

て *hprt* 遺伝子の突然変異生成頻度を測定した結果、これら全ての細胞株は、対照群に比べ有意に高頻度の点突然変異を起こす事を見出した。即ち、これら乳癌細胞株には、点突然変異を起こし易い遺伝的不安定性が誘導されていることを示した。この原因は不明であるが、我々の研究結果も加味して考えると、がんにおける新しい遺伝的不安定の誘導として注目される。

一方、「損傷乗り越え DNA 合成」における REV1 タンパク質の dCMP 転移活性以外の役割が注目されている。例えば Rev1 は、thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来ないが、Pol $\eta$  の thymine-thymine dimer の損傷乗り越え DNA 合成には Rev1 が必要である。また、DT40 細胞で *REV1* を knock out した細胞は、紫外線、放射線、シスプラチン、過酸化水素、さらには MMS 等の広範囲なゲノム障害因子に対し高感受性になる。これらの事は、Rev1 が dCMP 転移活性以外の役割で広く損傷乗り越え DNA 合成に関与していることを示している。さらに、我々が証明した REV1 と REV7 がヘテロダイマーを形成することや Rev1 が Pol $\kappa$ , Pol $\eta$  及び Pol $\iota$  と結合することは、REV1 が「損傷乗り越え DNA 合成」で重要な役割を担っていることを示唆している。

最近の研究により PCNA が RAD6・RAD18 複合体によりモノユビキチン化されると Y ファミリーポリメラーゼに共通に存在するユビキチン結合ドメインにより REV1, Pol $\kappa$ , Pol $\eta$  及び Pol $\iota$  は、PCNA に結合することが示された。一方、Pol $\kappa$  は、benzo[a]pyrene-G adducts や thymine glycol を、Pol $\eta$  は thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来る。これらのことは、fidelity の高いポリメラーゼ $\delta$  等が損傷塩基部位で DNA 合成出来ないとき、ゲノム損傷の種類により損傷乗り越え型のポリメラーゼと入れ替わり DNA

合成を継続するポリメラーゼスイッチ機構が存在する可能性を示唆している。この様に、損傷乗り越え DNA 合成は、複雑な蛋白質相互作用により高度に制御されており、複製フォークの進行を支えているものと考えられる。REV1 は、これらポリメラーゼ群と競合的に結合することから、損傷乗り越え DNA 合成の中心的役割をなすものと推定され、REV1 の dCMP 転移活性以外の新しい生化学的機能の解析が求められる。

そこで本年度は、REV1 タンパク質の生化学的性質を詳しく解析した。その結果以下のような REV1 の新しい生化学的性質が明らかとなった。1) REV1 タンパク質は ssDNA に強い親和性をもち、その親和性は見かけ上 ssDNA の長さに依存する。2) REV1 の dCMP 転移反応は ssDNA により阻害され、その阻害の程度も ssDNA の長さに依存して強くなる。3) この REV1 の ssDNA 結合活性は REV1 の dCMP 転移反応をつかさどる最小領域にマップされる。4) ところが、N-末端と C-末端を欠失した最小 REV1 では ssDNA による阻害効果が消失する。この一見矛盾する結果は、最小 REV1 では ssDNA との結合が比較的不安定であることに起因すると考えられ、REV1 の N-末端と C-末端の領域が ssDNA との結合の安定性に寄与していると思われる。おもしろいことに、この ssDNA による阻害は ssDNA がプライマーテンプレートに対してトランスに存在するときのみ観察された。さらに、ssDNA に結合した REV1 はその ssDNA 上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされることがわかった。これらの結果をうまく説明するためには、REV1 タンパク質は ssDNA 上をスライディングしていると考えざるをえない。この性質は他の DNA ポリメラーゼには観察されず、一部欠失型の REV1 では消失することから、REV1 に特異的に備わ

っている性質である。この結果は、REV1の最初のターゲットがプライマー末端というよりは ssDNA である可能性を示唆しており、「損傷乗り越え DNA 合成」機構の解明に繋がる成果といえる。

現在、世界的にも損傷乗り越え修復における REV1 の機能と作用機構の解析が行われているが、その全体像は、未だ殆ど解明されてない。我々は、「損傷乗り越え DNA 合成」機構に関連する蛋白質因子の多くを既に精製しており、その準備状況は世界の最先端にある。今後、REV1 を含め「誤りがちな DNA 合成」機構の解明を進め、放射線発がんにおける役割を明らかにしたい。

#### E. 結論

我々は、損傷乗り越え DNA 合成に関与する REV1 遺伝子の機能と放射線発がんの関連を調べるために、REV1 の生化学的解析を行った。その結果、ヒト REV1 タンパク質は ssDNA 結合活性をもち、ssDNA に結合した REV1 はその ssDNA 上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされることがわかった。この性質は他の DNA ポリメラーゼには観察されず、一部欠失型の REV1 では消失することから、REV1 に特異的に備わっている性質である。この結果は、REV1 の最初のターゲットがプライマー末端というよりは ssDNA であることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kashiwabara, S., Kashimoto, N., Uesaka, T., Wakabayashi, K., Kamiya, K., Watanabe, H. : Tumor Induction by Azoxymethane (AOM) and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) in F344 Rat Gastric Mucosa Featuring Intestinal Metaplasia Caused

by X-irradiation. J. Exp. Clin. Cancer Res., 24(2), 2005.

2. Ohuchi, Y., Myojin, Y., Shimamoto, F., Kashimoto, N., Kamiya, K., Watanabe, H. : Decrease in size of azoxymethane induced colon carcinoma in F344 rats by 180-day fermented miso . Oncology Reports, 14(6), 2005.
3. 神谷研二：高い発がん initiation 頻度と正常細胞による発がん抑制. 癌の臨床, 51(5), 2005.

##### 2. 学会発表

1. 榎本尚樹, 許榮海, 神谷研二, 渡邊敦光: BHP 誘発肺癌の靈芝菌糸体培養基熱水抽出物によるがん予防効果. ISCap Symposium in Kyoto, 京都, 2005.5.20, 21. (講演要旨集, p.67, 2005.)
2. 神谷研二: 放射線発がんのメカニズム. 第 46 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2005.6.4. (抄録集, p.19, 2005.)
3. 増田雄司, 朴金蓮, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 と DNA との相互作用. 第 46 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2005.6.4. (抄録集, p.30, 2005.)
4. 明神有紀, 榎本尚樹, 柏原昌次, 照屋輝一郎, 白畑實隆, 神谷研二, 渡辺敦光: 小腸腺窩再生と生存率を用いたマウスにおける発酵乳の放射線防御作用. 第 46 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2005.6.4. (抄録集, p.32, 2005.)
5. 増田雄司, 朴金蓮, 神谷研二: ヒト REV1 と DNA との相互作用. 平成 17 年度 変異・発癌抑制機構研究会, 愛知県瀬戸市, 2005.7.15,16. (講演要旨集, p.7, 2005.)
6. 増田雄司, 朴金蓮, 神谷研二: 損傷

- 乗り越え DNA 合成因子 REV1 タンパク質の損傷部位へのターゲティング機構. 第 30 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2005.8.30. (プログラム, p.2, 2005.)
7. 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成に関するヒト REV1 と DNA との相互作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005.9.14-16. (PROCEEDINGS, p.467, 2005.)
  8. 増田雄司: ヒト REV1 タンパク質と DNA との相互作用. 国立遺伝学研究所研究集会 ユビキチンを介した DNA 修復応答のメカニズム, 三島, 2005.9.21, 22.
  9. 増田雄司, 神谷研二: 放射線による突然変異誘発機構の生化学的解析. 日本放射線影響学会第 48 回大会・第 1 回アジア放射線研究会議, 広島, 2005.11.15-17. (講演要旨集, p.71, 2005.)
  10. 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Cloning of human RRM3 cDNA. 日本放射線影響学会第 48 回大会・第 1 回アジア放射線研究会議, 広島, 2005.11.15-17. (講演要旨集, p.119, 2005.)
  11. 増田雄司, 神谷研二: Biochemical analysis of post-replication repair pathway by human REV1 protein. 第 22 回放生研国際シンポジウム, 京都, 2005.11.21, 22. (Abstracts, p.13, 2005.)
  12. 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Cloning and Overexpression of a Novel Human Helicase. 第 22 回放生研国際シンポジウム, 京都, 2005.11.21-22.
  13. 神谷研二: 突然変異を誘発する損傷乗り越え DNA 合成酵素 REV1 の機能と発がん. 環境研セミナー, 青森, 2005.12.6.
  14. 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成に関するヒト REV1 の DNA 結合活性の解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10. (講演要旨集, p.191, 2005.)
  15. 橋 典子, 川村敏之, 増田雄司, 森 俊雄, 神谷研二: ネイティブ REV1 の精製方法の検討. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10. (講演要旨集, p.190, 2005.)
  16. Masuda, Y., Kamiya, K.: Function of human REV1 protein on the post-replication repair pathway. 広島大学 21 世紀 COE プログラム—放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点—第 3 回国際シンポジウム, 広島, 2006.2.1-2. (Abstracts, p.34, 2006.)
  17. Tachibana, N., Kawamura, T., Masuda, Y., Mori, T., Kamiya, K.: Examination of purification method for native REV1. 広島大学 21 世紀 COE プログラム—放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点—第 3 回国際シンポジウム, 広島, 2006.2.1-2. (Abstracts, p.35, 2006.)
  18. Piao, J.L., Masuda, Y., Kamiya, K.: Over production and purification of the recombinant human REV3 protein. 広島大学 21 世紀 COE プログラム—放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点—第 3 回国際シンポジウム, 広島, 2006.2.1-2. (Abstracts, p.36, 2006.)
  19. Gu, YQ., Masuda, Y., Kamiya, K.: Cloning and Characterization of hRRM3: a human DNA helicase. 広島大学 21 世紀 COE プログラム—放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点—第 3 回国際シンポジウム, 広島, 2006.2.1-2. (Abstracts, p.33, 2006.)
- H 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

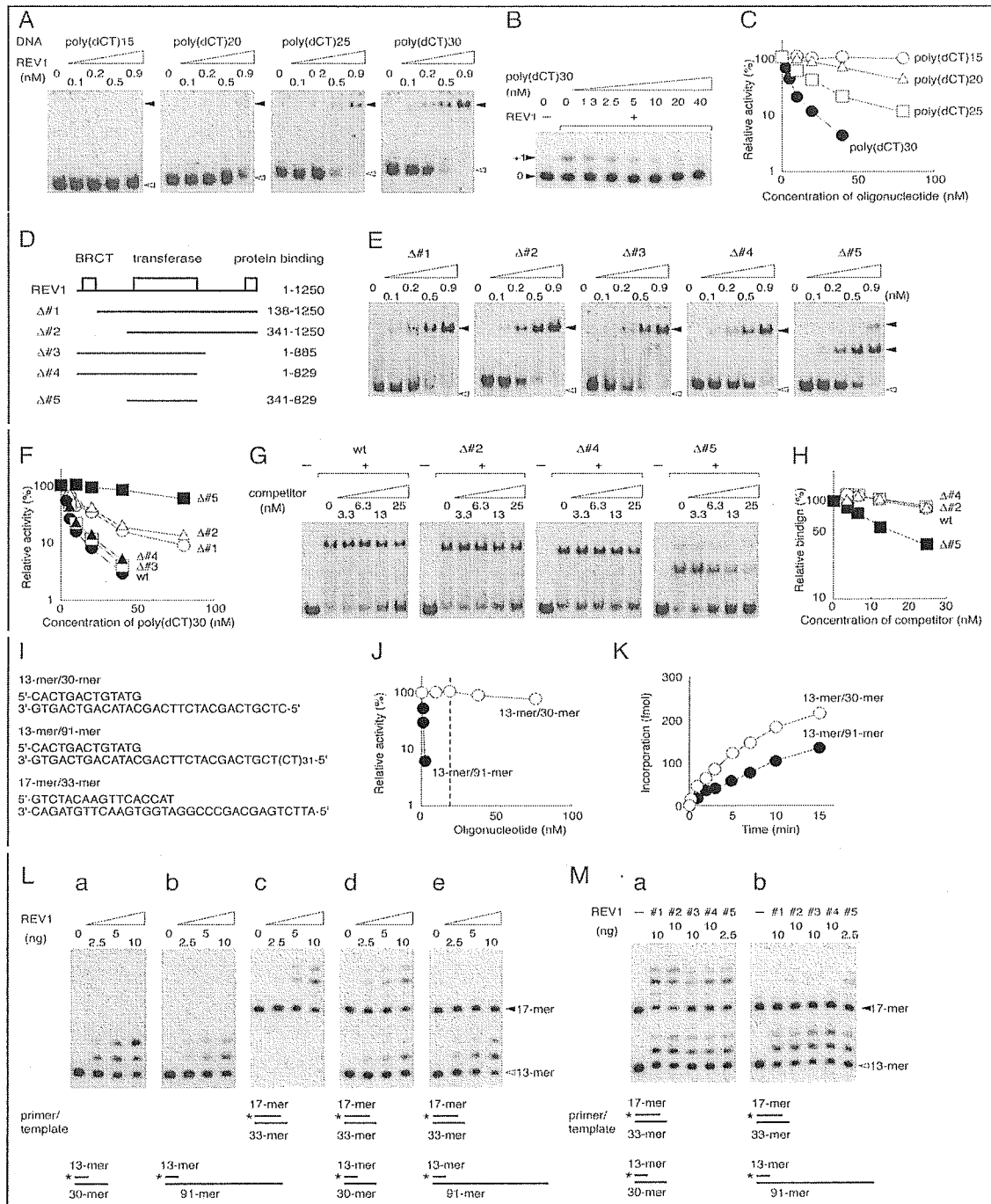


図1 A、32P で標識した様々な長さの ssDNA(Poly dCT)と REV1 によるゲルシフトアッセイ。B、REV1 の dCMP 転移反応における ssDNA の阻害効果。C、ssDNA による阻害効果の定量的解析結果。D、欠失型 REV1 の模式図。E、32P で標識した poly(dCT)<sub>30</sub> と欠失型 REV1 によるゲルシフトアッセイ。F、欠失変異型 REV1 の dCMP 転移反応における poly(dCT)<sub>30</sub> の阻害効果。G、32P で標識した poly(dCT)<sub>30</sub> と REV1 によるゲルシフトアッセイにおけるプライマーテンプレートの競合阻害効果。H、G の定量結果。I、プライマーテンプレートの塩基配列。J、REV1 の dCMP 転移反応における 13-mer/91-mer の阻害効果。K、13-mer/30mer と 13-mer/91-mer のプライマー末端への dCMP 転移反応の経時変化。L、REV1 の dCMP 転移反応における選択的反応性。プライマーテンプレート 13-mer/30mer(a)または 13-mer/91-mer(b)、17-mer/33-mer(c)、13-mer/30mer と 17-mer/33-mer(d)、13-mer/91-mer と 17-mer/33-mer(e) と REV1 を反応させた。M、欠失変異型 REV1 の dCMP 転移反応における選択的反応性。プライマーテンプレート 13-mer/30mer と 17-mer/33-mer(a)または 13-mer/91-mer と 17-mer/33-mer(b)と欠失変異型 REV1 を反応させた。

## 放射線による染色体不安定化の分子機構

分担研究者 宮川 清 東京大学大学院医学系研究科

（研究要旨）放射線の生体影響の一つとして複製フォークの進行阻害が知られているが、この障害に対する生体防御機構の解明は放射線発がんの理解に大きく貢献することが期待されている。Endonuclease活性を有するMus81-Eme1複合体は異常複製フォークのみならず相同組換え修復における組換え中間体の解消に重要な役割を果たすことが知られているために、複製期における染色体安定化にも重要であることが想定されている。そこで放射線被ばくによるS期の染色体安定化機構を解明するために、これらの遺伝子の欠損細胞においてS期からG2期における細胞周期の調節機構と染色体不安定性について解析した。その結果、これらの欠損細胞ではATM-Chk1/Chk2-Cdc25A-Cdkを介するS期チェックポイントに加えて、ATM-Chk1-Cdc25C-CdkによるG2期のチェックポイントも活性化することが明らかとなった。さらに、これらの欠損細胞において増加している染色体倍加の原因となるDNA再複製は、チェックポイントの活性化によって低下したCdk1活性を強制的に元に戻すことによって減少した。このように、持続的なDNA損傷に応答したS期からG2期における細胞周期調節機構の作動は染色体数的異常の原因となることが示唆され、低線量による放射線発がんの分子機構を理解する上で重要な知見が得られた。

### A. 研究目的

放射線被ばくによるDNA損傷に対して細胞は各細胞周期において特異的なチェックポイント機構を発揮して損傷の悪影響を最小限に食いとどめている。中でもDNA複製期は次世代に正確な遺伝情報を伝播する重要な時期であるために、様々な調節機構が存在するものと考えられている。しかし、他の細胞周期に比べて、その複雑性かつ解析系が可視化しにくいゆえに、分子機構の解明はかなり遅れている。

チェックポイント活性化による細胞周期の調節は、細胞周期の進行を一時停止することによって損傷を受けたDNAの修復に必要な十分な時間を確保したり、さもなければ修復が不可能な細胞に対しては細胞死を誘導して、正確な遺伝情報のみが次の細胞周期に伝播されるために必要な機構と考えられてきた。ところが、最近酵母を使った研究においては複製阻害に対するS期のチ

ェックポイントの活性化は相同組換えを介することによって染色体転座や欠失の頻度を高めることが明らかにされている。この事実が哺乳動物についても適応されるのであれば、DNA損傷に対する正常なS期チェックポイントの活性化は修復にとって都合がよい場合もあれば、逆に染色体の構造異常を誘発することによってがんの原因になることも考えられる。

このようなS期チェックポイントの解明は染色体異常による発がんのもっとも初期の理解に貢献するものと期待される。放射線被ばくにおける発がんを考えた場合、低線量の被ばくによる発がん機構の理解はもっとも研究が困難な領域である。そのために、その機構をより単純化したモデルで理解するために、S期のDNA損傷において重要な役割を果たすことが報告されているMus81-Eme1複合体の生物学的機能をS期からG2期に焦点を絞って解明することを目

的とする。

## B. 研究方法

ヒト細胞を対象として研究を行うが、多くのがん由来細胞株は染色体の数的異常を伴っているために、染色体不安定性を対象とした研究には不適切である。そこでヒト細胞株の中ではもっとも染色体が数的に安定している大腸がん由来のHCT116細胞を用いて研究をおこなう。すでにMus81のヘテロ接合性およびホモ接合性のノックアウト細胞はジーン・ターゲティング法によって作製済である。これらに加えて、Mus81と複合体を形成しているEme1のノックアウト細胞もHCT116において作製する。

S期からG2期の細胞周期の解析にはFACSを用いる。それによって得られた結果を確認するために、cyclin E、cyclin A、cyclin Bのkinase活性をhistone H1を基質として測定する。S期およびG2期の遅延が認められた場合はそれぞれのチェックポイントに関わる分子の活性化の検討をおこなう。具体的にはChk1、Chk2、p53などのリン酸化をウェスタン・プロット法および蛍光免疫染色法によってまず検討して、有意な結果が得られた場合にはその上流においてDNA損傷を感知して情報伝達を開始するATMとATRの関与を検討する。そのためにはこれらの機能をsiRNAを用いたRNA干渉によって低下させる。

染色体の数的異常はコルセミドで処理した分裂中期の細胞を集めて染色体を展開して解析する。変化が観察された場合は細胞周期調節において中心的役割をはたすCdkの関与を検討する。活性低下が予測されるが、その場合には外来性にCdkを発現することによって、そのkinase活性を元に戻した状態において染色体解析を行う。

(倫理面への配慮)

細胞株を使用した研究であるために、倫理面への配慮は特に必要はない。

## C. 研究結果

Mus81欠損細胞においてはFACS解析によりS期およびG2期の遅延が観察されたためにcyclinに関連するkinase活性を検討したところ、cyclin Eおよびcyclin Aの活性が

S期において低下していた。この時期、Chk1のSer317におけるリン酸化をウェスタン・プロットによって解析したが、欠損細胞において変化はみられなかった。これは正常でもある程度のレベルの発現があるためであり、チェックポイント活性化の有無は判定できないために、同じ抗体によって蛍光免疫染色をおこなった。その結果約2%のMus81欠損細胞において強いシグナルを検出したのに対して元の野生株においてはほとんど検出されなかった。これはMus81欠損によるChk1の活性化を示唆する。次に、RNA干渉によって上流分子の検討をおこなった。その結果、ATRとコントロールのsiRNAではChk1の活性化の頻度は変化がみられなかったが、ATMのsiRNAによってその活性化は著明に抑制された。また、下流に存在するCdc25Aの発現を蛍光免疫染色によって解析したところ、Chk1の活性化の頻度と一致して低下が観察された。以上より、Mus81機能低下はDNA損傷にตอบสนองしてATM-Chk1-Cdc25A-Cdk2の経路を活性化することが示唆された。

Chk2の活性化についてもS期に同調した細胞を用いて蛍光免疫染色によって検討したところ、Mus81欠損細胞において2%の頻度で活性化が観察され、それは同様にATM依存性であった。このようにS期においてはChk1とChk2の両者がATMによる情報を伝達してCdc25Aの抑制を介してCdk2の機能を抑制していることが明らかとなった。さらにG2期におけるチェックポイントの活性化をみるためにまず、cyclin Bのkinase活性を検討したところ、Mus81欠損細胞において活性の低下がみられた。そこでCdc25Cの断片を基質としてChk1およびChk2のリン酸化活性を検討したところ、G2期においてChk2のみの活性化が観察された。これはATMのsiRNAによって抑制された。さらに正常ではG2期において細胞質から核内に移行するCdc25Cは、Mus81欠損細胞では細胞質に留まる傾向にあった。これらの結果は、Mus81欠損はG2期においてATM-Chk2-Cdc25C-Cdk1の経路を活性化することを示唆する。なおこれらの経路とは独立したp53-p21の経路の関与は明らかではなかった。

以上のS期からG2期におけるチェックポイントの活性化はMus81のホモ接合性変異のみならず、ヘテロ接合性細胞においても観察された。さらに、Eme1のヘテロ接合性変異細胞においても同様の表現型が観察された。これまでの実験においてMus81とEme1の差異は観察されていない。

このような変異細胞いずれにおいても染色体の倍加が亢進していたが、外来性のCdk1の発現によってそのkinase活性を元に戻すと、その頻度は低下した。この結果は、正常のチェックポイントの活性化がCdk1の活性を抑制して染色体の数的異常を誘発することを示唆する。

#### D. 考察

S期においては他の細胞周期以上に複雑な細胞周期の調節機構が存在する。今回の研究ではMus81-Eme1の機能低下に伴うものについてはATM-Chk1/Chk2-Cdc25A/Cdk1の関与が明らかになったが、これはATMを入り口とする経路であるために、数多くのDNA損傷の中では二重鎖切断に応答する経路と考えてよい。それに対してATRを入り口とする経路は他のさまざまなDNA損傷に応答する経路と考えられている。それらの存在は今回の実験では明らかにならなかったが、複製チェックポイントにおいては重要な地位を占めていることが想定されている。Cyclin Eないしはcyclin Aの活性低下から判断すると、今回示したChk1とChk2の活性化だけだと量的には説明がつかない。今後、このATRを介する経路の解明がS期の細胞周期制御の理解に重要になってくる。

今回明らかとなったチェックポイント活性化を介する染色体の数的異常が、放射線発がんなどどのように関与するのは大きな課題であるが、最近この問題を議論するためにいくつかの重要な報告がされている。ヒト細胞の染色体倍加は正常数の染色体と比べてマウスにおいて造腫瘍性であることが最近報告された (Fujiwara et al. Nature 437: 1043-1047, 2005)。さらに実験の最初に用いられていた倍加した染色体は腫瘍形成の過程において数的変動をへて最終的には倍加した状態ではなく異数体として腫瘍

に存在することも明らかとなった。この結果は、倍加した状態では染色体は不安定であり、安定した状態で腫瘍形成に関与するためにはそこから異数体の形成が重要であることを示唆する。この経路については別の報告において証明されている (Shi and King: Nature 437: 1038-1042, 2005)。したがって、染色体の倍加の存在は異数体を介して発がんに関わると考えてよいであろう。

それでは次にMus81-Eme1の機能と発がんの関連性について議論してみたい。これらのノックアウトマウスは既に作製されて海外より報告されている。Mus81のノックアウトマウスはヘテロ接合性においても高頻度にリンパ腫をはじめとする腫瘍を形成することで注目された (McPherson et al. Science 304, 1822-1826, 2004)。ところが、つい最近の別のグループの報告によれば1年半経過した時点ではまだ腫瘍は観察されていない (Dendouga et al. Mol Cell Biol 25, 7569-7579, 2005)。この差異については、以下の考察が可能である。両方のマウスでも染色体の数的異常が存在することは共通している。すなわちMus81の機能低下が染色体数的異常の原因となるが、それだけでは発がんに至らないのである。染色体不安定性に加えて別の異常がおこることが発がんに必要なのである。なお、Eme1のノックアウトマウスでも発がん頻度の上昇は観察されていない。

以上の実験的考察から放射線被ばく者の健康影響については、以下の可能性が示唆される。どのような低線量の被ばくにおいてもヒトはDNA損傷を受け、それが正確に処理されなければ染色体の数的異常の頻度が高くなることが想定される。しかし、それがすぐに発がんに至るのでなく、別のイベントが疾患発症には必要となる。したがって、イベントが何であるのかを解明することが将来の課題となる。

#### E. 結論

Mus81-Eme1のヒト細胞における機能解析によって、これらの分子の機能低下は正常のS期およびG2期の複数のチェックポイントを活性化して細胞周期を制御することが明らかとなった。その結果、Cdkの活性



低下が誘導されるが、その一つの表現型として染色体数的異常が存在する。それだけでは発がんに至らないが、疾患発症の基盤としての染色体不安定性を誘導するために、一生涯における健康影響を評価する上では被ばく情報と染色体の情報は重要である。

#### F. 健康危険情報

どのような低線量の放射線でもDNA損傷によって細胞周期の遅延をおこすために染色体の数的異常は誘発される可能性がある。しかし、それだけですぐに発がんには至らない。一生涯にわたる健康調査が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, Miyagawa K and Koyama H: The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol* 25: 19-24, 2006.

Nobukuni Y, Kohno K and Miyagawa K: Gene trap mutagenesis-based forward genetic approach reveals that the tumor suppressor OVCA1 is a component of the biosynthetic pathway of diphtamide on elongation factor 2. *J Biol Chem* 280: 10572-10577, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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
Yasui W, Oue N, Kitadai Y, Nakayama H	Recent advances in molecular pathobiology of gastric carcinoma	Takubo K, et. al.	Diversity of Gastric Carcinoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy	Springer-Verlag	Tokyo	2005	51-71

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
Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Yoshida K, Noguchi T, Bosserhoff AK and Yasui W	Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer	Oncogene	in press 2005 Dec 5: [Epub ahead of print]	2005
Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H and Yasui W	Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in intestinal phenotype of gastric cancer	J Pathol	208: 633-642	2006
Kobayashi T, Hino S, Oue N, Asahara T, Zollo M, Yasui W and Kikuchi A	Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions	Mol Cell Biol	26: 898-911	2006
Oue N, Mitani Y, Motoshita J, Matsumura S, Yoshida K, Kuniyasu H, Nakayama H and Yasui W	Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer	Cancer	106: 1250-1259	2006
Aung PP, Mitani Y, Sanada Y, Nakayama H, Matsusaki K and Yasui W	Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas	Virchow Arch	in press 2005 Nov 17:1-7 [Epub ahead of print]	2005
Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H and Yasui W	Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma	J Pathol	207: 185-198	2005
Shutoh M, Oue N, Aung PP, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H, Kawahara K and Yasui W	DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric cancer: expression of retinoic acid receptor $\beta$ , cellular retinol binding protein 1 and tazarotene-induced gene 1 is associated with DNA	Cancer	104: 1609-1619	2005

	methylation			
Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, <u>Nakachi K</u> , Matsusaki K, Chayama K and <u>Yasui W</u>	A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer	J Cancer Res Clin Oncol	131: 19-25	2005
Tahara E Jr, Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Mtasuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, <u>Yasui W</u> , Barrett JC, Ide T and Tahara E	GIP3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell	Cancer Immunol Immunother	54: 729-740	2005
Mitani Y, Oue N, Hamai Y, Aung PP, Matsumura S, Nakayama H, Kamata N and <u>Yasui W</u>	Histone H3 acetylation is associated with reduced p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> expression in gastric carcinoma	J Pathol	205: 65-73	2005
Hamai Y, Matsumura S, Kuraoka K, Matsusaki K, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, <u>Nakachi K</u> , Toge T and <u>Yasui W</u>	A single nucleotide polymorphism in the 5'untranslated region of EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer	Pathobiol	172: 133-138	2005
Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, Tanaka S, Mastumura S, <u>Yasui W</u> and Chayama K	Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes	Int J Cancer	115: 388-392	2005
Kondo T, Oue N, Mitani Y, Kuniyasu H, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H and <u>Yasui W</u>	Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma	Oncogene	24: 157-164	2005
Ito R, Oue N, Yoshida K, Nakayama H, <u>Nakachi K</u> and <u>Yasui W</u>	Clinicopathological significance and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer	Virchow Arch	447: 717-722	2005
Motoshita J, Oue N, Nakayama H, Kuraoka K, Aung PP, Taniyama K, Matsusaki K and <u>Yasui W</u>	DNA methylation profile in differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotypes	Cancer Sci	96: 474-479	2005
Mizuiru H, Yoshida K, Toge T Oue N, Aung PP, Noguchi T and <u>Yasui W</u>	DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the sophagus: DNA methylation of RBP1 and TIG1 is associated with tumor stage	Cancer Sci	96: 571-577	2005
Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, <u>Yasui W</u> , Chayama K.	Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers	J Gastroenterol Hepatol	20: 1679-1684	2005
Ogawa T, Hayashi T, Tokunou M, <u>Nakachi K</u> , Trosko J E, Chang C-C and Yorioka N	Suberoylanilide hydroxamic acid enhances gap junctional intercellular communication <i>via</i> acetylation of histone containing connexin 43 gene	Cancer Res	65: 9771-9778	2005

	locus			
Packeisen J, <u>Nakachi K</u> , Boecker W, Brandt B and Buerger H	Cytogenetic differences in breast cancer samples between German and Japanese patients	J Clin Pathol	58: 1101-1103	2005
Ito Y, <u>Nakachi K</u> , Imai K, Hashimoto S, Watanabe Y, Inaba Y, Tamakoshi A and Yoshimura T	JACC Study Group: Stability of frozen serum levels of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor binding protein-3, transforming growth factor beta, soluble Fas, and superoxide dismutase activity for the JACC study	J Epidemiol	15: S67-73	2005
Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K, Sato A, Suga K, Hayashi, S-I, Nagasawa K and <u>Nakachi K</u>	Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time Polymerase Chain Reaction	Lung Cancer	48: 77-83	2005
Yamamoto H, Hanafusa H, Ouchida M, Yano M, Suzuki H, Murakami M, Aoe M, Shimizu N, <u>Nakachi K</u> and Shimizu K	Single nucleotide polymorphisms in the EXO1 gene and risk of colorectal cancer in a Japanese population	Carcinogenesis	26: 411-416	2005
Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama, Y, Sakai, H, Nakajima, T, Ohkura, Y, Takizawa, T, Koike, M, Tani, M, Iwai, T, Sugihara, K, Imai K and <u>Nakachi K</u>	Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients	Carcinogenesis	26: 193-200	2005
Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, <u>Kusunoki Y</u> , and <u>Nakachi K</u>	Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer immunosurveillance	Cancer Res	66: 563-570	2006
<u>Nakachi K</u> , Hayashi T, Imai K and <u>Kusunoki Y</u>	Perspectives on cancer immuno-epidemiology	Cancer Sci	95: 921-929	2005
Ron E, Preston DL, Tokuoka S, Funamoto S, <u>Nishi N</u> , Soda M, Mabuchi K and Kodama K	Solid cancer incidence among atomic bomb survivors: preliminary data from a second follow-up	Acta Med Nagasaki	50: 23-25	2005
Hamajima N, Mutoh H, <u>Eguchi H</u> and Honda H	Minimal sizes of cases with a susceptible genotype and minimal odds ratios among susceptible individuals in case-control studies A single nucleotide	Asian Pac J Cancer Prev	6: 165-169	2005
Hamatani K, <u>Eguchi H</u> , Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, Taga M, <u>Yasui W</u> and <u>Nakachi K</u>	Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens.	J Histochem Cytochem	in press	2006
Hayashi T, Morishita Y,	Long-term effects of	Am J Med	118: 83-86	2005

Kubo Y, <u>Kusunoki Y</u> , Hayashi I, Kasagi F, Hakoda M, Kyoizumi S and <u>Nakachi K</u>	radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors			
Kyoizumi S, <u>Kusunoki Y</u> , Hayashi T, Hakoda, M, Cologne J B and <u>Nakachi K</u>	Individual variation of somatic gene mutability in relation to cancer susceptibility: Prospective study on erythrocyte glycophorin A gene mutations of atomic bomb survivors	Cancer Res	65: 5462-5469	2005
Kubo Y, Yamaoka M and <u>Kusunoki Y</u>	A preliminary study measuring the number of T-cell receptor-rearrangement excision circles (TRECs) in peripheral blood T-cell populations of A-bomb survivors and control populations	Cytometry Res	in press	2006
Kashiwabara S, Kashimoto N, Uesaka T, Wakabayashi K, <u>Kamiya K</u> and Watanabe H	Tumor Induction by Azoxymethane (AOM) and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in F344 Rat Gastric Mucosa Featuring Intestinal Metaplasia Caused by X-irradiation	J Exp Clin Cancer Res	24: 305-312	2005
Kubo N, Myojin Y, Shimamoto F, Kashimoto N, Kyo E, <u>Kamiya K</u> and Watanabe H	Protective Effects of a Water-soluble Extract from Cultured Medium of Ganoderma Lucidum (Reishi) Mycelia and Agaricus blazei Murill Against X-irradiation in B6C3F1 Mice: Increased Small Intestinal Crypt Survival and Prolongation of Average Time to Animal Death	Int J Mol Med	15: 401-406	2005
Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, <u>Miyagawa K</u> and Koyama H	The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination	DNA Cell Biol	in press	2006
Nobukuni Y, Kohno K and <u>Miyagawa K</u>	Gene trap mutagenesis-based forward genetic approach reveals that the tumor suppressor OVCA1 is a component of the biosynthetic pathway of diphthamide on elongation factor 2	J Biol Chem	280: 10572-10577	2005

# Recent Advances in Molecular Pathobiology of Gastric Carcinoma

WATARU YASUI<sup>1</sup>, NAOHIDE OUE<sup>1</sup>, YASUHIKO KITADAI<sup>2</sup>, and HIROFUMI NAKAYAMA<sup>1</sup>

## Introduction

Cancer is a chronic proliferative disease with multiple genetic and epigenetic alterations, namely, disease with altered gene expression. Integrated research in molecular pathology over the past 15 years has uncovered the molecular mechanism of the development and progression of gastric cancer [1–5]. Multiple genetic and epigenetic alterations involve inactivation of tumor suppressor genes, activation of oncogenes, abnormalities of DNA repair genes, cell-cycle regulators, cell adhesion molecules, growth factors/receptors, matrix metalloproteinases, and so on. Gastric carcinoma is histologically classified into two types, well-differentiated and poorly differentiated types, and the former can be further classified into those with gastric and intestinal phenotypes. Some of these alterations occur commonly in both well-differentiated and poorly differentiated types whereas some differ depending on the histological types or mucin phenotypes. Recent advances in genomic science have enabled revealing the molecular mechanism of stomach carcinogenesis more in detail; these include global analysis of gene expression by microarray or other techniques and study of the association of genetic polymorphism with cancer risk. A better knowledge of the molecular bases of gastric cancer may lead to new approaches to diagnosis, treatment, and prevention.

This chapter presents an overview of the classical pathway of molecular stomach carcinogenesis, mechanism of epigenetic alterations, importance of genetic polymorphism, search for novel genes specific in gastric carcinoma through global analysis of gene expression, and the clinical implications.

---

<sup>1</sup>Department of Molecular Pathology, <sup>2</sup>Department of Medicine and Molecular Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan  
e-mail: [wyasui@hiroshima-u.ac.jp](mailto:wyasui@hiroshima-u.ac.jp)

TABLE 1. Footprint of molecular research on gastric cancer

Cancer in general		Gastric carcinoma	
1911	Rous sarcoma virus	1983	<i>Helicobacter pylori</i>
1914	Fijinami sarcoma virus		
1953	DNA double helix structure	1984	<i>c-myc</i> amplification
1956	Viral transformation	1985	Establishment of TMK-1
1969	Oncogene theory	1986	EGF overexpression
	Normal phenotype by cell fusion		H- <i>ras</i> altered expression
1970	Reverse transcriptase	1986	Identification of <i>HST-1</i>
1971	Knudson's two-hit theory	1988	EGFR overexpression
1972	Epidermal growth factor (EGF)		<i>HER-2/c-erbB2</i> amplification
	Apoptosis	1990	K- <i>sam</i> amplification
1973	DNA transfection	1991	Loss of E-cadherin
1975	Southern blot analysis		Multiple loss of heterozygosity (LOH)
1976	Proto-oncogene <i>c-src</i>	1992	<i>p53/APC</i> mutations
1979	Transformation by cellular DNA		<i>c-met</i> amplification
	<i>c-src</i> encodes tyrosine kinase		Cancer-stromal interaction
1982	Human H- <i>ras</i> oncogene	1993	Genetic changes in intestinal metaplasia
1983	Polymerase chain reaction (PCR) method		Interleukin 1 (IL-1) as an autocrine growth factor
	Platelet-derived growth factor (PDGF) as <i>c-sis</i> , EGFR as <i>v-erbB</i>		Molecular diagnosis
1986	<i>Rb</i> as a tumor suppressor gene	1994	Microsatellite instability in multiple cancer
	Transcription factor Sp1	1995	Increased telomerase activity
1987	Cell adhesion molecule E-cadherin		

1988	Vogelstein's model for colon cancer	
1989	<i>p53</i> as a tumor suppressor	
1990	Cell-cycle regulator <i>p34<sup>cdc2</sup></i> Microsatellite assay	
1991	Gene therapy for melanoma <i>APC</i> as a causative gene for familial adenomatous polyposis (FAP)	
1993	Angiogenesis: VEGF <i>hMSH2</i> as a causative gene for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC)	
1994	<i>p53</i> as transcription factor for <i>p21</i> TRAP assay for telomerase	
1995	DNA microarray technology Serial analysis of gene expression	
1996	CpG island methylation of <i>p16</i>	
1997	Laser capture microdissection Histone deacetylation	
1999	Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) DNA demethylase	
2001	Chromosome 22 whole genome sequence	
2003	Draft sequence of human genome Complete sequence of human genome	
1996		Cyclin E gene amplification
1997		Reduced <i>p21</i> expression
1998		Microsatellite instability in precancerous lesion
1999		Reduced <i>p27</i> expression
2000		E-cadherin germline mutation
2002		hTERT expression
2004		IL-8 and VEGF expression
		<i>hMLH1</i> hypermethylation
		<i>p73</i> genomic imbalance
		Hypoacetylation of histones
		23040 gene expression profile by microarray
		Serial analysis of gene expression (SAGE) libraries of gastric cancer

Era of Post-Genome  
and Genomic Medicine



## Overview of the Classical Pathway of Molecular Stomach Carcinogenesis

### *Footprint of Molecular Research on Gastric Carcinoma*

We have learned from the footprint of cancer research that the history of cancer research is a repetition of establishment of hypothesis, development of new technologies, and discovery of novel findings (Table 1). For instance, Todaro and Huebner [6] hypothesized the oncogene theory in 1969 and Knudson [7] proposed the two-hit theory in 1971. After several years, methods of DNA transfection, Southern blotting, and polymerase chain reaction (PCR) amplification were developed and enabled them to verify and identify *c-src* as an oncogene and *Rb* as a tumor suppressor gene. Microarray is a powerful technique to reveal gene expression profiles of individual cancers. As of April 2003, the human genome sequence has been completed, and this is now the era of postgenome sequence and genomic medicine.

The history of molecular research on gastric carcinoma began only 20 years ago when *c-myc* amplification was found in primary gastric carcinoma in 1984 [8]. The first oncogene of gastric carcinoma, *HST-1*, was isolated from a primary gastric cancer in 1986 in the National Cancer Center in Tokyo [9]. In the late 1980s and 1990s, extensive analyses of molecular pathogenesis had been performed and the role and significance of novel genes and molecules, identified in other tumors or systems, had been clarified in gastric carcinoma with minimal time lag [4]. Examples include epidermal growth factor (EGF), EGF receptor (EGFR), E-cadherin, *p53*, cyclin E, *p27<sup>Kip1</sup>*, human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*), and *hMLH1*. The importance of DNA methylation and genetic instability during stomach carcinogenesis was also proved. In 1993, a routine system of molecular diagnosis on pathology specimens was established and this useful information was given to clinics [2,10]. Furthermore, the molecular mechanism of cancer-stromal interaction and genetic changes in intestinal metaplasia was explored, and the HGF/*c-met* system and mutations of *p53* and *APC*, respectively, were found to be involved [4]. Recently, dissection of gene expression profiles has been carried out using microarray or other technology, and vast amounts of information regarding carcinogenesis, biological behavior, and chemosensitivity have been obtained, information that is directly connected with diagnosis and treatment.

### *Outline of Molecular Stomach Carcinogenesis*

A variety of genetic and epigenetic alterations occur during multistep stomach carcinogenesis (Fig. 1) [1–5]; these include activation of oncogenes and growth factors/receptors, inactivation of tumor suppressor genes, DNA repair genes, and cell adhesion molecules, and abnormalities of cell-cycle regulators. Genetic alterations found in gastric carcinoma are gene amplification, point mutation, and loss of heterozygosity, whereas representative epigenetic changes are gene silencing by DNA methylation and overexpression at the transcriptional level [5]. Some alterations are found in both well- and poorly differentiated types, and others are unique depending on the histological type. The former may confer development of cancer whereas the latter may participate in tumor morphogenesis and biological behavior. Genetic

polymorphism predisposes to an endogenous cause and alters cancer susceptibility. Genetic instability, cytosine p guanine (CpG) island methylation, telomerase activation, and *p53* mutation commonly participate in the early steps of stomach carcinogenesis. Amplification and overexpression of the *c-met* and cyclin E genes are frequently associated with the advanced stage. Reduced expression of p27<sup>Kip1</sup> participates in both development and progression of gastric carcinoma. Overexpression of growth factors/cytokines confers progression through multiple autocrine loops. On the other hand, *K-ras* mutations, *HER-2/c-erbB2* amplification, and *APC* mutation preferentially occur in the well-differentiated type. Precancerous lesions such as intestinal metaplasia and adenoma share alterations similar to those of the well-differentiated carcinomas. Loss of heterozygosity (LOH) of the *p73* gene occurs specifically in well-differentiated gastric carcinomas with foveolar epithelial phenotype. Inactivation of cadherins and catenins and amplification of the *K-sam* and *c-met* are frequently associated with poorly differentiated or scirrhous-type carcinomas.

### *Telomeric Repeats and Telomerase*

The DNA sequence at telomeres consists of tandem repeats of TTAGGG, which protects chromosome ends from recombination and fusion and stabilizes the chromosome structure. Maintenance of the telomere by telomerase activation induces cellular immortalization [11]. Strong telomerase activity associated with hTERT expression is present in a majority of gastric carcinomas regardless of histological type and tumor staging [4]. Some intestinal metaplasia and adenomas express telomerase activity at certain levels. Telomerase activity is found in half of gastric adenomas at a level of activity about 10% of that in gastric carcinomas [12]. Hyperplasia of epithelial “stem cells” expressing hTERT and telomerase activity in precancerous lesion may be triggered by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

PINX1, a telomeric-repeat binding factor (TRF)1-binding protein, binds hTERT and inhibits its activity directly [13]. Reduced expression of PINX1 is detected in 70% of gastric carcinomas that show higher telomerase activity [13]. LOH of *PINX1* locus (8p23) is found in 33% of gastric carcinoma and is correlated significantly with reduced PINX1 expression. There are cases with reduced PINX1 expression but without LOH. Treatment with histone deacetylase inhibitor (HDAC) induces PINX1 expression, enhances histone H4 acetylation, and inhibits telomerase activity in gastric carcinoma cell lines. Therefore, reduced expression of PINX1 by LOH of *PINX1* locus and hypoacetylation of histone H4 cause telomerase activation, resulting in cancer development.

POT1, a telomere end-binding protein, is proposed not only to cap telomeres but also to recruit telomerase to the ends of chromosomes [14]. POT1 expression levels are significantly higher in gastric carcinomas of advanced stage, and downregulation is frequently observed in those of early stage [14]. Reduced expression of POT1 is associated with telomere shortening and decreased telomerase activity. Inhibition of *POT1* by antisense oligonucleotides increases telomere shortening, inhibits telomerase activity, and increases anaphase bridging, a sign of telomere dysfunction. Therefore, POT1 may play an important role in regulation of telomere length and that inhibition of POT1 may induce telomere dysfunction. Changes in POT1 expression levels may be associated with development and progression of gastric carcinoma.

## Microsatellite Instability

Genomic instability is broadly classified into microsatellite instability associated with mutator phenotype and chromosome instability recognized by gross chromosomal abnormalities. A defect in DNA mismatch repair (MMR) is responsible for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). Target genes for microsatellite instability (MSI) include *TGFBR2*, *IGF1R*, *BAX*, *hMSH3*, *hMSH6*, and *MBD4* [4]. MSI or genetic instability causes accumulation of genetic alterations and participates in pathogenesis of sporadic gastric carcinomas as well [4]. The frequency of MSI is estimated to be about 30% of gastric carcinoma; the frequency is especially high in well-differentiated gastric carcinoma of foveolar phenotype with papillary morphology. Some intestinal metaplasias and adenomas also show MSI, and these should be considered "true precancerous lesions." Another important aspect of genetic instability is that multiple primary cancers frequently display MSI. Representative reports demonstrating the relation between MSI and tumor multiplicity are shown in Table 2. Although the frequency of MSI differs depending on the number and site of microsatellites, all show that the frequency of MSI is significantly higher in cases with multiple primary cancers. This finding indicates that the detection of MSI in a cancer may serve as a good molecular marker for the assessment of the risk of a second cancer in the same patient. CpG island hypermethylation of *hMLH1* and loss of expression is the main mechanism of MSI in sporadic gastric carcinoma [15].

## Cell-Cycle Regulators

Cell-cycle checkpoints are regulatory pathway that control cell-cycle transitions and ensure that DNA replication and chromosome segregation are completed with high fidelity. The checkpoints also respond to damage by arresting the cell cycle to provide time for repair. Imbalance in cell-cycle regulators results in genomic instability and unbridled cell proliferation and is implicated in stomach carcinogenesis [2,4]. Table 3 shows representative abnormalities of cell-cycle regulators found in gastric carcinoma. The cyclin E gene is amplified in 15%–20% of gastric carcinoma, and the over-

TABLE 2. Representative reports of Microsatellite instability (MSI) and multiple primary gastric carcinomas

Multiple vs. solitary		MSI cases	Reference
Early gastric cancer	Multiple cancer	21/63 (33%)	Takahashi H, Endo T, Yamashita K, et al. (2002) Int J Cancer 100:419–424
	Solitary cancer	3/39 (8%)	
Synchronous gastric cancer + adenoma	Multiple cancer	9/18 (50%)	Lee HS, Lee BL, Woo DK, et al. (2001) Int J Cancer 91:619–624
	Solitary cancer	14/149 (9%)	
Gastric cancer	Multiple cancer	11/14 (79%)	Nakashima H, Honda M, Inoue H, et al. (1995) Int J Cancer 64:239–242
	Solitary cancer	5/24 (21%)	
Gastrointestinal and biliary cancer	Multiple cancer	34/38 (89%)	Horii A, Han JHJ, Shimada M, et al. (1994) Cancer Res 54:3373–3375
	Solitary cancer	19/174 (11%)	

TABLE 3. Abnormalities in cell-cycle regulators found in gastric carcinoma

Cell-cycle regulators	Method <sup>a</sup>	Incidence	Role <sup>b</sup>	References
CDC2 high kinase activity	Kinase	92%	D	Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y et al. (1993) <i>Int J Cancer</i> 53:36–41
Cyclin E gene amplification	Southern	16%	P	Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, et al. (1995) <i>Jpn J Cancer Res</i> 86:617–621
Cyclin E overexpression	IHC	27%	D/P	Yasui W, Yokozaki H, Shimamoto F, et al. (1999) <i>Pathol Int</i> 49:763–774
CDC25A overexpression	Northern	38%	D	Kudo Y, Yasui W, Ue T, et al. (1997) <i>Jpn J Cancer Res</i> 88:947–952
CDC25B overexpression	Northern	70%	D/P	Kudo Y, Yasui W, Ue T, et al. (1997) <i>Jpn J Cancer Res</i> 88:947–952
p21 reduced expression	Northern	53%	D	Akama Y, Yasui W, Kuniyasu H, et al. (1996) <i>Mol Cell Differ</i> 4:187–198
p21 reduced expression	IHC	46%	D	Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, et al. (1996) <i>J Pathol</i> 180:122–128
p27 reduced expression	IHC	56%	D/P	Yasui W, Kudo Y, Semba S, et al. (1997) <i>Jpn J Cancer Res</i> 88:625–629
E2F-1 overexpression	Northern	40%	D	Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, et al. (1999) <i>Int J Cancer</i> 81:535–538
E2F-3 reduced expression	Northern	70%	D	Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, et al. (1999) <i>Int J Cancer</i> 81:535–538
Chk1 overexpression	Western	71%	D	Shigeishi H, Yokozaki H, Oue N, et al. (2002) <i>Int J Cancer</i> 99:58–62
Chk2 overexpression	Western	78%	D	Shigeishi H, Yokozaki H, Oue N, et al. (2002) <i>Int J Cancer</i> 99:58–62

<sup>a</sup> Kinase, kinase assay; Southern, Southern blotting; Northern, Northern blotting; IHC, immunohistochemistry; Western, Western blotting

<sup>b</sup> Participation in tumor development (D) or progression (P)

expression of cyclin E tends to correlate with tumor invasion and advanced stage. The overexpression of CDC25B is found in 70% of gastric carcinoma that is associated with invasion and metastasis. On the other hand, reduction in the expression of p27<sup>Kip1</sup> is associated with both development and progression of gastric carcinoma. An important downstream target of cyclins/CDKs at G<sub>1</sub>/S transition is a family of transcription factor E2F. E2F-1 is overexpressed in 40% of gastric carcinoma and 70% of gastric carcinomas show reduced expression of E2F-3, suggesting that E2F family members may have a distinct role in stomach carcinogenesis. Chk1 and Chk2 are DNA damage-activated kinases involved in the G<sub>2</sub>/M checkpoint. Both Chk1 and Chk2 are overex-