

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390245  
 研究課題名 (和文) 悪性中皮腫に対する新規治療分子標的の探索と診断マーカーの開発  
 研究課題名 (英文) Identification of new therapeutic target molecules and development of diagnostic markers for malignant mesothelioma  
 研究代表者  
 関戸好孝 (SEKIDO YOSHITAKA)  
 愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍学部・部長  
 研究者番号：00311712

## 研究成果の概要：

悪性中皮腫の特徴的な遺伝子異常を同定するために網羅的なゲノム解析を行った。従来報告されている異常に加え、複数の新規の染色体・遺伝子異常を明らかにした。JUN や YAP 遺伝子は中皮腫における重要ながん遺伝子であること、また染色体 16 番に新たながん抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。PTEN 遺伝子は一部の中皮腫で不活化しており、細胞レベルにおいてがん抑制効果を確認した。本研究成果は悪性中皮腫の新規治療法や診断マーカーの開発への大きな基盤になるものと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 5,800,000  | 1,740,000 | 7,540,000  |
| 2007 年度 | 4,700,000  | 1,410,000 | 6,110,000  |
| 2008 年度 | 4,700,000  | 1,410,000 | 6,110,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：胸膜疾患学

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露を外的要因とする極めて悪性度の高い腫瘍である。確定診断時点において従来の化学療法や外科手術療法では治療が困難であることが多く、罹患者の生命予後は極めて不良である。このように有効な早期診断法や標準的な治療法は未だ確立されていないにもかかわらず、本邦における患者数は今後増加することが予測されている。

悪性胸膜中皮腫の発がんメカニズムとし

てがん抑制遺伝子の NF2 遺伝子や p16INK4A/p14ARF 遺伝子の高頻度変異が明らかにされているがその他の遺伝子異常の詳細は他の頻度の高い肺がん、大腸がん等と比べて極めて理解が遅れている。特に高頻度の活性型がん遺伝子異常は明らかとなっていない。さらに以前報告された SV40 ウイルスの中皮腫発がんへの関与に対しても大きな議論がある。このように中皮腫の発がんや増殖・進展に関する遺伝子異常や分子機構の詳細が明らかでないことが、新たな分子標的治

療法や診断マーカー開発のための大きな障壁となっていると考えられる。

## 2. 研究の目的

新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定を目指し、特に、アレイ CGH 法を利用し高頻度の染色体異常領域を詳細に明らかにすることを目的とする。染色体増幅領域（特に高頻度の増幅領域あるいは high copy 増幅領域）や欠失領域（特にホモザイガス欠失領域）に着目し、ターゲット領域を絞り込むと同時に領域内に存在する遺伝子等を詳細に検討し、悪性中皮腫の新規原因遺伝子候補遺伝子の同定を試みる。それらの遺伝子の悪性中皮腫における遺伝子変異・発現異常の頻度等を明らかにし、さらに細胞株を用いた *in vitro* における細胞周期や増殖・浸潤能に関わる関与を明らかにする。これらの遺伝子変異・発現異常および機能異常の結果に基づき、分子標的療法に対する新規標的としての有用性や新規診断マーカーとしての可能性について検討を加えることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ゲノムワイドの解析：日本人患者由来の悪性中皮腫組織およびそれらより樹立された悪性中皮腫細胞株を用いてゲノムワイドの網羅的な異常の解析を行った。Comparative Genomic Hybridization (CGH) 解析においては平均 1.3Mb 間隔でゲノムコピー数が判定できる、2304 個の BAC/PAC クローンプローブがスポットされたアレイを用いて解析を行った。そのデータをベースとしてさらにアジレント社の 244K オリゴアレイを用いて BAC/PAC クローンアレイで得られたデータを確認しつつ、より高解像度のゲノムレベルでの検討を進めた。また、FISH 法を用い染色体のコピー数や相互転座の可能性について検討を加えた。さらに、アジレント社の 44K アレイを用いて遺伝子の mRNA レベルにおける網羅的発現解析を行った。

(2) 各種の遺伝子変異・発現解析：アレイ CGH 法で得られた高レベルコピー領域（増幅領域）及び欠失領域（特にホモザイガス欠失領域）に着目し、複数の臨床検体や細胞株で共通する異常領域について、その領域内に存在する遺伝子についてシーケンシングを用いた変異解析を行った。さらにリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロット法や免疫染色を用いた mRNA や蛋白の発現解析や Na-bisulfite 法を用いた DNA メチル化等のエピジェネティクス解析を行った。

(3) *in vitro* レベルでの遺伝子機能解析：新規のがん遺伝子・がん抑制遺伝子候補遺伝子の open reading frame を RT-PCR 法にて増

幅し、プラスミド発現ベクターを構築した。また、必要に応じ恒常的活性化あるいは不活化変異ベクターを構築した。これらのコンストラクトを中皮腫細胞株あるいは不死化正常中皮細胞株 MeT-5A に導入して遺伝子発現を誘導した。一方、RNA interference 法にて遺伝子発現を抑制させた。翻訳産物の発現をウエスタンブロット法や immunocytochemistry 等にて確認したのち、Calorimetric assay やコロニーフォーメーションアッセイによって細胞の増殖・影響に与える影響を検討した。さらに FACS 等の解析によってアポトーシスや細胞周期に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 中皮腫におけるゲノムワイドの染色体異常の同定：22 名の中皮腫患者由来の検体（17 例の臨床検体および 9 細胞株を解析し同一患者由来 4 例を含む）を検討したところ、20% 以上の中皮腫で検出された増幅領域は 1q、5p、7p、8q24、20p であった。同様に欠失領域は 1p36.33、1p36.1、1p21.3、3p21.3、4q22、4q34-qter、6q25、9p21.3、10p、13q33.2、14q32.13、18q、22q であった（図 1）。



図 1 . 悪性中皮腫における染色体 imbalance : 染色体の左側は欠失、右側は増幅、黒線は患者、赤線は細胞株を示す。

頻度は少なかったが 1p32.1 と 11q22 領域については複数の中皮腫検体で高度増幅を示していた。一方、9p21.3 領域欠失は最も高頻度に検出された異常であり、中皮腫細胞株のほぼ全例においてホモザイガス欠失が認められた。この欠失領域は p16INK4A/p14ARF 遺伝子を含み、ホモザイガス欠失領域は 500kb 以内と比較的狭い欠失範囲を示す細胞株から 4Mb 以上に及ぶ細胞株が認められた。

さらにアジレント社の 244K オリゴアレイを用い、14 株の中皮腫細胞株のゲノム解析を進めたところ、高解像度に染色体異常を検出することが可能であった。染色体 22q12 欠失

はNF2 遺伝子とその標的遺伝子と考えられるが、我々が樹立した新規悪性中皮腫細胞株の中において複数株でホモザイガス欠失が同定された (Y-MESO-12, 22, 26B) (図 2)。一方、その他の細胞株では NF2 遺伝子は allele loss 及びナンセンス変異で不活化している細胞株も同定された。また、染色体 13q12 領域と 16p13 領域において複数の細胞株でホモザイガス欠失が同定され、これらの欠失領域内に悪性中皮腫に関わる新規腫瘍抑制遺伝子が存在している可能性が強く示唆された。

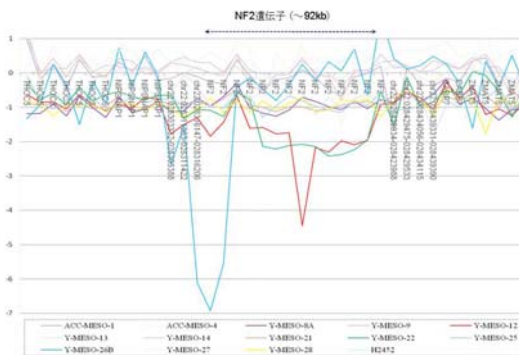


図 2. 中皮腫細胞株における、244K アレイ CGH 解析による NF2 遺伝子領域 (染色体 22q12) 欠失の同定

(2) がん遺伝子 JUN の増幅: 染色体 1p32.1 領域が 2 例の中皮腫臨床検体で高レベルに増幅していたので、その標的遺伝子の同定を試みた。増幅を同定した BAC/PAC クローンプローブとその領域のゲノムマップおよび定量 genomic PCR によって JUN 遺伝子の増幅を同定した (図 3)。さらに RT-PCR によって mRNA レベルにおいて遺伝子の発現上昇を明らかにした。最近、他の研究グループより、ある種の sarcoma において JUN 遺伝子増幅が発がんや腫瘍の悪性化に関与するとの報告があるが、本研究結果は一部の悪性中皮腫においても JUN 遺伝子増幅が中皮腫発がんに関与することを示唆するものと考えられた。

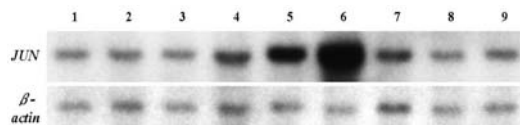


図 3. ゲノム PCR 解析による中皮腫臨床検体における JUN 遺伝子増幅の同定

(3) YAP 遺伝子の増幅と中皮腫におけるがん遺伝子機能の検討: 染色体 11q22 領域が 2 例の中皮腫臨床検体 (KD1033, KD1041) で高レベルに増幅していたので、その領域における標的遺伝子の同定を試みた。定量 genomic PCR 法にて 1Mb の領域が最も共通した増幅領域であり、その中に複数の遺伝子が

存在していることを明らかにした (図 4)。定量 RT-PCR 法にてそれらの遺伝子の中で YAP 遺伝子と BIRC2 遺伝子が高発現していることが明らかにされ、標的遺伝子であることが示唆された。悪性中皮腫細胞で shRNA 法にて YAP をノックダウンしたところ細胞増殖能が抑制され、一方、不死化正常中皮細胞に YAP をトランスダクションしたところ低濃度血清加培養条件下において細胞増殖が促進された。さらに、YAP 蛋白は NF2 遺伝子のトランスダクションによりリン酸化されて細胞核外に移送され、転写のコアクチベーターとして不活化されることを明らかにした。本結果は YAP 遺伝子の活性化が中皮腫細胞の増殖・生存等にかん遺伝子として機能することを強く示唆した。

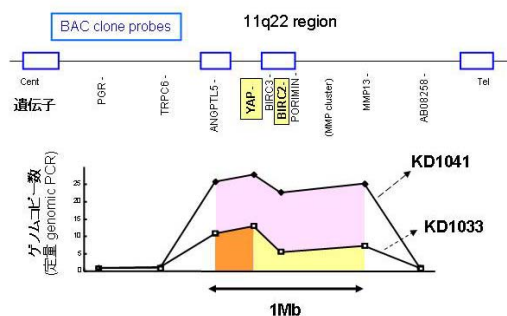


図 4. 染色体 11 q 22 増幅領域の解析

(4) 染色体 16 p 13 ホモザイガス欠失領域における新規がん抑制遺伝子候補遺伝子 (MMTS1) の同定: 染色体 16p13 領域は 3 つの異なる中皮腫細胞株でオーバーラップするホモザイガス欠失が認められ、genomic PCR においても再確認された。欠失領域内に候補遺伝子 (MMTS1: 仮称) が存在しており、予測アミノ酸配列から RNA 結合モチーフが存在していた。ホモザイガス欠失により MMTS1 遺伝子の一部のエクソンがそれぞれの細胞株において欠失していた。

(5) 腫瘍抑制遺伝子 PTEN の不活化の解析: 21 株の中皮腫細胞株を用い、PTEN 遺伝子の発現解析をウエスタンブロット法にて行った。2 株において PTEN 蛋白の発現が完全に抑制されていたため、不活性化変異の存在を疑い、ゲノムレベルでの異常を検討した。その結果、これらの細胞株にて PTEN 遺伝子のホモザイガス欠失が検出された。切断点をクローニングしたところ、ACC-MESO-1 株はエクソン 2 を含む 39.4kb、Y-MESO-25 株はエクソン 1 を含む 7.7kb が欠失していることを明らかにした (図 5)。一方、残りの 19 株のゲノム DNA を用いてシーケンシングを行ったが点突然変異は検出されなかった。PTEN の発現ベクターを構築し細胞にトランスダクション

したところ、野性型 PTEN を導入した Y-MESO-25 細胞株においてコロニー形成能が著しく抑制された。一方、PTEN 遺伝子不活化とともに AKT の恒常的活性化に関与する PIK3CA および LKB 遺伝子において変異解析を行ったが、変異は同定されなかった。これらの結果は、一部の中皮腫細胞において PI3K-AKT シグナル伝達系の活性化は PTEN 遺伝子異常によるものであることを示唆した。

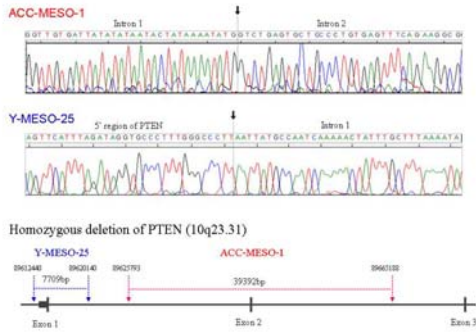


図 5. 中皮腫細胞株における PTEN ホモザイガス欠失領域の切断点クローニング

(6) FISH 法による染色体異常の同定 : Fluorescence in situ hybridization 法によって染色体コピー数および染色体転座に関する検討を行った。2-color FISH によって他の sarcoma 等で報告されている染色体相互転座領域を検討したが高頻度の異常は検出されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y: Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. *Carcinogenesis* (in press) (査読有)
2. Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Taniguchi T, Fujii M, Shinjo K, Kondo Y, Osada H, Shimokata K, Horio Y, Hasegawa Y, Hida T, Sekido Y: Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma cells. *Mol. Med. Rep.* 2: 181-188, 2009 (査読有)

3. Motohashi K, Hwang J-H, Sekido Y, Takagi M, Shin-ya K. JBIR-23 and -24, novel anticancer agents from *Streptomyces* sp. AK-AB27. *Org. Lett.* 11, 285-288, 2009 (査読有)

4. Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y: YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis* 29: 2139-2146, 2008. (査読有)

5. Yamada T, Yano S, Ogino H, Ikuta K, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Kanematsu T, Taniguchi T, Sekido Y, Sone S. Lysophosphatidic acid stimulates the proliferation and motility of malignant pleural mesothelioma cells through lysophosphatidic acid receptors, LPA1 and LPA2. *Cancer Sci.* 99, 1603-1610, 2008 (査読有)

6. Sekido Y: Molecular biology of malignant mesothelioma. *Environ. Health Prev. Med.* 13:65-70, 2008 (査読無)

7. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, Ueda Y, Mitsudomi T, Horio Y, Hida T, Yatabe Y, Seto M, Sekido Y: Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Sci.* 98:438-446, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 26 件)

1. 関戸好孝: 悪性中皮腫細胞のシグナル伝達系異常 第 49 回日本肺癌学会総会 2008 年 11 月 14 日 北九州市
2. 川口晃司、村上秀樹、谷口哲朗、藤井万紀子、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝: 悪性胸膜中皮腫における MET の活性化 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋
3. 藤井万紀子、谷口哲郎、村上秀樹、長田啓隆、関戸好孝: 悪性中皮腫細胞株に対する TGF-beta シグナルの影響 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋
4. 村上秀樹、谷口哲郎、川口晃司、藤井万



紀子、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝：中皮腫細胞株における遺伝子発現プロファイリング 第 67 回日本肺癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋

5. Taniguchi T, Murakami H, Fujii M, Usami N, Yokoi K, Sekido Y: Establishment and characterization of new malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. The 9<sup>th</sup> International conference of the International mesothelioma interest group. 2008 年 9 月 26 日 Amsterdam, Netherlands

6. 新城恵子、近藤豊、後藤康洋、近藤征史、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫における DNA メチル化標的遺伝子の解析とその診断への応用。第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 17 日 神戸

7. Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Taniguchi T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y: Activation of PI3K/AKT signaling pathway in malignant pleural mesothelioma cells. AACR 2008 年 4 月 14 日 San Diego, USA

8. Kawaguchi K, Murakami H, Suzuki Y, Taniguchi T, Yokoi K, Sekido Y: Activation of receptor tyrosine kinase c-Met in malignant pleural mesothelioma cells. AACR 2008 年 4 月 15 日 San Diego, USA

9. 後藤康洋、近藤豊、新城恵子、谷口哲郎、近藤征史、今泉和良、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫において DNA メチル化により制御されるがん抑制遺伝子の網羅的解析。第 48 回日本肺癌学会総会 2007 年 11 月 8 日 名古屋

10. 川口晃司、村上秀樹、鈴木裕太郎、谷口哲郎、横井香平、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫における HGF/MET の発現と活性化の解析。第 48 回日本肺癌学会総会 2007 年 11 月 8 日 名古屋

11. 谷口哲郎、村上秀樹、川口晃司、鈴木裕太郎、横井香平、関戸好孝：日本人悪性胸膜中皮腫患者由来の新しい中皮腫細胞株の樹立と解析。第 48 回日本肺癌学会総会 2007 年 11 月 8 日 名古屋

12. 横山俊彦、長田啓隆、村上秀樹、立松義朗、谷口哲郎、近藤豊、樋田豊明、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：YAP1 は悪性胸膜中皮腫の増殖を促進し、NF2 腫瘍抑制遺伝子で機能阻害される。2007 年 11 月 8 日 名古屋

13. 鈴木裕太郎、村上秀樹、川口晃司、谷口哲郎、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫における PI3K/AKT 経路、PTEN 遺伝子変異の検討。2007 年 11 月 9 日 名古屋

14. 関戸好孝 悪性中皮腫細胞のゲノム異常。第 48 回日本肺癌学会総会 2007 年 11 月 9 日 名古屋

15. 樋田豊明、朴智栄、小川紫都、清水淳市、堀尾芳嗣、吉田公秀、谷田部恭、谷口哲郎、関戸好孝：胸膜中皮腫に対するアムルビシノールとシクロオキシゲナーゼ 2 阻害剤の増殖抑制効果 第 66 回日本肺癌学会学術総会 2007 年 10 月 4 日 横浜

16. 横山俊彦、長田啓隆、村上秀樹、立松義朗、谷口哲郎、近藤豊、樋田豊明、下方薫、関戸好孝：がん遺伝子 YAP1 は悪性胸膜中皮腫の増殖に関与し、がん抑制遺伝子 NF2 で機能阻害される。第 66 回日本肺癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日 横浜

17. 村上秀樹、谷口哲郎、川口晃司、鈴木裕太郎、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝：Ectopic Merlin expression inhibits the growth of NF2-deficient cells with the distinct change of gene expression pattern. 第 66 回日本肺癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日 横浜

18. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, Ueda Y, Mitsudomi T, Horio Y, Hida T, Yatabe Y, Seto M, Sekido Y: Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization. 12<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer 2007 年 9 月 5 日 Seoul, Korea

19. Goto Y, Kondo Y, Gao D, Toyota M, Suzuki H, Ito M, Yokoyama T, Taniguchi T, Osada H, Murakami H, Tokino T, Imai K, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y: Genome wide analyses for aberrant DNA methylation observed in malignant pleural mesothelioma. AACR 2007 年 4 月 16 日 Los Angeles, USA

20. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, Ueda Y, Mitsudomi T, Horio Y, Hida T, Yatabe Y, Seto M, Sekido Y: Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent nonrandom chromosomal alteration regions including

JUN amplification on 1p32. AACR 2007年4月17日 Los Angeles, USA

21. Sekido Y, Murakami H, Kondo Y, Taniguchi T, Yokoyama T, Goto Y, Fukui T, Seto M, Osada H, Hida T: Genetic and epigenetic alterations in newly established malignant pleural mesothelioma cell lines. 7<sup>th</sup> Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. 2007年1月22日 Waikoloa, USA

22. Usami N, Fukui T, Kondo M, Taniguchi T, Yokoi K, Shimokata K, Hida T, Sekido Y: Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. The 8<sup>th</sup> International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. 2006年10月20日 Chicago, USA

23. 横山俊彦、長田啓隆、谷口哲郎、近藤豊、福井高幸、樋田豊明、谷田部恭、瀬戸加大、下方薫、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫における染色体 11q22 増幅領域の解析。第 65 回日本癌学会学術総会 2006年9月28日 横浜

24. 福井高幸、宇佐美範恭、谷口哲郎、横山俊彦、樋田豊明、関戸好孝：日本人由来悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立と解析。第 65 回日本癌学会学術総会 2006年9月28日 横浜

25. 樋田豊明、朴智榮、清水淳市、堀尾芳嗣、吉田公秀、谷田部恭、関戸好孝：胸膜中皮腫に対するシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤及びCOX阻害剤と抗がん剤投与による in vitro増殖抑制効果の検討。第 65 回日本癌学会学術総会 2006年9月29日 横浜

26. 谷口哲朗、シバスンダラム カルナン、福井高幸、横山俊彦、田川博之、光富徹哉、堀尾芳嗣、樋田豊明、谷田部恭、瀬戸加大、関戸好孝：Array CGH法を用いた悪性胸膜中皮腫の網羅的ゲノム解析。第 65 回日本癌学会学術総会 2006年9月29日 横浜

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-03.html>

アウトリーチ活動 (公開講座)

関戸好孝 「アスベストと中皮腫」平成 19 年度愛知県がんセンター公開講座 2007年7

月 12 日 愛知県がんセンター国際交流センター、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関戸 好孝 (SEKIDO YOSHITAKA)

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍学部・部長

研究者番号：00311712