

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

がんの臨床的特性に関する分子情報に基づく  
がん診療法の開拓的研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成17(2005)年4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
がんの臨床的特性に関する分子情報に基づくがん診療法の開拓的研究		
吉田 輝彦	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 網羅的遺伝子発現解析を基盤とする食道がんの予知医療の確立を目指した基礎的及び臨床的研究		
吉田 輝彦	-----	5
2. 分子情報に基づく組織画像解析を基盤とする食道・頭頸部扁平上皮がんの予知医療の確立を目指した基礎的及び臨床的研究		
落合 淳志	-----	8
3. 遺伝子発現データを元にした白血病等の発症・悪性化に関わる分子経路の同定と臨床応用の研究		
市川 仁	-----	10
4. 遺伝情報に基づく発がん高危険度群補足とその臨床応用		
菅野 康吉	-----	12
5. 固形がんに対する免疫遺伝子・細胞複合療法の臨床導入を実現する研究		
青木 一教	-----	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	18

がんの臨床的特性に関する分子情報に基づくがん診療法の開拓的研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部長

研究要旨 本研究の目的は、治療応答性や予後等の重要な臨床的特性を規定する分子情報を確定し、その知見に基づくがんの診断・治療の標的を同定、かつ実際の診療プロトコルを開拓・検証することにある。具体的研究項目は、①食道がん生検試料に対するマイクロアレイ解析から、放射線化学療法との予後と相関する遺伝子群の存在が示唆され、線形判別器構築を試みた。新たな前向き臨床試験の研究計画により試料数を追加し、十分な性能を発揮する判別器を構築する。また、組織画像解析を用いた食道がん・頭頸部がんの放射線感受性予知を生検組織で行うために、腫瘍内血管密を客観的に測定する画像解析システムを開発した。②急性骨髄性白血病(AML)のt(8;21)転座またはinv(16)逆位を有する症例に特異的な遺伝子発現プロファイルの解析から、これらの染色体異常がAML発症において共通の分子経路に働き、白血病幹細胞の自己複製を活性化することを示唆した。③表在性膀胱がんでは9pあるいは9qのヘテロ接合性の消失(LOH)を50-60%の症例で、1q、17p、11p、11q等の欠失を20%以上の症例で認めた。さらに、GeneChipによる解析を併用することにより、従来見逃されていた限局した領域の欠失が検出可能であった。尿や生検組織から得られた微量のDNAから欠失を検出する場合に、鋳型DNA濃度から検査の精度を予測するシステムを開発した。④同種主要組織適合抗原遺伝子の腫瘍への導入による抗原性の強化と、同種造血幹細胞移植とを併用して、ドナー免疫系による抗腫瘍効果を高める免疫遺伝子・細胞複合療法の前臨床段階の開発を進め、マウス造血幹細胞移植モデルを用いて、複合療法により相乗的抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。

分担研究者

落合 淳志	国立がんセンター研究所支所 部長
市川 仁	国立がんセンター研究所 プロジェクトリーダー
菅野 康吉	栃木県立がんセンター 副主幹・医長・特別研究員
青木 一教	国立がんセンター研究所 室長

A. 研究目的

がんの分子情報を包括的かつ効率よく捕捉する技術や、細胞への遺伝子導入・発現技術を適切

に応用することで、がん診療の成績や質の革新的な向上が期待されている。本研究の目的は、治療応答性や予後等の重要な臨床的特性を規定する分子情報を確定し、その知見に基づくがんの診断・治療の標的を同定、実際の診療プロトコルを開拓・検証することにある。具体的には以下の研究項目について焦点を絞り、3年計画で研究を推進する。①食道がん・頭頸部がんの治療前生検組織の分子情報を検索し、実際の医療現場において極めて有用な情報となる放射線化学療法等の治療感受性及びリンパ節転移リスクの予知を目的とする。現在の食道がん手術療法と放射線化学療法の5年生存率はほぼ同率であるが、本研究によりそれぞれの症例に適した治療法選別が促

進され、全体の治療効果の有意な向上が期待される。②AMLの網羅的遺伝子発現解析から同定された染色体異常関連遺伝子・予後関連遺伝子を中心として、発症・悪性化に働く分子経路を解明する。現在、転座によるキメラ遺伝子や、染色体欠失、付加が白血病発症につながる分子経路についてはほとんどわかっておらず、予後不良に関わる分子経路についてはさらに未知の点が多い。本研究により各々のAMLの個性を分子経路として把握する診断法を確立し、よりの確な治療法の選択と、新規治療標的分子の同定につながると期待される。③膀胱がんにおける発がんやがんの悪性化に至る過程で生じている染色体欠失等の遺伝子異常を尿等の臨床試料由来の微量DNAを用いて精度良く解析し、予知医療の指標としての有用性を検証する。④腫瘍局所へのアロ同種主要組織適合抗原遺伝子導入は、細胞障害性T細胞による拒絶反応の誘導を目指す。固形がんにおいてはしばしば局所での免疫寛容が成立しており、臨床上有効な抗腫瘍免疫反応の誘導が困難な場合が多い。このような免疫治療抵抗性を打破するために、同種造血幹細胞移植併用によりGraft-versus-Host Diseaseを抑えたまま、ドナー免疫系による高い抗腫瘍効果を発揮することが期待される免疫遺伝子・細胞複合療法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

各研究項目毎に以下のとおり。①国立がんセンター東病院において放射線化学療法(CRT)を受けた食道がん患者の内視鏡下生検材料の遺伝子発現プロファイルデータに対してFisher評価基準により選択した遺伝子を用いてFisherの線形判別式を遺伝的アルゴリズムを用いて複数構築し、その性能をleave-one-out法及びランダムに分離した8検体のテストサンプルを用いて評価した。対象は治療後3年以上生存18症例と治療後1年未満生存15症例の合計33症例で、Affymetrix GeneChip U95Aにより遺伝子発現を解析した。また、画像解析システムを用いてCD31抗体により

染色された組織内の血管を認識することにより、全腫瘍組織中の酸素化腫瘍組織の割合の測定(Oxygenated area)、血管周囲径の総和(Total perimeter/tumor area)、顕微鏡下200倍視野面積における腫瘍内血管数の最も多い値(compute MVD)を計測する画像解析プログラムを作成した。

②既已取得している54症例の小児AML検体及び新たに追加した数十例の検体のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルデータから、染色体異常関連遺伝子及び予後関連遺伝子を統計学的手法により抽出した。次に主要な遺伝子について、白血病細胞株での過剰発現、RNAiによる発現抑制等を用いて機能解析を行った。

③pTa Stageの表在性膀胱癌32例を対象として、short tandem repeat (STR)マーカーおよびsingle nucleotide polymorphism (SNP)を用いて1-22番染色体上の101ヶ所の多型部位についてLOHを解析した。さらに、腫瘍細胞が比較的豊富に含まれていると考えられる15例を対象にGeneChip (GeneChip Human Mapping 10K Array: Affymetrix社)を用いて約11,000個のSNPによるLOHの解析を行った。正常ヒトリンパ球由来のゲノムDNAを系列希釈してPCR-SSCP法を施行、LOH検出のためのPCRの鋳型DNAのコピー数を変化させた場合に生じる対立遺伝子のシグナル比を定量した。

