

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総合研究報告 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----- 吉田 輝彦	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	24
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	別添

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
総合研究報告書

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく診断・予防法開発及び分子標的探索と、  
免疫遺伝子治療の臨床開発に関する研究

研究代表者 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食道がん化学放射線治療前生検試料の網羅的遺伝子発現プロファイリングにより、治療成績の向上に貢献する予知医療の可能性を示し、日米欧で診断機器として承認済みの検査システムを用いた体外診断薬として、企業との共同開発に進んだ。また、化学放射線治療後1年以内に再発する群は、治療前生検の遺伝子発現プロファイル上、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マイクロアレイを用いて小児の急性骨髄性白血病(AML)の遺伝子発現プロファイル解析を行い、6基本サブタイプ(t(8;21)型、t(15;17)型、inv(16)型、単球系、巨核球系、骨髄球系)に分類されること、中間リスク群である単球系AMLには遺伝子発現により検出できる新規予後不良サブグループが存在すること、白血病の起源となる造血細胞の発達段階による違いを反映している可能性があることを明らかにした。これらの結果を基に、マイクロアレイ検査による小児AMLの診断アルゴリズムを開発した。③表在性膀胱がん200例を対象として経尿道的膀胱腫瘍切除後の再発リスクを評価する前向き研究を行なった。9番染色体と17番染色体短腕の欠失は腫瘍径とならぶ有意な予後因子であり、BCG投与例における治療効果の予測にも有用と考えられた。微量試料中の遺伝子変異の高感度検出系を開発し、FGFR3遺伝子の変異が低異型度の表在性膀胱がんの主要な遺伝子変異であること、術後尿中の変異検出率は尿細胞診の結果と完全に相補的であることを見出した。両者の併用により膀胱がん再発の検出感度向上が可能と考えられた。④家族性腫瘍の原因遺伝子の領域欠失変異を検出する方法として、リアルタイム定量的PCR法とlong-range PCR法を組み合わせる方法を考案し、多内分泌腺腫瘍症1型(MEN1型)等の遺伝子診断に応用できることを示した。MEN1型の原因遺伝子MEN1遺伝子産物メニンの細胞内安定性を測定する方法により、MEN1遺伝子のミスセンス変異保因者の予後を推定する方法を開発した。⑤造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合により、有害事象の増悪なく、相乗的な抗腫瘍免疫を増強し、マウスの生存率を延長できることを明らかにした。特に、GVHD発症のない自家造血幹細胞移植と、IFN $\alpha$ 発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入は安全性が高く、実際の臨床病態に近い転移モデルにおいても全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できるため、難治固形がんに対する新たな治療戦略となりうる。⑥がんの転移モデル動物を用いてRNAi治療による検討を行い、RNAi分子の転移性がん細胞へのデリバリー、標的遺伝子および下流の分子の制御、転移の抑制が可能であることを明らかにし、がんの治療応用をめざしたRNAi創薬の有効性が示された。

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

落谷 孝広 国立がん研究センター研究所  
室長（平成 19～20 年度）

竹下 文隆 国立がん研究センター研究所  
研究員（平成 21 年度）

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き治療効果を予測して治療の個別化に貢献するとともに、予後不良例を特徴付ける信号伝達経路の解明と、分子標的同定を目的とした。

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。中でも小児AMLは、発症に至るまでの年数が短いため、その発症過程が比較的単純だと予想される。本サブテーマでは、網羅的遺伝子発現解析により小児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。

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：本サブテーマでは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を開発することを目的とした。特に焦点を当て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。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：がん抑制遺伝子の生殖細胞系列における機能喪失型ヘテロ接合変異は、家族性腫瘍症候群の原因となるが、遺伝子全体またはエクソン全体が欠失するいわゆる大領域欠失変異の場合は、従来の変異解析法では感度が低く、遺伝子診断上、しばしば問題となる。大領域遺伝子欠失の迅速・簡便な検出法を開発した。

多内分泌腺腫瘍症1型(MEN1)の原因遺伝子MEN1遺伝子のミスセンス変異がMEN1の完全型や軽症型の原因となる機序を解明し、遺伝子変異の情報を、遺伝子診断後の経過観察や遺伝カウンセリングによりよく活用可能にすることを目指した。

【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腫瘍局所で成立している免疫寛容の打破である。新鮮な免疫系の再構築効果が期待でき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開発を目的とした。同種造血幹細胞移植では免疫遺伝子治療によるドナー免疫系の腫瘍抗原認識を強化する方法を、自家造血幹細胞移植では免疫再構築の際に腫瘍反応性T細胞の増殖を促進することにより抗腫瘍免疫を誘導する方法の開発を行った。

⑥RNA干渉(RNAi)によるがん転移制御法の開発：本サブテーマではがん患者のゲノム・遺伝子情報から臨床的に有効性が期待されるRNAi分子を選

択し、in vivo イメージング解析技術を駆使した前立腺がんの骨転移、乳がんのリンパ節転移および薬剤耐性腫瘍などの動物モデルを用いて、がんの転移・薬剤耐性化を規定する分子の解明と治療法開発の推進を目的とした。

## 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。

①食道がん予知医療には生検を用いることが不可欠である。CRT または手術を施行された食道がん患者、各々約 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。

②Affymetrix GeneChip による小児 AML 臨床試料の網羅的遺伝子発現解析データを取得し、サブタイプ分類を行うとともに、新たな予後不良サブグループの検出を行った。既知の予後不良因子と相関する遺伝子の同定を行い、遺伝子発現に基づく高精度リスク診断の可能性を検討した。上記の過程において予後不良に関わる遺伝子及び生物学的背景の解析を行い、治療標的としての可能性を検討する。

③全国の泌尿器科 10 施設の参加による多施設共同研究として平成 14 年 4 月から平成 17 年 3 月までに 209 症例が本登録された。その後最長 3 年間の経過観察期間を行い、平成 19 年 3 月に研究を終了した。全症例について TUR-Bt で切除された腫瘍組織より抽出したゲノム DNA を対象として 9 番染色体および 17 番染色体短腕の染色体欠失を検索した。

