

がんの網羅的なゲノム異常解析並びに臨床病態との相関解析

分担研究者 柴田 龍弘 国立がんセンター研究所

ゲノム構造解析プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨

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、新たながん関連遺伝子を多数同定し、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。胆道がん *in vivo* マウス移植モデルを作製し EGFR/VEGFR dual kinase inhibitor について、分子標的治療の有効性評価について検討した。乳がんの転移分子機構の解明に向けたゲノム解析を開始した。

A. 研究目的

本研究では、これまで独自に開発し、蓄積してきた高精度なゲノム解析技術を駆使して、諸臓器がんにおけるジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常を統合的に解析すると共に、発がんにおける重要な分子機構の解明を通して、諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌を明らかにし、画期的な分子治療法や予防法の開発に向けた研究の基盤構築を進める事を旨とする。

B. 研究方法

1) 難治がん・転移性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

難治がん・転移性がんを中心としたがん臨床検体を用いて、レーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞のみを選別し、高純度のがんゲノムバンクを構築し、ヒトゲノム全体をカバーする 4500 個の BAC クロームを搭載した高密度 BAC アレイあるいは 25 万個のオリゴプローブを搭載した高密度オリゴゲノムアレイによる網羅的な染色体コピー数異常の解析を進めた。

2) 新規がん抑制遺伝子の同定とその機能解析に関する研究

染色体コピー数異常解析から新たに同定した増幅領域並びにホモ欠失領域を更に詳細に検索し、新規がん遺伝子並びにがん抑制遺伝子を同定した。多数の臨床検体を用いて変異検索を行なった。当該分子のゲノム異常を持つがん細胞株を用いて、細胞増殖や抗がん剤抵抗性などについて検索を行なった。

3) 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

製薬会社との共同研究により EGFR/VEGFR dual kinase inhibitor を入手し、*in vitro* 並びに *in vivo* 分子イメージングを導入した胆道がんマウス移植モデルを作製し、EGFR/VEGFR 低分子阻害剤を用いた治療効果について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究内容については所属研究機関の倫理審査委員会の承認を得ており、平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に十分配慮して研究を進めた。また解析に用いる組織は、十分な病理学的検索がなされ、患者の治療方針決定には全く影響がない残余の固定標本だけを用い、患者への不利益を生じさせないよう留意する。動物を用いた実験は「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行った。

C. 研究結果

1) 肺がん・膵がんにおける新規がん遺伝子の同定  
肺がん並びに頭頸部がんの臨床検体を用いた変異解析により、新規のがん遺伝子 Nrf2 を同定した。Nrf2 は酸化ストレス応答において重要な役割を果たす転写因子の一つであり、ユビキチン修飾を介したタンパク質分解経路によってその活性が制御されている。今回我々が同定した変異は、Nrf2 の E3 ユビキチンリガーゼである Keap1 との結合に必要な部位に集中して起こっており、遺伝子異常によるタンパク分解の抑制によって、Nrf2 が恒常的に活性化していることが明らかになった。臨床的に Nrf2 の変異を認める症例は有意に予後不良であり、また Nrf2 が活性化しているがん細胞は、シスプラチンといった抗がん剤に抵抗性を示し、Nrf2 分子の発現を抑制することで薬剤反応性が充進することが明らかになり、Nrf2 が既存の化学療法の効果を増進するような新たな分子治療標的として有望と考えられた。

膵がん細胞株並びに臨床検体を用いた CGH 解析から、新規の染色体増幅領域を見だし、TGFB $\beta$  経路を抑制することが知られている E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1 を新規がん遺伝子として見出した。膵がん発がん過程においては、Smad4 の異常に加えて、Smurf1 の過剰発現も TGFB $\beta$  経路の抑制に関与していることが明らかになった。



## 2) 胆道がん、肺がんにおける新規がん抑制遺伝子の同定

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失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 Keap1 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。また肺がんにおいても同様に Keap1 遺伝子の変異を同定した。1) で明らかにしたように、Keap1 の異常は Nrf2 の活性化を起こすことから、抗がん剤に対する耐性ととの相関を検討した結果、Keap1 の機能喪失が胆道がんにおいて 5FU といった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。

がん抑制遺伝子 p53 の下流標的遺伝子の探索から、細胞の生存に必須な Akt キナーゼを負に制御する新規分子 PHLDA3 を同定した。PHLDA3 は p53 によって直接転写制御され、また肺内分泌性がん臨床検体において高頻度に遺伝子欠損と発現低下を示した。p53 の異常に加えて PHLDA3 遺伝子自身の異常によって、PHLDA3 の発現が減少し、AKT の活性化とがん細胞の細胞死抑制や増殖が引き起こされることが明らかになった。

## 3) 胆道がんにおける分子標的治療の評価

胆道がんにおいて、これまで EGFR や VEGF の発現が悪性度や予後と相関することを明らかにしてきたので、次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を進めた。製薬会社との共同研究により EGFR/VEGFR dual kinase inhibitor を入手し、*in vitro* 並びに *in vivo* マウス移植モデルを用いて増殖・転移抑制について検討した。その結果 *in vitro* では EGFR 遺伝子増幅を認める胆道がん細胞株では増殖低下、細胞死誘導等の著明な抗腫瘍効果を認め、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、*in vivo* では EGFR 増幅がん細胞に加えて EGFR 非増幅がん細胞でも VEGFR の阻害による腫瘍血管の減少を介した増殖抑制効果が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 治療は有望である可能性が示唆された。更に新たな標的分子として MET に注目し、低分子阻害剤による増殖抑制効果について検討を行った。

## 4) 転移性乳がんにおけるゲノム異常の同定

乳がんの転移分子機構の解明のため、リンパ節転移陽性 13 症例において、原発巣と転移巣におけるゲノム構造異常を比較解析し、転移に関係する新たなゲノム異常の同定を試みた。転移病変は原発巣とかなりゲノム像が異なり、単純な異常蓄積の結果ではなく複雑な分子機構が背景にあることが推測された。また、複数症例で共通して異常が見られる染色体領域を複数同定しており、今後転移に関係する新規がん関連遺伝子の同定を進める。

## D. 考察

## 1) 難治がんにおけるゲノム異常解析に関する新規がん関連遺伝子の同定研究

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、ゲノム構造異常を起点とした新規がん抑制遺伝子・がん抑制遺伝子の同定について研究を進めた。肺がん・頭頸部がん・胆道がんにおける Keap1-Nrf2 経路の高頻度なゲノム異常については、その異常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。P53 遺伝子の下流で、肺がんにおける新規がん抑制遺伝子として単離した分子については、より詳細な機能解析や他の腫瘍における異常についても検索を広げ、新たな治療標的あるいはバイオマーカーとしての可能性についても検討していく。

## 2) 胆道がんにおける分子標的治療の評価

本研究において独自に樹立した胆道がんの *in vivo* マウス移植モデルは、増殖・転移を指標とした様々な分子標的化合物の検証に有用であると考えられる。今年度は EGFR/VEGFR 阻害剤に加えて、新たに MET 阻害剤についても検討を進めているが、更に網羅的なゲノム異常解析から得られた新規標的についての検証にも用いて行く。

## 3) 転移性乳がんにおけるゲノム異常の同定

乳がんにおける転移病変の解析は、新たな転移に関連す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。

## E. 結論

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、新たながん関連遺伝子を多数同定し、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。乳がんの転移分子機構の解明に向けたゲノム解析を開始した。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) **Shibata T**, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, Hirohashi S. Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in Gallbladder Cancer. *Gastroenterology*. 2008, 135:1358-1368.
- 2) **Shibata T**, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, Asamura H, Yamamoto M, Hirohashi S. Cancer related mutations in Nrf2 impair its recognition by Keap1-Cu13 E3 ligase and promotes malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:13568-73.
- 3) Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, **Shibata T**, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on

array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5531-9.

- 4) Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H, Taya Y. Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular changes that are characteristic of the epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Cancer Res*, 2008, 68:5104-12.
- 5) Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Shibata T, Yamamoto Y, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* 2008, 68, 1303-1309.
- 6) Suehara Y, Kondo T, Seki K, Shibata T, Fujii K, Gotoh M, Hasegawa T, Shimada Y, Sasako M, Shimoda T, Kurosawa H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S. Pftin, as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res.* 2008, 14, 1707-17.
- 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. *Br J Cancer*, 2008, 98, 418-425.
- 8) Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 2008, 99, 986-94.

## 2. 学会発表

1) Keap1-Nrf2 system in cancer: environmental stress regulation as a heart of carcinogenesis

柴田 龍弘、Molecular Mechanism of environmental response to food and oxygen III

2) The Keap1-NRF2 system in human cancer

柴田 龍弘、BMB2008 (第31回分子生物学会年会)、Symposium Transcription factors regulating stress response (ストレス応答と転写因子)

## H. 知的財産権の出願・登録情報

### 1. 特許取得 (2件)

1) 発明等の名称 新規がん遺伝子 NRF2

出願日 2008年7月25日

出願番号 特願 2008-192876

2) 発明等の名称: PHLDA gene family は癌抑制能を持つ遺伝子である (出願中)



厚生労働科学研究費補助金（平成20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 譲治 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。今年度は、DNAメチル化によって発現抑制を受けその機能を消失する癌抑制性microRNA (miRNA)の同定を試みた。その結果、エピジェネティック制御によって機能を失う口腔扁平上皮がんの候補癌抑制miRNAとしてmiR-137ならびにmiR-193を同定し、さらにCDK6とE2F6がそれぞれの標的分子であることも明らかにした。

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や口腔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 (MC A) 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、これによっ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

本研究課題では口腔扁平上皮がん(OSCC)関連がん抑制miRNA遺伝子の単離・同定を目指して、18株のOSCC細胞株および正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株RT7における148種のmiRNAの定量的発現解析にDNAメチル化解析を組み合わせた絞り込みによって、OSCC細胞株で高頻度に発現低下を認め、且つメチル化異常のパターンと発現抑制が完全に一致する4種類のmiRNA (miR-34b, miR-137, miR-193a, miR-203)を選出した。選出した4種類の候補miRNA遺伝子についてOSCC患者11例のがん部・非がん部組織を用いたDNAメチル化解析と定

量的発現解析を進め、OSCC関連がん抑制miRNA遺伝子の候補としてmiR-137とmiR-193aを見出した。さらに、*in vitro*実験系を用いた詳細な機能解析の結果、miR-137ならびにmiR-193aはOSCCにおいてがん特異的DNA過剰メチル化によって発現が抑制されるがん抑制miRNA遺伝子であること、また、細胞増殖に重要ながん遺伝子として知られているCDK6とE2F6が、miR-137ならびにmiR-193a各々の標的分子であることも明らかにした。

#### D. 考察

がんの発症・進展過程におけるmiRNAの直接的あるいは間接的な関与は既に知られていたが、近年、一部のがん抑制遺伝子型miRNAによるRNAサイレンシングが腫瘍特異的なDNAメチル化異常による遺伝子サイレンシングを受けること、さらに、がん細胞でのDNAメチル化の制御機序やがん幹細胞の形質維持などへのmiRNAの関与も明らかにされた。今後もmiRNA研究が飛躍的に進展し、発がん・進展過程の新たな分子メカニズムの解明のみならず、miRNAの発現プロファイルやメチル化プロファイルによるがんの個別診断法や予後予測法の開発、あるいは新たな抗がん剤としてのアンチセンス核酸医薬などへの臨床応用も期待される。

#### 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

- Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, Motimoto Y, Kuroiwa T, Mizukami J, Umeda T, Noguchi T, Naguro I, Nishitoh H, Saegusa K, Tobiume K, Homma T, Shimada Y, Tsuda H, Aiko S, Imoto I, Inazawa J, Chiba K, Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y, Matsuzawa A, Ichijo H: ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J*. 2009 [Epub ahead of print]
- Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer. a candidate oncogene associated

with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol*. 2009 [Epub ahead of print]

- Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of akt. *Cell* 136:535-50, 2009
- Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis* 99:1940-9, 2009.
- Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 284:3334-44, 2008.
- Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Jaeduk Yoshimura Noh, Ito K, Imoto I, Inazawa J. *ITCH* is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*. 99:1940-49, 2008
- Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization. its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*. 14:5531-9, 2008
- Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T. Expression and gene amplification of actinin-4 in



- invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.*14:5348-56, 2008
9. Katsuki Y, Nakada S, Yokoyama T, Imoto I, Inazawa J, Nagasawa M, Mizutani S. Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes. *Cancer Sci.*99:1539-45, 2008
  10. 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-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.*38:886-95, 2008
  11. Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K. Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg.*37:1047-53, 2008
  12. Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res.*68:5067-75, 2008
  13. 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.*99:1390-400, 2008
  14. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.*68:2094-2105, 2008
  15. Suzuki A, Shibata T, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci.*99:986-94, 2008
  16. Tanaka S, Arii S, Yasen M, Moqushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg.*95:611-619, 2008
  17. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez BVJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood.*111:5118-29, 2008
  18. 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
2. 学会発表  
[国内発表一般演題]  
\_口頭発表
1. 小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、松井毅、嶋田裕、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治：食道扁平上皮癌における新規診断治療標的遺伝子 OES1 の同定。第 67 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2008 年 10 月 28 日
  2. 横井左奈、井本逸勢、柴田龍弘、北川昌伸、廣橋説雄、稲澤譲治：肺小細胞癌における 1p13 増幅領域の標的候補遺伝子 tripartite motif33(TRIM33)の解析。第 67 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2008 年 10 月 28 日
  3. 田中真二、茂樹薫、藍原有弘、ヤセンマハムレット、水島洋、三木義男、稲澤譲治、田中博、有井滋樹：肝癌血管侵襲の遺伝子プロファイルに基づく新規分子標的治療への展開。第 67 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2008 年 10 月 28 日
  4. 鶴田智彦、井本逸勢、平沢晃、小崎健一、

阪笠浩司、進伸幸、青木大輔、稲澤謙治：  
エピジェネティック異常により発現抑制  
される子宮体がん関連癌抑制遺伝子の  
MPA 療法における役割。第 67 回日本癌  
学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。  
2008 年 10 月 28 日

5. 本田一文、菊池哲、津田均、平岡伸介、  
稲澤謙治、井本逸勢、廣橋説雄、山田哲  
司：浸潤生膀胱がんにおけるアクチニン-4  
の遺伝子増幅とたんぱく質発現増加。第 67  
回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議  
場。愛知。2008 年 10 月 29 日
6. 春木茂男、小松周平、井本逸勢、小崎健  
一、嶋田裕、河野辰幸、稲澤謙治：高密  
度オリゴアレイ CGH を用いた新規食道扁  
平上皮癌関連癌抑制遺伝子の探索。第 67  
回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議  
場。愛知。2008 年 10 月 29 日
7. 小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村健、  
稲澤謙治：口腔癌において腫瘍特異的  
DNA 過剰メチル化により発現抑制される  
癌抑制 microRNA:miR-137 と miR-193a。  
第 67 回日本癌学会学術総会。名古屋国際  
会議場。愛知。2008 年 10 月 29 日
8. 藍原有弘、田中真二、Mahmut Yasin、  
茂嶺薫、野口典夫、工藤篤、中村典明、  
伊東浩次、井本逸勢、稲澤謙治、三木義  
男、田中博、有井滋樹：肝癌に対する選  
択的 Aurora kinase B 阻害剤の前臨床研  
究。第 67 回日本癌学会学術総会。名古屋  
国際会議場。愛知。2008 年 10 月 29 日
9. 石原孝也、津田均、堀田晶子、小崎健一、  
吉田明、吉村弘、伊藤公一、井本逸勢、  
稲澤謙治：自作 BAC アレイを用いた未分  
化甲状腺癌細胞株のコピー数異常解析に  
より検出された新規増幅領域 20q11.22 の  
標的遺伝子候補 ITCH。第 31 回日本分子  
生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・  
合同大会。神戸ポートアイランド。兵庫。  
2008 年 12 月 11 日

ポスター発表

【国内学会】

10. 井本逸勢、稲澤謙治：PRTFDC1, a possible  
tumor-suppressor gene, is frequently  
silenced in oral squamous-cell  
carcinomas by aberrant promoter

hypermethylation. テーラーメイド医療を  
目指したゲノム情報活用基盤技術 第 4 回  
公開シンポジウム。日本科学未来館みら  
いCANホール。東京。2008 年 8 月 1 日

11. 小崎健一、稲澤謙治：Silencing of tumor  
suppressive microRNAs by DNA  
hypermethylation in oral squamous cell  
carcinoma. テーラーメイド医療を  
目指したゲノム情報活用基盤技術 第 4 回公開シ  
ンポジウム。日本科学未来館みらいCAN  
ホール。東京。2008 年 8 月 1 日
12. 石原孝也、稲澤謙治：ITCH is a putative  
target for a novel 20q11.22 amplification  
detected in anaplastic thyroid carcinoma  
cells by array-based comparative  
genomic hybridization. テーラーメイド  
医療を  
目指したゲノム情報活用基盤技術  
第 4 回公開シンポジウム。日本科学未来  
館みらいCANホール。東京。2008 年 8  
月 1 日
13. Begum Asma、稲澤謙治：Identification of  
a novel amplification target gene in oral  
squamous cell carcinoma(OSCC)using  
array CGH-assisted strategy. テーラー  
メイド医療を  
目指したゲノム情報活用基  
盤技術 第 4 回公開シンポジウム。日本科  
学未来館みらいCANホール。東京。2008  
年 8 月 1 日
14. 古田蘭子、小崎健一、田中真二、有井滋  
樹、井本逸勢、稲澤謙治：Screening of  
tumor suppressive microRNAs silenced  
by tumor-specific DNA  
hypermethylation in hepatocellular  
carcinoma. 第 9 回文部科学省特定領域研  
究「がん」5 領域・若手研究者ワークショ  
ップ。アートランドホテル藝科。長野。2008  
年 9 月 4 日
15. 蔦田芳男、長屋建、高橋悟、藤枝憲二、  
林深、井本逸勢、稲澤謙治：商用 FISH  
プローブにてモザイクが検出された  
Miller-Dieker 症例群の 1 例。日本人類遺伝  
学会第 53 回大会。パシフィコ横浜。2008  
年 9 月 28 日
16. 小野正恵、林深、北爪勉、入江学、鈴木  
淳子、稲澤謙治：46,  
XY,der(9)t(6;9)(p24.1;p23)の兄弟例。日本  
人類遺伝学会第 53 回大会。パシフィコ横



- 浜. 2008年9月28日
17. 会津善紀、井本逸勢、林深、山口敏和、永田欽也、宮本力、稲澤譲治: 先天異常症診断用アレイ、Genome Disorder Array を用いた MCA/MR のアレイ CGH 解析. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. パシフィコ横浜. 2008年9月28日
  18. 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治: Inactivation of LC3A gene in human cancers. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  19. 村松智輝、井本逸勢、津田均、嶋田裕、小崎健一、稲澤譲治: 食道癌発生における Yes-associated protein 1(YAP1)増幅の意義. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  20. 坂本宙子、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治: X-tiling アレイを用いた X 染色体上の癌関連遺伝子群の探索. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  21. Asma Begum、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 a novel amplification-target gene in oral squamous cell carcinoma (OSCC) using array-CGH strategy. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  22. 石原孝也、津田均、小崎健一、吉田明、伊藤公一、井本逸勢、稲澤譲治: アレイ CGH を用いた甲状腺未分化癌のゲノム構造解析による新規増幅領域 20q11.22 の標的候補遺伝子 ITCH の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  23. 細田文恵、新井康仁、安田純、中西幸浩、井本逸勢、稲澤譲治、柳原五吉、廣橋説雄、大木操、柴田龍弘: 胃がんの 6p21 ゲノム増幅領域からの新規標的遺伝子の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  24. 山本宗平、津田均、本田一文、高野政志、山田哲司、井本逸勢、稲澤譲治、松原修: ヒト卵巣癌における Actinin-4 遺伝子の oncogenic な性質. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月28日
  25. 井上純、井本逸勢、稲澤譲治: 神経芽腫細胞での LAPTM5 遺伝子強制発現により誘導される細胞死の特性. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月29日
  26. 古田蘭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治: 肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2008年10月29日
  27. 古田蘭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治: 肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫. 2008年12月10日
  28. 石原孝也、津田均、堀田晶子、小崎健一、吉田明、吉村弘、伊藤公一、井本逸勢、稲澤譲治: 自作 BAC アレイを用いた未分化甲状腺癌細胞株のコピー数異常解析により検出された新規増幅領域 20q11.22 の標的遺伝子候補 ITCH. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会. 神戸ポートアイランド. 兵庫. 2008年12月11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】  
【US】4件
  1. 「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・富士写真フイルム株式会社、2008.5.28、12/128,468、特願2007-149110
  2. 「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・富士写真フイルム株式会社、2008.5.28、12/153,967、特願2007-143111
  3. 「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・



富士写真フィルム株式会社、2008.5.23、  
12/126,637、特願2007-169875

4. 「癌抑制剤」、三沢あき子・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・富士写真フィルム株式会社、2008.5.16(1)+2008.7.23(2)、12/153,342 + 12/219,508、特願2005-309921

[EP] 2件

1. 「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・富士写真フィルム株式会社、2008/5/30、08009943.5、特願2007-143110
2. 「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・富士写真フィルム株式会社、2008/5/30、08009927.8、特願2007-143111

[CN] 2件

1. 「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・富士写真フィルム株式会社、2008.5.30、200810108666.3、特願2007-143110
2. 「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・富士写真フィルム株式会社、2008/5/30、200810108639.6、特願2007-143111

【国内特許】

[国内] 6件

1. 2008.12.25、「BACクローンを用いる肝細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」金井弥栄・新井恵恵・稲澤譲治、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・国立大学法人東京医科歯科大学、特願2008-329872
2. 2008.10.27、「神経芽腫の検出方法」稲澤譲治・井本逸勢・井上純、富士フィルム株式会社・東京医科歯科大学、特願2008-275176
3. 2008.9.11、「BACクローンを用いる腎細胞癌の予後予測方法」金井弥栄・新井恵恵・廣橋説雄・稲澤譲治、財団法人ヒューマン

サイエンス振興財団・国立大学法人東京医科歯科大学、特願2008-233491

4. 2008.8.8、「口腔扁平上皮癌の検出方法」稲澤譲治・井本逸勢・中村恵理奈・津田均、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、特願2008-205138
5. 2008.8.1、「先天性異常症の染色体欠失の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・林深・会津善紀、国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル・富士写真フィルム株式会社、特願2008-199541
6. 2008.7.16、「甲状腺癌の検出方法」稲澤譲治・井本逸勢・石原孝也・津田均、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、特願2008-184982

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## 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/CADMIの遺伝子ホモ欠損マウスの37%、ヘテロ欠損マウスの28%に18月齢で肺腺腫、肺腺癌が生じ、野生型マウスより有意に高頻度であったことから、CADMIが肺がん抑制遺伝子であることが示された。また腫瘍ではCADMI類似タンパク質CADM4、CADMI結合分子4.1Nの膜での発現消失が認められ、肺腫瘍発生にCADMI、CADM4、4.1を含む分子経路の破綻が重要であることが示された。

## A. 研究目的

ヒト多段階発がんの分子機構の研究過程で同定したがん抑制遺伝子CADMI/TSLC1、並びに類似分子群の、がんにおける意義を明らかにする。本年度は特にこの分子の生理的、病理学的意義を明らかにする目的で、*Cadm1*遺伝子欠損マウスに生じた肺腺腫、肺腺癌を解析し、関連する分子経路の同定や、マウス培養肺がん細胞の樹立を試みた。

## B. 研究方法

1. *Cadm1*遺伝子欠損マウスの作成

全年度までに、C57BL6マウスとSv129由来ES細胞を用いて*Cadm1*遺伝子欠損マウスを作成し、維持、繁殖させた。*Cadm1*<sup>+/+</sup>雄マウスは精子成熟障害による不妊を示したが、*Cadm1*<sup>+/+</sup>雌マウス、並びに*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスは正常に発生、発育した。

2. *Cadm1*遺伝子欠損マウスの解析

15ヶ月、18ヶ月、22ヶ月齢の*Cadm1*<sup>+/+</sup>、*Cadm1*<sup>+/+</sup>、*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスを、各々20-30匹ずつ解剖し、肺、並びに全臓器における腫瘍発生、異常の有無を肉眼的、並びに組織学的解析により検討した。肺腫瘍については、病理解析のためのパラフォルムアルデヒドによる固定、ゲノムDNA、mRNA、タンパク質抽出などを腫瘍容積から可能な範囲で行った。また、肺腫瘍からは培養がん細胞の樹立を試みた。免疫組織染色としては、CADMI、CADM4、4.1N、EGFR、cerB2、METなどの発現を検索した。ゲノムDNAでは、*Kras2*、*Egfr*、*Tp53*遺伝子の変異の有無をPCR塩基配列決定法、*Cadm1*遺伝子のメチル化の有無を重亜硫酸・塩基配列決定法により検索した。抽出したmRNAはDNAチップにより遺伝子発現の網羅的解析を行った。また抽出したタンパク質については、EGFR、METを中心としたリン酸化経路の活性化の有無を免疫沈降法により

検討した。樹立した培養細胞は肺腺癌由来であることを、特異的マーカーの発現により確認した。

## 3. ヒト腫瘍におけるCADMI遺伝子異常の実態の解析

ヒト肺がんと解剖、組織学的に類縁である頭頸部がん(大部分が扁平上皮がん)におけるCADMI遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無を重亜硫酸・塩基配列決定法により検索した。またKRAS2、TP53、EGFR遺伝子の塩基配列変異の有無についてもPCR塩基配列決定法により検索した。

4. CADMI経路に関わる分子の網羅的解析  
CADMI結合タンパク質を免疫沈降法・質量分析法により網羅的に検索した。

## (倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、東京大学医科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、東京大学医科学研究所の諸規約に遵って行った。

## C. 研究結果

1. CADMI/TSLC1 遺伝子欠損マウスの解析  
*Cadm1*遺伝子ホモ欠損、ヘテロ欠損マウスで高率に肺腺腫、肺腺癌の自然発生を認めた。*Cadm1*<sup>+/+</sup>、*Cadm1*<sup>+/+</sup>、*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウス各々の肺腫瘍発生頻度(担がんマウス数/解析マウス数)は、15月齢で3/31(10%)、1/21(5%)、10/30(33%)、18月齢で2/30(7%)、5/18(28%)、13/35(37%)であり、*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスでは15月齢と18月齢、*Cadm1*<sup>+/+</sup>マウスでも18月齢において、*Cadm1*<sup>+/+</sup>と比較して有意に高い発生頻度であり、また腫瘍サイズにも顕著な差が認められた。病理組織学的解析では肺腺腫に加えて、15月齢と18月齢の*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスの一部、並



びに18月齢の*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスの一部に肺腺がんが認められた。また免疫組織染色により、*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスに生じた腫瘍においてもCADM1タンパク質の発現が欠如し、*Cadm1*遺伝子が結果的に2ヒットの不活化を起こしていると考えられた。*Cadm1*遺伝子欠損マウスに肺腫瘍が生じる分子機構を明らかにするために、種々の既知分子の異常の有無を検討した。その結果、肺腫瘍では*Kras2*, *Egfr*, *Tp53*遺伝子の異常は全く認められなかった。一方、免疫組織染色により、CADM4、並びに4.1Nタンパク質の発現欠如を、各々、9腫瘍中7腫瘍(78%)で認めた。さらに培養肺がん細胞の解析から、CADM4はタンパク質の発現が欠如していること、一方、4.1Nタンパク質は発現するが細胞膜への局在が損なわれていることが予想された。

## 2. ヒト腫瘍におけるCADM1遺伝子異常の実態の解析

ヒト肺がんと解剖、組織学的に類縁である頭頸部がん(大部分が扁平上皮がん)において、CADM1遺伝子プロモーター領域のメチル化を約30%程度に認めた。また*KRAS2*, *TP53*遺伝子の変異の一部に認めたが、*EGFR*遺伝子の変異は認めなかった。

## 3. CADM1経路に関わる分子の網羅的解析

CADM1の関わる分子経路を明らかにする目的で、免疫沈降・質量分析法を用いてCADM1タンパク質に結合する分子を検索し、3種の腫瘍抑制に関わる可能性のある分子を新たに同定した。現在、その機能を解析中である。

## D. 考察

ヒト肺がんが高率に異常が認められる分子の遺伝子改変マウスに肺腫瘍が自然発生した例は、*KRAS2*, *TP53*, *PTEN*などごく一部に過ぎず、肺特異的に腫瘍発生が認められるのはさらに珍しい。また、*Cadm1*<sup>-/-</sup>マウスに生じた腫瘍由来の培養肺がん細胞も樹立し、その旺盛な造腫瘍性を確認した。今後、これらのモデルを用いて、肺がんの発生や浸潤、転移の分子機構、並びに治療薬の基礎研究を進めていく予定である。現在、他のモデル系との交配や、様々なマウス系統への戻し交配を進めている。

一方、共同研究で、神経芽細胞腫の予後予測の指標としてCADM1発現欠如が有用であることを報告したが、これは神経芽細胞腫で以前より予測されていた第11染色体長腕上の予後因子の同定につながる研究成果であり、興味深い。頭頸部がんにおいても一部でCADM1遺伝子のメチル化を認めており、その意義を

解析中である。

## E. 結論

遺伝子欠損ホモマウス、ヘテロマウスに肺腺腫、肺腺がんが有意に高頻度に生じたことから、CADM1/TSLC1が遺伝学的に強力ながん抑制遺伝子であること、特に肺腺がんに関与していることが結論された。マウスで肺腺がんを発生する系は貴重であり、樹立した培養肺がん細胞とともに、今後の肺がん分子機構、並びに治療薬の研究に有用なモデルとなると思われる。また、CADM1の発現欠如は頭頸部がんや神経芽細胞腫でも高率に認められ、予後因子としての意義が期待される。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hagiya, M., Ichinaga, N., Kimura, B.K.,

Murakami, Y. and Ito, A. Expression of a

soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in

the brain and its involvement in directional

neurite outgrowth. *Am J Pathol*, in press.

2) Ando, K., Ohira, M., Ozaki, T., Akazawa, K., Suenaga, Y., Nakamura, Y., Koda, T., Kamijo, T., Murakami, Y. and Nakagawa, A. TSLC1 mapped top 11q23 is a candidate tumor suppressor in neuroblastoma. *Int J Cancer*, 123:2087-2094, 2008.

3) Overmeer, R.M., Snijders, P.J.F., Claassen-Kramer, D., Helmerhorst, T.J.M., Berkhof, J., Heideman, D.A.M., Wiling, S.M., Murakami, Y. and Ito, A. Meijer CJLM, and Steenberg RDM. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC. *J Pathol*, 215:388-397, 2008.

4) Suzuki, A., Shibata, T., Shimada, Y., Murakami, Y., Horii, A., Shiratori, K., Hirohashi, S.,

Inazawa, J., and Imoto, I. Identification of SMURF5 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 99:986-994, 2008.

## 2. 学会発表

1) Yoshinori Murakami. Involvement of a tumor suppressor CADM1/TSLC1 in lung tumorigenesis. The 13th Japan-Korea Cancer Research Workshop. Symposium. Daejeon, Korea, 2008年12月12-14日。

2) 尾鼻孝滋、菊池慎二、丸山智子、坪井裕見、伊藤彰彦、浅村尚生、金井弥栄、村上善則。非小細胞肺癌では CADM1/TSLC1、4.1B のメチル化による不活化と、EGFR、KRAS2 の変異は独立して生じる。第 67 回日本癌学会総会。口頭発表。名古屋、2008年10月28日-30日。

3) 伊藤彰彦、萩山満、村上善則。新規膵島細胞接着分子 CADM1 は神経一島細胞相互作用を促進し、膵島細胞腫瘍のホルモン機能性に関与する。第 67 回日本癌学会総会。口頭発表。名古屋、2008年10月28日-30日。

4) 村上善則、櫻井（八下田）美佳、永田政義、坪井裕見、岩井美和子、尾鼻孝滋、伊藤彰彦。細胞接着分子 CADM1/TSLC1 の異常による肺腫瘍形成の分子機構。第 67 回日本癌学会総会。シンポジウム。名古屋、2008年10月28日-30日。

5) 尾鼻孝滋、菊池慎二、丸山智子、坪井裕見、伊藤彰彦、浅村尚生、金井弥栄、村上善則。非小細胞肺癌では CADM1/TSLC1、4.1B のメチル化による不活化と、EGFR、KRAS2 の変異は独立して生じる。第 53 回日本人類遺伝学会大会。口頭発表。横浜、2008年9月27日-30日。

6) 村上善則。がんオミックス研究の現状。第 53 回日本人類遺伝学会大会。シンポジウム。横浜、2008年9月27日-30日。

7) Yoshinori Murakami. Involvement of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC1 in lung oncogenesis. The 14th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. Invited speaker. Urumqi, P.R. China, 2008年9月19-25日。

8) 村上善則、永田政義、尾鼻孝滋、菊池慎二、櫻井（八下田）美佳、坪井裕見、岩井美和子、伊藤彰彦。がん抑制遺伝子 CADM1/TSLC1 による肺がん抑制機構の解析。第 23 回日本肺癌学会ワークショップ。シンポジウム。横浜、2008年7月19日。

H. 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：なし



## ATLを含む難治性白血病の多段階発癌機構の解析

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)に対する統合的ゲノム解析により、染色体切断点集中部位として3領域を同定、その中で10p11において、共通欠失領域より癌抑制遺伝子候補として Transcription factor 8 (TCF8/ZEB1) を同定した。TCF8はゲノム欠失並びに epigenetic なゲノム異常により転写抑制化されており、ATL細胞へのTCF8遺伝子の強制発現は、細胞増殖を押さえアポトーシスを誘導した。TCF8欠損マウスの解析により、その84%にCD4+Tリンパ腫を発症し、リンパ腫細胞はリンパ節のみならず、肝臓を含む多くの臓器に高浸潤性を示した。従ってTCF8の転写抑制は、ATL発症に重要な役割を有するがん抑制遺伝子候補であり、ATL発症に至る多段階発症の1ステップとして示唆された。

## 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。同定した染色体切断点集中領域10p11.2、14q32、14q11について高密度 SNP アレイ解析を Affymetrix 社 GeneChip Human Mapping 250K Sty Arrayを用いCNAG等により解析する。この方法により10p11.2領域を同定、さらにRT-PCR法、Realtime-PCR法により領域に存在する遺伝子群に対して遺伝子発現解析を行い、TCF8/ZEB1遺伝子を癌抑制遺伝子候補として同定した。さらに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法により確認を行った。がん抑制遺伝子候補TCF8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った。また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により細胞増殖分化アポトーシスの検索を行った。さらに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、TCF8に対する欠損マウスの作製並びに腫瘍発症機能の解析を行う。

## C. 研究成果

(1)成人T細胞白血病(ATL)の統合的ゲノム解析及び癌抑制

## 遺伝子候補TCF8の同定

成人T細胞白血病(ATL)の白血病発症に関わるゲノム異常を同定するため、DNAマイクロアレイ遺伝子発現解析、高密度SNPアレイ解析、SKY法染色体分析等と組み合わせ発症因子の単離を行っている。急性型ATLの染色体切断点集中領域として10p11、14q11、14q32領域を同定し、それぞれから候補遺伝子を単離し機能解析を行っている。

a) TSLC1遺伝子;ATL細胞において細胞接着能を亢進させ、NOGマウスへのATL細胞皮下移植系においてTSLC1高発現は腫瘍形成を促進した。またNOGマウスへのATL細胞静注は肝、肺への臓器浸潤が著明であった。TSLC1 TGマウスの解析において約半数のマウスで1年半後より皮膚炎、腹水型Tリンパ腫を発症するためさらに検討を行っている。

b) TCF8遺伝子;10p11.2胸膈欠失領域より単離、TCF8欠損マウスは約80%にCD4陽性Tリンパ腫を発症させるため癌抑制遺伝子候補となった。TCF8はsmad3に結合しTGFbeta情報伝達系を正に制御し、ATLのTGFbeta抵抗性に対して、TCF8遺伝子発現の低下はその原因となっていた。TGFbeta欠損マウスにおいてもCD4陽性細胞の増加が報告されており、CD4陽性Tリンパ球がTGFbetaにより排除される機構に対して、TCF8遺伝子発現が関係することが示唆された。

2) EVI1高発現白血病に付随する7番染色体異常のゲノム解析

32例の7番欠失白血病細胞について高密度アレイCGH解析を行い、共通欠失領域を数カ所同定し、その1領域より2候補遺伝子に絞りその機能解析を行っている。

## 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 TSLC1 に引き続き、固形癌の多くでがんの転移機構 (EMT) を促進する転写因子である TCF8/ZEB1 が、ATL においてはゲノム異常、エピジェネティックな異常により転写抑制を受け、ATL の癌抑制遺伝子候補として働いていることを同定した。TCF8 欠損マウスの解析は CD4+T リンパ腫を発症しており、末梢型 T リンパ腫白血病の発症に重要な役割を有することが示唆される。

## E. 結論

ATL を含む難治性白血病は、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 ATL のゲノム解析から TCF8/ZEB1 遺伝子を癌抑制遺伝子候補として単離した。前回 TSLC1 をがん遺伝子候補として単離しており、さらに 2 領域の染色体切断点集中領域より遺伝子単利を計り、ATL 発症機序の解明、診断治療法の開発を進めていきたい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ of Adult T-cell leukemia. Dewan MZ, Takamatsu T, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Harutaka Katano H, Yamamoto N and **Morishita K** *J of Virology* 82:11958-63 (2008)
- 2) Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. Hidaka T, Nakahata S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, **Morishita K**. *Blood*. 112:383-393 (2008)
- 3) Activation of complement system in adult T-cell leukemia (ATL) occurs mainly through lectin pathway: A serum proteomic approach using mass spectrometry. Ishida YI, Yamashita K, Sasaki H, Takajou I, Kubuki Y, **Morishita K**, Tsubouchi H, Okayama A. *Cancer Lett.* 271:167-177 (2008)
- 4) SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, **Morishita K**, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. *J Biol Chem.* Epub 2008 Dec 1.

### 2. 学会発表

- 1) 高松尚文, 中畑新吾, 日高智徳, 前田宏一, 丸塚浩助, 眞鍋香澄, 濱崎誠, 久富木庸子, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 宇都宮典, 坪内博仁, 黒澤仁, 下田和哉, 森下和広: IgSF4/TSLC1 を用いた成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) に対する診断法の開発. 第 1 回 HTLV-1 研究会・合同班会議. 港区. 2008.8.23.
- 2) 中畑新吾, 濱崎誠, 齋藤祐介, 東雄二郎, 横田淳,

谷脇雅史, 森下和広: TCF8 遺伝子発現低下による ATLL 発症機構の解析. 第 1 回 HTLV-1 研究会・合同班会議. 港区. 2008.8.24.

- 3) 高松尚文, 中畑新吾, 日高智徳, 前田宏一, 丸塚浩助, 眞鍋香澄, 濱崎誠, 久富木庸子, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 坪内博仁, 黒澤仁, 下田和哉, 森下和広: ATL 特異的マーカー TSLC1/IgSF4 による臨床応用の検討: 宮崎県地域結集型共同研究事業: 食の機能を中心としたがん予防基盤技術創出最終成果報告会. 宮崎市. 2008.9.5.

- 4) 日高智徳, 中畑新吾, 畠山金太, 濱崎誠, 山下清, 河野隆志, 新井康仁, 滝智彦, 西田一弘, 岡山昭彦, 浅田祐士郎, 山口良二, 坪内博仁, 横田淳, 谷脇雅史, 東雄二郎, 森下和広: 統合的ゲノム解析に基づく ATL 発症因子の同定 TCF8. 宮崎県地域結集型共同研究事業: 食の機能を中心としたがん予防基盤技術創出最終成果報告会. 宮崎市. 2008.9.5.

- 5) 高松尚文, 日高智徳, 前田宏一, 丸塚浩助, 濱崎誠, 眞鍋香澄, 久富木庸子, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 坪内博仁, 黒澤仁, 下田和哉, 森下和広: 成人 T 細胞白血病 (ATL) 特異的発現遺伝子 IgSF4/TSLC1 の診断応用. 第 70 回日本血液学会総会. 京都市. 2008.10.11.

- 6) 中畑新吾, 濱崎誠, 齋藤祐介, 森下和広: TCF8 は Smad7 を抑制し ATL の TGF- $\beta$ 1 不能性を解除する. 第 70 回日本血液学会総会. 京都市. 2008.10.12.

- 7) 島原明子, 山川哲生, 西片一朗, 森下和広: EVI1 による GATA-2 転写活性化には P/CAF による CtBP 結合領域のリジンアセチル化が必須である. 第 70 回日本血液学会総会. 京都市. 2008.10.12.

- 8) 島原明子, 山川哲生, 西片一朗, 森下和広: EVI1 による GATA-2 転写活性化には P/CAF による CtBP 結合領域のリジンアセチル化が必須である. (英文: Crucial lysine-acetylation in CtBP binding domain of EVI1 by P/CAF during GATA-2 transcriptional activation) 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2008.10.28.

- 9) 中畑新吾, 濱崎誠, 齋藤祐介, 森下和広: TCF8 は Smad7 を抑制し ATL の TGF- $\beta$ 1 不能性を解除する. (英文: TCF8 expression overcomes the resistance to TGF $\beta$ 1-induced growth inhibition by Smad7 overexpression in ATL) 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2008.10.28.

- 10) 高松尚文, 日高智徳, 前田宏一, 丸塚浩助, 濱崎誠, 眞鍋香澄, 久富木庸子, 岡山昭彦, 坪内博仁, 鶴飼由範, 黒澤仁, 下田和哉, 森下和広: 成人 T 細胞白血病 (ATL) 特異的発現遺伝子 IgSF4/TSLC1 の診断応用. (英文: Diagnostic application of IgSF4/TSLC1 specific antibodies, a novel surface marker for Adult T-leukemia/lymphoma) 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2008.10.29.

- 11) 中畑新吾, 濱崎誠, 齋藤祐介, 森下和広: ATLL の TGF- $\beta$ 1 不能性はゲノム異常による TCF8 発現低下と SMAD7 高発現によりもたらされる. 第 31 回日本分



子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2008.12.11.

12) 黒澤仁, 住友万里子, 村松千穂, 小川恵子, 田中美帆, 北村由香, 杉浦元孝, 高崎昭彦, 林宣宏, 赤堀泰, 高松尚文, 森下和広, 鶴飼由範, 黒澤良和: 癌細胞膜上に発現する癌特異抗原 (TAA) の同定とこれに対するヒト抗体の取得. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2008.12.11.

13) 高松尚文, 日高智徳, 前田宏一, 丸塚浩助, 眞鍋香澄, 濱崎誠, 久富木庸子, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 坪内博仁, 黒澤仁, 下田和哉, 森下和広: 成人 T 細胞白血病 (ATL) 特異的発現遺伝子 IgSF4/TSCL1 の診断応用. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2008.12.11.

14) 西村拓真, 山口智, 森下和広, 植月太一: 細胞接着分子 TSCL1 を持つ新たな組換えバキュロウイルスを用いた白血病細胞への遺伝子導入の試み. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2008.12.11.

15) 島原明子, 山川哲生, 西片一朗, 森下和広: EVI1 による GATA-2 転写活性化には PCAF による CtBP 結合領域のリジンアセチル化が必要である. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2008.12.12.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

発明の名称: 成人 T 細胞白血病診断薬 登録番号: 特許第 4227881

分担研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 Cancer Board 特任准教授

### 研究要旨

骨髄異型性症候群(MDS)は、造血前駆細胞のクローナルな増殖と血球産生の異常を特徴とする難治性造血器腫瘍である。臨床的には多様性に富んだ病像を呈するものの、その遺伝学的基盤は十分に解明されていない。本年度の研究においては、MDSの遺伝学的な背景を明らかにすることを目的として、MDSの網羅的なゲノム異常の解析を行い、ゲノム分類の可能性を検討するとともに、複数のMDSの発症に関わる遺伝子変異の同定を試みた。その結果、MDSはゲノム異常の観点からいくつかの独立した病型に分類が可能であること、また、従来の染色体分析では同定が困難であった片親性二倍体(aUPD)の異常が高頻度に存在し、これらがしばしば特定の遺伝子変異と密接に相関していること、さらに、こうしたaUPDと関連した新規標的遺伝子を見いだした。本研究の結果により、マイクロアレイ解析によるMDSのゲノム診断が可能となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

MDSは汎血球減少と急性骨髄性白血病(AML)への移行を特徴とする造血前駆細胞に由来する腫瘍性疾患であるが、その分子病態の解明は進んでいない。本年度の研究では、MDSの分子病態をゲノム異常の観点から明らかにすることを目的として、SNPアレイを用いたMDSの網羅的なゲノム解析を行い、本疾患のゲノム分類の可能性を検討するとともに、本疾患で認められる特徴的なゲノム異常についてその標的遺伝子の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### (1)MDSのゲノム解析

治療ないしMDS関連AMLおよびMDS/MPN(慢性骨髄単球性白血病, CMML)を含む171例のMDS検体に由来するゲノムDNAについて、制限酵素で消化したDNA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/AsCNAR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。

#### (2)c-Cbl 遺伝子変異の同定

11番染色体長腕に集積するaUPDの最小の共通領域に見いだされたc-Cbl遺伝子についてMDS検体のゲノムDNAを用いてPCR-direct sequencingによる変異解析を行った。

#### (3)変異c-Cblの機能解析

MDSで見いだされた変異c-Cblの発がん活性を検討する目的で、同定された8種類の変異c-Cblを安定的に発現させるNIH3T3細胞を作製し、軟寒天培地におけるコロニー形成能およびヌードマウスにおける造腫瘍能を検討した。また、レトロウイルスベクターを用いて変異c-Cblを遺伝子導入した造血前駆細胞を用いてreplatingアッセイを行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は東京大学医学部における倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号xxx)。

### C. 結果

(1)高密度SNPアレイを用いたゲノム解析では、MDSに特徴的な多数の染色体異常が同定された。代表的な異常としては、従来染色体解析においても報告されてきた、+8, 1q, 19q, 21qのgain, 5q, 7q-, 7, 12p, 13q, 17p, 20qのlossなどであるが、SNPアレイでは染色体分析に比してより高い感度でこれらの異常が同定された。すなわち、染色体分析で43.3%を占める正常核型(異常なし)と判定される症例は、



SNPアレイでは28.1%と明らかに少なく、染色体分析で正常核型と判定された75例のうち43例でSNPアレイ解析による異常が同定された。また各染色体別にみた異常の検出率は、SNPアレイによる解析が平均で2.59倍となっており、またすべての染色体でSNPアレイの検出率が従来の核型分析を上回っていた。もっとも顕著な相違はaUPDの検出で、従来の各型分析では原理的に同定不可能な異常であるが、SNPアレイによる解析では、aUPDが30%の症例で検出された。一方、SNPアレイでは原理的に同定不能の相互転座型の異常は、染色体分析によって1.8%の症例に認められたのみであった。

### (2) 11qUPDに伴うc-Cblの遺伝子変異

これらのaUPDは特定の染色体に集積する傾向がみとめられ、1pにおけるc-MPL変異ないしNRAS変異、9pにおけるJak2変異、13qにおけるFLT3変異、17pにおけるp53変異、21qにおけるRunx1変異など、既知の遺伝子変異との強い相関が確認された。一方、我々は11qに集積する9例のaUPDの標的遺伝子変異としてc-Cblの変異を新たに同定した。変異はすべてc-CblのE3ユビキチンリガーゼ活性の中心を担うlinkerドメインとRINGフィンガードメインに集積していた。

### (3)c-Cbl変異の機能解析

変異c-CblをNIH3T3ないし造血前駆細胞分画に強制的に発現させることにより、その発がん活性を評価した。変異c-Cblを恒常的に発現させてNIH3T3細胞は、軟寒天培地中で足場非依存性の増殖活性の亢進がみとめられ、また免疫不全マウスに接種することにより腫瘍の形成が認められた。また、変異c-Cblを導入した造血前駆細胞では明かなreplating capacityの亢進が確認された。

## D. 考察

SNPアレイを用いたゲノム解析の結果、比較的大きな染色体領域の異常の同定においてすら、従来の染色体解析には大きな問題があることが明らかとなった。現在MDSの予後予測・治療法の選択に用いられれているIPSS分類は染色体解析の結果に強く依存していることから、今後SNPアレイを用いた臨床診断技術の開発とこれに基づく新規予後予測分類の検討が必要と考えられる。特にaUPDは従来の解析技術では全く同定不可能な変化であるが、今回の解析から、これらがいよいよ特異的な遺伝子標的を有しており、MDSの病態とも密接に関わっ

ていることが示唆された。とくに、我々は11qに集積するaUPDの遺伝子標的としてc-Cblを同定した。c-Cblは11qUPDを有する症例のほぼ全例で変異しており、これらの変異c-CblはNIH3T3細胞において強いトランスフォーミング活性をしめしたことから、MDSの病態への強い関与が示唆された。

## E. 結論

高密度SNPアレイを用いた

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 94:213-223, 2008.
2. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 455:971-974, 2008.
3. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, 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. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11921-11926, 2008.
4. Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*. 111:3286-3294, 2008
5. Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H, Scoles DR, Pavelka JC, Tran H, Miller CW, Kawamata N, Ginther C, Dering J, Sanada M, Nannya Y, Slamon DJ, Koeffler HP, Karlan BY. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 26:2952-2958, 2008.

### 学会発表

1. Masashi S, Yung SL, Suzuki T, Kato M,

Sakata MY, Kumano K, Kawamata N, Takita J, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Omine M, Koeffler HP, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of MDS/MPD Disclosed Frequent Homozygous C-Cbl mutations Tightly Associated with 11q-UPD. 50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting. Abstracts. 112:855-2008.

2. Kato M, Nakazaki K, Sato Y, Takeuchi K, Sanada M, Asakura Y, Muto S, Chen Y, Takita J, Hayashi Y, Igarashi T, Watanabe T, Tobinai K, Ishikawa Y, Mori S, Kurokawa M, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Disclosed Frequent Involvement of Genes in NFkB Pathway. 50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts. 112:807-2008.

3. Morishima S, Ogawa S, Kawase T, Matsubara A, Nanya Y, Kashiwase K, Saji H, Inoko H, Kato S, Koderia Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of Highly Conserved HLA Haplotype on Acute Graft-Versus-Host Disease in Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 112:59-2008.

4. Thoennissen NH, Kawamata N, Lasho TL, Weiss T, Nowak D, Kato M, Takita J, Sanada M, Haferlach T, Mesa RA, Tefferi A, Muller-Tidow C, Ogawa S, Koeffler PH. Genomic Changes Associated with Leukemic Transformation of Myeloproliferative Disorders. ASH Annual Meeting Abstracts. 112:3371-2008.

5. Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Koderia Y, Sasazuki T. Exploration of the Genetic Basis of GVHD by Genetic Association Studies, America Society for Blood and Marrow Transplantation Tampa, Florida, 2009.

6. 加藤元博, 中崎久美, 竹内健吾, 真田昌, 千葉滋, 石川雄一, 滝田順子, 林泰秀, 森茂郎, 小林幸夫, 黒川峰夫, 小川誠司. Genome-Wide Analysis of non-Hodgkin's Lymphoma. 日本癌学会総会. 67回:317-318,2008.

7. 真田昌, 鈴木隆浩, 加藤元博, 坂田麻実子, 熊野恵城, 滝田順子, 黒川峰夫, 千葉滋, 小川誠司. Genomewide LOH Mapping Using SNP Array Disclosed Association between a Uniparental Disomy and Homozygous Mutation in MDS. 日本癌学会総会記事. 67回:166,2008.

8. 陳玉彦, 滝田順子, 加藤元博, 大平美紀, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 中川原章, 林泰秀, 小川誠司. Molecular allelo-karyotyping and identification of target genes of neuroblastoma using SNP-genotyping microarray. 日本癌学会総会記事. 67回:64,2008.

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

- 1) Medina PP, Romero OA, Kohno T, Montuenga LM, Pio R, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. Frequent BRG1/ SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, 29:617-622, 2008.
- 2) 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 to Cells*, 13:483-495, 2008.
- 3) Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji 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.
- 4) 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*, 68:3193-3203, 2008.
- 5) 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*, 27:4788-4797, 2008.
- 6) 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*, 14:3746-3753, 2008.
- 7) Hidaka T, Nakahara S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult-T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 112:383-393, 2008.
- 8) Ajima R, Akazawa H, Kodama M, Takeshita F, Otsuka A, Kohno T, Komuro I, Ochiya T, Yokota J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes to Cells*, 13:987-999, 2008.
- 9) Yoneda M, Suzuki T, Nakamura T, Ajima R, Yoshida Y, Kakura S, Sudo K, Iwakura Y, Shibutani M, Mitsumori K, Yokota J, Yamamoto T. Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 100:225-232, 2009.
- 10) Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Watanabe S, Goto K, Nishiwaki Y, Shimada Y, Hirose H, Saito I, Kuchiba A, Yamamoto S, Yokota J. Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis*, 30:65-70, 2009.
- 11) Nakanishi H, Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T, Suzuki K, Tsuta K, Matsuno Y, Noguchi M, Shimizu E, Yokota J. Whole genome comparison of allelic imbalance between noninvasive and invasive small-sized lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 69:1615-1623, 2009.
- 12) Medina PP, Castillo SD, Blanco S, Sanz-Garcia M, Largo C, Alvarez S, Yokota J, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Clevers HC, Cigudosa JC, Lazo PA, Sanchez-Cespedes M. The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum Mol Genet*, in press, 2009.

- 13) Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, Karam R, Carrico R, Senz J, Kaurah P, Xiaogang W, Yokota J, Carneiro F, Huntsman D, Seruca R. Quantification of epigenetic and genetic second hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterol*, in press, 2009.
- 14) Blance R, Iwakawa R, Tang M, Kohno T, Angulo B, Pio R, Montuenga LM, Minna JD, Yokota J, Sanchez-Cespedes, M. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human Mutation*, in press, 2009.
- 15) Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, Motimoto Y, Kuroiwa T, Mizukami J, Umeda T, Noguchi T, Naguro I, Nishitoh H, Saegusa K, Tobiume K, Homma T, Shimada Y, Tsuda H, Aiko S, Imoto I, Inazawa J, Chiba K, Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y, Matsuzawa A, Ichijo H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J*, 2009 [Epub ahead of print]
- 16) Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer. a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol*. 2009 [Epub ahead of print]
- 17) Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of akt. *Cell* 136:535-550, 2009
- 18) Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis* 99:1940-1949, 2009.
- 19) Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 284:3334-3344, 2008.
- 20) Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Jaeduk Yoshimura Noh, Ito K, Imoto I, Inazawa J. *ITCH* is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 99:1940-1949, 2008.
- 21) Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization. its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*, 14:5531-5539, 2008
- 22) Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res*, 14:5348-5356, 2008.
- 23) Katsuki Y, Nakada S, Yokoyama T, Imoto I, Inazawa J, Nagasawa M, Mizutani S. Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes. *Cancer Sci*, 99:1539-1545, 2008.
- 24) Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arai S, Inazawa J, Okanoue T. Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 38:886-895, 2008.
- 25) Qi S, Mogi S, Tsuda H, Tanaka Y, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, Hasegawa S, Omura K. Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 37:1047-1053, 2008.
- 26) Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S,