

(1) マイクロアレイ解析の利点は、同時に多数の遺伝子発現変化を解析できることである。今回使用したHuman Cancer CHIPには382種類の癌関連遺伝子がターゲットとして配置されており、他のチップと比較してターゲットの種類は少ないが、全て癌関連遺伝子なので変化を検出できる効率が高くなったと考えられる。

(2) 抗癌剤耐性のメカニズムは様々なものが報告されている。KFr-のシスプラチン耐性機構には、p53遺伝子やmdr-1遺伝子が関与せず、シスプラチンの細胞内濃度が減少していることが報告されている。今回の検討により、3倍程度のシスプラチン軽度耐性KFr細胞では、KF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。すなわち、KFr細胞では、DNA修復に関連した酵素遺伝子群の発現増加が、その細胞のシスプラチン耐性機構に寄与している可能性が示唆された。

(3) 30倍程度のシスプラチン高度耐性細胞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。とくに、高度耐性細胞では、アポトーシス関連遺伝子群のうち、Caspase 3, BAK等のアポトーシス促進遺伝子群の発現低下、およびinsulin-like growth factor I receptor (IGF1R)およびinsulin-like growth factor II receptor (IGFR II)等のアポトーシス阻害遺伝子群の発現亢進が認められ、その結果として、アポトーシスに耐性になっていると考えられた。今までの我々の研究により、KFr-P200細胞では、p53の遺伝子変異が認められないことや、mdr-1遺伝子の発現増加も認められないことから、上記のアポトーシス関連遺伝子群の変化がこの細胞のシスプラチン高度耐性に深く関与していることが示唆された。

(4) 以上より、p53が変異をしていない場合のシスプラチン耐性獲得機構には、DNA修復に関連した酵素遺伝子群やアポトーシス関連遺伝子群が関与しており、とくに、アポトーシス関連遺伝子群の発現が高度に変化している場合には、シスプラチンをはじめとする多くの抗癌剤に耐性を臨床的に示す可能性があり、

何らかの耐性克服薬剤あるいは遺伝子導入が必要になるものと推定される。

E. 結論

I. 子宮頸癌

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。

II. 子宮体癌

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、TGF β R II, 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。

III. 卵巣癌

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) O 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.
- 2) O Muroya, T., Kawasaki, K., Kunugi, T.,

- Akiya, T., Iwabuchi, H., Sakunaga, H., Sakamoto, M., Sugishita, T., Tenjin, Y. : Application and Characteristics of Photodynamic Therapy for Cervical Cancer. Photomedicine in Gynecology and Reproduction. 270-277, 2000
- 3) ○ 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.
- 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) ○ 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
- 9) ○ 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
- 10) ○ 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
- 11) ○ 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
- 12) ○ 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. 坂本 優. : 教育講演 癌の遺伝子情報と細胞形態. : 第40回日本臨床細胞学会. 1999.6.25~27
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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

- 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.

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：女性生殖器癌における血管新生とその阻害

分担研究者：藤本 次良 岐阜大学医学部産婦人科 講師

研究要旨

癌の進展に血管新生が重要であることはいうまでもない。そこで、女性生殖器癌における血管新生の分子機構を知るために、血管新生因子であるbasic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF),platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF, thymidine phosphorylase)の発現様式や機能を検討し解析した。その結果、女性生殖器癌における血管新生因子は癌の進展時期に応じて特徴的な発現様式や機能を有するので、それに対応した血管新生阻害による治療が必然であることがわかった。

A. 研究目的

女性生殖器癌における増殖や進展に関わる血管新生の特徴を理解し、その抑制を成功させることによって制癌することである。

B. 研究方法

子宮頸癌における血管新生の分子機構を知るために、血管新生因子であるplatelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF, thymidine phosphorylase), interleukin (IL)-8などの発現様式や機能を検討し検討した。また、子宮内膜癌における血管新生をどのような薬剤で抑制できるか検討するため、ダブルチャンバー法による血管内皮細胞の基底膜崩壊能、遊走能、増殖能、管腔形成能を検討した。

(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. 研究結果と考察

子宮頸癌の転移リンパ節におけるthymidine phosphorylaseであるPD-ECGF発現量と予後の関連を検討したところ、これが予後のインディケータになることがわかった。したがって、子宮頸癌の増殖進展に関わる血管新生能のインディケータとしては、PD-ECGFが最適で、治療としては、5FUの前駆体などで奏効すると推察された。さらに、interleukin (IL)-8の発現量も微小血管数と相関す

ることがわかった。また、IL-8の発現量は浸潤マクロファージ数と相関した。したがってIL-8は一つの血管新生因子で、この供給源は浸潤マクロファージであるtumor-associated macrophage (TAM)であろうと推察された。さらに、高IL-8群では低IL-8群に比して著しく予後が悪いことがわかった。したがって、子宮頸癌の間質に浸潤してくるマクロファージが腫瘍の進展に関与する血管新生に働いていることがわかった。

近年、食生活がますます欧米化し、生活習慣病もますます発症してきたので、子宮内膜癌におけるプロゲステンの投与が制約を受けることも考えられ、プロゲステンに代わって血管新生を抑制できる薬剤をダブルチャンバーを用いてスクリーニングしてみた。その結果、giseniside-Rb2は血管内皮細胞の基底膜崩壊能、酢酸リュープロレリンは血管内皮細胞の遊走能を、dienogest,toremifene,ICI 182,780は血管内皮細胞の増殖能や管腔形成能を抑制することがわかった。

E. 結論

各々の女性生殖器癌において、血管新生因子は特徴的な発現様式や機能を有し、その疫学的背景も変遷がみられるので、これらに対応した血管新生阻害による治療が必然である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

2. 学会発表

シンポジウム

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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

- 4) 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

一般講演

- 1) 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回エンドメトリオーシス研究会, 大宮市, 1999, 1, 29-30
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

F. 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

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：がんの早期診断および転移に関する研究

分担研究者：大屋敷 一馬 東京医科大学内科学第1講座 教授

研究要旨

がんの診断、早期再発の発見を目的として細胞レベルでのテロメラーゼ活性の検出方法 (in situ TRAP法) および微量検体を用いてのテロメラーゼ活性の検出方法 (Resin-TRAP法) を開発した。これらの方法により各種のがん患者より得られた体液を用いて、微小残存病変や再発の予測が可能になるものと思われる。

A. 研究目的

正常二倍体細胞では細胞分裂ごとに染色体末端部のテロメア部分 (TTAGGG 反復配列) は短縮し、限界点まで達すると細胞はそれ以上の分裂を停止し死滅する。これは、通常、正常二倍体細胞ではテロメアの修復酵素であるテロメラーゼ活性を欠くためである。癌細胞では旺盛な細胞分裂と増殖がみられるにもかかわらず、細胞分裂の停止が起らないのはテロメラーゼの再活性が生じることによりテロメアの付加を行っているためと考えられる。実際、癌の約90%では高いテロメラーゼ活性がみられることから、テロメラーゼ活性は新たな癌のマーカーとして注目されている。テロメラーゼ活性は polymerase chain reaction を用いた TRAP 法により検出されるが、従来の方法では特定の蛋白量当たりの活性を測定しているため個々の細胞におけるテロメラーゼ活性を検出することは困難であった。そこで細胞レベルでのテロメラーゼ活性の検出法を開発し、その応用により腫瘍における早期診断、微小残存病変の検出の臨床的意義を明確にすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) in situ telomeric repeat amplification protocol (in situ TRAP) 法の開発：個々の細胞レベルでのテロメラーゼ活性を検出するために、従来用いられている TS プライマーおよび CX プライマーを end-labeling 法により蛍光標識し、automated laser fluorescence (ALF)・DNA・sequencer を用いての fluorescence-TRAP 法 (F-TRAP 法) でテロメラーゼ活性の検出が可能であることを検討した。

このことより、蛍光標識したプライマーでもテロメラーゼ特異的な伸長反応および PCR 反応を用いることでテロメラーゼ活性の検出が可能であることを証明した。そこで、細胞浮遊液を作成し、無蛍光のスライドガラスに細胞を固着させ、蛍光標識プライマーを用いて PCR 反応を行った。この際、非特異的な蛍光を除外する目的で、PCR 反応を行わないもの、あるいは蛍光標識していないプライマーを用いた実験をコントロールとした。

(2) 肺癌患者の気管支洗浄液におけるテロメラーゼ

肺癌患者の気管支洗浄液におけるテロメラーゼ陽性細胞を F-TRAP 法と in situ TRAP 法の両者を用いて検討し、肺癌の組織型、発生部位、テロメラーゼ活性検出率について検討した。また従来よりの TRAP 法より求めたテロメラーゼ活性との比較検討を行い、in situ PCR 法によるテロメラーゼの検出感度およびその再現性を検討した。気管支洗浄液は採取後、直ちに冷却し、高張液/低張液にて処理し、混入する赤血球や不純物を取り除き、細胞ペレットにして検討した。一部は F-TRAP 法により実際のテロメラーゼ活性を測定し、残りはスライドガラスにサイトスピンを用いて固着後 in situ TRAP により細胞レベルでのテロメラーゼの有無を検討した。in situ TRAP 法を用いた検討には蛍光顕微鏡を用いた。

(3) 泌尿器悪性腫瘍におけるテロメラーゼ

膀胱癌患者の自然排尿における尿中剥離細胞を用いて F-TRAP および in situ TRAP 法によりテロメラーゼ活性およびテロメラーゼ陽性細胞の存在を検討した。

(4) Resin telomeric repeat amplification protocol (Resin-TRAP)法の開発：従来用いられているTSプライマーおよびCXプライマーをend-labeling法により蛍光標識し、automated laser fluorescence (ALF) DNA sequencerを用いてのfluorescence-TRAP法 (F-TRAP法) でテロメラーゼ活性の検出とレジン処理による伸長反応後のDNA濃縮およびprotease inhibitor阻害剤であるEDTAの添加によるテロメラーゼ検出頻度を比較検討した。膀胱癌患者の早朝尿あるいは胆道系悪性腫瘍患者よりERCP等で得られた胆汁を10 ml 採取。採取時に検体をEDTA 添加と未添加に分けた。検体はCHAPSにて蛋白抽出し、0.1 ng TS primer (5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3') にてTRAP法を用いて伸長反応を施行。その後、10 micro litterのsilica-based StraClean Resin (Strategene)を添加、15分間の混和後、1分のインキュベーション、2000回転、DNAを含む上層をSupprec-02チューブに移し、遠心後、型どおりTRAP法をによりテロメラーゼ活性を測定した。また、一部の症例では細胞浮遊液を作成し、無蛍光のスライドガラスに細胞を固着させ、蛍光標識プライマーを用いてin situ TRAPを行った。

C. 研究成果

(1) in situ TRAP法

in situ TRAP法を検証するために、標識したテロメラーゼ活性陰性細胞(TIG-1)とテロメラーゼ活性陽性細胞であるK562での混和実験を行った。これらの実験により、in situ TRAP法ではテロメラーゼ陽性細胞を的確に捉えていることを証明した。すなわち、免疫ビーズにて標識したテロメラーゼ活性陰性細胞では蛍光を発せず、K562でのみ強い蛍光を認めた。さらに、樹立細胞株でも個々の細胞により蛍光発色の強度が異なっていた。このことより樹立細胞といえどもテロメラーゼの活性が一様でなく、腫瘍細胞の多様性を反映しているものと考えられた。さらに、特定の蛋白量当たりのテロメラーゼ活性とテロメラーゼ陽性細胞の比率は必ずしも相関しないことを見出した (表1)。

(2) 肺癌患者の気管支洗浄液では22例中9例 (41%) に細胞診にてclass Vを検出するにすぎなかったが、テロメラーゼ活性は18例 (82%) に認め、有意差 (P = .006) をもって検出感度の向上が観察された。テロメラーゼ活性を検出した18例のうち、16例はF-TRAP法で、15例

はin situ TRAP法によりテロメラーゼ活性を検出できたことより、この両者の測定の併用による検出感度の上昇も示唆された。さらに、中心性肺癌では8例中7例 (88%) でテロメラーゼ活性を認め、末梢性肺癌でも14例中11例 (79%) でテロメラーゼ活性を認めたことより、気管支鏡では観察不可能な末梢性肺癌の検出に有用であることが推測された。組

表 1: ヒト腫瘍細胞株およびリンパ球におけるテロメラーゼ陽性細胞の検出

	核の蛍光陽性率	活性
白血病細胞株		
HEL	17.0%	144
K562	53.7%	106
TS9;22	63.3%	70
SS9;22	43.0%	68
U937	30.3%	174
OM9;22	48.7%	150
HAL-01	35.7%	190
HL60	14.0%	72
大腸癌細胞株		
#320DM	67.0%	48
乳癌細胞株		
COLO #691	22.3%	9.0
子宮癌細胞株		
COLO #694	34.3%	254
肺癌細胞株		
COLO #699	58.0%	100
悪性黒色腫細胞株		
#711-N	27.3%	13.2
健常者リンパ球		
26歳	0%	0.9
29歳	0%	0.8
4歳	0%	0.4
63歳	0%	0.2

織別におけるテロメラーゼ活性の検出頻度の違いは明瞭でなく、今後の検討課題と考える (表2)。

(3) 泌尿器系悪性腫瘍患者の自然排尿を用いて尿中剥離細胞におけるテロメラーゼ活性をF-TRAP およびin situ TRAP法により検討した。F-TRAP法では治療前の10/13例に治療中および治療後の3/10にテロメラーゼ活性がみられた。一方、in situ TRAP法では未治療患者の11/13例、治療中/治療後患者では6/10例にテロメラ

一ゼ陽性細胞が尿中細胞より検出可能であった。このことより、尿中剥離細胞を用いた検討では、未治療例の泌尿器悪性腫瘍（特に膀胱癌患者）ではテロメラーゼ活性の検出頻度にF-TRAPとin situ TRAP法では有意な差は認めないもの治療後のものでは、in situ TRAPの方がテロメラーゼ陽性細胞の検出感度に優れていることが示唆された。このことはF-TRAPおよびin situ TRAP法を組み合わせることにより、膀胱癌患者の微小残存病変の検出に有用である可能性が見い出せた。(4)レジンカラムによるテロメラーゼ活性検出の向上：泌尿器系悪性腫瘍患者の自然排尿を用いて尿中剥離細胞におけるテロメラーゼ活性をF-TRAPおよびin situ TRAP法により検討した。F-TRAP法では治療前の10/13例に治療中および治療後の3/10にテロメラーゼ活性がみられた。一方、in situ TRAP法では未治療患者の11/13例、治療中/治療後患者では6/10例にテロメラーゼ陽性細胞が尿中細胞より検出可能であった。このことより、尿中剥離細胞を用いた検討では、未治療例の泌尿器悪性腫瘍（特に膀胱癌患者）ではテロメラーゼ活性の検出頻度にF-TRAPとin situ TRAP法では有意な差は認めないもの治療後のものでは、in situ TRAPの方がテロメラーゼ陽性細胞の検出感度に優れていることが示唆された。このことはF-TRAPおよびin situ TRAP法を組み合わせることにより、膀胱癌患者の微小残存病変の検出に有用である可能性が見い

出せた。次に泌尿器系悪性腫瘍患者の自然排尿を用いて尿中剥離細胞におけるテロメラーゼ活性を、テロメラーゼ活性を阻害する可能性のあるproteaseの阻害物質であるEDTAの有無およびレジン処理の有無により検討したところ、EDTAなしでレジン処理なしでは0/14 (0%)、EDTA処理でレジン処理なしでも0/14 (0%)であり、レジンによるDNA濃縮

表2：肺癌患者におけるテロメラーゼ活性と陽性細胞

年齢	細胞診	活性	陽性細胞	部位
73/M	V	0.95	高頻度	末梢性
66/M	V	2.3	低頻度	末梢性
57/F	V	1.3	低頻度	末梢性
49/M	V	3.08	高頻度	中心性
72/M	V	0	陰性	末梢性
78/M	V	6.06	陰性	末梢性

73/F	V	1.64	低頻度	中心性
60/M	IIIb	3.09	陰性	中心性
66/M	IIIa	1.23	高頻度	末梢性
74/F	II	3.55	低頻度	末梢性
扁平上皮癌				
71/M	V	0	高頻度	中心性
56/F	V	6.24	低頻度	末梢性
168/F	IIIa	0.91	高頻度	中心性
61/M	IIIa	3.0	低頻度	中心性
77/M	II	1.23	陰性	末梢性
84/M	II	0	低頻度	中心性
58/M	I	0	陰性	中心性
大細胞癌				
51/M	II	2.0	高頻度	末梢性
62/M	II	1.01	高頻度	末梢性
小細胞癌				
52/M	II	0	陰性	末梢性
転移性腎癌				
65/F	II	0	陰性	末梢性
転移性大腸癌				
65/M	IIIb	3.68	低頻度	末梢性

が少量 (10 ml) の尿を用いた剥離細胞でのテロメラーゼ検出には必要であることが示唆された。一方、EDTA処理なしでレジン処理のものでは4/9 (44%)、EDTA処理でレジン処理のものでは9/14 (64%)にテロメラーゼ活性を認め、本方法の有用性が確認された (表3、表4)。表3：膀胱癌患者の尿中 (10 ml) 剥離細胞を用いてのEDTAの添加の有無とレジン処理に有無によるテロメラーゼ活性検出の頻度

	膀胱癌	良性疾患
レジンカラムあり		
EDTA (-)	9/14 (66%)	0/9
EDTA (+)	4/9 (44%)	0/9
レジンカラムなし		
EDTA (-)	0/14 (0%)	0/9
EDTA (+)	0/14 (0%)	0/9

表4：膀胱癌患者の尿中 (10 ml) 剥離細胞を用いてのEDTAの添加の有無とレジン処理に有無によるテロメラーゼ活性検出の頻度と細胞診の結果との関係

Class	レジン(-)	レジンカラム(+)	
		EDTA(-)	EDTA(+)
I/II	0/6	1/5	4/6
IIIa/IIIb	0/6	2/3	3/6
V	0/2	1/1	2/2

さらに経尿道的腫瘍摘出術後の尿中剥離細胞内におけるテロメラーゼ活性を経時的に検討した結果、術後1週間で7/11例に尿中テロメラーゼ活性を検出したが、内1例は1ヵ月後に消失した。残りの6例の尿では3ヵ月後でもテロメラーゼ活性を認め、そのうち3例は膀胱癌の再発を認めた。一方、尿中剥離細胞でのテロメラーゼ活性が消失したものでは再発を認めなかった(表5)。このことは定期的な尿中剥離細胞のテロメラーゼ活性の検出が膀胱癌の早期再発を予測しうることを意味するものと考えた。

表5: 膀胱癌患者における経尿道的腫瘍切除術前後の尿中剥離細胞を用いたテロメラーゼ活性の検出と再発

	Before	1 wk	1 mo	3 mo	
1	+	-	-	-	
2	+	-	-	-	
3	+	+	+	++	
4	++	+	+	+	
5	++	+	+	+	
6	++	++	-	-	
7	++	-	-		Relapse
8	+	+	+	++	Relapse
9	++	+	+	++	Relapse
10	-	-	-	-	
11	+	+	-	-	

D. 考察および結論

in situ PCRによるテロメラーゼ活性の検出法(in situ TRAP法)を開発し、個々の細胞におけるテロメラーゼ活性の検出法を確立した。さらに微量な検体よりテロメラーゼ活性を検出するResin-TRAP法を開発した。これらの方法を用いて、がんの特異的酵素と考えられるテロメラーゼ活性を検討

したところ、がんの早期診断および微小残存病変の検出が可能であることが判明した。すなわち、細胞診での検討よりも、より鋭敏に癌細胞を検出することが可能であることが判明し、その診断的有用性が期待できた。さらに泌尿器科悪性腫瘍患者より自然排尿により得られた尿中剥離細胞にて蛋白レベルでのテロメラーゼ活性と細胞レベルでのテロメラーゼ陽性細胞の検出を行ったところ、治療後の早期再発の検出に有用であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Itoi T, Shinohara Y, Takeda K, Takei K, Ohno H, Nagao K, Hisatomi H, Ohyashiki K, et al.: Detection of telomerase activity in biopsy specimens for diagnosis of biliary tract cancers. *Gastrointest Endoscop*, 2000, in press.
4. 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.
5. 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.
6. 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)。

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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
12. 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.
13. Itoi T, Ohyashiki K, et al.: Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells obtained from bile. Int J Oncol. 1999, 15:1061~1067.

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：子宮頸がんにおけるSCC抗原発現の異常に関する研究

分担研究者：加藤 紘 山口大学医学部産婦人科 教授

研究要旨

子宮頸癌患者の末梢血中に存在している癌細胞を扁平上皮癌関連抗原であるSCC抗原をマーカーとしasymmetric semi-nested RT-PCRを利用して定量的に検出する事を試みた所、SCC抗原mRNA 470コピー/mg RNAをcut off値とすると感度78.9%、特異度82.6%で初期病変を含む子宮頸癌患者が検出でき、さらに治療後の状態を反映していた。このことからこの方法が子宮頸癌患者の早期血液診断及び予後の判定に利用できる可能性が示唆された。また子宮頸癌患者組織のホルマリン固定標本から連続する異形成、上皮内癌、浸潤癌の領域のそれぞれのDNAを採取しPCR後CGHにより染色体コピー数の異常を検討した(DOP-PCR CGH)所、CINIで3q+、11q-の異常、CINIIIでさらに1q+などの異常が検出され、発癌過程における染色体変化が明らかとなった。

A. 研究目的

1) 扁平上皮癌関連抗原であるSCC抗原は相同性の高い二つの遺伝子(SCCA1およびSCCA2)によりコードされており、それらは18番染色体21、3領域にタンデムに配列している。これらによりコードされるSCCA1およびSCCA2はともにserine protease inhibitor familyに属しその相同性は92%と高いが、そのtargetとなるproteaseを規定するreactive siteのアミノ酸配列は異なり実際in vitroでは生物活性は異なる。さらにSCCA2の発現は扁平上皮癌細胞で亢進する事が明らかにされている。そこで本研究ではSCCA2の発現機構を明らかにすることを目的とし、SCCA2のプロモーターの制御因子の検討を試みる。このことにより扁平上皮細胞の悪性変化あるいは悪性度を解明する事が期待できる。2) 癌患者の末梢血中には癌細胞が浮遊していると考えられる。そこで扁平上皮癌関連抗原であるSCC抗原をマーカーとし末梢血中扁平上皮癌細胞の存在をasymmetric semi-nested RT-PCRを利用して定量的に検出する事を試みる。このことで扁平上皮癌の悪性度あるいは患者の予後を推定できる可能性が期待できる。3) 子宮頸癌の発癌過程において各種遺伝子変化がおきている可能性がある。本研究では子宮頸癌患者組織のホルマリン固定標本から連続する異形成、上皮内癌、浸潤癌の領域のそれぞれのDNAを

microdissectionで採取しPCR後CGHにより染色体コピー数の異常を検討する(DOP-PCR CGH)。

B. 研究方法

1) これまでの研究で-432~+47の領域にSCCA2のプロモーター活性が認めている。この領域内に存在するE-boxに注目しこれに結合して転写を制御すると報告されているc-mycの影響を調べる。c-myc及びそのheterodimerの相手であるmaxのcDNAをSCCA発現細胞に導入しSCCA2の発現の変化を調べる。

2) 癌患者及び健常人の末梢血中よりRNAを精製し、SCCA1 SCCA2共に増幅できるprimerを用いてasymmetric semi-nested RT-PCRを行う。このときreal timeにPCR productを測定できるAmplisensor systemを用いる。

3) 子宮頸癌の中でも頻度の高い扁平上皮癌の初期病変に対し、同一症例での正常組織から扁平上皮癌までの各組織よりmicrodissectionを用いたDOP-PCR CGH法を行い細胞遺伝学的変化の検討する

(倫理面への配慮)

今回の研究にあたっては患者より十分なインフォームドコンセントを得た上で検体を採取した。

C. 研究結果

- 1) SCCA2のプロモーター活性が認められている-432~+47の領域に存在するE-boxに結合して転写を制御する可能性のあるc-myc及びそのheterodimerの相手であるmaxのcDNAをSCCA発現細胞に導入したが、baseの発現が高いためその効果は認められなかった。
- 2) 末梢血中に浮遊している扁平上皮癌細胞の存在を、SCCA1、SCCA2を共に増幅できるprimerを設定しasymmetric semi-nested RT-PCRを利用して定量的に検出する事を試みた。SCC抗原のcDNA10コピー以上の範囲で検量線を引くことが可能で、また血液中に腫瘍細胞数を変えて混入したsampleから回収したtotalRNAを検討したところ1個の細胞から測定可能であった。健康人23例、加療前子宮頸癌患者38例の症例における検討を行った所、470コピー/mg RNAをcut off値とすると感度78.9%、特異度82.6%であった。CISにおいて6例中5例陽性であったが進行度によるコピー数の有意差は認められなかった。また血清SCC抗原値とSCC抗原mRNAコピー数の間には相関は認められなかった。しかしながら加療前後の値を比較したところ10例中9例において加療後明らかにone order以上コピー数が減少していた。
- 3) 子宮頸癌の発癌過程において各種遺伝子変化がおきている可能性があるため、子宮頸癌患者組織のホルマリン固定標本から連続する異形成、上皮内癌、浸潤癌の領域のそれぞれのDNAをmicrodissectionで採取しPCR後CGHにより染色体コピー数の異常を検討した(DOP-PCR CGH)。CINIで3q+ (3/10)、11q- (3/10)の異常、CINIIIでさらに1q+ (4/13)などの異常が検出された。

D. 考察

- 1) SCCA2のプロモーター活性が認められている-432~+47の領域に存在するE-boxに注目しこれに結合して転写を制御する可能性のあるc-myc及びそのheterodimerの相手であるmaxのcDNAをSCC抗原発現細胞に導入したが、SCCA2の発現増加は認められなかった。これは今回遺伝子導入を試みた細胞がSCC抗原を発現している腫瘍細胞であったため、baseのc-myc発現量が高く遺伝子導入によってさらにoverexpressionさせてもその効果が

でなかったものと考えられる。今後SCC抗原を発現しているkeratinocyteに遺伝子導入するか、あるいはc-mycと同じくE-boxに結合してc-mycとは反対に転写を抑制するmadを遺伝子導入してSCCA2の発現の変化を調べる予定である。

- 2) 今回のdataより末梢血中のSCC抗原mRNAのコピー数の測定は子宮頸癌患者の早期血液診断及び予後の判定に利用できる可能性が示唆された。
- 3) 今回の検討は同一症例における連続する異形成、上皮内癌、浸潤癌の領域をmicrodissectionで採取し検討しているため、発癌過程における染色体変化の流れを正確に表していると考えられる。

E. 結論

子宮頸癌患者の末梢血中にはSCC抗原を発現している腫瘍細胞が浮遊している。これは初期癌の段階でも検出され、子宮頸癌の血液による診断の可能性が示唆された。また子宮頸癌の発癌過程における染色体変化が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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
6. 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
7. 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

1. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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

6. 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

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：子宮体がんの分子診断の確立に関する研究

分担研究者：和氣 徳夫 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

1) 18qLOHの標的遺伝子の同定

子宮体癌で観察される18qLOHはDPC4及びDCC両がん抑制遺伝子不活性化に関与していた。多くの子宮体癌では18qLOHが両遺伝子欠失の原因となっていた。18qLOH及び残存アレルプロモータ変異によりDPC4遺伝子不活性化を導いた。このため、DPC4遺伝子不活性化と子宮体癌化の関連が示唆された。

2) p53依存性サイクリンGの機能

DOXによりサイクリンGはp53依存性に発現誘導され、細胞のG2/M期停止に関与した。さらにDOXによるサブG1期領域のピークも消失した。サイクリンG高発現細胞はアポトーシス誘導刺激に反応し、顕著に細胞死した。bcl-2、bcl-X2発現に変化を認めなかったが、翻訳レベルでのBax蛋白の誘導が示された。

A. 研究目的

- 1) 子宮体癌では18qLOHが高率に観察される。18q上には様々な癌の発生に関与するDCC、DPC4及びSMAD2などの癌抑制遺伝子座が存在する。このため、本研究では子宮体癌における18qの詳細な欠失地図を作成し、欠失の標的遺伝子を同定する。
- 2) p53蛋白はDNA障害などを介して細胞内に蓄積し、様々な下流標的遺伝子発現の誘導や調節を行うことにより、細胞のG1期停止、G2/M期停止或いはアポトーシスの誘導に関与する。サイクリンGもp53下流でp53依存性に発現調節を受けているが、その詳細な機能は不明である。本研究ではREF及びRat1A細胞を用い、p53依存性サイクリンGの機能について解析する。

B. 研究方法

- 1) i) 子宮体癌組織61症例からDNAを採取し、18q上に遺伝子座を有するD18S542、D18S877、D18S46、D18S535、D18S858及びD18S851STSマーカーを用い、LOH解析を行った。
- ii) LOH(+)及び(-)症例におけるDPC4発現をRT-PCRにより解析した。
- iii) DPC4発現消失を示した症例におけるDPC4プロモーター領域の塩基配列を解析した。野生型及び子宮体癌症例で観察された塩基置換を有するプロモーターをpCATエンハンサーベクターに接続し、子宮体癌細胞株へ導入後プロモ

ーター活性を解析した。

- 2) i) REF及びRat1A細胞をDOX、CDDP及びNaBで処理し、p53、p21、サイクリンG発現レベルの変化を解析するとともに、細胞周期の変化を解析した。
- ii) DOX存在下で、サイクリンGに対するアンチセンスオリゴDNAを投与し、細胞周期の変化を解析した。
- iii) Rat1A細胞へサイクリンGcDNAを遺伝子導入し、アポトーシス刺激に対する反応性及びbc12系蛋白発現変化を解析した。

C. 研究結果と考察

- 1) 18q上にLOHが観察された20例の体癌DNAを用い、詳細な欠失地図を作成した。その結果、LOHはDPC4及びDCC遺伝子座近傍に集中していることが判明した。本領域に欠失を有する16例についてさらに欠失領域を解析した結果、子宮体癌における18qLOHの標的遺伝子はDPC4である場合とDCCである場合とが存在し、多くはSingle eventで両方の遺伝子不活性化に関与する可能性が示唆された。

18qLOHを示す子宮体癌において、DPC4発現及び残存アレルの塩基配列を決定した。LOH(+)子宮体癌におけるDPC4発現は消失しているか或いは発現の異常が示されたのに対し、LOH(-)子宮体癌におけるDPC4発現は正常に維持されていた。

DPC4発現に異常を認めた6例の子宮体癌においてDPC4プロモーター領域塩基配列を解析した結果、2例に塩基置換を認めた。変異型プロモーターはその転写活性が顕著に抑制されていた。

2) 本研究ではREF及びRat1A細胞を用いてサイクリンGの機能について解析した。細胞をドキソルビシン(DOX) 或いはシスプラチン(CDDP)で処理すると薬剤濃度依存性にp53蛋白の集積を認めた。同時にp53標的遺伝子であるp21及びサイクリンG発現も誘導され、顕著な細胞のG2/M期集積が観察された。一方ヒストン脱アセチル化阻害剤であるSodium Butyrate(NaB)で細胞を処理すると顕著なp53蛋白の集積及びp53依存性p21発現誘導を認めたが、サイクリンG発現は誘導されなかった。細胞はG1期に集積した。サイクリンG発現がp53により調節されていることを確認するため、p53^{-/-}MEFをDOXで処理したところ、サイクリンG発現を認めなかった。P53^{+/+} NIH3T3細胞では顕著なサイクリンG発現誘導が観察されたため、サイクリンGはp53依存性に発現が調節されていることを確認した。

サイクリンGに対するアンチセンスオリゴDNA(AS)を作成し、DOX処理細胞へ投与し、サイクリンG発現誘導の有無及びG2/M期集積の変化を解析した。ASによりサイクリンG発現は抑制され、細胞のG2/M期集積も消失した。細胞は二次的にG1期に集積した。さらにDOX処理に伴い、出現したサブG1領域のピークも消失したため、サイクリンGはG2/M期集積及びアポトーシスの誘導に機能すると示唆された。Rat1A細胞へサイクリンG遺伝子を導入し、サイクリンG高発現細胞を樹立した。高発現細胞はアポトーシス誘導刺激に反応し、顕著な細胞死を示した。高発現細胞では翻訳レベルでのBax蛋白発現の誘導が示された。

D. 結論

1) 子宮体癌において、18qLOH及び残存アリルプロモーター変異により、DPC4遺伝子は不活化されていた。このため、DPC4遺伝子の不活化と子宮体癌化の関連が示唆された。子宮体癌における18qLOH及びDPC4及びDCC両がん抑制遺伝子不活化に関与していた。

2) p53依存性サイクリンGはG2/M期集積及びアポトーシスの誘導に機能する重要な分子であると示

唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, Takada S, Takagi N, Arima T, Wake N, 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)
- 2) Kato H, Zhou Y, Asanoma K, Kondo H, Yoshikawa Y, Watanabe K, Matsuda T, Wake N 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)
- 3) Ueoka Y, Kato K, Kuriaki Y, Horiuchi S, Terao Y, Nishida J, Ueno H, Wake N. : HGF and Ovarian carcinoma cell motility and invasion. : British Journal of Cancer, 84, 4, 891-899 (2000)
- 4) Hachiya T, Kuriaki Y, Ueoka Y, Nishida J, Kato K and Wake N. : WAF1 Genotype and Endometrial Cancer Susceptibility. : Gynecologic Oncology 72, 187-192 (1999)
- 5) Zhou Y, Kato H, Shan D, Matsuda T, Minami K, Barrett JC, and Wake N. : Involvement of mutations in the DPC4 promoter in endometrial carcinoma development. : Molecular Carcinogenesis 25, 64-72 (1999)
- 6) Kato K, Horiuchi S, Terao Y, Ueoka Y, Nishida J, Mori D, Yoshikawa Y, Wake N. : Relevance of ER to the development of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. : Breast Cancer 6, 4, 312-319 (1999)
- 7) 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)
- 8) Taguchi M, Matsumoto Y, Kubota T, Tanabe F, Arima T, Wake N, 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)
- 9) Kaneta Y, Yoshiyama R, Inagaki N, Toyoshima K, Itoh K, Nishino R, Kital H, Kato H, Asanoma K, Wake N. : 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)
- 10) 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)

F. 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：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
分担研究者：伊東 恭悟 久留米大学医学部免疫学 教授

研究要旨

我々は、これまでにSART-1, SART-2, SART-3を扁平上皮癌拒絶抗原として同定し報告してきた。平成11年度第1回班会議ではSART-4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ファミリーの一つであるLckと同一であることを明らかとした。第2回班会議では、CTLエプトープとしてHLA-A24拘束性ペプチドを有するSART-3抗原がHLA-A2拘束性CTLにより認識されるエプトープも有していたので、それについて報告した。HLA-A2拘束性CTL株は大腸癌局所浸潤リンパ球より樹立したものを使用した。その結果、3つの合成ペプチド（SART-3152-160, SART-3302-310, SART-3309-317）がCTLエプトープであることが判明した。さらにこれらのペプチドは、HLA-A2陽性癌患者末梢リンパ球よりHLA-A2拘束性CTLを誘導する能力を有していた。解析に用いた患者リンパ球は大腸癌、肺癌、胃癌、頭頸部癌、脳腫瘍などの多くの癌種由来であり、いずれもCTL誘導能が確認された。一方、ペプチドにて誘導されたCTLは正常細胞（PHA-活性化T細胞など）とは反応しなかった。140kdのSART-3抗原は、殆ど全ての癌に発現されていることと今回の新知見を考慮した場合、これらのペプチドはHLA-A2+癌患者へのペプチドワクチンとして臨床応用可能と判断される。メラノーマ以外のHLA-A2癌患者へのペプチドワクチンはこれまで殆ど報告が無いことより、今回同定したHLA-A2拘束性ペプチド分子の第1相臨床試験を今後計画することが重要と考えられる。

A. 研究目的

- 1) 癌局所浸潤Tリンパ球の大量培養、もしくは末梢Tリンパ球を自家癌にて刺激することによりヒト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クローニングし、臨床応用可能な癌ワクチンの標的分子を開発することを本研究の主目的とする。
- 2) 癌種としては婦人科領域扁平上皮癌を主な対象とし、HLAとしてはHLA-class I 抗原を主対象として、その中で本邦で発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、HLA-A26（約2割）及びHLA-B51（約2割）拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定を目指す。
- 3) 上記にて同定した癌退縮抗原内に存在するペプチド抗原を同定し、消化器癌ワクチンとしての臨床応用の可能性について基礎的研究を行う。扁平上皮癌は、子宮癌の他、肺癌、頭頸部癌、皮膚癌などに広く認められ、予後不良の為に社会的にも大きな問題となっている。従って、従来の癌治療法に加えて新たな治療法が必要である。

B. 研究方法

- 1) 癌局所浸潤Tリンパ球のIL-2存在下での大量培養、もしくは末梢Tリンパ球を自家癌にて刺激することによりヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングした。遺伝子クローニングには、T. Boonらの開発したgene-expression cloning法の改良法を用いた。
- 2) 癌種としては婦人科癌を主な対象とし、HLAとしてはHLA-クラスI 抗原を主対象として、その中で本邦で発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、HLA-A26（約2割）拘束性のCTL認識性癌退縮抗原とペプチドの同定を実施した。
- 3) 上記癌拒絶抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現は、ポリクローナル抗体とウエスタンブロット法により実施した。mRNAレベルでの発現は、ノーザンブロット法によって解析した。
- 4) 上記にて同定した癌拒絶抗原内に存在するCTL株により認識されるペプチド抗原を同定し、それ

らを合成して癌患者リンパ球よりHLA拘束性キラーT細胞誘導能の有無を解析し、癌ワクチンとしての臨床応用の可能性について基礎的研究を実施した。

5) キラーT細胞の誘導能の明らかなペプチドについては、臨床応用可能なグレードのペプチド

(GMPグレード)を米国MPS社に依頼し2~4g作製した。安全性やこれらの精製制度などを確認後、有害事象の有無とキラーT細胞誘導能の有無を主目的として本久留米大学にて各種癌を対象に臨床第I相試験を実施予定である。

(倫理面への配慮)

癌患者末梢リンパ球からペプチド抗原にて癌特異的キラーT細胞を誘導する目的にて採血する場合は、本研究協力者(久留米大学産婦人科学講座教授 西田 敬、または河野光一郎助手)の直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意を得られた場合に限って14~20ml採血して研究に供した。また患者には貧血が認められず、14~20mlの採血が提供者の健康を決して害することのないような配慮のもとでのみ採血した。

C. 研究成果

1) 我々は、これまでにSART-1, SART-2, SART-3を扁平上皮癌拒絶抗原として同定し報告してきた。今回SART-4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ファミリーのひとつである lck と同一であることを明らかとした。56k dalton の lck (p56lck) は、CD4 や IL2R からのシグナルを伝達するT細胞活性化に不可欠の分子として1980年代にクローニングされた。しかし、p56lckはT細胞以外にも転移性大腸癌など非リンパ球系癌細胞に異所性発現していることが報告されている。そこで、p56lck 蛋白レベルの各種癌における発現を検討したところ、p56lckは扁平上皮癌や腺癌由来の細胞株、特に転移巣より樹立した癌細胞株や転移癌組織で強く発現していた。さらに、HLA-A24 結合モチーフを有する p56lck 由来ペプチド13個に対して CTL 株の反応性を検討したところ、3個のペプチドと容量依存的に反応した。次にこれらのペプチドによる PBMCからのCTL誘導を試みた結果、大腸癌や食道癌の転移性癌患者 PBMC より CTL が誘導され、そのCTLはHLA-A24拘束性に癌細胞に特異的な細胞傷害性を示すことが明らかとなった。以上 lck

抗原ペプチドが転移性癌で強く発現していること、及び転移性癌患者末梢血より HLA-A24 拘束性 CTLを誘導しえたことにより、同定した lck ペプチドは転移性癌に対するペプチドワクチンとしての可能性が示唆された。

2) CTLエピトープとしてHLA-A24拘束性ペプチドを有するSART-3抗原がHLA-A2拘束性CTLにより認識されるエピトープをも有していることを見出した。HLA-A2拘束性CTL株は大腸癌局所浸潤リンパ球より樹立したものを使用し、HLA-A2 cDNA及びSART-3遺伝子をco-transfectしたCos 7細胞に対する反応性を検討した。その結果HLA-A0201, 0206, A0207のいずれの cDNA移入Cos 7細胞とも反応した。しかしHLA-A2402, HLA-A2602 cDNA移入Cos 7細胞とは反応しないことが判明した。そこで、次にHLA-A2

(A0201, A0206, A0207) 結合モチーフをもつ SART-3由来ペプチドを26個合成し、それらに対するCTL株の反応性を解析した。その結果3つの合成ペプチド(SART-3152-16, SART-3302-310, SART-3309-317)がCTLエピトープであることが判明した。さらに、これらのペプチドはHLA-A2陽性癌患者末梢リンパ球よりHLA-A2拘束性CTLを誘導する能力を有していた。解析に用いた患者リンパ球は大腸癌、肺癌、胃癌、頭頸部癌、脳腫瘍など多くの癌種由来であり、いずれもCTL誘導能が確認された。一方ペプチドにて誘導されたCTLは、正常細胞(PHA-活性化T細胞など)とは反応しなかった。140kdのSART-3抗原は、殆ど全ての癌に発現されていることと今回の新知見を考慮した場合、これらのペプチドはHLA-A2+癌患者へのペプチドワクチンとして臨床応用可能と判断される。メラノーマ以外のHLA-A2癌患者へのペプチドワクチンはこれまで殆ど報告が無いことより、今回同定したHLA-A2拘束性ペプチド分子の第I相臨床試験を今後計画することが重要と考えられる。

D. 考察

あとで・・・。

E. 結論

本研究によりHLA-A24, A26及びA2癌ペプチドワクチンが婦人科癌に対して臨床応用可能であることが解明された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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) 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。
 - 2) 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。
 - 3) 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。
 - 4) 笹富輝男、宮城佳昭、七條茂樹、山名秀明、緒方裕、白水和雄、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。
 - 5) 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。
 - 6) 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。
 - 7) 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。
 - 8) 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。
 - 9) 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。
 - 10) 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。
 - 11) 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
 - 12) 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。