

- expression in androgenetic placenta. Human Molecular Genetics. 2004.(in press)
- 18) Hatakenaka.M., Yoshimitsu.K., Adachi.T., Matsuda.T., Wake.N., Honda.H. Transient uterine myometrial contraction associated with moles. J Magn Reson Imaging. 19(2):182-187. 2004.
 - 19) Ichinoe.A., Behmanesh.M., Tominaga.Y., Ushijima.Y., Hirano.S., Sakai.Y., Tsuchimoto.D., Sakumi.K., Wake.N and Nakabeppu.Y. Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. Nucl. Acids. Res. 32: 477-487. 2004.
 - 20) Kato.K and Wake.N. Contribution of estrogen receptor α and progesterone receptor-B to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation. Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma (Springer-Verlag Tokyo 2003). 207-218. 2003.
 - 21) Asanoma.K., Matsuda.T., Kondo.H., Kato.K., Kishino.T., Niikawa.N., Wake.N., Kato.H. NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene which encodes homeodomain consensus motif. Genomics. 81:15-25. 2003.
 - 22) Ueoka.Y., Kato.K and Wake.N. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras mediated pathway. Molecular and cellular endocrinology. 202:81-88. 2003.
 - 23) Yamayoshi.A., Kato.K., Iwase.R., Yamaoka.T., Wake.N and Murakami.A. Photodynamic antisense therapy: regulation of cervical carcinoma cells by psoralen-conjugated oligonucleotides. Nucleic Acid Research Supplement. 3:75-76. 2003.
 - 24) Matsuda.T., Wake.N. Genetics and molecular markers in gestational trophoblastic disease with special reference to their clinical application. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology. 17(6):827-836. 2003.
 - 25) Terasaki.T., Kyo.S., Takakura.M., Maida.Y., Tsuchiya.H., Tomita.K and Inoue.M. Analysis of telomerase activity and telomere length in bone and soft tissue tumors. Oncol. Report. 2004(in press)
 - 26) Nishi.H., Nakada.T., Kyo.S., Inoue.M., Shay.JW and Isaka.K. Hypoxia-inducible factor mediates upregulation of telomerase (hTERT). Mol.Cell.Biol. 2004(in press)
 - 27) Kawashima.T., Kagawa.S., Kobayashi.N., Shirakiya.Y., Umeoka.T., Teraishi.F., Taki.M., Kyo.S., Tanaka.N and Fujiwara.T. Telomerase-specific replication selective virotherapy for human cancer. Clin.Cancer.Res. 2004(in press)
 - 28) Yatabe.N., Kyo.S., Maida.Y., Nishi.H., Nakamura.M., Kanaya.T., Tanaka.M., Isaka.K., Ogawa.S and Inoue.M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. Oncogene. 2004(in press)
 - 29) 京 哲, 井上正樹. 子宮体癌の発癌分子機構—分子生物学的機序の解明はどこまで進んだか?—. 産科と婦人科. 2004(印刷中)
 - 30) 京 哲, 井上正樹. 子宮内膜増殖症の分子生物学—子宮内膜の発癌分子機構の観点から子宮内膜増殖症を考える—. 臨床と病理. 2004(印刷中)
 - 31) Nakamura.M., Kyo.S., Kanaya.T., Yatabe.N., Maida.Y., Ishida.Y., Fujii.C., Kondo.T., Inoue.M and Mukaida.N. hTERT-promoter-based tumor specific expression of MCP-1 effectively sensitize cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. Cancer Gene Ther. 11: 1-7. 2004.
 - 32) Kyo.S., Masutomi.K., Maida.M., Kanaya.T., Yatabe.N., Nakamura.M., Takarada.M., Sugawara.I., Murakami.S., Taira.T and Inoue.M. Significance of immunological detection of hTERT: re-evaluation of expression and localization of hTERT. Am.J.Pathol. 163: 859-867. 2003.
 - 33) Kyo.S., Nakamura.M., Kiyono.T., Maida.Y., Kanaya.T., Tanaka.M., Yatabe.N and Inoue.M. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. Am. J. Pathol. 163: 2259-2269. 2003.
 - 34) Kanaya.T., Kyo.S., Maida.Y., Yatabe.N., Tanaka.M., Nakamura.M and Inoue.M. Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. Oncogene. 22: 2352-2360. 2003.
 - 35) Tanaka.M., Kyo.S., Kanaya.T., Yatabe.N.,

- Nakamura.M., Maida.Y., Okabe.M and Inoue.M. Evidence of monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. *Am.J.Pathol.* 163: 295-301. 2003.
- 36) Nakajima.M., Fujiki.Y., Noda.K., Ohtsuka.H., Ohkuni.H., Kyo.S., Inoue.M., Kuroiwa.Y., Yokoi.T. Genetic polymorphisms of cyp2c8 in Japanese population. *Drug Metab Dispos.* 31:687-690. 2003.
- 37) Kanzawa.T., Germano.IM., Kondo.Y., Ito.H., Kyo.S and Kondo.S. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *Br J Cancer.* 89:922-929. 2003.
- 38) Kawagoe.J., Ohmichi.M., Takahashi.T., Ohshima.C., Mabuchi.S., Takahashi.K., Igarashi.H., Mori-Abe.A., Saitoh.M., Du.B., Ohta.T., Kimura.A., Kyo.S., Inoue.M., Kurachi.H. Raloxifene inhibits estrogen-induced up-regulation of telomerase activity in a human breast cancer cell line. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print] 2003.
- 39) Takahashi.A., Higashino.F., Aoyagi.M., Yoshida.K., Itoh.M., Kyo.S., Ohno.T., Taira.T., Ariga.H., Nakajima.K., Hatta.M., Kobayashi.M., Sano.H., Kohgo.T and Shindoh.M. EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 63: 8338-8344. 2003.
- 40) Takeda.T., Inaba.H., Yamazaki.M., Kyo.S., Miyamoto.T., Suzuki.S., Ehara.T., Kakizawa.T., Hara.M., Degroot.LJ and Hashizume.K. Tumor-specific gene therapy for undifferentiated thyroid carcinoma utilizing the telomerase reverse transcriptase promoter. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 88: 3531-3538. 2003.
- 41) Ikeda.N., Uemura.H., Ishiguro.H., Hori.M., Hosaka.M., Kyo.S., Miyamoto.K, Takeda.E., Kubota.Y. Combination treatment with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2:739-746. 2003.
- 42) Kanzawa.T., Komata.T., Kyo.S., Germano.IM., Kondo.Y., Kondo.S. Down-regulation of telomerase activity in malignant glioma cells by p27KIP1. *Int J Oncol.* 23:1703-1708. 2003.
- 43) Kyo.S., Kanaya.T and Inoue.M. Role of hMLH1 gene hypermethylation in endometrial carcinogenesis. In: Kuramoto H, Nishida M (Eds.) *Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma.* 232-244. 2003
- 44) 京 哲, 毎田佳子, 中村充宏, 金谷太郎, 谷田部典之, 田中政彰, 清野 透, 井上正樹. 子宮内膜腺上皮細胞の不死化プロジェクト. *産婦人科の世界* 55:871-882. 2003.
- 45) 京 哲, 井上正樹. 腫瘍マーカー (CA72-4). *産科と婦人科.* 2003
- 46) 毎田佳子, 京 哲, 井上正樹. 妊娠初期絨毛のテロメラーゼ活性-妊娠の進行に伴う推移について-. *産婦人科の世界.* 55:1315-1322. 2003.
- 47) T.Kita., Y.Kikuchi., M.Takano., M.Suzuki., M.Oowada., R.Konno., K.Yamamoto., H.Inoue., H.Seto., T.Yamamoto., K.Shimizu. The effect of single weekly paclitaxel in heavily pretreated patients with recurrent or persistent advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 92:813-818. 2004.
- 48) T. Gotoh., N. Hayashi., S. Takeda., S. Itoyama., M. Takano., Y. Kikuchi. Synchronous mucinous adenocarcinoma of the endometrium and mucinous cystadenoma of bilateral ovaries presenting during fertility therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 14:169-171. 2004.
- 49) K.Yamamoto., S.Oogi., H.Inoue., K.Kudoh., T.Kita., Y.Kikuchi. Chronic administration of single weekly paclitaxel in heavily pretreated ovarian cancer patients. *Current Medicinal Chemistry.* 11:425-428. 2004.
- 50) 菊池義公. 殺細胞効果の分類と作用機序 白金化合物 編集幹事 有吉 寛, 上田龍三, 西条長宏, 峠 哲哉, 福岡正博, 臨床腫瘍学 癌と化学療法社. 224-232. 2003.
- 51) H.Hiramatsu., S.Okamoto., T.Kita., Y.Kikuchi. Relationship between HER-2/neu gene status and chemosensitivity of human endometrial cancer cell lines. H. Kuramoto, M.Nishida (Eds.). *Cell and molecular biology of endometrial carcinoma.* Springer-Verlag. 295-312. 2003.
- 52) 菊池義公. 卵巣癌の薬剤耐性に関わる因子の同定. *産婦人科治療.* 86:874. 2003.
- 53) 菊池義公, 工藤一弥. DNA チップ法—遺伝

