

16 - 16 生検組織を用いた消化器がん・肺がんの治療感受性予知法および治療効果判定法の確立に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 落 合 淳 志

研究成果の要旨

本研究の目的は、生検組織を対象にした病理形態学的情報・ゲノム情報・遺伝子発現情報・タンパク情報の採取における問題点を明らかにし、生検組織からの情報取得技術の確立と、生検組織からの情報を基にしたがん治療の感受性予知及び効果判定に有効な新しい病理診断学の確立を目指すものである。本年度の研究成果として以下のことを明らかにした。1) ヒト生検組織を用いた治療法の選択や抗がん剤感受性の予知の可能性を示した。2) ゲノムワイドな遺伝子発現解析を用いた治療感受性予知を検討し、外科手術材料と比べ生検組織のみ発現する遺伝子クラスターの存在を明らかにした。また、SAGE データを基盤に作製したオリゴヌクレオチドアレイを用い、胃がんの薬剤感受性を評価する系の確立を試みた。3) 肺内分泌細胞がんの発現タンパク質のプロファイリングを行い、従来の方法で同定困難な高分子量タンパク質にたいする抗体の作製を行った。4) 22G, 23G という極細生検針からの RNA 採取法の確立を試みた。

研究者名および所属施設

分担研究課題

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
落 合 淳 志	国立がんセンター研究所支所 部長	生検組織を用いた治療感受性予知法
佐々木博己	国立がんセンター研究所 室長	各種生検組織の分子生物学的多様性に基づく遺伝子診断法の至適化技術の開発
佐 藤 雄 一	北里大学医療衛生学部 助教授	生検組織を用いたプロテオーム解析による治療関連分子の解析のための検討
大 上 直 秀	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助手	SAGE-based microarray を用いた微小検体の遺伝子発現解析と薬剤感受性の評価
宇 都 宮 徹	九州大学大学院別府先進医療センター 講師	肝細胞がん術前の非癌部肝生検による肝障害度の評価および残肝再発の予測
西 堀 英 樹	慶応大学医学部 助手	直腸がんに対する術前補助療法における感受性予測法の確立
松 村 晃 秀	国立病院近畿中央胸部疾患センター 医長	非小細胞肺がん切除後再発の遺伝子異常と EGFR TKI (イレッサ) の臨床効果の相関
寺 田 隆 介	国立病院長崎医療センター 医師	食道がん生検組織からの放射線化学療法感受性予知法

総括研究報告

1 研究目的

がん患者から採取される生検組織から得られる信頼できる情報は個人化医療の確立のために重要である。生検組織は微小検体であり、このため微小検体からの様々な情報採取技術の確立が必須である。本研究の目的は生検組織を対象にした病理形態学的情報、ゲノム情報、遺伝子発現情報、タンパク情報の採取における問題点を明らかにし、生検組織からの情報取得技術の確立を目指す。そして、生検組織からの情報を基にしたがん治療の感受性予知及び効果判定に有効な新しい病理診断学の確立基礎となる研究成果及び現在までの研究状況の概要を目指すものである。

2 研究成果

本年度の研究成果として以下のことを検討し明らかにした。

2-1 生検組織を対象にした遺伝子情報や蛋白発現情報を明らかにする目的で、今年度は胃がん、肺がんおよび大腸がんの薬剤治療効果判定に関わる分子の評価について検討した。

受容体チロシンキナーゼ c-erbB2 は乳がんにおいて遺伝子増幅しがん細胞表面の遺伝子産物の発現評価は、抗 c-erbB2 蛋白抗体治療の感受性を決めるために重要であることが知られており、実際の臨床において、現在生検組織を用いた治療法選択のために用いられている。この c-erbB2 蛋白はこれまでに胃がん、特に分化型胃がんにおいて乳がんと同様に遺伝子増幅を来し発現量が多いことが知られている。今年度は胃がん症例における生検組織を用いた免疫組織化学的染色および FISH 法による遺伝子増幅の検索が、実際の手術材料における免疫組織化学染色評価ならびに FISH 法による遺伝子増幅評価とどの程度同じになるかを検索した。胃がん（200 例）の生検・手術材料を用いて、c-erbB2 蛋白発現と FISH 法による遺伝子増幅の程度を検討した。生検組織と手術材料における c-erbB2 の評価は免疫染色では一致率 88.5%、FISH 法による一致率は 62.2%であった。また、FISH 法と免疫染色による一致率は 86.9%であり、これらの結果は胃がんにおける生検組織を用いた c-erbB-2 評価における免疫染色および遺伝子増幅でも可能であることが示された。

非小細胞性肺がん（72 例）の化学療法の治療効果予測に

5 種類の ABC トランスポーター分子の発現を検討した。検索した 5 種類の ABC トランスポーターは抗がん剤の細胞内から細胞外への移送により抗がん剤耐性を来すことがこれまでに示されている。72 症例の抗がん剤治療後肺がん症例を用いて、5 種類の ABC トランスポーター（Pgp(P-glycoprotein), MRP1, MRP2, MRP3, BCRP(breast cancer resistant gene)）の発現を免疫組織化学染色により検索し、抗がん剤耐性について検討を行った。用いた症例はいずれも CDDP を基礎にした 5 種類（VNR, DOC, CPT, GEM, PTX）の化学療法が行われており、組織型は腺がん 50 症例、扁平上皮がん 18 症例、他の非小細胞肺がん 4 症例であった。発現率では Pgp は腺がんが扁平上皮がんに比べ有意に発現が高かったが、その他の ABC トランスポーターでは発現率に変化は認められなかった。ABC トランスポーターの発現と患者生存期間の関係では単変量解析により MRP2 および BCRP 発現の高い症例が有意に生存期間の短縮が認められた。多変量解析を行ったところ、BCRP 発現のみが有意に独立した治療予測因子としての意義が存在することが示された。治療法による層別化によれば VNR+CDDP および CPT + CDDP の組み合わせにより BCRP の発現が治療法感受性と相関することが示されたことより、今後肺がんを用いる抗がん剤の選択が生検組織を用いて選別することが可能になると考えられた。

2-2 ゲノムワイドな遺伝子発現解析に基づく生検組織を用いた治療感受性予知を明らかにする目的で、食道がんの生検と外科的手術材料のマイクロアレイデータを比較することにより、治療前診断に必要な生検組織の遺伝子発現が手術材料の遺伝子発現同じかを検討した。食道がん、胃がんのゲノムワイド発現解析に基づく内視鏡切除サンプルによる遺伝子診断へ向けたサンプルの評価法の確立を目指し、マイクロアレイ解析によって得た食道扁平上皮がんの生検 35 症例と外科的切除サンプル 70 症例の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。対象となる遺伝子は約 12,000 種であり、105 症例中 1 症例でも発現が認められる遺伝子は、3,148 種であった。これらの遺伝子で unsupervised cluster 解析を行ったところ、全生検 35 症例のうち 29 症例（83%）が同一のクラスターに分類された。このデータは、生検と外科的切除サンプルの発現プロファイルは大きく異なることを示す。さらに、生検と外科的切除サンプルで大きく発現量が異なる遺伝子を t 検定で p 値が 0.01 以下となる条件で抽出し、さらに random permutation test を行い確実に両サンプル群間で発現量に隔りのあるものを選抜した結果、1,362 遺

伝子であった。検出可能な遺伝子のうち 43% (1362 / 3148) もが、両群で大きく発現量が異なることを示している。特に、外科的切除サンプルで発現が高いものが 80% 以上も占めていた。外科的切除サンプルが生検に比べ、がんの先深部を多く含むことを考慮する必要がある。実際に、外科的切除サンプルで発現が亢進している遺伝子には、炎症性サイトカインや増殖因子およびそれらの受容体が目立つ。したがって、それらシグナル伝達の下流の遺伝子も活性化され、結果として検出可能な遺伝子のうち 43% (1362 / 3148) もが、両群で大きく発現量が異なるものと考えることができる。以上の検討より、放射線化学療法、放射線化学療法後サルベージ手術、外科的切除、外科的切除後化学療法など食道がんの治療方針を決定するにあたって、いずれの場合も生検サンプルは採取される。前の 2 者の奏功性や予後を予測する場合は、生検によって調べることが決定される。しかし、後の 2 者の予後を予測する場合、生検と外科的切除サンプルが解析対象となる。今回のデータは、どんな治療においても、生検で発現プロファイルをとる方が治療前の診断では無難であることを示唆する。リンパ節転移のポテンシャルを予測する場合、これまですべて外科的切除サンプルで行われて来た。この場合、今回リストアップされた 1362 遺伝子の情報はほぼ無駄になっているものと考えられた。

2-3 SAGE 法および、そのデータを基盤に作製した cDNA microarray を用いて、胃がんを含む多種類のがんの遺伝子発現を包括的に解析し、がんの薬剤感受性を評価する系を確立することを当初の目的とした。胃がん 5 サンプルを SAGE 法で解析した結果、Taxol resistance-associated gene-3 (TRAG3) が胃がんを高発現していることが明らかとなった。TRAG3 は Taxol 抵抗性の卵巣がん細胞株より、ディファレンシャルディスプレイ法により、Taxol 抵抗性の卵巣がん細胞株で高発現している分子として同定されたものである。しかし、その後、TRAG3 そのものではなく、その近傍の MAGE 遺伝子群の発現が Paclitaxel 等の微小管重合阻害剤の耐性に関与していることが報告された。そこで、タキサン系抗がん剤の感受性が明らかとなっている胃がん 40 例 (切除材料 23 例、生検材料 17 例) を対象に MAGE-A1 遺伝子の発現を免疫染色で解析するとともに、MAGE-A1 の DNA メチル化の有無を Methylation-specific PCR (MSP) 法で解析した。その結果、MAGE-A1 の発現は 4 例 (10%) に見い出された。胃がんにおいては、MAGE-A1 は腫瘍組織全

体に染色される傾向にあった。MAGE-A1 遺伝子の発現が認められた 4 例は、すべて Progressive disease (PD) であり、No change (NC) と Partial response (PR) では MAGE-A1 の発現は全く認められなかった ($P=0.0230$)。MAGE-A1 の DNA 脱メチル化は 10 例 (25%) に見られ、DNA の脱メチル化と発現には有意な関連 ($P=0.0023$) が認められた。しかし DNA メチル化と薬剤感受性に明らかな関連は見い出されなかった。さらに、同一サンプルで、タキサン系抗がん剤の感受性と関連が報告されている CHFR の DNA メチル化についても検討を行った。CHFR が DNA メチル化により不活化されていると、Paclitaxel 等の微小管重合阻害剤処理により、アポトーシスが誘導されることが知られている。CHFR の DNA メチル化が見い出された 12 例のうち 5 例が PD、7 例が NC または PR であり、統計学的有意差は認められなかった ($P=0.7201$)。40 例のうち、12 例については mRNA が利用可能であり、CHFR の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で検討した。非腫瘍部の CHFR の発現と比較し、腫瘍部の発現が半分以下のものを発現低下と定義すると、12 例中 3 例 (25%) に CHFR の発現低下を認めた。CHFR の発現低下を認めた 3 例はすべて CHFR の DNA メチル化が検出され、統計学的にも有意であった ($P=0.0182$)。以上から、MAGE-A1 の発現はタキサン系抗がん剤の抵抗性を予知しうる、有用なマーカーであると考えられ、現在生検材料についてさらに検討を進めている。一方、SAGE 法を用いた解析から、胃がんを高発現している分子として、Reg IV をわれわれは同定している。Reg IV はディファレンシャルディスプレイ法を用いた解析から、5FU 耐性の細胞株で高発現している遺伝子としても同定されている。われわれはリコンビナント Reg IV を作成し、Reg IV に対するラビットポリクローナル抗体を作成した。本抗体を用いて、5FU の感受性が明らかになっている胃がん 26 例を材料に Reg IV の発現を免疫染色法で解析した。Reg IV は分化型胃がんのゴブレット、クロモグラニン A 陽性の腫瘍細胞、印環細胞がん等で染色された。Reg IV の発現は 6 例に認められ、その 6 例はすべて PD であり、NC と PR では Reg IV の発現は全く認められなかった ($P=0.0237$)。われわれのこれまでの解析で、Reg IV は腸型形質を有する胃がんを高発現しているという知見を得ている。腸型形質を有する胃がんは 5FU の耐性遺伝子の 1 つである thymidylate synthetase が高発現していることが知られており、Reg IV の高発現と 5FU 耐性が統計学的に関連していたことが、原因であるのか、結果であるのかは現時点では不明である。現在、胃がん細胞株に Reg IV を導入し、5FU の耐性

の変化について検討を進めている。また、生検材料についても免疫染色を行っており、生検材料から 5FU の感受性を予測しうるか否かにつき、検討を進めている。

2-4 肺がんの中でも特に予後不良な神経内分泌がん、小細胞がん (SCLC) と大細胞性神経内分泌がん (LCNEC) に関して、SCLC、LCNEC の腫瘍細胞と特異的に反応する抗体を網羅的に作製し、これら腫瘍の予後推定因子となり、生検材料でも有用な抗体を選定する。これに関しては、現在まで 490 個の単クローン性抗体をすでに作製。検索の終了している 315 抗体のうち、免疫源に用いた腫瘍細胞の AMeX 固定標本と免疫染色で反応する抗体は 148 個、免疫染色では陰性であるが、ドットプロット法でマウスの抗体価が上昇しているとしたもの 237 個で、これらの中には両方陽性であったものが 70 個含まれている。免疫染色陽性であった 148 抗体 (全抗体の 47%) の染色態度を見ると、細胞質 87 個 (58.8%)、細胞膜 33 個 (22.3%)、核 13 個、分泌物 6 個、核膜 5 個、核小体 1 個、その他 3 個であった。免疫染色されない抗体でも、その全てが癌患者の血清や腫瘍細胞の lysate と反応した。また、免疫プロット法が可能な抗体は途中ではあるが 167 個中 48 個 (29%) であった。現在、肺がん患者血清との反応性、外科的に摘出された AMeX 固定肺がん組織、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織との反応性を将来の生検組織での検討に応用すべく、φ1mm 系の組織マイクロアレイを作製し、染色している。AMeX アレイでは、幾つかの抗体で非腫瘍性肺組織では染色性は見られないが、各種肺がん細胞との反応性が見られるもの、小細胞がん細胞とのみ反応しているものなど様々であった。さらに、詳細に検討していく。2 次元電気泳動法 (2-DE) を用いた、肺がんの進展、治療の感受性に関与する分子の同定と、生検材料で行うべく、少量の蛋白で出来る 2-DE 法の開発を行う。これに関しては、アガロースを等電点電気泳動法に用いる agarose 2-DE 法で、小細胞がん (SCLC) 細胞株 N231 と大細胞性神経内分泌がん (LCNEC) 細胞株 LCN1 を用いて、発現タンパク質のプロファイリングを行い、300 のタンパク質の同定を行った。この中には従来の方法では困難であった転写調節因子が約 1/3 含まれていた。また、30 の両方で発現量に相違のあるタンパク質、報告されている分子量と異なる大きさのタンパク質が 39 個含まれている。抗体等を用いてさらに検討する。LCNEC の細胞株 LCN1 は浮遊状態で集塊をなして増殖する。この細胞株を collagen type I ディッシュで飼うと、細胞がバラバラになり底に接着し、突起を伸ばしながら増殖する。また、

labeling index も上昇する。両者を比較することにより、浸潤・転移に関与する分子が獲得できる可能性があり、agarose 2-DE 法で検討した。現在まで、浸潤・転移との関連性が報告されている DDH1, DDH3, AKR1B10 等の aldo-keto reductase 群の分子、PCNA, 14-3-3ε などの増殖関連分子、転写因子の EF-2 などであった。この方法で、LCNEC の浸潤・転移に関連した分子がさらに取れる可能性があり、進めていく。さらに現在、ミニゲルを用いた agarose 2-DE 法、従来のイモビラインを用いた 2-DE 法を検討し始めた。ミニゲルでも大型ゲルと同様のスポットが得られている。少量のタンパク質での検討が可能な 2-DE 法を開発する。

2-5 22G, 23G などの細径肝生検針にて低侵襲下に採取した非がん部肝組織の網羅的遺伝子解析を行うことを目的とし、その解析結果をもとに今年度は、(1) 正確で客観性のある肝障害度の分子遺伝学的評価法を確立し、(2) 多中心性発性肝がんのリスク予測を試みた。肝障害度の評価: ラット肝硬変モデルを用いた基礎的検討を行った。14,814 遺伝子を搭載したラット CDNA マイクロアレイにて肝線維化関連遺伝子を同定し、SUPERVISED LERNING 法を用いて遺伝子発現パターンに基づく肝線維化の程度のスコア化に成功した。実証のため肝がん切除症例の非がん肝組織を対象に DNA マイクロアレイにて解析を行い、従来の肝機能検査と HF 値との相関をみると IV 型コラーゲンが相関係数 0.65 と最も良かった。次いで ICGR15 値が相関係数 0.53 と良好であった。一方、肝線維化関連遺伝子を同定し 27 遺伝子の発現パターンにより GF 値を求めた。GF 値との相関係数は 0.95 であり、従来のどの肝機能検査よりも正確に肝線維化の程度を評価できることが明らかとなった。

肝がん多中心性発生の予測: MC 群: 12 例と SN 群: 28 例の間で肝機能や腫瘍因子などの臨床病理学的因子に有意差を認めなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、多中心性発生を示す MC 群で有意に ($P < 0.05$) 高発現する 101 遺伝子と低発現する 129 遺伝子を同定した。これら 230 遺伝子を用いてクラスター解析を行ったところ 4 つの大きなクラスターに分類され、MC 群の全例がクラスター III およびクラスター IV に属していた。また、残肝再発を示した 15 例中 9 例 (60%) はクラスター III に属しており、有意に ($P < 0.05$) クラスター III が他のクラスターと比べ残肝再発のリスクが高かった。次に、残肝再発を示した 15 例と認めない 25 例の遺伝子発現の違いを同様に DNA マイクロアレイにて解析を行った結果、残肝再発群

で有意に($P<0.05$)高発現する 420 遺伝子と低発現する 107 遺伝子を同定した。そこで上記 230 遺伝子とこれら 527 遺伝子で共通する 36 遺伝子を選択し、WEIGHT VOTING 法を用いて肝がん多中心性発生の予測のスコア化を試みた。GROUP A: SN 群で残肝再発無し($N=21$)、GROUP B: SN 群で残肝再発あり($N=7$)、GROUP C: MC 群で残肝再発無し($N=4$)、GROUP D: MC 群で残肝再発あり($N=8$)の 4 群に分けてスコアを比較したところ、GROUP A: -11.8 ± 12.7 、GROUP D: 19.9 ± 9.2 であり、有意に($P<0.05$)GROUP D がハイスコアを示した。GROUP B と GROUP C はその中間のスコアを示した。さらに 10 ポイントを閾値と設定した場合、GROUP A の全例が 10 ポイント以下、GROUP D の全例が 10 ポイント以上であり極めて良好な分離能を示した。したがって、非がん部肝組織の遺伝子発現パターンを解析し、本スコアが 10 ポイント以上の症例では仮に局所根治術が施行し得た場合でも嚴重な残肝の経過観察が必要であると考えられた。また、これらのスコアは C 型慢性肝炎患者の肝発がんリスク予測にも有用であると期待される。細径針にて採取した微量肝組織による評価: 22G, 23G という極細肝生検針にて、それぞれ 4.9 ± 0.9 MG, 3.4 ± 0.5 MG の TOTAL RNA を抽出可能であった。同一症例から切除肝組織とこれらの生検針を用いた微量肝組織を 17,000 遺伝子搭載のオリゴアレイ (0.2-0.5 MG の TOTAL RNA で解析可能)にて解析した結果、採取法に拘わらず同一症例は一つのクラスターに集まり、互いに極めて良い一致率を示した (相関係数: 0.98)。したがって、我々が確立した分子遺伝学的肝障害度評価法や多中心性発肝がんのリスク予測は、極細肝生検針にて得た微量肝組織でも評価可能と考えられた。

2-6 5-fluorouracil (5-FU)は、大腸がん化学療法の中心的な位置を占めている。近年、新規抗がん剤である irinotecan (CPT-11)や oxaliplatin (I-OHP)の導入に伴い、これらの抗がん剤との併用療法が多用され、消化器がん化学療法は新展開を見せている。しかし、これら併用療法においても 5-FU はいまだ重要な位置を占める key drug である。今回は、5-FU の治療効果を予測するため、進行大腸がんの臨床検体を用いて抗がん剤感受性試験を行い、5-FU 感受性と耐性遺伝子発現との関連を検討した。2000 年 9 月から 2001 年 10 月までに written informed consent を得た上で手術が施行された進行大腸がん 88 症例 (男性 55 例、女性 33 例、年齢中央値 63 (30-90)歳)を対象とした。88 症例全例で MTT assay 判定可能で、5-FU 感受性陽性症例は 10 例 (11.3%)であった。5-FU

感受性と各遺伝子発現との関連を検討すると、5-FU 感受性は、es-NT, DPD, E2F, TP と推計学的に有意な負の相関が認められた。しかしながら、TS との間には相関は認められなかった。次に ROC curve の解析により各遺伝子のカットオフ値を求め 5-FU 感受性との関係を検討した。その結果、es-NT mRNA レベルの cut-off 値を 6×10^{-4} とすると、5-FU 感受性予測に対する感度は 90%、特異度は 73%、正診率は 75%であった。同様に DPD mRNA レベルのカットオフ値を 4×10^{-4} とすると、感度は 80%、特異度は 74%、正診率は 76%であった。しかし、TP と TS においては、十分な感度、特異度を示すカットオフ値は得られなかった。5-FU の標的酵素である TS と分解酵素である DPD は、5-FU の抗腫瘍効果や耐性化に影響を与える因子として報告されている。今回の結果からは、5-FU の律速分解酵素 DPD と膜輸送蛋白 es-NT は、大腸がんの 5-FU 感受性を制御しており、5-FU の感受性予測因子となる可能性が示唆された。しかし、TS の 5-FU 感受性予測因子としての可能性は否定的であった。また胃がんの術前内視鏡下生検材料と手術切除材料を用いた検討でも、DPD では手術材料での酵素活性および生検材料での発現量ともに 5-FU 耐性との有意な相関を認めたが、TS では有意な相関は示されなかった。さらに生検材料での DPD 発現量は手術材料での DPD 酵素活性および発現量とも有意に相関することが示され、生検材料を用いた DPD 発現量測定の有用性も明らかにされた。一方、今回新たに es-NT が 5-FU 耐性に関与する可能性が示されたが、その機序のひとつとして、es-NT が細胞膜外に存在する thymidine の細胞内流入による局所的な thymidine rescue を起こし、ternary complex による DNA 合成阻害効果を減弱する可能性が考えられる。他には es-NT により 5-FU の活性代謝産物である fluorouridine, fluorodeoxyuridine が細胞外へ排出され、5-FU の効果が減弱する可能性も考えられる。新鮮凍結標本を用いた real-time RT-PCR 法による mRNA 定量は、より簡便であり、一般臨床への応用も可能である。今後は、直腸がんの術前補助療法症例を用いて DPD, es-NT が実際の臨床での治療効果予測因子となり得るかを明らかにしていく予定である。また同時に、生検材料を用いた DPD, es-NT 発現量測定により治療効果予測可能であるかを検討していく。

2-7 非小細胞肺癌に対する、上皮成長因子 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFRi; イレッサ, タルセハ) 治療では奏功する因子として女性、腺がん (特に肺胞上皮がん)、非喫煙者、アジア系人種が知られている。しかしな

からその生物学的な奏功予測因子は不明であった。一方イレッサ治療における薬剤性肺臓炎は重篤なものは4%前後に、致死的なものは2%前後に認められる。したがって治療により恩恵を受ける患者群を特定することは急務である。2004年相次いで2つの重要なEGFRの奏功を予測する、遺伝子異常が報告された。それらは奇しくも女性、腺がん、非喫煙者、アジア系人種という臨床的なマーカーと一致性が高く、大きな期待を抱かせるものであった。そこで我々は当院で手術された、その後イレッサを投与された27例の手術検体を用いて、EGFRのチロシンキナーゼ結合ドメインのexon 18,19,21の遺伝子異常と臨床効果を検討した。対象は1992年7月から2003年5月までに当院にて手術され、2002年9月から2004年2月まで再発に対しイレッサが投与された36例であった。肺がん以外の3症例(胸腺がん、大腸がん肺転移、atypical carcinoid)、不十分検体、DNA回収不能の6症例を除いた27例が解析症例であった。パラフィン検体12、凍結検体17であった。抗腫瘍効果はWHOの判定に従った。MagneSilによりDNAを抽出後、ABI Prism 3700 DNA analyzerによりBi-directional dye-terminator法によりexon 18, 19, 21のfull-sequenceを行った。イレッサ投与前の患者背景表1, 2に示す。27患者ミスセンス、インフレレイルム異常は9例に検出された。9例中5例(55.6%)に臨床的奏功を認めた。従来報告されているEGFRのexon18,19,21の遺伝子異常は同様に検出された。臨床的奏功との関連では従来の報告ほど高いものではなかった。

2-8 がん生検材料を用い、術前CRTの効果予測マーカーを模索した。対象は2002年1月より2003年12月の期間に術前CRT後、切除術を施行し、無治療の生検材料による検討が可能であった食道がん19例である。生検材料においてP53, Ki-67, Endoglin(CD105)の免疫染色を行い、切除標本のCRTの効果判定結果と比較検討した。P53, Ki-67は1000個の細胞をcountし、陽性率を計測した。CD105に関しては発現数・強さをそれぞれ、0~4にスコアし、スコアの総計が0~2をImmunoreactivity 1, 3~5をImmunoreactivity 2, 6~8をImmunoreactivity 3とした。術前CRTの効果判定は食道癌取り扱い規約に準じてGrade 0(無効)、Grade 1(やや有効)、Grade 2(かなり有効)、Grade 3(著効)とした。(結果) CRTの効果判定結果はGrade 0(1例)、Grade 1(6例)、Grade 2(8例)、Grade 3(4例)であった。Grade 0, 1 (A群), Grade 2, 3 (B群)とした場合のP53陽性率はA群で $37.1 \pm 36.2\%$ 、B群で

$45.2 \pm 29.3\%$ で有意差を認めなかった($P=0.735$ 、図1)。Ki-67陽性率は $35.6 \pm 22.8\%$ (A群), $59.3 \pm 19.4\%$ (B群)で、B群で有意に高かった($P<0.05$ 、図2)。CD105はImmunoreactivity 1がA群5例、B群0例、Immunoreactivity 2がA群2例、B群10例、Immunoreactivity 3がA群0例、B群2例で、CD105の発現は、B群において有意に高かった($P=0.0023$ 、図3)。以上の結果をまとめるとP53の発現はCRTの効果と関連しなかった。Ki-67の発現はCRTの効果と関連したが、染色性は低分化がんで高い傾向があり、効果判定の指標とするには問題がある。CD105はCRTの効果と良く関連し、効果判定の指標になりうる可能性がある。

3 倫理面への配慮

本研究においては、患者より採取された試料を使用する場合、医学研究に関する指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針に準じ、各施設の倫理委員会の規定に従い研究を行った。特に患者プライバシー保護ならびに個人情報の機密保持に十分に配慮し患者材料を用いた研究を行う場合インフォームドコンセントの取得または患者情報との連絡不可能匿名化を行った材料を用いて研究を行った。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Tahara M, Ochiai A, et al. Expression of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase, E2F-1, Bak, Bcl-X, and Bcl-2, and clinical outcomes for gastric cancer patients treated with bolus 5-fluorouracil. *Oncol.Rep.* 11:9-15, 2004.
2. Yonou H, Ochiai A, et al. Engraftment of adult human lung tissue in nonobese diabetic/ severe combined immunodeficient Mice: A novel lung epithelial regeneration model. *Pathobiol.* 71: 93-102, 2004.
3. Hasebe T, Ochiai A, et al. Prognostic significance of the intra-vessel tumor characteristics of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Virchow Arch.*, 444:20-27, 2004.
4. Miyamoto S, Ochiai A, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.*, 64:665-671, 2004.
5. Yoshikawa T, Ochiai A, et al. Topographical distribution of allelic loss in lung adenocarcinomas with lymph node metastases. *Mod. Pathol.*, 17: 204-213, 2004.
6. Shiono S, Ochiai A, et al. Late pulmonary metastasis of renal cell carcinoma resected 25 years after nephrectomy. *Jpn J Clin Oncol*, 34:46-49, 2004.
7. Yoh K, Ochiai A, et al. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10:1691-1697, 2004.
8. Lim S, Ochiai A, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin. Cancer Res.*, 10: 166-172, 2004.
9. Hasebe T, Ochiai A, et al. Histological characteristics of tumors in vessels and lymph nodes are significant parameter for predicting tumor progression of invasive ductal carcinoma of the breast: A prospective study. *Hum Pathol.*, 35:298-308, 2004.
10. Wada N, Ochiai A, et al. Evaluation of intraoperative frozen section diagnosis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 34:113-117, 2004.
11. Takahashi H, Ochiai A, et al. Biologically different subgroups of invasive ductal carcinoma of the pancreas: Dpc4 status according to the ratio of intraductal carcinoma components. *Clin. Cancer Res.*, 10: 3772-3779, 2004.
12. Miyamoto S, Ochiai A, et al. Nuclear β -catenin accumulation as a prognostic factor in Duke's D human colorectal cancers. *Oncol. Rep.*, 12: 245-251, 2004.
13. Shimizu K, Ochiai A, et al. Visceral pleural invasion classification in non-small cell lung cancer: A proposal on the basis of outcome. *J. Thorac. Cardiovascul. Surg.*, 127: 1574-1578, 2004.
14. Goya M, Ochiai A, et al. Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/ severe combined immunodeficient mice by ligand- specific antibody to human insulin- like growth factors. *Cancer Res.*, 64:6252-6258, 2004.
15. Tsuta K, Ochiai A, et al. Primary lung carcinoma with signet- ring cell carcinoma components. Clinicopathological analysis of 39 case. *Am J Surg Pathol.* 28:868-874, 2004.
16. Imoto S, Ochiai A, et al. Prognosis of breast cancer patients treated with sentinel node biopsy in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 34:452-456, 2004.
17. Aoyagi Y, Ochiai A, et al. Overexpression of TGF- β by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. *Br. J cancer.*, 91: 1316-1326, 2004.
18. Nakahashi C, Ochiai A, et al. Long-term survival achieved by repeated resections of metachronous pulmonary and adrenal metastases of alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: report of a case. *Surg Today.* 34: 784-787, 2004.
19. Kim Y, Ochiai A, et al. Dominant papillary subtype is a significant predictor of the response to gefitinib in adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.*, 10: 7311-7317, 2004.
20. Yonou H, Ochiai A, et al. Intraosseous growth of human prostate cancer in implanted adult human bone: Relationship of prostate cancer cells to osteoclasts in osteoblastic metastatic lesions. *Prostate*, 58:406-13, 2004.
21. Nakamura M, Ochiai A, et al. Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes's C human colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 15: 8434-8441,

- 2004.
22. Mori K, Sasaki H, et al., Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun*, 313: 931-937, 2004.
23. Kobayashi K, Sasaki H, et al., Identification of genes whose expression is upregulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene* 23: 3089-3096, 2004.
24. Masutani M, Sasaki H, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene in human tumor cell lines: Its expression and structural alteration. *Proc. Japan Acad. Ser. B80*: 114-118, 2004.
25. Terasaka S, Sasaki H, et al., Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives* 112: 773-782, 2004.
26. Shimizu A, Sasaki H, et al., The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunology Letters* 92: 227-235, 2004.
27. Narikiyo M, Sasaki H, et al., Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci.*, 95: 569-574, 2004.
28. Kuwahara Y, Sasaki H, et al., Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 41: 125-132, 2004.
29. Morita E, Sasaki H, et al., Molecular analysis of age-related changes of *Streptococcus anginosus* group and *Streptococcus mitis* in the saliva. *Oral Microbiol. Immunol.* 19:1-4, 2004.
30. Yamada S, Sasaki H, et al., Gene expression profiling identifies a set of transcripts up-regulated in human testicular seminoma. *DNA Res.*, 11: 335-344, 2004.
31. Kishimoto M, Sasaki H, et al., Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Cli, Cancer Res.*, (in press)
32. Nishigaki M, Sasaki H, Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.*, (in press)
33. Teratani T, Sasaki H, et al., Direct hepatic fate specification from embryonic stem cell. *Hepatology*, (in press)
34. Aoyagi, K and Sasaki, H Laser capture microdissection-microarray technology: global mRNA amplification for expression profiling on laser captured cells. *Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas*. Vol 2, Hayat, M. A (ed), 3-10, Elsevier academic press, 2005.
35. Utsuki S, Sato Y, et al. Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and β -catenin. *Clin Neuropathol* 24: 8-12, 2005
36. Nozawa T, Sato Y, et al. Specific expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in submucosa of human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 47: 2093, 2100, 2004
37. Igarashi T, Sato Y, et al. Divergent cyclin B1 expression and Rb/p16/Cyclin D1 pathway aberrations among pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 17: 1259-1267, 2004
38. Utsuki S, Sato Y, et al. E, N-cadherins and beta-catenin expression in medulloblastoma and atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 44: 402-407, 2004
39. Jiang S-X, Sato Y, et al. hASH1 expression is closely correlated with endocrine phenotype and differentiation extent in pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 17: 222-229, 2004
40. Nakayama M, Sato Y, et al. Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in hypopharyngeal cancer. *Laryngoscope* 114: 1259-1263, 2004
41. Kondo T, Que N, et al. Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, 24:157-164, 2005
42. Mitani Y, Que N, et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21(WAF1/CIP1) expression by gastric carcinoma. *J Pathol*, 205:65-73, 2005
43. Matsumura S, Que N, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131:19-25, 2005
44. Utsunomiya T, et al., A gene-expression signature can

quantify the degree of rat hepatic fibrosis. J Hepatol . 41: 399-406, 2004

45. Utsunomiya T, et al., Expression of cancer testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. Ann Surg Oncol. 11:934-940, 2004
46. Utsunomiya T (equal contribution), et al., Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in esophageal cancer. Br J Cancer 91: 282-286, 2004
47. Yoshinaga K, Utsunomiya T, 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
48. Haraguchi N, Utsunomiya T, et al., Analysis of the gastric cancer with cDNA microarray. Cancer Chemother Pharmacol. 54: S21-24, 2004
49. Mimori K, Utsunomiya T, et al., Coexpression of MMP-7 and EGF receptor in colorectal cancer; an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7 expressing cancer cells. Clin Cancer Res. 10: 8243-8249, 2004
50. Nishida K, Utsunomiya T, 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
51. Masuda T, Utsunomiya T, et al., Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. Int J Oncol. 26: 721-730, 2005
52. Utsunomiya T (equal contribution), et al., Clinical significance of human kallikrein gene 6 (KLK6) mRNA expression in colorectal cancer. Clin Cancer Res. (in press)
53. Utsunomiya T, et al., Clinicopathologic and prognostic values of apolipoprotein D alterations in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. (in press)
54. Sudo T, Utsunomiya T, et al., Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. (in press)
55. Nagahara H, Utsunomiya T, et al., Somatic mutations of EGFR in colorectal carcinoma. Clin Cancer Res. (in press)

日本語論文

1. 蘆田明雄、佐々木博己他、食道癌の放射線化学療法の効果予測遺伝子群、Bio Medical Quick Review Net, 4005 メディカルドウ、2004.
2. 佐々木博己他、癌ゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、辻本豪三、田中利男編、262-270、羊土社、2004.
3. 佐々木博己、青柳一彦編著、DNA チップ実験まるわかり、羊土社、2004.
4. 佐藤雄一他、1. 固定法と核酸・蛋白. 第3部 分子生物学の実践、A. 検体の取り扱い. 病理診断における分子生物学、病理と臨床 22 巻(臨時増感号) 文光堂(東京) 2004
5. 宇都宮徹他、cDNA マイクロアレイ解析のピットフォール Cancer Frontier 6:56-63, 2004
6. 宇都宮徹他、転移性肝癌のすべて-診断と治療方法の選択-「転移性肝癌の成立機序」外科治療 92:140-147, 2005