

200823020A

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

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に
関連する新規遺伝子の同定およびその機能的
意義の解明と臨床応用に関する研究

(H19・3次がん・一般・006)

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成21(2009)年3月

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

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に
関連する新規遺伝子の同定およびその機能的
意義の解明と臨床応用に関する研究

(H19・3次がん・一般・006)

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成21(2009)年3月

目 次

I. 総括研究報告

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の
同定およびその機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

中川原 章 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析

中川原 章 ----- 7

2. 神経芽腫における MYCN 標的の同定とその発がんにおける役割の解析

上條 岳彦 ----- 13

3. 発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析

尾崎 俊文 ----- 17

4. 発がんとがんの転移を制御する遺伝子の解析

竹永 啓三 ----- 21

5. 翻訳調節を介した細胞増殖と老化制御メカニズムの解明

古関 明彦 ----- 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 35

I . 総括研究報告書



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）
平成20年度 総括研究報告書

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定
およびその機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

研究代表者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 局長

研究要旨 個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにし、創薬の標的分子を同定するために、ゲノム情報と個体発生の分子機構から、本年度は以下のことを明らかにした。

(1) 神経芽腫の網羅的ゲノム異常解析から、新規原因遺伝子として ALK チロシンキナーゼ遺伝子を同定した。神経芽腫 346 例の解析結果、5.2%に点突然変異または増幅を認めた。変異は細胞内領域、とくにチロシンキナーゼに集中していた。また、予後不良な染色体部分的増加・欠失群と予後良好なはずのトリソミー群の両者に変異のクラスターが見られ、発がん早期の異常と思われた。ALK 遺伝子異常は新規予後因子であり、我々のゲノムリスク分類に組み込んで臨床評価を行う。(2) 染色体 1p36.2 にマップされるがん抑制遺伝子として同定した KIF1Bb の新規結合蛋白質 3 個を同定した。また、MYCN の転写制御因子として TAp63 を明らかにした。(3) がん幹細胞性の維持に重要な Bmi1 ポリコーム複合体構成分子が、p14ARF と p16INK4a 以外の抑制遺伝子経路を標的にしていることが示唆された。(4) 肺がんおよび大腸がんにおいて、原発巣に比べ転移巣のミトコンドリア *ND1* と *ND6* 遺伝子中のミスセンス変異が 2~4 倍高いことを見出した。

分担研究者

上條岳彦・千葉県がんセンター・部長
尾崎俊文・千葉県がんセンター・上席研究員
竹永哲三・千葉県がんセンター・主席研究員
古関明彦・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター・チームディレクター

A. 研究目的

がんの個性は、それが由来する正常組織の発生系統に依存しており、その発生物学的特性の違いが、そこから発生してくるがんの表現形を決定している。その発がんのイベントのほとんどがゲノムあるいはエピゲノム上での異常であり、その標的となっている遺伝子が発がんの原因遺伝子である。そして、それら原因遺伝子の多くは、創薬の標的となることが多いため、

発がんの機構解明は、治療薬の開発に繋がる。そこで、昨年度に引き続き、ゲノム情報に基づいて、個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子を同定及び機能解析し、それを臨床応用することを目的とした。また、個体発生に関連する遺伝子のなかで、既に発がんの制御に関わることが明らかになっている重要な遺伝子に関して機能解析も行った。

B. 研究方法

アレイ CGH (array comparative genomic hybridization) 用チップは、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ分校がんセンターが開発した 2464 BAC クローンを搭載したチップまたは Affimetrix 社の SNPs アレイ、およびアジレント社の 44K チップを用いた。ま

た、in-house cDNA microarray は、神経芽腫組織に由来する複数の cDNA ライブラリーから抽出した 5300 個の cDNA を固定したものを用い、Cy3, Cy5 を蛍光マーカーとして使用した。ALK 遺伝子変異検索には、腫瘍 DNA または腫瘍由来 cDNA を用いた。また、分子生物学的解析には、ノザンプロット、ウエスタンプロット、免疫沈降法、ChIP アッセイ、などを用い、細胞内への遺伝子導入はトランスフェクション法を用いた。さらに、マウスモデルとして、コンディショナルノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを作製した。(倫理面への配慮)

用いた神経芽腫、肝芽腫、肝細胞がん組織は、各施設において I.C. が得られ匿名化されたものを用いた。また、がん組織に由来する DNA, RNA の取り扱いに関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 神経芽腫における発がん関連遺伝子の同定と変異および機能解析

神経芽腫の網羅的アレイ CGH 解析から、新たに *ALK* チロシンキナーゼ受容体遺伝子の変異および増幅を見出し、東京大学の小川グループとの共同研究で、188 例の散発性神経芽腫中、点突然変異 8 例 (胚細胞性変異 1 例)、増幅 4 例であった。全例が進行例で、特定のゲノムリスクグループにクラスターが見られた。これにさらに症例を追加し、346 例中、点突然変異 12 例、増幅 2 例となり、最終的な *ALK* 遺伝子異常は 5.2% の頻度であった。大半が進行例で、特定のゲノムリスクグループにクラスターが見られた。

染色体 1p36 欠失領域に見出した新規がん抑制遺伝子 *KIF1Bb* に結合する蛋白質 3 種を同定した。また、同じく 1p36 にマップされる *RUNX3* は、予後不良な神経芽腫において有意に低下し、その程度は one allele deletion による遺伝子発現量の減少のみでは説明がつかず、epigenetic な制御の可能性を検討している。

また、*NLRR1* は *MYCN* により正に、*NLRR3* は *MYCN/Miz1* により負に発現制御され、*NLRR1* は変異の無い *EGFR* シグナルを増強し、*MYCN* の発現を誘導した。一方、TATA-less 転写因子である TLP (TRF2) の機能解析の過程において、TLP が TAp63 の転写を誘導し、さらに、TAp63 が *MYCN* を直接転写誘導することを見出した。

さらに、神経芽腫 cDNA プロジェクトから同定した新規依存性受容体 *UNC5D* は、p53/p73 により直接転写制御され、カスパーゼで切断された細胞内断片が核に移行して細胞死を増強した。

(2) p53 ファミリーと発がん機構に関する研究

細胞周期の調節因子の一つである *Plk1* は、p73 のアミノ末端近傍に結合し、27 番目のスレオニンをリン酸化することによって、p73 の共役因子である p300 の p73 からの解離を促進することで、p73 の細胞死誘導活性を抑制する。*Plk1* は同様に p53 の活性を阻害することから、*Plk1* はがん治療における分子標的因子の候補の一つとして考えられた。

(3) 転移、浸潤に関連する遺伝子の同定と意義

肺がん患者の原発巣 25 例、転移巣 35 例及び大腸がん患者の原発巣 13 例、転移巣 9 例における mtDNA 変異を、複合体 I のサブユニットをコードする NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*), *ND3*, *ND4L*, *ND6*、複合体 IV のサブユニットをコードする cytochrome c oxidase subunit II (*COII*) 遺伝子、及び複合体 V のサブユニットをコードする ATP synthase 6 (*ATP6*) 遺伝子について調べた。その結果、肺がんと大腸がんの転移巣における *ND1* と *ND6* 遺伝子のミスセンス変異の頻度が、原発巣のそれと比べて 2~4 倍高い傾向を示すことが判った。他の 4 遺伝子のミスセンス変異の頻度には差が認められなかった。

(4) 神経芽腫の幹細胞性に関わる遺伝子の解析

Bmi1 低発現神経芽腫細胞株に *Bmi1* を強制発

現すると、細胞増殖の促進および soft agar colony の形成促進が認められた。また、MYCN 誘導神経芽腫細胞 Tet-21/N においては MYCN と Bmi1 の相加的な増殖促進効果が示された。一方、shRNA で Bmi1 をノックダウンすると、増殖低下およびコロニー形成の抑制が見られた。神経芽腫細胞では p14ARF と p16INK4a 以外の遺伝子が神経芽腫細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この新規 Bmi1 標的遺伝子群をスクリーニングしたところ、これまで神経芽腫で予後を左右すると報告していたがん抑制遺伝子 2 種が抑制遺伝子の第 1 位と第 2 位にランクされた。

(5) 細胞増殖と老化の総合的制御機構の解析
新たながん抑制候補遺伝子 Pcl2 の機能発現機序を明らかにするために、その Tudor ドメイン及びふたつの PHD フィンガーについて構造解析及び生化学的特性の解析を行った。その結果、いずれも異なるヒストン修飾を認識しうることを示され、Pcl2 はヒストンコードを文脈として読み取るタンパクであることが示唆された。また、ヒストン以外のメチル化タンパクを認識しうる可能性が示唆された。

D. 考察

神経芽腫を中心に環境因子の影響が極めて少ない小児がんを対象として、発がんの分子機構をゲノムワイドに追求し、具体的な原因または候補遺伝子の機能が明らかになってきた。まず、神経芽腫における ALK 遺伝子変異の発見は極めて重要であった。最終的な ALK 遺伝子異常の頻度は 5~6% であったが、予後の悪いサブセットのみならず、予後良好な aneuploid サブセットにもクラスターがあり、ALK 変異のイベントは発がんの比較的早期に起こっていることが示唆された。染色体 1p36 にマップされる KIF1Bb および RUNX3 は共に進行神経芽腫において発現が抑制されており、とくに後者はエピジェネティックな制御も加わっている(未発表情報)ことが十分予想されるが、検証が必要である。

Bmi1 はがん幹細胞性の維持に重要な分子

あることが示唆されており、epigenetic 制御に重要なポリコーム複合体の構成分子であるが、今回の実験結果から、神経芽腫細胞の増殖・分化に関する Bmi1 の発現調節標的分子として、p14ARF と p16INK4a 以外の重要な分子であるがん抑制遺伝子群の存在が示唆された。

また、幹細胞マーカー遺伝子として知られる CD133 遺伝子が HIF-2 α の標的遺伝子であったことは、低酸素が幹細胞の維持や増殖に及ぼす影響という観点から興味深い。

一方、Pcl2 はヒストンコードを文脈として読み取るタンパクであることが示唆された。また、ヒストン以外のメチル化タンパクを認識しうる可能性が示唆された。

E. 結論

現在までに蓄積された膨大なゲノム情報に基づき、ALK や KIF1Bb を含め具体的な発がんの原因遺伝子および候補遺伝子が複数明らかになってきた。また、神経芽腫がん幹細胞の候補遺伝子の機能に関しても epigenetic な制御機構について情報が得られつつある。これらの原因遺伝子産物は、創薬の標的分子として期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 27:409-420, 2008
2. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene* 27:441-449, 2008

3. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 27:1183-1188, 2008
4. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Sugita K, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncol. Rep.* 19:1381-1388, 2008
5. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* 27:741-754, 2008
6. Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. Sp1-mediated transcriptional regulation of NFB1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway. *Genes Cells* 13:53-66, 2008
7. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Kota T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. *J. Biol. Chem.* 283:3979-3987, 2008
8. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene* 27:3700-3709, 2008
9. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:994-1000, 2008
10. Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie H, Ohnuma N, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer* 123:1117-1125, 2008
11. Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, Nakagawara A. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370:594-598, 2008
12. Abe M, Watanabe N, McDonell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, Ushijima T. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* 74:50-60, 2008
13. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8555-8563, 2008
14. Inoue K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Todo S, Nakagawara A, Ozaki T. NFB1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:829-833, 2008
15. Nakagawa H, Ohira M, Hayashi S, Abe S, Saito S, Nagahori N, Monde K, Shinohara Y, Fujitani N, Kondo H, Akiyama S, Nakagawara A, Nishimura S. Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer Lett.* 270:295-301, 2008
16. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara

- A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 27:6075-82, 2008
17. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int. J. Cancer* 123:2087-2094, 2008
 18. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1B β functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 283:24426-24434, 2008
 19. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, 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
 20. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.* 99:2070-2074, 2008
 21. Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 99:1891-1899, 2008
 22. Fujita T, Ikeda H, Kawasaki K, Taira N, Ogasawara Y, Nakagawara A, Doihara H. Clinicopathological relevance of UbcH10 in breast cancer. *Cancer Sci.* (in press), 2008
 23. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320:661-664, 2008
 24. Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J. Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion* 8:339-344, 2008
 25. Ishikawa K, Hashizume O, Koshikawa N, Fukuda S, Nakada K, Takenaga K, Hayashi J. Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. *FEBS Lett.* 582:3525-3530, 2008
 26. Mimura N, Yuasa S, Soma M, Jin H, Kimura K, Goto S, Koseki H, Aoe T. Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. *Mol. Cell Biol.* 28:293-301, 2008
 27. Calés C, Román-Trufero M, Pavón L, Serrano I, Melgar T, Endoh M, Pérez C, Koseki H, Vidal M. Inactivation of the polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated with Ink4a deletion. *Mol. Cell Biol.* 28:1018-1028, 2008
 28. Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono K, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, Koseki H, Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat. Genet.* 40:411-420, 2008
 29. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Fujimura Y, Ohara O, Toyada T, Otte AP, Okano M, Brockdorff N, Vidal M, Koseki H. Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* 135:1513-1524, 2008
 30. Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H, Yasui A. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res.* 36:2939-2947, 2008

31. Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M, Masuda K, Kawamura K, Wada A, Mochizuki S, Tagawa M, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Koseki H, Saito T, Kurosaki T, Wang JY. A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity* 29:33-43, 2008
32. Hirahara K, Yamashita M, Iwamura C, Shinoda K, Hasegawa A, Yoshizawa H, Koseki H, Gejyo F, Nakayama T. Repressor of GATA regulates T(H)2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:512-20.e11, 2008
33. Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE*. 3:e3642, Epub . 2008
34. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4:e1000242, 2008
35. Tanuma N, Kim SE, Beullens M, Tsubaki Y, Mitsuhashi S, Nomura M, Kawamura T, Isono K, Koseki H, Sato M, Bollen M, Kikuchi K, Shima H. Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPP1) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-associated Protein 155 (Sap155). *J. Biol. Chem.* 283:35805-35814, 2008
36. Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28:662-673, 2009
37. Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of *ncrAN*, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* (in press), 2009
38. Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Tanaka M, Shikama N, Kamijo T, Shiohara M, Koike K. Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies. *Pediatr. Transplant.* (in press), 2009
39. Abe M, Kamijo T, Matsuzawa S, Miki J, Nakazawa Y, Sakashita K, Okabe T, Honda T, Mitsuyama J, Koike K. High incidence of meropenem resistance among alpha-hemolytic streptococci in children with cancer. *Pediatric. International.* (in press), 2009
40. Harada M, Murakami H, Okawa A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, Akasaka R, Shiraishi YI, Futatsugi N, Mizutani-Koseki Y, Kuroiwa A, Shirouzu M, Yokoyama S, Taiji M, Iseki S, Ornitz DM, Koseki H. FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nat. Genet.* 41:289-98, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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）
平成20年度 分担研究報告書

個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析

研究分担者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 局長

研究要旨 網羅的ゲノム情報に基づいて個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにし、新しい臨床リスク分類の開発と治療の標的分子を明らかにすることを目的として、以下の知見を得た。(1) 神経芽腫の網羅的アレイ CGH 解析から、新たに *ALK* チロシンキナーゼ受容体遺伝子の変異および増幅を見出した。346 例中、点突然変異 12 例（胚細胞性変異 1 例）、増幅 1 例であった。全例が進行例で、特定のゲノムリスクグループにクラスターが見られた。トリソミー腫瘍にも 3 例で変異があり、*ALK* の異常は神経芽腫発がんの比較的早期のイベントであると思われた。(2) 染色体 1p36 欠失領域に見出した新規がん抑制遺伝子 *KIF1Bβ* に結合する蛋白質 3 種を同定した。また、同じく 1p36 にマップされる *RUNX3* は、悪性度の高い神経芽腫において発現が著しく低下していた。(3) *TRF2* (*TLP*)により転写制御される *TAp63* が *MYCN* を直接転写誘導していることを見出した。また、神経芽腫 cDNA プロジェクトから同定した新規依存性受容体 *UNC5D* は、p53/p73 により直接転写制御され、カスパーゼで切断された細胞内断片が核に移行して細胞死を増強した。これら神経芽腫の発がんに関連した新規遺伝子の発現や変異は、神経芽腫の予後と関連し、新たな予後因子としてリスク分類に組み込まれ、創薬の標的となることが期待された。

A. 研究目的

網羅的ゲノム解析情報を利用して発がんの分子機構を解明するために、異なる臓器から発生する小児および成人のがんを対比させる研究戦略を計画した。発がんの過程において環境因子の影響の少ない小児がんを研究対象に加えることにより、正常組織発生の分子機構と発がんのメカニズムをより単純な系で解析でき、さらに、その結果から得られる比較類推から、組織幹細胞に由来すると思われる成人がんの発がん機構を明らかにすることがより容易になると思われる。そこで、本年度も引き続き、網羅的ゲノム異常および遺伝子発現解析の情報を基にして新たな候補遺伝子の同定を含め、具体的な候補分子の機能解析

を進め、臨床へ展開することを目的とした。

B. 研究方法

アレイ CGH (array comparative genomic hybridization) 用チップは、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ分校がんセンターが開発した 2464 BAC クローンを搭載したチップまたは Affimetrix 社の SNPs アレイ、およびアジレント社の 44K チップを用いた。また、in-house cDNA microarray は、神経芽腫組織に由来する複数の cDNA ライブラリーから抽出した 5300 個の cDNA を固定したものを、Cy3, Cy5 を蛍光マーカーとして使用した。*ALK* 遺伝子変異検索には、腫瘍 DNA または腫瘍由来 cDNA を用いた。そのほか、通常分子生物学的、生化学的解析手

法を用いた。

C. 研究結果

(1) 神経芽腫における ALK 遺伝子増幅ならびに変異

神経芽腫の網羅的アレイ CGH 解析から、新たに ALK チロシンキナーゼ受容体遺伝子の変異および増幅を見出し、東京大学の小川グループとの共同研究で、188 例の散発性神経芽腫中、点突然変異 8 例 (胚細胞性変異 1 例)、増幅 4 例であった。全例が進行例で、特定のゲノムリスクグループにクラスターが見られた。これにさらに症例を追加して解析し、最終的に、346 例中、点突然変異 12 例 (胚細胞性変異 1 例)、増幅 2 例で、最終的に神経芽腫における ALK 遺伝子異常は 5.2% の頻度であった。大半が進行例で、特定のゲノムリスクグループにクラスターが見られた。トリソミー腫瘍にも 7 例で変異があり、ALK の異常は神経芽腫発がんの比較的早期のイベントであると思われた。

(2) 染色体 1p36 欠失領域の新規がん抑制遺伝子 KIF1B β と RUNX3 の解析

酵母 two-hybrid system 法を用いて、染色体 1p36 欠失領域に見出した新規がん抑制遺伝子 KIF1B β に結合する蛋白質 3 種を同定した。また、同じく 1p36 にマップされる RUNX3 の発現は、予後不良な神経芽腫において有意に低下し、その程度は one allele deletion による遺伝子発現量の減少のみでは説明がつかず、epigenetic な制御の可能性を検討している。

(3) MYCN 遺伝子の新しい制御機構と役割 NLR orphan receptor family は、神経芽腫において増殖、分化、細胞死のスイッチを行い、NLRR1 は MYCN により正に、NLRR3 は MYCN/Miz1 により負に発現制御されていた。また、NLRR1 は変異の無い EGFR シグナルを増強し、MYCN の発現を誘導した。一方、TATA-less 転写因子である TLP (TRF2) の機能解析の過程において、TLP が TAp63 の転写を誘導し、さらに、TAp63 が MYCN を直接転写誘導することを見出した。

(4) 新規遺伝子 UNC5D の機能解析

神経芽腫 cDNA プロジェクトから同定した新規依存性受容体 UNC5D は、p53/p73 により直接転写制御され、カスパーゼで切断された細胞内断片が核に移行して細胞死を増強した。

D. 考察

本年度の研究の中で最も大きな発見は、神経芽腫における ALK 遺伝子の変異を見出したことであった。2008 年 10 月号 Nature 誌に掲載された 215 例中 188 例が我々のセンターの保存検体であったが、その後さらに対象を追加し、計 346 例の解析を終えた段階で、ALK 遺伝子の異常は約 5.2% であることが明らかになった。うち増幅は 2 例であったが、いずれも 1p loss, MYCN 増幅および 17q gain を伴う症例であった。一方、ALK 遺伝子変異の方は、すべて細胞内ドメインの点突然変異であり、悪性リンパ腫や肺がんで見ついている染色体転座による融合蛋白質の形成ではなかった。何故このような違いがあるのか不明であるが、発生系統の違いと発がんの分子機構を考えるうえで極めて重要な知見であると思われた。また、ALK 遺伝子の変異は、予後の良いはずの triploid 腫瘍においても見られたため、変異を起こすイベントは神経芽腫発がんの比較的早期の段階で起きていることが示唆された。

1p36.2 にマップされ、神経芽腫を含む多くのがんの haploinsufficient tumor suppressor gene である KIF1B β は、他の 1p36 tumor suppressor genes と協調してがんの発生や悪性化に関与している可能性が考えられる。今回、我々は、酵母 two-hybrid screening 法を用いて、3 つの結合蛋白質を同定した。これから、それらの機能解析を展開する予定である。

MYCN の発現制御機構は長く不明であった。我々は、TATA-less 転写因子である TLP が直接 p53 family のひとつである TAp63 を転写誘導し、その TAp63 がさらに MYCN の転写を促進することを見出した。神経芽腫に

おける MYCN 発現制御機構の少なくとも一つが明らかになり、神経芽腫の発生と進展の分子機構を理解するうえで、極めて重要な知見であった。また、UNC5D に関しては、細胞内ドメインがカスパーゼで切断され、そのフラグメントが核に移行して転写誘導している可能性が示唆された。

E. 結論

ゲノム情報解析に基づく具体的な候補遺伝子が次々に明らかになってきており、本研究プロジェクトも新段階に入った。今後、これらの分子が創薬の標的となり、新しい治療薬が開発される可能性が高くなってきた。ALK およびその細胞内シグナル伝達分子は、その格好の標的となり得る。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 27:409-420, 2008
2. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene* 27:441-449, 2008
3. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 27:1183-1188, 2008
4. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Sugita K, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncol. Rep.* 19:1381-1388, 2008
5. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* 27:741-754, 2008
6. Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. Sp1-mediated transcriptional regulation of NFB1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway. *Genes Cells* 13:53-66, 2008
7. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Kota T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. *J. Biol. Chem.* 283:3979-3987, 2008
8. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene* 27:3700-3709, 2008
9. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:994-1000, 2008
10. Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie

- H, Ohnuma N, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer* 123:1117-1125, 2008
11. Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, Nakagawara A. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370:594-598, 2008
12. Abe M, Watanabe N, McDonnell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, Ushijima T. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* 74:50-60, 2008
13. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8555-8563, 2008
14. Inoue K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Todo S, Nakagawara A, Ozaki T. NFB1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:829-833, 2008
15. Nakagawa H, Ohira M, Hayashi S, Abe S, Saito S, Nagahori N, Monde K, Shinohara Y, Fujitani N, Kondo H, Akiyama S, Nakagawara A, Nishimura S. Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer Lett.* 270:295-301, 2008
16. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 27:6075-82, 2008
17. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int. J. Cancer* 123:2087-2094, 2008
18. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1B β functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 283:24426-24434, 2008
19. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, 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
20. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.* 99:2070-2074, 2008
21. Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 99:1891-1899, 2008
22. Fujita T, Ikeda H, Kawasaki K, Taira N,

- Ogasawara Y, Nakagawara A, Doihara H.
Clinicopathological relevance of Ubch10 in
breast cancer. *Cancer Sci.* (in press), 2008
23. Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R.
Distinct role of ShcC docking protein in the
differentiation of neuroblastoma. *Oncogene*
28:662-673, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
平成20年度分担研究報告書

神経芽腫におけるMYCN標的の同定とその発がんにおける役割の解析

研究分担者 上條岳彦 千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部長

研究要旨

前年までの研究で、神経芽腫におけるMYCNの新規ターゲット検索を行い、発がん起序に重要なポリコーム複合体の構成分子Bmilを見出した。Bmilは神経芽腫細胞の増殖を促進し、また神経芽腫の分化誘導にBmilが重要な意義を持つことが明らかになった。MYCNによってBmilの転写が調節され、In vivoにおけるMYCNのBmilプロモーター結合をChIPアッセイで検証した。今年度は、Bmilのノックダウン系および過剰発現系の実験を行ったところ、神経芽腫細胞の増殖・分化に関するBmilの発現調節標的分子として、p14ARFとp16INK4a以外の重要な分子の存在が推定された。このBmil標的遺伝子のスクリーニングをBmil過剰発現細胞での発現チップ解析にて行った結果、これまで神経芽腫で予後を左右すると当研究所で報告していたがん抑制遺伝子群が標的である可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、発がん機序において遺伝子発現のEpigenetic制御研究が注目されている。しかしながら神経芽腫の発がん起序におけるEpigenetic制御の役割については牛島らのゲノムメチル化 (Abe M. et al., Cancer Lett. 2007) 以外にはほとんど報告がなされていない。MYCNがん遺伝子は、神経芽腫の発がん起序に深く関与し、その悪性度の調節の主要な因子である。このMYCNターゲットは神経芽腫発がんに大きな役割を果たしており、分子標的治療の標的になりうるものとして注目されているが、そのターゲットが新規治療の開発に応用されていない。

我々は前年度の研究で、MYCNがBmilのプロモーター部分にMYCN結合配列 (E box) にダイレクトに結合し、Bmilの発現調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今年度は、Bmilが神経芽腫細胞の増殖およびコロニー形成能に与える影響を明らかにし、さらにBmilによる転写制御の標的遺伝子が既知のp14ARFとp16INK4a以外に存在するのか、新たな標的遺伝子が見出されるのか検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 神経芽腫細胞株に対する遺伝子導入：遺伝子導入はレンチウイルスベクター系 pH8-SIN-CSGWおよびCSII-CMV-MCS-IRES2-Bsdを用いて行った。
2. 神経芽腫細胞株における遺伝子ノックダウン：神経芽腫細胞株において、Bmil遺伝子のノックダウンをMISSIONTM shRNA Plasmid DNA (NM_005180 B lymphoma Mo-MLV insertion region: Bmil)を用いて行った。これはpLKO.1-puroベクターとMISSION Lentiviral Packaging Mixによるものであり、高力価のウイルス作成が可能でありさらにpuromycinによる薬剤選択が可能になる系である。
3. 細胞増殖の判定：WST-8アッセイによる平板培養系での判定と、soft agarを用いた足場非依存性増殖系を用いて判定した。
4. 神経芽腫細胞におけるBmil転写制御の標的遺伝子のスクリーニング：前述のレンチウイルスベクターを用いてmock株とBmil定常発現株を作成した。この2株からtotal RNAをIsogenにて抽出し、千葉県がんセンター研究所で作成した小児がん発現遺伝子解析チップ (Ohira M et al., Cancer Cell, 2005) を用いて網羅的に解析した。3回の実験結果の平均

値を算出し、Bmi1による発現抑制をBmi1発現株とmock株の差から検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料の解析研究を行うにあたっては千葉県がんセンターの倫理委員会の承認を得、資料等の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて充分配慮する。

動物実験は動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への充分な配慮のもとに、慎重に進めている。

C. 研究結果

1) Bmi1の神経芽腫細胞増殖に与える影響
レンチウイルスベクターを用いて、Bmi1低発現神経芽腫細胞株SH-SY5YおよびTet-21/NにBmi1強制発現を行うと、細胞増殖の促進およびsoft agar colonyの形成促進が認められた。この際にp14ARFおよびp16INK4aの低下は見られなかった。さらに、MYCN誘導神経芽腫細胞Tet-21/NにおいてはMYCNとBmi1の相加的な増殖促進効果が示された。

Bmi1高発現神経芽腫株SK-N-ASおよびNB-19でレンチウイルス由来shRNAでBmi1をノックダウンすると、増殖低下およびコロニー形成の抑制が見られた。この際p14ARFおよびp16INK4aの増加は認められなかった。

2) 神経芽腫細胞におけるBmi1転写制御の標的遺伝子のスクリーニング

上記の実験結果から、神経芽腫細胞ではp14ARFとp16INK4a以外の遺伝子が神経芽腫細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この新規Bmi1標的遺伝子群をスクリーニングするために、まずレンチウイルスによるBmi1定常発現神経芽腫細胞株SK-N-BE/Bmi1OEXを作成した。Mock株と比較した結果から、これまで神経芽腫で予後を左右すると当研究所で報告していたがん抑制遺伝子2種が抑制遺伝子の第1位と第2位にランクされていることが明らかとなった。

D. 考察

Epigenetic制御に重要なポリコム複合体の

構成分子Bmi1のノックダウン系および神経芽腫分化誘導系の実験結果から、神経芽腫細胞の増殖・分化に関するBmi1の発現調節標的分子として、p14ARFとp16INK4a以外の重要な分子であるがん抑制遺伝子群の存在が示唆された。これはBmi1・p16・ARF複合ノックアウトマウスでBmi1ノックアウトマウスのフェノタイプが完全に解消されなかったことと一致しており興味深い。これらのがん抑制遺伝子は神経芽腫では遺伝子変異、プロモーターメチル化などの制御を受けておらず、これまでその発現抑制機構が明らかにされていなかった。このがん抑制遺伝子がBmi1によるEpigeneticな転写抑制のターゲットである可能性が示唆され、この確定のために半定量的RT-PCRおよびプロモーターへのChIPアッセイを来年度行いたい。

E. 結論

神経芽腫におけるポリコム遺伝子Bmi1の新規ターゲット遺伝子として複数のがん抑制遺伝子を見出した。神経芽腫の発がん起序において、ポリコム遺伝子群によるEpigeneticな遺伝子発現調節機構として新たな知見を見出した。

F. 健康危険情報 (特記なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kami jo T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2008 Jan 31;27(6):741-54.
2. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kami jo T, Nakagawara A, Kizaki H. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem*. 2008, Feb 15;283(7):3979-87.
3. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono SKoda

- T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plkl in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008 Mar 28;283(13):8555-63.
4. Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, Nakagawara A. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun 13;370(4):594-8.
5. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene*. 2008 Oct 16;27(46):6075-82.
6. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer*. 2008 Nov 1;123(9):2087-94
7. Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Tanaka M, Shikama N, Kamijo T, Shiohara M, Koike K. Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies. *Pediatr Transplant*. 2008 Dec 16.
8. Abe M, Kamijo T, Matsuzawa S, Miki J, Nakazawa Y, Sakashita K, Okabe T, Honda T, Mitsuyama J, and Koike KH. High incidence of meropenem resistance among alpha-hemolytic streptococci in children with cancer. *Pediatric International*, 2009, in press
2. 書籍
 Kamijo T. "INK4a" in "Encyclopedia of Cancer" Chief Editor: Manfred Schwab, Springer, Germany, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし