

より、S6 キナーゼ増幅肝がん細胞株の増殖抑制が認められ、この経路が肝がんの新たな治療標的として有望であり、S6 キナーゼの異常が治療反応性の予測因子となる可能性が考えられた。次に早期肝がんとそこから進展した進行肝がんの両成分が共存する臨床検体を用いて、両成分における染色体構造異常を詳細に比較することで、肝発がん過程におけるゲノム異常の蓄積過程の詳細を明らかにした。

## 2) 肺がんにおけるゲノム異常探索

86症例の肺腺がんについてゲノムワイドな遺伝子発現解析を行なった結果、末梢肺胞上皮型と中枢気管支上皮型の2つに大きく分類できた。更にEGFR及びKRAS遺伝子変異との関連について検索した結果、KRAS遺伝子変異が有意に中枢型に多いこと、EGFR変異は両者で有意な差がないことが判った。またEGFR変異の有無と有意に発現量が相関する遺伝子群を同定したところ、その中にEGFR経路を阻害する分子であるBCRが同定でき、EGFR変異による活性化の結果として起こるnegative feedback機構によるものと考えられた。CT画像で診断された早期肺がん検体におけるEGFR遺伝子変異を検索した結果、いわゆる“磨りガラス”様のCT所見を示す肺がんでは高頻度にEGFR遺伝子変異を認めること、更にp53の異常が腫瘍の進行度と相関することを見いだした。小細胞がんにおけるEGFR変異を報告した。複数のサイトカインの発現パターンの解析から、早期肺がんの予後因子となるサイトカイン遺伝子発現セットを同定した。

## 3) 膵がん・胆道がんにおけるゲノム異常探索

膵がん臨床検体を用いたCGH解析から、新規の異常を含む多数の染色体構造異常を明らかにした。中でも新規染色体増幅領域からTGFβ経路に関係するユビキチンリガーゼを新規がん遺伝子候補として見いだした。

胆道がんにおける染色体コピー数異常解析から新たに同定したホモ欠領域を更に詳細に検索することで、新規がん抑制遺伝子としてE3ユビキチンリガーゼを同定した。当該遺伝子について、胆道がん臨床検体における変異検索の結果、複数のナンセンスあるいはミスセンス突然変異やフレームシフト変異などの異常を同定し、これらの変異は機能喪失型の変異であることを確認した。当該分子は、様々な環境ストレスに対する抵抗性の制御に関係することから、抗がん剤に対する耐性と相関を検討した結果、当該分子の機能喪失が5FU抗がん剤に対する抵抗性獲得に寄与していることを明らかにした。

## 4) 胆道がんにおける分子標的治療の評価

236症例の胆道がん臨床検体において、EGFR、VEGFの発現と臨床病理像との相関を検索した結果、EGFRの高発現は低分化がんや浸潤部に高頻度に見られ、独立した予後因子となること、VEGFの発現は、肝内胆管がんにおいて肝内転移と有意に相関することを報告した。更にこれらの分子の治療標的としての可能性について検索するため、マウス移植モデルを用いて、EGFR/VEGFR dual kinase

inhibitorによる増殖抑制について検討した。その結果EGFR遺伝子増幅を認める胆道がん細胞株では著明な抗腫瘍効果を認めたが、一方KRAS遺伝子変異のある細胞株では治療抵抗性であることを明らかにした。これらの結果から、胆道がんに対する分子治療として抗EGFR並びに抗VEGFR治療は一部の症例には有望であり、EGFR/KRAS遺伝子の異常が奏功性予測因子となる可能性が示唆された。

5) 染色体不安定性に着目した独自のCGHアレイ作製  
サブテロメア、傍セントロメア、染色体脆弱部位、染色体複製・分離関連遺伝子を含む640BACクローンを搭載した独自のCGHアレイを作製した。

## D. 考察

### 1) 難治がんにおける染色体構造異常の網羅的な解析に関する研究

肝がん、肺がん、胆道がん、膵がんについて、網羅的な染色体構造異常解析を進め、個別化医療の実現を目指す新たな腫瘍の層別化、網羅的な遺伝子発現との統合解析、並びにゲノム構造異常を起点とした新規治療標的の同定について研究を進めた。とりわけ胆道がんにおける新規がん抑制遺伝子については、その機能喪失が抗がん剤に対する耐性獲得と密接に関係していることを見出し、今後更にその分子経路の解析によって、既存の抗がん剤の感受性を増幅できるような新たな治療法の開発に向けて研究を進める。また肝がんにおける早期病変の解析は、臨床症例数の多い施設でなければ集められない症例数を対象としており、早期肝がんにおける重要なゲノム異常を同定できる可能性が期待され、今後より詳細な解析を進めていく予定である。

### 2) 胆道がん移植モデルの作製とそれを用いた分子標的治療の評価に関する研究

非常に予後不良でありながら、これまで外科切除以外に有効な治療法がなかった胆道がんに対して、新たな分子治療法の可能性を探索する目的で、多数の臨床検体における発現解析から、EGFRとVEGFを有望な標的として見いだした。更に抗腫瘍効果について検討するため、より定量性が高くしかも継続的な観察が可能な分子イメージングを導入したマウス移植モデルを樹立した。今回の解析の結果、EGFR遺伝子増幅を示す胆道がんではEGFR阻害剤が著効を示し、一方でKRAS変異を示す腫瘍は抵抗性を示すことが明らかになり、奏功性と相関する分子マーカーをモニタリングしていくことで、効果的な治療成績が得られる可能性が示され、今後臨床家と共同して臨床試験についても提案していきたいと考えている。またEGFR阻害剤が有効でなかった症例についての新たな分子標的の探索と阻害剤の開発や検証のために、今回樹立したモデルは非常に有用であると考えられる。

### 3) 乏遺伝子領域における染色体不安定性の検索を目指した新規ゲノムアレイの開発作製

染色体の末端部や中央部(紡錘糸の結合部位)は染色体の構造や分配にとって重要な役割を果たすこ

とが知られているが、がんにおけるその構造異常についての詳細はこれまで明らかになっていなかった。また染色体転座や遺伝子増幅の分子機構である染色体の断裂や融合が起こりやすい部位でもあり、新たな発がん機構の解明にとってもその詳細解析は重要と考えられる。今回開発・作製したゲノムアレイは、そうした遺伝子に乏しい構造領域に着目した独自のものであり、今後このアレイを用いた解析によって、がんにおけるより詳細な染色体構造のダイナミックな異常が解析できるものと考えられる。

#### E. 結論

肝がん・肺がん・膵がん・胆道がんにおける網羅的なゲノム異常解析によって、その全体像を明らかにし、また臨床病態と相関するようなゲノム異常パターンを組み合わせて存在することが分かった。また染色体構造異常プロファイリングから新たながん関連遺伝子を同定し、抗がん剤耐性や細胞増殖における機能解析と治療標的としての可能性についての検討も進めた。遺伝子に乏しい染色体領域における構造異常を検索するための新たなツールを開発した。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 発表論文

- 1) Katoh, H., Ojima, H., Kokubu, A., Kosuge, T., Hosoda, F., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., Shibata, T. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2007, 133, 1475-1486.
- 2) Shibata, T., Hanada, S., Kokubu, A., Matsuno, Y., Asamura, H., Ohta, T., Sakamoto, M., Hirohashi, S. Gene expression profiling of EGFR/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 2007, 98:985-991.
- 3) Seike, M., Yanaihara, N., Bowman, E.D., Zanetti, K.A., Budhu, A., Kumamoto, K., Mechanic, L.E., Matsumoto, S., Yokota, J., Shibata, T., Sugimura, H., Gemma, A., Kudoh, S., Wang, X.W., Harris, C.C. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, 99:1257-1269.
- 4) Yoshida, Y., Kokubu, A., Suzuki, K., Kuribayashi, H., Tsuta, K., Matsuno, Y., Kusumoto, M., Kanai, Y., Asamura, H., Hirohashi, S., Shibata, T. Molecular markers and changes of computed

tomography appearance in lung adenocarcinoma with ground-grass opacity. *Japan Journal of Clinical Oncology* 2007, 37, 907-912.

- 5) Fukui, T., Tsuta, K., Furuta, K., Watanabe, S., Asamura, H., Ohe, Y., Maeshima, A.M., Shibata, T., Masuda, N., Matsuno, Y. EGFR mutation status and clinicopathological features of combined small cell carcinoma with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Sci* 2007, 98, 1714-1719.
- 6) 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. *Cancer Sci.* 2007,98:392-400.
- 7) Yoshikawa, D., Ojima, H., Iwasaki, M., Hiraoka, N., Kosuge, T., Kasai, S., Hirohashi, S., Shibata, T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *British J Cancer*, 2008, 98, 418-425.