FGFR3 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、一部の微量試料に適用した。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。膀胱原発の尿路上皮がん 154 症例に対する TUR-bt の際に得ら

れた腫瘍組織および術前尿沈渣から抽出したゲノム DNA を鋳型として FGFR3 遺伝子変異を検出した。

④以前より開発してきた、競合的 PCR 法を用いた遺伝子コピー数の推定法を基に、より迅速・簡便に検出するための改変を行った。MEN1 遺伝子の上流と下流部分にコピー数を推定する標的配列を設定し、標的配列を増幅できる PCR プライマーを作製した。さらに、これらの標的配列中に PCR 用プライマーを設定し、long-range PCR で約 8 千塩基対の遺伝子領域を一挙に増幅することにより、その範囲内の大領域欠失を検出する方法を考案した。

先行研究により、MEN1 の原因となるミスセンス変異をもつ MEN1 遺伝子産物メニンは、野生型メニンと比較して細胞内で不安定であり、急速にユビキチン化されて分解されることを示した。変異メニンの細胞内安定性を評価するため 1 本の mRNA により変異型と野生型の双方のメニンを発現する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。

⑤主要組織適合抗原(H-2<sup>d</sup>)は一致するが、マイナー組織適合抗原が異なる、DBA2 マウスをドナー、BALB/c マウスをレシピエントとする同種骨髄移植モデルを確立した。移植後 8 週間目にマウスの足に同系の CT26 大腸がん細胞や Renca 腎がん細胞を移植し、腫瘍径が 5-6mm 大となったときに、インターフェロン(IFN) $\alpha$  発現アデノウイルスを腫瘍内に注入し、皮下腫瘍の大きさを経時的に測定した。また、移植片対宿主病 (GVHD) の変化も経時的に評価した。

自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発では、BALB/c マウス (H-2<sup>d</sup>) の自家骨髄移植モデルを用いた。骨髄移植と同時に、マウスの足に同系の CT26 細胞や Renca 細胞を移植し、同種主要組織適合抗原 (MHC) class I 抗原である H-2K<sup>b</sup> 発現プラスミドや IFN $\alpha$  発現プラスミドを正電荷リポソーム (DMRIE/DOPE) と混合して腫瘍内に直接注入し、皮下腫瘍の大きさを経時的に測定した。また、前臨床

研究として臨床病態により近いモデルで検討するため、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、IVIS システムを用いた生体イメージングを用いた。自家造血幹細胞移植後に、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 $\alpha$  発現プラスミドとリポソームと混合して 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<sup>+</sup>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転移性前立腺がん細胞株に増殖抑制効果を示す microRNA (miRNA) を網羅的解析から選択した。選抜された miRNA-16 (miR-16) をアテロコラーゲンによるデリバリー技術により、in vivo イメージングを利用した骨転移モデルマウスに投与し転移抑制効果を検討した。投与した miRNA の転移したがん細胞へのデリバリー効果と RNAi 作用をレポーター遺伝子の発現により評価した。前立腺がん細胞に miR-16 を導入した際に発現が変化する遺伝子及び遺伝子経路を明らかにするとともに、前立腺がん細胞の miR-16 の染色体上コード領域のコピー数異常について検討した。

リンパ節転移のある乳がん患者組織で発現の高い遺伝子に対する small interfering RNA (siRNA) のうち、乳がん細胞の浸潤能を抑制する siRNA を選別した。次に乳がんリンパ節転移モデルマウスに siRNA を投与し、治療候補遺伝子としての有効性を評価した。

(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。

①国立がん研究センターで CRT あるいは手術を受けた食道がん患者から治療前生検試料の提供を受け、Affymetrix U133 Gene Chip によって発現プロファイルを取得した。最終的に合計 CRT 111 例、手術 100 例を確保して、当初の目標に到達した。さらに CRT 例のうち 20 例については Laser microdissection によって、がん細胞とがん間質の発現プロファイルを取得した。研究初年度までに構築した CRT の CR と nonCR を約 80-100%の精度で予測できる判別式を作成した。判別に用いる代表的な遺伝子は定量的 RT-PCR で確認した。その中には CR で高頻度に発現する KRT7 が含まれるが、逆にこの遺伝子は手術で予後不良な高リンパ節転移群で高頻度に発現することを見出した。KRT7 は、転写因子 FOXA1 の下流にあり、FOXA1 もまた高リンパ節転移群で高頻度に発現し、KRT7 のほか LOXL2 などの EMT を誘導する遺伝子を活性化することによって、転移能を高めていることが示唆された。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 CRT 74 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。

②小児 AML 130 症例の遺伝子発現データを解析し、6 基本サブタイプ (t(8;21)型、t(15;17)型、inv(16)型、単球系、巨核球系、骨髄球系) に分類されることを見出した。通常診断では、リスク分類・治療選択において重要な t(8;21)-AML 群の症例が見落とされる場合もあることがわかり、遺伝子発現に基づく診断

の精度の高さが示唆された。そこで6基本サブタイプ分類・診断法の開発を目指し、各サブタイプの標準遺伝子発現パターン(重心)からの距離を基に各症例を診断するアルゴリズムを構築した。小児 AML 15 症例、成人 AML 391 症例の遺伝子発現データに適用し、小児 AML においては 100%、成人 AML においても t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、inv(16)-AML については 98%の精度で診断できることを示した。また、単球系 AML については、その遺伝子発現の多様性に基き 3つのサブグループ(A、B、C)に分類・診断を行うアルゴリズムを構築した。その結果、年長児に多いサブグループ C の予後(3年無病生存率 28%)が、サブグループ A、Bの予後(3年無病生存率 70%、75%)に比べて有意に悪いことを示した。

単球系 AML の多様性が年齢と相関することから、AML の起源となる造血細胞の発達段階の違いが原因となっている可能性が考えられた。そこで、MLL 融合遺伝子導入により単球系 AML を発症させるマウスモデルシステムを用い、白血病細胞の起源としての胎仔肝造血細胞と成体骨髄造血細胞を比較した。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。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。

③多施設共同研究に登録され、解析可能であった 200 例の内訳は TUR-Bt のみが施行された 154 例と術後補助療法として膀胱内 BCG 注入療法が施行された 46 例であり、表在性膀胱がんの再発は 84 例

(42%)に認められた。全症例について TUR-Bt で切除された腫瘍組織より抽出したゲノム DNA を対象として 9 番染色体および 17 番染色体短腕のヘテロ接合性の喪失(LOH)を検索した。全座位を併せた検討では、腫瘍数、組織学的異型度、病期、CIS の合併の有無に関して有意差が認められた。術後 3 年の無病生存率の、Cox 回帰分析の結果、腫瘍径および LOH の有無が有意な予後不良因子であることが明らかとなった。一方、BCG 投与の有無は、LOH 群において有意な予後改善因子であることが明らかとなった。

FGFR3 遺伝子変異については、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 検体から DNA を抽出し、0.125ng/ $\mu$ l 以上の濃度を示した 315 検体(全体の 73.4%)を解析対象とした。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各標的配列をリアルタイム定量的 PCR で定量し、大領域遺伝子欠失を有することが既に判明している患者と健常対照者の標的配列コピー数を比較したところ、欠失患者 DNA では健常者 DNA の約半量となる結果を得た。また、全長約 8 千塩基対に及ぶ MEN1 遺伝子全体をその両端から一挙に増幅するための

long-range PCR の最適条件も確立した。

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

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 種類を野生型メニン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。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になりやすいことを示した。

⑥同種造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発においては、低用量 ( $1 \times 10^8$  PFU) の IFN $\alpha$  アデノウイルスの腫瘍内局注が同種造血幹細胞移植腫瘍抑制効果を強力に増強することを示した。その機序として、腫瘍内での IFN $\alpha$  発現により、樹状細胞の成熟化が促進され腫瘍抗原提示能が増強することを示した。临床上、大きな問題となる GVHD は、複合治療により特に増悪しないことを明らかにした。

自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の開発においては、腫瘍の免疫原性を強化し腫瘍特異的免疫の誘導を促進することが期待できる同種 MHC 遺伝子導入や、自然免疫・獲得免疫を強化する IFN $\alpha$  遺伝子治療の組み合わせを検討した。造血幹細胞移植後早期 (6 週以内) の免疫系の再構築が起こっている時期に、腫瘍内に直接、これらの遺伝子導入を行うと、複数のがん細胞の皮下移植腫瘍の増殖が著明に抑制され、相乗的抗腫瘍効果が誘導

可能であった。自家造血幹細胞移植単独あるいは同種 MHC 遺伝子導入単独では、腫瘍の増殖は抑制できるもののマウスの生存率は延長できないが、複合療法ではマウスの生存率を有意に延長できた。自家造血幹細胞移植は安全性にも優れており、動物実験では有害事象は認められなかった。

また、自家造血幹細胞移植マウスの両足に CT26 細胞を、背中に Renca 細胞を移植し、右足の CT26 腫瘍のみに IFN $\alpha$  遺伝子導入を行うと、遺伝子を導入した CT26 腫瘍及び遺伝子を導入していない反対側の CT26 腫瘍の増殖は明らかに抑制されたが、Renca 腫瘍に対する抗腫瘍増強効果は認められず、腫瘍内 IFN $\alpha$  遺伝子導入により全身性の腫瘍特異的免疫が誘導されることを明らかにした。

さらに、ヒト臨床病態に近いモデルにおいて複合療法の効果を検討した。自家造血幹細胞移植後に、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する CT26-Luc 細胞を脾臓の被膜下に注入して肝転移巣を作成した。足の皮下腫瘍内に IFN $\alpha$  遺伝子導入を行い、肝転移巣に対する抗腫瘍効果を 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 > 自家造血幹細胞移植マウス > 皮下腫瘍に IFN $\alpha$  遺伝子導入した移植マウス、の順で光子カウントは低く、肝転移は明らかに抑制されることを明らかとした。

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、皮下腫瘍から CD11c<sup>+</sup> 細胞を分離し、種々のサイトカインの分泌を比較検討した。複合療法群では、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、TNF $\alpha$ 、IL-2 や IFN $\alpha$  の発現が有意に上昇していた。また、腫瘍内の CD11c<sup>+</sup> 細胞の抗原提示能が増強しており、本複合療法の相乗的抗腫瘍効果の誘導は、腫瘍局所の抗原提示細胞の活性化を含むことが考えられた。

最終的な自家造血幹細胞移植と腫瘍内 IFN 遺伝子導入の複合療法の臨床開発を目指して、段階的臨床研究として、骨悪性腫瘍や軟部肉腫に対する IFN 遺伝子治療の臨床研究実施計画申請書の作成を開始した。また、実際の臨床開発を行う中央病院の小児科や造血幹細胞移植科との連携体制も確立した。臨床試験用ベクターに関しては、名古屋大学



医学部脳神経外科教室との協力体制を構築した。

⑥ヒト前立腺がん細胞に増殖抑制効果を示した miR-16 をモデルマウスに投与した結果、骨転移が抑制された。また、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前立腺がん骨転移モデルマウスの骨転移巣における発光が低下し、骨転移巣への miRNA デリバリーが可能であることが示された。ヒト前立腺がん PC-3M-luc 細胞では、正常ヒト前立腺細胞と比較し、miR-16 遺伝子のコピー数が 1/2 であることを見いだした。

ヒト乳がん細胞の浸潤抑制効果を示した slug siRNA を乳がんモデルマウスに投与した結果、リンパ節転移が抑制されること、E-cadherin をはじめとした上皮間葉移行に関与する遺伝子の発現が、mRNA、タンパク質ともに上昇することを示した。

#### 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。逆に、FOXA1 が活性化し、KRT7 が発現する例は手術では予後不良であるが、CRT では CR 群に多く見られることから、2つの治療法選択の際に治療前生検試料の網羅的発現プロファイル情報も参照することにより、食道がん全体の治療成績が向上することが期待できる。

