

200924007A

別添1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

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-----	12
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-----	14
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-----	19
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 -----	23
竹下 文隆	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	別添

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 国立がん研究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・遺伝子解析技術や核酸・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、化学放射線治療後1年以内に再発する群(非感受性群)は、治療前生検の遺伝子発現プロファイルによって特定の亜群に分類されることを示唆し、その亜群に特徴的な分子経路を見出した。②小児単球系 AML は発症年齢と相関した多様性を示し、予後にも関連する。マウスモデルにおいて胎仔肝由来造血細胞を起源として発症したAMLと、成体骨髄由来造血細胞を基に発症したAMLでは、遺伝子発現、二次移植後の *in vivo* における増殖・白血病発症能等において異なった特徴を示すことを見出した。小児AMLの一部は胎児期に発生し、起源となる造血細胞の発達段階がAMLの病態の多様性の原因の一つとなり得ることを示した。③遺伝子変異の高感度検出系を開発し、経尿道的膀胱腫瘍切除術後の表在性膀胱がん45例を対象に、FGFR3 遺伝子変異検出の意義を検討した。原発腫瘍では53.3%(24/45例)、術後経過観察尿中には再発群で78%(7/9例)、非再発群では0%(0/15例)に変異が認められた。一方、尿細胞診は、原発腫瘍のFGFR3 遺伝子変異陽性例(n=24)では、再発群・非再発群ともに全例陰性であった。しかし原発腫瘍の変異陰性例の細胞診陽性率は再発群で56%(5/9例)、非再発群で0%(0/12例)であり、尿中の遺伝子変異検出は細胞診と相補的であった。両者の併用が必要と考えられた。④多内分泌腺腫瘍症1型(MEN1)の原因遺伝子MEN1の生殖細胞系列遺伝子変異のうち、ミスセンス変異保因者の予後を推定する方法の改良と、変異データの充実を進めた。変異メンンの細胞内安定性が低い場合は典型的なMEN1型に進展する可能性があり、内分泌腫瘍の定期的スクリーニングが必要と考えられた。⑤臨床病態に近い肝転移モデルにおいて、IFN- α プラスミドの腫瘍内注入を造血幹細胞移植と併用して強力な抗腫瘍効果を発揮できることを示した。本複合療法の相乗的抗腫瘍効果には、腫瘍局所の抗原提示細胞の活性化が関連していることが示唆された。⑥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、ヒト乳がんおよび前立腺がんの転移モデル動物を用いて、RNAi治療により標的遺伝子やその下流の分子の制御が可能であることを示した。MicroRNAをモデル動物に投与した際のがん細胞へのデリバリー効果の評価系を構築した。

分担研究者

市川 仁	国立がん研究センター研究所 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	国立がん研究センター研究所 プロジェクトリーダー
竹下 文隆	国立がん研究センター研究所 研究員

A. 研究目的

がんの臨床試料等の解析を基盤として、ゲノム等解析技術や遺伝子・核酸導入技術、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た。取り組む具体的な系として以下のサブテーマを設定し、総合的に研究を展開した。

【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期の食道がんでは、根治目的の化学放射線療法(CRT)と手術の成績が拮抗しており、治療選択予知法の開発が求められている。また、いずれの治療法についても約半数の症例が予後不良であり、新規分子標的治療薬の開発も望まれている。本サブテーマでは治療前生検試料の遺伝子発現プロファイルに基づく治療効果予測により治療の個別化に貢献する方法の開発とともに、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同定を目的とした。

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は主に遺伝子変異の種類に基づくリスク分類により個別化された治療開発が進められている。本サブテーマでは、網羅的遺伝子発現解析によりAML治療におけるリスク分類能を向上させること、新たな治療標的分子を同定することを目的とした。前年度までに小児単球系AMLの多様性の分子機構を明らかにしたが、今年度はマウス白血病モデルを用いて起源細胞の発達段階と病態の関係を検討することによ

り、診断・治療法開発のための生物学的基礎を提供することを目標とした。

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：再発や浸潤がんへの進展のリスク推定に有用な遺伝子異常を見出し、臨床応用可能な検査技術の開発を目的とした。膀胱がんの多くは経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)で切除可能であるが、しばしば再発を来し、筋層浸潤に至った場合には膀胱全摘術が必要となる。前年度、尿中のFGFR3 遺伝子変異の定量的検出による表在性膀胱がんの再発予測の有用性を報告した。本年度は本法の検出感度を向上させ、TUR-Bt 術後経過観察における尿を用いたFGFR3 遺伝子変異検出の臨床的有用性について検討した。

④遺伝性腫瘍の遺伝子診断法の開発：多内分泌腫瘍症1型(MEN1)の原因遺伝子MEN1の変異情報をもとに、臨床像を予測する方法を開発し、遺伝子診断後の経過観察や遺伝カウンセリングに役立てる。またMEN1 遺伝子の機能を完全に喪失した腫瘍の特徴を明らかにし、有効な治療法開発に貢献する。今年度は、以前より開発してきた変異型メニンの細胞内安定性を計測する方法をさらに改良するとともに、メニンの発現と放射線感受性の相関を調べた。

【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：固形がん免疫治療の最大の課題の一つが、免疫寛容の打破である。新鮮な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した。

⑥RNA 干渉(RNAi) によるがん転移制御法の開発：乳がん・前立腺がん転移の動物モデル系において、RNAiによる核酸治療が、がん組織において標的遺伝子およびその下流の分子を制御可能であることを証明する。がんの転移を規定する分子機構を解明し、また生体内の核酸デリバリー評価系を確立してRNAiを応用した新規治療法の開発を進めた。

B. 研究方法

上記研究目的に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①CRT または手術を施行された食道がん患者、各々およそ 100 症例を目標に、前向き試験にて生検試料の提供を受け、発現プロファイリングを取得、各種統計学的方法によって遺伝子を選抜し、予測判別式を作った。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した。

②レトロウイルスベクターを用いて MLL/AF10 融合遺伝子を導入したマウス胎仔肝臓由来造血細胞及び成体骨髄由来造血細胞をマウスに移植し、単球系 AML を誘導した。遺伝子導入細胞の性質、発生した AML の病態・遺伝子発現、二次移植後の生体内における挙動等を解析した。

③FGFR3 遺伝子変異の検出にはペプチド核酸 (PNA) を使用した PNA-mediated Realtime PCR clamping 法を改良し、微量 DNA 検査の擬陽性を抑制できる PNA-mediated pre-main amplifier (PPA) 法を開発・使用した。本法は 1ng (300 コピー) 程度の微量 DNA 中に 1% (3 コピー) 程度の濃度で存在する遺伝子変異を正確に検出する。TUR-bt を実施した表在性膀胱がんで、術後最長 3 年間の経過観察を行った 45 症例を対象に解析を行った。

④変異メニンの細胞内安定性を評価するため 1 本の mRNA により変異型メニンと野生型メニンの双方を発現する発現プラスミドを作成し、培養細胞に導入して変異型及び野生型メニンのタンパク質発現量を付加したタグに対する免疫ブロット法と蛍光免疫組織化学法により定量した。野生型メニンが集積する核のみを解析対象とし、同一核における野生型及び変異型メニンの蛍光強度を測定した。メニンの欠失が細胞の放射線感受性を高めるか否かを検討するために、ヒト培養細胞にメニンの siRNA を導入してノックダウンし、細胞増殖及び放射線感受性への影響を検討した。

⑤前年度までに自家造血幹細胞移植モデルを確立し、同系のマウス大腸がん細胞 CT26 や腎がん細胞

Renca を用いて、自家造血幹細胞移植と腫瘍内インターフェロン (IFN) α 遺伝子導入を組み合わせることにより、強力な腫瘍抑制効果を誘導できることを皮下腫瘍モデルで示した。本年度は、前臨床研究として臨床病態により近いモデルにおいて複合療法の効果と安全性を検討した。IVIS システムを用いた生体イメージングを可能とするために、CT26 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入した CT26-Luc 細胞を作成した。自家造血幹細胞移植後に、この CT26-Luc 細胞を脾臓の被膜下に注入して肝転移巣を作り、マウスの右足に CT26 皮下腫瘍を作成した。5 日後に皮下腫瘍内に IFN α 発現プラスミドとリポソームを混合して 3 回注入し、遺伝子を導入していない肝転移巣に対する抗腫瘍効果を検討した。また、複合療法の免疫学的抗腫瘍効果誘導における樹状細胞の役割を検討するために、治療を受けた腫瘍から CD11c⁺ 細胞を MACS にて分離・培養し、上清中の種々のサイトカインの濃度を ELISA にて測定した。

⑥リンパ節転移のある乳がん組織で発現の高い遺伝子に対する siRNA の投与による、乳がんモデルマウスのリンパ節転移抑制効果の分子機構を検討するため、siRNA 投与後に腫瘍を摘出し、標的遺伝子および上皮間葉移行に関与する遺伝子の mRNA の発現を定量的 PCR 法により解析し、タンパク質の発現を免疫組織化学染色により検討した。前立腺がんモデルマウスに対して骨転移抑制効果を示した microRNA-16 (miR-16) について、がん細胞における発現低下の原因を解明するため、miR-16 遺伝子領域のコピー数を PCR 法により検討した。また、骨転移モデルマウスに miRNA を全身性に投与した際の効果を生体内でリアルタイムに評価するため、RNAi 効果が発光の低下として現れる、miRNA のレポーター遺伝子を発現する細胞を移植してモデルマウスを作成し、in vivo イメージング技術によって解析した。

(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のサブテーマ毎に以下の通り。

①CRTと手術症例それぞれ85例、72例の解析を終了した。さらに国立がん研究センター中央病院の検体も入手し、合計CRT111例、手術100例と、当初の目標に到達した。データ解析時点で遺伝子発現プロファイルと治療効果の対応が可能だったCRT74例(半数がCR)を35例のtraining setと39例のvalidation setに分けて判別器の作成と評価を行った。その結果、検証セットにおいてnon CRを感度82%・特異度77%で予測可能な判別器を得た。1年後の再発の有無を、それぞれCRT非感受性・感受性と定義すると、評価可能症例の32%(23/71例)が感受性であった。これらの症例は発現プロファイル上、再現性よく4群に分離された。そのうち2群はそれぞれ86%(18/21例)、80%(15/19例)と、高率に非感受性症例を含んでいた。これら非感受性症例の試料から特徴的な信号伝達経路を同定することができた。また、これら非感受性グループのマウス治療モデルの作成にむけた造腫瘍性細胞株の選抜や体内循環がん細胞の移植腫瘍の作成の基盤も整えた。

②MLL/AF10遺伝子導入により形質転換した胎仔造血細胞と成体造血細胞明らかに異なる特徴を示し、胎仔造血細胞はin vitroにおける増殖能が低いが、in vivo増殖は早く、早期にAMLを発症した。発症したAMLの遺伝子発現プロファイルも、両者で異なる傾向があり、胎仔造血細胞起源AMLは胎仔の顆粒球・マクロファージ前駆細胞画分に類似した特徴を、成体造血細胞起源AMLは成体の造血幹細胞(KSL、c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ cell)画分に類似した特徴を持つことが明らかになった。この結果は、白血病細胞が起源細胞の発達段階特異的な特徴を維持したまま腫瘍

化していることを示唆する。また、白血病細胞のマウスへの移植では、成体造血細胞起源AMLの方が短期間に病態を悪化させる傾向があった。年長児に多く予後不良な小児単球系AMLのサブグループCと、マウスモデル成体造血細胞起源AMLにおいて共通して高発現している遺伝子としてEVI1を同定し、白血病細胞に強制発現させると二次移植時の発症が早期化することを示した。

③TUR-btを実施された表在性膀胱がん45例の腫瘍組織と術前および術後経過観察の際に得られた尿の429検体からDNAを抽出し、0.125ng/ μ l以上の濃度を示した315検体(全体の73.4%)をFGFR3遺伝子変異解析の対象とした。変異は53.3%(24/45例)に認められ、exon 7、10、15のホットスポットが約90%を占めた。変異の有無と再発、腫瘍径、発生個数、臨床病期、組織学的異型度、CIS合併の有無、BCG投与歴の有無等の間に有意な相関は認められなかった。FGFR3遺伝子変異陽性かつ術前尿の解析が可能であった症例では、尿由来DNA中に含まれる変異型FGFR3遺伝子の比率が11%以上の症例では78%(7/9例)が再発したが、11%未満の症例では再発例は17%(2/12例)と有意に低かった(P=0.002、HR=7.5)。術後尿については、再発群で78%(7/9例)、非再発群では0%(0/15例)にFGFR3変異が検出され、いずれも原発腫瘍で検出された変異と一致した。原発腫瘍のFGFR3遺伝子変異陽性例(n=24)では、尿細胞診は再発群、非再発群ともに全例陰性であった。一方、原発腫瘍のFGFR3遺伝子変異陰性例では、再発群で56%(5/9例)、非再発群で0%(0/12例)であり、尿中のFGFR3遺伝子変異の検出は尿細胞診の結果と完全に相補的であった。

④正常多型2種類(R171Q、A541T)、孤発性副甲状腺腫瘍患者に認められた生殖細胞系列ミスセンス変異7種類、家族性副甲状腺機能亢進症の原因として報告されたミスセンス変異14種類、典型的MEN1型の原因となるミスセンス変異20種類、疾患の原因として報告のないミスセンス変異3種類、およびマウスメンンの発現量を野生型メンン(wt)の発現量と比

較した。その結果、正常多型は野生型とほぼ同様の発現量を示し、孤発性の副甲状腺腫瘍患者や家族性副甲状腺機能亢進症の家系に見られるミスセンス型変異メニンも比較的発現量が高いものが多かった。しかし典型的な MEN1 型の原因となる変異メニンは概ね発現量が低かった。マウスメニンは発現量が高く、ヒト細胞内でもヒトメニンと同様の安定性があることが推定された。以上の結果より、ミスセンス型メニンの細胞内安定性は臨床像と相関があり、安定性の高い変異メニンは軽症型の臨床像になりやすいことが確認できた。メニン欠失細胞の放射線感受性を検討するため、ヒト培養細胞にメニン特異的 siRNA を導入してノックダウンしたところ両細胞株とも細胞増殖速度の上昇がみられたが、電離放射線 (10 Gy) に対する感受性の変化は認められなかった。

⑤肝転移巣の増殖を IVIS イメージングにより経時的に検討したところ、非移植マウスと比べて自家造血幹細胞移植マウスにおいては、腹腔内の腫瘍量を示すフォトンカウントは有意に低かった。骨髄移植に加えて、右足の皮下腫瘍に IFN α 遺伝子導入した移植マウスにおいては、さらにフォトンカウントは低下していた。肝臓摘出による ex vivo イメージングでも、皮下腫瘍への IFN α 遺伝子導入により、肝転移が移植単独群よりもさらに抑制されていることを確認した。血液生化学データでは、治療マウスにおいて有害事象は特に認められなかった。

複合療法の抗腫瘍免疫誘導における樹状細胞の役割を検討するために、治療マウスの CT26 皮下腫瘍から CD11c⁺細胞を分離し、種々のサイトカインの分泌を検討した。非治療マウスの腫瘍から分離した CD11c⁺細胞と比較して、自家造血幹細胞移植マウスの腫瘍由来の CD11c⁺細胞では、IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF α などの免疫刺激性サイトカインの発現が上昇していた。造血幹細胞移植と IFN 遺伝子導入の複合療法を受けたマウス由来の CD11c⁺細胞は、これらのサイトカインの発現がさらに上昇するとともに、IL-2 や IFN α の発現も有意に増加していた。一方、抑制性のサイトカインである TGF β の発現の変化は認めなかった。CD11c⁺細胞の抗原提示能を検討するため

に、各 CD11c⁺細胞を、マイトマイシン C 処理 CT26 細胞や CD4⁺細胞と共培養して3日後に ELISpot アッセイを行ったところ、複合療法を受けた CD11c⁺細胞との共培養は CT26 細胞反応性 CD4 細胞を明らかに増やし、複合療法を受けた CD11c⁺細胞の抗原提示能が増強していることが明らかとなった。

⑥乳がんリンパ節転移モデルマウスにおいて、slug-siRNA の投与により原発巣での slug の発現が抑制されること、E-cadherin をはじめとする上皮間葉移行に関与する遺伝子の発現が上昇することが確認された。ヒト前立腺がん骨転移モデルマウスの作成に用いた PC-3M-luc 細胞では、正常ヒト前立腺細胞と比較し、コピー数が 1/2 であることを見いだした。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に miR-16 の標的遺伝子の 3' 末端側非翻訳領域を結合させた配列を導入した細胞を移植して作成したヒト前立腺がん骨転移モデルマウスに miR-16 をアテロコラーゲンを担体として全身性に投与した。転移巣における発光の低下が確認され、骨組織に転移した細胞へ miRNA がデリバリー可能であることを示した。

D. 考察

「A. 研究目的」に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①食道がん CRT で CR または nonCR となるかは、治療前生検の遺伝子発現プロファイルによって予測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1年以内の再発群 (非感受性群) は発現プロファイルによって特定の亜群に分類されることが示唆された。CRT の5年生存率は平均約 40% であるが、発現プロファイルに基づく非感受性例を術前化学療法及び手術に振り分けることによって、CRT の治療成績が向上する可能性が高い。

②マウスにおいて胎仔造血細胞を起源とする場合と成体造血細胞を起源とする場合で、発生する白血病細胞が異なる特徴を示すという結果から、ヒトにおいても胎児期に起源を有する AML と成長後に形成された AML では異なる病態を示すことが推察された。

本研究で前年度までに見出したサブグループ C の予後不良性は、成体造血細胞起源 AML の示す短期間の病態悪化や、EVI1 の高発現による早期発症を反映した可能性が考えられる。

③PNA-mediated realtime PCR clamping 法は PNA が結合する 15-18 塩基程度の領域の遺伝子変異の検出が可能であり、多種類の PNA プローブを組み合わせることによって範囲を拡げた遺伝子変異解析が可能である。微量 DNA 試料に対する擬陽性を回避するための手段として、PNA を加えずに 7 サイクル程度の PCR を実施し、鋳型 DNA のコピー数を増加させた後に、PNA-mediated realtime PCR clamping 法を実施する PPA 法を併用することで、最終的に 232 検体 (54.1%) に対して解析が可能であった。

今回の検討で対象となった症例は全例が表在性膀胱がんであり、FGFR3 遺伝子変異の有無は再発を予測する予後因子とはならなかった。但しこの結果は他の臨床病理学的因子についても同様であった。表在性膀胱がんでは術後管理として、定期的な尿細胞診と膀胱鏡検査が行われる。しかし尿細胞診の陽性率は一般に低く、今回の症例でも再発例における細胞診の陽性率は 28% (5/18 例) と低率であった。本研究により、尿細胞診の陽性率と尿中の FGFR3 遺伝子変異の陽性率は完全に相補的であることが示された。両者を併用することにより、表在性膀胱がん再発の検出感度を大幅に向上させることが期待される。従来弱点とされてきた低異型度の膀胱腫瘍の経過観察における再発の早期診断に有用と考えられた。

④MEN1 は副甲状腺、膵腸管、下垂体など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るが、原因遺伝子 MEN1 のミスセンス変異の中には、副甲状腺腫瘍のみが発生する変異があると考えられる。MEN1 型の軽症型とされる孤発性副甲状腺腫瘍や家族性副甲状腺機能亢進症家系に見られるミスセンス変異は、細胞内で安定性が高い傾向にあったが、このような家系に見られるミスセンス変異であっても、非常に安定性が低いものがあり、副甲状腺のみならず他の内分泌腫瘍の発生

を予測して、定期的なスクリーニング検査を行う必要があると考えられた。MEN1 遺伝子産物メニンを欠損する細胞は放射線感受性が高いとする報告があるが、本研究では感受性増大を確認できなかった。既報の研究とは実験系の相違もあり、メニン欠損細胞の放射線感受性に関してはさらに検討が必要である。

⑤肝転移モデルにおいても、IFN α プラスミドの腫瘍内注入を造血幹細胞移植と併用して強力な抗腫瘍効果を発揮できることは、本複合療法が実際の臨床においても効果が十分に期待できる治療法であることを示している。また、本複合療法の相乗的抗腫瘍効果には、腫瘍局所の抗原提示細胞の活性化が寄与していることが示唆された。今後は、免疫抑制性環境に対する複合療法の効果の解明等を通して本複合療法の強化に結びつける。

⑥乳がんのモデルマウスへの siRNA の投与による結果から、siRNA による RNAi 治療は、従来の低分子化合物では困難であった遺伝子や遺伝子経路を直接標的とした治療が生体内でも有効であることを示した。前立腺がん細胞株で、過去にがん臨床試料で報告されたゲノム異常が miRNA の発現に変化を及ぼしていると考えられることを見だし、さらにその miRNA を投与することによりがんの転移を抑制する新しいがん治療戦略の可能性を示した。さらに、全身性に投与した miRNA の、転移巣へのデリバリー効果を生体内で評価できるモデル動物は、今後も核酸医薬開発の焦点となる、がん細胞特異的 RNAi 治療のデリバリーシステムの開発に極めて有用である。

E. 結論

①本研究の成果を受けて、日米欧で診断機器としての承認を得ている Affymetrix Gene Chip による体外診断薬の許認可と実用化に向け、企業との共同研究に着手した。食道がん治療前生検の網羅的遺伝子発現プロファイリングにより、食道がんの治療成績の向上につながる予知医療の実現と、新規分子標的薬の開発の基盤を提供したと結論する。今後、多施設の食道がん治療前生検のマイクロアレイ解析デー

タと臨床病理情報データを集積することによって検証される必要がある。また、CRTのみならず手術での成績を精度良く予測できる方法の確立や、予後不良例で特徴的な信号伝達系を標的にした治療法の開発も期待される。②マウスモデルにおいて胎仔造血細胞を起源とするAMLと成体造血細胞を起源とするAMLが異なる特徴を示した。ヒトにおいても起源細胞の発達段階の違いがAMLの多様性の一因となっていることが示唆された。③尿中のFGFR3遺伝子変異の定量的検出は尿細胞診との併用により、低異型度の表在性膀胱がんのTUR-Bt術後経過観察における再発予測法として、臨床的に有用と考えられた。④MEN1遺伝子のミスセンス変異のうち、メンタンパク質の細胞内安定性が高いものは軽症型である家族性副甲状腺機能亢進症の表現型をとる可能性が示唆された。開発した細胞内安定性の計測法は、MEN1遺伝子のミスセンス変異をもつ患者の予後推定に役立つと考えられる。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- γ 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ヒト乳がんや前立腺がんの転移に関する遺伝子に対し、RNAi治療による抑制がその下流に存在する遺伝子の発現をも制御し、転移の抑制につながることを、動物モデルを用いて実証した。本研究により、RNAi治療のデリバリー効果、標的分子の抑制効果、転移がんの治療効果まで、前臨床試験に必要な評価系の構築が完了した。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato Y., Yoshida T., et al. A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies. *The Pharmacogenomics J*,

9:137-146, 2009.

- 2) Hiura Y., Yoshida T., et al. Identification of Genetic Markers Associated With High-Density Lipoprotein-Cholesterol by Genome-Wide Screening in a Japanese Population. *Circ J*, 73:1119-1126, 2009.
- 3) Kobayashi M., Yoshida T., et al. Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of colorectal cancer: A hospital-based case-control study in Japan. *Scand J Gastroenterol*, 44:952-959, 2009.
- 4) Nishimoto T., Yoshida T., et al. Oncolytic virus therapy for pancreatic cancer using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. *Gene Ther*, 16:669-680, 2009.
- 5) Hara H., Yoshida T., et al. Intratumoral interferon-alpha gene transfer enhances tumor immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*, 58: 1007-1021, 2009.
- 6) Naruse H., Yoshida T., et al. Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay. *Fam Cancer*, 8: 509-517, 2009.
- 7) Sangrajrang S, Yoshida T., et al. Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women. *Int J Cancer*, 125: 837-843, 2009.
- 8) Wu X., Yoshida T., et al. Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet*, 41:991-995, 2009.
- 9) Isohata N., Yoshida T., et al. Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus. *Int J Cancer*, 125:1212-1221.2009.

- 10) Sano M., Yoshida T., et al. Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis. *Int. J. Oncol.*, 36:321-330, 2010.
- 11) Sugiyama E., Yoshida T., et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: Impact of genetic polymorphisms. *Clinical Pharmacokinetics*, in press.
- 12) Sai K., Yoshida T., et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, in press.
- 13) Yoshida T., et al. Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBG database: gastric cancer as an example. *Cancer Sci*, in press.
- 14) S. Noda S, Ichikawa H., et al.: Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 383: 210-215, 2009.
- 15) Miyake M, Sugano K., Fujimoto K, Hirao Y. 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.* 85:1020-1027, 2009.
- 16) Kuwabara K, Sugano K. 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*, 8:51-54, 2009.
- 17) Miyake M, Sugano K., et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci.*, 101:250-258, 2010.
- 18) Tsukada, T., et al. *MEN1* gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer Sci* 100: 209-215, 2009.
- 19) Okamoto, T., Tsukada, T., et al. Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Sug* 33: 2343-2354, 2009.
- 20) Kitoh, A., Tsukada, T., et al. Indispensable role of the Runx1-Cbf β transcription complex for in vivo-suppressive function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 31: 609-620: 2009.
- 21) Honma, K., Takeshita, F., et al. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. *Int. J. General Med.*, 2: 243-257, 2009.
- 22) Takeshita, F., et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell cycle genes. *Mol. Ther.*, 18: 181-187, 2010.
- 23) Tanooka, H., Takeshita, F. et al. Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther.*, 17: 1-10, 2010.
- 24) Kosaka, N., Takeshita, F., et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.*, in press.
2. 学会発表
- 25) 大浪澄子、佐伯宣久、坂本裕美、吉田輝彦. 未分化型胃腺がんの易罹患性と相関するPSCA遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第54回大会. グランドプリンスホテル高輪. (口演OA-066) 09/24/2009.
- 26) 馬淵智子、青柳一彦、藤田剛、竹下文隆、落谷孝広、吉田輝彦、佐々木博己. SPP1はヘッジホッグ信号伝達系のがん特異的下流因子の一

- つとして、食道扁平上皮がんの悪性度に関与する。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(示説P-0249) 10/01/2009.
- 27) 坂本裕美、大浪澄子、佐藤泰典、Suleeporn Sangrajrang, 吉田輝彦. エストロゲン代謝酵素の遺伝子多型とタイ王国の乳がんリスク。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(示説P-0327) 10/1/2009.
- 28) 大浪澄子、安東正貴、片井均、下田忠和、坂本裕美、吉田輝彦. 体系的候補遺伝子解析による胃がんの遺伝素因探索。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(示説P-0329) 10/1/2009.
- 29) 佐々木博己、深川剛生、森和彦、坂本裕美、片井均、吉田輝彦. 腫瘍トランスクリプトーム解析による胃がんの術後再発予測。第68回日本癌学会学術総会。シンポジウム8「分子情報を用いた個別化医療のTR」パシフィコ横浜 10/02/2009.
- 30) 鳴海兼太、近藤篤、後藤尚子、大浪俊平、竹下文隆、落谷孝広、五十嵐美德、吉田輝彦、青木一教. 腫瘍内インターフェロン遺伝子導入は、自家造血幹細胞移植の抗腫瘍免疫を増強する。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (口演O-475) 10/02/2009.
- 31) 上野秀樹、奥坂拓志、古瀬純司、石井浩、坂本裕美、斎藤嘉朗、澤田純一、西條長宏、吉田輝彦、佐藤泰典. ゲムシタピンの投与を受けた振興膀胱癌患者におけるゲノムワイド関連解析。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (口演O-487) 10/02/2009.
- 32) 牛尼美年子、菅野康吉、鈴木茂伸、坂本裕美、吉田輝彦. 国立がんセンター中央病院における網膜芽細胞腫の遺伝子診断。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (口演O-516) 10/03/2009.
- 33) 吉田輝彦、山本昇、國頭英夫、大江裕一郎、大浪澄子、坂本裕美、佐藤泰典、澤田純一、西條長宏、田村友秀. 非小細胞性肺がんに対するカルボプラチン及びパクリタキセル治療後の予後と関連するSNPのゲノム網羅的探索。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(口演O-557) 10/03/2009.
- 34) 藤田剛、竹下文隆、馬淵智子、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、佐野武、落谷孝広、吉田輝彦、柳原五吉、佐々木博己. 胃癌腹膜播種マウスモデルにおけるNEDD1 siRNAによる生存期間の延長。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(口演O-638) 10/03/2009.
- 35) 青柳一彦、佐野正行、高橋広夫、馬淵智子、藤田剛、井垣弘康、日月裕司、本多裕之、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己. 食道扁平上皮がんの悪性度と相関するリンパ節転移のFOXA1転写経路を介した新たな分子機構。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。(示説P-0932) 10/03/2009.
- 36) 近藤篤、鳴海兼太、後藤尚子、大浪俊平、五十嵐美德、吉田輝彦、青木一教. I型インターフェロン遺伝子導入により誘導される抗腫瘍免疫は、ベクターの投与経路により異なる。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (示説P-1242) 10/03/2009.
- 37) 山地太樹、岩崎基、笹月静、坂本裕美、吉田輝彦、津金昌一郎. Methionine synthase A2756G多型と大腸腺腫との関連。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (示説P-1301) 10/03/2009.
- 38) 溝田友里、山本精一郎、吉田輝彦、牛島俊和、勝俣範之、祖父江友孝、津金昌一郎、濱島ちさと、福田治彦、若尾文彦、関根郁夫、廣橋説雄. がん研究に対する国民の認識に関する研究。第68回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜 (示説P-1319) 10/03/2009.
- 39) 市川 仁他: Difference between fetal liver cell-derived leukemia and adult bone marrow cell-derived leukemia, 第68回日本癌学会学術総会。
- 40) 菅野康吉、牧島恵子、友田茉莉、矢崎久妙子、

- 平澤晃、武田祐子、和泉 秀子、牛尼美年子、吉田輝彦:日本人の遺伝性腫瘍に関するエビデンスの構築—研究から医療への展開— 第15回日本家族性腫瘍学会学術集会シンポジウム 2009年6月13(土)秋葉原コンベンションホール(東京都)
- 41) 千原良友、Gangning Liang、Jones Peter A、新井恵吏、藤元博行、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦、金井弥栄:定量的DNAメチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日(木)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 42) 菅野康吉:がんの遺伝的素因と遺伝カウンセリング 第68回日本癌学会学術総会モーニングレクチャ 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 43) 三宅牧人、石井正純、小山尚樹、川島清隆、児玉哲郎、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦:尿路上皮癌細胞株を対象とした5-アミノレブリン酸投与下光線力学的治療の作用増強効果の検討 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 44) 松村善昭、三宅牧人、石井正純、笠原優一、友田茉莉、久保麗子、田中宣道、藤本清秀、平尾佳彦、菅野康吉:前立腺癌における融合遺伝子の検出に関する研究 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 45) 牛尼美年子、菅野康吉、鈴木茂伸、坂本裕美、吉田輝彦:国立がんセンター中央病院における網膜芽細胞腫の遺伝診断 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3日(土)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 46) 菅野康吉:遺伝カウンセリング 第47回日本癌治療学会総会教育シンポジウム 2009年10月23日(土)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 47) Kokichi Sugano, Seigo Nakamura, Jiro Ando, Hiromitsu Jinno, Tadashi Ikeda, Daisuke Aoki, Takashi Fukutomi, Teruhiko Yoshida, Masami Arai, Yasuo Hirai, Fujio Kasumi, Takafumi Fukui, Shiro Yokoyama, Nobuhisa Gondo, Yoshio Miki: Cross-sectional study of BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected of hereditary breast/ovarian carcinoma BRCA Symposium: Fifteen Years of Progress October 14-16, 2009 Montreal (Canada)
- 48) 塚田俊彦 内分泌腫瘍の発生に関わる遺伝子、第68回日本癌学会学術総会、2009
- 49) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T.: Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells in vitro and in vivo. Keystone Symposia, 2010, British Columbia, Canada
- 50) Ochiya T and Takeshita F. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36THANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen ,Denmark. July 16-24, 2009
- 51) Ochiya T and Takeshita F. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009
- 52) Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits prostate tumor metastasis via downregulation of multiple cell cycle genes. Fumitaka Takeshita, Mitsuhiko Osaki, Ryou-u Takahashi, Nobuyoshi Kosaka, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第32回日本分子生物学会 (2009.12.9-12 横浜)
- 53) Studies on RNA interference-mediated inhibition of cancer metastasis. Fumitaka Takeshita and Takahiro Ochiya. 第68回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 54) MicroRNA regulation of anti-cancer drug resistance in human breast cancer. Fumitaka Takeshita, Ryou-u Takahashi, Yusuke Yamamoto, Kaho Minoura, Toshiki Taya, Kosaka Nobuyoshi, Kimi Honma, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第68回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)

- 55) RPN2 exerts a functional role in supporting cancer stem cell phenotype. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 56) Experimental therapy of autochthonous MCA-induced tumors by gene silencing with siRNA in mutant p53 transgenic mice. Hiroshi Tanooka, Kouichi Tatsumi, Hideo Tsuji, Yuko Noda, Hiroko Ishii, Akira Ootsuyama, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 57) Screening of potential molecular targets for colon cancer therapy. Kimi Honma, Ichiro Takemasa, Ryo Matoba, Fumitaka Takeshita, Masaki Mori, Morito Monden, Kenichi Matsubara, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 58) Identification of lung metastasis inhibitory microRNA in human osteosarcoma cells. Mitsuhiro Osaki, Fumitaka Takeshita, Ryu-u Takahashi, Nobuyoshi Kosaka, Eisuke Kobayashi, Tesshi Yamada, Hisao Ito, Mitsuo Oshimura, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 59) 合成ペプチドをキャリアとした siRNA の新規デリバリー方法の開発. 小林智、竹下文隆、落谷孝広. 遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (2009.7.9-11 大阪)

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

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)
分担研究報告書

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 国立がん研究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 我々は昨年度までに、小児単球系 AML には発症年齢と相関した多様性があり、予後にも関連することを見出している。小児 AML の一部は胎児期に起源があり、胎児期の造血細胞は成体期の造血細胞とは異なる性質を示すことから、起源となる造血細胞の違いが AML の病態／予後に影響している可能性が考えられる。我々は、マウスモデルにおいて胎仔肝由来造血細胞を基に発症させた AML と成体骨髄由来造血細胞を基に発症させた AML を比較し、白血病細胞の遺伝子発現、二次移植後の *in vivo* における増殖／白血病発症能等において両者が異なった特徴を示すことを見出した。これらの結果は、起源となる造血細胞の発達段階が AML の病態の多様性の原因の一つとなり得ることを示すものである。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病(AML)は種々の遺伝子変異により生ずる多様な疾患であり、主に遺伝子変異の種類に基づきリスク分類され、層別化治療が行われている。本研究は、臨床検体の網羅的遺伝子発現解析により、AML の治療におけるリスク分類を向上させること、新たな治療標的分子を同定することを目的としている。今年度は、マウス白血病モデルを用いて起源細胞の発達段階と病態の関係を検討することにより、本研究において見出された小児単球系 AML の多様性の生物学的背景を理解し、リスク分類の向上／新規治療標的の同定に資することを目指した。

B. 研究方法

レトロウイルスベクターを用いて *MLL/AF10* 融合遺伝子を導入することにより、マウス胎仔肝臓由来造血細胞及び成体骨髄由来造血細胞を transform した。次に、この細胞を放射線照射したマウスに移植し、単球系 AML を誘導した。transform した細胞

の性質、生じた AML の病態、白血病細胞の遺伝子発現、二次移植後の *in vivo* における挙動等を、胎仔造血細胞及び成体造血細胞の間で比較した。

(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」に従って行った。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った。

C. 研究結果

MLL/AF10 で transform した胎仔造血細胞と成体造血細胞を比較した結果、両者は明らかに異なる特徴を示し、胎仔造血細胞は *in vitro* における増殖能が低いにも関わらず、*in vivo* においては早く expand し、早期に AML を発症した。発症した AML の比較においては、骨髄中白血球数、肝腫大、脾

腫大等の症状には差が見られなかったが、マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を行ったところ両者には異なる傾向が見出され、胎仔造血細胞起源 AML は胎仔の顆粒球・マクロファージ前駆細胞 [GMP (granulocyte-macrophage progenitor) cell] 画分に類似した特徴を、成体造血細胞起源 AML は成体の造血幹細胞 [KSL (c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻) cell] 画分に類似した特徴を持つことが明らかになった。この結果は、白血病細胞が起源細胞の発達段階特異的な特徴を維持したまま腫瘍化していることを示している。また、白血病細胞を放射線照射したマウスに二次移植し *in vivo* における挙動を解析したところ、成体造血細胞起源 AML の方が末梢血中の白血病細胞数の急速な増加を示し、病態が短期間に悪化する傾向が観察された。さらに、年長児に多く予後不良な小児単球系 AML のサブグループ C と、マウスモデルにおける成体造血細胞起源 AML において共通して高発現している遺伝子として *EVII* を同定し、この遺伝子を白血病細胞に強制発現させると二次移植時の発症が早期化することを示した。

D. 考察

造血細胞は、胎生期から成体に至る過程で性質が大きく変化することが知られている。マウスにおいて胎仔造血細胞を起源とする場合と成体造血細胞を起源とする場合で生じる白血病細胞が異なる特徴を示すという結果から、ヒトにおいても胎児期に起源を有する AML と成長後に形成された AML では異なる病態を示すことが推察される。我々が昨年度までに見出したサブグループ C の予後不良は、成体造血細胞起源 AML の示す短期間の病態悪化や、*EVII* の高発現による早期発症を反映したものかもしれない。

E. 結論

マウスモデルにおいて胎仔造血細胞を起源とする AML と成体造血細胞を起源とする AML では異なる特徴を示すことから、ヒトにおいても起源細胞

の発達段階の違いが AML の多様性の一因となっていることが予想される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Noda S, Ichikawa H, *et al.*: Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 383: 210-215, 2009.

2. 学会発表

1) 市川 仁他: Difference between fetal liver cell-derived leukemia and adult bone marrow cell-derived leukemia, 第 68 回日本癌学会学術総会.

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

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)
分担研究報告書

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 (FGFR)-3 遺伝子変異を微量の DNA から高感度に検出可能な測定系を開発し、経尿道的膀胱腫瘍切除術を実施した表在性膀胱がん 45 例を対象に術後フォローアップ尿を用いた FGFR3 遺伝子変異検出の意義を検討した。原発腫瘍の解析で FGFR3 遺伝子変異は 53.3%(24/45 例)に認められた。FGFR3 遺伝子変異陽性例 24 例中 9 例が再発、同陰性例では 21 例中 9 例に再発が認められたが、再発率について両群間に有意差は認められなかった ($p=0.89$)。術後尿を用いた尿中の FGFR3 遺伝子変異の検出率は再発群で 78%(7/9 例)、非再発群では 0%(0/15 例)であり、尿中に検出された FGFR3 遺伝子の変異型は原発腫瘍で検出されたものと完全に一致していた。尿細胞診との比較では、原発腫瘍の FGFR3 遺伝子変異陽性例($n=24$)では、尿細胞診は再発群、非再発群ともに全例陰性であった。一方、原発腫瘍の FGFR3 遺伝子変異陰性例($n=21$)では、再発群で 56%(5/9 例)、非再発群で 0%(0/12 例)であった。以上の結果より尿中の FGFR3 遺伝子変異の検出は尿細胞診の結果と完全に相補的であり、両者の併用によって尿を用いた表在性膀胱がんの検出感度の向上が可能と考えられた。

A. 研究目的

本研究では各種固形腫瘍の遺伝子異常の解析から、再発や浸潤性癌への進展のリスク推定に有用な遺伝子異常を見出し、臨床応用可能な検査技術の開発を目的とする。膀胱がんの多くは筋層浸潤を伴わない表在性膀胱がんであり、経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)で切除可能であるが、TUR-bt 実施後高率に再発し再 TUR が必要となるばかりか筋層浸潤をともなう場合には膀胱全摘術の適応となる。昨年度、尿中の FGFR3 遺伝子変異の定量的検出による表在性膀胱癌の再発予測因子としての有用性を報告した。本年度は本法の検出感度を向上させ、TUR-Bt 術後フォローアップにおける尿を用いた FGFR3 遺伝子変異検出の臨床的有用性について検討した。

B. 研究方法

FGFR3 遺伝子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。しかし、従来法による解析では初期鋳型 DNA 量が 50ng 以下の場合、dNTP の misincorporation による false positive が生じ、遺伝子変異検出の精度が低下する。そこで、最初に通常の PCR 法を 7cycle 程度実施し、初期鋳型 DNA 量を増やした後に、PNA を加えて realtime PCR 法を実施する PNA-mediated pre-main amplifier (PPA)法を開発した。本法を用いることにより初期鋳型 DNA 量が 1 ng(300 copy)程度の微量の検体から鋳型 DNA 中に 1%(3 copy)程度の濃度で存在

する微量の遺伝子変異を検出することが可能となった。TUR-btを実施した表在性膀胱癌で、術後最長3年間経過を観察し、1-3ヶ月毎に経時的に尿中の遺伝子変異が検出可能であった45症例を対象に解析を行った。鋳型DNA量として50ngが使用可能な場合には通常のPNA-mediated realtime PCR clamping法を使用し、それ以下の場合には鋳型DNA量を1ngとしてPPA法を用いて解析を行った。

(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. 研究結果

TUR-btを実施された表在性膀胱がん45例の腫瘍組織と術前および術後経過観察の際に得られた尿の429検体を対象とした。尿中*FGFR3*遺伝子変異解析の手順としては、最初に尿から抽出されたDNA濃度を測定した結果、DNA濃度が50ng/ml以上のものが83検体(19.3%)、0.125-50ng/ml以上のものが232検体(54.1%)、0.125ng/ml以下の検体が114検体(26.6%)であった。このうち0.125ng/ml以上の濃度を示した315検体(73.4%)を*FGFR3*遺伝子変異解析の対象とした。*FGFR3*遺伝子変異は53.3%(24/45例)に認められた。遺伝子変異が認められた部位と変異型はExon7, R248Cが4例(16.7%)、S249Cが8例(33.3%)、Exon10, Y375Cが9例(37.5%)と多数を占め、その他にExon10、Codon372およびCodon373、Exon15, Codon652に各1例ずつ認められた。*FGFR3*遺伝子変異陽性例24例中9例が再発、同陰性例では21例中9例に再発が認められたが、再発率について両群間に有意差は認められなかった($p=0.89$)。その他、腫瘍径、発生個数、ステージ、組織学的異型度、CIS合併の有無、BCG投与歴の有無等の臨床背景の解析ではいずれも再発の有無に関して優位差は

認められなかった。術前尿の解析では、*FGFR3*遺伝子変異陽性であった24例中、再発例では9例、非再発例では12例について尿の解析が可能であったが、尿由来DNA中に含まれる変異型*FGFR3*遺伝子の比率が11%以上の症例では78%(7/9例)に再発が認められたのに対し、11%未満の症例では再発例は17%(2/12例)と有意に低い結果が得られた($p=0.002$, HR 7.50)。術後尿を用いた尿中の*FGFR3*遺伝子変異の検出率を再発と非再発の2群間で比較検討した。原発腫瘍の*FGFR3*遺伝子変異陽性例($n=24$)では、再発群で78%(7/9例)、非再発群では0%(0/15例)であった。尿中に検出された*FGFR3*遺伝子の変異型は原発腫瘍で検出されたものと全く同様であった。一方、原発腫瘍の*FGFR3*遺伝子変異陰性例($n=21$)では、尿中の*FGFR3*遺伝子変異の検出率は再発群で0%(0/9例)、非再発群で8.3%(1/12例)であった。尿細胞診との比較では、原発腫瘍の*FGFR3*遺伝子変異陽性例($n=24$)では、尿細胞診は再発群、非再発群ともに全例陰性であった。一方、原発腫瘍の*FGFR3*遺伝子変異陰性例($n=21$)では、再発群で56%(5/9例)、非再発群で0%(0/12例)であった。以上の結果より尿中の*FGFR3*遺伝子変異の検出は尿細胞診の結果と完全に相補的であった。

D. 考察

PNA-mediated realtime PCR clamping法はPNAが結合する15-18塩基程度の比較的広い領域に生じた遺伝子変異の検出が可能であり、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が可能と考えられる。PNA分子は野生型DNAの塩基配列に強く結合して、DNAポリメラーゼによるDNA鎖の伸長反応を阻害するため、遺伝子変異が存在する場合には、PNAの結合が弱い変異型DNAの増幅効率が相対的に高められることとなる。しかし、初期鋳型DNA量が少ない場合にPNAの存在下でPCR法を行うと、dNTPのmisincorporationにより生じた人工的な突然変異の誘発によって、遺伝子変異検

出の特異性が低下する要因となる。昨年度までの検討で、鋳型 DNA 量が 1ng 以下の場合、鋳型 DNA 中に含まれる変異型 DNA の割合が目的とする遺伝子の DNA コピー数の 10%以下である場合、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 程度以上の初期鋳型 DNA 量が必要と考えられた。TUR 術後の尿を用いた解析では、数十 ml の尿から抽出したゲノム DNA から解析を行う必要があり、今回の検討でも尿検体 429 例中尿中 DNA 濃度が 50ng/ml 以上であった検体は 83 検体(19.3%)に過ぎず、さらに 114 検体(26.6%)では尿中 DNA 濃度が 0.125ng/ml 以下の低値を示し、遺伝子検査の実施が困難であった。このような欠点を回避するための手段として、PNA を加えずに 7 サイクル程度の PCR を実施し、鋳型 DNA のコピー数を増加させた後に、PNA-mediated realtime PCR clamping 法を実施する PPA 法を実施することとし、最終的に 232 検体(54.1%)に対して PPA 法による解析が行われた。

TUR-bt 実施後最長 3 年間の経過観察が可能であった表在性膀胱がん 45 症例についての解析では、原発腫瘍における FGFR3 変異の有無と有意な相関をしめした背景因子は認められず、また、FGFR3 遺伝子変異の有無は腫瘍径、多発性、ステージ、組織学的異型度、CIS 合併の有無等、従来から知られている予後因子と同様に術後再発の有無との間に有意な相関は認められなかった。昨年度の報告で、FGFR3 遺伝子変異は pT2, Grade3 の浸潤性膀胱がんでは有意に低く、表在性膀胱がんにて特徴的な遺伝子異常であることが明らかとなったが、今回の検討で対象となった症例は全例が表在性膀胱がんであったため、FGFR3 遺伝子変異の有無は再発を予測する予後因子とはならなかった。ただしこの結果は今回の検討で比較した他の臨床病理学的因子についても同様であった。表在性膀胱がんでは術後のマネージメントとして、最初の2年間は3ヶ月毎、3年目は6ヶ月毎に定期的な尿細胞診と膀胱鏡検査が行われる。再発診断の

Golden standard は膀胱鏡による診断であり、従来の報告でも表在性膀胱がんにおける尿細胞診の陽性率は Grade1,2 で 17~34%程度と低いことが知られている。今回の症例では 90%以上 (41/45 例) が Grade1 あるいは Grade2 の低異型度の表在性膀胱がんであり、再発例における尿細胞診の陽性率は 28% (5/18 例) と低率であった。今回の検討で、原発腫瘍の FGFR3 遺伝子変異の有無は尿細胞診の陽性率と密接な関連を有することが明らかとなった。原発腫瘍の FGFR3 遺伝子変異が陽性であった 24 症例中 9 例に再発が認められたが、尿細胞診では全例が陰性であり、尿中の FGFR3 遺伝子変異は 78% (7/9 例) の症例で陽性であった。一方、原発腫瘍の FGFR3 遺伝子変異が陰性であった 21 例中 9 例に再発が認められ、尿細胞診は 56% (5/9 例) で陽性であり、尿中の FGFR3 遺伝子変異は全例が陰性であった。尿細胞診の陽性率と尿中の FGFR3 遺伝子変異の陽性率は完全に相補的であり、両者を併用することにより、表在性膀胱がん再発の検出感度を大幅に向上させることが可能と考えられる。従来弱点とされてきた低異型度の膀胱腫瘍の診断に有用と考えられる。

E. 結論

尿中の FGFR3 遺伝子変異の定量的検出は尿細胞診と併用することにより、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) Miyake M, Ishii M, Kawashima K, Kodama T, Sugano K, Fujimoto K, Hirao Y.

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.
85:1020-1027, 2009.

- 2) Naruse H, Ikawa N, Yamaguchi K, Nakamura Y, Arai M, Ishioka C, Sugano K, Tamura K, Tomita N, Matsubara N, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y. Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay. Fam Cancer, 8:509-517, 2009.
- 3) Iwama T, Kuwabara K, Ushiyama M, Yoshida T, Sugano K, Ishida H. 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, 8:51-54, 2009.
- 4) Miyake M, Sugano K, Sugino H, Ima K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. Cancer Sci., 101:250-258, 2010.

2. 学会発表

- 1) 菅野康吉、牧島恵子、友田茉莉、矢崎久妙子、平澤晃、武田祐子、和泉 秀子、牛尼美年子、吉田輝彦:日本人の遺伝性腫瘍に関するエビデンスの構築—研究から医療への展開— 第15回日本家族性腫瘍学会学術集会シンポジウム 2009年6月13(土)秋葉原コンベンションホール(東京都)
- 2) 千原良友、Gangning Liang, Jones Peter A, 新井恵吏、藤元博行、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦、金井弥栄:定量的DNAメチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日(木)パシフィ

コ横浜(神奈川県)

- 3) 菅野康吉:がんの遺伝的素因と遺伝カウンセリング 第68回日本癌学会学術総会モーニングレクチャ 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 4) 三宅牧人、石井正純、小山尚樹、川島清隆、児玉哲郎、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦:尿路上皮癌細胞株を対象とした5-アミノレブリン酸投与下光線力学的治療の作用増強効果の検討 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 5) 松村善昭、三宅牧人、石井正純、笠原優一、友田茉莉、久保麗子、田中宣道、藤本清秀、平尾佳彦、菅野康吉:前立腺癌における融合遺伝子の検出に関する研究 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日(金)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 6) 牛尼美年子、菅野康吉、鈴木茂伸、坂本裕美、吉田輝彦:国立がんセンター中央病院における網膜芽細胞腫の遺伝診断 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3日(土)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 7) 菅野康吉:遺伝カウンセリング 第47回日本癌治療学会総会教育シンポジウム 2009年10月23日(土)パシフィコ横浜(神奈川県)
- 8) Kokichi Sugano, Seigo Nakamura, Jiro Ando, Hiromitsu Jinno, Tadashi Ikeda, Daisuke Aoki, Takashi Fukutomi, Teruhiko Yoshida, Masami Arai, Yasuo Hirai, Fujio Kasumi, Takafumi Fukui, Shiro Yokoyama, Nobuhisa Gondo, Yoshio Miki: Cross-sectional study of BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected of hereditary breast/ovarian carcinoma BRCA Symposium: Fifteen Years of Progress October 14-16, 2009 Montreal (Canada)

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