

14－8 食道がん、胃がんの悪性度の分子情報の把握とそれを応用した生検診断法の確立

主任研究者 神戸大学大学院医学系研究科 横 崎 宏

研究成果の要旨

網羅的遺伝子解析から同定されたフォスファターゼ遺伝子 *PRL-3* は胃がん細胞の運動／浸潤能に関与し、転移巣の成立に重要な役割を果たす可能性が示された。予後不良である胚細胞型形質発現を有する胃がんの新たなマーカーとして *MAGE* 蛋白の強発現の有用性が判明した。*MMP* のプロモーターに結合する *Ets* ファミリー転写因子 *E1AF* は主にマトリライシンの発現を介して胃がんの浸潤・転移において重要な役割を果たし、有用な悪性度診断マーカーである可能性が示唆された。プロテオーム解析から胃がんにおいて発現低下する *MAD1* を同定し、胃がん細胞での発現低下および胃腺腫細胞との細胞内局在の違いを免疫組織化学的に確認した。ラット食道多段階発がんモデルを作成し各段階の病変における *cDNA* マイクロアレイ解析を行ったところ、がんにおいて発現亢進する遺伝子として *PCNA*、*FAK* などを認め、*cyclinD1* は前がん病変においてすでに発現亢進する傾向を認めた。これまでに確立した胃がん *SAGE* ライブラリーを用いてがんに特異的に発現し且つ悪性度に関連する新規遺伝子 8 種類を同定し、その内 *MIA* と *GW112* は高臨床病期胃がんでは有意に高発現していた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
横 崎 宏	神戸大学大学院医学系研究科 教授	食道がん、胃がんの生検悪性度診断に関する分子病理学的研究の総括
遠 藤 泰 志 ^{*1} *2	国立がんセンター東病院 医長 燕労災病院 部長	胃および食道がんの悪性形質獲得に関する分子病理学的解析
森 正 樹	九州大学生体防御医学研究所 教授	食道がんの悪性度を規定する分子情報の解析
今 井 浩 三	札幌医科大学 学長	胃がんの浸潤・転移機構の分子病理学的解析と悪性度診断への応用
井 藤 久 雄	鳥取大学医学部 教授	胃がんの悪性度を規定する分子情報の解析
中 山 宏 文	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授	胃がんの悪性度に関する分子病理学的解析と診断法の確立
大 賀 丈 史 (班 友)	国立病院機構九州がんセンター 医師	食道がんの増殖活性及び化学放射線療法感受性因子に関する検討

＊ 1：平成16年4月1日～平成16年10月16日

＊ 2：平成16年10月17日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は網羅的遺伝子発現解析を通して食道がん、胃がんの進展・転移を制御する分子情報を把握することにより、それぞれの悪性度を規定する因子を分子病理学的に明らかにし、得られた成果を基礎に生検組織を対象とした食道がん、胃がん悪性度の新しい遺伝子診断系を確立することである。今年度の研究計画は、1) 転移関連フォスファターゼ遺伝子 *PRL-3* の悪性度診断への応用と機能解析を行う、2) 高悪性度胃がん、食道がん多段階病変の網羅的遺伝子発現解析を行い、治療効果及び予後に関連の深い遺伝子群を抽出する、3) 胃がん・食道がん解析用カスタムアレイを作成し、様々な病態から採取した生検組織の遺伝子発現解析を行いその悪性度診断における有用性を検証する、4) プロテオミクス解析から新たな悪性度関連分子を抽出する、5) 転移予測 Artificial Neural Network Model の構築により悪性度診断を可能にする生検診断法を確立することである。

2 研究成果

SAGE (serial analysis of gene expression)法による網羅的遺伝子発現解析から大腸がん転移細胞において原発巣あるいは非腫瘍部大腸粘膜に比較して高発現を示す遺伝子として近年同定された *PRL-3* は、22KDの低分子量チロシンフォスファターゼをコードしている。昨年度までの研究で、胃がん原発巣における *PRL-3* の過剰発現は、腫瘍径、脈管侵襲、壁深達度、リンパ節転移ならびに病期と有意に相関し、生検材料からの悪性度診断に有用な指標となりうることを明らかにしてきた。本年度の分担研究では、胃がんの浸潤、転移における *PRL-3* の機能を解析する目的で、胃がん細胞に *PRL-3* 特異的 siRNA 発現ベクターを導入し、その増殖、浸潤ならびに転移に及ぼす影響を検索した。胃がん細胞 18 株の定量的 R-PCR 法による解析で、最も高いレベルの *PRL-3* mRNA 発現を示す SH101-P4 に対し、*PRL-3* siRNA をコードする二重鎖オリゴヌクレオチドおよび対照として GFP に対する siRNA 配列をを組み込んだ pSilencer 2.1-U6 neo ベクターをリポフェクション法にて導入・選択し、*PRL-3* siRNA 発現 2 クローン (SH101-P4^{APRL-3}-1、SH101-P4^{APRL-3}-2) および GFP siRNA 発現クローン (SH101-P4^{AGFP}) をえた。また、陰性対照として pSilencer 2.1-U6 neo ベクターのみを組み込んだクローン (SH101-P4^{vector}) を作成した。各クローンの *PRL-3* mRNA 発現の程度は親株に比較して SH101-P4^{APRL-3}-1 は 5% 未満、SH101-P4^{APRL-3}-2 は約 50% に抑制されていたが、コントロールの SH101-P4^{AGFP} ある

いは SH101-P4^{vector} の *PRL-3* のそれは親株とほぼ同等であった。さらに、抗 *PRL-3* 家兎ポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色共焦点レーザー顕微鏡観察では、親株では細胞質および一部核に *PRL-3* が局在していたが、強い mRNA 発現抑制を示した siRNA 導入クローン SH101-P4^{APRL-3}-1 では、*PRL-3* 免疫活性は顕著に抑制されていた。次に、胃がん細胞への *PRL-3* siRNA 発現ベクター導入による細胞生物学的効果を試験管内で検討した。まず、 1×10^5 個の細胞を血清無添加条件下 4 日までの WST-1 アッセイによる細胞増殖能を比較すると、コントロールとして用いた SH101-P4^{AGFP} および SH101-P4^{vector} は親株とほぼ同様の増殖態度を示したが、*PRL-3* siRNA 発現ベクター導入クローン SH101-P4^{APRL-3}-1 および SH101-P4^{APRL-3}-2 はこれらに比較して増殖が抑制される傾向にあった。次に、細胞外基質ゲルでコートしたトランスウェルを用いて各細胞の浸潤能を比較したところ、親株を基準とした場合の浸潤能の程度は、SH101-P4^{APRL-3}-1 1.1 %、SH101-P4^{APRL-3}-2 23.9 %、SH101-P4^{vector} 95.0 %、SH101-P4^{AGFP} 98.5 % と、*PRL-3* siRNA 発現ベクター導入クローンにおいて顕著な浸潤能抑制が観察された。胃がん細胞への恒常的 *PRL-3* siRNA ベクター導入により試験管内での増殖、浸潤能が抑制されたため、ヌードマウス脾臓注入肝転移モデルを用いた生体内における転移能に対する影響を検討した。8 週齢メス BALB/cA Jcl-nu マウス脾臓に 3×10^5 個の SH101-P4^{APRL-3}-1、SH101-P4^{vector} あるいは SH101-P4^{AGFP} クローンを注入 (各群 10 匹を使用) し、28 日後に屠殺、肉眼的および組織学的に肝転移巣を計測した。コントロールの SH101-P4^{vector} および SH101-P4^{AGFP} の平均転移個数がそれぞれ 3.1、2.6 個であるのに比較して、*PRL-3* siRNA ベクター導入クローン SH101-P4^{APRL-3}-1 では、0.7 個と有意に平均転移個数の抑制が認められた。以上、本年度の研究から *PRL-3* は胃がん細胞の運動/浸潤能に関与し、転移巣の成立に極めて重要な役割を果たす可能性が示唆された。(横崎)

AFP や HCG、胎盤型 ALP 等の胎児型蛋白を産生し胃肝様腺がんや胃絨毛がん等の胚細胞型形質を有する胃がんは、早期から肝転移をきたし極めて予後不良であることが知られている。本年度はこれらの胃がんの診断や治療の標的となり得る遺伝子発現を探索した。AFP を産生する胃がん 4 例 (絨毛がん 1 例、部分的肝様腺がん 1 例、通常型 1 例、肝様腺がん培養細胞移植腫瘍 1 例) と AFP 産生を伴わない通常型胃がん 4 例を、Affimetrix 社の Gene Chip (U95Av2) (12,625 transcripts) を用いて網羅的遺

伝子発現解析を行った。遺伝子強発現シグナルを示す症例が、通常型胃がんで 1/4 以下かつ AFP 産生胃がん 3/4 以上とする条件でソートしたところ、MAGE-A3,6,12 の mRNA が極めて特異的に AFP 陽性胃がん群で強発現していることが判明した。そこで MAGE 蛋白 A の 1,2,3,4,6,10 および 12 を広く認識する抗 MAGE 抗体 6C1 (ヒト MAGE-1,2,3,4,6,10 および 12 と反応) を用い、55 例の外科切除胃がん (AFP を産生胃がん: 22 例、通常型胃がん 33 例) について MAGE 蛋白発現と、HCG や胎盤型 ALP 等の胎児性蛋白発現、そして臨床病理学的な関連を検討した。臨床病理学的には AFP 産生胃がんは AFP 非産生性通常型胃がん に比べ、有意に低分化充実型の組織像を呈する病変が多く、脈管侵襲の程度が高度であった。免疫染色による MAGE 蛋白発現の程度と、Gene Chip の MAGE 遺伝子発現の程度は極めて良く相関していた。外科切除胃がん材料にける検討では、MAGE 蛋白発現と AFP 産生能は極めて強く相関していたが、HCG 発現との関連はみられなかった。MAGE 蛋白は腫瘍拒絶抗原として働くことが知られており、胚細胞型形質を有する胃がんが免疫療法の重要な対象となり得ると同時に、静脈侵襲が高度で予後不良である胚細胞型形質発現を有する胃がんの新たなマーカーとしての有用性が判明した。特に AFP 産生胃がんにおける AFP の発現は、部分的かつ深部浸潤部分での発現が殆どであり、生検材料での同定は困難であるのに対し、MAGE 蛋白発現のそれは腫瘍にほぼびまん性に強発現しているパターンが主体を占め、生検標本でも同定が可能であり、この点でも有用なマーカーであるとみなされた。(遠藤)

AMN (N-Amyl-N-methylnitrosamine) をイニシエーター、TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) をプロモーターとする、ラット食道がん 2 段階発がんモデルを作製し、normal、papilloma、dysplasia、cancer 各段階の検体からレーザーマイクロディセクション (LMD) 法により微小病変を採取し、RNA 線形増幅 (T7 増幅) 法・DNA マイクロアレイ法を用いて、多段階発がん過程における遺伝子発現変化を包括的に検討した。雄の Wistar ラットを 10 匹ずつ 4 群 (Group 1、AMN 4 週投与; Group 2、AMN 6 週投与の後 TPA 8 週投与; Group 3、AMN 12 週投与の後 TPA 4 週投与; Group 4、コントロール) に分け計 40 匹について発がん物質の投与を行い、食道を摘出して病変の発生を肉眼的に確認した。摘出標本より組織標本作製し、papilloma、dysplasia、cancer の発生を確認した。次に、発がん各段階 3 例ずつの凍結切片を薄切し、LMD 法にて目的の細胞集団を採取、RNeasy mini kit を用いて Total RNA

を抽出した。更に T7 増幅法にて RNA をマイクロアレイ可能な量まで増幅した。なお、LMD サンプルおよび RNA サンプルの質の評価法を厳密に評価するため、3つの方法 (OD チェック、Nanoo drop 定量、定性法、Agilent Bioanalyser) による相互チェック法を確立し、これらの検定に合格したサンプルのみを用いることで、マイクロアレイ実験の精度が格段に向上した。T7 増幅まで終了したサンプル (normal~cancer: 計 12 サンプル) を用いてマイクロアレイをおこなった。コントロールには normal 3 サンプルの mix を用いた。その結果、解析不能スポットの極めて少ない綺麗なデータが得られた。全遺伝子を用いたクラスター解析の結果、正常上皮、がん、前がん病変がクラスタリングされた。同じクラスにクラスタリングされた papilloma と dysplasia については再現性を持って同様の結果が得られており、ラットにおいてはヒトと異なり、パピローマは前がん性の性格を持つ可能性が考えられた。これまでに、がん遺伝子として知られる *Cyclin D1* は正常上皮ではその遺伝子発現が低く、前がん病変でやや高く、がんで高発現している傾向を認めた。がんにおける高発現が報告されている *CDK4* についても同様の結果が得られた。また、がんの転移に関係すると報告されている遺伝子 *FAK* は、転移能を持たない前がん病変まではその遺伝子発現が低く、がんにおいてのみ高発現を認めた。現在さらに各段階の病変の変化に伴って発現が変化する遺伝子、また前がん病変にとどまる段階からがんが発生してくる段階において発現が変化する遺伝子に特に注目して、遺伝子発現パターンの変化を詳細に検討している。本年度の研究から、ラット食道がんモデルにおける各段階の病変特異的な遺伝子発現プロファイルが決定され、多段階発がん過程において重要な働きをすると思われる遺伝子が包括的に同定可能であった。(森)

これまでの研究で細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) が、胃がんの浸潤・転移に密接な関わりを持っていることを明らかにしてきたが、その発現亢進のメカニズムの詳細はわかっていない。そのメカニズムを明らかにし胃がんの浸潤・転移機構の分子病理学的機序の解明や悪性度診断への応用をはかる目的で cDNA アレイ解析を行い、多くの MMP のプロモーター領域に存在する PEA3 エlement (Ets 結合サイト) に結合する Ets ファミリー転写因子 E1AF/PEA3 (E1AF) の発現亢進を認めた。次に、100 例の胃がん手術摘出組織のがん部および隣接非がん部、10 例の胃がんの肝転移組織について E1AF、ER81、ERM、Ets-1、Ets-2、MMP-1、

MMP-2、MMP-3、マトリライシン (MMP-7)、MMP-9、MMP-13、MMP-14 の mRNA 発現を半定量的に検討した。E1AF の過剰発現は 100 例中 64 例に見られ、さらに、10 例の肝転移組織全例においてその発現を認めた。一方、隣接非がん組織における E1AF の発現は認めないか、ごく少数例でのみ非常に低レベルの発現を認めるのみであった。臨床病理学的因子との関連では、E1AF 発現とがんの深達度、リンパ管および脈管浸襲、リンパ節および遠隔転移、病理学的 TNM 病期、再発との相関を認めた。E1AF 発現陽性例は、陰性例に比べ、全生存期間、無再発生存期間ともに有意に短かった。単変量解析では、E1AF 発現、年齢、腫瘍径、分化度、深達度、リンパ節転移、遠隔転移、病理学的 TNM 病期、リンパ管および脈管浸襲が、全生存期間、無再発生存期間と相関する因子であった。多変量解析では、E1AF 発現と病理学的 TNM 病期のみが不良な予後と相関した。また、40 例で発現を検討した MMP-1、MMP-2、MMP-3、マトリライシン、MMP-9、MMP-13、MMP-14 の中で、マトリライシンの発現が E1AF 発現と有意な相関を示した。一方、ER81、ERM、Ets-1、Ets-2 の発現は MMP の発現と相関しなかった。次に、胃がん組織における E1AF、 β -カテニン、マトリライシンの発現を免疫組織化学的に検討したところ、E1AF の核内発現は、正常上皮細胞においては散在的に観察されるのみであったが、がん細胞では、正常細胞に比べ強く染色され、特に浸潤先進部のがん細胞において強発現を認めた。 β -カテニンの核内発現、マトリライシンの発現も、特に浸潤先進部のがん細胞において顕著で、両分子と E1AF 発現との間に有意な相関を認めた。マトリライシンの発現は、 β -カテニン発現に比べ、E1AF 発現とより強い相関を示した。さらに、MKN-45 胃がん細胞株にアンチセンス E1AF 遺伝子を導入したところ、導入クローン中 2 つに著明な E1AF 発現低下が認められ、これらではコントロールクローンおよび親株に比べ、マトリライシンの発現低下を認めた。一方、ER81、ERM、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13、MMP-14 の発現は、コントロールと比べ有意な差を認めなかった。著明な E1AF 発現低下のみられた 2 つのクロンの浸潤能は、コントロールクローンおよび親株に比べ、有意に抑制されていたが、MMP インヒビターである TIMP-1 により、浸潤能の差は消失した。以上より、Ets 関連転写因子 E1AF は、主にマトリライシンの発現誘導を介して胃がんの浸潤・転移に深く関与し、その発現検索は胃がんの悪性度診断に有益な情報を与えることが示された。(今井)

ヒト RUNX3 遺伝子は runt ドメインをもつ RUNX family に属する遺伝子の一つであり、近年ヒト胃組織をはじめ様々な組織において正常上皮と比較してがん細胞において、DNA メチル化によりその mRNA 発現低下が報告されている。従って、RUNX3 蛋白はがん抑制因子と考えられることから、RUNX3 蛋白陰性胃がんに対し、RUNX3 発現ベクター導入が有効な治療となる可能性がある。そこで、ヒト細胞に感染可能な RUNX3 発現組換えアデノウイルスベクターを作製し、ヒト胃がん細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討した。作製したベクターは、ヒト胃がん細胞株 MKN-28 に対し 50MOI (multiplicity of infection) で高率に感染し、RUNX3 蛋白の過剰発現を確認した。ウエスタンブロット解析の結果、45kD 付近に 2 本のバンドが検出された。この 2 種類の蛋白は、ウイルスベクターに組み込んだ cDNA から alternative translation initiation により発現することが示された。RUNX3 発現ベクター導入 MKN-28 細胞は、コントロールベクター導入 MKN-28 細胞と比較しその増殖が抑制され、胃がん細胞に対し RUNX3 蛋白発現が増殖抑制効果を示すことを示唆した。この効果を細胞周期停止およびアポトーシス誘導の両面から検索した結果、感染 72 時間後ではフローサイトメトリー解析にて G2/M 期停止が示された。一方、DNA ラダー形成およびヘキスト染色による形態学的解析では、アポトーシスは観察されなかった。以上より、作製した RUNX3 発現組換えアデノウイルスベクターは、ヒト胃がん細胞 MKN-28 に感染し RUNX3 蛋白を発現して G2/M 期停止により増殖抑制効果を示すが、アポトーシスは誘導されないことが示された。(井藤)

昨年度までにヒト胃低分化腺がん切除標本 12 例のがん部および非腫瘍部から抽出した蛋白のプロテオーム解析によりがん部において発現量が低下する蛋白 MAD1 (Mitotic arrest deficient 1) を同定した。本年度はヒト胃における MAD1 発現異常を解析するため、胃がん細胞 7 株 (MKN-1, -7, -28, -45, -74, TMK-1, KATO-III) における発現をウエスタンブロットにて、また胃組織 (胃がん切除標本 75 例、胃腺腫 EMR 標本 16 例) における発現を免疫組織化学にて検索した。ヒト胃がん細胞株における MAD1 発現は、7 株中 5 株 (MKN-7, -45, -74, TMK-1, KATO-III) で陽性であったが、その発現量はコントロールに用いた β -アクチンと比較し微弱であった。MAD1 はヒト正常胃粘膜では、増殖帯から表層の上皮細胞と腺頸部の一部の細胞質に発現しており、被覆上皮においては核上部に、他方増殖帯および腺頸部における免疫活性

は細胞質全体に観察された。胃腸上皮化生および胃腺腫においても発現していたが、正常胃粘膜の被覆上皮におけるそれと同様に、局在は核上部に一致していた。がん細胞においては、MAD1 陽性細胞数は減少しており、陽性細胞は瀰漫性に存在し、細胞内における局在は細胞質全体であった。即ち、腺腫と腺がんでは MAD1 蛋白の細胞内局在が異なっており、局在の違いと腫瘍の良悪の関連性が示唆された。胃腫瘍細胞における MAD1 陽性細胞率を算出し、10%以上を陽性例、他方 10%未満を陰性例としたところ、胃腺腫における陽性例は 16 例中 9 例 (56.3%)、胃がんにおける陽性例は 75 例中 30 例 (40.0%) であり、前者と比べて後者における陽性例が減少していた。進行度および組織別での陽性例を比較検討した結果、早期がんで 27 例中 14 例 (51.9%)、進行がんで 48 例中 16 例 (33.3%)、一方、腸型で 40 例中 13 例 (32.5%)、胃型で 35 例中 17 例 (48.6%) であり、早期がんと比較し進行がんで、また胃型と比較し腸型で MAD1 発現が減少することが示唆された。MAD1 蛋白発現は、低分化腺がんのみならず高分化型腺がんにおいても低下していることが示された。さらに、MAD1 発現と胃がん細胞の増殖活性との関わりを検索した結果、MAD1 陽性例における Ki-67 標識率 (%) は 43.0 ± 1.62 、一方、陰性例では 44.4 ± 1.45 であり、後者で高値を示したが統計学的有意差はなかった。(井藤)

昨年度までに完成した組織型や進行度の異なる 5 種類の胃がん組織 SAGE ライブラリー(GEO accession no. GSE545)の検討から、胃がんの発生・進展に関与する多くの遺伝子を同定してきたが、本年度はがんの特異的に発現し且つ悪性度に関連する新規遺伝子を同定する目的で、まず、個々の胃がんと NCBI のデータベース中の主要な 12 の正常臓器における SAGE ライブラリーを比較し、約 200 の候補遺伝子をリストアップした。これらについて、実際の正常臓器(心臓、肺、肝臓、脳など 14 臓器)と 9 例の胃がんにおける遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により、がん特異的に発現する遺伝子かどうかのスクリーニングを行っている。現在までに、約 80 遺伝子の発現解析が終了し、少なくとも 8 種類のがん特異的発現遺伝子を同定した。その内、MIA (melanoma inhibitory activity)と GW112 について、さらに、検討を進めた。MIA は、メラノーマ細胞から分泌される蛋白として同定されたものであり、メラノーマの悪性度と関連し、細胞の浸潤能の亢進、アポトーシスの抑制作用が確認されている。胃がんについての定量的 RT-PCR では、stage I/II に比較して stage III/IV で有意に発現レベルが高く、

免疫染色でも stage III/IV で陽性症例が有意に多かった。さらに、MIA 陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であった。ELISA にて測定した MIA 値は、stage IV の胃がん症例の血清および腹膜播種症例の腹腔洗浄液で高値であった。尚、MIA の発現は、HMGB1/amphoterin によって制御されるが、一方、HMGB1/amphoterin は RAGE (receptor for advanced glycation end-products)のリガンドとしても知られている。胃がんにおける RAGE の発現は、深達度、転移と関連し、胃がん細胞株を RAGE アンチセンスで処理することにより、細胞浸潤が抑制されることを確認した。次に、GW112 は骨髄芽球からクローニングされた遺伝子であり、最近、アポトーシスの抑制作用を有すること、強制発現により腫瘍増殖に関与することが明らかにされた。遺伝子配列から分泌蛋白をコードする可能性が示唆されている。定量的 RT-PCR による検討で、正常の小腸、大腸、膵臓などで極めて低いレベルで発現しているのみであり、胃がんでは 58% (29/50) において過剰発現していることがわかった。さらに、stage I/II に比較して stage III/IV で有意に発現レベルが高かった。以上、MIA と GW112 は共通して、1) 生存に重要な正常臓器には発現は殆どないこと、2) 胃がんではステージの進んだ症例で高発現を示すこと、3) アポトーシスの抑制をはじめがん化の過程に関与する可能性のあること、4) 分泌蛋白をコードすること、という特徴を有していることが明らかとなった。従って、これらは、生検診断、血清診断を問わず胃がんの悪性度の新しいマーカーであるとともに、治療標的にもなり得るものと考えられた。(中山)

胃がんにおいて DNA メチル化によって不活化される遺伝子としては、p16INK4a、hMLH1、MGMT、E-cadherin、RASSF1 などが知られており、細胞周期の制御異常や遺伝子不安定性などを介してがん化に関与している。また、高頻度に CpG アイランドにメチル化が起きるがん形質があり、CpG island methylator phenotype (CIMP)と呼ばれている。そこで、胃がん 75 症例および 10 例の若年健常者胃粘膜において、hMLH1、MGMT、p16、CDH1、RAR-beta、HLTF、RIZ1、TM、FLNC、LOX、HRASLS、HAND1 の 12 遺伝子のメチル化を検討し、遺伝子発現、臨床病理学的所見および CIMP との関連を解析した。メチル化の頻度は、10.7% (hMLH1) から 66.7% (RIZ1) と遺伝子によって異なっており、50%以上にメチル化のみられたものは、RIZ1 の他、CDH1、RAR-beta、HLTF であった。殆ど (74/75) の胃がんにおいて少なくとも 1 遺伝子にメチル化が認められ、1 症例当たり平均 4.83 遺

伝子にメチル化が存在した。いずれの遺伝子もメチル化と発現抑制との間に有意な関連が確認された。若年健常者胃粘膜にはいずれの遺伝子にもメチル化は認められなかった。12 遺伝子中 5 遺伝子以上にメチル化のあった症例（高メチル化群）は 39 例（52%）、CIMP 陽性は 29 例（37.8%）であった。CIMP と臨床病理学的事項との間に有意な相関は認められなかったが、高メチル化群の出現は、深達度、リンパ節転移およびステージの進行と有意に相関していた。以上より、DNA メチル化の蓄積はがんの進行・進展に関連するものであり、悪性度のよいマーカーになると考えられた。（中山）

班友の大賀は食道癌の術前温熱化学療法、化学放射線療法症例における著効例の選別のため、術前生検検体に対する p53 および p21 免疫組織化学を施行し、p53(-)p21(+)症例全例が術前温熱化学放射線療法の治療感受性 grade 3 を示すことを明らかにした。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に該当するものは、三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 13 年 3 月）を遵守し、研究分担各施設におけるヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認の下に実施しており、遺伝子発現解析においても指針の趣旨を踏まえた対応を行っている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Nakaji, M., Yokozaki, H., et al., IFN-alpha prevents the growth of pre-neoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat. *Carcinogenesis*, 25:389-397, 2004.
2. Yano, Y., Yokozaki, H., et al., Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett.*, 207:139-147, 2004.
3. Miskad, U.A., Yokozaki, H., et al., Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology*, 71:176-184, 2004.
4. Wu, M., Yokozaki, H., et al., Molecular pathological analysis of mucinous adenocarcinomas of the stomach. *Pathobiology*, 71:201-210, 2004.
5. Kato, H., Yokozaki, H., et al., High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin. Cancer Res.*, 10:7318-7328, 2004.
6. Wu, M., Yokozaki, H., et al., *BRAF/K-ras* mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of *hMLH1/MGMT* in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer*, 7:246-253, 2004.
7. Miyamoto, S., Endoh, Y., et al., Nuclear beta-catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncol. Rep.*, 12:245-251, 2004.
8. Goya, M., Endoh, Y., et al., Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors. *Cancer Res.*, 64:6252-6258, 2004.
9. Tsuta, K., Endoh, Y., et al., Primary lung carcinoma with signet-ring cell carcinoma components: clinicopathological analysis of 39 cases. *Am. J. Surg. Pathol.*, 28:868-874, 2004.
10. Miyamoto, S., Endoh, Y., et al., Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.*, 64:665-671, 2004.
11. Mimori, K., Mori, M., et al., Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann. Oncol.*, 15:236-241, 2004.
12. Yamaguchi, H., Mori, M., et al., Identification of HLA-A24-restricted Cytotoxic T lymphocyte epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor Immune response. *Clin. Cancer Res.*, 10:890-896, 2004.
13. Yamashita, K., Mori, M., et al., Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 110:201-207, 2004.
14. Ishii, H., Mori, M., et al., Effect of exogenous E2F-1 on the expression of common chromosome fragile site genes, *FHIT* and *WWOX*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316:1088-1093, 2004.
15. Ogawa, K., Mori, M., et al., Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal

- carcinoma. *Br. J. Cancer*, 91:282-286, 2004.
16. Mimori, K., Mori, M., et al., Prediction of 5'-deoxy-5-fluorouridine sensitivity in colorectal cancer cases by thymidine phosphorylase activity and preliminary identification of susceptibility related genes. *Oncol. Rep.*, 12:19-23, 2004.
17. Yoshinaga, K., Mori, M., et al., N-cadherin is regulated by activin A and is associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10:5702-5707, 2004.
18. Haraguchi, N., Mori, M., et al., Analysis of gastric cancer with cDNA microarray. *Cancer Chemoth. Pharm.*, 54:S21-S24, 2004.
19. Mimori, K., Mori, M., et al., Coexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10:8243-8249, 2004.
20. Nishida, K., Mori, M., et al., Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray. *Cancer Res.*, 65:401-409, 2005.
21. Yamamoto, H., Imai, K., et al., Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25:325-332, 2004.
22. Satoh, A., Imai, K., et al., Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene*, 23:8876-8886, 2004.
23. Ueno, M., Imai, K., et al., Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumour Biol.*, 25:134-140, 2004.
24. Adachi, M., Imai, K., et al., Synergistic effect of histone deacetylase inhibitors FK228 and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide with proteasome inhibitors PSI and PS-341 against gastrointestinal adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 10:3853-3862, 2004.
25. Yamamoto, H., Imai, K., et al., Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 25:2353-2360, 2004.
26. Zhang, Y., Imai, K., et al., Histone deacetylase inhibitors FK228, N-(2-aminophenyl)-4-[N-(pyridin-3-yl-methoxycarbonyl) amino-methyl]benzamide and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide augment radiation-induced cell death in gastrointestinal adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 110:301-308, 2004.
27. Min, Y., Imai, K., et al., Insulin-like growth factor-I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut*, in press.
28. Osaki, M., Ito, H., et al., Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130:8-14, 2004.
29. Kawaguchi, K., Ito, H., et al., Fhit expression in human gastric adenomas and intramucosal carcinomas: correlation with Mlh1 expression and gastric phenotype. *Br. J. Cancer*, 90:672-677, 2004.
30. Honjo, S., Ito, H., et al., Cyclooxygenase-2 expression in human gastric tubular adenomas and carcinomas; correlation with intratumoral microvessel density and apoptotic index. *Anticancer Res.*, 24:1439-1444, 2004.
31. Osaki, M., Ito, H., et al., Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. *Eur. J. Clin. Invest.*, 34:605-612, 2004.
32. Honjo, S., Ito, H., et al., COX-2 correlates with F-box protein, Skp2 expression and prognosis in human gastric carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 26:353-360, 2005.
33. Oue, N., Nakayama, H., et al., Gene expression profile of gastric carcinoma: Identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res.*, 64:2397-2405, 2004.
34. Kondo, T., Nakayama, H., et al., Expression of *POT1* is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 64:523-529, 2004.
35. Nakayama, H., et al., Lack of vascular adventitial fibroblastic cells in tumor stroma of intestinal-type and solid-type gastric carcinomas. *J. Clin. Pathol.*, 57:183-185, 2004.
36. Toh, Y., Ohga, T., et al., Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relation to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 110:362-367, 2004.