

200924022A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

癌の新しい診断技術の開発と治療効果予測の研究

平成21年度 総括・分担研究報告書 (I～III)

研究代表者 金子 安比古

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

癌の新しい診断技術の開発と治療効果予測の研究	_____	1
金子 安比古		

II. 分担研究報告書

1. 小児がんの発生機構の解明と予後予測	_____	1 4
金子 安比古		
2. 小児がんのSNPアレイによるゲノム構造異常解析	_____	1 7
新井 康仁		
3. 乳癌のSNPアレイによるゲノム構造異常解析と術前化学療法の 効果予測	_____	2 0
武井 寛幸		
4. 乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測	_____	2 6
林 慎一		
5. がん転移関連蛋白質 NM23 と相互作用する蛋白質の同定及び 機能解析とその臨床応用	_____	3 2
角 純子		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	3 5
---------------------	-------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別冊にて一部添付)

総括研究報告書

癌の新しい診断技術の開発と治療効果予測の研究

研究代表者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 所長

研究要旨 小児がんの genetic 異常と epigenetic 異常を解明し、診断と治療に役立てるための研究を実施した。121 例のウイルス腫瘍を SNP array で解析した。その結果、常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。欠失領域には胎児腎など器官形成にかかわる遺伝子が位置しており、これらの遺伝子欠失が生じることにより、胎児性腫瘍であるウイルス腫瘍が発生したと考えられた。（金子、新井）

肝芽腫 56 例の解析によって、37 例（66%）にゲノム構造異常を検出し、1q, 2q, 20pq の増加、4q, 1p の欠失、11p15 の UPD などを多く認めた。1q 増加は最も頻度が高く（28 例、50%）、4 例においては 1q32.1 に局所増幅があり、その共通増幅領域の 1.3Mb にはがん遺伝子候補 *MDM4* が含まれていた。4q 欠失では、4q32.3 (1.6Mb) と 4q34.3-q35.2 (8.7Mb) の 2 か所に共通欠失領域を検出し、癌抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。4q 欠失は予後と相関し、肝芽腫の予後不良のマーカーとして用いることが可能となった。（新井、金子）

ウイルス腫瘍を *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無により 4 群に分類し、それぞれの分子生物学的特徴を調べた。*WT1* 異常群は発生年齢が若く、 β -catenin 変異が多く、染色体異常が少ないので、*WT1* 異常の役割が大きく、少数の genetic events の蓄積で腫瘍化すると考えられた。一方、*IGF2-LOI* 群の年齢は高く、染色体欠失、増加の頻度が高いので、多数の genetic/epigenetic events の蓄積により発生すると考えられた。*IGF2-UPD* 群と *IGF2-ROI* 群は *IGF2-LOI* 群と一部共通の染色体増加を示したので、*IGF2-LOI* 群と共通した genetic pathway を経て発生すると考えられた。これらの所見はウイルス腫瘍が分子生物学的に heterogeneous な疾患であることを示す。ウイルス腫瘍の予後因子として 1p LOH + 16q LOH が知られているが、この異常を示す腫瘍の頻度は 5%と低い。一方、今回、*RASSF1A* メチル化がウイルス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示した。*RASSF1A* メチル化の頻度は 15% であるので、既知の因子より有効な予後因子になると考えられた。（金子）

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。既知予後因子解析の結果、*HER2* 免疫染色陽性であっても、約 15% は Herceptin に反応しない例があるなど、現在の予後因子では化学療法の効果予知が十分できてはいない。新たな予後因子の確立をめざして、SNP アレイによる乳癌のゲノム異常の解析を 98 例について実施した。ゲノム増減領域と化学療法反応性の関係では、17q21 (*HER2*) 領域増幅腫瘍の治療反応性が良好であり、Herceptin の治療効果を反映していると考えられた。一方、*HER2* 免疫染色陽性例の中には *HER2* 増幅例と *HER2* 正常コピー数例があり、後者に Herceptin 不応例が多かった。また、8q24 領域増加と 16q22 領域欠失は治療反応性不良と相関した。前者には *MYC* と *PVT1*、後者には *CDH1* が位置しており、それぞれ有力な候補癌遺伝子、候補癌抑制遺伝子である。責任遺伝子を解明し、乳癌の診断・治療法の改善に役立てたい。（武井）

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。ERE-GFP レポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込み、乳癌検体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。また、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。その結果、ERタンパク発現と *ER* mRNA 発現は良く相関するが、ERE活性とは傾向はあるものの有意な相関を示さなかった。ERE活性はむしろ *PgR* タンパクや *PgR* mRNA と相関した。ERの標的遺伝子のmRNA発現はER陽性群の中でER発現と良く相関した。以上のことから現在の診断指標であるERタンパクの発現は、ERの転写活性を必ずしも反映していないことが示された。ERE活性がどのような診断指標としての意味を持つのか、今後の研究が必要である。この点に関しては術前治療の生検標品のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法との比較を継続している。また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌におけるER活性の評価も症例数を蓄積しつつ継続している。(林)

NM23 遺伝子を高発現している白血病では血清 *NM23* 蛋白質レベルも高く、生存率において有意な独立した予後不良因子となる。血清のような細胞外環境における *NM23* 分子は初代培養白血病細胞の増殖・生存を促進する。この増殖・生存促進活性は血清 *NM23* 蛋白質レベルが予後不良因子となる生物学的機能基盤と推察されるが、その分子機構は明らかになっていない。この *NM23* と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関連した新しい分子標的を開発することを目指している。これまでに白血病細胞から7種類の *NM23* 結合候補蛋白質を同定しているが、今年度は *NM23* の受容体候補分子として報告された腫瘍抗原 *MUC1* (a membrane-bound *MUC1* cleavage product=*MUC1**)の白血病細胞における発現と機能を検討した。*MUC1**の細胞外ドメインペプチドを抗原として *MUC1**を検出するために特異抗体を作製した。この抗体は、白血病細胞においては分子サイズ 33kDa の *MUC1**抗原 (*MUC1**-33) を認識した。*MUC1**-33 は、慢性骨髄性白血病細胞 (K562/KU812/MEG01) や赤白血病細胞 (HEL/TF1/M6) で発現していたが、他の骨髄性白血病細胞 (NB4/HL60/THP1) では顕著な発現は認められなかった。白血病臨床検体における *MUC1**-33 発現解析から、細胞外 *NM23* に反応して増殖した白血病細胞は *MUC1**-33 を高発現していることが明らかになった。*MUC1**の発現 (受容体) と細胞外 *NM23* (リガンド) に対する反応性には顕著な関連があることを示している。今後、*MUC1**発現細胞の生物学的特性および臨床的意義の解析へ進める。(角)

研究分担者

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

A. 研究目的

小児がんは、genetic異常とepigenetic異常の両方がかかわり、発生することが分かっている。染色体異常とuniparental disomy (UPD)を同時に検出可能なSNP arrayを用いて腫瘍検体を解析し、小児がんに共通な染色体異常領域や、それぞれの小児がんに特徴的な染色体異常領域を特定する。その領域から、腫瘍の

発生・進展に関与する遺伝子を特定する。同時にインプリント遺伝子 *IGF2* のアレル発現異常や、その発現調節領域である *H19*-DMR のメチル化状態を分析し、小児がんの発生に関与する *IGF2* 異常を同定する。成人がんにおいては、癌抑制遺伝子のメチル化研究が多数行われ、そのメチル化が予後因子であると報告されている。これまで、あまり研究されてこなかった小児癌の癌抑制遺伝子メチル化異常を分析し、予後因子になるかどうかを解明する。以上の研究から、小児がんの発生・進展に関与する遺伝子を特定し、診断・治療の改善に役立てる。(金子、新井)

乳癌治療における術前化学療法は、術後化学療法と同様の治療効果があるとして、標準的治療法として確立しつつある。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、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。(武井)

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世代のアロマタ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。(林)

がん転移関連遺伝子 *NM23* は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における *NM23* の高発現は、白血病細胞の生物学的特性(分化抑制/増殖促進)やその臨床的特性(予後不良)と関連する。*NM23* を高発現している白血病では血清 *NM23* 蛋白質レベルも高く、生存率において有意な独立した予後不良因子となる。血清のような細胞外環境における *NM23* 分子は初代培養白血病細胞の増殖・生存を促進する。この増殖・生存促進活性は血清 *NM23* 蛋白質レベルが予後不良因子となる生物学的機能基盤と推察されるが、その分子機構は明らかになっていない。一方、*NM23* 蛋白質の発現は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。この *NM23* と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関連した新しい分子標的を開発することを目指している。これまでに白血病細胞から7種類の *NM23* 結合候補蛋白質を同定しているが、今年度は *NM23* の受容体として報告された腫瘍抗原 MUC1(a membrane-bound MUC1 cleavage product (MUC1*))の白血病細胞における発現と機能を解明し、*NM23* 高発現白血病の診

断治療の分子標的として発展させることを目標としている。(角)

B. 研究方法

ウイルス腫瘍121例と肝芽腫54例を対象にして、SNP array (Affymetrix mapping 50K-Xba array および 250K-Nsp array) 解析を実施し、染色体異常を検出した。腫瘍部DNAに加えて非がん部組織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。(金子, 新井)

WT1 遺伝子の変異解析、*IGF2* アレル特異的発現解析、*IGF2* 発現を制御する *H19*-DMR のメチル化状態を解析した。また、*WTX* 遺伝子および β -catenin 遺伝子の変異解析、*WTX* 遺伝子ゲノム量の定量PCR解析を実施した。次に *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無によりウイルス腫瘍を4群に分類し、各腫瘍群における遺伝子・染色体異常の頻度を分析した。

一方、ウイルス腫瘍20例について18種類のがん抑制遺伝子のメチル化を methylation-specific PCR (MSP) 法にて分析した。最も頻度の高かった *RASSF1A* 遺伝子を選択し、そのメチル化量を、166例を対象にして MethyLight 法で定量した。メチル化量により2群に分類した患者群の生存期間を分析した。同様に肝芽腫54例を対象にして、*RASSF1A* 遺伝子のメチル化解析を実施した。(金子, 新井)

対象は埼玉県立がんセンター病院で2007年4月以降に術前化学療法を受けた浸潤性乳癌患者98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患者は62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。また、正常末梢血を採取し、腫瘍DNAの対照として用いた。DNA検体をSNPアレイ(Affymetrix mapping 250K-Nsp array)を用いてゲノム異常の解析を行った。化学療法はHER2免疫染色の結果、2+ (FISH+) と3+に対しては、anthracycline、taxan、およびHerceptin (ATH)、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。E-cadherinの免疫染色を16q22欠失例8例と

16q22 正常例 15 例に実施し、両者の関係を調べた。

(武井)

乳癌ホルモン療法の治療効果予測のために、以下の実験を行った。1) 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。2) また、それらの標品中の *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* 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) 一方、アロマトーゼ阻害剤治療後再発乳癌の ERE 活性を同様のウイルスアッセイによって解析し、その症例数を蓄積している。5) また、アロマト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を複数株樹立し、耐性のメカニズムの解明を進めた。(林)

NM23 高発現腫瘍の予後は不良である。NM23 蛋白質に結合し腫瘍抗原でもある MUC1*を解析するために、以下の実験を行った。1) NM23 受容体候補 MUC1*の特異抗体作製：MUC1*細胞外ドメインペプチド合成；キャリアー蛋白の結合；ウサギ（3羽）免疫；採血；抗体評価。2) 白血病細胞における MUC1*発現解析：諸種白血病細胞抽出液調整；western blotting による発現検証。3) 白血病細胞の増殖分化における MUC1*の発現動態解析。4) 臨床検体における MUC1*発現と NM23 に対する反応性の関連解析。5) MUC1*発現と血清 NM23 蛋白質レベル併用の臨床的意義の検討。(角)

(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。小児がん患者の検体を研究に使用することについて、親から同意を得た。成人がん患者については、本人から検体を研究に使用することについて、同意を得た。研究計画をそれぞれの研究者の所属する施設の倫理審査委員会に提出し、研究の実施についての承認を得た。

C. 研究結果

SNP array 解析の結果、ウイルス腫瘍 121 例中 106 例にゲノム異常を認めた。常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。ホモ欠失領域は *WT1* の位置する 11p13 に 12 例、*SOSTDC1* の位置する 7p21 に 1 例、*miR562* の位置する 2q37.1 に 1 例、*ROBO1*, *ROBO2* の位置する 3p12.3 に 1 例みられた。また、X 染色体上の遺伝子 *WTX* の位置する Xq11 のヘミ欠失が 5 例みられた。

WT1 遺伝子変異解析の結果、*WT1* 異常腫瘍が 36 例、*WT1* 正常腫瘍が 85 例にみられた。この 85 例を *IGF2* アレル特異的発現解析、*H19*-DMR のメチル化状態解析、SNP array 解析の結果から、29 例を retention of imprinting (*IGF2*-ROI) 群、27 例を loss of imprinting (*IGF2*-LOI) 群、21 例を uniparental disomy (*IGF2*-UPD) 群、9 例をその他群に分類した。*WT1* 異常群は発生年齢が 21 カ月と低年齢であり、染色体異常が少なく、 β -catenin 変異の頻度が高かった。一方、*IGF2*-LOI 群は 61 カ月と高年齢であり、染色体欠失 (1p-, 11q-, 16q-)・増加 (1q+, +12) が多く、*WTX* 欠失の頻度も高かった。*IGF2*-ROI 群と *IGF2*-UPD 群の年齢は 37 カ月と 34 カ月であり、*WT1* 異常群と *IGF2*-LOI 群の中間を示し、染色体異常は欠失が少なく、増加 (1q+, +12) が多く、*IGF2*-LOI 群と同様な染色体増加がみられた。*WTX* 欠失の頻度は UPD 群で低く、ROI 群で高かった。(金子、新井)

次に、ウイルス腫瘍 20 例を対象にして、18 種類の癌抑制遺伝子のメチル化解析を実施した。6 種類の癌抑制遺伝子が 11~54%の腫瘍でメチル化していた。最も高頻度にメチル化していた *RASSF1A* 遺伝子を選択し、そのメチル化量を、166 例を対象にして、Methylight 法で定量した。次に *RASSF1A* メチル化率と Kaplan-Meijer 法で分析した生存期間の関係を分析し、メチル化率 70%が最も小さい *P* 値を示すことがわかった。*RASSF1A* メチル化 $\geq 70\%$ の腫瘍は、 $<70\%$ の腫瘍に比して全病期の症例を対象にしても、III, IV 病期の症例を対象にしても生存期間は短かった ($P=0.01$ と $P=0.05$)。(金子)