- 子診断の新展開— 固形腫瘍. Medical Technology. 31:40-46. 2003.
- 54) M.Sawada., H.Tsuda., M.Kimura., S.Okamoto., T.Kita., T.Kasamatsu., T.Yamada., Y.Kikuchi., H.Honjo., Os.Matsubara. Different expression patterns of KIT, EGFR, and HER-2(c-erbB-2) oncoproteins between epithelial and mesenchymal components in uterine carcinosarcoma. Cancer Sci. 94:986-991. 2003.
- 55) Y.Kikuchi., T.Tode., J.Hirata. H.Nakata., T.Kita. Clinical usefulness of Korean red ginseng in postmenopausal women with severe climacteric disturbance. J Ginseng Res. 27:98-102. 2003.
- 56) K.Furuya., M.Murakami., N.Makimura., H.Matsuda., K.Ikou., K.Saito., Y.Kawakami., T.Shibazaki., U.Fukui., Y.Mizumoto., S.Tokuoka., I.Nagata., Y.Kikuchi. Immunological and endocrinological studies on lymphocyte subpopulation and medical treatment for infertility in patients with endometriosis. Molecular and Cellular Endocrinology. 202:195-199. 2003.
- 57) S.Machida., M.Ohwada., H.Fujiwara., R.Konno., M.Takano., T.Kita., Y.Kikuchi., S.Komiyama., M.Mikami., M.Suzuki. Phase I study of combination chemotherapy using irinotecan hydrochloride and nedaplatin for advanced or recurrent cervical cancer. Oncology. 65:102-107. 2003.
- 58) M.Takano., T.Shibasaki., K.Sato., S.Aida., Y.Kikuchi. Malignant mixed Mullerian tumor of the uterine corpus with alpha-fetoprotein-producing hepatoid adenocarcinoma component. Gynecol Oncol . 91:444-448. 2003._
- 59) Fujimoto.J., Nakagawa.Y., Sato.E., Sakaguchi.H., Tamaya.T. Clinical implications of estrogen related receptor (ERR) in uterine endometrial cancers. Eur J Cancer. 2004. (in press)
- 60) Sakaguchi.H., Fujimoto.J., Aoki.I., Tamaya.T. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in ovarian endometrioma. Fertil Steril. 2004. (in press)
- 61) Fujimoto.J., Aoki.I., Toyoki.H., Khatun.S., Sato.E., Sakaguchi.H., Tamaya.T. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers. Oncology. 2004. (in press)
- 62) Sun.WS., Fujimoto.J., Tamaya.T. Clinical implications of coexpression of growth arrested-specific gene 6 and receptor tyrosine kinase Axl and Sky in human ovarian cancers. Oncology. 2004. (in press)
- 63) Sun.WS., Fujimoto.J., Tamaya.T. Clinical implications of coexpression of growth arrested-specific gene 6 and receptor tyrosine kinase Axl and Sky in human uterine leiomyoma. Mol Hum Reprod . 11:701-707. 2003.
- 64) Khatun.S., Fujimoto.J., Toyoki.H., Tamaya.T. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in ovarian cancers. Cancer Sci (Jpn J Cancer Res) 1:769-773. 2003.
- 65) Sun.WS., Fujimoto.J., Tamaya.T. Coexpression of growth arrested-specific gene 6 and receptor tyrosine kinase AXI and Sky in human uterine endometrial cancers. Ann Oncol. 14:898-906. 2003.
- 66) Fujimoto.J., Aoki.I., Toyoki.H., Khatun.S., Sato.E., Tamaya.T. Expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrium during the menstrual cycle. J Biomed Sci. 10:320-327. 2003
- 67) Aoki.I., Fujimoto.J., Tamaya.T. Effect of various steroids on platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA expression in uterine endometrial cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 84:217-222. 2003_
- 68) A.Yamada., H.Yamana., K.Itoh. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. In "Current Topics in Peptide & Protein Research". Research Trend, India. Research Trend, India.
- 69) Y.Sato., Y.Maeda., T.Sasatomi., M.Takahashi., Y.Une., M.Kondo., T.Shinohara., N.Hida., K.Katagiri., K.Sato., A.Yamada., H.Yamana., K.Itoh and S.TODO. A phase I trial of CTL-purecursor-oriented peptide vaccine for colorectal carcinoma patients. Br. J. Cancer. 2004.(in press)
- 70) K.Fukuda., Y.Takao., Y.Miyazaki., K.Itoh and A.Yamada. Natural antibodies reactive to self

- peptides which had been identified as cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-directed tumor antigens. *Immunobiology*. 2004. (in press)
- 71) M.Koga., N. Komatsu., S.Shichijo., K.Itoh and A.Yamada. Analysis of cellular localization of SART3 tumor antigen by newly established monoclonal antibody: Heterotopic expression of SART3 tumor antigen on the surface of B-lineage leukemic cells. *Oncol. Reports*. 11: 785-789. 2004.
 - 72) N.Tsuda., K.Mochizuki., M.Harada., A.Sukehiro., K.Kawano., A.Yamada., K.Ushijima., T.Sugiyama., T.Nishida., H.Yamana., K.Itoh and T.Kamura. Vaccination with pre-designated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J. Immunother*. 27:60-67. 2004.
 - 73) W.Kumamaru., S.Nakamura., T.Kadena., A.Yamada., E.Kawamura., M.Sasaki., Y.Ohyama., T.Toyoshima., J.Hayashida., K.Itoh and K.Shirasuna. T cell receptor V β gene usage by T cells reactive with the tumor rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *In. J. Cancer*. 108:686-695. 2004.
 - 74) M.Noguchi., K.Itoh., S.Suekane., A.Yao., N.Suetsugu., K.Katagiri., A.Yamada., H.Yamana., S.Noda. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2 positive patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Cancer Sci*. 95:77-84. 2004.
 - 75) M.Koga., S.Shichijo., A.Yamada., J.Ashihara., H.Sawamizu., J.Kusukawa and K.Itoh. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor-rejection antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens*. 61: 136-145. 2003.
 - 76) A.Yamada., K.Kawano., M.Koga., S.Takamori., M.Nakagawa and K.Itoh. Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. 63: 2829-2835. 2003.
 - 77) N.Kawamoto., S.Ohkouchi., T.Maeda., S.Tanaka., T.Hashimoto., S.Saijo., Y.Saijo., S.Shichijo., K.Itoh and A.Yamada. IgG reactive to CTL-directed epitope peptides is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens*. 61: 352-361. 2003.
 - 78) M.Noguchi., K.Kobayashi., N.Suetsugu., K.Tomiyasu., S.Suekane., A.Yamada., K.Itoh and S.Noda. Induction fo cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate*. 57:80-92. 2003.
 - 79) S.Tanaka., M.Harada., T.Mine., M.Noguchi., R.Gohara., K.Azuma., M.Tamura., A.Yamada., A.Morinaga., M.Nishikori., K.Katagiri., K.Itoh., H.Yamana and T.Hashimoto. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancers based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the periphery. *J. Immunother*. 26: 357-366. 2003.
 - 80) T.Mine., R.Gouhara., N.Hida., N.Imai., K.Azuma., T.Rikimaru., K.Katagiri., M.Nishikori., A.Sukehiro., M.Nakagawa., A.Yamada., H.Aizawa., K.Shirouzu., K.Itoh and H.Yamana. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci*. 94: 548-556. 2003.
 - 81) S.Ohkouchi., N.Kawamoto., F.Sakanashi., S.Shichijo., Y.Saijo., T.Nukiwa., K.Itoh and A.Yamada. Identification of cytotoxic T lymphocyte-directed epitope encoded by an intron of putative tumor suppresser gene Testin of the common fragile site 7G region at 7q31.2: Peptide vaccine candidate for HLA-B52⁺ and -62⁺ cancer patients. *Eur. J. Immunol*. 33: 2964-2973. 2003.
 - 82) Y.Sato., H.Shomura., Y.Maeda., T.Mine., Y.Une., Y.Akasaka., M.Kondo., S.Takahashi., T.Shinohara., K.Katagiri., M.Sato., S.Okada., K.Matsui., A.Yamada., H.Yamana., K.Itoh and S.Todo. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci*. 94:802-808. 2003.
 - 83) N.Ikewaki., A.Yamada and H.Inoko. Depolymerization of actin filament by

cytochalasin E induces interleukin-8 production and up-regulates CD54 in the Hela epithelial cell line. *Microbiol. Immunol.* 47: 775-783. 2003.

2. 学会発表

- 1) 坂本 優、近藤亜矢子、坂本宙子、三宅清彦、小屋松安子、秋谷 司、中野 真、岩渕浩之、室谷哲弥、天神美夫、落合和徳、田中忠夫。マイクロアレイを用いた子宮頸癌の遺伝子発現解析と診断への応用。第 62 回日本癌学会総会。2003.9.25-27.
- 2) 平沢 晃、菅野康吉、宮倉安幸、阪埜浩司、進 伸幸、青木大輔、野澤志朗、坂本 優、五十嵐誠治。子宮体癌における hMLH1 遺伝子プロモーター領域のメチル化プロファイルの検討。第 62 回日本癌学会総会。2003.9.25-27.
- 3) 櫻井 拓也、坂本 優、浜田淳一、山田俊幸、及川恒之。乳がんならびに卵巣がん細胞における Etsファミリー転写因子 Fli-1 と悪性度マーカー遺伝子との発現パターンの比較。第 62 回日本癌学会総会。2003.9.25-27.
- 4) 小屋松安子、坂本 優、三宅清彦、近藤亜矢子、室谷哲弥、天神美夫、菅野康吉、岩坂剛。子宮体癌における microsatellite 不安定性と遺伝子解析について。第 2 回日本婦人科がん分子標的研究会。2003.7.19
- 5) 三宅清彦、坂本 優、小屋松安子、岩渕浩之、秋谷 司、室谷哲弥、天神美夫。cDNA マイクロアレイを用いた子宮平滑筋肉腫と子宮平滑筋腫の遺伝子発現 profiling に関する検討。第 2 回日本婦人科がん分子標的研究会。2003.7.19
- 6) M.Sakamoto., K.Miyake., Y.Koyamatsu., T.Akiya., M.Nakano., H.Iwabuchi., T.Muroya., Y.Tenjin. Photo-dynamic therapy for recurrent or residual uterine cervical cancer after conization. 9th World Congress of The International Photodynamic Association. 2003.5.20-23.
- 7) 室谷哲弥、三宅清彦、小屋松安子、秋谷 司、中野 真、岩渕浩之、坂本 優、天神美夫。子宮頸部初期がんに対する PDT の有用性とその普及に向けて。第 13 回光線力学学会(会長講演)。2003.3.22
- 8) 縄田修吾、平川 宏、末岡幸太郎、江本智子、西藤真紀子、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、住浪義則、沼 文隆、加藤 紘。扁平上皮癌関連蛋白 SCC 抗原-1 の cleaved form の検討。第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会。2003.4. 福岡
- 9) 平川 宏、縄田修吾、末岡幸太郎、河崎恵子、坂口優子、馬屋原健司、尾縣秀信、沼 文隆、加藤 紘。カドヘリン依存性細胞間接着阻害による SCC 抗原産生への影響。第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会。2003.4. 福岡
- 10) 末岡幸太郎、尾縣秀信、平川 宏、河崎恵子、馬屋原健司、縄田修吾、沼 文隆、加藤 紘。子宮頸部扁平上皮癌の再発時の予測指標としての血中 SCC の有用性。第 34 回日本婦人科腫瘍学会・学術集会。2003.7. 京都
- 11) 縄田修吾、末岡幸太郎、中川達史、平川 宏、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、武田 理、住浪義則、沼 文隆、杉野法広、加藤 紘。SCC 抗原の多様性と抗体に対する反応性の検討。第 23 回日本分子腫瘍マーカー研究会。2003.9. 名古屋
- 12) 縄田修吾、末岡幸太郎、平川 宏、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、住浪義則、沼 文隆、杉野法広、加藤 紘。子宮頸癌における扁平上皮癌関連蛋白 SCC 抗原-1 の cleaved form の検討。第 62 回日本癌学会。2003.9. 名古屋
- 13) S.Nawata., K.Nakamura., H.Hirakawa., K.Sueoka., T.Nakagawa., K.Kawasaki., K.Umayahara., H.Ogata., O.Takeda., N.Sugino., H.Kato. Characterization of the immunoreactivity between two homologous serpins, squamous cell carcinoma antigen-1 and -2 as demonstrated by western blot analysis. 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society. 2003.11. 名古屋
- 14) 上島千春、毎田佳子、橋本 学、中村充宏、谷田部典之、金谷太郎、田中政彰、京 哲、井上正樹。当科における子宮頸癌に対する chemoradiation の治療成績。第 51 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会。2003. 10.10-11. 福島市
- 15) 吉越信一、毎田佳子、京 哲、橋本 学、中村充宏、谷田部典之、金谷太郎、田中政彰、井上正樹。分子レベルでの異常を標的とした子宮内膜病変スクリーニングの試み。第 51 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会。2003. 10.10-11. 福島市
- 16) 京 哲、毎田佳子、中村充宏、橋本 学、金谷太郎、谷田部典之、田中政彰、清野 透、井上正樹。テロメラーゼ活性化機構と細胞不死

