

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）
分担研究報告書

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

分担研究者：坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長
研究協力者：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 医員
小屋松安子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医員
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 医員
近藤亜矢子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 研究員

研究要旨

本研究班は婦人科癌の発生・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) 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：

婦人科癌の発生および予後の因子となる遺伝子群の解明を目的とし、cDNA マイクロアレイ法を用いて子宮頸部腺癌由来培養細胞株と正常子宮頸部組織との間での癌関連遺伝子の発現量を比較した。また抗癌剤療法感受性・耐性を示した卵巣癌臨床症例間、および浸潤の有無を示した子宮頸癌症例間についても若干検討し、頸部の発癌・進展、および卵巣癌における抗癌剤耐性獲得に関わる遺伝子発現変化が明らかになりつつある。

(2) 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

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。

(3) 子宮体癌の CGH 法に基づく診断治療法の開発：

子宮体部腫瘍の症例につき新鮮凍結組織材料とその詳細な臨床情報を入手した。全症例につき臨床病理学的に検討し、前癌病変(子宮内膜増殖症)、初期癌、浸潤癌、転移を伴う癌の 4 群に分類した。類内膜型子宮体癌には、癌巣周囲に内膜増殖症を伴うホルモン依存型の亜型と、内膜増殖症を伴わないホルモン非依存型の亜型の少なくとも二つの亜型が存在し、日本人症例では、後者のホルモン非依存型亜型を相当数認めた。また入手した子宮体癌の約 30%に遺伝的不安定性を認め、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と考えられた。一方、TGFβRII, BAX 遺伝子の変異は、遺伝的不安定性を認める場合にも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。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、その予後は比較的良好と考えられた。

(4) 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：

近年、婦人科癌の中で比率の増加を認める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、各ホルモンレセプター、癌関連遺伝子の発現を抽出組織 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、Progesterone receptor と p53 の腫瘍進展・増殖への関与と、臨床的治療法への応用の可能性を見出し得た。

(5) 卵巣癌のバクリタキセル耐性機構の解明に関する研究：

バクリタキセル耐性機構解析を目的とし、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 と、これらの株より誘導されたバクリタキセル耐性株 KFTx、KFrTx より 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した。KF-KFTx、KFr-KFrTx 両系列における遺伝子発現の比較を行い、各々 5~10 個の遺伝子群で 2 倍以上の発現増加、あるいは低下を認めた。そのうち両系列に共通して 5 倍以上の発現差がみられた遺伝子は、MDR1, IGFBP-3, Rho GDI であった。これらの遺伝子は KF-KFr 系列でのシスプラチン耐性獲得により変化する遺伝子群とは異なり、バ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。

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

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し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。

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：

癌は正常細胞が遺伝子変化の蓄積を伴い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、発現変動した遺伝子群の同定が可能となる cDNA マイクロアレイ法を使用して、婦人科癌の発生およ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した。

(2) 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

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 量の測定が、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、高感度のフローサイトメトリー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を試みた。

(3) 子宮体癌の CGH 法に基づいた診断・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、未だ前癌病変の実体把握と理解が十分でなく、発癌過程の詳細も不明である。そこで、体癌症例につき遺伝的不安定性の有無等を検索し、遺伝的不安定性の発癌への関与の可能性につき検討した。またゲノム全体にわたり遺伝子コピー数の変化の有無を検索できる CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法により、体部発癌過程における分子遺伝学的特徴を解析し、診断および治療法選択に結びつけるマーカーを検索することを目的とした。

(4) 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の発現の検索と、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出すことを目的とした。

(5) 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課題である。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いる。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、その耐性獲得機構についての解明が待たれている。よってパクリタキセル耐性機構の解析を目的とし、cDNA マイクロアレイ法を用い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。

(6) 膣癌・外陰癌における遺伝子変化と HPV 16/18 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出すことを目的とした。

B. 研究方法

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：

術後、化学療法および放射線療法に抵抗性を有し、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 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プローブとした。2つのプローブを同量用いて 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例と抗癌剤療法に耐性を示した2例の癌組織サンプルの比較、および臨床診断が子宮頸部上皮内癌であった3例と子宮頸部扁平上皮浸潤癌3例の癌組織サンプルの比較も行なった。

2. 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

子宮頸部扁平上皮患者から、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。

3. 子宮体癌の CGH 法に基づいた診断・治療法の開発：

子宮体部腫瘍手術例から新鮮組織材料を採取し、各種測定や DNA 抽出、組織型確認のため凍結保存した。まず各症例の腫瘍組織より抽出した DNA につき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 のエクソン中の変異を 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、遺伝子コピー数変化との相互関連性を解析した。さらに、各症例につき 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、および内膜間質組織のアロマターゼ測定を実施した。なお検討した全症例につき、臨床病理学的検討を行い、前癌病変(子宮内膜増殖症)、初期癌、浸潤癌、転移を伴う癌の4群に分類し、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。

4. 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の発現の検索と、統計学的検討：

手術治療時にリンパ節廓清を施行した子宮体癌 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。

5. 卵巣癌のバ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、および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バクリタキセル耐性株 KFTx (11.5 倍 Tx 耐性)、および KFrTx (4.88 倍 Tx 耐性) のそれぞれより 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。

6. 腫瘍・外陰癌における遺伝子変化と HPV16/18 DNA の検索：

腫瘍 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、PCR により HPV DNA の検出を行い、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 I 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。

(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て本研究を行った。

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が認められた。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 (BIG3 など) などがあつた。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多数の遺伝子が認められた。

さらに、臨床卵巣癌症例、臨床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予定である。

2. 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

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。

3. 子宮体癌の CGH 法に基づいた診断・治療法の開発：

臨床病理学的検討により、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。また病理組織学的には、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た。ま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わかった。また解析した体癌症例の 30% 弱に遺伝的不安定性がみられた。CGH 法により全染色体上の遺伝子コピー数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コピー数変異に数が少ない傾向にあつた。また子宮内膜癌において、PTEN 遺伝子の変異を高率に認めた。遺伝的不安定性を認めた子宮内膜癌の 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。以上より PTEN 遺伝子の変異は子宮内膜癌の発癌過程に深く関わると考えられた。一方 TGF β RII、および BAX 遺伝子の変異は、遺伝的不安定性を認めた症例においても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た。さらに、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。 β -catenin の異常蓄積は、遺伝的不安定性を示す症例で高率にみられたが、PTEN 遺伝子変異の有無とは相関しなかつた。さらに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では PTEN の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にあつた。

4. 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 であつた。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 ($p=0.0025$)。

5. 卵巣癌のバクリタキセル耐性機構の解明に関する研究：

557 種類の遺伝子のうち 2 倍以上の発現差が認められたものは、KF—KFTx 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—KFrTx の比較では、増加 10 個、低下 8 個であつた。そのうち両系列に共通して変化を認め、かつ 5 倍以上の発現差を示した遺伝子が 3 個あり、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 KF-KFr でシスプラチン耐性による遺伝子発現を比較した結果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。

6. 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18DNA 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%、膣癌では各々 43.7%、18.7%、外陰癌では 12.8%、61.2% であり、頸部→膣部→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。

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が認められた。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 (BIGH3 など) などがあつた。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多数の遺伝子が認められた。さらに、卵巣癌症例、子宮頸癌症例でも発現が変化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、臨床に役立てたいと考える。(坂本、近藤)

2. 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

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が認められたことから、高感度のフローサイトメトリーにより末梢血中の癌細胞が捕らえられる可能性が示唆された。(住浪、三宅、近藤)

3. 子宮体癌の CGH 法に基づいた診断・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)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では欧米で重視される肥満、糖尿病との関連が明らかでない、(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等、今後解明、解決すべき問題点が多い。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の 2 型が存在することを明らかにした。これら 2 亜型につき、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、簡便・高精度の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。

(平井)

4. 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：

検索した分子生物学的因子と、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。(小屋松)

5. 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。しかしその抗腫瘍効果は、残存腫瘍細胞のパクリタキセル耐性獲得による限界があり、耐性化については MDR1 等の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 マイクロアレイを用いた解析により、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 の高度な発現増加を認めた。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。(後藤、菊池)

6. 膣癌・外陰癌における、遺伝子変化と HPV16/18DNA 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。(小屋松)

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. 高速高感度セルソーターによる末梢血中扁平上皮癌細胞検出の検討：

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、将来臨床診断に応用することが可能だと考えられる。

3. 子宮体癌の CGH 法に基づいた診断・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、後者のホルモン非依存型の亜型が相当数含まれることが明らかになった。また子宮内膜癌において PTEN 遺伝子変異は、発癌過程に深く関わると考えられる一方、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。また遺伝的不安定性をもつ症例の予後は、遺伝的不安定性を認めない内膜癌に較べて良好と考えられた。

4. 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。

5. 卵巣癌のバ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バ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バ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。

6. 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考えた。

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. 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. (Submitted)
1. 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
7. 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
8. 坂本 優, 近藤垂矢子, 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
9. 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
10. 坂本 優, 岩淵浩之, 天神美夫, 原理. Comparative genomic hybridization (CGH). *応用サイトメトリー.* P. 294-297, 2000
11. 坂本 優, 近藤垂矢子, 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. 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
12. 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): 1-7, 2000.

13. 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
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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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、岩渕浩之、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
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
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（がん克服戦略事業）
分担研究報告書

子宮頸がんにおける細胞外SCC抗原発現の検討

分担研究者：住浪 義則 山口大学医学部産婦人科 講師
研究協力者：縄田 修吾 山口大学医学部産婦人科 助手

研究要旨

SCC抗原（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。

A. 研究目的

- 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) SCCAを発現する腫瘍細胞を用いて nude mouseに皮下腫瘍を作成し、SCCAのantisenseをretrovirus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) 健康婦人及び上皮内癌、浸潤癌例の末梢血よりtotal RNAを精製する。これをtemplateにSCCA1、SCCA2 mRNA共に増幅できるプライマーを用いasymmetric semi-nested RT-PCRで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 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) 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を抑制する効果に加え、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。このときの細胞内の種々のcaspaseの変化を検討したところ、caspase2、caspase8は変化がなかったもののcaspase9、caspase3は明らかにSCCA1、SCCA2の存在で抑制されていた。またリン酸化された活性化p38 MAP kinaseはその上流の活性化MKKと共に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じ腫瘍の増大に関与している可能性が考えられた。
一方SCCA1遺伝子導入した腫瘍細胞をヌードマウスに埋め込んだ腫瘍では腫瘍内単核球が低下し、SCCAのantisenseをstable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より、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。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、濃度依存的に抑制された。またSCCA1のreactive site loopにアミノ酸変異を入れSCCA1のprotease inhibitorとしての活性を消失させるとこの化学遊走抑制は抑えられた。上記データよりSCCAのantisenseをretrovirus vectorを用いてヌードマウスに埋め込んだ腫瘍細胞に導入したところ腫瘍の増殖が有意に抑制され、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。治療後約4週間目にはSCCA mRNAは検出されず、さらに半年後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。

3) 18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と考えられる領域よりそれぞれmicrodissection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。

D. 考察

1) 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SCCA発現は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) 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

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。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

5.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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

子宮体がんの分子診断・治療法の開発

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) 婦人科癌に対するHDAC阻害剤を用いた、新たな分子標的療法を開発するため、その細胞老化誘導能及び分子機構を解析した。その結果、HDAC阻害剤はp53非依存性にp21発現を誘導し、細胞老化を導くことが判明した。p21下流でpRb脱リン酸化フォームへのシフトは細胞老化誘導に必ずしも重要な働きをしないことが判明した。

2) 子宮内膜細胞におけるK-或いはH-Rasを介するシグナル伝達は、独自の機能を有することを明らかにした。K-Rasはアポトーシスの誘導に、H-Rasを介するシグナルはその回避に機能することが示唆された。

A. 研究目的

1. HDAC阻害剤を用いた分子標的療法の可能性を評価する。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。
2. 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。

B. 研究方法

1. HDAC阻害Sodium Butyrate (NaB) を子宮頸癌、体癌及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。

C. 研究結果

1. NaB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及び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は細胞増殖の亢進及びアポトーシスの誘導が観察された。[H61L] H-Ras導入により、細胞増殖の亢進及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及びAktは活性化された。

D. 考察

1. pRb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、癌分子標的療法の重要な手段と考えられた。
2. 子宮内膜細胞におけるK-及び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。

E. 結論

1. 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。
2. 子宮内膜細胞において、K-及び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。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 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, 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)
- 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. Cancer82, 2, 459-466 (2000)
- 3 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)
- 4 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)
- 5 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
(2000)
- 6 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)
 - 7 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)
 - 8 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
press

2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

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

分担研究者：大屋敷一馬 東京医科大学内科第一講座 教授
研究協力者：田内 哲三 東京医科大学内科第一講座

研究要旨

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。テロメラーゼ活性の主たる要素であるhTERTを標的にしたDominant Negative (DN) hTERT遺伝子発現レトロウイルスベクターを慢性骨髄性白血病急性転化白血病細胞株に遺伝子導入しその抗腫瘍効果を解析する。治療システムを組織培養や動物実験でその効果や安全性を確認しヒトでの臨床トライアルを計画する。

A. 研究目的

テロメラーゼ活性が人の各種臓器由来の悪性腫瘍の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たcatalytic activityの消失したhTERT変異体 (DN-hTERT) (Nature Med 5:1164, 1999) を造血器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が本研究の目的である。

B. 研究方法

- (1)DN-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する。
- (2)DN-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する。さらに抗癌剤との併用による治療効果の検証を行う。

C & D. 研究結果&考察

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、K562及びRat-1 BCR/ABLへ導入し抗腫瘍効果、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。

E. 結論

以上の結果より、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。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Dejlmeek, 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.
4. Ohyashiki, K., Iwama, H., Tauchi, T., Shimamoto, T., Hayashi, S., Ando, K., Kawakubo, K., and Ohyashiki, J.H., Telomere dynamics and genetic

特になし

- instability in disease progression of chronic myeloid leukemia: Based on our experience. *Leukemia and Lymphoma*, 40, 49-56, 2000.
5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.

2. 学会発表

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

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

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

分担研究者：京 哲 金沢大学医学部産婦人科 講師
研究協力者：田中 政彰 金沢大学医学部産婦人科 助手

研究要旨

あらゆる種類の癌の発生過程にはテロメラーゼの活性化が極めて重要な役割を演じていることが最近の研究で明らかになってきた。我々は本研究においてテロメラーゼ活性化の分子メカニズムを解明するための基礎的研究を行った。独自にクローニングしたテロメラーゼ遺伝子プロモーターを解析し、テロメラーゼ遺伝子発現を転写レベルで制御する分子機構を明らかにし、得られた知見を応用して婦人科癌のあらたな遺伝子治療の確立を試みた。

A. 研究目的

ヒト染色体DNA末端は数キロ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。おそらくテロメラーゼの発現は、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、テロメラーゼ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ラーゼ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ラーゼ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ラーゼ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。

B. 研究方法

テロメラーゼ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promoter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が、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ラーゼ活性の変化を検討した。

テロメラーゼ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

1 RNA特異的切断酵素を付加したアンチセンス法

ターゲットとしてはhTERTとhTRが考えられる。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antiense oligo (2-5A antisense oligo)を導入し、細胞増殖抑制効果を検討した。

2 テロメラーゼ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 promoterは癌細胞で特異的に転写活性を示すので、このpromoterを自殺遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の upstream に組み込んだベクターを作製し、細胞への導入を行い、癌細胞特異的に細胞死が誘導されるかを検討した。また導入遺伝子としてはcaspase やBaxを用いた。

C. 研究結果

- hTERT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抑制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。
- hTERT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。
- 2-5A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。
- hTERTプロモーターをcaspase 8およびBax遺伝子のupstream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。

D. 考察

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、今回の研究にて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て行きたい。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。この事実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、癌の遺伝子治療へもあらたな道を開く可能性がある。

我々が行った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。導入遺伝子も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つもりである。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Taira T, Kanaya T, Itoh H, 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.
2. 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.
3. 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.
4. Kyo S, Takakura M, Inoue M. Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic

target. Review Article. *Histol. Histopathol.* 15, 813-824, 2000

5. 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.
6. 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.
7. Yang H, Kyo S, Takakura M, Sun L. Autocrine transforming growth factor b suppresses activity and hTERT transcription in human cancer cells. *Cell Growth Differentiation*, in press
8. 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.
9. 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.
10. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, Fujiwara M, Hayakawa J, Ohmichi M, Koike 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.
11. 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.
12. 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.

2. 学会発表

1. 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 京 哲 第52回日本産婦人科学会シンポジウム(徳島)平成12年4月2日
2. 性ステロイドによるテロメラーゼ活性調節機構の解

析 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 第59回日
本癌学会 ミニシンポジウム (横浜) 平成12年
10月4日

3. テロメラーゼ研究の新展開 京 哲、井上 正樹
第 回日本婦人科腫瘍学会 特別講演 (名古屋) 平
成12年7月29日
4. Regulation of telomerase activity by sex steroid
hormones. Kyo S. Geron symposium (Telomere
and telomerase dynamics in cancer and aging) (サ
ンフランシスコ) 平成12年6月25日
5. 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、
シンポジウム平成12年9月10日
6. 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 京 哲、 第10回日本サイトメトリー学
会 ワークショップ (東京) 平成12年8月6日
7. 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 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 日本
産婦人科テロメラーゼ研究会 (東京) 平成12
年7月23日
8. 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 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
日本産婦人科テロメラーゼ研究会 (東京) 平
成12年7月23日
9. 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 高倉 正博、京 哲、金
谷 太郎、王 卓、井上 正樹 第52回日本産婦
人科学会 (徳島) 平成12年4月3日
10. 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 京 哲 金沢大学十全医学会
総会、シンポジウム、平成12年6月3日
11. 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 京 哲、 大阪大学医学部生理
化学談話会 平成12年5月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

女性生殖器がんにおける血管新生とその制御

分担研究者：藤本次良 岐阜大学医学部附属病院産科婦人科 講師

研究要旨

女性生殖器癌すなわち子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌における増殖や進展に関わる血管新生にはそれぞれ特徴がある。この点を血管新生因子の発現調節や血管新生における転写の機能調節の面から明らかにしている。これを基に血管新生の制御戦略を確立し、侵襲の少ない癌治療法を考案している。

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、その制御の基礎を確立することによって、血管新生の制御を先進医療に包括することである。癌の血管新生能を制御することによって、初期浸潤を生じる前に癌を制御したり、たとえ転移巣を有していても、転移巣を増殖進展させない、すなわち転移巣を休眠させる tumor dormancy 治療によって制癌する。このような戦略は過剰な手術侵襲や癌細胞選択性の少ない従来の癌化学療法による重篤な副作用が避けられるので、QOLが高く、より良い予後をもたらすと期待されている。

B. 研究方法

女性生殖器癌において、注目されている血管新生因子 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), angiopoietin などや血管新生に関与する転写因子 E26 transcription specific 1 (ets-1), HOXD3, chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor II (COUP-TF II), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) など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、その血管新生因子の機能を解析する。

(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するインフォームド・コンセントをすべての患者より得ている。

C & D. 研究結果&考察

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する。ところで、一般に子宮頸癌でリンパ節転移がある症例では予後は不良であるが、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。したがって、TP の基質である 5FU の前駆体は増殖進展と関与する血管新生能を制御し、奏効すると考えられる。また、子宮頸癌患者において、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、扁平上皮癌でも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、腫瘍内に浸潤してくる 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。そこで、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る。

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では、予後が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ータとなると考えられ、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る。

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節される 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。したがって、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ータとなると考えられる。

そこで、この点を活用し、子宮内膜癌の血管新生能は、progesterin や血管新生阻害剤である TNP470、人参の成分である ginsenoside Rb2、乳癌の治療薬である d lenogest, toremifene および ICI 182,780 で制御できることを明らかにした。

E. 結論

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。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 治療を確立する必要がある。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Fujimoto J, et al.: Clinical implication of expression of Interleikin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:2632-2635.3.

2. 学会発表

1. 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、9,9,2000
2. 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、10.4-7,2000
3. Fujimoto J, et al.: Angiogenesis in female genital tract. 5 th World Congress of Advances in Oncology, Crete, Greece, 10.19-21,2000

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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

分担研究者 山田 亮 久留米大学免疫学講座 助教授

研究要旨

我々は扁平上皮癌及び腺癌由来の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の同定を試みており、現時点までに約100個の分子を同定した。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）に対し第Ⅰ相試験が実施されている。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、現時点では有害事象は注射部位の発赤及び腫脹以外は認められていない。CypB（肺癌）及び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及び癌特異的CTL前駆細胞頻度が増加していた。SART2及び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及び腺癌患者各2名に対して実施され、その安全性が確認された。さらに、免疫学的な解析も実施され、1症例について細胞傷害性T細胞の誘導が認められた。臨床試験の免疫学的な評価をするための方法として、従来より行われているCTL前駆細胞頻度測定にかかわりうる簡便法の開発が行われた。この方法を導入することにより、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いて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スタートしている。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種類のペプチド及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ものである。また、HLA-A2患者を対象とするプロトコールでは、SART3, Lck, CypB, ppMAPkkk, WHSC2, UBE2V, HNRPL, EIF4EBPI由来の16種類のペプチドが用いられる。対象症例は肺癌、大腸癌、婦人科癌、胃癌及びその他の癌（口腔癌、皮膚癌、腎臓癌など）の5群について実施されている。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compromized 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。

A. 研究目的

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、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングし、標的分子を同定するとともに癌特異的CTL誘導能を検討し、臨床応用可能な癌ワクチンを開発することを本研究の主目的とする。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 抗原を主対象として、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（約4割）、HLA-26（約2割）及びHLA-51（約2割）に限定して、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。上記にて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婦人科領域癌ワクチンとしての臨床応用の可能性について第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いる。従って、従来の癌治療法に加えて新たな治療法の開発が必要である。ペプチドワクチン療法は、抗原特異的宿主免疫応答を誘導するために有害事象が殆ど無いことが予想される。既に実施中の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、その安全性に加え有効性も実証されつつあり、

本研究によってもその有効性が証明されることが期待される。

B. 研究方法

新たに癌拒絶抗原の遺伝子クローニングを行い、その遺伝子解析を行うと共にCTLにより認識されるペプチドの同定及びその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）より婦人科領域癌に適用可能な分子を選択し、第Ⅰ相臨床試験において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。これにより婦人科癌に対する癌ワクチンの基盤的研究を行う。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expressioncloning法により単離し、その全塩基配列を確定する。
- 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、癌組織及び正常組織について調べる。

- 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。
- 5) SART2, ART4及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及び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実施する。
 - 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)

癌患者末梢血を採血する場合は、本研究協力者(久留米大学産婦人科学 西田 敬、または河野光一郎助手)により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り採血し研究に供する。また患者には、貧血が認められず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する。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いて実施される。

C. 研究結果

我々は扁平上皮癌及び腺癌由来の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の同定を試みており、現時点までに約100個の分子を同定した。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)に対し第I相試験が実施されている。0.3~3mgのペプチド溶液をフロインド不完全アジュバンドとともに皮下投与しているが、現時点では有害事象は注射部位の発赤及び腫脹以外は認められていない。CypB(肺癌)及び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及び癌特異的CTL前駆細胞頻度が増加していた。SART2及び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及び腺癌患者各2名に対して実施され、その安全性が確認された。さらに、免疫学的な解析も実施され、1症例について細胞傷害性T細胞の誘導が認められた。臨床試験の免疫学的な評価をするための方法として、従来より行われているCTL前駆細胞頻度測定にかかわりうる簡便法の開発が行われた。この方法を導入することにより、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いて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スタートしている。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種類のペプチド及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ものである。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種類のペプチドが用いられる。対象症例は肺癌, 大腸癌, 婦人科癌, 胃癌及びその他の癌(口腔癌, 皮膚癌, 腎臓癌など)の5群について実施されている。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compromized 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

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

以上の結果に基づき、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、総合的な評価がなされる予定である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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