

8. Yamamoto Y, Goto N, Ohnami S, Miura Y, Yamamoto M, Yoshida T, Aoki K. New method to produce peptide-displaying adenovirus library. 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
9. Ikarashi Y, Aoki K, Kim S-W, Imai T, Hoffman RM, Nakagama H. NKT cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
10. 青木一教. 固形がんに対する新たな免疫遺伝子・細胞療法の開発. 第6回日本緩和医療薬学会. Oct 6-7, 2012.
11. Narumi K, T Udagawa T, Miyakawa R, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of regulatory T cells within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第41回日本免疫学会総会. Dec 5-7, 2012.
12. Narumi K, Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation is enhanced by a priming of the donor T lymphocytes to tumor-associated antigens. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 21-25, 2013 (Maui).

H. 知的財産権の出願・登録状況

●特許取得状況

特になし

前向きトランスクリプトーム解析研究に基づく食道がん予知医療の開発

研究分担者 佐々木博己 国立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野・ユニット長

研究要旨

食道がんの根治的化学放射線療法について、治療前に効果を予測するとともに、予後不良症例に特徴的な分子経路の解明から新規治療標的候補を同定するため、治療前生検サンプル 274 症例を用いた食道がんの網羅的な遺伝子発現解析を行った。発現プロファイルを用いたサブタイピングにより、5年生存率が良好なサブタイプBと不良なサブタイプDを同定した。それぞれのサブタイプに特異的に高発現または低発現する遺伝子を選抜したところ、サブタイプB、Dは、それぞれMETまたはEMT制御転写因子SIM2、SIX1で支配される転写ネットワークが活性化しており、固有の生物学的特徴を有することが示された。選抜された遺伝子は、両サブタイプの分別による体外診断薬開発に有用であるばかりでなく、治療抵抗性サブタイプで活性化している分子経路には、国内外の製薬会社と共同開発中の分子標的薬の標的遺伝子も含まれており、治験の実施が期待される。

A. 研究目的

食道がんは年間 16,400 人が罹患し（2005 年）、11,669 人が死亡する（2007 年）難治性がんである。ここ 10 年間にわたる日本臨床腫瘍研究グループ（JCOG）をはじめとする標準治療の改良の努力により改善されつつあるが、依然としてその死亡率は高値である。現在、II-III 期の局所進行食道扁平上皮がんにおける標準治療は、術前化学療法（術前 CT）であり、5 年生存率は 55% である（JCOG9907）。今後、他の治療方法も含めた個別化医療を推進することによりさらなる改善が期待される。他の有望な治療方法としては、低侵襲性であるため潜在的需要が高いと考えられる根治的化学放射線療法（根治的 CRT）がある。JCOG9906 における 5 年生存率は、37% に留まったものの近年改善されつつあり、現在では術前 CT と拮抗している（本研究においては 53%）。根治的 CRT では、non CR (non complete response) の治療前診断はもとより、1 年間 CR (complete response) が継続する症例の 5 年生存率が約 80% であることが示されており、そうした感受性例を治療開始前に見つけ、治療の個別

化を図ることにより食道がん全体の予後の改善が期待できる (Fig. 1)。そこで、本研究では、感受性例、非感受性例の分類・診断のため、治療前生検サンプルの遺伝子発現プロファイルを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。また、予後不良症例については、新規治療標的候補遺伝子を探索するため特徴的な分子経路の同定を試みた。

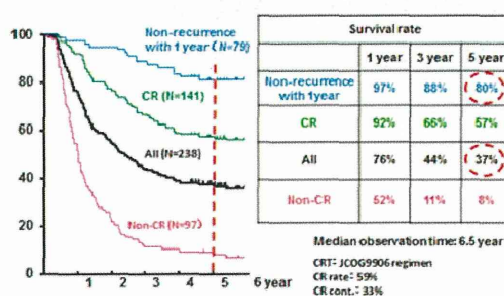


Fig. 1 Survival curve of CRT cases in past ESCC (Stages II, III) (N=238; 1992~2004, NCC Hospital East)

B. 研究方法

本研究に使用した臨床試料は、国立がん研究センターの倫理審査委員会で承認のもと、被験者からインフォームドコンセントの手続きを経て研究に寄与されている。実験に使用した治療前生検サンプル (II-III 期) は、当センター東病院において

2004年-2008年の4年間に収集された197例、および、中央病院にて2004年-2007年の3年間に収集された77例、全274例である。全てのサンプルについてマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを取得し、GeneSpring GX, EXCEL, Cluster & Treeview等の解析プログラムを用いたトランスクリプトーム解析を行った。従来の教師ありクラスター解析 (SV clustering) と機械学習による判別器の作製に加え、教師なしクラスター解析 (USV clustering) による症例のサブタイプ分類、および、CRT感受性と相関しているサブタイプの同定も行った。また、サブタイプ特異的に高発現または低発現している遺伝子を選抜することにより各サブタイプで活性化しているシグナル伝達経路の推定を行うと共に、診断キット開発向け qRT-PCR によるサブタイプ分類に有効と思われる遺伝子の選抜を行った。

(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」に従い研究を行った。また、所属施設の遺伝子組み換え実験や動物実験に関わる各種委員会の審査を受け理事長の承認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

根治的 CRT では、約 50%の症例が 2 ヶ月後の腫瘍最大効果が 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 70%であった (非感受性例)。

1. 根治的 CRT 感受性判別器の作成：東病院において根治的 CRT 施行された 82 症例を 1 年以上 CR が続いた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 SV clustering と機械学習による判別器の作製を試みた。学習セットとして 50 例、残りの 32

例を評価セットとして使用した。8 種の遺伝子抽出法と 5 種の機械学習アルゴリズムによって、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。

