

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 $\kappa$ 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。

③ HIF-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。

#### D. 考察

1) ①薬剤、siRNA 投与による、Ras/ER $\alpha$ /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 $\kappa$ 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。

②Rb, 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。

③HIF-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

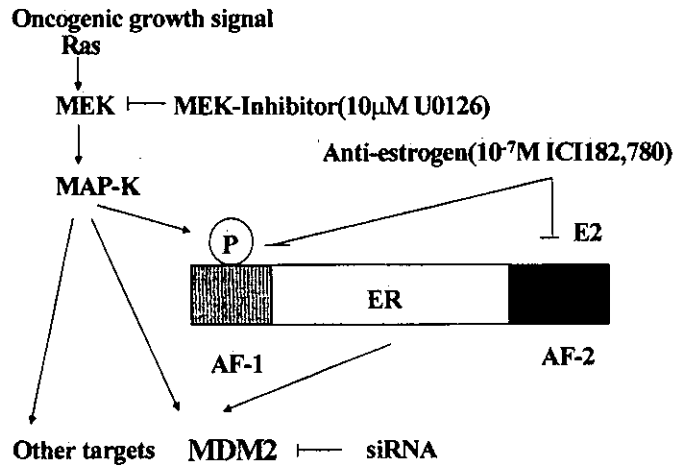
有用と思われた。

#### E. 結論

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 siRNA 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癌剤開発の基礎的情報を提供する。

図1



#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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 expression in androgenetic

- placenta. Human Molecular Genetics. 2004.(in press)
- 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) Kato.K and Wake.N. Contribution of estrogen receptor  $\alpha$  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.
  - 6) 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.
  - 7) 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. 202:80-88. 2003.
  - 8) 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.
  - 9) 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.

特になし  
 2. 実用新案登録  
 特になし  
 3. その他  
 特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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

1. 子宮内膜発癌メカニズムの分子生物学的解析
2. RNA interference を用いたテロメラーゼ活性制御の試み

分担研究者: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  
研究協力者:田中 政彰 金沢大学医学部産婦人科 講師  
研究協力者:中村 充宏 金沢大学医学部産婦人科 医員

## 研究要旨

子宮内膜発癌に関与する遺伝子変異として PTEN, Ras, P53 などが知られているが、これらの遺伝子変異とミスマッチ修復遺伝子の機能異常との関連が示唆されてきた。

そこで本研究では代表的なミスマッチ修復遺伝子である hMLH1 の発現異常を調べ、その原因とそれが引き起こす異常を明らかにすることを目的とした。

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。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。

一方、hMLH1 遺伝子のメチル化による不活化が他の遺伝子変異を誘発するのか、という疑問についての内膜発癌に関与する遺伝子の変異との相関を検討した。その結果、hMLH1 遺伝子のメチル化は PTEN の frameshift 変異と有意に相関していた。そのほかには TGF-beta receptor type II 遺伝子の frameshift 変異とも相関していた。現在アポトーシス関連遺伝子などの変異との相関についても検討中である。

今回の研究にて形態学的に正常である内膜腺のミスマッチ修復遺伝子のメチル化を検出し得たことは、病理診断や細胞診で検出不可能な癌化の早期変化を遺伝子診断にてスクリーニングできる可能性を示唆しており、癌の早期診断への臨床応用を考える上で非常に興味深い。また hMLH1 遺伝子のメチル化が内膜癌化に関わる複数の遺伝子の変異と相関していることは、hMLH1 遺伝子のメチル化が内膜発癌の initial step として重要であることを示唆する。

また今回、RNAi による hTERT 抑制を試みた。hTERT はテロメラーゼ酵素活性を担うサブユニットであり、殆どの癌細胞で発現していることから、癌特異的治療の標的のひとつとして期待できる。hTERT 陽性子宮頸癌細胞(HeLa)に hTERT に対する siRNA 産生レトロウイルスベクターを導入したところ、ベクターのみを導入した対照群と比較しテロメラーゼ活性抑制と細胞老化、およびテロメア長短縮が誘導され、コロニー形成能、およびヌードマウスにおける造腫瘍能も抑制された。さらに hTERT siRNA 導入 HeLa 細胞に、放射線を照射したところ、siRNA 単独導入の場合よりも細胞増殖が著しく抑制された。以上より、RNAi を用いた hTERT 抑制は癌細胞において細胞老化を誘導でき、かつ放射線照射を併用することにより、その効果を高められ、癌遺伝子治療への応用可能性が示唆された。

## A. 研究目的

1. 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。

2. 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。

## B. 研究方法

### 1.

#### 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 hyper-methylation 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発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。

### 2.

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。

## C. 研究結果

### 1.

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。

5) 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。

### 2.

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。

#### D. 考察

1. 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。

2. 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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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
  - 20) 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.
  - 21) 京 哲, 井上正樹. 腫瘍マーカー(CA72-4). *産科と婦人科*. 2003
  - 22) 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.
2. 学会発表
    - 1) 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
    - 2) 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
    - 3) 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
    - 4) 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
    - 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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.
- 20) 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.
- 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

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

分担研究者: 菊池 義公 防衛医科大学校産科婦人科学講座 教授  
研究協力者: 工藤 一弥 防衛医科大学校産科婦人科学講座 助手  
研究協力者: 藤井 和之 防衛医科大学校産科婦人科学講座 研究生  
研究協力者: 佐々木直樹 防衛医科大学校産科婦人科学講座 研究生

研究要旨

上皮性卵巣癌における HER-2/neu 及び EGFR の過剰発現は化学療法抵抗性の指標となり得る。Dexamethasone (DEX) 及び Paclitaxel (Tx) との接触によりある癌細胞株で HER-2/neu の発現が誘導され、誘導された株では Tx 及び adriamycin (ADR) に対する感受性が低下した。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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 (E<sub>2</sub>), 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。

C. 研究結果

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)。

細胞株	HER-2/neu 発現		Tx IC <sub>50</sub>	ADR IC <sub>50</sub>	
	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

表 1 HER-2/neu 過剰発現誘導に伴う Tx 耐性の誘導

Each IC<sub>50</sub> 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.

D. 考察

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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) K.Furuya., M.Murakami., N.Makimura., H.Matsuda., K.Ikou., K.Saito., Y.Kawakami., T.Shibasaki., 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.
- 11) 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.
- 12) 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.

#### 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

女性生殖器癌における血管新生とその制御

分担研究者: 藤本 次良 岐阜大学医学部附属病院産科婦人科 講師

研究要旨

女性生殖器癌すなわち子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌における原発巣の増殖、転移を含めた進展、さらに治癒切除後の再発に関わる血管新生にはそれぞれ特徴がある。この点を血管新生因子の発現調節や血管新生における転写の機能調節の面から明らかにした。これを基に血管新生の制御戦略を確立し、侵襲の少ない癌治療法を考案している。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果&D.考察

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種、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。卵巣癌腹膜播種巣における 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、ETS-1 は VEGF と、低分化型において 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。

#### E. 結論

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、癌における血管新生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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) 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

##### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 藤本次良, 豊木廣, 孫文聖, 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

#### 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

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

分担研究者:山田 亮 久留米大学先端癌治療研究センター がんワクチン分子部門 教授

研究要旨

癌ペプチドワクチン療法の開発に向けて、キラーT細胞により認識される新規癌抗原の同定を行った。その結果、5個の遺伝子(リボソームタンパク S2 および L10a、BTB domain containing 2, hairpin-binding protein,新規遺伝子 clone 83、および癌抑制遺伝子 testin のイントロンによりコードされる testin 関連遺伝子)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。これらの研究と並行して、個々の患者に最適なワクチンペプチドを投与するテーラーメイド型がんワクチンの第 I 相臨床試験を婦人科癌10例を含む高度進行癌患者113例について実施した。その結果、ペプチドワクチンの安全性が確認されたとともに、PR 症例が5例得られたことより第2相試験への移行が推奨された。次に、テーラーメイド型第 I 相臨床試験で高頻度に使用されたペプチド4種を用いた非テーラーメイド型ワクチンの第 II 相臨床試験を子宮頸癌およびスキルス胃癌に対して実施したが、テーラーメイド型に比べきわめて予後不良であった。これらの結果より、テーラーメイド型の必要性が再確認された。

A. 研究目的

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

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- $\gamma$  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

**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つ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

1) 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

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も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 I 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、きわめて高い奏効率が得られている。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を検討中である。

#### E. 結論

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

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) 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.
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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 $\beta$  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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) M.Noguchi., K.Kobayashi., N.Suetsugu., K.Tomiyasu., S.Suekane., A.Yamada, K.Itoh and S.Noda. Induction of 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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<sup>+</sup> cancer patients. Eur. J. Immunol. 33: 2964-2973. 2003.

- 15) 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.
- 16) 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) 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
- 2) 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、白水和雄、籾堂省、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
- 3) 正村裕紀、佐藤裕二、前田好章、峯孝志、山田亮、山名秀明、籾堂省、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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

- 7) 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
- 8) 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

No.	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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、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.Numai., 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.,	Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus	Biol Reprod.	70(2)	313-8	2004

	Ishikawa.H., <u>Kato.H.</u>	luteum after parturition in rats.				
9	Numa.F., Umayahara.K., Ogata.H., Nawata.S., Sakaguchi.Y., Emoto.T., Kawasaki.K., Hirakawa.H., Sase.M., Oga.A., <u>Kato.H.</u>	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., <u>Kato.H.</u>	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., <u>Kato.H.</u>	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., <u>Kato.H.</u>	Successful treatment of supraventricular tachycardia exhibiting hydrops fetalis with flecainide acetate.	A case report. Fetal Diagn Ther.	18(2)	83-6	2003
13	S.Nawata., K.Nakamura., H.Hirakawa., K.Sueoka., T.Emoto., A.Murakami., K.Umayahara., H.Ogata., Y.Suminami., F.Numa., <u>H.Kato.</u>	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., <u>Kato.H.</u>	Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production.	Fertil Steril.	80(4)	1012-6	2003
15	Kawasaki.K., Suehiro.Y., Umayahara.K., Morioka.H., Ito.T., Saito.T., Tsukamoto.N., Sugino.N., <u>Kato.H.</u> , 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., <u>Wake.N.</u>	K-Ras and H-Ras activation promote distinct consequences on endometrial cell survival.	Cancer Reserch.			2004(in press)
17	Oudejans.CBM.,	The parent - of - origin	Hum Mol Genet.			2004(in

	Mulders.J., Konst.A., Westerman.BA., van.Wijk IJ., Leegwater.PAJ., Kato.HD., Matsuda.T., <u>Wake.N.</u> , Pals.G., Lachmeijer.AMA., ten.Kate LP., and Blankensein.MA.	effect of 10q22 coincides with two regions enriched for genes with downregulated expression in androgenetic placenta.				press)
18	Ichinoe.A., Behmanesh.M., Tominaga.Y., Ushijima.Y., Hirno.S., Sakai.Y., Tsuchimoto.D., Sakumi.K., <u>Wake.N</u> 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
19	Hatakenaka.M., Yoshimitsu.K., Adachi.T., Matsuda.T., <u>Wake.N.</u> , Honda.H.	Transient uterine myometrial contraction associated with moles.	J Magn Reson Imaging.	19(2)	182-187	2004
20	Kato.K and <u>Wake.N.</u>	Contribution of estrogen receptor $\alpha$ and progesterone receptor-B to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation. Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma.	Springer-Verlag Tokyo.		207-218	2003
21	Asanoma.K., Matsuda.T., Kondo.H., Kato. K., Kishino.T., Niikawa.N., <u>Wake.N.</u> , Kato.H.	NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene which encodes homeodomain consensus motif.	Genomics.	81	15-25	2003
22	Ueoka.Y., Kato.K and <u>Wake.N.</u>	Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras mediated pathway.	Molecular and cellular endocrinology.	202	80-88	2003
23	Yamayoshi.A., Kato.K., Iwase.R., Yamaoka.T., <u>Wake.N</u> 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., <u>Wake.N.</u>	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