

分担研究報告書

DNA チップを用いた小児がんのゲノム解析に関する研究

分担研究者 新井 康仁 国立がんセンター研究所・主任研究員

研究要旨 一塩基多型(SNP)マーカーが高密度に配位された DNA マイクロアレイを用いて比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)解析とヘテロ接合性欠失(LOH)解析を同時に行うことにより、WT1 異常型のウイルス腫瘍におけるゲノム構造異常を網羅的に調べた。27 症例を分析し、20 症例(74%)に 11p13 領域の欠失を検出した。11p13 欠失がなく WT1 塩基変異を持つ 6 症例では、11p13 に加えて 11p15 でも UPD が認められ、11p15 の IGF2 の過剰発現も重要な要因だと考えられた。このうちの 3 症例では 7p の欠失も起こっており、7p 上の遺伝子が腫瘍の進展に関与していることが示唆された。頻度は高くなかったものの、他の領域における欠失、増加や UPD について調べてマッピングした。このような領域に腫瘍関連遺伝子の存在が推定される。

A. 研究目的

本研究は、小児がんにおいて生じたゲノムの構造異常を、染色体DNAの部分的コピー数の変化やヘテロ接合性の変化を網羅的に捕らえることによって明らかにし、腫瘍発生に密接に関連のあるゲノム構造異常領域に存在するがん関連遺伝子を同定することを目的としている。また、ゲノム構造異常を体系化することにより、腫瘍発生の全体像を解明するための基盤や、新しい病態診断の指針となることを目指している。

研究対象にはウイルス腫瘍を選んだ。ウイルス腫瘍では、11p13のWT1遺伝子の変異や11p15のIGF2遺伝子のインプリンティングの消失(LOI)が主に報告されており、また今までの染色体解析では、WT1遺伝子内に異常が認められる症例群(WT1異常群)では染色体異常は少ないとされている。そこで本研究では、まずWT1異常群を対象とし、この群の腫瘍発生に伴うゲノム構造異常の理解を進める。

B. 研究方法

WT1 異常群のウイルス腫瘍 27 例を対象として、高密度 SNP アレイ (Affymetrix mapping 50K-Xba array) を用いてアレイ CGH 解析と LOH 解析を行った。7 例については腫瘍部 DNA に加えて正常組織 DNA も用い

ることが可能であったため、ペア解析も行い、アレルのコピー数異常 (染色体の増加、欠失) を推定した。他の 20 例では、非自己コントロールを用いて解析した。これらの結果を以前の染色体分析の結果と照らし合わせて比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って実施した。

C. 研究結果

WT1 異常群のウイルス腫瘍 27 例を対象として、Affymetrix mapping 50K-Xba array を用いてアレイ CGH 解析と LOH 解析を行った。アレイによるアレルのコール率は 89.7% - 99.7%の範囲であり、平均コール率は 98.5%であった。89%以下のコール率を示すサンプルは部分分解していると考え、解析には用いなかった。

最も高頻度な染色体コピー数の異常は、WT1遺伝子が存在する11p13領域の欠失 (net loss) であり、27症例中20例 (74 %) で検出された。これまでのWT1 cDNAを用いたサザン解析によるWT1欠失の判別では21例を検出しており、WT1 微小欠失の1例を除いた全ての11p13欠失をこのDNAアレイで検出できた。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。

LOH解析においては、相同染色体数が2n (copy number neutral)を示しながら、2 Mb以上の領域に渡ってSNPジェノタイプがホモである染色体部位を片親性ダイソミー(UPD)と判別し、マッピングを行った。11p13欠失が検出されなかった6症例は、WT1遺伝子に塩基変異が起きているものであるが、6症例全例において11p13のUPDが認められた。この6症例と11p13欠失のある他の2症例においては、IGF2遺伝子が存在する11p15のUPDも起こっていた。他には、3p, 15q, 17q, 18qなど11箇所UPDが観察された。

D. 考察

SNP オリゴプローブが高密度に配位されたDNAアレイを用いることにより、染色体のコピー数変化を高解像度に検出するとともに、copy number neutralであるUPDのマッピングが可能となった。

この結果、WT1異常群での11p13の欠失のほとんどはこのアレイシステムで検出可能であった。また、WT1塩基変異を示す症例では11p13と11p15のどちらにもUPDが認められ、両領域を含んで体細胞組換えが起きていることが伺えた。このUPDにおいては、IGF2の発現がインプリンティングにより抑制されている母方アレルが欠失し、IGF2が発現している父方アレルが倍化することによりIGF2が過剰発現していることが推察される。WT1塩基変異に加えてIGF2の過剰発現も重要な要因だと考えられた。さらに、この6症例のうち3症例では7pの欠失も起こっており、7p上の遺伝子も腫瘍の進展に関与していると思われる。

E. 結論

高密度SNPアレイを用いてアレイCGH解析とLOH解析を同時に行うことにより、WT1異常群におけるゲノム構造異常を網羅的に捉えた。11p13のWT1領域の欠失が多く検出され、頻度は高くなかったものの、他の領域における欠失、増加やUPDについて調べてマッピングした。このような領域に腫瘍関連遺伝子の存在が推定される。WT1塩基変異の症例では11p13に加えて11p15のUPDも起きており、IGF2の過剰発現も腫瘍の重要な要因と考えられた。

今後は、WT1遺伝子異常群とは別の亜群、IGF2のLOI群、などについてゲノム構造異常の網羅的解析を

進めることにより、腫瘍発生の全体像の解明につなげる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) 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。
- 2) 長山和弘、新井康仁 他：肺がんゲノムのホモ欠失スキャンニング。第65回日本癌学会学術総会記事、2006年、9月、横浜。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳癌の新規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分子検査学分野 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 マイクロアレイ法や GFP を用いた新たな解析法を応用する研究を継続、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と実用化、さらにアデノウイルスベクターを用いた、患者の原発腫瘍への ERE-GFP の導入による解析系の開発を試みた。内分泌療法の奏効性予測や再発機序の解明の研究に応用して行くことを目指している。これまでのところ、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ことが観察されたことなどが明らかとなった。また、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 耐性の機構も患者ごとに複数の原因がありそうであることが示唆された。

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. これまで開発して来た診断用 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。
2. 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、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。
3. アロマターゼ阻害薬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。
4. 上記レポーターをアデノウイルスベクターへ組み込んだものを用い、原発腫瘍細胞へ導入し、アッセイすることによって、より *in vivo* に近い評価を行う。
5. 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。

- それらに対する AI 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。

(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

- これまでのマイクロアレイ解析結果とその過程で見出されてきたいくつかの候補遺伝子の免疫染色解析により、予後データと関係が見られる有望な候補遺伝子が複数同定された。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 (投稿中)。
- これまでの候補遺伝子、HDAC6、IGFBP4、IGFBP5、EGR3 については今後、他の乳癌の既知予後因子も含め、同一患者集団の Tissue アレイを用いて更なる詳細な検討を計画している。
- 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った 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。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。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となった (論文準備中)。
- ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、手術標品から作成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、子宮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 AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった (投稿中)。乳癌の症例についても検討データ

を蓄積中である。

- また、少数ではあるが AI 治療後の再発症例で検体の採取が可能であった症例について、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となった。

D. 考察

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現在急速に研究が展開中であり、いくつかの臨床試験も進行中であり、特にそれは乳癌においては顕著であるが、ホルモン療法へ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、我々のストラテジー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、本年度の研究から、その遺伝子は乳癌の浸潤に関与していることが明らかとなった。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。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は、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かもしれない。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。しかしながら、このようなRNAレベルの発現解析は実際に臨床に導入するには問題点も多く、短期の実用化を目指すなら他の手法、たとえばすでに確立している免疫染色法などに乗せていく必要があるかもしれない。その点についても今後Tissueアレイを用いて我々の絞り込んだコンテンツを用いて検討していきたい。

一方、近年開発されたアロマトーゼ阻害剤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、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。このシステムのアロマトーゼ阻害薬の奏効性予測への応用に向けてさらに研究を進めたい。さら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。また、上記のGFP指示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、子宮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。従来、乳癌で広範に使われる抗エストロゲン剤であるタモキシフェンが子宮癌ではアゴニストとして作用することから、内膜癌に対するホルモン療法は一般的でなかったが、我々の結果から第3世代の強力なアロマトーゼ阻害剤(AI)は内膜癌の治療に使える可能性があると思われる。

また近年、第3世代のAIが登場してから数年が経過したことにより、AI治療後の再発が見られるようになってきた。そこで、生検や再手術によって検体が採取可能な症例について、このウイルスGFP系を用いて検討をおこなってみたところ、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。さらに例数を増やして検討する必要がある

が、AI耐性機序の解明と、再発後の治療選択に役立つ結果が得られるものと思われる。

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。また、これらコンテンツのTissueアレイの免疫染色も検討している。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。EGR3は乳癌の浸潤に関与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。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。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 insitu steroidogenesis. *Cancer Let.*, 244, 24-33, 2006.
- 2) 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 (PPAR γ) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 233-250, 2006.
- 3) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Basic research for

- hormone-sensitivity of breast cancer. *Breast Cancer*, 13(2)Apr, 123-128, 2006.
- 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H. and Yaegashi, N. Biosynthesis and action of estrogen in gynecological cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, in press. , 2006.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 林 慎一：乳癌の発生と乳癌幹細胞, *Mamma*, 54: 27-31, 2006.
 - 13) 林 慎一：ホルモン療法における効果予測因子と個別化癌治療。Pharma Medica, 24: No11, 29-33, 2006.
 - 14) 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.
 - 15) 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
2. 学会・研究会発表
 - 1) 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。
 - 2) 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。
 - 3) 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。
 - 4) 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。
 - 5) 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。
 - 6) Mitsuyo Matsumoto, Yuri Yamaguchi, Yuko Seino, Hiroyuki Takei, Nobuo Yaegashi, 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.
 - 7) 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。
 - 8) 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トー

- 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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：ヒト乳癌アロマト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.
- 13) 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.
- 14) 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MTA1s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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 出願中2件
- 1) 出願番号：特願2005-160621 出願日：2005.05.31
名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願2005-160685 出願日：2005.05.31
名称：細胞分析方法

分担研究報告書

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

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 腫瘍細胞が分泌する NM23 蛋白質に着目して、血液を用いた予後診断法を開発し、この予後診断法を応用できる固形腫瘍を広く検索している。婦人科癌（H17 年度より継続中）および新たに前立腺癌を順次検討中である。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、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、諸種血清検体について測定した。H1 と H2 のレベルは概ね相関するが、H1 高値症例を H2 レベルにおいて高低 2 群に分けられた。今後この 2 群の生存解析を行い、予後予測効果の向上を検証する。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、予後因子となる新規分子を発見することも目的としている。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役立つことを示唆している。また、新たな予後因子となる分子の発見へと展開する目的で、NM23 と相互作用する蛋白質の検索を開始した。腫瘍関連蛋白質がプロットされた Protein array 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。

A. 研究目的

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（目的 1）。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（目的 2）。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。

B. 研究方法

(1) NM23-H2 の測定系の作製

血清 NM23-H1 による予後診断の精度・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。埼玉県立がんセンター病院婦人科との共同研究にて、各種血清及び腹水 NM23-H2 を定量した。

(2) 細胞外環境における NM23 蛋白質の生物学的機能の解析

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・生存に対する作用および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。腫瘍関連蛋白質がプロットされた Protein array 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同定した。in vivo での結合は免疫沈降法にて検証中である。

<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。したがって、細胞外環境における 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役立つことを示唆している。

また、新たな予後因子となる分子の発見へと展開する目的で、NM23 と相互作用する蛋白質の検索を開始した。腫瘍関連蛋白質がプロットされた Protein array を用いて、リコンビナント NM23-H1 蛋白質が特異的に結合する 9 個の腫瘍関連蛋白質を、NM23-H2 蛋白質が特異的に結合する 9 個、両者が結合する 3 個の計 21 個を同定した。現在、in vivo での結合検証を進めている。

(2) 血清 NM23-H1 による予後診断の精度・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 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 レベルにおいて高低 2 群に層別化できた。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 同様 H2 も高濃度検出された。

D. 考察

(1) 血清 NM23 蛋白質の腫瘍細胞に対する増殖促進活性は、予後不良因子となる生物学的機能基盤の 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 分子およびその機能は治療標的となりうる。また、腫瘍関連蛋白質がプロットされた Protein array を用いて、NM23 蛋白質が特異的に結合する腫瘍関連蛋白質を 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したい。

(2) 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。予後予測効果の向上を期待できる。

E. 結論

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生物学的機能基盤の 1 つであると同時に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、この生物学的基盤に基づいた新しい治療法、例えば、現在開発が進んでいる MAPK 阻害剤や STAT 阻害剤を適応することが可能である。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。

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. and Kaneko, Y.
Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.*, 96:653-660, 2005.

