

研究報告書表紙

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（H19-3次がん一般-007）

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成21（2009）年 4月

作成上の留意事項

分担研究報告書がある場合は、「総括・分担研究報告書」と表記すること。

研究報告書目次

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	1	
吉田 輝彦		
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	7	
市川 仁		
2. 遺伝と遺伝子情報による発がん高リスク群の診断	10	
菅野 康吉		
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	14	
塚田 俊彦		
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	17	
落谷 孝広		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		21
IV. 研究成果の刊行物・別刷		別添

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食道がんの予知医療開発に関して、化学放射線療法の奏効性を80%以上の精度で予測する判別器を構築した。*KRT7* は奏効群で高発現するが、逆に術後の予後不良群で高発現することを見出した。②小児急性骨髄性白血病が遺伝子発現プロファイルから6サブタイプに分類されることから、マイクロアレイ検査による診断法の開発と単球系 AML における予後不良亜群の生物学的背景の解析を行った。③ペプチド核酸を使用した realtime PCR-clamping 法により、尿路上皮がんにおける *FGFR3* 遺伝子変異を高感度に検出し、遺伝子変異陽性例は経尿道的膀胱腫瘍切除術の対象となる低異型度表在性膀胱がんの主要な遺伝子変異と考えられた。*FGFR3* 遺伝子変異を認めた表在性膀胱がんでは尿中からも遺伝子変異の定量的検出が可能であった。④多内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子 *MEN1* の遺伝子産物の細胞内安定性を測定する方法を考案し、ミスセンス変異保持者の臨床経過を推定できることを示唆した。⑤腫瘍局所への同種 MHC 遺伝子導入遺伝子治療と、リンパ球のホメオスタティック増殖を用いて免疫寛容の克服等を導く自家造血幹細胞移植との複合療法の前臨床開発を行い、担がんマウス腹膜播種モデルにおいて抗腫瘍効果・生存率改善を認めた。⑥乳がんのリンパ節転移に関与する分子として同定した *Slug* を抑制する siRNA が乳がんの全身への転移を抑制することを、リンパ節転移イメージング動物モデルを用いて示した。

分担研究者

市川 仁 国立がんセンター研究所
室長菅野 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

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・治療の開発に橋渡しすることを目的として、以下の研究を行う。

【A. 分子情報に基づく診断法開発と、治療の分子標的の探索】

①食道がん予知医療の開発：Ⅱ期およびⅢ期の食道がん患者の治療前生検試料の遺伝子発現プロファイルに基づき化学放射線療法(CRT)等の治療効果を予測して治療の個別化に貢献するとともに、予後不良例を特徴付ける信号伝達経路の解明と、分子標的的同定を目的とする。他の多くのがんゲノム解析研究と異なり、実際の臨床現場での治療前診断に

A. 研究目的

がんの臨床試料等の解析を基盤として、ゲノム・遺

必須となる生検試料に焦点を絞った研究を行う。

②急性骨髄性白血病 (AML) 予後不良サブタイプ診断法の開発と治療の新規分子標的の同定: AML 臨床試料の遺伝子発現プロファイル解析により、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して、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。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。

③固形がんのゲノム・遺伝子異常の把握に基づく再発等リスク診断法の開発: 散発性固形がんの遺伝子異常の解析に基づき、再発や浸潤性がんへの進展等、临床上重要なリスク評価を行うために実地応用可能な遺伝子検査法を開発する。本年度は Peptide Nucleic Acid (PNA) を用いた Real time PCR clumping 法を応用し、膀胱がんにおける Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) 遺伝子変異アレルを高感度かつ特異的に増幅・検出し、表在性膀胱がんに対する経尿道的膀胱腫瘍切除術 (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意義を検討した。

④遺伝性腫瘍の遺伝子診断法の開発: 遺伝性腫瘍の原因遺伝子の解析により同定された変異の臨床的意義が明瞭でない場合がしばしばあり、検査結果を遺伝医療に活かさないことが問題になっている。がん抑制遺伝子 *MEN1* の変異が原因となる多内分泌腺腫瘍症 1 型 (*MEN1* 型) 症例の生殖細胞系列に同定されたミスセンス変異が疾病の原因となり得るかどうか、どのような臨床病型の原因となるかを推定する方法の開発を目的とする。

【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: 免疫系を再構築する造血幹細胞移植と、自然免疫・獲得免疫を強化する免疫遺伝子治療の複合により、固形がんに対する高い抗腫瘍効果を発揮する治療法を開発することを目的とする。

⑥疫系を干渉 (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・前立腺がんの骨転移等の動物モデルの *in vivo* イメージング解析を駆使して、転移を規定する分子を解明し、RNAi 創薬等、新規治療法を開発を行う。

B. 研究方法

上記研究目的に記載した①～⑥の課題毎に以下の通り。

①固形がんの予知医療に不可欠の生検試料を用いて、CRT または手術を施行された患者、各 100 症例を目標にして前向き試験生検の発現プロファイルを取得し、各種統計学的方法によって遺伝子を選抜し、予測判別式を作る。また、予後不良症例の発現プロファイルから、特徴的な遺伝子・信号伝達経路を同定する。

②オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる小児 AML 臨床試料の遺伝子発現プロファイルデータを用いて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。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し、新規登録症例を用いて検証を行う。さらに、予後不良亜群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検討する。

③PNA-mediated Realtime PCR clamping 法を用いて *FGFR3* 遺伝子変異のホットスポットである exon7 の codon 248~249、exon10 の codon 372~375 および exon15 の codon 652 を解析する系を構築し感度等の評価を行った。膀胱原発の尿路上皮がん 154 症例について、TUR-Bt の際に得られた腫瘍組織および術前の尿沈渣から抽出したゲノム DNA を鋳型として *FGFR3* 遺伝子変異を検出した。

④以前の研究成果に基づき、メンンの細胞内安定性に注目し、その正確な測定系の確立を試みた。すなわち、変異型メンンと、対照となる正常メンンに Flag 又は Myc タグを付加した蛋白質を一本の mRNA として発現する種々のプラスミドを作成し、培養細胞に導入、発現させ、蛍光顕微鏡下で同一細

胞中の両蛋白質の量を、画像解析ソフト WinROOF を用いて評価した。メニンの機能として知られている転写因子 JunD を介する遺伝子転写のリプレッサー活性を、JunD 応答配列を有するルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて解析した。既報の種々の変異型メニンの安定性を正常型(野生型及び正常多型)と比較し、臨床像との相関を検討した。

⑤同種造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療の複合療法の開発では、免疫刺激性サイトカイン遺伝子の導入により抗腫瘍効果を発揮するエフェクターの同定と、抗腫瘍免疫の腑活機序について各種動物モデルを用いて検討した。自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療の複合療法の開発に関しては、移植早期の免疫再構築進行時期に、腫瘍内への免疫刺激性サイトカイン遺伝子や同種 MHC 遺伝子導入などの免疫治療を行うことにより、全身性の腫瘍特異的免疫を誘導して、抗腫瘍効果が発揮できるか否かを検討した。ついで、そのエフェクターの同定を行った。

⑥リンパ節転移のある乳がん組織で発現が増強している約 20 個の遺伝子候補を選択し、それらの発現を抑制する siRNA を合成、ヒト乳がん細胞の浸潤能を抑制する効果を検討した。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、ヒト乳がんの腋窩リンパ節転移モデル動物における転移抑制効果をバイオフォトニクスによるイメージング技術によって解析した。前年度に引き続き、ヒト前立腺がんが発現が低下し、骨転移との相関が認められた microRNA-16 についての解析も培養細胞や動物モデルにおいて検討を進めた。

(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」、それ以外の臨床試料等の観察研究は「疫学研究に関する倫理指針」、動物実験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、施設の倫理審査委員会の審査や機関の長の承認を受ける等の上、研究を行った。

C. 研究結果

「A. 研究目的」に記載した①～⑥の課題毎に以下の通り。

①H20 年 12 月までに CRT と手術例それぞれ 80 症例(2ヶ月以内の抗腫瘍効果判定がされている症例は、CR(完全奏効)30 症例、nonCR(CR 以外)31 症例)、56 症例の解析を終了した。H19 年度までに構築した CRT の CR 群と nonCR 群の判別式について、H20 年度は第 1 次検証と改良、並びに新たな遺伝子選抜を行い、約 80-100%の精度で予測できる判別式を作成した。判別に使う代表的な遺伝子は定量的 RT-PCR で確認した。その中には CR で高頻度に発現する *KRT7* が含まれるが、逆にこの遺伝子は手術で予後不良な高リンパ節転移群で高頻度に発現することを見出した。また、上記解析によって CRT で nonCR または CR でも 1 年以内に再発症例から、特徴的信号伝達経路を同定した。生検試料の集積は多施設で展開し、CRT 前の II 期および III 期の食道がん患者のみで 117 例となり、手術前生検試料も 116 例となり、目標を超えた。

②遺伝子発現プロファイルデータを用いて小児 AML を *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 の 6 亜群(サブタイプ)に分類する診断法の開発を行った。すなわち、サブタイプ特異的に発現する遺伝子に関して各サブタイプの標準遺伝子発現パターン(重心)を計算し、それらの重心からの距離を基に各症例を診断するアルゴリズムを構築した。この診断アルゴリズムを小児単球系 AML 15 症例、成人 AML 391 症例の遺伝子発現データに適用し、小児単球系 AML においては 100%の精度で、成人 AML においても *t(8;21)*-AML、*t(15;17)*-AML、*inv(16)*-AML については 98%の精度で診断できることを示した。

単球系 AML の予後不良サブグループが年長児に多いことに注目し、*MLL* 融合遺伝子を用いてマウスに単球系 AML を発症させるモデルシステムにおいて、胎仔肝造血細胞と成体骨髄造血細胞を起源として白血病を発症させ、比較した。その結果、胎仔肝細胞の方が成体骨髄細胞に比べて早期に白血病を

引き起こすこと、*in vitro* においては成体骨髄由来白血病細胞の方が胎仔肝由来白血病細胞より強い増殖能を示すことを見出した。

③ゲノム DNA 50 ng を鋳型とし、*FGFR3* の exon 7 の PNA-mediated realtime PCR clamping 法を構築し、評価したところ、検体中に 1% の濃度で存在する *FGFR3* 遺伝子変異の選択的な増幅と検出が可能と考えられた。一方、鋳型 DNA 量 1ng の場合は偽陽性の確率が大きくなるのがわかり、臨床試料の解析では鋳型 DNA 量を 50 ng を標準とし、直接塩基配列決定法により変異型を同定した。

膀胱原発の尿路上皮がん 154 例を対象として *FGFR3* 遺伝子変異を検出したところ、55 例 (35.7%) に *FGFR3* 遺伝子変異が認められた。組織学的深達度と異型度の比較では、変異は pTa および pT1 stage、grade 1 および 2 の症例で有意に高率であった。特に pTa/grade 1 では 76.9% に変異が認められたのに対して、筋層浸潤を伴う pT2 以上/grade 3 症例では 8.0% であった。さらに TUR-Bt 実施前の尿を試料として *FGFR3* 遺伝子変異を検出したところ、組織で *FGFR3* 遺伝子変異を認めた表在性膀胱がん 12 例中 11 例 (91.2%) で尿中に同遺伝子変異の検出が可能であった。TUR-Bt を実施した pTa および pT1 stage の表在性膀胱がん 110 例の検討では、*FGFR3* 変異の有無は無病生存期間の検討で有意差を認めなかったが、術前の尿中 *FGFR3* 遺伝子変異の濃度は表在性膀胱がんの再発を予測する有意な予後因子であることが示唆された。

④変異型メンを発現するプラスミドを培養細胞に導入し、シクロヘキシミドにより蛋白質合成を阻害してメン蛋白質の減少率を比較すると、典型的な MEN1 型の原因となるミスセンス変異型メンの減少率が概ね増大していることから、疾病の原因となるミスセンス変異型メンが不安定であることを確認した。既知の 2 種類の正常多型メン (R171Q 及び A541T) は野性型メンと同様に蛋白質発現量が多く、16 種類の典型的な MEN1 型の原因となるミスセンス変異型メンは不安定であった。一方、MEN1 型の軽症亜型として知られている家族性副甲状腺機能亢進症

(FIHP) や、孤発性に出現した副甲状腺腫瘍患者に認められたミスセンス変異では、メン蛋白質の安定性は多岐にわたった。また、FIHP の原因となる安定性の高いメンは、JunD を介した転写抑制能を保持していることを見出した。

⑤腫瘍局所への *IFN- γ* 遺伝子導入に、担がん個体の免疫抑制性環境を破壊し新鮮な免疫系を立ち上げる効果とリンパ球が増殖する際に腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖・活性化する効果を持つ自家造血幹細胞移植を複合した。BALB/c マウスに対する自家造血幹細胞移植直後に同系の大腸がん細胞 CT26 あるいは腎がん細胞 Renca を皮下に注入し、7 日後に皮下腫瘍内に *IFN- γ* 発現プラスミドとリポソームと混合して 3 回注入した。両者を併用した場合には、腫瘍の増殖は著明に抑制され、相乗的抗腫瘍効果を発揮できることを明らかにした。*IFN- γ* 遺伝子導入方法として、*IFN- γ* 発現プラスミド (30 μ g) とリポソーム (DMRIE/DOPE) 複合体の腫瘍内注入により、低用量の *IFN- γ* の発現アデノウイルスベクター (5×10^6 PFU) の腫瘍内投与に匹敵する腫瘍内での *IFN- γ* 蛋白質の発現が得られ、抗腫瘍効果においても十分な複合効果が認められることを示した。ついで、自家造血幹細胞移植マウスの両足に CT26 細胞を、背中に Renca 細胞を移植し、右足の CT26 腫瘍のみに *IFN- γ* 遺伝子導入を行うと、遺伝子を導入した CT26 腫瘍及び遺伝子を導入していない対側の CT26 腫瘍の増殖は明らかに抑制されたが、Renca 腫瘍に対する抗腫瘍増強効果は認められず、腫瘍内 *IFN- γ* 遺伝子導入により全身性かつ腫瘍特異的抗腫瘍免疫が誘導されることを示した。明らかな有害事象は認められなかった。*In vivo* リンパ球除去実験により CD4、CD8、NK 細胞を除去するといずれも抗腫瘍効果が低下するが、特に CD8 陽性細胞がエフェクターとして中心的役割を果たしていることがわかった。また、*IFN- γ* の抗腫瘍免疫機序として、腫瘍内での *IFN- γ* 発現により、腫瘍内や所属リンパ節での樹状細胞の成熟化が促進され腫瘍抗原提示能が増強することを示した。

⑥イメージング動物を用いたヒト乳がん細胞 MDA-MB231 のリンパ節転移の系を確立し、転移性

乳がん細胞で高発現している *Slug* に対する siRNA が、転移を顕著に抑制することを明らかにした。また、*Slug* の下流の分子である E-cadherin の発現が相反して回復することを示した。前立腺がんやその細胞株で発現が低下している microRNA16 の発現を復帰させることで、マウスの骨転移モデルにおける前立腺がんの増殖を顕著に抑制すること、microRNA16 の標的となる mRNA 群が主に細胞周期や細胞増殖に関わる遺伝子群であることをつきとめた。

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。

①食道がんの CRT の奏効性を、治療前生検の発現プロファイルによって優れた精度で判別可能であることが示された。また予後不良となる可能性の高い nonCR 群および1年以内の再発群の予測も発現プロファイルによって判別可能であることが示された。今後、多施設のデータを集積することによって、CRT のみならず手術での成績を精度良く判別できる方法の確立や、予後不良例を特徴づける信号伝達経路の同定ができる可能性が高くなった。

②AML はサブタイプにより治療内容や予後が異なるため、適切な治療を行うには適確な診断が重要である。現在、AML の診断及び層別化には、多種に渡る検査が複数、行われており相当量の検体が必要となっている。マイクロアレイによる検査はわずか 20 ng の RNA で可能で、一つの検査で多くの情報を得られるため、しばしば十分な検体採取が困難な小児患者においては特に有効である。

胎仔肝造血細胞を起源とする場合と成体骨髄造血細胞を起源とする場合で白血病の性質が異なるという結果は、発症年齢と関連した単球系 AML の生物学的悪性度等の多様性が、起源細胞の発生段階の違いに由来していることを示唆しており、予後不良の分子機構を解明し、新たな治療標的の同定につながる事が期待される。

③PNA/DNA の二重鎖は DNA/DNA の二重鎖よりも高い T_m 値を持つ。PNA-mediated realtime PCR

clamping 法は PNA が結合する比較的広い領域に生じた変異を高感度にスクリーニング可能であり、多種類の PNA プローブの組み合わせも有効であった。一方、*FGFR3* 遺伝子変異の検出感度は PCR 反応の際の鋳型 DNA 量が少ない場合には低下した。この原因は、PCR に使用される耐熱性ポリメラーゼの fidelity の限界を超える増幅が行われた時に引き起こされる nucleotide misincorporation によるものと考えられ、十分な検出感度を得るためには 50ng 程度の鋳型 DNA が必要であるとわかった。尿などの体液を対象とする場合、半数以上の検体で DNA 量が 50ng 以下となると予想され、少量の鋳型 DNA から高感度に変異を開発する方法の確立が必要と考えられる。

表在性膀胱がんは初発膀胱がんの約 80% を占め、TUR-Bt で治療可能であるが、50～70% は再発を繰り返し、10 から 30% は浸潤性膀胱がんに進展し、膀胱摘出術や全身化学放射線療法等の適応となる。*FGFR3* 遺伝子変異の検出は、これまで遺伝子異常がほとんど報告されていなかった pTa/grade 1 の表在性膀胱がんの 80% 弱に認められ、比較的悪性度と考えられてきた表在性膀胱がんの再発リスクを評価し、術後サーベイランスに有用な情報を提供する。

④家族性腫瘍症候群 MEN1 型やその軽症型である FIHP、あるいは *MEN1* 遺伝子の生殖細胞系列が同定された一件孤発性の副甲状腺腫瘍症例の臨床病型の重篤度は、変異によるメニン蛋白質の機能喪失の程度を反映すると考えられるが、メニンの生化学的活性を簡便に測定する方法がなく、ミスセンス変異等の遺伝子型から将来の臨床像を予測することができなかった。本研究により、典型的な MEN1 型を来すメニンと同程度の不安定性を呈するミスセンス変異型メニンを持つ患者は、副甲状腺腫瘍以外の腫瘍を積極的に探索するなど、MEN1 型として診療を行う必要があることが示唆された。一方、安定性の高いミスセンス変異型メニンをもつ患者は、比較的軽症型の臨床経過をとる可能性が考えられる。

⑤ *IFN- α* 遺伝子をウイルスベクターよりも安全性に優れるプラスミド・リポソーム複合体として腫瘍内注入し、造血幹細胞移植と併用することにより強力な抗腫

瘍効果を発揮できることは、本複合療法が従来の免疫療法の限界を突破する効果と安全性に優れた治療法となりうることを示している。今後は、投与量や投与スケジュールなどの検討を行い、臨床応用につなげる。また、治療によるサイトカイン等の発現の網羅的解析や免疫抑制性環境打破の過程の解明を通して本複合療法の強化に結びつける。

⑥乳がんの浸潤転移のアッセイ系で乳がんのリンパ節転移を制御する Slug 分子を同定し、その発現を siRNA によって抑制することで、*in vitro* 及び *in vivo* での乳がん細胞の転移を実際に抑制することを示したことは、siRNA 医薬による転移の制御の可能性を示唆する。本治療戦略は、今後多くのがんの転移に関わる分子群を同定する上でも有効と考えられる。

E. 結論

①食道がん治療前生検のマイクロアレイ解析データと臨床病理情報の集積によって、食道がんの予知医療の実現と新規分子標的薬の開発を進めた。②多数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効性が示された。また、小児 AML の病態の多様性が、起源細胞の発生段階に由来している可能性が示された。③尿中の *FGFR3* 遺伝子変異の定量的検出は、低異型度の表在性膀胱がんの 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、十分な精度を持つ臨床遺伝子検査技術の開発が求められる。④変異型メニンの細胞内安定性を計測する方法を開発し、多内分泌腺腫瘍症1型の典型例と軽症型の亜型を鑑別する可能性が示された。⑤GVHD 発症が無く、ドナーを必要としない自家造血幹細胞移植と *IFN- β* 発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入の複合療法は、安全性が高く、全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できるため、固形がんに対する有望な免疫治療戦略となる。⑥ヒト前立腺がんや乳がんの転移に関与する新たな分子種を特定し、それらを *in vivo* の RNAi で抑制することが、転移抑制につながることを、動物モデルを用いて実証した。

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

無し

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ゲノム解析・情報研究部 室長

研究要旨 昨年度までに、マイクロアレイを用いて小児急性骨髄性白血病(AML)百数十症例の遺伝子発現プロファイル解析を行い、小児 AML が遺伝子発現により六つのサブタイプ[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]に分類されること、中間リスク群である単球系 AML の中に遺伝子発現により特定でき、年長児に多い予後不良サブグループが存在することを明らかにして来た。これらの結果を基に本年度は、①マイクロアレイ検査による診断法の開発、②単球系 AML における予後不良サブグループの生物学的背景の解析を行った。

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)

臨床検体を用いる解析は、連結可能匿名化された試料のみを用い、国立がんセンター倫理審査委員会の承認の下「疫学研究に関する倫理指針」に従って行う。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

①診断法の開発:

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、層別化治療が行われている。この層別化治療において、t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML を正確に診断することは必須である。また、予後不良サブグループを検出するためにも、まず基本的なサブタイプに正しく

分類することが必要である。そこで、マイクロアレイ遺伝子発現データを用いて、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 の六つのサブタイプに分類する診断法の開発を行った。サブタイプ特異的に発現する遺伝子に関して各サブタイプの標準遺伝子発現パターン(重心)を計算し、それらの重心からの距離を基に各症例を診断するアルゴリズムを構築した。この診断アルゴリズムを小児単球系 AML 15 症例、成人 AML 391 症例の遺伝子発現データに適用し、小児単球系 AML においては 100%、成人 AML においても t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML については 98% の精度で診断できることを示した。

② 予後不良サブグループの生物学的背景の解析:

単球系 AML の予後不良サブグループが年長児に多いことから、白血病の起源となる造血細胞の発生段階が影響している可能性が考えられた。そこで、*MLL* 融合遺伝子を用いてマウスに単球系 AML を発症させるモデルシステムを用い、胎仔肝造血細胞と成体骨髄造血細胞を起源として白血病を発症させ、比較した。その結果、胎仔肝細胞の方が成体骨髄細胞に比べて早期に白血病を引き起こすこと、一方、*in vitro* においては成体骨髄由来白血病細胞の方が胎仔肝由来白血病細胞より強い増殖能を示すことが明らかとなった。これらの結果は、乳児単球系 AML の早期発症と、年長児単球系 AML の予後不良を反映したものではないかと考えられた。

D. 考察

AML はサブタイプにより治療内容や予後が異なるため、適切な治療を行うには適確な診断が重要である。現在、AML の診断及び層別化には、白血病細胞の形態検査、免疫学的性質(免疫染色、細胞表面マーカー)の検査、染色体分析(G-banding、FISH)、遺伝子検査(RT-PCR、サザンハイブリダイゼーション)など数多くの検査が用いられ、相当量

の検体が必要となっている。マイクロアレイによる検査はわずか 20 ng の RNA で可能で、しかも一つの検査で多くの情報を得られるため、必要最小限の検体量で効率的に診断を行える。しばしば十分な検体採取が困難な小児患者においては特に有効だと考える。

白血病の起源となる造血細胞は、胎生期から成体に至る過程で性質が変化することが知られている。胎仔肝造血細胞を起源とする場合と成体骨髄造血細胞を起源とする場合で生じる白血病の性質が異なるという結果は、発症年齢と関連した単球系 AML の多様性が、起源細胞の発生段階の違いに由来していることを示唆している。このモデルシステムを今後詳細に解析することで、予後不良の原因を明らかにすることができると考える。

E. 結論

今後、多数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効性が示された。また、小児 AML の病態の多様性が、起源細胞の発生段階に由来している可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Jo, et al.: Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Br. J. Haematol.*, 144, 917-929 (2009).
- 2) Y. Tagata, H Ichikawa, et al., Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP_β and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia* 22, 273-280, 2008

2. 学会発表

- 1) 城 青衣他: Novel diagnostic approach to pediatric acute myelogenous leukemia with DNA microarray (DNA マイクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断), 第 67 回日本癌学会学術総会.

- 2) 城 青衣他:DNA マイクロアレイによる小児急性
骨髄性白血病の診断, 第50回日本小児血液学
会.

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 Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)はチロシキナーゼ受容体をコードする遺伝子であり、多発性骨髄腫、子宮頸癌、尿路上皮癌等の悪性腫瘍で体細胞変異が報告されている。ペプチド核酸(PNA)を使用した PNA mediated realtime PCR-clamping 法により、膀胱尿路上皮癌における *FGFR3* 遺伝子変異の高感度検出を試みた。膀胱原発の尿路上皮癌 154 例を対象として *FGFR3* 遺伝子変異を検出したところ、55 例(35.7%)に *FGFR3* 遺伝子変異が認められ、特に pTa,Grade1 症例では 76.9% に変異が認められたのに対して、筋層浸潤を伴う \geq pT2, Grade 3 症例では 8.0%と低率であり、*FGFR3* 遺伝子変異陽性例は経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-Bt)の対象となる低異型度の表在性膀胱癌における主要な遺伝子変異と考えられた。*FGFR3* 遺伝子変異を認めた表在性膀胱癌では尿中からも遺伝子変異の定量的検出が可能であり、尿中からの *FGFR3* 遺伝子変異の検出は表在性膀胱癌の再発リスクを診断する分子腫瘍マーカーとして有用と考えられる。

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 Peptide Nucleic Acid (PNA)の存在下に Realtime PCR 法を施行し、変異アレルを選択的に増幅し検出する PNA-mediated Realtime PCR clamping 法を用いて、膀胱癌における Fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*)遺伝子変異の検出と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意義に関する検討を行った。

B. 研究方法

FGFR3 変異の検出にはペプチド核酸(PNA)とライトサイクラーを使用した Peptide Nucleic Acid (PNA)-mediated Realtime PCR clamping 法を用い

た。*FGFR3* 遺伝子変異の Hot spot である Exon7 の codon 248~249, Exon10 の codon 372~375 および Exon15 の codon652 を中心として野生型 *FGFR3* 遺伝子の塩基配列に相補的な 15 から 18 塩基程度の Peptide Nucleic Acid (PNA)鎖を合成し、PCR primer の片側が PNA 鎖の 5 の末端に overlap し、野生型 DNA へのプライマーのアニーリングとそれに続く DNA の増幅を阻止するようにプライマーを設計した。*FGFR3* 遺伝子変異を陽性の膀胱癌培養細胞株である UM-UC-14、MGHU3 および J82 より抽出したゲノム DNA を陽性対照として、正常ゲノム DNA で系列希釈し、変異型 *FGFR3* 遺伝子の野生型に対する濃度(Tumor Cellularity)が 100%、10%、1%、0%となるように調整したサンプルをコントロールとして用いた。膀胱原発の尿路上皮癌 154 症例を対象として TUR-Bt の際に得られた腫瘍組織および術前に得られた尿沈渣から抽出したゲノム DNA を鋳型として *FGFR3* 遺伝子変

異を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は栃木県立がんセンターの臨床研究審査委員会の承認を受けた研究計画『膀胱癌を対象とする*FGFR3*遺伝子変異検出の臨床的意義に関する研究(A-066)』に基づいて実施された。

C. 研究成果

ゲノム DNA 50 ng を鋳型とし、*FGFR3* exon 7 の PNA-mediated realtime PCR clamping 法 を施行したところ、Tumor Cellularity 100%、10%、1%、0% の assay standard の Crossing Point (CP) はそれぞれ 26.62、30.12、32.97、33.82 cycle であった。PCR 産物をシーケンスしたところ、100%、10%、1% の standard では変異アレル由来のシグナルである S249C のみが認められ、0% は wild type であった。以上の結果より本測定系では検体中に 1% の濃度で存在する *FGFR3* 遺伝子変異の選択的な増幅と検出が可能と考えられた。一方、 $n=8$ として変異 DNA 濃度が 100%、10%、1%、0% における CP の平均値と標準偏差より変動係数(CV 値)を求めたところ、鋳型 DNA 量が 50ng の場合には 26.68 ころ、鋳型変動係数 0% 能と考えられた。一方、amping 画『膀胱癌を対象とする PCR clamping 画』、再発や浸潤性癌への進展のリスク推定にであったのに対して、鋳型 DNA 量が 10ng では 29.27 に対して、鋳型 0.50%)、30.09、して、鋳型変動係数 0% 能と考えられた。一方、amping 画『膀胱癌を対象とする PCR clamping 画』、鋳型 DNA 量が 1ng では、32.86 に対して、鋳型 0.50%)、30.09、して、鋳型変動係数 0% 能と考えられた。一方、.18 (0.55%)、33.60 定にえられた。一方であった。鋳型 DNA 量 1ng、変異 DNA 量が 0% の条件で得られた PCR 産物を直接塩基配列決定法で解析したところ、いずれの PCR 産物でも PNA 結合部位に野生型と異なる塩基配列を持つ点突然変異が認められた。上記の結果より、臨床検体の解析では鋳型 DNA 量を 50 ng として *FGFR3* exon 7、10 および 15 における変異の有無を解析した。各 Run の際に系列希釈した standard

を入れ、変異 DNA 濃度 1% の standard の CP よりも少ない CP を示した検体を変異陽性と判定し、直接塩基配列決定法により変異型を同定した。

膀胱原発の尿路上皮癌 154 例を対象として *FGFR3* 遺伝子変異を検出したところ、55 例 (35.7%) に *FGFR3* 遺伝子変異が認められた。変異の検出された部位は細胞外ドメインである Exon7、28 例 (49.0%)、膜貫通ドメインである Exon10、27 例 (47.4%)、細胞質ドメインである Exon15、2 例 (3.6%) であり、2 例で Exon7 および Exon10 の重複変異が認められた。組織学的深達度と異型度の比較では pTa、50% (29/58 例)、pT1、34.3% (23/67 例)、 ≥ 1 、34.3% (23/67 例)、Grade1、73.3% (11/15 例)、Grade2、44.2% (34/77 例)、Grade3、16.1% (10/62 例) であり、*FGFR3* 遺伝子変異の陽性率は pTa および pT1 stage、Grade1 および Grade2 の症例で有意に高率であった。特に pTa、Grade1 では 76.9% に変異が認められたのに対して、筋層浸潤を伴う ≥ 2 変異が認められたのに対し症例では 8.0% と低率であり、*FGFR3* 遺伝子変異は経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)の対象となる低異型度の表在性膀胱癌における主要な遺伝子変異と考えられた。さらに TUR-bt 実施前の尿中からの *FGFR3* 遺伝子変異を検出したところ、*FGFR3* 遺伝子変異を認めた表在性膀胱癌 12 例中 11 例 (91.2%) で尿中に同遺伝子変異の検出が可能であった。TUR-bt を実施した pTa および pT1 stage の表在性膀胱癌 110 例の検討では、*FGFR3* 変異の有無は無病生存期間の検討で有意差を認めなかったが、術前の尿中 *FGFR3* 遺伝子変異の濃度は表在性膀胱癌の再発を予測する有意な予後因子であることが明らかとなった。腫瘍組織の解析で *FGFR3* 遺伝子変異が認められた表在性膀胱癌 24 例の解析で尿中 *FGFR3* 遺伝子変異濃度が 11% 以上の高値を示した 12 症例では 78% に再発が認められたのに対して、*FGFR3* 遺伝子変異濃度が 11% 未満の 9 症例では再発は 17% と低率であり、両群間に有意差が認められた ($p=0.002$)。

D. 考察

Peptide Nucleic Acid (PNA)は主鎖にペプチド構造を保持しDNA やRNA に似た構造を持つ人工的に合成された分子である。PNA 鎖は陰性に荷電するリン酸基を持たず、PNA/DNA の二重鎖はDNA/DNA の二重鎖よりも強い結合を形成し、高いTm 値を持つという特徴がある。PNA-mediated realtime PCR clamping 法はPNA が結合する比較的広い領域に生じた変異を高感度にスクリーニング可能であり、多種類のPNA プローブを組み合わせることによって、遺伝子変異の網羅的スクリーニングに応用可能と考えられた。一方、*FGFR3* 遺伝子変異の検出感度はPCR 反応の際の鋳型DNA 量が少ない場合には低下することが明らかとなった。この原因は、PCR に使用される耐熱性ポリメラーゼのfidelity の限界を超える増幅が行われた場合に引き起こされるnucleotide misincorporation によるものと考えられる。misincorporation は通常のPCR 条件では10の5乗あるいは6乗塩基に一回程度の頻度で生じるものと考えられている。一方、PNA の存在下では野生型の塩基配列に対するプライマーのアニーリングが阻害される結果、鋳型DNA 量が少ない場合にはmisincorporation により生じた点突然変異が相対的に増幅され易くなり、*FGFR3* 遺伝子変異の検出感度を低下させる原因となることが推測される。今回の検討では鋳型DNA 量が10ng の場合、1%以下の遺伝子変異の検出が困難となること、1ng 以下の場合には10%以下の遺伝子変異の検出が困難となることが示され、十分な検出感度を得るためには50ng 程度の鋳型DNA が必要と考えられた。

表在性膀胱癌は初発膀胱癌の約80%を占め、経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)で治療可能であるが、50~70%は再発を繰り返し、10から30%は浸潤性膀胱癌に進展し、膀胱摘出術、あるいは全身化学放射線療法等の適応となる。*FGFR3* 遺伝子変異の検出は、これまで遺伝子異常がほとんど報告されていなかったpTaG1 stage の表在性膀胱癌の80%弱に認められ、TUR-bt 術前の尿中

FGFR3 遺伝子変異の定量的検出は表在性膀胱癌の再発に関する予後因子であることが明らかとなった。今回の結果は、比較的低悪性度と考えられてきた表在性膀胱癌の再発リスクを明らかにし、表在性膀胱癌の術後サーベイランスに有用な情報を提供するものと考えられる。今回の検討では鋳型DNA 量が10ng の場合、1%以下の遺伝子変異の検出が困難となること、1ng 以下の場合には10%以下の遺伝子変異の検出が困難となることが示された。尿などの体液を対象とする場合、半数以上の検体で抽出されるDNA 量が50ng 以下となることが予想され、少量の鋳型DNA から高感度に変異を開発する方法の確立が今後必要と考えられる。

E. 結論

尿中の*FGFR3* 遺伝子変異の定量的検出は低異型度の表在性膀胱癌の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。今後、膀胱癌術後尿を用いたフォローアップによる再発の早期診断を目的としてさらに検討を進める予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirai Y, Sugano K et al. Molecular epidemiological and mutational analysis of DNA mismatch repair(MMR) genes in endometrial cancer patients with HNPCC-associated familial predisposition to cancer. *Cancer Sci*.99:1715-9.2008.
- 2) Yamashita M, Sugano K et al. Short Communication: Psychological impact and associated factors after disclosure of genetic test results concerning hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Stress and Health* 24: 407-412,2008
- 3) Iwama T, Sugano K et al. Identification of somatic APC mutations in recurrent desmoid

tumors in a patient with familial adenomatous polyposis to determine actual recurrence of the original tumor or de novo occurrence. *Fam Cancer*. 8:51-4.2009.

- 4) Miyake M, Sugano K et al. siRNA-mediated knockdown of the heme synthesis and degradation pathways: modulation of treatment effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in urothelial cancer cell lines. *Photochem Photobiol* 2009 (Published Online: Mar 20 2009)

2. 学会発表

- 1) Miyake M, Sugano K et al.: Sensitive detection of fibroblast growth factor receptor 3 gene mutations in urothelial cell carcinoma of the bladder and urine sediments by peptide nucleic acid mediated real-time PCR clamping (October 6,2008) 36th Congress of the International Society of oncology and Biomarkers (Tokyo)
- 2) 菅野康吉、中村清吾、安藤二郎、神野広光、池田正、青木大輔、福富隆志、吉田輝彦、新井正美、平井康夫、霞富士雄、福井崇史、三木義男: 遺伝性乳癌卵巣癌が疑われる日本人を対象とする BRCA1/2 遺伝子変異の横断的研究 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日(水)名古屋国際会議場 (愛知県)
- 3) 三宅牧人、菅野康吉、市川寛樹、川島清隆、平林かおる、金井弥栄、藤本清秀、平尾佳彦: 膀胱癌における *FGFR3* 遺伝子点突然変異と臨床病理学的因子との関連性の検討 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日(水)名古屋国際会議場(愛知県)
- 4) 松本絵里、今井一穂、友田茉莉、松村善昭、川島清隆、飯田勝之、小池祐介、平林かおる、五十嵐誠治、前田耕司、服菌真一、菅野康吉: 膀胱癌の遺伝子診断-腫瘍組織および尿検体からの9番染色体および17番染色体短腕の LOH

検出の有用性についての検討 第28回日本分子腫瘍マーカー研究会 2008 年 10 月 27 日(月)名古屋国際会議場 (愛知県)

- 5) 石井正純、三宅牧人、菅野康吉: 膀胱癌株由来ミトコンドリア欠損細胞におけるプロトポルフィリン IX 蓄積量の検討 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日(水)名古屋国際会議場(愛知県)

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
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 多内分泌腺腫瘍症1型の原因遺伝子 *MEN1* の germline におけるミスセンス変異の臨床的意義を明らかにするために、その遺伝子産物である変異型メンンの細胞内安定性を計測する方法を考案し、変異型メンンの安定性と当該変異に起因する臨床像との相関を検討した。その結果、変異型メンンの細胞内安定性を調べることにより、変異保持者の将来の臨床経過を推定できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

遺伝性腫瘍の診療において、遺伝子検査による原因遺伝子の germline 変異の同定は発端者の確定診断や血縁者の保因者診断に有用である。しかし、遺伝子検査により同定された変異の臨床的意義が必ずしも明瞭でない場合もあり、検査結果を治療や遺伝カウンセリングに生かし切れないことも多い。がん抑制遺伝子の機能喪失型変異には様々な変異型が見られ、特にミスセンス変異の場合はそれが病因論的意義を有する変異であるのか、あるいは稀少な正常多型にすぎないのか判断に迷うことがある。本研究は、がん抑制遺伝子の変異が原因となる家族性腫瘍症候群の一つである多内分泌腺腫瘍症1型(MEN1型)を対象として、germline 変異として同定されたミスセンス変異が疾病の原因となり得るか否か、また、どのような臨床病型の原因となるかを推定する方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

以前、我々は *MEN1* 遺伝子の遺伝子産物メンンに関して、典型的な *MEN1* 型を来すミスセンス変異型メンンが、急速にユビキチン化されて分解されることを見出した。このような細胞内不安定性によるタ

ンパクの量的減少がミスセンス変異型メンンの機能喪失をもたらす機序の一つと考えられるため、変異型メンンの細胞内安定性を調べることにより、変異型メンンの機能レベルを推定できる可能性がある。そこで、まず正常型や種々のミスセンス変異型メンンの細胞内安定性を正確に比較するための測定系の確立を試みた。すなわち、変異型メンンと正常メンンに Flag 又は Myc タグを付加したタンパクを発現する種々のプラスミドを作成し、トランスフェクション試薬を用いて培養細胞に導入した。これにより一過性に発現させた正常メンンと変異型メンンのタンパク量を抗 Flag 抗体および抗 Myc 抗体を用いた免疫プロット法または免疫細胞化学的手法により検出し、既報の種々の変異型メンンの安定性を正常型(野生型及び正常多型)と比較して、変異型メンンがもたらす臨床像との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の試料等を用いる研究や実験動物を用いる研究に適用される倫理指針の適用を受けるものではない。

C. 研究結果

変異型メンンのみを発現するプラスミドをトランスフェクションにより培養細胞に導入すると、プラスミド

毎に導入効率が著しく異なった。したがって、プラスミドから転写・翻訳されるタンパクの発現量を免疫プロット法等により検出して比較するのみでは、タンパクの細胞内不安定性を正確に推定することはできなかった。しかし、シクロヘキシミドによりタンパクの合成を阻害した場合のタンパク量の減少率を比較すると、正常メンよりも典型的な MEN1 型の原因となるミスセンス変異型メンの減少率が概ね増大していた。すなわち、疾病の原因となるミスセンス変異型メンが不安定であることを追認できた。

プラスミド導入効率の差異による発現量の変動を補正するため、内部対照として同時に導入して発現する正常メンを用いた。しかし、タグを付加した正常及びミスセンス変異型メンを個別に発現するプラスミドを作製し、それらを混和して同時に培養細胞に導入した場合には、用いた個々のプラスミドの量や導入効率を一定にするのは困難であり、発現タンパク量の比較による正常及びミスセンス変異型メンの安定性を推定することは困難と思われた。そこで、2種類のタンパクを1本の mRNA として転写できる発現ベクター (pCMV-BICEP-4) を用い、対照とする正常メンと検査するミスセンス変異型メンの両方の cDNA を組み込んだプラスミドを作成した。その場合、プラスミドから転写される bicistronic mRNA の上流側に Flag タグ付加ミスセンス変異型メンの cDNA を配置し、internal ribosomal entry site の下流に Myc タグ付加正常 (野生型) メンの cDNA を配置したプラスミドと、両タンパクの cDNA の順序を逆に配置したプラスミドの両者を作成した。プラスミドの一過性導入により正常及びミスセンス変異型メンの両タンパクを培養細胞 (WI38VA13) において発現させ、各タグに対する fluorescein 付加抗体及び Cy3 付加抗体を用いて、蛍光顕微鏡観察下における同一細胞中の蛍光強度を比較した。トランスフェクションした培養細胞に出現する mRNA 中に存在する Flag タグ付加メン及び Myc タグ付加メンの配列のコピー数がほぼ等しいことは、定量的 RT-PCR

により確認した。各細胞内の蛍光強度の比較には画像解析ソフト WinROOF を用いた。

その結果、既知の2種類の正常多型メン (R171Q 及び A541T) は野生型メンと同様にタンパク発現量が多く、一方16種類の典型的な MEN1 型の原因となるミスセンス変異型メンは不安定であった。核移行シグナル配列を欠くナンセンス変異型メン R460X は、核内および細胞質のいずれにもほとんど変異型メンタンパクが検出できなかった。一方、MEN1 型の軽症亜型として知られている家族性副甲状腺機能亢進症 (FIHP) の原因として報告されている14種類のミスセンス変異型メンを検討した結果、ほぼ正常型メンと同様の安定性を呈するものから、典型的な MEN1 型を来す変異型メンと同様の不安定性を呈するものまで多岐にわたった。また、一見孤発性に出現した副甲状腺腫瘍患者に認められた germline 変異のうち、7種類のミスセンス変異を検討したところ、FIHP と同様にその安定性は多岐にわたった。正常型メンとミスセンス変異型メンの配置順序を逆転させたプラスミドを用いても、変異型メンの安定性に関してほぼ同様の結果を得た。

メンの機能として、転写因子 JunD を介する遺伝子転写を抑制するリプレッサー活性が知られている。そこで、JunD 応答配列を有するルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて、ミスセンス変異型メンによる JunD 転写活性の抑制能を比較した。その結果、FIHP の原因となる安定性の高いメンは、転写抑制能を保持していることが明らかになった。

D. 考察

家族性腫瘍症候群 MEN1 型は副甲状腺・膵腸管内分泌組織・下垂体に種々のホルモン産生腫瘍が発生する常染色体優性の家族性腫瘍症候群であり、その原因遺伝子 MEN1 の germline におけるミスセンス変異は、上記腫瘍を多発する典型的な MEN1 型の他、その軽症型である FIHP の原因にもなる。また、FIHP であっても浸透率が極端に低い

場合、副甲状腺腫瘍が孤発性に発生したように見える場合があり、実際、低頻度ではあるが一見孤発性の副甲状腺腫瘍患者にも *MEN1* 遺伝子の germline 変異が認められている。このような臨床病型の重篤度は、遺伝子産物メニンの変異による機能喪失の程度を反映しているものと考えられるが、メニンの生化学的活性を簡便に測定する方法はなく、特にミスセンス変異の場合は germline における存在を知り得ても、直ちに将来の臨床像を予測することは不可能である。本研究の結果より、正常型メニン(野生型及び正常多型)と典型的な *MEN1* 型の患者に見られるミスセンス変異型メニンは、その細胞内安定性に明かな差があること、また、軽症型の一部は安定なミスセンス変異型メニンによるものであることが判明した。従って、典型的な *MEN1* 型を来すメニンと同程度の不安定性を呈するミスセンス変異型メニンを持つ患者は、副甲状腺腫瘍以外の腫瘍を積極的に探索するなど、*MEN1* 型として診療を行う必要があることが示唆された。一方、安定性の高いミスセンス変異型メニンをもつ患者は、比較的軽症型の臨床経過をとる可能性が考えられる。

E. 結論

変異型メニンの細胞内安定性を計測する方法を開発し、ミスセンス変異型メニンの細胞内安定性と表現型との相関を解析した結果、典型的な *MEN1* 型を呈する症例に見られる変異は細胞内安定性が低下していることが示された。一方、軽症型には比較的安定なミスセンス変異型メニンが見られた。本法により多内分泌腺腫瘍症1型の典型例と軽症型の重型を鑑別できる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohkura N, Nagamura Y, Tsukada T.

Differential transactivation by orphan nuclear receptor NOR1 and its fusion gene product EWS/NOR1: possible involvement of

poly(ADP-ribose) polymerase I, PARP-1. *J Cell Biochem* 105: 785-800, 2008.

2) Tsukada T, Nagamura Y, Ohkura N. *MEN1* gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer Sci* 100: 209-215, 2009.

2. 学会発表

- 1) 塚田俊彦、永村優央子、大倉永也、多内分泌腺腫瘍症1型類縁疾患の臨床病型と変異型メニンの安定性の相関、第67回日本癌学会学術総会、2008
- 2) 大倉永也、永村優央子、塚田俊彦、核内受容体 NOR1 と染色体転座由来融合遺伝子産物 EWS/NOR1 との転写調節における差異、第67回日本癌学会学術総会、2008

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

なし

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、ヒト乳がん細胞の動物個体でのリンパ節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として Slug を同定し、この分子を抑制する siRNA が動物における乳がんの全身への転移を抑制することを示した。

A. 研究目的

がんの治療において、薬剤耐性をいかに克服し、また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、乳がんの薬剤耐性腫瘍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探索を、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した。具体的には、転移にともなって発現の上昇する遺伝子群を選抜、今年度は乳がんのリンパ節転移のある患者サンプルで発現が高い20以上の遺伝子の候補に的を絞り、それらの発現を抑制する siRNA を合成し、ヒト乳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)の抑制効果をバイオフィトニ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。また前年度に引き続き、ヒト前立腺がんが発現が低下し、骨転移との相関が認められた microRNA-16 についての解析も、培養細胞や動物モデルにおいて検討を進めた。

C. 研究結果:

(1)乳がん細胞のリンパ節転移に関与する Slug 分子の解析: イメージング動物を用いたヒト乳がん細胞 MDA-MB231 のリンパ節転移の系を確立し、転移性乳がん細胞で高発現している Slug に対する siRNA が、リンパ節転移を顕著に抑制することを明らかにするとともに、Slug の下流の分子である E-cad が相反して発現が回復することを示した。(2)前立腺がんの骨転移を抑制する microRNA 解析: 前立腺がんやその細胞株で発現の低下している microRNA16 の発現を元に戻すことで、マウスの骨転移モデルにおいて、前立腺がんの増殖を顕著に抑制すること、および microRNA16 の標的となる mRNA 群が主に細胞周期や細胞増殖に関わる遺伝子群であることをつきとめた。(3)乳がん細胞の薬剤耐性株における microRNA の発現プロファイルの解析を終了し、複数の候補 microRNA を同定した。

D. 考察:

乳がんのリンパ節転移を制御する Slug 分子を乳が

んの浸潤転移のアクセシ系で同定し、その発現を RNAi の手法である siRNA によって抑制することで、*in vitro* 及び *in vivo* での乳がん細胞の転移を実際に抑制することを示したことは、今後、siRNA のような核酸医薬による転移の制御の可能性を示した。また、本研究での戦略は、今後おおくのがん種の転移に関わる分子群を同定する上でも有効と考えられる。薬剤耐性に関わる分子群に関しては、ようやくその候補が浮かび上がった段階なので、今後はその中でどの分子、あるいは microRNA が耐性を生み出しているかを、メカニズムの解明とともに進めている必要がある。

E. 結論:

ヒト前立腺がんや乳がんの転移に関与する新たな分子種を特定し、それらを RNA 干渉の方法で抑制することが、転移の抑制につながることを、動物モデルを用いて実証することが出来た。それらの RNA 干渉の分子によって制御される遺伝子のパスウェイを明らかにすることで、さらなる転移メカニズムの解明をめざし、創薬へとつなげる努力をする。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, Banas A, Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. In: Sioud M (eds), siRNA and miRNA Gene Silencing. USA, Humana Press, pp 83-92, 2009
- 2) Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*, 13:658-670, 2008
- 3) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*, 26:2705-2712, 2008

- 4) Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, Ochiya T. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs*, 11:274-278, 2008
- 5) Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29:1134-1138, 2008
- 6) Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya T. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat Med*, 14:939-948, 2008
- 7) Kodama M, Takeshita F, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Pancreatic endocrine and exocrine cell ontogeny from renal capsule-transplanted embryonic stem cells in streptozocin-injured mice. *J Histochem Cytochem*, 56:33-44, 2008
- 8) Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*, 142:293-300, 2008
- 9) 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*, 28:286-294, 2008
- 10) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc of SPIE*, 6868, 2008
- 11) Takahashi R, Kanesashi S, Inoue T, Enomoto T, Kawano M, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Presentation of functional foreign