

70050046PA

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17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18(2006)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. ウイルムス腫瘍と肝芽腫の分子細胞遺伝学的診断に関する研究	12
金子 安比古	

2. 乳癌の分子診断法の開発に関する研究	15
林 慎一	

3. 腫瘍 NM23 蛋白質の癌細胞に対する直接的、間接的増殖促進作用と 癌の予後に関する研究	19
角 純子	

4. 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	

5. LAMP 法を用いた癌の迅速遺伝子診断システムの開発、実用化に 関する研究	25
山口 研成	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
---------------------	----

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臨床腫瘍研究所・所長

研究要旨 ウイルムス腫瘍の染色体・CGHパターンと WT1 遺伝子、IGF2 遺伝子を分析し、WT1 異常群 12%、IGF2 loss of heterozygosity (LOH)群 30%、IGF2 loss of imprinting (LOI)群 16%、WT1 と IGF2 が正常な retention of imprinting (ROI)群 42%に分類した。IGF2 LOI 群は他群に比較して 11q、+12、16qの頻度が高かった。11q と 16q に癌抑制遺伝子、12番染色体上に癌遺伝子が位置しており、LOI 群腫瘍の進展と関係していると考えられた。ウイルス腫瘍は WT1 欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少ない WT1 型腫瘍と、IGF2 LOI、CCND2 や CDK4 の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失など多数の genetic/epigenetic 異常により発生する+12 型腫瘍に分類できることを示した。

乳癌に対するホルモン療法の治療奏効性予測に DNA マイクロアレイ法を応用する研究を進展させ、臨床応用可能な 3次元マイクロアレイシステムを開発している。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候補遺伝子 50 個を選択した。これを載せた 3次元型アレイチップを作成し、30 例の組織サンプルの遺伝子発現を検討した。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。それによって癌組織の間質が個々の乳癌患者ごとにその性質が異なることが明らかとなった。さらにウイルスベクターを原発乳癌細胞に導入し、エストロゲン応答性を調べるアッセイ系も作成した。

血清NM23蛋白質濃度は白血病や悪性リンパ腫の予後因子である。その理由を解明するため、NM23蛋白質の生物学的機能を検討した。NM23蛋白質は初代培養白血病細胞や正常単球にサイトカインを誘導し、オートクラインまたはパラクラインにその増殖を促進した。この作用は、MAPKおよび STAT (1, 3, 5) 系シグナル伝達の活性化と関連していた。一方、血清NM23蛋白質による予後診断法を応用できる腫瘍を拡大するために、婦人科悪性腫瘍癌患者の血清を分析した。卵巣癌でNM23蛋白質高濃度例が発見された。

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と予想して、非小細胞肺癌の p53 変異、腺癌の p53 変異と K-ras 変異、およびその他の遺伝子異常と患者予後と関係を検討した。全例の p53 変異頻度は 48%（扁平上皮癌 68%、腺癌 41%）と他報告と同様であったが、腺癌の K-ras 変異頻度は 8%と他の報告よりも低かった。腺癌の病理病期 I 期症例で 5 年生存率を検討した結果、p53(-)/K-ras(-)が 90%で最も高く、次いで p53 (+) / K-ras (-) が 81%、p53 (-) / K-ras (+) が 75%、p53 (+) / K-ras (+) が 60%であった。即ち、両遺伝子変異とも予後に影響を与えるが、その影響は K-ras 変異の方がより大きく、従って両遺伝子異常が重なった場合が最も予後が悪かった。

がんの遺伝子検査を簡便かつ迅速に行う新しい検査法の開発を試みた。まず、慢性骨髄性白血病に対する迅速遺伝子検査法の開発を開始した。RT-LAMP 法を用いること

により末梢血細胞 10^4 中に1個のがん細胞を、RNA 抽出後約 30 分で検出できる遺伝子検査法を開発した。この検査は一定量の total RNA を反応液に混ぜて 65°C で反応させるだけで結果を得られるので、一般の病院でも遺伝子検査が手軽にできるようになる。さらに、その他の白血病や固形がんの治療効果判定や効果予測に有用な遺伝子検査へと発展する可能性がある。

分担研究者

1. 金子 安比古 埼玉県立がんセンター
臨床腫瘍研究所 所長
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
臨床腫瘍研究所 主任研究員
4. 土屋 永寿 神奈川県立がんセンター
臨床研究所 所長
5. 山口 研成 埼玉県立がんセンター
病院 副部長

A. 研究目的

ウイル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異常はウイルス腫瘍の15%にみられるに過ぎない。IGF2は11p15に位置し、父性発現する imprint 遺伝子である。ウイルス腫瘍では高率に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。ウイルス腫瘍を comparative genomic hybridization (CGH)・染色体分染法により分析する。また、IGF2の LOIと LOH、WT1異常を分析する。これらの結果から、それぞれの群の臨床的特徴やLOIと相関する染色体異常を明らかにする。以上により、ウイルス腫瘍の発生機構を解明することが研究の目的である。

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。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。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 NM23 遺伝子の高発現が報告されている婦人科悪性腫瘍の血清および腹水の NM23 蛋白質を測定し、臨床的意義を検討する。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、正常血液細胞と白血病細胞を NM23 蛋白質で処理し、誘導される遺伝子/蛋白質の発現を protein array や cDNA microarray 等を用いて解析する。

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。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。そこで、肺癌において、1) p53 変異、K-ras 変異、その他の遺伝子変異を分析し、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た。その他、従来 p53 変異のうち CpG 部位の G→A Transition は内因、G→T 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きたが、最近これら塩基変異のパターンと発がん原因との関係に疑問が投げかけられている。そこで、2) 組織型、塩基変異のパターン、喫煙の3者間の関係を検討し、「p53 の変異の種類から発がん原因が推測可能か」という仮説について検討する。

がん医療における遺伝子検査の重要性は論を待たないが、がん診療として広く用いられている遺伝子検査はほとんどない。その理由の一つとして、煩雑で時間がかかることが上げられる。そこで、

私たちはがんの遺伝子検査を簡便かつ迅速に行う新しい検査法の開発を試みる。まず始めに、分子標的治療薬の登場により微少残存病変のモニタリングが求められる慢性骨髄性白血病に対する迅速遺伝子検査法の開発を開始した。RT-LAMP法を用いた簡便で迅速、高感度な、がんの遺伝子検査を開発することによりがん医療の飛躍的な向上を目指す。

B. 研究方法

ウイルス腫瘍 43 例について CGH・染色体分析を行った。腫瘍 DNA と正常組織 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 異常をサザン法および全エキソンの PCR direct sequencing 法で分析した。また、IGF2 エキソン 9 の *AvaII* 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 *AvaII* 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。次にウイルス腫瘍 23 例を対象にして、11q LOH を示す腫瘍の欠失部位に位置する癌抑制遺伝子 *TSLC1* エキソンの変異を PCR direct sequencing 法で、*TSLC1* プロモーター領域のメチル化を bisulfite sequencing 法で分析した。

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。アロマトーゼ阻害薬反応性予測のためにアロマト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。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。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、原発腫瘍へ導入する系を確立する。乳癌症例及び子宮内膜癌症例より得た手術標品へウイルス型 ERE-GFP を導入し、個々の症例について ERE 活性化能の評価を行い、データを蓄積する。

NM23 蛋白質の生物学的機能を分析するために、リコンビナント NM23 蛋白質を正常細胞および白血病細胞に添加した。その増殖・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。血清 NM23 蛋白質測定により予後予測が可能な固形腫瘍を拡大するために、婦人科癌患者の血清と腹水をサンドイッチ ELISA 法により測定した。

非小細胞肺癌（扁平上皮癌と腺癌）313 例の凍結保存材料を研究対象とした。p53 を PT-PCR, SSCP, direct sequencing 法にて、K-ras を MASA 法にて、EGFR と p16 の各エキソンを direct sequencing 法にてそれぞれ分析した。同時に p16 及び他の遺伝子（細胞周期、細胞増殖関連遺伝子等）異常を tissue array により免疫組織学的に検索した。肺癌の分類は 1999 年の WHO 分類に従い、臨床病理学的項目は病歴を参照した。

慢性骨髄性白血病(CML)の微少残存病変をモニタリングするために、*bcr-abl* 遺伝子を RT-LAMP 法を用いて検出した。CML 細胞株 K562(b3a2 type) 及び KCL-22(b2a2 type)を用いて、基礎的検討を行った。コントロールとして *abl* 遺伝子を用いた。*bcr-abl* 遺伝子の b3a2 type 及び b2a2 type を検出するプライマーを設計し、特異的増幅が起こるかどうかを調べた。LAMP 産物そのもの及び制限酵素処理した産物を電気泳動し、ラダーパターン及び予想される DNA 断片サイズを調べた。検出感度に関しては K562 及び KCL-22 細胞より抽出した RNA を希釈して検討した。また、*bcr-abl* を持たない *Jakat* 細胞株で K562 細胞、KCL-22 細胞を希釈し、検出の限界を調べた。定量性に関しては K562 細胞及び KCL-22 細胞の total RNA 希釈系列を用いて、*bcr-abl*, *abl* の定量化について検討した。また、測定法として蛍光法と濁度法があり、比較検討を行った。

（倫理面への配慮）

研究に使用する検体は患者または親（子どもの場合）から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。金子、林、角、山口の研究計画書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。土屋の研究については、神奈川県立がんセンターの倫理審査委員会に研究計画を申

請手続き中である。

C. 研究結果

ウィルムス腫瘍 43 例について IGF2 の LOH および LOI 分析と WT1 分析を行い、WT1 異常群 5 例 (12%)、IGF2 LOH 群 13 例 (30%)、IGF2 LOI 群 7 例 (16%)、IGF2 ROI 群 18 例 (42%) に分類した。IGF2 LOI 群の患者年齢中央値は他群に比較して高かった ($P < 0.01$)。病期の分布は 4 群間に差を認めなかった。CGH・染色体分析の結果、IGF2 LOI 群に 11q-と+12 の頻度が高かった ($P < 0.01$)。IGF2 LOH 群を除くと、16q-は IGF2 LOI 群に高い傾向を示した ($P = 0.06$)。WT1 異常群の染色体異常の頻度は他群に比較して低かった ($P < 0.01$)。LOI 群にみられた 11q の欠失領域には癌抑制遺伝子 TSLC1 が位置するので、ウィルムス腫瘍 23 例を対象にその変異とメチル化を分析した。変異を示す腫瘍はなかったが、メチル化は 4 例に認められた。その内訳は、11q-のある 14 例中 3 例、11q 正常の 9 例中 1 例であり、メチル化の頻度は低く、11q-との関連も認められなかった。

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。これを載せた 3 次元型マイクロアレイチップを作成し、乳癌 30 例の遺伝子発現と治療奏効性の関係を分析した。検体は 2 群に分かれ、ER の発現と相関し、病期と Her2 発現に相関する傾向がみられた。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、EGR3 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。前記 ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、乳癌初代培養細胞に導入して ER 活性化能を評価する系を作成した。これにより、症例毎の腫瘍と間質の ER シグナル系の評価が可能になった。

正常末梢血単核細胞や初代培養の末梢白血病血細胞をリコンビナント NM23 蛋白質で処理したところ、サイトカイン (GM-CSF, IL-1 β , TNF α , IL-6, INF- γ , IL-8, Gro α , I-309, RANTES) が誘導された。その内、GM-CSF や IL-1 β は初代培養白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。サイトカインの誘導は MAPK および STAT (1, 3, 5) 系シグナル伝達の活性化と関連していた。血清 NM23 蛋白質による予後診断法の適応腫瘍を拡大するために、婦人科悪性腫瘍について検討した。婦人科悪性腫瘍 45 例 (卵巣癌 14 例、子宮体癌 8 例、子宮頸癌 23 例) 中 4 例の血清に、また、9 例 (卵巣癌 7 例、子宮体癌 2 例) 中 6 例の腹水に高濃度の NM23 が検出された。陽性例はほとんどが卵巣癌であったので、今後卵巣癌を対象にした解析が重要と判断し血清 NM23 の測定を継続している。

非小細胞肺癌 (扁平上皮癌と腺癌) の p53 の変異頻度は、全例では 48% で、扁平上皮癌では 68%、腺癌では 41% であった。一方、腺癌における K-ras 変異頻度は 8% と低かった。腺癌で病理病期 I 期症例の 5 年生存率を p53 と K-ras 変異の状態の組み合わせで検討した結果、p53 (-) / K-ras (-) (両者とも変異の無い症例) が 90% と最も高く、次いで p53 (+) / K-ras (-) が 81%、p53 (-) / K-ras (+) が 75%、p53 (+) / K-ras (+) が 60% と最も悪く、p53 (-) / K-ras (-) は p53 (+) / K-ras (+) より生存率が良好である傾向を示した ($P = 0.06$)。喫煙、組織型、p53 変異パターンとの関係を調べると i) 全体の喫煙率は 64% で、扁平上皮癌 (89%) の方が腺癌 (55%) より有意に高く、ii) p53 の変異頻度は扁平上皮癌 (68%) の方が腺癌 (41%) よりも有意に高く、iii) 喫煙と p53 変異との関係では、p53 変異率は喫煙者で 55% と非喫煙者の 35% よりも有意に高く、また G \rightarrow T 変異もそれぞれ 31%、15% と有意に喫煙者に高かった。iv) Strand バイアスについては、G \rightarrow T 変異は 39/40 例で非翻訳鎖に認められ、CpG の G \rightarrow A は両鎖間に頻度の差は認められなかった。

RT-LAMP 法を用いて CML の微少残存細胞をモニタリングするための系を開発した。増幅された LAMP 産物が目的の bcr-abl 及び abl 由来のものであることを確認するため、LAMP 産物そのもの及び制限酵素処理した産物を電気泳動した。ラダーパターン及び予想される DNA 断片サイズより、

目的の増幅産物であることが確認された。検出感度の測定では、K562 及び KCL-22 細胞が5個存在すれば、bcr-abl は約25分、コントロールの abl は、細胞1個存在すれば、約18分で検出できた。また、bcr-abl を持たない Jakat 細胞株で K562 細胞を希釈した場合、Jakat 細胞 10^4 個に K562 細胞1個存在すれば、このシステムで検出することができた。定量性について K562 細胞の total RNA 希釈系列を用いて、bcr-abl, abl を検討したところ、80ng から 128pg の範囲で定量ができることが確認された。また、測定法として蛍光法と濁度法があるが、判定時間は蛍光法が約5分早い、検量線の直線性は濁度法の方が優れていた。

D. 考察

ウィルムス腫瘍には 11p13 に位置する WT1 遺伝子の異常により発生する少数の腫瘍と、11p15 に位置する IGF2 遺伝子の LOI や LOH を示す多数の腫瘍があると欧米から報告されている。IGF2 は胎児期の細胞増殖因子であり、LOI や LOH 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 43 例の分析では、WT1 異常群が 12%、IGF2 LOH 群が 30%、IGF2 LOI 群が 16%、IGF2 正常 imprint 群 42% であった。CTCF はウィルム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、その insulator 機能が失われ、IGF2 LOI が生じると推測される。私たちの研究結果によると、16q-の頻度は IGF2 LOI 群に高い傾向を示し、上記の仮説を支持した。さらに、IGF2 LOI 群には 11q- と +12 の頻度が有意に高かった。IGF2 LOI 群で見られる 11q- の欠失領域には癌抑制遺伝子 TSLC1 が位置しているので、その変異とメチル化を調べたが、LOI 群との関係は認められなかった。ウィルムス腫瘍は WT1 欠失、 β カテニン変異を示し、染色体異常数の少ない WT1 型腫瘍と、IGF2 LOI、12 番染色体に位置する CCND2 や CDK4 の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失など多数の genetic/epigenetic 異常により発生する +12 型腫瘍に分類できることを示した。IGF2 LOI 型腫瘍患者の年齢が WT1 型腫瘍患者より高い理由として、腫瘍発生に至る genetic/epigenetic event の数が多いためと考えられた。

乳癌のホルモン療法反応性予測診断法として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役立つと考えられた。さらに患者の検体、特に術前治療の生検材料を用いた解析から、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。HDAC6 は *in vitro* の研究から ER 陽性乳癌細胞においてエストロゲン依存性にチューブリンの脱アセチル化を介して浸潤能を増強させている可能性が示された。さらに我々が同定した新たな ER の標的遺伝子である EGR3 も予後と相関することが示された。これとは別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開発し、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床応用を目指している。これを用いて約 30 症例の原発乳癌を解析したところ、明瞭に 2 群に層別化でき、有用性が示唆された。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 を導入し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。さらにウイルスベクターを用いて原発腫瘍に GFP レポーターを導入し、腫瘍のアロマターゼ活性化能を評価する系を開発した。これによって総合的な ER 活性化能の評価が可能になった。

腫瘍細胞が産生する NM23 分子は、直接および間接的（単球を介して）に腫瘍細胞の増殖を促進することを明らかにした。NM23 高値が予後不良因子となる生物学的基盤の一部を明らかにしたことにより、高値症例に対して、血清 NM23 分子やその機能（腫瘍増殖促進やサイトカイン産生誘導等）を標的とした治療法の開発へと発展する可能性が示唆された。さらに、NM23 の増殖促進作用に関与するシグナル伝達系やその下流分子を同定し、新たな予後因子となる分子の発見へ展開できる可能性を見出した。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、高値症例が見出せなかった腫瘍は、肺腺癌、扁平上皮肺癌、そして乳癌である。今回婦人科悪性腫瘍、特に卵巣癌において血清および腹水にNM23蛋白質の高値症例が検出されているので、臨床成績を含めた今後の解析結果に期待している。

肺癌における p53 の変異頻度は我が国では 50% 前後で、今回の報告と一致している。K-ras 変異頻度は欧米では 30% 前後と報告されているが、我が国では 10-16% と低い頻度が報告されており、今回の検索結果はこれまでの報告の中では最も低い頻度であった。p53 変異、K-ras 変異と悪性度との関係については、これまで単独の遺伝子変異との関係を調べた報告は多数見られ、p53 に関しては予後と関係するとする説としないとする説があり定まった見解は無い。K-ras に関しては、変異があると予後が悪いとする報告が多いが、我が国では頻度が低いため、多くの症例を用いた検索はなされていない。病理病期 I 期に限って検索した結果、p53 変異よりも k-ras 変異の方が予後に与える影響は大きく、K-ras の状態が同じならば p53 変異のある腫瘍の予後が悪かった。p53 塩基変異パターンと発がん原因が関連するという仮説がある。今回の結果では G→T 変異は喫煙者に多く、非翻訳 strand に多いことから、明らかに喫煙と関係している。一方、CpG 部位の G→A は喫煙と関係なく、strand バイアスも示さないことから、内因と関係しているとの仮説は正しいとの結論を得た。

RT-LAMP 法による CML の bcr-abl mRNA を検出する系では、反応速度が速すぎるため、ちょっとした差が測定結果に大きく反映されてしまう傾向があり、2, 3 倍の測定差は必ずしも信用できるとは言えない。また、検体ごとに検量線を引くとなると反応件数が増えてしまい、時間やコストがかかる。RNA を反応させてからは約 30 分程度で結果が出せるが、採血から検査結果を出すまで 1 時間以内を目標としており、血液から RNA をより迅速に抽出することが必要である。CML のモニタリングでは、大まかな傾向がわかれば、治療方針に影響はないので、検量線を引いて定量化する方法より、RNA を希釈倍率して判定する方法でよいのではないかと考える。それが可能であれば、さらに検査を簡素化することができ、臨床検査と

してより実用的になる。

E. 結論

ウィルムス腫瘍 43 例の WT1 と IGF2 を分析し WT1 異常群を 12%、IGF2 LOH 群を 30%、IGF2 LOI 群を 16%、IGF2 正常インプリント群を 42% に分類した。染色体・CGH 分析の結果、IGF2 LOI を示す腫瘍は 11q- と +12 を示す頻度が高かった。ウィルムス腫瘍は WT1 欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少ない WT1 型腫瘍と、IGF2 LOI、12 番染色体上の CCND2 や CDK4 の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失などの多数の genetic /epigenetic 異常により発生する +12 型腫瘍に分類できることを示した。

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た。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、IGFBP4、EGR3 が同定された。HDAC6 は ER 陽性乳癌細胞においてエストロゲン依存性にチューブリンの脱アセチル化を介して浸潤能を増強している。また、癌細胞周辺の間質も含めた癌微小環境評価を行う 2 種類のアッセイシステムを用いて、個々の症例の内分泌治療の奏効性評価を可能にする系を開発、改良している。

腫瘍細胞は血中に分泌した NM23 分子をメディエーターとして、オートクラインに、また単球を介してパラクラインに腫瘍細胞の増殖を促進することを証明した。血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤の 1 つと考えられる。さらに、この所見から血清 NM23 濃度を下げることにより、腫瘍の増殖を抑える可能性が考えられ、新しい治療法の開発につながるのではないかと期待している。

p53 / k-ras 変異の組み合わせと肺癌の悪性度との関係を検討した結果、腺癌の病理病期 I 期症例では両遺伝子変異とも予後に影響を与えるが、そ

の影響は k-ras 変異の方が大きく、p53 の状態にかかわらず、k-ras 変異の有る方が無い方よりも予後が悪かった。5 年生存率は p53 (-) / K-ras (-) で 90% と最も予後が良く、p53 (+) / K-ras (+) で 60% と最も悪かった。

CML に対するイマチニブの治療効果をモニターする目的で、簡便で迅速な遺伝子検査法の開発を試みた。RT-LAMP 法は検出感度、定量性、特異性とも優れており、実用化が見込める結果が得られた。現在、臨床検体を測定して検証を行い、さらに簡素で使い易い検査へと改良を行っている。この方法は、様々ながん細胞を検出できるので、発展が見込める。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta A, Fukuzawa M., Okita H, Hata J., Soejima, H. and Kaneko, Y. Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006 Mar 3 [Epub ahead of print].
- 2) Kaneko, Y., Kobayashi, H., Watanabe, N., Tomioka, N. and Nakagawara, A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer* 46: 285-291, 2006.
- 3) Tsuchiya, T., Osanai, T., Ogose, A., Tamura, G., Chano, T., Kaneko, Y., Ishikawa, A., Orui, H., Wada, T., Ikeda, T., Namba, M., Takigawa, M., Kawashim, H., Hotta, T., Tsuchiya, A., Ogino, T. and Motoyama, T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet*, 158:148-155, 2005.
- 4) Kozu, T., Fukuyama, T., Yamami, T., Akagi, K. and Kaneko, Y. MYND-less splice variants of AML1-MTG8 are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer*, 43: 45-53, 2005.
- 5) 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.
- 6) Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funada, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M. and Toi, M. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, 24:4531-4539, 2005.
- 7) Yamaguchi, Y., Takei, H., Suemasu, K., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Harada, N. and Hayashi, S. Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65: 4653-4662, 2005.
- 8) Ishibashi, H., Suzuki, T., Suzuki, S., Niikawa, H., Lu, L., Miki, Y., Moriya, T., Hayashi, S., Handa, M., Kondo, T. and Sasano, H. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer: a potent prognostic factor and novel target for endocrine therapy. *Cancer Res.*, 65 (14): 6450- 6458, 2005.
- 9) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56 : 27-31, 2005.
- 10) Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Ono, K., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N. and Sasano, H. Peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*, in press, 2006.
- 11) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Basic research for hormone-sensitivity of breast cancer. *Breast Cancer*, 13(2), in press, 2006.

- 12) 林 慎一: エストロゲン応答遺伝子. 医学のあゆみ, 212: 231-232, 2005.
- 13) 林 慎一: エストロゲン応答遺伝子-乳癌の診断と治療の新たな候補. 癌治療と宿主, 特集・ホルモン療法の進歩, 18(1): 17-23, 2006.
- 14) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Hanada, R., Nakagawara, A. and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Science*, 96: 653-660, 2005.
- 15) Kasukabe-T., Okabe-Kado, J., Kato, N., Sassa, T. and Honma, Y. Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation -inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts. *Breast Cancer Res.*, 7: R1097-R1110, 2005.
- 16) Inamura, K., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Tsuchiya, E., Fukayama, M. and Ishikawa, Y. Pulmonary adenocarcinomas with enteric differentiation: histologic and immunohistochemical characteristics compared with metastatic colorectal cancers and usual pulmonary adenocarcinomas. *Am.J.Surg. Pathol.*, 29 :660-665, 2005.
- 17) Inamura, K., Fujiwara, T., Hoshida, Y., Isagawa, T., Jones, MH., Virtanen, C., Shimane, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Tsuchiya, E., Ishikawa, S., Aburatani, H., Nomura, H. and Ishikawa, Y. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene*. 24 : 7105- 7113, 2005.
- 18) Furukawa, C., Daigo, Y., Ishikawa, N., Kato, T., Ito, T., Tsuchiya, E., Sone, S. and Nakamura, Y. Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.*, 65:7102-7110, 2005.
- 19) Satoh, Y., Ishikawa, Y., Inamura, K., Okumura, S., Nakagawa, K. and Tsuchiya, E. Classification of parietal pleural invasion at adhesion sites with surgical specimens of lung cancer and implications for prognosis. *Virchows Arch.*, 447 : 984-989, 2005.
- 20) Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., Murakami, H., Takeshima, Y., Inai, K., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Kohno, N. and Nakamura, Y. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.*, 65 : 9176-9184, 2005.
- 21) Shimmyo, T., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Miyagi, Y., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Osada, H. and Tsuchiya, E. p53 mutation spectra for squamous cell carcinomas at different levels of human bronchial branches. *Int. J. Cancer*, 2006 Feb 27; [Epub ahead of print]
- 22) Suzuki, C., Daigo, Y., Ishikawa, N., Kato, T., Hayama, S., Ito, T., Tsuchiya, E. and Nakamura, Y. ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase / AKT pathway. *Cancer Res.*, 65: 11314-11325, 2005.
- 23) Suganuma, M., Kuzuhara, T., Yamaguchi, K. and Fujiki, H. Carcinogenic role of tumor necrosis factor-alpha inducing protein of helicobacter pylori in human stomach. *J. Biochem Mol. Biol., Review*, 39 (1) : 1-8, 2006.
- 24) Yamaguchi, K., Shimamura, T., Komatsu, Y., Takagane, A., Yoshioka, T., Saitoh, S., Munakata, M., Sakata, Y., Sato, T., Arai, T. and Saitoh, H. Phase I-II study of biweekly paclitaxel administration with fixed dose-rate cisplatin in advanced gastric cancer. *East Japan Gastric Cancer Study Group, Gastric Cancer*, 9 : 36-43, 2006.

2. 学会発表

- 1) 渡辺直樹、金子安比古 他：ウイルス腫瘍における WT1 および IGF2 異常と染色体異常。第 64 回日本癌学会学術総会記事、2005 年 9 月、札幌。
- 2) 春田雅之、金子安比古 他：RASSF1A プロモ

- ーターメチル化は高2倍性 Wilms 腫瘍のほぼ全てに生じるが、高2倍性急性リンパ性白血病にはみられない。第64回日本癌学会学術総会記事、2005年9月、札幌。
- 3) 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, 横浜。
 - 4) Shin-chi Hayashi : Estrogen Signaling and Prediction of Endocrine-Therapy. 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium, 2005, Nagoya.
 - 5) 林 慎一：内分泌療法奏効性予測の為の分子診断法開発。Breast Cancer Forum in Nagoya, 2005, Nagoya.
 - 6) 林 慎一：乳癌のホルモン感受性の基礎的研究。第13回日本乳癌学会総会シンポジウム「乳癌のホルモン療法・基礎と臨床」, 2005年, 倉敷。
 - 7) 林 慎一：エストロゲン依存性癌の内分泌治療のための基礎研究。第78回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「がんの増殖進展と内分泌学的メカニズム」, 2005年, 東京。
 - 8) 林 慎一、山口ゆり：エストロゲン依存性がんの分子標的治療のための基礎研究。第64回日本癌学会学術総会シンポジウム「ホルモン依存性癌研究の展開」, 2005年, 札幌。
 - 9) 伊藤 潔、鈴木 貴、宇都宮裕貴、田村充利、永瀬 智、新倉 仁、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌局所での性ステロイド代謝機構の検討—新たな内分泌治療法の可能性。第64回日本癌学会学術総会シンポジウム「個別化治療への最先端研究：婦人科がん」, 2005年, 札幌。
 - 10) Shin-chi Hayashi: Biomarkers for prediction of response to hormonal therapy in breast cancer. The 9th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Genomics and Proteomics Technology in Biomarker Discovery, 2006, Feb. in NIH Bethesda USA.
 - 11) 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：乳癌の微小環境におけるエストロゲンシグナル制御機構の解析。第4回ステロイドホルモンを考える会, 2005年3月, 東京。
 - 12) 林 慎一、松本光代、坂本宙子、岩瀬弘敬、佐治重衡、戸井雅和、木山亮一、原田信広、八重樫伸生、笹野公伸、武井寛幸、黒住昌史、山口ゆり：エストロゲン依存性腫瘍の分子診断法開発。第2回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2005年5月, 仙台。
 - 13) 太田恭子、伊藤 潔、鈴木 貴、齋藤純香、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌における Peroxisome Proliferator- activated Receptor γ についての検討。第6回ホルモンと癌研究会, 2005年7月, 名古屋。
 - 14) 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：乳癌の微小環境によるエストロゲン受容体の活性化と増殖促進作用。第6回ホルモンと癌研究会, 2005年7月, 名古屋。
 - 15) 三田圭子、安藤由明、濱口真帆、林 慎一、岩瀬弘敬、山下啓子：乳癌組織における IGFBP4 および IGFBP5 の発現の検討。第6回ホルモンと癌研究会, 2005年7月, 名古屋。
 - 16) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、小林康人、黒住昌史、原田信広、松本光代、清野祐子、林 慎一：乳癌の微小環境によるエストロゲン受容体の活性化と増殖促進作用。第64回日本癌学会学術総会, 2005年9月, 札幌。
 - 17) 三田圭子、山下啓子、安藤由明、濱口真帆、藤井義敬、林 慎一、岩瀬弘敬、：乳癌組織における IGFBP5 の発現の検討。第64回日本癌学会学術総会, 2005年9月, 札幌。
 - 18) 松本光代、坂本宙子、山口ゆり、清野祐子、武井寛幸、末益公人、黒住昌史、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3次元マイクロアレイを用いた乳癌治療反応性診断システムの開発。第64回日本癌学会学術総会, 2005年9月, 札幌。
 - 19) 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 MCF-7 細胞におけるプロモーターC の脱メチル化と ER α の高発現との関連。第28回日本分子生物学会年会, 2005年12月, 福岡。
 - 20) 角 純子、粕壁 隆、小林泰文、柵木信男、本間良夫、金子安比古。「NM23 蛋白質は初代培

- 養の白血病細胞の増殖・生存を促進する」第64回日本癌学会学術総会，2005年9月，札幌。
- 21) 粕壁 隆、角 純子、本間良夫。「分化誘導剤 cotylenin A と rapamycin による乳癌細胞増殖抑制における cyclin G2 の役割」、第64回日本癌学会学術総会，2005年9月，札幌。
- 22) 角 純子、粕壁 隆、久保田靖子、小林泰文、柵木信男、本間良夫、金子安比古。「NM23 蛋白質による初代培養白血病細胞の増殖・生存促進作用」、第67回日本血液学会総会。
- 23) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Kubota, N., Kobayashi, H., Maseki, N., Honma, Y., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein promotes growth / survival of human acute myeloid leukemia cells. The 6th International Congress of the Genetics, Biochemistry and Physiology of Nm23 / NDP kinase / Awd (Naples, Italy)
- 24) 稲村健太郎、佐藤之俊、石川俊平、土屋永寿、深山正久、石川雄一：肺扁平上皮癌の遺伝子発現プロファイルによる subclassification. 第94回日本病理学会総会（2005）p293、横浜。
- 25) 石川暢久、醍醐弥太郎、高野淳、谷脇雅也、加藤達哉、早馬聡、土屋永寿、河野修興、中村祐輔：血清マーカーを用いた非小細胞肺癌の gefitinib 感受性予測診断法の構築。第64回日本癌学会総会（2005）p41、札幌。
- 26) 鈴木千恵、醍醐弥太郎、石川暢久、加藤達哉、早馬聡、中鶴修一、土屋永寿、中村祐輔：非小細胞肺癌の進展、憎悪に關与する新規遺伝子 IMS-KN08 の同定とその機能解析。第64回日本癌学会総会（2005）p239、札幌。
- 27) 早馬聡、醍醐弥太郎、加藤達哉、中鶴修一、土屋永寿、近藤哲、中村祐輔：非小細胞肺癌特異的な癌-精巢抗原 IMS-CL54 および IMS-CL81 の同定と機能解析。第64回日本癌学会総会（2005）p240、札幌。
- 28) 新明卓夫、小林康人、宮城洋平、石川雄一、中川健、長田博昭、土屋永寿：肺扁平上皮癌の p53 遺伝子解析による発生部位別発癌原因の検討。第64回日本癌学会総会（2005）p330、札幌。
- 29) 二宮浩範、稲村健太郎、佐藤之俊、土屋永寿、石川雄一：肺癌 gefitinib 投与症例における EGF 受容体遺伝子変異の有無と細胞学的特徴。第64回日本癌学会総会（2005）p391、札幌。
- 30) 平山美也子、松本裕文、松田正典、二宮浩範、倉田盛人、稲村健太郎、佐藤之俊、石川雄一、土屋永寿：肺末梢の線毛性粘液結節性乳頭状腫瘍：新 entity の提唱と組織学的検討。第64回日本癌学会総会（2005）p398、札幌。
- 31) 稲村健太郎、二宮浩範、佐藤之俊、油谷浩幸、石川俊平、星田有人、藤原大、野村仁、嶋根みゆき、砂河孝行、深山正久、土屋永寿、石川雄一：網羅的遺伝子発現解析による肺扁平上皮癌の亜型分類の試み。第64回日本癌学会総会（2005）p402、札幌。
- 32) Shirao, K., Doi, T., Hatake, K., Arai, Y., Yamaguchi, K., Hyodo, I., Tamura, T., Takemiya, S., Takiuchi, H. and Sakata, Y. Efficacy and safety findings from a phase II study of capecitabine (X) as first-line therapy in Japanese patients (pts) with advanced/metastatic colorectal cancer (MCRC) for the Capecitabine MCRC Study Group in Japan. 2005 ASCO Annual Meeting.
- 33) Hyodo, I., Yamaguchi, K., Koizumi, W., Narahara, H., Kato, T., Akiya, T. and Sakata, Y. Phase I/II study of docetaxel (DOC) and S-1 for patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC). Taxotere Gastric Cancer Study Group, 2005 ASCO Annual Meeting.
- 34) 山口研成、坂田優、Yeul-Hong Kim。「胃癌に対する臨床試験-アジアにおける連携-」胃癌患者に対する Paclitaxel と Cisplatin の隔週併用化学療法第2相臨床試験，第78回日本胃癌学会総会。2005年。
- 35) 山口研成、新井吉子、石窪 力、八岡利昌、多田正弘、赤木 究。BRAF 遺伝子における V599E 変異の高感度検出系の開発。第64回日本癌学会総会。2005年9月，札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

角 純子

「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

2. 出願中 2 件

林 慎一

1) 出願番号：特願 2005-160621

出願日：2005 年 5 月 31 日

名称：遺伝子導入細胞

2) 出願番号：特願 2005-160685

出願日：2005 年 5 月 31 日

名称：細胞分析方法

分担研究報告書

ウィルムス腫瘍と肝芽腫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臨床腫瘍研究所・所長

研究要旨 ウィルムス腫瘍 43 例の染色体・CGH パターンと WT1 遺伝子、IGF2 遺伝子を分析し、WT1 異常群 12%、IGF2 loss of heterozygosity (LOH)群 30%、IGF2 loss of imprinting (LOI)群 16%、WT1 異常と IGF2 異常のない retention of imprinting (ROI)群 42% に分類した。これにより、ウィルムス腫瘍が genetic/epigenetic に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 11q-、+12、16q-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既報告を支持した。また、LOI 群に 11q-が関連したことより、11q に insulator complex 構成蛋白をコードする遺伝子の存在が示唆された。一方、12 番染色体上には細胞増殖因子である CCND2 と CDK4 が位置しており、ウィルムス腫瘍では高発現していると報告されているので、LOI 型腫瘍の進展にこれらの遺伝子の過剰発現が関与していることが示唆された。以上の所見より、ウィルムス腫瘍は WT1 欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少ない WT1 型腫瘍と、IGF2 LOI、CCND2 や CDK4 の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失など多数の genetic/epigenetic 異常により発生する+12 型腫瘍に分類できることを示した。

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 は、16q22 に位置する CTCF 遺伝子が 16q 染色体長腕欠失に伴い欠失することにより発生すると報告された。ウィルムス腫瘍を comparative genomic hybridization (CGH)・染色体分染法により分析する。また、IGF2 の LOI と LOH、WT1 異常を分析する。これらの結果から、それぞれの群の臨床的特徴や LOI と相関する染色体異常を明らかにする。

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 43 例について CGH・染色体分析を行った。腫瘍 DNA と正常組織 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 異常をサザン法および全エクソンの PCR direct sequencing 法で分析した。また、IGF2 エクソン 9 の AvaII 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 AvaII 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。次にウィルムス腫瘍 23 例を対象にして、11q LOH を示す腫瘍の欠失部位に位置する癌抑制遺伝子 TSLC1 エクソンの変異を PCR direct sequencing 法で、TSLC1 プロモーター領域のメチル化分析を bisulfite sequencing 法で分析した。

(倫理面への配慮)

ウイル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

ウイルス腫瘍43例について11番染色体のLOH分析を行い、11p15 LOHのある16例とIGF2アレルがヘテロである27例に分類した。次に後者27例をIGF2アレル発現分析から、LOIを示した7例と retention of imprinting (ROI)を示した20例に分類した。さらに、WT1分析の結果から、11p15 LOHのある16例中3例にWT1の点変異かメチル化を、またIGF2 ROIを示した20例中2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、43例中、WT1異常群5例(12%)、IGF2 LOH群13例(30%)、IGF2 LOI群7例(16%)、IGF2 ROI群18例(42%)になる。患者年齢の中央値はWT1群2歳1ヵ月、IGF2 LOI群4歳9ヵ月、IGF2 LOH群2歳4ヵ月、IGF2 ROI群1歳9ヵ月であり、IGF2 LOI群の年齢が高かった($P<0.01$)。病期の分布は4群間に差を認めなかった。CGH・染色体分析の結果、IGF2 LOI群に11qと+12の頻度が高かった($P<0.01$)。IGF2 LOH群を除くと、16qはIGF2 LOI群に高い傾向を示した($P=0.06$)。染色体異常の頻度はWT1異常群0.4/腫瘍、IGF2 LOH群1.5/腫瘍、IGF2 LOI群2.7/腫瘍、IGF2 ROI群1.3/腫瘍であり、WT1異常群の染色体異常頻度が低かった($P<0.01$)。

LOI腫瘍にみられた11q欠失領域とYuan達の同様の報告(2005)とあわせると欠失領域は60Mbに狭まった。この領域にはTSLC1が位置するので、ウイルス腫瘍23例を対象に変異とメチル化を分析した。変異を示す腫瘍はなかった。メチル化は23例中4例に認められた。その内訳は、11qのある14例中3例、11q正常の9例中1例であり、メチル化の頻度は低く、11qとの関連も認められなかった。

D. 考察

ウイルス腫瘍には11p13に位置するWT1遺伝子の異常により発生する少数の腫瘍と、11p15に位置するIGF2遺伝子のLOIやLOHを示す多数の腫瘍があると

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やLOH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43例の分析では、WT1異常群が12%、IGF2 LOH群が30%、IGF2 LOI群が16%、IGF2正常 imprint 群42%であった。WT1異常とIGF2異常のない42%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、非メチル化状態の母方H19 DMRに結合し、H19下流のエンハンサーシグナルが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 DMRがメチル化されると、CTCFが結合できず、エンハンサーシグナルがIGF2に届き、母方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が生じるとする仮説が提唱されている。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、そのinsulator機能が失われ、IGF2 LOIが生じると推測される。私たちの研究結果によると、16qの頻度はIGF2 LOI群に高い傾向を示し、上記の仮説を支持した。さらに、IGF2 LOI群には11qと+12の頻度が有意に高かった。11qの欠失領域にinsulator複合体蛋白質をコードする遺伝子が位置しており、11qによりinsulator異常が生じる結果、IGF2 LOIが起きるのではないかと推測された。

IGF2 LOI群でみられる11qの欠失領域には上記遺伝子やその他の癌抑制遺伝子が位置すると予想される。最近、アメリカのYuan他によりIGF2 LOI群に11qの頻度が高いと報告された。私たちの11q欠失領域とYuan他のデータを合わせると、11q欠失領域は60 Mbに狭めることができた。この領域には、癌抑制遺伝子であるTSLC1が位置しているので、その変異とメチル化を調べたが、LOI群との関係は認められなかった。

IGF2 LOI群には+12の頻度が高かった。12番染色体上には細胞増殖関連遺伝子であるCCND2とCDK4が位置しており、ウイルス腫瘍では高発現していると報告されている。LOI腫瘍はその進展に、これらの遺伝子の過剰発現が必要であると考えられた。

WT1異常型ウイルス腫瘍はβカテニン変異の頻度がWT1正常腫瘍に比して著しく高い。また今回の研究結果などから、WT1異常型ウイルス腫瘍は染色体異常の頻度が低い。以上の所見より、ウイルス腫瘍はWT1欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少

ないWT1型腫瘍と、IGF2 LOI、CCND2やCDK4の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失など多数のgenetic/epigenetic異常により発生する+12型腫瘍に分類できることを示した。IGF2 LOI型腫瘍患者の年齢がWT1型腫瘍患者より高い理由として、腫瘍発生に至るgenetic/epigenetic eventの数が多いためと考えられた。

E. 結論

ウイルス腫瘍43例のWT1とIGF2を分析しWT1異常群を12%、IGF2 LOH群を30%、IGF2 LOI群を16%、IGF2正常インプリント群を42%に分類した。染色体・CGH分析の結果、IGF2 LOIを示す腫瘍は11q-と+12の頻度が高かった。11qにinsulator complex蛋白質をコードする遺伝子が位置しており、11q欠失によるCTCF蛋白質の産生低下が生じ、IGF2 LOIの発生を導くと推測された。12番染色体上には細胞増殖関連遺伝子であるCCND2とCDK4が位置しており、ウイルス腫瘍では高発現していると報告されている。ウイルス腫瘍はWT1欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少ないWT1型腫瘍と、IGF2 LOI、CCND2やCDK4の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失などの多数のgenetic/epigenetic異常により発生する+12型腫瘍に分類できることを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Fukuzawa, M., Okita, H., Hata, J., Soejima, H. and Kaneko, Y. Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006 Mar 3 [Epub ahead of print].
- 2) Kaneko, Y., Kobayashi, H., Watanabe, N., Tomioka, N. and Nakagawara, A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer* 46 : 285-291, 2006.
- 3) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Hanada, R., Nakagawara, A. and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer*

Science, 96 : 653-660, 2005.

- 4) Tsuchiya, T., Osanai, T., Ogose, A., Tamura, G., Chano, T., Kaneko, Y., Ishikawa, A., Orui, H., Wada, T., Ikeda, T., Namba, M., Takigawa, M., Kawashim, H., Hotta, T., Tsuchiya, A., Ogino, T. and Motoyama, T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet*, 158 : 148-55, 2005.
- 5) Kozu, T., Fukuyama, T., Yamami, T., Akagi, K. and Kaneko, Y. MYND-less splice variants of AML1-MTG8 are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer*, 43 : 45-53, 2005.
- 6) 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. 学会発表

- 1) 渡辺直樹、金子安比古 他：ウイルス腫瘍におけるWT1およびIGF2異常と染色体異常。第64回日本癌学会学術総会記事、2005年、9月、札幌。
- 2) 春田雅之、金子安比古 他：RASSF1Aプロモーターメチル化は高2倍性Wilms腫瘍のほぼ全てに生じるが、高2倍性急性リンパ性白血病にはみられない。第64回日本癌学会学術総会記事、2005年、9月、札幌。

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 保健学科基礎検査学講座 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、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の導入を試みた。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製し、本チップを用いて基本的条件検討を行い、さらに患者検体の組織サンプル、約 30 症例の検討を行った。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、それによって癌組織の間質が個々の乳癌患者ごとにその性質が異なることが明らかとなった。さらにウイルスベクターを用いたアッセイ系も作製した。

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世代のアロマタ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、これまで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製する。
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. アロマターゼ阻害剤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。

7. 乳癌症例及び子宮内膜癌症例より得た手術標品へウイルス型 ERE-GFP を導入し、個々の症例について ERE 活性可能の評価を行い、データを蓄積する。(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製した。これを用いて約 30 症例の原発乳癌手術標品について解析した。その結果、症例数が少ないにもかかわらず、症例が明瞭に 2 群に分かれ、それらは ER の発現と相関し、Stage と Her2 発現に相関する傾向がみられた。
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。さらに新たに EGR3 についても予後と相関することが示された。
3. HDAC6 についてその発現ベクターを ER 陽性乳癌細胞 MCF-7 に安定導入し、高発現株を樹立し、各種 *in vitro* 実験を行い、その機能を解析した。その結果、高発現株はチューブリンのアセチル化が低下していること、それと平行して細胞の運動能、浸潤能が増加していることが示された。
4. また、アロマターゼ阻害剤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、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る。

5. 上記レポーター-ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、手術標品から作製した初代培養細胞に導入して ER 活性化能を評価する系を作製した。これによって個々の症例の原発腫瘍細胞での癌微小環境も含めた ER シグナル系の評価が可能になった。今後、これを用いて各症例のデータを蓄積していく。

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。HDAC6 は *in vitro* の研究から ER 陽性乳癌細胞においてエストロゲン依存性にチューブリンの脱アセチル化を介して浸潤能を増強している可能性が示された。

さらに我々が同定した新たな ER の標的遺伝子である EGR3 も予後と相関することが示された。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。試験的に本装置を用いて約 30 症例の原発乳癌を解析したところ、明瞭に 2 群に層別化でき、有望であることが示された。

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、エストロゲンを産生する酵素、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製し、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。このシステムのアロマトラーゼ阻害剤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ウイルスベクターを用いた系を開発した。これによってオリジナルの癌細胞を用いた GFP 活性による ER 活性化能の評価が可能になった。今後、この系を使って、いろいろな研究への応用展開が可能である。

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、IGFBP4、EGR3 が同定された。HDAC6 は ER 陽性乳癌細胞においてエストロゲン依存性にチューブリンの脱アセチル化を介して浸潤能を増強している可能性が示された。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 2 種類開発し、個々の症例の評価を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funada, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M. and Toi, M. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, 24: 4531-4539, 2005.
- 2) Yamaguchi, Y., Takei, H., Suemasu, K., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Harada, N. and Hayashi, S. Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65: 4653-4662, 2005.
- 3) Ishibashi, H., Suzuki, T., Suzuki, S., Niikawa, H., Lu, L., Miki, Y., Moriya, T., Hayashi, S., Handa, M., Kondo, T. and Sasano, H. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer: a potent prognostic factor and novel target for endocrine therapy. *Cancer Res.*, 65 (14) : 6450-6458, 2005.
- 4) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56 : 27-31, 2005.
- 5) Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Ono, K., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N. and Sasano, H. Peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*, in press, 2006.
- 6) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Basic research for hormone-sensitivity of breast cancer. *Breast Cancer*, 13(2), in press, 2006.
- 7) 林 慎一: エストロゲン応答遺伝子. 医学のあゆみ, 212: 231-232, 2005.
- 8) 林 慎一: エストロゲン応答遺伝子—乳癌の診断と治療の新たな候補. 癌治療と宿主, 特集・ホルモン療法の進歩, 18(1): 17-23, 2006.

2. 学会・研究会発表

- 1) 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, 横浜.
- 2) Shin-chi Hayashi: Estrogen Signaling and Prediction of Endocrine-Therapy. 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium, 2005, Nagoya.
- 3) 林 慎一：内分泌療法奏効性予測の為の分子診断法開発. Breast Cancer Forum in Nagoya, 2005, Nagoya.
- 4) 林 慎一：乳癌のホルモン感受性の基礎的研究. 第 13 回日本乳癌学会総会シンポジウム「乳癌のホルモン療法・基礎と臨床, 2005 年, 倉敷.
- 5) 林 慎一：エストロゲン依存性癌の内分泌治療のための基礎研究. 第 78 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「がんの増殖進展と内分泌学的メカニズム」, 2005 年, 東京.
- 6) 林 慎一, 山口ゆり：エストロゲン依存性がんの分子標的治療のための基礎研究. 第 64 回日本癌学会学術総会シンポジウム「ホルモン依存性癌研究の展開」, 2005 年, 札幌.
- 7) 伊藤 潔、鈴木 貴、宇都宮裕貴、田村充利、永瀬 智、新倉 仁、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌局所での性ステロイド代謝機構の検討—新たな内分泌治療法の可能性. 第 64 回日本癌学会学術総会シンポジウム「個別化治療への最先端研究：婦人科がん」, 2005 年, 札幌.
- 16) Shin-chi Hayashi : Biomarkers for prediction of response to hormonal therapy in breast cancer. The 9th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Genomics and Proteomics Technology in Biomarker Discovery, 2006, Feb. in NIH Bethesda USA.
- 17) 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：乳癌の微小環境におけるエストロゲンシグナル制御機構の解析. 第 4 回ステロイドホルモンを考える会, 2005 年 3 月, 東京.
- 18) 林 慎一、松本光代、坂本宙子、岩瀬弘敬、佐治重衡、戸井雅和、木山亮一、原田信広、八重樫伸生、笹野公伸、武井寛幸、黒住昌史、山口ゆり：エストロゲン依存性腫瘍の分子診断法開発. 第 2 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2005 年 5 月, 仙台.
- 19) 太田恭子、伊藤 潔、鈴木 貴、齋藤純香、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌における Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ についての検討. 第 6 回ホルモンと癌研究会, 2005 年 7 月, 名古屋.
- 20) 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：乳癌の微小環境によるエストロゲン受容体の活性化と増殖促進作用. 第 6 回ホルモンと癌研究会, 2005 年 7 月, 名古屋.
- 21) 三田圭子、安藤由明、濱口真帆、林 慎一、岩瀬弘敬、山下啓子：乳癌組織における IGFBP4 および IGFBP5 の発現の検討. 第 6 回ホルモンと癌研究会, 2005 年 7 月, 名古屋.
- 22) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、小林康人、黒住昌史、原田信広、松本光代、清野祐子、林 慎一：乳癌の微小環境によるエストロゲン受容体の活性化と増殖促進作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 2005 年 9 月, 札幌.
- 23) 三田圭子、山下啓子、安藤由明、濱口真帆、藤井義敬、林 慎一、岩瀬弘敬、：乳癌組織における IGFBP5 の発現の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会, 2005 年 9 月, 札幌.
- 24) 松本光代、坂本宙子、山口ゆり、清野祐子、武井寛幸、末益公人、黒住昌史、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3 次元マイクロアレイを用いた乳癌治療反応性診断システムの開発. 第 64 回日本癌学会学術総会, 2005 年 9 月, 札幌.
- 25) 荘徹哲哉、江口英孝、中地 敬、林 慎一、正村滋：エストロゲン枯渇耐性 MCF-7 細胞におけるプロモーター C の脱メチル化と ER α の高発現との関連. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月, 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願中 2 件

- 1) 出願番号：特願 2005-160621
出願日：2005 年 5 月 31 日
名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願 2005-160685
出願日：2005 年 5 月 31 日
名称：細胞分析方法