

医学部附属先端医学研究推進支援センター

平成20年度
研究推進部門 会計・成果報告

平成20年度医学部附属先端医学研究推進支援センター-研究推進部門

3,200,000	
-----------	--

使用額	使用内訳
3,125,040	消耗品
44,750	旅費(2名) (センター主催セミナー)
28,000	謝金(2名) (同上)
2,210	運送費 (測定用検体宅配便)
3,200,000	

平成20年度 医学部附属先端医学研究推進支援センター 研究推進部門

3,200,000	配分額	予算 4,000,000円 - 800,000円(光熱水費)=3,200,000円	アレー受託解析分 (計1,146,600)
使用額		使用内訳	
297,801	野出孝一教授	生物時計の分子中枢およびアウトプット機構の解析 野出(内科)、明石(内科)、副島(分子生命)	0
299,775	末岡栄三郎准教授	腫瘍バンクの確立と癌感受性および治療予測因子の検討 末岡(内科)、荒金(内科)、福島(内科)、岩永(内科)	504000
299,985	戸田修二教授	脂肪細胞ランドの構築:肥満、メタボリック症候群、癌、老化予防法の確立 魚住(泌尿器)、成澤(内科)、野出(内科)、藤本(内科)、佛淵(整形外科)、戸田(病因病態)、青木(病因病態)、内橋(病因病態)	252000
350,709	副島英伸教授	ゲノム刷り込みの分子機構の解明 副島(分子生命)、城(分子生命)、東元(分子生命)	0
299,910	出原賢治教授	慢性炎症の制御に向けたその発生機序の解明と治療戦略の構築 出原(分子生命)、金地(分子生命)、白石(分子生命)、太田(臨床検査)	390600
432,780	吉田裕樹教授	IL-27シグナルの動脈硬化発症・進展における役割・進展における役割 吉田(分子生命)、野出(内科)、平瀬(内科)、原(分子生命)、宮崎(分子生命)	0
1,219,040	研究推進部門	受託解析 1,146,600円 (傾斜配分 内訳は右欄) センター主催セミナー関連 旅費 44,750円 謝金 28,000円 切手代 1,680円 運送費 2,210円	1146600
3,200,000	合計		* 上欄の計 1146600

平成20年度先端医学研究推進支援センター活動報告

研究課題：IL-27 シグナルの動脈硬化発症・進展における役割

分子生命科学 吉田 裕樹、原 博満、宮崎 義之

内科学 野出孝一、平瀬 徹明

【背景】

冠動脈疾患や脳血管障害を中心とする動脈硬化性疾患は増加を続け、生命予後の改善、健康寿命の延長、医療費抑制の観点から動脈硬化の成因の解明と治療及び予防法開発は社会的急務となっている。動脈硬化の発症・進展においては、糖尿病や脂質異常症等の代謝異常を背景として血管細胞、免疫担当細胞、炎症メディエーターが中心となった血管壁における慢性炎症が重要な役割を果たしているが、その分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

【目的】

Th1 ヘルパーT 細胞分化・活性化の初期段階を制御し、炎症性サイトカイン産生を抑制するサイトカイン IL-27 とその受容体 WSX-1 が動脈硬化の発症・進展に關与するか否か、及びその分子メカニズムを明らかにする。

【方法及び結果】

昨年度 EBI3 欠損及び WSX-1 欠損による動脈硬化巣形成の促進を見出した。この成因を明らかにするために動脈硬化巣の病理組織学的検討を行った。内皮細胞活性化のマーカーである接着分子 VCAM1 の発現、動脈硬化巣内の平滑筋細胞増殖には EBI3 欠損及び WSX-1 欠損は影響を与えなかった。EBI3 欠損及び WSX-1 欠損は動脈硬化巣におけるマクロファージマーカー陽性面積を増加させた。マウス腹腔内マクロファージの変性 LDL 取り込みは EBI3 欠損及び WSX-1 欠損により有意に増加した。マクロファージの変性 LDL 取り込みに対するリコンビナント IL27 の作用及び細胞内シグナルについて現在検討中である。

【平成21年度研究計画】

単球・マクロファージ系細胞の骨髄からの動員、生存、血管壁における活性化に対する IL27 の作用を検討するため骨髄キメラマウスを作成し検討する。技術導入は平成20年度に完了しており、平成21年度における実験成果が期待される。また、マクロファージの活性化に対する IL27 の作用に関する検討をさらに進めるため、サイトカイン産生能やアポトーシスにおける作用を *in vitro* において検討する予定である。

【発表論文】

1. Angiotensin Increases the Expression of IP-10 and Renin-angiotensin System in Endothelial Cells.

Noriko Ide, Tetsuaki Hirase, Ai Nishimoto-Hazuku, Yuji Ikeda, Koichi Node.

Hypertension Research 2008;31:1257-1267.

先端医学研究推進支援センター

個体機能制御学分野 慢性炎症の制御に向けたその発生機序の解明と治療戦略の構築グループ 活動報告 出原 賢治

発表論文（原著）

1. Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Nakajima A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H,^P Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K:
Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease.
J Immunol, **180**: 6262-6269, 2008
2. Kanaji S, Kanaji T, Migita M, Kunishima S, Kunicki TJ, Okamura T, Izuhara K:
Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic thrombocytopenia.
Eur J Haematol, **80**: 361-364, 2008
3. Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H:
Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites
Medicinal Chemistry, **4**: 322-327, 2008
4. Honjo E, Shoyama Y, Tamada T, Shigematsu H, Hatanaka T, Kanaji S, Arima K, Ito Y, Izuhara K, Kuroki R.
Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor α chain and interleukin-13 receptor α 1 chain by a silkworm-baculovirus system.
Protein Expr Purif, **60**: 25-30, 2008
5. Oku E, Kanaji T, Takata Y, Oshima K, Seki R, Morishige S, Imamura R, Ohtsubo K, Hashiguchi M, Osaki K, Yakushiji K, Yoshimoto K, Ogata H, Hamada H, Izuhara K, Sata M, Okamura T:
Periostin and bone marrow fibrosis
Int J Hematol, **88**: 57-63, 2008
6. Izuhara K, Ohta S, Kanaji S, Shiraishi H, Arima K:
Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family.
Cell Mol Life Sci, **65**: 2541-2553, 2008

7. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S:
A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells.
Endocrinology, **149**: 4794-4798, 2008
8. 太田昭一郎, 東義則, 白石裕士, 野口保彦, 出原賢治:
オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患診断の確立—SCCA の新規 ELISA システムの確立—
臨床病理, **56**: 980-985, 2008

気管支喘息の発症におけるTLR4 シグナルの影響に関する研究

研究成果

本年度の活動の中で標記研究に関して以下の結果を得た。

マウスを卵白アルブミンで感作した後、卵白アルブミンを吸入させることで気管支喘息様の症状、所見を呈する喘息モデルマウスを作製した。感作1日前にTLR4に対する刺激型抗体であるUT12を投与すると、喘息様症状、所見が全て抑制された(図参照)。

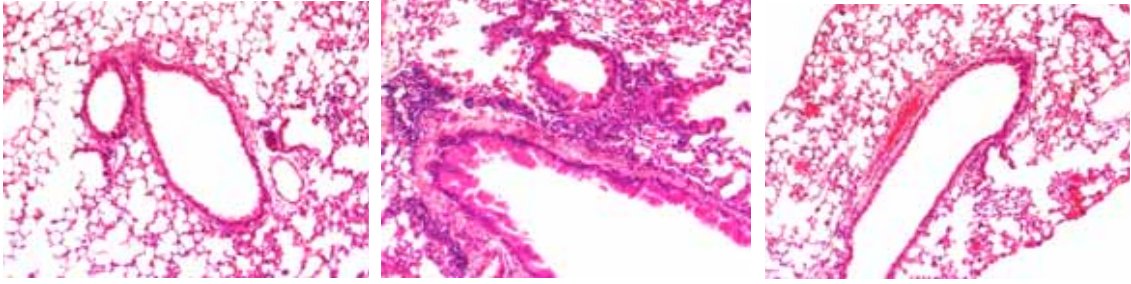
UT12投与した後卵白アルブミンにて感作したマウスより得られた脾細胞を卵白アルブミンにて *ex vivo* で刺激したところ、IL-13、IL-4、IL-17などのサイトカイン産生が抑制されていた。一方、IFN- γ の産生の増加は見られなかった。

UT12投与したマウスの脾臓での樹状細胞においては卵白アルブミンの取り込みが抑制されており、その結果、樹状細胞上の共刺激分子の発現が低下していた。

以上の結果より、TLR4シグナルは脾臓における樹状細胞の成熟化を引き起こし、それにより樹状細胞における抗原取り込み、共刺激分子の発現が低下し、そのため気管支喘息の発症が阻害されたと考えられた。多くの疫学的解析によりTLR4シグナルの活性化は気管支喘息などのアレルギー疾患の発症率と逆相関をすることが示されており、衛生状態の改善がアレルギー疾患の増加を招いたとする“衛生仮説”を裏付ける一因と考えられている。今回の研究成果は、そのTLR4シグナルによる気管支喘息の発症阻害を説明する一つの機序となりうる。

今後は、さらにTLR4シグナルの機序について詳細な解析を行うとともに、樹状細胞の成熟化がヒトにおいても発症抑制と関連しているか、あるいはTLR4シグナルの活性化を気管支喘息の治療あるいは予防に適用できないか検討を行っていく予定である。

喘息モデルマウスの肺組織像 (H&E 染色)



コントロール

卵白アルブミン

卵白アルブミン+ UT12

* 卵白アルブミン吸入による好酸球主体の細胞浸潤や上皮細胞の杯細胞化が UT12 投与により抑制されることが示されている。

細胞機能解析学分野

野出孝一（内科学）、明石真（内科学）、副島英伸（分子生命科学）

研究課題：生物時計の分子中枢およびアウトプット機構の解析

【背景と目的】

bHLH-PAS 型転写因子である NPAS2 (MOP4) は、様々な細胞内外の環境因子に応答するセンサータンパク質であることが報告されている。また NPAS2 は体内時計の正常なアウトプットにおいて必須である。NPAS2 は時計転写因子 BMAL1 との機能的相互作用により、ターゲット遺伝子の発現を制御すると考えられる。Npas2 mRNA の発現量日内変動は Bmal1 のそれと非常に似ており、NPAS2 と BMAL1 は同一体内時刻に発現量が高まることで、効率的にターゲット遺伝子の概日発現を行っていると思える。今回の研究の目的は、Npas2 遺伝子の発現リズム機構を明らかにする事である。我々は Npas2 発現リズムを制御する因子として核内受容体 RORalpha を候補として解析を行った。

【結果と考察】

Npas2 の転写開始点上流に見出された2つの ROR 結合コンセンサス (RORE) が、Npas2 の発現リズムにおいて機能するか調べるために、RORE の点変異コンストラクトを作成してレポーターアッセイを行った。その結果、RORalpha による転写活性化および REV-ERBalpha による転写抑制は、RORE に大きく依存していることが判明した。さらに、コンストラクトを NIH3T3 細胞に導入し、細胞自律的 Npas2 転写リズムをリアルタイムモニターしたところ、RORE の変異により完全にリズムが失われた。次に、内在性の RORalpha が細胞自律的な Npas2 発現リズムに必要なのか調べるために、RORalpha 変異体マウスから作成した MEF (マウス胚性線維芽細胞) を使用した。この MEF における Npas2 の発現リズムは、野生型 MEF のそれに比べて振幅が小さく持続性の低いものだった。

我々は今回、Npas2 の概日発現が REV-ERB / ROR 系に依存している事を明らかにした。RORalpha の発現量は顕著な日内変動を示さないことから、Npas2 発現リズムを駆動するのは REV-ERB であると考えられる。つまり、REV-ERB の発現量が減少する主観的夜に RORalpha が Npas2 発現を活性化し、Npas2 の発現リズムを生み出している。このシステムによって、Bmal1 と Npas2 の発現タイミングが正確に同期化し、

効率的な NPAS2:BMAL1 ダイマー形成および遺伝子発現が可能になり，体内時計のロバストネスも向上すると考えられる．

【発表論文】

Unusual circadian locomotor activity and pathophysiology in mutant CRY1 transgenic mice

Okano. S., Akashi. M., Hayasaka. K., and Nakajima. O.

Neuroscience Letters 2009; 451(3): 246-251

* * *

先端医学研究推進支援センター

細胞機能解析学分野 「脂肪細胞ランドの構築：肥満、メタボリック症候群、癌、老化予防法の確立」グループ 活動報告 戸田修二

脂肪組織の新規培養法の確立と細胞間相互作用に関する研究

発表論文

1. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology* 149(10):4794-4798, 2008
2. 内橋和芳, 青木茂久, 園田恵美子, 米満伸久, 船津丸貞幸, 井手口浩幸, 杉原甫, 佛淵孝夫, 戸田修二. 骨芽細胞とヒト骨髄脂肪組織の細胞間相互作用は骨髄のホメオスターシスに關与する. *ホルモンと臨床* 56: 170-176, 2008
3. Shuji Toda, Kazuyoshi Uchihashi, Shigehisa Aoki, Emiko Sonoda, Fumio Yamasaki, Meihua Piao, Akifumi Ootani, Nobuhisa Yonemitsu and Hajime Sugihara. Adipose tissue-organotypic culture system as a promising model for studying adipose tissue biology and regeneration. *Organogenesis* (in press)

研究成果

- 1) 脂肪組織片培養系を確立：ラット、マウス、ヒト脂肪組織片の培養系を確立した。即ち、成熟脂肪細胞、前脂肪細胞、間葉系幹細胞からなる脂肪組織を長期間培養することに成功した。この培養法により、肥満、肥満症、脂肪組織再生機構を解明するための細胞レベルでの手法が確立された。さらに、組織再生機構の cell density theory と niche theory の仮説を提唱した（図1）。
- 2) 脂肪組織—腎尿細管上皮細胞相互作用：上記培養法を用いて、腎尿細管上皮細胞と脂肪組織の相互作用を解析している。脂肪組織は、腎尿細管上皮細胞の細胞肥大、極性化、分化を促進する（図2）。即ち、脂肪組織は、尿細管上皮細胞の極性化分子（ZO-1, aPKC, Cdc42, Par3, PTEN）、イオン輸送体機能分子（pendrin）の発現を亢進する。さらに、脂肪組織は、尿細管上皮の増殖・アポトーシスを抑制する。一方、腎尿細管上皮細胞は、脂肪組織からの前脂肪細胞、間葉系幹細胞の再生を抑制する。また、尿細管上皮は、脂肪組織からのアディポネクチン産生を抑制するが、レプチンの産生には影響を与えない。以上の知見は、腎周囲脂肪組織、あるいは全身の脂肪組織と尿細管上皮細胞の細胞間相互作用が、腎臓や脂肪組織の pathophysiology に深く関与していることを示唆している。
- 3) 脂肪組織—心筋細胞相互作用：脂肪組織は、心筋細胞の増殖を抑制し、アポトーシ

スを促進する。さらに、心筋細胞のミオシンなどの収縮蛋白発現、ANP 等の機能分化分子の発現を抑制する。一方、心筋細胞は、脂肪組織からの前脂肪細胞、間葉系幹細胞の再生を抑制する。心外膜脂肪組織が心筋細胞の生存・増殖・機能分化を抑制することが示唆される。

今後の取り組み

我々が確立した脂肪組織片培養系を用いて、各種生体細胞（正常、癌）と脂肪組織の相互作用を解析する予定である。腎尿管細胞、心筋細胞の結果は、平成 21 年度中に論文として発表する予定である。

図 1

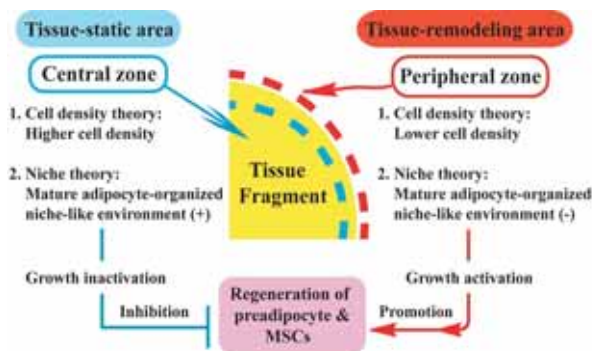
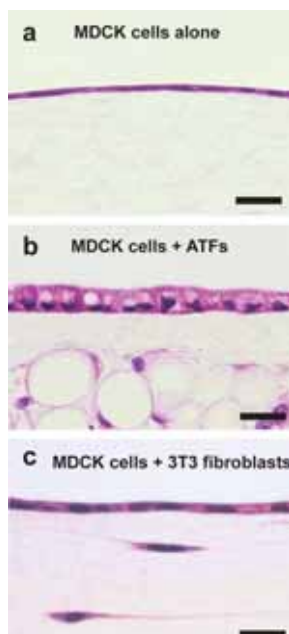


図 2



先端医学研究推進支援センター

研究推進部門 細胞機能解析学分野 エピジェネティクスグループ 活動報告

副島英伸 (分子生命科学講座 分子遺伝学・エピジェネティクス分野)

研究課題：ゲノム刷り込みの分子機構の解明

発表論文

1. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*, 149(10):4794-4798, 2008
2. Misago N, Joh K, Yatsuki H, Soejima H, Narisawa Y. A BHD Germline Mutation Identified in an Asian Family with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Acta Dermato-Venereologica*, 88(4): 423-425, 2008
3. Yakabe S, Soejima H, Yatsuki H, Tominaga H, Zhao W, Higashimoto K, Joh K, Kudo S, Miyazaki K, Mukai T. MeCP2 knockdown reveals DNA methylation-independent gene repression of target genes in living cells and a bias in the cellular location of target gene products. *Genes Genet Syst*, 83(2): 199-208, 2008
4. Haruta M, Arai Y, Sugawara W, Watanabe N, Honda S, Ohshima J, Soejima H, Nakadate H, Okita H, Hata JI, Fukuzawa M, Kaneko Y. Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*. 47(8):712-727, 2008
5. Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I. MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet*. 17(8):1192-1199, 2008
6. 東元 健, 副島英伸 . ゲノム刷り込みとBeckwith-Wiedemann症候群 . 日本小児血液学会雑誌 22(3): 139-143, 2008
7. 副島英伸 . ゲノムインプリンティング機構と疾患 . 臨床検査 52(6): 683-688, 2008
8. 副島英伸 . 特集エピジェネティクス・最近の動向と疾患 . ゲノムインプリンティング異常と疾患 . 最新医学 63(4): 83-90, 2008

研究成果

ゲノム刷り込みは、エピジェネティクスの中でも、特に個体発生や分化、臨床的には癌や先天性疾患の発症に関わる重要な遺伝システムである。複数の刷り込み遺伝子が刷り込みドメインを形成し、ドメイン内の刷り込み調節領域 (ICR) に付けられたマーク (DNA メチル化、ヒストン修飾) より、どちらの親由来の遺伝子が発現するか決定されている。しかし、物理的に離れた複数の遺伝子が、ICRのマークを基にどのような分子機構で発現調節されているかは未解明のまま

ある。本グループでは、刷り込みの分子機構を明らかにすることを目的とする。

(1) non-coding RNA *LIT1* の刷り込み調節機構

KIP2/LIT1 刷り込みドメイン内に存在する non-coding RNA *LIT1* に着目した。truncate した短い *LIT1* RNA を発現するような細胞を 3 種類作製し、近傍の刷り込み遺伝子 *KIP2*, *KvLQT1*, and *OBPH1*, の発現を real-time PCR で解析した。正常細胞ではこれらの遺伝子の発現は抑制されているが、3 種類の truncate 細胞すべてで発現上昇を認めた。また、クロマチン免疫沈降法により、各遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾を解析したところ、truncate 細胞ではヒストン H3 のアセチル化が共通して増加していた。DNA メチル化の変化は認められず、脱メチル化状態が維持されていた。このことから、正常細胞では、父性染色体上で non-coding RNA *LIT1* がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートすることにより刷り込み遺伝子の発現を抑制していること、この抑制は DNA メチル化に依存しないこと、が示唆された。

(2) *Murr1/U2af1-rs1* の刷り込み調節機構

Murr1 は、成体マウスの脳で特異的に母性発現する刷り込み遺伝子である。この遺伝子のイントロン 1 に逆向きに転写される父性発現遺伝子 *U2af1-rs1* が存在する。*U2af1-rs1* は、母性アレルのプロモーター領域が卵の段階からメチル化 (gametic methylation) されているため、母性アレルは抑制されて父性アレルが発現する。一方、*Murr1* の刷り込み機構は未解明であった。*Murr1* プロモーターの DNA メチル化とヒストン修飾は、両アレル間で有意な差は認められなかった。しかし、成体脳では *U2af1-rs1* が *Murr1* プロモーターを超えて転写されることを見いだした。RNA ポリメラーゼ (Pol) のリン酸化状態を解析したところ、実際に父性アレルにおいて *U2af1-rs1* 由来の Pol が *Murr1* プロモーターとその上流に存在することが明らかとなった。以上の結果から、*Murr1* の刷り込み (母性発現) は *U2af1-rs1* 由来の転写干渉によるものと示唆された。

研究成果を踏まえての今後の取り組み

(1) non-coding RNA *LIT1* の刷り込み調節機構

- ・正常細胞では各刷り込み遺伝子プロモーターに HDAC がリクルートされているのか？ truncate 細胞ではその HDAC が遊離しているのかを明らかにする。
- ・non-coding RNA *LIT1* と HDAC の interaction を証明する。
- ・刷り込み破綻を薬剤耐性で判別できる細胞を作製し、全遺伝子をカバーする siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングすることにより、刷り込み機構の調節分子を同定する。(進行中)

(2) *Murr1/U2af1-rs1* の刷り込み調節機構

- ・*U2af1-rs1* を truncate したマウスを作製し、転写干渉による刷り込み機構を証明する。

腫瘍バンクの確立とがん感受性及び治療予測因子の検討

発表論文

- 1 . Sueoka-Aragane N, Imai K, Komiya K, Sato A, Tomimasu R, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E. Exon 19 of *EGFR* mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1. *Cancer Sci.* 2008;99:1180-7
- 2 . Sato A, Sueoka-Aragane N, Saitoh J, Komiya K, Hisatomi T, Tomimasu R, Hayashi S, Sueoka E. Establishment of a new method, transcription-reverse transcription concerted reaction, for detection of plasma *hnRNP B1* mRNA, a biomarker of lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008;134:1191-7
- 3 . Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, Saito M, Osame M, Izumo S, Kuroda Y. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 2008;14:130-5.

研究成果

- 1 . 腫瘍バンクの確立：2008 年度は、肺癌領域では、呼吸器外科、病理部との連携にて、癌組織、非癌組織、正常気管支上皮細胞初代培養のセットで 90 例（計 417 例）血漿、末梢血リンパ球は約 80 例収集した。造血器腫瘍についても白血病 4 例、骨髄異形成症候群 4 例、悪性リンパ腫 8 例、成人 T 細胞性白血病 3 例について、骨髄、末梢血、リンパ節よりサンプルを収集した。
- 2 . 遺伝子バンク・細胞バンクの作成：上記の症例について、全例 DNA を抽出、約 50%の症例で RNA、蛋白を抽出し、-80℃にて凍結保存し、種々の遺伝子検査に対応可能となっている。
- 3 . 治療感受性予測因子の検討
分子標的薬である上皮増殖因子受容体（EGFR）阻害剤に対し治療予測因子として EGFR 変異検索を肺癌全例に対し施行している。計 350 例で EGFR 変異を検索し、115 例（33%）で exon18, 19, 21 に変異を認めた。50 名に gefitinib を投与した。18 名は EGFR 変異を認め、78%(14/18)で EGFR 阻

害剤が有効であった。

K-ras については、72 例検討し、10 例（13%）で変異（codon 12, codon 61）を認めた。全例 gefitinib 投与は行っていない。

分子標的薬以外の抗がん剤に対する効果予測因子として、最近 DNA 修復能が注目されている。我々は、RNA 結合蛋白である Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1(hnRNP B1)が hnRNP B1 が肺がん早期から高発現していること、DNA 修復因子である DNA 依存性キナーゼ（DNA-PK）に結合しその活性を阻害すること、hnRNP B1 の過剰発現は細胞内における DNA 修復能を抑制することを明らかにしてきた。そこで、hnRNP B1 が化学療法の効果予測因子となるか検討している。今年度は、hnRNP B1 の簡易検査法として、血漿 RNA を用いた hnRNP B1 mRNA の新しい核酸増幅法 TRC(transcription-reverse transcription concerted reaction)を確立し、肺癌患者、健常者にて比較検討した（Table）。本院職員検診で血漿を採取した健常人 729 例より各年代 20 人（男性 10 人、女性 10 人）を無作為に抽出し、TRC 法を用いて血漿 hnRNP B1 mRNA を測定した。その結果 97 例中 5 例（5.2%）で同定された。性別、年代別に統計学的有意差は見られなかった。肺癌症例では、23 例中 9 例（39.1%）で検出した

Comparison of plasma *hnRNP B1* mRNA levels between lung cancer patients and normal, healthy volunteers

	Frequency of detection
Lung cancer patients	9/23 (39.1%)
Healthy volunteers	5/97 (5.2%)

研究成果を踏まえての今後の取り組み

EGFR 阻害剤耐性化機構として K-ras 変異、c-MET 遺伝子の増幅が報告されている。K-ras 変異検索は施行可能となっているので今年度も続行する。c-MET 遺伝子増幅については、現在企業との共同研究にて FISH 法にて解析中である。

定量的 hnRNP B1 免疫組織化学法を確立し、化学療法感受性との相関を検討する。