④共通のMHCを有するが、マイナー組織適合抗原が異なるDBA/2マウスをドナー、BALB/cマウスをレシピエントとする造血幹細胞移植モデルを確立した。この移植モデルを用いて、BALB/c由来のCT26細胞を皮下接種後、同種MHC class I抗原であるH-2K<sup>b</sup>発現プラスミドをリポソームと混合して腫瘍内に直接注入し、同種造血幹細胞移植と同種MHC遺伝子導入の複合療法の固形がんに対する有効性と安全性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト体細胞(がん組織)遺伝子発現・構造異常解析を行うが、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針が適用される生殖細胞系列の遺伝子多型・変異解析は含まれない。し

かし、同指針に準拠し、各施設における倫理審査委員会の審査と機関の長の承認を受けて実施した。また、動物実験については、国立がんセンター研究所動物実験倫理規定を遵守し、十分な動物愛護への配慮に基づき実施した。

### C. 研究結果

各研究項目毎に以下のとおり。①食道がん生検試料 33 検体に基づく遺伝子発現プロファイルから構築した CRT 後の予後予測の線形判別器の平均正解率は約 50%であった。腫瘍内血管密度を客観的に測定するための画像解析システムの作成を試み、これまで主観的であった生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。

②AML における t(8;21) 転座関連遺伝子と inv(16) 逆位関連遺伝子を同定し、造血幹細胞特異的遺伝子を含む多くの重複があることを見出した。さらに、AML1-MTG8 キメラ転写因子及び CBF $\beta$ -MYH11 キメラ転写因子を臍帯血由来の造血幹細胞に発現させたところ、下流標的遺伝子をかなり共有していることがわかった。さらに、少なくともその一つが造血幹細胞の自己複製を *in vitro* において促進することを示した。

③STR による検討では 9p、9q で 50%以上の症例に、1q、17p、11p、11q で 20%以上の症例に LOH を認めた。LOH の頻度は組織学的グレードの高い腫瘍や TUR 術後の再発例で高率であった。GeneChip による解析で新たに 5q、8q、11p、18q、10p 等に LOH が認められた。鋳型 DNA 量の減少に伴い、PCR-SSCP 法における対立遺伝子間のシグナルの比率の変動が認められた。

④CT26 細胞に対し、同種抗原である H-2K<sup>b</sup> 遺伝子導入単独では、限られた抗腫瘍効果しか得られなかったが、同種造血幹細胞移植を併用することにより、H-2K<sup>b</sup> 遺伝子導入後の皮下移植腫瘍の増殖は明らかに抑制された。さらに、腫瘍が縮小したマウスに CT26 細胞を再接種したところ、腫瘍の形成が拒絶されることがわかり、*in vivo* においても特異的抗腫瘍免疫が誘導されていること

が示された。一方、マウスの全身所見や血液生化学データからは GVHD の増悪は認めなかった。

### D. 考察

各研究項目毎に以下のとおり。①判別正解率 5割程度の原因として考えられるのは、長期生存群と早期死亡群の間での発現の違いが微妙であり、遺伝子の選択や予測を行うためには、これまでの解析のために得られたサンプルサイズが小さいすぎることである。そこで、新たなサンプル収集が必要であり、前向き臨床試験の研究計画を策定した。また、食道がん、早期頭頸部がんは現在放射線化学療法ならびに放射線治療を第一治療とする場合が多く、本研究で画像解析システムの開発に成功し、客観的に放射線感受性を治療前に予測する基盤ができた。今後、実際の症例の生検組織を用いて放射線化学療法感受性との関連の検討に進む。

②本研究から、t(8;21) 転座 AML と inv(16) 逆位 AML では同じ分子経路の活性化を通して白血病化していることが示唆される。また、共通下流遺伝子が造血幹細胞の自己複製を促進することは、その分子経路は白血病幹細胞の自己複製に関わっていることが考えられる。

③pTa Stage の表在性膀胱がんは約半数に再発を認め、その一部では膀胱摘出術が必要となる。本研究より、LOH が表在性膀胱がんの治療方針の決定の指標となりうる組織学的グレードや再発リスクに相関する可能性が示唆された。LOH 判定の際、一般に STR マーカーの解析で欠失アレル由来のシグナル減少の比率が 50%以下の場合には GeneChip による LOH の検出は困難であったが、従来の STR マーカーによる解析では見過ごされていた染色体欠失の精密な解析が可能となった。新たに見い出された欠失領域には表在性膀胱癌の発生と進展に関連する遺伝子異常が存在する可能性が考えられる。生検組織や尿等の臨床検体を用いて LOH を解析する場合、アレル間のシグナル比は PCR の際の鋳型 DNA 量に影響されることを示し、微量の DNA 溶液を希積分注する際に生じる不均一

性を確率分布論的に予測し、遺伝子検査の精度を向上させるシステムを考案した。LOH解析の場合、対立遺伝子のシグナル比で10%以上の差をLOHとして検出可能とする為には、核酸増幅反応の際には33ng (10<sup>4</sup>コピー)以上の鋳型DNAが必要であり、微量検体からのLOHの検出には鋳型DNAの量に応じた適切なCut-off値の設定が必要と考えられた。

#### E. 結論

①食道がん生検試料に対するマイクロアレイ解析から、放射線化学療法の前と後と関連する遺伝子群の存在が示唆された。しかし線形判別器による予知は十分な性能を発揮せず、新たな前向き臨床試験による試料等収集が必要であった。腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムを開発し、生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。②t(8;21)とinv(16)による白血病発症の分子経路として、同じ遺伝子を介した造血幹細胞の自己複製の活性化が働いている可能性を示した。③表在性膀胱がんにおけるLOHは再発リスクの推定に有用な指標と考えられた。尿、生検組織等の臨床検体由来の微量DNAに対する遺伝子検査を行う場合に、検査の精度を判定するためのシステムを考案した。④腫瘍内同種MHC遺伝子導入と同種造血幹細胞移植の複合により、GVHDを増悪することなく、相乗的抗腫瘍効果が得られることを明らかとした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

別添5の通り。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

PCT/JP2004/014452「癌治療用医薬」

PCT/JP2004/012330「癌転移阻害剤」

米国特許出願中(60/565,526)「膵がんに対するインターフェロン $\alpha$ 遺伝子治療」

特願 2004-139707「癌転移阻害剤」

特願 2004-168116「ヒトPERP(p53 apoptosis effector related to PMP-22)遺伝子によりコードされるポリペプチドに対するモノクローナル抗体、および該抗体を用いた各種疾患の治療および診断方法」

特願 2004-279214「核酸増幅分析法および装置」(2004.9.27)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

