

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

癌の新しい診断技術の開発と治療効果予測の研究に関する研究

平成16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17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

- 癌の新しい診断技術の開発と治療効果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. ウイルムス腫瘍の分子細胞遺伝学的診断に関する研究 ————— 10
金子 安比古
2. 乳癌の分子診断法の開発に関する研究 ————— 13
林 慎一
3. 腫瘍 NM23 蛋白質の誘導する免疫担当細胞の蛋白質発現変化と
予後に関する研究 ————— 17
角 純子
4. 癌由来血漿変異 DNA の検出と臨床応用に関する研究 ————— 20
山口 研成
5. 複数遺伝子異常の組み合わせによる肺癌の悪性度診断に関する研究 —— 22
土屋 永寿

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 24

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

癌の新しい診断技術の開発と治療効果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研究室・室長

研究要旨 ウイルムス腫瘍 39 例の染色体・CGH、WT1、IGF2 の loss of imprinting (LOI), loss of heterozygosity (LOH) をそれぞれ分析し、WT1 異常群 15%、IGF2 の LOI 群 15%、IGF2 の LOH 群 31%、その他群 39% に分類した。この腫瘍が分子レベルで不均一な集団であることを示した。IGF2 LOI 群は他群に比較して 16q- と +12 の頻度が高かった。この結果は 16q 欠失による CTCF 遺伝子欠失が IGF2 LOI の発生に関与するという既報告を支持した。+12 は染色体数が 50 以上に増加する高 2 倍性ウイルス腫瘍のほぼ全てにみられる。高 2 倍性腫瘍では 11 番染色体上の癌抑制遺伝子や 11p13 に位置する WT1 の 3 コピー化が腫瘍化に不利に働くために、11 番染色体をトリソミーにせず、IGF2 の LOI または LOH により IGF2 を過剰発現させ増殖を促進していると考えられた。

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。臨床への導入を目指した操作の簡便化、自動化、高精度化を目的として 3 次元マイクロアレイシステム導入の検討を開始した。大規模マイクロアレイ、カスタムマイクロアレイによる解析結果から絞り込まれた候補遺伝子、約 50 個を載せた 3 次元型アレイチップを作成した。本チップを用いて基本的条件の検討を行った。さらに患者検体の組織サンプルを分析し、データを蓄積している。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用いて、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癌マイクロ環境の総合的評価系の開発を進めた。

乳癌患者 413 例の術前血清を用いて血清 NM23 蛋白質を測定したが、高値症例をほとんど見出せなかった。従って、この予後診断法は乳癌には応用できないと判断した。血清 NM23 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍は、白血病、悪性リンパ腫、肺小細胞癌、神経芽腫であり、適応できない腫瘍は、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌となった。正常末梢血単核細胞を NM23 蛋白質で処理すると、腫瘍の悪性化に関与する多くのサイトカインが誘導された。また、誘導されたサイトカイン中 GM-CSF や IL-1 β は初代培養の白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。一方、初代培養の白血病細胞を NM23 蛋白質で処理すると、白血病細胞の増殖・生存が促進された。腫瘍細胞が産生する NM23 分子をメディエーターとして、直接および単球を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を促進する機構が考えられた。この活性は、血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤の 1 つと予想された。

血漿中の癌由来の変異 DNA 量を化学療法の対象となる第 4 病期の患者血漿から経時的に解析してきた。現在までの臓器癌患者における解析から明らかになったことは、
1) 血行性転移をした患者では癌の進展に伴い正常細胞由来 DNA に対する腫瘍由来の DNA 比率が増加していくこと
2) これに反し腹膜転移などの非血行性転移においては増加してくる血漿中 DNA の大半は正常細胞由来であることを見いだした。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。

腫瘍の悪性度は複数の遺伝子の組み合わせにより決定される。また、P53 のコドン 72 の多型により、腫瘍の化学療法に対する反応性や予後が異なる可能性がある。扁平上皮癌の P53 の変異頻度は 62% で、変異の有無による 5 年生存率に差を認めなかった。P53 変異のうち CpG 部位の G/C→A/T transition 変異は自然突然変異（内因）、G/C→T/A transversion 変異はタバコ煙中の発がん物質により生じる変異（外因）と考えられている。腫瘍の発生部位を肺門、中間、末梢に分けて変異の種類を検索した結果、内因による腫瘍の割合は肺門に、喫煙が原因の腫瘍は中間に、複数の原因による腫瘍は末梢に多いという、従来の説とは異なる結果が得られた。

分担研究者

1. 金子 安比古 埼玉県立がんセンター研究室
室長
2. 林 慎一 東北大学医学部保健学科分子
検査分野・教授
3. 角 純子 埼玉県立がんセンター研究室
主任研究員
4. 山口 研成 埼玉県立がんセンター病院
医長
5. 土屋 永寿 神奈川県立がんセンター臨床
研究所・所長

A. 研究目的

ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として WT1(11p13) の他に imprint 遺伝子である IGF2(11p15) が知られている。すなわち、この腫瘍では IGF2 の LOI や LOH が高率に生じている。またウィルムス腫瘍には、+12 を伴い高 2 倍性の核型を示す一群がある。最近、IGF2 LOI の発生機構の一つとして、16q22 に位置する CTCF が 16q 染色体長腕欠失に伴い欠失することが報告された。ウィルムス腫瘍を CGH・染色体分析し、+12 や 16q- の有無を明らかにする。その所見と IGF2 LOI、11p15 LOH、WT1 異常の分析所見から、この腫瘍の発生機構の解明をめざす。

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。乳癌化学予防を含め、さまざまな内分泌療法剤を用いて個別化診療を実施するために、エストロゲン受容体に関する基礎研究の成果に基づき、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た分子診断法を開発する。

腫瘍細胞における NM23 遺伝子の過剰発現や、細胞外に分泌された NM23 蛋白質に着目して、血液を用いた予後診断法を開発した。これは白血病、悪性リンパ腫、肺小細胞癌および神経芽腫の予後診断に有用であった。今年度は乳癌患者の血清 NM23 蛋白質を測定した。また血清 NM23 蛋白質高値患者の予後が不良であることの生物学的基盤を解明するために、NM23 蛋白質で処理した正常血液細胞と白血病細胞に誘導される遺伝子/蛋白質の発現を protein array や cDNA microarray 等を用いて解析した。

癌の進展に伴い癌由来血漿変異 DNA 比は増加することを見いだした。これを臨床応用するために安定した血漿 DNA 抽出法を確立し、検出感度の向上と適応範囲の拡大を目指す検討を行った。また新たなバイオマーカーの開発、その臨床応用を目指している。

肺癌において、P53 変異とその多型、KRAS 変異、その他の遺伝子異常を検索し、各種遺伝子異常の組み合わせと臨床病理学的特徴との関連を検討する。遺伝子組み合わせの違いによる悪性度の変化、P53 多型と治療の反応性、予後との関係を明らかにする。

B. 研究方法

ウィルムス腫瘍 39 例について CGH・染色体分析を行った。腫瘍 DNA と正常 DNA を対象に、11 番染色体の DNA マーカーを用いて、LOH 分析を実施し

た。次に WT1 異常をサザン法と、全エキソン PCR 産物の直接塩基配列決定法で分析した。また、IGF2 の ApaI 多型部位を含むゲノム DNA や cDNA を PCR により増幅し、LOI が生じているかどうかを調べた。

エストロゲン応答性カスタムアレイを用いた乳癌細胞株の解析結果から候補遺伝子を絞り込み、3次元型アレイチップを作成する。カスタムアレイや3次元型アレイを用いて乳癌手術材料および生検材料を分析し、ホルモン療法応答性に関するデータベースを構築する。アロマターゼ阻害薬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する。

埼玉県立がんセンター病院乳腺外科で手術を受けた413例の術前血清を対象にして、血清 NM23 蛋白質をサンドイッチ ELISA 法により測定した。つぎに、リコンビナント NM23 蛋白質を正常末梢血液細胞および白血病細胞に添加し、MTT アッセイ法によりその増殖について、また protein antibody array、cDNA microarray、multiple RT-PCR、ELISA 法にて各種遺伝子やその蛋白質の発現を検討した。

患者血漿から、各種キットおよびDNA抽出法を組み合わせ、純度・回収率の高い抽出法の確立を目指している。血漿DNAによる治療効果判定の応用範囲を拡大するために、MAPKシグナル伝達系のうち、KRASに加え、それに相補的なBRAF遺伝子の変異を高感度に検出する系を開発した。

切除非小細胞肺癌 347 例の凍結保存材料より DNA を抽出し、PCR、SSCP、シーケンス法にて P53 変異と多型、KRAS 変異を分析する。他の遺伝子(細胞周期、細胞増殖関連遺伝子等)異常は、tissue array を作製して、免疫組織学的に分析する。肺癌は WHO1999 分類に従い分類し、臨床病理学的項目は病歴を参照した。

C. 研究結果

ウイルムス腫瘍 39 例を分析し、WT1 異常群 6 例 (15%)、IGF2 LOH 群 12 例 (31%)、IGF2 LOI 群 6 例 (15%)、IGF2 retention of imprinting (ROI) 群 15 例 (39%) に分類した。CGH・染色体分析の結果、+12 と 16q-の頻度は IGF2 LOI 群において他群より有意に高かった ($P=0.008$, $P=0.01$)。患者年

齢の中央値は WT1 群 1 歳 2 ヶ月、IGF2 LOI 群 4 歳、IGF2 LOH 群 2 歳 6 ヶ月、IGF2 ROI 群 1 歳であり、IGF2 LOI+LOH 群の年齢が高かった。病期の分布は 4 群間に差を認めなかった。

新鮮乳癌組織や乳癌培養細胞株をマイクロアレイ、real time RT-PCR により分析し、内分泌療法の奏効性予測因子となる約 50 遺伝子を選択した。これを搭載した 3 次元型マイクロアレイチップを作成し、遺伝子発現と治療奏効性の関係の分析を継続している。さらに選択した候補遺伝子の発現を免疫染色法で解析し、予後データと照合したところ、新たな予後因子として HDAC6、IGFBP4 が同定された。乳癌近傍間質のアロマターゼ阻害剤反応性を予測するために、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを作成し、レポーター細胞に導入した。これを間質細胞と共培養し、間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した。その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関し、各個人の癌微小環境の評価に有用であると示唆された。

乳癌患者 413 例から採取した術前血清の NM23 蛋白質を測定したが、高値症例をほとんど見出せなかった。この予後診断法は乳癌には応用できないと判断した。リコンビナント NM23 蛋白質で処理した正常末梢血液細胞には、多数のサイトカインやケモカインが誘導されたが、一部のケモカインの誘導は抑制された。誘導された GM-CSF や IL-1 β は、白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。一方、NM23 蛋白質を白血病細胞に添加すると、14 例中 11 例に増殖・生存促進効果がみられた。NM23 の増殖・生存促進作用は、各種サイトカイン抗体処理で一部中和されたので、サイトカインの産生誘導を介していると考えられた。

様々な DNA 抽出法やそれに付加した処理で検討を重ね、純度と効率のよい血漿 DNA 抽出法を確立した。BRAF 遺伝子変異は結腸直腸癌の 5~22% に認められ、KRAS 遺伝子と相補的であり、変異の約 90% は V599E である。この変異 DNA の En-Rich 法を開発し、原発巣および血漿からの変異 DNA を高感度に検出できた。原発巣から BRAF 遺伝子変異を同定した大腸癌患者で血漿中変異 DNA の有無を検討している。KRAS と BRAF 遺伝子変異を組み合わせると、約 60% の大腸癌患者が血漿 DNA による経過観

察の対象になる。

扁平上皮癌の P53 変異頻度は 46/74(62%) (4 例は 2 ケ所に変異あり) で、その有無は年齢、性、分化度、病理病期、5 年生存率と関係認めなかった。腫瘍の発生部位を肺門、中間、末梢に分けて変異の種類を検索した結果、内因 (G/C→A/T transition 変異) による腫瘍の割合は肺門に、喫煙が原因と考えられる G/C→T/A transversion 変異のある腫瘍は中間に、複数の原因による腫瘍は末梢に多いという、従来の説とは異なる結果が得られた。喫煙率は 90% (非喫煙者が 8、喫煙者 66) で、一日の喫煙本数×喫煙年数(SI)が 400 以下(軽喫煙者)は 3 例、400 以上(重喫煙者)は 63 例で、肺癌の発生部位による喫煙率に差は認められなかった。

D. 考察

ウイルス腫瘍 39 例の分析では、WT1 異常を示す腫瘍が 15%、LOH または LOI により IGF2 発現異常を示す腫瘍が 46%、WT1 と IGF2 異常のない腫瘍が 39%であった。IGF2 LOI 群における 16q-と +12 の頻度は IGF2 LOH 群、IGF2 ROI 群、WT1 群に比して有意に高かった。CTCF 遺伝子は insulator protein をコードしており、ウイルス腫瘍でしばしば欠失のみられる 16q22 に位置している。16q-の結果 CTCF 蛋白質の産生が抑制されると、insulator として機能せず、エンハンサーシグナルが母方 IGF2 に届き、IGF2 LOI が生じると推測される。また、+12 を示す腫瘍のほとんどは染色体数が 50 以上に増加した高 2 倍性核型を示す。高 2 倍性腫瘍は増殖関連遺伝子の載った染色体を増加させ、増殖能を維持している。IGF2 の載った 11 番染色体をトリソミーにして増殖能を高めようとするが、11 番染色体には高 2 倍性腫瘍の原因になる癌抑制遺伝子が載っているため、11 トリソミー化は腫瘍化の妨げになる。また、WT1 が 3 コピーあることも腫瘍化の妨げになるかもしれない。そこで、11 番染色体をダイソミーのまま、IGF2 を過剰発現する機構、つまり IGF2 LOI を獲得したと推測される。

乳癌のホルモン療法反応性予測診断マイクロアレイチップを開発した。このチップは新規抗ホルモン剤の開発にも有用であると考えられた。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。このチップを用いた乳癌の解析から、新たな予後因子として HDAC6 を発見した。現在、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床に実際に導入可能なシステムとなる 3 次元型アレイチップを開発している。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組織に存在するアロマトラーゼが標的であり、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。乳癌手術材料を用いた解析から、この GFP レポーター細胞システムを用いることによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることが示された。

血清 NM23 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍は、白血病、悪性リンパ腫、肺小細胞癌、神経芽腫であり、適応できない腫瘍は、肺腺癌、肺扁平上皮癌、そして乳癌となった。さらに適応範囲を検索するために、NM23 遺伝子の高発現が報告されている婦人科悪性腫瘍および膵臓癌について次年度から順次測定し、臨床的意義を包括的に検討する予定である。この検索により応用可能な癌の範囲が決定され、さらに対象疾患を拡大できればこの測定系の商品実用化へ拍車がかかると期待される。NM23 は正常末梢血単核細胞(特に単球)のサイトカイン産生を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持していると推察される。一方、初代培養の白血病細胞について同様の解析を行ったところ、NM23 蛋白質により多数例で白血病細胞の増殖・生存が顕著に促進された。腫瘍細胞が産生する NM23 分子は、直接および単球を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持していると考えられた。この活性は、血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤の 1 つになっていると推測される。

血行性転移をきたした膵癌患者においては、正常組織由来 DNA に対する変異 DNA 比率が癌の進行によって増加することが確認された。しかし、臨床応用を目指すには、効率と純度のよい血漿 DNA の抽出法の開発が必須である。この安定した抽出系を確立することで、リアルタイム PCR などの方

法により絶対量を定量することが出来、精度の高い腫瘍マーカーとしての応用が可能になると考える。また、KRAS 遺伝子変異は様々な癌腫で効率に変異を有するが、膵臓がんで 70-90%、大腸がんで約 50%の変異率である。BRAF 遺伝子などの他の遺伝子変異を組み合わせることで、血漿 DNA 測定により経過を追える患者が増加し、臨床応用の幅が広がるものと考えられる。

扁平上皮癌の発生部位別発がん機序の相違に関して、従来肺門型扁平上皮癌の発がん原因は喫煙が主であると考えられてきたが、今回の P53 変異スペクトラムの解析結果から、肺門型では重喫煙者が多いにも関わらず transition 変異の頻度が高く、自然変異で発生したと考えられる腫瘍の頻度が高いことを示唆した。肺門部ではタバコ煙のクリアランスが良く、外因性発癌物質の沈着・蓄積が起こりにくいため、transversion 変異が少なかったと考えられる。

E. 結論

ウィルムス腫瘍を WT1 異常群 15%、LOH または LOI による IGF2 発現異常群 46%、WT1 と IGF2 の異常のない群 39% に分類できた。IGF2 LOI を示す腫瘍は 16q- または +12 の頻度が高かった。16q には CTCF 遺伝子が位置しており、16q 欠失による CTCF 蛋白の産生低下が IGF2 LOI の発生に関与するという報告を支持する所見である。+12 は染色体数が 50 以上に増加する高 2 倍性腫瘍にみられる。高 2 倍性腫瘍では 11 番染色体上の癌抑制遺伝子や 11p13 に位置する WT1 の 3 コピー化が腫瘍化に不利に働く。そのため 11 番染色体をトリソミーにせず、IGF2 の LOI または LOH により IGF2 を過剰発現させ増殖を促進にしていると考えられる。

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、EGR3 などの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。さらに実用的なシステムとするため診断用 3 次元型マイクロアレイチップを開発している。一方、これらの研究の過程で新規予後因子 HDAC6 が同定された。また、癌

細胞周辺の間質も含めた癌微小環境評価を行うことで内分泌治療の奏効性をより正確に把握することを目的としたアッセイシステムを開発した。

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および白血病細胞からさまざまなサイトカインを誘導した。また、NM23 蛋白質そのものも、白血病細胞の増殖・生存を促進すること、また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 NM23 蛋白質の示す予後不良因子活性との関連が示唆された。

がん患者において癌の進展に伴い血漿中の正常細胞由来 DNA に対する癌由来変異 DNA 比率が増加することを見いだした。この知見をもとに変異 DNA の絶対量を計測する方法の検討を行っている。これと同時に消化器癌で変異が高いとされている BRAF 遺伝子変異の好感度検出法を開発し、KRAS 変異分析と併用することにより、血漿変異 DNA の測定による治療効果の判定に応用できる患者の幅を広げている。癌由来の変異 DNA の検出は検出感度及び血漿 DNA の抽出法の問題点が解決されるならば、転移の早期診断（手術適応の判断）など、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。

肺癌における P53 変異の種類から肺扁平上皮癌の発がん原因を発生部位別に検討した結果、肺門部では transition 変異が多く、自然突然変異により発生すると考えられる腫瘍の割合が他部位よりも高いという、従来の発がん機序説とは異なった結果が得られた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Namiki, T., Yanagawa, S., Izumo, T., Ishikawa, M., Tachibana, M., Kawakami, Y., Yokozeki, H., Nishioka, K. and Kaneko, Y. Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection:

- 6p gains may predict poor outcome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 157: 1-11, 2005.
- 2) 2. Zhang, Y., Zelenik-le, N., Emmanuel, N., Jayathilaka, N., Chen, J., Strissel, P., Strick, R., Li, L., Neilly, MB., Taki, T., Hayashi, Y., Kaneko, Y., Schlegelberger, B. and Rowley, JD. Characterization of genomic breakpoints in MLL and CBP in leukemia patients with t(11;16). *Genes Chromosomes Cancer*, 41: 257-265, 2004.
 - 3) 3. Yuki, Y., Imoto, I., Imaizumi, M., Hibi, S., Kaneko, Y., Amagasa, T, and Inazawa, J. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19) (q23;p13). *Cancer Sci.*, 95: 503-507, 2004.
 - 4) 4. Ishiguro, M., Iwasaki, H., Ohjimi, Y. and Kaneko, Y. Establishment and characterization of a renal cell carcinoma cell line (FU-UR-1) with the reciprocal ASPL-TFE3 fusion transcript. *Oncology Reports*, 11: 1169-1175, 2004.
 - 5) 金子安比古 : ウィルムス腫瘍の染色体異常と遺伝子異常. *細胞*, 36: 273-277, 2004.
 - 6) 金子安比古 : 骨軟部腫瘍の染色体転座・融合遺伝子. *日本医事新報*, 4185: 92-94, 2004.
 - 7) Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H. HDAC6 expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10:6962-6968, 2004.
 - 8) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Suemasu, K., Higashi, Y., Okazaki, T., Kiyama, R., Nakachi, K., Fujita, T. and Hayashi, S. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Science*, 95: 496-502, 2004.
 - 9) 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. Mo. Endocrin.*, 32: 649-661, 2004.
 - 10) Terasaka, S., Aita, Y., Inoue, A., Hayashi, S., Nishigaki, M., Aoyagi, K., Kiyama, Y., Sakuma, Y., Akaba, S., Tanaka, J., Sone, H. Yonemoto, J., Tanji, M. and Kiyama, R. Expression profiling of the estrogen responsive genes for evaluation of estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *Environ. Health Persp. Toxicogenomics*, 112: 773-781, 2004.
 - 11) Hayashi, S. Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58: 1-9, 2004.
 - 12) 林 慎一、鈴木 貴 : 核内受容体研究における進展. 特集・ホルモン療法の最近の進歩、細胞, 36: 388-391, 2004.
 - 13) 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 : 848-850, 2004.
 - 14) 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*, 52: 83-89, 2004.
 - 15) 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)*, 20: no.2, 2-11, 2004.
 - 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, p8-10, 2004.
 - 17) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Hanada, R., Nakagawara, A. and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. (in submission)
 - 18) 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.*, 10: 2482-2490, 2004.

- 19) 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.
- 20) Ishikubo, T., Nishimura, Y., Yamaguchi, K., Khansuwan, U., Arai, Y., Kobayashi, T., Ohkura, Y., Hashiguchi, Y., Tanaka, Y. and Akagi, K. The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer Lett.*, 8: 216(1): 55-62. 2004.
- 21) Yagura, T., Bidyut, R., Nishikawa, S., Karasawa, A., Yamaguchi, K., Ogata, M., Kobayashi, T. and Akagi, K. Identification and allelic frequencies of a novel polymorphism in human Ku70 gens. *Kwansai Gakuen University Natural Sciences Review*, 9: 17-21, 2004.
- 22) 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 Sci.*, 95: 334-41, 2004.
- 23) Ishikawa, N., Daigo, Y., Yasui, W., Inai, K., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Kohno, N. and Nakamura, Y. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10: 8363-70, 2004.
- 24) Chinen, K., Ohkura, Y., Matsubara, O. and Tsuchiya, E. Hemophagocytic syndrome associated with clostridial infection in a pancreatic carcinoma patient. *Pathol. Res. Practice*, 200: 241-245, 2004.
- 25) 石川雄一、土屋永寿．肺癌、病理診断に役立つ分子病理学・10、シリーズ最新医学講座・II.臨床検査 48: 1167-72, 2004.
2. 学会発表
- 1) Kaneko, Y., Watanabe., N, Tomioka., N, et al. : Neuroblastoma that might benefit from mass screening. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June In abstract p72. 2004; 250.1.
- 2) 渡辺直樹、金子安比古、他 : WT1 異常を示さず 12 トリソミーを伴う高 2 倍性群はウイルムス腫瘍の新しいサブグループか? 第 63 回日本癌学会学術総会記事、2004, 福岡.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 佐治重衡、林 慎一、吉田敦行、井上暁夫、広瀬牧子、堀口眞一郎、戸井雅和 : 新規エストロゲン誘導遺伝子 histone deacetylase 6 (HDAC6) は ER α 陽性乳癌患者の予後と tamoxifen 感受性を予測する. 第 12 回日本乳癌学会総会, 2004, 北九州.
- 7) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、黒住昌史、原田信広、林 慎一 : 乳癌における間質細胞の特性と予後因子との相関. 第 5 回ホルモンと癌研究会, 2004, 大阪.
- 8) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、小林康人、黒住昌史、原田信広、林 慎一 : 間質細胞による乳がんのエストロゲンシグナルの制御機構および予後因子との相関. 第 63 回日本癌学

- 会総会, 2004年, 福岡.
- 9) 莊厳哲哉、江口英孝、中地 敬、林 慎一、
正村 滋: エストロゲン枯渇耐性乳がん細胞
株におけるエストロゲン受容体 α の機能・発
現制御. 第27回日本分子生物学会年会, 2004
年, 神戸.
 - 10) 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, ハワイ.
 - 11) 林 慎一: 乳癌におけるエストロゲンシグナ
ル動態の解析と臨床応用. 第77回日本内分
泌学会学術総会シンポジウム「内分泌代謝学と
癌研究」, 2004年, 京都.
 - 12) 林 慎一: エストロゲンシグナル研究と内分
泌治療奏効性予測. 第5回乳癌最新情報カン
ファレンス, 2004年, 和歌山.
 - 13) 林 慎一: 癌細胞のホルモン依存性増殖と臨
床応用. 第75回藤田保健衛生大学医学セミナ
ー特別講演, 2004年, 名古屋.
 - 14) 林 慎一: 癌細胞のホルモン依存性増殖機構
とその臨床応用. 第34回東北大学医学部保健
学科学術研究会, 2004年.
 - 15) 林 慎一: エストロゲンシグナルと内分泌治
療反応性予測. 乳癌トランスレーションリサ
ーチセミナー招聘講演, 2004年, 仙台.
 - 16) 林 慎一: 乳がんの内分泌治療効果予測を目
指した基礎研究. 第63回日本癌学会総会シン
ポジウム「乳がん診療のための最先端研究」,
2004年, 福岡.
 - 17) 林 慎一: 性ステロイド依存性腫瘍における
アンドロゲンとエストロゲン作用の類似点と
相違点. 第1回東北ホルモンと癌研究会講演,
2004年11月, 仙台.
 - 18) 林 慎一: 乳癌内分泌治療のための分子診断
法開発. 第8回 Breast Cancer UP-TO-DATE
Meeting, 2005年1月, 横浜.
 - 19) 角 純子、中川原 章、花田良二、金子安比
古. 血清 NM23 蛋白質による腫瘍の予後診
断とその生物学的基盤の解析. 第63回日
本癌学会総会, 2004.
 - 20) 新津 望、角 純子、東原正明、本間良夫、
平野正美. 細胞質内 nm23-H1 陽性の末梢性 T
細胞リンパ腫患者の予後は不良である. 第6
3回日本癌学会総会, 2004.
 - 21) 角 純子、金子安比古. 血清 NM23 蛋白質に
よる神経芽腫の予後診断. 第5回神経芽腫
(基礎)研究会, 2004.
 - 22) 山口研成、島村智崇、石窪力、藤野喜理子、
山田麻子、有馬美和子、神田裕三、多田正弘.
C型肝炎による肝細胞癌治療後におけるイン
ターフェロン治療の問題点. 第42回日本癌治
療学会総会, 2004, 京都.
 - 23) 島村智崇、山口研成、石窪力、藤野喜理子、
山田麻子、有馬美和子、神田裕三、多田正弘.
転移性結腸・直腸癌に対する 5FU -
leovorinate (I-LV) 療法(de Gramont 法)の
治療成績. 第42回日本癌治療学会総会, 2004、
京都.
 - 24) 下條蒼幸、山口研成、赤木 究. Methylation
specific LMP (MS-LAMP)法の開発. 第63回
日本癌学会総会, 2004, 福岡.
 - 25) 赤木 究、山口研成、神津知子. 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63回日本癌学会総会, 2004、
福岡.
 - 26) 菅沼雅美、来須美樹、鈴木香、山口研成、藤
木博太. N-Acetylcysteine による *H. pylori*
発がん因子 Tip の2量体形成阻害を介する新
しいがん予防機構. 第63回日本癌学会総会、
2004, 福岡.
 - 27) 八岡利昌、石窪 力、新井吉子、西村洋治、
網倉 克己、坂本裕彦、山口研成、神田裕三、
田中洋一、赤木 究. MSI 陽性直腸癌の臨床病
理学的検討. 第63回日本癌学会総会, 2004、
福岡.
 - 28) Hamaguchi, T., Ohtsu, A., Hyodo, I., Arai,
Y., Takiuchi, H., Fujii, H., Yamaguchi, K.,
Yoshida, M. and Shirao, K. A phase II
study of biweekly irinotecan and
mitomycin C combination therapy in
patients with fluoropyrimidine-resistant
advanced gastric cancer: The Japan Clinical
Oncology Group trial (JOOGO109).
Abstract Citation: J. of Clin. Oncol.,

22(14S): 4071,2004.

- 29) 土屋永寿、小林康人、石川雄一：気管支扁平上皮癌発高危険度群の同定. 第93回日本病理学会総会, 2004、札幌
- 30) 土屋永寿、小林康人、西村仁志、石川雄一、中川健、佐藤之俊：肺神経内分泌腫瘍の組織分類に客観性を付与する分子マーカー. 第63回日本癌学会学術総会, 2004、福岡

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」

特許第3557367号：平成16年5月21日 特許権取得

分担研究報告書

ウィルムス腫瘍の分子細胞遺伝学的診断に関する研究

分担研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター研究室・室長

研究要旨 ウィルムス腫瘍 39 例の染色体・CGH、WT1、IGF2 の LOI、LOH をそれぞれ分析し、WT1 異常群 15%、IGF2 の loss of heterozygosity (LOH) 群 31%、IGF2 の loss of imprinting (LOI) 群 15%、WT1 異常と IGF2 異常のないその他群が 39% に分類した。この腫瘍が不均一な集団であることを示した。IGF2 LOI 群は他群に比較して 16q- と +12 の頻度が高かった。16q には CTCF 遺伝子が位置しており、16q 欠失による CTCF 蛋白の産生低下が IGF2 LOI の発生に関与するという報告を支持した。+12 は染色体数が 50 以上に増加する高 2 倍性ウィルムス腫瘍のほぼ全てにみられる。高 2 倍性腫瘍では 11 番染色体上の癌抑制遺伝子や 11p13 に位置する WT1 の 3 コピー化が腫瘍化に不利に働くと推測する。そのため 11 番染色体をトリソミーにせず、IGF2 の LOI または LOH により IGF2 を過剰発現させ増殖を促進していると考えられた。

A. 研究目的

ウィルムス腫瘍は代表的な小児の腎腫瘍である。その原因遺伝子として 11p13 染色体領域より WT1 が単離されたが、WT1 異常はウィルムス腫瘍の 15% にみられるに過ぎない。私たちは 12 トリソミーを伴う高 2 倍性腫瘍が WT1 異常をもたないウィルムス腫瘍のサブグループであることを報告した。IGF2 は 11p15 に位置し、父性発現する imprint 遺伝子である。ウィルムス腫瘍では高率に IGF2 の loss of imprinting (LOI) や loss of heterozygosity (LOH) が生じていると欧米から報告されている。最近、IGF2 LOI の発生機構の一つとして、16q22 に位置する CTCF が 16q 染色体長腕欠失に伴い欠失することが関係していると報告された。ウィルムス腫瘍を comparative genomic hybridization (CGH)・染色体分染法により分析し、+12 や 16q- の有無を明らかにする。また、IGF2 LOI、11p15 LOH、WT1 異常を分析し、その所見と +12 や 16q- の関係を明らかにする。以上により、ウィルムス腫瘍の発生機構を解明することが研究の目的である。

B. 研究方法

ウィルムス腫瘍 39 例について CGH・染色体分析を行った。腫瘍 DNA と正常 DNA を対象に、11 番染色体のマ

イクロサテライトマーカーを用いて、LOH 分析を実施した。次に WT1 異常をサザン法と、全エキソン PCR 産物の直接塩基配列決定法で分析した。また、IGF2 の ApaI RFLP 部位を含む領域を、ゲノム DNA の PCR および RT-PCR により増幅し、その産物を ApaI で消化した。電気泳動像を比較し、LOI が生じているかどうか調べた。

（倫理面への配慮）

ウィルムス腫瘍を研究に使用することについて、親よりインフォームドコンセントを得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。この研究は胚細胞遺伝子変異分析を含まない。研究計画を埼玉県立がんセンター倫理委員会に提出し、研究の実施についての承認を得た。

C. 研究結果

ウィルムス腫瘍 39 例について 11 番染色体の LOH 分析を行い、11p15 LOH のある 15 例と IGF2 アレルがヘテロである 24 例に分類した。次に後者 24 例を IGF2 アレル発現分析から、LOI を示した 6 例と retention of imprinting (ROI) を示した 18 例に分類した。さらに、WT1 分析の結果から、11p15 LOH のある 15 例中 3 例に WT1 の点変異かメチル化を、また IGF2 ROI を示した 18

例中 3 例に WT1 の欠失か点変異を認めた。以上の所見をまとめると、39 例中、WT1 異常群 6 例 (15%)、IGF2 LOH 群 12 例 (31%)、IGF2 LOI 群 6 例 (15%)、IGF2 ROI 群 15 例 (39%) になる。CGH・染色体分析の結果、+12 と 16q-は IGF2 LOI 群の 67%と 33%、IGF2 LOH 群の 17%と 8%、IGF2 ROI 群の 20%と 7%にみられたが、両異常は WT1 異常群にはみられなかった。+12 と 16q-の頻度は IGF2 LOI 群において他群より有意に高かった (P=0.008 と P=0.01)。患者年齢の中央値は WT1 群 1 歳 2 ヶ月、IGF2 LOI 群 4 歳、IGF2 LOH 群 2 歳 6 ヶ月、IGF2 ROI 群 1 歳であり、IGF2 LOI+LOH 群の年齢が高かった。病期の分布は 3 群間に差を認めなかった。

D. 考察

ウイルス腫瘍には 11p13 に位置する WT1 遺伝子異常により発生する腫瘍の他に、11p15 に位置する IGF2 遺伝子の loss of imprinting (LOI)や LOH を示す腫瘍が多数あると欧米から報告されている。IGF2 は胎児期の増殖因子であり、LOI による過剰発現が腫瘍の増殖にかかわると考えられている。私たちの 39 例の分析では、WT1 異常を示す腫瘍が 15%、LOH または LOI により IGF2 発現異常を示す腫瘍が 46%、WT1 と IGF2 異常のない腫瘍が 39%であった。WT1 異常と IGF2 異常のない 39%の腫瘍については、その発生に関与する遺伝子は不明である。

CTCF は insulator protein であり、母方 H19 プロモーター領域に結合し、H19 下流のエンハンサーからのシグナルが IGF2 に伝えられるのをブロックする。すなわち、母方アレルでは IGF2 の発現は抑制される。母方の H19 プロモーター領域がメチル化されると、CTCF が結合できず、IGF2 が発現する。すなわち、IGF2 LOI が生じる。これとは別の機構により IGF2 LOI が生じるとする考えがある。CTCF はウイルス腫瘍でしばしば欠失のみられる 16q22 に位置しており、16q-の結果 CTCF 蛋白質の産生が抑制されると、insulator が働かず IGF2 LOI が生じると推測される。私たちの研究によると、IGF2 LOI 群における 16q-の頻度は IGF2 LOH 群、IGF2 ROI 群、WT1 群に比して有意に高かった。この結果は、上記の仮説を支持している。さらに私たちは IGF2 LOI 群における +12 の頻度は他群より高いことを示した。+12 を示す腫瘍のほとんどは染色体数が 50 以上に増加した高 2 倍性核型を示す。増加する染色体は 12 番染色体の他に、1q, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 17 番染色体であり、

11 番染色体は決して増加することはない。増加する染色体にはがん遺伝子や増殖関連遺伝子が位置しており、これらの染色体が増加すると腫瘍の増殖能が亢進すると推測される。高 2 倍性腫瘍に IGF2 LOI の頻度が高い理由として以下を考えた。高 2 倍性腫瘍は増殖関連遺伝子の載った染色体を増加させ、増殖能を維持している。IGF2 の載った 11 番染色体をトリソミーにして増殖能を高めようとするが、11 番染色体には高 2 倍性腫瘍の原因になる癌抑制遺伝子が載っているため、トリソミー化は腫瘍化のさまたげになる。高 2 倍性ウイルス腫瘍の発生には WT1 の正常発現が必須であり、11 トリソミーによる WT1 過剰発現は腫瘍化を妨げる。そこで、11 番染色体をダイソミーのまま、IGF2 を過剰発現する機構、つまり IGF2 LOI または IGF LOH を獲得した。一方、乳児期の腎腫瘍である congenital mesoblastic nephroma (CMN)は ETV6-TRK3 融合遺伝子により発生する腫瘍であるが、11 トリソミーを高頻度に合併する。増加した 11 番染色体は IGF2 の発現している父親由来であるという。CMN の発生には、WT1 や 11 番染色体上の癌抑制遺伝子の関与を必要としないと考えれば、CMN と高 2 倍性ウイルス腫瘍における、IGF2 の過剰発現機構が、IGF2 の重複によるのか、LOI または LOH によるのかという違いになっていると考えられる。

E. 結論

ウイルス腫瘍を WT1 異常群 15%、LOH または LOI により IGF2 発現異常群 46%、WT1 と IGF2 異常のない群 39%に分類できた。IGF2 LOI を示す腫瘍は 16q-または +12 の頻度が高い。16q-には CTCF 遺伝子が位置しており、16q 欠失による CTCF 蛋白質の産生低下が IGF2 LOI の発生に関与するという報告を支持する所見を得た。+12 は染色体数が 50 以上に増加する高 2 倍性腫瘍にみられる。高 2 倍性腫瘍では 11 番染色体上の癌抑制遺伝子や 11p13 に位置する WT1 の 3 コピー化が腫瘍化に不利に働く。そのため 11 番染色体をトリソミーにせず、IGF2 の LOI または LOH により IGF2 を過剰発現させ増殖を促進していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Namiki, T., Yanagawa, S., Izumo, T., Ishikawa, M., Tachibana, M., Kawakami, Y., Yokozeki, H., Nishioka, K. and Kaneko, Y. Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 157: 1-11, 2005.
- 2) Zhang, Y., Zelenik-le, N., Emmanuel, N., Jayathilaka, N., Chen, J., Strissel, P., Strick, R., Li, L., Neilly, MB., Taki, T., Hayashi, Y., Kaneko, Y., Schlegelberger, B. and Rowley, JD. Characterization of genomic breakpoints in MLL and CBP in leukemia patients with t(11;16). *Genes Chromosomes Cancer*, 41: 257-265, 2004.
- 3) Yuki, Y., Imoto, I., Imaizumi, M., Hibi, S., Kaneko, Y., Amagasa, T, and Inazawa, J. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci.*, 95: 503-507, 2004.
- 4) Ishiguro, M., Iwasaki, H., Ohjimi, Y. and Kaneko, Y. Establishment and characterization of a renal cell carcinoma cell line (FU-UR-1) with the reciprocal ASPL/TFE3 fusion transcript. *Oncology Reports*, 11: 1169-1175, 2004.
- 5) 金子安比古 : ウィルムス腫瘍の染色体異常と遺伝子異常。細胞、36: 273-277, 2004.
- 6) 金子安比古 : 骨軟部腫瘍の染色体転座・融合遺伝子。日本医事新報、4185: 92-94, 2004.

2. 学会発表

- 1) Kaneko, Y., Watanabe, N, Tomioka, N, et al. : Neuroblastoma that might benefit from mass screening. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June In abstract p72. 2004; 250.1.
- 2) 渡辺直樹、金子安比古 他 : WT1 異常を示さず 12 トリソミーを伴う高 2 倍性群はウィルムス腫瘍の

新しいサブグループか？第63回日本癌学会学術総会記事、2004、福岡。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳癌の分子診断法の開発に関する研究

分担研究者 林 慎一 東北大学医学部保健学科分子検査学分野 教授

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。今年度は特に臨床への導入を目指した操作の簡便化、自動化、高精度化を目的として3次元マイクロアレイシステム導入の検討を開始した。大規模マイクロアレイ、カスタムマイクロアレイによる解析結果から絞り込まれた候補遺伝子、約50個を載せた3次元型アレイチップを作成した。本チップを用いて基本的条件検討を行った。さらに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。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用いて特にアロマトラ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癌ミクロ環境の総合的評価系の開発を進め、その過程で、癌組織の間質が個々の乳癌患者ごとに性質が異なることが明らかとなった。

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研究の成果に基づき、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. 以前行った大規模マイクロアレイや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た解析結果からさらに候補遺伝子を絞り込み、3次元型マイクロアレイチップを作成する。
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、昨年構築したエストロゲン応答配列を転写調節領域に持ったGFP発現ベクター導入細胞を用い、手術材料より得た標品について解析する。
6. 新たに上記レポーターのウイルスベクターへの組み込みを行い、原発腫瘍への導入を可能とする系を確立する。

(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。

C. 研究結果

1. これまでの乳癌培養細胞株を用いたマイクロアレイ解析、乳癌組織検体の解析、術前ホルモン療法（アロマターゼ阻害剤投与）を施行した治療前の生検標品と治療後の手術時の標品乳癌患者検体についての解析、また、real time RT-PCR による乳癌組織標品の解析等の結果を総合的に評価して、内分泌療法の奏効性予測因子となる可能性のある遺伝子を絞り込み、約 50 遺伝子を搭載した 3 次元型マイクロアレイチップを作成した。今後、これを用いて評価を重ねていく。特に高感度化、操作の簡便化、自動化を目指した開発研究を行う。
2. 上記解析の過程で見出されてきたいくつかの候補遺伝子については免疫染色法で解析し、予後データと比較検討したところ、新たな予後因子として HDAC6、IGFBP4 が同定された。HDAC6 については他の複数の施設でも乳癌の予後因子となることが確認された。
3. また、アロマターゼ阻害剤反応性予測を目指し、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、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 を選択し、樹立した。このレポーター細胞を用いて乳癌手術材料から得た間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した。その結果、その活性が患者ごとに大きく異なり、それぞれの癌の間質に個性があることが明らかとなった。また、その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関が見られた。これらのことから、この系は個々の癌の微小環境の評価に有用であると思われた。

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。我々のこれまでのホルモン療法反応性予測診断アレイチップ開発を目指した研究の結果、多くの有益な情報が得られた。たとえば、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と考えられた。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。しかし、複数の候補遺伝子、特に、HDAC6 では免疫染色法による過去の標品の解析結果から、これが乳癌の予後因子となることが我々も含め、複数の他施設でも確認され、我々の戦略が間違っていないことが証明された。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。特に新型のマイクロアレイ装置である 3 次元型アレイチップを導入することによって、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床に実際に導入可能なシステムとなることを目指す。

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に向けて研究を開始した。乳癌手術材料を用いた解析から、この GFP レポーター細胞システムを用いることによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることが示された。このシステムのアロマターゼ阻害薬の奏効性予測への応用に向けてさらに研究を進めたい。そのために個々の原発腫瘍を用いた微小環境評価を可能にする為にウイルスベクターの導入を検討している。

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、EGR3 などの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。さらに実用的なシステムとするため診断用 3 次元型マイクロアレイチップを開発している。一方、これらの研究の過程で新規予後因子 HDAC6 が同定された。また、癌細胞周辺の間質も含めた癌微小環境評価を行うことで内分泌治療の奏効性をより正確に把握することを目的としたアッセイシステムを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H.. HDAC6 expression is correlated with better prognosis in breast cancer. Clin. Cancer Res., 10 : 6962-6968, 2004.
 - 2) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Suemasu, K., Higashi, Y., Okazaki, T., Kiyama, R., Nakachi, K., Fujita, T. and Hayashi, S. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. Cancer Science, 95: 496-502, 2004.
 - 3) 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. Mo. Endocrin., 32: 649-661, 2004.
 - 4) Terasaka, S., Aita, Y., Inoue, A., Hayashi, S., Nishigaki, M., Aoyagi, K., Kiyama, Y., Sakuma, Y., Akaba, S., Tanaka, J., Sone, H., Yonemoto, J., Tanji, M. and Kiyama, R.. Expression profiling of the estrogen responsive genes for evaluation of estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. Environ. Health Persp. Toxicogenomics, 112 : 773-781, 2004.
 - 5) Hayashi, S. Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. Biomedicine & Pharmacotherapy, 58 : 1-9, 2004.
 - 6) 林 慎一、鈴木 貴：核内受容体研究における進展。特集・ホルモン療法の最近の進歩 細胞, 36: 388-391, 2004.
 - 7) 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 : 848-850, 2004.
 - 8) 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, 52: 83-89, 2004.
 - 9) 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), 20: no.2, 2-11, 2004.
 - 10) 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, p8-10, 2004.
- ##### 2. 学会・研究会発表
- 1) 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。
 - 2) 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.
 - 3) 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
 - 4) 佐治重衡、林 慎一、吉田敦行、井上暁夫、広瀬牧子、堀口眞一郎、戸井雅和：新規エストロゲン誘導遺伝子 histone deacetylase 6 (HDAC6)は ER α 陽性乳癌患者の予後と tamoxifen 感受性を予測する。第 12 回日本乳癌学会総会, 2004, 北九州。
 - 5) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、黒住昌史、原田信広、林 慎一：乳癌における間質細胞の特性と予後因子との相関。第 5 回ホルモンと癌研究会, 2004, 大阪。

- 6) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、小林康人、黒住昌史、原田信広、林 慎一：間質細胞による乳がんのエストロゲンシグナルの制御機構および予後因子との相関. 第 63 回日本癌学会総会, 2004 年, 福岡.
- 7) 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がん細胞株におけるエストロゲン受容体 α の機能・発現制御. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年, 神戸.
- 8) 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, ハワイ.
- 9) 林 慎一：乳癌におけるエストロゲンシグナル動態の解析と臨床応用. 第 77 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「内分泌代謝学と癌研究」, 2004 年, 京都.
- 10) 林 慎一：エストロゲンシグナル研究と内分泌治療奏効性予測. 第 5 回乳癌最新情報カンファレンス, 2004 年, 和歌山.
- 11) 林 慎一：癌細胞のホルモン依存性増殖と臨床応用. 第 75 回藤田保健衛生大学医学セミナー特別講演, 2004 年, 名古屋.
- 12) 林 慎一：癌細胞のホルモン依存性増殖機構とその臨床応用. 第 34 回東北大学医学部保健学科学術研究会, 2004 年.
- 13) 林 慎一：エストロゲンシグナルと内分泌治療反応性予測. 乳癌トランスレーションリサーチセミナー招聘講演, 2004 年, 仙台.
- 14) 林 慎一：乳がんの内分泌治療効果予測を目指した基礎研究. 第 63 回日本癌学会総会シンポジウム「乳がん診療のための最先端研究」, 2004 年, 福岡.
- 15) 林 慎一：性ステロイド依存性腫瘍におけるアンドロゲンとエストロゲン作用の類似点と相違点. 第 1 回東北ホルモンと癌研究会講演, 2004 年 11 月, 仙台.
- 16) 林 慎一：乳癌内分泌治療のための分子診断法開発. 第 8 回 Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting, 2005 年 1 月, 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

腫瘍NM23蛋白質の誘導する免疫担当細胞の蛋白質発現変化と予後に関する研究

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 (1) 血清 NM23 蛋白質による予後診断法を応用できる固形腫瘍を広く検索する目的で、今年度は乳癌について検討した。413例の術前血清の NM23 蛋白質を測定したが、高値症例をほとんど見出せなかった。この予後診断法は乳癌には応用できないと判断した。血清 NM23 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍は、白血病、悪性リンパ腫、小細胞肺癌、神経芽腫であり、適応できない腫瘍は、肺腺癌、扁平上皮肺癌、そして乳癌となった。

(2) 血清 NM23 蛋白質の予後因子活性の生物学的基盤を解明するため、NM23 蛋白質の正常および白血病末梢血単核細胞の増殖・生存に対する効果を検討した。NM23 蛋白質を処理した正常末梢血単核細胞細胞に誘導される遺伝子/蛋白質の発現を Protein array や cDNA microarray 等を用いて包括的に解析した。腫瘍の悪性化に関与する多くのサイトカインが誘導されていた。また、誘導されたサイトカイン中 GM-CSF や IL-1 β は初代培養の白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。NM23 は正常末梢血単核細胞（特に、単球）のサイトカイン産生を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持することができると推察される。一方、初代培養の白血病末梢血単核細胞（14症例）について同様の解析を行ったところ、11症例の白血病細胞の増殖・生存が NM23 蛋白質により顕著に促進された。腫瘍細胞が産生する NM23 分子をメディエーターとして、直接および単球を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持すると考えられる。この活性は、血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤の1つと推測される。

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。腫瘍細胞における NM23 遺伝子の過剰発現や、細胞外に分泌された NM23 蛋白質に着目して、血液を用いた予後診断法を開発した。この予後診断法は白血病、悪性リンパ腫、小細胞肺癌および神経芽腫に適用できることを報告してきた。本研究は、この予後診断法を応用できる固形腫瘍を広く検索することを目的の1つとしている（目的1）。今年度は NM23 遺伝子の高発現が報告されている乳癌の血清 NM23 蛋白質を測定し、臨

床的意義を検討した。また、本研究は血清 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している（目的2）。今年度は、NM23 蛋白質を処理した正常および白血病末梢血単核細胞細胞に誘導される遺伝子/蛋白質の発現を protein array や cDNA microarray 等を用いて包括的に解析した。

B. 研究方法

<目的1について>

血清 NM23 蛋白質は、サンドイッチ ELISA 法により測定した。埼玉県立がんセンター病院 乳腺外科(2002-2003年)の手術前血清 413

検体について解析した。

<目的2について>

リコンビナント NM23 蛋白質の正常および白血病末梢血単核細胞の増殖・生存に対する作用は MTT アッセイ法で、また NM23 で誘導される遺伝子/蛋白質の発現は cDNA microarray、multiple RT-PCR、protein antibody array および ELISA で検討した。NM23 蛋白質は自己複製能を獲得している腫瘍株細胞の増殖・生存には効果がないことをすでに確認しているので、初代培養の急性骨髄性白血病細胞（14例）を用いた。

<倫理面への配慮>

研究計画については埼玉県立がんセンター倫理委員会の審査を受けた。

C. 研究結果

(1)血清 NM23 蛋白質による予後診断法を応用できる固形腫瘍を広く検索する目的で、今年度は乳癌について検討した。413例の術前血清の NM23 蛋白質を測定したが、高値症例をほとんど見出せなかった。この予後診断法は乳癌には応用できないと判断した。

(2)リコンビナント NM23 蛋白質を処理した正常末梢血単核細胞細胞には、サイトカインやケモカイン (GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, Gro $\alpha/\beta/\gamma$, MIP-1 β , MCP1, I-309), ICAM-1, MMP12, MMP 7 等が誘導され、IP-10, MIG 等のケモカインの誘導は抑制された。腫瘍の悪性化に関与する多くのサイトカインや生理活性蛋白質が誘導されることが判明した。また、誘導されたサイトカイン中 GM-CSF や IL-1 β は初代培養の白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。一方、初代培養の白血病末梢血単核細胞 (14 症例) について同様の解析を行ったところ、11 症例の白血病細胞の増殖・生存が NM23 蛋白質により顕著に促進された。また、NM23 の増殖・生存促進作用は、各種サイトカイン抗体処理で一部中

和されたので、サイトカインの産生誘導を介していると考えられた。

D. 考察

(1)血清 NM23 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍は、白血病、悪性リンパ腫、小細胞肺癌、神経芽腫であり、適応できない腫瘍は、肺腺癌、扁平上皮肺癌、そして乳癌となった。さらに適応範囲を検索するために、NM23 遺伝子の高発現が報告されている婦人科悪性腫瘍および膵臓癌について次年度から順次測定し、臨床的意義を包括的に検討する予定である。この検索により応用可能な癌の範囲が決定され、さらに対象疾患を拡大できればこの測定系の商品実用化へ拍車がかかると期待される。

(2)腫瘍細胞が産生する NM23 分子をメディエーターとして、直接的および間接的 (単球を介して) に腫瘍細胞の増殖を支持すると考えられる。このような NM23 分子の機能は、血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤の 1 つと推測される。さらに、血清 NM23 濃度や NM23 の腫瘍増殖促進機能を標的とした治療法の開発への発展が期待される。

E. 結論

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 蛋白質が正常および白血病末梢血単核細胞の増殖・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., Kasukabe, T., Honma, Y., Hanada, R., Nakagawara, A. and