

200720037A

# 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19年度 総括・分担研究報告書 (I～III)

主任研究者 金子 安比古

平成20(2008)年 4月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

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	_____	1
金子 安比古		

## II. 分担研究報告書

1. 小児がんの発生機構の解明と予後予測に関する研究	_____	1 3
金子 安比古		
2. 小児がんのSNPアレイによるゲノム構造異常解析に関する研究	_____	1 7
新井 康仁		
3. 乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測に関する研究	_____	1 9
林 慎一		
4. 乳癌のSNPアレイによるゲノム構造異常解析と術前化学療法の 効果予測に関する研究	_____	2 4
武井 寛幸		
5. がん転移関連蛋白質 NM23 と相互作用する蛋白質の同定及び 機能解析とその臨床応用に関する研究	_____	2 7
角 純子		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	3 0
---------------------	-------	-----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷（別冊にて一部添付）

総括研究報告書

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** 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 *WT1*、*IGF2* (*WT2*)、*WTX*、*CTNMB1* 異常を分析した。ウィルムス腫瘍112例の *WT1* 遺伝子を分析し、38例 (33%) に *WT1* 異常を認めた。残り74例の *H19*-DMRのメチル化状態を分析し、31例 (28%) に *IGF2* の loss of imprinting (LOI)を、11例 (10%) に *IGF2* uniparental disomy (UPD)を、26例 (23%) に *IGF2* の retention of imprinting (ROI)を、6例にその他の異常を認めた。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を示唆した。これが日本人におけるウィルムス腫瘍の発生頻度が低い理由のひとつと考えられた。一方、*WT1* 異常型腫瘍38例の解析では、53%の腫瘍に *IGF2* のUPDかLOIがみられた。*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ことを示した。*WTX*、*CTNMB1* 異常の頻度は欧米と差がないようである。肝芽腫97例を対象にして、予後を予測可能な分子マーカーを検討した。*RASSF1A* メチル化が臨床的に有用な予後因子であることを示した。

肝芽腫38例のSNPアレイ解析では、1q, 2q, 8q, 20qの増加や4qの欠失を多く認めた。10例では *IGF2* 領域のUPDが生じていた。DNAコピー数やLOHの変化が観察されない一群 (10例) があり、肝芽腫のゲノム構造異常の多様性が示された。

近年乳癌の術前化学療法が行なわれるようになり、治療成績改善への寄与が期待されている。化学療法のレジメンとして、anthracycline、taxanに加え、HER2陽性乳癌にHerceptinを使用することでpCR (pathological complete response) rateが向上した。予後因子解析の結果、化学療法への反応、ER、HER2免疫染色陽性はすべて予後予測因子であった。しかしながら、HER2陽性であっても、約半数はHerceptinに反応しなかった。より正確な予後因子を確立するためにSNPアレイによる乳癌のゲノム異常の解析を開始した。*HER2* コピー数増加と免疫染色によるHER2陽性は必ずしも一致しなかった。一致しない理由や臨床データとの関連を今後検討したい。*HER2* 以外にも、有効な予後因子となる遺伝子異常をSNPアレイによるゲノム解析により特定し、臨床に応用したい。

乳癌のホルモン療法の治療効果予測法の確立を目指した研究を行った。ホルモン療法の効果予測のために開発したエストロゲン応答性3次元型マイクロアレイを用い、27例の乳癌検体の解析を行い、搭載遺伝子コンテンツの有用性を確認した。また、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持つGFPレポーター (ERE-GFP) を乳癌細胞に導入したレポーター細胞を用い、癌部間質のエストロゲン受容体 (ER) 活性化シグナルの評価を行い、さらにそれらの間質の関連する遺伝子の発現を検討した。また、同じレポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込み、乳癌検体の癌細胞に導入して、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。その結果、ERの発現とERの活性は完全に相関するものではないことが明らかとなった。さらに術前治療の生検標品のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較を開始した。

がん転移関連遺伝子 NM23 は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における NM23 の高発現は、

白血病細胞の生物学的特性 (分化抑制/増殖促進) やその臨床的特性 (予後不良) と関連する。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳癌では転移能抑制や予後良好と関連する。がん細胞の特性発現における NM23 の多彩な作用は、NM23 と相互作用する蛋白質の存在によると示唆されている。したがって、がん細胞の増殖/分化/転移と関連する NM23 結合蛋白質を同定し機能を解析する必要がある。NM23 結合蛋白質を探索することを糸口として、がん細胞の特性に関与する新しい分子標的の開発を目指している。NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索した。NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。抗体が入手できた 10 個および既知の NM23 結合蛋白質 10 個の抗体を用いて、白血病細胞 1 2 株と神経芽腫細胞 2 株での発現を Western blotting で検証した。白血病細胞を用いた免疫沈降と Western blotting にて 4 個 (HSC70, RAR  $\alpha$ , ROR  $\alpha$ , NM23-H2) の NM23 結合蛋白質を、また免疫沈降と質量解析にて 4 個 (S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2) の蛋白質を候補蛋白質として同定した。白血病細胞の特性に関連する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。今後、白血病臨床検体における発現を検証し、臨床的意義を検討する予定である。

#### 分担研究者

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. 新井 康仁 国立がんセンター研究所  
主任研究員
3. 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科  
教授
4. 武井 寛幸 埼玉県立がんセンター病院  
科長 兼 部長
5. 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

#### A. 研究目的

がんにおいては、ジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常の蓄積が発がんの過程に重要であり、がんの分子機構を解明して画期的治療へ結びつけるにはその解析が必須である。小児がんの SNP アレイによる分析の目的は、がんの生物学的特性を解明する上で重要な基盤の一つとなっている希少な小児がんに着目し、がんにおいて生じたゲノムの構造異常を、染色体 DNA の部分的コピー数の変化やヘテロ接合性の変化を網羅的に捕らえることによって明らかにし、ゲノム構造異常の視点からがんを整理、分別することである。これにより、腫瘍発生に密接に関連のあるゲノム構造異常領域を特定して発がんに関与する重要な遺伝子を明らかにすることが目標である。

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。ウイルス腫瘍は胎児性腫瘍なので、頻度差の原因として環境因子よりも遺伝学的因子が

重要であると考えられる。ウイルス腫瘍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* 異常はウイルス腫瘍の 15% にみられるに過ぎない。*IGF2* は 11p15 に位置し、父性発現する imprint 遺伝子である。また、第 2 ウイルス腫瘍 (*WT2*) 遺伝子の候補遺伝子である。ウイルス腫瘍では高率に *IGF2* の loss of imprinting (LOI) や uniparental disomy (UPD) により、*IGF2* の発現異常が生じていると欧米から報告されている。日欧の発生頻度差の理由として、欧米腫瘍の主な原因になっている *IGF2*-LOI や UPD が日本人腫瘍にはほとんどないからであるとする報告がある。さらに、2007 年に新しいウイルス腫瘍関連遺伝子 *WTX* が単離された。*WTX* はウイルス腫瘍で変異の報告されている *CTNNB1* 遺伝子と共に Wnt シグナル伝達系を担っている。日本人ウイルス腫瘍の *WT1*, *WTX*, *CTNNB1*, *IGF2* の 4 遺伝子の異常を分析し、欧米の報告と比較する。日欧間の発生頻度の差が、どのような遺伝子異常を背景にして生じているのかを明らかにする。

肝芽腫は小児の悪性肝腫瘍であるが、近年外科的手術と化学療法の進歩により予後は著しく改善した。しかし、現在でも 2~3 割の患者は悲惨な結末をたどる。更なる治療成績の向上の為には、治療開始前に、治療に対する反応を予測し、患者をリスクにより層別化して治療することが重要である。しかしながら、現在までに、予後を正確に反映する分子マーカーは知られていない。癌抑制遺伝子のメチル化を分析し、予後予測を可能にする分子マーカーを確立することが研究の目的である。

乳癌治療における術前化学療法は標準的治療法として

確立しつつあるが、その利点は以下の4つである。1) *in vivo* の感受性試験である。2) 縮小手術が可能となる(乳房温存率が向上)。3) 予後良好な症例を選別できる(効果のあったものは再発率が低い、特に *pathological complete response* (pCR) が得られた症例の予後は良好である。4) 術後投与と比べて生存率に差がない。以上の4つの術前化学療法の利点に基づいて、われわれは術後に化学療法が必要であると推察される患者にはできるだけ術前に化学療法を行うことを奨めている。化学療法が必要であると考えられる患者の特徴を以下に示す。1) ホルモンレセプター陰性。2) HER2 陽性。3) 腫瘍浸潤径2.1cm以上。4) リンパ管転移陽性。5) 腫瘍グレード2または3。6) リンパ管侵襲陽性。7) 35歳未満。これら7つの因子を総合的に考慮して決定する。一方、術前化学療法の欠点として、効果がなかった場合、手術が遅れることである。したがって、化学療法の効果予測因子が重要となる。そこで、われわれは化学療法前に腫瘍組織を生検し、SNP アレイによりゲノム解析を行い、術前化学療法の効果と関連性を検討し、化学療法の反応を予知することを研究の目的としている。

乳癌の臨床において広範に施行されている内分泌治療は、乳癌の3分の2以上を占めるER陽性乳癌の増殖に必須である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る。その治療法は近年、LH-RH アゴニストや第3世代のアロマトターゼ阻害剤 (AI) 等の新規薬剤の登場によって急速に進歩している。しかし、これらの薬剤の適応を決める確実な分子指標はまだなく、従来通りERの発現の有無を指標にして判断されているが、それだけでは不十分であることは明らかである。さらに、これらの薬剤は乳癌の化学予防薬としても期待されているが、そのためには乳癌の高危険度集団を同定するための低侵襲で、高感度な検診法が求められている。そこで新規分子診断法を開発し、個々の薬剤によってベネフィットが得られる患者を特定することによって、患者にとってQOLの良い内分泌治療のいっそうの普及と乳癌患者の癌再発防止に貢献することを目的とする。これは将来の乳癌の発癌予防に向けての重要なステップになると考える。

がん転移関連遺伝子 *NM23* は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における *NM23* の高発現は、白血病細胞の生物学的特性(分化抑制/増殖促進)やその臨床的特性(予後不良)と関連する。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳癌では転移能抑制や予後良好

と関連する。がん細胞の特性発現における *NM23* の多彩な作用は、*NM23* と相互作用する蛋白質の存在によると示唆されている。したがって、腫瘍細胞の増殖/分化/転移各々と関連する *NM23* 結合蛋白質を同定し機能を解析する必要がある。*NM23* と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関与する新しい分子標的の開発を目指している。

## B. 研究方法

ウイルス腫瘍と肝芽腫を対象にして SNP アレイ解析を行った。単離したゲノムDNAを高密度 SNP アレイ (*Affymetrix mapping 50K-Xba array*) にハイブリダイズして、アレイ CGH 解析と LOH 解析を行った。腫瘍部 DNA に加えて正常組織 DNA を用いることが可能であった検体については、ペア解析を行い、相同染色体のアレル別コピー数異常(染色体の増加、欠失)を推定した。他は、非自己コントロールを用いて解析した。これらの結果をこれまでの染色体分析や *WT1* 変異解析などの結果と照らし合わせて比較した。

ウイルス腫瘍112例について、CGH と SNP アレイ解析を行い染色体異常の有無を調べた。次に、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 解析を実施した。次に *WT1* 異常をサザン法および全エクソンの塩基配列決定法で分析した。また、*IGF2* エクソン9の多型を利用して、RT-PCR による LOI 解析を実施した。これとは別に *H19-DMR CTCF6* 領域の COBRA 解析を行い、*IGF2* の状態が LOI か retention of imprinting (ROI) かどうかを決定した。*WTX* 遺伝子異常を DNA の定量的 PCR 法 (qPCR)、FISH 法、塩基配列決定法で分析した。*CTNBN1* 変異を塩基配列決定法で分析した。*WT1* 異常のあるウイルス腫瘍38例を対象にして、*IGF2* 異常を調べた。RNA が分析可能な腫瘍については、定量的 (q) RT-PCR 法を用いて、*IGF2*、*H19* および *WT1* の mRNA 発現量を測定した。

肝芽腫38例を対象にして、SNP アレイを用いて染色体の増減や UPD 領域を分析した。これとは別に、肝芽腫20例を対象にして13種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析した。メチル化を示した3遺伝子について97例の肝芽腫を対象にしてメチル化分析を MSP 法により実施し、予後との関係を調べた。予後との関連がみられた *RASSF1A* のメチル化を新たに qPCR 法により分析した。また肝芽腫97例を対象にして *CTNBN1* 変異を塩基配列決定法で分析した。*RASSF1A* と *CTNBN1*

変異に他の臨床的予後因子を加え、生存期間に関する多変量解析を実施した。

現時点における乳癌の術前化学療法の病理学的抗腫瘍効果と予後因子（化学療法レジメン、ホルモンレセプター、HER2 免疫染色）の関係について検討した。対象は埼玉県立がんセンター病院で 2005 年以降に術前化学療法を受けた浸潤性乳癌 125 症例である。さらに、病理学的抗腫瘍効果およびその効果予後因子の予後への影響についても検討した。対象は同病院で 2005 年までに術前化学療法を受けた浸潤性乳癌 76 症例である。また、術前化学療法が必要な患者で腫瘍と末梢血が得られた 7 例について SNP アレイ(Affymetrix mapping 50K-Xba array)を用いてゲノム異常の解析を行った。

原発乳癌 27 例を対象にして実施したエストロゲン応答性 3 次元マイクロアレイチップ解析結果をまとめ、臨床病理学的情報と比較検討し、その搭載遺伝子セットの有用性を確認する。今後、現在進行中の術前ホルモン療法の多施設間臨床試験の中で、治療前生検標品と治療後手術標品を用いてそれら候補遺伝子の有用性について検討する。その結果、より少数の遺伝子セットでも有効な判定が可能であるとの結果が得られれば、より臨床応用の点で実用的な multiplex RT-PCR 法を候補遺伝子プロファイリングに採用する方向で検討する。ERE-GFP を ER 陽性乳癌細胞に安定導入して作成した指示細胞を患者組織より得た癌部の初代細胞と共生培養し、蛍光を観察、定量することにより個々の乳癌患者の癌の特性（エストロゲン環境に対する反応性）を把握する。特に術前アロマターゼ阻害剤治療の効果を判定し、治療奏効性との比較を行う。ERE-GFP を導入したアデノウイルスを用いて、原発腫瘍による ER 活性化能の評価法を確立する。これにより個々の患者のエストロゲンシグナルを総合的に評価でき、従来の ER の免疫染色法による評価に勝る結果が期待できる。

がん細胞の特性に結びつく分子の開発手段として、がん細胞の特性に関して多機能性を発揮する NM23 蛋白質への結合を指標として機能特異的な分子を探索する。免疫学的、生化学的、およびプロテオミックスの手法を用いた下記の 4 方法にて行う。1) NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索する。2) 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、Western blotting 法にて候補蛋白質の共沈降を検証する。3) 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降

法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、質量解析にて蛋白質を同定する。4) Pull-Down GST-NM23 Protein : Protein Interaction 法により、細胞抽出液および粗精製血清/腹水を用いて、NM23 結合蛋白質を分離精製し、質量解析にて蛋白質を同定する。

（倫理面への配慮）

ウイルス腫瘍と肝芽腫検体を研究に使用することについて、親よりインフォームドコンセントを得た。乳癌や白血病の検体は本人の同意を得て研究に使用した。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。この研究は胚細胞遺伝子変異分析を含まない。研究計画を埼玉県立がんセンター倫理委員会に提出し、研究の実施についての承認を得た。本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って実施した。

### C. 研究結果

ウイルス腫瘍 112 例を分析し、38 例 (33%) に *WT1* 異常を検出した。残り 74 例を、*IGF2* UPD を示す 11 例 (10%)、*IGF2* LOI を示す 31 例 (28%)、retention of imprinting (ROI) を示す 26 例 (23%)、その他の異常を示す 6 例 (5%) に分類した。LOI 型腫瘍 12 例と ROI 型腫瘍 12 例を qRT-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。

*WT1* 異常を認めた 38 例をサザン法と SNP アレイにより分析し、14 例に *WT1* (11p13) と *IGF2* (11p15) を含む UPD, 3 例に *IGF2* (11p15) を含む染色体末端部に限局した UPD を同定した。11p15 領域がヘテロ接合性を示す 20 例中、*IGF2*-LOI を 2 例に、*IGF2*-ROI を 17 例に認めた。残り 1 例は -11 を示した。一方、*WTX* 異常を 112 例中 14 例 (13%) に、*CTNNB1* 変異を 26 例 (23%) に認めた。*WT1* 異常を示す腫瘍に *WTX* 異常または *CTNNB1* 変異のどちらかのみはみられたが、*WTX* と *CTNNB1* の両異常が同時にはみられなかった。この関係は *WT1* 異常のない腫瘍においても同様に観察された。*WT1* 異常を示す 38 例における他の染色体領域の DNA 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, 8p, 19q, 20 の増加が低頻度に観察された。UPD は、3p, 8q, 17q, 18q などに観察された。

