

乳がんでメチル化されていた。また、21個の乳がん全てが、15個の遺伝子のうちいずれかのメチル化を示した。

サイレンシング遺伝子を同定するため、乳がん細胞株で完全なメチル化を認めた13遺伝子について、遺伝子発現を検討した。FOXA2及びXT3は、HMECで発現しているのに対し、完全にプロモーター領域CpGアイランドがメチル化された細胞株では発現していなかった。従って、一部の乳がんでは、これらの遺伝子は、DNAメチル化によりサイレンシングされていると考えられた。他の11遺伝子は、HMECで、もともと発現していない、または、発現レベルが極めて低いものであった。

D. 考察

(1) 神経芽細胞腫の予後マーカーの分離

昨年までの解析では、CIMPの有無により、神経芽細胞腫の予後は大きく異なり、あたかも異なる二つの疾患の如くであった。また、N-myc増幅を示す症例は、ほぼ全例CIMP陽性であり、CIMPがN-myc増幅に先行することが示唆されていた。本年度の、全く異なる症例を用いた解析でも、これらの知見は忠実に再現され、CIMPの新規予後マーカーとしての活用は臨床研究に値すると思われる。また、今回の症例では、N-myc増幅陽性例23例は全てCIMP陽性であった。今後、CIMPとN-myc増幅の関連を明らかにすることが重要である。

非プロモーター領域CpGアイランドのメチル化は、遺伝子サイレンシングの原因とならないために、従来、あまり解析されてこなかった。今回、神経芽細胞腫でのCIMPの検出には、プロモーター領域よりも、それ以外の領域のCpGアイランドの方が良いことが明確に示された。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のではないかと考えられる。

CIMPが神経芽細胞腫の予後不良を誘発する機構としては、分化や増殖抑制に重要な遺伝子が、異常メチル化によりサイレン

シングされることが考えられる。実際、RASSF1A及びBLUは、CIMP陽性の神経芽細胞腫症例で、より高頻度にメチル化されていた。現在、CIMPの標的遺伝子を同定しつつある。また、CIMPの分子機構の解明、治療の標的としての検討なども、重要な研究課題である。

(2) 乳がんでのメチル化異常とサイレンシング

乳がん手術材料でプロモーター領域CpGアイランドがメチル化されていた遺伝子13個のうち、11個はHMECで発現していない遺伝子であった。我々の以前の膝がんでのメチル化異常の網羅的探索でも、27個中10個は発現していない遺伝子であった。また、メラノーマでも同様の傾向が得られつつある。従って、正常細胞で転写されていない遺伝子については、プロモーター領域CpGアイランドのメチル化が起こりやすい可能性がある。

FOXA2は、winged helixの核内転写因子をコードし、肺の器官形成や上皮の分化に重要な役割を果たす。XT3は、Na⁺及びCl⁻に共役したトランスポーターをコードし、小さな親水性の分子が細胞膜を透化するのに重要な役割を果たす。これらの遺伝子の乳腺における働きは知られておらず、そのサイレンシングが乳腺発がんにどのように関与するのかも全く不明である。

乳がん手術材料特異的なメチル化を認めた15遺伝子も、他の組織ではより容易にメチル化される可能性がある。今後、リンパ組織等でもメチル化されないことが確認されたものについては、鋭敏に検出可能であるというDNAメチル化の特性を活かして、がん細胞検出のためのマーカーとして開発を進める。

E. 結論

神経芽細胞腫において、CIMPの有無は非常に強力な予後因子である。今後、予後マーカーとしての実用化、CIMPとN-myc増幅との因果関係の有無の解明、CIMPの標的と

なるプロモーター領域CpGアイランドの同定、CIMPの分子機構の解明、治療の標的としての検討など、多くの研究課題がある。一方、転写量が少ない遺伝子がメチル化によるサイレンシングを受けやすいことは、メチル化サイレンシングの標的遺伝子特異性決定の機構として、極めて重要である。

F. 健康危険情報

特に該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T, Ushijima T. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer*, in press.
2. Imura M, Yamashita S, Cai LY, Furuta JI, Wakabayashi M, Yasugi T, Ushijima T. Methylation and expression analysis of 15 genes and three normally-methylated genes in 13 ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett*, in press.
3. 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.
4. Ushijima T, Okochi-Takada E. Aberrant methylations in cancer cells: Where do they come from? *Cancer Sci*, 96: 206-211, 2005.
5. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 5: 223-231, 2005.
6. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol*, 35: 293-301, 2005.
7. 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*, 116: 407-414, 2005.

8. 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.

(2) 学会発表

1. Ushijima T. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. Ventura, Gordon Research Conference, January, 2005.
2. 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. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Anaheim, April, 2005.
3. Ushijima T, Maekita T, Watanabe N, Okochi-Takada E. Endogenous and exogenous origins of aberrant DNA methylation. 9th International Congress on Environmental Mutagens, San Francisco, September, 2005.
4. Okochi-Takada E, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Sugimura T, Ushijima T. A sensitive detection system for demethylating agents: potential carcinogens and chemotherapeutic agents. 9th International Congress on Environmental Mutagens, San Francisco, September, 2005.
5. Abe M, Yamashita S, Okochi-Takada E, Ushijima T. Utilization of aberrant DNA methylation that does not cause gene silencing.

Genome-Wide Epigenetics 2005, Tokyo, November, 2005

6. Ushijima T, Maekita T, Nakajima T. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae, and its association with gastric cancer risk. 10th Korea-Japan Cancer Research Workshop. Tokyo, December, 2005.
7. 前北隆雄、一瀬雅夫、牛島俊和 新規胃がんリスクマーカーとしての胃粘膜DNAメチル化異常の有用性 第91回日本消化器病学会総会 2005年4月
8. 牛島俊和 DNAメチル化のがん診断・治療への応用 第91回日本消化器病学会総会特別講演 2005年4月
9. 宮本和明、福富隆志、明石-田中定子、長谷川匡、浅原利正、牛島俊和 乳癌におけるDNAメチル化異常：バイオマーカーの候補として 第13回日本乳癌学会総会 2005年6月
10. 前北隆雄、中沢和之、中島健、三原真美、清水靖仁、杉村隆、斉藤大三、一瀬雅夫、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による異常DNAメチル化の高度の蓄積 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
11. 牛島俊和 内因性と外因性のDNAメチル化異常誘発機構 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
12. 阿部雅修、大平美紀、高戸毅、中川原章、杉村隆、牛島俊和 神経芽細胞腫の予後不良の原因となりうるサイレンシング遺伝子の同定 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
13. 大河内(高田)江里子、若林美香、市村静江、杉村隆、牛島俊和 高感度・高特異度をもつDNA脱メチル化剤検出系の開発 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
14. 中島健、前北隆雄、小田一郎、後藤田卓志、杉村隆、一瀬雅夫、斉藤大三、牛島俊和 新規胃がんリスクマーカーとしての胃粘膜DNAメチル化異常の有用性の検討 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
15. 牛島俊和 がんでのDNAメチル化異常の内因性と外因性の起源 日本人類遺伝学会第50回大会 2005年9月
16. 福田安伸、大河内(高田)江里子、伊東文生、杉村隆、牛島俊和 膵管上皮細胞において脱メチル化により発現誘導される遺伝子の網羅的解析 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
17. 若林美香、大河内(高田)江里子、市村静江、渡邊直子、杉村隆、牛島俊和 CpGアイランドのメチル化誘発における「メチル化の種」の重要性 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
18. 渡邊直子、杉村隆、牛島俊和 CpGアイランドが様々にメチル化されたHCT116由来細胞株パネルの構築 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
19. 古田淳一、梅林芳弘、延山嘉真、大塚藤男、杉村隆、牛島俊和 メラノーマにおけるPeroxisome protein 22のサイレンシング 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
20. 牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による異常DNAメチル化の高度の蓄積 第59回国立病院総合医学会 2005年10月
21. 阿部 雅修、大平美紀、高戸毅、中川原章、杉村隆、牛島俊和 CpGアイランドメチル化形質陽性の神経芽細胞腫における標的サイレンシング遺伝子の同定、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況
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）
分担研究報告書

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

分担研究者 金井 弥栄 国立がんセンター研究所部長

研究要旨：前がん段階にある可能性のある炎症性背景を伴う末梢膵管上皮において、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の蛋白発現が組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮に比して既に有意に亢進し、複数のがん関連遺伝子における DNA メチル化が既に蓄積していた。前がん病変 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) から膵管がんへと、DNMT1 蛋白発現は更に段階的に亢進し、がん関連遺伝子の DNA メチル化が更に蓄積していた。DNMT1 蛋白発現亢進ならびにがん関連遺伝子の DNA メチル化蓄積は膵管がんの分化度と有意に相関し、DNMT1 蛋白発現亢進は膵管がんの浸潤性増殖・症例の予後と有意に相関した。DNA メチル化の変化は前がん段階から浸潤性膵管がんの悪性進展に到るまで、難治がんである膵がんの多段階発生過程に継続して寄与し、膵がん症例の予後予測指標となりうると考えられた。組織標本上で解析すると、DNMT1 蛋白発現亢進はがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積とよく相関したため、膵がんの多段階発生過程において DNMT1 の蛋白発現亢進が領域的な DNA メチル化亢進に寄与する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、難治がんである膵がんの多段階発生過程における、DNA メチル化の変化の意義ならびに DNA メチル化の変化が惹起される機構の理解をすすめることを目的とする。具体的には、前がん状態や微小な前がん病変を含む、多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体において、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現・複数のがん関連遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を解析し、予後を含む症例の臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することによって、DNA メチル化の変化の膵がんの多段階発生過程への寄与の有無

を見極める。さらに、組織標本上で DNMT1 の発現と DNA メチル化の状態の相関を詳細に検討することによって、in vivo の正に病変の現場において、DNMT1 が領域的な DNA メチル化の亢進に寄与するかどうかを検証する。

B. 研究方法

膵管がん 100 症例の切除標本中の、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮 48 検体・炎症性背景を伴う末梢膵管上皮 54 検体・前がん病変 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) 188 検体・浸潤性膵管がん 220 検体において、DNMT1 発現を免疫組織化学的に評価した。炎

症性背景を伴う末梢腺管は、浸潤するリンパ球により圍繞され、周囲の腺房は萎縮し、遷延する炎症の存在が示唆された。浸潤性腺管がんにはしばしば組織学的多様性が見られたので、100 症例より 220 の領域を検討の対象として選択した。内訳は高分化腺がん成分 58 検体・中分化腺がん成分 114 検体・低分化腺がん成分 48 検体である。抗ヒト DNMT1 ヤギポリクローナル抗体 (N16, 1000 倍希釈, Santa Cruz 社製) を用いた。同抗体の反応の特異性はウエスタン法等で既に確認している。浸潤リンパ球を内部標準として用いた。全ての検体において抗 DNMT1 抗体による染色性は核にのみ見られ、細胞質や細胞膜に陽性所見を認めなかった。各検体の上皮性細胞 500 個に対し核における染色性を示した細胞の比率を算出して、DNMT1 蛋白発現陽性率とした。

次に、DNMT1 の蛋白発現亢進が実際に DNA メチル化の変化に結びついているかどうかを確認するため、組織マイクロダイセクション法により、周囲の腺房細胞・浸潤リンパ球・間質細胞の混入を排除して、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腺管上皮 13 検体・炎症性背景を伴う末梢腺管上皮 20 検体・PanIN 40 検体・浸潤性腺管がんより 147 領域を採取した。微小なマイクロダイセクション検体において DNA メチル化の状態を解析するために、神戸大学大学院分子病理学分野の北澤莊平助教授と共同で改良したアガロースビーズ封入メチル化特異的 PCR 法を採用し、p14・p15・p16・p73・APC・hMLH1・MGMT・BRCA1・GSTP1・TIMP-3・CDH1・DAPK-1 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を評価した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。病理組織標本作成後の残余の組織を採取することなどにより、患者への不利益を生じさせなかった。連結可能匿名化して解析をおこない、患者のプライバシーを遵守した。国立がんセンター倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腺管上皮においては抗 DNMT1 抗体による染色性をほとんど認めなかったが、遷延する炎症の存在を示唆するリンパ球浸潤と腺房の萎縮を伴うとき、末梢腺管上皮内に DNMT1 蛋白発現陽性細胞を散見した。DNMT1 蛋白発現陽性率は、炎症性背景を伴う末梢腺管上皮において、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腺管上皮に比して既に有意に亢進していた ($p=0.0003$)。DNMT1 蛋白発現陽性率は PanIN において更に有意に亢進した ($p<0.0001$)、PanIN I から PanIN II へとその異型度が亢進するとともに更に有意に亢進した ($p=0.0012$)。DNMT1 蛋白発現陽性率は PanIN に比し浸潤性腺管がんにおいて更に有意に亢進し ($p<0.0001$)、浸潤性腺管がんの中でも腫瘍が低分化になるとともに更に有意に亢進した ($p<0.0001$)。同一症例内でも、高分化腺がん成分・中分化腺がん成分・低分化腺がん成分へと DNMT1 蛋白発現陽性率が概して段階的に亢進していた。

上記のようにがん部において DNMT1 蛋白発現の heterogeneity を認めたの

で、各症例の最大断面の切片全域を再評価し、全てのがん細胞の20%以上の核に染色性を認めるとき DNMT1 高発現例・全てのがん細胞の20%未満の核に染色性を認めるとき DNMT1 低発現例とした。症例毎の DNMT1 発現レベルは年齢と相関せず、わが国の膵がん取り扱い規約において、膵前方被膜・後腹膜脂肪織・胆管・十二指腸壁・門脈系・総肝動脈・上腸間膜動脈・脾動脈系・腹腔動脈・大動脈への進展の程度を反映するtカテゴリー ($p=0.0224$) と、診断時の病期 ($p=0.0294$) と有意に相関した。膵がんは難治がんであり術後1年の死亡率は DNMT1 高発現例・低発現例とも高値を示したが、術後2年目以降に両症例群の生存率に差異が見られ、DNMT1 高発現例が有意に予後不良であることが分かった ($p=0.0469$)。

検討に供した12のがん関連遺伝子のうち1遺伝子以上のDNAメチル化を認める頻度は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮(60%)において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮(15.4%)に比して既に有意に亢進しており ($P=0.0151$)、PanIN(67.5%, $P=0.0014$)から浸潤性膵管がん(98.3%, $P<0.0001$)へと更に有意に亢進していた。メチル化されたがん関連遺伝子の数は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮 (0.85 ± 0.88)において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮 (0.15 ± 0.38)に比して既に有意に増加しており ($P=0.0224$)、PanIN (0.95 ± 0.85 , $P=0.0028$)から浸潤性膵管がん (2.50 ± 1.35 , $P<0.0001$)において更に有意に増加していた。マイクロダイセクション法によって採取した領域の腫瘍の分化度とメチル化されたがん関連遺伝子の数の関係を検討したとこ

ろ、その領域が低分化であるほどがん関連遺伝子のDNAメチル化が蓄積していることが分かった ($p=0.0249$)。何れの組織検体においても、DNAメチル化の状態と患者の年齢との間に相関を認めなかった。

浸潤性膵管がんにおいては、BRCA1・APC・p16・TIMP-3 遺伝子のDNAメチル化を高頻度に認めた(各々60.3%・58.6%・39.3%・30.9%)。APCならびにp16遺伝子におけるDNAメチル化の頻度は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮からPanIN、浸潤性膵管がんへと段階的に亢進していた。BRCA1・GSTP1 遺伝子におけるDNAメチル化も、前がん状態において既に検出された。特にBRCA1遺伝子のDNAメチル化は、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮において浸潤性膵管がんに比しても高頻度で、炎症が直接特定の遺伝子のDNAメチル化を惹起する機序の存在が考慮された。逆にがんの浸潤に寄与すると推測されるTIMP3遺伝子は、浸潤性膵管がんではDNAメチル化を受けていたが、前がん状態におけるDNAメチル化は認められなかった。組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮においても、一部の遺伝子については低頻度にDNAメチル化を認めたが、膵管がん症例より採取された末梢膵管上皮は組織学的に特記すべき所見を示さなくても既に発がん物質などに暴露されているか、これらの遺伝子が組織特異的あるいは臓器特異的にDNAメチル化を受けている可能性があると考えられた。

同一のがんからマイクロダイセクション法によって採取した全ての領域に同時にDNAメチル化を認めるときその遺伝子についてDNAメチル化のheterogeneity陰性、それ以外の場合その遺伝子についてDNAメチル化の

heterogeneity 陽性とした。浸潤性膵管がんにおいては各遺伝子について DNA メチル化の heterogeneity を認めしたが、APC 遺伝子において DNA メチル化の heterogeneity の頻度は最も低く (30.8%)、APC 遺伝子が DNA メチル化を受けるとサブクローナルな悪性進展過程で優位性を保持しやすい等の可能性があると考えられた。

各症例の最大断面の切片全域で評価した DNMT1 の蛋白発現レベルとがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積の間に、有意な相関があることが分かった ($p=0.0324$)。免疫染色標本においてマイクロダイセクション法により採取した領域を再鏡検して評価しても、DNMT1 の蛋白発現レベルとがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積との間に有意な相関があることが確認された ($p=0.0093$)。

D. 考察

浸潤性膵管がんはしばしば慢性膵炎に引き続いて発生するので、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮の少なくとも一部は、前がん段階にある可能性がある。炎症性背景を伴う末梢膵管上皮において、DNMT1 の蛋白発現が組織学的に特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮に比して既に有意に亢進し、がん関連遺伝子の DNA メチル化が既に蓄積していた。DNMT1 の発現亢進を背景とする領域的な DNA メチル化亢進は、膵がんの多段階発生過程に極めて早期から寄与する可能性があると考えられた。

PanIN から浸潤性膵管がんへと、DNMT1 蛋白発現は更に段階的に亢進し、がん関連遺伝子の DNA メチル化が更に蓄積していた。DNMT1 蛋白発現ならびにがん関連遺伝子の DNA メチル化蓄積は膵管がんの分化度と有意に相関し、

DNMT1 蛋白発現は膵管がんの浸潤性増殖とも有意に相関したことから、DNA メチル化の変化は前がん段階から浸潤性膵管がんの悪性進展に到るまで、膵がんの多段階発生過程に継続して寄与する可能性があると考えられた。DNMT1 蛋白発現は膵管がん症例の予後と有意に逆相関したので、生検・手術材料において抗 DNMT1 抗体を用いた免疫組織化学的検討を施行することにより、症例の予後予測に有益な情報が得られる可能性があると考えられた。

DNMT1 蛋白発現亢進は、症例ごとの検討でも個々のマイクロダイセクション領域においても、がん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積とよく相関した。DNMT1 は従来維持メチルトランスフェラーゼであると考えられてきたが、近年培養細胞に DNMT1 を高発現させると de novo メチル化も惹起されるとの報告が集積している。さらに、昨年度までの検討で分担研究者は消化管がん・膀胱がん等における DNMT1 の発現亢進と CpG アイランドメチル化形質の有意な相関を証明しており、膵がんの多段階発生過程においても DNMT1 の蛋白発現亢進が領域的な DNA メチル化亢進に寄与する可能性があると考えられた。

E. 結論

DNMT1 の発現異常を背景とするがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積は、難治がんである膵がんに対する前がん段階から悪性進展に到るまで、継続して寄与すると考えられた。DNA メチル化の変化は多段階発がん過程に伴って見出されるので、DNA メチル化の変化に着目した発がんリスクの評価・がんの早期診断・病態診断の実用化が期待される。今後、DNA メチ

ルトランスフェラーゼをはじめとする DNA メチル化制御機構の構成分子の中に、がんの予防・治療標的分子の候補を挙げることを目指して研究を進める。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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*, 173: 1767-1771, 2005.
3. Peng D-F, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci*, 96: 403-408, 2005.
4. Chihara Y, Sugano K, Kobayashi A, Kanai Y, Yamamoto H, Nakazono A, Fujimoto H, Kakizoe T, Fujimoto K, Hirohashi S, Hirao Y. Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab Invest*, 85: 895-907, 2005.
5. Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Kanai Y, Murakami Y. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, 118: 916-923, 2006.
6. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding non-tumorous renal tissues. *Int J Cancer*, in press.
7. Peng D-F, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*, in press.
8. Kanai Y, Arai E, Etoh T. Role of immunohistochemical expression of DNA methyltransferase 1 protein in gastric carcinoma. In: *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas. Vol. 4: Molecular Genetics, Gastrointestinal*

Carcinoma, and Ovarian Carcinoma
(ed. Hayat M. A.) , Elsevier, CA,
in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし。

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）
分担研究報告書

がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学学長

研究要旨

がん克服に向けた臨床応用への展開を念頭に、発がんおよび進展に関連する遺伝子異常であるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) について多段階消化器発がんにおけるジェネティック・エピジェネティックな異常を網羅的、系統的に解析し、RAS/RAF pathwayを中心に分子異常を明らかにした。BRAF遺伝子変異解析を組み込み開発したHNPCCスクリーニング法の有用性を示すとともに、RASSF1A、RASSF2をはじめとするRASSFファミリーのエピジェネティックな異常、さらに、MSI陽性大腸がんにおけるエフリンリセプターEphB2の不活化の機序を明らかにした。また、WntアンタゴニストであるWIF-1のエピジェネティックな不活化は、消化器がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにした。いずれの知見も診断に加え、分子標的治療などの臨床応用への展開が期待できるため、今後はさらにこの点の応用を進めていきたい。

A. 研究目的

DNAの複製エラーを修復するDNAミスマッチ修復系の異常による単純繰り返し配列の遺伝子不安定性つまりマイクロサテライト不安定性

(microsatellite instability; MSI) は、遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC)、散発性の胃・大腸・子宮がん、重複・多発がんなどの発がん・進展機構として極めて注目されている。

MSIの有無によりがんの病態は大きく異なることから、MSI陽性発がん機構の解明は、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に欠かせないものである。さらに高齢者の右側大腸がんの増加とともに、MSI陽性がんの発生頻度は増加している他、MSIと重複・多発がんとの関連、治療に伴う二次発がん、HNPCCの効果的なスクリーニング法の必要性などを考慮すると、MSI陽性発がん機構の解明は、厚生労働行政における対がん総合戦略のひとつとし

て極めて重要である。

本研究課題では、多数のMSI陽性がん、HNPCCにおいて、シグナル伝達系の異常を中心に、ジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常を網羅的、系統的に解析し、MSI陽性がんの多段階発がん分子病態を明らかにすることを目的とする。興味深い遺伝子に関しては、MSI陰性がんも含めた消化器がんを対象とした。発がんおよび進展機構の解明を通じて、明らかにした重要な分子異常を糸口に、がんの予防・診断・治療に亘り臨床医学における新局面を拓くことおよびがん制御を展望する。

B. 研究方法

1. 消化器がんにおけるMSI解析

HNPCC患者の大腸がんおよび大腸腺種、散発性大腸がん、胃がん、食道扁平上皮がん、膵臓がんのがん部および隣接非がん部組織より、DNAを抽出し、国際ガイドラインに基づき、マイクロ

サテライトマーカ―を用いて、MSIを検索した。同様に大腸がんをはじめとする各種がん細胞株のMSIをBAT26マーカ―で解析した。

2. 大腸がんにおけるRAS/RAF異常

BRAF遺伝子の変異をsingle strand conformation polymorphism (SSCP)とシーケンスにより解析した。RASSF1A遺伝子のDNAメチル化をmethylation-specific PCR (MSP)を用いて解析した。RASSF2-6のメチル化をCOBRA法およびbisulfite sequencing法により解析した。また、RT-PCR法を用いてmRNA発現を解析した。

3. 大腸がんにおけるEphB2遺伝子異常の解析

MSI陽性大腸がん246症例、MSI陽性大腸腺種29症例、MSI陰性大腸がん41症例を対象とした。また、MSI陽性24種およびMSI陰性20種の計44種の大腸がん細胞株を対象とした。

EphB2遺伝子の(A)9領域における遺伝子変異をPCRおよびDNAシーケンスにより解析した。EphB2遺伝子プロモーター領域のメチル化を特異的プライマーを用いたMSP法により解析した。SW620大腸がん細胞株を脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 0、2、5、10 mmol/Lで72時間処理した。処理後の細胞株から蛋白質を抽出し、抗EphB2抗体を用いたウエスタンブローディングを行った。

4. 消化器がんにおけるWIF-1遺伝子異常の解析

食道扁平上皮がん、胃がん、大腸がん、膵がんの各細胞株および組織を対象に、RT-PCR、real-time RT-PCR、western blottingによる発現解析。SSCPおよびDNA sequencingによる変異

解析。Bisulfite sequencing、MSP、real-time quantitative MSPによるDNAメチル化解析。5-aza-dC、trichostatin A (TSA) 処理後の再発現実験。Colony formation assay、TOPflash assay、Soft agar assayにより系統的に解析した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針に関する倫理指針」を遵守した。すなわち、提供者から十分なインフォームド・コンセントを得ることとし、人間の尊厳及び人権を尊重し、実施試料等提供者やその家族、血縁者の人権を科学的、社会的な利益より優先し、適正に研究を行った。

C. 研究結果

1. 大腸がんにおけるRAS/RAF異常

BRAF遺伝子変異のhot spot変異はコドン600のバリンからグルタミン酸へのミスセンス変異(V600E変異)である。hMSH6遺伝子生殖細胞変異陽性の14例、アムステルダム基準IIを満たすが、hMLH1、hMSH2、hMSH6遺伝子いずれにも変異を認めない13例、さらにBethesda基準のみ満たす臨床的HNPCCの計37例のいずれにおいてもBRAF遺伝子変異を検出しなかった。

RASSF1A遺伝子のメチル化をMSPにより解析した。RASSF1A遺伝子メチル化は、散发性MSI陽性大腸がんでは52%、HNPCCでは30%で陽性であった。散发性MSI陽性大腸がんの36%で、RASSF1Aメチル化とK-rasあるいはBRAF遺伝子変異を認めた。一方、HNPCCでは、8%においてのみRASSF1Aメチル化とK-ras遺伝子変異を認め、2つ以上の分子異常を認める頻度は、散发性MSI陽性大腸がんに比べ有意に低かった。また、RASSF1Aのメチル化は低分化度と相関

した。

RASSF2-6では、RASSF2、RASSF5のメチル化を大腸がんのそれぞれ、42%および8%において検出したが、RASSF3、RASSF4、RASSF6のメチル化を認めなかった。メチル化の頻度は、MSI陽性がんとは陰性がんでは有意な差を認めなかった。RASSF2のメチル化は、mRNA発現低下と相関した。

2. 大腸がんにおけるEphB2遺伝子異常の解析

EphB2遺伝子(A)9領域の変異を解析し、MSI陽性大腸がん細胞株の9種(37.5%)に1bpのdeletionを検出した。同様に、MSI陽性大腸がん組織246症例中101症例(41%)に変異を検出したが、正常組織では変異を検出できなかった。変異と臨床病理学的因子との相関を認めなかった。リン酸化によりkinase活性を調節していると考えられるS1048、S1052が検出された全ての変異で、不活化されていた。MSI陽性大腸腺種での変異は29例中6症例(20.7%)で、MSI陽性大腸がんでは有意に頻度が高かった。

EphB2遺伝子プロモーター領域のメチル化をMSPで解析した。大腸がん101症例中54症例(53.4%)でメチル化を検出した。メチル化は、MSI陽性がん(55%)とMSI陰性がん(51.2%)で有意な差を認めず、臨床病理学的因子との相関も認めなかった。変異との関連では、MSI陽性がん60症例中30症例(50%)で変異とメチル化の両方が陽性、22症例(36.7%)で変異のみ陽性、3症例(5%)でメチル化のみ陽性、5症例(8.3%)でともに陰性であった。

大腸がん細胞株20種中5種(25%)でメチル化を認め、メチル化陽性SW620細胞株の5-aza-dC処理によりEphB2の再発現を認めた。

3. 消化器がんにおけるWIF-1遺伝子異常の解析

WIF-1の発現は多くの消化器がん細胞株で著明に低下し、bisulfite sequence法、MSPで認めたWIF-1遺伝子のプロモーター領域の過剰メチル化と相関していた。WIF-1発現が消失・低下している消化器がん細胞株において、5-aza-dCおよびTSA処理によりWIF-1の再発現を認めた。また、WIF-1の発現は消化器がん組織において高頻度で低下し、プロモーター領域の過剰メチル化と相関していた。TE-1食道がん細胞株およびSW48大腸がん細胞株にWIF-1遺伝子導入を行い、TOPflash assay、colony formation assay、soft agar assay等によりWIF-1遺伝子の機能解析を行ったところ、導入株においてWntシグナルの抑制、細胞増殖能の低下、足場非依存性増殖の抑制を認めた。

D. 考察

がんに関連する遺伝子異常のひとつとしてMSIについて大腸がんを対象に、ジェネティックおよびエピジェネティックな異常を系統的に解析した。これまで、BRAF遺伝子変異は、HNPCCにおいて検出せず、散发性MSI陽性大腸発がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、HNPCC(hMLH1あるいはhMSH2遺伝子異常例)で変異を検出しないことから散发性MSI陽性大腸発がんとの鑑別診断に応用できる可能性を示してきた。今回、hMSH6遺伝子変異陽性例やBethesda基準のみ満たす臨床的HNPCCなど遺伝性が示唆される症例においてもBRAF遺伝子変異を認めないことを明らかにし、これまでに開発した新規HNPCCスクリーニングプロトコール

が有用であることが示唆された。

散发性MSI陽性大腸がんとHNPCCは、DNAミスマッチ修復遺伝子の不活化機構が異なり、前者が主にhMLH1遺伝子のメチル化、後者が主にhMLH1あるいはhMSH2遺伝子の変異によるが、他のphenotypeや遺伝子異常は共通している点が多い。このことが逆に、両者の鑑別診断を困難にしている要因のひとつである。フレームシフト変異の標的遺伝子など多くの共通性を有する散发性MSI陽性大腸がんとHNPCCにおいて、BRAF遺伝子変異の関わりについて著明な差を認めたことは、多段階発がんの分子機序の解明だけでなく、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ため、極めて重要な新知見である。現在、血清診断の実用化を目指している。

今後、BRAF/K-ras遺伝子変異の分子機構を解析することにより大腸発がん機構の詳細が一層明らかになり、効果的なchemopreventionの開発等への発展性も期待できる。

エピジェネティックな異常に関してもHNPCCと散发性MSI陽性大腸がんにおける有意な差を網羅的に明らかにし、個々の遺伝子ではRASSF1A遺伝子のメチル化が散发性MSI陽性大腸がんに多いことを示した。BRAF遺伝子とK-ras遺伝子変異の逆相関とは対照的に、RASSF1A遺伝子メチル化異常は、両遺伝子変異とは独立したエピジェネティックな異常であると考えられた。

また、RASSF1A遺伝子に加え、RASSF2遺伝子のメチル化による不活化を明らかにした。RASSF2のメチル化は、K-rasおよびBRAF遺伝子変異を有する腫瘍において高頻度に認められたことから、Rasシグナルの活性化に加えて、Rasを負に制御するRASSFファミリ

ーの不活化が重要であることが示唆された。

最近、エフリンリセプターEphB2の不活化が大腸発がんにおいて極めて重要であることが報告され (Nature 2005) 注目されているが、本研究では、EphB2がHNPCCおよび散发性MSI陽性大腸がんにおいて、(A)9の繰り返し配列の変異とメチル化により不活化されていることを明らかにした。MSI陽性大腸腺種に比べ大腸がんにおいて変異の頻度が高かったことから、EphB2遺伝子変異は、大腸発がん早期からの役割に加え、がん化の段階で重要であることが示唆された。また、メチル化は、MSI陰性がんにおいても高頻度で検出されたことから、MSIに関係なく、広く診断等への臨床応用が期待できると考えられた。

多くの消化器がん細胞株及び組織におけるWIF-1の発現低下とプロモーター領域の過剰メチル化との相関およびがん細胞株における再発現実験から、WIF-1発現のエピジェネティックな不活化は、Wntシグナル活性化を介して、消化器がんにおいて重要な働きをしていると考えられた。早期大腸がんや大腸腺腫において高頻度でメチル化による発現低下を認めたことからWIF-1の不活化は大腸発がんの早期から重要であることが示唆された。WIF-1遺伝子導入実験によってWIF-1の腫瘍抑制機能が示されたことから、消化器発がん・進展におけるWIF-1の不活化の重要性が示唆された。

Wnt pathwayの遺伝子異常として、MSI陽性がんでは、APC遺伝子のメチル化の頻度が低い一方で、 β -カテニンやAXIN2の変異が特徴である。一方、WntアンタゴニストであるWIF-1のメチル化は、MSIの有無で有意な差を認めなかった。この結果は、RASSFファミリ

一遺伝子やEphB2遺伝子のメチル化と同様であり、今後、これらの遺伝子メチル化および過剰メチル化フェノタイプとMSIの関連について更に解析を進める必要がある。

研究成果の意義及び今後の発展性として、本知見を基盤としてさらなるがん進展の分子機序の解明や診断、治療などの臨床応用が期待される。まず、MSI陽性大腸がんの多段階発がん分子病態の解明において大きな意義がある。BRAF遺伝子変異解析は、血清診断の実用化への発展が期待できる。RASSFファミリーおよびEphB2の異常も病態解明に加えて臨床応用可能な成果であり大きな意義がある。今後さらなる分子診断や分子標的治療への応用、他のがん種の多段階発がん機構の解明へと発展性が期待でき、がんの予防・診断・治療に亘り臨床医学における新局面が拓かれることが期待できる。がん克服、国民福祉の向上、医療費の抑制など厚生労働行政に与えるインパクトは極めて大きいと考えられる。

これまでに、MSI陽性大腸がんを中心に発がん・進展に深く関わるジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子異常が着実に明らかになっており、今後さらにMSI陽性がんを中心として消化器がんの多段階発がん・進展機構の全貌の解明およびがんの予防・診断・治療応用への展開を目指す。

E. 結論

BRAF遺伝子変異解析を組み込み開発したHNPCCスクリーニング法は、有用であること、また、大腸がんにおけるRASSFファミリー遺伝子のエピジェネティックな異常の重要性およびエフリンリセプターEphB2の不活化の分

子機序を明らかにした。さらに、WIF-1のエピジェネティックな不活化は、消化器がんにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上の研究成果はヒト多段階発がん機構の解明において大きな意義がある。診断や分子標的治療への臨床応用や他のがん種の多段階発がん機構の解明へと発展性が期待でき、がん克服へ向けた重要な新知見であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology*, 129: 156-169, 2005.

2) Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Arango D. Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res*, 65: 10170-10173, 2005.

3) Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S Jr, Hofstra RMW. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*, 24: 3995-3998, 2005.

4) Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto M, Oki M, Noshō K, Imsumran A, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, 24: 7946-7952, 2005.

5) 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*, 54: 591-600, 2005.

6) Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Sato T, Suga T, Shinomura Y, Imai K. Tumor matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. *Gut*, 54: 1751-1758, 2005.

7) Nosho K, Yoshida M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Hinoda Y, Imai K. Association of Ets-related transcriptional factor ELAF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26: 892-899, 2005.

8) Nosho 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*, 92: 1193-1200, 2005.

9) Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Sasaki Y, Akino K, Ueno M, Takahashi F, Kusano M, Mita H, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 1021-1027, 2005.

2. 学会発表

1) Yamamoto H, Shinomura Y, Imai K. New Development in microsatellite instability research in gastrointestinal cancer. The 64th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2005, Sapporo.

2) Takahashi T, Yamamoto H, Adachi Y, Nosho K, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, Mikami M, Sasaki S, Arimura Y, Endo T, Shinomura Y, Imai K. Molecular etiology of MSI-positive colorectal carcinogenesis from the aspect of alterations in the RAS/RAF/MAPK signal pathway. The 64th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2005, Sapporo.

3) Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nosho K, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Arimura Y, Endo T, Imai K. Molecular etiology of MSI-positive gastrointestinal carcinogenesis by the analysis of the RAS/RAF signal pathway. The 1st Annual Meeting of the Japanese Gastroenterological Association, 2005, Nagoya.

4) Adachi Y, Imsumran A, Yamamoto H, Min Y, Nosho K, Itoh F, Lee C-T, Park KH, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Insulin-like growth factor-I receptor is a candidate molecular target for human esophageal squamous cell cancer. The 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2005, Anaheim.

5) Adachi Y, Imsumran A, Yamamoto H, Piao W, Shinomura Y, Lee C-T, Carbone DP, Imai K. IGF-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. The 33rd Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2005, Rhodes.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Shibata T, Uryu S, Kokubu A, <u>Hosoda F</u> , Ohki M, Sakiyama T, Matsuno Y, Tsuchiya R, <u>Kanai Y</u> , Kondo T, Imoto I, <u>Inazawa J</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathological features.	Clin Cancer Res	11	6177-6185	2005
Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Loukopoulos P, <u>Kanai Y</u> , Kosuge T, Fukayama M, Kondo T, <u>Sakamoto M</u> , <u>Hosoda F</u> , Ohki M, Imoto I, <u>Inazawa J</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome.	J Hepatol	43	863-874	2005
Peng W-X, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Tsuchiya R, <u>Kanai Y</u> , <u>Hosoda E</u> , Sakiyama T, Ohki M, Imoto I, <u>Inazawa J</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Array-based comparative genomic hybridization analysis of high-grade neuroendocrine tumors of the lung.	Cancer Sci	96	661-667	2005

Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Matsuno Y, <u>Kanai Y</u> , Asamura H, Tsuchiya R, <u>Hirohashi S</u> .	Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung.	Lung Cancer	50	1-8	2005
Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Fukayama M, <u>Kanai Y</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma.	Am J Pathol		in press	2006
Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, <u>Kanai Y</u> , Kitajima M, <u>Hirohashi S</u> .	Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma.	Clin Cancer Res	11	2531-2539	2005
Nishizawa A, Nakanishi Y, Yoshimura K, Sasajima Y, Yamazaki N, Yamamoto A, Hanada K, <u>Kanai Y</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: Immunohistochemical analysis of 115 patients.	Cancer	103	1693-1700	2005
Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, <u>Imai K</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic β -catenin protein.	Oncogene	24	3141-3153	2005
Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, <u>Imai K</u> , <u>Hirohashi S</u> .	Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/ β -catenin complex.	Gastroenterology	128	1919-1936	2005
Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, <u>Hirohashi S</u> .	Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer.	Gastroenterology	128	51-62	2005
Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, Ino Y, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, <u>Hirohashi S</u> , Yamada T.	E-cadherin regulates the association between β -catenin and actinin-4.	Cancer Res	65	8836-8845	2005

Sato S, Idogawa M, Hond K, Fujii G, Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, <u>Hirohashi S</u> , Yamada T.	β -catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing.	Gastroenterology	129	1225-1236	2005
Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, <u>Hirohashi S</u> .	Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer.	Cancer Sci	96	323-332	2005
Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, <u>Hirohashi S</u> .	Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye.	Proteomics	5	1411-1422	2005
Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, Gemma A, Kudoh S, <u>Hirohashi S</u> .	Proteomic signatures for histological types of lung cancer.	Proteomics	5	2939-2948	2005
Mori Y, Kondo T, Yamada T, Tsuchida A, Aoki T, <u>Hirohashi S</u> .	Two-dimensional electrophoresis database of fluorescence-labeled proteins of colon cancer cells.	J Chromatography B	823	82-97	2005
Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, <u>Hirohashi S</u> , Yamada T.	Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry.	J Urol	174	1213-1217	2005
Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Matsuno Y, Iwatsuki K, <u>Hirohashi S</u> .	Protein expression pattern distinguishes different lymphoid neoplasms.	Proteomics	5	4274-4286	2005
Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, Hara T, Umaki T, Tsuchida A, Aoki T, <u>Hirohashi S</u> , Yamada T.	Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling.	Clin Cancer Res	11	8042-8047	2005

Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, <u>Hirohashi S</u> , Yamada T.	Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling.	Cancaer Res	65	10613-10622	2005
Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Okano T, Yamada M, Yamada T, Iwatsuki K, <u>Hirohashi S</u> .	Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye.	Proteomics	6	1640-1653	2006
Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, <u>Hosoda F</u> , <u>Hirohashi S</u> , Ohki M, <u>Inazawa J</u> .	ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation.	Oncogene	24	8051-8060	2005
Misawa A, Inoue J, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, <u>Hosoda F</u> , Ohki M, Imoto I, <u>Inazawa J</u> .	Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 1I2 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification.	Cancer Res	65	10233-10242	2005
Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Ohno K, Imoto I, <u>Inazawa J</u> .	Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas.	Cancer Sci	96	676-683	2005
Tanami H, Tsuda H, Okabe S, Iwai T, Sugihara K, Imoto I, <u>Inazawa J</u> .	Involvement of cyclin D3 in liver metastasis of colorectal cancer, revealed by genome-wide copy-number analysis.	Lab Invest	85	1118-1129	2005

Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, <u>Hirohashi S</u> , <u>Inazawa J</u> , Imoto I.	Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers.	Hum Molec Genet	14	997-1007	2005
Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Ichikura T, Mochizuki H, Okanoue T, <u>Inazawa J</u> .	Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization.	Cancer Sci	96	100-110	2005
Imoto I, Izumi H, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, <u>Hosoda F</u> , Ohki M, <u>Hirohashi S</u> , <u>Inazawa J</u> .	Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small cell lung cancers.	Cancer Res		in press	2006
Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, <u>Hirohashi S</u> , <u>Sakamoto M</u> .	Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules.	J Hepatol	42	225-229	2005
Nakanishi K, <u>Sakamoto M</u> , Yamasaki S, Todo S, <u>Hirohashi S</u> .	Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.	Cancer	103	307-312	2005
Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, <u>Sakamoto M</u> .	Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer.	Clin Cancer Res		in press	2006
Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, <u>Murakami Y</u> .	TSLC (tumor suppressor in lung cancer)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis.	J Biol Chem	280	42164-42171	2005
<u>Murakami Y</u> .	Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis.	Cancer Sci	96	543-552	2005