

2011/8022A

別紙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23年度 総括研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成24(2012)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-----	14
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-----	19
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-----	22
村上 善則	
4. 固形がんの免疫遺伝子・細胞複合療法の開発-----	26
青木 一教	
5. がんの遺伝子・核酸医薬の開発-----	30
金田 安史	
6. 核酸医薬によるがん診断・治療標的の開発-----	32
加藤 尚志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	39
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)  
総括研究報告書

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 国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の検討により、根治的 CRT の3年生存率が良好なサブタイプ B と不良なサブタイプ D の存在が独立したサンプルセットでも確認され、2つのサブタイプは固有の細胞生物学的特徴を有すると推察された。Podoplanin が予後不良症例を高精度に検出できるマーカーとして有用と考えられた。②前立腺がんにおける ERG 融合遺伝子は生検症例の35%、手術症例の16.5%に認められた。抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法では、遺伝子再構成を伴う症例で細胞核が強く染色され、遺伝子再構成のスクリーニング法として有用と考えられた。③CADM1 スプライシング・バリエント(CADM1v8/9)は小細胞肺がんでは特徴的に認められるが、CADM1v8/9 を小細胞肺がん細胞培養液の92%で検出することができ、血清診断法の開発が有望であることを示した。④腫瘍内インターフェロン(IFN)遺伝子導入と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を進めた。自家造血幹細胞移植後には、腫瘍局所では制御性T細胞の浸潤・増殖が明らかに抑制され、IFN による抗腫瘍免疫誘導を増強するのに適した環境を作り出してい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 IL2 遺伝子を封入して、悪性グリオーマのマウスモデルに投与すると、抗腫瘍免疫が増強され、腫瘍消失率が上昇した。⑥microRNA の miR-210 は、HIF-1 $\alpha$ によって発現が誘導され、鉄代謝関連遺伝子 ISCU とトランスフェリンレセプターの発現を抑制し、細胞内の鉄恒常性の調節に関与することを明らかにした。miR-210 の強発現により、乳がん細胞の増殖抑制効果が確認された。

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・検証を行い、治療の個別化に貢献する。また、予後不良症例に対する新規治療標的候補となる分子経路を同定する。また、本年度は GeneChip 解析から同定した、予後不良な症例において発現している SIX1、SOX2、podoplanin の発現を解析する。

②前立腺がんでは、これまで特徴的な遺伝子異常が認められず、その発症の分子機序について不明な点が多かったが、最近、核内転写因子である ERG 遺伝子と TMPRSS2-ERG、SLC45A3-ERG、NDRG1-ERG 等の遺伝子再構成が報告されている。日本人における ERG 融合遺伝子の出現頻度を明らかにし、前立腺がんの診断に有用であるか検討する目的で、ERG 遺伝子再構成の検出を試みる。

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、診断マーカーや治療標的として確立することを目的とする。特に、細胞接着分子 CADM1 が、小細胞肺がん(SCLC)の診断・治療標的分子として、あるいは、乳がんの予後予測マーカーとして有用であるか検討する。

#### 【B. 免疫遺伝子・核酸治療の開発】

④腫瘍特異的免疫を賦活する効果をもつ I 型インターフェロン (IFN) 免疫遺伝子治療に、免疫抑制性の環境を破壊し新鮮な免疫系を再構築する効果の期待できる造血幹細胞移植を合理的に組み合わせた新たな免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を目指している。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、骨軟部肉腫に対する免疫遺伝子・細胞複合療法の臨床開発を目指し、前臨床研究と抗腫瘍機序解明のための免疫学的検討を行っている。本年度は、造血幹細胞移植が腫瘍の免疫抑制性環境に及ぼす影響について解析する。

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、がん診療における新たな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例から治療前生検検体の提供を受け、前治療のない Stage II-III 食道がん CRT 89 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 (1000 mg/m<sup>2</sup>/day; day 1-4, 29-32) + CDDP (75mg/m<sup>2</sup>/day; day 1, 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 156 例および放射線化学療法後に外科的に切除された食道扁平上皮がん 5 例を材料に、免疫染色で SIX1、SOX2、podoplanin 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た。

②栃木県立がんセンターにおいて、PSA が 20ng/ml 以上の高値を示す進行前立腺がん症例を対象に、生検標本 (20 例) および前立腺がんの診断で前立腺摘出術を施行した手術標本 (119 例) を収集した。生検標本およびパラフィン包埋切片から RT-PCR 法、FISH 法、抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法等の方法を用いて ERG 遺伝子再構成の検出を行った。

③小細胞肺がん (SCLC) 特異的に発現する CADM1

スプライシング・バリエント (CADM1v8/9)に対する抗体を用いて、サンドイッチ法により、SCLC 細胞培養液の SCLC 断片を定量した。CADM1 非発現 SCLC 細胞 SBC5 に CADM1 を導入し、in vitro での凝集実験、細胞接着の共焦点顕微鏡による観察、ヌードマウスでの腫瘍形成実験を行った。また、CADM1 高発現 SCLC 細胞 NCI-H69 に CADM1 siRNA を導入し、in vitro での増殖実験を行った。

細胞接着分子 CADM1 と、その細胞内結合分子 4.1B の乳がん組織における発現の有無を免疫組織染色により、また遺伝子プロモーターのメチル化の有無を重亜硫酸処理により、解析した。

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。BALB/c マウスに致死量(9G)の放射線照射後、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 CT26 大腸がん細胞を接種した。腫瘍内に浸潤する CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の動態を免疫染色やフローサイトメーターにより解析し、がんが免疫寛容を獲得し、造血幹細胞移植がそれを打破する過程を検討した。ついで、腫瘍内の樹状細胞に着目して、樹状細胞を単離してサイトカインの発現状況を検討するとともに、造血幹細胞移植後の樹状細胞が腫瘍の制御性T細胞に及ぼす影響を免疫学的に解析した。

⑤マウス悪性グリオーマ細胞株 RSV-M を C3H/HeN mouse の背部皮内に移植し、マウス由来の IL-2、IL-12、GM-CSF、IFN-βの発現プラスミドをそれぞれ封入した HVJ-E を直接投与し、腫瘍増殖の抑制効果を比較した。IL-2 遺伝子封入 HVJ-E あるいは IL-2 発現レトロウイルスベクターをマウスグリオーマの脳内接種モデルに単回投与し、マウスの生存率、免疫細胞の腫瘍への浸潤を比較した。また、マウスに RSV-M 細胞を移植して腫瘍を形成させた後に切除し、残った腫瘍部位に IL-2 遺伝子封入 HVJ-E を投与し、生存率を調べた。

