

200720022A

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

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく診断・予防法開発及び分子標  
的探索と、免疫遺伝子治療の臨床開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成20（2008）年4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
ゲノム・遺伝子解析情報に基づく診断・予防法開発及び分子標的探索と、 免疫遺伝子治療の臨床開発に関する研究		
吉田 輝彦	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 遺伝子発現解析を基盤にした急性骨髄性白血病の層別化向上と治療標的 分子探索に関する研究		
市川 仁	-----	7
2. 遺伝と遺伝子情報による発がん高リスク群の診断		
菅野 康吉	-----	9
3. 遺伝性腫瘍の新しい遺伝子診断法の開発に関する研究		
塚田 俊彦	-----	13
4. がんの転移や薬剤応答性を規定する分子を標的にした RNAi 治療の開発の研究		
落谷 孝広	-----	16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20

## 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）

## 総括研究報告書

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく診断・予防法開発及び分子標的探索と、  
免疫遺伝子治療の臨床開発に関する研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部 部長

研究要旨 ゲノム・遺伝子解析技術や遺伝子導入技術の進歩をより優れたがんの診断・治療法開発に橋渡しする研究を行った。①食道がん化学放射線療法（CRT）後のCRとnonCRを発現プロファイルによって判別可能であることを確認し、生検試料内のがん細胞の割合を評価し得るマーカー遺伝子候補を同定した。後方視的研究から得られた術後予後不良症例のマーカー遺伝子11種を同定した。②小児急性骨髄性白血病（AML）130症例の解析から遺伝子発現データのみで6種のサブタイプ [t(8;21)型、t(15;17)型、inv(16)型、単球系、巨核球系、骨髄球系] に分類できることを示した。単球系AMLの予後不良サブグループを抽出するアルゴリズムを構築した。③表在性膀胱がん200例を対象として経尿道的膀胱腫瘍切除術（TUR-BT）実施後の再発リスクを評価する前向き研究を行なった。Cox 比例ハザードモデルによる解析では、染色体9p、9q、17pの欠失が腫瘍径とならぶ有意な予後因子であり、BCG治療効果の予測にも有用であった。④リアルタイム定量的PCR法とlong-range PCR法を組み合わせ大領域遺伝子欠失を検出する方法を考案し、多内分泌腺腫瘍症1型の遺伝子診断への有用性を示した。原因遺伝子MEN1のミスセンス変異をもつ変異型メニンの細胞内不安定性を定量化する方法を考案し、多内分泌腺腫瘍症1型の軽症型等の鑑別可能性を示した。⑤造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合により、明らかな有害事象なく相乗的な抗腫瘍免疫増強により生存率を延長できることを動物モデルで確認し、第I相臨床試験の科学的根拠を確立した。⑥転移イメージング動物モデルを用いて、乳がんのリンパ節転移に関与する分子Slugを同定しsiRNAによる治療の可能性を示した。前立腺がんの骨転移を制御するnon-coding smallRNA分子を同定した。

## 分担研究者

市川 仁	国立がんセンター研究所 プロジェクトリーダー
菅野 康吉	栃木県立がんセンター研究所 技幹
塚田 俊彦	国立がんセンター研究所 プロジェクトリーダー
落谷 孝広	国立がんセンター研究所 室長

## A. 研究目的

本研究の目的は、がんの実際の臨床例の解析を基盤として、ゲノム・遺伝子解析技術や遺伝子導入技術、腫瘍免疫学の進歩をより優れたがんの診断・治療の実現へと橋渡しするため以下の研究を行う。【A. 分子情報に基づく診断法開発と分子標的の探索】①食道がん化学放射線療法（CRT）の奏効性予測法開発と治療の新規分子標的の同定：食道がんの治療成績向上にはCRT感受性を予測するバイオマーカー開発が必要である。遡及的

研究及び現在進行中の前向き臨床試験の治療前生検試料の遺伝子発現プロファイルから奏効性予測判別式を開発するとともに、CRTで予後不良症例の新たな治療標的となりうる遺伝子・信号伝達系を同定する。②急性骨髄性白血病（AML）予後不良サブタイプ検出と治療の新規分子標的の同定：小児AML臨床試料の遺伝子発現プロファイルに基づく新たな予後不良サブタイプを検出、特徴的分子経路を同定して新規治療標的としての可能性を検討する。③固形がんのゲノム・遺伝子異常の把握に基づくがんの再発等リスク評価：各種固形がんを対象とし、ゲノム・遺伝子異常の解析により、再発や浸潤性がんへの進展のリスク推定に有用な臨床応用可能な遺伝子検査法を開発する。本年度はマルチアレイキャピラリー電気泳動装置を用いた一本鎖DNA高次構造多型（SSCP）解析法により染色体欠失を高感度に検出し、表在性膀胱がんに対するTUR-BT術後の再発リスクを評価する遺伝子診断技術の有用性に関する検討を行う。④遺伝性腫瘍の遺伝子診断法の開発：家族性腫瘍症候群の原因となる変異のうち、通常の変異解析法では見落とされやすい大領域欠失変異の迅速・簡便な検出法を開発する。多内分泌腺腫瘍症1型の原因遺伝子MEN1に認められる多型ではないミスセンス変異が多内分泌腺腫瘍症1型の完全型や軽症型の原因となる機序を解明することにより、遺伝子変異の情報を予後の推定とフォローアップの最適化に役立てる。【B. 遺伝子・RNA治療の開発】⑤免疫遺伝子・細胞複合療法の開発：多くの固形がん症例が示す免疫治療への抵抗性打破を目指して、移植片対宿主病（GVHD）の恐れがなく、移植時の免疫抑制環境破壊や、免疫系再構築の際の腫瘍抗原反応性のT細胞増殖促進等の機序により抗腫瘍効果が期待される自家造血幹細胞移植に、同種主要組織適合抗原（MHC）遺伝子やサイトカイン遺伝子の腫瘍への導入による腫瘍の抗原性強化や腫瘍特異的免疫賦活を組み合わせることで高い治療効果を発揮する複合療法の基礎開発を行い、第I相臨床試験を開始

する。⑥RNA干渉（RNAi）によるがん転移制御法の開発：臨床試料からがんの転移に関与するゲノム・遺伝子情報を解析し、乳がんのリンパ節転移や前立腺がんの骨転移などの動物モデルの*in vivo*イメージング解析により転移を規定する分子の解明と治療法を開発する。

## B. 研究方法

上記研究目的に記載した①～⑤の課題毎に以下の通り。

①実際の臨床における食道がんの予知医療を実現するためには、治療前生検試料の解析情報を用いることが不可欠であるため、食道の内視鏡生検試料からオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析に対して十分な質と量のRNAを提供する核酸抽出技術を確立し、CRTまたは手術を施行された症例から前向きに生検試料の提供を受けてAffymetrix GeneChipによる発現プロファイリングを取得、前年度までに検討・選択した各種統計学的方法組み合わせによって遺伝子を選抜、予測判別式候補を作った。また、予後不良症例の発現プロファイルの統計学的比較により、各郡に特徴的な遺伝子・信号伝達系を同定した。

②小児AML臨床検体の網羅的遺伝子発現解析情報に基づくサブタイプ分類を行うとともに、新たな予後不良サブグループの検出を行った。既知の予後不良因子と相関する遺伝子の同定も行い、遺伝子発現のみに基づく高精度リスク診断の可能性を検討、新規登録症例を用いて検証した。その過程で発症・予後不良に関わる分子経路を同定し、治療標的の可能性を探った。

③全国の泌尿器科10施設の参加による多施設共同研究として平成14年4月から平成17年3月までに登録され、その後最長3年間の経過観察を行った200例の表在性膀胱がんの全症例についてTUR-BTで切除された腫瘍組織より抽出したゲノムDNAを対象とし、9番および17番染色体短腕上の13カ所の多型マーカーとマルチアレイキャピラリー方式のSSCPを用いてLOH解析を行なった。

④これまでに開発してきた競合的PCR法を用いた遺伝子コピー数の推定法をより迅速・簡便に行えるように改良した。鋳型となるDNA量の測定誤差を補正するための対照配列として別のがん抑制遺伝子のエクソン部分を用いた。コピー数が正常であることが確認された標的配列にPCR用プライマーを設定し、long-range PCRで数千塩基対の遺伝子領域を一挙に増幅することによりその範囲内の大領域欠失を検出する方法を考案した。多内分泌腺腫瘍症1型の原因となるミスセンス変異をもつMEN1遺伝子の遺伝子産物メニンは正常メニンと比較して細胞内で不安定であることを以前報告したが、本年度は家族性副甲状腺機能亢進症の解析症例数を増やすとともに、孤発性副甲状腺腫瘍の患者のgerm lineに認められた変異も含めて、変異メニンの細胞内安定性の面から遺伝子型と表現型の相関を検討した。過去に文献報告のあるMEN1遺伝子のミスセンス変異またはは1アミノ酸欠失変異をもつメニンを発現するプラスミドを作製し正常型メニンとともに培養細胞に導入し、各メニン蛋白質の発現量、およびシクロヘキシミドにより蛋白質合成を阻害した時のメニンの量をウエスタンブロットにより定量した。

⑤同種造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発を目指して、主要組織適合抗原は一致するがマイナー組織適合抗原が異なる、DBA2マウス(H-2<sup>d</sup>)をドナー、BALB/cマウスをレシピエントとする同種骨髄移植モデルを用いた。移植後8週間目に骨髄移植したマウスの足に、同系のCT26大腸がん細胞やRenca腎がん細胞を移植した。腫瘍径が5-6mm程度になったときに、インターフェロン(IFN)- $\alpha$ 発現アデノウイルスを腫瘍内に注入し、皮下腫瘍の大きさを経時的に測定した。また、GVHDの状態も経時的に評価した。

自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発のために、BALB/cマウス(H-2<sup>d</sup>)の自家骨髄移植モデルを用いた。骨髄移植と同時に、マウスの足に同系のCT26大腸がん細胞やRenca腎がん細胞を移植した。腫瘍径が5-6mm程度になったと

きに、MHC class I抗原であるH-2K<sup>b</sup>発現プラスミドをリポソーム(DMRIE/DOPE)と混合して腫瘍内に直接注入し、皮下腫瘍径を経時的に測定し、マウスの生存率を評価した。

⑥乳がんや前立腺がんの転移に伴って発現上昇する遺伝子群を選抜、それらの発現を抑制するsiRNAを合成し、独自に開発したセル・トランスフェクションアレイ等を用いてヒト乳がん細胞や前立腺がん細胞の浸潤能を抑制する効果を評価した。次に、抑制効果の認められたsiRNAをアテロコラーゲンによるデリバリー技術を用いて動物に投与し、腫瘍の転移(乳がんの腋下リンパ節転移や前立腺がんの骨転移など)の抑制効果をバイオフィotonクスによるイメージング技術によって解析することで、治療候補遺伝子としての有効性の評価を行った。特に前立腺がんの骨転移に関与するmicroRNAの同定を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト試料の生殖細胞系列の遺伝子解析が含まれる研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、動物実験については施設の動物実験倫理規程など、それぞれの研究の種類に応じて求められる国や施設の指針・規程に従い、適宜施設の倫理審査委員会の審査や機関の長の承認を受けて研究を行った。

## C. 研究結果

「A. 研究目的」に記載した①～⑤の課題毎に以下の通り。

①CRTを受けた患者は70症例、手術は40症例のマイクロアレイによる発現プロファイルを取得した。RT-PCRでアレイデータを確認するため、全試料からcDNAを合成した。現時点での症例集積によるCRTを受けた37名の患者の教師無しのカスタリング解析(USVクラスター解析)で、CR(完全消失)とnonCR(不完全消失)を75%の精度で分類可能であり、予測判別式も、CRを80-90%、nonCRを70%の精度で診断できることを示した。今後、集積されるデータをもとに検証す

る。また両者を区別できる遺伝子を 53 種同定し、RT-PCR で確認を行った。遡及的試験で集めた手術試料の発現プロファイルから、手術で予後不良な症例で特徴的に発現する遺伝子を 11 種同定した。これらの遺伝子は全て、食道扁平上皮で発現せず、食道腺（導管）や他の腺上皮で発現する遺伝子であった。またがん細胞の含有率を見積もるためのマーカー遺伝子を分離するため、微量な生検からの LMD-マイクロアレイ解析技術を確立し、がん細胞またはがん間質で特徴的に発現する遺伝子（各 174 個、88 個）を分離することに成功した。

②AML99 プロトコールで治療を受けた小児 AML 130 症例の遺伝子発現データを解析し、遺伝子発現データのみで、小児 AML が六つのサブタイプ [t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML、単球系 AML、巨核球系 AML、骨髓球系 AML] に分けられることを示した。単球系 AML をサブグループ A（低年齢型）、B（中間年齢型）、C（高年齢型）の三つに分類するアルゴリズムを構築した。その結果、サブグループ C の予後（3 年無病生存率 28%）は、サブグループ A、B の予後（3 年無病生存率 70%、75%）に比べて有意に悪いことが確認された。

③表在性膀胱がんの LOH 解析では、200 例中 198 例（99%）が informative と判定され、腫瘍数（単発 vs. 多発）、組織学的異型度（G3 vs. G1/G2）、病期、CIS の合併の有無に関して有意差が認められた。LOH の有無と、従来予後因子として用いられている各種の臨床病理学的因子を独立変数とする Cox 回帰分析の結果、腫瘍径（3cm 以上）および 9 番染色体と 17 番染色体短腕の LOH の有無が再発に関する有意な予後不良因子であることが明らかとなった。一方、BCG 投与の有無は、LOH 群において有意な予後改善因子であった。

④リアルタイム定量的 PCR と long-range PCR を利用して家族性腫瘍症候群の大領域遺伝子欠失をより迅速・簡便に検出する方法を開発し、患者血液を解析したところ、多内分泌腺腫瘍症 1 型原因遺伝子の内部および周辺の標的配列においてコピー数が半減している例を検出できた。多内

分泌腺腫瘍症 1 型の原因となる MEN1 遺伝子を培養細胞に強制発現させ、メニン蛋白質発現量を定量する測定系を開発した。正常メニンと比較して完全型多内分泌腺腫瘍症 1 型の原因となるメニンの大部分は極度に不安定であり発現量が低かった。一方、軽症型等の原因となるミスセンスメニンは安定なものが多かった。

⑤同種造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発においては、まず IFN- $\alpha$  アデノウイルス単独の抗腫瘍効果を検討した。IFN- $\alpha$  は細胞死誘導や免疫賦活などの種々の抗腫瘍活性を有する。骨髓移植していない BALB/c マウスの CT26 や Renca 皮下腫瘍に IFN- $\alpha$  アデノウイルス ( $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$  PFU) を注入すると、用量依存的に腫瘍の増殖は抑制され、腫瘍内には細胞死が著明に誘導されていた。同種造血幹細胞移植マウスにおいては、低用量 ( $1 \times 10^8$  PFU) の IFN- $\alpha$  アデノウイルスを腫瘍に注入するのみで相乗的な抗腫瘍効果を発揮できることを明らかにした。一方、GVHD に関しては、IFN- $\alpha$  アデノウイルス腫瘍内投与後にも増悪することはなかった。

自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発においては、BALB/c マウスに致死量の放射線照射後、骨髓細胞と T 細胞を尾静脈より静注して T 細胞の増殖を促すと、CT26 細胞や Renca 細胞の皮下腫瘍の増殖は抑制され、自家造血幹細胞移植により強い腫瘍増殖抑制効果が得られる。そこで、腫瘍の免疫原性を強化し腫瘍特異的免疫の誘導を促進することが期待できる同種 MHC 遺伝子導入を併用した。造血幹細胞移植後早期（5 週以内）に、免疫系の再構築が起こっている時期に、同種 MHC 遺伝子導入を行うと、CT26 細胞や Renca 細胞の皮下腫瘍の増殖は著明に抑制され、異なるがん種において複合療法により相乗的抗腫瘍効果が誘導できることを明らかにした。自家造血幹細胞移植単独あるいは同種 MHC 遺伝子導入単独では、腫瘍の増殖は抑制できるもののマウスの生存率は延長できなかったが、複合療法では約 50% のマウスで腫瘍は完全に消失しマウスの生存率を延

長することも確認した。また、明らかな治療毒性は認められなかった。

⑥動物での転移能が高い乳がん細胞株 MDA-MB-231-M、前立腺がん細胞株 PC3-M にバイオフォトニクスが可能なルシフェラ-ゼや GFP 遺伝子を導入した細胞株を樹立、それらを用いて *in vitro* での siRNA や microRNA の導入の最適化や、浸潤能のアッセイ方法を確立した。同時に動物へこれらの細胞を移植して転移モデルを作製し *in vivo* イメージングによる評価系を構築した。その結果、ヒト乳がん細胞のリンパ節転移を規定する分子として Slug を同定し、その働きを siRNA で抑制することによって動物個体におけるリンパ節転移を顕著に抑制することができた。また、ヒト前立腺がんの骨転移巣での増殖を強く抑制する働きを持つ microRNA を同定した。

#### D. 考察

「A. 研究目的」に記載した①～⑤の課題毎に以下の通り。

①CRT による CR と nonCR は、USV クラスタ解析で分かれる傾向が強いことから、発現プロファイルによって判別可能であることが確認された。今後、前向き症例をさらに集積することによって、精度良い判別を可能にする方法の確立が可能と考えられた。後ろ向き試験から得られた手術で予後不良となる症例のマーカー遺伝子の特徴から、食道上皮ではなく導管由来のがんである可能性が示されたことはたいへん興味深い。今後は、前向き試験試料で検証するとともに、この予後不良な食道がんの由来を探る研究を展開する。生検は、微量でばらつきが多い懸念がある。また限られた数しか採取できない。そのため、実際の臨床応用ではがん細胞の割合を HE 染色によらずに見積もることが必要である。今回分離したがん細胞、がん間質のマーカー遺伝子の発現量を総合的に判定し、がん細胞の割合をモニターする方法を開発する道筋が得られた。

②小児 AML の中で、未だ十分にリスク分類がな

されておらず、中間リスク群として扱われて来た単球系 AML の中に、予後不良サブグループが存在し、それをマイクロアレイ解析により分類できることを示したことは、マイクロアレイ診断の新たな可能性を示すものである。

③9番および17番染色体短腕の欠失は表在性膀胱がんの再発に関して、腫瘍径(3cm以上)と並んで有意な予後因子であった。両因子のオッズ比はそれぞれ2.14、2.18とほぼ同等であるが、腫瘍径3cm以上の症例は表在性膀胱がん全体の15%程度であるのに対して、欠失は全症例の約半数(53%)に認められ、より多くの症例について再発リスクの判定が可能となる。さらにLOHが認められた症例ではBCG膀胱内注入療法による予後の改善が認められた。BCG膀胱内注入療法は表在性膀胱がんの術後補助療法として有効性が証明されている数少ない治療法であるが、膀胱刺激症状、萎縮性膀胱、BCGによる菌血症の合併等、重篤な合併症を伴う場合があり、治療効果を予測する指標の開発は重要な課題と考えられる。がん細胞・がん組織を対象とする遺伝子検査については、H18年度の診療報酬改訂で悪性腫瘍遺伝子検査として保険収載されている。今後、臨床検査を専門とする企業への技術移転を推進していく必要がある。

④リアルタイム定量的PCRを用いて特異的配列を有するDNAのコピー数を推定する試みは以前から行われてきたが、生殖細胞系列の大領域欠失変異のように正常2コピーと欠失1コピーの差を確実に判別するには信頼性が低く、個別の症例の遺伝子診断を目的とした遺伝子解析への応用は困難であった。しかし陽性症例を用いた今回の検討では、臨床に応用できる精度を得られる可能性が示唆され、long-range PCR法と組み合わせることにより、遺伝子内部の部分欠失も検出可能である。多内分泌腺腫瘍症1型の完全型を来す変異であっても、正常メニンとほぼ同等の安定性を呈するものがあり、メニンの分子機能上重要な役割をもつアミノ酸の置換である可能性がある。一方、文献上で軽症型の原因とされた変異メニンの中に

