

## 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

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による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に関わる条件の検討、2) ゲノムワイド発現解析に基づく内視鏡切除（生検）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試みた。3) 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として、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) 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法の確立法の確立と 22G, 23G という極細生検針からの RNA 採取法の検討を試みた。5) 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を行い、生検組織を用いた予知診断の可能性を示すことが出来た。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	
落合 淳 志	国立がんセンター東病院臨床開発センター 部長	
佐々木博己	国立がんセンター研究所 室長	分担研究課題
佐藤 雄一	北里大学医療衛生学部 助教授	生検組織を用いた治療感受性予知法
大上 直秀	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助手	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
宇都宮 徹	広島赤十字原爆病院外科 部長	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
西堀 英樹	慶応大学医学部 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
		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
		内視鏡下生検材料を用いた進行・再発大腸癌に対する化学療法の影響性予測法の確立

## 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。

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に関わる条件の検討：

生検組織を用いた治療効果判定を行うための問題点として、1) 生検組織が組織全体を代表しているか、また生検組織での評価に適した分子はどのようなものなのか、2) 検索する分子について治療効果判定は何を基準に評価すべきか、等の問題点がある。今年度は生検組織が組織全体を代表するかを分子の組織内における分布パターンにより分類し、生検組織での評価に適した分子について明らかにするとともに、代表的な分子を用いて、実際の生検組織と手術材料を用いて分子評価の相関を比較検討した。

1) 検組織が組織全体を代表するか、または生検組織での評価に適した分子の検索：

がん組織内における分子の発現分布パターンを1) びまん性、2) 結節性、ならびに3) 結節性に分類し、それぞれの分子変化の分布パターンにより生検による判定が可能かどうかを検証した。実験方法として p 5 3、Ki-67、cyclin D1 の分布パターンを57例の食道がん手術材料を用いて検討し、各分子の発現パターンとその頻度ならびに生検組織の個数を検討し、どの分子の発現様式では何個の生検組織を採取する必要があるか検討した。p 5 3、Ki67 分子発現は生検組織2個採取することのより、十分手術材料と同等な陽性所見を得られることが理論的に示された。これを証明する目的で、実際に手術前に採取された c-erbB-2 蛋白発現ならびに遺伝子増幅を FISH

法により生検組織と200症例の胃癌手術材料を用いて検討したところ、生検組織と手術材料の評価の一致率は陰性症例を陰性と判断する negative predictive value は91.7%であり、陽性を陽性と判断する positive predictive value は76.7%であった。これらの結果は、高率に陽性を認める、遺伝子変異を伴う分子ならびに免疫組織化学的染色による評価は生検組織においても可能であることが示された。

2) 放射線治療感受性を予測する生検組織を用いた画像解析法の確立：

これまでに組織内血管密度が放射線治療の感受性に相関することを明らかにしてきたが、今年度は、腫瘍組織内における新生血管密度を画像解析装置で客観的に測定するシステムを構築した。生検組織における腫瘍領域に存在する血管を CD31 抗体により染色し、陽性腫瘍新生血管を2値化し画像に取り込み、対物20倍視野の面積にあたる腫瘍内に存在する腫瘍血管数を自動的に計算することが可能になった。この方法により、これまで主観的であった、Hot spot 法による腫瘍内血管密度を客観的に測定可能になった。この画像解析法ならびにこれまでに作成した腫瘍内血管密度を計測する画像解析システムを用いて、放射線化学療法を受けた食道がん症例の治療反応性を測定したところ、腫瘍血管における総血管周囲径ならびに腫瘍内血管数が最も放射線化学療法の感受性に相関することが示された。

2. ゲノムワイド発現解析に基づく内視鏡切除（生検）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

1) 平成16年度には、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い、検出可能な遺伝子のうち43% (1362 / 3148) もが発現量に差のあるものとして選ばれた。その理由としては、そのサンプル採取の過程上、外科的切除サンプルが生検に比べ、炎症、組織の酸素・栄養不足、およびコールドショックのストレスにさらされていることが推察された。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った。つまり、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43% (上述) もが、両群で異なる発現量を示すことになったと推察された。

これらの発現情報から外科的切除サンプルでどのような

シグナルネットワークが活性化されているのか明らかにすることは、生検サンプルを用いた遺伝子解析においても、そのサンプルの質を判定するのに重要である。しかし、これまでの実験では、同一症例から得られた生検と外科的切除サンプルのデータは含まれていない。また、非がん部間の比較も行っていなかった。平成17年度には、同一の患者の生検と外科的切除サンプルの取得を行い、7症例集めた(10-15症例の集積が終了次第マイクロアレイ解析を行う計画)。また症例数は少ないものの、非がん部の生検5サンプルと外科的切除症例の非がん部5サンプルの遺伝子発現プロファイルの比較を行った。両グループにおける各遺伝子の発現量の平均値を比較し、3倍以上発現量の違う遺伝子を選抜したところ、187遺伝子が選抜された(がん部間の比較では、257遺伝子)。昨年行ったがん部の解析結果と同様、外科的切除サンプルで発現が高いものが80%以上を占めていた。がん部において選抜された257遺伝子と一致した遺伝子は、27遺伝子であった。どのようなシグナルネットワークが含まれるかを最新のシグナルネットワーク比較ソフトで解析したところ、非がん部、がん部ともにNFkBおよびPU.1のシグナルネットワークに関与する遺伝子が集積されていた。炎症反応は共通しているものと推察された。また、がん部で変動しやすいものと思われる257遺伝子を除去してクラスター解析を行うと、上記生検35症例と外科的切除サンプル70症例は2つのグループを形成しにくくなることが示された。

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、外科的切除サンプルは、ストレスで反応しやすい遺伝子の発現亢進がより多くみられることから、慎重にデータを取り扱う必要があることを意味する。そのような遺伝子は、生検でも変動しやすい可能性を否定できない。つまり、得られた生検サンプルにおいても、その取り扱い次第で発現が変化してしまう可能性がある。したがって、生検の発現プロファイルの質を判定するためにも、外科的切除サンプルでどのようなシグナルネットワークが活性化しているのかをより明確にすること、及び変動しやすい遺伝子をリスト化し、発現データから削除することも考慮すべきである。今後、同一症例での生検と外科的切除サン

ルの発現プロファイルの比較、マウスを使ったモデルサンプル調製、高感度な次世代マイクロアレイを使用、マイクロダイセクションを用いた解析によってさらに検証する必要がある。

2) SAGE法および、そのデータを基盤に作成したオリゴヌクレオチドアレイを用いて、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以下の検討を行った。

胃がん5サンプルをSAGE法で解析した結果、Regenerating islet-derived family, member 4 (Reg IV)が胃がんで極めて高発現していることが明らかとなった。Reg IVは5FU抵抗性の大腸がん細胞株において、ディファレンシャルディスプレイ法により、5FU抵抗性の大腸がん細胞株で高発現している分子としても同定されている。しかし、臨床検体におけるReg IVの発現と5FU抵抗性との関連については検討されていない。私達はReg IVに対するラビットポリクローナル抗体を作成し、本抗体を用いて5FUの抵抗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。その結果、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、印環細胞等で染色された。Reg IVの発現は6例に認められ、すべて5FUに対しPDであったのに対し、NCとPRの症例ではReg IVの発現は全く認められなかった( $P = 0.0237$ )。Reg IVの発現ベクターを構築し、胃がん細胞株TMK-1にReg IVを導入し、5FU誘導性のアポトーシスについてTUNEL法で解析したところ、Reg IV導入株はempty vector導入株と比較し、アポトーシスが著明に抑制された。さらにcaspase 3、8、9の活性をELISA法で測定した結果、Reg IV導入株はempty vector導入株と比べ、5FU誘導性のcaspase 3、9の活性化が抑制された。caspase 8に大きな変化はなかった。Reg IVは分泌されている分子であり、受容体が存在することが想定されていたが、最近EGF receptorのチロシン992と1068がReg IVによってリン酸化されることが報告された。私達もEGF receptorのリン酸化をその特異抗体を用いてWestern blotで検討したところ、EGF receptorの992と1068のチロシンは、Reg IV導入株でリン酸化されていることを確認した。992と1068のチロシンのリン酸化はAKTの活性化に関与しておりBcl-2の発現を誘導することが知られている。以上から、Reg IVはEGF receptorの活性化を誘導することで、AKTを活性化させ、Bcl-2の発現を誘導し、5FU投与により惹起されるcytochrome Cのミトコンドリアから細胞質への放出を

抑制し、caspase 9 の活性化の抑制、caspase 3 の活性化の抑制という機構でアポトーシスを抑制していることが示唆される。現在、胃がん組織を材料に Reg IV、EGF receptor の免疫染色を行っており、Reg IV-EGF receptor signaling pathway が胃がんにどのように関与しているのかを検討中である。

オリゴヌクレオチドアレイについては、原発性の胃がん 40 例の解析が終了している。プレリミナリーなデータでは、浸潤、転移に関連している遺伝子として SPC18 が同定されているが、薬剤感受性を予測する遺伝子については現時点では同定できていない。引き続きオリゴヌクレオチドアレイによる解析を実行している。

### 3. 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

神経内分泌肺癌の 2 つのタイプ小細胞癌 (SCLC) と大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC) に共通して、もしくは鑑別可能な分子の獲得を目指して、様々なプロテオーム解析法を駆使した検討を行い以下の結果を得た。

1) SCLC, LCNEC と反応する単クローン性抗体の作製: SCLC や LCNEC 細胞株をそのまま、もしくはソニケーションや AMeX 固定した細胞標本を用いてマウスに免疫し、細胞融合法を用いて単クローン性抗体を作製している。この方法で精製抗原での免疫法では獲得出来ない腫瘍化に伴い未知の修飾を受けたタンパク質に対する有用な抗体の作製を目指す。すでに 650 を超える抗体を作製済みであり、現在ホルマリン固定・パラフィン包埋された肺癌組織、同一患者の非癌組織の組織マイクロアレイを作製し、抗体の有用性を検討している。その中で、上皮細胞に特異的に存在する分子で、腫瘍組織と様々な程度で反応するが、その腫瘍間質の線維芽細胞とも反応する抗体が獲得できている (現在、特許申請中)。この抗体は非腫瘍性末梢肺組織とは反応せず、肺癌患者や膀胱癌患者血清とは反応するが、健常人血清とは反応しない。腫瘍と腫瘍間質の関係や、癌の早期血清診断に有用な抗体と思われる。現在まで、この分子と各種腫瘍との報告はない。

2) SCLC, LCNEC 細胞株培養上清中の分泌、変性タンパク質、ペプチドの検索: SCLC, LCNEC 細胞株を無血清培地で培養、維持している。この培地と細胞を飼った培養上性を図で示した方法で比較検討している。この方法で、直接腫瘍細胞が産生し血中に分泌される、もしくは腫瘍細胞由来で変性し血中に流れやすいタンパク質断片を同定でき、早期血清診断を含めた新しい腫瘍マーカーとなる可能性がある。分子量 5,000 以下のペプチドは逆相ク

ロマト、MALDI-TOF-MS と MALDI-TOF/TOF-MS を組み合わせることで、図で示したペプチドが同定されている。このペプチドは神経細胞や神経内分泌細胞にのみ発現し手いるタンパク質の断片であり、神経疾患患者の髄液中には同じ配列の断片が同定されている。SCLC の腫瘍マーカーとして広く使用されている pro-GRP とは異なる新たな分子であり、現在、このペプチドに対する抗体を作製中である。

さらに、分子量 5,000~20,000 までの低分子量タンパク質に関しては二次元電気泳動法で、二次元目には Tricine-SDS-PAGE を行うことで培養液にはない腫瘍細胞由来のタンパク質が幾つも見られることが確認された。現在、LCNEC の 2 つの細胞株 LCN1, LCN2 細胞上清の解析を行っている。また、低分子量の二次元電気泳動はほとんど行われていないが、図で示したように、細胞そのものを電気泳動しても分子量 20,000 以下のタンパク質は数多く存在することが確認されたので、今後、上清と併せて検討していく予定である。

### 4. 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

多様化した肝細胞癌 (肝癌) に対する治療方針決定のためには肝癌進行度のみならず肝障害度の正確な把握が必要である。22G 以下細径生検針にて採取した非癌部肝組織の網羅的遺伝子解析を行うことで、(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) 多中心性発生肝癌のリスク予測や interferon (IFN) 療法の治療効果予測を試みる。

1) 傷害度の評価: 対象は、肝癌切除 86 例の非癌部肝組織。組織学的に Azan 染色を行い、全面積に対する肝線維化領域の面積比を肝線維化率 (HF: Histological fibrosis) としてコンピューター画像解析により算出した。この HF 値ならびに従来の血液生化学的肝機能検査 (白血球数、血小板数、アルブミン値、総ビリルビン値、プロトロンビン時間、ヘパプラスチンテスト、ICGR15、IV 型コラーゲン・7S、ヒアルロン酸など) あるいは遺伝子発現に基づく肝線維化率 (GF: Genetic Fibrosis) との相関を評価した。GF 値の有用性は、74 例の training sample と 12 例の test sample に分けて、supervised learning 法を用いて評価した。Azan 染色標本による HF 値と良く相関する血液検査は、上位よりプロトロンビン時間 (R=0.53)、血小板数 (R=0.52)、ICGR15 (R=0.49)、IV 型コラーゲン (R=0.48) などであった。一方、遺伝子発現パターンに基づく GF 値と HF 値との相関では、74 例

の training sample ( $R=0.76$ ,  $P<0.001$ )、12 例の test sample ( $R=0.75$ ,  $P<0.01$ ) であり従来のいずれの肝機能検査より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。

2) 肝癌多中心性発生の予測: 対象は、Hepatitis C virus (HCV) 抗体陽性肝細胞癌切除 40 例の非癌部肝組織。原発性肝癌取扱い規約(第 4 版)に準じて判定可能な多中心性発生 (MC 群: 12 例と単発 (SN 群: 28 例) の 2 群に分け、予後を含めた臨床病理学的因子と遺伝子発現パターンとの関連を検討した。次に肝内再発を認めた 15 例と観察期間中肝内再発を認めなかった 25 例の遺伝子発現パターンを比較した。以上のデータより独自の方法で残肝再発予測スコアを算出した。多中心性肝発癌に関連すると考えられる 36 遺伝子を選択し、weight voting 法を用いて予測スコア化を試みた。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:  $-11.8 \pm 12.7$ 、Group D:  $19.9 \pm 9.2$  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良好な分離能を示した。

3) IFN 療法の治療効果予測: 今回、非癌部肝組織の DNA マイクロアレイ解析を行った 86 例中、24 例が IFN 療法を受けていた。そこで、効果のあった responder: R 群 ( $n=7$ ) と効果を認めなかった non-responder: NR 群 ( $n=17$ ) の 2 群に分け両群間の遺伝子発現パターンを比較し、クラスター解析を行った。治療効果を認めた R 群にて有意に高発現する 1078 遺伝子と低発現する 812 遺伝子を用いてクラスター解析を行うと 2 つの大きなクラスターに分け、R 群の 7 例は全て 10 例で構成する一つのクラスターに分類された。さらに、R 群で有意に低発現する遺伝子群の中には、G1P3, OAS3, IFIT1, MX1 など IFN 感受性関連遺伝子として既に報告されたものが含まれていた。

3) 細径針にて採取した微量肝組織による評価: これまでの検討にて 22G、23G の肝生検針で  $4.9 \pm 0.9 \mu\text{g}$ 、 $3.5 \pm 0.4 \mu\text{g}$  の total RNA を採取可能であることを確認した。またオリゴ DNA マイクロアレイ (17,000 遺伝子解析) では  $0.2\text{--}0.5 \mu\text{g}$  の total RNA で解析可能であることも確認した。一方、本研究成果の臨床応用を考慮した場合、解析センターなどに輸送し、サンプルを集積した上でまとめて解析することがコスト面等からも想定される。そこで、

23G 針 (Surecut) にて採取した微量肝組織の輸送および長期保存の RNA 品質管理に与える影響を検討した。細径針にて採取した微量肝組織による評価: われわれはこれまでに、同一症例から採取した切除肝組織と極細肝生検針による微量肝組織をオリゴアレイにて解析し、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すことを確認している (相関係数: 0.98)。今回、28 日間冷凍保存による RNA 品質管理への影響を検討したところ、28 日後でも RNA の質は良好に保たれることが明らかとなった。したがって、検査センターに集積してまとめて解析することは十分可能と考えられた。

#### 5. 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

近年、新規抗癌剤 irinotecan (CPT-11) や oxaliplatin (1-OHP) の導入に伴い、大腸癌に対する化学療法は新たな展開を呈している。しかし、これらの多剤併用療法においても中心的な位置を占めている key drug は依然として古典的な 5-fluorouracil (5-FU) である。今年度は、5-FU 耐性ヒト腫瘍細胞株の網羅的遺伝子発現解析によりその候補遺伝子のひとつとして報告された抗ストレス蛋白 Heat Shock Protein 27 (HSP27) に着目し、5-FU 感受性・耐性予測因子としての臨床応用を目的として基礎的検討を行った。

ヒト大腸癌細胞株 (LoVo, HCT15, WiDr, HCT116, HT-29, SW480) における HSP27 蛋白の発現をウェスタンブロット法により検討した。それぞれの発現量は densitometry で計測し、control である  $\beta$ -actin との比で求めた。それぞれの細胞を 5-FU に 48 時間連続接触させ、MTT assay 法により対照群と比較して 50% の細胞増殖抑制効果を引き起こす 5-FU 濃度 (IC50) を求めた。これを 5-FU 感受性の指標とし、HSP27 蛋白の発現量との関連性について検討した。6 種のヒト大腸癌細胞株 (LoVo, HCT15, WiDr, HCT116, HT-29, SW480) における HSP27 蛋白の発現量と IC50 との間に有意な相関を認めた ( $p=0.010$ )。

HCT15 における HSP27 蛋白の発現を RNA 干渉法によりノックダウンした。1) と同様に蛋白レベルの変化をウェスタンブロット法により定量し、IC50 の変化との相関について検討した。HSP27 を標的とする siRNA を HCT15 に導入すると、HSP27 蛋白発現は濃度依存性に抑制され、それぞれの IC50 は HSP27 蛋白の発現量と有意に相関した ( $p=0.039$ )。

2001 年 8 月から 2004 年 2 月までに 5-FU を中心とした術

前化学療法（5-FU/LV/CPT-11）を施行された直腸癌症例 26 例を対象とし、化学療法の組織学的奏効度と治療前生検組織を用いた免疫組織化学法による HSP27 蛋白発現度との関連性について検討したが、臨床検体による検討では化学療法の組織学的奏効度と HSP27 発現度に有意な相関は認められなかった。

5-FU 耐性株の網羅的遺伝子解析により 5-FU 耐性関連候補遺伝子として、アポトーシス関連分子として知られる HSP27 が同定された実験結果に着目した。アポトーシスにはミトコンドリアを介する経路と細胞膜の Death Receptor を介する経路の主に 2 つの経路が知られており、5-FU が大腸癌細胞を誘導するアポトーシスは前者が優位であることが最近報告され、ミトコンドリア内のチトクローム c が細胞質内に移行し、apoptosome を形成することで下流の casapase のカスケードを介してアポトーシスが誘導される。HSP27 はこのチトクローム c の細胞質への移行を阻害し、抗アポトーシスに作用する。このことは大腸癌細胞における 5-FU 耐性獲得に HSP27 が関与していることを強く示唆するものであり、本研究の結果を支持するものである。

本研究では、5-FU 耐性株 HCT15 において HSP27 蛋白の siRNA を用いたノックダウンにより 5-FU に対する感受性を増強することが可能であった。このことは、HSP27 の 5-FU 耐性獲得への関与の直接的な証明のひとつになったばかりでなく、大腸癌における 5-FU 耐性克服という新たな治療法の可能性を見出したという点においても注目すべきことである。しかしながら、臨床材料を用いた実験では、治療前の生検組織における HSP27 の発現と化学療法奏効度との関連性は明らかではなかった。これは、対象が直腸癌であることや用いた化学療法が 5-FU 単剤ではないこと、また症例数が少ないことなどが影響した可能性が考えられ、今後結腸癌を含めたより大規模かつ詳細な検討が必要と考えられた。

本研究は、HSP27 の 5-FU 感受性・耐性予測因子としての可能性を見出したのみならず、HSP27 siRNA の 5-FU 耐性克服による治療への応用の可能性も示唆することができた。今後は、HSP27 による 5-FU 耐性獲得の機序を解明するとともに、HSP27 と既知の 5-FU 感受性・耐性関連因子との関係や HSP27 の 5-FU 感受性・耐性予測因子としての臨床応用の可能性を明らかにすることが必要である。

### 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うことにより、患者情報の保持に最大限の注意を払い研究を行った。

### 研究成果の刊行発表

#### 外国語論文

1. Miyamoto, S., Ochiai, A. et al. Blockage of paracrine supply of Insulin-like growth factors using neutralizing antibodies suppresses the liver metastasis of human colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 11, 3494-3502, 2005.
2. Kanomata, N., Ochiai, A., et al., Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components. *Mod Pathol*, 18:828-837, 2005.
3. Yano, T., Ochiai, A., et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncology Report*. In press
4. Kishimoto, M., Sasaki, H., et al. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 512-519, 2005.
5. Nishigaki, M., Sasaki, H., et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*, 65: 2115-2124, 2005.
6. Teratani, T., Sasaki, H., et al. Direct hepatic fate specification from embryonic stem cell. *Hepatology*, 41: 836-846, 2005.
7. Sangai, T., Sasaki, H., et al. Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int. J. Cancer*, 115: 885-892, 2005.
8. Ishii, H., Sasaki, H., et al. Frag 1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links

- replication stress surveillance with apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102: 9655-9660, 2005.
9. Sato, M., Sasaki H., et al. Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer. *Oncogene*, 24: 6108-6118, 2005.
  10. Ishii, G., Sasaki, H., et al. In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma. *Int. J. Cancer*, 117: 212-220, 2005
  11. Morita, E., Sasaki, H., et al. Predominant presence of *Streptococcus anginosus* in the saliva of alcoholics. *Oral Microbiol, Immunol.*, 20: 362-365, 2005.
  12. Takahashi, K., Sasaki, H., et al. Homozygous deletion and reduced expression of the *DOCK8* gene in human lung cancer. *Int. J. Oncology*, 28: 321-328, 2006.
  13. Nakamura, N., Sasaki, H., et al. Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma. *Oncogene* (in press)
  14. Ashida, A., Sasaki, H., et al. Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: its clinical implications. *Int. J. Oncology* (in press)
  15. Fukaya, M., Sasaki, H., et al. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology* (accepted)
  16. Utsuki, S, Sato, Y., et al.: Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin. *Clin Neuropathol* 24: 8-12, 2005
  17. Yoshida K, Oue N, et al. DNA methylation of *CHFR* is not a predictor of the response to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res*, 26:49-54, 2006
  18. Oue N, et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer*, 106:1250-1259, 2006
  19. Sanada Y, Oue N, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol*, 208:633-642, 2006
  20. Kobayashi T, Oue N, et al. Glycogen synthase kinase 3 and h-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol*, 26:898-911, 2006
  21. Aung PP, Oue N, et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene*, in press
  22. Oue N, et al. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression. *Oncology*, 69 Suppl 1:17-22 (Review), 2005
  23. Shutoh M, Oue N, et al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric carcinoma. *Cancer*, 104:1609-1619, 2005
  24. Ito R, Oue N, et al. Clinicopathological significant and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchows Arch*, 447:717-722, 2005
  25. Mizuiri H, Oue N, et al. DNA methylation of genes linked to retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the esophagus: DNA methylation of *CRBP1* and *TIG1* is associated with tumor stage. *Cancer Sci*, 96:571-577, 2005
  26. Motoshita J, Oue N, et al. DNA methylation profiles of differentiated-type gastric carcinomas with distinct mucin phenotypes. *Cancer Sci*, 96:474-479, 2005
  27. Oue N, et al. Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Reg IV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *J Pathol*, 207:185-198, 2005
  28. Kuraoka K, Oue N, et al. A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan. *Oncol Rep*, 14:465-470, 2005

29. Yasui W, Oue N, et al. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review.
30. Gastric Cancer, 8:86-94, 2005
31. Kondo T, Oue 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
32. Mitani Y, Oue N, et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21(WAF1/CIP1) expression by gastric carcinoma. J Pathol, 205:65-73, 2005
33. Matsumura S, Oue 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
34. 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(2): 401-409, 2005
35. Utsunomiya T, et al Clinico-pathologic and prognostic values of apolipoprotein D alterations in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 116(1):105-109, 2005

#### 日本語論文

1. 佐々木博己、マイクロアレイ技術に必要な基礎知識、臨床検査、49(5):483-489、(2005)
2. 佐々木博己、連載「効率的なバイオ実験の進め方」第1回試薬と機器をうまく揃える方法、実験医学23(12):1946-1950(2005)
3. 佐々木博己、連載「効率的なバイオ実験の進め方」第2回経験のない実験法を素早く導入する方法、実験医学23(13):2058-2062(2005)
4. 佐々木博己、連載「効率的なバイオ実験の進め方」第3回バイオ実験がうまくいく方法、実験医学23(14):2187-2191(2005)
5. 佐々木博己、連載「効率的なバイオ実験の進め方」第4回足りない実験データを早く補充する方法、実験医学23(16):2051-2055(2005)