2. 学会発表

- 1) 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 6 5 回癌学会総会, 2006.
- 2) 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.
- 3) 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.

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 1 6 年 5 月 2 1 日 特許権取得

分担研究報告書

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
イマチニブによる癌治療の効果予測、効果判定

分担研究者 赤木 究 埼玉県立がんセンター病院 科長・副部長

研究要旨 分子標的治療薬の出現により、がんの治療法も大きく変わりつつある。そのため、治療効果を的確かつ高感度に測定したり、治療前に効果を予測する検査が予後改善に大変重要となってきた。分子標的治療薬は、その名の通り標的となる分子がはっきりしているため、その分子の発現や遺伝子変異が治療薬の感受性に大きく寄与し、また治療効果判定では、その発現や遺伝子変異の定量化を利用することにより評価することができる。そのため、効果判定や感受性予測に関しては、遺伝子検査がたいへん有用である。今回は、特にイマチニブにおける慢性骨髄性白血病の治療効果判定のための簡便で迅速な遺伝子検査の開発及びイマチニブ治療の有効性が期待される c-kit 発現腫瘍の探索として消化管神経内分泌腫瘍について検討を行った。慢性骨髄性白血病の治療効果判定のための遺伝子検査開発では、簡便な方法として total RNA の希釈による判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。これにより、total RNA 抽出後、約40分でおおよその白血病細胞の残存動態が判定できることとなる。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%の消化管神経内分泌細胞癌に 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ることはほとんどなく、一部に限られていることが多いため、イマチニブ単独では治療効果が不十分であることが推測された。

A. 研究目的

分子標的治療薬に対する治療効果予測や治療効果判定するための簡便で迅速、高感度な遺伝子検査法の開発及び、分子標的治療薬が有効な癌を探索することによりがん医療の飛躍的な向上を目指す。

(1) 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、その劇的な効果からCMLの治療に広く用いられるようになってきたが、再発や効果不十分なケースなどでは治療方針の変更を必要とするため、その判定法の確立が切望されている。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。

(2) 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、その臨床像は進行が早く、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おり、消化管NECにおいても同様の発現があるか、発現を認めた場合、消化管間質腫瘍 (GIST) と同様にc-kit 遺伝子に変異がないか解析を行い、c-Kitの分子標的治療薬でもあるImatinib mesylateが有効であるかの可能性について検討する。

B. 研究方法

1. 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。前年度までに、この検査法の反応条件を決定し、CML 細胞株の K562(b3a2 type)及び KCL-22(b2a2 type)を用いて、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。コントロールとして *abl* 遺伝子を用いた。最近の臨床研究より、末梢血液中の *bcr-abl*mRNA がイマチニブ治療後 10^3 以上の減少するかどうか予後に大きく影響することが分かってきた。そこで、今回は検量線を用いて定量する方法から、もっと簡便な方法としてテンプレート 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ないか検討した。Total RNA 400, 40, 4, 0.4, 0.004ng をテンプレートに RT-LAMP 反応を 65 度 40 分行い、その後 95 度 3 分で酵素を失活させ反応を止めた。反応チューブが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(Jurkat)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、検討を行った。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。

2. 消化管神経内分泌細胞癌における *c-kit* の発現

<検体>

外科的に切除された消化管神経内分泌細胞癌 23 検体を用いて検討した。カルチノイドは除外した。神経内分泌癌の診断は HE 染色と免疫染色 (NSE, Synaptophysin, Chromogranin A etc.) の所見よりなされた。

<遺伝子解析>

RNA または DNA を得ることができた検体に関しては RT-PCR による *c-kit* の発現および *c-kit* の遺伝子変異解析を SSCP にて行なった (exon 7-13, 17)

<免疫染色>

c-kit の発現は免疫染色で確認した。10% formalin で固定、paraffin で包埋された組織を 4 μ m 毎に切り、xylene などで deparaffinize した。Citrate buffer (PH6.0) に浸し、microwave で 95°C で 20 分間加熱した後、rabbit polyclonal anti-human *c-kit* (DAKO, Glostrup, Denmark) による免疫染色を 4°C, overnight で行った。

細胞膜、細胞質が *c-kit* で染色された場合を陽性とした。細胞が染色されない場合を陰性、10% 以下の細胞が染まっている場合を弱陽性 (distribution 1+)、10% 以上で強陽性 (distribution 2+) とした。また、染色の intensity は、組織内の mast cell をコントロールとし、同等以上を strong、それ以下を weak と判定した。

(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に、データ管理を厳密に行う。なお、本研究は当がんセンター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 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* を持たない Jurkat 細胞 10^4 個中に CML (K562, KCL-22) 細胞 1 個が存在すれば測定機器を用いることにより定量性をもって検出可能であった。また、測定機器がなくても、65 度で反応し、*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。また、高感度検出に関する実験では、*bcr-abl* を有する細胞 (K562, KCL-22) と有しない細胞 (Jurkat) を混和した検体で *Bcr-abl* 細胞の割合が 10^6 に 1 個でも、テンプレート RNA として一反応あたり 1.6 μ g の total RNA を用いることにより、検出が可能であった。
2. 消化管神経内分泌細胞癌 (NEC) における *c-kit* の発現男性 19 名、女性 4 名の消化管神経内分泌細胞癌について *c-kit* の免疫染色を行い、26% (6 名/23 名) に発現を認めた。これは肺の神経内分泌細胞における *c-kit* の発現頻度とほぼ同じであった。
c-kit 発現の 6 例 全例で non-NEC component の混在を認めたが (NEC+腺癌あるいは NEC+扁平上皮癌)、non-NEC component では *c-kit* の発現は認めなかった。

c-kit 発現は RNA レベルでも確認された。

c-kit 遺伝子の exon 7-13,17 領域を SSCP にて変異解析を行なったが、変異は検出されなかった。

イマチニブ単剤では、十分な治療効果が得られない可能性が示唆された。(c-kit 陰性 non-NEC component が混在するため)

D. 考察

慢性骨髄性白血病の治療経過を簡便で迅速にモニターできれば、外来受診時に治療効果を確認しながら外来治療が可能になる。今回の研究で血液細胞 10^4 個中に CML 細胞 1 個が存在すれば検出できること、また、RNA を希釈して反応させて目視で判定した結果でも定量性は保たれており、しかも 65 度で 40 分反応させるだけで検出できるので、ほとんどの施設で測定が可能である。また、今回、プレート RNA を希釈して測定する方法を確立したため、検量線による測定よりさらに簡便にできるようになった。また、前回採取した検体と同時に測定することにより、治療効果の比較が正確かつ容易に行える。さらに、検査コストもたいへん安価であり十分実用性に耐えうるものと考えられる。

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を検出することができ、治療からの離脱を試みる上でたいへん有用な検査である。

また、消化管神経内分泌細胞癌の研究では、ほとんどの消化管神経内分泌細胞癌は複数の組織型を混在させているため、c-kit 陽性細胞も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、効果を上げたとしても一部の癌細胞に限られてしまうものと予測された。そのため、イマチニブを用いる場合は、他の抗癌剤との併用が必要であると思われる。

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 2 種類の遺伝子検査法の開発を行い、臨床の現状に沿った検査法の確立ができた。

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、他の治療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) Akagi K., Uchibori R., Yamaguchi K., Kurosawa K., Tanaka Y. and Koza T. Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 352, 728-732, 2006.
- 2) Tanaka Y., Akagi K., Nakamura Y. and Koza T. RNA aptamers targeting the C-terminal of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Nucleic Acids Res.* in press.
- 3) 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. 遺伝性腫瘍における公的医療費助成制度の実態調査. *家族性腫瘍*, 7(1), 54-58, 2006.
- 4) 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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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

- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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ミスマッチ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)
- 8) 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)
- 9) 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 JUNE 2-6, 2006, ATLANTA, GEORGIA.
- 10) 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)
- 11) 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

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 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.
- 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.