

20000137

厚生科学研究研究費補助金
厚生科学特別研究事業

分子生物学、分子免疫学を駆使した微小残存、転移病変の評価
ならびに適切な集学的治療と予後推測法の開発

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 畠 清彦

平成13年度(2001)年3月

目 次

I . 総括研究報告

分子生物学、分子免疫学を駆使した微小残存、転移病変の評価ならびに
適切な集学的治療と予後推測法の開発

細胞周期関連分子、アポトーシス関連遺伝子の発現と種々のがん細胞の微小残存、 微小転移度との関連に関する研究	----- 1
畠 清彦	

II . 分担研究報告

1. サイトケラチンと p53-細胞周期関連遺伝子の発現による乳癌のリスク群の分類 伊藤 良則	----- 5
2. 転移性乳癌における骨髄破骨細胞の転移における役割：BMP 発現について 高橋 俊二	----- 7
3. 分子免疫学を駆使した術前、術後における微小病変の評価 國土 典宏	----- 9
4. 大腸癌の免疫原性を利用した微小転移病変ならびにその治療に関する研究 山口 俊晴	-----11
5. 微小転移病変における周辺の宿主細胞の応答機構 中森 正二	-----13
6. 転移性大腸癌、胆のう癌細胞に対するモノクローナル抗体を用いた 早期診断と免疫原性の研究 石坂 幸人	----- 17
7. 細胞周期のチェックポイントに関係するホメオボックス遺伝子の各転移性腫瘍に おける意義 Six と HAT (Histone Acetyl Transferase) 川上 潔	----- 19
III . 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

総括研究報告書

細胞周期関連分子、アポトーシス関連遺伝子の発現と種々のがん細胞の微小残存、
微小転移度との関連に関する研究

主任研究者 島清彦 財団法人 癌研究会附属病院 化学療法科 部長

種々の癌において微小残存病変や微小転移病変を評価する方法を検討した。肝臓癌では血中の微小残存病変としてマーカーとなる α -fetoproteinについてRT-PCRによるmRNAの半定量的測定の導入により、遠隔転移や予後との相関から、患者の再発を推測することができた。またCD13抗原については、アミノペプチダーゼNとして活性を有する蛋白であり、白血病の中でCD13陽性群が、我々の見出した内皮細胞由来インターロイキン8に対して耐性であり、アミノペプチダーゼNに対する酵素阻害剤により細胞死を促進、耐性機序の克服ができた。また胆嚢癌、大腸癌に対する抗体の開発と評価を進行中である。Six遺伝子ファミリーについては白血病の株細胞を増殖分化させ方向での発現を検討した。

伊藤良則	財団法人癌研究会	医長
高橋俊二	財団法人癌研究会	医員
國土典宏	財団法人癌研究会	医員
山口俊晴	財団法人癌研究会	副部長
中森正二	大阪大学医学部	助手
石坂幸人	国立国際医療センター	部長
川上 潔	自治医科大学	教授

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

白血病や悪性リンパ腫においては転写因子を含む融合遺伝子の異常が、残存病変の検出に有用とされている。細胞周期やbcl-2ファミリーの異常が知られている。固形腫瘍の一つである乳癌では、brca1やp53遺伝子、サイトケラチンに対する抗体で検出される。また大腸癌細胞に対するモノクローナル抗体を作成、腫瘍細胞特異的に発現している抗原の認識部位のペプチド配列を決定することができた。この抗体を用いて残存病変や微小な転移病変は検出され、腫瘍周囲の破骨細胞や支持細胞との相互作用を検討できる。腫瘍組織の周囲の応答反応についても検討する。胃癌、大腸癌の臨床例では、糖鎖構造の変化を認識する抗体を用いてリンパ節、肝臓への転移の有無や予後との関係をさらに追求して、残存病変の検出を向上させる。今後胆のう癌、膵癌に対するモノクローナル

抗体を作成しているところであるので、癌種を広げて検討する。臨床検体の使用については各施設のIRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。

2. 病変における細胞の特性の研究

p53ファミリーやアポトーシス関連遺伝子の発現の検討と早期再発する症例の予後を検討する。p53依存性または非依存性の細胞死は、多くの腫瘍疾患において予後を左右するような高リスク群の分類と早急な対処法を検討することが可能となる。細胞周期のチェックポイント機構に関係するホメオボックス遺伝子の発現、Histone Acetyl Transferase (HAT)の発現を腫瘍細胞および微小残存病変、転移病変における細胞で検討する。ヒストンのアセチル化は、現在白血病を始めとする癌に細胞死を誘導する薬剤の開発でも注目されているところである。

B. 研究方法

白血病細胞を用いてアポトーシスに対して抵抗性の機序を研究する。化学療法や造血細胞移植術において、自己血では腫瘍細胞の混入のないことが前提である。しかしまだ十分に残存病変の評価がされているわけではない。腫瘍細胞の除去を目標として研究する。大腸癌細胞を免疫して得られた抗体は、認識部位を示す7ペプチド構造が決定されたので、この抗体を用いて臨床検体での微小残存病変、微小転移病変の検出を試みる。内皮細胞に準じて腫瘍細胞との相互作用を研究する。これらの抗原性や悪性度、転写因子などの関連を基礎的に検討する。

C. 研究結果

内皮細胞由来インターロイキン8による細胞死の抵抗性の機序としてCD13の高発現が見い出された。CD13抗原については、アミノペプチダーゼNとして活性を有する蛋白であり、白血病の中でCD13陽性群が、我々の見出した内皮細胞由来インターロイキン8に

対して耐性であり、アミノペプチダーゼNに対する酵素阻害剤により細胞死を促進、耐性機序の回復ができた。また他にβ2-ミクログロブリンが細胞死の誘導因子である事がわかった。さらにこの蛋白の発現から薬剤耐性の機序のひとつに関係しているという報告があり、検討中である。

D. 考察

CD13, β2-ミクログロブリンについては発現と薬剤耐性や予後を左右する再発を予測する因子であるかどうかは、今後の検討課題である。また腫瘍細胞由来上皮細胞や血管内皮細胞にCD13が発現している報告もあり、今後の課題である。またβ2-ミクログロブリンについては大腸癌においても遺伝子発現、蛋白発現と薬剤耐性との関係を検討している。

E. 結論

白血病においてはCD13抗原が発現していると、内皮細胞由来インターロイキン8による細胞死に対して抵抗性があり、このCD13はアミノペプチダーゼN活性が相関しており、阻害活性のある抗体または酵素阻害剤を添加すると、抵抗性であった細胞死が、克服されて、細胞死をおこすようになった。この現象を利用して、CD13が高発現している白血病では、酵素阻害剤を加えた化学療法によって寛解に導入できた。今後再発や予後との関係を示していく必要がある。

F. 健康危険情報

特にありません

G. 論文発表

1. 論文発表

Watanabe J, Kondo H, Hatake K. *Leukemia and Lymphoma*, in press. 2001.
Watanabe J, Hatake K. *Leukemia and Lymphoma*, in press. 2001.
Yuji Mishima, Yasuhito Terui, Hiroshi Tomizuka, Masaki Mori, Masaya Uwai, Masuzu Ueda, Miyuki Tanaka, Muneo Yamada, Hirotoishi Hayasawa, Keiya Ozawa, Noboru Horikoshi, and Kiyohiko Hatake. CD13/aminopeptidase-N is a resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis. *ICCAS supplement*, 2001. in press.
Mori M, Hatake K, Ozawa K. CAM.-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia with trilineage dysplasia: Usefulness of in vitro apoptosis in leukaemic cells. *Leukemia and Lymphoma*. 2001, in press.
Mityazato A, Hatake K, Mano H. Identification of myelodysplastic syndrome(MDS)-specific genes screened by Background matched method. *Blood*, in press. 2001.
Masaki Mori, Yasuhito Terui, Miyuki Tanaka, Hiroshi Tomizuka, Yuji Mishima, Masayuki Ikeda, Tadashi Kasahara, Masaya Uwai, Masuzu Ueda, Rie Inoue, Takehito Itoh, Muneo Yamada, Hirotoishi Hayasawa, Yusuke Furukawa, Yukihito Ishizaka, Keiya Ozawa, and Kiyohiko Hatake. Anti-Tumor Effect of β2-Microglobulin in Leukemic Cells-Bearing Mice via Apoptosis-Inducing Activity: Activation of Caspase-3 and

NF-κB. *Cancer Res.* in press. 2001.

Matsumoto Y, Mori M, Ohtsuki T, Muroi K, Hatake K, Komatsu N, Ozawa K. [Outcome of acute myelogenous leukemia in 41 patients treated with idarubicin: the prognosis of t(8;21) cases]. *臨床血液*. 2001 Jan;42(1):15-22.

Ichida M, Imagawa S, Ohmine K, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K, Miura Y. Successful treatment of multiple myeloma-associated amyloidosis by interferon-alpha, dimethyl sulfoxide, and VAD (vincristine, adriamycin, and dexamethasone). *Int J Hematol*. 2000 Dec;72(4):491-3.

