

厚生科学研究研究費補助金
がん克服戦略研究事業

ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析 (H12-がん-018)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 崎山 樹

平成 14 (2002) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析	1
崎山 樹	

II. 分担研究報告

1. 1番染色体短腕に座位する新規がん抑制遺伝子の単離	6
中川原 章	
2. がん細胞の転移を制御する遺伝子の探索と解析	9
竹永 啓三	
3. DAN欠損マウスの作成とその解析	11
古関 明彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13

厚生科学研究費（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

発がんの分子機構に関する研究

（ヒトがんの発生ならびに転移を抑制する遺伝子の解析）

主任研究者 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局長

研究要旨

1) DAN 遺伝子の転写活性化因子として p73 が同定された。DAN が炎症性疼痛に関わっていることが判明した。2) p73 の C 末端側に結合する蛋白質として MMI を同定し、MMI は c-myc による p73 の転写活性化能の抑制を解除することが示された。3) p73 がそのスプライス変異体の $\Delta Np73$ のプロモーターを活性化すること、誘導された $\Delta Np73$ は p73 並びに p53 に対して抑制的に働き、負のフィードバックループが存在することを明らかにした。4) ヒト染色体 1 番 1p36.2 のホモ欠失領域にマップされた 6 個のがん抑制候補遺伝子の内の 1 つに、アンチセンス DNA 導入法で腫瘍形成能のあることが証明された。5) 転移能を正または負に相関する遺伝子群を複数同定した。6) bFGF による血管内皮細胞の増殖制御に methionine aminopeptidase 2 の活性と Ca^{++} の上昇に伴う S100A4 の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

分担研究者

1. 崎山 樹 千葉県がんセンター研究局 局長
2. 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 部長
3. 竹永 啓三 千葉県がんセンター研究局 主席研究員
4. 古関 明彦 千葉大学大学院医学研究科 教授

A. 研究目的

がんの発生ならびに転移に対して抑制的に関与する遺伝子を単離し、その構造解析、産物の機能を解明する。これら遺伝子の発現や存在様式をがんの組織型や悪性度との関連で把握することにより、各遺伝子産物の役割を明らかにし、それらを指標にして、がんの診断、治療、予後の判定や転移の予知および抑止をすることを最終目的とする。13 年度の具体的な目的は以下の通りである。1) 細胞の増殖ならびにがん化を抑制する機能を持つ分泌性蛋白質 DAN の分子レベルでの役割の解明。2) p73 の C-末端側の転写活性調節機構の解明。3) $\Delta Np73$ のアポトーシス制御機構の検討。4) 1 番染色体短腕遠位領域(1p34-pter)におけるがん抑制遺伝子の同定とその機能解析。5) がんの転移能と正または負に相関する遺伝子群の網羅的解析。6) 血管内皮細胞の増殖制御にかかわる S100A4 の機能解析。

B. 研究方法

1) ヒト神経芽細胞腫の分化またはアポトーシス誘導時、及びマウス骨芽細胞 MC3T3E1 の分化誘導時における DAN の発現レベルをノーザン、ウエスタン、RT-PCR 法にて解析した。DAN のプロモーター活性に与える p73 の影響をルシフェラーゼ法により

検討した。ラットの疼痛モデルで、疼痛誘発時における後根神経節での DAN の発現量を調べた。同系で抗 DAN 抗体を用いた中和実験を行った。

- 2) p73 に結合する蛋白質の検索を酵母 Two-hybrid 法により行った。得られた cDNA の完全鎖長 DNA のクローニングと塩基配列決定を行い、その機能解析のために p73 標的遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイや遺伝子導入後のコロニー形成能等を解析した。蛋白質の相互作用は、免疫沈降反応、細胞内局在性等により解析した。各機能領域の欠失変異体を作製した。
- 3) がん細胞をシスプラチン処理した時に変化する蛋白質を解析した。p73 遺伝子のイントロン 3 にある $\Delta Np73$ のプロモーター領域の活性を制御する因子並びにその標的配列の検索を行った。アデノウイルスベクターに $\Delta Np73$ を組み込み、その強制発現が p73 及び p53 のアポトーシス誘導能等に及ぼす影響を解析した。
- 4) 1p36.2 ホモ欠失領域から同定されたがん抑制候補遺伝子の活性を、アンチセンス導入後に生じる細胞増殖能や腫瘍形成能の変化で解析した。
- 5) 低転移性ルイス肺がん細胞株 p29 を DMSO 処理することにより高転移性に形質変換したものを材料として、PCR-Select cDNA subtraction 法により cDNA ライブラリーを作成した。各遺伝子の発現量の解析はノーザン法によった。また、Colon26 大腸がん、B16 メラノーマの転移能の異なる細胞株でも発現解析を行い、その普遍性を検討した。
- 6) マウス血管内皮細胞 MSS31 を bFGF 処理した時の

細胞内 Ca^{++} 濃度、DNA 合成能の変化を測定した。同系において methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) の S100A4 との結合部位を含む断片を強制発現させ、細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。

C. 研究成果

- 1) 神経芽細胞腫株 SH-SY5Y のシスプラチン処理後やマウス骨芽細胞 MC3T3E1 のアスコルビン酸による分化誘導時に、p73 の安定化に伴い、DAN の発現誘導が観察された。DAN のエクソン 1 の上流約 500bp に p53 結合領域に類似した配列のあることを見出し、この領域を含む約 900bp の DNA 断片を用い、DAN 遺伝子のプロモーター解析を試みた。その結果、p73 による転写活性化の昂進が見られ、この領域に p73 が試験管内反応で特異的に結合することが判明した。DAN の発現は脊髄後根小細胞で顕著に見られ、後角に運搬され炎症性疼痛に関わっていることが判明した。また、髄腔内への抗体注入によりフォルマリン刺激で誘発された痛みが抑制された。
- 2) p73 の SAM ドメインを含む COOH-末端領域に結合し機能に影響を与える因子のひとつとして、c-myc に結合してそれに抑制的に働くがん抑制遺伝子 MM-1 産物を同定した。MM-1 は p53 とは結合せず、p73 特異的に p73 の転写活性化能を促進した。さらに、p73 は c-myc とも直接結合し、MM-1 を含む 3 者は核内において複合体を形成していること、また、c-myc は p73 による Bax, p21, WAF1 の転写活性化能を抑制するが、その抑制は MM-1 によって解除されることを明らかにした。p53 に結合し DNA 修復の制御に関与する核内 DNA 結合蛋白質 HMGB1 が、p73 の 4 量体形成ドメインとも直接結合し、その転写活性化能に影響を与えることを明らかにした。
- 3) がん細胞のシスプラチン処理により誘導された p73 が、p73 の転写活性化領域を欠くスプライス変異体で、異なるプロモーターをもつ $\Delta Np73$ を誘導することを見出した。この誘導の機構は p73 遺伝子のイントロン 3 にある p53/p73 結合候補領域を介したものであること、また p53 はこの誘導に関わらないことが判明した。さらに、 $\Delta Np73$ は p53 と p73 の両者の転写活性化能を抑制すること、 $\Delta Np73$ の強制発現はシスプラチンにより誘導されるアポ

トーシスを抑制することが判明した。

- 4) 1p36.2 領域の 500 kb のホモ欠失領域に存在するがん抑制候補遺伝子の 1 つがコロニー形成能、ヌードマウスにおける腫瘍形成能・転移能に対して抑制的に働くことを見出した。
- 5) 高転移性を誘導した P29 細胞で発現量の変動をきたす遺伝子発現を、転移能の異なる他の細胞株も用いて検索した。その結果、いずれかの低転移性細胞株で発現の高いものとして、nm23-M2 (NDP kinase B)、pigment epithelium-derived factor (PEDF)、ST2、eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) 及び type III collagen α -1 (Col3A1) の 5 つの遺伝子が得られた。また、高転移性がん細胞で高発現を示す遺伝子として epithelin precursor 遺伝子が見い出された。
- 6) MSS31 細胞の bFGF (20 ng/ml) 16 時間処理により DNA 合成の促進が認められ、この誘導は MetAP2 の阻害剤である TNP-470 (0.2~5 nM) により抑制された。一方、bFGF 処理後数分で細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇が認められること、 Ca^{++} 流入阻害剤 CAI で濃度の上昇を抑えようと DNA 合成の促進も抑制されることが判った。一方で、MetAP2 中の S100A4 結合部位を含む蛋白質 (J6/2) を MSS31 細胞で強制発現させると、bFGF による DNA 合成の促進が抑制される傾向が認められた。

D. 考察

- 1) DAN 遺伝子の転写活性化は p53 ファミリーの内、p73 に特異的なものであることが分り、今後同ファミリーの機能的分担解析する手掛りになると思われる。DAN の生理的役割について未だ解明されていないが、p73 を介した細胞死、細胞分化への関与が示唆された。
- 2) p73, c-myc, MM-1 の 3 者が複合体を形成して、標的遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。これら 3 者が関与する各種がん細胞における、本複合体の意義についてのさらなる究明が求められる。
- 3) p73 は自らが誘導した $\Delta Np73$ による負のフィードバックを受けることが判明し、両者の微妙な量的バランスが細胞の生死を決める因子となることが示唆された。p73 は神経系の分化に必須であり、 $\Delta Np73$ は p53 にも直接結合してその機能を抑制するため、発がん性に働いている可能性は極めて高

く、 $\Delta Np73$ のがん化機構への関与は今後の重要な課題となると考えられる。

- 4) 1p36.2 領域にあるがん抑制候補遺伝子の機能解析については、増殖能を測定する対象細胞の絞り込みや分子生物学的な作用機序の解明を行い、さらに遺伝子治療への応用の可能性を探っていく必要がある。
- 5) 低転移性がん細胞で発現の上昇する遺伝子は転移に抑制的に働くと考えられるが、今回選別された nm23 は既に転移抑制遺伝子として報告されている。PEDF 産物は腫瘍血管新生に抑制的に働く可能性があり、分泌性蛋白質である ST2 の発現がリンパ節転移陰性の乳がんを高発現しているという報告が最近された。一方、高転移細胞で高発現している epithelin precursor 遺伝子の産物は分泌性増殖因子と考えられているが、その生理機能は不明である。今後、各遺伝子を強制発現させた時に生じる転移能の変化を詳細に検討していく必要がある。
- 6) 血管内皮細胞において TNP-470 及び CAI が DNA 合成に抑制的に働く結果から、bFGF による血管内皮細胞の増殖には、MetAP2 の活性と細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇が重要であることが示唆された。また、MetAP2 を分子標的とする新たな血管新生抑制剤のデザインに興味ある知見を与えたと考えられた。

E. 結論

DAN 遺伝子の転写活性化因子として p73 が同定され、細胞の分化やアポトーシスにおける両分子の相互作用の重要性が示唆された。一方、p73 は c-myc やその阻害活性を持つ MM1 と複合体を形成し相互に作用しあって標的遺伝子の転写の調節を行っていることが判明した。また、p73 は そのスプライス変異体の $\Delta Np73$ の転写を誘導し、 $\Delta Np73$ は p73 並びに p53 に対して抑制的に働くことを明らかとなった。1p36.2 のホモ欠失領域にがん抑制候補遺伝子の存在することを明らかにした。転移能と正または負に相関する遺伝子群を複数同定した。bFGF による血管内皮細胞の増殖制御に MetAP 2 の活性と Ca^{++} の上昇が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Sakiyama, S. Dan Gene In "Tumor-

Suppressing Viruses, Gene, and Drugs" (H.Maruta, Ed) pp221-232, Academic Press, 2002.

- 2) Naka, M., Ozaki, T., Takada, N., Takahashi, M., Shishikura, T., Sakiyama, S., Tada, M., Todo, S. and Nakagawara, A. Functional characterization of naturally occurring mutants (P405R) and p425L) of p73 α and p73 β found in neuroblastoma and lung cancer. **Oncogene**, 20:3568-3572, 2001.
- 3) Takayasu, H., Horie, H., Hiyama, E., Matsunaga, T., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Suita, S., Kaneko, M., Sasaki, F., Hashizume, K., Ozaki, T., Furuuchi, K., Tada, M., Ohnuma, N. and Nakagawara, A. Frequent deletions and mutations of the β -catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. **Clin Cancer Res**, 7: 901-908, 2001.
- 4) Ogita, J., Isogai, E., Ozaki, T., Nakamura, Y., Sudo, H., Nakagawara, A., Sakiyama, S. and Koseki, H. Expression of Dan gene during chicken embryonic development. **Mech Dev**, 109: 363-365, 2001.
- 5) Momoi, H., Okabe, H., Kamikawa, T., Satoh, S., Ikai, I., Yamamoto, M., Nakagawara, A., Shimahara, Y., Yamaoka, Y. and Fukumoto, M. Comprehensive allelotyping of human intrahepatic cholangiocarcinoma. **Clin Cancer Res**, 7:2648-2655, 2001.
- 6) Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A. and Ishii, S. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. **Oncogene**, 20: 8100-8108, 2001.
- 7) Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. and Nakagawara, A. HMGB1

- and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. **J Biol Chem**, 277: 7154-7157, 2002.
- 8) Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Yokoyama, S., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Tanaka, Y., and Kuchino, Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: Possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. **J Natl Cancer Inst** 94: 358-368, 2002.
- 9) Takahashi, M., Seki, N., Ozaki, T., Kato, M., Kuno, T., Nakagawa, T., Watanabe, K., Miyazaki, M., Ohira, M., Hayashi, S., Hosoda, M., Tokita, H., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Todo, S. and Nakagawara, A. Identification of the p33ING1-regulated genes that include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmuMG. **Cancer Res** 62: 2203-2209, 2002.
- 10) Ohtori, S., Yamamoto, T., Ino, H., Hanaoka, E., Shinbo, J., Ozaki, T., Nakamura, Y., Isogai, E., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Sakashita, Y., Takahashi, K., Chiba, T., Tanaka, K., Yamagata, M., Yamazaki, M., Shimizu, S. and Moriya, H. Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma protein modulates inflammatory pain in the spinal dorsal horn. **Neuroscience** 110: 579-586, 2002.
- 11) Miyauchi, M., Yoshida, Y., Tada, Y., Narita, M., Maeda, T., Bahar, R.K., Kadomatsu, T., Muramatsu, T., Matsubara, S., Takenaga, K., Nakagawara, A., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human cancer cells. **Int J Cancer**, 91: 723-727, 2001.
- 12) O-Wang, J., Kawamura, K., Tada, Y., Ohmori, H., Kimura, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. DNA polymerase κ implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. **Cancer Res**, 61:5366-5369, 2001.
- 13) Maeda, T., O-Wang, J., Matsubara, H., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M. A minimum c-erbB-2 promoter-mediated expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene confers selective cytotoxicity of human breast cancer cells to ganciclovir. **Cancer Gene Ther**, 8: 890-896, 2001.
- 14) Iwadate, Y., Yamaura, A., Sato, Y., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Induction of immunity in peripheral tissues combined with intracerebral transplantation of interleukin-2-producing cells eliminates established brain tumors. **Cancer Res**, 61: 8769-8774, 2001.
- 15) Tomizawa, M., Ebara, M., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Irradiation with ultrasound of low output intensity increased chemosensitivity of solid tumors to an anti-cancer agent. **Cancer Lett**, 173: 31-35, 2001.
- 16) Narita, M., Bahar, R., Hatano, M., Kang, M-M., Tokuhisa, T., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene. **Cancer Gene Ther**, 8: 997-1002, 2001.
- 17) Takada, N., Isogai, E., Kawamoto, T., Nakanishi, H., Todo, S., Nakagawara, A. Retinoic acid-induced apoptosis of

- CHP134 neuroblastoma cell line is associated with nuclear accumulation of p53 and is rescued by GDNF/Ret signal. **Med Pediatr Oncol**, 36: 122-126, 2001.
- 18) Ichimiya, S., Nimura, Y., Seki, N., Ozaki, T., Nagase, T., Nakagawara, A. Down-regulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines. **Med Pediatr Oncol**, 36: 132-134, 2001.
- 19) Nakagawara, A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. **Cancer Lett**, 169: 107-114, 2001.
- 20) Ozaki, T. and Nakagawara, A. p73 and p53: Functional implications of their interaction. **Recent Res Dev Cancer**, 3: 89-110, 2001.
- 21) Chen, Y. Z., Hayashi, Y., Wu, J. G., Takaoka, E., Maekawa, K., Watanabe, N., Inazawa, J., Hosoda, F., Arai, Y., Ohki, M., Mizushima, H., Morohashi, A., Ohira, M., Nakagawara, A., Liu S.-Y., Hosi, M., Horii, A. and Soeda, E. A BAC-based STS-content map spanning a 35-megabase region of human chromosome 1p35-36. **Genomics**, 74: 55-70, 2001.
- 22) Kawamura, K., Bahar, T., Namibia, H., Hamada, H., Sakiyama, S. and Kagawa, M. Bystander effect of uracil phosphoribosyl transferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. **Int J Oncol**, 18: 117-120, 2001.
- 23) Yoshida, Y., Tomizawa, M., Bahar, R., Miyauchi, M., Yamaguchi, T., Saisho, H., Kadomatsu, K., Muramatu, T., Matsubara, S., Sakiyama, S. and Tagawa, M. A promoter region of midkine gene can activate transcription of an exogenous suicide gene in human pancreatic cancer. **Anticancer Res**, 22: 117-120, 2001.
- 24) Matsubara, H., Maeda, T., Gunji, Y., Koide, Y., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. **Int J Oncol**, 18: 825-829, 2001.
- 25) Namba, H., Iwadate, Y., Kawamura, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Efficacy of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy is influenced by the expression of connexin 43 in the target cells. **Cancer Gene Ther**, 8: 414-420, 2001.
- 26) Shimada, H., Shimizu, T., Ochiai, T., Liu, T.-L., Sashiyama, H., Nakamura, A., Matsubara, H., Gunji, Y., Kobayashi, S., Tagawa, M., Sakiyama, S. and Hiwasa, T. Preclinical study of adenoviral p53 gene therapy for esophageal cancer. **Surgery Today**, 31: 597-604, 2001.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許出願中
- 発明の名称：ヒト 1p36 ホモ接合性欠失領域

分担研究報告書

1 番染色体短腕に座位する新規がん抑制遺伝子の単離とその機能解析

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所 生化学研究部 部長

研究要旨 1p36.2に見いだした神経芽腫ホモ欠失領域の候補遺伝子、ならびに 1p35-p36に座位する新規がん抑制遺伝子 p73 の機能解析をさらに進展させた。まず、前者に関しては、ホモ欠失内のひとつの遺伝子をアンチセンス cDNA を用いて発現抑制すると、コロニー形成能の促進とヌードマウス移植系における著しい腫瘍形成能および遠隔転移の促進を認めた。また、後者に関しては、p73 が c-myc 結合蛋白質 MM1 および c-myc 自身と直接結合して互いの機能を抑制しあうこと、p73 は核内 DNA 結合蛋白質 HMGB1 とも直接結合しその転写活性化能が影響を受けること、さらに、スプライス変異体であるΔNp73 のプロモーターに直接結合してその発現を誘導し、p53 をも含む負のフィードバック制御機構を形成していることを明らかにした。

A. 研究目的

1 番染色体短腕遠位領域 1p34-pter には、神経芽細胞腫をはじめとする多数のヒト腫瘍の抑制遺伝子が複数存在することが推測されている。そこで、神経芽腫細胞株において我々が見出した 1p36.2 の約 500 kb におよぶホモ欠失領域内に存在する抑制遺伝子候補の解析を行い真のがん抑制遺伝子を同定すること、および、1p36.2 にマップされたがん抑制候補遺伝子 p73 に関して、p73 と直接結合する蛋白質を同定し、その機能制御機構を解析することにより、発がんおよびがんの進展における意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1p36.2 ホモ欠失領域からの候補遺伝子の探索は、複数の候補遺伝子を対象にアンチセンスを用いた造腫瘍性を genomic suppressor elements (GSE) 法によって調べた。p73 の機能解析には、各機能ドメインの欠失変異体を作製し、ゲルシフトアッセイ、リポーターアッセイ、コロニー形成能などの方法を用いて解析を行った。また、必要に応じてアデノウイルスベクターを用いる強制発現系も用いた。

C. 研究結果

- 1) 我々が初めて見出した (Oncogene 19:4302-4307, 2000) 神経芽腫細胞株における 1p36.2 領域の 500 kb のホモ欠失領域に関し、以下の解析を行った。
 - i) ホモ欠失領域内に存在する 6 つの候補遺伝子のうち 2 つについて詳細な変異解析と細胞増殖抑制能について検討した。

その結果、いずれの遺伝子に関しても高頻度の遺伝子変異は認めなかったが、ひとつの遺伝子において、アンチセンス cDNA の細胞内導入によるコロニー形成能の促進と、ヌードマウス移植の系における著しい腫瘍形成能と遠隔転移の促進を認めた。現在、培養細胞を用いてさらに解析を進めている。

- ii) 同領域内にまだ未知の遺伝子がないかどうか確かめるため、同領域に相当するマウス BAC コンティグを作成し、現在ゲノムシークエンスを行っている。
- 2) 1p36 にマップされるがん抑制遺伝子 p73 について解析を進め、以下の知見を得た。
 - i) p73 の SAM ドメインを含む COOH-末端領域に結合し機能に影響を与える因子の同定を酵母 two-hybrid システムにより行い、c-myc 結合蛋白質である MM-1 を同定した。MM-1 は p53 とは結合せず、p73 特異的に p73 の転写活性化能を促進した。さらに、p73 は c-myc とも直接結合し、MM-1 を含む 3 者は核内において複合体を形成していること、また、c-myc は p73 の転写活性化能を抑制するが、その抑制は MM-1 によって解除されることを明らかにした (J. Biol. Chem., in press)。
 - ii) p53 に結合し DNA 修復の制御に関与する核内 DNA 結合蛋白質 HMGB1 が、p73 の oligomerization ドメインとも直接結合し、その転写活性化能に影響を与えることを明らかにした (J. Biol. Chem., in press)。

- 3) がん細胞をシスプラチン処理すると、誘導された p73 が、さらにそのスプライス変異体で異なるプロモーターをもつ Δ Np73 を直接誘導することを見いだした。P73 はアポトーシス、 Δ Np73 は細胞の生存促進機能を有するため、負のフィードバック制御機構が存在することが明らかになった。さらに、 Δ Np73 は p53 にも直接結合してその機能を抑制したため、発がんおよびがんの進展における Δ Np73 の意義が今後重要な課題となることが示唆された (Mol. Cell. Biol., in press)。

D. 考察

1p36 領域は多くのヒトがんで高頻度に欠失が見られ、複数のがん抑制遺伝子が存在することが推察されている。したがって、それらを同定し発がんにおける意義を明らかにすることは、がん克服のための治療法開発に急務である。我々が同定した 1p36.2 ホモ欠失領域内にある遺伝子には変異こそ認めなかったが、GSE 法により腫瘍形成能を示すものが認められ、この候補遺伝子の解析を早急に進める必要がある。また、今回の我々の研究により、同じ 1p36.2 にあってホモ欠失領域の遠位部に座位する p73 は、遺伝子変異という形で発がんに寄与する p53 とは異なり、プロモーターの異なる変異体 Δ Np73 と負のフィードバック制御機構を形成することによって、発がんを促進していることが明らかになった。さらに、p73 は c-myc と直接結合して互いに相手の機能を抑制し、MM1 が co-factor として関与していることも明らかになった。さらに、DNA 修復機構において重要な働きを担う HMGB1 が p73 と結合しその転写活性化能に影響を与えた。今回得られた我々のこれらの知見は、発がん機構における p73 の重要性をこれまで以上に明らかにすることになった。

E. 結論

1p36 のホモ欠失領域内にがん抑制機能をもつがん抑制候補遺伝子が存在することが強く示唆された。また、その遠位部にマップされる p73 は、 Δ Np73 と負のフィードバック制御機構を形成して発がんに関与すること、c-myc と直接結合して機能制御すること、さらに HMGB1 とも直接結合して DNA 修復機構の制御に関与していることを明らかにし、発がんとがんの進展の制御に直接関与していることを示した。

F. 論文発表

- Hirai M, Takenaga K, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenouchi T, Araki A, Oosaki T, Hayashi Y, Hirono M, Yoshihara T. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C/VEGF-2) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 80:181-188, 2001.
- Miyauchi, M., Yoshida, Y., Tada, Y., Narita, M., Maeda, T., Bahar, R., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M. Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 91:723-727, 2001.
- Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyauchi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T, Nakagawara A. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* 164:51-60, 2001.
- Takayasu H, Horie H, Hiyama E, Matsunaga T, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ozaki T, Furuuchi K, Tada M, Ohnuma N, Nakagawara A. Frequent deletions and mutations of the b-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly-differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin.CancerRes.* 7:901-908, 2001.
- Ozaki T, Nakagawara A. p73 and p53: Functional implications of their interaction. *Recent Res Dev Cancer* 3:89-110, 2001.
- Naka M, Ozaki T, Takada N, Takahashi M, Shishikura T, Sakiyama S, Tada M, Todo S, Nakagawara A. Functional characterization of naturally occurring mutants (P405R and P425L) of p73 α and p73 β found in neuroblastoma and lung cancer. *Oncogene* 20:3568-3572, 2001.
- Chen YZ, Hayashi Y, Wu JG, Yakaoka E, Maekawa K, Watanabe N, Inazawa J, Hosoda F, Arai Y, Mizushima H, Morohashi A, Ohira M, Nakagawara A, Liu S-Y, Hosi M, Horii A, Soeda E. A BAC-based STS-content map spanning a 35-megabase region of human chromosome 1p35-36. *Genomics* 74:55-70, 2001.
- Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 169:107-114, 2001.

9. Momoi H, Okabe H, Kamikawa T, Satoh S, Ikai I, Yamamoto M, Nakagawara A, Shimahara Y, Yamaoka Y, Fukumoto M. Comprehensive allelotyping of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7:2648-2655, 2001.
10. Miwa M, Kanai M, Binlian S, Hirai M, Xin X, Saito S, Hanai S, Kaneko M, Nakagawara A, Uchida K. DNA methylation in neuroblastoma. In "DNA methylation and cancer", Eds. Hirohashi S, Jones PA, Miwa M, Saya H, Ushijima T., pp104-106, 2001. (Extended Abstract for the 31st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, 2000)
11. Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A, Ishii S. Increased susceptibility to tumorigenesis of *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene* 20: 8100-8108, 2001.
12. Nakagawara A. TRK. In *Encyclopedic Reference of Cancer*, Ed. by Schwab M. 2001. Springer, Heidelberg, pp922-923.
13. Yoshida I, Koide S, Nakagawara A, Tsuji A, Matsuda Y. Proprotein convertase PACE4 is a target gene of the basic helix-loop-helix transcription factor hASH-1. *Biochem J* 360: 683-689, 2001.
14. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K, Nagashima Y, Nakagawara A, Momoi T, Yokoyama S, Toyoda Y, Kigasawa H, Nishi T, Tanaka Y, Kuchino Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: Possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 358-368, 2002.
15. Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Todo S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawara A. Autoinhibitory regulation of p73 by Δ Np73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the Δ Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* (in press).
16. Takahashi M, Seki N, Ozaki T, Kato M, Kuno T, Nakagawa T, Watanabe K, Miyazaki K, Ohira M, Hayashi S, Hosoda M, Tokita H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Todo S, Nakagawara A. Identification of the p33^{ING1}-regulated genes which include *cyclin B1* and proto-oncogene *DEK* by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG. *Cancer Res.* (in press).
17. Iuchi T, Namba H, Iwadate Y, Shishikura T, Kageyama H, Nakamura Y, Ohira M, Tamaura A, Osato K, Sakiyama S, Nakagawara A. Identification of the small interstitial deletion at chromosome 1p34-p35 and its association with poor outcome in oligodendroglial tumors. *Genes Chromosomes Cancer* (in press).
18. Stros M, Ozaki T, Bacikova A, Kageyama H, Nakagawara A. HNGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human *Bax* gene promoter. *J. Biol. Chem.* (in press).
19. Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A. Physical interaction of p73 with c-myc and MMT1, a c-myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press).
20. Takayasu H, Motoi T, Kanamori Y, Kitano Y, Nakanishi H, Tange T, Nakagawara A, Hashizume K. Two case reports of childhood liver cell adenomas harboring β -catenin abnormalities. *Hum. Pathol.* (in press).
21. Tomizawa M, Wang Y-Q, Ebara M, Saisho H, Watanabe K, Nakagawara A, Tagawa M. Expression of the CCAAT/enhancer binding protein a gene, involved in hepatocyte proliferation, was decreased in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* (in press).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特許出願中
発明の名称：
ヒト 1p36 ホモ接合性欠失領域

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

がん細胞の転移を制御する遺伝子の検索と解析

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター化学療法研究部主席研究員

研究要旨 マウスルイス肺癌由来低転移性細胞株P29はジメチルスルホキシド（DMSO）を作用させると高転移性に変化する。この際に発現の変化する遺伝子をsubtracted cDNAライブラリーを用いたディフレンシャルスクリーニングにより検索した。その結果、P29細胞で発現が高いものとして42種類の遺伝子を、DMSO処理P29細胞で発現の高いものとして42種類の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の発現変化が転移に関連したものであるかどうかを検討するために、ルイス肺癌、B16メラノーマ、Colon26大腸癌より既に樹立されている低転移性及び高転移性細胞株での発現を検討した。その結果、P29細胞及びいずれかの低転移性細胞株で発現の高い遺伝子としてnm23-M2、pigment epithelium-derived factor (PEDF)、ST2、eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) 及びtype III collagen α -1 (Col3A1) の5種類を、DMSO処理P29細胞及びいずれかの高転移性細胞株で発現の高い遺伝子としてepithelin precursorを見出した。

一方、転移関連遺伝子の一つであるカルシウム結合蛋白質S100A4が、血管内皮細胞の増殖において重要な働きをしているメチオニンアミノペプチダーゼ2 (MetAP2) と相互作用することを昨年度見出したので、引き続き血管内皮細胞におけるその相互作用の生理的意義を検討した。その結果、bFGFによるマウス血管内皮細胞MSS31でのDNA合成誘導にMetAP2活性と細胞内カルシウム濃度の増加が必須であることが判明し、さらにS100A4とMetAP2相互作用が必要である可能性も示唆された。

A. 研究目的

(1) マウスルイス肺癌由来低転移性細胞株P29は高い増殖性と浸潤性を示すにも関わらず遠隔転移能をほとんど示さない。しかし、この細胞にジメチルスルホキシド(DMSO)を作用させると、増殖能、浸潤能は低下するが、転移能が著明に促進される。この性状の変化がどのような遺伝子発現の変化により惹起されるのかは明らかにされていない。可能性としては、P29細胞で発現していた転移抑制遺伝子の発現がDMSO処理により抑えられた、あるいはDMSO処理により転移促進遺伝子の発現が促進されたことが考えられる。そこで本研究では、P29細胞とDMSO処理P29細胞で差次的発現を示す遺伝子を検索することを目的とした。さらに、これらの遺伝子について、既にルイス肺癌より樹立されている低転移性及び高転移性細胞株における発現や、他の組織由来の転移能の異なるがん細胞株における発現を検討することにより、転移関連遺伝子の絞り込みを行うことを目的とした。

(2) 転移関連遺伝子であるカルシウム結合蛋白質S100A4が、血管内皮細胞の増殖制御において重要な働きをしているメチオニンアミノペプチダーゼ2 (MetAP2) と相互作用することを見い出しているので、その相互作用の血管内皮細胞における生理的意義を検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞は、ルイス肺癌由来の低転移性 (P29、P34) 及び高転移性細胞株 (D6、A11)、B16メラノーマ由来の低転移性 (B16F1) 及び高転移性細胞株 (B16BL6)、ならびにColon26大腸癌由来の低転移性 (NM11) 及び高転移性細胞株 (LuM1) を用いた。P29細胞のDMSO処理は、P29細胞を2%DMSOを含む培地中で5日間培養して行った。Subtracted cDNAライブラリーは、P29及びDMSO処理P29細胞から抽出したmRNAを用いて、suppression PCRを利用したPCR-Select cDNA Subtraction法により作成した。ノーザンプロットは、各細胞株より抽出した全RNAを用いて行った。

(2) 血管内皮細胞は、マウス脾臓由来のMSS31細胞を用いた。細胞内カルシウム濃度の測定は、Fura-2/AM (1 mM) をローディングした細胞にbFGF (20 ng/ml) を添加し、その後の細胞内カルシウム濃度の変化をARGUS50を用いて測定した。DNA合成の測定は、細胞を低血清 (0.1%) 培地中で24時間培養した後、bFGF (20 ng/ml) を添加しさらに16時間培養した。次に、BrdUを2時間取り込ませ、取り込まれたBrdUの量をELISAキットにより測定した。MetAP2のS100A4結合部位を含む断片 (J6/2) の発現がDNA合成に及ぼす効果の検討は、まずその発現ベクター-pcDNA3/HA-J6/2とpBB14(Us9-EGFP)を9:1

の割合でMSS31細胞にトランスフェクトした。その後、bFGF処理、BrdUの取り込み、抗BrdU抗体-TRITC標識二次抗体による染色を行ない、細胞をFACScanにかけEGFP陽性細胞をgatingし、その中のTRITC陽性細胞数を計測した。

C. 研究成果

(1) DMSO処理P29細胞と比較して、P29細胞で高発現を示す遺伝子を検索した結果、42種類の遺伝子が同定された。これらの遺伝子について、ルイス肺癌より既に樹立されている転移能の異なる細胞株 (P34、D6、A11) での発現をノーザンブロット法により解析し低転移性細胞株で発現の高い遺伝子を調べたところ、11種類の遺伝子が選別された。さらに、Colon26大腸癌あるいはB16メラノーマ由来の転移能の異なる細胞株での発現を検討し、いずれかの低転移性細胞株で発現の高い遺伝子を選別した結果、nm23-M2 (NDP kinase B)、pigment epithelium-derived factor (PEDF)、ST2、eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) 及び type III collagen α -1 (Col3A1) の5つの遺伝子が得られた。同様なアプローチにより、P29細胞と比較して、DMSO処理P29細胞で高発現を示す遺伝子として42種類が同定され、その中で、種々の高転移性細胞株のいずれかで高発現を示す遺伝子を検索したところ epithelin precursor 遺伝子が見い出された。

(2) MSS31細胞に20 ng/ml bFGFを16時間作用させると、BrdUの取込みを指標としたDNA合成の促進が認められた。ここに、MetAP2阻害剤であるTNP-470 (0.2~5 nM) を同時に作用させたところ bFGFによるDNA合成の上昇が抑制された。一方、MSS31細胞にbFGFを作用させると、約5分後より細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。しかし、カルシウム流入阻害剤であるCAI (5 μ M) を同時に作用させると、bFGFによる細胞内カルシウム濃度の上昇が抑制され、さらにDNA合成の促進も抑制されることが判った。次に、MetAP2中のS100A4結合部位を含む蛋白質 (J6/2) をMSS31細胞で強制発現させると、bFGFによるDNA合成の促進が抑制される傾向が認められた。

D. 考察

(1) P29細胞及び他の組織由来の低転移性細胞株のいずれかで発現の高い遺伝子として選別されたnm23-M2、PEDF、ST2、eIF4B、Col3A1のうち、nm23-M2は既に転移抑制遺伝子として知られ、PEDF遺伝子産物はがん転移に必須な血管新生の抑制に働くことが報告されている。同様な発現様式を示す他の3種類の遺伝子も転移抑制に働く可能性が示唆される。ST2は分泌蛋白質であり、

Balb/c3T3 繊維芽細胞において様々な増殖因子により強く発現が誘導される遺伝子の産物として見い出されたが、その生理機能は未だ不明である。しかし、最近、その発現がリンパ節転移陰性乳癌において高発現していることが報告され、低転移性の指標になるのではないかと推察されている。Col3A1は、もし腫瘍内でコラーゲン繊維が形成されれば、浸潤に対するバリアーになることも考えられる。一方、epithelin precursor 遺伝子産物は分泌蛋白質であり増殖因子の一つと考えられているが、その生理機能はあまりよく判っていない。何らかの作用により転移促進に働く可能性も考えられる。今後、これらの遺伝子の発現ベクターを用いて転移との関連を検討することが望まれる。

(2) TNP-470 及びCAIの効果より、bFGFによるDNA合成の促進には MetAP2 活性と細胞内カルシウム濃度の上昇が極めて重要であることが示唆された。また、S100A4とMetAP2との相互作用を阻害するとbFGFによるDNA合成が抑制される傾向にあることより、細胞内カルシウム濃度の上昇により活性化されたS100A4とMetAP2の相互作用がbFGFによるDNA合成促進のために必要であることが推察された。今後、さらなる検討を行う予定である。

E. 結論

(1) 転移抑制に働く可能性のある遺伝子としてST2、eIF4B 及びCol3A1を、転移促進に働く可能性のある遺伝子としてepithelin precursor を新たに見い出した。

(2) bFGFによる血管内皮細胞のDNA合成の促進に、細胞内カルシウム濃度の上昇によるS100A4の活性化、それに引き続くS100A4とMetAP2の相互作用が重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tada Y, O-Wang J, Takenaga K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Tagawa, M. Expression of the NF- α gene on mouse lung carcinoma cells suppresses spontaneous lung metastasis without affecting tumorigenicity. *Oncol Rep.* in press.
2. Kawamura K, Bahar R, Namba H, Seimiya M, Takenaga K, Hamada H, Sakiyama S, Tagawa M. Bystander effect in uracil phosphoribosyl transferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. *Int J Oncol.* 18:117-20, 2001.

分担研究報告書

分泌タンパク DAN の形態形成における役割

分担研究者 古関明彦 千葉大学大学院医学研究科教授

研究要旨 我々は今までに、既知のは乳類ポリコーム群である Mel-18、Ring1B や Mph1 に結合する因子として、Mph2、SCMH1、p53BP3、YAF2、スプライセオソーム結合タンパク (SAP155) などを明らかにしてきた。今回、Mph2、SCMH1、SAP155 を欠損するマウスとそれらに対する抗体の作出に成功した。Mph2 と SAP155 は、ポリコーム複合体に属するタンパクと共に免疫共沈され、また、ノックアウトマウスではホメオチック変異が見られたことから、ポリコーム群として機能することが強く示唆された。また、は乳類ポリコーム群の発ガンへの寄与を明らかにするシステムを作成するために、Mel-18 変異を p53 欠損マウスに導入すると、胸腺腫の発生を強く促進することが明らかになった。今まで、Mel-18 は発ガンを促進すると考えられていたが、抑制的に作用するか、または未知の機序を介して作用することが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、発がんの過程におけるがん細胞におけるポリコーム遺伝子群の役割を明らかにするために、細胞死の抑制の過程におけるポリコーム群遺伝子産物の作用機序の解析を行う。また、我々は哺乳類ポリコーム群タンパクがセントロメア近傍に強く局在することを最近見出し、染色体の高次構造との関連を改めて示唆した。以下の3点に焦点を絞って研究を推進する。

- 1) ポリコーム群遺伝子産物が構成するタンパク複合体の構造と機能調節の分子機序を明らかにする。
- 2) ポリコーム群タンパク複合体の標的となる遺伝子座を明らかにする。
- 3) p53BP3 と SCMH1 の機能発現機序とポリコーム群タンパク複合体への作用機序を明らかにする。

B. 研究方法と結果

- 1) ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能の解析

- i) SCMH1、p53BP3、YAF2 は、ポリコーム複体のコンポーネントか？

新たに同定した SCMH1、p53BP3、YAF2 が、Mel-18、Mph1、Mph2、Ring1B、Bmi-1 と共通の複合体にふくまれているか否かを検定する。現在までに、Mel-18、Mph1、Mph2、Ring1B、Bmi-1 のそれぞれに対する抗体を用いて、それらが共通のタンパク複合体に含まれていることを示してきた。新たに、p53BP3 も Mph2

と免疫共沈降されること、培養細胞核内で共局在することが示された。p53BP3 を過剰発現させた細胞においては、細胞死がおこりやすくなっていることが示された。

- ii) マウス長鎖 cDNA ライブラリを用いた DNA アレイの作成

Mel-18/Bmi1 二重欠損マウスの異常を系統的に明らかにしていくために、系統的な cDNA アレイの作成を行った。胎児尾芽、胎児腸管、胸腺の cDNA ライブラリを作製し、そこから 15K の独立したクラスターを得、それらを 10ng ずつスポットしたフィルターの作出に成功した。

- iii) Mel-18 と p53 の相互作用

p53 においても、頻繁に胸腺腫が発症することは、よく知られているが、Mel-18 変異は、その p53 欠損マウスで見られる胸腺腫発症を著しく亢進させることを明らかにした。また、二重欠損マウスは胎生 14 日ごろまでに致死になること、また、その胎児性繊維芽細胞においては、細胞死が顕著に亢進していることが明らかになった。Mel-18 と p53 が、細胞死のコントロールをする上で、相互作用している可能性をしめしている。

- 2) ポリコーム群タンパク複合体による標的遺伝子群の発現調節の解析 (Hox クラスターにおける Mel-18 結合領域同定の試み)

クロマチン DNA 免疫共沈によるポリ

コーン群タンパクの結合領域の同定を試みた。Hoxb7/b8/b9 における Ring1B または Mph1 の結合領域を明らかにした。現在免疫沈降された DNA をライブラリー化し、そこで濃縮されている断片のスクリーニングを行っている。

3) SCMHI の機能発現機序とポリコーン群タンパク複合体への作用機序の解析

SCMHI を欠損したマウスを作製した。ここでは、精巣の異常が観察された。SCMHI は、精母細胞において強く発現され、SCMHI 欠損マウスでは、精母細胞層の精細管のすぐ内側において細胞死が顕著に認められ、精子形成が強く障害されていることが、明らかになった。おもしろいことに、SCMHI 欠損マウスでは、骨格系や血球系細胞には全く異常は観察されなかった。また、Mph1 や Mph2 との間にも、遺伝学的な相互作用は見られなかった。このことは、SCMHI は、Mel18、Mph1、Mph2、Bmi-1 とは必ずしも同じ複合体の中で機能しているとは限らないことを示している。

C. 発表

1. Atsuta, T., Fujimura, S., Moriya, H., Vidal, M., Akasaka, T., Koseki, H. Production of Monoclonal Antibodies against Mammalian Ring 1B Proteins. *Hybridoma* 20:43-46, 2001.
2. Sudo, H., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B., and Koseki, H. Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. *Dev. Biol.* 232:284-300, 2001.
3. Isono, K., Abe, K., Tomaru, Y., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Koseki, H. Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for the U2 snRNP component of spliceosome. *Mammalian Genome* 12:192-198, 2001.
4. Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. The role of Presenilin1 during somite segmentation. *Development* 128: 1391-1402, 2001.
5. Fukamachi, H., Fukuda, K., Suzuki, M., Furumoto, T., Ichinose, M., Shimizu, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Shiokawa, K., Suzuki, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Taniguchi, M., and Koseki, H. Mesenchymal transcription factor FKH6 controls gastric epithelial development and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1069-1076, 2001.
6. Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes Mel18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* 128:1587-1597, 2001.
7. Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W. and Aoe, T. The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 20: 3082-3091, 2001.
8. Ogita, J., Isogai, E., Sudo, H., Sakiyama, S., Nakagawara, A. and Koseki, H. The expression of chicken Dan. *Mech. Dev.* 109:363-365, 2001.
9. Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H. and Nakayama, T. Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene. *Immunity* 15:275-287, 2001.
10. Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asami, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K., Koseki, H. and Shirasawa, T. Mouse homologue of coq7/clk-1, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem Biophys Res Com.* 289:463-471, 2001
11. Nakayama, T., Kasproicz, D.J., Yamashita, M., Schubert, L.A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H. and Ziegler, S.F. The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 168:87-94., 2001

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Sakiyama, S.	DAN Gene	Maruta, H.	Tumor-Suppressing Viruses, Gene, and Drugs	Academic Press	San Diego	2002	221-232

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Naka, M., Ozaki, T., Takada, N., Takahashi, M., Shishikura, T., Sakiyama, S., Tada, M., Todo, S. and Nakagawara, A.	Functional characterization of naturally occurring mutants (P405R) and p425L) of p73 α and p73 β found in neuroblastoma and lung cancer.	Oncogene	20	3568-3572	2001
Takayasu, H., Horie, H., Hiyama, E., Matsunaga, T., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Suita, S., Kaneko, M., Sasaki, F., Hashizume, K., Ozaki, T., Furuuchi, K., Tada, M., Ohnuma, N. and Nakagawara, A.	Frequent deletions and mutations of the β -catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma.	Clin Cancer Res	7	901-908	2001
Ogita, J., Isogai, E., Ozaki, T., Nakamura, Y., Sudo, H., Nakagawara, A., Sakiyama, S. and Koseki, H.	Expression of Dan gene during chicken embryonic development.	Mech Dev	109	363-365	2001
Momoi, H., Okabe, H., Kamikawa, T., Satoh, S., Ikai, I., Yamamoto, M., Nakagawara, A., Shimahara, Y., Yamaoka, Y. and Fukumoto, M.	Comprehensive allelotyping of human intrahepatic cholangiocarcinoma.	Clin Cancer Res	7	2648-2655	2001
Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A. and Ishii, S.	Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice.	Oncogene	20	8100-8108	2001

Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. and Nakagawara, A.	HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter.	J Biol Chem	277	7157-7164	2002
Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Yokoyama, S., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Tanaka, Y., and Kuchino, Y.	Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: Possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression.	J Natl Cancer Inst	94	358-368	2002
Takahashi, M., Seki, N., Ozaki, T., Kato, M., Kuno, T., Nakagawa, T., Watanabe, K., Miyazaki, M., Ohira, M., Hayashi, S., Hosoda, M., Tokita, H., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Todo, S. and Nakagawara A.	Identification of the p33ING1-regulated genes that include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmuMG.	Cancer Res	62	2203-2209	2002
Ohtori, S., Yamamoto, T., Ino, H., Hanaoka, E., Shinbo, J., Ozaki, T., Nakamura, Y., Isogai, E., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Sakashita, Y., Takahashi, K., Chiba, T., Tanaka, K., Yamagata, M., Yamazaki, M., Shimizu, S. and Moriya, H.	Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma protein modulates inflammatory pain in the spinal dorsal horn.	Neuro-science	110	579-586	2002
Miyauchi, M., Yoshida, Y., Tada, Y., Narita, M., Maeda, T., Bahar, R.K., Kadomatsu, T., Muramatsu, T., Matsubara, S., Takenaga, K., Nakagawara, A., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene controlled by a promoter region of the midkine gene confers selective cytotoxicity to ganciclovir in human cancer cells.	Int J Cancer	91	723-727	2001

O-Wang, J., Kawamura, K., Tada, Y., Ohmori, H., Kimura, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	DNA polymerase κ implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer.	Cancer Res	61	5366-5369	2001
Maeda, T., O-Wang, J., Matsubara, H., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	A minimum c-erbB-2 promoter-mediated expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene confers selective cytotoxicity of human breast cancer cells to ganciclovir.	Cancer Gene Ther	8	890-896	2001
Iwadate, Y., Yamaura, A., Sato, Y., Sakiyama, S and Tagawa, M.	Induction of immunity in peripheral tissues combined with intracerebral transplantation of interleukin-2-producing cells eliminates established brain tumors.	Cancer Res	61	8769-8774	2001
Tomizawa, M., Ebara, M., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Irradiation with ultrasound of low output intensity increased chemosensitivity of solid tumors to an anti-cancer agent.	Cancer Lett	173	31-35	2001
Narita, M., Bahar, R., Hatano, M., Kang, M-M., Tokuhisa, T., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene.	Cancer Gene Ther	8	997-1002	2001
Takada, N., Isogai, E., Kawamoto, T., Nakanishi, H., Todo, S., Nakagawara, A.	Retinoic acid-induced apoptosis of CHP134 neuroblastoma cell line is associated with nuclear accumulation of p53 and is rescued by GDNF/Ret signal.	Med Pediatr Oncol	36	122-126	2001
Ichimiya, S., Nimura, Y., Seki, N., Ozaki, T., Nagase, T., Nakagawara, A.	Down-regulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines.	Med Pediatr Oncol	36	132-134	2001
Nakagawara, A.	Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development.	Cancer Lett	169	107-114	2001
Ozaki, T. and Nakagawara, A.	p73 and p53: Functional implications of their interaction.	Recent Res Dev Cancer	3	89-110	2001

Chen, Y. Z., Hayashi, Y., Wu, J. G., Takaoka, E., Maekawa, K., Watanabe, N., Inazawa, J., Hosoda, F., Arai, Y., Ohki, M., Mizushima, H., Morohashi, A., Ohira, M., Nakagawara, A., Liu S.-Y., Hosi, M., Horii, A. and Soeda, E.	A BAC-based STS-content map spanning a 35-megabase region of human chromosome 1p35-36.	Genomics	74	55-70	2001
Kawamura, K., Bahar, T., Namibia, H., Hamada, H., Sakiyama, S. and Kagawa, M.	Bystander effect of uracil phosphoribosyl transferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication.	Int J Oncol	18	117-120	2001
Yoshida, Y., Tomizawa, M., Bahar, R., Miyauchi, M., Yamaguchi, T., Saisho, H., Kadomatsu, K., Muramatu, T., Matsubara, S., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	A promoter region of midkine gene can activate transcription of an exogenous suicide gene in human pancreatic cancer.	Anti-cancer Res	22	117-120	2001
Matsubara, H., Maeda, T., Gunji, Y., Koide, Y., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells.	Int J Oncol	18	825-829	2001
Namba, H., Iwadate, Y., Kawamura, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M.	Efficacy of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy is influenced by the expression of connexin 43 in the target cells.	Cancer Gene Ther	8	414-420	2001
Shimada, H., Shimizu, T., Ochiai, T., Liu, T.-L., Sashiyama, H., Nakamura, A., Matsubara, H., Gunji, Y., Kobayashi, S., Tagawa, M., Sakiyama, S. and Hiwasa, T.	Preclinical study of adenoviral p53 gene therapy for esophageal cancer.	Surgery Today	31	597-604	2001