

4. プロジェクト研究（共同研究費）

<研究課題> 1

発がんプロファイルに基づくがんの分子生物学的腫瘍分類についての意義の検討

Interpretation of molecular classification of cancer: A novel attempt to integrate accumulated histopathologic knowledge to molecular oncology

<研究者氏名> 遺伝子病理診断部 谷田部 恭

共同研究者 長田啓隆, 光富徹哉

それぞれの腫瘍の発現プロファイルの比較に基づいた階層的クラスタリングは、全遺伝子の発現パターンを比較した分子生物学的分類ととらえることも可能である。この分子生物学的な分類は、既存の臨床病理学的な分類と一致する面もあるが、生物学的な新たな疾患単位を見出す手がかりを与えてくれる可能性もある。そこで、われわれはこの分子生物学的分類より得られた新しい肺がん分類の解釈を試みた。

現在の肺癌分類においては、臨床経過、病理学的特徴、治療戦略の違いから小細胞肺癌と非小細胞肺癌に大きく分けられる。しかしながら、われわれの報告も含めたこれまでの肺癌生物学的分類では、肺癌の分類に対してまったく異なった解釈を与えている。肺癌はまず2つのグループに大別化され、その後各病理組織学的特徴（小細胞癌、扁平上皮癌、大細胞癌、腺癌）に基づいたクラスターに分かれる。そのクラスター間の関係から見ると、小細胞肺癌と扁平上皮癌の違いは、腺癌クラスターの違いよりはるかに小さい。

これまでの検討から、肺癌の大きな2つのグループは、その由来となる細胞型に大きく依存しているのではないかと結果が得られた。すなわち、気管支上皮に関連した腫瘍と末梢肺細胞に由来した腫瘍である。実際に2つのうちの1つのグループでは、このグループを特徴付ける分子として、末梢肺実質のキーとなる転写制御因子である thyroid transcription factor-1 や呼吸機能の維持に欠かせないサーファクタントタンパク質などがあげられている。これらの分子は、正常肺組織において型肺上皮や細気管支上皮などの末梢肺細胞に特異的に発現している。われわれは以前にこれらの分子を発現する解剖学的な単位を terminal respiratory unit と名称し、そこを由来としたと思われる腺癌が臨床病理学的にきわめて特有の特徴を示すことを報告した。また、その特徴が、近年明らかとなった EGFR 遺伝子変異を有する腺癌の特徴と類似していたため、その関係を検討した。その結果、EGFR 遺伝子変異が末梢細胞型腺癌に特異に検出されることを見出した。これらの結果から、発現プロファイル解析による分子生物学的分類によって明らかとなった1つのグループは、末梢肺細胞から由来したと考えられる腺癌であり、EGFR 遺伝子変異を特徴とした一つの特異な臨床病理学的特徴を有する疾患グループと考えられた。

これまで、腫瘍の生物学的な分類の多くが、細胞系の違いを基盤としたものが多いが、肺癌においても同様であると推測さ

れた。ではなぜ、細胞系の違いが生物学的な分類に強く反映されるのか、これからの課題である。

<研究課題> 2

TEL-AML1 陽性 B 細胞白血病の発症機構解析

Analysis of Molecular Pathways Leading to B cell Leukemia Harboring TEL-AML1

<研究者氏名> 遺伝子医療研究部 都築 忍

共同研究者 瀬戸加大, 森島泰雄

TEL-AML1 は t (12; 21) 染色体転座により形成される異常融合遺伝子で、この融合遺伝子をもつ白血病は B 細胞性であり小児で最も多く、その成立過程を知ることは臨床的にも重要視されている。われわれは、マウスの造血幹細胞に TEL-AML1 を発現させてマウスに骨髄移植を行う骨髄再構築系を用いて、TEL-AML1 遺伝子の機能解析を行ってきた。その結果、TEL-AML1 の発現により未分化細胞が増殖し、B 細胞の分化が阻害されることを見出した。このことは、TEL-AML1 型白血病の細胞起源が未分化造血細胞であり、その分化過程で B 細胞系への分化異常が起こり、その結果 B 細胞性白血病が出現することを示唆する。しかしながら同時に、TEL-AML1 遺伝子発現単独では白血病化しないことも見出しており、何らかの付加的遺伝子異常 (second hit) が白血病成立に必要なことが分かった。そこで、臨床検体を用いてこの付加的遺伝子異常を見出すべく、アレイ CGH 解析を行ったところ、全例で何らかの遺伝子欠失を伴うことが明らかとなった。遺伝子欠失領域はランダムではなく、特定の部位に比較的集中しており、TEL, p16/Arf, BTG1 などの遺伝子領域が多くの例で欠失していた。

これらの遺伝子欠失の白血病化における意義を考察するために以下の2通りの方法を試みている。(1) TEL-AML1 白血病細胞株 Reh に TEL, p16/Arf, BTG1 遺伝子を発現しもどして細胞増殖への影響を観察する。(2) TEL, p16/Arf, BTG1 に対する siRNA を TEL-AML1 とともに発現させるベクターを構築し、マウスの造血細胞に遺伝子導入して骨髄再構築系でアッセイする。(1)では、予備実験ながら上記欠失遺伝子を発現しもどすことにより細胞増殖が抑制されることを観察している。これらに加えて、アレイ CGH の結果とは別の視点から p53 などの gate-keeper 遺伝子の異常が白血病化に寄与するかについても解析を進めている。このために、TEL-AML1 と同時に優勢抑制型 p53 などを発現させている。以上の解析を通じて、白血病成立機転について考察を深めてゆきたい。

<研究課題> 3

胃癌腹腔内微小転移の分子生物学的検出と治療法の開発

Molecular detection and therapeutic research for peritoneal

<研究者氏名> 消化器外科部 伊藤 誠二

共同研究者 中西速夫, 望月能成

腹膜再発は胃癌の再発形式の中でも最も頻度が高く, その制御は胃癌の治療上, 極めて重要である。本研究は, 分子生物学的手法を用いて胃癌腹腔内微小転移を検出し, これを術後早期から治療することによって, 腹膜再発を予防し, 胃癌根治手術患者の生存率の向上を図ることを目的とする。これまでの研究により, LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法を用いて胃癌患者腹腔洗浄液中の CEA mRNA を定量し, 適切なカットオフ値を設定することにより, 胃癌腹腔内微小転移の検出が可能であることを明らかにしてきた。これらの結果は, 既に高度先進医療として臨床応用され, 腹膜再発リスクの高い患者の選別に役立っている。一方, マウスを用いた動物実験の結果から, 腹膜転移を微小転移の段階から治療することにより, 腹膜転移の進展を阻止しうる可能性が示唆されている。これらの知見をもとに2003年7月から, 腹腔洗浄液中 CEA mRNA 陽性患者に対して, 術後に S-1 投与を行う臨床第 Ⅲ 相試験を開始している。

今回の検討で, 以前の後ろ向き研究により設定した CEA mRNA のカットオフ値に基づき, 前向き (prospective) に症例を集積し予後を追跡した結果, CEA mRNA 定量値に基づく胃癌腹腔内微小転移の有無が有用な予後予測因子であり, 多変量解析でも独立した予後因子であることが確認された。さらなる診断精度の向上を目指し, CEA の補助マーカーとして CK20 の有用性の検討を行ったところ, CK20 単独では67%と十分な感度が得られなかったが, CEA との組み合わせでは有意な予後因子であった。一方, 腹腔内化学療法に向けた術中診断の必要性から, さらなる検査時間の短縮を目指し, 直接 RNA 増幅法 (TRC 法) による CEA mRNA の検出法を確立した。本法は定量 RT-PCR 法とほぼ同程度の感度を有し, しかも術中診断 (1 - 2 時間) が可能であった。

治療法の開発に関しては, これまで, CEA mRNA 陽性症例に対する S-1 投与の臨床試験に28例を登録し, フォローアップ期間は短い (中央値443 5日) もの, 現時点での死亡例は1例のみで, 1年以内の死亡例はなく, 比較的良好な結果が得られつつある。更に, 今後の腹腔内化学療法に向け, 癌性腹膜炎症例に対してパクリタキセルを腹腔内投与する臨床第 Ⅰ 相試験を行った。4 例にパクリタキセル腹腔内投与を施行し, 2 例で Grade3 の腹痛を認めたが, 3 例で腹水の減少が得られた。また Paclitaxel は腹腔内投与では血中にはほとんど移行せず, 一定期間腹水中に留まることが確認された。

今後, Microarray の導入により, 遺伝子診断のさらなる精度の向上を図ると共に, S-1 投与のプロトコル治療を完遂し, Paclitaxel 腹腔内投与による治療効果の増強を目指したい。

<研究課題> 4

Helicobacter pylori 除菌後の胃癌発生リスク要因について
The risk factors of gastric cancers after Helicobacter pylori

<研究者氏名> 腫瘍病理学部 溝下 勤

共同研究者 塚本徹哉, 中村常哉, 河合宏樹, 立松正衛

[目的]

Helicobacter pylori (以下 Hp) の除菌治療が胃癌予防に有効であるか否か, は重要な問題であるが結論は出ていない。ヒトでは Hp 感染ポイントが不明であるが, ヒト類似の胃病変を発生する Hp 感染スナネズミ腺胃がんモデルでは, Hp 感染ポイントが明瞭であり連続的・経時的に腺胃病変を評価できる。今回, 我々は Hp 感染によって生ずる胃粘膜での遺伝子変化を形質発現の観点から解析した。

[方法]

1. スナネズミ腺胃がんの形質発現: N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 投与 Hp 感染群と MNU 単独投与群の比較。
2. Hp 感染スナネズミ腺胃粘膜での内分泌細胞の動態: real-time RT-PCR あるいは免疫染色によるクロモグラニン A (CgA), ガストリン, gastric inhibitory polypeptide (GIP) 発現の評価
3. ヒト異時性多発性胃癌の検討: ヒト内視鏡的胃癌切除術 (EMR) 症例での病理学的検討

[結果]

1. MNU+Hp 感染群のスナネズミ胃がん50例 (分化型44例, 未分化型 6 例) は, 胃型 (G) 21例, 胃腸混合型 (GI) 24例, 腸型 (I) 4 例, ヌル型 (N) 1 例に分類された。一方, Hp 非感染 MNU 投与群の胃がん 6 例 (分化型 5 例, 未分化型 1 例) は全て G 型であった。胃がん周辺粘膜の形質を検討すると, MNU+Hp 感染群の直径10mm 以内の分化型胃がん13 例中 (G 9 例, GI 2 例, I 2 例), G 型胃がん (7 例) では, G 型の周辺粘膜を有した。しかし, その他 6 例の胃がんでは, がんとその周辺粘膜の形質発現に明らかな相関関係が認められなかった。一方, Hp 非感染 MNU 投与群の胃がん 6 例の周辺粘膜は, すべて G 型の非がん腺管から成っていた。
2. Hp 感染スナネズミ腺胃での CgA, ガストリンは, 感染後 50週で著明な増加を示し, その後75週 ~ 100週になるに従って減少した。GIP は, 感染後50週 ~ 75週 ~ 100週となるに従って増加した。GI type の腺管では, ガストリンと GIP の両方の発現が確認された。
3. ヒト異時性多発性胃癌に対して EMR を行った 7 症例15 病変 (初発 7 例, 再発 8 例) では, 初発 EMR 病変は胃型形質を持つもの (G+GI 型) が 5 / 7 例 (約70%) を占めた。一方, 再発病変は腸型 (I 型) が 4 / 8 例 (50%) を占めた。

[結論]

Hp 感染によって, ヒト・スナネズミいずれも, がん部・非がん部とも腸型化すると考えられた。スナネズミモデルにて, Hp 感染から連続的・経時的に遺伝子の発現レベルを検索すること

は、除菌の胃癌予防への効果を判定するための基礎的データとして重要であると考えられた。