

関与している可能性が強いこと、である。さらにこのようなアポトーシス誘導遺伝子 *s-myc* がグリオーマ細胞の腫瘍特異抗原の抗原性を高めることを見い出した。すなわち、グリオーマ細胞で *s-Myc* を発現させるとそれまでグリオーマ細胞に対して寛容であった宿主の免疫系から認識されるようになり、遺伝子を取り込んで抗原性の増した細胞はもとより、遺伝子を取り込んでいない抗原性の低い細胞までも宿主の免疫系の攻撃を受け全滅してしまい、さらに、一旦、細胞中で抗原性が増すとその細胞を殺した状態でも抗原性は残り、その死細胞を宿主に投与しても宿主の免疫系が活性化されるという現象である。

*s-myc* 遺伝子以外に insulin-like growth factor I に対するアンチセンス治療 (Trojan et al. Science259:94-97,1993)あるいは granulocyte colony stimulating factor (GCSF)遺伝子 (Dranoff et al. Proc Natl Acad Sci USA 90:3539-3543,1993)で同様な免疫現象が報告されている。このうち *s-myc* 遺伝子の特徴はグリオーマ細胞に特異的な抗原の発現を増加させることであり、グリオーマ特異的なワクチン治療が可能になると思

われる。

*s-Myc* 発現により誘導されるグリオーマ特異抗原が同定されれば、現在グリオーマ細胞への *s-myc* 遺伝子導入により得られている宿主の免疫を介した抗腫瘍効果が、遺伝子を導入せずとも宿主に直接、抗原を注入するだけで同様もしくはそれ以上の効果が得られることが期待でき、ワクチン療法が可能になるものと考えられる。また、他のがんに関しても、構造上の類似性や本方法と類似した方法で新たながん特異抗原が同定され、同様にワクチン療法が可能になってくることが期待できる。本研究では、この *s-myc* 遺伝子発現によってグリオーマ細胞内で発現が上がってくる腫瘍特異抗原を同定することを中心に、それを用いたワクチン療法の臨床応用を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

(1) このグリオーマ特異的抗原を同定するための糸口となる系として、グリオーマ細胞にすでに *s-myc* 遺伝子が導入してあり、外からの刺激でその発現が加減できる細胞モデルを用いた。これらに differential display PCR 法と呼ばれる新たな

遺伝子を単離する方法を用いてトリガーである s-myc 遺伝子の発現から抗原発現にいたるまでのカスケードの中で発現が変動してくるいくつかの遺伝子を可能なかぎり単離同定することを試みた。

(2) このように s-myc 遺伝子はグリオーマ細胞でその腫瘍特異抗原と想定される因子の発現を増加させると同時に、また、同細胞でアポトーシスも誘導する。したがって、アポトーシス誘導の過程で産生される因子が腫瘍特異抗原として作用している可能性も十分に考えられる。そこで、グリオーマ細胞におけるアポトーシス関連遺伝子、あるいはグリオーマ細胞に限らず Myc によるアポトーシスの過程に関連する遺伝子の同定を試みた。

### C. 研究結果と考察

myc 遺伝子をグリオーマ細胞で高発現させる系に differential display PCR 法を適用することにより、その結果発現が変動する遺伝子として、800 余りの陽性クローンを得、それらをプローブとして Northern hybridization を行ったところ、5個のクローンで発現の上昇が確認できた。それら5個の cDNA

の部分塩基配列を決定したところ、それぞれ calmodulin, cytochrome c oxidase I, inositol triphosphate transfer protein, mcl-1, unknown であった。calmodulin は calcium を介したシグナル伝達系の媒体であり、calcineurin 活性を調節することが知られている。さらに、cyclosporin A, FK506 等、calcineurin の阻害剤が虚血による神経細胞死抑制に効果があることを考え併せて、神経系細胞の細胞死には calcium を介したシグナル伝達系が関与しているという仮説を立て、それを検証した。

#### 1) 臓器組織別および細胞株での calcineurin の発現

マウスの脳、肝、腎、精巣、膵臓、肺、および使用した細胞株、T98G (グリオーマ)、C6 (グリオーマ)、B104 (神経芽細胞種)、PC12 (褐色細胞腫)、Jurkat (T cell leukemia)、A673 (横紋筋肉腫)、NIH3T3 (線維芽細胞) における、calcineurin の発現を Northern hybridization および Western blot で検討すると、臓器別では、脳に選択的に高く、また、細胞株でも神経系の細胞で高く、神経系細胞での何らかの生理的役割を担ってい

る可能性が強く示唆された。

## 2) calmodulin, calcineurin の阻害剤による阻害実験

この仮説を検証するため、まず、一連の阻害実験を行った。C6 細胞の Myc 高発現アポトーシスモデル、T98G 細胞、Jurkat 細胞、U937 細胞、A673 細胞の抗 Fas 抗体アポトーシス誘導モデル、T98G 細胞の抗癌剤アポトーシスモデル、PC12 細胞の血清除去アポトーシスモデル、B104 細胞の calcium ionophore によるアポトーシスモデルに対して、calmodulin 阻害剤である W-7 および calcineurin の阻害剤である CsA で前処理した後、各アポトーシス刺激を加え、アポトーシスが阻害されるか否かを検討した。アポトーシスの評価には Hoechst 染色法、dye exclusion test, LDH release を用いた。また、アポトーシスに先行して上昇する caspase 3 の活性はペプチド蛍光基質である DEVD-MCA を用いて測定した。その結果、いずれのモデルでも W-7、CsA により、濃度依存性に caspase 3 の活性上昇およびアポトーシスが抑制された。

## 3) calcineurin 強制発現による

## caspase 3 活性の上昇

上記の結果より、calmodulin あるいはそれによって制御される calcineurin が神経系細胞のアポトーシス促進に作用していることが示唆されたため、それを直接検証するために、2種類の calcineurin cDNA を、constitutive な発現をする哺乳動物細胞発現ベクター、メタロチオネインプロモーターを有する哺乳動物細胞発現ベクターおよびレトロウイルスベクターに組み込んで、T98G、B104(レトロウイルスベクターのみ)、PC12(レトロウイルスベクターのみ)、Jurkat(レトロウイルスベクターのみ)、NIH3T3(レトロウイルスベクターのみ)の各細胞に遺伝子導入した。2種類の cDNA とは、calcineurin の全長(CN: 活性が弱い)と、calmodulin binding domainを欠損したもの(CN: 活性が強い)である。まず、メタロチオネインプロモーターを有する哺乳動物細胞発現ベクターのトランスフェクタントに 0 から 150 M の濃度の硫酸亜鉛で calcineurin の発現誘導をかけたところ、CN の方は濃度依存性に caspase 3 の活性が2倍まで上昇し、20%の細胞がアポトーシスをおこしたが、CN の方は caspase 3 活性の変動はほとんどなかった。ま

た、T98G の親株に硫酸亜鉛を投与しても caspase 3 の basal activity は全く上昇せずアポトーシスも認められなかった。calcineurin の constitutive な発現ベクターを導入したクローンでは、各クローンごとに calcineurin の活性と caspase 3 の活性が正の相関を示した。calcineurin および caspase 3 活性の高いクローンでは spontaneous にアポトーシスをおこす細胞が 15% 程度認められた。calcineurin cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターを感染させて、3段階の濃度（低、中、高）のブラストサイジンで select し、それぞれ polyclonal な集団を得たとき、T98G、B104、PC12、Jurkat、NIH3T3 いずれの細胞においても、導入された calcineurin のコピー数と calcineurin の活性および caspase 3 の活性が正の相関を示した。

#### 4) calcineurin 強制発現による caspase 3 活性上昇の機序

a) calcineurin 強制発現によるアポトーシス関連遺伝子発現の変化  
上述のように、各細胞であまねく calcineurin の活性が上がると caspase 3 の活性も上昇することが明らかになったが、その機序を検討

するため、T98G 細胞で caspase 3 の上流でアポトーシスのカスケードに関与してくるアポトーシス関連遺伝子のうち calcineurin によってその発現が影響を受けるものを、Northern hybridization および Western blot にてスクリーニングした。スクリーニングした bcl-2, bcl-xL, mcl-1, bcl-xS, bax, bad, bak, caspase 1, caspase 2, caspase 3 のうち、calcineurin を強制発現して発現が変動するものは mcl-1 と caspase 3 自身であった。両者ともその発現は上昇したが、特に mcl-1 の発現増加は著しかった。calcineurin の強制発現により、caspase 3 の遺伝子発現そのものが上昇することは、caspase 3 の転写を制御する因子が calcineurin 依存性であることを示唆しており、現在 caspase 3 遺伝子の 5'プロモータ上流域の塩基配列を検索中である。また、mcl-1 の発現上昇に関しては mRNA およびタンパク質レベルで確認したが、我々のその後の研究から、mcl-1 は T98G 細胞に限らず、U251 細胞など他のグリオーマ細胞における様々な刺激によるアポトーシスに際して、反応性に発現が増加してくることが明らかになった。mcl-1 は虚血に晒された神

経細胞でその発現が上昇することが知られているアポトーシス抑制遺伝子 bcl-2 のファミリーに属する遺伝子である。このことから、機序は不明であるが、おそらく mcl-1 は神経細胞における bcl-2 同様、グリア細胞において、細胞死の刺激に対して self-defensive にはたらく遺伝子ではないかと考えられる。この仮説を支持するものとして、Bcl-2 の発現はグリオーマ組織の約 60% にみとめられるのに対して、Mcl-1 の発現は 100% にみとめられるという報告がある。また、我々が有しているグリオーマの培養細胞株では 10 株すべてで Bcl-2 の発現がほとんどなく、逆に Mcl-1 の発現は高値であり、グリオーマ細胞における mcl-1 遺伝子の重要性を示唆するものである。現在、この仮説を検証するために、mcl-1 遺伝子あるいはそのアンチセンス遺伝子をグリオーマ細胞に導入して、各種細胞死刺激に対する感受性の変化等を検討中である。以上、calcineurin 強制発現によるアポトーシス関連遺伝子発現の変化を検討したが、調べた範囲では caspase 3 の活性上昇を説明するに足るものは見出せなかった。

c) calcineurin 強制発現によるプロテアソーム活性の低下

転写因子として知られる NF- $\kappa$ B は非活性型の状態では I $\kappa$ B と結合した状態で存在するが、プロテアソームで I $\kappa$ B が分解され、さらに NF- $\kappa$ B が p50 と p65 のサブユニットに分解されて活性型になる。このプロテアソームにおける一連の反応は calcineurin 依存性であることが知られている。したがって、次に、我々はプロテアソームそのものの活性が calcineurin によって制御されているという仮説を立て、それを検証した。先の実験で用いたメタロチオネインのプロモータを有する calcineurin 発現ベクターのトランスフェクタントおよび calcineurin 発現レトロウイルスベクターのトランスフェクタントを用いて、calcineurin の活性がプロテアソーム活性にどのような影響を及ぼすかを検討した。すなわち、メタロチオネインのプロモータを有する calcineurin 発現ベクターのトランスフェクタントに対しては、0-200 nM の硫酸亜鉛あるいは硫酸銅を投与し、calcineurin の発現を $\sim$ 3 倍程度まで増加させたときのプロテアソーム活性を測定した。このとき、プロテアソームの活性は calcineurin 発現にともなって70-

60%に低下した。さらにこれに伴って、caspase 3 の活性が 1.5-2 倍に上昇した。また、calcineurin 発現レトロウイルスベクターのトランスフェクタントでは calcineurin 低発現ポリクローン、中発現ポリクローン、高発現ポリクローンの3群でプロテアソームの活性を測定したところ、calcineurin の発現が高い群ほどプロテアソームの活性が低下していた。さらに、caspase 3 の活性はプロテアソームの活性の低いものほど高い値を示した。以上のことから calcineurin が何らかのかたちでプロテアソームの活性を制御し、さらにそれにより caspase 3 の活性が制御されていることが明らかになった。このことは、神経系の細胞ではアポトーシスが calcium を介したシグナル伝達系の支配を部分的であれ受けていることを意味し、非常に重要な知見である。現在、calcineurin によるプロテアソーム活性の制御の機序、ならびにプロテアソームによる caspase 3 活性制御の機序について、in vivo, in vitro の系を用いて検討中である。

differential display PCR 法によって単離されたその他の、cytochrome c oxidase I, inositol

triphosphate transfer protein, unknown clone については、今後解析を進める予定である。

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

食道がんの治療効果予測マーカーの探索

（がんの病理診断に関する研究）

分担研究者 中西幸浩 国立がんセンター研究所病理部

第一組織病理部室長

研究要旨

食道がんの生検標本を用いて、照射・化学療法の治療効果予測に有効なマーカーを検索した。免疫組織化学的検索で有効とされる9種のマーカーの発現と治療効果の相関を調べた結果、cyclin D1とp53の発現の組み合わせが最も有効な効果予測因子であることがわかった。

A. 研究目的

食道がんの照射・化学療法の効果予測因子の免疫組織化学的検討。

B. 研究方法

生検組織を用いた免疫組織化学的な検討で、食道がんの照射・化学療法の効果予測因子として有効であることが既に報告されている9種のマーカー（Cyclin D1, p53, HIF, MIB-1, Metallothionein, C-erB-2, CD31 (Microvessel density), VEGF, COX-2)の生検組織における発現を検索し、効果予測に

最も有効な組み合わせはどれかを検討した。一定の治療法（5FU+CDDP+Radiation(60Gy)）で治療された stage II or III の食道がん患者の治療前の生検組織片79例を対象とした。生検組織におけるそれぞれのマーカーの発現と臨床的な治療効果との相関を検索した。

C. 今後の研究

1. 単変量解析では、治療効果と有意な相関が見られたのは、cyclin D1とp53であった。
2. 多変量解析でも、治療効果と有意な相関がみられたのは、

cyclinD1 と p53 であった。

3. Trend test では cyclin D1 と p53 の組み合わせが治療効果と最も有意に相関していた。両マーカーが陰性の症例 12 例中無再発生存中の患者は 9 例で、一旦 Complete remission に入った後再発した症例が 3 例見られた。すなわち両マーカーが陰性の症例はすべて少なくとも一旦は Complete remission に入った。

#### D. 考察と結論

1. 生検組織を用いた免疫組織化学的な検索における既報告のマーカーの検索では、cyclin D1 と p53 の組み合わせが最も有効な組み合わせであることがわかった。

2. すでに有効であると報告されているマーカーを検索したが、今回の検索では有意差が見られたのは cyclin D1 と p53 のみであった。他のマーカーが有意にならなかった理由として、腫瘍の heterogeneity、免疫染色の評価法や inter-observer variations などがその原因と考えられる。

3. 免疫染色はすでに確立され

た実験方法であり、ほとんどの施設で実施可能である。生検組織を用いた有効な検討が確立されれば臨床応用への近道となる。

4. 今回の結果は、さらに大規模な臨床的な前向き試験で検証する必要がある。



「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」に関する研究

分担研究者 齋藤 彰 日本電気株式会社バイオ IT 事業推進センター

研究要旨

悪性脳腫瘍の個別適性治療のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた統合解析を行う。本報告では、そのうちのプロテオーム解析・画像解析・統合データベース構築について報告する。

A. 研究目的

Glioblastoma において化学療法・放射線療法に奏効する症例はどのような症例なのか、長期生存する要因はなにか、また Glioblastoma は他のグレードの脳腫瘍に対しどこが異なるのかなどの解明のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた総合的解析を行う目的でプロジェクトが実施された。またこのプロセスで収集された脳腫瘍に関するデータは総合的なデータであり、今後様々な施設での解析における基準データとなることを念頭とし、データ整理を実施する目的である。この中で NEC 側の分担は次の5点である。

- ① 遺伝子の発現解析を行い、前述の目的に対しアプローチを行うとともに、発現から見た染色体状態の推定も含めた解析を実施する。データ取得は国立がんセンター殿で行う。
- ② プロテオーム解析におけるデータ取得と解析作業を実施し、タンパクレベルからのアプローチを行う。
- ③ 病理画像データを解析し、病理画像を計測することにより組織レベルでの解析を行う
- ④ これらのバイオ情報および臨床情報・手術情報を格納するデータベースおよび症例管理システムの構築および基準データとしてのデータベースの構築を行う。
- ⑤ この上で総合的データマイニングおよび解析の支援を行う

⑤についてはすべての症例の固定化とデータ取得が完了後になるので本年度は実施できない。

すべてのデータは連結不能匿名データでの解析を行い、臨床情報およびそれを管理するシステムは国立がんセンター内医局に限定することで構築した。

本報告書では、②③④について報告する。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院を中心に収集された脳腫瘍検体の病理組織画像・プロテオーム解析対象サンプルについて、主任研究者である成田先生の指示に従い、解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究の活動内容および計画について、インフォームドコンセントが取られているか、匿名化管理がされているか等のチェック項目とともに、国立がんセンターおよび日本電気株式会社それぞれの倫理審査委員会の稟議を経て、研究活動の承諾を得ている。

また、実際のデータの取り扱いおよび管理については、いわゆる三省倫理に則った匿名化担当者を置き、データの匿名化とその安全性を確保している。さらに、互いにデータや染色スライド等の預り証を交わし、保管と返却について厳重に管理している。

1. 中枢神経原発悪性リンパ腫における脳脊髄液のプロテオーム解析

1. 1 プロテオーム解析の目的

脳腫瘍の中で脳や脊髄などの中枢神経に原発する

悪性リンパ腫 (Primary CNS Lymphoma : PCNSL) の割合は約 3%とされている。しかし、発生率は近年、増加傾向にあると言われており、その進行の早さや再発率の高さから、PCNSL の診断や予後予測に有効なバイオマーカーが求められている。PCNSL に特徴的な発現様式を示すタンパク質を探索するために、2D-DIGE (Differnece Gel Electrophoresis)を用いて PCNSL 患者と非 PCNSL 患者の脳脊髄液プロテオームの比較解析を行った。PCNSL 特異的なタンパク質が見つければ、診断や予後予測のマーカーになる可能性がある。

### 1. 2 プロテオーム解析手法

脳脊髄液サンプル(PCNSL : 7 サンプル、非 PCNSL : 5 サンプル)を Amicon Ultra4 (カットオフ分子量 10,000)を用いて遠心濃縮し、次にアルブミン/IgG 除去キット(GE ヘルスケア)を用いてアルブミンと IgG を除去した。さらに、サンプルをアセトン沈殿し、適量のサンプル溶解液 (7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 30mM Tris-HCl [pH8.5], 4% CHAPS, プロテアーゼ阻害剤) に溶解した。各サンプルを 50 $\mu$ g ずつエッペンドルフチューブに入れ、蛍光色素 Cy3 あるいは Cy5 で標識した。また、全てのサンプルを等量ずつ混合したものを内部標準(IS)とし、同様に蛍光色素 Cy2 で標識した。Cy3 あるいは Cy5 で標識したサンプルと Cy2 で標識した IS を混合し、同一のゲル上で二次元電気泳動(2DE)を行った。一次元目の等電点電気泳動は固定化 pH グラジエントゲル (pH 3-10, 24 cm)を用い、二次元目の SDS-PAGE は 12.5 % のポリアクリルアミドゲル ( 24 cm $\times$ 20 cm ) を用いて行った。泳動後、Cy2、Cy3 および Cy5 の各 2-DE ゲルイメージを取得し、Decyder ソフトウェアを用いて、スポット認識、スポットマッチングあるいは発現量の比較などのイメージ解析を行った。さらに、2-DE ゲルを銀染色した後、タンパク質スポットを回収し、ペプチドマスマフィンガープリンティング(PMF)によるタンパク質同定を行った。

### 2. 病理画像解析

#### 2. 1 画像解析の目的

脳腫瘍はグレードで評価されるが、すべての切除組織は均一でない。そこで病理画像の情報をデジタル

化情報として抽出する試みを行うこととした。これらの情報は遺伝子発現解析・プロテオーム解析などのフェノタイプとしての利用も試みる。

#### 2. 2 対象画像

GBM(10), AA(10), AOA(6),DA(10),OA(9),PA(3)の計 48 症例における HE 染色画像をあげた。まず腫瘍内における Oligodendrocyte 由来の細胞の個数をカウントすることから開始した。この比率が高い症例ほど化学療法などに奏効しやすいとの見解を臨床家がもっているためであり、一般に 20%が一つの目安とされている。最終的に症例が固定され、遺伝子解析における症例番号とリンクした時点で、実際の数値を計測する作業を開始するが、今年度は自動カウントに関するソフトを作成した。

### 3. 解析プラットフォームの構築

#### 3. 1 構築目的

本システムは、国立がんセンター中央病院様で収集した臨床情報を管理し、遺伝子発現データおよび解析結果と関連付けて保存することで、トランスレショナルインフォマティクス (TRI) 情報基盤の構築を行う。MicroArray 解析結果に基づき各染色体毎に発現情報を表示する ChromosomeViewer ソフトウェア (以下 CV) にて管理される発現解析結果に従った患者情報および臨床情報を容易に検索することを可能として、治療効果や予後に関する情報と発現データとの関連付けを実現する。

#### 3. 2 システムの要件

本システムではデータ管理システムとして、十分な導入実績を持つ NEC BIOPRISM をベースに以下のシステム要件に基づいたカスタマイズおよびシステム構築を行う。

- 1) 脳腫瘍患者に関する臨床情報として 1 患者につき複数の退院サマリーを登録、管理できること。
- 2) CV によって作成されるコンテンツを管理できること。
- 3) 遺伝子発現データを CV コンテンツに関連付けて登録できること。
- 4) 退院サマリーの項目を検索キーとして検索できること。この時、複数の臨床情報に関する検索キーによって検索できること。

- 5) MRI 画像、病理画像を臨床情報として登録できること。
  - 6) ログイン機能を有し、セキュリティ管理が可能であること。
  - 7) 将来的な拡張を考慮して、WEB ブラウザーによって臨床情報を閲覧、管理することが出来ること。
  - 8) データのバックアップを保存できること。
- を挙げた。

### C. 研究結果

#### 1. プロテオーム解析結果

2D-DIGE ゲルイメージの一例を図 1 に示す。PCNSL サンプル#16 由来のタンパク質スポットが赤、非 PCNSL サンプル#15 由来のものを緑で表示した。赤のタンパク質スポットは PCNSL で発現が増加していること、緑のスポットは逆に減少していることを、また黄色は両者での発現に差がないことを表している。PCNSL と非 PCNSL におけるタンパク質の発現比較を行い、PCNSL/非 PCNSL 発現比が 1.6 倍以上あるいは 1/1.6 以下であり、かつ t-test の  $p$  値  $\leq 0.05$  となるタンパク質を検索した。その結果、PCNSL で発現増加するスポットを 9 個、減少するスポットを 17 個、見いだすことができた。これまで、PMF 解析から、PCNSL で発現増加が見られた 5 個のスポットで、また発現の減少が見られた 8 個のスポットでタンパク質を同定することができた。

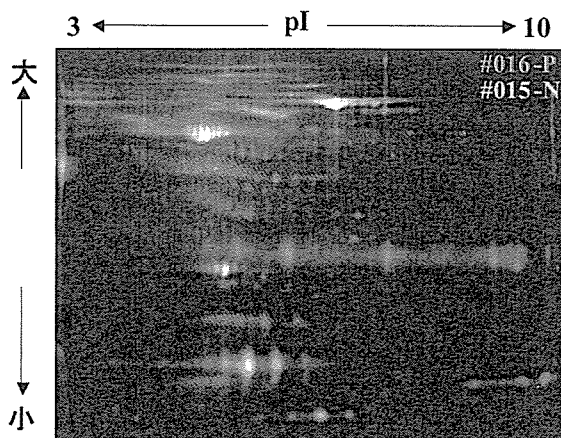


図 1 脳脊髄液の 2D-DIGE ゲルイメージ

#### 2. 画像解析 Oligodendrocyte のカウント

Oligodendrocyte は目玉焼き状の形態を持つ。HE 染色の画像の色分解を行い、自動認識を試みた。

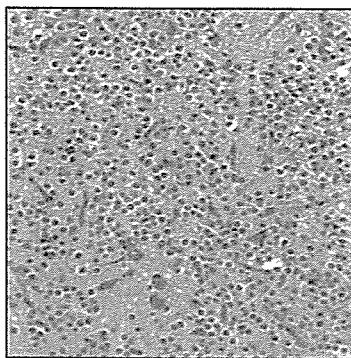


図 2. オリジナル HE 染色画像

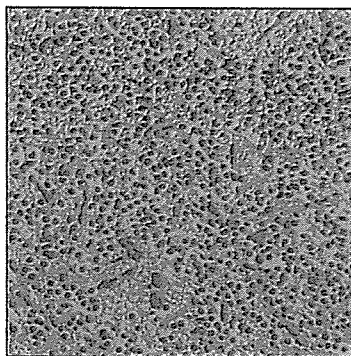


図 3. 色分解解析画像

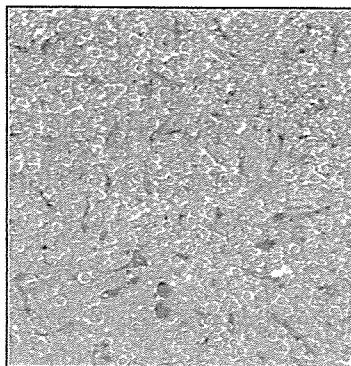


図 4. 抽出画像

図 2 が HE 染色基画像であり、色分解を行い中間画像図 3 を経て最終的に図 4 で Oligodendrocyte を青で表示した。これらのプログラムを病理画像全体に適用したとき、分布パターン・平均・最大比率などの情報を出力する。

#### 3. プラットフォーム構築

図 5 に本システムの画面例を示す。患者情報詳細画面において、患者番号毎に退院サマリーを複数登録できる。退院サマリーは入院毎に保存可能である。

退院サマリーに保存されたデータに基づいて患者を検索することが可能である。

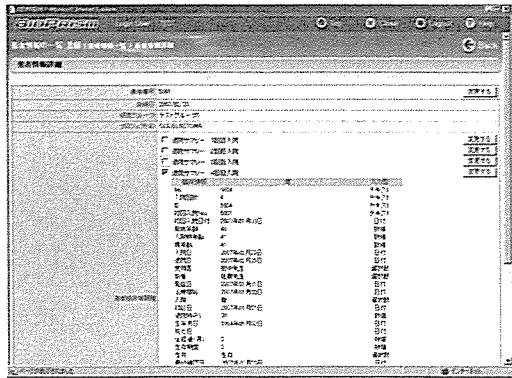


図5. システムの画面例

システム構成では設置環境を考慮して水冷式サーバとバックアップ用ストレージを高速ネットワークにて接続する。

#### D. 考察・結論

##### 1. プロテオーム解析

発現増加するタンパク質には Hemopexin、Complement component 3 や Kallikrein-sensitive glycoprotein が、また減少するタンパク質には Apolipoprotein E、alpha-2 antiplasmin、Transthyretin や Kallikrein 6 preproprotein が含まれていた。Kallikrein はタンパク質分解酵素の一種で腫瘍の悪性度との関連についての報告がある。しかし、Kallikrein をはじめ発現変動が見られたタンパク質と PCNSL の関連は明らかではない。今後、さらに多くの症例において、このような変動が見られるのかを検証するとともに、これらの発現変動と個々の症例の臨床像との関連性の検討も重要な課題と考えられる。

##### 2. 病理画像解析

今回 Oligodendrocyte の計測を行って、病理医・臨床家のもつ直感的な印象と画像計測を行った結果とでは差異があることが示された。今後には画像のなにを計測するべきかとの打ち合わせを行い、浸潤しているリンパ球数、血管の新生率などを計測することとし、計測免疫染色を実施した画像の提供をお願いした。一方、顕微鏡により摘出された腫瘍塊の一部の評価として最もグレードが高い部分の評価と、組織全体の平均を見た場合、どちらが臨床状態を表現するのかなどの命題も今後研究を行うこととなっ

た。

#### 3. フラットフォームシステム開発

本システムは重要なデータを統合管理し、解析を行うシステムとして使用される。今年度はまだ統合的解析を実施する段階ではなく個別のテーマごとの解析であり、主な目的はデータの収集保管のためのシステムである。解析に対して必要な要件を次年度以降早めに要件定義を行い今後の開発を実施していく。

#### E. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### F. 研究発表

##### 1. 社内技術報告書

「脳腫瘍画像解析に関する画像解析手法」(2007年3月1日)

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

「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」に関する研究

分担研究者 秋葉 幸範 日本電気株式会社バイオ IT 事業推進センター

研究要旨

悪性脳腫瘍の個別適性治療のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた統合解析を行う。本報告では、そのうちの遺伝子発現データの解析について、群間比較によるマーカー候補遺伝子の同定や生存時間解析などを報告する。

A. 研究目的

Glioblastoma において化学療法・放射線療法に奏効する症例はどのような症例なのか、長期生存する要因はなにか、また Glioblastoma は他のグレードの脳腫瘍に対しどこが異なるのかなどの解明のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた総合的解析を行う目的でプロジェクトが実施された。またこのプロセスで収集された脳腫瘍に関するデータは総合的なデータであり、今後様々な施設での解析における基準データとなることを念頭とし、データ整理を実施する目的である。この中で NEC 側の分担は次の5点である。

- ① 遺伝子の発現解析を行い、前述の目的に対しアプローチを行うとともに、発現から見た染色体状態の推定も含めた解析を実施する。データ取得は国立がんセンター殿で行う。
- ② プロテオーム解析におけるデータ取得と解析作業を実施し、タンパクレベルからのアプローチを行う。
- ③ 病理画像データを解析し、病理画像を計測することにより組織レベルでの解析を行う
- ④ これらのバイオ情報および臨床情報・手術情報を格納するデータベースおよび症例管理システムの構築および基準データとしてのデータベースの構築を行う。
- ⑤ この上で総合的データマイニングおよび解析の支援を行う

⑤についてはすべての症例の固定化とデータ取得が完了後になるので本年度は実施できない。

すべてのデータは連結不能匿名データでの解析を行い、臨床情報およびそれを管理するシステムは国立がんセンター内医局に限定することで構築した。

本報告書では、筆者の分担研究部分である①遺伝子の発現解析について、その研究状況と結果の表示ツール Chromosome Viewer について説明する。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院を中心に収集された脳腫瘍検体の遺伝子発現データについて、主任研究者である成田先生の指示に従い、統計解析やデータマイニング技術を駆使して解析を実施した。

マイクロアレイはアフィメトリクス社 Human Genome U133 Plus 2.0 を使用し、正規化手法は RMA (Robust Multichip Average) を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究の活動内容および計画について、インフォームドコンセントが取られているか、匿名化管理がされているか等のチェック項目とともに、国立がんセンターおよび日本電気株式会社それぞれの倫理審査委員会の稟議を経て、研究活動の承諾を得ている。

また、実際のデータの取り扱いおよび管理については、いわゆる三省倫理に則った匿名化担当者を置き、データの匿名化とその安全性を確保している。さらに、互いにデータや染色スライド等の預り証を

交わり、保管と返却について厳重に管理している。

## 1. 症例について

非腫瘍細胞 5 症例(6 症例中 1 症例除外)、Astrocytoma grade2 10 症例、grade3 18 症例、Oligodendroglioma grade2 8 症例、grade3 12 症例、Oligoastrocytoma grade2 14 症例、grade3 16 症例、Glioblastoma 71 症例、その他 13 症例の合計 168 症例(うち除外 1 症例)の遺伝子発現データが収集された。

## 2. 発現データ解析とその手法

### 2. 1. 正規化手法

アフィメトリクス社提供の正規化手法 MAS5.0 では発現シグナルの低い領域でのばらつきが大きく、解析の信頼性が落ちる可能性があることから、米スタンフォード大学の R. Irizarry らが開発した RMA というロバストな正規化手法を用いた。

### 2. 2. 群間比較

収集された発現データを適宜二群に分け、その群間の遺伝子発現量の差を比較することによって、特徴的な遺伝子を抽出した。有意差検定には t 検定あるいは Wilcoxon 順位和検定を使用し、FDR(False Discovery Rate)に基づいた偽陽性数の推定、および、検出力による偽陰性率のコントロールにより結果の妥当性を検討した。主任研究者である成田先生の指示に従い、(1)病理分類の違い、(2)Glioblastoma の抗がん剤テモダール(一般名テモゾロマイド)の有効・無効の違い、(3)再発期間および生存時間の長短、(4)Oligodendroglioma および Glioblastoma の腫瘍マーカー探索をそれぞれ実施した。

### 2. 3. 生存時間解析

Glioblastoma 症例において、遺伝子 MGMT の発現量の違いと生存時間の関連性を解析した。Kaplan-Meier 法による生存曲線と log-rank 検定による生存分析を実施した。

## C. 研究結果

発現データ解析の結果を以下に説明する。

### 1. 病理分類の違いによる発現の比較

病理分類による群間比較は 30 を超える組合せを解析した。とくに非腫瘍細胞に対する脳腫瘍の発現差の比較では、Oligodendroglioma、Astrocytoma、Glioblastoma の順に非腫瘍細胞との発現差および発現差のある遺伝子数とも増加する傾向となった。悪性度の低い脳腫瘍ほど非腫瘍細胞との違いが小さく、これは細胞核の異型性の小ささや癌としては穏やかであるとの臨床上の所見と一致した傾向となっている。また、悪性度の高い Anaplastic Astrocytoma や Glioblastoma では多数の抗原および免疫関連遺伝子が有意となっており、その根拠を考察中である。

### 2. Glioblastoma のテモダール有効・無効の比較

有効 4 症例対無効 3 症例の比較を実施。症例数が少なく、治療方針支援となるマーカー同定には至っていない。今後症例数を増やすことが課題である。

### 3. Glioblastoma 再発期間・生存期間の違いによる発現の比較

再発期間(28 症例)6 ヶ月、生存期間(27 症例)12 ヶ月、および 20 ヶ月を閾値として発現差を比較したが因子は特定できていない。

### 4. 遺伝子 MGMT の発現値と生存時間の関連

Glioblastoma の 27 症例について、予後因子として報告されている遺伝子 MGMT について、発現値 5.7 を閾値として生存時間分析をしたところ、 $p=0.09$  で MGMT 発現が小さい症例で生存期間が延びることが判明した(図 1)。現在、生存期間の追加データを収集中であり、今後の解析結果が期待される。

### 5. 悪性脳腫瘍のマーカー探索

病理分類による群間比較を進展させ、Oligodendroglioma と Glioblastoma に特徴的な遺伝子を絞り込んだ。

Oligodendroglioma では 33 個のマーカー候補遺伝子が同定され、うち 14 個が染色体 1p 上に存在した(表 1)。ここでは染色体バンド 1p34.1 上の遺伝子 PTPRF を有力な腫瘍マーカー候補とした。また、染色体 1p 上の多数の遺伝子の発現が抑制している

ことから、これは腫瘍組織の FISH 画像で観察される LOH(Loss Of Heterozygosity)と遺伝子発現との関連性を表す新しい発見であり、今後その仮説を検証し、治療への応用を目指すこととした。

Glioblastoma に対しても、同様に 45 個のマーカー候補遺伝子(ただし発現亢進のみ)が同定された(表 2)。また腫瘍抑制遺伝子 PTEN は Glioblastoma で抑制されていることが確認された。マーカー候補遺伝子のなかで、まず、染色体 11q 上の遺伝子 NNMT、17q 上の TMEM49 とその近傍の microRNA-21 を有望な候補として選定している。そのほか、Glioblastoma の特徴である血管新生に関与する VEGF も亢進している。

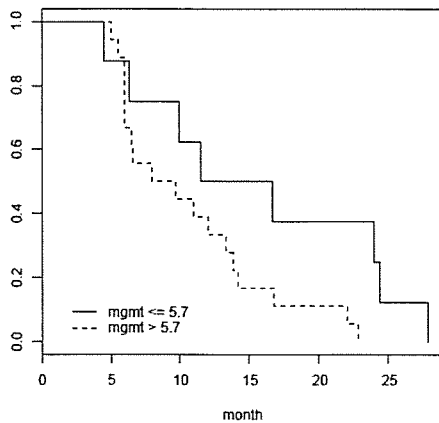


図 1. MGMT 発現量による生存時間分析

## 6. Chromosome Viewer の作成

発現データ解析結果と臨床情報、とくに患者頭部の MRI 画像とを相互に関連付けて表示し、臨床医の知識発見を支援するツールとして、以下の機能をもつ Chromosome Viewer を開発した。群間比較の結果は、本ビューアへ変換され成田先生に報告されている。

- ・ ウェブブラウザで表示
- ・ 有意プローブ(遺伝子)を染色体バンド上にマッピング
- ・ グラフのクリックでアノテーション表示
- ・ 二群の平均の差を棒グラフ表示
- ・ スライドバーによる表示位置移動、p 値の閾値、

グラフの拡大率等の変更

・ MRI 画像、HE 染色病理画像、コメント表示 等々  
これらの機能は TRI 解析プラットフォームに統合され活用される予定である。

## D. 考察

まず、低グレードの Oligodendroglioma は非腫瘍細胞との発現の差が小さいこと、また、組織 HE 染色画像の観察においても高グレードの細胞に比べて核の大きさや異型性が小さいことから、比較のおとなしい性質の腫瘍であることが推察される。また、FISH で確認される染色体 1 p の LOH と似たような遺伝子発現の抑制の分布は、エピジェネティックな作用や変異、遺伝子制御の異常などのなんらかのメカニズムによって生じたものと思われ、今後のそのメカニズムの特定や薬剤奏効性との関連を進めてゆきたい。マーカー候補遺伝子 PTPRF は Neuroblastoma の候補遺伝子としての報告があり、今後の RT-PCR やブロットングによる検証を進めることによって、より強固な根拠が得られると考えている。

次に、Glioblastoma においては、一般的に報告されている遺伝子 EGFR の亢進は 71 症例中 10 症例しか観察されず、マーカー候補とはならなかった。また、遺伝子 MGMT のエピジェネティックな修飾が予後因子として注目されており、本研究の生存時間解析ではそれを裏付ける結果が出ていると言える。

最後に、すべての発現データ解析について言えるのは、やはり、よくコントロールされた実験データと、多くの症例数が得られたことによって、統計解析の力を遺憾なく発揮できたことである。ここに検体およびデータを提供していただいた協力研究機関の諸先生方に大きな感謝の意を表したい。

## E. 結論

発現データの群間比較から、Oligodendroglioma のマーカー候補遺伝子 33 個から有力な遺伝子 PTPRF が同定された。Glioblastoma のマーカー候補遺伝子 45 個から microRNA-21、NNMT が候補として選択された。生存時間分析から、遺伝子 MGMT

が予後因子となり得るデータが得られた。

Oligodendrogliomaの特徴である染色体1pのLOHと似た、遺伝子発現の抑制が観察された。

発現データ解析結果を表示する Chromosome Viewerの開発により、視覚的・直感的に発現の様子を把握できる環境が整備された。

#### (発現解析における今後の課題)

マーカー探索および生存時間分析から得られた仮説の検証のために、病理画像の計測結果や免疫染色、FISH 画像との発現の関連解析、抗がん剤や生存期間等さらなる臨床情報の収集と予後因子の分析、さらに、それらを支持する CGH、LOH のデータの収集と蓄積、および多角的な情報の分析を進め、悪性脳腫瘍の治療法支援への根拠を探索するとともに、それらの解析を容易にする TRI システムの仕様へ反映させていきたい。

## F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 社内技術報告書

「脳腫瘍における classifier 構築と遺伝子選択について」(2006年5月18日)

「脳腫瘍発現データ解析と BioCompass の活用」(2006年7月10日)

「悪性脳腫瘍の発現データ解析」(2007年2月23日)

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

「クオンタイル正規化の並列化方法」(社内手続き中)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

Probe Set	Gene Symbol	Chromosomal Location
208498_s_at	AMY1A /// AM	1p21
223716_s_at	ZRANB2	1p31
227892_at	---	1p32.2
223418_x_at	ANKRD13C	1p32.3-p31.3
208634_s_at	MACF1	1p32-p31
200635_s_at	PTPRF	1p34
200636_s_at	PTPRF	1p34
222200_s_at	BSDC1	1p35.1
228604_at	---	1p35.3
224280_s_at	FAM54B	1p36.11
211950_at	ZUBR1	1p36.13
226929_at	MTHFR	1p36.3
221487_s_at	ENSA	1q21.2
244533_at	---	1q41
222441_x_at	C20orf45	20q11.32
226798_at	BCL2L13	22q11
212337_at	TI-227H /// TU	22q12.2
1553938_a_at	STK32A	5q32
218784_s_at	C6orf64	6p21.2
222801_s_at	FLJ13195	7p11.2-q11.2
226179_at	LOC653778	8p21.2
221969_at	(PAX5)	9p13
1554522_at	CNNM2	10q24.32
201457_x_at	BUB3	10q26
223048_at	FLJ20487	11q12.2
231538_at	C11orf1	11q13-q22
222541_at	RSF1	11q14.1
224965_at	GNG2	14q21
229652_s_at	LOC400236	14q32.11
213527_s_at	ZNF688	16p11.2
227164_at	SFRS1	17q21.3-q22
241367_at	FLJ35767	17q25.3
212132_at	LSM14A	19q13.11

表1. Oligodendroglioma マーカー候補遺伝子



Probe Set	Gene Symbol	Chromosomal Location
226218_at	----	----
209408_at	KIF2C	1p34.1
219918_s_at	ASPM	1q31
221730_at	COL5A2	2q14-q32
229400_at	HOXD10	2q31.1
202718_at	IGFBP2	2q33-q34
206157_at	PTX3	3q25
205046_at	CENPE	4q24-q25
218802_at	CCDC109B	4q25
218883_s_at	MLF1IP	4q35.1
222848_at	CENPK	5p15.2-q12.3
214710_s_at	CCNB1	5q12
228729_at	CCNB1	5q12
215446_s_at	LOX	5q23.2
201506_at	TGFBI	5q31
218755_at	KIF20A	5q31
210513_s_at	VEGF	6p12
211527_x_at	VEGF	6p12
210512_s_at	VEGF	6p12
1554018_at	GPNMB	7p15
235521_at	HOXA3	7p15-p14
201505_at	LAMB1	7q22
211651_s_at	LAMB1	7q22
219890_at	CLEC5A	7q33
204595_s_at	STC1	8p21-p11.2
204825_at	MELK	9p13.2
209122_at	ADFP	9p22.1
218542_at	CEP55	10q23.33
209803_s_at	PHLDA2	11p15.5
207714_s_at	SERPINH1	11q13.5
205374_at	SLN	11q22-q23
202237_at	NNMT	11q23.1
202238_s_at	NNMT	11q23.1
214452_at	BCAT1	12pter-q12
211980_at	COL4A1	13q34
211966_at	COL4A2	13q34
223484_at	C15orf48	15q21.1
210427_x_at	ANXA2	15q21-q22
201590_x_at	ANXA2	15q21-q22
213503_x_at	ANXA2	15q21-q22
204709_s_at	KIF23	15q23
228904_at	HOXB3	17q21.3
1569003_at	TMEM49	17q23.1
224917_at	MIRN21	(17q)
229437_at	BIC	21q21.3

表 2. Glioblastoma マーカー候補遺伝子

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Narita Y.</u> <u>Shibui S</u>	Cases with Carcinomatous Meningitis and Cerebral Infarction	Jpn. J. Clin. Oncol.,	36	676	2006
<u>Mishima K.</u> <u>Nishikawa R.</u> et al.	Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression.	Acta Neuropathol	111	483-488	2006
<u>Ishizawa T.</u> <u>Nishikawa R.</u> et al.	Papillary glioneuronal tumor with minigemistocytic components and increased proliferative activity.	Human Pathology	37	637-630	2006
<u>Uchikawa H.</u> <u>Nishikawa R.</u> et al.	Brain- and heart-specific Patched-1 containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas.	Biochem Biophys Res Commun	349	277-283	2006
<u>Batistatou A.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma.	Virchows Arch.	448 (6)	763-767	2006
<u>Kyzas PA.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Dysadherin Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Association With Lymphangiogenesis and Prognostic Significance.	Am J Surg Pathol.	30(2)	185-193	2006
<u>Nishizawa A.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Muir-Torre Syndrome with intriguing squamous lesions: case report and review of the Literature.	Am J Dermatopathol	28	56-59	2006
<u>Eguchi T.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Histopathological criteria for additional treatment after endoscopic mucosal resection for esophageal cancer: Analysis of 464 surgically resected cases.	Modern Pathol	19	475-480	2006
<u>Huang JF.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Primary hepatocellular carcinoma detected long after tumor markers and lymph metastases. Beyond our vision?	Dig Dis Sci	51(3)	610-615	2006
<u>Izumi T.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Prognostic significance of dysadherin expression in epithelioid sarcoma and its diagnostic utility in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor.	Mod Pathol	19(6)	820-831	2006
<u>Matsumoto S.</u> <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma.	Int J Cancer	119	1491-1494	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukaya M, Nakanishi Y, et al.	Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer.	Gastroenterology	131	14-29	2006
Takahashi H, Nakanishi Y, et al.	Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory.	J Biosci Bioeng	102	46-52	2006
Kim DH, Nakanishi Y, et al.	Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells.	Oncology reports	16	1053-1059	2006
Nishizawa A, Nakanishi Y, et al.	Syringoid eccrine carcinoma with apparently aggressive transformation: case report and review of the literature.	Int J Dermatopathol	45	1218-1221	2006
Hotta K, Nakanishi Y, et al.	Usefulness of Ki-67 for predicting metastatic potential of rectal carcinoids.	Pathol Int	56	591-596	2006
Takada H, Nakanishi Y, et al.	Genomic loss and epigenetic silencing of very-low-density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis.	Oncogene	25	6554-6562	2006
成田善孝	脳腫瘍に対する抗腫瘍薬の基礎(解説)	脳神経外科速報	16巻7号	642-648	2006
成田善孝	肺癌の脳転移に対する治療	呼吸器科	10巻4号	320-327	2006
澁井壮一郎	悪性グリオーマに対する化学療法 -大規模臨床試験とテーラーメイド治療-	脳神経外科	15	3-9	2006
澁井壮一郎	JCOG脳腫瘍グループ: 星細胞腫grade3/4に対するACNU vs ACNU+PCZによる第II/III相試験 (JCOG0305臨床試験)	Neuro-Oncology	15	50-53	2006
西川亮, 澁井壮一郎, 他	初回再発の退形成性星細胞腫患者に対するTemozolomide単剤投与の有効性及び安全性の検討-多施設共同第II相試験-	癌と化学療法	33	1279-1285	2006
西川亮	頭蓋内胚細胞腫瘍の最新知見	脳神経外科速報	16	129-135	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
西川亮	中枢神経胚細胞腫瘍治療の基本方針	脳神経外科 ジャーナル	15	171-176	2006
西川亮	あらたな一歩を踏み出した膠芽腫治療：テモ ゾロミド.	医学の歩み	218	1037-1038	2006
西川亮	悪性神経膠腫の治療戦略2006	脳神経外科 ジャーナル	15	694-699	2006
西川亮	新しい化学療法-テモゾロミド-	脳と神経	58	1035-1041	2006