肝芽腫 38 例の SNP アレイ解析では、1q, 2q, 8q, 20q の増加や 4q の欠失を多く認めた。その中の 10 例では、ウイルス腫瘍と同様に *IGF2* 領域の UPD を生じていた。DNA コピー数や UPD の変化が観察されない一群 (10 例)

があり、肝芽腫のゲノム構造異常の多様性が示された。

肝芽腫20例を対象にして13種類の癌抑制遺伝子のメチル化をMSP法により分析し、3遺伝子 (*RASSF1A*、*SOCS1*、*CASP8*) のメチル化をそれぞれ、30.9%、33.0%、15.5%に認めた。単因子解析の結果、*RASSF1A* のみが、予後と相関した。*RASSF1A* の定量的MSP法による解析の結果、97例中43例 (44.3%) にメチル化を認めた。97例中65例 (67%) に *CTNNB1* の点変異ないし欠失を認めた。単因子解析の結果予後と相関する6因子 (年齢、組織型、病期、化学療法に対する反応、*CTNNB1* 変異、*RASSF1A* メチル化) を決めた。これを用いて多変量解析を実施したところ、病期 ( $P=0.002$ ; relative risk (RR) 7.67) と *RASSF1A* メチル化 ( $P=0.043$ ; RR 9.39) はいずれも独立した予後予測因子であることが分かったが、*CTNNB1* 変異は独立した予後予測因子ではなかった。

化学療法のレジメンを以下の3群に分類した。Anthracycline と Taxan を使用 (AT)、Taxan と Herceptin を使用 (TH)、Anthracycline、Taxan、および Herceptin を使用 (ATH)。pCR rate は、AT : 25%、TH : 44%、ATH : 58%であり、Anthracycline および Herceptin を併用することで pCR rate は向上した。エストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) それぞれにおける pCR rate は、ER 陽性 : 19%、ER 陰性 : 49%、PR 陽性 : 9%、PR 陰性 : 45%であり、ホルモンレセプター陰性症例で pCR rate は高かった。HER2 発現による pCR rate は、HER2 0 : 20%、1+ : 33%、2+ : 35%、3+ : 55%であり、HER2 が高発現するにつれて pCR rate は高くなった。ER と HER2 の組み合わせによる pCR rate は、ER-PR- : 43%、ER-HER2+ : 56%、ER+HER2- : 21%、ER+HER2+ : 18%であり、ER-HER2+ の組み合わせが最も pCR rate が高かった (ここでは HER2+ = 2+ または 3+、HER2- = 0 または 1+ に分類した)。以上より、ER、PR、HER2 は化学療法効果予測因子と考えられた。次に、病理学的抗腫瘍効果とその効果予測因子である ER と HER2 の無再発生存率へ及ぼす影響を検討した。無再発生存率は Kaplan-Meier により算出し、log-rank test による有意差検定を行った。病理学的抗腫瘍効果を pCR (Grade 3)、Grade 2、Grade 0-1 に分類すると、pCR が得られた症例の無再発生存率は Grade 2 または Grade 1 に比べ良好な傾向を示した。さらに、Grade 2 は Grade 0-1 に比べ無再発生存率が良好な傾向を示した。一方、ER 陽性症例は ER 陰性症例に比べ無再発生存率が良好な傾向を示し ( $P=0.07$ )、HER2 陽性症例は HER2 陰性症例に比べ無再

発生存率が良好であった ( $P=0.043$ )。

乳癌の化学療法前に針生検により腫瘍の得られた7例につき、SNP アレイによるゲノム増減の解析を行った。3例以上に共通した染色体増加領域は1q, 3q, 6q, 7q, 8q, 13q21-qter, 16q, 17q, 20q, 21q, 22q であり、3例以上に共通した染色体欠失領域は3p, 8p, 13q11-q21, 15q, 17p であった。*HER2* (17q21.1) 領域の増加は4例にみられた。一方、7例の *HER2* 免疫染色の結果、6例が陽性であった。この6例中、*HER2* 増加は4例にみられたが、2例の *HER2* コピー数は正常であった。この2例では、遺伝子増加以外の機構で *HER2* 蛋白発現が増加していると考えられた。ゲノム減少領域では *BRCA1* (13q12) と *TP53* (17p13) 欠失がそれぞれ3例にみられ残存アレルにそれぞれの遺伝子の変異が生じている可能性が考えられた。

林等が開発したエストロゲン応答遺伝子とその関連遺伝子36個を搭載した3Dマイクロアレイを用いて原発乳癌患者27例の手術検体を解析したところ、そのクラスター解析から患者群が高発現群Aグループと低発現群Bグループの2群に分けられることが明らかとなった。その2群はER発現の有無とは有意な正の相関を示したが、完全には一致しなかった。また、病期やHER2 (逆相関) とも相関を示した。また、これらの患者の中から3例の再発症例が観察されたが、そのうち1例はER陽性患者で、2例がER陰性患者であったが、アレイ解析による分類では3例とも低発現群に属していた (論文準備中)。

次に、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを導入した ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7E10 を用いて乳癌手術材料から得た間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した結果、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、その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関が見られることを明らかにした (Yamaguchi et al. Cancer Res. 2005)。そこで、これらの間質の分類、層別化が間質繊維芽細胞の分化と関係する遺伝子の発現をみることで可能かどうかを検討している。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他の因子も分泌され、重要であることを明らかにした (論文準備中)。

ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、手術標品から作成した初代培養細胞に導入して ER 活性化能を評価する系を作成した。これによって個々の症例の原発腫瘍細胞での癌微小環境も含めた ER シグナル系の評価が可能になった。上記の E10 細胞の系とこの

ウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、ほぼ乳癌と同様の結果が得られ、子宮においても癌周囲の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対し AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった (in press)。このウイルスアッセイ系を用いて乳癌の症例約 60 例について検討を行った。その結果、本アッセイ系で解析した ER 活性はその検体の免疫染色法によって検出した ER タンパクの発現とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。しかも HER2 との興味深い相関が観察された (論文準備中)。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、このウイルスアッセイ系で ER 活性を解析したところ、治療後再発にもかかわらず、ER 活性が存在し、in vitro で抗エストロゲン剤が有用なケースがあることが明らかとなった。

NM23 蛋白質への結合を指標として免疫学的、生化学的、およびプロテオミックスの手法により、機能特異的な分子を探索した。1) NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索した。NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。2) 上記 21 の内 10 個について抗体が入手できた。また、既知の NM23 結合蛋白質 10 個についての抗体も入手した。合計 20 抗体を用いて、白血病細胞 12 株 (骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞 6 株) と神経芽腫細胞 2 株で、これら 20 抗原の発現を Western blotting で確認した。3) 白血病細胞中での結合を検証する目的で、NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いた免疫共沈降実験にて共沈降する蛋白質を上記 20 抗体を用いた Western blotting で解析した。NM23-H1 を高発現している白血病細胞において HSC70, RAR  $\alpha$ , ROR  $\alpha$ , NM23-H2 が NM23-H1 と特異的に共沈降した。白血病細胞の分化増殖におけるこれらの蛋白質の動態や機能を解析中である。4) NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いて、共沈降した蛋白質を分離精製し、質量解析した結果、S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2 蛋白質を同定した。前述の白血病細胞 12 株での発現を Western blotting で検証中である。5) Pull-Down GST-NM23 Protein: Protein Interaction 法により、ヒト正常血清中の NM23-H1 結合蛋白質 (27kDa) を見出した。今後、質量解析にて蛋白質を同定する予定である。

## D. 考察

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

ウィルム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、日本人ウィルムス腫瘍患者を対象に *WT1* 異常分析と *IGF2* の発現異常分析を SNP アレイなどにより実施した。112 例中 38 例 (34%) に *WT1* 異常を認め、この頻度は欧米の頻度 15% より高かった。しかし、日本人の発生頻度が 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。

これまで、*IGF2*-LOI 分析は RT-PCR によるアレル発現解析により実施されてきた。今回の COBRA 法を併用した解析で *IGF2*-LOI を示す腫瘍を 31 例 (28%) に認めた。qRT-PCR による *IGF2* と *H19* mRNA 発現量の定量から、*IGF2* LOI や UPD を示す腫瘍では *IGF2* ROI を示す腫瘍より、*IGF2* mRNA の発現量は高く、反対に *H19* mRNA の発現量は低かった。従来の RT-PCR によるアレル発現解析では *IGF2*-LOI の頻度は 30~70% と報告されているので、今回の日本人における *IGF2*-LOI 型腫瘍の頻度はやや低いと言える。さらに、日本人のウィルム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 *IGF2*-LOI 発生頻度は欧米の半分以下になる。日本人のウィルムス腫瘍には *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。

*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 38 例を分析したところ、14 例 (37%) に 11p13-11p15 を含む UPD を、3 例 (6%) に 11p15 に限局した UPD を認めた。また LOI を示す腫瘍が 3 例 (9%) にみられた。残り 18 例 (53%) は ROI を示した。11p13-11p15 UPD 型腫瘍では同一の *WT1* 変異が両アレルに認められたので、*WT1* 変異が第 1 イベントであり、UPD は第 2 イベントと考えられる。これに対して 11p15 限局型 UPD か *IGF2*-LOI を示す腫瘍では、*WT1* 異常が第 1 イベントになる場合と第 2 イベントになる場合の両方の可能性が考えられる。いずれにしても、*WT1* 異常型腫瘍の 53% に *IGF2* の過剰発現が生じていると予想された。実際、qRT-PCR により分析すると、*IGF2* UPD または LOI



型腫瘍は、*IGF2* ROI 型腫瘍に比べて *IGF2* mRNA 量が高いことが証明された。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。*WT1* 異常型腫瘍38例を *WT1* 異常の種類により、欠失群13例、変異群13例、欠失+変異群12例に分類できた。qRT-PCRにより *WT1* mRNA を分析すると、欠失群の *WT1* mRNA は、一般に低下していたが、変異群と欠失+変異群の中には高値を示す腫瘍がみられた。変異群と欠失+変異群の *WT1* mRNA の塩基配列分析の結果、*WT1* 変異が確認されたので、変異型 *WT1* mRNA 発現が証明されたことになる。112例の分析で *WTX* 異常を14例(13%)に、*CTNNB1* 変異を26例(23%)に認めた。*WT1* 異常群においても、*WT1* 正常群においても、*WTX* 異常単独、または *CTNNB1* 変異単独で生じることがあるが、*WTX* と *CTNNB1* の異常は同時に生じることがなかった。*WTX* と *CTNNB1* は共に Wnt シグナル伝達系の蛋白質をコードしているので、どちらかに異常が生じれば Wnt シグナル伝達系の活性を上昇させると考えられた。

肝芽腫においても高頻度に *IGF2* の UPD を認めた。この UPD においては、インプリンティングにより *IGF2* の発現が抑制されている母方アレルが欠失し、*IGF2* が発現している父方アレルが倍化することにより *IGF2* が過剰発現していることが推察される。つまりウイルス腫瘍だけでなく、肝芽腫においても *IGF2* の過剰発現が腫瘍の発生・進展に重要な要因だと考えられた。DNA コピー数や UPD が観察されない肝芽腫の一群については、エピジェネティックな遺伝子異常が生じている可能性がある。今後、現時点で判明しているこれらの効果予測因子に加え、さらに有効な因子となる遺伝子を SNP アレイによるゲノム解析により、特定したいと考えている。

肝芽腫の予後を予測できる分子マーカーを検討し、*RASSF1A* のメチル化が病期に次ぐ重要な予後因子であることを証明した。近年、肝芽腫の治療成績は著しく改善しているが、進行期例や遠隔転移例の予後は依然として不良であり、術前化学療法により down staging して完全切除に持ち込めるかどうかを治癒させるためには最も重要である。*RASSF1A* のメチル化は術前化学療法の効果予測に役立つので、臨床的に極めて有用である。今後、プロスペクティブに肝芽腫の *RASSF1A* メチル化を調べ、その有用性が確認できれば、治療研究の層別化に利用できるのではないかと期待している。

これまで、術前化学療法を実施した患者の予後因子を分析したところ、HER2 陽性、ER 陰性、PR 陰性がそれ

ぞれ予後良好因子であった。しかしながら、HER2 免疫染色陽性であっても約半数は Herceptin 治療に反応していない。一方、HER2 免疫染色の陽性例には *HER2* コピー数増加を示す腫瘍と *HER2* コピー数正常の腫瘍がみられた。今後、多数例について HER2 免疫染色、コピー数、Herceptin 治療効果について検討し、三者の関係を明らかにしたい。一方、乳癌の発生、進展に重要な *BRCA2* と *TP53* 癌抑制遺伝子を含む領域に欠失を示す腫瘍が7例中3例にみられた。残存アレルに点変異が生じているのかどうか今後検討したい。SNP アレイによるゲノム解析により、術前化学療法の予知に役立つ遺伝子異常を特定したいと考えている。

我々はこれまで、癌細胞におけるエストロゲンの作用の分子機序を解明する一助とするため、エストロゲン応答遺伝子を搭載した、エストロゲン応答マイクロアレイチップを開発し、様々な研究を行ってきた。その中で、*HDAC6* や *EGR3* などいくつかの遺伝子については実際に乳癌の予後と相関することを示した。そこでさらに、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子測診断を可能にする DNA チップの開発を目指した。今回用いた新型のマイクロアレイ装置である3次元型アレイチップを導入は、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床に実際に導入可能なシステムとなるかもしれない。試験的に本装置を用いて約27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、搭載コンテンツの有用性が示された。また、現在臨床的に用いられている ER の発現の有無との関連を検討したところ、相関は示したが、完全な一致ではなかった。さらに3名の再発患者の全員がアレイ解析の低発現グループに属していた。ちなみに3名のうち2名が ER 陰性患者、1名が陽性患者であった。人数も少なく、また、ホルモン療法の奏効性をみているわけではないが、興味深い結果と思われる。一方、このような検討を重ね、最小限の遺伝子セットの候補遺伝子が絞られれば、マイクロアレイでなく、より実用化しやすい RT-PCR での診断キット化も可能かもしれない。今後この点についても検討していく。また、このような RNA レベルの発現解析は実際に臨床に導入するには問題点も多く、短期の実用化を目指すなら他の手法、たとえばすでに確立している免疫染色法などに乗せていく方が良いかもしれない。これについても今後 Tissue アレイ等を用いて検討していきたい。

一方、近年臨床で広く用いられるようになった第3世

代のアロマトーゼ阻害剤は特に癌細胞周囲の間質組織に存在するエストロゲンを産生する酵素、アロマトーゼを標的としており、癌細胞へのエストロゲンの供給を遮断する治療である。そこで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となる。そこでエストロゲンシグナルに応答して蛍光を発する 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を目指した研究を行っている。乳癌手術材料から得た間質細胞とこの GFP レポーター細胞を共培養することによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることが示された。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、アデノウイルスベクターを用いて同じレポーターカセットを患者検体から得た癌細胞に導入して ER 活性を評価する系を開発した。現在この系を用いて乳癌手術検体の検討を進めている。これまでに本システムでアッセイした ER 活性は ER の発現とは相関するもの一致はしないことが観察されている。また、上記の GFP 指示細胞の系とこのウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、子宮においても癌周囲の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対し AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。従来、乳癌で広範に使われてきた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もあり、内膜癌に対するホルモン療法は進行癌に対する MPA 大量療法以外はほとんど行われていなかったが、我々の結果から、症例を限れば、第3世代の強力なアロマトーゼ阻害剤 (AI) は内膜癌の治療に効果があるかもしれない。

最近、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 剤治療後の再発が報告さ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再発症例について、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 AI 剤が効果を示さないにもかかわらず、ER 活性の高い症例が存在すること、そこにいくつかの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。今後さらに例数を増やして検討する必要があるが、AI 耐性機序の解明と、再発後の治療選択に役立つ結果が得られるものと思われる。このような観察結果も踏まえ、*in vitro* での研究を行うため、ERE 活性を保持している AI 耐性乳癌細胞株の作成を試みている。

白血病細胞抽出液を用いて NM23 結合蛋白質の分離同

定を目指し、いくつかの候補蛋白質を同定できた。NM23 は、多機能性である。白血病での NM23 高発現は、分化抑制/増殖促進を誘導し、予後不良と関連する。この機能に作用する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。白血病臨床検体における発現を検証し、臨床的意義を検討する。さらに、白血病予後不良患者で高濃度発現している血清 NM23 蛋白質と特異的に結合している蛋白質の同定およびその機能 (白血病細胞増殖促進活性) との関連解析へと展開する予定である。白血病における増殖/分化や予後不良に関する新しい診断・治療の分子標的の開発が期待できる。

## E. 結論

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、ウイルス腫瘍 112 例の *WT1*, *IGF2*, *WTX*, *CTNBN1* 異常を分析した。その結果、*WT1* 異常群を 33% に、*IGF2*-UPD を 10% に、*IGF2*-LOI を 28% に、*WT1* と *IGF2* の異常のない腫瘍が 29% に認められた。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* 異常の発生頻度は日欧で同程度であり、*IGF2*-LOI の日本の頻度は欧米の 1/2 以下であると考えられる。*WTX* と *CTNBN1* 異常の頻度は日欧間で差を認めなかった。欧米人に比べて日本人のウイルス腫瘍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。*WT1* 異常型腫瘍の SNP アレイ解析によりその半数では発生・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。一方、肝芽腫のゲノム異常を SNP アレイ解析により検出し、候補癌遺伝子、癌抑制遺伝子の位置する染色体領域を同定した。また、肝芽腫において予後予測に *RASSF1A* メチル化が有用であることを示した。今後、治療研究の層別化に利用したい。

乳癌化学療法のレジメンとして、anthracycline, taxan に加え、HER2 陽性乳癌に Herceptin を使用することで pCR rate が向上した。予後因子解析の結果、ホルモンレセプターと *HER2* 発現が術前化学療法の効果予測因子であった。しかしながら、HER2 陽性腫瘍の約半数は Herceptin 投与に対して反応を示さなかった。一方、HER2 免疫染色陽性であっても *HER2* コピー数が正常な腫瘍があり、今後、HER2 免疫染色、コピー数、Herceptin 治療効果の関係について検討が必要である。

乳癌のエストロゲン応答遺伝子群を搭載した 3 次元型

DNA マイクロアレイを用いた解析から *HDAC6* や *EGR3* など、これまでの研究で同定してきた候補遺伝子群の有用性が確認された。実用的なホルモン療法応答性予測診断法としてどのような解析手法にしていくかが今後の課題である。また、癌細胞周囲の間質も含めたエストロゲンシグナルの癌微小環境評価を行うことでホルモン療法の奏効性をより正確に把握することを目指したアッセイシステムを、指示細胞を用いる系とアデノウイルスを用いる系の2つを開発し、それを用いて乳癌検体と子宮内膜癌検体での検討を行った。特に子宮内膜癌へのホルモン療法の可能性が示されたことは興味深い。乳癌においても ER 活性を見ることは単純に ER の発現を判定することとは違った意味を持つことが示された。この点は重要であるので今後の詳細な検討が必要である。さらに乳癌再発検体を用いた解析から本アッセイシステムを用いることで AI 耐性機序解明と AI 剤再発後の治療選択に有益な情報を得ることが出来ると思われた。

NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索して、NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。抗体が入手できた 10 個および既知の NM23 結合蛋白質 10 個の抗体を用いて、白血病細胞 12 株（骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞株 6 株）での発現を Western blotting で検証した。白血病細胞を用いた免疫沈降と Western blotting にて 4 個（HSC70, RAR  $\alpha$ , ROR  $\alpha$ , NM23-H2）の NM23 結合蛋白質を、また免疫沈降と質量解析にて 4 個（S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2）の蛋白質を候補蛋白質として同定した。白血病細胞の特性に関連する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
- 2) Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A. and Kaneko, Y. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood & Cancer*, 49: 240-249, 2007.
- 3) Watanabe, N., Haruta, M., Soejima, H., Fukushi, D., Yokomori, K., Nakadate, H., Okita, H., Hata, JI., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of the paternal *IGF2* allele in trisomy 11 and elevated expression levels of *IGF2* mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type. *Genes Chromosomes Cancer*, 46: 929-935, 2007.
- 4) Tomioka, N., Oba, S., Ohira, M., Misra, A., Fridlyand, J., Ishii, S., Nakamura, Y., Isogai, E., Hirata, T., Yoshida, Y., Todo, S., Kaneko, Y., Albertson, DG, Pinkel, D., Feuerstein, BG and Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
- 5) Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S. and Kaneko, Y. The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer*, in press, (2008)
- 6) Haruta, M., Matsumoto, Y., Izumi, H., Watanabe, N., Fukuzawa, M., Matsuura, S. and Kaneko, Y. Combined *BubR1* protein down-regulation and *RASSF1A* hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol Carcinog*, in press, (2008)
- 7) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* in press, (2008)
- 8) 金子安比古: 細胞遺伝学. 新小児がんの診断と治療. 別所文雄, 杉本徹, 横森欣司編, 診断と治療社 25-30, 2007.
- 9) 金子安比古: Wilms 腫瘍の分子生物学. 特集: 小児固形腫瘍の分子生物学. 最新の知見, 小児外科, 39: 1348-1352, 2007.
- 10) Nagayama, K., Kohno, T., Sato, M., Arai, Y., Minna, JD. and Yokota, J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chrom Cancer*, 46: 1000-1010, 2007.

- 11) Li, X-L., Arai, Y., Harada, H., Shima, Y., Yoshida, H., Rokudai, S., Kimura, A. and Kitabayashi, I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene*, 26: 7231-7239, 2007.
- 12) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57: 103-108, 2007.
- 13) Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H. and Yaegashi, N. Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
- 14) 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*, 21, 741-752, 2007.
- 15) Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K. and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor  $\alpha$  gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 106-114, 2007.
- 16) 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.*, 67(8), April, 3945-3954, 2007.
- 17) Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya T., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. Early growth responsive gene 3 (EGR3) in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 279-292, 2007.
- 18) Mita, K., Zhang, Z., Ando, Y., Toyama, T., Hamaguchi, M., Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwase, H. and Yamashita, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 expression in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 37(8), 575-582, 2007.
- 19) Tanabe, K., Utsunomiya, H., Tamura, M., Niikura, H., Takano, T., Yoshinaga, K., Nagase, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Hayashi, S. and Yaegashi, N. The expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, in press, (2008)
- 20) Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, in press, (2008)
- 21) Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S. and Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.* in press, (2008)
- 22) 松本光代、畠山篤、坂本宙子、山口ゆり、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3次元マイクロアレイ-乳癌の診断と治療効果予測への臨床応用を目指して。東北大学医学部保健学科紀要, 16(1): 19-25, 2007.
- 23) 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.
- 24) 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, Vol. 65, 148-153, 2007.
- 25) 林 慎一：ホルモン療法奏効メカニズムと治療効果。医学のあゆみ, Vol. 221, No.2, 140-143, 2007.
- 26) 林 慎一：乳癌とエストロゲン受容体、コレグレート。最新医学, 特集・内分泌代謝疾患と核内受容体, Vol. 62, No.10, 47-54, 2007.
- 27) Kono, S., Kurosumi, M., Simooka, H., Kawanowa, K., Takei, H. and Suemasu, K. Nipple adenoma found in a mastectomy specimen: Report of a case with special regard to the proliferation pattern. *Breast Ca.*, 14(2) : 234-238, 2007.
- 28) Kurosumi, M. and Takei, H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Ca.*, 14(4) : 342-349, 2007
- 29) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Hagiwara, Y., Kamimura, M., Hayashi, Y., Tozuka, K., Suemasu, K., Inoue, K. and Tabei, T. Current trends of sentinel lymph node biopsy for breast cancer — A surgeon's perspective. *Breast Ca.*, 14(4) : 362-370, 2007

- 30) Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, Kinoshita T, Takei H, Takahashi K, Ikeda M, Nakashima K. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast*, 16, Suppl 2:S72-77, 2007.
- 31) Takei H, Suemasu, K. Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Koh, J., Sato, K., Tsuda, H., Kurosumi, M. and Tabei, T. Multicenter phase II trial of neoadjuvant exemestane for postmenopausal patients with hormone receptor-positive, operable breast cancer: Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-03). *Breast Ca. Res. Treat*, 107: 87-94, 2008
- 32) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Focus on Neuroblastoma Research* (Editor:Julio A. Fernandes, pp.85-97, 2007.
2. 学会発表
- 1) 金子安比古, 春田雅之、新井康仁、菅原和華、渡辺直樹、中館尚也、大喜多肇、秦順一、福澤正洋. *WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19-DMR* 分析により証明された *WT1* 変異型 Wilms 腫瘍の不均一性. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2007.10.
- 2) 金子安比古, 春田雅之、他 : *WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19-DMR* 分析により証明された *WT1* 異常型 Wilms 腫瘍の遺伝学的、臨床的不均一性. 第 52 回人類遺伝学会 (東京), 2007.9.
- 3) 金子安比古 : Spontaneous regression of neuroblastoma and the mass screening program at 6 months of age. 第 1 回依存性受容体研究会および第 10 回神経芽腫研究会合同会議 (東京), 2007.10.
- 4) 新井康仁, 柴田龍弘 他 : Homozygous deletion mapping in gastric cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2007.
- 5) 林 慎一 : 核内レセプターを標的としたホルモン依存性癌の診断と治療の展開. シンポジウム「核内レセプターの機能と治療への応用」, 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
- 6) 林 慎一 : ホルモン療法適応群の個別化の基礎研究. ワークショップ「癌治療の個別化と分子マーカー (乳腺)」, 第 45 回日本癌治療学会総会 (京都), 2007.
- 7) 林 慎一 : アロマトーゼ阻害剤併用性乳がんの治療戦略—基礎からのアプローチ、エストロゲンシグナル経路の変化. ランチョンセミナー38, 第 45 回日本癌治療学会総会 (京都), 2007.
- 8) 林 慎一 : エストロゲンと乳癌. 特別講演 II, 第 4 回北関東乳腺臨床腫瘍研究会 (大宮), 2007.
- 9) 林 慎一 : 乳癌内分泌療法におけるトランスレシヨナルリサーチ—エストロゲン依存性乳癌の個性と治療選択—. 10<sup>th</sup> Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting (神戸), 2007.
- 10) 林 慎一 : AI 再発に対する治療選択の基礎—エストロゲンシグナル経路の変化—. *Kyushu Breast Cancer Workshop* (福岡), 2007.
- 11) 林 慎一, 山口ゆり : 内分泌療法の適応選択の基礎研究. シンポジウム「本邦における内分泌療法のエビデンスと基礎研究」, 第 15 回日本乳癌学会学術総会 (横浜), 2007.
- 12) 林 慎一 : 転写因子、RNA 発現から見た核異型. シンポジウム「がんの細胞異型に迫る—核異型に対する科学的アプローチ」. 第 46 回日本臨床細胞学会 (仙台), 2007.
- 13) Akahira, J., Suzuki, H., Miura, I., Suzuki, T., Moriya, T. Miki, Y., Ito, K., Hayashi, S., Yaegashi, N., Sasano, H. The expression of RIZ1 in patients with epithelial ovarian cancer: Its correlation with aberrant DNA methylation. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2007.
- 14) Mori, K., Yamaguchi, Y., Sawada, N., Kondoh, K., Hayashi, S. In vivo and in vitro efficacy of capecitabine (X) + tamoxifen (TAM) in breast cancer. Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2007.
- 15) Azuma, K., Horie, K., Sakai, R., Hayashi, S., Ouchi, Y., Inoue, S. ER $\alpha$ -HDAC6 complex at plasma membrane mediates rapid tubulin deacetylation as a novel nongenomic estrogen action. The Endocrine Society's 89<sup>th</sup> Annual Meeting (Tronto), 2007.
- 16) Takehara, M., Ohsumi, S., Takei, H., Shimozuma, K., Ohashi, Y., Suemasu, K., Hozumi, Y. Health-related quality of life and psychological distress in Japanese patients with breast cancer treated with tamoxifen, exemestane or anastrozole for adjuvant therapy : a phase III randomized study of National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (N-SAS BC) 04. 30<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2007.
- 17) Kurosumi, M., Kobayashi, Y., Takei, H., Kitsugi, K., Ueno,

M., Green, G, Vargo, J. The necessity of two gene markers for accurate detection of lymph node micrometastasis using an investigational real time RT-PCR assay confirmed by 0.2mm interval frozen section analysis in breast cancer.

- 18) 武井寛幸、黒住昌史、吉田 崇、二宮 淳、上村万里、林 祐二、戸塚勝理、井上賢一、田部井敏夫：術前化学療法後の乳房温存療法における乳房内再発の検討。第32回日本外科系連合学会学術集会。要望演題5：乳癌外科における術前化学療法後の温存療法。2007.6.22-23。東京（東京医科大学外科学第一講座、加藤治文教授、京王プラザホテル）
- 19) 武井寛幸、末益公人、黒住昌史、吉田 崇、二宮 淳、萩原靖崇、上村万里、林 祐二、井上賢一、田部井敏夫：センチネルリンパ節転移陽性例に対し腋窩郭清省略は可能か。ミニパネルディスカッション1。第15回日本乳癌学会学術総会。2007.6.29-30。横浜（帝京大学医学部外科 池田正教授）
- 20) 武井寛幸、吉田 崇、戸塚勝理、石川裕子、浅川英輝、林 祐二、井上賢一、田部井敏夫、下岡華子、河野輪香織、黒住昌史：乳癌の腋窩リンパ節郭清の予後に及ぼす影響。第15回地域医療外科系連合会総会。2007.11.17。さいたま市（徳島県立中央病院、鎌村好孝）
- 21) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical and biological significance of overexpression of NM23 in leukemia. 7<sup>th</sup> International Congress of the NDP Kinase / NM23 / awd Family, 2007.
- 22) 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古: Detection of NM23-interacting proteins and their possible role on poor treatment outcome in leukemia. 第66回日本癌学会学術総会, 2007.
- 23) 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古：白血球細胞におけるNM23蛋白質の機能と相互作用蛋白質の探索。第69回日本血液学会, 2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

角 純子

「NM23蛋白質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」

特許第3557367号

平成16年5月21日 特許権取得

現在維持継続中

##### 2. 出願中2件

林 慎一

- 1) 出願番号：特願2005-160621 出願日：2005.05.31  
名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願2005-160685 出願日：2005.05.31  
名称：細胞分析方法
- 3) Application No./Patent No. : 06756855.0-1222  
PCT/JP2006310935 Date : 08.02.08  
Title: A transgenic cell and method for cell analysis.

分担研究報告書

小児がんの発生機構の解明と予後予測に関する研究

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** 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。日欧間の頻度差の原因は遺伝学的差異によると考えて *WT1*、*IGF2* (*WT2*)、*WTX*、*CTNNB1* 異常を分析した。ウイルス腫瘍 112 例の *WT1* 遺伝子を分析し、38 例 (33%) に *WT1* 異常を認めた。残り 74 例の *H19*-DMR のメチル化状態を分析し、31 例(28%)に *IGF2* の loss of imprinting (LOI) を、11 例 (10%) に *IGF2* uniparental disomy (UPD)を、26 例 (23%) に *IGF2* の retention of imprinting (ROI) を、6 例にその他の異常を認めた。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を示唆した。これが日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度が低い理由のひとつと考えられた。一方、*WT1* 異常型腫瘍 38 例の解析では、53%の腫瘍に *IGF2* の UPD か LOI がみられた。*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ことを示した。*WTX*、*CTNNB1* 異常の頻度は欧米と差がないようである。肝芽腫 97 例を対象にして、予後を予測可能な分子マーカーを検討し、*RASSF1A* メチル化が臨床的に有用な予後因子であることを示した。

A. 研究目的

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。ウイルス腫瘍は胎児性腫瘍なので、頻度差の原因として環境因子よりも遺伝学的因子が重要であると考えられる。ウイルス腫瘍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* 異常はウイルス腫瘍の15%にみられるに過ぎない。*IGF2* は11p15に位置し、父性発現する imprint 遺伝子である。また、第2ウイルス腫瘍 (*WT2*) 遺伝子の候補遺伝子である。ウイルス腫瘍では高率に *IGF2* の loss of imprinting (LOI) や uniparental disomy (UPD)により、*IGF2* の発現異常が生じていると欧米から報告されている。日欧の発生頻度差の理由として、欧米腫瘍の主な原因になっている *IGF2*-LOI や UPD が日本人腫瘍にはほとんどないからであるとする報告がある。さらに、2007年に新しいウイルス腫瘍関連遺伝子 *WTX* が単離された。*WTX*

はウイルス腫瘍で変異の報告されている *CTNNB1* 遺伝子と共に Wnt シグナル伝達系を担っている。日本人ウイルス腫瘍の *WT1*、*WTX*、*CTNNB1*、*IGF2* の4遺伝子の異常を分析し、欧米の報告と比較する。日欧間の発生頻度の差が、どのような遺伝子異常を背景にして生じているのかを明らかにする。

肝芽腫は小児の悪性肝腫瘍であるが、近年外科的手術と化学療法の進歩により予後は著しく改善した。しかし、現在でも2~3割の患者は悲惨な結末をたどる。更なる治療成績の向上の為に、治療開始前に、治療に対する反応を予測し、患者をリスクにより層別化して治療することが重要である。しかしながら、現在までに、予後を正確に反映する分子マーカーは知られていない。癌抑制遺伝子のメチル化を分析し、予後予測を可能にする分子マーカーを確立することが研究の目的である。

## B. 研究方法

ウイルス腫瘍 112 例について、CGH と SNP アレイ解析を行い染色体異常の有無を調べた。次に、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クソンの塩基配列決定法で分析した。また、*IGF2* エクソン 9 の多型を利用して、RT-PCR による LOI 解析を実施した。これとは別に *H19*-DMR 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。*WTX* 遺伝子異常を DNA の定量的 PCR 法 (qPCR), FISH 法、塩基配列決定法で分析した。*CTNNB1* 変異を塩基配列決定法で分析した。*WT1* 異常のあるウイルス腫瘍 38 例を対象にして、*IGF2* 異常を調べた。RNA が分析可能な腫瘍については、定量的 (q)RT-PCR 法を用いて、*IGF2*、*H19* および *WT1* の mRNA 発現量を測定した。

肝芽腫 20 例を対象にして 13 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析した。メチル化を示した 3 遺伝子について 97 例の肝芽腫を対象にしてメチル化分析を MSP 法により実施し、予後との関係を調べた。予後との関連がみられた *RASSF1A* のメチル化を新たに qPCR 法により分析した。また肝芽腫 97 例を対象にして *CTNNB1* 変異を塩基配列決定法で分析した。*RASSF1A* と *CTNNB1* 変異に他の臨床的予後因子を加え、生存期間に関する多変量解析を実施した。

(倫理面への配慮)

ウイルス腫瘍と肝芽腫検体を研究に使用することについて、親よりインフォームドコンセントを得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。この研究は胚細胞遺伝子変異分析を含まない。研究計画を埼玉県立がんセンター倫理委員会に提出し、研究の実施についての承認を得た。

## C. 研究結果

ウイルス腫瘍 112 例を分析し、38 例 (33%) に *WT1* 異常を検出した。残り 74 例を、*IGF2* UPD を示す 11 例 (10%)、*IGF2* LOI を示す 31 例 (28%)、retention of imprinting (ROI) を示す 26 例 (23%)、その他の異常を示す 6 例 (5%) に分類した。LOI 型腫瘍 12 例と

ROI 型腫瘍 12 例を qRT-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。

*WT1* 異常を認めた 38 例をサザン法と SNP アレイにより分析し、14 例に *WT1* (11p13) と *IGF2* (11p15) を含む UPD, 3 例に *IGF2* (11p15) を含む染色体末端部に限局した UPD を同定した。11p15 領域がヘテロ接合性を示す 20 例中、*IGF2*-LOI を 2 例に、*IGF2*-ROI を 17 例に認めた。残り 1 例は -11 を示した。一方、*WTX* 異常を 112 例中 14 例 (13%) に、*CTNNB1* 変異を 26 例 (23%) に認めた。*WT1* 異常を示す腫瘍に *WTX* 異常または *CTNNB1* 変異のどちらかはみられたが、*WTX* と *CTNNB1* の両異常が同時にはみられなかった。この関係は *WT1* 異常のない腫瘍においても同様に観察された。

肝芽腫 20 例を対象にして 13 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析し、3 遺伝子 (*RASSF1A*、*SOCS1*、*CASP8*) のメチル化をそれぞれ、30.9%、33.0%、15.5% に認めた。単因子解析の結果、*RASSF1A* のみが、予後と相関した。*RASSF1A* の定量的 MSP 法による解析の結果、97 例中 43 例 (44.3%) にメチル化を認めた。97 例中 65 例 (67%) に *CTNNB1* の点変異ないし欠失を認めた。単因子解析の結果予後と相関する 6 因子 (年齢、組織型、病期、化学療法に対する反応、*CTNNB1* 変異、*RASSF1A* メチル化) を決めた。これを用いて多変量解析を実施したところ、病期 ( $P=0.002$ ; relative risk (RR) 7.67) と *RASSF1A* メチル化 ( $P=0.043$ ; RR 9.39) はいずれも独立した予後予測因子であることが分かったが、*CTNNB1* 変異は独立した予後予測因子ではなかった。

## D. 考察

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* の発現異常分析を実施した。112 例中 38 例 (34%) に *WT1* 異常を認め、この頻度は欧米の頻度 15% より高かった。しかし、日本人の発生頻度が 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。

これまで、*IGF2*-LOI 分析は RT-PCR によるアレール発現解析により実施されてきた。今回の COBRA 法を併用した解析で *IGF2*-LOI を示す腫瘍を 31 例 (28%) に認めた。qRT-PCR による *IGF2* と *H19* mRNA 発現量の定量から、*IGF2* LOI や UPD を示す腫瘍では *IGF2* ROI を示す腫瘍より、*IGF2* mRNA の発現量は高く、反対に *H19* mRNA の発現量は低かった。従来の RT-PCR によるアレール発現解析では *IGF2*-LOI の頻度は 30~70% と報告されているので、今回の日本人における *IGF2*-LOI 型腫瘍の頻度はやや低いと言える。さらに、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分以下になる。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。

*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 38 例を分析したところ、14 例 (37%) に 11p13-11p15 を含む UPD を、3 例 (6%) に 11p15 に限局した UPD を認めた。また LOI を示す腫瘍が 3 例 (9%) にみられた。残り 18 例 (53%) は ROI を示した。11p13-11p15 UPD 型腫瘍では同一の *WT1* 変異が両アレールに認められたので、*WT1* 変異が第 1 イベントであり、UPD は第 2 イベントと考えられる。これに対して 11p15 限局型 UPD か *IGF2*-LOI を示す腫瘍では、*WT1* 異常が第 1 イベントになる場合と第 2 イベントになる場合の両方の可能性が考えられる。いずれにしても、*WT1* 異常型腫瘍の 53% に *IGF2* の過剰発現が生じていると予想された。実際、qRT-PCR により分析すると、*IGF2* UPD または LOI 型腫瘍は、*IGF2* ROI 型腫瘍に比べて *IGF2* mRNA 量が高いことが証明された。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。*WT1* 異常型腫瘍 38 例を *WT1* 異常の種類により、欠失群 13 例、変異群 13 例、欠失+変異群 12 例に分類できた。qRT-PCR により *WT1* mRNA を分析すると、欠失群の *WT1* mRNA は、一般に低下していたが、変異群と欠

失+変異群の中には高値を示す腫瘍がみられた。変異群と欠失+変異群の *WT1* mRNA の塩基配列分析の結果、*WT1* 変異が確認されたので、変異型 *WT1* mRNA 発現が証明されたことになる。112 例の分析で *WTX* 異常を 14 例 (13%) に、*CTNNT1* 変異を 26 例 (23%) に認めた。*WT1* 異常群においても、*WT1* 正常群においても、*WTX* 異常単独、または *CTNNT1* 変異単独で生じることはあるが、*WTX* と *CTNNT1* の異常は同時に生じることはなかった。*WTX* と *CTNNT1* は共に Wnt シグナル伝達系の蛋白質をコードしているので、どちらかに異常が生じれば Wnt シグナル伝達系の活性を上昇させると考えられた。

肝芽腫の予後を予測できる分子マーカーを検討し、*RASSF1A* のメチル化が病期に次ぐ重要な予後因子であることを証明した。近年、肝芽腫の治療成績は著しく改善しているが、進行期例や遠隔転移例の予後は依然として不良であり、術前化学療法により down staging して完全切除に持ち込めるかどうかは治癒させるためには最も重要である。*RASSF1A* のメチル化は術前化学療法の効果予知に役立つので、臨床的に極めて有用である。今後、プロスペクティブに肝芽腫の *RASSF1A* メチル化を調べ、その有用性が確認できれば、治療研究の層別化に利用できるのではないかと期待している。

## E. 結論

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、ウイルス腫瘍 112 例の *WT1*、*IGF2*、*WTX*、*CTNNT1* 異常を分析した。その結果、*WT1* 異常群を 33% に、*IGF2*-UPD を 10% に、*IGF2*-LOI を 28% に、*WT1* と *IGF2* の異常のない腫瘍が 29% に認められた。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* 異常の発生頻度は日欧で同程度であり、*IGF2*-LOI の日本の頻度は欧米の 1/2 以下であると考えられる。*WTX* と *CTNNT1* 異常の頻度は日欧間で差を認めなかった。欧米人に比べて日本人のウイルス腫瘍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。

*WT1* 異常型腫瘍の半数ではその発生・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。一方、肝芽腫の予後予測に *RASSF1A* メチル化が有用であることを示した。治療研究の層別化に利用したい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
- 2) Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A. and Kaneko, Y. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood & Cancer*, 49: 240-249, 2007.
- 3) Watanabe, N., Haruta, M., Soejima, H., Fukushi, D., Yokomori, K., Nakadate, H., Okita, H., Hata, JI., Fukuzawa, M. and Kaneko Y. Duplication of the paternal *IGF2* allele in trisomy 11 and elevated expression levels of *IGF2* mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type. *Genes Chromosomes Cancer*, 46: 929-935, 2007.
- 4) Tomioka, N., Oba, S., Ohira, M., Misra, A., Fridlyand, J., Ishii, S., Nakamura, Y., Isogai, E., Hirata, T., Yoshida, Y., Todo, S., Kaneko, Y., Albertson, DG., Pinkel, D., Feuerstein, BG. and Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
- 5) Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S. and Kaneko, Y. The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer*, in press, (2008)
- 6) Haruta, M., Matsumoto, Y., Izumi, H., Watanabe, N., Fukuzawa, M., Matsuura, S. and Kaneko, Y. Combined BubR1 protein down-regulation and *RASSF1A* hypermethylation in Wilms tumors with diverse

cytogenetic changes. *Mol Carcinog*, in press, (2008)

- 7) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* in press, (2008)
- 8) 金子安比古 : 細胞遺伝学。新小児がんの診断と治療。別所文雄、杉本徹、横森欣司編、診断と治療社 25-30, 2007.
- 9) 金子安比古 : Wilms 腫瘍の分子生物学、特集 : 小児固形腫瘍の分子生物学、最新の知見、小児外科、39: 1348-1352, 2007.

##### 学会発表

- 1) 金子安比古、春田雅之、新井康人、菅原和華、渡辺直樹、中館尚也、大喜多肇、秦順一、福澤正洋。*WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19-DMR* 分析により証明された *WT1* 変異型 Wilms 腫瘍の不均一性。第 66 回日本癌学会学術総会。2007.10. 横浜。
- 2) 金子安比古、春田雅之、他 : *WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19-DMR* 分析により証明された *WT1* 異常型 Wilms 腫瘍の遺伝学的、臨床的不均一性。第 52 回人類遺伝学会。2007.9. 東京
- 3) 金子安比古 : Spontaneous regression of neuroblastoma and the mass screening program at 6 months of age. 第 1 回依存性受容体研究会および第 10 回神経芽腫研究会合同会議。2007.10. 東京。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

分担研究報告書

小児がんの SNP アレイによるゲノム構造異常解析に関する研究

分担研究者 新井 康仁 国立がんセンター研究所・主任研究員

**研究要旨** 小児がんが生じたゲノム構造異常を包括的に調べるため、ウイルス腫瘍と肝芽腫について、一塩基多型 (SNP) マーカーが高密度に配位された DNA マイクロアレイを用いてアレイ CGH 解析と LOH 解析を行った。WT1 異常型のウイルス腫瘍 36 例においては、WT1 の 11p13 領域のゲノム欠失と WT1 の塩基変異によって、1) WT1 ホモ欠失型 13 例、2) WT1 ゲノム欠失と塩基変異型 11 例、3) WT1 ホモ変異型 12 例 という 3 つの亜型に分類することができた。11p15 の IGF2 領域の片親性ダイソミー (UPD) は高頻度 (16 例) に認められ、多くの腫瘍で IGF2 の異常を伴っていると考えられた。肝芽腫 38 例の解析では、1q、2q、8q、20q の増加や 4q の欠失を多く認めた。その中の 10 例では IGF2 領域の UPD も生じていた。DNA コピー数や LOH の変化が観察されない一群 (10 例) があり、肝芽腫のゲノム構造異常の多様性が示された。

**A. 研究目的**

がんにおいては、ジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常の蓄積が発がんの過程に重要であり、がんの分子機構を解明して画期的治療へ結びつけるにはその解析が必須である。

本研究の目的は、がんの生物学的特性を解明する上で重要な基盤の一つとなっている希少な小児がんに着目し、がんにおいて生じたゲノムの構造異常を、染色体 DNA の部分的コピー数の変化やヘテロ接合性の変化を網羅的に捕らえることによって明らかにし、ゲノム構造異常の視点からがんを整理、分別することである。これにより、腫瘍発生に密接に関連のあるゲノム構造異常領域を特定して発がんに必要な遺伝子を明らかにすることが目標である。

**B. 研究方法**

ウイルス腫瘍と肝芽腫に関して解析を行った。ウイルス腫瘍については、これまでの分析から WT1 遺伝子に異常があることが判明している腫瘍 36 例を対象として用いた。肝芽腫については、38 症例を対象とした。単離したゲノム DNA を高密度 SNP アレイ (Affymetrix mapping 50K-Xba array) にハイブリダイズして、アレイ CGH 解析と LOH 解析を行った。腫瘍部

DNA に加えて正常組織 DNA も用いることが可能であったものについては、ペア解析も行い、相同染色体のアレル別コピー数異常 (染色体の増加、欠失) を推定した。他は、非自己コントロールを用いて解析した。これらの結果をこれまでの染色体分析や WT1 変異解析などの結果と照らし合わせて比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従って実施した。

**C. 研究結果**

WT1 異常を伴うウイルス腫瘍の解析：  
アレイ CGH 解析による WT1 欠失領域のマッピングでは、数 Mb にわたる WT1 の広範な欠失を明らかにした。そして、WT1 の 11p13 領域のゲノム欠失の有無と WT1 の塩基変異の有無によって、WT1 異常を伴うウイルス腫瘍を 3 つの亜型に分類することができた。1) WT1 がホモ欠失しているもの 13 例、2) WT1 ゲノム欠失と塩基変異が生じているもの 11 例、3) WT1 がホモ変異している 12 例 という 3 つのタイプである。11p15 の IGF2 領域の片親性ダイソミー (UPD) は高頻度 (16 例) に認められ、多くの腫瘍で IGF2 の異常を伴っていると考えられた。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, 8p, 19q, 20q の増加が低頻度に観察された。UPD は、3p, 8q, 17q, 18q などに観察された。

肝芽腫 38 例の解析では、1q, 2q, 8q, 20q の増加や 4q の欠失を多く認めた。その中の 10 例では、ウイルス腫瘍と同様に *IGF2* 領域の UPD も生じていた。DNA コピー数や LOH の変化が観察されない一群 (10 例) があり、肝芽腫のゲノム構造異常の多様性が示された。

#### D. 考察

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

この結果、*WT1* 異常型のウイルス腫瘍を 3 つの亜型に分類することができた。*WT1* 塩基変異をホモに示すウイルス腫瘍の全症例と *WT1* ホモ欠失の症例の一部では、*IGF2* を含む 11p15 の UPD を認め、肝芽腫においても高頻度に 11p15 の UPD を認めた。この UPD においては、インプリンティングにより *IGF2* の発現が抑制されている母方アレルが欠失し、*IGF2* が発現している父方アレルが倍化することにより *IGF2* が過剰発現していることが推察される。つまり両方の腫瘍において、*IGF2* の過剰発現も重要な要因だと考えられた。DNA コピー数や LOH の変化が観察されない肝芽腫の一群については、エピジェネティックな遺伝子異常が要因の 1 つに考えられる。

#### E. 結論

高密度 SNP アレイを用いてアレイ CGH 解析と LOH 解析を同時に行うことにより、ウイルス腫瘍の *WT1* 異常群と肝芽腫におけるゲノム構造異常を網羅的に捉えた。染色体の欠失、増加や UPD について正確にマッピングすることにより、その特徴から腫瘍をおおまかに分類することができた。このような区分から腫瘍の重要な要因となる腫瘍関連遺伝子の存在が推定される。

今後は、*WT1* 遺伝子異常群とは別の亜群、*IGF2* の LOI 群、などについてゲノム構造異常の網羅的解析を進めることと、検出したゲノム構造異常領域をより限局化することにより、腫瘍発生の全体像の解明につなげる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nagayama, K., Kohno, T., Sato, M., Arai, Y., Minna, J.D. and Yokota, J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chrom Cancer*, 46: 1000-1010, 2007.
- 2) Li, X-L., Arai, Y., Harada, H., Shima, Y., Yoshida, H., Rokudai, S., Kimura, A. and Kitabayashi, I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene*, 26: 7231-7239, 2007.
- 3) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57: 103-108, 2007.
- 4) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*, in press, (2008)

##### 2. 学会発表

- 1) 金子安比古、新井康仁 他 : Comprehensive *WT1*, *IGF2*, *CTNNB1* and SNP analysis revealed genetic and clinical heterogeneity in *WT1*-mutant Wilms tumors. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2007.
- 2) 新井康仁、柴田龍弘 他 : Homozygous deletion mapping in gastric cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし