

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 1 7 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田哲司

平成 1 8 (2 0 0 6) 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. プロテオーム解析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	11
関する研究	
前川真人	
3. 腹水洗浄細胞を用いた胃がん細胞の高感度検出法の	18
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	23
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	29
佐々木一樹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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）
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」

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

研究要旨

近年急速に進歩したプロテオーム等のバイオテクノロジーの先端技術を応用し、流血中や尿中等に存在する核酸、タンパク質、ペプチドを高感度に検出・定量解析し、腫瘍マーカーとしてがん検診に応用できる可能のある分子を特定することを目的に研究を行った。平成17年度までには胃がん、膵がん、腎細胞がん、子宮体がんの早期診断や病態の診断に応用が期待できる腫瘍マーカーを開発し、臨床応用可能性を検討する段階まで発展することができた。

山田哲司

国立がんセンター研究所部長

前川真人

浜松医科大学医学部教授

中山 淳

信州大学医学部教授

近藤 格

国立がんセンター研究所室長

佐々木一樹

国立循環器病センター研究所室長

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。

このような状況の一方で、プロテオームの基礎研究の領域では近年急速な技術革新が行われ、微量なタンパク質、ペプチドの発現パターンが高感度で網羅的に検出されるようになってき

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

ている。またバイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のない様に思われるタンパク質の定量データからも、新たな診断情報が得られる事例も見られる様になって来ている。

本研究班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た。

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 子宮体がんの新規腫瘍マーカー開発

子宮体がん患者92例と対照者34例(子宮脱患者17例、健常者17例)の血清からアルブミン結合ペプチドを四重極搭載の飛行時間型質量分析法にて解析した。Mann-Whitney U 検定で P 値が 0.00001 以下、Receiver operating characteristics (ROC) 曲線下面積が 0.8 以上となるピークを3本同定した。対照者の平均値+標準偏差の2倍値をカットオフとすると、感度 65% (60/92)、特異度 94% (32/34) で子宮体がん患者を検出することが可能であった。さらに手術病期が0期やI期の早期症例でも、それぞれ感度 67% (4/6)、60% (38/63) で検出可能であった。

② 膵がんの腫瘍マーカー開発

昨年度までに国立がんセンター中央病院の受診者の血漿を用い、高精度・高分解能の質量分析と機械学習法で、94% (207/220) の判別率で膵がん患者を診断できる方法を開発した。今年度は他施設症例、特に膵がんと鑑別が問題となる慢性膵炎患者を含め 25 例の解析を行い、再現性を確認した。

③膵がん培養株の上清ペプチドーム解析

膵がん培養株の上清から同定された1330のペプチドが344種の前駆タンパク質に帰属することを明らかにした。プロセッシングにより生じたものが内10種あり、膜タンパク質、転写関連因子、脱リン酸化酵素が含まれていた。

④多次元液体クロマトグラフィーによる血清タンパク質のプロテオーム解析

肺癌患者の血清タンパク質を多次元液体クロマトグラフィーで分画し、高感度の蛍光色素で標識後、二次元電気泳動で定量解析した。観察された約3900個のスポットのうち、健常者と比較して発現差のある364個は58種のタンパク質に帰属することを質量分析にて明らかにした。

2) 糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発

胃癌患者56例の術中腹水洗浄細胞の α 4GnT mRNA発現をRT-PCRで検討し、細胞診の結果と比較した。両者の一致率は70% (39/56)で、細胞診が陰性であった44例中14例(32%)はPCRのみが陽性であり、さらにその内13例(93%)は漿膜浸潤があった。25ヶ月間の追跡調査の結果、細胞診陰性・PCR陽性群の再発率は55%で、細胞診陰性・PCR陰性群の再発率

20%を上回った。

3) がん特有の遺伝子発現の検出
新規 RT-PCR-SSCP 法を開発し、各種アミラーゼ遺伝子の発現を分別定量した。ほぼ全ての組織でAMY2B 遺伝子が発現し、一部はAMY2A、AMY1A を発現していた。また一部の癌細胞株ではAMY1Aのみの発現を認めた。

D. 考察

腫瘍組織より分泌されたペプチドはアルブミンなどの担体に結合することで、腎からの排出が抑制され、安定的に流血中に存在するものと考えられる。アルブミン結合ペプチドのプロファイリングががんの診断に有用性があることは国内外の研究者により指摘されていたが、本研究で初めてそれを実証した。また翻訳後修飾の異常を検出することで血清診断を行うことができる可能性がある結果が得られた。

本研究で発見した子宮体がんのマーカーによる感度は65%であり、見落としがあるため、単独では子宮体がんの検診には用いることができない。子宮内膜細胞診、超音波検査などを補い、これらの検査と併用することにより、診断精度を上げることが期待される。

培養細胞の上清を対象としたペプチドーム解析とプロテオーム解析を別途に実施することにより、膵癌培養細胞から分泌されるペプチドを多数同定することが可能であった。

また腫瘍マーカーによる病態の診断にも成果が見られた。 α 4GnT mRNA をターゲットとした RT-PCR 法は腹水洗浄液中に存在する胃癌細胞の検出に有用であり、細胞診と α 4GnT mRNA をターゲットとする RT-PCR 法を組み合わせることにより正確に予後を推定することができると考えられる。

アミラーゼ遺伝子発現型分類法において、簡便性、正確性の高い RT-PCR-SSCP 法を確立し、正常組織、がん細胞等の組織間における発現型の特徴を確認することができた。アミラーゼ産生腫瘍の病態生理学的意義についても一歩近づいたと考える。

E. 結論

現在までに胃がん、膵がん、腎細胞がん、子宮体がんの早期診断や病態の診断に応用が期待できる腫瘍マーカーを開発

した。今後発生頻度の高い腫瘍を含め、より汎用性の高い腫瘍マーカーの開発に発展させる必要がある。

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。)

(分担研究報告書参照)

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

「プロテオーム解析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

研究要旨

子宮体がん患者92例と対照者34例（子宮脱患者17例、健常者17例）の血清からアルブミン結合ペプチドを四重極搭載の飛行時間型質量分析法にて解析した。Mann-Whitney U 検定で P 値が 0.00001 以下、Receiver operating characteristics (ROC) 曲線下面積が 0.8 以上となるピークを 3 本同定した。対照者の平均値+標準偏差の 2 倍値をカットオフとすると、感度 65% (60/92)、特異度 94% (32/34) で子宮体がん患者を検出することが可能であった。さらに手術病期が 0 期や I 期の早期症例でも、それぞれ感度 67% (4/6)、60% (38/63) で検出可能であった。

A. 研究の目的

現在、子宮体がんの検査法として、子宮体がん検診（子宮内膜細胞診）がある。我が国では、昭和 58 年 2 月より老人保健法による子宮頸がん検診、昭和 62 年度より子宮体がん検診が開始されたが、現在の子宮がん検診受診率は老人保健法下では全国平均で約 15% に低迷しており、体がん検診施行率はわずか 5~6% と報告されている。老人保健法による体がん検診の対象は、過去 6 ヶ月以内に不正性器出血がある者で、50 歳以上か閉経以後の婦人、あるいは未経妊婦で月経不規則の場合、医師が必要と認める場合となっ

おり、極めて限定され十分とはいえない。また、子宮体がんは子宮の体部、すなわち、子宮の奥から発生するため、通常の子宮頸がん検診（子宮頸部をへらで擦り検査する方法）では検出できないことも多く、子宮内腔に細いスティック状の器具（細いブラシなど）を挿入して細胞を採取する方法で検査を行うが、進行初期では診断に至らないことも稀ではない。本検査は特に閉経後の被検者では子宮口が閉鎖して検査自体が行えない場合があることと、検査時の強い痛み、出血、感染、子宮穿孔などの問題点がある。この点が、被験者にとっても検査を行う婦人

科医にとっても、子宮頸がんのように簡便かつ被侵襲性で受け入れられやすいものではなく、子宮体がんの検診が敬遠される原因の一つとなっている。

そのため多数の被験者から子宮体がん罹患者を効率良く、かつ非侵襲的にスクリーニングし、治癒の可能な早期がんを発見できるがん検診技術の開発が必要である。

この様な状況の一方で、プロテオームの基礎研究の領域では近年急速な技術革新が行われ、微量なタンパク質、ペプチドの発現パターンが高感度で網羅的に検出されるようになってきている。またバイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のない様に思われるタンパク質の定量データからも、新たな診断情報が得られる事例も見られるようになって来ている。

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、子宮体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行った。

B. 研究方法

独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター婦人科で2001年から2004年9月までの期間に採取された子宮体がん患者92例と対照者34例(子宮脱患者17例、健常者17例)の合計125症例の凍結保存されていた血清を用いた。Perkin-Elmer社から市販されている proEXPRESSION kit を用いてアルブミン結合ペプチドを分離した。ZipPlate C-18(Millipore社)を用いて脱塩後、Perkin-Elmer社のMALDI(matrix-assisted laser desorption/ionization) plate に添

付し、マトリックスとして sinapnic acid を用いた。四重極搭載の飛行時間型質量分析器(ProTOF2000 Perkin-Elmer社)にて1000-8000 m/zの範囲でスペクトラを3回測定した。得られたペプチドデータは独自に開発したソフトウェア NCC-ProteoJudge にてピーク検出し、ペプチドピーク強度を取得した。ペプチドピーク強度は総強度補正を行い、症例間で一定の値とした。

(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、研究計画は事前に独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター及び国立がんセンターの倫理委員会の審査を受け、研究の目的と方法に科学的に妥当性があり、同意を得る方法に問題がなく、研究によって提供者の不利益が生じない事の審査を受け、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、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、身体的な危険や負担はほとんどないと考えられる。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

Mann-Whitney U 検定で P 値が 0.00001 以下、Receiver operating characteristics (ROC) 曲線下面積が 0.8 以上となるピークを 3 本同定した。対照者の平均値+標準偏差の 2 倍値を

カットオフとすると、感度 65% (60/92)、特異度 94% (32/34) で子宮体がん患者を検出することが可能であった。さらに手術病期が 0 期や I 期の早期症例でも、それぞれ感度 67% (4/6)、60% (38/63) で検出可能であった。さらに 3 本のピークを組み合わせて用いることで、感度 65% (60/92)、特異度 94% (27/30) で子宮体がん患者を検出でき、CA125 の感度 22% (17/77)、特異度 90% (27/30) を上回った。

D. 考察

腫瘍組織より分泌されたペプチドはアルブミンなどの担体に結合することで、腎からの排出が抑制され、安定的に流血中に存在するものと考えられる。アルブミン結合ペプチドのプロファイリングががんの診断に有用性があることは国内外の研究者により指摘されていたが、本研究で初めてそれを実証した。

本研究で発見したマーカーによる感度は 65% であり、単独では見落としがあるため、子宮体がんの検診には用いることができない。子宮内膜細胞診、超音波検査などを補い、これらの検査と併用することにより、診断精度を上げることが期待される。

E. 結論

子宮体がんの早期診断に期待できる腫瘍マーカーを開発した。今後症例数を蓄積し、また他の良性疾患などを含めて検討し、臨床上の有用性を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Yamada T, et al.

Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry.
Mol Cell Proteomics. In press.

Sato S, Yamada T, et al.

β -catenin interacts with the *FUS* proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing.
Gastroenterology. 2005 Oct;129(4):1225-36.

Honda K, Yamada T, et al.

Possible Detection of Pancreatic Cancer by Plasma Protein Profiling.
Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10613-22.

Hayashida Y, Yamada T, et al.

Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling.
Clin Cancer Res. 2005 Nov 15;11(22):8042-7.

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

Protein expression pattern distinguishes different lymphoid neoplasms.
Proteomics. 2005 Nov;5(16):4274-86

Hayashida Y, Yamada T, et al.

E-Cadherin Regulates the Association between β -Catenin and Actinin-4.
Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8836-45.

Hara T, Yamada T, et al.

Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry.
J Urol. 2005 Oct;174(4 Pt 1):1213-7.

Shibata T, Kondo T, et al.

Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features.
Clin Cancer Res. 2005 Sep 1;11(17):6177-85.

Katoh H, Kondo T, et al.

Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome.

J Hepatol. 2005 Nov;43(5):863-74.

Mori Y, Kondo T, Yamada T, et al.

Two-dimensional electrophoresis database of fluorescence-labeled proteins of colon cancer cells.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005 Sep 5;823(2):82-97.

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

Proteomic signatures for histological types of lung cancer.

Proteomics. 2005 Jul;5(11):2939-48.

Idogawa M, Yamada T, et al.

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

Gastroenterology. 2005 Jun;128(7):1919-36.

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

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

Proteomics. 2005 Apr;5(5):1411-22.

Naishiro Y, Yamada T, Kondo T, et al.

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

Oncogene. 2005 Apr 28;24(19):3141-53.

山田哲司、他

大腸発がんの発現プロテオーム解析
疾患プロテオミクスの最前線. 217-22,
2005

山田哲司、他

国立がんセンター研究所 ー先端ラ
ボ報告ー
疾患プロテオミクスの最前線. 185-7,
2005

本田一文、山田哲司

SELDI-TOF-MS 法

THE LUNG perspectives. 13(4):419,
2005

本田一文、山田哲司

腫瘍マーカーと包括的プロテオーム
解析: ペプチドの包括的プロファイリ
ングによる非侵襲的腫瘍マーカー開
発法

分子呼吸器病学 10(2):133, 2005

下重美紀、山田哲司

血液試料の適切な調整法と解析

バイオテクノロジージャーナル
1(3-4):148, 2006

2. 学会発表

第9回がんゲノムサイエンス研究会

特別講演 I

山田哲司「プロテオミクスによる新し
いがんの診断・治療法の開発」

第155回東京医科大学医学会総会

林田康治、山田哲司、他

「大腸がん浸潤先進部で β -catenin
と相互作用する分子のプロテオーム
解析」

日本ヒトプロテオーム機構 第3回
大会

本田一文、山田哲司、他

「SELDI-TOF-MS 法を用いた膵臓がん
血漿腫瘍マーカーの開発」

日本ヒトプロテオーム機構 第3回
大会

原智彦、山田哲司、他

「腎細胞がん診断マーカータンパク
質」

日本ヒトプロテオーム機構 第3回
大会

尾野雅哉、山田哲司、他

「2DICAL による LC/MS の定量的シヨ

ットガン分析」

日本ヒトプロテオーム機構 第3回大会

山田哲司、他

「免疫沈降による β -カテニン/TCF-4転写因子複合体の解析」

第23回 筑波研究発表会 招待講演
山田哲司

「がん克服をめざしたプロテオーム研究の現況」

第25回日本分子腫瘍マーカー研究会
本田一文、山田哲司、他

「高分解能質量分析装置を利用した膵臓がん血漿診断マーカーの開発」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

下重美紀、山田哲司、他

「同位体標識(ICAT)法による大腸がん制御分子機構のプロテオーム解析」

第64回日本癌学会学術総会
シンポジウム

山田哲司

「プロテオーム技術を応用した新しいがんの診断・治療法の開発」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

見田裕章、山田哲司、他

「分裂期チェックポイント分子 CHFRの結合分子探索と機能解析」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

井戸川雅史、山田哲司、他

「TCF/ β -cateninの転写制御でのPoly(ADP-ribose)

Polymerase-1 (PARP-1)の関与」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

林田康治、山田哲司、他

「プロテオーム解析を用いた食道がんに対する化学放射線療法の奏効性予測」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

尾野雅哉、山田哲司、他

「新しいプロテオミクス手法(2DICAL)による大規模発現定量解析」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

原智彦、山田哲司、他

「プロテオーム技術を用いた腎細胞がんの血清バイオマーカー探索」

第64回日本癌学会学術総会
ワークショップ

本田一文、山田哲司、他

「プロテオミクス解析と機械学習法による膵臓がんの血漿腫瘍マーカーの開発」

第4回北陸ポストゲノム研究フォーラム

本田一文、山田哲司

「プロテオーム技術を用いたがんの診断と浸潤・転移の分子機構解明」

第1回日本臨床プロテオーム研究会
逢坂由昭、山田哲司、他

「食道がんに対する化学放射線療法の奏効性の血清プロテオーム解析による予測」

第1回日本臨床プロテオーム研究会

下重美紀、山田哲司、他
「同位体標識 (ICAT) 法を用いた大腸
発がん制御分子のディファレンシャル
ディスプレイ解析」

第 1 回日本臨床プロテオーム研究会
本田一文、山田哲司、他
「SELDI-QqTOF-MS と教師付機械学習
法による膵臓がん血漿腫瘍マーカー
の開発」

第 50 回目日本口腔外科学会総会
指名研究講演
山田哲司
「プロテオーム解析による新しいがん
の診断・治療法の開発」

第 43 回日本がん治療学会
シンポジウム
山田哲司
「プロテオミクス解析による放射線
化学療法感受性予測」

第 2 回九州がん懇話会
山田哲司
「プロテオーム解析による発がん機
構の解明と新しいがん診断法の開発」

第 1 回血清プロテオミクス研究会
山田哲司
「質量分析を用いた新しいがん診断
法の開発」

第 3 回福井大学総合実験研究支援セ
ンターフロンティアセミナー
山田哲司
「プロテオーム解析による発がんの
分子機構解明と新しいがんの診断法
の開発」

H. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む。）
特許出願「子宮体がんの診断に有用な
血液腫瘍マーカー」
平成 18 年 3 月国内出願
発明者：本田一文、山田哲司、廣橋説
雄

特許出願「液体クロマトグラフィーの
データ補正方法」
平成 17 年 6 月出願
平成 18 年 3 月国際出願
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説
雄

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 (平成17年度)

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、*JAK2* 遺伝子ではプロモーター領域のメチル化と発現に相関が見られたが、細胞株1種類のみと頻度が低く、メチル化を分子マーカーとして用いることは難しいと考えられた。また、*RUNX1* 遺伝子では exon2 上流のプロモーター領域と splicing variant の発現について検討を行ったが、CpG アイランドのメチル化と3種類の splicing variant 発現との間に相関や法則は認められず、腫瘍に特異的な共通したパターンも見いだせなかった。

アミラーゼ遺伝子発現型の分類法として RT-PCR-SSCP 法を確立し、正常組織、がん細胞等の組織間における発現型の特徴を確認した。さらに、アミラーゼ産生骨髄腫細胞株で、*AMY1A* の強い発現を認めた。

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、DNA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。また現在、日常臨床検査で使用されている項目のDNAメチル化との関わりについても検討し、詳細な検査データの解釈による臨床検査診断を

目指した。

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

Janus kinase 2(*JAK2*), *RUNX1* (*AML1*) 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) アミラーゼ遺伝子の解析

腫瘍産生アミラーゼの臨床検査診断的意義を明らかにするために、各細胞、組織における遺伝子発現プロファイルを RT-PCR-SSCP 法によって作成した。対照として、RT-PCR-RFLP 法 (小山、穂苅らの方法) を基準とした。

C. 研究結果

1) *JAK2* プロモーターのメチル化と遺伝子発現について

JAK2 遺伝子は細胞質性チロシンキナーゼで、多様な造血成長因子レセプターからのシグナル変換において鍵となる役割を果たす。近年、ヒト骨髄増殖性疾患において *JAK2* 遺伝子の F617V ミスセンス変異が報告されてきたが (Lancet 2005, N Engl J Med 2005, Nature 2005)、*JAK2* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化についての報告はない。

そこで、白血病および固形癌の細胞株で *JAK2* プロモーターのメチル化と遺伝子発現について検討を行った。そ

の結果、Daudi で *JAK2* 遺伝子プロモーター領域と *JAK2* 遺伝子 exon1 ~ inton1 内 CpG アイランドのいずれもメチル化していることが判明した。また、この細胞株では遺伝子発現が低かったことから、プロモーター領域のメチル化が発現を抑制していると考えられた。

2) *RUNX1* 遺伝子 splicing variant 発現解析

RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 1 (*RUNX1/AML1*) 遺伝子は、造血系細胞の発生・分化に必須の転写因子であり、exon2 の上流のプロモーター領域に、哺乳類で最長クラスの 3.67kb におよぶ CpG アイランドを有している。さらに *RUNX1* 遺伝子は、exon1 と exon2 に転写開始部位があり、多様な splicing variant を発現することが分かっている (Gene 2001)。しかし、*RUNX1* 遺伝子 exon2 上流のプロモーター領域のメチル化に関する報告はまだない。

そこで、*RUNX1* 遺伝子の splicing variant 発現と、exon2 のプロモーター領域、exon2a および exon2b 内にある CpG アイランドのメチル化状態の関連について調べるため、RT-PCR 法で解析を行った。*AML1a* はほとんどの細胞株で発現がなく、発現していた場合でも薄いバンドが検出されるのみであった。*AML1c* は、固形癌細胞株の

MKN1、KATOIIIおよび Caki-1 で高発現していたが、その他は VMRC-RCW と VMRC-RCZ で発現がみられただけで、その他では認められなかった。固形癌細胞株では白血病細胞株と部位によって異なるメチル化パターンを示した。3種類の splicing variant 発現とメチル化パターンの間に、相関や法則を見出すことはできなかった。

3) アミラーゼ遺伝子の発現プロファイル

正常組織22種、がん細胞株35種、大腸がん患者臨床検体30症例(正常粘膜、がん組織のペア)について、今回確立したRT-PCR-SSCP法でアミラーゼ遺伝子発現型のプロファイリングを行った。その結果、ほぼ全ての組織でAMY2B遺伝子が発現しており、そのうち肺、腎臓、精巣、胸腺は唾液型のAMY1A遺伝子、膵臓、脾臓、大腸は膵型のAMY2A遺伝子、前立腺はAMY1A、2A遺伝子が同時に発現していることが判明した。唾液腺、甲状腺、脳腫瘍細胞株ON776、アミラーゼ産生骨髄腫細胞株KMS-12-PEはAMY1A遺伝子のみの発現を認めた。大腸がん患者臨床検体30症例については正常粘膜、がん組織全てAMY2B遺伝子のみの発現を認め、発現型に差は認めなかった。

D. 考察

1) JAK2 プロモーターのメチル化と

遺伝子発現について

本研究では、白血病細胞株と固形癌細胞株における JAK2 プロモーターのメチル化と遺伝子発現について検討を行った。JAK2 遺伝子のプロモーター領域 と JAK2 遺伝子 exon1~inton1 内 CpG アイランドのいずれも Methylated であった Daudi は、遺伝子の発現が低かった。このことから、プロモーター領域のメチル化が発現を抑制していると考えられる。しかしながら、JAK2 プロモーターのメチル化は現在のところ Daudi のみにみられるため、その頻度はかなり低いことが予想される。

2) RUNX1 遺伝子 exon2 プロモーター領域のメチル化と splicing variant の発現

RUNT domain を有する RUNX3 は胃癌で高頻度にメチル化を示すことがわかっている。RUNX1 は AML1 とも呼ばれ、血液悪性腫瘍で異常が認められているが、固形癌における役割ははっきりしていない。そこで、特に固形癌における RUNX1 のメチル化についての検討を行った。固形癌細胞株では白血病細胞株と部位によって異なるメチル化パターンを示したので、それぞれのメチル化パターンと 3 種類の splicing variant 発現プロファイルの関係が注目されたが、検討した結果、相関や法則を見出すことはできなかった。

た。

3) アミラーゼ遺伝子の発現プロファイル

従来までは、RT-PCR-RFLP 法が主に発現遺伝子のプロファイルに用いられてきたが、複数の種類の制限酵素を用いて、複数ステップを要した。また、制限酵素では不完全消化を必ず伴うこともあり、正確性に問題があった。今回用いた方法は、RT-PCR-SSCP 法であり、1回の泳動で、1A, 2A, 2B それぞれの割合が分別できる。アミラーゼ産生骨髄腫の細胞株では 1A の発現が増えており、本来アミラーゼ活性を持たない組織におけるアミラーゼ活性は 1A 型によると考えられた。そして、その発現亢進にメチル化が若干関与している可能性も示された。

E. 結論

JAK2 遺伝子ではプロモーター領域のメチル化と発現に相関が見られたが、細胞株 1 種類のみと頻度が低く、メチル化を分子マーカーとして用いることは難しいと考えられた。また、*RUNX1* 遺伝子では exon2 上流のプロモーター領域と splicing variant の発現について検討を行ったが、調べた 5 種類の CpG アイランドのメチル化と 3 種類の splicing variant 発現との間に相関や法則を見出すことはできず、腫瘍に特異的な共通したパターンも見い

だせなかった。

アミラーゼ遺伝子発現型分類法において、簡便性、正確性の高い RT-PCR-SSCP法を確立し、正常組織、がん細胞等の組織間における発現型の特徴を確認した。アミラーゼ産生腫瘍の病態生理学的意義についても一歩近づいたと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 355: 181-184, 2005
2. Muramatsu H, Horii T, Takeshita A, Hashimoto H, Maekawa M. Characterization of Fluoroquinolone and Carbapenem Susceptibilities in Clinical Isolates of Levofloxacin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 51: 70-75, 2005
3. Iwahara K, Tanabe C, Nishiyama K, Ohashi H, Maekawa M. Falsely High

- Serum Free Triiodothyronine and Free Thyroxin Concentrations due to Anti-Diiodothyronine Antibodies and Anti-Triiodothyronine Antibodies. *Clin Chem* 51: 1071-1072, 2005
4. Ishikawa J, Taniguchi T, Takeshita A, Maekawa M. Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: relation to methylation status of the CKB promoter. *Clin Chim Acta* 361: 135-140, 2005
 5. Izumi M, Ishikawa J, Takeshita A, Maekawa M. Increased serum alkaline phosphatase activity originating from neutrophilic leukocytes. *Clin Chem* 51: 1751-1752, 2005
 6. Shinjo K, Takeshita A, Sahara N, Kobayashi M, Nakamura S, Shigeno K, Naito K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Delayed recovery of normal hematopoiesis in arsenic trioxide treatment of acute promyelocytic leukemia: a comparison to all-trans retinoic acid treatment. *Intern Med* 44: 818-824, 2005
 7. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia* 19: 1306-1311, 2005
 8. Nagaoka T, Horii T, Satoh T, Ito T, Monji A, Takeshita A, Maekawa M. Use of a three-dimensional microarray system for detection of levogloxacin resistance and the mecA gene in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 5187-5194, 2005
 9. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Suzumura T, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Yada Y, Teshima H, Takeuchi J, Ohnishi K, Ohno R. Two patients with all-trans-retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia treated successfully with gemtuzumab ozogamicin as a single agent. *Int J Hematol* 82: 445-448, 2005
 10. 渡邊弘子、近藤光、菅野剛史、前川真人. 汎用自動分析装置に適用可能なラテックス免疫比濁法に基づいた新規P S A測定試薬の検討. *医学と薬学* 53: 831-837, 2005

2. 学会発表

1. 浦本武、前川真人、竹下明裕、梶村春彦：PTCH1B 遺伝子の新規スライミングバリエーションのがんにおける発現プロファイル. 第64回日本癌学会学術総会(2005年9月)札幌、日本癌学会学術総会議事 p 464, 2005

2. 浦本武、前川真人、竹下明裕、清遠英司、谷口照美、渡邊弘子、鳥居薫子：アミラーゼ遺伝子発現型プロファイリング. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 120, 2005
3. 飯野和美、沖隆、中村浩淑、堀井俊伸、白井直人、竹下明裕、前川真人：ACTH 分子認識に基づく測定間差異に関する検討. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 138, 2005
4. 濱田悦子、伊藤祐子、澤村暢、前川真人：未知の原因により白血球凝集が認められた症例の検討. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 140, 2005
5. 鈴村妙子、竹下明裕、内山幸則、飯野和美、白井直人、大西一功、前川真人：再発急性前骨髄性白血病の亜砒酸再寛解導入における輸血療法. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 142, 2005
6. 杉浦綾、竹下明裕、新庄香、大西一功、渡邊弘子、前川真人：悪性リンパ腫で化学療法後に血清LDH値が上昇を認めた症例の解析. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 145, 2005
7. 白井直人、古田隆久、杉本光繁、中村明子、小平誠、堀井俊伸、飯野和美、竹下明裕、前川真人：H. pylori の除菌療法における除菌前 CYP2C19 遺伝子多型及び Clarithromycin 耐性測定の有用性. 第52回日本臨床検査医学会総会（2005年11月）福岡、臨床病理 53 補冊, 351, 2005
8. 前川真人：エピジェネティクスが臨床検査とどのように関わるか. 日本臨床検査自動化学会第37回大会（2005年9月）横浜、日本臨床検査自動化学会会誌 30 巻、4号、322, 2005
9. 浦本武、鳥居薫子、谷口照美、渡邊弘子、清遠英司、竹下明裕、前川真人：RT-PCR-SSCPによるアミラーゼ遺伝子の発現型プロファイリング. 第56回日本電気泳動学会総会（2005年11月）東京、生物物理化学 49 補冊, 21, 2005
10. 清遠英司、谷口照美、浦本武、前川真人：癌における *synuclein* γ 遺伝子プロモーターのメチル化と遺伝子発現. 第45回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会（2006年3月）浜松、抄録集 28, 2005
11. 岩原邦宏、田邊千鶴子、竹下明裕、前川真人：3種のプロラクチン測定試薬によるマクロプロラクチンの反応性. 第45回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会（2006年3月）

- 浜松、抄録集 31, 2005
12. 林千雅、飯野和美、沖 隆、山下美保、中村浩淑、竹下明裕、前川真人：原発性アルドステロン症の病型診断における DEX-ACTH 試験の有用性. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 31, 2005
13. 竹下明裕、前川真人：過剰治療を回避する上からも微小残存病変のモニタリングが有用であったと思われる再発難治急性前骨髄球性白血病の 1 例. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 35, 2005
14. 澤村 暢、浜田悦子、伊藤祐子、藤原彩乃、工 治男、近藤 光、竹下明裕、前川真人：白血球凝集により偽性白血球減少症を示した胃癌症例. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 35, 2005
15. 藤原彩乃、浜田悦子、伊藤祐子、澤村 暢、工 治男、近藤 光、竹下明裕、前川真人：生体腎移植後経過観察中に一過性に巨大血小板出現が認められた一症例. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 36, 2005
16. 名倉理教, 堀井俊伸, 石川仁子, 金子 誠, 前川真人：血液培養の期間を 7 日間に延長することにより検出されたラセン菌. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 39, 2005
17. 白井直人, 古田隆久, 杉本光繁, 飯野和美, 堀井俊伸, 梶村昌良, 竹下明裕, 菱田明, 前川真人：*H. pylori* 再除菌療法としての高用量 PPI/AMPC 分割と PPI/AMPC/MNZ の比較. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 39, 2005
18. 石川仁子、堀井俊伸、名倉理教、金子誠、前川真人：悪性リンパ腫治療中に経験した糞線虫症の一例. 第 4 5 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会(2006 年 3 月)浜松、抄録集 40, 2005
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

腹水洗浄細胞を用いた胃癌細胞の高感度検出法の開発

（分担）研究者 中山 淳 信州大学医学部教授

研究要旨

腹水洗浄液中に存在する胃癌細胞を検出するため、56名の胃癌患者から術中に採取された腹水有核細胞について α 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素(α 4GnT) mRNAをターゲットとしたRT-PCRを行い、細胞診と比較検討した。RT-PCR法による α 4GnT mRNAの検出率は44.6%であり、細胞診による陽性率21.4%に比べ高かった。 α 4GnT mRNAが検出された25例中、細胞診が陰性であった症例は14例(56%)であり、その内の13例(92.9%)で癌細胞は漿膜下組織より深く浸潤していた。術後25ヶ月の再発率は細胞診が陰性かつ α 4GnT mRNAが検出されなかった症例が20%であったのに対し、細胞診が陰性でも α 4GnT mRNAが検出された症例は54.5%と高かった。以上の結果より、 α 4GnT mRNAを対象としたRT-PCR法は腹水中に存在する胃癌細胞の検出および予後の推定に有用と考えられた。

A. 研究目的

胃癌において腹腔内洗浄細胞診陽性(CY1)は腹膜転移(P1)に匹敵する予後因子であるが、腹水中に胃癌細胞の出現数が少ない、あるいは細胞異型が軽度な場合などではしばしばその診断は困難である。一方、GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基を生成する糖転移酵素である α 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素(α 4GnT)は胃癌細胞や膵癌細胞で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。これまでの研究成果により胃癌患者および膵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RT-PCR法が微量な癌細胞(circulating tumor cell)の検出に有用であることを明らかにした

(Shimizu et al, Lab Invest, 83, 187-197, 2003; Ishizone et al, Cancer Sci, 97, 119-126, 2006)。

今年度は α 4GnT mRNAをターゲットとしたRT-PCR法が胃癌患者の腹水中に存在する胃癌細胞の検出に有用か否かを検討し、さらにその結果と術中腹水細胞診の結果を比較した。

B. 研究方法

胃癌患者56名について検討した。腹水はRT-PCR用および細胞診用として術中別々に横隔膜下およびダグラス窩より生食約100mlを用いた洗浄細胞診検体として採取した。なお、腹水が存在する症例では採取検体を二分し、それぞれを細胞診用と遺伝