

Blood, 97: 1202-1210, 2001.

6) 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.

7) 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.

#### 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

### 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

分担研究者 石井 勝

埼玉県立がんセンター 総長

**研究要旨** MDM2 (Murine Double Minute 2) 蛋白質は、がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として、発癌、がんの進展に重要な役割を演じている。この蛋白質に対する血中 MDM2 自己抗体の測定法を開発し、早期がんの血清診断を試みた。血中 MDM2 蛋白抗体の測定はマイクロプレート固相化 MDM2 合成ペプチド抗原 (N 末端側の 20 アミノ酸残基) に対してビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 抗体と被検血清中の MDM2 蛋白自己抗体とを競合免疫結合反応させた後、固相化 MDM2 合成ペプチド抗原に結合したビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 抗体に酵素標識ストレプトアビジンを反応させる EIA 法で行った。本法により血中 MDM2 蛋白自己抗体を測定した結果、健常人 49 例は全例  $5 \mu\text{g/ml}$  以下であった。カットオフ値を  $5 \mu\text{g/ml}$  とした場合、乳癌、胃癌、肺癌の血中 MDM2 蛋白自己抗体陽性率は各々 64 % (23/36)、33% (17/51)、65% (30/46) を示した。また、早期乳癌 (0, I 期) では陽性率は 80% (9/11)、早期胃癌 (IA 期) では 34% (12/35) で、早期がんでも陽性率が高い傾向を示し、胃癌、肺癌では未分化型癌に比べ、分化型癌で血中 MDM2 自己抗体陽性率が高い傾向を示した。従って、それらががんの早期診断に役立つ腫瘍マーカーとして血中 MDM2 蛋白自己

#### A. 研究目的

MDM2 蛋白はがん抑制遺伝子産物の 1 つである p53 によって転写活性化され、p53 と結合するがん遺伝子産物であり、p53 に結合して p53 の転写活性を抑制することが知られている。近年、MDM2 蛋白による p53 の作用抑制機構に MDM2 蛋白がユビキチンリカーゼとして働き、p53 をユビキチン化して p53 を分解に導く作用があることが判明した。従って、MDM2 蛋白は各種がん細胞において高発現が認められ、p53 の分解酵素として働くことから、がんの発生機構に重要な役割をしていると考えられる。他方、担がん宿主においては腫瘍免疫反応により、がん細胞が破壊され、細胞核内に存在する MDM2 蛋白が細胞外へ移行する結果、体液性抗体の産生が生ずると考えられる。そこで、血中 MDM2 蛋白自己抗体の定量測定法を開発を行い、本測定法により各種がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定を行い、早期がん診断に対する血中 MDM2 蛋白自己抗体の臨床的有用性を検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### a) 血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定方法

MDM2 蛋白抗原は N 末端側の 20 アミノ酸残基から成る合成ペプチド抗原を用い、そのペプチド抗原に対するポリクローナル MDM2 家兎 IgG 抗体を標準抗体として用いた。さらに、その IgG 抗体を用いて Sulfo-NHS-LC-Biotin によりビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 抗体を作製し、デキストランカラムクロマトグラフィーを行いビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 精製抗体を得た。本年は血中 MDM2 蛋白自己抗体測定のために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 蛋白自己抗体とビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 精製抗体とを競合免疫結合反応させた後、マイクロプレート固相化 MDM2 合成ペプチド抗原に結合したビオチン標識 MDM2 家兎 IgG 精製抗体をアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンにて捕捉する酵素免疫測定法 (EIA) を開発した。本法により健常人およびがん患者血中の MDM2 蛋白自己抗体の測定を行った。以下に

その測定手順を述べる。標準 MDM2 蛋白家兎 IgG 抗体は 32  $\mu$ g/ml から 0.5  $\mu$ g/ml までウシ胎児血清にて倍々希釈したものを用意し、1%ウシ胎児血清および 0.1%正常家兎血清を含む P B S 緩衝液にて 9 倍希釈する。被検血清も同緩衝液にて 9 倍希釈し、マイクロプレート固相化 MDM2 合成ペプチド抗原に、9 倍希釈した標準抗体液とともに 100  $\mu$ l ずつ分注し、30  $^{\circ}$ C で 120 分反応させた。反応後、反応液を吸引除去し、各ウエルを 0.02% Tween20 を含む生食水にて 3 回洗浄し、1%ウシ胎児血清を含むトリス塩酸緩衝液にて 3  $\mu$ g/ml の濃度に調製したアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン溶液を各ウエルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、30  $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。反応後、反応液を吸引除去し、各ウエルを 0.02% Tween20 を含む生食水にて 3 回洗浄し、0.1 M 炭酸緩衝液 pH9.6 にて 4 mg/ml の濃度に調製した基質パラニトロフェニルりん酸塩を各ウエルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、30  $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。反応後、0.1 N の水酸化ナトリウム液を各ウエルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、反応を停止させた。次いで、波長 405 nm で吸光度を測定し、各標準 MDM2 家兎 IgG 抗体の吸光度から標準 MDM2 蛋白抗体検量線を作成し、その標準検量線から各被検血清中の MDM2 蛋白自己抗体量を求めた。

#### b) 対象検体

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。その男女別内訳は健常人が男性 24 例、女性 25 例、胃癌がそれぞれ 35 例と 16 例、肺癌が 33 例と 13 例であった。各血清は MDM2 蛋白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症例の血清であった。

(倫理面への配慮)

平成 12 年度のこの研究内容については、埼玉県立がんセンター倫理委員会で審議され、承認を受けた。個人情報に関する研究結果については本人が希望すれば伝えるが、第三者には決して伝えないこととした。

### C. 研究結果

#### a) 血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定成績

競合免疫結合反応に基づく EIA を開発し、本法により健常人および各種がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定を行った。その結果、健常人 49 例の血中 MDM2 蛋白自己抗体は 5  $\mu$ g/ml 以下であった。一方、がん患者の血中 MDM2 蛋白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  $\mu$ 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。さらに、乳癌の病期別血中 MDM2 自己抗体陽性率は 0 期が 100% (1/1)、I 期が 80% (8/10)、II 期が 58.8% (10/17)、III 期が 50% (4/8) で、とりわけ 0 期および I 期における陽性率が II 期以上に比較して、高い傾向を示した。胃癌の病期別血中 MDM2 自己抗体陽性率は I A 期が 34.3% (12/35)、I B 期が 44.4% (4/9)、II 期が 25% (1/4)、III 期が 0% (0/3) であり、症例数は少ないが、II 期および III 期に比較して、I A 期および I B 期で陽性率がより高い傾向を示した。また、乳癌および肺癌の組織型別血中 MDM2 自己抗体陽性率は乳癌では硬癌が 71.4% (15/21)、乳頭腺管癌 57.1% (4/7)、充実腺管癌 0% (0/3)、小葉癌 0% (0/1)、粘液癌 100% (1/1)、アポクリン癌 100% (2/2) であり、乳癌の組織型における陽性率に有意な差は認めなかった。肺癌では扁平上皮癌が 75% (9/12)、腺癌 60% (18/30)、大細胞癌 0% (0/1)、小細胞癌 100% (2/2)、不明 100% (1/1) であり、肺癌の組織型における陽性率に有意な差は認められなかった。さらに、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、分化型胃癌では 36.7% (11/30)、未分化型胃癌は 28.6% (6/21) であり、未分化型に比較し、分化型で陽性率が高い傾向を示した。肺扁平上皮癌では高分化型が 100% (1/1)、中分化型が 100% (7/7)、低分化型が 25% (1/4) で、肺腺癌ではそれぞれ 83.3% (5/6)、46.7% (7/15)、0% (0/1) であり、肺癌でも分化度が高いほど血中 MDM2 自己抗体の陽性率が高くなる傾向を示した。

#### D. 考察

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。

近年、MDM2 蛋白は乳癌、肺癌などの癌細胞において正常細胞に比較して高発現が認められ、がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として発癌、がんの進展に重要な役割を演じている。細胞核内に局在する MDM2 蛋白は容易に細胞外へ移行しないが、発がん初期に宿主免疫反応により、がん細胞が破壊され、MDM2 蛋白が細胞外へ移行し、その結果、担がん宿主の血中に MDM2 蛋白自己抗体が生ずることが予測される。そこで、血中 MDM2 蛋白自己抗体による早期がん診断法の開発を試みた。今回、MDM2 蛋白の N 末端側の合成ペプチド抗原 (20mer) とその抗原に対する特異的な家兎 IgG 抗体のビオチン標識物を用い、競合免疫結合反応に基づく酵素免疫測定法 (EIA) による MDM2 抗体測定法を開発した。標準抗体は合成ペプチド抗原 (20mer) に対する特異家兎 IgG 抗体を用い、その抗体のビオチン標識物と血中に存在する MDM2 蛋白自己抗体とを固相化 MDM2 合成ペプチド抗原に対して競合させる競合免疫結合反応による EIA 法であった。本法による日差、日内変動は 10 % 以内と良好であった。本測定法により、182 例の血清 MDM2 蛋白自己抗体を測定した。その結果、健常人 49 例の血中 MDM2 蛋白自己抗体は  $5 \mu\text{g/ml}$  以下を示し、男女別の有意差を認めなかった。一方、がん患者の血中 MDM2 蛋白自己抗体は健常人に比較して有意に高値を示した。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。胃癌の男女別陽性率は男性が 34.3 % (12/35)、女性が 31.3 % (5/16)、肺癌では男性が 66.7 % (22/33)、女性が 61.5 % (8/13) であり、健常人同様男女別陽性率に有意差は認めなかった。本法による血中 MDM2 自己抗体測定成績から、健常人においては  $5 \mu\text{g/ml}$  以下の MDM2 自己抗体が存在し、がん疾患では健常人に比較して  $5 \mu\text{g/ml}$  以上の多量の MDM2 自己抗体が血中に存在し、男女別の差がないことが判明した。さらに、早期乳癌 (0 期と I 期) の血中 MDM2 自己抗体陽性率

は 81.8 % (9/11) であり、II 期の 58.8 % (10/17)、III 期の 50 % (4/8) の陽性率に比較して、高い陽性率を示した。胃癌の血中 MDM2 自己抗体陽性率においても I A 期が 34.3 % (12/35)、I B 期が 44.4 % (4/9) であり、II 期の 25 % (1/4)、III 期の 0 % (0/3) に比較して早期ほど高い陽性率を示した。従って、乳癌および胃癌の早期癌に対する血中 MDM2 自己抗体の臨床的有用性が示唆された。また、乳癌および肺癌の組織型別血中 MDM2 自己抗体陽性率を比較検討した結果、組織型における陽性率に有意な差は認められなかった。しかし、胃癌、肺扁平上皮癌および肺腺癌について分化度別に血中 MDM2 自己抗体陽性率を比較検討した結果、胃癌では分化型で 36.7 % (11/30)、未分化型では 28.6 % (6/21) となり、分化型が未分化型に比較してわずかに高い陽性率を示した。肺扁平上皮癌では高分化型が 100 % (1/1)、中分化型が 100 % (7/7) と高い陽性率を示し、低分化型では 25 % (1/4) と低い陽性率であった。肺腺癌では高分化型が 83.3 % (5/6) と高い陽性率を示し、中分化型が 46.7 % (7/15)、低分化型が 0 % (0/1) であり、分化度が低くなるにつれて陽性率が低下する傾向を示した。以上の成績から、乳癌および肺癌では血中 MDM2 自己抗体の出現率は組織型と無関係であるが、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。そこで、分化型胃癌 10 例および未分化型胃癌 10 例の癌部と非癌部について EIA 法で使用したのと同じ MDM2 家兎 IgG 抗体を用いて免疫組織学的染色を試みた。50 % 以上が染色される場合を陽性、染色が 20 % 以下であった場合を陰性とし、癌部が非癌部よりもより強く染色される場合を高発現、癌部と非癌部とが同じ位染色される場合を同程度、癌部よりも非癌部組織がより強く染色された場合を低発現とした時の結果は、分化型胃癌 10 例のうち高発現が 7 例、同程度が 3 例、低発現が 0 例であったのに対し、未分化胃癌 10 例では高発現が 0 例、同程度が 5 例、低発現が 5 例であった。MDM2 家兎 IgG 抗体を用いた免疫組織学的染色成績から、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、未分化癌では癌部よりも非癌部において MDM2 の発現が高い傾向を示す成績であった。以上の未分化型よりも分化型胃癌組織において、MDM2 抗原の発現が高い免疫組織学的染色成績は今回開発した本 EIA 法による血中 MDM2 自己抗体陽性率が未分化型胃癌よりも分化型胃癌で高かった結果を裏付けるものと考えられた。今後、肺癌についても分化度別による免疫組織学的染色を行い、EIA 法による血中 MDM2 自己抗体測定成績との関連を検討する必要があると考えられた。さらに、早期がんにおける血中 MDM2 蛋白自己抗体の有用性についても症例を増やし、検討を行う必要があると考えられた。一方、がん特異性が高く、早期がんを高発現を示す MDM2 蛋白抗原決定基を究明し、その抗原に対する血中自己抗体を指標としたがんの早期診断法に関する研究を進める必要があると思われた。また、血中 MDM2 蛋白自己抗体の測定系については、簡便で短時間に、しかも再現性のすぐれたものに改良を重ねていくことが必要であり、血中 MDM2 蛋白自己抗体の腫瘍マーカーとしての有用性についてもさらなる検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

がん抑制遺伝子 p53 蛋白の分解酵素として、発がん、がん進展に重要な役割を演じている MDM2 に対する血中 MDM2 蛋白自己抗体の競合免疫結合反応に基づく EIA 法の開発を行い、早期がん診断への臨床的有用性を検討した。本測定法により、血中 MDM2 蛋白自己抗体を測定した結果、健常人では男女ともに  $5 \mu\text{g/ml}$  以下を示した。一方、がん疾患ではカットオフ値を  $5 \mu\text{g/ml}$  にした場合、乳癌、胃癌および肺癌の血中 MDM2 蛋白自己抗体陽性率は 64%、33%、65%であった。また、乳癌および胃癌の病期別血中 MDM2 蛋白自己抗体陽性率は早期癌ほど高い陽性率を示した。その結果、早期癌に対する血中 MDM2 蛋白自己抗体の臨床的有用性が示唆された。さらに、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 蛋白自己抗体陽性率が高い傾向を示した。従って、本法による血中 MDM2 蛋白自己

抗体が乳癌、胃癌および肺癌の腫瘍マーカーとしての臨床的有用性が示唆され、乳癌および胃癌では早期診断への有用性が期待できる成績であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 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講演予稿集(2000) p40.

2) 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 分担研究報告書

### 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

分担研究者 林 慎一

埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

**研究要旨** 乳癌の発生・進展にはエストロゲンレセプター(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、以前同定した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 ファミリーの一つである LAP である可能性を示した。また、癌遺伝子 MDM2 が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。

#### A. 研究目的

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。これらの癌細胞では核内ステロイドホルモン受容体の発現と消失が臨床像と密接に関係し、実際、受容体発現を指標にホルモン剤が投与されている。この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、エストロゲンレセプター(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。これが乳癌の発生・進展とどのような関係を有するかを解明し、早期診断と予防への応用の可能性を探る。さらに、このような現象が乳癌の発生・進展にどのような影響を与えるのか、癌関連遺伝子 (p53、MDM2) と核内受容体との相互作用の問題も含めて明らかにする。また、受容体陽性でもホルモン剤が奏功性を示さない場合も多く、より正確な新規の診断指標が求められている。そこで、その診断に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

(1) ER 遺伝子上の各プロモーター領域の構造と機能について、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

法などを用いて解析する。これらの結果から、*in vivo* での発現の亢進の原因となっている発現誘導因子を同定、単離する。単離された因子の構造と機能について解析を進め、臨床応用の可能性を探る。(2) ER と癌関連遺伝子との機能的相互作用について、それぞれの遺伝子の安定発現細胞株を作成し、その増殖能やレポーターアッセイ、mammalian two-hybrid 法や GST-pull down 法を用いて解析する。(3) 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行う。その解析結果に基づいて絞り込んだ候補遺伝子を埋め込んだカスタムチップを作成する。これを用いて各種培養細胞、ヒト乳癌組織を対象にプロファイル解析を行い、ホルモン療法応答性に関するデータベースを構築する。

(倫理面への配慮) 乳癌診断用マイクロアレイ開発に供する研究材料は手術によって得られる腫瘍組織であるが、本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。なお、本研究は当がんセンター倫理委員会の承認を得ている。

#### C. 研究結果

(1) 以前、我々が同定した 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  $\beta$  (LAP) である可能性を明らかにした。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が示され、また、LAP の発現ベクターの導入により、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を上昇させた。

(2) 癌遺伝子 MDM2 を安定導入した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 ERE レポーター活性が著しく高まっていることが明らかとなった。また、two-hybrid 法と GST pull-down 法によって両者が直接結合しうることが示された。(3) 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ものも含まれていた。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

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予防が可能かどうかはこの点に依存する。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。以前、p53 が ER の機能を阻害することを示したが、最近、逆に ER が p53 の機能を阻害しうることも見出した。このように核内受容体と癌関連遺伝子の機能的相互作用は、最近他より報告された、BRCA1 と ER との相互作用の例もあるように、今後、益々明らかになってくると思われる。乳癌の治療を考える上で重要な知見である。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、膨大な情報を提供している。たとえば、野生型 MCF-7 乳癌細胞と、そのタモキシフェン耐性株との発現プロファイルの比較から、タモキシフェン耐性に関わる可能性のある遺伝子が浮かび上がってきた。今後、カスタムチップを作成し、さらに詳細な検討を行っていく。

#### E. 結論

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 の機能が癌関連遺伝子によっても制御されうることが明らかにした。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) 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 in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 259-265, 2001.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

5) 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  $\alpha$  gene expression in human breast cancer: Methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis*, 21: 2193-2201, 2000.

6) 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 and Differ.*, 7: 439-446, 2000.

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

8) 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.

9) 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) 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 $\alpha$ の作用機構。第8回乳癌学会総会抄録集 p230, 2000.

2) 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。大宮ソニックスティール、6月23日、2000.

3) Hayashi, S.-I., Yoshida, T., Yoshida, N., Tanimoto, K., Okumura, N., Saji, S., and Eguchi, H. Modulators of estrogen receptor  $\alpha$  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.

4) 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 p241, 2000.

5) 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 p484, 2000.

6) 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  $\beta$  の発現。第59回日本癌学会総会記事 p484, 2000.

7) 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 p484, 2000.

8) 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 p484, 2000.

9) 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  $\beta$  発現の検討。第59回日本癌学会総会記事 p485, 2000.

10) 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  $\beta$  のヒト肺での発現。第73回日本生化学会大会抄録 p986, 2000.

11) 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 p986, 2000.

12) 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  $\beta$  の発現と機能解析。第41回日本肺癌学会総会 p377, 2000.

13) 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  $\beta$  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 大阪

14) 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 p30, 2000.

15) 大本陽子、江口英孝、岩瀬弘敬、林 慎二．エストロゲンレセプター $\beta$ 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 p410, 2000.

16) 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 $\alpha$ 転写活性調節．第 23 回日本分子生物学会年会要旨集 p410, 2000.

17) 坂本隆子、江口英孝、森 宏之、林 慎二．子宮内膜癌におけるエストロゲンレセプター(ER) $\alpha$ 、 $\beta$ 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 p783, 2000.

18) 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 p410, 2000.

19) 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 p786, 2000.

20) 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

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 (金子 安比古)

- 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).

分担研究者 (土屋永寿)

- 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) 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
- 5) 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.
- 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

分担研究者 (角 純子)

- 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. *Blood*, 97: 1202-1210, 2001.
  - 6) 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.
  - 7) 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.

分担研究者 (林 慎一)

- 1) 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 \_ gene expression in human breast cancer: Methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis*, 21: 2193-2201, 2000.
- 2) 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 and Differ.*, 7: 439-446, 2000.
- 3) 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.
- 4) Saji, S., Okumura, N., Eguchi, H., Nakashima, S., Suzuki, A., Toi, M., Nozawa, Y., and Hayashi, S.-I. MDM2 enhances the function of estrogen receptor in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 259-265, 2001.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 林 慎一、江口英孝．乳癌発症の分子機構．現代医療，32: 1835-1841, 2000.
- 8) 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.
- 9) 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.

