今後の方向]

BZLF 1 蛋白質による p53 転写活性化能抑制のメカニズムを明らかにするため、BZLF 1 蛋白質が p53 の四量体形成や標的配列への結合能に及ぼす影響を検討する。さらに、p53 と相互作用する転写関連因子に対する影響を調査する。

¹⁾ リサーチ・レジデント

研究課題 1—3

(主題) ヒトがんウイルス (Epstein-Barr virus) の増殖機構の解析

(副題) EB ウイルス BZLF 1 遺伝子産物の精製

研究者氏名

中洲 章, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

EB ウイルスの BZLF 1 遺伝子産物 (pBZLF 1) は、EB ウイルスの潜伏感染状態からウイルス産生サイクルへの移行を誘発し、転写制御因子であると共に、ウイルス産生サイクルで機能する複製開始点に結合する事から DNA 複製への関与が示唆されている。ここでは pBZLF 1 の生化学的な機能を調べるため

に精製を試みている。昆虫細胞を用いた大量産生系で発現させた pBZLF 1 は不可逆的に凝集体を作りやすく、カラムクロマトグラフィーで単一のピークを形成しない事から蛋白が正しい高次構造を取っていない事が示唆された。そこで EB ウイルスが潜伏感染しているマーマセット由来の B95-8 細胞からの精製を試みた。高塩濃度の条件下で界面活性剤により pBZLF 1 を抽出し、ハイドロフォビックカラムクロマトグラフィーで分画する事により低塩濃度 (0.1M NaCl) でも可溶化している pBZLF 1 標品を得る条件を設定した。しかし低塩濃度でショ糖密度勾配遠心を行うと大部分の pBZLF 1 は高分子量の分画に広く分布した。この事は pBZLF 1 は他のタンパクと複合体を形成している事を示している。さらに DEAE セファセル、フォスフォセルロース、ヒドロキシアパタイトを用いて精製を進めた後、高塩濃度 (1.5M NaCl) の条件でショ糖密度勾配遠心を行った。この条件では pBZLF 1 はモノマーの位置に分画される。この標品を再びイオン交換樹脂で分画するとこれまでとは異なった分画に来る pBZLF 1 標品が得られた。

[今後の方向]

高塩濃度の条件でのショ糖密度勾配遠心後にイオン交換樹脂でこれまでと異なる分画に来た pBZLF 1 は、それ以前とは異なるタンパクと複合体を形成しているかあるいは pBZLF 1 単独である可能性が考えられるのでこの点を検討する。また pBZLF 1 の量はかなり少ない事が示唆されてきたのでスケールアップしてさらなる精製を試みる。

研究課題 1—4

(主題) ヒトがんウイルス (Epstein-Barr virus) の増殖機構の解析

(副題) 改良 ChIP 法による EBNA 1 の EBV ゲノムとの結合の動態解析

研究者氏名

大黒 徹, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

EB ウイルス (EBV) の EBNA 1 が oriP の FR や DS, Q プロモーター領域に結合することはこれまでフットプリントの実験から報告されている。今回我々は染色体免疫沈降 (ChIP) 法の改良により EBNA 1 が結合している EBV ゲノム上の領域を網羅的に検索することが可能となったので、潜伏感染、溶解感染、細胞周期で比較検討を行い EBNA 1 の EBV ゲノムへの結合動態について解析した。

ホルムアルデヒドで EBV 感染細胞をクロスリンク処理した後 CsCl 密度勾配遠心にかけ抗 EBNA 1 抗体で ChIP を行いランダムプライマーで増幅シラベルしたものをプローブとし、EBV ゲノムライブラリーのどの部位に結合しているかをサザンブロットハイブリダイゼーションで検討した。

潜伏感染状態にある各培養細胞を出発材料として抗 EBNA 1 抗体で ChIP 法を行うと、EBV ゲノムライブラリー中 oriP を含む BamHI C 断片や Q プロモーターを含む Q 断片が検出され

た。EBV 潜伏感染状態の細胞の細胞周期による比較で結合状態に著しい変化は見られなかったが、B95-8 tet-BZLF1 細胞に DOX を添加することにより溶解感染を誘導した実験の結果から、溶解感染時にも EBNA1 蛋白質は DS や FR といった oriP 領域及び Q プロモーター下流に結合し続けていることが確認された。

また共焦点レーザー顕微鏡を用いて EBNA1, BMRF1, PCNA, BrdU の取り込みについての細胞内局在性について検討したところ、溶解感染時には EBNA1 は BMRF1 と一部共局在している像が観察された。このことから EBNA1 は DNA 複製の場の一端に局在していることが予想される。

[今後の方向]

ChIP assay の結果から EBNA1 は EBV が溶解感染状態の DNA 複製時にも EBV ゲノムの oriP 領域に結合し続けていることを明らかにしたが、蛍光抗体法による局在性の観察からも EBNA1 は DNA 複製が起こっているすぐ近傍に局在していることを示している。EBNA1 が他の複製に関係する蛋白質と相互作用している可能性も考えられるためそれらの蛋白質の同定と役割を解明していきたい。

研究課題 2

- (主題) ヒトサイトメガロウイルスの弱毒組換えワクチンの作成
- (副題) ヒトサイトメガロウイルス前初期遺伝子 IE1/2 エンハンサーの Sp1 結合部位欠損組換えウイルスは弱毒化する。

研究者氏名

磯村寛樹, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は癌化学療法や造血幹細胞移植後に再活性化し肺炎や骨髄抑制等の重篤な疾患を引き起こす。再活性化しない HCMV ワクチン接種が求められている。米国ではワクチン株として実験室株の野生型 Towne 株や AD169 株が用いられているが、野生型をワクチン株として使用することは、将来的にワクチン接種を受けた人の中でワクチン株自体が再活性化してくる可能性が考えられる。そこで本研究では再活性化を起こさない組換え HCMV ワクチン株を遺伝子工学の手法を用いて作成する。

私達はヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 前初期遺伝子 IE1/2 遺伝子のエンハンサーを全欠損させてプロモーターのみの HCMV-BAC DNA からウイルスは産生されないが、1つの Sp1 結合部位を含めた HCMV-BAC DNA からウイルスが産生されることを報告してきた。一方で HCMV エンハンサーの NF-κB 結合部位、あるいは CREB/ATF 結合部位を全欠損させてもウイルス増殖が変わらないことが報告されている。以上のことは NF-κB や CREB/ATF の機能はエンハンサーの他の結合部位で代償可能であると考えられる。

そこで、今回私達は近位エンハンサー-55と-75に存在する 2

つの Sp1 結合部位 Sp1 (-75) 及び Sp1 (-55) のウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、in vitro の EMSA から Sp1 (-75) の結合蛋白に対する結合活性は Sp1 (-55) に比較して 4 倍程度高いこと、さらに CAT assay から Sp1 (-75) Sp1 (-55) はともにこの結合活性に比例してヒト繊維芽細胞で、転写活性化能を持つことが示された。Sp1 (-75) 及び Sp1 (-55) をどちらか一方のみ、あるいは両方とも欠損したリコンビナントウイルスを作成して前初期遺伝子の発現及びそのリコンビナントウイルスの増殖を wt と比較した。Sp1 結合部位をどちらか一方のみ欠損したリコンビナントウイルスでは前初期遺伝子の発現およびウイルス増殖は wt と変わらないにも関わらず、Sp1 結合部位を両欠損したリコンビナントウイルスでは前初期遺伝子の発現およびウイルス増殖が著明に減少した。以上から Sp1 結合部位はエンハンサーの他の結合部位では代償不可能な機能を持っていると考えられた。

[今後の方向]

前初期遺伝子 IE2 は前初期遺伝子のなかで唯一ウイルス増殖に必須であり、その制御を解明することが HCMV の弱毒株の作成につながると考える。

分子病態学部

研究課題 1

- (主題) 癌の浸潤・転移および腫瘍血管新生における細胞間識別・接着機構とその動態の研究
- (副題) 上皮細胞癌化にともなう腫瘍マーカー糖鎖シアリルルイス a のエピジェネティックな発現誘導機構

研究者氏名

宮崎敬子¹⁾, 大森勝之²⁾, 井澤峯子, 古川鋼一³⁾, 山地俊之⁴⁾, 橋本康弘⁴⁾, 鈴木明身⁴⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

シアリルルイス a 糖鎖は CA19-9 の名で腫瘍マーカーとして臨床的に広く用いられており、この糖鎖の生理的意義の研究は重要である。我々はこの糖鎖が血管内皮細胞のセレクチンと結合して癌の血行性転移に関与することを明らかにしてきた。また癌における発現増加の機構については、正常消化管上皮細胞にさらに複雑な糖鎖 (2, 3/2, 6 ジシアリルルイス a) が発現されており、癌化すると 2, 6 シアル酸を欠失したシアリルルイス a が増加することから、2, 3/2, 6 ジシアリルルイス a の合成不全が癌化に伴って起こり、これによる糖鎖不全がシアリルルイス a の癌における増加を引き起こしていると考えている。2, 3/2, 6 ジシアリルルイス a の合成をつかさどる 2, 6 シアル酸転移酵素 ST6 GalNAcVI について大腸癌患者癌部及び非癌上皮細胞における mRNA 含量を検索すると癌部において著明に減少しており、上の仮説が正しいことが裏打ちされた。さらに細胞の癌化に伴って ST6 GalNAcVI 遺伝子の転写が抑制される機構を研究した。シアリルルイス a を発現する大腸癌細胞を選び HDAC 阻害剤 butyrate または DNA メ

チル化阻害剤 5-aza-cytidine (5-aza-C) 存在下に培養した所 ST 6 GalNAcVI の mRNA とジシアルルイス a の発現が誘導された。Butyrate では 2 ~ 4 mM, 5-aza-C では 20 μM 付近が至適で, mRNA の増加は 3 ~ 5 日後, 糖鎖発現は 5 ~ 7 日後に最大であった。この結果から癌におけるジシアルルイス a 発現抑制とシアルルイス a の増加の背後にはヒストン脱アセチル化および DNA メチル化による ST 6 GalNAcVI 遺伝子発現のエピジェネティックな抑制機構の存在が推定された。

[今後の方向]

以上から腫瘍マーカー CA19-9 が癌で増加して腫瘍マーカーとして役立つのは, ヒストン脱アセチル化および DNA メチル化による ST 6 GalNAcVI 遺伝子発現のエピジェネティックな抑制に原因があることが明らかになった。ヒストン脱アセチル化および DNA メチル化による遺伝子発現のエピジェネティックな抑制は発癌の初期に多様な遺伝子について起こり, 細胞癌化を導くとされており, CA19-9 糖鎖の癌における出現もまたこうしたエピジェネティックな変化の一環であることが明らかになった。この糖鎖が癌の血行性転移を促進するが, HDAC 阻害剤および DNA メチル化阻害剤による治療でこの糖鎖の発現が抑制されれば転移抑制が可能になると考えられ, 将来の検討課題である。

¹ 科学技術振興機構 (JST), ² 京大医, ³ 名大医, ⁴ 理研フロンティア

研究課題 2-1

- (主題) 悪性細胞における異常糖鎖の発現調節機構の研究
(副題) 低酸素による癌細胞におけるセレクチンの糖鎖リガンド発現誘導とその機構

研究者氏名

橋本彩子¹⁾, 小池哲史²⁾, 陳 国云¹⁾, 木村尚子²⁾, 宮崎敬子¹⁾, 八尾村多佳朗³⁾, 上田 大³⁾, 後藤嘉子, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

セレクチンを介した細胞接着は血行性転移や腫瘍巢の血管形成など癌の進展に深く関与する。癌ではセレクチンの糖鎖リガンドの発現が増大する。その背景因子として我々はこれまで多数の糖発現関連遺伝子を解析し, 癌で発現が増大するものを見いだしてきた。今回これら遺伝子の癌における発現誘導機構を明らかにするため, 低酸素による誘導を検索した。実験の結果, 大腸癌細胞の低酸素下培養によりセレクチンの糖鎖リガンドであるシアリルルイス x とシアリルルイス a の発現が誘導された。この時フコース転移酵素のアイソザイム FUT 7, シアル酸転移酵素 ST 3 O (ST 3 Gal I), グルコーストランスポーター (GLUT 1) および UDP ガラクトーストランスポーター (UGT 1) の転写が誘導されることが判明した。これら遺伝子の誘導とシアリルルイス x/a 糖鎖の発現は転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) の dominant negative 体の導入により抑制された。また, 以上の四つの遺伝子の転写を実際の大腸癌患者手術

組織の癌部と非癌上皮細胞部とで検索したところ, いずれも癌部で有意に増加していた。Dukes A および B の患者に比較して, Dukes C および D の進行癌の癌組織において増加がより著明であった。このことは, 実際の癌組織においても, とくに局所進行癌において上記のような培養細胞を用いた低酸素実験で解明された機構が働いていることを強く示唆した。

[今後の方向]

以上の結果は低酸素によって癌細胞に血管内皮細胞との接着を媒介する細胞接着糖鎖が誘導されることを示す。腫瘍巢の増大に伴い癌細胞の一部は低酸素にさらされ, 癌の進展の過程で遺伝子変異によって HIF の恒常的な高発現を獲得した癌細胞が選択的に増殖する。高転移性の癌細胞はこのような選択の結果生じると考えられる。低酸素による血管増生因子 VEGF の癌細胞での産生亢進はよく知られている。低酸素状態におかれると細胞は種々の代謝変化を起こして低酸素に適応しようとする。この代謝変化において転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF) が重要な役割を演じることが知られており, 上記の変化はその背後に転写因子 HIF の作用があることが明らかとなった。シアリルルイス x とシアリルルイス a 糖鎖の発現が細胞の癌化のごく初期に誘導される機構は主として糖鎖不全のメカニズムによると思われるが, シアリルルイス x とシアリルルイス a 糖鎖の発現は局所進行癌における癌のプログレッションに伴ってさらに増強する。転写因子 HIF の作用は, こうした進行癌における発現増強のメカニズムに相当すると考えられる。

¹ 科学技術振興機構 (JST), ² 研修生, ³ リサーチレジデント

研究課題 2-2

- (主題) 悪性細胞における異常糖鎖の発現調節機構の研究
(副題) セレクチンリガンド, シアリル 6-スルホ糖鎖の合成酵素のがん特異性とシアル酸部分の環状化反応

研究者氏名

木村尚子¹⁾, 大森勝之²⁾, 宮崎敬子³⁾, 橋本彩子³⁾, 殷 軍¹⁾, 北島 健⁴⁾, 森山昭彦⁵⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

我々が以前セレクチンのリガンドとして同定したシアリル 6-スルホルイス x 糖鎖 (Kimura, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 4530, 1999) は, 大腸上皮細胞や一部の癌細胞にも発現する。その合成に関与する 6-硫酸基転移酵素には数種のアイソザイムがありそれぞれ癌組織での発現と基質特異性が異なる。これらアイソザイムが合成する糖鎖の抗原性を検討し, あわせてシアル酸環状化の機構を解析した。大腸癌と非癌大腸上皮との比較では 6-硫酸基転移酵素のアイソザイムのうち GlcNAc 6 ST-1 は不変, -2 は癌で増加, -3 は減少とそれぞれ特徴的な変化を示した。GlcNAc 6 ST-2 が癌で増加することが注目された。これら酵素遺伝子を大腸癌細胞に導入すると, 発

現された 6-硫酸化糖鎖と各種の抗 6-硫酸化糖鎖抗体との反応性にはアイソザイムごとに大きな特徴が見られ、それぞれの抗体の癌特異性と並行した。シアリル 6-スルホルイス x 発現細胞に Ca^{2+} 動員刺激を加えるとすみやかにシアリル酸部分が環状化されてサイクリックシアリル 6-スルホルイス x に変化しセレクトインとの結合性が消滅する。大腸上皮細胞においても認められるこの 6-硫酸化糖鎖のシアリル酸環状化の反応機構の解析も進展させた。

[今後の方向]

サイクリックシアリル酸の疾患における病理的意義を解明するに当たり、6-硫酸基転移酵素のアイソザイムの組織局在や癌性変化を考慮に入れるべきであることが判明した。とくに大腸癌などの固形癌では以前検索した白血病細胞とは異なるアイソザイムを持つことが明らかになった。

¹ 研修生, ² 京大医, ³ 科学技術振興機構 (JST), ⁴ 名大・生物機能開発利用研究センター, ⁵ 名市大・システム自然科学

研究課題 3—1

(主題) 細胞接着分子セレクトイン・CD44およびその特異的リガンドの研究

(副題) ダブルノックアウトマウスを用いたリンパ球のホーミングを媒介する L-セレクトインリガンドを合成する二種の硫酸基転移酵素の貢献の検討

研究者氏名

井澤 肇子, Fathy El-Fasakhany¹⁾, 内村 健治²⁾, Steven. D. Rosen²⁾, 門松 健治³⁾, 村松 喬³⁾, 田口 修, 神奈木 玲児

[目的・概要・進捗状況]

以前我々はリンパ球のホーミングを媒介する L-セレクトインリガンドをシアリル 6-スルホルイス x と同定した。この合成酵素として硫酸基転移酵素 GlcNAc 6 ST-1 と HEC-GlcNAc 6 ST の二者が候補とされる。我々は以前より両者ともに貢献すると考えてきたが、関与するのは片方のみとする研究者もあり、見解はまだ一致していない。この問題について検討を加えた。GlcNAc 6 ST-1 KO マウスにおいては L-セレクトイン依存性のホーミングが低下しており、その低下の程度はパイエル板において最も著明であり、ついで腸間膜リンパ節、末梢リンパ節の順であった。これは HEC-GlcNAc 6 ST KO マウスにおいては L-セレクトイン依存性のホーミング低下が末梢リンパ節において最も著明であり、ついで腸間膜リンパ節、パイエル板の順であるのとちょうど反対になっており、互いに相補的に働くと考えられた。GlcNAc 6 ST-1 と HEC-GlcNAc 6 ST のダブルノックアウトマウスにおいては、リンパ節 high endothelial venule のシアリル 6-スルホルイス x は末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板のいずれにおいてもほぼ消失しており、L-セレクトイン依存性のホーミングの著明な低下が認められた。しかし、ダブルノックアウトマウスにおいてもなお、20%程度の L-セレクトイン依存性のホーミングが残存した。

[今後の方向]

GlcNAc 6 ST-1 と HEC-GlcNAc 6 ST とはいずれもシアリル 6-スルホルイス x を合成する。両酵素の分布はリンパ節の部位に依存して異なり、分担して機能すると考えられた。ンバ組織を分担して相補的に貢献すると考えられた。ダブルノックアウトマウスにおいてもなお完全なホーミングの完全な抑制に至らなかった点については、第三の硫酸基転移酵素が関与するか、あるいはなんらかの代償機構が働いている可能性が考えられる。これらの可能性につき今後、分析する必要がある

¹ 研修生, ² UCSF, ³ 名大医

研究課題 3—2

(主題) 細胞接着分子セレクトイン・CD44およびその特異的リガンドの研究

(副題) シアリル酸環状化をもたらすシアリル酸シクラーゼの遺伝子単離

研究者氏名

金森 審子, 神奈木 玲児

[目的・概要・進捗状況]

最近我々は、シアリル酸が新規な環状構造 (サイクリックシアリル酸) となる代謝経路を見いだした。サイクリックシアリル酸への変換は、セレクトインを介したがん細胞の接着能を低下させる。サイクリックシアリル酸生成に携わる酵素 (シアリル酸シクラーゼ) の遺伝子単離を発現クローニング法により試み、得られた cDNA を解析した。シアリル 6-スルホルイス x を発現させた HEK-293T 細胞をレシピエント細胞とし、サイクリックシアリル 6-スルホルイス x を認識する G159 抗体で認識される抗原 (G159 抗原) を発現させる cDNA を単離した。同遺伝子を昨年報告した、HUT-102 細胞由来の G159 抗原を欠損した突然変異株群に安定発現させ、G159 抗原を発現するようになる変異株を同定した。同変異株に先に G159 抗原発現を促進することを報告した IFN- γ を安定発現させても効果は認められなかった。現在、単離した遺伝子がコードする酵素がサイクリックシアリル酸を発現させる際に必要な因子についての解析を進めている。シアリル酸シクラーゼ活性をもつ酵素の cDNA が単離されたと考えられる。

[今後の方向]

今後、単離した遺伝子の触媒機能の有無の確認を行い、反応機構についての詳細を解析する必要がある。

研究課題 4—1

(主題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究

(副題) 硫酸化スフィンゴ糖脂質スルファチド分子種の MALDI-TOF MS を用いたハイスループット測定系の確立

研究者氏名

京ヶ島 守, 小泉恵子, 原 厚¹⁾, 青山俊文¹⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

コレステロールやスフィンゴエリンとともに、細胞膜上でマイクロドメインを形成するスフィンゴ糖脂質 (GSL) は、外部からのシグナルを伝達する糖鎖受容体としての機能の他に、細胞の増殖やアポトーシスのキー物質の一つである、遊離のセラミドやスフィンゴシンのリザーバーとしての機能を持つ。硫酸化 GSL であるスルファチドは P-セレクチン, L-セレクチンや細胞外マトリックス蛋白質であるラミニン, スロンボスポンジン 1, フォンビルブランド因子等に結合能をもつことから、がんの転移、浸潤に大きな影響を与えることが予想されて来た。従来は主として糖鎖に着目した研究が中心であったが、最近の研究で脂質部分を構成する脂肪酸やスフィンゴシンのアシル鎖長、不飽和度、水酸化修飾等の違いによりその機能が大きく影響を受けることが判明しつつある。しかしながら、残念な事に現状ではこれらの違いを簡便迅速に分析する手法がない。本研究ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) を用い、これらを迅速に分析する方法を研究した。ラット尿管癌モデルにスルファチド分画を調製し、一部は無修飾体で一部はリゾ体として分析したところ、スルファチド SM4s, SM3, SM2 を検出した。SM4s が主として通常のスフィンゴシンと水酸化脂肪酸からなるのに対し、SM3/SM2 はフィトスフィンゴシンと非水酸化脂肪酸から構成されていることが判明した。

[今後の方向]

スルファチドの微量迅速測定法を確立した。本法を用い、実際のがん細胞におけるスルファチドのがん化における変化を追及し、がんにおけるスルファチドの役割を明確にするとともに、あらたな診断マーカー、治療薬の開発につなげたい。また、本法がスルファチド以外のスフィンゴ脂質にも応用可能となるよう研究を続ける予定である。

¹⁾信州大

研究課題 4-2

(主題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究

(副題) 肝部分切除後の肝再生における phosphoinositides-specific phospholipase Cδ4 の役割

研究者氏名

芥川篤史¹⁾, 小泉恵子¹⁾, 二村雄次²⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

Phosphoinositides-specific phospholipase C (PLC) は主として、細胞の増殖および分化に関与する細胞外刺激により活性化され、イノシトールリン脂質を加水分解して、生理活性物質であるジアシルグリセロールとイノシトール 3-リン酸を産生する。

PLC には isoform が 12 存在し、それらはそれぞれ $\beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ の 5 つのクラスに分類されている。その中の一つである PLC $\delta 4$ はラット肝再生の S 期に一過性に発現する非常にユニークな PLC としてクローニングされた。ラット成熟静止肝はその 70% を切除することにより一時的に未熟な状態にもどり増殖を始める。そして元の肝重量に戻った時点で増殖を停止する。すなわち、正常肝組織は自分自身のサイズと増殖をコントロール出来るという点において癌とは全く異なる。我々は今回、PLC $\delta 4$ のノックアウトマウス (-/-) を用いて、肝再生における PLC $\delta 4$ の役割を検討した。

RT-PCR 解析によると、+/+ マウスの正常静止肝では PLC $\delta 4$ の発現はほとんど認められず、そのかわり PLC $\delta 4$ の 3 つの splicing isoform のなかの 1 つである ALTI が発現していることが判明した。+/+ マウスの静止肝を 70% 部分切除すると、直ちに残存肝において細胞の増殖がはじまるが、BrdU の取り込みは術後 26 時間あたりから始まり、38 時間から 42 時間でピークとなる。PLC $\delta 4$ は術後 24 時間、すなわち late G1 と early S の境目から発現し始め、一方、ALTI は術後のすべての時間帯において発現していた。Western blot 解析により、ALTI は静止肝および再生肝の核に局在していたが、PLC $\delta 4$ は再生肝において、核と核以外の細胞画分にも存在することが判明した。+/+ マウスと比較して -/- マウスでは、肝再生における BrdU の取り込み開始時間が数時間遅れるが、S 期の進行速度は+/+ マウスより速い傾向が認められた。すなわち、+/+ と -/- で、もとの肝重量にもどるために要する時間にほとんど差がなかった。PLC により産生されるジアシルグリセロールは Protein kinase C (PKC) を活性化する。そこで肝再生に伴う各種 PKC の核における発現パターンを+/+ と -/- で比較したところ、+/+ マウスでは early S 期の核に発現する PKC α が、-/- マウスの核では数時間遅れて発現した。以上の結果より、G1/S 期の再生肝の核において一過性に発現する PLC $\delta 4$ はジアシルグリセロールを産生することにより PKC α を核に引き入れ、その結果 G1/S 期における DNA 合成の timing を調節する役割を果たしている可能性が考えられた。また、核での constitutive expression が観察された ALTI も肝再生の過程で一過性に活性化され、PKC α の核への引き込みに一役かっている可能性も否定出来ない。

[今後の方向]

PLC $\delta 4$ が増殖期の細胞核において機能していることはほぼ確実な事実であると思われるが、具体的にどのような核機能調節に関与しているのかは依然として不明のままである。PLC $\delta 4$ の基質である PIP2 がクロマチン画分に存在することから、PLC $\delta 4$ による PIP2 の分解がクロマチン構造に変化をもたらす、その結果抑制されていた転写機能が活性化されるという考えも提唱されている。核内での PLC $\delta 4$ の役割を解明するための一つの方策として、細胞周期の各時期における PLC $\delta 4$ の詳細な核内分布を免疫形態学的手法で解析したいと考えている。

PLC $\delta 4$ は再生肝のみならず、正常組織では脳および睾丸にも多く発現しており、さらに、増殖の活発なラットおよびマウスの各種がん細胞株にも強い発現が認められる。今後、PLC $\delta 4$ の悪性細胞増殖における役割の解明を目指して、まずは正常

と悪性増殖細胞での PLC δ4 の構造ならびに酵素学的性状の比較検討が必要と考えている。

¹⁾研修生, ²⁾名大医

研究課題 4—3

- (主題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究
- (副題) 細胞膜マイクロドメインに局在するスフィンゴ脂質の構造と機能-脂質シグナリングにおける役割

研究者氏名

小泉恵子¹⁾, 京ヶ島 守, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

生体膜には「detergent-insoluble sphingolipid-enriched domain」と呼ばれるマイクロドメイン(ラフトおよびカベオラ)が存在する。マイクロドメインには脂質の他にシグナリングに関与する様々な機能蛋白質が局在しているため、シグナリングのプラットフォームとも呼ばれている。マイクロドメインにおける蛋白質と脂質の強固な結合性はスフィンゴ脂質の分子構造によるところが大きい。すなわち、スフィンゴ脂質には他の脂質には見られない、水素結合に関与する基が複数存在するという特徴がある。マイクロドメインにおけるスフィンゴ脂質はシグナリングに関与する機能蛋白質のための場を提供するという役目の他に、自らが代謝され、シグナリングに必要な様々な生理活性脂質、セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン1-リン酸などを産生する役目も果たしている。ところで、スフィンゴ脂質の骨格はセラミドであり、セラミドはスフィンゴシンと脂肪酸から出来ている。スフィンゴシンと脂肪酸にはそれぞれ多くの種類が存在することから、スフィンゴ脂質の分子種はかなりの数になる。近年、分析技術の急速な発展に伴い、スフィンゴ脂質の分子種の詳細な解析が可能となった。そこで我々はスフィンゴ脂質、特にスフィンゴミエリンの分子種と細胞膜マイクロドメインの性状との相関関係、およびスフィンゴミエリンの分解産物であるセラミドの分子種とその生理活性脂質としての機能との関連性に着目して研究を行っている。

材料としては純粋な細胞膜を大量に調製することが出来るラット正常静止肝およびラット腹水肝癌細胞, AH7974を用いた。得られた細胞膜を1% Triton X-100で処理し、5-30%の直線的シヨ糖密度勾配超遠心を行ったところ、肝の細胞膜では1% Triton X-100不溶性マイクロドメインのほとんどがシヨ糖密度の低い画分(30%以下)に浮遊してきた。しかし、AHの細胞膜では大部分のマイクロドメインが浮遊することなく、シヨ糖密度の高い画分にとどまっていた。次に、それぞれのマイクロドメインに存在するスフィンゴミエリンの分子種を比較検討した。肝のマイクロドメインに存在するスフィンゴミエリンのスフィンゴシンは90%以上がC18:1であったのに反し、AHでは50%以上がC18:0であった。また、スフィンゴミエリンの脂肪酸種については、肝ではC24:0とC24:1がほぼ半数を占めるのに反し、AHではC16:0やC18:0のような短鎖の

脂肪酸が多いことが注目された。AHのマイクロドメインがシヨ糖密度の低い方に浮遊してこない原因は、蛋白質の量に比し脂質の量が少ないことによると考えられ、実際、AHのマイクロドメインには種々の細胞骨格蛋白質が肝に比しより多く結合していることが判明した。細胞骨格蛋白質とスフィンゴミエリンとの相互作用におよぼすスフィンゴミエリン分子種の役割についても今後くわしく追求していく予定である。また、アポトーシスのシグナリングに関与している生理活性脂質、セラミドも細胞膜マイクロドメインに存在しており、その分子種についても現在解析中である。今一つ我々が注目していることは、セラミドを産生する酵素、スフィンゴミエリナーゼもマイクロドメインに存在し、その活性が肝に比し、AHで非常に低いことである。スフィンゴミエリナーゼの活性とその基質であるスフィンゴミエリンの分子種との相関関係についても検討したいと考えている。

[今後の方向]

我々は細胞膜マイクロドメインに局在しているスフィンゴ脂質の分子種と、マイクロドメインの性状ならびに機能との間に密接な相関関係が存在していると考えている。シグナリングのプラットフォームと呼ばれる細胞膜マイクロドメインが細胞の増殖、接着および癌の転移などのメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが次々と報告されており、スフィンゴ脂質の各種分子種が各種シグナリングにおいてそれぞれどのような役割を果たしているのかを今後詳細に追求していく予定である。

¹⁾研修生

研究課題 4—4

- (主題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究
- (副題) 全トランスレチノイン酸(ATRA)によるがん細胞死誘導メカニズムの解明-スフィンゴ脂質代謝の役割

研究者氏名

萩原和美¹⁾, 村手 隆^{1,2)}, 小泉恵子¹⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

ATRAは現在、ATRAのレセプターであるRARαがPMLと融合しているタイプの急性前骨髄性白血病を劇的に治癒させる薬剤として臨床の場で広く使われている。その際のATRAの作用メカニズムは、スフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴミエリンを分解して、生理活性脂質、セラミドを産生する酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼの転写を活性化させ、その結果、白血病細胞を分化させることによるものであることを我々は先に明らかに報告した(J. Biol. Chem., 2002)。一方、神経系のがん細胞に対しては、*in vitro*でATRAがアポトーシスを誘導するという報告が複数ある。しかしながら、いずれの場合も培地中のFCSの割合を非常に低くしないとATRAによるア

ポトーシスが起こらないことが指摘されている。これでは臨床
の場で治療薬としての ATRA の効果を期待することは出来な
い。そこで我々は神経芽細胞腫, SH-SY 5 Y 細胞株を用いて,
FCS 非存在下での ATRA によるアポトーシス誘導メカニズム
を解明し, それを基に, FCS 存在下でも ATRA が神経芽細胞
腫に対してアポトーシスを誘導することが出来る条件の検討を
試みた。

FCS 存在下では, ATRA の添加により SH-SY 5 Y は増殖を
止め, 分化による神経突起の伸長が観察された。FCS を除去
しても細胞は数日間付着生存しているが, ATRA の添加により
すみやかにシャーレから剥離し 1 ~ 2 日で細胞死が誘導され
た。DNA ラダーの検出と, 細胞透過性 Caspase-3 阻害剤 Z-
DEVD-FMK を加えると細胞死が抑制されたことから, FCS 除
去および ATRA の添加によるこの細胞死が Caspase-3 を介し
たアポトーシスであることが示唆された。FCS 非存在下にお
けるアポトーシス関連蛋白の発現では, 抗アポトーシス蛋白
Bcl-2 の減少およびアポトーシス促進蛋白 Bax の増加がみられ
た。FCS 非存在下でのスフィンゴ脂質代謝産物をみると, FCS
存在下の細胞に比べて全体に代謝が低下しており, また ATRA
の添加でセラミドの蓄積が観察された。以上の結果より, FCS
の非存在下では Bcl-2 の減少と Bax の増加が起こり, ATRA
を添加することでセラミドが蓄積され, 更に Caspase-3 が活性
化されて初めてアポトーシスが誘導されると考えられた。そこ
で Bcl-2 を siRNA により低下させた細胞を用い, FCS 存在下
で ATRA による細胞死を検証すると, 約50%の生存率低下が
認められた。同様に Bax を細胞内に導入し安定過剰発現させ,
FCS 存在下で細胞を培養すると, ATRA 未添加では細胞死は起
こらないが, ATRA を添加すると50%程度の細胞死が認められ
た。

[今後の方向]

各種抗癌剤の作用メカニズムとして, Bcl-2, Bax などアポ
トーシス関連遺伝子の発現の変化が報告されているが, 我々の
今回の実験結果によると, これらの遺伝子発現の変化のみでは
充分なアポトーシスは起こらず, これに例えばスフィンゴ脂質
代謝産物であるセラミドの蓄積が加わることでアポトーシ
ス反応が速やかに進行することが推察された。さらに, FCS
の有無により ATRA のスフィンゴ脂質代謝への影響が大きく
異なることが明らかとなった。これらの事実は, 抗癌剤とは異
なり比較的副作用の少ない ATRA を中心とした抗腫瘍治療体
系を構築する際の重要な知見と考えられる。現在 ATRA の作
用をさらに明らかにすべく, スフィンゴ脂質代謝系の酵素活性
を測定することにより, FCS 非存在下での ATRA 添加による
セラミド蓄積の要因を検索中である。

¹⁾研修生, ²⁾名大医

研究者氏名

田口 修, 西岡明子

[目的・概要・進捗状況]

新生時期の C57BL/6 マウスに estradiol-17 β (E2 8 mg/kg
body weight) を投与しておく, 前立腺において間質にリンパ
球やマクロファージの浸潤を伴う上皮の過形成や異形成がみら
れる。長期間マウスを飼育しておくで前立腺癌が発症すること
もある。出生当日から5日間ホルモンを投与する (E2-0 マ
ウス) と全例に前立腺異常が観察された。ホルモンの投与を7
日から始める (E2-7 マウス) と, およそ半数のマウスに上
皮の異常がみられ, 炎症反応も弱くなった。さらにホルモンの
投与を14日から始める (E2-14 マウス) と, ほとんどのマウ
スで前立腺の異常は認めなかった。

生後3日に C57BL/6 マウスの胸腺を摘出 (Tx) しておく (Tx-
3 マウス) と, およそ35%のマウスに自己免疫性前立腺炎の発
症が見られた。Tx-3 マウスにエストロゲンを生後7日 (Tx-
3 + E2-7 マウス) あるいは生後14日 (Tx-3 + E2-14 マウス)
から投与すると高率 (およそ80%) に激しい前立腺炎の発症が
見られた。ところが生後21日からエストロゲンを投与したマウ
ス (Tx-3 + E2-21 マウス) にはホルモン投与の効果は見られ
なかった。

Tx あるいはエストロゲンで発症した前立腺炎は両方とも T
細胞, B 細胞の浸潤が見られた。Tx を受けたマウスで前立腺
炎が発症している前立腺上皮は Ia 抗原を発現しており, さ
らに上皮の部位に Ia 抗原陽性細胞や CD11 陽性細胞の浸潤が多数
見られた。またこれらの細胞浸潤は間質部位にも認められた。
一方エストロゲン処理により発症した前立腺炎の場合には, 前
立腺上皮に Ia 抗原の発現はなく, 上皮内への細胞浸潤はほと
んど見られなかった。間質には Ia 陽性細胞の浸潤がみられた
が CD11 陽性細胞の浸潤は稀であった。

Tx-3 マウスには前立腺炎の他に涙腺炎や精巣炎が発症す
る。これらの臓器炎に対してはエストロゲン投与の効果はな
かった。このことは投与されたエストロゲンが免疫系に作用す
るのではなく, エストロゲンレセプターを持つ幼弱な前立腺に
対して不可逆的に作用し, 前立腺抗原の変化やバリアーの虚
弱化をもたらしたものと考えられる。

[今後の方向]

動物実験で雄マウスに前立腺の発生の初期にエストロゲンを
投与しておく, 加齢とともに前立腺癌の発生が見られるよう
になる。エストロゲンを投与したマウスの胸腺を摘出し, 常
に炎症を起こした状態にして長期間飼育した場合の発癌の程度を
検討したい。

発がん制御研究部

研究課題 5

(主 題) 自己免疫と腫瘍との相関

(副 題) マウス前立腺に及ぼす新生時期胸腺摘出と女性ホ
ルモン投与の相乗効果

研究課題 1-1

(主 題) 中間径フィラメント関連蛋白質を介した発がんの
基礎研究

(副 題) trichoplein と Fbf-1 の機能解析

研究者氏名

猪子誠人, 杉本昌彦¹⁾, 林 裕子, 小栗 崇¹⁾, 白倉治郎²⁾, 稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

細胞骨格および細胞接着の異常は、癌細胞に特徴的な形態や接着性の変化から運動性の獲得さらには遠隔転移という現象を引き起こす。そして中間径フィラメントの中でも keratin は、癌の発生源となる上皮において細胞骨格・接着に大きく関わっている。

われわれの目的は、中間径フィラメントを介した発がんのメカニズムを明らかにすることである。その一つ的手段として、keratin 結合蛋白質の検索とその解析を進めている。これまでに私共は keratin 8 / 18 に結合する分子として Mrj 及び TRADD を見出し、その生理的意義を報告してきた。

最近では、われわれは新規蛋白質 trichoplein を keratin 結合蛋白質として同定した。このことは yeast two-hybrid 法と共沈実験、免疫沈降反応により確かめられた。またこの蛋白質に対する特異抗体を作成し、培養上皮細胞および上皮組織で免疫染色を行った結果でも keratin filament との共局在が示された。特に Caco-2 細胞および小腸吸収上皮では trichoplein が細胞間接着装置である desmosome に局在することが示された。このことは、細胞骨格および細胞接着において trichoplein を介した新しい分子メカニズムが存在することを意味する。それで、trichoplein の機能を固体レベルおよび組織レベルで解析するために、われわれは trichoplein のノックアウト ES 細胞を確立した。

またわれわれは、keratin 8 / 18 に結合する新規蛋白質として Fbf-1 (Fas binding factor-1) を同定した。このことは yeast two-hybrid 法と共沈実験により確かめられた。またこの蛋白質に対する特異抗体を作成し、培養上皮細胞および上皮組織で免疫染色を行った結果でも keratin filament との共局在が示された。特に Caco-2 細胞および様々な上皮組織の細胞間接着部位に Fbf-1 が濃縮することが示されたので、これが desmosome かどうか免疫電顕により詳細に検討中である。

加えてわれわれは、trichoplein と Fbf-1 において trichohyalin および plectin のそれぞれに 20-30% の相同性をもつ domain を見出しこれを TPHD (Trichohyalin and Plectin Homology Domain) と命名した。

[今後の方向]

trichoplein および Fbf-1 に関して以下の解析を行う。

ノックアウトマウスを解析することにより、これらの蛋白質の生理学的機能を詳細に解析する。

RNAi を用いて単独もしくは両者をノックダウンした細胞を作成し、これらの蛋白質の細胞レベルでの生理的意義を調べる。

トランキエーションミュータントを作成し、TPHD の機能解析をする。

Fbf-1 と Fas シグナルの関係を解析する。

¹⁾ 研修生, ²⁾ 名古屋大学・医

研究課題 1-2

(主題) 中間径フィラメント関連蛋白質を介した発がんの基礎研究

(副題) がん細胞骨格異常の分子機構

研究者氏名

井澤一郎, 稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

多くのがんは上皮細胞から発生するが、正常な単層上皮細胞は基底層とよばれる層の上に接着し、となり合う細胞同志も接着して一層のシート状の組織を形成している。このような細胞と細胞、細胞と基底層との接着は、細胞表面にある細胞接着分子によって行われるが、細胞接着分子は、細胞の内部で細胞の骨組みをなす細胞骨格蛋白質と結合して細胞の形や運動性を制御している。細胞ががん化すると、細胞の形態や接着性が変化し、さらに運動性を獲得する(周囲に浸潤し、他の臓器へ遠隔転移する)が、この過程には細胞骨格蛋白質の異常な変化が関与している。私共は、細胞骨格蛋白質のうち単層上皮細胞に特異的に存在しているケラチン 8 / 18 蛋白質と結合する分子として、Mrj 及び TRADD を見出した。最近さらに、ケラチンと結合する分子として新規蛋白質を同定し、この蛋白質をトリコブレイン (Trichoplein) と命名した。トリコブレインは、培養上皮細胞及び小腸上皮においてケラチンと共局在し、細胞接着部位にも存在していた。また、私共は細胞極性制御因子である ERBIN や Densin-180 が細胞接着に関与していることを見出し、がんの浸潤・転移においてこれらの分子がどのように働いているかを研究している。

[今後の方向]

中間径フィラメントを中心とする細胞骨格蛋白質とがん化・浸潤転移との関連をさらに詳細に検討していく予定である。また、がん細胞における細胞極性の異常についても解析を行っていきたいと考えている。

研究課題 2-1

(主題) プロテインキナーゼを介した発がんの基礎研究

(副題) Plk 1 のピメンチンリン酸化反応-Cdk 1 と Plk 1 のシグナル伝達のクロストーク

研究者氏名

山口知也¹⁾, 後藤英仁, 横山智哉²⁾, Herman Silljé³⁾, Anja Hanisch³⁾, Andreas Uldschmid³⁾, 高井 泰⁴⁾, 小栗崇史¹⁾, Erich A. Nigg³⁾, 稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

一部の癌においては、異倍体核・多倍体核の出現頻度とその悪性度が強く相関していることが知られている。これは、癌細胞において、DNA 複製に異常が生じることや複製された染色体が正確に分配されないことなどによって、癌遺伝子群の増幅・癌抑制遺伝子群の欠損などが引き起こされているためではな

いかと考えられている。このような染色体の不安定性を引き起こす分子機構の1つとして、細胞骨格改変に伴う細胞質分裂の異常が想定されている。我々は、これまで分裂期に引き起こされる細胞骨格（特に、中間径フィラメント）の改変の制御機構に注目し、研究を行ってきた。その結果、昨年度までに、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の下流に位置する Rho-キナーゼおよび分裂期キナーゼの一つである Aurora-B が、1) 分裂後期から終期にかけてビメンチンなどの中間径フィラメント構成蛋白質を分裂溝特異的にリン酸化すること、2) このリン酸化反応を通して、中間径フィラメントの娘細胞への均等分配および細胞質分裂を制御していることを示してきた。

我々は、これまでに分裂期の開始に必須である Cdk 1 は分裂前中期から中期までビメンチンをリン酸化することを明らかにしてきたが、その生理的意義は不明の点が多かった。我々は、分裂期キナーゼの一つである Plk 1 (Polo-like kinase 1) が、Cdk 1 によってリン酸化されたビメンチンのセリン55と結合し、活性化することを明らかにした。この活性化 Plk 1 は、さらに、ビメンチンのセリン82をリン酸化することから、Cdk 1 による分裂期特異的なビメンチンのリン酸化反応は、Plk 1 をビメンチンへと集積させることを介して、Plk 1 によるビメンチンのリン酸化反応を制御していることが判明した。この Plk 1 によるリン酸化反応は、in vitro において、ビメンチンのフィラメント形成能を部分的に阻害した。また、セリン82のリン酸化反応を模倣したビメンチン変異体は、細胞内において正常なフィラメントを形成できず、ドット状の小さな集塊を形成した。さらに、ビメンチンのセリン55のリン酸化反応は分裂中期に減弱するのに対し、ビメンチンのセリン82のリン酸化反応は（ホスファテースに対する感受性が弱い）ため）分裂期が終了するまで高いレベルで維持されていることも判明した。以上のことから、Plk 1 のビメンチンリン酸化反応は、Rho キナーゼや Aurora-B のものと協調的に働き、ビメンチンフィラメントの娘細胞への分配に重要な役割を担っている可能性が高いと考えられる。

[今後の方向]

Rho キナーゼや Aurora-B のリン酸化部位に加えて、セリン82をリン酸化されないアラニンに置換したビメンチン変異体等を作製し、Plk 1 によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義を明らかにする予定である。

¹研修生、²レジデント、³Max-Planck Inst. for Biochem., ⁴埼玉医科大学・産婦人科

研究課題 2—2

(主題) プロテインキナーゼを介した発がんの基礎研究
(副題) 分裂期キナーゼ群間のシグナル伝達のクロストーク

研究者氏名

後藤英仁、清野 透¹、友野靖子²、河尻愛恵³、浦野 健⁴、Erich A. Nigg⁵、稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

細胞はその遺伝情報 (DNA) を S 期 (DNA 複製期) に複製し、その後、分裂期において、その DNA を染色体という形に濃縮し、それを2つの娘細胞に均等に分配する。近年、この DNA の複製および分配の過程において異常が生ずること (染色体の不安定性) が、細胞の癌化およびその悪性化に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。最近、分裂期に活性化される Aurora-B、Polo-like kinase 1 (Plk 1) などの分裂期に活性化する蛋白質リン酸化酵素 (キナーゼ) の異常が染色体の不安定性に重要な役割を担っていることが明らかにされてきたが、その詳細はまだ不明な点が多い。そこで、我々は、Aurora-B およびその細胞内局在および機能を制御する INCENP に注目し、研究を行ってきた。その結果、昨年度までに、Aurora-B と INCENP が複合体を形成すること、その後、Aurora-B がスレオニン232を自己リン酸化することが、Aurora-B の活性化に必須であることを明らかにしてきた。

我々は、最近、Aurora-B の結合蛋白質である INCENP が Cdk 1 によって分裂期特異的にリン酸化されることを見出し、そのリン酸化部位として T59 と T388 を同定した。これらの部位のリン酸化反応は、Aurora-B リン酸化部位のものと異なり、分裂前期から中期、つまり、INCENP が動原体に局在する時期においてのみ認められた。また、INCENP の T388 のリン酸化反応依存性に Plk 1 が INCENP と結合することが判明した。さらに、この T388 のリン酸化反応が分裂前中期から中期における Plk 1 の動原体局在、ならびに、細胞の分裂中期から後期への進行に重要な役割を担っていることが明らかになった。これらの結果は、Aurora-B および Plk 1 が同じ結合蛋白質 INCENP を介して、分裂期の染色体動態を制御している可能性を示すものである。

[今後の方向]

今後、上記の可能性を探索するため、Aurora-B が Plk 1 をリン酸化し Plk 1 の機能を制御している可能性、または、Plk 1 が Aurora-B もしくは INCENP をリン酸化し Aurora-B/INCENP 複合体の機能を制御している可能性について、検討する。

¹国立がんセンター・ウイルス、²重井医学研・分子細胞生物、³研修生、⁴名大・医・生化学、⁵Max-Planck Inst. for Biochem.

研究課題 2—3

(主題) プロテインキナーゼを介した発がんの基礎研究
(副題) Chk 1 の新規リン酸化修飾とその意義

研究者氏名

白水 崇¹、後藤英仁、清野 透²、友野靖子³、十津川剛⁴、松村文夫⁵、中西 真⁶、稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

細胞には細胞分裂を正しく遂行するため、DNA 複製や染色体分配など、細胞周期の各段階でのイベントが正しく行われているかを確かめるチェックポイント機構が存在する。DNA の

複製が不完全であったり、紫外線や放射線などによって DNA が損傷したりすると、エラーが修復されるまで細胞周期を一旦停止し、修復が不可能な場合はアポトーシスを誘導して細胞自身が除去される。もし、チェックポイント機構に異常が生じて細胞周期が不完全なまま進行すると、遺伝子の変異や欠損が蓄積して細胞の癌化を引き起こすと考えられている。本研究では、チェックポイント機構に関わる分子群において中心的な役割を担う Chk 1 に注目し、研究を行ってきた。これまで Chk 1 は DNA 損傷チェックポイントに関与する分子として、ATM/ATR によるリン酸化を受けることが報告されているが、我々は新たに Chk 1 が分裂期においてもリン酸化を受けていることを見いだした。さらに、この分裂期特異的なリン酸化は分裂期開始キナーゼである Cdk 1 によるものであり、そのリン酸化部位がセリン286およびセリン301であることを明らかにした。さらに、我々は、この部位のリン酸化反応は間期の細胞においても紫外線の照射にตอบสนองして起こることを明らかにした。

[今後の方向]

今後、この Chk 1 の新たなリン酸化反応の生理的意義を明らかにするために、Chk 1 のキナーゼ活性そのものを変化させている可能性、および、リン酸化反応による Chk 1 の細胞内局在が変化する可能性等に注目し、解析を進める予定である。

¹研修生、²国立がんセンター・ウイルス部、³重井医学研・分子細胞生物、⁴三菱化生研・細胞構造・病態部門、⁵Rutgers Univ.,
⁶名古屋市大・医

中央実験部

研究課題 1

- (主題) 食道がん、頭頸部腫瘍の分子遺伝学的研究
(副題) 飲酒・喫煙による食道がん、口腔がんの発がん危険度に影響を与える遺伝子多型

研究者氏名

組本博司、杉村友隆¹⁾、福山由佳子¹⁾、山本洋平¹⁾、石崎寛治、
藤内 祝²⁾

[目的・概要・進捗状況]

近年、各種のがんにおいて生活習慣による発がん危険度ががん関連遺伝子の多型により大きく異なることが報告されている。我々は、塩基除去修復に関する遺伝子 *hOGG 1*、*APE 1*、*XRCC 1*、*PARP-1* 遺伝子の多型と飲酒・喫煙による口腔がんの発がん危険度について解析した。口腔がん患者122例、健康者241例よりゲノム DNA を抽出し、PCR-RFLP 法などを用いて遺伝子型を判定した。また、質問票により飲酒・喫煙に関する情報を得た。解析の結果、遺伝子型の危険度は *APE 1* (GG 型)で上昇していた(OR : 1.85, 95%CI : 1.0-3.52, $p=0.049$)。また、*hOGG 1* (CG+GG 型)でも危険度の上昇が認められた(OR : 1.59, 95%CI : 0.94-2.71, $p=0.086$)。遺伝子型別に解析した喫煙・飲酒による発がん危険度の結果はどの遺伝子において

も危険度に著しい差はなく、交互作用は見られなかった。これらの結果から、飲酒・喫煙との関連は認められなかったものの、口腔がんの発がん危険度は *APE 1*、*hOGG 1* の多型と関連する事が示され、これらの遺伝子が発がん過程に関与することが示唆された。

STK 15 遺伝子の T91A 多型について食道がん患者180例、健康人370例について同様の解析をした。遺伝子型の危険度には差がなかったものの、喫煙による危険度は AA 型では上昇せず(OR : 0.82, 95%CI : 0.16-4.26, $p=0.812$)、TA、TT 型では有意に上昇しており(OR : 7.06, 95%CI : 2.28-21.85, $p<0.001$, OR : 4.29, 95%CI : 1.82-10.13, $p=0.001$)、その差は有意であった。一方、飲酒による危険度は全ての遺伝子型において上昇しているものの、それらの危険度に有意差はなかった。また、昨年度の口腔がんの解析に引き続き食道がんについて *XPG*、*ERCC 1* 遺伝子の多型と食道がんの発がん危険度について解析を行った。それぞれ遺伝子型の危険度については有意な差は見られなかった。さらに、飲酒・喫煙の危険度についても飲酒・喫煙それぞれの危険度は有意に高かったものの、遺伝子型別の危険度に差はなかった。以上の結果から、食道がんの発がん危険度は *STK 15* の多型と関連することが示され、*STK 15* が喫煙による発がんに関与することが示唆された。

[今後の方向]

STK 15 遺伝子は細胞分裂の際に中心体の分離、成熟に関与するキナーゼである。今回解析した多型の78塩基下流には別の多型が存在し、両者のハプロタイプによってキナーゼ活性が異なることが最近報告された。そこで、78塩基下流の多型を調べ、ハプロタイプ毎の発がん危険度を解析する。さらに、*STK 15* と相互作用する *LATS 2* 遺伝子について当研究室で見いだした多型について解析しその効果を考察する。

¹研修生、²名大

研究課題 2-1

- (主題) ヒト細胞の遺伝的安定性維持機構の研究
(副題) *hTERT* 遺伝子導入不死化ヒト細胞を用いた低線量放射線影響の研究

研究者氏名

中村英亮、安井善宏、齋藤典子、石崎寛治

[目的・概要・進捗状況]

我々は、低線量率放射線のヒト細胞への影響を明らかにするために、*hTERT* 遺伝子導入による不死化ヒト細胞株を樹立し研究を進めている。前年度は、不死化正常人由来線維芽細胞株について、その低線量率放射線の影響を報告したが、今年度は、放射線高感受性 AT 患者由来線維芽細胞株について報告する。低線量放射線照射装置(京都大学放射線生物研究センター)を利用し、G1期で停止したコンフルエントな状態の細胞に対して低線量率放射線(0.3mGy/min)を最長2週間の連続照射を行った。コントロールとして同様にコンフルエントな状態で X

線照射装置を用いて高線量率放射線（2 Gy/min）の照射を行った。各々の被曝の影響を生存率、微小核形成率、 γ H2AX のフォーカス形成および6 TG 選択による HPRT 遺伝子変異の誘発率により解析した。対照として用いた正常細胞株では、低線量率放射線被曝後の生存率は、高線量率放射線被曝と比較して顕著な抵抗性を示し、また、微小核の形成率は低線量率放射線被曝後でも有意に低下していた。一方、AT 細胞株では、低線量率放射線被曝による生存率および微小核形成率は、正常細胞株が示した抵抗性を示さず、高線量率放射線被曝による結果と変わらなかった。また、 γ H2AX のフォーカス形成を観察すると、低線量率放射線 5 Gy 被曝後、正常細胞株では無被曝のコントロールと同様にほとんど形成が見られなかったのに対し、AT 細胞株においては有意に多数のフォーカスが観察された。これらの結果は、AT 細胞が G1/G0 期の DNA 損傷の修復系に欠損があることを示唆している。

[今後の方向]

低線量率放射線被曝における DNA 損傷では DNA 2 重鎖切断以外にも DNA 単鎖切断等が重要になっている可能性が考えられる。よって、それらの損傷についても検討を行う。

研究課題 2—2

（主題） ヒト細胞の遺伝的安定性維持機構の研究

（副題） 頭頸部癌におけるシスプラチン耐性機構に関する研究

研究者氏名

足立 誠¹⁾、伊地知圭¹⁾、組本博司、安井善宏、中村英亮、長谷川泰久²⁾、石崎寛治

[目的・概要・進捗状況]

頭頸部に発症する悪性腫瘍への標準的化学療法としてシスプラチン + 5-FU が用いられる。しかし自然耐性の例や、あるいは再発症例のなかには本化学療法に対して獲得耐性を示し、治療に難渋することが少なくない。シスプラチンに対する耐性機序は様々なレベルで起きることが報告されているが、臨床的にシスプラチンに対する耐性診断で使用するまでには至っていないのが現状である。我々はシスプラチン耐性とシスプラチンによって生じる DNA 損傷乗り越え DNA 複製酵素である DNA ポリメラーゼ ϵ のサブユニット Rev 3 について検討した。

ヒト頭頸部癌細胞株 UM-SCC-23, UM-SCC-81B を用い、さらに UM-SCC-23 にシスプラチンを持続処理し、濃度を漸増することにより分離したシスプラチン耐性株 UM-SCC-23CDDP/R を樹立した。コロニー形成法にて評価したところ 3 種類の細胞株のうち最も感受性が高かった UM-SCC23 に比べて、自然耐性株である UM-SCC81B は 2 倍の耐性、UM-SCC23CDDP/R は約 3 倍の耐性を示した。

Rev 3 の発現量については real time RT-PCR 法を用いて評価した。UM-SCC81B と UM-SCC23CDDP/R とで UM-SCC23 と比べて Rev 3 mRNA の発現量が 1.3 ~ 1.4 倍増加していた。RNAi による rev 3 のノックダウンは double strand RNA (dsRNA) を

用いて行い、ノックダウンの程度は real time RT-PCR 法で解析した。dsRNA 導入後 72 時間の Rev 3 mRNA の発現量は ds RNA free のものと比べ 1/30 ~ 1/25 に低下していた。

さらに Rev 3 をノックダウンした細胞でシスプラチン感受性を検討した結果、シスプラチン感受性が 2 ~ 3 倍程度上昇していることが確認された。同様の条件下でシスプラチンと全く異なる DNA 損傷を生じるプレオマイシン感受性を検討したが、Rev 3 をノックダウンした細胞とコントロールの細胞でプレオマイシン感受性に差は認められなかった。

Rev 3 をノックダウンすることにより耐性株の感受性が大きく上昇したことからシスプラチンの感受性において Rev 3 は重要な因子であり、治療においても有効なターゲットとなる。

[今後の方向]

ヒト頭頸部癌細胞株を用いた実験によりシスプラチン感受性と Rev 3 との関係が明らかとなった。今後、臨床サンプルを用いて、シスプラチンの感受性因子について更なる検討を実施する。

¹⁾研修生、²⁾頭頸部