

Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. (in submission)

- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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63回日本癌学会総会、2004.
- 3) 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.

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

癌由来血漿変異DNAの検出と臨床応用に関する研究

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 血漿中の癌由来の変異DNAを測定し、化学療法の対象となるステージIVの癌患者血漿から経時的に変化を解析してきた。現在までの膵臓癌患者における解析から1) 血行性転移をした患者では癌の進展に伴い腫瘍由来の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が明らかになった。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。

A. 研究目的

要旨に記したように、癌の進展に伴い癌由来変異血漿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1) 安定した血漿DNA抽出法の確立 2) 検出感度の向上と、適応範囲の拡大を目指した検討を行い、新たなバイオマーカーを開発、臨床応用を目指す。

B. 研究方法

1. 患者血漿から、諸キットおよび抽出法を組み合わせ、純度・回収率の高い抽出法を確立する。
2. 応用範囲の拡大を目指し、MAPKシグナル伝達系のうち、KRASと相補的なBRAF遺伝子の遺伝子変異の高感度検出系を開発する。

(倫理面への配慮)

研修同意を文書にて取得する。特に、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. 様々な抽出法やそれに付加した処理で検討を重ねている。phenol/chloroformに比べ純度を低下させることなく収率が2倍以上にあがっている。
2. BRAF遺伝子はKRAS遺伝子とともにMAPKシグナル伝

達系の一員であり、遺伝子変異は結腸直腸がんで5~22%で認められKRAS遺伝子と相補的であること、変異の約90%はV599Eの変異であることが報告されている。この変異のEn-Rich法を開発し、原発巣および血漿からの変異遺伝子の高感度検出を行った。本法は 10^5 に1個の変異を検出でき、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。大腸癌患者でKRASとBRAF遺伝子変異を組み合わせることで約60%の大腸癌患者を網羅できる。

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が、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、膵臓癌で70~90%、大腸癌で約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検討できる幅が広がり、臨床応用への道が開けるものと考えられる。

E. 結論

昨年までの検討で、がん患者において癌の進展に伴い血漿中の癌由来変異 DNA 比率が増加することが見いだした。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。この過程で、回収率、純度の高い抽出法の確立が定量性の第一歩であると考え、位置づけの検討を行っている。

また、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、応用の幅を広げる検討も合わせて行っている。

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消されたあかつきには、転移の早期診断（手術適応の判断）および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) 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.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 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。
- 2) 斎藤聡、山口研成、島村智崇、坂田優、棟方正樹、小松嘉人、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 の隔週併用化学療法の臨床試験。（中間報告）〔東日本胃癌化学療法研究会〕第42回日本癌治療学会総会，2004，京都。

- 3) 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 - levofofinate (l-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。
- 4) 下條誉幸、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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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 (JCOG0109). Abstract No : 4071 Citation: *Journal of Clinical Oncology*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 土屋 永寿 神奈川県立がんセンター臨床研究所 所長

研究要旨 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 のポリモルフィズムにより、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。原発性肺癌 347 例を用いて、P53 変異とそのポリモルフィズム、K-RAS 変異、および、その他の遺伝子異常を検索し、臨床病理学的特徴との関連から、1) 複数遺伝子異常の組み合わせによる悪性度の変化、2) P53 のポリモルフィズムと治療の反応性、予後との関係を明らかにする。

現在までに扁平上皮癌の P53 検索を全て (74 例) 終了し、他の組織型では P53, K-RAS 検索の一部を終了した。扁平上皮癌の P53 の状態は、変異頻度 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 変異は内因、G/C→T/A 変異はタバコ煙中の発がん物質により生じる。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、内因が原因の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った、従来の説とは異なる結果が得られた。

A. 研究目的

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。単独で肺癌の悪性度に関与する重要な遺伝子の多くはすでに同定されたと考えられるが、それらの遺伝子を組み合わせで悪性度を検討した報告はない。また、P53 遺伝子異常を有する症例では、P53 のコドン 72 のポリモルフィズムにより、化学療法に対する反応性や予後が異なる可能性がある。そこで、肺癌において、1) P53 変異とそのポリモルフィズム、K-RAS 変異、その他の遺伝子を検索し、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して、遺伝子組み合わせの違いによる悪性度の変化、2) P53 のポリモルフィズムと治療の反応性、予後との関係を明らかにする。さらに、3) P53 の変異の種類から発がん機序が推測可能なことから、扁平上皮癌の発生部位別発がん機序の相違をも検討した。

B. 研究方法

検索材料は切除非小細胞肺癌 347 例である。腫瘍の凍結保存材料より DNA を抽出し PCR, SSCP, シーケンスにて P53, K-RAS, P53 ポリモルフィズムを検索し、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、免疫組織学的に検索する。肺癌は 1999WHO 分類に従い分類し、臨床病理学的項目はカルテを参照した。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異の解析については、特定の個人が同定されないように、連結可能匿名化を行った。P53 ポリモルフィズムの解析については対象者からインフォームドコンセントを受ける予定である。

C. 研究結果

- 1) 現在までに扁平上皮癌の P53 検索は全て終了し(74 例)、他の組織型の P53, K-RAS 検索は一部終了した。来年度中に P53 とそのポリモルフィズム、K-RAS の検索を終了し、最終年度で他の遺伝子異常を免疫染色で検索し、結論を出す予定である。
- 2) 検索を終了した扁平上皮癌の P53 の状態をまとめると変異頻度は 46/74(62%) (4 例は 2 ヶ所に変異あり)で、年齢、性、分化度、病理病期による差は認めなかった。5 年生存率は変異の有無では差を認めなかった。
- 3) P53 変異のうち CpG 部位の G/C→A/T Transition は内因、G/C→T/A Transversion は外因、殊にタバコ煙中の発がん物質により生じるとされている。腫瘍の発生部位を肺門、中間、末梢に分け、それぞれに於ける変異の種類と喫煙との関係を検討した。扁平上皮癌全体の各変異の頻度は CpG→A が 18%、G→T が 28%、その他の変異 54%であった。発生部

位別に各変異が占める率を比較すると、CpG→Aは肺門型で40%と最も高く、中間型(0%)とは有意に異なり、末梢型(14%)とは有意に異なる傾向が認められた。G→Tは中間型(27%)で最も高く、末梢型(19%)より有意に高い傾向が認められ、肺門型は(27%)であった。その他の変異は末梢型で最も高く(67%)肺門型(33%)とは有意の差を認めた。

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名、以上(重喫煙者)は63で、部位による喫煙率に差は認められなかったが、SI:400以上の重喫煙者の率は中間型で最も低く(65%)、肺門型(96%)や末梢型(90%)と有意差を認めた。

即ち、内因により発生する癌の割合は重喫煙者の多い肺門型で最も高く、喫煙が原因の癌の割合は喫煙量の少ない中間型で最も高く、様々な原因によると考えられる癌は重喫煙者の多い末梢型で最も高かった。

D. 考察

来年度のうちにはP53, K-RAS, P53ポリモルフィズムの解析を終了し、組織アレイの作製に取りかかる予定である。

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にも関わらず内因が原因で発生したと考えられる腫瘍の割合が他部位に比して最も多かった。気管・気管支モデルを用いたタバコ煙中微粒子の集積パターンの研究で、いわゆる“Hotspot”として気管・気管支分岐部での高度な集積が証明されているが、より末梢の分岐部ほど集積するとする報告や、大部分は気管支末梢に集積するとした報告が多い。このことから肺門部ではクリアランスが良く、外因性発癌物質の沈着・蓄積が起こりにくく、タバコ煙中の発がん物質によるDNAアダクトの産生が少ないため、喫煙が直接の発がん原因となる腫瘍の割合が他部位に比較し少ないと考えられた。

中間型では重喫煙者が最も少なかったにも関わらず、喫煙(外因性発癌原因)による変異が最も多かった。その原因は中間部の気管支にタバコ煙中の発がん物質を含んだ微粒子がより多く沈着するためと推測された。

気管支末梢部では様々な原因によると考えられる癌が最も多かった。末梢気管支では粘膜の線毛運動が中枢に比べ低いこと、および外来物質による慢性炎症で気道粘膜の損傷が存在する場合も少なくとも、排痰機構が破綻をきたしていることから、様々な外因性発がん物質が末梢部に沈

着していると推測される。このため末梢発生の扁平上皮癌では発がん原因の多様化を招いているものと推測された。

E. 結論

肺癌に於ける複数の遺伝子変異の解析は順調に進んでいる。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、肺門部では内因が原因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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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) 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
- 2) 土屋永寿、小林康人、西村仁志、石川雄一、中川健、佐藤俊之：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

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Namiki, T., Yanagawa, S., Izumo, T., Ishikawa, M., Tachibana, M., Kawakami, Y., Yokozeiki, 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.
- 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.