も極度に不安定なものがあり、完全型の部分症状のみが出現している可能性が考えられる。

⑤固形がんに対して、同種や自家の造血幹細胞移植に免疫遺伝子治療を複合することにより、相乗的な抗腫瘍免疫を強化・維持できることを明らかにした。今後は、同種造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発に関しては、IFN 遺伝子導入による抗腫瘍効果を発揮するエフェクターの同定と免疫機序について各種動物モデルを用いて検討する。自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発に関しては、遠隔転移巣を含めた全身性の腫瘍特異的免疫の賦活とエフェクター細胞の同定を行う。これらの研究成果をもとに、臨床応用可能な治療スケジュール等を検討し、標準的治療に抵抗性を示す固形がんに対して臨床研究の準備を進める。

⑥乳がんの治療体系において本研究により見いだされた Slug 分子やその下流の経路の同定・機能解析は転移の治療において重要な知見を提供する。前立腺がんの骨転移を制御する新たな標的として miRNA を特定出来たことは、今後の治療法開発の新たな選択肢を増やすことにつながる。

#### E. 結論

①食道がん化学放射線療法 (CRT) の奏効性予測法開発と治療の新規分子標的の同定：CRT 後の CR と nonCR は、教師無しクラスター解析で別の群に分かれる傾向が強いことから、発現プロファイルによって治療奏効性を判別可能であることを確認し、生検試料内のがん細胞の割合をモニターし得るがん細胞、がん間質に特徴的に発現するマーカー遺伝子候補を同定した。後方視的研究から得られた、手術で予後不良となる症例の 11 種のマーカー遺伝子を同定した。②今後、別症例を用いた検証が必要であるが、小児 AML のマイクロアレイ診断の有用性が示された。③表在性膀胱がんの TUR-BT 術後の再発や BCG 治療効果を予測する因子として、LOH 解析は臨床的に有用と考えられた。④家族性腫瘍症候群の原因遺伝子の領域欠

失変異を検出する方法として、リアルタイム定量的 PCR 法と long-range PCR 法を組み合わせる方法を考案した。多内分泌腺腫瘍症 1 型の原因遺伝子 MEN1 のミスセンス変異をもつ変異型遺伝子産物メニンの細胞内不安定性を定量化する方法を考案し、多内分泌腺腫瘍症 1 型の軽症型等の亜型を鑑別できる可能性を示した。⑤造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合により、動物モデルにおいて明らかな有害事象なく、相乗的な抗腫瘍免疫を増強しマウスの生存率を延長できることが確認され、第 I 相臨床試験プロトコルの科学的根拠を確立した。⑥乳がん・前立腺がん動物モデルを用いてがんにおいて重要な問題である転移に関与する分子を RNA 干渉と *in vivo* イメージングによって同定し、治療応用への可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

無し。

#### G. 研究発表

別添 5 の通り。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

・発明の名称「抗 PERP 遺伝子組換え抗体」、発明者：落合淳志、設楽研也、国際出願番号 PCT/JP2006/324385

・発明の名称「遺伝子検査結果判定法およびプログラムおよびその装置」、発明者：菅野康吉 他、出願番号：出願番号 P2007-021407

・発明の名称「膵がんに対するインターフェロン  $\alpha$  遺伝子治療」、発明者：青木一教、米国特許出願中 (60/565, 526)

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し



遺伝子発現解析を基盤にした急性骨髄性白血病の層別化向上と治療標的分子探索に関する研究

分担研究者 市川 仁 国立がんセンター研究所腫瘍発現解析プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨 遺伝子発現解析による小児急性骨髄性白血病（AML）の治療層別化の向上のため、130症例の遺伝子発現データを解析し、遺伝子発現データのみで小児AMLを六つのサブタイプ [t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML、単球系AML、巨核球系AML、骨髄球系AML] に分類できることを示した。また、単球系AMLの中に遺伝子発現により区別される予後不良サブグループが存在するという昨年度までの知見を基に、単球系AMLを三つのサブグループA、B、Cに分類し、予後不良なサブグループCを抽出するアルゴリズムを構築した。

#### A. 研究目的

本研究は、臨床検体の網羅的遺伝子発現解析により、AMLの治療における患者層別化の向上と新たな治療標的分子の同定を目指すものである。このため、マイクロアレイ解析により得られた網羅的遺伝子発現解析データを用いて、新たな予後不良サブタイプを同定するとともに遺伝子発現に基づくリスク診断法を開発する。また、遺伝子発現からAMLの発症・予後不良に関わる分子経路を同定し、新たな治療標的分子の探索を行う。

#### B. 研究方法

発症に至るまでの年数が短いため、その発症過程が比較的単純だと予想される小児AMLを対象とし、臨床検体の網羅的遺伝子発現解析データを用いて遺伝子発現に基づくサブタイプ分類を行うとともに、新たな予後不良サブグループの検出を行う。また、既知の予後不良因子と相関する遺伝子の同定を合わせて行い、遺伝子発現のみに基づく高精度リスク診断の可能性を検討する。これらの診断法に関しては、新規登録症例を用いて検証を行う。さらに、予後不良サ

ブグループの検出及び予後不良因子と相関する遺伝子の同定の過程において、発症・予後不良に関わる分子経路を同定し、そこに働く分子について治療標的の可能性を検討する。

（倫理面への配慮）

白血病患者検体の遺伝子発現解析は、国立がんセンター倫理審査委員会の承認の下、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行う。動物実験に関しては、国立がんセンター動物実験倫理委員会の承認の下、動物愛護の精神に基づき、国立がんセンター動物実験倫理規定に従って行う。

#### C. 研究結果

小児AMLは、その白血病細胞の有する染色体異常等に基づいて高リスク群、中間リスク群、低リスク群に分類され、t(8;21)、t(15;17)、inv(16)染色体転座を有する症例は低リスク群とされる。AML99プロトコールで治療を受けた小児AML130症例の遺伝子発現データを解析し、遺伝子発現データのみで、小児AMLが六つのサブタイプ [t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML、単球系AML、巨核球系AML、骨髄

球系 AML] に分かれることを示した。この解析において、通常の診断において見落とされていた t(8;21)転座症例が、マイクロアレイ解析においては正確に t(8;21)-AML に分類できることが明らかになった。また、中間リスク群に分類される単球系 AML に発症年齢と相関した遺伝子発現の相違が存在し、高年齢児に多い遺伝子発現パターンを示す症例は予後不良であるという昨年度までの知見を基に、単球系 AML をサブグループ A (低年齢型)、B (中間年齢型)、C (高年齢型) の三つに分類するアルゴリズムを構築した。その結果、サブグループ C の予後 (3年無病生存率 28%) は、サブグループ A、B の予後 (3年無病生存率 70%、75%) に比べて有意に悪いことが、あらためて示された。

#### D. 考察

現在のリスク分類において重要である t(8;21)、t(15;17)、inv(16)染色体転座を有する症例を、遺伝子発現データを用いて正確に分類できたことは、マイクロアレイ解析による診断の精度の高さと有効性を示すものである。また、未だ十分にリスク分類がなされておらず、中間リスク群として扱われて来た単球系 AML の中に、予後不良サブグループが存在し、マイクロアレイ解析により分類できることを示したことは、マイクロアレイ診断の新たな可能性を示すものである。

#### E. 結論

今後、別症例を用いた検証が必要であるが、小児 AML のマイクロアレイ診断の有用性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) H. Yoshida, H Ichikawa, et al., PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP $\alpha$  expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007
- 2) A. Shimada, H Ichikawa, et al., Low frequency of KIT gene mutation in pediatric acute myeloid leukemia with inv(16)(p13q22): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int. J. Hematol.* 86, 289-290, 2007
- 3) Y. Tagata, H Ichikawa, et al., Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP $\alpha$  and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia* 22, 273-280, 2008

##### 2. 学会発表

- 1) 城 青衣、市川 仁、他 単球系及び MLL 遺伝子再構成急性骨髄性白血病における発症年齢依存的な遺伝子発現, 第 66 回日本癌学会学術総会.
- 2) 城 青衣、市川 仁、他 DNA マイクロアレイによる AML99 登録 130 症例の網羅的遺伝子発現解析, 第 49 回日本小児血液学会.
- 3) A. Jo, H. Ichikawa, et al., Age-associated difference in gene expression of pediatric myelo-monocytic and MLL-rearranged AML. The 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology.

#### H. 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

遺伝と遺伝子情報による発がん高リスク群の診断

分担研究者 菅野 康吉

栃木県立がんセンター研究所がん遺伝子研究室・がん予防研究室 技幹

研究要旨 マルチアレイキャピラリー電気泳動を用いた SSCP 解析により染色体欠失を高感度に検出する方法を開発し、表在性膀胱癌 200 例を対象として経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) 実施後の表在性膀胱癌の再発リスクを評価する prospective study を行なった。9 番染色体短腕 (9p)、同長腕 (9q) と 17 番染色体短腕 (17p) の欠失は 104/200 例 (52.0%) に認められた。TUR-BT のみを施行された 154 例では術後 3 年の無病生存率は欠失群で 40.5%、非欠失群で 64.3% であり、欠失の有無は表在性膀胱癌の再発を予測する有意な予後因子であった。また TUR-BT 施行後に補助療法として BCG の膀胱内注入を実施した 46 例の解析では欠失陽性群の無病生存率は 67.6% となり、欠失陰性群の 63.6% よりも良好であった。Cox 比例ハザードモデルによる解析では、欠失は腫瘍径 (3cm 以上) とならぶ有意な予後因子であり、また BCG 投与例における治療効果の予測に有用と考えられた。

A. 研究目的

本研究では大腸癌、肺癌、子宮体癌、表在性膀胱癌、前立腺癌等の散発性腫瘍を対象とし、各種の遺伝子異常を解析することにより、再発や浸潤性癌への進展のリスク推定に有用な臨床応用可能な遺伝子検査法を開発する。本年度はマルチアレイキャピラリー電気泳動装置を用いた一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析法により染色体欠失を高感度に検出し、表在性膀胱癌に対する TUR-BT 術後の再発リスクを明らかにする遺伝子診断技術の有用性に関する検討を行った。

B. 研究方法

本研究は全国の泌尿器科 10 施設の参加による多施設共同研究として行われ、平成 14 年 4 月から平成 17 年 3 月までに 209 症例が本登録された。その後最長 3 年間の経過観察期間を行い、

平成 19 年 3 月に研究を終了している。全症例について TUR-BT で切除された腫瘍組織より抽出したゲノム DNA を対象として 9 番染色体および 17 番染色体短腕上の 13 カ所の多型マーカーを用いて染色体欠失を調べる解析を行なった。本研究で使用されたマルチアレイキャピラリー方式の SSCP 電気泳動装置の開発と臨床試験の開始については、平成 15 年度のがん克服新 10 年戦略で既に報告されている（がん克服新 10 年戦略分野 1: ヒト多段階発がんの基盤となる遺伝子異常の総合的把握によるがんの特徴の解明と診療への応用：分担研究報告書）。

（倫理面への配慮）

本研究は施設 IRB の承認を受けた研究計画に基づいて実施された。

C. 研究成果

全登録症例 209 例のうち、術後サーベイランス

不良のため脱落した9例を除く200例について解析を行った。その内訳はTUR-B1のみが施行された154例と術後補助療法として膀胱内BCG注入療法が施行された46例であり、表在性膀胱癌の再発は84例(42%)に認められた。

全症例についてTUR-B1で切除された腫瘍組織より抽出したゲノムDNAを対象として9番染色体上で7カ所、17番染色体短腕上で6カ所、計13カ所の多型マーカーを用いて解析を行なった結果、Informativeと判定された症例は9番染色体短腕(9p)および長腕(9q)に関してそれぞれ195/200例(97.5%)、短腕と長腕を併せた判定で197/200例(98.5%)であった。17番染色体短腕(17p)の解析では194/200例(97%)がInformativeと判定された。腫瘍径、腫瘍数、組織学的異型度、Stage、CISの合併の有無等の臨床病理学的因子と比較したところ、9pのLOHは腫瘍径(1cm以上 vs. 1cm未満)、腫瘍数(単発 vs. 多発)、組織学的異型度(G3 vs. G1, G2)、Stage(pTa, pT1, pT2)、CISの合併の有無に関して有意であった。9qのLOHは、腫瘍径(3cm以上 vs. 3cm未満)、腫瘍数(単発 vs. 多発)、組織学的異型度(G2, G3 vs. G1)、組織学的異型度(G3 vs. G1, G2)、CISの合併の有無に関して有意であった。17pのLOHは、組織学的異型度(G2, G3 vs. G1)、組織学的異型度(G3 vs. G1, G2)、Stage(pTa, pT1, pT2)、CISの合併の有無に関して有意であった。全Locusを併せた検討では、200例中198例(99%)がInformativeと判定され、腫瘍数(単発 vs. 多発)、組織学的異型度(G3 vs. G1, G2)、Stage(pTa, pT1, pT2)、CISの合併の有無に関して有意差が認められた。術後3年のDisease-free survival (DFS)をRetain群(n=94)とLOH群(n=104)に分けて比較したところ、両群間に有意差が認められた(p=0.025)。LOHの有無と、従来予後因子として用いられている各種の臨床病理学的因子を独立変数とするCox回帰分析の結果、腫瘍径(3cm以上 vs. 3cm未満)および9番染色体と17番染色体短腕のLOHの有無が

再発に関する有意な予後不良因子であることが明らかとなった。一方、BCG投与の有無は、LOH群において有意な予後改善因子であることが明らかとなった。

#### D. 考察

本試験では当初、表在性膀胱癌200-300例の登録と術後3年間の経過観察を予定していた。全登録症例について、術後3年間の経過観察を行う予定であったが、症例登録期間が1年延長して3年となったため、最終年度に登録された症例では経過観察期間が2年となる。そのため、平成19年3月の時点で中間解析を行い、もう1年の経過観察期間の延長が必要かどうかを判定した。今回の解析の結果、9番および17番染色体短腕の欠失は表在性膀胱癌の再発における有意な予後因子であることが明らかとなった。従来の予後因子を加えた多変量解析の結果、腫瘍径(3cm以上 vs. 3cm未満)とLOHの有無が有意な予後因子であること、さらにLOHが認められた症例ではBCG膀胱内注入療法による予後の改善が認められた。BCG膀胱内注入療法は表在性膀胱癌の術後補助療法として有効性が証明されている数少ない治療法であるが、膀胱刺激症状、萎縮性膀胱、BCGによる菌血症の合併等、重篤な合併症を伴う場合があり、治療効果を予測する指標の開発は重要な課題と考えられる。以上の結果より、本診断法が表在性膀胱癌の再発リスクを判定する診断法として有用と考えられた。また、今回の解析で再発に関して有意差が認められたことから、観察期間の延長は行わず、本年度で研究を終了することが決定された。

表在性膀胱癌はTUR-BT施行後も約50-70%が再発し、10-30%は浸潤性膀胱癌に進展し、膀胱摘出術等の適応となる。今回の検討で、9p、9qおよび17pの欠失と腫瘍径(3cm)が表在性膀胱癌における独立した予後因子であることが明らかになった。両因子のオッズ比はそれぞれ2.18(腫瘍径)、2.14(欠失)とほぼ同等であるが、

腫瘍径 3cm 以上の症例は表在性膀胱癌全体の 15%程度であるのに対して、欠失は全症例の約半数 (53%) に認められ、表在性膀胱癌の約半数について再発リスクの判定が可能となる。更に術後補助療法として、BCG 膀胱内注入療法を行った症例では、欠失例は良好な無病生存率を示し、欠失の有無は再発リスクの判定のみならず有効な治療法の選択についても有用な情報となることが明らかとなった。

以上の結果は、DNA レベルの詳細な遺伝子解析が、疾患の予後や治療法選択に有用な情報を提供することを示しており、今後は遺伝子異常の網羅的解析を進めることによって、表在性膀胱癌の病態解明と治療方針の決定に有用な遺伝子異常の解明が期待される。

#### E. 結論

本研究は表在性膀胱癌の TUR-Bt 術後の再発を予測する予後因子として臨床的に有用と考えられる。膀胱癌細胞あるいは尿を対象とする遺伝子検査については、H18 年度の診療報酬改訂で悪性腫瘍遺伝子検査として保険収載されており、本検査を保険診療として実施することは現在でも全く問題がない。但し、一般の医療機関で本遺伝子検査を実施することは困難と考えられるので、臨床検査を専門とする企業への技術移転を今後推進していく必要がある。本研究に関する技術開発の成果はすべて特許出願が終了しており、民間企業への技術供与が可能である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Miyake M, Sugano K, et al. Sensitive detection of FGFR3 mutations in bladder cancer and urine sediments by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR

clamping. *Biochem Biophys Res Commun.*

*Biochem Biophys Res Commun.* 362, 865-71, 2007

2) Yanaba K, Sugano K, et al. Muir-Torre syndrome caused by partial duplication of MSH2 gene by Alu-mediated nonhomologous recombination. *Br J Dermatol.* 158, 150-6, 2008

##### 2. 学会発表

1) Banno K, Sugano K, et al. Germline mutation analysis of DNA mismatch repair (MMR) gene in endometrial cancer patients with familial predisposition to cancer. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Mar. 27 - 30, 2007 (Yokohama)

2) Takeda Y, Sugano K et al. Evaluation of outpatient consultations for hereditary colorectal cancer. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Mar. 27 - 30, 2007 (Yokohama)

3) Sugano K et al. Clinical characteristics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Japan -Interim analysis of a multiinstitutional study-. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Mar. 27 - 30, 2007 (Yokohama)

4) Tomita N, Sugano K et al. A case of suspected HNPCC with heterogeneous defect of mismatch repair gene product in the tumor tissue. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Mar. 27 - 30, 2007 (Yokohama)

- 5) Ishii M, Sugano K et al. Analysis of microsatellite instability and allelic status in mouse xenograft. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Mar. 27 - 30, 2007 (Yokohama)
- 6) 菅野康吉：家族性腫瘍での正しい家系図の書き方 第13回日本家族性腫瘍学会学術集会 平成19年6月15日(高知)
- 7) 菅野康吉、他：日本人におけるBRCA1およびBRCA2遺伝子の全塩基配列直接解析法による基礎データ収集と、家族性乳がん、卵巣がんを対象とした易罹患性検査としての有用性に関する研究 第13回日本家族性腫瘍学会学術集会 平成19年6月15日(高知)
- 8) 菅野康吉：家族性腫瘍の診療と研究 第一回家族性腫瘍セミナー 平成19年6月17日(松山)
- 9) 菅野康吉：家族性乳がんの臨床(BRCAについてわかっていること) 第一回家族性腫瘍セミナー 平成19年6月17日(松山)
- 10) 菅野康吉：がんの遺伝カウンセリングとがん予防相談外来で行われる診療 日本がん予防学会シンポジウム 平成19年7月12日(東京)
- 11) Sugano K et al. Genetic Counseling and Gene Testing for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Associated Disorders. 11th Congress of Asian Federation of Coloproctology Sept. 22, 2007 (Tokyo)
- 12) 前田耕史、菅野康吉、他：表在性膀胱がんの再発を予測するための遺伝子検査の有用性に関する多施設共同研究 第27回日本分子腫瘍マーカー研究会 平成19年10月2日(東京)
- 13) 三宅牧人、菅野康吉、他：膀胱癌における腫瘍組織および尿中剥離細胞を対象とした Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) 遺伝子の点突然変異の検出 第27回日本分子腫瘍マーカー研究会 平成19年10月2日(東京)
- 14) Sugano K et al. Interim analysis of multi-institutional study for molecular diagnosis of superficial bladder cancer. 2007年10月3日 第66回日本癌学会学術総会(横浜)
- 15) Miyake M, Sugano K et al. Detection of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) mutation in bladder carcinoma and voiding urine sediment. 2007年10月3日 第66回日本癌学会学術総会(横浜)
- 16) Furuno K, Sugano K et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations in gastric cancer using Illumina 317K SNP array. 2007年10月4日 第66回日本癌学会学術総会(横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
名称:膀胱がん治療方針決定支援システム(出願準備中)
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

遺伝性腫瘍の新しい遺伝子診断法の開発に関する研究

分担研究者 塚田 俊彦 国立がんセンター研究所腫瘍内分泌プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨 家族性腫瘍症候群の原因遺伝子の大領域欠失変異を検出する方法として、リアルタイム定量的PCR法と long-range PCR法を組み合わせる方法を考案し、多内分泌腺腫瘍症1型の遺伝子診断に応用できることを示した。また、本症候群原因遺伝子 MEN1 のミスセンス変異をもつ変異型遺伝子産物メニンの細胞内不安定性を定量化する方法を考案した。本法により、多内分泌腺腫瘍症1型の軽症型の重型を鑑別できる可能性が示された。

A. 研究目的

1. がん抑制遺伝子の germ line における機能喪失型ヘテロ接合変異は、家族性腫瘍症候群の原因となる。このような機能喪失型変異のうち、遺伝子全体またはエクソン全体が欠失する変異は、遺伝子を部分的にPCRで増幅して行う通常の変異解析法では見落とされやすく、遺伝子解析を診療に活用する上でしばしば問題となる。このような大領域遺伝子欠失の迅速・簡便な検出法を開発する。

2. 多内分泌腺腫瘍症1型の原因遺伝子 MEN1 のある種のミスセンス変異が家族性副甲状腺機能亢進症の原因となることが知られており、また、内分泌腫瘍の家族歴がない副甲状腺腫瘍患者の germ line にも MEN1 遺伝子のミスセンス変異が認められることがあるが、このような表現型と遺伝子型の相関は明らかでない。本研究は MEN1 遺伝子のミスセンス変異が多内分泌腺腫瘍症1型の完全型や軽症型の原因となる機序を解明することにより、遺伝子変異の情報を予後の推定とフォローアップの最適化に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1. 我々はこれまでに競合的PCR法を用いた遺伝子コピー数の推定法を開発し、これが家族性腫瘍症候群の遺伝子診断に応用できることを示した。今回は同様の変異をより迅速・簡便に検出するための方法に改変した。MEN1 遺伝子の上流、遺伝子内のエクソン部分、及び遺伝子下流部分にコピー数を推定する標的配列を設定し、標的配列を増幅できるPCRプライマーを作製した。テンプレートとなるサンプルDNA量の測定誤差を補正するためのコントロール配列として、コピー数の異常が表現型として現れやすい別のがん抑制遺伝子のエクソン部分を用いた。これまでの研究により germ line に遺伝子全体のヘテロ欠失が存在することが明らかされた患者の血液と健常対照者血液を用いて、新たに考案した遺伝子コピー数推定法の検出能力を調べた。さらに、コピー数が正常であることが確認された標的配列にPCR用プライマーを設定し、long-range PCRで数千塩基対の遺伝子領域を一挙に増幅することにより、その範囲内の大領域欠失を検出する方法を考案した。

2. 我々は以前、多内分泌腺腫瘍症1型の原因となるミスセンス変異をもつ MEN1 遺伝子の

遺伝子産物メニンは正常メニンと比較して細胞内で不安定であり、急速にユビキチン化されて分解されることを示した。また、多内分泌腺腫瘍症1型の軽症型である家族性副甲状腺機能亢進症に見られるミスセンス変異をもつ変異メニンは、比較的安定であることを示した。今回は、解析する家族性副甲状腺機能亢進症の症例数を増やすとともに、孤発性副甲状腺腫瘍の患者の germ line に認められた変異も含めて、変異メニンの細胞内安定性の面から遺伝子型と表現型の相関を検討した。家族性副甲状腺機能亢進症および孤発性副甲状腺腫瘍の原因として過去に文献上で報告された MEN1 遺伝子のミスセンス変異又は1アミノ酸欠失変異をもつ遺伝子産物メニンを発現するプラスミドを作製した。各変異型メニンには Flag タグを付加した。培養細胞への導入効率を補正するための対照として、Myc タグを付加した正常メニンを発現するプラスミドを作製した。変異型メニンと正常型メニンを同時に培養細胞に導入し、各メニンタンパクの発現量、およびシクロヘキシミドによりタンパク合成を阻害した時のメニンの量をウエスタンブロット法とデンシトメトリーにより測定した。(倫理面への配慮)

研究計画書の倫理審査委員会による承認など、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行っている。

### C. 研究結果

1. 各標的配列をリアルタイム定量的 PCR で定量し、遺伝子欠失患者と健常対照者の標的配列コピー数を比較した。各測定値の偏差が大きいため、各サンプルを3回測定した平均を用いることにより、遺伝子周辺および遺伝子内の3カ所の標的配列において、欠失患者 DNA では健常者 DNA の約半量となる結果を得た。また、全長約8千塩基対に及ぶ MEN1 遺伝子全体をその両端から一挙に増幅するための long-range PCR の最適条件も確立した。

2. 正常メニンと正常多型として報告されているメニンの基礎発現量およびシクロヘキシミド添加時の発現量はほぼ同等であった。一方、完全型多内分泌腺腫瘍症1型の原因となるメニンは極度に不安定であることが多かったが、中には正常メニンに匹敵する安定性を示す変異メニンも見られた。一方、家族性副甲状腺機能亢進症や一見孤発性に発生する副甲状腺腫瘍など軽症型の原因となるミスセンスメニンは安定なものが多かったが、完全型と同様に極度の不安定性を示す変異も認められた。

### D. 考察

1. リアルタイム定量的 PCR を用いて特異的配列を有する DNA のコピー数を推定する試みは以前から行われてきた。しかし、この方法はばらつきが大きいいため、germ line の大領域欠失変異のように正常2コピーと欠失1コピーを確実に判別するには信頼性が低く、個別の症例の遺伝子診断を目的とした遺伝子解析への応用は困難と考えられてきた。しかし、陽性症例を用いた今回の検討では、臨床に応用できる精度を得られる可能性が示唆された。また、long-range PCR 法と組み合わせることにより、遺伝子内部の部分欠失も検出が可能になると考えられる。

2. ミスセンス変異型メニンの細胞内安定性は表現型と相関が認められた。しかし、多内分泌腺腫瘍症1型の完全型を来す変異であっても、正常メニンとほぼ同等の安定性を呈するものがあつた。この変異はメニンの分子機能上重要な役割をもつアミノ酸の置換である可能性がある。一方、文献上で軽症型の原因とされた変異メニンの中にも、極度に不安定なものがあつた。このような不安定メニンをもたらず変異が軽症型症例の germ line に同定された場合、予後不良の完全型の部分症状のみが出現している可能性が考えられる。

### E. 結論



1. 家族性腫瘍症候群の原因遺伝子の大領域欠失変異を検出する方法として、リアルタイム定量的PCR法とlong-range PCR法を組み合わせる方法を考案した。この方法は、多内分泌腺腫瘍症1型の遺伝子診断に応用できる。

なし

2. 多内分泌腺腫瘍症1型の原因遺伝子MEN1のミスセンス変異をもつ変異型遺伝子産物メニンの細胞内不安定性を定量化する方法を考案した。本法により、多内分泌腺腫瘍症1型の軽症型の亜型を鑑別できる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. Nature 446: 685-689, 2007

##### 2. 学会発表

1) 塚田俊彦、高橋真穂、永村優央子、矢口浩子、大倉永也、小原孝男、梶博史、船越顕博、大國智司 Usefulness and limitations of MEN1 mutation screening in the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. 第66回日本癌学会学術総会、2007

2) 大倉永也、矢口浩子、小野昌弘、坂口志文、塚田俊彦 Transcriptional control by Foxp3 and AML1/Runx1 in regulatory T cells. 第66回日本癌学会学術総会、2007

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

がんの転移や薬剤応答性を規定する分子を標的にした RNAi 治療の開発の研究

分担研究者 落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

研究要旨 がんの治療応用研究における RNAi 創薬の意義を追求するために、ヒト乳がん細胞や前立腺がん細胞の動物個体での転移イメージングモデルを用いて、乳がんのリンパ節転移に関与する分子の同定や、前立腺がんの骨転移を制御する non-coding smallRNA 分子を同定した。

#### A. 研究目的

がんの治療において、転移をどう制御するかは大きな課題である。本研究では臨床試料からがんの転移に関与するゲノム・遺伝子情報を解析し、*in vivo* イメージング解析技術を駆使した乳がんのリンパ節転移や前立腺がんの骨転移などの動物モデルを用いて、がんの転移を規定する分子の解明と治療方法を開発することにある。

#### B. 研究方法

乳がんや前立腺がんの転移を規定する分子の検索を、臨床試料の遺伝子発現情報から出発して、独自に開発したセルトランスフェクションアレイにより解析する。具体的には、転移にもなって発現の上昇する遺伝子群を選抜、それらの発現を抑制する siRNA を合成し、ヒト乳がん細胞や前立腺がん細胞の浸潤能を抑制する効果があるかどうかを判定する。次のステップでは抑制効果の認められた siRNA をアテロコラーゲンによるデリバリー技術を用いて動物に投与し、ヒトがんの転移モデル動物において腫瘍の転移（乳がんの腋下リンパ節転移や前立腺がんの骨転移など）の抑制効果をバイオフィotonクスによるイメージング技術によって解析することで、治療候補遺伝子としての有効性の評価を

行う。また特に前立腺がんの骨転移に関与する microRNA の同定に注力する。

（倫理面への配慮）

動物実験は、動物の愛護・福祉の精神のもとに、国立がんセンター動物倫理委員会の定める規定に従うものとする。

#### C. 研究結果

乳がんや前立腺がんの転移を規定する分子の検索を目的として、培養細胞を用いたセルトランスフェクションアレイのシステムを構築した。具体的には動物での転移能が高いヒトがん細胞株（乳がんの場合は MDA-MB-231-M、前立腺がんの場合は PC3-M）を入手し、バイオフィotonクスが可能なルシフェラーゼや GFP を発現する細胞株を樹立、それらを用いて、*in vitro* での siRNA や microRNA の導入の最適化や、浸潤能のアッセイ方法を確立した。同時に動物へこれらの細胞を移植して転移モデルを作製し、*in vivo* イメージングによる評価系を整えた。さらに、ヒト乳がん細胞のリンパ節転移を規定する分子として、Slug を同定し、この働きを siRNA で抑制することによって、動物個体におけるリンパ節転移を顕著に抑制した。また、ヒト前立腺がんの骨転移巣での増殖を強く抑制する働きを持つ microRNA を同定した。

#### D. 考察

乳がんの治療体系に於いて、全身の転移をどう制御するかは患者のQOLを大きく左右する要因であり、本研究により見いだされたSlug分子の役割や、この転写因子が支配する因子の同定は、リンパ節転移をコントロールする上で重要な知見となる。さらに前立腺がんの骨転移を制御する新たな標的としてmicroRNAを特定出来たことは、今後の治療方開発の上で新たな選択肢を増やすことにつながる。

#### E. 結論

がんにおいて重要な問題である転移に関与する分子をRNA干渉という新しい技術によって同定し、治療に有効であるかどうかを動物モデルで検討することは、転移に関与する新しい分子の同定、機能解析、治療への応用を考える上で重要な知見となる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeshita, F, Hokaiwado, N, Honma, K, Ochiya, T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotides therapy. In: *Methods in Molecular Biology*, In press.
- 2) Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, Ochiya T. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs*, In press
- 3) Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br. J. Haematol.* In press

- 4) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. In press
- 5) Tsuchihara K, Ogura T, Fujioka R, Fujii S, Kuga W, Saito M, Ochiya T, Ochiai A, Esumi H. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. *Cancer Sci*. In press
- 6) Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89: 687-696, 2007
- 7) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated drug discovery technology. *Expert Opin Drug Discov*, 2: 159-167, 2007
- 8) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc. Biomed. Optics and Med.* 9(27): 6868 OH, 2008
- 9) Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng.*, 14(2): 267-274, 2008.
- 10) Honma K, Miyata T, Ochiya T. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 7, 2007
- 11) Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev*

Dyn, 236:3228-3241, 2007

## 2. 学会発表

(海外)

1) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi Therapy SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited

2) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T. MicroRNA expression profile to define mouse liver development 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)

3) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. CYPs metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)

4) Ochiya T. RNAi-based anti-cancer strategy 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE)

5) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9. 2007 Seoul, Korea)

6) Takeshita F, Ochiya T. MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells. 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada)

7) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007

Indianapolis, USA.)

(国内)

1) 光イメージングによるがんのRNAi治療法の開発、落谷孝広(シンポジウム)、第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

2) がんの分子標的治療モデルにおける分子イメージングの実際、落谷孝広、第2回日本分子イメージング学会学術大会(2007.6.28-29 福井)

3) Efficacy of RNAi-based molecular target therapy against metastatic human breast cancer cells. Fumitaka Takeshita, Agnieszka Banas, Naomi Hokaiwado, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

4) MicroRNA therapy against bone metastasis of prostate cancer. Naomi Hokaiwado, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

5) MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. Yusuke Yamamoto, Fumiaki Koizumi, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

6) Genome-wide DNA methylation analysis of cancers. Izuho Hatada, Akira Sakurada, Masami Sato, Takashi Kondo, Akira Horii, Yusuke Yamamoto, Takahiro Ochiya, Riu Yamashita, Kenta Nakai, Katsumi Nakanishi, Ryo Matoba, Kenichi Matsubara 第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

7) RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Teruhiko Yoshida, Kasuto Nishio, Shunji Nagahara, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

8) Presence of multiple mechanisms in lymph node metastasis of esophageal cancers. Masayuki Sano, Fumitaka Takeshita, Kazuhiko