

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16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 廣橋 説雄

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
--------------------------	----

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
総合研究報告書

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：高密度 in-house BAC アレイによる比較ゲノムハイブリダイゼーション解析により、諸臓器のがんで高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を新規に多数見出し、新規がん関連遺伝子を複数同定した。諸臓器のがんの臨床病理学的因子とよく相関し、病態診断・治療法選択の指針となる可能性のあるゲノム構造異常プロファイルを同定した。

ゲノム構造解析により同定したがん抑制蛋白 TSLC1 に結合する DAL-1 をコードする遺伝子の DNA メチル化が、肺がんの予後不良因子となることを示した。TSLC1 類似蛋白質 TSL2 が前立腺がん抑制遺伝子の可能性があることを示した。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 Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) ・Ku70 を同定した。β-カテニンが核内で FUS (fusion/TLS: translocated in liposarcoma) と相互作用し、pre-mRNA スプライシングに関わる可能性を示した。大腸がん浸潤先進部で高発現しβ-カテニンと結合するアクチン結合蛋白アクチニン-4 は、細胞運動能を亢進させがんのリンパ節転移を亢進させる。膜糖蛋白ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格の構築制御を介して細胞運動能を亢進させる機序を示し、同分子の高発現が諸臓器のがん症例において転移性とよく相関し予後不良因子となることを示した。G 蛋白共役型受容体 Gpr49 がソニックヘッジホッグ経路の下流で発現が制御され、肝細胞がん株では、Wnt/β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により、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。ディスアドヘリン等細胞接着・運動能に関与する複数の機能分子の抗体パネルにより、大腸がんの肝転移を予測しうる新しいスコアシステムを確立した。遺伝性非ポリポーシス大腸がん症例の新規スクリーニングアルゴリズムを作成した。マイクロサテライト不安定性陽性消化管がんにおけるジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を網羅的に解析した。

MS-RDA 法によりあるいは新規に開発した BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイ

ランド増幅法により、がんにおいて DNA メチル化によって不活化される新規がん関連遺伝子候補等を同定した。PCDHB 遺伝子を指標として含む CpG アイランドメチル化形質が神経芽細胞腫症例の強い予後予測因子であることを示し、その予後予測力をドイツ人神経芽細胞腫症例においても確認した。CpG アイランド内に de novo のメチル化が蓄積するような、DNA メチル化状態伝達の忠実度が低下したがん細胞株が存在することを示した。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 発現亢進が、がん関連遺伝子の DNA メチル化蓄積と相関し、諸臓器のがんの予後予測因子となることを示した。傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の減弱が、染色体不安定性に帰結する可能性がある。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。

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 譲治 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

本研究は、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、がんの個性を新しい視点から分類・整理できるようにするとともに、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する。基礎医学・病理学・臨床医学を背景とする研究者が、協調して本研究課題を推進する。もって、がんの予防・診断・治療に亘り新局面を拓いて患者個々人に最適な医療の実現を図り、高齢化社会におけるがんの罹患率と死亡率の激減に向けて有意義な貢献をなすことを目指す。

- 1) ゲノム構造異常の網羅的解析
- 2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける発現等の異常の解析
- 3) 発がんにおけるエピジェネティック機

構

の各項について、研究をすすめる。

B. 研究方法

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

がん克服戦略研究事業以来開発・改良してきた、がん関連遺伝子を網羅的に含む「がん個性診断」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) を併用し、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) を施行した。対象として諸臓器のがん細胞株ならびに、肝がん・膵がん・肺がん・胃がん・乳がん等の臨床検体を用いた。臨床検体は全症例で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、がん細胞を回収して解析に供した。

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

原発性非小細胞肺がん検体等において、TSLC1 結合蛋白をコードする DAL-1/4.1B 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化の状態・ヘテロ接合性の喪失 (LOH) の有無・遺伝子発現等を評価した。TSLC1 との強い構造類似性から同定した TSL2 の、蛋白発現・糖鎖修飾の有無・強制発現前立腺がん細胞のヌードマウスにおける腫瘍形成能を評価した。Tslc1/Igsl4 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。経時的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。

β -カテニン-TCF-4 系の転写活性を制御する因子を同定するため、エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養細胞に発現させて免疫沈降を行い、質量分析によってその複合体に含まれる蛋白質を同定した。大腸がん細胞より、核蛋白質を抽出し、抗 β -カテニン抗体を用いた免疫沈降法と質量分析により、 β -カテニンを含む核内複合体の構成蛋白質を網羅的に同定した。

がん克服戦略研究事業において単離した β -カテニンと結合する新規アクチン結合蛋白であるアクチニン-4 の発現を、大腸がん臨床検体において免疫組織化学的に検討し、発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。アクチニン-4 遺伝子発現誘導による細胞運動能・細胞形態やアクチン細胞骨格の構築の変化を観察し、マウス移植モデルにおける転移能を定量的に評価した。

がん克服戦略研究事業において単離したディスアドヘリンの発現量を多数の膵がん細胞株において検討し、細胞運動能との相関を検討した。ディスアドヘリンを発現する膵がん細胞株において RNA 干渉により発現を減弱させ、あるいはディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株に強制発現させ、細胞運動能・細胞形態・アクチン細胞骨格の構築の観察・マウス移植モデルにおける転移能の評価を行った。舌・食道扁平上皮がん臨床検体において、免疫組織化学的に評価したディスアドヘリン発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。

多様な臨床病理学的特性を示す諸臓器のがんの臨床検体において、正常組織等に比して発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によって網羅的に同定した。同定された遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション法・免疫組織化学的検討により組織での発現の局在・病理像との対応をさらに詳細に解析し、病態との関連を絞り込んだ。培養がん細胞において同定された遺伝子の発現を RNA 干渉あるいは遺伝子導入により制御し、機能解析を行った。

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、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。

大腸がん肝転移予測システムを確立するため、Dukes B/C 期大腸がん 150 症例の手術検体（学習セット）・同施設で異なる時期に切除された 190 症例（第 1 検証セット）ならびに他施設で切除された 99 症例（第 2 検証セット）の手術検体において、従来大腸がんの予後因子であるとの報告のある 9 機能分子の発現を免疫組織化学的に評価した。

HNPCC 患者および散发性大腸がん患者の臨床検体において、国際ガイドラインに基づきマイクロサテライト不安定性 (MSI) の有無を検索し、K-ras・BRAF 遺伝子の変異・MSI 標的遺伝子のフレームシフト変異を解

析し、HNPCC 症例の新規スクリーニングアルゴリズムを作成した。MSI 陽性消化管がん等において、K-ras・BRAF 遺伝子の変異・EphB2 遺伝子の (A)9 領域における遺伝子変異・血管新生因子の発現等を解析した。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

アレイ上で DNA メチル化領域をゲノム規模でスクリーニングする新たな方法である BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA 法)、ならびに蛋白結合 DNA 領域を染色体規模で検出する BAC アレイを基盤とする ChIP 法確立した。これらの方法を実用に用いて、DNA メチル化によって不活化されがん関連遺伝子の同定を進めた。

予後良好な神経芽細胞腫と予後不良な神経芽細胞腫において、MS-RDA 法により、DNA メチル化を受ける遺伝子およびその CpG アイランドをゲノム網羅的に検索した。同定された CpG アイランドの DNA メチル化の状態を、メチル化特異的 PCR (MSP) 法等によってさらに詳細に評価した。DNA メチル化の状態と症例の予後・年齢・病期・N-myc 増幅の有無との相関を検討し、予後予測マーカーとなりうる DNA メチル化プロファイルを同定した。こうして確立した神経芽細胞腫における CIMPO の予後予測力を、ドイツから供与された神経芽細胞腫 152 症例においても検証した。

CIMP 陽性培養がん細胞 1 個を 106 個まで増殖させて DNA を回収し、パイサルファイトシーケンス法により DNA メチル化模様

を決定した。10-20 分子の DNA メチル化模様について、最初の 1 個の細胞での DNA メチル化模様からの変異を計測した。変異数は、観察した CpG 部位の数で標準化した。6 回の細胞培養を繰り返し、観察した細胞の世代数から、CpG 部位あたり・世代あたりの DNA メチル化状態複製の変異率および忠実度を求めた。

膀胱・膵・腎等の正常組織・前がん段階にある可能性がある組織・がん組織において、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の蛋白発現・複数の CpG アイランド等における DNA メチル化の状態を評価し、BAMCA 法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析も施行した。

(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き、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

食道扁平上皮がん細胞株において、LRP1B 遺伝子(2q22.1)のホモ欠失を検出した。食道がん臨床検体においても LRP1B 遺伝子のホモ欠失が高頻度認められ、ホモ欠失のない食道がん細胞株においてはプロモーター領域の CpG メチル化によって高頻度に発現が消失していた。LRP1B 発現を欠く食道がん細胞株に強制発現すると、コロニー形成が低下したため、LRP1B 遺伝子は食道がんの候補がん抑制遺伝子と考えられた。

SKP2 が肺非小細胞がんの 5p13 増幅の標的であり、その発現抑制が非小細胞肺がん細胞の遊走能・浸潤能を抑制することを明らかにした。非小細胞肺がん細胞株の 9q33 の新規ホモ欠失領域から、ホモ欠失あるいはプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化により高頻度に発現消失を認める肺がん特異的抑制遺伝子候補 DBC1 を同定した。非小細胞肺がん細胞株の新規 13q21.2 ホモ欠失を検出し、標的遺伝子プロトカドヘリン 20 (PCDH20) 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。さらに非小細胞肺がん臨床検体の 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。

胃がん細胞株において、7q21.2 に位置す

る CDK6 遺伝子の新規増幅を検出した。胃がん症例における免疫組織化学的検討で、高頻度に細胞質ならびに核における陽性所見を確認した。新規の 2q33.3 ホモ欠失を見出し、標的遺伝子 ADAM23 を明らかにした。胃がん手術材料でも ADAM23 遺伝子のホモ欠失を確認し、ADAM23 胃がん抑制遺伝子候補であることを示した。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。

卵巣明細胞腺がんの 17q 増幅の標的遺伝子が PPM1D であることを明らかにした。

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。

肝細胞がん臨床検体について、ゲノム構造異常の蓄積の程度は、腫瘍の分化度・B 型肝炎ウイルス感染・悪性度（門脈浸襲・

肝内転移）と有意に相関した。さらに、17p13.3 領域の欠失と 8q11 領域の重複が、他の臨床病理学的因子（臨床病期・門脈浸襲・肝内転移）と独立した予後予測因子になることを見いだした。発現解析の結果と照合し、肝細胞がんにおける 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。

ゲノム構造異常の蓄積過程の違いから、肺腺がんを大きく 3 つの群に分類することができた。この分類は患者の性別、喫煙歴、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子異常の有無と有意に相関した。さらに EGFR 遺伝子異常と相関する遺伝子構造異常を抽出したところ、MET 遺伝子の増幅が EGFR 遺伝子の異常と類似したゲノム異常の蓄積と共存することがわかった。極めて予後不良であることが知られている肺の内分泌性腫瘍（小細胞がんならびに内分泌性大細胞がん）におけるゲノム構造異常の全体像を明らかにした。

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。ステージ III ないし IV 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。

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

非小細胞肺がんの 44%に TSLC1/IGSF4 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が認められた。DNA メチル化の頻度は男性患者において有意に高く、喫煙者の中ではパッキヤーならびに 1 日当りのシガレット数と正に相関した。TSLC1/IGSF4 遺伝子に DNA メチル化を認めた肺腺がん症例は、無再発生存期間・全生存期間が有意に短縮した。原発性非小細胞肺がんの 57%に、TSLC1 結合蛋白をコードする DAL-1/4.1B 遺伝子のプロモーター領域の CpG メチル化が認められ、これらは DAL-1/4.1B 遺伝子の位置する 18p11.3 領域の LOH を伴うかあるいは両アリの DNA メチル化であった。DAL-1/4.1B 遺伝子の DNA メチル化が肺腺がん患者の予後不良のマーカーとなる可能性が示された。原発性非小細胞肺がんの 81% で TSLC1 遺伝子と DAL-1/4.1B 遺伝子のいずれかあるいは両方の不活化が認められることがわかった。

TSL2 が分、分子量約 55kD の糖蛋白質であ

ることを示した。TSL2 は前立腺の腺上皮に発現するが、TSL2 遺伝子の位置する第 19 染色体長腕 13.2 領域は LOH が好発する部位である。そこで、前立腺がん細胞 PPC-1 に TSL2 遺伝子を導入しヌードマウスに移植したところ、親細胞やベクター導入細胞と比較して、TSL2 導入細胞の腫瘍形成が有意に抑制されていた。

月齢 15 ヶ月の *Tslc1*^{-/-}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。*Tslc1*^{+/+}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 *Tslc1*^{-/-}マウスでも 19 匹中全く肺腺腫を認めず、*Tslc1*^{-/-}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、*Tslc1*/*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。さらに、*Tslc1*^{-/-}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。

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) が TCF-4 と結合することがわかった。PARP-1 の発現亢進は、 β -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 干渉によって PARP-1 の発現を低下させたところ、転写活性および細胞増殖を抑制した。家族性大腸腺腫症症例およびその実験モデルである Min マウスの腺腫では、PARP-1 の発現が β -カテニンの発現と共に亢進してい

た。

β -カテニン/TCF-4 複合体には FUS (fusion/TLS: translocated in liposarcoma)等の種々の RNA 結合蛋白質が含まれ、 β -カテニン/TCF-4 複合体がプレ mRNA スプライシングの制御に関わることが明らかになった。大腸がん細胞に β -カテニンを過剰発現させると、一般型のエストロゲン受容体- β に対しドミナントネガティブに転写活性を抑制する新規スプライズバリエントが発現することを示した。

核蛋白質 Ku70 が、TCF-4 と複合体を形成することが分かった。RNA 干渉による Ku70 の発現抑制は、TCF-4/ β -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/ β -カテニンの転写活性を抑制すると考えられた。

定量的免疫染色法で検討したところ、大腸がんの 73%において正常大腸粘膜上皮に比してアクチニン-4 の発現が亢進していた。特に大腸がんの浸潤先進部におけるアクチニン-4 の高発現は、リンパ節転移と有意に相関した。大腸がん細胞株 DLD-1 にアクチニン-4 の発現を誘導したところ、フィロポディア・ラメリポディア等の細胞突起が顕著に形成され、さらに運動能が亢進することが分かった。マウス同所性移植モデルでは、アクチニン-4 強制発現細胞移植群は、対照群に比し有意に高頻度に腸間膜所屬リ

ンパ節への転移を来たした。

膵がん細胞株において、ディスアドヘリンの発現量は細胞運動能と有意に相関した。ディスアドヘリンを高発現する膵がん細胞株において、RNA 干渉により発現を減弱させたところ、細胞運動能が減弱した。ディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株において高発現させたところ、細胞運動能が亢進した。RNA 干渉により発現を減弱させると、がん細胞は大型で扁平な形状を取り、細胞膜直下のアクチンレイヤーが減少して接着斑が発達しアクチンストレスファイバーが増加した。マウス同所性移植モデルにおいて、ディスアドヘリン強制発現細胞の転移能が亢進していた。舌扁平上皮がんにおいてディスアドヘリン発現は E-カドヘリン発現と逆相関し、ディスアドヘリン発現レベルは腫瘍の浸潤性増殖形態・臨床病期と相関する有意な予後不良因子であった。ディスアドヘリン発現陽性・E-カドヘリン発現陰性の食道扁平上皮がんの予後は、その他の症例に比べて有意に不良であった。

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ても有意に高発現していた。マウス基底細胞がん細胞株 ASZ001 にヘッジホッグシグナル経路を抑制すシクロパミンを投与すると、Gpr49 の発現が低下した。ソニック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。肝細胞がんにおいて β -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きたが、さらに Gpr49 の発現は GSK-3 β 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。

肝転移予測システム構築のための免疫組織化学的検討では、大腸がん学習セット 150 例のロジスティック回帰分析に基づき肝転移再発予測式；肝転移再発 (Immunohistochemical Metastatic Point)=3x ディスアドヘリン+ 4 x E-カド

ヘリン+ 2 x マトリライシンを確立した。5 点以上が高危険群、4 点以下を低危険群とした時、この式を用いた肝転移の予測は感度 85.7%・特異度 58.9%であった。第 1 検証セットでは感度 87.0%・特異度 66.5%、第 2 検証セットでは感度 80%・特異度 59.6%であった。

好発部位 (V599E) における BRAF 遺伝子変異を散発性マイクロサテライト不安定性陽性 (MSI) 大腸がんの 40% に検出し、右側大腸における発生および hMLH1 遺伝子メチル化との有意な相関を認めた。一方、散発性症例とは対照的に HNPCC 症例においては BRAF 遺伝子変異を検出しなかったことから、BRAF 遺伝子変異解析を組み込んだ新規 HNPCC スクリーニングアルゴリズムを作成することができた。MSI 陽性大腸がん細胞株の 38% に、EphB2 遺伝子 (A) 9 領域の 1bp の欠失を検出した。同様に、MSI 陽性大腸がん症例の 41% に変異を検出した。リン酸化によりキナーゼ活性を調節していると考えられる S1048・S1052 が、検出された全ての変異により不活化されていた。MSI 陽性大腸腺種での変異は 21% で、MSI 陽性大腸がんにおいて有意に高頻度であった。大腸がんの 53% で EphB2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を検出した。MSI 陽性がんの 50% で変異と DNA メチル化の両方が陽性、37% で変異のみ陽性、5% でメチル化のみ陽性、8% でともに陰性であった。HLA-A の発現低下・DNA メチル化は、MSI 陽性胃がんでは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。MSI陽性症例におけるFGF2発現は、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、他の症例に比べ予後が最も不良であった。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

BAMCA法を用いて第I・II病期と第III・IV病期の神経芽細胞腫間でDNAメチル化の差を検索し、予後不良群において特異的にDNAメチル化を受けるがん抑制遺伝子候補である核内受容体型転写因子NR1I2を同定した。NR1I2遺伝子のDNAメチル化が、神経芽細胞腫の悪性度・分化誘導療法薬剤感受性の良い指標となることを示した。BAMCA法により、食道扁平上皮がん細胞株における異常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。

予後良好な神経芽細胞腫5例のDNAプールをデスターに、予後不良な神経芽細胞腫由来の細胞株5系統のDNAプールをドライバーに用いて、MS-RDA法を行い、予後不良な神経芽細胞腫で特異的にメチル化されている可能性があるCpGアイランド、PCDHBファミリー(5q31)、PCDHAファミリー(5q31)、HLP(3p21)、DKFZp451I127(5q14)、および、CYP26C1(10q23)を同定した。新たな神経芽腫臨床検体においてこれら5個のCpGアイランドのメチル化レベルは互いに強く相関し、これらのCpGアイランドのメチル化を多発する神経芽細胞腫(CIMP陽性)と、多発しない神経芽細胞腫の2種類に群別可能であった。さらに、CIMPをもつ神経芽細胞腫症例は、ハザード比25.4で予後不良であった。CIMPは、臨床病期・染色体の倍数性・TrkAの高発現とは独立した予後因子であった。一方、N-myc増幅をもつ神経芽細胞腫のほぼ全例がCIMPをもち、N-myc増幅を持たない神経芽細胞腫の中にもCIMPをもつものが存在した。予後予測が重要なN-myc増幅のない病期IIIおよびVIの症例でも、CIMPの有無は予後との関連を示した。ドイツ人神経芽細胞腫152例のうち、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。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

胃がん細胞株で、bA305P22.2.3、FLJ32130、RIKEN2210016 のホモログ (RIKEN2210016)、E-カドヘリンおよびサイクロフィリンAのプロモーター領域 CpG アイランドについて、CpG 部位メチル化状態複製の忠実度を測定した。CIMP をもたない HSC39 と HSC57 は、すべての CpG アイランドで 99.90-100 %と、正常乳腺上皮細胞と同等の忠実度を示した。一方、CIMP をもつ KATOIII は RIKEN2210016 (1.9 倍) で、AGS は bA305P22.2.3 (3.2 倍)、RIKEN2210016 (5.7 倍) および E-カドヘリン (1.6 倍) で、有意にメチル化状態複製のエラーが増加していた。ほとんどすべてのエラーは、de novo メチル化であった。RIKEN2210016 の CpG アイランド全体がメチル化された DNA 分子は、KATOIII および AGS では、散発的に検出されたのに対し、HSC39 と HSC57 では、決して検出されなかった。従って、KATOIII と AGS での CpG 部位メチル化状態複製の忠実度の低下 (de novo メチル化の増加) は、CpG アイランド全体のメチル化を誘発する可能性があると考えられた。

膀胱がん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がん移行上皮において、正常移行上皮に比し、細胞増殖活性の亢進に先行して DNMT1 の蛋白発現が既に有意に亢進し、CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積が観察された。DNMT1 の蛋白発現は、異形成上皮・移行上皮がんにおいてさらに段階的に亢進し、全検体に

おいて DNMT1 の蛋白発現亢進の有無と DNA メチル化の蓄積は有意に相関した。

腭多段階発がんの諸過程に対応する臨床検体における免疫組織化学的検討で、DNMT1 蛋白発現陽性率は、炎症性背景を伴う末梢腭管上皮において、組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腭管上皮に比して既に有意に亢進していた。DNMT1 蛋白発現陽性率は PanIN から腭管がんへと段階的に亢進し、腭がんの浸潤性増殖と有意に相関し、腭がん患者の予後不良因子となった。検討に供した12のがん関連遺伝子のうち1遺伝子以上の DNA メチル化を認める頻度は、炎症性背景を伴う末梢腭管上皮 (60%) において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腭管上皮 (15%) に比して既に有意に亢進しており、DNA メチル化されたがん関連遺伝子の数は、炎症性背景を伴う末梢腭管上皮において組織学的に特記すべき所見を示さない末梢腭管上皮に比して既に有意に増加していた。DNMT1 の蛋白発現レベルとがん関連遺伝子の DNA メチル化の蓄積の間に、有意な相関があることがわかった。

傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化の減弱は、移行上皮がんの異型度・深達と有意に相関した。サテライト配列は傍セントロメアヘテロクロマチン領域に位置し、この領域の DNA メチル化の減弱はセントロメアのクロマチン脱凝縮や染色体組み換えを促進することが知られているが、本検討で、傍セントロメアサテライト領域における DNA メチル化の減弱と、サテライト配列が豊富である第9染色体 LOH の有無

が有意に相関することを確かめた。

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。諸臓器のがんの臨床検体等におけるゲノム構造異常の全体像が俯瞰でき、新規がん関連遺伝子を既に同定し得た。臨床病理像との対応の結果、予後予測因子といった臨床的に重要な遺伝子異常の候補領域を抽出することができた。今後この結果をさらに多数検体で検証し、ゲノム構造異常に基づくがんの個性診断アレイの作成・実用化を目指したい。

他方で、ゲノムアレイによる潜在的ゲノム異常のスクリーニングにより、数 10kb~Mb レベルの比較的大きなサイズのゲノム DNA の挿入・重複多型が少なからぬ頻度で存在することが判明した。これら大きなサイズのゲノム DNA の挿入・重複多型の日本人における正確な頻度・存在領域・ゲノム機能性を明らかにすることは、がんの罹病性を理解する上で重要な研究課題と考えられた。

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-DAL-1/4. 1B 経路の異常が原発性非小細胞肺がんの 80% 以上の症例で認められ、細胞接着・細胞骨格に関わるこの分子経路が肺がんの進展に極めて重要であると考えられた。TSLC1 遺伝子が上皮・神経由来等のさまざまな腫瘍で、特にその悪性進展に伴い LOH ならびにプロモーターのメチル化により不活化するとの知見が蓄積しており、TSLC-1 ががん抑制遺伝子として機能する傍証を与えてきた。さらに、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、この遺伝子ががん抑制遺伝子として機能することが結論された。

TCF-4 と β -カテニンの転写複合体には、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 ならびに β -カテニンが、核内で、PARP1 や Ku70 のような DNA 損傷の認識や修復に関わる分子

ならびに FUS のようなプレ mRNA スプライシングに関わる分子と相互作用することが分かったので、従来知られている遺伝子転写制御の以外の機能を介して腫瘍形成に寄与する可能性があると考えられた。

アクチニン-4 はがんの転移抑制の新規治療標的となる有力な候補分子と考えられたが、アクチニン-4 は家族性腎疾患の原因遺伝子であり、これを直接分子標的とするとは腎障害をきたすことが予測される。そこで、本研究で開発・改良したプロテオーム解析技術により、アクチニン-4 結合蛋白等を体系的に明らかにし、治療標的候補の同定を目指したい。

ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格を制御して細胞運動能を亢進させ、がん転移を直接促進する分子機構が示された。ディスアドヘリンの発現亢進を示す諸臓器のがんは概して悪性度が高く、患者の予後が不良であるとの知見がさらに集積してきた。ディスアドヘリンは、がん浸潤・転移制御の分子標的のひとつと考えられる。

Gpr49 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 が肝細胞がんにおいて 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がん細胞への作用を検討する予定である。

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。

従来までの報告には見られない多数の症例と複数のマーカーを用いて、大腸がん根治術後の肝転移再発予測式を確立した。学習セット・第1検証セットおよび第2検証セットいずれにおいても、従来のリンパ節転移の有無に基づく肝転移再発予測よりも高精度な結果が得られた。臨床検体においてマイクロアレイ解析を施行し肝転移再発を予測しようとするような他の研究者の試みとことなり、本予測式に用いた免疫染色法は、確立された手技で広く一般の病院の臨床検査部において安価で施行が可能であることから、術後化学補助療法施行の指標としてあるいは定期外来経過観察の期間を考慮する際に有用と期待される。

BRAF 遺伝子変異は RAS 遺伝子変異との相補性があると考えられているので、K-ras 遺伝子変異の低い MSI 陽性大腸がんの発生に BRAF 遺伝子変異が寄与する可能性が注目されていた。実際、BRAF 遺伝子変異は、散発性 MSI 陽性大腸がん 40%で検出された。

散発性 MSI 陽性大腸がん HNPCC ではフレームシフト変異の標的遺伝子などの多くの共通性を有するのにも、本研究において BRAF 遺伝子変異は HNPCC には全く検出しえなかった。BRAF 遺伝子変異の関わりについてのこのような著明な差は、臨床的にも HNPCC のスクリーニング診断に用いることができると期待される。エフリンリセプター EphB2 の不活化が大腸発がんにおいて重要であることが報告され注目されているが、本研究では、EphB2 が HNPCC および散発性 MSI 陽性大腸がんにおいて、(A)9 の繰り返し配列の変異と DNA メチル化により不活化されていることを示した。

3) 発がんにおけるエピジェネティック機構

CIMP の有無により、神経芽細胞腫の予後は大きく異なった。N-myc 増幅の陽性例がほぼ全例 CIMP 陽性であったことは、CIMP が N-myc 増幅に先行することを示唆していると考えられた。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。

遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドの中のもっともメチル化されにくいと予測される領域について解析し、細胞分裂あたりの CpG 部位メチル化状態複製のエラーを計測することで、CIMP の存在を明確に示した。正常状態では、CpG アイラ

ンド内の CpG 部位は de novo メチル化から保護されているが、一部のがん細胞では、その機構が破綻し、de novo メチル化が増加して CIMP も誘発されやすくなっていると考えられた。

DNMT1 の蛋白発現亢進は諸臓器の前がん状態から認められ、がん関連遺伝子等の多数の CpG アイランドにおける DNA メチル化の亢進を介して、がんの悪性進展に到るまで多段階発生過程に継続して寄与する可能性がある。DNMT の発現亢進とがん関連遺伝子等の DNA メチル化の蓄積は、がんの悪性度としばしば相関して、症例の予後予測指標になりうると考えられた。

従来から、DNMT3b4 が活性型のスプライスバリエーションと競合して傍セントロメアサテライト領域を標的とし、同領域における DNA メチル化の減弱を惹起する可能性を提唱してきた。実際、移行上皮がんにおいては、傍セントロメアサテライト領域における DNA メチル化の減弱と、サテライト配列が豊富である第 9 染色体におけるヘテロ接合性喪失 (LOH) の有意な相関を確認し得た。

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。C 型 CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積や、BAMCA 法で評価されるゲノム規模の DNA メチル化の変化を伴う前がん状態から、より

悪性度の高いがんが生じることが示唆された。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) が明らかになりつつあり、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの理解がすすんだ。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. Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*, 23: 5257-5262, 2004.
2. Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh

- M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 64: 6989-6995, 2004.
3. Nakanishi Y, Akimoto S, Sato Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in tongue cancer: immunohistochemical analysis of 91 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 12: 323-328, 2004.
 4. Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am J Pathol*, 164: 2269-2278, 2004.
 5. Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, Kobayashi M, Yamagiwa S, Genda T, Shioji K, Hashimoto S, Nomoto M, Hatakeyama K, Ajioka Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Aoyagi Y. Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 212: 253-259, 2004.
 6. Yokoo H, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Todo S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology*, 40: 609-617, 2004.
 7. Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics*, 4: 2776-2788, 2004.
 8. Sekine S, Shimoda T, Nimura S, Nakanishi Y, Akasu T, Katai H, Gotoda T, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. High-grade dysplasia associated with fundic gland polyposis in a familial adenomatous polyposis patient, with special reference to APC mutation profiles. *Mod Pathol*, 17: 1421-1426, 2004.
 9. Sekine S, Takata T, Shibata T, Mori M, Morishita Y, Noguchi M, Uchida T, Kanai Y, Hirohashi S. Expression of enamel proteins and LEF1 in adamantinomatous craniopharyngioma: evidence for its odontogenic epithelial differentiation. *Histopathology*, 45: 573-579, 2004.
 10. Yanagihara K, Tanaka H, Takigahira M, Ino Y, Yamaguchi Y, Toge T, Sugano K, Hirohashi S. Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess

- the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Sci*, 95: 575-582, 2004.
11. Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 128: 51-62, 2005.
 12. Shibata T, Uryu S, Kokubu A, Hosoda F, Ohki M, Sakiyama T, Matsuno Y, Tsuchiya R, Kanai Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa I, Hirohashi S. Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, 11: 6177-6185, 2005.
 13. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Loukopoulos P, Kanai Y, Kosuge T, Fukayama M, Kondo T, Sakamoto M, Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa I, Hirohashi S. Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome. *J Hepatol*, 43: 863-874, 2005.
 14. Peng WX, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Tsuchiya R, Kanai Y, Hosoda F, Sakiyama T, Ohki M, Imoto I, Inazawa I, Hirohashi S. Array-based comparative genomic hybridization analysis of high-grade neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Sci*, 96: 661-667, 2005.
 15. Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Matsuno Y, Kanai Y, Asamura H, Tsuchiya R, Hirohashi S. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 50: 1-8, 2005.
 16. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 11: 2531-2539, 2005.
 17. Nishizawa A, Nakanishi Y, Yoshimura K, Sasajima Y, Yamazaki N, Yamamoto A, Hanada K, Kanai Y, Hirohashi S. Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: Immunohistochemical analysis of 115 patients. *Cancer*, 103: 1693-1700, 2005.
 18. Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M,

- Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S. Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic β -catenin protein. *Oncogene*, 24: 3141-3153, 2005.
19. Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, Imai K, Hirohashi S. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/ β -catenin complex. *Gastroenterology*, 128: 1919-1936, 2005.
20. Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterol*, 128: 51-62, 2005.
21. Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, Ino Y, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. E-cadherin regulates the association between β -catenin and actinin-4. *Cancer Res*, 65: 8836-8845, 2005.
22. Sato S, Idogawa M, Honda K, Fujii G, Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, Hirohashi S, Yamada T. β -catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing. *Gastroenterol*, 129: 1225-1236, 2005.
23. Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci*, 96: 323-332, 2005.
24. Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics*, 5: 1411-1422, 2005.
25. Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics*, 5: 2939-2948, 2005.
26. Mori Y, Kondo T, Yamada T, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S. Two-dimensional electrophoresis database of fluorescence-labeled proteins of colon cancer cells. *J Chromatography B*, 823: 82-97, 2005.
27. Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma