

8. Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Yokoyama H, Munesue S, Kodera Y, Tatematsu M. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clin. Exp. Meta.* 22:137-147 (2005)
9. Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Tatematsu M. Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice. *Methods Mol Med.* 111:351-62 (2005)
10. Niwa T, Ikehara Y, Nakanishi H, Tanaka H, Inada K, Tsukamoto T, Ichinose M, Tatematsu M Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation. *J Histochem Cytochem.* 53(1): 75-85 (2005)
11. Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. Helicobacter pylori-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci.* 96(3):170-5, (2005)
- 第 64 回日本癌学会学術総会 (口演)
3. 中西速夫、小寺泰弘、池原 譲、伊藤 誠二、望月能成、大橋紀文、山村義孝、立松正衛、山村義孝、加藤知行 腹膜遊離癌細胞・微小転移の新しい診断・治療戦略 第 62 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)
4. 中西速夫、横山祐之、池原 譲、小寺泰弘、池原 早苗、中尾昭公、立松正衛 肝転移巣由来 HER2 高発現ヒト胃癌細胞株の gefitinib 感受性機構の解析 第 78 回日本胃癌学会総会 (ワークショップ)
5. Nakanishi, H., Yokoyama, Y., Ikehara, Y., Kodera, M., Tatematsu, M.: Anti-tumor effects of EGFR tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, on the HER2-overexpressing human gastric cancer cell lines derived from liver metastasis. *International Conference on Tumor Progression and Therapeutic Resistance. Poster, Philadelphia, USA, 2004.*
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

学会発表

1. 中西速夫、池原 譲、丹羽 徹、田口 修、立松正衛 TNF- α ノックアウトマウスを用いた腹膜転移の進展機構の解析 第 64 回日本癌学会学術総会 (口演)
2. 横山祐之、中西速夫、池原 譲、小寺泰弘、池原 早苗、中尾昭公、立松正衛 肝転移巣由来 HER2 高発現ヒト胃癌細胞株の gefitinib 感受性機構の解析

造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析

分担研究者 瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究 部長

研究要旨 粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫に関与する遺伝子異常 API2-MALT1 について詳細に解析を進め、(1)API2-MALT1 遺伝子の標的遺伝子のひとつが API2 であることを明らかにした。(2) また、MALT1 遺伝子の細胞局在を決定する NES(Nuclear Exporting Signal)を明らかにした。(3)これまでに確立した array CGH 法を用いて、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の ABC type と GCB type、マントル細胞リンパ腫、T/NK リンパ腫、急性前骨髄球性白血病に特徴的なゲノム異常を見出した。

A. 研究目的

1. MALT リンパ腫発症に関わる API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍化機能を調べるために、その標的遺伝子を明らかにする。
2. API2-MALT1 キメラ遺伝子の腫瘍化機能を調べるために、種々の欠失変異体を作成し、蛋白レベルの解析を行う。
3. これまでに確立した array CGH 法を用いて、種々の造血器腫瘍に特徴的なゲノム異常の有無を明らかにする。

B. 研究方法

1. API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索
MALT リンパ腫発症に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子導入細胞株と親株との間で発現差異のある遺伝子を Expression profiling 法で明らかにし、そのプロモーター領域を解析し、真の標的遺伝子あることを確認する。
2. API2-MALT1 の蛋白レベルの解析
API2-MALT1 の蛋白レベルの研究を進めるために、欠失変異体を含む種々の発現ベクターを構築し、細胞内での局在を調べる。
3. array CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析
これまでに確立した array CGH 法を用いて、新たな造血器腫瘍を解析し、病型特異的なゲノム異常を明らかにする。

C. 研究結果

1. API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索
MALT リンパ腫発症に関与する API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子導入細胞株を Hela 細胞株を樹立した。親株との間で発現差異のある遺伝子を Expression profiling 法で解析したところ、キメラ遺伝子の一方の遺伝子 API2 そのものが標的遺伝子であることが明らかとなった。そのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェレートをマーカーに転写活性を検討したところ、確かに標的であることが明らかとなった。プロモーター領域に存在する 3 つの NF- κ B 結合サイトを点突然変異を入れて、会席したところ、第一番目と第 3 番目の結合モチーフが主要な役割を担っていることが明らかとなった。
2. API2-MALT1 の蛋白レベルの解析
MALT リンパ腫発症に関与するキメラ遺伝子 API2-MALT1 の蛋白レベルの研究では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質と核を往復することが明らかとなった。種々の欠失変異体を作成し、検討したところ、その分子機構は、MALT1 に存在する Nuclear Exporting Signal (NES) が機能していることを明らかにした。また、BCL10 の細胞内局在にも NES シグナルが重要な働きを示していることを明らかにし

た。

3. array CGH 法による造血器腫瘍のゲノム異常の解析

今年度はマントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) の亜型 (GCB 型と ABC 型)、T/NK リンパ腫・白血病、TEL-AML1 キメラ型小児白血病について解析を進めた。

(1) マントル細胞リンパ腫では従来法 CGH で報告されていたとおり 11q22、13q21、13q34 の欠失が高頻度に認められた。その検出頻度は従来法の CGH よりも頻度が高かった。さらに、2q13 領域にホモ欠失を認め、その責任遺伝子が BCL2 蛋白と拮抗する機能を有する BIM 遺伝子であることを見出した。

(2) DLBCL の発現解析による細分類である GCB 型と ABC 型について、それぞれに特徴的なゲノム異常が見出されるかを検討したところ、GCB 型 DLBCL と ABC 型 DLBCL のゲノム異常様式は大きく異なっていることを明らかにした。ABC 型 DLBCL は 3q、18q と 19q の増幅、6q と 9p21 の欠失を特徴とし、GCB 型 DLBCL は 1q、2p、7q と 12q の増幅を特徴としていた。また、CD5+DLBCL は ABC 型とよく似ており、CD5-CD10+DLBCL は GCB 型とよく似ていることが明らかとなった。

(3) T/NK リンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病 (APL) の解析

Aggressive type の aggressive NK cell leukemia と Extranodal NK/T 細胞リンパ腫 (鼻型) は共に EB ウイルスが関連する aggressive 型として認識されており、類似性が指摘されていたが、今回の 27 症例を用いた array CGH 解析により両者はゲノム異常様式が異なることが明らかとなった。また、30 症例の APL について array CGH を行ったところ、約 60% の症例で特徴的なゲノム異常が認められたが、40% 程度の症例ではゲノム異常が認められず、リンパ腫とは異なり、APL ではゲノム異常の数が少ないことが明らかになった。また、現在用いているアレイでは検出できない異常があるのか、あるいはアレイ技術では見出せない点突然変異などの異常があるのか現時点では不明である。

D. 考察

1. API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子の探索

API2-MALT1 キメラ遺伝子導入細胞株を Hela 細胞株を樹立した。親株との間で発現差異のある遺伝子を Expression profiling 法で解析したところ、約 50 程度の遺伝子が有意に発現上昇していることを見出し、その中に転座に加わる API2 遺伝子そのものが見出された。そのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェレースをマーカーに転写活性を検討したところ、確かに標的であることが明らかとなった。プロモーター領域に存在する 3 つの NF- κ B 結合サイトを点突然変異を入れて、解析したところ、第一番目と第 3 番目の結合モチーフが主要な役割を担っていることが明らかとなった。ゲルリターデーションアッセイでもその結合が確認された。

2. API2-MALT1 の蛋白レベルの解析

MALT リンパ腫発症に関与するキメラ遺伝子 API2-MALT1 の蛋白レベルの研究では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質と核を往復することが明らかとなった。これはレプトマイシン B の添加により、核内に MALT1 および API2-MALT1 が貯留することを見出したことによる。この核、細胞質間のシャットリングは機能を考える上で重要な意義がある。事実、MALT1 蛋白は BCL10 を閥外に搬出するが、API2-MALT1 にはその機能がないことが明らかとなった。この発見は、これまでに予想されていたことではなく、機能を考察する上で、まったく新しい概念を導入する必要性を示唆する。また、種々の欠失変異体による検討で、Nuclear Exporting Signal (NES) を見出し、機能していることを明らかにしたことは重要である。また、BCL10 の細胞内局在にも NES シグナルが重要な働きを示していることを明らかにしたが、キメラ遺伝子には BCL10 のを核外に運び出す能力が欠けていることが明らかとなり、症例における BCL10 免疫染色とキメラ遺伝子の有無とがよく相関することが始めて明らかとなったことは、BCL10 の病的意義を確認する上で重要な発見である。

3. array CGH 法による造血器腫瘍のゲノ

ム異常の解析

(1) マントル細胞リンパ腫ではこれまでの方法と比較し、より高頻度に 11q22, 13q21, 13q34 の欠失を検出することができた。また、新たな責任遺伝子として、2q13 領域のホモ欠失領域の責任遺伝子として、BCL2 蛋白と拮抗する機能を有する BIM 遺伝子を見出した。マントル細胞リンパ腫の発症機構を考察する上で重要な発見である

(2) DLBCL の発症解析による細分類である GCB 型と ABC 型について、それぞれに特徴的なゲノム異常が見出されることを見出し、発症解析による分類がゲノム異常の観点からも妥当な分類であることを示唆したことは、意義が高い。また、CD5+DLBCL は ABC 型とよく似ており、CD5-CD10+DLBCL は GCB 型とよく似ていることが明らかとなったが、今後、両疾患単位の関係についてより明確な検討が必要であると考えられる。

(3) T/NK リンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病 (APL) の解析
Aggressive type の aggressive NK cell leukemia と Extranodal NK/T 細胞リンパ腫 (鼻型) は共に EB ウイルスが関連する aggressive 型として認識されており、類似性が指摘されていたが、両者は異なるゲノム異常様式を有しており、異なる疾患単位であると考えられる。また、APL について array CGH では、約 60% の症例で特徴的なゲノム異常が認められたものの、40% 程度の症例ではゲノム異常が認められず、今後の検討が必要である。現在用いているアレイでは検出できない異常があるのか、あるいはアレイ技術では見出せない点突然変異などの異常があるのかについて検討する必要がある。

E. 結論

(1) API2-MALT1 キメラ遺伝子の標的遺伝子ひとつは転座に関与する API2 であることを見出し、確認した。

(2) API2-MALT1 の蛋白レベルの解析では、細胞質のみに存在して機能すると考えられていた MALT1 および API2-MALT1 が細胞質と核を往復することを明らかにした。

(3) T/NK リンパ腫・白血病および急性前骨髄球性白血病 (APL) では、疾患特異的なゲノム異常を見出したが、APL では 40% の症例でゲノム異常が認められず、今後の問題として対処する必要がある。

F. 研究発表

1. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 24: 1348-1358, 2005.
2. Fujii, A., Oshima, K., Hamasaki, M., Utsunomiya, H., Okazaki, M., Kagami, Y., Seto, M., Kikuchi, M.: Differential expression of cytokines, chemokines and their receptors in follicular lymphoma and reactive follicular hyperplasia: Assessment by complementary DNA microarray. *Oncol. Rep.*, 13: 819-824, 2005.
3. Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 106:1770-1777, 2005.
4. Hosokawa, Y., Suzuki, H., Nakagawa, M., Lee, TH., Seto, M.: API2-MALT1 fusion protein induces transcriptional activation of the API2 gene through NF-kappaB binding elements: evidence for a positive feed-back loop pathway resulting in unremitting NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 51-60, 2005.
5. Nakashima, Y., Tagawa, H., Suzuki, R., Karnan, S., Karube, K., Ohshima, K., Muta, K., Nawata, H., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of Natural

- killer cell lymphoma/leukemia:
Different genomic alteration patterns
of aggressive NK-cell leukemia and
extranodal NK/T lymphoma, Nasal
type. *Genes Chrom. Cancer*, 44: 247-
255, 2005.
6. Tagawa, H., Seto, M.: A microRNA
cluster as a target of genomic
amplification in malignant lymphoma.
Leukemia Correspondence, 19: 2013-
2016, 2005.
7. Sawa, M., Yamamoto, K., Yokozawa,
T., Kiyoi, H., Hishida, A., Kajiguchi, T.,
Seto, M., Kohno, A., Kitamura, K.,
Itoh, Y., Asou, N., Hamajima, N., Emi,
N., Naoe, T.: BMI-1 Is Highly
Expressed in M0-Subtype Acute
Myeloid Leukemia. *Int. J. Hematol.*,
82:42-47, 2005.
8. Nakagawa, M., Hosokawa, Y.,
Yonezumi, M., Izumiyama, K., Suzuki,
R., Tsuzuki, S., Asaka, M., Seto, M.:
MALT1 contains nuclear export
signals and regulates cytoplasmic
localization of BCL10. *Blood*,
106:4210-4216, 2005.
9. Kasugai, Y., Tagawa, H., Kameoka, Y.,
Morishima, Y., Nakamura, S.,
Seto, M.: Identification of CCND3 and
BYSL as Candidate Targets for the
6p21 Amplification in Diffuse Large
B-Cell Lymphoma. *Clin. Cancer
Res.*, 11:8265-8272, 2005.
10. Karnan, S., Tsuzuki, S., Kiyoi, H.,
Tagawa, H., Ueda, R., Seto, M., Naoe,
T.: Genomewide array-based
comparative genomic hybridization
analysis of acute promyelocytic
leukemia. *Genes Chrom. Cancer*,
45:420-425, 2006.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）
1. 特許取得
出願特許
仮出願番号：未定
出願日：2005年 4月 19日
発明の名称：リンパ腫の予後・」病型
診断法
出願人：愛知県、日本ガイシ㈱
発明者：瀬戸加太、田川博之、吉田安
子、吉良茂樹

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

がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

分担研究者 稲垣 昌樹 愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨 Aurora-B、Plk1 などの分裂期キナーゼ群は、癌細胞において活性が上昇することが報告されているが、どのように発癌過程に関与しているかについては不明な点が多い。我々は、これまでに、Aurora-B の結合パートナーである INCENP および中間径フィラメント構成タンパク質ビメンチンが Cdk1 によってリン酸化されることを報告してきた。今回、我々は、Plk1 が INCENP またはビメンチンに Cdk1 によるリン酸化反応依存性に結合することを明らかにした。さらに、これらタンパク質と Plk1 の結合により、分裂中期から後期への進行および中間径フィラメントの均等分配が制御されていることが判明した。この研究は、Cdk1 の基質のリン酸化反応を通じて、Plk1 の機能が制御されていることを示すものであり、癌における染色体不安定性のメカニズムを解明するうえで有用な知見といえる。

A. 研究目的

染色体の不安定性は、がんの悪性化のみならず、発がんの過程そのものにも深く関与していると考えられており、それを引き起こすメカニズムの一つとして、分裂期の制御異常が想定されている。分裂期の制御には、分裂期開始に必須な Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1, Cdc2) キナーゼに加えて、Aurora-B、Plk1 (Polo-like kinase 1) などの分裂期キナーゼ群が重要な役割を担っている。近年の研究の集積により、これら個々の分裂期キナーゼの役割は徐々に解明されつつある。しかし、分裂期キナーゼ群の相互関係は依然として不明な点が多く、まだ、未解明な点が多いのが現状といえる。我々は、この Cdk1 と Plk1 のシグナル伝達のクロストーク機構の解明を通じて、発がん過程における分裂期キナーゼの役割を明らかにするとともに、そのクロストーク機構を標的とした新たな作用機序の抗がん剤の開発に役立てることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. Cdk1 による INCENP リン酸化反応の生理的意義の解析
 - 1) RNA 干渉法 (RNAi) によって INCENP または Aurora-B の発現を低下させたとき、Plk1 の動原体局在がどのように変化するかを解析した。
 - 2) マウス INCENP の野生型 (WT) およびそれぞれのリン酸化部位をリン酸化されないアラニンに置換した変異体をレトロウィルスの系で導入した HeLa 細胞株をそれぞれ樹立した。その後、ヒトに特異的な ds RNA を用いて、内因性の INCENP の発現のみを RNAi で低下させたときの分裂期の表現型を観察した。
2. Cdk1 によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義の解明
 - 1) Cdk1 リン酸化ビメンチンと Plk1 の結合を Far-Western 法および GST-pull down 法で確

認した。

- 2) また、ビメンチンとの結合によって、Plk1のキナーゼ活性が変化するか、また、その際、ビメンチンのどの部位をリン酸化するかについて、*in vitro*アッセイで検討した。
- 3) 上記の結合およびリン酸化反応が引き起こされているか確認するため、Cdk1のリン酸化部位をアラニンしたビメンチンの発現した際、および、Plk1をRNAiした際の、Plk1によるビメンチンリン酸化反応の変化を検討した。
- 4) 上記のPlk1のリン酸化反応の生理的意義を解明するため、Plk1のビメンチンリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を細胞に発現し、その表現型を検討した。

(倫理面への配慮)

実験に用いたレトロウイルスは愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたプロトコールに基づき、指定を受けた研究領域のみで使用しており、ヒトへの感染防御等十分な対策がとられている。

C. 研究結果

1. Cdk1によるINCENPリン酸化反応の生理的意義

INCENPがPlk1と結合しうるかをFar-Western法を用いて検討したところ、INCENPはCdk1によるリン酸化反応依存性にINCENPと結合しうる事が判明した。この結合はT388Aの場合では認められないことから、Plk1はCdk1によってリン酸化されたT388を認識してINCENPに結合していることが判明した。また、これらの現象は免疫沈降法によっても確認された。さらに、INCENPの発現をRNAiで低下させたとき、Plk1の中心体局在は保たれるものの、動原体への局在は阻害されていた。この現象は、Aurora-BのRNAiでは認められないことから、INCENPのRNAiによって認められている表現型は、Aurora-Bの活性を低下させたこと

によるものではなく、結合蛋白質としてのINCENPが減少したことによるものと考えられた。

さらに、INCENPのT59またはT388のリン酸化反応の生理的意義を検索するため、マウスINCENPのWT、T59A、または、T388Aを導入したHeLa細胞株において、ヒト由来(内因性)のINCENPの発現のみをRNAiで低下させたときの細胞の表現型を観察した。その結果、WTおよびT59Aを導入した細胞においては、Plk1の動原体局在の回復が認められたが、T388Aを導入した細胞では約半分ほどしか回復が認められなかった。また、T388Aを導入した細胞では、WTおよびT59Aを導入したものに比べて、分裂中期から後期への進行が遅くなっていることが判明した。以上のことから、Cdk1はINCENPのリン酸化反応を通じて、Plk1の動原体局在を制御していること、動原体のPlk1は、分裂中期から後期への進行に重要な役割を担っていることが判明した。

2. Cdk1によるビメンチンリン酸化反応の生理的意義

我々は、これまでにRhoキナーゼおよびAurora-Bが、分裂後期から終期にかけてビメンチンなどの中間径フィラメント構成蛋白質を分裂溝特異的にリン酸化し、中間径フィラメントの娘細胞への均等分配および細胞質分裂を制御していることを示してきた。また、我々は、Cdk1についても、分裂前中期から中期までビメンチンをリン酸化することを明らかにしてきたが、その生理的意義は不明のままであった。

我々は、Plk1が、Cdk1によってリン酸化されたビメンチンのセリン55と直接結合し、そのキナーゼ活性を著しく上昇させることを明らかにした。この活性化Plk1は、さらに、ビメンチンのセリン82をリン酸化することから、Cdk1による分裂期特異的なビメンチンのリン酸化反応は、Plk1をビメンチンへと集積させる

ことを介して、Plk1 によるビメンチンのリン酸化反応を制御していることが判明した。さらに、この Plk1 によるリン酸化反応は、細胞質分裂における Rho キナーゼや Aurora-B によるビメンチンのリン酸化反応と協調的に働き、ビメンチンフィラメントの娘細胞への分配に関与していることを明らかにした。

D. 考察

これまでの研究で、個々の分裂期キナーゼの役割は少しずつ明らかにされてきた。しかし、分裂期の細胞現象は複数の分裂期キナーゼが協調しながら制御していると考えられているが、その詳細は不明な点が多かった。今回、我々が得た知見は、Cdk1 の基質のリン酸化反応を介して Plk1 の局在および機能を制御していること、この機能変化が分裂期の進行に重要な役割を担っていることを示すものといえる。今後、このような分裂期キナーゼ群間のクロストーク機構の破綻が癌化においてどのような役割を演じているのかについても検討を加えていき、将来的には、新しい作用機序の抗がん剤の開発に役立てる予定である。

E. 結論

本年度、Cdk1 による INCENP およびビメンチンリン酸化反応を介して、Plk1 の局在、活性およびその機能が調節されていることを見出した。この Plk1 の機能変化は、分裂中期から後期への進行および中間径フィラメントの均等分配過程に重要な役割を担っていることが判明した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata, K. and Inagaki, M.

Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene* 24: 65-76, 2005

2. Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Usukura, J. and Inagaki, M. Identification of trichoplein, a novel keratin filament-binding protein. *J. Cell Sci.* 118: 1081-1090, 2005
3. Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* 10: 127-137, 2005
4. Tsui, J., Inagaki, M. and Schulman, H. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280: 9210-9216, 2005
5. Dyson, M.H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S.J., Nightingale, K., Iborra, F.J. and Mahadevan, L.C. MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *J. Cell Sci.* 118: 2247-2259, 2005
6. Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K., Inagaki, M. and Wileman, T. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde

- transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J. Virol.* 79: 11766-11775, 2005
7. Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J. and Kaibuchi, K. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell Biol.* 25: 9973-9984, 2005
 8. Yamaguchi, T., Goto, H., Yokoyama, T., Silljé, H., Hanisch, A., Uldschmid, A., Takai, Y., Oguri, T., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol.* 171: 431-436, 2005
 9. Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M. and Nosaka, T. Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell. Biol.* 25: 10965-10978, 2005
 10. Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, P.J. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24: 3834-3845, 2005
 11. Izawa, I. and Inagaki, M. Cleavage furrow kinases and cell division. *Signal Transduction of Cell Division.* 73-92, 2005
 12. Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A. and Inagaki, M. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nature Cell Biology* 8: 180-187, 2006
 13. Izawa, I. and Inagaki, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science* in press
 14. Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F. and Inagaki, M. Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* in press
 15. Oguri, T., Inoko, A., Shima, H., Izawa, I., Arimura, N., Yamaguchi, T., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Kikuchi, K. and Inagaki, M. Vimentin-Ser82 as a memory phosphorylation site in astrocytes. *Genes Cells* in press
2. 学会発表
 1. 稲垣昌樹: Development of site-and phosphorylation state-specific antibodies. ホスホジエステラーゼ関連国際シンポジウム 2006 (三重) [シンポジウム]
 2. 稲垣昌樹: 抗リン酸化抗体が明らかにした分裂期キナーゼ群: 分裂期キナーゼ群のクロストークを介した分裂期制御機構, バイオイメーキングセミナー 2005 (東京) [招待口演]
 3. 稲垣昌樹, 山口知也, 後藤英仁: 分裂期キナーゼ群間のクロストークを介した分裂期制御機構. 第64回日本癌学会学術総会 2005 (北海道) [シンポジウム]

4. 後藤英仁、河尻愛恵、清野透、友野靖子、稲垣昌樹: Cdk1によるINCENPリン酸化反応を介した分裂期キナーゼ群間のクロストーク。第64回日本癌学会学術総会 2005 (北海道) [ワークショップ]
 5. 猪子誠人、西澤美和子、井澤一郎、林裕子、永田浩一、横山智哉、稲垣昌樹: 新規keratin結合蛋白質としてtrichoplein、Fbf-1の同定とその特性の解析。第64回日本癌学会学術総会 2005 (北海道) [ポスター]
 6. 横山智哉、後藤英仁、井澤一郎、水谷仁、稲垣昌樹: Aurora-BとRho-kinase/ROCKは細胞質分裂の進行を独立的に制御する: erzin/radixin/moesinをリン酸化する新規分裂溝キナーゼの存在。第64回日本癌学会学術総会 2005 (北海道) [ポスター]
 7. 久野智彦、稲垣昌樹、長坂昌登、大澤弘勝、川面ひとみ、水野正明、吉田純: 悪性神経膠腫で見られる多核巨細胞の性状解析。第64回日本癌学会学術総会 2005 (北海道) [ポスター]
 8. Oguri, T., Inoko, A., Yamaguchi, T., Izawa, I., Shima, H., Kikuci, K, Inagaki, M.: Identification of vimentin, type III intermediate filament protein, as a regulatory subunit of PP1c γ in the astrocyte. 第78回日本生化学会大会 2005 (神戸) [ポスター]
 9. Inoko, A., Sugimoto, M., Zou, P., Hayashi, Y., Sasoh, M., Uji, Y., Usukura, J., Izawa, I., Inagaki, M.: Identification and characterization of a novel keratin filament-binding protein, Fbf-1. 第78回日本生化学会大会 2005 (神戸) [ポスター]
 10. Shiromizu, T., Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Totsukawa, G., Matsumura, F., Nakanishi, M., Inagaki, M.: A novel Chk1 phosphorylation in mitosis. 第78回日本生化学会大会 2005 (神戸) [ポスター]
 11. 稲垣昌樹: サイクリン依存性キナーゼカスケイド。平成17年度特定領域研究「細胞周期制御」全体進捗会議 2005 (宮崎) [シンポジウム]
 12. Inagaki, M., Goto, H., Yamaguchi, T., Hayashi, Y., : Regulation of Intermediate filament (IF) organization through IF protein phosphorylation. 第28回日本分子生物学会年会 2005 (福岡) [シンポジウム]
 13. 山口知也、後藤英仁、横山智哉、小栗崇史、稲垣昌樹: 分裂期でのビメンチンリン酸化反応におけるCdk1とPlk1のクロストーク。第28回日本分子生物学会年会 2005 (福岡) [ポスター]
 14. 後藤英仁、河尻愛恵、清野透、友野靖子、浦野健、古川鋼一、Erich Nigg、稲垣昌樹: Cdk1によるINCENPリン酸化反応を介した分裂期キナーゼ群間のクロストーク。第28回日本分子生物学会年会 2005 (福岡) [ポスター]
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
現在のところ、予定も含め、ない

クロマチン構造異常と発がんとの関連

分担研究者 長田 啓隆 愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 室長

研究要旨 本研究では、(1)クロマチン構造制御への関与が示唆されている小RNA分子の中でmicroRNA(miRNA)について検討した。小細胞肺癌を中心に高発現を示すmiRNA群を見出し、miRNAの異常の組織型特異性が示唆された。更にそのmiRNAが肺癌の増殖を促進することを確認した。(2)小細胞肺癌等の高悪性度肺癌に見られる神経内分泌分化に注目し、この分化誘導因子ASH1をRNAiで抑制することで、肺癌で細胞周期停止・細胞死誘導が起こり、マウスの移植肺癌でも増殖が抑制されることが確認された。今回の解析結果は、多様な組織型を示す肺癌の分子病態が、組織型に相関する多様な細胞分化の特性と密接に関係していることを示唆し、同時に肺癌治療標的の多様性をも示唆していると考えられる。したがって本研究は、分子標的治療法の開発を進める上で非常に重要な示唆を与えるものと期待される。

A. 研究目的

難治性固形腫瘍であるヒト肺癌の発生・進展の分子病態を解明すべく、がん遺伝子・がん抑制遺伝子・転移関連遺伝子について検討を進めている。これらの遺伝子異常にはクロマチン構造制御異常による遺伝子発現異常が見られる。又、肺癌は非常に多様な組織型を呈し、組織型に特異的な細胞分化に伴う遺伝子発現制御異常も想定される。本年度の研究の目的は、このような広範な遺伝子発現異常を引き起こすと考えられるクロマチン構造制御異常・細胞分化異常に注目し、以下のような因子について検討した。

(1)多くの生物種でRNA分子特にsiRNA等の小RNA分子がクロマチン構造を制御することが示されている。哺乳類でも同様な制御を示唆する報告も有るが、詳細は未だ解明されていない。そこで今年度は、小RNA分子の中のmiRNAの異常の有無と、その異常の肺癌発症進展及びクロマチン構造制御への関与を解明することを目的に検討を進めた。

(2)神経内分泌分化は、小細胞肺癌等の高悪性度肺癌にしばしば見られ、マウスでは実験的に癌の悪性化に関与することが示されている。しかし、その詳細は明らかではない。そこで、この神経内分泌分化とヒト肺癌悪性化の関連、およびこの神経内

分泌分化が肺癌治療の分子標的になるかを検討した。

B. 研究方法

(1)miRNAの標的を予想するアルゴリズムにより、癌関連遺伝子群・クロマチン構造制御遺伝子群を標的候補遺伝子とするmiRNA21種を選択し、肺癌細胞株における発現を、Northern blot法、及び定量RT-PCR法を用いて検討した。Northern blotは、約20残基のごく短いmiRNA mature formを検出するために、ポリアクリルアミドジェル電気泳動を用いた。定量RT-PCRの際は、pre-miRNA領域を増幅し18S ribosomal RNAの発現で補正して、定量した。肺癌で強発現を示したmiRNAに関しては、発現vectorを作成し、肺癌細胞へ導入し、細胞増殖等の変化を検討した。強発現を示したmiRNAに関しては、愛知県がんセンター病院の肺癌検体5例のRNAも用いて発現を検討した。

(2)神経内分泌分化を誘導する転写因子ASH1の発現ベクター及び、ASH1に対するプラスミド及びアデノウイルスRNAiベクターを作成した。これらのRNAiベクターはU6遺伝子プロモーターを挿入して作成した。又、RNAiの効果・特異性を検討するために、RNAi部位にsilent mutationを持つRNAi抵抗性の変異ASH1発現ベクターも作成した。肺癌細胞におけるASH1の

発現は Western 及び RT-PCR で検討した。細胞周期停止・細胞死誘導は FACS にて解析した。切断カススペース特異的抗体を用いて Western blot 解析を施行し、細胞死に伴うカススペース活性化の有無も検討した。又、細胞増殖は MTT にて計測した。更に、SCID マウスに肺癌細胞株を移植して ASH1-RNAi アデノウイルスを腫瘍内注入して、治療実験をおこなった。アデノウイルスは HEK293 細胞に transfection しウイルス粒子を産生させ、その後セシウム密度勾配超遠心法にて精製した。肺癌細胞は背部皮下に移植し、5 mm 径の大きさに増殖させ、その後精製アデノウイルス粒子を腫瘍内に 2 回投与し、一週間後に腫瘍径・重量を測定した。治療後の腫瘍組織も病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

愛知県がんセンターの一般倫理審査委員会、及び遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたプロトコールに基づき、腫瘍等の患者検体は本研究に使用されている。

C. 研究結果

(1) 選択した miRNA の、肺癌細胞株における miRNA mature form の発現を Northern blot にて検討した。すると、一部の miRNA が小細胞肺癌を中心に強発現パターンを示した。強発現が検出された miRNA は、類縁 miRNA を構成成分とする 3 個のパラログ miRNA クラスター由来の miRNA であった。miRNA mature form は 22 残基程度と非常に短く、クロスハイブリしやすいために、miRNA 発現ベクター導入細胞の RNA を用いた Northern blot 解析・特異性の高い pre-miRNA を増幅する定量 RT-PCR 解析を行い、さらに、クラスター内で、クロスハイブリがほとんど無い miRNA プローブを選んで Northern blot 解析を行い、染色体 13 番上の miRNA クラスター miR-17-92 が強発現していることを確認した。小細胞肺癌患者検体を用いて Northern blot を施行すると、やはり全例でこのクラスター由来 miRNA の強発現が見られた。このクラスターは、最近リンパ腫での遺伝子増幅が報告された C13orf25 遺伝子上に存在し、肺癌細胞株でも 2 株に著明な C13orf25 遺伝子の増幅が見られた。

この C13orf25 遺伝子自体も miR-17-92 と同様に強発現をしていた。そこで、次に、

C13orf25 と miR-17-92 のどちらの強発現が肺癌発症進展へ関与しているか検討するため、C13orf25 の ORF 発現ベクター及び miR-17-92 クラスター発現ベクターを肺癌細胞へ導入して、細胞増殖に対する作用を検討した。その結果、miR-17-92 は肺癌細胞の増殖を促進し、C13orf25ORF は促進効果を示さなかった。

(2) 転写因子 ASH1 に対するプラスミド RNAi ベクターを作成した。これを肺癌細胞株へ導入し、細胞増殖を検討したところ、ASH1 を発現する肺癌細胞株で、細胞増殖の抑制が見られた。しかし、ASH1 発現の無い細胞株や正常肺由来細胞株では増殖抑制作用はなかった。発現抑制作用を示した肺癌細胞株を用いて FACS 解析したところ、S 期減少・G2/M 期増加及び subG1 増加が見られた。同時に Western blot 解析でカススペース 9・カススペース 7 の活性化が見られた。これらの検討から細胞周期停止・細胞死が誘導されて、細胞増殖抑制がおこったと考えられた。RNAi 作用の特異性を検討するために、ASH1-RNAi ベクターと共に、RNAi 抵抗性 silent mutation を持つ変異 ASH1 発現ベクターを投与し RNAi の rescue が出来るか検討した。すると細胞周期停止・増殖抑制が完全ではないが rescue された。次に SCID マウスにヒト肺癌細胞を移植して、がん治療実験を施行した。皮下移植した肺癌細胞の腫瘍に ASH1-RNAi アデノウイルスを、腫瘍内注入して、対照ウイルスと比較した。すると、ASH1 を発現する肺癌細胞では、腫瘍径・重量の増加が対照に比して有意に少なく、腫瘍増殖抑制が見られたが、対照ウイルスでは抑制効果は得られなかった。腫瘍内の病理組織学的検討では、対照ウイルスに比して、ASH1-RNAi ウイルスではアポトーシス細胞の増加が見られた。

D. 考察

(1) 肺癌で強発現を示す miRNA クラスター miR-17-92 が見出され、癌細胞の増殖制御に関与する可能性が示唆された。このクラスターに含まれる miRNA は、PTEN や RB ファミリー等の癌抑制遺伝子を標的の遺伝子とすることが予想されていた。しかし、最近の報告では miRNA は非常に多数の標的遺伝子を制御すると考えられ、この miRNA クラスターの標的も種々のシグナル伝達系に係わる遺伝子群やクロマチン

構造を制御する遺伝子群等の多数の遺伝子群が含まれている。したがって miRNA クラスター強発現により非常に複雑な分子病態の変化が誘導され、細胞増殖に関与していると考えられる。又この miRNA 強発現が小細胞肺癌の組織型と相関を示すことから、小細胞肺癌を中心にみられる神経内分泌分化との関連も示唆される。今後、この miRNA 強発現に伴う複雑な分子病態を解明し、癌治療に貢献できる治療標的を検討していくことが必要と考えている。

(2) 今回の実験は、神経内分泌分化を誘導する転写因子 ASH1 が肺癌細胞の増殖・癌悪性化に関与することを示唆し、又、ASH1 が癌治療標的となる可能性も示唆した。この神経内分泌分化は ASH1 シグナルと Notch シグナルのバランスで誘導されていると考えられている。Notch シグナル誘導により、ASH1 の発現量が低下し、ASH1 発現肺癌細胞の増殖が抑制されるという報告もあり、この神経内分泌分化に関連したシグナルが肺癌治療において重要な位置を占めると思われる。

ASH1 自身が治療標的となる可能性が示唆されたが、ASH1 欠失マウスでは、自律神経系や内分泌細胞に異常が見られ、ASH1 を治療標的とした場合の危険性も考えられる。したがって現在、ASH1 下流分子の検討も進めており、ASH1 発現ベクターを肺癌細胞に導入し、発現制御される遺伝子群を、microarray を用いて網羅的に検討している。これら ASH1 で発現制御される遺伝子群を解析することで、安全で高効率な新たな治療標的が見出されてくることも予想される。

E. 結論

クロマチン構造制御への関与が示唆されている小 RNA 分子に注目し、小 RNA 分子の中の miRNA クラスターが小細胞肺癌を中心に高発現を示すことを見出した。更にその miRNA クラスターが肺癌の増殖を促進することを確認した。又、高悪性度肺癌に見られる神経内分泌分化に注目し、この分化誘導因子 ASH1 を RNAi で抑制することで、肺癌で細胞周期停止・細胞死が誘導され、マウスの治療実験でも腫瘍増殖が抑制されることが確認された。

今回の解析結果は、多様な組織型を示す肺癌の分子病態が、組織型に密接に相関する多様な細胞分化の特性と密接に関係し

ていることを示唆し、同時に肺癌治療標的の多様性をも示唆していると考えられる。したがって本研究は、難治癌である肺癌の治療戦略においてオーダーメイド医療の必要性を示唆し、分子標的癌治療法の開発を進める上で非常に重要な示唆を与えることと期待される。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Onco* (in press).

2: Maeno K, Masuda A, Yanagisawa K, Konishi H, Osada H, Saito T, Ueda R, and Takahashi T. Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers. *Oncogene* 25: 271-7, 2006

3: Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, and Takahashi T. The ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 65: 10680-5, 2005

4: Osada H*, Hayashita Y*, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yasushi Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, and Takahashi T. A polycistronic miRNA cluster, *miR-17-92*, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65: 9628-32, 2005 (* equal contributors)

5: Osada H, Tatematsu Y, Sugito N, Horio Y, and Takahashi T. Histone modification in the TGF β RII gene promoter and its significance for responsiveness to HDAC inhibitor in lung cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 44: 233-41, 2005

6. Anumanthan G, Halder SK, Osada H, Takahashi T, Massion PP, Carbone DP, Datta PK. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer

cells. *Br J Cancer*. 93: 1157-67, 2005

7. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of *Dicer* associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 96: 111-5, 2005

2. 学会発表

長田啓隆・谷田部恭・立松義朗・高橋隆 神経内分泌分化を有する肺癌に対する新規癌治療法の検討 第 64 回日本癌学会学術総会 (口演)

荻部陽子・田中寿明・長田啓隆・富田秀太・立松義朗・柳澤聖・谷田部恭・高見澤潤一・三好新一郎・光富徹哉・高橋隆 肺癌における *Dicer* の発現低下と外科切除後生存期間の短縮 第 64 回日本癌学会学術総会 (図説)

陳国云・平岩望・長田啓隆・浜窪隆雄・児玉龍彦・神奈木玲児 *T-bet* および *GATA-3* を含んだ転写因子複合体によるヒトリンパ球系細胞のフコース転移酵素 VII 遺伝子の転写調節 第 64 回日本癌学会学術総会 (口演)

長田啓隆・谷田部恭・立松義朗・高橋隆 神経内分泌分化を有する肺癌に対する新規癌治療法の検討 第 28 回日本分子生物学会年会 (図説)

竹内俊幸・富田秀太・谷田部恭・高坂貴行・長田啓隆・柳澤聖・光富徹哉・高橋隆 Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors 第 28 回日本分子生物学会年会 (図説)

佐野由加子・山下大輔・長田啓隆・大隈隆・廣瀬富美子 転写因子 *hDREF* は細胞周期進行に関与する 第 28 回日本分子生物学会年会 (図説)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版地	ページ
Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, <u>Tatematsu M.</u>	Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice.	R.D.Blumental	Humana Press Inc.	Totowa, NJ	351-362
Izawa, I., Inagaki, M.	Cleavage furrow kinases and cell division.	Toru Miki	Research Signpost	India	73-92

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
Yokoyama H, Nakanishi H, Kodera Y, Ikehara Y, Ohashi N, Ito Y, Koike M, Fujiwara M, <u>Tatematsu M.</u> , Nakao A.	Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line.	Clin. Cancer Res.	12(2)	361-68	2006
Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Ohashi N, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, <u>Tatematsu M.</u> , Nakao A.	Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: Analysis of real time RT-PCR after 5 years of follow-up.	J Am Coll Surg.	202(2)	231-236	2006
Ito S, Nakanishi H, Kodera Y, Mochizuki Y, <u>Tatematsu M.</u> , Yamamura Y.	Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients.	Br. J. Cancer	93 (9)	986-992	2005
Ohashi N, Kodera Y, Nakanishi H, Yokoyama H, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, <u>Tatematsu M.</u>	Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice.	Int. J. Oncol.	27(3)	637-644	2005
Yamachika T, Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Niwa T, Wanibuchi H, <u>Tatematsu M.</u> , Fukushima S.	Establishment and characterization of a human colonic mucinous carcinoma cell line with predominant goblet-cell differentiation from liver metastasis.	Pathol Int.	55(9)	550-557	2005
Futamura N, Nakanishi H, Hirose H, Nakamura S, <u>Tatematsu M.</u>	The effect of storage on the survival of cancer cells in blood and efficient elimination of contaminating cancer cells by a leukocyte depletion filter.	Am Surg.	71(7)	585-590	2005
Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, <u>Tatematsu M.</u> , Nakao A.	Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen.	Gastric Cancer.	8(3)	142-148	2005
Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Yokoyama H, Munesue S, Kodera Y, <u>Tatematsu M.</u>	Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis.	Clin. Exp. Meta.	22	137-147	2005
Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, <u>Tatematsu M.</u>	Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice.	Methods Mol Med.	111	351-62	2005
Niwa T, Ikehara Y, Nakanishi H, Tanaka H, Inada K, Tsukamoto T, Ichinose M, <u>Tatematsu M.</u>	Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation.	J Histochem Cytochem.	53(1)	75-85	2005
Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, <u>Tatematsu M.</u>	Helicobacter pylori-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines.	Cancer Sci.	96(3)	170-175	2005
Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., <u>Seto, M.</u>	Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM.	Oncogene	24	1348-1358	2005
Fujii, A., Oshima, K., Hamasaki, M., Utsunomiya, H., Okazaki, M., Kagami, Y., <u>Seto, M.</u> , Kikuchi, M.	Differential expression of cytokines, chemokines and their receptors in follicular lymphoma and reactive follicular hyperplasia: Assessment by complementary DNA microarray.	Oncol. Rep.	13	819-824	2005
Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Oshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., <u>Seto, M.</u>	Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma.	Blood	106	1770-1777	2005
Hosokawa, Y., Suzuki, H., Nakagawa, M., Lee, TH., <u>Seto, M.</u>	API2-MALT1 fusion protein induces transcriptional activation of the API2 gene through NF-kappaB binding elements: evidence for a positive feed-back loop pathway resulting in unremitting NF-kappaB activation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	334	51-60	2005
Nakashima, Y., Tagawa, H., Suzuki, R., Karnan, S., Karube, K., Oshima, K., Muta, K., Nawata, H., Morishima, Y., Nakamura, S., <u>Seto, M.</u>	Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of Natural killer cell lymphoma/leukemia: Different genomic alteration patterns of aggressive NK-cell leukemia and extranodal NK/T lymphoma, Nasal type.	Genes Chrom. Cancer	44	247-255	2005
Tagawa, H., <u>Seto, M.</u>	A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma.	Leukemia Correspondence	19	2013-2016	2005
Sawa, M., Yamamoto, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Hishida, A., Kajiguchi, T., <u>Seto, M.</u> , Kohno, A., Kitamura, K., Itoh, Y., Asou, N., Hamajima, N., Emi, N., Naoe, T.	BMI-1 Is Highly Expressed in M0-Subtype Acute Myeloid Leukemia.	Int. J. Hematol.	82	42-47	2005
Nakagawa, M., Hosokawa, Y., Yonezumi, M., Izumiya, K., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Asaka, M., <u>Seto, M.</u>	MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10.	Blood	106	4210-4216	2005
Kasugai, Y., Tagawa, H., Kameoka, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., <u>Seto, M.</u>	Identification of CCND3 and BYSL as Candidate Targets for the 6p21 Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma.	Clin. Cancer Res.	11	8265-8272	2005
Karnan, S., Tsuzuki, S., Kiyoi, H., Tagawa, H., Ueda, R., <u>Seto, M.</u> , Naoe, T.	Genomewide array-based comparative genomic hybridization analysis of acute promyelocytic leukemia.	Genes Chrom. Cancer	45	420-425	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagata, K. and Inagaki, M.	Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin.	Oncogene	24	65-76	2005
Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Usukura, J. and Inagaki, M.	Identification of trichoplein, a novel keratin filament-binding protein	J.Cell Sci.	118	1081-1090	2005
Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H. and Inagaki, M.	Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM).	Genes Cells	10	127-137	2005
Tsui, J., Inagaki, M., Schulman, H.	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation.	J.Biol.Chem.	280	9210-9216	2005
Dyson, M.H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S.J., Nightingale, K., Iborra, F.J. and Mahadevan, L.C.	MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2.	J. Cell Sci.	118	2247-2259	2005
Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K., Inagaki, M. and Wileman, T.	Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II.	J. Virol.	79	11766-11775	2005
Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J. and Kaibuchi, K.	Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones.	Mol. Cell Biol.	25	9973-9984	2005
Yamaguchi, T., Goto, H., Yokoyama, T., Silje, H., Hanisch, A., Uldschmid, A., Takai, Y., Oguri, T., Nigg, E.A. and Inagaki, M.	Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis.	J.Cell Biol.	171	431-436	2005
Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M. and Nosaka, T.	Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4.	Mol. Cell. Biol.	25	10965-10978	2005
Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, P.J.	PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility.	EMBO J.	24	3834-3845	2005
Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A. and Inagaki, M.	Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition.	Nature Cell Biology	8	160-167	2006
Izawa, I. and Inagaki, M.	Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies.	Cancer Sci.	97	167-174	2006
Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F. and Inagaki, M.	Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1).	Genes Cells		in press	
Oguri, T., Inoko, A., Shima, H., Izawa, I., Arimura, N., Yamaguchi, T., Inagaki, M., Kaibuchi, K., Kikuchi, K. and Inagaki, M.	Vimentin-Ser82 as a memory phosphorylation site in astrocytes.	Genes Cells		in press	
Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T.	Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors.	J Clin Onco		in press	
Maeno K, Masuda A, Yanagisawa K, Konishi H, Osada H, Saito T, Ueda R, and Takahashi T.	Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers.	Oncogene	25	271-277	2006
Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, and Takahashi T.	The ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features.	Cancer Res.	65	10680-5	2005
Osada H*, Hayashita Y*, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yasushi Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, and Takahashi T.	A polycistronic miRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation.	Cancer Res.	65	9628-32	2005
Osada H, Tatematsu Y, Sugito N, Horio Y, and Takahashi T	Histone modification in the TGF beta RII gene promoter and its significance for responsiveness to HDAC inhibitor in lung cancer cell lines.	Mol. Carcinog.	44	233-41	2005
Anumanthan G, Halder SK, Osada H, Takahashi T, Massion PP, Carbone DP, Datta PK	Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells.	Br J Cancer.	93	1157-67	2005
Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T.	Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients.	Cancer Sci.	96	111-115	2005