

200100157A

厚生科学研究研究費補助金  
厚生科学特別研究事業

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

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 畠 清彦

平成14(2002)年3月

## 目 次

### I . 総括研究報告

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

細胞周期関連分子、アポトーシス関連遺伝子の発現と種々のがん細胞の微小残存、 微小転移度との関連に関する研究 畠 清彦	-----	6
--	-------	---

### II . 分担研究報告

1. サイトケラチンと p53-細胞周期関連遺伝子の発現による乳癌のリスク群の分類 伊藤 良則	-----	9
2. Bone morphogenetic protein (BMP) と乳癌骨転移との関係 高橋 俊二	-----	11
3. 分子生物学を駆使した大腸癌肝転移巣近傍の癌の進展についての検討 國土 典宏	-----	12
4. 大腸癌の免疫原性を利用した微小転移病変ならびにその治療に関する研究 山口 俊晴	-----	14
5. 微小転移の実態把握と診断の迅速化・簡易化に関する研究 中森 正二	-----	16
6. 転移性大腸癌、胆のう癌細胞に対するモノクローナル抗体を用いた 早期診断と免疫原性の研究 石坂 幸人	-----	18
7. 細胞周期のチェックポイントに関係するホメオボックス遺伝子の各転移性腫瘍に おける意義 Six と HAT (Histone Acetyl Transferase) 川上 潔	-----	20
III . 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

総括研究報告書

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

主任研究者 畠清彦 財団法人癌研究会附属病院 化学療法科 部長

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

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

A. 研究目的

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

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

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

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

2. 病変における細胞の特性の研究

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

B. 研究方法

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

肝臓癌では血中の微小残存病変としてマーカーとなる $\alpha$ -fetoproteinやCEAについてRT-PCRの系を作成する。

C. 研究結果

内皮細胞由来インターロイキン8による細胞死の抵抗性の機序としてCD13の高発現が見出された。

CD13 抗原については、アミノペプチダーゼNとして活性を有する蛋白であり、白血病の中でCD13 陽性群が、我々の見出した内皮細胞由来インターロイキン8 に対して耐性であり、アミノペプチダーゼN に対する酵素阻害剤により細胞死を促進、耐性機序の回復ができた。また他にβ2-ミクログロブリンが細胞死の誘導因子である事がわかった。さらにこの蛋白の発現から薬剤耐性の機序のひとつに関係しているという報告があり、検討中である。肝臓癌ではα-fetoprotein に対してRT-PCR の系を作成し微小残存病変の判定量的測定を可能とした。

#### D. 考察

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

Six ファミリーについては、白血病の株細胞を増殖分化させ検討した。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

特にありません

#### G. 論文発表

##### 1. 論文発表

Watanabe J, Kondo H, Hatake K. Leukemia and Lymphoma, in press. 2001.

Watanabe J, Hatake K. Leukemia and Lymphoma, in press. 2001.

Yuji Mishima, Yasuhito Terui, Hiroshi Tomizuka, Masaki Mori, Masaya Uwai, Masuzu Ueda, Miyuki Tanaka, Muneo Yamada, Hirotohi Hayasawa, Keiya Ozawa, Noboru Horikoshi, and Kiyohiko Hatake. CD13/aminopeptidase-N is a resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis. ICCAS supplement, 2001. in press.

Mori M, Hatake K, Ozawa K. CAM-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia with trilineage dysplasia: Usefulness of in vitro apoptosis in leukaemic cells. Leukemia and Lymphoma. 2001, in press.

Mityazato A, Hatake K, Mano H. Identification of myelodysplastic syndrome(MDS)-specific genes screened by Background matched method. Blood, in press. 2001.

Masaki Mori, Yasuhito Terui, Miyuki Tanaka, Hiroshi Tomizuka, Yuji Mishima, Masayuki Ikeda, Tadashi Kasahara, Masaya Uwai, Masuzu Ueda, Rie Inoue, Takehito Itoh, Muneo Yamada, Hirotohi Hayasawa, Yusuke Furukawa, Yukihito Ishizaka, Keiya Ozawa, and Kiyohiko Hatake. Anti-Tumor Effect of β2-Microglobulin in Leukemic Cells-Bearing Mice via Apoptosis-Inducing Activity: Activation of Caspase-3 and NF-κB. Cancer Res. in press. 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muroi K, Suzuki T, Amemiya Y, Yoshida M, Kawano C, .

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

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

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

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

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

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

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

Ito Y. [Paclitaxel for treatment of advanced breast cancers]. *日本臨床*. 2000 Apr;58 Suppl:259-64.

伊藤良則 乳癌の診断と治療 一最新の研究動向一  
*日本臨床* (58):259-264

伊藤良則 タキサン系薬剤 一適応とレジメン一  
*癌の臨床* 46(5):725-731

伊藤良則 乳がんの薬物療法 臨床看護 26(7):1069-1074

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

Koizumi M, Suzuki T, Takahashi S, Ogata E. Transient splenic accumulation of Tc-99m HMDP caused by megaloblastic anemia. *Clin Nucl Med*. 2000 Dec;25(12):1024-7.

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

Kokudo N, Kimura H, Yamamoto H, Seki M, Ohta H, Matsubara T, Takahashi T. Hepatic parenchymal transec-

tion using ultrasonic coagulating shears: a preliminary report. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000;7(3):295-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai M, Kusama T, Fujii H, Matsumoto Y, Akedo H. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell pro-

liferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res.* 2000;32(6):374-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sakon M, Nagano H, Shimizu J, Kondo M, Nakamori S, Dono K, Umeshita K, Nakamura H, Murakami T, Monden M. He-

patic resection of hepatocellular carcinomas based on tumor hemodynamics. *J Surg Oncol.* 2000 Mar;73(3):179-81. No abstract available.

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

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

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

Gotoh K, Nagano H, Sakon M, Miyamoto A, Shimizu J, Taniguchi H, Dono K, Nakamori S,

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

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

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

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

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

Kobayashi M, Osanai H, Kawakami K, Yamamoto M. Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites. *Mech Dev.* 2000 Nov;98(1-2):151-5.

Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-

like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Oct 10;97(21):11403-8.

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

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

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

## 2. 学会発表

伊藤良則 再発乳癌化学療法 -Evidence の解釈-

第8回 日本乳癌学会 横浜 2000年5月

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

伊藤良則、田部井敏夫 日本の臨床試験の現状

前橋 2000年6月

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

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

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

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

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

前橋、2000年6月

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

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

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

第9回日本乳癌学会総会、前橋、2000年6月

## H. 知的財産権の出願。登録状況

### 1. 特許取得

特にありません。

### 2. 実用新案登録

特にありません。

### 3. その他

特にありません。

総括研究報告書

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

主任研究者 畠清彦 財団法人 癌研究会附属病院 化学療法科 部長

内皮細胞由来インターロイキン8による細胞死の耐性機序としてCD13/アミノペプチダーゼNが関与しており、白血病細胞のうち急性前骨髄球性白血病株NB-4のみが全く耐性であった。さらにCD13遺伝子を導入したK562細胞でもこの耐性は証明され、この酵素活性を抑制する阻害剤ubenimexを添加することによって、この耐性を克服でき、治療にも応用可能である。固形腫瘍でも同様に、大腸癌ではCD13が発現している症例もあり、株細胞での検討を行った。

伊藤良則	財団法人癌研究会	医長
高橋俊二	財団法人癌研究会	医員
國土典宏	東京大学 外科学	助教授
山口俊晴	財団法人癌研究会	消化器外科部長
中森正二	大阪大学医学部	助手
石坂幸人	国立国際医療センター	部長
川上潔	自治医科大学	生物学 教授

A.研究目的

血液系悪性疾患に対する高用量化学療法または造血幹細胞移植術によって、これまでに治癒の期待されなかった癌腫が、治癒、その後の社会復帰が期待できるようになってきた。また血液系の悪性疾患は、これまでに解明された技術により、微小残存病変の存在を予測したり、 $10^6$ 個に1個の白血病細胞や悪性リンパ腫細胞の混入を検出できるようになった基礎的研究がある。固形がんの治療法においても、手術や化学療法後の微小残存病変の評価、さらに早期再発を予測するために微小転移病変の発見により、早期の治療に入れるようにすることは重要である。特に術後の強力な化学療法を必要とする癌腫や血行性、リンパ行性の転移をするために予後不良である大腸癌や膵癌、胆のう癌においては早急な社会的要請が生じている。手術中または直後に微小転移部分の存在が証明された患者さんでは、続いて強力な化学療法や免疫療法ができるだけ早急に開始できる。特にこれまでに用いられなかった大腸癌や胆のう癌、膵癌細胞に対する抗体を用いて残存する細胞を検出したり、これまでに研究されていないDNA合成やヒストンのアセチル化に関する酵素活性や細胞周期に関する遺伝子や遺伝子産物を検討する。さらに新たな転移しやすい、もしくは初期治療により残存死やすい癌腫がさらに区別することによって、層別化を行って、治療方法を選択できるようになる成果が得られる。またがん基礎および臨床研究者の交流、共同研究を全く新たな分野同士で行うことにより、新たな展開をはかり、異なる癌腫の研究に進展も期待される。これらは現在外科領域や乳癌領域で

導入されてきた造血幹細胞採取や移植における採取時の混入細胞の有無を判定したり、混入した癌細胞を抗腫瘍効果によって殺細胞効果を誘導する手段としての抗体の候補を探すことにも繋がる。移植前処置術の発展にも貢献する。

B.研究方法

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

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

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



らに追求して、残存病変の検出を向上させる。今後胆のう癌、膵癌に対するモノクローナル抗体を作成しているところであるので、癌種を広げて検討する。臨床検体の使用については各施設の IRB、厚生省の遺伝子解析研究の倫理指針案に従う。

## 2. 病変における細胞の特性の研究

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

平成12年度 主として基礎的検討を行う。白血病細胞を用いてアポトーシスに対して抵抗性の機序を研究する。化学療法や造血細胞移植術において、自己血では腫瘍細胞の混入のないことが前提である。しかしまだ十分に残存病変の評価がされているわけではない。腫瘍細胞の除去を目標として研究する。大腸癌細胞を免疫して得られた抗体は、認識部位を示す7ペプチド構造が決定されたので、この抗体を用いて臨床検体での微小残存病変、微小転移病変の検出を試みる。乳癌や大腸癌での周囲の破骨細胞の転移における役割を研究する。内皮細胞に準じて腫瘍細胞との相互作用を研究する。また腫瘍細胞の糖鎖の変化も検討する。固形腫瘍においても HAT、Six など転写因子やホメオボックス遺伝子の発現と悪性度の研究を行う。これらの抗原性や悪性度、転写因子などの関連を基礎的に検討する。平成13年度 主として臨床検体を用いて、研究する。これにあたっては、各施設の IRB、生体材料を用いた遺伝子解析に関する厚生省の指針案の作成からこれを遵守して行う。

## C. 研究結果

内皮細胞は、白血病細胞の接着により活性化され、内皮細胞由来インターロイキン8を放出し、細胞死を誘導するが、白血病細胞表面のアミノペプチダーゼNであるCD13が高発現している細胞では、細胞死耐性である。この酵素阻害剤である ubenimex を添加すると、白血病細胞に作用するだけでなく、血管内皮細胞にも作用して、種々の遺伝子を活性化するが、内皮細胞由来インターロイキン8の放出、遺伝子の活性化を誘導が生じた。これによって腫瘍細胞に対して接着により細胞死の誘導が生じ、さらに抗腫瘍効果が増強されることがわかった。固形腫瘍のうち大腸癌や肺がんでもCD13が発現している場合があり、検討中である。

## D. 考察

大腸癌の症例で、CD13の発現、発現していない例との比較がなされ、発現している症例の予後が不良である報告がされている。また肺扁平上皮癌の術後に bestatin というCD13に対する酵素阻害剤を2年間投与した症例群で、予後の改善が認められている。このようにCD13が固形腫瘍でも予後に関係する知見が見い出されており、内皮細胞の分化にもCD13抗原の発現は必須であり、内皮細胞が細胞死に重要な役割を演じており、抗腫瘍作用に関係していることを示す知見である。β2-ミクログロブリンについては、悪性黒色腫において増殖抑制する蛋白を精製したところ、β2-ミクログロブリンであった報告があり、興味深い。共同研究を開始している。

## E. 結論

白血病細胞におけるCD13発現は内皮細胞由来インターロイキン8による細胞死に耐性であり、アミノペプチダーゼ阻害剤の添加によりこの耐性は克服された。この機序が固形腫瘍の一部でも生じている可能性があり、今後応用可能である。

## F. 健康危険情報

特にありません

## G. 論文発表

### 1. 論文発表

Igarashi H, Hatake K, Shiraishi H, Samada K, Tomizuka H, Momoi MY. Elevated serum levels of macrophage colony-stimulating factor in patients with Kawasaki disease complicated by cardiac lesions. Clin Exp Rheumatol. 19:751-6, 2001.

Mori M, Hatake K, Tanaka M, Takatoku M, Matsumoto Y, Uchida M, Kametaka M, Terui Y, Tomizuka H, Muroi K, Ozawa K. CAM-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia with trilineage dysplasia: Usefulness of in vitro apoptosis in leukaemic cells. Leukemia and Lymphoma. 42:387-391. 2001.

Tanaka-Dounono M, Suzu S, Yamada M, Wakimoto N, Hayasawa H, Hatake K, Motoyoshi K. Detection of Murine Adult Bone Marrow Stroma-Initiating Cells in Lin<sup>c-fms</sup><sup>+</sup>c-kit<sup>low</sup>VCAM-1<sup>+</sup> cells. J Cell Physiol. 189: 45-53, 2001.

Watanabe J, Kondo H and Hatake K. Autologous Stem Cell Transplantations for Recurrent Adult T Cell Leukemia/lymphoma Using Highly Purified CD34+ Cells Derived from Cryopreserved Peripheral Blood Stem Cell. Leukemia and Lymphoma. 42:1115-7, 2001.

Watanabe J-I, Kondo H, Iwazaki H, Hatake K, Horikoshi N. An unusual association of monoclonal

gammopathy, paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and myelodysplastic syndrome transformed into acute myeloid leukaemia: coexistence of triple clonal disorders. *Leukemia and Lymphoma*.42:813-7, 2001.

Mori M, Terui Y, Tanaka M, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Ueda M, Inoue R, Itoh T, Yamada M, Hayasawa H, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. Anti-tumor effect of b2-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-kB. *Cancer Res*. 2001; 61:4414-7.

Mishima Y, Terui Y, Tomizuka H, Mori M, Uwai<sup>3</sup> M, Ueda M, Tanaka M, Yamada M, Hayasawa H, Ozawa K, Horikoshi N, and Hatake K. CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis ICCSA supplement, Cell-surface aminopeptidases: Basic and clinical aspects. 177-184, 2001. ElsevierScience. Edited by Mizutani S, et al.

Tabata M, Tarumoto T, Ohmine K, Furukawa Y, Hatake K, Ozawa K, Hasegawa Y, Mukai H, Yamamoto M, Imagawa S.

Stimulation of GATA-2 as a mechanism of hydrogen peroxide suppression in hypoxia-induced erythropoietin gene expression.

*J Cell Physiol*. 2001 Feb;186(2):260-7.

## 2. 学会発表

特にありません。

## H. 知的財産権の出願。登録状況

### 1. 特許取得

特にありません。

### 2. 実用新案登録

特にありません。

### 3. その他

特にありません。

分担研究報告書

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

分担研究者 伊藤良則 財団法人癌研究会化学療法科 医長

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

乳癌組織における癌遺伝子やサイトケラチンの発現を、RT-PCR法を用いて検討した。主として乳癌組織の一部から、mRNA を抽出し、それぞれの特異的オリゴヌクレオチドを用いて RT-PCR の系を作成して、検討した。Her-2 の発現している症例においては早くより transuzumab を用いた単剤または

タキサン系薬剤を併用した治療を行って報告した。

C. 結果

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表  
伊藤良則 《最新がん治療と看護(3):化学療法と看護ケア:後編》乳がんに対する化学療法とその限界 6(1)16-19 2001  
伊藤良則 化学ホルモン療法 日本医師会雑誌 125(11) 1713-1720  
伊藤良則 再発乳癌化学療法-Evidence の解釈 乳癌の臨床 16(3)220-223 2001

Yoshinori Itou, Keisuke Aiba, Noboru Horikoshi, Takaahi Saotome, Tetsuya Irie, Kastuki Sugiyama, Minoru Nakane, Daigo Hashimoto, Nobuyuki Yoshida, Nobuyuki Mizunuma, Syunji Takahashi, Yusuke Tanigawara. Dose-finding phase I study of simultaneous weekly infusion with doxorubicin and docetaxel in patients with advanced breast cancer  
Int J Clin Oncol 6: 242-247 2001

## 2. 学会発表

乳癌肝転移例に対する全身化学療法、肝動注療法、または外科的肝切除との比較 入江哲也、橋本大吾、杉山勝紀、中根実、渡邊純一郎、霞富士雄、吉本賢隆、猪狩功遺、高野浩一、水沼信之、伊藤良則、高橋俊二、畠清彦、相羽恵介、堀越昇 第9回日本乳癌学会総会 前橋 2001

日本の臨床試験の現状 伊藤良則、田部井敏夫  
第9回日本乳癌学会総会 前橋 2001

乳腺原発悪性リンパ腫の治療方針 高橋俊二、伊藤良則、入江哲也、中根実、杉山勝紀、水沼信之、相羽恵介、堀越昇、山下孝、霞富士雄、橋本大吾  
第9回日本乳癌学会総会 前橋 2001

Docetaxel 耐性乳癌患者に対する Weekly Paclitaxel の効果 橋本大吾、伊藤良則、杉山勝紀、渡邊純一郎、中根実、水沼信之、高橋俊二、相羽恵介、堀越昇  
第9回乳癌学会 前橋 2001

固形癌における制癌剤感受性と生化学的・分子薬理的アプローチ 柴田はるみ、水沼信之、高橋俊二、伊藤良則、畠清彦、堀越昇、相羽恵介 第34回制癌剤適用研究会 大阪 2001

βサラセミア合併の乳癌症例に対する化学療法の経験 中根実、伊藤良則、高橋俊二、相羽恵介、堀越昇、畠清彦、霞富士雄、服部幸夫 日本内科学会関東地方会 東京 2001

原発性アルドステロ症で発症し、Cushing症候群で再発した副腎皮質癌の1例 中根実、高橋俊二、伊藤良則、相羽恵介、堀越昇、畠清彦、高野浩一、尾形悦郎、石川雄一 第439回日本内科学会関東地方会 東京 2001

## H. 知的財産権の出願。登録状況

### 1. 特許取得

特にありません。

### 2. 実用新案登録

特にありません。

### 3. その他

特にありません。

分担研究報告書

Bone morphogenetic protein (BMP)と乳癌骨転移との関係

分担研究者 高橋 俊二 財団法人癌研究会化学療法科 医員

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

A. 研究目的

前立腺癌、乳癌などにみとめられる造骨性転移の機序については未だ明らかになっていない。最近乳癌の造骨性転移のモデルが開発されつつあり、endothelinやPDGF-Bなどが原因物質として提唱されているが、実際の臨床での骨転移との関係は明かでない。本研究では乳癌の造骨性転移と最も強力な骨形成因子であるBMPとの関連について検討するとともに、乳癌細胞に対するBMPの効果を増殖、分化、形態、遺伝子発現レベルについて詳細に検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

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

C. 結果

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

D. 考察

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

E. 結論

乳癌の骨転移ではBMP-6の発現が重要であり今後臨床例での解析をさらに進めたい。またホルモン感受性乳癌は、BMP-2による抑制が可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitsuru Koizumi, Shunji Takahashi, and Etsuro Ogata, Bone Metabolic Markers and metastatic bone tumors. Res. Adv. In Cancer 1: 33-46, 2001

高橋俊二 癌に伴う骨疾患 カルシウムと骨  
西井易穂 他編、朝倉書店、2001

2. 学会発表

特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得

特にありません。

2. 実用新案登録

特にありません。

3. その他

特にありません。

分担研究報告書

分子生物学を駆使した大腸癌肝転移巣近傍の癌の進展についての検討

—とくに肝実質方向および Glisson 鞘方向進展について—

分担研究者 國土 典宏 東京大学外科学 助教授

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

A. 研究目的

大腸癌肝転移に対する肝切除で確保すべき Surgical Margin について、一部の文献では 10mm 以上が推奨される一方で、やむを得ず腫瘍ぎりぎり切除しながら再発しない症例も多く経験する。我々は再発形式の検討や肝転移巣近傍の癌の進展についての遺伝子学的・組織学的検討から、必要最低限の Surgical Margin はかなり少なくてよく、2mm 程度ではないかと報告してきた。肝実質方向、またグリソン鞘方向への進展について検討した。

B. 研究方法

1996年から2000年の期間に癌研附属病院で切除した大腸癌肝転移 58 例（のべ 62 回）を対象とした。新鮮標本の病巣最大割面で、転移巣と非癌部肝組織から約 5 x 3 mm 角のサンプルを採取し、DNA を抽出後、K-ras および p53 遺伝子の変異を検討した。K-ras 変異は MASA 法 (mutant allele specific amplification) を用いて codon 12 および 13 での変異を検索した。P53 遺伝子についてはエクソン 5～8 について PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) でスクリーニングし、シークエンス法によって変異を同定した。この方法により数千個に一個の変異細胞を検出できるといわれている。同じ割面で組織学的な micrometastases についても検索した。

対象例の背景因子は、男性 38 例、女性 24 例で平均 60.1 才。原発巣は結腸癌 46 例、直腸癌 16 例であっ

た。平均肝転移個数は 2.2 個（1～9）、腫瘍最大径は 4.3cm（0.7～18cm）で、肉眼的な Surgical Margin は平均 5.8mm（0～25mm）であった。肝転移巣の遺伝子変異は K-ras が 15 例（24.2%）、p53 が 31 例（50%）で認められ、どちらかに変異の見られた症例は 39 例（62.9%）であった。これ以後の遺伝子検索はこの 39 例でのみ行った。

C. 結果

非癌部肝実質サンプルの検討では、変異がみられ遺伝子学的な micrometastasis の存在が疑われたのは 2 例のみで、その部位は腫瘍境界から 2 mm と 4 mm で、比較的近傍に限られていることがわかった。

グリソン鞘組織サンプルの採取部位は、腫瘍境界から 2～25mm に分布していた。変異がみられたのは 5mm の部位の 3 例で、1 例は肉眼的な門脈腫瘍栓のある特殊例、1 例は胆管末梢枝内に mucus cellular hyperplasia がみられこのための変異の可能性もあり、現在検討中である。

組織学的な Micrometastases は 62 例中 15 例 24.2% でみられた。部位別の分布はほとんどが 2mm 以内、最大で 5mm の範囲にとどまっていた。遺伝子学的な micrometastases と一致したのは 2 例であった。

対象例の長期予後は 3 年生存率 74.5%、5 年生存率 63.9% と比較的良好であった。残肝の再発率は 1 年で 36.8%、3 年で 50.7% になった。肝の切除断端での再発は疑い例を含めて 4 例あったが、今回検出された micrometastases と関連すると考えられたものはなかった。

D. 考察

今回の 3 つの方法で調べられた micrometastases の

検出限界と頻度をまとめると、まず組織学的には腫瘍境界から2mmまでは19.4%にmicrometastasesを認めたが、それ以上に離れたものは5mmで1.6%と少なく、今回の検討では5mmが限界と考えられた。次に非癌部肝実質で遺伝子学的に検出されるmicrometastasesの検出限界は4mmで3.2%の頻度であった。グリソン鞘方向では検出限界は5mmで頻度は16.7%と肝実質に比べてやや高い傾向にあった。

#### E. 結論

大腸癌肝転移切除において、肝実質方向およびGlisson鞘方向の断端再発を完全に防止するためには5mm以上のSurgical Marginが推奨されるが、95%以上の症例では2mm程度のMarginでも十分であると考えられた。ただし、Glisson鞘方向の進展はやや広い傾向があり注意を要すると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特にありません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Norihiro Kokudo, Keiichiro Tada, Makoto Seki, Hirotohi Ohta, Kaoru Azekura, Masashi Ueno, Keiichiro Ohta, Toshiharu Yamaguchi, Toshiki Matsubara, Takashi Takahashi, Toshifusa Nakajima, Tetsuichiro Muto, Takaaki Ikari, Akio Yanagisawa, Yo Kato Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal embolization. 2001 Hepatology 34:267-272

Norihiro Kokudo, Keiichiro Tada, Makoto Seki, Hirotohi Ohta, Kaoru Azekura, Masashi Ueno, Toshiki Matsubara, Takashi Takahashi, Toshifusa Nakajima, Tetsuichiro Muto Anatomical major resection vs. non-anatomical limited resection for liver metastases from colorectal carcinoma. 2001 American Journal of Surgery 181:153-159

Toshiki Matsubara, Mamoru Ueda, Norihiro Kokudo, Takashi Takahashi, Tetsuichiro Muto, Akio Yanagisawa Role of esophagectomy in treatment of esophageal carcinoma with clinical evidence of adjacent organ invasion. 2001 World J Surg 25: 279-284

##### 2. 学会発表

学会発表：国土典宏、須貝幸子、三木義男、柳澤昭夫、加藤 洋、関 誠、大山繁和、上野雅資、太田恵一朗、畦倉 薫、山口俊晴、松原敏樹、太田博俊、高橋 孝、中島聰總、武藤徹一郎、大腸癌肝転移近傍の癌の進展についての遺伝子学的および臨床病理学的検討とくに肝実質方向および

Glisson鞘方向進展について. 第87回日本消化器病学会総会、4月20日、東京(日消誌98suppl.A224, 2001)、2001年

#### H. 知的財産権の出願。登録状況

##### 1. 特許取得

特にありません。

##### 2. 実用新案登録

特にありません。

##### 3. その他

特にありません。

分担研究報告書

大腸癌の免疫原性を利用した微小転移病変ならびにその治療に関する研究

分担研究者 山口 俊晴 財団法人癌研究会 消化器外科 部長

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

A. 研究目的

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

1. 微小残存病変、微小転移病変の評価

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

2. 病変における細胞の特性の研究

B. 研究方法

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

これについてはFISH法による検討を行った。

C. 結果

胃癌においては染色体20qが、ある特異的な組織型と特に高頻度に認められた。

D. 考察

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

E. 結論

胃癌での染色体異常では20qがもっとも高頻度に生じており、ある特異的な組織型と相関が認められた。

再発の頻度や転移などとの関係を検討する事が必要である。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A, Kato Y. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology*. 2001 Aug;34(2):267-72.

Ohta K, Nakajima T, Ohyama S, Kokudo N, Matsubara T, Yamaguchi T, Takahashi T, Muto T. Neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer *Nippon Rinsho*. 2001 Apr;59 Suppl 4:456-62. Review. Japanese.



2. 学会発表  
特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得  
特にありません。

2. 実用新案登録  
特にありません。

3. その他  
特にありません。

分担研究報告書

微小転移の実態把握と診断の迅速化・簡易化に関する研究

分担研究者 中森 正二 大阪大学医学部外科 講師

固形癌根治手術後の再発のほとんどは、手術時に切除範囲外や遠隔臓器に遺残した微小な転移巣や浸潤巣が原因であると考えられており、このような微小癌病巣の実態の把握は、新しい癌治療戦略を考える上で重要な意義を持つものと考えられる。

A. 研究目的

癌に対する手術後の治療方針決定は、画像診断や病理診断などの形態学的診断による進展度診断により行われているが、形態学的な診断のみで、必ずしも正確な進展度診断が行われている訳ではなく、予期しえない再発を経験することが少なくなかった。その原因の一つとして、リンパ節転移や癌深達度など代表的な進展度診断が、病変の一部のみの検索しかできないために、潜在的な癌巣を検出するのに限界があることがあげられる。したがって、このような形態的診断の弱点を補うべく、近年、分子生物学的手法などを利用した微小癌病巣検出のための遺伝子診断が盛んに試みられている。しかしながら、現在までに試みられている遺伝子診断は、定性的なものがほとんどで客観性が低く、また、技術的、時間的制約からも広く臨床応用されるまでには至っていない。そこで、本研究では、癌進展度診断として最も重要なリンパ節転移診断および転移再発の指標となり得る流血中癌細胞検出の遺伝子診断において、キャピラリーPCR増幅装置を利用し、診断の迅速化・簡易化をはかり、さらに定量性を導入、客観性のある臨床応用可能な遺伝子診断を行うことをめざした。

B. 研究方法

肝臓癌症例から同意を得て、末梢血中に存在する $\alpha$ -fetoprotein(AFP)のmRNAに対するオリゴヌクレオチドを合成し、Real Time PCRの系を作成し、

その臨床的意義を検討した。またCEAについても同様にリンパ節が病理所見陰性例、陽性例ではmRNAを検出する系を作成した。

C. 結果

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特にありません。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Bilchik A, Miyashiro M, Kuo C, Fujiwara Y, **Nakamori S**, Monden M, Hoon DSB. Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 88: 1037-1944, 2000.

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

Sakon M, Nagano H, Shimizu J, Kondo M, **Nakamori S**, Dono K, Umeshita K, Nakamira H, Murakami T, Monden M. Hepatic resection of hepatocellular carcinomas based on tumor hemodynamics. *J Surg Oncol* 73: 179-181, 2000.

Yamada T, **Nakamori S**, Ohzato H, Higaki N, Aoki T, Oshima S, Shiozaki K, Okami J, Hayashi N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Outcome of pancreatic cancer patients based on genetic lymph node staging. *Int J Oncol* 16: 1165-1171, 2000.

Kondo M, Nagano H, Sakon M, Yamamoto H, Morimoto O, Arai I, Miyamoto A, Eguchi H, Dono K, **Nakamori S**, Umeshita K, Wakasa K, Phmoto Y, Monden M. Expression of interferon a receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 17: 83-88, 2000.

Okami J, Dohno K, Sakon M, Iwao K, Yamada T, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Umeshita K, Matsuura N, **Nakamori S**, Monden M. Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 2326-2332, 2000.

Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Wang M, Nagano H, Dono K, Ariyoshi H, **Nakamori S**, Kawasaki T, Gotoh M, Monden M. The inhibitory effect of prostagrandin E1 on oxidative stress-induced hepatic injury elevated by calpain- $\bar{\alpha}$  activation. *Transplantation* 69 (11): 2314-2319, 2000.

Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto S, Dono K, **Nakamori S**, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M. Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by posthepatectomy liver failure. *Dig Dis Sci* 45 (7): 1383-1388, 2000.

Miyamoto A, Dohno K, Sakon M, Iwao K, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Umeshita K, Matsuura N, **Nakamori S**, Monden M. Development of a multiple-marker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 45 (7): 1376-1382, 2000.

Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, **Nakamori S**, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon  $\alpha$  is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6 (7): 2881-2890, 2000.

Sakon M, Umeshita K, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Miyamoto A, Ohshima S, Dono K, **Nakamori S**, Gotoh M, Monden M. The clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma, analysed by disease-free survival curves. *Arch Surg*. 135: 1456-1459, 2000.

Hei L, Dono K, Gotoh M, Okumura M, Takeda Y, Shimizu J, Nagano H, **Nakamori S**, Umeshita K, Sakon M., Monden M. Role of the liver in alloimmune response following inoculation of donor spleen cells. *Cell Transplant* 9: 725-728, 2000.

Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, **Nakamori S**, Monden M. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain  $\bar{\alpha}$  activation. *J Hepatol*: 135: 1456-1459, 2000.

Oakamoto H, Ohigashi H, **Nakamori S**, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai M, Kusama T, Fujii H, Matsumoto Y, Akedo H.

Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res*: 32: 374-379, 2000.

Miyamoto a, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Dono K, **Nakamori S**, Gothoh M, Monden M. Case Report: Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of interferon-alpha and oral tegafur/uracil (UFT). *J Gastroenterol Hepatol* 15(12):1447-1451, 2000.

Miyamoto A, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Sugita Y, Eguchi H, Kondo M, Morimoto O, Dono K, Umeshita K, **Nakamori S**, Monden M. Clinical application of quantitative analysis for detection of hematogenous spread of hepatocellular carcinoma by real-time PCR. *Int J Oncol* 18: 527-532, 2001

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

Kim T, Murakami T, Takamura M, Hori M, Takahashi S, **Nakamori S**, Sakon M, Tanji Y, Wakasa K, Nakamura H. Pancreatic mass due to chronic pancreatitis: correlation of CT and MR imaging features with pathologic findings. *Am J Roentgenol* 177: 367-371, 2001.

19. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, Sekimoto M, Tomita N, **Nakamori S**, Matoba R, Monden M, Matsubara K. Construction of Preferential cDNA Microarray Specialized for Human Colorectal Carcinoma: Molecular Sketch of Colorectal Cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1244-1249, 2001.

Shiozaki K, **Nakamori S**, Tsujie M, Okami J, Yamamoto H, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Furukawa H, Hiratsuka M, Kasugai T, Ishiguro S, Monden M. Human stomach-specific gene, CA11, is down-regulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 19(4):701-707, 2001.

Hayashi H, Yamamoto H, Hiraoka N, Dono K, Ito Y, Okami J, Kondo M, Nagano H, Umeshita K, Sakon M, Matsuura N, **Nakamori S**, Monden M. Differential expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in bile duct epithelial cells and bile duct neoplasm. *Hepatology* 34: 638-650, 2001.

Sakon M, nagano H, Dono K, **Nakamori S**, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M. Combined intraarterial fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* (in press)

Kondo M, Dono K, Sakon M, Shimizu J, Nagano H, **Nakamori S**, Umeshita K, Wakasa K, Monden M. Adenosquamous carcinoma of the gallbladder. *Hepat-Gastroenterol* (in press).

Eguchi H, Nagano H, Sakon M, Miyamoto A, Kondo M, Irai I, Morimoto O, Dono K, Umeshita K, **Nakamori S**, Wakasa K, Monden M. Successful resection and long-term survival of a patient with intrahepatic recurrences of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: Report of a case. *Surg Today* (in press).

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

2. 学会発表  
特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

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

分担研究報告書

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

分担研究者 石坂 幸人 国立国際医療センター名難治疾患研究部 部長

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

C. 結果

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報 特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/Amiinopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, in press.  
Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. *Cancer Res.*, (2001)