

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト多段階発がん過程における
遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明と
その臨床応用に関する研究
(H16-3次がん-001)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広橋 説雄

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

ヒト多段階発がん過程における遺伝子異常の把握に基づいたがんの本態解明と その臨床応用に関する研究 _____	1
主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	

II. 分担研究報告書

1. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる蛋白発現異常の網羅的解析 _____	19
広橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	
2. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる遺伝子発現異常の網羅的解析 _____	25
坂元 亨宇 (慶應義塾大学医学部病理学教室)	
3. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 _____	29
稲澤 譲治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)	
4. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 _____	36
細田 文恵 (国立がんセンター研究所分子腫瘍学部)	
5. 染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 _____	40
村上 善則 (国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト)	
6. MS-RDA 法によるエピジェネティックな発がん機構の解明 _____	47
牛島 俊和 (国立がんセンター研究所発がん研究部)	
7. 諸臓器の前がん状態ならびにがんにおける DNA メチル化異常の網羅的解析 _____	53
金井 弥栄 (国立がんセンター研究所病理部)	
8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究 _____	58
今井 浩三 (札幌医科大学内科学第一講座)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	64
---------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒト多段階発がん過程における遺伝子異常の把握に基づいた
がんの本態解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：全染色体を4500個のBACクローンでカバーする高密度アレイを開発して比較ゲノムハイブリダイゼーション解析を行い、がんで高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を多数同定した。肝がんにおけるウイルス感染・予後と相関するゲノム構造異常や、肺腺がんにおける性差・喫煙歴・予後・EGF受容体遺伝子変異の関与する発がん経路と相関するゲノム構造異常を見出した。ゲノム構造解析により同定したがん抑制蛋白TSLC1に結合するDAL-1をコードする遺伝子のDNAメチル化が、肺がんの予後不良因子となることを示した。Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)が、TCF-4と結合してβ-カテニン・TCF-4複合体の転写活性を増強し、大腸発がん早期に寄与する可能性を示した。大腸がん浸潤先進部で高発現しβ-カテニンと結合するアクチン結合蛋白アクチニン-4は、細胞運動能を亢進させがんのリンパ節転移を亢進させる。膜糖蛋白ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格の構築制御を介して細胞運動能を亢進させる機序を示し、同分子の高発現が諸臓器のがん症例において転移性とよく相関し予後不良因子となることを示した。遺伝性非ポリポーシス大腸がん症例の新規スクリーニングアルゴリズムを作成した。神経芽腫の予後マーカーとして有用なDNAメチル化のパターンを示した。CpGアイランド内にde novoのメチル化が蓄積するような、DNAメチル化状態伝達の忠実度が低下したがん細胞株が存在することを示した。DNAメチルトランスフェラーゼDNMT1の発現亢進がde novoメチル化に帰結し、DNMT3bのスプライズバリエントであるDNMT3b4の過剰発現が染色体不安定性の惹起と遺伝子発現変化に結びついて発がん早期に寄与する可能性を示した。

分担研究者

- | | | | |
|----------|---------------------------|----------|-------------------------------------|
| 1. 広橋 説雄 | 国立がんセンター
研究所 所長 | 5. 村上 善則 | 国立がんセンター
研究所 プロジェクト
リーダー (室長) |
| 2. 坂元 亨宇 | 慶應義塾大学
教授 | 6. 牛島 俊和 | 国立がんセンター
研究所 部長 |
| 3. 稲澤 譲治 | 東京医科歯科大学
難治疾患研究所
教授 | 7. 金井 弥栄 | 国立がんセンター
研究所 部長 |
| 4. 細田 文恵 | 国立がんセンター
研究所 室長 | 8. 今井 浩三 | 札幌医科大学
教授 |

A. 研究目的

本研究は、諸臓器のがんにおいて遺伝子の発現異常ならびにジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの個性を新しい視点から分類・整理できるようにするとともに、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにしてヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を解明することを目的とする。基礎医学・病理学・臨床医学を背景とする研究者が、協調して本研究課題を推進する。もって、がんの予防・診断・治療に亘り新局面を拓いて患者個人に最適な医療の実現を図り、高齢化社会におけるがんの罹患率と死亡率の激減に向けて有意義な貢献をなすことを目指す。具体的には、以下の各項について研究をすすめる。

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

高精度ゲノムアレイを開発して、諸臓器のがん臨床検体多数を解析し、がんにおけるゲノム構造異常を網羅的に同定する。臨床病理学的因子とゲノム構造異常の全体像を比較検討することで、がん細胞の特性をゲノム構造異常の観点から理解する。がん特異的に高頻度に染色体欠失あるいは増幅を認める領域を詳細に同定し、網羅的な遺伝子あるいは蛋白の発現解析の結果を有機的に活用しながら、候補標的遺伝子の異常を多数検体で検索することで、新規がん関連遺伝子の単離を目指す。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

がん克服戦略研究事業において腫

瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制蛋白質 TSLC1 を含む分子経路の、ヒトがんにおける異常の実態とその機能を検討する。 β -カテニン-T-cell factor-4 (TCF-4)系の転写活性を制御する因子の、大腸早期発がんへの機能的関与を明らかにする。アクチン細胞骨格を中心としたがんの浸潤・転移の分子機構の理解をすすめる、転移の抑制を目標とした新規治療法開発の基盤となる知見を得る。諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる遺伝子発現異常を網羅的に解析する。散発性の大腸がんならびに遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC)における遺伝子異常を系統的に解析して診断アルゴリズムを改良し、分子標的治療の可能性を展望する。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

罹患率の高い小児固形腫瘍のひとつである神経芽細胞腫には、治療に抵抗して進行するものと、場合によっては自然退縮を示す悪性度が低いものがあるので、がん克服戦略研究事業において開発したゲノム内のDNAメチル化の変化を網羅的に検索する技術である methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を用いて、神経芽細胞腫の予後判定に役立つマーカーを分離する。発がん過程においてDNAメチル化異常を来す分子機構の理解をすすめるため、局所的なDNAメチル化亢進すなわち CpG アイランドメチル化形質 (CIMP)を示す培養がん細胞において、DNA複製時のメチル化状態複製の忠実度が低下する現象が実在するかどうか検証する。発がん

におけるフィールド効果が顕著な膀胱移行上皮がんや、肝炎ウイルスの持続感染を伴う前がん状態を背景として発生する肝細胞がん症例の組織検体の解析をもとに、DNAメチル化酵素の発現・スプライス等の異常が、DNAメチル化の亢進あるいは減弱を介して遺伝子の不活化や染色体不安定性に帰結する経路を示す。

B. 研究方法

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がん克服戦略研究事業において開発してきたしてきた、がん関連遺伝子を網羅的に含む「がん個性診断」アレイ (MCG Cancer Array-800) ならびにヒトゲノム全体を高密度に検索できる高密度ゲノムアレイ (MCG Whole Genome Array-4500) を併用し、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法により、ヒトゲノムを平均 0.6 Mb 間隔で解析した。対象として、肝がん・膵がん・肺がん・胃がん・乳がん等の臨床検体を用いた。全症例でレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて腫瘍組織からがん細胞のみを選別し、DNAを抽出後、アダプターライゲーション法により増幅し、解析した。得られたゲノム構造異常の全体像を俯瞰し、臨床病理学的な特徴と相関するゲノム構造異常の抽出を行った。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

原発性非小細胞肺がん検体において、TSLC1 結合蛋白をコードする DAL-1/4.1B 遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランド内転写開始点近傍の CpG 配列の DNAメチル化の状態を、バイサルファイト変換により検討した。DAL-1/4.1B 遺伝子の位置する第 18

染色体 q11.3 領域のヘテロ接合性の喪失 (LOH) の有無を、マイクロサテライト多型マーカーを用いて検討した。DAL-1/4.1B 遺伝子発現をノザン法・定量 RT-PCR 法により評価した。ヒト成人 T 細胞白血病細胞、HTLV-1 ウイルス感染細胞等において、TSLC1 遺伝子プロモーター領域の DNAメチル化の状態をバイサルファイト変換によって検討し、TSLC1 遺伝子発現をノザン法・定量 RT-PCR 法で評価した。

β -カテニン-TCF-4 系の転写活性を制御する因子を同定するため、エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養細胞に発現させて免疫沈降を行い、質量分析によってその複合体に含まれる蛋白質を同定した。

がん克服戦略研究事業において単離した β -カテニンと結合する新規アクチン結合蛋白であるアクチニン-4 の発現を、大腸がん臨床検体において免疫組織化学的に検討し、発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。テトラサイクリン誘導システムを用いてアクチニン-4 遺伝子発現を厳密に制御できる大腸がん細胞株 DLD-1 Tet OFF ACTN4 を樹立し、細胞運動能・細胞形態やアクチン細胞骨格の構築の変化を観察し、マウス移植モデルにおける転移能を定量的に評価した。

がん克服戦略研究事業において単離した新規がん関連遺伝子であるディスアドヘリンの発現量を多数の膵がん細胞株において検討し、アレイスキャンシステムで評価した細胞運動能との相関を検討した。ディスアドヘリンを発現する膵がん細胞株において RNA 干渉により発現を減弱させ、あるいはディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株に cDNA 導入により強

制発現させ、細胞運動能・細胞形態・アクチン細胞骨格の構築の観察・マウス移植モデルにおける転移能の評価を行った。舌・食道扁平上皮がん臨床検体において、免疫組織化学的に評価したディスアドヘリン発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。

多様な臨床病理学的特性を示す肺がん・膵がん・卵巣がんの臨床検体において、正常組織等に比して発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によって網羅的に同定した。同定された遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション法・免疫組織化学的検討により組織での発現の局在・病理像との対応をさらに詳細に解析し、病態との関連を絞り込んだ。培養がん細胞において同定された遺伝子の発現を RNA 干渉あるいは遺伝子導入により制御し、機能解析を行った。

HNPCC 患者および散发性大腸がん患者の臨床検体において、国際ガイドラインに基づきマイクロサテライト不安定性 (MSI) の有無を検索し、K-ras および BRAF 遺伝子の変異の有無を評価した。MSI 陽性例に対してはさらに標的遺伝子のフレームシフト変異を解析した。HNPCC 症例においては、ミスマッチ修復遺伝子の変異の有無や発現を解析した。以上の結果を総合して、HNPCC 症例の新規スクリーニングアルゴリズムを作成した。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

予後良好な神経芽細胞腫と予後不良な神経芽細胞腫において、MS-RDA 法により、DNA メチル化を受ける遺伝子およびその CpG アイランドをゲノム網羅的に検索した。同定された CpG ア

일랜드の DNA メチル化の状態を、メチル化特異的 PCR (MSP) 法等によってさらに詳細に評価した。DNA メチル化の状態と症例の予後・年齢・病期・N-myc 増幅の有無との相関を検討し、予後予測マーカーとなりうる DNA メチル化プロファイルを同定した。

CIMP 陽性培養がん細胞 1 個を 106 個まで増殖させ、DNA を回収した。得られた DNA について、バイサルファイトシークエンス法により DNA メチル化模様を決定した。10-20 分子の DNA メチル化模様について、最初の 1 個の細胞での DNA メチル化模様からの変異を計測した。変異数は、観察した CpG 部位の数で標準化した。6 回の細胞培養を繰り返し、観察した細胞の世代数から、CpG 部位あたり・世代あたりの DNA メチル化状態複製の変異率および忠実度を求めた。

正常移行上皮・尿中にある発がん物質等に暴露され前がん段階にある可能性がある膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮・異形成上皮・移行上皮がんにおいて、DNA メルトランスフェラーゼ DNMT1 の蛋白発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、複数の CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態をバイサルファイト変換によって、傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の状態をサザン法によって、それぞれ評価した。ヒト胎児腎上皮由来 293 細胞に DNMT3b4 のスプライスバリエーションである DNMT3b4 全長 cDNA を安定的に強制発現させた。DNMT3B4 強制発現細胞の増殖速度を評価し、増殖能が亢進するとき発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によって網羅的に同定した。同定した遺伝子の発現を、正常肝組織・肝細胞がん症例の手術

材料より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織・肝細胞がん組織等においても定量 RT-PCR 法により評価した。

(倫理面への配慮)

厚生科学審議会により制定された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題などに対応するための指針」および科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守した。手術材料の残余の組織の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせないようにした。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程では無記名として検体番号のみで取り扱うなどの細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がん関連遺伝子 800 種類の解析を可能とする「がん個性診断」アレイ (MCG Cancer Array-800)・4523 個の BAC クロームを配置した全ゲノムをカバーする高密度ゲノムアレイ (MCG Whole Genome Array-4500) 等を作製し、標準化した。これらのゲノムアレイは、わずか数 10kb のヘミ欠失を検出する精度であることが確認され、がんの特異的な染色体コピー数異常の解析の強力なツールとなった。

食道扁平上皮がん細胞株において MCG Cancer Array-800 を用いたアレイ CGH 解析で、LRP1B 遺伝子 (2q22.1) のホモ欠失を検出した。食道がん臨床検体においても LRP1B 遺伝子のホモ欠失が高頻度認められ、ホモ欠失のない食道がん細胞株においてはプロモーター領域の CpG メチル化によって高頻度に発現が消失していた。LRP1B 発現を欠く食道がん細胞株に強制発現すると、コロニー形成が低下したため、LRP1B 遺伝子は食道がんの候補がん抑制遺伝子と考えられた。SKP2 が肺非小細胞がんの 5p13 増幅の標的であり、その発現抑制が非小細胞肺がん細胞の遊走能・浸潤能を抑制することを明らかにした。肺非小細胞がん細胞株のアレイ CGH 解析で検出した 9q33 の新規ホモ欠失領域から、肺がん抑制遺伝子候補 DBC1 を同定した。Cancer Array-800・MCG Whole Genome Array-4500 を用いて胃がん細胞株においてアレイ CGH 解析を施行し、7q21.2 に位置する CDK6 遺伝子の新規増幅を検出した。胃がん症例における免疫組織化学的検討で、高頻度に細胞質ならびに核における陽性所見を確認した。卵巣明細胞腺がんの 17q 増幅の標的遺伝子が PPM1D であることを明らかにした。

肝細胞がん臨床検体について、MCG Cancer Array-800 を用いたゲノム構造異常の検索を行った。高頻度に染色体欠失を示す領域として、1p36, 4q21-25, 4q34-35, 8p23-11, 13q14, 16p13, 16q22-24, 17p13 を、染色体重複領域として、1q21-44, 2q21, 2q34, 3q11, 5p14, 5q13-14, 7p22, 7p14, 7q21, 7q22, 7q34, 8q12-24, 17q23 を同定した。さらに高頻度染色体増幅領域として、1q25, 8q11, 11q11 を、新規の染色体ホモ欠失領域として

14q32 領域を検出した。ゲノム構造異常の蓄積の程度は、腫瘍の分化度・B 型肝炎ウイルス感染・悪性度（門脈浸襲・肝内転移）と有意に相関した。さらに、17p13.3 領域の欠失と 8q11 領域の重複が、他の臨床病理学的因子（臨床病期・門脈浸襲・肝内転移）と独立した予後予測因子になることを見いだした。

肺腺がん臨床検体について、MCG Cancer Array-800 を用いたゲノム構造異常の検索を行った。高頻度の染色体欠失領域と染色体重複領域を多数同定すると同時に、高頻度の染色体増幅領域として 7p12, 11q13, 12q14-15, 17q21 を、新規の染色体ホモ欠失領域として 8p23 領域を検出した。またゲノム構造異常の蓄積過程の違いから、肺腺がんを大きく 3 つの群に分類することができた。この分類は患者の性別、喫煙歴、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子異常の有無と有意に相関した。さらに EGFR 遺伝子異常と相関する遺伝子構造異常を抽出したところ、MET 遺伝子の増幅が EGFR 遺伝子の異常と類似したゲノム異常の蓄積と共存することがわかった。

胃がん臨床検体において、MCG Whole Genome Array-4500 を用いたゲノム構造異常の検索を行った。胃がんにおいては染色体 1p36, 1q21, 1q31, 1q42, 3q26, 5p13, 6p21, 7p22-p11, 8q22-q24, 9p13, 9q34, 11q13, 12p12, 12q13, 13q, 16p13-p11, 17q12-q21, 17q25, 19q12-q13, 20 の重複が頻度 20%以上で認められ、高頻度の重複は 20q (60%), 8q22-q24 (50%), 7p22 (40%), 17q12-q21 (40%), 6p21 (40%), 1q12 (40%) 等であった。また染色体 1p13, 3p26, 3p24, 4q34, 5q21, 8p23, 9p24-p21, 18q12-q23, 19q13, 21q21

の欠失が頻度 20%以上で認められ、高頻度の欠失は 18q23 (35%), 9p21 (30%), 5q21 (30%) であった。乳がんにおいては染色体 1q, 3p13, 3q24-q28, 4q, 5p15, 5q11, 5q21, 8q, 9p23-p21, 11q13, 12q21, 13q21-q31, 20q, X の重複が頻度 30%以上で認められ、特に 1q, 4q, 5p15, 8q, 12q21 の重複は 60%の高頻度を示した。欠失は染色体 1p36-p34, 1p21, 3p21, 8p, 9q32, 10q11, 10q24-q26, 11q23-q25, 16q, 17p-q21, 22q において頻度 20%以上で認められ、高頻度欠失は 17p (55%), 8p (50%), 11q23-q25 (40%) に見られた。染色体 1p36 欠失, 8p 欠失, 8q 重複, 11q23-q25 欠失, 17q21 欠失は異型度と有意に相関し、エストロゲン受容体 (ER) 発現陽性症例には 11q23 欠失, 16p13 重複, 16q13-q23 欠失が特徴的であるのに対して、14q24-q32 欠失, 17p 欠失, 17q21 重複は ER 陰性症例に高頻度に見られた。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

原発性非小細胞肺がんの 57%に、TSLC1 結合蛋白をコードする DAL-1/4.1B 遺伝子のプロモーター領域の CpG メチル化が認められ、これらは DAL-1/4.1B 遺伝子の位置する 18p11.3 領域の LOH を伴うかあるいは両アレルの DNA メチル化であった。肺扁平上皮がんでは、DAL-1/4.1B 遺伝子の DNA メチル化は臨床病期 I 期から認められたが、肺腺がんにおいては臨床病期の進行に伴い DAL-1/4.1B 遺伝子の不活化の頻度が亢進した。無再発生存率・全生存率は DAL-1/4.1B 遺伝子の DNA メチル化を示す肺腺がん患者において有意に低く DAL-1/4.1B 遺伝子の DNA メチル化が予後不良のマーカーとなる可能性が示された。原

発性非小細胞肺がんの 81% で TSLC1 遺伝子と DAL-1/4. 1B 遺伝子のいずれかあるいは両方の不活化が認められることがわかった。他方、TSLC1 の発現はリンパ球では全く認められないが、成人 T 細胞白血病細胞では TSLC1 の異所性発現が認められることを見出した。成人 T 細胞白血病培養細胞において、TSLC1 遺伝子の DNA メチル化の減弱が高発現と相関した。TSLC1 の高発現は HTLV-1 ウイルス感染細胞でも認められたが、HTLV-1 感染と関連のない白血病細胞や健常人の正常 CD4 陽性細胞では全く TSLC1 の発現が認められなかった。

エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養細胞に発現させて免疫沈降を行い、質量分析によってその複合体に含まれる蛋白質を同定したところ、poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) が TCF-4 と結合することがわかった。PARP-1 の発現亢進は、 β -カテニンによる TCF の転写活性を増強したが、その酵素活性は必要としなかった。RNA 干渉によって PARP-1 の発現を低下させたところ、転写活性および細胞増殖を抑制した。家族性大腸腺腫症症例およびその実験モデルである Min マウスの腺腫では、PARP-1 の発現が β -カテニンの発現と共に亢進していた。

定量的免疫染色法で検討したところ、大腸がんの 73% において正常大腸粘膜上皮に比してアクチニン-4 の発現が亢進していた。特に大腸がんの浸潤先進部におけるアクチニン-4 の高発現は、リンパ節転移と有意に相関した。大腸がん細胞株 DLD-1 にアクチニン-4 の発現を誘導したところ、フィロポディア・ラメリポディア等の細胞突起が顕著に形成され、さらに運動能が亢進することが分かった。

マウス同所性移植モデルでは、アクチニン-4 強制発現細胞移植群は、対照群に比し有意に高頻度に腸間膜所属リンパ節への転移を来たした。

膵がん細胞株において、ディスアドヘリンの発現量は細胞運動能と有意に相関した。ディスアドヘリンを高発現する膵がん細胞株において、RNA 干渉により発現を減弱させたところ、細胞運動能が減弱した。ディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株において、cDNA を導入して高発現させたところ、細胞運動能が亢進した。細胞形態とアクチン構築は、ディスアドヘリン発現量に依存して変化した。すなわち、RNA 干渉により発現を減弱させると、がん細胞は大型で扁平な形状を取り、細胞膜直下のアクチンレイヤーが減少して接着斑が発達しアクチンストレスファイバーが増加した。マウス同所性移植モデルにおいて、ディスアドヘリン強制発現細胞の転移能が亢進していた。舌扁平上皮がんにおいてディスアドヘリン発現は E-カドヘリン発現と逆相関し、ディスアドヘリン発現レベルは腫瘍の浸潤性増殖形態・臨床病期と相関する有意な予後不良因子であった。ディスアドヘリン発現陽性・E-カドヘリン発現陰性の食道扁平上皮がんの予後は、その他の症例に比べて有意に不良であった。

マイクロアレイ解析により初期肺腺がん症例のがん部・非がん部を区別できる約 200 の遺伝子群を同定し、がん部で発現上昇していた 20 遺伝子について定量 RT-PCR 法で発現量を厳密に確認し、さらに免疫組織化学的解析を施行した。一連の遺伝子発現は肺胞上皮置換性増殖をしているがん細胞に認められたが、II 型肺胞上皮にも発現が認められる遺伝子が多く、初期肺腺がんが遺伝子発現レベ

ルにおいても II 型肺胞上皮の性質を強く維持している可能性が示唆された。その中で、がん特異的な発現を示す分子群に関して現在機能等の解析をすすめている。

膵がんの腫瘍組織を直接膵臓に移植して得られた同所性移植腫瘍の移植片で高発現する遺伝子として、adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1)を抽出した。膵管がんにおける CAP1 の高発現を免疫組織化学的に確認した。CAP1 は、分化度の低いがん細胞でより高発現する傾向があった。膵管がん細胞株において免疫細胞化学的に検討したところ、CAP1 は核周辺の細胞質に多く存在し、またラメリポディアの先端部特にラップリングが見られるところにも局在することが分かった。RNA 干渉により膵管がん細胞株の CAP1 発現量を減弱させたところ、ラメリポディア形成の阻害が見られ、さらに細胞の運動能が低下した。

がん克服戦略研究事業の成果として、HNF1 β が卵巣明細胞腺がんの特異的に発現し、診断マーカーおよび治療標的分子となる可能性を示してきた。今年度は、HNF1 β についての免疫細胞化学的検討が腹水細胞診に適用可能であるかどうか検討した。HNF1 β は明細胞腺がん細胞の細胞核のみに陽性であり、中皮細胞には陰性であった。陽性症例の割合は明細胞腺がんが 96%、漿液性腺がんが 0%、粘液性腺がんが 0%、類内膜腺がん 30%であり、HNF1 β は腹水細胞診標本でも明細胞腺がんの診断マーカーとして利用しうると考えられた。

がん克服戦略研究事業における諸臓器のがんでのシグナル伝達系異常の網羅的解析の結果に基づき、本年度は RAS/RAF/MAPK シグナルに注目し

た。多数の散発性大腸がん症例・HNPCC 症例のがん組織において、K-ras・BRAF 遺伝子変異等を系統的に解析した。hMLH1 遺伝子の DNA メチル化の有無も併せて解析した。好発部位 (V599E) における BRAF 遺伝子変異を散発性マイクロサテライト不安定性陽性 (MSI) 大腸がんの 40%に検出し、右側大腸における発生および hMLH1 遺伝子メチル化との有意な相関を認めた。一方、散発性症例とは対照的に HNPCC 症例においては BRAF 遺伝子変異を検出しなかったことから、本知見の臨床応用として、BRAF 遺伝子変異解析を組み込んだ新規 HNPCC スクリーニングアルゴリズムを作成することができた。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

予後良好な神経芽細胞腫 5 例の DNA プールをテスターに、予後不良な神経芽細胞腫由来の細胞株 5 系統の DNA プールをドライバーに用いて、MS-RDA 法を行い、予後不良な神経芽細胞腫で特異的にメチル化されている可能性がある CpG アイランドを分離した。PCDHB ファミリー (5q31), PCDHA ファミリー (5q31), HLP (3p21), DKFZp451I127 (5q14)、および、CYP26C1 (10q23) の 5 個についてテスターとドライバーとで DNA メチル化状態に明瞭な違いがあることを、MSP 法により確認した。新たな神経芽腫臨床検体においてこれら 5 個の CpG アイランドのメチル化レベルは互いに強く相関し、これらの CpG アイランドのメチル化を多発する神経芽細胞腫 (CIMP 陽性) と、多発しない神経芽細胞腫の 2 種類に群別可能であった。さらに、CIMP をもつ神経芽細胞腫症例は、ハザード比 25.4 で予後不良であった。CIMP は、臨床病期・染色体の倍数性・TrkA の

高発現とは独立した予後因子であった。一方、N-myc 増幅をもつ神経芽細胞腫のほぼ全例が CIMP をもち、N-myc 増幅を持たない神経芽細胞腫の中にも CIMP をもつものが存在した。予後予測が重要な N-myc 増幅のない病期 III および VI の症例でも、CIMP の有無は予後との関連を示した。CIMP をもつ神経芽細胞腫では、既知のがん抑制遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化も高頻度に認められた。

CIMP をもつ胃がん細胞株 2 系統 (KATOIII, AGS)、CIMP をもたない胃がん細胞株 2 系統 (HSC39 と HSC57) について、bA305P22.2.3, FLJ32130, RIKEN2210016 のホモログ (RIKEN2210016)、E-カドヘリンおよびサイクロフィリン A のプロモーター領域 CpG アイランドについて、CpG 部位メチル化状態複製の忠実度を測定した。HSC39 と HSC57 は、すべての CpG アイランドで 99.90-100 % と、正常乳腺上皮細胞と同等の忠実度を示した。一方、KATOIII は RIKEN2210016 (1.9 倍) で、AGS は bA305P22.2.3 (3.2 倍)、RIKEN2210016 (5.7 倍) および E-カドヘリン (1.6 倍) で、有意にメチル化状態複製のエラーが増加していた。ほとんどすべてのエラーは、de novo メチル化であった。

さらに、この忠実度の低下が、CpG アイランド全体のメチル化を誘発するか否かを、全体がメチル化された DNA 分子を MSP 法により高感度に検出することで検討した。RIKEN2210016 の CpG アイランド全体がメチル化された DNA 分子は、KATOIII および AGS では、散発的に検出されたのに対し、HSC39 と HSC57 では、決して検出されなかった。従って、KATOIII と AGS での CpG 部位メチル化状態複製の忠実度

の低下 (de novo メチル化の増加) は、CpG アイランド全体のメチル化を誘発する場合があると考えられた。

膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、正常移行上皮に比し、細胞増殖活性の亢進に先行して DNMT1 の蛋白発現が既に有意に亢進し、CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積が観察された。DNMT1 の蛋白発現は、異形成上皮・移行上皮がんにおいてさらに段階的に亢進し、全検体において DNMT1 の蛋白発現亢進の有無と DNA メチル化の蓄積は有意に相関した。傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の減弱は、移行上皮がんの異型度・深達と有意に相関した。サテライト配列は傍セントロメアヘテロクロマチン領域に位置し、この領域の DNA メチル化の減弱はセントロメアのクロマチン脱凝縮や染色体組み換えを促進することが知られているが、本検討で、傍セントロメアサテライト領域における DNA メチル化の減弱と、サテライト配列が豊富である第 9 染色体 LOH の有無は実際に有意に相関した。

DNMT3b4 をヒト胎児腎上皮由来 293 細胞に強制発現し、細胞増殖速度を定量したところ、DNMT3b4 導入後比較的早期にすなわち染色体不安定性が未だ蓄積していないと考えられる段階で、DNMT3b4 強制発現細胞の増殖速度が対照細胞の 2 倍程度に亢進していた。DNMT3b4 強制発現細胞において、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) とその下流でインターフェロンシグナルに寄与する可能性のある分子群の発現が亢進していた。DNMT3b4 と STAT1 の mRNA 発現量は肝細胞がん検体においても相互に有意に相関した。STAT1 とイン

ターフェロンシグナルに寄与する分子群の mRNA 発現も臨床検体において相互に有意に相関し、ともに正常肝組織に比して慢性肝炎ないし肝硬変症の段階で有意に亢進していた。

D. 考察

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がんの特異的なゲノム構造異常の網羅的スクリーニングを可能にする高精度・高密度のゲノムアレイを開発した。本技術により従来法では検出困難であった、数 100kb レベルの欠失や重複のゲノムコピー数異常を検出できるようになった。諸臓器のがんの臨床検体等におけるゲノム構造異常の全体像が俯瞰できた。新規がん関連遺伝子の単離に必要な、高頻度染色体異常領域の狭小化が達成された。標的領域に含まれる候補がん関連遺伝子のいくつかを既に同定した。他の領域については網羅的な遺伝子あるいは蛋白の発現解析の結果を参照しながら、候補遺伝子の絞り込みを行い、さらに single strand conformation polymorphism 法あるいは denaturing high-performance liquid chromatography 法を用いて遺伝子異常を効率良く多数検体で検索することで、新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子の単離を目指す。また臨床病理像との対応の結果、予後予測因子といった臨床的に重要な遺伝子異常の候補領域を抽出することができた。今後この結果をさらに多数検体で検証し、ゲノム構造異常に基づくがんの個性診断アレイの作成・実用化を目指したい。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

TSLC1-DAL-1/4. 1B 経路の異常が原

発性非小細胞肺がんの 80% 以上の症例で認められ、細胞接着・細胞骨格に関わるこの分子経路が肺がんの進展に極めて重要であると考えられた。TSLC1 遺伝子が上皮・神経由来等のさまざまな腫瘍で、特にその悪性進展に伴い、LOH ならびにプロモーターのメチル化により不活化し、がん抑制遺伝子として機能することが、さらに確認された。これまでに TSLC1 のメチル化が 30% 程度以上の頻度で報告された腫瘍は、非小細胞肺がん・鼻咽頭がん・食道がん・肝細胞がん・膵がん・乳がん・前立腺がん・子宮頸がん・髄膜腫と極めて多岐にわたる。今後、免疫グロブリン・スーパーファミリー接着分子としての活性をもつ TSLC1 が、細胞接着を介して細胞のどのような機能を制御して上皮性形質の維持と腫瘍抑制、あるいは浸潤・転移抑制に働くのか、分子細胞生物学的見地から明らかにしていく必要がある。一方、接着分子である TSLC1 が、血球系の細胞で発現しないことは妥当な現象で、TSLC1 の発現が成人 T 細胞白血病の疾患特異的診断の指標となると考えられた。共同研究により、成人 T 細胞白血病においては TSLC1 の過剰発現が自らの凝集活性や繊維芽細胞や血管内皮細胞への接着・浸潤活性を高めることが実験的に示されたので、TSLC1 を介する細胞接着が、組織浸潤や腫瘍形成といった成人 T 細胞白血病に特徴的な病態の形成に関与する可能性が考慮される。

β -カテニン-TCF-4 系の発がんにおける意義の理解が進んだ。すなわち、PARP-1 が TCF-4 と結合し TCF-4 の転写活性を増強することで、大腸発がん早期に寄与する可能性があると考えられた。アクチニン-4 はがんの転移

抑制の新規治療標的となる有力な候補分子と考えられたが、アクチニン-4 は家族性腎疾患の原因遺伝子であり、これを直接分子標的とすると腎障害をきたすことが予測される。そこで、アクチニン-4 遺伝子発現をがん細胞株において誘導し、トランスクリプトーム・プロテオーム手法によって、アクチニン-4 結合蛋白等を体系的に明らかにし、治療標的候補の同定を目指したい。がん克服戦略研究事業において、ディスアドヘリンを強制発現したがん細胞株では、E-カドヘリン発現が、RNA レベルでは保たれているにもかかわらず蛋白レベルで低下して細胞間接着性が損なわれることを示してきた。ディスアドヘリンはカドヘリン細胞接着系のがんにおける新たな不活化機構を提供すると考えられる。これに加え本年度の成果により、ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格を制御して細胞運動能を亢進させ、がん転移を直接促進する分子機構が示された。ディスアドヘリンの発現亢進を示す諸臓器のがんは概して悪性度が高く、患者の予後が不良であるとの知見がさらに集積してきた。ディスアドヘリンは、がん浸潤・転移制御の分子標的のひとつと考えられる。

遺伝子発現解析により、腺がん初期のがん細胞は肺胞 II 型上皮の性質を維持していることが確認された。正常肺胞 II 型上皮では発現が認められず、初期肺腺がんのみで発現が確認された遺伝子については、早期肺がんの腫瘍マーカーの候補として解析をすすめている。がん克服戦略研究事業の成果として、HNF1 β が卵巣明細胞腺がんの特異的に発現し、治療標的分子となる可能性を示してきたが、今年度の成果により、腹水細

胞診標本における明細胞腺がんの診断マーカーとしての有用性も示された。

BRAF 遺伝子変異は RAS 遺伝子変異との相補性があると考えられているので、K-ras 遺伝子変異の低い MSI 陽性大腸がんの発生に BRAF 遺伝子変異が寄与する可能性が注目されていた。実際、BRAF 遺伝子変異は、散发性 MSI 陽性大腸がん 40% で検出された。散发性 MSI 陽性大腸がん と HNPCC ではフレームシフト変異の標的遺伝子などの多くの共通性を有するのに、本研究において BRAF 遺伝子変異は HNPCC には全く検出しえなかった。BRAF 遺伝子変異の関わりについてのこのような著明な差は、臨床的にも HNPCC のスクリーニング診断に用いることができると期待される。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

CIMP の有無により、神経芽細胞腫の予後は大きく異なった。N-myc 増幅の陽性例がほぼ全例 CIMP 陽性であったことは、CIMP が N-myc 増幅に先行することを示唆していると考えられた。神経芽細胞腫の予後判定には、プロモーター領域よりも、それ以外の CpG アイランドの方が良いマーカーであった。プロモーター領域以外の CpG アイランドの方が、容易にメチル化され、CIMP を鋭敏に検出できると考えられた。CIMP が神経芽細胞腫の予後不良を誘発する機構として、分化や増殖抑制に重要な遺伝子が DNA メチル化により不活化されるためと考えられた。今後、具体的な標的遺伝子を明らかにし、脱メチル化剤の治療における有用性を検討することが必要である。

遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドの中のもっともメチ

ル化されにくいと予測される領域について解析し、細胞分裂あたりの CpG 部位メチル化状態複製のエラーを計測することで、CIMP の存在を明確に示した。正常状態では、CpG アイランド内の CpG 部位は de novo メチル化から保護されているが、一部のがん細胞では、その機構が破綻し、de novo メチル化が増加して CIMP も誘発されやすくなっていると考えられた。

DNMT1 の蛋白発現亢進は、多数の CpG アイランドにおける DNA メチル化の亢進を介して、膀胱がんの多段階発生過程に早期から寄与する可能性があると考えられた。がん克服戦略研究事業において、DNMT3b4 が、肝細胞がんに対する前がん状態である慢性肝炎ないし肝硬変症の段階で過剰発現し、正常肝組織に発現する主たるスプライスバリエントである DNMT3b3 と競合して傍セントロメアサテライト領域を標的とし、同領域における DNA メチル化の減弱を惹起する可能性を提唱した。実際本年度には、傍セントロメアサテライト領域における DNA メチル化の減弱と、サテライト配列が豊富である第 9 染色体における LOH の有意な相関も膀胱がん検体において見出している。ヒト多段階発がん過程における DNMT3b4 の意義の理解をさらにすすめるために、DNMT3b4 過剰発現により惹起される遺伝子発現変化について検討し、DNMT3b4 強制発現細胞におけるのと同様の遺伝子発現変化を、肝多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体においても確認し得た。DNMT3b4 の過剰発現は、染色体不安定性の惹起のみならず特定の遺伝子の発現変化を介しても、ヒト多段階発がん過程に前がん段階から寄与する可能性があると考えられた。

E. 結論

諸臓器のがんにおいて遺伝子の発現異常ならびにジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにして、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を解明することを目的として研究をすすめた。高密度アレイを開発してアレイ CGH 解析を行い、がんで高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を多数同定した。諸臓器のがんの臨床病理学的因子とよく相関するゲノム構造異常を見出した。ゲノム構造解析により同定したがん抑制蛋白 TSLC1 に結合する DAL-1 をコードする遺伝子の DNA メチル化が、肺がんの予後不良因子となることを示した。がん克服戦略研究事業で同定したアクチニン-4 やディスタドヘリンが、アクチン細胞骨格の構築制御を介して細胞運動能を亢進させ、がん転移に寄与する機序を示した。神経芽細胞腫の予後マーカーとして有用な DNA メチル化のパターンを示した。CpG アイランド内に de novo のメチル化が蓄積するような、DNA メチル化状態伝達の忠実度が低下したがん細胞株が存在することを示した。DNMT1 の発現亢進や DNMT3b のスプライスバリエントである DNMT3b4 の過剰発現が、de novo メチル化亢進・染色体不安定性の惹起・遺伝子発現変化に結びついて発がん早期に寄与する可能性を示した。今後さらに、がんの病理像と遺伝子・分子・細胞レベルの変化との対応を明らかにし、新しいがん治療の標的になるような多段階発がんの分子機構の解明を積極的に推進する予定である。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*, 23: 5257-5262, 2004.
- 2) Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 64: 6989-6995, 2004.
- 3) Nakanishi Y, Akimoto S, Sato Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in tongue cancer: immunohistochemical analysis of 91 cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 12: 323-328, 2004.
- 4) Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 164: 2269-2278, 2004.
- 5) Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, Kobayashi M, Yamagiwa S, Genda T, Shioji K, Hashimoto S, Nomoto M, Hatakeyama K, Ajioka Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Aoyagi Y. Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett.*, 212: 253-259, 2004.
- 6) Yokoo H, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Todo S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology*, 40: 609-617, 2004.
- 7) Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics*, 4: 2776-2788, 2004.
- 8) Sekine S, Shimoda T, Nimura S, Nakanishi Y, Akasu T, Katai H, Gotoda T, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. High-grade dysplasia associated with fundic gland polyposis in a familial adenomatous polyposis patient, with special reference to APC mutation profiles. *Mod. Pathol.*, 17: 1421-1426, 2004.
- 9) Sekine S, Takata T, Shibata T, Mori M, Morishita Y, Noguchi M, Uchida T, Kanai Y, Hirohashi S. Expression of enamel proteins and LEF1 in adamantinomatous craniopharyngioma: evidence for its odontogenic epithelial differentiation. *Histopathology*, 45: 573-579, 2004.
- 10) Yanagihara K, Tanaka H, Takigahira M, Ino Y, Yamaguchi Y, Toge T, Sugano K, Hirohashi S. Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Sci.*, 95: 575-582, 2004.
- 11) Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino

- Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 128: 51-62, 2005.
- 12) Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, in press.
- 13) Nishizawa A, Nakanishi Y, Yoshimura K, Sasajima Y, Yamazaki N, Yamamoto A, Kanai Y, Hirohashi S. Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: Immunohistochemical analysis of 115 cases. *Cancer*, in press.
- 14) Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S, Sakamoto M. Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J. Med.*, 53: 90-97, 2004.
- 15) Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*, 29: 193-203, 2004.
- 16) Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 41: 629-636, 2004.
- 17) Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103: 307-312, 2005.
- 18) Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, Hirohashi S, Sakamoto M. Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules. *J. Hepatol.*, 42: 225-229, 2005.
- 19) Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. *Hum. Mol. Genet*, in press.
- 20) Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Okanoue T, Inazawa J. Array-based comparative genomic hybridization (CGH-array) analysis for genome-wide screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines. *Cancer Sci.*, 96: 100-110, 2005.
- 21) Sanada T, Yokoi S, Ariei S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J. Skp2 overexpression is a p27Kip1-independent poor prognosticator in patients with biliary tract cancers. *Cancer Sci.*, 95: 969-976, 2004.
- 22) Tanami H, Imoto I, Hirasawa A, Yuki Y, Sonoda I, Inoue J, Yasui K, Misawa-Furihata A, Kawakami Y,

- Inazawa J. Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene*, 23: 8796-8804, 2004.
- 23) Misawa A, Hosoi H, Imoto I, Iehara T, Sugimoto T, Inazawa J. Translocation (1;22)(p36;q11.2) with concurrent del(22)(q11.2) resulted in homozygous deletion of SNF5/INI1 in a newly established cell line derived from extrarenal rhabdoid tumor. *J. Hum. Genet.*, 49: 586-589, 2004.
- 24) Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am. J. Pathol.*, 165: 175-180, 2004.
- 25) Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J. Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am. J. Pathol.*, 165: 71-81, 2004.
- 26) Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, Inazawa J. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci.*, 95: 503-507, 2004.
- 27) Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Res.*, 64: 3741-3747, 2004.
- 28) Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Tsuruo T, Inazawa J. Alteration in copy-numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res.*, 64: 1403-1410, 2004.
- 29) Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of the DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, in press.
- 30) Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Ishida Y, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute type of adult T-cell leukemia. *Blood*, 105: 1204-1213, 2005.
- 31) Surace EI, Murakami Y, Scheithauer BW, Perry A, Gutmann DH. Tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression is lost in sporadic meningioma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63: 1015-1027, 2004.
- 32) Lung H- L, Cheng Y, Kumaran MK, Liu ET-B, Murakami Y, Chan CY, Yau WL, Stanbridge EJ, Lung ML. Fine mapping of 11q22-23 tumor suppressive region and involvement

- of TSLC1 in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 112: 628-635, 2004.
- 33) Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol. Rep.*, 12: 7-52, 2004.
- 34) Murakami Y, Isogai K, Tomita H, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Hidaka A, Nose K, Sugano K, Kaneko A. Detection of allelic imbalance in the gene expression of hMSH2 or Rb1 in lymphocytes from pedigrees of hereditary non-polyposis colorectal cancer and retinoblastoma by an RNA difference plot. *J. Hum. Genet.*, 49: 635-641, 2004.
- 35) Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int. J. Cancer*, in press.
- 36) Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.*, 65: 828-834, 2005.
- 37) Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, 5: 223-231, 2005.
- 38) Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T, Kaneda A. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res.*, 65: 11-17, 2005.
- 39) Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, Kikuchi K, Otsuka F, Sugimura T, Ushijima T. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci.*, 95: 962-968, 2004.
- 40) Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, 23: 8705-8710, 2004.
- 41) Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.*, 64: 6410-6415, 2004.
- 42) Okochi-Takada E, Ichimura S, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T. Establishment of a detection system for demethylating agents using an endogenous promoter CpG island. *Mutat. Res.*, 568: 187-194, 2004.
- 43) Takada T, Yagi Y, Maekita T, Imura M, Nakagawa S, Tsao SW, Miyamoto K, Yoshino O, Yasugi T, Taketani Y, Ushijima T. Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci.*, 95: 741-744, 2004.
- 44) Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M,

- Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am. J. Pathol.*, 164: 689-699, 2004.
- 45) Nam J-S, Ino Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Exp. Metas.*, 21: 49-56, 2004.
- 46) Kanai Y, Saito Y, Ushijima S, Hirohashi S. Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130: 636-644, 2004.
- 47) Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J. Urol.*, 173: 243-246, 2005.
- 48) Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J. Urol.*, in press.
- 49) Chihara Y, Sugano K, Kobayashi A, Kanai Y, Yamamoto H, Nakazono A, Fujimoto H, Kakizoe T, Fujimoto K, Hirao Y, Hirohashi S. Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab. Invest.*, in press.
- 50) Yamamoto H, Taniguchi H, Nosho K, Adachi Y, Imai K. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*, in press.
- 51) Yamamoto H, Taniguchi H, Nosho K, Seruca R, Schwartz S Jr, Imai K. Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, in press.
- 52) Nosho K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Yoshida Y, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Imai K. Interplay of IGF-II, IGF-I, IGF-I receptor, COX-2, and MMP-7 plays key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 10: 7950-7957, 2004.
- 53) Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, Imai K. Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25: 325-332, 2004.
- 54) Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto M, Nosho K, Imsumran A, Fujita M, Hosokawa M, Hinoda Y, Imai K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9

in esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis, 25: 2353-2360, 2004.

55) Noshio K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Hinoda Y, Imai K. Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. Carcinogenesis, in press.

56) Noshio K, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Hinoda Y, Imai K. Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. Br. J. Cancer, in press.

57) Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Imsumran A, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Lee C-T, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Insulin-like growth factor-I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. Gut, in press.

58) Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Yabana T, Imamura A, Sato T, Suga T, Hosokawa M, Imai K. Refined evaluation of metastatic potential of colon and rectal cancers by tumor matrilysin. J. Clin. Oncol., in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 発明の名称：薬剤耐性を獲得したがん細胞の検出方法

出願番号：特願 2004-36028、
PCT/JP2004/001574、PBM95PCT

2) 発明の名称：新規キメラ蛋白質およびこれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段

出願番号：PTC/JP2004/002294、
PBM96PCT

3) 発明の名称：ゲノム DNA の定着基盤と当該基盤を用いた染色体異常並びにそれに起因する疾患の検出方法
出願番号：特願 2004-81926

4) 発明の名称：食道がんの検出方法、および、抗食道がん物質のスクリーニング方法

出願番号：特願 2004-84795

5) 発明の名称：特定のがん関連遺伝子を用いるがんの検出方法及びがんの抑制方法

出願番号：特願 2004-88424

6) 発明の名称：哺乳動物の神経芽細胞腫の予後を判定する方法

出願番号：特願 2004-6867

(千葉県との共願)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし