

2003/4/3

厚生労働科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書 (I~III)

主任研究者 金子 安比古

平成16(2004)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

- がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究 — 1
金子 安比古

II. 分担研究報告書

1. 神経芽腫マスキング発見腫瘍の染色体・遺伝子異常の検討に関する研究 - 13
金子 安比古
2. 乳癌の新規ホルモン療法奏効性予測診断法の開発に関する研究 ————— 17
林 慎一
3. 腫瘍における nm23 蛋白質の発現解析と予後診断への応用に関する研究 ————— 22
角 純子
4. 肺癌早期診断法の研究に関する研究 ————— 25
土屋 永寿
5. がん患者における血漿 DNA を用いた化学療法に伴う変異 DNA 量の変動の測定と
臨床応用に向けての基礎検討に関する研究 ————— 28
山口 研成

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷（別冊にて一部添付）

総括研究報告書

がん関連遺伝子異常を利用したがんの診断と予後予測の研究に関する研究

主任研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 デイケア部長

研究要旨 6ヵ月乳児の尿を用いた神経芽腫のマスクリーニング(マス)の死亡率減少効果は確定していないが、自然退縮することがわかっている腫瘍を手術により切除するため生じる患者の不利益は明白なので、平成16年度よりマスは中止と決まった。マスにより救命されている患者はいるのか、いるとしたらその頻度はどれくらいなのかを推定する研究を実施した。マス発見乳児腫瘍(A1群)、マス以前に発症した乳児腫瘍(A2群)、マス陰性/未受験年長児腫瘍(B群)のFISH分析を実施し、ploidyを決定した。Triploidyは乳児腫瘍に多く、diploidyは年長児腫瘍に多かった。各群の病期を比較すると、triploid腫瘍はdiploid腫瘍より早期が多く、マス発見腫瘍は臨床的発見腫瘍より早期が多かった。Triploid腫瘍に比較してdiploid腫瘍の生存率は低く、乳児腫瘍に比較して年長児腫瘍の生存率は著しく低かった。マスにより死亡率減少効果の期待できるのはマス発見diploid腫瘍の約半数とtriploid腫瘍のごく一部ということになり、マス発見腫瘍の10%と推定された。

乳癌に対するホルモン療法の治療奏効性を予測する診断にDNAマイクロアレイ法を応用する研究を進展させた。大規模マイクロアレイ法によってエストロゲン反応性遺伝子群を同定し、それらを乗せたカスタムマイクロアレイチップを作成した。本チップを用いて、エストロゲン受容体(ER)陽性細胞の基礎的なエストロゲン反応性プロファイルデータを蓄積し、解析方法を確立した。また、抗エストロゲン薬に対する反応性のプロファイルデータを得た。現在、組織検体の検討を行い、データを蓄積している。さらに臨床の場で使用可能なものにするための高感度化、自動化、簡便化を目指した新規のチップ担体の採用を検討している。このような改良を重ね、ホルモン療法に対する反応性の予測を可能とする診断チップを開発している。一方、エストロゲンシグナル応答性GFPを導入した乳癌細胞株を樹立し、アロマトーゼ阻害剤の奏効性予測を目的とした、癌周辺の間質も含めた総合的評価系を開発している。

白血病や悪性リンパ腫では血清NM23蛋白質レベルが優れた予後因子となることを明らかにしてきた。さらに適応可能な固形腫瘍を検索するため、神経芽腫について血清NM23蛋白質濃度を測定し、臨床成績との関連を解析した。健常成人、健常乳幼児、肺癌患者さらに造血器腫瘍患者に比べて、多くの神経芽腫患者が高値の血清NM23蛋白質を示した。高値群の生存率は低値群に比べて低かった(Log-rank, $p=0.00001$)。血清NM23蛋白質は神経芽腫の新しい予後因子である。予後不良の造血器腫瘍に検出される血清NM23濃度において、NM23蛋白質は正常末梢血単核細胞(特に単球)に炎症性サイトカインの発現(mRNAおよび蛋白)を誘導し、さらにその生存を阻害することを見出した。NM23を高発現/分泌している腫瘍細胞が免疫系からの攻撃を回避する1つの手段としての単球の生存阻害という新しい機構を提唱した。

昨年度、肺扁平上皮癌の早期発見に有効な「気管支上皮の癌発生高危険度状態の同定」には、p53遺伝子の高発現が良いマーカーになると報告した。今年度は、p53発現に影響

を与える MDM2 と、p53 発現により影響を受ける WAF-1、両遺伝子の発現状況が、扁平上皮癌発生高危険度状態同定のマーカーとなるかどうか、p53 染色の結果と合わせて検討した。その結果、p53 陽性の気管支上皮のほとんど全ては MDM2 と WAF-1 が陽性であったが、3 染色の上皮陽性部位を比較すると、p53 陽性部位は MDM2 の陽性部位とのみ一致し、両者間では正常なフィードバック機構が働いていた。しかし、原発癌では p53 陽性例の半数が MDM2 陰性で、その機構に障害が認められた。以上より、p53 陽性上皮の中でも MDM2 陰性の上皮が特に発癌高危険度状態であると考えられた。

血漿中に癌由来の変異 DNA が存在し、これを用いて癌の診断や治療効果の判定に役立てる研究を実施した。膵臓癌患者の治療経過にそって採血し、血漿 DNA の経時的変化を検討した。血行転移のある患者の血漿中には、原発巣と同じ癌遺伝子変異を示す DNA が存在することを明らかにした。さらに、化学療法の対象となるステージ IV の患者において、増加した血漿 DNA の性状に特徴があるのか、血漿中にがん由来の DNA がどの程度含まれているのかを検討している。最終的にはこれらの知見を元に血漿 DNA の推移を治療の指標や病態の把握に用いるためのバイオマーカーの作成を目指している。

分担研究者

1. 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 部長
2. 林 慎一 埼玉県立がんセンター研究室
主任研究員
3. 角 純子 埼玉県立がんセンター研究室
主任研究員
4. 土屋 永寿 埼玉県立がんセンター研究室室長
5. 山口 研成 埼玉県立がんセンター病院 医長

A. 研究目的

我が国では6ヵ月乳児尿を用いた神経芽腫マスキリーニング(マス)が1985年頃より全国的に実施されており、毎年約180人の患者が発見されている。マスによる死亡患者減少効果について、カナダ、ドイツからは疫学的に効果を否定する報告が、厚労省の久繁班からは効果を肯定する報告が出されている。このようにマスの効果は確定していないが、マスで発見される腫瘍の一部は自然縮小することがわかっており、この腫瘍を手術により切除することによる患者の不利益は明白なので、平成16年度よりマスは中止と決まった。マスにより救命されている患者はいるのか、いるとしたらその頻度はどれくらいなのかを明らかにすることは、今後マスをどうするのかを判断するのに重要である。そこで、マスで発見される乳児腫瘍と、臨床的に発見された乳児腫瘍、12ヵ月以降に臨床的に発見された年長児腫瘍の生物学的性格を明らかにし、どのような腫瘍がマスにより救命さ

れているのかを推定した。

乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌などはステロイドホルモン依存性に発生・進展する。これらの癌細胞では核内ステロイドホルモン受容体の機能がその病態と密接に関係し、実際、受容体発現を指標に抗ホルモン剤が投与されている。近年、乳癌に対する内分泌治療はLH-RHアゴニストや第3世代アロマトラーゼ阻害剤の登場によって急速に発展進化している。しかし、これらの適応を決める明確な分子指標はまだない。また、これらの薬剤は一般の抗癌剤に比べてきわめて有害事象が少なく、乳癌化学予防薬としても期待されているが、その適応のためには乳癌の高危険度集団を同定する必要がある。そこで、我々は、これまで長年進めてきたエストロゲン受容体に関する基礎的研究の成果に基づき、これまで開発してきたエストロゲン応答性マイクロアレイチップやエストロゲンシグナル反応性 GFP 導入細胞などを用いて、乳癌の個別化診療のための分子診断法の開発を目指した。

がんの治療指針を選択する上で予後因子解析は重要である。予後診断に用いる検体は、腫瘍組織よりも血液の方が、患者の身体的負担、検査試料採取の容易性、大量処理の面から考えて有利である。これまで、血清 NM23 蛋白質レベルは造血器腫瘍では優れた予後因子となることを報告した。NM23 遺伝子の発現亢進は造血器腫瘍以外にも多くの固形腫瘍において報告されているので、この血清 NM23 蛋白質の測定法を予後診断に応用でき

る固形腫瘍を検索することを目的とする。また、血清 NM23 蛋白質の予後因子活性の生物学的基盤を解明し、新たな予後因子となる分子の発見へ発展させることが第二の目的である。

肺癌は難治がんで、日本で悪性新生物による死亡の第一位を占めることから、その予防、早期発見は緊急の課題である。肺癌は組織学的に扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞癌に大別され、このうち扁平上皮癌は3-4割を占める。昨年度、肺扁平上皮癌の早期発見を目的として、気管支上皮の p53 遺伝子異常を検索し、同遺伝子の気管支上皮（扁平上皮化生、異形成）における高発現は肺扁平上皮癌発生高危険度群同定の良いマーカーになると報告した。今年度は、p53 発現は WAF-1 発現や、フィードバック機構により MDM2 発現を誘導することから、気管支上皮におけるこれら3遺伝子の発現が、肺扁平上皮癌発生高危険度群同定の有効なマーカーとなるかどうかを検討した。

がん患者の臨床経過中に採取した血液から血漿 DNA を抽出し、その中のがん由来遺伝子変異 DNA の推移を測定し、患者の病態と比較し臨床的意義を解明する。この知見を用い、新たなバイオマーカーを作成し、臨床応用を目指す。

B. 研究方法

対象は神経芽腫 446 例である。そのうち 285 例はマスで発見された乳児例 (A1 群) であり、49 例は主としてマス受験前に臨床的に発見された乳児例 (A2 群) で、112 例はマス受験時には陰性かマス未受験であり、1 歳以降、親や家族に神経芽腫を発見された年長児例 (B 群) である。間期核を対象に、1 番染色体の数とその短腕欠失 (1p-) の有無を 2 色 FISH 法で分析した。1 番染色体の数を基準にして、ploidy を決定し、diploid 腫瘍と triploid 腫瘍に分類した。また、diploid 腫瘍の中に tetraploid 腫瘍を、triploid 腫瘍の中に 3n/4n 混合腫瘍 (triploid 細胞と tetraploid 細胞よりなる) を含めた。次に 144 例について、フローサイトメトリーを用いて、腫瘍細胞の DNA index (DI) を求め、FISH により決定した ploidy 所見と比較した。A1, A2, B 群間の ploidy や病期の分布を比較した。腫瘍の発見方法や ploidy で分類した患者群の生存曲線を Kaplan-Meier 法で求め、有意差を Log-rank 法で検定した。

これまで開発してきたエストロゲン応答性カスラムマイクロアレイを用いて各種培養細胞のエストロゲン応答性発現プロファイルを解析した。また、これら培養細胞に対する各種抗ホルモン剤の作用をこの発現プロファイルから解析した。次に乳癌手術材料および生検材料を用いた解析を行った。その際、マイクロダイセクション法による癌細胞の単離、そこからの RNA 抽出、RNA ポリメラーゼを用いた定量的増幅法を試みた。順次、これらの結果をフィードバックしてチップに乗せるコンテンツの入れ替えやチップ高密度化、信頼性向上などの改良を進めている。ヒト組織の解析結果を蓄積し、ホルモン療法応答性に関するデータベースを構築する。アロマターゼ阻害剤反応性予測のためにアロマターゼが存在する癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系を確立に取り組んだ。そのため、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを構築し、ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に安定導入した。その後のクローニングにより、もっとも目的に適した細胞株を樹立した。

正常乳幼児 23 例、神経芽腫 259 例の血清 NM23 蛋白質を、サンドイッチ ELISA 法により測定した。次に、リコンビナント NM23 蛋白質の正常末梢血リンパ球および単球の生存に対する作用を MTT アッセイ法で分析した。またサイトカイン遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子の発現を multiple RT-PCR 法で、分泌サイトカインを cytokine antibody array 法にて検討した。

昨年度 p53 免疫染色を実施した同じ組織検体を分析に用いた。切除肺癌 37 例 (原発癌 29、転移癌 8) の気管支輪切り切片のうち、扁平上皮化生や異形成を有する切片の上皮変化を正常、基底細胞増殖、炎症異型、化生、異形成、癌、に再分類した。MDM2, WAF-1 遺伝子の発現異常 (高発現=陽性) を免疫組織学的に検出した。すなわち、細胞の核が染色された細胞を陽性とし、最も陽性細胞の密度が高い部位の細胞を 100 個数え、3% 以上を高発現ありと判定した。

埼玉県立がんセンター消化器内科の患者から採取した血漿 DNA を抽出した。DNA は微量のため効率のよい抽出法を開発している。原発巣において確定した癌遺伝子変異を SSCP 法で同定し、血漿から検出した。変異/正常の比率をシーケンサーにて定量し、患者に行われた治療や病態の変化とそ

の推移を比較検討した。

(倫理面への配慮)

研究のために検体を使用することについて、患者からインフォームドコンセントを得るように努めた。また、個人の研究結果が第三者に特定されないように配慮した。この研究班の研究内容については、埼玉県立がんセンター倫理委員会で審議され、承認を受けた。

C. 研究結果

フローサイトメトリーによる DNA index (DI) を分析できた 144 例について、DI と FISH による 1 番染色体数より決定した ploidy との関係調べた。Diploid 腫瘍の DI 中位値は 1、tetraploid 腫瘍の DI 中位値は 1.9、triploid 腫瘍の中位値は 1.44 であった。Triploid 細胞と tetraploid 細胞よりなる 3n/4n 混合腫瘍の DI 中位値は 1.9 であった。以上の結果、FISH による diploid, triploid, tetraploid 腫瘍の分類はフローサイトメトリーによる DI の結果とよく一致していたが、tetraploid 腫瘍と 3n/4n 混合腫瘍の DI は重なっており、フローサイトメトリーでは両者の鑑別が不能であった。A1 (マス発見腫瘍)、A2 (乳児腫瘍)、B (年長児腫瘍) 群の ploidy の分布をみると、B 群に比較して A2 群では triploidy が多く、A1 群ではさらに triploidy の頻度が高かった。次に、A1, A2, B 群を triploidy(3n)か diploidy(2n)かで 6 群に分類し、それぞれの病期の分布を調べた。I, II, IVS 病期 (早期) は A1, A2 群に多く、B 群で低かった。反対に、III, IV 期 (進行期) は A1, A2 群に少なく、B 群が多かった。発見方法と ploidy で分類した 6 群の生存曲線を求め、5 年生存率を調べると、A1/3n 99.6%, A1/2n 89.3%, A2/3n 97.0%, A2/2n 68.8%, B/3n 71.9%, B/2n 47.4% であった。

エストロゲン応答遺伝子のみを載せたカスタムマイクロアレイチップを用いて ER 陽性乳癌細胞を材料に種々の詳細な解析を行った。エストロゲンによる発現誘導の時間変化を解析した結果、エストロゲン応答遺伝子は短時間で誘導されてくる遺伝子群と長時間のエストロゲン処理によって誘導されてくる遺伝子群の 2 群に分けられることが明らかとなった。また、抗エストロゲン剤の乳癌細胞に対する効果を発現プロファイルで見ること

ができたので、新規内分泌治療薬、SERMs の開発にも役立つ可能性が示された。これまでの結果を参考にカスタムチップに載せる遺伝子の改変を行い、約 200 遺伝子を載せた新型に改良した。術前ホルモン療法 (アロマターゼ阻害剤投与) を施行した乳癌患者検体 12 例について、治療前の生検材料と治療後の手術材料を用い、それぞれより癌細胞のみをマイクロダイセクション法で採取し、mRNA を抽出後、定量的 RNA 増幅を行い、カスタムチップを用いて解析した。その結果、患者群を 2 群に分けられた。さらに絞り込んだ候補遺伝子約 10 個についてリアルタイム RT-PCR 法によって患者検体を用いて解析した。その一つの遺伝子 HDAC6 が新規予後因子であることを、乳癌組織の免疫染色分析により証明した。また、アロマターゼ阻害剤反応性予測のために癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系の確立を試みた。エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを構築し、ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に安定導入した。その細胞株を乳癌患者から単離した間質細胞と共生培養し、十分な蛍光が観察できることを確認した。

これまでの研究で、血清 NM23 蛋白質レベルが白血病や悪性リンパ腫の優れた予後因子であることを明らかにした。さらに適応可能な固形腫瘍を検索するため、神経芽腫について血清 NM23 蛋白質濃度と臨床成績との関連を解析した。健常成人血清、健常乳幼児血清、肺癌患者血清さらに造血器腫瘍患者血清に比べて、神経芽腫患者では多くの症例が高値を示した。高値群の生存率は低値群に比べて低かった (Log-rank, $p=0.00001$)。N-MYC 増幅は神経芽腫の優れた予後因子であるが、血清 NM23 蛋白質は N-MYC 増幅のない症例においても、有意な予後因子であった。予後不良の造血器腫瘍に検出される血清 NM23 濃度において、NM23 蛋白質は正常末梢血単核細胞 (特に単球) の生存を阻害することを見出した。血清 NM23 が予後不良因子となる生物学的基盤としてこの傷害作用に注目した。ヒト正常末梢血単核細胞にリコンビナント NM23 蛋白質を処理後、免疫機能や増殖・生存に関与するサイトカイン関連遺伝子の発現を解析した。IL-1 β , IL-6, IL-8, および MCP-1 等の炎症性サイトカインの発現 (mRNA および蛋白) が誘導された。NM23 蛋白質が正常単球を活性化し、炎症性サ

イトカインの発現が亢進したと考えられる。正常免疫担当細胞の活性化は基本的に細胞死がプログラムされているので、生存が阻害されたと考えられた。

気管支上皮の p53, MDM2, WAF-1 陽性頻度について分析した。原発性癌と転移性癌を比較すると、3染色とも陽性率は原発性の方が高かった。原発性肺癌気管支上皮の組織像別では、炎症異型を除いたいずれの組織像においても p53 陽性率が最も低く、他の2染色はほぼ同じであった。特に原発癌の正常上皮、および転移癌の気管支上皮では、p53 は全て陰性なのに、他の2染色では陽性例が認められた。炎症性異型では3染色とも同じで67%と高率に陽性であった。気管支上皮 p53 陽性部位における MDM2, WAF-1 の発現状況については、気管支上皮層を最上層 (S) とそれ以下の中間-基底層 (BM) に2分して、3染色の染色性を比較した。S 層の細胞核では p53 陽性頻度が MDM2 と WAF-1 より有意に低かった。一方 BM 層では p53, MDM2 が高率に陽性で、WAF-1 の染色性とは有意に異なっていた。すなわち、BM においては p53 と MDM2 の染色性が一致していた。原発癌における p53 と MDM2 発現の関係について分析すると、p53 の陽性例、陰性例の両者で MDM2 陽性率は同じであった。p53 陽性の癌と p53 陽性の気管支上皮における MDM2 染色性については、原発癌 11 例中、MDM2 陽性例と陰性例はほぼ同数であったが、上皮では既述のごとくほぼ全てが陽性で、両者の差は有意であった。

癌患者の血漿中 DNA を分析し、病態とがん由来変異 DNA の比率について検討した。現在までに、原発巣から K-ras 変異が証明された膵癌患者 14 例について、化学療法施行中から終末期までの推移を検討した。検討を行った採血ポイントは、160 ポイントで (11 ポイント/人) あった。このうち、血行性転移 (肝、骨、肺) を来した患者は終末期までに 8 名中 8 名に原発と同じ K-ras の変異を SSCP 法で認め、がんの進展に従い比率は増加した。しかし、血行性転移が臨床的に認められなかった患者 6 名においては (主に腹膜転移) 終末期においても K-ras の変異は血漿からは検出できなかった。本検出法が、mutated DNA / wild-type DNA + mutated DNA の比率が 0.05 から検出できることを考えると、血行性転移のない患者においては増加

する血漿 DNA は主に正常細胞由来のものであると考えられる。血漿 DNA を en-rich 法で検討したが、血行性転移の無い患者においては 1 例を除いて経過中 K-ras 変異は認められなかった。血漿 DNA は、癌の進展に伴い増加することが知られている。したがって、今回得られた変異 DNA 比率と血漿 DNA の両者を計測することにより変異 DNA の絶対量を計算できる。しかし、現在様々な抽出法を検討しているが、誤差が大きく定量性が得られないために、効率がよくかつ純度の高い方法を開発中である。

D. 考察

平成 16 年度より神経芽腫マスキリーニングは中止と決まった。しかし、マスの恩恵を受けるこどもがいたら、不利益を減らしたマスを実施することが、こどもの福祉につながると考えられる。そこで、マス発見腫瘍と臨床的に発見された腫瘍の ploidy, 病期、生存率を比較することにより、マスの効果を予測した。臨床的に発見された乳児腫瘍では triploidy が優位であり、年長児腫瘍では diploidy が優位であった。この頻度差は、乳児腫瘍の予後は良好、年長児腫瘍の予後は不良という神経芽腫の臨床的特徴の生物学的背景になっている。マス発見腫瘍では、臨床的に発見された乳児腫瘍より、さらに triploidy の頻度が高くなった。これは、マスで発見され、自然退縮する腫瘍の ploidy が triploidy であるためと推測された。triploid 腫瘍の方が、diploid 腫瘍より病期は早期であり、マス発見腫瘍の病期は臨床的発見腫瘍より早期であった。この結果は、マスキリーニングは腫瘍を早期に発見していることをしめしている。発見方法と ploidy で分類した 6 群の患者の 5 年生存率を分析すると、乳児 triploid (A1/3n, A2/3n) 腫瘍は良好で 97% 以上であるが、年長児 triploid (B/3n) 腫瘍は 72% と低下する。マス発見 diploid (A1/2n) 腫瘍の 5 年生存率は 89% であるが、臨床的発見 diploid (A2/2n) 腫瘍では 69%、年長児 diploid (B/2n) 腫瘍では 47% であり、臨床的に発見された diploid 腫瘍の生存率は低い。昨年度報告したように、マス発見 diploid 腫瘍と年長児 diploid 腫瘍、マス発見 triploid 腫瘍と年長児 triploid 腫瘍の CGH パターンは類似している。この所見は、マスを実施していなけれ

ば、前者の腫瘍が進展して後者として発見されることを示唆している。マスによる早期発見により死亡率が減少するのは diploid 腫瘍のほとんどと、triploid 腫瘍のごく一部であり、全体の 10% を占めると推測される。この数は年間 18 人の小児が救命されていると推定されるが、これは久繁班の推定値 16 人と類似している。マスに死亡率減少効果があるのかどうか明らかにするために、マスによる不利益を最小限にした臨床試験を開始すべきである。

乳癌のマイクロアレイ解析は世界的なレベルで多くの培養細胞、癌組織を対象にして、現在急速に研究が展開中であるが、ホルモン療法の応答性に特化したものは未だ見られない。我々のこれまでの研究結果は、ホルモン療法反応性予測診断アレイチップ開発研究の第 1 段階であるが、すでに多くの有益なかつ、膨大な情報を提供している。たとえば、昨年までに野生型 MCF-7 乳癌細胞株と、そのタモキシフェン耐性株との発現プロファイルの比較から、タモキシフェン耐性に関わる可能性のある遺伝子を同定した。また、既存の抗ホルモン剤の効果の違いをカスタムチップによる解析プロファイルから評価可能であることを示した。この方法は、患者検体、特に術前治療の生検検体を用いた解析から、患者群の層別化にも有用であることが示唆された。これがホルモン療法奏効性と相関するかどうかは現在検討中であり、ある程度の症例数の解析結果の蓄積を待たねばならない。今後さらに、ヒト組織検体を用いた解析とチップの改良を進め、高精度なホルモン療法奏効性予測診断を可能にする DNA チップの開発を目指す。一方、近年開発されたアロマターゼ阻害剤は特に癌細胞周辺の間質組織に存在し、エストロゲンを産生する酵素、アロマターゼが標的であり、この治療の奏効性予測には周辺間質を含めた総合的な評価系が必要である。そこで、新たに ERE-GFP を持った指示細胞を作成し、そのような評価系の確立へ向けて研究を開始した。少なくともこの系で患者から単離した間質を用いてアッセイすることができることが示され、十分この方法で上記の目的に沿った総合的な評価系を開発できるという根拠が得られた。

多くの腫瘍患者では、血清 NM23 蛋白質レベルは健常者に比べて高値である。血清 NM23 蛋白質レベ

ルが造血器腫瘍や肺癌（小細胞癌）に加えて、神経芽腫においても有意な予後因子となることを示した。さらに予後診断へ応用できる固形腫瘍を検索中である。腫瘍の種類に関わらず血清 NM23 蛋白質レベルが高い症例は予後不良である。予後不良の造血器腫瘍の血中に検出される NM23 濃度において、リコンビナント NM23 蛋白質が正常末梢血単核細胞の生存・増殖、サイトカインやアポトーシス関連遺伝子の発現を修飾することを見出した。この活性と予後不良因子活性との関連の解析も今後の研究課題である。さらに、NM23 の下流の新たな予後因子となる分子の発見へも展開したい。生体防御機構に関与する正常血液細胞に対する NM23 蛋白質の新しい生物活性を見出した。すなわち、NM23 を高発現/分泌している腫瘍細胞が免疫系からの攻撃を回避する 1 つの手段としての単球の生存阻害という新しい機構を提示した。癌の予後と炎症性反応（特に、炎症性サイトカイン）の関連を結ぶ NM23 分子の働きとして、研究を展開したい。

気管支上皮の p53 高発現は扁平上皮癌発生高危険度群のマーカーになると考えられており、昨年度の我々の結果とも一致していた。しかし、免疫組織学的に確認された p53 高発現は、p53 遺伝子の変異による場合と、DNA 障害により誘導される p53 正常遺伝子蛋白の過剰発現の場合がある。後者の場合には、発現のない上皮より発がん高危険度群と言えるが、p53 変異のある場合よりその危険度は低いものと考えられる。一方、p53 の高発現は WAF1 の高発現を、またフィードバック機構により MDM2 の高発現を誘導することが知られている。これまで肺癌で p53 と MDM2、WAF1 の関連を検討した報告は多数有るが、気管支上皮で 3 遺伝子の免疫染色による染色性と発がん危険度との関係を検討した報告はないようだ。今回、発がん高危険度群の範囲をより狭めるため、p53、MDM2、WAF1 の発現異常を検索した。免疫染色で MDM2、WAF1 は正常上皮でも高発現が認められたことから、これらの染色単独では高危険度群の同定は困難であると判断した。上皮層を 2 分し、部位別に染色性を比較した結果、WAF1 はいずれの部位の染色性も p53 とは異なっていたが、MDM2 は BM 層の染色性が p53 と一致していた。しかし、癌に於いては p53 陽性と MDM2 或は WAF1 陽性の間には関連が無いことが

知られており、我々の結果も同様であった。このことから、p53 陽性の気管支上皮の大多数では、正常の制御機構が作動しているため MDM2 が陽性になるが、癌の場合のように制御機構に障害があると p53 陽性でも、MDM2 は陰性になると考えられた。即ち、p53 陽性で MDM2 陰性の上皮が特に発がん高危険度群と思われた。

血行性転移をきたした膵癌患者においては、血漿中変異 DNA 比率が癌の進行によって増加することが確認された。治療の効果においてもこの比率は変化するが、感染症の併発など癌以外の要因が生じた場合、変異 DNA 比率が低くなる傾向を認めた。今後変異 DNA 検出の正確性、血漿 DNA の安定した抽出法が得られればマーカーとしての臨床応用の可能性が広がるものと期待している。膵臓癌は、手術を施行しても肝転移率が高く手術適応の判断が難しい。検出感度を上げれば sub clinical な血行性転移の診断に応用できるものとする。

E. 結論

神経芽腫マススクリーニングの死亡率減少効果については研究者間で意見が分かれる。FISH/CGH 所見により、マス発見腫瘍の中に将来、進展し予後不良になると予想される一群を特定した。この群はマス発見腫瘍の 10% と推定される。マスの死亡率減少効果を明らかにするために、受験者の不利益を減じた、新しいマスを臨床試験として計画するべきである。

DNA マイクロアレイを用いた解析から乳癌細胞におけるエストロゲン応答性遺伝子群のプロファイルが得られた。新規の標的遺伝子が明らかになり、ホルモン療法応答性予測診断チップ開発のための有用な情報が得られた。また、組織標品を用いた解析から本チップが患者群の層別化に有用であることが示された。さらに新規予後因子の候補のひとつとして HDAC6 が有用であることを示した。さらに、カスタムチップの開発、改良と、癌周辺部の間質を含めた総合的な評価系の作成を推進している。

急性骨髄性白血病や高悪性度非ホジキンリンパ腫では血清 NM23 蛋白質レベルが既知の予後因子から独立した予後因子であることを示してきた。同様な関係が、神経芽腫においても観察された。

造血器腫瘍患者の血中に検出される NM23 濃度において、NM23 蛋白質が正常末梢血単核細胞の生存を阻害すること、また諸種サイトカイン遺伝子発現を修飾することを見出した。この作用と予後不良因子活性との関連が示唆された。

気管支上皮の免疫染色に基づき、p53 陽性で MDM2 陰性所見が、扁平上皮癌発生高危険度状態同定のマーカーになると考えられた。

膵臓癌患者の終末期までの経過を検討すると、血行性転移を有する患者全員から原発巣と同じ遺伝子変異 DNA を血漿中に検出した。また、癌の進展とともに増加傾向を認めた。血行性転移以外の膵臓癌患者では、変異 DNA は検出されず、血行性転移を有する患者においてのみ、診断マーカーとして有用であると考えられた。検出感度の上昇及び血漿 DNA 抽出法の問題点が解決されれば、転移の早期診断（手術適応の判断）や、治療効果の判定に有用なバイオマーカーの開発につながるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomioka, N., Kobayashi, H., Kageyama, H., Ohira, M., Nakamura, Y., Sasaki, F., Todo, S., Nakagawara, A., and Kaneko, Y. Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 36: 139-150, 2003.
- 2) Watanabe, N., Kobayashi, H., Ichiji, O., Yoshida, M., Kikuta, A., Komada, Y., Sekine, I., Ishida, Y., Horikoshi, Y., Tsunematsu, Y., Yano, M., Nakadate, Y., and Kaneko, Y. Cryptic insertion and translocation or non-dividing leukemic cells disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic

- findings. *Leukemia*, 17: 876-882, 2003.
- 3) Satoh, Y., Soejima, H., Nakagawachi, T., Nakadate, H., Kaneko, Y., Masaki, Z., and Mukai, T. Significant reduction of WT1 gene expression possibly due to epigenetic alteration in Wilms' tumor. *J. Biochem.*, 133: 303-308, 2003.
 - 4) Namiki, T., Sakashita, A., Kobayashi, H., Maseki, N., Izumo, T., Komada, Y., Koizumi, S., Shikano, T., Kikuta, A., Watanabe, A., Suzumiya, J., Kikuchi, M., and Kaneko, Y. Clinical and genetic characteristic of Japanese Burkitt lymphomas with or without leukemic presentation. *Int. J. Hematol.*, 77: 490-498, 2003.
 - 5) 金子安比古: ヒトの病気と染色体. *生物の科学* 57: 35-40, 2003.
 - 6) Aoyagi, K., Tatsuta, T., Nishigaki, M., Akimoto, S., Tanabe, C., Omoto, Y., Hayashi, S., Sakamoto, H., Sakamoto, M., Yoshida, T., Terada, M. and Sasaki, H. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 915-920, 2003.
 - 7) Hayashi, S., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yosida, N. and Yamaguchi, Y. The expression and function of ER α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer*, 10, 193-202, 2003.
 - 8) Omoto, Y., Eguchi, H., Yamamoto-Yamaguchi, Y. and Hayashi, S. Estrogen receptor (ER) β 1 and ER β cx / β 2 inhibit ER α function differently in breast cancer cell line MCF-7. *Oncogene*, 22, 5011-5020, 2003.
 - 9) Hayashi, S., Sakamoto, T., Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y. and Yamaguchi, Y. Estrogen and growth factor signaling pathway: basic approaches for clinical application. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 86, 433-442, 2003.
 - 10) Hayashi, S. Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomed. Pharmacotherapy*, 58, 1-9, 2004.
 - 11) Inoue, A., Omoto, Y., Yamaguchi, Y., Kiyama, R. and Hayashi S. Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J. Mol. Endocrin.*, in press, 2004.
 - 12) 林 慎一: エストロゲン依存性増殖のメカニズム. 乳癌の抗アロマターゼ療法 (戸井雅和、笹野公伸監修) 医科学出版社、2003, pp. 21-34.
 - 13) 中地 敬, 林 慎一, 末益公人, 東 靖宏: 「乳癌の分子疫学」, 特集・マクロとミクロの疫学, 現代医療, 35, 183-187, 2003.
 - 14) 林 慎一: 内分泌療法の効果予測: DNA マイクロアレイの応用. 乳癌の最新医療 (小山博記、霞富士雄監修) 先端医療技術研究所、2003, pp.285-290.
 - 15) 林 慎一, 吉田敦行: ホルモン療法. 臨床腫瘍学第三版 (日本臨床腫瘍研究会編) 癌と化学療法社, 2003, pp.272-278.
 - 16) 林 慎一: 乳癌研究の視点「乳癌関連遺伝子—最近の研究から」. *Mamma*, 46: 12-17, 2003.
 - 17) 林 慎一: 異所性ホルモン産生腫瘍の発生と増殖. 特集・異所性ホルモン産生腫瘍, 日本臨床, 62: 印刷中
 - 18) 林 慎一: 乳癌における ER α , β の発現・機能と臨床応用. ホルモンと臨床, 印刷中
 - 19) 林 慎一: DNA マイクロアレイを用いた乳癌のホルモン依存性に関する研究—臨床応用を目指して—. *Breast Cancer Today* (Elsevier Japan), 印刷中
 - 20) 林 慎一: ホルモン依存性癌. 予防医学事典, 朝倉書店, 印刷中
 - 21) 林 慎一: 乳腺領域幹細胞と乳癌の発生. 医学の歩み, 別冊, 乳腺疾患-state of arts, 印刷中
 - 22) Okabe-Kado, J., and Kasukabe, T. Physiological and pathological relevance of extracellular NM23/NDP kinases. *J.*

- Bioenerg Biomemb., 35 (1): 89-93, 2003.
- 23) Niitsu, N., Okamoto, M., Honma, Y., Nakamine, H., Tamaru, T., Nakamura, S., Yoshino, T., Higashihara, M., Hirano, M., and Okabe-Kado, J. Serum levels of the nm23-H1 protein and their clinical implication in extranodal NK cell lymphoma. *Leukemia* 17: 987-989, 2003.
- 24) Niitsu, N., Honma, Y., Iijima, K., Takagi, T., Higashihara, M., Sawada, U., and Okabe-Kado, J. Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed on cell surface in Non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 17: 196-202, 2003.
- 25) Niitsu, N., Nakamine, H., Okamoto, M., Akamatsu, H., Honma, Y., Motomura, S., Aoki, S., Okabe-Kado, J., and Hirano, H. Expression of nm23-H1 is associated with a poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 123: 621-630, 2003.
- 26) 36) Yamamoto-Yamaguchi, Y., Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Honma, Y. Induction of apoptosis by combined treatment with differentiation-inducing agents and interferon- α in human lung cancer cells. *Anticancer Res.*, 23: 2537-2548, 2003.
- 27) Yokoyama, A., Yamashita, T., Shiozawa, E., Nagasawa, A., Okabe-Kado, J., Nakamaki, T., Tomoyasu, S., Kimura, F., Motoyoshi, K., Honma, Y., and Kasukabe, T. MmTRA1b/phospholipid scramblase 1 gene expression is new prognostic factor for acute myelogenous leukemia. *Leukemia Res.* 28: 149-157, 2004.
- 28) Niitsu, N., Nakamine, H., Okamoto, M., Akamatsu, H., Higashihara, M., Honma, H., Okabe-Kado, J., and Hirano, M. Clinical Significance of nm23-H1 Proteins Expressed in Cytoplasm in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, (2004) in press.
- 29) Honda, S., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., and Tsuchiya, E. A role for the pituitary tumor-transforming gene in the genesis and progression of non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.*, 23: 3775-3782, 2003.
- 30) Miyoshi, T., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Shirakusa, T., Tsuchiya, E., and Ishikawa, Y. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27: 101-109, 2003.
- 31) Kurosuni, M., Tabei, T., Inoue, K., Takei, H., Ninomiya, J., Naganuma, R., Suemasu, K., Higashi, Y., and Tsuchiya, E. Prognostic significance of scoring system based on histological heterogeneity of invasive ductal carcinoma for node-negative breast cancer patients. *Oncol. Rep.*, 10: 833-7, 2003.
- 32) Kobayashi, K., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, M., Nishimura, H., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Sato, Y., Takahashi, A., and Tsuchiya, E. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Science*, (2004) in press.
- 33) Sumitsuji, I., Sugano, K., Matsui, T., Fukayama, N., Yamaguchi, K., Akasu, T., Fujita, S., Moriya, Y., Yokoyama, R., Nomura, S., Yoshida, T., Kodama, T., and Ogawa, M. Frequent genomic disorganisation of *MLH1* in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) screened by RT-PCR on puromycin treated samples. *J. Med. Genet.*, 40 (3): e30 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/40/3/e30>), 2003.

2. 学会発表

- 1) 金子安比古, 小林泰文、富岡信元、渡辺直樹、中川原章：マススクリーニングにより予後改善効果が期待できる神経芽腫の性格：マス陽性乳児腫瘍と年長児腫瘍の細胞遺伝学的差異。第 62 回日本癌学会総会，2003 年，名古屋。

- (第 62 回日本癌学会総会記事, p.141, 2003.)
- 2) 渡辺直樹、小林泰文、中舘尚也、小林良二、佐々木文章、遠藤幹也、恒松由記子、豊田恭徳、掘越泰雄、見須英雄、水田祥代、江口春彦、金子安比古、福澤正洋：ウイルムス腫瘍におけるゲノム異常の検討と IGF2 アレル発現分析。第 19 回日本小児がん学会。2003 年、東京。(小児がん 40:406, 2003.)
 - 3) 山口ゆり、大本陽子、武井寛幸、末益公人、原田信広、林 慎一：乳癌細胞、間質細胞間のエストロゲンシグナル動態の可視化による解析。第 2 回ステロイドホルモンを考える会、2003 年、東京。
 - 4) Yamaguchi, Y., Omoto, Y., Takei, H., Suemasu, K., Harada, N., Hayashi, S.: Analysis of tumor-stromal interactions in breast cancer by using MCF-7 cells stably transfected with ERE-GFP. 94th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2003, Toronto. (Proceedings Vol. 44, p.820, 2003).
 - 5) Hayashi, S., Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Yamaguchi, Y.: Gene expression profiling of estrogen responsive genes in breast cancer and prediction of hormone therapy. 94th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2003, Toronto. (Proceedings Vol. 44, p.1123, 2003).
 - 6) 吉田敦行、大本陽子、井上暁夫、岡崎具樹、藤田敏郎、林 慎一：エストロゲン応答性遺伝子の発現パターンによる乳癌術後内分泌療法不応群の同定。第 76 回日本内分泌学会学術総会、2003、横浜 (第 76 回日本内分泌学会学術総会抄録集, p149, 2003.)
 - 7) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、原田信広、林 慎一：エストロゲンシグナルの可視化による乳癌細胞と間質細胞の相互作用の解析とホルモン療法奏効性予測診断への応用。第 4 回ホルモンと癌研究会、2003、つくば。
 - 8) 吉田敦行、大本陽子、井上暁夫、田中祐司、藤田敏郎、林 慎一：ER 陽性乳癌におけるエストロゲン応答性遺伝子の予後予測因子としての意義。第 4 回ホルモンと癌研究会、2003、つくば。
 - 9) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、原田信広、林 慎一：ヒト乳癌における癌細胞と間質細胞の相互作用によるエストロゲンシグナルの制御機構。第 62 回日本癌学会総会、2003、名古屋。(第 62 回日本癌学会総会記事, p261, 2003.)
 - 10) 林 慎一、井上暁夫、木山亮一：マイクロアレイ解析によって見出されたエストロゲン応答遺伝子の機能解析。第 62 回日本癌学会総会、2003、名古屋。(第 62 回日本癌学会総会記事, p261, 2003.)
 - 11) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、原田信広、林 慎一：乳癌の癌細胞と間質細胞の相互作用におけるエストロゲンシグナルの解析。第 11 回日本ステロイドホルモン学会、2003、岐阜。
 - 12) 林 慎一、井上暁夫：新規エストロゲン受容体標的遺伝子 EGR3 の機能解析。第 11 回日本ステロイドホルモン学会、2003、岐阜。
 - 13) 寺坂俊一、会田雪絵、伊勢良太、丹治雅夫、林 慎一、木山亮一：DNA マイクロアレイを用いた環境ホルモン影響評価法の開発。第 26 回日本分子生物学会年会、2003、神戸。(講演要旨集, p583, 2003)
 - 14) 荘巖哲哉、江口英孝、中地 敬、林 慎一、正村 滋：エストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株のエストロゲン受容体に対する抗エストロゲン剤の影響。第 26 回日本分子生物学会年会、2003、神戸。(講演要旨集, p1028, 2003)
 - 15) 林 慎一：特別講演、エストロゲン受容体研究とホルモン療法奏効性予測診断法の開発。第 24 回香川乳腺研究会、2003 年 2 月、高松。
 - 16) 林 慎一：マイクロアレイ解析を用いた乳癌のホルモン依存性の研究とその臨床応用。シンポジウム「乳癌内分泌療法の最新情報」、乳がん化学内分泌療法研究会第 4 回学術集会、2003 年 3 月、大阪。
 - 17) 林 慎一：特別講演、乳癌組織でのエストロゲン応答性遺伝子発現と治療感受性。第 33 回兵庫乳腺疾患研究会、2003 年 5 月、神戸。
 - 18) 林 慎一：前立腺癌と比較した乳癌の分子生物学的特性。第 4 回ホルモンと癌研究会、

2003年7月, つくば.

- 19) 林 慎一: 癌細胞におけるエストロゲンシグナル経路の動態と臨床応用. 第6回岡山癌分子生物学セミナー, 2003年12月, 岡山.
- 20) Hayashi, S.: Molecular mechanisms of estrogen-dependency in breast cancer. 1st Breast Cancer Frontier Meeting. 2003. Tokyo.
- 21) Hayashi, S.: ER α , ER β and basic approach for prediction of endocrine-therapy. 学術振興会日米がん研究協力事業セミナー「Role of nuclear receptors in carcinogenesis」, 2004年3月, ハワイ.
- 22) 林 慎一: 乳癌の臨床応用に求められるエストロゲンシグナル研究. 第3回ステロイドホルモンを考える会, 2004, 東京.
- 23) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Tanaka, Y., Motoyoshi, K., Okazaki, T., Nakachi, K., Fujita, T. and Hayashi, S. Expression Profile of Selected Estrogen-Regulated Genes Predict Prognosis of Nuclear Receptor-Positive Breast Cancer. The American Endocrine Society's 86th Annual Meeting, 2004.
- 24) Saji, S., Hayashi, S., Yoshida, N., Inoue, A., Hirose, M., Horiguchi, S., Toi, M. Expression of novel estrogen-regulated gene HDAC6 correlates to the prognosis of ER-positive breast cancer. Keystone Symposia: Nuclear Receptor Superfamily, 2004, Utah, USA
- 25) 角 純子, 金子安比古, 中川原 章, 粕壁 隆, 本間良夫. 腫瘍における血清 NM23 蛋白質の発現と予後診断への応用. 第62回日本癌学会総会 (2003)
- 26) 粕壁 隆, 角 純子, 本間良夫. 諸種薬剤によるヒト前骨髄球性白血病細胞の MmTRA1b/リン脂質 scramblase 1 の発現修飾. 第62回日本癌学会総会 (2003)
- 27) Kado, Junko Okabe, Kasukabe, T., Nakagawara, A., and Kaneko, Y. Physiological and pathological relevance of extracellular NM23 / NDP kinases. 5th International Congress of the Genetics, Biochemistry and Physiology of NM23/NDP Kinase/AWD (2003)
- 28) 土屋永寿, 小林康人, 西田一典, 石川雄一, 橋本毅久: 肺線癌, 扁平上皮癌の亜型や発生部位による p53 遺伝子変異頻度・種類の相違. 第92回日本病理学会総会 (2003), 福岡.
- 29) 土屋永寿, 小林康人, 石川雄一, 中川健: 気管支扁平上皮癌発生高危険度群の特定. 第44回日本肺癌学会総会 (2003), 東京.
- 30) 山口研成, 島村智崇, 坂田優, 棟方正樹, 小松嘉人, 斉藤聡, 高金明典, 阿部薫, 吉岡孝志, 金丸龍之介, 斎藤博. 胃癌患者に対する Paclitaxel と Cisplatin の併用化学療法の Phase I study 第2報〔東日本胃癌化学療法研究会〕. 第41回日本癌治療学会総会, 2003, 札幌.
- 31) 島村智崇, 山口研成, 坂本裕彦, 西村洋治, 野津聡, 中島哲夫, 多田正弘. 結腸, 直腸癌の多発性肝転移に対する 5FU - leovorinate (1-LV) 療法 (de Gramont 法) に準じた肝動注化学療法の検討. 第41回日本癌治療学会総会, 2003, 札幌.
- 32) 土井俊彦, 朴成和, 小泉和三郎, 宮田佳典, 白尾國昭, 山口研成, 佐藤温, 滝内比呂也, 斎藤博, 大津敦. 進行胃癌患者に対する gefinitib (Iressa, ZD1839) の臨床第 II 相試験. 第41回日本癌治療学会総会, 2003, 札幌.
- 33) 陳勁松, 近藤建, 坂本純一, 小島宏, 寺島雅典, 山村義孝, 辻仲利政, 兵藤一之介, 近藤征文, 西連寺意勲, 小泉和三郎, 田宮洋一, 滝内比呂也, 東野正幸, 鈴木孝雄, 市倉隆, 氏家重紀, 斎藤博, 秋谷寿一, 山口研成. Ro09-1978 (Capecitabine) 之進行再発胃癌に対する後期第 2 相臨床試験. 第41回日本癌治療学会総会, 2003, 札幌.
- 34) 山口研成, 新井吉子, 石窪 力, 多田正弘, 神田裕三, 赤木 究. 膵臓癌患者の臨床経過に伴う癌由来変異血漿 DNA の推移. 第62回日本癌学会総会, 2003, 名古屋.
- 35) 赤木 究, 山口研成, 石窪 力, 新井吉子, 小林照忠, 西村洋治, 田中洋一. 大腸癌におけるゲノムの不安定性と KRAS, BRAF 遺伝子変異の検討. 第62回日本癌学会総会, 2003, 名古屋.
- 36) 石窪 力, 新井吉子, 山口研成, 西村洋治, 小林照忠, 多田正弘, 神田裕三, 田中洋一, 赤木 究. 日本人における microsatellite

instability (MSI)陽性大腸直腸癌の頻度と
その臨床像の男女差. 第 62 回日本癌学会総
会、2003, 名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「NM23 蛋白質の測定方法及びそれを用いた悪性
腫瘍の診断方法」

特許出願公開番号：特開 2000-304746
(P2000-304746A)

分担研究報告書

神経芽腫マススクリーニング発見腫瘍の染色体・遺伝子異常の検討に関する研究

主任研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター病院 デイケア部長

研究要旨 我が国では6ヵ月乳児の尿を用いた神経芽腫のマススクリーニング(マス)が1985年頃から全国的に実施されており、毎年約180人の乳児患者が発見されている。マスによる神経芽腫患者の死亡率減少効果について、カナダ、ドイツから否定する報告が、厚労省の久繁班からは肯定する報告が出されている。このように、マスの効果は確定していないが、マスで発見される腫瘍の一部は自然退縮することがわかっており、この腫瘍を手術により切除することによる患者の不利益は明白なので、平成16年度よりマスは中止と決まった。マスにより救命されている患者はいるのか、いるとしたらその頻度はどれくらいなのかを推定する研究を実施した。マス発見乳児腫瘍285例(A1群)、マス以前に発症した乳児腫瘍49例(A2群)、マス陰性/未受験年長児腫瘍112例(B群)のFISH分析を実施し、ploidyを決定した。FISHによるploidy分析結果とフローサイトメトリーによるploidy分析結果は一致した。Triploidyは乳児腫瘍に多く、diploidyは年長児腫瘍に多かった。A1, A2, B群をそれぞれtriploidyとdiploidyに分類し、各群の病期を比較すると、diploid腫瘍はtriploid腫瘍より進行期が多く、マス発見腫瘍は臨床的発見腫瘍より早期が多かった。これは、マスが臨床的発見例に比べて早期に腫瘍を発見していることを示す所見である。Triploid腫瘍に比較してdiploid腫瘍の生存率は低く、年長児腫瘍の生存率は乳児腫瘍の生存率より、著しく低かった。マスにより死亡率減少効果の期待できるのはマス発見diploid腫瘍の約半数とtriploid腫瘍のごく一部ということになり、マス発見腫瘍の10%と推定された。受験者の不利益を減じた新しいマススクリーニングを臨床研究として実施し、死亡率減少効果があるのかどうか明らかにするべきである。

A. 研究目的

我が国では6ヵ月乳児尿を用いた神経芽腫マススクリーニング(マス)が1985年頃より全国的に実施されており、毎年約180人の患者が発見されている。マスによる死亡患者減少効果について、カナダ、ドイツからは疫学的に効果を否定する報告が、厚労省の久繁班からは効果を肯定する報告が出されている。このようにマスの効果は確定していないが、マスで発見される腫瘍の一部は自然退縮することがわかっており、この腫瘍を手術により切除することによる患者の不利益は明白なので、平成16年度よりマスは中止と決まった。マスにより救命されている患者はいるのか、いるとし

たらその頻度はどれくらいなのかを明らかにすることは、今後マスをどうするのかを判断するのに重要である。そこで、マスで発見される乳児腫瘍と、臨床的に発見された乳児腫瘍、12ヵ月以降に臨床的に発見された年長児腫瘍の生物学的性格を明らかにし、どのような腫瘍がマスにより救命されているのかを推定した。

B. 研究方法

対象は神経芽腫446例である。そのうち285例はマスで発見された乳児例(A1群)であり、49例は主としてマス受験前に臨床的に発見された乳児例(A2群)で、112例はマス受験時には陰性か

マス未受験であり、1歳以降、親や家族に神経芽腫を発見された年長児例(B群)である。腫瘍細胞をハサミで細切後、短期間培養し、収穫した細胞をカルノア溶液で固定した。間期核を対象に、1番染色体の数とその短腕欠失(1p-)の有無を2色FISH法で分析した。プローブは1番染色体のD1Z1(1cen)とD1Z2(1pter)を用いた。1番染色体の数を基準にして、ploidyを決定し、diploid腫瘍とtriploid腫瘍に分類した。またDiploid腫瘍とtetraploid腫瘍をまとめてdiploid腫瘍と、triploid腫瘍と3n/4n混合腫瘍(triploid細胞とtetraploid細胞よりなる)をまとめてtriploid腫瘍とよんだ。次に144例について、フローサイトメトリーを用いて、腫瘍細胞のDNA index(DI)を求め、FISHにより決定したploidyの所見と比較した。腫瘍の発見方法やploidyで分類した患者群の生存曲線をKaplan-Meier法で求め、有意差をLog-rank法で検定した。

(倫理面への配慮)

研究の対象は手術による採取後5年以上経過した腫瘍組織である。研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守した。なお、本研究は当がんセンター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

フローサイトメトリーによるDNA index(DI)を分析できた144例について、DIとFISHによる1番染色体数より決定したploidyとの関係を調べた。Diploid腫瘍25例中、19例のDIは1であり、6例のDIは1.10~1.26であった。Tetraploid腫瘍4例のDIは1.8~2.4であり、中位値は1.9であった。Triploid腫瘍90例のDIは1.17~1.71で、中位値は1.44であった。Triploid細胞とtetraploid細胞よりなる3n/4n混合腫瘍のDIは1.69~2.46で、中位値は1.91であった。以上の結果、FISHによるdiploid, triploid, tetraploid腫瘍の分類はフローサイトメトリーによるDIの結果とよく一致していたが、tetraploid腫瘍と3n/4n混合腫瘍のDIは重なっており、フローサイトメトリーでは分類不能であった。

A1, A2, B群のploidyの分布をみると、triploidy(3n)が87%、67%、23%であり、diploidy(2n)が13%、33%、77%であった。年長児腫瘍(B群)に比較して乳児腫瘍(A2群)で

はtriploidyが多く、マス発見腫瘍(A1群)ではさらにtriploidyの頻度が高かった。

A1, A2, B群をtriploidy(3n)かdiploidy(2n)かで6群に分類し、それぞれの病期の分布を調べた。I, II, IVS病期(早期)はA1/3n 78%, A1/2n 75%, A2/3n 79%, A2/2n 56%, B/3n 39%, B/2n 14%であり、A1, A2群に多く、B群で低かった。反対に、III, IV期(進行期)はA1/3n 22%, A1/2n 25%, A2/3n 21%, A2/2n 44%, B/3n 61%, B/2n 86%であり、A1, A2群に少なく、B群に多かった。

発見方法とploidyで分類した6群の生存曲線を求め、5年生存率を調べると、A1/3n 99.6%, A1/2n 89.3%, A2/3n 97.0%, A2/2n 68.8%, B/3n 71.9%, B/2n 47.4%であった。

D. 考察

これまでの疫学的研究は、一致して、マスキューニング開始後、乳児神経芽腫の発生頻度はマス開始前の2倍に増加したと報告した。しかし、神経芽腫の死亡率減少効果については、肯定する報告と否定する報告があり、はっきりしない。発生率の増加とマス発見腫瘍の無治療観察結果から、マス発見腫瘍の半数はマスを受験しなければ自然退縮していたと推測される。死亡率減少効果は明白でないが、自然退縮する腫瘍を手術で摘出する不利益は明白なので、平成16年度よりマスキューニングは中止と決まった。しかし、マスの恩恵を受けるこどもがいるとしたら、不利益を減らしたマスを実施することが、こどもの福祉につながると考えられる。そこで、マス発見腫瘍と臨床的に発見された腫瘍のploidy, 病期、生存率を比較することにより、マスの効果を予測した。

FISH分析で1番染色体数を数え、ploidyを決めたが、同時にフローサイトメトリーによるDIを求め、両者の関係を調べた。Diploid, triploid, tetraploid腫瘍のDI中位値はそれぞれ1, 1.44, 1.9であり、きれいに相関した。しかし、17%を占めるtriploid細胞とtetraploid細胞よりなる3n/4n混合腫瘍のDI中位値も1.9であり、この群とtetraploid腫瘍をフローサイトメトリーで分類することは不可能であった。3n/4n混合腫瘍は細胞遺伝学的にまた、生物学的にtriploid腫瘍に属するので、神経芽腫のploidy分析はFISHで行うべきであることを示した。

これまでの研究で、triploid 神経芽腫の予後は diploid 神経芽腫より良好であることがわかっている。今回の研究で、臨床的に発見された乳児腫瘍の 67%は triploidy であるが、年長児腫瘍の 77%は diploidy であり、優位な ploidy の分布が乳児腫瘍と年長児腫瘍で反対であった。これは、乳児腫瘍の予後は良好、年長児腫瘍の予後は不良という神経芽腫の臨床的特徴の生物学的背景になっている。マス発見腫瘍では、臨床的に発見された乳児腫瘍より、さらに triploidy の頻度が高くなった。これは、マスで発見され、自然退縮する腫瘍の ploidy が triploidy であるためであると推測された。

同じ方法で発見された腫瘍の病期を比較すると、triploid 腫瘍の方が、diploid 腫瘍より病期は早期である。また、同じ ploidy の腫瘍で比較するとマス発見 diploid 腫瘍 (A1 群) の病期は臨床的に発見された乳児 (A2) 群や年長児 (B) 群に比較すると病期は早期であった。この結果は diploid 腫瘍は triploid 腫瘍に比較して進行が早いこと、また、マススクリーニングは腫瘍を臨床的発見腫瘍より早期に発見していることをしめしている。

発見方法と ploidy で分類した 6 群の患者の 5 年生存率を分析すると、乳児 triploid (A1/3n, A2/3n) 腫瘍は良好で 97%以上であるが、年長児 triploid (B/3n) 腫瘍は 72%と低下する。マス発見 diploid (A1/2n) 腫瘍の 5 年生存率は 89%であるが、臨床的発見 diploid (A2/2n) 腫瘍では 69%、年長児 diploid (B/2n) 腫瘍では 47%であり、臨床的に発見された diploid 腫瘍の生存率は低い。

昨年度報告したように、マス発見 diploid 腫瘍と年長児 diploid 腫瘍、マス発見 triploid 腫瘍と年長児 triploid 腫瘍の CGH パターンは類似していた。この所見は、マスを実施していなければ、前者の腫瘍が進展して後者として発見されることを示唆している。

今回の分析において、マス発見例には triploid 腫瘍の頻度が高く、その多くは自然退縮すると予想される。また、triploid 腫瘍は乳児期に臨床的に発見されても、良好な予後が期待できる。一方、年長児における triploid 腫瘍の発生頻度は低く、マスで発見腫瘍のごく一部がマスを受験しなければ、年長児 triploid 腫瘍として発見されると推測される。従って、マススクリーニングで triploid

腫瘍を発見しても、死亡率減少に対する貢献は少ないと考えられる。

一方、diploid 腫瘍を比較すると、その 5 年生存率はマス発見 (A1/2n) 腫瘍 89%、臨床発見乳児 (A2/2n) 腫瘍 69%、年長児 (B/2n) 腫瘍 47%であり、3 群間にはそれぞれ約 20%の差が認められる。従って、マスによる早期発見が死亡率を減少させるのは diploid 腫瘍であると考えられる。diploid 腫瘍はマス発見腫瘍の 13%を占め、マス発見による死亡率減少効果を $89\% - 47\% = 42\%$ とすると、 $13\% \times 0.42 = 5.5\%$ と計算される。triploid 腫瘍の中でマスを受験しなければ年長児 triploid 腫瘍として発生する腫瘍の頻度を推定することは困難であるが、diploid 腫瘍と合わせてマス発見腫瘍の 6~10%に死亡率減少効果が得られると考えられる。マスにより年間 180 人の患者が発見されるので、最大 18 人が救命されていることになる。厚生労働省の久繁班の報告によると、マス受検小児とマス非受検小児を比較すると、年間 16 人が救命されているという。この数と私たちの報告した数は近い。

2002 年にカナダとドイツから、神経芽腫マススクリーニングに死亡率減少効果はないという報告がだされた。これに対して日本の研究者は以下のような批判をした。カナダのスクリーニングは薄層クロマトグラフィーを使用しており、わが国で使用されている高速液体クロマトグラフィーとは異なるので、日本のデータと比較にはならない。ドイツのデータは中間報告であり、最終報告は 2008 年に予定されており、今後、否定される可能性がある。また、都合のよいコントロールを選んで対照群の神経芽腫発生頻度を低くみせているので、マスの効果が否定される結果になる。久繁班の疫学的データや私たちのデータはマスに死亡率減少効果があることを示唆している。マススクリーニングに死亡率減少効果があるのかどうか明らかにするために、マススクリーニングによる不利益を最小限にした臨床試験を開始すべきである。

E. 結論

神経芽腫マススクリーニングの死亡率減少効果については研究者間で意見が分かれる。FISH/CGH 所見により、マス陽性腫瘍の中に将来、進展し予後不良になると予想される一群を特定した。この群はマス発見腫瘍の 10%と推定される。

マスの死亡率減少効果を明らかにするために、受験者の不利益を減じた、新しいマススクリーニングを臨床試験として計画するべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomioka, N., Kobayashi, H., Kageyama, H., Ohira, M., Nakamura, Y., Sasaki, F., Todo, S., Nakagawara, A., and Kaneko, Y. Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 36: 139-150, 2003.
- 2) Watanabe, N., Kobayashi, H., Ichiji, O., Yoshida, M., Kikuta, A., Komada, Y., Sekine, I., Ishida, Y., Horikoshi, Y., Tsunematsu, Y., Yano, M., Nakadate, Y., and Kaneko, Y. Cryptic insertion and translocation or non-dividing leukemic cells disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia*, 17: 876-882, 2003.
- 3) Satoh, Y., Soejima, H., Nakagawachi, T., Nakadate, H., Kaneko, Y., Masaki, Z., and Mukai, T. Significant reduction of WT1 gene expression possibly due to epigenetic alteration in Wilms' tumor. *J. Biochem.*, 133: 303-308, 2003.
- 4) Namiki, T., Sakashita, A., Kobayashi, H., Maseki, N., Izumo, T., Komada, Y., Koizumi, S., Shikano, T., Kikuta, A., Watanabe, A., Suzumiya, J., Kikuchi, M., and Kaneko, Y. Clinical and genetic characteristic of Japanese Burkitt lymphomas with or without leukemic presentation. *Int. J. Hematol.*, 77: 490-498, 2003.

- 5) 金子安比古: ヒトの病気と染色体. *生物の科学* 57: 35-40, 2003.

2. 学会発表

- 1) 金子安比古, 小林泰文, 富岡信元, 渡辺直樹, 中川原章: マススクリーニングにより予後改善効果が期待できる神経芽腫の性格: マス陽性乳児腫瘍と年長児腫瘍の細胞遺伝学的差異。第 62 回日本癌学会総会, 2003 年, 名古屋。(第 62 回日本癌学会総会記事, p.141, 2003.)
- 2) 渡辺直樹, 小林泰文, 中舘尚也, 小林良二, 佐々木文章, 遠藤幹也, 恒松由記子, 豊田恭徳, 掘越泰雄, 見須英雄, 水田祥代, 江口春彦, 金子安比古, 福澤正洋: ウイルムス腫瘍におけるゲノム異常の検討と IGF2 アレル発現分析。第 19 回日本小児がん学会, 2003 年, 東京。(小児がん 40:406, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳癌の新規ホルモン療法奏効性予測診断法の開発に関する研究

分担研究者 林 慎一 埼玉県立がんセンター研究室 主任研究員

研究要旨 乳癌に対するホルモン療法の治療奏効性を予測する診断に DNA マイクロアレイ法を応用する研究をさらに進展させた。大規模マイクロアレイ法によってエストロゲン反応性遺伝子群を同定し、それらを乗せたカスタムマイクロアレイチップを作成した。本チップを用いて、エストロゲン受容体（ER）陽性細胞を用いて、基礎的なエストロゲン反応性プロファイルデータを蓄積し、解析方法を確立した。また、抗エストロゲン薬に対する反応性のプロファイルを得た。現在、患者検体の組織サンプルの検討を行い、データを蓄積している。さらに臨床の場で使用可能なものにするための高感度化、自動化、簡便化を目指した新規のチップ担体の採用を検討している。このような改良を重ね、ホルモン療法に対する反応性の予測を可能とする診断チップを開発していく。一方、エストロゲンシグナル応答性 GFP を導入した乳癌細胞株を樹立した。これを用いて特にアロマターゼ阻害剤の奏効性予測を目的とした、癌周辺の間質も含めた総合的評価系を開発する。

A. 研究目的

乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌などはステロイドホルモン依存性に発生・進展する。これらの癌細胞では核内ステロイドホルモン受容体の機能がその病態と密接に関係し、実際、受容体発現を指標に抗ホルモン剤が投与されている。乳癌に対するこのようなホルモン療法はエストロゲン受容体ないしはそのシグナル経路を遮断する分子標的治療の典型であり、その分子機構の理解が治療の発展に必須である。近年、乳癌に対する内分泌治療は LH-RH アゴニストや第 3 世代のアロマターゼ阻害剤の登場によって急速に発展進化している。しかし、これらの適応を決める明確な分子指標はまだない。また、これらの薬剤は一般の抗癌剤に比べてきわめて有害事象が少なく、乳癌化学予防薬としても期待されているが、その適応のためには乳癌の高危険度集団を同定する必要がある。そこで、我々は、これまで長年進めてきたエストロゲン受容体に関する基礎研究の成果に基づき、これまで開発してきたエストロゲン応答性マイクロアレイチップやエストロゲンシグナル反応性

GFP 導入細胞などを用いて、乳癌の個別化診療のための分子診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. これまで開発してきたエストロゲン応答性カスタムマイクロアレイを用いて各種培養細胞のエストロゲン応答性発現プロファイルの詳細に解析する。また、これら培養細胞に対する各種抗ホルモン剤の作用をこの発現プロファイルから解析する。
2. 乳癌手術材料および生検材料を用いた解析を行う。その際、マイクロダイセクション法による癌細胞の単離、そこからの RNA 抽出、RNA ポリメラーゼを用いた定量的増幅法を試みる。
3. 順次、これらの結果をフィードバックしてチップに乗せるコンテンツの入れ替えやチップ高密度化、信頼性向上などの改良を進める。
4. ヒト組織の解析結果を蓄積し、ホルモン療法応答性に関するデータベースを構築する。
5. アロマターゼ阻害剤反応性予測のためにア

ロマトラーゼが存在する癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系を確立するため、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを構築する。

6. そのベクターを ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に安定導入し、その後のクローニングにより、もっとも目的に適した細胞株を樹立する。

(倫理面への配慮)

乳癌診断用マイクロアレイ開発に供する研究材料は手術によって得られる腫瘍組織であるが、本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。なお、本研究は当がんセンター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 昨年までの研究の結果作成したエストロゲン応答遺伝子のみを載せたカスタムマイクロアレイチップを用いて ER 陽性乳癌細胞を材料に種々の詳細な解析を行った。
2. エストロゲンによる発現誘導の時間変化を解析した結果、エストロゲン応答遺伝子は短時間で誘導されてくる遺伝子群と長時間のエストロゲン処理によって誘導されてくるものとの 2 群に分けられることが明らかとなった。また、抗エストロゲン剤の乳癌細胞に対する効果を発現プロファイルの形で見ることが示された。新規内分泌治療薬、SERMs の開発にも役立つ可能性が示された。
3. これまでの結果を参考にカスタムチップに載せる遺伝子の改変を行い、約 200 遺伝子を載せた新型のものに改良した。
4. 術前ホルモン療法（アロマトラーゼ阻害剤投与）を施行した乳癌患者検体 12 例について治療前の生検標品と治療後の手術時の標品を用い、それぞれより癌細胞のみをマイクロダイセクション法で採取し、mRNA を抽出後、定量的 RNA 増幅を行い、カスタムチップを用いて解析した。その結果患者群が 2 群に明瞭に分けられたが、詳細なデータ解析は現在進行中である。
5. さらに絞り込んだ候補遺伝子約 10 遺伝子についてリアルタイム RT-PCR 法によって患

者検体を用いて解析し、さらにその中から予後データのある乳癌サンプルを用いて、免疫染色法によって解析し、その結果、新規予後因子として HDAC6 が見出された。

6. また、アロマトラーゼ阻害剤反応性予測のためにアロマトラーゼが存在する癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系を確立するため、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを構築した。その際、定量的測定を可能にするため、ユビキチン化部位を持った半減期の短い GFP を用いた。
7. そのベクターを ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に安定導入し、複数の株を得た。その中から蛍光のバックグラウンドが低く、最もよくエストロゲンと反応する株、MCF-7E10 を選択、樹立した。その細胞株を乳癌患者から単離した間質細胞と共生培養し、十分な蛍光を観察できることを確認した。

D. 考察

マイクロアレイによる解析は世界的なレベルで多くの癌培養細胞、癌組織において現在急速に研究が展開中であるが、ホルモン療法の応答性に特化したものは未だ見られない。我々のこれまでの結果は、ホルモン療法反応性予測診断アレイチップ開発研究の第 1 段階であるが、すでに多くの有益なかつ、膨大な情報を提供している。たとえば、昨年までに野生型 MCF-7 乳癌細胞と、そのタモキシフェン耐性株との発現プロファイルの比較から、タモキシフェン耐性に関わる可能性のある遺伝子が示唆され、また、既存の抗ホルモン剤の効果の違いをカスタムチップによる解析プロファイルから評価する事が可能であることが示唆され、本チップが新規抗ホルモン剤の開発にも有用であることを示した。今回、さらに患者の検体、特に術前治療の生検サンプルを用いた解析から、患者群の層別化にも有用であることが示唆された。これがホルモン療法奏効性と相関するかどうかは現在検討中であり、ある程度の症例数の解析結果の蓄積を待たねばならない。今後さらに、ヒト組織標品を用いた解析とチップの改良を進め、高精度なホルモン療法奏効性予測診断を可能にする DNA チップの開発を目指す。一方、近年開発されたアロマトラーゼ阻害剤は特に癌細胞周辺の間質