

200400434A

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

ヒトがんで高頻度に変異の見られるがん関連遺伝子の発がんにおける  
意義の解明とその臨床応用に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田矢 洋一

平成17(2005)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
ヒトがんで高頻度に変異の見られる がん関連遺伝子の発がんにおける意義 の解明とその臨床応用に関する研究 田矢 洋一	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 細胞周期を制御する癌抑制蛋白質 の生理機能の解析とそのがん治療へ の応用 田矢 洋一	-----	5
2. p53標的遺伝子類の解析とその がん治療への応用 荒川 博文	-----	7
3. ヒストンアセチル化酵素MOZ 及びPMLによるp53の機能制御 北林 一生	-----	10
4. p16 <sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節機構 とCdk4-サイクリンDの活性 制御機構 原 英二	-----	11
5. 細胞周期関連蛋白質の分解制御機構 北川 雅敏	-----	12
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別に添付

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

ヒトがんで高頻度に変異の見られるがん関連遺伝子の発がんにおける  
意義の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 田矢 洋一 国立がんセンター研究所放射線研究部・部長

研究要旨： エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見したしていたが、クラスリンの軽鎖とp53とがクラスリンの重鎖のC末端領域への結合で競合することを明らかにした。また、白血病関連因子MOZはp53と結合してアセチル化し、p53の標的遺伝子を制御することにより、細胞の増殖とアポトーシスを制御することが示された。一方、白血病関連融合タンパク質MOZ-CBPはp53を介した転写を抑制する。さらには、Mdm2がRB蛋白質のユビキチンリガーゼでもあることを見出し、それを証明した。

分担研究者

1. 田矢 洋一 国立がんセンター研究所  
放射線研究部・部長
2. 荒川 博文 国立がんセンター研究所  
生物物理部・部長
3. 北林 一生 国立がんセンター研究所  
分子腫瘍学部・部長
4. 原 英二 徳島大学  
ゲノム機能研究センター・教授
5. 北川 雅敏 浜松医科大学  
医学部生化学第一講座・教授

A. 研究目的

非常に多くのヒトがんにおいて、p53とRB蛋白質を中心とした細胞周期、チェックポイント関連蛋白質に変異が起きていることがわかってきた。したがって、これらの蛋白質の生理機能を集中的に解析することによって、多くのヒトがんに共通した発がん機構を明らかにでき、新しいがん治療法開発への応用の道も開けると期待できる。本研究はそれを目指した。

B. 研究方法

1) クラスリンによるp53の生理機能の制御

クラスリン重鎖上のp53とクラスリン軽鎖(CLC)の結合部位をマッピングするために、クラスリン重鎖のさまざまな領域の欠失変異体をreticulocyte lysateを用いてin vitro translationすることによって35S-Metラベルした。これらをGST-p53あるいはGST-CLCとのpull down assayにかけて結合部位をマッピング

した。

2) MOZによるp53のアセチル化

FLAGタグを結合したMOZタンパク質をヒト293T細胞に強制発現させ、抗FLAG抗体を用いてMOZ複合体を精製し、質量分析によりMOZ結合タンパク質を同定した。MOZのノックアウトマウスを作成し、その胎児性繊維芽細胞のDNA傷害に対する感受性を調べた。また、MOZ及びMOZ-CBP融合タンパク質によるp53のアセチル化及びp53による転写活性に対する効果について検討した。

3) p53の新規標的遺伝子

アデノウイルスに組み込んだp53遺伝子の導入により顕著なアポトーシスが誘導される3種類のp53変異細胞株（グリオーマ細胞株・大腸癌細胞株・肺癌細胞株）を用い、p53依存性の発現誘導を示す遺伝子群についてマイクロアレイ法によって解析した。p53依存性に強く発現誘導される遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子についてDNA損傷刺激により活性化した内因性p53による発現誘導の有無をRT-PCRおよびノザンプロットにて確認した。p53依存性の発現誘導が確認された遺伝子については、さらにヒトゲノムDNAデータ・ベースから対応するゲノムDNAの塩基配列を引用してp53結合配列の有無を検索し、クロマチン免疫沈降法・EMSA法・レポーターアッセイ法によって、候補標的遺伝子を同定・機能解析を行った。

4) Mdm2とRB

免疫共沈法によりpRBとMdm2の結合を証明し、in vitroおよびin vivoのユビキチン化アッセイでユビキチンリガーゼとその基質の同定を行った。さらに、

SiRNAによるノックダウンにより検証した。

#### 5) E2F/DPと癌

p16INK4a遺伝子の作用機序並びに発現調節機構をp16INK4a遺伝子の発現調節因子やその下流の因子をRNA干渉法によりノックダウンすることにより解析した。

(倫理面への配慮)

