

発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた
新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究

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

主任研究者 杉 下 匡

目 次

総括研究報告書

- 発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた
新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究・・・・・・杉下 匡 1

分担研究報告書

- LSC を用いた婦人科がんの分子診断に関する研究・・・・・・杉下 匡 他 10
- CGH を用いた婦人科がんの遺伝子診断に関する研究・・・・坂本 優 他 14
- 女性生殖器癌における血管新生とその阻害・・・・・・藤本 次良 21
- がんの早期診断および転移に関する研究・・・・・・大屋敷一馬 24
- 子宮頸がんにおける SCC 抗原発現の異常に関する研究・・・・加藤 紘 29
- 子宮体がんの分子診断の確立に関する研究・・・・・・和氣 徳夫 32
- 婦人科領域扁平上皮癌退縮抗原の同定と
癌ワクチン分子開発に関する研究・・・・・・伊東 恭悟 35

研 究 班 構 成

主任研究者	杉 下	匡	佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科	副院長
分担研究者	坂 本	優	佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科	医長
	藤 本	次良	岐阜大学医学部産婦人科	講師
	大屋敷	一馬	東京医科大学第一内科学	教授
	加 藤	紘	山口大学医学部産婦人科	教授
	和 氣	徳夫	九州大学生体防御医学研究所	教授
	伊 東	恭悟	久留米大学医学部免疫学	教授
研究協力者	平 井	康夫	癌研究会附属病院婦人科	副部長
	岩 渕	浩之	佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科	医長

本報告書は、「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 発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究班」において得られた研究成果をまとめたものである。

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

発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究
主任研究者：杉下 匡 佐々木研究所附属杏雲堂病院 副院長

研究要旨

- 1) CGH解析で判明したCNAの20q13.2染色体領域に存在するZNF217遺伝子が、子宮頸部浸潤癌で高頻度な増幅と発現増加を示し、癌進展への関与の可能性が示唆された。
- 2) DNAのレジンカラム濃縮によるTRAP法改良により、テロメラーゼ活性検出の極微量検体への応用が可能となった。
- 3) SCCA2遺伝子上流-432~+47領域にプロモーター活性を認め、Ets、myc等の転写制御因子認識配列を認めた。また患者末梢血を用いたSCC抗原を指標とする扁平上皮癌診断法を検討し、約80%の感度・特異度で癌症例を識別した。
- 4) 体癌の18qLOH標的遺伝子がDPC4とDCC遺伝子であることを見出した。体癌細胞にDCCを強制発現させたところ造腫瘍性抑制さらにアポトーシスが誘導された。
- 5) 卵巣癌CDDP耐性株でアポトーシス抑制関連遺伝子やDNA修復関連遺伝子等の発現増加を認めた。
- 6) 頸癌転移巣でのPD-ECGFの発現は血管新生能や予後と関連した。
- 7) 癌拒絶抗原SART4即ちIck抗原ペプチドが転移性癌で強発現し、転移性癌患者末梢血よりHLA-A24拘束性CTLを誘導し得たことから、転移性癌に対するワクチンとなる可能性が示唆された。

分担研究者

1. 杉下匡(佐々木研究所附属杏雲堂病院 副院長)
2. 坂本優(佐々木研究所附属杏雲堂病院 副部長)
3. 藤本次良(岐阜大学医学部産婦人科 講師)
4. 大屋敷一馬(東京医科大学第一内科学講座教授)
5. 加藤紘(山口大学医学部産婦人科 教授)
6. 和氣徳夫(九州大学生体防御医学研究所 教授)
7. 伊東恭悟(久留米大学医学部免疫学 教授)

研究協力者

1. 平井康夫(癌研究会附属病院婦人科 副部長)
2. 岩淵浩之(佐々木研究所附属杏雲堂病院 医長)

A. 研究目的

1) 子宮頸癌検診は細胞形態に基づく細胞診によりほぼ確立しているが、依然として偽陰性症例が問題となっている。また細胞診や組織診では異形成や進行癌の予後の正確な推定が困難であり、それらを解決する新しい指標を用いた診断法の開発が必須である。我々は、遺伝子、蛋白質等の分子指標を用いた新しい診断法の開発を目的とする。子宮頸部発癌・浸潤・転移に関与する遺伝学的変化

をCGH、FISHにより明らかにし、細胞形態との関連を検討し、遺伝子変化を細胞診にフィードバックする。またテロメラーゼ活性が、癌化・進展の有用な分子診断指標となる可能性を検討する。末梢血中のSCCA2mRNAを指標とした低侵襲な扁平上皮癌診断法を開発する。さらにSCCA2プロモーター制御因子を検索し、扁平上皮細胞の悪性変化機構の解明を試みる。以上は予後推定可能な細胞診断システム確立、検診精度向上、より低侵襲な診断法確立を可能にし、受診率向上、初期癌発見、ハイリスク症例鑑別に有効であり検診費・医療費削減につながると考える。

2) 子宮体癌では、高頻度に欠失がみられる第18染色体長腕上のDCC、DPC4両遺伝子、およびサイクリンGの発癌における関与機構を解析し、体癌発生の分子機構解明や遺伝子診断、遺伝子治療への応用を目指す。また臨床検体のCGH分析により、発癌進展や組織学的分化度に関わる遺伝学的変化を明らかにし、分子診断の新たな指標発見を目指す。

3) 卵巣癌では、問題となっている抗癌剤耐性に関わる遺伝子群を検索し耐性獲得機構の解明を試み、耐性克服手段開発を目指す。

4) 婦人科癌の増殖・進展に関わる血管新生の特徴を解明し、血管新生抑制による制癌法開発を試みる。血管新生抑制による初期癌浸潤制圧や転移巣増殖制圧を図ることで、過剰な手術侵襲や化療の重篤な副作用を回避できると考える。

5) 予後不良である婦人科領域扁平上皮癌を対象として、癌ワクチン標的分子を開発し、癌特異的免疫療法の開発を目指す。標的分子開発は、局所浸潤Tリンパ球の大量培養、または自家癌にて末梢Tリンパ球を刺激しHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌退縮抗原遺伝子を単離し行う。よって癌細胞で発現し宿主CTLにより認識される癌退縮抗原遺伝子の同定は不可欠な研究である。

B. 研究方法

1) 子宮頸部発癌・進展過程の解析：子宮頸部癌化過程の各段階の細胞株、臨床材料につき症例数を増やしCGH分析を行い、転移を有する症例も含め検討した。高頻度に異常を検出した染色体領域20q13.2に存在する癌遺伝子ZNF217に着目し、その発現を定量的RT-PCRにより測定、臨床的意義を検討した。また*In situ* TRAP assayを用いテロメラーゼ陽性細胞を同定し、発癌・進展におけるテロメラーゼ活性化と細胞形態変化との相関を個々の細胞において検討し、F-TRAP法高感度化も検討した。さらにSCCA2プロモーター領域を含む5'側上流配列につき、レポーターアッセイ系を構築し制御因子同定を試み、またSCC抗原を指標とした、末梢血中扁平上皮癌細胞のasymmetric semi-nested PCRによる定量的検出を検討した。

2) 子宮体癌の分子診断法の開発：子宮体癌60例につき18q上の様々なSTSマーカーを用いLOH解析を行い18q21.3領域につき詳細な欠失地図を作成、共通欠失領域がDCC、DPC4の何れを標的とするか解析した。さらに両遺伝子の発現変化の有無、および残存アリルの塩基置換につき解析し、また発癌におけるp53依存性サイクリンGの役割につき検討した。さらに臨床検体につきCGH分析を行い、体癌の発癌・進展に関わる遺伝学的変化を検索し、既知の遺伝学的・臨床病理学的因子（年齢、臨床進行期、組織学的分化度、ER・PRの発現、Replication

ErrorやPTEN遺伝子変異の有無など）との相関を検討した。

3) 卵巣癌抗癌剤耐性機構の解明：卵巣癌CDDP感受性細胞株とそれより誘導した耐性株（p53変異-、mdr1発現-）を用い、cDNAマイクロアレイにより遺伝子発現を比較し、耐性獲得関連遺伝子群を検索した。

4) 婦人科癌における血管新生とその阻害：腫瘍の進展に関わる各種血管新生因子（VEGF, PD-ECGF, bFGF等）の発現と予後との相関を検討し、さらに血管新生阻害の可能性をもつ薬剤につき阻害能を調べた。

5) 婦人科癌退縮遺伝子の同定・機能解析・発現：SART-1、2、3、4各抗原の婦人科癌、とくに子宮頸癌における発現をWestern Blot法で解析し、それらに由来するペプチドのHLA-クラスI拘束性癌特異的CTL誘導能を調べ、さらに上記以外の新たな癌拒絶抗原の同定も行った。

(倫理面への配慮)

研究に関わったすべての方から対象組織の採取および研究内容に関するインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究成果と考察

1) 杉下・坂本は、CGH解析により子宮頸癌の細胞形態と相関するCNAを同定した。さらに浸潤・進展関連CNAの一つである20q13.2染色体領域に存在するZNF217遺伝子につき、浸潤癌で高頻度な増幅と発現増加を認め、頸癌進展への関与の可能性を示した。大屋敷らはTRAP法において、レジンカラムを用いたDNA濃縮による微量検体からのテロメラーゼ活性検出を可能にし、検出感度向上による癌診断の確実性を高めた。加藤らはSCC抗原(SCCA2)遺伝子プロモーター領域に存在するE-boxに注目し、SCCA発現細胞にc-mycおよびmax遺伝子を導入しSCCA遺伝子発現への影響を調べたが、効果は認められなかった。また臨床症例につき、SCCA1、SCCA2を検出指標とした末梢血中扁平上皮癌細胞のasymmetric semi-nested RT-PCRによる定量的検出を検討し、1mg RNAあたり470コピーをカットオフ値とし、感度・特異度とも80%で癌症例を識別できた。さらに患者組織のホルマリン固定標本から、連続して異形成、上皮内癌、浸潤

癌を示す領域の各部分の細胞をmicrodissectionで採取し、各々につきCGH解析を行った結果、CINIで1p+ (2/6)、1q+ (2/6)、3q+(3/6)、CINIIで3q+ (5/8)、11q- (3/8)、6q- (2/8)等のCNAを検出した。

2) 和気らは子宮体癌で高率に認められる18qLOHおよび残存アシルプロモーター変異を解析し、DPC4遺伝子不活化の体癌発生への関与を示した。またDCC遺伝子の発癌への関与を明らかにするため、DCC強制発現子宮体癌細胞を樹立したところ、DCC発現に伴い造腫瘍性の顕著な抑制、さらに高発現細胞でのアポトーシス誘導を認め、同遺伝子がリガンド非存在下でのアポトーシス誘導により癌抑制する可能性を示した。また、細胞のDOX処理によるp53、p21およびサイクリンG蛋白発現誘導とG2/M期集積、NaB処理によるp53、p21発現誘導とG1期集積、さらにDOX処理下でサイクリンGに対するアンチセンスオリゴDNA投与によるG2/M期集積解除とG1期集積を認め、さらにサイクリンG高発現細胞でBax蛋白の高発現誘導とプロアポトーシスシグナルによるアポトーシス誘導を認めたことから、サイクリンGが細胞のG2/M期集積およびアポトーシス誘導能をもつことを示した。

3) 坂本は、卵巣癌CDDP感受性細胞より誘導した耐性株において、アポトーシス抑制関連遺伝子やDNA修復関連遺伝子等の発現増大を認めた。

4) 藤本らは、子宮頸癌の転移リンパ節においてPD-ECGFの発現と血管新生能および予後と高相関を認め、PD-ECGF高発現を示す症例では5FU前駆体が奏効すると推察した。また体癌においては、プロゲスチンに代わる血管新生抑制薬剤をスクリーニングし、gensenoside Rb2の血管内皮細胞の基底膜崩壊能抑制、dienogest、toremifene、ICI182,780の血管内皮細胞の増殖能および管腔形成能抑制を認めた。

5) 伊東らは、SART4として同定した拒絶抗原が非レセプター型チロシンキナーゼSrcファミリーのlckと同一であることを明らかにした。さらにlck抗原ペプチドの転移性癌での強発現を認め、さらに転移性癌患者末梢血からのHLA-A24 拘束性CTL誘導能を認めたことから、同ペプチドの転移性癌に対するワクチンとしての可能性を示した。

D. 結論

1) CGH解析で判明したCNAの20q13.2染色体領域に存在するZNF217遺伝子が、子宮頸部浸潤癌で高頻度な増幅と発現増加を示し、癌進展への関与の可能性が示唆された。

2) DNAのレジンカラム濃縮によるTRAP法改良により、テロメラーゼ活性検出の極微量検体への応用が可能となった。

3) SCCA2遺伝子上流-432~+47領域にプロモーター活性を認め、Ets、myc等の転写制御因子認識配列を認めた。また患者末梢血を用いたSCC抗原を指標とする中扁平上皮癌診断法を検討し、約80%の感度・特異度で癌症例を識別した。

4) 体癌の18qLOH標的遺伝子がDPC4とDCC遺伝子であることを見出した。体癌細胞にDCCを強制発現させたところ造腫瘍性抑制さらにアポトーシスが誘導された。

5) 卵巣癌CDDP耐性株でアポトーシス抑制関連遺伝子やDNA修復関連遺伝子等の発現増加を認めた。

6) 頸癌転移巣でのPD-ECGFの発現は血管新生能や予後と相関した。

7) 癌拒絶抗原SART4即ちlck抗原ペプチドが転移性癌で強発現し、転移性癌患者末梢血よりHLA-A24拘束性CTLを誘導し得たことから、転移性癌に対するワクチンとなる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 岩瀬浩之、坂本 優、河崎恵子、秋谷 司、功刀孝也、室谷哲弥、坂本宙子、杉下 匡、天神美夫、田中忠夫。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた・comparative・genomic hybridization(CGH)法の確立とCGH法の臨床応用の拡大。CYTOMETRY RESEARCH 10(1) :in press.2000.

2) Suehiro, Y., Sakamoto, M., Umayahara, K., Iwabuchi H., Sakamoto, H., Tanaka, N., Takeshima, N., Yamauchi, K., Hasumi, K., Akiya, T., Sakunaga, H., Muroya, T., Numa, F., Kato, H., Tenjin, Y., and Sugishita, T. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in ovarian clear cell adenocarcinomas. Oncology. in press, 2000.

3) Muroya, T., Kawasaki, K., Kunugi, T., Akiya, T., Iwabuchi, H., Sakunaga, H., Sakamoto, M.,

- Sugisgita, T., Tenjin, Y.: Application and Characteristics of Photodynamic Therapy for Cervical Cancer. *Photomedicine in Gynecology and Reproduction*. 270-277, 2000
- 4) Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, Okamoto A, Nakayama H, Aoki D, Yamamoto K, Hata H, Sugishita T, Tenjin Y. Clinical Significance of Semi-quantitation of Telomerase Activity in the Gynecologic Tumors. (submitted)
 - 5) Hirai Y, Tanaka N, Takeshima N, Hasumi K, Furuta R, Kawaguchi T, Kitagawa T, Shirahama S, Sakamoto M, and Noda T. Somatic Mutations of the PTEN/MMAC1 Gene Associated With Frequent Chromosomal Loss Detectable by CGH In MI+ Endometrial Cancer. *International Journal of Cancer*(Submitted)
 - 6) Kashima, K., Sekine, M., Nagata, H., Tanaka, K., Iwabuchi, H., Sakamoto, M, and et al. : Comparative Genomic Hybridization Analysis of Familial Ovarian Tumors without BRCA1 Germ-Line Mutations. Submitted
 - 7) Shoko, T., Naotake, T., Kouichirou, Kwano., Masaru, S., Takashi, N., Sigeki, S., Toshiharu, K., and K, Itoh. : EXPRESSION OF TUMOR-REJECTION ANTIGEN IN GYNECOLOGIC CANCERS. Submitted
 - 8) 杉下 匡. コルポスコピー. *臨床産婦人科産科* 53(4) : 444-447, 1999
 - 9) T, Muroya., K, Kawasaki., Y, Suehiro., T, Kunugi., K, Umayahara., T, Akiya., H, Iwabuchi., H, Sakunaga., M, Sakamoto., T, Sugishita., and Y, Tenjin. Application of PDT for Uterine Cervical Cancer. *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*. 5 : 183-190, 1999
 - 10) 坂本 優, 坂本宙子, 岩渕浩之, 馬屋原健司, 功刀孝也, 秋谷 司, 作永穂高, 室谷哲弥, 菊池義公, 平井康夫, 河口徳一, 野田哲生, 杉下 匡, 天神美夫, 田中忠夫. CGH法(Comparative Genomic Hybridization)によるゲノム異常の解析—婦人科がん診断への応用—. *CYTOMETRY RESEARCH* 9(1) : 41-51, 1999
 - 11) 坂本 優, 杉下 匡, 田中忠夫, 天神美夫. fluorescence in situ hybridization(FISH) 新女性医学大系40婦人科腫瘍の細胞診 : 385-401, 1999
 - 12) 坂本 優, 杉下 匡, 田中忠夫, 天神美夫. 画像およびDNA解析システム Laser scanning cytometer (LSC). *新女性医学大系40婦人科腫瘍の細胞診* : 418-426, 1999
 - 13) 室谷哲弥, 河崎恵子, 功刀孝也, 秋谷 司, 岩渕浩之, 作永穂高, 坂本 優, 杉下 匡, 天神美夫. 子宮頸部初期病変に対する治療—特に妊孕能温存を目的として—光線力学的治療(PDT: Photodynamic Therapy)による方法. *産科と婦人科*66(9) : 1164-1171, 1999
 - 14) Fujimoto J, Skaguchi H, Hirose R, Hongwu W and Tamaya T. : Clinical implication of expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Res* 1999;59:3041-3044.
 - 15) Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Tamaya T. : Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor related to angiogenesis in ovarian endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:359-362.
 - 16) Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. : Expression of vascular endothelial growth factor and its mRNA in uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 1999;80:827-833.
 - 17) Fujimoto J, Ichigo S, Sakaguchi H, Hirose R, Tamaya T. : Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical Cancers, *Br J Cancer* 1999;79:1249-1254.
 - 18) Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. : Progestins suppress estrogen-induced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) subtypes in uterine endometrial cancers. *Cancer Lett* 1999;141:63-71.
 - 19) 八幡尚之, 平野隆, 加藤治文, 大屋敷一馬(2000) : テロメラーゼによる肺癌診断—臨床応用への可能性—. *日本呼吸器学会雑誌* (投稿中)。
 - 20) Itoi T, Shinohara Y, Takeda K, Takei K, Ohno H, Nagao K, Hisatomi H, Ohvashiki K, et al.:

- Detection of telomerase activity in biopsy specimens for diagnosis of biliary tract cancers. *Gastrointest Endoscop*, 2000, in press.
- 21) Minamiguchi H, Yahata N, Kimura T, Fujiki H, Harada S, Wang J, Okuda K, Kaneko H, Hodohara K, Yasukawa K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, et al.: Expression of interleukin-6 receptor on human cord blood- and peripheral blood-derived primitive hematopoietic progenitors implies an acquisition of different function properties. *Br J Haematol*, 2000, in press.
 - 22) Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Iwama H, Ando K, Tauchi T, Ohyashiki K: Impaired telomere regulation mechanism by TRF1 (telomere-binding protein) expression in acute leukemia cells. *Br J Haematol*, 2000, submitted.
 - 23) Dejmek A, Yahata N, Ohyashiki K, et al.: Correlation between morphology and telomerase activity in-cell of exfoliative lung cytological specimens. *Cancer Cytopathol*, 2000, in press.
 - 24) Ohyashiki K, et al.: Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia: Based on our experience. *Leuk Lymphoma*, 2000, in press.
 - 25) Yahata N, Nagao K, Ohyashiki JH, Hisatomi H, Ohyashiki K: Improvement in detecting telomerase activity using silica-based resin treatment: An experience of urine in bladder carcinoma. *Int J Oncol*, 1999, 14:709-712.
 - 26) Ohyashiki JH, Iwama H, Yahata N, Ando K, Hayashi S, Shay JW, Ohyashiki K: Telomere stability is frequently impaired in high-risk groups of patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:1155-1160.
 - 27) Izutsu T, Kudo K, Sato T, Nishiya I, Ohyashiki K, et al.: Telomerase activity and proliferative activity in placenta with or without fetal growth retardation. *Obstet Gynecol*, 1999, 93:124-129.
 - 28) Kitsukawa S, Ohyashiki K, et al.: Subsequential telomerase activity in exfoliated urinary cells detects recurrent disease in bladder cancer after transurethral resection. *Int J Oncol*, 1999, 15:505-510
 - 29) Hayashi S, Iwama H, Yahata N, Ando K, Tauchi T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: Subsequent alterations of telomeric DNA length correlate with cytogenetic response in chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. *Hematol*, 1999, 4:1-10.
 - 30) Itoi T, Ohyashiki K, et al.: Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells obtained from bile. *Int J Oncol*. 1999, 15:1061-1067.
 - 31) 大屋敷一馬、八幡尚之、大屋敷純子：細胞診におけるテロメラーゼ活性検出法とその臨床応用。日本臨床細胞学会東京都支部会報 1999, 17:13-16.
 - 32) Suminami, Y., Nagashima, S., Vujanovic, N. L., Hirabayashi, K., Kato, H., and Whiteside, T. L. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumor-associated serpin, SCC antigen-1. *British J of Cancer*, in press.
 - 33) Murakami, A., Suminami, Y., Sakaguchi, Y., Nawata, S., Numa, F., Kishi, F., and Kato, H. Specific Detection and Quantitation of SCC Antigen-1 and SCC Antigen-2 mRNA by Fluorescence-based Asymmetric Semi-nested Reverse Transcription-PCR. *Tumor Biol.*, 82: 981-989, 2000.
 - 34) Sakaguchi, Y., Kishi, F., Murakami, A., Suminami, Y., and Kato, H. Structural analysis of human SCC antigen 2 promoter. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1444: 111-6, 1999.
 - 35) Nawata, S., Murakami, A., Hirabayashi, K., Sakaguchi, Y., Ogata, H., Suminami, Y., Numa, F., Nakamura, K., and Kato, H. Identification of squamous cell carcinoma antigen-2 in tumor tissue by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.*, 20:614-7, 1999.

- 36) 縄田修吾、加藤紘、中村薫. SCC腫瘍マーカーの発現とその機能解析. 生物物理化学 42巻, 257-263, 1999
- 37) 加藤紘. 腫瘍マーカーの生物活性と癌の悪性度. 日本産科婦人科学会雑誌 61巻, 661-664, 1999
- 38) 村上明弘、住浪義則、加藤紘. 末梢血中扁平上皮癌細胞の出現と血中SCC抗原mRNA. 産婦人科の世界 50巻, 475-478, 1999
- 39) Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, Takada S, Takagi N, Arima T, WakeN, Kamumura K, Satomura K, Hermann R, Bonthron DT, Hayashizaki Y. : The cell cycle gene ZAC/PLAG1 is imprinted - a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. : Human Mol. Genetics,9,3,453-460(2000)
- 40) Kato H, Zhou Y, Asanoma K, Kondo H, Yoshikawa Y, Watanabe K, Matsuda T, WakeN and Barrett JC. : Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of DCC gene : Br.J. Cancer 82,2,459-466(2000)
- 41) Ueoka Y, Kato K, Kuriaki Y, Horiuchi S, Terao Y, Nishida J, Ueno H, WakeN. : HGF and Ovarian carcinoma cell motility and invasion.: British Journal of Cancer,84,4,891-899(2000)
- 42) Hachiya T, Kuriaki Y, Ueoka Y, Nishida J, Kato K and WakeN. : WAF1 Genotype and Endometrial Cancer Susceptibility. : Gynecologic Oncology 72,187-192(1999)
- 43) Zhou Y, Kato H, Shan D, Matsuda T, Minami K, Barrett JC, and WakeN. : Involvement of mutations in the DPC4 promoter in endometrial carcinoma development.: Molecular Carcinogenesis 25,64-72(1999)
- 44) Kato K, Horiuchi S, Terao Y, Ueoka Y, Nishida J, Mori D, Yoshikawa Y, WakeN. : Relevance of ER to the development of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma.: Breast Cancer 6,4,312-319(1999)
- 45) Takada S, Kamiya M, Arima T, Kagebayashi H, Shibata H, Muramatsu M, Chapman VM, WakeN, Hayashizaki Y, Takagi N. : Detection and cloning of an X-linked locus associated with a Not1 site that is not methylated on mouse inactivated X chromosome by the RLGS-M Method : Genomics 61,92-100(1999)
- 46) Taguchi M, Matsumoto Y, Kubota T, Tanabe F, Arima T, WakeN, and Aso t. : Nongestational trophoblastic disease of the ovary diagnosed by DNA polymorphism analysis.: A case of prolonged survival by intensive surgical and chemotherapies. : Trophoblast Research 13,161-170(1999)
- 47) Kaneta Y, Yoshiyama R, Inagaki N, Toyoshima K, Itoh K, Nishino R, Kitai H, Kato H, Asanoma K, WakeN. : Gestational choriocarcinoma whose responsible pregnancy was a complete hydatidiform mole identified by PCR analysis with new sequence tagged site primers. : Jpn J Clin Oncol,29(10) 504-508(1999)
- 48) Wang D, Kanuma T, Takama F, Mizunuma H, Ibuki Y, WakeN, Mogi A, Shitara Y, Hagiwara K, Takenoshita S. : Mutation analysis of the Smad 3 gene in human ovarian cancers.: Int J Oncol 15,5,949-953(1999)
- 49) Matsunaga, K., Nakao, M., Masuoka, K., Inoue, Y., Gouhara, R., Imaizumi, T., Nishizaka, S., and Itoh, K., Cytokines required for induction of histocompatibility leukocyte antigen-class I-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by a SART1-derived peptide. JJCR, 90:1007-1015, 1999.

- 50) Yang, D., Nakao, M., Shichijo, S., Sasatomi, T., Takasu, H., Matsumoto, H., Mori, K., Hayashi, A., Yamana, H., Shirouzu, K. and Itoh, K. A New gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing cytotoxic T Lymphocytes in cancer patients. *Cancer Research*, 59:4056-4063, 1999.
- 51) Yamada, A., Kawano, K., Harashima, N., Niiya, F., Nagai, K., Kobayashi, T., Ushijima, K., Nishida, T., and Itoh, K. Study of HLA-class I-restriction and directed antigens of cytotoxic T lymphocytes at the tumor sites of ovarian cancer. *Can. Immunol. Immunotherapy*, 48:147-152, 1999.
- 52) Kikuchi, M., Nakao, M., Inoue, Y., Matsunaga, K., Shichijo, S., Yamana, H., Itoh, K. Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing the HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 81: 459-466, 1999.
2. 学会発表
- 1) 杉下 匡. : 子宮頸部細胞診の実際と評価—細胞診クラスⅢaの今後の取扱い—: 第51回日本産科婦人科学会レクチャーシリーズクリニカルカンファレンス. 1999.4.10
- 2) 杉下 匡. : 会長講演 婦人科細胞診の理論と実際. : 第40回日本臨床細胞学会.
- 3) 近藤亜矢子、坂本 優、河崎恵子、功刀孝也、秋谷 司、岩淵浩之、室谷哲弥、杉下 匡、天神美夫. : 子宮頸部擦過検体のLaser Scanning Cytometer(LSC)による核DNA量の測定と細胞診との相関. : 第9回日本サイトメトリー学会. 1999.6.28~30
- 4) 河崎恵子、坂本 優、馬屋原健司、功刀孝也、秋谷 司、岩淵浩之、室谷哲弥、杉下 匡、天神美夫. : 子宮頸部発癌過程における細胞内テロメラーゼ活性のin situ TRAP法による検出. : 第9回日本サイトメトリー学会. 1999.6.28~30
- 5) 岩淵浩之、坂本 優、河崎恵子、秋谷 司、功刀孝也、室谷哲弥、杉下 匡、天神美夫. : シンポジウムホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたcomparative genomic hybridization(CGH)法の確立とCGH法の臨床応用. : 第9回日本サイトメトリー学会. 1999.6.28~30
- 6) 坂本 優、坂本宙子、河崎恵子、秋谷 司、功刀孝也、岩淵浩之、室谷哲弥、河口徳一、平井康夫、田中忠夫、野田哲生、杉下 匡、天神美夫. : ワークショップ CGH法による子宮頸部癌のゲノム異常の解析と臨床的意義. : 第58回日本癌学会. 1999.9.29~10.1
- 7) Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Wen H, Aoki I and Tamaya T. : Angiogenesis related to the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF) in ovarian endometriosis. 2nd Japan Conference of Endometriosis, Hakone, Japan, 1999, 5-8
- 8) 藤本次良、坂口英樹、青木生美、玉舎輝彦. : 血管新生の分子機構とその阻害剤による効果. 第37回日本癌治療学会、岐阜、1999, 10, 12-14
- 9) 藤本次良. : 子宮内膜癌の浸潤・転移に対する新しい治療戦略に関する研究. 第12回日本婦人科悪性腫瘍化学療法学会、東京、1999, 11-20
- 10) 藤本次良. : 癌浸潤・転移におけるGnRHアナログやその他血管新生阻害物質における影響. 第3回GnRHフォーラム、東京、2000, 1-8
- 11) 坂口英樹、藤本次良、廣瀬玲子、玉舎輝彦. : 卵巣子宮内膜症におけるplatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)発現の意義. 第20回エンドメトリーオーシス研究会、大宮市、1999, 1, 29-30
- 12) 坂口英樹、藤本次良、廣瀬玲子、玉舎輝彦. : 子宮頸癌の原発巣および転移巣におけるplatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)発現の意義. 第8回がん転移研究会、東京、1999, 5, 24-25
- 13) 坂口英樹、藤本次良、廣瀬玲子、玉舎輝彦. : 子宮内膜症におけるplatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)発現の意義. 第72回日本内分泌学会、横浜、1999, 5, 31-6, 2
- 14) 坂口英樹、藤本次良、青木生美、玉舎輝彦. : 子宮内膜癌細胞におけるジンセンノサイドRb2の基底膜浸潤抑制の分子機構. 第19回産婦人科

- 漢方研究会、東京、1999,9,12
- 15) 青木生美、坂口英樹、藤本次良、玉舎輝彦.: 子宮頸癌におけるplatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)およびそのmRNA発現の意義.第58回日本癌学会、広島、1999,9,29-10,1
 - 16) 藤本次良、坂口英樹、青木生美、玉舎輝彦.: 婦人科癌における血管新生の分子機構.第58回日本癌学会、広島、1999,9,29-10,1
 - 17) 青木生美、藤本次良、坂口英樹、玉舎輝彦.: 子宮頸癌の転移巣におけるplatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)発現の臨床的意義.第37回日本癌治療学会、岐阜、1999,10,12-14
 - 18) 住浪義則、村上明弘、坂口優子、縄田修吾、沼文隆、加藤紘 SCC抗原アンチセンス鎖cDNAによる腫瘍増殖の抑制 第51回日本産科婦人科学会学術講演会1999.4 東京
 - 19) 縄田修吾、村上明弘、坂口優子、末広寛、馬屋原健司、尾縣秀信、住浪義則、沼文隆、加藤紘 蛋白分解酵素との反応を利用したSCC抗原遺伝子SCCA1およびSCCA2の発現蛋白の解析 第51回日本産科婦人科学会学術講演会1999.4 東京
 - 20) 村上明弘、住浪義則、末広寛、坂口優子、馬屋原健司、縄田修吾、尾縣秀信、沼文隆、加藤紘 asymmetric semi-nested RT-PCRによるSCCA mRNAの定量とその臨床利用 第51回日本産科婦人科学会学術講演会1999.4 東京
 - 21) 住浪義則、縄田修吾、村上明弘、加藤紘 ワークショップ「疾患マーカーとしてのプロテアーゼとインヒビター」 serpin family に属する子宮頸癌腫瘍マーカーSCC抗原の機能 第4回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会 1999.8 名古屋
 - 22) 縄田修吾、住浪義則、村上明弘、住江正大、平川宏、末広寛、馬屋原健司、尾縣秀信、沼文隆、中村和行、加藤紘.未変性条件下2次元電気泳動法によるSCC抗原-1、SCC抗原-2蛋白の解析 第19回腫瘍マーカー研究会 1999.9 宇部
 - 23) Y. Suminami, A. Murakami, S. Nawata, Y. Sakaguchi, K. Umayahara, H. Hirakawa, F. Numa, H. Kato Symposium " Function and Significance of Tumor Marker SCC" Biological functions of SCC antigen The XXVII Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 1999.10 Kyoto
 - 24) 小林照忠、伊藤雅昭、原嶋奈々江、七條茂樹、伊東恭悟: HLA-A2拘束性キラーT細胞が認識するSART-1抗原ペプチドの解析、第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 25) 原嶋奈々江、田中耕二、笹富輝男、七條茂樹、伊東恭悟: HLA-A24拘束性癌特異的CTLに認識されるlck遺伝子産物の解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 26) 原田健司、楊大木、七條茂樹、中尾真修、伊東恭悟: ヒト癌拒絶抗原: SART-3のマウスホモログ遺伝子のクローニングと解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 27) 笹富輝男、宮城佳昭、七條茂樹、山名秀明、緒方裕、白水雄、伊東恭悟: ヒト大腸癌組織における癌拒絶抗原SART-1およびSART-3の発現.第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 28) 田中聖子、河野光一郎、七條茂樹、山田亮、西田敬、伊東恭悟: ヒト卵巣癌における癌拒絶抗原の発現. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 29) 津田尚武、七條茂樹、坂本優、伊東恭悟、西田敬、嘉村敏治: ヒト子宮癌における癌拒絶抗原の発現. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 30) 中尾真修、松永和子、井上佳子、増岡慈、七條茂樹、伊東恭悟: HLA-A24拘束性癌拒絶抗原SART-2の解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 31) 山田亮、河野光一郎、原嶋奈々江、新谷文彦、西田敬、伊東恭悟: 卵巣癌特異的細胞傷害性T細胞のHLA拘束性と認識抗原の解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99. 広島.
 - 32) 伊藤雅昭、小林照忠、七條茂樹、伊東恭悟: 大腸癌局所におけるHLA-class I拘束性キラーT細胞株の樹立、及びそれらに認識される抗原の解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-

10/1/99. 広島.

- 33) 小林照忠、伊藤雅昭、原嶋奈々江、七條茂樹、伊東恭悟：HLA-A2拘束性キラーT細胞が認識するSART-1抗原ペプチドの解析. 第58回日本癌学会総会、9/29-10/1/99.
- 34) Itoh, K., Shichijo, S., Nakao, M., Gomi, S., Yamana, H.: Genes encoding antigenic peptides of human epithelial cancers recognized by cytotoxic T lymphocytes. The 27th meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 1999, Oct 31-Nov 4, Kyoto
- 35) 原嶋奈々江、清水佳奈子、田中耕二、山田亮、七條茂樹、伊東恭悟：p56lck由来ペプチドによるHLA-A24拘束性癌特異的細胞傷害性T細胞の誘導と機能解析. 第29回日本免疫学会総会・学術集会、12/1-12/3/99. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 坂本 優：U.S. Patent No. 5,856,097
「Comparative Genomic Hybridization (CGH).」(発明者) Issued: January 5, 1999.
- 2) 坂本 優：U.S. Patent No. 5,965,362
「Comparative Genomic Hybridization (CGH).」(発明者) Issued: October 12, 1999.
- 3) 坂本 優：U.S. Patent No. 5,976,790
「Comparative Genomic Hybridization (CGH).」(発明者)
Issued: November 2, 1999.

4) 伊東恭悟 特許名：「ヒト癌退縮抗原タンパク質 (SART-2)」

特許番号 (出願年月日) :

10-126398号 (1998/5/8) .

5) 伊東恭悟 特許名：「SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチド」

特許番号 (出願年月日) :

10-212940号 (1998/7/28)

PCT/JP99/04010 (1999/7/27)

6) 伊東恭悟 特許名：「新規な腫瘍抗原タンパク質

SART-3及びその腫瘍抗原」

特許番号 (出願年月日) :

10-242660号 (1998/8/28)

PCT/JP99/04622 (1999/8/27)

7) 伊東恭悟 特許名：「SART-1由来の腫瘍抗原ペプチド」特許番号 (出願年月日) :

10-196152号 (1998/7/10)

PCT/JP99/03659 (1999/7/7)

8) 伊東恭悟 特許名：「腫瘍抗原タンパク質、その遺伝子及び腫瘍抗原ペプチド」

特許番号 (出願年月日)

8-168429号 (1996/6/7)

8-287572号 (1996/10/8)

8-330424号 (1996/11/25)

PCT/JP97/01893 (1997/6/4)

9) 伊東恭悟 特許名：「腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子並びにその利用」

特許番号 (出願年月日) :

9-356895号 (1997/12/25)

PCT/JP98/05809

10) 伊東恭悟 特許名：「腫瘍抗原 (Lck)」

特許番号 (出願年月日) :

11-222101号 (1999/8/5)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究課題名：LSCを用いた婦人科がんの分子診断に関する研究

主任研究者：杉下 匡 佐々木研究所附属杏雲堂病院 副院長

分担研究者：坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

研究協力者：近藤亜矢子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 助手

研究要旨

Laser scanning cytometer (LSC)を用いた核DNA量測定が細胞診断の補助診断として有用であるかを検討した。子宮頸部擦過検体95症例を対象とした結果、感度96%、特異度100%と良好であった。また同時に作成したパパニコロウ標本の細胞診断との相関も得たことから、LSC判定を細胞診断の補助診断となる可能性があることが示唆された。また、LSCによる子宮頸部擦過検体のFISHシグナル数カウントについて検討した。（杉下）

A. 研究目的

Laser scanning cytometer (LSC)はスライドガラス上の細胞標本について高速に蛍光量を測定して測定データを表示し、かつその測定データと対比して細胞形態の観察も行うことが出来る。この特徴を利用し、子宮頸部擦過検体について

1) 核DNA量測定による細胞診の補助診断としての有用性

2) FISHシグナル数カウント

以上2項目について検討した。

B. 研究方法

1) 核DNA量の測定

子宮頸部擦過検体は、婦人科外来検査時に細胞診ブラシにて採取し、エタノール溶液で洗浄したものとした。その洗浄液をオートスメアでスライドガラス上に展開した。染色は37℃のRNase A加Propidium Iodide (PI) 溶液で15分間行った。各スライド上の約5千個の細胞についてLSCにより核DNA量を測定した。4倍体以上のDNA量をもつ細胞集団が検出された場合は測定後直ちにリコールを行い、接合した2つ以上の細胞群でないか確認を行った。また、DNA Index(DI)は、リコールによりリンパ球が存在する細胞集団を確認し、この細胞集団のDIを1.0として計算した。

さらに、同時に作成したパパニコロウ標本にてLSC判定とは全く別に細胞診断を行い、陽性・疑陽性・陰性の3段階で判定し、両者の比較検討を行

った。

2) FISHシグナル数カウント

染色体11番セントロメアのコピー数の増加が確認された2例の子宮頸癌患者の子宮頸部擦過検体を使用し、カルノア固定後FISH法にて11番セントロメアをSpectrum Greenで標識後、PIで核染色を行いLSCによるシグナル数のカウントを実施した。

C. 研究結果

1) 核DNA量の測定

対象としたのは子宮頸部擦過検体95症例である。その内訳は、良性頸部35例、異形成15例、上皮内癌20例、浸潤癌25例であった。

(1) LSC判定基準の決定

LSC判定には核クロマチン凝集度に相関するPI Peak値と核DNA総量に相関するPI Value値を使用した。DNA量が異数倍体を示すDNA aneuploidy (DA)は腫瘍細胞の指標に使われるが、今回の測定では良性頸部症例においてもDAが観測された例が認められた。これらのDAはDIが1.1~1.3の2倍体近傍に出現し、またPI Peak値が高値に集積する場合と低値に集積する場合の2種類があった。リコールによりPI Peak高値に集積する細胞集団は重層扁平上皮表層細胞 (ST)であることが分かった。また、悪性症例で同じ位置に出現した細胞集団を観察したがやはりSTであり異常細胞は認められなかった。よって、DIが1.1~

1.3でかつPI Peak高値に集積する場合はこれを偽DAとし、悪性と区別した。さらにPI Peak低値に出現する細胞集団を観察した結果、分葉核状の顆粒球が認められた。しかし、悪性症例で同じ位置に出現した細胞集団を観察したところ顆粒球以外に異常細胞も検出された。よってDIが1.1~1.3でPI Peak低値に集積する細胞集団が出現した場合はリコールによる細胞観察が必要であると思われた。

以上から腫瘍細胞陽性の判定基準を1) DI>1.3のDAの出現する検体、2) DI=1.1~1.3のDAの出現する検体で、かつPI Peak低値に集積しリコールにより顆粒球でないと確認された検体、3) 4倍体以上のDNA量を持ち、かつリコールにより2つ以上の接合した細胞ではないと確認された細胞集団を持つ検体の3つとし、いずれかに該当した場合をLSC判定陽性とした。

(2) 細胞診との比較
結果を下記に示す。

Cytology	Histology		
	normal	dysplasia	C.I.S
Negative			
LSC Positive	35	12	2
Negative	0	8	38

Table1. Comparison of cytology with LSC judgement

LSC判定陽性で細胞診陰性となった2例の内訳は、1例が異形成、1例が上皮内癌症例であった。また細胞診疑陽性でLSC判定陽性となった12例中、4例は異形成症例であったが、7例は上皮内癌症例、1例は浸潤癌症例であり、LSC判定陰性8例はすべて異形成症例であった。LSC判定陰性、細胞診陽性症例はなく、良好な相関を得ることができた。

(3) 病理組織診断との比較
さらに、子宮頸部擦過検体採取時に病理組織検査を行った症例66例についてLSC判定と病理組織診断との比較を行った。

Histology
normal dysplasia C.I.S
invasive

LSC	normal	dysplasia	C.I.S	invasive
Positive	1	10	18	20
Negative	10	6	1	0

Table2. Comparison of histology with LSC judgement

LSC判定陽性で病理組織診断が正常となった1例は浸潤癌症例であり、細胞診も陽性であった。また、LSC判定陽性で病理組織診断が異形成となった10例のうち、4例はその後の検査で上皮内癌と診断された。LSC判定陰性で病理組織診断が上皮内癌となった1例は細胞診も陰性であった。

2) FISHシグナル数カウント

11番セントロメアのコピー数増加をFISHの肉眼的観察により認めた2症例中、2症例ともにLSCにおいてコピー数増加が確認された。但し、実際の細胞内のシグナル数より少なくカウントされた細胞が多数あった。肉眼的観察による11番セントロメアのコピー数増加を認める細胞が全カウント数の50%に対しLSCでは13%であり、今回の測定ではLSCのFISHシグナル検出感度は、肉眼的観察よりも低い傾向を示した。

D. 考察

1) 核DNA量の測定

STや顆粒球など正常細胞の中にDIがリンパ球よりも若干ずれるものが観測された。PI色素はDNA結合の際に様々な要因によって影響を受けることがあり、STや顆粒球は実際のDNA量よりもPI Value値がやや増加する傾向があるのではないかと思われた。これらは偽DAとして真のDAと区別する必要があり、特にPI Peak低値に出現する細胞群はリコールによる観察を行うことが不可欠であると思われた。LSC判定においてDAが存在した例は全症例中18例で、3例が上皮内癌、残り15例が浸潤癌と浸潤癌に多い傾向となった。また今回の測定結果では、LSC判定の感度は96%、特異度は100%となった。

2) FISHシグナル数カウント

肉眼では観察する細胞数に限界があるが、LSCでは

さらに多くの細胞を測定することができる。また増幅が認められた細胞について、その場でリコールで細胞形態観察ができ、確認を行うことができる。今回の測定では感度の点において、肉眼的観察に相關した結果には至らなかったが、低張処理など細胞裸核化をさらに促進させることで感度を上げることができると思われた。

E. 結論

1) 核DNA量の測定

LSCを用いたPIによる核DNA量測定での陽性判定は細胞診断と良好な相関を認め、細胞診の補助診断となりうる可能性があると思われた。しかし今回の測定では良性頸部症例に偽DAが出現したことから、材料・染色法の違いによりLSC判定条件設定を検討する必要があると思われた。

2) FISHシグナル数カウント

細胞の前処理を検討し、さらに感度を向上させる必要があるが臨床応用できる可能性はあると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩淵浩之、坂本 優、河崎恵子、秋谷 司、功刀孝也、室谷哲弥、坂本宙子、杉下 匡、天神美夫、田中忠夫. ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた comparative genomic hybridization(CGH)法の確立とCGH法の臨床応用の拡大. CYTOMETRY RESEARCH 10(1) :in press.2000.
- 2) Suehiro, Y., Sakamoto, M., Umayahara, K., Iwabuchi H., Sakamoto, H., Tanaka, N., Takeshima, N., Yamauchi, K., Hasumi, K., Akiya, T., Sakunaga, H., Muroya, T., Numa, F., Kato, H., Tenjin, Y., and Sugishita, T. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in ovarian clear cell adenocarcinomas. Oncology. in press, 2000.
- 3) Tetsuya, M., Keiko, K., Takaya, K., Tsukasa, A., Hiroshi, I., Hotaka, S., Masau, S., Tadashi, S., Yoshio, T. : Application and Characteristics of Photodynamic Therapy for Cervical Cancer. Photomedicine in Gynecology and Reproduction. 270-277,2000
- 4) Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, Okamoto A, Nakayama H, Aoki D, Yamamoto K, Hata H, Sugishita T, Tenjin Y. Clinical Significance of Semi-quantitation of Telomerase Activity in the Gynecologic Tumors. (submitted)
- 5) Hirai Y, Tanaka N, Takeshima N, Hasumi K, Furuta R, Kawaguchi T, Kitagawa T, Shirahama S, Sakamoto M, and Noda T. Somatic Mutations of the PTEN/MMAC1 Gene Associated With Frequent Chromosomal Loss Detectable by CGH In MI+ Endometrial Cancer. International Journal of Cancer (Submitted)
- 6) Kashima, K., Sekine, M., Nagata, H., Tanaka, K., Iwabuchi, H., Sakamoto, M, and et al. : Comparative Genomic Hybridization Analysis of Familial Ovarian Tumors without BRCA1 Germ-Line Mutations. Submitted
- 7) Shoko, T., Naotake, T., Kouichirou, K., Masaru, S., Takashi, N., Sigeki, S., Toshiharu, K., and K. Itoh. : EXPRESSION OF TUMOR-REJECTION ANTIGEN IN GYNECOLOGIC CANCERS. Submitted
- 8) 杉下 匡. コルポスコピー. 臨床産婦人科産科 53(4) : 444-447, 1999
- 9) T. Muroya., K. Kawasaki., Y. Suehiro., T. Kunugi., K. Umayahara., T. Akiya., H. Iwabuchi., H. Sakunaga., M. Sakamoto., T. Sugishita. and Y. Tenjin. Application of PDT for Uterine Cervical Cancer. Diagnostic and Therapeutic Endoscopy. 5 : 183-190, 1999
- 10) 坂本 優、坂本宙子、岩淵浩之、馬屋原健司、功刀孝也、秋谷 司、作永穂高、室谷哲弥、菊池義公、平井康夫、河口徳一、野田哲生、杉下 匡、天神美夫、田中忠夫. CGH法(Comparative Genomic Hybridization)によるゲノム異常の解析—婦人科がん診断への応用—. CYTOMETRY RESEARCH 9(1) : 41-51, 1999
- 11) 坂本 優、杉下 匡、田中忠夫、天神美夫. fluorescence in situ hybridization(FISH) 新女性医学大系40婦人科腫瘍の細胞診 : 385-401, 1999
- 12) 坂本 優、杉下 匡、田中忠夫、天神美夫. 画像およびDNA解析システム Laser scanning cytometer (LSC). 新女性医学大系40婦人科腫瘍の細胞診 : 418-426, 1999
- 13) 室谷哲弥、河崎恵子、功刀孝也、秋谷 司、岩淵

浩之、作永穂高、坂本 優、杉下 匡、天神美夫。
子宮頸部初期病変に対する治療—特に妊孕能温存を
目的として—光線力学的治療(PDT: Photodynamic
Therapy)による方法。産科と婦人科66(9) : 1164-
1171,1999

2. 学会発表

- 1) 杉下 匡。 : 子宮腫瘍部細胞診の実際と評価—
細胞診クラスⅢaの今後の取扱い— : 第51回
日本産科婦人科学会レクチャーシリーズクリ
ニカルカンファレンス。1999.4.10
- 2) 杉下 匡。 : 会長講演 婦人科細胞診の理論と
実際。 : 第40回日本臨床細胞学会。
- 3) 近藤亜矢子、坂本 優、河崎恵子、功刀孝也、
秋谷 司、岩淵浩之、室谷哲弥、杉下 匡、
天神美夫。 : 子宮頸部擦過検体のLaser
Scanning Cytometer(LSC)による核DNA量
の測定と細胞診との相関。 : 第9回日本サイ
トメトリー学会。1999.6.28~30
- 4) 河崎恵子、坂本 優、馬屋原健司、功刀孝也、
秋谷 司、岩淵浩之、室谷哲弥、杉下 匡、
天神美夫。 : 子宮頸部発癌過程における細胞
内テロメラーゼ活性のIn situ TRAP法による
検出。 : 第9回日本サイトメトリー学会。
1999.6.28~30
- 5) 岩淵浩之、坂本 優、河崎恵子、秋谷 司、功
刀孝也、室谷哲弥、杉下 匡、天神美夫。 :
シンポジウムホルマリン固定パラフィン包埋
切片を用いたcomparative genomic
hybridization(CGH)法の確立とCGH法の臨
床応用。 : 第9回日本サイトメトリー学会。
1999.6.28~30
- 6) 坂本 優、坂本宙子、河崎恵子、秋谷 司、功
刀孝也、岩淵浩之、室谷哲弥、河口徳一、平
井康夫、田中忠夫、野田哲生、杉下 匡、天
神美夫。 : ワークショップ CGH法による子宮
頸部癌のゲノム異常の解析と臨床的意義。 :
第58回日本癌学会。1999.9.29~10.1

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

発がん・進展とがん免疫機構の解析に基づいた新しい分子診断法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究項目：CGHを用いた婦人科がんの遺伝子診断に関する研究

分担研究者：坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医長

研究協力者：平井康夫 癌研究会附属病院 婦人科 副部長

：岩淵浩之 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医長

：河崎恵子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医員

：坂本宙子 オリパスLRC 主任研究員

研究要旨

1) 子宮頸がんに対するCGH法により明らかにされた浸潤・進展関連CNAの一つである20q13.2に存在するzabc-1遺伝子において、高頻度な増幅および発現増加がみられ、子宮頸がんの進展過程に関与している可能性が示唆された。

2) 子宮体部腫瘍の症例について連続して、その新鮮凍結組織材料とその詳細な臨床情報を入手した。材料を入手できた全症例について臨床病理学的に検討し各腫瘍について、前癌病変（子宮内膜増殖症）、初期癌、浸潤癌、転移を伴う癌に区別した。類内膜型子宮体癌には、癌巣周囲に内膜増殖症を伴うホルモン依存型の亜型と内膜増殖症を伴わないホルモン非依存型の亜型の少なくとも二つの亜型が存在する。日本の体癌には、内膜増殖症を伴わないホルモン非依存型の亜型が相当数含まれる。

本シリーズの子宮体癌の約30%に遺伝的不安定性をみとめた。PTEN遺伝子の変異は、子宮内膜癌の発癌過程に深く関わっている。一方、TGFβRII、BAX遺伝子の変異は、遺伝的不安定性をみとめる場合にも対側アレルの欠失をみとめる例は少なく（1例）、発癌への関与は限られている。遺伝的不安定性のある子宮体癌の発癌過程においては、その標的遺伝子、特にPTEN遺伝子が深く関わっていると考えられた。

3) 卵巣がんCDDP感受性株とそれより誘導した耐性株（p53変異、mdr1発現共になし）に対してcDNAマイクロアレイ法を用いて解析したところ、耐性株において発現増大した遺伝子群には、アポトーシス抑制するものやIGFBP2遺伝子などがみられた。今後、臨床症例においてマイクロアレイを用いて卵巣がんの抗癌剤耐性および感受性に関わる遺伝子群の発現パターンの変化を検索することにより、化学療法個別化への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

1) 子宮頸がんの検診は細胞形態に基づく細胞診によりほぼ確立しているが、依然として偽陰性症例が問題となっている。また細胞診や組織診では異形成や進行がんの予後の正確な推定が困難である。さらに、卵巣がん化学療法においては、抗がん剤感受性および耐性の予知が臨床的に重要な問題である。それらの問題点を解決するためには、新しい指標を用いた診断法の開発が必須である。そこで我々は、遺伝子、蛋白質等の分子指標を用いたがん化・進展ならびに抗がん剤耐性に関する新しい診断法の開発を目的とし、以下の4項目について検討した。

2) 子宮体癌は近年増加の傾向が著しいにも関わらず、未だその前癌病変の実体と理解が十分でなく、前癌病変に続く発癌過程の詳細も不明である。そこで、遺伝的不安定性の有無、遺伝的不安定性の発癌への関与の可能性についてさらに検討した。特に、子宮体癌の染色体全領域について未知の遺伝子変異の有無を検索できるCGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を活用して、その発癌過程の分子生物学的特徴を解析した。その成果を、分子遺伝学的手法を用いた子宮体癌の効率の良い早期発見、早期治療に結びつけることを本研究の目的

B. 研究方法

I. 子宮頸癌

1) 浸潤・進展関連遺伝子コピー数異常領域

(CNA) の一つである20q13の候補遺伝子ZABC-1の遺伝子増幅をFISH法により検出した。

1. Hybridization

培養細胞株MCF-7、SKGⅢa、CaSki、SiHa、CX-1、TMCC-1は75mM KCl低張処理を行い、カルノア固定してスライドガラスに展開した。臨床検体 (CIS 1例、扁平上皮癌11例、腺癌5例) は新鮮凍結組織からタッチスメア標本を作製してエタノール固定を行った。検体スライドガラスは10分間のカルノア固定後、73℃のホットプレート上で1時間加温し、ターゲットDNAを変性させるため73℃のdenature solution(70%ホルムアミド、4×SSC, pH7) 中にて培養細胞株スライドガラスは2.5分間、臨床検体スライドガラスは5分間加熱、次いで70%,85%,100%エタノール各2分間にて脱水、風乾した。臨床検体のスライドガラスは0.5 μg/ml proteinase K溶液中で37℃7.5分間インキュベートした後、再び70%,85%,100%エタノール各2分間にて脱水、風乾した。Hybridization mixtureはbiotin標識ZNF217 プロープ1 μl、Spectrum Orange標識CEP 20 プロープ1 μl、master mix 7 μl、cot-1DNA 1 μl に調整し、73℃5分間変性させた後37℃30分間インキュベートした。変性させたHybridization mixtureをスライドガラス上に添加し、カバーガラスをかけて37℃にて18時間インキュベートした。

2. Washing

インキュベーションを終了したスライドガラスはwashing solution(50%ホルムアミド、4×SSC, pH7、45℃)にて10分間3回、4×SSC(45℃)で10分間1回、0.1×SSC(45℃)で10分間1回、4×SSC(室温)で5分間1回洗浄し、4×SSC / 1%BSAにて5分間プレブロック後、5 μg/ml FITC標識アビジンを含む4×SSC / 1%BSAにて45分間インキュベートした。その後、室温にてPN bufferで10分間洗浄し、PNMにて5分間プレブロック後、5 μg/mlピオチン化アビジンを含むPNMにて45分間インキュベートした。引き続き室温にてPN bufferで10分間洗浄し、PNMにて5分間プレブロック後、5 μg/ml FITC標識アビジンを含むPNMにて45分間インキュベートした。室温にて

PN bufferで10分間洗浄後、対比染色のため0.4 μM DAPI(4,5-diamino-2-phenylindole)を用いて封入した。

3. Signal count

蛍光顕微鏡にてZNF217、CEPの各シグナルをカウントし、ZNF217のCEP20に対する比を算出した。

2) ZNF217遺伝子の発現をTaqMan RT-PCR法により定量した。

培養細胞株MCF-7、SKGⅢa、CaSki、SiHa、CX-1、TMCC-1、新鮮凍結組織 (正常子宮頸部4例、異形成1例、CIS 2例、扁平上皮浸潤癌12例、腺癌6例) よりAGPC法にてtotal RNAを抽出し、DEPC-treated waterにて溶解しTemplate solutionとした。primerは、exon 3において105bをcodeする領域をターゲットとし、forward primer : 5'-GATGTTACTCCTCCTCCGGATG, reverse primer : 5'-CACACTTGGCCTGTATCTGCAに設定した。Taq Man probeはそのターゲット領域に特異的にハイブリダイズするよう、5'FAM(6carboxy fluorescein)-AAAGAGAAGCAAACGGAGACCGCAGC-3'TAMRAと設定した。PCR solutionは1×PCR buffer A 22.5 μl、25mM MgCl₂ 11 μl、10mM ATP 1.5 μl、10mM dATP 1.5 μl、10mM dCTP 1.5 μl、10mM dGTP 1.5 μl、20mM dUTP 1.5 μl、10 μM forward primer 1 μl、10 μM reverse primer 1 μl、5 μM Taq Man probe 1 μl、Taq Gold DNA Polymerase 0.25 μl、MultiScribe Reverse Transcriptase 0.25 μl、RNase Inhibitor 1 μl、Template solution 2.2 μlに調整した。MultiScribe Reverse Transcriptaseによる逆転写反応(48℃ for 30min)終了後、引き続きTaq Man PCR 95℃ for 10min (95℃ for 15sec, 60℃ for 1min) ×50cycle (ABI PRISM 7700)を行った。なお、Taq Man PCRは両端に蛍光色素をもつTaq Man probeによって標的PCRプロダクト量に比例する蛍光発光量を検出することにより標的核酸配列の有無の判定とその定量を行うシステムである。また、RNA純度の内部標準としてβ2-microglobulin mRNA定量を行い、mRNA発現量の評価はβ2-microglobulinに対するZNF217の比を

とることで行った。正常子宮頸部4例において発現定量値の平均を算出し、発現量変化の評価基準とした。

II. 子宮体癌

1. 子宮体部腫瘍の新鮮凍結組織材料の蓄積：本年度も全子宮体部腫瘍の手術例から新鮮組織材料を採取した。組織材料は、各種測定やDNA抽出、組織型確認のため凍結保存した。

2. 癌関連遺伝子変異の解析：各症例の腫瘍組織より抽出したDNAについて、遺伝的不安定性の有無を検索した。さらに、遺伝的不安定性にもとづく発癌機構において、標的遺伝子と推測されるTGF beta type II receptor, BAX, およびPTEN/MMAC1のexon中の変異をSSCP法とdirect sequenceにより検索した。当施設で以前から行っているゲノム全般にわたる遺伝子の増幅と欠失の解析が可能なCGH (comparative genomic hybridisation) 法を全症例に実施し、上記遺伝的不安定性との相互関連性を解析した。

3. 腫瘍組織および内臓間質組織のアロマターゼ活性の測定とエストロゲンおよびプロゲステロンセプターの測定：各症例についてDEXA法による体脂肪の正確な測定と血中エストロゲン3分画の測定と併せて、体部発癌に関係すると考えられるホルモン環境を評価するため腫瘍組織そのものおよび内臓間質組織のアロマターゼ活性の測定を開始した。

4. 子宮腫瘍の臨床病理学的検討：組織材料を入手した全症例について臨床病理学的に検討した。各腫瘍について、前癌病変（子宮内膜増殖症）、初期癌、浸潤癌、転移を伴う癌に区別し、遺伝子変異やその他の分子生物学的所見と比較検討した。

III. 卵巣癌

シスプラチン感受性を有する卵巣癌培養細胞株KFと同株より誘導されたシスプラチン耐性株KFr、高度耐性株KFr-P200細胞における遺伝子発現をHuman Cancer CHIP(TaKaRa)を用いて比較した。

1. 蛍光標識cDNAプローブ調整

培養細胞株KF、KFr、KFr-P200よりAGPC法にて抽出したtotal RNAからOligotex-dT30<Super> mRNA purification kit (TaKaRa) を用いてpolyA+RNAを精製。polyA+RNA 1 μ g, oligo dT primer 300pmol, DEPC-treated waterをtotal 15 μ lとなるよう調整し、70℃で5分間加熱した後氷上で冷却。5×

AMV Reaction buffer 8 μ l, 10×Low TdNTP mix 4 μ l, Cy 3 or Cy 5-dUTP 4 μ l, RNase Inhibitor 50units, Reverse Transcriptase XL(AMV) 50units, DEPC-treated waterを加え全量40 μ lとし42℃で1時間保温、さらにReverse Transcriptase XL(AMV) 50unitsを加え42℃で1時間保温後、50mM EDTA 5 μ lを加え反応を停止させた。内部標準とするlambda poly A+RNAを逆転写反応時にサンプルpoly A+RNA 1 μ gに対して100pgずつ添加した。

1N NaOH 10 μ lを加え、37℃で10分間処理後1M Tris-HCl (pH 7.5)25 μ lを加え中和し、CENTRI-SEP Spin Columnを用いて合成されたcDNAを精製した。

容出液に1/10量の3M CH₃COONa (pH 5.2)と2.5倍量の100%エタノールを加え-20℃で冷却した後、15,000rpm 20分間遠心し上清を除き、沈澱を70%エタノールでリンスした。さらに15,000rpm 10分間遠心し上清を除いて沈澱を5 μ lのHbridization 溶液 (6×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhardt's溶液、ヒトcot-1 DNA 1.5 μ g/ μ l, poly dA 0.8 μ g/ μ l, Yeast tRNA 1.0 μ g/ μ l) に溶解した。

2. Hybridization

pre-hybridization 溶液 (6×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhardt's溶液, 1mg/ml denatureed salmon sperm DNA) を用いてスライド全体を処理、室温、2時間放置後2×SSC, 引き続き0.2×SSCでリンスする。その後低速遠心で水分を除去する。Cy 3 およびCy 5 各標識プローブ5 μ lを混合し、95℃ 2分間加温して変性させた後室温まで冷却し、15,000rpm 25℃で10分間遠心。上清をDNAチップ表面のアレイDNA上に滴下し、カバーガラスをかけ65℃ 13.5時間インキュベートした。

3. Washing

ハイブリダイゼーション終了後、室温の2×SSC中でカバーガラスをはずし、2×SSC / 0.2% SDS (65℃)で5分間、2×SSC / 0.2% SDS (55℃)で30分間2回、0.05×SSC(室温)で5分間洗浄した。

4. Scanning

GMS 418 Array Scannerを用いて各スポットの蛍光シグナルを読み取り、データ解析は解析ソフトウェアImaGeneによって行った。Cy 3, Cy 5の各検出波長のlambdaのシグナル強度を算出し、そ

の平均値より補正係数を求めた。さらにImaGeneにより補正係数をかけてCy 3, Cy 5のシグナル強度補正を行いシグナル強度の測定を行った。

C. 研究結果

I. 子宮頸癌

1) 20q13.2領域に存在するZABC-1遺伝子において、子宮頸部浸潤がんの約5割に遺伝子コピー数増幅がみられた。培養細胞株MCF-7では高度増幅、CaSki、SiHaでは5コピー以上の増幅を認めた。臨床検体では17例中9例(53%)でZNF217のCEP20に対する比が1.5以上となり、17例中12例(71%)で5コピー以上の増幅を認めた。

2) ZABC-1遺伝子は、子宮頸部浸潤がんの約6~7割に発現増加がみられた。すべての培養細胞株、異形成およびCISの全3例、扁平上皮浸潤癌12例中6例、腺癌6例中3例で正常子宮頸部の2倍以上の発現増加を認めた。

3) ZABC-1遺伝子の発現増加例と遺伝子増幅例の間に正の相関がみられた。

II. 子宮体癌

1) 子宮内膜癌において、PTEN遺伝子の変異を高率に認めた。

2) 遺伝的不安定性をみとめる子宮内膜癌にみられたPTEN遺伝子変異の場合特に、対側アレルの欠失を高率にみとめることをCGH法により初めて推定した。PTEN遺伝子の変異は、子宮内膜癌の発癌過程に深く関わっている。

3) TGF β RII, BAX遺伝子の変異は、遺伝的不安定性をみとめる場合にも対側アレルの欠失をみとめる例は少なく(1例)、発癌への関与は限られている。

4) 子宮内膜癌において、 β -cateninの細胞内異常蓄積が高率にみられた。 β -cateninの異常蓄積は、遺伝的不安定性をみとめる場合には特に高率だが、PTEN遺伝子変異の有無とは相関しなかった。

III. 卵巣癌

KFr細胞では、KFr細胞と比較し、DNA修復関連酵素遺伝子群(XRCC5, XRCC6, ERCC5, hMLH1など)や活性酸素除去酵素のSOD遺伝子発現増加など、42種の遺伝子の発現量変化が認められた。

KFr-P200細胞では、KFr細胞と比較し、アポトーシス関連遺伝子群(Caspase, BAK, Aktなど)、

やInsulin-like growth factor receptorなど、26種の遺伝子の発現量変化が認められた。

D. 考察

I. 子宮頸癌

正常上皮細胞にHPVを遺伝子移入して得られた不死化細胞における遺伝学的変化として高頻度な20q13ゲインが知られている。また、20q13ゲインは種々の腫瘍で高頻度に観察されることがCGH解析により明らかにされている。さらに、ZNF217遺伝子は20q13ゲインを有する乳がん細胞からpositional cloningにより同定された遺伝子であり、transcriptional activatorとして機能することが知られている。今回、子宮頸がんのCGH解析により明らかになった20q13ゲインのターゲットがZNF217遺伝子であるかどうか明らかにするため、ZNF217遺伝子特異的DNAプローブを作成し、FISH解析をするとともに、定量的RT-PCR法により、ZNF217遺伝子の発現を定量した。その結果、ZNF217遺伝子は、子宮頸部浸潤がんの約5割に遺伝子コピー数増幅がみられた。また、子宮頸部浸潤がんの約6~7割に発現増加がみられた。これは、子宮頸がんにおける遺伝子増幅の頻度としては、3q26領域の次に高いものであり、子宮頸がんにおいてZNF217遺伝子が高頻度に発現していることも国の内外を問わず初めての報告である。今後は、この遺伝子が発がん過程のどのステップで発現増加し、どのステップで遺伝子増幅するかを、同定する予定である。さらに、ZNF217を含めたマイクロアレイを用いて、他の遺伝子との関連性も検討する予定である。

II. 子宮体癌

平井らは、子宮体部癌の臨床病理学的特徴を詳細に分析することにより、癌巣周囲に内膜増殖症を伴う亜型と、内膜増殖症を伴わない亜型が存在することを明らかにしてきた。これら2亜型の体部癌について、染色体全領域について未知の遺伝子変異の有無を検索できるCGH(comparative genomic hybridisation)法を用いて、その発癌過程の分子生物学的特徴をさらに解析中である。これにより、高度の熟練を要しない、より簡便で精度の高い分子遺伝学的診断手段の開発と治療への応用が期待できる。

III. 卵巣癌