

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

平成20年度 総括・分担研究報告書 (I～III)

研究代表者 金子 安比古

平成21(2009)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	_____	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	_____	16
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	_____	22
新井 康仁		
3. 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	_____	25
武井 寛幸		
4. 乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測	_____	28
林 慎一		
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	_____	34
角 純子		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	37
---------------------	-------	----

## 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

研究代表者 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** 小児がんの genetic 異常と epigenetic 異常を解明し、診断と治療に役立てるための研究を実施した。7番染色体短腕7pはウイルス腫瘍で4番目に欠失頻度の高い領域であるが、100例のウイルス腫瘍を SNP array で解析し、9例に7p異常を検出した。そのうち1例は7p21に4.3 Mbのホモ欠失を示した。既報告のホモ欠失例と合わせて欠失領域を2.1 Mbに狭めた。遺伝子変異、発現、メチル化解析結果と当該遺伝子の癌との関連を述べた報告から、ホモ欠失領域に位置する2遺伝子、*MEOX2*と*SOX2DC1*を癌抑制候補遺伝子として同定した。7p異常を示す腫瘍は全例 *IGF2*異常や *WT1*異常を伴っており、これらの異常はウイルス腫瘍発生初期に生じると考えられるので、*MEOX2*と*SOX2DC1*異常は腫瘍発生の後期に生じ、進展に関与すると推測された。（金子、新井）

肝芽腫54例を分析し、*IGF2*-uniparental disomy (UPD)を22%に、*IGF2*-loss of imprinting (LOI)を17%に、*IGF2*-retention of imprinting (ROI)を61%に認めた。また、*IGF2*-LOI型腫瘍に関しては、本来、非メチル化状態であるべき母方 *H19*-differentially methylated region (DMR) が高メチル化しており、ウイルス腫瘍と同様に enhancer competition model の破綻により、*IGF2*高発現が生じることを証明した。肝芽腫の *IGF2*異常 (UPD+LOI)頻度は39%であり、ウイルス腫瘍の58%に比して低い。肝芽腫56例の SNP array 解析では、1q, 2q, 8q, 20qの増加や4qの欠失を多く認めた。2q増加では、2q24に共通領域を特定できた。4q欠失は予後と相関し、予後不良のマーカーとして用いることが可能である。（金子、新井）

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。既予後因子解析の結果、HER2陽性であっても、約半数はHerceptinに反応しない例があるなど、現在の子後因子では化学療法の効果予知が十分できてはいない。新たな予後因子の確立をめざして、治療前に採取した乳癌検体のSNP arrayによるゲノム異常解析を開始した。ゲノム増減領域と化学療法反応性の関係では、17q12 (HER2)領域増加腫瘍の治療反応性は良好であり、Herceptinの治療効果を反映していると考えられた。一方、HER2コピー数増加と免疫染色によるHER2陽性所見は必ずしも一致しなかった。不一致例のなかで、治療反応不良腫瘍が多い傾向がみられた。また、8q24領域増加は治療反応性不良と、13q11-q14領域減少は治療反応性良好と相関した。前者には*MYC*と*PVT1*、後者には*BRCA2*と*RBI*が位置しており、それぞれ有力な候補癌遺伝子、癌抑制遺伝子である。責任遺伝子を解明し、乳癌の診断・治療法の改善に役立てたい。（武井）

昨年引き続き、乳癌ホルモン療法の治療効果予測法を確立する研究を行った。臨床への導入を容易にするため、検体をパラフィン包埋切片より抽出したRNAとし、マイクロアレイ研究からその有用性を確認できた候補遺伝子と既知予後因子をコードする遺伝子を RT-PCR 法によって解析することを試みた。また、ERE-GFP 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、患者検体の乳癌細胞に導入して、癌細胞自身の ER (estrogen receptor) 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ので、乳癌検体のER標的遺伝子発現を解析し、ER発現やER活性との相関を検討した。さらに治療前に採取した検体のウイルスアッセイを行

い、術前ホルモン療法の治療効果との比較を継続している。また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のために基礎研究を開始した。(林)

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、(1) 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。昨年度までに、我々は白血病細胞から 7 個の NM23 結合候補蛋白質を同定したが、腫瘍抗原の 1 つである MUC1 (membrane-bound MUC1 cleavage product=MUC1\*) が NM23 の受容体として今年報告された。MUC1\* を含めた NM23 結合候補蛋白質の白血病細胞における発現および分化における発現動態を解析した。一方、乳癌では NM23 高発現は細胞の転移/運動能を抑制するが、昨年この機能と密接に関連しその発現が抑制される下流遺伝子 (EDG2) が報告された。(2) NM23 高発現による白血病細胞の分化抑制機構にも乳癌の転移抑制機構と共通する分子基盤があるのかどうかを検討することを、ひとつの目標としている。白血病細胞の myeloid 系分化誘導において、NM23 発現抑制と EDG2 発現増強という統計的に有意な負の相関があることを明らかにした。このような相関は erythroid 系分化誘導においては認められなかった。したがって、細胞運動能を必要とする myeloid 系への分化誘導を抑制する機構にも乳がん細胞の転移抑制機構と共通する NM23 と EDG2 に関連する分子基盤があると考えられた。(角)

#### 研究分担者

1. 金子 安比古 埼玉県がんセンター臨牀腫瘍研究所 所長
2. 新井 康仁 国立がんセンター研究所 主任研究員
3. 武井 寛幸 埼玉県がんセンター病院 科長 兼 部長
4. 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 教授
5. 角 純子 埼玉県がんセンター臨牀腫瘍研究所 主任研究員

#### A. 研究目的

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、ゲノム構造異常を解明することである。小児がんは成人がんと異なり、胎児期の臓器形成に関わる遺伝子の異常が腫瘍発生に関わる。また、genetic 異常と epigenetic 異常の両方が発癌過程にとって重要であることが分かっている。染色体異常と uniparental disomy (UPD) を同時に検出可能な SNP アレイを用いて腫瘍検体を解析し、それぞれの小児がんに特徴的な染色体異常領域を特定する。

その領域から、腫瘍の発生・進展に関与する遺伝子を特定する。同時にインプリント遺伝子の発現異常や、その発現調節領域である DMR のメチル化状態を分析し、小児がんの発生に関与するインプリント遺伝子異常を解明する。成人がんにおいては、癌抑制遺伝子のメチル化研究が多数行われ、そのメチル化が予後因子であると報告されている。これまで、あまり研究されてこなかった小児癌の癌抑制遺伝子メチル化異常を分析し、予後因子になるかどうかを解明する。以上の研究から、小児がんの発生・進展に関与する遺伝子を特定し、診断・治療の改善に役立てる。(金子、新井)

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、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) リンパ管浸潤陽性。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、化学療法前に腫瘍組織を生検針で採取し、SNPアレイによりゲノム解析を行う。その結果明らかになったゲノム異常と術前化学療法の効果と関連性を検討する。最終的に、化学療法の効果予測に役立つゲノム異常や遺伝子異常を確立することを研究の目的としている。(武井)

乳癌の内分泌治療は、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世代のアロモタゼ阻害剤等の新規薬剤の登場によって急速に進歩した。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、従来通り主にERの発現の有無を指標にして判断しているが、それだけでは不十分である。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、高感度な検査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利益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。この研究は将来の乳癌予防に向けての重要なステップともなると思われる。(林)

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、(1)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。一方、乳癌ではNM23高発現は細胞の転移/運動能を抑制するが、昨年この機能と密接に関連しその発現が抑制される下流遺伝子(IG2)が報告された。そこで

(2) 白血病細胞の分化抑制機構にも乳癌の転移抑制機

構と共通する分子基盤があるのかどうかを検討する。(角)

## B. 研究方法

ウイルス腫瘍100例について、SNPアレイ解析を行い、9例に7p異常を同定した。その中の1例に7p21のホモ欠失がみられた。ウイルス腫瘍細胞株3株、胎児腎、正常腎を用いて、ホモ欠失領域に位置する10遺伝子の発現をRT-PCRで分析した。その結果と、当該遺伝子の癌との関連を述べた報告から、2個の遺伝子、*MEOX2*と*SOX11*を選択し、腫瘍検体を対象にして、両遺伝子の変異解析を実施した。次に、7p異常のある腫瘍4検体と、7p異常のない腫瘍18検体を対象にして*MEOX2*と*SOX11* mRNA発現量を半定量RT-PCRで分析した。また、細胞株3株と腫瘍検体18例を対象にして、DNAをbisulfite処理し、3箇所の*MEOX2* CpG islandsをmethylation-specific PCR (MSP)で分析し、メチル化状態を検討した。また、MSPの結果と*MEOX2* mRNA発現量との関係を検討した。

肝芽腫54例を対象にして*H19*-DMR領域のメチル化状態をCOBRA法にて分析し、高メチル化状態と正常メチル化状態に分類した。次にSNPアレイ解析を行い、*IGF2*領域がretention of heterozygosity (ROH)とloss of heterozygosity (LOH)のどちらであるかを検討した。また、*IGF2*のアレル特異的発現分析を実施し、腫瘍の発現形式がモノアレル発現とバイアレル発現のどちらであるかを検討した。以上の結果より、*IGF2*の状態をloss of heterozygosity (LOH)、loss of imprinting (LOI)、retention of imprinting (ROI)に分類した。定量RT-PCR法により*IGF2*と*H19*のmRNA量を測定し、その結果と*IGF2*パターンにより分類した3群との関係を検討した。一方、肝芽腫56例のSNP array解析を実施し、検出されたゲノム異常と予後との関係を検討した。

肝細胞癌腫瘍45例を対象にして、*H19*-DMRと*SNRPN*-DMRをCOBRA法で分析し、それぞれのメチル化状態を決定した。両DMR領域が高メチル化状態であった7例に対してSNPアレイ解析を行い、高メチル化がLOHとLOIのどちらにより生じているのかを検討した。また、*IGF2*の*ApaI*多型、*SNRPN*の*HpaII*多型を利用して、両領域がヘテロ接合性かホモ接合性状態であるかを検討した。次に、*H19*、*IGF2*、*SNRPN*の各mRNAの発現量をRT-PCR法で半定量した。また、*H19*と*IGF2*については、それぞれの多型部位がヘテロ接合性を示す腫瘍に対してアレル特異的発現分析を実施した。最後に、17種類の癌抑制遺伝子のメチル

化をMSP法により分析し、その頻度と胚細胞腫瘍の3分類(セミノーマ、奇形腫、yolk sac 腫瘍)との関係进行分析した。(金子、新井)

対象は埼玉県立がんセンター病院で2007年4月以降に術前化学療法を受けた浸潤性乳癌患者53症例である。そのうち化学療法後、手術を行い、病理学的に治療効果が判定できたのは41例である。治療前に針生検で腫瘍を採取し、凍結切片を作成した。腫瘍細胞が20%以上浸潤している検体からDNAを抽出した。SNPアレイ(Affymetrix mapping 250K-Nsp array)を用いて腫瘍検体のゲノム異常解析を行った。また、正常末梢血を採取し、腫瘍DNAの対照とした。化学療法はHER2免疫染色の結果、陽性度2+ (FISH+)と3の腫瘍に対しては、Anthracycline、Taxan、およびHerceptin (ATH)を、陽性度0、1、2 (FISH-)の腫瘍に対してはAnthracyclineとTaxan (AT)を使用した。化学療法6コース終了後、手術を行い、組織学的治療効果の判定基準に従い、無効grade 0、やや有効1、かなり有効2、完全奏効3のいずれかに分類した。(武井)

昨年までのマイクロアレイ研究からその有用性を確認できた候補遺伝子群 (*HDAC6*, *EGR3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *Efp*, *PgR*) などのエストロゲン応答遺伝子と既知の予後因子遺伝子群 (*MIB-1*, *HER2*, *Bcl-2*, *ER*) の発現をreal-time RT-PCR法によって解析した。解析に用いる検体は、保存されている手術検体のパラフィン包埋切片より抽出したRNAである。次に、ERE-GFP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、乳癌検体をコラゲナーゼで処理し、調製した初代培養分散細胞に感染導入して、3日後のGFP活性を測定した。これにより、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。また、それらの検体のER標的遺伝子発現をreal-time RT-PCR法で解析し、それらの遺伝子発現とER発現、およびERE-GFP活性との相関を検討した。さらに現在術前患者の生検検体に対して上述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関係を検討するためのデータを蓄積している。一方、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のための基礎研究として、ERE-GFPを安定導入したER陽性乳癌培養細胞株MCF-7-E10細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株の樹立とその特徴を分析している。(林)

がん細胞の特性に結びつく分子の開発手段として、NM23蛋白質への結合を指標としてがん細胞に発現する機能特異的な分子を探索した。組み替え体NM23蛋白質をプローブとしたprotein arrayによるNM23結合蛋白質の

網羅的探索と、白血病細胞抽出液とNM23抗体を用いた免疫共沈降とWestern blottingおよび質量解析等から7個の候補NM23結合蛋白質をすでに同定している。白血病細胞の分化誘導におけるこれらの蛋白質の発現動態をWestern blottingにて解析する。さらに昨年報告されたNM23結合蛋白質である腫瘍抗原MUC1\*については、細胞外ドメインの合成ペプチドを抗原として特異的抗体を製作する。白血病細胞のmyeloid系(単球/好中球)への分化誘導とがん細胞の転移能誘導には、運動能獲得という共通する機能があるので、白血病細胞におけるEDG2発現およびNM23発現との関連を検討した。EDG2およびNM23蛋白質の発現はWestern blottingにて分析した。また、白血病細胞(HL60, NB4, THP-1)のmyeloid系への分化誘導剤および白血病細胞(K562, HEL)のerythroid系への分化誘導剤として*all-trans* retinoic acid (ATRA)を用いた。(角)

(倫理面への配慮)

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い、試料提供者の人権とプライバシーに十分な配慮のもとに実施している。小児がん患者の検体を研究に使用することについて、親より同意を得た。成人がん患者については、本人から検体を研究に使用することについて、同意を得た。研究計画をそれぞれの研究者の所属する施設の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100例を対象にして、SNPアレイ解析を行い、9例に7p異常を同定した。その内訳は7p全体のヘミ欠失が7例、7p21のホモ欠失が1例、7p全体のUPDが1例であった。1例にみられたホモ欠失領域は4.3 Mbであり、イギリスから報告された1例のウイルス腫瘍にみられたホモ欠失領域と一部が重複しており、両腫瘍の共通ホモ欠失領域は2.1 Mbであった。この領域には8個の遺伝子が位置しており、その遺伝子発現を3細胞株、胎児腎、正常小児腎組織を用いてRT-PCRで解析した。1遺伝子は胎児腎と小児腎で非発現、2遺伝子は3細胞株と胎児腎、小児腎で全て発現、1遺伝子は既報告で遺伝子変異なしとなっていたため、その後の分析から除外した。残る4遺伝子の中で、腫瘍との関連が報告されている2遺伝子(*MEOX2*と*SOSTDC1*)について、分析を継続し、変異解析を実施した。*MEOX2*ではポリヒ

スチジンをコードするCAC/CAGリピート数の多型がみられたのみで、塩基の置換はみられなかった。一方、*SCSTDC1*については、アミノ酸置換を引き起こす2箇所の塩基置換が4腫瘍にみられた。両遺伝子のRT-PCRによる発現解析を腫瘍検体により実施した。7p異常のある4例と7p異常のない18例を比較すると*MEK2*の発現は7p正常腫瘍に比べて7p異常で低く( $P=0.01$ )、*SCSTDC1*では発現に差はなかった( $P=0.29$ )。7p異常のある9例と7p異常のない91例を比較すると、臨床所見に差を認めなかったが、7p異常群では*IGF2* UPDまたは*IGF2* UPD + LOIの頻度が7p正常群に比べて高かった( $P=0.028$ と $P=0.014$ )。

肝芽腫54例の*H19*-DMRのメチル化、SNP array、*IGF2* アレル特異的発現解析の結果から、12例(22%)をLOH型、9例(17%)をLOI型、33例(61%)をROI型に分類した。*IGF2* 内の*ApaI*多型部位がヘテロであった9例について解析したところ、2例がバイアレル発現を示すLOI型であり、7例はモノアレル発現を示すROI型であった。バイアレル発現腫瘍の*H19*-DMRは高メチル化状態であったが、モノアレル発現腫瘍では正常メチル化状態を示し、前者でenhancer competition modelの破綻が証明された。定量的RT-PCRの結果から、*H19* mRNAは*IGF2* LOH型とLOI型腫瘍では発現していなかったが、*IGF2* mRNAは高発現していた。一方、*IGF2* ROI型腫瘍では*H19* mRNAと*IGF2* mRNA両者が多くの腫瘍で高発現していた。*IGF2* ROI型腫瘍で*IGF2* mRNAを高発現した腫瘍では*IGF2*の転写因子遺伝子*PLAG1*が発現していた。肝芽腫56例のSNP array解析では、1q、2q、8q、20qの増加や4qの欠失を多く認めた。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。2q増加では、2q24に共通領域を特定できた。4q欠失は予後と相関し、予後不良のマーカーとして用いることが可能となった。

胚細胞腫瘍45例の*H19*-DMRおよび*SNRPN*-DMRのメチル化解析を実施し、その結果と腫瘍の発生部位に基づき25例は正常reprogramming経路、20例は異常reprogramming経路にあることを明らかにした。*H19*-DMRおよび*SNRPN*-DMRのメチル化状態はセミノーマでは完全消去、奇形腫では生理的消去、yolk sac腫瘍では低メチル化から高メチル化まで様々であった。*H19*-DMRのメチル化状態は*IGF2*のモノアレル発現やバイアレル発現と一定の関係を示さなかった。17種類の癌抑制遺伝子のメチル化をMSP法により分析したところ、メチル化した癌抑制遺

伝子数はセミノーマや奇形腫に比べてyolk sac腫瘍に高頻度であった( $P<0.001$ と $P=0.004$ )。Yolk sac腫瘍では癌抑制遺伝子*RASSF1A*、*HOX9*、*RUNX3*、*CASP8*、*SCGB3A1*、*SFRP2*のメチル化を50%以上の腫瘍で認めたが、それぞれのメチル化は予後とは無関係であった。(金子、新井)

化学療法前に針生検により腫瘍の得られた乳癌53例につき、SNPアレイによるゲノム増減の解析を行った。全例になんらかのゲノム異常がみられた。異常の頻度は1~29箇所に分布した。12例以上に共通した染色体増加領域は1q、6p、8p、8q12、8q24、11q、14q、17q12、17q24、20qの10領域であり、12例以上に共通した染色体減少領域は9p24、9p21、8p、13q11-q14、14q、16q、17pの7領域であった。

*HER2* (17q12) 領域の増加は12例にみられた。一方、52例の*HER2*免疫染色の結果、3+15例、2+(FISH+)3例、2+(FISH-)6例、1+18例、010例であった。免疫染色3+の15例中、*HER2* (17q12) 領域のDNA増加は10例にみられたが、残り5例の*HER2*コピー数は正常であった。この5例では、遺伝子増加以外の機構で*HER2*蛋白発現が亢進していると考えられた。免疫染色2+(FISH+)3例のうち1例は*HER2*コピー数増加を、2例は正常*HER2*コピー数を示した。2+(FISH-)6例のうち1例は*HER2*コピー数増加を、5例は正常*HER2*コピー数を示した。このように、*HER2*免疫染色所見と*HER2*コピー数は必ずしも一致しなかった。

化学療法後に抽出した乳癌41例を病理学的に検討し、治療効果を反応不良なgrade 0および1と良好なgrade 2および3の2群に分類した。前述のゲノム増加がみられた10領域と、ゲノム減少がみられた7領域と治療効果との関係を検討したところ、17q12(*HER2*)増加腫瘍の治療反応性が良好であり( $P=0.028$ )、8q24増加腫瘍の治療反応性が不良であった( $P=0.053$ )。一方、13q11-q14減少腫瘍は治療反応性良好な傾向を示した( $P=0.079$ )。(武井)

過去手術後10年以上保存されているパラフィン包埋検体、及び保存期間の短い検体から切り出した切片からRNAを抽出調製し、real-time RT-PCRで検証した結果、十分PCRによる発現解析に耐えうるRNAが得られることを確認した。そこで昨年までのマイクロアレイ研究からその臨床的有用性を確認できたエストロゲン応答遺伝子、*HDAC6*、*BGR3*、*IGFBP4*、*IGFBP5*、*Efp*、*PgR*と既知の予後因子の遺伝子、*MIB-1*、*HER2*、*Bcl-2*、*ER*についてreal-time RT-PCR法によって60例以上の症例の発現解析を実施した。その結果、ほとんどの症例と遺伝子において定量的

解析が可能なが示された。今後、ホルモン療法の反応性のデータとその他の臨床病理学的データが整えられている症例について上記遺伝子発現を検討し、治療効果予測能について検討する。

ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の乳癌検体の ER 活性を解析した。また、同じ検体の ER 標的遺伝子発現を real-time RT-PCR 法で解析し、遺伝子発現と ER 発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。その結果、ER 発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、ER 標的遺伝子発現と ER 活性は相関する傾向にあることが明らかとなった。また、中には ER 陰性でありながら強い ER 活性を示す腫瘍検体が見出され、それらのメカニズム、生物学的意義付けが大変興味深い。さらに現在、治療前に採取した生検検体に対して上述の ERE-GFP 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のデータを蓄積している。

アロマトーゼ阻害剤投与後再発症例の検体を対象にして ERE-GFP ウイルスアッセイを行なったところ、アロマトーゼ阻害剤耐性と考えられる症例であるにも関わらず、ER 活性を有する検体が多く観察された。この中には *in vitro* で抗エストロゲン剤が効果を示す検体がみられた。そこで、アロマトーゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、MCF-7-E10 細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇培地で長期間培養し、耐性となって再び増殖するようになった細胞のコロニーを蛍光顕微鏡下で観察し、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高い ERE 活性を示すコロニーを選択的に単離、培養し、複数の株を樹立した。その性質を詳細に調べている。(林)

NM23 遺伝子は、多くの腫瘍で高発現している。乳癌をはじめとする多くの腫瘍では、がん転移抑制遺伝子として知られている。白血病細胞における NM23 過剰発現は、分化抑制因子として機能するが、その分子機構は不明である。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唆されているので、白血病細胞における NM23 結合蛋白質の探索/同定を試み、7 個の NM23 結合候補蛋白質 (HSC70, RAR $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRY2E) を同定した。白血病細胞 HL60 の ATRA による顆粒球系分化誘導において、S100-A8, S100-A9 蛋白質は顕著に誘導され、HSC70, ROR $\alpha$ , NM23-H2, および NM23-H1 は減少し、各々に分化に伴う発現動態を示した。

NM23 結合蛋白質として報告された腫瘍抗原 MUC1\*については、NM23 受容体として注目できるので、特異的抗体を作製するためにその細胞外ドメインの合成ペプチドを作製した。現在ウサギポリクローナル抗体を作製中である。

白血病細胞における NM23 過剰発現は、分化抑制因子として機能するが、その分子機構は不明である。一方、乳癌細胞における NM23 過剰発現は、運動能/転移能抑制因子として機能するが、最近、その標的遺伝子として LPA 受容体 (EDG2) が報告された。リソホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) はシグナリング分子の働きをするリン脂質誘導体であり、オートタキシンと呼ばれるリソホスホリパーゼ D により生成される。高親和性 Gタンパク共役受容体を活性化し、細胞増殖を刺激する。オートタキシンや EDG2 の異常調節は腫瘍形成と転移に寄与すると報告されている。白血病細胞の単球/好中球への分化誘導とがん細胞の転移能誘導には、運動能獲得という共通する機能があるので、白血病細胞における EDG2 発現および NM23 遺伝子発現との関連を検討した。EDG2 蛋白質の発現は HL60 を含む多くの白血病株細胞で確認できた。また、NM23 蛋白質は HL60 細胞を ATRA で分化誘導すると顕著に減少したが、EDG2 発現は反対に増加した。ATRA による同様な効果は、NB4 細胞の好中球への分化誘導や THP-1 細胞の単球への分化誘導でも観察された。ATRA による myeloid 系分化誘導において、NM23 発現抑制と EDG2 発現増強には統計的に有意な負相関 ( $r = -0.7538$ ,  $P = 0.0237$ ) があつた。しかし、このような相関は ATRA による HEL 細胞や K562 細胞に対する erythroid 系分化誘導においては認められなかった。したがって、細胞運動能を必要とする myeloid 系への分化誘導を抑制する機構にも乳癌の転移抑制機構と共通する NM23 と EDG2 に関連する分子基盤があると考えられた。

(角)

#### D. 考察

ウイルス腫瘍の発生に関わる遺伝子異常として、*WT1*, *IGF2*, *CTNBI*, *WTX* の異常がこれまで報告されてきた。しかし、これらの異常は合わせても、60% の腫瘍に認められるに過ぎず、未知の遺伝子異常の存在が推測されてきた。100 例の SNP array 解析の結果から、9 例に 7p 異常を発見し、そのうち 1 例に 7p21 に局限したホモ欠失を検出した。7p21 ホモ欠失は既に外国から 1 例報告されており、両ホモ欠失の位置を検討し、重複領域を 2.1



Mbに狭めることができた。その欠失領域に位置する8遺伝子のウイルス腫瘍細胞株における発現解析とこれまでの報告された当該遺伝子の腫瘍化との関わりについての研究結果から、*MEOX2*と*SOSTDC1*を候補癌抑制遺伝子として同定した。*MEOX2*発現は7p異常腫瘍で低下しており、発現はexon 1 CpG islandsのメチル化と負の相関傾向を示した。*SOSTDC1*発現については、7p異常腫瘍4例中3例において低下していたが、7p正常腫瘍群と比較して発現頻度に有意差を認めなかった。一方、*SOSTDC1*の2箇所のミスセンス変異を4腫瘍に認めたが、これらの腫瘍の7pは正常であった。*MEOX2*の発現消失は腫瘍の血管新生を促進し、*SOSTDC1*発現異常はWntシグナル伝達系のシグナル伝達を亢進すると推定されている。7p異常腫瘍は*IGF2*や*WT1*の異常を合併すること、また*MEOX2*と*SOSTDC1*の腫瘍化に関わる役割から考えて、両遺伝子異常はウイルス腫瘍の発生ではなく、進展に関わると考えられた。

肝芽腫の発生にはウイルス腫瘍と同様に*IGF2*異常が腫瘍化に関与することが知られている。一方、正常胎児組織では*H19*下流のエンハンサーシグナルを*H19*と*IGF2*が奪いあうというenhancer competition modelが成立すると考えられている。その機序として父方*H19*-DMRはメチル化しているため、インシュレーター蛋白が結合できず、エンハンサーシグナルは*IGF2*を刺激する。一方、母方*H19*-DMRは非メチル化状態であるため、インシュレーター蛋白が結合し、エンハンサーシグナルはブロックされるため*H19*を刺激する。ウイルス腫瘍では本来非メチル化状態である母方*H19*-DMRが高メチル化しているために、エンハンサーシグナルは母方*IGF2*アレルを発現させる。これをenhancer competition modelの破綻と呼び、欧米人ウイルス腫瘍の50%、日本人ウイルス腫瘍の25%に報告されている。これまで、肝芽腫の*IGF2*インプリント消失(LOI)はウイルス腫瘍とは別の機序により生じていると報告されてきたが、私たちは肝芽腫においても、enhancer competition modelの破綻により、*IGF2*/LOIが生じていることを証明した。*IGF2*LOHとLOIの頻度は肝芽腫に比べてウイルス腫瘍において高く、胎児腎の方が、胎児肝より*IGF2*刺激に対する感受性が高いことが示唆された。肝芽腫のSNP array解析では、4q欠失が予後不良マーカーとなった。4q欠失は多くの種類のがんで報告されており、これらに共通する遺伝子が候補になると考えられる。

胚細胞腫瘍においては*H19*-DMRの高メチル化はウイルス腫瘍や肝芽腫と異なり、*IGF2*のバイアレル発現と相関しない。従って、enhancer competition modelとは別の機序により、*IGF2*発現が調節されていると考えられた。Yolk sac腫瘍は他の小児がんに比して、多数の癌抑制遺伝子が、高頻度にメチル化を受けていた。*RASSF1A*など癌抑制遺伝子のメチル化は神経芽腫、肝芽腫、ウイルス腫瘍の予後不良因子であることが報告されているが、yolk sac腫瘍では、癌抑制遺伝子のメチル化は予後不良因子にならないことがわかった。癌抑制遺伝子メチル化の機序がyolk sac腫瘍と他の癌では異なることが示唆された。(金子、新井)

術前化学療法を受ける乳癌53例のSNP array解析の結果、全例に何らかのゲノムコピー数異常を見出した。ゲノムコピー数異常の部位と数はさまざまであり、術前化学療法の適応になる臨床所見を示す腫瘍であっても、ゲノム異常はheterogeneousであることがわかった。HER2免疫染色の結果と*HER2*領域のゲノム増加との関係を分析したところ、必ずしも両者の結果は一致しなかった。免疫染色陽性でゲノム増加を認めた腫瘍はほぼ全例Herceptin治療に反応しているが、両者が不一致の腫瘍にHerceptin治療に反応しない腫瘍があるようだ。これまで自分たちの行った臨床的検討の結果、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。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。今回のSNP arrayの検討で、HER2領域ゲノム増加腫瘍の治療反応性が良好なのは、Herceptinを含む化学療法レジメンの効果が良好であることを反映している。

8q24領域増加を示す腫瘍の化学療法に対する反応は不良であった。この領域には*MYC*、*PVT1*などが位置しており、今後、候補遺伝子の発現異常を検討し、責任遺伝子を同定したい。一方、13q11-q14減少腫瘍の化学療法反応性は良好であった。この領域にはDNA修復に関わる*BRCA2*が位置している。DNA修復能に障害があるため、anthracycline、taxanに対する感受性が増強し、その結果、治療に対する反応が良くなっているのかもしれない。今後、*BRCA2*異常の有無について検討を進める予定である。(武井)

これまで、癌細胞におけるエストロゲン作用の分子機序を解明するため、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、*HDMC6*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報告した。そこで、臨床応用研究として、ヒト組織検体を用いた解析とチップの改良を進めた。昨年用いた3次元型アレイチップによる解析では、約27症例の原発乳癌を明確に2群に層別化でき、搭載コンデンツの有用性が示された。一方、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、より臨床に導入しやすいRT-PCRでの診断キット化が可能になるかもしれない。そこで乳癌症例60例以上を対象にして、エストロゲン応答遺伝子群と既知の予後因子遺伝子の発現をreal-time RT-PCR法によって解析した。次にパラフィン包埋検体から抽出したRNAを用いて定量的解析を実施したところ、再現性のあるデータが得られたので、臨床応用へ近づいたと思われる。今後本法を用いて検体を解析し、ホルモン療法の反応性と臨床病理学的データとの相関を調べる予定である。

ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60数例の癌細胞自身のER活性を解析したところ、ER活性には高いものから低いものまで多様であることが明らかとなった。そのER活性は免疫染色で判定したERの発現とは必ずしも相関しない。ER発現は現在臨床で用いられている主要なホルモン療法の予測因子であり、また一方、ER陽性と判定された症例でも、ホルモン療法が奏効しない症例が知られている。ER活性を見ることがERの正しい機能を評価することになるのか、またホルモン療法の奏効性予測に重要な意味を持つかは臨床的にも重大である。そこで、今回ER活性を検討した症例についてそれらの検体のER標的遺伝子の発現をreal-time RT-PCR法で解析し、遺伝子発現とERの発現、およびERE-GFP活性との相関を検討した。ER標的遺伝子発現とER活性は相関する傾向にあるが、中には矛盾する例もあり、そのメカニズム、生物学的意義付けについて検討している。

現在、術前のホルモン療法の試みが行なわれているが、術前化学療法とは異なり、その効果判定には困難な点が多く、その後の治療選択に曖昧さをもたらしている。そこで、治療前に採取した生検検体に対して上述のERE-GFP ウイルスアッセイを行い、臨床効果との比較のデータを蓄積している。今後さらにデータを蓄積して、ERE-GFPアッセイが有用かどうかを検証していきたい。

さらに、アロマトーゼ阻害剤投与後再発症例の検体を対象にしてERE-GFP ウイルスアッセイを行なったところ、アロマトーゼ阻害剤耐性と考えられる症例であるにも関

わらず、ER活性を有している検体が観察された。この結果は2次治療としてホルモン療法適応の可能性が残されていることを示している。実際in vitroで抗エストロゲン剤に反応した腫瘍検体があるので、耐性獲得機序の解明によって他の有効な治療法の選択や開発が可能になるかもしれない。そこで、アロマトーゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、そのモデル細胞となるようMCF-7-E10細胞を用いて、ERを恒常的に活性化して長期エストロゲン枯渇に耐性となった株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高いER活性を示す株を複数樹立した。現在順次、それらの細胞株の性質を詳細に調べているが、特定の細胞内リン酸化カスケードの活性化が起こっている可能性が高い。(林)

白血病細胞におけるNM23結合蛋白質の探索/同定を試み、7個のNM23結合候補蛋白質を同定した。その内5個は、白血病細胞の分化誘導に伴ってその発現が変動した。今後、分化に伴うNM23との結合形態の変化、細胞内局在の変動、白血病臨床検体における発現の検証、臨床的意義の解析、分化抑制に関与する新しい分子標的としての可能性を検討する。白血病における増殖/分化や予後不良に関与する新しい診断・治療の分子標的として期待できる。一方、NM23による白血病細胞の増殖分化の調節にLPA/EDG2/G-proteinという新しいシグナル伝達系の関与が示唆され、分化に関与する新しい分子標的としての可能性を提示している。(角)

## E. 結論

ウイルス腫瘍のSNP array解析の結果、7pにホモ欠失のある腫瘍を発見し、その欠失領域に位置する2遺伝子、*MEOX2*と*SOSTDC1*を癌抑制候補遺伝子として同定した。両遺伝子の発現異常はウイルス腫瘍の進展に関与すると推測される。

肝芽腫54例を分析し、*IGF2*-UPDを22%に、*IGF2*-LOIを17%に、*IGF2*-ROIを61%に認めた。また、*IGF2*-LOI型腫瘍に関しては、母方*H19*-DMRがメチル化しており、ウイルス腫瘍と同様にenhancer competition modelの破綻により、*IGF2*高発現が生じることを証明した。肝芽腫のSNP array解析の結果4q欠失が予後不良因子となることがわかった。

胚細胞腫瘍45例中25例は正常reprogramming経路、20例は異常reprogramming経路にあることがわかった。癌抑制遺伝子のメチル化はセミノーマではほとんど認め

られず、奇形腫では低頻度に、yolk sac 腫瘍では高頻度に生じていた。Yolk sac 腫瘍を他の小児がんや成人腫瘍と比較すると、より多数の癌抑制遺伝子が、より高頻度にメチル化していたが、そのメチル化はyolk sac 腫瘍の予後因子にならないことが分かった。(金子、新井)

今回実施した乳癌のSNP array 分析から、HER2 免疫染色所見と *HER2* 領域ゲノム増加が一致しない腫瘍の存在がわかった。これまで、HER2 免疫染色陽性腫瘍の約半数は Herceptin 投与に対して反応を示さないことがわかっていて、今後の検討により、その理由を説明できるかもしれない。*HER2* 領域増加とは異なり、8q24 領域増加は治療反応性不良と相関した。この領域に位置する責任遺伝子が新たな分子標的になることを期待する。一方、13q11-q14 減少腫瘍の化学療法反応性は良好であったので、責任遺伝子が *BRC12* であるかどうかを含め、その理由を明らかにしたい。(武井)

エストロゲン応答遺伝子、*HDAC6*, *EGR3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *Efp*, *PgR* と既知の予後因子遺伝子、*MIB-1*, *HER2*, *Bcl-2*, *ER* の発現についてパラフィン包埋切片から抽出したRNAを対象にreal-time RT-PCR法によって60例以上の腫瘍検体を解析した。その結果、ほとんどの検体と遺伝子において定量的解析が可能なが示された。今後、臨床的有用性評価のために多数の腫瘍検体を検討する予定である。

ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の癌細胞のER活性を解析した。その結果と、real-time RT-PCR法で解析したER標的遺伝子発現と免疫染色法によるER発現との相関を検討したところ、ER発現とER活性は必ずしも相関しないが、ER標的遺伝子とER活性は相関する傾向にあることが明らかとなった。中にはER陰性でありながら強いER活性を示す腫瘍が見出され、そのメカニズム、生物学的意義付けが臨床的にも重要であると考えられた。

さらに治療前に採取した生検検体に対して上述のERE-GFP 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のデータを蓄積している。また、数例のアロマトーゼ阻害剤投与後再発症例の検体についてERE-GFP ウイルスアッセイを実施したところ、ER活性を有する検体が多く観察された。その中にはin vitroで抗エストロゲン剤に反応する検体がみられた。そこで、MCF-7-E10細胞を用いて、AI耐性モデル細胞株の樹立を試み、ERが恒常的に活性化している株を複数樹立した。それらの細胞株の性質を詳細に調べている。(林)

白血病細胞における7個のNM23結合候補蛋白質(HSC70, RAR $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRR2E)の内、S100-A8, S100-A9蛋白質発現は白血病細胞HL60のATRAによる分化誘導において顕著に誘導され、反対にHSC70, ROR $\alpha$ , NM23-H2, およびNM23-H1発現は減少し、各々が分化に伴って発現変動することが明らかになった。

白血病細胞のATRAによるmyeloid系への分化誘導に伴って、NM23発現は顕著に抑制され、反対にEDG2の発現は増強された。NM23発現抑制とEDG2発現増強には統計的に有意な負相関があった。白血病細胞におけるNM23過剰発現の標的もEDG2であることが推測された。(角)

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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., Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
- 2) Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., Kaneko, Y. The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer*, 123: 1117-1125, 2008.
- 3) Haruta, M., Matsumoto, Y., Izumi, H., Watanabe, N., Fukuzawa, M., Matsuura, S., Kaneko, Y. Combined BubR1 protein down-regulation and *RASSF1A* hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol. Carcinog.*, 47: 660-666, 2008.
- 4) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M., 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*, 47: 712-727, 2008.
- 5) Honda, S., Arai, Y., Haruta, M., Sasaki, F., Ohira, M., Yamaoka, H., Horie, H., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., Kaneko, Y. Loss of imprinting of *IGF2* correlates with hypermethylation of the *H19* differentially methylated region in hepatoblastoma. *Brit. J. Cancer*, 99: 1891-1899, 2008.
  - 6) Fukushi, D., Watanabe, N., Kasai, F., Haruta, M., Kikuchi, A., Kikuta, A., Kato, K., Nakadate, H., Tsunematsu, Y., Kaneko, Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy divergence, but not with *MYCN* amplification in neuroblastoma tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 188: 32-41, 2009.
  - 7) Furukawa, S., Haruta, M., Arai, Y., Honda, S., Ohshima, J., Sugawara, W., Kageyama, Y., Higashi, Y., Nishida, K., Tsunematsu, Y., Nakadate, H., Ishii, M., Kaneko, Y. Yolk sac tumor but not seminoma or teratoma is associated with abnormal epigenetic reprogramming pathway and shows frequent hypermethylation of various tumor suppressor genes. *Cancer Sci.*, 2009. in press.
  - 8) 金子安比古: 固形腫瘍の分子生物学. 小児科学第3版. 医学書院. 1354-1359, 2008.
  - 9) 金子安比古: 小児がんの臨床遺伝学. 小児科診療 72: 87-91, 2009.
  - 10) Hidaka, T., Nakahata S., Hatakeyama, K., Hamasaki, M., Yamashita, K., Kohno, T., Arai, Y., Taki, T., Nishida, K., Okayama, A., Asada, Y., Yamaguchi, R., Tsubouchi, H., Yokota, J., Taniwaki, M., Higashi, Y., and Morishita, K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112: 383-393, 2008.
  - 11) Takei, H., Suemasu, K., Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Koh, J., Sato, K., Tsuda, H., Kurosumi, M., 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 Cancer Res. Treat.*, 107(1) : 87-94, 2008.
  - 12) Matsumoto, M., Sakamoto, H., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Sasano, H., Yaegashi, N., Hayashi, S. 3-Dimensional microarray analysis of breast cancer tissues: its potential clinical use in prognosis prediction and chemotherapy individualization. *Breast Cancer*, 2009 (in press) .
  - 13) 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*, 15: 451-463, 2008.
  - 14) 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.*, 99: 1125-1130, 2008.
  - 15) 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.*, 99 : 267-271, 2008.
  - 16) Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109: 201-206, 2008.
  - 17) Niikawa, H., Suzuki, T., Miki, Y., Suzuki, S., Nagasaki, S., Akahira, J., Honma, S., Evans, DB., Hayashi, S.I., Kondo, T. and Sasano, H. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 14: 4417-4426, 2008.
  - 18) Santen, R.J., Song, R.X., Masamura, S., Yue, W., Fan, P., Sogon, T., Hayashi, S., Nakachi, K. and Eguchi, H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and

hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630: 19-34, 2008.

- 19) Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15: 256-261, 2008.
  - 20) Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, in press, 2009.
  - 21) Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosuni, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.*, in press, 2009.
  - 22) Azuma, K., Urano, T., Horie, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. and Inoue, S. Association of estrogen receptor and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res.* in press, 2009.
  - 23) 林 慎一: ホルモン依存性増殖の分子機構。「みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床」(戸井雅和編) in press, 2009.
  - 24) Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Honma, Y. Cotylenin A, a new differentiation inducer, and rapamycin cooperatively inhibit growth of cancer cells through induction of cyclin G2. *Cancer Sci*, 99:1693-1698, 2008.
2. 学会発表
- 1) Kaneko, Y., Fukushi, D., Watanabe, N., Kasai, F., Haruta, M., Kikuchi, A., Kikuta, A., Tsunematsu, Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy instability in infant neuroblastoma (NB) tumors, but not with *MYCN* amplification in infant and childhood NB tumors or cell line. *Advances in Neuroblastoma Reserch.* 2008. 5. 千葉
  - 2) 金子安比古, 本多昌平, 新井康仁, 春田雅之: Wilms 腫瘍と共通な *IGF2* 過剰発現機構が芽芽腫においても証明された. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 2008. 9. 横浜
  - 3) 角 純子, 粕壁 隆, 金子安比古: 白血病細胞にお

ける *NM23* 結合蛋白質の探索と発現解析. 第 70 回日本血液学会. 2008. 10. 京都

- 4) 角 純子, 粕壁 隆, 本間良夫, 金子安比古: 白血病細胞の分化における *NM23* 発現抑制と LPA 受容体 *EDG2* 発現更新の関連. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 5) 笠井文生, 富士大輔, 渡辺直樹, 春田雅之, 金子安比古: 乳児と小児 2 倍体神経芽腫の特徴—中心体の増幅と異数性細胞の混在—. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 6) 渡辺潤子, 小林康人, 黒住昌史, 志佐 淵, 吉田光明, 穠山美穂, 金子安比古, 松島芳文: エンドセリンレセプター B (EdnrB) 遺伝子変異近交系 JF1 マウスにおける自然発症癌好発のメカニズム(4). 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 7) 春田雅之, 笠井文生, 大喜多肇, 福澤正洋, 金子安比古: *WTX* の日本人ウィルムス腫瘍において頻繁に生じる. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 8) 金子安比古, 本多昌平, 新井康仁, 春田雅之, 佐々木文章, 中川原章, 檜山英三: 父方 *IGF* 重複, 母方 *IGF2* インプリント消失, *P3* プロモーター低メチル化による *IGF2* 高発現が芽芽腫の大多数に生じる. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 9) 古川真祐, 春田雅之, 本多昌平, 菅原和華, 中館尚也, 景山幸雄, 東 四雄, 金子安比古: 小児性腺外原発胚細胞腫瘍における腫瘍抑制遺伝子メチル化とインプリント障害との関連. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 10) 大島淳二郎, 春田雅之, 新井康仁, 金子安比古: ウィルムス腫瘍における *7p21* ホモまたはヘミ欠失領域に位置するがん抑制候補遺伝子. 第 67 回日本癌学会. 2008. 10. 名古屋
- 11) 金子安比古, 春田雅之: Wilms 腫瘍の分子生物学: 最新の知見. 第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 12) 大植孝治, 福澤正洋, 越永從道, 樋之津史郎, 秦順一, 堀江弘, 田中祐吉, 大喜多肇, 金子安比古, 陳基明, 中館尚也, 麦島秀雄, 齋藤正博, 北野良博, 野崎美和子: 日本ウィルムス腫瘍スタディグループ (JWiTS) 登録症例の追跡調査報告. 第 24 回日本小

- 児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 13) 春田雅之、渡辺直樹、大喜多肇、秦 順一、堀江 弘、福澤正洋、金子安比古：日本人 Wilms 腫瘍において *WT1* 欠失は *WT1* 異常と合併するが *CTNWB1* 変異とは合併しない。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 14) 大島淳二郎、春田雅之、渡辺直樹、金子安比古、樋之津史郎、越永従道、秦 順一、堀江弘、田中祐吉、大喜多肇、陳 基明、中館尚也、齋藤正博、北野良博、野崎美和子、大植孝治、福澤正洋：がん抑制遺伝子 *RASSF1A* のメチル化はウィルムス腫瘍の新しい予後因子である。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 15) 中館尚也、陳 基明、齋藤正博、越永従道、樋之津史郎、大植孝治、北野良博、大喜多肇、金子安比古、堀江弘、田中祐吉、野崎美和子、麦島秀雄、福澤正洋：日本ウィルムス腫瘍スタディグループ (JWiTS) -1 における晩期障害調査研究—JWiTS 報告—。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 16) 古川真祐、春田雅之、本多昌平、中館尚也、石井正浩、金子安比古：小児性腺外原発胚細胞腫瘍における腫瘍抑制遺伝子メチル化とインプリント障害との関連。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 17) 本多昌平、新井康仁、春田雅之、佐々木文章、中川原章、檜山英三、藤堂省、金子安比古：肝芽種で見られる *IGF2* 発現亢進にはウィルムス腫瘍と同様の過剰発現機構がはたらいている。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 18) 越永従道、北野良博、齋藤正博、陳 基明、中館尚也、野崎美和子、麦島秀雄、大植孝治、大喜多肇、金子安比古、田中祐吉、秦 順一、樋之津史郎、堀江弘、福澤正洋：守る会助成課題 ウィルムス腫瘍グループスタディにおける腎横紋筋肉腫様腫瘍 (RTK) に対する集学的治療。第 24 回日本小児がん学会. 2008. 11. 千葉
- 19) 細田文恵、新井康仁 他：Identification of novel target genes for the 6p21 amplicon in gastric cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋), 2008.
- 20) 戸塚勝理、吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、石川裕子、浅川英輝、林 祐二、田部井敏夫、黒住昌史、井上賢一、小野亮子、下岡華子、川野輪香織、末益公人、堀口 淳、飯野佑一、竹吉 泉：術前化学療法後の乳房温存療法症例の乳房内再発に関する臨床病理学的検討。第 108 回日本外科学会定期学術総会 2008. 5. 15-17. 長崎 (長崎大学医学部、兼松隆之教授)
- 21) 武井寛幸、吉田 崇、黒住昌史、石川裕子、戸塚勝理、林 祐二、浅川英輝、大庭華子、川野輪香織、小野亮子、井上賢一、田部井敏夫：乳癌センチネルリンパ節生検 (SLNB) の術中迅速病理診断偽陰性例に腋窩郭清 (ALND) は必要か。第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生、大阪国際会議場)
- 22) 川野輪香織、黒住昌史、大庭華子、戸塚勝理、浅川英輝、石川裕子、林 祐二、二宮 淳、吉田 崇、武井寛幸、小野亮子、井上賢一、田部井敏夫：トリプルネガティブ乳癌 (TN) に対する術前化学療法 (NAC) の組織学的効果と効果予測因子についての検討。第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生、大阪国際会議場)
- 23) 黒住昌史、武井寛幸：乳癌のセンチネルリンパ節微小転移術法としての real-time RT-PCR 法の有用性と複数マーカー検索の意義。パネルディスカッション 2「センチネルリンパ節生検の state-of-the-art」第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生、大阪国際会議場)
- 24) 吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、林 祐二、石川裕子、浅川英輝、戸塚勝理、井上賢一、小野亮子、大庭華子、川野輪香織、黒住昌史、田部井敏夫：若年者乳癌に関する臨床病理学的検討。ワークショップ 1「若年者乳癌をめぐる諸問題」。第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生、大阪国際会議場)
- 25) 武井寛幸、黒住昌史、吉田 崇、石川裕子、戸塚勝理、林 祐二、小野亮子、大庭華子、川野輪香織、井上賢一、田部井敏夫：リンパ節転移陽性乳癌に対する術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検の有効性 (口演)。第 46 回日本癌治療学会総会. 2008. 10. 30.-11. 1. 名古屋 (平川弘聖、大阪市立大学 腫瘍外科学)
- 26) 武井寛幸：2. 乳癌ホルモン療法—過去から未来へ—

- 一、特別企画「過去から学ぶ現在の治療」第5回日本乳癌学会関東地方会、2008.12.13. 大宮ソニックシティ(当番世話人 堀口 淳)。
- 27) 林 慎一: アロマターゼ阻害剤耐性乳癌の治療戦略をそのメカニズムから考える。第44回東海乳癌疾患懇話会(名古屋)2008
- 28) 林 慎一: アロマターゼ阻害剤の奏功性予測について。Breast Cancer Round Meeting(仙台)2008
- 29) 林 慎一: 乳癌の mRNA 解析-その実体と問題点、今後の展望。シンポジウム「乳癌の内分泌療法の効果予測因子の手術/生検検体を用いた検索の実際」第20回日本内分泌外科学会総会(仙台)2008
- 30) 林 慎一: ホルモン依存性喪失癌。シンポジウム「ホルモン依存性喪失癌」第9回ホルモンと癌研究会(岐阜), 2008.
- 31) 林 慎一: 特別講演。蛍光タンパクを用いたレポーター細胞による乳癌・子宮癌の診断を目指して- ER 転写活性のイメージングとその臨床応用。第18回日本サイトメトリー学会学術集会(東京)2008
- 32) 林 慎一: 特別講演。ERE-GFP を用いたエストロゲンシグナル解析による乳癌の個別化。第18回乳癌基礎研究会(福島), 2008.
- 33) Hayashi, S.I.. Estrogen signaling and response to hormonal therapy. Symposium: Hormonal Carcinogenesis and Hormonal Therapy. 2nd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Breast Cancer Research (淡路), 2008.
- 34) 林 慎一: エストロゲン受容体研究のトランスレショナルリサーチ。シンポジウム。第7回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会(名古屋), 2008.
- 35) Hayashi, S.I.. Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and aromatase inhibitor-resistant cancers. 3rd Seoul Breast Cancer Symposium (ソウル), 2008.
- 36) 林 慎一: AI 剤の耐性メカニズムの個別化-基礎からのアプローチ。第5回日本乳癌学会中国四国地方会(米子), 2008.
- 37) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposium. Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and hormone refractory cancers. The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research (倉敷), 2008.
- 38) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposia. Estrogen signaling and response to hormonal therapy. 13<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック), 2008.
- 39) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposium. Basic research and hormonal therapy for Luminal-type of breast cancer. 第67回日本乳癌学会学術総会(名古屋), 2008.
- 40) 林 慎一, 山口ゆり: ランチョンセミナー。エストロゲンレセプター転写活性のイメージングとその臨床応用。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(神戸), 2008
- 41) 林 慎一: 特別講演。エストロゲンシグナルの可視化とその臨床応用。熊本乳癌カンファレンス(熊本), 2009.
- 42) 林 慎一: 特別講演。乳癌の個別化とエストロゲンシグナル。第26回信州内分泌談話会(松本), 2009.
- 43) 神代理史, 相馬佳絵, 中島由佳, 山口ゆり, 川野輪香織, 木村圭志, 黒住昌史, 林 慎一, 柳澤 純: ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の悪性を抑制する。第8回関東ホルモンと癌研究会(東京), 2008.
- 44) 東浩太郎, 堀江公仁子, 大内尉義, 林 慎一, 堺 隆一, 井上 聡。乳癌における細胞膜局在エストロゲン受容体の新規核外作用の解析。第4回SERM 学術研究会学術集会, 2008.
- 45) Kataoka, M., Yamaguchi, Y., Sawada, N., Morita, K.I., Evans, D.B., Yasuno, H., Mori, K., Hayashi, S.I.. Antitumor activity of chemoendocrine therapy in premenopausal (Capecitabine [CAP] + Tamoxifen [TAM]) and postmenopausal (CAP+Letrozole[LET]) human breast cancer [BC] xenograft models. 31st San Antonio Breast Cancer Symposium, 2008.
- 46) 松本光代, 清野祐子, 山口ゆり, 武井寛幸, 黒住昌史, 笹野公伸, 八重樫伸生, 林 慎一: ERE-GFP アッセイによる原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性の解析と臨床病理学的因子との関連。第16回日本内分泌学会東北地方会(仙台), 2008.
- 47) 大庭華子, 山口ゆり, 小林康人, 武井寛幸, 黒住昌史, 林 慎一: エストロゲンシグナルに関連した乳癌間質細胞の特性の解析。第9回ホルモンと癌研究会(岐阜), 2008.
- 48) 今野広海, 白山由子, 山口ゆり, 清野祐子, 松本光代, 丹羽俊文, 林 慎一: ER の恒常的活性化を呈するホルモン療法耐性モデル乳癌細胞株の樹立。第9

- 回ホルモンと癌研究会 (岐阜)、2008.
- 49) 松本光代、清野祐子、山口ゆり、武井寛幸、黒住昌史、八重樫伸生、林 慎一 : ERE-GFP アッセイを用いた原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性解析と臨床病理学的因子との関連. 第9回ホルモンと癌研究会 (岐阜)、2008.
- 50) 鈴木史彦、赤平純一、三浦伊久美、伊藤 潔、鈴木貴、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生 : ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現とメチル化についての検討. 第9回ホルモンと癌研究会 (岐阜)、2008.
- 51) 松本光代、清野祐子、山口ゆり、武井寛幸、黒住昌史、八重樫伸生、林 慎一 : ERE-GFP アッセイによる原発性乳がんのエストロゲン受容体転写解析とその臨床病理. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.
- 52) 今野広海、白山知子、山口ゆり、清野祐子、松本光代、丹羽俊文、林 慎一 : ER のリガンド非依存性活性化を呈するエストロゲン枯渇型乳癌細胞株の樹立. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.
- 53) 山口ゆり、清野祐子、林 慎一 : 乳癌微小環境のエストロゲンシグナルに対する Chemo-endocrine 併用療法による抑制効果. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.
- 54) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり : 乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.
- 55) Azuma, K., Urano, T., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue S. : Association of Estrogen Receptor  $\alpha$  and HDAC6 causes novel nongenomic action in breast cancer cells. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.
- 56) 松本光代、伊藤潔、新倉 仁、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一 : 子宮体癌-間質細胞におけるエストロゲンを介した相互作用の解析. 第13回日本産婦人科乳癌学会、2008.
- 57) 鈴木史彦、赤平純一、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生 : ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現とメチル化についての検討. 第81回日本内分泌学会 (青森)、2008.
- 58) Suzuki, F., Akahira, J., Miura, I., Nagase, S., Takano, T., Niikura, H., Suzuki, T., Ito, K., Hayashi, S., Sasano, H., Yaegashi, N. : Expression of estrogen receptor (ER) beta isoforms and its correlation with DNA methylation in human epithelial ovarian cancer. American Soci. Clin. Oncol., 2008
- 59) Saji, S., Hirose, M., Iwase, H., Yamaguchi, Y., Toi, M., Hayashi, S., Kuroi, K. : Rationale for salvage therapy with high-dose Selective Estrogen Receptor Modulator after treatment failure of Aromatase Inhibitors in breast cancer. American Soci. Clin. Oncol., 2008
- 60) Yamaguchi, Y., Seino, Y., Oba, H., Takei, H., Kurosumi, M., Hayashi, S. : In vivo assessment of estrogen signal-related function of carcinoma-associated fibroblast (CAF) in human breast cancer. 13<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック)、2008.
- 61) 山口ゆり、松本光代、大庭華子、清野祐子、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一 : 乳癌のエストロゲンシグナルと Cancer-Associated Fibroblast (CAF) の機能. 第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (福井)、2008.
- 62) 神代理史、相馬佳絵、村山明子、仲島由佳、藤村亜紀子、大家洋平、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純 : ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の浸潤性を抑制する. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会合同大会 (神戸)、2008.
- 63) 角 純子、粕壁 隆、金子安比古. 白血病細胞における NM23 結合蛋白質の探索と発現解析. 第70回日本血液学会、2008.
- 64) 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古. EDG2/lpa1 expression in leukemia cells and its association with NM23 expression. 第67回日本癌学会総会 (名古屋)、2008.
- 65) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kaneko, Y. Inverse correlation of NM23 expression with lysophosphatidic acid receptor EDG2/lpa1 expression of human leukemia cells during myeloid differentiation induced by all-trans retinoic acid. 50th ASH Annual Meeting, 2008.



## 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

研究代表者 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** 小児がんの genetic 異常と epigenetic 異常を解明し、診断と治療に役立てるための研究を実施した。7番染色体短腕はウイルス腫瘍で4番目に欠失頻度の高い領域であるが、100例のウイルス腫瘍を SNP array で解析し、9例に7p異常を検出した。そのうち1例は7p21に4.3 Mbのホモ欠失を示した。既報告のホモ欠失例と合わせて欠失領域を2.1 Mbに狭めた。遺伝子変異、発現、メチル化解析結果と当該遺伝子の癌との関連を述べた報告から、ホモ欠失領域に位置する2遺伝子、*MEOX2*と*SOSTDC1*を癌抑制候補遺伝子として同定した。7p異常を示す腫瘍は全例*IGF2*異常や*WT1*異常を伴っており、これらの異常はウイルス腫瘍発生初期に生じると考えられるので、*MEOX2*と*SOSTDC1*異常は腫瘍発生の後期に生じ、進展に関与すると推測された。

肝芽腫54例を分析し、*IGF2*-uniparental disomy (UPD)を22%に、*IGF2*-loss of imprinting (LOI)を17%に、*IGF2*-retention of imprinting (ROI)を61%に認めた。また、*IGF2*-LOI型腫瘍に関しては、本来、非メチル化状態であるべき母方*H19*-differentially methylated region (DMR)が高メチル化しており、ウイルス腫瘍と同様に enhancer competition model の破綻により、*IGF2*高発現が生じることを証明した。肝芽腫の*IGF2*異常(UPD+LOI)頻度は39%であり、ウイルス腫瘍の58%に比して低い。

胚細胞腫瘍の起源細胞と想定される始原生殖細胞はインプリント遺伝子 DMR のメチル化消去と再メチル化という epigenetic reprogramming を受ける。胚細胞腫瘍45例を分析し、25例は正常 reprogramming 経路に、20例は異常 reprogramming 経路にあることを示した。癌抑制遺伝子のメチル化はセミノーマではほとんど認められず、奇形腫では低頻度に、Yolk sac 腫瘍では高頻度に生じていた。Yolk sac 腫瘍を他の小児がんや成人腫瘍と比較すると、より多数の癌抑制遺伝子が、より高頻度にメチル化していた。また、癌抑制遺伝子のメチル化は多くの腫瘍において予後不良因子であると報告されているが、Yolk sac 腫瘍では予後因子にならないことを示した。

## A. 研究目的

小児がんは成人がんと異なり、胎児期の臓器形成に関わる遺伝子の異常が腫瘍発生に関わる。また、genetic 異常と epigenetic 異常の両方が発癌過程にとって重要であることが分かっている。染色体異常と uniparental disomy (UPD)を同時に検出可能な SNP アレイを用いて腫瘍検体を解析し、それぞれの小児がんの特徴的な染色体異常領域を特定する。その領域から、腫瘍の発生・進展に関与する遺伝子を特定する。同時にインプリント遺伝子の発現異常や、その発現調節領

域である DMR のメチル化を分析し、小児がんの発生に関与するインプリント遺伝子異常を解明する。成人がんにおいては、癌抑制遺伝子のメチル化研究が多数行われ、そのメチル化が予後因子であると報告されている。これまで、あまり研究されてこなかった小児癌の癌抑制遺伝子メチル化異常を分析し、予後因子になるかどうかを解明する。以上の研究から、小児がんの発生・進展に関与する遺伝子を特定し、診断・治療の改善に役立てる

## B. 研究方法

ウイルス腫瘍 100 例について、SNP アレイ解析を行い、9 例に 7p 異常を同定した。その中に 7p21 のホモ欠失が 1 例にみられた。ウイルス腫瘍細胞株 3 株、胎児腎、正常腎を用いて、ホモ欠失領域に位置する 10 遺伝子の発現を RT-PCR で分析した。その結果と、これまでの研究により報告された癌化との関係に基づき 2 個の遺伝子、*MEOX2* と *SOSTDC1* を選択し、両遺伝子の変異解析を実施した。*MEOX2* は胎児腎と正常腎で発現していたが、ウイルス腫瘍細胞株 3 株では発現していなかった。次に、7p 異常のある腫瘍 3 検体と、7p 異常のない腫瘍 18 検体を対象にして *MEOX2* と *SOSTDC1* mRNA 発現量を半定量 RT-PCR で分析した。また、細胞株 3 株と腫瘍検体 18 例を対象にして、DNA を bisulfite 処理し、3 箇所の *MEOX2* CpG islands を methylation-specific PCR (MSP) で分析し、MSP の結果と *MEOX2* mRNA 発現量との関係を検討した。

肝芽腫 54 例を対象にして *H19*-DMR 領域のメチル化状態を COBRA 法にて分析し、高メチル化状態と正常メチル化状態に分類した。次に SNP アレイ解析を行い、*IGF2* 領域が retention of heterozygosity (ROH) と loss of heterozygosity (LOH) のどちらであるかを検討した。また、*IGF2* のアレル特異的発現分析を実施し、腫瘍の発現形式がモノアレル発現とバイアレル発現のどちらであるかを検討した。以上の結果より、*IGF2* の状態を loss of heterozygosity (LOH), loss of imprinting (LOI), retention of imprinting (ROI) に分類した。定量 RT-PCR 法により *IGF2* と *H19* の mRNA 量を測定し、その結果と *IGF2* パターンにより分類した 3 群との関係を検討した。

胚細胞腫瘍 45 例を対象にして、*H19*-DMR と *SNRPN*-DMR を COBRA 法で分析し、それぞれのメチル化状態を決定した。両 DMR 領域が高メチル化状態であった 7 例に対して SNP アレイ解析を行い、高メチル化が LOH と LOI のどちらにより生じているのかを検討した。また、*IGF2* の *ApaI* 多型、*SNRPN* の *HpaII* 多型を利用して、両領域がヘテロ接合性かホモ接合性状態であるかを検討した。次に、*H19*、*IGF2*、*SNRPN* の各 mRNA の発現量を RT-PCR 法で半定量した。また、*H19* と *IGF2* については、それぞれの多型部位がヘテロ接合性を示す腫瘍に対してアレル特異的発現分析を実施した。最後に、17 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析し、その頻度と胚細胞腫瘍の 3 分類(セミノーマ、奇形腫、Yolk sac

tumor) との関係进行分析した。

(倫理面への配慮)

小児がん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。成人胚細胞腫瘍患者については、本人から検体を研究に使用することについて、同意を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。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 100 例を対象にして、SNP アレイ解析を行い、9 例に 7p 異常を同定した。その内訳は 7p 全体のヘミ欠失が 7 例、7p21 のホモ欠失が 1 例、7p 全体の UPD が 1 例であった。1 例にみられたホモ欠失領域は 4.3 Mb であり、イギリスから報告された 1 例のウイルス腫瘍にみられたホモ欠失領域と一部が重複しており、両腫瘍の共通ホモ欠失領域は 2.1 Mb であった。この領域には 8 個の遺伝子が位置しており、その遺伝子発現を 3 細胞株、胎児腎、正常小児腎組織を用いて RT-PCR で分析した。1 遺伝子は胎児腎と小児腎で非発現、2 遺伝子は 3 細胞株と胎児腎、小児腎で全て発現、1 遺伝子は既報告で遺伝子変異なしとなっていたため、その後の分析から除外した。残る 4 遺伝子の中で、腫瘍との関連が報告されている 2 遺伝子 (*MEOX2* と *SOSTDC1*) について分析を継続し、変異解析を実施した。*MEOX2* ではポリヒスチジンをコードする CAC/CAG リピート数の多型がみられたのみで、塩基の置換はみられなかった。一方、*SOSTDC1* については、アミノ酸置換を引き起こす 2 箇所の塩基置換が 4 腫瘍にみられた。両遺伝子の RT-PCR による発現解析を腫瘍検体により実施した。7p 異常のある 4 例と 7p 異常のない 18 例を比較すると *MEOX2* の発現は 7p 正常腫瘍に比べて 7p 異常で低く ( $P=0.01$ )、*SOSTDC1* では発現に差はなかった ( $P=0.29$ )。7p 異常のある 9 例と 7p 異常のない 91 例を比較すると、臨床所見に差を認めなかったが、7p 異常群では *IGF2* UPD または *IGF2* UPD + LOI の頻度が 7p 正常群に比して高かった ( $P=0.028$  と  $P=0.014$ )。

肝芽腫 54 例の *H19*-DMR のメチル化、SNP array、*IGF2* アレル特異的発現解析の結果から、12 例(22%)を LOH 型、9 例(17%)を LOI 型、33 例(61%)を ROI 型に分類した。*IGF2* 内の *ApaI* 多型部位がヘテロであった 9 例について

解析したところ、2例はバイアレル発現を示すLOI型であり、7例はモノアレル発現を示すROI型であった。バイアレル発現腫瘍の *H19*-DMR は高メチル化状態であったが、モノアレル発現腫瘍では正常メチル化状態を示し、前者で enhancer competition model の破綻が証明された。定量的 RT-PCR の結果から、*IGF2* LOH 型と LOI 型腫瘍は *H19* mRNA をほとんど発現していなかったが、*IGF2* mRNA はほとんどすべての腫瘍で高発現していた。一方、*IGF2* ROI 型腫瘍では *H19* mRNA と *IGF2* mRNA 両者が多くの腫瘍で高発現していた。*IGF2* ROI 型腫瘍で *IGF2* mRNA を高発現した腫瘍では *IGF2* の転写因子 *PLAG1* が発現していた。

胚細胞腫瘍 45 例の *H19*-DMR および *SNRPN*-DMR のメチル化解析を実施し、その結果と腫瘍の発生部位に基づき 25 例は正常リプログラミング経路、20 例は異常リプログラミング経路にあることを明らかにした。*H19*-DMR および *SNRPN*-DMR のメチル化状態はセミノーマでは完全消去、奇形腫では生理的消去、Yolk sac 腫瘍では低メチル化から高メチル化まで様々であった。*H19*-DMR のメチル化状態は *IGF2* のモノアレル発現やバイアレル発現と一定の関係を示さなかった。17 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により解析したところ、メチル化した癌抑制遺伝子数はセミノーマや奇形腫に比べて Yolk sac 腫瘍に高頻度であった ( $P < 0.001$  と  $P = 0.004$ )。Yolk sac 腫瘍では癌抑制遺伝子 *RASSF1A*, *HOXA9*, *RUNX3*, *CASP8*, *SCGB3A1*, *SFRP2* のメチル化を 50% 以上の腫瘍で認めたが、それぞれのメチル化は予後とは無関係であった。

#### D. 考察

ウイルス腫瘍の発生に関わる遺伝子異常として、*WT1*, *IGF2*, *CTNNT1*, *WTX* の異常がとこれまで報告されてきた。しかし、これらの異常を合わせても、60% の腫瘍に認められるに過ぎず、未知の遺伝子異常の存在が推測されてきた。100 例の SNP array 解析の結果から、9 例に 7p 異常を発見し、そのうち 1 例に 7p21 に限局したホモ欠失を検出した。7p ホモ欠失は既に外国から 1 例報告されており、両ホモ欠失の重複領域を 2.1 Mb に狭めることができた。その領域に位置する 8 遺伝子のウイルス腫瘍細胞株における発現解析とこれまでの報告された当該遺伝子の腫瘍化との関わりについての研究結果から、*MEOX2* と *SOSTDC1* を候補癌抑制遺伝子として同定した。*MEOX2* 発現は 7p 異常腫瘍で低下してお

り、発現は exon 1 CpG islands のメチル化と負の相関傾向を示した。*SOSTDC1* 発現については、7p 異常腫瘍 4 例中 3 例において低下していたが、7p 正常腫瘍群と比較して有意差を認めなかった。一方、*SOSTDC1* の 2 箇所のミスセンス変異を 4 腫瘍に認めたが、これらの腫瘍の 7p は正常であった。*MEOX2* の発現消失は腫瘍の血管新生を促進し、*SOSTDC1* 発現異常は Wnt シグナル伝達系のシグナル伝達を亢進すると推定されている。7p 異常腫瘍は *IGF2* や *WT1* の異常を合併すること、また *MEOX2* と *SOSTDC1* の腫瘍化に関わる役割から考えて、両遺伝子異常はウイルス腫瘍の発生ではなく、進展に関わると考えられた。

肝芽腫はウイルス腫瘍と同様に *IGF2* 異常が腫瘍化に関与することが知られている。一方、正常胎児組織では *H19* 下流のエンハンサーシグナルを *H19* と *IGF2* が奪いあうという enhancer competition model が成立すると考えられている。ウイルス腫瘍では本来非メチル化状態である母方 *H19*-DMR が高メチル化しており、インシュレーター蛋白が結合できなくなるため、エンハンサーシグナルが母方 *IGF2* アレルを発現させる。これを enhancer competition model の破綻と呼び、欧米人ウイルス腫瘍の 50%、日本人ウイルス腫瘍の 25% にみられる。これまで、肝芽腫の *IGF2* インプリント消失 (LOI) はウイルス腫瘍とは別の機序により生じていると報告されてきたが、私たちは肝芽腫においても、enhancer competition model の破綻により、*IGF2* LOI が生じていることを証明した。*IGF2* LOH と LOI の頻度は肝芽腫に比べてウイルス腫瘍において高く、胎児腎の方が、胎児肝より *IGF2* 刺激に対する感受性が高いことが示唆された。

胚細胞腫瘍においては *H19*-DMR の高メチル化はウイルス腫瘍や肝芽腫と異なり、*IGF2* のバイアレル発現と相関しない。従って、enhancer competition model とは別の機序により、*IGF2* 発現が調節されていると考えられた。Yolk sac 腫瘍は他の小児がんに比して、多数の癌抑制遺伝子が、高頻度にメチル化を受けていた。*RASSF1A* など癌抑制遺伝子のメチル化は神経芽腫、肝芽腫、ウイルス腫瘍の子後不良因子であることが報告されているが、Yolk sac 腫瘍では、癌抑制遺伝子のメチル化は子後不良因子にならないことがわかった。癌抑制遺伝子メチル化の機序が Yolk sac 腫瘍と他の癌では異なることが示唆された。