網羅的遺伝子発現解析を基盤とする食道がんの予知医療の確立を目指した基礎的及び臨床的研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部長

研究要旨 食道がん生検試料 33 例に対する約 12,600 個のプローブセットを持つオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析から、放射線化学療法の予後と関連する遺伝子群の存在が示唆された。しかし線形判別器による予知は十分な性能を発揮せず、試料数不足の可能性がある。そこで新たな前向き臨床試験の研究計画を策定した。

#### A. 研究目的

本研究では食道扁平上皮がんに対する根治的  
化学放射線療法（CRT）の効果を予測するため、  
治療前に内視鏡的に採取した腫瘍組織の遺伝子  
発現プロファイルと治療効果を照合し、CRT 感受  
性群と非感受性群が遺伝子発現により事前に区  
別可能か否かを検討する。

従来食道がんに対する治療は、外科的切除が主  
であったが、1990 年代から CRT の治療成績が前向  
き臨床試験で検討され、T4 以外の Stage II・III  
に関しては、外科的切除に匹敵する生存が期待で  
きることが示唆されている。例えば、国立がんセ  
ンター東病院において 1992 年～2002 年までに  
CRT を行った胸部食道扁平上皮がんの  
retrospective な検討では、T4 を除く Stage  
II/III は 149 例で、CR は 64%（93 例）であった。  
一方、CR 例と CR に至らない（non CR）での生存  
期間中央値はそれぞれ 2173 日（6.0 年）と 313 日  
（0.85 年）、3 年生存率は 66.5%と 7.8%であり、  
CR が得られた場合は長期生存が期待できるが、  
non CR での予後は厳しいことも示されている。

現時点では、切除可能病期の食道がんに対して  
は、主に施設の状況、主治医判断、患者の希望に  
より、治療法として外科的切除か CRT を選択して  
いるのが現状である。近年、治療前の生検組織を  
用いて、免疫組織学的な解析で感受性を規定する

因子の発現と治療効果の関連性を示す研究結果

も報告されてきているが、まだその臨床応用は発  
展途上である。近年、マイクロアレイによる網羅  
的遺伝子発現情報の捕捉が多くのがんの臨床病  
理学的特徴の予測に有用なことが示唆されてい  
る。本研究では、食道がんの治療選択において、  
腫瘍生検組織の遺伝子発現情報から CRT の奏効性  
を予測する判別器の開発を目指し、その有効性を  
検証、最終的に臨床検査として導入することを目  
的とする。

#### B. 研究方法

国立がんセンター東病院において 1994 年から  
1999 年までに CRT を受けた切除可能病期食道がん  
患者の内視鏡下生検材料の遺伝子発現プロファ  
イルデータに対して、放射線化学療法後の予後良  
好と不良の 2 群を判別する分類器の開発を目的  
として、Fisher 評価基準により選択した遺伝子  
を用いて生成される Fisher の線形判別式の評価を  
行った。対象は治療後 3 年以上の生存 18 症例（CRT  
治療効果が CR の症例）と治療後 1 年未満の生存  
15 症例（CRT の治療効果が non CR の症例）の合  
計 33 症例である。遺伝子発現プロファイルデー  
タはオリゴヌクレオチドマイクロアレイ  
Affymetrix GeneChip U95A による約 12,625 遺伝  
子の発現情報であり、scaling により全プローブ

の average difference の平均値を 1,000 に調整されている。

まず、全 33 サンプルから、任意の 1 サンプルを除いた 32 サンプルのデータセットについて、Fisher 評価基準の大きな 50 遺伝子を、線形判別式を構成する候補の遺伝子として選択した。すなわち、線形判別においてはクラス間平均/クラス間分散が大きくなるようにデータを変換し、判別を行うため、その線形判別式を構成するひとつひとつの遺伝子もまた、クラス間平均/クラス間分散が大きい方が望ましい、と考えられることによる。具体的には、リサンプリングによるブートストラップデータセットから、遺伝子毎のフィッシャー評価基準を求め上位 50 遺伝子を選択する、という操作を 10000 回繰り返し、最も出現頻度の高い 50 遺伝子を選択した。

次に、この 50 遺伝子から遺伝子をいくつか選択して、最適な線形判別式を構成する組み合わせ最適化問題において、総当りで計算を行って最適解を選ぶことは莫大な計算量が伴うため、遺伝的アルゴリズムを用いて、高い判別正解率をもつ線形判別式を構成した。

最後に、得られた線形判別式を用いて、最初の遺伝子選択の段階で除いておいた 1 サンプルを評価することを、全サンプルに渡って繰り返した (leave-one-out 法)。また、最初に取り除くサンプルを、長期生存群からランダムに 4 サンプル、早期死亡群からランダムに 4 サンプルの計 8 サンプルとし、これを 30 回繰り返すという方法でもあわせて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は体細胞 (がん組織) 遺伝子発現解析を含むが、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針が適用される生殖細胞系列の遺伝子多型・変異解析は含まれない。しかし、同指針に準拠し、国立がんセンターにおいて倫理審査委員会の審査と総長の承認を受けて実施した (国立がんセンター倫理審査承認第 13-10・「切除可能(T4 以外の StageII, III) 食道がん症例に対する放射線化

学療法の効果等と関連するがん組織における遺伝子発現の検索:retrospective study)。

### C. 研究結果

Leave-one-out 法による正解頻度は 33 回中 18 回であり、テストサンプル 8 サンプルにおける正解率の分布は、0/8 が 0、1/8 が 1、2/8 が 2、3/8 が 6、4/8 が 8、5/8 が 8、6/8 が 5、7/8 と 8/8 がともに 0 回であった。これらを平均正解率値にすると、それぞれ 0.55、0.52 となった。

### D. 考察

判別正解率 5 割程度と、ランダムに予測しているのと変わらない結果となった。このような結果となった原因として考えられるのは、長期生存群と早期死亡群の間での発現の違いが微妙であり、遺伝子の選択や予測を行うためには、これまでの解析のために得られたサンプルサイズが小さいすぎることである。検定によって遺伝子を選択することを考えた場合、チップの遺伝子数が約 10,000 なので、これらが全て独立だとして多重検定の Bonferroni 補正を適用するとカットオフの p 値は 0.000001 程度以下となるが、全遺伝子に対し U 検定を行って得られた p 値の分布では  $p < 0.0001$  に 2 つの遺伝子が認められるにとどまる。今回選択された Fisher 評価基準上位 50 遺伝子の p 値も、ほぼ 0.0001 から 0.01 の間に分布している。p 値はサンプル数を増やすと小さくなっていくので、今回の結果はただちにこれらの遺伝子が、2 群間で差がないと結論されるわけではなく、差を検出するのに十分なサンプル数が得られていない(あるいはこのサンプル数では検出できない差である)とも考えられる。そこで、新たなサンプル収集が必要であり、前向き臨床試験の研究計画を策定した。

### E. 結論

食道がん生検試料 33 例に対する約 12,600 個のプローブセットを持つオリゴヌクレオチドマイ

クロアレイ解析から、放射線化学療法の予後と関連する遺伝子群の存在が示唆された。しかし線形判別器による予知は十分な性能を発揮せず、試料数不足の可能性がある。新たな前向き臨床試験による試料等収集が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada M, Sasaki H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritonea washings. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4):913-917.

Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Katori N, Jinno H, Hasegawa R, Kaniwa N, Sawada J, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Kitamura Y, Kamatani N, Minami H, Ohtsu A, Shirao K, Yoshida T, Saijo N. UGT1A1 Haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese cancer patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 75:501-15.

Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, Shiseki K, Saeki M, Nakamura T, Kurose K, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Hanai S, Nakajima T, Matsumoto K, Saito H, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Minami N, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, and Sawada J. Haplotypes of CYP3A4 and Their Close Linkage With CYP3A5 Haplotypes in a Japanese Population. *Human Mutation*. Mutation in brief. #681 online 2004.

Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2:147-56.

Sugano K, Yoshida T, Izumi H, Umezawa S, Ushiyama M, Ichikawa A, Hidaka A, Murakami Y, Kodama T, Suzuki S, and Kaneko A. Outpatient clinic for genetic counseling and gene testing of retinoblastoma. *Int Clin Oncol*, 2004, 9:25-30.

Kuwahara Y, Tanabe C, Ikeuchi T, Aoyagi K, Nishigaki M, Sakamoto H, Hoshinaga K, Yoshida T, Sasaki H, and Terada M. Alternative mechanisms of gene amplification

in human cancers. *Genes, Chrom & Cancer*, 2004, 41:125-132.

Murakami Y, Okamura H, Sugano K, Yoshida T, Kazuma K, Akechi T, and Uchitomi Y. Psychologic distress after disclosure of genetic test results regarding hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. A preliminary report. *Cancer*, 2004, 101:395-403.

Aoki K, Ohnami S, and Yoshida T. Suppression of Pancreatic and Colon Cancer Cells by Antisense K-ras RNA Expression Vectors. In: *Methods in Mol Med, Antisense Therapeutics*, 2nd ed., ed. Phillips MI, Human Press, p.193-204, 2004.

Fukushima-Uesaka H, Sai K, Maekawa K, Koyano S, Kaniwa N, Ozawa S, Kawamoto M, Kamatani N, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Minami H, Ohtsu A, Shirao K, Yoshida T, Saijo N, Saito Y, and Sawada J. Genetic variation of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population. *Drug Metabol Pharmacokin*, 2004, SNP26 (320)-SNP32 (326).

Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Yoshida T and Yoshimura K. Designing a multistage, SNP-based, genome screen for common diseases. *J Hum Genetics*, 2004, 49:669-676.

Hichiya H, Tanaka-Kagawa T, Soyama A, Jinno H, Koyano S, Katori N, Matsushima E, Uchiyama S, Tokunaga H, Kimura H, Minami N, Katoh M, Sugai K, Goto Y, Tamura T, Yamamoto N, Ohe Y, Kunitoh H, Nokihara H, Yoshida T, Minami H, Saijo N, Ando M, Ozawa S, Saito Y and Sawada J. Functional Characterization of Five Novel CYP2C8 Variants, G171S, R186X, R186G, K247R and K383N, found in a Japanese population. *Drug Metabolism and Disposition*, in press.

Liu Y, Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnami S, Ohnami S, Kohno T, Yoshida T, Sakamoto H, Sobue T, Tsugane S. Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes: data from random population-based Japanese samples. *J Hum Genet* 50:62-68, 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

分子情報に基づく組織画像解析を基盤とする食道・頭頸部扁平上皮がんの予知医療の確立を目指した基礎的及び臨床的研究

分担研究者 落合淳志 国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部長

研究要旨 組織画像解析を用いた食道がん・頭頸部がんの放射線感受性予知を生検組織で行うために、本年度は、腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムの作成を試み、これまで主観的であった生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。

A. 研究目的

食道がん、早期頭頸部がんは現在放射線化学療法ならびに放射線治療を第一治療とする場合が多く、放射線治療への感受性を治療前生検組織で判断することは予知医療の確立には必須と考えられる。組織画像解析を用いた食道がん・頭頸部がんの放射線感受性予知を生検組織で行うために、腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムを作成した。

B. 研究方法

本年度は、画像解析システム（KS3000）を用いてCD31抗体により染色された組織内の血管を認識することにより、1）血管から150ミクロン以内に存在する組織を酸素化されている組織と判断し、全腫瘍組織中の酸素化腫瘍組織の割合の測定（Oxygenated area: OA）、2）全腫瘍組織内の血管周囲径の総和（Total perimeter/tumor area: TP/TA）、3）顕微鏡下200倍視野面積における腫瘍内血管数の最も多い値（compute MVD）、のための画像解析プログラムを作成した。この画像解析システムにより、これまで主観的であった生検組織を用いた腫瘍血管の画像解析システムを客観化することに成功した。

（倫理面への配慮）

ヒト生検組織を用いた検討であり、国立がんセンター倫理指針に準じ、患者情報の保護に十分な注意を払い研究を行った。特に今年度は画像解析システムの作成が研究の主体であるために実際のヒト切除材料はこれまでに既に匿名化され過去に腫瘍血管密度について検討された症例を用いて検討を行っており、個人情報には注意を払っている。

C. 研究結果

本年度は、腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムの作成を試み、これまで主観的であった生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。

a) 研究により得られた成果の今後の活用・提供  
食道がん、早期頭頸部がんは現在放射線化学療法ならびに放射線治療を第一治療とする場合が多く、放射線治療への感受性を治療前生検組織で判断することは予知医療の確立には必須と考えられる。今年度の結果として画像解析システムができたことにより、客観的に生検組織における放射線感受性を検索可能になったと考えられ、今後、実際の症例の生検組織を用いて放射線化学療法感受性との相関を検討する予定である。

b) 研究の実施経過

組織画像解析を用いた食道がん・頭頸部がんの放射線感受性予知を生検組織で行うために、腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムを作成し、評価した。本年度作成したシステムは、組織内の血管をCD31抗体により染色し、画像解析装置KS3000システムにより自動的に認識することにより、1)血管から150ミクロン以内に存在する組織を酸素化されている組織と判断し、全腫瘍組織中の酸素化腫瘍組織の割合の測定(Oxygenated area: OA)、2)全腫瘍組織内の血管周囲径の総和(Total perimeter/tumor area: TP/TA)、3)顕微鏡下200倍視野面積における腫瘍内血管数の最も多い値(compute MVD)、のための画像解析プログラムを作成した。この画像解析システムにより、これまで主観的であった生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。

#### D. 考察

食道がん、早期頭頸部がんは現在放射線化学療法ならびに放射線治療を第一治療とする場合が多く、放射線治療への感受性を治療前生検組織で判断することは予知医療の確立には必須であり、今年度の結果として画像解析システムができたことにより、客観的に生検組織における放射線感受性を検索可能になったと考えられ、今後、実際の症例の生検組織を用いて放射線化学療法感受性との相関を検討する予定である。

#### E. 結論

腫瘍内血管密を客観的に測定するための画像解析システムの作成を試み、これまで主観的であった生検組織を用いた画像解析システムを客観化することに成功した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 別添5のとおり。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

国際出願

国際出願番号：PCT/JP2004/014452

発明の名称：癌治療用医薬

発明者：国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部 落合 淳志、協和発酵工業株式会社 日下 英昭、秋山 忠和

国際出願番号：PCT/JP2004/012330

発明の名称：癌転移阻害剤

発明者：国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部 落合 淳志、協和発酵工業株式会社 設楽 研也、中村 和靖、大木 祐二

国内出願

出願番号：特願 2004-139707

発明の名称：癌転移阻害剤

発明者：国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部 落合 淳志、協和発酵工業株式会社 設楽 研也、中村 和靖、大木 祐二

出願番号：特願 2004-168116

発明の名称：ヒトPERP(p53 apoptosis effector related to PMP-22)遺伝子によりコードされるポリペプチドに対するモノクローナル抗体、および該抗体を用いた各種疾患の治療および診断方法

発明者：国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部 落合 淳志、協和発酵工業株式会社 関根 進、太田 紀夫、設楽 研也、加藤 容子、白石 紀彦、古谷 安希子

##### 2. 実用新案登録

無し。

##### 3. その他

なし

遺伝子発現データを基にした白血病等の発症・悪性化に関わる分子経路の同定と臨床応用の研究

分担研究者 市川 仁 国立がんセンター研究所 腫瘍発現解析プロジェクトリーダー

研究要旨 今年度は、急性骨髄性白血病（AML）の主要な染色体異常である t(8;21)転座と inv(16)逆位に注目した。AML 臨床検体の遺伝子発現データを用いてこれらの染色体異常を有する症例に特異的な発現パターンを示す遺伝子を同定するとともに、これらの染色体異常の産物である AML1-MTG8 及び CBF $\alpha$ -MYH11 キメラ転写因子によって制御を受ける下流標的遺伝子を同定した。その結果、これらの染色体異常が AML 発症において共通の分子経路に働き、白血病幹細胞の自己複製を活性化することが示唆された。

#### A. 研究目的

本研究は、急性骨髄性白血病（AML）の治療向上のため、臨床検体の網羅的遺伝子発現情報から AML の発症・悪性化に働く分子経路を明らかにし、その知見を基に個々の症例に最も適した治療法を選択できる遺伝子診断法の開発を行うこと、新たな治療標的分子・分子経路を同定することを目的としている。

#### B. 研究方法

まず、既已取得している 54 症例の小児 AML 検体の約 12,000 遺伝子の発現データ及び新たに解析する数十症例の約 47,000 の転写産物の発現データから、染色体異常関連遺伝子及び予後関連遺伝子を統計学的手法により抽出する。次に、データベース検索等により機能予測を行うとともに、主要な遺伝子について、白血病細胞株での過剰発現、RNAi による発現抑制等を用いて機能解析を行う。増殖、分化等に働き、機能的に重要だと判断された遺伝子については、マウスモデルを用いて白血病発症・悪性化への寄与を評価するとともに、遺伝子診断の有用性と治療標的としての可能性の検討を行う。

（倫理面への配慮）

AML 臨床検体の解析は、国立がんセンター倫理審査委員会の承認の下、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行う。

#### C. 研究成果

今年度は、54 症例の小児 AML 検体の遺伝子発現解析データを用いて t(8;21)転座関連遺伝子と inv(16)逆位関連遺伝子を同定し、これらの遺伝子の間には造血幹細胞特異的遺伝子を含む多くの重複があることを見出した。次に、臍帯血由来の造血幹細胞に、t(8;21)転座の結果生ずる AML1-MTG8 キメラ転写因子及び inv(16)逆位の結果生ずる CBF $\alpha$ -MYH11 キメラ転写因子を発現させ、下流標的遺伝子の解析を行った。その結果、これら二つのキメラ転写因子がともに、t(8;21)転座関連遺伝子、inv(16)逆位関連遺伝子の多くを含むほぼ同じ遺伝子に作用することを明らかにした。さらに、少なくともその一つが造血幹細胞の自己複製を in vitro において促進することを示した。

#### D. 考察

t(8;21)転座 AML と inv(16)逆位 AML において共通の遺伝子発現パターンがあり、造血幹細胞にお

いては AML1-MTG8 キメラ転写因子と CBF $\beta$ -MYH11 キメラ転写因子が同じ下流標的遺伝子に作用するという事は、これら二つの染色体異常が白血病発症において同じ分子経路を活性化していることを示唆している。また、共通下流遺伝子が造血幹細胞の自己複製を促進することは、その分子経路は白血病幹細胞の自己複製に働いていることが予想される。

#### E. 結論

t(8;21)と inv(16)による白血病発症の分子経路として、同じ遺伝子を介した造血幹細胞の自己複製の活性化が働いている可能性を示した。今後、この分子経路の白血病発症における重要性及び治療標的としての有用性等についてさらに検討する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

S. Inoue, et al.: J. Biol. Chem. 279, 38701-38709 (2004).

##### 2. 学会発表

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

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

遺伝情報に基づく発がん高危険度群捕捉とその臨床応用

分担研究者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所副主幹・医長・特別研究員

研究要旨 pTa Stage の表在性膀胱がん 32 例を対象に常染色体上の 101 ケ所の Locus について allelotyping を行った。膀胱癌で高率に報告されている 9p あるいは 9q のヘテロ接合性の消失は pTa Stage でも 50-60%の症例で認められた。その他に 20%以上の症例で欠失が認められた領域として 1q, 17p, 11p, 11q 等が挙げられる。GeneChip による解析を併用することにより、さらに像度の解析が可能であり、従来法で見逃されていた限局した領域の欠失が検出可能であった。index は Histological Grade と相関し、FAL index 7%以上の症例では再発は有意に高率であった。尿や生検組織から得られた微量の DNA から欠失を検出する場合に、鋳型 DNA 濃度が LOH 検出に影響を与えることを見出し、鋳型 DNA 濃度から検査の精度を予測するシステムを開発した。

A. 研究目的

本研究では各種固形腫瘍を対象として、がんの易罹患性や悪性度に関連した遺伝子異常を明らかにし、遺伝子診断の臨床応用に役立つ遺伝子解析技術を開発する事を目的とする。本年度は pTa Stage の表在性膀胱癌を対象として Allelotyping を行い、比較的早期の膀胱癌における染色体欠失の解析および膀胱癌再発のリスクとの関連を検討した。また、尿あるいは生検組織等から得られた微量の DNA 試料からのヘテロ接合性の消失 (LOH) を解析する場合に精度向上に必要な技術的問題について検討した。

B. 研究方法

1) pTa Stage の表在性膀胱癌 32 例を対象として、short tandem repeat (STR) marker および single nucleotide polymorphism (SNP) marker を用いて 1-22 番染色体上の 101 ケ所の多型部位について LOH を解析した。informative な locus を含む arm の本数に対する欠失を認めた arm の本数の比率を fractional allelic loss (FAL) index として計算した。

2) Allelotyping を施行した表在性膀胱癌 32 例の

うち、腫瘍細胞が比較的豊富に含まれていると考えられる 15 例を対象に GeneChip (GeneChip Human Mapping 10K Array : Affymetrix 社) を用いて約 11000 個の SNP による LOH の解析を行った。

3) LOH 検出の際に、PCR に用いる鋳型 DNA のコピー数を変化させた場合に生じる対立遺伝子のシグナル比の変化を解析した。正常ヒトリンパ球由来のゲノム DNA を 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l (3 $\times$ 10<sup>4</sup> copy) から 0.0001  $\mu$ g/ $\mu$ l (30 copy) まで系列希釈し、これを鋳型として 9 番染色体長腕に存在する STR marker である D9S303 と SNP である ALDOB について n=8 として PCR を施行した。マルチアレーキャピラリー電気泳動を使用した SSCP 法により PCR 産物を泳動し、対立遺伝子間のシグナルの比率を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究の内容がヒトゲノム・遺伝子解析研究に關与すると考えられる場合には、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』を遵守して行われる。体細胞変異についての解析は過去に遺伝子解析を目的として収集された DNA を使用して行う場合、検体はコード化された試料として取り扱われる。遺伝子解析のために新たな検体の採取が必

要な場合には、施設倫理委員会の承認した研究計画に基づき、被験者に対する説明と同意を得た後に行なわれる。

### C. 研究結果

1) STRによる検討では9p、9qで50%以上の症例にLOHが認められた。その他のLocusでは1q、17p、11p、11qで20%以上の症例にLOHが認められた。FAL indexをHistological Grade別に比較したところ、Grade 1(n=11), 0.04, Grade 2(n=15), 0.17, Grade 3 (n=6), 0.30となり、FAL indexはHistological Gradeの高い腫瘍で有意に高値を示した(p<0.0001)。また、TUR術後の膀胱癌再発はFAL index7%以上の症例では有意に高率であった(p=0.0048)。

2) GeneChipによる解析では11561ヶ所のSNPのうち、ヘテロ接合性が認められたものは平均3260 locus (28.2%)であった。STRによる解析でRetainと判定されたLocusの99.2%がGeneChipでもRetainと判定された。一方、STRでLOHと判定されたLocusのうちGeneChipでLOHと判定されたものは58.8%、全体での一致率は88.2%であった。STRとGeneChipの解析の結果が一致しなかったLocusでは、STRによる解析で欠失しているアレル由来のシグナルの減少の度合いが軽度である傾向が認められた。GeneChipによる解析で新たにLOHが認められた領域として5q、8q、11p、18q、10p等が挙げられる。また9p、9q等の広範な領域にLOHを認めたにも関わらず、9p21の領域が保持されていたことから、p16遺伝子を含む領域のホモ欠失が示唆される1例を認めた。

GeneChipとSTRを併用することにより、LOH検出の解像度を向上させることが可能であった。

3) 正常リンパ球由来のゲノムDNAを系列希釈し、D9S303およびALDOBの二種類の多型マーカーについて対立遺伝子間のシグナルの比率を定量した。鋳型DNA量を0.1 $\mu$ g (3 $\times$ 10<sup>4</sup> copy)から

0.0001 $\mu$ g (30 copy)まで変化させた場合の希釈系列について、n=8としてCV値を求めた。D9S303およびALDOBのCV値は鋳型DNA量が0.01 $\mu$ g (3 $\times$ 10<sup>3</sup> copy)の場合にはそれぞれ3.8%および3.0%であったのに対して、0.001 $\mu$ g (300 copy)では9.3%および10.1%、0.0001 $\mu$ g (30 copy)では28.2%および28.8%となり、鋳型DNA量の減少に伴い、対立遺伝子間のシグナルの比率の変動が認められた。

### D. 考察

pTa Stageの表在性膀胱癌は経尿道的腫瘍切除術(TUR-BT)で治療が可能であるが、約半数に再発を認め、その一部は浸潤性膀胱癌に進展し膀胱摘出術が必要となる。従って、表在性膀胱癌の治療方針の決定には再発と浸潤性膀胱癌への進展のリスクの推定が重要である。今回の研究では、pTa Stageの表在性膀胱癌32例を対象にAllelotypingを行った。9番染色体の欠失は膀胱癌において高頻度に報告されている異常であるが、pTa Stageの膀胱癌においても50-60%の症例で認められた。FAL indexはHistological Gradeと有意な相関を示し、FAL index 7%以上の症例では再発が有意に高率であることが明らかとなった。STR markerによる解析でLOHと判定されたLocusのうち、GeneChipによる解析でLOHと判定されたものは58.8%であった。これはLOH判定の際のGeneChipの検出感度の違いによるものと考えられ、一般にSTR markerの解析で欠失アレル由来のシグナル減少の比率が50%以下の場合にはGeneChipによるLOHの検出は困難であった。STR markerによる解析で各染色体座位の対立遺伝子間のシグナルの減少の比率を定量的に把握しておくことがGeneChipによるLOHの判定に重要と考えられた。GeneChipによる解析では11561ヶ所のSNPのうち、3260 locus (28.2%)がヘテロ接合であり、常染色体上のInformativeなSNP間の距離は平均750kbと考えられる。今回の解析により、従来のSTRマーカーによる解析では見過ごされて

いた染色体欠失の精密な解析が可能となった。新たに見いだされた欠失領域には表在性膀胱癌の発生と進展に関連する遺伝子異常が存在する可能性が考えられ、今後も検討を続けていく予定である。生検組織や尿等の臨床検体を用いて LOH を解析する場合、対立遺伝子の比率の正確な定量が困難な場合がある。このような LOH 測定の際に生じるアレル間のシグナルの変動は PCR の際の鋳型 DNA 量に影響されることが明らかとなった。微量の DNA 溶液を希釈分注する際に生じる不均一性を確率分布論的に予測し、遺伝子検査の精度を向上させるシステムを考案した。LOH 解析の場合、対立遺伝子のシグナル比で 10%以上の差を LOH として検出可能とする為には、核酸増幅反応の際には 33ng (104 copy) 以上の鋳型 DNA が必要と考えられ、微量検体からの LOH の検出には鋳型 DNA の量に応じた適切な Cut-off 値の設定が必要と考えられた。

#### E. 結論

pTa Stage の表在性膀胱癌における Allelotyping と FAL index の測定は再発リスクの推定に有用な指標と考えられた。GeneChip による解析で LOH の詳細な検出が可能であった。尿、生検組織等の臨床検体からの LOH 解析を行う場合には、十分な量の鋳型 DNA が必要であると考えられ、微量の検体から遺伝子検査を行う場合に、検査の精度を判定するためのシステムを考案した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyakura, Y., Sugano, K., et al., Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2: 147-56, 2004.

Murakami, Y., Sugano, K., et al., Psychologic distress after disclosure of genetic test results regarding hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer*,

101: 395-403, 2004.

Maekawa, M., Sugano, K., et al., Methylation of mitochondrial DNA is not a useful marker for cancer detection. *Clin Chem*, 50: 1480-1, 2004.

Maekawa, M., Sugano, K., et al., Three-dimensional microarray compared with PCR single-strand conformation polymorphism analysis / DNA sequencing for mutation analysis of K-ras codons 12 and 13. *Clin Chem*, 50: 1322-7, 2004.

Yanagihara, K., Sugano, K., et al., Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Sci*, 95: 575-82, 2004.

Tomita, N., Sugano, K., et al., The novel germline mutation of the hMLH1 gene in a case of suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) in a patient with family history of cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 34: 556-560, 2004.

Ozawa, S., Sugano, K., et al., High resolution for single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 76: 6122-9, 2004.

Banno, K., Sugano, K., et al., Met688Ile and Leu390Phe of the MSH2 gene are not functional mutations, but polymorphisms in Japanese individuals. *Cancer Genet Cytogenet*, 155: 92, 2004.

#### 2. 学会発表

菅野康吉: シンポジウム 癌検診の方法論-エビデンスと展望「癌検診と遺伝子診断(腫瘍マーカー)」日本総合健診医学会第32回大会 平成16年1月30日(東京)

菅野康吉: リサーチレビュー「遺伝(子)情報-何がどこまでわかるのか-」家族性腫瘍としての子宮体癌 分子遺伝学的側面から 第56回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 平成16年4月10日(東京)

菅野康吉: 癌の遺伝 第32回遺伝カウンセリングセミナー 2004年8月20日(東京)

菅野康吉、宮倉安幸: シンポジウム がんのエピジェネティクス: 分子機構と診断・治療への応用 マイクロサテライト不安定性陽性大腸癌における MLH1 遺伝子プロモーター領域のメチル化 2004年10月1日(金) 第63回日本癌学会学術総会(福岡)

菅野康吉: 遺伝性腫瘍の遺伝カウンセリングと遺伝子診断 第524回日本小児科学会東京都地方会講話会 2004年10月23日(東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特願 2004-279214 核酸増幅分析法および装置 (2004.9.27)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

固形がんに対する免疫遺伝子・細胞複合療法の臨床導入を実現する研究

分担研究者 青木一教 国立がんセンター研究所 がん宿主免疫研究室長

研究要旨 固形がんの多くの症例が免疫治療に抵抗性である理由として、固形がんの系は、宿主の免疫系に対して被認識性が悪い、免疫寛容が成立しているなどが考えられる。そこで、同種主要組織適合抗原遺伝子の腫瘍への導入による抗原性の強化と、新し細胞免疫療法として期待されている同種造血幹細胞移植とを併用して、ドナー免疫系による腫瘍効果をもつ免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を行う。平成16年度には、本複合の臨床導入に必要な前臨床研究として、マウス造血幹細胞移植モデルを用いて、複合療より相乗的抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。

A. 研究目的

固形がんに対する免疫治療として、同種主要組織適合抗原 (major histocompatibility antigen: MHC) やサイトカイン遺伝子を腫瘍に導入することにより、宿主免疫系による腫瘍抗原等の認識を強化させる遺伝子治療の臨床開発が進んでいる。中でも、同種 MHC 遺伝子を腫瘍局所に導入・発現させて、細胞障害性 T 細胞 (CTL) による拒絶反応を誘導、併せて局所での腫瘍抗原の認識を促進する遺伝子治療は、臨床第Ⅲ相試験 (悪性黒色腫) まで進んでいる数少ない遺伝子治療戦略である。しかし固形がんにおいては、局所での免疫寛容のために、臨床上有効な抗腫瘍免疫反応の誘導に至らないことが多い。そこで、本研究では、このような免疫治療抵抗性の機序を打破する戦略として、同種造血幹細胞移植を併用してドナー免疫系による抗腫瘍効果をもつ免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を目的とし、本年度は、その臨床導入に必要な、前臨床研究を行った。近年進歩著しい遺伝子導入・発現制御などの生命科学技術を、より優れたがん診療の実現に結びつけることは、最先端の厚労科学の重要課題であると考えられる。

B. 研究方法

まず、共通の MHC (H-2<sup>d</sup>) を有するが、マイナー組織適合抗原が異なる DBA/2 マウスをドナー、BALB/c マウスをレシピエントとする造血幹細胞移植モデルを確立した。具体的には、DBA/2 マウス由来の骨髓細胞 ( $5 \times 10^6$ ) と T 細胞 ( $1-2 \times 10^6$ ) を混合して、致死量の放射線 (9Gy) を照射した BALB/c マウスに静脈内注射を行うものである。この移植モデルにおいては、移植片対宿主反応 (Graft versus host disease: GVHD) が出現するとともに、レシピエントと同系の CT26 大腸がん細胞や Renca 腎がん細胞の皮下移植腫瘍に対して、移植片対腫瘍効果 (Graft versus tumor: GVT) が認められ、造血幹細胞移植後のヒト臨床像と類似していることが確認された。この移植モデルを用いて、CT26 細胞を皮下接種後、同種 MHC class I 抗原である H-2K<sup>b</sup> 発現プラスミドをリポソーム (DMRIE/DOPE) と混合して腫瘍内に直接注入し、同種造血幹細胞移植と同種 MHC 遺伝子導入の複合療法の固形がんに対する有効性と安全性を検証した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター研究所の動物実験倫理規定に基づいて、動物実験を行った。動物愛護に配慮して、研究の目的に必要な十分な動物数のみを実験に

用い、実験終了後は速やかに苦痛軽減の措置をとった。

### C. 研究結果

CT26 細胞は *in vivo* での造腫瘍性が強いために、H-2K<sup>b</sup> 遺伝子導入単独では、限られた抗腫瘍効果しか得られない。しかし、骨髄細胞及び成熟 T 細胞を用いた同種造血幹細胞移植を併用することにより、H-2K<sup>b</sup> 遺伝子導入後の皮下移植腫瘍の増殖は明らかに抑制され、また、T 細胞を除去した骨髄細胞のみを移植した場合にも、同様の皮下腫瘍の増殖抑制効果が認められた。一方、マウスの全身所見（体重減少、活動性、姿勢、体毛、皮膚）や血液生化学データ（AST, ALT, ALP 等）を検討したところ、治療マウスにおいては、GVHD の増悪は認められなかった。*In vitro* 細胞障害活性試験では、H-2K<sup>b</sup> 遺伝子導入群において、CT26 細胞特異的 CTL が誘導されていることが確認され、さらに、腫瘍が縮小したマウスに CT26 細胞を再接種したところ、腫瘍の形成が拒絶されることがわかり、*in vivo* においても特異的抗腫瘍免疫が誘導されていることが示された。このように、動物実験において、腫瘍内同種 MHC 遺伝子導入と同種造血幹細胞移植の併用により、相乗的抗腫瘍効果が認められることを明らかとした。

### D. 考察

本年度の研究成果として、同種 MHC 遺伝子導入と同種造血幹細胞移植の複合療法の抗腫瘍効果と安全性を明らかとすることができた。T 細胞除去した骨髄細胞を移植したマウスにおいても、同等の抗腫瘍効果が認められてことは、移植された成熟 T 細胞に加えて、造血幹細胞由来の T 細胞も、抗腫瘍効果を担うエフェクターとして重要な役割を持っているものと考えられた。今後は、本複合療法の有用性をさらに明らかとするために、担がんモデル等の実際の臨床病態に即した動物モデルにおける抗腫瘍効果の検討、移植腫瘍内でのサイトカインの発現の変化等を解析による抗腫

瘍効果のメカニズムの検討、同種 MHC 発現ベクターを用いて preimmunization を行うなど抗腫瘍効果を増強する試み、を行う。また、この免疫遺伝子治療においては、局所での導入遺伝子の発現誘導等の反応が重要であると考えられるので、腫瘍細胞に生体内で高効率に遺伝子導入を標的できるベクターの開発も併せて行う。

### E. 結論

腫瘍内同種 MHC 遺伝子導入と同種造血幹細胞移植の複合により、GVHD を増悪することなく、相乗的抗腫瘍効果が得られることを明らかとした。今後、標準的治療に抵抗性を示す固形がんに対して、最終的な本複合療法の臨床応用を目指し、段階的な臨床試験のプロトコールを作成する予定である。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

K. Hatanaka, K. Suzuki, K. Yohisda, Y. Miura, S. Ohnami, Y. Kitade, T. Yoshida, K. Aoki. Interferon  $\alpha$  and antisense K-ras combination gene therapy against pancreatic cancer. *J. Gene Med.* 6: 1139-1148, 2004.

A. Yamane, T. Kohno, K. Ito, N. Sunaga, K. Aoki, K. Yoshimura, H. Murakami, Y. Nojima, J. Yokota. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell *in vivo*. *Carcinogenesis* 25: 1689-1694, 2004.

T. Yoshida, S. Ohnami, K. Aoki. Development of gene therapy to target pancreatic cancer. *Cancer Science* 95: 283-289, 2004.

T. Okusaka, Y. Matsumura, K. Aoki. New approach for pancreatic cancer in Japan. *Cancer Chemothor Pharmacol* 54 (Suppl 1): S78-82, 2004.

Y. Miura, S. Ohnami, M. Ohashi, M. Nakano, K. Yoshida, S. Ohnami, M. Fukuhara, K. Yanagi, A. Matsushita, E. Uchida, T. Yoshida, K. Aoki. Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. *Cancer Letters* 218; 53-62, 2005.

K. Aoki, S. Ohnami, T. Yoshida. Suppression of

pancreatic and colon cancer cells by antisense K-ras RNA expression vectors. In: Antisense Therapeutics, 2nd edition, Humana Press, 2004.

## 2. 学会発表

Kazunori Aoki, Kazuteru Hatanaka, Koichi Suzuki, Yoshiaki Miura, Kimiko Yoshida, Shumpei Ohnami, Yukio Kitade, Teruhiko Yoshida. Interferon  $\alpha$  and antisense K-ras RNA combination gene therapy against pancreatic cancer. The 10th Annual Meeting, The Japan Society of Gene Therapy.

Kazunori Aoki, Masaki Ohashi, Yoshiaki Miura, Kimiko Yoshida, Shumpei Ohnami, Yukio Kitade, Teruhiko Yoshida. Intratumoral adenovirus-mediated interferon alpha gene transfer induces regional direct cytotoxicity and possible systemic immunity against pancreatic cancer. The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting.

三浦慶昭、畑中一映、大橋昌記、吉田貴三子、大浪俊平、吉田輝彦、浅香正博、青木一教、キャプシド蛋白質改変アデノウイルス・ライブラリーを用いた、がん特異的アデノウイルスベクターの開発、第63回日本癌学会学術総会

青木一教、吉田貴三子、大橋昌記、三浦慶昭、池田智美、大浪俊平、吉田輝彦、膵がんに対するインターフェロン $\alpha$ 遺伝子導入は、直接的細胞障害効果と免疫学的抗腫瘍効果を誘導する、第63回日本癌学会学術総会

大橋昌記、池田智美、三浦慶昭、吉田貴三子、万代昌紀、吉田輝彦、青木一教、固形がんに対するアロ同種主要組織適合抗原遺伝子導入の抗腫瘍効果、第63回日本癌学会学術総会

吉田貴三子、大浪俊平、三浦慶昭、大橋昌記、中野雅、内田英二、吉田輝彦、青木一教、アンチセンス K-ras RNA 発現アデノウイルスの腹腔内投与による、膵がん腹膜播種抑制、第63回日本癌学会学術総会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

米国特許出願中(60/565,526)

「膵がんに対するインターフェロン $\alpha$ 遺伝子治療」

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## ○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mori K, Yoshida T, et al.	Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritonea washings	Biochem Biophys Res Commun	313	913-917	2004
Sai K, Yoshida T, et al.	UGT1A1 Haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese cancer patients.	Clinical Pharmacology and Therapeutics	75	501-515	2004
Fukushima-Uesaka H, Yoshida T, et al.	Haplotypes of CYP3A4 and Their Close Linkage With CYP3A5 Haplotypes in a Japanese Population	Human Mutation. Mutation in brief	#681	On line	2004
Miyakura Y, Yoshida T, et al.	Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability.	Clin Gastroenterol Hepatol	2	147-156	2004
Kuwahara Y, Yoshida T, et al.	Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers.	Genes, Chrom & Cancer,	41	125-132	2004
Fukushima-Uesaka H, Yoshida T, et al.	Genetic variation of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population.	Drug Metabol Pharmacokin	SNP	26(320)-32(326)	2004
Sato Y, Yoshida T, et al.	Designing a multistage, SNP-based, genome screen for common diseases.	J Human Genet	49	669-676	2004
Hichiya H, Yoshida T, et al.	Functional Characterization of Five Novel CYP2C8 Variants, G171S, R186X, R186G, K247R and K383N, found in a Japanese population.	Drug Metabolism and Disposition		In press	2005
Liu Y, Yoshida T, et al.	Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes: data from random population-based Japanese samples.	J Human Genet	50	62-68	2005
Yoshikawa, T., Ochiai, A., et al.	Topographical distribution of allelic loss in lung adenocarcinomas with lymph node metastases.	Mod. Pathol	17	204-213	2004