

分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨 白血病や悪性リンパ腫の予後不良因子/血清 NM23 蛋白質の生物学的機能基盤を解明するため、細胞外環境における 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の増殖を促進した。この作用はサイトカイン誘導、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、NM23 蛋白質により活性化された正常単球の産生するサイトカインも、初代培養白血病細胞の増殖を促進した。したがって、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。血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的機能基盤の1つと考えられる。

また、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、今年度は婦人科悪性腫瘍癌の血清(45例)および腹水(9例)について検討を開始した。卵巣癌14例中3例の血清に、腹水7例中4例に高濃度のNM23が検出された。卵巣癌においては今後の解析が期待できる。

A. 研究目的

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応用できることを報告してきた。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目的で、細胞外環境におけるNM23蛋白質の標的細胞や生物学的機能を解析する。NM23蛋白質の腫瘍細胞/白血病細胞の増殖・生存に対する直接的促進作用について解析する。さらに、NM23蛋白質を処理した正常単球が産生するサイトカイン（昨年度報告）についても腫瘍細胞/白血病細胞の増殖・生存に対する促進作用を検討する。

また、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も目的の1つとしている。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。

B. 研究方法

(1) NM23蛋白質の生物学的機能

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。またNM23蛋白質により誘導されるシグナル伝達系の同定はWestern Blotting法にて解析した。埼玉県立がんセンター病院血液科との共同研究にて、初代培養の急性骨髄性白血病細胞（14例）を用いた。

(2) 応用できる固形腫瘍の検索

血清及び腹水 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婦人科との共同研究にて、血清45検体および腹水9検体について解析した。

<倫理面への配慮>

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) 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や初代培養の白血病末梢血単核細胞に誘導されるサイトカイン (GM-CSF, IL-1 β , TNF α , IL-6, INF- γ , IL-8, Gro α , I-309, RANTES) の内、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、リコンビナント NM23 蛋白質は初代培養の白血病末梢血単核細胞の増殖・生存を顕著に促進した。この増殖・生存促進作用は、サイトカインの誘導、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。

(2) 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継続中である。

D. 考察

(1) 腫瘍細胞が産生する NM23 分子をメディエーターとして、直接および間接的(単球を介して)に腫瘍細胞の増殖を支持することを明らかにした。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、この診断法により選別された高値症例に対して、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できる。また、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。

(2) 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。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 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に期待している。

E. 結論

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。細胞外環境におけるこの機能は、血清 NM23 蛋白質が予後不良因子となる生物学的機能基盤の 1 つと考えられる。さらに、それは治療の新しい標的でもある。

血清 NM23 を用いた予後診断法により選別された高値症例に対して、予後不良因子血清 NM23 の生物学的基盤に基づいた新しい治療法を提供できる。

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 Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuro-blastoma. *Cancer Science* 96: 653-660, 2005.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 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」(2005)、第 64 回日本癌学会。
- 2) 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」(2005)、第 64 回日本癌学会。

- 3) 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」(2005)、第67回日本血液学会総会.
- 4) 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).

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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。原発性非小細胞肺癌（扁平上皮癌と腺癌）例を用いて、p53 変異、腺癌の 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、複数遺伝子異常の組み合わせと悪性度（予後）との関係を明らかにする。

P53 と K-ras 変異の解析を終了し、腺癌の EGFR と p16 遺伝子異常は現在解析中、他の遺伝子異常は今後解析を開始する予定である。

全例の p53 変異頻度は 48%（扁平上皮癌 68%、腺癌 41%）と他の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 年生存率を両遺伝子変異の組み合わせで検討した結果、p53 (-)/K-ras (-) 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% 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。

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。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 者間の関係を検索し、「p53 の変異の種類から発がん原因が推測可能か」の仮説について検討した。

B. 研究方法

検索材料は切除非小細胞肺癌（扁平上皮癌と腺癌）313 例である。腫瘍の凍結保存材料より DNA を抽出し

PT-PCR, SSCP, シーケンスにて p53, MASA 法にて K-ras, 分子生物学的検索方法で EGFR, p16 を、p16 及び他の遺伝子（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。肺癌の分類は 1999 年の WHO 分類に従い、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。