Tabata M, Tarumoto T, Ohmine K, Furukawa Y, Hatake K, Ozawa K, Hasegawa Y, Mukai H, Yamamoto M, Imagawa S. Stimulation of GATA-2 as a mechanism of hydrogen peroxide suppression in hypoxia-induced erythropoietin gene expression. *J Cell Physiol*. 2001 Feb;186(2):260-267.

Matsumoto Y, Kawano C, Kametaka M, Otsuki T, Hatake K, Muroi K, Ozawa K. Phenotypic conversion of T-lineage lymphoblasts in the lymph node to myeloblasts in the bone marrow during relapse after allogeneic bone. *Int J Hematol*. 2000 Aug;72(2):253-4.

Muroi K, Tarumoto T, Akioka T, Kirito K, Nagai T, Izumi T, Nakamura M, Hatake K, Hakomori S, Miura Y, Ozawa K. Sialyl-Tn- and neuron-specific enolase-positive minimally differentiated erythroleukemia. *Intern Med*. 2000 Oct;39(10):843-6.

Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T, Mori M, Ueda M, Inoue R, Yamada M, Hayasawa H, Horiuchi T, Niho Y, Matsumoto M, Ishizaka Y, Ikeda K, Ozawa K, Hatake K. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol*. 2000 Nov;185(2):280-92.

Tabata M, Imagawa S, Tarumoto T, Ohmine K, Hatake K, Miura Y, Ozawa K. Essential thrombocythemia transformed to acute myelogenous leukemia with t(3;17)(p24; q12), del(5)(q13q34) after treatment with carboquone and hydroxyurea. *Jpn J Clin Oncol*. 2000 Jul;30(7):310-2.

Miyawaki S, Tanimoto M, Kobayashi T, Minami S, Tamura J, Omoto E, Kuriyama K, Hatake K, Saito K, Ohno R. [Effect of etoposide added to individualized induction therapy of adult acute myeloid leukemia--the JALSG-AML-92 Study. Japan Adult Leukemia Study Group]. *癌と化学療法*. 2000 Jul;27(8):1160-7.

Tarumoto T, Imagawa S, Ohmine K, Mano A, Nagai T, Takatoku M, Muroi K, Hatake K, Ozawa K. A de novo philadelphia chromosome-positive acute mixed-lineage leukemia with both major and minor BCR/ABL mRNA transcripts. *Am J Hematol*. 2000 Sep;65(1):72-4.

Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul;68(1):87-96.

Yamada M, Suzu S, Tanaka-Douzono M, Wakimoto N, Hatake K, Hayasawa H, Motoyoshi K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells. *J Cell Physiol*. 2000 Sep;184(3):351-5.

Muroi K, Suzuki T, Amemiya Y, Yoshida M, Kawano C, Kuribara R, Otsuki T, Izumi T, Tomizuka H, Komatsu N, Imagawa S, Hatake K, Miura Y, Ozawa K. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for adults with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a pilot study. *Leuk Lymphoma*. 2000 Jun;38(1-2):103-11.

Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. *Hum Gene Ther*. 2000 May 1;11(7):995-1004.

Oncol 2000 Mar;30 (3):159-62.

Tarumoto T, Imagawa S, Hotta T, Ohmine K, Nagai T, Takatoku M, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K. A case of bilateral heel ulcers associated with hydroxyurea therapy for chronic myelogenous leukemia. Jpn J Clin Oncol. 2000 Mar; 30(3):159-62.

Nagashima T, Izumi T, Muroi K, Miyasato A, Uchida M, Imagawa S, Komatsu N, Yoshida M, Hatake K, Miura Y, Ozawa K. [Two cases of acute myelogenous leukemia complicated with fatal gastrointestinal tract bleeding after treatment with idarubicin and cytarabine]. 癌と化学療法. 2000 Mar;27(3): 487-90.

Ohmine K, Izumi T, Muroi K, Shimizu R, Imagawa S, Komatsu N, Sasaki R, Hatake K, Miura Y, Ozawa K. [Low-dose prednisolone therapy for idiopathic thrombocytopenic purpura]. 臨床血液 2000 Jan;41(1):8-11.

Kawano C, Muroi K, Kuribara R, Matsumoto Y, Ohtsuki T, Hatake K, Ozawa K. Engraftment syndrome after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high numbers of peripheral blood stem cells followed by granulocyte colony-stimulating factor administration. Bone Marrow Transplant. 2000 Jan;25(2):228-9.

Kaji Y, Ikeda K, Ikeda T, Kawakami K, Sasaki K, Shindo M, Hatake K, Harada M, Motoyoshi K, Mori S, Norimatsu H, Takahara J. IL-4, but not vitamin D(3), induces monoblastic cell line UG3 to differentiate into multinucleated giant cells on osteoclast lineage. J Cell Physiol. 2000 Feb;182(2):214-21.

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

サイトケラチンと p53-細胞周期関連遺伝子の発現による乳癌のリスク群の分類

分担研究者 伊藤良則 財団法人癌研究会化学療法科 医長

乳癌において臨床的に化学療法剤、特にTaxane系薬剤に対する反応と種々の遺伝子との相関について検討した。まだ十分な相関が得られている訳ではないが、今後の課題である。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価
臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。
2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

乳癌組織における癌遺伝子やサイトケラチンの発現を、RT-PCR法を用いて検討した。主として乳癌組織の一部から、mRNAを抽出し、それぞれの特異的オリゴヌクレオチドを用いて RT-PCR の系を作成して、検討した。

C. 結果

サイトケラチンの発現については十分に検討したが、癌組織において発現が検出されても、群間での差を認める所見は得られなかった。他の遺伝子についてはさらに検討が必要である。

D. 考察

細胞周期遺伝子や細胞死関連遺伝子の発現については、さらに検討が必要であり、現在も種々の遺伝子異常が乳癌において報告されてきている。まだどの遺伝子をもっとも予後推測や再発予測に最も有用であるかは今後の検討を要する。

E. 結論

まだ結論づけられる有用な遺伝子を特定できるに至っていない。さらに種々の遺伝子における検討を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ito Y. [Paclitaxel for treatment of advanced breast cancers]. 日本臨床. 2000 Apr;58 Suppl:259-64.
伊藤良則 乳癌の診断と治療 ー最新の研究動向ー 日本臨床 (58):259-264
伊藤良則 タキサン系薬剤 ー適応とレジメンー 癌の臨床 46(5):725-731
伊藤良則 乳がんの薬物療法 臨床看護 26(7):1069-1074

伊藤良則 乳房温存療法 補助療法としての化学療法、
ホルモン療法 臨床放射線 45(11):1427-1434

2. 学会発表

伊藤良則 再発乳癌化学療法 -Evidence の解釈-

第8回 日本乳癌学会 横浜 2000年5月

入江哲也、橋本大吾、杉山勝紀、中根実、渡邊純一郎、
霞富士雄、吉本賢隆、猪狩功遺、高野浩一、水沼信之、
伊藤良則、高橋俊二、畠清彦、相羽恵介、堀越昇

乳癌肝転移例に対する全身化学療法、肝動注療法、ま
たは外科的肝切除との比較 第9回日本乳癌学会総会
前橋 2000年6月

伊藤良則、田部井敏夫 日本の臨床試験の現状

前橋 2000年6月

高橋俊二、伊藤良則、入江哲也、中根実、杉山勝紀、水
沼信之、相羽恵介、堀越昇、山下孝、霞富士雄、橋本大
吾 乳腺原発悪性リンパ腫の治療方針

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

橋本大吾、伊藤良則、杉山勝紀、渡邊純一郎、中根実、
水沼信之、高橋俊二、相羽恵介、堀越昇 Docetaxel 耐
性乳癌患者に対する Weekly Paclitaxel の効果

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

転移性乳癌における骨髄破骨細胞の転移における役割：BMP 発現について

分担研究者 高橋 俊二 財団法人癌研究会化学療法科 医員

転移性乳癌においては、増殖の際に骨髄での破骨細胞は、活性化されて、骨病変では中心的役割を演じている。破骨細胞の活性化を抑制する薬剤によって制御すると転移性乳癌の増殖が抑制される事がある。TGFβ系の一つである BMP (Bone morphogenic protein)の発現について検討した。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価
臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。
2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

乳癌患者から同意を得て、骨髄を採取し、BMPs 及び BMP 受容体の発現を RT-PCR を用いて検討した。さらに基礎的に乳癌株細胞を用いて BMP による増殖に対する影響を検討した。

C. 結果

乳癌患者由来組織では、BMP-6の発現が骨転移と相関が認められた。受容体発現との関係は認められなかった。株細胞を用いて研究では、BMP-2添加でエストロゲン受容体陽性細胞で増殖抑制が認められた。PTHrp の発現とは相関しなかった。

D. 考察

乳癌の骨転移手術材料では一部の BMP ファミリーが関係し、特に BMP-6が重要であった。受容体の関与は明らかではなかった。また乳癌由来株細胞では BMP-2 がホルモン感受性細胞では増殖抑制を示した。

E. 結論

乳癌の骨転移では BMP- の発現が重要であり今後臨床例での解析をさらに進めたい。またホルモン感受性乳癌は、BMP-2による抑制が可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表
Koizumi M, Suzuki T, Takahashi S, Ogata E. Transient splenic accumulation of Tc-99m HMDP caused by megaloblastic anemia. Clin Nucl Med. 2000 Dec;25(12):1024-7.
2. 学会発表
入江哲也、橋本大吾、杉山勝紀、中根実、渡邊純一郎、霞富士雄、吉本賢隆、猪狩功遺、高野浩一、水沼信之、伊藤良則、高橋俊二、畠清彦、相羽恵介、堀越昇
乳癌肝転移例に対する全身化学療法、肝動注療法、ま

たは外科的肝切除との比較. 第9回日本乳癌学会総会
前橋、2000年6月

2. 学会発表

入江哲也、橋本大吾、杉山勝紀、中根実、渡邊純一郎、
霞富士雄、吉本賢隆、猪狩功遺、高野浩一、水沼信之、
伊藤良則、高橋俊二、畠清彦、相羽恵介、堀越昇
乳癌肝転移例に対する全身化学療法、肝動注療法、ま
たは外科的肝切除との比較. 第9回日本乳癌学会総会
前橋、2000年6月

高橋俊二、伊藤良則、入江哲也、中根実、杉山勝紀、水
沼信之、相羽恵介、堀越昇、山下孝、霞富士雄、橋本大
吾 乳腺原発悪性リンパ腫の治療方針

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

橋本大吾、伊藤良則、杉山勝紀、渡邊純一郎、中根実、
水沼信之、高橋俊二、相羽恵介、堀越昇 Docetaxel 耐
性乳癌患者に対する Weekly Paclitaxel の効果

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

分子免疫学を駆使した術前、術後における微小病変の評価

分担研究者 國土 典宏 財団法人癌研究会 外科 医員

食道がんや肝臓癌の切除例において周囲のリンパ節の病理所見と再発との関係を検討する。さらに肝臓癌では増殖因子産生腫瘍に着目して、再発のマーカーとした。腫瘍由来の細胞を用いて増殖因子の産生調節機構を検討している

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価
臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。
2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

食道がんや肝臓癌の切除例において周囲のリンパ節の病理所見と再発との関係を検討する。さらに肝臓癌では増殖因子産生腫瘍に着目して、再発のマーカーとする。

C. 結果

胸部食道癌においては局所の周囲リンパ節への転移が再発、予後を左右する。またエリスロポエチン産生腫瘍である肝臓の肉腫を経験し、血清中エリスロポエチン値によって経過を追うことができた。

D. 考察

肝臓腫瘍は、手術可能であっても再発率も高く、種々の方法で臨床経過を追跡する必要がある。血清中エリスロポエチン値が追跡する際のマーカーのひとつになる場合がある。

E. 結論

肝臓腫瘍について再発や微小転移の評価に局所のリンパ節や血清中のサイトカインが指標となる場合がある。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsubara T, Ueda M, Kaisaki S, Kuroda J, Uchida C, Kokudo N, Takahashi T, Nakajima T, Yanagisawa A. Localization of initial lymph node metastasis from carcinoma of the thoracic esophagus. *Cancer*. 2000 Nov 1;89(9):1869-73.

Kokudo N, Kimura H, Yamamoto H, Seki M, Ohta H, Matsubara T, Takahashi T. Hepatic parenchymal transection using ultrasonic coagulating shears: a preliminary report. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000; 7(3):295-8.

2. 学会発表
特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得
特にありません。
2. 実用新案登録
特にありません。
3. その他
特にありません。

分担研究報告書

大腸癌の免疫原性を利用した微小転移病変ならびにその治療に関する研究

分担研究者 山口 俊晴 財団法人癌研究会 外科 副部長

comparative genomic hybridization を用いて、47例の胃癌において染色体異常を検討した。またこれについては FISH 法による検討を行った。胃癌においては染色体20qが、ある特異的な組織型と特に高頻度に認められた。大腸癌での検討中である。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。

2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

大腸癌においては、予後決定因子のひとつとして、肝臓への転移、所属リンパ節への転移が重要な因子である。また転移後の予後を決めるのは、化学療法に感受性があるかどうかである。まずこれまでに comparative genomic hybridization を用いて、47例の胃癌において染色体異常を検討した。また

これについては FISH 法による検討を行った。

C. 結果

胃癌においては染色体20qが、ある特異的な組織型と特に高頻度に認められた。

D. 考察

胃癌において染色体異常や遺伝子異常が特異的に認められることがわかったが、大腸癌やその他の癌においては検討を要する。

E. 結論

胃癌での染色体異常では20qがもっとも高頻度に生じており、ある特異的な組織型と相関が認められた。再発の頻度や転移などとの関係を検討する事が必要である。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi T, Mishima Y, Idezuki Y, Hiki Y, Nakamura J, Deguchi N. [Problems concerning the prices of surgical operations in Japan. Union of Social Medical Insurance Committee Members of Surgical Societies in Japan]. 癌と化学療法. 2000 Aug;27(9):1354-9.

Nakajima T, Ohta K, Ohyama S, Yamaguchi T. [Surrogate and true endpoints in cancer clinical trials]. 癌と化学療法. 2000 May;27(5):671-5.

Koide K, Sakakura C, Hagiwara A, Yamaguchi T,

Yamagishi H, Abe T, Inazawa J. An improved rapid procedure for fluorescence in situ hybridization that is applicable to intraoperative cancer cytodiagnosis. *Cancer Lett.* 2000 Oct 1;158(2):165-9.

Nakanishi M, Sakakura C, Fujita Y, Yasuoka R, Aragane H, Koide K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H. Genomic alterations in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization and clinicopathological factors. *Hepatogastroenterology.* 2000 May-Jun;47(33):658-62.

Otsuji E, Yamaguchi T, Taniguchi H, Sakakura C, Kishimoto M, Urata Y, Tsuchihashi Y, Ashihara T, Takahashi T, Yamagishi H. Malignant endocrine carcinoma of the stomach. *Hepatogastroenterology.* 2000 Mar-Apr;47(32):601-4.

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

微小転移病変における周辺の宿主細胞の応答機構

分担研究者 中森 正二 大阪大学医学部 助手

肝臓癌症例から同意を得て、末梢血中に存在する α -fetoprotein(AFP)の mRNA に対するオリゴヌクレオチドを合成し、Real Time PCR の系を作成し、その臨床的意義を検討した。臨床的に有用であった。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。 α -fetoprotein(AFP)、CEAについて検出する系を作成する。

B. 研究方法

肝臓癌症例から同意を得て、末梢血中に存在する α -fetoprotein(AFP)の mRNA に対するオリゴヌクレオチドを合成し、Real Time PCR の系を作成し、その臨床的意義を検討した。また CEA についても同様にリンパ節が病理所見陰性例、陽性例では

mRNA を検出する系を作成した。

C. 結果

肝臓癌切除例23例から切除前後、非肝臓癌例5例、健常例を対象に、8mlの末梢血から、RNAを抽出し、reverse transcriptionして、LightCyclerTMを用いた Real Time PCR で50サイクルで測定した。健常例、非肝臓癌、肝硬変例では検出されず、39回のサンプルから10例は陽性であった。またそのうち再発した例からは陽性度が高かった。術後早期に認められた例は遠隔転移を認めた。また検出された3例は mRNA 量が多い例で早期再発した。また CEA についてはリンパ節病理所見陽性例で検出されやすく、さらに病理所見が陰性例でも遺伝子が発現している例が認められた。

D. 考察

代表的な腫瘍マーカーである α -fetoprotein(AFP)、CEA について検出する系は、Real Time PCR 法を用いて、肝臓癌における術後の早期再発、遠隔転移の予測を試み、十分に臨床的に有用であった。

E. 結論

Real Time PCR を用いて、肝臓癌切除症例での末梢血における AFP mRNA の定量が可能であり、従来の方法より特異性が向上し、応用性が高いことが示された。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, Nakamori S, Monden M. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain mu activation. *J Hepatol.* 2001 Feb;34(2):278-83.

Sakon M, Aono Y, Ariyoshi H, Ueda A, Tsuji Y, Umeshita K, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Monden M. Involvement of calcium influx in hypoxia-induced bleb formation in human umbilical vein endothelial cells. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):898.

Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Dono K, Nakamori S, Gotoh M, Monden M. Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of alpha-interferon and oral tegafur/uracil. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Dec;15(12):1447-51.

Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai M, Kusama T, Fujii H, Matsumoto Y, Akedo H. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res.* 2000;32(6):374-9.

Miyamoto A, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Sugita Y, Eguchi H, Kondo M, Arai I, Morimoto O, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Monden M. Clinical application of quantitative analysis for detection of hematogenous spread of hepatocellular carcinoma by real-time PCR. *Int J Oncol.* 2001 Mar;18(3):527-32.

He L, Dono K, Gotoh M, Okumura M, Takeda Y, Shimizu J, Nagano H, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Role of the liver in alloimmune response following inoculation of donor spleen cells. *Cell Transplant.* 2000 Sep-Oct;9(5):725-8.

Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto S, Dono K, Nakamori S, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M. Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by posthepatectomy liver failure. *Dig Dis Sci.* 2000 Jul;45(7):1383-8.

Miyamoto A, Fujiwara Y, Sakon M, Nagano H, Sugita Y, Kondo M, Eguchi H, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Monden M. Development of a multiple-marker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2000 Jul;45(7):1376-82.

Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2881-90.

Okami J, Dohno K, Sakon M, Iwao K, Yamada T, Yamamoto

H, Fujiwara Y, Nagano H, Umeshita K, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000 Jun;6(6):2326-32.

Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Meng W, Nagano H, Dono K, Ariyoshi H, Nakamori S, Kawasaki T, Gotoh M, Monden M, Imajoh-Ohmi S. The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain-mu activation. *Transplantation.* 2000 Jun 15;69(11):2314-9.

Kondo M, Nagano H, Sakon M, Yamamoto H, Morimoto O, Arai I, Miyamoto A, Eguchi H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Wakasa K, Ohmoto Y, Monden M. Expression of interferon alpha/beta receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2000 Jul;17(1):83-8.

Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Higaki N, Aoki T, Oshima S, Shiozaki K, Okami J, Hayashi N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Outcome of pancreatic cancer patients based on genetic lymph node staging. *Int J Oncol.* 2000 Jun;16(6):1165-71.

Sakon M, Nagano H, Shimizu J, Kondo M, Nakamori S, Dono K, Umeshita K, Nakamura H, Murakami T, Monden M. Hepatic resection of hepatocellular carcinomas based on tumor hemodynamics. *J Surg Oncol.* 2000 Mar;73(3):179-81. No abstract available.

Ito Y, Monden M, Takeda T, Eguchi H, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Sakon M, Nakamura M, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Yokosaki Y, Matsuura N. The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2000 Mar;82(6):1211-7.

Fujiwara Y, Sugita Y, Nakamori S, Miyamoto A, Shiozaki K, Nagano H, Sakon M, Monden M. Assessment of Stanniocalcin-1 mRNA as a molecular marker for micrometastases of various human cancers. *Int J Oncol.* 2000 Apr;16(4):799-804.

Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, Kuo C, Fujiwara Y, Nakamori S, Monden M, Hoon DS. Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer.* 2000 Mar 1;88(5):1037-44.

Gotoh K, Nagano H, Sakon M, Miyamoto A, Shimizu J, Taniguchi H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Gotoh M, Nakamura H, Wakasa K, Monden M. [A case of mucinous cholangiocarcinoma with lymph node metastasis]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 1999 Dec;96(12):1401-6.:

Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4005-12. Sakon M, Umeshita K, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S,

Miyamoto A, Ohshima S, Dono K, Nakamori S, Gotoh M, Monden M. Clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma: analysis by disease-free survival curves. Arch Surg. 2000 Dec;135(12):1456-9.

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

転移性大腸癌、胆のう癌細胞に対するモノクローナル抗体を用いた早期診断と免疫原性の研究

分担研究者 石坂 幸人 国立国際医療センター名難治疾患研究部 部長

大腸癌、胆嚢癌に対するモノクローナル抗体を作成した。さらにこの抗体を用いて特異性、反応の陽性率を検討した。大腸癌に対する抗体には、各抗腫瘍剤を化合物として抱合体を作成し、抗腫瘍効果と特異性を検討した。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価
臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。
2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

大腸癌、胆嚢癌に対するモノクローナル抗体を作成した。さらにこの抗体を用いて特異性、反応の陽性率を検討した。大腸癌に対する抗体には、各抗腫瘍剤を化合物として抱合体を作成し、抗腫瘍効果と特異性を検討した。癌遺伝子 ret に対する抗体を用いて特異的な結合と遺伝子導入を検討した。

C. 結果

大腸癌に対する抗体は特異的で、抗腫瘍剤との抱合は、特異性を増強する手段として有用と考えられた。また認識する配列は数ペプチドであり、この配列が重要であることがわかった。

D. 考察

癌それぞれに特異的な抗体を開発する事は、癌の再発、微少な残存病変、転移病変の評価に有用である可能性があり、今後さらにその応用性を高めるために研究の進展が必要である。

E. 結論

癌それぞれに特異的な抗体を開発する事によって癌組織を染色し、さらに残存病変や微小転移を評価でき、免疫療法（抗体療法）への可能性が出てきた。

F. 健康危険情報 特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表
Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T, Mori M, Ueda M, Inoue R, Yamada M, Hayasawa H, Horiuchi T, Niho Y, Matsumoto M, Ishizaka Y, Ikeda K, Ozawa K, Hatake K. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol.* 2000 Nov;185(2):280-92.
Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. *J Leukoc Biol.* 2000 Jul;68(1):87-96.
Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Improved gene transfer

to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. Hum Gene Ther. 2000 May 1;11(7):995-1004.

Okuma E, Saeki K, Shimura M, Ishizaka Y, Yasugi E, Yuo A. Induction of apoptosis in human hematopoietic U937 cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible existence of caspase 3-like pathway. Leukemia. 2000 Apr;14(4):612-9.

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

細胞周期のチェックポイントに関するホメオボックス遺伝子の各転移性腫瘍における意義
Six と HAT (Histone Acetyl Transferase)

分担研究者 川上 潔 自治医科大学 教授

転写因子SixファミリーのうちのひとつhSix1が、骨髄CD34陽性細胞ではGM-CSFによる分化をした方が、Epo, Tpoによる分化よりもより発現していた。また多方向に分化する株細胞 UT-7 を用いてノザン解析を行うと、GM-CSF によって刺激した場合により hSix1 が発現していた。

用いてノザン解析を行うと、GM-CSFによって刺激した場合により hSix1 が発現していた。

A. 研究目的

癌に対して多くの手術療法や化学療法、放射線療法が開発され、行われている。手術後や化学療法後に早期に再発する症例も依然として存在することも事実である。各種臓器の原発とするがんに対して特異的なマーカーである抗原や遺伝子の発見は、多くの期待を持って今後の癌の臨床経過や予後を推測させ、早期に対処できるようになることが期待される。しかし現実にはまだ多くの症例での検討や基礎的意味付けの必要な部分が多く残っている。そこで社会のニーズに答えるような臨床的検討から、微小残存病変や微小転移病変の有無の評価やその結果を生かして予後を推測することに生かせれば患者さんへの恩恵や社会への貢献度が高いと考えられる。そのための基礎的および臨床的研究を行う。

1. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

増殖と分化に関する転写因子 Six ファミリーのひとつ hSix1 について遺伝子の発現と分化の方向での検討を行った。ほ乳類細胞での検討の前に、zebrafish で検討した。

C. 結果

まず骨髄 CD34 陽性細胞では GM-CSF による分化をした方が、Epo, Tpo による分化よりもより発現していた。また多方向に分化する株細胞 UT-7 を

D. 考察

増殖と分化に関する転写因子 Six ファミリーのひとつ hSix1 について遺伝子の発現と分化の方向での検討を行った。ほ乳類細胞での検討の前に、zebrafish で検討した。分化の方向によっては発現が増強される遺伝子がある事がわかった。

E. 結論

転写因子 Six ファミリーのひとつ hSix1 について遺伝子の発現と分化の方向での検討を行った。特に GM-CSF による分化によって増強した。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ozaki H, Watanabe Y, Takahashi K, Kitamura K, Tanaka A, Urase K, Momoi T, Sudo K, Sakagami J, Asano M, Iwakura Y, Kawakami K. Six4, a Putative myogenin Gene Regulator, Is Not Essential for Mouse Embryonal Development. Mol Cell Biol. 2001 May 15; 21(10):3343-50.

Kawakami K. [Insertional mutagenesis in zebrafish and a proviral insertional mutation hagogromo] Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2000 Dec;45(17 Suppl): 2810-9.

Kobayashi M, Osanai H, Kawakami K, Yamamoto M. Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial

sensory placodes and the developing somites. *Mech Dev.* 2000 Nov;98(1-2):151-5.

Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11403-8.

Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K. Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays.* 2000 Jul;22(7):616-26.

Kawakami K, Amsterdam A, Shimoda N, Becker T, Mugg J, Shima A, Hopkins N. Proviral insertions in the zebrafish hagoromo gene, encoding an F-box/WD40-repeat protein, cause stripe pattern anomalies. *Curr Biol.* 2000 Apr 20;10(8):463-6.

Muto S, Nemoto J, Okada K, Miyata Y, Kawakami K, Saito T, Asano Y. Intracellular Na⁺ directly modulates Na⁺,K⁺-ATPase gene expression in normal rat kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1617-35.

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。