

200400449A

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

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田哲司

平成17（2005）年 4月

別紙 1

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

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田哲司

平成 17 (2005) 年 4 月

別紙 2

I. 総括研究報告書

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発	1
山田哲司	

II. 分担報告書

1. SELDI-MS 法による新規腫瘍マーカーの探索	5
山田哲司	
2. 体液診断への応用を目指した腫瘍のバイオマーカーの開発に	10
関する研究	
前川真人	
3. α 1,4- <i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を	16
ターゲットとした膵癌分子診断法の開発	
中山 淳	
4. 悪性腫瘍において異常を来している血清タンパク質の網羅的解析	21
近藤 格	
5. 膵癌のペプチド性腫瘍マーカーの開発に関する研究	24
佐々木一樹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

別紙 3

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）

「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」班

総括研究報告書

主任研究者 山田哲司

国立がんセンター研究所化学療法部部長

腫瘍プロテオミクスプロジェクトリーダー

研究要旨

下記の1から4のアプローチにて難治性の高い膵がんを中心として新規腫瘍マーカーの検索を行った。

- 1) プロテオーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発
- 2) 糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発
- 3) がん特有の遺伝子 alternative splicing の検出
- 4) がん特有のメチル化 DNA の検出

A. 研究の目的

肺がん、スキルス胃がん、膵がん等の難治がんでは、進行症例の治療は現在利用可能な医療技術では著しく困難であり、高感度な検出方法を用いて微小のがんを発見し、早期に治療を開始することにより、予後の改善を求める必要がある。Computerized tomography (CT) や positron emission tomography (PET) などの画像診断を利用した検診も考えられるが、設置に高額な経費がかかり、また放射線被曝の問題も指摘されており、全国規模で均一に行うには問題点が多い。

本研究はこのような近年急速に進歩したバイオテクノロジーの先端技術を応用し、従来の概念とは全く異なる腫瘍マーカーを開発しがん検診に応用する事で、難治がんの早期発見に

よる治療成績の向上をさせることを目的としている。

B. 研究方法

下記の1から4のアプローチにて難治性の高い膵がんを中心として新規腫瘍マーカーの検索を行った。

1. プロテオーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発
2. 糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発
3. がん特有の遺伝子 alternative splicing の検出
4. がん特有のメチル化DNAの検出
(倫理面への配慮)

ヒト試料を研究に使用する際には、「臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)等の指針に沿って計画を作成し、研究計画は事

前に各施設の倫理委員会の審査を受け、研究によって提供者の不利益が生じない事を確認し、承認を得た後に行った。本研究では「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に定められている生殖細胞系のゲノム・遺伝子情報は含まれない。

C. 研究結果

1) プロテオーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発

① 腎細胞がんの腫瘍マーカー開発

SELDI-MS(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry)法にて腎細胞がん患者40例と対照者44例の血清を測定し、腎細胞がん症例を感度89.5%、特異度95%で検出できる2種の腫瘍マーカーの組み合わせを見出した。病期I期の早期腎細胞がん症例においても88.9%(16/18)の高感度で検出が可能であった。

② 膵がんの腫瘍マーカー開発

SELDI-MS法に精密なハイブリッド型四重極質量分析装置を使用し、新たに開発したピーク検出アルゴリズムを用いることで、再現性に優れた定量解析が可能となった。膵がん患者71例と対照者71例の結果を学習セットとして機械学習法を行い、がん患者に固有に見られるタンパク質発現パターンを同定した。このパターンは別の検証セット(膵がん患者33例と健常者45例)の血漿を判別率91.0%(71/78)と高精

度に診断できた。さらに既存の腫瘍マーカーであるCA19-9と組み合わせることで病期I期の早期症例を含めた膵がん症例の100%が検出可能であった。

③ がん抑制遺伝子 *DMBT1* 産物の検出

DMBT1 タンパク質 C 末29アミノ酸からなるペプチドを膵がん患者血清中に検出した。

④ 多次元液体クロマトグラフィーによる血清・血漿タンパク質のプロテオーム解析

血清・血漿タンパク質サンプルを多色の蛍光色素で標識し、多次元液体クロマトグラフィーと電気泳動で分離する独自のプロテオーム解析システムを構築した。

2) 糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発

膵がん患者から採取された末梢血の単核球分画における、1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(4GnT) mRNA の発現量を定量PCR法で解析した結果、55例中42例(76.5%)が陽性であった。

3) がん特有の遺伝子 alternative splicing の検出

① 肺小細胞がん特異的な *ACTN4* 遺伝子の splice variant の発見

肺非小細胞がんや他臓器の腫瘍、精巣以外の正常組織には発現がみられず、肺小細胞がんの特異性が高い腫瘍マーカーであると考え

られた。

② *PTCH1* 遺伝子の alternative splicing

4種類の splice variant の内 1 種は大腸がん患者検体 13 例中 8 例 (62%) で腫瘍特異的に発現していた。

D. 考察

腎細胞がんや膵がんの早期診断に応用が期待できる血漿タンパク質を同定した。今後は鑑別が問題となる慢性膵炎症例などの血漿を含めて症例数を増やし、これまでの成果の普遍性を検証する必要がある。

α 4GnT mRNA を対象とした real-time RT-PCR 法は胃癌の場合と同様に膵癌の検出に有用であると考えられた。特に CEA や CA19-9 の測定結果とは相関せず、また検出困難な II 期の膵癌については今回検討し得た症例は 3 例と少ないものの、その 2 例において α 4GnT mRNA が陽性となったことから、 α 4GnT mRNA は早期膵癌に対する新たな腫瘍マーカーとして期待できる。今回、複数のがん関連遺伝子のメチル化と Hedgehog シグナル伝達遺伝子をターゲットとし、検索した結果、*SNCG*, *SARP2*, *NPTX2* のメチル化もしくは脱メチル化と、*PTCH1* について 4 種の選択的スプライシング変異遺伝子を同定することに成功した。後者のうち 1 種は、組織によっては (特に大腸がん) がんと特異的に発現している可能性が示唆された。

E. 結論

難治がんの早期診断に応用が期待できる血漿タンパク質、遺伝子発現、メチル化遺伝子、alternative splicing を同定した。今後は症例数を増やし、これまでの成果の普遍性を検証する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(分担研究報告書参照)

2. 学会発表

(分担研究報告書参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特願 2005-70512

「膵がんの診断に有用な血液腫瘍マーカー」

U. S. patent (provisional) 60/546.600 「Molecule, functional molecule and process for manufacturing thereof, composition, pharmaceutical, food, beverage, milk, transgenic mammal, process for inhibiting growth of bacteria, process for treating and preventing gastric ulcers, and method for treating gastric cancer」

特許 2004-366206

「癌状態の判定方法及びその方法に
用いる遺伝子産物検出試薬」

公開特許 W02003/027138

「新規なスクリーニング法によるがん
マーカーの探索」

別紙 4

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） 「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」班 分担研究報告書

SELDI-MS法による新規腫瘍マーカーの探索

主任研究者

山田哲司

国立がんセンター研究所化学療法部部長
腫瘍プロテオミクスプロジェクトリーダー

研究要旨

SELDI-MS法に精密なハイブリッド型四重極質量分析装置を使用し、新たに開発したピーク検出アルゴリズムを用いることで、再現性に優れる定量解析が可能となった。膵がん患者 71 例と対照者 71 例の結果を学習セットとして機械学習法を行い、がん患者に固有に見られるタンパク質発現パターンを同定した。このパターンは別の検証セット（膵がん患者 33 例と健常者 45 例）の血漿を判別率 91.0% (71/78) と高精度に診断できた。さらに既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と組み合わせることで病期 I 期の早期症例を含めた膵がん症例の 100% が検出可能であった。

A. 研究の目的

肺がん、スキルス胃がん、膵がん等の難治がんでは、進行症例の治療は現在利用可能な医療技術では著しく困難であり、高感度な検出方法を用いて微少のがんを発見し、早期に治療を開始することにより、予後の改善を求める必要がある。Computerized tomography (CT) や positron emission tomography (PET) などの画像診断を利用した検診も考えられるが、設置に高額な経費がかかり、また放射線被曝の問題も指摘されており、全国規模で均一に行うに

は問題点が多い。

本研究はこのような近年急速に進歩したバイオテクノロジーの先端技術を応用し、従来の概念とは全く異なる腫瘍マーカーを開発しがん検診に応用する事で、難治がんの早期発見による治療成績の向上をさせることを目的としている。

B. 研究方法

国立がんセンターの 104 症例の膵がん血漿と 116 例の健常者の血漿を SELDI-MS (Surface Enhanced Laser

Desorption/Ionization Mass Spectrometry) 法に精密質量分析機を用いた独自のプロテオーム解析を行い、膵がん患者特有にみられるプロテオームパターンを検索した。71 症例の膵がん血漿と 71 例の健常者学習セットとして機械学習を行い両者を識別できるタンパク質発現パターン同定し、検証セット 78 例を判別した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を研究に使用する際には、「臨床研究に関する倫理指針（平成 15 年厚生労働省告示第 255 号）等の指針に沿って計画を作成し、研究計画は事前に倫理委員会の審査を受け、研究によって提供者の不利益が生じない事を確認し、承認を得た後に行った。

対象とする研究材料は担当医により説明を受け、同意のもとに採取され、連結可能匿名化の後、連番の番号などで管理され、氏名、患者 ID 番号など個人情報やそれが関連付けられるような情報が記載されていない容器に分注後、凍結保存されている血漿を用いた。本研究で用いる検体は血漿のみであり、通常の临床上必要な採血に際し、10 mL の採血管を追加するのみで可能である。従って、身体的な危険や負担はほとんどないと考えられる。担当医師の判断で 10 mL でも身体的な影響が予測される場合、当然本研究の対象としては除外する。本研究で解析するのは血中のペプチドとタンパク質のみであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に定められている生殖細胞系のゲノム・遺伝子情報は含まれない。

C. 研究結果

膵がん患者 71 例と対照者 71 例の結果

を学習セットとして質量と発現量を、独自に開発した解析ソフトウェアをもちいて support vector machine、neural network、fuzzy neural network などのアルゴリズムで統計解析するシステムにて機械学習法を行い、がん患者に固有に見られるタンパク質発現パターンを同定した。このパターンは別の検証セット（膵がん患者 33 例と健常者 45 例）の血漿を判別率 91.0% (71/78) と高精度に診断できた。さらに既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と組み合わせることで病期 I 期の早期症例を含めた膵がん症例の 100% が検出可能であった。

D. 考察

平成 16 年度までに国立がんセンターの 104 症例の膵がん血漿と 116 例の健常者の血漿を機械学習法で比較することで、両者の判別率の高いタンパク質とペプチドを同定した。しかしこれは単一施設の検体のみの解析であり、また慢性膵炎などの臨床的に膵がんを鑑別の困難な疾患が含まれておらず、これらが新規の腫瘍マーカーとして臨床検査に本当に応用できるかどうかは明らかでない。17 年度に計画している研究は、国立がんセンター以外の症例、特に膵がんを鑑別が問題となる慢性膵炎症例の血漿を用いて、同様のプロテオーム解析を行い、これまでの研究の普遍性を検証することが目的である。今回の研究にて検証が可能であれば、さらに大規模な全国規模の多施設共同研究を行う計画である。

I. 結論

腎細胞がんや膵がんの早期診断に応用が期待できる血漿タンパク質を同定した。今後は鑑別が問題となる慢性膵炎症例などの血漿を含めて症例数を増やし、これまでの成果の普遍性を検証する必要がある。

J. 健康危険情報

なし

K. 研究発表

3. 論文発表

Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, et al.

Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye.

Proteomics, in press.

Naishiro Y, Yamada T, et al.

Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein.

Oncogene, in press.

Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, Hirohashi S, Yamada T.

Identification of two serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry.

J. Urology, in press.

Idogawa M, Yamada T, et al.

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a component of the oncogenic T-cell factor-4 (TCF-4)/ β -catenin complex.

Gastroenterology, in press

Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, et al.

Prognostic significance of Tissue Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Clinical Cancer Research, in press.

Seike T, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, et al.

Proteomic signatures for histological types of lung cancer

Proteomics, in press

Honda K, Yamada T, et al.

Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer.

Gastroenterology, 2005

Jan;128(1):51-62.

Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, et al.

Proteomic signature of human cancer cells.

Proteomics, 2004 Sep;4(9):2776-88.

Yokoo H, Kondo T, Fujii K, Yamada T, et al.
Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells.
Hepatology, 2004 Sep;40(3):609-17.

Honda K, Yamada T, et al.
Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer.
Oncogene, 2004 Jul 1;23(30):5257-62.

Liu QY, Lei JX, LeBlanc J, Sodja C, Ly D, Charlebois C, Walker PR, Yamada T, et al.
Regulation of DNaseY activity by actinin-alpha4 during apoptosis.
Cell Death Differ, 2004 Jun;11(6):645-54.

山田哲司
プロテオミクスの現状と将来
Modern Media (モダンメディア)、
2004年10月 50巻10号、227-232頁

山田哲司、他
MDR1は β -cateninとTCF4転写複合体の標的遺伝子である
分子消化器病、2004年12月 1巻4号、336-341頁

本田一文、山田哲司
難治がんの早期診断マーカーの探索
検査と技術、2005年2月 33巻2号、172-174頁

4. 学会発表

The 95th annual meeting, American Association for Cancer Research
Proteomic analysis of the T-cell factor (TCF)-4/beta-catenin transcriptional complex.

Idogawa M, Yamada T, et al.
March 2004, Orland, FL.

The 95th annual meeting, American Association for Cancer Research
Expression of actinin-4 enhances cell motility and mediates lymphatic spread of colorectal cancer

Honda K, Yamada T, et al.
March 2004, Orland, FL.

The 24th International Symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation

Pharmacogenomics in Cancer Chemotherapy: Recent Advances in ABC Transporters and Genome Analyses
Yamada T, et al.

Suppression of Intestinal Polyposis in Mdr1-deficient ApcMin/+ Mice.
June 22, 2004, Sapporo

AACR Special Conference in Cancer Research

Advances in Proteomics in Cancer Research

Idogawa M, Yamada T, et al.
Proteomic Analysis of the molecular composition of the β -catenin and TCF-4 (T-cell factor-4)

transcriptional complex
October 6, 2004, Sonesta Beach Resort
Key Biscayne, Key Biscayne, Florida,
USA

HUPO 3rd Annual World Congress
October 25-27, 2004, Beijing
International Convention Center
(BICC)

Kondo T, Fujii K, Yokoo H, Yamada T,
et al.

Proteomics of lymphoid neoplasms
proteome-mining for 2D gel
Mol. Cell. Proteomics Vol. 3, No. 10.
Oct. S33, 2004

HUPO 3rd Annual World Congress
October 25-27, 2004, Beijing
International Convention Center
(BICC)

Yokoo H, Kondo T, Okano T, Yamada T,
et al.

Proteomic Signature Corresponding to
Early Intrahepatic Recurrence of
Hepatocellular Carcinoma
Mol. Cell. Proteomics Vol. 3, No. 10.
Oct. S119, 2004

HUPO 3rd Annual World Congress
October 25-27, 2004, Beijing
International Convention Center
(BICC)

T. Yamada, et al.

Cancer Proteomics Project of
National Cancer Center in Japan
Mol. Cell. Proteomics Vol. 3, No. 10.
Oct. S170, 2004

HUPO 3rd Annual World Congress
October 25-27, 2004, Beijing
International Convention Center
(BICC)

Okano T, Kondo T, Kakisaka T, Yamada T,
et al.

Serum proteomics of lung cancer by
multi-dimensional liquid
chromatography and gel
electrophoresis
Mol. Cell. Proteomics Vol. 3, No. 10.
Oct. S225, 2004

L. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む。）

特許出願 「膵がんの診断に有用な
血液腫瘍マーカー」

特願2005-70512

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

体液診断への応用を目指した腫瘍のバイオマーカーの開発 に関する研究

分担研究者 前川 真人 浜松医科大学医学部教授

研究要旨

がん関連遺伝子のメチル化、およびスプライシングバリエーションを標的として、新規バイオマーカーの探索を行った。その結果、*SNCG*, *SARP2*, *NPTX2* のメチル化もしくは脱メチル化を標的として、体液を試料として検出することがバイオマーカーとなる可能性が示された。また、*PTCH1* について4種の選択的スプライシング変異遺伝子を同定することに成功し、うち1種は、組織によっては(特に大腸がん)がん特異的に発現している可能性が示唆され、臨床応用の可能性が示された。

A. 研究目的

がんにおいては、種々の腫瘍マーカーが臨床検査として用いられているが、がんの発見という目的で十分な成果が得られているものがほとんどない。一方、昨今ではDNAやRNAという広い意味での分子マーカーが腫瘍マーカーとして考えられ始めている。そこで、臨床検査として使用可能ながんマーカーの開発を目的として、遺伝子のメチレーションとスプライシングバリエーションに焦点をあてて、特定の遺伝子配列や報告例を基に解析を行った。

B. 研究方法

1) 対象

膵がん細胞株 (AsPC-1, MIApaca2,

PANC-1, Qcp-1, Kp2, Kp3, Kp4, BxPC3, H48N, YPK1, YPK2, S2-013, PSN1)、白血病細胞株 (HL60RG, Raji, K562, Daudi, U937, NB4)、消化器系癌細胞株 (MKN1, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, KATO III, NEDATE, SW1116, C-1, Colo320 HSR)、脳腫瘍 (Daoy, PFSK, ON776, TE671, uw228, D283) などがん細胞株 39 種、大腸がん患者組織 (癌部と正常粘膜、25 症例)、正常組織 (パネルセル 16 種類: クロンテック社)、全血 14 種 (正常人 9 人、白血病 5 人)

2) 遺伝子メチル化の解析

hMAD2, *SNCG*, *SARP2*, *NPTX2* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化と mRNA の発現量についてそれぞれ sodium bisulfite 処理した DNA、mRNA

を試料として、PCR および RT-PCR によって調べた。

3) スプライシングバリエーションの解析

Hedgehog シグナル伝達遺伝子 3 種類 (*PTCH1*, *GLI1*, *SMO*) の発現スクリーニングを RT-PCR により行った。*PTCH1* 発現スクリーニングで目的以外のバンドについては、それぞれのバンドをゲルから切り出し再度の PCR および塩基配列決定によりスプライシングバリエーションを同定した。さらにそれらスプライシングバリエーションに特異的なプライマーを作成し、RT-PCR、Real-time-PCR で、正常遺伝子と発現組織・発現量を比較した。

(倫理面への配慮)

プレリミナリーな実験として、エピジェネティクス発現量の解析を、手術時に同意が得られ、連結不可能匿名化された DNA, RNA 試料を用いて行った。特定の患者に遡ることはできないため、患者のプライバシーを侵害する危険性はない。健常者の血液は、研究グループのボランティアから得られたものであり、個々人の同意は得られている。

C. 研究結果

1) *hMAD2* 遺伝子のメチル化

39 種類のがん細胞株を bisulfite-PCR-SSCP で調べた結果、

hMAD2 遺伝子プロモーター領域にメチル化は認められなかった。また、RT-PCR により特に発現量に差がある例も認めなかった。

2) *SNCG* 遺伝子のメチル化

メチル化している場合は発現が沈黙し、低メチル化によって *SNCG* 遺伝子の発現が生じていると考えられた。しかし、メチル化しているにもかかわらず、発現が認められた細胞もあった。白血病・消化器癌・脳腫瘍でも約半数で低メチル化と *SNCG* 遺伝子の発現が認められた。健常人の全血から抽出した DNA ではメチル化しており、発現は認められなかった。

3) *SARP2*, *NPTX2* 遺伝子のメチル化

SARP2 遺伝子のメチル化は膀胱癌細胞株 3/12、白血病細胞株 6/6、消化器系癌細胞株 12/12、脳腫瘍 4/6 に認められた。メチル化していた細胞株では *SARP2* 遺伝子の発現はみられなかった。5-aza-dC, TSA 含有の培養では脱メチル化され発現が回復した。

NPTX2 遺伝子のメチル化は、膀胱癌細胞株 13/13、白血病細胞株 6/6、消化器系癌細胞株 12/12、脳腫瘍 4/6 に認められた。メチル化していた細胞株では *NPTX2* 遺伝子の発現はみられなかった。5-aza-dC, TSA 含有の培養では若干脱メチル化されたが、十分な発現が認められるには至らなかった。

4) *PTCH1* 遺伝子

PTCH1 遺伝子について4種の選択的スプライシング変異遺伝子を見いだした。遺伝子バンクの情報を照らし合わせると、いずれもエクソンの脱落したバリエーションであった。RT-PCRの産物の長さは、それぞれ759bp, 557bp, 394bp, 239bpであった。そのうちの最も長い1種は、エクソン2を丸ごとスキップしたスプライシングバリエーションで、脳、肺、大腸、白血球においてがん特異的に発現している可能性が示唆された。また、がん細胞株39種類のいずれにも発現を認めた。大腸がん患者組織では、正常粘膜25種中5種(20%)で発現を認めたのに対し、がん組織では25種中18種(72%)で発現を認め、発現率はがん組織で有意に高かった。さらに同一患者の正常粘膜とがん組織で比較すると、13人中8人(62%)でがん特異的に発現を認め、定量PCRでも同等の結果が得られた。

他のスプライスバリエーションは、エクソン4から7のスキップ、2から6、2から7のスキップであった。量的にもわずかであることなどもあり、各種の細胞でどのような反応を示しているか、十分に検討していない。

D. 考察

がんにおいては、その発がんの過程から、いくつかの遺伝子のメチル化が、

多くは発現量の増減を介して関与していることがわかっている。正常組織とは異なるメチル化体系を示す遺伝子を見いだせば、そのメチル化、もしくは低メチル化を指標として、異常ながん細胞の存在を知ることができると考えられ、有望視されている。そこで、我々はピンポイントではあるが、がんの分子マーカーとして使用できるDNAメチル化の標的分子を見いだすべく、検討を加えた。*hMAD2*は、乳癌や肺癌では発現量の低下が、一方胃がんでは発現量の亢進が報告されている。すなわち、メチル化の態度に特徴的な所見が得られると考え検討したが、全てのがん細胞株でメチル化は認めなかった。*SNCG*は、乳がんや卵巣がん、膵がんでは発現量の増加を示し、メチル化の低下が原因の一つと考えられるため、低メチル化がマーカーになる可能性が考えられた。健常人の全血から抽出したDNAを調べたところ、メチル化しており発現はみられなかった。すなわち、低メチル化を指標としたマーカーは役に立つかもしれない。*SARP2*, *NPTX2*に関しては、メチル化が高率に見いだされたので、がん化によってメチル化される遺伝子のグループとして、多変量解析の一つのマーカーとして使用できる可能性が示された。その際、定量的に扱い、感度と特異度を十分考慮する必要がある。

ヘッジホッグシグナル伝達遺伝子群は、はじめにショウジョウバエで同定された後、マウスやヒトなどの哺乳類においても相同遺伝子が同定され、機能解析が進められてきた。発生過程や生体機能の維持に重要な働きを有している。この遺伝子群には、*Hedgehog (shh, Ihh, Dhh)*, *Patched homolog (ptch1, ptch2)*, *Smoothed homolog, Cubitus interruptus (Gli1, Gli2, Gli3)*などがある。これらの一部は膀胱がんや前立腺がんなどで異常発現しているという報告がみられる。そこで我々は、これらの遺伝子群を RT-PCR によって発現解析を行い、量的な変化だけでなく質的な変化として、特徴的なスプライスバリエーションの存在を調べた。一般にいくつかの研究でスプライシングパターンの変化と、がんの悪性度との関連性が認められているが、問題はスプライス変異遺伝子のがん診断に有用なツールとなり得るかかどうかということである。選択的スプライシングは様々な遺伝子、組織で起こり、パターンも多種多様であるため、特異的なバリエーションをいかにして見いだすかが問題である。今までにも代表的な分子として、CD44 のスプライシングバリエーションが存在診断・予後診断などに用いられた。今回同定した変異遺伝子についても上記に示した結果が得られたが、これからがん診断に実

用的に応用するためには、更に感度の増強、定量比較、変異遺伝子機能解析などを今後の課題と考えている。

E. 結論

今回、複数のがん関連遺伝子のメチル化と Hedgehog シグナル伝達遺伝子をターゲットとし、検索した結果、*SNCG*, *SARP2*, *NPTX2* のメチル化もしくは脱メチル化と、*PTCH1* について 4 種の選択的スプライシング変異遺伝子を同定することに成功した。後者のうち 1 種は、組織によっては(特に大腸がん)がん特異的に発現している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Maekawa M, Taniguchi T, Uramoto T, Higashi H, Horii T, Takeshita A, Sugimura H, Kanamori M : Pilot study of arbitrarily primed PCR-single stranded DNA conformation polymorphism analysis for screening genetic polymorphisms related to specific phenotypes. *Clin Chim Acta (in press)*

Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J, Toyoda S, Takahata N. Problem

- with Detection of an Insertion-Type Mutation in the BCHE Gene in a Patient with Butyrylcholinesterase Deficiency. Clin Chem 50: 2410-2411, 2004
- Shinmura K, Tao H, Goto M, Igarashi H, Taniguchi T, Maekawa M, Takezaki T, Sugimura H. Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer. Carcinogenesis 25: 2311-2317, 2004
- Ishikawa J, Taniguchi T, Higashi H, Miura K, Suzuki K, Takeshita A, Maekawa M. High lactate dehydrogenase isoenzyme 1 in a patient with malignant germ cell tumor is attributable to aberrant methylation of the LDHA gene. Clin Chem. 2004 50: 1826-1828, 2004
- Maekawa M, Taniguchi T, Higashi H, Sugimura H, Sugano K, Kanno T: Methylation of mitochondrial DNA is not a useful marker for cancer detection. Clin Chem 50: 1480-1481, 2004
- Maekawa M, Nagaoka T, Taniguchi T, Higashi H, Sugimura H, Sugano K, Yonekawa H, Satoh T, Horii T, Shirai N, Takeshita A, Kanno T: 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: 1322-1327, 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 2: 147-156, 2004
- Ishikawa J, Fujita K, Kanno T, Maekawa M. Lactate dehydrogenase (LD) extra isoenzyme electrophoretic band between LD1 and LD2 caused by a complex with alpha1-lipoprotein. A case report. Clin Chem Lab Med 42:102-104, 2004
- 前川真人： 膵癌の腫瘍マーカー。膵臓 Vol. 19, No. 6, 2004 (in press).
- 前川真人： 原発不明癌。日本分子腫瘍マーカー研究会誌 Vol. 20,

2005 (オンライン掲載予定)

2. 学会発表

石川仁子、谷口照美、前川真人、須藤加代子、豊田 茂、高島典子：挿入変異による変異検出のピットフォール—コリンエステラーゼ欠損症における A / u 挿入とミスセンス変異のコンパウンドヘテロ接合体例の解析—。第 55 回日本電気泳動学会総会 (2004 年 11 月) 東京、生物物理化学 48 補冊, 19, 2004

前川真人、谷口照美、東 仁美、浦本武、梶村春彦、金森雅夫：A P — PCR — SSCP 法を用いた、各種病態に関連する遺伝子多型の網羅的探索法の確立。第 55 回日本電気泳動学会総会 (2004 年 11 月) 東京、生物物理化学 48 補冊, 20, 2004

前川真人、長岡智紀、堀井俊伸、白井直人、竹下明裕、菅野剛史：3 次元マイクロアレイシステムによる K-r a s コドン 12, 13 の変異解析の検討。第 51 回日本臨床検査医学会総会 (2004 年 9 月) 東京、臨床病理 52 補冊, 110, 2004

前川真人、長岡智紀、堀井俊伸、白井直人、竹下明裕：3 次元マイクロ

アレイシステムによる K-r a s 遺伝子の変異検出。第 11 回日本遺伝子診療学会大会 (2004 年 9 月) 東京、抄録集 77, 2004

石川仁子、谷口照美、竹下明裕、前川真人：コリンエステラーゼ欠損症ヘテロ接合体の臨床検査医学的意義—遺伝子解析症例の提示と基準範囲への影響についての考察—。第 15 回日本臨床化学会 東海北陸支部総会 (2004 年 9 月) 富山、抄録集 16, 2004

石川仁子、菅野剛史、前川真人：血清酵素とアイソザイム、パターンの判読と異常分画パターンの解析。第 54 回日本電気泳動学会シンポジウム (2004 年 6 月) 横浜、抄録集, 26, 2004

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

特許 2004-366206 「癌状態の判定方法及びその方法に用いる遺伝子産物検出試薬

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

α 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子をターゲットとした膵癌分子診断法の開発

(分担) 研究者 中山 淳 信州大学医学部教授

研究要旨

α 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(α 4GnT)は胃粘膜の腺粘液細胞や十二指腸粘膜のブルネル腺、胃幽門腺化生を示した膵管上皮細胞から分泌される粘液に含まれる特徴的な糖鎖、GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基の生合成に関与する糖転移酵素である。この酵素は胃癌や膵癌でも高頻度に発現しているが、末梢血の有核細胞では全く検出されない。末梢血中に存在している微量な膵癌細胞を検出する目的で、インフォームドコンセントの得られた膵癌患者55名、慢性膵炎患者10名、健常人70名を対象にreal-time RT-PCR法を用いて末梢血有核細胞成分における α 4GnT mRNAの発現量を定量的に解析した。 α 4GnT mRNAは76.4%の膵癌患者、40.0%の慢性膵炎患者、ならびに17.1%の健常人で検出されたが、膵癌患者における α 4GnT mRNAの発現量は慢性膵炎患者や健常人に比べて有意に高値であった。以上の結果より、 α 4GnT mRNAをターゲットとしたアッセイ法は、膵癌の検出に有用と考えられた。

A. 研究目的

胃粘膜の中層から下層にかけて存在する腺粘液細胞と十二指腸粘膜のブルネル腺、ならびに胃幽門腺化生を示した膵導管上皮細胞は特徴的にGlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基を産生している。このユニークな糖鎖は胃癌や膵癌でも高頻度に発現していることから、GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基は胃癌や膵癌における癌関連糖鎖抗原と考えること

ができる (Nakamura et al, *J Histochem Cytochem* 46:793-802, 1998)。一方、 α 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(α 4GnT)はGlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基を生成する糖転移酵素であり、私達は発現クローニング法によってこの酵素のcDNAを単離し、その組織局在等を明らかにしてきた (Nakayama et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8991-8996, 1999; Zhang et al,

J Histochem Cytochem 49, 587-596, 2001). さらに α 4GnT が胃癌細胞や膵癌細胞でも高頻度に発現しているが、好中球やリンパ球など末梢血の有核細胞では発現していないことを見出し、胃癌患者の末梢血有核細胞分画における α 4GnT mRNA の発現量を定量する real-time RT-PCR 法が微量な胃癌細胞(circulating tumor cell)の検出に有用であることを報告した (Shimizu et al, *Lab Invest* 83, 187-197, 2003). 最近、私達はこのアッセイ法を改良することによって、より高感度な測定結果を得ることができたので、この方法が膵癌の検出に有用か否かを検討した。

B. 研究方法

膵癌患者 55 名、慢性膵炎患者 10 名、健常人 70 名について検討した。採取した 5ml の末梢血から有核細胞成分を分画して total RNA を抽出、逆転写酵素により cDNA を合成し、 α 4GnT 遺伝子に特異的なプライマー (5'-GTTTTCTCTTCCCTTTGGATATGA-3', 5'-AGCTGATGTGGAGCCAGTTTCT-3') と TaqMan プローブ (5'-TGGTACAATCAAATCAAGCCAGCGC-3') を用いて real-time RT-PCR を行った。同時に multiplex PCR にて GAPDH mRNA の発現量も定量し、 α 4GnT mRNA/GAPDH mRNA $\times 10^7$ を α 4GnT mRNA の発現量と定

義した。

(倫理面への配慮)

本研究の実験計画は信州大学医学部遺伝子解析倫理委員会にて承認済みであり、また検体は全てインフォームドコンセントが得られた後に採取されている。

C. 研究結果

まず、膵癌患者群と健常人群で得られた α 4GnT mRNA の発現量に対して ROC 曲線を作製し、両群間を判別するカット・オフ値として 10.5 を得た。従って、 α 4GnT mRNA の基準値を 10.5 以下と定義することで各群を解析し、さらに群間の比較検討を行った。

膵癌患者群の末梢血における α 4GnT mRNA の陽性率は 76.4% でありその発現量は 37.50 ± 5.44 (平均 \pm 標準誤差)であった。さらに膵癌における各病期別の陽性患者数は、0 期 0/1 例 (0%)、II 期 2/3 例 (66.7%)、III 期 7/8 例 (87.5%)、IV 期 33/43 例 (76.7%)であり、また α 4GnT mRNA の発現量は病期の進行とともに増加の傾向にあった。

膵内における腫瘍の占拠部位別の検討では、膵頭部癌 25/32 例 (78.1%)、体尾部癌 17/23 例 (73.9%)で α 4GnT mRNA が陽性となり、癌の占拠部位にかかわらず高頻度に陽性となった。 α 4GnT mRNA の発現量に関しても膵頭