肝芽腫 56 例について SNP アレイ解析を行った結果、37 例 (66%) にゲノム構造異常を検出した。1q, 2q, 20pq の増加、4q, 1p の欠失、11p15 の UPD などを多く認めた。シーケンス解析によって肝芽腫で報告されている β -catenin の変異を調べた所、51 例中の 12 例に

exon 3 の点変異を認め、24 例には exon 3 を含む部分欠失が生じており、全体の 70.6%に β -catenin の活性化変異が観察された。最も頻度の高い染色体異常は 1q 増加であり (28 症例, 50%)、4 例においては 1q32.1 に局所のゲノム増幅が生じていた。その共通増幅領域の 1.3Mb には、がん遺伝子候補である *MDM4* と *PIK3C2B* が含まれていた。このことにより、肝芽腫の発生には 1q32.1 領域の遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。染色体欠失については、4q の欠失が最も高頻度に観察され (9 症例, 16%)、4q32.3 (1.6Mb) と 4q34.3-q35.2 (8.7Mb) の 2 カ所に共通欠失領域を検出し、4q32.3 にがん抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。正常肝や胎児肝で発現している *ANXA10S* アイソフォームは、大部分の肝芽腫組織 (19/24, 79.2%) において発現が消失していた。さらに、肝芽腫細胞株 HuH6 にて片アレルにミスセンス変異 (E36K, c.106G>A) を検出した。4q の欠失は、*RASSF1A* のメチル化と共に独立した予後因子となることが、多変量解析にて明らかになった。(新井, 金子)

化学療法前に針生検により腫瘍の得られた 98 例につき、SNP アレイによるゲノム増減の解析を行った。全例になんらかのゲノム異常がみられた。異常の頻度は 1~29 箇所に分布した。20 例以上に共通した染色体増加領域は 1q, 6p, 8p, 8q12, 8q24, 11q, 14q, 17q21, 17q24, 20q の 10 領域であり、20 例以上に共通した染色体欠失領域は 9p24, 9p21, 8p, 13q11-q14, 14q, 16q, 17p の 7 領域であった。手術により、術前化学療法の効果が判定可能であったのは 62 例であった。*HER2* 免疫染色の結果、2+ (FISH+) または 3+ であり、Herceptin を含む化学療法を受けた患者は 23 例おり、そのうち *HER2* (17q21.1) 領域の増幅は 17 例にみられた。残り 6 例の *HER2* コピー数は正常であった。この 6 例では、遺伝子増幅以外の機構で *HER2* 蛋白発現が増加していると考えられた。免疫染色 2+ (FISH+) 4 例のうち 2 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* ゲノムコピー数は必ずしも一致しなかった。Herceptin を含む化学療法を受けた 23 例を *HER2* 増幅例 17 例と *HER2* 正常コピー数例 6 例に分類し、術前化学療法の効果との関係を分析したところ、*HER2* 増幅例は全例 grade 2, 3 と効果を示したが、*HER2* 正常コピー数例は 6 例中 5 例が grade 0, 1 を示し

($P < 0.001$)、*HER2* 正常コピー数例の中に治療抵抗性を示す腫瘍が多かった。*HER2* 以外のゲノム異常と術前化学療法の効果との関係を分析したところ、8q24 (*MYC*) 増幅例または 16q22 (*CDH1*:E-cadherin) 欠失例の予後が、それぞれ、8q24 正常コピー数例または 16q22 正常コピー数例に比して不良である傾向を示した ($P = 0.076$ と $P = 0.093$)。E-cadherin の免疫染色を 16q22 欠失例 8 例と 16q22 正常例 15 例に実施したところ、陰性例は 16q22 欠失例に多かった ($P = 0.008$)。(武井)

乳癌のホルモン療法効果予測の研究を実施し、次の研究結果を得た。

1) 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 *HDAC6*, *EGR3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *Efp*, *PgR* と既知の予後因子、*MIB-1*, *HER2*, *Bcl-2*, *ER* 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 タンパクの発現および mRNA の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、むしろ *PgR* のタンパクや mRNA 発現と正の相関を示すことが明らかとなった。また、ER 標的遺伝子群の mRNA と ERE 活性は、ER 陽性群において総じて正相関する傾向にあることが明らかとなった。また、興味深いことに ER 陽性で ERE 活性が高い群において ERE 活性と *HER2* 発現が正相関することが観察された。

2) 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。

3) これまで十数例のアロマト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。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。

4) そこで、アロマトーゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、MCF-7-E10 細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇培地で長期間培養し、耐性となって再び増殖するようになった細胞のコロニーを蛍光顕微鏡下で観察し、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高い ERE 活性を示すコロニーを選択的に単離、培養し、その様な複数の株を樹立した。それらの株について各種解析を行ったところ、

MAPK 系や AKT 系のリン酸化過剰は認められず、従来報告されているエストロゲン枯渇耐性株とは異なったメカニズムで、ER が恒常的活性化をしている可能性が示唆された。現在さらに詳細に検討中である。(林)

NM23高発現腫瘍の予後は不良である。NM23蛋白質に結合し腫瘍抗原でもあるMUC1*を解析する実験を行い、以下の結果を得た。

1) 白血病細胞におけるNM23受容体候補 MUC1*の発現を調べるために、MUC1*の細胞外ドメインペプチドを抗原としてMUC1*抗体を作製した。MUC1*の細胞外ドメインペプチドCNVHDTVETQFNQYKTEAASを合成し、これを抗原として3羽のウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を得た。抗原カラムにて特異精製抗体を得た(免疫生物研究所との共同研究)。

2) 乳癌細胞 T47D を MUC1*発現陽性の対照として、各種白血病細胞における MUC1*の発現を検討した。乳癌細胞の MUC1*-23kDa とは異なり、白血病細胞では3抗体とも共通して分子サイズ 33kDa の蛋白(MUC1*-33)を認識した。

3) 抗原ペプチドで完全に中和されることから、これらの抗体は抗原ペプチド特異的に MUC1*-33 を認識していると考えられた。

4) MUC1*-33 の発現は、細胞外NM23に反応性があり、その受容体の存在が想定される白血病株細胞(K562/HEL/KU812/M6)で検出されたが、細胞外NM23に反応性のない、白血病株細胞(HL60/NB4/THP1)では検出されなかった。MUC1*の発現(受容体)と細胞外NM23(リガンド)に対する反応性とは顕著な相関が見られた。

5) K562細胞を用いた発現解析から、MUC1*-33の発現は細胞増殖に伴ってその発現が変動することが示された。

6) 急性骨髄性新鮮白血病細胞においても MUC1*-33 の発現が認められ、細胞外NM23蛋白質の機能(増殖促進活性)に対する感受性と顕著に相関することが明らかになった。(角)

D. 考察

SNP array 解析の結果から、常染色体上に4か所のホモ欠失領域を、X染色体上に1か所のヘミ欠失領域を発見した。これら欠失領域には、ウイルス腫瘍のがん抑制遺伝子が位置すると考えられた。11p13の*WT1*とXq11の*WTX*は既知であり、胎児腎の形成にかかわる

遺伝子である。7p21の*SOSTDC1*は胎児と成人の腎に発現しており、2q37.1の*miR562*は胎児腎形成にかかわる*EYA1*を制御している。3p12.3の*ROBO1*, *ROBO2*は胎児脳に発現しており、肺癌や乳癌でもホモ欠失が報告されている。これらの所見から、胎児期の器官形成に関与する遺伝子がホモ欠失すると、胎児性腫瘍は発生すると考えられた。

SNP array 分析によりゲノム異常のみられたウイルス腫瘍106例を*WT1*異常と*IGF2*異常の有無により4群に分類し、発症年齢、 β -catenin変異、*WTX*欠失、染色体欠失・増加の頻度を調べた。*WT1*異常群は、*WT1*異常を起始遺伝子変異とし、 β -catenin変異を加えることで、短時間に腫瘍化すると考えられた。一方、*IGF2*-LOI群はインプリント消失による*IGF2*の過剰発現が腫瘍化への初期変化であり、長時間かけて*WTX*欠失、1p-, 11q-, 16q-, 1q+, +12などを蓄積して腫瘍化する。このように、両群は異なる genetic/epigenetic pathway を経て発生すると考えられた。*IGF2*-ROI群と*IGF2*-UPD群は*IGF2*-LOI群と同様に1q+, +12などを示したが、1p-, 11q-, 16q-をほとんど示めさなかった。そこで、*IGF2*-LOI群と一部同様な events がその発現にかかわっていると考えられた。これらの所見はウイルス腫瘍が分子生物学的に heterogeneous な疾患であることを示す。このような研究を継続し、各腫瘍群の生物学的性格を明らかにし、診断・治療の分子標的を明らかにしたい。

ウイルス腫瘍の臨床的予後因子として病期、組織型が知られている。一方、分子生物学的予後因子としては1p LOH + 16q LOHが知られているが、この異常を示す腫瘍の頻度は5%と低い。一方、今回、*RASSF1A*メチル化がウイルス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示したが、その頻度は15%であるので、より有効な予後因子になると考えられた。(金子、新井)

これまでに多数検体を対象とした肝芽腫の染色体解析の報告はなく、本研究によって肝芽腫のゲノム構造異常を詳細かつ新しく同定することができた。その結果、1q32.1に*MDM4*と*PIK3C2B*を含む局所のゲノム増幅領域を同定した。少なくとも一部の肝芽腫の発生にはこの1q32.1領域の遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。肝芽腫においては、神経芽腫と同様に*TP53*の遺伝子変異は稀であるものの、細胞質での野生型TP53タンパク質の発現が検出されることが以前に報告されている。*MDM4*は*TP53*の転写活性を抑制

することが知られており、*MDM4*が増幅発現することによって野生型 *TP53* の活性化が阻害されてしまうことが考えられる。*MDM4* は、*TP53* の分解を調節する *MDM2* と構造が類似している。*nutlin-3* という薬剤は、それぞれの *TP53* 抑制機能を阻害することによって、野生型 *TP53* を保持するがん細胞においてアポトーシスを誘導することができる。つまり、少なくとも 1q32 増幅があるか *MDM4* の発現が亢進している一部の肝芽腫には、*MDM4* を対象とした分子標的治療が有効である可能性がある。*PIK3C2B* は class II の *PI3K* 遺伝子である。class IA の *PI3K* 遺伝子である *PIK3CA* は、AKT 経路を恒常的に活性化してアポトーシスを抑制することによりがん細胞の生存を導いていることが知られているが、*PIK3C2B* は細胞運動に関与することが報告されている以外に詳しい機能はまだ明らかになっていない。

4q32.3 の共通欠失領域に同定した *ANXA10* は、カルシウム依存性のリン脂質結合タンパク質であり、細胞増殖・小胞輸送やエンドサイトーシスなどへの関与が報告されている *annexin* ファミリーの一つであるがその機能は明らかになっていない。正常肝や胎児肝で発現している *ANXA10S* アイソフォームは、大部分の肝芽腫組織において発現が消失していた。*ANXA10S* は、肝細胞がんの 60%において発現が低下していることが以前に報告されており、肝細胞がんでの発現の減少は *TP53* 変異や予後不良と関連が認められている。*ANXA10* は胃がん細胞株においてホモ欠失が見つかり最近報告されており、免疫染色法によって *ANXA10* タンパク質の発現低下が 49%の胃がん症例に観察されている。*ANXA10* 発現のない胃がん細胞株への強発現と、発現の高い胃がん細胞株での siRNA を用いた発現抑制の実験により、*ANXA10* は胃がん細胞の増殖を制御していることが明らかになっている。したがって、肝芽腫において発現が抑制されており、ミスセンス変異を検出した *ANXA10S* は、がん抑制遺伝子であると考えられる。(新井, 金子)

術前化学療法を受けた乳癌 98 例を SNP array 解析した結果、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、*HER2* 免疫染色陽性腫瘍の中には *HER2* 増幅例と *HER2* 正常コピー数例があること

がわかった。*HER2* 増幅を認めた腫瘍は全例 Herceptin 治療に反応しているが、*HER2* 正常コピー数を示す 6 例中 5 例は治療に対する反応が不良であった。これまで私たちの行った乳癌患者の臨床的検討の結果、*HER2* 免疫染色陽性であっても 15%は Herceptin 治療に反応不良であることがわかっている。Herceptin 抵抗性乳癌は異常 *HER2* 転写産物を発現しているという報告がある。*HER2* 免疫染色陽性、*HER2* 正常コピー数を示す乳癌が Herceptin 治療に対して反応不良の理由を *HER2* 転写産物を分析することにより明らかにしたい。今後、多数例について *HER2* 免疫染色、*HER2* コピー数、*HER2* 転写産物を分析し、その結果と Herceptin 治療効果の関係を検討し、どのような、*HER2* 解析法が Herceptin 併用術前化学療法の効果を的確に予知するのか明らかにしたい。8q24 領域増加を示す腫瘍と 16q22 領域欠失を示す腫瘍の化学療法の反応は不良であった。8q24 領域には *MYC*、*PVT1* などの癌遺伝子が、16q22 には *CDH1* (E-cadherin) などの癌抑制遺伝子が位置している。免疫染色の結果、16q22 欠失例は E-cadherin 陰性であることが多かった。乳癌細胞における E-cadherin 消失は浸潤、転移を促進し、予後不良因子であることが報告されている。今後、*CDH1* のメチル化や遺伝子変異と予後や病期との関係を分析する予定である。(武井)

これまで、乳癌の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。それらの研究の中で、*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関連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ことが示され、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大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予測因子であり、また一方、ER 陽性と判定された症例でも、ホルモン療法が奏効しない症例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、さらに 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。その結果、ER タンパクの発現および mRNA の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、むしろ PgR のタンパクや mRNA 発現と正の相関を示すことが明らかとなった。また、ER 標的遺伝子群の mRNA と ERE 活性は、ER 陽性群において総じて正相関する傾向にあることが明らかとなった。また、興味深いことに ER 陽性で ERE 活性が高い群において ERE 活性と HER2 発現が正相関することが観察された。全体的に ER の発現はその活性や標的遺伝子の発現とは有意に相関しない傾向が明らかとなり、今後、ER 活性はどのような臨床的意義を持つのかを検討する必要がある。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めている。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、十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、このことは *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生し、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、これまでのところ、MAPK 系や AKT 系のリン酸化の過剰は認められず、従来報告されているエストロゲン枯渇耐性株とは異なったメカニズムで、ER が恒常的に活性化をしている可能性が示唆された。網羅的リン酸化プロテオミクス解析もを行い、現在さらに詳細に検討中である。(林)

難治性白血病で高発現している NM23 の研究を実施した。細胞外環境にある NM23 蛋白質が腫瘍抗原 MUC1* に結合し、その下流シグナル伝達系を活性化し、白血病細胞の増殖を促進する構図が示された。多くのがん細胞において MUC1* が高発現していることを考えると、血清 NM23 蛋白質レベルの臨床的意義が大きくなってくる。リガンド血清 NM23 とその受容体 MUC1* の両発現解析により、予後予測精度の向上を図ることが可能になってきた。さらなる臨床応用に向けて MUC1* 抗体の開発・改良 (Flow cytometry 適用抗体・治療分子標的薬としての MUC1* シグナル抑制抗体等) を目指したい。(角)

E. 結論

ウィルス腫瘍 121 例の SNP array 解析の結果、常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。欠失領域には胎児腎

など器官形成にかかわる遺伝子が位置していた。ウィルムス腫瘍を *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無により4群に分類し、その特徴を調べたところ、*WT1* 異常群は少数の genetic events により、*IGF2-LOI* 群は多数の genetic/epigenetic events の蓄積により発生すると考えられた。*IGF2-UPD* 群と *IGF2-ROI* 群は *IGF2-LOI* 群と一部共通した genetic pathway を経て発生すると考えられた。*RASSF1A* メチル化が、ウィルムス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示した。(金子、新井)

