

Kondo M, Nagano H, Sakon M, Hayashi H, Okami J, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Wakasa K, Monden M. The effect of beta-blocker on intractable ascites in cirrhotic patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Hepat-Gastroenterol* 50: 504-506, 2003.

Miyamoto A, Kato T, Dono K, Umeshita K, Kawabata R, Hayashi S, Kubota M, Kobayashi S, Nagano H, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Living related liver transplantation with renoportal anastomosis for a patient with large spontaneous splenorenal collateral. *Transplantation* 75(9): 1596-1598, 2003.

Kobayashi S, Dono K, Takahara S, Isaka Y, Imai E, Lu Z, Nagano H, Kato T, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Electroporation-mediated ex vivo gene transfer into graft not requiring injection pressure in orthotopic liver transplantation. *J Gene Med* 5(6): 510-517, 2003.

Xu X, Yamamoto H, Sakon M, Yasui M, Ngan CY, Fukunaga H, Morita T, Ogawa M, Nagano H, Nakamori S, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*. 9(5), 1764-1772, 2003.

Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Growth inhibition of pancreatic cancer cells through activation of peroxisome proliferator activated receptor gamma / retinoid X receptor alpha pathway. *Int J Oncol* 23(2):325-331, 2003.

Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 21(13): 2537-2544, 2003.

Morimoto O, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Yamada T, Nakagawa H, Miyamoto A, Kondo M, Arai I, Yamamoto T, Ota H, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Sasaki Y, Ishikawa O, Imaoka S, Monden M. Diagnosis of intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis by microsatellite loss of heterozygosity in patients with multiple and recurrent hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 39(2):215-221, 2003.

Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology*, 125(2): 556-571, 2003.

Shimizu J, Oka H, Dono K, Sakon M, Takamura M, Murakami T, Hayashi S, Nagano H, Nakamori S, Umeshita K, Sase S, Gotoh M, Wakasa K, Nakamura H, Monden M. Noninvasive quantitative measurement of tissue blood flow in hepatocellular carcinoma using xenon-enhanced computed tomography. *Dig Dis Sci*. 48(8):1510-1516, 2003.

Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma / retinoid X receptor alpha pathway. *Exp Cell Res* 289(1): 143-151, 2003.

Okami J, Nakamori S, Hiraoka N, Tsujie M, Hayashi N, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Suppression of pancreatic cancer cell invasion by a cyclooxygenase-2-specific inhibitor. *Clin Exp Metastasis* (in press).

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

ありません

2. 実用新案登録

ありません

3. その他

ありません

厚生労働科学研究費補助金（がん克服研究事業）

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マ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難治疾患研究部・部長

研究要旨

神経芽腫細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET に結合する8個のアミノ酸からなるペプチド（RBP-1）を同定した。本年度は、RBP-1 の RET 分子への結合性を明らかにする一方、RET 発現細胞を用いた選択的遺伝子導入を試みた。

A.研究目的

標的細胞に対して選択的にしかも効率良く形質転換を誘導することが可能なシステムの構築を試みた。これまでの標的化では EGF レセプターや HER2 などのように、膜抗原に対する抗体を介して行われてきたが、近年抗体に代わって膜抗原に結合するペプチドを用いた標的化の可能性が示され、その簡易性と高い安全性により今後の臨床応用の可能性が期待されている。神経芽細胞腫をはじめとして卵巣癌に発現している RET への標的化を目的とする。

B.研究方法

特に HER2 遺伝子産物に結合するペプチド (NatBiotechnol, 18:194-8, 2000) は、抗体と同様 HER2 発現細胞に対して増殖

阻害活性を示すことが示された。申請者はこれまでに、神経芽腫細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET に結合する8個のアミノ酸からなるペプチド（RBP-1）を同定した。RBP-1 の RET 分子への結合性を明らかにする一方、RET 発現細胞を用いた選択的遺伝子導入を試みた。まず、ビオチン化 RBP-1 の C-末側に benzoylphenylalanine を付加したペプチドを合成した。このペプチドはブラックライトを照射すると共有結合する性質を有しており、光照射によりタグされた蛋白質をストレプトアビジン-HRP で発色検出することが可能である。RET 遺伝子産物をまず RET 抗体で免疫沈降法により調整し、ここにペプチドを作用させ、照射した後、SDS-PAGE を行い、検出を試みた。

C. 研究結果

150 及び 170 kDa に RET 特異的なバンドが検出された。一方、RET を発現

可能性を明らかにしたいと考えている。また、一般にレセプターを介した遺伝子導入効率は低いことから、標的ペプチドとナノミセルを併用した新しい遺伝子導入システムまたは標的治療法の開発に向けた研究を行う予定である。

#### D. 考察

今後パイロット実験として、RET 発現細胞に対する *in vivo* での標的化の可能性を明らかにしたいと考えている。また、一般にレセプターを介した遺伝子導入効率は低いことから、標的ペプチドとナノミセルを併用した新しい遺伝子導入システムまたは標的治療法の開発に向けた研究を行う予定である。

#### E. 結論

抗体を用いることから癌細胞の表面に RET を例として、ペプチドを用いて標的化を計画して、種々のマーカーを作り、細胞を染色、内部への取り込み、標的化した細胞のみへ抗がん作用を示すことの可能性が認められた。

#### F. 健康危険情報

特にありません

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Minemoto, Y. Uchida, S. Ohtsubo, M. Shimura, M. Sasagawa, T. Hirata M. Nakagama, H. Ishizaka, Y. & Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. Arch. Biochem. Biophys. 2003. 412:13-19.

Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Hirata M, Nakagama H, Matsunaga T, Yoshida M, Ishizaka Y, Yamashita K.: Nuclear export signal in CDC25B. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 26;316(1):226-32.

##### 2. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

ありません

##### 2. 実用新案登録

ありません

##### 3. その他

ありません

分担研究報告書

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)

分担研究者 川上 潔 自治医科大学生物医学・教授

研究要旨 転写因子 Six ファミリーのひとつ hSix1 が、過剰発現すると、接着性が亢進し、インテグリンの過剰発現、欠損させると細胞増殖、細胞死に異常が認められたことを見いだした。

A. 研究目的

転写因子が癌細胞の増殖や分化にどのように関係しているのかを明らかにし、SIX1 の過剰発現細胞の接着性が増加するのにもない、インテグリンの発現亢進がみられたこと、および Six1 欠損マウス胚において、細胞増殖とアポトーシスに異常が見られた点について解析を行う。

B. 研究方法

SIX1 蛋白質および、DNA 結合能を欠く SIX1 蛋白質を誘導発現する白血病細胞株を作成した。標的遺伝子を探すために 2 種の細胞からの RNA によるマイクロアレイの結果、接着因子と増殖因子が標的遺伝子候補として同定できた。一方接着分子として、エフリン B 6 とインテグリン  $\beta$  5 が

有意に上昇していた。エフリン B 6 は T 細胞活性化に伴い上昇する因子であり、下記の Six1 欠損マウスの結果を説明する可能性がある。T 細胞の活性化の系として Jurkat 細胞株を用いた。カルシウムイオノフォアと PMA にて活性化された Jurkat では、インターロイキン 2 およびエフリン B 6 が上昇したが、SIX1 は変化しなにかむしろ減少していた。そのため、エフリン B 6 の制御については発生段階での制御に関わる可能性を今後検討していく。一方インテグリン  $\beta$  5 は癌の転移に深く関わり、SIX1 強発現の乳癌が、転移を高率におこすことを説明できると考えた。実際、SIX1 誘導発現後は細胞同士の融合、シャーレへの付着性の増強が観察された。インテグリン B 5 のプロモーター解析は既に Dr. Paddy Ross らが行っており、転写開始点より 10

1000bp に、種々の細胞での発現を担う領域が同定されている。その領域の中には SIX1 結合配列と考えられる領域があるため、現在 Dr. Paddy Ross からプロモーターを含むプラスミドを送付してもらっており、SIX1 による制御があるかどうかを確認する予定である。

### C. 研究結果

Six1 欠損マウスは生後すぐに死亡する。多くの臓器や器官に形成異常がみられた。すなわち、骨格筋は低形成となり、腎臓は全くないかあっても小さなものが形成されていた。胸腺は全く形成されず、内耳や嗅上皮もその大部分が形成されなかった。胸腺が全く見られないことから、T細胞の形成に、Six1 が必須であることが考えられた。こうした器官形成における Six1 の役割を明確にするために、内耳をモデルとして解析を進めた。内耳は外胚葉性のプラコードから生じた耳胞が劇的な形態変化を遂げた結果、半規管、前庭、蝸牛、内リンパ管などの各部分からなる器官で、音と加速度を検知する。Six1 欠損マウスでは、蝸牛は形成されず、半規管と前庭はその前駆体である canal plate のままとどまっていた。一方内リンパ管は拡大していた。胎生 9.5 日及び 10.5 日の時期には耳胞の各領域が将来内耳のどの部分になるかが運命づけられていて、各領域を代表するようなユニークな遺伝子発現プロフィールが見られる。耳胞における空間的な

遺伝子発現パターンを Six1 欠損マウスで精査すると、野生型耳胞において腹側で発現する遺伝子群はその発現が消失し、背側で発現する遺伝子群はその発現領域が腹側にまで拡大していることが観察された。従って、Six1 は耳胞で多くの遺伝子の発現パターンを司ることで、内耳の形態形成に寄与していることが結論された。さらに、Six1 欠損マウスの耳胞においては BrdU とりこみ細胞数が低下し、アポトーシスが昂進していることが観察できるので、Six1 が細胞増殖の制御にも関与することが明らかにできた。

D. 考察 Six1 は、転写因子として、接着と増殖に関する遺伝子を制御していると考えられる。またがん細胞に観察される細胞死の異常も観察され、今後内耳由来のがん、内耳への抗がん剤による障害などの研究に結びつくと考えられる。

### E. 結論

転写ファミリーのひとつ Six1 について遺伝子の発現、分化、接着、細胞死との関連について、欠損マウスを用いて検討した。内耳での細胞死に関連する遺伝子と考えられる。

### F. 健康危険情報

特にありません

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ikeda, K., Onaka, T., Yamakado, M., Nakai, J., Ishikawa, T., Taketo, M. M. and Kawakami, K. (2003) Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump  $\alpha 2$  subunit (Atp1a2) deficient mice. J.Neurosci. 23, 4667-4676

Ozaki, H., Nakamura, K., Funahashi, J., Ikeda, K., Yamada, G., Tokano, H., Okamura, H., Kitamura, K., Muto, S., Kotaki, H., Horai, T., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kawakami, K. (2004) Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. Development 131, 551-562

Isenovic, E. R., Jacobs, D. B., Kedees, M. H., Sha, Q., Milivojevic, N., Kawakami, K., Gick, G., Sowers, J.R. (2004) Ang II Regulation of the Na<sup>+</sup> Pump Involves the PI3K and p42/44 MAPK Signaling Pathways in VSMC. Endocrinology, in press.

### 2. 学会発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

ありません

### 2. 実用新案登録

ありません

### 3. その他

ありません

研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi S, et, al	Elevation of circulating plasma cytokines in cancer patients with high plasma parathyroid hormone-related protein levels.	Endocr Relat Cancer.	10	403-7.	2003
Shigeta K, et,al	In vitro platelet activation by an echo contrast agent.	J Ultrasound Med.	22	365-73.	2003
Tada K, et, al	Severe infusion reaction induced by trastuzumab: a case report.	Breast cancer.	10	167-9	2003
Mori M. et, al.	Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-XL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling.	J Cell Physiol.	195	290-297	2003
Minemoto, Y.	Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. Arch.	Biochem. Biophys.	412:	13-19.	2003
Kokudo N.	Sling suspension of the liver in donor operation: a gradual tape-repositioning technique.	Transplantation.	76	803-7	2003
Tada K,	Hepatic resection for colorectal metastasis with macroscopic tumor thrombus in the portal vein.	World J Surg	27	299-303	2003
Sugawara Y,	Living donor liver transplantation for hepatitis B cirrhosis.	Liver Transpl	9:	1181-1184	2003



Minagawa M,	Selection criteria for 7 repeat hepatectomy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma.	Ann Surg	238	703-710	2003
Akamatsu N,	Effects of middle hepatic vein reconstruction on right liver graft regeneration.	Transplantation.	76	832-7	2003
Tang W,	Des-gamma-carboxy prothrombin in cancer and non-cancer liver tissue of patients with hepatocellular carcinoma.	Int J Oncol	22	969-975	2003
Sakamoto Y,	Segmental resection of the third portion of the duodenum for a gastrointestinal stromal tumor: a case report.	Jpn J Clin Oncol	33	364-366	2003
Guo Q,	An in vitro evaluation of radiation effects of different fractionated regimens by absolute cell count beads.	Oncology Reports	10	1405-1410	2003
Sakamoto Y,	Surgical resection of liver metastases of gastric cancer: an analysis of a 17-year experience with 22 patients.	Surgery	133	507-511	2003
Norihiro Kokudo,	Clinical Application of TcGSA	Nuclear Medicine and Biology	30	845-849	2003
Norihiro Kokudo,	Strategies for Surgical Treatment of Gall Bladder Carcinoma Based only on Information Available before.	Resection Arch Surg	138	741-750	2003
Yamamoto S,	Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor	J Clon Oncol	21	447-452	2003

	recurrence.				
Tsujie M,	Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ /retinoid X receptor $\alpha$ pathway.	Exp Cell Res	289	143-151	2003
Muro S,	Monden M, Ishii S, Kato K. Identification of expressed genes linked to malignancy of human colorectal carcinoma by parametric clustering of quantitative expression data.	Genome Biol	4	R21	2003
Xu X,	Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas.	Clin Cancer Res.	9	1764-1772	2003
Tsujie M,	Growth inhibition of pancreatic cancer cells through activation of peroxisome proliferator activated receptor gamma / retinoid X receptor alpha pathway.	Int J Oncol	23	325-331	2003
Yamamoto H,	JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis.	Gastroenterology	125	556-571	2003
Ikeda K,	Degeneration of the amygdala/piriform cortex and	J Neurosci	23	4667-76	2003

	enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice.				
Okami J,	Suppression of pancreatic cancer cell invasion by a cyclooxygenase-2-specific inhibitor.	Clin Exp Metastasis.	20	577-84	2003
Okami J,	Patterns of regional lymph node involvement in intrahepatic cholangiocarcinoma of the left lobe.	J Gastrointest Surg.	7	850-6.	2003
Kurokawa Y,	Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study.	J Hepatol.	39	1004-12	2003
Uchida S,	Nuclear export signal in CDC25B. Biochem	Biophys Res Commun.	16	226-32	2004

20030153

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。