

200621015B

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16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 金子 安比古

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総合研究報告書 (平成16年度～平成18年度)

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

主任研究者 金子 安比古

金子 安比古 ウイルムス腫瘍の分子細胞遺伝学的診断 (平成16年)

ウイルムス腫瘍と肝芽腫の分子細胞遺伝学的診断 (平成17年, 平成18年)

林 慎一 乳癌の分子診断法の開発 (平成16年度, 平成17年度)

乳癌の新規分子診断法の開発 (平成18年度)

角 純子 腫瘍NM23蛋白質の誘導する免疫担当細胞の蛋白質発現変化と予後 (平成16年度)

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 (平成17年度)

細胞外環境におけるNM23蛋白質の機能と癌の予後 (平成18年度)

土屋 永寿 複数遺伝子異常の組み合わせによる肺癌の悪性度診断 (平成16年度, 平成17年度)

山口 研成 癌由来血漿変異DNAの検出と臨床応用 (平成16年度)

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 (平成17年度)

新井 康仁 DNAチップを用いた小児がんのゲノム解析 (平成18年度)

赤木 究 癌における高速遺伝子診断システムの開発 (平成18年度)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 25

III. 研究成果の刊行物・別刷 (別冊にて一部添付)

総合研究報告書

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 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遺伝子を分析し、WT1異常群12%、IGF2 loss of heterozygosity (LOH)群30%、IGF2 loss of imprinting (LOI)群16%、WT1異常とIGF2異常のないretention of imprinting (ROI)群42%に分類した。これにより、ウイルス腫瘍が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を分析し、106例中27例(25%)にIGF2-LOHを認めた。IGF2-no LOHである残り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。

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行った。1) 過去に行ってきたエストロゲン応答性マイクロアレイの研究を臨床応用に向けた取り組みを行った。3 次元マイクロアレイ装置での診断用チップの作製、絞り込まれた候補遺伝子の機能解析などを行い、より実用的な診断ツール開発を目指している。2) さら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ることなどが明らかとなった。また、アロマトラーゼ阻害剤(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る可能性が示唆された。

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討した。乳癌 (血清 4 1 3 例)、婦人科癌 (血清 1 1 9 例および腹水 1 6 例) および前立腺癌を順次分析している。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。適応できない腫瘍は、肺腺癌、扁平上皮肺癌、そして乳癌となった。婦人科癌では卵巣癌に高濃度の NM23 が検出される症例が見出されるので、今後、解析の成果が期待できる。また、この予後診断の精度・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。今後、H2 測定の併用による予後予測効果の向上を検証する。次に NM23-H1 高値の白血病や悪性リンパ腫患者の予後が不良な理由を解明するため、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 蛋白質を処理した正常末梢血単核細胞に誘導される遺伝子/蛋白質の発現を cDNA microarray、multiple RT-PCR、蛋白質アレイ等を用いて包括的に解析した。腫瘍の悪性化に関与する多くのサイトカインが誘導されていた。また、誘導されたサイトカインの一部は初代培養の白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。NM23 は正常末梢血単核細胞 (特に、単球) のサイトカイン産生を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持すると推察された。一方、初代培養の白血病末梢血単核細胞について同様の解析を行ったところ、白血病細胞の増殖・生存が NM23 蛋白質により顕著に促進された。この作用はサイトカイン誘導、MAPK および STAT (1,3,5) シグナル伝達系の活性化と関連した。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。さらに、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 2 1 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。現在、*in vivo* での結合を検証している。

末梢血を用いて固形癌の治療効果をモニタリングすることができれば、患者に対する侵襲も少なく適切な治療を適切なタイミングで行うことができる。本研究は、血液の血漿部分を用いた遺伝子検査による治療効果モニタリング法と血液の細胞成分を用いた遺伝子検査による治療効果のモニタリング法の開発を目的にした。血漿を用いたモニタリング法では、化学療法の対象となるステージ IV の癌患者の血漿中に存在する癌由来の変異 DNA を測定し、その経時的変化が治療効果と関連しているかどうかを、画像診断や腫瘍マーカーを用いて評価した。これまでの解析から 1) 血行性転移の患者では、癌の進展に伴い腫瘍由来の DNA 比率が増加していくこと 2) これに反し腹膜転移などの非血行性転移においては増加してくる血漿中 DNA の大半は正常細胞由来であることを明らかにした。これらの知見は血漿 DNA の推移が、症例により治療の指標や病態把握のためのバイオ

マーカーとして利用可能である場合とそうでない場合があることを示唆している。一方、血液の細胞成分を用いた治療効果モニタリング法として、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 40 分で検出できる遺伝子検査法を開発した。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、特別な測定機器を必要とせず、またその結果は目視により判定することができる。簡便なので実用化されれば、一般の病院でも遺伝子検査が手軽にできるようになる。また、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も応用が可能である。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。

腫瘍の悪生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）例の p53 変異と腺癌の K-ras 変異を検索し、臨床病理学的特徴との関連から、同腫瘍における複数遺伝子異常の組み合わせと悪性度（予後）との関係を検討した。全例の p53 変異頻度は 48%（扁平上皮癌 68%、腺癌 41%）と他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ており、その影響は K-ras 変異の方がより大きく、両遺伝子異常が重なった場合が最も予後が悪かった。

分担研究者

平成16年度～平成18年度

1. 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 所長
2. 林 慎一 東北大学医学部保健学科基礎検査学 講座 教授
3. 角 純子 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 主任研究員

平成16年度～平成17年度

1. 山口 研成 埼玉県立がんセンター病院 副部長
2. 土屋 永寿 神奈川がんセンター研究所 所長

平成18年度

1. 赤木 究 埼玉県立がんセンター病院 科長 兼 副部長
2. 新井 康仁 国立がんセンター研究所 主任研究員

A. 研究目的

ウィルムス腫瘍は代表的な小児の腎腫瘍である。そ

の原因遺伝子として 11p13 染色体領域より WT1 が単離されたが、WT1 異常はウィルムス腫瘍の 15%にみられるに過ぎない。私たちは 12 トリソミーを伴う高 2 倍性腫瘍が WT1 異常をもたないウィルムス腫瘍のサブグループであることを報告した。IGF2 は 11p15 に位置し、父性発現するインプリント遺伝子である。ウィルムス腫瘍では高率に IGF2 の loss of imprinting (LOI) や loss of heterozygosity (LOH)が生じていると欧米から報告されている。最近、IGF2 LOI 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と報告された。平成 16、17 年度はウィルムス腫瘍を 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ことが研究の目的である。

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と考えて、平成 18 年度は WT1 および IGF2(WT2)異常の分析を 106 例まで増加して行う。ウィルムス腫瘍では 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もある。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 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、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。

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、白血病、悪性リンパ腫、小細胞肺癌および神経芽腫に應用できることを報告してきた。本研究は、この予後診断法を應用できる固形腫瘍を広く検索することおよび予後診断の精度・効率を向上させることを目指している。本研究期間において、乳癌、婦人科癌、前立腺癌について検討する。また、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、H2 測定を併用することによる予後予測効果の向上を検証する。さらに、本研究は血清 NM23 蛋白質高値例の予後が不良な理由を解明し、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。そのため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。さらに白血病細胞や正常末梢血単核細胞の増殖・生存に対する NM23 蛋白質の効果およびその作用機序を解明する。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、血清 NM23 蛋白質の生物学的機能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。

本研究は、末梢血を用いた固形癌の治療効果をモニタリングする分子マーカーの探索と測定法の確立を目指した研究である。末梢血を用いることで、患者に対する侵襲も少なく、適切な治療を適したタイミングで行うことができる。血液の血漿部分より癌由来の DNA を測定し、治療効果をモニタリングする法と血液の細胞成分を用いた癌細胞由来の癌特異的遺伝子変化を測定することにより治療効果をモニタリングする方法の開発を試み、臨床応用を目指す。

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。

腫瘍の悪生度は複数の遺伝子の組み合わせにより決定される。単独で肺癌の悪生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生度を検討した報告はない。そこで、肺癌において、1) *p53* 変異と *K-ras* 変異の組み合わせと臨床病理学的特徴との関連を分析して、悪生度の変化を検討した。この研究とは別の研究を次に行った。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者間の関係を探索し、「*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

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、loss of imprinting (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)、LOH 分析、WT1 分析を実施した。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。

過去に行った大規模マイクロアレイやこれまで開発してきたエストロゲン応答性カスタムマイクロアレイを用いた解析結果からさらに候補遺伝子を絞り込み、3次元型マイクロアレイチップを作成した。これらを用いて乳癌手術材料および生検材料を用いた解析を行った。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試みる。アロマターゼ阻害薬 (AI) 反応性予測を目的にして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した。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コンストラクトを作製した。これを手術標品、生検標品から得た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* に近い評価系を確立した。乳癌症例及び子宮内膜癌症例より得た標品へウイルス型 ERE-GFP を導入し、個々の症例について ERE 活性可能の評価を行い、データを蓄積している。それらに対する AI の効果を今後、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 蛋白質は、サンドイッチ ELISA 法により測定した。乳癌患者の手術前血清 4 1 3 検体と、婦人科癌患者の血清 1 1 9 検体および腹水 1 6 検体について解析した。また、前立腺癌患者の血清検体の収集を開始した。次に、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。各種血清及び腹水の NM23-H2 を定量し、NM23-H1 や臨床データとの関連を解析する。さらに、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の増殖・生存に対する作用を MTT アッセイ法で、また NM23 で誘導される遺伝子/蛋白質の発現を cDNA microarray、multiple RT-PCR、蛋白質抗体アレイおよび 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 blot 法にて解析した。130種類の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 蛋白質が特異的に結合する腫瘍関連蛋白質を同定した。今後、*in vivo* での結合を免疫沈降法にて検討する予定である。

血漿を用いた固形癌由来 DNA 検査法の開発として、まず、患者血漿から、諸キットおよび抽出法の組み合わせ、純度・回収率の高い抽出法の比較検討を行った。また、癌由来 DNA の検出法として、膵癌のほとんどに認められる K-ras 遺伝子変異部位に対して蛍光標識プライマーを用いた PCR-SSCP を行った。野生型と変異型の K-ras 遺伝子のシグナル強度より、その比を数値化して経時的に観察した。また、適応範囲の拡大を目指し、MAPK シグナル伝達系の癌遺伝子である BRAF 遺伝子の変異を高感度に検出する系の開発を検討した。KRAS の SSCP 法に対して、BRAF は PCR-RFLP をベースとした方法を用いた定性的な測定の実験を行った。

血液の細胞成分を用いた治療モニタリング法の開発としては、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、微小残存病変をモニタリングする方法の開発を試みた。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。次に、*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 Jurkat 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。

外科的に切除された 23 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。

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 RT-PCR, SSCP, シークエンス法にて *p53* 変異を, MASA 法にて *K-ras* 変異を検索した。肺癌の分類は 1999 年の WHO 分類に従い、臨床病理学的項目はカルテを参照した。

(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 年度はウィルムス腫瘍 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、ウィルムス腫瘍 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年度はウィルムス腫瘍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(25%)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(34%)とretention of imprinting (ROI)を示す43例(41%)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例のウィルム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。ウィルム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

の正常腎では、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。

これまでの乳癌培養細胞株を用いたマイクロアレイ解析、乳癌組織検体の解析、術前ホルモン療法(アロマターゼ阻害剤投与)を施行した治療前の生検標品と治療後の手術時の標品乳癌患者検体についての解析、また、real-time RT-PCRによる乳癌組織標品の解析等の結果を総合的に評価して、内分泌療法の奏効性予測因子となる可能性のある遺伝子を絞り込み、約50遺伝子を搭載した3次元型マイクロアレイチップを作成した。これによってアレイ解析の高感度化、操作の簡便化、自動化が可能となった。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、HDAC6、IGFBP4、IGFBP5、EGR3等が同定された。HDAC6については他の複数の施設でも乳癌の予後因子となることが確認された。また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。これらの候補遺伝子、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、同一患者集団の組織アレイを用いて更なる詳細な検討を計画している。また、アロマターゼ阻害剤反応性予測のためにアロマターゼが存在する癌細胞近傍の間質細胞も含めた評価系を確立するため、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持ったGFP発現ベクターを構築し、ER陽性乳癌細胞株MCF-7に安定導入し、複数の株を得た。その中から蛍光のバックグラウンドが低く、最もよくエストロゲンと反応する株、MCF-7E10を選択、樹立した。このレポーター細胞を用いて乳癌手術材料から得た間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した。その結果、その活性が患者ごとに大きく異なり、それぞれの癌の間質に個性があることが明らかとなった。また、その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関が見られた。これらのことから、この系は個々の癌の微小環境の評価に有用であると思われる。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エストロゲン以外の他の因子も分泌され、癌細胞の生存と増殖に重要であることが明らかとなった。次に、ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、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、これに対しアロマターゼ阻害剤 (AI) 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。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症例があることが明らかとなった。

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、乳癌および婦人科癌について検討した。413 例の乳癌血清の NM23-H1 蛋白質を測定したが、高値症例をほとんど見出せなかった。この予後診断法は乳癌には応用できないと判断した。婦人科癌 (119 例血清および 16 例腹水) には、高濃度の NM23-H1 が検出される症例が見出された。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。前立腺癌血清のプロテオミックス解析から、NM23-H1 蛋白が検出されると報告されたので、前立腺癌についても血清集積を開始している。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 NM23-H2 を特異的に測定できる sandwich ELISA を新たに作製した。この系を用いて婦人科癌検体について解析したところ、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が明らかになった。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予定である。次に、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には、サイトカインやケモカイン (GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, Gro $\alpha/\beta/\gamma$, MIP-1 β , MCP1, I-309), ICAM-1, MMP12, MMP7 等が誘導され、IP-10, MIG 等のケモカインの誘導は抑制された。腫瘍の悪性化に関与する多

くのサイトカインや生理活性蛋白質が誘導されることが判明した。また、誘導されたサイトカイン中 GM-CSF や IL-10 は初代培養の白血病細胞の増殖・生存を直接促進した。次に、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対して、諸種サイトカインの誘導、MAPK および STAT (1,3,5) シグナル伝達系の活性化と関連して、その増殖・生存を促進した。このような増殖促進作用は正常末梢血単核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。最後に、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蛋白質アレイを用いて、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* での結合について検証を進めている。

血漿を用いた固形癌由来 DNA 検査法を開発するために、NaI を用いた抽出法に改良を加えて検討を重ねた結果、phenol/chloroform 法に比べ純度を低下させることなく収率が 2 倍以上あることがわかった。KRAS 遺伝子とともに MAPK シグナル伝達系の一員である BRAF 遺伝子の変異に対し enrich 検出法を開発し、原発性大腸癌を用いた変異解析を行った。その結果、BRAF 遺伝子変異は結腸直腸がんの約 5% で認められ、KRAS 遺伝子変異と相補的であること確認した。この変異解析の検出感度を検討した結果、野生型 BRAF¹⁰ に対し 1 個の変異 BRAF を検出できた。この方法を用いて原発巣に BRAF 遺伝子変異を検出した大腸癌患者の血漿中に変異 DNA が存在するかを検討し、検出できる症例があることが確認できた。大腸癌患者で KRAS と BRAF 遺伝子変異を組み合わせることで約 50% の大腸癌患者を診断できることを明らかにした。慢性骨髄性白血病の治療効果モニタリング法としては特異性：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、ラダーパターン及び予想される DNA 断片サイズより、目的の増幅産物であることが確認された。検出感度：

K562 及び KCL-22 細胞が 5 個存在すれば、*bcr-abl* は約 2.5 分、コントロールの *abl* は、細胞 1 個存在すれば、約 1.8 分で検出できた。また、*bcr-abl* を持たない Jurkat 細胞株で K562 細胞を希釈した場合、Jurkat 細胞 10^4 個に K562 細胞 1 個存在すれば、このシステムで検出することができた。定量性: 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。80 ng から 128 pg 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。次に、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。

肺癌における *p53* の変異頻度は、全例では 48% (149/313) (7 例は 2ヶ所に変異あり) 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。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。次に、喫煙、組織型と *p53* 塩基変異のパターンとの関係を検討した。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

ウイルス腫瘍には 11p13 に位置する WT1 遺伝子異常により発生する少数の腫瘍の他に、11p15 に位置する IGF2 遺伝子の異常により発生する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をコードするインプリント遺伝子であり、両親由来アレルの発現する loss of imprinting (LOI) や LOH により父方アレルの重複を示す LOH による過剰発現が腫瘍の発生・進展にかかわると考えられている。CTCF は insulator protein であり、母方 H19-DMR 領域の CTCF 結合領域 (CTCF6) 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 CTCF6 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 遺伝子はウイルス腫瘍でしばしば欠失のみられる 16q22 に位置しており、16q の結果 CTCF 蛋白質の産生が抑制されると、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 +12 と 11q- の頻度が IGF2 LOI 群においては、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。

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 他データのデータを合わせると、11q- 欠失領域は 60 Mb に狭めることができた。この領域には、癌抑制遺伝子である TSLC1 が位置しているので、その変異とメチル化を調べたが、LOI 群との関係は認められなかった。IGF2 LOI 群には +12 の頻度が高かった。12 番染色体上には細胞増殖関連遺伝子である CCND2 と CDK4 が位置しており、ウイルス腫瘍では高発現していると報告されている。LOI 腫瘍はその進展に、これらの遺伝

子の過剰発現が必要であると考えられた。WT1 異常型ウイルス腫瘍はβカテニン変異の頻度が WT1 正常腫瘍に比して著しく高い。また今回の研究結果などから、WT1 異常型ウイルス腫瘍は染色体異常の頻度が低い。以上の所見より、ウイルス腫瘍は WT1 欠失、βカテニン変異を示し、染色体異常数の少ない WT1 型腫瘍と、IGF2 LOI、CCND2 や CDK4 の過剰発現、11q 癌抑制遺伝子欠失など多数の genetic/epigenetic 異常により発生する+12 型腫瘍に分類できることを示した。IGF2 LOI 型腫瘍患者の年齢が WT1 型腫瘍患者より高い理由として、腫瘍発生に至る genetic/epigenetic event の数が多いためと考えられた。

平成 18 年度には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 106 例に対して実施した。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、日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度が欧米の 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。日本人における発生頻度が低い原因のひとつと考えられる。

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。

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、現在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、その機能を解析する研究を行ったところ、EGR3 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なるように準備している。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 レベルの発現解析を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組織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ラーゼ阻害剤 (AI) は特に癌細胞周辺の間質組織に存在するエストロゲンを産生する酵素、アロマトラーゼが標的であり、この治療

の奏効性予測には周辺間質を含めた総合的な評価系が必要である。そこで新たに ERE-GFP を持った指示細胞を作成し、そのような評価系の確立へ向けて研究を開始した。乳癌手術材料を用いた解析から、この GFP レポーター細胞システムを用いることによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることを示した。このシステムの AI 剤の奏効性予測への応用に向けてさらに研究を進めたい。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。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 AI 剤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 剤が登場してから数年が経過したことにより、AI 剤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 剤耐性機序の解明と、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。

血清 NM23-H1 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍を決めるために、NM23 遺伝子の高発現が報告されている乳癌、婦人科癌、前立腺癌について臨床的意義を包括的に検討している。現在までのところ、以前報告した造血器腫瘍において最も予測効果を発揮している 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ので、予後診断の精度・効率の向上が期待できる。次に腫瘍細胞が産生する NM23 分子をメディエーターとして、直接のおよび間接的 (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（腫瘍増殖促進活性、そ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、サイトカイン産生誘導活性等）を標的とした治療法の開発へとつながる可能性がある。また、蛋白質が細胞内で繰り広げる様々な機能の解析には、個々の蛋白質の解析に加えていくつもの蛋白質との相互作用やネットワークを明らかにする必要がある。そこで、NM23 と相互作用する蛋白質の検討を開始した。新たな予後因子となる標的分子の発見へと展開したい。

血漿 DNA を用いた固形腫瘍の治療効果判定法の研究を進めた。血行性転移をきたした肺癌においては、変異 DNA の比率が癌の進行によって増加することが確認されたが、臨床応用を目指すには、効率と純度のよい血漿 DNA の抽出法の開発が必須である。この安定した抽出系を確立することで、real-time PCR などの方法により絶対量を定量することが出来、精度の高い腫瘍マーカーとしての応用が可能になると考える。また、KRAS 遺伝子変異は様々な癌腫で高率に変異を有するが、肺癌で 70~90%、大腸癌で約 40%の変異率である。BRAF 遺伝子などの他の遺伝子変異を組み合わせることで検討できる幅が広がるものと考えられる。

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 Jurkat 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、およそその 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(Jurkat)を混和した検体で bcr-abl mRNA 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。以上より、RT-LAMP 法による慢性骨髄性白血病患者における

bcr-abl mRNA のモニタリングは、簡便、迅速で、十分な臨床的価値があると考えている。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のみを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測されるので、他の抗癌剤との併用が必要であると考えられた。

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、関係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。次に、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、一施設からこれまで報告された中では最も多い症例を集めて解析した。その結果、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った。今後、EGFR

や*p16* 変異の解析や、同遺伝子蛋白発現の状況を検索し、遺伝子異常の組み合わせを増やし、より生体の状態を反映した場合に、予後が如何に変化するか検討する予定である。

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 異常型腫瘍の発生頻度は日欧で同程度であり、IGF2-LOI 型腫瘍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、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、新規の標的遺伝子群が明らかになり、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、これらのコンテンツを組織アレイの免疫染色により検討している。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。アロマターゼ阻害剤(AI)耐性機序解明と AI 再発後の治療法の選択に有用な情報が得られた。

血清 NM23-H1 蛋白質による予後診断法を適応できる腫瘍範囲を検索しているが、現在までのところ造血器腫瘍において最も効果を發揮している。乳癌には応用できないこと、卵巣癌には応用の可能性があることを明らかにした。また、アイソタイプ NM23-H2 測定系を作製し、併用による予後予測効果の向上が得られる可能性を示した。次に、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ことを明らかにした。この NM23 分子の増殖促進活性は、諸種サイトカインの誘導、MAPK 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。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基盤の 1 つと考えられる。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 阻害剤を適応できるのではないかと考えられる。このように、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。

血漿 DNA を用いた固形癌の治療効果診断法では、がん患者において癌の進展に伴い血漿中の癌由来変異 DNA 比率が増加することを見だし、モニタリングとして利用できるものと思われた。また、これと同時に悪性黒色腫など一部の癌で変異が高いとされている BRAF 遺伝子変異の高感度検出法を開発した。癌由来の変異 DNA の検出は検出感度及び血漿DNAの抽出法の問題点を解消することにより、臨床上有用なバイオマーカーとして用いられる可能性がある。次に、慢性骨髄性白血病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、他の薬剤との併用が好ましいと考えられた。

p53 変異と 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) Zhang, Y., Zelenik-le, N., Emmanuel, N., Jayathilaka, N., Chen, J., Strissel, P., Strick, R., Li, L., Neilly, MB., Taki, T., Hayashi, Y., Kaneko, Y., Schlegelberger, B., and Rowley, JD. Characterization of genomic breakpoints in MLL and CBP in leukemia patients with t(11;16). *Genes Chromosomes Cancer*, 41: 257-265, 2004.
- 2) Yuki, Y., Imoto, I., Imaizumi, M., Hibi, S., Kaneko, Y., Amagasa, T., and Inazawa, J. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci.*, 95: 503- 507, 2004.
- 3) Ishiguro, M., Iwasaki, H., Ohjimi, Y. and Kaneko, Y.

Establishment and characterization of a renal cell carcinoma cell line (FU-UR-1) with the reciprocal ASPL-TFE3 fusion transcript. *Oncology Rep.*, 11: 1169-1175, 2004.

- 4) 金子安比古: ウィルムス腫瘍の染色体異常と遺伝子異常. *細胞*, 36: 273-277, 2004.
- 5) 金子安比古: 骨軟部腫瘍の染色体転座・融合遺伝子. *日本医事新報*, 4185: 92-94, 2004.
- 6) Tsuchiya, T., Osanai, T., Ogose, A., Tamura, G., Chano, T., Kaneko, Y., Ishikawa, A., Orui, H., Wada, T., Ikeda, T., Namba, M., Takigawa, M., Kawashim, H., Hotta, T., Tsuchiya, A., Ogino, T. and Motoyama, T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 158: 148-55, 2005.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
 - 17) 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.
 - 18) Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H.. HDAC6 expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10 : 6962-6968, 2004.
 - 19) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Suemasu, K., Higashi, Y., Okazaki, T., Kiyama, R., Nakachi, K., Fujita, T. and Hayashi, S. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Science*, 95: 496-502, 2004.
 - 20) Inoue, A., Omoto, Y., Yamaguchi, Y., Kiyama, R. and Hayashi S. Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J. Mo. Endocrin.*, 32: 649-661, 2004.
 - 21) Terasaka, S., Aita, Y., Inoue, A., Hayashi, S., Nishigaki, M., Aoyagi, K., Kiyama, Y., Sakuma, Y., Akaba, S., Tanaka, J., Sone, H. Yonemoto, J., Tanji, M. and Kiyama, R.. Expression profiling of the estrogen responsive genes for evaluation of estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *Environ. Health Persp. Toxicogenomics*, 112 : 773-781, 2004.
 - 22) Hayashi, S. Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58 : 1-9, 2004.
 - 23) 林 慎一, 鈴木 貴: 核内受容体研究における進展. 特集・ホルモン療法の最近の進歩, 細胞, 36: 388-391, 2004.
 - 24) 林 慎一: 異所性ホルモン産生腫瘍の発生と増殖. 特集・異所性ホルモン産生腫瘍, 日本臨床, 62 : 848-850, 2004.
 - 25) 林 慎一: 乳癌における ER α , β の発現・機能と臨床応用. ホルモンと臨床, 52: 83-89, 2004.
 - 26) 林 慎一: DNA マイクロアレイを用いた乳癌のホルモン依存性に関する研究—臨床応用を目指して—. *Breast Cancer Today (Elsevier Japan)*, 20: no.2, 2-11, 2004.
 - 27) 林 慎一: 乳腺領域幹細胞と乳癌の発生. 医学の歩み, 別冊, 乳腺疾患-state of arts, p8-10, 2004.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) 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.
- 31) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56 :27-31, 2005.
 - 32) 林 慎一 : エストロゲン応答遺伝子. *医学のあゆみ*, 212:231-232, 2005.
 - 33) 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.
 - 34) 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.
 - 35) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. Basic research for hormone-sensitivity of breast cancer. *Breast Cancer*, 13(2)Apr, 123-128, 2006.
 - 36) 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.
 - 37) 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.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
 - 40) 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.
 - 41) 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.
 - 42) 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.
 - 43) 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.
 - 44) 林 慎一 : 乳癌の発生と乳癌幹細胞, *Mamma*, 54: 27-31, 2006.
 - 45) 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.
 - 46) 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.
 - 47) 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
 - 48) Niitsu, N., Nakamine, H., Okamoto, M., Akamatsu, H., Higashihara, M., Honma, H., Okabe-Kado, J., and Hirano, M. Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed in cytoplasm in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 10: 2482-2490, 2004.
 - 49) Yokoyama, A., Yamashita, T., Shiozawa, E., Nagasawa, A., Okabe-Kado, J., Nakamaki, T., Tomoyasu, S., Kimura, F., Motoyoshi, K., Honma, Y. and Kasukabe, T. MmTRA1b/ phospholipid scramblase 1 gene expression is new prognostic factor for acute myelogenous leukemia. *Leukemia Res.*, 28: 149-157, 2004.
 - 50) 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 Sci.*, 96: 653-660, 2005.

- 51) 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
- 52) Ishikubo, T., Nishimura, Y., Yamaguchi, K., Khansuwan, U., Arai, Y., Kobayashi, T., Ohkura, Y., Hashiguchi, Y., Tanaka, Y. and Akagi, K.. The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer Let.*, 8: 216(1): 55-62. 2004.
- 53) Yagura, T., Bidyut, R., Nishikawa, S., Karasawa, A., Yamaguchi, K., Ogata, M., Kobayashi, T. and Akagi, K. Identification and allelic frequencies of a novel polymorphism in human Ku70 gene. *Kwansai Gakuen University Natural Sciences Review*, 9 : 17-21, 2004.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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.
- 57) 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.
- 58) 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, 2007.
- 59) 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.
- 60) Kobayashi, K., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, M., Nishimura, H., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Sato, Y., Takahashi, A. and Tsuchiya, E. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Sci.*, 95: 334-41, 2004.
- 61) Ishikawa, N., Daigo, Y., Yasui, W., Inai, K., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Kohno, N. and Nakamura, Y. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10 : 8363-70, 2004.
- 62) Chinen, K., Ohkura, Y., Matsubara, O. and Tsuchiya, E. Hemophagocytic syndrome associated with clostridial infection in a pancreatic carcinoma patient. *Pathol. Res. Practice*, 200 : 241-245, 2004.
- 63) 石川雄一、土屋永寿. 肺癌、病理診断に役立つ分子病理学・10、シリーズ最新医学講座・II. 臨床検査 48: 1167-72, 2004.
- 64) 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.
- 65) Inamura, K., Fujiwara, T., Hoshida, Y., Isagawa, T., Jones, M.H., 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.
- 66) 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.
- 67) 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.

- 68) 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.
 - 69) 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.
 - 70) 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*, 119 : 501-507, 2006.
2. 学会発表
- 1) Kaneko Y., Watanabe, N, Tomioka, N, et al. : Neuroblastoma that might benefit from mass screening. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June In abstract p72. 2004; 250.1.
 - 2) 渡辺直樹、金子安比古 他 : WT1 異常を示さず 12 トリソミーを伴う高 2 倍性群はウイルムス腫瘍の新しいサブグループか? 第 63 回日本癌学会学術総会記事、2004、福岡。
 - 3) 渡辺直樹、金子安比古 他 : ウイルムス腫瘍における WT1 および IGF2 異常と染色体異常。第 64 回日本癌学会学術総会記事、2005 年、9 月、札幌。
 - 4) 春田雅之、金子安比古 他 : RASSF1A プロモーターメチル化は高 2 倍性 Wilms 腫瘍のほぼ全てに生じるが、高 2 倍性急性リンパ性白血病にはみられない。第 64 回日本癌学会学術総会記事、2005 年、9 月、札幌。
 - 5) 金子安比古 : ウイ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。
 - 6) 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。
 - 7) 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。
 - 8) 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。
 - 9) 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。
 - 10) 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。
 - 11) 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。
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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。
 - 15) 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。
 - 16) 林 慎一 : 乳癌の臨床応用に求められるエストロゲンシグナル研究。第 3 回ステロイドホルモンを考える会、2004、東京。
 - 17) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Tanaka,