

200200768A

厚生科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森谷 宜皓

平成15（2003）年7月30日

目次

I.総括研究報告書	
遺伝子ならびに遺伝子診断システムの実用化研究	1
森谷亘皓	
II.分担研究報告	
1. 大腸がんの遺伝子診断法の開発	7
森谷亘皓	
松村保広	
佐々木博己	
藤田 伸	
2. 動脈硬化症の遺伝子診断法の開発	11
永井良三	
前村浩二	
3. 遺伝子診断システムの技術検討	13
永井啓一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

主任研究者 森谷亘皓 国立がんセンター中央病院部長

研究要旨：大腸がんスクリーニング法の開発および自動化に向け、便中の上皮細胞の分離のための処理工程の確立、細胞診を行い、現在のところほぼ 100%の確立で上皮性細胞が確認され、がん患者便の 90%以上で異形性細胞を含んでいることが判明した。一方で、大腸内視鏡を受け大腸がんがないことが確認されている健康人便からは正常扁平上皮のみで異形細胞は認められなかった。また、大腸がんを正常と区別できる遺伝子を検査対象遺伝子と捉え、がん組織や血液細胞のマイクロアレイ解析（約 3 万遺伝子）と RT-PCR によって、スクリーニングを行い、32 個に絞り込んだ。循環器に関しては心筋梗塞、高血圧の発症および病態に関連する遺伝子多型の診断法の開発・実用化を目的とし、東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行うと同時に既知の動脈硬化関連因子に着目して遺伝子解析を行い、マトリクスメタロプロテアーゼ多型が心筋梗塞発症に関連することが判明し、また数十の SNP の解析が目下進行中であり、疾患に関連するより有用な遺伝子マーカーの同定が可能になると考えられる。

分担研究者氏名・所属機関名および職名
松村保広・国立がんセンター研究所支所・
部長

藤田 伸・国立がんセンター中央病院・医長
佐々木博己・国立がんセンター研究所・室長
永井良三・東京大学大学院医学系研究科
循環器内科・教授
前村浩二・東京大学大学院医学系研究科
循環器内科・助手
永井啓一・(株)日立製作所中央研究所・
研究主幹

B. 研究方法

大腸がんのスクリーニング法は、便中からがん細胞を含む細胞群を効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理の条件設定、便中の生きた細胞に対する細胞診、また DNA あるいは RNA を精製する方法の簡便化を行う。また検査システムの開発としては、検査対象遺伝子の決定とその mRNA の検出系の開発を行う。

動脈硬化症の遺伝子検査は、心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行なう。動脈硬化症との関連性の示唆される遺伝子の SNP について解析を日立製作所開発の BAMPER 法に代表される新しい遺伝子解析システムを活用して解析し、臨床データベースと統合的に相関性を検討し、発症および予後、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定を試みる。

C. 研究結果

大腸がんのスクリーニング法

便の前処理システムの開発では、最初に約 5 g の便を生理食塩水でストマッカーを用いてけん濁後、フィルターをせいろ過によって未消化物を除き、次に磁気ビーズで、ヒト細胞を分離した。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、便中に絶対数として 1000 個のがん細胞が存在していれば細胞診で確認できることが判明した。この方法を 20 例の大腸がん患者便に適応したところ 20 例中 18 例でがん細胞陽性であった。その中には回

A. 研究目的

本研究は、生活習慣病であるがんや心筋梗塞、脳卒中に関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とし、がんの中でも遺伝子解析の進んでいる大腸がんと心筋梗塞と脳卒中の原因である動脈硬化症を研究対象疾患としている。

大腸がんに関しては比較的少量の便の生細胞を分離する方法を確立し、細胞診、DNA、RNA を用いた大腸がんスクリーニング法の実用化を目的とした。

動脈硬化症に関しては、本疾患に関連する遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的とした。

いずれの研究も日立製作所との共同で汎用的で実地臨床に還元される遺伝子診断システムの構築を行う。

盲部がんや横行結腸がんも含まれていた。すべて手術可能なステージでありしかも陽性例のうち70%はDukesAであった。大腸内視鏡検査にて大腸病変がないことが確認されている健常人便7例すべてにおいて異形細胞は確認できなかった。正常の扁平表皮のみ存在していた。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、大腸がん組織および大腸正常粘膜から抽出したRNAを用いマイクロアレイ解析(12600 遺伝子)を行い、大腸がんのスクリーニングのため新たな候補遺伝子の分離を開始した。現在、大腸がん組織で発現し正常では発現していない32種の遺伝子の同定に成功した。

D. 動脈硬化症

2003年3月の段階で心臓カテーテル検査施行患者約1800症例をデータベース化し、遺伝子検体数は約1300例に達し、この遺伝子検体を用いて動脈硬化の発症、進展に寄与する遺伝子マーカーの検出を進めた。既知の動脈硬化関連因子に着目し、その遺伝子に存在する遺伝子多型の解析を行い、すでに構築してある臨床データベースとの間で相関解析を行った。一例として動脈硬化の発症・進展に関与が示唆されるマトリクスメタロプロテナーゼ(MMP)の遺伝子多型に関して心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。各々の転写活性に関与するMMP-1プロモーター領域-16071G/2G多型、MMP-3プロモーター領域-11715A/6A多型には互いに強い連鎖不平衡を認め、MMP3の5AアレルおよびMMP1 1G-MMP3 5Aハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。またATP-binding Casette A1(ABCA1)遺伝子のMet823多型と血中HDL値ならびに動脈硬化との関係を明らかにした。血管平滑筋の形質転換において主たる役割を担う転写因子KLF5/IKLF/BTEB2の差異と動脈硬化性疾患との関連につき検討中である

D. 考察

大腸がんスクリーニング法の研究においては、便処理法は上皮性細胞表面抗原を認識する抗体が付加された磁気ビーズにて分離することでほぼかたまったと考える。今後はこの方法を用いて100例のがん患者便の処理および解析を行い、同時に大腸内視鏡にて大腸がんが認められない正常人でも20例行う予定である。さらに現在までに絞り込まれた発現解析用の32遺伝子についても、大腸がん患者便からの細胞で発現しない遺伝子をさら

に絞り込む予定である。またさらに現行では時間もかかり、しかも一回の検査がかなり高額であるのでできる限り自動化を図るべきと考える。

循環器に関しては、国内外で遺伝子多型の検討が多く施行されているが、包括的な臨床情報と遺伝子情報を統合的に解析し、かつ臨床事象を前向きに観察してその予後、治療反応性、薬剤副作用などの関連性を検討を試みている研究は稀少であり、非常に有用である。本研究の問題点としては、健常対照群が必ずしも冠動脈疾患保有患者と年齢、性別などの点で合致しない点が挙げられるが、今後関連医療機関および健康診断などからの高齢男性健常者のサンプリングを検討する必要がある。

E. 結論

大腸がんのスクリーニング法では、便の前処理システムに関しては、今後、各ステップを自動化に向けて、簡便化する必要がある。またさらに陽性率を高めるため、新たな候補遺伝子の探索が必要である。

動脈硬化では、MMP1、MMP3やABCA1の遺伝子多型が心筋梗塞発症に関連する有用なマーカーであることが確認されたが、今後、さらに有用な疾患感受性、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定が必要である。また日常外来患者診療のために安価で迅速な診断方法の確立が望まれる。

以上、いずれの研究も実用化に関しては途上であり、今後さらに対象例を増やし、日立製作所が開発したBAMPER(バンパー)法と対象遺伝子特異的プローブによる検査用マイクロアレイ解析の適用を検討し、実用的なシステムを開発していく予定である

F. 健康危惧情報

特に認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

国立がんセンター

1. Yamamoto, H., Ochiya, T., Takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res*, 62: 1641-1647, 2002.

2. Ishizuka, T., Tanabe, C., Sakamoto, H., Aoyagi, K., Maekawa M., Matsukura, N., Tokunaga, A., Tajiri, T., Teruhiko, Y., Terada, M., and Sasaki, H. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296: 152-155, 2002.
3. Nuzu, M., Nishigaki, M., Tomoki, I., Kuwahara, Y., Tanabe, C., Aoyagi, K., Sakamoto, H., Saito, Y., Yoshida, T., Sasaki, H., and Terada, M.. Identification of the *CAB2/hCOS16* gene on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1183-1186, 2002 .
4. Inoue, A., Hayashi, S., Aoyagi, K., Nishigaki, M., Sasaki, H., and Kiyama, R. A reporter gene assay for evaluation of tissue-specific responses to estrogens based on the differential use of promoters A to F of human estrogen receptor a gene. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 5397: 1-7, 2002.
5. Aoyagi, K., Tatsuta, T., Nishigaki, M., Akimoto, S., Tanabe, C., Omoto, Y., Hayashi, S., Sakamoto, H., Sakamoto, M., Teruhiko, Y., Terada, M., and Sasaki, H. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300: 915-920, 2003.

東京大学

- 1) Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost.* 2001;85:226-30.
- 2) Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in alpha CGRP. *Circ Res.* 2001;89:983-90.
- 3) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation.* 2001;104:1964-71.
- 4) Itoh T, Kikuchi K, Odagawa Y, Takata S, Yano

- K, Okada S, Haneda N, Ogawa S, Nakano O, Kawahara Y, Kasai H, Nakayama T, Fukutomi T, Sakurada H, Shimizu A, Yazaki Y, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Correlation of genetic etiology with response to b-adrenergic blockade among symptomatic patients with familial long-QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 38-40
- 5) Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population in six candidate genes for long QT syndrome. *J Hum Genet* 2001; 46: 158-162
- 6) Hiori Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 2001; 28:276-280
- 7) Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 2001; 7: 382-383
- 8) Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. Troglitazone Improves Endothelial Function and Augments Renal klotho mRNA Expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with Multiple Atherogenic Risk Factors. *Hypertension Research* 2001; 24: 705-709
- 9) Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, Yamamoto K, Yagyu H, Ohashi K, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Okazaki H, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 12624-12628
- 10) Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. *J Hypertens.* 2002;20:55-62.
- 11) Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;947:56-66; discussion 66-7.
- 12) Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res.* 2002;90:348-55.
- 13) Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R. Acute and chronic smooth

muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 ;21:1733-7.

2. 学会発表

国立がんセンター

11、佐藤弘、芦田明雄、青柳一彦、坪佐恭宏、井垣弘康、日月裕司、加藤抱一、寺田雅昭、佐々木博己、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づく食道癌リンパ節転移のリスク診断、食道疾患研究会、2/2、2002年

2、Kim, D-H., Aoki, K., Tanabe, C., Nishigaki, M., Kajiwara, T., Yoshida, T., terada, M., and Sasaki, H. Identification of a novel tumor suppressor gene, GDM, in gastric and breast cancers. 93 th Annual meeting of AACR, San Francisco, April, 2002.

3、成清道博、山田行重、佐々木博己、中島祥介、*S. anginosus* の食道がん発生における役割、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

4、上田哲也、青柳一彦、森和彦、坪佐恭宏、西垣美智子、笹子三津留、佐野武、片井均、丸山圭一、真船健一、上西紀夫、寺田雅昭、佐々木博己、複数マーカー遺伝子による胃癌の腹膜再発予測のための新たなマーカー遺伝子の探索(第2報)、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

5、金達浩、佐々木博己、田邊智佳子、西垣美智子、佐伯宣久、梶原哲郎、寺田雅昭、遺伝子増幅に伴う発現異常とメチル化、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

6、芦田明雄、佐藤弘、青柳一彦、落合淳志、武藤学、朴成和、大津敦、吉田茂昭、大木操、寺田雅昭、佐々木博己、食道がんの放射線化学療法感受性を予測するための網羅的遺伝子発現解析、第61回日本癌学会総会、2002年

7、青柳一彦、西垣美智子、龍田健、森和彦、田邊智佳子、大本陽子、林慎一、吉田輝彦、寺田雅昭、佐々木博己、TALPAT による数10-100細胞のマイクロアレイ解析、第61回日本癌学会総会、2002年

8、龍田健、青柳一彦、西垣美智子、森和彦、田邊智佳子、坂本裕美、谷徹、寺田雅昭、佐々木博己、TALPAT による胃がん微小均一標本におけるマイクロアレイ解析、第61回日本癌学会総会、2002年

9、西垣美智子、青柳一彦、壇上稲穂、龍田健、森和彦、柳原五吉、坂本裕美、寺田雅昭、佐々木博己、脱メチル化剤を用いた低分化胃がんにおけるがん抑制遺伝子の網羅的スクリーニング、第61回日本癌学会総会、2002年

10、寺田雅昭、佐々木博己、中島祥介、分化型胃がんにおけるアンギノサス菌の選択的感染、第61回日本癌学会総会、2002年

11、上田哲也、森和彦、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、吉田輝彦、下山省三、真船健一、寺田雅昭、上西紀夫、佐々木博己、胃癌再発予測に有用な遺伝子の臨床応用に向けての検討、第61回日本癌学会総会、2002年

12、森和彦、青柳一彦、上田哲也、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、真船健一、上西紀夫、吉田輝彦、寺田雅昭、佐々木博己、胃癌術後再発の予測に有用な遺伝子の同定、第61回日本癌学会総会、2002年

13、佐藤弘、芦田明雄、青柳一彦、坪佐恭宏、井垣弘康、日月裕司、加藤抱一、寺田雅昭、佐々木博己、食道がんリンパ節転移のリスク診断のための網羅的遺伝子発現解析、第61回日本癌学会総会、2002年

14、佐々木博己、微量 DNA・RNA の新しい増幅法の開発とそのマイクロアレイおよびアレイ CGH 解析への適用、ランチョンセミナー、第61回日本癌学会総会、2002年

15、佐々木博己、GeneChip を用いた食道がん、胃がんの網羅的遺伝子発現解析、アマシヤム バイオサイエンス シンポジウム、2002年

16、上田哲也、青柳一彦、森和彦、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、松野吉宏、真船健一、上西紀夫、佐々木博己、新たなマーカー遺伝子を含めた複数マーカー遺伝子による胃癌の腹膜再発予測、第57回日本消化器外科学会、2002年

17、芦田明雄、佐藤弘、青柳一彦、落合淳志、吉田茂昭、寺田雅昭、佐々木博己、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づく放射線化学療法感受性診断、第57回日本消化器外科学会、2002年

18、成清道博、山田行重、藤本平祐、上野正闘、鎌田喜代志、蜂須賀崇、頼木領、水野崇志、佐々木博己、中島祥介、胃がんと *streptococcus anginosus*、第57回日本消化器外科学会、2002年

東京大学

第65回日本循環器学会総会学術集会】

1) 森田啓行, 永井良三
The Human Genome Project in Cardiovascular Diseases Genetic Polymorphism in Homocysteine Metabolism

2) 野尻剛史, 森田啓行, 林同文, 藤田英雄, 今井靖, 吹野恵子, 山崎憲, 深山源太, 碓井伸一, 原田智浩, 池田祐一, 山崎力, 杉山卓郎, 鈴木亨, 小室一成, 中村文隆, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 永井良三

Reduced susceptibility to Coronary Heart Disease by Matrix Metalloproteinase-1 promoter 1G allelhomogeneity

3) 吹野恵子, 森田啓行, 今井靖, 野尻剛史, 中村文隆, 大野実, 杉浦清了, 平田恭信, 武藤真祐, 浅川雅子, 飯田陽子, 永井良三, 林同文, 山崎力, 深山源太, 藤田英雄, 小室一成, 杉山卓郎

ACE and AT1R polymorphism are genetic risk factors for coronary artery disease

4) 森田啓行, 栗原裕基, 吉田成孝, 矢崎義雄, 永井良三

Homocysteine-lowering with folate supplementation ameliorates the detrimental effect of hyperhomocysteinemia; An experiment in rat balloon injury model

5) 林同文, 森田啓行, 藤田英雄, 中村文隆, 今井靖, 吹野恵子, 浅川雅子, 池田祐一, 野尻剛史, 武藤真祐, 山崎憲, 深山源太, 小室一成, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 山崎力, 永井良三

The levels of ANP and BNP are positively correlated with the severity of CHD irrespective of left ventricular function

6) 林同文, 森田啓行, 鈴木亨, 藤田英雄, 中村文隆, 今井靖, 吹野恵子, 天木幹博, 野尻剛史, 山崎憲, 水野由子, 深山源太, 小室一成, 杉浦清了, 大野実, 平田恭信, 山崎力, 永井良三

Elevated levels of malondialdehyde modified (MDA) -LDL levels in patients with coronary artery disease

【第 98 回日本内科学会】

7) 林同文, 深山源太, 山崎力, 藤田英雄, 森田啓行, 今井靖, 吹野恵子, 野尻剛史, 山崎憲, 永井良三

臨床医学研究における新しいデータ管理・解析システムの構築とゲノム研究による分子疫学への展開

8) 林同文, 深山源太, 山崎力, 藤田英雄,

森田啓行, 今井靖, 吹野恵子, 野尻剛史, 山崎憲, 永井良三

血中 ANP および BNP 濃度は冠動脈疾患の重症度と相関する

【 5th International Conference on Preventive Cardiology】

9) 森田啓行, 永井良三
Practical implication of “new” risk factors for prevention in the genetic polymorphism Homocysteine and cardiovascular disease

【第 8 回日本遺伝子診療学会大会】

・森田啓行, 永井良三

シンポジウム 新しいゲノム技術とその臨床応用

ホモシステイン代謝関連酵素遺伝子多型と動脈硬化

・今井 靖, 前村浩二, 鈴木亨, 石井雅巳, 林同文, 森田啓行, 山崎力, 油谷浩幸, 永井良三

心臓リモデリングの際、心臓線維芽細胞において発現する遺伝子プロファイルの DNA chip による解析

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

国立がんセンター

1) DNA の増幅方法、平成 13 年 5 月 8 日

特許願第 2001-137858 号

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

2) 癌の検出方法、平成 13 年 8 月 18 日

国際特許願 PCT/JP01/06201 号

発明者：佐々木博己、坪佐恭宏、青柳一彦、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：宝酒造株式会社

3) DNA の増幅方法、平成 13 年 10 月

国際特許願中 (米国)

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

4) リアルタイム臨床データナビゲーションシステム

特許出願申請予定

- 5) 便中の大腸がん細胞を特異的に分離する
方法：特許出願申請中
発明者：松村保広、松下尚之
出願人：国立がんセンター 日立製作所

東京大学

リアルタイム臨床データナビゲーションシステム（我々独自に開発した臨床データ管理・解析システム）

特許出願申請予定

2. 実用新案登録

特になし

3. そのほか

特になし

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

分担研究者 森谷亘皓 国立がんセンター中央病院部長
藤田 伸 国立がんセンター中央病院医長
松村保広 国立がんセンター研究所支所部長
佐々木博己 国立がんセンター研究所室長

研究要旨：大腸がんスクリーニング法の開発および自動化に向け、便中の上皮細胞の分離のための処理工程の確立、細胞診を行い。現在のところほぼ 100%の確立で上皮性細胞が確認され、がん患者便の 90%以上で異形性細胞を含んでいることが判明した。一方で、大腸内視鏡を受け大腸がんがないことが確認されている健常人便からは正常扁平上皮のみで異形細胞は認められなかった。また、大腸がんを正常と区別できる遺伝子を検査対象遺伝子と捉え、がん組織や血液細胞のマイクロアレイ解析（約 3 万遺伝子）と RT-PCR によって、スクリーニングを行い、32 個に絞り込んだ

A. 研究目的

本研究は、比較的少量の便の生細胞を分離する方法を確立し、細胞診、DNA、RNA を用いた大腸がんスクリーニング法の実用化を目的とした。

本研究は日立製作所との共同で汎用的で実地臨床に還元される遺伝子診断システムの構築を行う。

B. 研究方法

本大腸がんのスクリーニング法は、便中からがん細胞を含む細胞群を効率良く分離することを基盤に置いた方法である。便の前処理の条件設定、便中の生きた細胞に対する細胞診、また DNA あるいは RNA を精製する方法の簡便化を行う。また検査システムの開発としては、検査対象遺伝子の決定とその mRNA の検出系の開発を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は国立がんセンターの倫理審査委員会の承認を得ており、検体の提供者に研究の目的と解析対象（生殖細胞系列の遺伝子異常や多型ではなく、がん細胞における遺伝子発現）に関する説明に基づきインフォームドコンセントを取り、検体はすべて匿名化を行っている。したがって倫理面での問題はないと判断する。

C. 研究結果

便の前処理システムの開発では、最初に約 5 g の便を生理食塩水でストマッカーを用いてけん濁後、フィルターをすくって未消化物を除き、次に磁気ビーズで、ヒト細胞を分離した。蛍光標識したがん細胞と便を混ぜる実験で、便中に絶対数として 1000 個のがん細胞が存在していれば細胞診で確認できることが判明した。この方法を 20 例の大腸

がん患者便に適応したところ 20 例中 18 例でがん細胞陽性であった。その中には回盲部がんや横行結腸がんも含まれていた。すべて手術可能なステージであり、しかも陽性例のうち 70%は DukesA であった。大腸内視鏡検査にて大腸病変がないことが確認されている健常人便 7 例すべてにおいて異形細胞は確認できなかった。正常の扁平表皮のみ存在していた。検査対象遺伝子のスクリーニングとしては、大腸がん組織および大腸正常粘膜から抽出した RNA を用いマイクロアレイ解析（12600 遺伝子）を行い、大腸がんのスクリーニングのため新たな候補遺伝子の分離を開始した。現在、大腸がん組織で発現し正常では発現していない 32 種の遺伝子の同定に成功した。

D. 考察

本研究においては、便処理法は表皮性細胞表面抗原を認識する抗体が付加された磁気ビーズにて分離することでほぼかたまったと考える。今後はこの方法を用いて 100 例のがん患者便の処理および解析を行い、同時に大腸内視鏡にて大腸がんが認められない正常人でも 20 例行う予定である。また今後現在までしぼりこまれた 32 種の遺伝子に関して大腸がん患者便で発現し、正常人便では発現しない遺伝子を同定していく予定である。その後マイクロアレイシステムを構築する予定である。陽性率等の実用化評価を行なうため、年間 100 症例について便処理を行ない、細胞診、DNA、RNA 診断を行なう。

E. 結論

便の前処理システムに関しては、今後、各ステップを自動化に向けて、簡便化する必要がある。またさらに陽性率を高めるため、新

たな候補遺伝子の探索が必要である。
以上、実用化に関しては途上であり、今後さらに対象例を増やし、日立製作所と共同で実用的なシステムを開発していく予定である

F. 健康危惧情報 特に認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, H., Ochiya, T., Takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res*, 62: 1641-1647, 2002.
2. Ishizuka, T., Tanabe, C., Sakamoto, H., Aoyagi, K., Maekawa M., Matsukura, N., Tokunaga, A., Tajiri, T., Teruhiko, Y., Terada, M., and Sasaki, H. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296: 152-155, 2002.
3. Nuzu, M., Nishigaki, M., Tomoki, I., Kuwahara, Y., Tanabe, C., Aoyagi, K., Sakamoto, H., Saito, Y., Yoshida, T., Sasaki, H., and Terada, M. Identification of the *CAB2/hCOS16* gene on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1183-1186, 2002.
4. Inoue, A., Hayashi, S., Aoyagi, K., Nishigaki, M., Sasaki, H., and Kiyama, R. A reporter gene assay for evaluation of tissue-specific responses to estrogens based on the differential use of promoters A to F of human estrogen receptor a gene. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 5397: 1-7, 2002.
5. Aoyagi, K., Tatsuta, T., Nishigaki, M., Akimoto, S., Tanabe, C., Omoto, Y., Hayashi, S., Sakamoto, H., Sakamoto, M., Teruhiko, Y., Terada, M., and Sasaki, H. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300: 915-920, 2003.

2. 学会発表

- 1、佐藤弘、芦田明雄、青柳一彦、坪佐恭宏、井垣弘康、日月裕司、加藤抱一、寺田雅昭、佐々木博己、マイクロアレイによる遺伝子発

現プロファイルに基づき食道癌リンパ節転移のリスク診断、食道疾患研究会、2 / 2、2002年

- 2、Kim, D-H., Aoki, K., Tanabe, C., Nishigaki, M., Kajiwara, T., Yoshida, T., terada, M., and Sasaki, H. Identification of a novel tumor suppressor gene, GDM, in gastric and breast cancers. 93 th Annual meeting of AACR, San Francisco, April, 2002.

- 3、成清道博、山田行重、佐々木博己、中島祥介、S. anginosus の食道がん発生における役割、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

- 4、上田哲也、青柳一彦、森和彦、坪佐恭宏、西垣美智子、笹子三津留、佐野武、片井均、丸山圭一、真船健一、上西紀夫、寺田雅昭、佐々木博己、複数マーカー遺伝子による胃癌の腹膜再発予測のための新たなマーカー遺伝子の探索(第2報)、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

- 5、金達浩、佐々木博己、田邊智佳子、西垣美智子、佐伯宣久、梶原哲郎、寺田雅昭、遺伝子増幅に伴う発現異常とメチル化、第102回日本外科学会総会、4月、2002年

- 6、芦田明雄、佐藤弘、青柳一彦、落合淳志、武藤学、朴成和、大津敦、吉田茂昭、大木操、寺田雅昭、佐々木博己、食道がんの放射線化学療法感受性を予測するための網羅的遺伝子発現解析、第61回日本癌学会総会、2002年

- 7、青柳一彦、西垣美智子、龍田健、森和彦、田邊智佳子、大本陽子、林慎一、吉田輝彦、寺田雅昭、佐々木博己、TALPAT による数10-100細胞のマイクロアレイ解析、第61回日本癌学会総会、2002年

- 8、龍田健、青柳一彦、西垣美智子、森和彦、田邊智佳子、坂本裕美、谷徹、寺田雅昭、佐々木博己、TALPAT による胃癌微小均一標本におけるマイクロアレイ解析、第61回日本

癌学会総会、2002年

9、西垣美智子、青柳一彦、壇上稲穂、龍田健、森和彦、柳原五吉、坂本裕美、寺田雅昭、佐々木博己、脱メチル化剤を用いた低分化胃がんにおけるがん抑制遺伝子の網羅的スクリーニング、第61回日本癌学会総会、2002年

10、寺田雅昭、佐々木博己、中島祥介、分化型胃がんにおけるアンギノサス菌の選択的感染、第61回日本癌学会総会、2002年

11、上田哲也、森和彦、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、吉田輝彦、下山省三、真船健一、寺田雅昭、上西紀夫、佐々木博己、胃癌再発予測に有用な遺伝子の臨床応用に向けての検討、第61回日本癌学会総会、2002年

12、森和彦、青柳一彦、上田哲也、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、真船健一、上西紀夫、吉田輝彦、寺田雅昭、佐々木博己、胃癌術後再発の予測に有用な遺伝子の同定、第61回日本癌学会総会、2002年

13、佐藤弘、芦田明雄、青柳一彦、坪佐恭宏、井垣弘康、日月裕司、加藤抱一、寺田雅昭、佐々木博己、食道がんリンパ節転移のリスク診断のための網羅的遺伝子発現解析、第61回日本癌学会総会、2002年

14、佐々木博己、微量 DNA・RNA の新しい増幅法の開発とそのマイクロアレイおよびアレイ CGH 解析への適用、ランチョンセミナー、第61回日本癌学会総会、2002年

15、佐々木博己、GeneChip を用いた食道がん、胃がんの網羅的遺伝子発現解析、アマシヤム バイオサイエンス シンポジウム、2002年

16、上田哲也、青柳一彦、森和彦、笹子三津留、佐野武、片井均、松野吉宏、松野吉宏、真船健一、上西紀夫、佐々木博己、新たなマーカー遺伝子を含めた複数マーカー遺伝子に

よる胃癌の腹膜再発予測、第57回日本消化器外科学会、2002年

17、芦田明雄、佐藤弘、青柳一彦、落合淳志、吉田茂昭、寺田雅昭、佐々木博己、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づく放射線化学療法感受性診断、第57回日本消化器外科学会、2002年

18、成清道博、山田行重、藤本平祐、上野正闊、鎌田喜代志、蜂須賀崇、頼木領、水野崇志、佐々木博己、中島祥介、胃がんと streptococcus anginosus、第57回日本消化器外科学会、2002年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1) DNA の増幅方法、平成13年5月8日

特許願第2001-137858号

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、

加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

2) 癌の検出方法、平成13年8月18日

国際特許願 PCT/JP01/06201 号

発明者：佐々木博己、坪佐恭宏、青柳一彦、寺田雅昭、峰野純一、

浅田起代蔵、加藤郁之進

出願人：宝酒造株式会社

3) DNA の増幅方法、平成13年10月

国際特許願中(米国)

発明者：佐々木博己、田邊智佳子、寺田雅昭、峰野純一、浅田起代蔵、

加藤郁之進

出願人：国立がんセンター、医薬品機構、宝酒造株式会社

4) リアルタイム臨床データナビゲーションシステム

特許出願申請予定

5) 便中の大腸がん細胞を特異的に分離する

方法：特許出願申請中

発明者：松村保広、松下尚之

出願人：国立がんセンター 日立製作所

2. 実用新案登録

0件

遺伝子診断法ならびに遺伝子診断システムの実用化研究

研究者 永井 良三 東京大学大学院医学系研究科循環器内科学 教授

研究要旨

心筋梗塞、高血圧の発症および病態に関連する遺伝子多型の診断法の開発・実用化を目的とし、東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行うと同時に既知の動脈硬化関連因子に着目して遺伝子解析を行い、ABCA1 遺伝子多型が動脈硬化と、MMP1 と MMP3 遺伝子多型が心筋梗塞発症に関連することが判明した。また数十の SNP の解析が目下進行中であり、疾患に関連するより有用な遺伝子マーカーの同定が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本研究は生活習慣病とくに動脈硬化疾患である心筋梗塞、脳梗塞に関連する遺伝子多型、変異、発現量をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発、実用化およびその普及に必要な臨床用遺伝子診断システムの確立を目的とする。動脈硬化に伴う循環器疾患の治療法の選択において発症や再発のリスク評価は患者に効果的で適切な治療を施す上で重要である。発症や再発のリスクは個人の遺伝子多型に基づくと考えられ、関連遺伝子の多型に基づくと考えられ、関連遺伝子の多型をプローブによって検出するリスク診断は患者の経済的・身体的負担の軽減を可能にする。

B. 研究方法

循環器疾患の発症進展には環境・遺伝要因が深く関与するが、ゲノムと臨床情報とをリンクさせたデータベース構築が不可欠であり、すでに我々は東大病院循環器内科入院の全患者を対象にゲノム収集を行うのと同時に病歴、薬歴などすべての臨床情報を臨床医の視点から体系的に収集する。また自動システム化に向けた組織、血液等からの核酸抽出・精製を行うシステムを確立する。国内外の研究成果から研究成果や塩基配列が既知である動脈硬化関連が実証されている遺伝子を数十種類選出し、解析によって得られた情報を統計学的ならびに遺伝学的な方法を用いて臨床像と対比することにより診断に有用な遺伝子発現または多型を特定しそれらを検出するためのプローブを設計する。最終的には開発したプローブアレイによる遺伝子診断システムならびに遺伝子精製から診断までの自動化システムの実用化に向けた評価を行う。

（倫理面への配慮）

東京大学と株式会社日立製作所のそれぞれが定めた遺伝子診断および遺伝子解析に関する倫理指針に基づき、各々の施設に設置された倫理審査委員会において審査を受け、それによる承認内容を遵守し、患者よりインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

我々は東大病院循環器内科入院の全患者を対象にゲノム収集を行うのと同時に病歴、薬歴などすべての臨床情報を臨床医の視点から体系的に収集し、遺伝子検

体は約 1300 検体、臨床データベースには約 1800 症例が入力されている。

動脈硬化発症は糖尿病や高脂血症といった代謝障害が基盤となるが、そのなかでも低 HDL コレステロール症は独立した危険因子と知られる。低・無 HDL 血症の原因遺伝子である ATP-binding cassette A1 (ABCA1) 遺伝子に着目しその多型解析を行ったところ Met823Ile 多型が日本人において HDL 濃度と関連し、Met823 の保有者で HDL コレステロールが高値を示し、抗動脈硬化傾向を示すことを日本人を対象とした研究では初めて明らかにした。

血管のリモデリングに関与する matrix metalloproteinase (MMP) の MMP1 および MMP3 のプロモーター領域の転写活性に直接関与する遺伝子多型について、その 2 つの遺伝子多型が互いに連鎖し、その組み合わせからなるハプロタイプが心筋梗塞発症に有意に関連すること（オッズ比が約 1.8 倍に上昇）を明らかにした。

動脈硬化発症においては血管平滑筋の収縮型から各種液性因子および構成蛋白を合成し増殖する合成・増殖型へ形質転換することが病態生理の鍵を握る。その形質転換に主たる役割を担う転写因子 KLF5/IKLF/BTEB2 に着目し、遺伝子欠損マウスを作成することに成功、ホモの個体は胎性早期に致死であること、ヘテロの抗体は正常に出生するものの血管障害モデルや圧負荷モデルにおける心血管のリモデリングがヘテロ接合体で抑制されることが示され、本遺伝子が心血管系のリモデリングの主たる規定因子であることが証明された。現在この遺伝子の変異と動脈硬化性疾患との関連につき検討中である。

D. 考察

このような心血管病に関連すると予測される多数の遺伝子群について遺伝子多型解析をすることにより、実地臨床において有用な遺伝子が選別され、それらに基づく個別化医療の実践が将来的に可能になるものと考えられる。またあわせてそのような遺伝子の機能を詳細に解析することが必要になるが、それには発生工学など先端の基礎生物学的研究を平行して進行させる必要がある。

E. 結論

包括的な臨床情報収集と疾患関連候補遺伝子の多型解析との統合により、冠危険因子の一つである低 HDL 血症に関して ABCA1 遺伝子 Met823Ile 多型が関与すること、また MMP-1, MMP-3 のプロモーター多型のハプロタイプが独立した心筋梗塞発症の遺伝的危険因子であることを示した。また動脈硬化発症に関与する平滑筋の活性化・脱分化を制御する遺伝子 KLF5 の心血管リモデリングに関する機序を発生工学の手法により明らかにし、現在その遺伝子多型・変異解析が進行中である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* (in press).

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Sato A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Int J Cardiol* (in press)

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Twenty single-nucleotide polymorphisms in four genes encoding cardiac ion channels. *J Hum Genet*. 2002;47:208-12.

Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N, Nagai R. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1680-5.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-9.

Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling

and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med*. 2002;8:856-63.

2. 学会発表

新藤隆行、真鍋一郎、佐田政隆、鈴木亨、前村浩二、倉林正彦、永井良三

Critical roles of IKLF/BTEB2 in vascular remodeling proved by gene targeting.

日本循環器学会 第 66 回日本循環器学会学術集会 2002

原田智浩、野尻剛史、森田啓行、今井靖、林同文、杉山卓郎、前村浩二、山崎力、永井良三

ATP binding Cassette Transporter (ABCA1) variant is one of the determinantsof plasma high density lipoprotein level in Japanese population

日本循環器学会 第 66 回日本循環器学会学術集会 2002

野尻剛史、森田啓行、林同文、今井靖、前村浩二、原田智浩、藤田英雄、山崎憲、中村文隆、平田恭信、大野実、杉山卓郎、山崎力、永井良三 The Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) 1G/2G Polymorphism and the Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) 5A/6A Polymorphism are Useful Genetic Markers for Myocardial Infarction 日本循環器学会第 66 回日本循環器学会学術集会 2002, 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. そのほか

特記すべきことなし

遺伝子診断システムの技術検討

分担研究者 永井 啓一 株式会社日立製作所 中央研究所 研究主幹

研究要旨

大腸がんならびに循環器疾患を対象とした遺伝子診断法の普及に必要な遺伝子診断システム機器を開発する。低コスト、高感度、簡便操作のシステム実現が目標である。

A. 研究目的

疾患に関連する遺伝子多型、変異、発現量を測定した結果に基づく遺伝子診断は、個人の体質に的確な診療を可能にし、患者の経済的・身体的負担を軽減する。本研究は、生活習慣病であるがんや心筋梗塞・脳卒中を対象にした遺伝子検査技術の開発とその技術に基づく臨床用遺伝子診断システムの確立を目的とする。

B. 研究方法

便中に微量に存在する大腸がん細胞を検出することによる大腸がんスクリーニング法について、自動検査システムの開発を行う。一方、複数の SNPs に基づいた循環器疾患の再発や副作用のリスクに関する遺伝子診断について、検査対象となる様々な SNPs に対して汎用性の高い検査技術を実現するためプロトコルの最適化を進めるとともに、患者サンプルによる技術評価を行う。

(倫理面への配慮)

大腸がん患者からのがん細胞ならびに便や血液の採取に関するインフォームド・コンセント内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は、国立がんセンターと株式会社日立製作所のそれぞれが定めた倫理指針に基づき双方の倫理審査委員会において審査を受け承認を得ている。一方、循環器疾患患者の血液採取に関するインフォームド・コンセント内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は、東京大学と株式会社日立製作所のそれぞれが定めた倫理指針に基づき設置された倫理審査委員会において審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

便の懸濁後から大腸がん細胞を回収するまでの工程を自動化するため、便中の固形分や代謝物の除去を行う工程について要素試作を行った。また、SNPs 検査技術について、汎用性を高めるためのプローブ設計やアニリング温度の最適化を行い、循環器疾患との関連が既知の 25 種の SNP について、患者サンプルでデータを取得し、25 種全てについてタイピングが可能であることを確認した。

D. 考察

大腸がんスクリーニングは、取り扱いの難しい検体（便）を対象としているため、検査に係る全工程について、ユーザ（医師や検査技師）の作業時間と動作を軽減する全自動化が実用上必要である。今後は回収後の細胞検出までのアーキテクチャを含めて装置開発を進める。一方、SNPs 検出技術は、独自に開発した BAMPER 法に基づいている。本法を適用するシステムの実用化には、低コスト化、高感度の課題があり、試薬成分や必要量の検出感度への影響を定量的に吟味していく。

E. 結論

大腸がんスクリーニング用自動化装置について、今後患者サンプルによる要素試作の有用性評価を実施し、問題点抽出と改良を進め、全体試作へとつなげる。一方、BAMPER 法に基づく SNPs 検査技術について、一定の汎用性と患者サンプルへの適性を確認した。今後は、システムへ適用するため、低コスト化、高感度化も含めた技術の高度化と検査デバイスの実用化を、NEDO から受託した事業「臨床用遺伝子診断システム機器」を活用して行う。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

便処理手法に関して特許申請予定

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aoyagi, K., Tatsuta, T., Nishigaki, M., Akimoto, S., Tanabe, C., Omoto, Y., Hayashi, S., Sakamoto, H., Sakamoto, M., Teruhiko, Y., Terada, M., and <u>Sasaki, H.</u>	A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	300	915-920	2003
Yamamoto, H., Ochiya, T., Takeshita, F., Toriyama-Baba, H., Hirai, K., Sasaki, H., <u>Sasaki, H.</u> , Sakamoto, H., Yoshida, T., Saito, I., and Terada, M.	Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1 conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation.	Cancer Res	62	1641-16	2002
Ishizuka, T., Tanabe, C., Sakamoto, H., Aoyagi, K., Maekawa M., Matsukura, N., Tokunaga, A., Tajiri, T., Teruhiko, Y., Terada, M., and <u>Sasaki, H.</u>	Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	296	152-155	2002
Nuzu, M., Nishigaki, M., Tomoki, I., Kuwahara, Y., Tanabe, C., Aoyagi, K., Sakamoto, H., Saito, Y., Yoshida, T., <u>Sasaki, H.</u> , and Terada, M.	Identification of the CAB2/hCOS16 gene on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancers.	Jpn. J. Cancer Res.	93	1183-11	2002
Inoue, A., Hayashi, S., Aoyagi, K., Nishigaki, M., <u>Sasaki, H.</u> , and Kiyama, R.	A reporter gene assay for evaluation of tissue-specific responses to estrogens based on the differential use of promoters A to F of human estrogen receptor a gene.	J. Pharmacol. Toxicol. Methods.	5397	1月7日	2002
Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R.	A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population.	Atherosclerosis		in press	
Shindo T, Imai Y, <u>Nagai R</u> et al.	Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling.	Nature Medicine.	8	856-863	2002
Iwasa H, Kurabayashi M, <u>Nagai R</u> , Nakamura Y, Tanaka T.	Twenty single-nucleotide polymorphisms in four genes encoding cardiac ion channels.	J Hum Genet.	47	208-212	2002
Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N, <u>Nagai R.</u>	Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	22	1680-16	2002
Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, <u>Nagai R.</u>	Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Nat Med.	Nat Med.	8	403-9	2002

20020768

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P14「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください