

腫瘍系分科会

(第110回北海道癌談話会例会)

日時：平成26年9月13日(土) 9:30~16:00

会場：札幌医科大学医学部北第一講義室

札幌市中央区南1条西17丁目

TEL (011) 611-2111

会長：札幌医科大学医学部病理学第二講座 教授 澤田 典均

特別講演

がんゲノムから見たTP53「ゲノムの守護神」

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門

教授 時野 隆至

-
- | | |
|------------|-------------|
| 1. 講演時間 | 7分 |
| 2. 討論 | 3分 |
| 3. プロジェクター | 1台使用 |
| 4. 発表形式 | PCプレゼンテーション |

お問い合わせ

札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学 病理学第2講座

TEL (011) 611-2111 (内線2701)

腫瘍系分科会

(第110回北海道癌談話会例会)

日時：平成26年9月13日(土) 9:30~16:00

会場：札幌医科大学医学部北第一講義室

札幌市中央区南1条西17丁目

TEL (011) 611-2111

会長：札幌医科大学医学部病理学第二講座 教授 澤田 典均

特別講演

がんゲノムから見たTP53「ゲノムの守護神」

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門

教授 時野 隆至

一般演題1 (9:30~10:20)

座長 谷野美智枝 (北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野)

塚原 智英 (札幌医科大学医学部病理学第一講座)

1. EpiregulinはERK/MAPK pathwayを介して膠芽腫の腫瘍形成性を促進する

○王 磊³, 高阪 真路¹, 日野原邦彦², 漆戸万沙那¹, 谷地 一博¹, 津田真寿美¹, 谷野美智枝¹, 木村 太一¹, 西原 広史¹, 後藤 典子², 田中 伸哉^{1,3} (北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野¹, 東京大学医学研究科分子療法分野がん分子標的研究グループ², 北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野・探索病理講座³)

2. STING contributes to anti-glioma immunity via triggering type-I IFN signals in the glioma microenvironment.

○大栗 敬幸¹, 小林 博也¹, 小坂 朱², 岡田 秀穂² (旭川医科大学医学部病理学講座免疫病理学分野¹, ピッツバーグ大学医学部脳神経外科²)

3. 悪性髄膜腫におけるシグナル伝達分子発現の分子病理学的検討

○湯澤 明夏¹, 西原 広史², 王 磊², 菅野 宏美³, 小林 浩之⁴, 寺坂 俊介⁴, 田中 伸哉^{1,2} (北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座², 北海道大学病院病理部³, 北海道大学大学院医学研究科脳神経外科⁴)

4. 肉腫幹細胞の同定を目指した新規骨肉腫細胞株の樹立と機能解析

○村田 憲治^{1,2}, 塚原 智英¹, 江森 誠人², 芝山 雄二^{1,2}, 加谷 光規², 鳥越 俊彦¹, 山下 敏彦², 佐藤 昇志¹ (札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部整形外科講座²)

5. 消化管間質腫瘍におけるmicroRNA遺伝子のエピジェネティックな制御

○伊早坂 舞¹, 新沼 猛², 山本英一郎^{1,2}, 甲斐 正広², 丸山 玲緒², 篠村 恭久¹, 鈴木 拓² (札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座¹, 札幌医科大学医学部分子生物学講座²)

一般演題2 (10:20~11:10)

座長 田中 敏 (札幌医科大学医学部病理学第二講座)

山本 雅大 (旭川医科大学腫瘍病理)

6. マウス肝発癌モデルによるPI3 kinase-Akt経路とRas-MAP kinaseの肝発癌における役割の検討

○辛 氷, 山本 雅大, 陳 錫, 藤井 清永, 大塩 貴子, 西川 祐司 (旭川医科大学腫瘍病理)

7. 胆道癌におけるclaudin-18の調節機構および機能解析

○高澤 啓¹, 村田 雅樹¹, 計良 淑子², 田中 敏¹, 澤田 典均¹ (札幌医科大学医学部病理学第二講座¹, 札幌医科大学医学部病理診断学²)

8. 膵癌細胞株を用いたclaudin modulator C-CPEによる抗癌剤の増強作用の検討

○河野 剛¹, 木村 康利¹, 今村 将史¹, 伊東 竜哉¹, 平田 公一¹, 小島 隆² (札幌医科大学医学部第一外科¹, 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所細胞科学部門²)

9. 上皮系ニッチに多細胞凝集塊 (MCA) を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する

○池下 隼司, 宮武由甲子, 朴 鐘建, 大塚 紀幸, 笠原 正典 (北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野)

10. 膵癌におけるmicroRNA-31の新規バイオマーカーとしての可能性

○三橋 慧¹, 能正 勝彦¹, 菅野 伸一¹, 栗原 弘義¹, 伊藤 美樹¹, 五十嵐央祥², 田沼 徳真³, 真口 宏介³, 今村 将史⁴, 木村 康利⁴, 平田 公一⁴, 篠村 恭久¹ (札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座¹, 札幌同交会病院消化器内科², 手稲溪仁会病院消化器内科³, 札幌医科大学医学部消化器・総合・乳腺・内分泌外科学講座⁴)

一般演題3 (11:10~12:00)

座長 井戸川雅史 (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

廣橋 良彦 (札幌医科大学医学部病理学第一講座)

11. Ion PGMシーケンサーを用いたがん関連遺伝子の網羅的変異解析

○佐々木泰史^{1,2}, 中垣 貴文¹, 田村みゆき¹, 小橋 健太¹, 竹田 康佑¹, 井戸川雅史^{1,2}, 鈴木 拓³, 篠村 恭久², 時野 隆至¹ (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学¹, 札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科², 札幌医科大学医学部分子生物³)

12. プロテオミクスを用いたマウス肝腫瘍モデルにおける代謝状態の検討

○藤井 清永, 陳 錫, 大塩 貴子, 辛 氷, 岡田 陽子, 山本 雅大, 西川 祐司 (旭川医科大学医学部病理学講座腫瘍病理分野)

13. 癌幹細胞に特異的な新規ナチュラル抗原ペプチド (NAP) の同定

○宮本 昇^{1,2}, 金関 貴幸¹, 高橋あかり¹, Vitaly Kochin¹, 廣橋 良彦¹, 鳥越 俊彦¹, 平塚 博義², 佐藤 昇志¹ (札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部口腔外科学講座²)

14. 液状処理細胞診検体を使用したmRNA発現解析

○赤羽 俊章¹, 大貫 なつみ¹, 山口 朋美¹, 澤田 貴宏², 福島 祐介², 鎌田 一³, 西原 広史^{1,2,4,5} (北斗病院腫瘍医学研究所病理遺伝子診断科¹, 北斗病院腫瘍医学研究所先進医療推進科², 北斗病院脳神経外科³, 北海道大学医学部探索病理学講座⁴, 北海道大学病院高度先進医療支援センター⁵)

15. 口腔扁平上皮癌の発生や進展において重要な役割を果たす長鎖非コードRNAの同定

○西山 廣陽^{1,2}, 丸山 玲緒², 竹田 康佑^{1,3}, 中垣 貴文^{1,3}, 新沼 猛², 荻 和弘², 出張 裕也², 宮崎 晃亘², 甲斐 正広², 佐々木泰史³, 時野 隆至³, 平塚 博義², 鈴木 拓² (札幌医科大学医学部口腔外科学講座¹, 札幌医科大学医学部分子生物学講座², 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門³)

休憩 (12:00~13:00)

北海道癌談話会奨励賞授賞式・受賞記念講演 (13:00~13:30)

特別講演 (13:30~14:30)

座長 澤田 典均 (札幌医科大学医学部病理学第二講座)

16. がんゲノムから見たTP53「ゲノムの守護神」

○時野 隆至 (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

一般演題4 (14:30~15:10)

座長 津田真寿美 (北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野)

高澤 啓 (札幌医科大学医学部病理学第二講座)

17. p53ファミリーの新規標的遺伝子intercellular adhesion molecule-2 (ICAM2) の同定と機能解析

○竹田 康佑^{1,2}, 佐々木泰史¹, 中垣 貴文^{1,2}, 田村みゆき¹, 大箸 智子¹, 井戸川雅史¹, 荻 和弘², 平塚 博義², 時野 隆至¹ (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門¹, 札幌医科大学医学部口腔外科学講座²)

18. p53の直接転写標的AKR1B10は大腸癌で発現抑制されp53誘導アポトーシスを制御する

○大箸 智子, 井戸川雅史, 田村みゆき, 佐々木泰史, 時野 隆至 (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

19. p53のmiR-200ファミリーを介したCRKLの発現抑制

○田村みゆき, 佐々木泰史, 竹田 康佑, 中垣 貴文, 大箸 智子, 井戸川雅史, 時野 隆至 (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

20. ROSが腫瘍血管内皮へ及ぼす影響

○北條 敬之^{1,2}, 間石 奈湖¹, 秋山 廣輔¹, 大賀 則孝³, 進藤 正信⁴, 樋田 泰浩⁵, 藤澤 俊明², 樋田 京子¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究科歯科麻酔学², 北海道大学大学院歯学研究科口腔診断内科学³, 北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学⁴, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科学⁵)

一般演題5 (15:10~16:00)

座長 佐久間裕司 (札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所分子医学部門)

村田 雅樹 (札幌医科大学医学部病理学第二講座)

21. FUT8の発現は非小細胞肺癌の予後と関係する

○本間 理央¹, 木下 一郎¹, 三善 英知², 外丸 詩野³, 松野 吉宏⁴, 清水 康¹, 竹内 啓¹, 加賀基知三⁵, 谷口 直之⁶, 秋田 弘俊¹ (北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座², 北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野³, 北海道大学病院病理部⁴, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科学分野⁵, 理化学研究所システム糖鎖生物学研究グループ⁶)

22. 口腔扁平上皮癌における新規予後因子としてのVasohibin-1

○鳥居ちさほ^{1,2}, 進藤 正信⁵, 秋山 廣輔¹, 樋田 泰浩⁴, 大賀 則孝³, 間石 奈湖¹, 大廣 洋一², 小野 貢伸², 戸塚 靖則², 松野 吉宏⁶, 北川 善政³, 鄭 漢忠², 佐藤 靖史⁷, 樋田 京子¹ (北海道大学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究科口腔顎顔面外科学², 北海道大学大学院歯学研究科口腔診断内科学³, 北海道大学大学院循環器・呼吸器外科学⁴, 北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学⁵, 北海道大学病院病理部⁶, 東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野⁷)

23. 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進

○間石 奈湖¹, 大場 雄介², 秋山 廣輔¹, 大賀 則孝^{1,3}, 浜田 淳一⁴, 山本 和幸¹, 川本 泰輔¹, Mohammad T Alam¹, 進藤 正信⁵, 樋田 泰浩⁶, 樋田 京子¹ (北海道大学遺制研血管生物学¹, 北海道大学医学研究科細胞生理学², 北海道大学歯学研究科口腔診断内科学³, 北海道大学遺制研幹細胞生物学⁴, 北海道大学歯学研究科口腔病理病態学⁵, 北海道大学医学研究科循環器・呼吸器外科学⁶)

24. ヒト生殖腺での11-ケトテストステロン合成と乳癌細胞MCF7における機能解析

○矢澤 隆志¹, 今道 力敬², 宮本 薫², 谷口 隆信¹ (旭川医科大学生化学講座細胞制御科学¹, 福井大学医学部分子生体情報学²)

25. RNA編集酵素ADAR2の発現抑制は悪性胸膜中皮腫細胞の悪性を低下させる

○坂田健一郎¹, 前田浩次郎¹, 桜井 希¹, 梁 珊珊¹, 中澤誠多朗¹, 項 慧慧¹, 吉山 裕規³, 柳原 五吉⁴, 久保 貴紀⁵, 北川 善政², 浜田 淳一¹, 飯笹 久^{1,3,6} (北海道大学医学部幹細胞生物学分野¹, 北海道大学歯学部口腔診断内科学教室², 島根大学医学部微生物免疫学講座微生物学分野³, 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センタートランスレーショナルリサーチ分野⁴, 安田女子大学薬学部⁵, 島根大学医学部耳鼻咽喉科学講座⁶)

1. EpiregulinはERK/MAPK pathwayを介して膠芽腫の腫瘍形成性を促進する

○王 磊³, 高阪真路¹, 日野原邦彦², 漆戸万沙那¹, 谷地一博¹, 津田真寿美¹, 谷野美智枝¹, 木村太一¹, 西原広史¹, 後藤典子², 田中伸哉^{1,2}(北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野¹, 東京大学医学研究科分子療法分野がん分子標的研究グループ², 北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野・探索病理講座³)

【背景と目的】グリオーマ(神経膠腫)は悪性度の高い脳腫瘍で、長年の研究努力にも関わらず、効果的な治療法は未だ見いだされていない。特に最も悪性度の高いグリオプラストーマ(GBM; WHO分類でGrade-IV)の5年生存率は極めて低く、新規治療薬の早急な開発が求められている。また近年腫瘍組織中でのheterogeneityが提唱されており、治療標的とすべきは高悪性度の集団と考えられる。本研究では、高悪性度を規定する分子を同定し、治療標的となり得るかを検討した。【材料と方法】GBM細胞株U373及びLN443をマウスに皮下移植し、形成された腫瘍からより悪性度の高い亜株U373X及びLN443Xを樹立した。この細胞株を用いて、細胞増殖能、コロニー形成能、neurosphere形成能、および浸潤能を検討した。さらに臨床検体(grade II~IV)を用いてマイクロアレイ解析を行い、治療標的となり得る分子を検討した。【結果】マイクロアレイ解析により、U373X及びLN443X細胞株においてAdipocyte enhancer binding protein 1, epiregulin (EREG)及びmicrofibrillar associated protein 5の発現亢進が認められた。免疫組織化学的染色において、EREGの発現量は生存期間と強く相関した。GBM細胞株において、EREG刺激またはEREGの過剰発現は、上皮成長因子受容体(EGFR)およびERKのリン酸化を亢進させることが明らかとなり、コロニー形成能、neurosphere形成能、およびin vivo腫瘍形成能を促進させた。一方、EGFR阻害剤ゲフィチニブは、EGFRおよびERKのリン酸化を阻害し、EREG過剰発現U373細胞の腫瘍形成能を低下させた。【結論】EREGが神経膠腫の悪性に関与する分子の一つであり、EGFR阻害剤は、EREG過剰発現GBM患者のための候補治療剤となり得ることが示唆された。

2. STING contributes to anti-glioma immunity via triggering type-I IFN signals in the glioma microenvironment.

○大栗敬幸¹, 小林博也¹, 小坂 朱², 岡田秀穂²(旭川医科大学医学部病理学講座免疫病理分野¹, ピッツバーグ大学医学部脳神経外科²)

While type-I IFNs play critical roles in antitumor activity, it remains to be elucidated how type-I IFNs are produced in sterile conditions of the tumor microenvironment. We demonstrated that both human and de novo mouse gliomas showed increased expression of type-I IFN messages. CD11b⁺ brain-infiltrating leukocytes (BILs) in mice were the main source of type-I IFNs that were induced in response to DNA, at least partially in a STING (stimulator of IFN genes) -dependent manner. Glioma-bearing Sting^{Gt/Gt} mice showed low expression levels of Ifns and short survival. Furthermore, BILs of Sting^{Gt/Gt} mice showed increased immature myeloid suppressor and regulatory T-cells, while decreased IFN- γ -producing CD8⁺ T-cells. Intratumoral administration of a STING agonist, c-di-GMP, improved the survival of glioma-bearing mice. With subcutaneous OVA peptide-vaccination, c-di-GMP enhanced OVA-specific immunity. These data demonstrate significant contributions of STING to antitumor immunity via enhancement of the type-I IFN signaling in the tumor microenvironment, and imply a potential use of STING agonists for development of effective immunotherapy.

3. 悪性髄膜腫におけるシグナル伝達分子発現の分子病理学的検討

○湯澤明夏¹, 西原広史², 王 磊², 菅野宏美³, 小林浩之⁴, 寺坂俊介⁴, 田中伸哉^{1,2}(北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野¹, 北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座², 北海道大学病院病理部³, 北海道大学大学院医学研究科脳神経外科⁴)

【背景】脳腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍の一つである髄膜腫は、大部分は良性腫瘍であるが、そのうち数%は悪性髄膜腫に分類される。しかしその生物学的特性は不明であり、また標準治療法が確立しておらず、予後は不良である。そこで本研究では、悪性髄膜腫の標準化学療法確立のための基盤作成を目指して、シグナル伝達分子の発現プロファイルの検討、および悪性髄膜腫細胞株HKBMMを用いたシグナル伝達分子の阻害効果を検討した。【方法】当病理学講座の関連病院にて切除された髄膜腫39症例のバラフィンブロックを用いて、下記のシグナル伝達分子の免疫染色を施行した[EGFR, PDGFR α/β , HER2, cKit, cMet, p-mTOR, CrkII, CrkL, DOCK180]。免疫染色をintensity score + proportion scoreで評価し、WHO Grade間での発現プロファイルを比較検討した。また、Grade II以上で予後を追跡できた21症例に関して、発現プロファイルと予後との相関を検討した。免疫染色の結果に基づき、HKBMMにてEGFR阻害剤(PD153035)およびEGFRの下流シグナル分子の一つであるMekの阻害剤(U0126)の増殖抑制効果の検討を行った。さらに、バラフィンブロックから抽出したDNAを用いてK-, H-, N-Ras遺伝子の変異検索を行った。【結果と考察】免疫染色の結果、EGFR, PDGFR β 及びCrkIIはGradeに関係なくほぼ全ての症例で高発現を認めた。HER2は約40%の症例で陽性であった。Grade II以上でHER2陰性例は陽性例と比較して有意に予後が不良であった。c-kit, PDGFR β , c-Metも、有意差はないものの低発現の症例で予後が不良となる傾向があった。また、HKBMMに対するPD153035およびU0126の増殖抑制効果は限定的であった。EGFR高発現にもかかわらず、EGFR阻害剤が無効であったことから、Rasの活性型変異の可能性を検討したが、Rasの変異は検索し得た全ての症例で認めなかった。

4. 肉腫幹細胞の同定を目指した新規骨肉腫細胞株の樹立と機能解析

○村田憲治^{1,2}, 塚原智英¹, 江森誠人², 芝山雄二^{1,2}, 加谷光規², 鳥越俊彦¹, 山下敏彦², 佐藤昇志¹(札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部整形外科学講座²)

【はじめに】骨肉腫の予後は化学療法の導入により飛躍的に向上したが、化学療法不応症例の予後は未だ不良であり新規治療法の確立が求められている。我々は、これまで骨軟部肉腫における癌幹細胞(肉腫幹細胞)を標的とした分子標的治療開発を目指して研究を行ってきた。今回、新規の骨肉腫細胞株を樹立して肉腫幹細胞の探索を試みたので報告する。【方法】15歳女性の大腿骨遠位骨幹端に発生した通常型骨肉腫の生検組織を細片化し、10%ウシ胎児血清を添加したIscove's modified Dulbecco's Eagle's mediumを用いて通常の条件下で培養をおこない、週2-3回の継代を行った。樹立した細胞株をNOD/SCIDマウスへ背部皮下移植を行い、in vivoでの腫瘍形成能を検討した。肉腫幹細胞の同定には、無血清培地での足場非依存性増殖に基づくSphere形成を行った。【結果と考察】細片化した腫瘍組織を50回以上継代して、新規の骨肉腫細胞株OS13を樹立した。OS13をNOD/SCIDマウスの背部皮下に移植して形成された腫瘍は、組織学的に悪性腫瘍を示した。また、OS13において無血清培地で多くの浮遊細胞塊を形成した。よって、OS13は肉腫幹細胞の形質をもつ可能性が示唆された。今後、Sphere細胞とAdherent細胞の造腫瘍能を検討し、このOS13における肉腫幹細胞の存在を証明するとともに肉腫幹細胞特異抗原の同定につなげていく。

5. 消化管間質腫瘍におけるmicroRNA遺伝子のエピジェネティックな制御

○伊早坂舞¹, 新沼 猛², 山本英一郎^{1,2}, 甲斐正広², 丸山玲緒², 篠村恭久¹, 鈴木 拓²(札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座¹, 札幌医科大学医学部分子生物学講座²)

【背景】消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) は消化管間葉系腫瘍で最も多い腫瘍である。microRNA (miRNA) 発現異常がさまざまな腫瘍の発生や悪性化などにおいても重要な役割を果たしていることが報告されているが、GISTにおいてはいまだ報告は少ない。今回我々はエピジェネティックに発現抑制されるmiRNAをスクリーニングし、それらの発現調節機構ならびに機能について解析した。【方法】GIST-T 1細胞を5-aza-2'-deoxycytidineおよび4-phenylbutyric acidで処理し、発現変動するmiRNAをTaqMan microRNA arrayを用いてスクリーニングした。発現上昇したmiRNA遺伝子のメチル化をBisulfite pyrosequencing法によって解析した。miRNA遺伝子のヒストン修飾 (H3K4me3) をChIP sequencingで解析した。細胞増殖をMTTアッセイにより、浸潤能をMatrigelアッセイにより解析した。臨床検体を対象にメチル化解析を行い、年齢・性別・悪性度・転移・予後などの臨床病理学的因子と比較検討した。【結果】GIST-T 1細胞においてエピジェネティックに発現抑制されたmiRNA候補として25遺伝子を同定した。miR-335およびmiR-34a遺伝子は臨床検体においても高頻度にメチル化が確認された。GIST細胞の増殖や浸潤能に対する影響についての解析を合わせて報告する。

6. マウス肝発癌モデルによるPI3 kinase-Akt経路とRas-MAP kinaseの肝発癌における役割の検討

○辛 氷, 山本雅大, 陳 錫, 藤井清永, 大塩貴子, 西川祐司(旭川医科大学腫瘍病理)

【目的】PI3 kinase-Akt経路およびRas-MAP kinase経路は肝発癌過程において重要と考えられているが、それらの相互作用については不明の点が多い。今回、マウス肝で両経路の活性化が肝腫瘍形成に与える影響を検討した。【方法】活性型 (ミリスチル化) Akt (myrAkt) 単独、変異型Hras (HrasV12) 単独または両方をSleeping Beautyトランスポゾンベクターとともに尾静脈から急速静注し、肝細胞に安定的に発現させ、腫瘍形成過程を経時的に検討した。【結果】myrAktが導入された肝細胞はリン酸化Akt強陽性で、高度の脂肪の蓄積を伴い著明に腫大し、20週後には大小のコロニーを形成した。Ki67 labeling index (LI) は、正常肝細胞が1.3%であったのに対し、これらの腫大肝細胞は18.8%であった。36週以上経過した3個体中2個体において肉眼的な腫瘍が形成され、組織学的に肝細胞癌、胆管癌、混合型肝癌を含む多彩な像が認められた。脂肪を蓄積した前癌肝細胞では、免疫組織化学的にリン酸化ERKは陰性であったが、腫瘍性結節を構成する腫瘍細胞には種々の程度のリン酸化が確認された。myrAktとHrasV12の両方を同時に導入した場合、myrAkt単独導入と同様の脂肪蓄積を伴う肝細胞が出現したが、Ki67 LIは2週目において44.6%であり、myrAkt単独よりも有意に高値であった。4週目には結節性病変が明らかになり、脂肪を蓄積した肝細胞に混在し、脂肪に乏しく核・細胞質比の大きい比較的小型の腫瘍細胞が認められるようになった。これらの細胞のKi67 LIは69.5%できわめて増殖性が高かった。8週目では、肝細胞癌を主体とした腫瘍が肝臓を置換していた。なお、HrasV12単独では、6週間観察した時点で、腫瘍の形成は確認されていない。【考察】PI3 kinase-Akt経路単独の活性化では発癌までに長期間を要するが、その発癌過程にRas-MAP kinase経路の活性化が関わっている可能性がある。また、両経路の同時活性化は、肝細胞の腫瘍性増殖を誘導する上で十分条件であることが示唆された。

7. 胆道癌におけるclaudin-18の調節機構および機能解析

○高澤 啓¹, 村田雅樹¹, 計良淑子², 田中 敏¹, 澤田典均¹(札幌医科大学医学部病理学第二講座¹, 札幌医科大学医学部病理診断学²)

【背景】最近、タイト結合関連タンパク質であるclaudinファミリーはがん細胞でその発現が変化し、浸潤・転移様式に変化を与えることが明らかとなってきている。当研究室では、膵癌および胆道癌におけるclaudin-18の異常発現を確認しており、膵癌細胞株におけるclaudin-18の発現調節機構の解析を進めてきた。本研究では、胆道癌細胞株におけるclaudin-18の発現調節機構と増殖・浸潤能に与える影響を検討した。【方法】札幌医科大学病院で外科的切除された胆道癌を用い、claudin-18の発現と局在を検討した。胆道癌細胞株を用い、種々の刺激を行いclaudin-18の発現変化を解析した。各種シグナルの選択的阻害剤を用い、claudin-18の発現を調節するシグナル伝達経路の同定を試みた。【結果】胆道癌手術材料で、claudin-18の細胞膜への異常発現が観察された。高分化腺癌では高発現しており、低分化腺癌では低下傾向を示した。癌細胞株では、種々の刺激によりclaudin-18の発現は変化した。Claudin-18の発現増加には、PKC、ERKの活性化が関与している可能性が示唆された。

8. 膵癌細胞株を用いたclaudin modulator C-CPEによる抗癌剤の増強作用の検討

○河野 剛¹, 木村康利¹, 今村将史¹, 伊東竜哉¹, 平田公一¹, 小島 隆²(札幌医科大学医学部第一外科¹, 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所細胞科学部門²)

膵癌は抗癌剤治療に強い抵抗性を示すことが多く、最近では抗癌剤と分子標的治療薬を併用した治療法が検討されている。膵癌を含む多くの癌でtight junctionを構成する主要な膜貫通タンパクであるclaudinの高発現が認められており、近年claudinをtargetとした癌治療戦略が注目されている。食中毒の起因菌の一つであるウエルシュ菌の毒素(CPE)のC末断片(C-CPE)はclaudinと高い結合性をもち、細胞を傷害することなくtight junctionのバリア及びフェンス機能を減弱させる。C-CPEを用いることで抗癌剤の作用を増強できる可能性があり、今回我々は膵癌細胞株と正常膵管上皮細胞を用いて、in vitroで検証した。最初に、tight junctionが高発現しバリア機能を有している膵癌細胞株HPACを用いて、C-CPEの作用を調べた。C-CPE処置により、バリア及びフェンス機能の減弱が認められ、またWestern blottingではpMAPKの上昇がみられた。MEK inhibitorであるUO126前処置により、C-CPE処置によるバリア及びフェンス機能の減弱が抑制され、C-CPEによるtight junctionの機能調節機構にはpMAPKが強く関係していることが示唆された。次に、2種類の膵癌細胞株 (HPAC, PANC-1) と我々が樹立したhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子を導入した培養ヒト正常膵管上皮細胞 (hTERT-HPDE) を使用しcell proliferation assayを行った。抗癌剤はgemcitabineとTS-1を用いた。HPAC, PANC-1においてC-CPEをgemcitabineまたはTS-1と併用することで、抗癌剤単独よりも細胞増殖が抑制された。hTERT-HPDEではC-CPEを併用しても抗癌剤の増強作用はみられなかった。またWestern blottingでは、C-CPE処置によりHPACだけでなくPANC-1, HPDEにおいてもpMAPKの上昇がみられた。以上より、claudin modulatorであるC-CPEは膵癌細胞株において抗癌剤の作用を増強し、その作用機構にはMAPK signalが深く関与している可能性が示唆された。

9. 上皮系ニッチに多細胞凝集塊 (MCA) を形成した膀胱癌細胞は治療抵抗性を獲得する

○池下隼司, 宮武由甲子, 朴 鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典(北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野)

膀胱癌は高い浸潤・転移能、および治療抵抗性を持つ極めて予後不良な難治性癌である。がん幹細胞マーカーとして知られるCD44には、多くのスプライシングバリエーション (CD44v) が存在し、中でもCD44v8-10は活性酸素の抑制作用を有しており、治療抵抗性に関与することが報告されている。また、CD44vからCD44 standard (CD44s) への移行は上皮間葉転換 (EMT) に重要な役割を果たしていることが最近報告されている。本研究では、周囲微小環境を構成する上皮系ニッチに焦点をあて、膀胱癌細胞が上皮系ニッチによってより悪性度の高いフェノタイプを獲得し得るかどうかを、正常上皮系組織由来細胞株HEK 293Tを使用した直接共培養モデルを用いて検討した。ヒト膀胱癌細胞株7種におけるCD44v発現パターン解析により、CD44v^{high}型とCD44s^{high}型の2つのフェノタイプが存在することが判明した。膀胱癌細胞をHEK 293Tと共培養したところ、CD44v^{high}膀胱癌細胞ではHEK 293Tに接着し、多細胞凝集塊 (Multicellular aggregates; MCAs) を形成、その膜表面には糸状仮足およびCD44の高発現を認めた。一方、CD44s^{high}膀胱癌細胞ではMCA形成は観察されなかった。MCA形成CD44v^{high}膀胱癌細胞ではゲムシタピンに対する抵抗性が有意に亢進し、CD44v8-10の発現の割合が上昇していた。さらに、MCA形成CD44v^{high}膀胱癌細胞ではKi-67陽性細胞の割合が劇的に低下しており、細胞周期静止状態であることが示唆された。一方、このようなCD44v^{high}膀胱癌細胞におけるMCA形成、ゲムシタピン耐性獲得および細胞静止状態は、線維芽細胞との共培養では全く認められなかった。以上の結果より、膀胱癌細胞は上皮系ニッチにおいてMCAを形成することで、CD44v8-10の発現を亢進させ、細胞静止状態になることによって、治療抵抗性を獲得することが示唆された。この過程は、膀胱癌細胞がEMTを獲得する前に起こる可能性が推測された。

10. 膀胱癌におけるmicroRNA-31の新規バイオマーカーとしての可能性

○三橋 慧¹, 能正勝彦¹, 菅野伸一¹, 栗原弘義¹, 伊藤美樹¹, 五十嵐央祥², 田沼徳真³, 真口宏介³, 今村将史⁴, 木村康利⁴, 平田公一⁴, 篠村恭久¹(札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座¹, 札幌同交会病院消化器内科², 手稲仁会病院消化器内科³, 札幌医科大学医学部消化器・総合、乳腺・内分泌外科学講座⁴)

【背景】近年、microRNA (miRNA) は様々な癌において有用なバイオマーカーとなりうるようになってきている。しかし、膀胱癌におけるmiRNAの役割は不明な点が多い。今回、我々は膀胱癌症例のmiRNA-31-5p発現を測定し、新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。【方法】外科的切除を受けた284例の膀胱癌症例について、パラフィン包埋切片よりDNA, RNAを抽出した。KRAS (codon 12/13/61/146) はパイロシークエンス法で解析した。各miRNAはqRT-PCR法で解析し、発現の上位1/4を高発現群と定義した。BXPc-3およびMIA PaCa-2を用い、miRNA-31-5pをリポフェクション法にて強制発現させ、細胞増殖実験としてMTTアッセイを施行した。【結果】KRAS変異の頻度はcodon 12/13で65.5%, codon 61/146で3.1%であった。Kaplan-Meier法にて、miRNA-31高発現群の全生存期間 (OS) は有意に不良であった (P=0.002)。miRNA-31高発現群はKRAS変異 (codon 12/13/61/146) を有する例が有意に多かった [odds ratio (OR) : 3.5 (1.4-8.7) ; P = 0.003]。miRNA-31の高発現は、他の臨床病理学的因子や、すでに予後不良因子として報告されているmiRNA-21の高発現とは相関しなかった。細胞増殖実験にて、miRNA-31を強制発現した細胞株は有意に増殖能が増大した。【結論】miRNA-31は膀胱癌において独立した予後不良因子であり、分子標的治療および予後予測における新規バイオマーカーとして有用な可能性がある。

11. Ion PGMシーケンサーを用いたがん関連遺伝子の網羅的変異解析

○佐々木泰史^{1,2}, 中垣貴文¹, 田村みゆき¹, 小橋健太¹, 竹田康佑¹, 井戸川雅史^{1,2}, 鈴木 拓³, 篠村恭久², 時野隆至¹(札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学¹, 札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科², 札幌医科大学医学部分子生物³)

半導体シーケンサー Ion PGMシステムをプラットフォームとして、マルチプレックスPCRにより目的のゲノム領域を増幅し、ヒト癌細胞株、癌症例における体細胞変異の同定を試みた。Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2では、10ngのDNAからTP53, KRAS, BRAF, EGFRなど50種類の主要ながん関連遺伝子に存在する2,855のCOSMIC登録変異を含む207アンプリコン (計22,027塩基) について変異解析が可能であった。PGM 318チップを用いた場合、1回約4時間のランで500万リード、500 Mb以上のアウトプットが期待でき、バーコードを用いた1チップあたり8-16サンプルの多検体解析によっても平均coverage depth 500以上のデータが得られた。さらに口腔癌20症例の癌部、正常コントロール (隣接非癌部、または正常リンパ球) について、より網羅的に409がん関連遺伝子の全コーディング領域 (カバー率95.4%, 15,992アンプリコン、計1,233,394塩基) の解析を行ったところ、1ランあたり平均coverage depth 242.1の配列データから、塩基置換、コピー数異常を同定した。FFPEサンプルからの解析も可能であり、臨床研究における遺伝子解析ツールとしての活用が期待される。

12. プロテオミクスを用いたマウス肝腫瘍モデルにおける代謝状態の検討

○藤井清永, 陳 錫, 大塩貴子, 辛 氷, 岡田陽子, 山本雅大, 西川祐司(旭川医科大学医学部病理学講座腫瘍病理解分野)

【背景】腫瘍の病態生理を正確に理解し、有効な治療法を確立する上で、腫瘍細胞における代謝状態の変化を知ることは重要である。悪性腫瘍の一般的な代謝変化としてWarburg効果が注目されているが、各種腫瘍における代謝状態の特徴はほとんど解明されていない。本研究では、マウス腫瘍モデルを対象にプロテオミクスの手法を用いて、腫瘍における代謝関連タンパク質の変動を体系的に調べた。【方法】マウス肝腫瘍は、diethylnitrosamine (DEN) の生後2週間に於ける単回投与または四塩化炭素 (CCl₄) の反復投与 (約25週間) により誘発した。前者は肝硬変を伴わず、過形成結節、腺腫を経て肝細胞癌に進展し、後者は、線維化、肝硬変を背景として腺腫や肝細胞癌が発生する。両実験モデルより得られた肝腫瘍組織とコントロールマウスの肝組織から可溶性タンパク質を抽出し、酵素消化を行った後、LC-MS/MSを用いたプロテオーム解析を行った。試料間におけるタンパク質の発現変動はスペクトルカウント法を用いて定量し、同定したタンパク質のアノテーションには、KEGGデータベースを適用した。【結果】同定された約1,000種類のタンパク質の中から定量評価が可能なものを選び、試料間における代謝関連タンパク質の発現変動を調べたところ、両実験モデルに共通して、グルタチオン代謝とビルビン酸代謝に関わるタンパク質の発現が亢進し、分枝鎖アミノ酸の分解や酸化的リン酸化に関わるタンパク質の発現が低下していた。DENモデルでは、アミノ酸全般の分解ならびにクエン酸回路に関わるタンパク質の発現が低下していた。CCl₄モデルでは、脂肪酸の分解に関わるタンパク質の発現が低下し、糖代謝に関わるタンパク質の発現が亢進していた。【考察】マウス肝腫瘍では、酸化的リン酸化に依存しないエネルギー代謝へとシフトすることが明らかになるとともに、2種のモデルで腫瘍細胞がそれぞれ特有の代謝状態にあることが示唆された。

13. 癌幹細胞に特異的な新規ナチュラル抗原ペプチド (NAP) の同定
○宮本 昇^{1,2}, 金関貴幸¹, 高橋あかり¹, Vitaly Kochin¹, 廣橋良彦¹, 鳥越俊彦¹, 平塚博義², 佐藤昇志¹(札幌医科大学医学部病理学第一講座¹, 札幌医科大学医学部口腔外科学講座²)

癌幹細胞はin vivoでの腫瘍形成能が高くまた従来の化学療法・放射線療法に抵抗性を有することから癌の増殖や再発に大きく寄与すると考えられている。我々は癌幹細胞を標的としたペプチドワクチンによるCTL免疫療法の実現を目指し、ナチュラル抗原ペプチド (NAP) に着目したスクリーニングを行っている。なぜなら癌細胞における抗原提示メカニズムはいまだ不明な点が多く、任意の遺伝子発現が必ずしも同タンパク由来ペプチドのHLA提示につながるには限らない。今回我々は癌幹細胞をCTL標的とするためのNAP同定を試みた。従来のリバースイムノロジー手法とは異なり、マスマスペクトロメトリーを用い癌細胞表面のHLA-A 24に提示されているナチュラルペプチドのレパートリーを網羅的解析し、そのなかで癌幹細胞成分に遺伝子発現しかつ抗原提示される新規ペプチドを同定した。このペプチドは発癌に関わるFAM 83B遺伝子由来の産物であり、健康人由来のPBMCから特異的CD8+T細胞の誘導が可能であった。さらに誘導したT細胞は大腸癌SW 480から抽出した幹細胞クローン由来細胞株を傷害した。これは即ち癌幹細胞に提示されるNAPという新しいタイプのCTL抗原ペプチドであり、我々は引き続きマスマスペクトロメトリーを用いた網羅的解析をすすめている。

14. 液状処理細胞診検体を使用したmRNA発現解析

○赤羽俊章¹, 大貫なつみ¹, 山口朋美¹, 澤田貴宏², 福島祐介², 鎌田 一³, 西原広史^{1,2,4,5}(北斗病院腫瘍医学研究所病理遺伝子診断科¹, 北斗病院腫瘍医学研究所先進医療推進科², 北斗病院脳神経外科³, 北海道大学医学部探索病理学講座⁴, 北海道大学病院高度先進医療支援センター⁵)

【はじめに】液状処理細胞診検体(liquid-based cytology; LBC)は、従来のスライドガラスに直接塗抹する細胞診検査法に代わって、欧米で普及し日本国内においても、徐々に普及しつつある。LBC法は細胞変性や乾燥が少なく、サンプリングエラーによる不適正が減少するだけでなく、残存したLBCを使用することでDNAの検出といった、分子生物学的なアプローチが可能である。今回、LBCから抽出したRNAを使用しいくつかの分子マーカーの発現量を測定し、その有用性を検討したので報告する。

【方法】4℃で保管していた甲状腺および乳腺LBC 検体から市販のRNA抽出kitを使用しRNAを抽出後、cDNAを合成しABI 7900HTを使用してqPCRをおこなった。各遺伝子の発現量は ΔC_t 法を用いて算出した。

【結果】甲状腺濾胞癌や甲状腺乳頭癌などの高分化型甲状腺癌において酵素活性が増加することが報告されているCD 26/DPP 4 のmRNAが高発現の症例では、術材による最終診断で甲状腺濾胞癌と診断された。またCD26 mRNAが高発現である場合、明らかな核異型が認められた。

乳腺LBC検体では、臨床で分泌癌が疑われた症例においてLBCから抽出したRNAを用いてETV 6-NTRK fusion geneを検出することができた。

【総括】LBCからDNAを抽出し変異検出する報告は多数あるが、RNAの検討はまだ少ない。LBCからfusion geneを検出できることはALK fusionやRET fusionといった分子標的治療の観点からもその有用性は高い。また診断に苦慮することの多い、甲状腺濾胞癌をLBCの時点でスクリーニングできる可能性が示唆された。

15. 口腔扁平上皮癌の発生や進展において重要な役割を果たす長鎖非コードRNAの同定

○西山廣陽^{1,2}, 丸山玲緒², 竹田康佑^{1,3}, 中垣貴文^{1,3}, 新沼 猛², 荻 和弘², 出張裕也², 宮崎晃巨², 甲斐正広², 佐々木泰史³, 時野隆至³, 平塚博義², 鈴木 拓²(札幌医科大学医学部口腔外科学講座¹, 札幌医科大学医学部分子生物学講座², 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門³)

近年長鎖非コードRNA (long non-coding RNA:lncRNA)の細胞・生命活動における重要性が次々と明らかになっているが、癌におけるその病的意義に関しては一部の例を除きほとんど分かっていない。本研究では口腔扁平上皮癌(Oral Squamous Cell Carcinoma:OSCC)の発生や進展に関与しうるlncRNAを同定し、その病的・機能的意義を明らかにすることを目的とする。まず候補となるlncRNAを同定するための方法として、近年爆発的な勢いで増加を続ける公共データベースを最大限に利用することを試みた。特にTCGA (The Cancer Genome Atlas)にて公開されているRNA SeqデータとゲノムワイドなDNAメチル化データ (Infinium Human Methylation 450)の詳細な解析を行い、非癌部に比べてOSCCで有意に発現上昇や減少を認めるlncRNA候補や、臨床的特徴と有意に関連を認めるメチル化領域を同定した。次にOSCC細胞株や臨床検体を用いて実際にそれらの発現やメチル化を検証した。またsiRNAを用いたlncRNA候補のノックダウン実験では細胞増殖に変化が認められ、現在更に詳細な機能解析を進めている。

16. がんゲノムから見たTP53「ゲノムの守護神」

○時野隆至(札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

次世代シーケンサによる網羅的な解析により、ヒトがんゲノムの概観が明らかになってきた。多くの腫瘍の遺伝子変異は、高頻度に変異のある少数の遺伝子群と、低頻度しか変異のない多数の遺伝子群から構成される。変異したときにがん化を推進する150から250のドライバー遺伝子の存在がわかってきた。このドライバー遺伝子は12から20種類のシグナル経路に分類される。これらのシグナル経路の全貌を解明することが、がんの基礎研究において最も重要な課題である。将来、がん患者のゲノム情報から最適な個別化治療がもたらされ、がん予防と早期発見の革新的な方法を探索するのに利用されるであろう。ヒトがんで特に高頻度に変異が見つかるのががん抑制遺伝子 TP53であることから「ゲノムの守護神」と呼ばれている。TP53の基礎研究から新たな診断法や個別化治療開発への応用への可能性にも言及したい。

17. p53ファミリーの新規標的遺伝子intercellular adhesion molecule-2 (ICAM2)の同定と機能解析

○竹田康佑^{1,2}, 佐々木泰史¹, 中垣貴文^{1,2}, 田村みゆき¹, 大箸智子¹, 井戸川雅史¹, 荻和弘², 平塚博義², 時野隆至¹(札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門¹, 札幌医科大学医学部口腔外科学講座²)

【目的】p53はヒト悪性腫瘍において最も高頻度に異常が認められる遺伝子である。細胞がDNA損傷などのストレスを受けると、p53は活性化し標的遺伝子の転写を制御することでがん抑制機能を発揮している。本研究ではマイクロアレイ解析でp53ファミリーにより発現誘導される遺伝子として同定した接着因子をコードするICAM2について、転写調節機構、癌細胞の増殖・浸潤・遊走、接着能に対する影響を検討した。【方法】外来性および内在性p53ファミリーによるICAM2の遺伝子発現、タンパク発現を解析した。siRNAによるICAM2を発現抑制、または発現誘導した際のがん細胞の増殖・浸潤・遊走・接着能に対する影響をコロニーアッセイ、Matrigel invasion assay、Wound healing assayにより検討した。【結果】ヒト、マウス、ラット細胞において、p53ファミリーはICAM2の遺伝子、タンパクの発現を誘導した。ヒトICAM2遺伝子のイントロン1にp53結合コンセンサス配列を同定し、クロマチン免疫沈降およびリポーターアッセイでp53ファミリーがこの配列を介してICAM2の転写を活性化することを明らかにした。ICAM2の発現抑制によりがん細胞の遊走・浸潤能の上昇がみられた。一方ICAM2の強制発現、recombinant ICAM2タンパク添加によりがん細胞の遊走・浸潤能の低下、接着能の上昇を認めた。またICAM2の発現抑制により恒常的なERKの活性化を認め、ICAM2が、ERKの活性化制御を介してがん細胞の浸潤・遊走に関わっていることが示唆された。【結論】p53ファミリーにより転写活性化される新規標的遺伝子としてICAM2を同定した。p53ファミリーがICAM2の発現調節を介してがんの浸潤・転移を制御することが示唆された。

18. p53の直接転写標的AKR1B10は大腸癌で発現抑制されp53誘導アポトーシスを制御する

○大箸智子, 井戸川雅史, 田村みゆき, 佐々木泰史, 時野隆至(札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

転写因子p53の変異はヒト癌の約半数に認められる重要な現象である。p53は異常な成長シグナルや様々な細胞ストレスに応答して活性化し、標的遺伝子の発現を制御することで、細胞周期停止やアポトーシスを引き起こして異常な細胞増殖を阻害する。しかし、未だ同定されていないp53の標的遺伝子が多数あり、p53の未知の機能が存在することが想定される。そこでp53の新規標的遺伝子を同定するため、p53が欠失している肺癌細胞H1299に、p53もしくはコントロールの発現アデノウイルスを感染させ、マイクロアレイで網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、主に小腸や大腸に高発現しているAldo-keto reductase family 1, member B10(AKR1B10)がp53により発現誘導されることが判明した。また、正常大腸組織と比較し大腸癌でAKR1B10の発現低下が認められた。そこで、大腸癌細胞においてsiRNAを用いてAKR1B10をノックダウンしたところ、有意にp53誘導アポトーシス低下を認め、逆にAKR1B10を過剰発現させた大腸癌細胞ではp53誘導アポトーシスの増強が認められた。さらに、大腸癌患者におけるAKR1B10の低発現は生存率の低下および予後不良と関連していた。これらの結果から、AKR1B10の低発現はp53の腫瘍抑制機能を阻害し、それにより大腸癌患者の生存率が低下することが示唆された。以上よりAKR1B10の発現が、大腸癌の診断および予後予測マーカーとなりうる事が期待される。

19. p53のmiR-200ファミリーを介したCRKLの発現抑制

○田村みゆき, 佐々木泰史, 竹田康佑, 中垣貴文, 大箸智子, 井戸川雅史, 時野隆至(札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門)

p53はヒト悪性腫瘍において最も高頻度に異常が認められるがん抑制遺伝子であり、その遺伝子産物は転写因子としてゲノム上の応答配列に結合し、近傍の標的遺伝子の転写を活性化することによって、細胞周期調節・アポトーシス誘導・血管新生抑制などに関与している。最近、p53がmiR-200ファミリーの転写調節を介してがんの進行や転移を抑制していることが報告された。miR-200ファミリーは、miR-200b, 200a, 429が1番染色体に、miR-200c, 141が12番染色体にクラスターを形成し、一方で、miR-200b, 200c, 429とmiR-141, 200aがそれぞれ同じシード配列を有している。我々は2つのクラスター周辺にp53結合配列を同定し、この配列がp53ファミリーに転写応答することを示した。さらに*in silico*解析によってmiR-200ファミリーの標的遺伝子を予測したところ、miR-200b/200c/429の標的としてv-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like (CRKL)を同定した。miR-200b/200c/429がCRKL遺伝子の3'-UTRに結合することによって蛋白、およびmRNA発現を抑制することを示した。さらにp53ファミリーの外来性発現、内在性p53の活性化によりCRKL発現が低下した。また変異型p53を持つ乳癌症例において、CRKL mRNAの発現が有意に高値であることを明らかにした。CRKLは種々のがんが発現上昇しており、予後不良因子として報告されている。以上の結果より、p53がmiR-200b/200c/429を介してCRKLの発現を制御し、腫瘍抑制機能を発揮していることが示唆された。

20. ROSが腫瘍血管内皮へ及ぼす影響

○北條敬之^{1,2}, 間石奈湖¹, 秋山廣輔¹, 大賀則孝³, 進藤正信⁴, 樋田泰浩⁵, 藤澤俊明², 樋田京子¹(北海道大学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究科歯科麻酔学², 北海道大学大学院歯学研究科口腔診断内科学³, 北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学⁴, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科学⁵)

腫瘍血管は正常血管と比較して未熟な構造をとっている。例えば、血管内皮同士の結合は疎であり、血管の透過性亢進により組織間圧が高くなり、血管の走行が乱雑になっている。そのため、腫瘍内では有効な血液循環が得られず、低酸素・低栄養状態に陥っていることが知られている。このような環境では活性酸素種(ROS)が蓄積し、細胞に対して様々な影響を及ぼしている。しかし、腫瘍血管内皮細胞(TEC)におけるROSの影響については報告がない。本研究では、ROSがTECに及ぼす影響を検討した。マウス皮下移植腫瘍内のROSをDihydroethidium染色により可視化すると腫瘍血管にはROSの蓄積がみられた。初代培養TECにROSを誘導すると血管新生関連遺伝子の発現が亢進した。それらの中から、我々はBiglycan(BGN)に着目した。BGNはsmall leucine-rich proteoglycanであり、分泌タンパクであることが知られている。我々はこれまでBGNがTECにおいて発現が亢進しており、TLR2,TLR4を介したオートクライン機構により細胞遊走能に関与することをすでに報告している(Brit J Cancer 2012)。TECにおいてROS誘導によりBGNの転写因子、smad2/3が活性化し、細胞運動能が亢進した。ROS阻害剤によりそれらは抑制された。また、shRNAによりBGNをノックダウンしたTECにROSを誘導しても運動能の亢進はみられなかった。以上より、腫瘍微小環境においてROSがTECにおけるBGNの発現亢進を介した高い血管新生能の誘導因子のひとつである可能性が示唆された。

21. FUT8の発現は非小細胞肺癌の予後と関係する

○本間理央¹, 木下一郎¹, 三善英知², 外丸詩野³, 松野吉宏⁴, 清水 康¹, 竹内 啓¹, 加賀基知⁵, 谷口直之⁶, 秋田弘俊¹(北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学分野¹, 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座², 北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野³, 北海道大学病院病理部⁴, 北海道大学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科学分野⁵, 理化学研究所システム糖鎖生物学研究グループ⁶)

【目的】アスパラギン(N)結合型オリゴ糖は、腫瘍化した細胞の糖タンパク質の活性を制御することによって、しばしば腫瘍の生物学的特徴の制御に役割を果たしている。各オリゴ糖は、グリコシル化を通して糖タンパク質の機能に影響を及ぼす特異的な糖転移酵素によって合成される。Fucosyltransferase 8 (FUT8) は、EGF受容体やTGF- β 1受容体を含む糖タンパク質のNグリカンのフコシル化を担う糖転移酵素であり、本研究ではFUT8の発現を免疫組織化学的に解析し、その臨床的な意義を検討した。【方法】FUT8の発現は、当院で外科手術を施行した129検体の非小細胞癌の原発腫瘍を用い、免疫組織化学的に解析した。腫瘍細胞の陽性染色割合に基づいて分類し(高発現>30%または低発現<30%)、組織型、生存、予後を含む因子との関係を統計的に解析した。【結果】FUT8高発現を67例(52%)、低発現を62例(48%)に認めた。多変量解析の結果、FUT8発現は組織型と有意な関係があり、非扁平上皮癌では、扁平上皮癌に比し、有意に高発現していた($p = 0.008$)。完全切除された非小細胞肺癌において、FUT8高発現の患者は、低発現の患者に比し、有意に生存期間が短かった($p = 0.03$)。完全切除された腺癌の患者においても($p = 0.009$)、pStage Iの非小細胞癌の患者においても($p = 0.03$)、同様であった。FUT8高発現は完全切除された非小細胞肺癌でも($p = 0.047$)、pStage Iの非小細胞肺癌でも($p = 0.03$)、有意に独立した予後不良因子であった。【結論】FUT8の発現は非小細胞肺癌の組織型に関係があり、非小細胞肺癌や腺癌の術後予後不良因子であった。

22. 口腔扁平上皮癌における新規予後因子としてのVasohibin-1

○鳥居ちさは¹², 進藤正信⁵, 秋山廣輔¹, 樋田泰浩⁴, 大賀則孝³, 間石奈湖¹, 大廣洋一², 小野真伸², 戸塚靖則², 松野吉宏⁶, 北川善政³, 鄭 漢忠², 佐藤靖史⁷, 樋田京子¹(北海道大学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室¹, 北海道大学大学院歯学研究所口腔顎顔面外科学², 北海道大学大学院歯学研究所口腔診断内科学³, 北海道大学大学院循環器・呼吸器外科学⁴, 北海道大学大学院歯学研究所口腔病理病態学⁵, 北海道大学病院病理部⁶, 東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野⁷)

Vasohibin-1 (VASH1) は血管内皮細胞において血管内皮増殖因子VEGF-Aにより誘導され、血管新生を抑制する負のフィードバック調節因子である。近年、乳癌や前立腺癌など様々な癌において腫瘍血管におけるVASH1の発現と予後との関連が報告されている。しかし、口腔癌におけるVASH1の発現に関する報告はまだない。口腔癌は全悪性腫瘍の1~2%を占め、そのほとんどが扁平上皮癌である。進行した口腔癌は機能的(摂食嚥下障害・構音障害など)・審美的に著しいQuality of life (QOL)の低下をもたらすことから、口腔癌の治療方針の決定に有用なバイオマーカーが求められている。本研究では口腔扁平上皮癌33症例について、抗VASH1抗体を用いて組織免疫染色を行い、VASH1の発現と臨床病理学的因子や予後との関連について統計的に解析を行った。VASH1は非癌部では発現していなかったが、癌部では腫瘍血管や癌細胞に発現していた。腫瘍血管におけるVASH1の発現と臨床病理学的因子や予後との関連はなかった。また、腫瘍組織全体におけるVASH1の発現と臨床病理学的因子との関連もなかった。しかし、腫瘍組織全体におけるVASH1の発現と予後とを解析したところ、VASH1高発現群は低発現群と比較して頸部後発転移率が高い傾向にあり、無病生存率が有意に低かった。これらの結果から口腔扁平上皮癌においてVASH1の予後予測マーカーとしての可能性が示唆された。

23. 腫瘍血管内皮細胞のがん転移促進

○間石奈湖¹, 大場雄介², 秋山廣輔¹, 大賀則孝^{1,3}, 浜田淳一⁴, 山本和幸¹, 川本泰輔¹, Mohammad T Alam¹, 進藤正信⁵, 樋田泰浩⁶, 樋田京子¹(北海道大学遺制研血管生物学¹, 北海道大学医学研究科細胞生理学², 北海道大学歯学研究所口腔診断内科学³, 北海道大学遺制研幹細胞生物学⁴, 北海道大学歯学研究所口腔病理病態学⁵, 北海道大学医学研究科循環器・呼吸器外科学⁶)

血行性転移において、腫瘍細胞は血管内皮細胞間を通過して血液循環に入ることから、腫瘍細胞と血管内皮細胞(EC)の相互作用は重要である。我々はこれまでヌードマウスの皮下移植腫瘍(高転移性、低転移性)から2種類の腫瘍血管内皮細胞(高転移性腫瘍由来: HM-TEC, 低転移性腫瘍由来: LM-TEC)を、正常マウスから正常皮膚由来EC(NEC)を分離培養し、TECがNECと比較して様々な差異があること、さらには、転移能が異なる腫瘍由来のTEC間でも様々な性質の違いがあることを明らかにした。本研究では、高転移性腫瘍内のTECが、腫瘍細胞と相互作用し、がんの転移にどのように関わるかについて解析した。腫瘍細胞と各ECをマウスに共移植すると、腫瘍細胞単独移植およびNEC, LM-TEC共移植マウスでは肺転移が見られないのに対し、HM-TECとの共移植により循環腫瘍細胞数の増加と肺転移の促進が認められた。腫瘍細胞の血管内侵入の過程についてin vitroで解析すると、腫瘍細胞はHM-TECに対して最も高い走化性、接着能を示した。HM-TECにおいて特異的に発現が亢進している分子に着目し、その遺伝子発現をRNAiによりノックダウンすると、腫瘍細胞の遊走および転移が有意に抑制された。腫瘍微小環境内で変化した腫瘍血管内皮細胞が、がんの転移促進に関与することが示唆された。

24. ヒト生殖腺での11-ケトテストステロン合成と乳癌細胞MCF7における機能解析

○矢澤隆志¹, 今道力敬², 宮本 薫², 谷口隆信¹(旭川医科大学学生化学講座細胞制御科学¹, 福井大学医学部分子生体情報学²)

アンドロゲンは、男性の生理機能のみならず、女性においても、それ自身或いはエストロゲンに変換されることにより重要な役割を果たす。私たちは、過去の研究により魚類のアンドロゲンであると考えられてきた11-ケトテストステロン(11-KT)が、マウスにおいてもテストステロンから合成され、その合成が卵巣で高いことを証明している。本研究では、ヒトの11-KT合成経路と、乳癌由来のMCF7細胞における11-KTの機能について調べた。まず初めに、11-KT合成に関わる酵素群(CYP11B1とHSD11B2)の発現をヒト生殖腺において調べたところ、両者は精巣と卵巣で発現することが確認された。ヒト血中における11-KTとテストステロン濃度を測定したところ、両ホルモン共に男女で検出することができた。女性血中のテストステロン濃度は、男性血中の10分の1程度しか存在しないものの、11-KT濃度には男女差がほとんど認められなかった。CV-1細胞におけるレポーターアッセイを用いた実験では、11-KTのアンドロゲン受容体活性化能は、テストステロンと大きな違いが認められなかった。一方、アロマトラーゼを発現する細胞株(KGN細胞、MCF7細胞等)においては、11-KTの活性が高くなることから、11-KTはエストロゲンに変換されないことが予想された。この仮説を支持するように、高濃度のテストステロンはエストロゲン受容体を活性化するが、11-KTには活性化能が全く観察されなかった。そして、エストロゲン依存性に増殖するMCF7細胞は、高濃度のテストステロンにより増殖が亢進するが、11-KTではむしろ増殖を抑制する傾向がみられた。以上の結果より、11-KTは、ヒト生殖腺においても合成され、特に女性では、エストロゲンへ変換されないアンドロゲンとして機能することが示唆された。

25. RNA編集酵素ADAR2の発現抑制は悪性胸膜中皮腫細胞の悪性度を低下させる

○坂田健一郎¹, 前田浩次郎¹, 桜井希¹, 梁珊瑚¹, 中澤誠多朗¹, 項慧慧¹, 吉山裕規³, 柳原五吉⁴, 久保貴紀⁵, 北川善政², 浜田淳一¹, 飯笹久^{1,3,6}(北海道大学医学部幹細胞生物学分野¹, 北海道大学歯学部口腔診断内科学教室², 島根大学医学部微生物免疫学講座微生物学分野³, 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センタートランスレーショナルリサーチ分野⁴, 安田女子大学薬学部⁵, 島根大学医学部耳鼻咽喉科学講座⁶)

Adenosine Deaminase, Acting on RNA (ADAR) 2はmRNA前駆体2本鎖領域のアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集酵素のひとつである。がんにおけるADAR 2の役割を明らかにするために、悪性胸膜中皮腫細胞 (MPM) のADAR2発現を人為的に変化させ悪性形質 (細胞増殖・運動・浸潤能) の変化について検討した。まず、siRNAを用いてMPM細胞のADAR 2の発現を抑制したところ、COPA遺伝子のRNA編集頻度が低下した。また、ADAR 2の発現抑制はMPM細胞の増殖、運動、浸潤能を低下させることがわかった。つぎに、2種類のADAR 2の変異タンパク (酵素活性ドメイン (T375A) あるいは2本鎖RNA結合能を欠損した変異体 (EAA)) をMPM細胞に強制発現させた。いずれの変異体を強制発現させても、COPAのRNA編集頻度は低下した。一方、細胞増殖、運動能および浸潤能はRNAに結合できないADAR2を発現させた場合でのみ低下した。これらのことから、MPM細胞においてADAR2は、その酵素活性非依存的に細胞増殖、運動能および浸潤能の維持・増強に関与していると考えられた。