- 1) 国立がんセンターの実験において用いる癌細胞株は世界的にも広く実験室で用いられている細胞であり、特定の患者検体を用いたものではない。また、ヌードマウスを用いた実験は、国立がんセンター動物実験倫理委員会の実験指針に従って行われた。
- 2) 徳島大学と浜松医大での臨床サンプルの使用にあたっては、それぞれの大学の倫理委員会の承認を得た後にインフォームドコンセントを経て行った。また、データの発表に関してはサンプルの提供者が特定出来ないように配慮した。

#### C. 研究結果

以下の様な結果が得られた。

- 1) クラスリンによるp53の生理機能の制御  
エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたが、クラスリンの軽鎖とp53とがクラスリンの重鎖のC末端領域への結合で競合することを明らかにした。
- 2) MOZによるp53のアセチル化  
ヒストンアセチル化酵素MOZがp53と結合し、その転写コファクターとして機能することを明らかにした。MOZはp53のリシン382をアセチル化し、p21などのp53の標的遺伝子の発現を促進した。また、p53のG279E腫瘍変異はDNA結合能には影響しないがMOZとの結合を阻害することから、MOZとの協調作用ががん抑制遺伝子産物としての機能に重要であることが示唆された。さらに、白血病で生じるMOZ-CBP融合タンパク質はp53による転写を抑制した。
- 3) p53の新規標的遺伝子  
マイクロアレイ法により新規p53標的遺伝子としてプロリンの代謝を介してアポトーシスを負に制御するALDH4遺伝子を、またアポトーシスを正に制御するSTAG1遺伝子を単離同定した。
- 4) Mdm2はp53のエビキチンリガーゼとして知られているが、RBタンパク質のエビキチンリガーゼでもあることを見出し、種々の方法でそれを証明した。Mdm2が高発現しているヒトの癌ではp53だけでなくRBの分解も亢進された。
- 5) RNA干渉法によりp16/RB経路の下流因子であるE2F/DP複合体形成を阻害すると、RBやp53蛋白が失活している癌細胞においても細胞増殖が急激に停

止し細胞老化様の不可逆的増殖停止を引き起こすことを明らかにした。

#### D. 考察

##### 1) クラスリンとp53

エンドサイトーシスとp53というこれまで全く関係ないと思われていた分野をつなぐ新しい研究分野が開かれると期待される。

##### 2) MOZとp53

白血病において変異の見られるMOZ及びPMLはp53を介して作用することから、p53の機能異常が白血病発症に関与することが示唆された。MOZノックアウトマウスを作製したので、今後、p53の機能制御におけるMOZ及びPMLの役割を詳細に解析する。

##### 3) 新規p53標的遺伝子

これら新規p53標的遺伝子の解析から、p53によるがん抑制機構における新しいメカニズムを明らかとすることが出来た。

##### 4) Mdm2とRB

p53とRBの二大癌抑制経路がMdm2によって攪乱されることが示唆された。

##### 5) E2F/DPと癌

多くのヒトの癌細胞においてRNA干渉法によりE2F/DPの機能を阻害すると、細胞老化を誘導し癌細胞の増殖を永久に停止出来る可能性が示された。今後、E2F/DP複合体を標的として細胞老化を誘導する新しい癌治療法開発の可能性が期待される。

#### E. 結論

クラスリンとp53の結合は誰も予想していなかった新発見であり、今後、新しい研究分野を切り開くことになると思われる。白血病において変異の見られるMOZ及びPMLはp53を介して作用することから、p53の機能異常が白血病発症に関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A. and Koromilas, A.E.: Endoplasmic reticulum stress impairs the nuclear import of p53 and prevents p53-mediated apoptosis through the activation of the glycogen synthetase kinase 3 $\beta$ . *Genes Dev.*, 18, 261-277 (2004)
2. Takagi, M, Tsuchida, R, Oguchi, K, Shigeta, T, Nakada, S, Shimizu, K, Ohki, M, Delia, D, Chessa, L, Taya, Y, Nakanishi, M, Tsunematsu, Y, Bessho, F, Isoyama, K, Hayashi, Y, Kudo, K, Okamura, J, Mizutani, S. : Identification and

- characterization of poly,orphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*, 103, 283-290 (2004)
3. Ohtani, S., Kagawa, S., Tango, Y., Umeoka, T., Tokunaga, N., Tsunemitsu, Y., Roth, J.A., Taya, Y., Tanaka, N. and Fujiwara, T.: Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, 3, 93-100 (2004)
  4. Takagi, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H. : Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 *in vitro*. *J. Biochem*, 137, 381-386 (2005).
  5. Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M, Saya H.: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem.* , in press.
  6. Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I.: Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, 105, 292-300 (2005)
  7. Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML.: Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol.* 24, 5639-5649 (2004)
  8. Yaguchi H, Ohkura N, Takahashi M, Nagamura Y, Kitabayashi I, Tsukada T.: Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol.* 24, 6569-6580 (2004)
  9. Yasuda J, Yokoo H, Yamada T, Kitabayashi I, Sekiya T, Ichikawa H.: Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci.* 95, 52-57 (2004)
  10. Yoshida K, Monden M, Nakamura Y, Arakawa H.: Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors. *Cancer Sci*, 95:91-97 (2004)
  11. Yoon K-A, Nakamura Y, Arakawa H.: Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet*, 49:134- 140 (2004)
  12. Anazawa Y, Arakawa H, Nakagawa H, Nakamura Y.: Identification of STAG1 as a key mediator of a p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 23: 7621-7627 (2004)
  13. Graff P, Seim J, Amellen O, Arakawa H, Nakamura Y, Andersson KK, Stokke T, Pettersen EO.: Counteraction of pRb-dependent protection after extreme hypoxia by elevated ribonucleotide reductase. *Cell Prolif*, 37:367-383 (2004)
  14. Arakawa H: Netrin-1 and its receptors in tumori genesis. *Nat Rev Cancer*, 4:978-987 (2004)
  15. Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M.: Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.*, 24: 160-169 (2005)
  16. Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M., and Kikugawa, K.: The FWD1/b-TrCP-mediated degradation pathway establishes a turning off switch of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes to Cells*, in press.
  17. Naito, M., Katayama, R., Ishioka, T., Suga, A., Takubo, K., Nanjyo, M., Hashimoto, C., Taira, M., Takada S., Takada, R., Kitagawa, M., Matsuzawa, S.-i., Reed, J. C. and Tsuruo, T.: Cellular FLIP inhibits b-catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 24:8418-8427 (2004)
  18. Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A, Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in mice obstructive nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 : 8687-8692 (2004)
  19. Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake S., Matsumoto, M., Ishida, N., Hatakeyama S., Kitagawa, M., Iemura, S.-i., Natsume, T., and Nakayama, K.-i.: Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into Mitosis. *Dev. Cell*, 6 :661-672 (2004)
  20. Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. and Nakayama K-I : Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J*, 23: 659-669(2004)

21. Inoue, Y., Kitagawa, M., Onozaki, K, and Hayashi, H.: Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin-proteasome pathway to transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Interferon & Cytokine Research*, 24: 43-54 (2004)
22. Kimura M, Uchida C, Takano Y, Kitagawa M, Okano Y.: Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 316: 930-6 (2004)
23. Fukasawa, H., Yamamoto, T., Suzuki, H., Togawa, A. Ohashi, N., Fujigaki, Y., Uchida, C., Aoki, M., Hosono, M., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Treatment with anti-TGF- $\beta$  antibody ameliorates progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- $\beta$  signaling. *Kidney Int.*, 65: 63-74 (2004)
24. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. & Hara, E.: Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell Biol.*, 168, 553-560 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

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）  
分担研究報告書

細胞周期を制御する癌抑制蛋白質の生理機能の解析とそのがん治療への応用

分担研究者 田矢 洋一 国立がんセンター研究所放射線研究部・部長

研究要旨： エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたが、クラスリンの軽鎖とp53とがクラスリンの重鎖のC末端領域への結合で競合することを明らかにした。

#### A. 研究目的

RB蛋白質はCdk4-サイクリンDとCdk2-サイクリンEによる2段階のリン酸化を受けるが、その意義を明らかにする。一方、p53においても、そのリン酸化の生理的意義や結合蛋白質の機能の研究を進める。特に、エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたのでその解析を進める。

#### B. 研究方法

E2Fは6種類の存在が知られているが、そのうち、E2F-1, 2, 3と4がRB蛋白質と結合する。そして、E2F-1はアポトーシスを誘導し、逆に、E2F-2は細胞増殖を誘導するというようにE2F種には機能的な使い分けがあることがわかっている。そして、E2F-1は他のE2F種とは違って、RB蛋白質上の2ヶ所の異なった領域に結合することも最近わかってきた。そこで、E2F-1やE2F-2-4がRB蛋白質と解離する際に使われるRB蛋白質のリン酸化部位の違いも解析した。この実験には、それぞれのリン酸化部位に対する特異的な抗体を用いた。

一方、クラスリン重鎖上のp53とクラスリン軽鎖(CLC)の結合部位をマッピングするために、クラスリン重鎖のさまざまな領域の欠失変異体をreticulocyte lysateを用いてin vitro translationすることによって<sup>35</sup>S-Metラベルした。これらをGST-p53あるいはGST-CLCとのpull down assayにかけて結合部位をマッピングした。

#### C. 研究結果

DNAダメージを細胞に与えると、E2F種のうちE2F1

のみがRB蛋白質と強く結合するようになることを見出した。この時、RB蛋白質のSer612のリン酸化がこの複合体形成を促進することも発見した。しかも、このリン酸化はCdkインヒビターで阻害されないのでCdk以外のキナーゼによってなされると推定される。

クラスリン重鎖上のp53とクラスリン軽鎖(CLC)の結合部位はどちらもC末端側に存在して一部分オーバーラップしていて、クラスリン重鎖への結合で競合することがわかった。

#### D. 考察

RB蛋白質のSer612のリン酸化がE2F1との複合体形成を促進することは全く予想していなかった新発見であり、しかも、そこをリン酸化する酵素がCdkでないらしいので、その酵素を同定することは重要であり、RB蛋白質に関する全く新しい研究を切り開くと期待される。

クラスリンとp53についても、エンドサイトーシスとp53というこれまで全く関係ないと思われていた分野をつなぐ新しい研究分野が開かれると期待される。

#### E. 結論

RB蛋白質のSer612のリン酸化、および、クラスリンとp53の結合はいずれも誰も予想していなかった新発見であり、今後、新しい研究分野が切り開くことになると思われる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A.

- and Koromilas, A.E.: Endoplasmic reticulum stress impairs the nuclear import of p53 and prevents p53-mediated apoptosis through the activation of the glycogen synthetase kinase 3 $\beta$ . *Genes Dev.*, 18, 261-277 (2004)
2. Takagi, M, Tsuchida, R, Oguchi, K, Shigeta, T, Nakada, S, Shimizu, K, Ohki, M, Delia, D, Chessa, L, Taya, Y, Nakanishi, M, Tsunematsu, Y, Bessho, F, Isoyama, K, Hayashi, Y, Kudo, K, Okamura, J, Mizutani, S. : Identification and characterization of poly,orphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgikin disease. *Blood*, 103, 283-290 (2004)
  3. Ohtani, S., Kagawa, S., Tango, Y., Umeoka, T., Tokunaga, N., Tsunemitsu, Y., Roth, J.A., Taya, Y., Tanaka, N. and Fujiwara, T.: Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, 3, 93-100 (2004)
  4. Takagi, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H., : Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 *in vitro*. *J. Biochem*, 137, 381-386 (2005).
  5. Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M, Saya H.: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem.* , in press.



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）  
分担研究報告書

ヒトがんで高頻度に変異の見られるがん関連遺伝子の発がんにおける意義の解明とその臨床応用に関する研究

分担研究者 荒川 博文 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨

がん抑制遺伝子 p53 の生理機能の全貌解明のためにその標的遺伝子の単離と機能解析を行った。新規 p53 標的遺伝子として ALDH4 遺伝子と STAG1 遺伝子を単離同定した。また、神経軸索関連分子が p53 によるアポトーシス制御の経路に重要である可能性を明らかとした。活性型 p53 と考えられる p53-46F 遺伝子や p53AIP1 遺伝子を用いた遺伝子導入が、顕著な抗腫瘍効果を示すことを証明した。p53 の生理機能の解明は、p53 を用いた遺伝子治療を劇的に改善するとともに、新しいがん治療法の開発につながると考えられる。

A. 研究目的

がん化のメカニズムは未だ十分には解明されておらず、一旦発症した個体における疾患としてのがんについての対策も改善されるべき点がかかなり多い状況である。p53 については既に遺伝子治療が臨床応用されているが未だそのがん抑制機序の全貌は明らかとなっておらず、その標的遺伝子の単離と機能解析は、p53 の機能解明を格段に前進させ、さらにはそれを応用した治療法を改善・開発しようと予想される。

B. 研究方法

アデノウイルスに組み込んだ p53 遺伝子の導入により顕著なアポトーシスが誘導される 3 種類の p53 変異細胞株（グリオーマ細胞株・大腸癌細胞株・肺癌細胞株）を用い、p53 依存性の発現誘導を示す遺伝子群についてマイクロアレイ法によって解析する。p53 依存性に強く発現誘導される遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子について DNA 損傷刺激により活性化した内因性 p53 による発現誘導の有無を RT-PCR およびノザンプロットにて確認する。p53 依存性の発現誘導が確認された遺伝子については、さらにヒトゲノム DNA データ・ベースから対応するゲノム DNA の塩基配列を引用

して p53 結合配列の有無を検索し、クロマチン免疫沈降法・EMSA 法・レポーターアッセイ法によって、候補標的遺伝子を同定・機能解析を行う。中でも、アポトーシス制御に関わる標的遺伝子は、アデノウイルスベクターに組み込み、ヌードマウスに作成した皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を積極的に評価してゆく。また、同様の研究を活性型 p53 として知られる p53-46F 遺伝子や p53-121F 遺伝子についても実施し、アポトーシス関連標的遺伝子の迅速かつ完全な解析と、新しいがん治療法開発の基盤研究を行う。

（倫理面への配慮）

研究を行うにあたっての倫理面への問題は無い。

C. 研究結果

本年度は、マイクロアレイ法により新規 p53 標的遺伝子としてプロリンの代謝を介してアポトーシスを負に制御する ALDH4 遺伝子を、またアポトーシスを正に制御する STAG1 遺伝子を単離同定した。また、p53 によるアポトーシス制御の経路に netrin-1 やそのレセプターである UNC5A や UNC5B を介した新しい制御経路の存在することを明らかとした。活性型 p53 と考えられる

p53-46F 遺伝子や p53AIP1 遺伝子を用いた遺伝子導入が、肺癌細胞株や大腸癌細胞株に対して顕著な抗腫瘍効果を示すことを in vivo で証明した。

#### D. 考察

転写因子 p53 の標的遺伝子群は、その癌抑制機能を遂行する大変重要な役割を担っているが、その総数は 100 を越えると予想されている。その中でも、本年度報告したアポトーシス制御分子としてのアポトーシスの負の制御因子 ALDH4 や逆にアポトーシスの正の制御因子 STAG1 など、その機能は多岐にわたっている。p53 はかなり多くの標的遺伝子を様々な状況に応じて使い分け、その多彩な生理機能を巧妙に制御することで細胞の安全な生存を維持しているものと考えられる。おそらく、p53 は状況に応じた生理機能を発揮するために、様々な機能を有する標的遺伝子を使い分け、細胞の生死の運命をチェックポイント分子として決定している可能性が高い。これら標的遺伝子群の p53 結合配列と p53 蛋白質の修飾（リン酸化・アセチル化など）との組み合わせは、おそらく p53 による多彩な機能の使い分け機序を可能とするであろう。このことは p53 遺伝子治療における p53 遺伝子導入が、必ずしも癌治療のために期待されたアポトーシス誘導や細胞増殖抑制作用のみを誘導することが出来ない可能性を示唆している。p53 遺伝子治療において効果的な癌増殖抑制作用を発揮させるためには、p53 依存性アポトーシス経路を特異的に活性化する活性型 p53 を癌細胞に導入することや、p53 依存性アポトーシス経路の実行分子である p53AIP1 遺伝子の導入を考慮する必要があると思われる。事実、本年度の研究によってアデノウイルスベクターを用いた p53AIP1 遺伝子の腫瘍への導入は、顕著な抗腫瘍効果を示した。

#### C. 結論

p53 の生理機能の全貌解明のためには、p53 標的遺伝子の全単離が不可欠であると考えられる。また、p53 の生理機能の正確

な理解は、p53 を用いた遺伝子治療を劇的に改善するとともに、新しいがん治療法の開発につながると考えられる。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照のこと。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 4:978-987, 2004

2. Graff P, Seim J, Amellen O, Arakawa H, Nakamura Y, Andersson KK, Stokke T, Pettersen EO. Counteraction of pRb-dependent protection after extreme hypoxia by elevated ribonucleotide reductase. *Cell Prolif*, 37:367-383, 2004

3. Anazawa Y, Arakawa H, Nakagawa H, Nakamura Y. Identification of STAG1 as a key mediator of a p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 23: 7621-7627, 2004

4. Yoon K-A, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet*, 49:134-140, 2004

5. Yoshida K, Monden M, Nakamura Y, Arakawa H. Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors. *Cancer Sci*, 95:91-97, 2004

##### 2. 学会発表

1. 荒川博文 第63回日本癌学会学術総会シンポジウム S27 転写システム研究からがん治療研究へ 口演発表 演題「転写因子 p53 の生理機能とその癌治療への応用」

2. 中村康之、二村学、中村祐輔、荒川博文

第63回日本癌学会学術総会ポスターがん  
遺伝子・がん抑制遺伝子治療(1) ポス  
ター発表 演題「p53 耐性癌に対する新し  
い治療法としてのアデノウイルスによる変  
異体 p53-46F 遺伝子導入」

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

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・分担）研究報告書

ヒストンアセチル化酵素MOZ及びPMLによるp53の機能制御に関する研究

分担研究者 北林 一生 国立がんセンター研究所分子腫瘍学部

研究要旨 白血病関連因子MOZはp53と結合してアセチル化し、p53の標的遺伝子を制御することにより、細胞の増殖とアポトーシスを制御することが示された。一方、白血病関連融合タンパク質MOZ-CBPはp53を介した転写を抑制する。

A. 研究目的

ヒストンアセチル化酵素MOZ及びPMLは急性白血病における染色体転座に関与する。がん抑制因子p53の機能制御におけるMOZ及びPMLの役割を調べ、白血病発症の分子メカニズムを明らかにすることにより、新たな白血病治療法開発のための基礎とする。

B. 研究方法

FLAGタグを結合したMOZタンパク質をヒト293T細胞に強制発現させ、抗FLAG抗体を用いてMOZ複合体を精製し、質量分析によりMOZ結合タンパク質を同定した。MOZのノックアウトマウスを作成し、その胎児性繊維芽細胞のDNA傷害に対する感受性を調べた。また、MOZ及びMOZ-CBP融合タンパク質によるp53のアセチル化及びp53による転写活性に対する効果について検討した。

C. 研究結果

精製したMOZ複合体にはp53を含む30種類以上のタンパク質が含まれることが明らかになった。また、MOZはp53のリジン382をアセチル化し、p21などの細胞周期制御に関わる因子の発現を抑制し、BAXなどのアポトーシス関連因子の発現を抑制することが示された。MOZを欠失したマウス胎児性繊維芽細胞は野生型に比べてDNA傷害に対する感受性が顕著に増大していることが明らかになった。一方、白血病で見られるt(8;16)転座により生じるMOZ-CBP融合タンパク質はp53による転写を抑制することが示された。

D. 考察

MOZはp53の標的のうち細胞周期制御に関わる因子の発現を抑制し、アポトーシス関連因子の発現を抑制することから、細胞周期を停止してアポトーシスを

抑制することが予想される。MOZを欠失したマウス胎児性繊維芽細胞ではMOZによるアポトーシスの抑制が起こらないことからDNA傷害に対する感受性が増大していると考えられる。白血病関連融合タンパク質MOZ-CBPはp53を介した転写活性化を抑制することから、この白血病ではp53の機能が抑制されることが発症に関与すると考えられる。

E. 結論

MOZはp53の機能を制御することにより細胞周期を停止しアポトーシスを抑制する。MOZの関与する白血病ではp53の機能抑制が発症に重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, **105**, 292-300, 2005.

Yaguchi H, Ohkura N, Takahashi M, Nagamura Y, Kitabayashi I, Tsukada T. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*. **24**, 6569-6580, 2004.

Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol*. **24**, 5639-5649, 2004.

## 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）

## （分担）研究報告書

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節機構と Cdk4-サイクリンD の活性制御機構に関する研究

（分担）研究者 原 英二 徳島大学・教授

研究要旨：サイクリンDとCDK4の結合を促進する作用を有するp34<sup>SEI-1</sup>蛋白をコードする遺伝子（SEI-1）を欠損したノックアウトマウスを作成することに成功した。また、RNA干渉法によりp16/RB経路の下流因子であるE2F/DP複合体形成を阻害すると、RBや53蛋白が失活している癌細胞においても細胞増殖が急激に停止し細胞老化様の不可逆的増殖停止を引き起こすことを明らかにした。

## A. 研究目的

発がんの分子メカニズムを明らかにし、発がんの鍵を握る分子を標的とした特異性の高い抗癌剤開発を可能にする基礎的データを得ることを目的としている。

## B. 研究方法

- 1) p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の作用機序並びに発現調節機構をp16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節因子やその下流の因子をRNA干渉法によりノックダウンすることにより解析する。
- 2) SEI-1遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成し、Cdk4-サイクリンD複合体形成機構を解析する。

（倫理面への配慮）

本研究では、既にライン化されている提供者不明のヒト細胞株を用いることで人権擁護上の配慮や研究方法による研究対象者に対する不利益や危険性を排除した。

## C. 研究結果

- 1) ヒトの正常細胞のみならず、癌化した細胞においても全てのE2Fファミリー遺伝子の機能を阻害すると、急速に細胞老化様の増殖停止が起こることを明らかにした。
- 2) SEI-1遺伝子を完全に欠損したES細胞並びにノックアウトマウスを作成することに成功した。

## D. 考察

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子はヒトの癌細胞において高頻度に失活している癌抑制遺伝子である。我々の研究結果はそのような癌細胞においても、p16<sup>INK4a</sup> の下流因子であるE2F

ファミリー遺伝子の機能を阻害すると、癌細胞の増殖を永久に停止出来るものと考えられる。

## E. 結論

本研究より、RNA干渉法を用いてp16<sup>INK4a</sup> の下流因子を標的とすることにより、多くの癌細胞の増殖を永久に阻止できる抗ガン剤を開発出来る可能性が強く示唆された。また、ガン細胞で高頻度に活性化しているサイクリンDキナーゼ活性化のメカニズムを解明するのに必要なSEI-1遺伝子ノックアウトマウスを得ることが出来た。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. & Hara, E. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell. Biol.*, 168, 553-560 (2005).

## 2. 学会発表

原 英二 p16/RB-経路による細胞周期制御と癌抑制。日本癌学会2005年9月29日（福岡）  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

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・分担）研究報告書

細胞周期関連蛋白質の分解制御機構に関する研究

分担研究者 北川 雅敏 浜松医科大学・教授

研究要旨：我々は Mdm2 が RB タンパク質のユビキチンリガーゼでもあることを見出し、それを証明した。Mdm2 が高発現しているヒトの癌では p53 だけでなく pRB の分解も亢進され、p53 と RB の二大癌抑制経路の攪乱が起こることが示唆された。一方我々はもう一つの p53 のユビキチンリガーゼとして知られている Pirh2 が CDK 阻害タンパク質 p27 の新しいユビキチンリガーゼであることを見出した。

A 研究目的

本研究はユビキチン-プロテアソーム系による細胞周期関連蛋白質 pRB, p53 および CDK 阻害蛋白質 p27 の分解機構を解析し、がん化およびがんの予後不良化のメカニズムおよび診断治療に応用することを目指す。

B 研究方法

免疫共沈法により pRB, と Mdm2 の結合、p27 と Pirh2 の結合を証明し、in vitro および in vivo のユビキチン化アッセイでユビキチンリガーゼとその基質の同定を行った。さらに、SiRNA によるノックダウンにより検証した。臨床肺がん検体の病理学的解析については、倫理指針にのっとりインフォームドコンセントを取り本学倫理委員会の承認の上慎重に行った。

C 研究結果

①Mdm2 による pRB のユビキチン依存的分解とがん化への関与：内因性 Mdm2 が pRB の結合を確認し、Mdm2 による pRB のユビキチン化を in vitro および in vivo で証明した。さらに、Mdm2 のノックダウン、ノックアウトにより pRB の分解が抑制されることを確認した。また、臨床肺がん検体の病理学的解析により Mdm2 の高発現検体で pRB の発現量低下が有意に相関した。

②p27 の新たな分解因子 Pirh2：Two-hybrid 法により p27 の N 末端に結合する分子として Pirh2 を同定し、Pirh2 による p27 のユビキチン化を in vitro および in vivo で証明した。さらに、Pirh2 のノックダウンにより p27 の分解が抑制され細胞周期進行が抑制されることを見出した。

D 考察

Mdm2 が高発現しているヒトの癌では p53 だけでなく RB の分解も亢進され、p53 と RB の二大癌抑制経路の攪乱が起こることが示唆された。一方 p27 の分解亢進は予後不良と相関するので Pirh2 が予後不良化因子の一つである可能性が示唆された。

E 結論

ユビキチンリガーゼ Mdm2 および pirh2 がそれぞれ pRB, p27 の分解因子であり、新たな細胞悪性化機構となる可能性が示唆された。

F 研究発表（論文発表）

- 1 Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M.: Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 24: 160-169, 2005.
- 2 Takaki, T., Fukasawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H.: Differences in phosphorylation Site on the retinoblastoma protein between D-Type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *J. Biochem.* In press.
- 3 Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M., and Kikugawa, K.: The FWD1/ $\beta$ -TrCP-mediated degradation pathway establishes a turning off switch of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes to Cells* 10: 241-251, 2005.
- 4 Naito, M., Katayama, R., Ishioka, T., Suga, A., Takubo, K., Nanjyo, M., Hashimoto, C., Taira, M., Takada S., Takada, R., Kitagawa, M., Matsuzawa, S.-i., Reed, J. C. and Tsuruo, T.: Cellular FLIP inhibits  $\beta$ -catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24:8418-8427, 2004.
- 5 Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in mice obstructive nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (23): 8687-8692, 2004.
- 6 Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake S., Matsumoto, M., Ishida, N., Hatakeyama S., Kitagawa, M., Iemura, S.-i., Natsume, T., and Nakayama, K.-i.: Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into Mitosis. *Dev. Cell*, 6: 661-672, 2004.
- 7 Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. and Nakayama K.-i.: Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* 23: 659-669, 2004.
- 8 Inoue, Y., Kitagawa, M., Onozaki, K., and Hayashi, H.: Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin-proteasome pathway to transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Interferon & Cytokine Research*, 24: 43-54, 2004.
- 9 Kimura M, Uchida C, Takano Y, Kitagawa M, Okano Y.: Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(3): 930-6, 2004.
- 10 Fukasawa, H., Yamamoto, T., Suzuki, H., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Uchida, C., Aoki, M., Hosono, M., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Treatment with anti-TGF- $\beta$  antibody ameliorates progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- $\beta$  signaling. *Kidney Int.* 65: 63-74, 2004.

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A. and Koromilas, A.E	Endoplasmic reticulum stress impairs the nuclear import of p53 and prevents p53-mediated apoptosis through the activation of the glycogen synthetase kinase 3 $\beta$ .	<i>Genes Dev</i>	18	261-277	2004
Takagi, M, Tsuchida, R, Oguchi, K, Shigeta, T, Nakada, S, Shimizu, K, Ohki, M, Delia, D, Chessa, L, Taya, Y, Nakanishi, M, Tsunematsu, Y, Bessho, F, Isoyama, K, Hayashi, Y, Kudo, K, Okamura, J, Mizutani, S.	Identification and characterization of poly,orphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease.	<i>Blood</i>	103	283-290	2004
Ohtani, S., Kagawa, S., Tango, Y., Umeoka, T., Tokunaga, N., Tsunemitsu, Y., Roth, J.A., Taya, Y., Tanaka, N. and Fujiwara, T	Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 <i>in vivo</i> .	<i>Mol. Cancer Ther.</i>	3	93-100	2004
Takagi, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H.,	Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 <i>in vitro</i> .	<i>J. Biochem.</i>	137	381-386	2005
Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M, Saya H.	Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria.	<i>J Biol Chem</i>		In press	2005
Nguyen LA, Pandolfi P P, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I.	Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML.	<i>Blood</i>	105	292-300	2005
Yaguchi H, Ohkura N, Takahashi M, Nagamura Y, Kitabayashi I, Tsukada T.	Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway.	<i>Mol Cell Biol</i>	24	6569-6580	2005
Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML.	Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression.	<i>Mol Cell Biol</i>	24	5639-5649	2004
Arakawa, H.	Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis	<i>Nature Rev. Cancer</i>	4	978-987	2004

Graff, P., Seim, J., Amellen, O., Arakawa, H., Nakamura, Y., Andersson, K.K., Stokke T., Pettersen, E.O.	Counteraction of pRb-dependent protection after extreme hypoxia by elevated ribonucleotide reductase	<i>Cell Proliferation</i>	37 (5)	367-383	2004
Anazawa, Y., Arakawa, H., Nakagawa, H., Nakamura, Y.	Identification of STAG1 as a key mediator of a p53-dependent apoptotic pathway	<i>Oncogene</i>	23 (46)	7621-7627	2004
Yoon, K.A., Nakamura, Y., Arakawa, H.	Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses	<i>Journal of Human Genetics</i>	49 (3)	134-140	2004
Yoshida, K., Monden, M., Nakamura, Y., Arakawa, H.	Adenovirus-mediated p53AIP1 gene transfer as a new strategy for treatment of p53-resistant tumors	<i>Cancer Science</i>	95 (1)	91-97	2004
Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M.	Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation.	<i>EMBO J.</i>	24	160-169	2005
Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M., and Kikugawa, K.	The FWD1/b-TrCP-mediated degradation pathway establishes a turning off switch of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1.	<i>Genes to Cells</i>	10	241-251	2005
Naito, M., Katayama, R., Ishioka, T., Suga, A., Takubo, K., Nanjyo, M., Hashimoto, C., Taira, M., Takada S., Takada, R., Kitagawa, M., Matsuzawa, S.-i., Reed, J. C. and Tsuruo, T.	Cellular FLIP inhibits $\beta$ -catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	24	8418-8427	2004
Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., Kitagawa, M. and Hishida, A.	Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in mice obstructive nephropathy.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	101	8687-8692	2004
Nakayama, K., Nagahara, H., Minamishima, Y. A., Miyake S., Matsumoto, M., Ishida, N., Hatakeyama S., Kitagawa, M., Iemura, S.-i., Natsume, T., and Nakayama, K.-i	Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into Mitosis.	<i>Dev. Cell</i>	6	661-672	2004
Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. and Nakayama K-I	Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4	<i>EMBO J</i>	23	659-669	2004
Inoue, Y., Kitagawa, M., Onozaki, K., and Hayashi, H.	Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin-proteasome pathway to transforming growth factor- $\beta$ signaling.	<i>J. Interferon &amp; Cytokine Research</i>	24	43-54	2004
Kimura M, Uchida C, Takano Y, Kitagawa M, and Okano Y	Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	316	930-936	2004



Fukasawa, H., Yamamoto, T., Suzuki, H., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Uchida, C., Aoki, M., Hosono, M., Kitagawa, M. and Hishida, A	Treatment with anti-TGF- $\beta$ antibody ameliorates progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- $\beta$ signaling.	<i>Kidney Int.</i>	65	63-74	2004
Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. & Hara, E.	Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53.	<i>J. Cell Biol.</i>	168	553-560	2005