

肺癌の遺伝子変化と悪性度の解析

《研究の概要》

ヒト肺癌の早期発見、より良い治療を目的として、“ヒト肺癌の遺伝子変化と悪性度の解析”を行い、以下の成果を得た。

1) 肺癌の発生・進展に関わる a. 未知の遺伝子、b. 既知の遺伝子変化、c. テロメラーゼ活性の検索を行い、それらと悪性度に関係した臨床病理学的特徴との関連を検討：

a. 未知の遺伝子：第 17 番染色体短腕 p13.3 領域の 2 ケ所（いずれも p53 遺伝子よりテロメア側）（土屋）、第 2 番染色体長腕 q33 及び第 21 番染色体長腕 q11.1-q21.1 領域（横田）、及び第 3 番染色体短腕 p21.3 領域（高橋）に、未知の癌抑制遺伝子の存在が示唆された。この内 17P、及び 2q と 21q 上の候補遺伝子は悪性度と関連する可能性がある（土屋、横田）。b. 既知の遺伝子変化：1) 肺腺癌に於いて K-ras 遺伝子変異は悪性度、予後とは関連がなかった（土屋）。2) サイクリン D1 遺伝子の発現消失は外科切除後の予後と有意な関連があり、多変量解析においても病期とともに有意な予後因子であった（高橋）。c. テロメラーゼ活性：肺癌では 8 割以上の症例でテロメラーゼ活性が認められ、ことに P53 あるいは RB 遺伝子異常にヘテロ接合性の消失を認めた症例で高活性例が有意に多かった。また、細胞診検体では判定量的テロメラーゼ活性の評価が癌診断の向上に寄与すると考えられた（山木戸）。

2) 多段階発癌過程における遺伝子変化の順序：非小細胞癌では、発生初期に 3p、13q、17p の欠失が生じ、進展・悪性化の過程で 2q、9p、18q、22q の欠失、p16 遺伝子の異常及びマイクロサテライト DNA の複製異常が生じるのに対し、小細胞癌では 3p、5q、13q、17p、22q の欠失が発生初期から蓄積しており、p16 遺伝子の異常、マイクロサテライト DNA の複製異常は発生・進展過程を通じて稀であった。即ち、両組織型で発生・進展のメカニズムが異なると思われた（横田）。

3) 転移・増悪と関係する血管新生因子 (VEGF) の発現：肺癌切除例の血管の形態計測、VEGF mRNA 発現の対比から、VEGF の発現が大口径の異常血管の誘導に関与している可能性を見いだした。そこで、VEGF 産生か抑制された肺癌細胞株を作成し、ヌードマウスに移植し、腫瘍形成能、血管誘導能を観察中である（深山）。

4) p53 で誘導される細胞増殖抑制因子の解析：発現が微量な、あるいは組織特異的に発現する P53 標的遺伝子を単離する新しい方法を開発し、幾つかの新規 P53 標的遺伝子を単離した。この内、GML 遺伝子はアポトーシス誘導に重要な役割をはたしており、癌細胞では GML の発現を失うことが抗癌剤に対する耐性を獲得することを明らかにした（時野）。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所屬機関及び地位	分 担 研 究 課 題
土屋 永寿	埼玉県立がんセンター 研究所病理部部長（兼） （財）癌研究会癌研究 所病理部嘱託研究員	肺癌の遺伝子変化と臨床病理所見
山木戸 道郎	広島大学医学部呼吸器 内科教授	肺癌の進展に関わる遺伝子変異
志関 雅幸	東京女子医科大学血液 内科助手（平成6年度）	転移に関わる癌抑制遺伝子
横田 淳	国立がんセンター研究 所生物学部部長（平成 7,8年度）	転移に関わる癌抑制遺伝子
高橋 隆	愛知県立がんセンター 研究所超微形態学部	肺癌の進展と遺伝子発現異常
深山 正久	自治医科大学病理部教 授	肺癌遺伝子変化と転移
時野 隆至	東京大学医科学研究所 助教授	ヒトゲノム解析センターシーケンス解析 分野 p53 及び細胞増殖抑制因子の解析

研 究 報 告

I 研究目的

肺癌は難治癌の一つで、男性の悪性新生物では死亡の第一位でありしかも、わが国では男女とも発生率、死亡率とも増加している。この為、個々の腫瘍の悪性度（良悪の判定までも含めた広義の悪性度）を的確に判定し、早期発見、および、治療法の改善が急務となっている。これまで、ヒト腫瘍の悪性度の判定は主として形態観察で行われてきたが、限界があった。近年、癌の発生・増悪はいくつかの遺伝子変化が積み重なって起きることが明らかとなった。このため、悪性度と関連した遺伝子が同定できれば、従来の形態観察に加えて、遺伝子検索を行うことにより、癌か否か、より悪性度の高い癌かどうかを的確に判断し、それぞれに対応した適切な治療を行うことが可能となる。

我々は、ヒト肺癌の早期発見、より良い治療を最終目的として、“ヒト肺癌の遺伝子変化と悪性度の解析”を行う。具体的な目標として、1) 肺癌の発生・進展に関わる a. 未知の遺伝子の検索、 b. 既知の遺伝子変化（p53、RB、p16、HIC-1、サイクリン D1、その他）の検索（土屋、横田、高橋）、c. テロメラーゼ活性の検索（山木戸）、などを行い、それらと悪性度に関係した臨床病理学的特徴（前癌病変、組織像、転移の有無、病理病期などとの関連を検討し、2) 多段階発癌過程における遺伝子変化の順序（横田）を明らかにし、3) 転移・増悪と関係する癌内血管新生及び血管新生因子の発現を検索し（深山）、さらに 4) p53 によって発現が誘導される遺伝子群を単離し機能解析し、癌との関わりについて検討

(時野) し、肺癌の悪性度に関係する遺伝子を明らかにする。

以下、研究者順に研究内容を記述する。

(土屋)

II 研究計画及び材料と方法

1. 腺癌に於ける遺伝子変異と組織像や予後との関係を明らかにするため、K-ras 遺伝子変異と病理組織像及び病期との関係を検討した (平成 6 年度)。

検索材料は手術切除された肺腺癌 120 例である。腺癌は WHO 分類に従い亜型分類したほか構成細胞の形態により鋸釘型、円柱型、多角形型、混合型、杯細胞型に分類した。K-ras 遺伝子検索は腫瘍組織と正常組織の凍結材料より DNA を抽出し、コドン 12、13、61 の変異を mutant-allele-specific amplification (MASA) 法を用いて検索した。

2. 扁平上皮癌の前癌病変検出の可能性を、dysplasia-carcinoma シーケンスを経て発生した扁平上皮癌例につき、p53 免疫染色を用いて検討した (平成 7 年度)。

検索材料は元クロム酸塩工場従業員の気管支上皮異形成病変 3 症例 4 病巣である。初回生検時は 2 病巣が高度異形成、2 病巣が軽度異形成で、経時的観察により (7 から 84 ヶ月後) いずれも生検で扁平上皮癌と診断されている。軽度異形成の一病巣は初回生検材料のみ、他の 3 病巣は初回および癌の生検材料を p53 の抗体で免疫染色を行い光顕的に観察した。

3. 第 17 番染色体短腕 (17P13.2) の p53 遺伝子よりもテロメア側に肺癌と関係する癌抑制遺伝子が存在する可能性、その候補遺伝子と Ad の悪性度との関係、さらに、YNZ22 領域から単離された HIC-I 遺伝子が標的遺伝子か否かを検討した (平成 7-8 年度)。

検索材料は切除肺癌 145 例 (Sq35、Ad110) である。癌及び正常肺組織より DNA を抽出し、11 個のマーカーを用いて染色体欠失 (LOH) を検索した。マーカー名及びセントロメアからテロメア側にむかった配列順序は、TP53、D17S513、EN03、S1566、S379、YNZ22、S525、S1574、ABR、S926、S643 である。HIC-I 遺伝子は mRNA の発現量を RT-PCR 法で測定した。病理病期は stage I と stage II 以上の 2 群に分け、候補遺伝子の存在が考えられた欠失領域の LOH との関係を検討した。その際、p53 遺伝子異常の影響を除くため、肺癌標本の p53 免疫染色を行い、陽性例は p53 遺伝子変異を有する症例として検索対象から除外した。

III 研究成果

1. 肺腺癌に於ける K-ras 変異はコドン 12 しこのみ認められ、その頻度は 10% (12/129) であった。腺癌の細胞亜型では、杯細胞型で全例 (6/6) に変異が認められ、その変異率は他の細胞型より有意 ($p < 0.05$) に高かった。K-ras 変異と腺癌の組織亜型および病理病期との間には有意な関係は認められず、また喫煙者と非喫煙者の間でも K-ras 遺伝子の変異率に差を認めなかった。

2. 異形成病変の免疫染色の結果、高度異形成→癌の一病巣はともに p53 陰性であったが他の 3 病巣 (高度異形成→癌、軽度異形成→癌、軽度異形成) はいずれも p53 陽性で、異形成巣は全て基底から表層に向かって上皮の 1/3 以上が陽性であった。

3. a) 17p 上の新たな癌抑制遺伝子の検索 : TP53 から S1574 にかけて 53-67%、および S926 で 55% の高頻度欠失を認めた。TP53 から S1574 の欠失地図を作成した結果、TP53 の

領域以外に、S379、YNZ22、S525 の範囲が共通欠失領域であった。以上より、S379 から S525、および S926 の 2 ケ所に肺癌抑制遺伝子が存在する可能性が得られた。

b) 腺癌の病理病期と S379、YNZ22、S525、及び S926 の欠失との関係を、p53 染色陰性の 69 例で検討した。S379 と S926 の欠失頻度は stage I よりも stage II で有意に ($p < 0.05$) 高かった。即ち、同領域の癌抑制遺伝子は癌の悪性度と関係している可能性が得られた。

c) 癌組織に於ける HIC-I 遺伝子 mRNA の発現量は、半数の症例で正常の肺組織の 50% 以下に減少していた。しかし、欠失との関連は認められなかったことから、HIC-I 遺伝子は目的の標的遺伝子ではないと考えた。

IV 考察

1. 腺癌の細胞型との関係では杯細胞型で変異率が高かったが、粘液を産生する卵巣癌や、mucous hyperplasia を示す膵臓の膵管でも高頻度の変異が報告されている。以上より、胞体内に粘液を多量に有するような高円柱状細胞からなる癌の発生には、臓器を問わず K-ras 遺伝子の変異が関係している可能性が考えられた。

K-ras 遺伝子変異を有する癌は予後不良との報告があるが、我々の結果では stage と関係が認められず、変異の有無と予後は関連がないと思われた。

2. これまで、扁平上皮化生や軽度異形成の内でも如何なる特徴を有するものが癌に成るかは不明であった。今回の検索結果から、扁平上皮癌高危険度群の認定には p53 染色の陽性細胞の割合が重要であり、その基準は、基底から表層に向かって上皮の 1/3 以上が陽性であるもの、とすべきと考えられた。

3. 17p 上の p53 遺伝子のテロメア側に、少なくとも 2 つの異なった新たな癌抑制遺伝子が存在する可能性が得られた。一つは S379、YNZ22、S525 の領域、他は S926 の領域である。このうち、S379 と S926 に癌抑制遺伝子が存在する場合には、同遺伝子は肺腺癌の増悪と関連する可能性がある。S379 上の癌抑制遺伝子は astrocytoma の増悪と関係する可能性が指摘されている。S965 上の抑制遺伝子と悪性度との関連は今回はじめて指摘されたものである。肺癌において、p53 遺伝子異常と予後との関連は統一した見解が得られていないが、その理由として、これらの領域の候補癌抑制遺伝子の影響を考慮せずに解析していたことが一因とも考えられる。

(山木戸)

II 研究計画及び材料と方法

1. 肺癌組織のテロメラーゼ活性と、臨床病理学的特徴や遺伝子変異との関係を比較検討し、テロメラーゼ活性が生物学的悪性度の指標になるか否かを検討した(平成 6-7 年度)。

2. 細胞診検体でテロメラーゼ活性と紺胞診の判定との比較検討をおこない、癌の早期診断におけるテロメラーゼの有用性を検討した(平成 7-8 年度)。

癌組織は 136 例(小細胞癌 11 例、非小細胞癌 125 例)の肺癌を、細胞検体は、肺癌患者由来細胞診検体 34 例および非癌症例 128 例を対象とした。テロメラーゼ活性の測定は、組織および細胞より蛋白を抽出し、TS プライマー、CX プライマーを用いた telomerase mediated elongation-PCR を行い、電気泳動後テロメラーゼに特異的な 6 塩基ラダーの検出を行った。また、1 アッセイに用いる抽出液の希釈系列を作るとともに内部標準に対す

るラダーのシグナルの比を算出し、テロメラーゼ活性を半定量的に評価した。

更に、86 症例の肺癌において、テロメア長変化と p53、Rb 遺伝子変化の関係を検討した。テロメア長は DNA を制限酵素 Hinf I で消化後、(TTAGGG)₄ をプローブとしてサザンブロット法にて測定した。p53 遺伝子は変異と LOH を、Rb 遺伝子は LOH を検索した。

III 研究成果

1. 原発性肺癌手術組織におけるテロメラーゼ活性は、標準法の 100 倍希釈抽出液を用いた測定では、小細胞癌で 81.8% が陽性であるのに対し、非小細胞癌では 28.8% のみ陽性であった。さらに、p53 および Rb 癌抑制遺伝子の両方にヘテロ接合性の消失 (LOH) を認めた症例に高活性例が多かった。一方、病理病期、腫瘍の分化度、最大径とテロメラーゼ活性との関連性はみられなかった。即ち、肺癌におけるテロメラーゼの活性化は、組織型 (小細胞癌) と遺伝子変異の有無と相関した。

2. 細胞診検体における検討では、肺癌患者で細胞診陽性と判定された擦過細胞診・胸水細胞診検体中での検出率は 44% (11/25)、陰性と判定された検体でも 33% (3/9) に活性を認めた。一方、肺癌が盃定された症例から得られた細胞診検体や気管支肺胞洗浄液細胞での陽性率は 5.5% (7/128) であった。非癌疾患における偽陽性をさらに鑑別するために、これら細胞検体におけるテロメラーゼ活性をシグナル強度により半定量的に評価したところ、肺癌患者由来のテロメラーゼ活性陽性細胞診検体ではそのほとんどが強いテロメラーゼ活性 (不死化癌細胞 10 個の活性の 2 倍以上) を示したのに対し、非癌患者由来テロメラーゼ活性陽性検体のシグナルは全例弱かった。

IV 考察

小細胞癌や非小細胞癌で p53 および Rb 遺伝子の欠損を伴う症例では、テロメラーゼ活性を獲得した細胞のみが選択されて増殖を続けている可能性があることを明らかにした。即ち、テロメラーゼ活性レベルを定量評価することにより、強活性の検出は臨床検体における不死化した癌細胞の存在を示す補助診断として応用可能であり、また、遺伝子異常の蓄積を反映する生物学的悪性度の指標となる可能性が示された。

(横田)

II 研究計画及び材料と方法

1. 肺非小細胞がん (NSCLC)、及び小細胞がん (SCLC) における遺伝子異常について検討した (平成 6-7 年度)。

切除された NSCLC 組織/正常肺組織ペア 45 検体 (Stage I 原発巣 23 例、脳転移巣 22 例)、および、切除もしくは剖検の SCLC 組織/正常肺組織ペア 37 検体より抽出された DNA を材料とした。染色体欠失は、LOH をサザン法及び PCR 法で、マイクロサテライト DNA の複製異常は PCR 法で検出した。

2. p53 及び p16 がん抑制遺伝子導入実験を行った (平成 7-8 年度)。p53cDNA を組み込んだテトラサイクリン誘導発現ベクター、及びトランスアクチベーターベクターを、N417 細胞に導入し、p53 蛋白発現量の調節可能なクローンを得た。p16cDNA を組み込んだ発現ベクター-pcDNA3 を A549 細胞に導入し、p16 蛋白を stable に発現するクローンを得た。細胞

周期の解析及びアポトーシスの検出は、FACS を用いて行った。

3. SCLC 細胞株 H82 及び NSCLC 細胞株 Ma17 のホモ欠失領域の解析を行った（平成 8 年度）。

H82 のホモ欠失は Arbitrarily-primed PCR ゲノムフィンガープリント法により検出され、コスミドクローンよりなるコンテイングによってカバーされた。エクソントラッピング法によって単離されたエクソン様 DNA 断片をプローブとして、ヒトの脳、胎児心臓、及び HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、PLC-L 遺伝子全長 cDNA を単離した。Ma17 のホモ欠失は ANA/T0B5 遺伝子をプローブとしたサザン法解析によって検出された。PLC-L および、ANA/T0B5 遺伝子をカバーするゲノムクローンを解析することにより、エクソン/イントロン構造を決定した。各エクソンを増幅するプライマーを設定し、55 種の肺がん細胞株 DNA に対する PCR-SSCP 解析を行い、PLC-L および ANA/T0B5 遺伝子の変異の検索を行った。

III 研究成果と、IV 考察

1. NSCLC では、がんの発生初期では、主に 3p、13q、17p の欠失が生じ、進展・悪性の過程において 2q、9p、18q、22q の欠失、p16 遺伝子の異常及びマイクロサテライト DNA の複製異常が生じることがわかった。これに対し、SCLC では 3p、5q、13q、17p、22q の欠失ががんの発生初期から蓄積しており、p16 遺伝子の異常、マイクロサテライト DNA の複製異常は発生・進展過程を通じて稀であった。この結果は、発生・進展のメカニズムは SCLC と NSCLC で異なることを示している。

2. p53 及び p16 がん抑制遺伝子の不活化の生物学的な意義を検討するため、p53 発現量の調節可能なベクター系を構築し、p53 が欠失している SCLC 細胞株 N417 に、種々の量の p53 蛋白質を発現させた結果、p53 高発現では apoptosis、低発現では cell cycle arrest を起こすことを明らかにした。また、p16 が欠失している NSCLC 細胞株 A427 は p16 遺伝子の強制発現により、G1 期において細胞周期を停止することが明らかとなった。この結果は、p53 及び p16 遺伝子の不活化により、細胞増殖の制御機構が肺がん細胞で異常をきたしていることを示している。

3. SCLC 細胞株 H82 の第 2 染色体長腕 q33 領域、及び NSCLC 細胞株 Ma17 の第 21 染色体長腕 q11.1-q21.1 領域のホモ欠失を明らかにした。これらの領域は、進行肺がんを高頻度に LOH がみられ、NSCLC の悪性化に関与する未知のがん抑制遺伝子が存在することが示唆された。H82 細胞及び Ma17 細胞のホモ欠失領域内には PLC-L 遺伝子、及び、ANA/T0B5 遺伝子がそれぞれ存在することが明らかになったが、これらの遺伝子異常は他の肺がん細胞では検出されず、標的がん抑制遺伝子ではないと思われた。よって、これらのホモ欠失領域内に存在する別の遺伝子の探索及び解析が必要である。

（高橋）

II 研究計画及び材料と方法

1. 染色体欠失地図をもとにしたポジショナルクローニング法と、機能的候補遺伝子アプローチ法の両者を用いて、肺癌と関連する未知の遺伝子の検索を行った（平成 6 年度）。

2. 既知の遺伝子異常の肺癌発症と進展への関与と臨床病態との関連を検討するため、愛

知県がんセンターおよび香港大学の肺癌症例より抽出した DNA 及び RNA を用いて、PCR-SSCP 法による分子生物学的検索と、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検索を行った（平成 7 年度）。

3. 細胞増殖に抑制的に働くマウス Cis 遺伝子が、ヒト 3p21.3 と相同性を持つ領域に位置することが判明したことに基づき、ヒト CIS 遺伝子 cDNA の単離及び塩基配列の決定と FISH 法によるマッピング及び変異検索を行った。また、サイクリン D1 遺伝子の発現と予後との関係を検討した（平成 8 年度）。

III 研究成果と、IV 考察

1. 染色体 3p21.3 より単離した新しいインテグリン α サブユニット（ α RLC と命名）遺伝子は、肺癌で変異を認めず標的遺伝子ではなかったが、高転移性の肺小細胞癌に高い発現が見られ、その転移との関連が示唆された。

2. a) 喫煙者を対象とした 69 例のコホートをを用いて、喫煙による強い修飾を受けない場合の p53 遺伝子異常のスペクトラムを検討した結果、非喫煙者にみられる p53 遺伝子異常は喫煙者に比して有意に G to T 変異が低く、その変異頻度も低い事が確認された。また、非喫煙者に G to C 変異が多いことや、特殊な CC to TT 変異が検出され、非喫煙者の発癌には酸素フリーラジカルの関与が示唆された。

b) 低喫煙率にもかかわらず肺癌死亡率の極めて高いホンコン女性に関する分子疫学的検討を行い、他の地域に類を見ない一塩基欠失の多発を見出し、特異な変異源の存在の可能性を示唆する結果を得た。

c) 肺癌細胞株にみられる p16 遺伝子異常が、細胞株の由来する患者腫瘍組織内においてすでに検出可能であることを初めて示し、9p21 欠失の *in vivo* における標的遺伝子が p16 遺伝子であることを強く示唆する結果を得た。

3. a) ヒト CIS 遺伝子は 3p21.3 領域に存在し、肺癌では変異を認めなかったが、小細胞がんにおける有意な発現の低下を認めた。

b) サイクリン D1 遺伝子の発現に関する検討によって、外科切除後の予後とサイクリン D1 発現の消失との間に、有意な関連性を見出した。多変量解析においても、病期とともに有意な予後因子であることが、明らかとなった。

（深山）

II 研究計画及び材料と方法

肺癌の転移・増悪における血管内皮増殖因子（VEGF）と腫瘍血管の関係、意義を明らかにするため、

1. 肺癌切除材料を用いた癌内血管の特性の組織計測を行った（平成 6 年度）。

材料・方法：切除肺癌症例（ $n=25$ ；腺癌 13、扁平上皮癌 11、小細胞癌 1）の癌組織を血管内皮細胞を認識する単クローン抗体（抗 CD34）を用いて免疫染色し、CD34 陽性の血管が最も密に分布する部位を写真撮影し、その写真を基に画像解析装置によって、腫瘍細胞 103 個当りの血管数、血管断面積を求め、さらに単位血管面積（血管断面積／血管数）を算出した。

上記症例の癌組織内の VEGF について、組織内の mRNA をノーザンプロット法を用い検出、

正常組織内の量と比較し半定量的に3段階で評価した。

2. VEGF の腫瘍血管誘導能を明らかにするため、遺伝子導入による実験的研究を行った(平成7、8年度)。

材料・方法：遺伝子導入細胞株の樹立は、発現ベクターpTJneo のプロモータの下流に、VEGF の cDNA 断片を逆向きに挿入し、anti-sense VEGF の発現 vector pTJaVEGF を作成した。VEGF 高度発現肺癌培養細胞株 1c-1、中程度発現肺癌培養細胞株 NCIH-69 に pTJaVEGF を遺伝子導入し、G-418 存在下で遺伝子導入株を選択。また対照として pTJneo のみの導入株を作成。VEGF 発現の検策は、Northern 法で anti-sense mRNA の発現を、培養上清の VEGF 濃度を ELISA 法で測定した。また、ヌードマウス移植による腫瘍血管誘導が抑制されるか否かを検討した。

III 研究成果と、IV 考察

1. 腫瘍細胞 103 個当りの血管数、血管断面積 ($\times 10^3 \text{mm}^2$) は組織型に密接に関係し、腺癌では各々47、24、扁平上皮癌では13、5であった ($p < 0.05$)。一方、単位血管面積 (mm^2) は腺癌、扁平上皮癌で有意な差はなく、小細胞癌で876と高値を示した。このことから、単位血管面積は組織構築によらず、断面積の大きな異常血管の存在に対応している可能性が示唆された。単位血管面積 (mm^2) は VEGF 発現強度とともに増大する傾向がみられた。即ち、腫瘍内血管の単位血管面積の増大は異常血管の存在を反映し、VEGF 発現の増強がその誘導に関与している可能性が考えられた。

2. VEGF 高度発現肺癌培養細胞株 1c-1 への遺伝子導入では、VEGF 蛋白の産生・分泌は対照細胞株の4分の1程度の抑制にとどまったが、中等度発現肺癌培養細胞株 NCIH-69 については、培養液中の VEGF 濃度で、対照細胞株 539pg/ml に対し 28pg/ml と 1/20 程度までに産生が抑制された。現在 VEGF の発現を種々抑制させた細胞株をヌードマウスに移植、観察中である。

(時野)

II 研究計画及び材料と方法

1. 酵母における遺伝的選択系 (1. ヒト p53cDNA 発現プラスミドと、2. ヒトゲノム由来の MboI 断片を HIS3 レポーター遺伝子の upstream に挿入したレポータープラスミドライブラリー) を利用して、p53 の転写活性化能を指標に、p53 遺伝子産物が特異的に結合する DNA 断片をヒトゲノムから単離する。さらに、ヒトゲノム由来の p53 遺伝子産物が結合する配列を持ったクローンをプローブとして、ヒトゲノムのコスミドライブラリーをスクリーニングする (平成6年度)。

2. p53 結合性 DNA 断片を含む 25 種類のコスミドからエクソン・トラップ法およびゲノムシークエンス法によってエクソン断片を単離し、p53 標的遺伝子の候補を同定する。さらに p53 によってその発現が制御されるか否かを、正常型 p53 を欠失した大腸癌由来の細胞株 SW480 に、正常型 p53 あるいは変異型 p53 を発現するプラスミドを導入し、同細胞から RNA を抽出して、RT-PCR で検索する (平成7年度)。

3. p53 標的遺伝子として、GML (GPI-anchored molecule like protein) を単離した。GML 遺伝子の発現とヒト癌細胞の DNA 障害性薬剤や細胞障害性薬剤に対する感受性に相関

があるか、さらに GML の導入によるこれらの薬剤に対する感受性の亢進について検討した(平成 8 年度)。

a) GML 遺伝子の構造解析を行い、さらに FISH 法によって染色体座位を決定した。

b) GML 遺伝子の導入：正常型 p53 遺伝子および GML の発現を有しないヒト食道癌細胞株 TE10 に、GMLcDNA の全長を含む発現ベクターを導入し、GML の発現が誘導可能な細胞株を 2 株樹立した。また、empty vector のみを導入した細胞株を樹立し、親株 TE10 と共に対照とした。

c) 感受性試験：3.0-5.0x10⁵/6cm-dish の細胞を、3nM-10nM タキソール（微小管脱重合阻害作用をもつ抗癌剤）あるいは 0.3uM-1.5uM プレオマイシン（DNA 障害性抗癌剤）存在下に培養し、増殖曲線を作製した。

d) 抗癌剤タキソールに対する感受性を検索するため、培養細胞をフローサイトメトリーで検索し細胞周期の解析を行い、またアポトーシスに陥った細胞の核を形態的に検出するために蛍光染色（DAPI 染色）を行い、蛍光顕微鏡下に 500 個の細胞（核）を観察しアポトーシスの出現率を経時的に計測した。

III 研究成果

1. p53 遺伝子産物が特異的に結合する DNA 断片をヒトゲノムから多数単離した。さらに、これら 57 種類の DNA 断片をプローブとして 25 種類のコスミドクローンを得た。

2. p53 結合配列を含むコスミド DNA から複数の遺伝子の一部分を単離した。p53 遺伝子の発現と新たに単離した遺伝子の発現パターンとを比較検討した結果、いくつかの新規の遺伝子が正常型 p53 によって発現誘導されることを見いだした。

SW480 に正常型 p53 と変異型 p53 を導入した細胞群で、その発現量に差が認められたのは 8 クローンあった。塩基配列を決定し、これらはすべて新規の p53 標的遺伝子と結論した。

3. a) GML 遺伝子は全長約 12kb、4 つのエクソンから構成され、158 アミノ酸からなる GPI アンカータンパクをコードし、染色体 8q24.3 に位僅していた。b、c) 食道癌細胞において GML の発現とプレオマイシン感受性に強い相関があること。また GML の導入により薬剤感受性が上昇することを見出した。d) GML の発現が認められない食道癌細胞（親株）に比較して、GML を導入した細胞において、タキソール処理後早期からアポトーシスか出現した。

IV 考察

現在、薬剤感受性を決定する大きな要因としてアポトーシス関連遺伝子が考えられている。食道癌由来の細胞株において、GML の導入はアポトーシスの亢進に寄与し、薬剤感受性を亢進させた。GML 遺伝子はアポトーシス誘導に重要な役割を果たしており、癌細胞では GML の発現を失うことが抗癌剤に対する耐性獲得につながることを明らかにした。この作用は p53 に非依存的であり、臨床的見地からは GML の発現が抗癌剤に対する感受性を予測する指標になりうる可能性が示唆された。

V 研究成果の発表

1. Sato, S., Nakamura, Y. and Tsuchiya, E.: Difference of allelotype between

- squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung . Cancer Res., 54: 5652-5655, 1994.
2. Hayashi, N., Tsuchiya E., Nakamura, Y., et al.: Somatic mutation of the MTS (multiple tumor suppressor) 1/CDK4I (cyclindependent kinase 4 inhibitor) gene in human primary non-small cell lung cancers. Biochem. Biophys. Res. Commun., 202: 1426-1430, 1994
 3. Shimizu, H., Tsuchiya, E., et al.: Riskof lung cancer among cigarette smokers in relation to tumor location. Jpn. J. Cance Res., 85: 1196-1199, 1994
 4. Tsuchiya, E., et al. High K-ras mutation rates in goblet-cell-type adenocarcinomas of the lung. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 121: 577 -581, 1995.
 5. Satoh Y, Tsuchiya E., et al.: A follow-up study of progression from dysplasia to squamous cell carcinoma with immunohistochemical examination of p53 protein overexpression in the bronchi of ex-chromate workers. Br. J. Cancer, 75: 678-683, 1997
 6. Shirotani Y., Yamakido M. et al.: Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. Lung Cancer, 11: 29-41, 1994.
 7. Hiyama K., Yamakido M. et al.: Duplication polymorphism within the third intron of the p53 gene is a rare event in Japanese population. Jpn. J. Human Genet., 39: 193-195, 1994.
 8. Isobe T., Yamakido M. et al.: Prognostic significance of p53 and ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. Jpn. J. Cancer Res., 85: 1240-1246, 1994
 9. Hiyama K., Yamakido M. et al.: Alteration of telomeric repeat length in adult and childhood solid neoplasias. Int. J. Oncol., 6: 13-16, 1995.
 10. Hiyama K., Yamakido M. et al.: Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. Oncogene, 10: 937-944, 1995.
 11. Hiyama K., Yamakido M., et al.: Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. J. Natl. Cancer Inst., 87: 895-902, 1995
 12. Hiyama K., Yamakido M., et al.: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. J. Immunol., 155: 3711-3715, 1995.
 13. Yamakido M., Hiyama K., et al: Former poison gas workers and cancer: Incidence and inhibition of tumor formation by treatment with biological response modifier N-CWS. Environ. Health Perspect., 104(Suppl3): 485-488, 1996.
 14. Yamanishi Y., Yamakido M., et al.: Specific growth inhibition of small-cell lung cancer cells by adenovirus vector expressing antisense c-kit transcripts. Jap. J. Cancer Res., 87: 534-542, 1996.
 15. Murakami, I., Yamakido M., et al.: Detection of p53 gene mutations in non-surgical diagnostic specimens from patients with lung cancer. Am. J. Respir. Crit. Med., 154: 1117-1123, 1996.

16. Shiseki, M., et al.: Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, 54: 5643-5648, 1994.
17. Okamoto, A., Shiseki, M., Yokota, J., et al.: Mutation of p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2 and p18 genes in primary and metastatic lung cancers. *Cancer Res.*, 55: 1448-1451, 1995.
18. Kohno, T., Yokota, J., et al.: Identification of a novel phospholipase C family gene at chromosome 2q33 that is homozygously deleted in human small cell lung carcinoma. *Human Mol. Genet.*, 4: 667-674, 1995
19. Koh, T Yokota J., et al.: Alternative splicing of the neurofibromatosis 1 gene correlates with growth patterns and neuroendocrine properties of human small-cell lung carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 60: 843-847, 1995.
20. Adachi, J., Yokota, J., et al.: Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 14: 301-306, 1995.
21. Otsuka, T., Yokota, J., et al.: Deletion mapping of chromosome 2 in human lung carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 16: 113-119, 1996.
22. Adachi, J., Yokota, J., et al.: Induction of apoptosis but not G1 arrest by expression of the wild-type p53 gene in small-cell lung carcinoma. *Cell Growth & Differentiation*, 7: 879-886, 1996
23. Okazaki, T., Yokota, J., et al.: Detection of amplified genomic sequences in human small-cell lung carcinoma cell lines by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Human Genetics*, 98: 253-258, 1996.
24. Shiseki, M., Yokota, J., et al.: Comparative allelotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, in press, 1996.
25. Kohno, T., Yokota, J., et al.: Breakpoint junction of interstitial homozygous deletion at 2q33 in a small cell lung carcinoma. *DNA Res.*, 3: 421-424, 1996.
26. Adachi, J., Yokota, J., et al.: Growth suppression of non-small cell lung carcinoma cells by the introduction of the p16INK4 gene. *Int. J. Oncol.*, 10: 33-39, 1997.
27. Tani, M., Yokota, J., et al.: Infrequent mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene at chromosome 3p22 in human lung cancers with chromosome 3p deletions. *Carcinogenesis*, 18: 1119-1121, 1997.
28. Kawanishi, M., Yokota, J., et al.: Allelotype and replication error phenotype of small cell Lung carcinoma. *Carcinogenesis*, in press, 1997.
29. Adachi, J., Yokota, J., et al.: Phenotypic alterations of small cell lung carcinoma induced by different levels of wild-type p53 expression. *Cell Death Diff.*, in press, 1997.
30. Suzuki, H., Takahashi, T. et al.: Altered imprinting in lung cancer. *Nature Genet.* 6: 332-333, 1994.
31. Kondo, M., Takahashi, T. et al.: Parental origin of 11p15 deletions in human

- lung cancer. *Oncogene* 9: 3063-3065, 1994.
32. Hibi, K., Takahashi, T., et al.: Aberrant upregulation of a novel integrin α subunit gene at 3p21.3 in small cell lung cancer. *Oncogene*, 9: 611-619, 1994.
 33. Washimi, O., Takahashi, T., et al.: Expression of CD44 variant isoforms in normal and neoplastic cells of the lung. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85: 1112-1116, 1994.
 34. Horio, Y., Takahashi, T. et al.: Predominantly tumor-limited expression of a mutant allele in a Japanese family carrying a germline p53 mutation. *Oncogene* 9: 1231-1235, 1994
 35. Kondo, M., Takahashi, T., et al.: Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene* 10: 1193-1198, 1995.
 36. Washimi, O., Takahashi, T., et al.: In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 55: 514-517, 1995.
 37. Gray, D., Takahashi, T., et al.: Elevated expression of Unph, a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors. *Oncogene* 10: 2179-2183, 1995.
 38. Takagi, Y., Takahashi, T., et al.: Distinct mutational spectrum of the p53 gene in lung cancers from Chinese women in Hong Kong. *Cancer Res.* 55: 5534-5537, 1995
 39. Nishio, M., Takahashi, T. et al.: Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small lung cancers. *J. Clin. Oncol.* 14: 497-502, 1996.
 40. Kondo, M., Takahashi, T., et al.: Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57KIP2 gene at 11p15.5. *Oncogene* 12: 1365-1368, 1996.
 41. Nagatake, M., Takahashi, T., et al.: Aberrant hypermethylation at the bcl-2 locus at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56: 1886-1891, 1996.
 42. Nagatake, M., Takahashi, T., et al.: Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56: 2718-2720, 1996.
 43. Yanagisawa, K., Takahashi, T., et al.: Molecular analysis of the FHIT gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 56: 5579-5582, 1996.
 44. Uchida, K., Takahashi, T., et al.: Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56: 5583-5585, 1996.
 45. Nishio, M., Takahashi, T., et al.: Prognostic significance of cyclin D1 and Rb expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.* 3: 1051-1058, 1997.
 46. Uchida, K., Takahashi, T., et al.: Molecular cloning of CISH, chromosome assignment to 3p21.3, and analysis of expression in fetal and adult tissues. *Cytogenet. & Cell Genet.* (in press).

47. Tokino, T., Thiagalingam, S., et al.: p53 tagged sites from human genomic DNA. Human Molecular Genetics, 3: 1537-1542, 1994.
48. El-Deiry, W. S.*, Tokino, T.*, Vogelstein, B., et al.: (1995) Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res. 55, 2910-2919, 1995. (*The first two authors contributed equally to this work.)
49. Tanaka, N., Tokino, T., et al.: Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. Nature 382: 816-818, 1996
50. Macleod, K.F., Tokino, T., Vogelstein, B., et al.: p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes & Development 9: 935-944, 1995.
51. Kimura Y, Tokina T., et al.: Genomic structure and chromosomal localization of GML (GPI-anchored molecule-like protein), a gene induced by p53. Genomics, 41, 477-480, 1997.
52. Kimura Y, Tokino T., et al.: GML sensitizes cancer cells to Taxol by induction of apoptosis. Oncogene (in press).