

201019024A

別添1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、
免疫遺伝子治療に資する研究 (H22-3次がん一般-007)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成22(2011)年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告		
ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、 免疫遺伝子治療に資する研究-----	1	
吉田 輝彦		
II. 分担研究報告		
1. 上部消化管がんの予知医療開発のための病理学的解析-----	16	
大上 直秀		
2. 固形がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発-----	20	
菅野 康吉		
3. 肺がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発-----	23	
村上 善則		
4. 固形がんの免疫遺伝子・細胞複合療法の開発-----	28	
青木 一教		
5. がんの遺伝子・核酸医薬の開発-----	33	
金田 安史		
6. 核酸医薬によるがん診断・治療標的の開発-----	35	
加藤 尚志		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	40	
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----		別添

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

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、
免疫遺伝子治療に資する研究

研究代表者 吉田 輝彦 立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野 分野長

研究要旨 ゲノム・遺伝子解析技術や核酸導入技術、腫瘍免疫学の進歩を、より優れたがんの診断・治療法開発に橋渡すことを目的に研究を行い、以下の成果を得た。①食道扁平上皮がん治療前生検の遺伝子発現プロファイルは化学放射線治療の予後因子として有用であったが、遺伝子発現に基づくサブタイプ分類の確立によるさらなる精度向上が示唆された。サイトケラチン7陽性食道がんは有意に予後不良であった。腸型粘液形質を示す胃がんにおいて活性化している転写因子 CDX2 が誘導する遺伝子として薬剤耐性遺伝子 MDR1 を同定した。②線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)チロシンキナーゼ阻害剤 PD173074 は G1/G0 停止とアポトーシス誘導を介して FGFR3 遺伝子変異陽性膀胱がん培養細胞の増殖及び Scid マウス xenograft の造腫瘍性を抑制した。③CADM1 が小細胞肺がん・ATL では過剰発現し、浸潤や悪性化を促進すること、がん特異的スプライシング・バリエントを発現することを見出した。CADM1 を分子標的とする血清診断法や転移抑制薬の開発が期待される。④骨軟部肉腫に対するインターフェロン遺伝子導入と自家造血幹細胞移植の複合療法の効果と安全性を示した。自家造血幹細胞移植後に腫瘍内で制御性 T 細胞が抑制されることを明らかにした。⑤不活性化センダイウイルスを基にした HVJ-E (hemagglutinating virus of Japan envelope) に Eg5 siRNA を封入したベクターの単回投与はグリオーマ細胞に強いアポトーシスを誘導し、脳内接種モデルにおいて腫瘍の完全消失等の著明な抗腫瘍効果と生存率向上を示めた。⑥固形がんが発現している miR-210 の発現が HIF-1α によって誘導され、トランスフェリン受容体や鉄-硫黄クラスター形成の分子経路を制御することを見出し、新たなバイオマーカーあるいは治療標的となる可能性を示した。

研究分担者

大上 直秀 広島大学大学院
講師
菅野 康吉 栃木県立がんセンター研究所
技幹
村上 善則 東京大学医科学研究所
教授
青木 一教 国立がん研究センター研究所
分野長
金田 安史 大阪大学大学院
教授
加藤 尚志 早稲田大学大学院
教授

A. 研究目的

ゲノム解析や遺伝子・核酸導入技術、腫瘍免疫学等の進歩に基づき、個々の症例に最も適したがん診療法確立を目的に以下のサブテーマを設定し情報・技術の交換を行いつつ総合的に研究を推進する。

【A. ゲノム等解析情報に基づく予知医療の開発】

①集学的治療が行われる上部消化管がん(食道がん・胃がん)を例として、奏効性や予後予測に資する分子情報を同定する。先行する前向き臨床研究において、化学放射線治療(CRT)前生検試料の遺伝子発現情報を基に、治療効果を予測する技術を開発してきた。また、術後の予後と相関する分子も同定している。それらの分子情報の評価・検証と、予後不良症

例に対する新規治療標的候補となる遺伝子経路を同定する。

胃がんに関しては、SAGE法を用いた網羅的遺伝子発現解析から、腸型粘液形質を有する症例は5-FUに対し抵抗性であることを示してきた。腸型粘液形質の発現には、転写因子CDX2の発現が重要であり、CDX2により誘導される遺伝子の探索を行い、薬剤耐性との関連を解析する。

②表在性膀胱がんでは線維芽細胞増殖因子受容体3型(FGFR3)をコードするFGFR3遺伝子の点突然変異が50-70%程度の症例で認められがんの発生に関わる主要な活性化変異と考えられる。FGFRに特異的なチロシンキナーゼ阻害剤を用いた膀胱がんに対する分子標的治療の可能性について検討する

③肺がん、泌尿器がん、ATLなど種々の腫瘍の発生、進展に関わり、診断、治療の標的分子候補となる分子群を同定し、診断マーカー、治療標的として確立することを研究目的とする。特に小細胞肺がんの診断マーカーとしての細胞接着分子CADM1の確立、腎腎淡明細胞がんの予後予測マーカーの同定、ATLの治療標的分子について検討する。

【B. 免疫遺伝子・核酸治療の開発】

④インターフェロン遺伝子治療と、新鮮な免疫系を再構築して腫瘍特異的免疫反応を高める自家造血幹細胞移植を組み合わせる複合療法は、両者の弱点を補完し、従来の限界を打破できる戦略として画期的な治療法である。国立がん研究センターに蓄積された基礎研究と造血幹細胞移植の臨床実績・研究成果を背景に、骨肉腫等固形がんに対する免疫遺伝子・細胞複合療法を開発し、自家造血幹細胞が腫瘍抑制環境を抑える機序の解明を進めた。

⑤不活化ウイルス粒子を利用したHVJ envelope vector(HVJ-E)は、それ自身が抗腫瘍作用を有する。HVJ-Eに遺伝子や合成核酸を封入してその抗腫瘍機能の増強を図り、新たながん治療法を確立する。

⑥がんとその微小環境の関係はがんの悪性化に重

要な役割を果たしているが、特に低酸素環境下におけるがん細胞の挙動は転移や薬剤耐性と関わっている。低酸素環境下において発現が上昇するmiR-210とがん細胞の関係を解明し、がん治療における新たな診断法に結びつくバイオマーカーあるいは治療標的分子としての有用性を検討する。

B. 研究方法

上記研究目的に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①国立がん研究センター東病院において、2005年6月より2009年4月までに274例から治療前生検標本の提供を受け、前治療のないStageII-III食道がんCRT89例および手術71例を登録し、全ての症例のマイクロアレイ解析によるゲノム網羅的遺伝子発現プロファイルを取得した。治療プロトコールは5-FU(1000mg/m²/day; day1-4, 29-32) + CDDP(75mg/m²/day; day1, 29)と放射線治療(総線量50.4Gy)であった。CRT後の治療効果をCRT終了後のCR・nonCRおよび1年後のCR継続の有無により感受性・非感受性と定義し、それを予測する判別器を作成、評価した。

また、広島大学病院で術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん230例を材料に、免疫染色でサイトケラチン7の発現を解析した。腫瘍組織全体の10%以上が染色された症例を陽性と判定し、サイトケラチン7の発現と予後との関連、補助化学療法の効果との関連を解析した。

胃がんについては、転写因子CDX2の標的遺伝子を同定するため、大腸がん細胞株HT-29にレトロウイルスを用いてCDX2遺伝子を導入した。CDX2高発現株の遺伝子発現をGene chipで解析し、薬剤耐性遺伝子であるMDR1に注目した。MDR1の発現をRNAプロット・ウェスタンブロット法で、MDR1プロモーター領域のCDX2の結合をクロマチン免疫沈降法で解析した。胃がん組織におけるCDX2とMDR1の免疫染色を行い、共局在を解析した。CDX2高発現株を対象に各種抗がん剤で処理し、薬剤耐性を

MTT アッセイで定量した。

②8種類の膀胱がん培養細胞株を用いて、FGFRに特異的なチロシンキナーゼ阻害剤PD173074による細胞増殖抑制効果をWST-8を用いた細胞増殖アッセイで検討した。FGFR3タンパク質の発現、細胞質ドメインのリン酸化、Ki67・p27/Kip1・活性化 caspase-3の発現、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行った。さらにPD173074による細胞増殖抑制効果が認められた細胞株2種類をScidマウスに移植して作成したxenograftに対してPD173074を経口投与し、腫瘍の増殖抑制効果を検討した。

③小細胞肺癌(SCLC)培養細胞あるいはがん組織に対するRNAプロット解析、RT-PCR、抗CADM1抗体を用いた免疫組織染色などを用いて、CADM1のスプライシング・バリエーション(8AB型)の発現を解析した。SCLC培養細胞へのCADM18ABのcDNAの導入、あるいはsiRNAによる発現抑制により、CADM18ABの機能を解析した。さらに、CADM18ABの培養上清での検出を行なった。

腎淡明細胞がんに対して細胞接着分子CADM1-4と、その細胞内結合分子4.1群タンパク質の免疫組織染色により、腎組織で発現する分子群を解析した。また、ウェスタンブロット解析により、タンパク質の結合を解析した。さらに、腎がん培養細胞にCADM4 cDNAを導入し、ヌードマウス皮下に移植することにより、腫瘍形成能を検討した。

ATL腫瘍細胞(臨床試料)並びにHTLV-1感染細胞におけるCADM1結合タンパク質候補を、モチーフ解析、免疫沈降法、GSTプルダウン法により解析した。ATLリンパ節組織を用いた免疫組織染色により、ATL症例におけるTiam1の発現亢進を検討した。

④骨軟部肉腫に対する複合療法の検討を、マウスの自家骨髄移植モデルを用いて行った。致死量(9G)の放射線照射後に、同系マウスの骨髄細胞とリンパ球を移入して自家造血幹細胞移植を行った。骨髄移植と同時にマウスの足に同系の骨肉腫細胞を接種した。ついでIFN-β発現プラスミドを正電荷リポソーム

(DMRIE/DOPE)と混合して腫瘍内に直接注入し、腫瘍の大きさを経時的に測定した。また、2週間以内に自然にマウスの肝や肺に遠隔転移を形成するLM8細胞にluciferase遺伝子を導入し、遠隔転移に対する抑制効果をIVISイメージング装置により評価した。

自家造血幹細胞移植後に、皮下腫瘍内および脾臓内のCD4、CD8、FoxP3細胞の経時変化を免疫染色やフローサイトメーターを用いて解析した。また、EGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞やリンパ球を用いて移植を行い、腫瘍部や脾臓におけるリンパ球の由来を解析した。

⑤PKH26で標識したHVJ-Eをヒトグリオーマ細胞株に作用させ、その親和性を調べた。Cy3でラベルしたsiRNAを導入して細胞内導入効率を調べた。HVJ-EへAkt、Mcl1、Eg5のsiRNAを封入し、これをヒトがん細胞株に導入し、細胞増殖能をMTSアッセイで評価しアポトーシスをFACSで解析した。グリオーマU118MG細胞由来のマウス皮内腫瘍や脳内接種モデルを作成し、siRNA封入HVJ-Eの投与を行い腫瘍増殖・生存率を評価した。

⑥ヒト前立腺がん由来PC3細胞、ヒト乳がん由来MCF7細胞、ヒト胎児腎細胞由来HEK293細胞を対象にしmiR-210の転写一次産物pri-miR-210の発現を調べ、低酸素ストレスによりmiR-210の発現が顕著であったMCF7細胞株を主に用いて解析を進めた。低酸素ストレスは、1%酸素嫌気細胞培養24時間を基本とした。さらにsiRNAを用いてHIF-1αの発現を減少させた後、miR-210の発現をリアルタイム定量PCR法により測定した。Target Scanを用いて、miR-210の標的候補遺伝子を絞り込み、ルシフェラーゼ下流に各遺伝子の3'UTRを組み込み、評価した。固形腫瘍細胞株におけるmiR-210の発現と検索された候補遺伝子との発現の関連について、miR-210を強制発現させた細胞を作成し、標的遺伝子の発現をウェスタンブロット法で確認した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料の生殖細胞系列の遺伝子解析が含まれる研

究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、それ以外の臨床試料等の観察研究は「疫学研究に関する倫理指針」、動物実験は施設の動物実験倫理規程など、それぞれの研究の種類に応じて求められる国や施設の指針・規程に従い、施設の倫理審査委員会の審査や機関の長の承認を受ける等の上、研究を行った。

C. 研究結果

「A. 研究目的」に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①CRT 終了後の治療効果と遺伝子発現プロファイルが対応可能で、かつマイクロアレイデータの品質が確保された 85 例を学習セットと検証セットに分けて判別器の作成と評価を行なった。検証セットにおいて CR および感受性ともに、感度約 80%・特異度約 70%で予測可能な判別器が得られた。しかし、選抜された遺伝子の発現量と症例の教師あり (supervised) の 2 次元クラスター解析図を分析すると、分類不能な例が 20-30%存在し、適切に分類された症例でも、いくつかのサブタイプに分かれることが示された。そこで、CRT 85 例について遺伝子発現プロファイルによる教師なし (unsupervised, USV) クラスターリングによる class discovery を試みたところ、6 つのサブタイプに分けられた。臨床データが得られた 82 例の 3 年生存率は全体で 44%だったのに対し、生存率 82%の予後良好のサブタイプ-2 (23 人、28%) と、0%の予後不良のサブタイプ-1 (12 人) が見出された。次に、上述の USV クラスターリング解析において CRT85 例と手術 71 例で、再現性よく現れる遺伝子クラスターを基に intrinsic subtyping を行ったところ、上記のサブタイプ-2 と 19 人の重なりがあるサブタイプ-B (28 人、33%) が見出された。このサブタイプに分類された症例の 80%が 3 年以上生存した。また上記のサブタイプ-1 の 12 人が全員含まれていたサブタイプ-A (40 人、47%) も見出された。このサブタイプに分類された症例の 88%は 1 年以内に再発した。以上の結果より、遺伝子発現プロファイルによって、これらの予後良好または不良サブタイプを再現性よく分類できることが示唆された。

食道扁平上皮がん 230 例を対象にサイトケラチン 7 の免疫染色を施行した結果、サイトケラチン 7 陽性例は 21 例 (9%) に見い出され、有意にリンパ節転移を有する症例が多かった。全症例 (ステージ 0 から III、根治切除) で予後との関連を解析した結果、サイトケラチン 7 陽性例の 5 年生存率は 40%であったのに対し、陰性例では 70%であり、陽性例は有意に予後不良であった ($P=0.0047$)。サイトケラチン 7 の発現、ステージ、分化度、補助化学療法の有無を変数として多変量解析を行った結果、サイトケラチン 7 の発現 (ハザード比 (HR)=2.27、 $P=0.0297$)、ステージ (HR=17.85、 $P<0.0001$) が独立した予後予測因子であった。

ステージ II と III の症例 ($n=129$) のうち、補助化学療法が施行された症例 ($n=65$) でサイトケラチン 7 の発現と予後との関連を解析したが、5 年生存率に差はなかった ($P=0.8624$)。しかしサイトケラチン 7 陽性例に限って補助化学療法の有無と予後との関連を解析した結果、補助化学療法が施行された症例の 5 年生存率は 50%であったのに対し、補助化学療法が施行されなかった症例の 5 年生存率は 0%であり、相関が示唆された ($P=0.1629$)。一方、サイトケラチン 7 陰性例では補助化学療法の有無により、予後の改善効果は認められなかった ($P=0.6782$)。

胃がんにおける腸の転写因子 CDX2 により誘導される遺伝子として、薬剤耐性遺伝子である MDR1 に注目し RNA ブロット・ウェスタンブロットで MDR1 の発現を検討したところ、CDX2 高発現株において、MDR1 の発現上昇が認められた。MDR1 のプロモーター配列中には CDX2 のコンセンサス配列が 4 ヶ所見出された。CDX2 抗体によるクロマチン免疫沈降から、細胞内において CDX2 が MDR1 のプロモーター領域に結合していることが示された。胃がん切除組織 214 例を搭載した tissue microarray を用いて CDX2 と MDR1 の発現を検討した結果、CDX2 は 71%、MDR1 は 67%の症例で陽性であり、CDX2 陽性例は有意に MDR1 陽性であった ($P<0.0001$)。CDX2 高発現株を用いて、各種抗がん剤の耐性を MTT アッセイで検討したところ、CDX2 高発現株はパクリタキセルに対し抵抗性を

示したが 5-FU に対する抵抗性に変化はなかった。

②FGFR3 遺伝子の exon 7 または 10 に変異を認める膀胱がん培養細胞株では PD173074 投与による細胞増殖抑制効果を認めた。しかし FGFR3 遺伝子の exon15 に変異を持つ一細胞株 (J82) 及び FGFR3 遺伝子が野生型であるその他の細胞株では PD173074 による増殖抑制効果は認められなかった。PD173074 感受性株では FGFR3 タンパク質の過剰発現と自己リン酸化が認められたが、PD173074 投与によりリン酸化の抑制と S 期細胞の減少、p27/Kip1 の発現増加、Ki67 の発現減弱が認められた。Scid マウスの xenograft に対する PD173074 の経口投与でも増殖抑制効果と活性化 caspase3 の発現等が認められた。

③SCLC 培養細胞 16 例中 14 例で CADM1 の過剰発現を認めた。これに対し、非小細胞肺がん培養細胞 10 例では、CADM1 の過剰発現を全く認めなかった。CADM1 の過剰発現を示した細胞は通常の培養条件でスフェロイドを形成し、壁に対して非接着性に増殖する細胞であった。RT-PCR 産物の塩基配列解析から、SCLC では上皮で発現する 8A 型のスプライシング・バリエントに加えて、ほぼ等量の 8AB 型バリエントが発現していた。8AB バリエントはマウス、ヒト正常組織では、精巣以外では、脳・神経組織で痕跡程度に発現が認められるのみであった。SCLC 組織の解析では 34 例中 9 例 (26%) に CADM1 の過剰発現を認めた。CADM1 を発現しない SCLC 細胞 に CADM1 を導入すると、ヌードマウス皮下腫瘍の形成が顕著に抑制された。SCLC 培養上清を濃縮すると、CADM1 細胞外領域に対する単クローン抗体のウェスタンブロット解析により CADM1 断片が検出可能であった。

ヒト・マウスの腎組織における CADM1 分子群、4.1 分子群の解析から、近位尿細管では CADM4 と 4.1B、遠位尿細管では CADM1 と 4.1N が特異的に発現し、それぞれ特異的に複合体を形成することを見出した。腎がんの大部分を占める腎淡明細胞がんは、近位尿細管由来であることから、CADM4 の腎がんにおける異常を検討した。CADM4 発現の顕著な低下は、腎がん細胞 10 例中 7 例、また腎淡明細胞がん組織

40 例中 28 例 (70%) で認められた。

患者由来の ATL 腫瘍細胞、並びに HTLV-1 感染細胞における CADM1 結合タンパク質候補として Tiam1 を抽出し、免疫沈降・ウェスタンブロット解析・GST プルダウン法により、PDZ ドメインで CADM1 と複合体を形成することを確認した。Tiam1 の過剰発現は ATL のリンパ節 9 例中 3 例に認められ、細胞膜及び浸潤突起の先端で CADM1 と共局在することを示唆した。

④ヒト骨肉腫細胞や軟部肉腫細胞に IFN-β 発現プラスミドをリポフェクションしたところ、細胞の増殖を有意に抑制し、特に骨肉腫細胞や平滑筋肉腫に対して効率良く細胞死を誘導できた。In vivo ではヒト骨肉腫細胞のヌードマウス皮下腫瘍に IFN-β 発現プラスミドを正電荷リポソーム (DMRIE/DOPE) と混合して腫瘍内に直接注入したところ、皮下腫瘍の増殖を明らかに抑制した。また、抗 asialo-GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去すると、IFN-β 遺伝子導入の抗腫瘍効果は明らかに減少し、抗腫瘍効果には NK 細胞が関与していることが示された。

マウス骨肉腫の自然転移モデルにおける腫瘍内 IFN-β 遺伝子導入に、自家造血幹細胞移植を複合することによりさらに強く腫瘍の増殖は抑制された。また、この腫瘍増殖抑制効果は、遺伝子を導入した腫瘍のみならず、肺や肝等の遠隔転移巣においても認められ、複合療法により全身の抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかになった。治療マウスは、肉眼的にも血液生化学的にも明らかな異常を示さなかった。

皮下腫瘍を有するマウスに自家造血幹細胞移植を行い、腫瘍や脾臓内に存在する CD4 陽性細胞と制御性 T 細胞の数や割合の経時的変化を、免疫染色とフローサイトメリー法により解析した。自家造血幹細胞移植後は、脾臓では制御性 T 細胞が CD4 陽性細胞と比較して優位に増殖し 4 週後に標準的なレベルに戻るが、腫瘍局所ではむしろ移植後 2-3 週間は、制御性 T 細胞の浸潤・増殖が CD4 陽性細胞と比較して抑制されており、造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導の機序の一つである可能性が考えられた。

EGFP トランスジェニックマウスを用いた造血幹細胞移植の解析から、腫瘍内に浸潤するCD4陽性細胞と抑制性T細胞の約70%は、移植片中のリンパ球が浸潤・増殖したものであることがわかった。腫瘍部の免疫寛容環境をさらに抑制するために、移植片から制御性T細胞を除去して自家造血幹細胞移植を行ったところ、さらに強力な腫瘍増殖抑制効果が持続して認められ、移植片中の制御性T細胞が、腫瘍での免疫寛容環境の構築に重要であることが示唆された。

IFN- β 遺伝子治療と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を目指し、その第1段階として骨軟部肉腫を対象としたIFN- β 遺伝子治療等単独の臨床研究を行うために、国立がん研究センター中央病院の関連診療科の臨床医や、ベクターの供給先である名古屋大学と共同研究体制を確立し、臨床研究の研究実施計画書策定を進めた。

⑤解析した5種類のヒトグリオーマ細胞株はいずれもHVJ-Eへの親和性が高く、siRNA導入効率は50%以上であった。Akt、Mcl1、Eg5のsiRNAを試したところ、Eg5siRNAを封入したHVJ-Eを導入した場合に、最も強く細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導された。Eg5siRNA封入HVJ-Eのマウス皮内腫瘍や脳内接種腫瘍モデルへの導入により、腫瘍の完全消失が見られた。それに対し、Eg5siRNAを封入しないHVJ-Eでは脳内接種モデルで90日後に全マウスが死亡した。

⑥PC3、MCF7、HEK293のいずれの細胞株においても低酸素ストレスによってmiR-210前駆体の転写が顕著に亢進した。低酸素ストレス加MCF7細胞にHIF-1 α のsiRNAを添加するとmiRNA-210の発現は有意に低下したことから、HIF-1 α の転写制御を受けること、miRNA-210遺伝子転写開始地点上流約250bpにあるACGTG配列とHIF-1 α の結合が転写制御に重要であることを見出した。

Target Scanにより抽出したmiR-210の標的遺伝子候補の中から、細胞において鉄代謝の恒常性を担う鉄-硫黄クラスター形成の足場タンパク質(ISCU)と細

胞内への鉄取り込みを担うトランスフェリン受容体(TfR)に注目し、miR-210発現とこれらの翻訳抑制の関連を解析したところ、miR-210強制発現細胞では有意にISCUとTfRの発現が低下した。

D. 考察

「A. 研究目的」に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①食道がん治療前生検の遺伝子発現プロファイルがCRTの予後因子として有用であることが確かめられたが、食道がんには遺伝子発現情報に基づくサブタイプが存在すること、そのサブタイプの適格な診断を組み入れることでより優れた予測が可能であることが示唆された。今後、東病院で採取された別のCRT113例、中央病院のCRT59例、中央病院の手術134例の発現プロファイルを解析に加え、妥当なサブタイプ数の評価方法等を検討することでサブタイプ分類法の確立を行う。特に、CRTで3年生存率が80%を超えるサブタイプの予測は目的に適切であり、薬事申請、2項先進医療の実現へ向け、企業との共同研究も開始した。予後不良サブタイプについては、特徴的な信号伝達経路や遺伝子変異の同定を行い、分子標的候補を探索する研究も並行して進める。

食道がんのサイトケラチン7の免疫染色の有用性が2施設で独立に実証された。サイトケラチン7の免疫染色は、施設間でばらつきのない有用な予後予測法と考えられる。サイトケラチン7陽性例は予後不良であるが、このような症例では根治切除術後の補助化学療法が必要と考えられる。実際にサイトケラチン7陽性例では補助化学療法による予後の改善が示唆された。食道扁平上皮がんの外科切除材料の病理診断時にサイトケラチン7の免疫染色施行を標準化し、陽性例については補助化学療法を積極的に施行することが患者予後の改善につながると期待できる。

胃がんにおいて、腸の転写因子CDX2により薬剤耐性遺伝子であるMDR1の発現が誘導されることが細胞株のみならず、実際の外科的に切除された胃がん組織においても免疫染色により確認された。MDR1

はパクリタキセル等のタキサン系抗がん剤に耐性を示すことが知られており、腸型粘液形質を示す胃がんは、5-FUのみならず、タキサン系抗がん剤に対しても抵抗性を示す可能性が考えられる。但し、今後は化学療法が施行された胃がん組織を用いて検討する必要がある。

②表在性膀胱がんは高齢者に発症し再発を繰り返すことから経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)後の継続的なフォローアップが必要であり、再発時にはTUR-btの再施行あるいは膀胱摘出等の手術が必要となる。今回の研究により、FGFR3遺伝子変異陽性の表在性膀胱がんに対する分子標的治療薬の有用性が示された。他臓器がんを対象として臨床試験が進行中の薬剤の安全性が確認されれば、副作用が軽度でQOLが保たれるがんの二次予防薬として臨床応用の可能性が期待される。なお、FGFR3 exon15に変異を有する膀胱がん培養細胞株J82については明らかな増殖抑制効果は認められなかったが、この細胞ではFGFR3蛋白質の発現が陰性であったことから、遺伝子変異以外の原因によりFGFR3遺伝子が不活化されている可能性が考えられる。

③近位尿管由来である腎淡明細胞がんにおいてCADM4、4.1Bの異常が認められることを明らかにした。腎細胞がんが臨床的に大きな問題となっている点の一つは早期がん当たる腫瘍を外科的に切除しても、その一部に早期に再発、転移し死の転帰をとる例が少なくないことである。今回、T1aの早期腎淡明細胞がんにおいても、その63%でCADM4の発現欠如、または著明低下が認められたことは、T1aの腫瘍の中に、すでにCADM4を介する接着機構が破綻した例が含まれることを示唆する。今後、これらの症例の予後を検討し、腎淡明細胞がんの予後予測や治療選択に資するバイオマーカーとしての有用性を検討する。

CADM1はATLでは異所性に発現し、むしろ細胞浸潤を促進する可能性を報告した。加えて本年度の研究で、CADM1がSCLCでも高発現し、細胞の悪性化に寄与している結果が得られたことは意義深い。

ATL・SCLCで強発現し、浸潤・転移を促進することは、治療標的分子となりうることを意味する。特にSCLCは患者数が多い難治性の疾患でありながら、治療の分子標的が確立しておらず重要な研究課題である。また、SCLCでは上皮・ATLで認められるCADM1-8A型に加えて、特異的なスプライシング・バリエーションであるCADM1-8AB型を発現している。まず血清による診断を目指して、培養上清中にCADM1断片が検出可能であることを示した。現在、サンドウィッチ法で、血中CADM1タンパク質を検出する系を構築中である。

一方、ATLではCADM1の下流経路を解析し、上皮細胞とは異なり、ATLではCADM1はTiam1(T-cell lymphoma invasion and metastasis)と結合し、RACを活性化することにより細胞運動性を促進し、ATL細胞の特徴的な浸潤能の更新に関わっている可能性を示した。SCLC・ATLで共通する点は初期からの高浸潤能、高転移能である。CADM1の分子経路を阻害することで浸潤転移を抑制することを目指して、低分子化合物のスクリーニング系の構築も進めている。

④骨軟部肉腫に対して、自家造血幹細胞移植にIFN免疫遺伝子治療を複合することにより、相乗的な抗腫瘍免疫を強化・維持できることを明らかにした。特に、自然に肺転移や肝転移をきたす実際の臨床病態に近い動物モデルにおいても、IFN-βプラスミドの腫瘍内注入を造血幹細胞移植と併用して強力な抗腫瘍効果を発揮できることは、本複合療法が実際の臨床においても効果が十分に期待できる治療法であることを示している。

また、造血幹細胞移植により、腫瘍内のCD4陽性細胞の中でも特に制御性T細胞が減少することが明らかとなり、腫瘍免疫を誘導する上で適した腫瘍環境を作り出していることが示唆された。抗腫瘍免疫をさらに賦活するため、腫瘍内で制御性T細胞が減少する免疫学的機序に関する解明を進める必要がある。

⑤HVJ-Eをヒトグリオーマ細胞に作用させると細胞死が誘導されるが、細胞周期は停止しない。Eg5の

siRNAは紡錘体の分離を阻害してG2/Mで細胞周期を停止させ分裂期の細胞にアポトーシスを誘導する。そのためEg5 siRNA封入HVJ-Eはがん細胞、特に分裂速度の速い細胞に、より選択的に細胞死を誘導することができ、抗腫瘍効果の増強が可能になったと考えられる。

⑥転写因子HIF-1 α による転写制御経路の中で、本研究により新たにmiRNA-210の発現が正に制御されており、さらに細胞の鉄代謝に関わる2つの遺伝子の発現を制御することが示された。miR-210はがん細胞における低酸素環境と鉄代謝を結ぶ新たな因子であることが考えられ、その知見を新たな分子標的診断法と治療法の探索に活用していく。HIF-1 α の発現上昇は少なくとも肺がん・乳がんの予後不良因子であることが報告されている。本研究の結果より血液循環中に存在するmiR-210をHIF-1 α の代理指標として利用する可能性が考えられる。

E. 結論

①食道扁平上皮がん治療前生検の遺伝子発現プロファイルのCRTの予後因子として有用性を確認したが、遺伝子発現に基づくサブタイプ分類の確立により、さらなる精度向上が可能である。サイトケラチン7の免疫染色は施設間でばらつきのない有用な予後診断法で術後補助化学療法の適用の指標になりうる。腸型粘液形質を示す胃がんにおいて活性化している転写因子CDX2は、薬剤耐性遺伝子MDR1を誘導し、薬剤耐性に関わる可能性がある。

②FGFR3遺伝子変異陽性の表在性膀胱がんではFGFRに対するチロシンキナーゼ阻害剤による抗腫瘍効果が認められ、対する分子標的治療薬あるいはTUR-bt術後の再発予防薬としての応用の可能性が期待される。

③CADM1がSCLC・ATLでは疾患特異的に過剰発現し、浸潤や悪性化を促進することを見出した。これを分子標的とする血清診断法や、この経路を阻害することによる浸潤・転移抑制医薬品の開発を目指して、対応する基礎研究を進める。

④造血幹細胞移植とIFN- β 免疫遺伝子治療の複合により、有害事象の増悪なく相乗的な抗腫瘍免疫を増強し、マウスの生存率を向上できることを示した。GVHD発症が無い自家造血幹細胞移植と、IFN- β 発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入の複合は安全性が高く、実際の臨床病態に近い転移モデルにおいても全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できるため、骨軟部肉腫に対する新たな免疫治療戦略となりうる。

⑤HVJ-Eの抗腫瘍作用を相補する治療分子を封入することにより有効性の高いがん治療法開発の可能性が示唆された。

⑥固形がんが発現しているmiR-210は予後因子の一つであるHIF-1 α により発現が誘導されることを示した。新たなバイオマーカーとしての有用性や、細胞の鉄代謝関連遺伝子ISCUとTfRの発現を制御することから、新たな治療標的となる可能性も考えられる。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hudson TJ, Yoshida T, et al International network of cancer genome projects Nature464(7291):993-8, 2010.
- 2) Sai K, Yoshida T, et al, Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. Cancer Chemother. Pharmacol.,66(1): 95-105. 2010.
- 3) Andoh M, Yoshida T, et al.Detection of inappropriate samples in association studies by an IBS-based method considering linkage disequilibrium between genetic markers. J Hum Genet. 55: 436-40. 2010.
- 4) Yoshida T, Ono H, Kuchiba A, Saeki N, Sakamoto H. Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBJ database: gastric cancer as an example. Cancer Sci,

- 101(7):1582-1589. 2010.
- 5) Low S-K., Yoshida T, et al Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. PLoS One, 5(7): e11824. 2010.
 - 6) Sugiyama E., Yoshida T, et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: Impact of genetic polymorphisms. Clinical Pharmacokinetics, 49(8): 549-58. 2010.
 - 7) Sai K., Yoshida T, et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. Br J Clin Pharmacol, 70(2): 222-33. 2010.
 - 8) Sangrajrang S., Yoshida T, et al. Genetic polymorphisms in folate and alcohol metabolism and breast cancer risk a case-control study in Thai women. Breast Cancer Res Treat. 123:885-93. 2010.
 - 9) Sato Y., Yoshida T, et al. Biostatistic tools in pharmacogenomics--advances, challenges, potential. Curr Pharm Des. 16(20):2232-40, 2010.
 - 10) Saeki N., Yoshida T, et al. Prostate Stem Cell Antigen: A Jekyll and Hyde Molecule? Clin Cancer Res 16: 3533-3538, 2010.
 - 11) Sato Y., Yoshida T, et al. Genome-wide association study on overall survival of advanced non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. J Thorac Oncol. 6(1):132-8:2011.
 - 12) Totoki Y., Yoshida T, et al. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. Nat Genet 43:464-9, 2011.
 - 13) Saeki N., Yoshida T, et al. A functional SNP in MUC1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer Short title: MUC1 is a gastric cancer susceptibility gene. Gastroenterology:140(3)892-902-2011.
 - 14) Katori N., Yoshida T, et al. Genetic variations of orosomucoid genes associated with serum alpha-1-acid glycoprotein level and the pharmacokinetics of paclitaxel in Japanese cancer patients" to the Journal of Pharmaceutical Sciences, in press.
 - 15) Que N, Noguchi T, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Wakamatsu Y, Sasaki H and Yasui W. Serum concentration and expression of Reg IV in patients with esophageal cancer: age-related elevation of serum Reg IV concentration. Oncol Lett, 2: 235-239, 2011.
 - 16) Sentani K, Que N, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W. Up-regulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. Pathobiology, 77: 241-248, 2010.
 - 17) Qui W, Wang X, Leibowitz, Liu H, Barker N, Okada H, Que N, Yasui W, Clevers H, Schoen RE, Yu J and Zhang L. Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drug eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA, 107: 20027-20032, 2010.
 - 18) Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, Hinoi T, Okajima M, Matsusaki K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Que N and Yasui W. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: Ectopic expression of claudin-18 is associated with poor prognosis. Pathol Int, 60: 673-680, 2010.
 - 19) Takakura Y, Hinoi T, Que N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W and Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. Cancer Res, 70: 6767-6778, 2010.
 - 20) Tanaka M, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Que N, Yasui W and Chayama K. Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. Cancer Sci, 101: 2121-2127, 2010.

- 21) Anami K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM and Yasui W. Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Pathol*, 221: 275-284, 2010.
- 22) Sentani K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Matsusaki K and Yasui W. Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, pancreatic polypeptide and somatostatin. *Pathol Int*, 60, 291-297, 2010.
- 23) Sakamoto N, Que N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and Yasui W. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 101: 1038-1044, 2010.
- 24) Yamamoto H, Que N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W and Kikuchi A. Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene*, 29: 2036-2046, 2010.
- 25) Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Que N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA and Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol*, 11: 136-146, 2010.
- 26) Seko N, Que N, Noguchi T, Sentani K, Sakamoto N, Hinoi T, Okajima M and Yasui W. Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med*, 1: 73-78, 2010.
- 27) Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto, K, Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci*.101: 250-58, 2010.
- 28) Miyake M, Ishii M, Koyama N, Kawashima K, Kodama T, Anai S, Fujimoto K, Hirao Y, Sugano K. 1-tert-Butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-urea (PD173074), a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR3), Inhibits Cell Proliferation of Bladder Cancer Carrying the FGFR3 Gene Mutation along with Up-Regulation of p27/Kip1 and G1/G0 Arrest. *J Pharmacol Exp Ther*.332: 795-802,2010.
- 29) Koyamatsu Y, Sakamoto M, Miyake K, Muroya T, Sugano K, Nakao Y, Yokoyama M, Iwasaka T. Gene expression profiles and microsatellite instability in uterine corpus endometrioid adenocarcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*.36: 336-343,2010.
- 30) Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 70; 8169-8178, 2010.
- 31) Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi M, Hagiya M, Ito A, Sakurai-Yageta M, and Murakami Y. Transcriptional regulation of the *CADM1* gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes to Cells*, in press.
- 32) Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors, *CADM1* and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, in press.
- 33) Hagiya M, Furuno T, Hosokawa Y, Iino T, Ito T, Inoue T, Kakanishi M, Murakami Y and Ito A. Enhanced Nerve-Mast Cell Interaction by a

- Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1, CADM1. *J Immunology*, in press.
- 34) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, and Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, in press.
- 35) Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid Receptor Expression in Thymomas and Thymic Carcinomas. *Cancer*, in press.
- 36) Hosokawa Y, Hagiwara M, Iino T, Murakami Y, Ito A. Non-contact estimation of intercellular breaking force using femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1777-1872, 2011.
- 37) Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ and Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285:15511-15522, 2010.
- 38) Narumi K, Kondoh A, Udagawa T, Hara H, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, and Aoki K. Administration route-dependent induction of antitumor immunity by interferon-alpha gene transfer. *Cancer Sci*. 101; 1686-1694, 2010.
- 39) Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S and Yamada T. Traf2- and Nck-interacting kinase TNIK is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res*. 70; 5024-5033, 2010.
- 40) Aoki K and Narumi K. Development of interferon- β gene therapy against pancreatic cancer. In: *Cancer Gene Therapy* ed. by Tagawa M. Research Signpost, Kerala, India, 2010.
- 41) Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T and Aoki K. *In vivo* interferon- β gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther*, in press.
- 42) Kaneda, Y. A non-replicating oncolytic vectors as a novel therapeutic tool against cancer. *BMB Reports* 773-780 2010.
- 43) Matsuda, M., Nimura, K., Shimbo, T., Hamasaki, T., Yamamoto, T., Matsumura, A. and Kaneda, Y. Immunogene therapy using immunomodulating HVJ-E vector augments anti-tumor effects in murine malignant glioma. 2010.
2. 学会発表
- 44) 村上義則、増田万理、丸山智子、太田力、伊藤彰彦、林徳眞吉、塚崎邦弘、上平憲、山岡昇司、星野洪郎、吉田輝彦、渡邊俊樹 成人T細胞性白血病における細胞接着分子CADM1とTiam1の統合と浸潤促進作用第69回日本癌学会学術総会大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (EW-025) 9/22/2010
- 45) 西村公男、青柳一彦、谷口浩和、馬淵智子、坂井義治、吉田輝彦、佐々木博己 EMT制御因子SIX1はリンパ節移転をともなう進行食道癌において脱メチル化により活性化される大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 第69回日本癌学会学術総会 (口演O-278) 9/23/2010
- 46) 鳴海兼太、宇田川剛、近藤篤、五十嵐美徳、大浪俊平、吉田輝彦、青木一教 自家造血幹細胞移植レシピエントにおいて、腫瘍内インターフェロン- α 遺伝子導入は腫瘍の免疫寛容を制御する第69回日本癌学会学術総会大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (口演O-335) 9/23/2010
- 47) 青木一教、宇田川剛、近藤篤、鳴海兼太、後藤尚子、大浪俊平、竹下文隆、落谷孝広、五

- 十嵐美徳、吉田輝彦 I型インターフェロン遺伝子導入は、骨肉腫や軟部肉腫に対する自家造血幹細胞移植の抗腫瘍免疫を増強する第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (口演O-336) 9/23/2010
- 48) 十時泰、新井康仁、山本尚吾、漆館智子、大橋祥子、大浪澄子、坂本裕美、吉田輝彦、油谷浩幸、柴田龍弘 全ゲノムシーケンスによる肝がん体細胞変異の全貌第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (口演O-361) 9/23/2010
- 49) 佐伯宣久、斎藤聡、松尾恵太郎、片井均、大浪澄子、口羽文、佐々木博己、梶村春彦、中村祐輔、廣橋説雄、吉田輝彦、坂本裕美 全ゲノム関連解析により固定されたびまん型胃がん易罹患性関連染色体領域1q22及びその機能的SNP 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (口演O-363) 9/23/2010
- 50) Low S-K, Kuchiba A, Zembutsu H, Saito A, Takahashi A, Kubo M, Daigo Y, Kamatani N, Chiku S, Totsuka H, Ohnami S, Hirose H, Shimada K, Okusaka T, Yoshida T, Nakamura Y, Sakamoto Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (示説P-0574) 9/23/2010
- 51) 小野弘恵、平岡伸介、金井弥栄、坂本裕美、吉田輝彦、佐伯宣久 胃上皮細胞においてがん制御遺伝子的特徴を持つPSCA遺伝子の胆嚢がんでの発現制御 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (示説P-0654) 9/23/2010
- 52) 宇田川剛、鳴海兼太、近藤篤、後藤尚子、五十嵐美徳、大浪俊平、吉田輝彦、青木一教 自家造血幹細胞移植は、免疫抑寛容環境を制御し抗腫瘍効果をもたらす 第69回日本癌学会学術総会 (示説P-0692) 9/23/2010
- 53) 辰野健二、永江玄太、Linghua Wang、山本尚吾、菌田幸太郎、石川俊平、堤修一、緑川泰、國土典宏、柴田龍弘、吉田輝彦、油谷浩幸 ターゲットキャプチャーシーケンスによるウイルス性肝癌の遺伝子変異探索 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (示説P-0574) 9/23/2010
- 54) 青柳一彦、三科桂子、山田康秀、加藤健、馬淵智子、西村公男、武藤学、大津敦、吉田輝彦、佐々木博己 食道がんの治療効果予測へ向けた生検サンプルの網羅的遺伝子発現解析 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (示説P-1302) 9/23/2010
- 55) 大上直秀、菊池 章、安井 弥: Wnt-5aは laminin g2の発現を誘導し、胃癌細胞の浸潤を促進する. 第99回日本病理学会総会, 4月27-29日, 東京, 2010
- 56) 大上直秀、阿南勝宏、内藤 寛、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: 胃癌における細胞表面蛋白質desmocollin2の解析. 第19回日本がん転移学会学術集会・総会 ミニシンポジウム(2)がん転移診断, 6月16-17日、金沢、2010
- 57) 大上直秀: HER2病理組織判定の症例提示. HER2病理セミナー、9月16日、広島、2010
- 58) 大上直秀、仙谷和弘、坂本直也、野口 剛、安井 弥: RegIVとgastrin、serotonin、pancreatic polypeptide、somatostatinの発現の関連. 第69回日本癌学会学術総会、9月22-24日、大阪、2010
- 59) 菅野康吉: がんの遺伝カウンセリング 第16回日本家族性腫瘍学会学術集会 2010年7月9日(金) 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県)
- 60) 松村善昭、三宅牧人、石井正純、友田茉莉、笠原優一、田中宣道、藤本清秀、平尾佳彦、菅野康吉: 前立腺癌生検組織および切除標本を対象とするERG遺伝子再構成の検出に関する研

究 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会
2010年9月21日(火) 大阪国際会議場(大阪府)

- 61) 三宅牧人、菅野康吉、松本絵里、児玉哲郎、藤本清秀、平尾佳彦:筋層非浸潤性膀胱尿路上皮癌における Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) 遺伝子点突然変異の術後再発マーカーおよび分子標的治療への応用 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 2010年9月21日(火) 大阪国際会議場(大阪府)
- 62) Kokichi Sugano, Miyake Makito, Eri Matsumoto, Koshi Maeda, Shinichi Fukuzono, Tetsuro Kodama, Tadao Kakizoe, Yae Kanai, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao: Urine FGFR3 mutation is useful diagnostic marker and potential molecular target for superficial bladder cancer 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.), 2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka
- 63) Makito Miyake, Masazumi Isii, Noki Koyama, Kiyotaka Kawashima, Tetsuro Kodama, Satoshi Anai, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Kokichi Sugano: A FGFR3-selective tyrosine kinase inhibitor (PD173074) suppresses cellular growth of urothelial carcinoma 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.),2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka
- 64) Yoshiaki Matsumura, Makito Miyake, Masazumi Isii, Mari Tomoda, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Tetsuro Kodama, Kokichi Sugano: Detection of TMPRSS2-ERG recurrent fusion genes in prostate cancer 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.),2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka
- 65) Kawai T, Nagata M, Iwai M, Morikawa T, Ito A, Kume K, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of CADM1 and CADM4 in urinary bladder cancer. Poster presentation, The 26th European Association of Urology (EAU Annual Congress, ウィーン市、オーストリア国, 2011年3月18-22日
- 66) ASCB Sakurai, Poster Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Dynamics of CADM1 protein in the membrane of stable adhesion and in the process of cell-cell contact formation. American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting、米国、フィラデルフィア市、2010年12月11-15日
- 67) ASCB Shigefumi, Poster Murakami S, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Analysis of CADM1 signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay. American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting、米国、フィラデルフィア市、2010年12月11-15日
- 68) Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Murakami Y. Proteomic analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1) complex. 第33回日本生化学会、分子生物学会合同年会、示説、神戸市、2010年12月8-11日
- 69) 菊地慎二、山岡賢俊、小林尚寛、薄井真悟、後藤行延、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、岩井美和子、村上善則 細胞接着分子 CADM1 の小細胞肺癌における特異的スプライシングバリエーションの同定。第55回日本肺癌学会、口頭、広島市、2010年11月3-4日
- 70) 永田政義、山田大介、川合剛人、櫻井美佳、伊藤彰彦、久米春喜、森川鉄平、本間之夫、村上善則 腎細胞がんにおける新規腫瘍抑制経路 CADM4-4.1B/DAL-1 の解析、第55回日本人類遺伝学会大会、口頭、大宮市、2010年10月27-30日
- 71) 川合剛人、永田政義、岩井美和子、森川鉄平、伊藤彰彦、久米春喜、深山正久、本間之夫、村上善則 膀胱癌における細胞接着分子 CADM1 および CADM4 の異常、第55回日本人類遺伝学会大会、口頭、大宮市、2010年10月27-30日
- 72) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Kawai T, Tsuboi Y, Ito T, Ito A, Yoshida M, Murakami M. Spontaneous development of lung adenocarcinoma in the *Cadm1* gene-deficient mice. The 16th Charles Heidelberger International

Symposium on Cancer Research, ポルトガル国、
コインブラ市、2010年9月25-28日

- 73) Murakami Y, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka H., Hoshino T, Yoshida T, Watanabe T, Masuda M. A cell adhesion molecule, *CADM1*, interacts with *Tiam1* and promotes invasive phenotype of human adult T-cell leukemia cells. 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 74) Murakami S, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Analysis of *CADM1* signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 75) Kawai T, Nagata M, Iwai M, Morikawa T, Ito A, Kume H, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of *CADM1* and *CADM4* in urinary bladder cancer 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 76) Ito A, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Function and transcriptional regulation of *CADM1* during the neural differentiation of P19 cells induced by retinoic acid. 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 77) 村上善則 家族性腫瘍の遺伝カウンセリングの現状と問題点、第16回家族性腫瘍学会、シンポジウム、新潟市、2010年7月9-10日
- 78) 永田政義、川合剛人、山田大介、久米春喜、本間之夫、村上善則 男性不妊症を手掛かりとした新規家族性腫瘍検索の試み、第16回家族性腫瘍学会、シンポジウム、新潟市、2010年7月9-10日
- 79) 八牧愉二、分田貴子、開田美保、星百合子、高橋典子、山形静香、島田真紀子、五十嵐美徳、青木一教、高上洋一、平家勇司. 臨床応用可能な遺伝子組み換えヒトフィブロネクチン (CH296; *RetroNectin*)を用いたリンパ球拡大培養法の確立研究. 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年
- 80) K Narumi, T Udagawa, A Kondoh, T Yoshida, K Aoki. INTRATUMORAL DELIVERY OF TUMOR-SPECIFIC IMMUNITY AND SUPPRESSES IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AFTER AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (Oral), 第16回日本遺伝子治療学会 2010年7月
- 81) T Udagawa, K Narumi, A Kondoh, N Goto, T Yoshida, K Aoki. ADMINISTRATION ROUTE-DEPENDENT INDUCTION OF ANTITUMOR IMMUNITY BY INTERFERON-ALPHA GENE TRANSFER (Poster), 第16回日本遺伝子治療学会 2010年7月
- 82) Y Yamaki, T Wakeda, M Kaida, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, M Shimada, Y Ikarashi, K Aoki, Y Takaue, Y Heike. Lymphocyte expansion from peripheral blood using recombinant human fibronectin fragment (CH296; *RETRONECTIN*) (Poster), 第16回日本遺伝子治療学会 2010年7月.
- 83) K Aoki, T Udagawa, A Kondo, K Narumi, N Goto, S Ohnami, F Takeshita, T Ochiya, Y Ikarashi, T Yoshida. Interferon gene transfer enhances the antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation for sarcoma. 第69回日本癌学会学術総会(口演) 2010年9月.
- 84) K Narumi, T Udagawa, A Kondoh, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K Aoki. Intratumoral interferon- α gene transfer suppresses cancer-induced immunotolerance in a lymphopenic host. 第69回日本癌学会学術総会(口演). 2010年9月.
- 85) T Udagawa, K Narumi, A Kondoh, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K Aoki. Suppression of cancer-induced immunotolerant environment by autologous hematopoietic stem cell transplantation. 第69回日本癌学会学術総会(示説). 2010年9月.
- 86) M Yamamoto, Y Totsuka, T Nakano, Y Hibiya, A Nakaguchi, K Aoki, T Sugimura, K Wakabayashi. Anti-cancer activity of DNA ADP-ribosylating protein using mesothelin promoter-mediated gene expression. 第69回日本癌学会学術総会(示説). 2010年9月.

- 87) 青木一教、鳴海兼太. 固形がんに対する造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合療法の開発, 日本癌治療学会 シンポジウム「遺伝子治療」(口演)、2010年10月28日
- 88) Y Yamaki, T Wakeda, M Kaida, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, M Shimada, A Kondoh, Y Ikarashi, K Aoki, Y Takaue, Y Heike. Establishment of a clinically applicable method for lymphocyte expansion using recombinant human fibronectin fragment (CH296; RETRONECTIN). ISCT 2010 Annual Meeting, May 2010.
- 89) Yamaki, T Wakeda, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, Y Ikarashi, K Aoki, T Enoki, M Ideno, J Mineno, Y Takaue, Y Heike. Ex-vivo expansion of lymphocytes from cord blood using recombinant human fibronectin fragment (CH296; RETRONECTIN) (Poster). 1st ISCT Asian-Pacific Regional Meeting, October 2010
- 90) Y Ikarashi, K Aoki, Y Heike, T Yamazaki, Y Takaue. Screening of immunomodulating drugs for graft-versus-host disease by in vivo fluorescence imaging (Poster). 1st ISCT Asian-Pacific Regional Meeting, October 2010.
- 91) K Narumi, K Aoki. *In vivo* delivery of interferon gene enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation (Poster). 1st ISCT Asian-Pacific Regional Meeting (Poster), October 2010
- 92) K Aoki. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob (Lecture). MRCCMT International symposium. January 2011 (Busan)
- 93) 金田安史: 遺伝子治療の過去・現在・未来第109回日本皮膚科学会総会(特別講演)平成22年4月16日大阪
- 94) 松田真秀、松村明、新保隆史、金田安史: IL2 immunotherapy using HVJ-E vector exhibits a synergistic anti-tumor effect in murine malignant glioma 第69回日本癌学会学術総会(大阪)平成22年9月23日
- 95) Yusuke Yoshioka, Keiichi Sugiura, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, Norio Komatsu, Hiroshi Miyazaki, Takahiro Ochiya, Takashi Kato. Erythropoietin-Inducible MicroRNA-362 Contributes to Erythropoiesis Via the Suppression of Histone Deacetylase 3. Session: Hematopoiesis · Regulation of Gene Transcription: Poster I. Poster Board II-483, Abstract 2603, 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA. Dec 5, 2010
- 96) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. 鉄欠乏により発現誘導される miR-210 の標的遺伝子の同定と機能解析. (Iron deficiency-inducible miR-210 suppress iron homeostasis related proteins.)第69回日本癌学会, ポスター, 大阪国際会議場, 2010年9月22~24日
- 97) 吉岡祐亮, 杉浦圭一, 小坂展慶, 山本雄介, 宮崎洋, 小松則夫, 落谷孝広, 加藤尚志. エリスロポエチンにより誘導される miR-188 と miR-362 のマウス赤血球造血における発現. (Erythropoietin-Induced Expression of miR-188 and miR-362 in Primary Murine Erythrocytes.)第72回日本血液学会学術集会, 一般口演 OS-3-14, セッション 67「赤血球造血」, 横浜パシフィコ, 2010年9月24日
- 98) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. 鉄代謝の fine-tuner としての miR-210 の意義. 第2回日本RNAi学会, グランドプリンスホテル広島, 2010年8月27~28日
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
 - 1) Interferon alpha and antisense K-ras RNA combination gene therapy against pancreatic cancer. (米国特番 US7,514,416)
 - 2) がんの治療法 (2008-102377) (国内、出願中)
 - 3) Method of treating solid tumors (11/114,088) (米国、出願中)
 2. 実用新案登録
 - 無し
 3. その他
 - 無し

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

上部消化管がんの予知医療開発のための病理学的解析
大上直秀 広島大学分子病理学研究室

研究要旨 本研究の目的は、上部消化管がん、すなわち食道がん・胃がんを対象に、治療の奏効性や予後予測に関連する分子情報を同定することである。本年度は術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん230例を材料に、サイトケラチン7の発現を解析し、予後、**adjuvant therapy**の効果との関連を解析した。サイトケラチン7陽性例は21例(9%)に見い出され、全症例(ステージ0からIII)では、サイトケラチン7陽性例は独立した予後不良因子であった。ステージII、IIIの症例においてもサイトケラチン7陽性例は予後不良であった。さらにサイトケラチン7陽性例では、**adjuvant therapy**が施行された症例の5年生存率は50%であったのに対し、**adjuvant therapy**が施行されなかった症例の5年生存率は0%であり、中等度の相関を認めた。胃がんについては、腸の転写因子CDX2の標的遺伝子を同定した。薬剤耐性遺伝子であるMDR1に注目し、MDR1のプロモーター配列を解析した結果、CDX2のコンセンサスシーケンスが4ヶ所見出された。ルシフェラーゼアッセイでは、最も5'側を含むコンストラクトにおいて、最も高い転写活性が測定された。外科的に切除された胃がん214例を材料に免疫染色を行った結果、CDX2陽性例は有意に高頻度にMDR1も陽性であった。以上から、食道扁平上皮がんにおけるサイトケラチン7の免疫染色は、施設間でばらつきのない有用な予後予測法と考えられる。腸型粘液形質を有する胃がんはCDX2が陽性であるが、このような症例ではMDR1も陽性であり、タキサン系抗がん剤に耐性であると考えられる。

A. 研究目的

上部消化管がん、すなわち食道がん・胃がんを対象に、治療の奏効性や予後予測に関連する分子情報を同定することが目的である。食道がんに対しては、**Gene chip**を用いた網羅的遺伝子発現解析から、治療効果を予測する技術を開発しているが、その検証を行う。胃がんに関しては、**SAGE**法を用いた網羅的遺伝子発現解析から、腸型粘液形質を有する症例は5-FUに対し抵抗性であることを示してきた。腸型粘液形質の発現には、転写因子CDX2の発現が重要であり、CDX2により誘導される遺伝子の探索を行い、薬剤耐性との関連を解析する。

B. 研究方法

食道がんについては、扁平上皮がんを対象に解析を行っているが、ステージII、IIIの症例においては手術後に再発する症例としない症例とがあり、手術後の治療法の選択が重要である。分担研究者のこれまでの**Gene chip**を用いた網羅的遺伝子発現解析から、5個以上の転移リンパ節を有す

る症例では、サイトケラチン7をコードするKRT7遺伝子が高発現していることが明らかとなっている。本年度は広島大学病院で術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん230例を材料に、免疫染色でサイトケラチン7の発現を解析した。腫瘍組織全体の10%以上が染色された症例を陽性と判定し、サイトケラチン7の発現と予後との関連、**adjuvant therapy**の効果との関連を解析した。

胃がんについては、転写因子CDX2の標的遺伝子を同定するため、大腸がん細胞株HT-29にレトロウイルスを用いてCDX2遺伝子を導入した。CDX2高発現株の遺伝子発現を**Gene chip**で解析し、薬剤耐性遺伝子であるMDR1に注目した。MDR1の発現を、**Northern blot**、**Western blot**法で解析し、CDX2による発現誘導をRNAレベル、蛋白質レベルで検証した。さらにMDR1のプロモーター配列を同定し、ルシフェラーゼアッセイを用いてCDX2による転写活性を測定した。*in vivo*におけるMDR1プロモーター領域のCDX2の結合をクロマチン免疫沈降法で検討した。胃がん組織における

CDX2とMDR1の発現を免疫染色で可視化し、共局在を解析した。最後にCDX2高発現株を対象に、各種抗がん剤で処理し、薬剤耐性をMTTアッセイで定量した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト由来の食道がん・胃がん組織を用いた研究が含まれており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)および細則に定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に該当するため、上記指針に従って研究を実施した。試料の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護のため、本研究に用いる試料についてはすべて連結不可能匿名化を行った。解析対象となる試料については臨床病理学的な事項以外の個人情報についてはすべて破棄し、広島大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認の下に実施した。

C. 研究結果

食道扁平上皮がん230例を材料に、サイトケラチン7の免疫染色を施行した結果、サイトケラチン7陽性例は21例(9%)に見い出され、サイトケラチン7陽性例は有意にリンパ節転移を有する症例が多かった。本年度解析した症例はステージ0からIIIの症例であり、外科的に根治切除された症例である。全症例(ステージ0からIII)で予後との関連を解析した結果、サイトケラチン7陽性例の5年生存率は40%であったのに対し、サイトケラチン7陰性例では70%であり、サイトケラチン7陽性例は有意に予後不良であった($P=0.0047$)。単変量解析では、サイトケラチン7の発現(Hazard ratio: 2.69, $P=0.0069$)、ステージ(Hazard ratio: 18.51, $P<0.0001$)が統計学的に有意な予後予測因子であり、分化度(Hazard ratio: 1.68, $P=0.0661$)、**adjuvant therapy**の有無(Hazard ratio: 1.67, $P=0.0845$)は予後と中程度の相関を示した。年齢、性別と予後との間に相関はなかった。サイトケラチン7の発現、ステージ、分化度、**adjuvant therapy**の有無を変数として多変量解析を行った結果、サイトケラチン7の発現(Hazard ratio: 2.27, $P=0.0297$)、ステージ(Hazard ratio: 17.85, $P<0.0001$)が独立した予後予測因子であった。

次に、ステージIIとIIIの症例のみ($n=129$)で解析した。これらの症例のうち、**adjuvant therapy**

が施行されたのは65例であったが、**adjuvant therapy**が施行された症例と施行されなかった症例で、予後に差はなかった($P=0.8410$)。ステージIIとIIIの全症例でサイトケラチン7の発現と予後との関連を解析したところ、サイトケラチン7陽性例の5年生存率は0%であったのに対し、サイトケラチン7陰性例では45%であり、サイトケラチン7陽性例は有意に予後不良であった($P=0.0325$)。**adjuvant therapy**が施行されなかった症例($n=64$)でサイトケラチン7の発現と予後との関連を解析したところ、サイトケラチン7陽性例は有意に予後不良であった($P=0.0106$)。一方、**adjuvant therapy**が施行された症例($n=65$)でサイトケラチン7の発現と予後との関連を解析したが、5年生存率に差はなかった($P=0.8624$)。サイトケラチン7陽性例に限って**adjuvant therapy**の有無と予後との関連を解析した結果、**adjuvant therapy**が施行された症例の5年生存率は50%であったのに対し、**adjuvant therapy**が施行されなかった症例の5年生存率は0%であり、中等度の相関を認めた($P=0.1629$)。一方、サイトケラチン7陰性例では**adjuvant therapy**の有無により、予後の改善効果は認められなかった($P=0.6782$)。

胃がんにおける腸の転写因子CDX2により誘導される遺伝子として、薬剤耐性遺伝子であるMDR1に注目した。HT-29にCDX2を導入し、CDX2高発現株を樹立した。Northern blot、Western blotでMDR1の発現を検討したところ、CDX2高発現株において、MDR1の発現上昇が認められた。MDR1のプロモーター配列を組み込んだレポーターコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイでCDX2によるMDR1の転写活性を測定した。MDR1のプロモーター配列中にはCDX2のコンセンサスシークエンスが4ヶ所見出されたが、最も5'側を含むコンストラクトにおいて、最も高い転写活性が測定された。また同部位を標的としたプライマーを設計し、CDX2抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った結果、PCR産物が検出され、*in vivo*においてCDX2がMDR1のプロモーター領域に結合していることが実証された。外科的に切除された胃がん組織214例を搭載したtissue microarrayを用いてCDX2とMDR1の発現を検討した結果、CDX2は71%、MDR1は67%の症例で陽性であり、CDX2陽性例は有意に高頻度にMDR1も陽

性であった ($P < 0.0001$)。CDX2高発現株を用いて、各種抗がん剤の耐性をMTTアッセイで検討したところ、CDX2高発現株はパクリタキセルに対し抵抗性を示した。一方、5-FUに対しては抵抗性に変化はなかった。

D. 考察

食道がんのサイトケラチン7陽性例は、II-III期のみならずステージI-II期の症例でも予後不良であることが分担研究者から報告されており、独立した2つのコホートにおいて、サイトケラチン7の免疫染色の有用性が実証された。サイトケラチン7の免疫染色は、施設間でばらつきのない有用な予後予測法と考えられる。本研究では、サイトケラチン7陽性例は *adjuvant therapy* が施行されていない症例において予後と相関していたことから、がんの生物学的悪性を正確に反映しているものと考えられる。サイトケラチン7陽性例は予後不良と考えられるが、このような症例では根治切除術後の *adjuvant therapy* が重要である。実際にサイトケラチン7陽性例では *adjuvant therapy* による予後の改善が本研究から明らかになった。一方、サイトケラチン7陰性例は予後良好と考えられるが、このような症例では *adjuvant therapy* を施行しても予後に影響しなかった。以上を鑑みて、食道扁平上皮がんの外科切除材料の病理診断時にサイトケラチン7の免疫染色をルーチン化し、陽性例については *adjuvant therapy* を施行することが患者の予後を改善するものと期待できる。

胃がんにおいて、腸の転写因子CDX2により薬剤耐性遺伝子であるMDR1の発現誘導が本研究より証明された。CDX2によるMDR1の発現誘導は、細胞株のみならず、実際の外科的に切除された胃がん組織においても免疫染色により確認された。MDR1はパクリタキセル等のタキサン系抗がん剤に耐性を示すことが知られており、タキサン系抗がん剤の感受性との関連を解析する必要がある。これまでの研究で、CDX2により、Reg IV遺伝子が誘導され、Reg IVによりEGFRが活性化され、5-FU誘導性のアポトーシスを抑制することを報告している。従って、腸型粘液形質を示す胃がんは、5-FUのみならず、タキサン系抗がん剤に対しても抵抗性を示すと考えられる。これらは細胞株を用いた研究であって、今後は化学療法が施行

された胃がん組織を材料に検討する必要がある。

E. 結論

食道扁平上皮がんにおけるサイトケラチン7の免疫染色は、施設間でばらつきのない有用な予後予測法と考えられる。また根治切除されたステージII、IIIの症例において、*adjuvant therapy* 施行の判断材料になる。サイトケラチン7の抗体は市販されており、多くの施設で施行可能である。胃がんにおけるMDR1の発現は、転写因子CDX2により誘導される。CDX2陽性の胃がんは腸型粘液形質を有しており、HE染色を基盤としたルーチンの病理診断業務においても検討可能である。今後は前向き臨床試験を実施し、これらの有用性を確認すべきである。

F. 健康危険情報

分担ですので、ございません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Que N, Noguchi T, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Wakamatsu Y, Sasaki H and Yasui W. Serum concentration and expression of Reg IV in patients with esophageal cancer: age-related elevation of serum Reg IV concentration. *Oncol Lett*, 2: 235-239, 2011.

Sentani K, Que N, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W. Up-regulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. *Pathobiology*, 77: 241-248, 2010.

Qui W, Wang X, Leibowitz, Liu H, Barker N, Okada H, Que N, Yasui W, Clevers H, Schoen RE, Yu J and Zhang L. Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drug eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 20027-20032, 2010.

Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, Hinoi T, Okajima M, Matsusaki K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Que N and Yasui W. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: Ectopic expression of claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathol Int*, 60: 673-680, 2010.

Takakura Y, Hinoi T, Que N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W and Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene