

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた

新しい分子診断・治療法の開発

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坂本 優

平成13年(2001年)3月

目 次

I. 総括研究報告書

婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に 基づいた新しい分子診断・治療法の開発 坂本 優 (佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長)	-----	1
--	-------	---

II. 分担研究報告書

1. CGHとマイクロアレイを用いた婦人科がんの 遺伝子診断に関する研究 坂本 優 (佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長)	-----	17
2. 子宮頸がんにおける細胞外SCC抗原発現の検討 住浪 義則 (山口大学医学部産婦人科 講師)	-----	23
3. 子宮体がんの分子診断・治療法の開発 和氣 徳夫 (九州大学生体防御医学研究所産婦人科 教授)	-----	26
4. テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性 大屋敷 一馬 (東京医科大学第一内科 教授)	-----	28
5. テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と 婦人科がんの遺伝子治療への応用 京 哲 (金沢大学医学部産婦人科 講師)	-----	30
6. 女性生殖器がんにおける血管新生とその制御 藤本 次良 (岐阜大学医学部産婦人科 講師)	-----	33
7. 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発 山田 亮 (久留米大学医学部免疫学 助教授)	-----	35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	38
---------------------	-------	----

I. 総括研究報告書

『婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に 基づいた新しい分子診断・治療法の開発』

主任研究者： 坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

分担研究者： 住浪 義則 山口大学医学部産婦人科 講師
和氣 徳夫 九州大学生体防御医学研究所産婦人科 教授
大屋敷一馬 東京医科大学第一内科 教授
京 哲 金沢大学医学部産婦人科 講師
藤本 次良 岐阜大学医学部産婦人科 講師
山田 亮 久留米大学医学部免疫学 助教授

研究協力者： 菊池 義公 防衛医科大学校産婦人科 教授
平井 康夫 癌研究会附属病院婦人科 副部長
室谷 哲弥 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 部長
岩渕 浩之 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医長
秋谷 司 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
小屋松安子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
後藤 友子 防衛医科大学校産婦人科 助手
三宅 清彦 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
近藤亜矢子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）
総括研究報告書

婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子診断・治療法の開発

主任研究者：坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

研究要旨

本研究班は婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づく新しい分子診断・治療法の開発と臨床応用を目指している。

(1) 子宮頸癌のマイクロアレイ解析により頸部の発癌・進展に関わる遺伝子発現変化が明らかになりつつある。

(2) 扁平上皮癌に特異的に発現する SCC 抗原は、アポトーシス抑制、NK 細胞の遊走抑制能等の機能を有することにより、腫瘍増殖促進的に働いていることが判明した。

(3) 高速高感度セルソーターにより末梢血中子宮頸癌細胞の検出を試みた。子宮頸部扁平上皮癌患者の末梢血中有核細胞群から扁平上皮癌のマーカーである SCC 抗原陽性細胞をソーティングして細胞診断を行なった結果、異形成様扁平上皮核異常細胞が認められ、将来癌転移予測診断に応用出来る可能性が示唆された。

(4) テロメラーゼ活性に重要な hTERT 遺伝子のプロモーター領域を単離し、その発現調節機構を解明した。とくに、hTERT プロモーター領域のヒストン蛋白のアセチル化状態がテロメラーゼ活性化を決定することが判明した。また癌細胞特異的に機能する hTERT プロモーターを組み込んだ遺伝子治療用新規ベクターシステムを開発し、in vitro で極めて癌細胞特異的に機能することを確認した。

(5) hTERT を標的とする DN-hTERT を用いた遺伝子治療法を開発し、DN-hTERT を導入した癌細胞において、テロメラーゼ活性低下、テロメア長短縮に続き、細胞増殖停止、アポトーシス誘導を認め、まず in vitro において有効性を確認した。

(6) NaB はヒストン脱アセチル化阻害作用を有し、様々な遺伝子転写を制御する作用を有する。NaB は p53 非依存的に p21 発現誘導を行うなど、NaB の細胞老化誘導の分子機構を明らかにし分子標的療法に応用できる可能性を示唆した。

(7) 子宮内膜癌において β -catenin の細胞内異常蓄積を高率に認めた。特に遺伝的不安定性を示した症例で高率に認めたが、PTEN 遺伝子変異の有無とは相関しなかった。また臨床病理学的検索により、遺伝的不安定性を示した子宮内膜癌において PTEN 遺伝子変異がより高率にみられ、かつ無病生存率がより高い傾向を認めた。

(8) 子宮体癌の予後因子並びに治療法を同定、開発することを目的とし、各種ホルモンレセプター、癌関連遺伝子の発現を摘出組織 99 例において後方視的に検索した。これらをリンパ節転移や生存率等に関し、統計学的に解析した結果、Progesterone receptor と p53 の腫瘍進展・増殖への関与を見い出した。

(9) マイクロアレイ解析によりタキソール耐性卵巣癌細胞において mdr-1 のみならず IGFBP3 や GDI 遺伝子の発現増加を見い出した。またマイクロアレイ解析により卵巣癌で抗癌剤耐性と関連する遺伝子変化を見出し、遺伝子情報による感受性薬剤選択や耐性予測の可能性が示された。

(10) 発生頻度が低く、早期診断、治療導入が遅延しがちである膣・外陰癌の発生因子を、HPV との関連がほぼ確立されている子宮頸部扁平上皮癌と比較することで検討し、膣癌では HPV16/18 E6 E7 遺伝子が、外陰癌では癌関連遺伝子が、より優位に発生に関与することが示された。

(11) 子宮頸癌において血清 PD-ECGF の発現が扁平上皮癌でも腺癌でも臨床進行期や予後と相関し診断マーカーとなりうることを示した。この発現は血管新生の転写因子である ets-1 の発現とよく相関した。腫瘍内に浸潤してくるマクロファージから産生される IL-8 も血管新生因子として増殖進展と関与し予後と相関することがわかった。

(12) 癌拒絶抗原遺伝子 6 種につき高度進行・再発婦人科癌患者に癌ワクチン臨床第 I 相試験を実施、注射部位の発赤・腫脹以外の有害事象を認めず、末梢血中 CTL 前駆細胞頻度の増加を認めた。

分担研究者

1. 住浪 義則 山口大学医学部産婦人科 講師
2. 和氣 徳夫 九州大学生体防御医学研究所産婦人科 教授
3. 大屋敷一馬 東京医科大学第一内科 教授
4. 京 哲 金沢大学医学部産婦人科 講師
5. 藤本 次良 岐阜大学医学部産婦人科 講師
6. 山田 亮 久留米大学医学部免疫学 助教授

研究協力者

1. 菊池 義公 防衛医科大学校産婦人科 教授
2. 平井 康夫 癌研究会附属病院婦人科 副部長
3. 室谷 哲弥 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 部長
4. 岩淵 浩之 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医長
5. 秋谷 司 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
6. 小屋松安子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
7. 後藤 友子 防衛医科大学校産婦人科 助手
8. 三宅 清彦 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科
9. 近藤亜矢子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科

A. 研究目的

(1) マイクロアレイ法を用いた婦人科癌の遺伝子診断に関する研究：

癌は正常細胞が様々な遺伝子変化の蓄積を伴いながら異常増殖することで引き起こる。我々は、2種類のサンプルに対し、発現変動のみられる遺伝子群の同定が可能となるマイクロアレイ法を使用して、婦人科癌の発生及び予後の因子となる遺伝子群を明らかにすることを目的とする。

(2) 子宮頸がんにおける細胞外 SCC 抗原発現の検討：

① SCC 抗原 (SCCA) は腫瘍組織内でも serine protease inhibitor として存在しており、SCCA1、SCCA2 共に種々の刺激によるアポトーシスを減弱させる効果を持つが、中でも SCCA1 は NK 細胞による腫瘍細胞のアポトーシスを抑制する。この SCCA1 を導入した腫瘍細胞はマウスに埋め込むと増殖速度が速い。ところで血中に出現する SCCA は、その等電点パターンから腫瘍崩壊によるものではなく腫瘍細胞より分泌されることにより癌患者の血中に存在していると考えられる。これらのことから SCCA1 は細胞内における NK 細胞の殺腫瘍細胞効果の抑制のみならず細胞外においても NK 細胞などの免疫系細胞に働きかけて腫瘍の増殖を亢進させている可能性が考えられる。そこで本研究本研究では細胞外における SCCA の役割について検討する事を目的とする。これが明らかになれば将来的に SCCA の発現のコントロールにより子宮頸癌の治療へと結びつく可能性が期待できる。

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 SCCA 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患者を初期段階において末梢血で診断できる可能性が期待できる。また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 DPO-PCR で増幅後 CGH により染色体コピー数の異常を検討する (DOP-PCR CGH)。

(3) 高速高感度セルソーターによる末梢血中子宮頸癌細胞の検出：

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ている。加藤紘教授 (山口大学医学部産婦人科) らの研究により、子宮頸癌患者の末梢血中に存在する扁平上皮癌マーカー SCC 抗原 mRNA の検出・定量が、扁平上皮癌の早期診断・予後の判定に利用できる可能性が示唆されている。今回、我々は高感度のフローサイトメトリの試作機を使用する機会を得たので、子宮頸部扁平上皮癌患者の SCC 抗原染色を施した末梢血中有核細胞群から癌細胞がソーティング可能であるか試みた。

(4) テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性：

テロメラーゼ活性がヒトの各種臓器由来悪性腫瘍の90%以上で高いことが明らかとなり、テロメラーゼ分子そのものを標的にした遺伝子治療の可能性が報告されている。テロメア、テロメラーゼ分子を介在した癌の新しい遺伝子治療を開発し、臨床的に効果のある遺伝子治療法の開発と臨床応用、その安全性の確立を目指す。従来よりテロメラーゼは3つのサブユニット (hTR: human telomerase RNA, TP1: telomerase associated protein, hTERT: human telomerase reverse transcriptase) から構成されることが知られていたが、このうち hTERT が酵素活性を担う因子であることが明らかとなった。我々は米国 MIT (Dr. Weinberg) のグループとの共同研究により、hTERT の第3エクソンの2つのアミノ酸残基を変異させ catalytic activity を消失した hTERT 変異体 (DN-hTERT) (Nature Med 5:1164, 1999) を造血管悪性腫瘍にレトロウイルスベクターシステムを用いて遺伝子導入し、日本での DN-hTERT による遺伝子治療の臨床システム確立への一端を開くことを目的とする。

(5) テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と婦人科がんの遺伝子治療への応用：

ヒト染色体 DNA 末端は数千 base におよぶテロメア繰り返し配列 (TTAGGG)_n により構成される。これは DNA の分解や再構成、欠失などから DNA 末端を保護すると考えられている。しかし細胞分裂に伴いテロメア配列は短縮してゆき、これを伸長する機構が働かない限りテロメアは極限まで短縮し、染色体の不安定化を引き起こされる。テロメラーゼはテロメアを伸長させる RNA 蛋白質で、正常細胞では不活化されている。ところがほとんど全てのヒトの癌組織ではテロメラーゼが活性

化されていることが我々の研究を含めて明らかになってきた。おそらくテロメレーズの発現は、テロメアの短縮を防ぎ、染色体 DNA の安定化をもたらすことにより細胞の不死化や癌化に関与すると考えられ、その活性化は癌化過程の重要なステップである。ところが全世界の癌研究者の精力的な研究にもかかわらず、テロメレーズ活性化のメカニズムに関してほとんど何もわかっていない。そこで我々はテロメレーズ遺伝子の発現を制御する因子およびその機構を同定し、婦人科癌におけるテロメレーズ活性化のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともに得られた知見をテロメレーズをターゲットにした癌の遺伝子治療に応用することを本研究の目的とした。

(6) 子宮体がんの分子診断・治療法の開発

①婦人科癌に対するヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDAC 阻害剤) を用いた新たな分子標的療法の開発を目的とし、HDAC 阻害剤による癌細胞の老化誘導を証明し、その分子機構について解析することにより HDAC 阻害剤による分子標的療法の可能性を評価する。

②子宮体部発癌機構の解明を目的とし、子宮内膜細胞における K-及び H-Ras を介するシグナル伝達の生物学的機構を明らかにする。

(7) 子宮体がんの CGH 法に基づく診断・治療法の開発:

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、体癌における遺伝的不安定性の有無を検索し、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。さらにゲノム全体にわたり遺伝子コピー数変化の有無を検索できる CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を活用して発癌過程の分子遺伝学的特徴を解析し、子宮体癌の効率の良い早期発見のためのマーカーを見い出すことを目的とした。

(8) 子宮体癌予後因子としての癌関連遺伝子・ホルモンレセプター発現の検索と、統計学的検討:

子宮体癌における発生、増殖、進展に関わる有力因子を検索し、新たな治療法開発、予防、制癌への可能性を見い出すことを目的とした。

(9) 卵巣癌のパクリタキセル耐性機構の解明に関する研究:

卵巣癌化学療法における抗癌剤感受性および耐性の予知は重要な問題である。シスプラチン耐性卵巣癌に対しても感受性を示すパクリタキセルが近年注目を集めており臨床研究も盛んである。しかしながら、パクリタキセルに当初反応していた腫瘍が耐性を示すようになる事も多く、その耐性化機構についての解明が待たれている。パクリタキセル耐性機構の解析を目的として、cDNA マイクロアレイ法を用いてパクリタキセル耐性誘導卵巣癌培養細胞株についての遺伝子発現を比較検討した。

(10) 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索:

膣癌、外陰癌における発生、増殖、進展に関わる有力因子を検索し、新たな治療法開発、予防、制癌への可能

性を見い出すことを目的とした。

(11) 婦人科がんにおける血管新生とその制御:

婦人科癌の増殖や進展に関わる血管新生の特徴を理解し、その制御の基礎を確立することにより、血管新生制御を先進医療に包括することを目的とする。癌血管新生能の制御により、初期浸潤を生じる前に癌を制御したり、転移巣を有しても増殖進展させない、すなわち転移巣を休眠させる tumor dormancy 治療法が考えられる。これらは過剰な手術侵襲や癌細胞選択性の少ない従来の化学療法による重篤な副作用を回避し、QOL の高い、より予後の良い治療をもたらすと期待できる。

(12) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

婦人科領域上皮性がんにつき、臨床応用可能な癌ワクチンを開発することを目的とする。癌種としては婦人科領域上皮性癌を主な対象とし、HLA としては HLA-Class I 抗原、その中でも本邦で発現頻度の高い HLA-A24 (癌患者の 6 割)、HLA-A2 (4 割)、HLA-26 (2 割)、および HLA-51 (2 割) に限定し、これらの HLA 分子拘束性の CTL によって認識される癌拒絶抗原の同定を目指す。さらに同定した癌拒絶抗原分子内に存在するペプチド抗原を同定し、患者末梢血からの癌特異的 CTL の誘導能を検討するとともに、癌ワクチンとしての臨床応用可能性について第 I 相臨床試験を含む基盤的研究を行う。婦人科領域腫瘍の中でも、特に再発癌は予後不良のため社会的にも大きな問題となっており、従来の治療法に加えて新たな治療法の開発が必須である。ペプチドワクチン療法は、抗原特異的宿主免疫応答の誘導によるため、有害事象が殆ど無いことが予想される。既に婦人科領域癌以外の癌患者を対象とした癌ワクチンの第 I 相臨床試験では、安全性に加え有効性も実証されつつあり、本研究により婦人科癌でもその有効性を評価したい。

B. 研究方法

(1) 子宮頸癌のマイクロアレイ解析:

術後、化学療法および放射線療法に抵抗性を示し、予後不良であった子宮頸部腺癌症例より樹立した子宮頸部腺癌由来培養細胞株 (TMCC-1) と正常子宮頸部組織から同量の RNA を抽出し、2 種類の蛍光色素 (Cy5, Cy3) にてそれぞれを蛍光標識しサンプルとした。これらを等量混合し、cDNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションを行ない、検出器により蛍光量を測定し、内部コントロールとして用いた遺伝子群により補正を行なった後、癌関連遺伝子の発現を比較検討した。

また臨床検体として、杏雲堂病院婦人科にて治療を行なった患者のうち、臨床診断が子宮頸部上皮内癌であった患者 3 名と子宮頸部扁平上皮浸潤癌であった 3 名の癌組織サンプル間の比較も行なった。

(2) 子宮頸がんにおける細胞外 SCC 抗原発現の検討:

①SCCA を発現する腫瘍細胞を用いてヌードマウスに皮下腫瘍を作製し、SCCA のアンチセンスをレトロ

ウイルスを用いて腫瘍に導入し、腫瘍の増殖の変化を検討すると同時に NK 細胞の浸潤を免疫組織学的に検討する。さらに健康人から精製したNK細胞を用い SCCA1 の chemotaxis に対する効果を検討する。すなわち pore size 3mm の chemotaxel の中に NK 細胞を入れ、24 穴 plate の上にのせる。24 穴 plate 内には種々の濃度の SCCA1、及び NK 細胞の活性化因子として IL-2、さらに NK 細胞の chemoattractant として MCP-1 を入れ、SCCA1 による chemotaxis 抑制効果を検討する。さらに SCCA1 の reactive site loop に変異を導入した変異型 SCCA1 においても同様の実験をし、NK 細胞に対する SCCA1 の効果における責任部位を決定する。

②健康婦人および上皮内癌、浸潤癌症例の末梢血より total RNA を精製する。これを鋳型に SCCA1、SCCA2 mRNA をともに増幅できるプライマーを用い asymmetric semi-nested RT-PCR により SCCA mRNA の定量的解析を試みる。

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マイクロダイセクションを行い、それらをサンプルとして DOP-PCR CGH 法を行い細胞遺伝学的変化の検討する。

(3) 高速高感度セルソーターによる末梢血中子宮頸癌細胞の検出：

子宮頸癌扁平上皮患者から、末梢血中の有核細胞と子宮頸部擦過細胞を採取し、それぞれ SCC 抗原を免疫染色後、PI 核染色をして FCM にて測定した。得られた蛍光情報からソーティングにより細胞を採取しパバニコロウ染色を行って細胞の種類を確認した。また、SCC 抗原陽性である子宮頸部扁平上皮癌由来培養細胞 SKGⅢa と正常人の単核球とを混合したサンプルを陽性・陰性の control として測定した。

(4) テロメレースをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性：

①DN-hTERT、hTERT を含む高力価ウイルス産生細胞の作成：DN-hTERT、hTERT を含むレトロウイルスベクター pBABE-puro を ecotropic packaging cell line GP86 にリン酸カルシウム沈降法を用いてトランスフェクトし、48 時後にその supernatant を amphotropic packaging cell line PA317 に添加し 105puroR CFU/ml 以上の高力価ウイルスを作成した。

②DN-hTERT、hTERT の造血器腫瘍細胞株への導入実験：上記により得られた高力価ウイルスを造血器腫瘍細胞株へ導入し抗腫瘍効果、アポトーシス誘導効果を解析した。

(5) テロメレース活性化の分子機構の解明と婦人科がんの遺伝子治療への応用：

①テロメレース遺伝子の活性化機構の解明

1. 転写因子の解析

現在までに Sp1, c-Myc, estrogen receptor などが hTERT 転写活性化因子として同定された。Gel shift assay, footprint 法、さらに Southwestern 法を用いて新たな転写活性化因子の同定を試みた。また我々は

Luciferase assay によりプロモーター活性を負に調節する negative regulatory element を同定済みである。ここに作用する抑制因子についても同様の方法で同定した。

2. アセチル化の関与

最近、クロマチンを構成するヒストンのアセチル化が、ある特定の遺伝子プロモーターの活性化をもたらす、また脱アセチル化が遺伝子の silencing をもたらすことが明らかにされつつある。我々は脱アセチル化阻害剤を用いて癌細胞、正常細胞でのテロメレース活性の変化を検討した。

3. テロメレース遺伝子発現をターゲットとした婦人科癌の遺伝子治療の展開

(a)RNA 特異的切断酵素を付加したアンチセンス法

ターゲットとして hTERT と hTR を考えた。従来のアンチセンス法では遺伝子発現抑制効が不十分であった。よって RNA 特異的切断酵素を付加した anti-sense oligo (2-5A anti-sense oligo)を導入し、細胞増殖抑制効果を検討した。

(b) テロメレースプロモーターを利用した新規ベクターシステムの構築

hTERT プロモーターは癌細胞で特異的に転写活性を示すため、これを自殺遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の上流に組み込んだベクターを作製して細胞へ導入を行い、癌細胞特異的に細胞死が誘導されるか否かを検討した。導入遺伝子としては caspase や Bax を用いた。

