

総合研究報告書表紙

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

研究分野2：がんの臨床的特性の分子基盤に関する研究  
「がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成19（2007）年 4月

総合研究報告書目次

目 次

I. 総合研究報告		
がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究-----		1
横田 淳		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14

総合研究報告書

がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

候補がん抑制遺伝子 MYO18B の結合蛋白質として HOMER2 を同定し、MYO18B の足場非依存性増殖抑制能を増強する作用があることを明らかにした。肺がんの原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似性と不均一性を明らかにし、候補転移抑制遺伝子の染色体部位を同定した。LKB1 遺伝子の変異は男性喫煙者の低分化肺腺がんを高頻度で起こっていることを明らかにした。子宮頸がん、子宮内膜がん、卵巣がんの in vitro 発がんモデルを作製した。また、ウイルスの代わりに bmi-1 あるいは p16-shRNA を用いて、乳腺上皮細胞、肺気管支上皮、皮膚角化細胞などを不死化する方法を開発した。独自に開発した分化誘導システムを用いて、脂肪由来のヒト間葉系幹細胞から肝細胞の性質を有する細胞を作製した。遺伝子改変ラット作製に必用なラット ES 細胞の培養系を確立した。CDCP1 が足場喪失時の細胞死を抑制すること、ephrin-B1 がメタロプロテアーゼ分泌を促進すること、パキシリンが腫瘍の細胞運動と転移能を促進すること、Cas が腫瘍の外力に対する感受性を制御することを見出し、どれも Src ファミリーの基質としてチロシンリン酸化を受けながら、腫瘍の悪性を促進する方向に影響を与えることが分った。HIF は糖鎖関連遺伝子の転写を誘導し、シアリルルイス a/x 糖鎖の発現や N-グリコシルシアル酸含有糖鎖の出現のような糖鎖異常を起こすことを明らかにした。低酸素で転写誘導される遺伝子はがん組織でも転写が増大しており、新規腫瘍マーカーになると考えられた。また、低酸素で出現する糖鎖の一部は免疫原性を持ち、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞治療の標的になると考えられた。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 清野 透 国立がんセンター研究所 部長
3. 落谷 孝広 国立がんセンター研究所 室長
4. 堺 隆一 国立がんセンター研究所 部長
5. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長

A. 研究目的

がんの罹患率と死亡率を減少させるためには、がんの生物学的特性の分子基盤を解明し、その情報を積極的に臨床へ導入していく必要がある。本研究の目的は、多様性のあるがんの生物学的特性を細胞内に蓄積した遺伝子異常、蛋白質リン酸化異常、細胞接着糖鎖異常との対応で把握し、がんの個性診断や分子標的療法の開発に有用な分子情報を得ることである。本研究は、がんの多様性の分子基盤解明を目指すもので、個々のがんにも最も適した治療法を提供する予知医療の実現へ向けて、必須の、且つ、極めて重要な研究課題である。この20余年のがん研究の進歩によりがんの本態が分子レベルで解明されつつある。そして、その情報はがん患者の予後診断やがんの分子標的療法などへ応用され、一部のがんでは予後の改善が見られている。しかし、まだ多くのがんでは、個々のがんの個性を分子レベルで把握するには至らず、治療の標的となる分子も同定されていない。

一方、近年、網羅的な遺伝子・蛋白質解析技術の確立など、解析技術も急速に進歩してきた。従って、個々の

がん細胞内に蓄積した遺伝子・蛋白質異常を網羅的に解析することが可能になった。また、近年、ヒト不死化細胞や各種幹細胞の樹立法が進歩し、がんの生物学的特性を分子レベルで解明できる情報、材料、技術が整ってきた時期と言える。そんな背景の中で、がんの本態解明研究をさらに推進することは極めて重要であり、今後の研究により、がん細胞で特異的に起こっている遺伝子異常やその発現異常が網羅的に明らかになり、それらの異常の生物学的意義が解明され、さらに、その制御法が開発されれば、新たながんの予防法・診断法・治療法の開発へ繋がり、がんの罹患率や死亡率の激減へ大きく貢献できる。

本研究では、各分野で独自の研究歴を持つ各班員によって、独自に単離された遺伝子や開発された解析法を中心に、がんの生物学的特性の分子基盤に関する研究を進めるとともに、がん化との関連では研究が遅れている蛋白質リン酸化や細胞接着糖鎖にも着目して研究を進めた。特に、細胞不死化や幹細胞培養の技術に優れた研究者とゲノム解析技術に優れた研究者が共同で多段階的な発がん過程の再現による分子基盤の解明を試みるとともに、ゲノム解析では解決できないリン酸化や糖鎖構造に関して優れた解析技術を持つ構成員によるがんの新たな制御法の開発も進めた。3年間の研究で、がん細胞の特性を規定する新規分子が数多く同定され、その一部は臨床への応用の可能性も出て来たので、以下に研究方法とその成果を列記した。

## B. 研究方法

### 1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

#### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

Yeast two-hybrid screen 法を用いてヒト MYO18B 蛋白質の C 末領域 (2020-2567 アミノ酸) と結合する蛋白質を探索した。候補として同定された Sug1 と HOMER2 に関して、種々の抗体を用いて結合を確認した。さらに、種々の発現ベクターを作製して生物学的機能解析を行った。

#### 2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

ヒト肺がん細胞株を対象に、ゲノム網羅的に約 10,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip、Mapping 10k array を用いて染色体のホモ欠失領域を探索した。ホモ欠失は Multiplex genomic PCR 法で確認した。第 9 染色体短腕の PTP-RD 遺伝子の領域にホモ欠失を検出したので、遺伝子内やその周辺のプライマーを用いたゲノム PCR 法でホモ欠失領域の詳細な解析を行なった。また、肺がん細胞株より RNA を抽出し、発現解析を行った。

#### 3) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

ヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍から DNA を抽出し、Mapping 10k array を用いて染色体の欠失領域を探索した。脳転移腫瘍で高頻度に第 11 染色体短腕の欠失を検出したので、その領域のマイクロサテライトマーカーのプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失領域の詳細な解析を行なった。

#### 4) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

ヒト肺がん細胞株と肺腺がん臨床検体もにおける LKB1 遺伝子の欠失と変異について解析し、その臨床病理学的意義や他の遺伝子異常との関連性を検討した。

### 2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

正常ヒト細胞を TERT 単独あるいはこれに加え HPV16 E7 や E6 あるいは bmi-1, p16-shRNA の導入により不死化した。また、これまでに不死化した種々のヒト細胞を用いて、これにさらに各がんを高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入やがん抑制遺伝子の RNA 干渉法を用いた発現抑制により導入し、そのがん化過程を in vitro で再現した。組換えレトロウイルスを用いることにより遺伝子挿入部位に依存しない細胞がん化過程をモニターした。組換えレトロウイルスは G418, hygromycin B, puromycin, blasticidin S, zeocin 耐性遺伝子を持つものを組み合わせ、複数の遺伝子発現に用いた。導入遺伝子は hTERT, bmi-1, HPV16 E6, 変異 E6 シリーズ, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性型 Akt (myr-Akt), erbB2, c-myc などを用いた。short hairpin RNA (shRNA) は H1 promoter を用い puromycin 耐性レトロウイルスにより導入した。子宮内膜腺上皮細胞並びに子宮頸部上皮細胞を用いてそれぞれ、子宮内膜がん、子宮頸がんの多段階発がんモデルを作製した。また、上皮性卵巣がんの母体となる正常卵巣表層上皮細胞も不死化した。解析方法としては、不死化機構から、細胞増殖、足場非依存性増殖、ヌードマウスでの造腫瘍性などの細

胞トランスフォーメーション検出法を用いるとともに、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾の変化などを DNA マイクロアレイや Western ブロットング法などを用いて解析した。

### 3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

#### 1) 間葉系幹細胞の肝細胞分化

独自に開発した肝細胞を ES 細胞から分化誘導する培養系を用いて、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞を作製した。インフォームドコンセントのもとに得られたがん患者 6 名の皮下脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養した後、CD105 陽性分画を精製、in vitro で肝細胞に分化誘導する操作を行った。この細胞の肝細胞としての性状を、肝特異的遺伝子の発現、肝特異的蛋白質の発現と培養上清中への産生、四塩化炭素によって肝不全状態になった動物へ移植した際の肝機能回復機能の有無を検討した。

#### 2) ラット ES 細胞の作製

リコンビナントラット LIF を用いて、胚盤胞よりラット ES 細胞の候補となる複数の細胞株の樹立と、遺伝子改変に必要な遺伝子導入条件と相同組換え技術の確立、さらに胚操作などの基盤技術の整備を行った。

### 4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

#### 1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

肺がん細胞株を材料に用いて、足場非依存性増殖に関わるリン酸化蛋白質群の解析を行った。具体的には、足場非依存性の強いグループの肺癌細胞株に共通に見られる非接着状態でチロシンリン酸化が残存する蛋白質群を精製し、質量分析により同定した。RNAi 法などを用いて機能解析を行った。

#### 2) ephrin-B1 の癌浸潤における役割

ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことが分かったので、そのメカニズムの詳細について解析を抜いた。

#### 3) 骨肉腫細胞の接着能、運動に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨肉腫細胞株 Hu-O9 の運動能や接着能を制御している鍵となるチロシンリン酸化蛋白質を探索した。これらの蛋白質のリン酸化に関わるチロシンキナーゼキナーゼを推定するとともに、過剰発現や RNAi による発現抑制の系を用いて、これらの分子の接着・運動能への関わりを検討した。

#### 4) Cas によるメカニカルストレスの受容

米コロンビア大学の澤田泰宏先生との共同研究で、細胞に外力すなわちメカニカルストレスをかけたときに、細胞内の Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が大きく亢進する現象について解析を進めた。そのようなメカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、リン酸化特異的抗体や RNAi の手法を用いて解析した。

### 5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

低酸素(1% O<sub>2</sub>)下で上皮細胞を培養することによって、細胞表面に糖鎖発現の変化が誘導されるかどうかを検索した。さらに低酸素によって発現が増加する糖鎖について、その増加の分子生物学的背景を明らかにするために、低酸素によって転写が誘導される遺伝子を DNA マイク

ロアレイおよび RT-PCR 法にて検索した。低酸素発現誘導が明らかになった遺伝子については、その背景に転写因子 HIF-1 が働いているかどうかをレポーターアッセイやクロマチン免疫沈降法を用いて検索した。また、これらの遺伝子によって発現誘導される糖鎖の機能を明らかにするために、遺伝子導入細胞を用いて細胞接着能などを測定した。低酸素によって発現が誘導される糖鎖関連遺伝子の産物に相当する糖鎖については特異的単クローン抗体を作製した。また、臨床例についてリアルタイム RT-PCR 法により当該遺伝子の転写発現を測定した。

#### (倫理面への配慮)

手術で得られたヒト正常細胞とヒト間葉系幹細胞の使用は、倫理審査委員会の承認を得て、提供者に不利益の生じないよう、また、同意を確認して行っている。ヒトがん組織の使用に当たっては、「臨床研究に関する倫理指針」に従い、個人情報の保護に十分に配慮し、倫理審査委員会の承諾を得て進めている。動物の操作は、各施設の動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮のもとに進めている。

### C. 研究結果

#### 1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

##### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

これまでの本研究で、肺がんで高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) から MYO18B 遺伝子を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の約 50% で失活していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにしてきた。そこで、MYO18B 遺伝子の生物学的機能を明らかにするため、Yeast two-hybrid screen 法を用いて MYO18B 蛋白質に結合する蛋白質を探索した。その結果、Sug1 と HOMER2 と言う 2 つの蛋白質の結合が示唆されたので、さらに詳細な解析を進めた。Sug1 は 26S proteasome の 19S regulator subunit で、proteasome 阻害剤や siRNA を用いた Sug1 の機能・発現抑制により、MYO18B 蛋白質量の増加とポリユビキチン化が観察され、MYO18B は proteasome で Sug1 との結合を介して分解される基質のひとつであることが示唆された。HOMER2 は Homer/Ves1 ファミリー蛋白質のひとつで、細胞膜の突起部分とアクチンのストレスファイバーで共局在していることが示唆された。MYO18B の発現はヒト肺がん細胞株の足場非依存性増殖を抑制するので、さらに、この機能における HOMER2 の作用を解析した結果、HOMER2 の共発現によりソフトアガーでの肺がん細胞株のコロニー形成能がさらに減弱した。これらの結果より、HOMER2 蛋白質は MYO18B 蛋白質との結合を介して、MYO18B のがん抑制機能を制御していることが示唆された。

##### 2) マイクロアレイを用いた肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析

Affymetrix 社から発売された「Mapping 10k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 210-kb 間隔で調べることのできるマイクロア

レイである。このマイクロアレイを用いて、29 例のヒト肺がん細胞株におけるホモ欠失 (homozygous deletion) の分布状態をゲノム網羅的に解析したところ、染色体上の 34 領域が候補として選択された。次に、この 34 領域について、multiplex genomic PCR 法を用いてホモ欠失の有無を確認したところ、18 領域でホモ欠失が実際に存在した。そこで、細胞株をさらに 49 例増やし、78 例におけるこれら 18 領域の欠失の頻度を調べた。その結果、2q24、3p14、5q11、9p21、9p23、11q14、21q21 の 7ヶ所の欠失が 2 つ以上の細胞株で検出された。9p21 の CDKN2A を含む領域の欠失が最も高頻度に検出され (20/78、26%)、この欠失は非小細胞がんのみに検出された。9p23 の PTPRD を含む領域の欠失が次に高頻度に検出され (8/78、10%)、この欠失は小細胞がんと非小細胞がんの両方で検出された。さらに、これら 2 領域の欠失は連続した同一の欠失ではなかった。9p21 の欠失は p16 がん抑制遺伝子の失活を促すゲノム異常であることが知られているが、9p23 領域の欠失に関しては、PTPRD がその標的遺伝子であるかどうかは定かでない。そこで、PTPRD 遺伝子の全ゲノム構造を決め、上記 8 例のホモ欠失領域を詳細にマップした。その結果、8 例全例の欠失は PTPRD の遺伝子内に存在することが分った。しかし、1 例を除き、欠失は非翻訳領域に存在したので、PTPRD 遺伝子が欠失の標的遺伝子ではあるが、欠失によって変異蛋白質が発現するのではなく、発現量が低下すると予想された。そこで、さらに定量的 RT-PCR 法を用いて 54 例の肺がん細胞株における PTPRD 遺伝子の発現量について調べた。その結果、欠失のある細胞株では欠失のない細胞株に対して有意に発現量が低下していることが分った。この結果より、PTPRD 遺伝子が 9p23 領域の欠失によって失活しているがん抑制遺伝子の強力な候補であると結論した。

##### 3) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

やはり「Mapping 10k array」を用いて、8 セットのヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍における染色体欠失の分布状態をゲノム網羅的に解析した。その結果、各腫瘍に 5-20ヶ所の欠失が検出され、同一患者から得られた腫瘍では原発巣と転移巣で 67% 以上の欠失が一致していた。しかし、原発巣あるいは転移巣のみで検出される欠失もあり、それぞれの部位でがん細胞が増殖する過程で新たなクローンが出現していることが分った。特に転移腫瘍の 50% (4/8) で第 11 染色体短腕の欠失が蓄積しており、この領域に転移能を規定する遺伝子の存在が示唆された。

##### 4) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

消化管に過誤種様ポリープを形成する遺伝性疾患 Poutz-Jeghers syndrome の原因遺伝子 LKB1 は肺がんでも変異が報告されているが、その詳細は不明である。そこで、まず多くの肺がん細胞株を用いて欠失と変異の検索を行った。その結果、30% (21/70) の細胞株で遺伝子異常が検出され、特に非小細胞肺がんでは頻度が高く (39%、20/51)、その異常は KRAS 変異と共存することが有意に多かった。さらに、多くの肺腺がん臨床検体で変異検索を行ったところ、変異は男性喫煙者のみで検出され、女性あるいは非喫煙者には全く検出されなかった。

また、組織学的には、低分化型で有意に多かった。以上より、LKB1 遺伝子の変異は喫煙によって誘導され、低分化型腺がんの形成に関わっていると考えられた。

## 2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

### 1) 子宮頸がんモデル

約 95% の子宮頸がんでは HPV の E6, E7 が発現している。E6 には様々な活性が知られている。このうちテロメラーゼの活性化には、hTERT プロモーターの転写抑制因子 NFY1-91 の分解、分化抑制には p53 分解による p53 の標的遺伝子であり扁平上皮の分化誘導に関わる Notch1 の発現抑制、トランスフォーメーションには DLG4 など PDZ ドメイン含有蛋白質群の分解が関わっていることを明らかにした。また、E6 の新たな機能として ErbB2 を安定化することも見出した。さらに、E6 と E7 は共に染色体不安定性の誘導するが、hWAPL の発現誘導を介している可能性を示した。hTERT のみで不死化した正常子宮頸部上皮細胞株 (HCK1T) を樹立した。この細胞株は 20 番染色体のトリソミーを除いて正常 2 倍体であり、分化能や、3 次元培養における組織像も正常だった。この細胞に HPV16 E6E7 を導入すると、分化抵抗性を獲得し、3 次元培養により CIN3 様構造を取るようになった。また、軟寒天培地中で微小コロニーを作るようになるが、ヌードマウスにおける腫瘍原性はなかった。さらに、HrasV12 を追加導入し血清入り培地で培養すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3 次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-myc を追加導入すると軟寒天培地中でサテライトを伴う巨大なコロニーを作る非常に造腫瘍能の強い細胞集団が得られた。この細胞集団は、僅か 200 個の細胞接種により腫瘍を形成した。さらに新たに手術材料 11 検体から HCK2-12 の培養細胞を得、E6, E7+HrasV12 のみで造腫瘍能を獲得することを確認した。

### 2) 子宮内臓がんモデル

TERT+HPV16 E6E7 の導入で不死化した子宮内臓上皮細胞に活性型 ras(KrasV12)、活性型 Akt(myr-Akt) を導入すると、細胞増殖は亢進し、形態変化が見られた。これらの細胞は軟寒天培地中でコロニーを形成し、足場非依存性増殖能を獲得していた。また、KrasV12 被導入細胞はヌードマウスに腫瘍を形成した。一方、PTEN 特異的 sh RNA (PTEN-shRNA) の導入により内因性 PTEN 量は 1/2 に減少したが、増殖能の亢進、足場非依存性増殖、造腫瘍性は見られなかった。

### 3) 上皮性卵巣がんモデル

同様に卵巣がんの in vitro モデル作製のため、手術材料 2 検体から、hTERT+E7 や hTERT+cdk4+cyclin D により不死化した卵巣表層上皮細胞株 (HOSE1, HOSE2) を樹立した。これらは世界初の正常 2 倍体卵巣表層上皮細胞株である。現在までに種々の遺伝子導入により造腫瘍能を獲得した細胞株を得た。

また、ウイルス遺伝子の代わりに bmi-1 あるいは p16-shRNA を用いて、乳腺上皮細胞、肺気管支上皮、皮膚角化細胞などを不死化する方法を開発し、対応する各がんの in vitro モデル作製の基礎を確立した。

## 3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

1) 36-54 歳のがん患者ドナーのヒト皮下脂肪組織中にはおよそ 3-8% の間葉系幹細胞が存在していた。この細胞は容易に継代培養や凍結保存が可能であり、細胞の倍加

時間は 18-22 時間程度、継代数が 5 代を越えると細胞の倍加能力に明らかな低下が認められた。脂肪、軟骨、骨への分化能は 5-8 世代までは高い分化能を示すことも分かった。肝細胞への分化は、増殖因子の処理後 35 日ごろから顕著になり、形態的にも機能的にも肝臓の特徴を示した。特に、アルブミンの産生やアンモニア解毒能等は顕著に発現され、肝不全動物への移植実験では 24 時間後に血中アンモニアレベルを有意に低下させた。

2) Nanog や Oct4 などの幹細胞のマーカー遺伝子を発現するラット ES 細胞を複数のストレインから樹立することに成功した。これらの ES 細胞は胚様体やテラトーマを形成し、3 胚葉系への細胞分化能力があることから、がん研究に有用な遺伝子改変ラット作製のための基礎準備が整った。さらにラット ES 細胞を用いた遺伝子改変ラットの作製を目指して、エレクトロポレーションの条件を設定し、ターゲティングベクターによる相同組換えの頻度を明らかにした。また、キメララット作製に向けて、ラットの胚操作およびマイクロインジェクションの条件や胚の培養条件などの環境設定を行った。

## 4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

肺がん細胞株を、ソフトアガーアッセイによる足場非依存性増殖能と浮遊状態におけるチロシンリン酸化蛋白質の違いにより 4 つのグループに分類した。足場非依存性の強いグループにおいて、浮遊状態においてチロシンリン酸化が顕著な蛋白質の一つとして同定された CDCP1 は、実際に RNAi を用いた発現抑制により、浮遊状態におけるアポトーシスを選択的に誘導することを明らかにした。その作用のためには CDCP1 のチロシンリン酸化部位とプロテインキナーゼ C $\delta$  が必要であることがわかった。さらに、CDCP1 は腫瘍の遠隔転移にも関わることを示された。

ephrin-B1 を高発現する肺がん細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを発見した。各種阻害剤を用いてその切断がマトリックスメタロプロテアーゼ特に MMP8 の働きによることがわかった。更に ephrin-B1 は EphB の刺激によってマトリックスメタロプロテアーゼの発現ではなく分泌を誘導するという新しい機能が明らかになり、現在のシグナルの解明を急いでいる。

転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質パキシリンは、活性が上昇した Fyn と協調して骨肉腫細胞の運動能・転移能を制御していることを示した。

培養細胞における Cas 蛋白質のチロシンリン酸化は、接着斑など、ごく限られた部位に限局してみられるが、細胞の足場をストレッチすることによりメカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進した。蛍光分子断片によって Cas 蛋白質の N 末と C 末をラベルすることにより相互の距離を推定すると、Cas が外力により伸長しうる構造であることが示された。また、ストレッチによる刺激で活性化される Rap1 蛋白質などの活性化は Cas 蛋白質の発現をブロックすることで抑えられたので、Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止めるセンサーであることが明らかになった。

## 5.細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

がん細胞を低酸素下で培養すると、シアリルルイス a やシアリルルイス x などのセレクトインの糖鎖リガンドの発現が著しく亢進することを明らかにした。これらの糖鎖の発現亢進の背景には、*FUT7*、*ST3O*、*UGT1*、*GLUT1*、*SIALIN* など、低酸素による一連の糖鎖関連遺伝子遺伝子の転写誘導があることが DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法で明らかになった。このうち *FUT7*、*ST3O*、*UGT1* の転写誘導については luciferase を用いたレポーターアッセイと転写因子 HIF-1 のドミナントネガティブ体を用いて、HIF-1 の下流で起こっていることを確認した。また大腸がん症例の組織において *FUT7*、*ST3O*、*UGT1*、*GLUT1* の転写が統計的に有意に増加していることを明らかにした。また、低酸素により  $\alpha 5$  インテグリンおよびシンデカン 4 などの細胞接着分子の発現も亢進することを明らかにした。

低酸素で誘導される糖鎖関連遺伝子のうちシアル酸トランスporter *SIALIN* によって、本来ヒトでは合成されないシアル酸分子種である *N*-グリコシルシアル酸が取り込まれ、異常な糖鎖が合成されることを明らかにした。これにより合成される糖鎖のひとつ、*N*-グリコシル GM2 ガングリオシドに着目して特異的単クローン抗体で検索したところ、大腸がんおよび乳がん症例の組織において有意に強発現していることが分かった。*N*-グリコシルシアル酸が本来ヒトでは合成されないシアル酸分子種であることから、免疫治療のターゲットとしての応用を試み、ヒトと同様に *N*-グリコシルシアル酸を合成できないノックアウトマウスを用いて *in vivo* での腫瘍移植実験を行ったところ、腫瘍増生の有意の抑制が観察された。

## D. 考察

### 1.がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

*MYO18B* のがん抑制遺伝子としての機能を明らかにするため、細胞内で結合している蛋白質を探索し、*HOMER2* を同定した。*HOMER2* は *MYO18B* の足場非依存性増殖抑制能を増強する作用があり、*MYO18B* のがん抑制遺伝子としての機能解明の糸口になると考えられた。

肺がんにおけるホモ欠失領域のゲノム網羅的解析では、新規の候補がん抑制遺伝子として *PTPRD* を同定することができた。この遺伝子の産物は膜型のチロシン脱リン酸化酵素なので、細胞の増殖・分化・死のシグナルを伝える分子である可能性が高い。今後は生物学的機能解析を行うことにより、細胞がん化の意義を明らかにしていきたい。

転移の分子機構を明らかにするために、原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似点・相違点を検討した。その結果、原発腫瘍内に新たなクローン細胞が出現し、その細胞が、ある時には原発腫瘍内で優位に増殖し、ある時には選択的に転移を起こすことが分かった。この結果は、転移腫瘍の鑑別診断や特異的治療を考える上で貴重な情報である。今後は転移形質発現の原因となるゲノム異常を明らかにし、診断のマーカー、治療の標的を同定していきたい。

肺腺がんにおける *LKB1* 遺伝子の変異に関しては、ま

だ報告が少なく、その実態や意義が明らかでなかった。本研究では、高頻度に変異している重要な遺伝子であることを確認するとともに、男性喫煙者に多く、低分化型腺がんの形成に関わっていることを示すことができた。肺腺がんの悪性度を規定する遺伝子のひとつであると考えられるので、今後は生物学的機能解析を進めるとともに、診断・治療の標的分子としての可能性も追求していきたい。

### 2.正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

不死化してきた種々の正常ヒト細胞を用い、*in vitro* がん化モデルの作製を進めてきた。まず、子宮内膜がんのモデル作製を試み、*p53* 経路と *RB* 経路の不活化とテロメラゼの活性化により不死化した細胞に *KrasV12* を導入する事により、ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得することが示された。不死化子宮頸部上皮細胞(HCK1T)を用いた発現モデルでは、当初 E6E7 導入後であっても、*HrasV12* を導入すると細胞死が誘導された。*HrasV12* 高発現細胞は維持できず、*in vitro* がん化モデル作製の困難さを感じた。しかし、この細胞死誘導機構の解析から、無血清の角化細胞培地の特異性が関与していることが明らかになった。通常血清入り培地中で E6E7+*HrasV12* 被導入細胞は、分化抵抗性ととも高い増殖性を示した。また、足場非依存性増殖とともにヌードマウスにおける造腫瘍性を示したことから、HCK1T 細胞のがん化には E6E7 に加えがん遺伝子の活性化1つのみで可能であることが示された。HCK1T+E6E7+*HrasV12* 細胞にさらに *c-myc* を導入すると著しい造腫瘍能の増強が見られた。50 万個の細胞接種では数日後から腫瘍の増大が確認され、接種した細胞の多くが腫瘍形成に関わっていることが示唆された。実際、200 個の細胞接種によっても 6/6 で腫瘍を形成したことから、がん幹細胞様の細胞集団であることが示唆された。今後、がん幹細胞の理解や同細胞を標的とした治療における標的分子の同定に有効であると考えられる。

子宮頸部角化細胞と同様に、皮膚、食道などの角化細胞や気管支・肺上皮細胞などは、血清やカルシウムにより分化が誘導されるため、無血清、低カルシウム培地という特殊培地で培養されている。これまでの成果を元に、食道がんや肺がんなどの *in vitro* がん化モデルも作製していきたい。他の細胞種でも *in vitro* がん化モデルを作製することで、異なる細胞種間での特異性や共通性を明らかに出来るものと考えている。

### 3.幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

本研究成果によってがん患者の脂肪組織中の間葉系幹細胞に肝細胞の機能を有する細胞へと分化する可塑性があることが証明された。この細胞は確かにいくつかの肝臓の機能を発現し、また細胞移植による肝不全動物の肝機能の改善に有効であったが、移植の実用化に向けては、この細胞が本来の肝臓とどこまで機能的に近く、移植は安全で有効なのかを明らかにしていく必要がある。また、ラット ES 細胞が樹立されたことは、化学発がん等の莫大なデータを有し、マウスよりもがん研究に貢献する可能性の高いラットでの遺伝子改変動物作製の可能性が示され、今後の展開に向けて大きな前進だと考えている。

### 4.蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

CDCP1 が足場喪失時の細胞死を抑制すること、ephrin-B1 がメタロプロテアーゼ分泌を促進すること、パキシリンが腫瘍の細胞運動と転移能を促進すること、Cas が腫瘍の外力に対する感受性を制御することが明らかになり、どれも Src ファミリーの基質としてチロシンリン酸化を受けながら、腫瘍の悪性化をそれぞれ異なる形で促進する方向に影響を与えることが明らかになった。限られた数のチロシンキナーゼが、数多くの基質を組織特異的にチロシンリン酸化して種々の生物機能を調節することを考えれば、腫瘍におけるチロシンキナーゼの活性化による恒常的な基質のリン酸化は元来の細胞内シグナル伝達の微妙な調節を細胞から奪ってしまうことになる。様々な遺伝子変化の集積として得られた無秩序な増殖や転移など幾つかの腫瘍特異的な特性が、それぞれどのようなチロシンリン酸化の異常によって引き起こされるか整理することは、腫瘍特異的な治療薬を考える上でも極めて重要である。

#### 5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

低酸素抵抗性を獲得した、より悪性度の高いがん細胞では、必然的にシアリルルイス x およびシアリルルイス a 糖鎖が強く発現することを示した。シアリルルイス x およびシアリルルイス a 糖鎖はすでに腫瘍マーカーとしてがん診断に利用されているが、その産生増加の背景にこのような機構が存在することが分った。即ち、低酸素抵抗性を獲得して悪性度の増大したがん細胞は、必然的にシアリルルイス a/x 糖鎖を強発現するようになり、これががん細胞と血管内皮の接着を媒介して血行性転移を引き起こすことになる。一方、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞には N-グリコリルシアル酸含有糖鎖の出現のような糖鎖異常も出現することが判明した。正常細胞が低酸素となった場合にも共通して出現する糖鎖を除外して、がん特異性が高い N-グリコリル GM2 などの糖鎖を選択すれば、こうした糖鎖の一部はがん治療の標的として利用できること可能性がある。

#### E. 結論

MYO18B 遺伝子のがん抑制機能を支持し、その機構解明に結びつく結果を得た。また、ヒト肺がんの新規候補がん抑制遺伝子として PTPRD を同定した。今後の更なる生物学的機能解析により、MYO18B および PTPRD の異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていきたい。原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似性と不均一性を明らかにし、候補転移抑制遺伝子の染色体部位を同定した。LKB1 遺伝子は喫煙等が原因で起こり、肺がん細胞の分化抑制を引き起こすと考えられた。

種々のヒト正常細胞の不死化を進め、ヒト細胞の不死化には p16/RB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要であることが確認された。また、細胞種によっては同時に p53 の不活化が必要であった。また、不死化した細胞を用いて in vitro 発がんモデルを作製し、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが示された。実際のがん細胞では多数の遺伝子異常が蓄積しているためどれががん化に重要な異常かを見極めることが困難である。正常細胞に限られた数の特定の異常を導入することでがん化を

再現することは、多段階発がんの一見複雑にみえるステップを単純化することが出来る。分子標的薬剤の開発においても有効なツールとなることが期待される。

正常臓器の機能を回復させるために再生医療は重要な役割を果たすが、今回の成果は、実際のがん患者の、しかも脂肪組織から得た幹細胞から患者さん自身の肝細胞を作り出す可能性を初めて示したものである。また、遺伝子改変ラット作製に必用なラット ES 細胞の培養が可能になったことから、マウスとは異なる全く新しいがんのモデル動物の作製に結びつく可能性が生まれた。

Src ファミリーキナーゼは多くの基質のリン酸化に関わるが、個々の基質の腫瘍における役割を理解すること、そして、キナーゼの代わりに特定の基質のシグナルをブロックすることで、キナーゼ活性化が伝える多くのシグナルのうちあるものを選択的にブロックできる可能性がある。今回、幾つかの Src ファミリーの基質の腫瘍における効果を特定することができたので、実際に起こっているシグナルの異常に合わせた分子標的を選択できる可能性が出てきた。

低酸素下での転写因子 HIF の恒常的発現は糖鎖関連遺伝子の転写を誘導し、シアリルルイス a/x 糖鎖の発現や N-グリコリルシアル酸含有糖鎖の出現のような様々な糖鎖異常を引き起こすことが分った。低酸素で転写が誘導される遺伝子はいずれも実際の患者がん組織でも転写が増大しており、新規腫瘍マーカーの候補であると考えられた。また、低酸素により出現する糖鎖の一部は免疫原性を持ち、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞の治療の標的になると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
- 2) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
- 3) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, 23:3089-3096, 2004.
- 4) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraiishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 40:146-151, 2004.
- 5) Yanaiharu, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka,

- A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 112:150-154, 2004.
- 6) Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., Yokota, J. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cells in vivo. *Carcinogenesis*, 25:1689-1694, 2004.
  - 7) Shimada, H., Shimizu, K., Mimaki, S., Sakiyama, T., Mori, T., Shimasaki, N., Yokota, J., Nakachi, K., Ohta, T., Ohki, M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genet.*, 115:372-376, 2004.
  - 8) Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hirama, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., Takenoshita, S. and Yokota, J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:512-519, 2005.
  - 9) Nakano, T., Tani, M., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Ohwada, S. and Yokota, J. Genetic and epigenetic alterations of the MYO18B gene, a candidate tumor suppressor, on chromosome arm 22q in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 43:162-171, 2005.
  - 10) Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y. and Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, 24:4754-4764, 2005.
  - 11) Sato, M., Takahashi, K., Nagayama, K., Arai, Y., Ito, N., Okada, M., Minna, J.D., Yokota, J. and Kohno, T. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 44:405-414, 2005.
  - 12) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
  - 13) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:2498-2504, 2006.
  - 14) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
  - 15) Yanaihara, N., Caplen, N., Bowmen, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Takana, T., Calin, G. A., Liu, C.-G., Croce, C. M. and Harris, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9:189-198, 2006.
  - 16) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342:829-834, 2006.
  - 17) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 119:1491-1494, 2006.
  - 18) Akca, H., Tani, M., Hishida, T., Matsumoto, S. and Yokota, J. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 54:25-33, 2006.
  - 19) Kohno, T. and Yokota, J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair*, 5(9-10):1273-1281, 2006.
  - 20) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13(1):11120, 2007.
  - 21) Edakuni, N., Ikuta, K., Yano, S., Nakatani, E., Muguruma, H., Uehara, H., Tani, Masachika, Yokota, J., Aizawa, H. and Sone, S. Restored expression of the MYO18B gene suppresses orthotopic growth and the production of bloody pleural effusion by human malignant pleural mesothelioma cells in SCID mice. *Oncol. Res.*, 16:235-243, 2006.
  - 22) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, in press, 2007.
  - 23) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D. and Yokota, J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, in press, 2007.

- 24) Ajima, R. Kajiya, K., Inoue, T., Tani, M., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Maeda, M., Segawa, T., Furuichi, T., Sutoh, K. and Yokota, J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2007.
- 25) Yokota, J., Matsumoto, S. and Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int. J. Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
- 26) Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., Kivono, T., Nishiyama, Y., Tsurumi, T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J. Virol.*, 78:104-115, 2004.
- 27) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kivono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Urnezawa, A. Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.*, 6:833-45, 2004.
- 28) Sawada, M., Kivono, T., Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., Sakai, N. Molecular mechanisms of TNF- $\alpha$ -Induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ.*, 11:997-1008, 2004.
- 29) Hara, S., Nakashima, S., Kivono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., Sakai, N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during  $\gamma$ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11: 853-861, 2004.
- 30) Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kivono, T., Nishi, H., Isaka, K., Urnezawa, A., Kuroda, M., Mukai, K. Expression of a novel human gene, hWAPL, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 64:3545-3549, 2004.
- 31) Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kivono, T., Nishitani, H., Fujita, M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.*, 279:19691-19697, 2004.
- 32) Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., Kivono, T., and Imamura, M. Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells. *Life Sci.*, 75:21-34, 2004.
- 33) Hara, S., Nakashima, S., Kivono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Sakai, N. Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol. Rep.*, 12:119-123, 2004.
- 34) Gewin, L., Myers, H., Kivono, T., Galloway, D. A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.*, 18:2269-2282, 2004.
- 35) Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kivono, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Ishizaki, K., Tsurumi, T. Activation of ATM DNA damage checkpoint signal transduction elicited by Herpes simplex virus infection. *J. Biol. Chem.*, 280:30336-41, 2005.
- 36) Maeda, T., Tashiro, H., Katabuchi, H., Begum, M., Ohtake, H., Kivono, T., Okamura, H. Establishment of an immortalised human ovarian surface epithelial cell line without chromosomal instability. *Br. J. Cancer*, 93: 116-123, 2005.
- 37) Mori, T., Kivono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., and Urnezawa, A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell Biol.*, 25: 5183-5195, 2005.
- 38) Kuroda, M., Kivono, T., Oikawa, K., Yoshida, K., Mukai, K. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. *Br. J. Cancer*, 92:290-293, 2005.
- 39) Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X. K., Urnezawa, A., Kivono, T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, 16:1491-1499, 2005.
- 40) Saito, M., Handa, K., Kivono, T., Hattori, S., Yokoi, T., Tsubakimoto, T., Harada, H., Noguchi, T., Toyoda, M., Sato, S., Teranaka, T. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J. Bone Miner. Res.*, 20:50-57, 2005.
- 41) Goto, H., Kivono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano T., Furukawa, K., Nigg, E.A., Inagaki, M. Complex Formation of Plk1 and INCENP Required for Metaphase-Anaphase Transition. *Nat. Cell Biol.*, 8:180-187, 2006.
- 42) Hashimoto N., Kivono T., Wada M.R., Shimizu S., Yasumoto S., and Inagawa M., Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 348:1383-1388, 2006.
- 43) Mizumoto Y., Kyo S., Ohno S., Hashimoto M., Nakamura M., Maida Y., Sakaguchi J., Takakura M., Inoue M., and Kivono T. Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene*, 25:5673-5682, 2006.
  - 44) Tatsumi, Y., Sugimoto, N., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Kivono T. and Fujita, M., Deregulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability. *J. Cell Sci.*, 119:3128-3140, 2006.
  - 45) Yamashita, Y., Tsurumi, T., Mori, N. and Kivono T. Immortalization of Epstein-Barr virus-negative human B lymphocytes with minimal chromosomal instability. *Pathol. Int.*, 56:659-667, 2006.
  - 46) Morishima S., Akatsuka Y., Nawa A., Kondo E., Kivono T., Torikai H., Nakanishi T., Ito Y., Tsujimura K., Iwata K., Ito K., Kodera Y., Morishima Y., Kuzushima K., and Takahashi T., Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int. J. Cancer*, 120:594-604, 2007.
  - 47) Haga, K., Ohno, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Fujita, M., Sakamoto, M., Galloway, D. A. and Kivono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16<sup>Ink4a</sup>-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.*, 98:147-154, 2007.
  - 48) Handa, K., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kivono T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J. Virol.*, 81:1379-89, 2007.
  - 49) Shima, Y., Okamoto, T., Aoyama, T., Yasura, K., Ishibe, T., Nishijo, K., Shibata, K. R., Fukidage, K. Kivono T. and Toguchida, J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353:60-6, 2007.
  - 50) Narisawa-Saito, M., Handa, K., Yugawa, T., Ohno, S., Fujita, M. and Kivono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, in press.
  - 51) Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kivono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell Biol.*, in press.
  - 52) Honma, K., Miyata, T. and Ochiya T. Atelocollagen-based cell transfection array allows high-throughput screening of gene functions and drug discovery. *Current Drug Discovery Technologies*, 1:287-294, 2004.
  - 53) Sasaki, H., Hirai, K., Yamamoto, Y., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., Takahashi, T., Terada, M. and Ochiya T. HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene*, 23:3681-3688, 2004.
  - 54) Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, T., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M. and Ochiya T. Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucl. Acids Res.*, 32:e109, 2004.
  - 55) Hirai, K., Sasaki, H., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Kubota, Y., Kakizoe, T., Terada, M. and Ochiya T. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp. Cell Res.*, 294:77-85, 2004.
  - 56) Kai, E. and Ochiya T. A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan. *Pharm. Res.*, 21:838-843, 2004.
  - 57) Hanai, K., Kurokawa, T., Minakuchi, Y., Maeda, M., Nagahara, S., Miyata, T., Ochiya T. and Sano, A. Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum. Gene Ther.*, 15:263-272, 2004.
  - 58) Nakamura, M., Ando, Y., Nagahara, S., Sano, A., Ochiya T., Maeda, S., Kawaji, T., Ogawa, M., Hirata, A., Terazaki, H., Haraoka, K., Tanihara, H., Ueda, M., Uchino, M. and Yamamura, K. Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 11:838-846, 2004.
  - 59) Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A. and Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:12177-12182, 2005.
  - 60) Yanagihara, K., Takigahira, M., Tanaka, H., Komatsu, T., Fukumoto, H., Koizumi, F., Nishio, K., Ochiya T., Ino, Y. and Hirohashi, S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.*, 96:323-332, 2005.
  - 61) Saito, S., Honma, K., Kita-Matsuo, H., Ochiya T. and Kato, K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput

- functional analysis. *Physiol. Genomics*, 22:8-13, 2005.
- 62) Teratani, T., Quinn, G., Yamamoto, Y., Sato, T., Yamanokuchi, H., Asari, A. and Ochiya, T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.*, 14: 629-635, 2005.
- 63) Yamamoto, Y., Teratani, T., Yamamoto, H., Quinn, G., Murata, S., Ikeda, R., Kinoshita, K., Matsubara, K., Kato, T. and Ochiya, T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Hepatology*, 42: 558-567, 2005.
- 64) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Sasaki, H., Terada, M. and Ochiya, T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 41: 836-846, 2005.
- 65) Banas, A., Quinn, G., Yamamoto, Y., Teratani, T. and Ochiya, T. "Stem cells into liver"—basic research and potential clinical applications. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 585:3-17, 2006.
- 66) Takeshita, F., Kodama, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Ueda, S., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tamatani, T., Kanegasaki, S., Ochiya, T. and Quinn, G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49:2948-2958, 2006.
- 67) Kosaka, N., Kodama, M., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Takeshita, F., Takahama, Y., Sakamoto, H., Kato, T., Terada, M. and Ochiya, T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J.* 20:1484-1485, 2006.
- 68) Katsumoto, T., Aikawa, Y., Iwama, A., Ueda S, Ichikawa H, Ochiya, T. and Kitabayashi, I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 20:1321-1330, 2006.
- 69) Fukaya, M., Isohata, N., Ohta, H., Aoyagi, K., Ochiya, T., Nakanishi, Y., Taniguchi, H., Sakamoto, H., Shimoda, T., Nimura, Y., Yoshida, T. and Sasaki, H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131:14-29, 2006.
- 70) Ochiya, T., Honma, K., Takeshita, F. and Nagahara, S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2:159-167, 2007.
- 71) Hanai, K., Takeshita, F., Honma, K., Nagahara, S., Maeda, M., Minakuchi, Y., Sano, A. and Ochiya, T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1082:9-17, 2006.
- 72) Kurokawa, Y., Honma, K., Takemasa, I., Nakamori, S., Kita-Matsuo, H., Motoori, M., Nagano, H., Dono, K., Ochiya, T. Monden, M. and Kato, K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int. J. Oncol.*, 28:383-391, 2006.
- 73) Fujii, T., Saito, M., Iwasaki, E., Ochiya, T., Takei, Y., Hayashi, S., Ono, A., Hirao, N., Nakamura, M., Kubushiro, K., Tsukazaki, K. and Aoki, D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 29:541-548, 2006.
- 74) Yanagihara, K., Takigahira, M., Takeshita, F., Komatsu, T., Nishio, K., Hasegawa, F. and Ochiya, T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res.*, 66:7532-7539, 2006.
- 75) Takeshita, F. and Ochiya, T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.*, 97:689-696, 2006.
- 76) Fukasawa, M., Morita, S., Kimura, M., Horii, T., Ochiya, T. and Hatada, I. Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice. *Cytogenet. Genome Res.*, 113:138-143, 2006.
- 77) Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D. B., Moore, M. A., Saito, I., Ochiya, T. and Tsuda, H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis*, 27:2497-2510, 2006.
- 78) Watanabe, H., Ochiya, T., Ueda, S., Kominami, Y., Gon, R., Nishiki, M., Hayashi, M., Sasaki, A., Shiraiishi, M., Kashimoto, N., Myojin, Y. and Kamiya, K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354:841-845, 2007.
- 79) Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura, K., Kamo, T., Sakai, R., Sugimura, H. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J.*, 23:1075-1088, 2004.
- 80) Azuma, K., Horie, K., Inoue, S., Ouchi, Y., Sakai, R. Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Lett.*, 577:339-344, 2004.
- 81) Miyake, I., Hakomori, Y., Misu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M., Sakai, R. Domain-

- specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 24:3206-3215, 2005
- 82) Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y., Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, 24:4754-4764, 2005
  - 83) Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R., Mori, N. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 25:1826-1835, 2005
  - 84) Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A., Sakai, R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.*, 167:213-222, 2005
  - 85) Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S., Hirai, H. Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J. Immunol.*, 175:3492-3501, 2005
  - 86) Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J.*, 24:3700-3711, 2005.
  - 87) Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.*, 280:42375-42382, 2005
  - 88) Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, M., Yamamoto, H., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Kannagi, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells—a missing link between Warburg effect and induction of selectin ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:8132-8137, 2004.
  - 89) Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., Kannagi, R. Loss of disialyl Lewis<sup>x</sup>, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor Siglec-7, associated with increased sialyl Lewis<sup>x</sup> expression on human colon cancers. *Cancer Res.*, 64:4498-4505, 2004.
  - 90) Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 95:377-384, 2004.
  - 91) Kannagi, R., Goto, Y., Fukui, F. In search of the carbohydrate structures on CD44 critical for hyaluronic acid binding – roles of sialylation and sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 16:211-223, 2004.
  - 92) Kannagi, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression – the Warburg effect revisited. *Glycoconjugate J.*, 20:353-364, 2004.
  - 93) Suzuki, A., Yoshioka, S., Sekine, M., Yonekawa, H., Takenaka, M., Kannagi, R. Core 2 GlcNAc transferase and kidney tubular cell-specific expression. *Glycoconjugate J.*, 20:151-156, 2004.
  - 94) Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B.G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O., Miyasaka, M. Human PSGL-1 interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J. Biol. Chem.*, 279:51775-51782, 2004.
  - 95) Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., Kimata, K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.*, 279:18679-18687, 2004.
  - 96) Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., Itano, N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.*, 279:33281-33289, 2004.
  - 97) Uchimura, K., Kadomatsu, K., El-Fasakhany, F.M., Singer, M.S., Izawa, M., Kannagi, R., Takeda, N., Rosen, S.D., Muramatsu, T. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.*, 279:35001-35008, 2004.
  - 98) Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., Kiso, M. Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$  core structure. *Tetrahedron Asymmetry*, 16: 1321-1327, 2005.
  - 99) Satoh, T., Kanai, Y., Wu, M.H., Yokozeki, H., Kannagi, R., Lowe, J.B., Nishioka, K. Synthesis of  $\alpha$ (1,3)fucosyltransferases IV- and VII-dependent eosinophil selectin ligand and recruitment to the skin. *Am. J. Pathol.*, 167: 787-796, 2005.

- 100) Tjew, S.L., Brown, K.L., Kannagi, R., Johnson, P. Expression of N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferases (GlcNAc6STs) -1 and -4 in human monocytes: GlcNAc6ST-1 is implicated in the generation of the 6-sulfo N-acetyllactosamine/Lewis x epitope on CD44 and is induced by TNF- $\alpha$ . *Glycobiol.*, 17: 7C-13C, 2005.
- 101) Uchimura, K., Gauguier, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., Von Andrian, U.H., Rosen, S.D. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat. Immun.*, 6: 1105-1113, 2005.
- 102) Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Uchimura, K., Kannagi, R., Kato, K. Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods. *Glycobiol.*, 15: 1051-1060, 2005.
- 103) Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Kiso, M. 6-O-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neoglycolipids containing lactamized neuraminic acid: Synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconj. J.*, 22: 95-108, 2005.
- 104) Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G.-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F.-L., Lin, C.-H., Sato, C., Kitajima, K., Kannagi, R. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.*, 66: 2937-2945, 2006.
- 105) Huang, J., Sakai, R. and Furuichi, T. The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons. *Mol. Biol. Cell.*, 17:3187-3196, 2006.
- 106) Sawada, Y., Tamada, M., Dubrin-Thaler, B., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S. and Sheetz, M. P. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, 127:1015-1026, 2006.
- 107) Akutagawa, A., Fukami, K., Banno, Y., Takenawa, T., Kannagi, R., Yokoyama, Y., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S., and Tamiya-Koizumi, K. Disruption of Phospholipase C $\delta$  Gene Modulates the Liver Regeneration in Cooperation with Nuclear Protein Kinase C. *J. Biochem. (Tokyo)*, 140: 619-625, 2006.
- 108) Chen, G.-Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L.F., and Kannagi, R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 16894-16899, 2006.
- 109) Helal Uddin, B.M., Hasegawa, H.H., Aminur, R.M., Huang, P., Mon, N.N., Ruhul Amin, A.R., Senga, T., Kannagi, R., and Hamaguchi, M. SHP-2-Erk signaling regulates Concanavalin A-dependent production of TIMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348: 1145-1149, 2006.
- 110) Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., and Nishihara, S. Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phospho- adenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J. Biol. Chem.*, 281: 10945-10953, 2006.
- 111) Kanoh, A., Seko, A., Ideo, H., Yoshida, M., Nomoto, M., Yonezawa, S., Sakamoto, M., Kannagi, R., and Yamashita, K. Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconj. J.*, 23: 453-460, 2006.
- 112) Kyogashima, M., Tamiya-Koizumi, K., Ehara, T., Li, G., Hu, R., Hara, A., Aoyama, T., and Kannagi, R. Rapid demonstration of diversity of sulfatide molecular species from biological materials by MALDI-TOF MS. *Glycobiology*, 16: 710-728, 2006.
- 113) Ohmori, K., Fukui, F., Kiso, M., Imai, T., Yoshie, O., Hasegawa, H., Matsushima, K., and Kannagi, R. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo Lewis x, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, 107: 3197-3204, 2006.
- 114) Sobue, S., Iwasaki, T., Sugisaki, C., Nagata, K., Kikuchi, R., Murakami, M., Takagi, A., Kojima, T., Banno, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., Kannagi, R., Suzuki, M., Abe, A., Naoe, T., and Murate, T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 20: 2042-2046, 2006.
- 115) Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., and Kimata, K. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J. Biol. Chem.*, 281: 20303-20314, 2006.
- 116) Kannagi, R., Miyazaki, K., Kimura, N., and Yin, J. Selectin-mediated metastasis of tumor cells: Alteration of carbohydrate-mediated cell-cell interactions in cancers induced by epigenetic silencing of glyco genes. In: C. Sansom and O. Markman (eds.), *Glycobiology*, pp. 274-287,

Bloxham, Oxfordshire, UK: Scion Publishing Ltd., 2007.

### 3. その他 なし

- 117) Kontani, K., Teramoto, K., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Ishida, H., Kajino, K., Fujino, S., Yamauchi, A., Taguchi, O., Kannagi, R., Yokomise, H., and Ogasawara, K. Preparation of fully activated dendritic cells capable of priming tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with metastatic cancer using penicillin-killed streptococcus pyogenes (OK432) and anti-CD40 antibody. *Oncol. Rep.*, 17: 895-902, 2007.
- 118) Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Hyperproduction of hyaluronan in Neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: Possible involvement of versican/PG-M. *Am. J. Pathol.*, 170: 1086-1099, 2007.
- 119) Li, G., Hu, R., Kamijo, Y., Nakajima, T., Aoyama, T., Inoue, T., Node, K., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Hara, A. Establishment of a quantitative, qualitative, and high-throughput analysis of sulfatides from small amounts of sera by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 362: 1-7, 2007.
- 120) Teramoto, K., Kontani, K., Fujita, T., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Fujino, S., Itoh, Y., Taguchi, O., Kannagi, R., and Ogasawara, K. Successful tumor eradication was achieved by collaboration of augmented cytotoxic activity and anti-angiogenic effects following therapeutic vaccines containing helper-activating analog-loaded dendritic cells and tumor antigen DNA. *Cancer Immunol. Immunother.*, 56: 331-342, 2007.
- 121) Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B. P. Glycosylation changes in cancer. In: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, G.W. Hart and J.D. Marth (eds.), *Essentials of Glycobiology*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, in press.

### G. 知的財産権の出願・登録情報

#### 1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」出願中

「(抗HPV16 E6)モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマおよびキット」出願中

「ヒト肝細胞様細胞及びその利用」出願中 (特許出願番号2005-042364)

#### 2. 実用新案登録 なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

- 1) Yabuta, T., Shinmura, K., Yamane, A., Yamaguchi, S., Takenoshita, S., Yokota, J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
- 2) Yokota, J., Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95: 197-204, 2004.
- 3) Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H., Yokota, J. Identification of genes whose expression is up-regulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, 23:3089-3096, 2004.
- 4) Tani, M., Ito, J., Nishioka, M., Kohno, T., Tachibana, K., Shiraishi, M., Takenoshita, S., Yokota, J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 40:146-151, 2004.
- 5) Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T., Yokota, J. Frequent epigenetic inactivation of MYO18B, a candidate tumor suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 112:150-154, 2004.
- 6) Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., Yokota, J. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cells in vivo. *Carcinogenesis*, 25:1689-1694, 2004.
- 7) Shimada, H., Shimizu, K., Mimaki, S., Sakiyama, T., Mori, T., Shimasaki, N., Yokota, J., Nakachi, K., Ohta, T., Ohki, M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genet.*, 115:372-376, 2004.
- 8) Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hirama, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., Takenoshita, S. and Yokota, J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:512-519, 2005.
- 9) Nakano, T., Tani, M., Nishioka, M., Kohno, T., Otsuka, A., Ohwada, S. and Yokota, J. Genetic and epigenetic alterations of the MYO18B gene, a candidate tumor suppressor, on chromosome arm 22q in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 43:162-171, 2005.
- 10) Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y. and Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, 24:4754-4764, 2005.
- 11) Sato, M., Takahashi, K., Nagayama, K., Arai, Y., Ito, N., Okada, M., Minna, J.D., Yokota, J. and Kohno, T. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 44:405-414, 2005.
- 12) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene

- in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
- 13) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:2498-2504, 2006.
  - 14) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
  - 15) Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Takana, T., Calin, G. A., Liu, C.-G., Croce, C. M. and Harris, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9:189-198, 2006.
  - 16) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342:829-834, 2006.
  - 17) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 119:1491-1494, 2006.
  - 18) Akca, H., Tani, M., Hishida, T., Matsumoto, S. and Yokota, J. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 54:25-33, 2006.
  - 19) Kohno, T. and Yokota, J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair*, 5(9-10):1273-1281, 2006.
  - 20) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13(1):11120, 2007.
  - 21) Edakuni, N., Ikuta, K., Yano, S., Nakatani, E., Muguruma, H., Uehara, H., Tani, Masachika, Yokota, J., Aizawa, H. and Sone, S. Restored expression of the MYO18B gene suppresses orthotopic growth and the production of bloody pleural effusion by human malignant pleural mesothelioma cells in SCID mice. *Oncol. Res.*, 16:235-243, 2006.
  - 22) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, in press, 2007.
  - 23) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D. and Yokota, J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, in press, 2007.
  - 24) Ajima, R., Kajiya, K., Inoue, T., Tani, M., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Maeda, M., Segawa, T., Furuichi, T., Sutoh, K. and Yokota, J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2007.
  - 25) Yokota, J., Matsumoto, S. and Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int. J. Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
  - 26) Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., Kiyono, T., Nishiyama, Y., Tsurumi, T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral

- lytic replication. *J. Virol.*, 78:104-115, 2004.
- 27) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A. Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.*, 6:833-45, 2004.
  - 28) Sawada, M., Kiyono, T., Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., Sakai, N. Molecular mechanisms of TNF- $\alpha$ -Induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ.*, 11:997-1008, 2004.
  - 29) Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., Sakai, N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during  $\gamma$ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11: 853-861, 2004.
  - 30) Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., Mukai, K. Expression of a novel human gene, hWAPL, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 64:3545-3549, 2004.
  - 31) Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H., Fujita, M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.*, 279:19691-19697, 2004.
  - 32) Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., Kiyono, T., and Imamura, M. Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells. *Life Sci.*, 75:21-34, 2004.
  - 33) Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Sakai, N. Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol. Rep.*, 12:119-123, 2004.
  - 34) Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway, D. A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.*, 18:2269-2282, 2004.
  - 35) Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kiyono, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Ishizaki, K., Tsurumi, T. Activation of ATM DNA damage checkpoint signal transduction elicited by Herpes simplex virus infection. *J. Biol. Chem.*, 280:30336-41, 2005.
  - 36) Maeda, T., Tashiro, H., Katabuchi, H., Begum, M., Ohtake, H., Kiyono, T., Okamura, H. Establishment of an immortalised human ovarian surface epithelial cell line without chromosomal instability. *Br. J. Cancer*, 93: 116-123, 2005.
  - 37) Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., and Umezawa, A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 5183-5195, 2005.
  - 38) Kuroda, M., Kiyono, T., Oikawa, K., Yoshida, K., Mukai, K. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. *Br. J. Cancer*, 92:290-293, 2005.
  - 39) Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X. K., Umezawa, A., Kiyono, T., Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, 16:1491-1499, 2005.
  - 40) Saito, M., Handa, K., Kiyono, T., Hattori, S., Yokoi, T., Tsubakimoto, T., Harada, H.,

- Noguchi, T., Toyoda, M., Sato, S., Teranaka, T. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J. Bone Miner. Res.*, 20:50-57, 2005.
- 41) Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano T., Furukawa, K., Nigg, E.A., Inagaki, M. Complex Formation of Plk1 and INCENP Required for Metaphase-Anaphase Transition. *Nat. Cell Biol.*, 8:180-187, 2006.
  - 42) Hashimoto N., Kiyono T., Wada M.R., Shimizu S., Yasumoto S., and Inagawa M., Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality. *Biochem Biophys Res Commun*, 348:1383-1388, 2006.
  - 43) Mizumoto Y., Kyo S., Ohno S., Hashimoto M., Nakamura M., Maida Y., Sakaguchi J., Takakura M., Inoue M., and Kiyono T., Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene*, 25:5673-5682, 2006.
  - 44) Tatsumi, Y., Sugimoto, N., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Kiyono, T. and Fujita, M., Dereglulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability. *J. Cell Sci.*, 119:3128-3140, 2006.
  - 45) Yamashita, Y., Tsurumi, T., Mori, N. and Kiyono, T., Immortalization of Epstein-Barr virus-negative human B lymphocytes with minimal chromosomal instability. *Pathol. Int.*, 56:659-667, 2006.
  - 46) Morishima S., Akatsuka Y., Nawa A., Kondo E., Kiyono T., Torikai H., Nakanishi T., Ito Y., Tsujimura K., Iwata K., Ito K., Kodera Y., Morishima Y., Kuzushima K., and Takahashi T., Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int. J. Cancer*, 120:594-604, 2007.
  - 47) Haga, K., Ohno, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Fujita, M., Sakamoto, M., Galloway, D. A. and Kiyono, T. Efficient immortalization of primary human cells by p16<sup>Ink4a</sup>-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.*, 98:147-154, 2007.
  - 48) Handa, K., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J. Virol.*, 81:1379-89, 2007.
  - 49) Shima, Y., Okamoto, T., Aoyama, T., Yasura, K., Ishibe, T., Nishijo, K., Shibata, K. R., Fukiage, K. Kiyono, T. and Toguchida, J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353:60-6, 2007.
  - 50) Narisawa-Saito, M., Handa, K., Yugawa, T., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, in press.
  - 51) Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell Biol.*, in press.
  - 52) Honma, K., Miyata, T. and Ochiya, T. Atelocollagen-based cell transfection array allows high-throughput screening of gene functions and drug discovery. *Current Drug Discovery Technologies*, 1:287-294, 2004.
  - 53) Sasaki, H., Hirai, K., Yamamoto, Y., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., Takahashi, T., Terada, M. and Ochiya, T. HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene*, 23:3681-3688, 2004.
  - 54) Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, T., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M. and Ochiya, T.

- Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucl. Acids Res.*, 32:e109, 2004.
- 55) Hirai, K., Sasaki, H., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Kubota, Y., Kakizoe, T., Terada, M. and Ochiya, T. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp. Cell Res.*, 294:77-85, 2004.
  - 56) Kai, E. and Ochiya, T. A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan. *Pharm. Res.*, 21:838-843, 2004.
  - 57) Hanai, K., Kurokawa, T., Minakuchi, Y., Maeda, M., Nagahara, S., Miyata, T., Ochiya, T. and Sano, A. Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum. Gene Ther.*, 15:263-272, 2004.
  - 58) Nakamura, M., Ando, Y., Nagahara, S., Sano, A., Ochiya, T., Maeda, S., Kawaji, T., Ogawa, M., Hirata, A., Terazaki, H., Haraoka, K., Tanihara, H., Ueda, M., Uchino, M. and Yamamura, K. Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 11:838-846, 2004.
  - 59) Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A. and Ochiya, T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:12177-12182, 2005.
  - 60) Yanagihara, K., Takigahira, M., Tanaka, H., Komatsu, T., Fukumoto, H., Koizumi, F., Nishio, K., Ochiya, T., Ino, Y. and Hirohashi, S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.*, 96:323-332, 2005.
  - 61) Saito, S., Honma, K., Kita-Matsuo, H., Ochiya, T. and Kato, K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol. Genomics*, 22:8-13, 2005.
  - 62) Teratani, T., Quinn, G., Yamamoto, Y., Sato, T., Yamanokuchi, H., Asari, A. and Ochiya, T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.*, 14: 629-635, 2005.
  - 63) Yamamoto, Y., Teratani, T., Yamamoto, H., Quinn, G., Murata, S., Ikeda, R., Kinoshita, K., Matsubara, K., Kato, T. and Ochiya, T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Hepatology*, 42: 558-567, 2005.
  - 64) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Sasaki, H., Terada, M. and Ochiya, T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 41: 836-846, 2005.
  - 65) Banas, A., Quinn, G., Yamamoto, Y., Teratani, T. and Ochiya, T. "Stem cells into liver"—basic research and potential clinical applications. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 585:3-17, 2006.
  - 66) Takeshita, F., Kodama, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Ueda, S., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tamatani, T., Kanegasaki, S., Ochiya, T. and Quinn, G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49:2948-2958, 2006.
  - 67) Kosaka, N., Kodama, M., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Takeshita, F., Takahama, Y., Sakamoto, H., Kato, T., Terada, M. and Ochiya, T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J.* 20:1484-1485, 2006.
  - 68) Katsumoto, T., Aikawa, Y., Iwama, A., Ueda S, Ichikawa H, Ochiya, T. and Kitabayashi, I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 20:1321-1330, 2006.