

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、*H19*-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。

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 腫瘍の子後因子にならないことが分かった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

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, D.G., Pinkel, D., Feuerstein, B.G., 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.

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* 過剰発現機構が肝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、福士大輔、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、榎山美穂、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: WT1 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 高発現が肝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、越永従道、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 *WTX* 欠失は *WT1* 異常と合併するが *CTNMB1* 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: 肝芽腫のみられる *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している. 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。

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

研究分担者 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調べ、腫瘍発生に関わる遺伝子異常を明らかにするため、ウイルス腫瘍 102 例と肝芽腫 38 例について、一塩基多型 (SNP) の高密度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。ウイルス腫瘍においては、WT1 (11p13)、IGF2 (11p15) 領域のゲノム欠失や片親性ダイソミー (UPD) の他に、7p の欠失を高頻度 (10/102) に認めた。1 例では 7p21 に 4.2Mb のホモ欠失があり、この領域内にがん抑制遺伝子が示唆された。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 IGF2 領域の UPD も生じていた。2q 増加では、2q24 に共通領域を特定できた。4q 欠失は予後と関連し、予後不良のマーカーとして用いることが可能となった。

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、腫瘍の発生や進展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重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

小児がんの対象として、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 に異常があることが判明している腫瘍 36 例と WT1 の非異常型 66 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 および 250K-Nsp 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実施している。研究計画は、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

ウイルス腫瘍の解析では、昨年度において WT1 異常型の腫瘍 36 例を 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 3 つの亜型に分類することを行っている。今回はさらに WT1 非異常型の 66 例を追加して解析した。この群では、WT1 異常型の群で全く見られなかった chr12 の増加と 11q, 16q の欠失が多く観察された。これは、以前に報告された古典的 CGH の結果を踏襲するものである。7p の欠失はどちらの腫瘍群にも見られ、

比較的頻度も高かった (10 例/102 例)。1 例には 7p21 に 4.2Mb のホモ欠失を認め、この領域内の 7 つの遺伝子 SCIN, ARL4A, ETV1, DGKB, MEOX2, SOSTDC1, ANKMY2 をがん抑制遺伝子候補とした。両側性に腫瘍が生じた 1 つの症例では、どちらの腫瘍も 11p の UPD を示し、また両側で同一の WT1 ホモ変異を示した。250K の高密度アレイを用いて 11p 上の UPD の breakpoint を調べた所、右腎腫瘍と左腎腫瘍では断端が異なっており、ダイソミーの形成は独立に起ったことが示唆された。

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。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

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、7p21 にウイルス腫瘍のがん抑制遺伝子の候補領域を同定した。WT1 異常型と WT1 非異常型の両群に共通に関わる遺伝子が含まれていると考えられる。両側性腫瘍において UPD の断端の位置の違いを明らかにした。これは、ダイソミーの形成が独立に起ったと考えられる。肝芽腫の解析では、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。

E. 結論

50K と 250K の高密度 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。また、アレイ密度を 50K から 250K に上げることによって欠失などの断端をより細かくマッピングすることが可能になった。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、腫瘍発生に関わる遺伝子異常の同定につなげたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* in press
- 2) 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.* *British J. Cancer*, 99: 1891-1899, 2008.
- 3) 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., Morishita, K. *Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma.* *Blood*, 112: 383-393, 2008.
- 4) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, J., 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 Chrom. Cancer*, 47: 712-727, 2008.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 金子安比古、新井康仁 他 : Duplication of paternal IGF2, loss of maternal IGF2 imprinting or P3 hypomethylation occurs in most hepatoblastoma. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月、名古屋
- 3) 大島淳二郎、新井康仁 他 : Candidate tumor suppressor genes located in the homozygous and hemizygous 7p21 deletion region of Wilms tumors. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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

研究分担者 武井 寛幸 埼玉県立がんセンター病院 科長 兼 部長

研究要旨 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。既子後因子解析の結果、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。新たな子後因子の確立をめざして、SNPアレイによる乳癌のゲノム異常の解析を開始した。ゲノム増減領域と化学療法反応性の関係では、17q (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。不一致例のなかに、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RB1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。

A. 研究目的

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) リンパ節転移陽性。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。化学療法の効果予知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。

B. 研究方法

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。術前に針生検で腫瘍を採取し、凍結切片を作成する。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に対しては、Anthracycline、Taxan、およびHerceptin (ATH)、陽性度0, 1, 2 (FISH-) 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。

(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実施している。研究計画は、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

化学療法前に針生検により腫瘍の得られた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+が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蛋白発現が増加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。

化学療法の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群に分けてゲノムコピー数異常との関係を41例について分析した。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($P=0.079$)。

D. 考察

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の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。

E. 結論

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るが、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BRCA2であるかどうかを含め、その理由を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-Ma K, Ito I., Yamaguchi, Y., Ohie, SH., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, YI., Takei, H., Hayashi, SI., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K., Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat. Cell Biol.*, 11(3):312-319, 2009.
- 3) Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N., Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, 15:451-463, 2008.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 黒住昌史, 武井寛幸: 乳癌のセンチネルリンパ節微小転移診断法としての 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)

- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 武井寛幸: 2. 乳癌ホルモン療法—過去から未来へ—. 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).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測

研究分担者 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 分子機能解析学分野 教授

研究要旨 昨年に引き続き、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。より臨床への導入を現実的なものとするため、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と既知の予後因子を RT-PCR 法によって解析すること、さらに検討対象標品をパラフィン包埋切片より抽出した RNA とすることを試みた。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んだものを用い、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、昨年、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、それらの標品の ER の標的遺伝子の発現を解析し、ER の発現と ER の活性との相関を検討した。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継続している。また、アロマトラーゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のための基礎研究を開始した。

A. 研究目的

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世代のアロマトラー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されているが、それだけでは不十分であるのは明らかである。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、高感度な検診法も求められている。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ともなると思われる。

B. 研究方法

- 1) 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、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、MIB-1、HER2、Bcl-2、ER を Real-Time RT-PCR 法によって解析する。また、保存されている手術検体のパラフィン包埋切片よりなるべく intact な RNA を抽出調製することを試みた。
- 2) 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んだものを用い、乳癌検体の組織をコラゲナーゼで処理し、調製された分散細胞の初代培養に感染導入して、3日後の GFP 活性を測定することによって、個々の癌細胞自身の ER 活性を解析した。また、それらの標品の ER の標的遺伝子の発現を Real-Time RT-PCR 法で解析し、それらの遺伝子の発現と ER の発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。
- 3) さらに現在術前治療の生検標品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比較のデータを蓄積している。

4) 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 characterization を試みている。

(倫理面への配慮)

本研究に供する研究材料は手術及び生検によって得られる腫瘍組織であるが、本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。

C. 研究結果

- 1) 過去 10 年以上保存されている手術検体のパラフィン包埋標品、及び最近の同様の標品から切り出した切片からインタクトな RNA を抽出調製することを試み、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ものが得られることが確認できた。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、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、PgR と既知の予後因子、MIB-1、HER2、Bcl-2、ER について Real-Time RT-PCR 法によって 60 例以上の症例を解析した。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の厳密なスタディを計画する必要がある。
- 2) ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析した。また、それらの標品の ER の標的遺伝子の発現を Real-Time RT-PCR 法で解析し、それらの遺伝子の発現と ER の発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。その結果、ER の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、ER 標的遺伝子と ERE 活性は相関する傾向にあることが明らかとなった。
- 3) さらに現在術前治療の生検標品に対して上述の 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が、まだ意味ある解析が可能な数には至っていない。
- 4) 数例のアロマターゼ阻害剤投与後再発症例の検体入手して ERE-GFP ウイルスアッセイを行なったところ、アロマタ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 活性を有しているものが多く観察された。また、これらに対して in vitro で抗エストロゲン剤が

効果を示したものがみられた。そこで、アロマタ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、その様な複数の株を樹立した。現在順次、それらの細胞株の性質を調べている。

D. 考察

我々はこれまで、基礎研究として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。それらの研究で、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が示された。そこで、臨床応用研究として、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予測診断を可能にする DNA チップの開発を目指してきた。昨年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による解析では、約 27 症例の原発乳癌を明瞭に 2 群に層別化でき、搭載コンテンツの有用性が示された。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 での診断キット化も可能かもしれない。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群について、既知の予後因子とともに、Real-Time RT-PCR 法によって 60 例以上の乳癌症例を解析した。さらに解析対象は、より臨床で容易に実現可能なものとするため、パラフィン包埋標品とすることを試みた。その結果、その後の解析に耐えうる十分な品質の RNA が得られることを確認した。そして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、臨床への実用化に大きく近づいたと思われる。今後、臨床的有用性を確立するため、本法を用いて、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の厳密なスタディを計画する必要がある。

さらに、ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析したとこ

ろ、それらの活性には高いものから低いものまで多様な個性があることが明らかとなった。そしてその ERE 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ことが明らかとなった。ER の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前因子であり、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も多くあることも知られている。ERE 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、それがホルモン療法の奏効性予測に重要な意味を持つのかは臨床的にも非常に重大な問題である。そこで、今回 ERE 活性を検討した症例について、標品の ER の標的遺伝子の発現を Real-Time RT-PCR 法で解析し、標的遺伝子の発現と ER の発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。ER 標的遺伝子と ERE 活性は相関する傾向にあるが、中には ER 陰性でありながら強い ERE 活性を示し、その標的遺伝子の発現が高いものと低いものと両方が見出され、それらのメカニズム、生物学的意義付けが大変興味深い。現在この点をさらに詳細に検討を進めている。それらの結果如何では従来の ER による診断法を大きく見直す必要性が出てくるかもしれない。

また現在、術前のホルモン療法の試みが行なわれつつあるが、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、術前治療の生検標品に対して上述の 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が、まだ意味ある数には至っていない。今後さらにデータを蓄積して、この点においても 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、他施設も含め、数例のアロマトーゼ阻害剤投与後再発症例の検体を入手して 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 活性を有しているものが多く観察された。このことは引き続き 2 次治療としてホルモン療法の適応の可能性が残されていることを示しており、*in vitro* で抗エストロゲン剤の効果が認められたことから示唆された。さらに、これらの結果は耐性獲得のメカニズムが一様でないことも示しており、そのメカニズムの解明によって他の有効な治療法の選択や開発も可能になると思われる。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 ERE 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と考えている。

E. 結論

これまで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、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、PgR と既知の予後因子、MIB-1、HER2、Bcl-2、ER についてパラフィン包埋切片を対象に Real-Time RT-PCR 法によって 60 例以上の症例を解析し、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、臨床的有用性評価のために適切な症例群についての綿密な試験を行なう必要がある。

また、新規診断法開発を目的として ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析し、Real-Time RT-PCR 法で解析した。それらの ER の標的遺伝子の発現と免疫染色法による ER の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、ER 標的遺伝子と ERE 活性は相関する傾向にあることが明らかとなった。

さらに現在術前治療の生検標品に対して上述の 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 ウイルスアッセイにおいて、ER 活性を有しているものが多く観察され、また、これらに対して *in vitro* で抗エストロゲン剤が効果を示したものがみられた。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、それらの細胞株の性質を詳細に調べている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) Niikawa, H., Suzuki, T., Miki, Y., Suzuki, S., Nagasaki, S., Akahira, J., Honma, S., Evans, D.B., 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.
 - 6) 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.
 - 7) Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15: 256-261, 2008.
 - 8) Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, in press, 2009.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
2. 学会・研究会発表
 - 1) 林 慎一: アロマトキシン阻害剤阻害性乳癌の治療戦略をそのメカニズムから考える. 第44回東海乳腺疾患懇話会(名古屋) 2008
 - 2) 林 慎一: アロマトキシン阻害剤の奏功性予測について. Breast Cancer Round Meeting(仙台) 2008
 - 3) 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回日本内分秘外科学会総会(仙台) 2008
 - 4) 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.
 - 5) 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
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 林 慎一: エストロゲン受容体研究のトランスレーショナルリサーチ. 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.
 - 9) Hayashi, S.I. Estrogen signaling in breast

- cancer microenvironment and aromatase inhibitor-resistant cancers. 3rd Seoul Breast Cancer Symposium (ソウル), 2008.
- 10) 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
 - 11) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposium. Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and hormone refractory cancers. The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research (倉敷), 2008.
 - 12) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposia. Estrogen signaling and response to hormonal therapy. 13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック), 2008.
 - 13) Hayashi, S.I., Yuri, Yamaguchi. Symposium. Basic research and hormonal therapy for Luminal-type of breast cancer. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2008.
 - 14) 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
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) 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耐性乳癌細胞株の樹立. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2008.
 - 27) 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.
 - 28) 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.

- 29) Azuma, K., Urano, T., Hayashi, S.I., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue S. : Association of Estrogen Receptor α 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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. 13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック)、2008.
- 35) 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.
- 36) 神代理史、相馬佳絵、村山明子、仲島由佳、藤村亜紀子、大家祥平、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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 3 件

- 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

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

研究分担者 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

研究要旨 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、がん細胞の特性に關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を検討することも目標としている。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 と関連する分子基盤があると考えられた。

A. 研究目的

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、がん細胞の特性に關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 (EDG2) が報告された。(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を検討することも目標としている。

B. 研究方法

1) 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。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、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作製する。

2) 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にて検討した。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。

C. 研究結果

1) NM23は、多くの腫瘍で高発現している。乳がん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示唆されているので、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 α , ROR α , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRR2E)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 α , 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。

2) 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。リゾホスファチジン酸(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ゾホスホリパーゼ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($r = -0.7538$, $p = 0.0237$)があった。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。

D. 考察

1) 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。

2) 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。

E. 結論

1) 白血病細胞における7個のNM23結合候補蛋白質(HSC70, RAR α , ROR α , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRR2E)の内、S100-A8, S100-A9蛋白質は白血病細胞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 α , NM23-H2, およびNM23-H1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。

2) 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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 3 5 5 7 3 6 7 号.

平成 1 6 年 5 月 2 1 日 特許権取得.

現在維持継続中

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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: 267-271, 2008.
12. 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 carcinoma. *Cancer Sci.*, 99: 1125-1130, 2008.
13. 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.
14. Niikawa, H., Suzuki, T., Miki, Y., Suzuki, S., Nagasaki, S., Akahira, J., Honma, S., Evans, DB., Hayashi, SI., Kondo, T. and Sasano, H. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 14: 4417-4426, 2008.