

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト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と  
その臨床応用に関する研究  
(H16-3次がん一般-001)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 廣橋 説雄

平成19(2007)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

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と その臨床応用に関する研究 .....	1
主任研究者 廣橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	

## II. 分担研究報告

1. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる蛋白発現異常の網羅的解析 研究の総括 第3次対がん総合戦略研究事業の重点的推進 .....	20
廣橋 説雄 (国立がんセンター研究所)	
2. 諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる遺伝子発現異常の網羅的解析 .....	25
坂元 亨宇 (慶應義塾大学医学部病理学教室)	
3. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 .....	29
稲澤 譲治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)	
4. 諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析 .....	33
細田 文恵 (国立がんセンター研究所ゲノム構造解析プロジェクト)	
5. 染色体欠失の検出を基盤とするがん関連遺伝子の把握とその機能の解析 .....	36
村上 善則 (国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト)	
6. MS-RDA法によるエピジェネティックな発がん機構の解明 .....	45
牛島 俊和 (国立がんセンター研究所発がん研究部)	
7. 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 .....	49
金井 弥栄 (国立がんセンター研究所病理部)	
8. がん関連遺伝子を標的としたがん制御に関する研究 .....	54
今井 浩三 (札幌医科大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	60
---------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金第3次対がん総合戦略研究事業  
総括研究報告書

ヒト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  
がんの本態解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 廣橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：微細ゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出する高密度・高精度の in-house BAC を用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション法により、肝・膵等における多段階発がん早期のゲノム構造異常を網羅的に明らかにした。ゲノム構造異常の蓄積過程が複数の組み合わせで並立し、多段階発がん過程が進展していることを示した。諸臓器がんにおいてゲノム構造異常を認める領域から、がん関連遺伝子の同定をすすめた。

ゲノム構造異常を示す領域から腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制遺伝子 *Tslc1/Igsf4* の欠損マウスが、肺腺腫・肺腺がんを高率に自然発生することを見出した。TCF-4 の結合蛋白としてポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) と Ku70 を同定した。PARP-1 は TCF-4/ $\beta$ -カテニンの転写活性を増強し、未分化な腸上皮細胞や大腸腺腫では、 $\beta$ -カテニンと共に強発現していた。RNA 干渉による Ku70 の発現抑制は、TCF-4/ $\beta$ -カテニン間の結合と転写活性を増強し、その標的遺伝子の発現量を増加させた。G 蛋白共役型受容体 Gpr49 が皮膚基底細胞がんで過剰発現し、ソニックヘッジホッグ経路の下流で発現が制御されていること、基底細胞がんの増殖に関与していることを明らかにした。さらにこの Gpr49 は肝細胞がんにおいても過剰発現を認めるが、肝細胞がん株では、Wnt/ $\beta$ -カテニン系の標的分子であることを示した。蛍光二次元電気泳動法を改良してプロテオーム解析技術の革新を図り、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移を高い精度で予測できる蛋白質としてフェチンを特定した。マイクロサテライト不安定性陽性胃がんにおける、HLA class I 関連遺伝子の高頻度な変異を明らかにした。MSI 陽性胃がんと陰性胃がんの間で、VEGF 等血管新生関連遺伝子の異常に相違があることを示した。

DNA メチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法である BAC array-based MCA (BAMCA) 法や、クロマチン免疫沈降法とゲノムアレイを組み合わせた ChIP-on-chip 法を開発し、すでに本研究で開発していた MS-RDA 法を加え、諸臓

器のがん DNA メチル化によって不活化される遺伝子の同定をすすめた。ドイツ人神経芽細胞腫症例においても、日本人例と同様に、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) の有無が予後と密接に関連すること、N-myc 遺伝子増幅をもつ症例はほぼ全例 CIMP 陽性であり、再発危険度は CIMP の有無のみで決まり N-myc 遺伝子増幅には関係しないことを見出した。DNA メチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても既に前がん段階にあると認識された。DNA メチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんを生じ、前がん状態におけるゲノム規模の DNA メチル化異常が症例の予後まで規定する可能性がある。

#### 分担研究者

1. 廣橋 説雄 国立がんセンター  
研究所 所長
2. 坂元 亨宇 慶應義塾大学  
教授
3. 稲澤 諒治 東京医科歯科大学  
難治疾患研究所  
教授
4. 細田 文恵 国立がんセンター  
研究所 室長
5. 村上 善則 国立がんセンター  
研究所 プロジェクト  
リーダー (室長)
6. 牛島 俊和 国立がんセンター  
研究所 部長
7. 金井 弥栄 国立がんセンター  
研究所 部長
8. 今井 浩三 札幌医科大学  
学長

#### A. 研究目的

独自に開発してきた高精度なゲノム解析技術を用い、諸臓器のがんにおけるジェネ

ティックな遺伝子異常を網羅的に把握し、がんの個性を新しい視点から分類・整理する。がん特異的ゲノム異常領域より新規のがん関連遺伝子の同定をすすめ、がんの予防・治療の標的候補を挙げる。

遺伝子改変動物を作製し、腫瘍抑制活性を指標として同定したがん抑制蛋白質 TSLC1 の発がん過程への寄与の実態を示す。 $\beta$ -カテニンと TCF-4 を含む転写複合体には大腸がんの治療標的の候補分子を含む可能性が高いと考え、プロテオーム解析技術を用い、その構成蛋白を網羅的に探索する。臓器がんにおける網羅的遺伝子発現解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤の理解をすすめる。独自に開発してきたプロテオーム解析技術を用い、消化管間葉系悪性腫瘍の術後再発を予測するバイオマーカーを開発する。マイクロサテライト不安定性 (MSI) の有無によりがんの病態は大きく異なることから、MSI 陽性がんにおいて、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、系統的に解析する。

昨年度までに、日本人神経芽細胞腫症例においてPCDHB 群遺伝子等を指標とする CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) が症例の予後とよく相関することを示していたが、今年度は、ドイツ人神経芽細胞腫症例を用いて、CIMP の予後マーカーとしての有用性を確立する。MS-RDA 法によりメラノーマ・大腸がんにおいて DNA メチル化により不活化されるがん関連遺伝子を同定する。前がん状態から腎細胞がんの悪性進展に到るまでの諸過程に対応する組織検体において DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析し、多段階発がん過程における DNA メチル化異常の臨床病理学的意義の理解をすすめる。

## B. 研究方法

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がん関連遺伝子を網羅的に含むゲノムアレイ (MCG Cancer Array 800) ならびにヒトゲノム全体を高密度に検索できる高密度ゲノムアレイ (MCG Whole Genome Array-4500) を用いて、比較ゲノムハイブリダイゼーション法によるゲノム構造異常の網羅的な探索を諸臓器のがんの培養細胞ならびに手術検体において施行した。手術検体は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を施行し、がん細胞のみを選別して解析に供した。得られたゲノム異常プロファイルを経典病理像と照合し、がんの病理組織像や症例の臨床的な特性と相関するゲノム構造異常の抽出を行った。諸臓器がんにおいてゲノム構造異常を認める領域から、がん関連遺伝子の同定をすすめた。

### 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

Tslc1/Igsf4 遺伝子のエクソン 1 を欠失させ、ネオマイシン耐性遺伝子と LacZ 遺伝子とに置換した全身欠損マウスを作成し、自家繁殖させた。適当な時期に全身臓器を探索し、肺腫瘍の有無と性状を組織学的に評価した。

FLAG エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養大腸がん細胞に発現させ、免疫沈降を行い、質量分析を用いて共同沈降する複合体に含まれる蛋白質を網羅的に同定した。

皮膚がん等の組織検体に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、候補がん関連遺伝子の発現ならびに機能を、臨床検体における *in situ* ハイブリダイゼーションならびに免疫組織化学、培養細胞における強制発現や発現抑制によって解析した。

手術後 1 年以内に転移を来した消化管間葉系悪性腫瘍症例と、2 年以上転移を来さなかった症例について、原発巣の蛋白質発現プロファイルを蛍光二次元電気泳動法で調べた。バイオインフォマティクス手法を用いて、術後再発した症例を無再発の症例と区別するに有用な蛋白質を同定した。多数症例において同定した候補蛋白質の発現を免疫組織化学的に評価し、術後転移および生存との相関を調べた。

散発性消化器がんにおいて、国際ガイドラインに基づき、マイクロサテライトマーカーを用いて MSI を検索した。MSI 陽性ある

いは陰性胃癌において、HLA-A・-B・-C 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化状態・遺伝子変異・蛋白発現等を解析した。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

BAMCA 法・ChIP-on-chip 法により、食道扁平上皮がんにおいて DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定を試みた。MS-RDA 法により、メラノーマ細胞株・大腸がん細胞株で DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定を試みた。ドイツがんセンターから供与を受けた神経芽細胞腫臨床材料において、メチル化特異的 PCR (MSP) 法、定量的 MSP 法等を施行し、臨床検体における DNA メチル化状態と症例の予後との相関を解析した。非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織・腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織ならびに腫瘍組織において、9 箇所 C 型 CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を MSP 法およびバイサルファイト制限酵素処理 (COBRA) 法で評価し、さらに BAMCA 法により DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した。DNA メチル化の状態と、腎腫瘍の臨床病理学的因子ならびに症例の予後との相関を検討した。

(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すすめた。手術材料の残余の組織の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。患

者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせないようにした。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておく、解析の過程では無記名として検体番号のみで取り扱う等の細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守し、所属施設の動物倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

肝がん臨床検体 87 症例における染色体構造異常の全体像を明らかにし、構造異常の組み合わせに基づく肝がんの分類を行なった。構造異常に基づく肝がんの亜分類から、8q の増幅、1q・16q の増幅、17q の増幅といった各群に特徴的な染色体異常が抽出された。発現解析の結果と照合し、17q の増幅の標的のひとつとして、mTOR 経路で作用する S6 キナーゼを同定した。培養肝がん細胞において、17q の増幅と mTOR 経路の阻害剤であるラパマイシンに対する感受性に有意な相関を認めた。mTOR 経路が、肝がんの新しい治療標的となる可能性が示唆された。

肝がんにおけるジェネティックならびにエピジェネティックな遺伝子異常の相互の関係を理解する目的で、染色体不安定性と DNA メチル化不安定性の相関について検討

を行なった。9箇所 CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態を評価し、染色体不安定性との相関を検討した。染色体不安定性の少ない肝がんの一部に、DNA メチル化不安定性が強いグループが見られた。肝炎ウイルス感染とゲノム不安定性の間に有意な相関を認めた。

結節内結節型肝がんの解析により、5q の非常に狭い領域が肝がんの悪性進展に伴い欠損することを見いだした。5q の当該領域にある APC 遺伝子の体細胞遺伝子変異を、肝がんにおいて初めて報告した。

膵がん 44 症例の手術検体の染色体構造異常を網羅的に解析し、さらにはがん組織の免疫不全マウス移植株における網羅的な発現解析の結果と照合することで、高頻度に増幅を認める領域に位置する膵がんの治療標的候補分子の同定をすすめた。膵がんの悪性度や患者生命予後と相関する、染色体構造異常を同定した。

胃がん臨床検体 129 症例における染色体構造異常の全体像を明らかにし、構造異常の組み合わせに基づく胃がんの分類を行なった。ゲノムコピー数異常の少ない群には女性例が多く、ゲノムコピー数異常の多い群に比して、低分化で腫瘍径が大きく脈管侵襲・神経浸潤を伴うタイプ 4 の硬がんが有意に高頻度であった。第 III ないし IV 病期の症例に限ると、ゲノムコピー数異常の少ない群のほうが予後不良であった。新規がん関連遺伝子の同定を目指して網羅的発現解析を実施し、ゲノム増幅症例で顕著な発現亢進が見られることを基準として

95 ヶ所の増幅領域から標的遺伝子候補 600 遺伝子を抽出した。

胃がん細胞株における 9p24.2 ホモ欠失の標的遺伝子が、VLDLR であることを明らかにした。VLDLR 遺伝子のプロモーターは DNA メチル化により高頻度に不活化されていた。臨床検体においても高頻度に DNA メチル化を検出し、VLDLR type I を胃がん細胞株に強制発現すると増殖抑制効果を示したことから、本遺伝子は胃がん抑制遺伝子候補と考えられた。

すでに食道扁平上皮がんではホモ欠失またはプロモーターのメチル化により不活化されるがん抑制遺伝子候補として同定した LRP1B は、口腔がんの細胞株・臨床検体双方において高頻度に DNA メチル化で不活化されていた。

非小細胞肺癌細胞株に新規 13q21.2 ホモ欠失を検出し、プロトカドヘリン 20 (PCDH20) が標的遺伝子であることを明らかにした。PCDH20 の mRNA レベルでの発現は細胞株の 52.6% で消失し、これが PCDH20 遺伝子プロモーターのメチル化に起因することを明らかにした。さらに非小細胞肺癌臨床検体の 54.2% (32/59) にメチル化を検出し、PCDH20 メチル化陽性例は有意に予後不良であることを示した。

甲状腺未分化がん細胞株の 8p12 共通増幅領域から、標的がん遺伝子候補の DUSP26 を同定した。甲状腺未分化がん細胞株での DUSP26 強制発現と発現抑制により、細胞増殖促進と抑制効果がそれぞれ認められ、この効果は p38MAPK を基質としたアポトーシ

ス抑制作用に起因する可能性が示唆された。

グリオーマの高頻度 13q 欠失の標的遺伝子候補として、RGC32 を同定した。RGC32 は臨床検体でも p53 点突然変異を伴う進行例で発現が低下していた。RGC32 は転写因子 p53 の直接標的であることが示された。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

Tslcl<sup>-/-</sup>マウスを長期間飼育した結果、12 ヶ月を越える頃から肺腫瘍が高率に自然発生することを見出した。月齢 15 ヶ月の Tslcl<sup>-/-</sup>マウスでは、30 匹中 10 匹に肺腺腫を生じ、このうちの 1 匹では別に肺腺がんが生じていた。Tslcl<sup>+/+</sup>マウスでは 20 匹中 1 匹に顕微鏡レベルでの微小な肺腺腫が認められたのみであり、また Tslcl<sup>-/-</sup>マウスでも 19 匹中全く肺腺腫を認めず、Tslcl<sup>-/-</sup>マウスにおける肺腺腫の発生が有意に高いことが示された (p=0.33)。このことから、Tslcl/IgSF4 遺伝子の不活化が、肺腫瘍発生の抑制に確かに寄与していることが示された。一方 Tslcl<sup>-/-</sup>マウスについては、16 ヶ月以上長期飼育した場合に肺腺腫、肺腺がんが高率に自然発生することを予備的に見出しているため、その腫瘍発生率が野生型マウスと比較して有意に上昇するかどうかの検討をさらに続けている。腫瘍径の大きい 7 例については、組織の一部を凍結し、ゲノム DNA を抽出し、K-ras2, Tp53, Egfr 遺伝子の変異の有無を予備的に解析したが、現時点では変異を示す腫瘍は見出せなかった。

Ku70・ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ-1 (PARP-1) などの核蛋白質が、TCF-4 と複合体を形成することが分かった。PARP-1 の発現亢進は、 $\beta$ -カテニンによる TCF の転写活性を増強したが、その酵素活性は必要としなかった。RNA 干渉により PARP-1 の発現を低下させると、その転写活性および細胞増殖が抑制された。アルキル化剤による DNA 損傷で起こる PARP-1 の自己修飾は、TCF-4 との結合を阻害した。家族性大腸腺腫症 (FAP) およびその実験モデルである Min マウスの腺腫では、PARP-1 の発現は  $\beta$ -カテニンと共に増加していた。RNA 干渉による Ku70 の発現抑制は、TCF-4/ $\beta$ -カテニン間の結合と転写活性を増強し、その標的遺伝子の発現量を増加させた。アルキル化剤であるブレオマイシン処理によって DNA 切断が生じると、PARP-1 は自己ポリ ADP リボシル化され TCF-4 から乖離したが、Ku70 の結合は逆に増強し、相乗的に TCF-4/ $\beta$ -カテニンの転写活性を抑制すると考えられた。

DNA マイクロアレイにより、基底細胞がん有意に発現する新規遺伝子 G 蛋白共役型受容体 49 (Gpr49) を同定した。定量 PCR にて Gpr49 は基底細胞がん手術検体にも有意に高発現していた。In situ hybridization 法では、GPR49 が腫瘍細胞内に特異的に発現していることが示された。マウス基底細胞がん細胞株 AS2001 にヘッジホッグシグナル経路を抑制するシクロパミンを投与すると、Gpr49 の発現が低下した。ヘッジホッグシグナル経路に易反応性



の胎児マウス線維芽細胞株 NIH3T3 にヘッジホッグのアゴニストであるパリモルファミンを作用させると、Gpr49 の発現量が増加した。ASZ001 において RNA 干渉により Gpr49 発現を抑制すると、細胞増殖が低下した。HaCaT 細胞に Gpr49 を強制発現すると、細胞増殖が亢進し、免疫不全マウスに移植したところ有棘細胞がん様の組織所見を呈する腫瘍形成が認められた。

昨年度までに、肝細胞がんにおける  $\beta$ -カテニンの変異と Gpr49 の発現が強い相関関係にあることを報告していたが、本年度の検討で、Gpr49 の発現は GSK-3 $\beta$  阻害剤による Wnt シグナルの活性化により強く促進され、その作用は阻害剤の濃度および時間依存的であった。Gpr49 プロモーターに TCF/LEF コンセンサス配列が存在し、Wnt シグナルの特異的阻害物質でも Gpr49 の発現が抑制された。

蛍光二次元電気泳動法により、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移と発現が相関する 43 個の蛋白質スポットを同定した。質量分析の結果、これら 43 個の蛋白質スポットは、25 個の異なる遺伝子産物であることが分かった。このうちのひとつであるフェチンの発現が術後転移と逆相関することを、ウェスタン法・免疫組織化学にて確認した。210 症例を対象とする免疫染色を追加し、術後転移や生存と有意な逆相関があることを確認した。

胃がんの 43%、45%、32% に HLA-A、-B、-C の発現低下をそれぞれ認めた。HLA-A の発現低下は MSI 陽性胃がん で有意に頻度が高

かった。HLA-A、-B、-C の DNA メチル化を 38%、40%、28% でそれぞれ認めた。HLA-A の DNA メチル化は MSI 陽性胃がん で有意に頻度が高かった。

VEGF 発現を胃がんの 46% に認め、その発現レベルは静脈侵襲・リンパ節転移・遠隔転移・病期と相関した。腫瘍内の血管密度は、VEGF 陽性群で有意に高値であった。MSI 陽性症例における VEGF 発現の頻度は、MSI 陰性症例と比較して有意に低頻度であった。FGF2 発現を胃がんの 54% に認め、低分化度および深達度と相関した。腫瘍内の血管密度は、FGF2 陽性群で有意に高値であった。MSI 陽性症例における FGF2 発現の頻度は、MSI 陰性症例と比較して有意に低頻度であった。THBS1 遺伝子の DNA メチル化を胃がんの 44% に認め、前庭部における発生・静脈侵襲・遠隔転移と相関した。腫瘍内の血管密度は、THBS1 遺伝子 DNA メチル化陽性群で有意に高値であった。THBS1 遺伝子の DNA メチル化は p53 変異を認めない症例で有意に頻度が高かった。MSI 陽性症例における THBS1 遺伝子の DNA メチル化の頻度は、MSI 陰性症例と比較して有意に高頻度であった。MSI 陽性症例の予後は、MSI 陰性症例と比較して有意に良好であった。VEGF 発現陽性かつ THBS1 遺伝子 DNA メチル化陽性症例は、各病期および全病期を対象にした解析において、他の症例に比べ予後が最も不良で、多変量解析においても有意であった。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

BAMCA 法により食道扁平上皮がん細胞株

をスクリーニングして DNA メチル化領域を探索し、異常 DNA メチル化の標的遺伝子候補として CRABP1 を同定した。CRABP1 のプロモーター領域の DNA メチル化は臨床検体でも認められ、発現低下は遠隔リンパ節転移と関連していた。さらに CRABP1 強制発現による細胞増殖抑制作用から、食道がん抑制遺伝子候補と考えられた。

ドイツ人神経芽細胞腫 152 例について、昨年度までに日本人症例で確立した方法により、PCDHB 群遺伝子、HLP 及び CYP26C1 について DNA メチル化レベルを定量した。昨年度までに日本人症例で確立した基準を用いて判定したところ、95 例が CIMP 陰性、50 例が CIMP 陽性と判定され、残り 7 例は中間型となった。単変量解析では、CIMP 陽性症例は相対死亡危険度 9.5 (95%CI = 3.2-28) と、極めて予後不良であることが確認された。N-myc 遺伝子増幅陽性であった 23 例は全例 CIMP 陽性であり、N-myc 遺伝子増幅陰性の 122 例の中でも、CIMP の有無は生命予後および再発予後に影響した。特に再発は CIMP の有無でのみ決まり、N-myc 遺伝子増幅の有無は影響しなかった。多変量解析では、N-myc 遺伝子増幅または CIMP の有無は年齢・病期とは独立な予後因子だった。

3 系統のヒトメラノーマ細胞株の何れかでメチル化され、正常メラノサイトではメチル化されない DNA 断片を MS-RDA 法により分離した。このうちの 1 個である PRDX2 遺伝子は、PDGF のシグナルを抑制することが知られており、その不活化は細胞増殖を誘

導すると考えられた。臨床材料についても、PRDX2 のプロモーター領域の CpG アイランドがメチル化されたメラノーマでは、蛋白発現も低下していることを確認した。

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を 0.5  $\mu$ M の 5-aza-dC で処理、発現上昇を示す遺伝子を DNA マイクロアレイにより検索した。プロモーター領域に CpG アイランドを有しかつ発現上昇を示す 5 個のうち 1 個が、脱ユビキチン化酵素として同定され、E3 ユビキチン結合酵素活性も見出された ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) であった。UCHL1 のプロモーター領域 CpG アイランドが高度にメチル化されること、5-aza-dC による脱メチル化誘発により発現が誘導されることが確認された。臨床材料においても UCHL1 遺伝子の DNA メチル化を検出した。

メチル化された C 型 CpG アイランド数は、腎腫瘍症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織において、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して既に有意に増加し、腎腫瘍においてさらに有意に増加した。非腫瘍部腎組織におけるメチル化された CpG アイランド数は、その症例に生じた通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した。通常型腎細胞がんにおけるメチル化された CpG アイランド数は、がんの肉眼型 (浸潤性・転移性とよく相関することが知られている)・組織学的異型度・進展様式・静脈侵襲の有無と有意に相関した。通常型腎細胞がん症例のうち、がん部において CpG アイ

ランドの DNA メチル化の蓄積の見られた症例は、見られなかった症例に比して無再発生存率が有意に低かった。

正常腎組織検体間では、BAMCA 法に用いた少数の BAC クローンにおいて、DNA メチル化状態に個体差や加齢に基づくばらつきが見られた。通常型腎細胞がん症例より得られた非がん部腎組織では既に、正常腎組織に見られた個体差や加齢の範囲を越えて、多くの BAC クローンが DNA メチル化の減弱あるいは亢進を示した。通常型腎細胞がん組織では、DNA メチル化の減弱あるいは亢進を示す BAC クローンがさらに増加し、DNA メチル化の減弱あるいは亢進の程度も亢進した。

通常型腎細胞がん組織において DNA メチル化減弱あるいは亢進を示した BAC クローン数は、通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した。通常型腎細胞がん組織において DNA メチル化減弱を示した BAC クローン数が 200 以上の症例ならびに DNA メチル化亢進を示した BAC クローン数が 300 以上の症例は、そうでない症例に比較して有意に予後不良であった。

通常型腎細胞がんの背景にある非がん部腎組織において DNA メチル化亢進を示した BAC クローン数は、その症例に生じた通常型腎細胞がんの肉眼型ならびに組織学的異型度と有意に相関した。通常型腎細胞がんの背景にある非がん部腎組織において DNA メチル化亢進を示した BAC クローン数が 300 以上の症例は、300 未満の症例に比し、有意に予後不良であった。

## D. 考察

### 1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がんの特異的なゲノム構造異常の網羅的スクリーニングを可能にする高精度・高密度の in-house ゲノムアレイにより、従来法では検出困難であった数 100kb レベルの欠失や重複のゲノムコピー数異常を検出できるようになった。この結果、新規の遺伝子増幅領域、あるいはホモ欠失領域を諸臓器のがんに検出することができた。多数の臨床検体における解析で、それぞれの臓器がんにおける特徴的なゲノム構造異常の蓄積過程を示した。ウイルス感染などの発がん要因とゲノム構造異常の関係を示すとともに、分子治療標的候補を同定することができた。腫瘍の悪性度や予後といった臨床病態と相関するゲノム構造異常の同定も進み、病態診断への基盤が整備された。

### 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

TSLC1/IGSF4 遺伝子は、非遺伝性非小細胞肺癌の抑制遺伝子候補として、機能的相補法により同定したものである。ヒトの様々な腫瘍の摘出手術組織でも高頻度に不活化が認められたことは、この遺伝子のがん抑制遺伝子として機能する傍証を与えてきた。加えて本年度の研究により、少なくとも Tslc1/Igsf4 遺伝子ホモ欠失マウスでは、肺腺腫、肺腺がんが野生型と比較して有意に高く発生することが明らかとなり、この遺伝子のがん抑制遺伝子として機能することが結論された。一方、Tslc1/Igsf4

遺伝子ヘテロ欠失マウスでも、野生型マウスと比較して有意に高く肺腺腫、肺腺がんが発生することが明らかになれば Tslcl1/Igsf4 のヒト遺伝性腫瘍への関わりがさらに示されるので、現在 Tslcl1/Igsf4 遺伝子ヘテロ欠失マウスでの検討を追加している。

$\beta$ -カテニンと TCF-4 の転写複合体には、大腸がんの治療標的の候補分子を含む可能性が高いと考えられたので、複合体構成蛋白の網羅的同定を試みた。TCF-4 が、核内で、PARP1 や Ku70 のような DNA 損傷の認識や修復に係わる分子と相互作用することが分かったので、Wnt シグナル伝達機構が、従来知られている遺伝子転写制御の機能以外に、DNA 損傷にも関わる可能性があると考えられた。

Gpr4 がソニックヘッジホッグシグナル経路の標的遺伝子として発現し、がん遺伝子としての機能を有する可能性が示唆された。本遺伝子は膜蛋白質をコードすることから、治療標的となる可能性が期待される。

Gpr49 が Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子のひとつであることを示す知見を得たので、今後 Gpr49 の発現抑制による肝細胞がんへの作用を検討する。

消化管間葉系悪性腫瘍には、チロシンリン酸化酵素阻害剤のイマチニブ（グリベック）が奏効するが、治療の第一選択は手術であり、補助化学療法としてのグリベックの使用についてのエビデンスは国内外で確立していない。本研究で同定したフェチンは、蝸牛に発現するカリウムイオンチャン

ネル蛋白質である。フェチンの発現は、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移の予測マーカーとなり得ると考えられ、術後転移が予測される症例に早期からグリベックを投与すれば治療成績を向上させる得る可能性がある。

がんに関連する遺伝子異常のひとつとして MSI について胃がんを対象に、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。MSI 陽性胃がんで HLA-A の発現低下が高頻度であった。胃がん組織における HLA-A、-B、-C 遺伝子のメチル化は、不活化の重要な機序であると考えられた。但し、HLA-A のメチル化のみが MSI 陽性胃がんで有意に高頻度であったので、アセチル化も含めたエピジェネティック機構とともにさらなる検討が必要である。VEGF 発現陽性かつ THBS1 遺伝子 DNA メチル化陽性の組み合わせは、多変量解析においても有意な予後不良因子であり、予後判定や将来の分子標的治療の選択に有用である可能性が考慮された。

### 3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

神経芽細胞腫の予後予測における CIMP の有用性が、その同定に用いた日本人症例のみならずドイツ人症例でも確認された。近年のゲノム網羅的な解析で頻発する偽陽性ではなく、異なる人種でも有用であることを示しており、今後の臨床応用にむけて重要な成果である。N-myc 遺伝子増幅を示す症例は全例 CIMP 陽性であったことから、CIMP が N-myc 遺伝子増幅の誘因となってい

ることも示唆された。

メラノーマでのサイレンシングが見出された PRDX2 によりコードされる Prx II は、チオレドキシニペルオキシダーゼであり、PDGF による PDGF 受容体のリン酸化を抑制する。従って、その不活化は、PDGF シグナルを増強し、細胞増殖を誘導すると考えられる。メラノーマや膀胱がんの進展に伴い PRDX2 の発現が低下することが知られているので、PRDX2 は治療標的候補と考えられる。

CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態に着目して、正常腎組織と腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織を、組織学的に特記すべき所見を示さなくても区別できたことから、DNA メチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織は、既に前がん状態にあると考えられた。ウイルスの持続感染や慢性炎症等の明確な背景を伴わず、組織学的に認識し難いことから、前がん状態が従来ほとんど議論されてこなかった腎においてすら、DNA メチル化に着目すれば前がん状態の存在を認識し得ることは注目される。

通常型腎細胞がんの背景にある組織学的に特記すべき所見を示さない非腫瘍部腎組織におけるメチル化された CpG アイランド数が、その症例に生じた通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関した。本知見は、DNA メチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんが生じる可能性を示唆するものである。

BAMCA 法による解析で、ゲノム規模の DNA メチル化の変化は前がん状態において既に起こり、多段階発がん過程の進展に伴いさらに変化することが分かった。ゲノム網羅的に解析しても、DNA メチル化の変化を伴う前がん状態からは、より悪性度の高いがんを生じ、前がん状態におけるゲノム規模の DNA メチル化の変化が、症例の予後すら反映する可能性があると考えられた。

## E. 結論

諸臓器のがんにおいて遺伝子の発現異常ならびにジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにして、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を解明することを目的として研究をすすめた。

ゲノムアレイをプラットフォームにした諸臓器のがんのゲノム構造異常の網羅的研究により、新規の遺伝子増幅領域あるいはホモ欠失領域を諸臓器のがんに検出することができた。多数の臨床検体における解析で、それぞれの臓器がんにおける特徴的なゲノム構造異常の蓄積過程を示した。腫瘍の悪性度や予後といった臨床病態と相関するゲノム構造異常の同定も進み、病態診断への基盤が整備された。Tslc1/IgSF4 の欠損マウスの解析により、この遺伝子のがん抑制遺伝子として機能することが結論された。TCF-4 の結合蛋白としてポリ(ADP-リボ

ース) ポリメラーゼ-1 (PARP-1) と Ku70 を同定した。G 蛋白共役型受容体 Gpr49 が皮膚基底細胞がんで過剰発現し、ソニックヘッジホッグ経路の下流で発現が制御されていること、肝細胞がん株では、Wnt/ $\beta$ カテニン系の標的分子であることを示した。蛍光二次元電気泳動法を改良してプロテオーム解析技術の革新を図り、消化管間葉系悪性腫瘍の術後転移を高い精度で予測できる蛋白質としてフェチンを特定した。マイクロサテライト不安定性陽性胃がんにおいて、HLA class I 関連遺伝子の高頻度な変異ならびに VEGF 等血管新生関連因子の異常を示した。がんで DNA メチル化によって不活性化される遺伝子を同定した。ドイツ人神経芽細胞腫症例においても、日本人例と同様に、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)の有無が予後と密接に関連することを見出した。DNA メチル化異常の観点から、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても既に前がん段階にあると認識された。ゲノム網羅的な DNA メチル化異常を伴う前がん状態からより悪性度の高いがんを生じ、前がん状態における DNA メチル化異常が症例の予後まで規定する可能性がある。

今後、がんの病理像と遺伝子・分子・細胞レベルの変化との対応がさらに明らかになれば、諸臓器における多段階発がん過程の分子機構の全貌の解明がすすむのに加え、革新的ながん診断の指標あるいは新しいがん予防・治療の標的の同定に結びつくと期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Fukayama M, Kanai Y, Hirohashi S. Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 168: 1375-1384, 2006.
2. Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Okano T, Yamada M, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye. *Proteomics*, 6: 1640-1653, 2006.
3. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Kosuge T, Kanai Y, Hirohashi S. Genetic inactivation of the APC gene contributes to the malignant progression of sporadic hepatocellular carcinoma: A case report. *Gene Chrom Cancer*, 45: 1050-1057, 2006.
4. Okano T, Kondo T, Kakisaka T, Fujii K, Yamada M, Kato H, Nishimura T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel

- electrophoresis. *Proteomics*, 6: 3938-3948, 2006.
5. Suehara Y, Kondo T, Fujii K, Hasegawa T, Kawai A, Seki K, Beppu Y, Nishimura T, Kurosawa H, Hirohashi S. Proteomic signatures corresponding to histological classification and grading of soft-tissue sarcomas. *Proteomics*, 6: 4402-4409, 2006.
  6. Fujii K, Kondo T, Yamada M, Iwatsuki K, Hirohashi S. Toward a comprehensive quantitative proteome database: proteome expression map of lymphoid neoplasms by 2-D DIGE and MS. *Proteomics*, 6: 4856-4876, 2006.
  7. Hatakeyama H, Kondo T, Fujii K, Nakanishi Y, Kato H, Fukuda S, Hirohashi S. Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. *Proteomics*, 6: 6300-6316, 2006.
  8. Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzuki H, Hirohashi S, Yamada T. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 5: 1338-1347, 2006.
  9. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: Identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98: 392-400, 2007.
  10. Kondo T, Hirohashi S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor Saturation Dye) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat Protocol*, 1: 2940-2956, 2007.
  11. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Matsuno Y, Gemma A, Kato H, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 799-805, 2007.
  12. Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Involvement of Splicing Factor-1 in  $\beta$ -Catenin/T Cell

- Factor-4-mediated Gene Transactivation and Pre-mRNA Splicing. *Gastroenterology*, in press.
13. Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, in press.
14. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate  $\beta$ -catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*, in press.
15. Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, Sakamoto M. 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*, 12: 2419-2426, 2006.
16. Shibata R, Mori T, Du W, Chuma M, Gotoh M, Shimazu M, Ueda M, Hirohashi S, Sakamoto M. Overexpression of cyclase-associated protein 2 in multistage hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 12: 5363-5368, 2006.
17. Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci*, 98: 147-154, 2007.
18. Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M. Specific expression of hepatocyte nuclear Factor-1 $\beta$  in the ovarian clear cell adenocarcinoma and its application to cytological diagnosis. *Cancer Sci*, in press.
19. Imoto I, Izumi H, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Hosoda E, Ohki M, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers. *Cancer Res*, 66: 4617-4626, 2006.
20. Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K,



- Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol*, 172: 835-846, 2006.
21. Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, Mizutani S. Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest*, 116: 80-89, 2006.
22. Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 97: 1351-1358, 2006.
23. Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Sakakura C, Mitsufuji S, Hirohashi S, Inazawa J. Genomic loss and epigenetic silencing of very low density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis. *Oncogene*, 25: 6554-6562, 2006.
24. Nakagawa T, Pimkhaokham A, Suzuki E, Omura K, Inazawa J, Imoto I. Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 97: 1070-1074, 2006.
25. Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, Aoyagi M, Ohno K, Nakamura Y, Inazawa J. RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest. *Oncogene*, 26: 1110-1121, 2007.
26. Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J. A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene*, 26: 1178-1187, 2007.
27. Lung HL, Kwok A, Cheung L, Xie D, Cheng Y, Murakami M, Guan XY, Sham JS, Chua D, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, Lung ML. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 66: 9385-9392, 2006.
28. Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama M, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an

- immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, 26: 3610-3624, 2006.
29. Weyden LVD, Arends MJ, Chausiaux OE, Lange UC, Surani MA, Affara N, Murakami Y, Adams DJ, Bradley A. Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis. *Mol Cell Biol*, 26: 3595-3609, 2006.
30. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer*, 106: 1751-1758, 2006.
31. Williams YN, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Cell adhesion and prostate tumor suppressor activity of TSL2/IGSF4, an immunoglobulin superfamily molecule homologous to TSLC1/IGSF4. *Oncogene*, 25: 1446-1453, 2006.
32. 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.
33. Furuta J, Nobeyama Y, Umebayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res*, 66: 6080-6086, 2006.
34. 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*, 241: 213-220, 2006.
35. 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*, 119: 1338-1344, 2006.
36. Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T, Sasaki H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, 25: 3059-3064, 2006.
37. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic

- significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*, 247: 253-258, 2007.
38. Nobeyama Y, Okochi-Takada E, Furuta J, Miyagi Y, Kikuchi K, Yamamoto A, Nakanishi Y, Nakagawa H, Ushijima T. Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas. *Int J Cancer*, in press.
39. Cai L-y, Abe M, Izumi S-i, Imura M, Yasugi T, Ushijima T. Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers. *Life Sci*, in press.
40. 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 nontumorous renal tissues. *Int J Cancer*, 119: 288-296, 2006.
41. Peng DF, 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*, 27: 1160-1168, 2006.
42. Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett*, in press, 2006.
43. Noshō K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Takahashi T, Adachi Y, Imamura A, Imai K, Shinomura Y. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer*, 42: 2374-2381, 2006.
44. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, 106: 1467-1479, 2006.
45. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 2006 Nov 3; [Epub ahead of print].

46. Mikami M, Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Maehata T, Taniguchi H, Adachi Y, Imamura A, Fujita M, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Mutational analysis of b-catenin and the RAS-RAF signaling pathway in early flat-type colorectal tumours. *Eur J Cancer*, 42: 3065-3072, 2006.
47. Takahashi T, Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Miyamoto N, Adachi Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Flat-type colorectal advanced adenomas (laterally spreading tumors) have different genetic and epigenetic alterations from protruded-type advanced adenomas. *Mod Pathol*, 20: 139-147, 2007.
48. Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Mikami M, Taniguchi H, Miyamoto N, Adachi Y, Arimura Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Genetic and epigenetic profiling in early colorectal tumors and prediction of metastatic potential in pT1 (early invasive) colorectal cancers. *Carcinogenesis*, in press, 2006 Dec 20; [Epub ahead of print].
49. Insumran A, Adachi Y, Yamamoto H, Li R, Wang Y, Min Y, Piao W, Nosho K, Arimura Y, Shinomura Y, Hosokawa M, Lee C-T, Carbone DP, Imai K. Insulin-like growth factor-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in human esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, in press, 2006 Dec 20; [Epub ahead of print].
50. Kobayashi T, Sasaki Y, Oshima Y, Yamamoto H, Mita H, Suzuki H, Toyota M, Tokino T, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int J Mol Med*, 18: 161-170, 2006.
51. Hirata T, Yamamoto H, Taniguchi H, Horiuchi S, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Characterization of immune escape phenotype of human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *J Pathol*, 211: 516-523, 2007.
52. Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett*, in press.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得
- 1) 特願 2006-078786 「がん抑制剤」  
2006. 3. 22