②現在の AML の診断及びリスク分類には白血病細胞の形態検査、免疫学的検査、染色体分析、遺伝子検査等の数多くの検査が用いられ、相当量の検体が必要となっている。マイクロアレイによる検査は 20 ng の RNA で可能で、しかも一つの検査で多くの

情報を得られるため、最小限の検体量で効率的に診断を行える。しばしば十分な検体採取が困難な小児患者においては特に有用だと考えられる。臨床的に重要な t(8;21)、t(15;17)、inv(16)を正確に判定できたのみならず、中間リスク群として扱われて来た単球系 AML の中に新規予後不良サブグループを同定できたことは、マイクロアレイ診断の新たな有用性を示すものである。一方、FLT3-ITD 等の既知予後不良因子については、遺伝子発現から高精度に診断することはできなかったことから、マイクロアレイ診断のみで AML のリスク分類を行うことは難しいと考えられた。

本研究で同定した単球系 AML の新規予後不良サブグループ C について、白血病の起源となる造血細胞の発達段階による違いを反映している可能性を示すとともに、主要候補遺伝子の一つとして EVI1 を同定した。起源細胞の違いが病態に関係するという結果は、主に遺伝子変異の種類に基づき行われている AML のリスク分類に新たな視点を与えるものである。

③表在性膀胱がんの再発については、多変量解析の結果、腫瘍径と 9 番および 17 番染色体短腕の LOH の有無が有意な予後因子であることを示した。両因子のオッズ比はそれぞれ 2.18、2.14 とほぼ同等であるが、腫瘍径 3cm 以上の症例は表在性膀胱がん全体の 15%程度であるのに対して、欠失は全症例の約半数(53%)に認められる重要な因子である。更に術後補助療法として BCG 膀胱内注入療法を行った症例では、欠失例は良好な無病生存率を示し、欠失の有無は術後補助療法の選択についても有用な情報となることが示唆された。

FGFR3 遺伝子変異は、遺伝子異常の報告が少ない pTaG1 stage の表在性膀胱がんの 80%弱に認められるのに対し、pT2 以上、G3 の浸潤性膀胱がんでは 8%程度の症例にしか認められないことから、浸潤に関する予後良好因子となることが推測される。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 症例中再発を認めた 9 例について、尿細胞診ではその全例が陰性であったが、尿中の

FGFR3 遺伝子変異は 78% (7/9 例) の症例が陽性を示した。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) で陽性であったが、尿中の FGFR3 遺伝子変異は全例が陰性であった。FGFR3 遺伝子変異陽性の表在性膀胱がんの多くは Grade1、2 の低異型度のものが多く、このような症例では尿細胞診の陽性率が低いことから、尿中の FGFR3 遺伝子変異の測定を加えることで、表在性膀胱がんの検出感度を大幅に向上させることが可能と期待される。

④リアルタイム定量的 PCR を用いて DNA コピー数を推定する試みは以前から行われてきたが、ばらつきも大きかった。今回開発した技術は、臨床に応用できる精度を得られることが示唆され、long-range PCR 法と組み合わせることにより、遺伝子内部の部分欠失も検出が可能になると考えられる。

MEN1 は副甲状腺、膵膵管内分泌腫瘍、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、予後不良の完全型の部分症状のみが出現している可能性がある。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。

⑤本研究により、固形がんに対して、同種や自家の造血幹細胞移植に免疫遺伝子治療を複合することにより、相乗的な抗腫瘍免疫を強化・維持できることを明らかとすることができた。特にウイルスベクターよりも安全性に優れるプラスミド・リポソーム複合体の腫瘍内注入により、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、本複合療法が臨床応用可能な治療法であることを示している。また、肝転移モデルなどの実際の臨床病態に近い動物モデルにおいても、IFN $\alpha$ 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。今後は、まず、免疫遺伝子治療単独として、骨悪性腫瘍や軟部肉腫に対するインターフェロン遺伝子治療の臨床研究を行い、効果と安全性や実行可能性を確認した後、GVHD 発症の危険がなく安全な自家造血幹細胞移植・免疫遺伝子治療複合療法の臨床研究を行い、最終的に、同種造血幹細胞移植と IFN 遺伝子導入の臨床開発に展開する。

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全く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て、企業との共同研究に着手した。食道がん治療前生検の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できた。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の集積による検証が必要である。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小児 AML は遺伝子発現プロファイルにより 6 基本サブタイプ (t(8;21)-AML、t(15;17)-AML、

inv(16)-AML、単球系 AML、巨核球系 AML、骨髓球系 AML)に分かれ、遺伝子発現により検出できる新規予後不良サブグループが存在した。この予後不良サブグループは、白血病の起源となる造血細胞の発達段階による違いが原因となっている可能性がある。小児 AML のマイクロアレイ診断は基本サブタイプを正確に判定するのみならず、新規予後不良サブグループの同定が可能であり、その有用性が示された。一方、予後不良因子である FLT3-ITD 等を正確に判定することは難しく、マイクロアレイ検査のみでリスク診断を行うことは難しいことも示された。

③膀胱がん組織および尿を用いた 9 番染色体短腕、長腕および 17 番染色体短腕の遺伝子欠失の解析並びに尿中の FGFR3 遺伝子変異の定量的検出は低異型度の表在性膀胱がんの TUR-bt 術後の再発を予測する予後因子として臨床的に有用と考えられた。今後、膀胱がん術後尿を用いた経過観察による再発の早期診断を目的としてさらに開発を進める。

④家族性腫瘍の原因遺伝子の領域欠失変異を検出する方法として、リアルタイム定量的 PCR 法と long-range PCR 法を組み合わせる方法を考案した。多内分泌腺腫瘍症 1 型等の遺伝子診断に応用できる。MEN1 遺伝子のミスセンス変異のうち、その変異をもつ遺伝子産物メニンの細胞内安定性が高いものは、MEN1 型の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保因者の予後の推定に役立つと考えられる。

⑤造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合により、有害事象の増悪なく、抗腫瘍免疫を相乗的に増強し、マウスの生存率の延長が可能であった。特に、GVHD 発症のない自家造血幹細胞移植と、IFN- $\alpha$  発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入は、安全性が高く、実際の臨床病態に近い転移モデルにおいても全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できるため、難治固形がんに対する新たな免疫治療戦略となりうる。

⑥ヒト乳がんや前立腺がんの転移に関与する遺伝子に対し、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. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi A., Yoshida T, et al. Allogeneic major histocompatibility complex gene transfer enhances an effective antitumor immunity in the early period of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Can Res*, 13: 7469-7479, 2007.
- 2) Furuhashi S., Yoshida T, et al. Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis. *Mol and Cell Biochem*, 298: 125-138, 2007.
- 3) Hara H., Yoshida T, et al. Local interferon- $\alpha$  gene therapy elicits a systemic immunity in a syngeneic pancreatic cancer model in hamster. *Cancer Sci*, 98: 455-463, 2007.
- 4) Nakayama R., Yoshida T, et al. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol*, 20: 749-759, 2007.
- 5) Saeki N., Yoshida T, et al. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF- $\beta$  dependent apoptotic signaling. *Oncogene*, 26: 6488-6498, 2007.
- 6) Takano T., Yoshida T, et al. Epidermal growth factor receptor mutation detection using high-resolution melting analysis predicts outcomes in patients with advanced non small cell lung cancer treated with gefitinib. *Clin Can Res*, 13: 5385-5390, 2007.
- 7) Yajima S., Yoshida T, et al. Expression

- profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 31: 1029-1037, 2007.
- 8) Miura Y., Yoshida T., et al. Direct selection of targeted adenovirus vectors by random peptide display on the fiber knob. *Gene Ther*, 14: 1448-1460, 2007.
  - 9) Tagata Y., Ichikawa H., et al. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP  $\epsilon$  and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22: 273-280, 2008.
  - 10) Yoshida H., Ichikawa H., et al. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP  $\epsilon$  expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 5819-5834, 2007.
  - 11) Shimada A., Ichikawa H., et al. Low frequency of KIT gene mutation in pediatric acute myeloid leukemia with inv(16)(p13q22): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int. J. Hematol.*, 86: 289-290, 2007.
  - 12) Yanaba K., Sugano K., et al. Muir-Torre syndrome caused by partial duplication of MSH2 gene by Alu-mediated nonhomologous recombination. *Br J Dermatol*, 158: 150-156, 2008.
  - 13) Miyake M., Sugano K., et al. Sensitive detection of FGFR3 mutations in bladder cancer and urine sediments by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR clamping. *Biochem Biophys Res Commun.*, 362: 865-871, 2007.
  - 14) Ono M., Tsukada T., et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 446: 685-689, 2007.
  - 15) Takeshita F., Ochiya T., et al. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc. Biomed. Optics and Med.*, 9: 68680H, 2008.
  - 16) Takeuchi T., Ochiya T., et al. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng.*, 14: 267-274, 2008.
  - 17) Morita S., Ochiya T., et al. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89: 687-696, 2007.
  - 18) Ochiya T., et al. Atelocollagen-mediated drug discovery technology. *Expert Opin Drug Discov.*, 2: 159-167, 2007.
  - 19) Honma K., Ochiya T., et al. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int.*, 7: 1-9, 2007.
  - 20) Banas A., Ochiya T., et al. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn.*, 236: 3228-3241, 2007.
  - 21) Nakayama R., Yoshida T., et al. Association of missense SNP, Cys1367Arg of the WRN gene, with the risk of bone and soft tissue sarcomas in Japan. *Cancer Sci*, 99: 333-339, 2008.
  - 22) Yamashita M, Yoshida T., et al. Psychological impact and associated factors after disclosure of genetic test results concerning hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Stress and Health*, 24: 407-412, 2008.
  - 23) Ohnami Sh, Yoshida T., et al. His595Tyr Polymorphism in the Methionine Synthase Reductase (MTRR) Gene is Associated with Pancreatic Cancer Risk. *Gastroenterol*, 135: 477-488, 2008.
  - 24) Sakamoto H, Yoshida T., et al. Genetic variation in PSCA is associated with

- variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Gen*, 40: 730–740, 2008.
- 25) Yasuda K, Yoshida T, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Gen*, 40: 1092–1097, 2008.
  - 26) Hanada S, Yoshida T, et al. Expression profile of early lung adenocarcinoma: identification of MRP3 as a molecular marker for early progression. *J Pathol*, 216: 75–82, 2008.
  - 27) Kim SR, Yoshida T, et al. Twenty novel genetic variations and haplotype structures of the DCK gene encoding human deoxycytidine kinase (dCK). *Drug Metab Pharmacokinet*, 23: 379–384, 2008.
  - 28) Yamaji T., Yoshida T, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism interacts with alcohol and folate intake to influence the risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 267–274, 2009.
  - 29) Ohta H., Yoshida T, et al. Cross talk between hedgehog and epithelial–mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers. *Br J Cancer*, 100: 389–398, 2009.
  - 30) Saeki N., Yoshida T, et al. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA–D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 261–271, 2009.
  - 31) Saito Y, Yoshida T, et al. Close association of UGT1A9 IVS1+399C>T with UGT1A1\*28, \*6, or \*60 haplotype and its apparent influence on 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) glucuronidation in Japanese. *Drug Metab Dispos*, 37: 272–276, 2009.
  - 32) Ueno H, Yoshida T, et al. Homozygous CDA\*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. *Br J Cancer*, 100: 870–873, 2009.
  - 33) Jo A, Ichikawa H, et al. Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Br.J. Haematol.*, 144: 917–929, 2008.
  - 34) Hirai Y, Sugano K, et al. Molecular epidemiological and mutational analysis of DNA mismatch repair (MMR) genes in endometrial cancer patients with HNPCC-associated familial predisposition to cancer. *Cancer Sci*, 99: 1715–1719, 2008.
  - 35) Ohkura N, Tsukada T, et al. Differential transactivation by orphan nuclear receptor NOR1 and its fusion gene product EWS/NOR1: possible involvement of poly(ADP-ribose) polymerase I, PARP-1. *J Cell Biochem*, 105: 785–800, 2008.
  - 36) Tsukada T, et al. MEN1 gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer Sci*, 100: 209–215, 2009.
  - 37) Osaki M, Ochiya T, et al. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*, 13: 658–670, 2008.
  - 38) Banas A, Ochiya T, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*, 26: 2705–2712, 2008.
  - 39) Hokaiwado N, Ochiya T, et al. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs*, 11: 274–278, 2008.
  - 40) Hokaiwado N, Ochiya T, et al. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells.

- Carcinogenesis, 29: 1134–1138, 2008.
- 41) Honma K, Ochiya T, et al. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat Med*, 14: 939–948, 2008.
  - 42) Kodama M, Ochiya T, et al. Pancreatic endocrine and exocrine cell ontogeny from renal capsule-transplanted embryonic stem cells in streptozocin-injured mice. *J Histochem Cytochem*, 56: 33–44, 2008.
  - 43) Kosaka N, Ochiya T, et al. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*, 142: 293–300, 2008.
  - 44) Matoba T, Ochiya T, et al. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*, 28: 286–294, 2008.
  - 45) Ochiya T, et al. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc of SPIE*, 6868: 68680H1–68680H11, 2008.
  - 46) Takahashi R, Ochiya T, et al. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol*, 135: 385–392, 2008.
  - 47) Ueda S, Ochiya T, et al. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS ONE*, 3: E2800, 2008.
  - 48) Yamamoto Y, Ochiya T, et al. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275: 1260–1273, 2008.
  - 49) Yu D, Ochiya T, et al. Down regulation of BRCA2 causes radio-sensitization of human tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*, 99: 810–815, 2008.
  - 50) Takeshita F, Ochiya T, et al. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. In: *Methods in Molecular Biology: siRNA and miRNA Gene Silencing*, Sioud M (eds). 83–92, 2009.
  - 51) 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.
  - 52) 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.
  - 53) 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.
  - 54) 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.
  - 55) 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.
  - 56) 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.
  - 57) Sangrajang 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.

- 58) 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.
- 59) 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.
- 60) Kobayashi M., Yoshida T, et al. Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of stomach cancer: a hospital-based case-control study in Japan. *Gastric Cancer*, 12: 198-205, 2009.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) Sai K., Yoshida T, et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, in press.
- 64) Yoshida T, et al. Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBJ database: gastric cancer as an example. *Cancer Sci*, in press.
- 65) 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.
- 66) Miyake M., Sugano K, et al. siRNA-mediated knockdown of the heme synthesis and degradation pathways: modulation of treatment effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in urothelial cancer cell lines. *Photochem Photobiol*, 85: 1020-1027, 2009.
- 67) Iwama T., Sugano K, et al. Identification of somatic APC mutations in recurrent desmoid tumors in a patient with familial adenomatous polyposis to determine actual recurrence of the original tumor or de novo occurrence. *Fam Cancer*, 8: 51-54, 2009.
- 68) 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.
- 69) Tsukada T, et al. *MEN1* gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer Sci*, 100: 209-215, 2009.
- 70) Okamoto T., Tsukada T, et al. Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Surg*, 33: 2343-2354, 2009.
- 71) Kitoh A., Tsukada T, et al. Indispensable role of the Runx1-Cbfb transcription complex for in vivo-suppressive function of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity*, 31: 1-12, 2009.
- 72) 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, 2009.
- 73) Honma K., Takeshita F, et al. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. *Int J General Med*, 2: 243-257, 2009.
- 74) 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.

- 75) Kosaka, Takeshita, F., et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Kokichi Sugano, Naoki Koyama, Keiko Makishima, Yasuyuki Miyakura1, Yuko Takeda, Teruhiko Yoshida. Genetic counseling and gene testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer and associated disorders. 第11回アジア大腸肛門病学会. 東京ドームホテル(2007).
- 2) 中山ロバート、長谷川匡、栃木直文、川井章、森岡秀夫、生越章、戸山芳昭、吉田輝彦、市川仁. 第66回日本癌学会学術総会. 低分化型滑膜肉腫の遺伝子発現プロファイル. 横浜パシフィコ. (口演 O-096)(2007)..
- 3) 青柳一彦、三梨桂子、武藤学、大津敦、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己. 第66回日本癌学会学術総会. 食道がん生検サンプルの網羅的な in vivo 遺伝子発現プロファイリング. 横浜パシフィコ. (示説. P-341)(2007)..
- 4) 坂本裕美、森和彦、鈴木智博、深川剛生、山本伸子、松野吉宏、笹子三津留、上西紀夫、吉田輝彦、佐々木博己. 第66回日本癌学会学術総会. 胃癌治療切除症例の再発予測チップの前向き試験評価. 横浜パシフィコ. (示説. P-342)(2007)..
- 5) 佐々木博己、秋山英雄、青柳一彦、久保木芳秀、吉田輝彦、信元均. 第66回日本癌学会学術総会. 癌で働くシグナル伝達経路を同定するための高感度アレイの開発. 横浜パシフィコ. (示説. P-351)(2007)..
- 6) 本間紀美、竹下文隆、山本雄介、吉田輝彦、西尾和人、加藤菊也、落谷孝広. 第66回日本癌学会学術総会. RPN2 gene confers

docetaxel resistance in breast cancer. 横浜パシフィコ. (English Workshop. EW10-4) (2007)..

- 7) 西本武史、吉田貴三子、三浦慶昭、畑中一映、大浪俊平、吉田輝彦、青木一教. 第66回日本癌学会学術総会. キャプシド蛋白室改変アデノウィルス・ライブラリーから得られた、制限増殖型アデノウィルスによる膵がん治療効果の検討. 横浜パシフィコ. (口演 O-241) (2007)..
- 8) 青木一教、小林昭彦、原秀彦、西本武史、吉田貴三子、吉田輝彦. 第66回日本癌学会学術総会. 同種MHC遺伝子導入は自家造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を増強する. 横浜パシフィコ. (口演 O-246)(2007)..
- 9) 佐野正行、竹下文隆、青柳一彦、中西幸浩、落谷孝広、二村雄次、吉田輝彦、佐々木博己. 第66回日本癌学会学術総会. 食道癌のリンパ節転移における複数の分子機構の存在. 横浜パシフィコ. (口演 O-293)(2007)..
- 10) 吉田貴三子、原秀彦、小林昭彦、大浪俊平、内田英二、吉田輝彦、青木一教. 第66回日本癌学会学術総会. Local interferon a gene therapy elicits a systemic immunity in a syngeneic pancreatic cancer model in hamster. 横浜パシフィコ. (示説 P-933)(2007)..
- 11) 原秀彦、小林昭彦、近藤篤、吉田貴三子、吉田輝彦、青木一教. 第66回日本癌学会学術総会. Interferon -a gene transfer enhances antitumor activity of allogeneic HSCT against solid cancers. 横浜パシフィコ. (口演 O-934) (2007).
- 12) 福井朋也、益田典幸、西尾和人、田口史子、加藤晃史、河石真、深井順也、小寺康夫、吉田輝彦、坂本裕美、渡辺隆、小泉史明. 第66回日本癌学会学術総会. Synergistic interactions between the synthetic retinoid T%M411 (Tamibarotene) and Glucocorticoids in human myeloma cells. 横浜パシフィコ. (示



- 説 P-1150)(2007).
- 13) 城 青衣他:単球系及び *MLL* 遺伝子再構成急性骨髄性白血病における発症年齢依存的な遺伝子発現, 第 66 回日本癌学会学術総会(2007).
  - 14) 城 青衣他:DNA マイクロアレイによる AML99 登録 130 症例の網羅的遺伝子発現解析, 第 49 回日本小児血液学会(2007).
  - 15) A. Jo *et al.*: Age-associated difference in gene expression of pediatric myelo-monocytic and *MLL*-rearranged AML. The 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology (2007).
  - 16) Banno K, Sugano K, et al. Germline mutation analysis of DNA mismatch repair (MMR) gene in endometrial cancer patients with familial predisposition to cancer. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (2007).
  - 17) Takeda Y, Sugano K et al. Evaluation of outpatient consultations for hereditary colorectal cancer. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (2007).
  - 18) Sugano K et al. Clinical characteristics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Japan -Interim analysis of a multiinstitutional study-.The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (2007).
  - 19) Tomita N, Sugano K et al. A case of suspected HNPCC with heterogeneous defect of mismatch repair gene product in the tumor tissue. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (2007).
  - 20) Ishii M, Sugano K et al. Analysis of microsatellite instability and allelic status in mouse xenograft. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (2007).
  - 21) 菅野康吉:家族性腫瘍での正しい家系図の書き方 第 13 回日本家族性腫瘍学会学術集会(2007).
  - 22) 菅野康吉、他:日本人における BRCA1 および BRCA2 遺伝子の全塩基配列直接解析法による基礎データ収集と、家族性乳がん、卵巣がんを対象とした易罹患性検査としての有用性に関する研究 第 13 回日本家族性腫瘍学会学術集会(2007).
  - 23) 菅野康吉:家族性腫瘍の診療と研究 第一回家族性腫瘍セミナー (2007).
  - 24) 菅野康吉:家族性乳がんの臨床(BRCAについてわかっていること)第一回家族性腫瘍セミナー(2007).
  - 25) 菅野康吉:がんの遺伝カウンセリングとがん予防相談外来で行われる診療 日本がん予防学会シンポジウム(2007).
  - 26) Sugano K et al. Genetic Counseling and Gene Testing for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Associated Disorders. 11<sup>th</sup> Congress of Asian Federation of Coloproctology (2007).
  - 27) 前田耕史、菅野康吉、他:表在性膀胱がんの再発を予測するための遺伝子検査の有用性に関する多施設共同研究 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会(2007).
  - 28) 三宅牧人、菅野康吉、他:膀胱癌における腫瘍組織および尿中剥離細胞を対象とした Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) 遺伝子の点突然変異の検出 第27回日本分子腫瘍マーカー研究会(2007).
  - 29) Sugano K et al. Interim analysis of multi-institutional study for molecular diagnosis of superficial bladder cancer. 第 66

- 回日本癌学会学術総会(2007).
- 30) Miyake M, Sugano K et al. Detection of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) mutation in bladder carcinoma and voiding urine sediment. 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007).
  - 31) Furuno K, Sugano K et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations in gastric cancer using Illumina 317K SNP array. 第 66 回日本癌学会学術総会(2007).
  - 32) 塚田俊彦、高橋真穂、永村優央子、矢口浩子、大倉永也、小原孝男、梶博史、船越顕博、大國智司 Usefulness and limitations of MEN1 mutation screening in the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. 第 66 回日本癌学会学術総会(2007).
  - 33) 大倉永也、矢口浩子、小野昌弘、坂口志文、塚田俊彦 Transcriptional control by Foxp3 and AML1/Runx1 in regulatory T cells. 第 66 回日本癌学会学術総会(2007).
  - 34) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T. "MicroRNA expression profile to define mouse liver development" 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)
  - 35) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. "CYP's metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells" The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. "CYP's metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells" The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)
  - 36) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. "Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies" 7<sup>th</sup> International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)
  - 37) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12<sup>th</sup> Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9. 2007 Seoul, Korea)
  - 38) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S. "Optical imaging of RNAi Therapy" SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited
  - 39) Ochiya T. "RNAi-based anti-cancer strategy" 1<sup>st</sup> Internatinal Conference on Drug Design & Discovery.(Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE)
  - 40) Takeshita F, Ochiya T. "MicroRNA therapy for inibition of bone metastatic human prostate tumor cells." 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada)
  - 41) がんの分子標的治療モデルにおける分子イメージングの実際、落谷孝広、第 2 回日本分子イメージング学会学術大会 (2007) .
  - 42) siRNA による放射線感受性増強、落谷孝広 (シンポジウム)、第37回放射線による制癌シンポジウム (2007) .
  - 43) A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Kana Yanagihara, Satoshi Terada, Takahiro Ochiya 第 6 回国際動物実験代替法会議 (2007) .
  - 44) 光イメージングによるがんの RNAi 治療法

- の開発、落谷孝広(シンポジウム)、第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 45) Efficacy of RNAi-based molecular target therapy against metastatic human breast cancer cells. Fumitaka Takeshita, Agnieszka Banas, Naomi Hokaiwado, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 46) MicroRNA therapy against bone metastasis of prostate cancer. Naomi Hokaiwado, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 47) MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. Yusuke Yamamoto, Fumiaki Koizumi, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 48) Genome-wide DNA methylation analysis of cancers. Izuho Hatada, Akira Sakurada, Masami Sato, Takashi Kondo, Akira Horii, Yusuke Yamamoto, Takahiro Ochiya, Riu Yamashita, Kenta Nakai, Katsumi Nakanishi, Ryo Matoba, Kenichi Matsubara 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 49) RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Teruhiko Yoshida, Kasuto Nishio, Shunji Nagahara, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 50) Presence of multiple mechanisms in lymph node metastasis of esophageal cancers. Masayuki Sano, Fumitaka Takeshita, Kazuhiko Aoyagi, Yukihiro Nakanishi, Takahiro Ochiya, Yuji Nimura, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 51) Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. Shinobu Ueda, Takumi Teratani, Hiroyuki Tsuda, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 52) Cancer Patients' Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会(2007)。
- 53) がん治療戦略におけるRNAi創薬の意義、落谷孝広(シンポジウム)、ゲノム創薬フォーラム第10回シンポジウム(2007)。
- 54) バイオフォトニクスとNon-coding small RNAの融合がもたらすがん研究の革新、落谷孝広、バイオフォトニクス技術研究会(2007)。
- 55) RNA干渉による発がんの分子標的の同定と治療への応用、落谷孝広(シンポジウム)、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(2007)。
- 56) 合成microRNA導入によるヒト転移性前立腺がん細胞における機能解析、竹下文隆、外岩戸尚美、本間紀美、落谷孝広、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(2007)。
- 57) 薬剤抵抗性獲得に関与するmicroRNAの探索、外岩戸尚美、竹下文隆、山本雄介、箕浦加穂、田谷敏貴、本間紀美、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(2007)。
- 58) マウス肝臓発生と肝がん形成に関わるmicroRNAの同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(2007)。
- 59) 画像イメージングと毒性病理学の接点、落谷孝広(ワークショップ)、第24回日本毒

- 性病理学会学術集会 (2008) .
- 60) RNAi 創薬とがん治療、落谷孝広 (ワークショップ)、第 145 回日本獣医学会 (2008. 3. 30)
  - 61) 再生肝由来の切片担体を利用して ES 細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想、竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明、日本薬学会第 128 年会 (2008) .
  - 62) 佐伯宣久、坂本裕美、吉村公雄、下田忠和、片井均、大浪澄子、青柳一彦、佐々木博己、廣橋説雄、吉田輝彦. Diffuse 型胃がん易罹患性と相関する PSCA 遺伝子の SNP の機能解析. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 63) 西本武史、吉田貴三子、大浪俊平、栗栖薫、吉田輝彦、青木一教. ペプチド・ディスプレイ・アデノウイルス・ライブラリーの in vivo スクリーニングによる腫瘍標的ベクターの開発. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 64) 鳴海兼太、近藤篤、小林昭彦、吉田輝彦、青木一教. 腫瘍内 I 型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活性化する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 65) 大浪俊平、坂本裕美、吉村公雄、大浪澄子、上野秀樹、森実千種、阪本良弘、江崎稔、島田和明、小菅、友男、奥坂拓志、吉田輝彦. 膵がんの易罹患性に関わる MTRR 遺伝子多型の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 66) 鳴瀬宏、古川洋一、吉田輝彦、中村祐輔、森谷宣皓. HNPCC 患者に於ける異常スプライシング昨日の検出. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 67) 吉田貴三子、吉田輝彦、青木一教. 細胞外基質蛋白質とインターフェロン・アルファ蛋白質の結合: 保持と細胞障害活性. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 68) 青木一教、西本武史、吉田貴三子、大浪俊平、栗栖薫、吉田輝彦. ペプチド・ディスプレイ・アデノウイルス・ライブラリーを用いた膵がんに対するウイルス療法の開発. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 69) 近藤篤、鳴海兼太、吉田貴三子、大浪俊平、吉田輝彦、青木一教. 腫瘍内インターフェロン  $\alpha$  遺伝子導入は、同種造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を増強する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 70) 藤田剛、竹下文隆、柳原五吉、太田裕之、馬淵智子、青柳一彦、深川剛生、下腿仁、佐野武、落谷孝広、吉田輝彦、佐々木博己. 未分化胃がんの腹膜転移治療モデルマウスの作成. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 71) 古川洋一、吉田輝彦、中村祐輔、森谷森谷宣皓. 日本の HNPCC の臨床遺伝学的特徴. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 72) 馬淵智子、佐野正行、高橋広夫、藤田剛、青柳一彦、中西幸浩、二村雄次、本多裕之、吉田輝彦、佐々木博己. マイクロアレイ解析による予後不良な食道扁平上皮がんのマーカー遺伝子の同定とその起源と性質について. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 73) 青柳一彦、三梨桂子、馬淵智子、武藤学、大津敦、落合尚、吉田輝彦、佐々木博己. 食道がんにおける化学放射線療法の感受性と予後予測へ向けた治療前生検の発現プロファイリング. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).
  - 74) 佐々木博己、森和彦、藤本健太郎、深川剛生、福島雅夫、藤田剛、藤原一彦、坂本裕美、下腿仁、佐野武、吉田輝彦. ミニチップによる腹腔内洗浄液を用いた進行胃がんの再発・予後予測法の実用化開発. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (2008).