

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

## 総括研究報告書 および 分担研究報告書

分野 5 : 新しい診断技術の開発に関する研究

研究テーマ がん関連遺伝子と腫瘍免疫を用いたがんの早期診断と予後の研究

主任研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 化学療法部長

分担研究者（分担する研究項目）

1. 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 部長  
(骨軟部腫瘍の遺伝子診断と治療成績の改善)
2. 石井 勝 埼玉県立がんセンター 総長  
(腫瘍免疫を用いたがんの早期診断の開発)
3. 林 慎一 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員  
(ホルモン依存性がん核内受容体の機能と臨床応用)
4. 土屋 永寿 埼玉県立がんセンター研究所 主幹兼部長  
(遺伝子異常を用いた肺癌の早期診断と予後の研究)
5. 末岡 榮三朗 埼玉県立がんセンター研究所 研究員  
(hnRNP A2/B1 抗体を用いた肺がんの早期診断)

## 総括研究報告書

がん関連遺伝子と腫瘍免疫を用いたがんの早期診断と予後の研究に関する研究

主任研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 化学療法部長

**研究要旨** がんは遺伝子異常により発生し、遺伝子異常が悪性度を決定しているため、その解明は、がんの診断や予後の予知、治療法の改善に役立つ。青少年に好発する骨軟部腫瘍、ホルモン依存性がんである乳癌、前立腺癌、近年増加している肺癌、大腸癌等を対象として、遺伝子構造、遺伝子発現、蛋白発現の異常を分析し、その異常と臨床像との関係の解明を試みた。骨軟部腫瘍においてp53, P16, P14など癌抑制遺伝子の異常が予後不良因子であることを示した。この結果が多数例による追試で確認されるなら、リスクに応じた治療を試みて、治療成績が改善するかどうか調べてみたい。血中MDM2蛋白自己抗体を競合免疫反応に基づくEIA法により検出し、早期がん診断のための臨床的有用性を検討した。男性では大腸癌、胃癌、肺癌、女性では乳癌の腫瘍マーカーとしての有用性が示めされた。エストロゲンレセプター(ER)遺伝子の癌特異的発現亢進にプロモーター領域の結合因子ERBF-1が重要であることを明らかにした。また、ER発現抑制はこれらの因子の消失や遺伝子そのもののメチル化など複数の機構によることを明らかにした。手術摘出肺癌のp53遺伝子異常を分析し、約1/3の腫瘍にnull 変異を検出した。この変異を有する腫瘍はp53免疫染色陰性であり、早期(病理病期 I 期)であっても、予後が不良であることを明らかにした。null 変異を有する早期肺癌は化学療法が適応になる。RNA結合蛋白質であるhnRNP B1蛋白質の高発現は、臨床病期I期を含む肺扁平上皮癌の全例に認められた。またhnRNP B1蛋白質は、潜在微小肺扁平上皮癌、異形成病変、早期口腔癌、口腔白板症においても過剰発現していたので、これらの病変の診断にも有用である。以上のように、癌で生じているさまざまな遺伝子の構造・発現異常を、DNA, RNA, 蛋白、自己抗体により検出することにより、癌の診断や予後の予測が可能になる。今後、研究の成果を臨床に応用し、治療成績の改善に役立てたい。

### 分担研究者

1. 金子安比古 埼玉県立がんセンター病院 部長
2. 石井 勝 埼玉県立がんセンター 総長
3. 林 慎一 埼玉県立がんセンター研究所  
主任研究員
4. 土屋 永寿 埼玉県立がんセンター研究所  
主幹兼部長
5. 末岡榮三朗 埼玉県立がんセンター研究所  
研究員

### A. 研究目的

がんが生じているさまざまな遺伝子の構造異常や発現異常を、DNA, RNA, 蛋白質、自己抗体等により検出し、がんの診断や予後の予知、治療成績の改善に役立てる。骨軟部腫瘍の病理診断は難しく、診断を誤ったり、最終診断に手間取ることが多いため、適切な治療が適切な時期に開始されないことがある。遺伝子診断は特異性が高いので、骨軟部腫瘍の確定診断に役立つ。p53, P16などのがん抑制遺伝子の異常が、骨軟部腫瘍の予後因子であると証明できれば、異常の認められた症例に対してより強力な治療を行うなど、その分析結果は治療法の選択に役立つ。

つ。乳癌や、胃癌、大腸癌など頻度の高いがんに対して、一次医療(かかりつけ医)において役立つ簡便な早期診断法が求められている。血中 MDM2 自己抗体を用いたがんの血清学的診断法が確立できれば、臨床的有用性は高い。ホルモン依存性がんである乳癌などでは、ステロイドホルモンがその受容体を介して種々の標的遺伝子の発現を調節している。受容体の発現量は細胞のホルモン感受性を規定する。また、癌の進展・悪性化に伴いホルモン依存性は消失し、ホルモン療法が無効になることが知られている。受容体の発現量の調節機構やホルモン依存性消失の機構は不明であるが、これを解明できれば、新たなホルモン依存性癌の診断と治療に役立つと考えられる。手術可能な早期の肺癌患者でも約 40%はその後、進展、転移により死亡する。摘出肺癌の p53 異常が予後因子として有用であると分かれば、化学療法を行うなど術後の治療方針の決定に役立つ。hnRNP B1 蛋白は肺癌の早期から発現している。形態異常を示さない病変や前癌病変が、hnRNP B1 抗体で陽性に染色されれば、肺癌の病理組織診断上、有用な情報となりえる。また肺癌検診で得られた喀痰細胞診サンプルを hnRNP B1 抗体で染色し、肺癌細胞の検出を試みる。その有用性が証明されれば、喀痰による肺癌検診の精度の向上に役立つ。

## B. 研究方法

骨軟部腫瘍の研究は骨肉腫 30 例と Ewing 肉腫 24 例を対象として行われた。Ewing 肉腫 24 例中、全例がサザン法または RT-PCR 法により EWS 融合遺伝子を有していると証明された。骨肉腫と Ewing 肉腫において、癌抑制遺伝子 p53, P15, P16, P14 と癌遺伝子 MDM2 の異常を、サザン法、PCR-SSCP 法、塩基配列決定法にて分析した。P15, P16 については、メチル化部位認識制限酵素とサザン法によるメチル化についても分析した。検出した遺伝子異常の有無により患者を分類し、各群の無病生存曲線を Kaplan-Meier 法でもとめ、有意差を log-rank 法により検定した。

血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定方法として、まず MDM2 蛋白の N 末端側の 20 アミノ酸残基から成る合成ペプチドを抗原として用い、特異的なポリクローナル家兎抗体を作製した。マイクロプレート固相化 MDM2 蛋白合成ペプチド抗原に対して、血中の MDM2 蛋白自己抗体と家兎抗体を競合免疫反応させる酵素免疫測定法(EIA)を開発した。MDM2 蛋白

自己抗体を測定するために、男性 69 例および女性 65 例の計 134 例の血清検体を用いた。内訳は健康人が男女各 20 例、各種癌患者が 94 例であった。

エストロゲンレセプター (ER) 遺伝子の発現調節領域の分子生物学的解析から発現亢進の原因となっている因子をルシフェラーゼ法やゲルシフト法で探索し、単離同定を試みた。さらに主要な発現抑制の機序と考えられる遺伝子のメチル化についても解析した。

切除非小細胞肺癌 144 例(腺癌 109、扁平上皮癌 37)を対象として p53 異常を分析した。いずれも術後5年以上経過し、完全な予後追跡が行われている症例である。腫瘍組織から抽出した DNA を用いて、p53 遺伝子のエクソン 4-8、及び 10 を PCR-SSCP 法で検索し、塩基配列解析を行った。遺伝子異常の種類は missense 変異と null 変異に分類した。免疫染色は腺癌例に対して RSP53 抗体を用いて行い、腫瘍細胞の 15%以上が染色された場合を陽性とした。生存曲線を Kaplan-Meier 法で求め、予後因子を log-rank 法および多変量解析で検討した。

微小肺扁平上皮癌および異形成病変、あるいは口腔扁平上皮癌および口腔白板症について、hnRNP B1 蛋白質の発現を免疫組織染色法を用いて解析した。喀痰を用いた肺癌スクリーニングへの応用を考え、抗 hnRNP B1 抗体による免疫化学法で、喀痰中の肺癌細胞の同定を行なった。

(倫理面への配慮)

研究のため検体を使用することについて、患者からインフォームドコンセントを得るように努めた。また、研究結果が第三者に特定されないように配慮した。この研究班の研究内容については、埼玉県立がんセンター倫理委員会で審議され、承認を受けた。

## C. 研究結果

Ewing 肉腫と骨肉腫において、癌抑制遺伝子 P16, P15, P14, p53 と癌遺伝子 MDM2 の異常を分析した。P16, P15, P14 異常は骨肉腫の 10~20%にみられた。p53 異常は骨肉腫の 50%にみられたが、Ewing 肉腫には 4%しかみられなかった。MDM2 異常はどの腫瘍にも認められなかった。p53 異常を示す骨肉腫患者の予後は p53 異常を示さない骨肉腫患者より不良であった ( $P=0.048$ )。また P16, P14 異常を示す Ewing 肉腫患者の予後は P16, P14 異常を示さない Ewing 肉腫患者より不良であっ

た( $P=0.019$ )。

EIA 法により血中 MDM2 蛋白自己抗体を測定した結果、健常男性の MDM2 蛋白自己抗体値を基準にすると、がん患者の陽性率は 78 % (38/49) となり、がんの種類別に分けた陽性率は大腸癌 100 % (11/11)、胃癌 68 % (13/19)、肺癌 82 % (9/11)、膵癌 50 % (2/4)、原発性肝癌 75 % (3/4) であった。他方、健常女性の MDM2 蛋白自己抗体値を基準にすると、女性がん患者における血中 MDM2 蛋白自己抗体は有意な高値を示さなかった。乳癌 27 例の血中 MDM2 蛋白自己抗体は健常女性に比して全症例で低く、その陰性率は 52 % と高率であった。その他の女性がん患者における陰性率は大腸癌では 40 % (2/5)、胃癌では 33 % (1/3)、肺癌では 25 % (1/4)、膵癌、肝癌および卵巣癌ではそれぞれ 0 % であった。

乳癌における ER 遺伝子の発現亢進にはプロモーター B による転写が重要であることを明らかにし、さらにプロモーター B からの転写を規定するシスエレメントとその結合因子 (ERBF-1) の存在を同定した。また、発現抑制にはメチル化が重要な要因となっていることを明らかにした。

非小細胞肺癌切除 144 例の p53 遺伝子を分析し、65 例 (45 %) に異常を検出した。変異の種類別では、44 例 (68 %) は missense 変異、21 例 (32 %) は null 変異であった。p53 免疫染色との関係は、missense 変異は 76 % が陽性であったが、null 変異は 93 % が陰性で、遺伝子異常と免疫染色陽性の一致率は 65 % と低かった。変異の種類別に検討すると、病期 I では null 変異を有する症例は変異のない症例よりも有意に予後が悪く ( $P=0.008$ )、多変量解析でも独立した予後因子であった。

RNA 結合蛋白質である hnRNP B1 蛋白質は肺癌細胞に特異的に高発現していることを見いだした。今年度は hnRNP B1 蛋白質の過剰発現が、微小肺扁平上皮癌の 58.1 % (25/48)、異形成病変、早期口腔扁平上皮癌、前がん病変である白板症においても認められることを示した。また、喀痰や口腔内塗抹標本を用いた、抗 hnRNP B1 抗体による免疫化学法を確立した。

#### D. 考察

p53, P15, P16, P14, MDM2 遺伝子は細胞周期制御因子をコードしており、その異常は広範ながんで報告されている。私たちの研究では、p53 異常は骨肉腫の半数にみられたが、Ewing 肉腫では 4 % と、まれ

であった。P16, P15, P14 異常の頻度は骨肉腫とも 10 ~ 20 % で低かった。この結果から、骨肉腫の発生に p53 異常が、Ewing 肉腫の発生に EWS 融合遺伝子がそれぞれ決定的な働きをしていると考えられた。p53 異常のある骨肉腫患者の予後は p53 異常のない骨肉腫患者に比して不良であった。また、P16, P14 異常をもつ Ewing 肉腫患者の予後は P16, P14 異常をもたない Ewing 肉腫患者に比して不良であったので、P16, P14 異常は Ewing 肉腫の進展・進行に関係していると考えられた。p53 異常を有する骨肉腫患者や P16, P14 異常を有する Ewing 肉腫患者の予後は不良なので、十分強力な化学療法を行うことが重要であり、末梢血幹細胞移植療法を併用した超大量化学療法も試みられるべき治療法である。

簡便で、経済効率の優れた新しいがんの早期診断法の開発はがん克服のために重要である。このため、早期癌の発見に役立つ新しい診断法の開発を目的に、血中 MDM2 蛋白自己抗体測定法を開発し、腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を検討した。MDM2 蛋白は乳癌、肺癌などで高発現しており、がん抑制遺伝子産物 p53 蛋白の分解にかかわり、がんの発生や進展に重要な役割を演じている。MDM2 自己抗体を用いて癌の診断を試みたところ、男性のがんでは、大腸癌、胃癌、肺癌で陽性率が高率であったが、女性では乳癌で健常人女性より低値を示し、陰性率が有意に高い傾向を示した。従って、男性では大腸癌、胃癌、肺癌、女性では乳癌の腫瘍マーカーとしての有用性が示された。

ER の発現はエストロゲン依存性癌発生に密接に関連し、また細胞のホルモン感受性を規定するとともにホルモン療法の有効性にも関係する。また、癌の進展・悪性化に伴うホルモン依存性消失現象とも関連して非常に重要な問題であるが、その制御機構は不明であった。今回、癌特異的発現制御機構の一端を明らかにし、少なくとも ERBF-1 がその key factor である可能性を示した。この因子が他の応答性因子群と共同的に作用して、ER 遺伝子の発現を調節している可能性が考えられる。また、このような因子の存在と共に、遺伝子側のメチル化などもその発現を規定する因子であることが明らかとなった。

摘出肺癌を用いた p53 分析の結果、早期の肺癌において missense 変異ではなく、null 変異のみが予後不良と関係していた。その理由として p53 蛋白の生物学的機能にとって重要なのは C 末端で、この部分は細胞増殖の抑制やアポトーシス、DNA との

結合、Bax や p21Waf1 等の転写に必要である。したがって、missense 変異を起こしていても C 末端が正常に残っていれば p53 蛋白の機能の一部は残存するが、null 変異を起こすと p53 蛋白の機能は全く失われてしまうためと思われる。今回用いた免疫染色陽性の認識方法及びその頻度はこれまでの多くの報告と同じであったことから、私たちの成績は一般の肺癌の染色性を代表するものと考えられる。p53 免疫染色陽性と遺伝子異常との一致率は低かったが、このことが p53 遺伝子異常と予後との相関に定説がなかった一因と考えられる。また遺伝子異常があるにもかかわらず免疫染色陰性の症例が約 1/3 あることは、免疫染色の結果を評価するうえで考慮すべき事実である。

hnRNP B1 蛋白質の高発現は特に扁平上皮癌の全例で、臨床病期 I 期の段階から認められた。抗 hnRNP B1 抗体を用いた肺癌細胞の同定法を喀痰細胞診に応用し、肺癌検診や肺癌術後再発の早期診断への有用性を示した。また、hnRNP B1 蛋白質の高発現が発癌の早期から認められることから、hnRNP B1 蛋白質の高発現の機序の解析は、肺癌発生機構の解明の上でも重要なので、今後の課題としたい。

#### E. 結論

骨軟部腫瘍において p53, P16, P14 などの癌抑制遺伝子の異常が予後不良因子であることを示した。この結果が多数例による追試で確認されるなら、リスクに応じた治療法を試みて、治療成績が改善するかどうか調べてみたい。血中 MDM2 蛋白自己抗体の競合免疫反応に基づく EIA 法を開発し、早期がん診断への臨床的有用性を検討した。男性では大腸癌、胃癌、肺癌、女性では乳癌の新しい腫瘍マーカーとして有用性が示された。ER 遺伝子の癌特異的発現亢進に ERBF-1 が重要であることを明らかにした。また、ER 発現の抑制はこれらの因子の消失や遺伝子そのもののメチル化など複数の機構によることを明らかにした。肺癌の p53 遺伝子異常のうち null 変異は約 1/3 と高頻度の症例に存在する。null 変異腫瘍は p53 免疫染色陰性であり、早期肺癌(病理病期 I 期)の予後不良因子である。hnRNP B1 蛋白質の高発現は、肺扁平上皮癌の全例で、臨床病期 I 期の段階から認められた。またその発現亢進は、潜在微小肺扁平上皮癌、異形成病変、早期口腔癌、口腔白板症にもみられることを明らかにした。今後、早期診断マ

ーカーとしての臨床的有用性が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sakakibara, M., Koizumi, S., Saikawa, Y., Wada, H., Ichihara, T., Sato, H., Horita, S., Mugishima, H., and Kaneko, Y. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastomas. *Cancer*, 85: 231-239, 1999.
- 2) Kaneko, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Nakagawara, A., and Sakurai, M. Disomy 1 with terminal 1p deletion was frequent in mass screening-negative/late-presenting neuroblastomas in young children, but not in mass screening-positive neuroblastomas in infants. *Int. J. Cancer*, 80: 54-59, 1999.
- 3) Nakadate, H., Tsuchiya, T., Maseki, N., Hatae, Y., Tsunematsu, Y., Horikoshi, Y., Ishida, Y., Kikuta, A., Eguchi, H., Endo, M., Miyake, M., Sakurai, M., and Kaneko, Y. Correlation of chromosome abnormalities with presence or absence of WT1 deletions/mutations in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 25: 26-32, 1999.
- 4) Kumon, K., Kobayashi, H., Maseki, N., Sakashita, A., Sakurai, M., Tanizawa, A., Imashuku, S., and Kaneko, Y. Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21): an analysis of AF10-CALM and CALM-AF10 fusion mRNAs and clinical features. *Genes Chromosomes Cancer*, 25: 33-39, 1999.
- 5) Iwasaki, H., Ishiguro, M., Ohjimi, Y., Ikegami, H., Takeuchi, T., Kikuchi, M., Kaneko, Y., and Ariyoshi, A. Synovial sarcoma of the prostate with t(X;18)(p11.2;q11.2). *Am. J. Surg. Pathol.*, 23(2): 220-226, 1999.
- 6) Kawamura, M., Ohnishi, H., Guo, S., Sheng, X. M., Minegishi, M., Hanada, R., Horibe, K., Hongo, T., Kaneko, Y., Bessho, F., Yanagisawa, M., Sekiya, T., and Hayashi, Y. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 23: 115-126, 1999.
- 7) Ichimiya, S., Nimura, Y., Kageyama, H., Takada, N., Sunahara, M., Shishikura, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Seki, N., Ohira, M., Kaneko, Y.,

- McKeon, F., Caput, D., and Nakagawara, A. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene*, 18: 1061-1066, 1999.
- 8) Satake, N., Maseki, N., Nishiyama, M, Kobayashi, H., Sakurai M., Inaba, H., Katano, N., Horikoshi, Y., Eguchi, H., Miyake, M., Seto, M., and Kaneko, Y. Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants. *Leukemia* 13: 1013-1017, 1999.
- 9) Nishiyama, M., Arai, Y., Tsunematsu, Y., Kobayashi, H., Asami, K., Yabe, M., Kato, S., Oda, M., Eguchi, H., Ohki, M., and Kaneko, Y. 11p15 Translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, 26: 215-220, 1999.
- 10) 金子安比古 骨軟部腫瘍・白血病にみられる ETS ファミリー遺伝子の異常. 転写因子研究 1999. 実験医学 17: 206-209, 1999.
- 11) Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., sogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
- 12) Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T., and Kaneko, Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes, and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* in press, 2000.
- 13) Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Ishii, M., and Kozu, T. : Association of MTG8(ETO/CDR), a leukemia-related protein, with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human hematopoietic cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 60-68, 1999.
- 14) 山口研成、清野祐子、神田裕三、松井武寿、石井 勝: 血中エストロゲンレセプター(ER)自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床応用を目指した癌、非癌組織におけるERステータスの検討. 腫瘍マーカー研究会誌. 14 印刷中, 2000.
- 15) Tanimoto, K., Eguchi, H., Yoshida, T., Hajiro-Nakanishi, K., and Hayashi, S. Regulation of estrogen receptor a gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer. *Nucl. Acids Res* , 27: 903-909,1999.
- 16) Saji, S., Nakashima, S., Hayashi, S., Toi, M., Saji, S., and Nozawa, Y. MDM2, a regulator for estradiol induced p53 up-regulation in breast cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 210-218, 1999.
- 17) Okamoto, K., Tanaka, H., Ogawa, H., Makino, Y., Eguchi, H., Hayashi, S., Poellinger, L., Umesono, K., and Makino, I. Redox-dependent modulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 274: 10363-10371,1999.
- 18) Tanimoto, K., Hayashi, S., Yoshiga, K., and Ichikawa, T. Polymorphisms of the CYP1A1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with cigarette dose. *Oral Oncol.*, 35: 191-196, 1999.
- 19) Matsushima, Y., Hayashi, S., and Tachibana, M. Spontaneous hyperlipidemic mice (SHLM), Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. *Mammalian Genome*, 10: 352-357, 1999.
- 20) Tokuchi, Y., Kobayashi, Y., Hayashi, S., Hayashi, M., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Nishida, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Sato, Y., Yamamoto, M., and Tsuchiya, E. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and non-cancerous lesion. *Genes Chromosomes Cancer*, 24: 105-111, 1999.
- 21) Eguchi, H., Suga, K., Saji, H., Toi, M., Nakachi, K., and Hayashi, S. Different expression patterns of Bcl-2 family genes in breast cancer by estrogen receptor status with special reference to pro-apoptotic Bak gene. *Cell Death Differ.*, in press, 2000.
- 22) Tanimoto, K., Hayashi, S., Tsuchiya, E. Tokuchi, Y., Kobayashi, Y., Yoshiga, K., and Ichikawa, T. Abnormalities of FHIT gene in human oral squamous cell carcinoma, a possible biomarker for malignant transformation of the oral epithelium. *Brit. J. Cancer*, 82: 838-843, 2000.
- 23) Tokuchi, Y., Tanimoto, T., Kobayashi, K., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in

- lung cancer, independent of p53 gene alteration. *Brit. J. Cancer*, 80 : 1623 - 1629, 1999.
- 24) Daigo, Y., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Tamari, M., Tsuchiya, E., and Nakamura, Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. *Cancer Res*, 59: 1966-1972, 1999.
- 25) 得地令郎、土屋永寿：肺癌における遺伝子検索を用いた発癌機序及び悪性度の解明。(日本人の病気と病理学)病理と臨床 17 : 262, 1999.
- 26) Hashimoto, T., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Nishida, K., Hayashi, S., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Nakagawa, K., Hayashi, J., and Tsuchiya, E. p53 null mutation undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early stage non-small-cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 59: 5572-5577, 1999.
- 27) 得地令郎、土屋永寿：遺伝子異常とその表現型からみた肺癌。呼吸 18 : 1230-1235、1999.
- 28) Izumo, T., Maseki, N., Mori, S., and Tsuchiya, E. Practical utility of the revised European-American classification of lymphoid neoplasms for Japanese non-Hodgkin lymphomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 351-360, 2000.
- 29) Goto, Y., Sueoka, E., Chiba, H., and Fujiki, H. Significance of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new early detection marker for oral squamous cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 1358-1363, 1999.
- 30) Sueoka, E., Goto, Y., Sueoka, N., Kai, Y., Kozu, T., and Fujiki, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res.*, 59: 1404-1407, 1999.
- 31) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E., and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in tumor promotion as revealed by TNF- $\alpha$ -deficient mice. *Cancer Res.*, 59: 4516-4518, 1999.
2. 学会発表
- 1) 公文和子、小林泰文、柵木信男、坂下暁子、桜井雅温、谷澤昭彦、今宿晋作、金子安比古。t(10;11)(p13;q21)転座型急性白血病は mixed lineage 抗原を示す：AF10-CALM 遺伝子分析と臨床像。第 61 回日本血液学会抄録。平成 11 年 4 月
- 2) 金子安比古、中舘尚也、土屋登嗣。ウイルムス腫瘍の病理組織型、染色体異常、WT1 異常の関係。第 58 回日本癌学会総会記事。平成 11 年 9 月
- 3) 金子安比古、佐竹典子、柵木信男、西山真由美、小林泰文、桜井雅温、他 6 名。乳児急性骨髄性白血病の染色体異常と MLL 遺伝子再構成。第 41 回日本臨床血液学会総会抄録。平成 11 年 10 月
- 4) 金子安比古、土屋登嗣、日野原眞一、関根紀一。骨肉腫と Ewing 肉腫における p15, p16, p14ARF, p53, MDM2 遺伝子異常と予後。第 15 回日本小児がん学会総会プログラム。平成 11 年 11 月
- 5) 石井 勝、山口研成、清野祐子、神田裕三、林 慎一。血中エストロゲンレセプター (ER) 自己抗体を腫瘍マーカーとしたがん診断法。第 58 回日本癌学会総会。広島, 1999.
- 6) 西田一典、小林康人、林 泉、土屋繁裕、中川健、得地令郎、橋本毅久、林 盛昭、石川雄一、土屋永寿。肺の adenomatosis と診断した一例。日本病理学会会誌, 第 88 巻 p169, 1999.
- 7) 小林康人、佐藤之俊、得地令郎、橋本毅久、林盛昭、西田一典、石川雄一、高橋 敦、土屋永寿。定型から非定型へ増悪したと考えられる肺カルチノイド腫瘍の一例。日本病理学会会誌, 第 88 巻, p169, 1999.
- 8) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、小林康人、西田一典、林 慎一、石川雄一、中川 健、林 純一、土屋永寿。MASA 法を用いた肺癌微小リンパ節転移の検索。日本病理学会会誌, 第 88 巻 p182, 1999.
- 9) Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Kawakami, Y., and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *American Association For Cancer Research (AACR)*, 90th, p279, 1999.
- 10) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤洋、平井康夫、中川 健、石川雄一、土屋永寿。非小細胞肺癌の comparative genetic hybridization (CGH)法による染色体異常解析と臨床病理学的特徴。第58回日本癌学会総会記事。p312, 1999.
- 11) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、土屋永寿、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤洋、石川雄一、平井康夫、中川 健。CGH 法を用いた非小細胞肺癌の遺伝子異常解析。第40回日本肺癌学

会総会号. p663, 1999.

G. 知的所有権の取得状況  
なし



## 分担研究報告書

### 骨軟部腫瘍の遺伝子診断と治療成績の改善に関する研究

主任研究者 金子 安比古

埼玉県立がんセンター病院 化学療法部長

**研究要旨** Ewing 肉腫と骨肉腫は代表的な骨軟部腫瘍であり、前者には染色体転座により EWS 融合遺伝子が形成されているが、後者に特有な遺伝子変化は知られていない。Ewing 肉腫と骨肉腫において、癌抑制遺伝子 P16, P15, P14, p53 と癌遺伝子 MDM2 の異常を分析した。P16, P15, P14 異常は両肉腫の 10～20%にみられた。p53 異常は骨肉腫の 50%にみられたが、Ewing 肉腫には 4%しかみられなかった。p53 異常は骨肉腫の、P16, P14 異常は Ewing 肉腫の予後不良因子であった。Ewing 肉腫の発生には EWS 融合遺伝子が、骨肉腫の発生には p53 異常が、それぞれ決定的な役割を果たしていると考えられた。

#### A. 研究目的

骨軟部腫瘍の診断は難しく、診断を誤ったり、手間取ることが多い。そのため、適切な治療が適切な時期に開始されない場合が生じている。Ewing 肉腫と骨肉腫は代表的骨軟部腫瘍である。両者とも難治であり、新たな予後因子の発見や治療法の改善が必要である。前者は染色体転座により生じる EWS 融合遺伝子を有するので、これを利用して正確に診断できる。骨軟部腫瘍の発生や、進展に癌抑制遺伝子の関与が予測されるが、予後因子としての役割は解明されていない。治療面では、末梢血幹細胞移植を併用した超大量化学療法が実用化しているが、難治性の骨軟部腫瘍の治療成績に役立つかどうか明らかではない。遺伝子診断を用いて骨軟部腫瘍の病名を正確に診断する。また、分子生物学的予後因子を明らかにして、幹細胞移植を含めた治療法を選択し、治療成績の改善をめざす。

#### B. 研究方法

対象は骨肉腫 30 例(年齢 6～55 歳)と Ewing 肉腫 24 例(年齢 0～30 歳)である。Ewing 肉腫 24 例中、11 例は骨原発、13 例は骨外原発であり、全例がサザン法または RT-PCR 法により EWS 融合遺伝子を有していると証明された。骨肉腫と Ewing 肉腫において、癌抑制遺伝子 p53, P15, P16, P14 と癌遺伝子 MDM2 の異常を、サザン法、

PCR-SSCP 法、塩基配列決定法にて分析した。P15, P16 については、メチル化部位認識制限酵素とサザン法によるメチル化についても分析した。分析した遺伝子異常の有無により患者を分類し、各群の無病生存曲線を Kaplan-Meier 法でもとめ、有意差を log-rank 法により検定した。

(倫理面への配慮)

研究のため検体を使用することについて、患者からインフォームドコンセントを得るように努めた。また、研究結果が第三者に特定されないように配慮した。

#### C. 研究結果

サザン分析で P16, P15, P14 のホモ欠失を骨肉腫 2 例と Ewing 肉腫の 2 例に認めた。P16 の PCR-SSCP 分析では Ewing 肉腫の 1 例にのみ異常バンドが検出された。この DNA の塩基配列を決定したところ、コドン 72 にナンセンス変異が証明された。P16 と P14 は同じエクソンを共有しているが、異なる読み枠をとるので、同一の点変異により、P14 のコドン 94 にミスセンス変異が生じたことになる。メチル化分析の結果 P15 のメチル化を骨肉腫の 1 例、Ewing 肉腫の 2 例に、P16 のメチル化を骨肉腫の 2 例、Ewing 肉腫の 1 例に認めた。

骨肉腫に対する p53 のサザン分析ではホモ欠失を 3 例に、再構成バンドを 9 例に認めた。対照に用いた白血病細胞のサザン分析では再構成バ

ンドはみられなかったので、これらの再構成バンドは RFLP によるのではなく、ヘミ欠失を表していると考えられた。Ewing 肉腫のサザン分析では、再構成バンドを示した腫瘍はなかった。p53 の PCR-SSCP 分析では骨肉腫の 4 例と Ewing 肉腫の 1 例に異常バンドが検出された。塩基配列分析から、骨肉腫の 3 例と Ewing 肉腫の 1 例にミスセンス変異が、骨肉腫の 1 例にスプライス・アクセプターサイトの点変異がみられた。

以上の結果をまとめると、p53, P16, P15, P14 異常はそれぞれ骨肉腫の 50%, 19%, 14%, 9% に、Ewing 肉腫の 4%, 17%, 17%, 13% にみられたことになる。MDM2 異常は骨肉腫と Ewing 肉腫のどちらにもみられなかった。

p53 異常を示す骨肉腫患者の予後は p53 異常を示さない骨肉腫患者より不良であった ( $P=0.048$ )。また P16, P14 異常を示す Ewing 肉腫患者の予後は P16, P14 異常を示さない Ewing 肉腫患者より不良であった ( $P=0.019$ )。P15 遺伝子異常の有無で分類した患者群の予後に有意差はなかった。

#### D. 考察

P16, P15 遺伝子はサイクリン依存性キナーゼ抑制因子をコードしており、その不活化は細胞の形質転換や不死化を引き起こす。P16, P15 欠失は急性リンパ性白血病をはじめとして、さまざまな腫瘍で報告されている。しかし、骨軟部腫瘍でそのメチル化や微小変異を分析した研究や、P14 異常を分析した研究は見当たらない。私たちは P16, P15 異常を骨肉腫の 19% と 14%、Ewing 肉腫の 17% と 17% に見いだした。P14 欠失を有する腫瘍は P16, P15 も欠失しており、P16 点変異を有する腫瘍は P14 が P16 と同じエクソンを共有することから、P14 の点変異も有していた。

p53 異常は骨肉腫の半数にみられたが、Ewing 肉腫では 4% と、まれであった。前述のように、P16, P15, P14 異常の頻度は骨肉腫とも 10 ~ 20% で低かった。この結果から、骨肉腫の発生に p53 異常が、Ewing 肉腫の発生に EWS 融合遺伝子がそれぞれ決定的な働きをしていると考えられた。P16, P14 異常をもつ Ewing 肉腫患者の予後は P16, P14 異常をもたない Ewing 肉腫患者に比して不良であったので、これらの遺伝子異常は Ewing 肉腫

の進展・進行に関係していると考えられた。

p53 異常のある骨肉腫患者の予後は p53 異常のない骨肉腫患者に比して不良であった。p53 異常の有無が予後に関係するという報告は悪性グリオーマや、慢性リンパ性白血病でもなされている。p53 異常は腫瘍細胞のシスプラチン耐性を引き起こすという研究がある。シスプラチンは骨肉腫の化学療法に用いるキードラッグのひとつであるので、p53 異常を有する骨肉腫患者の予後が不良な理由はシスプラチン耐性と関係しているかもしれない。

p53 異常を有する骨肉腫患者や P16, P14 異常を有する Ewing 肉腫患者の予後は不良なので、十分強力な化学療法を行うことが重要であり、末梢血幹細胞移植療法を併用した超大量化学療法も試みられるべき治療法である。

#### E. 結論

骨軟部腫瘍の癌抑制遺伝子異常が予後不良因子であることを示した。この結果が多数例による追試で確認されるなら、予後因子により骨軟部腫瘍患者を層別化し、リスクに応じた治療を試みて、治療成績が改善するかどうか調べてみたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sakakibara, M., Koizumi, S., Saikawa, Y., Wada, H., Ichihara, T., Sato, H., Horita, S., Mugishima, H., and Kaneko, Y. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastomas. *Cancer*, 85: 231-239, 1999.

2) Kaneko, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Nakagawara, A., and Sakurai, M. Disomy 1 with terminal 1p deletion was frequent in mass screening-negative/late-presenting neuroblastomas in young children, but not in mass screening-positive neuroblastomas in infants. *Int. J. Cancer*, 80: 54-59, 1999.

3) Nakadate, H., Tsuchiya, T., Maseki, N., Hatae, Y., Tsunematsu, Y., Horikoshi, Y., Ishida, Y., Kikuta, A., Eguchi, H., Endo, M., Miyake, Sakurai, M., and Kaneko, Y. Correlation of chromosome

- abnormalities with presence or absence of WT1 deletions/mutations in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 25: 26-32, 1999.
- 4) Kumon, K., Kobayashi, H., Maseki, N., Sakashita, A., Sakurai, M., Tanizawa, A., Imashuku, S., and Kaneko, Y. Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21): an analysis of AF10-CALM and CALM-AF10 fusion mRNAs and clinical features. *Genes Chromosomes Cancer*, 25: 33-39, 1999.
- 5) Iwasaki, H., Ishiguro, M., Ohjimi, Y., Ikegami, H., Takeuchi, T., Kikuchi, M., Kaneko, Y., and Ariyoshi, A. Synovial sarcoma of the prostate with t(X;18)(p11.2;q11.2). *Am. J. Surg. Pathol.*, 23(2): 220-226, 1999.
- 6) Kawamura, M., Ohnishi, H., Guo, S., Sheng, X. M., Minegishi, M., Hanada, R., Horibe, K., Hongo, T., Kaneko, Y., Bessho, F., Yanagisawa, M., Sekiya, T., and Hayashi, Y. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 23: 115-126, 1999.
- 7) Ichimiya, S., Nimura, Y., Kageyama, H., Takada, N., Sunahara, M., Shishikura, T., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Seki, N., Ohira, M., Kaneko, Y., McKeon, F., Caput, D., and Nakagawara, A. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene*, 18: 1061-1066, 1999.
- 8) Satake, N., Maseki, N., Nishiyama, M., Kobayashi, H., Sakurai, M., Inaba, H., Katano, N., Horikoshi, Y., Eguchi, H., Miyake, M., Seto, M., and Kaneko, Y. Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants. *Leukemia* 13: 1013-1017, 1999.
- 9) Nishiyama, M., Arai, Y., Tsunematsu, Y., Kobayashi, H., Asami, K., Yabe, M., Kato, S., Oda, M., Eguchi, H., Ohki, M., and Kaneko, Y. 11p15 Translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, 26: 215-220, 1999.
- 10) Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
- 11) Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T., and Kaneko, Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes, and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* in press.
- 12) 金子安比古 骨軟部腫瘍・白血病にみられる ETS ファミリー遺伝子の異常. *転写因子研究 1999. 実験医学* 17: 206-209, 1999.

## 2. 学会発表

- 1) 公文和子、小林泰文、柵木信男、坂下暁子、桜井雅温、谷澤昭彦、今宿晋作、金子安比古. t(10;11)(p13;q21)転座型急性白血病は mixed lineage 抗原を示す: AF10-CALM 遺伝子分析と臨床像. 第 61 回日本血液学会抄録、平成 11 年 4 月
- 2) 金子安比古、中舘尚也、土屋登嗣 ウイルムス腫瘍の病理組織型、染色体異常、WT1 異常の関係.. 第 58 回日本癌学会総会記事、平成 11 年 9 月
- 3) 金子安比古、佐竹典子、柵木信男、西山真由美、小林泰文、桜井雅温、他 6 名. 乳児急性骨髄性白血病の染色体異常と MLL 遺伝子再構成. 第 41 回日本臨床血液学会総会抄録、平成 11 年 10 月
- 4) 金子安比古、土屋登嗣、日野原眞一、関根紀一 骨肉腫と Ewing 肉腫における p15, p16, p14ARF, p53, MDM2 遺伝子異常と予後. 第 15 回日本小児がん学会総会プログラム、平成 11 年 11 月

## 分担研究報告書

### 腫瘍免疫を用いたがんの早期診断の開発に関する研究

分担研究者 石井 勝

埼玉県立がんセンター 総長

**研究要旨** がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として、発癌、がんの進展に重要な役割を演じている MDM2 (Murine Double Minute 2) 蛋白に対する血中 MDM2 自己抗体による早期がん診断法の開発を試みた。血中 MDM2 蛋白抗体の測定はマイクロプレート固相化 MDM2 合成ペプチド抗原 (N末側の 20 アミノ酸残基) に対して血中 MDM2 蛋白抗体と合成ペプチド家兎抗体とを競合免疫反応させた後、固相化 MDM2 抗原に結合した合成ペプチド家兎抗体をワサビペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ラット抗体を反応させる方法により行った。本法により MDM2 蛋白自己抗体を測定した結果、健常人では女性が男性に比較して推計学的に有意 ( $P<0.001$ ) に高値を示した。カットオフ値を 15ng/ml に設定した場合の陽性率は男性の癌が 78 % (38/49) で、なかでも大腸癌、胃癌、肺癌で有意 ( $P<0.001$ ) に高値を示し、陽性率は高い傾向にあった。他方、女性は健常人に比較し、癌では有意に高値を示さなかったが、乳癌で有意 ( $P<0.001$ ) に低値を示し、陰性率は 52 % と高率であった。以上の成績から、血中 MDM2 蛋白自己抗体は男性では大腸癌、胃癌、肺癌、女性では乳癌の腫瘍マーカーとして有用性が示唆された。

#### A. 研究目的

MDM2 蛋白はがん抑制遺伝子産物の 1 つである p53 によって転写活性化され、p53 と結合するがん遺伝子産物であり、p53 に結合して p53 の転写活性を抑制することが知られている。近年、MDM2 蛋白による p53 の作用抑制機構に MDM2 蛋白がユビキチンリカーゼとして働き、p53 をユビキチン化して p53 を分解に導く作用があることが判明した。従って、がん遺伝子産物 MDM2 蛋白は各種がん細胞において高発現が認められ、p53 の分解酵素として働くことから、がんの発生機構に重要な役割をしていると考えられる。他方、担がん宿主においては腫瘍免疫反応により、がん細胞が破壊され、細胞核内に存在する MDM2 蛋白が細胞外へ移行する結果、体液性抗体の産生が生ずると考えられる。そこで、血中 MDM2 蛋白自己抗体の定量測定法の開発を行い、本測定法により各種がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定を行い、早期がん診断に対する血中 MDM2 蛋白自己抗体の臨床的有用性を検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### a) 血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定方法

MDM2 蛋白は N 末端側の 20 アミノ酸残基から成る合成ペプチドを抗原として用い、そのペプチド抗原に対する特異的なポリクローナル家兎抗体を抗体として用いた。マイクロプレート固相化 MDM2 蛋白合成ペプチド抗原に対して、血中の MDM2 蛋白自己抗体と MDM2 蛋白合成ペプチド特異家兎抗体とを競合免疫反応させる酵素免疫測定法 (EIA) を開発し、本法により血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定を行った。以下にその測定手順を述べる。マイクロプレート固相化 MDM2 蛋白合成ペプチド抗原に、標準抗体液を入れるウエルには緩衝液のみを、血清は緩衝液にて 9 倍希釈した液を各々 100  $\mu$  l ずつ加え、室温で 90 分反応させた。各ウエルを洗浄後、11.25ng/ml から 180ng/ml まで 5 濃度に調製した各標準 MDM2 蛋白家兎抗体液および被検血清を反応させた各ウエルには標準 MDM2 蛋白家兎抗体液の 180ng/ml を各ウエルあたり 100  $\mu$  l ずつ入れ、室温で 90 分

反応させた。各ウエルを生食水にて洗浄後、固相化 MDM2 蛋白合成ペプチド抗原に結合した MDM2 蛋白合成ペプチド特異家兎 I g G 抗体にワサビペルオキシダーゼ標識抗家兎 I g G ラット抗体を各ウエルあたり 100  $\mu$  l ずつ注入し、室温で 45 分反応させた。各ウエルを生食水にて洗浄後、基質として過酸化水素水を含む発色剤 (A B T S) をウエルあたり 100  $\mu$  l ずつ加えて室温 30 分反応させ、反応停止液 (0.1%NaN<sub>3</sub>) を各ウエルあたり 100  $\mu$  l を加えて、波長 420 nm の吸光度を測定した。各標準 MDM2 蛋白抗体の吸光度から MDM2 蛋白抗体標準検量線を作成し、その標準検量線から各被検血清中の MDM2 蛋白自己抗体量を求めた。

#### b)対象検体

対象検体は男性 69 例および女性 65 例の計 134 例の血清検体を用いた。その男女別の内訳は健常人が各 20 例、大腸癌が 11 例と 5 例、胃癌が 19 例と 3 例、膵癌が 4 例と 1 例、原発性肝癌が 4 例と 1 例、肺癌が 11 例と 4 例、および乳癌 27 例、卵巣癌 4 例であった。各血清は MDM2 蛋白自己抗体の測定時まで凍結保存し、健常人以外は未治療または術前症例の血清であった。

(倫理面への配慮)

平成 11 年度のこの研究内容については、埼玉県立がんセンター倫理委員会で審議され、承認を受けた。個人情報に関係する研究結果については本人が希望すれば伝えるが、第三者には決して伝えないこととした。

### C. 研究結果

#### a)血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定成績

競合免疫反応に基づく EIA を開発し、本法により健常人および各種がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定を行った。その結果、健常人では女性 20 例の血中 MDM2 蛋白自己抗体の [平均値  $\pm$  2SD(標準偏差の 2 倍)] は 27.5  $\pm$  18.6 ng/ml で、男性 20 例のそれは 8.2  $\pm$  11.9 ng/ml で、女性が男性に比較して統計学的に有意(P<0.001)に高値を示した。一方、男性のがん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の [平均値  $\pm$  2SD] は大腸癌が 24.9  $\pm$  17.4ng/ml、胃癌が 20.6  $\pm$  22.8 ng/ml、膵癌が 15.7  $\pm$  7.9

ng/ml、原発性肝癌が 29.0  $\pm$  23.8 ng/ml、肺癌が 28.5  $\pm$  22.0 ng/ml となり、健常人男性に比較して男性がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体は有意に高値を示した。カットオフ値を 15ng/ml に設定した場合、男性のがん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の陽性率は 78 % (38/49) となり、とりわけ大腸癌 100 % (11/11)、胃癌 68 % (13/19)、肺癌 82 % (9/11) で高率で、健常人よりもそれぞれ有意(P<0.001)に高値を示した。また、膵癌では 50 % (2/4)、原発性肝癌では 75 % (3/4) の陽性率で、それぞれ P<0.01 と P<0.05 の有意差で高値を示した。他方、女性では健常人に比較してがん疾患における血中 MDM2 蛋白自己抗体は有意に高値を示さなかった。乳癌 27 例の血中 MDM2 蛋白自己抗体の [平均値  $\pm$  2SD] は 13.2  $\pm$  22.5 ng/ml、大腸癌 5 例では 22.5  $\pm$  20.0 ng/ml、胃癌 3 例では 21.2  $\pm$  35.5 ng/ml、肺癌 4 例では 26.9  $\pm$  26.0 ng/ml となり、健常人の抗体値よりも全症例で低い [平均値  $\pm$  2SD] となった。なかでも、乳癌ではカットオフ値 15ng/ml 以下の低値を示す症例が 27 例中 14 例存在し、その陰性率は 52 % と高率を示し、健常人女性に比較し有意(P<0.001)に低値を示した。その他のがん疾患における陰性率は大腸癌では 40 % (2/5)、胃癌では 33 % (1/3)、肺癌では 25 % (1/4)、膵癌、肝癌および卵巣癌ではそれぞれ 0 % であった。

#### D. 考察

簡便で、経済効率の優れた新しいがんの早期診断法の開発はがん克服のために重要である。このため、早期癌に役立つ新しい診断法の開発を目的に、血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を検討した。

近年、MDM2 蛋白は乳癌、肺癌などの癌細胞において正常細胞に比較して高発現が認められ、がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として発癌、がんの進展に重要な役割を演じている。細胞核内に局在する MDM2 蛋白は容易に細胞外へ移行しないが、発がん初期に宿主免疫反応により、がん細胞が破壊され、MDM2 蛋白が細胞外へ移行し、その結果、担がん宿主の血中に MDM2 蛋白自己抗体が生ずることが予測される。そこで、血中 MDM2 蛋白自己抗体

による早期がん診断法の開発を試みた。今回、MDM2 蛋白のN末端側の合成ペプチド抗原(20mer)とその抗原に対する特異的な家兎抗体を用い、競合免疫反応に基づく酵素免疫測定法(EIA)を開発した。標準抗体は合成ペプチド抗原(20mer)に対する特異家兎抗体を用い、その抗体と血中の MDM2 蛋白自己抗体とを固相化合成ペプチド抗原と競わせ、血中の MDM2 蛋白自己抗体が多ければ、固相化 MDM2 蛋白抗原に反応する特異家兎抗体は少なく、また反対に血中の MDM2 蛋白自己抗体が少なければ、固相化 MDM2 蛋白抗原に反応する特異家兎抗体は多くなる。このような競合反応により、固相化 MDM2 蛋白抗原に反応した特異家兎抗体を酵素標識抗家兎抗体を用い反応させ、基質と発色剤でその反応量を定量的に測定する方法であった。この方法による日差、日内変動は 10 %以内と良好であり、本測定法により、134 例の血清 MDM2 蛋白自己抗体を測定した。その結果、健常人の男性と女性では[平均値±2SD]に統計学的に有意( $P<0.001$ )差を認め、女性が男性に比べ高値を示し、性差があることが判明した。男性は 20 例すべてが 20ng/ml 以下を示したのに対し、女性 20 例は 10 ~ 43 ng/ml と幅広い分布を示し、20ng/ml 以下は 15 % (3/20) しか存在しなかった。そのため、がん症例についても男性と女性に分けて、測定結果を検討した。カットオフ値を暫定的に 15ng/ml と設定した場合、男性では健常人に比べ、すべてのがん症例で高い陽性率を示した。とりわけ大腸癌では 100 % (11/11)、胃癌では 68 % (13/19)、肺癌では 82 % (9/11)のそれぞれ有意( $P<0.001$ )に高い陽性率を示した。また、膵癌では 50 % (2/4)、原発性肝癌では 75 % (3/4)の陽性率を示し、それぞれ  $P<0.01$  と  $P<0.05$  の有意差が認め、各がん症例で高い陽性率を示した。この成績から、男性では大腸癌、胃癌、肺癌の腫瘍マーカーとして、血中 MDM2 蛋白自己抗体の有用性が示唆された。他方、女性では、乳癌を除く大腸癌、胃癌、膵癌、肝癌、肺癌および卵巣癌において、健常人女性に比較して、陽性率において統計学的に有意な差を認めなかったことから、女性のそれらのがん症例においては血中の MDM2 蛋白自己抗体の臨床的有用性は低いと考えられ

た。しかし、カットオフ値を 15ng/ml に設定した時に、乳癌 27 例中 14 例(52 %)がカットオフ値以下の低値を示した。従って、女性では男性の場合に用いたカットオフ値以上の陽性率ではなく、カットオフ値以下の陰性率に診断的意義があると考えた。その結果、乳癌症例では 52 %の陰性率を示し、女性では乳癌において血中 MDM2 蛋白自己抗体の臨床的有用性が期待された。また、今回測定した乳癌 27 例の内、19 例の病期別内訳は 0 期 1 例、I 期 5 例、II 期 12 例、III 期 1 例であった。カットオフ値を 15ng/ml に設定した時の病期別血中 MDM2 蛋白自己抗体の陰性化率は 0 期と I 期では 33.3 % (2/6)、II 期では 50 % (6/12)、III 期では 0 % (0/1)であった。この成績から、0 期、I 期および II 期の比較的早期の乳癌における陰性化率は 44.4 % (8/18)となり、早期乳癌において血中 MDM2 蛋白自己抗体は健常人女性に比較して、低値を呈することが判明し、早期乳癌の腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。この成績は血中に存在する自己抗体が健常人女性では遊離抗体と考えられるのに対して、乳癌症例の女性では、乳癌細胞核内から MDM2 蛋白抗原が血中に移行することにより、血中に存在する抗体と反応して抗原抗体複合物を形成していることが考えられた。本測定系では固相化 MDM2 蛋白抗原には遊離 MDM2 蛋白抗体は反応しやすいが、乳癌患者血中に存在することが予測される MDM2 蛋白抗原抗体複合物は遊離 MDM2 蛋白抗体に比較し、固相化 MDM2 蛋白抗原に反応しにくいと考えられた。その結果、乳癌患者血中 MDM2 蛋白抗体が低値を示したものと考えられた。今後、男女ともに症例を増やし、さらに早期がんにおける血中 MDM2 蛋白自己抗体の有用性についても検討を行う必要があると考えられ、一方、がん特異性が高く、早期がんを高発現を示す MDM2 蛋白抗原決定基を究明し、その抗原に対する血中自己抗体を指標としたがんの早期診断法に関する研究を進める必要があると思われた。さらに、血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定系については、簡便で短時間にしかも再現性良く測定できるサンドイッチ EIA 法を開発し、本測定法による血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての有用性について

も検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として、発がん、がん進展に重要な役割を演じている MDM2 に対する血中 MDM2 蛋白自己抗体の競合免疫反応に基づく EIA 法を開発を行い、早期がん診断への臨床的有用性を検討した。本測定法により、血中 MDM2 蛋白自己抗体を測定した結果、健常人では男性が女性に比べて血中 MDM2 蛋白自己抗体が有意に低値を示し、男性のがん疾患では大腸癌、胃癌、肺癌で健常人男性より陽性率が高率であったが、女性では乳癌で健常人女性より低値を示し、陰性率が有意に高い傾向を示した。従って、男性では大腸癌、胃癌、肺癌、女性では乳癌の新しい腫瘍マーカーとして有用性が示唆され、さらに、乳癌では早期診断への臨床的有用性が期待された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Komori,A. ,Sueoka,E., Fujiki,H., Ishii,M. and Koza , T. : Association of MTG8(ETO/CDR) , a leukemia-related protein,with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human hematopoietic cell lines. Jpn.J.Cancer Res.,90, 60-68 (1999).
- 2) 山口研成、清野祐子、神田裕三、松井武寿、石井 勝 :血中エストロゲンレセプター (ER) 自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床応用を目指した癌、非癌組織におけるERステータスの検討. 腫瘍マーカー研究会誌. 14 印刷中, (2000).

### 2. 学会発表

- 1) 石井 勝、山口研成、清野祐子、神田裕三、林 慎一 :血中エストロゲンレセプター (ER) 自己抗体を腫瘍マーカーとしたがん診断法. 第 58 回日本癌学会総会. 広島, (1999).

## 分担研究報告書

ホルモン依存性がん核内受容体の機能と臨床応用に関する研究

分担研究者 林 慎一

埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

**研究要旨** 乳がんの発生に中心的役割を果たすエストロゲンレセプター (ER)の癌特異的な発現亢進や癌進展時の発現消失の分子機序を明らかにし、乳癌の診断、予防への応用の可能性を探ることを目的に ER 遺伝子の発現制御機構を解析した。その結果、本遺伝子の転写に重要な因子を同定し、さらに本遺伝子のメチル化も発現の調節に重要であることを明らかにした。

### A. 研究目的

早期乳癌で特徴的に見られるエストロゲンレセプター (ER) の癌特異的な発現亢進や癌進展時の発現消失の分子機序を明らかにし、乳癌の診断、予防への応用の可能性を探る。

### B. 研究方法

ER 遺伝子の発現調節領域の分子生物学的解析から発現亢進の原因となっている因子を探索し、単離同定を試みる。さらに主要な発現抑制の機序と考えられる遺伝子のメチル化について解析する。

### C. 研究結果

乳癌における ER 遺伝子の発現亢進にはプロモーターBによる転写が重要であることを明らかにし、さらにプロモーターBからの転写を規定するシスエレメントとその結合因子(ERBF-1)の存在を同定した。また、発現抑制にはメチル化が重要な要因となっていることを明らかにした。

### D. 考察

ER の発現はエストロゲン依存性癌発生に密接に関連し、また細胞のホルモン感受性を規定するとともにホルモン療法の有効性にも関係する。また、癌の進展・悪性化に伴うホルモン依存性の消失の現象とも関連して非常に重要な問題であるが、その制御機構は不明であった。今回、癌特異

的発現制御機構の一端を明らかにし、少なくとも ERBF-1 がその key factor である可能性を示した。この因子が他の応答性因子群と共同的に作用して ER 遺伝子の発現を調節している可能性が考えられる。また、このような因子の存在と共に、遺伝子側のメチル化などもその発現を規定する因子であることが明らかとなった。

### E. 結論

ER 遺伝子の癌特異的な発現亢進に ERBF-1 が重要であることを明らかにした。また、ER 発現の抑制はこれらの因子の消失や遺伝子そのもののメチル化など複数の機構によることが明らかとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1)Hidetaka Eguchi, Kenji Suga, Hisashi Saji, Masakazu Toi, Kei Nakachi, and Shin-ichi Hayashi : Different Expression Patterns of Bcl-2 Family Genes in Breast Cancer by Estrogen Receptor Status with Special Reference to Pro-apoptotic Bak Gene. Cell Death and Differ., in press (2000).

2)Keiji Tanimoto, Shin-ichi Hayashi, Eiju Tsuchiya, Yoshio Tokuchi, Yasuhito Kobayashi, Koji Yoshiga, and Takeshi Ichikawa : Abnormalities of FHIT Gene in Human Oral Squamous Cell Carcinoma, A Possible Biomaker



for Malignant Transformation of the Oral Epithelium. *British J. Cancer*, 82, 838-843 (2000).

3) Takehisa Hashimoto, Yoshio Tokuchi, Moriaki Hayashi, Yasuhito Kobayashi, Kazunori Nishida, Shin-ichi Hayashi, Yuichi Ishikawa, Ken Nakagawa, Jun-ichi Hayashi, and Eiju Tsuchiya : p53 Null Mutations Undetected by Immunohistochemical Staining Predict a Poor Outcome with Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Cancer Res.*, 59, 5572-5577 (1999).

4) Keiji Tanimoto, Hidetaka Eguchi, Takashi Yoshida, Kyoko Hajiro-Nakanishi, and Shin-ichi Hayashi : Regulation of Estrogen Receptor a Gene Mediated by Promoter B Responsible for Its Enhanced Expression in Human Breast Cancer. *Nucl. Acids Res.*, 27, 903-909 (1999).

5) Shigehira Saji, Shigeru Nakashima, Shin-ichi Hayashi, Masakazu Toi, Shigetoyo Saji, and Yoshinori Nozawa : MDM2, a Regulator for Estradiol Induced p53 Up-regulation in Breast Cancer Cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 210-218 (1999).

6) Kensaku Okamoto, Hirotohi Tanaka, Hidesato Ogawa, Yuichi Makino, Hidetaka Eguchi, Shin-ichi Hayashi, Lorenz Poellinger, Kazuhiko Umesono, and Isao Makino: Redox-dependent Modulation of Nuclear Import of the Glucocorticoid Receptor. *J. Biol. Chem.*, 274, 10363-10371 (1999).

7) Yoshio Tokuchi, Takehisa Hashimoto, Yasuhito Kobayashi, Moriaki Hayashi, Shin-ichi Hayashi, Kazunori Nishida, Yuichi Ishikawa, Ken Nakagawa, and Eiju Tsuchiya : The expression of p73, a new p53 homolog, is increased in lung cancer. *British J. Cancer*, 80, 1623-1629 (1999).

8) Keiji Tanimoto, Shin-ichi Hayashi, Koji Yoshiga and Takeshi Ichikawa : Polymorphisms of the CYP1A1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with cigarette dose. *Oral Oncology*, 35, 191-196 (1999).

9) Yoshiumi Matsushima, Shin-ichi Hayashi, and Masayoshi Tachibana : Spontaneous hyperlipidemic mice (SHLM), Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. *Mammalian Genome*, 10, 352-357 (1999).

10) Yoshio Tokuchi, Yasuhito Kobayashi, Shin-ichi Hayashi, Moriaki Hayashi, Keiji Tanimoto, Takehisa Hashimoto, Kazunori Nishida, Yuichi Ishikawa, Ken Nakagawa, Yukitoshi Sato, Mitsunobu Yamamoto, and Eiju Tsuchiya : Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and non-cancerous lesion. *Genes Chromosomes & Cancer*, 24, 105-111 (1999).

## 分担研究報告書

### 遺伝子異常を用いた肺癌の早期診断と予後の研究に関する研究

分担研究者 土屋 永寿

埼玉県立がんセンター研究所 主幹兼部長

**研究要旨** p53 遺伝子異常を分子生物学的に解析し異常の種類別に分類し、それらと免疫組織学的染色結果との一致率を検討し、両者の結果と予後との関係を検討した。検索対象は144例の切除非小細胞肺癌(腺癌107、扁平上皮癌37)で、p53 遺伝子はエクソン4-8、及び10をPCR-SSCP法で検索し、シーケンス解析を行った。遺伝子異常は missense 変異と null 変異に分類した。免疫染色は腺癌例に対して RSP53 抗体を用いて行った。その結果、p53 遺伝子異常は65例(45%)に認められ、うち44例は missense 変異、21例は null 変異であった。一方、免疫染色では40例(37%)が陽性を示し、missense 変異は76%が陽性であったが、null 変異は一例を除き他の全て(93%)が陰性であった。遺伝子異常と免疫染色陽性の一致率は65%と低かった。予後との関係を変異別に見ると、null 変異の症例は病理病期Iで有意に予後不良と相関しており(p=0.03)、missense 変異や変異なしは予後との相関を認めなかった。免疫染色結果と予後との相関も認めなかった。以上より、遺伝子異常と免疫染色陽性の一致率は低く、遺伝子異常のうち p53 の null 変異のみが早期の肺癌で予後不良の指標となる。

#### A. 研究目的

肺癌の死亡率を下げるために新たな方策が検討されている。現在、肺癌手術後の個々の症例の予後を予測することは困難であるが、もし、それが可能となれば、予後不良症例について強力な化学療法や遺伝子治療などを行うことにより、予後の改善が可能になると思われる。p53 遺伝子異常の存在が肺癌の予後不良の指標となる可能性が指摘されているが、反対の意見もあり定まった見解がない。その原因として、p53 遺伝子異常の解析には分子生物学的解析方法と免疫組織学的解析方法があり、両者の一致率は高いとの仮定のもとにそれぞれの結果が同じ比重で扱われ、予後との検討が行われているが、この仮定が誤りである可能性がある。また最近 p53 遺伝子は変異の種類により生物学的活性が異なるとの報告がなされた。そこで、p53 遺伝子異常を分子生物学的に解析し異常の種類別に分類し、免疫組織学的解析結果との一致率を検討し、それらの結果と予後との関係を検討することで、p53 遺伝子異常が肺癌の予後予測の指標になるか否かを検討した。

#### B. 研究方法

検索対象は144例の切除非小細胞肺癌(腺癌107、扁平上皮癌37)で、いずれも術後5年以上経過し、完全な予後追跡が行われている症例である。p53 遺伝子は、分子生物学的には新鮮凍結腫瘍組織から抽出されたDNAにつき、エクソン4-8、及び10をPCR-SSCP法で検索し、シーケンス解析を行った。遺伝子異常の種類は missense 変異と null 変異(nonsense 変異、deletion、insertion、及び splicing junction 変異)に分類した。免疫染色は腺癌例に対して RSP53 抗体を用いて行い、腫瘍細胞の15%以上が染色された場合陽性とした。統計学的解析は $\chi^2$ 検定、フィッシャーズテスト、スチューデントテスト、生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いログランクテストおよび多変量解析で検討した。

(倫理面への配慮)

特定の個人が同定されないように配慮した。

#### C. 研究結果

p53 遺伝子異常は65例(45%)に認められ、病

病理病期 I よりも II - IIIB 期で頻度が有意に高く ( $p=0.01$ )、扁平上皮癌の方が高く、喫煙者で高い傾向が認められたが、組織分化度とは関係なかった。変異の種類別では、44例(68%) は missense 変異、21例(32%) は null 変異で、それらの分布は年齢、性、組織型、分化度、病理病期で差を認めなかった。免疫染色では40例(37%)が陽性で、p53 遺伝子異常との間に有意の相関が認められたが、陽性と遺伝子異常との一致率は65%と低かった。変異の種類別で見ると、missense 変異の症例は76%が陽性であったが、null 変異の症例は一例を除き他の全て(93%)が陰性であった。予後との関係では、全症例ではp53遺伝子異常を有する症例は異常のない症例よりも有意に予後不良であった。しかし、病期の進んだものに p53 陽性が多かったことから病理病期 I と II 以上の症例に分けて検討すると、いずれも遺伝子異常と予後との間には有意の相関は認められなかった。また免疫染色と予後との関係も認められなかった。しかし、変異の種類別に検討すると、病期 I では null 変異を有する症例は変異のない症例よりも有意に予後が悪く( $P=0.008$ )、多変量解析でも独立した予後因子であった。また missense 変異症例と比較しても予後の悪い傾向 ( $p=0.079$ )が認められた。しかし、病期 II 以上の症例ではそのような相関は認められなかった。一方 missense 変異と変異の無い症例とでは病期別でも全く相関は認められなかった。

#### D. 考察

我々の検索症例における p53 遺伝子異常の頻度は、100例以上の日本人の非小細胞肺癌の全エクソンを検索して得られた異常の頻度と同じであり、null 変異の頻度もこれまでの報告(20-42%)と一致するものであった。早期の肺癌において missense 変異ではなく、null 変異のみが予後不良と関係していた理由は以下のことが考えられる。p53 蛋白の生物学的機能にとって重要なのは C 末端で、この部分は細胞増殖の抑制やアポトーシス、DNA との結合、Bax や p21Waf1 等の転写に必要である。したがって、missense 変異を起こしても C 末端が正常に残っていれば p53 蛋白の機能の一部は残存するが、null 変異を起こすと p53 蛋白の機能は全く失われてしまう。

進行した(病理病期 II 以上)肺癌切除例では p53 の null 変異が予後不良と相関しなかった理由としては、早期の肺癌(病理病期 I 期)では細胞の生物学的悪性度に影響を与える遺伝子異常はまだ少ないため p53 遺伝子異常の相対的影響力は大きい、進行癌では他の悪性度と関連した遺伝子異常が多く加わり、p53 遺伝子異常の相対的影響力が小さくなるためと思われる。

免疫染色陽性の認識方法及びその頻度はこれまでの多くの報告と同じであったことから、一般の肺癌の染色性を代表するものと考えられる。陽性と遺伝子異常との一致率は低かったが、このことが p53 遺伝子異常と予後との相関に定説がなかった一因と考えられる。また遺伝子異常があるにもかかわらず免疫染色陰性の症例が約1/3あることを常に念頭におく必要がある。

#### E. 結論

p53 遺伝子異常のうち null 変異は約1/3と高頻度に存在し、免疫染色は陰性であり、早期の肺癌(病理病期 I 期)の予後不良の指標となる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokuchi, Y., Tanimoto, T., Kobayashi, K., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K. and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. Br.J.Cancer 80 : 1623 - 1629, 1999
- 2) Daigo, Y., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Tamari, M., Tsuchiya, E. and Nakamura, Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. Cancer Res. 59:1966 - 1972, 1999.
- 3) 得地令郎, 土屋永寿. 肺癌における遺伝子検索を用いた発癌機序及び悪性度の解明.(日本人の病気と病理学) 病理と臨床, 17:262, 1999(4月5日発行)
- 4) Hashimoto, T., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Nishida, K., Hayashi, S., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Nakagawa, K., Hayashi, J. and Tsuchiya, E. p53 null mutation undetected by immunohistochemical staining predict a poor

outcome with early stage non-small-cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 59: 5572 - 5577, 1999

5) 得地令郎、土屋永寿. 遺伝子異常とその表現型からみた肺癌. *呼吸* 18 : 1230-1235、1999

6) Izumo, T., Maseki, N., Mori, S. and Tsuchiya, E. Practical utility of the revised European-American classification of lymphoid neoplasms for Japanese non-Hodgkin lymphomas. *JJCR*, in press

7) Tanimoto, K., Hayashi, S., Tsuchiya, E., Tokuchi, Y., Kobayashi, Y., Yoshiga, K., Okui, T., Kobayashi, M. and Ichikawa, T. Abnormalities of the FHIT gene in human oral carcinogenesis. *Br.J.Cancer* 82:838-843, 2000

## 2. 学会発表

1) 西田一典、小林康人、林 泉、土屋繁裕、中川 健、得地令郎、橋本毅久、林 盛昭、石川雄一、土屋永寿; 肺の adenomatosis と診断した一例. *日本病理学会会誌*, 第 88 巻 p169, (1999)

2) 小林康人、佐藤之俊、得地令郎、橋本毅久、林盛昭、西田一典、石川雄一、高橋 敦、土屋永寿; 定型から非定型へ増悪したと考えられる肺カルチノイド腫瘍の一例. *日本病理学会会誌* 第 88 巻 p169, (1999)

3) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、小林康人、西田一典、林 慎一、石川雄一、中川 健、林純一、土屋永寿; MASA 法を用いた肺癌微小リンパ節転移の検索 *日本病理学会会誌* 第 88 巻 p182, (1999)

4) Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Kawakami, Y., and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *American Association For Cancer Research (AACR)*, 90th, p279, (1999)

5) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤洋、平井康夫、中川 健、石川雄一、土屋永寿; 非小細胞肺癌の comparative genetic hybridization (CGH) 法による染色体異常解析と臨床病理学的特徴 第58回日本癌学会総会記事. p312, (1999)

6) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、土屋永寿、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤

洋、石川雄一、平井康夫、中川 健; CGH 法を用いた非小細胞肺癌の遺伝子異常解析. 第40回日本肺癌学会総会号. p663, (1999)