

2003/4/10

厚生科学研究費補助金
がん予防等健康科学総合研究事業

婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた

新しい分子診断・治療法の開発

(H15-がん予防-012)

平成 15 年 度

「総括・分担研究報告書」

主任研究者 坂 本 優

目 次

I. 総括研究報告書

- 婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた
新しい分子診断・治療法の開発 1
坂本 優(佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長)

II. 分担研究報告書

1. マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索 24
坂本 優(佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長)
2. 子宮頸癌におけるSCC抗原の分子多様性の検討 33
加藤 紘(山口大学長)
3. 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発 36
和氣 徳夫(九州大学大学院別府先進医療センター産婦人科専門診療科 教授)
4. 子宮内膜発がん機構の分子生物学的解析 39
京 哲(金沢大学大学院医学系研究科、がん医科学専攻、分子移植学 講師)
5. 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測 44
菊池 義公(防衛医科大学校産婦人科学講座 教授)
6. 女性生殖器がんにおける血管新生とその制御 47
藤本 次良(岐阜大学医学部附属病院産科婦人科 講師)
7. 婦人科領域上皮内性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発 50
山田 亮(久留米大学医学部先端癌治療研究センター 教授)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 54

I . 総括研究報告書

『婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に 基づいた新しい分子診断・治療法の開発』

| | | | |
|--------|-------|---------------------------------|-----|
| 主任研究者: | 坂本 優 | 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 | 副部長 |
| 分担研究者: | 加藤 紘 | 山口大学 | 学 長 |
| | 和氣 徳夫 | 九州大学大学院 別府先進医療センター 産婦人科専門診療科 | 教 授 |
| | 京 哲 | 金沢大学大学院医学系研究科、 がん医科学専攻、分子移植学 | 講 師 |
| | 菊池 義公 | 防衛医科大学校産婦人科学講座 | 教 授 |
| | 藤本 次良 | 岐阜大学医学部附属病院産科婦人科 | 講 師 |
| | 山田 亮 | 久留米大学医学部先端癌治療研究センター | 教 授 |
| 研究協力者: | 平井 康夫 | 癌研究会附属病院婦人科 | 副部長 |
| | 西尾 和人 | 国立がんセンター研究所薬効試験部 | 室 長 |
| | 津田 浩史 | 大阪市立総合医療センター婦人科 | 副部長 |
| | 藤ノ木政勝 | 独協医科大学生理学 | 助 手 |
| | 縄田 修吾 | 山口大学医学部産婦人科 | 助 手 |
| | 加藤 聖子 | 九州大学生体防御医学研究所 | 講 師 |
| | 加藤 秀則 | 九州大学生体防御医学研究所 | 講 師 |
| | 田中 政彰 | 金沢大学医学部産婦人科 | 講 師 |
| | 中村 充宏 | 金沢大学医学部産婦人科 | 医 員 |
| | 工藤 一弥 | 防衛医科大学校産科婦人科学講座 | 助 手 |
| | 藤井 和之 | 防衛医科大学校産科婦人科学講座 | 研究生 |
| | 佐々木直樹 | 防衛医科大学校産科婦人科学講座 | 研究生 |
| | 下山 達 | 国立がんセンター研究所薬効試験部 | 研究員 |
| | 稲葉 憲之 | 獨協医科大学産婦人科 | 教授 |
| | 室谷 哲弥 | 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 | 部 長 |
| | 三宅 清彦 | 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 | 医 員 |
| | 近藤亜矢子 | 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 | 研究員 |

Ⅱ. 分担研究報告書

1. マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索

坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

2. 子宮頸癌におけるSCC抗原の分子多様性の検討

加藤 紘(山口大学長)

3. 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発

和氣 徳夫(九州大学生体防御医学研究所産婦人科 教授)

4. 子宮内膜発癌メカニズムの分子生物学的解析

京 哲(金沢大学大学院医学系研究科、がん医科学専攻、分子移植学 講師)

5. 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測

菊池 義公(防衛医科大学校産婦人科学講座 教授)

6. 「女性生殖器癌における血管新生とその制御」に関する研究

藤本 次良(岐阜大学医学部附属病院産科婦人科 講師)

7. 婦人科領域上皮内性癌拒絶抗原の同定と癌ワクチン分子開発

山田 亮(久留米大学医学部免疫学教室 助教授)

厚生科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
総括研究報告書

婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子診断・治療法の開発
主任研究者:坂本 優 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 副部長

研究要旨

本研究班は、婦人科癌の発生・進展および免疫機構の解析に基づく新しい分子診断・治療法の開発と臨床応用を目指した。インフォームドコンセント等倫理面への十分な配慮の下に、以下の研究を行った。(1) cDNA マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断:cDNA アレイによる子宮頸癌遺伝子診断スコアの、癌存在診断、組織型診断及び悪性度診断への応用可能性を示した。また上皮性卵巣癌では、漿液性と明細胞2種の腺癌の組織型に関連した遺伝子発現変化を見出した。今後は遺伝子悪性度診断のみならず、蛋白質アレイ解析を加え血清診断・検診への応用を目指す。

(2)子宮頸癌の SCC 抗原分子多様性の検討:従来の血清 SCC 抗原測定系 IMx において SCCA1 に比べ検出感度の低い癌特異的 SCCA2 を A1 と同程度に認識可能な新規抗体 PabY2 を作成した。これを用いた EIA 法により、IMx 陰性患者症例に高値を示す例を見出した。新規抗 SCCA 抗体 PabY2、Mab27 を利用した測定系の改良により、早期癌での SCCA 腫瘍マーカー検出感度・精度改善の可能性を示した。(3)子宮体癌分子標的療法の開発:MEK 阻害剤、抗エストロゲン剤や MDM2siRNA の投与による RAS/ER α /MDM2 機能の抑制、細胞増殖抑制による癌分子標的療法への応用可能性を示した。婦人科癌に老化死を効率的に誘導する3種の系一ヒストンアセチル化阻害剤、p21 限局ドメイン発現アデノウィルス及び HIF-1 不活化一を明らかにした。ヒストンアセチル化阻害剤、HIF-1 プロリン水酸化剤等の細胞老化死誘導機構活性化薬剤が有用な新規抗癌剤となり得る可能性を示唆した。(4)RNAi による癌細胞のテロメラーゼ活性の抑制:hTERTmRNA に対する siRNA を産生するレトロウイルスベクターを構築、子宮頸癌細胞に感染させ permanent クローンを樹立した。このクローンはテロメラーゼ活性・hTERTmRNA の発現共に抑制され、テロメア長短縮、増殖能・造腫瘍能抑制、老化死を示した。RNAi を用いた癌細胞のテロメラーゼ活性抑制による細胞増殖阻害・老化死誘導の癌治療への応用可能性を示した。(5)卵巣癌の抗癌剤耐性機序解明と反応性予測:卵巣癌における MUC-1、HER-2/neu 過剰発現は、それぞれシスプラチン耐性、タキソール耐性を示すことを見出した。また EGFR、MMP-9 の過剰発現は予後因子となり得、COX-2 発現は COX-2 阻害剤の有効性の指標となり得ることを示した。卵巣癌における MUC-1、HER-2/neu の発現が化学療法個別化の指標となる可能性を示した。またイレッサとタキソールの併用効果を検討中である。(6)血管新生とその制御:Gas6/Axl が血管平滑筋細胞の増殖促進を介してアポトーシス抑制に関わり分化型子宮内膜癌の増殖に関与することを示唆した。血管新生因子の転写因子の制御による血管新生制御という戦略により、より効率の良い腫瘍休眠療法を確立しつつある。(7)上皮性癌拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:新たに6種の癌抗原ペプチドを同定、卵巣癌等の種々の癌で発現を認めた。テラーメイド型癌ワクチン第一相臨床試験を実施、免疫学的因子と予後との相関を解析し、ペプチド特異抗体が早期誘導された患者が良好な予後を示した。テラーメイド型の方が非テラーメイド型より優れることを実証した。CTL 認識抗原ペプチドに対する抗体はワクチン投与により増加、予後と相関し、ワクチンペプチド選択の指標となることを示した。

分担研究者

1. 加藤 紘 山口大学長
2. 和氣徳夫 九州大学生体防御医学研究所 教授
3. 京 哲 金沢大学医学部産婦人科 講師
4. 菊池義公 防衛医科大学校産婦人科 教授
5. 藤本次良 岐阜大学医学部産婦人科 講師
6. 山田 亮 久留米大学医学部先端癌治療研究センター 教授

研究協力者

1. 平井康夫 癌研究会附属病院婦人科 副部長
2. 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験

部 室長

3. 津田浩史 大阪市立総合医療センター婦人科
臨床腫瘍科 副部長
4. 藤ノ木政勝 獨協医科大学大学生理学液性統御
助手
5. 縄田修吾 山口大学医学部産婦人科 講師
6. 加藤聖子 九州大学生体防御医学研究所 講師
7. 加藤秀則 九州大学生体防御医学研究所 講師
8. 田中政彰 金沢大学医学部産婦人科 講師
9. 中村 充宏 金沢大学医学部産婦人科 医員
10. 工藤 一弥 防衛医科大学校産科婦人科学講座

助手

11. 藤井 和之 防衛医科大学校産科婦人科学講座 研究生
12. 佐々木直樹 防衛医科大学校産科婦人科学講座 研究生
13. 下山 達 国立がんセンター研究所薬効試験部 研究員
14. 稲葉憲之 獨協医科大学産婦人科 教授
15. 室谷哲弥 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 部長
16. 三宅清彦 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医員
17. 近藤亜矢子 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 研究員

A. 研究目的

(1) マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索:

a. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断:

マイクロアレイ法を用いて子宮頸部の癌化浸潤に関わる各種の遺伝子群を同定し、それら遺伝子群を用いて新しい癌診断法(遺伝子診断スコア)を構築し、その検証を行なった。

b. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断:

子宮平滑筋肉腫4例、子宮平滑筋腫4例の臨床症例に対してcDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の相違を解析し臨床診断への応用が可能であるか検討した。

c. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析:

子宮頸部腺癌は、ヒト子宮頸癌の大多数を占める扁平上皮癌と比べ、初期での発見が細胞診等では難しく、発見が遅れる傾向にある。また、臨床的に同等の進行度で発見されても扁平上皮癌に比べ予後が著しく悪いため生物学的悪性度が高いと考えられる。本研究は、子宮頸癌のなかでも稀少な頸部腺癌の臨床材料が比較的入手しやすい本施設の特徴を生かし、本腫瘍の新鮮材料をもとにして、細胞遺伝学的手法により発がん過程を比較解析することにより、子宮頸部腺癌の本態解明と分子遺伝学的診断および予防治療に応用することを目的とした。

d. 子宮頸癌にて子宮頸部円錐切除術後遺残症例に対するPDT療法:

現在 Ia 期までの早期子宮頸癌に対する子宮温存療法は、全国的には子宮頸部円錐切除術が主流となっている。子宮頸部円錐切除術後、再発した場合や切除断端陽性の遺残癌の場合には、通常、子宮全摘術や2度目の子宮頸部円錐切除術が行われている。しかしながら妊孕性温存を目的とする

場合、2度目の子宮頸部円錐切除術を施行すると、流早産の可能性が高くなると考えられる。そのため、当院では、子宮頸部円錐切除術後、再発した場合や切除断端陽性の遺残癌の場合には、積極的にPDT療法を施行しているので報告する。

e. アレイによる卵巣癌の遺伝子解析:

卵巣癌はもっとも死亡率が高い婦人科癌である。卵巣癌の組織型で特に薬剤抵抗性で予後不良な明細胞腺癌と、もっとも高頻度な漿液性腺癌の遺伝子発現を比べることにより組織型特異性に関する遺伝子について検討した。

f. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索: cDNA array CGH(ACGH)は cDNA チップ上でCGHを施行する手技で、Chromosome CGH(CCGH)やBAC CGHと比較して、各遺伝子毎に解析でき同時に expression profile(EP)も解析できる。しかし従来の ACGH では感度の点から microdissection(LCM)した微量検体には応用不能であった。今回、我々は微量検体による ACGH を開発した。明細胞腺癌(CC)は本邦婦人に多く、抗癌剤耐性でその予後も悪い。そこで本研究では明細胞腺癌(CC)の生物学的特性に関与している蛋白を明らかにするため、CC と、最も頻度の高い組織型である漿液性腺癌(SC)を対象に array CGH および EP にて DNA コピー数および発現プロファイルを同時に解析し、CC と SC を比較した。

g. プロテインチップシステムによる卵巣癌血清診断:

SELDI プロテインチップシステムは加工を施したチップ上にタンパク質を吸着させ、吸着したタンパク質を質量分析計で検出するタイプのMALDI-TOF-MASSである。チップ上でいわばカラム操作をすることになるので、体液などのクルードなサンプルをそのまま処理することができる。また、必要なサンプル量が微量ですみ、かつ解析速度も速いという利点がある。このプロテインチップシステムで新たに卵巣癌患者血清を解析することで、新規のマーカーを検索すると共に診断法の開発を試みた。

h. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討:

臨床検体の DNA チップを用いた遺伝子発現研究が本研究班でも進展し、膨大なデータが蓄積されつつある。統計的解析、生物学的意味づけと検証が重要な課題である。本研究では臨床サンプルを用いた、遺伝子発現解析の解析の方法の検討をおこなった。

(2) 子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討:

扁平上皮がん関連蛋白 SCC 抗原(SCCA)は子宮頸がんをはじめとする各種扁平上皮がんの腫瘍マーカーとして臨床的に広く用いられている。この SCCA には相同性の非常に高い SCCA1、SCCA2 が存在しており、ともにセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)ファミリーに属する。これまでの検討から、プロテアーゼ阻害作用、種々の刺激に対するアポトーシス抑制機能、NK 細胞の遊走抑制作用などの機能を有することが次第に明らかとなり、がんの進展に深く関与しているものと推察される。本研究では、SCCA の分子多様性、その発現意義に着目し、扁平上皮がんの進展の新しい分子診断・治療法の開発を試みる。

(3) 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発:

①我々は、Ras を介する造腫瘍能獲得に Estrogen Receptor α を介した MDM2 の発現の増加や、MDM2-p53 結合能の亢進を介した p53 機能の抑制が関与することを報告した。そこで、Ras/ER/MDM2 経路の抑制がヒト癌細胞の増殖に与える影響を解析した。

②我々が今までに行ってきた様々な検討から、不死化した婦人科癌に老化死(senescence)を効率的に誘導する 3 つの系が明らかとなっている。これらの系の *in vitro* における活性化の解析を行い新たな抗癌戦略の構築を計る。

(4) 子宮内膜発がん機構の分子生物学的解析:

a. 子宮内膜発癌メカニズムの分子生物学的解析:

子宮内膜癌の発症には様々な癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が関与していることが明らかになってきた。このなかでも PTEN は代表的な癌抑制遺伝子であり、その遺伝子異常は最も高率で、現在までに約30-50%の頻度で遺伝子変異が認められており、子宮内膜癌の発症に極めて重要なステップであることが示唆される。一方、遺伝子変異以外にも転写レベルや epigenetic な経路で発現そのものが低下している可能性も考えられるが、これらについてはほとんど明らかになっていない。

最近、これらの遺伝子異常を引き起こす原因として、ミスマッチ修復遺伝子の異常が指摘されている。なかでも hMLH1 や hMSH2 は代表的なミスマッチ修復遺伝子であり、その遺伝子異常や発現異常により様々な遺伝子の変異が集積することが発癌メカニズムの根幹となっている可能性がある。子宮内膜癌では hMLH1 の遺伝子変異は稀で、むしろ epigenetic な経路としてのプロモーターメチル化による発現低下が指摘されている。しかしながらプロモーターメチル化も十分には解析されておらず、

特定のプロモーター領域のどの部分のメチル化が重要か、またメチル化の程度、部位と発現レベルの関係などについては明らかにされていない。さらにはこれらミスマッチ修復遺伝子の異常が一連の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の遺伝子変異を誘発する initial event であるのか否か、という疑問についてはほとんど答えが得られていない。そこで我々は子宮内膜癌やその前癌病変である増殖症において PTEN 遺伝子の変異や発現異常を同定し、ミスマッチ修復遺伝子の異常や Microsatellite Instability(MSI)との相関を明らかにすることにより内膜癌発癌過程の molecular event の全容を解明することを目的とした。特にミスマッチ修復遺伝子の異常がプロモーター hyper-methylation という epigenetic な現象で起こり得ることが示唆されており、我々は内膜癌発症の initial event として注目している。この epigenetic な現象の分子機構について詳細に解析を加え、内膜発癌の根幹を明らかにすることを目指す。これらにより得られた結果は内膜癌の発癌機構を明らかにするのみならず、内膜癌の早期発見や治療にも応用できる可能性がある。

b. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み:

近年 RNA interference(RNAi)を用いてターゲット遺伝子の発現を制御する試みが注目されている。我々は RNAi を用いてテロメラーゼ活性を抑制することによる癌細胞の生物学的変化及び遺伝子治療への可能性について検討した。

(5) 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測:

卵巣癌の化学療法はシスプラチンやタキソールの登場により大いに改善された。しかし初回より耐性を示す症例が 20-30%、再発例では 50%近くにのぼり、長期予後の改善はみられていない。そこで我々は化学療法感受性に関わる因子の同定を行ってきた。本年度は卵巣癌で過剰発現のみられる HER-2/neu 及び EGFR について臨床検体及び細胞株を用いて検討を行った。

(6) 女性生殖器癌における血管新生とその制御:

女性生殖器癌における増殖や進展に関わる血管新生の特徴を理解し、その制御の基礎を確立することによって、血管新生制御を先進医療に包括することを目的とする。癌の血管新生能を制御することによって、初期浸潤を生じる前に癌を制御し、たとえ転移巣を有していても、転移巣を増殖進展させない、すなわち転移巣を休眠させる tumor dormancy 治療によって制癌する。また、治癒切除できた症例において、再発初期病変の血管新生を

抑制することによって再発を防止し、臨床予後を大きく改善する。このような戦略は過剰な手術侵襲や癌細胞選択性の少ない従来の癌化学療法による重篤な副作用が避けられるので、QOLが高く、より良い予後をもたらすと期待できる。

(7) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

婦人科領域癌に対する特異免疫療法の基礎及び臨床研究、とりわけ個々の患者のペプチド特異的免疫反応性に基づくペプチドワクチンの基礎及び臨床研究を実施し、個々の患者の免疫学的特性(HLAの型及びペプチド特異的キラーT細胞前駆体や抗体の有無)に即応したテーラーメイドがんワクチンの開発を行う。

B. 研究方法

(1) マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索:

a. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断:

患者から子宮頸部癌部組織または正常組織を採取し、このtotal RNAをCy5で、また、コントロールとして正常扁平上皮細胞培養株のtotal RNAをCy3で、それぞれ等量ずつ蛍光標識しプローブを作製し混合液を、557種類の癌関連遺伝子がスポットされているDNAチップIntelligene Cancer CHIP ver. 2.1 (TaKaRa)上でハイブリダイゼーションした。測定した蛍光強度を数値化し、複数の内部コントロール用遺伝子を用いてCy3、Cy5間の蛍光強度のNormalizationを行なった。蛍光強度が小さく信頼性が低いと思われる遺伝子はあらかじめ解析から除いた。正常頸部4例から各遺伝子の蛍光強度の平均値を算出し、この値で各症例の遺伝子蛍光強度を割った値を発現比とした。発現比が0.5~2のものは発現に変化がないとし、比較したい2グループ間において4割以上変化がみられた遺伝子に対しMann-Whitney検定を行ない、p値<0.05となる遺伝子群を抽出し、発現相同性によりクラスタリングを行った。さらにグループ分けに対するその遺伝子の相関をもとに各遺伝子に係数を付け、その係数と遺伝子の発現比を掛けたものを全遺伝子分足しあげた数値をそのサンプルの遺伝子診断スコアとみなした。構築した遺伝子診断スコアを用いて診断未知症例に対する検証を症例を追加して施行した。

b. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断:

患者から採取した筋肉腫組織または筋腫組織のtotal RNAをCy3で、コントロールとして正常子宮筋層組織10例のtotal RNAをCy5で蛍光標識し、cDNAプローブを作製。癌関連遺伝子638個(Aチ

ップ)及び16000個(Bチップ)スポットされている2種類のDNAチップを使用し、ハイブリダイゼーション後、Cy3とCy5の各遺伝子の蛍光強度を測定・数値化した。Cy3、Cy5間の蛍光強度補正は、内部コントロール用遺伝子を用いた。蛍光強度が低く、信頼性が低いと考えられる遺伝子はあらかじめ解析から除いた。Cy3、Cy5各症例の遺伝子蛍光強度を割った値を発現比とした。発現比が0.5~2.0のものは、発現に変化のないものとした。Aチップにて変化の認められた遺伝子に対し、Mann-Whitney U-testにて有意に発現のある遺伝子群を抽出し、発現相同性によりクラスタリングを行った。グループ分けに対する遺伝子の相関をもとに、重みを付け診断スコアとみなした。発現の高い遺伝子に対し、平滑筋肉腫8例、筋腫10例、富細胞平滑筋腫6例、転移性肺腫瘍(平滑筋肉腫)2例についてABC法を用い、免疫染色を行った。平滑筋肉腫原発組織を用いてHistoculture Drug Response Assay (HDRA)を行った。診断スコア、免疫染色の結果をもとに生存率を比較検討した。

c. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析

子宮頸癌の中で、予後不良な組織亜型である子宮頸部腺癌の臨床病理学的解析およびスリガラス細胞癌の細胞株を樹立してその検討をした。HPV感染の有無判定と型判定を目的に、サザンブロットハイブリダイゼーション法とPCR法を併用した。PCR法は、HPV consensus primerとしてGP5+: 5' > TTTGTTACTGTGGTAGATACTACおよびGP6+: 5' > GAAAAATAAACTGTAAATCATATTCを用い、denature 94°C 1min., annealing 40°C 2min., extension 72°C 1.5min.でPCR増幅した(PE9600, ParkinElmer Inc.)。生成したPCR産物は、sequencer (ALFred, Amersham Pharmacia Biotech Inc.)によってdirect sequenceし、HPV-DNAの存在と型を確認した。さらに、HPV18型の存在の確認のために、HPV18 E6-E7にまたがるprimer(5' > AACGACGCAGAGAAACACAAGTAT; 5' > GCTCGTCCGGCTGGTAAAT)を用いたPCR増幅を併せて実施した。新規に樹立した子宮頸部腺癌の亜型であるスリガラス細胞癌由来の細胞株について、細胞株のゲノム全般にわたる遺伝子の増幅と欠失の解析のために、CGH(Comparative Genomic Hybridization)法を用いた。細胞株から抽出したDNAはFITC標識し、テキサスレッド標識した正常DNAと等量ずつヒト正常メタフェーズ上でハイブリダイズした。さらに、個々の遺伝子コピー数の増減が解析できるarray-based CGH解析も同時に施行した。

収集した新鮮な臨床材料は凍結して -80°C 保存とし、必要時に DNA を抽出した。遺伝的不安定性の有無を、任意の染色体から任意に5つの microsatellite marker を選択し、PCR産物の泳動パターンから遺伝的不安定性を判定した。遺伝的不安定性の発癌過程における標的遺伝子と考えられる TGF- β Type II Receptor 遺伝子、SMAD 遺伝子、BAX 遺伝子、転写因子 E2F 等の変異分析を実施している。がん抑制遺伝子として注目されている PTEN 遺伝子は、子宮体癌を含む他領域での変異分析では全エクソンにわたる種々の変異が報告されている。集積した頸部腺癌において、PTEN 遺伝子各エクソンの SSCP を実施し、変異の推定されるエクソンについてダイレクトシーケンスをして全症例で変異の有無を検討した。また全症例で、全染色体の解析に威力を発揮する Comparative Genomic Hybridization 法 (CGH 法) と個々の遺伝子コピー数の増減が解析できる array-based CGH 解析を同時に実施した。

d. 子宮頸癌にて子宮頸部円錐切除術後遺残症例に対する PDT 療法:

CINIII (6例) ~ Ia 期 (4例) の診断にて、子宮頸部円錐切除術後、再発した頸部腫瘍や切除断端陽性の遺残腫瘍の計 10 例に対してインフォームドコンセントを得た後に PDT 療法を施行した。照射方法は、原則としてコルポ照射と頸管照射を $100\text{J}/\text{cm}^2$ で施行した。但し、子宮頸部円錐切除術後、微小浸潤腺癌 + CIS で切除断端陽性の遺残癌の 1 症例に対しては、コルポ照射と頸管照射に加えてカットファイバーを用いて外子宮口の周囲の4箇所から刺入照射を行った。

e. アレイによる卵巣癌の遺伝子解析:

1) サンプル採取: 遺伝子解析の関する同意のえられた卵巣癌患者の手術時に摘出された卵巣癌部組織を採取し、直ちに液体窒素にて凍結するか、または RNAlater (Qiagen) にて保存し、アレイ用サンプルとした。採取した際、そのサンプルを 2 つに分け、1 つは病理組織検査を行なって組織診断の確認をした。また、リファレンス細胞として Immortalized human ovarian surface epithelial cells (OES2a) を使用した。

2) 方法: 各サンプルから RNA を抽出し Amino Allyl MessageAmpTM aRNA kit (Ambion) により aRNA 増幅後、OES2a の aRNA は Cy3 で、癌組織の aRNA は Cy5 で標識して競合ハイブリダイゼーションを行った。使用したチップは Known Function ORF を多く搭載 (10,000 遺伝子) した AceGene Human Oligo Chip 30K subset A である。

3) 測定と解析: GMS 418 Array Scanner にて Cy3 と

Cy5 の各遺伝子の蛍光強度を測定し、さらに ImaGene ver.4.1 により、測定した蛍光強度を数値化した。Cy3、Cy5 間の蛍光強度の Normalization には複数の内部コントロール用遺伝子を用いた。さらに、蛍光強度が小さく信頼性が低いと思われる遺伝子はあらかじめ解析から除いた。明細胞腺癌 5 例と漿液性腺癌 5 例の発現比において、80% 以上の症例に値のある遺伝子 (この場合 10 例中 8 例以上)、また各遺伝子の standard deviation が 0.5 以上のものを選び出した。その結果、1465 個の遺伝子について、MultiExperimentViewer (MeV: TIGR) を用いて t-test ($p < 0.05$) を行ない、有意差のある遺伝子群を抽出し、Hierarchical Clustering を作成した。

f. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索:

基礎的検討 (1) 女性 DNA を DOP-PCR で増幅させた後標識し、reference DNA (rDNA)、test DNA (tDNA) として hybridization し Tyramide Signal Amplification 法で発色させた。各 target 遺伝子の蛍光パターンを、女性 DNA / 女性 DNA (F/F 値) で算出した。(2) 男性 DNA、女性 DNA を同様に増幅し、各々 rDNA、tDNA として女性 DNA / 男性 DNA (F/M 値) を算出し、X 染色体上遺伝子の 1 copy の差を detect できる精度を検討した。また標識を入れ替えて検討した。(2) 卵巣癌株 (OV633) に対し、ACGH、EP、CCGH を施行し、精度を確認した。なお DNA チップは卵巣特異的で 10816 個の cDNA チップである。各実験は 6 回ずつ施行した。

臨床的検討 CC30 例、SC19 例を対象に、LCM した組織より DNA、RNA を抽出し ACGH、EP を施行した。なお ACGH による増幅および欠失に対する cut-off 値は、95% の特異度で 1 copy の差を detect できる cut off 値 (1.4, 0.7) を採用した。CC 特異的に DNA コピー数、mRNA 発現の増減を示した遺伝子に対し、定量的 PCR にて確認した。

(倫理面への配慮) 本研究に使用した検体は大阪市立総合医療センターと米国 Brigham & Women's hospital のものが混在している。大阪市立総合医療センターでの検体は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に基づいて、患者から原則として文章同意を得て、またその使用に関しては倫理委員会で審査を受けた。米国の検体については Harvard Medical School の倫理委員会で審査を受けている。

g. プロテインチップシステムによる卵巣癌血清診断:

インフォームドコンセントを得た 60 名の健常女性と 52 名の卵巣癌患者の計 112 名の血清を用いた。これら 112 名分の血清をイオン交換チップ、金属アフ

イニティチップ、逆相チップでそれぞれ処理し、タンパク質の吸着と洗浄を行った。チップに吸着したたんぱく質は MALDI-TOF-MASS であるプロテインチップリーダーで検出し、同装置付属の解析ソフトである Peaks の Biomarker Wizard という機能を用いて解析した。さらに、診断法を開発するために Biomarker Patterns で再解析し、診断のための決定木を作成した。

h. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討:

各種生物統計学的解析法を、遺伝子発現データの解析へ適応するアプローチをおこなった。ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に遵守し、国立がんセンター倫理委員会の審査承認をへて、実施された抗悪性腫瘍薬の臨床試験における、カスタムフィルターアレイを用いた遺伝子発現変動の解析データを解析し、得られたヒト遺伝子発現解析データを各種統計方法で解析し、バイオマーカーの選択をおこなった。

(2) 子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討:

組織中 SCCA の分子多様性を 2 次元電気泳動法により解析した。特に SCCA に対する新しい抗体を作成し、western blot により、その分子種による反応性を検討した。さらに、がんの浸潤に関与しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 分泌におよぼす SCCA の影響を検討するため、子宮頸部扁平上皮がん細胞株 CaSki 細胞を用い、SCCA1、SCCA2 を大腸菌に発現させ精製した glutathione-S-transferase (GST) 融合タンパク質を添加し、培養液中の MMP-2、MMP-9 を gelatin zymography で解析した。

(倫理面への配慮)

患者組織を採取する際には山口大学医学部附属病院治験臨床研究審査委員会の承認を得た上でボランティアを募りインフォームドコンセントを得た後に施行した。

(3) 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発:

1) ①子宮体癌細胞株 (Hec6, HHUA)、卵巣癌細胞株 (KK, PA-1, KF, SKOV, MCAS, KM) を用いた。

②各細胞株の ras, p53, p16, p14 の変異の有無を塩基配列にて、また ER α , MDM2 の発現を Western blot 法 (WB) で解析した。

③培養液中に MEK 阻害剤 (ER の AF-1 機能を阻害)、抗エストロゲン剤 (AF-2 機能を阻害) や MDM2siRNA を添加し、細胞増殖能や MDM2 発現の変化について検討した。

④③の条件下における各種蛋白の発現を WB で

解析した。

2) ①ヒストン脱アセチル化阻害剤による老化死の機構を検討した。in vitro の基礎的検討には酪酸ナトリウムを用いた。子宮頸癌、体癌、卵巣癌など様々な婦人科癌で細胞死が誘導されたものの p21, p53, p16, Rb の本来の発現量、変異の有無の影響を WB とシーケンスにて検討した。

②p21, p16, Rb はそれぞれ老化死誘導に必要とされている。P21 発現ウイルスを作製し細胞老化を誘導し、このときの残り 2 つの蛋白の発現、リン酸化の変化などを WB を主に用いて検討した。

③HIF-1 プロリン残基水酸化酵素の変異が子宮内膜癌で多く見られ、この再発現が癌細胞株に老化死をもたらすことが我々の検討で明らかとなっている。この酵素による老化死誘導と HIF-1 の不活化との関連を HIF-1 への siRNA、アンタゴニストの FIH などを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

基本的に細胞株を用いた実験系なので倫理に抵触可能性はほぼない。基礎的検討などで患者組織を用いるときは、本人と保証人のインフォームドコンセントを書面にて得ている。

(4) 子宮内膜癌がん機構の分子生物学的解析:

a. 子宮内膜癌メカニズムの分子生物学的解析:

1) hMLH1 プロモーターメチル化の解析

子宮内膜癌およびその正常内膜組織を用いて Methylation Specific PCR (MSP) 法や Bisulfite sequencing 法によりプロモーターの hypermethylation の有無を検討し、メチル化好発部位や程度を解析する。

2) hMLH1 遺伝子の発現解析

子宮内膜癌およびその正常内膜組織の免疫組織染色にて hMLH1 遺伝子の発現を解析する。

3) Microsatellite Instability の解析

子宮内膜癌およびその正常内膜組織より DNA を抽出し、Microsatellite marker を用いた PCR 法により、Microsatellite Instability (MSI) を解析する。

4) 以上より、hMLH1 プロモーターメチル化が、遺伝子発現異常に及ぼす影響およびその結果としての MSI phenotype の有無を解析する。

5) PTEN およびその他の内膜癌関連遺伝子の変異同定

内膜癌および増殖症、正常内膜より DNA を回収し、sequencing により遺伝子変異を同定する。

好発部位 (Hot spot) や臨床予後との相関も明らかにする。

6) 以上の成績より hMLH1 遺伝子のプロモーター

メチル化と PTEN をはじめとする内膜発癌関連遺伝子の変異の関係について解析する。これにより修復遺伝子の発現異常によりこれらの遺伝子の変異が誘発されるのか否かが明らかになり、修復遺伝子のターゲットすなわち下流に PTEN およびその他の遺伝子が位置するのか否かが解決される可能性がある。

b. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み:

hTERT mRNA をターゲットとした siRNA を作成する Retrovirus vector を構築し、子宮頸癌細胞 HeLa に感染させテロメラーゼ活性が抑制された Permanent clone を樹立し種々の検討を行った。

(5) 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測:

当科にて初回手術及び術後化学療法を施行した上皮性卵巣癌 112 症例について HER-2/neu 及び EGFR の発現頻度を調べた。HER-2/neu 及び EGFR の免疫組織化学染色はパラフィン固定標本を用い ABC 法で染色し、判定は 0, +1, +2, +3 の 4 段階にわけ評価した。さらに種々の卵巣癌細胞株及び子宮体癌細胞株における HER-2/neu の過剰発現を調べ、その過剰発現と抗癌剤感受性との相関を調べた。また Estradiol (E₂), DEX, EGF, Tx との接触による HER-2/neu 発現誘導を試みた。

(倫理面への配慮)

患者にはこの研究の意義について十分に説明した上で書面によるインフォームド・コンセントを得ている。

(6) 女性生殖器癌における血管新生とその制御:

女性生殖器癌において、注目されている血管新生因子 basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), thymidine phosphorylase (TP), interleukin (IL)-8, angiopoietin/tie2, cyclooxygenase (cox)-2, ephrin/Eph などや血管新生に関与する転写因子 E26 transcription specific 1 (ets-1), hypoxia inducible factor (HIF), COUP-TFII の癌組織内の局在や発現誘導機構を解析する。さらに、これらの血管新生因子と血管内皮細胞の局在および密度、癌の脈管侵襲、癌の進展様式(微小浸潤、リンパ節転移、腹膜播種、遠隔転移など)、予後などとの関連を調べ、その血管新生因子の機能を解析する。

(倫理面への配慮) 研究内容および癌組織の採取と研究への利用に関するインフォームド・コンセントをすべての患者より得ている。

(7) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

本研究ではヒト HLA 拘束性癌特異的細胞傷害

性 T 細胞 (CTL) 株を作製し、それらの CTL により認識される癌抗原をコードする遺伝子および抗原ペプチドを同定した。また、ペプチドワクチン臨床試験では、患者の末梢血単核球 (T 細胞) を抗原ペプチドで 2 週間刺激し、その反応性を IFN- γ を測定することにより判定し、陽性ペプチド最大 4 種類をフロイント不完全アジュバント ISA-51 (SEPPIC 社製、米国 FDA の DMF 収載品) とともにエマルジョン化した製剤 3mg を患者の皮下に 2 週間毎に投与した。T 細胞反応性に加え、血中抗ペプチド抗体価測定によってもワクチンペプチドの選択を行った。ペプチド及びアジュバント (ISA-51) は全て GMP 下で製造されたものを使用した。

(倫理面への配慮)

臨床試験 (トランスレーショナルリサーチ) は久留米大学の倫理委員会により実施計画書が審査承認されたのちに GCP に準拠して実施された。患者には、研究協力医師が試験の目的及び研究内容、プライバシーの保護、試験に参加しない場合にも不利益を被らない等について文書による説明と同意 (インフォームド・コンセント) を得たのちに実施された。

C. 研究結果

(1) マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索:

a. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断:

子宮頸部の正常組織 4 例に対し上皮内癌と扁平上皮浸潤癌の計 12 例を比較して発現比に変化が見られた遺伝子 38 個を抽出した。この遺伝子群を解析し遺伝子診断スコアを計算した。正常組織 4 例のスコアは 1.5 ± 12.6 (mean \pm s.d.)、癌 12 例のスコアは 489.6 ± 115.4 となった。同様に、上皮内癌 6 例と扁平上皮浸潤癌 6 例の比較を行ない、発現比に変化が見られた遺伝子 29 個を抽出し、遺伝子診断スコアを計算した。上皮内癌 6 例のスコアは 16.1 ± 37.5 、扁平上皮浸潤癌 6 例のスコアは 190.1 ± 46.0 となった。各診断スコアのカットオフ値を 2 つのグループの平均値の中間値とし、追加測定した未知症例サンプル 11 例について上記 2 種類の遺伝子診断スコアに当てはめて検討した。また子宮頸癌の扁平上皮癌 8 例と腺癌 4 例についても発現比に変化が見られた遺伝子 39 個を抽出し遺伝子診断スコアを求めてみた。結果、扁平上皮癌のスコアは -53.4 ± 94.3 、腺癌のスコアは 501.6 ± 78.6 となった。

b. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断:

cDNA マイクロアレイ法を用いて子宮筋腫と子宮平滑筋肉腫を比較した。A チップにて有意に発現が

増加した遺伝子12個、減少した遺伝子4個であった。平滑筋肉腫で発現が増加した遺伝子は、DNA修復関連遺伝子(TOP2A,PCNA),細胞周期関連遺伝子(CPNEF等),発現が減少した遺伝子は、腫瘍抑制関連遺伝子(ST5,TGFBR)等であった。BチップにてMGC33887,HTATIP,C20orf152,GDF2,TCFL4等、発現の高い遺伝子が認められた。HDRA法(平滑筋肉腫原発組織)の結果は、83.8%であった。免疫染色にて肉腫原発組織と肺転移組織を比較検討した結果、原発組織よりやや転移組織でのTOP2Aの発現低下は認められたが、陽性であった。抽出した遺伝子群を用い、作成した子宮平滑筋肉腫の診断スコアは組織診断と相関しており、新しい遺伝子診断法として応用できる可能性が示唆された。また、今回の結果より、化学療法におけるVP-16の有効性が推測された。現在、癌関連遺伝子が16000スポットされたチップを用いて解析中である。今後、各症例を増やすとともに、富細胞平滑筋腫などの遺伝子解析も検討していく予定である。

c. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析:

収集した新鮮な臨床材料のうち、一部は細胞培養に供し、新規の頸部腺癌細胞株の樹立を目指した。その結果、子宮頸部腺扁平上皮癌の亜型と考えられる、子宮頸部スリガラス細胞癌に由来する組織より、新規培養細胞株を確立した。これらスリガラス細胞癌由来の2細胞株についてのCGHとarray-based CGHによる解析では、1p36.2-1のFGR(SRC2)および1q25-31のLAMC2で本細胞株に特徴的な遺伝子コピー数の増加が検出された。一方、本細胞株に特徴的な遺伝子コピー数の減少が検出されたのは、9p領域、11q22.3のATM、そして16q12-13のCYLDであった(図1参照;向かって左側にコピー数の減少、右側にコピー数の増加している領域を示した)。これら2細胞株からは、いずれもHPV18型が検出された。任意の染色体から任意に5つのmicrosatellite marker(D1S226, D2S393, D3S1067, D5S644, TP53)を選択し、子宮頸部腺癌の新鮮臨床材料について遺伝的不安定性の有無を検索した。子宮頸部腺癌においても、一部の症例では遺伝的不安定性の存在が示唆されたが、子宮内膜癌において報告されている頻度と比して、ずっと低率であった。がん抑制遺伝子として注目されているPTEN遺伝子についての頸部腺癌における解析では、意義のある変異は検出されなかった。

d. 子宮頸癌にて子宮頸部円錐切除術後遺残症例に対するPDT療法:

子宮頸部円錐切除術後再発あるいは遺残腫瘍に

対して上記のごとくPDT療法を施行したところ、10例全例においてCRが得られ、外来にて1年2ヶ月~7年間経過をみているが1例も再発はみられていない。さらに、10例中3例は、妊娠出産に至り生児を得ている。

e. アレイによる卵巣癌の遺伝子解析:

明細胞腺癌5例、漿液性腺癌5例の比較検討において、有意差のある遺伝子が92個抽出された。その中には遺伝子にはcell adhesionにかかわるLAMC1やLAMB1,transcription factorであるFOXO1Aなどがあり、漿液性腺癌に比べ明細胞腺癌で発現が増加していた。これら遺伝子は卵巣癌のその他の組織型(漿液性、粘液性、類内膜)に比べ、明細胞癌で発現が増加しているという報告がある。

f. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索:

基礎的検討 (1)DOP-PCRでDNAは300倍に増幅された。ACGHは5ngの微量DNA(増幅前)で可能であった。F/F値は1.0であり、相関係数は0.94($p<0.001$)であった。(2)X染色体上遺伝子のF/M値の平均値は常染色体上遺伝子のそれより高かった(1.2 vs 0.9, $p<0.0001$)。ROC解析よりF/M値のcut off値を1.4とすると、95%の特異度で1copyの差をdetectできた。(2)OV633はKRAS,LRMP遺伝子が増幅過剰発現していることが判明しているが、ACGH,EPにて確認できた。またACGHはCCGHのデータともよく相関していた。

臨床的検討 CCで特異的にDNAコピー数、mRNA発現の変化を示した遺伝子が22個選出された。ATP-binding cassette(ABCF2)、Hypoxia inducible protein2(HIG2)が、CC特異的に増幅、過剰発現を示した。

g. プロテインチップシステムによる卵巣癌血清診断:

健常女性2名の血清と6名の卵巣癌患者血清を用いた予備実験で陽イオン交換チップ、銅・アフィニティチップ、ニッケル・アフィニティチップ、逆相チップでそれぞれ血清を処理するのがよい条件であることが判った。そこで60名の健常女性と52名の卵巣癌患者の計112名の血清を上記4種類のチップで処理し、解析を行ったところ、非常に多くのタンパク質ピークで健常女性と卵巣癌患者間で発現に差が認められた。さらに、これらの結果を用い決定木の作成を行ったところ、仮ではあるがそれぞれの条件で健常者の認識率が60~90%、患者認識率が85~100%の決定木を作成することが出来た。

h. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討:

2-1) 治療前後で有意に変動する遺伝子群をスー

パーバイズに3つの統計的手法で解析した。

正規化は各アレイデータの平均を一致させるようなモデルを用いておこない、その予測残差に関して遺伝子ごとに Fisher's combined probability test を実施した。

主成分解析では、血管新生に関連する遺伝子群が薬剤投与により大きく影響をうけることが明らかとなった。有害事象の認められる患者とそうでない患者とを区別する遺伝子を投与前と投与後の遺伝子発現の平均に基づくステップワイズ判別分析による遺伝子発現解析で選択し、有害事象関連遺伝子マーカと位置づけられた。一方日に基づくステップワイズ判別分析で、治療反応性について病気進行(PD)とそれ以外を区別する遺伝子群を選択したところ、9遺伝子が抽出された。さらに、パスウェイ解析を試み、それらが血管新生に関与する特定のレセプター型チロシンキナーゼとその下流に位置する一連の遺伝子の発現が特異的に変化することが示された。

薬力学的効果の把握として、治療による遺伝子発現変動の用量反応性解析をおこなった。個人内の遺伝子発現の相関を考慮するために同テストの並べ替え検定をおこなった。並べ替え検定で得られた12個のp値に対して Bonferroni Stepdown 法により検定の多重性の調整をおこない、5%の有意水準で発現変動が有意と判断された遺伝子グループに関して、グループ内のどの遺伝子に用量反応性があるかを探索するために、Fisher's combined probability test の検定統計量の scree plot を描いた。すなわち主成分分析において、各主成分がもつ分散を図示し、第何主成分まで考えれば十分かということを検討した。この検定統計量の値の大きさに対して各遺伝子がどれくらい寄与しているかを図示し、あらかじめ機能的に分類した遺伝子グループの有意性に対する寄与をみた。薬剤投与前と投与後における遺伝子グループ別用量反応性は、血管新生関連遺伝子群などで有意に高かった。またマーカ遺伝子が選択でき、同選択遺伝子のパスウェイ解析により、同薬物が作用するシグナル伝達経路が把握できた。

(2)子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討:

①子宮頸部扁平上皮がん組織中には、分子量約45,000のp16.4-5.9のSCCA1およびp15.7-5.5のSCCA2が存在し、がんでは、正常に比べSCCA2の発現が特に増加していた。今回作成した抗体の反応性を、western blotにて解析すると、SCCA1ペプチドに対して作成した抗体(PabY1)は intact のSCCA1のみを、SCCA2ペプチドに対して作成した抗体(PabY2)は intact のSCCA1と intact のSCCA2

の両者を同程度に認識した。現在臨床で用いられているSCCA測定系IMxは、SCCA1に比べ、がんでは特に増加すると考えられるSCCA2の測定値が underestimate された。Preliminary ではあるが、実際、PabY2を用いたComparative EIAによりがん患者検体中のSCCAを測定した結果、IMx陰性症例の中にも、高値を示す例が存在した。

②CaSki細胞を用いてSCCAのMMP分泌に対する影響を検討した結果、培養液中のproMMP-9は、SCCA1、SCCA2添加群では濃度依存的に増加したが、proMMP-2の増加は認めなかった。

(3)子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発:

1)①使用した細胞株全てにMDM2, ER α の発現を認めた。正常子宮内膜細胞に比べ、8株中4株にMDM2の発現増加をみとめた。

②MEK阻害剤と抗エストロゲン剤同時投与により、8株中5株で細胞増殖能が有意に抑制された。5株中4株は、MDM2が過剰発現している細胞株であった。細胞増殖能の抑制とp14, p16の発現の間に相関はみられなかった。

③変異型p53細胞株の中で、細胞増殖抑制が1株にみられたが、この細胞株ではNF κ Bの機能が抑制されていた。

④siRNAによりMDM2を発現抑制することによって、MDM2の過剰発現がみられた4株全てで、細胞増殖抑制がみとめられた。

2)①酪酸ナトリウムは子宮頸癌、体癌、卵巣癌など様々な婦人科癌に細胞死を誘導することができ、P53, Rbのstatus(変異の有無、発現量)に無関係であった。

②p21の限局したドメインを発現するアデノウイルスベクターの感染はRbの発現が消失したHela, p53に変異を持つSKOV, p16の発現のないHela等でも老化死を誘導した。

③HIF-1の不活化は、VHL系によるユビキチン化、HIF-1のアンタゴニストであるFIHやSiRNA、HIF-1プロリン残基水酸化酵素などで誘導することができ

多くの癌で発現が亢進しているHIF-1とその下流の低酸素誘導遺伝子群の転写抑制が子宮内膜癌の老化死を誘導することも明らかとなった。

(4)子宮内膜がん機構の分子生物学的解析:

a. 子宮内膜発癌メカニズムの分子生物学的解析:

1) hMLH1遺伝子は子宮内膜癌において約50%もの高率にメチル化を起こしていた。メチル化の程度が遺伝子(プロモーター)領域の80%以上を占める高度の症例ではhMLH1蛋白発現が阻害されていた。蛋白発現が阻害された症例では極めて高

い相関を持ってマイクロサテライト不安定性(MSI)が誘発されていた。

2) また内膜癌に併存する隣接正常内膜でも高率にメチル化が検出されたことより hMLH1 遺伝子のメチル化は内膜発癌過程における初期変化である可能性が示唆された。

3) PTEN 遺伝子変異は内膜癌症例の約40%に認められた。

4) hMLH1 遺伝子プロモーターがメチル化されていた症例では有意に PTEN の frameshift mutation の頻度が高かった。

また同様に hMLH1 遺伝子プロモーターがメチル化されていた症例では有意に TGF-beta receptor type II 遺伝子の frameshift mutation の頻度が高かった。

b. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み:

得られた clone はテロメラーゼ活性、hTERT mRNA の発現共に制御されていた。またテロメラーゼ活性が抑制された clone は control に比べてテロメア長が著明に短縮していた。また最近テロメア長以外に 3'-overhang(3'-OH)の長さが senescence を決定づける重要な因子であることが示唆されており、これを測定したところ 3'-OH の短縮が認められた。テロメラーゼ活性が抑制された clone を再度 single clone にしたところほとんどの clone は senescence になった。in vitro での細胞増殖はコントロールに比べ著明に阻害され、Soft agar での colony 形成、ヌードマウスでの造腫瘍能とも有意に抑制された。

(5) 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測:

112 例の組織型は漿液性腺癌 60 例、類内膜腺癌 15 例、粘液性腺癌 11 例、明細胞腺癌 26 例で、臨床進行期は I 期 22 例、II 期 16 例、III 期 59 例、IV 期 15 例であった。HER-2/neu 及び EGFR の過剰発現はそれぞれ 16 例(15%)、41 例(36%)にみられ、組織型及び臨床進行期との相関は認めなかった。化学療法非奏効群 25 例のうち HER-2/neu 及び EGFR の過剰発現はそれぞれ 6 例(24%)、12 例(48%)に認め、化学療法奏効例の 10%、36%に比べ、過剰発現例には化学療法非奏効例が多かった。また HER-2/neu 及び EGFR 共に低発現例では化学療法奏効例が 81%に達した。今回調べた細胞株 10 株のうち唯一 HER-2/neu の過剰発現が認められた SPAC-1-L 細胞は Tx 及び ADR に対する感受性が最も低かった。そして HER-2/neu の過剰発現誘導は Tx 耐性を誘導すると思われた。(表1)。

表1 HER-2/neu 過剰発現誘導に伴う Tx 耐性の誘導

| 細胞株 | HER-2/neu 発現 | | Tx IC ₅₀ ADR IC ₅₀ | | |
|----------|--------------|-----------|--|----------|-----------|
| | Before | After DEX | After Tx | B/A (nM) | B/A (nM) |
| Ishikawa | N(1+) | P(2+) | N(1+) | 5.2/8.2 | 80.0/92.1 |
| HEC-1A | N(1+) | P(2+) | N(1+) | 1.1/10.3 | 9.4/41.5 |
| HEC-59 | N(1+) | N(1+) | P(2+) | 6.5/215 | 520/310 |

Each IC₅₀ value is the average of three independent experiments. 1+, 2+; HercepTest

Score. B; before induction of HER-2/neu. A; after induction of HER-2/neu. N; negative.

P; positive.

(6) 女性生殖器癌における血管新生とその制御:
女性生殖器癌において最も予後と関連する癌の進展様式は子宮頸癌におけるリンパ節転移、卵巣癌における腹膜播腫、子宮内膜癌における筋層浸潤である。子宮頸癌リンパ節転移巣における TP は血管新生を介し腫瘍の増殖進展に働き、予後因子となることがわかった。したがって、TP の基質である 5FU の前駆体は増殖進展に関与する血管新生能を制御し、奏効すると考えられる。また、血清 TP はどの組織型の症例に対しても良い腫瘍マーカーと成り得ることがわかった。また、腫瘍内に浸潤してくるマクロファージから分泌される IL-8 も血管新生因子として増殖進展と関与し、予後と相関することがわかった。さらに、ETS-1 は IL-8 や TP とリンクして、血管新生を介し腫瘍の増殖進展に働くことがわかった。このことから子宮頸癌における血管新生を制御するために血管新生因子だけでなく、転写因子を標的にする戦略も耐性を妨げ、効率的であると考えられた。卵巣癌腹膜播腫巣における VEGF の発現が血管新生を介した増殖進展に働き、予後因子になることがわかった。さらに、ETS-1 の発現も同様であった。したがって、VEGF および ETS-1 は増殖進展に関与する血管新生のインディケターとなると考えられ、抗 VEGF 抗体や抗 VEGF 受容体の tyrosine kinase inhibitor や ETS-1 を標的にする戦略も奏効すると考えられた。子宮内膜癌において、筋層浸潤とともに IL-8 が飽和状態まで誘導され、血管新生を介した増殖進展に働くことがわかった。また、分化型においては ETS-1 は VEGF と、低分化型においては ETS-1 は bFGF とリンクして血管新生を仲介していた。さらに、growth arrest-specific gene 6 にコードされるタンパク Gas6 は受容体チロシンキナーゼ Axl, Sky, Mer のリガンドであることが解明され、血管平滑筋細胞の増殖

促進に働くことが明らかにされてきた。分化型子宮内膜癌において、Gas6/Axlの発現は亢進していた。また、分化型子宮内膜癌においてアポトーシス・インデックスは低下していた。したがって、Gas6による受容体チロシンキナーゼ Axl のシグナル伝達が分化過程と特異的に関与して、おそらく血管平滑筋細胞の増殖促進を介して、Gas6/Axl がアポトーシスの抑制に関わり、分化型子宮内膜癌の増殖に関与していると推察された。子宮内膜癌に関して、現時点では筋層浸潤にともなう血管新生を直接抑制する戦略はないが、分化度を加味した戦略も重要であることがわかった。

(7) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

基礎研究: 新たに癌拒絶抗原の遺伝子クローニングと細胞傷害性Tリンパ球(CTL)により HLA 拘束性に認識される抗原ペプチドの同定を実施した。その結果、以下に示す5遺伝子によってコードされる癌抗原を同定することができた。これらのうちの2分子は全く新規にクローニングされたものであった。さらにこれらの分子に由来し、CTLによりHLA拘束性に認識される抗原ペプチド9分子を同定した。

1) Ribosomal proteins S2 および L10a。この分子は HLA-A26 拘束性に CTL により認識される癌拒絶抗原である。さらに、これらの遺伝子のコードする HLA-A26 拘束性ペプチド3種も同定した。これらの分子は ubiquitous に発現しているものであった。

2) 肺癌の cDNA ライブラリーより新規癌拒絶抗原として3分子同定した(BTB domain containing 2, hairpin-binding protein, clone 83)。これらのうち、clone 83 は新規遺伝子であった。これらの遺伝子のコードする HLA-A24 拘束性ペプチドも4種同定した。これらの遺伝子発現に着いても詳細に検討した。その結果、広汎な腫瘍での発現が認められた。

3) 癌抑制遺伝子 testin のイントロンによりコードされる testin 関連遺伝子が細胞傷害性Tリンパ球(CTL)により HLA 拘束性に認識される事を明らかにし、その抗原ペプチドを同定するとともに種々の癌に広汎に発現している事を示した。

4) がんワクチン用に開発されたペプチドに反応性を有する抗体の存在を癌患者、健常人およびアトピー患者で検討し、その特異性と Th1/Th2 バランスとの関連について解析した。

5) 扁平上皮癌局所より分離した SART1 特異的 CTL の T細胞抗原レセプターのレパトアを明らかにした。

臨床試験

第I相臨床試験の解析

HLA クラス I 拘束性細胞傷害性T細胞によって認識される癌抗原ペプチドを用いたテラーメイド癌ワクチンの第I相臨床試験を婦人科癌10例を含む高度進行癌症例に対し実施し、各種免疫学的パラメーターと臨床予後との相関を解析した。HLA-A24もしくは-A2 拘束性に CTL に認識される癌抗原ペプチド 30 種をワクチンペプチドとして用いた。事前に患者末梢血 T 細胞のこれらワクチンペプチドに対する in vitro での反応性を解析し、反応性の認められたペプチド上位 4 種をワクチンとして接種した。各ペプチド 3 mg はフロイント不完全アジュバントとともに隔週で患者に皮下投与した。遅延型過敏反応(DTH)は24時間後に判定した。5 mm 以上の硬結もしくは 10 mm 以上の発赤が認められたものを陽性とした。HLA-A24 患者 78 例、-A2 患者 35 例、計 113 症例に対し臨床試験を実施し、ワクチン開始前および6回投与後の血中抗ペプチド抗体量、末梢血 CTL のワクチンペプチドに対する in vitro での反応性、細胞傷害活性、および DTH を測定した。その結果、ワクチン開始6回後という比較的早期の時点での細胞傷害活性、CTL 反応性、および DTH と予後との間に相関は認められなかったが、抗ペプチド抗体の誘導と生存期間延長とのあいだには強い相関が認められた。これらのことより、ペプチド特異的抗体の誘導はワクチン投与患者の予後を規定する良好なマーカーであることが示唆された。また、抗腫瘍免疫作用発現における抗体の関与も示唆された。

早期第II相臨床試験の成績

子宮頸癌、再燃前立腺癌、およびスキルス胃癌患者に対し早期第II相臨床試験を実施中である。第I相試験で使用された30種類のペプチドにはその使用頻度、および免疫誘導能において大きな偏りがあった。すなわち、HLA-A24 患者用には SART3-109, SART3-315, lck-208, lck-408 の4種、HLA-A2 患者用には CypB-172, lck-246, MAP-432, UBE-43 の計8種類のペプチドが高頻度に投与され、かつ CTL, DTH, 抗体のいずれをも高頻度に誘導可能であった。このことより、これらのペプチドを用いればテラーメイド型ワクチンに匹敵する臨床成績が得られることが期待された。そこで、上記8種類のペプチドを用いた“非テラーメイド”ワクチンの早期第II相臨床試験を子宮頸癌およびスキルス胃癌患者15例に対し実施した。テラーメイド型の TTP は4ヶ月であったのに対し、非テラーメイド型では 1.5 ヶ月ときわめて悪い結果となった。これらのことより、テラーメイド型の必要性が再確認された。

D. 考察

(1) マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索:

a. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断:

遺伝子診断スコアにおいて子宮頸部の正常組織と扁平上皮癌、上皮内癌と扁平上皮浸潤癌、また扁平上皮浸潤癌と腺癌という3種類の比較では3種ともに同症例グループごとにきれいに分かれた。また子宮頸部の正常組織と扁平上皮癌、上皮内癌と扁平上皮浸潤癌の比較において追加した未知症例11例(正常組織2例、上皮内癌3例、扁平上皮浸潤癌6例)の遺伝子診断スコアは11例ともに臨床診断と一致した(正診率100%)。

さらに、子宮頸部扁平上皮浸潤癌のうち、リンパ節転移を有する群と有しない群の2群間の原発巣における鑑別のための遺伝子診断スコアを構築しつつある。とくに、リンパ節転移の予測は重要な研究課題であるので、AceGene Human Oligo Chip 30Kの大規模アレイを用いて転移関連遺伝子の同定を試みている。

以上、アレイ法により子宮頸癌の遺伝子診断の可能性を示した。とくに、遺伝子による悪性度診断は従来の病理組織学的方法では困難であり、今後の臨床応用が期待される。

b. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断:

抽出した遺伝子群を用い、作成した子宮平滑筋肉腫の診断スコアは組織診断と相関しており、新しい遺伝子診断法として応用できる可能性が示唆された。遺伝子の発現は抗腫瘍薬の選定及び、予後を推測する可能性が示唆された。

c. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析:

子宮頸部腺癌は、同部の扁平上皮癌と異なり、多段階発がんの前癌状態にあたる病変が組織学的にはっきり同定されておらず、従ってその発がん過程の解析がすすんでいない。

本施設は、隣接する症例数が非常に豊富な臨床部門を有する。そのため、稀少なため通常は入手し難い子宮頸部腺癌の多数の新鮮臨床材料が利用できた。

スリガラス細胞癌由来細胞株のCGHによる解析では、FGR(SRC2) および LAMC2 が重要な oncogene であることが示唆された。また、9p 領域、ATM、CYLD の各遺伝子は、tumor suppressor gene として機能している可能性があることが示唆された。これら2細胞株から検出されたHPV18型は、以前に樹立された細胞株からも検出されたとの報告があり、この組織亜型に特徴的なHPV感染で有る可能性が高い。

遺伝的不安定性の有無の検索は、任意の染色体から任意に5つの microsatellite marker を選択し、PCR産物の泳動パターンから遺伝的不安定性を判定した。頸部腺癌の遺伝的不安定性は、報告されている子宮体部癌にみられる遺伝的不安定性の頻度よりは低いことが示唆された。遺伝的不安定性の発癌過程における標的遺伝子である TGF- β Type II Receptor 遺伝子、SMAD 遺伝子、BAX 遺伝子、転写因子 E2F の変異は、現在解析中である。

がん抑制遺伝子として注目されている PTEN 遺伝子の変異の有無は、全エクソンの SSCP とダイレクトシーケンシングによって解析した。子宮体癌を含む他領域の腺癌では、高頻度に種々の変異が報告されている。今回解析結果が判明した頸部腺癌症例では、明瞭な変異の存在はなかった。PTEN 遺伝子の変異分析をさらに継続する必要がある。

全ゲノム領域の欠失と増幅の解析に威力を発揮する Comparative Genomic Hybridization 法 (CGH 法) と array-based CGH を、蓄積した頸部腺癌症例に実施中であるが、まだまとまった解析結果に至っていない。

d. 子宮頸癌にて子宮頸部円錐切除術後遺残症例に対する PDT 療法:

現在 Ia 期までの早期子宮頸癌に対する子宮温存療法は、全国的には子宮頸部円錐切除術が主流となっている。子宮頸部円錐切除術後、再発した場合や切除断端陽性の遺残癌の場合には、通常、子宮全摘術や2度目の子宮頸部円錐切除術が行われている。しかしながら妊孕性温存を目的とする場合、2度目の子宮頸部円錐切除術を施行すると、流産の可能性が高くなると考えられる。そのため、当院では、子宮頸部円錐切除術後、再発した場合や切除断端陽性の遺残癌の場合には、積極的に PDT 療法を施行している。子宮頸部円錐切除術後再発あるいは遺残腫瘍に対して PDT 療法を施行したところ、10例全例において CR が得られ、外来にて1年2ヶ月~7年間経過をみているが1例も再発はみられていない。さらに、10例中3例は、妊娠出産に至り生児を得ている。症例のさらなる蓄積が必要であるが、PDT 療法は子宮頸部円錐切除術後再発あるいは遺残癌に対しても極めて有用な子宮温存治療法であると考えられる。

e. アレイによる卵巣癌の遺伝子解析:

この解析によって有意差のある遺伝子群 92 個が得られた。この中にはすでに明細胞癌で発現増加が有意であると報告された遺伝子がいくつか存在し、さらに解析を進めることにより組織特異性や抗癌剤感受性にかかわる遺伝子が特定できると考え

られる。

f. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索: ACGH は微量検体にも施行可能であった。これにより今後、Micridissection した微量検体からでも DNA コピー数および mRNA 発現の網羅的解析が可能になった。CC で特異的に DNA コピー数、mRNA 発現の変化を示した遺伝子が 22 個選出されたが、これらが CC 特異的な生物学的特性に関わっているものと推察される。

g. プロテインチップシステムによる卵巣癌血清診断:

今回の SELDI プロテインチップシステムを用いた解析の結果、複数の卵巣癌腫瘍マーカー候補と試作ではあるが診断のための決定木を作成することが出来た。結果を詳細に検討してみると、腫瘍マーカーの候補であると考えられた健常者と患者で発現差の大きなタンパク質ピークが必ずしも決定木で用いられる訳ではなかった。従って今後、発現差の大きなタンパク質ピークの同定を行っていくと共に、決定木で用いられているタンパク質ピークの同定を進めていこうと考えている。また、今回得られた結果をより普遍的なものにするために、より多くの方の協力を得、大規模に解析を行っていく必要があると考えられた。

現在までに腫瘍細胞を用いた遺伝子発現の検討が数多くなされ、診断、予後の予測や治療抵抗性に関する遺伝子の報告がなされてきた。本研究において、末梢血サンプルを用いて、同様の検討を行った結果、末梢血単核球においても薬力学的作用・薬物の作用や治療反応性の予測マーカーの選択に関与する遺伝子を同定できる可能性が示唆された。

h. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討:

別の統計的なアプローチとして、抗がん剤の薬力学的効果の解析として、容量依存性変化をページアンネットワークなどのネットワーク類推モデルを用いた解析、Q-Q plot による評価も実施中であるが、概ね良好な結果を得ている。

(2) 子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討:

SCCA の生物学的機能として種々の刺激に対する آپトシス抑制機能、NK 細胞の遊走抑制作用を介して腫瘍形成促進作用をこれまで報告してきたが、扁平上皮がんの浸潤機構においても、SCCA は proMMP-9 分泌を増加させることによりがんの浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。また、現在の SCCA 測定系は、SCCA1 に比べ SCCA2 の値が低くなるため、新たに作成した

SCCA の polyclonal 抗体を利用して改良することで、早期癌における腫瘍マーカー SCCA の感度、精度の改善が期待されると思われた。

(3) 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発:

1) ① 薬剤、siRNA 投与による、Ras/ER α /MDM2 機能の抑制は、ヒト癌細胞増殖抑制を惹起し、癌の分子標的療法への応用の可能性が示唆された。

② 変異型 p53 を発現する細胞株では、細胞増殖に関与する p53 非依存性の経路が考えられ、その一つとして NF κ B の機構の存在が示唆された。

2) ① 酪酸ナトリウムを用いた細胞死誘導は p53, Rb の status (変異の有無、発現量) に無関係であった。ヒストン脱アセチル化阻害活性を持った薬剤はすでに他疾患では臨床使用されており、抗癌剤としても有用である可能性が示された。

② Rb, p16 とは独立に、p21 によって転写活性化する下流の未知の遺伝子群が細胞死誘導に関与すると考えられた。活性酸素消去剤である NAC にて細胞死は抑制されることから、活性酸素誘導系のシグナルが関与していると考えられた。p21 によって誘導されるシグナル群の解明が新たな抗癌戦略の鍵のひとつになると考えられた。

③ HIF-1 の不活化とそれに伴う老化死は、VHL 系によるユビキチン化、HIF-1 のアンタゴニストである FIH、HIF-1 プロリン残基水酸化酵素などで誘導することができこれらを活性化する薬剤も抗癌戦略に有用と思われた。

(4) 子宮内膜発がん機構の分子生物学的解析:

a. 子宮内膜発癌メカニズムの分子生物学的解析:

今回の結果より hMLH1 の遺伝子メチル化が内膜癌で高率に起こっており、PTEN 遺伝子変異と密接に相関していることが明らかになった。これは内膜癌の癌化過程で hMLH1 の遺伝子メチル化によりミスマッチ遺伝子修復機能の異常が起き、内膜癌の癌化にかかわる様々な遺伝子の変異を誘発するのではないかという仮説を支持するものである。PTEN 以外の遺伝子では、TGF-beta receptor type II 遺伝子にも変異を認め、hMLH1 の遺伝子メチル化と強い相関を認めた。これらのことは、hMLH1 の遺伝子メチル化が引き金となって次々と遺伝子変異が誘発される可能性を示唆する。すなわち、内膜癌はメチル化という epigenetic な変化によりミスマッチ修復遺伝子機能が破綻し、これが癌化の initiation となる可能性が示された。形態的に正常な内膜の段階でそのような異常が起こっていることから、hMLH1 の遺伝子メチル化を高感度に検出するアッセイ系で内膜癌の早期診断が可能に

なるかもしれない。

b. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み:

RNAi による癌細胞のテロメラーゼ活性の抑制が細胞増殖能や造腫瘍能を阻害し、細胞を senescence へと向かわせた。今後臨床応用に向けて adenovirus vector etc の gene deliver system の確立、化学療法や放射線療法との併用効果について検討する予定である。

(5) 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測:

上皮性卵巣癌 112 例の臨床検体を用いた HER-2/neu の免疫組織化学染色の結果 HER-2/neu の過剰発現は卵巣癌の約 15% で観察され、これらの症例は化学療法に抵抗性である傾向があった。一方 10 株の癌細胞株のうち HER-2/neu の過剰発現していた SPAC-1-L 細胞は Tx 及び ADR に耐性であった。また HER-2/neu の過剰発現を誘導すると Tx 耐性が誘導された。これらの事実は HER-2/neu 過剰発現は Tx 耐性であることを示しており、卵巣癌のスタンダードレジメンとして定着しつつある TJ 療法を行う際の参考になると考えられる。少なくとも今後はタキソールを主とした治療法 TJ に対する反応性と HER-2/neu の発現との関係を調べていく必要がある。

(7) 婦人科領域上皮がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

本年度は新たに 5 分子の癌抗原をコードする遺伝子、および CTL により HLA-A2、-A24 および -A26 拘束性に認識される 9 種の抗原ペプチドを同定した。日本人におけるこれらの HLA タイプはそれぞれ、約 40%、60%、及び 20% である。そこで、これらの HLA タイプに対応するワクチンペプチドを今後同定することにより、日本人の約 9 割の患者に対応できる癌ワクチンが開発される事になる。また、第 1 相試験の解析結果より、癌抗原ペプチドに対する抗体がすでに患者の体内に存在すること、これらの抗体はワクチン投与により増加し臨床予後とも相関することが明らかになり、ワクチンペプチド選択のための指標となることが示唆された。早期第 II 相臨床試験の成績よりテラーメイド型でワクチン療法を実施する必要性が明確に示された。また、ホルモン不応性再燃前立腺癌に対する臨床試験では、低用量の抗癌剤リン酸エストラムスチンとの併用により 15 例中 7 例において PR、5 例で SD となっており、CR は得られていないものの、きわめて高い奏功率が得られている。また生存期間延長も認められており、きわめて有望な治療法であることが示唆された。そこで、婦人科癌においても免疫抑

制作用の少ない抗癌剤とペプチドワクチンとの併用療法のレジメンを検討中である。

E. 結論

(1) マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索:

a. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断:

マイクロアレイ法を用いた子宮頸部の扁平上皮の上皮内癌・浸潤癌の鑑別、また扁平上皮癌と腺癌鑑別における遺伝子診断スコアは臨床情報とよい相関が得られたことから、新しい分子診断法として応用される可能性が示唆された。

b. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断:

アレイ解析により抽出した遺伝子群を用い、作成した子宮平滑筋肉腫の診断スコアは組織診断と相関しており、新しい遺伝子診断法として応用できる可能性が示唆された。

c. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析:

新規樹立したスリガラス細胞癌由来細胞株 (2 株) の CGH による解析では、FGR(SRC2) および LAMC2 が重要な oncogene であることが示唆された。

d. 子宮頸癌にて子宮頸部円錐切除術後遺残症例に対する PDT 療法:

症例のさらなる蓄積が必要であるが、PDT 療法は子宮頸部円錐切除術後再発あるいは遺残癌に対しても極めて有用な子宮温存治療法であると考えられる。

e. アレイによる卵巣癌の遺伝子解析:

今後さらに解析を進め、組織型特異性や抗癌剤感受性にかかわる分子マーカーを見出すことにより卵巣癌の新しい診断方法や治療法に応用できる分子基盤となることが期待される。

f. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索:

ATP-binding cassette(ABCF2)、Hypoxia inducible protein2(HIG2)が、CC 特異的に増幅過剰発現を示したが、これらは抗癌剤感受性との関連も報告されており、CC の抗癌剤耐性に関与しているものと推察した。

g. プロテインチップシステムによる卵巣癌血清診断:

SELDI プロテインチップシステムを用いて新たに卵巣癌患者血清を解析することで、新規のマーカーを検索すると共に診断法の開発を試みた。非常に多くのタンパク質ピークで健常女性と卵巣癌患者間で発現に差が認められた。さらに、これらの結果を用い卵巣癌血清診断のための決定木の作成を行ったところ、予備的データであるが、高い感度と特異度が得られた。

h. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討:

臨床サンプルの遺伝子発現データを主成分解析、判別分析、パスウェイ解析などで解析することは、有用な手法であることが示された。同手法は婦人科領域の遺伝子発現解析の解析に有用であると考えられた。

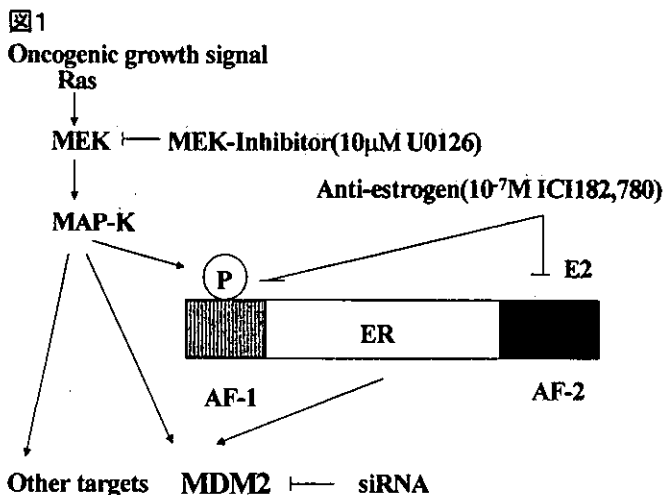
(2) 子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討:

SCCA1, SCCA2 を同程度によく認識する PabY2 を用いた Comparative EIA によりがん患者血清中の SCCA を測定した結果、IMx 陰性症例の中に、高値を示す例が存在した。このことから、今後、SCCA 測定系を改良することで腫瘍マーカー SCCA の感度、精度の改善が期待できると思われた。また、SCCA は proMMP-9 分泌を増加させることによりがんの浸潤・転移に関与している可能性を見出した。

(3) 子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発:

1) MEK 阻害剤+抗エストロゲン剤の同時投与、或いは MDM2 を標的とした Si RNA は MDM2 発現を抑制し、p53 安定化シグナルを再構築することにより 癌細胞の増殖を抑制する。このため、ホルモン依存性腫瘍の新規治療手段の可能性を有する。

2) 主な細胞周期制御遺伝子の変異、発現の有無にかかわらず、①ヒストン脱アセチル化阻害剤 ② p21 の発現上昇 ③HIF-1 の不活化は癌細胞老化死をもたらす。それぞれは独自の downstream シグナルを持つと考えられ、その機能を追及することは新たな抗がん剤開発の基礎的情報を提供する。



(4) 子宮内膜発がん機構の分子生物学的解析:
子宮内膜癌では hMLH1 の遺伝子メチル化が内膜癌で高率に起こっている。また癌の近傍に存在する正常内膜でもおり同様の変化が起こっていることから内膜癌発生過程の初期変化であると考えられ

る。hMLH1 の遺伝子メチル化によるミスマッチ遺伝子修復機能の破綻が PTEN 遺伝子変異をはじめ様々な遺伝子変異を引き起こし、内膜癌の癌化過程において重要な役割を演じていることが示唆された。

(5) 卵巣がんにおける抗癌剤耐性機序の解明と反応性の予測:

上皮性卵巣癌において HER-2/neu 及び EGFR の過剰発現は15%及び36%にみられ、過剰発現群では化学療法反応性が低かった。また薬剤(タキソール)との接触により HER-2/neu 過剰発現が誘導されこれに伴ってタキソール耐性が誘導されることが明らかになった。

(6) 女性生殖器癌における血管新生とその制御:

女性生殖器癌における増殖や進展に関わる血管新生の特徴には、臓器や細胞特異性や進展時期による特異性がある。これらを解明し、癌による血管新生に対する制御の臨床戦略の基礎が確立しつつある。さらに、血管新生因子の情報伝達を含めた血管新生の制御を包括した臨床戦略を開発し、より効率の良い tumor dormancy 治療を確立する必要がある。

(7) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

本研究により、婦人科癌に対する特異免疫療法の基礎および臨床研究、とりわけ個々の患者の免疫学的個性に基づいたテーラーメイドペプチドワクチン開発の基盤的研究が飛躍的に推進された。

F. 健康危険情報

(6) 婦人科領域上皮性がん拒絶抗原の同定とがんワクチン分子開発:

今回実施した臨床試験においてはワクチン投与局所における発赤腫脹などの炎症反応が約半数の症例において認められた。また、軽度の発熱や感冒様症状をはじめとする種々の有害事象がみとめられたが、これらは全症例においてトレラブルであり、安全であると判断された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M.Sakamoto, A.Kondo., K.Miyake., Y.Koyamatsu., T.Akiya., M.Nakano., H.Iwabuchi., T.Muroya., K.Ochiai., T.Tanaka., and Y.Tenjin. Molecular Diagnosis of Uterine Cervical Cancer Using Microarray. Cytometry Research . 2004 (in press)
- 2) 坂本 優, 近藤亜矢子, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷 司, 中野 真, 岩淵浩之, 室谷哲弥,

- 天神美夫. 婦人科領域のがん検診・診断法の最先端情報. 日本婦人科がん検診・診断学会誌. 10(2):183-187. 2003.
- 3) 坂本 優. 婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子診断・治療法の開発. 平成 12 年度がん克服新 10 年戦略プロジェクト研究報告書. 180-195. 2003.
 - 4) 坂本 優, 加藤 紘, 和氣徳夫, 京 哲, 菊池 義公, 藤本次良, 山田 亮, 平井康夫, 西尾 和人, 岡本愛光, 縄田修吾, 加藤聖子, 加藤 秀則, 高野政志, 岡本三四郎, 室谷哲弥, 岩 渕浩之, 小屋松安子, 三宅清彦, 近藤亜矢子. 婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子診断・治療法の開発. 婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子診断・治療法の開発報告書(平成 14 年度). 1-17. 2003.
 - 5) 坂本 優, 平井康夫, 西尾 和人, 室谷哲弥, 岩渕浩之, 小屋松安子, 三宅清彦, 近藤亜矢子. マイクロアレイによる婦人科癌遺伝子診断と分子標的探索. 婦人科がんの発生・進展の分子機構解析に基づいた新しい分子・診断治療法の開発報告書(平成 14 年度). 18-24. 2003.
 - 6) 室谷哲弥, 三宅清彦, 小屋松安子, 秋谷 司, 岩渕浩之, 中野 真, 坂本 優, 天神美夫. 8. 術後治療—化学療法併用放射線療法. 産科と婦人科. 70(5): 617-626. 2003.
 - 7) H.Hirakawa., S.Nawata., K.Sueoka., A.Murakami., O.Takeda., F.Numa., H.Kato., N.Sugino. Regulation of squamous cell carcinoma antigen production by E-cadherin mediated cell-cell adhesion in squamous cell carcinoma cell line. *Oncol. Rep.* 11:415-419. 2004
 - 8) Takiguchi.S., Sugino.N., Esato.K., Karube-Harada.A., Sakata.A., Nakamura.Y., Ishikawa.H., Kato.H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod.* 70(2): 313-318. 2004.
 - 9) Numa.F., Umayahara.K., Ogata.H., Nawata.S., Sakaguchi.Y., Emoto.T., Kawasaki.K., Hirakawa.H., Sase.M., Oga.A., Kato.H. De novo uterine sarcoma with good response to neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 13(3):364-7. 2003.
 - 10) Takayama.H., Nakamura.Y., Tamura.H., Yamagata.Y., Harada.A., Nakata.M., Sugino.N., Kato.H. Pineal gland (melatonin) affects the parturition time, but not luteal function and fetal growth, in pregnant rats. *Endocr J.* 50(1):37-43. 2003.
 - 11) Nakata.M., Sase.M., Anno.K., Sumie.M., Hasegawa.K., Nakamura.Y., Kato.H. Prenatal sonographic chest and lung measurements for predicting severe pulmonary hypoplasia in left-sided congenital diaphragmatic hernia. *Early Hum Dev.* 72(1):75-81. 2003.
 - 12) Nakata.M., Anno.K., Matsumori.LT., Fujiwara.M., Sumie.M., Sase.M., Kato.H. Successful treatment of supraventricular tachycardia exhibiting hydrops fetalis with flecainide acetate. A case report. *Fetal Diagn Ther.* 18(2):83-86. 2003.
 - 13) S.Nawata., K.Nakamura., H.Hirakawa., K.Sueoka., T.Emoto., A.Murakami., K.Umayahara., H.Ogata., Y.Suminami., F.Numa., H.Kato. Electrophoretic analysis of the cleaved form of serpin, squamous cell carcinoma antigen-1 in normal and malignant squamous epithelial tissues. *Electrophoresis* 24:2277-2282. 2003.
 - 14) Nakamura.Y., Tamura.H., Takayama.H., Kato.H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril.* 80(4):1012-1016. 2003.
 - 15) Kawasaki.K., Suehiro.Y., Umayahara.K., Morioka.H., Ito.T., Saito.T., Tsukamoto.N., Sugino.N., Kato.H., Sasaki.K. 11q23-24 loss is associated with chromosomal instability in endometrial cancer. *Int J Mol Med.* 12(5):727-31. 2003.
 - 16) Ninomiya.Y., Kato.K., Takahashi.A., Ueoka.K., Kamikihara.T., Arima.T., Matsuda.T., Kato.H., Nishida.J., Wake.N. K-Ras and H-Ras activation promote distinct consequences on endometrial cell survival. *Cancer Reserch.* 2004.(in press)
 - 17) Oudejans.CBM., Mulders.J., Konst.A., Westerman.BA., van.Wijk.IJ., Leegwater.PAJ., Kato.HD., Matsuda.T., Wake.N., Pals.G., Lachmeijer.AMA., ten.Kate.LP and Blankensein.MA. The parent - of - origin effect of 10q22 coincides with two regions enriched for genes with downregulated