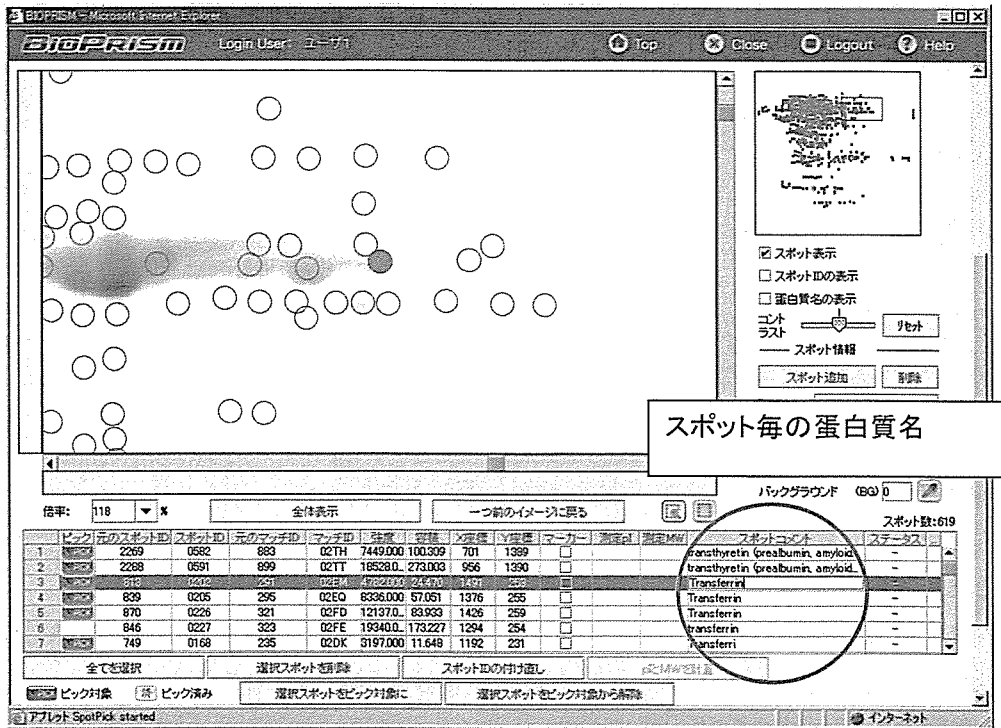


プロテオーム解析結果をゲル情報として登録して、各実験ごとにゲル画像を一覧表示する。

【ゲル画像詳細情報】



脳脊髄液や脳腫瘍に関するプロテオーム実験データを登録、閲覧できる。この画面では、ゲル画像に関連付けられたスポット情報を一覧表示し、NEC プロテオミクス研究センターにて検出した主要な蛋白質について併せて表示する。ゲル画像は自由に縮小拡大が可能であり、登録されたスポットの位置情報やスポットの容積、強度を表示する。

【スポット詳細情報】

マッチング情報やマッチしたスポットの発現量を参照する場合は、ゲル画像詳細画面においてスポットを選択し、「選択スポットの詳細データ表示」ボタンよりスポット詳細情報を表示する。

ゲル画像名: Gel1_PMT450 Cy2 Trim

項目	値				
スポットID	0202				
元のスポットID	013				
測定値					
測定時間					
ステータス					
スポットコメント	Transferin				
蛋白質情報					
元のマッチID	マッチID	ゲル画像名	スポットID	強度比	容積比
291	02EM	Gel1_PMT450 Cy3 Trim	0202	0.57	0.787
291	02EM	Gel1_PMT450 Cy5 Trim	0202	0.532	0.714
291	02EM	Gel2_PMT450 Cy2 Trim	0197	1.038	1.207
291	02EM	Gel2_PMT450 Cy3 Trim	0197	2.959	2.911
291	02EM	Gel2_PMT450 Cy5 Trim	0197	0.725	0.98
291	02EM	Gel3_PMT450 Cy2 Trim	0199	1.247	1.956
291	02EM	Gel3_PMT450 Cy3 Trim	0199	0.756	1.369
291	02EM	Gel3_PMT450 Cy5 Trim	0199	1.643	2.282
291	02EM	Gel4_PMT450 Cy2 Trim	0191	0.924	1.569
291	02EM	Gel4_PMT450 Cy3 Trim	0191	1.971	2.804
291	02EM	Gel4_PMT450 Cy5 Trim	0191	0.922	1.71
291	02EM	Gel5_PMT450 Cy2 Trim	0209	0.815	0.764
291	02EM	Gel5_PMT450 Cy3 Trim	0209	0.455	0.639
291	02EM	Gel5_PMT450 Cy5 Trim	0209	2.709	2.733
291	02EM	Gel6_PMT450 Cy2 Trim	0270	1.454	1.231
291	02EM	Gel6_PMT450 Cy3 Trim	0270	1.068	1.374
291	02EM	Gel6_PMT450 Cy5 Trim	0270	0.694	0.807

ピックアップ
スポット強度 4782.0

【統合表示機能】

プロテオーム実験結果で得られたゲル画像について複数枚同時に同じ画面上で表示することが出来る。その際に、関連するスポットの情報および蛋白質の情報を表示して、スポットの発現量を複数サンプル間で比較可能である。

ゲル画像を比較しやすく並べて表示

スポット発現情報をリスト表示

ピク	元のスポットID	スポットID	元のマッチID	X座標	Y座標
0001	176	0001	2	1480	52
0002	193	0003	4	537	50
0003	201	0006	4	785	54
0004	205	0002	3	659	51
0005	210	0004	5	511	61
0006	257	0006	12	459	70
0007	261	0007	13	506	70
0008	265	0009	15	558	72

【Excel への Export 機能】

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with a table containing the following columns: スポットID, 元のスポットID, コンプレ, 元のタンパク, ヒスト, スポット強度, スポット強度, 濃度, Y座標, マーカー, 濃度, 濃度, スポットスコア, スコア, and 蛋白質名. The table contains multiple rows of data, with some cells containing numerical values and others containing protein names like 'Candabactam (resistant)' and 'Candabactam (sensitive)'. A white text box with a black border is overlaid on the table, containing the text 'スポット発現情報、蛋白質名を Excel へ出力'.

プロテオーム解析で得られたスポット発現情報と蛋白質情報を併せて Microsoft Excel 上に出力できる。これによって、他の Excel ファイルとの融合や、Excel のフィル機能などを活用して、データ整理を容易に行うことができる。

【発明の名称】 クオントイル正規化方法および装置 (特許出願中)

【出願番号】 特願 2007-068510

【出願日】 2007年03月16日

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内

【氏名】 秋葉 幸範

【技術分野】

本発明は、クオントイル正規化 (Quantile Normalization) 方法および装置に関する。

【背景技術】

従来のクオントイル正規化処理の一例が非特許文献1に記載されている。従来のシステムは第1の並べ替え手段と順位付け手段と平均値計算手段と第2の並べ替え手段とから構成されている。しかしながら従来は単一のプロセッサ上での動作しか記述されていない。

また、マイクロアレイによる遺伝子等のデータ解析においては、マイクロアレイチップ上の検出プローブ数が、初期の数千個から現在は数百万個と飛躍的に増加しており、正規化のための計算時間が増大していること、記憶容量不足により多数のデータを取扱えないことなどの問題が発生している。

【非特許文献1】

Supplementary information for Bolstad, B. M., Irizarry R. A., Astrand, M, and Speed, T. P. (2003) A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics* 19,2,pp 185-193

【発明が解決しようとする課題】

上述した従来の方法は、一度に大量の数値データを処理すると計算時間が長くなる問題があった。

本発明の目的は、処理を高速化でき、また大量のデータを処理できるクオントイル正規化方法および装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段概要】

たとえば複数のプロセッサを有するクラスター型計算機などにおいて、症例＝マイクロアレイデータを各プロセッサに均等に分配し、独立に計算できる部分を並列に実行することによって計算時間の短縮を図る。

Chromosome Viewer (Microarray data解析ソフトウェア) の概要

国立がんセンター
日本電気株式会社 (NEC)
バイオIT事業推進センター 成田善孝 滝中徹 秋葉幸範

Affymetrix社のHG-U133 plusなどから得られた遺伝子発現プロファイルデータ (Microarray data) の解析は、統計的な手法により、ある群と対照群との有意な遺伝子発現の差をもとに、両群間で異なる遺伝子を同定する。しかし、膨大な数の解析結果が得られ、抽出された遺伝子の臨床的意味を考えることが困難なことが多い。

ここ10年間でCGH (Comparative Genomic Hybridization) 法やFISH法などにより染色体のLOHなどが明らかになり、どの染色体に神経膠腫の重要な遺伝子が存在するかはおおよそ明らかになってきた。たとえば、乏突起膠腫系の腫瘍 (Oligodendroglioma/Oligoastrocytoma) は、染色体1pのLOHが化学療法の感受性と相関があることが判明している。

そこで、染色体情報も参考にしながらMicroarray dataからより重要な遺伝子を探索するツールとしてChromosome viewerを開発することとなった。

Chromosome viewerでは以下のことが可能である。

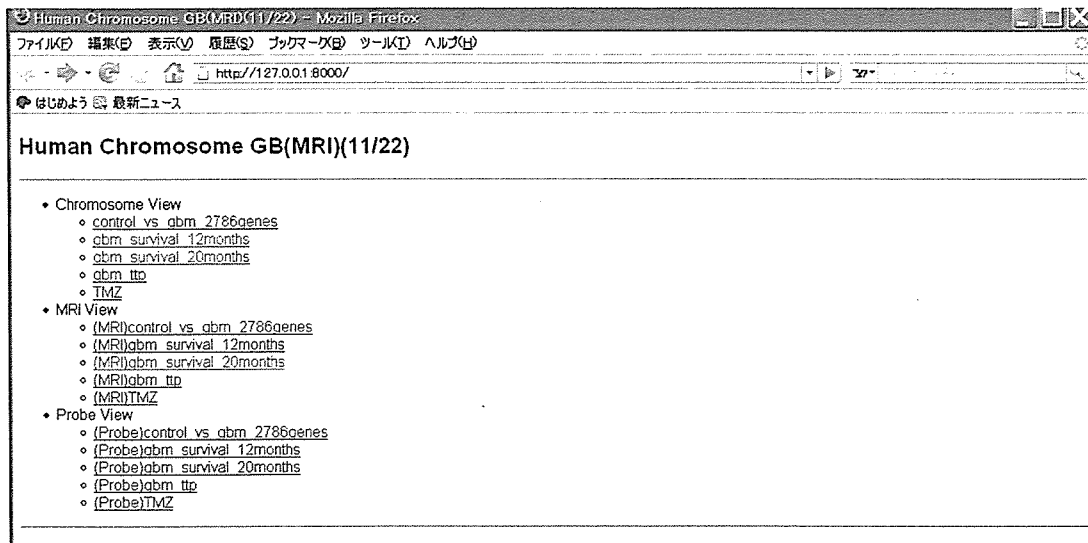
- ・ Microarray dataから得られた遺伝子発現情報を統計的に解析して有意な遺伝子を、染色体上に表示。
- ・ 有意な遺伝子はp値により表示可能 (より有意な遺伝子を視覚的に表示)
- ・ 遺伝子の存在する部位に加え、二群間の遺伝子の発現を表示
- ・ 染色体を拡大することにより、遺伝子の詳細な部位を塩基単位で表示
- ・ 2群間の症例を、MRI画像・病理画像とともに表示可能。

Microarray dataからは膨大な情報が得られるが、この手法により発現の差や有意差だけでなく、過去に行われた神経膠腫のDNA/RNA解析結果を利用した遺伝子探索が可能となった。

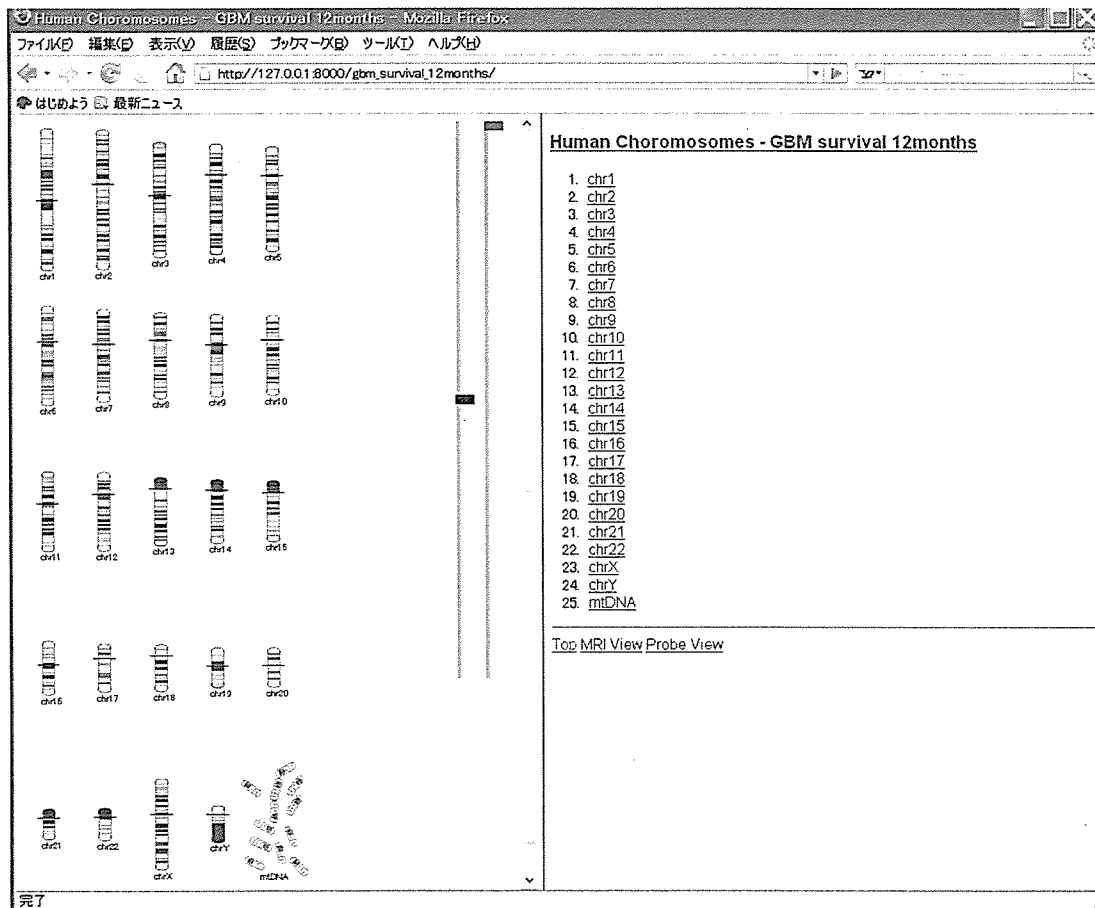
また、症例を見ながら抽出された遺伝子情報の重要性を検討することが可能となる。

(1) メインメニュー

例：GBM(膠芽腫)の生存率12ヶ月以上・以下で比較



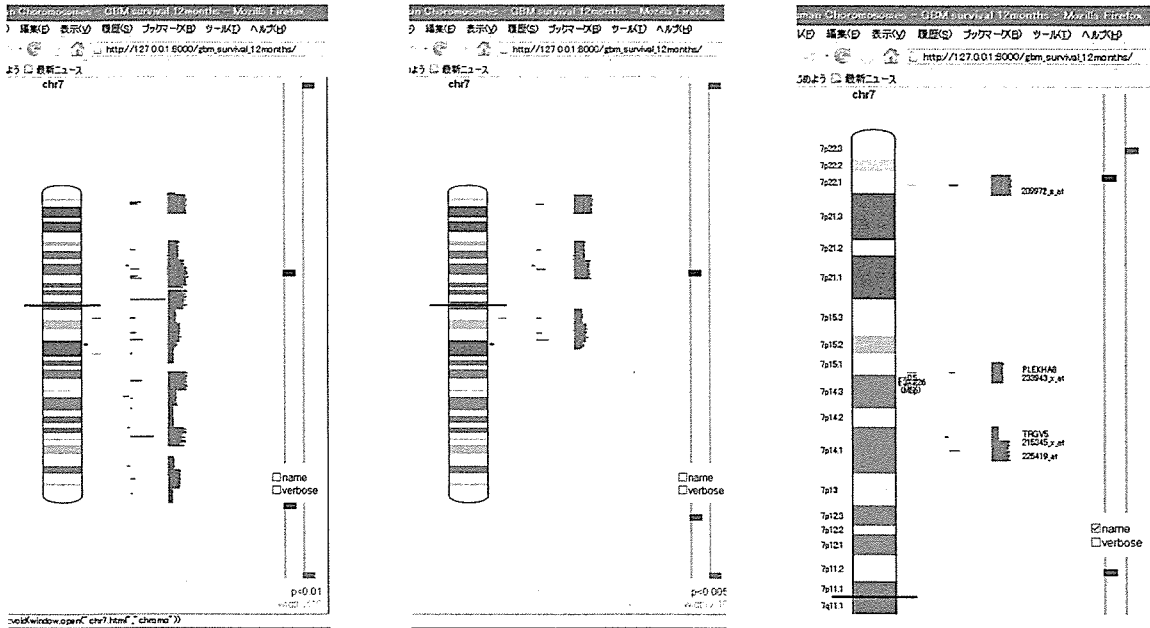
(3) 染色体選択画面



(3) Microarray 解析結果を表示

例：7番染色体上の遺伝子を表示。p値を変更することにより、より有意な遺伝子を絞ることができる

- (a) $p < 0.01$ の遺伝子 (b) $p < 0.001$ に絞る (c) 染色体を拡大し、遺伝子表示



(4) 比較群（生存期間>12ヶ月）と対照群（生存期間<12ヶ月）症例を呈示（各症例の詳細へリンク）

<p>Human Chromosomes - GB... 232535_at - Human Cho...</p> <table border="1"> <tr><td>GeneID</td><td>222194</td></tr> <tr><td>ProbeID</td><td>232535_at</td></tr> <tr><td>Symbol</td><td>RSBN1L</td></tr> <tr><td>Description</td><td>round spermatid basic protein 1-like [Source:RefSeq; peptide:AcNP_940869]</td></tr> <tr><td>Start Pos.</td><td>77165696 (bp)</td></tr> <tr><td>End Pos.</td><td>77246939 (bp)</td></tr> <tr><td>Strand</td><td>+</td></tr> <tr><td>Chromosome</td><td>chr7</td></tr> <tr><td>Band</td><td>q11.23</td></tr> <tr><td>P-value</td><td>0.00430288988613</td></tr> </table>		GeneID	222194	ProbeID	232535_at	Symbol	RSBN1L	Description	round spermatid basic protein 1-like [Source:RefSeq; peptide:AcNP_940869]	Start Pos.	77165696 (bp)	End Pos.	77246939 (bp)	Strand	+	Chromosome	chr7	Band	q11.23	P-value	0.00430288988613
GeneID	222194																				
ProbeID	232535_at																				
Symbol	RSBN1L																				
Description	round spermatid basic protein 1-like [Source:RefSeq; peptide:AcNP_940869]																				
Start Pos.	77165696 (bp)																				
End Pos.	77246939 (bp)																				
Strand	+																				
Chromosome	chr7																				
Band	q11.23																				
P-value	0.00430288988613																				
<p>case [232535_at] (4.630)</p> <p>AS05801 Rank.1(5.277)</p> <p>GEN AS05801</p> <p>AS05201 Rank.2(5.170)</p> <p>GEN AS05201</p>	<p>control [232535_at] (3.942)</p> <p>AS00201 Rank.28(2.773)</p> <p>GEN AS00201</p> <p>AS03901 Rank.27(3.212)</p> <p>GEN AS03901</p>																				