#### H. 知的財産権の出願・登録情報 特になし

厚生労働科学研究費補助金（平成19年年度第3次がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

分担研究者 稲澤 謙治 東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授

研究要旨

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析や特定の表現型（臨床情報、病理組織、各種がん細胞の特性など）と比較することで、新規のがん関連遺伝子を同定とがんの病態解明研究を実施した。独自開発のメチル化DNA探索法であるBAC array-based MCA (BAMCA)法を用いて神経芽腫(NB)の悪性化に関与するメチル化領域を特定し、その標的である新規NB抑制遺伝子候補PTGDR、PTGER2を同定した。

A. 研究目的

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析や特定の表現型（臨床情報、病理組織、各種がん細胞の特性など）と比較することで、新規のがん関連遺伝子を同定し、さらに病態形成機構を明らかにすることで、がんの診断、治療、予防の個別化に資する成果を上げることがを目的とする。

B. 研究方法

高密度ゲノムアレイの開発を推進し、自作ゲノムアレイにより各種がんのゲノムコピー数異常を体系的に解析し、がん特異的ゲノム構造異常のデータを蓄積する。特に悪性度の高い小児神経芽腫、甲状腺未分化癌、肺小細胞癌などの生命予後が極めて不良で有効な治療法が確立されていない難治がんを研究の主たる対象とする。これら難治がんにおいて、新規に見出された病型特異的な増幅や欠失などをランドマークに新規がん関連遺伝子を同定し、がん悪性度診断のバイオマーカーとしての有用性を検討する。さらに、同定することができたがん関連遺伝子の機能を解析し、その破綻によって起きるがん病態を解明するとともに、これを新たながん治療薬開発のシードとする。また、ゲノムアレイによるがん個性診断システムの確立と実用化に向けての開発研究を行う。さらに、methylated CpG island amplification (MCA) 法やChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法をゲノムアレイに応用することで、メチル化DNA領域のゲノムワイド探索や特定タンパク結合DNA領域を探索し、エピジェネティクスの側面からも難治性がんの病態解明にアプローチする。加えて、ナノテクノロジーとの融合により、がんの個性診断用マイクロチップの実用化と、これによ

て得られた網羅的ゲノム構造異常解析データベースの構築によりオーダーメイド医療に向けた診断支援のサービス体制の整備にも取り組む。さらに、網羅的発現解析データとの統合解析により、ゲノム構造変化に裏付けられたがんにおける遺伝子発現調節制御の破綻のメカニズムを解明し、新しいがんの診断、治療、予防法の開発に資する成果を上げる。

（倫理面への配慮）研究は、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」（科学技術会議生命倫理委員会）ならびに「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」（厚生科学審議会先端医療技術評価部会）を遵守して遂行すると共に、東京医科歯科大学をはじめ共同研究施設の各機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

神経芽腫 (NB) は、未治療経過観察で自然退縮するstage-1, 2の非進行型およびstage-4Sと、致死的なstage-3,4の進行型NBに大別される。stage-3,4 NBでは癌遺伝子MYCNの増幅と第1番染色体短腕(1p)欠失が高頻度に検出される。加えて、NBの悪性化にはDNAメチル化の関与が報告されてきている。このような背景から、BAMCA法により、進行型NBにおいて優先的にメチル化を受けるゲノムDNA領域をゲノムアレイ上に検出し、これをランドマークにがん抑制遺伝子候補の探索を行った。

その結果、NB細胞株で高頻度にDNAメチル化をおこすProstaglandin D2 受容体遺伝子(PTGDR)ならびにProstaglandin E受容体2型遺伝子(PTGER2)を見出した。PTGER2プロモーター領域のCpG islandメチル化はMYCN増幅陽性のNB細胞株で高頻度に生じ、かつ遺伝子発現の消失をともなっていた。PTGER2発現消失はヒスト

ンH3の脱アセチル化、H3K9のメチル化と強い相関を示した。PTGER2発現陰性NB株から作製したPTGER2安定発現株は細胞増殖能の低下が起こり、これに、PTGER2の選択的agonistであるbutaprostを作用させるとcAMPの細胞内増加ならびに細胞増殖抑制と細胞死が起きた。また、PTGER2の有無に影響を受けない8-Bromo-cAMPを処理すると細胞増殖抑制が確認され、NBにおけるPTGER2介在の細胞増殖抑制/細胞死経路の重要性が確認された。

#### D. 考察

神経芽腫(NB)は小児固形腫瘍の中で最も高頻度に発症する。未治療経過観察で自然退縮するタイプと、強力な化学療法に抵抗し致死となるNBに大別される。その病態を明らかにすることは治療や予防法の解明に繋がるだけでなく、神経細胞分化の分子機構の理解にも大きく貢献する。われわれは、BAMCA法により進行NBで優先的にDNAメチル化を受けるゲノム領域の染色体ワイド探索を糸口にしてNBがん抑制遺伝子の探索においてNR1I2を見出したが(Misawa et al., Cancer Res.2005)、今回、これに続き、同様に進行NBのがん抑制遺伝子候補PTGER2を同定した。今回の研究アプローチががん関連遺伝子探索に有効であることが示された。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書のため未記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A(MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. Cancer Sci. 2008(in press).
2. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res. 2008 (in press).
3. Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iidab S, Ueda R, Inazawa J. POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth of multiple myeloma cells by directly regulating expression of a B-cell maturation factor, TNFRSF17. Oncogene 27(1):63-75,2008
4. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to Frequent Inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. Cancer Res. 67(15):7095-7105,2007
5. Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham P, Nakagawa T, Kamata N, Kozaki Ken-ichi, Amagasa T, Inazawa J. PRTFDC1, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation. Oncogene 26(57):7921-32,2007
6. Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. Oncogene 26(53):7401-13, 2007
7. Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma. Oncogene 26: 6456-68, 2007
8. Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J. Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. Cancer Sci. 98:1078-1086,2007
9. Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki K, Aida S, Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J. BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. Cancer Sci. 98:1070-7,2007
10. 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 Result in G2/M Arrest. Oncogene 26: 1110-21, 2007
11. 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 26:1178-87,2007

12. Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Inazawa J, Okanoue T: Activation of B-Mybby E2F1 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology Research*. 2007 (in press)
  13. Arai A, Yan W, Wakabayashi S, Hayashi S, Inazawa J, Miura O: Successful imatinib treatment of cardiac involvement of FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -Positive chronic eosinophilic leukemia followed by severe hepatotoxicity. *Int J Hematol*. 86(3):233-7, 2007
  14. Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Saito S, Kondo T, Kosuge T, Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T: Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets. *Gastroenterology*. 133:1475-86, 2007
  15. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Kita T, Takano M, Tamai S, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O: Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type. *Mod Pathol*. 20:1278-85, 2007
  16. Mitsui F, Dobashi Y, Imoto I, Inazawa J, Kono K, Fujii H, Ooi A: Non-incidentally coamplification of Myc and ERBB2, and Myc and EGFR, in gastric adenocarcinomas. *Modern Pathology* 20, 622-631, 2007
  17. Morita D, Tsuda H, Ichikura T, Kimura M, Aida S, Kosuda S, Inazawa J, Mochizuki H, Matsubara O: Analysis of sentinel node involvement in gastric cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 5:1046-1052, 2007
  18. Yamamoto S, Tsuda H, Kita T, Maekawa K, Fujii K, Kudoh K, Furuya K, Tamai S, Inazawa J, Matsubara O: Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 451 : 27-35, 2007
  19. Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Matsui Y, Watanabe J, Ito N, Kamoto T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Imoto I, Inazawa J, Nishiyama H, Ogawa O: Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 97:260-6, 2007
  20. Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y. The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 13: 1331-40, 2007
  21. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kohakubu 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
  22. Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol*. 27:1730-44, 2007
2. 学会発表  
[国内発表一般演題]
- ①口頭発表
1. 井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治: Cancer genomic and epigenomic analyses on BAC-array platform. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日
  2. 小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、稲澤譲治: Identification of tumor suppressor microRNA silenced by DNA methylation in oral squamous cell carcinoma. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日
  3. 杉野由里子、三沢あき子、井上純、北川正信、細井創、井本逸勢、杉本徹、稲澤譲治: Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 is associated with progression of neuroblastomas. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日
  4. 菊池良子、井本逸勢、津田均、金井弥栄、笠松高弘、千石一雄、広橋説雄、稲澤譲治: CTGF is a tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日
  5. 横井左奈、井上純、井本逸勢、稲澤譲治:

Long-range chromosomal interactions regulate the expression of novel E2F1 target gene. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日.

6. 河崎勉、横井左奈、和泉宏幸、井本逸勢、吉澤靖之、稲澤譲治: BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日.
7. 石原孝也、于衛、井上純、音田正光、江見充、井本逸勢、稲澤譲治: In-house BAC array-based copy-number analysis revealed novel cancer-related genes in Anaplastic thyroid cancer. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日.
8. Begum Asma、鈴木江美奈、中村恵理奈、井本逸勢、小崎健一、津田均、天笠光雄、稲澤譲治: Identification of novel amplification-target genes in oral squamous cell carcinoma using array-CGH-assisted strategy. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日.
9. 篠田康夫、小崎健一、井本逸勢、執印太郎、藤岡知昭、三木恒治、稲澤譲治: Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月3日.
10. 中村恵理奈、鈴木江美奈、中川貴之、津田均、山本剛、入江太朗、小崎健一、井本逸勢、立川哲彦、天笠光雄、稲澤譲治: Epigenetic silencing of TSOC25 by hypermethylation of the CpG island in oral cancer. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月3日.

## ②ポスター発表

### 【国際学会】

1. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I: TSOVC2 is a putative conditional tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer. 98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007. (Los Angeles, USA) 15/April/2007 (14-18/April/2007)
2. Nakamura E, Suzuki E, Nakagawa T, Tsuda

H, Yamamoto G, Kozaki K, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Imoto I, Inazawa J:

Epigenetic silencing of TSOC25 by hypermethylation of the CpG island in oral cancer. 98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 (Los Angeles, USA) 16/April/2007 (14-18/April/2007)

3. Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: MicroRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma cell lines. 98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 (Los Angeles, USA) 17/April/2007 (14-18/April/2007)
4. Ishihara T, Yu W, Inoue J, Onda M, Emi M, Imoto I, Inazawa J: A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. 98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 (Los Angeles, USA) 18/April/2007 (14-18/April/2007)

### 【国内学会】

1. 井上純、井本逸勢、稲澤譲治: Inactivation of LC3A gene in human cancers. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日.
2. 趙晨、井本逸勢、井上純、田中信治、有井滋樹、田中博、稲澤譲治: Detection of aberrantly methylated genes in hepatocellular carcinoma by BAC-array based MCA(BAMCA) strategy. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日.
3. 田中浩司、井本逸勢、井上純、小崎健一、津田均、嶋田裕、河野辰幸、岩井武尚、稲澤譲治: Frequent methylation-associated silencing of candidate tumor-suppressor, CRABP1 in esophageal squamous-cell carcinoma. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月5日.
4. 細田文恵、新井康仁、安田純、中西幸浩、稲澤譲治、広橋説雄、大木操、柴田龍弘: Identification of candidate target genes at genomic loci with high copy number increase in gastric cancer. 第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日.
5. 坂本宙子、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治: Exploration of cancer-related genes on X chromosome using X-tilling array-based copy-

number analysis in human cancer.第66回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2007年10月4日

#### H.知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

##### 1.特許取得

##### 【海外特許】

##### 【米国】

- 1.「多発性骨髄腫の検出方法および抑制方法」、趙晨・井上純・井本逸勢・稲澤譲治、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2007.9.21、特願2006-255155
- 2.「癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・三枝邦康、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.7.25、特願2006-204601
- 3.「癌の検出方法および抑制方法」、于衛・稲澤譲治・井本逸勢、富士写真フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2007.3.21、11/723.712 特願 2006-078787
- 4.「癌抑制剤」、井本逸勢・稲澤譲治・和泉宏幸・横井左奈、富士写真フィルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、2007.3.21、11/723.694 特願 2006-078786

##### 【EP】

- 1.「多発性骨髄腫の検出方法および抑制方法」、趙晨・井上純・井本逸勢・稲澤譲治、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2007.9.21、701852.2.8 特願2006-255155
- 2.「癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・三枝邦康、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.7.26、7014658.4 特願2006-204601
- 3.「VLDLR遺伝子の検出による胃癌の検出方法」、高田久・井本逸勢・稲澤譲治、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2007.4.19、11/785.683 特願2006-118030

##### 【CN】

- 1.「多発性骨髄腫の検出方法および抑制方法」、趙晨・井上純・井本逸勢・稲澤譲治、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.9.21、200710140650.6 特願2006-255155

- 2.「癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・三枝邦康、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.7.27、200710139900.4 特願2006-204601
- 3.「VLDLR遺伝子の検出による胃癌の検出方法」、高田久・井本逸勢・稲澤譲治、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2007.4.23、20071097943.0 特願2006-118030
- 4.「癌関連欠失遺伝子マーカーを用いた癌の診断方法」、稲澤譲治・井本逸勢・和泉宏幸・横井左奈、富士写真フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、2007.4.12、0710095875.4 特願 2006-109312

##### 【国内特許】

- 1.「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2008.1.23、特願2008-012256
- 2.「神経芽腫の悪性度を含めた検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・杉野由里子、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.6.28、特願2007-169875
- 3.「口腔扁平上皮癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・鈴木江美奈、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.5.30、特願2007-143110
- 4.「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・菊池良子、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、2007.5.30、特願2007-143111
- 5.「膀胱癌の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・篠田康夫・小崎健一、国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル、2007.5.10、特願2007-125838
- 6.「食道癌の判別方法」、稲澤譲治・井本逸勢・田中浩司、国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル、2007.4.19、特願2007-111033

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

## 研究報告書レイアウト

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・分担）研究報告書  
新規腫瘍抑制経路の解明

分担研究者 村上 善則 東京大学教授

研究要旨 細胞接着分子 TSLC1/CADM1 の個体レベルでの機能を遺伝子欠損マウスを用いて解析し、ホモ欠損マウスが精子形成障害に加え、15月齢以降、肺腺種、肺腺がんを高率に生じることを見出した。これらの腫瘍では KRAS, TP53, EGFR 遺伝子の変異は認められず、CADM1 遺伝子欠損による肺腫瘍の発生が新規経路による可能性が示唆された。

## A. 研究目的

がん抑制遺伝子として同定された細胞接着分子 TSLC1/CADM1 の生理的、病理的意義を個体レベルで解明することを目的とし、CADM1 遺伝子欠損マウスを解析した。その結果生じたマウスの肺腺腫、肺腺がん、ヒト肺がんを対象として、がん化と進展の分子機構を解明し、種々の網羅的な解析手法により、新たな治療標的分子を同定することを研究目的とする。

## B. 研究方法

1. マウスの解析：CADM1 遺伝子ホモ、ヘテロ欠失マウス、並びに野生型(+/+) マウスを長期間飼育、観察し、月齢 15 ヶ月、及び 22 ヶ月間にて病理解剖に供した。病理解剖では、体重、並びに主要臓器の重量や、腫瘍発生の有無、その他の異常の有無を検索した。また、腫瘍臓器のホルマリン固定、あるいは凍結保存を行った。

2. 免疫組織染色：パラフィンブロックより組織切片を切り出し、HE 染色により主要臓器の形態を観察し、腫瘍や炎症性病変、変性病変などの有無を検討した。抗 CADM1、抗 TSLC2/CADM4、抗 DAL-1、抗 4.1N ポリクローナル抗体は独自に作成した。一方、EGFR、erbB2 等に対する抗体は購入、或いは他から分与を受けた。免疫組織染色は定法に従った。

3. 遺伝子変異の解析：凍結臓器より DNA を抽出した。K-ras 遺伝子エクソン 1,2、EGFR 遺伝子エクソン 21、TP53 遺伝子エクソン 5-8 を、エクソン-イントロン接合部を含む周囲のイントロンとともに PCR により増幅し、SSCP 法を用いて変異の有無を検索した。

4. 免疫グロブリン・スーパーファミリー細

胞接着分子 (IgCAM) のがん組織における異常の解析：IgCAM に属する CADM1, CADM3, CADM4 等の分子の異常の有無を検索する目的で各々、特異抗体を作製した。また CADM1, CADM3 の発現が神経膠腫で欠如すること、CADM1 の発現欠如が鼻咽頭がんの転移巣で選択的に欠如すること、CADM4 は前立腺癌で発現欠如を示すことを見出した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、東京大学医学研究所の諸規約を遵守し、倫理的、社会的、法的見地から、患者の不利益にならないように十分に配慮した。動物実験も、東京大学医学研究所の諸規約に遵って行った。

## C. 研究結果

1. CADM1/TSLC1 遺伝子欠損マウスの解析：CADM1 ホモ欠損マウスでは精子形成障害に加え、15月齢以降、肺腺種、肺腺癌を高率に生じた。すなわち 15月齢で肺腫瘍を生じたマウスは、Cadm1+/+, Cadm1+/-、Cadm1-/- マウスで各々 1/29 (3%)、0/19 (0%)、10/30 (33%)、平均腫瘍容積は各々 2.7、0、0.005 mm<sup>3</sup> であった。Cadm1-/- マウスでは腺腫 10 個に加え、腺がん 1 個が生じていた。他にリンパ腫が生じたが同系マウスと同等の頻度であった。

2. Cadm1 遺伝子欠損マウスの肺腫瘍の解析：Cadm1+/+ マウス、Cadm1+/- マウス(22 ヶ月)の肺腫瘍はいずれも正常肺胞構造が全く失われ、異常増殖した細胞で置換されていた。大部分は肺腺腫と診断されたが、一部は核の異型性が極めて強く肺腺がんとして診断された。しかしヒトと異なり、浸潤、転移、全身症状は認められなかった。14 個の腫瘍より抽出した DNA を用いて K-ras2, EGFR, TP53 の遺伝子異常を PCR-SSCP 解析によ



り検索したが、構造異常は認めなかった。一方、免疫組織染色では、まず *Cadm1*<sup>+/-</sup> マウスに生じた肺腺腫では、CADM1 タンパク質の発現が欠如することを見出した。また *Cadm1*<sup>+/-</sup>、*Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスに生じたすべての腫瘍で、CADM1 の類似分子 CADM4 や、CADM1 と結合する 4.1N タンパク質の発現が著明に減少することを見出した。

3. CADM1 の生理的機能の解析: *Cadm1*<sup>-/-</sup> マウスが精子形成障害に関わるが、CADM1 の発現欠如がヒト男性不妊にも関わる可能性を共同研究により見出した。また、精子細胞で発現する CADM1 は、セルトリ細胞で発現する Nect3 タンパク質と結合する可能性、さらに腹膜マスト細胞の接着と生存に CADM1 が関与する可能性を共同研究により報告した。

#### D. 考察

遺伝子欠損マウスで肺がんが生じる例は *TP53*, *PTEN*, *STK11* など限られており、肺がん抵抗性の *C57BL6* 系統に生じた点、ヘテロマウスの腫瘍でも不活化する点からも、強い肺がん抑制遺伝子と考えられる。CADM1 はヒト進行肺がんで不活化し、ヒト肺がんにも極めて類似した変異 *K-ras* マウスモデルでも肺がんの進行に伴い発現が欠如することが示されていることから、ヒト肺がんの発生、進展に重要な新たな分子経路であると考えられ、肺がんの分子機構の解明、並びに創薬モデルとして極めて興味深い。現在、肺がん感受性マウスへの戻し交配や *K-ras* 変異マウスとの交配を開始している。今後、この肺がんモデルを用いて、肺がんの発生、進展に関わる分子経路、シグナル伝達経路を、プロテオームなどの網羅的解析法を用いて明らかにし、治療モデルとしても応用していく予定である。

#### E. 結論

CADM1 が肺がんの強力ながん抑制遺伝子であることが遺伝的に実証された。また、CADM1 はヒト肺がん、マウス肺がんの進展に関わる重要な経路を担う分子であることが明らかにされた。今後、肺がんの分子機構の解明、標的分子の同定、治療モデルの構築などの点で、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスは極めて重要なモデルとなると考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Wakayama T, Sai Y, Ito A, Kato Y, Kurobo M, Murakami Y, Nakashima E, Tsuji A, Kitamura Y, Iseki S. Heterophilic binding of the adhesion molecules poliovirus receptor and immunoglobulin superfamily 4A in the interaction between mouse spermatogenic and Sertoli cells. *Biology Reprod*, 76, 1081-1090, 2007.

2) Ito, A, Hagiwara, M, Oonuma, J, Murakami Y, Yokozaki, H, Takaki, M. Involvement of the SgIGSF/Nect-2 adhesion molecule in degradation of mesenteric mast cells. *J Neuro Immunol*, 184, 209-213, 2007.

#### 2. 学会発表

1) 桜井 (八下田) 美佳、坪井裕見、増田万里、山田大介、永田政義、尾鼻孝滋、村上善則。がん抑制蛋白質 TSLC1/CADM1 による上皮様形態形成と腫瘍抑制の分子機構の解析。第 30 回日本分子生物学会年会、シンポジウム。横浜、2007 年 12 月 11-15 日。

2) 増田万里、増田智子、伊藤彰彦、大田力、村上善則。成人 T 細胞白血病 (ATL) において細胞接着分子 TSLC1/CADM1 が惹起する低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化とその下流分子の解析。第 30 回日本分子生物学会年会、示説。横浜、2007 年 12 月 11-15 日。

3) Nagata M, Obana T, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Yamada D, Masuda M, Ichihara H, Masuda T, Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/CADM1, in lung tumorigenesis. International Symposium on Cell Polarity and Future Medicine, 示説。葉山、2007 年 12 月 9-10 日。

4) Nagata M, Obana T, Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M, Masuda T, Ichihara H, Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/CADM1, in lung tumorigenesis. The 14th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, シンポジウム。東京、2007 年 11 月 13-14 日。

5) Nagata M, Yamada D, Obana T, Masuda M, Ichihara H, Maruyama T, Yoshida M, Tsutsumi M, Murakami Y. Male infertility and spontaneous development of lung tumor in mice lacking the tumor suppressor gene, *Tslc1/Cadm1*. 日本癌学会、口演。横浜、2007 年 10 月 3-5 日。

6) Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Ito A, Murakami Y. TSLC1/CADM1 induces lamellipodia formation through activation of Rac in the HTLV-1 infected T cells and the ATL cells. 日本癌学会、口演。横浜、2007年10月3-5日。

7) Ando K, Ohira M, Ozaki T, Koide K, Kageyama H, Nakagawa A, Akazawa K, Murakami Y, Nakagawara A. TSLC1 mapped to 11q23 is candidate tumor suppressor in neuroblastoma. 日本癌学会、口演。横浜、2007年10月3-5日。

8) 村上善則。肺癌の発生、進展に関わる癌抑制遺伝子 TSLC1/CADM1。第52回日本人類遺伝学会大会、シンポジウム。東京、2007年9月12-15日。

9) Murakami Y, Kikuchi S, Yamada D, Nagata M, Obana T, Masuda M, Tsuboi Y, Usui S, Ichihara H, Maruyama T. Involvement of a Tumor Suppressor TSLC1/CADM1 in Lung Tumorigenesis in Human and the Gene-deficient Mice. The 12th World Conference on Lung Cancer、口演。韓国京城市、2007年9月2-5日。

10) Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Ito A, Murakami Y. TSLC1 induces lamellipodia formation through activation of Rac in the HTLV-1 infected T cells and the ATL cells. The 13th International Conference in Human retrovirology. HTLV-1 and related viruses、口演。箱根、2007年5月22-25日。

11) 山田大介、永田政義、尾鼻孝滋、増田万里、市原博美、増田智子、吉田緑、堤雅弘、北村唯一、村上善則。ヒト家族性腫瘍のモデルとしての *Tslc1/Cadm1* 遺伝子欠損マウスの解析。第12回家族性腫瘍学会。高知、2007年6月16日。

12) 村上善則。第11染色体 q23 上の新規がん抑制遺伝子 TSLC1/IGSF4。第9回神経芽腫(基礎)研究会。東京、2007年3月24日。

13) Murakami Y, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Kikuchi S, Tsuboi Y, Usui S, Nagata M, Obana T, Maruyama T, Ichihara H. Involvement of TSLC1/IGSF4 and its cascade in lung carcinogenesis. The 1st

JCA-AACR Special Joint Conference. 名古屋、2007年3月12-14日。

14) Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Murakami Y. Analysis of TSLC1/IGSF4-interacting proteins in epithelial cell. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 名古屋、2007年3月12-14日。

15) Usui S, Maruyama T, Sugano K, Murakami Y. Quantitative analysis of allele specific mRNA expression by an RNA difference plot. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 示説。名古屋、2007年3月12-14日。

16) Goto A, Niki T, Ishikawa Y, Murakami Y, Fukayama M. Loss of TSLC1/IGSF4 expression in lung adenocarcinoma: relationships with gender and prognostic significance. The 1st JCA-AACR Special Joint Conference. 示説。名古屋、2007年3月12-14日。

17) Yamada D, Nagata M, Obana T, Masuda M, Ichihara H, Maruyama M, Tsuboi Y, Usui S, Yoshida M, Murakami Y. Spontaneous development of lung adenoma and adenocarcinoma in mice lacking the tumor suppressor gene, *Tslc1/igsf4*. The 7th JCA-AACR Joint Conference. 米国ハワイ州、2007年1月21-25日。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特許査定〔権利化完了〕遺伝子検査方法及び遺伝子検査装置(平成11年特許願第294257号)

平成19年11月21日

2. 実用新案登録:なし

3. その他

- 1) 成果有体物(東京大学) *Tslc1/Cadm1* 遺伝子欠損マウス
- 2) 成果有体物(東京大学) *Tsll1/Cadm3* 遺伝子欠損マウス
- 3) 成果有体物(東京大学) *Tsll2/Cadm4* 遺伝子欠損マウス
- 4) 成果有体物(東京大学) *Tslc1/Cadm1-8A* CD4 トランスジェニックマウス
- 5) 成果有体物(東京大学) *Tslc1/Cadm1-8A* CAG トランスジェニックマウス

ATLを含む難治性白血病の多段階発がん機構の解析

分担研究者 森下 和広 宮崎大学・医学部・教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)に対する網羅的遺伝子発現解析により Tumor Suppressor Lung Cancer-1 (TSLC1)を新規発現マーカーとして単離した。TSLC1 は各種 ATL のほぼ全症例で高発現しており、in vivo 実験によりがん遺伝子様の機能を持ち、FACS 解析により CD4<sup>+</sup>/TSLC1<sup>+</sup>細胞分画として白血病細胞を同定できた。TSLC1 抗体はADCC 活性をもち抗体治療法の開発を行っている。さらに SKY 法を用いた 61 症例の急性型 ATL 症例の染色体分析により、ATL における 30%以上の症例において染色体切断点集中領域として 10p11,14q11,14q32 領域を同定した。SNP アレイ CGH 等により詳細なゲノム解析を行い、10p11 において染色体切断点は 1Mb の領域に集中しかつヘミ欠失を伴っていた。さらにこの3領域において原因遺伝子群の単離を行っている。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL) や急性骨髄性白血病(AML)における 7 番染色体欠失などの難治性白血病発症に関わる遺伝子異常は複合的であり未解決の遺伝子異常を解決する事である。そこで近年開発されたゲノム網羅的な解析手法を用い、難治性白血病の代表である ATL 及び 7 番染色体欠失を有する AML の網羅的ゲノム解析から、原因遺伝子の単離・機能解析を行う。さらにその情報を元に新規診断治療法の基礎開発を行う。

B. 研究方法

統合的ゲノム解析として、(1)DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 (2) 高密度 SNP アレイを用いたゲノム解析、(3)Spectral karyotyping(SKY)/FISH 法を用いた染色体分析を組み合わせて、ATL 及び 7 番染色体欠失型骨髄性白血病のゲノム解析を行う。網羅的遺伝子発現解析として Affymetrix 社 HG-U133 アレイを用い、コントロール健常人末梢血 CD4 陽性細胞群と各種 ATL 患者白血病細胞分画を各群数検体から 10 検体を比較検討する。高密度 SNP アレイ解析は Affymetrix 社 GeneChip Human Mapping 250K Sty Array を用い CNAG 等により解析する。SKY は多蛍光標識した染色体プローブを用い染色体分析を画像解析として行う。さらに FISH 法により領域を絞りゲノム解析を行う。これらの情報を統合して原因遺伝子を絞り込む。さらに RT-PCR 法、Realtime-PCR 法により遺伝子発現解析を行い、遺伝子単離につなげる。またエピジェネティックゲノム異常として DNA プロモーターメチル化を、5-Aza-dC 処理並びに Bisulfite 法、TrichostatinA 処理並びにアセチル化ヒストン抗体による CHIP 法により確認する。がん抑制遺伝子候補に関してはゲノム遺伝子配列により点突然変異の検討を行う。同定した白血病関連遺伝子について、遺伝子発現ベクターの導入による過剰発現系もしくは siRNA 導入による発現抑制による遺伝子機能解析を行う。細胞増殖分化アポトーシスの検索を行う。さらにその遺伝子異常と白血病発症機構抗体作製によるタンパク質発現解析、NOG マウスを用いた白血病細胞移植実験を行う。次年度に渡り TG マウス、KO マウスの作製を行う。TSLC1 に関しては、Phage display 法を用いて抗体を作製する。作製した抗体を用いて細胞染色、FACS 解析、病理免疫組織染色、血清

TSLC1 の同定、ELISA の開発に用いる。さらに抗体療法開発として、完全ヒト型抗体への変換、ADCC 活性、細胞障害性の検討、ATL モデルマウス・NOG マウス白血病移植系への投与実験にて効果判定を行う。

C. 研究成果

ATL に対して行った DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、ATL 特異的遺伝子発現マーカーとして Tumor Suppressor Lung Cancer-1 (TSLC1)を同定した。急性型 ATL のほぼ全ての症例で TSLC1 の高発現がみられ、慢性型やくすぶり型リンパ腫型など各種 ATL 細胞でも同様に発現が認められた。TSLC1 の高発現は in vitro 実験により自己細胞接着能の亢進、血管内皮細胞への接着能亢進をきたした。さらに、in vivo 白血病細胞マウス移植実験により臓器浸潤性の亢進や早期死亡、さらに NOG マウス皮下移植系で腫瘍の増大など、固形がんで示されているがん抑制遺伝子としてではなくがん遺伝子様の働きを示した。

ATL 細胞における接着因子 TSLC1 高発現を用いて新規診断及び抗体療法を開発するために、Phage display 法を用いてヒト型抗体を 30 種以上作製した。抗 TSLC1 抗体を用いた FACS 解析により、ATL 白血病細胞はその多くが CD4<sup>+</sup>/TSLC1<sup>+</sup> に分画され、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>とも重なる事から Treg の一部を認識していることが示唆された。各種 ATL 白血病細胞分画において陽性にできることから診断として、また HTLV-1 キャリアにおいて 20-30%が陽性となり、その一部に高発現が見られる事から TSLC1 発現解析は発症前診断としての可能性が示唆された。また血清中に可溶性 TSLC1 たんぱく質を同定できたので、さらに ELISA 法の開発を行っている。また TSLC1 抗体の一部に高 ADCC 活性を有する抗体を同定したので、完全ヒト型抗体を作製し抗体療法の基礎実験を行った。NOG マウスへの ATL 細胞移植実験系に抗体投与する事により、肝臓や卵巣への明らかな臓器浸潤が抑えられたことから、in vivo において接着阻害効果が示された。

SKY 法を用いて急性型 ATL61 症例に対する染色体転座点の解析を行った。症例あたり平均 10 転座が存在し、その中で 30%以上転座点が集中する領域として 10p11, 14q11, 14q32 領域を同定した。それぞれの領域に対して高密度 SNP アレイ CGH を行い、10p11 領域においては染色体転

座が約 1Mb 領域に集中しかつヘミ欠失を伴っている事が分かった。さらに詳細に検討し遺伝子単離を行っている。

#### D. 考察

日本の難治性白血病の代表として ATL が存在するが、HTLV-1 キャリアは今だ 100 万人以上存在し、年間 100 人を超える患者が死亡している。南米を中心に世界ではその 20 倍以上の HTLV-1 キャリアが存在しているが、すでに感染しているキャリアに対する対処法や治療法が今だ確立されていない。今回の統合的ゲノム解析により ATL 発症に関わる遺伝子群が複数個単離でき、多段階発癌機構が明らかになってくれば、新規診断治療法の開発に繋がる可能性が高い。今回がん抑制遺伝子 TSLC1 は ATL において高発現することを発見し、またその発現様式から ATL の有用な表面マーカーになり得る事がわかったことは、診断治療法開発の意味からかなり重要であると考えられる。さらに TSLC1 高発現は細胞接着能の亢進、in vivo 腫瘍形成能の亢進に繋がり、ATL の特徴の一つである臓器浸潤性に重要な働きを持つ事がわかり、この TSLC1 を標的とした治療法の開発も重要である。

#### E. 結論

難治性白血病は、そのゲノム異常の複雑さのためその原因となる遺伝子群がまだ単離されておらず、原因遺伝子の単離と有効な診断治療法の開発が急がれている。今回用いた統合的ゲノム解析は白血病の原因の多くが染色体転座に依存する事から、SKY 法を基本として染色体転座集中部位を同定し、その領域を中心に SNP アレイ CGH により詳細なゲノム異常を同定する方式をとっている。さらに DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行う事で、複雑なゲノム解析の中で重要なゲノム部位のみを集中的に解析できる。今回 ATL を中心としてゲノム解析を行っており、今回 3 箇所の染色体切断点集中領域の同定ならびに ATL 特異的発現マーカーとして TSLC1 遺伝子を同定できた。TSLC1 遺伝子は今後診断治療のターゲットとして、将来的に臨床応用出来る可能性を持っている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Morishita K. Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. *Int J Hematol.* 85: 279-86, 2007
- 2) Yamasaki M, Fujita S, Morishita K, et al., Soy-derived isoflavones inhibit the growth of adult T-cell leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 98:1740-6, 2007
- 3) Takajo I, Umeki K, Morishita K, et al., Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from human T-lymphotropic virus Type 1 carriers in NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Int J Cancer.* 121:2205-11, 2007.

##### 2. 学会発表

- 1) 藤田諭, 石山絵李菜, 森下和広他: ATL 細胞株 HUT102 に対する Genistein の細胞増殖抑制効果. 平成 19 年度日本生化学会九州支部例会. 宮崎市. 2007.5.19.
- 2) 中畑新吾, 日高智徳, 森下和広他: TCF8 遺伝子発現低下による ATLL 発症機構の解明. 平成 19 年度日本生化学会九州支部例会. 宮崎市. 2007.5.19.
- 3) Yamamoto I, Umeki K, Morishita K, et al.: HTLV-1

infection in the NOG mice. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜市. 2007.10.4.

4) Morishita K, Tsubouchi H, Hamasaki M et al. : Diagnostics development of adult T-cell Leukemia by a novel surface marker, IGSF4/TSLC1. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜市. 2007.10.4.

5) Shimizu D, Taki T, Morishita K, et al. : Molecular analysis of T cell receptor  $\alpha/\delta$  locus at 14q11 and BCL11B at 14q32 in adult T cell leukemia/lymphoma. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜市. 2007.10.4.

6) Shimahara A, Yamakawa N, Morishita K : PCAF-mediated acetylation of EVI1 is important for up-regulation of GATA-2 transcription in EVI1 (+) myeloid leukemia. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜市. 2007.10.4.

7) Nakahata S, Hidaka T, Morishita K et al. : Downregulation of TCF8 is involved in ATLL development by the escape from TGF-beta 1 during T cell differentiation. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜市. 2007.10.5.

8) 中畑新吾, 日高智徳, 森下和広他: TCF8 遺伝子発現低下による ATLL 発症機構の解明. 第 69 回日本血液学会: 第 49 回日本臨床血液学会合同総会. 横浜市. 2007.10.11.

9) 清水大介, 滝智彦, 森下和広他: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫における 14q11 の T 細胞受容体  $\alpha/\delta$  遺伝子領域と 14q32 の BCL11B 遺伝子領域の解析. 第 69 回日本血液学会: 第 49 回日本臨床血液学会合同総会. 横浜市. 2007.10.12.

10) 島原明子, 山川哲生, 森下和広他: GATA-2 転写活性化には PCAF 依存性 EVI1 アセチル化が必須である. 第 69 回日本血液学会: 第 49 回日本臨床血液学会合同総会. 横浜市. 2007.10.13.

11) 島原明子, 山川哲生, 森下和広他: EVI1 依存性 GATA-2 発現を伴う急性骨髄性白血病の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会: 第 80 回日本生化学会大会合同大会. 横浜市. 2007.12.12.

12) 中畑新吾, 日高智徳, 森下和広他. TCF8 遺伝子発現低下による ATLL 発症機構の解明. 第 30 回日本分子生物学会年会: 第 80 回日本生化学会大会合同大会. 横浜市. 2007.12.14.

13) 黒澤仁, 住友万里子, 森下和広他: 抗体セットを用いた癌の分類法の確立と癌治療法開発に向けて. 第 30 回日本分子生物学会年会: 第 80 回日本生化学会大会合同大会. 横浜市. 2007.12.14.

14) 高松尚文, 浜崎誠, 森下和広他: 抗 IgSF4/TSLC1 抗体による成人 T 細胞白血病(ATL)細胞の検出と臨床応用. 第 30 回日本分子生物学会年会: 第 80 回日本生化学会大会合同大会. 横浜市. 2007.12.14.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- (1) 森下和広他, "成人 T 細胞白血病マーカー" 出願番号 2007-86749
- (2) 森下和広他, "物質を細胞内へ導入するために用いるエマルジョン及びそれを用いた物質導入方法" 出願番号 2007-93469

分担研究者 小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 21世紀 COE プログラム 特任准教授

#### 研究要旨

小児急性リンパ性白血病(ALL)に対する新規診断技術および治療技術の開発に資する分子標的の同定を目的として、BFM 共通プロトコールに基づいて治療された399例の小児 ALL 検体および寛解期検体由来のゲノムを高密度 SNP アレイにより解析し、独自に開発した CNAG/AsCNR ソフトウェアを用いてゲノムコピー数異常およびアレル不均衡のゲノム網羅的な解析を行った。解析の結果、小児 ALL はゲノムコピー数異常の観点から、共通のゲノム異常を共有するサブグループに分類されること、また、複数の症例で共通して認められる異常の集積する領域の解析により、小児 ALL の発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補として、KIF9, CCDC12, HypB (3p), NR3C2(4q), Ikaros(7p), PAX5(9p), PL3KAP1(10q)を含む複数の遺伝子を同定した。さらにゲノムコピー数データに基づいて繰り返し認められる不均衡転座の切断点を9番染色体に同定し、その転座切断点の解析から、小児 ALL の診断・治療の新規遺伝子標的として、PAX5 遺伝子を含む複数の新規融合遺伝子を同定した。これらの PAX5 融合遺伝子は、正常 PAX5 遺伝子の転写活性化能をドミナントネガティブに抑制して正常 B 細胞の正常の分化を阻害することにより、B 前駆細胞の腫瘍化に関与する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

小児 ALL の治療成績は、近年の化学療法の進歩により著しい進歩を遂げたが、なお、既存の治療に抵抗性の症例が存在し、また、化学療法剤の使用による長期副作用も重要な課題である。今後治療率のさらなる向上と患児の QOL の改善を図る上からは、腫瘍特異的な分子標的を同定し、これをターゲットとする新規薬剤の開発が望まれる。本研究の目的は、マイクロアレイ解析技術に代表される近年のゲノム解析技術の進歩を背景として、小児 ALL の網羅的なゲノム異常の解析により、新規診断技術および治療法の開発の標的となる分子を同定し、本症の治療法の改善に資することである。

#### B. 研究方法

##### (1)小児 ALL 腫瘍検体

解析に用いた試料は、2000年から2005年の間に、ドイツの小児 ALL 共同研究プロトコール(BFM protocol)の共通プロトコールにより治療された患児より採取保存された、初診時腫瘍検体および寛解時正常骨髄検体由来のゲノム DNA、399 ペアである。

##### (2)SNP アレイ解析

ゲノム DNA を XbaI で消化した制限酵素断片を単一アダプターによる PCR により増幅後、DNaseI 処理と蛍光色素標識を行い、Affymetrix 社製 SNP アレイ (GeneChip50K XbaI)上で42度16時間ハイ

ブリダイズし、洗浄操作ののち、専用スキャナでアレイシグナルを検出した。得られたアレイシグナルを独自に開発した CNAG/AsCNR ソフトウェアにより解析することにより、ゲノムコピー数異常およびアレル不均衡のゲノムワイドな同定を行った。ゲノムコピー数の異常は隠れマルコフモデルを用いて検出し、検出されたゲノム異常に基づいて、症例間のクラスタリングを行った。

##### (3) 新規 PAX5 融合遺伝子の同定

ALL のゲノムコピー数解析に基づいて、不均衡転座の転座切断点集積領域を同定したのち、転座切断点の集積する9番染色体短腕の PAX5 遺伝子について、予測される融合遺伝子の転座切断点をまたぐように設定したエクソプライマーセットを用いて、RT-PCR を行うことにより、当該融合遺伝子の存在を確認した。確認された融合遺伝子については、長距離 PCR 法により融合遺伝子全長のクローニングを行った。

##### (4)標的分子の機能解析

小児 ALL の網羅的なゲノムコピー解析により同定された PAX5 関連融合遺伝子を正常 PAX5 遺伝子に対して競合的に 293T 細胞に遺伝子導入し、PAX5 感受性の CD19 プロモーター配列の下流に luciferase cDNA を配置したレポーター遺伝子を用いた luciferase アッセイにより、PAX5 融合産物の正常 PAX5 に対する効果を解析した。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフ

CCDC12,HypB (3p),NR3C2(4q), Ikaros(7p),  
PAX5(9p), PI3KAP1(10q)を含む多数の標的  
遺伝子の候補が同定された。

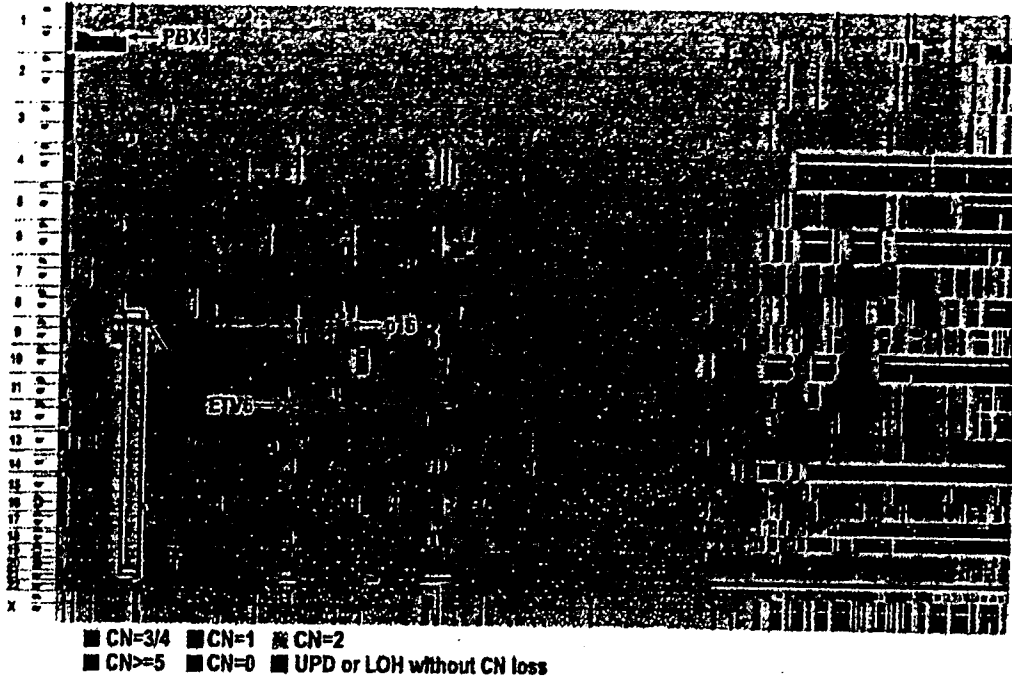


図1. 399例の小児ALLにおけるゲノムコピー数異常およびアレル不均衡

フォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。

C. 結果

(1)高密度 SNP アレイによる 399 検体の解析を通じて、小児 ALL におけるゲノム異常およびアレル不均衡のゲノムワイドかつ高解像度な解析が可能となった(図 1)。小児 ALL はゲノムコピー数異常の観点から、多倍体を示す症例、低倍数体を示す症例、CDKN2 ないし ETV6 の欠失を伴う症例、およびその他の近二倍体の症例に大きく分類できる。多倍体の症例で高頻度に増加する染色体は4,6,8,10,14, 17, 18, 21 番染色体に限られており、特に 21 番染色体の増加は小児 ALL で最も高頻度に認められる異常の一つであった。また、17 番および 18 番染色体の増加を伴わない多倍体症例の予後は有意に不良であった。

(2)ゲノム全体にほぼ均等に配置された数万個の probe を用いた高解像度な解析から、通常の染色体分析では同定不可能な微細な領域における異常が多数同定され、複数の症例で異常が集積する領域から、従来報告されてきた遺伝子異常に加えて、KIF9,

(3)特に興味深いのは、9p に認められた PAX5 遺伝子内にマップされる転座切断点の集積領域であった。PAX5 内に転座切断点予測された 14 症例について SNP アレイ解析から予測される他の転座切断点の解析により、PAX5 が ETV6(12p), AUTS2(7q), FOXP1(3p),C20orf112(20q)を含む様々な遺伝子と融合遺伝子を形成することが明らかとなった(図 2)。実際、これらの融合遺伝

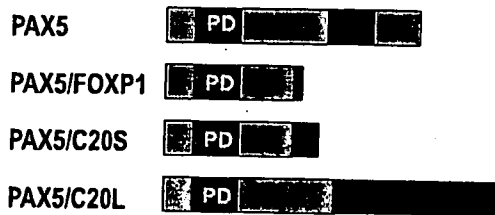
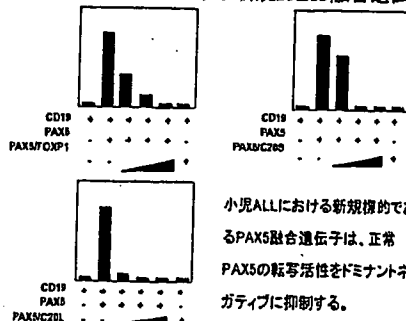


図2. 小児ALLにおける新規PAX5融合遺伝子の同定



小児ALLにおける新規標的であるPAX5融合遺伝子は、正常PAX5の転写活性をドミナントネガティブに抑制する。

図3. PAX5融合遺伝子によるPAX5転写活性の抑制

子と正常 PAX5 を競合的に発現させることにより、融合遺伝子産物が正常 PAX5 の転写活性化能に及ぼす効果を解析したところ、異常な PAX5 融合遺伝子はドミナントネガティブに正常 PAX5 の転写活性化能を抑制することが明らかとなった(図3)。

#### D. 考察

高密度 SNP アレイによるゲノムコピー数の網羅的な解析は、小児 ALL の発症に関わる遺伝子変異を同定する上で極めて有効なツールであることが示された。多数例の解析により、標的遺伝子の同定を可能とする微細な異常の集積領域が明確に同定され、当該領域より小児 ALL の発症への関与が示唆される遺伝子が複数同定された。とくに、9 番染色体短腕に存在する PAX5 遺伝子が種々の遺伝子と遺伝子再構成を生ずることにより、従来知られていなかった PAX5 を共通のパートナーとする種々の融合遺伝子が形成されていることが明らかとなった。背 PAX5 遺伝子は、B 細胞の分化に必須の機能を有することが示されているが、我々の解析により、これらの融合遺伝子産物が正常 PAX5 の転写活性化能をドミナントネガティブに抑制することによって B 細胞の正常の分化を阻害することが、ALL の発症に重要である可能性が示唆された。

#### E. 結論

高密度 SNP アレイによる 399 例の小児 ALL 検体の解析により、小児 ALL で生じているゲノムコピー数異常およびアレル不均衡の網羅的な解析を行った。本解析により、小児 ALL を特徴づけるゲノム異常のゲノムワイドな同定が可能となり、同定されたゲノム異常についてその標的遺伝子の候補が多数同定された。特に、9 番染色体短腕を含む染色体転座によって、B 細胞の分化に必須の機能を有する PAX5 遺伝子が種々の遺伝子と融合遺伝子を形成していること、また、融合遺伝子は正常 PAX5 に対してドミナントネガティブに作用することを明らかにした。今後、本解析を通じて明らかにされた分子標的およびその候補遺伝子をターゲットとした新規分子診断技術の開発、治療薬の開発が期待される。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表 論文発表

1. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud S, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Akagi T,

Kawamata N, Koeffler H. Molecular allelokaryotyping of early stage untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer in press*.

2. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller C, Harbott J, Ludwig W, Stanulla M, Schrappe M, Bartram C, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high resolution single nby high resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide by high resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood in press*.

3. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*. 81:114-126, 2007.

4. Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*. 16:3494-3505, 2007.

5. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol*. 179:5335-5345, 2007.

6. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res*. 67:2544-2551, 2007.

#### 学会発表

1. Motohiro Kato, Kumi Nakazaki, Kengo Takeuchi, Go Yamamoto, Yasuhito Nannya, Masashi Sanada, Satsuki Muto, Shigeru Chiba, Shigeo Mori, Yukio Kobayashi, Mineo Kurokawa, Ogawa S. Genomic Profiling of Different Subtypes of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Using High-Density Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Microarrays.. The 49th Annual meeting of American Society of Hematology, 2007.

2. Norihiko Kawamata, Seishi Ogawa, Martin Zimmermann, Masashi Sanada, Kari Hemminki, Go Yamamoto, Yasuhito Nannya, Rolf Koehler, Thomas Flohr, Carl W. Miller, Jochen Harbott, Wolf-Dieter Ludwig, Martin Stanulla, Martin Schrappe, Claus R. Bartram, Koeffler PH. Rearrangement and Deletion of the PAX5 Gene in Pediatric Acute B-Cell Lineage Lymphoblastic Leukemia. S. The 49th Annual meeting of American Society of Hematology, 2007.

3. Ryoko Okamoto, Seishi Ogawa, Tadayuki Akagi, Motohiro Kato, Masashi Sanada, Carl W. Miller, Norihiko Kawamata, Claudia Haferlach, Torsten Haferlach, Koeffler HP. Genetic Profiling of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Single Nucleotide Polymorphism Oligonucleotide Microarray. The 49th Annual meeting of American Society of Hematology. 2007.

4. Sanada M, Lee-Y., Shih L, Suzuki T, Yamamoto G, Nannya Y, Yanagimoto-Sakata M, Kato M, Kumano K, Kawamata N, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Omine M, Koeffler PH, S O. SNP Chip Analysis of Myelodysplastic Syndromes Disclosed High Frequency of Uniparental Disomy and a Novel Dominant Mutation as the Target of 11q UPD. The 49th Annual meeting of American Society of Hematology, 2007.

5. Satsuki Muto, Go Yamamoto, Yasuhito Nannya, Masashi Sanada, Nazanin Dabaghmanesh, Takaomi Ishida, Atee Utsunomiya, Yasuaki Yamada, Shimeru Kamihira, Kazunari Yamaguchi, Toshiki Watanabe, Ogawa S. Molecular Allelo-Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarrays. The 49th Annual meeting of American Society of Hematology, 2007.

6. Yasuhito Nannya, Makoto Onizuka, Koichi Kashiwase, Masashi Sanada, Yoshiki Akatsuka, Masahiro Satake, Shigeru Chiba, Mineo Kurokawa, Ken Yamamoto, Hiroo Saji, Etsuko Maruya, Hidetoshi Inoko, Yasuo Morishima, Yoshihisa Kodaera, Ogawa S. Exploring Genetic Basis of GVHD by Whole-Genome Association Studies in a Large Series from the Japan Marrow Donation Program (JMDP). The 49th Annual meeting of American Society of Hematology, 2007.

7. 加藤元博, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, KawamataNorihiko, Koeffler HP, ZimmermannMartin, 小川誠司. 小児急性リンパ性白血病におけるmolecular allelo-

karyotypingとPAX5遺伝子. 第69回日本臨床血液学会・第49回日本血液学会合同総会

8. 加藤元博, 滝田順子, 陳玉彦, 中村文彦, 山本豪, 真田昌, 南谷泰仁, 康勝好, 井田孔明, 古屋彩夏, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 神経芽腫におけるDNAメチル化領域の網羅的解析. 第23回日本小児がん学会

9. 武藤早紀, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, DabaghmaneshNazanin, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山ロー成, 小川誠司, 渡邊俊樹. 高密度SNPマイクロアレイを用いた成人T細胞白血病のアレル核型分析 (Molecular allele-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays). 第66回日本癌学会総会

10. 滝田順子, 陳玉彦, 加藤元博, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, 古屋彩夏, 康勝好, 井田孔明, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析. 第23回日本小児がん学会

11. 王莉莉, 半下石明, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, 中崎久美, 黒川峰夫, 千葉滋, 小川誠司. Blimp-1はRbとp53経路を介して細胞周期を負に制御する(Blimp-1 negatively regulates the cell cycle through Rb and p53 pathway). 第66回日本癌学会総会

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析  
ツール CNAG のライセンス提供(タカラ  
バイオ)



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

- 1) Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin Cancer Res*, 13:111-120, 2007.
- 2) Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57:103-108, 2007.
- 3) Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, Suzuki K, Nakamoto M, Shimizu E, Minna JD, Yokota J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, 26:5911-5918, 2007.
- 4) Ajima R, Kajiyama K, Inoue T, Tani M, Shiraishi-Yamaguchi Y, Maeda M, Segawa T, Furuichi T, Sutoh K, Yokota J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 356:851-856, 2007.
- 5) Yokota J, Matsumoto S, Kohno T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int J Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
- 6) Nagayama K, Kohno T, Sato M, Arai Y, Minna JD, Yokota J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chromosomes Cancer*, 46:1000-1010, 2007.
- 7) Seike M, Yanaihara N, Bowman ED, Zanetti KA, Budhu A, Kumamoto K, Mechanic LE, Matsumoto S, Yokota J, Shibata T, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Wang XW, Harris CC. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst*, 99:1257-1269, 2007.
- 8) Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T, Sakai R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol Cell Biol*, 27:7649-7660, 2007.
- 9) Medina PP, Romero OA, Kohno T, Montuenga L M, Pio R., Yokota J, Sanchez-Cespedes M. Frequent BRG1/ SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2008.
- 10) Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsui M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*, 68:1303-1309, 2008.
- 11) Inoue T, Kon T, Ohkura R, Yamakawa H, Ohara O, Yokota J, Sutoh K. BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes Cells*, in press, 2008.
- 12) Kumamoto K, Spillare E, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. Nutlin-3a activates the p53 tumor suppressor to both down-regulate ING2 and up-regulate mir-34a, b and c expression and induce senescence. *Cancer Res*, in press, 2008.
- 13) Ogiwara H, Kohno T, Nakanishi H, Nagayama K, Sato M, Yokota J. Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in

- human lung cancer. *Oncogene*, in press, 2008.
- 14) Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Noguchi M, Suzuki K, Matsuno Y, Mishima K, Nishikawa R, Tashiro F, Yokota J. Association of p16 homozygous deletions with clinicopathological characteristics and EGFR/KRAS/p53 mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, in press, 2008.
  - 15) 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, 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.
  - 16) Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, 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.
  - 17) Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J Virol*, 81:1379-1389, 2007.
  - 18) Shima Y, Okamoto T, Aoyama T, Yasura K, Ishibe T, Nishijo K, Shibata KR, Fukiage K, Otsuka S, Uejima D, Nakayama T, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem Biophys Res Commun*, 353:60-66, 2007.
  - 19) Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, 26: 2988-2996, 2007.
  - 20) Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 27:3732-3742, 2007.
  - 21) Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Biol Ther*. 11:1623-1637, 2007.
  - 22) Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, Stagliano KE, Anderson MA, Deb D, Crane BM, Kiyono T, Windle B, Deb SP, Deb S. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene*, in press.
  - 23) Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Kosuge T, Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol*, 133:1475-1486, 2007.
  - 24) Shibata T, Hanada S, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Ohta T, Sakamoto M, Hirohashi S. Gene expression profiling of EGFR/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 98:985-991, 2007.
  - 25) Yoshida Y, Kokubu A, Suzuki K, Kuribayashi H, Tsuta K, Matsuno Y, Kusumoto M, Kanai Y, Asamura H, Hirohashi S, Shibata T. Molecular markers and changes of computed tomography appearance in lung adenocarcinoma with ground-glass opacity. *Japan Journal of Clinical Oncology*, in press, 2008.
  - 26) Fukui T, Tsuta K, Furuta K, Watanabe S, Asamura H, Ohe Y, Maeshima AM, Shibata T, Masuda N, Matsuno Y. EGFR mutation status and clinicopathological features of combined small cell carcinoma with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Sci*, 98:1714-1719, 2007.
  - 27) 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. *Cancer Sci*, 98:392-400, 2007.
- 28) Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *British J Cancer*, in press, 2008.
  - 29) Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A(MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008(in press).
  - 30) Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, in press, 2008.
  - 31) Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iidab S, Ueda R, Inazawa J. POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth of multiple myeloma cells by directly regulating expression of a B-cell maturation factor, TNFRSF17. *Oncogene* 27:63-75,2008.
  - 32) Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res*, 67:7095-7105,2007.
  - 33) Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham P, Nakagawa T, Kamata N, Kozaki Ken-ichi, Amagasa T, Inazawa J. PRTFDC1, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene*, 26:7921-32, 2007.
  - 34) Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. *Oncogene*, 26:7401-13, 2007.
  - 35) Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma. *Oncogene* 26: 6456-6468, 2007.
  - 36) Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J. Association of KLK5-overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Sci*, 98:1078-1086,2007.
  - 37) Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki K, Aida S, Ozeki Y, Yoshizawa Y, Imoto I, Inazawa J. BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci*, 98:1070-1077,2007.
  - 38) 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 result in G2/M arrest. *Oncogene* 26: 1110-1121, 2007
  - 39) 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
  - 40) Mitsui F, Dobashi Y, Imoto I, Inazawa J, Kono K, Fujii H, Ooi A. Non-incidentally coamplification of Myc and ERBB2, and Myc and EGFR, in gastric adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 20:622-631,2007.
  - 41) Yamamoto S, Tsuda H, Kita T, Maekawa K, Fujii K, Kudoh K, Furuya K, Tamai S, Inazawa J, Matsubara O. Clinicopathological significance of WT1 expression in ovarian cancer: a possible accelerator of tumor progression in serous adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 451:27-35,2007.

- 42) Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Matsui Y, Watanabe J, Ito N, Kamoto T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Imoto I, Inazawa J, Nishiyama H, Ogawa O. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*, 97:260-266, 2007.
- 43) Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y. The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 3:1331-1340, 2007.
- 44) Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol*, 27:1730-1744, 2007.
- 45) Wakayama T, Sai Y, Ito A, Kato Y, Kurobo M, Murakami Y, Nakashima E, Tsuji A, Kitamura Y, Iseki S. Heterophilic binding of the adhesion molecules poliovirus receptor and immunoglobulin superfamily 4A in the interaction between mouse spermatogenic and Sertoli cells. *Biology Reprod*, 76:1081-1090, 2007.
- 46) Ito A, Hagiyaama M, Oonuma J, Murakami Y, Yokozaki H, Takaki M. Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degradation of mesenteric mast cells. *J Neuro Immunol*, 184:209-213, 2007.
- 47) Morishita K. Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. *Int J Hematol*. 85: 279-286, 2007.
- 48) Yamasaki M, Fujita S, Ishiyama E, Mukai A, Madhyastha H, Sakakibara Y, Suiko M, Hatakeyama K, Nemoto T, Morishita K, Kataoka H, Tsubouchi H, Nishiyama K. Soy-derived isoflavones inhibit the growth of adult T-cell leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 98:1740-1746, 2007.
- 49) Takajo I, Umeki K, Morishita K, Yamamoto I, Kubuki Y, Hatakeyama K, Kataoka H, Okayama A. Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from human T-lymphotropic virus Type 1 carriers in NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Int J Cancer*. 121:2205-11, 2007.
- 50) Suzuki M, Kato M, Chen J, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano K, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci*, in press, 2008.
- 51) Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 112:1296-305, 2008.
- 52) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*, 111:776-784, 2008.
- 53) Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*. 81:114-126, 2007.
- 54) Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*, 16:3494-3505, 2007.
- 55) Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Suzhai K, Karsten T, Nannya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single