

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） mRNA 導入 T 細胞を用いた細胞傷害性 T 細胞（CTL）の誘導

直田浩明¹⁾，宮原慶裕¹⁾，珠玖洋¹⁾，高橋利忠，赤塚美樹²⁾，葛島清隆²⁾

[目的・概要・進捗状況]

（目的）以前，我々は培養により増殖可能である CD40 活性化-B（CD40-B）細胞にレトロウイルスベクターを用い，抗原遺伝子を発現させた細胞を抗原提示細胞（APC）として用いることにより，抗原特異的 CTL を樹立する系を確立した。今回，抗原 mRNA を導入した PHA プラストを APC として同様に CTL の誘導を試みた。（方法）PHA 刺激 CD4 陽性 T 細胞（PHA プラスト）は，末梢血より CD4 陽性細胞を調整し，IL-2，IL-7 の存在下に PHA にて刺激し調整した。導入に使用した mRNA は，EGFP と MAGE-A4 由来の cDNA により in vitro transcription を行なった後 poly A を付加して調整した。PHA プラストに amaxa biosystems 社の Nucleofector を用いて EGFP mRNA を電気穿孔法で導入し，Flow cytometry にて発現を検討した。これらの細胞を標的細胞とし，MAGE-A4 に由来する抗原ペプチド特異的 HLA-A*2402 拘束性 CD8 陽性 CTL との反応性を ELISPOT 法で検討した。さらに，HLA-A24 陽性健常人の末梢血より CD8 陽性細胞を調整し，MAGE-A4 の mRNA を導入した自家 PHA プラストとともに IL-2，IL-7 の存在下に共培養し，抗原特異的 CTL の誘導を試みた。CTL はテトラマー法，ELISPOT 法，Cr 遊離法にて確認した。（結果）30ug の EGFP mRNA を電気穿孔法により導入すると，PHA プラストにおいて，導入24時間後で90%以上の高い導入効率を示された。MAGE-A4 の mRNA を導入した細胞は，抗原ペプチド特異的 HLA-A*2402 拘束性 CD8 陽性 CTL クローンを特異的に刺激し，IFN- γ の産生を誘導することを ELISPOT 法を用いて観察した。さらに MAGE-A4 mRNA 導入 PHA プラストを APC として用い，末梢血 CD8 陽性 T 細胞を in vitro で刺激することにより，新たに HLA-B*4402 拘束性の MAGE-A4 特異的 CTL の誘導に成功した。

[今後の方向]

本研究により，抗原 mRNA 導入 PHA プラストは，免疫モニタリングのための ELISPOT 法の刺激細胞として用い得る可能性が示された。また，mRNA 導入 PHA プラストを APC として in vitro 感作に用いることにより，抗原特異的 CD8 陽性 CTL の誘導が可能であることが示された。CD40B も同様な機能を持つことを以前報告しており，今後両者を比較しその有用性を検討して行きたい。

¹⁾三重大学医学部第二内科，²⁾腫瘍免疫学部

疫学・予防部

< 研究課題 > 1

（主 題） 愛知県のがん罹患，死亡情報を構築するための記述疫学研究

（副 題） 愛知県中央部における地域がん登録の精度向上

< 研究者氏名 >

伊藤秀美，松尾恵太郎，増井恒夫¹⁾，田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

県地域がん登録は，県のがん対策の策定に不可欠な情報となるがん罹患の実態把握を目的とし，1962年から実施している。本登録事業は県健康福祉部の事業として運営されており，その精度向上と活用に向けた技術支援をがんセンター研究所疫学・予防部が行っている。1999年度における新システム導入に伴い，登録患者の喫煙・飲酒習慣の実態調査を再開した。今回は，がん登録によって収集されたデータを用い，発生部位別のがんの罹患・進展に及ぼす喫煙習慣の影響を比較し，評価したので主な結果を報告する。

県下で1999年から2003年に新たに診断され，2004年12月までに届出られた20歳以上のがん患者は，80,924例であった。発がん要因として重視されている喫煙習慣の影響を各部位のがんについて相対的に評価するため，発生部位別に罹患者の喫煙習慣の分布（非喫煙，禁煙，現在喫煙，不明）を検討した。

喫煙習慣を，非喫煙，禁煙，現在喫煙，不明に分けると，男では33.1%，20.9%，34.3%，11.6%，女では78.4%，3.2%，8.5%，10.0%とそれぞれ分布していた。男の口腔・咽頭，食道，喉頭，肺，膀胱がん，女の食道，喉頭，肺，膀胱がんなどで喫煙者の割合が高く，男の結腸，直腸，胆道，皮膚，前立腺，甲状腺がん，脳腫瘍，リンパ腫，白血病，および女の結腸がん，乳房，卵巣，甲状腺がんでは喫煙者の割合が低かった。

次に，喫煙習慣ががんの進展に与える影響について検討を行った。解析対象から，喫煙習慣（喫煙者，非喫煙者）またはがんの進展度（限局，領域，遠隔）が不明である症例を除外した66,400例を解析対象とした。喫煙者は，非喫煙者に比べて，進展度が領域，遠隔転移となるリスクが高かった。部位別では，口腔・咽頭，喉頭，肺癌，乳房，子宮で領域転移となるリスクが有意に高く，肺，乳房で進展度が遠隔転移となるリスクが有意に高かった。以上より，喫煙習慣は生存率に関連するがんの進展度に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

がん登録事業の枠組みで収集される喫煙習慣の定義の不明確さが本研究の問題点であるが，一方，5年間にわたるがん登録患者を用いて評価したため，喫煙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。また，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

体制を推進するための啓発にも役立つことと考えた。

[今後の方向]

今後、喫煙習慣の予後に対する影響を検討する方針である。

¹⁾愛知県健康福祉部健康対策課

< 研究課題 > 2 - 1

(主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究

(副 題) 愛知県民の生活習慣特性からみたがんの要因探索
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，
鈴木勇史¹⁾，栗木清典²⁾，斉藤敏子

[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18年間（第一次：1988～2000年，第二次：2001～2004年，第三次：2005年～）に130,000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。それらの情報を用いて，1）国内外の学術会議や国際学術雑誌への逐次報告，2）一般県民向けのがん予防リーフレットの作成とその改訂，3）さらに個々人のがんの危険度評価と予防情報を対話方式により提供する健康ゲームソフトプログラムの開発と改訂，などに務めてきた。

また，2005年から開始した第三次病院疫学研究は，全国の多施設共同による分子疫学コホート研究（代表：名古屋大学，浜島信之教授）にも参画しており，栄養摂取に関する詳細な調査のみならず，血液採取も合わせ行い，生活習慣とDNAの両情報を合わせた生活習慣・遺伝子型の交互作用を明らかにしていくための分子疫学研究を開始した。すでに3,000人以上の新来患者集団の研究協力を得ており，それらの資料を用いて個々人の特性を遺伝子多型により明らかにし，主な部位のがんについて生活習慣の影響を分子疫学的に再評価してきた。

[今後の方向]

がん専門病院を背景とした系統的，かつ大規模な病院疫学研究は国内外にも例がなく，地域がん予防の推進に役立つ意義ある研究と考えており，今後も本研究を継続実施していく。

¹⁾リサーチレジデント，²⁾研修生

< 研究課題 > 2 - 2

(主 題) がんの環境・宿主要因，および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究

(副 題) 頭頸部がんの環境・宿主要因に関する疫学研究

< 研究者氏名 >

鈴木勇史¹⁾，若井建志，松尾恵太郎，広瀬かおる，伊藤秀美，
栗木清典²⁾，長谷川泰久³⁾，田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

頭頸部がんは近年の新しい手術法や抗がん剤の開発にもかかわらず，治療成績の向上が見られていない悪性腫瘍の一つで，死亡率は増加傾向にある。また，頭頸部領域は摂食，呼吸，会話等の生活上かかせない重要な機能が集中しており，がん治療によって機能が損なわれることがある。したがって，頭頸部がんの発症に関する危険要因を解明し，予防対策を進めていくことは重要であると考え。いままでの報告において，抗酸化物質の摂取は頭頸部がんの罹患リスクを低下させることが報告されている。しかしながら，頭頸部がんの重要な危険因子である喫煙・飲酒習慣別にみた検討は少なく，その点を明らかにするために，症例・対照研究を施行した。

症例は2001～04年，組織学的に口腔，咽頭，喉頭がんと診断された385例，対照は当センターを受診した非がん患者1,925例とした。両者の性・年齢分布をマッチさせた。抗酸化物質のカロテン，ビタミンC，Eの摂取量は47項目の食物摂取頻度調査の回答から算出し，三分位別に比較検討した。

その結果，カロテン，ビタミンC，Eの摂取が多い集団は，少ない集団に比べ，頭頸部がんのリスクが約40%減少することが認められた。喫煙・飲酒習慣別の検討では，抗酸化物質の摂取は喫煙・飲酒習慣にかかわらず，頭頸部がんのリスクを低下させる傾向を認めた。

[今後の方向]

今後も頭頸部がんの要因探索研究を続けていく。特に，遺伝的背景について解析を加え，遺伝・環境要因の交互作用を検討していく。

¹⁾リサーチレジデント，²⁾研修生，³⁾中央病院・頭頸部外科部

< 研究課題 > 2 - 3

(主 題) がんの環境・宿主要因，および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究

(副 題) 食道がんの環境・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，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アルコール代謝に関連した酵素遺伝子 ALDH2 / ADH2 の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。ALDH2 遺伝子多型の Glu / Glu 型では、非飲酒者に対する、中等度飲酒者、大量飲酒者のオッズ比は、1.88, 4.62であったが、Glu / Lys 型では、9.64, 95.4であった。この結果は、飲酒の影響が、ALDH2 遺伝子型によって大きく異なることを示唆する。また、ADH2 遺伝子型に関しては、代謝能の低い Arg アレルを保持するものでは、His / His に比べ2.0倍、統計学的にも有意にリスクが高くなることが示された。

【今後の方向】

他の飲酒関連がんにおける同様の検討が必要である。

¹⁾リサーチレジデント、²⁾中央病院・緩和ケア部、³⁾中央病院・胸部外科部

<研究課題> 2 - 4

- (主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究
(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⁾、鈴木勇史⁴⁾、
田島和雄

【目的・概要・進捗状況】

悪性リンパ腫の罹患リスクに及ぼす既往歴の影響については不明であり、それを疫学的に解明することが重要と考えられる。症例対照研究デザインを用いた。症例は2000年から2004年、組織学的に悪性リンパ腫と診断された193例、対照は当センターを受診した非がん患者で965例とした。全ての既往歴は自記式生活歴調査に基づく。関連の指標として条件付きロジスティック回帰分析によるオッズ比(OR)と95%信頼区間(CI)を用いた。胃潰瘍の既往のみが悪性リンパ腫のリスクを上昇させていることが認められた(OR=2.75, 95% CI: 1.77 - 4.28)。部位別に検討したところ、胃原発の悪性リンパ腫でOR=7.83(95% CI: 3.04 - 20.17)と高値であり、また、胃原発以外の悪性リンパ腫でもOR=1.96(95% CI: 1.16 - 3.33)と高かった。組織学的検討では、胃のMALTリンパ腫でOR=8.03(95% CI: 1.73 - 37.31)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫でOR=18.45(95% CI: 3.31 - 102.76)とともに高値であった。胃潰瘍の既往は胃のMALTリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫とともに著しくリスクを高める可能性が示唆された。

【今後の方向】

胃原発以外の悪性リンパ腫と胃潰瘍の関連も認められたが、さらなる検討が必要である。

¹⁾中央病院・血液・細胞療法部、²⁾遺伝子医療研究部、³⁾中央病院・遺伝子病理診断部、⁴⁾リサーチレジデント

<研究課題> 2 - 5

- (主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究
(副 題) 結腸がんおよび直腸がんの食事関連要因の研究

<研究者氏名>

若井建志、広瀬かおる、松尾恵太郎、伊藤秀美、栗木清典¹⁾、
鈴木勇史²⁾、加藤知行³⁾、平井 孝³⁾、金光幸秀³⁾、田島和雄

【目的・概要・進捗状況】

わが国では結腸がんの罹患率が直腸がんよりも急速に上昇している。その背景には結腸がんと直腸がんの間で、発生に関連する食事要因に相違があることも考えられる。そこで愛知県がんセンター中央病院における病院疫学研究のデータを用いて症例対照研究を実施し、結腸がんと直腸がんの食事要因を比較した。症例は新たに診断された結腸がん265例、直腸がん242例、対照は外来を受診した非がん患者2,535例である。栄養素および食品群の摂取は食物摂取頻度調査票により評価し、unconditional logistic model を用いて、多変量調整オッズ比を推定した。

その結果、結腸がんと直腸がんではかなり異なる食事要因が明らかになった。結腸がんのリスクはカルシウムおよび不溶性食物繊維の摂取量が増加するにしたがって低下し、摂取量四分位別のオッズ比は低摂取群から順に、カルシウムで1.00, 0.90, 0.80, 0.67 (trend p = 0.040)、不溶性食物繊維で1.00, 0.69, 0.64, 0.65 (trend p = 0.027)であった。一方、直腸がんのリスクはカロテンおよび肉類の高摂取とともに減少し、摂取量四分位別のオッズ比は低摂取群から順に、カロテンで1.00, 1.10, 0.71, 0.70 (trend p = 0.028)、肉類で1.00, 0.99, 0.68, 0.72 (trend p = 0.036)であった。また炭水化物の摂取が直腸がんリスクと正に関連した(摂取量四分位別のオッズ比: 1.00, 1.14, 1.42, 1.54 [trend p = 0.048])。一方、脂質摂取は女性の結腸および直腸がんのリスクと負に関連していた。本研究の結果はすでに論文として発表済である。

【今後の方向】

本研究は「日・中・韓三国で増加するがんの環境・宿主要因に関する国際比較研究」(研究課題3-1)の一環として実施されており、中国、韓国における大腸がん症例対照研究の結果とも比較し、結腸がんと直腸がんの食事要因の相違をさらに明らかにしていく。

¹⁾研修生、²⁾リサーチレジデント、³⁾中央病院・消化器外科部

<研究課題> 2 - 6

- (主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究
- (副 題) 日本人女性における大豆製品摂取の乳がん罹患リ
スクに与える影響

<研究者氏名>

広瀬かおる、岩田広治¹⁾、田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

大豆製品摂取量の多い日本人をはじめアジアの国々で、乳がんの罹患率が低いことから、大豆製品摂取と大豆に豊富に含まれるイソフラボンの予防効果が注目されている。愛知県がんセンター中央病院において研究参加同意の得られた初診患者約2,300名を対象に詳細な食事調査を行い、この調査データに基づき症例・対照研究を実施した。120項目あまりの食品の摂取頻度と1回あたりの摂取量をたずね、35種類の栄養素について1日あたりの推定摂取量を推計できる半定量食物摂取頻度調査票を使用し、栄養士が面接により調査を行った。当該調査票が回収された30歳以上の女性のうち乳がんと診断された167名を症例群、非がん患者854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、大豆製品およびイソフラボン摂取などの乳がん罹患リスクに与える影響を検討した。大豆製品、イソフラボンなどの推定摂取量を算出し、量によって3分位に分類した。最小3分位を基準とし、年齢・受診年および生殖歴関連要因で調整し、閉経前後別にORを算出した。

大豆製品摂取量の最も多い群(3分位)では最も低い群に比べて閉経前女性ではORは0.53と、危険度の低下が観察された。代表的な大豆製品である豆腐摂取量でみると、閉経前女性で1日あたり摂取量が一番多い群では51%のリスク低下が認められたが、閉経後女性ではこの傾向は認められなかった。さらに、イソフラボン摂取量では高摂取群のORは閉経前女性で0.44と統計学的に有意に低いORが観察された。閉経後女性においても統計学的に有意ではなかったがORは0.58と予防効果を示唆する結果であった。大豆中のイソフラボンであるゲニステインやダイゼインはエストロゲンと類似構造を有しており、エストロゲンレセプターに結合することによりエストロゲンの作用を抑制し、乳がんに予防的に作用することが推察される。

[今後の方向]

今回の解析結果から大豆製品およびイソフラボン摂取による乳がん予防効果が閉経前女性で著明であったが、閉経後女性において著明とする報告もあるのでさらに症例を集積し、生物学的作用機序を含めた検討を行い乳がん予防に有用な情報を提供していく予定である。

¹⁾中央病院・乳腺科部

<研究課題> 2 - 7

- (主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を
解明するための病院疫学研究

(副題) 食生活パターンと乳がん罹患リスクとの関連

<研究者氏名>

広瀬かおる、岩田広治¹⁾、田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

栄養とがんの関連性についての研究の多くは特定の栄養素や単一の食品摂取との関連を中心に検討されてきた。今回は、食生活全体のパターンに注目して解析を行った。食品の組み合わせの相互関係を検討し、乳がん予防のための食事指針作成の情報に資することを目的として、症例・対照研究を実施した。

当疫学・予防部では1988年から全新生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。今回の研究は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歳の女性を対象者とした。はじめに、非がん女性患者22,333名の質問調査票より得られた飲酒および食習慣・食品摂取項目31項目のデータを用い、因子分析(主成分)を行った。代表的な食生活パターンとして「健康志向型」、「肉・脂肪摂取型」、「日本食型」、「塩分嗜好型」の4つの食生活パターンを検出した。次に、個々人の食習慣の各パターンとの関連の度合いを示す因子得点を個人ごとに算出し、4段階に分割し、乳がん患者1,885名を症例群、先の非がん患者を対照群とし、症例・対照研究により各因子の危険度を比較検討した。

野菜・果物をよく食べ、豆腐・魚・牛乳を好む特徴とする健康志向パターンにおいては高因子得点群で統計学的に有意に低いオッズ比が観察された(因子得点最下位群を1とすると、最高4分位群のオッズ比は0.69)。その他の3つの食生活パターンでは明らかな関連は認められなかった。また、閉経後乳がんの重要な危険因子である肥満との関連性を検討するため、肥満度の指標であるBMI(Body Mass Index)で層別化して解析を行った。その結果、いわゆる肥満とされるBMIが25以上の群では脂っこい味を好み、肉類摂取の多い肉・脂肪摂取型の食生活パターンにおいて高因子得点群のORは1.58と統計学的に有意に高い結果となったが、BMIが25未満の群ではこの傾向は認められなかった。

食生活パターンが野菜・果物をよく食べ、豆腐・魚・牛乳を好むなどを特徴とする健康志向型であるほど、乳がんに対する危険度が低下する可能性が示唆された。また、肥満女性では肉類や脂っこい食べ物の摂取を控えることが乳がん予防に有用と考えられる。

[今後の方向]

同様の手法を用いて、主要な臓器のがんと食生活パターンの関連性を検討し、総合的にがん予防に有用な食生活パターンを検出することにより、がん予防のための食生活指針を提示するための情報として活用していく予定である。

¹⁾中央病院・乳腺科部

<研究課題> 2 - 8

- (主 題) がんの環境・宿主要因、および両者の交互作用を

解明するための病院疫学研究

（副題） 赤血球膜の脂肪酸分画を指標とした大腸がんの要因探索—新規開発した脂肪酸分析によるがんの要因探索—

<研究者氏名>

栗木清典¹⁾、若井建志、広瀬かおる、松尾恵太郎、伊藤秀美、鈴木勇史²⁾、金光幸秀³⁾、平井 孝³⁾、加藤知行³⁾、田島和雄

[目的・概要・進捗状況]

食生活習慣の欧米化、特に、脂質摂取の増加およびアンバランスな脂肪酸摂取によって、大腸がんは日本で増加しているものと考えられる。生体内に取り込まれて細胞膜を構成する脂肪酸のうち、アラキドン酸（AA）は cyclooxygenase-2（COX-2）によって prostaglandin E₂ などに代謝され、炎症を介して、がんの発生や進展などに関与していると考えられている。一方、青身魚に多いエイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）などの n-3 系多価不飽和脂肪酸（PUFAs）は、抗炎症作用やがん抑制作用があると報告されている。赤血球膜の脂肪酸構成レベルは、最近数ヶ月間の脂肪・脂肪酸摂取を反映するので、私たちは簡便に測定できる独自の方法を開発し、赤血球膜の脂肪酸構成レベルと大腸がんリスクの関連性を検討した。大腸がん罹患症例74名、性、年齢および受診年月をマッチ（1：3）した非がん患者221名を対象に症例・対照研究を実施した。

その結果、赤血球膜中の PUFAs およびその構成要因である AA や DHA の低レベルに対する高レベルのオッズ比（ORs）は、0.15、0.42、0.36であった。一方、大腸がんのリスク要因と考えられている飽和脂肪酸（SFAs）とその一種であるパルミチン酸では、8.20、6.46で、SFAs/PUFAs の比では、9.45と高かった。赤血球膜の脂肪酸構成レベルは、大腸がんリスクを評価する適切なバイオマーカーであることを示し、特に、青身魚に多い DHA を摂取して、赤血球膜の SFAs/PUFAs の比を低くすることで、大腸がんリスクを低下させる可能性を示唆した。

[今後の方向]

今後は、乳がんなどで同様に検討し、大腸がんの知見と比較することにより、AA、EPA、DHA によるがんの発生もしくは抑制の機序を解明する。さらに、日本人は抗炎症作用やがん抑制作用のある DHA の多い魚を多く摂取していることから、赤血球膜の脂肪酸構成レベルを指標に、日本人に最適ながんの予防方法や5-FU などの抗がん剤の副作用を低減する治療方法の開発を目指す。

¹⁾ 研修生、²⁾ リサーチレジデント、³⁾ 中央病院・消化器外科部

<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・宿主要因探索のための民族疫学研究

（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

<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、鈴木勇史¹⁾、栗木清典²⁾、高長明³⁾、Ahn Y.-O⁴⁾、Yoo K.-Y⁴⁾、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、われわれは平成12～16年度は東北アジア三国（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。平成17年度からは乳がんにも焦点を当て、研究対象地域としてソウル市周辺（韓国）、愛知県（日本）、江蘇省南京市（中国）の3か所を選び、大腸がんと乳がんの環境・宿主要因に関する比較疫学的研究を継続実施している。

大腸がんについては、三国5カ所で2,000例以上の症例と3,000例以上の比較対照群を集め、主な解析結果から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。一方、乳がんの症例対照研究も順調に進んでおり、すでに三国で600組以上の症例対照群を収集できた。

[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リスク要因の検討、および各地域の情報を統合化した解析などを試み、乳がんの要因探索のための症例対照研究を進めていく。

¹⁾ リサーチレジデント、²⁾ 研修生、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⁾ 名古屋文理短期大学、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・宿主要因探索のための民族疫学研究

（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、松尾恵太郎、千葉仁志¹⁾、妹尾春樹²⁾

[目的・概要・進捗状況]

過去25年間における環太平洋（東南アジア、東北アジア、中南米、太平洋諸島）、チベット高原（中国、ネパール）、北極圏（ノルウェー北部、ロシア北西部）などの地域に居住するモンゴロイド、さらにアンデス高地に埋葬されている1,500年前の古モンゴロイド集団の先祖（ミイラ）を対象としたヒトT細胞白血病ウイルス型（HTLV-Ⅰ）、および同型（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。その延長として平成17年度からは人類移動の歴史の中で最極北東地域と言われているグリーンランド（デンマーク

領)の東海岸に居住するイヌイット族に焦点を当てた野外調査を計画してきた。国内・外の諸事情により今年度は野外調査を実施するまでには至らなかったが、グリーンランドのイトコトミット診療所の周辺居住者約200名から書面による受諾を得た後に、約10ccの血液を採取する調査計画が進められている。これまでの野外調査に準じ、採血した血液は同診療所において血漿とBuffy Coatに分離し、全検体をノルウェーのオスロ大学の実験室に持ち帰り、ウイルス学的検索(HTLV-、HBV、HCVなど)を実施し、続いて血漿の脂肪酸分画、DNAを用いた遺伝子多型などについて検索する。

【今後の方向】

本研究はすでに終結しつつあり、モンゴロイド集団の移動史、およびHTLV-の流行軌跡を探るため、平成18～19年度には、グリーンランドのみならず、日本人の起源に深く関連していると考えられるモンゴル住民の野外調査も計画している。

¹⁾北海道大学医学部、²⁾秋田大学医学部

<研究課題> 4

(主題) 愛知県民のためのがん予防啓発技術の開発研究
(副題) 食事・運動への介入研究

<研究者氏名>

若井建志、広瀬かおる、松尾恵太郎、伊藤秀美、栗木清典¹⁾、鈴木勇史²⁾、田島和雄

【目的・概要・進捗状況】

不適切な食事・運動習慣が、がんのリスクを増加させることがこれまでの疫学研究で指摘されてきたが、生活習慣改善はかならずしも容易ではない。そこでわれわれはこれまで、乳がん患者を対象に食事・運動習慣の改善を推進する介入研究を実施し、食事・運動習慣の指導効果を示してきた。本研究は、対象者をがん患者から一般住民に変更することにより、がん予防を目的とした日常の食事および運動習慣の改善が、これら習慣についての指導により実際に可能かどうかを検証するためのものである。

研究対象者は、一般から募集した名古屋市中種区在住の35～69歳の女性97名、研究期間は平成18年4～10月の予定である。研究では48名を即時介入群、49名を3ヵ月後介入群に無作為に割付けた。即時介入群は研究開始から3ヵ月間を介入期間、その後3ヵ月間は無介入の観察期間とし、3ヵ月後介入群は研究開始から3ヵ月間を無介入観察期間、その後3ヵ月間を介入期間とする。

本研究における介入内容は、食事指導(1.野菜・果物の摂取を増やし、脂質の摂取を減らす集団指導、2.食事記録にもとづく、栄養士による個別指導、3.料理教室)および運動指導(1.加速度計の記録にもとづく、栄養士の個別指導、2.運動教室)である。介入効果の評価は、即時介入群と3ヵ月後介入群を、研究開始後3ヵ月までの時期および4～6ヵ月の時期について比較することにより行う。

主なエンドポイントは、野菜・果物・脂質摂取量(食物摂取頻度調査票により評価)と身体活動度(加速度計により評価)である。補助的なエンドポイントは、血清脂質、体重、体脂肪率、体脂肪分布、調査票による身体活動度などである。さらに介入効果の評価に資する血清成分の測定を追加する可能性がある。

【今後の方向】

6月までに即時介入群の料理教室、運動教室は終了し、7月中旬までに即時介入群への介入を継続、以後は3ヵ月後介入群に対して介入を実施し、10月に介入の効果を評価する。

¹⁾研修生、²⁾リサーチレジデント

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17年4月～平成18年3月)は14体の病理解剖を行い、開所以来の総剖検数を2,556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、血液細胞療法部の多発性骨髄腫の1例、消化器内科の膵癌の2例、放射線診断部の大腸癌の1例についてCPCを計3回開催した。

【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) 消化器癌発生の実験的研究

〔副題〕 大腸陰窩の fissioning による幹細胞分裂と発癌感受性

<研究者氏名>

塚本徹哉¹⁾, 平田暁大¹⁾, 高須伸二²⁾, 立松正衛

〔目的・概要・進捗状況〕

Min マウスは、生後10日齢をピークに放射線感受性が高く、放射線照射により小腸・大腸腫瘍発生を増強するが、40日齢以降の照射では感受性が増加しない。一方、大腸陰窩は、陰窩底部の分裂を示さない single (S) type crypt と分裂を示す bifurcating (B) type crypt に分類され、後者は大腸粘膜における fission mechanism による陰窩の増殖と密接に関係している。放射線感受性のメカニズムを解明するため、大腸陰窩を腺管分離し3次元的に解析した結果、B 陰窩の割合は、生後12日では約55%、51日では約5%と、前者で有意に多く、12日齢のX線照射群では、野生型に比べて Min mouse のB 陰窩の減少が見られた。また、細胞増殖の程度を検討したところ、BrdU 陽性細胞数は、12日齢のB 陰窩で最も少なく放射線感受性と逆相関した。以上のことから、fission mechanism による分裂途上の陰窩の腺底部の分裂細胞が、放射線感受性である可能性が示唆された。小腸陰窩では、腺底部のパネート細胞直上の細胞が幹細胞であるとの報告があるが、大腸陰窩における幹細胞の局在と数、あるいは発癌感受性細胞との関連等、未だ明らかにされていない。本研究では、大腸上皮の幹細胞の同定と陰窩内における細胞動態と陰窩の組織内における動態を解明し、発癌メカニズムの解明とその予知と予防に貢献することである。

〔今後の方向〕

B type crypt の (i) 腺底部から分岐部まで、(ii) 分岐部、(iii) 分岐部から開口部までを別々に考えると、分岐部では陰窩上皮細胞が別々の陰窩に移動し、開口部までの細胞はその準備段階にある。また、腺底部から分岐部までが BrdU labeling index が最も高いというデータが得られている。このように陰窩内の位置によって陰窩上皮細胞の細胞動態が異なることが示唆され、今後の発展が期待できる。

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〕 胃癌の形質発現 - 大腸・小腸型特異的マーカーを用いた検討 -

<研究者氏名>

溝下 勤, 塚本徹哉, 田中晴就, 小笠原尚高¹⁾, 平野尚樹²⁾, 曹 雪源³⁾, 竹中芳治⁴⁾, 立松正衛

〔目的・概要・進捗状況〕

【はじめに】 *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜では、癌部・非癌部

ともに腸型化することが知られている (Mizoshita, T., et al. *Cancer Sci.*, 97: 38-44, 2006.)。しかし、腸型形質発現における大腸型・小腸型の臨床病理学的な意義については不明な点が多い。今回は、ヒト胃癌あるいは腸上皮化生腺管において、大腸特異的な carbonic anhydrase 1 (CA1) と小腸特異的な sucrase の発現を検討した。

【方法】

1. ヒト胃癌 (粘膜内癌22例, 進行癌64例) 86例に対し HE 染色と胃型 (MUC5AC, MUC6) あるいは腸型 (MUC2, villin) マーカー, CA1, sucrase, Cdx2 の発現を免疫染色で検索した。胃型・腸型マーカーの発現により、胃癌を胃型 (G type), 胃腸混合型 (GI type), 腸型 (I type), ヌル型 (N type) に分類した。同様に、腸上皮化生腺管も、胃腸混合型 (GI-IM), 腸単独型 (I-IM) に分類した。
2. 正常幽門腺および腸上皮化生分離腺管にて、CA1・sucrase-isomaltase・MUC5AC mRNAs の発現を relative quantitative real-time RT-PCR で検討した。

【結果】

1. 86例の胃癌の中で、CA1 は2例 (2.3%) で陽性であり、Sucrase は12例 (14.0%) で陽性であった。CA1 と Sucrase の発現は、腸型形質発現および Cdx2 発現と高い相関性を示した。2例の CA1 陽性胃癌では、MUC5AC 発現が陰性であった。
2. 腸上皮化生腺管 (n=591) の中で、CA1 陽性は23.5% (n=139), CA1 陰性は76.5% (n=452) であった。CA1 陽性腸上皮化生腺管では、CA1 陰性腸上皮化生腺管に比較して、Sucrase 発現が増加し MUC5AC 発現が減少していた。分離腺管での relative quantitative real-time RT-PCR による検討の結果、I-IM では GI-IM に比較して、CA1・sucrase-isomaltase mRNAs 発現が増加・MUC5AC mRNA 発現が減少していた。

【結語】

大腸形質発現を有する胃癌は稀であった。CA1 と MUC5AC の発現は、胃癌および腸上皮化生で逆相関の関係を示し、臨床病理学的な重要性が示唆された。

〔今後の方向〕

CA1 と MUC5AC の発現を制御する因子を明らかにし、胃癌との関連を検討する。

¹⁾ 研修生 (名古屋市大・院医・臨床機能内科), ²⁾ 研修生 (東邦大・医・第1内科), ³⁾ 日本学術振興会特別研究員, ⁴⁾ リサーチレジデント (東大・院医・消化管外科)

<研究課題> 3

〔主題〕 消化器癌の細胞分化

〔副題〕 スナネズミ腸上皮化生における外分泌系および内分泌系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, 曹 雪源²⁾, 立松 正衛

【目的・概要・進捗状況】

これまで、腸上皮化生を粘液上皮細胞の形質の観点から胃腸混合型と腸型に分類する方法を提唱してきた。今回、腸上皮化生胃粘膜における内分泌細胞の分化の変動と、粘液上皮細胞および内分泌細胞の観点からみた両形質の相関について、*Helicobacter pylori* 単独感染スナズミモデルを用いて検討した。腸上皮化生発生初期には胃型内分泌細胞は増加していたが、化生進展にともなって漸減した。一方で腸型内分泌細胞は化生発生、進展にともなって漸増することが示された。腸上皮化生腺管では、粘液上皮細胞の腸型化に従って内分泌細胞の分化も変動し、両者の形質は相関することが示された。

【今後の方向】

腸上皮化生における幹細胞の動態に注目してその化生性変化を引き起こす転写因子の発現異常を解析する。

¹リサーチレジデント、²日本学術振興会特別研究員

<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、微小転移に対する高感度な診断法と効果的な治療法の組み合わせ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定量 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高度先進医療による前向き研究で明らかにしてきた。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比較して各種抗癌剤（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、実際に再発予防を目指して定量 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、定量 RT-PCR 法の実用上の課題や従来の化学療法では治癒率の改善に限界があり、また副作用もあることなど、さらなる改善をはかるため微小転移に対する新しい診断・治療法を開発する必要がある。本年度は、1）直接 mRNA 増幅法である TRC 法を新たに導入し、1時間で測定できる術中迅速遺伝子診断法を確立した。また CEA を補完できる新しいマーカー遺伝子探索のためにオリゴマイクロアレイを企業との共同研究により作成した。また治療法に関しては 1）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（糖鎖被覆リボゾーム）を構築し、その転移抑制効果を明らかにすると同時に（池原主任研究員との共同研究）、2）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播種の抑制、さらに 3）独自に樹立した肝転移巣由来 HER2 高発現胃癌細胞株を用い、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た。

【今後の方向】

作成したオリゴマイクロアレイを用いて実際の検体を測定、CEA を補完できる遺伝子を探索し、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り、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と考えられている。近年、生理的なリンパ管新生の分子機構が急速に明らかにされ、またリンパ管内皮細胞に特異的な抗体が開発され、免疫組織学的な手法により腫瘍のリンパ管新生に関する知見も集積しつつある。しかし腫瘍リンパ管の新生機構とリンパ節転移における意義に関しては依然として不明な点が多いのが現状である。本年度は、腫瘍リンパ管の新生機構に関して in vivo と in vitro の両面から検討した。1）リンパ管内皮特異抗体である D2-40 抗体や Podoplanin 抗体を用いて70例の大腸癌症例、50例の舌癌症例における腫瘍リンパ管新生を免疫組織染色に検討した。その結果、血管新生とは異なり、リンパ管はいずれの腫瘍においても腫瘍内（深部）では誘導されず、腫瘍周囲辺縁部にとどまること、VEGF-C は VEGF と異なり腫瘍ではむしろ腫瘍近傍に比べて発現が低下している事を見出し、これが腫瘍内のリンパ管密度の低下に関連している可能性を示唆した。2）これまでにヒト胸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転写酵素遺伝子 (hTERT) を導入することにより不死化リンパ管内皮細胞株 (HuTLEC) を、また 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 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可能性を明らかにした。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た調節機構が存在すること、リンパ管新生には VEGF-C 以外にも増殖を正あるいは負に制御する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 譲, 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 p363-376 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なっている。
- 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、効果的に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に成功した (論文投稿中)。さらに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、原虫感染症 (投稿中) や

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。

- 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)。また新規胃上皮分化マーカーとなる糖転移酵素を同定し、その生物学的特性を解析して報告している (Glycobiology 06 In press)

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 - 1

(主題) 肺がん等のヒト固形腫瘍の発症・進展機序の解明

(副題) 肺がん細胞における上皮成長因子受容体 (EGFR) 変異解析

< 研究者氏名 >

横山俊彦^{1,2)}, 近藤征史¹⁾, 後藤康洋^{1,2)}, 福井高幸^{2,3)}, 佐藤尚他^{2,3)}, 吉岡洋³⁾, 横井香平³⁾, 長田啓隆, 今泉和良¹⁾, 長谷川好規¹⁾, 下方薫¹⁾, 関戸好孝

[目的・概要・進捗状況]

上皮成長因子受容体 (EGFR) の阻害薬である分子標的薬ゲフィチニブは、非小細胞肺がんにおいて、腺がん、女性、非喫煙者、日本人といった特徴的なサブグループに奏功することが報告された。このサブグループの腫瘍では EGFR 遺伝子変異が高頻度に存在することが明らかとなり、遺伝子変異はエクソン 19 における小欠失およびエクソン 18 における L858R 点突然変異が変異の 90% を占めることが報告された。しかし、EGFR 変異獲得のメカニズムや肺がんにおける EGFR 変異獲得による細胞生物学的な役割、さらには分子標的薬に対する耐性獲得の機序等、未だ明らかになっていない課題も多く残されている。349 例の肺外科手術症例の肺がん組織よりゲノム DNA を抽出し、シーケンシング法にて EGFR 変異を検討した。102 例において EGFR 変異が認められた。そのうち 7 例においては double mutation が認められ、cDNA クローニングによりこれら 2 つの変異が同一 mRNA 由来であることが確認され、変異が同一アレルに生じたものであることが明らかになった。さらに、サザンブロット法にて 202 例の症例をテストしたところ 11 例において遺伝子増幅が認められ、そのうち 8 例は遺伝子変異が共存していた。以上の結果は EGFR 変異が 2nd ヒットの genetic event として点突然変異あるいは遺伝子増幅を伴い、肺がん細胞の生存・増殖のために、EGFR シグナル伝達経路の恒常的活性化状態への依存度がさらに高まる可能性が示唆された。

【今後の方向】

肺がんの治療は非小細胞肺がんと小細胞肺がんといった、古典的な病理組織型分類に基づいて行われている。しかし、非小細胞肺がんにおける EGFR 変異と分子標的薬の奏功性との相関の確立から、今後、いかに EGFR 変異を始めとするバイオマーカーが実際の治療に役立てられるのかが重要となってきた。EGFR 変異は単独で生じるものではなく、2nd ヒット変異・増幅が起きる場合があり、これらの腫瘍では EGFR のシグナル伝達経路の依存性が高まっていることが予想され、分子標的薬に対する感受性が変容している可能性も十分に想像される。このように、個別の症例における EGFR 変異およびシグナル伝達経路をより詳細に明らかにすることにより、単に EGFR 変異の有無だけでなく、遺伝子変異の場所や 2nd ヒット異常の有無、発現異常のデータを統合することにより、さらに精密な EGFR シグナルを標的とした分子標的治療を確立していきたい。

¹⁾名大・院医・機能調節内科（呼吸器内科）、²⁾研修生、³⁾名大・院医・胸部構築外科（胸部外科）

<研究課題> 1 - 2

（主題） 肺がん等のヒト固形腫瘍の発症・進展機序の解明

（副題） 肺がん細胞において過剰発現を示す miRNA クラスター miR-17-92 の同定とその機能解析

<研究者氏名>

林下陽二¹⁾、長田啓隆、立松義朗、山田英貴^{2,3)}、柳澤聖³⁾、富田秀太³⁾、谷田部恭⁴⁾、川原克信⁵⁾、関戸好孝、高橋隆³⁾

【目的・概要・進捗状況】

蛋白をコードしない noncoding RNA の生物学的な機能が注目されている。特に近年 microRNA (miRNA) は発生・分化・増殖といった重要な生物学的機能の制御に関与していることが知られてきている。そこで miRNA のヒト肺がんの発症・進展への関与を検討した。in silico の標的遺伝子予測に基づき、がんに関連する可能性が考えられる miRNA 21個を選択し、肺がん細胞株における発現をノザン法、定量 RT-PCR 法により検討し、さらに階層的クラスタリング解析を行った。遺伝子増幅はザン法により、遺伝子導入による細胞増殖への影響は MTT 法などにより検討した。

一部の miRNA が小細胞肺がんを中心に強発現パターンを示した。強発現が検出された miRNA は、類縁 miRNA を構成成分とする 3 個のパラログ miRNA クラスター由来の miRNA であった。miRNA mature form は 22 残基程度と非常に短くクロスハイブリしやすいために、miRNA 発現ベクター導入細胞の RNA を用いた Northern blot によるクロスハイブリの確認、特異性の高い pre-miRNA の定量 RT-PCR 解析、更に、クラスター内の、クロスハイブリがほとんど無い他の miRNA プロブでの Northern blot 解析等で検討した。その結果、染色体 13q31.3 の miRNA クラスター miR-17-92 が小細胞性肺がんを中心に強発現していることを確認した。このクラスターは、最近リンパ腫での遺伝子増幅が報告された C13orf25 遺伝子上に存在し、肺がん細胞株でも 2 株に著明な C13orf25 遺伝子の増幅が見られた。

また、小細胞性肺がん検体 5 例においても過剰発現を確認した。

この C13orf25 遺伝子自体も miR-17-92 と同様に強発現をしていた。そこで、次に、C13orf25 と miR-17-92 のどちらの強発現が肺がん発症進展へ関与しているか検討するため、C13orf25 の ORF 発現ベクター及び miR-17-92 クラスター発現ベクターを肺がん細胞へ導入して、細胞増殖に対する作用を検討した。その結果、miR-17-92 は肺がん細胞の増殖を促進し、C13orf25 ORF は促進効果を示さなかった。

【今後の方向】

肺がんで強発現を示す miRNA クラスター miR-17-92 が見出され、その発現亢進に肺がん組織型特異性があること、肺がん細胞の増殖制御に関与すること見出された。このクラスターに含まれる miRNA は、TGF β RII, RB ファミリー等のがん抑制遺伝子を標的遺伝子とすることが予想されていた。しかし、最近の報告では miRNA は非常に多数の標的遺伝子を制御すると考えられ、この miRNA クラスターの標的も種々のシグナル伝達系に係わる遺伝子群やクロマチン構造を制御する遺伝子群等の多数の遺伝子群が含まれている。したがって miRNA クラスター強発現により非常に広範で複雑な遺伝子発現の変化が誘導され、細胞増殖に関与していると考えられる。又この miRNA 強発現が小細胞肺がんの組織型と相関を示すことから、小細胞肺がんを中心にみられる神経内分泌分化との関連も示唆される。今後、この miRNA 強発現に伴う複雑な分子病態を解明し、肺がん発症・進展への関与を検討すると共に、がん治療に貢献できる治療標的を検討していくことが必要と考えている。

¹⁾リサーチレジデント、²⁾研修生、³⁾名大・院医・分子腫瘍、⁴⁾病院・遺伝子病理診断部、⁵⁾大分大・医・二外

<研究課題> 1 - 3

（主題） 肺がん等のヒト固形腫瘍の発症・進展機序の解明

（副題） 悪性中皮腫の細胞株樹立と遺伝子変異解析

<研究者氏名>

宇佐美範恭¹⁾、福井高幸^{1,2)}、近藤征史³⁾、谷口哲郎^{1,2)}、横山俊彦^{2,3)}、森正一⁴⁾、横井香平¹⁾、堀尾芳嗣⁵⁾、下方薫³⁾、樋田豊明³⁾、関戸好孝

【目的・概要・進捗状況】

アスベスト曝露を外的要因とする中皮腫は、今後日本において増加することが予想され、またその職業性曝露等により大きな社会問題となっている。ヒト腫瘍細胞の細胞生物学的解析には樹立された細胞株が極めて有用な研究材料であるが、現在までに中皮腫細胞株の樹立は極めて少ない。当部を中心に日本人由来中皮腫細胞株、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-8A、Y-MESO-8D の 4 株を新規に樹立し、さらに外国人由来の細胞株 6 株と合わせてその遺伝子変異・発現解析を行った。染色体 22q12 に存在する NF2 腫瘍抑制遺伝子は 4 株において不活化変異が認められた。また p16^{INK4a}/p14^{ARF} は全例においてホモザイガス欠失が認められ、そのホモザイガス欠失領域の範囲は細胞間

において差が認められ、異なる染色体 breakpoint の存在が示唆された。さらに中皮腫細胞株では N- カドヘリンの発現が認められ、E- カドヘリンの発現が低下していた。さらに Y-MESO-8A, Y-MESO-8D は同一患者由来の細胞株であり上皮様形態、肉腫様形態をそれぞれ呈し、中皮腫の2相性を反映するものと考えられた。この2株の網羅的発現解析を行ったところそれぞれに発現レベルに大きな差がある遺伝子があり、細胞形態等の phenotype に寄与する遺伝子の存在が示唆された。

【今後の方向】

樹立された細胞株に対して、さらに細胞生物学的な解析を加え、その特性を明らかにすることにより新たな予防・診断・治療法に役立てることを試みる。特にシグナル伝達系の解析やエピジェネティクス解析、網羅的発現解析、実験動物に対する移植実験等によりその細胞生物学的な特性をより明らかにする。

今後も日本人由来の中皮腫細胞株の樹立を継続し、中皮腫研究の研究基盤づくりを行う。樹立された細胞株は、当センターのみならず、他大学や研究機関に提供することを考え、日本における中皮腫研究の大きなバイオリソースとすることを目標とする。

¹⁾名大・院医・胸部構築外科（胸部外科）、²⁾研修生、³⁾名大・院医・機能調節内科（呼吸器内科）、⁴⁾病院・胸部外科部、⁵⁾病院・呼吸器内科部

<研究課題> 2 - 1

- （主 題） 肺がん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） 肝細胞がんにおける異なるエピジェネティック機構による遺伝子の不活化

<研究者氏名>

近藤 豊，関戸 好孝

【目的・概要・進捗状況】

肝細胞がんは、肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎から多段階発がん的に、そしてしばしば多中心性に発生する。近年、抗ウイルス剤の進歩により肝炎ウイルス排除による慢性炎症の抑制が、肝がんを抑制することが明らかとなってきた。しかし、肝炎ウイルスの排除不能例や、肝炎ウイルスの排除可能例であっても、過去の繰り返す慢性炎症により、既にジェネティックもしくはエピジェネティックな異常が背景肝に蓄積している場合、依然として肝がんの発生を考慮する必要がある、その制御が重要な問題となる。本研究では肝細胞がん症例に蓄積するエピジェネティクス異常のうち DNA メチル化、およびヒストン修飾異常を解析した。

肝細胞がん症例23例のがん部および非がん部における DNA メチル化異常を、5 つの遺伝子（P16, RASSF1a, Progesterone receptor(PGR), Estrogen receptor alpha (ERa), runt-related transcription factor 3 (RUNX3)）で定量的に検討した。またクロマチン免疫沈降法を用いてヒストン H3- リジン 4 (H3-K4), H3-

K9, H3-K27 の修飾変化を検討した。

がん部および非がん部のメチル化のレベルは、P16; 24% vs 3 % とがん部で特異的に高レベルのメチル化が検出されたのに対して、RASSF1a; 44% vs 20%, ERa; 44% vs 25% と 2 遺伝子では、非がん部で既に低～中等度レベルのメチル化が検出された。一方 PGR; 10% vs 7 % はがん部、非がん部ともにメチル化は低レベルだった。また肝がん細胞株による検討で、P16, RASSF1a は DNA メチル化に依存して遺伝子が不活化されているのに対して、PGR, ERa の不活化は DNA メチル化よりもむしろ H3-K27 のメチル化に依存していた。肝細胞がんの発がん過程において、遺伝子不活化機構には複数のエピジェネティックな事象が関与しており、異常をきたすタイミングも遺伝子ごとにより異なることが示唆された。

【今後の方向】

肝細胞がんにおける、異なったエピジェネティクス異常により不活化される遺伝子群の網羅的解析を現在検討中である。また、エピジェネティクス異常をきたす機構についての研究を予定している。

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 API2-MALT1 による抗アポトーシス作用：API2-MALT1 の NF- κ B の活性化を介した標的遺伝子の同定

研究者氏名

細川 好孝，鈴木 裕子，瀬戸 加大

【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、その本体として API2-MALT1 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。昨年度、マイクロアレイと分子生物学的手法を組み合わせ、API2-MALT1 の下流標的遺伝子として API2 遺伝子を同定した。今回、さらに新しい標的遺伝子の同定を目的とした。

API2-MALT1 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 FAT10 遺伝子そのものであることが示唆された。FAT10 は、ユビキチンと機能が類似しており、細胞内タンパク質を修飾することで、その機能を制御していることが知られている。また、ある種の癌組織では FAT10 の発現が著明に亢進していることが報告されている。FAT10 遺伝子プロモーターの欠失や変異導入を作製し、ルシフェラーゼ法を行った結果、ひとつの NF- κ B 結合部位が転写に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-kB 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。

私たちは、一昨年度、API2-MALT1 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の一端を明らかにしている。

[今後の方向]

今回、API2-MALT1 の下流標的遺伝子として API2 遺伝子に続いて FAT10 遺伝子を同定した。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、API2-MALT1 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 などがこ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い。我々は、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) 法で転座相手遺伝子を同定した。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。この non-coding RNA の配列中に micro RNA が存在する可能性を考え、可能性のある palindrome 配列の probe で Northern blotting を行ったが、micro RNA のシグ

ナルは得られなかった。Micro RNA のクローニングも試みたが、この non-coding RNA に合致する配列の遺伝子断片は得られなかった。本症例の遺伝子異常は、これまでに報告のない未知の転座様式であると考えられた。その本態に関しては、なお探索が必要であると考えられた。

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 / 標的遺伝子の探索

研究者氏名

田川博之, 中村栄男¹⁾, 森島泰雄²⁾, 瀬戸加太

[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。濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、成人 T 細胞リンパ腫 / 白血病のゲノム解析を行った。びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は 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、染色体 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を明らかにした。濾胞性リンパ腫では、BCL2 転座陰性群で 3 番染色体のトリソミーが特徴である。バーキットリンパ腫では 1q と 13q の増幅が特徴であり、13q の増幅の標的遺伝子は microRNA-17 cluster であった。この cluster は、バーキットリンパ腫、DLBCL などのアグレッシブなリンパ腫に比較的高頻度にみられ、Rat-1 細胞株に遺伝子導入すると Rat-1 が c-MYC と協調して transformation し、造腫瘍性遺伝子として働いていることを明らかにしている。ATLL では急性型とリンパ腫型では異なるゲノム異常パターンが見られることを明らかにし、またリンパ腫型の 7p25 の標的が CARMA1 であることを同定した。現在、リンパ腫疾患単位、サブタイプを分けることができるアルゴリズムを確立しつつあり、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、さらにこれら標的遺伝子の機能解析を行っている。

[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。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。特に microRNA-17 cluster の標

の遺伝子を同定する。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 - 1

（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-AML1型B細胞性白血病の発症機構解析

研究者氏名

都築忍，瀬戸加大

【目的・概要・進捗状況】

TEL-AML1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、このタイプの白血病の発症機序は不明である。われわれは、レトロウイルスシステムを用いてTEL-AML1を発現させた血液細胞をマウスに移植することにより、TEL-AML1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。しかしながら、このマウスは白血病を起すことなく、何らかの付加的な異常が白血病化に必要であることが示唆された。そこで、臨床検体を用いたアレイCGH解析を行って付加的異常を検索したところ、多くの症例で共通する遺伝子領域に欠失があることが見出された。

【今後の方向】

アレイCGH法で見出した遺伝子欠失の白血病化における意義を明らかにするために、TEL-AML1細胞株を用いて欠失遺伝子を入れ戻してどのような効果が得られるか検討している。最近、RNA干渉の手法を用いて特定の遺伝子の発現を止め、かつTEL-AML1を発現させるシステムを完成したので、今後はこの方法を用いてモデルマウスの作成を行っていく計画である。

研究課題 2 - 2

（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リンパ腫におけるAPI2-MALTおよびMALT1の核細胞質間移動の意義

研究者氏名

中川雅夫¹⁾，瀬戸加大

【目的・概要・進捗状況】

MALTリンパ腫に特徴的な染色体転座であるt(11;18)(q21;q21)およびt(1;14)(p22;q32)の切断点から同定さ

れたMALT1、BCL10、API2-MALT1キメラ蛋白は、MALTリンパ腫形成において重要な分子である。これらは共に細胞質内でNF- κ Bを活性化することが最近明らかになってきたが、そのほかの機能については報告がない。そこでわれわれは細胞内局在のメカニズムを研究することで、これらの重要分子がNF- κ Bのみならず、ほかの機序でも腫瘍発症に関与するのか検討することを目的とした。

Nuclear Export Signal (NES)を持つ分子は、核内で担体タンパクCRM1と結合し能動輸送によって核外に排出されることが知られている。MALT1またはAPI2-MALT1を一過性発現するCOS7細胞に対しNES特異的阻害薬であるレプトマイシンB(LMB)で処理すると、MALT1、API2-MALT1は核内に集積する。これらの分子は細胞質のみにとどまっているのではなく、能動的に細胞質と核を往復していることを初めて明らかにした。更に複数のMALT1ミュータントコンストラクトを作成することで、MALT1のC端にNESアミノ酸配列を同定した。このNESは種を超えて保存されており、MALT1の核・細胞質間移動がリンパ球の生理的機能に何らかの役割を担っている可能性を示唆している。BCL10はNESを持たないが、MALT1と共にCOS7細胞に発現させることで核外に輸送される。臨床検体において正常リンパ球のBCL10は細胞質に染色されるのに対して、t(11;18)及びt(1;14)陽性MALTリンパ腫では核にも染色されることが近年報告されている。BCL10核陽性例は進行期症例が多いと報告されており、臨床的に非常に重要な所見でありながら、その機序は全く不明であった。我々の新しい知見はMALTリンパ腫におけるBCL10の局在異常の機序とMALT1の関与を示唆しており、BCL10の細胞内局在メカニズムモデルを提唱するに至った。

【今後の方向】

MALT1、API2-MALT1の核細胞質間往復がMALTリンパ腫形成にどのように関与しているのかを検討する。また、核内でのBCL10の分子機構についても検討したい

¹⁾研修生

腫瘍ウイルス学部

研究課題

（主題） ヒトがんウイルスの増殖機構の解析

（副題） Epstein-Barr virus(EBV)溶解感染によるMCM4のリン酸化と宿主DNA複製開始阻害

研究者氏名

工藤あゆみ¹⁾，鶴見達也

【目的・概要・進捗状況】

EBV溶解感染を誘導すると宿主細胞内ではEBVゲノム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RBタンパク質が高リン酸化状態となりCyclinA(E)/CDK2の活性が維持され、EBウイルスゲノム

合成に適した S 期様細胞環境となる。しかも宿主 DNA 複製は停止する。宿主 DNA 複製開始のライセンス化は MCM 複合体を含む複製開始複合体が複製開始点付近に結合し行われている。このライセンス化は主に 4 つの標的 (ORC, Cdc6, Cdt1, MCM) がリン酸化を受けることで阻害される。MCM 複合体は MCM2-7 までの 6 つのサブユニットから構成され、特に MCM4-6-7 からなる 3 量体には DNA Helicase(unwind) 活性があることが知られる。我々は EBV 溶解感染に伴い MCM の不活化部位 (Thr-19, Thr-110) がリン酸化されることを見出した。このリン酸化は EB ウイルスが持つ BGLF4 タンパク質キナーゼによって in vitro でも HeLa 細胞での単独発現系でも起きることが解った。また、MCM4-6-7 から構成される 6 量体の持つ DNA Helicase 活性は BGLF4 タンパク質共存下では抑制された。以上から、EBV 溶解感染期に BGLF4 タンパク質が MCM4 をリン酸化することで、宿主 DNA 複製開始が阻害されることが示唆された。

[今後の方向]

BGLF4 ウイルスキナーゼの活性が EB ウイルスゲノム複製においてどのように作用するのかを知るため、BGLF4 遺伝子を欠損したリコンビナント EB ウイルス株を作成し分子生物学的、生化学的解析を試みている。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更なる因子 (RPA2 や Rad51 など) の解析を行っている。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⁾日本学術振興会特別研究員 (PD)

< 研究課題 >

- (主 題) ヒトがんウイルスの増殖機構の解析
(副 題) EBV 溶解感染に伴う宿主 DNA ミスマッチ修復蛋白質群のウイルス DNA 合成部位への集積

< 研究者氏名 >

大黒徹、鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

真核細胞では染色体 DNA 複製と連結してミスマッチ修復システムが働き、誤って取り込まれたヌクレオチドを除去修復することによってゲノムの完全性を保持している。EBV の溶解感染を誘導すると宿主 DNA 合成はおこなないが、S 期様細胞内環境になる。一方で EBV のゲノム複製は核内の限局した部

位 (replication compartments; RC) でおこなっている。EBV のゲノム複製にミスマッチ修復が連結しているのかを検討する為、EBV の DNA 複製タンパク質と宿主の複製・修復タンパク質の局在性と相互作用を解析した。

溶解感染誘導時には EBV 複製タンパク質の一つである BMRF1 タンパク質の局在性が BrdU の取り込みの部位と一致し、また EBV ゲノムの BamHI W 断片をプローブとした FISH とも共局在した。したがってウイルスゲノム複製の場である RC 全体に均一に局在することから、そのマーカーとして使用できると考えられる。宿主蛋白質 PCNA、また PCNA を DNA にロードする RF-C は RC 内に共局在することが観察された。溶解感染誘導後 BrdU でウイルス DNA を標識し、抗 PCNA 抗体で depletion assay を行ったところ、PCNA も BALF2、BMRF1 と同様に複製された EBV ゲノムと結合していることが確認された。さらに宿主細胞の DNA ミスマッチ修復に関するタンパク質群 MSH2、MSH6 (MutS α を構成)、MLH1、PMS2 (MutL α) が溶解感染の誘導により RC 内で PCNA と一致して局在することが明らかとなった。

これらの結果から EBV は溶解感染時のウイルスゲノム複製時にゲノムの integrity を高めるため、宿主 DNA ミスマッチ修復機構を利用している可能性が考えられる。

< 研究課題 >

- (主 題) ヒトがんウイルスの増殖機構の解析
(副 題) EB ウイルス BZLF1 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 BZLF1 遺伝子産物 (pBZLF1) 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 pBZLF1 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 pBZLF1 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タンパク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 pBZLF1 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 pBZLF1 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 pBZLF1 は高分子量の分画に広く分布した。この事は pBZLF1 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 pBZLF1 はモノマーの位置に分画される。この標品を再び

フォスフォセルロースで分画するとこれまでとは異なった分画に来る pBZLF1 標品が得られた。低塩濃度の条件下でしょ糖密度勾配遠心を行ったところモノマーの位置に分画された。この事は、高塩濃度下でしょ糖密度勾配遠心を行う事により他のタンパクと複合体を形成していないフリーな pBZLF1 が得られた事を示す。これまでに高塩濃度下でしょ糖密度勾配遠心、ゲルろ過、あるいは両方を組み合わせて効率良くフリーの pBZLF1 を調製する方法を検討している。

[今後の方向]

高塩濃度の条件でのショ糖密度勾配遠心あるいはゲルろ過でフリーの pBZLF1 を調製する効率は現在のところの方法をもちいてもあまり効率がよくない。最近高塩濃度下で pBZLF1 をヒドロキシアパタイトに吸着させる条件をみつけたので、こちらの方法も検討する。また pBZLF1 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 >

- (主題) ヒトがんウイルスの増殖機構の解析
- (副題) ヘルペスウイルス感染に伴う宿主転写因子 Sp1 のリン酸化機構解析

< 研究者氏名 >

岩堀聡子, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

Sp1 は様々な遺伝子の発現に関わる転写因子であり、その機能はリン酸化による制御を受けている。EB ウイルス (EBV) のゲノム上には Sp1 結合配列が存在し、ウイルス遺伝子の発現制御に Sp1 が関与していると推測される。EBV の溶解感染誘導時に Sp1 は感染後48時間からリン酸化型に相当する移動速度の遅いバンドとして検出される。さらに EBV と同じヘルペスウイルスに属するヒトサイトメガロウイルスや単純ヘルペスウイルス (HSV-1) においても、ウイルス感染後に Sp1 のリン酸化が誘導される。Sp1 のリン酸化の誘導はヘルペスウイルス感染に共通の現象であり、リン酸化による Sp1 の機能の変化はウイルスの増殖に影響を及ぼすことが推察される。そこで、変異型ウイルス及び変異細胞を利用することが可能な HSV-1 を用いて、ヘルペスウイルス感染に伴う Sp1 のリン酸化部位の特定及びキナーゼの同定を試みた。

ウイルスがコードするキナーゼ (UL13, Us3) を欠損した変異型ウイルスの感染において、リン酸化に伴う Sp1 の SDS-PAGE 上の移動度の変化は野生型ウイルスと同様であり、ウイルスキナーゼは Sp1 のリン酸化に関与しないと思われる。Sp1 の配列中には、これまでに5つのリン酸化部位が同定されており、CDK2 によって Ser59, DNA-PK により Ser220, CKII により Thr668, ERK により Thr453 及び Thr739 がリン酸化される。これらの既知のリン酸化部位が HSV-1 感染後にリン酸化されるかどうかを検討した。5つのリン酸化部位をそれぞれ Ala に置換し、N 末に FLAG タグを融合した Sp1 の発現ベクターを構築した。各発現ベクターをトランスフェクションした細胞に

HSV-1 を感染させ、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロット法により変異型 Sp1 が感染に伴ってリン酸化されるかどうかを調べた。その結果、Ser59 を Ala に置換した変異型 Sp1 の場合には、感染後24時間まで移動速度の遅いバンドは検出されなかった。従って、HSV-1 感染により少なくとも Sp1 の Ser59 がリン酸化されることが判明した。

[今後の方向]

HSV-1 感染における Sp1 の Ser59 のリン酸化に対する CDK2 の関与の有無を明らかにするとともに、感染に伴う Sp1 の活性の変化を検討する。以上の HSV-1 を用いた実験により明らかにされたことを EBV 溶解感染の場合に還元するため、Sp1 のリン酸化特異抗体を作製し、EBV 溶解感染に伴う Sp1 のリン酸化部位を同定していきたいと考えている。

< 研究課題 >

- (主題) ヒトがんウイルスの増殖機構の解析
- (副題) 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：ヒトサイトメガロウイルス前初期遺伝子の TATA box 下流には TBP-TFIIB-DNA 複合体を安定化する配列が存在する

< 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) 感染症は造血幹細胞移植および臓器移植後の重篤な合併症 1 つであり、その予防が求められている。HCMV 前初期遺伝子 IE2 は HCMV の増殖に必要な転写因子であり、その適当な発現は産生されるウイルス量に大きな影響を与える。一方、IE2 遺伝子プロモーター TATA box 下流には IE2 蛋白が結合して自身の転写を抑制する crs (cis repression signal) が存在する。その配列を変異させた組換えウイルスを作成してその配列の *in vivo* での役割を検討した。

HCMV 全長がクローニングされた BAC DNA を用いて、大腸菌内での相同組換え法によって組換え BAC DNA を作成し、感染許容細胞に遺伝子導入して組換えウイルスを作成した。

crs を変異させた HCMV では野生型と比較して感染初期の IE2 遺伝子発現が低下し、ウイルス DNA の複製も低下した。*in vitro* での解析の結果この配列は TBP-TFIIB-DNA 複合体を安定化することにより、感染初期には促進 signal として、IE2 蛋白が産生された後には抑制 signal として働くと考えられた。

[今後の方向]

さらに HCMV の増殖に必要な制御領域とその制御機構を決定する。そして、その部位を欠損した組換えウイルスを作成することによって、癌の化学療法後や造血幹細胞移植後に再活性化しない HCMV 弱毒ワクチン候補株の作成を目標とする。

<研究課題>

(主題) EB ウイルス陽性癌の治療を目指した基礎的研究

(副題) EBV BZLF1 蛋白質と p53 との相互作用

<研究者氏名>

白田典子, 佐藤好孝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。その機構を解析するため, 本研究では EBV BZLF1 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。

既に我々は, BZLF1 蛋白質は p53 の DNA 結合ドメインを介して結合すること, さらに BZLF1 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を明らかにしている。

この抑制メカニズムを明らかにするため, まず BZLF1 蛋白質が p53 の四量体形成に影響を及ぼすかどうかを crosslink assay によって検討したところ, BZLF1 蛋白質の有無で p53 の四量体形成に変化は観察されなかった。次に p53 標的配列への結合能に対する影響を解析するため gel shift assay を行った。すると, BZLF1 蛋白質は TBP の結合を阻害することなく p53 の DNA への結合を強めるという, レポーターアッセイの結果と相反する結果が得られた。よって, BZLF1 蛋白質は p53 の転写活性を阻害するだけでなく, 他の機構によっても制御されていることが示唆された。

[今後の方向]

p53 転写活性抑制の分子メカニズムを明らかにするため, BZLF1 蛋白質が他の基本転写因子に与える影響や *in vitro* 転写系での p53 依存的転写への影響を検討すると共に, 他のがんウイルスと同様な p53 の分解による制御が行われているかどうかを検討していきたい。

¹⁾ 研修生

<研究課題>

(主題) 抗がんウイルス療法の開発

(副題) HSV アンプリコン / HF10 ウイルス mixture の作製法の開発

<研究者氏名>

Lumin Zhang¹⁾, 鶴見達也

[目的・概要・進捗状況]

近年, oncolytic ウイルスは様々な癌に対する抗癌療法の一つとして注目されている。HSV-1 系 HF クローン10は親 HSV-1 系 HF から由来した弱毒 oncolytic ウイルスで, UL53, UL54 および UL55 の二つの完全なコピー, 一つは完全で, もう一つは

部分的なコピーの UL52 および UL56 の二つの不完全なコピーを含む HSV 遺伝子の欠損がある。さらに, HF10 は免疫系が正常なマウスで結腸癌, 乳癌など腹膜に散布された腫瘍を破壊することができ, また, 臨床応用では乳癌患者の治療のため HF10 を使用し, 抗癌療法としてその有効性が証明されている。

しかしながら, oncolytic HSV の一連の研究から oncolytic ウイルス単独では全ての腫瘍細胞を破壊するのに十分ではない事がわかっている。したがって抗癌活性のある外来遺伝子を発現するアンプリコンベクター (HSV amplicon) と HF10 を組み合わせることによって, 相乗効果が期待できる。HSV amplicon は, 広い感染宿主域, 大きなサイズの遺伝子の導入, 高い形質導入効率, および構造の容易さなど多くの利点を持ち, *in vivo* アプリケーションにおける遺伝子導入に利用されている。

本研究はヘルパーウイルスとして oncolytic HSV HF10 を利用し, 高い titer の外来遺伝子を搭載する HSV-1 amplicon を作成する方法を開発した。まず COS 細胞に HSV oriS と packaging signal および GFP 遺伝子をもつ amplicon DNA をトランスフェクションし, 24時間後に low MOI で HF10 を感染させた。その結果, COS 細胞は細胞融合を起こし, amplicon とヘルパーウイルスの比率 (A/H > 1) の高いウイルス mixture を得ることができた。次に, さらに A/H 比の高いウイルス mixture を得る為に, 3つの細胞株: COS 細胞, Vero 細胞および Vero2-2 細胞にウイルス mixture を low MOI で感染させたところ, やはり COS 細胞で A/H > 10 をこえるウイルス mixture を得ることができた。しかし COS 細胞では HF10 のウイルスタイターは高くないので最後に A/H > 10 を超えるウイルス mixture を Vero 細胞に low MOI で感染させることによって A/H 比が高く且つ HF10 のウイルスタイターの高いウイルス mixture を得ることに成功した。さらに, 外来遺伝子の発現を HSV 感染細胞にだけ限定する為に, huamn サイトメガロウイルス MIE プロモーターの代わりに, HSV-1 ICP8 プロモーターを外来遺伝子の上流に導入した。ICP8 プロモーターによって導入した遺伝子の発現は HF10 が複製していた細胞に制限されることが確認された。これらのシステムは抗癌ウイルス療法の研究に大きく貢献すると考えられる。

¹⁾ 研修生

発がん制御研究部

<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) 新規 keratin 結合蛋白質である trichoplein と Fbf-1 の機能解析

<研究者氏名>

猪子誠人, 鄧鵬¹⁾, 杉本昌彦²⁾, 林裕子, 小栗崇史²⁾, 佐宗幹夫³⁾, 宇治幸隆³⁾, 清野透⁴⁾, 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、がん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。そして、これまでに私共は keratin8/18 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。また、その後の解析により、trichoplein は中心体にも存在することが免疫染色および生化学的に明らかになった。それで、細胞レベルでの trichoplein の機能解析をするために、HeLa 細胞に対して RNAi を用いて trichoplein の発現レベルを下げその影響を観察した（遺伝子ノックダウン）。その結果、trichoplein をノックダウンした細胞では形態が round-up することが明らかになった。現在は、この現象と trichoplein を結ぶ分子機構について検討中である。また一方で、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、trichoplein と同様に TPHD (Trichohyalin and Plectin Homology Domain: trichohyalin および plectin のそれぞれに 20 - 30% の相同性をもつ domain) を有する蛋白質 Fbf-1 (Fas binding factor-1) について、これを keratin8/18 に結合する蛋白質として同定した。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。特に極性化した細胞である MDCK 細胞、A549 肺がん細胞および様々な上皮組織では、細胞間接着部位に Fbf-1 が濃縮することが示されたので、この場所が細胞間接着装置のどこに位置するのかについて、免疫電顕で詳細に検討中である。さらに細胞レベルでの Fbf-1 の機能解析を行うために、これを恒常的にノックダウンした細胞を作成した。その結果、この細胞では keratin filament の細胞間接着部位への結合が障害されていることが明らかになった。現在は、この細胞における細胞間接着分子の変化についてさらに検討中である。

【今後の方向】

trichoplein および Fbf-1 に関して以下の解析を行う。

ノックダウン細胞およびノックアウトマウスの表現型の解析を行う。

他分子間との相互作用を理解するため、トランスキエーションミュータントを用いて細胞工学的な解析を行う。

trichoplein および Fbf-1 に結合する蛋白質を検索し、上記の mutant が示す表現型の原因となる分子機構を明らかにする。

¹⁾レジデント、²⁾研修生、³⁾三重大学、⁴⁾国立がんセンター

<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プレイン (Trichoplein) と命名した。トリコプレインは、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分子である ERBIN や Densin-180 が細胞接着に関与していることを見出した。現在、ERBIN の形質膜移行に関与する制御機構の解明に取り組んでいる。

【今後の方向】

細胞骨格蛋白質や細胞極性を制御する分子とがん化・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。これらの分子と相互作用する新規蛋白質の同定を推し進め、浸潤転移に関係する新しい分子メカニズムを明らかにし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) 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¹⁾, 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 (Plk1) 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。

我々は、Aurora-B の細胞内局在を制御する INCENP に注目し、研究を行ってきた。その結果、1) INCENP と Aurora-B の結合によって、Aurora-B の自己リン酸化反応および INCENP のリン酸化反応が引き起こされること、2) そのリン酸化反応が Aurora-B の活性化に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。今年度、我々は、INCENP が Aurora-B 以外にも分裂期の開始に必須な Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1, Cdc2) によってリン酸化されることを明らかにし、Cdk1 によるリン酸化部位として INCENP のスレオニン 59 (T59) とスレオニン 388 (T388) を同定した。INCENP のリン酸化部位に対する抗リン酸化 (ペプチド) 抗体を用いた解析から、Aurora-B によるリン酸化反応は分裂期を通して認められるのに対し、Cdk1 によるものは分裂前期から中期 (INCENP が動原体に局在する時期) にも引き起こされていた。次に、Far-Western 法を用いた解析から、INCENP の T388 のリン酸化反応依存性に、INCENP が Plk1 と結合することが判明した。細胞内でこのような結合が起こっているかを検証するため、RNA 干渉法を用いて、INCENP をノックダウンした。その結果、INCENP をノックダウンした細胞では、分裂前期から中期の Plk1 の動原体局在が障害されていた。この表現型は、INCENP の野生型 (WT) を発現させると回復するが、T388 をリン酸化されないアラニンに置換した INCENP 変異体 (T388A) では回復しなかった。また、このような T388A 細胞では、分裂中期での染色体の分断が遅延し、結果として、分裂中期から後期への進行が著しく障害されていた。これらの結果は、Aurora-B および Plk1 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り、がんにおける染色体不安定性のメカニズムを考えるうえで有用な知見といえる。

[今後の方向]

近年のプロテオミクスを用いた解析から、INCENP は、Cdk1 や Aurora-B によるものと考えられる部位のほかにも、多くのリン酸化部位が存在することが判明した。これらリン酸化部位のなかで Plk1 のコンセンサスと考えられるものが含まれていることから、Plk1 が INCENP に結合し、さらに、INCENP をリン酸化している可能性を想定している。これらの可能性を検証することを通じて、このリン酸化反応が染色体動態に与え

る影響を明らかにするとともに、最終的には、がんにおいてこの制御機構に異常が認められるかについて検討する。

¹⁾国立がんセンター, ²⁾重井医学研究所, ³⁾研修生, ⁴⁾名古屋大学, ⁵⁾Max-Planck Institute

<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) Chk1 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, 山口知也¹⁾, 清野透²⁾, 友野靖子³⁾, 十津川剛¹⁾, 松村文夫³⁾, 中西真⁴⁾, 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 Chk1 に注目し、研究を行ってきた。これまで、Chk1 は、紫外線の照射時および DNA 合成阻害時に、ATM/ATR によってそのセリン 317 (S317) およびセリン 345 (S345) がリン酸化され、活性化することが報告されている。

我々は Chk1 が分裂期においてもリン酸化を受けていることを見だし、その部位としてセリン 286 (S286) およびセリン 301 (S301) を同定した。この部位をリン酸化しうるプロテインキナーゼの検索を in vitro で行ったところ、分裂期開始キナーゼである Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1, Cdc2) およびスピンドルチェックポイントに関与するとされている p38 によって同部位がリン酸化されうることが判明した。つぎに、細胞内における酵素を同定するため、それぞれのキナーゼ阻害剤を用いた検証を行ったところ、Cdk1 の阻害剤で特異的にそのリン酸化反応が消退することが判明した。以上の結果から、Cdk1 が分裂期特異的に Chk1 をリン酸化していることが明らかになった。

[今後の方向]

最近、我々は、この部位のリン酸化反応は紫外線の照射時およびハイドロキシウレア等による DNA 合成阻害時に引き起こされていることが判明した。つまり、我々の見いだしたリン酸化反応はチェックポイントシグナル機構において普遍的な意味をもつ現象といえる。現在、このリン酸化反応の生理的意義を検索するため、1) 同部位のリン酸化反応を認識する抗リン酸化抗体の作製、および、2) 同部位をリン酸化されないアラニンに置換した Chk1 変異体を薬剤誘導性に発現できる細胞の確立を行っている。これらの解析により、同部位のリン酸化反応

の生理的意義を明らかにするとともに、がんにおけるチェックポイント機構の異常を明らかにしていく予定である。

¹研修生，²国立がんセンター，³重井医学研究所，⁴三菱化生研究所，⁵Rutgers University，⁶名古屋市立大学

<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) ビメンチンのセリン 82 のリン酸化状態を特異的に持続させる分子機序の解明

<研究者氏名>

小栗崇史¹⁾，猪子誠人，島礼²⁾，井澤一郎，有村奈利子¹⁾，山口知也¹⁾，稲垣直之³⁾，貝淵弘三⁴⁾，菊池九二三⁵⁾，稲垣昌樹

[目的・概要・進捗状況]

がん細胞において、細胞骨格の異常はその特徴的な形態や異常な細胞分裂の原因となり得る。ビメンチンは細胞骨格蛋白質の一つであり、その構築の変化はリン酸化により起こることが知られている。その現象の一つとして、アストロサイトにおいては PGF_{2α}あるいはイオノマイシン刺激を行うとビメンチンのセリン38およびセリン82のリン酸化がカルモジュリン依存性キナーゼを介して誘導されることが知られていた。

私共はこのセリン82のリン酸化が、セリン38のそれより長く持続することを発見した。そしてその理由として、PP1c ホスファターゼのこれらに対する脱リン酸化反応がセリン82に対しては起きにくいことを明らかにした。

[今後の方向]

正常個体内においてビメンチンがリン酸化される生理的意味を明らかにしていく。そのために、マウス ES 細胞のビメンチンゲノムに対しジーンターゲティングを行い、最終的にリン酸化部位変異ビメンチンをノックインしたマウスを作成・解析する。つまり、ビメンチン上のリン酸化され得るアミノ酸残基を全てアラニン置換し、リン酸化の入らないビメンチンのみを発現するマウスを作成・解析する。

¹研修生，²宮城県立がんセンター，³奈良先端科学技術大学，⁴名古屋大学，⁵北海道大学

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) 正常上皮細胞に発現するシアリルルイス a 類縁糖鎖の粘膜ホメオスタシス維持作用についての研究

<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 E- 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。一方、正常の腸管上皮細胞においては、シアリルルイス a 糖鎖はほとんど発現せず、これにさらにシアル酸が結合したジシアリルルイス a 糖鎖が強く発現していることを明らかにしてきた。更に検索したところ、ジシアリルルイス a 糖鎖は E- セレクチンとは結合しないが、免疫系細胞のもつシアル酸認識蛋白質 Siglec-7 および Siglec-9 の特異的リガンドであることが判明した。Siglec-7 および Siglec-9 は免疫抑制性のリセプターであることから、正常の腸管上皮細胞のジシアリルルイス a 糖鎖はこれらと結合することによって、腸管粘膜での免疫系細胞の過度の活性化を抑制していると考えられた。Siglec-7/9 を発現し、ジシアリルルイス a 糖鎖陽性の上皮細胞と相互作用する粘膜内細胞は主として単球- マクロファージ系統の細胞であることが明らかになった。末梢血単球が Siglec-9 強陽性 /Siglec-7 弱陽性であるのに対して、粘膜内マクロファージは Siglec-7 強陽性 /Siglec-9 弱陽性となり、粘膜内における単球- マクロファージ系細胞の分化に伴って Siglec 分子の交代が起こると考えられた。

[今後の方向]

以上から正常の上皮細胞のジシアリルルイス a 糖鎖は、正常腸管粘膜の免疫学的ホメオスタシスを維持する機能を持っていると考えられる。細胞の癌化に伴ってジシアリルルイス a 糖鎖は消失し、腫瘍マーカー糖鎖であるシアリルルイス a 糖鎖 (CA19-9) が増加する。これに伴って正常腸管粘膜の免疫学的ホメオスタシスは失われ、癌細胞に出現したシアリルルイス a 糖鎖が E- セレクチンとの結合により転移を引き起こしていくと考えられた。ジシアリルルイス a 糖鎖による正常腸管粘膜の免疫学的ホメオスタシス維持の機構とその破綻のメカニズムについて今後検討する必要がある。

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異常シアル酸含有ガングリオシドの発現誘導とその機構

<研究者氏名>

殷 軍¹⁾，井澤峯子，宮崎敬子²⁾，小池哲史¹⁾，陳 国云²⁾，北島 健³⁾，神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

G_{M2} ガングリオシドは従来からヒト癌治療のターゲットの一つと考えられており、ヒト型抗体の臨床応用も試みられている。一方、ヒトはシアル酸のうち N- グリコリル型のシアル酸を合成する酵素を欠損して居ることが知られている。ガングリオシ

ドの含有するシアル酸は、正常ヒトでは *N*-アセチル型のシアル酸のみであり、治療のターゲットとしても *N*-アセチル型のシアル酸を有する G_{M2} が対象とされている。

ほんらいヒトには存在しないはずの *N*-グリコリル型のシアル酸が、ヒト癌にはしばしば出現することが知られ、古くから癌関連糖鎖の一つと考えられてきた。このことから我々は、*N*-グリコリル型のシアル酸を有する G_{M2} はさらにがん特異性が高いターゲットとなる可能性があると考え、そのヒト大腸癌における発現を特異抗体 MK2-34 を用いた免疫組織染色にて検索した。その結果、臨床症例において 37.5% (6/16 例) において *N*-グリコリル G_{M2} が癌組織に強陽性であった。また培養大腸癌細胞においても陽性株が見いだされた。免疫組織染色では予想に反して一部の非癌大腸上皮細胞にも弱陽性像が見いだされた。

さらに我々はその出現機構を検討した。10%FCS を含む通常の培養条件下で *N*-グリコリル型シアル酸を発現するヒト大腸癌細胞株を選び、この細胞を FCS 不含合成培地にて長期間培養すると、*N*-グリコリル型シアル酸は消退した。一方、*N*-グリコリル型シアル酸を合成する CMP-NeuAc hydroxylase 遺伝子を同じ細胞株に導入したところ、FCS 不含合成培地による培養でも *N*-グリコリル型シアル酸は消退しなかった。このことから、ヒト大腸癌細胞株はなんらかのシアル酸トランスポーターの働きで培地中の FCS の *N*-グリコリル型シアル酸を活発に取り込んでいると考えられた。

通常の培養条件下で *N*-グリコリル型シアル酸を発現せず、正常の *N*-アセチル型シアル酸のみを発現する細胞株を選び、これを低酸素下で培養したところ、細胞表面に *N*-グリコリル型シアル酸を含有するガングリオシドが出現した。このとき、低酸素によりシアル酸トランスポーター sialin の mRNA が著明に誘導された。このことから、低酸素による sialin の発現増大により培地中の *N*-グリコリル型シアル酸の取り込みが亢進して、これにより細胞表面に *N*-グリコリル型シアル酸を含有するガングリオシドが出現したと考えられた。以上の仮説を証明するため、この細胞株に sialin 遺伝子を導入して強制発現させたところ、通常の培養条件下でも細胞表面に *N*-グリコリル型シアル酸を含有するガングリオシドが出現した。

【今後の方向】

以上の結果は低酸素によってシアル酸トランスポーターの遺伝子発現が誘導され、これにより異常シアル酸が癌細胞表層に発現されることを示す。*N*-グリコリル型シアル酸は免疫原性を持つので、癌の免疫治療のターゲットの候補となり得ると考えられる。今後治療への応用を検討する必要がある。

¹研修生、²科学技術振興機構 (JST)、³名大・生物機能開発利用研究センター

<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) セレクチンおよびシグレクの特異的リガンドとしてのシアル酸含有硫酸化糖鎖とシアル酸部分の環状化反応の研究

<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⁾、森山昭彦⁴⁾、神奈木玲児

【目的・概要・進捗状況】

我々は以前シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖 (Kimura, N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4530, 1999) をセレクチンのリガンドとして同定した。本糖鎖は末端にシアル酸を持ち、かつ糖鎖中の GlcNAc が 6-硫酸化されている。シアル酸と硫酸基を持つこうしたユニークな糖鎖は、セレクチンのみならず他の糖鎖認識分子のリガンドとなっている可能性があると考え、今回はシアル酸と硫酸基を持つこうした糖鎖がシアル酸認識蛋白質のファミリーとして知られるシグレクのリガンドとして働くかを検索した。糖転移酵素遺伝子を導入したヒトリンパ球系細胞で、シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖を発現する株と、シグレク 2 およびシグレク 7 との反応性を解析したところ、有意の結合が観察された。特異性の異なる数種のシアリダーゼ処理によるこの結合の阻害から、シグレク 2 は 2 → 6 結合のシアル酸を、またシグレク 7 は 2 → 3 結合のシアル酸を必要とすると考えられる結果が得られた。同時に対照として用いた L-セレクチンは、既知のごとく 2 → 3 結合のシアル酸を要求した。また、細胞を NaClO₃ 存在下に培養して糖鎖の硫酸化を阻害したところ、対照として用いた L-セレクチンもまた NaClO₃ によって結合が著明に低下し、E-セレクチンの結合は影響されず、既知の結果が確認された。同じ条件下で、シグレク 2 およびシグレク 7 との結合性は NaClO₃ によって著明に低下し、これらの糖鎖認識蛋白質も硫酸化を要求すると考えられた。シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖は、これを発現する細胞をイオノマイシンや A23187 などのカルシウムイオノフォアで刺激すると速やかに末端シアル酸が 5 ~ 10 分ほどの短時間の間に環状化し、シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖の発現が消退してサイクリックシアリル 6-スルホルイス × 糖鎖が出現し、細胞はこれによりセレクチンとの結合性を失う。Thapsigargin, cyclic ADP-ribose, ryanodine などを用いた実験から、シアル酸の環状化はイノシトール 3 リン酸 (IP3) を介したカルシウムイオンの細胞内動員によって起こることが明らかになった。TPA でも同様の環状化反応が引き起こされる。この反応は可逆的であって、通常の培養条件下ではサイクリックシアリル 6-スルホルイス × 糖鎖を発現する細胞を TPA 阻害剤の staurosporine 存在下で培養すると、サイクリックシアリル 6-スルホルイス × 糖鎖が消退して、シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖が出現した。共焦点顕微鏡による観察で、シアリル 6-スルホルイス × 糖鎖発現細胞がカルシウムイオノフォア刺激でサイクリックシアリル 6-スルホルイス × となる反応は細胞膜近傍で起こることが明らかになった。また、通常の培養条件下でサイクリックシアリル 6-スルホルイス糖鎖を発現する細胞においては、シアリル 6-スルホルイス糖鎖が trans-ゴルジ体で合成され、細胞膜への移行時にサイクリックシアリル 6-スルホルイス糖鎖へ変化する事が明らかになった。同様のすみやかなリガンド活性の変化が、シグレク 2 およびシグレク 7 との結合においても起こっているかを、細胞をカルシウムイオノフォアで刺激した際の結合能の変化を指標にして検索したところ、シグレク 2 およびシグレク 7 との結合性は、カルシウムイオノ

フォア刺激により、L-セレクトインの場合とほぼ同様の速度で消退した。健常人ヒト末梢白血球においては、シアリル 6-スルホリス糖鎖やサイクリックシアリル 6-スルホ糖鎖は顆粒球にはきわめて弱く、リンパ球系細胞の一部と単球に発現している。いずれの細胞集団においても、不活化リガンドであるサイクリックシアリル 6-スルホ糖鎖のほうがリガンド活性のあるシアリル 6-スルホリス糖鎖よりも多数の細胞によって発現されていた。

【今後の方向】

以上から、シアリ酸と 6-硫酸基を併せ持つ糖鎖は、セレクトインとともに一部のシグレクの特異的リガンドとなっており、シアリ酸の環状化によってその結合活性が調節されていると考えられる。ただし、硫酸基の意義についての実験結果が NaClO₂ 処理だけであるのは不十分であり、今後、シアリ酸と 6-硫酸基を併せ持つ糖鎖がシグレクの特異的リガンドとなっていることを確認するため、糖転移酵素遺伝子導入細胞を用いたリガンドの再構成実験を行い、またさらに、糖鎖リガンド特異的な抗体による阻害実験を行う必要がある。また、ヒト白血球におけるサイクリックシアリル 6-スルホ糖鎖およびシアリル 6-スルホリス糖鎖を発現する細胞集団の特徴について、またその病態的意義について解析する必要がある。

¹研修生、²京大医、³科学技術振興機構（JST）、⁴名古屋市・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>

井澤寧子、Fathy El-Fasakhany¹⁾ 内村健治²⁾、Steven.D.Rosen²⁾ 門松健治³⁾、村松 喬⁴⁾、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-スルホリス x と同定した。この合成酵素として硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1 と HEC-GlcNAc6ST の二者が候補とされる。GlcNAc6ST-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-GlcNAc6ST 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。GlcNAc6ST-1 と HEC-GlcNAc6ST 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-スルホリス 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。この残存ホーミングは、抗 6-硫酸化糖鎖抗体によってまったく減少しなかったことから、非 6-硫酸化型のリガンドによって引き起こされると考えられた。一方、ワイルドタイプマウスにおいては、抗硫酸化糖鎖抗体によってホーミングはほぼ完全に阻害され、これは正常マウスのほとんど全ての糖鎖リガンドは 6-硫酸化型であることを示す。これらの成績から、ダブルノックアウトマウスにおける残存ホーミングを媒介している糖鎖リガンドは、二種の糖転移酵素遺伝子のダブルノックアウトによって人工的に生じたものと考えられた。

【今後の方向】

GlcNAc6ST-1 と HEC-GlcNAc6ST とはいずれも L-セレクトインリガンド、シアリル 6-スルホリス 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。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、ダブルノックアウトによって、正常マウスにはない糖鎖リガンドが人工的に生じたためと考えられた。

¹研修生・日本学術振興会、²UCSF、³名大医、⁴愛知学院大

<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） セレクトインの糖鎖リガンドの律速合成酵素フコース転移酵素 VII 遺伝子の転写調節

<研究者氏名>

陳 国云¹⁾、平岩 望、長田啓隆²⁾、神奈木玲児

【目的・概要・進捗状況】

セレクトインを介した細胞接着は悪性細胞の血管外浸潤および血行性転移に深く関与する。セレクトインの特異的糖鎖リガンドであるシアリル Le^x 糖鎖の合成においては、フコース転移酵素が重要な役割を演じる。今回我々はヒトリンパ球系細胞のフコース転移酵素 VII 遺伝子（*FUT7*）の転写調節機構を解析したので報告する。ヒト *FUT7* の 5' 調節領域には転写因子 T-bet、GATA-3、MZF-1、SP1 が結合し、GATA-3 は転写抑制的に、他の転写因子は促進的にはたらくことが染色体免疫沈降法およびレポーターアッセイにより明らかになった。T-bet およびドミナントネガティブ体の GATA-3 の co-transfection によって *FUT7* の転写は著明に亢進し、細胞表面のシアリル Le^x 糖鎖発現も誘導された。さらに T-bet、GATA-3、CBP/P300、HDAC が複合体を形成し、これが *FUT7* の 5' 調節領域に結合して転写を調節していることが明らかになった。以上の知見は、T-bet が Th1 細胞、GATA-3 が Th2 細胞にそれぞれ特異的な転写因子とされていることから、悪性リンパ球系細胞における *FUT7* の発現調節

のみならず、ヒト正常T細胞における *FUT7* の発現調節機構の解明にとっても重要な知見であると考えられる。

[今後の方向]

セレクトインの特異的糖鎖リガンドは、Tリンパ球においてはTh1細胞に強く発現し、Th2細胞には弱いことが知られている。今回の実験結果は、これがセレクトインの糖鎖リガンドの律速合成酵素フコース転移酵素Ⅶ遺伝子の転写調節によっていることを明らかにした。今後、こうした転写調節の悪性疾患における病態的意義を解析する必要がある。

¹科学技術振興機構 (JST) , ²分子腫瘍学部

< 研究課題 > 3 - 3

- (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) シアル酸環状化をもたらすシア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]

我々は、セレクトインを介したがん細胞の接着能を低下させる、シアル酸の新規な環状構造 (サイクリックシアル酸) を見いだした。サイクリックシアル酸生成に携わる酵素 (シアル酸シクラーゼ) 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 Le^x を発現させた HEK-293T 細胞にサイクリックシアリル 6- スルホ Le^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 HUT-102 細胞に突然変異を誘発させて得られた G159 抗原欠損変異株に安定発現させたところ、G159 抗原の発現にともない、前駆体のシアル酸含有糖鎖の発現が減少した。単離した遺伝子がコードする酵素に His-tag をつけて HEK-293T 細胞に発現させた可溶性分子を上清から精製し、ELISA 法でシアル酸シクラーゼ活性を検討したところ、カルシウムイオン要求性が認められた。また、methyl- β -cyclodextrin 処理後に固定した HUT-102 細胞の免疫染色により、単離した遺伝子がコードする酵素の局在が細胞表層に粒子状に観察された。

[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) 全トランスレチノイン酸 (ATRA) による神経芽細胞腫、SH-SY5Y 細胞株のアポトーシス誘導機

構の解明

< 研究者氏名 >

萩原和美¹⁾, 京ヶ島 守, 村手 隆^{1,2)}, 小泉恵子¹⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

ATRA は急性前骨髄性白血病の治療薬として広く使われている。今回我々は、神経芽細胞腫、SH-SY5Y 細胞株に対する ATRA のアポトーシス誘導機構を検索した。培地中に仔牛血清 (FCS) が存在すると、ATRA により SH-SY5Y は増殖を止めて分化し、FCS 非存在下では ATRA により細胞死が誘導された。この死がアポトーシスであることは DNA ラダーの検出と、Caspase-3 の阻害剤によって細胞死が抑制されることにより確認された。さらに、Bcl-2 の減少と Bax の増加も同時に観察された。非常に興味深いことに、セラミドの分子種に ATRA 依存性の変化が認められ、また、FCS 非存在下でのみ、ATRA 依存性にセラミドの蓄積が見られた。これらの結果は、FCS の有無により ATRA のセラミド代謝への影響が大きく異なること、Bcl2 や Bax の遺伝子発現の変化とセラミド代謝の変化との共同作業により、SH-SY5Y のアポトーシスが速やかに進行する可能性を示唆しており、比較的副作用が少ない ATRA を中心とした抗神経系腫瘍の治療体系を構築する際の重要な知見と考えられる。

[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十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により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。FCS 非存在下での ATRA 添加によるセラミド蓄積の要因および、蓄積するセラミドの分子種を現在検索中である。

¹研修生, ²名大医

< 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) がん細胞表層における新規ヘパラン硫酸 (アカラン硫酸様) 糖鎖の出現

< 研究者氏名 >

後藤嘉子, 京ヶ島 守, 鈴木喜義¹⁾, 宮浦修一¹⁾, 神奈木玲児

[目的・概要・進捗状況]

PDGF や VEGF 等に結合しその活性を増幅するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) 糖鎖はがん化に伴い、増殖、浸潤、転移といった細胞特性に重要な影響を与えられとされる。しかし従来はマトリックス型 HSPG や、細胞膜結合型 HSPG で

あってもシンデカン，グリピカンといったコア蛋白質発現に関する研究が主で，細胞表層 HS 糖鎖自体の研究は乏しく，その主原因は多様な分子サイズを持ち複雑に硫酸化された HS 糖鎖の構造解析が極めて困難な事による。この解決手段とし，異なる HS 糖鎖構造を認識する複数の単クローン抗体を用いた FACS による細胞表層 HS 糖鎖発現プロファイリングを扁平上皮がん，大腸がんを用い試みた。GlcA-GlcNAc（認識抗体 NAH46）は全ての細胞で強発現しているのに対し，GlcNS/GlcNAc（10E4），GlcNH₂（JM403）は細胞により発現量が異なった。加えてアカラン硫酸様構造 IdoA2S-GlcNAc，IdoA-GlcNAc を認識する新規抗体を用いたところ，大腸がんの一部で反応性が見られた。以上からがん細胞表層の HS 糖鎖発現には多様性があることが判明した。

【今後の方向】

新規のヘパラン硫酸鎖がヒト癌細胞に見いだされたことはきわめて興味深いことである。我々は以前にヘパラン硫酸鎖を担うコア蛋白質の一つであるシンデカン 4 が低酸素により増加し，また，ヒト癌で発現が増大していることを見いだしており，また最近，他の研究室からヘパラン硫酸鎖を担うコア蛋白質の一つであるグリピカン 3 もまた癌で発現が増大していることが報告されている。癌においてはこうしたコア蛋白質の変化に，さらにヘパラン硫酸糖側鎖の変化が加わっていると考えられ，今後詳しく検索する必要がある。

¹⁾生化学工業

<研究課題> 5

（主題） 自己免疫と腫瘍との相関

（副題） 免疫系におよぼす抗 IL-2 モノクローナル抗体投与の効果

<研究者氏名>

田口 修，西岡明子

【目的・概要・進捗状況】

新生時期マウスの生後 3 日に胸腺を摘出しておく（Tx-3）と複数の臓器に自己免疫病が自然発症する。自己免疫病のエフェクター T 細胞が活性化するとき IL-2 を必要とするか，あるいはエフェクター T 細胞の活性化を抑制する Treg 細胞が IL-2 を必要とするかを Tx-3 マウスを用いて検討した。動物は（C57BL/6 x A/J）F1 マウスを用いた。出生当日を 0 日とし，生後 3 日に胸腺を摘出した（Tx-3 マウス）。体内の IL-2 の作用を不活化するために抗 IL-2 モノクローナル抗体（S4B6）を生後 4 日から週 2 回屠殺直前まで腹腔内に投与した。マウスは 2 ヶ月で屠殺した。Tx-3 マウスでは涙腺炎，卵巣炎や前立腺炎が高率に発症する。Tx-3 マウスに抗 IL-2 モノクローナル抗体を投与しておくと Tx-3 マウスに自然発症する涙腺炎等の自己免疫病の発症頻度にあまり変動はなかったが，8 割弱のマウスに新たに脾臓炎の発症がみられた。この炎症は腺房細胞が標的となったおり，ランゲルハンス島には障害が見られなかった。

無処置マウスに抗 IL-2 モノクローナル抗体を投与しておいたのではどの臓器にも自己免疫病は認めなかった。しかしながらこの抗体投与マウスの末梢の T 細胞をヌードマウスに注射しておくで高率に自己免疫病の発症が見られた。

以上からエフェクター T 細胞が活性化するには，IL-2 を必要としないが，Treg 細胞の維持のためには IL-2 が不可欠であることが強く示唆された。

【今後の方向】

ラットの胸腺原基をヌードマウスに移植しておくで，マウス由来の T 細胞免疫系をもつマウスが作製される（TG ヌードマウス）。このマウスには多発性に自己免疫病が発症する。その原因はラットの胸腺ではマウス抗原特異的な Treg が産生されないためである。TG ヌードマウスは Treg を持たないために，移植腫瘍細胞を拒絶する傾向にある。抗 IL-2 モノクローナル抗体を投与して Treg の働きを抑制してあるマウスは TG ヌードマウスのように自己免疫病は発症しない。抗 IL-2 モノクローナル抗体投与マウスでも抗腫瘍効果があるかを検討したい。

腫瘍免疫学部

<研究課題> 1 - 1

（主題）腫瘍抗原の免疫学的，分子生物学的検索

（副題）上咽頭癌局所に浸潤した EBV 溶解感染抗原に特異的な T 細胞の解析

伊藤嘉規，太田里永子¹⁾，不破信和²⁾，岡村文子¹⁾，谷田部恭³⁾，中村栄男⁴⁾，葛島清隆

【目的・概要・進捗状況】

上咽頭癌の治療として現在は放射線療法，化学療法等が施行されているが，さらに治癒率を向上させるために新規の治療法開発が望まれている。上咽頭癌においては Epstein-Barr virus（EBV）潜伏感染抗原の発現は EBNA1，LMP1 あるいは LMP2 などに限られている。EBNA1 は細胞傷害性リンパ球（CTL）の標的になりにくいと考えられているため，LMP1 や LMP2 を標的抗原として免疫療法の基礎的および臨床的研究が進められている。また，これらの潜伏感染蛋白の他に，上咽頭癌においては一部の溶解感染蛋白も発現していることが報告されている。上咽頭癌組織内には T 細胞（tumor-infiltrating lymphocyte；TIL）が浸潤していることが知られており，腫瘍特異的な傷害活性を持つ T リンパ球の存在が期待される。平成 17 年度は上咽頭癌局所より TIL の樹立を試み，その EBV 抗原特異性を検討した。

【方法】病理組織で EBER in situ hybridization 陽性または血漿中の EBV-DNA（Taqman-PCR）陽性の症例を EBV 陽性上咽頭癌と診断した。生検で得られた腫瘍組織の一部を IL-2 存在下で培養し，TIL を樹立した。TIL の表面抗原を flow cytometry 法にて検討した。標的抗原として，EBNA1，LMP1，LMP2，BARF1，BRLF1 及び BZLF1 の mRNA を自己由来 CD40 活性化 B 細胞に導入し，TIL の応答を ELISPOT アッセイにより解析した。

TILが反応した症例では、末梢血リンパ球のEBV抗原特異的T細胞頻度と比較検討した。

【結果及び考察】EBV陽性上咽頭組織5例よりTILを樹立した。TILの表面抗原は3例でCD8⁺T細胞が優位、2例でCD4⁺T細胞が優位だった。CD8⁺T細胞が優位に増殖した1例において、溶解感染抗原BZLF1に対するCD8⁺T細胞の応答が検出された。BZLF1に特異的なCD8⁺T細胞頻度は、末梢血リンパ球中よりもTILにおいて優位に多く認められた。この症例ではBZLF1に応答するCD8⁺T細胞が腫瘍組織内に集積していることが示唆された。

【今後の方向】

上咽頭癌局所において、EBV溶解感染蛋白のBZLF1に特異的なCD8⁺T細胞が集積していることが明らかとなった。BZLF1は放射線や抗癌剤などでEBV感染細胞に発現が誘導されることが知られている。今後は、BZLF1に特異的なCD8⁺T細胞（CTL）が、γ線や抗癌剤などで処理をしたEBV感染細胞を傷害できるか、実験的検証を進める予定である。

¹⁾リサーチレジデント、²⁾中央病院・放射線治療部、³⁾中央病院・遺伝子病理診断部、⁴⁾名古屋大学大学院医学系研究科・臓器病態診断学

<研究課題> 2 - 1

（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

<研究者氏名>

赤塚美樹、鳥飼宏基¹⁾、谷田部恭²⁾、宮崎幹規¹⁾、川瀬孝和³⁾、辻村朱音⁴⁾、田地浩史⁵⁾、森島泰雄⁶⁾、葛島清隆、高橋利忠⁷⁾

【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療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）効果をもたらす標的抗原であり、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を報告したが、本年度はこれらのmHAを認識する細胞傷害性T細胞（CTL）の傷害能と標的となるカテプシンH蛋白質の発現との関係についてさらに検討した他、HLA-B44拘束性の新規mHAを同定した。

【カテプシンHの発現とCTLへの感受性】

2名の予後不良の急性骨髄性白血病の患者の移植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クローンを得た。これらのCTLをプローブとし、発現クローニング法により、mHAをコードしている遺伝子として染色体15q25に存在する*cathepsin H*（CTSH）を同定した。

リアルタイムPCRでの発現解析の結果、造血系細胞以外にも広範な発現が認められた。このmHAはライソゾームに局在するとされるisoform aにのみコードされていたため、種々の組織から得た細胞内におけるカテプシンHの発現分布をライソゾームに存在するHLA-DRとの二重染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。CTLで傷害されない線維芽細胞や腎尿細管上皮、腎がん細胞などにおいても、ライソゾームにカテプシンHの中～強度の発現が認められ、CTLへの感受性との相関はなかった。また細胞内の抗原プロセッシングに関わる各種の酵素やトランスポーターの発現程度を検討したが、CTLへの感受性の差を説明できるものはなかった。現在RNA干渉法で責任分子の同定を進めている。

【HLA-B44拘束性の新規mHA】

HLA-B44拘束性のCTLクローンは上記のA*3303拘束性のCTLを樹立した患者より個別に樹立された。連鎖解析法では染色体18q21領域までmHA遺伝子の存在部位を絞り込めたが、同定には至らなかった。発現クローニング法にて、同部に存在するESTのsplice variantにコードされるポリペプチド上にmHAエピトープが同定された。このEST遺伝子のイントロンに存在する一塩基多型がvariantの生成をコントロールしていた。このESTの発現は骨髄性白血病細胞と一部の活性化した血液細胞に限局しており、mHAのみならず白血病特異抗原としても利用できる可能性があり、現在検討を進めている。

【今後の方向】

過去に同定した造血器細胞特異的mHAを認識するCTLによる養子免疫療法を推進する（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。

¹⁾研修生、²⁾中央病院・遺伝子病理診断部、³⁾名古屋大学大学院医学系研究科・機能構築医学・細胞工学、⁴⁾中央病院・レジデント、⁵⁾中央病院・血液細胞療法部、⁶⁾中央病院・副院長、⁷⁾総長

<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）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（CTL）が認識するCTLエピトープの臨床応用性の検討

<研究者氏名>

赤塚美樹、森島聡子¹⁾、那波明宏²⁾、伊藤則雄³⁾、水野美香³⁾、丹羽慶光³⁾、中西透³⁾、葛島清隆、高橋利忠⁴⁾

【目的・概要・進捗状況】

Human papillomavirus（HPV）16型は子宮頸がん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。我々は昨年度、日本人に多いHLA-A24によって提示される

HPV-16型のE6に由来するCTLエピトープを同定した。本年度は同定したE6₄₉₋₅₇エピトープの臨床的な有用性を明らかにするために、prospective studyとして複数のHLA-A24を有する子宮頸がん患者の末梢血T細胞を本ペプチドで刺激して、特異的なCTLがどれくらい効率よく誘導できるか検討した。

【特異的CTLの誘導方法と検出頻度】子宮頸癌またはcervical intraepithelial neoplasia (CIN)と診断され、子宮摘出術または円錐切除術を受ける予定のHLA-A24陽性患者より全血を採取した。CD8陰性分画より樹立した活性化CD40-B細胞にE6₄₉₋₅₇ペプチドをパルスした抗原提示細胞にて、CD8陽性細胞を3回刺激しT細胞株の樹立を試みた。病変部の切除組織または擦過細胞から分離したDNAを用いてHPV-16, 18, 33型が検出可能なPCR-RFLP法を行い、感染HPVの遺伝子型を決定した。PCR産物が検出されなかった場合、病理標本のパラフィン切片からDNAを採取し感染の有無を判定した。

20例中7例がHPV-16陽性、13例がHPV-16陰性（HPV-16以外の型）であった。全ての患者において、未刺激の末梢血中ではテトラマー陽性細胞は検出限界以下であった。他方、HPV-16陽性の7例中5例、HPV-16陰性の13例中5例で刺激後にテトラマー陽性細胞（CD8⁺T細胞中の0.02 - 68.1%）が認められるようになった。

【考察】病変部でHPV-16が検出された患者7例中5例で*in vitro*での刺激によって特異的T細胞の誘導が可能であったことから、末梢血中にprecursor T細胞が存在すると考えられた。一方、病変部がHPV-16陰性でありながら特異的T細胞が誘導可能であった症例は、HPV-16感染の既往があったが、その後宿主免疫能により排除された可能性等が考えられた。これまで、E6はE7に比較して抗原性が弱く、免疫療法の標的として有望視されなかったが、HPV-16感染患者のほとんどでE6特異的CTLの誘導が可能であることが明らかとなった。

【今後の方向】

CTL誘導効率を改善するための培養条件の検討。

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。

本エピトープを使用したワクチンや養子免疫療法等の臨床応用への可能性の検討。

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科・機能構築医学・細胞工学，

²⁾名古屋大学大学院医学系研究科・産婦人科，³⁾中央病院・婦人科，⁴⁾総長

<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） 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，赤塚美樹，葛島清隆，高橋利忠²⁾

【目的・概要・進捗状況】

マウスThymus-Leukemia (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-2K^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等の問題点も明らかとなり、これら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。現在 (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。また、移入したCTLが生体内で長期生存するのに必要と予想されるサイトカイン (IL-2, 7, 15等) の同時投与の効果についても検討を開始した。

【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⁾総長

中央実験部

<研究課題>

（主題） 食道がん、頭頸部腫瘍の分子遺伝学的研究

（副題） ミトコンドリアゲノムDNAのX線照射により誘発される変異

<研究者氏名>

組本 博司, 齋藤 典子, 石崎 寛治

[目的・概要・進捗状況]

ミトコンドリアは真核細胞内に存在する小器官であり, 細胞のエネルギー生産の場として知られている。また, アポトーシスにも関与しており, 細胞の機能にとって重要な器官である。昨年度までに食道がんにおいてミトコンドリアゲノム DNA (mtDNA) に高頻度に変異が生じており, 核ゲノムとは独立にゲノム不安定性が生じている事を示唆する結果を得た。そこで本年度は食道がん培養細胞株 (KYSE-30, 110, 410) 及び正常培養細胞株 (SuSa / T-n) に X 線を照射し, mtDNA に生じる変異を解析した。

それぞれの細胞に生存率が 0.01 となるように X 線を照射した後, 出現したコロニーを単離し, それぞれのコロニーから DNA を抽出した。変異の指標となる D310 領域は C 塩基の繰り返しであるが, この領域の PCR 産物を GeneScan にかけて, C 塩基のくり返し数が変化した割合を解析し, 変化の割合が 30% 以上のコロニーを変異コロニーと判定した。その結果, 非照射の場合 D310 領域の変異コロニーはどの細胞株についてもほとんど見られなかった。X 線を照射した場合, SuSa / T-n, 及び KYSE-410 では変異コロニーはほとんど増加しなかったものの, KYSE-30 では約 10%, KYSE-110 では約 30% で変異コロニーが見られ, 非照射と比較して有意に増加していた。最近, p53 タンパク質がミトコンドリアにも局在し, mtDNA の安定性に関与するという報告がなされたが, KYSE-30, 110 では p53 に変異を持つことが明らかとなっており, p53 が mtDNA の変異誘発に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また, 4977 塩基のコモン欠失を多く持つコロニーの割合は SuSa / T-n, 及び KYSE-30, 110 では X 線の照射によって減少していたが, KYSE-410 では増加していた。これはコモン欠失を多く持つ細胞に X 線の照射によって別の変異が生じると生存できなくなり結果として見かけ上 X 線の照射によってコモン欠失を多く持つ細胞の割合が減少した可能性がある。

[今後の方向]

mtDNA の安定性に対する p53 タンパク質の関与を明らかにするため, p53 遺伝子に変異の存在する細胞株 KYSE-30 および KYSE-110 に p53 wild type の遺伝子を導入し, 放射線照射による mtDNA の変異を多く持つ頻度を解析する。

<研究課題>

(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重粒子線被曝に対する影響研究

<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, 重粒子線がヒト細胞へ与える影響を検討するために,

hTERT 遺伝子導入による不死化細胞株を樹立し研究を進めている。正常細胞株および AT 細胞株を使用し, LET の異なる炭素線 (135MeV/u, LET: 50keV/μm) および鉄線 (500MeV/u, LET: 約 200keV/μm) 被曝後の影響を, 生存率, 微小核の形成率, 2重鎖切断 (DSB) の指標である γH2AX のフォーカス形成により検討した。また, 生存率に対する重粒子線の生物効果比 (RBE) は X 線被曝後の結果をもとに算出した。生存率は, 両細胞株とも X 線被曝の結果と比較し重粒子線被曝において高い致死効果を示した。また, 正常細胞株の生存率は, LET が高い鉄線においてより高い RBE を示した。しかしながら, AT 細胞株では, LET の違いによる明確な RBE の差が見られなかった。微小核の形成率では, 両細胞株とも X 線被曝の結果と比較して重粒子線被曝において多くの微小核を有する細胞が観察された。重粒子線被曝後の γH2AX のフォーカス形成は, 線量依存的に増加していたが, 形成される個数は LET に反比例していた。次に, DSB の修復効率について検討した。正常細胞株では, 炭素線被曝と比較し鉄線被曝により生じた DSB の修復効率が悪くなっていたが, 40 時間後にはほぼ DSB が修復されていた。しかしながら, AT 細胞株では LET の違いによる修復効率に差はなく, 被曝後 40 時間経過した後も多くのフォーカスが残っており, 重粒子線により生じた DSB が修復されていないことが示唆された。

正常細胞株では, 高 LET ほど修復に時間がかかることから, LET が高くなるほどより “大きな” DSB が生じ, そのために生存率に差が現れるのではないかと考えられる。また, AT 細胞では, ある程度以上の大きな DSB の修復ができないために LET の依存性がないのではないかと考えられる。

[今後の方向]

癌治療の選択肢として重粒子線治療が行われるようになってきたが, 未だ正常細胞株に対する影響は不明な点が多い。また, AT ヘテロの人々が 100~200 人に 1 人の割合で存在することから, これらの人々が重粒子線治療を受けた場合どのような影響があるのかを調べる必要がある。