

# 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19年度～21年度 総合研究報告書 (I～II)

研究代表者 金子 安比古

平成22(2010)年 5月

# 目 次

## I. 総合研究報告書 (平成19年度～平成21年度)

癌の新しい診断技術の開発と治療効果予測の研究に関する研究 \_\_\_\_\_ 1

研究代表者 金子 安比古

金子 安比古 小児がんの発生機構の解明と予後予測 (平成19年～平成21年)

新井 康仁 小児がんのSNPアレイによるゲノム構造異常解析 (平成19年～平成21年)

武井 寛幸 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  
(平成19年～平成21年)

林 慎一 乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測 (平成19年～平成21年)

角 純子 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  
(平成19年～平成21年)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 23

III. 研究成果の刊行物・別刷 (別冊にて一部添付)

総合研究報告書

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、胎児性腫瘍が発生したと考えられた。

日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度は欧米の 1/2 と報告されている。欧米の腫瘍では *IGF2*-loss of imprinting (LOI) が 32~38%にみられると報告されている。私たちの 114 例についての分析結果では、*IGF2*-LOI が 22%にみられた。*IGF2*-LOI を示す腫瘍が比率においても、母集団当たりの頻度においても、欧米より低く、これが日本人におけるウイルス腫瘍の発生頻度が低い理由のひとつと考えられた。*IGF2*-LOI は肝芽腫でも観察されると報告されている。これまで、肝芽腫の *IGF2*-LOI はウイルス腫瘍とは別の機序により生じていると報告されてきたが、私たちは肝芽腫の *IGF2*-LOI の頻度が 17%であることを示すと共に、肝芽腫においてもウイルス腫瘍と同様に、enhancer competition model の破綻により、*IGF2I*-LOI が生じていることを証明した。

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、 $\beta$ -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*-uniparental disomy (UPD) 群と *IGF2*-retention of imprinting (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している。

肝芽腫 56 例の SNP array 解析においては、37 例 (66%) にゲノム構造異常を検出し、1q, 2q, 20p 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 カ所に共通欠失領域を検出し、がん抑制遺伝子候補 *ANXA10S* を同定した。4q 欠失は予後と関連し、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。

肝芽腫 97 例を対象にして、予後を予測可能な分子マーカーを検討し、*RASSF1A* メチル化が臨床的に有用な予後因子であることを示した。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、ウイルス腫瘍 166 例を対象にして *RASSF1A* メチル化を分析し、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、既知因子より有効な予後因子になると考えられた。(金子、新井)

近年乳癌の術前化学療法が行なわれるようになり、治療成績改善への寄与が期待されている。化学療法のレジメンとして、anthracycline、taxanに加え、HER2陽性乳癌にHerceptinを使用すること

でpCR (pathological complete response) rateが向上した。既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*) 領域増加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*CDHI*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。ホルモン療法の効果予測のために開発したエストロゲン応答性3次元型マイクロアレイを用い、27例の乳癌検体の解析を行い、搭載遺伝子コンテンツの有用性を確認した。また、マイクロアレイ研究からその有用性を確認できた候補遺伝子と既知の予後因子をRT-PCR法によって解析すること、さらに検討対象標品をパラフィン包埋切片より抽出したRNAとすることを試みた。また、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持つGFPレポーター(ERE-GFP)を乳癌細胞に導入したレポーター細胞を用い、癌部間質のエストロゲン受容体(ER)活性化シグナルの評価を行い、さらにそれらの間質に関連する遺伝子の発現を検討した。また、同じレポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込んだものを用い、乳癌検体の癌細胞に導入して、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。その結果、昨年、ERの発現とERの活性は完全に相関するものではないことが明らかとなったので、それらの標品のERの標的遺伝子の発現を解析し、ERの発現とERの活性との相関を検討した。さらに術前治療の生検標品のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較を開始した。また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のための基礎研究としてエストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株の樹立を行い、また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌症例におけるER活性の評価も症例数を蓄積しつつ解析した。(林)

がん転移関連遺伝子*NM23*は、難治性白血病など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*結合蛋白質を探索することを糸口として、がん細胞の特性に関与する新しい分子標的の開発を目指した(目標1)。*NM23*蛋白質をプローブとしたprotein array、白血病細胞を用いた免疫沈降とwestern blottingおよび免疫沈降と質量解析により、7個(HSC70, RAR $\cdot$ , ROR $\cdot$ , S100-A8, S100-A9, SPRR2E, *NM23*-H2)の*NM23*結合候補蛋白質を同定した。また、*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・生存を促進することを明らかにした。この増殖・生存促進活性は、サイトカインの誘導およびMAPKシグナル伝達の活性化を伴うことも判明した。この活性は血清*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ので、その分子機構を検討した。*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\*)の発現と機能を解析した。MUC1\*の細胞外ドメインペプチドを抗原としてMUC1\*を検出するための特異抗体を作製した。この抗体は、分子サイズ33kDaのMUC1\*抗原(MUC1\*-33)を認識した。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た。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。

一方、乳がんでは*NM23*高発現は細胞の転移/運動能を抑制するが、この機能と密接に関連しその発現が抑制される下流遺伝子(EDG2)が報告された。*NM23*高発現による白血病細胞の分化抑制機構に

における転移抑制機構と共通する分子基盤を検討することも目標とした（目標2）。白血病細胞の myeloid 系分化誘導において、NM23 発現抑制と EDG2 発現増強という統計的に有意な負の相関があることを明らかにした。このような相関は erythroid 系分化誘導においては認められなかった。したがって、細胞運動能を必要とする myeloid 系への分化誘導を抑制する機構にも乳がん細胞の転移抑制機構と共通する NM23 と EDG2 に関連する分子基盤があることを明らかにした。（角）

## 研究分担者

平成19年～平成21年

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、小児がんに通な染色体異常領域や、それぞれの小児がんの特徴的な染色体異常領域を特定する。その領域から、腫瘍の発生・進展に関与する遺伝子を特定する。同時にインプリント遺伝子のアレル発現異常や、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。（金子、新井）

乳癌治療における術前化学療法は標準的治療法として確立しつつあるが、その利点は以下の4つである。

- 1) in vivo の感受性試験である。
- 2) 縮小手術が可能となる（乳房温存率が向上）。
- 3) 予後良好な症例を選別できる（効果のあったものは再発率が低い、特に pathological complete response (pCR) が得られた症

例の予後は良好である。4) 術後投与と比べて生存率に差がない。以上の4つの術前化学療法の利点に基づいて、われわれは術後に化学療法が必要であると推察される患者にはできるだけ術前に化学療法を行うことを奨めている。化学療法が必要であると考えられる患者の特徴を以下に示す。1) ホルモンレセプター陰性。2) HER2 陽性。3) 腫瘍浸潤径 2.1cm 以上。4) リンパ節転移陽性。5) 腫瘍グレード 2 または 3。6) リンパ管侵襲陽性。7) 35 歳未満。これら7つの因子を総合的に考慮して決定する。一方、術前化学療法の欠点として、効果がなかった場合、手術が遅れることである。したがって、化学療法の効果予測因子が重要となる。そこで、われわれは化学療法前に腫瘍組織を生検し、SNP array 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。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳がんでは転移能抑制や予後良好と関連する。がん細胞の特性発現における *NM23* の多彩な作用は、*NM23* と相互作用する蛋白質の存在によると示唆されている。したがって、腫瘍細胞の増殖/分化/転移各々と関連する *NM23* 結合蛋白質を同定し機能を解析する必要がある。*NM23* と相互作用する蛋白質の探索という視点から、がん細胞の特性に關与する新しい分子標的の開発を目指している (目標 1)。また、*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。この作用は血清 *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考えられるので、その分子機構 (特に *NM23* 受容体の存在) を明らかにすることも目指している。

一方、乳がんでは *NM23* 高発現は細胞の転移/運動能を抑制するが、この機能と密接に関連しその発現が抑制される下流遺伝子 (*EDG2*) が報告された。白血病細胞の分化抑制機構にも乳がんの転移抑制機構と共通する分子基盤があるのかを検討することも目標としている (目標 2)。(角)

## B. 研究方法

ウイルス腫瘍 121 例と肝芽腫 56 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。

次に *WT1* 異常をサザン法および全エキソンの塩基配列決定法で分析した。*IGF2* エクソン 9 の多型を利用して、RT-PCR によるアレル特異的発現解析を実施した。この解析と同時に *H19*-DMR *CTCF6* 領域の COBRA 分析を行い、*IGF2* の状態が LOI か retention of imprinting (ROI) かどうかを決定した。RT-PCR と COBRA 分析の結

果、日本人ウイルス腫瘍における *IGF2*-LOI の頻度を決定した。肝芽腫 54 例を対象にして同様の *IGF2* 解析を行った。定量 RT-PCR 法により *IGF2* と *H19* の mRNA 量を測定し、その結果と 3 群 (LOI, ROI, UPD) との関係を検討した。*WTX* 遺伝子異常を DNA の定量的 PCR 法 (qPCR), FISH 法、塩基配列決定法で分析した。*β-catenin* 変異を塩基配列決定法で分析した。*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 *WTX* 遺伝子異常、*β-catenin* 遺伝子変異、SNP array 解析の結果得られた染色体異常の頻度を分析した。(金子、新井)

一方、ウイルス腫瘍 20 例について 18 種類の癌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 20 例を対象にして 13 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析した。メチル化を示した 3 遺伝子について 97 例の肝芽腫を対象にしてメチル化分析を MSP 法により実施し、予後との関係を調べた。予後との関連がみられた *RASSF1A* のメチル化を新たに定量 PCR 法により分析した。また肝芽腫 97 例を対象にして *β-catenin* 変異を塩基配列決定法で分析した。*RASSF1A* と *β-catenin* 変異に他の臨床的予後因子を加え、生存期間に関する多変量解析を実施した。(金子)

対象は埼玉県立がんセンター病院で 2007 年 4 月～2009 年 8 月に術前化学療法を予定して針生検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)

乳癌のホルモン療法効果予測のために、以下の研究方法を用いた。

1) 原発性乳癌 27 例についてエストロゲン応答性 3 次元マイクロアレイ用のチップを用いた解析結果をまとめ、臨床病理学的情報と比較検討し、その搭載遺伝子セットの有用性を確認した。今後、現在進行中の術前ホルモン療法の多施設間臨床試験の中で、治療前生検標品と治療後手術標品を用いてそれら候補遺伝子の有用性について検討した。その結果、より少数の遺伝子セットでも有効な判定が可能であるとの結果が得られれば、より臨床応用の点で実用的な multiplex RT-PCR 法を候補遺伝子プロファイリングに採用する方向で検討する。

2) ERE-GFP を ER 陽性乳癌細胞に安定導入して作成した指示細胞を患者組織より得た癌部の初代細胞と共生培養し、蛍光を観察し、定量することにより個々の乳癌患者の癌の特性(エストロゲン環境に対する反応性)を把握する。特に術前アロマターゼ阻害剤治療の効果を判定し、治療奏効性との比較を行なった。

3) 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。これは個々の患者のエストロゲンシグナルを総合的に評価でき、従来の ER の免疫染色法による評価に勝る結果が期待できる。

4) 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。

5) 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。

6) 一方、アロマタ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。

7) また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のための基礎研究として、ERE-GFP を安定導入した ER 陽性乳癌培養細胞株 MCF-7-E10 細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株を複数株樹立し、耐性の

メカニズムの解明を進めた。(林)

NM23 蛋白質と結合し、癌細胞の機能を制御する蛋白質を発見するために、以下の研究方法を用いた。

1) NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索する。

2) 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、Western blotting 法にて候補蛋白質の共沈降を検証する。

3) 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、質量解析にて蛋白質を同定する。

4) Pull-down GST-NM23 protein-protein interaction 法により、細胞抽出液および粗精製血清/腹水を用いて、NM23 結合蛋白質を分離精製し、質量解析にて蛋白質を同定する。

5) NM23 受容体蛋白質として報告された腫瘍抗原 MUC1\* については、細胞外ドメインの合成ペプチドを抗原として特異的抗体を作製する。具体的には 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。

6) 白血病細胞における MUC1\*発現解析。具体的には、諸種白血病細胞抽出液調整; western blotting による発現検証; 白血病細胞の増殖分化における MUC1\*の発現動態解析; 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; MUC1\*発現と血清 NM23 蛋白質レベル併用の臨床的意義の検討。

7) 白血病細胞の myeloid 系 (単球/好中球) への分化誘導とがん細胞の転移能誘導には、運動能獲得という共通する機能があるので、白血病細胞における EDG2 発現および NM23 発現との関連を検討した。EDG2 および NM23 蛋白質の発現は western blotting にて検討した。また、白血病細胞 (HL60, NB4, THP1) の myeloid 系への分化誘導剤および白血病細胞 (K562, HEL) の erythroid 系への分化誘導剤として *all-trans* retinoic acid (ATRA) を用いた。(角)

## C. 研究結果

SNP array 解析の結果、ウィルムス腫瘍 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。

ウイルス腫瘍 114 例を分析し、*IGF2*-LOI を示す 24 例 (22%)、*IGF2*-UPD を示す 39 例 (34%)、retention of imprinting (ROI) を示す 51 例 (44%) に分類した。LOI 型腫瘍 12 例と ROI 型腫瘍 12 例を定量 RT-PCR 法で分析したところ、前者では *IGF* の過剰発現と *H19* の発現低下を認めたのに対し、後者では *IGF2* の軽度発現と *H19* の過剰発現を認めた。肝芽腫 54 例を対象にして同様な解析を行い、9 例 (17%) を LOI 型、12 例 (22%) を UPD 型、33 例 (61%) を ROI 型に分類した。アレル特異的発現解析の結果、バイアレル発現を示す腫瘍の *H19*-DMR は高メチル化状態であったが、モノアレル発現腫瘍では正常メチル化状態を示し、前者で enhancer competition model の破綻が証明された。定量的 RT-PCR の結果から、*IGF2*-UPD 型と *IGF2*-LOI 型腫瘍は *H19* mRNA をほとんど発現していなかったが、*IGF2* mRNA はほとんどすべての腫瘍で高発現していた。一方、*IGF2*-ROI 型肝芽腫では *H19* mRNA と *IGF2* mRNA 両者が多くの腫瘍で高発現していた。

ウイルス腫瘍 121 例を分析し、36 例 (30%) に *WT1* 異常を検出した。残り 85 例を、*IGF2*-LOI を示す 27 例 (28%)、*IGF2*-UPD を示す 21 例 (25%)、*IGF2*-ROI を示す 29 例 (23%)、その他の異常を示す 9 例 (5%) 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、 $\beta$ -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。

肝芽腫 56 例の SNP array 解析では、37 例 (66%) にゲノム構造異常を検出した。1q, 2q, 20pq の増加、4q, 1p の欠失を多く認めた。また、ウイルス腫瘍と同様に、11p15 の *IGF2* 領域の UPD も観察された。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 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  $\beta$ -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 *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。(金子、新井)

肝芽腫 20 例を対象にして 13 種類の癌抑制遺伝子のメチル化を MSP 法により分析し、3 遺伝子 (*RASSF1A*, *SOCS1*, *CASP8*) のメチル化をそれぞれ、30.9%, 33.0%, 15.5% に認めた。単因子解析の結果、*RASSF1A* のみが、予後と相関した。*RASSF1A* の定量的 MSP 法による解析の結果、97 例中 43 例 (44.3%) にメチル化を認めた。97 例中 65 例 (67%) に  $\beta$ -catenin の点変異ないし欠失を認めた。単因子解析の結果予後と相関する 6 因子 (年齢、組織型、病期、化学療法に対する反応、 $\beta$ -catenin 変異、*RASSF1A* メチル化) を決めた。これを用いて多変量解析を実施したところ、病期 [ $P=0.002$ ; relative risk (RR) 7.67] と *RASSF1A* メチル化 ( $P=0.043$ ; RR 9.39) はいずれも独立した予後予測因子であることが分かったが、 $\beta$ -catenin 変異は独立した予後予測因子ではなかった。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  $P=0.05$ )。(金子)



化学療法前に針生検により腫瘍の得られた乳癌 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* 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 の効果を示したが、*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の効果予測の研究を実施し、以下の結果を得た。

1) 我々が開発したエストロゲン応答遺伝子とその関連遺伝子 36 個を搭載した 3D マイクロアレイを用いて原発乳癌患者 27 例の手術検体を解析したところ、そのクラスター解析から患者群が高発現群 A グループと低発現群 B グループの 2 群に明瞭に分けられることが明らかとなった。その 2 群は ER の発現の有無とは有意な正の相関を示したが、完全には一致しなかった。ま

た、Stage や *HER2* (逆相関) と相関を示した。また、これらの患者の中から 3 例の再発症例が観察され、そのうち 1 例は ER 陽性患者、2 例が ER 陰性患者であったが、アレイ解析による分類では 3 例とも低発現群に属していた。

2) 以前作製した、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを導入した ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7/E10 を用いて乳癌手術材料から得た間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した結果、その活性が患者ごとに大きく異なり、それぞれの癌の間質に個性があること、その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関が見られることを明らかにした。そこで、山口らはこれらの間質の分類、層別化が間質線維芽細胞の分化と関係する遺伝子の発現をみることで可能かどうかを検討している。一方、山口は各標品の液性因子の解析から、個々の間質細胞からは乳癌細胞の増殖をサポートする他の因子も分泌され、重要であることを明らかにした。

3) ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、手術標品から作成した初代培養細胞に導入して ER 活性化能を評価する系を作成した。これによって個々の症例の原発腫瘍細胞での癌微小環境も含めた ER シグナル系の評価が可能になった。上記の E10 細胞の系とこのウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、ほぼ乳癌と同様の結果が得られ、子宮においても癌周辺の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対しアロマトーゼ阻害剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。

4) 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、*Ki-67*, *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。

5) 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。

6) また、アロマトーゼ阻害剤治療後の再発症例で検体の採取が可能であった症例について、これまで十数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。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。

7) 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)

難治性白血病で高発現している NM23 の機能を制御する結合蛋白質を発見する研究を行い、以下の結果を得た。

1) NM23 蛋白質をプローブとして、protein array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索した。NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。

2) 上記 21 の内 10 個について抗体が入手できた。また、既知の NM23 結合蛋白質 10 個についての抗体も入手した。合計 20 抗体を用いて、白血病細胞 12 株 (骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞 6 株) と神経芽腫細胞 (2 株) での発現を western blotting で確認した。

3) 白血病細胞中での結合を検証する目的で、NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いた免疫共沈降実験にて共沈降する蛋白質を上記 20 抗体を用いた western blotting で解析した。NM23-H1 を高発現している白血病細胞において HSC70, RAR  $\alpha$ , ROR  $\alpha$ , NM23-H2 が NM23-H1 と特異的に共沈降した。

4) NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いて、共沈降

した蛋白質を分離精製し、質量解析した結果、S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2 蛋白質を同定した。

5) 白血病細胞 HL60 の ATRA による顆粒球系分化誘導において、S100-A8, S100-A9 蛋白質は顕著に誘導され、HSC70, ROR  $\alpha$ , NM23-H2, および NM23-H1 は減少し、各々に分化に伴う発現動態を示した。

6) Pull-down GST-NM23 protein:protein interaction 法により、ヒト正常血清中の NM23-H1 結合蛋白質 (27 Kda) を見出した。

7) 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 CNVHDVETQFNQYKTEAAS 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)。

8) 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\* - 23 kDa 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 33 kDa の蛋白 (MUC1\* - 33) を認識した。

9) 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。

10) 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。

11) 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。

12) 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。

13) 白血病細胞における NM23 過剰発現は、分化抑制因子として機能するが、その分子機構は不明である。一方、乳癌細胞における NM23 過剰発現は、運動能/転移能抑制因子として機能するが、最近、その標的遺伝子として LPA 受容体 (EDG2) が報告された。リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) はシグナリ

ング分子の働きをするリン脂質誘導体であり、オートタキシンと呼ばれるリゾホスホリパーゼ Dにより生成される。高親和性Gタンパク共役受容体を活性化し、細胞増殖を刺激する。オートタキシンやEDG2の異常調節は腫瘍形成と転移に寄与すると報告されている。白血病細胞の単球/好中球への分化誘導とがん細胞の転移能誘導には、運動能獲得という共通する機能があるので、白血病細胞におけるEDG2発現およびNM23遺伝子発現との関連を検討した。EDG2蛋白質の発現はHL60を含む多くの白血病株細胞で確認できた。また、NM23蛋白質はHL60細胞をATRAで分化誘導すると顕著に減少したが、EDG2発現は反対に増加した。ATRAによる同様な効果は、NB4細胞の好中球への分化誘導やTHP1細胞の単球への分化誘導でも観察された。ATRAによるmyeloid系分化誘導において、NM23発現抑制とEDG2発現増強には統計的に有意な負相関( $r = -0.7538$ ,  $p = 0.0237$ )があった。しかし、このような相関はATRAによるHEL細胞やK562細胞に対するerythroid系分化誘導においては認められなかった。したがって、細胞運動能を必要とするmyeloid系への分化誘導を抑制する機構にも乳がんの転移抑制機構と共通するNM23とEDG2に関連する分子基盤があると考えられた。(角)

#### D. 考察

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。

ウイルス腫瘍の発生頻度が日欧間で著しく異なる原因を調べるために、日本人ウイルス腫瘍患者を対象に*IGF2*の発現異常分析を実施した。アレル特異的発現解析とCOBRA法による*H19*-DMRのメチル化解析を併用し、114例中24例(22%)に*IGF2*-LOIを認めた。これまで欧米から報告された*IGF2*-LOIの頻度は32~38%と報告されているので、今回の日本人における*IGF2*-LOI型腫瘍の頻度はやや低いと言える。さらに、

日本人のウイルス腫瘍の発生頻度が欧米の1/2であることを考慮すると、母集団における発生頻度は欧米の半分以下になる。このように日本人ウイルス腫瘍における*IGF2*-LOIの発生頻度は、比率においても、母集団当たりの頻度においても、欧米より低く、これが日欧間でウイルス腫瘍の発生頻度が異なる理由のひとつであると考えられた。

肝芽腫はウイルス腫瘍と同様に*IGF2*異常が腫瘍化に関与することが知られている。一方、正常胎児組織では*H19*下流のエンハンサーシグナルを*H19*と*IGF2*が奪いあうというenhancer competition modelが成立すると考えられている。ウイルス腫瘍では本来非メチル化状態である母方*H19*-DMRが高メチル化しており、インシュレーター蛋白が結合できなくなるため、エンハンサーシグナルが母方*IGF2*アレルを発現させる。これをenhancer competition modelの破綻と呼び、欧米人ウイルス腫瘍の32~38%、日本人ウイルス腫瘍の22%にみられる。これまで、肝芽腫の*IGF2*インプリント消失(LOI)はウイルス腫瘍とは別の機序により生じていると報告されてきたが、私たちは肝芽腫においても、enhancer competition modelの破綻により、17%に*IGF2*-LOIが生じていることを証明した。*IGF2*-UPDと*IGF2*-LOIの頻度は肝芽腫に比べてウイルス腫瘍において高く、胎児腎の方が、胎児肝より*IGF2*刺激に対する感受性が高いことが示唆された。

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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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*-ROI群と*IGF2*-UPD群は*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。

肝芽腫の解析では、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* 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。(金

子、新井)

肝芽腫の予後を予測できる分子マーカーを検討し、*RASSF1A* のメチル化が病期に次ぐ重要な予後因子であることを証明した。近年、肝芽腫の治療成績は著しく改善しているが、進行期例や遠隔転移例の予後は依然として不良であり、術前化学療法により down staging して完全切除に持ち込めるかどうかは治癒させるためには最も重要である。*RASSF1A* のメチル化は術前化学療法の効果予知に役立つので、臨床的に極めて有用である。今後、プロスペクティブに肝芽腫の *RASSF1A* メチル化を調べ、その有用性が確認できれば、治療研究の層別化に利用できるのではないかと期待している。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。私たちの研究結果は、*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、これまでの予後因子よりすぐれていると考えられた。(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、全例にいずれかの染色体に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可能であ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)

乳癌のホルモン療法効果予測のための基礎研究として、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。それらの研究で、*HDAC6* や *EGR3* などいくつかの遺伝子については実際に乳癌の予後と相関することが示された。そこで、臨床応用研究として、ヒト組織標品を用いた解析とチップの改良を進め、高精度なホルモン療法奏効性予測診断を可能にする DNA チップの開発を目指してきた。

今回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の導入は、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床に役立つシステムになる可能性がある。試験的に本装置を用いて約 27 症例の原発乳癌を解析したところ、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。また、現在臨床的に用いられている ER の発現の有無との関連を検討したところ、相関は示したが、完全な一致ではなかった。さらに 3 名の再発患者の全員がアレイ解析の低発現グループに属していた。ちなみに 3 名のうち 2 名が ER 陰性患者、1 名が陽性患者であった。人数も少なく、また、ホルモン療法の奏効性をみているわけではないが、興味深い結果と思われる。一方、このような検討を重ね、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、より実用化しやすい RT-PCR での診断キット化も可能かもしれない。今後この点についても検討していく。また、このような RNA レベルの発現解析は実際に臨床に導入するには問題点も多く、短期の実用化を目指すなら他の手法、たとえばすでに確立している免疫染色法などに乗せていく方が良いかもしれない。これについても今後 tissue アレイ等を用いて検討していきたい。

また、マイクロアレイ研究からその臨床的有用性を確認できたエストロゲン応答遺伝子群について、既知

の予後因子とともに、real-time RT-PCR 法によって 60 例以上の乳癌症例を解析した。さらに解析対象は、より臨床で容易に実現可能なものとするため、パラフィン包埋標品とすることを試みた。その結果、その後の解析に耐えうる十分な品質の RNA が得られることを確認した。そしてほとんどの症例と遺伝子において定量的解析が可能なが示され、臨床への実用化に大きく近づいたと思われる。今後、臨床的有用性を確立するため、本法を用いて、ホルモン療法の反応性のデータとその他の臨床病理学的データが整えられている症例についての厳密なスタディを計画する必要がある。

一方、近年臨床で広く用いられるようになった第 3 世代のアロマトラーゼ阻害剤は特に癌細胞周囲の間質組織に存在するエストロゲンを産生する酵素、アロマトラーゼを標的としており、癌細胞へのエストロゲンの供給を遮断する治療である。この治療の奏効性予測には周辺間質を含めた総合的な評価系が必要となる。そこでエストロゲンシグナルに応答して蛍光を発する ERE-GFP を持った指示細胞を作成し、そのような評価系の確立を目指した研究を行っている。乳癌手術材料から得た間質細胞とこの GFP レポーター細胞を共培養することによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることが示された。さらに個々の原発腫瘍を用いた微小環境評価を可能にするために、アデノウイルスベクターを用いて同じレポーターカセットを患者検体から得た癌細胞に導入して ER 活性を評価する系を開発した。まず、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、子宮においても癌周囲の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対しアロマトラーゼ阻害剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。従来、乳癌で広範に使われてきた抗エストロゲン剤であるタモキシフェンが子宮癌ではアゴニストとして作用することもあり、内膜癌に対するホルモン療法は進行癌に対する MPA 大量療法以外はほとんど行われていなかったが、我々の結果から、症例を限れば、第 3 世代の強力なアロマトラーゼ阻害剤は内膜癌の治療に効果があるかもしれない。

そこで、この 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子測因子であり、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。

最近、第3世代のアロマターゼ阻害剤が登場してから数年が経過したことにより、アロマターゼ阻害剤治療後の再発が報告されるようになってきた。そこで、そこで、生検や再手術によって検体が採取可能な再発症例について、他施設も含め、十数例のアロマタ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、アロマターゼ阻害剤耐性と考えられる症例であるにも関わらず、ER 活性を有しているものが多く観察された。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樣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、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、そのモデル細胞となるよう MCF-7-E10 細胞を用いて、ER を恒常的に活性化して長期エストロゲン枯渇に耐性となった株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高い ERE 活性を示す株を複数樹立した。現在順次、それらの細胞株の性質を詳細に調べているが、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行い、現在さらに詳細に検討中である。(林)

難治性白血病やその他の癌で高発現している NM23 の機能を制御する結合蛋白質を同定する研究を実施した。白血病細胞における NM23 結合蛋白質の探索/同定を試み、7個の NM23 結合候補蛋白質を同定した。その内5個は、白血病細胞の分化誘導に伴ってその発現が変動した。今後、分化に伴う NM23 との結合形態の変化、細胞内局在の変動、白血病臨床検体における発現の検証、臨床的意義の解析、分化抑制に関与する新しい分子標的としての可能性を検討する予定である。白血病における増殖/分化や予後不良に関与する新しい診断・治療の分子標的として期待できる。

次に、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いく。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。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の解明を目指したい。また、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) が期待される。

NM23による白血病細胞の増殖分化の調節に LPA/EDG2/G-proteinという新しいシグナル伝達系の関

与が示唆され、分化に関与する新しい分子標的としての可能性が提示された。(角)

## 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。ウイルス腫瘍 114 例の *IGF2* アレル特異的発現解析と *HI9-DMR* の COBRA 解析の結果により、*IGF2-LOI* を示す腫瘍を 24 例 (22%) に認めた。これまで欧米から報告された *IGF2-LOI* の頻度は 32~38% と報告されているので、今回の日本人における *IGF2-LOI* 型腫瘍の比率はやや低いと言える。さらに、日本人のウイルス腫瘍の発生頻度が欧米の 1/2 であることを考慮すると、*IGF2-LOI* の発生頻度は、比率においても、母集団当たりの頻度においても、欧米より低く、これが日欧間でウイルス腫瘍の発生頻度が異なる理由のひとつであると考えられる。肝芽腫の *GF2* 異常解析の結果、ウイルス腫瘍と同様に、enhancer competition model の破綻により *IGF2-LOI* が生じていることがわかった。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。肝芽腫の SNP array 解析の結果、肝芽腫の解析では、1q32.1 に *MDM4* と *PIK3C2B* を含む局所のゲノム増幅領域を同定した。また、4q 欠失腫瘍の予後は不良であることを示し、4q32.3 の共通欠失領域に *ANXA10* を同定した。肝芽腫とウイルス腫瘍の予後予測に *RASSF1A* メチル化が有用であることを示した。(金子、新井)

乳癌ホルモン療法の効果予測の研究のために実施した、エストロゲン応答遺伝子群を搭載した 3 次元型 DNA マイクロアレイ解析の結果から、*HDAC6* や *EGR3* など、これまでの研究で同定してきた候補遺伝子群の有用性が確認された。癌細胞周辺の間質も含めたエストロゲンシグナルの癌微小環境評価を行うことでホルモン療法の奏効性をより正確に把握することを目指し、指示細胞を用いる系とアデノウイルスを用いる 2 つのアクセスシステムを開発した。新規診断法開発を目的とし

て ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析し、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、*MTB-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。(林)

難治性白血病で高発現している NM23 蛋白質と結合し、その機能を制御する結合蛋白質を同定する研究を実施し、白血病細胞における 7 個の NM23 結合候補蛋白質 (HSC70, RAR $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRR2E) を同定した。S100-A8, S100-A9 蛋白質は白血病細胞 HL60 の ATRA による分化誘導において顕著に誘導され、反対に HSC70, ROR $\alpha$ , NM23-H2, および NM23-H1 は減少し、各々が分化に伴って発現変動することが明らかになった。次に、白血病細胞の増殖・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、白血病細胞における新規 MUC1\*-33 蛋白を同定した。MUC1\*-33 の発現は白血病細胞の細胞外 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。また、白血病細胞の ATRA による myeloid 系への分化誘導に伴って、NM23 発現は顕著に抑制され、反対に EDG2 の発現は増強された。NM23 発現抑制と EDG2 発現増強には統計的に有意な負相関があった。白血病細胞における NM23 過剰発現の標的も EDG2 であることが推測された。(角)

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) [Kaneko, Y.](#) Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
- 2) Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A. and [Kaneko, Y.](#) Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood & Cancer*, 49:

- 240-249, 2007.
- 3) Watanabe, N., Haruta, M., Soejima, H., Fukushi, D., Yokomori, K., Nakadate, H., Okita, H., Hata, JI., Fukuzawa, M. and Kaneko Y. Duplication of the paternal *IGF2* allele in trisomy 11 and elevated expression levels of *IGF2* mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type. *Genes Chromosomes Cancer*, 46: 929-935, 2007.
  - 4) 金子安比古 : 細胞遺伝学。新小児がんの診断と治療。別所文雄、杉本徹、横森欣司編、診断と治療社 25-30, 2007.
  - 5) 金子安比古 : Wilms 腫瘍の分子生物学、特集：小児固形腫瘍の分子生物学、最新の知見、小児外科、39: 1348-1352, 2007.
  - 6) Nagayama, K., Kohno, T., Sato, M., Arai, Y., Minna, JD., and Yokota, J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chrom Cancer* 46: 1000-1010, 2007.
  - 7) Li, X-L., Arai, Y., Harada, H., Shima, Y., Yoshida, H., Rokudai, S., Kimura, A. and Kitabayashi, I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene* 26: 7231-7239, 2007.
  - 8) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer* 57: 103-108, 2007.
  - 9) Kono, S., Kurosumi, M., Simooka, H., Kawanowa, K., Takei, H. and Suemasu, K. Nipple adenoma found in a mastectomy specimen: Report of a case with special regard to the proliferation pattern. *Breast Ca.*, 14(2) : 234-238, 2007.
  - 10) Kurosumi, M. and Takei, H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Ca.*, 14(4) : 342-349, 2007
  - 11) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Hagiwara, Y., Kamimura, M., Hayashi, Y., Tozuka, K., Suemasu, K., Inoue, K. and Tabei, T. Current trends of sentinel lymph node biopsy for breast cancer — A surgeon's perspective. *Breast Ca.*, 14 (4) : 362-370, 2007
  - 12) Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, Kinoshita T, Takei H, Takahashi K, Ikeda M, Nakashima K. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast*. 2007 Dec ;16 Suppl 2:S72-7. Epub 2007 Aug 21.
  - 13) Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H. and Yaegashi, N. Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
  - 14) Inoue, A., Seino, Y., Terasaka, S., Hayashi, S., Yamori, T., Tanji, M. and Kiyama, R. Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines. *Toxicology In Vitro*, 21, 741-752, 2007.
  - 15) Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K. and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor  $\alpha$  gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 106-114, 2007.
  - 16) Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S., Ohuchi, N. and Sasano, H. Aromatase localization in human breast cancer tissues - possible interaction between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.*, 67(8), April, 3945-3954, 2007.
  - 17) Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya T.,



- Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. Early growth responsive gene 3 (EGR3) in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 279-292, 2007.
- 18) Mita, K., Zhang, Z., Ando, Y., Toyama, T., Hamaguchi, M., Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwase, H. and Yamashita, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 expression in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 37(8), 575-582, 2007.
- 19) 松本光代、畠山篤、坂本宙子、山口ゆり、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3次元マイクロアレイ乳癌の診断と治療効果予測への臨床応用を目指して。東北大学医学部保健学科紀要, 16(1)：19-25, 2007.
- 20) 林 慎一、山口ゆり：ホルモン療法反応性と乳癌微小環境。乳癌の臨床, 特集・乳癌ホルモン療法の進歩-基礎と臨床, Vol. 22, No1, 6-12, 2007.
- 21) 林 慎一：内分泌療法感受性予測因子。日本臨床, 増刊・乳癌-基礎・臨床研究のアップデート, Vol. 65, 148-153, 2007.
- 22) 林 慎一：ホルモン療法奏効メカニズムと治療効果。医学のあゆみ, Vol. 221, No. 2, 140-143, 2007.
- 23) 林 慎一：乳癌とエストロゲン受容体、コレグレーション。最新医学, 特集・内分泌代謝疾患と核内受容体, Vol. 62, No. 10, 47-54, 2007
- 24) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Focus on Neuroblastoma Research* Editor:Julio A. Fernandes, pp.85-97 (2007)
- 25) Tomioka, N., Oba, S., Ohira, M., Misra, A., Fridlyand, J., Ishii, S., Nakamura, Y., Isogai, E., Hirata, T., Yoshida, Y., Todo, S., Kaneko, Y., Albertson, DG., Pinkel, D., Feuerstein, BG., Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
- 26) Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., Kaneko, Y. The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer*, 123: 1117-1125, 2008.
- 27) Haruta, M., Matsumoto, Y., Izumi, H., Watanabe, N., Fukuzawa, M., Matsuura, S., Kaneko, Y. Combined BubR1 protein down-regulation and *RASSF1A* hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol. Carcinog.*, 47: 660-666, 2008.
- 28) Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M., Kaneko, Y. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*, 47: 712-727, 2008.
- 29) Honda, S., Arai, Y., Haruta, M., Sasaki, F., Ohira, M., Yamaoka, H., Horie, H., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S., Kaneko, Y. Loss of imprinting of *IGF2* correlates with hypermethylation of the *H19* differentially methylated region in hepatoblastoma. *Brit. J. Cancer*, 99: 1891-1899, 2008.
- 30) 金子安比古：固形腫瘍の分子生物学。小児科学第3版、医学書院、1354-1359, 2008.
- 31) Hidaka, T., Nakahata S., Hatakeyama, K., Hamasaki, M., Yamashita, K., Kohno, T., Arai, Y., Taki, T., Nishida, K., Okayama, A., Asada, Y., Yamaguchi, R., Tsubouchi, H., Yokota, J., Taniwaki, M., Higashi, Y., and Morishita, K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112: 383-393, 2008.
- 32) Takei, H., Suemasu, K. Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Koh, J., Sato, K., Tsuda, H., Kurosumi, M. and Tabei, T. Multicenter phase II trial of neoadjuvant exemestane for

- postmenopausal patients with hormone receptor-positive, operable breast cancer: Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-03). *Breast Ca. Res. Treat.*, 107: 87-94, 2008
- 33) Tanabe, K., Utsunomiya, H., Tamura, M., Niikura, H., Takano, T., Yoshinaga, K., Nagase, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Hayashi, S. and Yaegashi, N. The expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, 99:267-271, 2008.
- 34) Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, 15:451-463, 2008.
- 35) Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S. and Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.*, 99(6):1125-1130, 2008.
- 36) Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109: 201-206, 2008.
- 37) Niikawa, H., Suzuki, T., Miki, Y., Suzuki, S., Nagasaki, S., Akahira, J., Honma, S., Evans, DB., Hayashi, S.I., Kondo, T. and Sasano, H. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 14: 4417-4426, 2008.
- 38) Santen, R.J., Song, R.X., Masamura, S., Yue, W., Fan, P., Sogon, T., Hayashi, S., Nakachi, K. and Eguchi, H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630: 19-34, 2008.
- 39) Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15: 256-261, 2008.
- 40) Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Honma, Y. Cotylenin A, a new differentiation inducer, and rapamycin cooperatively inhibit growth of cancer cells through induction of cyclin G2. *Cancer Sci.*, (2008)99:1693-1698.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 金子安比古: 小児がんの臨床遺伝学. *小児科診療* 72: 87-91, 2009.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, 56(1), 1-7, 2009..
- 52) Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosuni, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.*, Mar. 11(3), 239-241, 2009.
- 53) 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.
- 54) Hayashi S., Niwa T., Yamaguchi Y. Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. *Cancer Sci.*, 100(10), 1773-1778, 2009. (Jun)
- 55) 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.
- 56) 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., 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.* 2009.
- 57) 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.
- 58) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, H., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth/survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci.* (2009) 100:1885- 1894
- 59) 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.* (2009) 90:143- 152.
- 60) 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

- 61) 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.

- 62) Kato K., Takao T., Kuboyama A., Tanaka Y., Ohgami T., Yamaguchi S., Adachi S., Yoneda T., Ueoka Y., Kato K., Hayashi S., Asanoma K., 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.

## 2. 学会発表

- 1) 金子安比古, 春田雅之, 新井康人, 菅原和華, 渡辺直樹, 中館尚也, 大喜多肇, 秦順一, 福澤正洋. *WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19*-DMR 分析により証明された *WT1* 変異型 Wilms 腫瘍の不均一性. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 横浜.
- 2) 金子安比古, 春田雅之, 他: *WT1* および *IGF2* 遺伝子の SNP array と *H19*-DMR 分析により証明された *WT1* 異常型 Wilms 腫瘍の遺伝学的, 臨床的不均一性. 第 52 回人類遺伝学会. 2007. 9. 東京
- 3) 金子安比古: Spontaneous regression of neuroblastoma and the mass screening program at 6 months of age. 第 1 回依存性受容体研究会および第 10 回神経芽腫研究会合同会議. 2007. 10. 東京.
- 4) 新井康人, 柴田龍弘 他: Homozygous deletion mapping in gastric cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会記事, 2007 年, 10 月, 横浜.
- 5) 武井寛幸, 黒住昌史, 吉田 崇, 二宮 淳, 上村 万里, 林 祐二, 戸塚勝理, 井上賢一, 田部井敏夫: 術前化学療法後の乳房温存療法における乳房内再発の検討. 第 32 回日本外科系連合学会学術集会. 要望演題 5: 乳腺外科における術前化学療法後の温存療法. 2007. 6. 22-23. 東京 (東京医科大学外科学第一講座, 加藤治文教授, 京王プラザホテル)
- 6) 武井寛幸, 末益公人, 黒住昌史, 吉田 崇, 二宮 淳, 萩原靖崇, 上村万里, 林 祐二, 井上賢一, 田部井敏夫: センチネルリンパ節転移陽性例に対し腋窩郭清省略は可能か. ミニパネルディスカッション 1. 第 15 回日本乳癌学会学術総会. 2007. 6. 29-30. 横浜 (帝京大学医学部外科 池田正教授)
- 7) 武井寛幸, 吉田 崇, 戸塚勝理, 石川裕子, 浅川英輝, 林 祐二, 井上賢一, 田部井敏夫, 下岡華子, 河野輪香織, 黒住昌史: 乳癌の腋窩リンパ節郭清の予後に及ぼす影響. 第 15 回地域医療外科系連合会総会. 2007. 11. 17. さいたま市 (徳島県立中央病院, 鎌村好孝)
- 8) 林 慎一: 核内レセプターを標的としたホルモン依存性癌の診断と治療の展開. シンポジウム「核内レセプターの機能と治療への応用」, 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
- 9) 林 慎一: ホルモン療法適応群の個別化の基礎研究. ワークショップ「癌治療の個別化と分子マーカー (乳腺)」, 第 45 回日本癌治療学会総会 (京都), 2007.
- 10) 林 慎一: アロマトキシン阻害剤耐性乳がんの治療戦略—基礎からのアプローチ、エストロゲンシグナル経路の変化. ランチョンセミナー-38, 第 45 回日本癌治療学会総会 (京都), 2007.
- 11) 林 慎一: エストロゲンと乳癌. 特別講演 II, 第 4 回北関東乳腺臨床腫瘍研究会 (大宮), 2007.
- 12) 林 慎一: 乳癌内分泌療法におけるトランスレーショナルリサーチ—エストロゲン依存性乳癌の個性と治療選択—. 10<sup>th</sup> Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting (神戸), 2007.
- 13) 林 慎一: AI 再発に対する治療選択の基礎—エストロゲンシグナル経路の変化—. Kyushu Breast Cancer Workshop (福岡), 2007.
- 14) 林 慎一, 山口ゆり: 内分泌療法の適応選択の基礎研究. シンポジウム「本邦における内分泌療法のエビデンスと基礎研究」, 第 15 回日本乳癌学会学術総会 (横浜), 2007.
- 15) 林 慎一: 転写因子, RNA 発現から見た核異型.