2. 遺伝子発現プロファイル固有のサブタイプ同定：1) の結果を受け、次に USV clustering によるサブタイプ同定を行った。

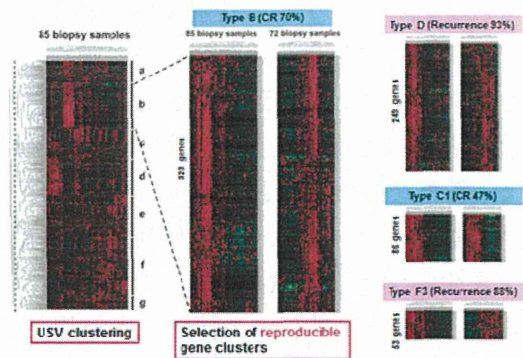


Fig. 2 USV clustering identified 4 subtypes in two sample sets

その結果、根治的 CRT85 例および手術 72 例 (術前 CT 29 例を含む) の両者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 (Fig. 2)。これら 4 つのサブタイプは、東病院で根治的 CRT が施行された確認用の 40 サンプルセットでも再現性よく分類された。さらに、このうちの B, D, F3 については、中央病院からの 77 例を加えた全 274 例での同様の解析においても高い再現性をもって分類できることが確認された。また、全 274 サンプルを利用することで、新たなサブタイプが 2 つ同定できた。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。

### 3. サブタイプ B および D の生物学的特徴：

サブタイプ B または D で特異的に高発現している遺伝子 ( $p < 0.05$ , t-test、平均 2 倍以上) は、それぞれ 599 個、453 個あった。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



SIM2で支配されていることが分かった。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によって多くが支配されていることが分かった(西村、青柳ら、第71回日本癌学会)。

次に、食道がんにおけるSIM2、SIX1のシグナル伝達経路に関連した遺伝子セットをサンプル間の発現パターンとの相関性を利用して抽出を試みたところ、それぞれ442個、162個抽出することができ、それぞれのシグナル伝達経路がそれぞれのサブタイプにおいて活性化されていることが示された。2サブタイプとも、活性化しているシグナル伝達経路と病理組織学的分化度との相関はほとんどなく、新たな分類指標となる可能性が示された。得られた遺伝子リストは、qRT-PCRにより両サブタイプを生物学的な特徴を踏まえて分別できるだけでなく、治療標的遺伝子の探索にも有用である。現在、qRT-PCRにより両サブタイプを同定できる最良、最小の遺伝子組み合わせを検討中である。また、F3も含めた他のサブタイプについても、同様の解析を進行中である。

#### D. 考察

マイクロアレイの普及に伴い、がんの新たなサブタイプ同定が進んできた。すなわち遺伝子発現プロファイル固有のサブタイプ分類が広まった。しかし、多くのがん(乳がん、胃がんなど)での報告は、「発生起源細胞や特定の転座や遺伝子増幅などの機序」が異なるタイプの分類に留まっているのが現状であった。我々が分類を行っ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癌であり、約半数の症例で、治療法を選択上有用な2つのサブタイプの存在を示した意義は大きい。今後、診断においては、サブタイプDを除くことにより予後の底上げを図り、さらにサブタイプBを同定することにより、治療効果が見込まれる症例を段階別に分類できることが期待される。また、診断法の確立以外にも創薬に繋がる各サブタイプの本態解明に関する研究が展開されるものと考えられる。

#### E. 結論

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の存在が他施設の77サンプルセットにおいても確認された。サブタイプB、Dは病理組織学的分化度との相関がないにもかかわらずそれぞれSIM2、SIX1に関するシグナル伝達経路が活性化しているという固有の細胞生物学的特徴を有することが示された。以上より、本研究で抽出した食道がんにおけるSIM2、SIX1のシグナル伝達経路に関連した遺伝子セットは、サブタイプ分類診断薬、治療薬の開発に役立つ可能性は極めて高い。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### ●論文発表

1. Ono H, Hiraoka N, Lee Y-S, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Sakamoto H, Chiwaki F, Sasaki H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:30-41, 2012.
2. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto M, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1, and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 42: 148-152, 2012.
3. Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W. Cytokewratin 7 is a predictive marker for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 19: 1902-1910, 2012.
4. Matsumoto K, Arai T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Ichiro Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Kazuto Nishio, K,

- Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 106: 727-732, 2012.
5. 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 intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis* 33: 1081-1088, 2012.
  6. Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 79: 290-306, 2012.
  7. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse* 66: 747-751, 2012.
  8. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and m-opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology* 117: 847-856, 2012.
  9. Imoto A, Mitsunaga S, Inagaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Ikeda M, Nakachi K, Higuchi K, Ochiai A. Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 131:2795-2807, 2012.
  10. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W. Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci.* 103:1744-1750, 2012.
  11. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W. RegIV is a direct target of intestinal transcription factor CDX2 in gastric cancer *PLoS One* 7(11): e47545, 2012.
  12. Fujita T, Yanagihara K, Takeshita F, Aoyagi K, Takigahira M, Chiwaki F, Fukagawa T, Katai H, Ochiya T, Sakamoto H, Konno H, Yoshida T, Sasaki H. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhus gastric cancer model mice. *Cancer Sci.* 104: 214-222, 2013.
  13. 佐々木博己、五十畑則之、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、千脇史子、青柳一彦、EMTと食道扁平上皮癌、*Surgery Frontier* 19: 51-55 (2012)
- 学会発表
15. 藤田剛、青柳一彦、柳原五吉、佐々木博己、今野弘之、びまん性胃癌で特異的に発現するプロテアーゼの探索、第17回日本病態プロテアーゼ学会、2012.
  16. 藤田剛、高橋陵宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己、腹膜播種におけるびまん性胃癌幹細胞に対する TGF-beta の二元的機能、第71回日本癌学会、ワークショップ、2012.
  17. 千脇史子、浜口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、吉田輝彦、佐々木博己、未分化胃癌患者腹水からの新規34がん細胞株および2マウス中皮細胞株の樹立、第71回日本癌学会、2012.
  18. 小野弘恵、千原大、千脇史子、佐々木博己、坂本裕美、吉田輝彦、松尾恵太郎、佐伯宣久、胃がん・膀胱がん易罹患性関連遺伝子PSCA上のミスセンスSNPは胆のうがん細胞においてPSCAのがん抑制機能を減弱させる、第71回日本癌学会、2012.
  19. 大上直樹、野口剛、阿南勝宏、坂本直也、仙谷和弘、浦岡直礼、青柳一彦、吉田輝彦、佐々木博己、北野正剛、安井弥、食道扁平上皮癌に対する Adjuvant therapy 効果予測因子としてのサイトケラチン7、第71回

日本癌学会、2012.

20. 玉置将司、青柳一彦、三梨桂子、日月裕司、小松崎理絵、落合淳志、武藤学、千葉勉、吉田輝彦、佐々木博己、手術標本で認められる人為的に誘導された上皮間質転換：癌研究における意味、第71回日本癌学会、2012.
21. 小松崎理絵、青柳一彦、山田康秀、加藤健、西村公男、玉置将司、三梨桂子、武藤学、吉田輝彦、佐々木博己、腫瘍特異的 CTL の活性化が化学放射線療法感受性例で起きている、第71回日本癌学会、2012.
22. 西村公男、青柳一彦、千脇史子、小松崎理絵、三梨桂子、武藤学、坂井義治、吉田輝彦、佐々木博己、SIX1 は食道扁平上皮癌においてがん幹細胞の維持に関与する、第71回日本癌学会、2012.
23. 松本和子、荒尾徳三、浜口哲弥、島田安博、加藤健、小田一郎、谷口浩和、小泉史明、柳原五吉、佐々木博己、西尾和人、山田康秀、胃がんにおける FGFR2 遺伝子増幅の検討、第71回日本癌学会、ワークショップ、2012.
24. 市川寛、神田達夫、谷口浩和、畠山勝義、佐々木博己、近藤格、胃がんリンパ節転移に関わるタンパク質の同定、第71回日本癌学会、2012.
25. 青柳一彦、三梨桂子、山田康秀、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、武藤学、大津敦、吉田輝彦、佐々木博己、遺伝子発現プロファイルを用いた教師無しサブタイプ分類による食道がんの化学放射線療法感受性例の治療前診断、第71回日本癌学会、2012.
26. 佐々木博己、体外診断薬としての発現解析型 DNA チップ、第32回日本分子腫瘍マーカー研究会、特別企画、2012.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ●特許出願状況

1. 発明の名称：抗癌剤の作用を増強する医薬組成物、がん治療用キット、診断薬、及

びスクリーニング方法

出願番号：特願

2012-29907/PCT/JP2013/53522

出願日：平成25年2月14日

発明者：佐々木博己、上園保仁、鈴木雅美、長瀬博、鈴木勉、成田年

出願人：独立行政法人国立がん研究センター

内容：静止期のがん細胞を再増殖誘導、抗がん剤の効果を高める方法と対象患者の診断法の発明

##### ●政策、ガイドライン作成

1. 平成 23-24 年厚生労働省次世代医療機器評価指標作成事業、テーラーメイド医療診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）審査 WG 委員として審査指標案を作成、平成 24 年に 11 月 20 日厚労省より公表（薬食機発 1120 第 5 号）。

上部消化管がんの予知医療開発のための病理学的解析

研究分担者 大上直秀 広島大学大学院・准教授

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・分子標的特定を目的とする。術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん143例を材料に、GeneChip解析から特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、その下流の分子であるpodoplanin、分化マーカーとしてサイトケラチン14、4の発現を免疫染色で解析した。その結果、podoplaninは腫瘍胞巣全体に染色される症例は19%、腫瘍胞巣辺縁に染色される症例は31%、全く染色されない症例は51%であり、podoplaninが腫瘍胞巣全体に染色される症例は有意にステージが進行しており予後不良であった。一方、多変量解析を行ったがpodoplaninは独立した予後予測因子ではなかった。サイトケラチン14は腫瘍の全体に染色され、サイトケラチン4はほとんど染色されなかった。以上の結果から、podoplaninは幹細胞が存在する基底細胞を染色する単なるマーカーではなく、幹細胞の機能に関わっているものと考えられ、放射線化学療法耐性に重要と予想される。

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・分子標的特定を目的とする。

前年度では、GeneChip解析から特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。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例を材料にSIX1、SOX2、podoplaninの免疫染色を施行したが、SOX2、podoplaninの発現と予後との間に相関関係はなく、SIX1は染色性が弱く多数例での解析には不向きであった。

SIX1、SOX2、podoplaninはいずれも分化に関わる分子であり、扁平上皮の基底細胞に染色されることが知られている。腫瘍組織においてもこれらの分子は腫瘍胞巣辺縁に染色されることが多いが、症例によっては腫瘍胞巣が小さく、辺縁に染色されているのか、全体に染色されているのかが判定困難であった。そこで本年度は、扁平上皮の分化

マーカーの免疫染色を合わせて行い、腫瘍胞巣の辺縁部分を明瞭にし、解析対象分子が腫瘍胞巣の辺縁に染色されているのか、全体に染色されているのかを解析した。使用した分化マーカーはサイトケラチン14とサイトケラチン4であり、サイトケラチン14は基底細胞に、サイトケラチン4は表層の分化した細胞に染色される。

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143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。さらに、分化マーカーとしてサイトケラチン14とサイトケラチン4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、サイトケラチン14、サイトケラチン4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、サイトケラチン14とサイトケラチン4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)、サイトケラチン14とサイトケラチン4はDAKO社のものを使用した。

(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

はじめに食道扁平上皮がん143例を材料にSIX1、SOX2、podoplaninの免疫染色を施行した。前回の症例集団はSIX1がほとんど染色されなかったことから、別の症例集団を行ったが、一部の症例にのみ染色された。SIX1が染色された症例を詳細に観察すると、SIX1が腫瘍胞巣辺縁に染色される症例ではpodoplanin、SOX2も辺縁に染色されたが、SIX1が腫瘍胞巣全体に染色された症例ではpodoplanin、SOX2も全体に染色され、これらの3分子は同様の染色像を示していた。そこでこれらの3分子のうち最も染色性のよかったpodoplaninを使用しさらに検討を行うこととした。尚、SOX2は多くの症例で腫瘍全体に染色され、パターン分類が困難であったため、解析が困難であった。

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、血小板凝集作用により癌細胞の転移を促進することが知られている。病理診断領域ではリンパ管内皮細

胞の特異的なマーカーとして、リンパ管のマーカーとして使用されており、汎用性も高い。本検討ではまずpodoplaninが10%以上の腫瘍細胞に染色された場合を陽性と判定し、予後との関連、分子病理学的因子との関連を検討したが、podoplaninの発現と予後との間に有意な関連は認めなかった。そこで50%以上の腫瘍細胞に染色された場合を陽性と判定し解析を行ったが、podoplaninの発現と予後との間に相関関係はなかった。

次にpodoplaninの染色パターンに注目した。podoplaninはSIX1やSOX2と同様、幹細胞に関わっていることが報告されており、陽性率よりも染色パターンの方が重要である可能性もある。そこでpodoplaninの免疫染色を腫瘍胞巣辺縁に染色されるパターン、腫瘍胞巣全体に染色されるパターン、全く染色されないパターンの3種類に分類した。腫瘍胞巣が小さく全体か辺縁か判定に苦慮するものは全体が染色されるパターンに分類した。その結果、podoplaninは腫瘍胞巣全体に染色される症例は19%、腫瘍胞巣辺縁に染色される症例は31%、全く染色されない症例は51%であった。臨床病理学的因子との関連を解析した結果、podoplaninが腫瘍胞巣全体に染色される症例はそれ以外の症例と比較し有意にステージが進行していた。 Kaplan-Meier法で5年生存率との関連を解析した結果、podoplaninが腫瘍胞巣全体に染色される症例は有意に予後不良であった。Cox Hazardモデルで単変量、多変量解析を行ったがpodoplaninは独立した予後予測因子ではなかった。

一方、サイトケラチン14、サイトケラチン4についても同様の方法で評価した。その結果、サイトケラチン14は腫瘍胞巣全体に染色される症例は49%、一部が染色される症例は45%、全く染色されない症例は6%であった。臨床病理学的因子との関連を解析したが、いずれの因子もサイトケラチン14の発現パターンとの関連は認められなかった。サイトケラチン4は7%の症例が染色され、全例腫瘍胞巣中心部が染色された。サイトケラチン4の発現と臨床病理学的因子との関連は認められなかった。サイトケラチン14、サイトケラチン4についてもKaplan-Meier法、Cox Hazardモデルによる予後解析を行ったが、関連は認められなかつ



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おり、SIX1が最も重要と考えられたが、SIX1は転写因子のためか染色性が弱く、日常臨床に使用するマーカーとしては不向きと考えられた。一方、SIX1とほぼ同様の染色像を示すpodoplaninは既にリンパ管のマーカーとしても日常臨床に使用されており、汎用性は高い。本検討ではpodoplaninの陽性、陰性を染色された腫瘍細胞の割合で決定しても予後との関連はなかったが、染色パターンで分類すると腫瘍胞巣全体が染色される症例で予後不良であった。podoplaninの発現はステージとも関連しており、独立した予後予測因子ではなかったことから、直接的に予後に関わるのではなく、食道扁平上皮がんの進行と関連しているものと考えられる。ステージが進行した症例でpodoplaninが腫瘍胞巣全体に染色される意義については尚不明であるがpodoplaninが幹細胞の機能に関わっていることを考慮すると、腫瘍胞巣全体にpodoplaninが染色される症例は分化の過程が障害されているものと考えられる。非腫瘍部重層扁平上皮と同様、腫瘍胞巣辺縁にpodoplaninが染色される症例は、食道扁平上皮がんといえども分化の過程がある程度保たれており、ステージは進行していないものと予想される。

サイトケラチン14、サイトケラチン4は非腫瘍部ではそれぞれ基底細胞、表層の分化した細胞に染色されるが、食道扁平上皮がんではサイトケラチン14は多くの症例で腫瘍胞巣全体が染色され、サイトケラチン4は多くの症例は染色されなかった。これらの結果から、サイトケラチン14、サイトケラチン4は幹細胞の機能には関わっておらず、単に非腫瘍部重層扁平上皮のマーカーであると考えられ、臨床応用には困難と予想される。

#### 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ており、SIX1よりもpodoplaninが食道扁平上皮がんの分化マーカーとして適切である。

本検討ではpodoplaninが腫瘍胞巣全体に染色された症例はステージが進行しており、podoplaninは食道扁平上皮がんの幹細胞に何らかの機能を有していると予想される。今後は放射線化学療法が施行された後に切除された食道扁平上皮がんを材料にpodoplaninの免疫染色を施行し、放射線化学療法耐性の腫瘍細胞におけるpodoplaninの発現を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### ● 論文発表

1. Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Que N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC: Combination of protein coding and non-coding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, in press.
2. Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Que N, Yasui W: Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology*, in press.
3. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Que N, Yasui W: Decreased FANCI caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, in press.

4. Naito Y, Que N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W: Reg IV is a direct target of intestinal transcriptional factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One*, 7(11):e47545, 2013.
  5. Shinmei S, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Anami K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Que N, Kitadai Y, Yasui W: MicroRNA-155 is a predictive marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol*, 20(5):468-77, 2013.
  6. Hayashi T, Sentani K, Que N, Ohara S, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Matsubara A, Yasui W: The search for secreted proteins in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of NBL1 is highly restricted to the prostate and is related to cancer progression. *Pathobiology*, 80(2):60-9, 2013.
  7. Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Que N, Yasui W: Infantile adenomyoma subclinically excreted into the patient's diaper. *Pathol Int*, 62(8):532-7, 2012.
  8. Sakamoto N, Que N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci*, 103(9):1744-50, 2012.
  9. Okayama H, Saito M, Que N, Weiss JM, Stauffer J, Takenoshita S, Wiltrout RH, Hussain SP, Harris CC: NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. *Int J Cancer*, 132(1):9-18, 2013.
  10. Sentani K, Que 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):1081-8, 2012.
  11. Gersemann M, Becker S, Nuding S, Antoni L, Ott G, Fritz P, Que N, Yasui W, Wehkamp J, Stange EF: Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J Crohns Colitis*. 6(4):425-34, 2012.
  12. Takami H, Sentani K, Matsuda M, Que N, Sakamoto N, Yasui W: Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology*, 79(3):154-61, 2012.
  13. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Que 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*. 2012 Feb;62(2):112-9, 2012.
  14. 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 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 19(6):1902-10, 2012
- 学会発表
1. 大上直秀、野口 剛、仙谷和弘、阿南勝宏、坂本直也、浦岡直礼、安井 弥：食道扁平上皮癌におけるサイトケラチン7の免疫染色は術後補助化学療法の効果予測マーカー、予後予測マーカーとして有用である。第23回日本消化器癌発生学会、ワークショップ4、11月15-16日、徳島、2012。
  2. Que N, Sakamoto N, Naito Y, Sentani K, Harris CC and Yasui W: Alteration of microRNA expression in gastrointestinal cancer. The 22nd Hiroshima Cancer Seminar and the 4th Japanese Association for RNA interference Joint International Symposium "MicroRNAs in cancer", Hiroshima (Japan), August 30, 2012.
  3. 大上直秀：SAGE法、CAST法から明らかになっ

た胃型・腸型胃癌の生物学的・臨床的特徴. 第  
5回消化器 Research Seminar、特別講演、6  
月19日、広島、2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

● 特許取得

なし

● 実用新案登録

なし

● その他

なし

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

研究分担者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所・技幹

研究要旨

VEGFR, FGFR, PDGFR等を阻害するマルチキナーゼ阻害剤であるBIBF1120の膀胱癌培養細胞株に対する増殖抑制効果を検討した。各種膀胱癌培養細胞株を用いた *in vitro* の実験ではFGFR3 遺伝子変異陽性膀胱がん細胞株に対する特異的な増殖抑制効果が示された。一方、Mouse xenograft model を用いた *in vivo* の検討ではFGFR3 遺伝子が野生型である細胞株に対しても増殖抑制効果が認められ、VEGFRの抑制によって腫瘍組織内の血管新生が抑制された結果と考えられた。しかし、FGFR3 遺伝子変異陽性例では更に強い増殖抑制効果を認め、腫瘍細胞への直接的な増殖抑制効果によって治療効果が増強されているものと考えられた。

A. 研究目的

表在性膀胱がんは経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)による低侵襲の治療が可能であるが、約半数が再発し、10-30%は筋層浸潤癌に進展して膀胱摘出術の適応となる。表在性膀胱癌ではチロシンキナーゼ受容体である繊維芽細胞成長因子受容体3型(FGFR3)遺伝子の変異が約50~70%に認められる。FGFR3 遺伝子変異陽性膀胱癌は、浸潤性膀胱癌への進展は少ないが、高率に再発し、定期的な経過観察と再発例に対しては再切除やその他の治療が必要となる。本研究ではFGFR3をターゲットとする分子標的治療の開発を目的とする。

B. 研究方法

各種膀胱癌培養細胞株を対象として、チロシンキナーゼ受容体阻害薬BIBF1120の *in vitro* の増殖抑制効果とKi-67, p27/Kip1等の発現を検討した。更に、SH0マウスを用いた xenograft model を作成し、移植腫瘍に対する増殖抑制効果を検討すると共に、血管内皮細胞のマーカーであるCD31の発現を免疫染色法により確認し、移植腫瘍内の血管新生の程度を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究の中で、生殖細胞系列変異の解析部分については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、また体細胞遺伝子発現・構造を解析する観察研究の場合には同指針に準拠し、かつ「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して研究計画の承認や、説明・同意を行い、試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。

C. 研究結果

各種膀胱癌培養細胞株を用いた *in vitro* の実験ではFGFR3 遺伝子変異陽性膀胱がん細胞株であるUM-UC-14およびMGHU3に対する特異的な増殖抑制効果が示された。投与群ではKi-67の発現抑制およびp27/Kip1の発現等の変化が認められた。一方、マウス xenograft model を用いた検討ではFGFR3 遺伝子が野生型である細胞株に対しても増殖抑制効果が認められた。CD31染色による血管内皮細胞の腫瘍内密度の測定では、BIBF1120投与群では腫瘍内血管密度は著しく低下していた。一方、FGFR3 遺伝子変異陽性例では更に強い増殖抑制効果が認められた。

#### D. 考察

これまでの研究で尿中 FGFR3 遺伝子変異の検出が表在性膀胱癌の術後再発の診断に有用であり、さらに FGFR3 遺伝子変異陽性膀胱癌細胞株に対して FGFR に特異的なチロシンキナーゼ受容体阻害剤 PD173074 が強い増殖抑制効果を発揮することを報告してきた。しかし、PD173074 は研究用試薬であり臨床応用困難であることから、VEGFR, FGFR, PDGFR 等に対する抑制効果を示すマルチキナーゼ阻害剤である BIBF 1120 の表在性膀胱癌培養細胞株に対する増殖抑制効果を検討した。

In vitro では BIBF1120 は FGFR3 遺伝子変異陽性の膀胱癌培養細胞株 UM-UC-14 および MGHU3 の二種類の膀胱癌培養細胞株の増殖を抑制した。この結果は PD173074 と同様であり、in vitro では G1/G0 の細胞周期停止による増殖抑制効果が主体と考えられる。一方、in vivo の実験では、SHO マウスにおける腫瘍内の血管密度が著明に減少していることから、マルチキナーゼ阻害剤によって宿主の血管内皮における VEGFR の抑制が関わっているものと考えられた。このような所見は FGFR3 遺伝子が野生型の膀胱癌細胞株でも認められたが、FGFR3 遺伝子に変異を認める細胞株では腫瘍細胞への直接的な増殖抑制効果によってさらに治療効果が増強されているものと考えられた。

#### E. 結論

マルチキナーゼ阻害剤である BIBF1120 は腫瘍組織の血管新生の抑制と、細胞内での細胞周期停止という二つの作用を通じて薬理作用を発揮しているものと考えられた。本薬剤は浸潤性膀胱癌の治療のみならず、FGFR3 遺伝子変異陽性の表在性膀胱癌の TUR-bt 実施後の再発予防薬としても効果が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### ●論文発表

1. Tahara M, Inoue T, Miyakura Y, Horie H, Yasuda Y, Fujii H, Kotake K, Sugano K. Cell diameter measurements obtained with a handheld cell counter could be used as a surrogate marker of G2/M arrest and apoptosis in colon cancer cell lines exposed to SN-38. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
2. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Tsuruta T, Banno K, Makita K, Susumu N, Jinno H, Kitagawa Y, Sugano K, Kosaki K, Aoki D. Experience of Risk-reducing Salpingo-oophorectomy for a BRCA1 Mutation Carrier and Establishment of a System Performing a Preventive Surgery for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in Japan: Our Challenges for the Future. *Jpn J Clin Oncol*. 43:515-9, 2013.
3. Shiozawa M, Miyakura Y, Tahara M, Morishima K, Kumano H, Koinuma K, Horie H, Lefor AT, Sata N, Yasuda Y, Gonda K, Takenoshita S, Tamura A, Fukushima N, Sugano K. Partial duplication of MSH2 spanning exons 7 through 14 in Lynch syndrome. *J Gastroenterol* (in press).
4. Hirasawa A, Akahane T, Tsuruta T, Kobayashi Y, Masuda K, Banno K, Fujii T, Susumu N, Itsubo T, Kameyama K, Sugano K, Aoki D. Lobular endocervical glandular hyperplasia and peritoneal pigmentation associated with Peutz-Jeghers syndrome due to a germline mutation of STK11. *Ann Oncol*. 23:2990-2, 2012.
5. 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.

#### ●学会発表

1. Sugano K et al. Risk assessment for BRCA1/2 mutations based on recursive partitioning analysis



in Japanese HBOC cohort. BRCA: From Theory to Practice Fourth International Symposium on Hereditary Breast and Ovarian Cancer Centre Mont-Royal, 2200 Mansfield Street, Montréal, April 25-27 (2012)

2. 菅野康吉、他：日本人の遺伝性乳がん卵巣がん(HBOC)症例に対する BRCA1/2 遺伝子検査—遺伝子検査費用の軽減と高リスク群同定に関する研究— 第18回日本家族性腫瘍学会学術集会 大阪市 6月15日～16日 (2012)
3. 菅野康吉：遺伝性大腸がん (FAP, Lynch 症候群等)第15回家族性腫瘍セミナー 京都市 8月24日～26日 (2012)
4. Sugano K, et al. Splicing variants caused by mutations of exonic splicing enhancer (ESE) elements in MLH1 or MSH2. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21 (2012)
5. 菅野康吉. がんの遺伝カウンセリング 文部科学省平成24年度大学病院人材育成機能強化事業地域躍動型専門医養成一貫教育プログラム シンポジウム「若き医師に必須の遺伝カウンセリング講座」 新宿区 9月29日 (2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

研究分担者 村上善則 東京大学・教授

研究要旨

小細胞肺がん、細胞接着分子 CADM1 のスプライシング・バリエーション (CADM1v8/9) が特異的に発現することを見出し、血清診断マーカーとして確立するため、CADM1断片の検出、並びに糖鎖構造の解析を行った。また、CADM1の発現を抑制するmiRNAとして、miR-214, miR-375を同定した。

A. 研究目的

肺がん、乳がん、泌尿器がん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(SCLC)の診断、治療標的分子としての細胞接着分子 CADM1 の確立について検討した。

B. 研究方法

1. 小細胞肺がん特異的に発現する細胞接着分子 CADM1 の検出

小細胞肺がん手術組織における CADM1 の発現は、抗 CADM1 抗体に対する免疫組織染色法にて検討した。小細胞肺癌組織、または細胞における CADM1 タンパク質、mRNA は、抗 CADM1 抗体を用いたウェスタン・ブロット解析、ノーザン・ブロット解析、RT-PCR 解析により検討した。

2. CADM1 の糖鎖構造の解析

CADM1 タンパク質の糖鎖解析は、CADM1 細胞外ドメイン+Fc 融合タンパク質の精製物、並びに細胞抽出物から、抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降し、トリプシンにて分解した後、質量分析法によりその糖鎖構造を推定、決定した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、東京大学医科学研究所の諸規約を遵守し、倫理的、社会的、法律の見地から、患者の不利益にならないように十分に配慮した。動物実験も、東京大学医科学研究所の諸規約に遵って行った。

C. 研究結果

1. 小細胞肺がん特異的に発現する細胞接着分子 CADM1 の検出

小細胞肺がん組織の免疫組織染色では 34 例中 9 例 (26%)、小細胞肺がん細胞の RT-PCR、ウェスタン・ブロット解析では 13 例中 12 例 (92%) で、CADM1 の発現を検出した。小細胞肺がんを発現する CADM1 は、正常組織では精巣のみで発現が認められるエクソン 8,9 を含むバリエーション (CADM1v8/9) であった。そこで、CADM1 v8/9 を小細胞肺がんの新規診断マーカーとして確立する目的でさらなる解析を行った。まず、小細胞肺がんの抽出物を抗 CADM1 抗体で免疫沈降し、ウェスタン・ブロット法にて解析したところ、細胞抽出物では約 80 kD、75 kD の分子量の異なる 2 つの断片が検出され、それぞれ、CADM1 v8/9、v8 バリエーションに対応した。また、共同研究により、CADM1v8 では細胞外ドメインがまず ADAM10 で切断され、続いて細胞内ドメインが -セクレターゼで切断されることを示した。そこで、v8/9 に対する特異的抗体、特異的検出法が必

要であることが示された。

## 2. CADM1 の糖鎖構造の解析

次に、CADM1 の細胞外ドメインに6か所存在する N-型糖鎖、並びにエクソン 8, 9 に存在する O-型糖鎖の構造を、質量分析によって解析した。その結果、上皮細胞に発現する CADM1 のスプライシングバリエーション (v8, v8/9) の N 型糖鎖は、主に複合型 4 分岐構造にフコース、およびシアル酸が付加した構造を示すこと、また、O 型糖鎖はコア 1, 2 構造およびシアル酸を含むことを明らかにした。

## D. 考察

CADM1 は多くの上皮組織で発現し、一方、上皮由来の様々な腫瘍で、その進展に伴い不活化し、がん抑制遺伝子として機能する。ところが、成人 T 細胞性白血病 (ATL) や、小細胞肺癌では剰発現し、むしろ細胞の浸潤性や腫瘍形成能を促進する癌遺伝子として機能する。CADM1 は上皮細胞内では、アクチン結合能をもつ 4.1B タンパク質や、PDG 結合ドメインを有する裏打ち群タンパク質 MAGuK 群と結合することにより、細胞接着のシグナルを細胞骨格や極性形成へと伝える機能を持ち、がん抑制遺伝子として機能する。これに対し、ATL では、CADM1 は細胞内で RAC の活性化因子 Tiam-1 と結合することにより、細胞の運動性を亢進し、がん遺伝子として機能することを我々は示した。小細胞肺癌での下流経路は解析中であるが、小細胞肺癌の特徴として、エクソン 9 を含み、正常組織では精巣でしか発現しない v8/9 バリエーションを発現することである。しかし、CADM1v8/9 が切断断片として存在する証拠はない。そこで、CADM1v8/9 を特異的に検出する特異度の高い抗体の作成と検出法の確立を目指している。

本年度に得られた成果の中で、細胞接着分子である CADM1 は ADAM10 等のプロテアーゼによって切断されることは興味深い。前年度までに得られた結果のなかで、CADM1 が小細胞肺癌の診断マーカーとして有望な点としては、1) CADM1 v8/9 は精巣を除き、小細胞肺癌特異的に発現する。2)

CADM1v8 断片は ADAM10, ...-セクレターゼによる切断をうける。3) CADM1 v8/9 小細胞肺癌培養細胞抽出物の 13 例中 12 例 (92%) で発現し、既存マーカーである Pro-GRP や NSE とは独立した発現様式を示し、しかも頻度が高い。

今後、v8/9 を認識する単クローン抗体を作成することが求められている。来年度はこの見地から、小細胞肺癌に特異的な CADM1 の糖鎖修飾の解析、ならびに、高度特異的な抗体作成を目指して、検討を進める予定である。

## E. 結論

CADM1 v8/9 バリエーションが小細胞肺癌で疾患特異的に過剰発現すること、CADM1 の N-型、O-型糖鎖に特徴的な修飾が認められることを見出した。これらの結果により、CADM1 v8/9 断片の検出による小細胞肺癌の診断の可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### ●論文発表

1. Ishimura M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Ando T, Fukayama M, Goto A, Murakami Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malign.ant features of non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. J Cancer Therapy, 3:379-387, 2012.
2. Ito A, Mimae T, Yamamoto Y-S-Z, Hagiya M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, and Kondo T. Novel application for pseudopodia proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. Lab Invest, 92:1374-1385, 2012.
3. Nakata H, Wakayama T, Adthapanyawanich K, Nishiuchi T, Murakami Y, Takai Y, Iseki S. Compensatory upregulation of myelin protein zero-like 2 expression in spermatogenic cells in cell adhesion molecule-1-deficient mice. Acta

- Histochem Cytochem 45:47-56. 2012.
4. 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*, 103, 1051-1057, 2012.
  5. Ito A, Ichianagi N, Ikeda Y, Hagiyaama M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet  $\alpha$ -cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islets*, in press.
  6. Mimae T, Okada M, Hagiyaama M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Upregulation of Notch2 and Six1 Is Associated with Progression of Early-Stage Lung Adenocarcinoma and a More Aggressive Phenotype at Advanced Stage. *Clinical Cancer Research*, 18, 945-955, 2012.
  7. Nagara Y, Hagiyaama 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*, 417:462-467, 2012.
  8. 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*, 19:242-252, 2012.
  9. 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.
  1. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 3rd Joint Symposium of the Max-Planck Society and University of Tokyo Graduate School of Medicine. 2013年3月8日、東京、日本。
  2. Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Mika Sakurai-Yageta, Yumi Tsuboi, Daisuke Matsubara and Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  3. Yoshinori Murakami, Masanao Miwa, Hideo Tanaka, Masakazu Yamamoto and Puangrat Yongvanit. Towards the control of cholangiocarcinoma by international collaboration between Thailand and Japan. The International Symposium on Cholangiocarcinoma, Tokyo, 2013. 2013年2月8日、東京都、日本。
  4. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 2nd France-Japan Cancer Workshop, 2012年11月30日、鳴門市、日本。
  5. Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 18th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2012年6月29日、ウルム市、ドイツ。
  6. Yoshinori Murakami, Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. The 9th AACR-JCR Joint Conference of Cancer Research. マウイ市、米国ハワイ州、2013年2月24日。
  7. Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. The oncogenic role of a cell adhesion molecule, CADM1, in adult T-cell leukemia and small cell

- lung cancer. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
8. Yumi Tsuboi, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Akihiko Ito, Yoshinori Murakami. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  9. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Kaoru Kaneshiro, Sadanori Sekiya, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka and Yoshinori Murakami. The 19th International Mass Spectrometry Conference. 2012年9月18日、京都市、日本。
  10. 桑野秀規、中島淳、村上善則、ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構における細胞接着分子 CADM1 の意義、第9回東京呼吸器リサーチフォーラム、2012年11月14日、東京都
  11. Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. 第71回日本癌学会学術総会、シンポジウム、2012年9月21日、札幌市
  12. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Megumi Ishimura and Yoshinori Murakami. Analysis of the structures and functions of N-glycans on a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌市、日
  13. Hideki Kuwano, Miwako Iwai, Taketo Kawai, Takeshi Ito, Mika Sakurai-Yageta, Akiteru Goto, Jun Nakajima, Kenji Tamura and Yoshinori Murakami. Possible involvement of a cell adhesion molecule, CADM1 in acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-TKIs. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌市
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 特許取得：2件。
    1. 村上善則、増田万里・国立大学法人東京大学・がんの診断、処置および/または予防、および/または浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法・特許第5131946号(2012/11/16登録)・日本
    2. 村上善則・国立大学法人東京大学・村上善則、増田万里・国立大学法人東京大学・がんの診断、処置および/または予防、および/または浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法・特許第5131751号(2012/11/16登録)・日本
  - 実用新案登録  
なし
  - その他  
なし



がんの遺伝子・核酸医薬の開発

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

HVJ-EにRad51siRNAを封入して、抗がん剤のDacarbazineとともにメラノーマ細胞に投与すると、抗がん剤の効果が増強された。またHVJ-Eによる抗腫瘍免疫の活性化は、抗がん剤投与化でもおこり、メラノーマのマウスモデルでの腫瘍縮小効果が増強された。

A. 研究目的

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、新たな癌治療法を確立する。

B. 研究方法

マウスメラノーマ細胞株B16F10にメラノーマで唯一臨床応用されている抗がん剤であるDacarbazine (DTIC)を投与し、DNA修復に関与する遺伝子の発現をWestern blotで調べた。

Rad51siRNAを封入したHVJ envelope (HVJ-E) vectorをB16F10細胞にDTICとともに投与し、ゲノムに二重鎖切断箇所を集積する $\gamma$ -H2AXの経時的变化を免疫染色法で評価した。またそのときのコロニー形成率、Annexin-V陽性細胞のカウントによるアポトーシス誘導率を測定した。C57BL/6 mouseの背部皮内にB16F10細胞を移植し、臨床で用いられている相当量のDTIC(80 mg/kg)を5回腹腔内投与(day7-day11), Rad51siRNA(2.5 nmol)封入のHVJ-Eは2日ごとに3回投与(day6, 8, 10)し、腫瘍容積を測定した。また腫瘍内でのCD4, CD8の発現をRT-PCRで、メラノーマ細胞に対する細胞傷害性リンパ球の活性を脾臓由来のリンパ球細胞を用いたinterferon- $\gamma$ のElispot assayで評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

C. 研究結果

Rad51遺伝子発現がDTICのドーズに依存して増強されることが分かった。Ku70遺伝子発現は変化しなかった。そこでRad51siRNAをHVJ-E vectorに封入してマウスメラノーマ細胞株B16F10に導入したところ、DTICによるDNA二重鎖切断の修復が抑制され、 $\gamma$ -H2AXの核内での著明な集積が起こった。またコロニー形成が抑制され、アポトーシス細胞が有意に増加した。そこでマウスメラノーマモデルを作成して治療を開始したところ、DTICとRad51siRNA封入HVJ-Eを投与した群が最も強い腫瘍増殖抑制を示した。さらにこの群ではDTICの投与下においてもCD4, CD8の発現が増加し、Elispot assayでメラノーマに対する細胞傷害性T細胞の活性化が示唆された。

D. 考察

DTICとRad51siRNAを用いることによりゲノムの二重鎖切断の修復が抑制され、アポトーシスが誘導されると考えられる。HVJ-Eによる抗腫瘍免疫活性は抗がん剤投与下でも機能し、細胞傷害性T細胞の誘導が起こることが明らかになった。

#### E. 結論

Rad51siRNA 封入HVJ-E はDTIC の効果を増強させ、かつ抗腫瘍免疫の活性可能を維持して、多彩な抗腫瘍効果を発揮することができる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### ●論文発表

1. 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.
2. Kaneda Y. Virosome A novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 64, 730-738, 2012.

##### ●学会発表

1. 金田安史. 新規抗がん剤としての不活化ウイルス粒子のポテンシャル第 71 回日本脳神経外科学会学術集会（特別医学セミナー）2012 年 10 月 18 日 大阪
2. 金田安史. Future direction of Gene Therapy 第 18 回日本遺伝子治療学会（理事長講演）2012 年 6 月 28 日 熊本

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ●特許取得

なし

##### ●実用新案登録

なし

##### ●その他

なし