(6) 子宮体がんの分子診断・治療法の開発

①HDAC 阻害 Sodium Butyrate (NaB) を子宮頸癌、体癌および卵巣癌培養細胞に添加し、細胞老化誘導、p21 発現及び pRb パターンを解析した。

②ラット子宮内膜細胞へ活性化型 [K12V] K-Ras 及び [H61L] H-Ras を遺伝子導入し、その表現型の変化と下流分子の活性化を解析した。

(7) 子宮体癌の CGH 法に基づく診断・治療法の開発：

①子宮体部腫瘍の新鮮凍結組織材料の蓄積：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。また CGH (Comparative Genomic Hybridization) 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腫瘍組織および内膜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リセプターの測定：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則定を開始した。

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。

(8) 子宮体癌予後因子としての、癌関連遺伝子・ホルモンレセプター発現の検索と、統計学的検討：

手術治療時にリンパ節廓清を施行している、子宮体癌 99 例を対象とし、術前生検組織と、術後摘出組織における p53、PCNA、Progesterone receptor (PR)、Estrogen receptor (ER) の発現を免疫組織学的に検索した。それら因子の、術前後の同一性、リンパ節転移、生存率への関与を検討項目として、従来子宮体癌の予後因子とされる、組織分化度、筋層浸潤等の臨床病理学的因子と比較し、有力な予後因子と成り得るかを、後方視的に統計学的に解析した。

(9) 卵巣癌のパクリタキセル耐性機構の解明に関する研究：

卵巣癌培養細胞株 KF、同株より誘導されたシスプラチン耐性株 KFr (4.84 倍 P 耐性) と、これらの株より誘導されたパクリタキセル耐性株 KFTx (11.5 倍 Tx 耐性)、KFrTx (4.88 倍 Tx 耐性) より、それぞれ total RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ法により 557 種類の癌関連遺伝子の発現プロファイルを比較検討した。(後藤、菊池) また、臨床検体として、杏雲堂病院婦人科にて治療を行なった患者のうち、臨床診断が卵巣癌Ⅲc 期で抗癌剤療法感受性であった 2 名と抗癌剤療法に耐性を示した 2 名の癌組織サンプルの比較も行った。

(10) 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索：

膣癌 16 例、外陰癌 31 例の扁平上皮癌において、パラフィン包埋組織を検体とした、HPV DNA の、PCR による検出を行い、同一組織における癌抑制遺伝子 p 53、癌増殖抗原 Ki 67 の発現を、免疫組織学的に検索した。

(抗 p53 monoclonal 抗体：DO7, monoclonal MIB 1 抗体使用) また、HPV の発癌機構への関与がほぼ証明されている子宮頸部扁平上皮癌の既存の data と比較し、これら一連の癌の、各因子における相関を検討した。

(11) 婦人科がんにおける血管新生とその制御：

婦人科癌において注目されている各種血管新生因子、basic fibroblast growth factor (bFGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)、interleukin (IL)-8、hepatocyte growth factor (HGF)、および angiopoietin 等や、血管新生に関与する転写因子である E26 transcription specific 1 (ets-1)、HOXD3、chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor II (COUP-TF II)、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 等の、癌組織内の局在や発現誘導機構を解析する。さらに、これらの血管新生因子と血管内皮細胞の局在および密度、癌の脈管侵襲、癌の

進展様式(微小浸潤、リンパ節転移、腹膜播種、遠隔転移など)、予後などとの関連を調べ、血管新生因子の機能を解析した。

(12) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発：

新たに癌拒絶抗原の遺伝子クローニングを行い、その解析を行うとともに、CTL により認識されるペプチドの同定と、その CTL 誘導能を調べる。これらの新規の分子に加え、これまでに同定した 7 種類の HLA-A24 拘束性上皮性癌拒絶抗原 (ART1, SART2, SART3, Lck, サイクロフィリン B, ART1, ART4) から、婦人科領域癌に適用可能な分子を選択して第 I 相臨床試験を実施し、ペプチド癌ワクチンとしての安全性と有効性を確認する。具体的には以下の研究を実施する。

①癌拒絶抗原遺伝子の同定：癌局所浸潤 T リンパ球、もしくは患者末梢血 T 細胞を癌細胞にて刺激することにより、HLA クラス I 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 expression cloning 法により単離し、その全塩基配列を決定する。

②同定された癌拒絶抗原遺伝子の発現を、種々の組織型の婦人科癌由来の細胞株、癌組織および正常組織につき検索する。

③これらより HLA 拘束性 CTL により認識される癌抗原ペプチドを同定し、さらにこれらの CTL 誘導能を調べる。

④既に同定した 7 種類の癌拒絶抗原の婦人科癌における発現スペクトルを明確にする。

⑤SART2, ART4 およびサイクロフィリン B については、婦人科癌での発現スペクトル、また婦人科癌患者末梢血からの CTL 誘導能が確認されているので、第 I 相臨床試験を久留米大学病院で以下のように実施した。

i) HLA-A24 陽性婦人科再発扁平上皮癌に対する SART2 ペプチドの第 I 相臨床試験。

ii) 扁平上皮癌を除く HLA-A24 陽性再発婦人科癌に対する ART4 ペプチドの第 I 相臨床試験。

(倫理面への配慮)

研究内容、および癌組織の採取と研究への利用に関して、インフォームド・コンセントをすべての患者より得た。また第 I 相臨床試験は、学内の倫理委員会で審査承認済みのプロトコールに基づき実施した。

C. 研究結果

(1) マイクロアレイ法を用いた婦人科癌の遺伝子診断に関する研究：

TMCC-1 細胞において正常子宮頸部組織と比較し、多数の遺伝子の発現変化を認めた。発現が増加した遺伝子としては細胞周期制御遺伝子 (PCNA など) や、中間径フィラメント (vimentin など)、成長因子遺伝子 (BIGH 3 など) などがあつた。また、発現が減少した遺伝子は細胞接着関連遺伝子や細胞周期制御遺伝子など多数の遺伝子が認められた。

さらに、臨床検体として行なった子宮頸癌症例でも発

現が増加・減少した遺伝子が多数認められたが、これらは今後症例を増やし絞り込みをする。

(2) 子宮頸がんにおける細胞外 SCC 抗原発現の検討:

①遺伝子導入実験より、今まで報告してきた SCCA1 の NK 細胞、抗癌剤、TNF α 刺激によるアポトーシスの抑制効果に加え、SCCA2 にも放射線アポトーシスに対する抑制効果が認められた。このとき細胞内の種々の caspase の変化を検討したところ、caspase2、caspase8 には変化がなかったものの caspase9、caspase3 は明らかに SCCA1、および SCCA2 の存在で抑制されていた。またリン酸化された活性化型 p38 MAP kinase は、その上流の活性化型 MKK とともに SCCA1、SCCA2 の存在で発現が抑制されていた。これらのことより、扁平上皮癌で発現した SCCA1、SCCA2 はアポトーシスの抑制を通して腫瘍の増大に関与している可能性が示唆された。

また SCCA1 遺伝子導入した腫瘍細胞をヌードマウスに埋め込み形成した皮下腫瘍では、腫瘍内単核球数が低下するが、SCCA の anti-sense を恒常的に遺伝子導入した腫瘍細胞では逆の効果が認められることから、細胞外に分泌された SCCA が単核球の浸潤を防いでいる可能性が考えられた。よって、Monocyte chemotactic protein-1 を化学遊走物質とし、段階希釈した SCCA1 を加え modified Boyden chamber 法で NK 細胞の化学遊走性を解析したところ、SCCA1 の濃度依存的に遊走性が抑制された。また SCCA1 の reactive site loop にアミノ酸変異を入れ SCCA1 の protease inhibitor 活性を消失させると、この抑制は抑えられた。上記結果より、腫瘍細胞への SCCA の anti-sense 導入による遺伝子治療の可能性が示唆された。

②扁平上皮癌患者の末梢血中の腫瘍細胞量を SCCA の mRNA をマーカーとして定量的 RT-PCR で推定する試みを行った。Amplisensor system を利用し 10 copy/mg RNA 以上を陽性とする、感度 80.6%、特異度 93.3%と高い検出率を示した。また治療後約 4 週間目には SCCA mRNA は検出されず、さらに半年後では全例再発を認めなかったが、この時点でも SCCA mRNA は検出されなかった。

③18 例の子宮頸部扁平上皮癌患者のホルマリン固定標本より、同一症例で組織学的に正常、CIN I、CIN II、CIN III、Invasive carcinoma と考えられる領域からそれぞれマイクロダイセクションにて組織を採取し、DOP(Degenerated Oligonucleotide Primer)-PCR 法にて全ゲノム DNA を増幅した後 CGH 法を行い、正常から Invasive carcinoma 領域に至るまでの細胞遺伝学的検索を行った。高頻度(>20%)な遺伝学的変化は、CIN I 領域では認めず、CIN II 領域で 3q+ (33%)を認めるのみであった。CIN III 領域では 3q+に加え、1p+ (22%)、1q+ (22%)、4p- (28%)、6p- (22%)、11q- (33%)を認め、Invasive carcinoma 領域では、さらに 3p- (25%)、4q- (25%)、11p- (25%)、17p- (25%)を新たな変化として認めた。今回の結果より、子宮頸部扁平上皮癌では、その

発癌過程で、前段階の病変の遺伝学的変化を伴いながら新たな変化が加わり進展するものと示唆された。

(3) 高速高感度セルソーターによる末梢血中子宮頸癌細胞の検出:

測定に使用した臨床検体は、放射線治療中の子宮頸癌 IV 期患者の末梢血中有核細胞と子宮頸部擦過細胞、子宮上皮内癌患者の子宮頸部擦過細胞の 3 種類である。今回、末梢血中有核細胞検体から癌細胞は認められなかったが、異形成様扁平上皮核異常細胞が認められた (頻度 1/5000)。また擦過細胞検体からは癌細胞などが確認された。

(4) テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性:

WT-hTERT および DN-hTERT をそれぞれ含むレトロウイルスベクターを、造血器腫瘍細胞株 K562 および Rat-1 BCR/ABL へ導入し、抗腫瘍効果およびアポトーシス誘導効果を解析した。WT-hTERT を遺伝子導入した K562 細胞株ではテロメラーゼ活性の上昇、テロメア長の延長が見られたが growth curve に変化は認められなかった。これに対し、DN-hTERT を遺伝子導入した K562 細胞株ではテロメラーゼ活性の低下、テロメア長の短縮に引き続き、細胞増殖の停止、アポトーシス誘導が認められた。また、DN-hTERT を遺伝子導入した Rat-1 BCR/ABL 細胞株では soft agar 法にて BCR/ABL の腫瘍形成能の著しい低下がみられた。

(5) テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と婦人科がんの遺伝子治療への応用:

①hTERT プロモーターに作用する新たな転写因子を同定した。c-myc Sp1 以外にも ER、MZF2 などが直接 hTERT プロモーターに結合して転写を制御することを明らかにした。MZF2 は hTERT promoter の silencer に結合し、転写を抑制する因子であることが確認された。

②hTERT プロモーターは正常細胞ではそのヒストン蛋白が脱アセチル化され、転写活性が負に制御されているのに対し、癌細胞ではこれがアセチル化され、転写活性化に寄与していることを明らかにした。すなわちプロモーター領域のヒストン蛋白のアセチル化状態がテロメラーゼ活性化を決定するという概念を提唱するに至った。

③2-5A アンチセンス hTR により子宮頸癌細胞の増殖を効率的に抑制することに成功した。この際、hTR の発現抑制に引き続き、テロメラーゼ活性が阻害され、最終的に細胞がアポトーシスにより死滅することも確認した。

④hTERT プロモーターを caspase 8 および Bax 遺伝子上流に組み込んだベクターを作製し、これを細胞に導入したところ、癌細胞特異的にアポトーシスが誘導され、正常細胞への毒性がほとんどないことを確認した。

(6) 子宮体がんの分子診断・治療法の開発:

①NaB 処理により、癌細胞は G1 期に集積し、顕著な細胞老化が誘導された。NaB による p21 発現に伴い、pRb は脱リン酸化フォームへシフトした。pRb が不活化している HPV (+) 子宮頸癌細胞は NaB により G0/G1 および G2/M 期に集積し、細胞老化が誘導され

た。NaB による p21 発現誘導を認めたが pRb の脱リン酸化へのシフトは観察されなかった。

② [K12V] K-Ras 導入子宮内膜癌細胞では、細胞増殖の亢進およびアポトーシスの誘導が観察された。一方、[H61L] H-Ras 導入によっては、細胞増殖の亢進およびアポトーシスの回避が示された。それぞれの発現に伴い、MAPK および Akt は活性化された。

(7) 子宮体癌の CGH 法に基づく診断・治療法の開発：

①臨床病理学的検討から、高分化型の子宮体癌に有意にエストロゲンリセプター活性が高いことが判明した。

②類内膜型子宮体癌には、病理組織学的に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した。DEXA 法で測定した子宮体癌患者の正確な体脂肪量と、血中エストロゲン 3 分画の同時測定により、少なくとも日本の体癌では、高エストロゲン状態とはいえないものが相当数含まれていることが判明した。

③解析した子宮体癌症例の 30%弱に遺伝的不安定性を認めた。CGH 法により全染色体上の遺伝子量変異の有無を検索したところ、遺伝的不安定性が認められる症例では、CGH 検出される変化が少ない傾向にあった。

④子宮内膜癌において、PTEN 遺伝子の変異を高率に認めた。

⑤遺伝的不安定性を示した子宮内膜癌にみられた PTEN 遺伝子変異は、対側アレルの欠失を高率に伴うことを CGH 法により推定した。このことより PTEN 遺伝子の変異は子宮内膜癌の発癌過程に深く関わることを示唆された。

⑥TGF β RII, BAX 遺伝子の変異は、遺伝的不安定性を示す症例で、対側アレルの欠失を伴う例は少なく(1例)、発癌への関与は限られていると考えられた。

⑦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、遺伝的不安定性を示す場合には特に高率にみられるが、PTEN 遺伝子変異の有無とは相関しなかった。

⑧臨床病理学的検索により、遺伝的不安定性を示す子宮内膜癌症例は、示さない症例と比較して PTEN の変異をより高率に伴い、かつ無病生存率がより高い傾向を示した。

(8) 子宮体癌予後因子としての、癌関連遺伝子・ホルモンレセプター発現の検索と、統計学的検討：

リンパ節転移は全 25 例で、p53 陽性 9 例中の 6 例 (66.7%, p=0.003)、PCNA 陽性 12 例中の 4 例 (33.3%, p=0.49)、PR 陰性 44 例中の 21 例 (47.7%, p=0.001)、ER 陰性 48 例中の 4 例 (29.2%, p=0.38) であり、転移と p53 陽性、PR 陰性に統計学的有意差を認め、このうち、術前後で発現の一致したのは PR であった。また、PR 陰性例は Cox ハザード比による Kaplan-Meier 生存曲線にて、明らかな生存率の低下が認められた (p=0.0025)。

(9) 卵巣癌のパクリタキセル耐性機構の解明

に関する研究：

検索した 557 種の遺伝子のうち 2 倍以上の発現差が認められたものは、KF と KFTx との比較では、Tx 耐性株において発現増加を認めた遺伝子が 7 個、低下を認めた遺伝子が 5 個であり、KFr と KFrTx との比較では、増加 10 個、低下 8 個という結果であった。また両系列で共通に変化を認め、かつ 5 倍以上の高度な発現差を示した遺伝子が 3 種あり、MDR1 はともに 18 倍の発現増加、insulin like growth factor binding protein 3 はともに 7 倍の発現増加、Rho GDP dissociation inhibitor は KF-KFTx で 7 倍、KFr-KFrTx で 3 倍の発現増加を認めた。これら 3 つの遺伝子はシスプラチン感受性株 KF と耐性株 KFr 間でみられた遺伝子発現変化とは異なるパターンであり、パクリタキセル耐性に固有な変化である可能性が示唆された。

さらに、卵巣癌の薬剤感受性・耐性臨床症例でも発現が増加・減少した遺伝子を多数認めたが、これらについては今後症例を増やし絞り込みをする予定である。

(10) 腫瘍・外陰癌における遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索：

子宮頸癌における HPV 16/18 DNA 陽性率は 53%、p53 陽性率は 2.5%、腫瘍では各々 43.7%、18.7%、外陰癌では 12.8%、61.2%であり、頸部→腫部→外陰部の順で HPV の存在は低く、p53 の発現は高くなる逆相関を認めた (R=-0.999, p<.0001)。Ki 67 はいずれも 70%前後と有意差を認めなかった。

(11) 婦人科がんにおける血管新生とその制御：

子宮頸癌において、thymidine phosphorylase (TP) である PD-ECGF の発現は間質に特徴的で、血管新生能や予後とよく相関した。一般に子宮頸癌でリンパ節転移がある症例は予後不良であるが、転移リンパ節での PD-ECGF の発現量がより良いインディケータになることがわかった。よって TP の基質である 5FU 前駆体は、PD-ECGF による血管新生を制御し奏効する可能性が示唆された。また頸癌患者において血清 PD-ECGF は、血清 SCC のように扁平上皮癌だけに対する腫瘍マーカーではなく、腺癌でもその進展に対して良い腫瘍マーカーと成り得ることがわかった。さらに、腫瘍内に浸潤する tumor associated macrophage から分泌される IL-8 も血管新生因子として増殖進展と関与し、予後と相関することがわかった。

卵巣癌において、VEGF165 が主なアイソフォームであり、組織型による発現の差はないが、予後と相関することがわかった。さらに、腹膜播種腫瘍における VEGF の発現が原発巣に比して著しく高くなる症例は、予後不良であることがわかった。

子宮内膜癌において、bFGF は癌の進展と関与し、臨床進行期と相関する。IL-8 および性ステロイドにより発現調される PD-ECGF は子宮内膜癌の早期における筋層浸潤に関与し、やはり性ステロイドにより発現調節される VEGF も子宮内膜癌の早期における進展と関与する。

(12) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定と

がんワクチン分子開発：

扁平上皮癌および腺癌由来の cDNA ライブラリーより HLA-A 分子拘束性に CTL に認識される癌拒絶抗原を現時点までに約 100 分子を同定した。これらは当初の予想に反し、癌細胞特異的なものではなく、増殖期の正常細胞にも発現しているものがほとんどであった。これらのうち HLA-A24 拘束性に認識される 6 分子 (SART1, SART2, SART3, Lck, CypB, ART4) については、各々のペプチドを単独で用いた癌ワクチンの第 I 相臨床試験が久留米大学病院において進行中である。現時点で 35 名の高度進行・再発癌患者 (食道癌, 肺癌, 大腸癌, 乳癌, 卵巣癌, 子宮癌) に対し、0.3~3mg のペプチド溶液をフロイド不完全アジュバンドとともに皮下投与しているが、現時点で有害事象は注射部位の発赤および腫脹以外は認めていない。CypB (肺癌) および SART3 (大腸癌, 乳癌) についてはプロトコールはすでに終了した。いずれの症例においても末梢血中のペプチド特異的、および癌特異的 CTL 前駆細胞頻度が増加していた。SART2 および ART4 ペプチドを用いた癌ワクチンの臨床試験は、高度進行婦人科領域扁平上皮癌ならびに腺癌患者各 2 名に対して実施され、その安全性が確認された。さらに、免疫学的な解析も行い、1 症例について細胞傷害性 T 細胞の誘導を認めた。

臨床試験の免疫学的評価法として、従来行われている CTL 前駆細胞頻度測定に代替できる簡便法開発を行った。この方法を導入すれば、事前に患者末梢血 T 細胞の反応性を解析し、これらのデータに基づき患者の個性にあわせた複数のペプチドを同時に投与するオーダーメイド癌ペプチドワクチン療法も可能である。現在、HLA-A24 および HLA-A2 患者を対象とした 2 つの evidence-based ワクチンの第 I 相臨床試験が学内倫理委員会で承認されており、HLA-A24 に関しては 6 症例がすでに開始されている。HLA-A24 患者を対象とするプロトコールでは、SART1, SART2, SART3, Lck, CypB, ART1, ART4 由来の 13 種類のペプチド、およびコントロールペプチド 3 種 (HIV, flu, EBV) に対する患者末梢血 T 細胞の反応性をあらかじめ簡便法にて調べ、反応性のあったペプチドのみをワクチンとして投与する。また、HLA-A2 患者を対象とするプロトコールでは、SART3, Lck, CypBM, ppMAPkkk, WHSC2, UBE2V, HNRPL, EIF4EBPI 由来の 16 種類のペプチドを用いる。対象症例は肺癌, 大腸癌, 婦人科癌, 胃癌, およびその他の癌 (口腔癌, 皮膚癌, 腎臓癌など) の 5 群につき実施している。事前にこの検査を実施することにより、免疫能の低下している compromised host を対象患者から除外し、個々の患者により適切なワクチンを選択することが可能となった。

D. 考察

(1) マイクロアレイ法を用いた婦人科癌の遺伝子診断に関する研究：

TMCC-1 細胞において正常子宮頸部組織と比較し、多数の遺伝子の発現変化を認め、発現が増加した遺伝子

としては細胞周期制御遺伝子 (PCNA など) や、中間径フィラメント (vimentin など)、成長因子遺伝子 (BIGH3 など) が、また発現が減少した遺伝子には細胞接着関連遺伝子や細胞周期制御遺伝子などがあつた。さらに、卵巣癌臨床症例、および子宮頸癌臨床症例でも発現量の変化した遺伝子を多数認めたが、これらにつき今後症例を増やし絞り込みをする予定である。

このようにマイクロアレイ法によって、婦人科癌の癌化、悪性度等に関わる重要な遺伝子群を同定することが出来ると思われる。また、同定された遺伝子群をさらに多くの症例にて再評価し確認を行なって臨床に役立てたいと考える。

(2) 子宮頸がんにおける細胞外 SCC 抗原発現の検討：

①SCCA 発現が、細胞内でのアポトーシス抑制のみならず細胞外での NK 細胞の遊走阻止により扁平上皮癌での細胞死を抑制している可能性が示唆された。また SCCA の発現抑制による遺伝子治療の可能性が示唆された。

②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や予後の判定に利用できる可能性が示唆された。

③子宮頸部発癌の各段階の組織を用いた CGH 解析によって検出された遺伝子変化様式は、同一症例における連続する異形成、上皮内癌、浸潤癌の組織領域をマイクロダイセクションにより採取し検討したため、発癌過程における染色体変化の流れを正確に反映していると考えた。

(3) 高速高感度セルソーターによる末梢血中子宮頸癌細胞の検出：

今回は少数の検体での評価であったが、良好なソーティング結果が得られた。また末梢血中からのソーティングにより核異常細胞を捕捉したことから、高感度のフローサイトメトリーにより末梢血中のごく微量の癌細胞をも捕らえられる可能性が示唆された。

(4) テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性：

DN-hTERT 遺伝子導入による telomerase 維持の破壊によりヒト白血病細胞のアポトーシス誘導が確認され、hTERT を分子標的とする白血病の遺伝子治療の有用性が示唆された。この方法は固形腫瘍にも応用可能と考えられる。

(5) テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と婦人科がんの遺伝子治療への応用：

テロメラーゼ活性化のメカニズムを解明するためには hTERT 発現機構の解析が肝要であるが、今回の研究により hTERT 発現が転写レベルで調節されることが明らかになり、転写因子のいくつかを同定するに至った。これらはいずれも既知の転写因子であったが、今後未知の転写因子の同定を試み、hTERT 転写機構をさらに詳細に解明したい。また転写因子ばかりでなく、ヒストン蛋白のアセチル化が転写活性化に重要であることも明らかになった。このことは、脱アセチル化製剤により hTERT

活性化を抑制し得る可能性を示唆するものであり、新規な癌治療の可能性を示唆する。

また 2-5A アンチセンス hTR システムは子宮頸癌細胞の増殖を効率的に抑制した。興味深いのは、hTR によるテロメラーゼのブロックがテロメア短縮をもたらすよりもずっと早期に、細胞がアポトーシスに陥ることである。この原因については現在解明中であるが、caspase カスケードが働いている証拠を掴んでいる。これらの成績はテロメラーゼがテロメア伸長以外に何らかの未知の機能を有している可能性を示唆するものである。最後に hTERT プロモーターを癌の遺伝子治療のベクターに用いたが、予想通り、極めて癌細胞に選択性の高いベクターが構築された。導入遺伝子には caspase8, Bax を用いたが、現在さらにあらたな遺伝子の導入も行っており、婦人科腫瘍の遺伝子治療としてに最も効率の良い遺伝子を模索して行く予定である。

(6) 子宮体がんの分子診断・治療法の開発：

①pRb 不活化状態で p21 は pRb 下流標的であるサイクリン E/CDK2 を不活化するため、子宮頸癌細胞は G0/G1 に集積する。同様に p21 による G2/M 期集積への関与もよく知られている。NaB により発現誘導される p21 は pRb 依存性及び非依存性の経路を介して細胞老化を誘導することが示唆され、癌分子標的療法的重要手段と考えられた。

②子宮内膜細胞における K-および H-Ras を介するシグナルは細胞増殖及びアポトーシスの制御に独自の機能を有することが判明した。癌化における両シグナル伝達の活性化は細胞増殖とアポトーシスの回避に機能することが示唆された。

(7) 子宮体癌の CGH 法に基づく診断・治療法の開発：

従来より欧米で増加の傾向が指摘されていた子宮体部癌は、近年日本においてもその発生率の著明な増加が報告されている。子宮体部癌は、最も代表的な婦人の悪性腫瘍である子宮頸部癌に比較すると、(1)その前癌病変の実体と理解が十分でない(2)前癌病変に続く発癌過程の詳細が不明である(3)日本における発癌素因の疫学研究によると、欧米で重視される肥満、糖尿病との関連がはっきりしない(4)早期発見の手段である細胞診断が技術的に難しく、高度な熟練を要する、など今後解明、解決すべき問題点が多い。そこで今回、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た。さらに、これら 2 亜型の体部癌について、CGH (comparative genomic hybridization) 法を用いて、その発癌過程の分子遺伝学的特徴をさらに解析中である。これにより、高度の熟練を要せず、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と考える。

(8) 子宮体癌予後因子としての、癌関連遺伝子・ホルモンレセプター発現の検索と、統計学的検討：

検索した分子学的因子と、他の臨床病理学的因子のうち、単変量・多変量の両解析において独立予後推定因子

と成りえたのは、PR 陰性、p53 陽性、頸管浸潤陽性であった。なお、PR 陰性/p53 陽性の 4 例は、全例がリンパ節転移をきたしており、両因子の combination は有力な転移推定因子になりえると考えられた。しかしながら、今回の研究では receptor 等に関する分子遺伝学的検索までは至っておらず、今後さらに癌増殖・進展機構への関与を、その転写・活性経路まで含めて追求すべきであると考察された。

(9) 卵巣癌のパクリタキセル耐性機構の解明に関する研究：

微小管を標的とした抗癌剤であるパクリタキセルは、tubulin の異常な重合を促進し、異常微小管の形成により腫瘍細胞分裂を抑制し、抗腫瘍効果を発現することが知られている。しかしその効果は、残存腫瘍細胞のパクリタキセルの耐性獲得による限界があり、耐性化については MDR1 等一部の遺伝子の関与が明らかになりつつあるが、その実際のメカニズムは不明である。今回の cDNA マイクロアレイ解析で、パクリタキセル耐性誘導株は親株に比較して MDR1 のみならず IGFBP-3, Rho GDI の高度な発現増加がみられた。Rho GDI は、Rho の機能を抑制する重要な活性制御蛋白で、Rho はアクチン細胞骨格系の再編成に関与し、細胞の形態や運動、極性、細胞質分裂などを制御している。細胞運動の観点から癌の浸潤・転移との関連を示唆する知見が多くみられており、パクリタキセル耐性細胞での Rho GDI 発現増加の報告はあるもののその抗癌剤との関連機序についての見解は得られていない。Rho ファミリーのうち Rac と Cdc42 は JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) カスケードを活性化することがわかっている。JNK/SAPK は様々なストレスによって活性化し、とくに DNA 損傷や増殖因子除去によるアポトーシスに機能することが知られている。パクリタキセルはこの JNK/SAPK も活性化することが証明されており、Rho GDI は Rac もしくは Cdc42 を不活化することによって JNK/SAPK を軸とした p53 非依存性アポトーシスを抑制していることが推測され、これがパクリタキセル耐性化メカニズムのひとつである可能性が示唆された。

(10) 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索：

各部位における HPV 16/18 DNA と p53 の間には統計学的関連はみいだせず、予後に関してもこれら因子による有意差はみられなかった。

(11) 婦人科がんにおける血管新生とその制御：

子宮頸癌における血管新生因子の情報伝達を明らかにするため、血管新生とよく相関する転写因子である ets-1 の発現を検討したところ、PD-ECGF および IL-8 の発現とよく相関し、状況に応じて発現が変化する血管新生因子よりも ets-1 を標的にする戦略がより効率的であろうと推察された。

卵巣癌において、VEGF165 が主なアイソフォームで、この発現は組織型による差はないが、予後と相関する。さらに、腹膜播種巣における VEGF の発現が原発巣に

比して著しく高くなる症例は、予後不良であることがわかった。したがって、VEGF は増殖進展に関与する血管新生のインディケターとなると考えられ、抗 VEGF 抗体や VEGF 受容体のチロシン・キナーゼを阻害する VEGF 受容体の抗体は奏効すると考えられた。

子宮内膜癌において bFGF は増殖進展に関与する血管新生のインディケターとなると考えられる。よって子宮内膜癌の血管新生能は、progestin や血管新生阻害剤である TNF470、人參の成分である ginsenoside Rb2、乳癌の治療薬である dienogest, toremifene および ICI 182,780 で制御できることを明らかにした。

(12) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがん ワクチン分子開発：

癌種ごとにそれぞれの癌拒絶抗原分子の発現量および発現頻度を調べ、それらの結果に基づき適用する癌ワクチンの決定を行ってきた。この方法により、婦人科腫瘍では SART2 および ART4 分子が癌ワクチン候補として選択され、それぞれ扁平上皮癌および腺癌患者に対し臨床試験が実施された。実施された 4 症例の 1 例において投与ペプチド特異的かつ癌細胞特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が患者末梢血中に誘導された。この患者の癌ワクチン投与前の血液中のリンパ球の種々の癌拒絶抗原ペプチドに対する反応性を調べたところ、投与ペプチドに対する反応性が試験管内でも確認できた。一方、ワクチン投与により CTL が誘導されなかった 3 症例では投与前血液中リンパ球で投与ペプチドに対する反応性が認められなかったが、投与されなかった別の癌ワクチン分子に対する反応性が認められた。これらのことより、癌種ごとに適用する癌ワクチンの決定を行うよりも、患者ごとに反応性を事前に調べてから投与ワクチンを決定する方が望ましいと考えられた。そこで、現在実施中の臨床試験では、複数の候補ペプチドより反応性の高いものを選択して投与するプロトコールに移行している。

E. 結論

(1) マイクロアレイ法を用いた婦人科癌の遺伝子診断に関する研究：

マイクロアレイを用いて婦人科癌の癌化、悪性度等に関わる遺伝子群を同定し、臨床に応用可能な癌診断の確立を目指したい。

(2) 子宮頸がんにおける細胞外 SCC 抗原発現の検討：

SCCA はアポトーシスを抑制するのみならず NK 細胞の遊走を阻止する働きがあることが判明した。SCCA を抑制することにより腫瘍の増殖を抑制出来る可能性が示唆された。また SCCA の mRNA をマーカーとして扁平上皮癌患者の末梢血中の腫瘍細胞量を定量的 RT-PCR で推定することが可能になり、新しい再発予知マーカーになる可能性が示唆された。子宮頸部扁平上皮癌では、その発癌過程で、前段階の病変の遺伝学的変化を伴いながら新たな変化が加わり進展するものと示唆された。

(3) 高速高感度セルソーターによる末梢血中

子宮頸癌細胞の検出：

SCC 抗原は正常な扁平上皮にも存在する。採血時に表皮の扁平上皮細胞が混入することが分かっているが、今回使用したような高感度のフローサイトメトリーを使用して SCC 抗原陽性細胞をソーティングし、染色して観察を行えば容易に確認が出来るので、将来癌転移予測診断に応用することが可能だと考えられる。

(4) テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性：

DN-hTERT 遺伝子導入による telomerase 維持の破壊によりヒト白血病細胞のアポトーシス誘導が確認され、hTERT を分子標的とする白血病の遺伝子治療の有効性が示唆された。

(5) テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と婦人科がんの遺伝子治療への応用：

テロメラーゼ活性化のメカニズムの一端が解明された。またテロメラーゼ活性を制御することで癌細胞の増殖がコントロール出来る可能性も示された。さらに癌特異性の極めて高い hTERT プロモーターが癌の遺伝子治療用のベクターに応用出来ることが明らかになった。

(6) 子宮体がんの分子診断・治療法の開発：

HDAC 阻害剤を用いた婦人科癌に対する新規分子標的療法の可能性が示唆された。また子宮内膜細胞において、K-および H-Ras は独自の機能を有し、両シグナルの活性化が癌化に重要であることが判明した。

(7) 子宮体癌の CGH 法に基づく診断・治療法の開発：

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し、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ことがわかった。また子宮体癌の約 30% に遺伝的不安定性を認めた。さらに PTEN 遺伝子の変異が子宮内膜癌発癌に重要であると考えられ、一方、TGF β RII, BAX 遺伝子の変異の発癌への関与は限られていることが示唆された。遺伝的不安定性を示す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、また、その予後は遺伝的不安定性のない内膜癌に較べて良好と考えられた。

(8) 子宮体癌予後因子としての癌関連遺伝子・ホルモンレセプター発現の検索と、統計学的検討：

子宮体癌の予後因子として、PR, p53 の有用性が示された。特にリンパ節転移との関連が認められ、今後この因子をターゲットとした治療法開発への応用や、臨床的にもリンパ節廓性の検討項目に用いる可能性が示唆された。

(9) 卵巣癌のパクリタキセル耐性機構の解明に関する研究：

マイクロアレイ解析によりパクリタキセル耐性誘導卵巣癌細胞株においてシスプラチン耐性株と異なった遺伝子の発現パターンを認めた。今後これらの遺伝子のパクリタキセル耐性化機構への関与について更なる実験を進

めていく予定である。

(10) 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索：

子宮頸癌発生には HPV 感染が一義的な役割を担い、外陰癌発生には p53 遺伝子の何らかの変化が主体となっている可能性が示唆され、膣癌はその中間的性質を持つものと考察された。これら、発生の有力因子の違いを追及することは、早期診断、治療法開発の一助に成りうると思われた。

(11) 婦人科がんにおける血管新生とその制御：

婦人科癌における増殖や進展に関わる血管新生の特徴には、臓器特異性や進展時期による特異性がある。これらを解明し、癌による血管新生に対する制御の臨床戦略の基礎が確立しつつある。今後さらに、血管新生因子の情報伝達を含めた血管新生の制御を包括した臨床戦略を開発し、より効率の良い tumor dormancy 治療を確立したい。

(12) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発：

HLA-A24 患者に対しては 7 分子由来の 13 ペプチドから、また HLA-A2 患者に対しては 8 分子由来の 16 ペプチドより患者にもっとも適したワクチンを選択し、最大 4 種まで同時に投与する第 2 世代の癌ワクチンの開発がスタートしたところである。今後、詳細な免疫学的解析や臨床効果の判定が行われ、総合的な評価を行う予定である。

F.健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, Okamoto A, Nakayama H, Aoki D, Yamamoto K, Hata H, Sugishita T, Tenjin Y. Telomerase Activity in Gynecological Tumors. *Oncology Reports* 7: 1003-1009, 2000
2. Tanaka, S., Tsuda, N., Kawano, K., Sakamoto, M., Nishida, T., Hashimoto, T., Shichijo, S., Kamura, T., and Itoh, K. : EXPRESSION OF TUMOR-REJECTION ANTIGEN IN GYNECOLOGIC CANCERS. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 1177-1184, 2000
3. 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* 59: 50-56, 2000.
4. 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

5. 坂本 優 編集. 第 11 回日本サイトメトリー学会技術講習会テキスト. 発行: 日本サイトメトリー学会 P. 1-68, 2000
6. 坂本 優, 室谷哲弥, 杉下 匡. 卵巣癌. *Flow cytometry. 応用サイトメトリー.* P. 104-107, 2000
7. 坂本 優, 近藤亜矢子, 田中忠夫. FISH を取り入れた応用. *Laser scanning cytometry (LSC). 応用サイトメトリー.* P. 154-159, 2000
8. 坂本 優, 秋谷 司, 杉下 匡. 婦人科腫瘍. *Fluorescence in situ hybridization (FISH).* 応用サイトメトリー. P. 278-285, 2000
9. 坂本 優, 岩渕浩之, 天神美夫. 原理. *Comparative genomic hybridization (CGH).* 応用サイトメトリー. P. 294-297, 2000
10. 坂本 優, 近藤亜矢子, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷司, 岩渕浩之, 室谷哲弥, 杉下 匡, 天神美夫, 田中忠夫. フローサイトメトリー. *細胞診—21 世紀への展望. 臨床検査.* 44 (11) 1423-1433, 2000
11. 岩渕浩之, 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): 1-7, 2000.
12. Y. Suminami, S. Nagashima, A. Murakami, S. Nawata, T. Gondo, H. Hirakawa, F. Numa, G.A. Silverman, H. Kato. Suppression of a squamous cell carcinoma-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res.* (in press).
13. A. Murakami, Y. Suminami, H. Hirakawa, S. Nawata, F. Numa, H. Kato. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Brit. J. Cancer* (in press).
14. S. Nawata, Y. Suminami, A. Murakami, H. Hirakawa, H. Ogata, F. Numa, M. Fujimoto, T. Tanaka, K. Nakamura, H. Kato. Nondenaturing two-dimensional electrophoretic analysis of loop-sheet polymerization of serpin, squamous cell carcinoma antigen-2. *Electrophoresis* 22: 161-164, 2000
15. Y. Suminami, S. Nagashima, N.L. Vujanovic, K. Hirabayashi, H. Kato, T.L. Whiteside. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Brit. J. Cancer* 82: 981-989, 2000.
16. A. Murakami, Y. Suminami, Y. Sakaguchi, S. Nawata., F. Numa, F. Kishi, H. Kato. Specific

- Detection and Quantitation of SCC Antigen-1 and SCC Antigen-2 mRNA by Fluorescence-based Asymmetric Semi-nested Reverse Transcription-PCR. *Tumor Biol.* 21: 224-234, 2000
1. Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, Takada S, Takagi N, Arima T, Wake N, Kamimura K, Satomura K, Hermann R, Bonthron DT, Hayashizaki Y : The cell cycle control gene ZAC/PLAG1 is imprinted - a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. : *Human Mol. Genetics*, 9, 3,453-460 (2000)
 - 18.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)
 - 19.Ueoka Y, Kato K, Kuriaki Y, Horiuchi S, Terao Y, Nishida J, Ueno H, Wake N : Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras-mediated pathway. : *Br. J. Cancer* , 84, 4, 891-899 (2000)
 - 20.Matsui H, Sekiya S, Hando T, Wake N and Tomoda Y : Hydatidiform mole coexistent with a twin live fetus : a national collaborative study in Japan. : *Human Reproduction* 15, 3, 608-611 (2000)
 - 21.Shigematsu T, Kamura T, Arima T, Wake N, Nakano H : DNA polymorphism analysis of a pure non-gestational choriocarcinoma of the ovary : case report. : *Eur. J. Gynaec. Oncol.* 21,153-154
 - 22.Arima T, Drewell RA, Oshimura M, Wake N, Surani MA : A Novel imprinted gene, HYMAI is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing ZAC. : *Genomics* 67, 248-255 (2000)
 - 23.Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y and Takenoshita S : Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer : *Cancer Research* 60, 4507-4512 (2000)
 - 24.Murakami A, Yamayoshi A, Iwase R, Nishida J, Yamaoka T, Wake N : Photodynamic antisense regulation (PDAR) of human cervical carcinoma cell growth using psoralen-conjugated oligo (nucleoside phosphorothioate). : *European Journal of Pharmaceutical Science* (2000) in pres
 - 25.Minamiguchi, H., Yahata, N., Kimura, T, Fujiki, H., Harada, S., Wang, J., Okuda, K., Kaneko, H., Hodohara, K., Banba, T., Yasukawa, K., Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K., Abe, T., and Sonoda, Y., Interleukin 6 receptor expression by human cord blood- or peripheral blood-derived primitive haematopoietic progenitors implies acquisition of different functional properties. *British Journal of Haematology*, 110, 327-338, 2000.
 - 26.Itoi, T., Shinohara, Y., Takeda, K., Takei, K., Ohno, H., Ohyashiki, K., Yahata, N., Ebihara, Y., and Saito, T., Detection of telomerase activity in biopsy specimens for diagnosis of biliary tract cancers. *Gastrointestinal Endoscopy*, 52,380-386, 2000.
 - 27.Dejimek, A., Yahata, N., Ohyashiki, K., Kakihana, M., Hirano, T., Kawate, N., Kato, H., and Ebihara, Y., Correlation between morphology and telomerase activity in cells from exfoliative lung cytologic specimens. *Cancer*, 90, 117-125, 2000.
 - 28.Ohyashiki K., Iwama, H., Tauchi, T., Shimamoto, T., Hayashi, S., Ando, K., Kawakubo, K., and Ohyashiki, J.H., Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia: Based on our experience. *Leukemia and Lymphoma*, 40, 49-56, 2000.
 - 29.Dejimek, A., Yahata, N., Ohyashiki, K., Ebihara, Y., Kakihana, M., Hirano, T., Kawate, N., and Kato, H., In situ telomerase activity in pleural effusions: A promising marker for malignancy. *Diagnostic Cytopathology*, 24, 11-15, 2001.
 - 30.Itoi, T., Shinohara, Y., Takeda, K., Nakamura, K., Shimizu, M., Ohyashiki, K., Hisatomi, H., Nakano, H., and Moriyasu, F., Detection of telomerase reverse transcriptase mRNA in biopsy specimens and bile for diagnosis of biliary tract cancers. *International Journal of Molecular Medicine*, 2001, in press.
 - 31.Ohyashiki, K., Iwama, H., Yahata, N., Tauchi, T., Kawakubo, K., Shimamoto, T., Ohyashiki, J.H., Telomere dynamics in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. *Leukemia and Lymphoma*, 2001, in press.
 - 32.Shimamoto, T., Tomoda, A., Ando, K., and Ohyashiki, K., Antitumor effects of a novel phenoxazine derivative on human leukemia cell lines in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 2001, in press.
 - 33.Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Taira T, Kanaya T, Itoh H3 Yutsudo M, Ariga H, and Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Nucleic Acids Res.* 28: 669-677, 2000.
 - 34.Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M. Granulocyte-colony stimulating factor- and

- interleukin-6-producing cervical cancer: The aggressive tumor growth by possible autocrine fashion. *Gynecol Oncol* 78: 383-387, 2000.
35. Kyo S. Expression and regulation of telomerase activity in normal and cancer cells. Review Article. *Recent Research Development in Cancer*, (Transworld Research Network), in press.
 36. Kyo S, Takakura M, Inoue M. Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic target. Review Article. *Histol. Histopathol.* 15, 813-824. 2000
 37. Kitagawa Y, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Koshida K, Namiki M, Inoue M. Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT. *Clin. Cancer Res.* 6: 2868-2875, 2000.
 38. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kiragawa Y, Inoue M. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of hTERT transcription. *Clin. Cancer Res.* 6: 1239-1247, 2000.
 39. Yang H, Kyo S, Takakura M, Sun L. Autocrine transforming growth factor b supresses activity and hTERT transcription in human cancer cells. *Cell Growth Differentiaton*, in press
 40. Koga S, Hirohata S, Kondo Y, Komata T, Takakura M, Inoue M, Kyo S, Kondo S. A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter. *Hum Gene Ther.* 10:1397-1406, 2000.
 41. Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, Takahashi M and Inoue M. Identification and characterization of negative regulatory elements of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: Possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res.* 13: 2557-2562, 2000.
 42. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, Fujiwara M, Hayakawa J, Ohmichi M, Kolke K and Inoue M. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression via activation of MAP kinase signaling pathway. *Cancer Res* 60: 5359-5364, 2000.
 43. Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. Tumor-specific transgene expression from hTERT promoter: Targeting pharmaceutical effects of the Bax gene to cancer. *Cancer Res* 60: 5359-5364, 2000.
 44. Komata T, Kondo Y, Hirohata S, Koga S, Srinivasula SM, Alnemri ES, Barna BP, Takakura M, Inoue M, Kyo S and Kondo S. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene. *Cancer Res*, in press.
 45. Fujimoto J, et al.: The value of platelet-derived endothelial cell growth factor as a novel predictor of advancement of uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:3662-3665.
 46. Fujimoto J, et al.: Clinical implication of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:2632-2635.3.
 47. N. Seki, A. Yamada, Y. Suefuji, T. Mine, S. Tanaka, S. Gomi, N. Kawagoe, K. Koufuji, and K. Itoh. Establishment and epitope analysis of allo-specific cytotoxic T lymphocytes at a tumor site recognizing a spouse's HLA-A0206 molecule. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 43: 167-173, 2000.
 48. H. Kawagoe, A. Yamada, H. Matsumoto, M. Itoh, K. Ushijima, T. Nishida, and K. Itoh. Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncol.*, 76: 336-339, 2000.
 49. K. Harada, A. Yamada, T. Mine, N. Kawagoe, H. Takasu, and K. Itoh. Mouse homologue of human SART3 gene encoding tumor rejection antigen. *Jap. J. Cancer Res*, 91: 239-247, 2000.
 50. M. Nakao, S. Shichijo, T. Imazumi, Y. Inoue, K. Matsunaga, A. Yamada, M. Kikuchi, N. Tsuda, K. Ohta, S. Takamori, H. Yamana, H. Fujita, and K. Itoh. Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, 164: 2565-2575, 2000.
 51. K. Kawano, S. Gomi, K. Tanaka, T. Kamura, K. Itoh, and A. Yamada. Identification of a new endoplasmic reticulum-resident protein recognized by HLA-A24-restricted tumor infiltrating lymphocytes of lung cancer. *Cancer Res.*, 60: 3550-358, 2000.
 52. M. Ito, S. Shichijo, Y. Miyagi, T. Kobayashi, N. Tsuda, A. Yamada, N. Saito, and K. Itoh. Identification of SART3-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with different HLA-A2 subtypes. *Int. J. Cancer*, 88: 633-639, 2000.
 53. N. Tsuda, K. Murayama, H. Ishida, K. Matsunaga, S. Komiya, K. Itoh, and A. Yamada. Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by

- SART3-derived peptides. J. Orthopaed. Res., in press.
54. N. Harashima, K. Tanaka, T. Sasadomi, K. Shimizu, Y. Miyagi, A. Yamada, M. Tamura, H. Yamana, K. Itoh, and S. Shichijo. Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by cytotoxic T lymphocytes of metastatic cancer patients. Eur. J. Immunol., in press.
2. 学会発表
1. 坂本 優, 菊池義公, 河崎恵子, 後藤友子, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷 司, 岩淵浩之, 室谷哲弥, 杉下 匡, 天神美夫, 田中忠夫: マイクロアレイ法によるシスプラチン耐性卵巣癌細胞の遺伝子発現プロファイルの検討. 第5回日本産婦人科腫瘍マーカー・遺伝子診断学会, 2000.2.1-2
 2. 坂本 優, 近藤亜矢子, 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, 田中忠夫: 子宮頸部病変のDNA解析, とくにDNA量, PIピーク値と細胞形態との相関. 第5回日本産婦人科腫瘍マーカー・遺伝子診断学会, 2000.2.1-2
 3. T. Muroya, K. Kawasaki, T. Kunugi, T. Akiya, H. Iwabuchi, H. Sakunaga, M. Sakamoto, T. Sugishita, Y. Tenjin: PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) FOR UTERINE CERVICAL CANCER. 4th INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONGRESS, 2000.4.5-9
 4. M. Sakamoto, H. Sakamoto, K. Kawasaki, T. Akiya, H. Iwabuchi, T. Muroya, T. Noda, T. Sugishita, Y. Tenjin, and T. Tanaka: GENETIC ANALYSIS OF DYSPLASIAS AND CANCER OF THE UTERINE CERVIX USING CGH, FISH AND RT-PCR. International Society of Analytical Cytology, フランス, 2000.5.24
 5. 坂本 優: 細胞診とサイトメトリー (ランチョンセミナー). 第41回日本臨床細胞学会総会, 東京, 2000.6.1-2
 6. 坂本 優, 坂本宙子, 河崎恵子, 秋谷 司, 岩淵浩之, 室谷哲弥, 野田哲生, 杉下 匡, 天神美夫: CGH法による子宮頸癌の発生・浸潤・転移過程に関する遺伝学的変化の検索 (シンポジウム). 第24回日本リンパ学会総会, 2000.6.23-24
 7. 小屋松安子, 福田耕一, 岩井京子, 岩坂 剛, 坂本 優, 室谷哲弥, 杉下 匡, 天神美夫: 子宮体癌におけるリンパ節転移とその術前推定因子について. 第24回日本リンパ学会総会, 2000.6.23-24
 8. 河崎恵子, 馬屋原健司, 加藤 紘, 坂本 優, 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テロメラーゼ活性と増殖能の相関 (ワークショップ). 日本産婦人科テロメラーゼ研究会第3回学術集会, 2000.7.23
 9. 坂本 優: 分子腫瘍学の進歩とサイトメトリー (特別講演). 第10回日本サイトメトリー学会総会, 東京, 2000.8.5-6
 10. 近藤亜矢子, 坂本 優, 小屋松安子, 三宅清彦, 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 (第二報). 第10回日本サイトメトリー学会総会, 東京, 2000.8.5-6
 11. 小屋松安子, 坂本 優, 岩井京子, 福田耕一: 子宮体癌予後因子としての, リンパ節転移に関する諸因子の多角的検討. 第10回サイトメトリー学会, 東京, 2000.8.5-6
 12. 小屋松安子, 坂本 優, 岩井京子, 福田耕一: 子宮体癌における術前頸部細胞診の臨床病理学的意義. 第8回日本がん検診・診断学会, 熊本, 2000.8.31-9.1
 13. 坂本 優: マイクロアレイ法による抗癌剤耐性卵巣癌細胞の遺伝子発現プロファイルの解析. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 2000.10.4
 14. Muroya, T., Miyake, K., Koyamatsu, Y., Akiya, T., Iwabuchi, H., Sakamoto, M., Sugishita, T., Tenjin, Y.: RESULTS OF PDT APPLIED TO CERVICAL CANCER AND ITS PERSPECTIVE. The 5th International Porphyrin-Heme Symposium, 2000.10.20-21
 15. 秋谷 司, 三宅清彦, 小屋松安子, 岩淵浩之, 坂本 優, 室谷哲弥, 天神美夫: 婦人科領域における PDT と安全性について. 第21回日本レーザー医学会総会, 2000.11.8-10
 16. 室谷哲弥, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷 司, 岩淵浩之, 坂本 優, 天神美夫: PDT の新しい試み・・・進行子宮頸癌に対する化学療法との併用. 第21回日本レーザー医学会総会, 2000.11.8-10
 17. 坂本 優, 近藤亜矢子, 河崎恵子, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷 司, 岩淵浩之, 室谷哲弥, 杉下 匡, 天神美夫: 細胞診の精度向上に寄与する新技術-LSC と In situ TRAP 法 (シンポジウム). 第39回日本臨床細胞学会秋期大会, 2000.11.17-18
 18. 坂本 優: 会長. 第11回日本サイトメトリー学会技術講習会, 2000.11.25-26 馬屋原健司, 平川宏, 末広寛, 縄田修吾, 尾縣秀信, 住浪義則, 沼文隆, 加藤 紘: 子宮頸部初期病変に対し DOP-PCR CGH法を用いた細胞遺伝学的検索 第52回日本産科婦人科学会学術講演会 2000, 4 徳島
 19. 縄田修吾, 住浪義則, 平川宏, 村上明弘, 末広寛, 馬屋原健司, 尾縣秀信, 沼文隆, 加藤 紘: ケラチノサイトにおける扁平上皮癌関連蛋白 SCC 抗原の発現に関する検討 第52回日本産科婦人科学会学術講演会 2000. 4 徳島
 20. Y. Suminami, F. Numa, H. Kato: Squamous cell carcinoma related serpin, SCC antigen-1, inhibits NK cell infiltration to tumor 2000. 9 XXVIIIth ISOBM Meeting Munich
 21. 住浪義則, 長島茂樹, 縄田修吾, 平川宏, 沼文隆, 加藤 紘: 扁平上皮癌関連セルピン, SCC 抗原-1に

- よる NK 細胞化学遊走性阻止 第 59 回日本癌学会
総会 2000.10 横浜
22. 平川宏、住浪義則、河崎恵子、末広寛、馬屋原健司、
縄田修吾、尾縣秀信、沼文隆、加藤紘: SCC 抗原 mRNA
を用いた子宮頸癌患者における末梢血中腫瘍細胞の
検出 第 38 回日本癌治療学会総会 2000.10 仙台
 23. 田内哲三、中嶋晃弘、住 昌彦、指田吾郎、嶋本隆
司、大屋敷一馬、大屋敷純子、阿部健司、山本興太
郎: hTERT を分子標的とする白血病の遺伝子治療の
基礎研究. Japanese Journal of Cancer Research 91:
229, 2000.
 24. 中嶋晃弘、田内哲三、大屋敷一馬: チロシンホスフ
ァターゼ阻害剤 STI571 による Ph 陽性白血病のアポ
トーシス誘導: 分子標的療法としての拡大に向けて。
Japanese Journal of Cancer Research 91: 229,
2000.
 25. Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Shimamoto T,
Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: Telomere
shortening and apoptosis in telomerase-inhibited
human acute lymphoblastic leukemia cells. Blood
96: 750a, 2000.
 26. Tauchi T, Nakajima A, Sashida G, Shimamoto T,
Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: Inhibition of
human telomerase in BCR-ABL transformed cells
to progressive telomere shortening and cell death.
Blood 96: 740a, 2000.
 27. 京 哲: 子宮内膜におけるテロメラーゼ発現とそ
の異常および発現制御機構の解析. 第 52 回日本産
婦人科学会シンポジウム (徳島) 2000.4.2
 28. 高倉 正博、京 哲、金谷 太郎、王 卓、井上 正
樹: ヒストンのアセチル化は子宮頸癌におけるテロ
メラーゼ活性化に寄与する. 第 52 回日本産婦人科
学会 (徳島)、2000.4.3
 29. 京 哲: テロメラーゼ活性の発現制御機構の解析
と癌の遺伝子治療への応用. 大阪大学医学部生理化
学談話会、2000.5.26
 30. 京 哲: テロメラーゼ活性の発現制御機構の解析
と癌の遺伝子治療への応用. 金沢大学十全医学会総
会、シンポジウム、2000.6.3
 31. Kyo S.: Regulation of telomerase activity by sex
steroid hormones. Geron symposium (Telomere
and telomerase dynamics in cancer and aging) (サ
ンフランシスコ) 2000.6.25
 32. 毎田 佳子、京 哲、王 卓、高倉 正博、谷田
部 典之、田中 政彰、井上 正樹: 性ステロイド
ホルモンによるテロメラーゼ活性の制御機構. 日本
産婦人科テロメラーゼ研究会 (東京)、2000.7.23
 33. 谷田部 典之、京 哲、毎田 佳子、王 卓、高
倉 正博、田中 政彰、井上 正樹: hTR に対する
2-5A システムを付加した新しいアンチセンス療法.
日本産婦人科テロメラーゼ研究会 (東京)、
2000.7.23
 34. 京 哲、井上 正樹: テロメラーゼ研究の新展開.
第 回日本婦人科腫瘍学会、特別講演 (名古屋)
2000.7.29
 35. 京 哲: テロメラーゼ活性化機構の解明と癌の遺
伝子治療への応用. 第 10 回日本サイトメトリー学会
ワークショップ (東京) 2000.8.6
 36. 子宮内膜病変の自然史と遺伝子学的診断 京 哲、
第 17 回日本臨床細胞学会北陸支部連合会学術集会、
シンポジウム、2000.9.10
 37. 京 哲、王 卓、高倉 正博、田中 政彰、谷田
部 典之、毎田 佳子、井上 正樹: 性ステロイドに
よるテロメラーゼ活性調節機構の解析. 第 59 回日
本癌学会 ミニシンポジウム (横浜) 2000.10.4
 38. Fujimoto J, et al.: Angiogenesis in female
genital tract. 5 th World Congress of Advances in
Oncology, Crete, Greece, 10.19-21, 2000
 39. 藤本次良: 女性生殖器癌における血管新生とその制
御. 第 6 回北陸婦人科腫瘍講演会、金沢、2000.9.9
 40. 藤本次良、他: 子宮頸癌における血管新生とその特
徴. 第 59 回日本癌学会、横浜、2000.10.4-7
 41. 合原るみ、力丸徹、一木昌郎、松永和子、今井伸恵、
山田亮、大泉耕太郎、伊東恭悟: ペプチドワクチン
による高度進行肺癌治療の免疫学的評価. 第 59 回日、
横浜、2000.10.
 42. 伊東恭悟、山名秀明、七條茂樹、山田亮、合原るみ:
キラー T 細胞により認識される癌抗原ペプチド、遺
伝子同定から臨床研究へ. 第 59 回日本癌学会総会、
横浜、2000.10.
 43. 山田亮、河野光一郎、古賀真、伊東恭悟: HLA-A24
拘束性 CTL により認識される肺癌拒絶抗原をコード
する遺伝子の同定. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、
2000.10.
 44. 伊東恭悟、山名秀明、七條茂樹、山田亮、嘉村敏治、
大泉耕太郎、白水和雄: 難治性癌に対するペプチド
による癌特異免疫療法の可能性. 第 59 回日本癌学会
総会、横浜、2000.10.
 45. 津田尚武、村山久美子、石田漂太、松永和子、小宮
節朗、伊東恭悟、山田亮: ヒト骨髄腫における癌拒
絶抗原(SART3)の発現. 第 59 回日本癌学会総会、横
浜、2000.10.
 46. Itoh K, Shichijo S, Yamada A, Yamana H :
Peptides on tumor cells. From genes to clinical
research. 第 30 回日本免疫学会学術集会、仙台、
2000.11.
 47. 原田健司、山田亮、Yang Damu, 伊東恭悟、七條
茂樹: ヒト癌拒絶抗原 SART3 の機能解析. 第 30 回
日本免疫学会学術集会、仙台、2000.11.
 48. 今井伸恵、原嶋奈々江、山田亮、七條茂樹、伊東恭
悟: 転移性癌疾患における p56kk 由来ペプチドによ
る HLA-A2 拘束性癌特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導.
第 30 回日本免疫学会学術集会、仙台、2000.11.
 49. 大河内真也、山田亮、伊東恭悟: サイクロフィリン
B 由来癌抗原ペプチドに対する 1 型アレルギーの解
析. 第 30 回日本免疫学会学術集会、仙台、2000.11.

50. 今井伸憲, 合原るみ, カ丸徹, 山田亮, 山名秀明,
伊東恭悟: ペプチドワクチンによる高度進行肺癌の
免疫学的評価. 第13回日本バイオセラピー学会学術
集会総会, 京都, 2000.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号: 特願 2000-304155 号

出願日: 平成12年10月3日

発明の名称: 腫瘍抗原

発明者: 伊東恭悟、山田 亮

特許出願人: 伊東恭悟

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

1. CGHとマイクロアレイを用いた婦人科がんの

遺伝子診断に関する研究

坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

2. 子宮頸がんにおける細胞外SCC抗原発現の検討

住浪 義則 山口大学医学部産婦人科 講師

3. 子宮体がんの分子診断・治療法の開発

和氣 徳夫 九州大学生体防御医学研究所産婦人科 教授

4. テロメラーゼをターゲットとした遺伝子治療の可能性と安全性

大屋敷 一馬 東京医科大学第一内科 教授

5. テロメラーゼ活性化の分子機構の解明と

婦人科がんの遺伝子治療への応用

京 哲 金沢大学医学部産婦人科 講師

6. 女性生殖器がんにおける血管新生とその制御

藤本 次良 岐阜大学医学部産婦人科 講師

7. 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発

山田 亮 久留米大学医学部免疫学 助教授