肝芽腫 56 症例の SNP array 解析の結果、1q32.1 の共通増幅領域にはがん遺伝子候補 *MDM4* を、4q32.3 の共通欠失領域にはがん抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。4q 欠失は予後と相関し、肝芽腫の予後不良のマーカーとして用いることが可能となった。(金子、新井)

今回実施した乳癌の SNP array 分析から、HER2 免疫染色陽性であっても、*HER2* 正常コピー数の腫瘍は Herceptin に対する反応が不良であることがわかった。これまで、HER2 免疫染色陽性腫瘍の約 15% は Herceptin を含む術前化学療法に対して反応を示さないことがわかっている。その理由は Herceptin 不応腫瘍は異常 *HER2* 転写産物を発現しているためと考えて、現在、発現解析を実施している。8q24 領域増加と 16q22 領域欠失を示す腫瘍は治療反応不良と相関傾向を示した。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して、研究を進めている。(武井)

乳癌の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、さらにそれらの検体の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 法で mRNA 発現を解析した。その結果、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。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。

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 (AI) 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た結果、従来の耐性株とは異なったメカニズムの存在が示唆された。(林)

白血球細胞の増殖・生存の促進因子となる血清 NM23 蛋白の受容体 MUC1* を検出するための特異抗体を作製した。この抗体を用いて、白血球細胞における新規 MUC1*⁺33 蛋白を同定した。MUC1*⁺33 の発現は白血球細胞の細胞外 NM23 に対する反応性と顕著な相関があり、細胞の増殖に伴ってその発現が変動した。今後、診断治療の分子標的としての新しい NM23 受容体候補分子 MUC1*⁺33 の生物学的および臨床的意義を解明していく予定である。(角)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.*, 100: 698-708, 2009.
- 3) Oue T, Fukuzawa M, Okita H, Mugishima H, Horie H, Hata J, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate H, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Kitano Y, Tanaka Y; Japan Wilms Tumor Study (JWiTS) Group. Outcome of pediatric renal tumor treated using the Japan Wilms Tumor Study-1 (JWiTS-1)

- protocol: a report from the JWITS group. *Pediatr Surg Int.*, 25: 923-929, 2009.
- 4) Ohshima, J., Haruta, M., Arai, Y., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ariga, T., Okita, H., Fukuzawa, M., Hata, J., Horie, H. and Kaneko, Y. Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 1037-1050, 2009.
 - 5) 金子安比古:小児がんの臨床遺伝学. *小児科診療* 72: 87-91, 2009.
 - 6) Kubo, T., Kuroda, Y., Shimizu, H., Kokubu, A., Okada, N., Hosoda, F., Arai, Y., Nakamura, Y., Taniguchi, H., Yanagihara, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 30: 1857-1864, 2009.
 - 7) Nakamura, Y., Migita, T., Hosoda, F., Okada, N., Gotoh, M., Arai, Y., Fukushima, M., Ohki, M., Miyata, S., Takeuchi, K., Imoto, I., Katai, H., Yamaguchi, T., Inazawa, J., Hirohashi, S., Ishikawa, Y. and Shibata, T. Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer* 125: 1859-1867, 2009.
 - 8) Kubo, T., Kuroda, Y., Kokubu, A., Hosoda, F., Arai, Y., Hiraoka, N., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing analysis of the human tyrosine kinase gene family in pancreatic cancer. *Pancreas* 38: e200-e206, 2009.
 - 9) Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M. and Morishita, K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 48: 768-776, 2009.
 - 10) Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H. and Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and *MDM* amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chrom Cancer*, 49: 596-609, 2010.
 - 11) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Tozuka, K., Asakawa, H., Oba, H., Inoue, K., Tabei, T. Positive sentinel lymph node biopsy predicts the number of metastatic axillary nodes of breast cancer. *The Breast*, 18:244-247, 2009.
 - 12) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Ninomiya, J., Tozuka, K., Oba, H., Inoue, K., Nagai, S., Saito, Y., Kazumoto, T., Saitoh, Jun-ichi, Tabei, T. Axillary lymph node dissection can be avoided in women with breast cancer with intraoperative, false-negative sentinel lymph node biopsies. *Breast Cancer*, 17:9-16, 2010.
 - 13) Yamaguchi, Y. Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, 56(1), 1-7, 2009.
 - 14) 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., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.*, Mar. 11(3), 239-241, 2009.
 - 15) 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.*, 69 (7), 2935-2940, April, 2009.
 - 16) Hayashi, S., Niwa, T. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. *Cancer Sci.*, 100(10), 1773-1778, 2009. (Jun)
 - 17) Matsumoto, M., Sakamoto, H., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. 3-Dimensional microarray analysis of estrogen signal-

- related genes in breast cancer tissues. *Anticancer Res.*, 29(10) 3971-3976, 2009.
- 18) Kato, K., Takao, T., Kuboyama, A., Tanaka, Y., Ohgami, T., Yamaguchi, S., Adachi, S., Yoneda, T., Ueoka, Y., Kato, K., Hayashi, S., Asanoma, K. and Wake, N. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am. J. Pathol.*, 176(1), 381-392, 2010.
 - 19) Imach, H., Murao, K., Dobashi, H., Bhuyan, M. M., Cao, X., Kontani, K., Niki, S., Murazawa, C., Nakajima, H., Kohno, N., Yamashita, H., Iwase, H., Hayashi, S., Ishida, T. and Yamauchi, A. Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* In press, 2010.
 - 20) 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) 医薬ジャーナル社, p58-63, 2009.
 - 21) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, T., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth/survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci.* 100:1885- 1894, 2009
 - 22) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Extracellular NM23-H1 protein inhibits the survival of primary cultured normal human peripheral blood mononuclear cells and activates the cytokine production. *Int. J. Hematol.* 90:143-152, 2009
2. 学会発表
- 1) 金子安比古, 新井康仁, 本多昌平, 春田雅之, 笠井文生, 藤原由以子: SNP アレイ解析により検出された肝芽腫の 4q 欠失は予後不良因子である. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. 2009. 9. 東京.
 - 2) 春田雅之, 大喜多肇, 秦順一, 福澤正洋, 金子安比古: ウィルムス腫瘍で初めて同定された *APC* 遺伝子変異. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 3) 笠井文生, 小林泰文, 中館尚也, 渡辺直樹, 春田雅之, 金子安比古: 年長児 3 倍体神経芽腫における 1p 欠失を伴わない *MYCN* 遺伝子の増幅. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 4) 金子安比古, 新井康仁, 本多昌平, 春田雅之, 笠井文生, 大島淳二郎, 中川原章, 檜山英三: SNP アレイ解析により検出された肝芽腫の 4q 欠失は予後不良因子である. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 5) 大島淳二郎, 春田雅之, 新井康仁, 笠井文生, 大喜多肇, 秦順一, 福澤正洋, 金子安比古: Wilms 腫瘍の 7p21 ホモ欠失領域から同定された候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1*. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 6) 大島淳二郎, 春田雅之, 笠井文生, 新井康仁, 大喜多肇, 秦順一, 福澤正洋, 金子安比古: Wilms 腫瘍の 7p21 ホモ欠失領域から同定された候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1*. 第 25 回日本小児がん学会. 2009. 11. 千葉.
 - 7) 新井康仁, 細田文恵 他: Identification of a novel tumor suppressor gene candidate in gastric cancer using SNP microarrays. 第 68 回日本癌学会学術総会記事, 2009 年, 10 月, 横浜.
 - 8) 細田文恵, 新井康仁 他: Cooperation of multiple oncogenes on chromosome 6p21 amplicon in gastric cancer. 第 68 回日本癌学会学術総会記事, 2009 年, 10 月, 横浜.
 - 9) 中村 裕, 新井康仁 他: Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. 第 68 回日本癌学会学術総会記事, 2009 年, 10 月, 横浜.
 - 10) 浜崎 誠, 新井康仁 他: NDRG2 is a candidate tumor suppressor gene in adult-T cell leukemia/lymphoma. 第 68 回日本癌学会学術総会記事, 2009 年, 10 月, 横浜.
 - 11) Takei H: Breast conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. Case-study. Kyoto Breast Cancer Consensus Conference. 2009. 4. 16-18. Kyoto, Japan
 - 12) Takei H, Ohsumi S, Shimozuma K, Takehara M, Suemasu K, Ohashi Y, Hozumi Y: Health-Related Quality of Life and Psychological Distress in

- Japanese Postmenopausal Women with Breast Cancer Treated with Tamoxifen, Exemestane or Anastrozole for Adjuvant Endocrine Therapy: A Final Analysis of National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (N-SAS BC) 04. The 32nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2009. 12. 10-13, San Antonio, TX, USA.
- 13) 武井寛幸, 吉田 崇, 石川裕子, 戸塚勝理, 林 祐二, 黒住昌史, 大庭華子, 井上賢一, 永井成勲, 田部井敏夫: 年齢によるホルモン環境の変化と乳癌の臨床病理学的特徴および予後. パネルディスカッション1. 「ホルモン環境の変化と内分泌療法」. 第17回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba, 日本医大芳賀駿介教授)
 - 14) 武井寛幸, 吉田 崇, 黒住 昌史, 井上 賢一, 石川 裕子, 林 祐二, 樋口 徹, 二宮 淳, 大庭 華子, 永井 成勲, 田部井 敏夫: 腋窩リンパ節転移陽性乳癌における術前化学療法後の腋窩リンパ節転移状況の予測. 口演 41. 乳腺薬物療法1. 第47回日本癌治療学会学術集会. 2009. 10. 22-24. 横浜 (パシフィコ横浜, 岩手医科大学産婦人科 杉山 徹教授)
 - 15) 武井寛幸, 吉田 崇, 二宮 淳, 石川裕子, 林 祐二, 戸塚勝理, 黒住昌史, 大庭華子, 田部井敏夫, 井上賢一, 堀口 淳, 飯野佑一, 竹吉 泉: 乳癌におけるリンパ管侵襲の臨床的意義と治療法に関する検討. サージカルフォーラム. 第109回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
 - 16) 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)
 - 17) 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)
 - 18) 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).
 - 19) 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年2月14日(土)
 - 20) 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年2月21日(土)
 - 21) 林 慎一: Breast Cancer Education TV Seminar. AstraZeneca Breast Cancer TV lecture (東京) 2009年5月8日(金)
 - 22) 林 慎一: 特別講演. ホルモン療法の奏効性子測とAI耐性機序. Meet The Professors (横浜) 2009年6月26日(金)
 - 23) 林 慎一: 特別講演. アロマターゼ阻害剤耐性機序の基礎研究と治療戦略. 第17回日本乳癌学会学術総会ランチョンセミナー4 (東京) 2009年7月3日(金) 11:50~12:50
 - 24) 林 慎一, 山口ゆり: シンポジウム. 乳癌における治療効果予測因子の現状と今後の展望. 第17回日本乳癌学会学術総会 (東京) 2009年7月3日(金) 15:00~17:00
 - 25) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi: Simposia. Growth factors and estrogen signaling implicated in the hormonal therapy for human breast cancer. 14th International Congress of Endocrinology ICE 2010 (Kyoto) 2010/03/29 (Mon)
 - 26) Shin-ichi Hayashi: Simposia. Translational research of estrogen signaling for hormonal therapy in breast cancer. 14th International Congress of Endocrinology ICE 2010 第83回日本内分泌学会学術総会 JES-Sponsored Symposia (kyoto). 2010/03/29 (Mon)
 - 27) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi: Symposium. Classification of breast cancer by estrogen signaling and acquisition of ai-resistance. 第23回国際がん研究シンポジウム (東京) 2010年4月23日(金) 13:10~13:30
 - 28) 角 純子, 粕壁 隆, 萩原由貴, 金子安比古

- 「Expression of NM23-interacting proteins in leukemia cells」第71回日本血液学会（2009.10, 京都）
- 29) 角 純子、粕壁 隆、萩原由貴、本間良夫、金子安比古 「MUC1 expression in leukemia cells as a possible receptor of extracellular NM23 protein」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 30) 萩原由貴、粕壁 隆、金子安比古、新津 望、角純子 「Ellagic acid induces apoptosis and enhances ATRA-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 31) 粕壁 隆、角 純子、本間良夫 「Rapamycin and arsenic trioxide synergistically induce apoptois of human ovarian cancer cells.」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 32) 粕壁 隆、角 純子、本間良夫 「新規分化誘導剤コチレニンAによる固形癌細胞の増殖抑制の分子基盤の解析」第13回日本がん分子標的治療学会（2009.6, 徳島）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

角 純子

「NM23 蛋白質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」

特許第3557367号

平成16年5月21日 特許権取得

2. 出願中2件

林 慎一

- 1) 出願番号：特願2005-160621 出願日：2005.05.31
名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願2005-160685 出願日：2005.05.31
名称：細胞分析方法

分担研究報告書

小児がんの発生機構の解明と予後予測

研究代表者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 所長

研究要旨 小児がんの genetic 異常と epigenetic 異常を解明し、診断と治療に役立てるための研究を実施した。121 例のウイルス腫瘍を SNP array で解析した。その結果、常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。欠失領域には胎児腎など器官形成にかかわる遺伝子が位置しており、これらの遺伝子欠失が生じることにより、胎児性腫瘍が発生したと考えられた。ウイルス腫瘍を *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無により 4 群に分類し、それぞれの分子生物学的特徴を調べた。*WT1* 異常群は発生年齢が若く、 β -catenin 変異が多く、染色体異常が少ないので、*WT1* 異常の役割が大きく、少数の genetic events の蓄積で腫瘍化すると考えられた。一方、*IGF2*-LOI 群の年齢は高く、染色体の欠失、増加の頻度が高いので、多数の genetic/epigenetic events の蓄積により発生すると考えられた。*IGF2*-UPD 群と *IGF2*-ROI 群は *IGF2*-LOI 群と一部共通の染色体増加を示したので、*IGF2*-LOI 群と共通した genetic pathway を経て発生すると考えられた。これらの所見はウイルス腫瘍が分子生物学的に heterogeneous な疾患であることを示す。ウイルス腫瘍の予後因子として 1p LOH + 16q LOH が知られているが、この異常を示す腫瘍の頻度は 5% と低い。一方、今回、*RASSF1A* メチル化がウイルス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示したが、その頻度は 15% であるので、より有効な予後因子になると考えられた。

A. 研究目的

小児がんは、genetic 異常と epigenetic 異常の両方がかかわり、発生することが分かっている。染色体異常と uniparental disomy (UPD) を同時に検出可能な SNP array を用いて腫瘍検体を解析し、小児がんに通な染色体異常領域や、それぞれの小児がんに特徴的な染色体異常領域を特定する。その領域から、腫瘍の発生・進展に関与する遺伝子を特定する。同時にインプリント遺伝子のアレル発現異常や、その発現調節領域である *H19*-DMR のメチル化状態を分析し、小児がんの発生に関与するインプリント遺伝子 *IGF2* の異常を同定する。成人がんにおいては、癌抑制遺伝子のメチル化研究が多数行われ、そのメチル化が予後因子であると報告されている。これまで、あまり研究されてこなかった小児癌の癌抑制遺伝子メチル化異常を分析し、予後因子になるかどうかを解明する。以上の研究から、小児がんの発生・進展に関与する遺伝子を特定し、診断・治

療の改善に役立てる。

B. 研究方法

ウイルス腫瘍 121 例を対象にして、SNP array 解析を実施し、染色体異常を検出した。*WT1* 遺伝子の変異解析、*IGF2* アレル発現解析、*IGF2* 発現を制御する *H19*-DMR のメチル化状態を解析した。また、*WTX* 遺伝子および β -catenin 遺伝子の変異解析、*WTX* 遺伝子ゲノム量の定量 PCR 解析を実施した。次に *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無によりウイルス腫瘍を 4 群に分類し、各腫瘍群における遺伝子・染色体異常の頻度を分析した。

一方、ウイルス腫瘍 20 例について 18 種類のがん抑制遺伝子のメチル化を methylation-specific PCR (MSP) 法にて分析した。最も頻度の高かった *RASSF1A* 遺伝子を選択し、そのメチル化量を、166 例を対象にして MethyLight 法で定量した。メチル化量により 2 群に分類した患者群の生存期間を分析した。

(倫理面への配慮)

小児がん検体を研究に使用することについて、親よりインフォームドコンセントを得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。研究計画を埼玉県立がんセンター倫理委員会に提出し、研究の実施についての承認を得た。

C. 研究結果

SNP array 解析の結果、ウイルス腫瘍 121 例中 106 例にゲノム異常を認めた。常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。ホモ欠失領域は *WT1* の位置する 11p13 に 12 例、*SOSTDC1* の位置する 7p21 に 1 例、*miR562* の位置する 2q37.1 に 1 例、*ROBO1*, *ROBO2* の位置する 3p12.3 に 1 例みられた。また、X 染色体上の遺伝子 *WTX* の位置する Xq11 のヘミ欠失が 5 例みられた。

WT1 遺伝子変異解析の結果、*WT1* 異常腫瘍が 36 例、*WT1* 正常腫瘍が 85 例にみられた。この 85 例を *IGF2* アレル特異的発現解析、*H19*-DMR のメチル化状態解析、SNP array 解析の結果から、29 例を retention of imprinting (*IGF2*-ROI) 群、27 例を loss of imprinting (*IGF2*-LOI) 群、21 例を uniparental disomy (*IGF2*-UPD) 群、9 例をその他群に分類した。*WT1* 異常群は発生年齢が 21 カ月と低年齢であり、染色体異常が少なく、 β -catenin 変異の頻度が高かった。一方、*IGF2*-LOI 群は 61 カ月と高年齢であり、染色体欠失 (1p-, 11q-, 16q-)・増加 (1q+, +12) が多く、*WTX* 欠失の頻度も高かった。*IGF2*-ROI 群と *IGF2*-UPD 群の年齢は 37 カ月と 34 カ月であり、*WT1* 異常群と *IGF2*-LOI 群の中間を示し、染色体異常は欠失が少なく、増加 (1q+, +12) が多く、*IGF2*-LOI 群と同様な染色体増加がみられた。*WTX* 欠失の頻度は UPD 群で低く、ROI 群で高かった。

次に、ウイルス腫瘍 20 例を対象にして、18 種類の癌抑制遺伝子のメチル化解析を実施した。6 種類の癌抑制遺伝子が 11~54% の腫瘍でメチル化していた。最も高頻度にメチル化していた *RASSF1A* 遺伝子を選択し、そのメチル化量を、166 例を対象にして、Methylight 法で定量した。次に *RASSF1A* メチル化率と Kaplan-Meijer 法で分析した生存期間の関係を分析し、メチル化率 70% が最も小さい P 値を示すことがわかった。*RASSF1A* メチル化 $\geq 70\%$ の腫瘍は、 $< 70\%$ の腫瘍に比して全病期の症例を対象にしても、III, IV 病期の症例を対象にしても生存期間は短かった ($P=0.01$ と $P=0.05$)。

D. 考察

SNP array 解析の結果から、常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。これら欠失領域には、ウイルス腫瘍のがん抑制遺伝子が位置すると考えられた。*WT1* と *WTX* は既知であり、胎児腎の形成にかかわる遺伝子である。*SOSTDC1* は胎児と成人の腎に発現しており、*miR562* は胎児腎形成にかかわる *EYAI* を制御している。*ROBO1*, *ROBO2* は胎児脳に発現しており、肺癌や乳癌でもホモ欠失が報告されている。これらの所見から、胎児期の器官形成に関与する遺伝子がホモ欠失すると、胎児性腫瘍は発生すると考えられた。

SNP array 分析によりゲノム異常のみられたウイルス腫瘍 106 例を *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無により 4 群に分類し、発症年齢、 β -catenin 変異、*WTX* 欠失、染色体欠失・増加の頻度を調べた。*WT1* 異常群は、*WT1* 異常を起始遺伝子変異とし、 β -catenin 変異を加えることで、短時間に腫瘍化すると考えられた。一方、*IGF2*-LOI 群はインプリント消失による *IGF2* の過剰発現が腫瘍化への初期変化であり、長時間かけて *WTX* 欠失、1p-, 11q-, 16q-, 1q+, +12 などを蓄積して腫瘍化する。このように、両群は異なる genetic/epigenetic pathway を経て発生すると考えられた。*IGF2*-ROI 群と *IGF2*-UPD 群は *IGF2*-LOI 群と同様に 1q+, +12 などを示したが、1p-, 11q-, 16q- をほとんど示めさなかった。そこで、*IGF2*-LOI 群と一部同様な events がその発生にかかわっていると考えられた。これらの所見はウイルス腫瘍が分子生物学的に heterogeneous な疾患であることを示す。このような研究を継続し、各腫瘍群の生物学的性格を明らかにし、診断・治療の分子標的を明らかにしたい。

ウイルス腫瘍の臨床的予後因子として病期、組織型が知られている。一方、分子生物学的予後因子としては 1p LOH + 16q LOH が知られているが、この異常を示す腫瘍の頻度は 5% と低い。一方、今回、*RASSF1A* メチル化がウイルス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示したが、その頻度は 15% であるので、より有効な予後因子になると考えられた。

E. 結論

ウイルス腫瘍 121 例の SNP array 解析の結果、常染色体上に 4 か所のホモ欠失領域を、X 染色体上に 1 か所のヘミ欠失領域を発見した。欠失領域には胎児腎な

ど器官形成にかかわる遺伝子が位置していた。ウィルムス腫瘍を *WT1* 異常と *IGF2* 異常の有無により 4 群に分類し、その特徴を調べたところ、*WT1* 異常群は少数の genetic events により、*IGF2*-LOI 群は多数の genetic/epigenetic events の蓄積により発生すると考えられた。*IGF2*-UPD 群と *IGF2*-ROI 群は *IGF2*-LOI 群と一部共通した genetic pathway を経て発生すると考えられた。*RASSF1A* メチル化が、ウィルムス腫瘍の新たな予後不良因子であることを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushi, D., Watanabe, N., Kasai, F., Haruta, M., Kikuchi, A., Kikuta, A., Kato, K., Nakadate, H., Tsunematsu, Y. and Kaneko, Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy divergence, but not with *MYCN* amplification in neuroblastoma tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 188: 32-41, 2009.
 - 2) Furukawa, S., Haruta, M., Arai, Y., Honda, S., Ohshima, J., Sugawara, W., Kageyama, Y., Higashi, Y., Nishida, K., Tsunematsu, Y., Nakadate, H., Ishii, M. and 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.*, 100:698-708, 2009.
 - 3) Oue, T., Fukuzawa, M., Okita, H., Mugishima, H., Horie, H., Hata, J., Saito, M., Nozaki, M., Chin, M., Nakadate, H., Hinotsu, S., Koshinaga, T., Kaneko, Y., Kitano, Y. and Tanaka, Y. Japan Wilms Tumor Study (JWiTS) Group. Outcome of pediatric renal tumor treated using the Japan Wilms Tumor Study-1 (JWiTS-1) protocol: a report from the JWiTS group. *Pediatr Surg Int.*, 25: 923-929, 2009.
 - 4) Ohshima, J., Haruta, M., Arai, Y., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ariga, T., Okita, H., Fukuzawa, M., Hata, J., Horie, H. and Kaneko, Y. Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 1037-1050, 2009.
 - 5) Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H., Hiyama, E. and Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and *MDM4* amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 49: 596-609, 2010
 - 6) 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) 金子安比古、新井康仁、本多昌平、春田雅之、笠井文生、藤原由以子: SNP アレイ解析により検出された肝芽腫の 4q 欠失は予後不良因子である. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. 2009. 9. 東京.
 - 2) 春田雅之、大喜多肇、秦順一、福澤正洋、金子安比古: ウィルムス腫瘍で初めて同定された *APC* 遺伝子変異. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 3) 笠井文生、小林泰文、中館尚也、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古: 年長児 3 倍体神経芽腫における 1p 欠失を伴わない *MYCN* 遺伝子の増幅. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 4) 金子安比古、新井康仁、本多昌平、春田雅之、笠井文生、大島淳二郎、中川原章、檜山英三: SNP アレイ解析により検出された肝芽腫の 4q 欠失は予後不良因子である. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 5) 大島淳二郎、春田雅之、新井康仁、笠井文生、大喜多肇、秦順一、福澤正洋、金子安比古: Wilms 腫瘍の 7p21 ホモ欠失領域から同定された候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1*. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 10. 横浜.
 - 6) 大島淳二郎、春田雅之、笠井文生、新井康仁、大喜多肇、秦順一、福澤正洋、金子安比古: Wilms 腫瘍の 7p21 ホモ欠失領域から同定された候補腫瘍抑制遺伝子 *MEOX2* と *SOSTDC1*. 第 25 回日本小児がん学会. 2009. 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 小児がんに生じたゲノム構造異常を包括的に調べ、腫瘍発生や進展に関わる遺伝子異常を明らかにするため、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 法による DNA コピー数解析と LOH 解析を行った。肝芽腫 56 例の解析によって、37 例 (66%) にゲノム構造異常を検出し、1q, 2q, 20pq の増加、4q, 1p の欠失、11p15 の UPD などを多く認めた。1q 増加は最も頻度が高く (28 例, 50%)、4 例においては 1q32.1 に局所増幅があり、その共通増幅領域の 1.3Mb にはがん遺伝子候補 *MDM1* が含まれていた。4q 欠失では、4q32.3 (1.6Mb) と 4q34.3-q35.2 (8.7Mb) の 2カ所に共通欠失領域を検出し、がん抑制遺伝子候補 *ANKK105* を同定した。4q 欠失は予後と相関し、肝芽腫の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、ジェネティックやエピジェネティックな遺伝子異常の蓄積が、がんの発生や進展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、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解析することによって、がん組織において特異的に生じたゲノムの構造異常を捕らえ、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明らかにし、病態診断の新しいマーカーを得ることやがん関連遺伝子を同定することを研究の目的としている。

B. 研究方法

小児がんの対象として、本年度は肝芽腫を中心に解析を行った。がん部及び非がん部組織より単離したゲノム 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 に加えて非がん部組織 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を行い、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 *RASSF1A* のメチル化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、国立がん研究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

肝芽腫 56 例について SNP アレイ解析を行った結果、37 例 (66%) にゲノム構造異常を検出した。1q, 2q, 20pq の増加、4q, 1p の欠失、11p15 の UPD などを多く認めた。シーケンス解析によって肝芽腫で報告されている beta-catenin の変異を調べた所、51 例中の 12 例に exon3 の点変異を認め、24 例には exon3 を含む部分欠失が生じており、全体の 70.6% に beta-catenin の活性化変異が観察された。最も頻度の高い染色体異常は 1q 増加であり (28 症例, 50%)、4 例においては 1q32.1 に局所のゲノム増幅が生じていた。その共通増幅領域の 1.3Mb には、がん遺伝子候補である *MDM1* と *PIK3C2B*

が含まれていた。このことにより、肝芽腫の発生には1q32.1領域の遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。

染色体欠失については、4qの欠失が最も高頻度に観察され(9症例, 16%)、4q32.3(1.6Mb)と4q34.3-q35.2(8.7Mb)の2カ所に共通欠失領域を検出し、4q32.3にがん抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。正常肝や胎児肝で発現している *ANXA10S* アイソフォームは、大部分の肝芽腫組織(19/24, 79.2%)において発現が消失していた。さらに、肝芽腫細胞株のHuH6にて片アレルにミスセンス変異(E36K, c.106G>A)を検出した。4qの欠失は、*RASSF1A* のメチル化と共に独立した予後因子となることが、多変量解析にて明らかになった。

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。これまでに多数検体を対象とした肝芽腫の染色体解析の報告はなく、本研究によって肝芽腫のゲノム構造異常を詳細かつ新しく同定することができた。

この結果、1q32.1に *MDM4* と *PIK3C2B* を含む局所のゲノム増幅領域を同定した。少なくとも一部の肝芽腫の発生にはこの1q32.1領域の遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。肝芽腫においては、神経芽腫と同様に *p53* の遺伝子変異は稀であるものの、細胞質での野生型 *p53* タンパク質の発現が検出されることが以前に報告されている。*MDM4* は *p53* の転写活性を抑制することが知られており、*MDM4* が増幅発現することによって野生型 *p53* の活性化が阻害されてしまうことが考えられる。*MDM4* は、*p53* の分解を調節する *MDM2* と構造が類似している。nutlin-3という薬剤は、それぞれの *p53* 抑制機能を阻害することによって、野生型 *p53* を保持するがん細胞においてアポトーシスを誘導することができる。つまり、少なくとも1q32増幅があるか *MDM4* の発現が亢進している一部の肝芽腫には、*MDM4* を対象とした分子標的治療が有効である可能性がある。*PIK3C2B* は class II の *PI3K* 遺伝子である。class IA の *PI3K* 遺伝子である *PIK3CA* は、AKT経路を恒常的に活性化してアポトーシスを抑制することによりがん細胞の生存を導いていることが知られているが、*PIK3C2B* は細胞運動に関与することが報告されている

以外に詳しい機能はまだ明らかになっていない。

4q32.3の共通欠失領域に同定した *ANXA10* は、カルシウム依存性のリン脂質結合タンパク質であり、細胞増殖・小胞輸送やエンドサイトーシスなどへの関与が報告されている *annexin* ファミリーの一つであるがその機能は明らかになっていない。正常肝や胎児肝で発現している *ANXA10S* アイソフォームは、大部分の肝芽腫組織において発現が消失していた。*ANXA10S* は、肝細胞がんの60%において発現が低下していることが以前に報告されており、肝細胞がんでの発現の減少は *p53* の変異や予後不良と関連が認められている。*ANXA10* は胃がん細胞株においてホモ欠失がつい最近報告されており、免疫染色法によって *ANXA10* タンパク質の発現低下が49%の胃がん症例に観察されている。*ANXA10* 発現のない胃がん細胞株への強発現と、発現の高い胃がん細胞株での siRNA を用いた発現抑制の実験により、*ANXA10* は胃がん細胞の増殖を制御していることが明らかになっている。したがって、肝芽腫においても発現が抑制されており、ミスセンス変異を検出した *ANXA10S* は、がん抑制遺伝子であると考えられる。

E. 結論

56症例の肝芽腫について、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、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。1q32.1の共通増幅領域にはがん遺伝子候補 *MDM4* を、4q32.3の共通欠失領域にはがん抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。4q欠失は予後と相関し、肝芽腫の予後不良のマーカーとして用いることが可能となった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H. and Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor