

	Exon	Mutation	Effect on Coding	
Patient	Missense			
	G8	11	1514G>A	G509D
	Insertions, Deletions			
	G15	3	447delT	Frameshift, truncation
	G1	6	900delC	Frameshift, truncation
	G2	6	900delC	Frameshift, truncation
	G4	9	1247insT	Frameshift, truncation
	G14	10	1400_1403dupTGGC	Frameshift, truncation
	G3	13	1999delC	Frameshift, truncation
	G11	18	3118_3119dupGC	Frameshift, truncation
	G12	18	3118_3119dupGC	Frameshift, truncation
	G20	20	3352_53delAT	Frameshift, truncation
	G9	Splicing		
		Intron 6	933+5G>T	Splice variant, 29 aa deletion
	G17	3	G572A	Splice variant, truncation

表 1

PTCH<sub>S</sub>)を同定した(図1)。マウスにおけるアイソフォームの存在は本研究で始めて明らかにされたものであった。各アイソフォームはヒト組織毎に異なる発現プロフィールを示した。PTCH 遺伝子自身が Shh シグナル伝達経路の標的遺伝子であることが知られているが、主要な3種のアイソフォーム全てにおいて Shh の下流の転写因子 Gli で発現が誘導された。またエクソン 1a 上と第一イントロンに機能的な Gli 結合部位が存在することが明らかとなった。またアミノ末端が短い PTCH<sub>S</sub> 蛋白質は不安定であることが明らかとなった。

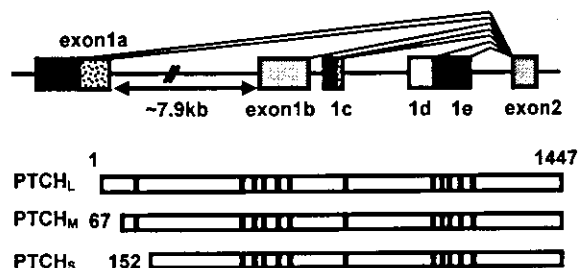


図1

#### D. 考察

少なくとも日本人における NBCCS では PTCH 遺伝子に変異が認められる頻度が以前

の欧米からの報告より多いことがより鮮明となった。それでも遺伝子変異の見出されない症例が存在することも事実である。これらの症例では PTCH の関連遺伝子 (PTCH-2, SMO 等) に変異のある可能性、今回明らかとなったプロモーター領域やイントロン領域の Gli 結合配列に変異のある可能性、PTCH 遺伝子が大きく欠損している可能性が考えられる。PTCH 遺伝子は個体発生と癌抑制の接点に位置する遺伝子であり、多様な機能が想像されるが、複数存在するアイソフォームがその理由の一部であると思われた。

#### E. 結論

日本人では大部分の NBCCS で PTCH 遺伝子に変異が認められる。変異の大部分はフレームシフトやスプライシングの異常によって短い蛋白質が生ずる変異である。ヒトとマウス PTCH 遺伝子には第一エクソンを選択的に用いる少なくとも7種類のアイソフォームが存在し、アミノ末端が短い蛋白質 PTCH<sub>S</sub> は他の2種類に比べて不安定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyashita, T.: Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol. Biol.* 261: 399-410, 2004.

Nagao, K., Fujii, K., Yamada, M., and Miyashita, T.: Identification of a novel polymorphism involving a CGG repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CGG-containing genes. *J. Hum. Genet.* 49: 97-101, 2004.

Subramanian, R. R., Zhang, H., Wang, H., Ichijo, H., Miyashita, T., and Fu, H.: Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp. Cell Res.* 294: 581-591, 2004.

U, M., Shen, L., Oshida, T., Miyauchi, J., Yamada, M., and Miyashita, T.: Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia* 18: 1850-1856, 2004.

Nagao, K., Toyoda, M., Takeuchi-Inoue, K., Fujii, K., Yamada, M., and Miyashita, T.: Identification and characterization of multiple

isoforms of a murine and human tumor suppressor, *Patched*, having distinct first exons. *Genomics in press*

## 2. 学会発表

長尾和右, 豊田雅士, 井上佳織, 藤井克則, 宮下俊之, 山田正夫. マウス及びヒト *Patched* 遺伝子の選択的スプライシングにより生ずるアイソフォームの解析. 第27回日本分子生物学会年会 (神戸), 2004年12月, ワークショップ

宮下俊之, 藤井克則, 豊田雅士, 山田正夫. ヒト、マウス癌抑制遺伝子 *Patched* アイソフォームの構造・機能解析. 第63回日本癌学会総会 (福岡), 2004年9-10月, ワークショップ

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

ゲノム刷り込み機構の解明

分担研究者 副島英伸 佐賀大学医学部助手

研究要旨 ゲノム刷り込みは、先天異常疾患や腫瘍に関連する。ヒト 11p15.5 の刷り込み領域の刷り込みマークについてマウス細胞を用いて解析した。その結果、DNA メチル化およびヒストン H3K9 メチル化が刷り込み領域のマークとして重要であることが明らかとなった。また、H3K27 トリメチル化が異なる機能をもつ別の刷り込みマークであることが示唆された。

A. 研究目的

ゲノム刷り込みは、一对の対立遺伝子のうち一方の親由来の遺伝子のみが発現する現象で、配偶子形成過程で付けられる印(刷り込みマーク)に基づき遺伝子発現が決定される。ヒト染色体 11p15.5 は、複数の刷り込み遺伝子が存在する刷り込み領域であり、刷り込みの破綻は Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や胎児性腫瘍と関連する。刷り込みマークとして、DNA メチル化と特定のヒストン修飾が考えられている。本研究では刷り込みマークに基づく遺伝子発現調節の分子基盤を明らかにする。

B. 研究方法

DNA メチル化酵素遺伝子欠失 ES 細胞(Dnmt<sup>-/-</sup>ES)とヒストン H3K9 メチル化酵素欠失 ES 細胞(G9a<sup>-/-</sup>ES)を用いて、刷り込み遺伝子 *Lit1* の解析を行った。また、クロマチン免疫沈降法にて、刷り込みマークとしてのヒストン H3K27 トリメチル化の役割について検討した。マウスの実験に関しては、佐賀大学動物実験指針に準じ、同委員会にて承認されている。

C. 研究結果

Dnmt<sup>-/-</sup>ES および G9a<sup>-/-</sup>ES の両細胞において、DNA メチル化は消失し、刷り込み遺伝子 *Lit1* が両アレル発現を示した。G9a をトランスジーンでレスキューすると *Lit1* の発現は片アレル発現に回復した。トリメチル化 H3K27 は、BWS 領域では母アレル特異的に認められたが、別の刷り込み領域である PWS/AS 領域では父アレル特異的に認められた。

D. 考察

ES 細胞の結果から、刷り込み維持には DNA メチル化とヒストン H3K9 メチル化の両方が重要であることが考えられる。また、G9a<sup>-/-</sup>ES で DNA メチル化が消失していることから、H3K9 メチル化が DNA メチル化より上位の刷り込みマークである可能性が示唆される。一方、エピジェネティックな修飾が類似しているが遺伝子発現パターンが異なる2つの刷り込み領域において、H3K27 トリメチル化はそれぞれ異なる親由来アレルで認められた。H3K27 トリメチル化が、両領域の刷り込み遺伝子の発現パターンの違いを引き起こすマークである可能性を示唆する。

E. 結論

DNA メチル化、ヒストン H3K9 メチル化が刷り込み領域のマークとして機能していることを明らかにし、H3K27

トリメチル化が異なる機能をもつ別の刷り込みマークである可能性を示した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Soejima H, et al. Silencing of imprinted *CDKN1C* gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer. *Oncogene*, 23(25): 4380-4388, 2004

Soejima H, et al. Gene silencing in DNA damage repair. *Cell Mol Life Sci*, 61(17): 2168-2172, 2004

Satoh A, et al. Epigenetic Inactivation of Class II Transactivator (CIITA) is Associated with the Absence of Interferon- $\gamma$ -Induced HLA-DR Expression in Colorectal and Gastric Cancer Cells. *Oncogene*, 23(55): 8876-8886, 2004

2. 学会発表

副島英伸, 他. DNA 修復遺伝子 MGMT のエピジェネティックな発現抑制機構. 第63回日本癌学会学術総会 2004. 9. 29.-10. 1. 福岡

Soejima H, et al. Epigenetic regulation of *p57<sup>KIP2</sup>/LIT1* imprinting domain and its implication in human disease. The Fourteenth International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar 2004.10.30-31. Hiroshima

Soejima H, et al. The Essential Role of Histone H3 Lys9 Methylation and MeCP2 Binding in *MGMT* Silencing with Poor DNA Methylation of the Promoter CpG Island. An American Association for Cancer Research Special Conference, 2004.11.10-14. Hawaii, USA

副島英伸, 他. 刷り込み調節領域のヒストン H3Lys27 メチル化解析. 第27回日本分子生物学会年会 2003. 12. 8-11. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

キメラ遺伝子に対する分子標的治療法の開発

(分担) 研究者 黒田 雅彦 東京医科大学・講師

研究要旨

一部の悪性小児腫瘍は依然として治療成績が不良であり、新たな治療法の確立が急務である。本研究では、腫瘍の原因と考えられるキメラ融合蛋白質に対して siRNA を用いた治療の開発、抗体療法の基礎開発を行った。また、キメラ遺伝子の成因に細胞分化における染色体テリトリーが重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

一部の小児がんは依然として治療成績が不良であり、新たな治療法の確立が急務である。このような背景から、我々は、腫瘍の原因と考えられるキメラ融合蛋白質に対しての分子標的治療の開発を目指す。具体的には、未だ治療成績が不良の小児固形腫瘍に出現するキメラ遺伝子の発現を siRNA または抗体を用いて抑制する。また、開発に際しては、siRNA の細胞内導入法として、レトロウイルスによるベクターの開発、また従来のカチオン脂質にかわる細胞内導入法の開発も行う。これにより、効率的な siRNA の組織内導入が期待される。以上の研究開発より、小児悪性腫瘍の治療選択が増えると同時に、キメラ遺伝子が関与する腫瘍化のメカニズムとその役割の詳細が明らかになる事が期待される。

B. 研究方法

今年度は以下の検討を行った。

(1)キメラ遺伝子を標的とした siRNA に分子標的治療の開発：

EWS-Fli1 を持つユーイング肉腫/PNET は、EWS 遺伝子に対する DNA アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることにより、EWS-Fli1 遺伝子の発現を抑制し、その結果として細胞増殖を抑制する事が確かめられている。一方、短鎖干渉性二重鎖 RNA (siRNA) は、DNA アンチセンスオリゴヌクレオチドよりもさらに効率よく目的遺伝子をノックダウンすることが明らかになり、多くの悪性腫瘍でその応用が期待されている。我々も、今年度 TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する siRNA を設計し、粘液型脂肪肉腫に対する増殖抑制効果を検討した。

(2) キメラ遺伝子特異抗体による分子標的治療の開

発：

近年、がん遺伝子産物に対する特異抗体を用いた分子標的治療が開発され、臨床においても大きな効果が示されている。このような背景から、本年度、我々も粘液型脂肪肉腫に特異的に発現する TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する特異抗体を開発した。

(3) 染色体転座によるキメラ遺伝子形成メカニズムの検討：

近年、分子細胞生物学の発展により、キメラ遺伝子の腫瘍メカニズムは明らかにされつつあるが、染色体転座によるキメラ遺伝子形成メカニズムは不明な点が多く残されている。そのような背景から、我々は、隣接する染色体の相対核内配置が、それらの染色体の転座と相関する可能性が高いという仮説をたてた。一方、粘液型脂肪肉腫は 12 番染色体と 16 番染色体の相互転座を示し、申請者らの研究から、本腫瘍が、脂肪細胞の分化の過程で異常をきたし腫瘍化するということが明らかになっている。このことから、申請者は脂肪細胞分化における染色体テリトリーを検討した。

C. 研究結果

(1) キメラ遺伝子を標的とした siRNA に分子標的治療の開発：

我々はまず、TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する siRNA を設計し、その発現抑制効果を real-time PCR 法にて確認した。具体的には、TLS-CHOP キメラ遺伝子を発現する腫瘍細胞を樹立した。TLS-CHOP 遺伝子の 11 箇所の配列に対する siRNA を合成し、本細胞に導入し、TLS-CHOP 遺伝子の発現抑制を検討した。さらに、最も抑制効率の高かった siRNA を用いて TLS-CHOP キメラ遺伝子を発現する粘液型脂

筋肉腫由来の腫瘍細胞における、増殖抑制効果を検討した。その結果、粘液型脂肪肉腫において、増殖の抑制が観察された。今後はさらに、臨床応用に向けて *in vivo* での効果を検討していきたい。

(2) キメラ遺伝子特異抗体による分子標的治療の開発：

本年度、我々は粘液型脂肪肉腫に特異的に発現する TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する特異抗体を開発した。特に TLS-CHOP キメラ遺伝子は、他のキメラ遺伝子とことなり、染色体転座特異的な遺伝子配列が存在する。この遺伝子配列は CHOP 遺伝子のエクソン 1 に対応しこのエクソンは染色体転座がない場合には、転写されない。よって、この配列に相当する遺伝子産物を抗原にしてモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、TLS-CHOP キメラ遺伝子を特異的に認識する 5 種類のクローンを得た。来年度は、このモノクローナル抗体を用いて、臨床応用に向けた基礎研究をおこなっていく。

(3) 染色体転座によるキメラ遺伝子形成メカニズムの検討：

染色体転座によるキメラ遺伝子形成メカニズムを明らかにするため、まず本年度は、脂肪細胞分化における染色体テリトリーを検討した。ヒト脂肪前駆細胞初代培養細胞を用い、PPAR $\gamma$ ligand により成熟脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化前及び分化後において、ヒト 12 番及び 16 番染色体ペインティングプローブを用いた 3D-FISH 法により、両染色体テリトリーの核内配置を解析した。染色体テリトリーの距離を計測するに当たり、基準となるポイントは、輝度のピーク点 FPC (Fluorescence Peak Center) とした。また、核形状・大きさの異なる細胞同士の比較を行うため、核形状の標準化とその標準核内における染色体核内配置の算出法を確立した。その結果、前脂肪細胞においては、12 番染色体と 16 番染色体の距離が  $4.10\mu\text{m}$  ( $n=40$ ) に対して、分化誘導後は  $3.40\mu\text{m}$  ( $n=38$ ) というように染色体が近接するという、ダイナミックな染色体テリトリーの変化が観察された。我々の従来からの研究から、本腫瘍が、脂肪細胞の分化の過程で異常をきたし腫瘍化することが明らかになっている。この脂肪分化過程における、12 番染色体と 16 番染色体の空間的な近接が、脂肪肉腫の発生の原因となる染色体転座によるキメラ遺伝子の形成の原因となる可能性が示唆された。

D. 考察

本年度の研究から、キメラ遺伝子を持つ小児腫瘍に対して siRNA が治療に応用できる可能性が示された。本年度は、*in vitro* における検討を行ったが来年度はさらに *in vivo* の動物モデルを用いて検討していく必要がある。また、siRNA の *in vivo* デリバリーに関して、ベクターを用いる方法やアテロコラーゲンを用いることも検討していきたい。また、抗体医薬はすでに臨床応用されていることから、その実用化はすぐにでも可能であるが、我々は本年度 TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する特異抗体を開発した。この抗体はパラフィンブロックでも、染色が可能であることから、粘液型脂肪肉腫の診断に大きな効果を発揮すると考えられる。また TLS-CHOP キメラ遺伝子の抑制によって細胞増殖が抑制されることから、本抗体が抗腫瘍効果を示す可能性も考えられる。来年度は、まず *in vitro* において抗 TLS-CHOP 抗体の抗腫瘍効果を確認していきたい。

E. 結論

治療成績が不良な小児悪性腫瘍の新たな治療法として、RNA 干渉による siRNA を用いた分子標的治療の有用性が示された。今後さらに臨床応用に向けた基礎的研究が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda, M, Oikawa, K, Ohbayashi, T, Yoshida, K, Yamada, K, Mimura, J, Matsuda, Y, Fujii-Kuriyama, Y and Mukai, K: A dioxin sensitive gene, mammalian *WAPL*, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett*, 579: 167-172, 2005.
2. Kuroda, M, Kiyono, T, Oikawa, K, Yoshida, K and Mukai, K: The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, *hWAPL*, exhibits potential as a therapeutic target. *Br J Cancer*, 92: 290-293, 2005.
3. Kuroda, M, Tanabe, H, Yoshida, K, Oikawa, K, Saito, A, Kiyuna, T, Mizusawa, H and Mukai, K: Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J Cell Sci*, 117: 5897-5903, 2004.
4. Oikawa, K, Ohbayashi, T, Kiyono, T, Nishi, H, Isaka, K, Umezawa, A, Kuroda, M and Mukai, K: Expression of a Novel Human Gene, *Human Wings Apart-Like (hWAPL)*, Is Associated with

Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004.

5. Hattori, H, Kuroda, M, Ishida, T, Shinmura, K, Nagai, S, Mukai, K and Imakiire, A: Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma. *Pathol Int*, 54: 26-31, 2004.
6. Shinmura, K, Ishida, T, Goto, T, Kuroda, M, Hattori, H, Nagai, S, Imamura, T, Mukai, K and Imakiire, A: Expression of cyclooxygenase-2 in chondroblastoma: immunohistochemical analysis with special emphasis on local inflammatory reaction. *Virchows Arch*, 444: 28-35, 2004.
7. Kuroda, M, Oikawa, K, Yoshida, K, Takeuchi, A, Takeuchi, M, Usui, M, Umezawa, A and Mukai, K: Effects of 3-Methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene *hWAPL*. *Cancer Lett*, in press, 2004.
8. Oshiro, H, Ebihara, Y, Serizawa, H, Shimizu, T, Teshima, S, Kuroda, M and Kudo, M: Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis Associated with Immunohematological Abnormalities. *Am J Med*, in press, 2004.
9. 黒田雅彦、及川恒輔、向井 清: 診断への応用と展望—骨軟部腫瘍—. *病理と臨床*, 22 (臨増): 100-106, 2004
10. 松林 純、黒田雅彦、向井 清: キメラ遺伝子と軟部腫瘍の形態形成. 「骨・関節・靭帯」17(11): 1261-1267, 2004.
11. 黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、石田 剛、向井 清: キメラ遺伝子と形態形成—染色体テトリ—の関与—. *病理と臨床*, Vol. 22 (2), 175-180, 2004.

## 2. 学会発表

1. 黒田雅彦: パラフィン包埋検体からのキメラ遺伝子解析法. 日本病理学会病理技術講習会—4、講演、名古屋市、2004年12月.
2. 及川恒輔、高梨正勝、吉田恵一、梅澤明弘、向井清、黒田雅彦: 癌遺伝子 *hWAPL* の転写活性と mRNA 量に対する環境ホルモンの影響. 第 27 回日本分子生物学会年会、示説、2004年12月.
3. 黒田雅彦、吉田恵一、田辺秀之、及川恒輔、向井清: キメラ遺伝子形成における染色体テトリ—の関与. 第 63 回日本癌学会総会、シンポジウム、福岡市、2004年9月.
4. 及川恒輔、黒田雅彦、吉田恵一、向井 清: 新

規遺伝子 *hWAPL* の発現と子宮頸癌との関連. 第 63 回日本癌学会総会、ワークショップ、福岡市、2004年9月.

5. 吉田恵一、黒田雅彦、及川恒輔、向井 清: 脂肪分化における発癌性環境化学物質の影響. 第 63 回日本癌学会総会、福岡市、2004年9月.
6. 黒田雅彦: DIF-2/h WAPL と環境化学物質—染色体テトリ—と減数分裂—. 科学技術振興機構・CREST、「内分泌かく乱物質」第 5 回領域シンポジウム、東京、2004年9月.
7. 黒田雅彦: siRNA を用いたガン治療への応用. 第 9 回(東京医科大学)医科学フォーラム、2004年7月.
8. 黒田雅彦、及川恒輔、石田 剛、松林 純、吉田恵一、服部宏行、今給黎篤弘、向井 清: 病理切片を用いたキメラ遺伝子産物の検出と軟部腫瘍診断への応用. 第 45 回日本神経病理学会総会、ワークショップ 3、群馬県前橋市、2004年5月.
9. 及川恒輔、黒田雅彦、石田 剛、吉田恵一、向井清: キメラ遺伝子を標的にした RNA 干渉法による治療法の開発. 第 93 回日本病理学会総会、ワークショップ、札幌市、2004年6月.
10. 吉田恵一、田辺秀之、喜友名朝春、齋藤 彰、水沢 博、黒田雅彦、向井 清: 粘液型脂肪肉腫発生における染色体テトリ—の関与. 第 93 回日本病理学会総会、札幌市、2004年6月.
11. 松林 純、黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、向井清: マイクロアレイによる乳癌の遺伝子発現解析. 第 93 回日本病理学会総会、札幌市、2004年6月.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**研究要旨** 網羅的遺伝子発現プロファイリングに基づいた難治性小児癌の新しいテーラーメイド医療システムの実現を目指し、代表的な小児がんである腎芽腫、肝芽腫、神経芽腫由来の遺伝子ライブラリーを作製し、それぞれから大量に遺伝子を単離した。各ライブラリーの詳細な解析から、これらは約 11,000 個の独立遺伝子を含み、機能未知の新規遺伝子にあたるもの、また発現が発生時期に見られるものが豊富に含まれていることが示された。このような独自の遺伝子ソースを網羅的な発現解析に用いるため、これらを搭載した小児がん DNA チップを作製した。我々は既に神経芽腫について、腫瘍特異的 DNA チップの作製と発現解析およびその結果からの患者予後関連遺伝子抽出法を確立しているが、同様の手法と今回作製したチップを用いて、更に大規模に小児がんを広くターゲットとした発現解析を開始した。

#### A. 研究目的

近年の抗がん剤開発により、小児がんの治癒率は大幅に改善されてきたものの、有効な治療法が確立していない難治性腫瘍も未だ存在し、それらをターゲットとした難治性小児腫瘍の早期診断と、治療層別化による効率的な治療システムの構築が急務となっている。将来を担う小児にとり、QOL を重視した治療の供給は特に優先すべき事項である。一方で、腫瘍組織における遺伝子発現プロファイルが、悪性度などの個性を規定することが明らかになってきた。そこで本研究では、小児がんの臨床的特性の背景にある分子的特徴を DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により明らかにし、その成果を臨床におけるより正確な早期診断システムに取り入れることを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1) 小児がん由来遺伝子ライブラリーの作製と遺伝子断片の大量収集

小児がんは、その発症時期の早さから、発生初期の細胞の分化・増殖を制御しながら正常な組織形成へと導く遺伝子発現ネットワークに異常が起きて発症すると予想される。その腫瘍における遺伝子の発現から層別化を行うには、発生初期に発現する遺伝子を網羅的に揃え解析することが、より精度の高い層別化に繋がること期待される。小児がん組織はこのような早期の遺伝子を豊富に発現していることが予想されるため、本研究ではまず小児がん由来の遺伝子ソースを大量に収集しチップ化することとした。まず代表的な小児がんである腎芽腫（ウィルムス腫瘍）、肝芽腫、神経芽腫由来の複数の腫瘍組織から RNA を調製し、完全長 cDNA を豊富に単離するオリゴキャッ

ピング法により cDNA ライブラリーを作製した。それぞれから各々 12,000 個ずつランダムにクローンピックアップし、両端塩基配列を全て決定した。次に配列のデータベースに対する相同性検索を行い、クローン毎の情報を収集すると共に、既知遺伝子にヒットしないクローンについては、挿入断片の全塩基配列を決定した。このような新規配列については、さらに特異的プライマーを合成し、各種ヒト組織由来 RNA を用いて半定量 RT-PCR を行うことにより、その臓器別遺伝子発現のパターンを検討した。さらに、両端塩基配列をライブラリー内で比較することにより遺伝子の重複を除き、この遺伝子ソースに含まれる独立遺伝子を抽出した。

##### 2) 小児がんにて特化した DNA チップの作製とハイブリダイゼーション用のサンプル調製

チップ作製には、クローンの挿入断片（平均約 2.5kb）を LA-PCR により増幅し、精製したものを用いた。スポットティングにはスポット毎の均一性の高いインクジェット方式を採用した。チップ解析用のサンプルとして凍結腫瘍組織から total RNA を調製し、アジレントバイオアナライザーによる RNA クオリティの確認を進めた。

倫理面の配慮としては、今回ライブラリー作製に用いた小児がん組織は、個人を特定できないよう全て連結不可能匿名化されたものを複数症例分混合した後に用いた。遺伝子発現解析に用いるサンプルは、全て組織供与施設において文書によるインフォームドコンセントを得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いる。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施にあたっては、千葉県がんセンター倫理審査

委員会に諮り、あらかじめ承認を得た後に研究を開始した。

## B. 研究結果

36,000 クローンの両端塩基配列の解析から、腎芽腫ライブラリーでは約 2 割、肝芽腫ライブラリーでは約 1 割、神経芽腫ライブラリーでは約 3 割に機能未知の新規遺伝子にあたるクローンが含まれていた。前述の方法により、腎芽腫由来遺伝子 5,000 個を搭載した腎芽腫チップ (CCC-REN05000-Chip) の他、5,000 遺伝子の肝芽腫チップ (CCC-HB5000-Chip)、5,000 遺伝子の神経芽腫チップ (CCC-NB5000-Chip) を作製した。

これまでに本研究室では、神経芽腫チップを用いて、既に神経芽腫を対象としたチップ解析を進め、患者予後情報と発現データを組み合わせた統計解析とマシン学習を行い、患者の予後と強く相関する遺伝子の抽出とそれを用いた予後予測アルゴリズムの構築を行った。その高い予後予測能 (約 90%) から、我々のチップを用いた遺伝子発現プロファイルによるがんの層別化が実際に可能であることが示された (論文投稿中)。本研究では同様の手法をより広く小児がんに応用するため、さらに大量の遺伝子を搭載したチップ作製を進めた。36,000 クローンの両端塩基配列の比較から、独立遺伝子は合計約 11,000 個含まれることが判明した。そこで、本年度はこれらを全て搭載した小児がん DNA チップ (CCC-NHR11000-Chip) を完成するとともに、UCSC の Genome Browser データベースの情報を元に、スポット毎の遺伝子コード、染色体マッピング、および遺伝子オントロジー情報を付与し、独自の小児がんチップデータベースを作成した。また、以前より進めていた新規遺伝子にあたるクローンから設計したプライマー 3,700 ペアを用い、半定量 RT-PCR による臓器別発現パターン、癌部と非癌部の間あるいは予後の異なるサブセット間において発現パターンが異なる遺伝子のスクリーニングの結果も、チップ上のスポットに付与する情報として整備した。現在までに神経芽腫の異なるサブセット間で発現に差のある遺伝子を約 500 個 (論文 1, 3, 4 参照)、肝芽腫と対応する非癌部で差のある遺伝子を 86 個 (論文 2 参照) 同定している。これらの独自の情報は、未知の遺伝子の機能を推測する際によいヒントとなると期待される。

これらのチップ作製と並行して、ウイルス腫瘍の予後の異なる亜型間を遺伝子発現プロファイル解析

により分類すべく、約 50 検体のインフォームドコンセント取得済みの組織から RNA サンプル調製に着手した。これらの解析には、まず腎芽腫チップ (CCC-REN05000-Chip) の使用を予定している。

## D. 考察

従来診断に用いるには様々な克服すべき問題があった DNA チップであるが、当研究室の手法を用いて作製することにより、高い再現性をもって遺伝子発現プロファイリングに利用できることが神経芽腫の結果から既に示されている。今後は 11,000 個の小児がん由来遺伝子を搭載したチップを用いて、ウイルス腫瘍をはじめとする様々な腫瘍の亜型分類と、予後予測アルゴリズムの開発を目指す。具体的には、臨床応用に向けて、よりコストをおさえた少数の遺伝子のみを搭載したミニ診断チップを作製したい。来年度はウイルス腫瘍の各病型における遺伝子発現プロファイル、病理学的所見ならびに各種マーカーなどのデータを統合し、患者予後との関連性について統計処理を行う計画である。

## E. 結論

今後はさらに対象となる腫瘍を広げ、腫瘍層別化に向けての発現プロファイリングを進めると共に、予後評価の基準となる新たな診断法開発を進めたい。

## F. 健康危険情報

該当事項無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* **112**, 365-75, 2004.
2. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers:



Identification of high expression of the *PLK1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* **23**, 5901-11, 2004.

3. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncology*, **24**, 1457-66, 2004.
4. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. *Cancer Lett.* **204**, 213-24, 2004.
5. 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**, 828-34, 2005.
6. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett. In press.*

## 2. 学会発表

M. Ohira, S. Oba, Y. Nakamura, E. Isogai, S. Kaneko, T. Hirata, H. Kubo, T. Goto, S. Yamada, Y. Yoshida, S. Ishii, A. Nakagawara

“Molecular signature to predict the prognosis of neuroblastoma and its application to a diagnostic microarray of clinical use”

口頭発表, Luca Rotti Award 受賞(Genetics 部門)

Advances in Neuroblastoma Research Eleventh Conference, イタリア・ジェノバ, 2004/6/15-18

大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、金子節子、平田隆洋、久保浩之、山田佐一、吉田安子、石井 信、中川原 章

「神経芽腫の予後に関わる遺伝子発現プロファイルの同定と DNA チップを用いた予後予測システムの開発」ポスター発表

第 63 回日本癌学会総会, 福岡, 2004/9/29-10/1

大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、平田隆洋、久保浩之、金子節子、石井 信、中川原 章

「遺伝子発現解析による新しい神経芽腫予後予測システムの開発」口頭発表

第 20 回日本小児がん学会学術総会, 京都, 2004/11/21-23

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

分担研究報告書

分子情報に基づく小児がん治療研究推進

分担研究者 熊谷昌明 国立成育医療センター 小児腫瘍科 医員

**研究要旨** 近年の治療の進歩により小児がん全体の治癒率は70%を超えるに至った。しかし、残る30%の難治例においては、その治癒を阻害している因子を検討、同定することにより有効な対処法を見出す必要がある。われわれは国立小児病院/国立成育医療センターにおいて過去10年間に新規発症した小児がん症例を検討することにより、最先端の医療を用いても治癒が困難である疾患の同定と治療上の問題点を考察した。本邦の他施設の報告と併せて検討すると、現時点で最大限まで治療が強化されてもなお治癒が困難である腫瘍として、進行神経芽腫、転移を伴う骨軟部肉腫、一部の脳腫瘍（脳幹グリオーマなど）があげられた。造血器腫瘍においては、一部の急性リンパ性白血病（Ph1染色体陽性、MLL遺伝子異常、寛解導入不能例）と一部の急性骨髄性白血病（Ph1染色体陽性、モノソミー7、白血球数>10万の単球性白血病など）を除けば70%以上の治癒率が得られている。また、造血器腫瘍においては造血細胞移植による救済が可能な症例も多い。しかし、化学療法後の二次性白血病・骨髄異形成症候群については造血細胞移植によっても治癒が困難である。当センターでの死亡例の検討では、腫瘍死が2/3、非腫瘍死が1/3を占めた。非腫瘍死の原因としては、細菌感染症はみられず、造血細胞移植に関連する真菌感染症と血管障害、乳児症例のウイルス感染症、血球貪食症候群が主要なものであった。これらの克服が治癒率の向上に寄与するものと考えられた。

A. 研究目的

国立小児病院/国立成育医療センターにおいて治癒が困難であった小児がん症例を検討することにより、最新の治療法を用いてもなお治癒が困難である疾患群を確認し、また、治療に付随する問題点を明らかにする。

B. 研究方法

1995年から2004年に発症し、国立小児病院および国立成育医療センターで治療が行われた小児がん症例の疾患別の生存割合、

死亡割合および死因を後方視的に検討し、本邦および欧米の報告と比較することにより克服すべき課題と対処法を考察する。

C. 研究結果

1. 国立小児病院/国立成育医療センターにおける主な腫瘍性疾患の治療成績（1995年1月～2004年6月発症）

表 1：主な腫瘍性疾患の症例数と治療成績

	症例数 (死亡数)	造血細胞移植 症例数 (死亡数)
ALL*	40 (1)	8 (0)
AML**	16 (4)	9 (4)
MDS**	8 (3)	5 (2)
JMML		
悪性リンパ腫	21 (3)	1 (1)
進行神経芽腫	25 (9)	21 (8)
骨軟部腫瘍	13 (2)	9 (2)
脳腫瘍	21 (3)	2 (0)

\*乳児 ALL：5 例（死亡 1 例）を含む

\*\*二次性 AML/MDS：3 例（死亡 3 例）を含む

急性リンパ性白血病（ALL）は 40 例、そのうちに難治と考えられる乳児 ALL が 5 例含まれていたが、死亡例はアデノウィルス感染症による乳児例の 1 例のみであった。再発例も造血細胞移植で全例が救済されており、少数の検討ではあるものの化学療法の有効性、造血細胞移植の効果が最も顕著な疾患であった。一方で、再発例の中には、予後良好とされてきた高二倍体の染色体異常および TEL-AML1 を有する ALL 症例が含まれていた。これらの染色体異常を有する群については過去 20 年間で大きな成績の向上が得られておらず、一部に難治例を包含するものと考えられる。急性骨髄性白血病（AML）では 16 例中 4 例が死亡していた。死亡例は全て造血細胞移植後の再発であった。2 例はダウン症に合併した AML（M7）、1 例は二次性の AML であり、通常の AML の死亡は 1 例のみであっ

た。骨髄異形成症候群（MDS）/若年型骨髄単球性白血病（JMML）では 8 例中 3 例が死亡していた。死亡例のうち 2 例は二次性の MDS、1 例は造血細胞移植が施行できなかった JMML であった。非ホジキンリンパ腫は 21 例中 3 例が死亡していた。うち 2 例は免疫不全症に合併したリンパ腫であり、1 例は二次性の MDS を発症して死亡した症例であった。通常の悪性リンパ腫では大部分に治癒が期待できるものと考えられた。注意すべきは初発時の腫瘍崩壊症候群による死亡であり、これには ICU との連携が重要であった。進行神経芽腫は 25 例中 9 例が死亡した。7 例が腫瘍死（腫瘍増悪期の移植中の死亡 2 例を含む）、2 例が造血細胞移植関連死であった。自家造血細胞移植後に再発した 3 例に対して同種造血細胞移植を試みたがいずれも死亡しており、再発後の救済は困難であった。骨軟部肉腫は 13 例（横紋筋肉腫 7 例、ユーイング肉腫 6 例）、うち 2 例が死亡した。いずれも自家造血細胞移植後の再発/腫瘍死であった（髄膜播種および腹膜播種）。両者とも初発時に遠隔転移あるいは髄膜浸潤を認めた症例であった。脳腫瘍は 21 例中 3 例（脳幹グリオーマ 2 例、先天性上衣芽腫 1 例）が腫瘍死した。脳腫瘍については診療が開始されてから 2 年が経過した時点の評価であるため、今後その結果は大きく異なる可能性があるが、従来難治とされていた髄芽腫および胚細胞腫瘍の 4 例が強力な化学療法と造血細胞移植により無病生存しており、これらの腫瘍は今

後さらなる化学療法の洗練により治癒率の向上が期待できるものと考えられた。一方、脳幹グリオーマは全例に治癒が見込めず、依然として最も難治な腫瘍である。

## 2. 国立小児病院/国立成育医療センターにおける同種造血細胞移植の成績 (1995年1月～2004年6月の施行例)

表2：同種造血細胞移植の成績

	第一寛解期	再発/非寛解期	計
ALL	5 (0)	5 (0)	10 (0)
AML	3 (0)	7 (5)	10 (5)
MDS・JMML	0	5 (2)	5 (2)
神経芽腫	0	4 (4)	4 (4)
計	8 (0)	21 (11)	29 (11)

カッコ内は死亡数 (死亡例の内訳 二次性AML・MDS: 3例、AML再発例: 2例、ダウン症のAML: 2例、神経芽腫移植後再発/不応例: 4例)

上記の期間中に同種造血細胞移植が29例に施行されていた。ALL10例では第一寛解期、再発/非寛解期を問わず死亡例はなかった。AML10例では再発/非寛解期の移植例7例中5例が死亡していた。MDS/JMMLでは5例中2例が死亡、神経芽腫の同種移植症例はすべて再発あるいは治療抵抗性の症例であったが、全例が移植に関連して死亡していた。これらの結果から、少数例の検討ではあるものの、ALLは病期を問わず造血細胞移植により救済される

可能性があると考えられた。一方、二次性白血病、ダウン症の白血病、MDS、神経芽腫の同種造血細胞移植の効果は十分とは言えず、これらの疾患において同種造血細胞移植が効果をあげるためには、より有効な前処置の考案、あるいは移植に至るまでの化学療法の強化が必要であると考えられた。また、神経芽腫の自家移植後の再発例に対して同種移植を試みる場合には、前治療による臓器障害が存在するため、移植合併症に十分な注意を要すると考えられた。

## 3. 死因の検討

表3：死因の検討

死亡	33例 (死亡割合 13.4%)
生存	214例 (生存割合 86.6%)
死亡の原因	腫瘍死 22例
	造血細胞移植関連死 7例
	その他の合併症死 4例
非腫瘍死の内訳	感染症 6例 (アデノウイルス感染 2例、真菌感染 4例)
	出血 3例
	血球貪食症候群 3例

過去10年間の小児悪性腫瘍患者247例のうち生存例は214例 (生存割合 86.6%) と従来の報告と比べて良好な治療成績であった。死亡例33例のなかで治療関連死亡が11例 (死亡例の33.3%、全症例の4.5%) を占め、その対策が重要であると考えられた。そのうちの最も大きな要因は造血細胞移植に関連する合併症 (真菌感染症、血管障害) であったが、通常の化学療法中のウィルス

感染、および血球貪食症候群が重要な問題として提起された。ウイルス感染および血球貪食症候群による死亡の3/4は乳児例であり、乳児期の治療における重要な合併症と考えられた。一方で、検討した247例では細菌感染症による死亡例はみられず、抗菌剤の予防内服、常在菌の監視、感染症発症時の迅速な治療が奏効したものと考えられた。

#### D. 考察

国立小児病院および国立成育医療センターにおいて過去10年間に発症した悪性腫瘍患者の生存割合は86%と良好であった。この成績が得られた要因としては、化学療法、放射線照射、外科治療の進歩および造血細胞移植の導入とともに、細菌感染症死がみられなかったことに象徴される支持療法の進歩がもたらす総合的な治療強度の増強の寄与が考えられた。また、固形腫瘍においては外科、放射線治療科、集中治療科、腫瘍科および病理、放射線診断科の緊密な連携により最適化された治療を行うことが重要であると考えられた。これらの基盤を整備することにより、現行の治療を用いても全体の成績の向上が得られ、施設間の成績の差が縮まるものと考えられる。しかし、その後も依然として軟治性の腫瘍が存在することはわれわれの経験からも明らかであり、それらの難治性腫瘍について、わが国および欧米の報告を参照し、各腫瘍における課題と治癒率の向上のために求められる情報を以下に考察した。

ALL :

- ・ 予後良好と考えられている染色体異常である高二倍体およびTEL-AML1を持つ

ALLにおける予後不良因子の検討

- ・ 移植前処置の検討(高用量全身照射の有効性の検討)
- ・ 臨床所見と相関する抗がん剤感受性試験の開発

AML :

- ・ ATRAに次ぐ分子標的療法薬の開発
- ・ 再発と薬剤代謝の関連の検討(特にAra-Cについて)
- ・ 移植前処置の検討
- ・ アントラサイクリンによる心毒性の個人差の検討(症例別に異なる用量設定を行い得る可能性の検討)
- ・ 二次性AMLの生物学的特性の検討

悪性リンパ腫 :

- ・ 再発例および初期治療抵抗例に対する造血細胞移植前処置の検討

神経芽腫 :

- ・ 造血細胞移植前処置の検討
- ・ 分化誘導療法の検討
- ・ 年長児のstage 3症例における予後良好群の選別と治療の軽減
- ・ 年長児stage 4症例における造血細胞移植を要しない群の選別と治療の軽減
- ・ 乳児神経芽腫におけるMYCN以外の予後因子の検討
- ・ 無治療経過観察が可能な神経芽腫の生物学的特性の同定
- ・ 抗がん剤感受性試験の確立

横紋筋肉腫 :

- ・ 発生部位による生物学的特性の差の検討(予後良好部位では治療におけるどの要素を軽減できるのか)

ユーイング肉腫 :

- ・ 本邦と欧米の治療成績の差の検討(統一プロトコールを用いた臨床試験)

- ・ 局所療法（手術・放射線照射）の標準化

382, 2004

脳腫瘍：

- ・ 脳幹グリオーマにおける正常脳細胞と  
の生物学的差異の検討
- ・ 分子標的療法の検討（ゲフィチニブなど）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### E. 結論

現時点で最大限まで治療が強化されてもなお治癒が困難である腫瘍として、進行神経芽腫、転移を伴う骨軟部肉腫、一部の脳腫瘍（脳幹グリオーマなど）があげられた。造血器腫瘍においては、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病の一部を除けば70%以上の治癒率が得られている。また、造血器腫瘍においては造血細胞移植による救済が可能な症例も多い。しかし、化学療法後の二次性白血病・骨髄異形成症候群については造血細胞移植によっても治癒が困難である。一方、当センターでの死亡例の検討では、腫瘍死が2/3、非腫瘍死が1/3を占めた。非腫瘍死の原因としては、細菌感染症はみられず、造血細胞移植に関連する真菌感染症と血管障害、乳児症例のウィルス感染症、血球貪食症候群が主要なものであった。これらの克服が治癒率の向上に寄与するものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：  
熊谷昌明、他：集中治療室(ICU)と連携した小児がん治療. 日小血会誌 18 :

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	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
Miyashita T.	Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins.	Fu H.	Protein-Protein Interaction Methods Mol Biol Vol. 261	Humana Press	Totowa, USA	2004	399-410

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	発表年
Shibata R, Matsufuji H, Morimoto T, Araki A, Hata J.	Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child.	Pediatr Blood Cancer	42	292-293	2004
Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ushii H, Kohhara M, Hibi T.	Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with infectious molecular clone.	Liver Int	4	259-267	2004
Du W, Hattori Y, Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, Yamada T.	Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment.	Pathol Int	54	285-294	2004
Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, Yamada T, Hata J, Itakura M.	In vivo proliferation pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4.	Diabetologia	47	1819-1830	2004
Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J.	Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma.	Modern Pathol	17	423-429	2004
Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T,	Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells.	Microbiol Immunol	48	377-387	2004



Fujimoto J.					
Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J.	Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I $\alpha$ chain.	Hybridoma Hybridom	23	187-191	2004
Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J.	Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells.	J Cell Sci	117	3911-3922	2004
Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahshi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J.	Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and Ca <sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells.	Immunology	112	575-582	2004
Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J.	Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor $\delta$ -chains.	Veterinary Immunol Immunopathol			In press
Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J.	Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells.	Leukemia Research			In press
Nagao K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T.	Identification of a novel polymorphism involving a CGG repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CGG-containing genes.	J Hum Genet	49	97-101	2004
Subramanian RR, Zhang H, Wang H,	Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with	Exp Cell Res	294	581-591	2004

Ichijo H, Miyashita T, Fu H.	isoforms of 14-3-3 proteins.				
U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T.	Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor.	Leukemia	18	1850-1856	2004
Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T.	Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, <i>Patched</i> , having distinct first exons.	Genomics			in press
Soejima H, Nakagawachi T, Zhao W, Higashimoto K, Urano T, Matsukura S, Kitajima Y, Takeuchi M, Nakayama M, Oshimura M, Miyazaki K, Joh K, Mukai T.	Silencing of imprinted CDKN1C gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer.	Oncogene,	23(25)	4380-4388	2004
Soejima H, Joh K, Mukai T.	Gene silencing in DNA damage repair.	Cell Mol Life Sci,	61(17):	2168-2172	2004
Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K.	Epigenetic Inactivation of Class II Transactivator (CIITA) is Associated with the Absence of Interferon- $\gamma$ -Induced HLA-DR Expression in Colorectal and Gastric Cancer Cells.	Oncogene,	23(55)	8876-8886	2004
Kuroda, M, Oikawa, K, Ohbayashi, T, Yoshida, K, Yamada, K, Mimura, J, Matsuda, Y, Fujii-Kuriyama, Y and Mukai, K.	A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis.	FEBS Lett	579	167-172	2005
Kuroda, M, Kiyono, T, Oikawa, K, Yoshida, K and Mukai, K.	The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target.	Br J Cancer	92	290-293	2005
Kuroda, M, Tanabe, H, Yoshida, K,	Alteration of chromosome positioning during adipocyte	J Cell Sci,	117:	5897-5903	2004

Oikawa, K, Saito, A, Kiyuna, T, Mizusawa, H and Mukai, K.	differentiation.				
Oikawa, K, Ohbayashi, T, Kiyono, T, Nishi, H, Isaka, K, Umezawa, A, Kuroda, M and Mukai, K.	Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression.	Cancer Res	64	3545-3549	2004
Hattori, H, Kuroda, M, Ishida, T, Shinmura, K, Nagai, S, Mukai, K and Imakiire, A.	Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma.	Pathol Int	54	26-31	2004
Shinmura, K, Ishida, T, Goto, T, Kuroda, M, Hattori, H, Nagai, S, Imamura, T, Mukai, K and Imakiire, A.	Expression of cyclooxygenase-2 in chondroblastoma: immunohistochemical analysis with special emphasis on local inflammatory reaction.	Virchows Arch	444	28-35	2004
Kuroda, M, Oikawa, K, Yoshida, K, Takeuchi, A, Takeuchi, M, Usui, M, Umezawa, A and Mukai, K.	Effects of 3-Methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.	Cancer Lett			In press
Oshiro, H, Ebihara, Y, Serizawa, H, Shimizu, T, Teshima, S, Kuroda, M and Kudo, M.	Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis Associated with Immunohematological Abnormalities.	Am J Med			In press
Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A.	Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis.	Int. J. Cancer	112	365-75	2004
Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A.	Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas.	Oncogene	23	5901-11	2004

Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A.	Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas.	Int. J. Oncology,	24	1457-66	2004
Nakagawara A, Ohira M.	Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model.	Cancer Lett	204	213-24	2004
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	828-34	2004
Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A.	A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas	. Cancer Lett			In press
秦 順一	ウイルス腫瘍総論	細胞	36	262-264	2004
秦 順一	ウイルス腫瘍と WT1 遺伝子	細胞	36	269-272	2004
大喜多 肇、秦 順一	4. 小児腫瘍	病理と臨床臨時増刊号	22	123-129	2004
秦 順一	神経芽腫新国際分類 INPC について	小児がん	41	11-14	2004
黒田雅彦、及川恒輔、向井 清	診断への応用と展望—骨軟部腫瘍—	病理と臨床、	22 (臨増)	100-106	2004
松林 純、黒田雅彦、向井 清	キメラ遺伝子と軟部腫瘍の形態形成.	骨・関節・靭帯	17(11)	1261-1267	2004
黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、石田剛、向井 清	キメラ遺伝子と形態形成—染色体テロメアの関与—.	病理と臨床、	22 (2)	175-180	2004