

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

レトロウイルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定とがんの早期診断治療への応用に関する研究

分担研究者 北村 俊雄 東京大学医科学研究所 細胞療法分野／幹細胞シグナル制御部門 教授

## 研究要旨

多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占め、がんの早期診断早期治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によって完治するケースが多くなってきた。しかしながら膵がんなど早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。本研究の目的は、早期診断が難しく予後が悪い膵臓がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、および日本に多い胃がん、食の欧米化によって増加傾向にある大腸がん、さらにはがん以外の他疾患との区別が難しい前立腺がん、膀胱がん、腎臓がんなどのマーカー分子を用いた血清診断を確立するなど、がん疾患を対象として、抗体を用いた治療への応用を目指すことである。

これまでにシグナルシーケンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クロンのcDNAのうち、本年度は各がん由来分子に対するモノクローナル抗体を51種類作製し、これらの抗体の解析を開始した。

また、これまでに得られた抗体の機能解析数を増やし、それぞれの由来細胞株のみならず、網羅的に細胞株を材料として、候補の探索を行った。

昨年までの解析結果から、シグナルシーケンストラップ法(SST-REX法)で得られるSSTクロン（ヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞膜上に発現しているマウス細胞）を利用することによって効率良くモノクローナル抗体を作製できることが再確認された。抗体の機能解析結果から、本手法で得たモノクローナル抗体が高頻度に抗腫瘍活性を有することが示唆された。

本年度の機能解析の拡大によって、複数のがん細胞に対して共通して増殖抑制活性を有する抗体が存在することから、SST-REX由来以外の細胞株でも該当蛋白質が高発現であれば、機能を有する事を見出した。

### A. 研究目的

平成18-20年度厚生労働省科研費「第3次対がん10カ年戦略」において、レトロウイルス技術を利用した新しい方法論により、早期診断が難しく予後が悪い膵癌、グリオブラストーマ、ユーイング肉腫および日本に多い胃癌に由来する分泌蛋白質および膜蛋白質を同定し、これらのがん抗原に対してモノクローナル抗体を作成した。ヒトがん抗原を一種類ずつ発現するマウス細胞のカタログを作成し、これらの細胞を

直接マウスに免疫して抗体を作成する点が本方法の特色・独創的な点であり、本方法によってがん細胞を認識する抗体、癌細胞の増殖を抑制する機能抗体が効率良く取得できることが判明した。今回の計画では、膵癌、グリオブラストーマ、ユーイング肉腫、胃癌に加え、欧米化、高齢化で我が国においても増加の傾向にある大腸癌、前立腺癌、腎癌も対象に加え、血清診断の確立、抗体治療を目指す。

## B. 研究方法

本研究では、主任研究者らが開発した高効率かつ正確なシグナルシーケンストラップ法 SST-REX (Kojima and Kitamura, Nat Biotech, 1999) を利用して、がん特異的抗原を同定し、モノクローナル抗体を網羅的に作成する。

特定のがん細胞からシグナルシーケンストラップ用のライブラリーを作成し SST-REX 法でスクリーニングを行うと、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 にヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質がサイトカインレセプター MPL との融合蛋白質として一種類ずつ発現する細胞カタログが得られる。SST-REX 法では、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞の自律増殖能獲得を指標としてライブラリーをスクリーニングする。実験の原理は、シグナルシーケンスを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が恒常的活性型サイトカインレセプター MPL と融合して Ba/F3 表面に発現された場合は細胞の自律増殖が誘導されることである。自律増殖能を獲得した細胞に挿入されている cDNA は PCR で容易に回収できる。シグナルシーケンスを持たない蛋白質が恒常的活性型 MPL と融合しても細胞の自律増殖は誘導できない。

本研究においては SST-REX 法の過程で得られるがん細胞由来の分泌蛋白質あるいは膜蛋白質と MPL の融合蛋白質として発現している Ba/F3 細胞群(以後 SST クローンと呼ぶ) を免疫源としてマウスモノクローナル抗体を作製する。患者がん組織あるいはがん細胞株を利用して樹立した抗体の特異性およびがん細胞株に対する増殖抑制効果を調べる。

## C. 研究成果

がん細胞株のシグナルシーケンストラップを行い、がん細胞由来の膜蛋白質および分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを樹立した。発現データベースなどによって興味深い発現分布を示す分子を提示する SST クローンを中心に、マウスに免疫することによりモノクローナル抗体を作製し、樹立した抗体のがん細胞株に対する反応性および増殖抑制効果を調べた。

作製した 51 種類の抗体のうち新規に前立腺がん細胞株、グリオーマ細胞株、膵臓癌細胞株、胃がん細胞株において、*in vitro* で増殖を抑制する抗体がのべ 32 種類存在した。

### 1. 各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法

我々は、昨年度までに既に各ガン細胞株において cDNA ライブラリーを作製し、随時 SST-REX 法による膜蛋白質・分泌蛋白質の解析を実施している。昨年度までにはがん細胞株 22 種類のシグナルシーケンストラップを行い、3804 クローンを解析した。その結果、それぞれの細胞株に発現する膜蛋白質・分泌蛋白質として、合計 963 種類の同定を行った。下記にがん種ごとの内訳を Table1 で示す。

本年度は、シグナルシーケンストラップの新規の解析は行っていない。その理由として、既に得られている候補因子の中から抗体作製を行う事、得られた抗体の機能解析を重点的に行う事を目標とした。シグナルシーケンストラップの実施に比べ、抗体作製および機能解析に要する期間が長く、

因子探索で候補を増やすのみならず、得られた因子のスクリーニングに重点を置くべきと考えたからである。

Table1. 各がん種における SST-REX 法の解析クローンおよび同定遺伝子数

がん種	細胞種	解析クローン数	遺伝子数
前立腺ガン	Du145, PC3, LNCap	518	145
膵臓ガン	AsPC1, BxPC3, Capan1	602	106
グリオーマ	T98G, U251, U87MG	442	99
胃ガン	MKN1, GCIY, KATOIII	532	114
膀胱ガン	T24, UM-UC-3, 5637	582	215
腎臓ガン	Caki1, KMRM-M1, KMRC2	620	130
大腸ガン	HCT116, DLD1, SW480, WiDr	508	154
合計		3804	963

## 2. がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作製

本研究プロジェクトの特徴は、マウス細胞がヒト癌細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを免疫原として簡便にマウスモノクローナル抗体を作製する点である。本年度は、SST-REX 法で解析を行ったがん種のうち、前立腺がん、膵臓がん、胃がん、グリオーマ、膀胱ガン、大腸ガン、腎臓ガンの由来分子に対するモノクローナル抗体を 51 種樹立した。

## 3. 樹立したモノクローナル抗体の Characterization

各がん由来膜蛋白質および分泌蛋白質に対して作製したモノクローナル抗体 51 種について予備的な characterization を行った。また、昨年度までに作製した 140 種（下記参照）についても再度機能解析を実施した。

Table2 作製したモノクローナル抗体一覧

がん種	抗体数	抗体作製遺伝子数
前立腺ガン	75	21
膵臓ガン	34	12
グリオーマ	14	7
胃ガン	17	7
合計	140	47

具体的には、シグナルシーケンスストラ

アップ法の由来細胞以外の細胞も含めて解析をする事で、例えばより高発現の細胞株においては、増殖抑制などの効果が発揮されたり、複数のがん細胞に対して機能を発揮する事を期待して試験を追加した。

その結果、前立腺ガンに対して 15 種類、膵臓がん細胞株に対して 5 種類、グリオーマに対して 5 種類、胃がんに対して 7 種類の抗体が、*in vitro* で細胞の増殖を抑制した。一つの抗体が複数のがん細胞株増殖を抑制する例があるが、網羅的に作成したモノクローナル抗体としては、増殖抑制効果を認める抗体は多いと言える。

#### 4. 機能抗体の *in vivo* での抗がん活性

我々は、樹立した機能抗体を用いて、SCID マウス(重度免疫不全マウス)にヒトがん細胞を移植し、*in vivo* での抗腫瘍活性について検討を行った。

前立腺がんに対する機能抗体は、前立腺ガン細胞株(PC3、Du145、LNCap)に対して MTT アッセイならびに CDC アッセイを実施し、SCID マウスでの移植試験、増殖抑制試験を行った。前立腺ガン細胞株 LNCap 細胞株は SCID マウスへのガン移植モデルが確立できず、*in vivo* 試験は行わなかった。

膵臓がんに対する機能抗体は、膵臓がん細胞株(AsPC1、BxPC3)に対して MTT アッセイならびに CDC アッセイを実施し、SCID マウスでの移植試験、増殖抑制試験を行った。

胃がんに対する機能抗体では、スキルス胃がん細胞株(GCIY) に対して MTT アッセイならびに CDC アッセイを実施し、SCID マウスでの移植試験、増殖抑制試験

を行った。

グリオーマに対する機能抗体は、グリオーマ細胞株(U87MG、T98G、U251)に対して MTT アッセイならびに CDC アッセイを実施し、SCID マウスでの移植試験、増殖抑制試験を行った。グリオーマ細胞株 T98G と U251 細胞は SCID マウスへのガン移植モデルが確立できず、*in vivo* 試験は行わなかった。

*in vivo* の活性試験については、5 週齢の SCID マウスに各種ヒトがん細胞を移植し、3~6 週間観察したところ約 5mm 角大の腫瘍を確認した。マウスの尾静脈より、開発した抗体を 10mg/kg・回にて 1 週間おきに 3 回~4 回投与し、4 週目~5 週目のがん細胞の発育を観察した。

本年度は 12 モデルでの解析を実施したが、いずれのモデルでも増殖抑制活性は確認できなかった。得られた機能抗体の内、まだ試験中の 10 モデルについては来年度に結果を報告できる。

#### D. 考察

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質の同定は、本年度新たな解析は行わなかったが、合計で 3800 クローンを超える解析を実施し、述べ数で 1000 近い遺伝子を同定するに至っている。

本年度は抗体の機能解析に注力する方針を取った。シグナルシーケンストラップ法の由来細胞以外の細胞においても解析の幅を広げる事で、多くの *in vitro* 機能抗体がスクリーニングできた。昨年、SST-REX 法にて発現が確認できた細胞においても、染色が弱陽性であるなどの一見ネガティブな結果もあることについて、内在性蛋白質

の発現量が少ない事を考察した。スクリーニングの幅を広げる事で、内在性蛋白質の発現量が低いために機能を示さなかった抗体について、より高発現な細胞株を用いる事で機能を確認できたと考えている。

## E. 結論

本年度は新規に得られた抗体ならびに既に得られた抗体について、機能解析の幅を広げる事で、有用な抗体候補を増やす事ができた。

この事は、SST-REX 法を利用したターゲット探索では、数多くの解析を進めると特異的に発現していると思われる因子が徐々に明らかになり、ターゲットとしての科学的根拠を増やす事、発現量が低くても SST-REX 法で因子を同定できる事が証明され、ターゲット探索に有用な技術である事が示唆された。また、SST クローンを用いたモノクローナル抗体作製では、単に作製効率が良いというだけでなく、機能を有する抗体の取得にも有効な手段である事が示唆された。

SST-REX 法から抗体開発への一貫した本研究プロジェクトは、ターゲット探索から機能解析まで有用な技術である事が証明できたと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T. Expression of

ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. (2010) **Int. J. of Oncol.** in press.

2. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b and LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. **J. Exp. Med.** in press.

3. Ikeya, M., Fukushima, K., Kawada, M., Onishi, S., Furuta, Y., Yonehara, S., Kitamura, T., Nosaka, T., and Sasai, Y. (2010) Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. **Dev. Biol.** 337:405-414.

4. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., Kitamura, T., and Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 115: 2872-2881.

5. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T.

- (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. **Leukemia** 24:1018-1024.
6. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2009) Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. **Stem cells** 27:183-190.
  7. Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009) Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. **Science** 323:388-393.
  8. Komeno, Y., Kitaura, J. and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models. **J Cell. Physiol.** 219:529-534.
  9. Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Takahashi, N., Nosaka, T., Inoue, M., Sato, T., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. **Mol Cell Biol.**, 29:1796-1813.
  10. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. **Int J. Hematology** 89: 470-481.
  11. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T. and Kitamura, T. (2009) Activating and inhibitory signals from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcRg in mast cells. **J. Immunol.** 183:925-936.
  12. Doki, N., Kawashima, T., Nomura, Y., Tsuchiya, A., Oneyama, C., Akagi, T., Nojima, Y. and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is constitutively phosphorylated on serine 387 in the v-Src-transformed NIH3T3 cells. **Cancer Science**, 100:1675-1679.
  13. Miyazaki, K., Yamasaki, N., Oda, H., Kuwata, T., Kanno, Y., Miyazaki, M., Komeno, Y., Kitaura, J., Honda, Z., Warming, S., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kitamura, T., Nakamura, T., and Honda, H. (2009) Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of

- Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood** 113:4702-4710.
14. Nakajima, H., Ito, M., Morikawa, Y., Komori, T., Fukuchi, Y., Shibata, F., Okamoto, S., and Kitamura, T. (2009) Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 390:65-70.
  15. Oki, T., Eto, K., Izawa, K., Yamanishi, Y., Inagaki, N., Frampton, J., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2009) Evidence that integrin alpha 2b beta 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. **J. Biol. Chem.** 284:31463-31472.
  16. Ono, R., Kumagai, H., Nakajima, H., Hishiya, A., Taki, T., Horikawa, K., Takatsu, K., Satoh, T., Hayashi, Y., Kitamura, T., and Nosaka T. (2009) Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. **Leukemia** 23:2197-2209.
  17. Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T., and Furukawa, Y. Expression levels of histone deacetylases determine the hematopoietic progenitors. (2009) **J. Biol. Chem.** 284:20673-30683.
  18. Kubagawa, H., Oka, S., Kubagawa, Y., Torii, I., Takayama, E., Kang, D.W., Gartland, G.L., Bertoli, L.F., Mori, H., Kitamura, T., Ohno, H., and Wang, J-Y. (2009) Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcμR) in humans. **J. Exp. Med.** 206:2773-2793.
- ## 2. 学会発表
1. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽一、北村俊雄、黒川峰夫（2009年10月京都）EVI1 Downregulates PTEN Transcription and Activates AKT/mTOR Through Interaction with Polycomb Group. 第71回日本血液学会学術集会、口演
  2. 中島秀明、森川吉博、小森忠介、福地由美、柴田文、岡本真一郎、北村俊雄（2009年10月京都）Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 differentially regulate hematopoietic stem cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演
  3. 和田妙子、北村俊雄（2009年10月京都）ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）による血球分化の制御と白血球発症への関与の説明. 第71回日本血液学会学術集会、口演
  4. 土岐典子、川島敏行、殿塚行雄、箕嶋幸範、北村俊雄（2009年10月京都）

Constitutive phosphorylation of a RacGAP is involved in v-Src-induced transformation of NIH3T3 cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演

5. 小埜良一、榊屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉（2009年10月京都）MLL-ENL 融合遺伝子は造血幹細胞のみを標的として形質転換を生じる。第71回日本血液学会学術集会、口演

6. 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺直子、中原史雄、土岐典子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄（2009年10月京都）Analysis of C/EBPA mutations in AML, MDS by a mouse BMT model. 第71回日本血液学会学術集会、口演

7. 中原史雄、北浦次郎、坂田-柳本麻美子、米野由希子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄（2009年10月京都）Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and induces CML BC-like disease. 第71回日本血液学会学術集会、口演

8. 中原史雄、坂田-柳本麻美子、米野由紀子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄（2009年10月横浜）Hes1 による骨髓前駆細胞への自己複製能付与と、慢性骨髓性白血病における急性転化の誘導。第68回日本癌学会学術総会、口演

9. 小埜良一、榊屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉（2009年10月横

浜）MLL-ENL 融合遺伝子による形質転換は造血幹細胞のみを標的として生じる。第68回日本癌学会学術総会、口演

10. 土岐典子、川島敏行、小根山千歳、赤城剛、北村俊雄（2009年10月横浜）MgcRacGAP の恒常的リン酸化は v-Src による NIH3T3 細胞の transform に関与する。第68回日本癌学会学術総会、ポスター

11. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽一、北村俊雄、黒川峰夫（2009年10月横浜）EVI1 はポリコム群を介して PTEN の転写を抑制し AKT/mTOR シグナルを活性化する。第68回日本癌学会学術総会、口演

12. 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、貝谷綾子、榎本豊、沖俊彦、秋葉久弥、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）LMIR5 のリガンドとして TIM1 および TIM4 を同定した。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演

13. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）LMIR3 ノックアウトマウスの解析；LMIR3 欠損はマウス腹膜炎モデルにおける致死率を改善する。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演

14. 沖俊彦、北浦次郎、山西吉典、北村俊雄（2009年12月大阪）マスト細胞上のインテグリン  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 と慢性炎症。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演



15. 高橋まり子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、榎本豊、貝谷綾子、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）ヒト LMIR/CD300 ファミリー分子の解析：CD300C は FcR $\gamma$  と会合して活性化シグナルを伝達する。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演

16. 貝谷綾子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）LMIR8/CLM-6 は pDC マーカーである。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演

17. 榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）活性化レセプターLMIR7 と LMIR4 の比較解析：FcR $\gamma$  との会合から得られた知見。第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター

18. 前原明絵、伊沢久未、山西吉典、貝谷綾子、高橋まり子、榎本豊、沖俊彦、高井俊行、北浦次郎、北村俊雄（2009年12月大阪）An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcR $\gamma$  in mast cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター

19. Kitamura, T. "Learning from mouse BMT models for MDS and MPD" MDS/MPD シンポジウム 招待講演 ヒューストン 2009年4月

20. Kitamura, T. "Lessons from mouse BMT models for leukemia, MDS and MPD" 日米血液腫瘍ワークショップ 招待講演 ハワイ島 2009年3月

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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

ユーイング肉腫における新規膜抗原・分泌蛋白の探索に関する研究

分担研究者 野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 教授

## 研究要旨

ユーイング肉腫 (Ewing sarcoma) は若年者に好発する骨腫瘍である。化学療法の発達により予後は改善されつつあるが、依然不良であり、早期診断が望まれる。当研究ではシグナルシーケンストラップ法を用いて、ユーイング肉腫に特異的な新規膜抗原や分泌蛋白の探索スクリーニングを行い、*ADAMTS4*遺伝子を得た。同遺伝子はユーイング肉腫患者細胞で全例mRNA発現が見られたのに対し、骨肉腫患者細胞では一部の症例のみに見られ、診断への応用が示唆された。

### A. 研究目的

ユーイング肉腫は1921年、ユーイングによって報告された高悪性度小円形細胞肉腫で、5-15歳で発症し、骨肉腫よりも若年者に好発する傾向がある。ユーイング肉腫の細胞起源は間葉系幹細胞、神経系細胞起源などが示唆されているが、詳細は不明である。骨の腫瘍であるにもかかわらず軟部への進展が速く、放射線や化学療法に対する反応はよいが、再発しやすく、骨や肺への転移のため、5年生存率は50%程度と悪性度が高い。ユーイング肉腫は、骨を覆っている軟部組織が厚いため早期発見が困難な場合も多い。このような若年性の難治性悪性腫瘍の克服は我が国における医学の重要課題のひとつであるが、そのためには、まず、早期に正確な診断をつけることが肝要である。

当研究においてユーイング肉腫特異的な分泌蛋白や膜蛋白、即ち、腫瘍マーカーを同定することは、上記目的を達成す

るための第一歩となる。将来的には分子標的療法への応用も視野に入れている。

### B. 研究方法

(レトロウイルスを用いたシグナルシーケンストラップ法によるユーイング肉腫特異的分泌蛋白、膜蛋白遺伝子の同定)

ユーイング肉腫由来のヒト細胞株

(SJES-2, SJES-3, SJES-5, SJES-6, SJES-7, SJES-8) からmRNAを抽出し、レトロウイルスcDNA発現ライブラリーを作製し、当研究代表者らが開発したシグナルシーケンストラップ法 (Kojima T & Kitamura T, Nat Biotechnol 1999) を用いて、膜蛋白、分泌蛋白を探索した。

(単離された遺伝子の発現解析)

得られたクローンのうち、組織特異性において興味深い発現パターンを示した遺伝子に関して、詳細に解析した。具体的には、細胞株、患者病変組織における当該遺伝子の発現を免疫組織染色で解析し、

同時に患者細胞におけるRNA発現もRT-PCRにて解析した。また、ユーイング肉腫において頻繁に観察される*EWS-FLI1*融合遺伝子の発現が当該遺伝子の発現に及ぼす影響に関してもsiRNAを用いて解析した。さらに、ELISAにてユーイング肉腫患者血清や他疾患患者血清における当該遺伝子産物の濃度を解析した。

(倫理面への配慮)

当研究は、三重大大学の研究倫理委員会の承認を得ている (No 1002)。臨床検体を用いる解析に関しては、その指針に従って該当者に説明を行い、同意書に署名をいただいた後、研究を行った。基本的には手術の際に摘出された検体や、検査のために採血された血清を、匿名性を保ったまま、患者様の同意のもとに一部使用させていただいたので、患者様の不利益や危険性はない。

### C. 研究結果

レトロウイルス発現系を用いたシグナルシーケンストラップ法にて80種類256クローンが単離された。これらのうち、明らかに組織特異的発現のない遺伝子や、他の組織の癌細胞で強く発現されているものは除外し、興味深い組織特異的mRNA発現パターンを示す遺伝子に焦点を絞ってさらに解析した。我々が最も注目したのは*ADAMTS4*遺伝子である。*ADAMTS4*は細胞外マトリックス蛋白質を分解するメタロプロテアーゼである。分泌蛋白であり、RT-PCR解析にて、正常マ

ウス組織では脳において特異的に強く発現し、ヒト間葉系幹細胞での発現は検出されなかった。腫瘍細胞株では神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫由来のものでmRNAの強い発現が検出された。細胞株における*ADAMTS4*の蛋白レベルでの発現を免疫組織化学染色法にて解析したところ、ユーイング肉腫細胞株 (SJES-2, SJES-5) では細胞質で発現していたが、骨肉腫細胞株 (MG63, SaOS2) では発現が検出されなかった。免疫沈降-Western法では前者細胞株において細胞抽出液、培養上清の両者から*ADAMTS4*蛋白が検出された。臨床検体を用いた解析では、ユーイング肉腫患者の病変組織25検体中10検体で*ADAMTS4*の発現が観察された。検出されなかった15検体は化学療法にて腫瘍が消失しているものであった。患者細胞におけるRNA発現もRT-PCRにて解析したところ、骨肉腫2/13症例、ユーイング肉腫7/7症例、滑膜肉腫1/4症例、軟骨肉腫3/4症例で陽性であったが、横紋筋肉腫3症例、シュワン細胞腫、類腱腫、脂肪腫計6症例では検出されなかった。

また、ユーイング肉腫細胞株SJES-5において*EWS-FLI1*融合遺伝子の発現をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、コントロールの遺伝子発現に比較して、*ADAMTS4*遺伝子の発現が有意に低下した。

最後に患者血清中における*ADAMTS4*蛋白の検出をELISAにて試みたが、ユーイング肉腫6症例、健常者4例、軟骨肉腫、滑膜肉腫各1症例全てにおいて検出感度以下で

あった。一方、骨肉腫2/3症例、骨線維性異形成1/1症例で陽性であった。

#### D. 考察

上記の実験結果では、*ADAMTS4*の遺伝子発現がRT-PCRで見られないときは、ユーイング肉腫の可能性が低いと言えそうである。これは、骨肉腫との鑑別診断に役立つと思われる。

*ADAMTS4*は分泌蛋白であるが、血清中の蛋白レベルでの存在は、疾患の鑑別診断には役立たないことも判明した。腫瘍組織局所での働きが重要であるのかもしれない。ELISAの感度を改善すれば、予後との関連や病態の反映など、病態マーカー的に利用できるか、さらには、*ADAMTS4*がユーイング肉腫の病因に直接関与するのか、明らかにする必要がある。また、*EWS-FLI1*融合遺伝子産物が直接に*ADAMTS4*遺伝子の発現を調節しているのか、も今後の検討課題である。

#### E. 結論

レトロウイルス発現クローニング法を用いたシグナルシーケンストラップ法にて6種のユーイング肉腫細胞株mRNAの混合物から、80種、256クローンの遺伝子を単離した。そのうちのひとつの遺伝子である*ADAMTS4*の、病変部でのmRNA発現の有無はユーイング肉腫と骨肉腫の鑑別診断に応用できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ikeya M, Fukushima K, Kawada M, Onishi S, Furuta Y, Yonemura S, Kitamura T, Nosaka T, Sasai Y. Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. *Dev Biol* 337: 405-414, 2010.

2) Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 1001-1006, 2009.

3) Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23: 2197-2209, 2009.

4) Watanabe-Okochi N, Oki T, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Harada Y, Harada H, Hayashi Y, Nakajima H, Nosaka T, Kitaura J, Kitamura T. Possible involvement of

RasGRP4 in leukemogenesis. Int J Hematol 89: 470-481, 2009.

5) Kawashima T, Bao YC, Minoshima Y, Nomura Y, Hatori T, Hori T, Fukagawa T, Fukada T, Takahashi N, Nosaka T, Inoue M, Sato T, Kukimoto-Niino M, Shirouzu, M, Yokoyama S, Kitamura T. A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. Mol Cell Biol 29: 1796-1813, 2009.

## 2. 学会発表

1) Ono R, Masuya M, Miyata E, Nakajima H, Kamisako T, Ito M, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. (2009年10月1日 横浜)

Malignant transformation by *MLL-ENL* fusion gene arises selectively from long-term hematopoietic stem cells. 第68回日本癌学会学術総会.

2) 小埜良一、榊屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉. (2009年10月24日 京都)

*MLL-ENL*融合遺伝子は造血幹細胞のみを標的として形質転換を生じる. 第71回日本血液学会学術集会.

3) 北川敬之、坂口直、仁儀明納、西村廣明、伊奈田宏康、駒田洋、鶴留雅人、野

阪哲哉、保富康宏、河野光雄. (2009年10月26日 東京)

パラインフルエンザ2型ウイルスベクターを用いたアトピー性疾患に対する遺伝子免疫療法. 第57回日本ウイルス学会学術集会.

4) 西尾真智子、大塚順平、鶴留雅人、野阪哲哉. (2009年10月27日 東京)

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) P蛋白上の核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) の同定. 第57回日本ウイルス学会学術集会.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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

多種がんの高集積アレイを用いた分子標的抗体薬候補の特異性検討、および全身がんにおける横断的発現分布の観察と機能の評価に関する研究

分担研究者 福岡 順也 富山大学附属病院・外科病理学講座 客員教授

## 研究要旨

がんによる死亡は現在、死因の一位を占めるが、今後も高齢化に伴い、その割合は増加することが予想される。症状の出にくい癌では、発見時に進行癌である可能性が高く、その早期診断早期治療には、有効なバイオマーカーの発見と治療標的薬の開発が望まれる。本研究では、早期診断が難しく予後が悪い膵臓がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、および日本に多い胃がん、増加傾向にある大腸がん、食道がん、さらにはがん以外の他疾患との区別が難しい前立腺がん、膀胱がん、腎臓がんなどのマーカー分子を用いた血清診断を確立するため、これらの組織型を含む組織アレイの作成を目指し、これらを用いて、シグナルシークエンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クロンの cDNA から作成された、がん由来分子に対するモノクローナル抗体で、効率よく抗腫瘍活性を有するものにおいて、ホルマリン固定、パラフィン切片での染色条件を模索し、特異的な染色性が確認されたものにおいて、組織上での組織アレイ上での腫瘍細胞の認識、腫瘍細胞意外の組織上での局在などを確認する。

本年度は、必要な腫瘍組織型コホートの選定、一部の組織アレイの作成、過去に作成された組織アレイコホートによる本検討用の新しいブロックの作成を主な目標とした。また、いくつかの候補因子に対する抗体が SST-REX 法にて作成され組織上で染色条件の検討を行い、14 種類の一般的な組織型を有する組織アレイにて染色、解析を行った。本年度では、染色性において特異度の高いものは得られていない。

## A 研究目的

今後のがん治療は分子標的薬が主体となることに何の疑いもない。抗体薬はそういった分子標的薬の中心的存在の一つであるが、新規に開発された抗体が抗体薬として受け入れられるためには、特異的で高感度な腫瘍抑制効果が必要である。開発される抗体がどのような頻度で患者の病変部のみを認識するかを検討することが重要であるが、これには、組織アレイを使用した研究が大きな役割を果たすと考えられる。我々は今回、SST-REX 法にて作製された新規薬の候補抗体において、主要な癌腫における反応性の分布と特異性を我々独自の集積組織

アレイによって検討する。

## B 研究方法：

＜サンプリングと組織アレイ作成＞

富山大学附属病院の病理アーカイブより 1150 症例が収集され、組織アレイ用アーカイブとして整理されているが、これに加え、96 症例の脳腫瘍を集積、食道癌、子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部がんなどの扁平上皮癌 350 例を収集した。これらから径 0.6mm コアの組織片を抜き出し、アレイブロックへ移植し、組織アレイブロックを作成した。テープトランスファー法にて 4 $\mu$  厚の切片を薄切し、HE 染色および免疫染色を行っ

た。

#### <抗体の選定>

抗体は、SST-REX 法にて研究代表者の北村らが作製した抗体のうち、ACT00056-0045、ACT00064-0004、ACT00064-0041、ACT00064-0052、ACT00064-0195 を使用した。組織アレイの品質評価を行うため、vimentin, CD34, Keratin の染色を行った。

#### <染色性の検証>

抗体の免疫染色における特異性は、in vitro でカルチャーした cell line をホルマリン固定し、パラフィンに包埋したセルブロックを使用した。細胞株の wild type と 抗原を transfection した細胞株を使用してセルブロックを作製し、染色性を比較した。

#### <組織アレイの評価>

組織アレイの評価では、陽性を示す細胞の分布を Distribution Score (DS) とし、強度を Intensity Score (IS) とした。DS は無し(0%)=0、1-50%=1、51-100%=2 と評価し、IS は、シグナルなし=0、弱いシグナル=1、中等度のシグナル=2、強いシグナル=3 とスコアし、IS と DS の和を Total Score (TS) とし、TS2 と TS3 を陽性と考えた。

#### 倫理面への配慮：

本研究のプロトコルは富山大学倫理委員会にて承認されている。個人情報 は匿名化を経て、連結不可能な試料 (C 試料) として保存されている。

## C. 研究成果

がん細胞株のシグナルシーケンストラップから、がん細胞由来の膜蛋白質および分

泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンよりモノクローナル抗体が作製されたが、それらのうち、5 種の抗体において、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織での免疫染色への染色性を検討し、染色の観察された 1 つの抗体において、14 の主な癌腫における発現の観察を行った。また、以前にオーガナイズされてカバーされていない組織型のがん (食道がん、グリオーマを中心とする脳腫瘍) における組織アレイ作製のため、病理アーカイブ、臨床アーカイブを検索し、臨床情報の収集、ブロック、スライドの評価を行った。また、腫瘍の染色ヘテロ性を検討する必要があると考え、ヘテロ性をよりカバーする可能性の高いスパイラル組織アレイを、ヘテロ性の高いことが知られている肺腺癌において作製した。

### 1. 組織アレイ作製

我々は、昨年度までに既に 14 種類の主要な各ガン組織型をカバーする組織アレイを作製している。これには、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌、甲状腺癌、胆道癌、肝癌、腎癌、胃がん、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮体癌、膀胱癌が含まれている。SST-REX 法による膜蛋白質・分泌蛋白質の解析より作製された抗体のヒト組織上における発現を順次網羅的に観察するために、不足している脳腫瘍 (とくにグリオーマ)、食道癌における組織アレイ作製を目指し、症例の収集、HE スライドの検鏡、ブロックの評価、臨床情報の取得を行った。その結果、脳腫瘍では 96 症例の脳腫瘍が収集された。食道癌、子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部がんなどの扁平上皮癌 350 例を収集した。

## 2. 作製されたモノクローナル抗体の免疫染色特異性評価

作製された抗体のうち、ACT00056-0045、ACT00064-0004、ACT00064-0041、ACT00064-0052、ACT00064-0195 において、染色条件の決定を行った。それぞれの蛋白をトランスフェクションによって過剰発現させた細胞株と、発現させていない親細胞株を細胞ブロックにし、ホルマリン固定を行い、パラフィン包埋し、細胞アレイブロックへの移植を行った。免疫染色にて抗体希釈濃度をふり、抗原賦活の温度、PHを調整し、染色性の調整を行った。残念ながら、5抗体いずれにおいても、特異性をしめす陽性 vs. 陰性の染色分けを行うことが出来なかった。

## D. 考察

SST-REX 法により作成された抗体の評価において、本年度、特異的な染色性を示す抗体はえられず、それらの各種がんにおける発現の解析は行わなかったが、作製される抗体を順次評価できる体制が整った。

## E. 結論

本年度は新規に得られる抗体にたいして、その発現を各種がんで検討し、評価を行う検出系の作成を行った。来年度は順次作製された抗体の評価を行い、バイオマーカー候補、分子標的薬の選定を行いたい。

## F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshizawa A., Fukuoka J., Shimizu S., Shilo K., Franks TJ., Hewitt SM., Fujii T., Cordon-Cardo C., Jen J., Travis WD.: Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 16(1): 240-8, Epub 2009.
- 2) Kageyama-Yahara N., Suehiro Y., Maeda F., Kageyama S., Fukuoka J., Katagiri T., Yamamoto T., Kadowaki M.: Pentagalloylglucose down-regulates mast cell surface FcepsilonRI expression in vitro and in vivo. FEBS Lett, 584(1): 111-8, Epub 2009.
- 3) Kadota M., Sato M., Duncan B., Oshima A., Yang HH., Diaz-Meyer N., Gere S., Kageyama S., Fukuoka J., Nagata T., Tsukada K., Dunn BK., Wakefield LM., Lee MP.: Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA. Cancer Res, 69(18): 7357-65, 2009.
- 4) Tsuna M., Kageyama S., Fukuoka J., Kitano H., Doki Y., Tezuka H., Yasuda H.: Significance of S100A4 as a prognostic marker of lung squamous cell carcinoma. Anticancer Res, 29(7): 2547-54, 2009.
- 5) Ozbudak IH., Shilo K., Tavora F., Rassaei N., Chu WS., Fukuoka J., Jen J., Travis WD., Franks TJ.: Glucose transporter-1 in



pulmonary neuroendocrine carcinomas: expression and survival analysis. *Mod Pathol*, 22(5): 633-8, 2009.

- 6) 小林直子, 岩田 実, 小橋親晃, 宇野立人, 石木 学, 薄井 勲, 山崎勝也, 浦風雅春, 小林 正, 戸辺一之, 林 央周, 遠藤俊郎, 笹岡利安, 福岡順也, 加藤弘巳, 沖 隆: 間脳・下垂体 高分子量 ACTH の産生を認めた下垂体 macroadenoma による Cushing 病の 1 例. *ホルモンと臨床*, 57: 75-80, 2009.
- 7) 近石泰弘, 井上政昭, 宗 哲哉, 川口誠, 福岡順也, 安元公正: ラブドイド形質を伴う肺大細胞癌の一例. *日本呼吸器外科学会雑誌*, 23, 183-189, 2009.

## 2. 総説

- 1) 清水重喜, 福岡順也: 間質性肺炎の病理組織像と考え方. *炎症と免疫*, 17: 666-674, 2009.
- 2) 谷 洋一, 福岡順也: 組織マイクロアレイを利用した自己抗体によって認識される腫瘍関連抗原の免疫組織化学的解析. *BIO Clinica*, 24: 1086-1089, 2009.
- 3) 岩田安弘, 江頭玲子, 田中伴典, 福岡順也: 腫瘍性疾患 上皮性 (原発性) 腫瘍 乳頭腫. *日本臨床, 別冊呼吸器症候群 III*, 60-64, 2009.
- 4) 石澤 伸, 堀 隆, 福岡順也: 診断の進歩 バーチャルスライドとその有用性. *Annual Review 呼吸器* 2009, 211-219,

2009.

## 3. 学会発表

- 1) Iinuma Y., Kashima Y., Ishizawa S., Hayashi R., Tanaka T., Iwata Y., Kageyama S., Hofer M., Fukuoka J.: IgG4 Plasmacytosis Is a Common Histological Association in Aspergillosis. *USCAP 2009 Annual Meeting*, 2009, 3, 7-13, Boston.
- 2) Hofer MD., Kageyama S., Tanaka T., Nakagawa K., Hori T., Chirieac LR., Fukuoka J.: A Paradigm for Biomarker Discovery Combining Expression Array Data Mining and Tissue-Based Validation. *USCAP 2009 Annual Meeting*, 2009, 3, 7-13, Boston.
- 3) Maruno T., Tanaka T., Hofer MD., Iinuma Y., Nakagawa K., Hori T., Fukuoka J.: Aberrant Co-Expression of D2-40 and CD31/CD34 in Vascular Neoplasm Is an Indicator of Aggressive Behavior. *USCAP 2009 Annual Meeting*, 2009, 3, 7-13, Boston.
- 4) Egashira R., Tanaka T and Fukuoka J.: Differences of carbon dust location in the secondary lobule between upper and lower levels of normal lung -possible clue to understand diffuse lung disease. *PPS 2009 Biennial Meeting*, 2009, 6, 24-26, Oregon.
- 5) Fukuoka J.: Update on Non-Neoplastic Lung Diseases I. *PPS Biennial Meeting 2009*, 6, 24-26, Oregon.

- 6) Fukuoka J.: Two Cases of Idiopathic Pleuroparenchymal Fibroelastosis with Upper Lobe Predominance. PPS Biennial Meeting 2009, 6, 24-26, Oregon.
- 7) Fukuoka J.: Lymphangiomatosis. PPS Biennial Meeting 2009, 6, 24-26, Oregon.
- 8) Kitano H., Chung J-Y., Ylaya K., Takikita M., Fukuoka J., Tezuka N., Stephen M. Hewitt: The Combination of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, Phospho-MAPK and EGFR Predicts Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. IASLC 13th World Conference on Lung Cancer, 2009, 7, 31-8, 4, Francisco.
- 9) 熊副洋幸, 江頭玲子, 永松佳憲, 若松謙太郎, 田口和仁, 南 貴博, 永田忍彦, 工藤 祥, 福岡順也: Reversed-halo sign を呈した小型肺腺癌の 1 例. 第 50 回日本肺癌学会総会, 2009, 11, 12-13, 東京.
- 10) 宮園卓宜, 和田暁法, 米澤和美, 村上純, 石澤 伸, 福岡順也, 中川泰三, 井上 博, 高野康雄, 杉山敏郎: 生体腎移植後 7 年目に発症し, 高カルシウム血症を合併した EB ウィルス非関連 DLBCL の一例. 第 71 回日本血液学会学術集会, 2009, 10, 23-25, 東京.
- 11) 嶋田 裕, 奥村知之, 大澤宗士, 関根慎一, 澤田成朗, 長田拓哉, 福岡順也, 塚田一博: 新しく樹立した食道小細胞癌細胞株について. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009, 10, 1-3, 横浜.
- 12) 安藤秀信, 尾崎秀徳, 白川彩弓, 板谷純, 福岡順也, 南 優子, 野村将春, 野口雅之, 梅谷内晶, 佐藤 隆, 池原讓, 成松 久: 肺腺癌細胞株および肺腺癌組織におけるシアリル Tn キャリアタンパク質の同定. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009, 10, 1-3, 横浜.
- 13) 鈴木賀代, 福岡順也, 金森昌彦, 安田剛敏, 堀 岳史, 木村友厚: 骨肉腫における tissue microarray を用いた網羅的蛋白発現解析による予後マーカーの検討. 第 82 回日本整形外科学会学術総会, 2009, 5, 14-17, 福岡.
- 14) 正木康晶, 猪又峰彦, 岡澤成祐, 神原健太, 山田 徹, 三輪敏郎, 林 龍二, 松井祥子, 戸邊一之, 菓子井達彦, 温井孝昌, 福岡順也: 小細胞肺癌と大細胞神経内分泌癌との鑑別が困難であった Lambert-Eaton 症候群の 1 例. 第 60 回日本肺癌学会北陸支部会; 2009, 7, 4, 福井.
- 15) 山田 徹, 岡澤成祐, 猪又峰彦, 正木康晶, 神原健太, 三輪敏郎, 林 龍二, 松井祥子, 戸邊一之, 菓子井達彦, 福岡順也: 多発性空洞陰影を呈した肺腺癌の 1 例. 第 60 回日本肺癌学会北陸支部会, 2009, 7, 4, 福井.
- 16) 長谷川徹, 中島彰俊, 島 友子, 橋本誠司, 大洞由紀子, 日高隆雄, 齋藤 滋, 野本一博, 福岡順也: 子宮内膜ポリー

- プに認められた Endometrial intraepithelial carcinoma (EIC) の1例. 第47回日本癌治療学会学術集会, 2009, 10, 22-24, 横浜.
- 17) 山本 優, 土岐善紀, 峠 正義, 津田基晴, 本間崇浩, 仙田一貴, 三崎拓郎, 猪又峰彦, 山田 徹, 河岸由紀男, 林龍二, 三輪敏郎, 菓子井達彦, 福岡順也: 若年者 (23歳) 肺癌の1例. 第59回日本肺癌学会北陸支部会, 2009, 2, 14, 金沢.
- 18) 渋谷和人, 福岡順也, 藤井拓人, 酒井秀紀, 塚田一博: ヒト肝細胞癌における Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3-isoform の発現. 第64回日本消化器外科学会総会, 2009, 7, 16-18, 大阪.
- 19) 中川泰三, 安田佐智子, 大原麻衣子, 今立真由美, 広羽可奈呼, 劉 和幸, 小池 勤, 鍵谷聡志, 供田文宏, 井上博, 宮園卓宜, 杉山敏郎, 福岡順也: 高カルシウム (Ca) 血症と血圧低下を認め, 持続的血液濾過 (CHF) 下に化学療法を施行した Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLPD) の一例. 第54回日本透析医学会学術集会・総会, 2009, 6, 5-7, 横浜.
- 20) 村上 純, 鈴木庸弘, 藤波 斗, 宮園卓宜, 和田暁法, 米澤和美, 杉山敏郎, 福岡順也, 石澤 伸, 中村栄男: 感染性単核球症様の症状を呈した Classical Hodgkin lymphoma, nodular sclerosis. 第49回日本リンパ網内系学会総会, 2009, 7, 9-11, 兵庫.
- 21) 石田正之, 中間貴弘, 葛籠幸枝, 円山英昭, 福岡順也, 古本朗嗣, 土橋佳子, 森本浩之輔, 有吉紅也: 悪性関節リウマチ (MRA) 治療中に急速な経過で発熱・呼吸不全を呈し死亡した, 胸部多発結節影症例の一剖検例. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 2009, 6, 12-14, 東京.
- 22) 福岡順也, 江頭玲子, 田中伴典: 急速進行性の間質性肺炎の病態をめぐって急速進行性の間質性肺炎と病理. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 2009, 6, 12-14, 東京.
- 23) 影山俊一郎, 飯沼ゆり子, 田中伴典, 江頭玲子, 鈴木賀代, 加島志郎, 丸野崇志, 福岡順也: バイオインフォマティクスと組織アレイを用いた予後・治療効果予測因子の探索. 第98回日本病理学会総会, 2009, 5, 1-3, 京都.
- 24) 一松啓介, 飯田裕朗, 森井章裕, 明石拓也, 藤内靖喜, 水野一郎, 布施秀樹, 福岡順也, 奥村昌央: Mixed epithelial and stromal tumor of the kidney の1例. 第97回日本泌尿器科学会総会, 2009, 4, 16-19, 岡山.
- 25) 野本一博, 堀 隆, 中川加奈子, 木屋千恵子, 福岡順也, 三上芳喜: 膈断端に発生した内膜症が発生母地と考えられる Microglandular adenocarcinoma の1例. 第50回日本臨床細胞学会総会.

- 2009, 6, 26-28, 東京.
- 2009, 2, 7, 高知. (招待講演)
- 26) 安藤裕貴, 河岸由紀男, 猪又峰彦, 山田 徹, 三輪敏郎, 林 龍二, 戸邊一之, 菓子井達彦, 松井祥子, 野本一博, 福岡順也, 土岐善紀: 血管肉腫を疑われシスプラチンとドセタキセルによる治療が奏効した1例. 第58回日本肺癌学会北陸支部会, 2008, 7, 12, 富山.
- 27) 山本 優, 土岐善紀, 峠 正義, 津田基晴, 仙田一貴, 三崎拓郎, 菓子井達彦, 三輪敏郎, 河岸由紀男, 林 龍二, 福岡順也: 分岐部切除を行った肺癌の1例., 2008, 7, 12, 富山.
- 28) 福岡順也: 細気管支病変の病理像. 静岡県総合画像診断研究会, 2009, 1, 10, 静岡. (招待講演)
- 29) 福岡順也: Pemetrexed と肺癌のHistology. Histology NSCLC Advisory Board Meeting, 2009, 1, 17, 東京. (招待講演)
- 30) 福岡順也: 間質性肺炎の病理診断とアプローチ. 第69回山梨ぶどうの会, 2009, 1, 26, 山梨. (招待講演)
- 31) 福岡順也: 組織アレイによるバイオバイオマーカーの検証・がん個別化医療にむけて. がんセンタープロテオミクス, 2009, 2, 3, 東京. (招待講演)
- 32) 福岡順也: 気道中心性肺病理変の病理. 第15回高知びまん性肺疾患研究会,
- 33) 福岡順也: 特発性間質性肺炎の病理. 第17回佐賀・筑後びまん性肺疾患研究会, 2009, 4, 10, 佐賀. (招待講演)
- 34) 福岡順也: 急速進行性の間質性肺炎の病態をめぐって. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 2009, 6, 12-14, 東京. (招待講演)
- 35) 福岡順也: 化学療法に対する病理医の新たな役割. 北陸肺癌講演会, 2009, 8, 7, 金沢. (招待講演)
- 36) 福岡順也: 肺癌の化学療法に対する病理医の役割. 非小細胞肺癌学術講演会, 2009, 8, 29, 名古屋. (招待講演)
- 37) 福岡順也: 病理医の立場から. 第48回日本臨床細胞学会秋期大会ランチョンセミナー2, 2009, 10, 31, 福岡. (招待講演)
- 38) 福岡順也: 組織アレイの研究の現状と今後の展開. 鳥取大学染色体研究センターセミナー, 2009, 11, 10, 鳥取. (招待講演)
- 39) 福岡順也: びまん性肺疾患における病理診断の一致と不一致. 第18回香川びまん性肺疾患研究会, 2009, 11, 14, 香川. (招待講演)
- 40) 福岡順也: 化学療法における病理医の役割 - 肺癌の組織型と間質性肺炎につ