

組織に存在する、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系が開発できるという根拠が得られた。

E. 結論

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、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 が有用であることが示された。これらの研究結果のフィードバックを重ねつつ、本目的に適したカスタムチップの開発、改良をさらに進めていく。一方、癌周辺部の間質を含めた総合的な評価系の作成にも着手した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Hayashi, S., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, 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.
- 3) Omoto, Y., Eguchi, H., Yamamoto- Yamaguchi, Y. and Hayashi, S. Estrogen receptor (ER) β 1 and

ER β α / β 2 inhibit ER α function differently in breast cancer cell line MCF-7. *Oncogene*, 22, 5011-5020, 2003.

- 4) 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.
- 5) Hayashi, S. Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomed. Pharmacotherapy*, 58, 1-9, 2004.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 林 慎一 : ホルモン依存性癌. 予防医学事典, 朝倉書店, 印刷中
- 16) 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

2. 学会発表

1. 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.
2. Yamaguchi, Y., Omoto, Y., Takei, H., Sueyasu, 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).
3. 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).
4. 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.)
5. 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.
6. 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.
7. 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.)
8. 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.)
9. 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.
10. 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.
11. 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)
12. 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)
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Hayashi S. Molecular mechanisms of estrogen-dependency in breast cancer. 1st Breast Cancer

Frontier Meeting, 2003, Tokyo.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 角 純子 埼玉県立がんセンター研究室 主任研究員

研究要旨 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、予後因子解析が特に重要である神経芽腫について血清 NM23 蛋白質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、肺癌血清さらに造血器腫瘍血清に比べて、神経芽腫では非常に高値を示す多くの症例が検出された。高値群は低値群に比べて生存率における予後は不良であった（generalized Wilcoxon test: $p=0.00004$, Logrank test: $p=0.00001$ ）。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示した。

A. 研究目的

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。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。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も目的とする。

B. 研究方法

血清 NM23 蛋白質は、サンドイッチ ELISA 法により測定した。正常乳幼児 23 例、神経芽腫 259 例。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は MTT アッセイ法で、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は multiple RT-PCR 法で、分

泌サイトカインは Cytokine Antibody Array にて検討した。

（倫理面への配慮）

埼玉県立がんセンター倫理委員会の審査を受けた。また、研究結果が第三者に特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

1) 神経芽腫の新しい予後因子：血清 NM23 蛋白質
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、予後因子解析が特に重要である神経芽腫について血清 NM23 蛋白質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、肺癌血清さらに造血器腫瘍血清に比べて、神経芽腫では非常に高値を示す多くの症例が検出された。高値群は低値群に比べて生存率における予後は不良であった（generalized Wilcoxon test: $p=0.00004$, Logrank test: $p=0.00001$ ）。N-MYC の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 の増幅のない症例においても、有意な予後因子となった。

2) 正常単球に対する血清 NM23 蛋白質の傷害作用
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・生存に関するサイトカイン関連遺伝子の発現を解析した。IL-1, 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る。

D. 考察

多くの腫瘍では、血清 NM23 蛋白質レベルは正常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。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 分子として新しく展開したい。

E. 結論

急性骨髄性白血病や aggressive 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、神経芽腫についても観察された。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、NM23 蛋白質が正常末梢血単核細胞の生存や諸種サイトカイン遺伝子発現等を修飾することを見出した。この効果と予後不良因子活性との関連が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okabe-Kado, J. and Kasukabe, T. Physiolo - gical and pathological relevance of extracellular NM23/NDP kinases. J. Bioenerg. Biomemb., 35(1): 89-93, 2003.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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 MmTRA1 b / リン脂質 scramblase 1 の発現修飾. 第62回日本癌学会総会, 2003.
- 3) Okabe-Kado, J. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

肺癌早期診断法の研究に関する研究

分担研究者 土屋 永寿 埼玉県立がんセンター研究室 室長

研究要旨 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 の発現に影響を与える MDM2 と、p53 の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、p53 染色の結果と合わせて検討した。

昨年度と同じ切除肺癌 37 例の気管支輪切り切片を用いて、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、免疫組織学的に MDM2 と WAF-1 遺伝子の発現異常（高発現＝陽性）を検索した。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、両者間では正常の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。

A. 研究目的

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。従ってその早期発見は肺癌の死亡率を減少させるために重要である。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 の発現は WAF-1 の発現と、フィードバック機構により MDM2 の発現を誘導することから、気管支上皮におけるこれら遺伝子の発現と p53 発現との相互関係を検索し、両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検討を行なった。

B. 研究方法

昨年度と同じ切除肺癌 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）は免疫組織学的検索を行い、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した。

（倫理面への配慮）

特定の個人が同定されないように連結可能匿名化を行ない、個人情報の保護を行なった。

C. 研究結果

1) 気管支上皮の p53, MDM2, WAF-1 陽性頻度：
原発性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。

- 2) 気管支上皮 p53 陽性部位における MDM2, WAF-1 の発現状況: 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。
- 3) 原発癌における p53 と MDM2 発現の関係: 原発癌に於いては p53 の陽性例、陰性例の両方で MDM2 陽性率は同じであった。
- 4) p53 陽性の癌と p53 陽性の気管支上皮における MDM2 染色性の関係: 原発癌 11 例中、MDM2 陽性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。

D. 考察

気管支上皮の p53 高発現は扁平上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かなり低いものと思われる。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 染色の染色性と発がん危険度との関係を検討した報告は認められていない。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された。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。

E. 結論

気管支上皮に於いて、p53 と MDM2 発現状況の組み合わせ、P53 陽性で MDM2 陰性、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Kurosumi, 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 : 833-837, 2003.

- 4) 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, in press.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 山口 研成 埼玉県立がんセンター病院 医長

研究要旨 血漿中に癌由来の変異DNAが存在し、その存在から癌の診断、ないし癌の遺伝子情報を検討する試みは数多く報告されてきた。現時点の血漿DNA研究は、
1)一塩基置換の変異やmicrosatelliteの変異を検出し癌の予後マーカーとしての応用
2)メチル化DNAをmethyl specific PCRによりまたは、k-ras遺伝子のように変異部位が固定されているものについてはmutation specific PCRにより高感度検出し、早期診断を目指した応用の、2種に大別できる。

我々は、これらの方向性とは趣を変え、一点で検討するのではなく、治療経過にそって採取された血漿から経時的变化を検討することを主点として解析を行っている。おもに、化学療法の対象となるステージIVの膵臓癌患者において、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。

A. 研究目的

がん患者の血漿中DNAのがん由来変異DNAの推移を、患者の病態と比較しその推移の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

1. 埼玉県立がんセンター消化器科の患者採取された血漿からDNAを抽出する。抽出に際しては、DNAは微量のため効率のよい抽出法を開発する。
2. 原発巣から確定された変異をSSCP方で同定し、血漿から検出する。
3. 変異/正常の比率をシーケンサーにて定量し、患者の治療や病態の変化とその推移を比較検討する。

（倫理面への配慮）

患者のうち、研究時に生存されている方には同意を取得する。とくに、診療データとの突き合わせが重要なために、データ管理を厳密に行う。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) 病態とがん由来変異DNAの比率について現在までに、原発巣からK-rasの変異が証明された膵臓癌患者14名について、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、mutation/wild + mutation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法で検討を追加したが、血行性転移の無い患者においては経過中に1点程度でk-rasの変異が認められるだけであることより、再検も含め臨床的意味の再評価を行っている。

2) がん由来変異 DNA の絶対量の定量について血漿 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模索中である。

D. 考察

血行性転移をきたした膵癌においては、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が変化するが、感染症の併発など癌以外の要因が生じた場合比率が低くなる傾向を認めた。今後検出の正確性、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検討中である。

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

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 8 名中 8 名に原発の癌と同じ遺伝子変異を血漿中から検出し得、癌の進展とともに増加傾向を認めたが、血行性転移以外の場合は比率があがらず、僅かに En-rich 法で全経過中 1 ポイント陽性を見るだけであった。血漿 DNA は、血行性転移を有する患者において診断マーカーとして有用であると考えられる。

この検出感度及び血漿 DNA の抽出法の問題点が解消されたあかつきには、転移の早期診断（手術適応の判断）や、臨床上有用なバイオマーカーの開発につながるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) 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。
- 2) 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。
- 3) 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、斉藤博、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。
- 4) 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、斉藤博、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。
- 5) 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。
- 6) 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。

- 7) 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

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (H15年度)

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, Y., 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．乳癌の抗アロマトーゼ療法（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) Kurosumi, 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.