

研 究 編

第 1 部 研究抄録関係

1. 病院における研究（課題別研究費）

<研究課題> 1

がん治療におけるインターベンショナル・ラジオロジーの応用についての研究

Clinical evaluation of interventional radiology in oncology

<研究者氏名> 放射線診断部 稲葉 吉隆

共同研究者 山浦秀和、佐藤洋造、名嶋弥菜、
金本高明、友澤祐樹、坂根 誠、

【背景と目的】

腹部大動脈周囲リンパ節腫大をはじめとする後腹膜腫瘍性病変は体表から離れた部位に存在するため、超音波装置での視認が困難であり、病理組織診断のための生検（組織採取）は開腹下または腹腔鏡下に侵襲的に施行されることが一般的であった。

一方、画像誘導下で行われる経皮的生検は、超音波装置での視認が困難な場合はCTガイドを用いることが多く、CTガイド下針生検として肺生検などで汎用されている。さらに、CTと血管造影装置（X線透視）が合体したIVR-CTやCT透視の開発にともない、その実行性、安全性は向上し、その適応範囲も広がり、後腹膜腫瘍性病変に対しても施行可能となってきた。

本研究は、後腹膜腫瘍性病変に対するCTガイド下針生検の臨床的有効性を後方視的に評価しようとするものである。

【研究計画】

IVR-CT装置にCT透視機能が導入された1998年4月から2007年7月までの間に、以下の適格条件を満たす症例に対して施行された後腹膜腫瘍性病変に対するCTガイド下針生検について、その安全性と臨床的有効性を評価する。

適格条件：①画像的に確認される後腹膜腫瘍性病変を有し、その確定診断がなされていない症例。②予めCTにて安全な穿刺経路が確認できる病変である。③他に生検可能な病変がない。④出血傾向がない。抗血栓剤をしている場合は一定期間休薬している。⑤患者本人から文書による同意が得られている。

【研究方法】

対象症例は46症例で、男性24例、女性22例、平均年齢は56.9歳（18～80歳）であった。病変の存在部位は、腹部大動脈周囲30例、下大静脈背側4例、大腰筋腹側3例、仙骨前面3例、腸骨領域3例、その他の後腹膜領域3例で、生検の標的病変の長径は平均5.4cm（1.5～12.5cm）、CT上での穿刺皮膚から標的病変までの距離は平均9.1cm（5.0～11.1cm）であった。

全例局所麻酔下に、7例でTandem法、39例で間欠的CT透視法により経皮的生検を行った。使用した生検針は、FineCore半

自動生検針（18G：全25例）、Biopsy生検針+MAGNUM自動生検装置（18G：20例、20G：1例）であった。

以上の後腹膜腫瘍性病変に対するCTガイド下針生検について実行性と安全性を評価した。

【研究結果】

穿刺回数は平均1.7回（1～3回）で、46例中45例（97.8%）で診断に十分な検体を採取できた。

病理組織学的に悪性と診断されたものが42例で、悪性リンパ腫27例、リンパ節転移9例、悪性神経鞘腫、原始神経外胚葉性腫瘍等の原発性悪性腫瘍6例であった。一方、良性とされたものが3例で、神経鞘腫、血管筋脂肪腫、非悪性リンパ節腫大が各々1例ずつであった。悪性リンパ腫は27例のうち25例（92.6%）でサブタイプまで診断可能であった。

合併症は、3例で軽度血腫、2例で穿刺部の疼痛を認めたが、経過観察のみで改善し、重篤なものは認めなかった。

【結論】

後腹膜病変に対するCTガイド下針生検の実行性は高く、診断に際し有用であった。また、安全性も十分に許容されるものであった。CTガイド下針生検は経皮的に低侵襲で施行可能であり、従来開腹下または腹腔鏡下に施行されることの多かった後腹膜病変に対しても十分対応可能であり臨床的に有用であると考えられた。

<研究課題> 2

治療感受性と再発リスクによる乳癌術後補助療法の選択に関する研究

The selection of adjuvant therapy for breast cancer, based on the treatment sensitivity and the relapse risk.

<研究者氏名> 乳腺科部 岩田 広治

共同研究者 山下年成、藤田崇史、林 裕倫
安藤由明

1年間の総括

この1年間にも乳癌の術前後薬物療法に関する膨大な情報が見聞から流入し、我々が参加している国内・国外の臨床試験も多方面にわたって進行した。特に、近年の薬剤開発の動向は、世界共同治験に早期から参画して、この結果で日本での承認を得る流れができてきた。当院でも多くの世界共同治験に参加している。

1：術後内分泌療法に関する研究

報告：閉経後乳癌術後患者へのホルモン療法としてアロマターゼ阻害剤は標準治療と位置づけられ、骨密度低下の検査（DEXA法）や対応も一般臨床の中で、標準的に行われるようになった。この1年間で新しい試験の開始やエビデンスは出ていないが、探索的研究としてTAMの代謝酵素であるSYP 2D6の多型によってTAMの効果に差があることが報告され、将来的には患者個人のプロファイルによる治療選択の可能性がでてきた。ホルモン治療の投与期間の問題に関しては、引き続き日本で行われているアナストロゾールの5年と10年を比較するN-SAS-BC05試験に今後当院からも登録を行っていく予定である。

2：術後化学療法に関する研究

報告：術後薬物療法における抗癌剤の位置づけが、再考される時代になってきた。大規模臨床試験のアーカイブマテリアルを用いた解析で、ホルモン高感受性乳癌に対する抗癌剤の意義が見直されてきた。さらに、昨年度から問題になってきたアンスラサイクリン系薬剤の心毒性は引き続き、臨床の現場の大きな問題と捉えている。今年度は、東海乳癌臨床試験グループ（TBCRG）にて行った、ドセタキセルによる爪・皮膚障害に対するfrozen gloveの有効性を検証する試験（TBCRG03）の結果が出て、frozen gloveの有効性が示された。また今年度、日本の多施設共同研究で、当院の臨床データも使った遺伝子プロファイリング（Oncotype DX）による日本人でのデータを示すことができ、Oncotype DXの解析結果が日本人でも適応されることを示すことができた。

3：術後分子標的治療に関する研究

報告：HER2陽性乳癌に対する術後Trastuzumab投与が日本でも標準治療として行われるようになり、既に世界は次のステップへと向かっている。術後Trastuzumabとlapatinibを比較検討する国際共同試験（ALLTO study）に、当院から23名の患者の登録を行い、日本からの登録は終了した。また、個別化治療が進む中で、ホルモン陰性、HER2陰性のいわゆるトリプルネガティブ乳癌を対象にした血管新生阻害剤であるAvastin（bevacizumab）の有効性を検証する世界共同治験（Beatrice study）には、既に当院から10例以上の患者が登録された。

4：術前化学内分泌療法に関する研究

報告：この分野の臨床試験は世界の中でも特に日本で積極的に行われている。本年度はHER2陽性患者を対象にしたTrastuzumab+パクリタキセル or ドセタキセルのrandomized phase II試験（医師主導治験）が100例（当院から13例）の登録で終了した。またFEC100で効果を認めた患者を対象に、ドセタキセル単剤とドセタキセル+カペシタピン併用を比較する国際試験（OOTR003）は、既に400例以上の登録で現在も登録継続中である。閉経前ホルモン陽性乳癌を対象にした初めての術前ホルモン療法の治験は、200例（当院から12例）の登録が終了して解析が待たれる。本年度は閉経後ホルモン感受性乳癌を対象にした術前ホルモン療法の効果で術後の抗がん剤の必要性を検証する、第III相多施設共同比較試験（N-SAS-BC06、NEOS

study）が当院の岩田を試験責任者として日本で開始された。この試験は日本発のエビデンスとして非常に重要な試験と位置づけ、既に当院からは多くの症例を登録している。

<研究課題> 3

消化器癌の診断に対する超音波内視鏡下穿刺生検法の有用性の検討

Study for Clinical utility of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) for the diagnosis of the gastrointestinal diseases

<研究者氏名> 消化器内科部 山雄健次

共同研究者 水野伸匡、原 和生、澤木 明、中村常哉、田近正洋、河合宏紀、谷田部恭、越川 卓（愛知看護大学）

はじめに

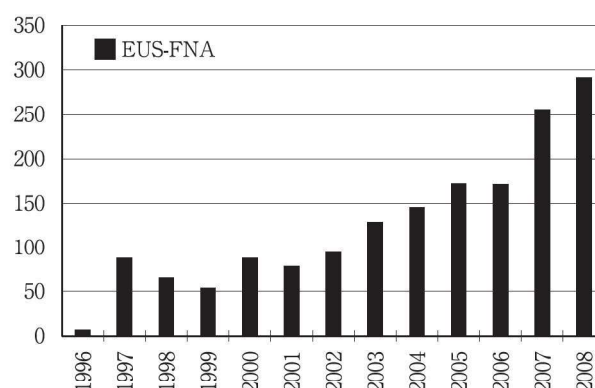
膵・胆道癌の化学療法を始めるにあたっては、その前に病理学的な確証、histological evidenceを何らかの形で得ることは必須である。我々はhistological evidenceを得る目的で従来から超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診・組織診(Endoscopic ultrasonography guided fine needle aspiration: EUS-FNA)を行ってきたので、その成績を報告する。

1. 検査件数の実績

当院では1997年1月27日にEUS-FNAが開始され、2008年3月31日までに合計で1693件に実施し、本邦で最も多い実施施設となっている。その年次別推移（図-1）を見てみると、1996年度に8件実施して以来、2002年までは年間100件以内であったものが、2003年以降は年間100件を超え、2007年には200件を超えて、2008年には291件となっている。

主な疾患の内訳は、膵腫瘍や膵周囲病変、縦隔や腹腔内の腫大リンパ節、胃粘膜下腫瘍や吻合部の病変などである。上部消化管（食道～十二指腸）周囲と下部消化管（直腸）周囲の病変は、消化器の病変のみならず、肺癌（特に縦隔リンパ節）、血液疾患（悪性リンパ腫等）、微量な胸腹水などの確定診断にも有用である。

図-1：EUS-FNAの実施件数の年次別推移



2. 診断成績

1997年1月～2007年12月までに当センターでEUS-FNAを施行し、その中で最終診断の得られたものが1208例あり、その主なものとしては膵腫瘍673例、胆道癌のリンパ節転移等を含む腹腔内腫大リンパ節211例、胃粘膜下腫瘍188例、縦隔腫大リンパ節60例などであった。膵腫瘍性病変におけるEUS-FNAの診断成績は、検体採取率99.4% (669/673)、感度88.7% (485/547)、特異度100% (126/126)、正診率90.8% (611/673)であった。腹腔内腫大リンパ節211例におけるEUS-FNAの診断成績では、検体採取率は96.7% (204/211)、感度87.8% (165/188)、特異度100% (23/23)、正診率89.1% (188/211)であった。合併症は0.86%で、重篤なもの、死亡例は認めなかった。

3. まとめ

EUS-FNABは従来の検査法では確定診断できない疾患に対する確定診断法としては有用な検査法であり、安全性の高い検査法と結論できる。

<研究課題> 4

骨軟部肉腫の進行例に対する治療法の研究

A clinical trial of novel therapy for cases with advanced musculoskeletal sarcomas.

<研究者氏名> 整形外科部 杉浦 英志

共同研究者 山田健志

(目的)

進行性の骨軟部肉腫症例に対しては有効な標準的治療がないのが現状である。今回腫瘍の進行の為に手術療法が困難な症例あるいは再発性の腫瘍に対してカルボプラチン、エトポシドによる動注化学療法及び術前放射線療法を行い、その有効性と安全性を確認した。

(対象および方法)

血管造影により腫瘍血管を確認。血管造影後にカテーテルをmain feederにおき、病室にてカルボプラチン300mg/m² (2時間)・エトポシド200mg/body (2時間)を順に計4時間にわたって投与した。上記動注療法を2クール以上行っても縮小効果の見られなかった症例では放射線療法を追加した。照射法は分割照射とし、一回2-3Gy、totalで30-60Gyとした。

(結果)

動注療法を施行した骨軟部腫瘍症例は12例であり、放射線療法を併用した症例は7例であった。放射線線量は30-60Gy、平均44.9Gyであった。12例の内訳は男性6例、女性6例、平均年齢は41.8歳 (22-73歳)であった。腫瘍の組織型は、骨腫瘍ではEwing肉腫1例、骨MFH1例、軟部腫瘍では平滑筋肉腫4例、MFH3例、滑膜肉腫2例、類上皮肉腫1例であった。腫瘍発生部位は骨腫瘍では上腕骨1例、脊椎1例であり、軟部腫瘍では大腿部4例、臀部2例、下腿部1例、頭部1例、肩部1例、会陰部1例で

あった。

治療効果：12例中9例はPR、3例はNCであった。PR9例のうち2例は60%以上の著明な腫瘍縮小が認められた。著明な腫瘍縮小の見られた症例は滑膜肉腫1例と平滑筋肉腫2例であり、滑膜肉腫の1例と平滑筋肉腫の1例は最終経過観察時においてCDFであったが、平滑筋肉腫の残りの1例はDODであった。局所再発は12例中3例に見られ、遠隔転移は6例に見られた。また、最終経過観察時の予後はCDF5例、AWD3例、DOD4例であり、PR症例の予後はCDF5例、AWD2例、DOD2例であった。副作用：治療当日は軽度の悪心を訴えたが、翌日以降も嘔気が持続することはなく、外来通院でも治療可能であった。血液検査では、初期の2コースでは白血球の軽度の減少を見るのみであったが、3コース以後は、白血球のみならずヘモグロビン、血小板いずれも減少する汎血球減少症を呈した。

(考察)

神経血管束等の重要臓器に近接した軟部肉腫進行例では、機能温存のために切除縁を縮小した手術が試みられるが、これには一定した術前治療の方針が必要である。放射線照射は、脂肪肉腫等の比較的感受性が高いものを除き、大部分の軟部肉腫に対してはその有用性は明らかではない。化学療法においては、小円型細胞肉腫を除き軟部腫瘍の感受性は乏しく、術前治療において有効性が確認されているものは現在のところ見られない。このため、腫瘍の縮小と安全な切除縁の確保を目的に、我々はカルボプラチン・エトポシドによる動注療法を行った。今回の結果ではCRといった著しい効果を得る事は困難であったが、PRを示した症例は12例中9例 (75%)であった。

<研究課題> 5

前立腺がんに対する小線源治療の臨床的研究

Clinical study of brachytherapy against prostate cancer

<研究者氏名> 泌尿器科部 小倉 友二

共同研究者 林 宣男、脇田利明、田丸智巳

[研究目的]

愛知県がんセンター中央病院における限局性前立腺癌に対する密封小線源治療の初期経験について、治療の質に関してはポストプランでのV100 (処方線量の100%が照射される前立腺容積の割合)、D90 (%) (前立腺容積の90%をカバーする線量の処方線量に対する割合)で評価し、急性期有害事象は排尿障害を中心に評価した。

[研究の対象と方法]

2006年8月から2008年9月まで当センターで施行した46症例を対象とした。術中プランニング法で辺縁配置変法にて施行した。処方線量および照射方法は、Low risk groupに対しては小線源単独治療で144Gy、Intermediate risk groupに対しては外照射併用で治療し、小線源で104Gy、Seed刺入1ヵ月後から40Gy/20frのブーストを行った。High risk groupは適応としてい

ない。13.1MBqのシードを使用し（1例は線源数が多くなり15.3MBqを使用）、線源配置のポストプランは刺入1ヵ月後にCTとMRIで行った。基本的には、積極的なNeoadjuvant endocrine therapyは施行せず、術後は排尿障害の治療として、 α 1ブロッカーを投与した。

【患者背景】

平均年齢は67.6 \pm 5.3歳（53~77歳）で、T stage はT1cが27例・T2aが17例・T2bが2例であった。生検時PSA値は6.59 \pm 2.65ng/ml（3.72~17.1ng/ml）で、Gleason score は5が1例・6が38例・3+4が7例であった。生検陽性Core率は34%未満が40例・34~66%が5例・67%以上が1例であった。Neoadjuvant endocrine therapy施行群が24例・未施行群が22例、小線源単独治療群が34例・外照射併用群が12例であった。

【研究結果】

- 1) 密封小線源治療を行った46例の中に再発は認めていない。
- 2) 挿入した平均線源数は60.8 \pm 14.4個、要した平均刺入針は19.2 \pm 3.2本、平均前立腺容積は23.8 \pm 6.3mlであった。
- 3) V100は95.1%、D90(%)は115.6%であった。V100が95%以上、D90が100~130%が望ましいと言われていたことから、良好な治療が行われていると考えられた。また、V100、D90(%)ともに症例の経験とともに改善傾向であり、10例目以降は安定した結果を得ている。
- 4) 急性期合併症は、排尿に関するものだけであった。カテーテル管理を要する症例を6.5%（46例中3例）に認めたものの、おおむね安全に施行可能であった。カテーテル管理を要した症例は、小線源治療前から排尿状態が悪かった。カテーテル管理を当する症例は、IPSSかQmaxが有意に悪く、事前に予測できる可能性はある。
- 5) 排尿状態を反映するQmax、Qave、IPSS、QOL INDEXを経時的に調べると、治療後有意に悪化し術後9ヶ月-1年で改善を認めた。この結果は、緒家の報告と同様であった。
- 6) 線源移動は5例に計8個認め、移動先は肺に4例・骨盤内に4例であった。線源の尿中脱落は1例にみられた。

【結果】

当センターでの小線源治療は、カテーテル管理を要する排尿障害を6.5%に認めたが、安全に施行されていた。

また、治療効果を示すポストプランの結果は、10例目以降は安定しており、良好な結果を得ていた。

<研究課題> 6

病理細胞診断における分子腫瘍診断法の研究

Development of a novel molecular method for practical cancer diagnosis

<研究者氏名> 遺伝子病理診断部 谷田部 恭

共同研究者 北村淳子、細田和貴、佐々木英一、
立松明子

【研究成果】

近年の分子生物学の飛躍的な発達により、がんの発生・悪性度の評価・薬剤応答性などの知見が蓄積され、それは現在も増えつつある。これら情報の一都は実臨床に直結しており、その応用により適切な診断・治療に結びつくものも多い。そこで、これらの知見を検証した上で、実際の病理診断、細胞診断に導入、応用することを目標に掲げた。その際に、診断に用いられる臨床検体は、生検検体などの小さな組織を利用しなければならなかったり、正常細胞が多数混じているなどの問題点も多い。そこで、それらの点を踏まえた新たなアッセイ系の確立を検討した。

今年度は2007年に新たに遺伝子異常が同定されたEML4-ALK転座についての検出系の確率とその検討を行った。ALKは元来リンパ腫の一種である未分化大細胞リンパ腫（Anaplastic Large cell Lymphoma）の原因遺伝子として同定された遺伝子である。このリンパ腫は頻度は低いものの悪性度が高く、この分子に対する分子標的療法がすでに開発され、すでに臨床段階にある。この分子標的薬は、EML4-ALK融合を示す肺癌細胞株にも効果を示すことが知られ、米国ではすでに肺癌に対する第1相臨床治験も始まっている。これらの背景から、この変異に対する臨床応用は日本でも近いと考えられる。過去の症例を調べた結果、11例のEML4-ALK変異が同定され、これまでの報告通り、非小細胞性肺癌のおよそ5%程度を占めると考えられた。また、この変異の同定は技術的に比較的難しい部類にはいるが、生検組織においても検出が可能であることも確認した。さらに、短い長さの逆位転座であるため、パラフィン標本でも応用可能なFISH法においても検出系の確率を進めつつある。また、EML4-ALK転座のみならず、ALK遺伝子の点突然変異や遺伝子増幅も知られており、それらについてもデータがそろいつつある。

さらに、HER2陽性胃癌に対するトラツズマブの臨床腫瘍学的効果が報告されたことを受け、操作が複雑で費用や手間のかかるFISH法に代わり、REALTIME PCRを用いたCopy number analysis法を確立した。乳癌組織において遺伝子増幅が確認されている腫瘍とないことが確認されている腫瘍20例を用いて検討した結果、充分信頼のおけるデータを得ることができると同時に、操作手順の著しい簡略化（PCR反応を行うのみ）や検索時間の短縮（3時間での検出）が可能であった。ただし、正常細胞との混入度合いの著しい症例では、偽陰性化傾向が見られ、組織学的な腫瘍の特徴とあわせた運用が必要であることも判明した。

<研究課題> 7

婦人性器癌における術前化学療法に関する臨床的研究

Clinical study of neoadjuvant chemotherapy for gynecological malignancies

<研究者氏名> 婦人科部 中西 透

共同研究者 伊藤則雄、水野美香、吉田憲生

【目的】

子宮内膜癌は閉経期以後の不正性器出血という特有の初期症状があり、全体の60%余が初期で診断されるため、比較的子後良好な悪性腫瘍とされている。しかし、近年生活習慣の変化から子宮内膜癌自体は増加傾向にあり、これに伴い進行症例も増加してきている。子宮内膜癌はリンパ行性に進展すると共に、腹腔内に蔓延する性質があり、進行症例では腹膜播腫や癌性腹膜炎を呈するものも多く、根治手術は不可能となり、化学療法による治療が重要な位置を占めている。

子宮内膜癌の組織型は多くが類内膜型腺癌であり化学療法に比較的反応するため、本邦では手術後の追加治療として広く用いられている。この化学療法に欧米ではCDDP+ADMが主に用いられており、進行子宮内膜癌の予後の改善に寄与してきた。近年はタキサン系薬剤+白金製剤（PTX+CBDCA等）が卵巣癌の第一選択化学療法として認知されたが、子宮内膜癌に対しても有効性が報告されている。

今回は進行子宮内膜癌に対する術前化学療法の確立を目的とし、当院で術前化学療法としてPTX+CBDCAを施行した子宮内膜癌症例を対象として、子宮内膜癌に対するこの化学療法の効果と副作用の評価を行う。

【方法】

2000～2009年に当院で治療した進行子宮内膜癌症例より、術前化学療法としてPTX+CBDCAを施行した21例を対象とし、その化学療法の有効性を検討した。

【成績】

対象症例は24例、平均年齢は58.7歳（範囲：43.8～79.1）であった。FIGO進行期分類はIII期が7例、IV期が17例で、組織型は類内膜腺癌が11例、漿液性腺癌が2例、明細胞腺癌が1例、癌肉腫が4例であった。PTX+CBDCAを施行したが6例が病状悪化のため、1例が合併症のため手術されなかった。PTX+CBDCAを施行後に手術した17例中3例で、子宮に残存腫瘍を認めなかった。以後経過観察しているが14例が再発し、11例が子宮内膜癌により死亡した。

【結論】

今回子宮内膜癌に対する術前化学療法としてのPTX+CBDCAの有効性を検討したが、化学療法中増悪例が6例認められ、また短い経過観察期間に14例の再発と11例の死亡を経験した。対象とした症例が進行症例であるためと考えられるが、術前化学療法としての十分な有用性を見出すことができず、今後さらに検討する必要があると考えられた。

<研究課題> 8

食道癌に対する術前化学療法についての臨床試験

Clinical trial of preoperative chemotherapy for esophageal cancer

<研究者氏名> 薬物療法部 室 圭

高齢者大腸癌症例に対するCPT11療法の検討

CPT11 for elderly patients with colorectal cancer

共同研究者 宇良 敬、篠田雅幸
波戸岡俊三、中村常哉
田近正洋、河合宏紀

【研究目的】

根治切除可能な、胸部食道癌を対象とし、術前補助化学療法としてのDocetaxel/Cisplatin/5-FU療法の有用性評価のための第II相試験の準備として、同療法の安全性を評価する。

【研究計画】

根治切除可能な、胸部食道癌を対象とし、術前補助化学療法としてのDocetaxel/Cisplatin/5-FU療法の有用性評価のための第II相試験の準備として、同療法の安全性を評価する。 Primary endpoint は治療完遂割合。secondary endpoints は治療関連死亡率、1年生存割合、術前化学療法の奏効割合、有害事象発生割合、重篤な有害事象発生割合、入院期間とする。治療計画は、登録後1週以内にDCF療法を4週毎に2コース施行する。DCF療法終了後4週以降に手術を施行する。DCF療法の用量は、Docetaxel 70mg/m² 第1日目、Cisplatin 80mg/m² 第1日目、5-FU 800mg/m² 第1～5日目とする。予定登録数は24例。登録期間は1.5年。登録終了後1年を追跡期間とし、総研究期間2.5年である。

【結果】

本試験は平成18年9月に倫理委員会において承認を得たうえで、登録可能となった。その後、適格症例が事前の予想よりも少なく登録は遅れている。平成19年4月に新規症例の登録が行われた。平成19年2月、先行研究としてJCOG食道グループによる補助化学療法の臨床試験JCOG9907の中間解析がなされ、Cisplatin/5-FUの補助療法は術後よりも術前に実施することが無再発生存期間において優れることが示された。よって、今後は術前補助化学療法が本邦の標準治療となる見込みである。また、胃癌、頭頸部癌領域において、従来のCisplatin/5-FU療法に比してDocetaxel を加えたDocetaxel/Cisplatin/5-FU療法が海外の比較試験において遠隔成績に優れることが示されており、食道癌領域でも同様な有用性が期待されている。よって、現状のCisplatin/5-FU療法よりも長期成績の向上に寄与する治療としてDocetaxel/Cisplatin/5-FU療法は期待され、術前補助療法として本療法の開発を迅速に進めることが急務となった。本試験は単施設による臨床試験であるが、登録速度を高めるために、食道癌手術症例が豊富かつ成績が優れ、また腫瘍内科医と密に診療連携が可能な専門医療機関との共同研究に拡張する可能性もある。

<研究課題> 9

悪性リンパ腫の大量化学療法

High dose chemotherapy for malignant lymphoma

<研究者氏名> 血液・細胞療法部 森島 泰雄

共同研究者 鏡味良豊、山本一仁、田地浩志、
大木康弘、加藤春美

血液・細胞療法部では再発・難反応性リンパ腫を対象にしてCD20抗体や大量Ara-Cを用いた多剤併用療法や自家末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法のプロトコールを作成し、その安全性と有用性につき検証し治療法を確立してきた。本研究ではこれらの治療法を初回悪性リンパ腫のハイリスク症例に適用することを目的に、びまん大細胞性B細胞リンパ腫とマンツル細胞リンパ腫に対する臨床試験を立案し、全国多施設共同研究を日本臨床試験グループ（JCOG）リンパ腫研究グループで実施している。

前者は、初発、予後不良（high-intermediate riskおよびhigh-risk群）の進行期CD20陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）に対するrituximab併用bi-weekly R-CHOP/CHASER療法（vs. bi-weekly R-CHOP療法）に引き続く自家末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法（LEED療法）の臨床ランダム化第II相試験であり、CHASE（R）療法ならびにLEED療法は血液細胞療法部において第1、2相試験が実施され、その安全性と有効性が確認された治療法である。H19年度に全国スタディーのプロトコールを完成した。

後者は、未治療マンツル細胞リンパ腫に対する抗CD20抗体（rituximab）併用の寛解導入療法（R-high-CHOP-G/CHASER-G）と自家末梢血幹細胞移植併用の大量化学療法（LEED療法）の臨床第II相試験である。マンツル細胞リンパ腫は低悪性度リンパ腫の中で、きわめて予後不良な難治性リンパ腫である。このプロトコールは前者のDLBCLの臨床試験と同じく愛知県がんセンターにて開発した多剤併用化学療法であるCHASER療法と同じく自家末梢血幹細胞移植療法の前治療として開発したLEED療法をベースとするわが国独自のプロトコールであり、本プロトコールを用いてのパイロットスタディを11症例に実施し、重篤な有害事象は認めず、本プロトコールが実施可能であることが確認されている。H19年8月から全国スタディーが開始され、H20年度にも月1例以上のペースで症例登録されている。

これら多施設共同臨床試験により、わが国における難治性悪性リンパ腫に対する標準初回療法が確立するものと考えられる。

<研究課題> 10

癌患者におけるうつ病のアセスメント用紙の確立
Establishing the method for the assessment of depression

<研究者氏名> 緩和ケア部 篠田 正幸

共同研究者 新田都子、美濃屋亜矢子

背景

がんであることを告げられたり再発を告げられたりすると、多くの人は死を連想して心に衝撃を受ける。衝撃からは次第に

回復するのが一般的であるが、一部の患者では衝撃が遷延する。このように、抑うつはがん臨床経過のあらゆる時期におこり、がん患者の6~42%に認められる。また、抑うつはがんそのものの治療、QOL、予後にまで影響を及ぼすため、早期に対応する事が必要である。しかしその診断基準の中には、「食欲不振」・「不眠」・「倦怠感」などの症状が含まれ、がん治療中によく見られる症状と重なり見逃されやすい現状がある。

昨年の報告で現状調査を行うことが課題となっていたため、現在病棟でどの程度「抑うつ」が把握できているのか緩和ケアチームへの依頼の現状を調査した。

方法

- ①2008年3月~2009年3月に緩和ケアチーム（身体症状担当）に相談のあった相談内容からその相談の主症状を分析した。
- ②2008年4月~2009年3月に緩和ケアチーム（精神腫瘍科）に依頼のあった患者の精神科診断名について調査した。

結果

身体症状チームへの相談内容は1名の患者に対し1~4症状であった。1件の相談で2つ、3つの症状の相談が大半を占めた。その中で、「痛み」123件（55.2%）、「呼吸困難」24件（10.8%）の身体症状について、「せん妄」22件（9.9%）、「アカシジア」10件（4.5%）と精神症状が続いた。しかし「抑うつ」は3件（1.3%）であった。精神腫瘍科への依頼ではせん妄26件（38.4%）、適応障害24件（32.9%）につき、抑うつ6件（8.2%）であった。

考察

相談の中でも抑うつは1.3%と8.2%であった。相談にあがってくる患者は、スタッフが「抑うつではないか?」と感じている患者である。また、緩和ケアチームは保険適応上、入院患者を対象にしており外来患者をカバーできていない。先にも述べたように、抑うつはがん臨床経過のどの時期にもおこる事を考えると、医療スタッフに気がつかれることなく、苦しんでいる患者が多いと推測できる。このことから抑うつのアセスメント用紙の活用が必要と考える。

<研究課題> 11

非小細胞肺癌の分子生物学的解析とその臨床的意義
Molecular biologic analysis of non-small cell lung cancer and its clinical implications

<研究者氏名> 胸部外科部 光富 徹哉

共同研究者 伊藤志門、福井高幸、波戸岡俊三
安部哲也、谷田部恭

【背景・目的】

MET遺伝子は7q31に存在する癌遺伝子であり、近年新たな分子標的として注目されている。EGFR遺伝子変異を有する肺癌はEGFRのチロシンキナーゼ阻害剤に対して高い感受性を有し

ているが、ほとんどの症例で平均10か月後に耐性となる。およそ20%の獲得耐性症例はMET遺伝子の増幅によることが示されている。肺癌におけるMET遺伝子変異はほとんどがSEMAおよびJuxtamembrane domainに存在するとされており、体細胞変異の頻度は非小細胞肺癌の1.6-3.6%とされている。特にJuxtamembrane domainの存在するエクソン14がスキップされるスプライス変異ではE3ユビキチンリガーであるc-cblの結合部位が欠失することになり、MET蛋白のupregulationを引き起こすとされている。

【対象・方法】

当院において手術施行した原発性肺癌262例（腺癌211例、扁平上皮癌33例、大細胞癌10例、小細胞癌2例、腺扁平上皮癌6例）、および27例の肺癌細胞株（腺癌6例、扁平上皮癌3例、大細胞癌3例、小細胞癌4例）を対象とした。LINE-1遺伝子に対するMET遺伝子のコピー数をSYBR-Green法によって決定した。また、Juxtamembrane domainが存在するエクソン14を挟みRT-PCR、ダイレクトシーケンスを施行し解析した。RNAはRNAeasy kitを使用し、DNAはproteinase Kを用いて抽出し、PCR-直接塩基配列決定をおこなった。

【結果】

MET遺伝子増幅は2/18の細胞株で認められた。一方、187例の臨床症例でのMET遺伝子増幅では2例に増幅を認めたにすぎなかった。この二例はいずれも腺癌であり、腺癌に限るとMET遺伝子増幅頻度は1.4%となる。

Juxtamembrane 領域の遺伝子変異は肺癌細胞株では認めず、手術症例では262例中7例（2.7%）に認め全例でエクソン14が欠失するスプライスバリエーションであった。変異症例は全例腺癌であり、4例は男性喫煙者、3例は女性非喫煙者であった。これらではEGFR, HER2, KRAS遺伝子変異はいずれも認められなかった。

【まとめ】

MET遺伝子増幅および変異は、それぞれ1.4%と3.3%の腺癌に見いだされた。増幅と変異は重複していないためおよそ5%の肺腺癌にMET遺伝子の異常があることになる。これらの症例にはEGFR, HER2, KRASの遺伝子の変異はなく、MET遺伝子変異は肺癌形成においてこれら三遺伝子と同等な重要な役割を果たす可能性があると考えられた。したがってMET遺伝子異常例ではMETを標的とした分子標的治療によって高い臨床効果が得られる可能性がある。

<研究課題> 12

頭頸部局所進行癌に対するSTS併用CDDP選択動注併用放射線治療の研究

Super-selective intra-arterial CDDP with STS infusion combined with radiotherapy on locally advanced head and neck cancer

<研究者氏名> 放射線治療部 古平 毅

共同研究者 古谷和久、立花弘之、富田夏夫

はじめに

近年、頭頸部進行癌に対する全身投与の化学療法と放射線治療の併用による化学放射線療法の有効性が確認されつつある。しかし同じ扁平上皮癌であっても亜部位により、その感受性は大きく異なる。上咽頭癌、中咽頭癌は放射線や抗がん剤の感受性は良好であるのに対し、声門癌、舌癌に代表される口腔癌、上顎癌の感受性は乏しい。

1992年より放射線治療部では浅側頭動脈からの動注併用放射線治療を口腔癌、上顎癌を中心に行ってきた。2002年10月より、より高い抗腫瘍効果を目指し、動注薬剤としてCBDCAからSTSを併用したCDDPに変更した。本研究では適宜的に治療成績を分析し、特にSTS併用CDDPの有用性について検証した。

動注併用放射線治療の治療成績

放射線治療部では放射線治療単独では制御不能と思われる進行口腔癌、上顎癌を主な動注療法の対象とし、1992年からCBDCAの持続動注併用放射線治療を始めたが、1997年より遠隔転移、頸部リンパ節の制御を目指し、全身化学療法の併用を始めた。全身化学療法は5FU（700mg/m²/日、5日間）/nedaplatin（120mg/m²）を用い、2回の施行を基本とし、動注療法は後半の放射線治療時に施行した。より高い局所制御率の改善を目指し2002年の秋からCDDPの中和剤であるSTSを併用したCDDPに動注薬剤を変更した。具体的には選択的動注の場合はCDDP20mg/m²、複数の栄養動脈から栄養されている場合は外頸動脈からの動注とし、その場合はCDDP30-50mg/m²を5時間で投与した。高齢者やPS不良例については全身化学療法の併用は施行しなかったが、可能な症例は5FU（700mg/m²/日、5日間）/CDDP（75mg/m²）を2回施行する方法を基本とした。

最も症例数の多いⅢ期、Ⅳ期口腔癌134例全体での3年生存率は53.9%、Ⅲ期62.9%、Ⅳ期45.3%であった。多変量解析による総生存率に関与する因子として有意な因子としては年齢（65歳未満）、動注薬剤としてSTS併用のCDDP、選択的動注であった。口腔癌の中で最も症例数の多い舌癌（88例）に限れば、動注薬剤としてSTS併用のCDDP、選択的動注、全身化学療法の併用が有意な因子であった。今回の我々の治療成績は文献上報告された手術成績と遜色のないものであった。

まとめ

今回の我々の結果は進行口腔癌の治療選択枝の一つとして動注療法が提示できるようになったことを示すものと考えている。特に2002年から開始したSTS併用CDDP動注療法の治療成績は良好であった。今後は多施設による臨床試験により、この治療法の有効性と問題点を明らかにして行きたいと考えている。

2. 研究所における研究（人当研究費）

所長室

研究課題

- (主題) アジア太平洋地域におけるがんの民族疫学研究
(副題) 日・中・韓三国で増加するがんの環境・宿主要因に関する国際共同研究

<研究者氏名>

田島和雄、松尾恵太郎、鈴木勇史、川瀬和孝、田中英夫、高長明¹⁾、Ahn Y-O²⁾、Yoo K-Y³⁾、Cao Jie⁴⁾

<目的・概要・進捗状況>

日・中・韓三国で増加している大腸がん和乳がんの予防を目指した要因探索のための三国合作による疫学研究を文部科学省科研費「がん特定領域研究」の計画研究として、十年計画で実施している。平成12～16年度は主に大腸がんを対象に三国共同研究を実施してきた。さらに、平成17～21年度は大腸がんと同様に乳がんにも焦点を当てた研究を展開している。研究対象地域を韓国のソウル市周辺、日本の愛知県、中国の江蘇省南京市、重慶市（大腸がんのみ）、本溪市（胃がん和大腸がん）に絞り込み、ほぼ共通の研究方法に基づき、5カ所で大腸がん和乳がんの環境・宿主要因に関する比較疫学的研究を継続実施している。

大腸がんについては三国5カ所（中国3カ所）で約2,500組の症例対照研究が終了し、欧米型食嗜好習慣、アルコールの多量摂取、野菜摂取の影響などについて検討した。一方、乳がんの症例対照研究も順調に進められており、すでに三国で約3,000組以上の症例対照群を収集しており、一般的に指摘されてきた乳がんの危険・防御要因を確認してきた。

<今後の方針>

平成21年度までに約10年間の三国共同研究を総合的に評価していくため、今後は大腸がん和乳がんの三国に共通した、あるいは三国で異なる要因解明、さらに遺伝的特性を考慮した環境・宿主交互作用などについて詳細に検討し、三国における大腸がん和乳がんの予防対策に資する。

疫学・予防部

<研究課題> 1

- (主題) がん統計情報の構築に必要な地域がん登録の精度向上を目指した記述疫学研究
(副題) 日米のフィルタータバコ消費量の増加と肺腺癌罹患率の増加との関連

<研究者氏名>

伊藤秀美¹⁾、松尾恵太郎、川瀬孝和、三宅哲也²⁾、田島和雄³⁾、田中英

<目的・概要・進捗状況>

【背景】日米において、肺がん罹患率における組織学的構成割合が過去30年の間に大きく変化した。我々は、紙タバコからフィルタータバコへのデザインの変化と肺腺癌ならびに扁平上皮癌の罹患率トレンドとの関連性について検討した。

【方法】米国Surveillance, Epidemiology, and End Resultsプログラムが提供する地域がん登録データ、および日本において登録精度の高い山形、新潟、福井、滋賀、大阪、岡山、広島市、佐賀、長崎の地域がん登録が提供するデータを用いて、単年ごとに肺腺癌ならびに扁平上皮癌の年齢調整罹患率を算出する（米国1973-2005年、日本1975-2003年、1985年世界人口）。また、Joinpoint Regression Analysisを用いて、組織型別に肺癌の罹患率の変化を評価する。さら、重回帰モデルを用いて、肺腺癌と扁平上皮癌の罹患率トレンドとタバコデザインの変化との関連性を検討する。

【結果】日米とも1970年代から肺腺癌罹患率は増加傾向にあり、1990年代前半に扁平上皮癌罹患率を上回り、肺癌の中で最も頻度の高い組織型となった。肺腺癌罹患率は、米国人男性では1993年以降減少に転じ、一方、日本人男性では1991年まで増加した後、横ばいとなった。以降増加傾向は観察されず、女性では前観察期間を通して増加傾向が続いている。扁平上皮癌罹患率は、米国人男性では1982年以降減少傾向が観察され、日本人男性では1975年から続いた増加傾向は1994年を境に減少傾向へ転じていた。米国では1950年代、日本では1960年代にフィルタータバコ消費量の急激な増加を認め、重回帰モデルにおいて、日米の男性、女性とも、フィルタータバコ消費量の変化は、扁平上皮癌よりも腺癌罹患率と有意に強く関連しており、肺腺癌罹患率と統計学的有意に正の関連を示していた。

【結論】紙たばこからフィルタータバコへのデザインの変化は、単に扁平上皮癌から腺癌への組織学的なシフトをもたらしたに過ぎないことがわかった。喫煙開始の予防、禁煙の促進、受動喫煙の防止等の禁煙プログラムのみが、喫煙率の減少とそれに続く肺癌の罹患率の減少と関連すると考えられる。

<今後の方向>

解析モデルの妥当性、フィルターたばこ消費量を変数とすることの妥当性を検討する。

1) Brown Univ., 2) 愛知県健康福祉部健康対策課, 3) 研究所

<研究課題> 2-1

- (主題) がん予防に資する情報の構築に必要な分析疫学研究
(副題) アルコール関連代謝酵素の遺伝子多型と癌のリスク

<研究者氏名>

松尾恵太郎、諫田淳也、鈴木勇史、川瀬孝和、渡邊美貴、田島和雄¹⁾、田中英夫

<目的・概要・進捗状況>

アルコール摂取の膵臓がんリスクへの影響に関する疫学研究の結果は、必ずしも一致を見ていない。この背景には、既存疫学研究において、アルコール代謝関連酵素の遺伝的背景が全く考慮されていないことが考えられる。我々は、愛知県がんセンター中央病院受診者を対象に実施している大規模病院疫学研究システムを用いて、膵臓癌のリスク要因としてのアルコール摂取の意義をアルデヒド脱水素酵素ALDH2遺伝子多型、アルコール脱水素酵素ADH1B、ADH1C遺伝子多型を考慮した形で評価を行った。対象は160名の膵臓癌患者と性・年齢を適合させた1600名の非がん対照者を用いた。

本研究において、我々は過去の研究同様、飲酒単独、あるいは遺伝子型単独では全く有意な関連を認めなかった。一方飲酒習慣と遺伝子多型を組み合わせた解析では、飲酒習慣の影響が、ALDH2 Lysアレル保持者(trend p=0.077)、ADH1B His/His (p-trend=0.003)、ADH1C Arg/Arg (p=trend=0.020) のように顕著であることを発見した。これらの遺伝子型、あるいはアレルは何れもアセトアルデヒドの体内での濃度が高くなるものであり、アセトアルデヒドの膵臓癌発症への寄与を示す結果であったと考えられる。

<今後の方向>

頭頸部癌・食道がんなどの他のアルコール関連がんにおいて、ALDH2、ADH1B、ADH1C以外のアルコール関連代謝酵素以外の影響が報告されており、それらの影響を合わせて評価することで、総合的なアルコールと膵臓癌の関連の評価を実施していく。

1) 研究所

<研究課題> 2-2

(主 題) がんの環境要因、宿主要因、および両者の交互作用を解明するための病院疫学研究

(副 題) 葉酸代謝酵素MTHFRの遺伝子多型は、アルコール摂取による膵臓癌発症リスクを修飾する

<研究者氏名>

鈴木勇史、松尾恵太郎、川瀬孝和、渡邊美貴、田中英夫、田島和雄¹⁾

<目的・概要・進捗状況>

アルコールの多量摂取は、慢性膵炎のリスク因子であるが、膵臓癌のリスク因子であるかどうかについては明らかではない、また、野菜や果物に含まれる葉酸の代謝産物は、DNA合成能を抑制することから、これを規定する遺伝子多型(SNP)は直接、あるいはアルコール摂取による炎症が引き起こすDNA修飾過程に働いて、膵臓癌の発症に影響するかもしれない。そこで葉酸の代謝酵素の1つである methylenetetrahydrofolate reductase

(MTHFR)のSNPと、アルコール摂取量との間に、膵臓癌発症に関する交互作用があるかどうか、検討した。

愛知県がんセンター中央病院初診患者を対象とした病院疫学研究システムを用い、157名の膵臓癌患者(症例群)と、785名の対照群により症例対照研究を行った。その結果、MTHFRの活性が低いSNPがTTタイプの人(約16%)とCTタイプ(約37%)では、アルコール摂取量が増えるに従い、膵臓癌発症リスクが有意に上昇した(trend P < 0.01)。

以上のことからMTHFRのSNPは膵臓癌発症に関しアルコール摂取量との間に交互作用があり、日本人の中にはアルコール摂取量を減らすことで膵臓癌が予防できるポピュレーションがいることが示唆された。

<今後の方向>

東アジアの他の国で検証をするための共同研究を企画する。

1) 研究所

<研究課題> 2-3

(主 題) がんの環境要因、宿主要因、および両者の交互作用を解明するための病院疫学研究

(副 題) ビタミンD、カルシウム摂取と乳がん発症との関連

<研究者氏名>

川瀬孝和 松尾恵太郎 細野覚代 伊藤秀美 渡邊美貴 田中英夫 田島和雄¹⁾

<目的・概要・進捗状況>

これまでに幾つかの疫学研究においてビタミンD (VD) とカルシウム (Ca) の摂取と乳がんの発症との関係が報告されているが、その結果は研究によって異なり、VDとCa摂取の乳がん予防効果についての評価は定まっていない。今回我々は、VDとCa摂取と乳がん発症との関連を検討するため、愛知県がんセンターの病院疫学研究システム[Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC)]を用いた症例対象研究を計画した。HERPACCに登録され、乳がんと診断された患者3,606名と、同時期にHERPACCに参加し且つ非がんと診断された、交絡因子である年齢・性別・受診理由を適合させた対照者1,803名を用いて検討を行った。自己記入式の半定量食物頻度摂取票をもとに、エネルギー調整後のCaとVDの摂取量と四分位数を計算した。条件付きロジスティック回帰分析を用いて交絡因子調整オッズ比(OR)と95%信頼区間(95%CI)を閉経前、閉経後乳がん各々で調べた。また腫瘍のestrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)の発現状況のデータが存在した730名に関しては層別化解析を施行した。多変量解析の結果、VD摂取では閉経前乳がんのみで有意な負の相関を認め、VD摂取が最も少ないグループに対してもっとも多いグループはOR=0.65 (95%CI: 0.50-0.86) (trend P<0.001)であった。一方、Ca摂取では閉経後乳がんのみで有意な負の相関を認め、Ca摂取が最も少ないグループに対してもっとも多いグ

ループは OR=0.79 (95%CI: 0.61-1.02) (trend P=0.026) であった。また、レセプターの発現状況による層別化解析で上記の負の相関は、ER+ and/or PR+かつHER2-の群のみで有意に認められた。この結果によりCaとVD摂取は乳がんに対して予防効果を持ち、その効果は、閉経前乳がんか閉経後乳がんかということと、腫瘍細胞に発現するレセプターの状況により異なる事が示唆された。

<今後の方向>

今後、特に日本人における効果的ながん予防法を開発するためのエビデンスとなりうる症例対照研究を推進する。

1) 研究所

<研究課題> 3

(主題) 「健康日本21あいち」に基づく愛知県民のためのがん予防啓発技術の開発研究

(副題) 病院における禁煙治療の標準化と効果評価

<研究者氏名>

田中英夫、谷口千枝^{1) 2)}、鈴木勇史

<目的・概要・進捗状況>

2006年診療報酬改訂に伴い、ニコチン依存症管理料の算定が開始されて以来、当センターでも禁煙外来を開設している。愛知県がんセンター禁煙外来では、標準化された禁煙の開発と評価を行っている。

2008年6月に経口禁煙補助薬バレニクリンが発売される以前の2007年1月～08年5月に治療を受けた患者48名(前期群)と、08年6月～09年5月に治療を受けた患者37名(後期群)で、禁煙成功率および関連要因を比較した。なお、バレニクリン導入に際し、クリニカルパスの改訂を行い、患者用ワークシート類を7種から10種に増やした。

後期群は前期群に比べて基礎疾患を有しない者の割合が高く(19%対8%)、入院中の者の割合が低く(5%対33%)、より禁煙しにくい属性を有していたにもかかわらず、禁煙成功率(治療開始後12週経過した時点で4週以上禁煙が継続している者の割合)は、後期群91%に対し、前期群78%と、逆に高率であった。

以上のことからバレニクリンの導入に合わせて開発・改訂した禁煙治療クリニカルパスを用いた治療方法は、高い禁煙成功率を生み出すことが示唆された。

<今後の方向>

当施設で開発した方法は現在他の3施設でも導入されており、その効果の検証を進めて行く。

1) 病・看護部, 2) 国立病院機構名古屋医療センター・禁煙外来

<研究課題> 4

(主題) がん治療の長期予後(効果)に影響する要因の分析

(副題) 非血縁者間骨髄移植におけるGVL(Graft-versus-leukemia)効果

<研究者氏名>

川瀬孝和 松尾恵太郎 森島泰雄¹⁾

<目的・概要・進捗状況>

これまで非血縁者間造血幹細胞移植における、HLA-A, B, C, DR, DQ, DP locusの臨床的重要性が明らかにされ、HLA一部ミスマッチのドナー選択において有用な情報となっている。また、最近の解析により不適合HLA型の組み合わせの臨床的意義が明らかとなり(Blood. 2007;110(7):2235-41)、ドナー選択の新たな選択基準となるものと期待されている。今後さらに移植成績を向上させるために不適合HLA型の組み合わせとGVLの関係についても明らかにする事が重要であると考えられた。今回我々は、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1に関して不適合HLA型の組み合わせとGVL(Graft-versus-leukemia)の関係について解析を試みた。方法は、1993年1月より2005年末までの期間に日本骨髄移植財団を介し施行された造血器悪性腫瘍に対する非血縁者間造血幹細胞移植のうち、HLA-A, B, DR locusの血清型が一致した4863例を多変量解析(Competing Risks Regression model)の手法を用いてレトロスペクティブに解析した。その結果、HLA-C、HLA-DPにおいて再発のリスクを有意に下降させるHLA アリルミスマッチコンビネーションが明らかとなった。特にHLA-DPでは6つのコンビネーションが明らかとなった。これらのコンビネーションはaGVHD(急性の移植片対宿主病)のリスクを有意に上昇させるコンビネーションとは異なっていたため、aGVHDのリスクを上昇させずにGVLを誘導しうる可能性が示唆され、更なる検証が必要である。また、HLA-Cにおいて、2つの再発リスクを有意に下降させるアミノ酸置換部位・種類が同定され、そのうちの1つはaGVHDを有意に上昇させるアミノ酸置換とは異なっていた。

<今後の方向>

今後、本結果を含むHLA アリルミスマッチコンビネーションに関するエビデンスの国際間比較を行ない、さらに詳細な検討を行う予定である。

1) 愛知県がんセンター中央病院血液細胞療法部

腫瘍病理学部

<研究課題> 1

(主題) 人体剖検例の病理組織学的研究

<研究者氏名>

立松正衛, 中西速夫, 塚本徹哉, 福山隆一

<目的・概要・進捗状況>

本年度（平成20年4月～平成21年3月）は9体の病理解剖を行い、開所以来の総剖検数を2,602体とした。これらの症例は組織検査後、病理診断・解剖所見を付して担当医に報告されると同時に、日本病理学会の剖検輯報に掲載される。学問的に貴重な症例、臨床的（診断並びに治療上）に重要で検討を要する症例に関しては、担当医との意見の交換は勿論であるが、適時行われるCPC（臨床病理検討会）に提出し相互討議を深め、当がんセンターの医療水準の向上の一役を担ってきた。本年度は胸部外科の肺がん症例および薬物療法部の原発不明がんの2症例についてCPCを2回開催した。

<今後の方向>

がんの診断技術、制がん手段（手術・照射・制がん剤・免疫療法）の進歩によって、根治例の増加は勿論、非根治例でも長期間寛解をもたらす機会が開かれつつある。悪性リンパ腫等に対する幹細胞移植を組み合わせた化学療法や分子標的治療、食道がん、脳転移巣への分割照射の治療効果などがその代表で、剖検時腫瘍の顕著な縮小、瘢痕治癒を認めることが少なくない。しかし一方で感染症をはじめ出血、血栓症などの合併症が死因となる例も決して稀ではない。かかる症例を疾患の自然史的立場から系統的な病理学的検討を行い、良好な予後に導く要因を引き出すのが今後の重要な課題である。また近年、相対的に増加傾向にある臨床試験（治験）が行われている症例や医療事故の可能性のある医療関連死症例の剖検については臨床側との密接な情報交換、また第三者機関へのコンサルテーション等により積極的に症例報告、情報開示を行ってゆくことが大切である。

<研究課題> 2

（主題）消化器がん発生の実験的研究

（副題）凝集キメラマウスを用いた大腸潰瘍の修復過程の解析

<研究者氏名>

塚本徹哉、時亮¹⁾、豊田武士、高須伸二²⁾、齋藤典子、齋藤亜弓、田中卓三³⁾、立松正衛

<目的・概要・進捗状況>

潰瘍性大腸炎は原因不明の炎症性腸疾患である。Dextran sulfate sodium (DSS) は、齧歯類に潰瘍性大腸炎類似の炎症を起こし、また、大腸発がん促進因子として広く用いられている。その解析のため、キメラマウスを用いて、DSS誘発大腸潰瘍の修復過程における細胞のclonalityと増殖形態を検討した。C3H及びgreen fluorescent proteinトランスジェニックマウス（C57BL/6J系統、Green mouse）より、8細胞期の受精卵を採取し、透明帯を除去した後、凝集させ仮親（ICR）に移植しキメラマウスを作製した。5～6週齢のキメラマウスに2% DSSを7日間飲水投与し、実験第8日、10日、14日、21日にBrdUを投与後1時間で屠殺した。大腸組織をC3H特異抗体（CSA）及び抗BrdU抗体で免疫染色し、再生上皮のclonalityと増殖パターンを検討した。DSS投与により、盲腸から直腸に至るまで、多数の潰瘍が発生した。潰瘍部の粘膜欠損部分は、隣接する陰窩上皮

と同系統の上皮により修復され、その後、一層の修復上皮の一部にBrdU陽性の増殖単位が出現し、徐々に陰窩の形態を形成した。また、潰瘍に隣接する陰窩では、腺底部に多数のくびれ（fissioning）が出現し、細胞分裂と共に陰窩の分裂を示した。細胞分裂、陰窩のfissioningは潰瘍底に近いほど、また、時間が経つほど有意に高頻度であった。DSS終了後、CldUを6時間毎に4回投与し、屠殺直前にIdUでflash labelして、陰窩から潰瘍底に至る細胞集団の系譜を観察した結果、CldU陽性細胞は、陰窩から潰瘍底につながっており、IdU陽性細胞は、陰窩のみに陽性であった。以上より、潰瘍を覆う上皮は、上皮細胞の増殖ではなく、隣接する陰窩由来の表層上皮の移動による事が示唆された。潰瘍底上を被覆した一層の細胞において、異なる系統由来の細胞同士が接触するpatch boundaryにBrdU陽性の増殖単位が一致する確率は9%と低く、潰瘍に隣接する陰窩から供給され移動した細胞がランダムに増殖能を獲得すると考えられた。以上より、潰瘍修復過程には、隣接する陰窩からの上皮細胞の供給とその後の陰窩単位の形成、さらに陰窩のbifurcationによる分裂が重要であると考えられた。

<今後の方向>

潰瘍の修復を阻害しないようにcrypt fissionを制御し、腫瘍発生を抑制できるようメカニズムの解明を行う。

1) リサーチレジデント、2) 研修生、3) 金沢医大・腫瘍病理

<研究課題> 3

（主題）消化器がん発生の実験的研究

（副題）*Helicobacter pylori*感染スナネズミ胃発がんモデルを用いたNF- κ B阻害剤による胃がん予防効果の検討

<研究者氏名>

豊田武士、塚本徹哉、高須伸二¹⁾、時亮²⁾、齋藤典子、齋藤亜弓、立松正衛

<目的・概要・進捗状況>

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) は広範な生命現象に関与する転写因子として知られ、炎症および発がん過程においても重要な役割を果たすことから、分子治療の新たな標的として注目されている。今回我々は、ヒト胃がん培養細胞株および*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染スナネズミモデルを用いて、天然成分由来のNF- κ B特異的阻害剤である caffeic acid phenethyl ester (CAPE) による慢性胃炎・胃がん抑制効果を検討した。

AGS細胞を用いた *in vitro* の解析では、*H. pylori*によって誘導されるNF- κ B活性化、および炎症関連因子（IL-1 β ・IL-8・TNF- α ・iNOS）のmRNA発現がCAPE投与により濃度依存性に抑制されることが明らかとなった。また、ウエスタンブロットによる解析では、CAPEがNF- κ B活性化を抑制する機序として、I κ B- α の分解抑制とp65サブユニットのリン酸化阻害に関与する可能性が示唆された。

次に、スナネズミモデルを用いて、*H. pylori*誘発胃炎に対するCAPEの*in vivo*での抗炎症作用を評価した。6週齢雄SPFスナネズミに*H. pylori*を胃内接種し、感染後2週よりCAPEを混餌投与した。12週目に解剖し胃炎の程度を検索した結果、0.1% CAPEを混餌投与した群の胃粘膜では、好中球・単核細胞浸潤および上皮細胞増殖活性が対照群と比較して有意に抑制された。免疫組織化学的には、NF- κ B p50サブユニットの核移行およびI κ B- α リン酸化の抑制が明らかとなった。また、CAPEは幽門腺粘膜における炎症関連因子（TNF- α ・IFN- γ ・IL-2・IL-6・iNOS）のmRNA発現を有意に低下させた。以上の結果から、CAPEはスナネズミにおける*H. pylori*誘発胃炎に対し、NF- κ B経路の抑制を通じた抗炎症作用を発揮することが示された。

さらに、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 投与によるスナネズミ胃癌モデルを用いて、CAPEの胃癌抑制効果についても検討した。上記の*H. pylori*感染スナネズミに10ppm MNUを20週間飲水投与し、52週目に解剖したところ、胃癌発生率は対照群53.7% (29/54) に対し、0.1% CAPE投与群では26.9% (7/26) と有意 ($P < 0.05$) に低下した。血清抗*H. pylori*抗体価の減少、胃粘膜における炎症性細胞浸潤の軽減、IL-1 β ・TNF- α ・iNOS・COX-2 mRNA発現の低下が認められた。以上の結果から、*H. pylori*誘発性慢性胃炎および胃癌に対し、NF- κ B経路を標的とした化学予防法が効果的である可能性が示された。

<今後の方向>

NF- κ Bは炎症・がん治療における標的分子として注目を集めている。今後、CAPEによるNF- κ B抑制が慢性胃炎と胃癌の発生・進展を抑える上でいかに機能するかについて検討を進める。

1) 研修生、2) リサーチレジデント

<研究課題> 4-1

(主題) ヒトおよび動物癌転移の分子病理学的研究

(副題) 胃癌・大腸癌の微小転移に対する遺伝子診断法および治療法の開発

<研究者氏名>

中西速夫、伊藤誠二¹⁾、山村義孝¹⁾、平井孝¹⁾、金光幸秀¹⁾、立松正衛

<目的・概要・進捗状況>

胃癌の術後再発の半数以上は腹膜再発である。この腹膜再発は腹腔内の遊離癌細胞あるいは目に見えない微小転移によるものと考えられることから、微小転移に対する高感度な診断法と効果的な治療法の組み合わせにより再発の予防と生存率の大幅な改善が期待できる。我々はこれまでに微小転移の検出法として定量RT-PCR法を用いた腹腔洗浄液中CEA mRNAの定量法を確立し、本法が術後の腹膜再発のリスクを評価するための優れた診断法であることを高度先進医療による前向き研究で明らかにしてきた。一方、GFP遺伝子導入ヒト胃癌の腹膜微小転移モ

デルを用いて、微小転移は進行した転移に比較して各種抗癌剤（殊にパクリタキセルの腹腔内投与）に対する化学療法感受性が高いことを明らかにしてきた。以上の知見から遺伝子診断により微小転移の発見と術後の腹腔内化学療法による腹膜再発予防戦略を提唱してきた。しかし、定量RT-PCR法の実用上の課題や従来の化学療法では治癒率の改善に限界があり、また副作用もあることなど、さらなる改善をはかるため微小転移に対する新しい診断・治療法の開発を進めている。本年度は、1) CEAを補完できる新しいマーカー遺伝子を見出すために25Kチップを用いた網羅的探索を行い、新規診断遺伝子マーカーを4個同定し、個々の遺伝子の予後予測マーカーとしての有用性を評価すると同時に、一度に4-5個の遺伝子発現を定量できるMultiple RT-PCRを構築し、従来のCEA単独のRT-PCRに比べ、診断精度の向上が得られることを150例の症例を用いた後ろ向き研究で明らかにした。2) さらに診断用カスタムDNAマイクロアレーを企業との共同研究により作成、再発予測アルゴリズムを構築し、本法がCEA単独のRT-PCRに比べ検出感度が高いことを明らかにした。

一方、新規治療法に関しては1) 糖鎖の機能を利用しマクロファージ(m ϕ)をcellular vehicleとする腹膜初期転移巣(大網乳斑)に選択的に抗癌剤を送達できるドラッグデリバリーシステム(マンノース被覆リポソーム=OML)は、これまでのマウスm ϕ のみならず、健常人末梢血のm ϕ ならびに胃癌患者の腹腔m ϕ でもヒト大網乳斑に選択的に送達できることをEx vivo実験で確認した。さらに、臨床応用をめざして企業と共同してシスプラチン等の種々の抗がん剤を封入したリポソームの製剤化とその薬効評価のための前臨床試験を進めている。また2) 胃癌肝転移巣から樹立した3株のHER2高発現胃癌細胞株(GLM-1,2,4)を用いてHER2高発現胃癌の腹膜転移がTrastuzumab (Herceptin)に対して高感受性を示すこと、さらにその感受性機構として、HER2過剰発現によって恒常的に活性化されたPI3K/Aktシグナルの抑制と抗体依存性細胞障害活性の両者が関与することを明らかにし、HER2過剰発現胃癌の腹膜転移に対する分子標的治療法の可能性を明らかにした。

<今後の方向>

現状のCEA単独のRT-PCRに代わるより高い診断精度を有する遺伝子診断法として1) CEAを補完できる新規遺伝子を含む4-5個の遺伝子を組み合わせたmultiple RT-PCR、および2) 診断用腹腔洗浄液カスタムDNAマイクロアレー、により高精度に腹膜再発予測が可能か否かを確立するために前向き研究(臨床研究の付随研究として)を開始する。一方、新しい治療法に関する基礎的研究、前臨床試験をさらに進め、第1相あるいは第2相臨床試験に進めてゆく予定である。

1) 愛知県がんセンター中央病院・消化器外科、

<研究課題> 4-2

(主題) ヒトおよび動物癌転移の分子病理学的研究

(副題) 口腔癌、胃癌、大腸癌(転移)に対する分子標的治療法の開発ならびにがん幹細胞を標的とする新規治療法

の開発

<研究者氏名>

中西速夫, 福山隆一、原賢康¹⁾, 太田充彦¹⁾, 大島由起子¹⁾, 高木大志¹⁾, 松井誠²⁾, 伊藤誠³⁾, 金光幸秀³⁾, 平井孝³⁾, 立松正衛

<目的・概要・進捗状況>

当教室で樹立したEGFRを高発現する高悪性度低分化型大腸がん細胞株 (COLM-5) に対しGefitinib (ならびにCetuximab) はアポトーシス誘導は軽度だが、in vitroにおいて有意な増殖抑制を示し、in vivoにおいてはヌードマウス皮下移植腫瘍ならびに腹膜転移に対し顕著な抗腫瘍効果、転移抑制効果を示す。このgefitinib感受性の機序としてP27^{Kip1}誘導による細胞周期G1期停止が関与していることを既に明らかにしているが、本年度はこれにLoss of HER3が関与することをHER3誘導実験ならびに強制発現実験により明らかにしつつあり、EGFR(+)/HER2(+)/HER3(-)形質を示す低分化型大腸がんがEGFR標的薬の標的になりうる可能性を示唆した。

一方、上記、低分化型大腸癌細胞株 (COLM-5) から磁気ビーズ法で分離したCD133(+)細胞はCD133(-)細胞に比べ、in vitroにおける増殖能は低いが、コロニー形成能やspheroid形成能が高かった。またCD133(+)細胞は少数(1x10³)個の細胞移植によるNOD/Scidマウス皮下腫瘍形成率もCD133(-)細胞に比べ高く、がん幹細胞様形質を示した。そこで次に抗がん剤感受性ならびにGefitinib感受性をCD133(-)株と比較検討した。薬剤感受性をin vitroならびにヌードマウス皮下移植系で検討したところ、両者の間でCPT-11などの抗がん剤感受性に有意な差は認めなかったが、Gefitinib感受性はCD133(-)細胞に比べ、CD133(+)細胞の方が有意に高かった。受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の網羅的解析の結果、CD133(+)細胞において数種類のRTKの発現亢進が認められた。以上の結果より、Gefitinibは低分化型大腸がんのがん幹細胞(CD133陽性COLM-5細胞)の増殖シグナルを標的とする分子標的治療薬と成りうる可能性が示唆された。

<今後の方向>

胃がん、大腸がんの分子標的治療に関して独自に樹立した感受性細胞株を用いて、作用機序の解明を行い、新しい分子標的を明らかにし、それを効果的に抑制できる既知、新規薬剤の探索を行う。また上記細胞から分子標的治療に対する各種耐性株を作成し、耐性機構についても明らかにする。また、上記CD133発現大腸がんのがん幹細胞モデルを用いることによりそれらの増殖シグナルの分子機構の詳細を明らかにしてゆく予定である。

1) 研修生, 2) リサーチレジデント, 3) 愛知県がんセンター中央病院・消化器外科

分子腫瘍学部

<研究課題> 1

(主題) 肺癌の発症・進展機序の解明と分子標的療法の探索

(副題) 新規遺伝子ADw1の肺癌悪性化への関与の検討

<研究者氏名>

長田啓隆、立松義朗、富田秀太¹⁾、谷田部恭²⁾、藤井万紀子、村上秀樹、近藤豊、関戸好孝、高橋隆¹⁾

<目的・概要・進捗状況>

神経内分泌分化は小細胞肺癌や一部の非小細胞肺癌に見られ、神経内分泌分化肺癌は高悪性度であることが報告されている。これまで神経内分泌分化の誘導因子ASH1を検討し、神経内分泌分化肺癌細胞のCell lineage依存性を報告した。又、ASH1が神経内分泌分化関連遺伝子群の発現を誘導すると共に、がん抑制遺伝子群の発現を抑制するという両方向性の発現制御機構を持ち、細胞接着の低下を伴って肺癌悪性化に関与することを報告した。更に詳細にASH1の下流シグナルを検討しており、本年度はASH1シグナルの作用分子として、ASH1によって発現抑制される新規遺伝子ADw1に注目し検討した。

肺癌でのADw1の発現をmicroarrayと定量RT-PCRで検討したところ、ADw1は肺癌検体及び肺癌細胞株で高頻度に発現低下が見られた。その原因としてADw1プロモーター領域のDNAメチル化をbisulfite sequencingにて検討したところ、肺癌細胞株3/10でDNAメチル化が確認された。更にADw1 cDNAをRT-PCRで増幅し配列を検討したところ、6例中2例でframe shiftを伴う異常転写産物が見られた。そこで、更にADw1の機能を検討すべく、ADw1 cDNAをRT-PCRで単離し発現ベクターを作成した。全長ADw1を発現させると、ADw1は糸状仮足を中心とした細胞表面に局在を示し、糸状仮足の形成促進がみられ、細胞が大型化した。一方、shRNAオリゴを挿入したレンチウイルスでADw1をノックダウンすると、細胞形態が小型化し、細胞間接着・アクチン繊維の乱れが観察された。このような結果から、ADw1遺伝子は肺癌で高頻度に異常な発現を示し、機能的にはADw1は細胞接着・運動能に関与しており、肺癌悪性化において重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

<今後の方向>

肺癌症例におけるADw1の異常な転写産物を解析する。又、更にADw1に機能を明らかにする。それらの所見から、ADw1の肺癌悪性化への関与を解明し、肺癌の治療戦略に応用することを目指す。

1) 名大・院医・分子腫瘍、2) 中央病院・遺伝子病理

<研究課題> 2

(主題) 中皮腫の発がん機序の解明と細胞生物学的研究

(副題) 中皮腫における受容体チロシンキナーゼの同時活性化の解析

<研究者氏名>

川口晃司^{1,2)}、村上秀樹、谷口哲朗²⁾、藤井万紀子、
川田滋久、鈴木裕太郎^{1,3)}、近藤豊、長田啓隆、
福井高幸⁴⁾、堀尾芳嗣⁵⁾、樋田豊明⁵⁾、関戸好孝

解明

(副題) Gastrointestinal stromal tumorにおけるDNAメチル化
解析

<目的・概要・進捗状況>

悪性中皮腫は極めて予後不良の腫瘍である。受容体チロシンキナーゼ (RTK) の恒常的活性化が中皮腫において認められ、中皮腫細胞の生存・増殖に深く関与すると報告されている。しかし、臨床試験におけるそれぞれの受容体チロシンキナーゼに対する特異的分子標的剤の効果は極めて限定的である。この相反する結果をもたらした原因を理解するためには、中皮腫細胞の受容体チロシンキナーゼの活性化状態の本態を明らかにすることが必要と考えられる。われわれは、20株の悪性中皮腫細胞株を用いて受容体チロシンキナーゼの活性化状態、活性型変異等のゲノムレベルの変異の有無、さらに特異的阻害剤の単独・併用効果を検討した。

42個の受容体チロシンキナーゼのリン酸化状態を検出するホスフォRTKアレイを用いて検討したところ、無血清培養下で平均6.5個の受容体チロシンキナーゼの活性化が認められ、最も活性化の頻度が高い分子はMETおよび上皮成長因子受容体 (EGFR) ファミリーであった。両者が恒常的に活性化した細胞株を用いて、MET特異的阻害剤およびEGFR特異的阻害剤を投与したところ、単独での細胞増殖抑制効果に比べて、コンビネーションにより抑制効果はさらに増強した。さらに細胞の運動能および浸潤能も抑制された。また、下流のPI3K-AKTシグナル伝達系およびMEK-ERKシグナル伝達系をそれぞれに対する特異的阻害剤にて抑制したところ、前者において増殖抑制効果が顕著であった。

一方、METおよびEGFRの変異検索を行ったが活性型の変異は検出されなかった。PI3K-AKTカスケードを負に制御するPTEN遺伝子について2株においてホモザイガス欠失が検出された。

<今後の方向>

今後は中皮腫細胞を移植した動物モデルを用い、受容体チロシンキナーゼ阻害剤の併用効果をin vivoで検証することが重要であると考えられる。中皮腫細胞においても、その複数の受容体チロシンキナーゼの活性化が認められたため、特異的阻害剤の併用療法あるいはブロードな阻害活性をもつ阻害剤による治療戦略が有望と考えられた。さらに、受容体チロシンキナーゼ経路の下流においてはPI3K-AKTカスケードの脱制御が引き起こされておりこのシグナル伝達系が中皮腫細胞における生存・増殖にとって鍵となる経路と考えられたので、この経路を有効に遮断することが新たな分子標的治療法の開発戦略に有効と考えられた。

1) 研修生、2) 名大・胸外、3) 名大・呼吸器内科、4) 胸部外科部、5) 呼吸器内科部

<研究課題> 3

(主題) 消化器がんの発症におけるエピジェネティクス関与の

<研究者氏名>

岡本泰幸¹⁾、近藤 豊

<目的・概要・進捗状況>

Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は、胃や小腸、大腸などの消化管に発生する間葉系由来の腫瘍であり、KIT遺伝子やPDGFR α 遺伝子の変異が高頻度に認められる。しかしGISTには、転移を伴う極めて予後不良な群と、腫瘍の増大が遅く転移を伴わない予後が比較的良好な群を認め、それらの分子生物学的な違いは明らかになっていない。今回我々は、GIST48例 (胃原発25例、小腸原発19例、大腸原発4例) を対象とした。GISTは検体採取時にすでに再発・転移をきたしているものに加えて腫瘍径と腫瘍細胞の核分裂像から予後の不良が予測される悪性GIST 群 (38例) と、臨床像から根治が高率に期待される良性GIST 群 (10例) に分類した。Methylated CpG Island amplification-microarray (MCAM) 法を用いて6,157遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化異常を網羅的に解析した。同定した遺伝子のメチル化状態をパイロシーケンス法により定量的に解析してGISTの臨床病理学的背景との関連を検討した。44症例 (90%) でKIT遺伝子 (42症例) もしくはPDGFR α 遺伝子 (1症例) のいずれかの変異が認められたが、遺伝子変異とGISTの悪性度、DNAメチル化様式には相関が認められなかった。6,157遺伝子のうち良性GIST 群では375遺伝子、悪性GIST群では503遺伝子でDNAメチル化異常を認め、悪性度の高いGISTで有意に高頻度にDNAメチル化異常を認めた ($P=0.01$)。また悪性GISTと良性GISTは異なったクラスターに集積する傾向があり、特に88遺伝子のDNAメチル化状態は両群で明らかに異なった。総ゲノムのDNAメチル化を反映するLINE 1のメチル化レベルは良性GIST 群で69%、悪性GIST 群で65%であり、悪性度の高いGISTでLINE 1のメチル化低下が認められた ($P=0.004$)。以上の結果より、GISTの発症にはKIT遺伝子、PDGFR α 遺伝子のチロシンキナーゼ受容体の変異が重要であるが、その進展にはゲノム全体の低メチルとプロモーター領域のメチル化亢進が深く関与していると考えた。

<今後の方向>

高悪性度のGISTに特異的にメチル化する遺伝子を同定した。診断マーカーとしての可能性を目指して解析を進める。

1) 研修生

遺伝子医療研究部

<研究課題> 1-1

(主題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究及び診断治療への応用

(副題) Array CGHによるT細胞性リンパ腫の疾患特徴的ゲノム構造異常/標的遺伝子の探索

<研究者氏名>

中川雅夫, 中村栄男¹⁾, 塚崎邦弘²⁾, 宇都宮興³⁾,
大島孝一⁴⁾, 瀬戸加大

<目的・概要・進捗状況>

我々は、造血器腫瘍におけるゲノム構造変化を全ゲノムにわたって均等に配置された2304個の人工ヒトDNAを貼り付けたスライドガラスを作成し、Comparative genomic hybridization (CGH) をする方法=Array CGH法を確立した。これを用いて約300例近くのB細胞性リンパ腫をこれまでに解析し、ゲノム異常を詳細に明らかにしてきた。一方、T細胞性リンパ腫は全世界的にもいまだゲノム異常解析が不十分で、特徴的なゲノム異常は全く分かっていない。その原因の一端は臨床・病理・ゲノム異常に相関する疾患分類がいまだ十分でない点にある。Peripheral T-cell lymphoma, unspecified (PTCL-U) は新WHO分類で提唱されているどのT細胞性リンパ腫病型にも分類し得ない症例を扱う疾患単位で、複数の疾患を含んでいる可能性がある。再分類に関して様々に検討されているがいまだ結論は出ていない。本研究では網羅的、かつ高精度にゲノム異常を解析できるアレイCGH法でPTCL-U 51症例のゲノム異常を検討した。その結果、ゲノム異常や病理所見・予後に関して均一な新規サブグループを見出す事に世界で初めて成功した。さらにこの新規サブグループは別のPTCLであるリンパ腫型ATLLと高度に類似したゲノム異常様式を持つことも始めて明らかにした。一方、同じくATLLの中でも異なる臨床サブグループである急性型ATLLは、リンパ腫型ATLLとは全く異なるゲノム異常様式を持つことも明らかにした。

<今後の方向>

ゲノム異常領域に発現解析を組み合わせ、バイオインフォマティクス解析で新規PTCL-Uサブグループおよびリンパ腫型ATLLの病態に深く関わる候補遺伝子群を明らかにする。急性型ATLLとリンパ腫型ATLLを発現解析により比較し、その分子病態の差異を明らかにするとともに、分類に有用な臨床的マーカーを検索する。

1) 名古屋大学医学部附属病院・病理部、2) 長崎大学医学部・原爆後障害医、3) 慈愛会 今村病院分院、4) 久留米大学医学部・病理学教室

<研究課題> 1-2

(主題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究及び診断治療への応用

(副題) MALTリンパ腫におけるAPI2-MALTおよびMALT1の核細胞質間移動の意義

<研究者氏名>

中川雅夫, 瀬戸加大

<目的・概要・進捗状況>

MALTリンパ腫に特徴的な染色体転座であるt(11;18)(q21;q21)およびt(1;14)(p22;q32)の切断点から同定されたMALT1, BCL10,API2-MALT1キメラ蛋白は,MALTリンパ腫形成において重要な分子である。これらは共に細胞質内でNF-κBを活性化することが最近明らかになってきたが,そのほかの機能については報告がない。そこでわれわれは細胞内局在のメカニズムを研究することで,これらの重要分子がNF-κBのみならず,ほかの機序でも腫瘍発症に関与するのか検討することを目的とした。

Nuclear Export Signal (NES)を持つ分子は,核内で担体タンパクCRM1と結合し能動輸送によって核外に排出されることが知られている。MALT1またはAPI2-MALT1を一過性発現するCOS7細胞に対しNES特異的阻害薬であるレプトマイシンB (LMB)で処理すると,MALT1, API2-MALT1は核内に集積する。これらの分子は細胞質のみにとどまっているのではなく,能動的に細胞質と核を往復していることを初めて明らかにした。更に複数のMALT1ミュータントコンストラクトを作成することで,MALT1のC端にNESアミノ酸配列を同定した。このNESは種を超えて保存されており,MALT1の核・細胞質間移動がリンパ球の生理的機能に何らかの役割を担っている可能性を示唆している。BCL10はNESを持たないが,MALT1と共にCOS7細胞に発現させることで核外に輸送される。臨床検体において正常リンパ球のBCL10は細胞質に染色されるのに対して,t(11;18)及びt(1;14)陽性MALTリンパ腫では核にも染色されることが近年報告されている。BCL10核陽性例は進行期症例が多いと報告されており,臨床的に非常に重要な所見でありながら,その機序は全く不明であった。我々の新しい知見はMALTリンパ腫におけるBCL10の局在異常の機序とMALT1の関与を示唆しており,BCL10の細胞内局在メカニズムモデルを提唱するに至った。

<今後の方向>

MALT1,API2-MALT1の核細胞質間往復がMALTリンパ腫形成にどのように関与しているのかを検討する。また,核内でのBCL10の分子機構についても検討したい

<研究課題> 1-3

(主題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究及び診断治療への応用

(副題) A20のリンパ腫形成における機能解析

<研究者氏名>

本間圭一郎, 瀬戸加大

<目的・概要・進捗状況>

我々は、過去に行ったリンパ腫のアレイCGH解析のデータから、Activated B cell like (ABC) typeのびまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) とマンツル細胞リンパ腫 (MCL) に高頻度にA20の欠失が認められることをすでに報告した。A20の腫瘍形成における役割については相反する報告があり、その意義は明らかでなかったが、我々は、A20欠失リンパ腫細胞株に対しA20をreintroductionすることによってNF-κB活性が抑制さ

れ、アポトーシスが誘導される一方、A20の欠失がない細胞株ではA20導入によるNF-κB活性に変化はなく、アポトーシスも誘導されなかった。このことから、A20欠失リンパ腫細胞株では、A20の欠失によってNF-κBが活性化し、その生存におけるNF-κB活性にたいする依存が形成されている可能性が示唆された。また、A20は、NF-κBシグナルのうち、canonical pathwayを制御しnon-canonical pathwayへの影響は少ないことを明らかにした。さらにEBV不死化B細胞のA20をsiRNAでノックダウンすることで、腫瘍形成にかかわるNF-κB標的遺伝子の発現が亢進すること、アポトーシス耐性およびコロニー形成能亢進をきたすことを明らかにし、A20がB細胞性腫瘍におけるがん抑制遺伝子として機能することを示した。

<今後の方向>

A20が制御する基質のうち、腫瘍形成に最も重要なものは何か、またNF-κB標的遺伝子群のなかで、腫瘍化に最も重要な役割を示す遺伝子は何かを明らかにしていき、分子標的療法へ応用可能な知見を集積する。

<研究課題> 1-4

- (主 題) 造血器腫瘍発症機構の分子生物学的研究及び診断治療への応用
- (副 題) 遺伝子発現プロファイルおよびアレイCGHを用いた、節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型の病因遺伝子の同定

<研究者氏名>

加留部謙之輔, 中川雅夫, 瀬戸加大

<目的・概要・進捗状況>

節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型 (ENKTL) は、欧米よりもアジアに頻度が高い悪性リンパ腫であり、日本から発信する研究が重要と考えられる。しかし、その頻度の低さと検体の取りにくさから、その病態の解明は、他のリンパ腫、特にB細胞リンパ腫に比べ進んでいない。

ENKTLの癌化に関わる遺伝子を同定するため、遺伝子発現プロファイルを用いて以下のステップで研究を行った。

1. ENKTLの正常対応細胞の同定

病因遺伝子の同定のため、正常細胞とENKTLで発現が異なる遺伝子を抽出する必要があるが、ENKTLの正常対応細胞は明らかではない。そのため、まず正常対応細胞を同定するため、ENKTLの細胞株4個、臨床検体11例および正常対応細胞の候補となる正常リンパ球サブセットとして、CD4+/8+ T細胞、CD16+CD56dim NK細胞、CD16-CD56bright NK細胞、 γ δ T細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、NK細胞および γ δ T細胞、つまりinnate immunityに関与するリンパ球がENKTLに最も近い性質を示し、正常対応細胞であると考えられた。

2. ENKTLの遺伝子発現プロファイルおよびゲノム異常

1.をうけてENKTLとNK/ γ δ T細胞の発現プロファイルを比

較し、差の有意な遺伝子を抽出した。その結果、ASPM、STEAP1、IL10などが高発現遺伝子として、LPAL2、CENTA1、TAGAPなどが低発現遺伝子として抽出された。IL10はすでにENKTLで高発現であるとの報告もあり、今回の結果が正しく判定されていることを示唆している。

また、オリゴアレイCGHを用いて、ゲノム異常の解析も行った。その結果、6q21の狭い領域において、最も高頻度な欠失が認められた。この部位にはPRDM1、AIM1、PERPなどの遺伝子の存在が確認された。

<今後の方向>

以上の結果から、遺伝子発現プロファイルは正常対応細胞の同定に有用であり、したがって腫瘍の再分類にも有用である可能性がある。正常対応細胞との比較で有意に腫瘍細胞において発現が異なる遺伝子はがん遺伝子、癌抑制遺伝子の候補と考えられるので、今後ゲノム異常解析も参考にして、機能実験を進めていきたい。

<研究課題> 2-1

- (主 題) 造血器細胞の分化・増殖に関与する遺伝子の血清学的、分子生物学的研究
- (副 題) TEL-AML1型B細胞性白血病の発症機構解析、およびAML1のアイソフォーム特異的造血細胞生着能亢進機序の解明

<研究者氏名>

都築忍, 瀬戸加大

<目的・概要・進捗状況>

TEL-AML1は染色体転座t(12;21)に伴って形成される異常融合遺伝子で、小児リンパ性白血病の原因として最も多いことが知られている。TEL-AML1の機能として、B細胞の分化を特にプロB細胞レベルで著しく阻害する作用があること、B細胞の自己複製能を亢進させることによりB細胞を増殖優位にする機能があることを見出してきた。本年度はマイクロアレイ解析によりTEL-AML1によってB細胞で発現の変化する遺伝子を抽出した。さらに、TEL-AML1が付加的遺伝子異常と協調して白血病を起こすかどうかについてマウスモデルを用いて解析している。

一方、AML1転写因子の短いアイソフォームには骨髓移植後の造血細胞生着能を亢進させる働きがあることを見出していたが、その機序が造血幹細胞の増加にあることを見出し、造血幹細胞の体外増幅を目指して詳細に解析中である。

<今後の方向>

TEL-AML1によって発現が変化する遺伝子の生物学的意義についてshRNAの手法を用いて解析する。付加的遺伝子異常と協調して白血病が発生した場合には治療実験を行う。

また、短いAML1による造血幹細胞増幅作用のメカニズムをさぐる目的で、未分化造血細胞で発現する他の転写因子についても同様の系でその機能を解析していく。

腫瘍免疫学部

<研究課題> 1-1

(主題) 腫瘍抗原の免疫学的、分子生物学的検索

(副題) 新規のヒトマイナー組織適合抗原の同定

<研究者氏名>

赤塚美樹、亀井美智^{1,2)}、川瀬孝和、鳥飼宏基、
南谷泰仁³⁾、小川誠司³⁾、森島聡子²⁾、谷田部恭、
森島泰雄、葛島清隆、高橋利忠⁴⁾

<目的・概要・進捗状況>

同種造血幹細胞移植は難治性造血器腫瘍に対する治療法として確立しているが、未だ20~40%の頻度で起こる移植後再発が大きな問題である。この原因の一つとして、十分なアロ免疫が誘導されていないことが挙げられる。移植後にはマイナー組織適合抗原 (mHA) を中心としたアロ免疫反応が起り、残存する腫瘍細胞を排除していると考えられており、移植片対腫瘍 (GVT) 効果をもたらす標的抗原として期待される。昨年度は SNP アレイを用いたゲノムワイド解析法を開発し、HLA-A24 拘束性の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンが認識する新規 mHA (ACC-1C) の同定を報告したが、本年度はこれをさらに改良し、国際 HapMap 計画で収集された試料とデータを駆使する迅速な mHA 同定法を開発した。

【HLA-B*4002 拘束性の新規 mHA】

慢性骨髄性単球性白血病に対して HLA 一致の同胞ドナーから異性間骨髄移植を受けた患者の移植後 31 日目の末梢血より、HLA-B*4002 拘束性の CD8+T 細胞クローン (IIIB6) を樹立した。300 万個以上の SNP タイピングが終了した国際 HapMap 計画で収集された B-LCL に HLA-B*4002 を導入したパネルに対する細胞傷害パターンとその SNP ゲノムタイピングデータをもとに相関解析法を行い、もっとも細胞傷害性の表現型と関連する SNP を全ゲノム上で検索した。その結果、染色体 19 番長腕に位置する SLC1A5 遺伝子の Exon 1 の上流にある SNP が極めて高い χ^2 乗値を示した。実際にはそのすぐ側の Exon 1 に存在する SNP が mHA の表現型と完全一致したが、HapMap のゲノムタイピングはなされていなかったため最初の段階では候補にならなかった。この SNP を含む異なった長さの minigene を作製し、HLA-B*4002 を安定導入した 293T 細胞に強制発現させ IIIB6 が認識する最小エピトープの同定を試みた。その結果、IIIB6 は SNP を含む 11 アミノ酸からなるエピトープを認識していることがわかった。この遺伝子がコードするタンパク質は細胞膜上のアミノ酸トランスポーターであるが、定量 PCR により白血病細胞を含む造血細胞系と、精巣、前立腺、大腸など一部の非造血組織で発現が認められた。同様の方法で HLA-A*0206 拘束性の mHA も同定でき、本法が有力な方法であることが示された。

<今後の方向>

- ①今回開発した HapMap 細胞・ゲノムデータを用いた方法を普遍化し、ウェブページにて一般公開する。
- ②これまでに同定した造血器細胞特異的 mHA ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験を進める (既に 2 症例がワクチンの

第一段階量の投与済み)。

1) 名古屋市立大学・院・新生児・小児医学分野、2) リサーチレジデント、3) 東京大学・院・血液・腫瘍内科、4) 健康科学総合センター・センター長、(財)愛知県健康づくり振興事業団

<研究課題> 1-2

(主題) 腫瘍抗原の免疫学的、分子生物学的検索

(副題) 未知の腫瘍抗原探索のための人工抗原提示細胞システムの構築

<研究者氏名>

岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆

<目的・概要・進捗状況>

癌患者のリンパ球を自己の癌細胞株で刺激することで得られる細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は、CTL 標的抗原の同定に必須である。このため、細胞株を樹立しにくい膀胱癌などでは CTL 標的抗原の同定が遅れている。他の患者から樹立された癌細胞株を抗原提示細胞として使用すると、一致していない HLA に対する強いアロ反応が CTL の誘導を阻害する。

単独の HLA のみを発現してアロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞 (aAPC) システムの構築を試みている。今年度は、HLA-A24、共刺激分子である CD86 と 4-1BBL を発現する aAPC を作製し、CTL 誘導能の検討を行い、HLA-A*2402 拘束性に K562 細胞および膀胱癌細胞株を認識する CTL を樹立し、その認識抗原を同定した。

【方法】

HLA を表面に発現していない K562 細胞 (慢性骨髄性白血病細胞) に、レンチウイルスベクターを用いて HLA-A*2402、CD86 および 4-1BBL を導入した。この細胞を aAPC として用いて、HLA-A24 陽性成人のナイーブ CD8+T 細胞を刺激して T 細胞株を樹立した。特異性はエリスロット法とインターフェロン (IFN) γ キャッチ法にて確認した。限界希釈培養法にて CTL クローンを複数得た。全てのクローンは、HLA-A24 拘束性に K562 細胞を認識するが、HLA-A24 陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞は認識しなかった。他の癌細胞株への反応性を調べたところ、16F3 クローンは複数の膀胱癌細胞を認識した。また種々の細胞への反応性パターンから、樹立したクローンはそれぞれ異なる抗原を認識していると考えられた。K562 細胞の mRNA から構築した cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニングにより、4 個の CTL クローンがそれぞれ認識する 4 種類の抗原を同定した。同定した遺伝子は、1) 赤芽球系の転写因子、2) 慢性リンパ性白血病患者血清を用いた serological analysis of cancer antigens by recombinant cDNA expression cloning 法により、過去に同定された腫瘍抗原、3) RNA 結合蛋白質、4) ユビキタスな発現をする遺伝子 (のサブライソバリエント) であった。

【結果及び考察】

16F3クローンは、ユビキタスな発現をする遺伝子（のスプライスバリエーション）由来のエピトープを標的とするが、なぜK562細胞と一部の腫瘍細胞のみを認識し、正常細胞を含めた他の細胞を認識しないのか不明である。抗原プロセッシングの差異、エピトープ発現を抑制する何らかの因子の存在、エピトープを産生する他のスプライスバリエーションの存在、等の仮説を立てて検証実験を進めている。

同定された抗原のうち2個は白血病細胞に特徴的な遺伝子であった。これは、本aAPCシステムが、使用した癌細胞株に発現する新規腫瘍抗原を同定するのに有効なツールとなり得ることを示している。

<今後の方向>

①他の癌から樹立された細胞株を用いて同様にaAPCを作製し、免疫療法に有用な腫瘍抗原の同定を行っていく。

<研究課題> 2-1

（主題）免疫診断及び免疫治療の前臨床的及び臨床的研究

（副題）遺伝子導入した抗原をCD4陽性T細胞に効率よく提示する方法の確立

<研究者氏名>

渡邊友紀子、岡村文子、森島聡子¹⁾、葛島清隆

<目的・概要・進捗状況>

腫瘍抗原に対する免疫応答の増強を期待したがワクチン療法の効果判定には、臨床効果とともに抗原特異的な免疫応答の検出が重要である。抗原mRNAを導入した抗原提示細胞は、HLA拘束性エピトープの同定が不要な反面、クラスII経路を介したCD4+T細胞に認識されにくい。そこで私たちは、抗原とクラスII経路関連蛋白とを融合した遺伝子を用いて、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）およびCD4+T細胞へ同時に抗原提示させるシステムの確立を目指してきた。これまでに、Epstein-Barr virus核蛋白の1つであるEBV-nuclear antigen（EBNA）1蛋白抗原では、クラスII経路関連蛋白関連遺伝子を融合したgp96EBNA1-lamp1およびInvariant chain-EBNA1の2つが抗原特異的CD4+T細胞への抗原提示を増強することを確認した。また、これらの融合遺伝子では、EBNA1単独の遺伝子よりもより高頻度にEBNA1特異的CD4+T細胞を誘導することができた。

次に、メラノーマをはじめいくつかの腫瘍で発現している腫瘍抗原MAGE A4について抗原特異的CD4+T細胞の誘導を試みた。EBNA1での結果をふまえ、Invariant chain-MAGE A4遺伝子を有するプラスミドを作製し、in vitro transcriptionにてmRNAを合成した。電気穿孔法にて自己CD40活性化B細胞にmRNAを導入し、抗原提示細胞とした。この細胞を用いてMAGE A4のprecursorを有する健康人ドナーのナイーブCD4+T細胞から、MAGE A4特異的CD4+T細胞を誘導した。コントロールとしてcognate peptideをパルスした自己CD40活性化B細胞（CD40B）でも誘導をおこなった。

今回の方法では、目的としたInvariant chain-MAGE A4 mRNA導入自己CD40Bにより抗原特異的CD4+T細胞を誘導することはできなかった。MAGE A4 mRNA導入自己CD40Bおよび cognate peptideをパルスした自己CD40Bでも抗原特異的CD4+T細胞は誘導されなかった。

<今後の方向>

①健康人から腫瘍抗原特異的T細胞を誘導する際の抗原提示細胞としての自己CD40Bの有用性が判明しなかったため、他の抗原提示細胞を用いることを検討する。

1) リサーチレジデント

<研究課題> 2-2

（主題）免疫診断及び免疫治療の前臨床的及び臨床的研究

（副題）マイナー抗原特異的CTLの骨髄へのホーミング法の検討

<研究者氏名>

鳥飼宏基、赤塚美樹、森島泰雄、葛島清隆、高橋利忠¹⁾

<目的・概要・進捗状況>

最近、我々を含めた複数の施設から、骨髄がセントラルメモリーT細胞のリザーバーとして中心的な役割を果たしているとする報告がなされている。しかし、同時に骨髄は造血器腫瘍患者の治療後に残存する腫瘍幹細胞の存続の場所（ニッチ）としての役割も果たしている。そこで、SDF-1/CXCL12を分泌する骨髄へのホーミングレセプターであるCXCR4を、CTLの効率的な骨髄への送達に利用できないか検討した。

マウスと人のCXCR4はアミノ酸レベルで89%相同であることから、まずCXCR4高発現ヒト骨髄腫細胞株がマウス骨髄に集積しうるか検討した。細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し安定株を得た後、8週齢のNOGマウスの尾静脈から 1×10^7 個を投与し経過観察した。6週目の時点でも末梢血中には骨髄腫細胞が認められなかったが屠殺し、骨髄・脾臓への浸潤をフローサイトメトリー（抗ヒトCD45、CD38抗体を指標）で検討したところ、骨髄への選択的な生着が認められた。またルシフェラーゼの発光でも同様の傾向が認められた。以上の予備的結果より、CXCR4-IRES-GFPのコンストラクトをレトロウイルスにてマイナー抗原（mHA）特異的CTLに導入し、機能解析を試みた。GFPを指標とした場合、CTLへの遺伝子導入効率は80%程度と良好であった。このCTLとマイクロチャンバーを隔ててSDF1 α 濃度勾配を用いたchemotaxis assayを行ったところ、単回実験ではあるが、CXCR4導入細胞で有意なmigrationが認められた（約80% vs. 約35%）。次いで、CXCR4遺伝子導入ありなし、mHag特異的または非特異的CTL（4種類の組み合わせ）をNOGマウスの尾静脈から投与し、骨髄へのホーミングと抗腫瘍活性を検討した。各グループ3匹ずつの検討では、vitroの実験で得られたようなCXCR4導入細胞の高い遊走能のデータを支持するような差は認められなかった。しかし、事前に生着させておいた骨髄腫細胞株は、この細胞株が発現するmHAを認識す

るCTLを入れた場合のみNOGマウスの骨髄内で減少しており、生着した骨髄腫細胞はmHAを標的とした養子免疫療法によって治療しうることが示された。

<今後の方向>

- ①CTLはCXCR4以外のレセプターを使って自律的に骨髄へ移動する可能性が残ったため、さらに検討を進める。
- ②多発性骨髄腫への同種骨髄移植は、患者の平均年齢が高く合併症が多いこともありあまり実施されない。しかしミニ移植後に積極的なmHA特異的CTLにより抗腫瘍効果を増強しうる可能性が示されたため、今後移植例におけるmHA特異的CTLの骨髄での動態を検討したい。

1) 健康科学総合センター・センター長、(財)愛知県健康づくり振興事業団

腫瘍ウイルス学部

<研究課題>

- (主題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副題) EBウイルス産生感染に伴うp27Kip1分解の分子機構

<研究者氏名>

岩堀聡子¹⁾、村田貴之、鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

EBV産生感染の進行に伴い、細胞内CDK活性は高くなる。CDK阻害剤(Purvalanol、Roscovitin)で感染細胞を処理すると、ウイルス最早期、早期遺伝子群の転写が阻害され、ウイルスゲノム合成が低下する。これらの観察からEBVはウイルス産生感染を遂行するため積極的にCDK活性の高いS期様細胞環境にする機構を備えていると考えられる。本研究ではEBV産生感染の進行に伴ってCDK阻害蛋白質p27Kip1がプロテアソーム依存的に分解されることを見出し、その分解にEBV蛋白質キナーゼ(BGLF4)が関与する事を明らかにした。

<材料と方法>

EBV産生感染に伴うp27Kip1の挙動を解析した。また、BGLF4欠損ウイルスの作製やBGLF4に対するsiRNAを用いたノックアウトによる影響を検討した。さらにBGLF4単独発現細胞において、p27Kip1の挙動および翻訳後修飾を解析した。

<結果と考察>

EBV産生感染に伴ってp27Kip1がプロテアソーム依存的に分解されることを見出した。BGLF4欠損ウイルスの作製やsiRNAによりBGLF4をノックアウトすると、p27Kip1の分解は抑制された。また、BGLF4単独発現細胞において、p27Kip1はユビキチン/プロテアソーム系により顕著に分解された。これらのことから、EBV産生感染に伴ってBGLF4依存的にp27Kip1が分解される事が明らかとなった。p27Kip1は細胞周期特異的に分解さ

れ、特にS期には核内においてp27Kip1の187番目のスレオニン(Thr-187)がCyc E/CDK2によりリン酸化され、その結果、Skp2を含むSCF複合体(SCFSkp2)により認識され、ユビキチン化される。BGLF4はin vivo及びin vitroのいずれにおいてもp27Kip1のThr-187をリン酸化すること、また、BGLF4はCyc E/CDK2と異なり、p27Kip1による活性阻害を受けず、効率よくp27Kip1をリン酸化する事が解った。また、siRNAによりSkp2をノックアウトすると、BGLF4によるp27Kip1の分解が抑制された。以上より、BGLF4はp27Kip1のThr-187を効率よくリン酸化することで、SCFSkp2ユビキチンリガーゼを介したユビキチン/プロテアソーム系によるp27Kip1の分解を促進することが示された。Skp2 siRNAによるp27Kip1の分解抑制やp27Kip1の過発現はウイルス産生量を減少させることから、EBVはp27Kip1を積極的に分解することで、S期CDK活性の上昇を助け、ウイルス増殖に適した細胞環境を形成すると考えられる。

1) リサーチレジデント

<研究課題>

- (主題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副題) EBウイルスBMRF1蛋白質はウイルス転写因子BZLF1のコファクターとしてBALF2蛋白質の大量発現を促進する。

<研究者氏名>

中山早苗¹⁾、鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

Epstein-Barrウイルス(EBV)の潜伏感染からウイルス産生感染への移行はBZLF1蛋白質の発現により引き起こされる。BZLF1蛋白質は転写活性化因子であり、初期蛋白質群(ウイルス複製蛋白質群、核酸代謝蛋白質群など)の発現を誘導する。続いてウイルスDNA合成が始まり、その後後期蛋白質群(ウイルス粒子構成蛋白質群など)の転写が誘導される。BMRF1蛋白質はウイルス複製フォークの構成蛋白質の一つであり、ウイルスDNAポリメラーゼの伸長反応を促進するポリメラーゼ付随蛋白質として機能する。またdsDNA結合能をもち、複製されたウイルスゲノムに結合し、ヌクレアーゼの攻撃やヒストンのアッセンブリーから保護していると考えられている。さらに一部の初期遺伝子の発現を制御することが報告されている。

我々はBMRF1蛋白質の新たな機能の一つとして、一本鎖DNA結合蛋白質をコードするBALF2遺伝子の発現を促進することを明らかにした。BALF2蛋白質はウイルス複製蛋白質の一つで、ウイルス産生感染初期に大量に発現する。BALF2遺伝子上流領域(-356 to +10)をルシフェラーゼ発現プラスミド(pGL4.10; Promega社)に組み込み、レポーター遺伝子を作製した。BALF2遺伝子の転写はウイルス転写因子であるBZLF1とBRLF1蛋白質によりその転写活性が促進されることが知られている。BMRF1蛋白質はBZLF1蛋白質の存在下でのみ発現誘導を促進した。ルシフェラーゼアッセイ及びEMSAによって、BALF2プロモーター上に2つのBZLF1認識部位(ZREs)が存在

(-133 to -114, -80 to -57) し、これらのZREsにBZLF1が結合することによってBALF2遺伝子の発現が誘導され、BMRF1蛋白質によってさらに促進されることがわかった。BZLF1結合領域であるN末領域を欠損した変異BMRF1蛋白質(Δ1-10, Δ1-30)では転写促進能はみられなかった。また、構造解析からBMRF1蛋白質はモノマー、ダイマー、テトラマーを形成することがわかったが、ダイマー形成を阻害した変異蛋白質(C95E)は、BZLF1との結合能も転写促進能もwild-typeとかわらず保持していた。これらの結果から、モノマーBMRF1蛋白質はBZLF1蛋白質と結合し、BZLF1のコファクターとしてBALF2遺伝子の発現を促進していることが示唆された。また、我々はBMRF1遺伝子とBALF5遺伝子を欠損させたEBV BAC DNAをもつHEK293細胞を作成した。BMRF1発現プラスミドを導入した上で薬剤によってBZLF1蛋白質の発現を誘導すると、BALF2蛋白質の発現量が増加した。この結果から、感染レベルにおいても、BALF2蛋白質の発現促進にBMRF1蛋白質が関与していることが示唆された。この研究はJournal of Biological Chemistryに発表した(Nakayama et al., JBC, 2009. 284:21557-21568)。

<今後の方向>

我々はダイマー形成を阻害した変異蛋白質(C95E)を含むEBV BAC DNAをもつHEK293細胞を作成した。ウイルス産生感染を誘導すると、wild-typeと比べウイルスDNA合成の低下がみられたことから、dsDNA結合能をもつダイマー形成が、ウイルスDNA合成に必要であることが示唆された。この他にポリメラーゼの伸長促進能を欠いた変異蛋白質(H141F)やBMRF1蛋白質の機能全般を欠いた変異蛋白質(R256E)などのEBV BAC DNA細胞を作成した。これら変異EBV BAC DNA細胞において、複製蛋白質の局在やウイルス産生などの解析を進める予定である。これらの解析は、感染レベルでのBMRF1蛋白質の機能解析を可能にする。これらの結果によって、BMRF1蛋白質の立体構造と機能との関係がさらに明らかとなり、EBVゲノム複製及び転写のメカニズムの解明へと繋がることを期待される。

1) リサーチレジデント

<研究課題>

(主題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副題) BZLF1のSUMO化によるEBウイルス再活性化の制御

<研究者氏名>

村田貴之, 鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

EBウイルスは多くの健康成人のBリンパ球などに潜伏感染しており、刺激により再活性化し、溶解感染に至る。再活性化の機序を明らかにすることはウイルス拡散の防止にもつながり、意義深い。EBウイルスの再活性化には前初期遺伝子のひとつであるBZLF1が必要かつ十分であることが知られている。BZLF1はウイルスのコードするb-zip型転写因子であり、ウイルスの初期遺伝子の転写を活性化することでウイルスの再活性化を強力

に促進する。

今回我々は、BZLF1がSmall Ubiquitin-related Modifier (SUMO) による修飾を受けること、またそれによって自身の転写活性が抑制されることを明らかにした。

まず我々はレポーターアッセイにより、K12R変異を導入したSUMO化されないBZLF1は、野生型のBZLF1よりも有為に強い転写活性をもつことを見いだした。

また、BZLF1のSUMOは、SENPとよばれる脱SUMO化酵素によって脱修飾された。SENPを強制発現させると、BZLF1の転写活性が増強した。

SUMO化されていないBZLF1はCBPと強く相互作用し、HDACとの結合はほとんどみられなかったのに対し、SUMO化されたBZLF1はCBPと相互作用しなくなり、HDAC7と相互作用するようになった。

以上からBZLF1はSUMO化されることによりその転写活性が抑制されるということが明らかになった。BZLF1は基本的には転写活性因子であり、HAT活性をもつCBPをリクルートすることで転写を活性化することがこれまで知られていたが、SUMO化によりHDAC7と相互作用するように切り替わることでヒストン脱アセチル化を引き起こし、転写抑制にもはたらくことで、ウイルス複製を微調整するものと考えられた。

<今後の方向>

今回の研究では、EBウイルス再活性化におけるBZLF1のSUMO化の役割について明らかにした。今後はより網羅的な研究を遂行することで、EBウイルス再活性化メカニズムの包括的解明を目指したい。

<研究課題>

(主題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副題) EBウイルスBZLF1遺伝子産物の精製

<研究者氏名>

中洲 章, 鶴見 達也

<目的・概要・進捗状況>

EBウイルスのBZLF1遺伝子産物(pBZLF1)は、EBウイルスの潜伏感染状態からウイルス産生サイクルへの移行を誘発し、転写制御因子であると共に、ウイルス産生サイクルで機能する複製開始点に結合する事からDNA複製への関与が示唆されている。ここではpBZLF1の生化学的な機能を調べるために精製を試みている。

昆虫細胞を用いた大量産生系で発現させたpBZLF1は不可逆的に凝集体を作りやすく、カラムクロマトグラフィーで単一のピークを形成しない事からタンパクが正しい高次構造を取っていない事が示唆された。そこでEBウイルスが潜伏感染しているマーマセト由来のB95-8細胞からの精製を試みた。高塩濃度の条件下で界面活性剤によりpBZLF1を抽出し、ハイドロフォビックカラムクロマトグラフィーで分画する事により低塩濃度(0.1M NaCl)でも可溶化しているpBZLF1標品を得る条件を設定した。しかし低塩濃度でシヨ糖密度勾配遠心を行うと大部

分のpBZLF 1は高分子量の分画に広く分布した。この事はpBZLF 1は他のタンパクと複合体を形成している事を示し、このタンパクを精製するためには高塩濃度の条件下で分画を行える段階が必要となる。一般的に高塩濃度(1.5M NaCl)の条件下で分画する方法としてはシヨ糖密度勾配遠心、ゲルろ過があげられるが、これに加えてpBZLF 1は1mMのリン酸の存在下ではヒドロキシアパタイトに吸着しないが、リン酸の非存在下では3Mの塩の存在下でもこのカラムに吸着することをみだした。イオン交換樹脂で部分精製した標品を段階的にリン酸濃度を下げてヒドロキシアパタイトを通過させて後にシヨ糖密度勾配遠心を行う。pBZLF 1を含む分画をリン酸の非存在下でヒドロキシアパタイトに吸着させ、1mMのリン酸を含むバッファーで容出したのち0.3MのNaClの条件でヘパリンセファロースで分画することによりpBZLF 1が主成分になった標品が得られる。

<今後の方向>

現在までのところ非常に回収率が低く(<1%)ばらつきがあるので安定して回収できるように改善する。4℃で保存していると1週間ぐらいで半減するので安定して保存できる条件を検討する。また現在3リットルの細胞培養液から精製を始めているがpBZLF 1の量はかなり少ない事が示唆されてきたのでスケールアップしてさらなる精製を試みる。

<研究課題>

- (主 題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副 題) EBNA1蛋白質と相互作用する細胞性因子の同定

<研究者氏名>

神田 輝、小布施 力史¹⁾、鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

細胞に潜伏感染しているEBウイルスエピゾーム(2本鎖環状DNA)は、ウイルス蛋白質EBNA1を介して宿主細胞染色体に付着して複製・分配される。そこでEBNA1蛋白質の宿主染色体付着の分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的として、EBNA1蛋白質と相互作用する細胞性因子の同定を試みた。EBV-BAC(bacterial artificial chromosome)システムを応用して、EBNA1蛋白質にエピトープタグ(HAないしFLAG)を付加し、エピトープタグ付加EBNA1蛋白質発現組換えEBウイルスを産生した。この組換えEBウイルスを健常人ドナー由来Bリンパ球に感染させて、エピトープタグ付加EBNA1蛋白質発現Bリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)を樹立した。野生型EBウイルス感染で樹立したコントロールLCLおよびHAエピトープタグ付加EBNA1蛋白質発現LCLより細胞抽出液を製作し、抗HA抗体を用いた免疫沈降実験を行い、それぞれ免疫沈降物を得た。

<今後の方向>

上記免疫沈降物を質量分析により解析し、EBウイルス潜伏感染細胞内においてEBNA1蛋白質と相互作用する細胞性因子を同定する。同定した細胞性因子について、相互作用の確認、機能

阻害実験等を行い、EBNA1蛋白質の染色体付着の分子メカニズムを明らかにする。

1) 北海道大学・先端生命科学研究院

<研究課題>

- (主 題) 抗癌ウイルス療法の開発
(副 題) がん抗原発現リンパ芽球様細胞株を用いたがん抗原特異的細胞傷害性T細胞誘導の試み

<研究者氏名>

神田 輝、葛島清隆、鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

EBウイルスを末梢血Bリンパ球に試験管内感染させることで樹立できるLCLは、抗原提示細胞として有用であることが知られている。EBV-BACシステムを用いて産生したがん抗原遺伝子組み込み組換えEBウイルスを健常人ドナー由来の末梢血Bリンパ球に感染させることで、がん抗原(Muc1、ウィルムス腫瘍原因遺伝子WT1)を発現するLCLを樹立可能である。しかしながら従来のシステムでは、純粋な組換えウイルスを用いていなかったため、LCL培養中のがん抗原の発現安定性に課題が残されていた。

そこで今回、EBV-BACシステムを改良して、純粋な組換えEBウイルスを産生する系を構築した。この系を用いて産生した純粋なWT1遺伝子組み込みEBウイルスを健常人ドナーリンパ球に感染させたところ、WT1発現LCLが樹立でき、しかも樹立したLCLにおけるがん抗原の発現安定性が大きく向上した。

<今後の方向>

がん抗原特異的細胞傷害性T細胞の体外増幅を行う上で、樹状細胞を用いたがん抗原特異的な抗原刺激による初期プライミングに引き続いて、WT1発現LCLを抗原提示細胞とした反復刺激を加えるストラテジーの有用性を検証する。

<研究課題>

- (主 題) ヒトがんウイルスの増殖と宿主細胞応答の解析
(副 題) ヒトサイトメガロウイルスUL76ORF内に存在する internal entry ribosome site

<研究者氏名>

磯村寛樹、鶴見達也

<目的・概要・進捗状況>

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)はヒトの体内で初感染後、潜伏、持続感染、造血幹細胞移植等でヒトの免疫力が低下すると再活性化して、肺炎、骨髄抑制等の病態に関与することが知られている。また、最近ではグイオブラストーマの患者の腫瘍組織および患者末梢血から検出され、(Cobbs et.al,

Cancer Res., 2002, Mitchell et.al., Neuro. Oncol., 2007) HCMVのウイルス蛋白がその腫瘍化に関与している (Cobbs, et.al., Cancer Res., 2008, Straat et. al., J. Natl. Cancer Inst., 2009) との報告がなされている。そこで、今回はHCMVの翻訳制御機構を解析し、HCMV特異的な翻訳制御機構を見いだした。

HCMV UL77遺伝子はウイルスDNAのパッケージングに関与するHCMVの増殖に必須の遺伝子である。UL77ORFは異なったフレームで、UL76ORFの途中からその最初のメチオニンが始まる。そして、UL76からUL77遺伝子には1つのbicistronicな転写産物が存在し、UL77に特異的なmonocistronicな転写産物は存在しない。さらに、UL76蛋白はウイルス粒子を構成する蛋白で、実際にHCMV感染細胞で発現している。そこで、UL77ORFがどのように翻訳制御されているのかを明らかにしようと考えた。(1) bicistronicなレポーターコンストラクトを作成して、UL76配列の2nd cistronの発現に及ぼす影響を検討した。(2) UL76ORFの開始直後にストップコドン挿入し、さらにUL77ORFのN端にflag epitopeを融合した組換えHCMVをBAC DNAを用いた大腸菌内での相同2回組み換え法で作成した。(3) UL76ORFのN端にflag epitope、UL77ORFのC端にHA epitopeを融合したUL76-77配列をpcDNAにクローニングしたplasmidを作成した。そして、plasmidおよび組換えHCMVを用いて、UL76のUL77ORF翻訳に及ぼす影響を検討した。その結果、(1) UL77遺伝子上流のUL76配列を挿入したbicistronicなレポーターplasmidからin vitroで作成したmRNAを細胞に導入すると、UL76配列を含まない、あるいはcomplementaryなUL76配列を挿入したplasmidから作成したmRNAを導入した場合と比較して、2nd cistronの発現が著明に増加したことより、UL76配列の中にinternal entry ribosome site(IRES)があると考えられた。(2) そのIRES活性はポリオウイルスのIRES(野本明男、大岡静衣先生より供与)と比較して、40%程度であった。(3) UL77遺伝子上流のUL76配列のN及びC端の両方でIRES活性が認められた。(4) UL76 ORFの開始直後にストップコドン挿入、あるいはフレームをずらした組換えHCMVあるいはplasmidでは、野生型と比較してUL77融合蛋白の発現が増加したことより、UL76 ORFの翻訳はUL77の蛋白発現を負に制御していると考えられた。

<今後の方向>

(1) bicistronicなレポーターplasmidを用いた結果から、UL77ORFはUL76配列内のIRESを利用して翻訳されていると考えられる。しかし、どのようにしてUL76の翻訳がUL77の蛋白発現を負に制御しているのかは不明である。現在、UL76 ORFの翻訳が自身のIRES活性に影響を与えるかどうか検討している。

(2) さらに、上記HCMVの遺伝子制御機構に加えて、HCMVのグリオーマ発症への役割についても解明していく

分子病態学部

<研究課題> 1-1

(主題) 癌の浸潤・転移および腫瘍血管新生における細胞間識別・接着機構とその動態の研究

(副題) Bリンパ球系悪性細胞におけるCD22高親和性リガンド α 2,6シアリン6-スルホLacNAcの発現と血管外浸潤との関連性に関する研究

<研究者氏名>

宮崎敬子¹⁾、井澤峯子、大森勝之²⁾、神奈木玲児

<目的・概要・進捗状況>

B細胞系悪性腫瘍のCD22はEpratuzumabやInotuzumabなどの抗体治療のターゲット分子とされている。しかしB細胞系悪性疾患の進展におけるCD22の役割にはなお不明な点が多い。我々は α 2,6シアリン6-スルホ糖鎖がCD22の特異的リガンドであることを見いだした。 α 2,6シアリン6-スルホ糖鎖は血管内皮細胞に発現しており、とくにリンパ節HEVに強く発現する。従ってCD22はB細胞系悪性細胞の血管内皮への接着に関与すると考えられる。CD22陽性の培養B細胞株で細胞接着実験を行ったところ、B細胞自身に内因性の α 2,6シアリン6-スルホ糖鎖が存在するとCD22はこれら内因性のリガンドによってマスクされて細胞接着活性を示さないことが判明した。シアリダーゼやNaClO₃で内因性のリガンドを不活化したときのみ、CD22の細胞接着活性が検出された。CD22は健康人B細胞にも発現するが、正常B細胞の大部分をなすナイーブB細胞は α 2,6シアリン6-スルホ糖鎖をも発現しており、通常はCD22はこれら内因性のリガンドによってマスクされて細胞接着活性をあらわさないと考えられる。B細胞系悪性細胞でCD22を介した血管内皮への接着が起こるのは、(i)CD22を高発現し、加えて(ii)内因性 α 2,6シアリン6-スルホ糖鎖の発現が低下するという二つの条件を満たす場合に限られると考えられた。B細胞系悪性疾患で検索したところ、多くのALL患者の白血病細胞や悪性リンパ腫細胞はCD22が陽性で、かつ α 2→6シアリン6-スルホ糖鎖が陰性という上記の二条件を満たすことが判明した。このことは、これらの疾患の悪性細胞は、CD22を介して血管内皮細胞に接着できることを意味する。一方、細胞系悪性疾患のうちCLL患者では上記の二条件を満たさないことが多かった。

<今後の方向>

CD22が陽性で、かつ α 2→6シアリン6-スルホ糖鎖が陰性の細胞は、CD22を介して血管内皮細胞に接着できると考えられるが、この結果から、そのような細胞はALLと悪性リンパ腫で出現頻度が高い事がわかった。今後、こうした接着分子の発現が、これらの疾患の病態進展にどのように関与しているか今後調査すべきである。

1) 研修生、2) 京大医

<研究課題> 1-2

(主題) 癌の浸潤・転移および腫瘍血管新生における細胞間識別・接着機構とその動態の研究

(副題) 癌におけるCD44/ヒアルロン酸を介した細胞接着とセ

レクチンを介した細胞接着の相乗効果とその患者検体
における検出

<研究者氏名>

林 啓智¹⁾、宮崎敬子²⁾、木村尚子²⁾、井澤峯子、
神奈木玲児

<目的・概要・進捗状況>

我々はこれまで、セレクチンを介した細胞接着が癌の浸潤・
転移において重要な役割を演じていることを明らかにしてきた。
セレクチンを介した細胞接着では癌細胞側の糖鎖リガンド
がなんらかのムチン様蛋白に結合していると考えられている。
一方、CD44はヒアルロン酸と結合して細胞接着を起す細胞接
着分子であり、ヒアルロン酸糖鎖に特異的に結合して細胞接着
を起す。この接着も癌の浸潤・転移において重要な役割を演
じていると指摘されてきた。CD44にはバリエーションがあり、
以前からバリエーションのCD44の発現が転移性など癌
の悪性度と臨床的に相関することが知られている。しかし、バ
リエーションのヒアルロン酸への結合性は、スタンダード
フォームと大きな違いがないため、どうしてバリエーション
が悪性度と臨床的に相関するのか理由が不明であった。

このCD44のバリエーションドメインは実はムチン型糖鎖の結合部
位を多く含んでいる。我々が検索したところ、この部位にはセ
レクチンのリガンドであるシアリルルイスXやシアリルルイス
a糖鎖が結合していることが判明した。このことから、これら
の糖鎖がバリエーション領域に結合したCD44は、ヒアルロン酸に結
合するだけではなく、セレクチンに結合する、一分子で二重
の接着活性を持つと考えられる。バリエーションを持つ
CD44の発現が癌の悪性度と相関するという臨床統計は、こうい
う特殊なCD44分子の二重の細胞接着活性による可能性がある
と考えられた。

このセレクチンリガンドを兼ねたCD44バリエーションは
細胞の運動に伴って切断されるため、癌患者血中に出現する。
我々はこのセレクチンリガンドを兼ねたCD44バリエーション
の切断断片の血清検体での測定法を樹立した。測定原理は、
CD44バリエーションに対する特異抗体を固相に用い、セレ
クチンの糖鎖リガンドであるシアリルルイスXやシアリルルイ
スa糖鎖に対する特異抗体を標識抗体に用いたダブルターミ
ナント・サンドイッチアッセイである。測定結果は期待通り、
癌患者血清で高値となった。

<今後の方向>

これらの成績から、ヒアルロン酸に結合するだけではなく
、セレクチンに結合する、一分子で二重の接着活性を持つよ
うなCD44バリエーション分子が実際に癌患者に存在し、血清中にも
出現することが判明した。今後、セレクチンに結合しない糖鎖
をもつ対照のCD44バリエーション分子も並行測定し、両者の測定値
の比較から、この特殊なCD44分子のもつ臨床的意義を解明する
必要がある。

1) リサーチレジデント、2) 研修生

<研究課題> 1-3

(主題) 癌の浸潤・転移および腫瘍血管新生における細胞間識
別・接着機構とその動態の研究

(副題) 硫酸トランスポーター遺伝子のエピジェネティック・
サイレンシングによる大腸癌のシアリルルイスX糖鎖
の発現誘導

<研究者氏名>

遊佐亜希子¹⁾、宮崎敬子²⁾、後藤嘉子、井澤峯子、
木村尚子²⁾、神奈木玲児

<目的・概要・進捗状況>

腫瘍マーカーとして臨床応用されているシアリルルイスX糖
鎖は、癌が増加しており、正常上皮細胞には微量にしか存在し
ない。一方、正常上皮ではシアリルルイスX糖鎖がさらに硫酸
化された構造をもつシアリル6スルホルイスX糖鎖が多量に発
現している。このがん特有の糖鎖変化を生じる分子制御機構の
解明に向けて研究を行った。

臨床検体20症例を用いてシアリル6スルホルイスX糖鎖の合
成に関与すると考えられる硫酸基転移酵素の発現を定量
RT-PCR法を用いて調べた。その結果、腸上皮特異的に発現し
ている6硫酸基転移酵素が、癌部において顕著な発現低下を起
こしていた。しかし、この硫酸基転移酵素はシアリル6スルホ
ルイスX糖鎖を合成しなかった。そこで硫酸基転移酵素だけで
なくPAPS合成酵素やトランスポーターなど、硫酸基供与体に関
する遺伝子まで対象を広げて発現解析を行ったところ、前出の
6硫酸基転移酵素以外に硫酸トランスポーターであるDTDST
遺伝子の発現が顕著に抑制されていることが判明した。そこで
大腸癌細胞株を用いて、DTDST遺伝子の発現とその抑制機構
について分析を進めた。その結果、(1)ほとんどの大腸癌細
胞株において、DTDSTの転写が低下あるいは消失しており、
(2)強い発現抑制が見られたHT29、SW480、SW1083につい
て、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるブチレートとDNAメチ
ル化阻害剤である5-アザ-2-デオキシシチジンで処理したとこ
ろ、ブチレート処理を行った細胞でDTDST遺伝子の発現が誘
導された。(3)またTet-off発現系にDTDST遺伝子を組み込
んで行った実験では、DTDSTの発現に伴いシアリルルイスX糖
鎖は減少し、シアリル6-スルホルイスX糖鎖が発現した。
DTDSTの発現に伴い、癌細胞の増殖にも有意の抑制が観察さ
れた。

<今後の方向>

本研究により、大腸がんにおける糖鎖不全現象の原因遺伝子
が特定された。またDTDST遺伝子の発現は、がん細胞におい
て増殖抑制作用を持つことが明らかとなった。癌細胞での増殖
抑制にDTDST遺伝子がどのように関与しているのかは、今後
明らかにすべき課題である。

1) リサーチレジデント、2) 研修生

<研究課題> 2

(主 題) 悪性細胞における異常糖鎖の発現調節機構の研究

(副 題) 6-硫酸基転移酵素遺伝子の転写調節機構

<研究者氏名>

佐久間圭一朗, 陳国云¹⁾, 木村尚子²⁾, 神奈木玲児

糖鎖非還元末端に存在するGalβ1→4GlcNAcβ構造のGlcNAcの6位に硫酸基が付加された6-硫酸化糖鎖は、セレクチンやシグレックを介した細胞間相互作用やCD44分子の結合活性の調節に関与する重要な糖鎖である。我々はこれまでに、6-硫酸化糖鎖が正常リンパ球のホーミングや活性化において重要な機能を持つことを明らかにしてきた。本研究課題では、6-硫酸化糖鎖が血液悪性腫瘍や免疫・アレルギー疾患において果たす役割を解明し、新規の治療ターゲットを開発することを目的とする。

GlcNAcの6位硫酸化を触媒する6-硫酸基転移酵素は、ヒトではこれまでに5つ報告されている。血液細胞において主に機能しているのは、GlcNAc6ST-1とHEC-GlcNAc6STである。我々は現在、これらの酵素遺伝子の転写調節機構を通して6-硫酸化糖鎖の機能にアプローチしようと考え、研究を行っている。

血液悪性腫瘍においては、急性骨髄性白血病(AML)細胞を骨髄同様の低酸素下で培養すると、アシアロ6-硫酸化糖鎖の発現増加を認めた。AML幹細胞はCD44を介して骨髄ニッチに結合するといわれている。CD44タンパクを修飾する糖鎖の脱シアル化や6-硫酸化によってCD44分子が活性化されることが知られており、低酸素下におけるAML細胞のアシアロ6-硫酸化糖鎖の増加は、AML幹細胞とニッチの相互作用を促進する可能性がある。この6-硫酸化糖鎖発現増加に関与する糖鎖遺伝子の同定およびHypoxia inducible factor-1(HIF-1)などの転写因子の関与について、現在検証を行っている。

ヘルパーT細胞においては、GlcNAc6ST-1はNF-κBとGATA-3によって、HEC-GlcNAc6STはT-betとGATA-3によって転写が促進されることを明らかにした。GATA-3はTh2細胞の分化決定因子である。実際に、Th2細胞が病態に大きく関与する気管支喘息やアトピー性皮膚炎では6-硫酸化糖鎖の異常高発現が見られることを見出した。これらの疾患において、GATA-3を介した6-硫酸基転移酵素の正常発現調節機構のどこかに異常が生じることで病態が形成される可能性が示唆され、現在検証中である。

<今後の方向>

現在の研究を継続発展し、血液悪性腫瘍や免疫・アレルギー疾患における6-硫酸基転移酵素遺伝子の発現調節機構を解明し、6-硫酸化糖鎖の悪性腫瘍や免疫・アレルギー疾患における役割を明らかにすると共に、新規の治療ターゲットを探索する。

¹⁾ 科学技術振興機構(JST)、²⁾ 研修生

<研究課題> 3

(主 題) 細胞接着分子セレクチン・CD44およびその特異的

リガンドの研究

(副 題) CD44バリエーションフォーム上の糖鎖がセレクチンを介した細胞接着に及ぼす影響の解析

<研究者氏名>

金森審子、卓麗聖¹⁾、木全弘治¹⁾、神奈木玲児

<目的・概要・進捗状況>

CD44はヒアルロン酸に結合し、広範囲な細胞上で細胞接着に寄与している。細胞のがん化に伴い、通常発現されている分子種(CD44Hと示す)以外にスプライシングによって生じるバリエーションフォーム(V1~V10)に由来するペプチドを含む種々のCD44バリエーションフォームの発現がみられる。バリエーションフォーム上の糖鎖とセレクチンの結合を介した細胞接着が、がん細胞の転移に寄与すると言われている。本研究では、大腸がんにおいて予後を悪化させる報告の多いCD44バリエーションフォームV8-V10の発現がE-セレクチンを介した細胞接着に及ぼす影響の解析を試みた。

HEK-293T細胞あるいはヒトfucosyltransferase-7を安定発現させたHEK-293T細胞(hFT7-293T細胞)を親株とし、ヒトCD44HまたはV8-9,V10,V8-10を含むバリエーションフォーム(以下、hCD44V8-9,hCD44V10,hCD44Eと示す)の安定発現細胞を調製した。ヒトE-selectinを安定発現させたCHO-K1細胞と上記の2種類の親株および8種類のhCD44安定発現細胞との細胞接着の強さを単層細胞接着法とフローシステムを用いた細胞接着法により解析した。その結果、E-セレクチンを介した細胞接着はhFT7の安定発現細胞によってシアルルLewis x糖鎖を発現している細胞群にのみ認められ、CD44Hよりもバリエーションフォーム発現細胞に強い接着がみられたばかりでなく、バリエーションフォームの分子種によって細胞接着の強さ(細胞のローリング、接着の頻度と至適流圧)やローリングの速度に明確な差異が見いだされた。他方、固定したヒアルロン酸に対する各細胞の結合能を調べたところ、hCD44Hを発現した細胞に強い結合がみられた。

<今後の方向>

がん細胞の血行性転移につながる高速で流れる細胞の接着には、CD44とヒアルロン酸の結合よりはむしろ、CD44バリエーションフォーム上の糖鎖とセレクチンの結合が大きく寄与することが示唆された。

¹⁾ 愛知医大・分医研

<研究課題> 4-1

(主 題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究

(副 題) アポトーシス誘導能をもつセラミド分子種の発現機構の解明

<研究者氏名>

京ヶ島守、田中広治¹⁾、萩原和美¹⁾、小泉恵子²⁾、

<目的・概要・進捗状況>

スフィンゴ脂質セラミド (Cer) は、スフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質の構成成分として存在する。近年のソフトイオン化法による質量分析技術の発達により、Cer分子の種類は、それを構成する長鎖塩基や脂肪酸のアルキル鎖長、二重結合の有無、水酸化の程度の等の違いにより、従来考えられてきた以上に多様である事が判明してきている。Cerは遊離の形で存在し、細胞に分化やアポトーシスを誘導するが、分子種の違いによってその誘導活性が異なる事が予想される。もし癌細胞に強力にアポトーシスを誘導するCer分子を同定しその発現メカニズムを解明できれば、癌治療を考える上で大変有用と考えられる。ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞は、通常の血清存在下における培養条件では盛んに増殖するが、血清非存在下 (F-A-) で培養すると増殖は停止し、さらに全トランスレチノイン酸ATRAが添加される (F-A+) と細胞にアポトーシスが誘導される。この時のセラミドの変化を質量分析計で解析した。

(F-A-) 時と比較して (F-A+) では、構成セラミド分子種のうち、d18:1-C16:0及びd18:1-C24:1の二つの分子種が特異的に増加する為、これらがアポトーシス誘導Cer候補として考えられた。そこで、(F-A-) の条件下で、培地に外因性にd18:1-C16:0, d18:1-C18:0, d18:1-C24:0, d18:1-C24:1の異なるCerを各々添加した。0.5 μMでd18:1-C24:1が他のCerと比較して有意にアポトーシスを誘導したので、ATRA添加時に増加したCerのうち、d18:1-C24:1が最も強力にアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。次にこのCer増加のメカニズムを解析した。Cerの合成が更新している可能性を考え、関連遺伝子群の発現を見たが変化は認められなかった。またスフィンゴミエリン (SM) や、糖脂質 (HexCer) からの分解の関与も検討したが、これらにも変化が認められなかった。しかしCer分解酵素のうち中性セラミダーゼの発現の低下が認められ、その酵素活性も低下していたので、本例におけるCerの増加は中性セラミダーゼの発現の低下であることが示唆された。

<今後の方向>

通常、アポトーシスを誘導するCerはSM分解により生じるとされるが (スフィンゴミエリンサイクル)、本研究によりアポトーシス誘導Cerの新たな発現メカニズムが示された。遊離Cerが生じるメカニズムの違いにより、活性の異なるCer分子種が誘導される可能性がある。最もアポトーシス活性の高いCerを癌細胞に強力に誘導する研究は、スフィンゴ脂質を応用した癌治療に重要と考えられる。

1) 研修生、2) 名大医

<研究課題> 4-2

(主題) グリコサミノグリカンおよびスフィンゴ脂質と癌の進展に関する分子生物学的研究

(副題) 癌細胞における異常ヘパラン硫酸の発現とその生物学的、臨床的意義

<研究者氏名>

藤井正宏^{1,2)}、遊佐亜希子³⁾、宮浦修一⁴⁾、谷田部恭⁵⁾、岩田広治⁶⁾、小田高司^{2,7)}、京ヶ島守、神奈木玲児

<目的・概要・進捗状況>

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖 (HSGAG) は、その特異的な陰性荷電に富んだ硫酸糖鎖ドメインを介し線維芽細胞増殖因子 (FGF) や血管内皮増殖因子 (VEGF) 等に結合し、増殖因子シグナルをより効率よく増幅し細胞に伝達する。癌化により細胞表層のHSGAGに異常が生ずれば増殖因子結合能にも変化が生じ、癌の悪性度に影響を与えるであろう事が考えられる。我々はこうした増殖因子結合ドメインに関連した糖鎖配列を特異的に認識するものも含んだ5種類の抗HSGAG抗体を用い、乳癌組織標本の免疫組織染色を行い、癌の生物学的悪性度とHSGAGエピトープの発現につき解析した。用いた抗体の内、JM403が認識するGlcNH₃⁺は乳癌症例の約60%で細胞質に発現が認められ、その発現の程度は核異型度、核分裂指数、核グレード並びに腋窩リンパ節転移等の生物学的悪性度を示す指標と各々強い正の相関を示した。一方予想に反し、抗体10E4が認識するVEGF結合ドメイン関連糖鎖GlcNS(6S)/GlcNAcの発現や、抗体AS22あるいはACH55が認識するFGF2結合ドメイン関連糖鎖IdoA(+/-2S)-GlcNAcの発現においては、これまでのところこうした相関関係は認められていない。GlcNH₃⁺はHSGAGに存在する三種類のグルコサミンのうち、わずかに0.7-4%に過ぎず、長い間その存在についても疑問視されていた。抗体JM403はHSGAGのGlcNH₃⁺を認識するとされているが、この構造にはアミノ基に由来する陽性荷電が含まれているため、天然に存在するポリアミンや塩基性ペプチド等との交差反応も懸念された。そこで、JM403の認識エピトープにつき更に解析した。その結果、この抗体はGlcA-GlcNH₃⁺には強い反応を示すが、IdoA-GlcNH₃⁺には全く反応しない事が判明し、この抗体が間違いなくHSGAG上に存在する極めて特異な糖鎖配列、GlcA-GlcNH₃⁺を認識する事が明らかとなった。この配列の合成経路、機能については未だ不明であるが、今回の結果からこの細胞質内発現が細胞増殖に関与する可能性が示唆された。

<今後の方向>

従来、HSGAG糖鎖ドメインは陰性荷電に富んだ硫酸基による修飾が重要と考えられてきた。またHSGAGは主として細胞表層ないし、細胞外マトリックスで重要な働きをなすと考えられてもきていた。ところが今回、癌の悪性度に密接に相関すると判明したHSGAGは陽性荷電を帯びたGlcA-GlcNH₃⁺で、その発現部位は細胞質であった。今後はこの糖鎖の機能解析を進めるとともに、さらに症例を検討しこのもの持つバイオマーカーとしての役割を明確にしていく必要がある。

1) 研修生、2) 愛知病院乳腺科、3) リサーチレジデント、4) 生化学バイオビジネス、5) 中央病院臨床検査、6) 中央病院乳腺科、7) 名大医

<研究課題> 5

(主題) 発癌過程に及ぼす組織間相互作用

(副題) 骨髄細胞の再生能の研究

<研究者氏名>

田口 修、西岡明子

<目的・概要・進捗状況>

致死量の x 線を照射したマウスにGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞を静注し (BMTマウス)、GFPをマーカーとして骨髄細胞の動きを追ってみた。BMTマウスを経時的に屠殺して個々の臓器におけるGFP陽性細胞の存在を検討した。その結果全ての臓器においてGFP陽性の細胞が確認できた。かなりの臓器において上皮はホストの細胞で占められ、間質がドナーの細胞により置換していた。BMTマウスにおける臓器の再生は、x線照射によるダメージを回復するために骨髄細胞が緊急にやってくる可能性がある。x線照射無しでも臓器の再生がなされることがあるかどうかを調べるために、x線照射をしていない野生型マウスにGFPマウスの骨髄細胞の注射を試みた。3ヶ月後の検索ではGFP陽性の細胞はどこにも存在しなかった。この結果は移植した骨髄細胞は骨髄や脾臓等のリンパ組織にも定住できないことを示している。それは野生型のマウスのリンパ組織ではx線照射マウスの組織のように血液細胞が入りこめる空き部屋がないからかもしれない。

そこでT細胞とB細胞を欠損し、リンパ球の空き部屋が沢山あるscidマウスに、GFPマウスの骨髄細胞の注射を試みた (BMTscidマウス)。その結果は骨髄や末梢リンパ臓器にもGFP陽性の細胞が定住し、BMTマウスと同様に多くの臓器でGFP陽性の細胞による組織再生が確認できた。このことは骨髄細胞は定住できる場所から個々の臓器に移動し、常時臓器の再生を繰り返していることを示唆している。

さらに野生型マウスとGFPマウスを並体結合し、GFP細胞の動態を検討した。3ヶ月後の検討でお互いのリンパ臓器は40%近くが相手方のリンパ球で占められていた。さらに骨髄細胞も20%近くが相手方の細胞となっていた。そして野生型マウスの臓器の一部がGFP陽性の細胞で形成されていた。野生型マウスの骨髄内に侵入してきたGFP陽性細胞を選択的に回収し、致死量の x 線を照射したマウスに静注してみたところ、そのマウスは免疫能を回復するとともに個々の臓器内にGFP陽性組織の再生が観察できた。骨髄細胞の一部は一度末梢に出て再び骨髄に帰ってくることが明らかとなった。

<今後の方向>

個々の臓器構成細胞となる骨髄細胞や、末梢に出て再び骨髄に帰ってくる骨髄細胞の性状を明らかとしたい。

発がん制御研究部

<研究課題> 1-1

(主題) 中間径フィラメント関連蛋白質を介した発がんの基礎

研究

(副題) がん細胞骨格異常の分子機序

<研究者氏名>

井澤一郎、林裕子、稲垣昌樹

<目的・概要・進捗状況>

私共は、細胞の形態や運動性に関与する細胞骨格や細胞極性を制御する機構とがんの浸潤・転移の関係を研究している。最近、leucine-rich repeatsドメイン及びPDZドメインをもつScribble、LET-413、Densin-180、ERBINなどの分子が同定され、これらの分子群 [LAP (leucine-rich repeats and PDZ) 蛋白質ファミリー] が細胞極性形成に関与していることが報告された。ショウジョウバエのScribbleは、Lgl及びDlgと同一のシグナル経路上で上皮細胞の極性形成に重要な役割を果たしており、がん抑制機能をもつとされる。私共は、Densin-180のPDZドメインと結合しうる蛋白質としてアルマジロ蛋白質のp120カテニン・サブファミリーに属するデルタ・カテニンを世界に先駆けて同定した。そして、Densin-180は、デルタ・カテニン及びN-カドヘリンと複合体を形成しており、海馬神経細胞初代培養の神経シナプスでデルタ・カテニン及びN-カドヘリンと共局在することを見出した。さらに、ERBINのPDZドメインと結合する蛋白質として、デルタ・カテニンに高い相同性をもつアルマジロ蛋白質であるp0071蛋白質を同定した。MDCK細胞においてERBINはp0071と共に細胞間接着部位に存在し、低分子量G蛋白質Rhoファミリーのドミナントアクティブ型を発現させると、ERBINが細胞間接着部位に濃縮することを世界に先駆けて報告した。これらの結果は、LAP蛋白質が細胞間接着を介して、細胞極性の制御に関与していることを示唆する。また、私共は、ERBINのシステイン14及び16がパルミトイル化されていることを見出した。細胞にパルミトイル化を阻害する薬剤を投与すると、内在性のERBINの形質膜局在が影響を受けることが認められ、ERBINの形質膜局在化には、システイン14及び16のパルミトイル化が必要であることが判明した。最近さらに、ERBINノックダウン細胞では、Aktのリン酸化が減少していることを認め、ERBINとPI3K-Aktシグナルとの関連の検討している。

<今後の方向>

細胞極性を制御する分子とがん化・浸潤転移との関連をさらに詳細に検討していく予定である。これらの分子と相互作用する新規蛋白質の同定を推し進め、がん細胞の浸潤・転移に関係する新しい分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

<研究課題> 1-2

(主題) 中間径フィラメント関連蛋白質を介した発がんの基礎研究

(副題) 新規ケラチン結合蛋白質であるトリコプレインとアルバトロスの機能解析

<研究者氏名>

猪子誠人、白水崇¹⁾、衣斐美歩¹⁾、林裕子、米村重信²⁾、清野透³⁾、稲垣昌樹

<目的・概要・進捗状況>

中間径フィラメントはアクチン、微小管とならぶ細胞骨格である。中間径フィラメントは、細胞に機械的強度を与えており、その一種であるケラチンは上皮に特異的に発現する。上皮とは体表面、管腔、体腔を覆う細胞層で、がんの発生源でもある。上皮の特性として、細胞間接着、上下極性をふくむ細胞極性が発達、つまり高度に分化している。この分化状態の欠失はがん細胞の特徴でもある。ケラチンは上皮細胞に特異的かつ豊富に発現しているにも関わらず、このような上皮分化との詳細な関係は長らく注目されていなかった。近年になって、ケラチンの新たな機能がわれわれを含むいくつかのグループから報告されるようになってきた。すなわち、ケラチンはアポトーシスを減弱させたり蛋白質の生合成を促したりするのである。われわれの目的は、ケラチンを介した新たな発がんのメカニズムを明らかにすることである。

そのため、われわれはケラチン結合蛋白質の検索とその解析を進めてきた。その結果、新規ケラチン結合蛋白質トリコプレインおよびアルバトロスを同定し、これらをTPHD分子群として解析を進めている。これまでの解析で、TPHD分子群は10数種ほどの蛋白質群からなり、既知のケラチン結合蛋白質であるトリコヒアリン、プレクチンと類似のドメイン (TPHD) を共通して持ち、同部位でケラチンと結合する。また上皮細胞の分化相と増殖相に応じて、細胞間接着部位あるいは中心体に局在変化し、異なった細胞機能を果たすユニークな分子群であることが明らかになりつつある。

トリコプレインについて、その細胞内局在は、組織ではケラチンフィラメント上および細胞間接着部位に見られるが、増殖中の培養上皮細胞では中心体、厳密には母中心小体の遠位端にあった。イーストハイブリッド法および生化学的結合実験では、トリコプレインは中心小体の同部位に局在する分子Odf2およびナイニンと結合した。そしてsiRNAを用いた機能欠失実験 (ノックダウン) の結果により、トリコプレインが母中心小体の2つの重要な機能を制御することを明らかにした。その一つは、ナイニンを介した微小管の母中心小体appendage への係留であった。もう一つは、増殖中の上皮細胞での一次線毛 (分化状態で母中心小体より伸びる構造物) の形成抑制であった。この分子機序の一端は、トリコプレインがオーロラAキナーゼ (主に細胞分裂時の紡錘体極形成との関わりが知られていた) の新規活性化因子であるという我々の発見にある。

アルバトロスについては、その局在が、増殖中の上皮細胞ではケラチンフィラメント上に、分化した上皮細胞においては「細胞間接着装置複合体」にあることを明らかにした。そして、ノックダウン実験により、アルバトロスがこの複合体の統合的形成及び生理機能、さらに細胞側面 (ラテラル) 蛋白質の局在を制御することを明らかにした。すなわちアルバトロスは細胞極性を制御する重要分子であった。その分子機序については、アルバトロスが極性制御分子Par3と複合体を作り、細胞間接着装置複合体の形成およびラテラルを制御すると考えられた。また、細胞頂部 (アピカル) 蛋白質の局在化にはアルバト

ロスと結合しないPar3経路が働いていることを明らかにした。そして、ケラチン欠失上皮細胞 (SW13) にケラチンを導入して細胞間接着について比較したところ、ケラチンはアルバトロス蛋白質を安定化することで細胞間接着装置形成に促進的に働くことがわかった。このケラチン結合蛋白質アルバトロスの解析結果により、発がんにおける上皮細胞極性変化とケラチンの関連を解明する大きな手がかりを得た。

<今後の方向>

- 1) アルバトロスについては、種々の生化学的方法で単離した結合分子のMS解析および酵母ツーハイブリッド法を用いた結合蛋白質の検索を行い、上皮細胞極性に関与する詳細な分子機構を明らかにする。また、中心体でのアルバトロスの機能解析をノックダウン実験により行う。
- 2) トリコプレインについても、同様に結合蛋白質の検索を行う。また一次線毛形成に加え、細胞間接着とトリコプレインとの関わりについても、ノックダウン実験にて詳細に検討する。
- 3) すでに同定している複数のTPHD分子の機能解析も合わせて行う。
- 4) アルバトロス、トリコプレインノックアウトマウスを作成・解析する。

これらTPHD分子群の解析を通して得られる結果を統合していくことで、上皮細胞分化と増殖の二律背反を分子レベルで理解し、ケラチンを介した新たな発がんのメカニズムを明らかにする一助とする。

- 1) リサーチレジデント, 2) 理研 発生・再生科学総合研究センター, 3) 国立がんセンター

<研究課題> 2-1

(主題) プロテインキナーゼを介した発がんの基礎研究

(副題) Chk1の新規リン酸化反応の生理的な役割

<研究者氏名>

榎本将人^{1) 2)}、後藤英仁²⁾、笠原広介、友野靖子³⁾、辻村邦夫⁴⁾、清野透⁵⁾、稲垣昌樹²⁾

<目的・概要・進行状況>

細胞には、紫外線 (UV) や放射線などのDNAの損傷が生じた際やDNAの複製阻止が引き起こされた際、そのDNA異常を監視し修復するチェックポイント機構が存在する。このチェックポイント機構の中心分子として、ATR (ATM- and Rad3-relate) からチェックポイントキナーゼ1 (Chk1)に至るプロテインキナーゼカスケードがその中心的な役割を担っている。種々のDNA損傷によって活性化されたATRは、Chk1のSer317およびSer345をリン酸化し、その後、Chk1は活性化される。このChk1のリン酸化反応により、細胞周期進行のエンジンであるサイクリン依存性キナーゼ1 (Cdk1) の活性化を抑制し、DNA損傷を持ったまま (あるいは、DNA複製が完全でないまま) 分裂期に進行することを阻止している。しかし、逆に、Cdk1が活性化した後 (つまり、分裂期移行期) のChk1の

挙動に関しては、多くの不明な点が残されているのが現状といえる。

我々の研究グループは、以前、Cdk1が分裂期においてChk1のSer286およびSer301をリン酸化していることを報告した。今回、Chk1が分裂前期（prophase）において核内から細胞質に放出されること、この核外移行がCrm-1依存性に引き起こされることを見出した。この核外移行がリン酸化反応によるものかを確認するため、Ser286およびSer301をAlaに置換したChk1変異体（S286A/S301A）またはChk1の野生型（WT）を誘導性に発現する細胞を確立した。その結果、WTは細胞質および核に局在するにも関わらず、S286A/S301Aは核内に著しく集積していた。S286A/S301Aを発現した細胞では、Cyclin B1/Cdk1の活性化の遅延が認められるとともに、分裂期への進行も著しく遅延することが判明した。また、キナーゼ活性を持たないS286A/S301A変異体（K38M/S286A/S301A）は、S286A/S301Aと同様にほとんど核内にしか局在しないにもかかわらず、分裂期への進行を全く阻害しないことが判明した。さらに、核内移行シグナルを付加したChk1（WT-3NLS）では、S286A/S301Aと同様に分裂期への進行を遅延させることが判明した。

以上の結果より、1）Cdk1がChk1のSer286およびSer301をリン酸化することでChk1を核から細胞質に移行させていること、2）このChk1の核外排出により、核内のCdk1の活性化および分裂期への進行が円滑に遂行されることが明らかになった。つまり、これらの結果は、Cdk1とChk1の間にはポジティブフィードバック機構が存在し、この機構の活性化が分裂期への円滑な移行に重要な役割を担っていることを示唆するものである。

<今後の方向>

がん細胞においては、分裂期移行期のG2/Mチェックポイント機構に異常が生じていることが広く知られている。今回、見出したChk1のリン酸化反応によるG2/Mチェックポイント離脱機構は、がん細胞がDNA障害を持っていても分裂期に入る、つまり、がん細胞が染色体の不安定性を獲得する一つのメカニズムになっている可能性がある。今後、この可能性を検討する予定である。

1) 研修生、2) 名大・医・細胞腫瘍、3) 重井医学研・分子細胞生物、4) 浜松医大・感染・生体防御、5) 国立がんセンター・ウイルス

<研究課題> 2-2

(主題) プロテインキナーゼを介した発がんの基礎研究

(副題) Chk1キナーゼ活性化の分子メカニズム

<研究者氏名>

笠原広介、後藤英仁¹⁾、榎本将人^{1) 2)}、友野靖子³⁾、清野透⁴⁾、稲垣昌樹¹⁾

<目的・概要・進行状況>

近年、抗がん剤の新たな標的としてDNA障害チェックポイント（チェックポイント）が有望視されている。チェックポイントとは、染色体DNAに障害が生じるなどの異常が検知されると細胞周期を特定の位置で停止させることで、DNA異常を効率的に修復する機構である。紫外線（UV）によるDNA損傷や、DNA複製障害におけるチェックポイント機構においては、ATR（ATM- and Rad3-related）キナーゼからChk1キナーゼに至るシグナル伝達経路が中心的な役割を担う。Chk1の活性化には、ATRによる317位と345位のSer（Ser-317及びSer-345）のリン酸化が重要な機能を果たすことが報告されている。活性化したChk1はCdc25ホスファターゼを抑制的にリン酸化することで、間接的にCdk1を阻害し細胞周期の停止を誘導する。しかしながら、リン酸化によるChk1制御機構の詳細については、未だ不明な点が多く残っているのが現状である。

そこで我々は、Chk1のリン酸化部位の1つであるSer-296がChk1の機能制御に果たす役割について解析を進めた。機能解析は主に、①Chk1Ser-296に対する抗リン酸化モノクローナル抗体および、②Chk1のリン酸化部位をAla置換した変異体（S296A）をテトラサイクリン依存的に誘導発現する細胞株を確立して進めた。

Chk1のSer-296は、ATRによるリン酸化（Ser-317/Ser-345）を阻害した場合および、Chk1のキナーゼ活性を阻害した場合においてリン酸化されないことが判明した。この結果は、ATRによってリン酸化されたChk1が、自己のキナーゼ活性に依存してSer-296をリン酸化（自己リン酸化）することを意味する。ATRによるリン酸化はChk1のキナーゼ活性亢進を誘導し、Cdc25Aのリン酸化依存的な分解（phospho-degron）には必須である。驚いたことに、S296A変異はChk1のキナーゼ活性には影響を与えないにも関わらず、Cdc25Aの分解を抑制することを見出した。この分子メカニズムを明らかにするため、Chk1の自己リン酸化部位に結合するタンパク質を探索した結果、多機能性タンパク質として知られる14-3-3 γ を同定した。14-3-3 γ のノックダウン細胞でも、Cdc25A分解の抑制が起きたことから、14-3-3 γ がChk1によるCdc25Aのリン酸化依存的な分解を制御していることが示唆された。精製タンパク質を用いたin-vitro kinase assayにおいて、14-3-3 γ はCdc25Aの分解に必須なリン酸化部位であるSer-76のリン酸化を促進した。さらにChk1は14-3-3 γ を介してCdc25Aと複合体を形成することも分かった。以上の結果は、Chk1がCdc25Aをリン酸化依存的に分解するためには、キナーゼ活性の亢進だけでなく、自己リン酸化依存的にChk1/14-3-3 γ /Cdc25Aの3者複合体を形成することも重要であることが示された。

<今後の方向>

本研究によって、DNA障害チェックポイントにおけるChk1の機能が14-3-3タンパク質によって制御されることが明らかとなった。細胞のがん化によって14-3-3のタンパク量は影響を受けることが報告されている。すなわち、正常細胞とがん細胞においてChk1の機能は違う制御を受けている可能性が示唆される。今後、この可能性を検討する。

1) 名大・医・細胞腫瘍、2) 研修生、3) 重井医学研・分子

<研究課題> 3

(主題) 抗リン酸化ペプチド抗体の進化

(副題) 生細胞で機能するリン酸化抗体製法開発

<研究者氏名>

大室有紀¹⁾、笠原広介、北岡優一²⁾、上田宏²⁾、稲垣昌樹

<目的・概要・進捗状況>

既存のリン酸化抗体を改良して、生細胞内でリン酸化反応を阻害、または、可視化することを目的とする。4抗体可変領域部cDNAのクローニングを完了し、2抗体については、in vitroで抗原親和性・特異性検出法としてOS-ELISAの系が確立された。さらに1抗体は、軽鎖可変領域に変異を挿入することによって、抗原親和性が上昇することを確認した。現在、適切な抗体導入法を検討している。

また、生細胞内の抗体反応検出法として、FRET法よりも観察が容易な2分子相互作用検出法の開発が望まれる。そこで、酸素非依存性Protein Complementation Assay法に応用することによって、FRET法よりも観察が容易な2分子相互作用検出法の開発も行い、知見を得つつある。

<今後の方向>

生細胞内に抗体可変領域部を導入し、その抗原親和性・特異性を確認後、変異挿入によって可視化用プローブ、または、機能阻害抗体として機能するクローンを選択する。適切なクローンに酸素非依存性Protein Complementation Assay法用タグを付加し、生細胞内でのリン酸化反応可視化を行う。

- 1) 研修生、財団法人がん研究振興財団リサーチレジデント、
- 2) 東京大学大学院工学系研究科

<研究課題> 4

(主題) ノックアウトマウスの手法を用いた細胞増殖・細胞分化の二律背反に関する研究

<研究者氏名>

松山誠¹⁾、稲垣昌樹

<目的・概要・進捗状況>

がんの増殖・浸潤の一因として、細胞骨格編成の異常によって細胞周期・細胞接着などの秩序が乱れることが挙げられる。細胞周期・細胞接着に関わる細胞骨格編成は、様々なキナーゼシグナルが複雑にクロストークしながら調節されている。

中間径フィラメントは、細胞骨格を形成する主要成分の一つである。主に中間径フィラメントとして機能しているタンパク質として、間葉系細胞・がん細胞においてビメンチンがある。中間径フィラメント構成タンパク質の基本構造は、ヘッド・ロッド・テイルの3ドメインで構成される。プロテインキナーゼによる中間径フィラメントの編成制御は、ヘッドドメインのリ

ン酸化を通じて行われる。これまで本研究室において、in vitro、in vivoにおける解析から、細胞周期特異的にリン酸化される部位が同定されている。それらのリン酸化部位がリン酸化されなくなるような変異を導入したビメンチンを培養細胞に導入すると、細胞分裂終了後の娘細胞間に、断裂されていない中間径フィラメントによる架橋が観察されたという報告がある。このことは、細胞周期特異的なリン酸化反応が中間径フィラメントの娘細胞への均等分配に必要であることを示唆している。

しかし、マウスなどを用いた個体レベルにおいて、それらのリン酸化シグナルの生理的な機能は、ほとんど解明されていない。そこで我々は、ビメンチンの細胞周期特異的なリン酸化部位に変異を導入したマウスの作製・解析を行っている。

最初に、細胞周期に依存したリン酸化部位をアラニンに置換したビメンチンのcDNAと、マウスゲノムの情報を用いて、ターゲティングベクターの作製を行った。次に、そのベクターとエレクトロポレーション法を用いて、ビメンチンの遺伝子変異ES細胞の樹立に成功した。現在、生殖系列キメラマウスを作製するために、マイクロインジェクション法を用いて、マウス胚へ遺伝子変異ES細胞の顕微注入を行っているところである。

<今後の方向>

現在、数匹のキメラマウスが誕生している。今後、これらを交配して、ヘテロ変異マウス・ホモ変異マウスを作製する予定である。今回作製する変異マウスは細胞周期に関する何らかの異常が生じると期待される。よって、これらの変異マウスの、発生過程や成獣における表現型を詳細に検討する。ビメンチンは間葉系の細胞やがん化した細胞で発現するため、ビメンチンの変異マウスでは、様々な組織において、細胞のがん化や細胞周期の異常がないか検討を行う。

将来、このビメンチン変異マウスを解析することにより、組織あるいは発生段階特異的な中間径フィラメントの機能が明らかになると予想される。また、中間径フィラメント構成タンパクの点突然変異に起因する様々な疾患との関連づけができると期待でき、発がんの分子機構のメカニズムの一端が明らかになると確信する。

- 1) 研修生、財団法人がん研究振興財団リサーチレジデント

中央実験室

<研究課題>

(主題) 食道がん、頭頸部腫瘍の分子遺伝学的研究

(副題) ミトコンドリアDNAの多型と食道がん発がんリスク

<研究者氏名>

組本博司、松尾恵太郎¹⁾、田中英夫¹⁾、田島和雄²⁾

<目的・概要・進捗状況>

ミトコンドリアゲノムDNA (mtDNA) は核ゲノムDNA と比べ、一般に変異が生じやすいといわれている。また最近では老

化やがん化に伴ってmtDNA に変異を生じることも報告されている。我々は、食道がんについて高頻度にmtDNA の変異が蓄積していることを以前明らかにした。もともと食道は、喫煙・飲酒の影響を直接受ける器官であり、これらの生活習慣によって発がんリスクも上昇することが示されている。そこで、本研究の目的は、食道がんの発がんリスクに関わるミトコンドリアゲノムDNAの多型を探索することである。また、mtDNAの多型の数が食道がん発がんリスクに関わっている可能性も考えられる。そこで、mtDNAの多型の数と食道がん発がんリスクの関連も解析する。

本研究には、HERPACC (the Hospital based Epidemiologic Research Program at the Aichi Cancer Center) のデータベースより食道がん患者185例、食道がん患者に性、および年齢を一致させた非がん患者対照185例を用いた。書面による同意を得た後、自記式質問票により喫煙、飲酒習慣を含む生活習慣に関する情報を得た。さらに、7mlの血液の提供を受け、DNA を抽出した。

mtDNAのコントロール領域を解析するプライマー、9セットを用いて、PCR を行った。その結果、9セットのうち4セットでのみ増幅が見られた。mtDNAは多型が多く、さらに人種による違いも大きい。プライマーの塩基配列は詳細には公表されておらず、詳細は不明であるが、残り5セットのプライマーは、人種の違いによる多型などが原因で、mtDNAと相補鎖を形成できなかった可能性が考えられる。増幅産物の塩基配列を決定し、4プライマーセットによる増幅領域の詳細を解析したところ、4プライマーセットによりD-loop 領域全域をカバーしていることが明らかとなった。

<今後の方向>

そこで、今後これらのプライマーを用いて、D-loop 領域全域の塩基配列を解析し、mtDNAの基準配列であるrCRS と比較することによって、D-loop 領域の多型を網羅的に検出する。これらの結果を用いて食道がんリスクを与える多型の探索や、多型の数と食道がんリスクとの関連、さらに飲酒・喫煙のリスクを修飾する多型の探索を行う。また、核だけでなくミトコンドリアでも働いていることが明らかとなっている修復遺伝子、hOGG-1 の多型 (Ser326Cys) をそれぞれのサンプルについて解析し、mtDNA の変異と喫煙・飲酒に関連があるかどうか解析する。さらに、これらの解析によって、mtDNA の変異と飲酒・喫煙習慣との関連を明らかにし、食道がんにおけるmtDNA の変異がどのような過程で生じるかを考察する。

1) 疫学・予防部、2) 研究所長

3. 病院及び研究所における共同研究（共同研究費）

<研究課題> 1

非小細胞肺癌におけるEGFR遺伝子変異と効果・予後についての検討

Clinical outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients screened for epidermal growth factor receptor gene mutations

<研究者氏名> 呼吸器内科部 樋田 豊明

共同研究者 吉田公秀、堀尾芳嗣、清水淳市
小川紫都、朴智栄、朴将哲、光富徹哉、
谷田部恭、松尾恵太郎

【背景と目的】

EGFR遺伝子変異はゲフィチニブの効果および予後予測因子とされる。今回ゲフィチニブ投与の指標としてEGFR遺伝子変異解析を施行した症例について、治療効果と予後について検討した。

【対象と方法】

2004年11月から2006年12月までに当院呼吸器内科において変異検索が行われた311例（他院からの依頼131例を含む）のうち切除または根治照射不能IIIB/IV期非小細胞肺癌100例について、レトロスペクティブに検討した。変異検索は、生検または穿刺細胞診から得られた未染切片から病理医の評価に基づきDNAを抽出し、Exon19欠失またはExon20挿入変異はFragment Analysis、L858R点突然変異はCycleave法により検出した（Yatabe et al. J. Mol. Diagn. 2006;8: 335-341）。RNA抽出可能な十分な検体量が得られた場合はRT-PCR法により増幅した後、direct sequenceにより検出した。

【結果】

変異陽性群（n=48）では腺癌/非腺癌：47/1、男/女：15/33、年齢中央値61歳（42~84）、喫煙歴有/無：16/32、PS0または1/2/3/4：42/2/3/1、臨床病期IIIB/IV：7/41、前治療なし/胸膜癒着術/骨放射線/脳放射線：35/4/5/4であった。変異陰性群（n=52）では腺癌/非腺癌：48/4、男/女：38/14、年齢中央値63歳（30~79）、喫煙歴有/無：41/11、PS0または1/2/3/4：40/7/3/2、臨床病期IIIB/IV：17/35、前治療なし/胸膜癒着術/骨放射線/脳放射線：35/7/8/2であった。両群の背景因子において性、喫煙、臨床病期において有意差がみられた（それぞれP<0.0001、P<0.0001、P=0.03）。ゲフィチニブ投与は、変異陽性群では48例中46例、変異陰性群では52例中3例のみであった。変異陽性群でのゲフィチニブ奏効率は1st line 87%、2nd line 80%であった。1st line 細胞傷害性抗癌剤感受性は変異陽性群、陰性群それぞれ奏効率32%、28%（P=0.7198）と有意差を認めなかった。変異陽性群での無増悪生存期間中央値は、1st lineではゲフィチニブ7.8ヶ月、細胞傷害性抗癌剤5.1ヶ月（P=0.0323）、2nd

lineではそれぞれ6.5ヶ月、4.0ヶ月（P=0.0048）であり、ともにゲフィチニブ投与で有意に延長した。1st line治療からの生存期間中央値は、変異陽性群24.3ヶ月、陰性群12.6ヶ月（P=0.0029）であり、有意な延長がみられた。

【結語】

変異陽性例でのゲフィチニブ投与は有意な無増悪生存期間の延長をもたらす、生存期間の延長に寄与するものと考えられる。

<研究課題> 2

RT-PCR法による腹腔内洗浄細胞診と術後成績からみた網嚢切除の有用性に関する検討

Study on effectiveness of bursectomy for advanced gastric carcinoma

<研究者氏名> 消化器外科部 山村 義孝

共同研究者 伊藤誠二、望月能成、中西速夫、
立松正衛

【はじめに】

進行胃癌の手術では網嚢合併切除が行われる。この網嚢切除の有用性を検証する目的で、reverse-transcriptase polymerase chain reaction（RT-PCR）法^{1,2)}による腹腔内洗浄細胞診を行った。

【対象と方法】

2002年7月~2005年8月の進行胃癌手術例のうち、P0・CY0で感染症がなく、患者本人から同意を得た136例を対象とした。

開腹直後に左横隔膜下、ダグラス窩、網嚢内に生理食塩液を各100ml注入。回収液のパパニコロー染色によりCY0であることを確認したのち、LightCyclerによるリアルタイムRT-PCR法を行いCEAmRNAが0.1以上を陽性と判定した。

【結果】

136例中、3カ所とも陰性は93例、3カ所とも陽性は6例、2カ所陽性が10例、1カ所陽性が27例であった。部位別の陽性例はダグラス窩が34例、左横隔膜下が17例、網嚢内が14例であった。この14例のうち網嚢内のみが陽性であったのは1例（全例の1.5%、陽性例の4.7%）で、この2例はいずれも前壁の漿膜浸潤が陽性であった。

【考察】

網嚢内だけに限局する早期の腹膜播種があるかどうかを調べるため、網嚢内を含む腹腔内3ヶ所の洗浄液をLightCyclerを用いたリアルタイムRT-PCR法にて測定した。

その結果、P0・CY0の進行癌136例のうち43例がRT-PCR法で陽性となり、このうち網嚢内が陽性であったのは14例であ

た。この14例中12例は他部位でも陽性であったが、2例は網嚢内のみが陽性であった。しかし、この2例はいずれも前壁の漿膜浸潤が陽性であることから偽陽性（もしくは他二部位が偽陰性）と思われた。

理論上最も網嚢切除の適応がある症例は漿膜浸潤が後壁のみに限局したP0、CY0の症例である。しかし、retrospectiveな研究ではあるが、このような症例を対象とした手術成績でも網嚢切除の有用性は証明されなかった³⁾。

以上より、網嚢内に播種された癌細胞は早期に全腹腔に移行すると考えられた。

[結語]

P0・CY0の進行癌に対してRightCyclerを用いたリアルタイムRT-PCR法による洗浄細胞診を腹腔内3カ所にて行った。

その結果、癌細胞が網嚢内のみ留まっている可能性は極めて低く、外科的に網嚢切除を行う有用性はないと思われた。

文献

- 1) Nakanishi H et al. Rapid quantitative detection of carcino-embryonic antigen-expressing free tumor cells in the peritoneal cavity of gastric cancer patients with real-time RT-PCR on the LightCycler. Int J Cancer 2000; 89:411-7.
- 2) Koderia Y et al. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time RT-PCR: a sensitive predictor of outcome for gastric carcinoma patients. Ann Surg 2002;235:499-506.
- 3) 山村義孝ほか：胃癌手術における大網切除・網嚢切除は有用か？ 外科治療 90：70-76

<研究課題> 3

がん患者の術後疼痛及びがん性疼痛に関する研究

A management of cancer pain and post-operative pain

<研究者氏名> 麻酔科部 細田 蓮子

共同研究者 西良雅夫、仲田純也、篠田雅幸

<はじめに>

当がんセンター中央病院麻酔科部ではがん患者の手術麻酔に対し、麻酔の4大要素、意識消失、鎮痛、筋弛緩、有害反射の防止を確実にするバランス麻酔を実施している。痛みの無い、しかも呼吸循環変動の少ない麻酔覚醒の実現には、脊髄レベルで手術侵襲刺激を遮断し、神経内分泌反応を抑制する硬膜外鎮痛法が最も有効である。また術後持続鎮痛を図れることも利点とされる。今回は昨年に引き続き1年間の硬膜外鎮痛法実施状況につき集計し、術後患者のQOL並びに予後改善につき検討、報告する。

<対象と方法>

平成20年1月から12月の1年間に行われた全手術件数につき、手術部位別に硬膜外鎮痛法実施件数を集計し、有効性と問題点

につき検討した。硬膜外カテーテルは全例、全身麻酔施行前に挿入し、術後の持続注入は0.2%ロピバカイン+フェンタニル4~8A、制吐剤としてドロレプタン1ml計100mlを充填した持続注入ポンプ（リニアフューザー）を用い、3~5ml/hrで2~3日間投与した後、カテーテルを抜去した。

<結果>

年間総手術件数は2761件、麻酔科管理症例は2320件、そのうち全身麻酔2302件につき集計した。男性972：女性1330、年齢構成は18歳以下：6（0.2%）、18~65歳：1426（61.9%）、65~85歳：853（37.1%）86歳以上：17（0.7%）であった。ASA（米国麻酔学会）が定める術前評価PS（Physical Status）分類ではPS1：942（40.9%）、PS2：1275（55.3%）、PS3：35（1.5%）、緊急手術1E：3（0.1%）、2E：29（1.3%）、3E：17（0.7%）、4E：1（0.04%）であった。麻酔法別統計では全身麻酔：888（38.5%）、硬膜外麻酔併用全身麻酔：1379（59.9%）、硬膜外麻酔のみ：0（0%）、脊髄くも膜下麻酔：11（0.5%）、その他4（0.2%）であった。

次に手術部位別に硬膜外麻酔併用状況を集計した。

	麻酔科管理	硬膜外併用	%
開胸・縦隔（主に肺手術）	292	255	87.3
開胸+開腹（主に食道手術）	57	56	98.2
開腹			
非内視鏡手術	902	841	93.2
内視鏡手術	98	84	85.7
頭頸部・咽喉頭	373	61	16.4
胸壁・腹壁・会陰（主に乳腺手術）	494	32	6.5
脊椎（含硬膜外カテ挿入のみ）	2	0	0
股関節・四肢	53	36	67.9
その他	31	14	45.2
総計	2302	1379	59.9

麻酔に関する偶発症は3/1379（0.2%）で、クモ膜下腔穿刺2件、術後下肢不全麻痺→回復、1件であった。食道がん症例は全例ダブルカテーテル、かつPCA機能付きの硬膜外持続注入ポンプで管理し、術後の円滑な人工呼吸器離脱に貢献していた。術後の問題点は吐気で、後半にはメジャートランキライザー：ドロレプタンを硬膜外に投与することで予防に努めた。術後痛がないことで患者の早期離床、早期退院にも貢献していた。

<考察>

愛知県がんセンター麻酔科部年間硬膜外持続鎮痛併用手術は1379（59.9%）で、昨年60%とほぼ同様に実施率であった。開胸、開腹手術での実施率が90%以上と高く、頭頸部、乳腺手術など低侵襲手術では実施が少なかった。併用例ではいずれも周術期管理は円滑に行われ、翌日からの離床を図ることで肺塞栓予防、早期退院が実現していた。術中の血圧が低め安定していることも出血量の減少につながっていると推定された。吐気対策はドロレプタンの併用で軽減した。硬膜外併用麻酔の予後調査でも利点が指摘され、かつ遠隔転移への影響は無いとの報告もある¹⁾。がん患者の手術麻酔には硬膜外鎮痛法が有用と考

察された。

<参考文献>

- 1) R.Christphersen et al. Long-term Survival After Colon Cancer Surgery: A Variation Associated with Choice of Anesthesia. Anesth Analg 107.1.325-338 2008

<研究課題> 4

機能の温存を目指す頭頸部癌の外科治療
Organ preservation surgery for head and neck cancer

<研究者氏名> 頭頸部外科 長谷川 泰久

共同研究者 寺田聡広、花井信弘、小澤泰次郎

副題：舌扁平上皮癌における救済手術の予後－1次症例との比較より－

本臨床研究の目的は、1) 舌癌1次症例における初回手術後の予後と予後因子の検討、2) 再発舌癌2次症例に対して行った救済手術後の予後と予後因子の検討、3) 両者の累積生存率をそれぞれ検討することであった。

<対象・方法>

対象とした症例は、1985年3月より2000年3月までの間に、愛知県がんセンター頭頸部外科において手術を行った可動部舌扁平上皮癌の症例である。本研究に妥当であると判断した対象症例は、未治療の症例（1次症例）で手術を施行した110例と、他施設で治療後の再発症例（2次症例）に対して救済手術を施行した77例であった。平均経過観察期間は48.3ヶ月であった。それぞれの症例に対して、術後の経過と予後因子について検討を行った。検討した項目は、患者因子として性別、年齢、腫瘍因子として亜部位、T分類、原発腫瘍の深達度、pN分類、転移リンパ節の合計とlevel、節外浸潤の有無、治療因子として頸部郭清術施行の有無、化学療法と放射線治療の有無である。

<結果>

1) 1次症例の内訳。

初回手術の術式は、舌部分切除術：63例（57.3%）、舌半側切除術：23例（20.9%）、舌亜全摘出術：16例（14.5%）、舌全摘出術：8例（7.3%）であった。原発腫瘍切除と同時に選択的頸部郭清術を施行した症例が36例（32.7%）、治療的頸部郭清術を施行した症例が37例（33.6%）であった。

2) 1次症例の予後と予後因子。

経過観察期間内に死亡症例は24例(21.8%)に認めた。Cox比例ハザードモデルによる予後因子の解析で、単変量解析では、年齢と亜部位以外が有意な因子となった。有意因子を変数とした多変量解析の結果では転移リンパ節のlevelが独立した有意な予後因子となった。

3) 2次症例の内訳。

平均再発期間は19.8ヶ月であり、他施設での初回治療で手術を主体としたのが23例（29.9%）、放射線治療を主体としたのが54例（70.1%）であった。局所再発腫瘍の切除と同時に選択的頸部郭清術を施行した症例が12例（15.6%）、治療的頸部郭清術を施行した症例が46例（59.7%）であった。

4) 2次症例の予後と予後因子。

経過観察期間中に死亡症例は28例（36.4%）に認めた。Cox比例ハザードモデルによる予後因子の解析で、単変量解析ではpN分類、転移リンパ節の合計とlevel、節外浸潤、術後化学療法と術後放射線治療の有無が有意な因子となった。節外浸潤は予後因子として明確である点、術後化学療法と術後放射線治療は遠隔転移症例を含めて予後不良症例に対して行われていた点より、pN分類、転移リンパ節の合計とlevelにより多変量解析を行ったところ、転移リンパ節のlevelが独立した有意な予後因子となった。

5) 1次症例と2次症例の5年累積生存率。

1次症例は78.9%、2次症例は67.5%であり、統計学的有意差は認めなかった。2次症例で救済手術時の頸部再発の有無で検討した。頸部再発症例は54.8%、非頸部再発症例は82.9%であり、統計学的有意差を認めた。

<結語>

今回、舌扁平上皮癌の1次症例と2次症例の手術後の予後を検討した。両症例とも、頸部リンパ節転移を認めるlevelが予後因子となった。5年累積生存率は1次症例と2次症例の間で有意差を認めないものの、頸部に対して救済手術を行った症例の予後は不良であった。上記に加えて再発の早期発見が予後向上に重要であり、今後はPET-CTも助けとなって救済手術の頻度の増加が予想される

4. プロジェクト研究（共同研究費）

<研究課題> 1

悪性胸膜中皮腫細胞株におけるWntシグナル経路異常の同定

<研究者氏名>

愛知県がんセンター中央病院胸部外科¹、愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部²

福井高幸¹、高坂貴行¹、小野里良一、関戸好孝²、光富徹哉¹

【背景】

過去のアスベスト使用に起因して悪性胸膜中皮腫の罹患数、死亡数が増加している。そのため、難治腫瘍である悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療戦略を確立する上でその生物学的特性を理解することが望まれている。特に今後の分子標的治療の標的遺伝子となりうるがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異、異常の有無を同定することは臨床にも有用である。Wntシグナル伝達系はさまざまな悪性腫瘍の形成、増殖における重要性が報告されているが、悪性胸膜中皮腫では重要性が明らかではない。今回大腸がんなどの消化器がんでは異常が指摘されているSFRP遺伝子、 β -catenin遺伝子に着目し、細胞株を用いて遺伝子解析を行った。

【対象と方法】

日本人由来の悪性胸膜中皮腫細胞株14株および欧米人由来の6細胞株計20株を対象とし、発現プロファイルを行った。リファレンスとして正常中皮由来の細胞株MeT-5Aおよび2つの初代培養中皮細胞のmRNAをMixしたものを使用した。アレイのデータよりSFRP遺伝子（SFRP1~5）の発現についての検討を行った。また β -catenin遺伝子については遺伝子解析を行った。

【結果】

SFRP遺伝子群においてコントロール（正常中皮）と比較して50%以上発現の低下がみられた頻度はSFRP1で50%、SFRP2で10%、SFRP3で0%、SFRP4で95%、SFRP5で0%であった。SFRP4およびSFRP1遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。また β -catenin遺伝子の遺伝子解析ではH28ではホモザイガス欠失していることが明らかになった。

【考察】

我々はこれまでに非小細胞肺癌においてSFRP1遺伝子が腫瘍抑制遺伝子の候補の一つであることを報告した。今回の研究では悪性中皮腫細胞株においてSFRP4で95%（20細胞株中19細胞株）、SFRP1で50%の細胞株で発現低下が認められたことになる。SFRP4に関しては非常に高頻度に強い発現抑制がみられたが、細胞株を用いたアレイCGH解析では明らかなSFRP4（7p14.1）を含む領域のホモ欠失は認められず、発現低下はエピジェネティックな異常等による可能性が考えられた。またH28ではSFRP1およびSFRP4の発現抑制がみられるが β -catenin遺伝子がホモザイガス欠失していることから古典的Wnt経路以外の非古典的経路の活性化に関与している可能性が考えられる。

以上よりSFRP4およびSFRP1が悪性胸膜中皮腫の形成に関与している可能性を示唆され、今後はさらにSFRP4およびSFRP1の悪性胸膜中皮腫における細胞増殖、分化抑制作用などを明らかにする必要があると考えている。

<研究課題> 2

新規ヒト化抗CD20抗体のB細胞性リンパ腫治療への応用のための基礎的検討

<研究者氏名> 血液・細胞療法部 鏡味 良豊

共同研究者 瀬戸加大、山本一仁、田中里恵、岡田恭孝

【目的】

キメラ型抗CD20抗体（rituximab）は、化学療法との併用において治療効果が確立されてきたが、中高悪性度Bリンパ腫での効果は限定的であり、さらなる強力な抗CD20抗体の開発が必要である。rituximabの作用機序は、complement dependent cytotoxicity（CDC）、antibody dependent cell mediated cytotoxicity（ADCC）と、apoptosisが考えられており、前年度に、大阪大学工学部が樹立した数種のヒトマウスキメラ型抗CD20単クローン抗体から、最良のクローンを選択することに成功した。今年度は、同クローン由来完全ヒト型単クローン抗体を作成し、その活性を検討した。

【方法および結果】

1. 完全ヒト化CD20抗体の作成

前回のCDC活性において、高活性であったマウス・ヒトキメラ抗体クローンである、1K1782、1K1791をもとに、h1782fv、h1791sf、h1791fvの完全ヒト化抗体が作成された。対照としては現在臨床応用されているrituximabを使用し、また、すでに治験段階のofatumumabも使用した。

2. 各ヒト化抗体のADCC能

標的細胞にSUDHL4（IgH-BCL-2の転座を持つBリンパ腫）、RCK8（びまん性大細胞型Bリンパ腫）を使用した。標的細胞をcalceinとincubation後、健常者末梢血単核球をeffector細胞に使用してE/T比を25:1として混和した。各抗体終濃度0、0.2、1.0 μ g/mlにて添加し、96well microplateにて4時間incubateすることにより、ADCC活性を検討した。細胞障害は、FluoroImager595をもちいて、well全体での励起波長488nmでの蛍光量を530nmにてscanし、解析ソフトであるImageQuontにて数値化した。その結果、SUDHL4,RCK8細胞ともにADCC活性が認められたが、クローン間での差およびrituximab、ofatumumabとの差は明らかでなく、ADCC活性はすべて、rutuximabと比しても同程度と考えられた。

3. CDC能の検出

標的細胞にRaji, SUDHL4, RCK8を使用し、健常者プール血清20%存在下、標的細胞と2時間incubateすることにより、

CDC活性を検討した。細胞障害は、核のPI染色後、陽性、陰性細胞割合をflowcytometryにて計測し、陽性細胞の比率を求め、抗体非存在下での陽性細胞比率との差をCDC活性とした。Raji細胞では、h1782fv抗体において、やや他より低い傾向が認められた。SU-DHL4細胞では、h1791fvとofatumumabでやや高いCDC活性が認められたが、クローン間での差およびrituximabとの差はわずかであった。RCK8細胞を標的としたものでは、rutuximabとh1782fvにおいて、CDC活性の低下が顕著であった。

4. Bリンパ腫細胞に対する、各種抗体のCDC活性の検討
実際の腫瘍細胞に対するCDC活性について、flowcytometryを用いて検討した。腫瘍細胞 1.1×10^5 を、健常者プール血清20%存在下、各抗体終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 、にて2時間incubateし、CD19とPIの2重染色を行った後、CD19陽性細胞中のPI陽性細胞の比率を求めた。陰性対照として、抗体非存在下でのCD19陽性、PI陽性比率との差により、CDC活性とした。種々の病型でのCDC活性の結果を示すが、一定の傾向は認められなかったが、全体にrituximabより活性が高い傾向が認められた。

【結論】

キメラ抗体1K1791由来で、ヒト化抗体であるh1791は、rituximabより高いCDC活性が認められた。一般の臨床検体においてもその傾向は変わらず、今後臨床応用にむけて有望な抗体と考えられた。

<研究課題> 3

ESD(endoscopic submucosal dissection)時代における早期胃癌の新しい進展度診断法の研究

<研究者氏名> 内視鏡部 田近 正洋

共同研究者 中村常哉、河合宏樹、澤木明、水野伸匡、
石川英樹、山雄健次、塚本徹哉、横井太紀雄
谷田部恭、立松正衛

【背景】

早期胃癌に対する内視鏡治療はESDの登場により大きく転換し、全国で盛んに行われている。しかし一方で、術前診断の重要性も再認識されている。我々は胃癌の生検標本における癌組織の間質反応の有無から深達度診断が可能であるとの知見を得たが、この判定は病理医の主観に左右されることが危惧されたため、より客観的なマーカーを探求することとした。これまでTenascin-C・alpha-SMA・CD10・CD34・MUC1による免疫組織化学染色、さらにアザン染色を行い間質反応の有無の有無との関連を検討したが、関連は認められなかった。そこで改めてHE染色での深達度診断の客観化を検討することとした。

【目的】

診断基準を生検組織の膠原線維の増生・腺管の乱れの二項目に絞り、診断基準を簡略化し、その有用性を検討した。

【方法】

対象は平成18年1月から平成19年12月までの2年間に上部消化管内視鏡検査(GIF)にて早期胃癌と診断された症例中、分化型腺癌で内視鏡または外科的に切除され病理組織学的検討が可能であった連続164例、175病変。方法は消化器専門の病理医1名に対し、「内視鏡所見において早期胃癌と診断された病変からの生検標本である。」との情報のみを提供し、膠原線維の増生や腺管の乱れが目立たないM、膠原線維の増生または腺管の乱れを認めるSMs、膠原線維の増生及び腺管の乱れ共に認めるSMdの3群に分類し、その診断能をGIF、上部消化管X線検査(UGI)、超音波内視鏡所見(EUS)と比較した。

【結果】

生検診断M、SMsは病理診断m、sm1に、SMdはsm2以深に対応していた。生検診断の感度：特異度：正診率は96.5%：35.3%：84.6%であった。GIFは90.4%：57.5%：82.9%、UGIは89.6%：58.1%：81.9%、EUSは77.8%：66.7%：76.5%であり、感度において生検診断が優れていた。診断乖離例につき検討したところ、生検診断SMd、病理診断m、sm1の深読み例では標本のねじれや斜め切りなどが原因と考えられた。また、診断基準の妥当性を検討する目的に他の病理医に判定を依頼したところ、感度：特異度：正診率は86.5%：38.5%：74.0%と良好な結果が得られた。

【考察】

当初我々は生検組織における間質反応を、免疫組織化学染色を用い客観化できないかを検討した。しかし、各種免疫組織化学染色と間質反応の有無との間に関連を示すものは存在しなかった。そこでHE染色に立ち返り、診断基準を簡略化し再検討を行った。その結果、新しい基準は特に感度、正診率において他の検査法と同等以上であり有用であり、客観性をもった診断基準となりうる可能性が示唆された。

【結論】

新しい診断基準を用いた早期胃癌に対する生検組織による深達度診断は有用である。しかし、生検診断SMdと判断した際には、標本が評価可能なものを考慮する必要があると考えられた。

<研究課題> 4

TNFAIP3によるB細胞性腫瘍抑制機構の解明
Identification of tumor suppressive effect of TNFAIP3 in lymphomagenesis.

<研究者氏名> 遺伝子医療研究部 本間 圭一郎

共同研究者 都築 忍 森島泰雄 山本一仁
鏡味良豊 瀬戸加大

TNFAIP3 (A20) の腫瘍形成における役割についてはほとんど検討されていない。

このため、まず初年度は、TNFAIP3の腫瘍抑制効果を明らかにすることを目標とした。

(1) TNFAIP3欠失リンパ腫細胞株に対する強制発現

TNFAIP3を欠失したリンパ腫細胞株 (Jeko-1, OCI-LY8) に TNFAIP3をレトロウイルスベクターにより導入した強制発現実験を行い、ゲノム解析の研究結果から推測される腫瘍抑制機能を検討した。ControlとしてTNFAIP3を欠失していないリンパ腫細胞株 (Raji) を用いた。TNFAIP3を欠失した細胞株では、TNFAIP3導入によりアポトーシスが誘導された一方、TNFAIP3が欠失していない細胞株では、アポトーシスが誘導されなかった。アポトーシスが誘導された細胞株では、TNFAIP3の導入によるNF- κ B活性の抑制が認められ、TNFAIP3欠失リンパ腫細胞株では、その生存が、TNFAIP3欠失によって活性化したNF- κ Bシグナルに依存していることを明らかにした。

(2) EBV不死化B細胞株に対するTNFAIP3ノックダウン実験

EBV不死化B細胞株に対するTNFAIP3のノックダウンにより、TNFAIP3を欠失による腫瘍化へのステップをシミュレーションできるかを検討した。TNFAIP3のノックダウンにより、NF- κ B活性が亢進する事を示した。さらに、TNFAIP3のノックダウンにより、過酸化水素や抗がん剤 (VP-16) に対するアポトーシス耐性能が亢進することを明らかにした。これは、TNFAIP3欠失が高頻度に認められる難治性リンパ腫における、治療抵抗性のメカニズムの一端を示していると考えられる。

また、増殖能の評価としてin vitroでのメチルセルロースコロニー形成試験を行い、TNFAIP3ノックダウンによるコロニー形成能の亢進を明らかにした。さらに、NF- κ B阻害剤をもちいることで、コロニー形成能の亢進は失われることを示した。これらの実験結果から、TNFAIP3ノックダウンによるコロニー形成能の亢進は、NF- κ B活性化を介した効果であること、さらにNF- κ B活性化経路を標的とした分子標的療法が、TNFAIP3欠失を有するリンパ腫において有効である可能性が示唆された。

以上の結果からTNFAIP3のリンパ腫形成におけるがん抑制遺伝子としての機能を明らかにし、プロジェクトの基礎検討における知見をまとめ論文にした。(論文投稿中)

また、現時点での研究成果を、来る2009年の日本癌学会総会において発表予定である。

今後は、がん抑制遺伝子として機能するうえでもっとも重要なTNFAIP3の基質を明らかにすることで、新たな分子標的療法の標的となる分子の検索など、臨床応用可能な知見の集積を行う予定である。