- 化における役割. 第 62 回日本癌学会総会. カッティングエッジフォーラム. 2003.9.25-27. 名古屋
- 17) 京 哲、毎田佳子、中村充宏、橋本 学、金谷太郎、谷田部典之、田中政彰、清野 透、井上正樹. 子宮内膜腺上皮細胞不死化の試み. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27. 名古屋
 - 18) 中村充宏、京 哲、増富健吉、田中政彰、毎田佳子、金谷太郎、谷田部典之、毎田佳子、橋本 学、Harn WC, 井上正樹. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27. 名古屋
 - 19) 高橋暁子、東野史裕、青柳麻里子、吉田幸一、京 哲、大野貴敏、平 敬宏、有賀寛芳、向後隆男、進藤正信. EWS/ETS は telomerase を活性化し Ewing 肉腫の発生に関わっている. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27. 名古屋
 - 20) 滝 正樹、藤原俊義、川嶋 健、岸本浩行、藤原俊哉、水口裕之、京 哲、香川俊輔、西崎正彦、田中紀章. RGD ファイバー変異を挿入した腫瘍特異的増殖可能アデノウイルス (TRAD) の抗腫瘍効果の増強. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27. 名古屋
 - 21) 京 哲、毎田佳子、金谷太郎、谷田部典之、中村充宏、橋本 学、田中政彰、井上正樹. 細胞診材料を用いた子宮内膜癌の分子診断法の確立. 第 2 回日本婦人科がん分子標的研究会. 2003. 7.9. 大阪
 - 22) 金谷太郎、京 哲、毎田佳子、坂口純子、橋本 学、中村充宏、谷田部典之、田中政彰、井上正樹. 子宮体癌における MLH1 のメチル化は各種遺伝子変異のトリガーとなるか? 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27. 名古屋
 - 23) 京 哲、毎田佳子、中村充宏、谷田部典之、金谷太郎、田中政彰、井上正樹. テロメア、テロメラーゼと発癌機構に関する新概念. 第 34 回日本婦人科腫瘍学会. ワークショップ. 2003. 7.10-12. 京都
 - 24) 金谷太郎、京 哲、毎田佳子、中村充宏、谷田部典之、田中政彰、井上正樹. 子宮内膜の発癌におけるミスマッチ修復遺伝子のメチル化と PTEN 変異について. 第 34 回日本婦人科腫瘍学会. 2003. 7.10-12. 京都
 - 25) 中村充宏、京 哲、田中政彰、金谷太郎、谷田部典之、毎田佳子、橋本学、Harn WC、井上正樹. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み. 第 31 回日本産科婦人科学会北陸連合地方部会. 2003. 6.15. 富山市
 - 26) 毎田佳子、京 哲、橋本 学、中村充宏、谷田部典之、金谷太郎、田中政彰、井上正樹. 晩期再発を認めた成人型顆粒膜細胞腫の一例. 第 31 回日本産科婦人科学会北陸連合地方部会. 2003. 6.15. 富山市
 - 27) 京 哲、毎田佳子、田中政彰、金谷太郎、谷田部典之、中村充宏、井上正樹. 子宮内膜腺上皮細胞の不死化プロジェクト. 第 55 回日本産婦人科学会総会. 2003. 4.12-15. 福岡
 - 28) 田中政彰、京 哲、金谷太郎、谷田部典之、中村充宏、毎田佳子、井上正樹. ヒト正常子宮内膜腺はモノクローナルである. 第 55 回日本産婦人科学会総会. 2003. 4.12-15. 福岡
 - 29) 金谷太郎、京 哲、毎田佳子、中村充宏、谷田部典之、田中政彰、井上正樹. 子宮体癌における hMLH1 プロモーターのメチル化が PTEN 変異に及ぼす影響. 第 55 回日本産婦人科学会総会. 2003. 4.12-15. 福岡
 - 30) 中村充宏、京 哲、田中政彰、金谷太郎、谷田部典之、毎田佳子、井上 正樹. hTERT プロモーター、単球走化因子(MCP-1)を用いた新たな子宮頸癌の遺伝子治療の試み. 第 55 回日本産婦人科学会総会. 2003. 4.12-15. 福岡
 - 31) 木村晃子、大道正英、馬淵誠士、石田絵美、川越 淳、京 哲、田坂慶一、井上正樹、倉智博久、村田雄二. 卵巣癌におけるエストロゲンによるテロメラーゼ活性化機構の解析. 第 55 回日本産婦人科学会総会. 2003. 4.12-15. 福岡
 - 32) 川越 淳、高橋一広、高橋俊文、吉田雅人、森 亜紀子、杜 伯、中原健次、大道正英、京 哲、井上正樹、倉智博久. ラロキシフェンの乳癌細胞増殖抑制作用. 第 11 回日本がん検診、診断学会. ワークショップ. 2003.
 - 33) 京 哲、金谷 太郎、井上 正樹. 細胞診材料を用いた子宮内膜癌の遺伝子診断の可能性. 第 20 回日本臨床細胞学会北陸支部連合会学術集会. 2003. 藤本次良. 性ステロイド受容体変異体・オーバービュー. 第 11 回日本ステロイドホルモン学会(シンポジウム). 2003. 11.22. 岐阜
 - 34) Fujimoto.J., Aoki.I., Toyoki.H., Khatun.S., Tamaya.T. Tumor dormancy therapy for uterine cervical cancers. 8th World Congress on Advances in Oncology (Grete, GREECE)(シンポジウム). 2003.10.16-18.
 - 35) 藤本次良. 婦人科癌における新しい治療戦略.

- 第 12 回鴨和腫瘍カンファレンス(教育講演).
2003. 6.28. 京都
- 36) 藤本次良. 子宮内膜疾患における性ステロイド感受性とそのシグナル伝達. 第1回子宮内膜疾患研究会(シンポジウム). 2003.5.24.東京
- 37) 藤本次良, 豊木廣, 孫文壁, スフィアカートン, 青木生美, 佐藤英理子, 玉舎輝彦. ネオバスキュラリゼーション. 第 24 回エンドメトリオーシス研究会学術講演会(シンポジウム). 2003. 1.23-24. 岐阜
- 38) 山田 亮. テーラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後との相関. 第3回トランスレーショナルリサーチ研究会. 2003. 9. 淡路
- 39) 峯孝志, 佐藤裕二, 野口正典, 笹富輝男, 合原るみ, 津田尚武, 田中聖子, 正村裕紀, 白水雄, 藤堂省, 山田亮, 山名秀明, 伊東恭悟. 癌ペプチドワクチン療法における予後判定マーカーの検討. 第 62 回日本癌学会総会. 2003. 9.26. 名古屋
- 40) 正村裕紀, 佐藤裕二, 前田好章, 峯孝志, 山田亮, 山名秀明, 藤堂省, 伊東恭悟. 高度進行・再発胃癌に対する CTL precursor-oriented 癌ペプチドワクチンの第一相臨床試験. 第 62 回日本癌学会総会. 2003. 9.26. 名古屋
- 41) 矢島直樹, 山中龍也, 土屋尚人, 山田亮, 伊東恭悟, 田中隆一. 再発悪性神経膠腫に対する CTL precursor-oriented ペプチドワクチン療法の第一相臨床試験. 第 62 回日本癌学会総会. 2003. 9.26. 名古屋
- 42) 山田亮, 峯孝志, 合原るみ, 笹富輝男, 野口正典, 津田尚武, 望月一生, 田中聖子, 正村裕紀, 佐藤裕二, 山名秀明, 伊東恭悟. テーラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後の相関. 第62回日本癌学会総会. 2003. 9.26. 名古屋
- 43) 山田 亮, 峯 孝志, 合原るみ, 笹富輝男, 野口正典, 津田尚武, 望月一生, 田中聖子, 正村裕紀, 佐藤裕二, 山名秀明, 伊東恭悟. テーラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後との相関. 第7回基盤的癌免疫研究会. 2003. 7. 岡山
- 44) 矢島直樹, 山中龍也, 土屋尚人, 山田 亮, 伊東恭悟, 田中隆一. 再発悪性神経膠腫に対する CTL precursor-oriented ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験. 第7回基盤的癌免疫研究会. 2003. 7. 岡山
- 45) A.Yamada., H.Yamana., K.Itoh. New

Development of Tailor-made Peptide Vaccine for Cancer Immunotherapy. The International Symposium held by Catholic Research Institutes of Medical Science and Catholic Cancer Center, The Catholic University of Korea "Recent Advances in Medical Science; Cancer Immunotherapy and Neural Science" 2003. 3.23. Seoul. Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1)名称:C型肝炎ウイルス由来ペプチド

出願番号:特願 2003-330258

出願日:平成 15 年 9 月 22 日

発明者:伊東恭悟, 山田亮, 佐田通夫

出願人:学校法人久留米大学

2) 名称:肺癌由来 B52&B62 拘束性腫瘍抗原

出願番号:特願 2003-338402

出願日:平成 15 年 9 月 30 日

発明者:伊東恭悟, 山田亮

出願人:伊東恭悟

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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)
分担研究報告書

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

分担研究者: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臨床腫瘍科 副部長
稲葉憲之 獨協医科大学産婦人科 教授
藤ノ木政勝 獨協医科大学生理学液性統御 助手
室谷哲弥 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 部長
岩渕浩之 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 医長
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

研究要旨

1. アレイによる子宮頸癌の遺伝子診断: 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。(近藤、坂本)
2. アレイによる子宮平滑筋肉腫の遺伝子診断: 子宮平滑筋肉腫および子宮平滑筋腫に対してcDNA マイクロアレイを用い遺伝子発現の相違を解析し臨床診断への応用可能性を検討した。平滑筋肉腫で有意に発現上昇した遺伝子12個、減少した遺伝子4個であり、発現上昇遺伝子は、DNA 修復関連遺伝子(TOP2A, PCNA), 細胞周期関連遺伝子(CPNEF 等), 発現減少遺伝子は、腫瘍抑制関連遺伝子(ST5, TGFBR)等であった。抽出した遺伝子群を用い作成した診断スコアは組織診断と相関し、新規遺伝子診断法として応用できる可能性が示唆された。(三宅、坂本)
3. アレイによる子宮頸部腺癌の遺伝子解析: 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、新規樹立したスリガラス細胞癌由来細胞株(2株)の CGH 解析により、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示唆された。(平井)
4. 子宮頸癌頸部円錐切除術後遺残症例に対する PDT 療法: 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た。(坂本)
5. アレイによる卵巣癌遺伝子解析: 卵巣・明細胞腺癌5例、漿液性腺癌5例につき OSE2a (Immortalized human ovarian surface epithelial cells) を対照細胞に用いアレイ解析を行い、2種の卵巣癌での発現比が有意に差のある遺伝子を92個抽出し(t-test)、Hierarchical Clusteringを行った。(近藤、坂本)
6. アレイによる卵巣明細胞腺癌の分子標的探索: 明細胞腺癌(CC)の生物学的特性に関与する蛋白を明らかにするため、CC と、最も高頻度の組織型である漿液性腺癌(SC)を対象にアレイ CGH および expression profile にて DNA コピー数と発現プロファイルを同時に解析し、CC と SC を比較した。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。(津田)
7. 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。60名の健常女性と52名の卵巣癌患者の計112名の血清を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卵巣癌血清診断のための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。(藤ノ木、稲葉)
8. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量性の検討: 腫瘍組織、末梢血単核球等の臨床検体、培養細胞のcDNAアレイを用いた遺伝子発現解析において、検体保存方法、データ再現性、相同性、非増幅・増幅サンプルにおける再現性を検討・比較した。臨床検体では保存状態が結果に大きく影響し、非増幅系と増幅系間の相同性は低いが、増幅検体間の比較は可能であることを示した。(西尾)

A. 研究目的

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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を報告する。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

B. 研究方法

1. 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。

2. 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。

3. 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、サザンプ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 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' > GCTCGTCGGGCTGGTAAAT) 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 と等量づ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。

4. 子宮頸癌にて頸部円錐切除術後遺残症例に対する PDT 療法：CIN III (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 100J/cm² 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。

5. 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、MultiExperiment Viewer (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。

6. 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。

7. 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、金属アフィニティチップ、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。

8. 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。

C. 研究結果

1. 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。

2. 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、TGFBFR) 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。

3. 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に比して、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。

4. 子宮頸癌にて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。

5. 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。

6. 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 1 copy 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。

7. 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。

8. 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。

D. 考察

1. 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。

2. 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。

3. 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スによって解析した。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。

4. 子宮頸癌にて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。

5. 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。

6. 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。

7. 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する遺伝子を同定できる可能性が示唆された。

8. 臨床検体の遺伝子発現解析の再現性、定量的な検討:

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、容量依存性変化をベイ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。

E. 結論

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 子宮頸癌にて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。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

F. 健康危険情報

特になし

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、岩渕浩之、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か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、綱田修吾、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.
- ### 2. 学会発表
- 1) 坂本 優、近藤亜矢子、坂本宙子、三宅清彦、小屋松安子、秋谷 司、中野 真、岩渕浩之、室谷哲弥、天神美夫、落合和徳、田中忠夫. マイクロアレイを用いた子宮頸癌の遺伝子発

現解析と診断への応用. 第 62 回日本癌学会
総会. 2003.9.25-27.

- 2) 平沢 晃、菅野康吉、宮倉安幸、阪埜浩司、
進 伸幸、青木大輔、野澤志朗、坂本 優、五
十嵐誠治. 子宮体癌における hMLH1 遺伝子
プロモーター領域のメチル化プロファイルの検
討. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27.
- 3) 櫻井 拓也、坂本 優、浜田淳一、山田俊幸、
及川恒之. 乳がんならびに卵巣がん細胞にお
ける Ets ファミリー転写因子 Fli-1 と悪性度マー
カー遺伝子との発現パターンとの比較. 第 62 回
日本癌学会総会. 2003.9.25-27.
- 4) 小屋松安子、坂本 優、三宅清彦、近藤亜矢
子、室谷哲弥、天神美夫、菅野康吉、岩坂
剛. 子宮体癌における microsatellite 不安定性
と遺伝子解析について. 第 2 回日本婦人科が
ん分子標的研究会. 2003.7.19
- 5) 三宅清彦、坂本 優、小屋松安子、岩淵浩之、
秋谷 司、室谷哲弥、天神美夫. cDNA マイク
ロアレイを用いた子宮平滑筋肉腫と子宮平滑
筋腫の遺伝子発現 profiling に関する検討. 第
2 回日本婦人科がん分子標的研究会.
2003.7.19
- 6) M.Sakamoto., K.Miyake., Y.Koyamatsu.,
T.Akiya., M.Nakano., H.Iwabuchi., T.Muroya.,
Y.Tenjin. Photo-dynamic therapy for recurrent
or residual uterine cervical cancer after
conization. 9th World Congress of The
International Photodynamic Association.
2003.5.20-23.
- 7) 室谷哲弥、三宅清彦、小屋松安子、秋谷 司、
中野 真、岩淵浩之、坂本 優、天神美夫. 子
宮頸部初期がんに対する PDT の有用性とその
普及に向けて. 第 13 回光線力学学会(会長講
演). 2003.3.22

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

∴
∴
∴

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)
分担研究報告書

子宮頸がんにおける SCC 抗原の分子多様性の検討

分担研究者:加藤 紘 山口大学長

研究協力者:縄田修吾 山口大学産婦人科 助手

研究要旨

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。SCCA には相同性の高い SCCA1、SCCA2 が存在するが、現在の SCCA 測定系 IMx は、SCCA1 に比べ、癌で特に増加する SCCA2 の測定値が低くなるため、SCCA に対する新たな抗体作成を試みた。その中で、PabY2 は intact な SCCA1、SCCA2 を同程度によく認識した。Preliminary ではあるが、PabY2 を用いた Comparative EIA によりがん患者血清中の SCCA を測定した所、IMx 陰性症例の中にも高値を認める例が存在したことから、今後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、これまでがんにおける SCCA の役割として、抗がん剤などの刺激に対するアポトーシス抑制作用や、NK 細胞のがん組織内への遊走を抑制させる作用などを報告してきたが、今回新たに 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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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 によりがん患者血清中の 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。

D. 考察

SCCA の生物学的機能として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を介した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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Nakata.M., Anno.K., Matsumori.L.T., 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.
- 7) S.Nawata., K.Nakamura., H.Hirakawa., K.Sueoka., T.Emoto., A.Murakami., K.Umayahara., H.Ogata., Y.Sumiami., 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.
- 8) 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):1012-10166. 2003.
- 9) 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.

2. 学会発表

- 1) 縄田修吾、平川 宏、末岡幸太郎、江本智子、西藤真紀子、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、住浪義則、沼 文隆、加藤 紘。扁平上皮癌関連蛋白 SCC 抗原-1 の cleaved form の検討。第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会。2003.4. 福岡
- 2) 平川 宏、縄田修吾、末岡幸太郎、河崎恵子、坂口優子、馬屋原健司、尾縣秀信、沼 文隆、加藤 紘。カドヘリン依存性細胞間接着阻害による SCC 抗原産生への影響。第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会。2003.4. 福岡
- 3) 末岡幸太郎、尾縣秀信、平川 宏、河崎恵子、馬屋原健司、縄田修吾、沼 文隆、加藤 紘。子宮頸部扁平上皮癌の再発時の予測指標と

しての血中 SCC の有用性. 第 34 回日本婦人科腫瘍学会・学術集会. 2003.7. 京都

- 4) 縄田修吾、末岡幸太郎、中川達史、平川 宏、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、武田 理、住浪義則、沼 文隆、杉野法広、加藤 紘. SCC 抗原の多様性と抗体に対する反応性の検討. 第23回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2003.9. 名古屋
- 5) 縄田修吾、末岡幸太郎、平川 宏、河崎恵子、村上明弘、馬屋原健司、尾縣秀信、住浪義則、沼 文隆、杉野法広、加藤 紘. 子宮頸癌における扁平上皮癌関連蛋白 SCC 抗原-1 の cleaved form の検討. 第 62 回日本癌学会. 2003.9. 名古屋
- 6) S.Nawata., K.Nakamura., H.Hirakawa., K.Sueoka., T.Nakagawa., K.Kawasaki., K.Umayahara., H.Ogata., O.Takeda., N.Sugino., H.Kato. Characterization of the immunoreactivity between two homologous serpins, squamous cell carcinoma antigen-1 and -2 as demonstrated by western blot analysis. 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society. 2003.11. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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)
分担研究報告書

子宮頸がん・体がんの分子標的療法の開発

分担研究者:和氣 徳夫 九州大学生体防御医学研究所 教授
研究協力者:加藤 聖子 九州大学生体防御医学研究所 講師
研究協力者:加藤 秀則 九州大学生体防御医学研究所 講師

研究要旨

1) 婦人科癌における Ras/ER α /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み

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) 婦人科癌における新たな細胞老化死誘導系の検討

①ヒストン脱アセチル化阻害剤 ②p21 の発現上昇 ③HIF-1 の不活化の癌細胞老化死誘導能について研究し、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老化死が誘導されることが明らかとなった。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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 とシークエンスにて検討した。

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。

C. 研究結果

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