希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための
TRI(Translational Research Informatics)システムの構築
Astrocytoma と Oligodendroglioma の鑑別マーカーの検索
主任研究者 国立がんセンター 成田善孝

研究要旨

Gliomaにおいては、染色体1p上の遺伝子が化学療法や放射線治療の感受性に関与していることが報告されてきた。我々は国内最大のGliomaのMicroarrayによる遺伝子発現プロファイルデータベースであるTRIシステムを用いて、OligodendrogliomaとAstrocytomaの遺伝子発現プロファイルの差を検討し、1p上の責任遺伝子の探索を行った。

A. 研究目的

悪性脳腫瘍に代表される希少がんは、症例が少なく、肺癌や消化器癌に比べて治療効果の予測、標準的治療の確立や新規治療法の開発が極めて困難である。

特に悪性脳腫瘍の中で最も多い膠芽腫 Glioblastoma (grade 4) は、平均生存期間が1年程度であり、あらゆるがんの中で最も予後が悪い。

Low grade Glioma に分類される Oligodendroglioma (grade 2) の中には、染色体 1p, 19q の

LOHが見られる症例があり、放射線や化学療法に感受性があることが報告されてきた。我々はFISH法により、Glioblastomaにおいても1p, 19qのLOHのある症例はACNUをはじめとした化学療法に感受性があることを報告した。

そこで、AstrocytomaとOligodendrogliomaの症例をMicroarrayにより比較し、Oligodendrogliomaの感受性に関与している遺伝子を探索した。

B. 研究方法

悪性脳腫瘍を対象とし、国立がんセンター・埼玉医科大学・杏林大学・東京女子医科大学など多施設で集められた匿名化臨床情報、画像情報、病理情報、Microarrayによる腫瘍遺伝子情報、プロテオーム情報をデータベース化した TRI (Translational Research Informatics) システムを、日本電気バイオインフォマティクス部門と共同で開発をすすめた。さらに Microarray データを視覚的に解析するソフトウェアとして、Chromosome viewer を開発し、1p 上の遺伝子を探索した。

C. 研究結果

(1) Chromosome Viewer の開発

Affymetrix 社の HG-U133 plus から得られた遺伝子発現プロファイルデータ (Microarray data) の解析は、統計的な手法によって行われ、ある群と対照群との有意な遺伝子発現の差をもとに、両群間で異なる遺伝子を同定する手法がとられている。ここ 10 年間で CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法や

FISH 法などにより、染色体の LOH などが明らかになり、どの染色体に神経膠腫の重要な遺伝子が存在するかはおおよそ明らかになってきた。

Oligodendroglioma は、染色体 1p の LOH が化学療法の感受性と相関があることが判明している。そこで、染色体情報も参考にしながら Microarray data からより重要な遺伝子を探索するツールとして Chromosome viewer を開発した。

Chromosome viewer では以下のことが可能である。

- ・ Microarray data から得られた遺伝子発現情報を統計的に解析して有意な遺伝子を、染色体上に表示。
- ・ 有意な遺伝子は p 値により表示可能 (より有意な遺伝子を視覚的に表示)
- ・ 遺伝子の存在する部位に加え、二群間の遺伝子の発現を表示
- ・ 染色体を拡大することにより、遺伝子の詳細な部位を塩基単位で表示
- ・ 2 群間の症例を、MRI 画像・病理画像とともに表示可能。

Microarray data からは膨大

な情報が得られるが、この手法により発現の差や有意差だけでなく、過去に行われた神経膠腫の DNA/RNA 解析結果を利用した遺伝子探索が可能となった。

統括研究報告書添付資料 3 参照。

(2) Oligodendroglioma に特徴的な遺伝子の解析

図 1 に、Microarray による遺伝子発現プロファイルのうち、Astrocytoma をコントロールとして、Oligodendroglioma で有意に変化の見られる遺伝子の染色体上の位置と、発現レベルを示した ($p < 0.01$)。赤は Oligodendroglioma で発現の亢進している遺伝子、緑は発現の低下している遺伝子を示す。その結果、Oligodendroglioma においては染色体 1p 上の遺伝子が明らかに発現が低下していることが示された。

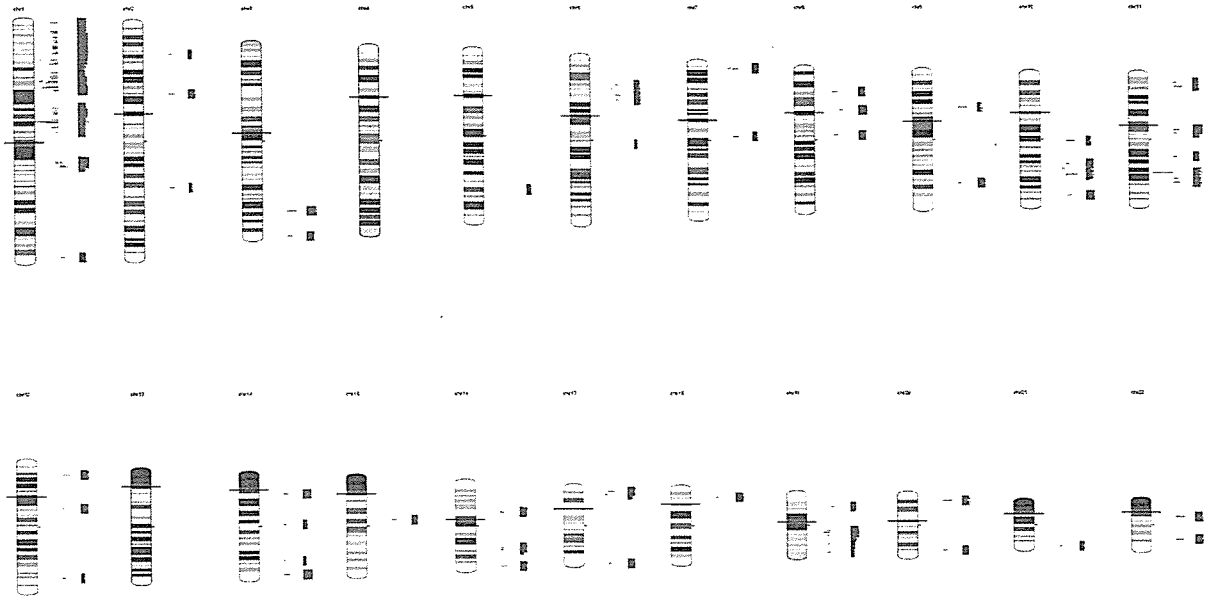
Oligodendroglioma においては、Astrocytoma と比較して 33 個の遺伝子の有意な発現の変化が見られたが、うち 14 個が染色体 1p 上に存在し、発現が低下していた(図 2)。

Oligodendroglioma において

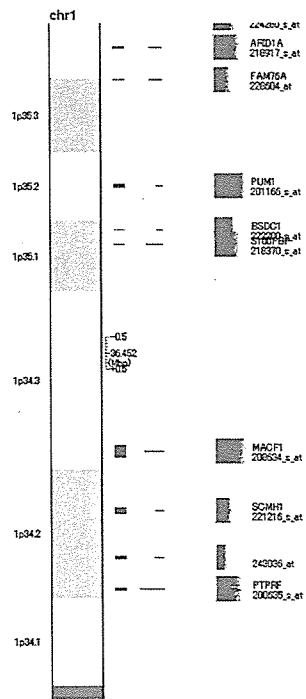
は、1p の中でも 1p34 にある遺伝子がこれまでの報告で、化学療法等に感受性があることが報告されており、その中で発現の差異・遺伝子の機能検索の結果から、1p34.1 上の遺伝子 PTPRF がその責任遺伝子と考えられ、現在解析をすすめている。

D. 考察・今後の発展性

我々の開発した Chromosome viewer を用いた解析結果は、これまでに報告されてきた CGH や FISH 法のデータと合致している。今後 PTPRF などの遺伝子をはじめとして、1p34 上の遺伝子について、RT-PCR, Real time PCR 法によりさらに詳細にその発現を検討し、Glioblastoma においても、化学療法の感受性と関連がることを検討していく予定である。



[図1 Oligodendroglioma に特徴的な遺伝子発現]



[図2 1 p 上に見られる遺伝子発現変化]

神経膠腫における MGMT のメチル化の検討

分担研究者 渋井壮一郎 国立がんセンター中央病院脳神経外科医長

研究要旨

悪性神経膠腫に対しては ACNU 等のニトロソウレア製剤が用いられるが、その耐性には MGMT 遺伝子の発現が関与している。MGMT の発現調節は MGMT のメチル化によって行われており、パラフィン標本から DNA を抽出し、MGMT メチル化を検証する方法を確立した。

神経膠腫 52 例について検討したところ、膠芽腫で 36.4%、退形成性星細胞腫の 33.3%でメチル化が見られず、MGMT の非メチル化が予後に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

悪性神経膠腫に対しては、ACNU(ニトロソウレア)が治療に用いられてきた。しかし悪性神経膠腫は ACNU に対する薬剤耐性をもつものがあり、MGMT がその主因と考えられる。この酵素は、ACNU により guanine と結合したメチル基を除去することで薬剤耐性を発揮するが、PCZ (procarbazine) も alkylguanine を形成することから、procarbazine を前投

与することにより、MGMT が消費され、ACNU の治療効果を高められることが期待できる。MGMT の発現はメチル化により調節されているため、MGMT のメチル化が全く見られない症例では MGMT の発現が高く、ACNU に対して耐性をもつと考えられる。

JCOG 脳腫瘍グループで亜、悪性神経膠腫を対象として、ACNU vs PCZ + ACNU による第 II/III 相試験 (JCOG0305) を

2003 年から開始した。2006 年 11 月にまでに第 II 相部分が終了し、現在 111 例のデータを解析中である。

データ解析に当たっては、各症例の MGMT のメチル化と発現の程度と、生存期間・予後との関係を検討する予定である。そのためには、パラフィン標本から DNA を抽出し、MGMT のメチル化を検出する方法を確立することが必要である。

B. 研究方法

JCOG0305 臨床試験に参加した 111 例を検討する前に、国立がんセンターにおいて手術を行った 52 例を用いて、MGMT メチル化の検出法を確立した。

(1) DNA 抽出

凍結腫瘍組織および、パラフィン包埋未染色標本スライドより Qiagen DNA extraction kit を用いて DNA を抽出した。

(2) 凍結組織からのメチル化 MGMT の同定

MGMT の DNA のメチル化を同定するために、まず ZYMO RESEARCH の DNA Methylation Kit を用いて bisulfate 処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルへ変換した(図 1)。

凍結腫瘍組織から抽出した DNA を bisulfate 後、非メチル化およびメチル化 DNA を検出する PCR primer として、それぞれ MGMT-U-F/ MGMT-U-R、MGMT-M-F/ MGMT-M-R を用いた (Methylation specific PCR; MSP)。

(3) パラフィン組織からのメチル化 MGMT の同定

パラフィン組織からは、DNA 抽出の効率が悪いため、two step PCR 法を用いた。MGMT を増幅させるために、1st PCR として、MGMT-F/ MGMT-R primer を用いた。

次に凍結組織 DNA と同様に bisulfate 処理を行い、MSP を行った。

[図 1] MSP の原理

[非メチル化 DNA]

gcgtaatggcgatcg

↓ gc → gU

gUgtaatggUgatUg

[メチル化 DNA]

gc*gtaatggc*gatcg*

↓ *メチル化 DNA

↓ (変換されず)

gc*gtaatggc*gatcg*

C. 研究結果

(1) 凍結標本とパラフィン標本の DNA 抽出・MSP

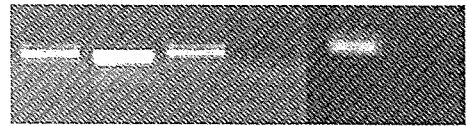
凍結標本から DNA を抽出したものと、パラフィン標本から DNA を抽出してそれぞれ MSP を行ったが、結果はいずれも同じであった (図 2)。パラフィン標本からの DNA 抽出による MSP の信頼性が証明され、また凍結標本のない過去の症例でも MGMT 等のメチル化の状態を検出できることが判明した。PCR のサイクルについては、2nd PCR 数を 35 から 40 回に増やしても結果は同じであった。

[図 2] MSP

CASE No. 1 (F) No. 2 (F) No. 2 (P)

PCR U M U M U

M



F: 凍結標本

P: パラフィン標本

(2) グレードによる MSP の結果

星細胞腫 (Diffuse astrocytoma; DA) 10 例、乏突起星細胞腫 (Oligoastrocytoma; OA) 5 例、退形成性星細胞腫 (Anaplastic astrocytoma; AA) 3 例、退形成性乏突起星細胞腫 (Anaplastic Oligoastrocytoma; AA) 12 例、膠芽腫 (Glioblastoma; GBM) 22 例の結果は、DA の 20%、AA の 33.3%、AOA の 16.7%、GBM の 36.4% では、メチル化 MGMT が検出されなかった (表 1)。MGMT のメチル化が検出されない症例では、PCR 回数を増やし、また PCR テンプレート量も調節したが、メチル化は検出されなかった。

[表 1] MSP

	M(+)	M(-)	U%
DA Grade 2	8	2	20.0%
OA Grade 2	5	0	0.0%
AA Grade 3	2	1	33.3%
AOA Grade 3	10	2	16.7%
GBM Grade 4	14	8	36.4%

D. 考察・今後の方針

パラフィン標本からも容易にMGMTのメチル化を検証することができた。

放射線化学療法への反応性や予後は、グレードが高いほど悪くなり、GBM>AA>AOAである。MGMTのメチル化の見られない症例はGBMで36.4%、AAで33.3%、AOAで16.7%であった。化学療法への反応性が高いと言われるOAは全例メチル化が認められた。

今後はJCOG0305の標本を解析し、MGMTのメチル化とPCZ+ACNUの効果や予後について検討していく予定である。

頭蓋内胚細胞腫瘍の遺伝子発現プロファイルと新規マーカーの検索

分担研究者 西川亮 埼玉医科大学教授

研究要旨

頭蓋内胚細胞腫瘍(CNSGCT)の手術標本を用いて cDNA array による解析を行い Bone Morphogenetic Protein-4 を初めとする新規腫瘍マーカー候補分子の抽出を行った。

A. 研究の背景

頭蓋内胚細胞腫瘍(CNSGCT)の発生に関しては、始原生殖細胞 primordial germ cell 起源説が有力である。GCT に関する分子遺伝学的知見としては、wild-type TP53 蛋白の過剰発現、cyclin D2 遺伝子の増幅と過剰発現、isochromosome 12p, X 染色体の増加等が知られている。これらの変化は、減数分裂過程の内、特に DNA ploidy が 4n になる過程、即ち第一減数分裂の prophase の pachytene stage において認められる形質で、primordial germ cell の減数分裂過程の或るタイミングが腫瘍化のターゲットであることを示唆する。し

かし具体的な腫瘍化の機序は未解明である。また CNSGCT は放射線照射や抗がん剤による化学療法に対する感受性が幅広い。例えば germinoma は放射線治療および化学療法に対して極めて感受性が高く、24Gy の放射線照射と3クール of 化学療法によって10年生存率が90%に達する。一方、胎児性癌、卵黄囊腫瘍、絨毛癌、およびこれらの組織型を主体とする mixed germ cell tumor は、放射線照射と化学療法に対して共に感受性が低く、50Gy 以上の放射線と年余にわたる化学療法を必要とする。Germinoma であれば現行の放射線照射+化学療法によって90%の症例で治癒させる

ことが出来るが、裏返せば 10% の treatment failure がある。この 10% の症例を予め識別することが出来れば、低感受性群並の強力な治療を行なうことによって救うことが出来るかもしれない。臨床的な観点から治療感受性を支配している分子機構の解明も急務である。

B. 研究の方法と結果

我々は CNSGCT の発生機序と治療感受性機構の解明ならびに新規腫瘍マーカーの検索を目的として、CNSGCT 19 例の凍結標本を用い、cDNA array による遺伝子発現の解析を行なった。従来から言われているマーカー、HCG- β 、AFP、PLAP、c-Kit は、いずれもそれぞれに

特有の組織型において発現している事が観察された。いくつかの遺伝子発現が germinoma と non-germinomatous GCT を区別する遺伝子としてピックアップされたが、その中には primordial germ cell の分化に関与していると報告されている遺伝子が複数含まれていた。特に TGF- β 関連因子である Bone Morphogenetic Protein-4(BMP-4)が統計学的有意差を持って non-germinomatous tumor に高発現していた(図 1)。BMP-4 は extraembryonic ectoderm の細胞が germ cell lineage に入る最初の段階を制御している事が知られている。

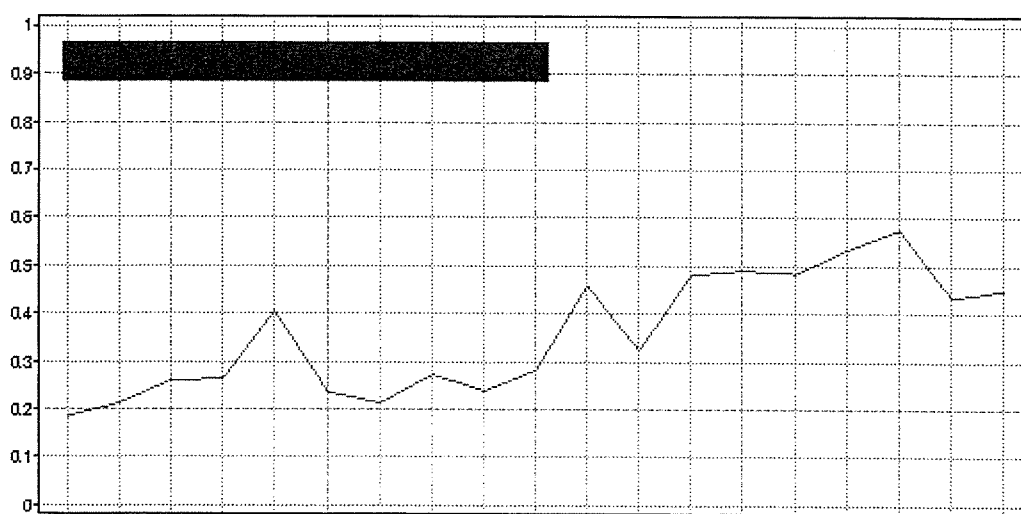


図 1. 頭蓋内胚細胞腫瘍における BMP-4 の発現。横軸は症例。縦軸は発現レベル。左の 10 症例 (黒線) は germinoma. 右の 9 症例は non-germinomatous GCT. Germinoma 群において発現が有意に ($p=4.1 \times 10^{-6}$) 低い。

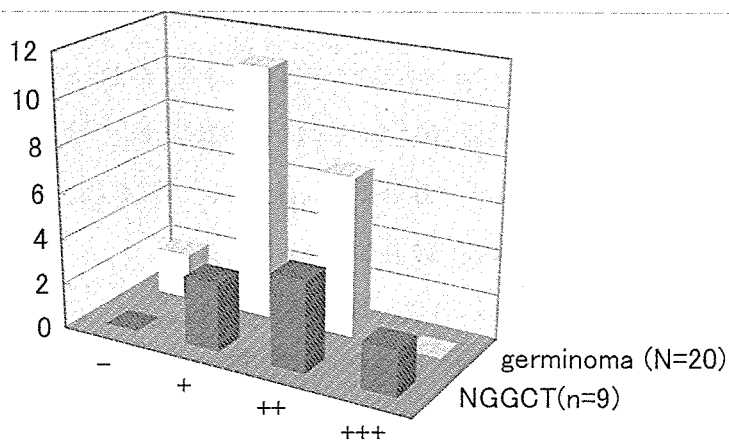
BMP-4 が従来に無い non-germinomatous GCT のマーカーとなる可能性を探るために免疫組織化学染色を行ったが、BMP-4 の染色性には既知のマーカーである PLAP, cKit 程の特異性は認められなかった。Germinoma では 21 例中 19 例が陽性であった。ただ、染色強度は+から++までで、PLAP あるいは cKit に比べると弱いものが多かった(表 1)。STGC につ

いては染色性にばらつきがあり、細胞も少数なので明確には結果が出なかった。卵黄嚢腫瘍、絨毛癌でも陽性所見が得られ、むしろ germinoma よりも染色性の強い症例が目立った(表 1, 図 2, 図 3)。また奇形腫では、主として上皮成分、神経組織、間質の一部に陽性を認め、特に上皮の反応性が強いようであった(図 3)。

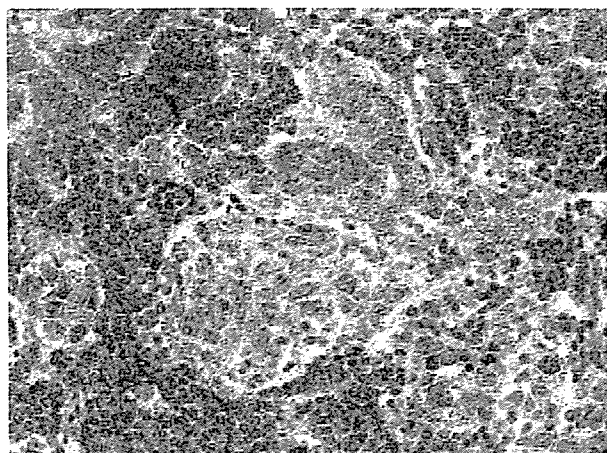
表 1. BMP-4 の免疫染色による染色性. NGGCT, non-germinomatous germ cell tumor.

染色強度	-	+	++	+++
NGGCT	0	3	4	2
germinoma	2.0	11	7	0

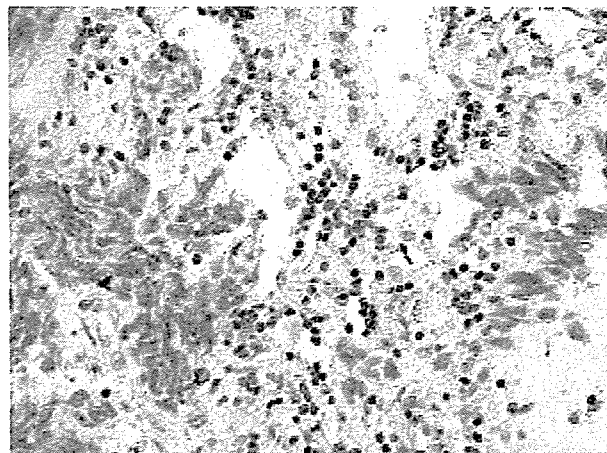
図 2. BMP-4 の染色性のヒストグラム. 両群の腫瘍の染色性に統計学的な有意差は認められなかった。



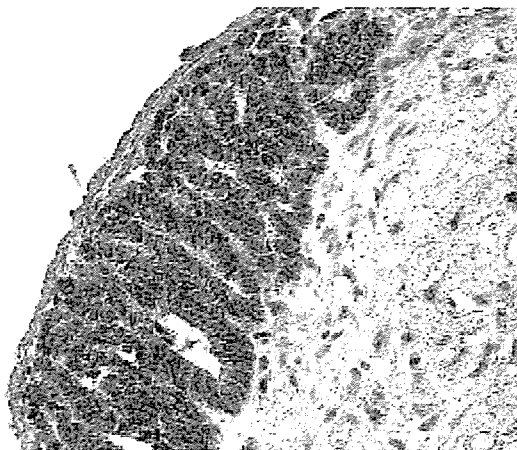
germinoma, array low, IHC positive



germinoma, array low, IHC negative



immature teratoma, array high, IHC positive



yolk sac tumor, array high, IHC positive

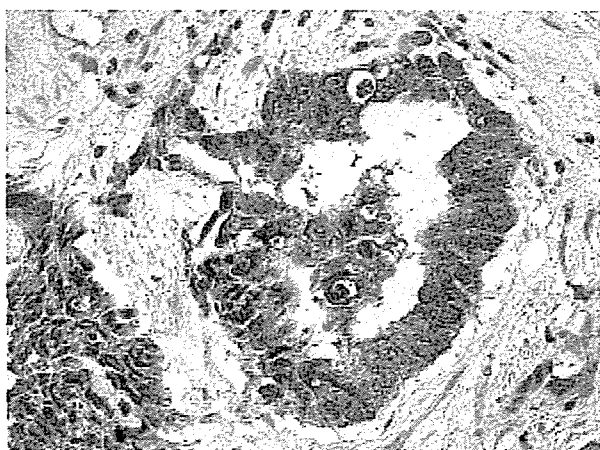


図3. BMP-4の染色様態. Germinomaではdiffuseに淡く染色されるパターンが多かった. 一方卵黄嚢腫瘍は奇形腫では局所的に強く染色されるパターンが目立った.

C. 今後の研究

今後は更に cDNA array によってピックアップされた他の分子についても, 免疫組織化学染色他の方法による解析を行って, さらに有意義なマーカーの抽出を試みていく予定である.

D. 研究発表

- 1. 論文発表
なし

2. 学会発表

Nishikawa R, Bono H, Okazaki Y, Matsutani M. Gene expression profiling in CNS germ cell tumors. The 16th International Brain Tumor Research and Therapy Meeting, 2006.4.26-30, Napa.

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）

分担研究報告書

アポトーシス誘導遺伝子を用いた悪性グリオーマに対するワクチン療法の開発に関する基礎的研究

分担研究者 浅井昭雄 関西医科大学教授

研究要旨

グリオーマ細胞において、アポトーシスがプロテアソームの制御を受けていること、プロテアソームが calcium を介したシグナル伝達系の一因子である calcineurin の支配を受けていることを明らかにした。このことはアポトーシスが calcium を介したシグナル伝達系の支配を受けていることを示すものである。また、calcium ionophore 等のグリオーマ治療への応用の可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

5年生存率が5%以下と極めて予後不良の悪性グリオーマに対して、近年米国で始まった単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルを用いた遺伝子治療は、レトロウイルスによる遺伝子導入の効率が十分でないために、従来の治療法を上回るような期待したほどの抗腫瘍効果がえられず、すでに暗礁に乗り上げているが、我々は偶然、このような行き詰まりの breakthrough となる免疫現象を見い出した。

myc ファミリー遺伝子の一つである s-myc 遺伝子産物が p53 と同様に

細胞周期を G1/S でブロックすることによりラットおよびヒトグリオーマ細胞の増殖を抑制し、また、ヌードマウス皮下での造腫瘍性をも抑制することを見い出した。さらにこの増殖抑制のメカニズムを検討した結果、以下のことを明らかにした。(1) s-Myc は転写促進因子としてはたらくこと。(2) s-Myc の発現によりグリオーマ細胞でアポトーシスが誘導されること。(3) s-Myc はラット胎児(14-17GD) の hypertrophic chondrocyte (アポトーシスで死んでゆく chondrocyte でこの部分がやがて骨化する)で発現しており、発生的にもアポトーシスの誘導に