

200000145A

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書 (I~III)

主任研究者 金子 安比古

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

- がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究 — 1
金子 安比古

II. 分担研究報告書

1. FISH 法と CGH 法を用いた神経芽腫の予後診断に関する研究 ————— 1 0
金子 安比古
2. 遺伝子異常を用いた肺癌の悪性度診断に関する研究 ————— 1 3
土屋 永寿
3. 腫瘍における nm23 蛋白質発現の解析と臨床的意義の検討に関する研究 —— 1 7
角 純子
4. 腫瘍免疫を用いたがんの早期診断法の開発に関する研究 ————— 2 0
石井 勝
5. ホルモン依存性がん核内受容体の機能と臨床応用に関する研究 ————— 2 4
林 慎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 2 8

IV. 研究成果の刊行物・別刷（別冊にて一部添付）

総括研究報告書

がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究

主任研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 化学療法部長

研究要旨 神経芽腫178例の1p欠失、17q増加、ploidyを2色FISH法で、N-myc増幅をサザン法で分析した。単変量解析の結果、これらの4因子はいずれも有意な予後因子であることがわかった。多変量解析の結果、予後に対する影響はploidyが最も大きく、1p欠失、N-myc増幅、17q増加の順に小さくなった。triploid腫瘍はdiploid腫瘍に比較して、1p欠失、N-myc増幅、17q増加などのgenetic eventの数が少なかった。神経芽腫はploidy、1p欠失、N-myc増幅、17q増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。HE染色で病理学的に転移の証明されない肺癌患者31例のリンパ節をMASA (mutant-allele specific amplification) 法を用いて検索し、27%の患者に微小転移を認めた。同一リンパ節をサイトケラチン抗体による免疫染色を行い、77%に微小転移を認めた。MASA法によるリンパ節微小転移の検索は免疫染色に比較し、偽陽性が少なく、予後予測に優れた方法であることを証明した。血液を材料とするnm23蛋白質の定量システム(特許出願申請中)を開発し、患者血中nm23蛋白質を測定し、その臨床的意義を検討した。悪性リンパ腫および急性骨髄性白血病(AML)患者は健常人に比べて、有意に高値のnm23蛋白質を示した。aggressive非ホジキンリンパ腫およびAMLにおいて、血中nm23蛋白質高値例の生存期間は非高値例に比して短かった。多変量解析の結果、血中nm23蛋白質レベルは両疾患の独立した予後因子であると証明できた。癌患者の血中MDM2自己抗体を測定するEIA法を開発した。乳癌、胃癌、肺癌で、それぞれ64%、33%、65%の陽性率が示された。早期がんにおいても陽性率は高かったので、早期診断に役立つ腫瘍マーカーとして有用性が期待される。乳癌の発生・進展にはエストロゲン受容体(ER)が深く関わっている。まず、乳癌特異的ER遺伝子の発現制御機構に着目し、発現に重要なシスエレメントERBF-1に結合する因子を検索し、C/EBPファミリーの一つのLAPである可能性を示した。また、癌遺伝子産物MDM2蛋白質がER遺伝子に直接結合することによって、ERの機能を亢進することを明らかにした。さらに、マイクロアレイを用いて乳癌におけるエストロゲン応答遺伝子群を解析し、エストロゲン依存性癌増殖の原因遺伝子を探索するとともに、カスタムアレイを用いたホルモン療法応答性予測診断法の開発を目指した研究を開始した。

分担研究者

1. 金子安比古 埼玉県立がんセンター病院 部長
2. 土屋 永寿 埼玉県立がんセンター研究所
副所長
3. 角 純子 埼玉県立がんセンター研究所
主任研究員
4. 石井 勝 埼玉県立がんセンター 総長
5. 林 慎一 埼玉県立がんセンター研究所
主任研究員

A. 研究目的

がんが生じているさまざまな遺伝子の構造異常や発現異常を、DNA, RNA, 蛋白質、自己抗体等により検出し、がんの診断や予後の予知、治療成績の改善に役立つ。神経芽腫は最も頻度の高い小児固形腫瘍である。この腫瘍には自然退縮する予後良好群から超大量化学療法にも抵抗する予後不良群まで、その悪性度はさまざまである。治療成績を向上させるためには、診断後すみやかにリスクに対応したプロト

コールを選択し、治療することが重要である。既知の予後因子である発生年齢、病期、ploidy、1p 欠失、N-myc 遺伝子増幅などと共に、新たに遺伝学的因子 17q 増加を分析し、より正確な予後予測法の確立をめざす。手術で肺癌切除を受け、病理診断でリンパ節転移なし(n0 症例)とされた患者の約30%は後で再発転移を起こす。通常の病理検索では検出されない微小転移の存在がその原因の一つと考えられる。これまで、サイトケラチンや CEA を指標とする微小転移の検出が試みられてきたが、偽陽性の頻度が高く、有用性に乏しかった。転移なしとされたリンパ節を改良した MASA (mutant-allele specific amplification) 法と、サイトケラチン免疫染色で分析し、得られた転移の有無と予後との関係性を分析した。また、どちらの方法が予後予測に有用であるか検討した。nm23 は、癌転移抑制遺伝子として単離されたが、その遺伝子産物は NDP キナーゼ活性、MYC 転写因子活性および白血病細胞の分化誘導抑制因子活性等をもつ多機能性蛋白質である。既に、nm23 遺伝子の過剰発現が白血病の予後因子となることを明らかにしたが、今回は血液を用いた nm23 蛋白質の定量法を開発し、白血病や悪性リンパ腫患者の予後診断が可能かどうか検討した。各種がん細胞において高発現している MDM2 蛋白質は p53 との相互作用により、細胞周期を調節している。担がん患者においては、がん細胞の破壊に伴い MDM2 蛋白質が細胞外へ移行するため、体液性抗体の産生が生ずると考えられる。そこで、血中 MDM2 蛋白質自己抗体の定量測定法を開発し、本測定法により各種がん患者の血中 MDM2 蛋白質自己抗体の測定を行った。特に、早期がん診断に対する有用性を検討した。乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌などはステロイドホルモン依存性に発生・進展する。核内ステロイドホルモン受容体の発現と消失の機構を解明し、ホルモン依存性癌の診断と治療に役立てる。特に、乳癌において、エストロゲン受容体(ER)の癌特異的な転写の亢進が、どのような分子機序で引き起こされているのか、そのメカニズムを明らかにする。受容体陽性でもホルモン剤が奏功しない患者の予知を目的として、マイクロアレイを応用したホルモン療法反応性予測診断法を開発する。

B. 研究方法

神経芽腫 178 例の腫瘍細胞を細切後、短期間培養し収穫した細胞をカルノア溶液で固定した。間期

核を対象に、1 番染色体の数とその短腕欠失(1p-)の有無、および 17 番染色体の数とその長腕増加(+17q)の有無を 2 色 FISH 法で分析した。用いたプローブは 1 番染色体が D1Z1 (1cen)と D1Z2 (1pter)、17 番染色体が D17Z1 (17cen)と survivin (17q25)である。1 番染色体の数を基準にして、ploidy を diploidy か triploidy に決めた。N-myc コピー数を腫瘍 DNA を用いたサザン法で分析した。17q 増加の有無、1p 欠失の有無、N-myc 増幅の有無、ploidy (diploidy vs triploidy)、神経芽腫マスマスクリーニング(陽性 vs 陰性)でそれぞれ分類した患者群の生存曲線を求め、各 2 群間の有意差検定を行った。次に予後に対する各予後因子の影響を、多変量解析により分析した。

手術切除された非小細胞肺癌 31 例を対象とし微小転移の有無を検討した。そのうち 30 例は p53 遺伝子変異を、1例は K-ras 遺伝子変異を有することがわかっている。22例が n0、9例が n1 症例である。全例術後5年以上の経過観察が行われている。ホルマリン固定パラフィン包埋された HE 染色では転移の認められないリンパ節を連続的に薄切し、最初と最後の切片は HE 染色、2-3枚目からは DNA を抽出、4枚目は免疫染色に用いた。各症例ごとにプライマーの3'末端が変異塩基に対合する塩基を持った MASA プライマーを作成した。各症例の DNA 増幅は nested PCR 法を用いた。PCR 産物を電気泳動してバンドの有無で微小転移の有無を検索した。免疫染色はサイトケラチンの抗体 CAM5.2 を用いて染色した。

血清 nm23-H1 蛋白質の検討を、急性骨髄性白血病(AML)102例、急性リンパ性白血病6例、慢性骨髄性白血病21例、骨髄異形成症候群18例、多発性骨髄腫21例、慢性リンパ性白血病4例、ホジキン病40例、非ホジキンリンパ腫548例(indolent type 108例、aggressive type 440例)、健常人45例を対象に行った。測定はサンドイッチ ELISA 法により実施した。

血中 MDM2 蛋白質自己抗体の測定を、マイクロプレート固相化 MDM2 合成ペプチド抗原に対する血中 MDM2 蛋白質自己抗体とビオチン標識 MDM2 家兔 IgG 精製抗体とを競合免疫結合反応させる、酵素免疫測定法(EIA)により実施した。対象被検血清検体は健常人 49 例、乳癌 36 例、胃癌 51 例および肺癌 46 例の計 182 例であった。各血清は MDM2 蛋白質自己抗体の測定時まで凍結保存し、健常人以外

は未治療または術前に採取した。

エストロゲン受容体(ER)遺伝子上の各プロモーター領域の構造と機能の解析には、各種乳癌培養細胞株を対象に、ルシフェラーゼアッセイや、ゲルシフト法などを用いて実施した。ERと癌関連遺伝子との機能的相互作用については、それぞれの遺伝子の安定発現細胞株を作成し、レポーターアッセイ、mammalian two-hybrid法やGST-pull down法を用いて解析した。エストロゲン応答性遺伝子群のトランスクリプトーム解析のためER陽性乳癌培養細胞を対象として大規模マイクロアレイ解析を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究の研究計画や成果の公表方法については、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

神経芽腫 178 例をそれぞれの予後因子で分類すると、病期 (1, 2, 4S 病期 96 例、3, 4 病期 82 例)、年齢 (1 歳未満 107 例、1 歳以上 71 例)、1p (正常 108 例、欠失 70 例)、17q (正常 60 例、増加 118 例)、N-myc (シングルコピー 151 例、増幅 27 例)、ploidy (diploidy 68 例、triploidy 110 例)、マススクリーニング(陽性 101 例、陰性例 49 例、未受験例 28 例)であった。これらの因子はすべて単変量解析の結果、有意な予後因子であることが証明された。次に、17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅、diploidy の 4 因子を対象にして、多変量解析を行った。相対危険度は diploidy が 6.6、1p 欠失が 5.6、N-myc 増幅が 2.9、17q 増加 が 1.6 であった。ploidy が最も重要な予後因子であったので、178 例を diploid 腫瘍 68 例と、triploid 腫瘍 110 例に分類し、それぞれの腫瘍の 17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅など genetic event の頻度を調べた。triploid 腫瘍の方が、diploid 腫瘍に比較して、有意に genetic event の数が少なかった。

肺癌患者の摘出腫瘍の周囲リンパ節に、転移のないことを HE 染色で光顕的に再確認した。MASA 法による PCR 産物(微小転移)陽性率は、リンパ節では 34/229 (15%)、患者では 9/31 (14%) であった。免疫染色による微小転移陽性率は、リンパ節では 61/229 (27%)、患者では 24/31 (77%) であった。MASA 法と免疫染色法の一致率は 76.9% であった。なお、n0 症例に限ると、MASA では 6/22 例 (27%) に、免疫染色では 17/22 例 (77%) に微小

転移を認めた。n0 症例における微小転移と予後との関係を見ると、MASA では転移を認めた 6 例中 4 例 (67%) が死亡し、転移の無い症例は全例生存していた。両者の生存率に有意差を認めた。一方、免疫染色では転移を認めた 17 例中 4 例 (24%) が死亡しており、転移のない症例は全例生存していたが、両者の生存率に有意差を認めなかった。さらに、光顕結果に MASA の結果を加えてリンパ節転移 (n) を再分類して予後を比較すると、n0 症例では死亡が認められず、n1 および n2 症例よりも有意に生存期間が長かった。

血液中に分泌される nm23-H1 蛋白質を定量する ELISA 法を開発して、血中 nm23-H1 蛋白質が白血病においても簡便な予後予測法となりうるかどうか検討した。AML 102 症例について血中 nm23-H1 を測定した。AML では健常人血中レベルに比べ有意に高値であった。nm23-H1 高値群と低値群を比較すると、高値群では生存率の顕著な低下を認めた。多変量解析により、血中 nm23-H1 レベルは AML の有意な予後因子であった。AML 以外の白血病や多発性骨髄腫 70 症例についても測定し、いずれの疾患においても、健常人血中レベルに比べ有意に高値であることを示した。悪性リンパ腫については、Adult Lymphoma Treatment Study Group による大規模な検討においても、優れた予後因子であることが証明された。314 例の diffuse large B cell lymphoma における解析では、血中 nm23 蛋白質高値群の生存率が、顕著に低下していることを認めた。また、国際予後指標 (IPI) のリスク群別に検討しても、nm23-H1 高値患者の予後は有意に不良であった。

血中 MDM2 蛋白質自己抗体の測定を、競合免疫結合反応に基づく EIA を開発して実施した。その結果、健常人 49 例の血中 MDM2 蛋白質自己抗体は $5 \mu \text{g/ml}$ 以下であった。一方、がん患者の血中 MDM2 蛋白質自己抗体は健常人に比較して有意に高値を示し、カットオフ値を $5 \mu \text{g/ml}$ とした場合、乳癌では 63.9% (23/36)、胃癌では 33.3% (17/51)、肺癌では 65.2% (30/46) の陽性率を示した。胃癌、肺扁平上皮癌および肺腺癌について分化度別血中 MDM2 自己抗体陽性率を比較したところ、分化型で陽性率が高い傾向を示した。

エストロゲン受容体 (ER) 遺伝子の発現制御に重要なシスエレメント結合因子 (ERBF-1) が、C/EBP 転写因子ファミリーの 1 員である C/EBP β (LAP) である可能性を示した。すなわち、ゲルシフト法により

LAP は ERBF-1 結合シスエレメントに結合することを示した。また、LAP の発現ベクターを導入すると、ER 遺伝子上流部分の発現調節領域をつないだレポーターの活性が上昇した。次に、癌遺伝子 MDM2 を安定導入すると、乳癌細胞のエストロゲン依存性のコロニー形成能が高まること、そのエストロゲン反応因子(ERE)レポーター活性が著しく高まることを明らかにした。また、two-hybrid 法と GST pull-down 法によって、MDM2 と ER が直接結合しうることを示した。3 種の乳癌培養細胞と1種の子宮内膜癌細胞の大規模 cDNA マイクロアレイ解析を行い、エストロゲン応答性遺伝子発現プロファイルを得た。エストロゲンにより発現が増強する遺伝子群には癌遺伝子や、細胞増殖関連遺伝子が多く見られたが、これまで知られていなかった遺伝子も含まれていた。これらの結果に基づき、候補遺伝子を絞り込んだカスタムアレイを作成中である。

D. 考察

神経芽腫の予後因子として、発生年齢、病期、ploidy, 1p 欠失、N-myc 増幅等が、これまでに報告されている。今回の解析では、これらの因子に加えて、17q 増加も有意な予後因子であることがわかった。17q 増加の有無、1p 欠失の有無、N-myc 増幅の有無、ploidy の 4 因子について多変量解析を行うと、相対危険度と p-value の両方とも ploidy がもっとも予後に対する影響が大きく、1p 欠失、N-myc 増幅がこれにつき、17q 増加の影響は少なかった。triploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比較して、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加が少なかったため、これらの genetic event を起こしにくい機構をもっていると推測された。また、triploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比較して各染色体の数が 1 本多いので、劣性変異を起こしにくいと予想される。神経芽腫では、まず ploidy が diploidy か triploidy に決まり、それぞれ 17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅の順に genetic event が加わることにより、より悪性化すると考えられた。神経芽腫は ploidy、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。FISH 法を用いれば、これらの予後因子を、針生検により得られた小さな検体を用いても分析できるので、この方法の臨床的有用性は高い。

これまで微小転移を発見するためにサイトケラチンを用いた免疫染色がしばしば用いられ、その予後予測に対する有効性が指摘されていた。しかし改良し

た MASA 法による微小転移の検索と予後予測は、免疫染色による結果よりもより正確であることが明らかとなった。その理由は、MASA 法では癌由来の DNA のみを認識するが、免疫染色では正常に存在する肺の上皮細胞から由来するケラチンをも認識するため、正確度に差が出たものと考えられる。その他に、遺伝子検索による微小転移の発見方法として RT-PCR を利用した方法もあるが、その検索対象となる遺伝子は癌特異的に発現しているわけではなく、正常上皮の構成成分においても発現しているため、偽陽性率が高いという欠点を有している。MASA 法により転移ありとされた症例においては、光顕的に転移が発見された症例よりもがん細胞が少ない状態にあると考えられる。これらの症例に化学療法を行うことにより、手術後に残存する癌細胞を根絶できれば、治療成績が改善する可能性がある。

がんの予後診断に用いる検体は、腫瘍組織よりも血液の方が、患者の身体的負担、検査試料採取の容易性、大量処理の面から考えて有利である。急性骨髄性白血病と悪性リンパ腫では血中 nm23-H1 蛋白質レベルが、既知の予後因子から独立した予後因子であることを証明した。特に、治療指針の選択に予後因子解析が重要である悪性リンパ腫については、治療前に血中 nm23-H1 蛋白質を測定し、その結果により、治療法を選択する可能性が実際に期待できる。「nm23 タンパク質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」として特許出願申請をするとともに、血中 nm23 蛋白質測定キットの開発を進めている。nm23 遺伝子の高発現が観察されている他の造血器腫瘍や固形腫瘍についても、血中 nm23-H1 蛋白質の予後予測因子としての役割を今後検討したい。しかし、この顕著な臨床的意義にもかかわらず、その分子基盤は明らかにされていないので、これについても今後検討したい。

簡便で、経済効率の優れた新しいがんの早期診断法の開発はがん克服のために重要である。このため、早期癌に役立つ新しい診断法の開発を目的に、血中 MDM2 蛋白質自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を検討した。乳癌では 63.9 % (23/36)、胃癌では 33.3 % (17/51)、肺癌では 65.2 % (30/46) の陽性率を示し、臨床的有用性が示唆された。また、乳癌では血中 MDM2 自己抗体出現率は組織型と無関係であったが、肺癌および胃癌では分化度が高いほど血中 MDM2 自己抗体の出現率が高い傾向にあることが判明した。MDM2 家兎 IgG 抗体を用いた免

疫組織学的染色から、分化型胃癌では未分化胃癌に比べ、非癌部よりも癌部において MDM2 の高発現が認められたが、未分化胃癌では癌部よりも非癌部において MDM2 の発現が高い傾向がみられた。この結果は、未分化型胃癌よりも分化型胃癌で血中 MDM2 自己抗体陽性率が高かった結果と一致する所見と考えられた。

ERBF-1 が LAP であるならば、今後は LAP がどのように ER 遺伝子の発現を制御しているのか、LAP が乳癌の臨床病理学的因子、背景と相関があるのかといった点が問題となってくる。LAP を標的とした診断や癌予防が可能かどうかこの点に依存する。また、ER の機能が癌遺伝子 MDM2 によって亢進することは、乳がんにおける MDM2 の過剰発現が ER 陽性例で多く見られることと考えあわせると、大変興味深い。一方、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析は世界的なレベルで多くの癌培養細胞、癌組織において現在急速に研究が展開中であるが、ホルモン療法の応答性に特化したものは未だ見られない。我々の大規模アレイの結果は今後のホルモン療法反応性予測診断アレイチップ開発研究の第1段階にすぎないが、すでに多くの有益なかつ、膨大な情報が得られている。

E. 結論

神経芽腫は ploidy、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。FISH 法を用いれば、これらの予後因子を、針生検により得られた小さな検体を用いても分析できるので、この方法の臨床的有用性は高い。今後、これらの因子で患者を分類し、治療法を選択する臨床研究の実施が望まれる。肺癌において、MASA 法によるリンパ節微小転移の検索は免疫染色に比較し偽陽性が少なく、予後不良症例を見つけだすのに極めて有効である。これらの微小転移を有する症例に対し化学療法を行うことにより予後の改善を図れる可能性がある。血清 nm23-H1 蛋白質は急性骨髄性白血病や悪性リンパ腫の重要な独立した予後因子であることを示した。特に、aggressive 非ホジキンリンパ腫における結果は多施設・多数例による追試でも確認できた。今後、悪性リンパ腫患者を、nm23-H1 蛋白質値で層別化し、治療戦略を決めることにより、治療成績の改善が期待できるかもしれない。血中 MDM2 蛋白質自己抗体を、競合免疫結合反応に基づく EIA 法で測定し、早期がん診断への臨床的有用性を検討した。乳

癌、胃癌および肺癌の血中 MDM2 蛋白質自己抗体陽性率は 64 %、33 %、65 %であった。また、胃癌および肺癌では未分化型癌に比べ分化型癌で、血中 MDM2 蛋白質自己抗体陽性率が高い傾向を示した。本法の臨床的有用性が示唆された。エストロゲン受容体(ER)の発現制御をつかさどる因子の一つとして LAP を同定した。また、ER の機能が MDM2 等、癌関連遺伝子によっても制御されうることを明らかにした。マイクロアレイを用いた解析からエストロゲン応答性遺伝子群のプロファイルが得られ、新規の標的遺伝子や、ホルモン療法応答性予測診断チップ開発のための有用な情報が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
- 2) Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T., and Kaneko, Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes, and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 120: 91-98, 2000
- 3) Hoshi, M., Otagiri, N., Shiwaku, H. O., Asakawa, S., Shimizu, N., Kaneko, Y., Ohi, R., Hayashi, Y., and Horii, A. Deletion mapping of chromosomal band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. *Brit. J. Cancer*, 82: 1801-1807, 2000.
- 4) Kaneko, Y. and Knudson, A. G. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 29: 89-95, 2000.
- 5) Ohira, M., Kageyama, H., Mihara, M., Furuta, S., Machida, T., Shishikura, T., Takayasu, H., Islam, A., Nakamura, Y., Takahashi, M., Tomioka, N., Sakiyama, S., Kaneko, Y., Toyoda, A., Hattori, M., Sakaki, Y., Ohki, M., Horii, A., Soeda, E., Inazawa,

- J., Seki, N., Kuma, H., Nozawa, I., and Nakagawara, A. Identification and characterization of a 500-kb homozygously deleted region at 1p36.2-p36.3 in a neuroblastoma cell line. *Oncogene*, 19: 4302-4307, 2000.
- 6) Hoshi, M., Shiwaku, H., Hayashi, Y., Kaneko, Y., and Horii, A. Deletion mapping of 14q32 in human neuroblastoma defines a 1,100-kb region of common allelic loss. *Med. Pediatr. Oncol.*, 35: 522-525, 2000.
- 7) Okutsu, T., Kuroiwa, Y., Kagitani, F., Kai, M., Aisaka, K., Tsutsumi, O., Kaneko, Y., Yokomori, K., Surani, M. A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., and Ishino, F. Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J. Biochem*, 127: 475-483, 2000.
- 8) Fujimaki, S., Funato, T., Harigae, H., Imaizumi, M., Suzuki, H., Kaneko, Y., Miura, Y., and Sasaki, T. A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of leukaemic cells with t(8;21) in peripheral blood. *Eur. J. Haematol.*, 64: 252-258, 2000.
- 9) Sonobe, H., Takeuchi, T., Furihata, M., Taguchi, T., Kawai, A., Ohjimi, Y., Iwasaki, H., Kaneko, Y., and Ohtsuki, Y. A new human malignant peripheral nerve sheath tumour-cell line, HS-Sch-2, harbouring p53 point mutation. *Int. J. Oncol.*, 17: 347-352, 2000.
- 10) Go, Y., Ohjimi, Y., Iwasaki, H., Oka, K., Ishiguro, M., Kaneko, Y., Tsuchimochi, H., Tomonaga, M., and Kikuchi, M. A case of papillary meningioma with a t(1;4)(q44;q21). *Cancer Genet Cytogenet*, 119: 37-41, 2000.
- 11) Xin, Z., Soejima, H., Higashimoto, K., Yatsuki, H., Zhu, X., Satoh, Y., Masaki, Z., Kaneko, Y., Jinno, Y., Fukuzawa, R., Hata, J., and Mukai, T. A novel imprinted gene, KCNQ1DN, within the WT2 critical region of human chromosome 11p15.5 and its reduced expression in Wilms' Tumors. *J. Biochem*. 128: 847-853, 2000.
- 12) Kaneko, Y. and Cohn, S. L. Ploidy and cytogenetics in neuroblastoma. In G. M. Brodeur, T. Sawada, Y. Tsuchida, P. A. Voute (Eds), *Neuroblastoma*, pp. 41-56, Elsevier Science, Amsterdam (2000).
- 13) Tsuchiya, E., Tanigami, A., Ishikawa, Y., Nishida, K., Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Okumura S., Tsuchiya, S. and Nakagawa, K. Three new regions on chromosome 17p13.3 distal to p53 with possible tumor suppressor gene involvement in lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*: 91, 589-596, 2000.
- 14) Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Okumura, S., Nakagawa, K., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Hayashi, J. and Tsuchiya, E. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res.*: 60, 6472 - 6478, 2000.
- 15) Hashimoto, T., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Nishida, K., Hayashi, S., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Hayashi, J. and Tsuchiya, E. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiologic factors: Evidence from p53 mutational spectra. *Am. J. Pathol.* 157: 2133 - 2141, 2000.
- 16) Yamashita, K., Yamamoto, M., Nishimura H, Akiyama, H., Tsuchiya, E., and Tanaka, S. Hilar lymph node metastasis in renal cell carcinoma. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 48:194-197, 2000
- 17) Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, S., Nishida, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Tsuchiya, S., Okumura S. and Tsuchiya, E. Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *Anticancer Res.* in press.
- 18) 橋本毅久、土屋永寿:遠隔転移の分子生物学的知見. *肺癌の臨床*, 3 : 19 - 25, 2000
- 19) Niitsu, N., Okabe-Kado, J., Nakayama, M., Wakimoto, W., Sakashita, A., Maseki, N., Motoyoshi, M., Umeda, M., and Honma, Y. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implication in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 96 :1080-1086, 2000.
- 20) Niitsu, N., Kasukabe, T., Yokoyama, A., Okabe-Kado, J., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Umeda, M., and Honma, Y. Anticancer derivative of butyric acid (pivalyloxymethyl butyrate) specifically potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and

daunorubicin through the suppression of microsomal glycosidic activity. *Mol. Pharmacol.*, 58: 27-36, 2000.

21) Niitsu, N., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Umeda, M., and Honma, Y. Antileukemic efficacy of 2'-deoxycoformycin in monocytic leukemia cells. *Blood*, 96: 1512-1516, 2000.

22) Honma, Y., Ishii, Y., Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Kakegawa, T., and Awaya, A. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by novel synthetic neurotrophic pyrimidine derivatives. *Exp. Hematol.*, 29: 194-201, 2001.

23) Niitsu, N., Okabe-Kado, J., Okamoto, M., Takagi, T., Yoshida, T., Aoki, S., Hirano, M., and Honma, Y. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 97: 1202-1210, 2001.

24) Yamamoto-Yamaguchi, Y., Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Honma, Y. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by immunosuppressant macrolides (rapamycin and FK506) and calcium/calmodulin-dependent kinase inhibitors. *Exp Hematol*, in press.

25) Niitsu, N., Okamoto, M., Okabe-Kado, J., Takagi, T., Yoshida, T., Aoki, S., Honma, Y. and Hirano, M. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, in press.

26) Saji, S., Okumura, N., Eguchi, H., Nakashima, S., Suzuki, A., Toi, M., Nozawa, Y., Saji, S. and Hayashi, S.-I. MDM2 enhances the function of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 259-265, 2001.

27) Suga, K., Imai, K., Eguchi, H., Hayashi, S.-I., Higashi, Y. and Nakachi, K. Molecular significance of excess body weight in postmenopausal breast cancer patients, in relation to expression of insulin-like growth factor I receptor and insulin-like growth factor II gene. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 127-134, 2001.

28) 林 慎一. 癌におけるエストロゲン機能のモジュレーター. *Molecular Medicine*, 37: 1162-1168,

2000.

29) 林 慎一. エストロゲン受容体のレドックス制御因子および癌関連遺伝子産物による機能制御. *ホルモンと臨床*, 48: 50-54, 2000.

30) Yoshida, T., Eguchi, H., Nakachi, K., Tanimoto, K., Higashi, Y., Suemasu, K., Iino, Y., Morishita, Y. and Hayashi, S.-I. Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor α gene expression in human breast cancer: Methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis*, 21: 2193-2201, 2000.

31) Eguchi, H., Suga, K., Saji, H., Toi, M., Nakachi, K. and Hayashi, S.-I. Different expression patterns of Bcl-2 family genes in breast cancer by estrogen receptor status with special reference to pro-apoptotic bak gene. *Cell Death Differ.*, 7: 439-446, 2000.

32) 林 慎一、江口英孝. 乳癌発症の分子機構. *現代医療*, 32: 1835-1841, 2000.

33) 林 慎一. 乳癌のエストロゲンレセプターの新しい展開. *内分泌・糖尿病科*, 10: 168-176, 2000.

34) 林 慎一、吉田崇. 乳癌の発生・進展におけるER遺伝子の発現制御機構. *日本臨床*, 58: 495-503, 2000.

2. 学会発表

1) 金子安比古、並木剛、小林泰文、柵木信男、恒松由記子、宮内潤、駒田美弘: 2q23-q31 領域は肝芽腫で高頻度に増加しており、この領域増加を示した患者の予後は不良である: CGH と染色体による分析. 第59回日本癌学会総会記事(2000) p118. .

2) 富岡伸元、小林泰文、影山肇、中川原章、金子安比古: 4S 病期神経芽腫の 17q 増加および 1p 欠失の FISH による検出と他病期神経芽腫との比較解析. 第59回日本癌学会総会記事(2000) p114. .

3) 富岡伸元、小林泰文、中川原章、金子安比古: 幼児神経芽腫の 17q 増加および 1p 欠失の FISH 法による解析と予後因子としての役割. 第16回日本小児がん学会プログラム(2000) p346.

4) 渡辺直樹、小林泰文、金子安比古、畑江芳郎、平間敏憲、菊田敦、駒田美弘、小泉晶一、鶴知光、恒松由記子、横森欣司: Congenital Mesoblastic Nephroma (CMN)における11トリソミーとTEL/TRKC転座の分析. 第16回日本小児がん学会プログラム(2000) p352.

5) Tsuchiya, E.; A Follow-up study of progression from preneoplastic lesion to squamous cell carcinoma

in the bronchi of ex-chromate workers. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology. Oct. 15-20, Nagoya, 2000.

6) 西田一典、小林康人、石川雄一、高橋 敦、佐藤之俊、中川 健、山本光伸、土屋永寿; 肺 Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)の発生・形質発現に対する MDM2 の関与の検討. 第 89 回日本病理学会総会 (2000) p233.

7) 出雲俊之、土屋永寿: MALT リンパ腫の発生臓器による特異性. 第 89 回日本病理学会総会 (2000) p262.

8) 知念克也、出雲俊之、大倉康男、松原 修、土屋永寿: EBER-ISH が診断に有用であった Angiocentric lymphoma の 1 剖検例. 第 89 回日本病理学会総会 (2000) p262.

9) 橋本毅久、土屋永寿、奥村 栄、土屋繁裕、中川健、石川雄一、林 純一; 遺伝子変異を利用した非小細胞肺癌微小リンパ節転移の検出と術後予後. 第 100 回日本外科学会総会 (2000).

10) 石井 勝、清野祐子、神田祐三、知念克也、大倉康男、土屋永寿; 血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p180.

11) 大倉康男、土屋永寿: 長期経過観察例からみた食道粘膜癌の発育進展過程. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p259.

12) 小林康人、西田一典、林 慎一、西村仁志、石川雄一、中川 健、佐藤之俊、土屋永寿: 小細胞癌における第 3 番染色体短腕上の LOH と予後について. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p373.

13) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、林 慎一、小林康人、西田一典、石川雄一、奥村栄、土屋繁裕、中川 健、林 純一、土屋永寿: 非小細胞肺癌における p53 遺伝子変異型、免疫染色と予後. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p375.

14) 石川雄一、野村起美恵、向井裕幸、中川 健、藤原睦憲、土屋永寿: 肺癌の各組織型における染色体異常と mini-satellite instability の検索 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p375.

15) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤 洋、平井康夫、中川 健、石川雄一、土屋永寿: 染色体 CGH 解析による肺扁平上皮癌の予後予測. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p376.

16) 出雲俊之、柵木信男、土屋永寿: MALT リンパ

腫発症における apoptosis 異常の関与について. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p572.

17) 大本陽子、小林康人、西田一典、江口英孝、岩瀬弘敬、藤井義敬、土屋永寿、林 慎一: ヒト肺癌組織および肺癌細胞株における Estrogen Receptor β の発現と機能解析. 第 41 回日本肺癌学会総会号 (2000) p377.

18) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、林 慎一、西田一典、小林康人、奥村 栄、土屋繁裕、中川健、石川雄一、林 純一、土屋永寿: 肺腺癌における新 WHO 組織亜型分類の特徴と遺伝子変異. 第 41 回日本肺癌学会総会号 (2000) p502

19) 西田一典、小林康人、石川雄一、高橋 敦、佐藤之俊、中川 健、秋山博彦、西村仁志、土屋永寿: 肺 atypical adenomatous hyperplasia (AAH) の遺伝子異常: ARF-MDM2-p53 系および p16-cyclin D1-Rb 系の免疫組織化学的検討. 第 41 回日本肺癌学会総会号 (2000) p527.

20) 石井 勝、山口研成、清野祐子: 血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性. 第 20 回腫瘍マーカー研究会予稿集 (2000) p40.

21) 石井 勝、神田裕三、知念克也、大倉康男、土屋英寿、清野祐子: 血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p180

22) 吉田崇、林 慎一、江口英孝、東 靖宏、末益公人、飯野佑一、森下靖雄: タモキシフェン耐性乳癌細胞株におけるエストロゲンレセプター α の作用機構. 第 8 回乳癌学会総会抄録集 (2000) p230.

23) 林 慎一: エストロゲンレセプター機能のモジュレーター. 日本癌学会公開シンポジウム、ホルモン依存性がんと核内受容体. 大宮ソニックシティ、6 月 23 日、2000.

24) Hayashi, S.-I., Yoshida, T., Yoshida, N., Tanimoto, K., Okumura, N., Saji, S., and Eguchi, H. Modulators of estrogen receptor α function and gene expression in breast cancer. A Joint International Symposium of Center for Biotechnology and EUROSTERONE, Nuclear receptors in health and disease, Stockholm, Sep. 24-27, 2000.

25) 江口英孝、正村 滋、奥村直樹、林 慎一: 乳癌細胞におけるエストロゲンレセプターを中心とした転写活性化因子複合体の解析. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p241.

26) 吉田崇、江口英孝、飯野佑一、森下靖雄、林 慎一:タモキシフェン耐性乳癌細胞株におけるエストロゲンレセプターの作用機構. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p484.

27) 大本陽子、小林康人、西田一典、江口英孝、岩瀬弘敬、藤井義敬、土屋永壽、林 慎一:ヒト肺癌組織および肺癌細胞株における Estrogen Receptor β の発現. 第 59 回日本癌学会総会記事(2000)p484.

28) 奥村直樹、佐治重衡、江口英孝、佐治重豊、林 慎一:乳癌における MDM2 過剰発現のメカニズム. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p484 .

29) 寺尾俊哉、加藤幹雄、岡田耕市、東 四雄、林 慎一、江口英孝:前立腺癌におけるエストロゲンレセプターの発現とその機能. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p484.

30) 松山 悟、江口英孝、小林康人、大倉康男、赤木 究、内田健二、三宅 智、中地 敬、林 慎一:胃癌における estrogen receptor β 発現の検討. 第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p485.

31) 大本陽子、小林康人、西田一典、江口英孝、岩瀬弘敬、藤井義敬、土屋永壽、林 慎一: Estrogen Receptor β のヒト肺での発現. 第 73 回日本生化学会大会抄録 (2000) p986 .

32) 吉田崇、江口英孝、飯野佑一、森下靖雄、林 慎一:抗エストロゲン剤耐性乳癌細胞株におけるエストロゲンレセプターの作用機構. 第 73 回日本生化学会大会抄録 (2000) p986.

33) 大本陽子、小林康人、西田一典、江口英孝、岩瀬弘敬、藤井義敬、土屋永壽、林 慎一. <フォーラム> 肺癌への臨床応用を目指した基礎研究、ヒト肺癌組織および肺癌細胞株における Estrogen Receptor β の発現と機能解析. 第 41 回日本肺癌学会総会 (2000) p377.

34) 大本陽子、江口英孝、岩瀬弘敬、小林俊三、林 慎一:ヒト乳癌組織および乳癌細胞株における Estrogen receptor β isoform の発現とその機能解析. 第 8 回日本ステロイドホルモン学会. 2000/11/25

35) 林 慎一. シンポジウム:核内レセプターと脂溶性シグナル分子の発生・分化に対する作用機構、ステロイドホルモン依存性腫瘍の発生・進展と核内レセプター. 第 53 回日本細胞生物学会大会講演要旨集 (2000) p30.

36) 大本陽子、江口英孝、岩瀬弘敬、林 慎一:エストロゲンレセプター β およびその variant の発現と機能解析. 第 23 回日本分子生物学会年会要旨集

(2000) p410 .

37) 江口英孝、正村 滋、林 慎一. エストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株でのエストロゲンレセプター α 転写活性調節. 第 23 回日本分子生物学会年会要旨集 (2000) p410 .

38) 坂本隆子、江口英孝、森 宏之、林 慎一:子宮内膜癌におけるエストロゲンレセプター(ER) α 、 β の発現とタモキシフェンの作用機序. 第 23 回日本分子生物学会年会要旨集 (2000) p783.

39) 奥村直樹、佐治重衡、江口英孝、佐治重豊、林 慎一. 乳癌における MDM2 遺伝子の転写亢進. 第 23 回日本分子生物学会年会要旨集 (2000) p410.

40) 吉田敦行、林 慎一、小口しのぶ、木山亮一:マイクロアレイを用いたエストロゲン応答性遺伝子のプロファイリング. 第 23 回日本分子生物学会年会要旨集 (2000) p786 .

41) 林 慎一、吉田敦行、井上暁夫、大本陽子、小口しのぶ、中地 敬、木山亮一:マイクロアレイによるエストロゲン応答遺伝子群の発現プロファイル解析とホルモン療法反応性予測診断チップの開発. 第 2 回日本がん分子疫学研究会学術集会(3月9日、東京) 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

1) nm23 タンパク質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法:特開 2000-304746 (P2000-304746A). 出願人および発明者:角 純子. 出願番号:特願平 11-109586 . 公開日:平成 12 年 11 月 2 日.

分担研究報告書

FISH 法と CGH 法を用いた神経芽腫の予後診断に関する研究

分担研究者 金子 安比古

埼玉県立がんセンター病院 化学療法部長

研究要旨 神経芽腫 178 例の 1p 欠失、17q 増加、ploidy を 2 色 FISH 法で、N-myc 増幅をサザン法で分析した。単変量解析の結果、これらの 4 因子はいずれも有意な予後因子であることがわかった。多変量解析の結果、予後に対する影響は ploidy が最も大きく、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加の順に小さくなった。triploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比較して、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加などの genetic event の数が少なかった。神経芽腫は ploidy、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。2 色 FISH 法を用いれば、これらの予後因子を、針生検により得られた小さな検体を用いても分析できるので、この方法の臨床的有用性は高い。

A. 研究目的

神経芽腫は最も頻度の高い小児固形腫瘍である。この腫瘍には自然退縮する予後良好群から、幹細胞移植を併用した超大量化学療法にも抵抗する予後不良群まで、その悪性度はさまざまである。治療成績を向上させるためには、診断後すみやかにリスクに対応したプロトコールを選択し、治療することが重要である。既知の予後因子には発生年齢、病期、ploidy、1p 欠失、N-myc 遺伝子増幅などがある。最近、欧米から 17q 増加が新たな予後因子として報告されたので、17q 増加を新たに分析し、上記の因子を含めて、予後予測因子としての解析を行い、より正確な予後予測法の確立をめざす。

B. 研究方法

対象は神経芽腫 178 例である。腫瘍細胞を細切後、短期間培養し収穫した細胞をカルノア溶液で固定した。間期核を対象に、1 番染色体の数とその短腕欠失(1p-)の有無、および 17 番染色体の数とその長腕増加(+17q)の有無を 2 色 FISH 法で分析した。用いたプローブは 1 番染色体が D1Z1 (1cen)と D1Z2 (1pter)、17 番染色体が D17Z1 (17cen)と survivin (17q25)である。1 番染色体の数を基準にして、ploidy を diploidy か triploidy に決めた。N-myc コピー数を腫瘍

DNA を用いたサザン法で分析した。17q 増加の有無、1p 欠失の有無、N-myc 増幅の有無、ploidy (diploidy vs triploidy)、神経芽腫マスキリーニング（陽性 vs 陰性）でそれぞれ分類した患者群の生存曲線を求め、各 2 群間の有意差検定を行った。次に予後に対する各予後因子の影響を、多変量解析により分析した。

（倫理面への配慮）

本研究の研究計画や成果の公表方法については、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

178 例をそれぞれの予後因子で分類すると、病期 (1, 2, 4S 病期 96 例、3, 4 病期 82 例)、年齢 (1 歳未満 107 例、1 歳以上 71 例)、1p (正常 108 例、欠失 70 例)、17q (正常 60 例、増加 118 例)、N-myc (シングルコピー 151 例、増幅 27 例)、ploidy (diploidy 68 例、triploidy 110 例)、マスキリーニング(陽性 101 例、陰性例 49 例、未受験例 28 例)であった。これらの因子はすべて単変量解析では有意な予後因子であった。次に、17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅、diploidy の 4 因子を対象にして多変量解析を行った。相対危険度は diploidy 6.6, 1p 欠失 5.6, N-myc 増幅 2.9, 17q 増加 1.6 であった。ploidy が最も重

要な予後因子であったので、178 例を diploid 腫瘍 68 例と、triploid 腫瘍 110 例に分け、それぞれの腫瘍の 17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅など genetic event の頻度を調べた。triploid 腫瘍の方が、diploid 腫瘍に比較して有意に genetic event の数が少なかった。

D. 考察

これまで報告された予後因子を述べると、発生年齢は予後良好群が 12 カ月未満、不良群が 12 カ月以上、病期は良好群が第 1、2、4 S 病期、不良群が 3、4 病期、ploidy は良好群が triploidy、不良群が diploidy、1p 欠失は良好群がなし、不良群があり、N-myc 遺伝子は良好群がシングルコピー、不良群が増幅である。今回の解析では、これらの因子に加えて、17q 増加も有意な予後因子であることがわかった。17q 増加の有無、1p 欠失の有無、N-myc 増幅の有無、ploidy の 4 因子について多変量解析を行うと、相対危険度と p-value の両方とも diploidy がもっとも予後に対する影響が大きく、1p 欠失、N-myc 増幅がこれにつき、17q 増加の影響は少なかった。triploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比較して、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加などの genetic event の数が少なかった。triploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比較して各染色体の数が 1 本多いので、劣性変異を起こしにくいと推測される。神経芽腫では、まず ploidy が diploidy か triploidy に決まり、それぞれ 17q 増加、1p 欠失、N-myc 増幅の順に genetic event が加わることにより、より悪性化すると考えられた。神経芽腫は ploidy、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。FISH 法を用いれば、これらの予後因子を、針生検により得られた小さな検体を用いても分析できるので、この方法の臨床的有用性は高い。

E. 結論

神経芽腫は ploidy、1p 欠失、N-myc 増幅、17q 増加を調べることにより、予後を正確に予測できる。FISH 法を用いれば、これらの予後因子を、針生検により得られた小さな検体を用いても分析できるので、この方法の臨床的有用性は高い。今後、これらの因子で患者を分類し、治

療法を選択する臨床研究の実施がのぞまれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
- 2) Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T., and Kaneko, Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes, and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 120: 91-98, 2000
- 3) Hoshi, M., Otagiri, N., Shiwaku, H. O., Asakawa, S., Shimizu, N., Kaneko, Y., Ohi, R., Hayashi, Y., and Horii, A. Deletion mapping of chromosomal band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. *Brit. J. Cancer*, 82: 1801-1807, 2000.
- 4) Kaneko, Y. and Knudson, A. G. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 29: 89-95, 2000.
- 5) Ohira, M., Kageyama, H., Mihara, M., Furuta, S., Machida, T., Shishikura, T., Takayasu, H., Islam, A., Nakamura, Y., Takahashi, M., Tomioka, N., Sakiyama, S., Kaneko, Y., Toyoda, A., Hattori, M., Sakaki, Y., Ohki, M., Horii, A., Soeda, E., Inazawa, J., Seki, N., Kuma, H., Nozawa, I., and Nakagawara, A. Identification and characterization of a 500-kb homozygously deleted region at 1p36.2-p36.3 in a neuroblastoma cell line. *Oncogene*, 19: 4302-4307, 2000.
- 6) Hoshi, M., Shiwaku, H., Hayashi, Y., Kaneko, Y., and Horii, A. Deletion mapping of 14q32 in human neuroblastoma defines an 1,100-kb region of common allelic loss. *Med. Pediatr. Oncol.*, 35:

522-525, 2000.

7) Okutsu, T., Kuroiwa, Y., Kagitani, F., Kai, M., Aisaka, K., Tsutsumi, O., Kaneko, Y., Yokomori, K., Surani, M. A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., and Ishino, F. Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms'tumors. *J. Biochem*, 127: 475-483, 2000.

8) Fujimaki, S., Funato, T., Harigae, H., Imaizumi, M., Suzuki, H., Kaneko, Y., Miura, Y., and Sasaki, T. A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of leukaemic cells with t(8;21) in peripheral blood. *Eur J Haematol*, 64: 252-258, 2000.

9) Sonobe, H., Takeuchi, T., Furihata, M., Taguchi, T., Kawai, A., Ohjimi, Y., Iwasaki, H., Kaneko, Y., and Ohtsuki, Y. A new human malignant peripheral nerve sheath tumour-cell line, HS-Sch-2, harbouring p53 point mutation. *Int. J. Oncol.*, 17: 347-352, 2000.

10) Go, Y., Ohjimi, Y., Iwasaki, H., Oka, K., Ishiguro, M., Kaneko, Y., Tsuchimochi, H., Tomonaga, M., and Kikuchi, M. A case of papillary meningioma with a t(1;4)(q44;q21). *Cancer Genet Cytogenet*, 119: 37-41, 2000.

11) Xin, Z., Soejima, H., Higashimoto, K., Yatsuki, H., Zhu, X., Satoh, Y., Masaki, Z., Kaneko, Y., Jinno, Y., Fukuzawa, R., Hata, J., and Mukai, T. A novel imprinted gene, KCNQ1DN, within the WT2 critical region of human chromosome 11p15.5 and its reduced expression in Wilms' Tumors. *J. Biochem*. 128: 847-853, 2000.

12) Kaneko, Y. and Cohn, S. L. Ploidy and cytogenetics in neuroblastoma. In G. M. Brodeur, T. Sawada, Y. Tsuchida, P. A. Voute (Eds), *Neuroblastoma*, pp. 41-56, Elsevier Science, Amsterdam (2000).

2. 学会発表

1) 金子安比古、並木剛、小林泰文、柵木信男、恒松由記子、宮内潤、駒田美弘：2q23-q31 領域は肝芽腫で高頻度に増加しており、この領域増加を示した患者の予後は不良である：CGHと染色体による分析。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p118.

2) 富岡伸元、小林泰文、影山肇、中川原章、金子安比古：4S 病期神経芽腫の 17q 増加および 1p 欠失の FISH による検出と他病期神経芽腫との比較解析。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p114.。

3)富岡伸元、小林泰文、中川原章、金子安比古：幼児神経芽腫の 17q 増加および 1p 欠失の FISH 法による解析と予後因子としての役割。第 16 回日本小児がん学会プログラム (2000) p346.

4)渡辺直樹、小林泰文、金子安比古、畑江芳郎、平間敏憲、菊田敦、駒田美弘、小泉晶一、鶴知光、恒松由記子、横森欣司：Congenital Mesoblastic Nephroma (CMN)における 11 トリソミーと TEL/TRKC 転座の分析。第 16 回日本小児がん学会プログラム (2000) p352.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

遺伝子異常を用いた肺癌の悪制度診断に関する研究

分担研究者 土屋 永寿

埼玉県立がんセンター研究所 副所長

研究要旨 切除肺癌で組織学的にリンパ節転移なし（n0）とされた症例でも術後30%は再発死亡する。微小転移の存在がその原因の一つと考えられ、RT-PCR法や免疫染色を用いてその検索がなされてきたが、偽陽性の頻度が高かった。我々は変異遺伝子の特異的に発見するMASA (mutant-allele specific amplification) 法を用いて、p53あるいはK-ras変異を有するn0症例（22）のリンパ節を検索した。MASAでは6例（27%）に微小転移を認め、うち4例が再発死亡していたが、転移なし例は全例生存していた。同一リンパ節をサイトケラチン抗体による免疫染色を行った結果、17例（77%）に微小転移（陽性）を認め、うち4例が死亡していた。以上より、MASA法によるリンパ節微小転移の検索は免疫染色に比較し偽陽性が少なく、予後予測に優れた方法である。これらの症例に対し化学療法を行うことにより予後の改善を図れる可能性がある。

A. 研究目的

手術切除され病理診断でリンパ節転移なし（n0症例）とされても、約30%の患者は再発転移を起こす。通常の病理検索では検出されない微小転移の存在がその原因の一つと考えられる。これまで、免疫染色やRT-PCR法を用いて、サイトケラチンやCEAを指標として微小転移を見つける方法が行われてきたが、これらの方法は感度は高いが癌細胞に特異的でないため偽陽性の頻度が高かった。ところで、MASA (Mutant-allele specific amplification) 法は遺伝子変異のある癌細胞由来のDNAを特異的に発見することが可能である。しかし安定してPCR産物を得ることが出来なかったため、同法を用いた微小転移の検索は極めて少ない。我々は、MASA法にnested PCRを応用することにより安定してPCR産物が得られることを見いだした。この方法を用いて、通常の病理学的検索では転移なしとされたリンパ節を検索するとともに、同一リンパ節を免疫染色でも検索し、得られた転移の有無と予後との関係を検討し、予後予測にはどちらの方法が有効かを比較した。

B. 研究方法

検索症例は手術切除された非小細胞肺癌31例（腺癌22、扁平上皮癌9）で、うち30例はp53遺伝子変異を、1例はK-ras遺伝子変異を有する。22例がn0、9例がn1症例で、前者は肺門及び縦隔リンパ節を、後者は縦隔リンパ節のみを検索した。検索したリンパ節の総数は229個（症例あたり平均8コ、最小4コ、最大9コ）である。全例術後5年以上の経過観察が行われており、5年以内の癌死は6例、1例は他病死、他は全例生存している。

ホルマリン固定パラフィン包埋された転移のないリンパ節を連続的に薄切し、最初と最後の切片はHE染色、2-3枚目からはDNAを抽出、4枚目は免疫染色に用いた。各症例ごとにプライマーの3'末端が変異塩基に対合する塩基を持ったMASAプライマーを作成した。各症例のDNA増幅はnested PCR法を用いた。まずMASAプライマーよりも外側に位置するプライマーをホルマリン固定パラフィン包埋された転移のないリンパ節を連続的に薄切し、最初と最後の切片はHE染色、2-3枚目からはDNAを抽出、4枚目は免疫染色に用いた。各症例ごとにプライマーの3'末端が変異塩基に対合する塩基を持ったMASAプライマーを作

成した。各症例の DNA 増幅は nested PCR 法を用いた。まず MASA プライマーよりも外側に位置するプライマーを作成し PCR を行った後、その PCR 産物を MASA プライマーを用いて再度増幅した。この PCR 産物を電気泳動してバンドの有無で微小転移の有無を検索した。免疫染色はサイトケラチンの抗体 CAM5.2 を用いて染色した。

(倫理面への配慮)

特定の個人が同定されないように連結可能匿名化を行った。

C. 研究結果

検索したリンパ節には光顕的には転移のないことを再確認した。MASA 法では 34/229 リンパ節 (15%)、9/31 症例 (14%) にバンド (微小転移) を認め、免疫染色では 61/229 リンパ節 (27%)、24/31 (77%) に陽性所見 (微小転移) を認めた。両者の一致率は 76.9% であった。なお、n0 症例に限ると、MASA では 6/22 例 (27%) に、免疫染色では 17/22 例 (77%) に微小転移を認めた。n0 症例における微小転移と予後との関係を見ると、MASA では転移を認めた 6 例中 4 例 (67%) が死亡し、転移の無い症例は全例生存しており、両者の生存率に有意差を認めた。一方、免疫染色では転移を認めた 17 例中 4 例 (24%) が死亡しており、転移なし症例は全例生存していたが、両者の間に有意差は認められなかった。さらに、光顕結果に MASA の結果を加えてリンパ節転移 (n) を再分類して予後を比較すると、n0 症例では死亡が認められず、n1 および n2 症例よりも有意に生存期間が長かった。一方光顕所見のみ、あるいは免疫染色結果に光顕所見を加えた結果で n を分類して予後を比較した場合には n0 と n1 あるいは n2 の間には有意差は認められなかった。

D. 考察

これまで微小転移を発見するためにサイトケラチン抗体を用いた免疫染色がしばしば用いられ、その予後予測に対する有効性が指摘されていた。しかし改良した MASA 法による微小転

移の検索と、それによる予後予測は、免疫染色による結果よりもより正確であることが明らかとなった。その理由は、MASA 法では癌由来の DNA のみを認識するが、免疫染色では正常に存在する肺の上皮細胞から由来するケラチンをも認識するため、正確度に差が出たものと思われる。その他に、遺伝子検索による微小転移の発見の方法として RT-PCR を利用した方法も行われているが、その検索対象となる遺伝子は癌特異的な DNA ではなく、正常上皮の構成成分である DNA のため、偽陽性率が高いという欠点が克服されていない。MASA 法により転移ありとされた症例においては、光顕的に転移が発見された症例よりもがん細胞が少ない状態にあると考えられる。このため、これらの症例に化学療法を行うことにより残った癌細胞を根絶し、良好な予後が得られる可能性がある。

E. 結論

肺癌において、MASA 法によるリンパ節微小転移の検索は免疫染色に比較し偽陽性が少なく、予後不良症例を見つけたすのに極めて有効である。これらの微小転移を有する症例に対し化学療法を行うことにより予後の改善を図れる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchiya, E., Tanigami, A., Ishikawa, Y., Nishida, K., Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Okumura S., Tsuchiya, S. and Nakagawa, K. Three new regions on chromosome 17p13.3 distal to p53 with possible tumor suppressor gene involvement in lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* : 91, 589-596, 2000.
- 2) Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Okumura, S., Nakagawa, K., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Hayashi, J. and Tsuchiya, E. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma

cases. *Cancer Res.* : 60, 6472 - 6478, 2000.

3) Hashimoto, T., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Nishida, K., Hayashi, S., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Hayashi, J. and Tsuchiya, E. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiologic factors: Evidence from p53 mutational spectra. *Am. J. Pathol.* 157: 2133 -2141, 2000.

4) Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, S., Nishida, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Tsuchiya, S., Okumura S. and Tsuchiya, E. Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *Anticancer Res.* in press.

5) Yamashita, K., Yamamoto, M., Nishimura H, Akiyama, H., Tsuchiya, E., and Tanaka, S. Hilar lymph node metastasis in renal cell carcinoma. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 48:194-197, 2000

6) 橋本毅久、土屋永寿：遠隔転移の分子生物学的知見、肺癌の臨床。3：19-25, 2000.

2. 学会発表

1) Tsuchiya, E. ; A Follow-up study of progression from preneoplastic lesion to squamous cell carcinoma in the bronchi of Ex-chromate workers. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology. Oct. 15-20, Nagoya, 2000.

2) 西田一典、小林康人、石川雄一、高橋 敦、佐藤之俊、中川 健、山本光伸、土屋永寿：肺 Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)の発生・形質発現に対する MDM2 の関与の検討。第 89 回日本病理学会総会(2000) p233.

3) 出雲俊之、土屋永寿：MALT リンパ腫の発生臓器による特異性。第 89 回日本病理学会総会。(2000) p262.

4) 知念克也、出雲俊之、大倉康男、松原 修、土屋永寿：EBER-ISH が診断に有用であった Angiocentric lymphoma の 1 剖検例。第 89 回日本病理学会総会(2000) p262.

5) 橋本毅久、土屋永寿、奥村 栄、土屋繁裕、中川 健、石川雄一、林 純一：遺伝子変異を利用した非小細胞肺癌微小リンパ節転移の検出と術後予後。第 100 回日本外科学会総会(2000).

6) 石井 勝、清野祐子、神田祐三、知念克也、大倉康男、土屋永寿：血中 MDM2 蛋白自己抗

体の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p180.

7) 大倉康男、土屋永寿：長期経過観察例からみた食道粘膜癌の発育進展過程。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p259.

8) 小林康人、西田一典、林 慎一、西村仁志、石川雄一、中川 健、佐藤之俊、土屋永寿：小細胞癌における第 3 番染色体短腕上の LOH と予後について。第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p373.

9) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、林 慎一、小林康人、西田一典、石川雄一、奥村栄、土屋繁裕、中川 健、林 純一、土屋永寿：非小細胞肺癌における p53 遺伝子変異型、免疫染色と予後。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p375.

10) 石川雄一、野村起美恵、向井裕幸、中川 健、藤原睦憲、土屋永寿：肺癌の各組織型における染色体異常と mini-satellite instability の検索。第 59 回日本癌学会総会記事(2000)p375.

11) 林 盛昭、得地令郎、橋本毅久、林 慎一、小林康人、西田一典、古田玲子、加藤 洋、平井康夫、中川 健、石川雄一、土屋永寿：染色体 CGH 解析による肺扁平上皮癌の予後予測。第 59 回日本癌学会総会記事 (2000) p376.

12) 出雲俊之、柵木信男、土屋永寿：MALT リンパ腫発症における apoptosis 異常の関与について。第 59 回日本癌学会総会記事(2000) p572.

13) 大本陽子、小林康人、西田一典、江口英孝、岩瀬弘敬、藤井義敬、土屋永寿、林 慎一：ヒト肺癌組織および肺癌細胞株における Estrogen Receptor α の発現と機能解析。第 41 回日本肺癌学会総会号(2000) p377.

14) 橋本毅久、得地令郎、林 盛昭、林 慎一、西田一典、小林康人、奥村 栄、土屋繁裕、中川 健、石川雄一、林 純一、土屋永寿：肺腺癌における新 WHO 組織亜型分類の特徴と遺伝子変異。第 41 回日本肺癌学会総会号(2000) p502.

15) 西田一典、小林康人、石川雄一、高橋 敦、佐藤之俊、中川 健、秋山博彦、西村仁志、土屋永寿：肺 atypical adenomatous hyperplasia(AAH)の遺伝子異常：ARF-MDM2-p53 系および p16-cyclin D1-Rb 系の免疫組織化学的検討。第 41 回日本肺癌学会

総会号(2000) p527.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

腫瘍における nm23 蛋白質発現の解析と臨床的意義の検討に関する研究

分担研究者 角 純子

埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨 nm23 遺伝子産物は多機能性蛋白質である。白血病細胞では nm23 遺伝子が過剰発現し、その発現量は寛解導入療法に対する感受性や生存率と有意に相関し白血病の予後不良因子となる。血液を材料とする nm23 蛋白質の定量システム（特許出願申請中）を開発し、患者血中 nm23 蛋白質を測定し、その臨床的意義を検討した。悪性リンパ腫および急性骨髄性白血病(AML)では正常対照に比べて有意に高値であった。aggressive 非ホジキンリンパ腫および AML において、血中 nm23 蛋白質高値例は低値例に比して有意に生存期間が短かった。多変量解析の結果、血中 nm23 蛋白質レベルは両疾患の生存率において有意な独立した予後因子であった。特に、aggressive 非ホジキンリンパ腫では Adult Lymphoma Treatment Study Group による大規模な検討においても優れた予後因子となった。

A. 研究目的

nm23 は、癌転移抑制遺伝子として単離されたが、その遺伝子産物は NDP キナーゼ活性、MYC 転写因子活性および白血病細胞の分化誘導抑制因子活性等をもつ多機能性蛋白質である。我々は、nm23 遺伝子が白血病細胞において過剰発現していること、その発現量は寛解導入療法に対する感受性や生存率と有意に相関し白血病の予後因子となることを明らかにした。この nm23 遺伝子の発現量に着目した予後診断法を、白血病以外の腫瘍にも応用する目的で、また定量法をより簡便化する目的で、血液を材料とした nm23 蛋白質の定量システムを作製した。この方法は、骨髄細胞の採取という患者の負担を軽減するばかりでなく、手術適応例以外の固形腫瘍に至るまで応用可能となり、さらに測定操作も簡便化されている。この方法を利用して、悪性リンパ腫について検討したところ既存の国際予後指標のいずれよりも優れた予後因子となることが明らかになった。本年度は、この結果を多施設・多数例による追試で確認するとともに他の造血器腫瘍および固形腫瘍について予後診断への応用を検討することを目的とした。

B. 研究方法

急性骨髄性白血病 (AML) 102 例、急性リンパ性白血病 6 例、慢性骨髄性白血病 21 例、骨髄異形成症候群 18 例、多発性骨髄腫 21 例、慢性リンパ性白血病 4 例、ホジキン病 40 例、非ホジキンリンパ腫 548 例 (indolent type 108 例、aggressive type 440 例)、正常対照 45 例。血清 nm23-H1 蛋白質は、サンドイッチ ELISA 法により測定した。
(倫理面への配慮)
埼玉県立がんセンター倫理委員会の審査を受けた。また、研究結果が第三者に特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

白血病で RT-PCR 法により nm23 mRNA を定量し予後因子となることを既に明らかにしている。血液中に分泌される nm23-H1 蛋白質を定量する ELISA 法を利用して、血中 nm23-H1 蛋白質が白血病においても簡便な予後予測法となりうるかどうかを検討した。AML 102 症例について血中 nm23-H1 を測定した。AML では健常人血中レベルに比べ有意に高値であった。nm23-H1 高値群と低値群を比較すると、高値群では生存率の顕著な低下を認めた。多変量解

析により、血中 nm23-H1 レベルは AML の有意な予後因子となることが明らかになった。また、血中 nm23-H1 レベルは、細胞内 nm23-H1 mRNA 発現レベルや末梢血総白血球数とは相関しないが、その積に相関した。したがって、血中 nm23-H1 レベルは総 nm23-H1 蛋白量を反映していると推察された。

AML 以外の造血器腫瘍 70 症例（急性リンパ性白血病 6 例、慢性骨髄性白血病 21 例、骨髄異形成症候群 18 例、多発性骨髄腫 21 例、慢性リンパ性白血病 4 例）についても測定した。いずれの疾患においても、健常人血中レベルに比べ有意に高値であった。したがって、これらの疾患においても予後因子となる可能性が示唆された。

悪性リンパ腫については、Adult Lymphoma Treatment Study Group による大規模な検討においても優れた予後因子となった。314 例の diffuse large B cell lymphoma における解析では、血中 nm23 蛋白質高値群では生存率の顕著な低下を認めた。また、国際予後指標 (IPI) の risk group 別に検討したが、各 risk group で nm23-H1 高値の症例で有意に生存率が低かった。

D. 考察

がんの予後診断に用いる検体は、腫瘍組織よりも血液の方が、患者の身体的負担、検査試料採取の容易性、大量処理の面から考えて有利である。急性骨髄性白血病と悪性リンパ腫では血中 nm23-H1 蛋白質レベルが、既知の予後因子から独立した予後因子であり、臨床的にきわめて有用である。特に、治療指針の選択に予後因子解析が重要である悪性リンパ腫については、予後診断への実用化が期待できる。「nm23 タンパク質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」として特許出願申請をするとともに、血中 nm23 蛋白質の測定キットを進めている。しかし、この顕著な臨床的意義にもかかわらず、その分子基盤は明らかにされていない。今後の重要な研究課題である。

また、nm23 遺伝子の高発現が観察されている他の造血器腫瘍や固形腫瘍についても今後検討したい。

E. 結論

血清 nm23-H1 蛋白質は急性骨髄性白血病や悪性リンパ腫の重要な独立した予後因子であることを示した。特に、aggressive 非ホジキンリンパ腫における結果は多施設・多数例による追試でも確認した。今後層別化した治療戦略を検討する上で有用な因子であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niitsu, N., Okabe-Kado, J., Nakayama, M., Wakimoto, W., Sakashita, A., Maseki, N., Motoyoshi, M., Umeda, M., and Honma, Y. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implication in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 96: 1080-1086, 2000.
- 2) Niitsu, N., Kasukabe, T., Yokoyama, A., Okabe-Kado, J., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Umeda, M., and Honma, Y. Anticancer derivative of butyric acid (pivalyloxymethyl butyrate) specifically potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and daunorubicin through the suppression of microsomal glycosidic activity. *Mol. Pharmacol.*, 58: 27-36, 2000.
- 3) Niitsu, N., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Umeda, M., and Honma, Y. Antileukemic efficacy of 2'-deoxycoformycin in monocytic leukemia cells. *Blood*, 96: 1512-1516, 2000.
- 4) Honma, Y., Ishii, Y., Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Kakegawa, T., and Awaya, A. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by novel synthetic neurotrophic pyrimidine derivatives. *Exp. Hematol.*, 29: 194-201, 2001.
- 5) Niitsu, N., Okabe-Kado, J., Okamoto, M., Takagi, T., Yoshida, T., Aoki, S., Hirano, M., and Honma, Y. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin's lymphoma.