

20030622

別添2 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

**心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる
遺伝子診断システムの確立**

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 康行

平成16(2004)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる遺伝子診断システムの確立 主任研究者 池田 康行	1
II. 分担研究報告	
1. がん細胞の転移能を予測する臨床遺伝子 診断システム開発のための研究 竹永 啓三	13
2. DNA チップを用いた迅速がん診断システム開発の研究 落合 淳志	16
3. リポ蛋白リパーゼ遺伝子の SNPs 集積とその診断法の確立 池田 康行	21
4. 血漿 DNA を用いた遺伝子診断に関する研究 赤木 究	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	30

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

心疾患及びがん疾患遺伝子の SNPs 解析と ECA チップによる遺伝子診断システムの確立

主任研究者 池田 康行 国立循環器病センター研究所・病因部室長

がんや心疾患は日本における死因の第一位、二位を占めており、その予防、診断・治療法の開発は、社会的重要な課題である。

■肺がんおよび乳がん細胞の転移能を予測可能にする候補遺伝子の特定：肺がん転移能を予測する遺伝子として、抗アポトーシスに關与する Mcl-1 とアポトーシスの促進に關与する Bnip3 が考えられた。Mcl-1 が Bnip3 によるアポトーシスの誘導を抑制することによりアポトーシス抵抗性となり、その結果高転移能を獲得している可能性が示唆された。病理学的に乳がん転移の陽性と陰性が診断されたケースをモデル系として、これら5種類の遺伝子 (CK19, CEA, HER2, Muc1, E-cadherin) 発現量を定量することにより、乳がん転移を予測できることを明らかにした。

■ECA-チップによる遺伝子診断システムの確立：心疾患関連遺伝子のリポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異および抗がん剤代謝酵素 (TPMT, thiopurine S-methyltransferase) の多型をモデル系として、ECA チップを用いる多種変異同時検出法 (SMMD: simultaneous multiple mutation detection) による遺伝子診断システムの開発に成功した。ECA-SMMD 法は、モデル系としての7種の LPL 遺伝子変異のホモ、ヘテロ、正常の3群の判別を可能とし、TPMT3C の多型ヘテロの検出を可能とした。更に、ECA-SMMD 法の評価は、臨床検体を用いてのブラインド試験にて確認され、本方法の日常臨床検査への応用が期待された。

分担研究者

赤木 究：埼玉県立がんセンター研究室
遺伝子診断室 専門研究員
竹永啓三：千葉県がんセンター研究局化学
療法研究部 主席研究員
落合淳志：国立がんセンター研究所支所
臨床腫瘍病理部 部長

A. 研究目的

本研究は、新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター (FND: ferrocenyl naphthalene diimide) を用いる ECA (electrochemical array) チップを完成させるために必須のソ

フトウエア、つまり診断にどのような遺伝子を候補とするかを、心疾患およびがん関連遺伝子群から選択し、選択した遺伝子の変異の同定または遺伝子発現を定量できる条件を決定し、ECA チップの実用化を目指すことである。心疾患関連遺伝子の場合、多種のリポ蛋白リパーゼ (LPL; lipoprotein lipase) 遺伝子変異を同時に検出できるプロトコール (SMMD: simultaneous multiple mutation detection) の確立を目的とする。がん関連の場合は、抗がん剤に対する薬剤代謝関連遺伝子 (TPMT) の SNP (single nucleotide polymorphism) 解析を ECA チッ

プを用いて可能とするプロトコールの確立と乳がん・肺がん転移能の予測に有効な遺伝子の選択を目的とするものである。

B. 研究方法

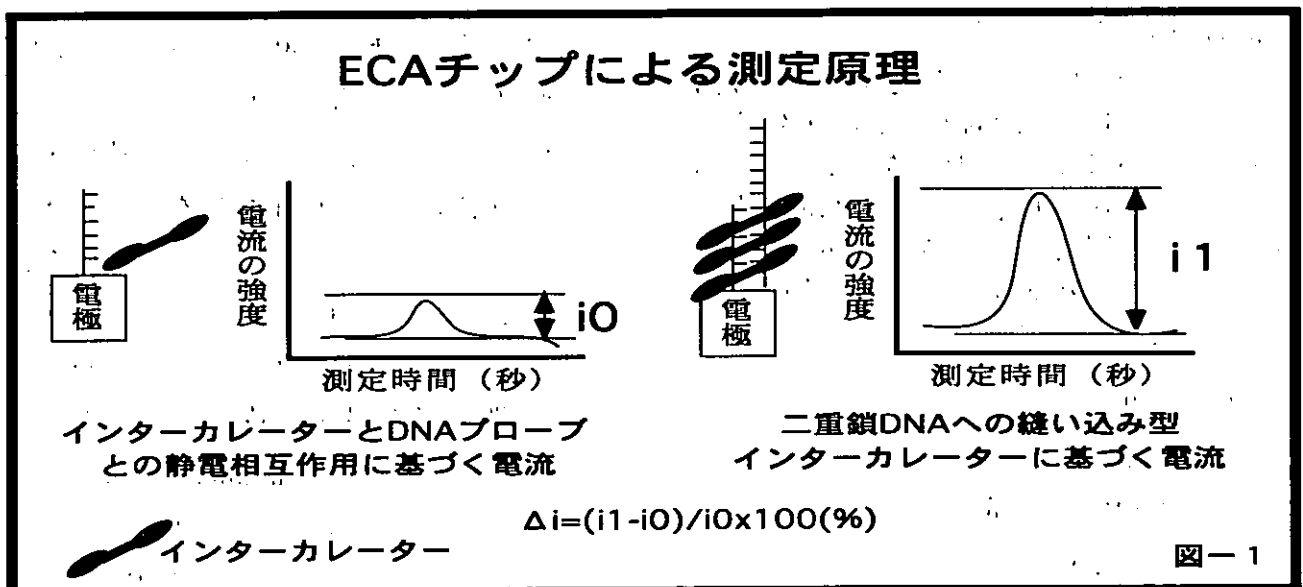
■ ヒト DNA の調製：

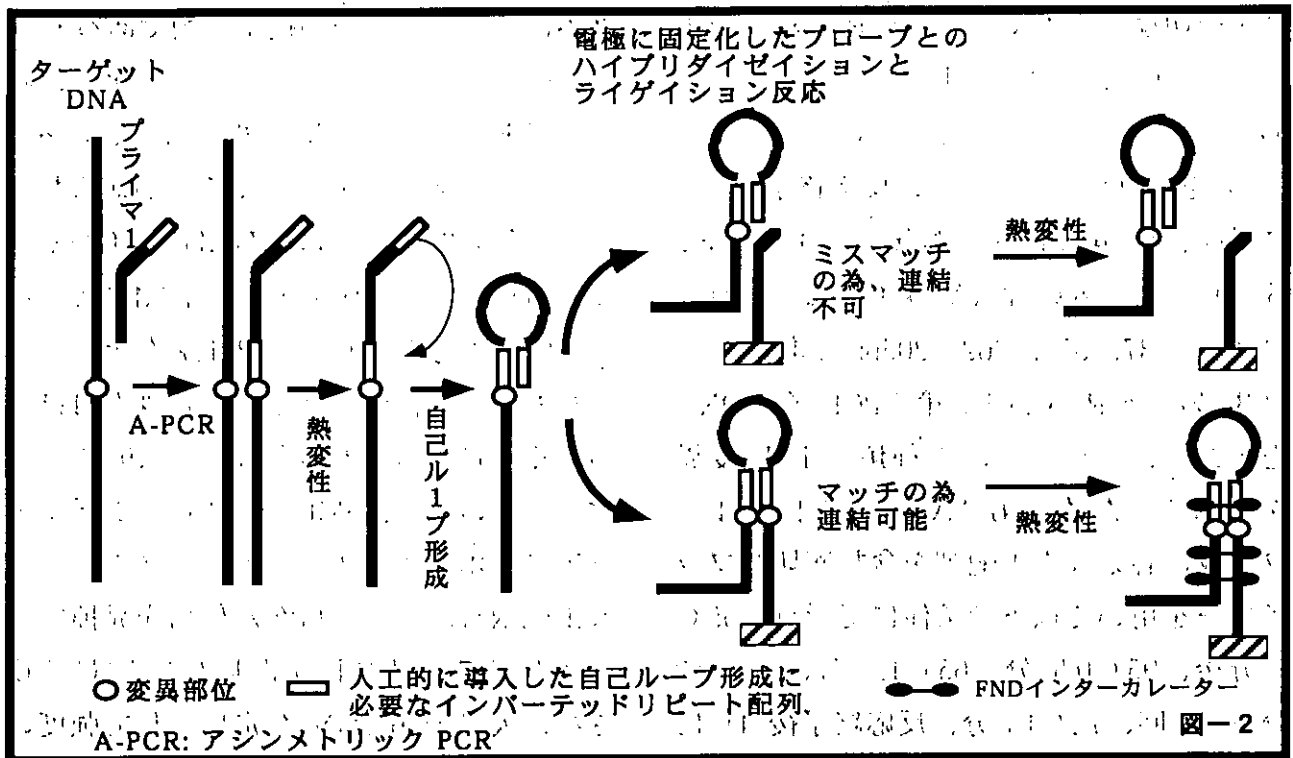
対象者の末梢血から常法に従って DNA を調製した。

■ ECA チップによる遺伝子変異の検出原理：検出原理は、図—1に示す。ターゲット遺伝子の正常塩基と変異塩基を含むプローブをそれぞれ金電極ピンに固定化する。ターゲット遺伝子の PCR 産物とプローブをハイブリダイゼーションする前に、縫い込み型インターカレーターと DNA プローブとの静電相互作用に基づく電流応答を測定する (i_0 測定)。ターゲット遺伝子の PCR 産物とプローブをハイブリダイゼーション後、二重鎖 DNA へ縫い込み型インターカレーターが入り込み、このインターカレーターに基づく電流応答を測定する (i_1 測定)。ハイブリした DNA 量は、 $\Delta i = (i_1 - i_0) / i_0 \times 100(\%)$ の式にて定量する。

■ ECA-SMMD 法の測定原理

図—2に示すように、変異を含むターゲット遺伝子を第1PCRにて増幅し、その産物をテンプレート(ターゲットDNA)として、第2PCR(A-PCR:アシンメトリックPCR)を自己ループ形成のプライマーを用いて行い、プローブとハイブリを行う。ミスマッチの場合、ライゲーションされないが、マッチの場合、ライゲーションされる。熱変性により、ミスマッチの場合、DNA2本鎖は形成されないが、マッチの場合、2本鎖が形成され、インターカレーターが2本鎖に入り込み、電流応答が得られる。正常プローブと変異プローブに対する電気応答の有無により、正常と変異を決定することができる。また、正常と変異の両プローブから電気応答が得られた場合、ヘテロ接合体と判定する。





■ LPL 遺伝子変異と PCR 条件：

(1) LPL 遺伝子変異：現在、日本人から LPL 機能を失う変異 (SNP) として、我々の見出した 17 種類を含む 22 種類が報告されている。これらの変異は、W-14X, N43S, Int2/5-dss/g(+1)a, Y61X, G105R, G154V, G188E, I194T, V200A, D204E, A221-del (Arita), C239X, R243C, R243H, A261T, F270L, C278R, N291-del, S323C, A334T, W382X, Int8/5-dss/t(+2)c の 22 種類である。これら変異のホモ接合体者は、血清トリグリセリド値が健常者の約 10 倍程度に上昇し、膵炎の成因となり、重篤な場合死に至る。頻度は、100 万人に一人である。ヘテロ接合体者は、粗悪な生活習慣 (アルコール多飲癖や運動不足によるインシュリン抵抗性等) が負荷する場合、中程度の高トリグリセリド血症となるが、生活習慣の改善により正脂血化が可能である。頻度は、500 人に一人で、日本人においては、約 20 万人がヘテロ接合体と推定される。高トリグ

リセリド血症の持続は酸化されやすい小型 LDL の産生を惹起することから動脈硬化症への危険因子と考えられている。それ故、LPL 特化 ECA チップを用いての LPL 欠損ヘテロ接合体の早期診断は、予防医学およびテーラーメイド医療において重要である。

モデル系として用いた LPL 遺伝子変異は、1 塩基置換の LPL 遺伝子変異 6 種類と 1 塩基欠失の 1 種類、計 7 種類である。それらは、エキソン 3 の Y61X (438 の T→A)、エキソン 5 の V200A (854 の T→C)、エキソン 6 の R243C (982 の C→T)、A261T (1036 の G→A)、エキソン 7 の A334T (1255 の G→A)、エキソン 8 の W382X (1401 の G→A) の 1 塩基置換とエキソン 5 の A221-del (916 の G が欠失) の 1 塩基欠失である。これらの LPL 変異は、LPL 酵素機能を完全に失活させる。

(2) 第 1 PCR：これら 7 種の LPL 変異を検出するために、エキソン 3, 5, 6, 7,

8を適切なプライマー (F と R の組) を用いて第1 PCR 増幅を以下の条件にて行う。95°C 5 分後、95°C 0.5 分、60°C 1.5 分、72°C 0.2 分を40回、72°C 10 分、反応終了後 4°C に保存した。第1 PCR 増幅後のエクソン 3, 5, 6, 7, 8 の DNA サイズは、それぞれ 340, 337, 353, 202, 205pb である。

(3) 第2 PCR (A-PCR): 第1 PCR 後の DNA をテンプレートとして 7 種類の LPL 変異を検出するため、第2 A-PCR を自己ループ形成に必要な人工配列を含む適切なプライマーを用いて以下の条件にて行う。95°C 5 分後、95°C 0.5 分、65°C 1.5 分、72°C 0.2 分を40回、72°C 10 分、反応終了後 4°C に保存する。

■プローブの設計と金電極への固定化: 正常アレルと変異アレルを検出するために、30~40mer のプローブを作成し、それぞれのプローブの3'末端が正常塩基あるいは変異塩基となるように設定し、5'末端を金電極に固定化する。

■ハイブリダイゼーション、ライゲーションと電流測定: 第2 A-PCR 産物 (40 μ L) を 10xSSC 緩衝液 (10 μ L) と混合し、それぞれの正常型プローブと変異型プローブ結合アレイピン上にセットしたファイバーシートの中央に全量滴下し、37°Cにて 30 分間ハイブリを行う。ハイブリ後、新たなファイバーシートをピン上に置き、ライゲーション液 (1 μ L T4 ライゲース/5 μ L の 10x ライゲーション緩衝液+40 μ L 蒸留水) をシートの中央に全量滴下し、室温にて 10 分間反応する。洗浄後、インターカレーター (FND) を含む 2 ml の電解液中にて電流応答を測定する。

■TPMT 遺伝子変異と PCR 条件: TPMT

酵素は、小児白血病の抗がん剤である 6-メルカプトプリン (6MP) をメチル化し、解毒的代謝を行う。TPMT 酵素は、その多型により酵素活性が失活することが知られている。代表的なものは、TPMT3B (460G→A)、TPMT3C (719A→G)、TPMT3A (3B と 3C の両方を含む)、TPMT2 などで、いずれもホモ接合体では TPMT 活性がほぼ失活する。TPMT 酵素の失活は、6MP を不活化できないので、6MP がヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) によって抗がん作用を発揮するチオグアニンヌクレオチド (6-TGN) に変換され、大量の 6-TGN が毒性として強度の骨髄抑制を起こす。それ故、TPMT 酵素の多型解析は、個々人に対しての 6MP の使用量を決定することができるテーラーメイド医療として重要である。

ECA-SMMD 法の検証のために、TPMT3C (719A→G) 変異をモデル系として用いた。変異を含む領域を適切なプライマーを用いて、第1 PCR を行い、この DNA をテンプレートとして、第2 A-PCR を以下の条件にて行った。95°C 5 分後、95°C 30 秒、68°C 30 秒 を 30 回、反応終了後 4°C に保存した。

■肺がんおよび乳がんの転移能に関連する遺伝子候補選定のための基礎実験:

(1) 肺がんの転移能に関与する遺伝子の検索: がん細胞の低酸素下における転移能に関与する遺伝子を検索するために、ルイス肺がん由来の低転移性細胞株 (P29, P34)、中転移性細胞株 (C2, D6) および高転移性細胞株 (A11) を用いた。低酸素下培養は 1% O₂ 濃度下で行った。Mcl-1 および Bnip3 の発現はノーザンブロット法およびウェス

ダジブロット法により調べた。

(2) 乳がんのセンチネルリンパ節への転移能に関与する遺伝子の検索：乳がんセンチネルリンパ節 18 症例 29 リンパ節（病理診断による陽性検体 9 例、陰性 20 例）および 63 症例 134 リンパ節（病理診断による陽性検体 17 例、陰性 117 例）を対象として、mRNA 抽出を行った。CEA, CK19, E-cadherin, HER2, Muc1 の遺伝子発現量を LightCycler™ を用いた定量 PCR 法で解析し、転移陽性と陰性を区別する為の cut-off 値の設定を行った。

(倫理面への配慮)

3 省庁が合同で出した「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行う。LPL 遺伝子解析およびがん関連の研究は各センターの倫理審査委員会にてすでに承認を受けている。また、研究に使用する検体は、十分な説明を受けた提供者の自由意思により「高脂血症の成因解明の研究およびがん研究のための同意書」に同意の表明をいただいているものを使用している。この研究に伴う人権の保護（研究協力の任意性、同意の撤回、個人情報の保護、研究による利益不利益など）は同意書の中に盛り込まれている。患者検体は解析前に暗号化を行うことにより、個人情報の保護を行っている。

C. 研究結果

■肺と乳がん細胞の高転移能に関するメカニズムと乳がん転移診断基準の作成に必須遺伝子の組み合わせ（竹永・落合）：

(1) ルイス肺がんにおける浸潤・転移の予測を可能にする遺伝子マーカーの探索と転移メカニズム（竹永）：ルイス肺がん細胞

の高転移性細胞株と低転移性細胞株を用いて、低酸素誘導アポトーシス抵抗性遺伝子 (Mcl-1) の関与を検討した結果、Mcl-1 遺伝子が高転移性細胞で高発現していることが判明した。また、低酸素で誘導されるアポトーシス促進遺伝子 Bnip3 は、転移能に関係なく高発現していた。Mcl-1 はミトコンドリア内で Bnip3 と結合し、細胞のアポトーシスを抑制し、結果的にがん細胞が高転移能を獲得している可能性が示唆された。

(2) ヒト乳がんセンチネルリンパ節を用いてのがん転移能に関与する遺伝子の選択

(落合)：ヒト乳がんセンチネルリンパ節 29 症例（転移陽性 9 症例と陰性 20 症例）の病理標本から RNA を抽出し、定量 PCR 法にて、がん転移に関与する遺伝子 CEA, CK19, E-cad, HER2, Muc1 の 5 種の発現量を比較検討した。それぞれの遺伝子発現量の ROC 曲線を作成し、判定基準値を決定した（スコア値として、1 から 5 の 5 段階）。5 種類の遺伝子発現量から得られるスコア値の合計が 4 以上の場合、陽性 9 例中 8 例を陽性と判定でき、陰性 20 例は、全て陰性と判定できた。この基準値（スコア値の合計が 4）を用いて、乳がんセンチネルリンパ節 63 症例（陽性 17 例、陰性 117 例）について検討した結果、陽性 17 例中 15 例を陽性に、陰性 117 例を全て陰性に判定できた。これらの結果から、CEA, CK19, E-cadherin, HER2, Muc1 の 5 種の遺伝子発現量を定量することにより、乳がんの転移を、病理組織学的診断と同程度に判定できることが判明した。

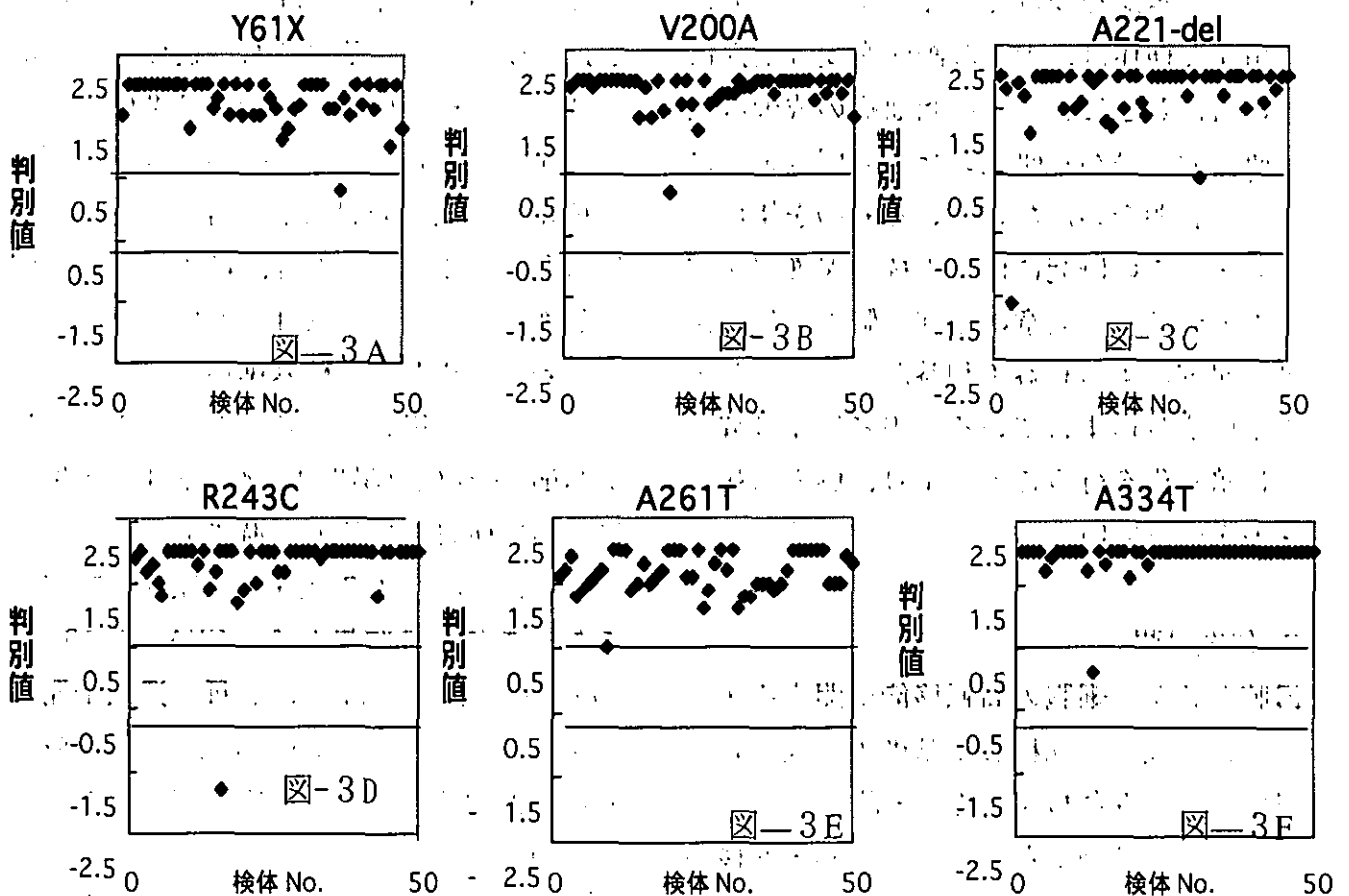
■ECA-SMMD 法による LPL 遺伝子変異の解析（池田）：

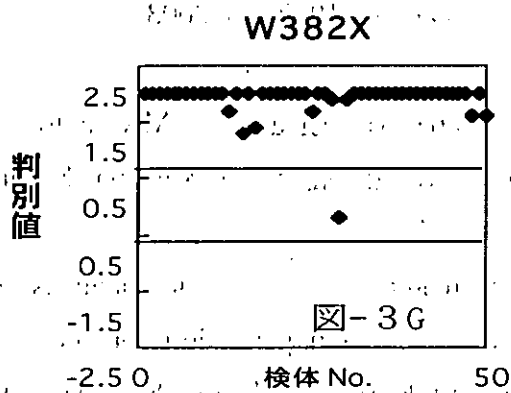
(1) ECA-SMMD 法による 7 種類の LPL 遺伝子変異の検出系の確立：第 1 PCR および第 2 A-PCR にて調製した 7 種類の LPL 変異の PCR 産物を ECA-SMMD 法にて解析し、ホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別できる判定基準を作成した。判定値は、 $2(\Delta i-Wt - \Delta i-Mt) / (\Delta i-Wt + \Delta i-Mt)$, $\Delta i = (i1 - i0) / i0 \times 100$ (%) の式にて計算した。得られた値を基に、3 群 (ホモ、ヘテロ、正常) の判定を以下の判定値にて行うことで、7 種類の変異を確実に、ホモ、ヘテロ、正常の 3 群に判別することができた。

表—1 判定基準値

正常	$2.0 \geq X \geq 1.0$
正常/変異のヘテロ	$0.5 \geq X \geq -0.5$
変異/変異のホモ	$-1.0 \geq X \geq -2.0$

(2) ブラインドテストによる ECA-SMMD 法の評価：臨床検体 50 例に塩基配列決定法により確認された LPL 遺伝子変異、2 例のホモ (A221-del, R243C) と 6 例の LPL 変異ヘテロ (Y61X, V200A, A221-del, A261T, A334T, W382X) の計 8 例を含め、ブラインド試験による LPL 変異検出を行った。確立した判定基準値 (表—1) を用いて、50 例の検体からホモ、ヘテロ、正常の 3 群を判別した場合、図—3 に示す様に、2 例のホモ (図—3 C の A221-del と図—3 D の 243C) と 6 例のヘテロ (図—3 A の 61 X, 図—3 B の 200A, 図—3 C の A221-del, 図—3 E の 261 T, 図—3 F の 334T, 図—3 G の 382X) が同定された。





■ECA-SMMD 法による TPMT 遺伝子の SNP 解析 (赤木):

日本人に認められる 1 塩基置換の TPMT3C 多型について、ヘテロ接合体 3 例を含む 132 例の臨床検体を用いて、ECA-SMMD 法による遺伝子診断のブラインド試験を行った。その結果、期待通り、3 例の TPMT3C のヘテロ接合体を同定することができた。

D. 考察

■ルイス肺がんにおける浸潤・転移の予測を可能にする遺伝子マーカーの探索と転移メカニズム (竹永): 低酸素下において、

抗アポトーシス遺伝子 (Mcl-1) の発現量が肺がん細胞の転移能と正の相関を示したが、アポトーシスを促進する Bnip3 遺伝子も高発現していたので、両蛋白の相互作用を解析した。その結果、Mcl-1 が Bcl-2 や Bcl-X_L よりも強く Bnip3 と結合することが明らかになった。このことは、Mcl-1 が Bnip3 と結合することにより、Bnip3 によるアポトーシスの誘導を抑制する可能性を強く示唆した。

■乳がんセンチネルリンパ節を用いてのがん転移能に関与する遺伝子の選択 (落合): 5 種類の遺伝子マーカーの発現量を定量す

ることによりがん転移能を予測することが可能と思われた。現行の病理診断とほぼ同程度の感度でがん細胞の存在を確認できることは、これら遺伝子発現を ECA チップで検出することにより、リンパ節転移の診断補助が可能になると考えられた。

■ECA-SMMD 法の確立と LPL 遺伝子変異の検出 (池田): LPL 遺伝子変異 7 種類 (6 種類の 1 塩基置換変異と 1 種類の 1 塩基欠失変異) をモデル系として、ECA チップを用いる多種変異同時検出法 (ECA-SMMD 法) の確立に成功した。本方法の評価を臨床検体 50 例に、LPL 欠損ホモ 2 例、LPL 欠損ヘテロ 6 例、計 8 例を含ませ、これら変異の検出をブラインド試験にて行った。結果は、期待通り、すべての変異を検出することが可能であった。これらの結果から、ECA-SMMD 法は、日常臨床検査への応用が可能と思われた。

■ECA-SMMD 法による TPMT 多型の検出 (赤木): 臨床検体 132 例を用いてのブラインド試験は、2 例の人為的ミス以外は、満足な結果が得られた。今後、測定操作の自動化が望まれる。

E. 結論

■肺がんの転移能に関する遺伝子の検索 (竹永): ルイス肺がん由来の低酸素誘導アポトーシス抵抗性を有する高転移性細胞株中では、Mcl-1 と Bnip3 が物理的な結合をし、Mcl-1 が Bnip3 によるアポトーシス誘導を抑制している可能性が示唆された。その結果、アポトーシス抵抗性となり、高転移能を獲得していると考えられた。

■乳がんのセンチネルリンパ節への転移を予測可能にする遺伝子の選択 (落合): 乳

がん細胞にて発現している5種類の遺伝子 (CEA, CK19, E-cadherin, HER2, Muc1) を同時に測定することにより、乳がん症例におけるセンチネルリンパ節へのがん転移の有無を現在の病理診断と同等の感度で診断することが可能になると考えられた。

■ECA-SMMD法によるLPL遺伝子変異の解析 (池田) : LPL遺伝子診断システムの確立を目的とし、モデル系として、7種類のLPL遺伝子変異(Y61X, V200A, A221-del, R243C, A261T, A334T, W382X)を用いて、これら遺伝子のホモ、ヘテロ、正常の3群を判別することが可能なECA-SMMD法の確立に成功した。確立したECA-SMMD法の評価は、ブラインド試験にて臨床検体50例から目的のLPL変異が検出されるか否かに行われた。期待通り、全て目的のLPL変異が検出されることにより、ECA-SMMD法の精度が100%であることが証明された。

■ECA-SMMD法によるTPMT遺伝子のSNP解析 (赤木) : TPMT3C (719A→G)をモデル系として、ECA-SMMD法の評価を132例の臨床検体を用いてブラインド試験にて行った結果、期待通り3例のヘテロ接合体が検出された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1: 論文発表

Nojima, T., Yamashita, K., Takagi, A., Takagi, M., Ikeda, Y., Kondo, H., and Takenaka, S., Direct detection of single nucleotide polymorphism (SNP) with genomic DNA by the ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay (FND-

EHA). *Anal. Sci.* 19:79-83, 2003.

Harada-Shiba, M., Takagi, A., Miyamoto, Y., Tsushima, M., Ikeda, Y., Yokoyama, S., and Yamamoto, A.

Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia.

J. clin. Endocrinol. Metab. 88:2541-2547, 2003.

池田康行, 高木敦子

HTGL「高脂血症ナビゲーター」山田信博他篇 p.120-121, 2003.

Wang, Y.Q., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.*, in press (2004).

Tachibana, M., Ohkura, Y., Kobayashi, Y., Sakamoto, H., Tanaka, Y., Watanabe, J., Amikura, K., Nishimura, Y. and Akagi, K. Expression of Apolipoprotein A1 in Colonic Adenocarcinoma.

ANTICANCER RESEARCH 23: 4161-4168 (2003)

Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M., Takenaga, K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor

overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene*, 22, 6717-6724, 2003.

Duarte, WR., Shibata, T., Takekaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, Y., Yamauchi, M. and Kasugai, S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 493-501, 2003.

Oga, M., Takekaga, K., Sato, Y., Nakajima, H., Koshikawa, N., Osato, K. and Sakiyama, S. Inhibition of metastatic brain tumor growth by intramuscular administration of the endostatin gene. *Int. J. Oncology*, 23, 73-79, 2003.

Tada, Y., O-Wang, J., Yu, L., Shimozato, O., Wang, Y. Q., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takekaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther.*, 10, 451-456, 2003.

Funai, K., Yokose, T., Ishii, G., Araki, K., Yoshida, J., Nishimura, M., Nagai, K., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27, 978-984, 2003.

Araki, K., Ishii, G., Yokose, T., Nagai, K., Funai, K., Kodama, K., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Frequent overexpression of the c-kit protein

in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 40: 173-180, 2003.

Yonou, H., Kanomata, N., Gaya, M., Kamijo, T., Yokose, T., Hasebe, T., Nagai, K., Hatano, T., Ogawa, Y., Ochiai, A. Osteoprotegerin/ Osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into non-obese diabetic/ severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.*, 63: 2096-2102, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Significance of nodal metastatic tumor characteristics in nodal metastasis and prognosis of patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 181-187, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Histological characteristics of tumors in blood vessels play an important role in tumor progression of invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 158-165, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Sugitoh, M., Ono, M., Saitoh, N., Ochiai, A. Proliferative activities of tumor stromal cells play important role in tumor thickness and progression of T3 ulcerative-type colorectal cancer patients.

Virchows Arch., 442: 569-576, 2003.

Nakahashi, C., Oda, T., Kinoshita, T., Ueda, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Inoue, K., Furuse, J., Ochiai, A., Ohkohchi, N. The impact of liver metastasis on mortality in patients initially diagnosed with locally advanced or respectable

pancreatic cancer. *Int. J. Gastroint. Cancer*, 33: 155-162, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Tumor cell in lymph vessels and lymph nodes closely associated with nodal metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 508-514, 2003.

Ishii, G., Sangai, T., Oda, T., Aoyagi, Y., Hasebe, T., Kanomata, N., Endoh, Y., Okumura, C., Okuhara, Y., Magae, J., Emura, M., Ochiya, T., Ochiai, A. Bone-marrow derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309: 232-240, 2003.

Yoshikawa, T., Aoyagi, Y., Kodama, K., Kamijo, T., Yonou, H., Yokose, T., Ishii, G., Oda, T., Takamochi, K., Nishiwaki, Y., Shimizu, N., Ochiai, A. Topographical distribution of allelic loss in lung adenocarcinomas with lymph node metastases. *Mod. Pathol.*, 17: 204-213, 2004.

Hironaka, S., Ohtsu, A., Boku, N., Muto, M., Nagashima, F., Saito, H., Yoshida, S., Nishimura, M., Haruno, M., Ishikura, S., Ogino, T., Yamamoto, S., Ochiai, A. Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T_{2,3}N_{any}M₀ squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57: 425-433, 2003.

Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T.,

Hirohashi, S., Ochiai, A., Tohnai, I., Ueda, M., Kimata, K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncol. Rep.*, 10: 1919-1924, 2003.

Miyamoto, S., Yano, K., Sugimoto, S., Ishii, G., Hasebe, T., Endoh, Y., Kodama, K., Goya, M., Chiba, T., Ochiai, A. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.*, 64: 665-671, 2004.

Lim, S., Zhang, S., Ishii, G., Endoh, Y., Kodama, K., Miyamoto, S., Hayashi, R., Eboihara, S., Cho, J., Ochiai, A. Predictive markers late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin. Cancer Res.*, 1: 166-172, 2004.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Prognostic significance of the intra-vessel tumor characteristics of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Virchows Arch.*, 444: 20-27, 2004.

Sano, Y., Kuga, R., Kuang I. Fu, Yoshino, T., Shigeaki, Y., Ochiai, A., Fujii, T. Superficially elevated colonic adenoma changed to undetectable configuration of ordinary endoscopy during treatment with preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. *J. Gastroenterol.*, 38: 909-914, 2003.

- Yoh, K., Ishii, T., Yokose, T., Minegishi, Y., Tsuta, K., Goto, K., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Suga, M., Ochiai, A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10:1691-7, 2004.
- Zhang, S., Miyamoto, S., Kamijo, T., Hayashi, R., Hasebe, T., Ishii, G., Fukayama, M., Ochiai, A. Intratumor microvessel density in biopsy specimens predicts local response of hypopharyngeal cancer to radiotherapy. *Jpn. J. Cancer Oncol.*, 33: 613-619, 2003
- Tahara, M., Ochiai, A., Fujimoto, J., Boku, N., Yasui, W., Ohtsu, A., Tahara, E., Yoshida, S. Expression of thymidyl synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase, E2F-1, Bak, Bcl-X, and Bcl-2, and clinical outcomes for gastric cancer patients treated with bolus 5-fluorouracil. *Oncol. Rep.*, 11: 9-15, 2004.
- Tsuta, K., Ishii, G., Nitadori, J., Shiono, S., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Primary lung carcinoma with signet ring cell carcinoma components: clinicopathological analysis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2004, in press.
- Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Morozumi, K., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., Kimata, K. Elevated transcript level of hyaluronan synthase gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. *Clin. Exp. Metastasis*. 2004 in press.
- Yonou, H., Yokose, T., Yoshikawa, T., Kanomata, N., Kamijo, T., Hasebe, T., Nagai, K., Ito, H., Yamasaki, A., Hatano, T., Ogawa, Y., Emura, M., Ochiai, A. Engraftment of adult human lung tissue in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice: a novel lung epithelial regeneration model. *Pathobiol.*, 71: 93-102, 2004.
- Yonou, H., Ochiai, A., Goya, M., Kanomata, N., Hokama, S., Morozumi, M., Sugaya, K., Hatano, T., Ogawa, Y. Intraosseous growth of human prostate cancer in implanted adult human bone: Relationship of prostate cancer cells to osteoclasts in osteoblastic metastatic lesions. *Prostate*, 58: 406-13, 2004.
- Kusakai G, Suzuki A, Ogura T, Miyamoto S, Ochiai A, Kamiishi M, Esumi H. ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 164(3):987-95, 2004
- Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Histological characteristics of tumor in vessels and lymph nodes are significant predictors of progression of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Hum Pathol.* 35, 298-308, 2004.

2. 学会発表

「性差による MSI 陽性大腸がんの臨床病理学的特徴」

赤木究、石窪力、小林照忠、新井吉子、山口研成、西村洋治、田中洋一

第9回 家族性腫瘍研究会学術集会

(国立成育医療センター1階講堂)

平成15年6月13日(金)～14日(土)

「リポ蛋白リパーゼ分子異常の早期診断システムの開発とその高トリグリセリド血症に対するテーラーメイド予防への応用」

池田康行、高木敦子、大軽靖彦、長野 誠

第10回日本遺伝子診療学会(大阪)

平成15年7月24日～25日

「膵臓癌患者の臨床経過に伴う癌由来変異血漿DNAの推移」

山口研成、新井吉子、石窪力、多田正弘、神田裕三、赤木究、

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸がん進行に伴うアポリポタンパクA-1の発現増強;その機序について」

渡辺潤子、大倉康男、小林康人、坂本裕彦、田中洋一、西村洋治、網倉克己、赤木究、黒住昌史、橘正芳

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「siRNAによる白血病融合遺伝子 AML1-MTG8の特異的ノックダウン」

神津知子、赤木究

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸癌におけるゲノムの不安定性と

KRAS, BRAF 遺伝子変異の検討」

赤木究、石窪力、小林照忠、新井吉子、山口研成、西村洋治、田中洋一

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「日本人における microsatellite instability (MSI) 陽性大腸直腸癌の頻度とその臨床像の男女差」

石窪力、新井吉子、山口研成、西村洋治、小林照忠、神田裕三、田中洋一、赤木究、

第62回 日本癌学会総会 (名古屋国際会議場)

平成15年9月25日(木)～27日(土)

「大腸がんにおける K-ras 遺伝子変異の解析:新規変異の同定及び機能解析」

竹内朋代、赤木究、

第26回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド)

平成15年12月10日～13日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

がん細胞の転移能を予測する臨床遺伝子診断システム開発のための研究

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター研究局化学療法研究部 主席研究員

肺癌由来の転移能の異なる数種類の細胞株で転移能と低酸素誘導アポトーシス抵抗性とが正の相関を示し、この抵抗性の原因がアンチアポトーティック Mcl-1 遺伝子の高発現によることを昨年度示し、Mcl-1 ががん細胞の転移能を予測するための遺伝子の一つとして使用できる可能性を示した。一方、低酸素は同じく Bcl-2 ファミリーに属するプロアポトーティック Bnip3 遺伝子の発現を促進することが知られており、Bnip3 の発現の差もアポトーシス抵抗性さらには転移能に関与している可能性も考えられる。そこで本年度は、低酸素誘導アポトーシスに関与するプロアポトーティック Bnip3 遺伝子の発現が転移能と関連するかどうか、また両者の間に相互作用があるのかどうかを調べた。その結果、低酸素下では転移能に関係なく Bnip3 が同程度に発現が誘導されることが判った。そこで次に、Mcl-1 と Bnip3 の相互作用を検討したところ、両蛋白質ともミトコンドリアに存在し、互いに物理的に結合することが判明した。従って、本実験系の高転移性細胞では、Mcl-1 が Bnip3 によるアポトーシスの誘導を抑制することによりアポトーシス抵抗性となり、その結果高転移能を獲得している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は日本独自の技術で近年開発された DNA チップ (ECA チップ) を用い、これにがんの悪性度特に浸潤転移に関連する遺伝子や予後因子遺伝子を集積したものを作製し、それを最終的に転移能や予後の予測に役立てることを目指している。しかし、そのためには多くの浸潤・転移に関連する遺伝子を明らかにしておく必要がある。

がん組織内では血管構築異常や血流不足、血管新生の遅れによる低酸素状態が生じている。腫瘍内低酸素に対するがん細胞の応答として解糖系や血管新生などに関わる遺伝子の活性化が知られているが、長時間にわたり慢性的な低酸素あるいは無酸素下に

置かれたがん細胞は最終的に細胞死 (アポトーシス) を起こす。一方、最近の研究ではアポトーシスに対する抵抗性のがん細胞の転移能と正の相関を示すことが報告されている。我々は前年度に、ルイス肺癌より樹立されている複数の低転移性と高転移性細胞株において、高転移性の細胞ほど低酸素誘導アポトーシスに対して抵抗性を示し、この抵抗性の原因が Bcl-2 ファミリーに属するアンチアポトーティック Mcl-1 遺伝子の高発現によることを示した。このことは、Mcl-1 遺伝子が転移能を予測するための遺伝子の一つとして使用できる可能性を示す。一方、低酸素は同じく Bcl-2 ファミリーに属するプロアポトーティック Bnip3 遺伝子の発現を促進することが知られており、

Bnip3 の発現の差もアポトーシス抵抗性さらには転移能に關与している可能性も考えられる。そこで、転移能の異なる細胞株において Bnip3 遺伝子の発現が異なるのかを調べた。さらに、Mcl-1 と Bnip3 との間に相互作用があるのかどうかについての検討を行った。

B. 研究方法

ルイス肺癌由来の低転移性細胞株 (P29, P34)、中転移性細胞株 (C2, D6) および高転移性細胞株 (A11) を用いた。低酸素下培養は 1% O₂ 濃度下で行った。Mcl-1 および Bnip3 の発現はノーザンブロット法およびウェスタンブロット法により調べた。両蛋白質の細胞内局在は HA-tagged Mcl-1 あるいは Bnip3 を COS 細胞内で強制発現させた後、抗 HA 抗体を用いた免疫蛍光染色により調べた。ミトコンドリアは cytochrome c を免疫染色することにより識別した。両蛋白質の物理的な相互作用は、GST pull-down 法および免疫沈降法により検討した。

C. 研究結果

Bnip3 の発現を P29, P34, D6 および A11 細胞で調べたところ、Bnip3 の発現が低酸素下で顕著に亢進されるが、転移能の違いによる差異はほとんど認められないことが判った。一方、Mcl-1 の発現量は、低酸素下と常酸素下で違いは認められないが、以前の結果と一致して転移能が高い細胞ほどその発現量が多いことが判った。また、COS 細胞内で強制発現させた Bnip3 と Mcl-1 は、cytochrome C と同一部位に存在することから、ともにミトコンドリアに局在することが判った。さらに、GST pull-down 法および

免疫沈降法による解析から、両者が物理的に結合することが判明した。Bnip3 には Bcl-2 や Bcl-X_L が結合することが報告されているので、これらの結合と Mcl-1 の結合を比較したところ、Mcl-1 が最も強く Bnip3 と結合することが明らかになった。

D. 考察

本研究により、低酸素下では転移能に関わらず Bnip3 が発現誘導されることが判った。従って、異なる転移能を示す細胞株における低酸素誘導アポトーシス抵抗性の差は Bnip3 の発現量では説明できず、Bnip3 のプロアポトーティック活性を抑制する Bcl-2 や Bcl-X_L あるいは Mcl-1 の発現量に依存することが強く示唆された。Bcl-2 や Bcl-X_L は Bnip3 と結合しヘテロ二量体を形成することで Bnip3 によるアポトーシスを抑制することが報告されている。しかし、これらの発現とアポトーシス抵抗性あるいは転移能とは相関しないことが明らかになっている。一方、Mcl-1 と Bnip3 との相互作用に関する報告はない。そこで Mcl-1 と Bnip3 との結合を調べたところ、Mcl-1 が Bcl-2 や Bcl-X_L よりも強く Bnip3 と結合することが明らかになった。このことは、Mcl-1 が Bnip3 と結合することにより、Bnip3 によるアポトーシスの誘導を抑制する可能性を強く示唆する。今後、この可能性を検討すると共に、これらの蛋白質が細胞内で実際に結合しているのか否かを検討する必要がある。

Bnip3 は Bcl-2 ファミリーが持つ BH 1~4 (Bcl-2 Homology 1~4) ドメインのうち、BH3 ドメインのみを有する。一般的には、プロアポトーティック Bcl-2 ファミリーメ

ンバーとアンチアポトーティック Bcl-2 ファミリーメンバー、例えば Bax と Bcl-2、とのヘテロ二量体形成には BH3 ドメインが重要であることが知られている。しかし、Bnip3 と Bcl-2 や Bcl-X_L との結合には BH3 ドメインは必要ではなく、N 末端および C 末端側に存在する膜貫通領域が必要であることが明らかになっている。Bnip3 と Mcl-1 との結合にも BH3 ドメインが必要ないのか、またもしそうであるならば結合部位はどこなのかも今後検討する必要がある。

Mcl-1 の発現量が多いために低酸素誘導アポトーシスに対する抵抗性が高くなり、それが転移能の高さと相関するならば、低転移性細胞で Mcl-1 を強制発現させると高転移性に変化すると推測される。また、ヒトのがんの原発巣と転移巣における Mcl-1 の発現量を調べると、転移巣で発現が高いことも考えられる。これらの点も今後の研究課題であると思われる。

E. 結論

本年度の検討により、ルイス肺癌由来の低酸素誘導アポトーシス抵抗性を有する高転移性細胞株中では、Mcl-1 と Bnip3 が物理的な結合をし、Mcl-1 が Bnip3 によるアポトーシス誘導を抑制している可能性が示唆された。その結果、アポトーシス抵抗性となり、高転移能を獲得していると考えられた。

F. 健康危険情報 特に無し。

G. 研究発表

1. Wang, Y.Q., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. and O-Wang, J. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.*, in press (2004).
2. Koshikawa, N., Iyozumi, A., Gassmann, M., Takenaga, K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene*, 22, 6717-6724, 2003.
3. Duarte, WR., Shibata, T., Takenaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, Y., Yamauchi, M. and Kasugai, S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 493-501, 2003.
4. Oga, M., Takenaga, K., Sato, Y., Nakajima, H., Koshikawa, N., Osato, K. and Sakiyama, S. Inhibition of metastatic brain tumor growth by intramuscular administration of the endostatin gene. *Int. J. Oncology*, 23, 73-79, 2003.
5. Tada, Y., O-Wang, J., Yu, L., Shimozato, O., Wang, Y. Q., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther.*, 10, 451-456, 2003.

DNA チップを用いた迅速がん診断システム開発の研究

分担研究者 落合 淳志 国立がんセンター研究所支所・臨床腫瘍病理部長

がん細胞を手術中に短時間で検出することは、外科的がん治療にとり次の治療法選択のために必須である。これまで上皮マーカーおよびがん細胞マーカーとして有用と考えられる分子マーカー5 (CK-19, CEA, HER2, Muc1 および E-cadherin) の発現の cut off 値を1.8 症例2.9 リンパ節の結果を基に score 化し、各分子発現の score 総和が3.5 以上の場合を陽性とした。本年度は、この cut off 値を基に63 症例134 リンパ節を用いて、前向きに各遺伝子発現を検索したところ、特異度100%感度88%でヒト乳がん手術症例のセンチネルリンパ節におけるがん細胞の転移が検出可能であることが示された。

A. 研究目的

リンパ節に転移したがん細胞や胸・腹水中のがん細胞を検出することはがん患者治療のためには重要である。現在、迅速診断として手術中に標本を凍結し組織を作製し比較的短い時間で病理組織学的に検出されてその組織内にはがん細胞が存在するかを検索し、その結果治療方針が決定されている。近年、がん細胞ががん胞巣から解離し最初に転移するリンパ節（センチネルリンパ節）の概念が出現し、実際の症例においても、センチネルリンパ節を同定しそのリンパ節への転移を検索することにより、がん細胞の転移がない症例には縮小手術を行うなど、センチネルリンパ節へのがん細胞の転移が治療法の選択に重要になってきている。しかし、センチネルリンパ節転移巣の検索には熟練した病理医が各病院に常駐する必要があり、すべての医療施設で行うことは困難な現況である。

近年、分子生物学的手法を用いて各種の腫

瘍マーカー遺伝子発現によりがん細胞の微小転移を検出する試みが行われているが、迅速診断のためにはより簡便な遺伝子発現測定系の作製が必要とされる。

本研究は、新しい電気化学的活性を持つ DNA 二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター (Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND) を用いる E-CA (Electrochemical Array) チップで、種々のがんマーカーおよび上皮細胞マーカーを同一条件下で同時に検出できる遺伝子診断システムを確立し、がんの遺伝子診断ならびに迅速診断をできるようにするものである。

本年度は最終年度としてこれまでに確認された分子発現の cut off 値を用いて前向きに症例を集め検討し、遺伝子発現検索によるがん転移の検出が可能であるか検討した。

B. 研究方法

LightCycler™ を用いた定量 PCR 法；昨年検討した LightCycler™ を用いた定量 PCR

法を用いて、標的として分子 (CK19, CEA, E-cadherin (E-cad), HER2, Mucl, β actin) による乳がん症例のセンチネルリンパ節転移遺伝子診断について検討した。また、同時に採取された病理標本を基準にしたセンチネルリンパ節遺伝子診断基準の作成を試みた。

材料と方法： mRNA を抽出し定量 PCR を行った症例および材料は、以下の毎くである。Cut off 値決定のために 18 症例 29 リンパ節および cut off 値の確認のために 63 症例 134 リンパ節を用いた。mRNA の抽出はヒト乳がんセンチネルリンパ節の迅速病理標本作製時に、連続して 6 ミクロン標本 10 枚を作製し、同検体から mRNA を抽出した。抽出 mRNA の一部は mRNA 量の測定に用い、採取検体の中で 10 μ g を用いて reverse transcriptase により cDNA を作製した。作製された cDNA 100ng 内における各種分子のコピー数を昨年度同様に LightCycler™ を用いた定量 PCR 法に operating characteristic curve (ROC) カーブを作成し各分子発現における適切な cut off 値を設定した。

Cut off 値の設定

Cut off 値はそれぞれの分子に対し最も感度・特異度の高い遺伝子コピー数と ROC 曲線により求められる Az 値を基に CEA: 2 点, CK19: 5 点, E-cadherin: 2 点, HER2: 3 点そして Mucl: 4 点としてスコア化しその総和が 3.5 点を超えた場合を陽性とした。

C. 研究結果

昨年度まで、がん細胞遺伝子診断の検出に用いた遺伝子は CEA, CK19, E-cad, HER2, Mucl の 5 つであり、コントロールとして

β -アクチンと GAP-DH を用いた。

昨年度の症例を用いて ROC 曲線により得られるそれぞれの分子における cut off 値を決定し、同時に求められる Az 値からそれぞれの分子発現に重み付けを行った。CEA: 1.14×10^3 , score 2, CK19, 5.82×10^3 , score 5, E-cadherin: 6.76×10^3 , score 2, HER2: 1.55×10^4 , score 3, Mucl: 1.65×10^4 , score 4 として点数をつけた。これらの得点をもとに再び ROC 曲線を作成し最も適切な Cut off 値を決定した。

次に、前向きにこの Cut off 値 (score 3.5 以上) の有用性を検討したところ 134 センチネルリンパ節 (病理診断陽性リンパ節 17 個のなかで遺伝子診断陽性リンパ節は 15 個 (特異度 88%) でありまた陰性症例 117 個のリンパ節はいずれも遺伝子診断陰性であった (感度 100%)。

今後、症例数を重ねることと本遺伝子の組み合わせにより特異度・感度を上げてがん細胞を検出することが可能であることが示された。

D. 考察

本研究は、新しい電気科学的活性迅速病理診断を行った後の連続切片から抽出した mRNA を用いて検討した。昨年度までの検討により、異なったマーカーの発現を検索することにより、効率よくがん細胞を検出することが可能と考えられたが、今年度は昨年度までに検討したそれぞれ 5 種類のマーカーの Cut off 値を ROC 曲線により決定し、またそれぞれの分子発現に重み付けを行った。その結果、score 3.5 以上の症例を陽性と判断した。この Cut off 値を基に前向きに 134 センチネルリンパ節の遺伝子

発現を検索し、がん細胞の病理学的がん細胞の有無と比較検討した。その結果、5種類の分子発現の score が3.5以上の症例では特異度100%感度88%で乳がんの存在を同定できることが示された。現行の病理診断とほぼ同程度の感度でヒトがん細胞の存在を確認できることは、これら遺伝子発現を ECA チップで検出することにより、リンパ節転移の診断補助が可能になると考えられた。しかし、今回の前向き検討ではよい結果が出たが、今後より適切なプローブ領域の検索と分子の選択が必要と思われた。ECA チップにより検出が可能となれば短時間でがんの転移の有無の補助診断が可能になり今後、術中迅速だけでなく、がんのステージを決定するリンパ節病理診断において ECA チップを用いた遺伝子検索法の適応が拡大されると考えられる。

E. 結論

ヒト乳がん細胞の発現する遺伝子を同時に多検体測定することにより、ヒト乳がん症例におけるセンチネルリンパ節へのがん転移の有無を現在の病理診断と同等の感度で診断することが可能になると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

Funai, K., Yokose, T., Ishii, G., Araki, K., Yoshida, J., Nishimura, M., Nagai, K., Nishiwaki, Y., Ochiai, A.: Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27: 978-984, 2003.

Araki, K., Ishii, G., Yokose, T., Nagai, K., Funai, K., Kodama, K., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Frequent overexpression of the c-kit protein in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 40: 173-180, 2003.

Yonou, H., Kanomata, N., Goya, M., Kamijo, T., Yokose, T., Hasebe, T., Nagai, K., Hatano, T., Ogawa, Y., Ochiai, A. Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 63: 2096-2102, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Significance of nodal metastatic tumor characteristics in nodal metastasis and prognosis of patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 181-187, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Ochiai, A. Histological characteristics of tumors in blood vessels play an important role in tumor progression of invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.*, 94: 158-165, 2003.

Hasebe, T., Sasaki, S., Sugitoh, M., Ono, M., Saitoh, N., Ochiai, A. Proliferative activities of tumor stromal cells play important role in tumor thickness and progression of T3 ulcerative-type colorectal cancer patients. *Virchows Arch.*, 442: 569-576, 2003.

Nakahashi, C., Oda, T., Kinoshita, T., Ueda, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Inoue, K., Furuse, J.,