C. 研究結果

- 1) 全例の p53 変異及び腺癌の K-ras 変異検索を終了し、現在腺癌の EGFR と p16 変異検索を進行させている。
- 2) p53 の変異頻度は、全例では 48% (149/313) (7 例は 2 ケ所に変異あり) 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% (18/239) と低かった。
- 3) 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 (-) と p53 (+)/K-ras (+) との生存率の間には有意の傾向 ($p=0.06$) が認められた。

- 4) 喫煙、組織型、p53 塩基変異のパターンとの関係 :
- 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→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→T 変異は 39/40 例が非翻訳鎖に認められ、CpG の G→A は両鎖間に頻度の差は認められなかった。

D. 考察

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。我々が検索に用いた MASA 法は高感度に変異を発見する方法であることから、変異症例の見落としは他の方法より少ないと考えている。

P53, 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。今回の我々の検索のごとく多くの腺癌症例を遺伝子検索して両遺伝子変異の組み合わせによる予後の検討をした報告は認められない。

予後の検索を病理病期期に限ったのは、より病期が進むとこれらの遺伝子以外の要素が予後に与える影響が大きくなるため、それらを排除するためである。

検索の結果、p53 よりも k-ras 変異の方が予後に与える影響は大きく、p53 の状態にかかわらず、K-ras 変異のある方が無い方よりも予後が悪かった。また、K-ras の状態が同じならば p53 変異のある方が予後が悪かった。

P53 塩基変異パターンと発がん原因との関連を否定する説は、IARC p53 データベースの解析から生じた。しかし、IARC のデータベースは文献から変異症例を集めて作成したものであり、多くのバイアスを含むことが

指摘されている。我々はバイアスを除くため、これまで報告された中では一施設からの症例として最も多くの症例を解析し、G→T 変異は喫煙者に多く、非翻訳鎖に多いことから、明らかに喫煙と関係しており、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。即ち、P53 塩基変異のパターンから発がん原因が推測可能である。

現在 EGFR 変異と p16 のメチレシヨンの状態を遺伝子レベルで検索中であるが、その他の遺伝子および p16 遺伝子の変異の状態は組織アレイを作製して検索する予定である。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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]
- 7) 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 : 11314-25, 2005.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 石川暢久、醍醐朔太郎、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
- 3) 鈴木千恵、醍醐朔太郎、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、憎悪に関与する新規遺伝子 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
- 4) 早馬聡、醍醐朔太郎、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-精巣抗原 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 山口 研成 埼玉県立がんセンター病院 副部長

研究要旨 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。遺伝子検査の実用化を推進することは、がん医療を飛躍的に向上させることにつながる。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た。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試みた。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の開発に成功した。しかもこの検査は一定量のtotal RNAを反応液に混ぜて65°Cで反応させるだけなので、特別な機械を必要とせず、またその結果は目視により判定できる。これが実用化されれば、一般の病院でも遺伝子検査が手軽にできるようになり、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ことが可能である。

A. 研究目的

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

慢性骨髄性白血病に特異的に認められるbcr-abl遺伝子をRT-LAMP法を用いて検出することにより、微少残存病変をモニタリングする。まず、この検査法の基本部分を構築し、CML細胞株のK562(b3a2 type)及びKCL-22(b2a2 type)を用いて、基礎検討を行った。コントロールとしてabl遺伝子を用いた。

まず、bcr-abl遺伝子のb3a2 type及びb2a2 typeに特異的なプライマーを設計し、特異的増幅が起こるか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)

研究への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、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. 特異性：増幅されたLAMP産物が目的のbcr-abl及びabl由来のものであるかを確認するため、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。
2. 検出感度：K562または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。
3. 定量性：K562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。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。また、カルセインを反応液に混ぜることにより、より明瞭に目視で増幅反応を確認できた。

D. 考察

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てしまう傾向があり、2, 3 倍の測定値の差は必ずしも信用できるとは言い切れない側面がある。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。

慢性骨髄性白血病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と思われるので、検量線を引いて定量化する方法より、RNA を希釈して何倍希釈まで検出可能かを判定する方法が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である。

E. 結論

CML の治療効果をモニターするための簡便で迅速な遺伝子検査法の開発を試み、検出感度、定量性、特異性の評価を行い、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。

今後、様々ながんに対し、この方法を応用した検査法が考えられ、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) 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.

- 2) 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) 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.
- 2) 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) I. Taxotere Gastric Cancer Study Group, 2005 ASCO Annual Meeting.
- 3) 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の第2相臨床試験, 第78回日本胃癌学会総会, 2005年.
- 4) 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

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 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.