

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18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19(2007)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	_____	13
金子 安比古		
2. DNAチップを用いた小児がんのゲノム解析に関する研究	_____	19
新井 康仁		
3. 乳癌の新規分子診断法の開発に関する研究	_____	21
林 慎一		
4. 細胞外環境におけるNM23蛋白質の機能と癌の予後に関する研究	_____	26
角 純子		
5. 癌における高速遺伝子診断システムの開発に関する研究	_____	29
イマチニブによる癌治療の効果予測、効果判定		
赤木 究		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	33
---------------------	-------	----

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 日本人におけるウィルムス腫瘍の発生頻度は欧米の1/2と報告されている。日欧間の頻度差の原因は遺伝学的差異によるかと考えてWT1およびIGF2(WT2)異常を分析した。ウィルムス腫瘍106例のWT1遺伝子を分析し、32例(30%)にWT1異常を認めた。次に、11pのマイクロサテライトマーカーを用いてLOHを分析し、106例中27例(25%)にIGF2-LOHを認めた。IGF2-noLOHを示す残り79例を対象にしてH19-DMRのメチル化状態を分析し、36例(34%)にloss of imprinting(LOI)を、43例(41%)にretention of imprinting(ROI)を認めた。欧米の腫瘍ではWT1異常が15%、IGF2-LOIが30-70%にみられると報告されている。私たちの分析結果は、母集団に対するWT1異常の頻度は日欧間で差がないが、IGF2-LOIを示す腫瘍の頻度が欧米人の半数であることが推測された。これが、日本人に発生頻度が低い理由の一部と考えられた。一方、WT1異常型腫瘍32例をSNPアレイで解析し、47%の腫瘍にIGF2のLOHかLOIがみられた。WT1異常型腫瘍においても、その発生・進展にIGF2の過剰発現が関与している可能性を示した。11p以外にも共通欠失領域やuniparental disomy(UPD)を示す領域が観察された。

肝芽腫39例を対象にして癌抑制遺伝子RASSF1Aのメチル化分析とβカテニン変異分析を実施し、予後との関係を検討した。RASSF1Aのメチル化を39%に、βカテニン変異を56%に認めた。RASSF1Aメチル化腫瘍は2歳以上に多く、病期は進行期であり、βカテニン変異を合併しやすく、予後は不良であった。多変量解析でもRASSF1Aのメチル化は独立した予後因子であることが証明されたので、今後、患者の層別化に利用できると期待される。

乳癌に対するホルモン療法の治療奏効性を予測するためにDNAマイクロアレイ法やGFPを用いた新たな診断法を開発する研究を進展させた。本年度は特に、エストロゲンシグナル応答性GFP(ERE-GFP)を導入した乳癌細胞株を用いて、癌周囲の間質も含めた癌マイクロ環境の総合的評価系を実用化した。さらに患者から採取した原発腫瘍にアデノウイルスベクターを用いて、ERE-GFPを導入し、内分泌療法の奏効性予測や再発機序の解明の研究に役立てた。これらの解析から、乳癌の微小環境には個人差が大きいこと、それは癌の臨床病理学的特徴と相関すること、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌でも乳癌と同様の所見が観察されることなどが明らかになった。さらに、アロマターゼ阻害剤(AI)などの効果予測に役立つ可能性があること、また、AI耐性機構について複数の原因があることが示唆された。

腫瘍細胞が分泌するNM23蛋白質に着目して、血液を用いた癌患者の予後診断法を開発した。血液腫瘍、肺癌、神経芽腫での分析を終了し、現在、婦人科癌(H17年度より継続中)と前立腺癌を検討中である。さらに今年度は血清NM23-H1による予後診断の精度・効率の向上を目指して、アイソタイプであるNM23-H2の測定系を作製した。H1とH2のレベルは概ね相関した。また、H1高値症例はH2レベルが高値か低値かにより2群に分けられた。今後この2群の生存解析を行い、予後予測効果が向上するかどうかを検討する。次にNM23高値例の予後が不良な理由を検討した。昨年度までに、白血病細胞が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)に白血病細胞の増殖を促進することを明らかにした。この増殖促進作用は、サイトカインの誘導、MAPK(p38,ERK)およびSTAT(1,3,5)シグナル伝達系の活性化と関連していた。さらに、p38 MAPK阻

害剤、MEK 阻害剤、およびSTAT3 阻害剤がNM23 による増殖促進を抑制することを見出した。NM23 の機能解析およびその制御は、予後不良である血清NM23 高値症例に対する新しい治療標的の開発につながると思われる。NM23 の癌細胞増殖促進作用は、相互作用する蛋白質に左右されると考えて、その検討を開始した。腫瘍関連蛋白質がプロットされた蛋白質アレイを用いて、リコンビナントNM23 蛋白質と特異的に結合する21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。現在、*in vivo* での結合検証を進めている。

分子標的治療薬のひとつであるイマチニブを用いた慢性骨髄性白血病の治療効果判定のために、簡便で迅速な遺伝子検査法を開発した。total RNA の希釈による半定量的目視判定法を開発し、 10^4 倍希釈まで直線的な相関をもって判定することができた。これを用いるとtotal RNA 抽出後、約40 分で白血病細胞の残存動態が判定できる。また、高感度な定性判定では、テンプレートとして $1.6 \mu\text{g}$ のtotal RNA を用いることにより 10^6 個中に1 個存在する白血病細胞を検出することが可能であった。反応時間もtotal RNA を加えて40 分以内で検出可能であった。一方、イマチニブが有効な癌の探索として、消化管神経内分泌細胞癌におけるc-kit の発現及び変異解析を行った。その結果、26%の消化管内分泌細胞癌にc-kit の発現を認めたが、消化管間質腫瘍で認めるようなc-kit の遺伝子変異は認められなかった。また、c-kit の発現も腫瘍細胞全般に認められず、一部に限られているため、イマチニブ単独では治療効果が不十分であると推測された。

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. 新井 康仁 国立がんセンター研究所
主任研究員
3. 林 慎一 東北大学医学部保健学科基礎検査学
講座 教授
4. 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
5. 赤木 究 埼玉県立がんセンター病院
科長 兼 副部長

A. 研究目的

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米の1/2 と報告されている。日欧間の頻度差の原因は遺伝学的差異によると考えてWT1 およびIGF2 (WT2)異常を分析する。IGF2 は父性発現するインプリント遺伝子であるが、ウイルス腫瘍では30%~70%にloss of imprinting (LOI) が生じていると欧米から報告されている。一方、日本人にはIGF2-LOI 型腫瘍の頻度がきわめて低いと報告されている。LOI はIGF2 エクソン内の多型を用いてRT-PCR で分析されてきたが、ヘテロ接合性を示す個体が少ないことから、分析不能例が多いことが問題であった。最近、IGF2 に隣接するH19-DMR のメチル化状態を知ることにより、LOI の有無を同定する方法が開発された。これを

用いて、IGF2-LOI 型腫瘍の頻度を決定し、日欧間の発生頻度の差が、IGF2-LOI 型腫瘍の頻度が少ないためかどうかを明らかにする。一方、WT1 異常型腫瘍の頻度を明らかにすると同時に、これらの腫瘍においてH19-DMR のメチル化分析と SNP アレイによるゲノム分析を行い、WT1 異常型腫瘍におけるIGF2 異常の有無を同定する。さらにウイルス腫瘍において分裂期チェックポイント遺伝子異常が染色体異常の発生と関係するのかどうかを検討する。この様にウイルス腫瘍の染色体・遺伝子異常を総合的に分析し、日欧間の発生頻度差の原因を遺伝学的に解明すると共に、その発生機構を解明することが研究の目的である。

肝芽腫の治療成績は向上したが、現在でも約25%の患者は死亡する。肝芽腫の予後因子となる分子マーカーを発見し、患者の層別化に利用することにより、治療成績の改善をめざす

乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌などはステロイドホルモン依存性に発生・進展する。これらの癌細胞では核内ステロイドホルモン受容体の機能がその病態と密接に関係し、実際、受容体発現を指標に抗ホルモン剤が投与されている。乳癌に対するこのようなホルモン療法はエストロゲン受容体ないしはそのシグナル経路を遮断する分子標的治療の典型であり、その分子機構の理解が治療の発展に必須である。近年、乳癌に対する内分泌治療はLH-RHアゴニストや第3世代のアロマトラーゼ阻害剤の登

場によって急速に発展進化している。しかし、これらの適応を決める明確な分子指標はまだない。また、これらの薬剤は一般の抗癌剤に比べてきわめて有害事象が少なく、乳癌化学予防薬としても期待されているが、その適応のためには乳癌の高危険度集団を同定する必要がある。そこで、これまで長年進めてきたエストロゲン受容体に関する基礎研究の成果に基づき開発し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。

腫瘍細胞から細胞外に分泌された NM23 蛋白質に着目して、血液を用いた癌患者の予後診断法を開発した。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およびその精度・効率の向上を目的の 1 つとしている。また、本研究は血清 NM23 蛋白質の予後因子活性の生物学的基盤を解明し、新たな予後因子となる分子の発見へ発展させることも目的としている。昨年度までに、腫瘍細胞が NM23 分子をメディエーターとして、直接的および間接的（単球を介して）に腫瘍細胞の増殖を促進することを証明した。その作用機序を解明することは、血清 NM23 の腫瘍増殖促進活性やサイトカイン誘導活性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上流下流分子を同定できれば、新たな予後因子となる分子の発見へ展開できる。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することを目指している。

分子標的治療薬に対する治療効果の予測や判定をするために、簡便で迅速、高感度な遺伝子検査法を開発する。また、分子標的治療薬が有効な新たな癌を探索する。慢性骨髄性白血病(CML)の分子標的治療薬であるイマチニブは、CMLの治療に広く用いられているが、再発や反応不良例などでは治療方針の変更が必要となるため、治療効果判定法の確立が切望されている。そこで、簡便で迅速な微小残存病変 (minimal residual disease:MRD) をモニターする検査法の開発を試みる。消化管における神経内分泌細胞癌 (NEC)は、消化管悪性腫瘍の0.1-1.0%を占める。進行が早く予後不良であり、現在有効な治療法はない。近年、肺NECにc-kitが発現していることが報告されているので、消化管NECにおいても同様の検討を行った。

B. 研究方法

ウイルス腫瘍 106 例について、CGH (comparative genomic hybridization)を行い染色体異常の有無を調べた。次に、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 エクソン 9 の多型を利用して、RT-PCR による LOI 解析を実施した。これとは別に H19-DMR CTCF6 領域の COBRA 分析を行い、IGF2 の状態が LOI か retention of imprinting (ROI)かどうかを決定した。WT1 異常のあるウイルス腫瘍 32 例を対象にして、SNP アレイで分析し、ゲノムの増減と LOH の有無を調べた。RNA が分析可能な腫瘍については、定量的 real-time PCR 法を用いて、IGF2 および H19 の mRNA 発現量を測定した。さらに、24 例を対象にして、分裂期チェックポイント遺伝子である BUB1B 遺伝子の変異分析、Western blot による蛋白質発現解析と、RASSF1A 遺伝子の MSP 法によるメチル化分析を実施した。

平成 17、18 年度に肝芽腫 39 例を対象にして、MSP 法と bisulfite sequencing 法により RASSF1A のメチル化分析を行った。また β カテニン遺伝子の PCR 産物をクローン化した後、塩基配列を決定した。RASSF1A のメチル化および β カテニン遺伝子変異分析の結果と臨床的所見との関係を検討した。

これまでに開発した診断用 DNA チップを用いて乳癌手術材料および生検材料を用いた解析を継続する。順次、これらの結果をフィードバックしてチップに載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、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し、有用なバイオマーカーの同定に役立てる。アロマトラーゼ阻害薬反応性予測のためにアロマトラーゼが存在する癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系を確立する。そのため、エストロゲン応答配列を転写調節領域につないだ GFP 発現ベクターを乳癌細胞(MCF7)に導入し、手術材料より得た間質細胞と共培養し、アロマトラーゼ活性などについて解析する。これとは別に、上記レポーターをアデノウイルスベクターに組み込み、原発腫瘍細胞へ導入し、腫瘍細胞のエストロゲン活性化能を評価する。子宮内膜癌についても同様の解析により、個々の症例について ERE 活性化能の評価を行い、所見を蓄積する。これらの所見と AI 療法の効果を比較検討する。また、AI 治療後再発の症例について

も解析し、AI 耐性機構解明の足がかりとする。

血清 NM23-H1 による癌患者の予後診断の精度・効率の向上を目指して、NM23-H1 と同様に腫瘍での高発現が報告されているアイソタイプ NM23-H2 の測定系を作製した。リコンビナント NM23-H2 蛋白質 (標準液) の作製、捕足抗体と検出抗体の選定、サンドイッチ ELISA 作製およびその系の検定を行った。婦人科腫瘍患者を対象にして、各種血清及び腹水の NM23-H1 と NM23-H2 を定量した。次に、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への増殖・生存に対する作用を検討した。各種シグナル伝達系阻害剤の効果は MTT アッセイ法で、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。腫瘍関連蛋白質アレイを用いて、リコンビナント NM23 蛋白質と特異的に結合する腫瘍関連蛋白質を検出する。in vivo での NM23 とその結合蛋白質の同定は免疫沈降法にて検討する。

慢性骨髄性白血病の発現する bcr-abl mRNA を RT-LAMP 法を用いて検出することにより、微少残存病変のモニタリングに利用する。前年度までに、CML 細胞株の K562(b3a2 type)及び KCL-22(b2a2 type)を用いて、この検査法の反応条件と定量測定のための基礎検討を行い、良好な結果が得られた。最近の臨床研究は、末梢血液中の bcr-abl mRNA がイマチニブ治療後、 10^3 以上減少するかどうか予後に影響すると報告している。そこで、今回はテンプレート RNA を希釈して反応させることにより、陽性と判定した希釈倍数から 10^3 以上の減少が確認できるかどうか検討した。Total RNA 400, 40, 4, 0.4, 0.004 ng をテンプレートに RT-LAMP 反応を 65 度 40 分を行い、その後 95 度 3 分で酵素を失活させ反応を止めた。反応チューブを目視により白濁している場合は bcr-abl mRNA を検出して増幅反応が起こったことを意味し、n = 3 のうち 2 本以上白濁すれば陽性と判定した。また、定性反応にて、どの程度高感度に検出することができるか、bcr-abl を有する細胞(K562, KCL-22)と有しない細胞(Jakat)を混和した検体 (bcr-abl 細胞の割合が 10^5 に 1 個又は 10^6 に 1 個存在) を用いて検討した。テンプレート RNA として、一反応あたり 1.6 μ g の total RNA を用いた。

外科的に切除された 2-3 検体を HE 染色と免疫染色 (NSE, Synaptophysin, Chromogranin A etc.) 所見より消化管神経内分泌細胞癌と診断した。c-kit の発現を免疫染色で確認した。RNA を得ることができた検体に関しては

RT-PCR による c-kit mRNA 発現を検討した。また c-kit の遺伝子変異解析を SSCP にて行った。

(倫理面への配慮)

研究に検体を使用することについては、成人の場合は本人より、小児の場合は親の同意を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。全ての研究計画は埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けた後に実施した。

C. 研究結果

ウイルス腫瘍 106 例について 11 番染色体の LOH 分析を行い、11p15 LOH のある 27 例と IGF2 アレルまたは 11p15 領域がヘテロ接合性を示す 79 例に分類した。次に後者 79 例を RT-PCR によるアレル発現解析と CTCF6 の COBRA 分析から、LOI を示す 36 例と retention of imprinting (ROI) を示す 43 例に分類した。LOI 型腫瘍 12 例と ROI 型腫瘍 12 例を real-time PCR 法で分析したところ、前者では IGF の過剰発現と H19 の発現低下を認めたのに対し、後者では IGF2 の軽度発現と H19 の過剰発現を認めた。

106 例の WT1 分析の結果から、32 例に WT1 異常を認めた。この 32 例をマイクロサテライトマーカーと SNP アレイにより分析し、10 例に WT1(11p13)と IGF2(11p15)を含む LOH、2 例に IGF2(11p15)より染色体末端部に限局する LOH を同定した。11p15 領域がヘテロ接合性を示す 20 例中、IGF2-LOI を 3 例に、IGF2-ROI を 17 例に認めた。11p13 欠失に関する SNP アレイとサザン法の結果は微小欠失の 1 例を除き、全て一致した。その他の染色体 DNA の部分的コピー数異常としては、1p, 2p, 3q, 7p, 9p, 21q の欠失や 1q, 3p, 7q, 18q, 19q, 20 の増加が低頻度 (1 例から 3 例) に観察された。11p13-11p15 の uniparental disomy (UPD) は 9 例に認められたが、他の部位の UPD は、3p, 15q, 17q, 18q など 11 箇所を観察された。

24 例のウイルス腫瘍を対象にして、BUB1B 遺伝子の変異分析を行ったが、変異は観察されなかった。次に Western blot による BUB1B 蛋白質発現解析と RASSF1A プロモーター領域のメチル化分析を行い、CGH により同定された染色体異常の有無との関係を調べた。ウイルス腫瘍に近接する正常腎組織に BUB1B の発現はみられなかった。染色体異常を示す 7 例中 6 例で BUB1B 蛋白質の発現低下を認めたが、染色体が正常な 5 例中 4 例では、その発現は亢進していた。一方、染色体異常を示す 17 例中 13 例で RASSF1A の完全メチル化を認めたが、

染色体が正常な7例では、全例が非メチル化状態が部分メチル化を示した。正常腎組織は非メチル化状態を示した。

肝芽腫39例を分析してRASSF1Aのメチル化を39%に、βカテニン変異を56%に認めた。肝芽腫近傍の正常肝では、RASSF1Aは非メチル化状態であった。RASSF1Aメチル化腫瘍は2歳以上に多く、病期は進行期であり、βカテニン変異を合併しやすく、予後は不良であった。単変量解析では、年齢、病期、組織型、βカテニン変異、RASSF1Aメチル化の全てが、予後因子であったが、多変量解析ではRASSF1Aメチル化のみが、他の因子から独立した予後因子として認められた。

これまでの乳癌のマイクロアレイ解析結果とその過程で見出された候補遺伝子の免疫染色解析により、予後因子として有望な候補遺伝子を複数同定した。特にEGR3についてはその後の機能解析から、癌の浸潤に関与している可能性が示された。その他の候補遺伝子としてHDAC6、IGFBP4、IGFBP5を同定した。これらの候補遺伝子の発現異常を同一患者集団の組織アレイを用いて詳細に検討する予定である。これまでに作製した、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持つGFP発現ベクターを導入したER陽性乳癌細胞株MCF-7E10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。活性は患者ごとに異なり、それぞれの癌の間質に個性があることが明らかになった。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。一方、各標品の液性因子の解析から、個々の間質細胞からは乳癌細胞の増殖をサポートする他の因子も分泌され、重要であることが明らかになった。次に、ERE-GFPをアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、初代乳癌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。上記のE10細胞の系とこのウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、ほぼ乳癌と同様の結果が得られた。子宮癌においても癌周辺の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対しアロマトーゼ阻害剤(AI)の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。また、少数ではあるがAI治療後の乳癌再発症例をこのウイルス系で解析したところ、治療後再発にもかかわらず、ER活性が存在し、抗エストロゲン剤が有用なケースがあることが明らかになった。

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に諸種サイトカイン、MAPKおよびSTAT(1,3,5)シグナル伝達系の活性化を誘導し、その増殖・生存を促進することを昨年度報告した。このような増殖促進作用は正常末梢血単核細胞細胞に対しては認められないこと、さらに、p38 MAPK阻害剤、MEK阻害剤、およびSTAT3阻害剤がNM23の作用を抑制することを見出した。また、新たな予後因子となる分子を発見する目的で、NM23と相互作用する蛋白質の検索を開始した。腫瘍関連蛋白質アレイを用いて、リコンビナントNM23-H1蛋白質と特異的に結合する9個の腫瘍関連蛋白質を、NM23-H2蛋白質と結合する蛋白質9個、両者が結合する蛋白質3個の計21個を同定した。現在、*in vivo*での結合を検証している。次に血清NM23-H1による予後診断の精度・効率の向上を目指して、アイソタイプであるNM23-H2を特異的に測定できるsandwich ELISAを作製した。この系を用いて婦人科癌検体(血清119例、腹水16例)について測定した。H1とH2のレベルは概ね相関するが、H1高値症例をH2が高値か低値かを基準にして2群に分類できた。今後この2群の生存解析を行い、予後予測効果の向上を検証する。腹水にはH1とH2の両方が高濃度に検出された。

慢性骨髄性白血病に関するRT-LAMP法では、400ngのtotal RNAを用いるとbcr-abl mRNAを持たないJakat細胞 10^4 個中にCML(K562, KCL-22)細胞1個が存在すれば定量的に検出できた。また、測定機器を用いなくても、65°Cで反応させ、bcr-abl mRNAがRT-LAMPにより増幅されれば、反応液は白濁するので、直接目視で判定することができる。この反応系の検出感度は一定であるため、検体の何倍希釈まで陽性と判定できるかで、おおよそのRNAコピー数を推定することができる。具体的には、一反応あたり400ngのRNAを10, 100, 1000, 10000倍に希釈して反応し、何倍希釈まで陽性となるか目視で判定した。その結果、判定結果は再現性よく、また含有するbcr-abl mRNAの量とも直線性の相関を示した。次に高感度検出法に関する実験では、bcr-abl mRNAを有する細胞(K562, KCL-22)と有しない細胞(Jakat)を混和した検体でbcr-abl mRNA細胞の割合が 10^6 に1個でも、プレートRNAとして一反応あたり1.6μgのtotal RNAを用いることにより、検出が可能であった。

消化管神経内分泌細胞癌23例についてc-kitの免疫染色を行い、26%に発現を認めた。これは肺の神経内分泌細胞癌におけるc-kitの発現頻度とほぼ同じであった。

c-kit 発現のみられた6例では、神経内分泌細胞癌の他に腺癌あるいは扁平上皮癌が併存していたが、これらの成分にはc-kitの発現を認めなかった。c-kit発現はRNAレベルでも確認されたが、変異は検出されなかった。

D. 考察

ウイルス腫瘍の発生頻度が日欧間で著しく異なる原因を調べるために、日本人ウイルス腫瘍患者を対象にWT1異常分析とIGF2の発現異常分析を実施した。106例中32例(30%)にWT1異常を認め、この頻度は欧米の頻度15%よりやや高かった。しかし、日本人の発生頻度が1/2であることを考えると母集団におけるWT1異常型腫瘍の発生頻度は日欧間で差がないと考えられる。胎児腎において、IGF2発現はH19-DMR(differentially methylated region)上のCTCF binding site 6(CTCF6)のDNAメチル化状態に依存している。つまり、父方由来アレルではCTCF6がメチル化を受けるためインシュレーター蛋白CTCFが結合できず、エンハンサーシグナルはIGF2を発現させる。一方、母方由来アレルではCTCF6がメチル化されておらず、CTCFが結合するために、エンハンサーシグナルが遮断され、H19が発現する。今回のCTCF6の解析でIGF2-LOIを示す腫瘍を36例(34%)に認めた。Real-time PCRによるIGF2とH19 mRNA発現量の定量から、COBRA法によるCTCF6のメチル化状態の程度とIGF2およびH19 mRNA発現は一定の関係を示した。すなわち、CTCF6が高メチル化状態であれば、IGF2 mRNAは高発現し、H19は低発現であるが、反対にCTCF6が50%程度のメチル化であればIGF2は軽度の発現であるが、H19は高発現であった。欧米から従来のRT-PCRによるアレル発現解析ではIGF2-LOIが30~70%に検出されると報告されているので、今回の日本人におけるIGF2-LOI型腫瘍の頻度が必ずしも低いとは言えない。しかし、日本人のウイルス腫瘍の発生頻度が欧米の1/2であることを考慮すると、母集団における発生頻度は欧米の半分以下になる。日本人のウイルス腫瘍にはIGF2-LOIは認められないとする報告があるが、今回の報告は、日本人にも欧米の半数程度、IGF2-LOI型腫瘍が発生することを示した。これが日本人における発生頻度が低い理由の一部と考えられた。

WT1とIGF2は共に11番染色体短腕に位置している。WT1異常型腫瘍においてIGF2は腫瘍の発生・進展に関与しているのかどうかは、これまで明らかではなかった。WT1異常型腫瘍32例を分析したところ、10例(32%)に

11p13-11p15を含むLOHを、2例(6%)に11p15に限局したLOHを認めた。特に後者はマイクロサテライトマーカーによる分析では検出できず、SNPアレイを用いて初めて検出できた。またLOIを示す腫瘍が3例(9%)にみられた。残り17例(53%)はROIを示した。以上の結果より、WT1異常型腫瘍の47%にIGF2の過剰発現が生じていることになり、これらの腫瘍ではWT1とIGF2の両者が腫瘍の発生・進展に関与していることが明らかになった。

ウイルス腫瘍の半数以上に染色体の異数性を特徴とする染色体異常がみられる。異数性染色体異常を示す散発性ウイルス腫瘍に分裂期チェックポイント遺伝子であるBUB1B遺伝子の体細胞変異がみられるのではないかと考えて分析したが、変異は認められなかった。次にBUB1B蛋白の発現解析を行ったところ、染色体異常を示す腫瘍では低下がみられた。反対に正常染色体を示す腫瘍では発現は亢進していた。やはり、分裂期チェックポイント遺伝子であるRASSF1Aのメチル化を分析したところ、染色体異常を示すほとんどの腫瘍で完全メチル化がみられたのに対し、正常染色体を示す腫瘍では部分メチル化か非メチル化状態であった。以上の結果は、ウイルス腫瘍の染色体異常の発生に複数の分裂期チェックポイント遺伝子のエピジェネティックな機序による発現低下が関与していることを示唆した。

近年、手術法と化学療法の進歩により肝芽腫の治療成績は著しく向上した。しかしながら、初診時に遠隔転移を示す患者や化学療法に反応しない患者の予後は現在でも不良であり、全体の約25%を占める。治療成績改善のためには、新しい治療法や、初診時に予後を適確に予測する分子マーカーを開発することが重要である。これまで、肝芽腫において病期以外の予後因子は確立されていなかったが、今回の研究で、RASSF1Aのメチル化が有力な予後因子になることを示した。多数例による検証により確認されるなら、RASSF1Aのメチル化は肝芽腫の分子マーカーとして、今後、臨床応用が期待される。

乳癌研究の領域でもマイクロアレイによる解析やその臨床応用を目指した研究は世界的なレベルで進められている。しかし、この研究のように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。これまでの研究により野生型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を同定した。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を示し、

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、ある程度の症例数を蓄積している。既に複数の予後予測候補遺伝子が同定され、その中でも HDAC6 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を確認した。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 は乳癌の浸潤と予後に関係することが明らかとなった。今後さらに、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し、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して確立することを目指している。臨床応用を実現するために、DNA アレイによる発現解析の他に、組織アレイを併用し、最も有用な予後予測遺伝子を決定したい。

一方、近年開発されたアロマトラーゼ阻害剤(AI)は特に癌細胞周囲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成し、個々の癌の間質を含めた微小環境の評価を可能にした。次に個々の原発腫瘍を用いた微小環境評価を可能にするためにウイルスベクターを用いた系を開発した。これにより、患者の癌細胞を用いた GFP 活性による ER 活性化能の評価が可能になった。また、上記の GFP 指示細胞の系とこのウイルスベクターによる解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体を検討したところ、子宮癌においても癌周囲の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対し AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。これらの結果から、第3世代の AI 剤は子宮内膜癌の治療に使える可能性が示唆された。さらに最近、AI 剤治療後の乳癌再発が見られるようになった。そこで、ウイルスベクター-GFP 系を用いて検討をおこなったところ、GFP 活性の高い、すなわち ER 活性の高い症例が存在すること、そこに抗エストロゲン剤の添加が抑制効果を示す場合があることが明らかとなった。AI 耐性機序の解明と、再発後の治療選択にウイルスベクター-GFP 系が役立つ可能性を示している。

血清 NM23 蛋白質の腫瘍細胞に対する増殖促進活性は、その高値例の予後が不良である理由の1つである。この増殖促進に伴うシグナル伝達系の活性化を阻害すると、NM23 による増殖促進は制御された。したがって、血清 NM23 高値症例においては、NM23 分子およびそのシグナル伝達経路は治療標的となりうる。また、腫瘍関連蛋白質アレイを用いて、NM23 蛋白質が特異的に結合す腫瘍関連蛋白質を21個同定した。現在、*in vivo* での結合検証を進めているが、新たな予後因子となる分子の発見へと展開させたい。NM23-H1 と同様に腫瘍での高発現が報告されているアイソタイプ NM23-H2 を特異的に測定できるようになった。H1 と H2 を併用することで、予後予測効果の向上を期待できるかもしれない。

慢性骨髄性白血病の治療経過を簡便で迅速に判定できるシステムを開発した。正常血液細胞 10^4 個中に CML 細胞1個が存在すれば検出できることを示した。また、測定機器を使用せず、RNA を希釈し、 65°C 、40分間反応させて目視で判定した結果でも定量性は保たれていた。一方、完治が見込まれる患者でイマチニブ投与を中止したい場合でも、今回の高感度検出実験で示したとおり、 10^6 に1個の CML 細胞を検出することができる反応系も準備した。これにより、外来で迅速かつ高感度に白血病細胞が末梢血中に存在しないかどうかを検出することができるので、治療中止を決める上で有用な情報が得られる検査法になった。消化管神経内分泌細胞癌の研究では、ほとんどの腫瘍が複数の組織型を混在させている。c-kit 陽性細胞は腫瘍細胞の一部にのみ発現を認めるケースが多く、c-kit を標的としたイマチニブによる治療だけでは、効果が十分得られない予想されるので、他の抗癌剤との併用が必要であると考えられた。

E. 結論

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米人の1/2である。その理由に遺伝子異常が関係していると考えて、ウイルス腫瘍106例の WT1 と IGF2 を分析した。その結果、WT1 異常群を30%に認めた。同じ106例を IGF2-LOH, IGF2-LOI, IGF2-ROI のいずれかに分類すると、それぞれは25%, 34%, 41%であった。欧米の報告では、WT1 異常型腫瘍が15%, IGF2-LOI 型腫瘍が30-70%と報告されているので、母集団における WT1 異常の発生頻度は日欧で同程度であり、IGF2-LOI の日本の頻度は欧米の1/2程度であると考えられた。日本人のウイルス腫

瘍の発生頻度の低い理由として、IGF2-LOI型腫瘍の発生頻度が相対的に低いことを示唆する所見である。次に SNP アレイを用いた研究から WT1 異常型腫瘍の一部ではその発生・進展に IGF2 発現異常が関与していることを、初めて証明した。また、ウィルムス腫瘍の染色体異常の発生には、分裂期チェックポイント遺伝子のエピジェネティックな機序による発現低下が関与している可能性を示唆する所見が得られた。

治療法の進歩により、肝芽腫の治療成績は改善したが、約25%の患者は不幸な転帰をとる。肝芽腫の予後を予測する分子マーカーは確立されていない。今回の研究により、RASSF1A のメチル化は肝芽腫の予後を予測する分子マーカーとして有用と考えられたので、今後、臨床的に使用できるかもしれない。

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の開発を進めると同時に、選択された遺伝子発現を組織アレイの免疫染色法により決定する系を検討している。これまでの研究で新規予後因子 HDAC6、IGFBP4、EGR3 を同定した。HDAC6 と ER は乳癌の浸潤能を増強することが示された。また、癌細胞周囲の間質も含めた癌微小環境評価を行う2種類の系を開発した。これにより内分泌治療の奏効性をより正確に知ることができ、個々の症例のホルモン療法の効果判定を可能にした。子宮内膜癌でも同様の戦略が可能であることが示唆された。最後に乳癌において、AI 耐性機序解明と AI 再発後治療選択に有用な情報が得られた。

白血病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白血病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理由の1つであると同時に治療の新しい標的の探索に役立つ。血清NM23を用いた予後診断法により分類された高値症例に対して、MAPK 阻害剤やSTAT 阻害剤を適応することが試みられて良い。一方、NM23-H2の測定系を作製し、H1高値症例をH2レベルにおいて高低2群に層別化できることを示した。今後この両者併用による生存の予後予測効果の向上を検証する。

CML の治療効果をモニターするために簡便で迅速な2種類の遺伝子検査法を開発した。また、消化管神経内分泌細胞癌の研究では、26%にc-kitの発現を認め、イマチニブによる治療の可能性を見いだしたが、腫瘍内に他組織成分が併存するので、治療には他の薬剤との併用が好ましいと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh, Y., Nakadate, H., Nakagawachi, T., Higashimoto, K., Joh, K., Masaki, Z., Uozumi, J., Kaneko, Y., Mukai, T. and Soejima, H. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer*, 95: 541-547, 2006.
- 2) Hakozaiki, M., Hojo, H., Sato, M., Kaneko, Y., Watanabe, N., Kikuchi, S., Abe, M. Establishment and characterization of a new cell line, FRTK-1, derived from human malignant rhabdoid tumor of the kidney, with overexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2. *Oncol Rep*, 16: 265-271, 2006.
- 3) Ishiguro, M., Iwasaki, H., Takeshita, M., Hirose, Y., Kaneko, Y. A cytogenetic analysis in two cases of malignant peripheral nerve sheath tumor showing hypodiploid karyotype. *Oncol Rep*, 16: 225-232, 2006.
- 4) Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Kaneko, Y. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood & Cancer*, E-pub, 2006.
- 5) Honsei, N., Ikuta, T., Kawana, K., Kaneko, Y., and Kawajiri, K. Participation of nuclear localization signal 2 in the 3'-ETS domain of FLI1 in nuclear translocation of various chimeric EWS-FLI1 oncoproteins in Ewing tumor. *Int J Oncology*, 29: 689-693, 2006.
- 6) Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Fukuzawa, M., Okita, H., Hata, J., Hidenobu, 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*, 45: 592-601,

- 2006.
- 7) 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.
 - 8) Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
 - 9) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Yamamoto, S., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin Cancer Res*, 13: 111-120, 2007.
 - 10) Miki, Y., Clyne, C.D., Suzuki, T., Moriya, T., Shibuya, R., Nakamura, Y., Ishida, T., Yabuki, N., Kitada, K., Hayashi, S. and Sasano, H. Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: possible regulator of in situ steroidogenesis. *Cancer Let.*, 244, 24-33, 2006.
 - 11) 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 γ (PPR γ) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 233-250, 2006.
 - 12) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Basic research for hormone-sensitivity of breast cancer. *Breast Cancer*, 13(2)Apr., 123-128, 2006.
 - 13) Ota, K., Ito, K., Suzuki, T., Saito, S., Tamura, M., Hayashi, S., Okamura, K., Sasano, H. and Yaegashi, N. Peroxisome proliferators-activated receptor γ and growth inhibition by its ligands in uterine endometrial carcinoma – a possible link between obesity and endometrial malignancy. *Clin. Cancer Res.*, 12(14)July, 4200-4208, 2006.
 - 14) Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. 5 α -reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *Int. J. Cancer*, 120, 285-291, 2006.
 - 15) Inoue, A., Seino, Y., Terasaka, S., Hayashi, S., Yamori, T., Tanji, M. and Kiyama, R. Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines. *Toxicology In Vitro*, in press, 2007.
 - 16) Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K., and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor α gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, in press, 2007.
 - 17) Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S., Ohuchi, N. and Sasano, H. Aromatase localization in human breast cancer tissues – possible interaction between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.*, in press, 2007.
 - 18) Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H., Yaegashi, N. Biosynthesis and action of estrogen in gynecological cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, 2007, in press.
 - 19) 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: no.1, 17-23, 2006.
 - 20) 坂本宙子, 林 慎一: 3次元マイクロアレイ. 医学のあゆみ, 218: 741-742, 2006.
 - 21) 林 慎一: 乳癌の発生と乳癌幹細胞, *Mamma*, 54: 27-31, 2006.
 - 22) 林 慎一: ホルモン治療における効果予測因子と個別化癌治療. *Pharma Medica*, 24: No11, 29-33, 2006.
 - 23) 林 慎一: 内分泌療法感受性予測因子. 日本臨床増刊・乳癌-基礎・臨床研究のアップデート, 印刷中
 - 24) 林 慎一, 山口ゆり: ホルモン療法反応性と乳癌微小環境. 乳癌の臨床, 特集・乳癌ホルモン療法の進歩-基礎と臨床, Vol. 22, No1, 6-12, 2007.
 - 25) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T. and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.*, 96:653-660, 2005.
 - 26) Akagi K., Uchibori R., Yamaguchi K., Kurosawa K., Tanaka Y. and Kozu T. Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 352, 728-732, 2006.
 - 27) Tanaka Y., Akagi K., Nakamura Y. and Kozu T. RNA aptamers targeting the C-terminal of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Nucleic Acids Res.* in press.
 - 28) 遺伝性腫瘍における公的医療費助成制度の実態調査

- 山本佳世乃、仲島晴子、土橋文枝、片桐三枝子、新井良子、田村智英子、赤木 究. 家族性腫瘍, 7(1), 54-58, 2007.
- 29) Ishikubo T., Akagi K., Kurosumi M., Yamaguchi K., Fujimoto T., Sakamoto H., Tanaka Y. and Ochiai A. Immunohistochemical and mutational analysis of c-kit in gastrointestinal neuroendocrine cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 36(8), 494-498, 2006.
2. 学会発表
- 1) 金子安比古: ウイムス腫瘍の発症メカニズム—最近の知見について—. 第3回北関東小児がんセミナー. 特別講演 2006.4. 伊香保、群馬.
- 2) 金子安比古: 臨床検査としての血液・腫瘍の染色体分析. 第13回臨床細胞遺伝学セミナー. 2006.8. 東京.
- 3) 渡辺直樹、春田雅之、中館尚也、福澤正洋、金子安比古: +11 を伴う先天性間葉性腎芽腫(CMN)では父方 *IGF2* アレルが重複している: cytogenetic/epigenetic 異常の相関. 第65回日本癌学会. 2006.9. 横浜.
- 4) 春田雅之、中館尚也、渡辺直樹、福澤正洋、副島英伸、金子安比古: Wilms 腫瘍における *IGF2* の loss of imprinting(LOI)と *WT1* 構造異常. 第65回日本癌学会. 2006.9. 横浜.
- 5) 金子安比古、春田雅之、大平美紀、中川原章: マスクリーニングで発見された神経芽腫における *RASSF1A*, *CASPASE8*, *DCR2* 遺伝子のメチル化異常. 日本人類遺伝学会第51回大会. 2006.10. 鳥取.
- 6) 福士大輔、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古: 神経芽腫の ploidy 異常の発生に中心体異常は関与するのかわ? 第22回日本小児がん学会. 2006.11. 大阪.
- 7) 春田雅之、大平美紀、中川原章、金子安比古: マスクリーニングで発見されたアポトーシス関連遺伝子のメチル化異常. 第22回日本小児がん学会. 2006.11. 大阪.
- 8) Kaneko Y., Watanabe N., Nakadate H., Haruta M., Sugawara W., Sasaki F., Tsunematsu Y., Kikuta A., Fukuzawa M., Okita H., Hata J., Soejima H.. Association of 11q loss, trisomy 11, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. The 97th American Association of Cancer Research annual meeting. April 2006. Washington DC, USA.
- 9) Kaneko Y., Haruta M., Ohira M., Nakagawara A. Epigenetic alterations of the *RASSF1A* and caspase 8 genes in neuroblastoma found by mass screening. Advances in neuroblastoma research 12th Conference, May, 2006. Loss Angeles, USA.
- 10) 高橋健司、新井康仁 他: 肺がん転移巣に蓄積している遺伝子異常の全ゲノム探索. 第65回日本癌学会学術総会記事. 2006年、9月、横浜.
- 11) 長山和弘、新井康仁 他: 肺がんゲノムのホモ欠失スキニング. 第65回日本癌学会学術総会記事. 2006年、9月、横浜.
- 12) 林 慎一: エストロゲン依存性腫瘍(乳癌・子宮癌)の新規分子機能診断法開発. 東北大学イノベーションフェア2006, 2006年2月, 東京.
- 13) 山口ゆり、清野祐子、武井寛幸、林 慎一: 乳癌の微小環境が制御するエストロゲンシグナルと増殖促進作用機構. ステロイドホルモンを考える会. 第5回研究発表会, 2006年3月, 東京.
- 14) 松本光代、山口ゆり、杉橋陽子、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔、八重樫伸生、林 慎一: 子宮体癌におけるエストロゲンシグナルを介した癌微小環境の解析. 第7回日本がん分子疫学研究会学術集会, 2006年5月, 広島.
- 15) 三木康宏、鈴木 貴、山口ゆり、本間誠次郎、北田邦雄、林 慎一、笹野公伸: ヒト乳癌組織におけるアロマトーゼの局在-乳癌細胞および周囲間質細胞の相互作用. 第3回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2006年5月, 仙台.
- 16) 鈴木 貴、三木康宏、森谷卓也、石田孝宣、菅原 明、林 慎一、大内憲明、笹野公伸: 乳癌組織における核内受容体 peroxisome proliferator -activated receptor (PPAR)の発現意義. 第79回日本内分泌学会学術総会, 2006年5月, 神戸.
- 17) Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Yaegashi, N. and Shin-ichi Hayashi. Visualization and characterization of estrogen-signal susceptibility in individual estrogen-dependent cancer by adenovirus -ERE-GFP Assay. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, June, Kyoto.
- 18) 松本光代、山口ゆり、杉橋陽子、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔、八重樫伸生、林 慎一: 子宮体癌の微小環境におけるエストロゲン受容体活性化の解析. 第7回ホルモンと癌研究会, 2006年6月, 前橋.

- 19) 三木康宏、山口ゆり、本間誠次郎、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：ヒト乳癌組織におけるアロマターゼの発現-癌細胞・間質細胞の相互作用。第7回ホルモンと癌研究会，2006年6月，前橋。
- 20) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、小林康人、黒住昌史、清野祐子、坂本宙子、松本光代、林 慎一：乳癌の微小環境が制御する増殖促進作用とエストロゲンシグナル。第7回ホルモンと癌研究会，2006年6月，前橋。
- 21) Yamaguchi Y., Takei, H., Kurosumi, M., Seino Y., Hayashi S. Regulation of growth and estrogen signals by tumor microenvironment in human breast cancers. 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2006, September, Atenes-Grees.
- 22) 松本光代、山口ゆり、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔、八重樫伸生、林 慎一：子宮体癌のエストロゲンシグナルを標的とした治療をめざして。第5回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会，2006年8月，東京。
- 23) 三木康宏、鈴木 貴、山口ゆり、森谷卓也、林 慎一、大内憲明、笹野公伸：ヒト乳癌アロマターゼの腫瘍内局在と発現機序の検討。第65回日本癌学会学術総会，2006年9月，横浜。
- 24) 松本光代、山口ゆり、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔、八重樫伸生、林 慎一：微小環境に依存した子宮体癌のエストロゲン受容体活性化の解析。第65回日本癌学会学術総会，2006年9月，横浜。
- 25) 植山美穂、小川慎一、滝口総一、藤也寸志、汜吳強、柳瀬敏彦、林 慎一、池田 都、片岡泰文、井口東郎：MTA1 及び MTA1 s の癌悪性化に関連した機能解析。第65回日本癌学会学術総会，2006年9月，横浜。
- 26) 山口ゆり、武井寛幸、末益公人、島田佳弘、小林康人、黒住昌史、清野祐子、松本光代、林 慎一：乳癌の微小環境によるエストロゲンシグナルと増殖促進作用。第65回日本癌学会学術総会，2006年9月，横浜。
- 27) 東浩太郎、堀江公仁子、大内尉義、林 慎一、堺 隆一、井上 聡：乳癌細胞における膜局在エストロゲン受容体結合因子の解析。第6回関東ホルモンと癌研究会，2006年12月，川越。
- 28) 鈴木 貴、三木康宏、森谷卓也、赤平純一、石田孝宣、平川 久、山口ゆり、林 慎一、笹野公伸：乳癌組織におけるアンドロゲン濃度。第14回日本ステロイドホルモン学会学術集会，2006年12月，大阪。
- 29) 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：前立腺癌細胞における Estrogen receptor beta 及び beta cx の機能解析。第14回日本ステロイドホルモン学会学術集会，2006年12月，大阪。
- 30) 赤平純一、鈴木 貴、三木康宏、長崎修治、伊藤 潔、森谷卓也、林 慎一、八重樫伸生、笹野公伸：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen related receptor (ERR) の発現と臨床病理学的因子との関連について。第14回日本ステロイドホルモン学会学術集会，2006年12月，大阪。
- 31) 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、小林泰文、柵木信男、金子安比古：細胞外 NM23 蛋白質が初代培養の白血病細胞に誘導するシグナル伝達系。第65回癌学会総会，2006。
- 32) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Kobayashi, H., Maseki, N., Honma, Y. and Kaneko, Y. Effect of extracellular NM23 protein on *in Vitro* survival of normal PBMNC and acute myeloid leukemia cells. 48th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2006.
- 33) 角 純子：造血器腫瘍における血清 NM23 蛋白質の生物学的意義。第1回山陰血液疾患研究会，2006。
- 34) Yatsuoka, T., Nishimura, Y., Tanaka, Y. and Akagi, K. The clinical features of the colorectal cancers with high level of the microsatellite instability. The 20th World Congress of Digestive Surgery 29 November - 2 December 2006 in Rome, Italy.
- 35) 赤木 究、下條誉幸、新井吉子、金子安比古、神津知子、小林泰文、柵木信男。RT-LAMP法による慢性骨髄性白血病の高速遺伝子診断。第65回日本癌学会学術総会。9月、横浜。
- 36) 神津知子、田中陽一郎、赤木究。AML1-MTG8のノックダウンによる白血病細胞の遺伝子発現プロファイルの変化。第65回日本癌学会学術総会。9月、横浜。
- 37) Sudo, J., Akagi, K., Sakai, H., Honmura, Y., Kurimoto, F., Komagata, H. and Yoneda, S. Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in histologic and cytologic specimens of non-small cell lung cancer by fragment analysis and polymerase chain. Reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

analysis. ESMO2006 Poster Symposium Molecular markers. Sep 30, Istanbul, Turkey

2) 出願番号：特願 2005-160685 出願日：2005.05.31
名称：細胞分析方法

- 38) 山本 尚吾、緑川 泰、森川 鉄平、石川 俊平、上村 直子、赤木 究、西村 洋治、坂本 裕彦、幕内 雅敏、油谷 浩幸、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた同時性大腸癌肝転移における網羅的染色体変異解析。第17回消化器癌発生学会 (H18.9.15, 名古屋)
- 39) 仲島晴子、山本佳世乃、土橋文枝、片桐三枝子、新井良子、赤木 究、遺伝性腫瘍における難病医療費助成制度の実態調査。第12回家族性腫瘍学会学術集会、パネルディスカッション (H18.6, 大阪)
- 40) 赤木 究、新井吉子、仲島晴子、土橋文枝、八岡利昌、西村洋治。3種類のDNA mismatches修復酵素遺伝子に変異を認めたHNPCC症例。第12回家族性腫瘍学会学術集会。 (H18.6, 大阪)
- 41) 菅野康吉、赤木 究、他11名。非遺伝性ポリポーシス大腸癌(HNPCC)のリスク評価と遺伝子診断の適応。第12回家族性腫瘍学会学術集会。 (H18.6, 大阪)
- 42) Sakai, H., Akagi, K., Sudoh, J., Yoneda, S., Komagata, H., Kurimoto, F. and Hommura, Y. EGFR mutation analysis in histologic and cytologic specimens of non-small-cell lung cancer. ASCO ANNUAL MEETING JUNE2-6, 2006, ATLANTA, GEORGIA
- 43) 須藤淳子、酒井 洋、栗本太嗣、駒形浩史、赤木 究。気管支鏡下組織・細胞診検体を用いた非小細胞肺癌 EGFR 遺伝子変異の検討。第29回日本呼吸器内視鏡学会。 (H18.6, 茨城)
- 44) 須藤淳子、栗本太嗣、本村泰雄、駒形浩史、酒井 洋、米田修一、赤木 究。非小細胞肺癌における生検組織および細胞診検体を用いた EGFR 遺伝子変異検出の試み。第46回日本呼吸器病学会 (H18.6, 東京)

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 3 5 5 7 3 6 7 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：2005.05.31

名称：遺伝子導入細胞

分担研究報告書

ウイルス腫瘍と肝芽腫の分子細胞遺伝学的診断に関する研究

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 平成16-17年度には、ウイルス腫瘍43例の染色体・CGHパターンとWT1遺伝子、IGF2遺伝子进行分析し、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、ウイルス腫瘍が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、ウイル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。

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米の1/2と報告されている。平成18年度は日欧間の頻度差の原因は遺伝学的差異によると考えて、106例に分析腫瘍を増加し、WT1およびIGF2 (WT2)異常を検討した。106例中32例(30%)にWT1異常を認めた。次に、11pのマイクロサテライトマーカを用いてLOH进行分析し、106例中27例(25%)にIGF2-LOHを認めた。残り79例を対象にしてH19-DMRのメチル化状態进行分析し、36例(34%)にloss of imprinting (LOI)を、43例(41%)にretention of imprinting (ROI)を認めた。欧米の腫瘍ではWT1異常が15%、IGF2-LOIが30-70%にみられると報告されている。私たちの分析結果から、母集団に対するWT1異常の頻度は日欧間で差がないが、IGF2-LOIを示す腫瘍の頻度が欧米人の半数であることが推測された。これが、日本人に発生頻度が低い理由の一部と考えられた。一方、WT1異常型腫瘍32例をSNPアレイで解析し、47%の腫瘍にIGF2のLOHかLOIを証明した。WT1異常型腫瘍においても、その発生・進展にIGF2の過剰発現が関与している可能性を示した。SNPアレイの結果、WT1とIGF2の位置する11p以外にも共通欠失領域やuniparental disomy (UPD)を示す領域が観察された。

肝芽腫39例を対象にして癌抑制遺伝子RASSF1Aのメチル化分析とβカテニン変異分析を実施し、予後との関係を検討した。RASSF1Aのメチル化を39%に、βカテニン変異を56%に認めた。RASSF1Aメチル化腫瘍は2歳以上に多く、病期は進行期であり、βカテニン変異を合併しやすく、予後は不良であった。多変量解析でもRASSF1Aのメチル化は独立した予後因子であることが証明されたので、今後、患者の層別化に利用できると期待される。

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。私たちは 12 トリソミーを伴う高 2 倍性腫瘍が WT1 異常をもたないウイル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、父性発現するインプリント遺伝子である。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。最近、IGF2 LOI の発生機構の一つとして、16q22 に位置する CTCF が 16q 染色体長腕欠失に伴い欠失することが関係していることが報告された。ウイルス腫瘍を comparative genomic hybridization (CGH)・染色体分染法により分析し、+12 や 16q-の有無を明らかにする。また、IGF2 LOI、11p15 LOH、WT1 異常を分析し、その所見と+12 や 16q-の関係を明らかにする。以上により、ウ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。

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米の 1/2 と報告されている。日欧間の頻度差の原因は遺伝学的差異によると考えて WT1 および IGF2 (WT2)異常の分析を 106 例まで増加して行う。ウイルス腫瘍では 30%~70%に IGF2 の loss of imprinting (LOI)が生じていると欧米から報告されているが、一方、日本人には IGF2-LOI 型腫瘍の頻度がきわめて低いという報告がある。LOI は IGF2 エキソン内の多型を用いて RT-PCR で分析されてきたが、ヘテロ接合性を示す個体が少ないことから、分析不能例が多いことが問題であった。最近、IGF2 に隣接する H19-DMR のメチル化状態を知ることにより、LOI の有無を同定する方法が開発された。これを用いて、IGF2-LOI 型腫瘍の頻度を決定し、日欧間の発生頻度の差が、IGF2-LOI 型腫瘍の頻度が少ないためかどうかを明らかにする。一方、WT1 異常型腫瘍の頻度を明らかにすると同時に、これらの腫瘍において H19-DMR のメチル化分析と SNP アレイによるゲノム分析を行い、WT1 異常型腫瘍における IGF2 異常の有無を決定する。さらにウイルス腫瘍において分裂期チェックポイント遺伝子異常が染色体異常の発生と関係するのかどうかを決定する。この様にウイルス腫瘍の染色体・遺伝子異常を総合的に分析し、日欧間の発生頻度差の原因を遺伝学的に解明すると共に、その発生機構を解明することが研究の目的である。

肝芽腫の治療成績は向上したが、現在でも約 25%の患者は死亡する。肝芽腫の予後因子となる分子マーカーを発見し、患者の層別化に利用することにより、治療成績の改善をめざす。

B. 研究方法

平成 16, 17 年度はウイルス腫瘍 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分析を bisulfite sequencing 法で分析した。

平成 18 年度は分析例を増加して、ウイルス腫瘍 106 例について、CGH (comparative genomic hybridization)を行い染色体異常の有無を調べた。次に、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、H19-DMR 上の CTCF6 領域の COBRA 分析を行い、IGF2 の状態が LOI か retention of imprinting (ROI)かどうかを決定した。WT1 異常のあるウイルス腫瘍 32 例を対象にして、SNP アレイで分析し、ゲノムの増減と LOH の有無を調べた。RNA が分析可能な腫瘍については、定量的 real-time PCR 法を用いて、IGF2 および H19 の mRNA 発現量を測定した。さらに、24 例を対象にして、分裂期チェックポイント遺伝子である BUB1B 遺伝子の変異分析、Western blot による蛋白質発現解析と、RASSF1A 遺伝子の MSP 法によるメチル化分析を実施した。

平成 17, 18 年度に肝芽腫 39 例を対象にして、MSP 法と bisulfite sequencing 法により RASSF1A のメチル化分析を行った。また β カテニン遺伝子の PCR 産物をクローン化した後、塩基配列を決定した。RASSF1A のメチル化および β カテニン遺伝子変異分析の結果と臨

床的所見との関係を検討した。

(倫理面への配慮)

研究に検体を使用することについては、成人の場合は本人より、小児の場合は親の同意を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。全ての研究計画は埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けた後に、実施した。

C. 研究結果

平成 16, 17 年度はウイルス腫瘍 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 ヶ月、IGF2 LOI 群 4 歳 9 ヶ月、IGF2 LOH 群 2 歳 4 ヶ月、IGF2 ROI 群 1 歳 9 ヶ月であり、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 ($P < 0.01$)。IGF2 LOI 型腫瘍にみられた 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。

平成 18 年度はウイルス腫瘍 106 例について 11 番染色体の LOH 分析を行い、11p15 LOH のある 27 例と IGF2 アレルまたは 11p15 領域がヘテロ接合性を示す 79 例に分類した。次に後者 79 例を CTCF6 の COBRA 分析から、IGF2 LOI を示す 36 例と retention of imprinting

(ROI) を示す 43 例に分類した。LOI 型腫瘍 12 例と ROI 型腫瘍 12 例を real-time PCR 法で分析したところ、前者では IGF の過剰発現と H19 の発現低下を認めたのに対し、後者では IGF2 の軽度発現と H19 の過剰発現を認めた。106 例の WT1 分析の結果から、30% に WT1 異常を認めた。この 32 例をマイクロサテライトマーカールと SNP アレイにより分析し、10 例に WT1 (11p13) と IGF2 (11p15) を含む LOH、2 例に IGF2 (11p15) より染色体末端部に限局する LOH を同定した。11p15 領域がヘテロ接合性を示す 20 例中、IGF2-LOI を 3 例に、IGF2-ROI を 17 例に認めた。11p13 欠失に関する SNP アレイとサザン法の結果は微小欠失の 1 例を除き、全て一致した。その他の染色体 DNA の部分的コピー数異常としては、1p, 2p, 3q, 7p, 9p, 21q の欠失や 1q, 3p, 7q, 18q, 19q, 20 の増加が低頻度 (1 例から 3 例) に観察された。11p13-11p15 領域の uniparental disomy (UPD) は 9 例に認められたが、他の部位の UPD は、3p, 15q, 17q, 18q など 11 箇所を観察された。

24 例のウイルス腫瘍を対象にして、BUB1B 遺伝子の変異分析を行ったが、変異は観察されなかった。次に Western blot による BUB1B 蛋白質発現解析と RASSF1A プロモーター領域のメチル化分析を行い、CGH により同定された染色体異常の有無との関係を調べた。ウイルス腫瘍に近接する正常腎組織に BUB1B の発現はみられず、RASSF1A は非メチル化状態であった。染色体異常を示す 7 例中 6 例で BUB1B 蛋白質の発現低下を認めたが、染色体が正常な 5 例中 4 例では、その発現は亢進していた。一方、染色体異常を示す 17 例中 13 例で RASSF1A の完全メチル化を認めたが、染色体が正常な 7 例では、全例が非メチル化状態か部分メチル化を示した。

肝芽腫 39 例を分析し、RASSF1A のメチル化を 39% に、 β カテニン変異を 56% に認めた。肝芽腫近傍の正常肝では、RASSF1A は非メチル化状態であった。RASSF1A メチル化腫瘍は 2 歳以上に多く、病期は進行期であり、 β カテニン変異を合併しやすく、予後は不良であった。単変量解析では、年齢、病期、組織型、 β カテニン変異、RASSF1A メチル化の全てが、予後因子であったが、多変量解析では RASSF1A メチル化のみが、他の因子から独立した予後因子として認められた。

D. 考察

ウィルムス腫瘍には 11p13 に位置する WT1 遺伝子異常により発生する腫瘍の他に、11p15 に位置する IGF2 遺伝子の loss of imprinting (LOI) や LOH により母方アレルの欠失と父方アレルの重複を示す腫瘍が多数あると欧米から報告されている。IGF2 は胎児期の増殖因子であり、LOH または LOI による過剰発現が腫瘍の増殖にかかわると考えられている。CTCF は insulator protein であり、母方 H19-DMR 領域に結合し、H19 下流のエンハンサーからのシグナルが IGF2 に伝えられるのをブロックする。すなわち、母方アレルでは IGF2 の発現は抑制される。母方の H19 プロモーター領域がメチル化されると、CTCF が結合できず、IGF2 が発現する。すなわち、IGF2 LOI が生じる。これとは別の機構により IGF2 LOI が生じるとする考えがある。CTCF はウ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、insulator が働かず IGF2 LOI が生じると推測される。平成 16, 17 年度の研究によると、IGF2 LOI 群における 16q-の頻度は IGF2 LOH 群、IGF2 ROI 群、WT1 群に比して有意に高かった。この結果は、上記の仮説を支持している。さらに私たちは IGF2 LOI 群における +12 と 11q-の頻度は他群より高いことを示した。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。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。

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、ウィルム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 異常型ウィルムス腫瘍は 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 異常型ウィルムス腫瘍は染色体異常の頻度が低い。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。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。

平成 18 年度にはウィルムス腫瘍の発生頻度が日欧間で著しく異なる原因を調べるために、日本人ウィルムス腫瘍患者を対象に WT1 異常分析と IGF2 の発現異常分析を実施した。106 例中 32 例(30%)に WT1 異常を認め、この頻度は欧米の頻度 15%よりやや高かった。しかし、日本人の発生頻度が 1/2 であることを考えると母集団における WT1 異常型腫瘍の発生頻度は日欧間で差がないと考えられる。前述の様に胎児腎において、IGF2 発現は H19-DMR 上の CTCF6 の DNA メチル化状態に依存している。今回の CTCF6 の COBRA 法によるメチル化解析で IGF2-LOI を示す腫瘍を 36 例(34%)に認めた。Real-time PCR による IGF2 と H19 mRNA 発現量の定量から、CTCF6 のメチル化状態の程度と IGF2 および H19 mRNA 発現は一定の関係を示した。すなわち、CTCF6 が高メチル化状態であれば、IGF2 mRNA は高発現し、反対に H19 は低発現になる。反対に CTCF6 が 50%程度のメチル化であれば IGF2 は軽度の発現を示したが、H19 は高発現であった。欧米から IGF2-LOI が 30-70%に検出されると報告されているので、今回の日本人における IGF2-LOI 型腫瘍の頻度が必ずしも低いとは言えない。しかし、日本人のウィルムス腫瘍の発生頻度が欧米の 1/2 であることを考慮すると、母集団における発生頻度は欧米の半分以下になる。日本人のウィルムス腫瘍には IGF2-LOI は認められないとする報告があるが、今回の報告は、日本人にも欧米の半数程度、IGF2-LOI 型腫瘍が発生することを示した。

WT1 と IGF2 は共に 11 番染色体短腕に位置している。WT1 異常型腫瘍において IGF2 は腫瘍の発生・進展に関与しているのかどうかは、これまで明らかではなかった。WT1 異常型腫瘍 32 例を SNP アレイで分析した

ところ、10例(32%)に11p13-11p15を含むLOHを、2例(6%)に11p15に限局したLOHを認めた。特に後者はマイクロサテライトマーカーによる分析では検出できず、SNPアレイを用いて初めて検出できた。またIGF2 LOIを示す腫瘍が3例(9%)にみられた。残り17例(53%)はROIを示した。以上の結果より、WT1異常型腫瘍の47%にIGF2の過剰発現が生じていることになり、これらの腫瘍ではWT1とIGF2の両者が腫瘍の発生・進展に関与していることが明らかになった。

ウイルス腫瘍の半数以上に染色体の異数性を特徴とする染色体異常がみられる。異数性染色体異常を示す散発性ウイルス腫瘍に分裂期チェックポイント遺伝子であるBUB1B遺伝子の体細胞変異がみられるのではないかと考えて分析したが、変異は認められなかった。次にBUB1B蛋白の発現解析を行ったところ、染色体異常を示す腫瘍では低下がみられた。反対に正常染色体を示す腫瘍ではBUB1B蛋白の発現は亢進していた。やはり、分裂期チェックポイント遺伝子であるRASSF1Aのメチル化を分析したところ、染色体異常を示すほとんどの腫瘍で完全メチル化がみられたのに対し、正常染色体を示す腫瘍では部分メチル化か非メチル化状態を示した。以上の結果は、ウイルス腫瘍の染色体異常の発生に複数の分裂期チェックポイント遺伝子のエピジェネティックな機序による発現低下が関与していることを示唆した。

近年、手術法と化学療法の進歩により肝芽腫の治療成績は著しく向上した。しかしながら、初診時に遠隔転移を示す患者や化学療法に反応しない患者の予後は現在でも不良であり、全体の約25%を占める。治療成績改善のためには、新しい治療法や、初診時に予後を正確に予測する分子マーカーを開発することが重要である。これまで、肝芽腫において病期以外の予後因子は確立されていなかったが、今回の研究で、RASSF1Aのメチル化が有力な予後因子になることを示した。多数例による検証により確認されるなら、RASSF1Aのメチル化は肝芽腫の分子マーカーとして、今後、臨床応用が期待される。

E. 結論

平成16, 17年度はウイルス腫瘍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。

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米人の1/2である。その理由に遺伝子異常が関係していると考えて、平成18年度はウイルス腫瘍106例のWT1とIGF2を分析した。その結果、WT1異常群を30%に認めた。同じ106例をIGF2-LOH、IGF2-LOI、IGF2-ROIのいずれかに分類すると、それぞれは25%、34%、41%であった。欧米の報告では、WT1異常型腫瘍が15%、IGF2-LOI型腫瘍が30-70%と報告されているので、母集団におけるWT1異常の発生頻度は日欧で同程度であり、IGF2-LOIの日本の頻度は欧米の1/2程度であると考えられた。日本人のウイルス腫瘍の発生頻度の低い理由として、IGF2-LOI型腫瘍の発生頻度が相対的に低いことを示唆する所見である。次にSNPアレイを用いた研究からWT1異常型腫瘍の一部ではその発生・進展にIGF2発現異常が関与していることを、初めて証明した。また、ウイルス腫瘍の染色体異常の発生には、複数の分裂期チェックポイント遺伝子のエピジェネティックな機序による発現低下が関与している可能性を示唆する所見が得られた。

治療法の進歩により、肝芽腫の治療成績は改善したが、約25%の患者は不幸な転帰をとる。肝芽腫の予後を予測する分子マーカーは確立されていない。今回の研究により、RASSF1Aのメチル化は肝芽腫の予後を予測する分子マーカーとして有用と考えられたので、今後、臨床的に使用できるかもしれない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh, Y., Nakadate, H., Nakagawachi, T., Higashimoto, K., Joh, K., Masaki, Z., Uozumi, J., Kaneko, Y., Mukai, T. and Soejima, H. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer*, 95: 541-547, 2006.
- 2) Hakozaki, M., Hojo, H., Sato, M., Kaneko, Y., Watanabe, N., Kikuchi, S., Abe, M. Establishment and characterization of a new cell line, FRTK-1, derived from human malignant rhabdoid tumor of the kidney, with overexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2. *Oncol Rep*, 16: 265-271, 2006.
- 3) Ishiguro, M., Iwasaki, H., Takeshita, M., Hirose, Y., Kaneko, Y. A cytogenetic analysis in two cases of malignant peripheral nerve sheath tumor showing hypodiploid karyotype. *Oncol Rep*, 16: 225-232, 2006.
- 4) Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Kaneko, Y. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood & Cancer*, E-pub, 2006.
- 5) Honsei, N., Ikuta, T., Kawana, K., Kaneko, Y., and Kawajiri, K. Participation of nuclear localization signal 2 in the 3'-ETS domain of FLI1 in nuclear translocation of various chimeric EWS-FLI1 oncoproteins in Ewing tumor. *Int J Oncology*, 29: 689-693, 2006.
- 6) Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Fukuzawa, M., Okita, H., Hata, J., Hidenobu, 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*, 45: 592-601, 2006.
- 7) 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.
- 8) Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.

2. 学会発表

- 1) 金子安比古 : ウィルムス腫瘍の発症メカニズム—最近の知見について— 第3回北関東小児がんセミナー. 特別講演 2006.4. 伊香保, 群馬.
- 2) 金子安比古 : 臨床検査としての血液・腫瘍の染色体分析. 第13回臨床細胞遺伝学セミナー. 2006.8. 東京.
- 3) 渡辺直樹、春田雅之、中館尚也、福澤正洋、金子安比古 : +11 を伴う先天性間葉性腎芽腫(CMN)では父方 *IGF2* アレルが重複している : cytogenetic/epigenetic 異常の相関. 第65回日本癌学会. 2006.9.横浜.
- 4) 春田雅之、中館尚也、渡辺直樹、福澤正洋、副島英伸、金子安比古 : Wilms 腫瘍における *IGF2* の loss of imprinting(LOI)と WT1 構造異常. 第65回日本癌学会. 2006.9.横浜.
- 5) 金子安比古、春田雅之、大平美紀、中川原章 : マスクリーニングで発見された神経芽腫における *RASSF1A, CASPASE8, DCR2* 遺伝子のメチル化異常. 日本人類遺伝学会第51回大会. 2006. 10. 鳥取.
- 6) 福士大輔、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古 : 神経芽腫の ploidy 異常の発生に中心体異常は関与するのか? 第22回日本小児がん学会. 2006.11.大阪.
- 7) 春田雅之、大平美紀、中川原章、金子安比古 : マスクリーニングで発見されたアポトーシス関連遺伝子のメチル化異常. 第22回日本小児がん学会. 2006.11.大阪.
- 8) Kaneko Y., Watanabe N, Nakadate H, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Tsunematsu Y, Kikuta A, Fukuzawa M, Okita H, Hata J, Soejima H. Association of 11q loss, trisomy 11, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. The 97th American Association of Cancer Research annual meeting. April 2006. Washington DC, USA.
- 9) Kaneko Y., Haruta M, Ohira M, Nakagawara A. Epigenetic alterations of the *RASSF1A* and caspase 8 genes in neuroblastoma found by mass screening. *Advances in neuroblastoma research 12th Conference*, May, 2006. Los Angeles, USA.