⑥低酸素ストレスにより miR-210 の発現が顕著であっ

たヒト乳がん細胞 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。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。さらに、赤色蛍光蛋白質 dsRed 遺伝子の下流に miR-210 の相補鎖を組み込んだベクターを、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 に導入し、それら細胞株をヌードマウスの乳腺に移植して、HIF-1α と miR-210 の生体内での関連を調べた。ついで、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。また、トランスフェリンを介した細胞内鉄代謝を確認するため、Alexa594 を標識したトランスフェリンを miR-210 強発現細胞株の培養上清に添加し、トランスフェリンの取り込みを観察した。さらに miR-210 強発現細胞株の細胞増殖を、発色吸光度法により測定した。

細胞の表現型の変化に伴い特異的に変動する遺伝子を探索するため、UT-7 細胞株から派生した赤血球系巨核球系共通前駆細胞 (MEP) に相当する UT-7/GM、赤血球系に分化した UT-7/EPO、巨核球系に分化した UT-7/TPO をモデルとし、Affymetrix 社の Human Genome U133 Plus2.0 を使用して発現解析を行い、パスウェイ解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

「A. 研究目的」に記載した①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①根治的CRTでは、約50%の症例において2ヶ月後の最大効果がCRとなり、そのうち約60%がCRを1年以上継続する(感受性例、全体の30%程度)。一方、non CRと判定された症例およびCRと判定されたものの1年後に再発した症例は合わせて70%であった(非感受性例)。根治的CRT施行82症例を、感受性群とそれ以外の非感受性群に分け、治療前生検の遺伝子発現プロファイルを用いた機械学習による判別器の作製を試みた。50例の学習セットで最適な判別器を構築し、32例の評価セットで検証した。しかし、2群を再現性良く判別するに至らなかった。その大きな理由として、両群に遺伝子発現プロファイル上固有のいくつかのサブタイプ(intrinsic subtype)が存在することが分かった。そこで、次に、教師なしクラスター解析(USV clustering)によるサブタイプ同定を行った。その結果、根治的CRT85例および手術72例(術前CT29例を含む)の両方で再現性良く現れる4つのサブタイプ(B, C1, D, F3)を同定した。このうちサブタイプBは3年生存率80%と高く、感受性例を多く含んでいた。一方、サブタイプDは3年生存率が40%と低く、非感受性例を多く含んでいた。サブタイプBは、正常食道扁平上皮の管腔側の分化細胞のマーカー遺伝子の発現が顕著で、それら分化マーカーの発現は間質-上皮分化転換(MET)を誘導する転写因子が重要な役割を果たしていると考えられた。一方、サブタイプDは、正常食道扁平上皮の基底および傍基底細胞といった未分化細胞のマーカーの発現が顕著で、こちらは上皮-間質分化転換(EMT)を誘導する転写因子SIX1が重要な因子であると考えられた。

術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん156例を材料に、GeneChip解析から同定した予後不良な症例において発現している転写因子SIX1、およびその下流の分子であるSOX2、podoplaninの免疫染色を施行した。その結果、SIX1は8%、SOX2は90%、podoplaninは34%の症例が陽性となった。腫瘍

胞巣辺縁で染色される症例と全体で染色される症例に分類し、予後との関連を解析したが有意な差はなかった。一方、SIX1が染色される扁平上皮がん細胞はpodoplaninも染色され、扁平上皮がんにおいてはSIX1がpodoplaninの発現を誘導する主な転写因子と考えられた。また、CRTの後に外科的に切除された食道扁平上皮がん5例を材料に免疫染色を行うと、SIX1は全く染色されなかったが、SOX2、podoplaninはviableな扁平上皮がん細胞に染色された。

②生検標本の場合35%(7/20例)、手術症例では16.5%(18/109例)でERG融合遺伝子が検出された。腫瘍細胞におけるERG蛋白質の発現は、キメラ遺伝子陰性の細胞株で検出はされるものの、その発現強度は低く、キメラ遺伝子の発現の有無と細胞核における染色性は良好な一致を示した。キメラ遺伝子陽性の症例ではいずれも中等度あるいは強度のERG蛋白質の発現が認められた。一方、キメラ遺伝子陰性の症例では85%(77/91例)の症例がERG蛋白質陰性であり、15%(14/91例)程度の症例でERG蛋白質の中等度の発現が認められたが、ERG蛋白質が強度の発現を示す症例は認められなかった。

③小細胞肺癌組織の免疫組織染色では、34例中9例(26%)にCADMの過剰発現が認められた。小細胞肺癌細胞培養液では13例中12例(92%)で、サンドイッチ法によりCADM1断片を検出した。一方、同じ培養液6例(46%)に、ProGRPを検出したが、この6例では全例でCADM1v8/9が検出された。次に、CADM1非発現SCLC細胞SBC5にCADM1v8/9を導入したところ、in vitroでの凝集能が著明に増加し、CADM1v8/9発現細胞はCADM1発現同様に、ヌードマウスでの腫瘍形成能の促進が認められた。これに対し、CADM1高発現SCLC細胞NCI-H69にCADM1 siRNAを導入してin vitroで培養すると、3次元のスフェロイド様の増殖は著しく抑制された。

細胞接着分子CADM1はアクチンとの結合能を有する4.1Bと細胞内で結合する。手術摘出乳がん67例の免疫組織染色の解析から、CADM1タンパク質、並びに4.1Bタンパク質の発現欠如、または著明低下が、

それぞれ 45 例(67%)、49 例(73%)で認められた。これらの異常は臨床病期の進行に伴って高頻度に認められた。CADM1 と 4.1B の発現異常は、同一患者の腫瘍の非浸潤部と比較して、浸潤部でより高頻度に認められた。

④自家造血幹細胞移植マウスにおいて、脾臓では CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の割合が、非移植群と比較して優位に増加しているが、腫瘍局所ではむしろ制御性T細胞の割合が明らかに抑制されており、抗腫瘍免疫誘導を誘導するのに適した環境を作り出していた。造血幹細胞移植を行ったマウスの腫瘍内 CD11c<sup>+</sup>細胞(樹状細胞)のサイトカイン発現解析したところ、制御性 T 細胞の分化・増殖を抑制する IL-6 の発現が明らかに亢進していた。造血幹細胞移植後の腫瘍の微小環境が CD11c<sup>+</sup>細胞からの IL-6 分泌を促進して、制御性 T 細胞を抑制している可能性が考えられた。そこで、マウスサイトカイン・ケモカイン蛋白質を検出できる抗体アレイを用いて、造血幹細胞移植を行った腫瘍を解析すると、非移植群に比べて VEGF-D の発現が3倍以上亢進していることが明らかとなった。この VEGF-D の刺激により、腫瘍内の CD11c<sup>+</sup>細胞からの IL-6 の分泌を亢進した。このように、自家造血幹細胞移植後に腫瘍内の VEGF-D の濃度が高まり、CD11c<sup>+</sup>細胞に作用して IL-6 の分泌を促すことで腫瘍内の制御性T細胞が抑制される機序を初めて明らかにした。

再発骨軟部肉腫 10 例を対象として、IAB-1(ヒトβ型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤)の腫瘍内直接注入を繰り返し行う遺伝子治療単独の第 I 相臨床試験(用量設定試験)の臨床研究実施計画を策定し、国立がん研究センターの遺伝子治療倫理審査委員会に提出した。

⑤皮内腫瘍モデルでは、IL-2とIL-12遺伝子をそれぞれ封入したHVJ-Eが最も腫瘍抑制効果が強力で、IL-2封入HVJ-Eの方が腫瘍消失率が高かった(70% vs. 40%)。IL-2遺伝子封入HVJ-Eをマウスグリオーマの脳内接種モデルに単回投与し、IL-2遺伝子発現レトロウイルス投与と比較すると、HVJ-E投与

群では、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>リンパ球の浸潤の増強と、制御性T細胞の抑制が認められ、生存率は有意に延長した。切除後残存した腫瘍部位にIL-2遺伝子封入HVJ-Eを単回投与すると60%のマウスが長期生存を示した。一方、IL-2遺伝子を封入しないHVJ-Eでは35日で全例死亡した。

⑥MCF7細胞に、HIF-1αの siRNA を添加し、48 時間後の miRNA-210 の発現量を調べたところ、低酸素ストレス加環境では有意に低下しており、HIF-1αの転写制御を受けて miRNA-210 の発現が誘導されることが明らかとなった。また、腫瘍移植モデルマウスを用いて、腫瘍内においても、HIF-1αの発現が強い低酸素領域において miR-210 の発現が認められることを確認した。

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。がん細胞の増殖には鉄が必須因子である。MCF7 に miR-210 を強発現させてトランスフェリンの取り込みを阻害すると、細胞の増殖速度は 8 割程度に低下した。

UT-7 細胞株の 3 種類の亜株を用いて mRNA マイクロアレイを行うと、UT-7/EPO では 2320 種類、UT-7/TPO では 3728 種類の遺伝子が抽出された。その中でもサイトカインに依存するパスウェイに着目したところ、がんに関与するとの報告がある複数の mRNA, miRNA が抽出された。

#### 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。食道がんは分化度以外の病理組織学的分類指標のない扁平上皮がんであり、約半数の症例で、治療法の選択上有用な2つのサブタイプが存在を示した意義は大きい。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っており、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進んでいる。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。

免疫染色において podoplanin の陽性率は34%であり、染色される扁平上皮がん細胞と染色されていない扁平上皮がん細胞のコントラストがよく、施設間で差のない免疫染色が可能と考えられ、podoplanin が免疫染色による予後予測マーカーとして最も有用と考えられた。また、転写因子 SIX1 の下流として SOX2、podoplanin が存在するものと想定していたが、ヒト扁平上皮がん組織において、SIX1 が染色される扁平上皮がん細胞では podoplanin も染色され、少なくとも扁平上皮がん細胞では SIX1 が podoplanin の発現を制御する主たる転写因子であることが確認された。放射線化学療法後に外科的に切除された食道扁平上皮がんにおいても、podoplanin は viable な扁平上皮がん細胞に染色され、治療抵抗性の扁平上皮がん細胞で発現していると考えられた。

②抗 ERG 抗体を用いた免疫染色では、遺伝子再構成を伴う症例で細胞核が強く染色される一方、キメラ遺伝子陰性の症例でも15%程度の症例で ERG 蛋白質の中等度の発現を示した。このことから、核内転写因子である ERG 蛋白質の発現が前立腺がんの発症に関わる重要な因子であることが推測される。また免疫染色法のみではキメラ遺伝子の発現の有無を決定することは困難であるが、FISH 法では、広い範囲を観察することは困難である。免疫染色法は FISH 法実施前にキメラ遺伝子の有無をスクリーニングし、FISH 法による観察が必要な部位を決定する第一段階のスクリーニング法として有用と考えられた。

③乳がんでは、再発を予知する分子マーカーが必要

である。そこで、乳がんについて CADM1, 4.1B の免疫組織染色を行い、CADM1, 4.1B の発現欠如、低下が病理学的悪性度の高い症例に高頻度で認められたことから、CADM1 経路の不活化、異常が、乳がんの浸潤、転移に関わることが示唆された。また、CADM1, 4.1B の発現欠如の分子機構として、染色体欠損、遺伝子座位のゲノム DNA のヘテロ欠失などに加え、遺伝子プロモーター領域のメチル化が重要であることが明らかになった。これらの結果から、乳がんでは、CADM1, 4.1B はがん抑制遺伝子として働くことが示された。

これに対し、CADM1 は ATL では異所性に高発現し、むしろ ATL 細胞の浸潤能を促進し、がん遺伝子のように働くことを、これまでに明らかにしてきた。本研究では、ATL と類似して、SCLC でも CADM1 の高発現を見出した。しかも、SCLC で発現するスプライシング・バリエント CADM1 v8/9 は、SCLC 以外では精巣にしか発現が認められない疾患特異的な分子である。この特徴を生かして、血清診断を目指し、培養細胞の上清中に CADM1 断片が検出できるかどうかを検討した。抗 CADM1 抗体のサンドイッチ法を用いることにより、SCLC 細胞の92%で CADM1 断片が検出可能なこと、この感度は ProGRP の2倍であること、かつ proGRP を検出できる6例全例で検出できたことから、CADM1 断片の血清診断の臨床展開が有望であることが示された。

さらに細胞膜タンパク質である CADM1v8/9 は、SCLC 治療の分子標的としても有望と考えられ、ベンチャー企業と共同でのヒト化抗体の開発の可能性を探っている。同時に低分子阻害剤の開発のための基礎研究を進める目的で、SCLC 下流経路の解析を行い、CADM1-MPP3-DLG-PI3Kp85 が順に複合体を形成することを示した。SCLC では、CADM1 は PI3K を活性化することにより、AKT や RAC の活性化を介して、細胞運動の促進する可能性が示された。また、この検討で用いた、固相化 CADM1 細胞外断片上に CADM1 発現 MDCK 細胞を重層して、既知の低分子化合物をスクリーニングするアッセイ系は、新規低分



子阻害剤のスクリーニングに転用可能であり、有用性が高い。

④近年、自家造血幹細胞移植では、がん関連抗原を認識するリンパ球が優先的に増殖するなどの機序により抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかとなっている。しかし、造血幹細胞移植が腫瘍の免疫抑制環境に及ぼす効果については明らかでない。本研究により、腫瘍の免疫寛容環境を打破することも、自家造血幹細胞移植の腫瘍免疫誘導機序の一つであることを示した。これは、腫瘍内 IFN 遺伝子導入だけでなく、腫瘍ワクチンなど様々な免疫療法と複合することが可能であり、発展性がある。今後は、自家造血幹細胞移植後に腫瘍免疫を担うリンパ球の特徴や宿主細胞との相互作用を解明し、抗腫瘍免疫をさらに効率よく誘導する治療戦略の開発に役立てる。

⑤IL-2 遺伝子は制御性 T 細胞の増殖も促進する欠点があるが、HVJ-E に封入して用いることで、制御性 T 細胞の有意な抑制が見られ、これが抗腫瘍効果の増強の原因の 1 つであろうと推察される。それ自身が抗腫瘍作用を有する HVJ-E に免疫を賦活するなどの核酸や遺伝子を封入する戦略は、汎用性と発展性があり、がんに対する新たな治療戦略として有望であると考えられる。

⑥転写因子 HIF-1 $\alpha$  による転写制御は低酸素ストレスに関連したがん細胞の病態などに深く関与するが、この経路の中で、新たに、HIF-1 $\alpha$  によって miRNA-210 の発現が上昇し、細胞の鉄代謝に関わる 2 つの遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

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と考えられる。また、HIF-1 $\alpha$  自体は転写因子であるため診断マーカーとしては利用に制限があるが、血液循環中に存在する miR-210 が診断マーカーあるいは HIF-1 $\alpha$  のサロゲートマーカーとして利用できる可能性があると考えられた。さらに、miR-210 の強発現はトランスフェリンの取り込みを阻害し、細胞増殖を抑制することから、治療薬開発に結び付く可能性もある。

## 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検討より、根治的 CRT の 3 年生存率が良好なサブタイプと不良なサブタイプの存在が、独立したサンプルセットでも確認された。この 2 つのサブタイプは、病理組織学的分化度との相関が乏しいにもかかわらずそれぞれ固有の細胞生物学的特徴を有すると推察される遺伝子発現プロファイルを持っており、新規の診断マーカーや治療標的遺伝子の探索に有用であることが示された。また、食道扁平上皮がんの予後不良例において発現している SIX1 とその下流の分子である SOX2 及び podoplanin の免疫染色の結果、podoplanin が予後不良症例を高精度に検出できるマーカーとして有用と考えられた。

②ERG 融合遺伝子は、ヒト前立腺がん組織において、ある一定の割合で認められることを明らかとした。ERG 蛋白質の免疫染色法による検出は FISH 法による観察が必要な部位を決定し、ERG 融合遺伝子の有無をスクリーニングするための方法として有用と考えられた。

③CADM1 が SCLC 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、また CADM1 が培養細胞上清中で検出可能なことを見出した。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自家造血幹細胞移植が、腫瘍の免疫抑制環境を打破し、抗腫瘍免疫誘導を誘導するのに適した環境を作り出せることを明らかとした。GVHD 発症が無い自家造血幹細胞移植と、I 型 IFN 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、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、グリオーマに対して有効性の高いがん治療法開発の可能性が示唆された。

⑥固形がんで発現しているmiR-210は、HIF-1 $\alpha$ 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) Totoki Y, Yoshida T, et al High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 43:464-9, 2011 May.
- 2) Shibata K, Yoshida T, et al Relationship of detection rate of PET cancer screening examinees and risk factors: analysis of background of examinees. *Ann Nucl Med.* 25(4): 261-7, 2011 May.
- 3) Aoyagi K, Yoshida T, et al. Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. *PLoS ONE.* 6(4): e18196, 2011.
- 4) 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.* 100(10): 4546-59, 2011 June.
- 5) Ono H, Yoshida T, et al. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 51(1): 30-41, 2012.
- 6) Kohno T, Yoshida T et al . KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 18(3): 375-7, 2012 Feb.
- 7) Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W: Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival and effect of adjuvant chemotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, in press.
- 8) Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N,

Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, 33(5):1081-1088, 2012.

9) Takami H, Sentani K, Matsuda M, Oue N, Sakamoto N, Yasui W: Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology*, 79(3):154-161, 2012.

10) Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W: Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*, 62(2):112-119, 2012.

11) Hayashi T, Sentani K, Oue N, Anami K, Sakamoto N, Ohara S, Teishima J, Noguchi T, Nakayama H, Taniyama K, Matsubara A, Yasui W: Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology*, 59(4): 710-721, 2011.

12) Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N: Molecular pathology of gastric cancer: Research and practice. *Pathol Res Pract*, 207(10): 608-612, 2011.

13) Hayashi T, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology*, 78(5): 277-284, 2011.

14) Oue 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(2): 235-239, 2011.

15) Miyakura Y, Sugano K, Nomizu T, Lefor A, Yasuda Y. Pathogenicity of A600V variant in exon 12 of the MSH2 gene detected in a Japanese kindred with Lynch syndrome. *Jpn J Clin Oncol.* 42:78-82, 2012. Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Masuda T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, and Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Science*, in press.

- 16) Mimae T, Okada M, Hagiya M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Notch2 and Six1 are up-regulated during progression of early-stage lung adenocarcinoma and define its unfavorable subset at advanced stages. *Clinical Cancer Research*, in press.
- 17) Nagara Y, Hagiya M, Hatano, N, Futai, E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ishiura S, and Ito A. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
- 18) Ito A, Ichianagi N, Ikeda Y, Hagiya M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, and Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet beta cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islet*. in press.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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*, 130:1329-1337, 2012.
- 22) 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*, 117:4396-4405, 2011.
- 23) 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*, 186:5983-5992, 2011.
- 24) Hosokawa Y, Hagiya M, Iino T, Murakami Y, Ito A. Non-contact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1777-1872, 2011.
- 25) 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, Aoki K. In vivo interferon- $\gamma$  gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther*, 19; 34-48, 2012
- 26) Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum. Gene Ther*, 23; 173-186, 2012
- 27) T. Yamazaki, K. Aoki, Y Heike, SW, Kim, T. Ochiya, T. Wakeda, RM. Hoffman, Y. Takaue, H. Nakagama and Y. Ikarashi. Real-time in vivo cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents. *Immunol Lett*. 144; 33-40, 2012
- 28) Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by screening of high diversity targeting ligand library in the format of adenovirus capsid. *Mol Ther*. in press.
- 29) Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: *Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine* ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p227-246
- 30) Kiyohara, E., Tamai, K., Katayama, I., and Kaneda, Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Therapy*, in press.
- 31) 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. *J. Neuro-Oncology*, 103, 19-31, 2011.

## 2. 学会発表

- 32) 河野隆志、白石航也、坂本裕美、久保充明、醍

- 酬弥太郎、中村祐輔、吉田輝彦、横田淳. 肺腺がん感受性を規定する遺伝要因の解明に向けた全ゲノム関連解析. 第70回日本癌学会学術総会名古屋国際会議場 (Symposia S18-1) 10/5/2011.
- 33) 吉田輝彦、佐伯宣久、斎藤聡、松尾恵太郎、佐々木博己、大浪澄子、小野弘恵、坂本裕美、片井均. 胃がんのゲノム網羅的関連解析. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Symposia S18-3) 10/5/2011.
- 34) Siew-Kee Low, Aya Kuchiba, Hitoshi Zembutsu, Akira Saito, Atsushi Takahashi, Michiaki Kubo, Naoyuki Kamatani, Takuji Okusaka, Teruhiko Yoshida, Yusuke Nakamura, Hiromi Sakamoto. Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Symposia S18-4) 10/5/2011.
- 35) 小野弘恵、岩崎基、口羽文、大浪澄子、坂本裕美、吉田輝彦、津金昌一郎. 白血球由来DNAのグローバルなメチル化レベルと葉酸代謝に関わる食事・遺伝的要因の関連. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Japanese Oral Sessions J-3056) 10/5/2011.
- 36) 牛尼美年子、菅野康吉、鈴木茂伸、坂本裕美、吉田輝彦. 網膜芽細胞腫の遺伝子診断-臨床導入の現状-. 日本人類遺伝学会第56回大会第11回東アジア人類遺伝学会 幕張メッセ (シンポジウム12 家族性腫瘍SY12-7) 11/12/2011.
- 37) 吉田輝彦. オミックス時代のがん研究を支える包括的同意に基づくバイオバンク戦略. オミックス医療研究会シンポジウム「先制医療と個別化医療が開く未来」. 理化学研究所 横浜研究所 12/26/2011. (講演)
- 38) 大上直秀: 胃癌トラスツズマブ病理部会作成のHERS ATRAS の紹介と症例提示. 2011 山陰病理 Meeting、特別講演、5月28日、米子、2011
- 39) 大上直秀: 病理セッション「胃癌における HER2 評価法と当研究室における経験」. 第 2 回 HER2 胃癌診断セミナー、講演、9月8日、広島、2011
- 40) 大上直秀、柳原五吉、内藤 寛、阿南勝宏、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: 消化器癌発生・進展と微小環境: SEC11A の胃癌における高発現と TGF- $\alpha$ /EGF 分泌促進作用. 第 22 回日本消化器癌発生学会、ワークショップ 1、11月25-26日、佐賀、2011
- 41) Que N, Yanagihara K, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y and Yasui W: Overexpression of SEC11A is associated with tumor progression through TGF- $\alpha$  secretion in gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka (Japan), September 21-23, 2011
- 42) 大上直秀、林哲太郎、柳原五吉、若松雄太、内藤 寛、仙谷和弘、坂本直也、安井 弥: SAGE-based microarray により同定した SEC11A (SPC18) は TGF- $\alpha$  の分泌を促進し胃癌の進行に関連している. 第 100 回日本病理学会総会、4月28-30日、横浜、2011
- 43) 大上直秀、Aaron J. Schetter、Markus Moehler、下村 学、檜井孝夫、青柳一彦、佐々木博己、岡島正純、大段秀樹、Peter R. Galle、安井 弥、Curtis C. Harris: miR-21 の発現は大腸癌の予後、薬剤感受性に関与する. 第 70 回日本癌学会学術総会、10月3-5日、名古屋、2011
- 44) 菅野康吉: 尿路上皮癌の分子腫瘍マーカー開発の現状と障壁 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会シンポジウム 平成23年10月2日(日) 名古屋国際会議場 (愛知県)
- 45) Makiko Tahara, Futoshi Satoh, Takeshi Inoue, Yasuyuki Miyakura, Yasuyuki Yasuda, Kokichi Sugano: Colorectal cancer cell lines sensitive to 5-aza-dC respond to topoisomerase I inhibitor and DNA cross-linking agent 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya
- 46) Takeshi Inoue, Makiko Tahara, Tetsuro Kodama, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Kokichi Sugano: Antitumor effect of a triple angiokinase inhibitor, BIBF1120 against bladder cancer cell lines harboring FGFR3 mutations 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress

Center, Nagoya

- 47) Kokichi Sugano, Kohji Tanakaya, Hideki Ishikawa, Junichirou Nasu, Yoshihiro Moriya, Teruhiko Yoshida, Yoichi Furukawa: Genomic deletion of exon5 in MLH1 is a major founder mutation in Japanese kindred with Lynch syndrome 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya
- 48) Yoshiaki Matsumura, Makito Miyake, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Tetsuro Kodama, Kokichi Sugano: Prevalence of ERG gene rearrangements in Japanese patients with prostate cancer 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya
- 49) Yoshitomo Chihara, Motokiyo Yoshikawa, Masaomi Kuwada, Yi Luo, Makito Miyake, Yasushi Nakai, Satoshi Anai, Kokichi Sugano, Kiyohide Fujimoto, Hiroki Kuniyasu, Yoshihiko Hirao: Integrated Genetic Analysis of Allelic Imbalance and FGFR3 Mutation by SNP-based Pyrosequencing in Urothelial Cancer 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya
- 50) 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 99 回日本泌尿器科学会総会、名古屋市、2011 年 4 月 21 日
- 51) 村上善則、伊藤彰彦、後藤明輝。膜タンパク質 CADM1 による細胞の接着と浸潤の制御。第 100 回日本病理学会総会ワークショップ、横浜市、2011 年 4 月 29 日
- 52) 萩山満、井上敬夫、村上善則、伊藤彰彦「CADM1 のスプライシングによる神経 - マスト細胞相互作用の発生時期特異的な制御」第 100 回日本病理学会総会、横浜市、2011 年 4 月 30 日
- 53) Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 17<sup>th</sup> Charles Heidelberger International Symposium. 西安市、中国、2011 年 6 月 6 日
- 54) Yoshinori Murakami, Masayoshi Nagata, Mika Sakurai-Yageta, Taketo Kawai, Yumi Tsuboi, Miwako Iwai, Mari Masuda, Akiteru Goto, Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC, in oncogenesis. The 3rd CREST-SBM International Conference: Mathematical Methods in Cancer Cell Biology, 広島市、2011 年 6 月 9 日
- 55) Akiteru Goto, Junichi Shibahara, Masashi Fukayama, Yoshinori Murakami: Pathological Role of CADM1 in Cholangiocarcinoma Related and Unrelated to Liver Fluke Infection. The 3rd International Symposium 2011 at Keimyung University Dongsan Hospital Cancer Center and Korea Regional Biobank. 大邱(テグ)市、韓国、2011 年 6 月 17 日
- 56) Akiteru Goto, Masayoshi Nagata, Masashi Fukayama, Yoshinori Murakami. Loss of CADM4 expression in human non-small cell lung cancer. 文部省科学研究費「がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動」平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ、茅野市、2011 年 9 月 1 日
- 57) 櫻井美佳、丸山智子、石村恵、柳川梓、尾山大明、近藤裕子、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、村上善則、MALDI 質量分析を用いた細胞間接着分子 CADM1 の N 型糖鎖の解析、第 59 回日本質量分析学会総合討論会、吹田市、2011 年 9 月 14 日
- 58) 櫻井美佳、丸山智子、石村恵、柳川梓、尾山大明、近藤裕子、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、村上善則、MALDI 質量分析を用いた細胞間接着分子 CADM1 の O 型糖鎖の解析、第 59 回日本質量分析学会総合討論会、吹田市、2011 年 9 月 15 日
- 59) 川合剛人、後藤明輝、岩井美和子、永田政義、森川鉄平、久米春喜、深山正久、本間之夫、村上善則、Aberrations of cell adhesion molecules, CADM1 and CADM4, in urinary bladder cancer、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3 日
- 60) 萩山満、伊東剛、村上善則、伊藤彰彦「組織構築を再現した培養形における細胞間接着の力学的解析：フェムト秒レーザーの応用」第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3 日
- 61) 後藤明輝、櫻井美佳、Chawait Pairojkul,

- Puangrat Yongvanit, 柴原純二、深山正久、村上善則、肝吸虫関連および非関連肝内胆管癌における CADM1 の発現：日本及びタイ症例の比較研究、第 70 回日本癌学会年会、名古屋、2011 年 10 月 4 日
- 62) Yuka Takahashi, Miwako Iwai, Taketo Kawai, Atsushi Arakawa, Takeshi Ito, Mika Sakurai-Yageta, Akihiko Ito, Akiteru Goto, Noriko Ito, Mitsuru Emi, Mitsue Saito, Fujio Kasumi and Yoshinori Murakami. Identification of molecular targets involved in the progression and recurrence of breast cancer. 第 70 回日本癌学会年会、名古屋市、2011 年 10 月 4 日
- 63) 石村恵、櫻井美佳、後藤明輝、村上善則、miR-375 および miR-214/199a による CADM1 の発現抑制とそのがん化への関与、第 70 回日本癌学会年会、名古屋市、2011 年 10 月 4 日
- 64) 村上成文、櫻井美佳、村上善則、細胞伸長アッセイの特異的阻害剤の検索による CADM1 シグナル伝達経路の解析、第 70 回日本癌学会年会、名古屋市、2011 年 10 月 4 日
- 65) Shigefumi Murakami, Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. Analysis of CADM1 signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay. The 26th European Cytoskeletal Forum (ECF) Meeting. ストリーサ市、イタリア、2011 年 10 月 29 日
- 66) 村上善則、齊藤光江、江見充、Copy Number Variation (CNV) の網羅的検索による癌のゲノム異常の解析、日本人類遺伝学会第 56 回大会シンポジウム、千葉市、2011 年 11 月 11 日
- 67) 川合剛人、後藤明輝、永田政義、岩井美和子、森川鉄平、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 の異常、日本人類遺伝学会第 56 回大会、千葉市、2011 年 11 月 11 日
- 68) Mika Sakurai-Yageta, Mari Masuda, Toshiki Watanabe, and Yoshinori Murakami. The role of a cell adhesion molecule, CADM1, in human adult T-cell leukemia, The 8th China-Japan Joint Laboratory Workshop, 北京市、中国、2011 年 11 月 21 日
- 69) Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 1st France-Japan Cancer Workshop, モンペリエ市、フランス、2011 年 11 月 23 日
- 70) Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 18th East Asia Joint Symposium – Life Science Today in East Asia, 上海市、中国、2011 年 12 月 9 日
- 71) Yumi Tsuboi, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Akihito Ito, Yoshinori Murakami. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年 12 月 15 日
- 72) Hiroyuki Kogai, Mika Sakurai-Yageta, Yoshinori Murakami. Cleavage of CADM1 by Caspase-3 and its role in the induction of apoptosis. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年 12 月 16 日
- 73) 伊東剛、永田政義、山田大介、川合剛人、岩井美和子、市原博美、丸山智子、櫻井美佳、伊藤彰彦、後藤明輝、村上善則、遺伝子欠損マウスを用いた CADM1 の肺腫瘍抑制における役割の解明、文部省科学研究費「がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動」平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津市、2012 年 1 月 18 日
- 74) Taketo Kawai, Akiteru Goto, Miwako Iwai, Masayoshi Nagata, Teppei Morikawa, Shigeki Morita, Haruki Kume, Masashi Fukayama, Yukio Homma, and Yoshinori Murakami. Aberration of a cell adhesion molecule, CADM1, and its pathological or biological significance in urinary bladder cancer. The 27th European Association of Urology Annual Congress, パリ市、フランス、2012 年 2 月 25 日
- 75) K. Aoki. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob (Symposium). 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
- 76) T Udagawa, K Narumi, T Ochiya, T Yoshida, K. Aoki. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of type I interferon gene transfer for sarcoma. 第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
- 77) T Udagawa, K Narumi, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K. Aoki. Autologous hematopoietic stem cell transplantation

- suppresses immunotolerant environment in tumors and induces antitumor immunity. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
- 78) K. Aida, T. Udagawa, K. Narumi, K. Suzuki, N. Goto, Y. Ikarashi, S. Ohnami, T. Yoshida, K. Aoki. Inhibition of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- $\gamma$  gene transfer. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
- 79) Kazunori Aoki. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. MRCCMT International symposium. January 2011 (Busan)
- 80) K. Narumi, T. Udagawa, Y. Ikarashi, T. Ochiya, T. Yoshida and K. Aoki. In vivo delivery of interferon- $\gamma$  gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle).
- 81) 金田安史: HVJ envelope vector の抗腫瘍効果の解明と高機能型ベクターの開発 第84回日本生化学会大会 (シンポジウム) 平成23年9月24日京都
- 82) Yasufumi Kaneda: Multilateral anti-cancer strategies using Sendai virus envelope vector 2011 International Advanced Drug delivery Symposium (Taiwan)平成23年4月27日
- 83) Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, Takahiro Ochiya. miR-210 Maintains Iron Homeostasis in Cancer Cells by Down-Regulating ISCU and TfR: RNAi&miRNA Europe 2011 Munich, Germany 8-9 September 2011. Poster Award Winner.
- 84) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. microRNA-210 による鉄代謝制御と腫瘍内における役割. 第3回日本 RNAi 研究会, 口演, グランドプリンスホテル広島, 2011年8月26~27日
- 85) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. miRNA-210 による新たな鉄代謝制御機構. 第84回日本生化学会, ポスター, 京都国際会館, 2011年9月21~24日
- 86) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. miR-210 is an iron sensor and contributes to maintenance of iron homeostasis in breast cancer cells.(がん細胞における miR-210 による新たな鉄代謝制御機構). 第70回日本癌学会学術総会, 口演, 名古屋国際会議場, 2011年10月3~5日
- 87) 谷崎祐太, 吉岡祐亮, 永澤和道, 小坂展慶, 小松則夫, 落谷孝広, 加藤尚志. ヒト白血病細胞株における網羅的遺伝子発現プロファイリング. (Global Gene Expression Profiling of Human Leukemia Cell Lines.)第73回日本血液学会学術集会, 一般口演 OS-1-179, セッション「AML: 標的遺伝子」, 名古屋国際会議場 431+432 (3F), 2011年10月14日

1. 特許取得

1)Method of treating solid tumor (Patent No.: US 7,985,407 B2)

Date of Patent:Jul 26, 2011

Inventors:Kazunori Aoki, Teruhiko Yoshida

Assignee:National Cancer Center

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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 本研究課題では、治療前の食道がんの遺伝子発現プロファイルに基づき治療効果を予測して治療の個別化に貢献するとともに、予後不良症例の信号伝達系解明・分子標的的同定を目的とする。術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん 156 例を材料に、GeneChip 解析から同定した予後不良な症例において発現している転写因子 SIX1、およびその下流の分子である SOX2、podoplanin の免疫染色を施行した。その結果、SIX1 は 8%、SOX2 は 90%、podoplanin は 34%の症例が陽性となった。腫瘍胞巣辺縁で染色される症例と全体で染色される症例に分類し、予後との関連を解析したが有意な差はなかった。一方、SIX1 が染色される扁平上皮がん細胞は podoplanin も染色され、扁平上皮がんにおいては SIX1 が podoplanin の発現を誘導する主な転写因子と考えられた。SIX1 は陽性率が低く免疫染色で検出するには適さない分子と考えられ、SIX1 の下流である podoplanin が予後不良症例を高精度に検出できるマーカーとして有用と考えられた。今後はさらに症例数を増やし、予後予測マーカーとしての有用性および評価方法を検討する。

## A. 研究目的

食道がんは根治目的の放射線化学療法と手術の成績が多く施設で拮抗しており、治療選択法が求められている。本研究課題では、治療前の食道がん生検組織の遺伝子発現プロファイルに基づき治療効果を予測して治療の個別化に貢献するとともに、予後不良症例の信号伝達系解明・分子標的的同定を目的とする。本年度は GeneChip 解析から同定した予後不良な症例において発現している SIX1、SOX2、podoplanin の発現を解析した。SIX1 は転写因子であり、SIX1 の下流に SOX2 や podoplanin が存在しているものと想定している。SOX2 は転写因子であり、多分化能や ES 細胞の維持に関わっていることが知られている。マウスでは foregut に発現しており、角化等に関わっている。podoplanin は腎臓の上皮細胞である podocyte から発見された I 型膜貫通型タンパク質で、血小板凝集作用があり、がんの転移に関わっていることが知られている。さらにリンパ管内皮のマーカーとして病理診断業務で汎用されている。

## B. 研究方法

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156例および放射線化学

療法後に外科的に切除された食道扁平上皮がん5例を材料に3種類の免疫染色、すなわちSIX1、SOX2、podoplaninの免疫染色を施行した。

免疫染色の方法として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、賦活化処理を行いSIX1、SOX2、podoplaninの1次抗体を1時間室温で反応させた。切片をPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ラビットおよび抗マウス抗体(DAKO社)を1時間室温で反応させ、DABにより発色を行った。賦活化処理は、SIX1はpH9のTarget Retrieval Solution(DAKO社)を使用し、95℃、40分処理した。SOX2、podoplaninはpH6のクエン酸バッファーを使用し、95℃、40分処理した。1次抗体にはSIX1はシグマ社、SOX2はミリポア社、podoplaninはニチレイ社(クローン名D2-40)を使用した。

免疫染色の評価方法として、扁平上皮がん細胞に注目し、10%以上染色された症例を陽性とし、10%以下の染色は陰性とした。陽性例のうち、腫瘍胞巣の辺縁に染色された症例を辺縁陽性例、腫瘍胞巣の全体に染色された症例を全体陽性例とした。

(倫理面への配慮) 本研究はヒト由来の食道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はずべて破棄し、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

はじめに、術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん 156 例を材料に SIX1、SOX2、podoplanin の免疫染色を施行した。SIX1 は、上記研究方法に記載した方法で行っても多くの症例は腫瘍細胞の核にほとんど染色されなかった。ただし 12 例において弱いながらも扁平上皮がんの核に染色された。この 12 例では、10%以上の扁平上皮がんに染色されており、陽性率は 8%であった。ただし、染色強度が非常に弱いので、陽性とするか、陰性とするかは今後の課題である。さらに染色強度が弱いということから、辺縁陽性例なのか全体陽性例なのか判定が困難であった。

SOX2 は 155 例 (99%) とほぼすべての症例で染色された。155 例のうち 10%以上の腫瘍細胞が染色された症例は 141 例で、陽性率は 90%であった。特に上皮内がんの部分では全例染色された。上皮内がんの部分では原則基底側に染色され、辺縁陽性と判定された。このように上皮内がんの成分を有する症例では辺縁陽性と判定されるため、上皮内がんを含まない症例のみで SOX2 の判定を行うこととした。さらに腫瘍胞巣中心部で壊死をきたしている症例もあり、このような症例では腫瘍胞巣中心部の染色の評価ができないため解析対象から除外した。その結果 19 例が評価可能な症例として残り、9 例が辺縁陽性例、10 例が全体陽性例であった。陰性例 14 例、辺縁陽性例 9 例、全体陽性例 10 例を対象とし、カプランマイヤー法で予後との関連を解析したが、大きな差は見出されなかった。

podoplanin は扁平上皮がん細胞に加え、間質

の線維芽細胞やリンパ管内皮細胞にも染色された。本検討では扁平上皮がん細胞における染色性のみを評価の対象とした。その結果、10%以上の扁平上皮がん細胞に染色される症例は 53 例 (34%) であった。SOX2 と同様、上皮内がんの部分では全例染色された。上皮内がんの部分では原則基底側に染色され、辺縁陽性と判定された。このように上皮内がんの成分を有する症例では辺縁陽性と判定されるため、上皮内がんを含まない症例のみで判定を行うこととした。さらに腫瘍胞巣中心部で壊死をきたしている症例もあり、このような症例では腫瘍胞巣中心部の染色の評価ができないため解析対象から除外した。その結果 19 例が評価可能な症例として残り、9 例が辺縁陽性例、10 例が全体陽性例であった。辺縁陽性例 9 例、全体陽性例 10 例を対象とし、カプランマイヤー法で予後との関連を解析したが、大きな差は見出されなかった。

次に、SIX1、SOX2、podoplanin が染色される扁平上皮がん細胞の分布について検討した。その結果、podoplanin が染色されている扁平上皮がん細胞では SOX2 が高頻度に染色されていた。特に腫瘍胞巣辺縁のみで podoplanin が染色される部分では SOX2 も腫瘍胞巣辺縁で強く染色される傾向にあった。一方、SOX2 が染色された扁平上皮がん細胞でも podoplanin が染色されないものも認められた。SIX1 は 12 例において弱いながらも染色が認められた。この 12 例においては、SIX1 の発現と podoplanin 発現が一致する傾向にあった。すなわち、SIX1 が腫瘍胞巣全体に染色されている部分では podoplanin も腫瘍胞巣全体に染色され、SIX1 が腫瘍胞巣辺縁のみで染色されている部分では podoplanin も腫瘍胞巣辺縁のみに染色された。一方、SIX1 が染色された扁平上皮がん細胞では SOX2 は染色されない傾向にあった。

次に、放射線化学療法後に外科的に切除された食道扁平上皮がん 5 例を材料に SIX1、SOX2、podoplanin の免疫染色を施行した。その結果、SIX1 は全く染色されなかったが、SOX2、podoplanin は viable な扁平上皮がん細胞に染色された。一方、壊死に陥っていると想定される変性した腫瘍細胞では SOX2、podoplanin は染

色されなかった。

#### D. 考察

本年度は GeneChip 解析から同定した予後不良な症例において発現している SIX1、SOX2、podoplanin の発現を解析した。SIX1 は転写因子であり、SIX1 の下流に SOX2 や podoplanin が存在しているものと想定している。術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん 156 例の解析において、SIX1 は 12 例のみに弱い染色を認めた。SIX1 が SOX2 や podoplanin の発現を制御していると考えており、予後に影響する最も重要な分子であるが、転写因子という性質上発現量が少なく、弱い染色像しか得られなかったものと考えられる。本研究の最終目的は臨床応用可能なマーカー分子を同定することであり、少なくとも SIX1 の免疫染色は臨床応用には適さないと考えられた。SIX1 の下流の分子である SOX2 は 155 例 (99%) とほぼすべての症例で染色され、免疫染色では感度が高すぎると考えられた。加えて、弱く染色される扁平上皮がん細胞と強く染色される扁平上皮がん細胞が混在しており、施設間で差がでないような免疫染色を行うのは困難と考えられた。podoplanin の陽性率は 34% であり、染色される扁平上皮がん細胞と染色されていない扁平上皮がん細胞のコントラストがよく、施設間で差のない免疫染色が可能と考えられた。さらにリンパ管内皮のマーカーとして既に病理診断業務で汎用されており、各施設で導入は容易である。以上、podoplanin が免疫染色による予後予測マーカーとして最も有用と考えられた。

本年度は、10%以上の扁平上皮がん細胞が染色された症例を陽性とし、陽性例のうち腫瘍胞巣の辺縁に染色された症例を辺縁陽性例、腫瘍胞巣の全体に染色された症例を全体陽性例とした。このような評価方法は扁平上皮がんの分化の状態を反映する優れた方法ではあるが、上皮内がんの成分を混在する症例や腫瘍胞巣中心部に壊死をきたしている症例では評価できない。本年度の結果においても適切に評価できた症例は 19 例であり、予後との関連は認められなかった。今後は陽性例の定義を検討し、予後を正確に予

測し施設間で差のない評価方法を検討する。

転写因子 SIX1 の下流として SOX2、podoplanin が存在するものと想定していたが、実際の扁平上皮がん組織において少なくとも SIX1 が染色される扁平上皮がん細胞では podoplanin も染色された。従って少なくとも扁平上皮がん細胞では SIX1 が podoplanin の発現を制御する主たる転写因子であることが確認された。GeneChip 解析から同定した予後不良な症例において発現している遺伝子として SIX1 を同定しているが、上述のごとく SIX1 の染色性は弱く、SIX1 陽性例を高感度に同定するには podoplanin の免疫染色が有用と考えられた。

放射線化学療法後に外科的に切除された食道扁平上皮がんにおいても、podoplanin は viable な扁平上皮がん細胞に染色され、治療抵抗性の扁平上皮がん細胞で発現していると考えられた。

#### E. 結論

GeneChip 解析から同定した予後不良な症例において発現している SIX1 は扁平上皮がん組織では発現レベルが低く、免疫染色では検出が困難である。podoplanin は SIX1 の下流に位置していると想定しているが、実際の扁平上皮がん組織において、SIX1 が podoplanin の発現を制御する主たる転写因子であることを確認した。

今後は podoplanin の免疫染色を行い、予後を正確に予測する評価方法を検討するとともに、多数例の放射線化学療法後に切除された食道扁平上皮がんを材料に podoplanin の発現を解析し、治療抵抗性との関連を検討する。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) **Que N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W: Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival and effect of adjuvant chemotherapy in patients**

with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, in press.

- 2) Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, 33(5):1081-1088, 2012.
  - 3) Takami H, Sentani K, Matsuda M, Oue N, Sakamoto N, Yasui W: Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology*, 79(3):154-161, 2012.
  - 4) Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W: Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*, 62(2):112-119, 2012.
  - 5) Hayashi T, Sentani K, Oue N, Anami K, Sakamoto N, Ohara S, Teishima J, Noguchi T, Nakayama H, Taniyama K, Matsubara A, Yasui W: Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology*, 59(4): 710-721, 2011.
  - 6) Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N: Molecular pathology of gastric cancer: Research and practice. *Pathol Res Pract*, 207(10): 608-612, 2011.
  - 7) Hayashi T, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology*, 78(5): 277-284, 2011.
  - 8) Oue 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(2): 235-239, 2011.
2. 学会発表
    - 1) 大上直秀 : 胃癌トラスツズマブ病理部会作成の HERS ATRAS の紹介と症例提示. 2011 山陰病理 Meeting、特別講演、5月28日、米子、2011
    - 2) 大上直秀 : 病理セッション「胃癌における HER2 評価法と当研究室における経験」. 第2回 HER2 胃癌診断セミナー、講演、9月8日、広島、2011
    - 3) 大上直秀、柳原五吉、内藤 寛、阿南勝宏、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥 : 消化器癌発生・進展と微小環境 : SEC11A の胃癌における高発現と TGF- $\alpha$  /EGF 分泌促進作用. 第22回日本消化器癌発生学会、ワークショップ1、11月25-26日、佐賀、2011
    - 4) Oue N, Yanagihara K, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y and Yasui W: Overexpression of SEC11A is associated with tumor progression through TGF- $\alpha$  secretion in gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka (Japan), September 21-23, 2011
    - 5) 大上直秀、林哲太郎、柳原五吉、若松雄太、内藤 寛、仙谷和弘、坂本直也、安井 弥 : SAGE-based microarray により同定した SEC11A (SPC18) は TGF- $\alpha$  の分泌を促進し胃癌の進行に関連している. 第100回日本病理学会総会、4月28-30日、横浜、2011
    - 6) 大上直秀、Aaron J. Schetter、Markus Moehler、下村 学、檜井孝夫、青柳一彦、佐々木博己、岡島正純、大段秀樹、Peter R. Galle、安井 弥、Curtis C. Harris : miR-21 の発現は大腸癌の予後、薬剤感受性に関与する. 第70回日本癌学会学術総会、10月3-5日、名古屋、2011
  - H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。