

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・胃がん・膵がんにおける網羅的なゲノム異常解析と発現解析や機能解析を組み合わせることで、新たながん関連遺伝子を多数同定した。代謝関連分子の解析、がん幹細胞性に関連した機能解析並びに新たな治療標的としての可能性についての検討も進めた。ゲノム異常を基盤とした肺内分泌性がんの分子分類を提唱した。

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目指す。

B. 研究方法

1) 肺がん・胃がん・膵がん等の難治がんにおける網羅的なゲノム解析に関する研究

難治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クローンを搭載した高密度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。更に多数の臨床検体を用いて、候補遺伝子あるいはキナーゼ遺伝子群について包括的な塩基解読を行った。

2) 新規がん関連遺伝子の機能解析に関する研究

当該分子のゲノム異常を持つがん細胞株を用いて、細胞増殖能、造腫瘍能測定や薬剤感受性などについて検索を行なった。免疫染色による臨床検体での発現解析等の検討を行った。

（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、「疫学研究に関する倫理指針」（平成19年8月16日全部改正）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) 肺がんにおけるがん抑制遺伝子・がん遺伝子の同定

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。更に PHLDA3 遺伝子異常をその他の腫瘍についても検索した結果、膵内分泌腫瘍においても高頻度の遺伝子欠損を同定した。

肺小細胞がんにおけるがん遺伝子の探索を目的として、既存のがん遺伝子の包括的なシークエンス解析を行った結果、PIK3CA 遺伝子の活性化型変異を細胞株並びに臨床検体にて同定した。この遺伝子異常を持つ細胞株は、PIK3CA の下流にある AKT に対する低分子阻害剤に対して選択的な感受性を持ち、更にそのシスプラチン耐性株に対しても AKT 阻害剤が有効であることを明らかにした。

包括的な染色体コピー数異常解析から、肺内分泌性腫瘍を3つの亜群に分類し、中でも予後不良な1群で有意に見られるゲノム異常の一つとして DEK 遺伝子増幅を同定した。細胞株を用いた検討から、DEK 遺伝子は肺小細胞がんにおける造腫瘍性や幹細胞マーカーの発現といったがん幹細胞の性質に密接に関与していることが明らかになり、またその高発現は生命予後不良と有意に相関した。更に白血病での異常がすでに報告されているような様々な転写制御分子が DEK の下流で制御されていることを明らかにした。

2) 胃がんにおける新規がん遺伝子の同定

胃がんにおける染色体コピー数異常解析から新たに染色体6番短腕の増幅領域を同定し、更にその領域に含まれる遺伝子に対する網羅的な siRNA library・強制発現細胞系と、in vitro 並びに in vivo に

おける増殖・腫瘍形成能の測定を組み合わせることで、複数の新規がん遺伝子候補を同定した。中でも細胞内の代謝経路において重要な役割を果たす酵素が、造腫瘍能を含めたがん遺伝子として機能することを明らかにし、ゲノム異常からメタボローム異常へと繋がる新たな分子経路を同定した。

低分化胃がんに対する包括的な染色体コピー数異常解析から、新規増幅領域を複数同定し、その中から KLF12 という転写因子が低分化胃がんにおいてがん遺伝子として機能することを明らかにした。

3) 低分化胃がん・膵がんにおける包括的なキナーゼ遺伝子変異解析

スキラス型のような低分化胃がんや膵がんは間質が豊富なため、これまでその遺伝子異常解析が困難であった。そのため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を用いて、ヒトゲノムにある 636 個のチロシンキナーゼ遺伝子について包括的な変異解析を行った。52 症例の胃がん臨床検体並びに 17 の低分化胃がん細胞株を検索した結果、22 遺伝子（うち 4 遺伝子では複数の変異を認めた）において変異を同定した。また同じ検体において各キナーゼ遺伝子のコピー数異常を検索した結果、24 遺伝子の増幅と 2 遺伝子のホモ欠失を検出した。29 症例の膵がん臨床検体並びに 11 の膵がん細胞株について同様の検討を行い、15 の変異を同定した。

4) 胆道がんにおける MET 発現異常と EGFR/KRAS 異常との相関に関する検討

胆道がん臨床検体において MET 遺伝子の発現を検討した結果、MET 遺伝子発現増加は有意な予後不良因子でありかつ EGFR 発現増加と相関していた。また胆道がん細胞株における解析では MET 遺伝子異常は KRAS 遺伝子変異と有意に相関していた。MET 発現と EGFR, KRAS の分子異常との間には相関関係があり、両者の組み合わせによって腫瘍の悪性度が増す可能性が示唆された。

D. 考察

1) 肺がんにおけるがん抑制遺伝子・がん遺伝子の同定

遺伝子発現解析並びにゲノム異常解析を組み合わせることで、p53 遺伝子下流遺伝子である PHLDA3 が、肺がんにおける新規がん抑制遺伝子であることを明らかにできた。更に肺がんのみならずその他に腫瘍においてもがん抑制遺伝子として機能することが判明し、今後はモデル動物を用いた機能解析と治療標的として可能性について更に解析を進める。

包括的な染色体コピー数異常解析による分子分類の結果、肺内分泌腫瘍が予後と相関するような複数の亜群に分類できることが明らかになり、その特性を規定している分子の一つとして、がん幹細胞性と関連した DEK を同定した。DEK はこれまで悪性黒色腫などの固形腫瘍におけるがん遺伝子として報告されているが、今回初めて肺がんにおける分子診断マーカーとしての可能性、がん幹細胞性を制御するといった機能、更には下流の遺伝子変化に関する報

告を行った。

小細胞がんにおける PIK3CA 変異と AKT 阻害剤奏功性との関連については、とりわけシスプラチン等の化学療法抵抗性症例に対する新たな治療選択肢として有望なものと考えられる。

2) 胃がん・膵がんにおけるゲノム異常解析

胃がんにおける網羅的な染色体コピー数異常解析と機能解析の統合により、染色体 6 番短腕の増幅領域から新規がん遺伝子候補を同定できた。この中には解糖系代謝経路において重要な役割を果たす酵素も含まれており、ゲノム異常からメタボローム異常へと直接繋がる新たな分子経路と考えられる。またこの酵素に対する阻害剤が既に開発されているので、胃がんにおける新たな分子標的治療の可能性としても有望であると考えられる。

間質が豊富なためこれまで解析困難だった難治がんに対して、マイクロダイセクションを組み合わせた大規模シーケンス解析によって、新規のがん遺伝子候補を同定することができた。今後は次世代シーケンス技術を導入し、検索範囲を全エクソン領域に拡大して、新規がん遺伝子の同定を進める。

E. 結論

肺がん・胃がん・膵がんにおける網羅的なゲノム異常解析と発現解析や機能解析を組み合わせることで、新たながん関連遺伝子を多数同定した。代謝関連分子の解析、がん幹細胞性に関連した機能解析並びに新たな治療標的としての可能性についての検討も進めた。ゲノム異常を基盤とした肺内分泌性がんの分子分類を提唱した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawase T, Ohki R, **Shibata T**, Tsutsumi S, Kamimura M, 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*. 2009, **136**:535-550.
- 2) Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubu A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, **Shibata T**. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2009, **30**:1857-1864.
- 3) Kubo T, Kuroda Y, Kokubu A, Hosoda F, Arai Y, Hiraoka N, Hirohashi S, **Shibata T**. Resequencing analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2009, e200-6.
- 4) Nakamura Y, Migita T, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K, Imoto I, Katai H, Yamaguchi T, Inazawa J, Hirohashi S, Ishikawa Y, **Shibata T**. Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J*

- Cancer**. 2009, **125**:1859-1867.
- 5) **Shibata T**, Kokubu A, Tsuta K, Hirohashi S. Oncogenic mutation of *PIK3CA* in small cell lung carcinoma: A potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. **Cancer Letters**. 2009, **283**:203-211.
 - 6) Yoshikawa D, Ojima H, Kokubu A, Ochiya T, Kasai S, Hirohashi S, **Shibata T**. Vandatinib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signaling, as a novel molecular target therapy against cholangiocarcinoma. **Br J Cancer**. 2009, **100**:1257-1266.
 - 7) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, **Shibata T**, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**. 2009, **125**:2854-2862.
 - 8) Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, **Shibata T**. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. **Cancer Sci**, 2010, in press.
 - 9) **Shibata T**, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiating activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. **Oncogene**, 2010, in press.

2. 学会発表

1) Cancer genome resequencing

柴田 龍弘、日本癌学会総会、シンポジウム

2) Keap1-NRF2 system in cancer: a molecular link between environmental stress adaptation and carcinogenesis

柴田 龍弘、25th Nagoya International Cancer Treatment Symposium

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 PHLDA gene family は癌抑制能を持つ遺伝子である

出願日 2009年2月2日

出願番号 特願 2009-22048

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）

分担研究報告書

がんのゲノム異常の網羅的解析

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。肝細胞がん(HCC)において CpG island 過剰メチル化をスクリーニングすることでエピゲノム制御によって発現抑制されるがん抑制性型 miRNA の探索を行い、腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化で機能を喪失させる肝がん抑制型 miRNA の *miR-124* と *miR-203* 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により、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を目的とする。

B. 研究方法

高精度の自作ゲノムアレイとその応用技術を確認し、これら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、甲状腺未分化がん、肺小細胞がん、口腔がん、肝がんなどの生命予後が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、さらにはがん特異的 DNA メチル化などをランドマークに、新規がん関連遺伝子やマイクロ RNA 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。同定し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。

（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

肝細胞がん(HCC)において CpG island 過剰メチル化をスクリーニングすることでエピゲノム制御によって発現抑制されるがん抑制性型 miRNA の探索を行った。miRNA の 456 種において UCSC ゲノムデータベース検索から CpG island 近傍に存在している 43 個の miRNA に着目した。COBRA 法でメチル化解析を行い、

正常肝と比してHCC細胞株で過剰DNAメチル化されている11個のmiRNAを特定した。このうち3種のmiRNAは過剰DNAメチル化と同時に発現抑制を認めた。これらのうち、*miR-124*と*miR-203*はHCC臨床検体においても高頻度にかん部特異的DNA過剰メチル化と発現低下を認めた。一方、これらの候補miRNAの過剰発現は細胞増殖の抑制を惹起した。FACS解析で*miR-124*はG1停止、*miR-203*はアポトーシスを起こした。*miR-124*は*VIM*, *IQGAP1*, *SMYD3*を、*miR-203*では*ABCE1*をそれぞれ標的にすることを見出した。

以上より、*miR-124*と*miR-203*は腫瘍特異的DNA過剰メチル化で機能を喪失させる肝がん抑制型miRNAであることを明らかにした。

D. 考察

今後、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、あるいは新規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。

E. 結論

前年度の口腔がん抑制遺伝子型*miR-137*と*miR-193a*遺伝子同定に続き、今年度は肝細胞がん抑制遺伝子型*miR-124*と*miR-203*を同定した。前者においては*VIM*, *IQGAP1*, *SMYD3*を、後者においては*ABCE1*がそれぞれ新規ターゲットであることを見出した。

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. Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2010 [in press]
2. Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K: DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009 Dec 22. [Epub ahead of print]
3. Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S: Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. *Surgery*. 147:405-414. 2009
4. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009 [Epub ahead of print]
5. Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of

- neuroblastomas. *PLoS One*. 4:e7099. 2009
6. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y: Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci*. 101:231-40. 2009
 7. Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubo A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T: Resequencing and Copy Number Analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Poorly Differentiated Gastric Cancer. *Carcinogenesis*. 30:1857-64. 2009
 8. Begum A, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Amagasa T, Inazawa J: Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 100:1908-16. 2009
 9. Nakamura Y, Migita T, Hosoda F, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K, Imoto I, Katai H, Yamaguchi T, Inazawa J, Hirohashi S, Ishikawa Y, Shibata T: Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer*. 125:1859-67. 2009
 10. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y: Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 125:2854-62. 2009
 11. Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki K, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J: Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 30:1139-46. 2009
 12. Fujita K, Sanada M, Harada H, Mori H, Niikura H, Omine M, Inazawa J, Imoto I: Molecular cloning of t(2;7)(p24.3;p14.2), a novel chromosomal translocation in myelodysplastic syndrome-derived acute myeloid leukemia. *J Hum Genet*. 54:355-9. 2009
 13. Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S: Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular-invasion-negative hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg*. 208:368-74, 2009
 14. 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 Journal*. 28:843-53, 2009
15. 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*. 36:535-550, 2009
 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*. 22:499-507, 2009
 17. 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, 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*. 30:214-21, 2009
2. 学会発表
 1. Inazawa J: Genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine". Tokuda Hospital, Sofia, Bulgaria. 19-20/March/2009
 2. Inazawa J: Integrative genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders. Medical Genetics Symposium Commemorating the 10th anniversary of inauguration of Medical Genetics Clinic & Laboratory. Asan Medical Center, Seoul, Korea. 13/November/2009
 3. Imoto I: Integrative genomics and epigenomics in cancer. The 9th East Asian Union of Human genetics Society. Yonsei 大学医療院, Seoul, Korea. 19/November/2009
 4. 稲澤譲治:「高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索」。「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5回公開シンポジウム. 東京. 2009年8月3日
 5. 井本逸勢、稲澤譲治: がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析. 第68回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009年10月1日
 6. 小崎健一、稲澤譲治: DNA 過剰メチル化により発現抑制されるがん抑制遺伝子型

- microRNA. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
7. 稲澤譲治、井上純: LAPTM5 の蓄積により誘導されるオートファジー障害を伴う細胞死; その神経芽腫の自然退縮への関与. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 3 日
 8. 稲澤譲治: 「LAPTM5 蓄積で誘導されるリソゾーム細胞死と神経芽腫の自然退縮機構」. がん特定研究 5 領域合同シンポジウム. 学術総合センター・一橋記念講堂. 東京. 2010 年 1 月 14 日
 9. 稲澤譲治: 「口腔がんと先天異常症のゲノム・エピゲノム解析」. 第 3 回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム. 東京医科歯科大学講堂. 東京. 2010 年 2 月 16 日
 10. 稲澤譲治: 「がんと遺伝疾患の統合的ゲノム・エピゲノム解析」. 琉球大学大学院セミナー. 琉球大学医学部機器センターセミナー室. 沖縄. 2009 年 7 月 9 日
 11. 稲澤譲治: 「ゲノム・エピゲノム解析によるがん関連遺伝子の探索」. 広島がんセミナー学術講演会. 広島大学. 広島. 2009 年 7 月 13 日
 12. 稲澤譲治: 「アレイ CGH 法と新しい細胞遺伝学」. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京. 2009 年 9 月 24 日
 13. 稲澤譲治: 「がんと遺伝疾患のゲノム解析: その分子診断から標的治療へ」. 札幌開成高等学校プレ先端科学特論プログラム. 北海道医療大学. 北海道. 2010 年 1 月 8 日
 14. 本田尚三、林深、井本逸勢、當山潤、岡本伸彦、黒澤健司、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治: BAC-based X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞 (X LMR) の原因遺伝子探索. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京. 2009 年 9 月 24 日
 15. 井本逸勢、松村聡、小崎健一、有井滋樹、稲澤譲治: ゲノムワイドな統合的 DNA メチル化異常解析による肝がん抑制遺伝子候補探索. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京. 2009 年 9 月 26 日
 16. 田中真二、藍原有弘、茂柳薫、ヤーセン マームット、野口典男、入江工、工藤篤、中村典明、井本逸勢、三木義男、稲澤譲治、田中博、有井滋樹: 肝がん再発ネットワーク解析に基づく Aurora kinase B 分子標的治療の開発. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 1 日
 17. 西山直隆、新井恵史、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄: 尿路上皮がんならびに前がん段階にある尿路上皮における DNA メチル化プロファイル発がんリスク評価と予後予測. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
 18. 新井恵史、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄: 肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年

10月2日

19. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治：肝細胞がん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がん抑制 microRNA. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
20. 小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、嶋田裕、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治：食道扁平上皮がんにおける新規診断・治療標的遺伝子 SMYD2 の同定. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
21. 横井左奈、津田均、稲澤譲治：乳がんにおける 1p13 増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33(TRIM33)の解析. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
22. 中村裕、右田敏郎、細田文恵、後藤政広、新井康仁、宮田敏、竹内賢吾、片井均、山口俊晴、稲澤譲治、廣橋説雄、石川雄一、柴田龍広：低分化胃がん進展における KLF12 転写因子の役割. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
23. 鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪奈浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治：子宮体がん細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制されるがん抑制遺伝子型 microRNA の探索. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
24. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、有井滋樹、稲澤譲治：肝細胞がんにおいてエピゲノムで制御されるがん抑制遺伝子の統合的アレイ解析. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 2 日
25. 村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、津田均、嶋田裕、稲澤譲治：食道扁平上皮がんにおける YAP1 とその isoform のがん遺伝子としての機能. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 3 日
26. 大木理恵子、川瀬竜也、柴田龍弘、堤修一、太田力、市川仁、稲澤譲治、油谷浩幸、田代文夫、田矢洋一：p53 標的遺伝子 PHLDA3 は Akt 抑制因子として機能する PH domain-only protein をコードする. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 3 日
27. ベガム アスマ、井本逸勢、小崎健一、津田均、鈴木江美奈、天笠光雄、稲澤譲治：口腔扁平上皮がんにおける 19q13.12-q13.2 増幅の新規標的遺伝子 PAK4. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 3 日
28. 横井左奈、津田均、井本逸勢、稲澤譲治：1p13 増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33(TRIM33)は乳がんの予後不良因子である. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. グランドプリンスホテル高輪. 東京. 2009 年 9 月 25 日
29. 細田文恵、新井康仁、宮本正之、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：胃がんにおける 6p21 ゲノム増幅と複数のがん関連遺伝子の協調的活性化. 第 68 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009 年 10 月 1 日
30. 春木茂男、井本逸勢、小松周平、村松智

輝、松井毅、小崎健一、河内洋、嶋田裕、
河野辰幸、稲澤譲治：食道扁平上皮がん
において高頻度に発現抑制されるがん関
連抑制遺伝子 DESC1 の同定. 第 68 回日
本がん学会学術総会. パシフィコ横浜.
神奈川. 2009 年 10 月 1 日

31. 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治：ヒ
トがんにおける LC3A variant 1 の発現
低下の意義. 第 68 回日本がん学会学術
総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2009
年 10 月 1 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本
逸勢・井上純、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、
2009.9.28、12/568,569、特願 2008-275176
2. 「甲状腺がんの検出方法」、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、2009.7.15、12/503,434、特願
2008-184982
3. 「がんの検出方法およびがん抑制剤」、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・富士写真フィルム株
式会社、2009.1.22、12/357,894、特願
2008-012256
4. 「核酸マイクロアレイの異常スポットを検
出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・稲澤
譲治・井本逸勢、富士フィルム株式会社・
国立大学法人東京医科歯科大学、
2009.5.27、特願 2009-128162
5. 「核酸マイクロアレイを用いた解析方法」、
氏原大・金原秀行・稲澤譲治・井本逸勢、
富士フィルム株式会社・国立大学法人東
京医科歯科大学、2009.5.26、特願

2009-126780

6. 「核酸アレイ及び核酸アレイの識別方法」、
石井靖幸・吉田淳哉・氏原大・三好隼人・
岩木義英・稲澤譲治・井本逸勢、富士フ
ィルム株式会社・国立大学法人東京医科
歯科大学、2009.5.26、特願 2009-126894
7. 2009.5.1、「薬剤耐性マーカーおよびその
利用」、井上純・稲澤譲治、稲澤譲治・富
士フィルム株式会社、特願 2009-111725

2. 実用新案登録

3. その他

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の生理的機能を知る目的で、培養上皮細胞にsiRNAを加えCADM1の発現を抑制したところ、成熟した細胞接着と上皮様整列が失われ、CADM1が上皮様形態形成に必須であることが示された。一方、ATLではCADM1の過剰発現が認められるが、上皮と異なりCADM1はTiam1タンパク質と結合し、RACの活性化を介して細胞運動性を高め、がんの進展を促進する可能性を見出した。

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 CADM1/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。本年度は上皮における細胞接着を介した腫瘍抑制機構と、ATLにおける過剰発現の意義、並びに分子機構について、まず細胞生物学的な解析を行い、次いで腫瘍組織の免疫組織染色により病理学的意義を検討した。

B. 研究方法

1. CADM1発現細胞における、siRNAによるCADM1抑制効果の検討

CADM1高発現細胞HEK293、Caco-2にCADM1siRNAをトランスフェクションしてCADM1の発現を十分に抑制し、細胞形態、アクチンフィラメント、結合タンパク質の変化を共焦点顕微鏡観察により、また、分子の量的変化をウェスタン・ブロット法により検討した。

2. ATLにおけるCADM1結合タンパク質Tiam1の同定

患者由来のATL腫瘍細胞、並びにHTLV-1感染細胞におけるCADM1結合タンパク質候補を、モチーフ解析によりTiam1に限定し、免疫沈降法、GSTプルダウン法により結合を実証した。さらにATL患者リンパ節組織を用いた免疫組織染色により、ATL症例におけるTiam1の発現亢進を検討した。

3. CADM1経路に関わる分子の網羅的解析 CADM1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。候補分子については、その生理的機能を細胞生物学的に解析した。

4. ヒト腫瘍におけるCADM1遺伝子異常の実態の解析

ヒト頭頸部がん、乳がんにおけるCADM1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。

(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、法律的地見地から、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. 細胞における CADM1発現の生理的意義の解析

CADM1発現の生理的意義を、CADM1を高発現する293、Caco-2細胞にCADM1siRNAをトランスフェクションすることにより検討した。この結果、293、Caco-2細胞のCADM1の発現は顕著に抑制され、成熟したアクチンフィラメント束の形成と上皮様整列が失われ、個々の細胞の形態は立体的から平面的に顕著に変化した。同時にE-カドヘリンやベータ・カテニン、4.1B、MPP2などの結合タンパク質の細胞膜への局在が失われた。以上の結果から、CADM1が上皮様形態形成に必須であることが示された。

2. ATLにおけるCADM1結合タンパク質Tiam1の同定

ATLではCADM1の過剰発現が認められ、CADM1が細胞の接着や浸潤に関与することが示唆されてきた。今回、ATLでは上皮細胞と異なり、CADM1の細胞内PDZ結合モチーフを介してTiam1タンパク質がCADM1と結合することを見出した。また、ATL細胞の*in vitro*での浸潤が、RACの優性欠変異体により阻害されることから、Tiam1がRACの活性化を介してATL細胞の運動性を高め、臓器浸潤を促進する可能性を見出した。さらに、ATL患者リンパ節組織を用いた免疫組織染色により、ATL症例9例中3例においてTiam1の過剰発現を見出した。

3. CADM1経路に関わる新たな分子の同定

まず、候補分子法を用いて、CADM1の細胞内領域に存在する4.1結合モチーフと結合する

4.1N、PDZ結合モチーフと結合するMPP1、MPP2を新たに同定した。また、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同定した。この中にはキロシンキナーゼ活性を抑制するがん抑制タンパク質候補が含まれていたことから、その分子の腫瘍における意義、CADM1との相互作用について検討した。

4. ヒト腫瘍における CADM1 遺伝子異常の実態の解析

ヒト頭頸部がん、乳がんにおけるCADM1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。その結果、頭頸部扁平上皮がん56例中22例(39%)にナンセンス変異を認め、フレームシフト3例を含めて25例(45%)にタンパク質のトランケーション型変異が認められ、多臓器の報告や頭頸部がんの他の報告よりも顕著が高かった。これらの症例では喫煙歴、飲酒歴が濃厚であった。一方、乳がんの解析では、非がん部DNAですでにCADM1遺伝子のメチル化が認められ、前がん病変への関与が示唆された。

D. 考察

CADM1は正常上皮では4.1群、MPP群タンパク質と結合し、上皮様形態形成に必須の働きをすると考えられる。今回の研究により、その発現欠如は細胞の整列や組織の上皮様形態、アクチンによる成熟した接着を積極的に破綻させる可能性が示唆された。従って、すでに幾つかのがんで報告されている様に、上皮性腫瘍では、CADM1の発現欠如ががんの浸潤、転移を予測するマーカーとなる可能性が高く、特異抗体を用いた免疫組織染色法が診断医薬として確立されることが望まれる。

これに対し、CADM1遺伝子は血球細胞では発現が認められないが、ATL腫瘍細胞では疾患特異的に発現することから、宮崎大学の森下教授らにより診断マーカーとして実用化されつつある。本研究では、ATL細胞ではCADM1が、RACを活性化するGuanine Nucleotide Exchange Factor (GEF)として働くTiam1タンパク質と特異的に結合することを示した。さらにRACを阻害すると、ATL細胞の線維芽細胞上や血管内皮細胞上での葉状仮足形成や浸潤

性が抑制されることを見出した。この結果から、CADM1がTiam1と結合してRACを活性化することにより、ATL細胞の運動性、浸潤性が高まり、ATLで特徴的に認められる臓器浸潤に関わる可能性が示された。今後、この分子経路は、ATLの浸潤を抑制する薬剤の分子標的となる可能性が示唆される。

E. 結論

CADM1が肺がんなど上皮性腫瘍ではがん抑制タンパク質、ATLでは浸潤促進因子として相反する機能を示すことの分子機構が示された。上皮腫瘍では質的診断マーカー、ATLでは浸潤抑制治療の標的分子となると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ and Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells. *Journal of Biological Chemistry*, in press.
- 2) Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Ito A and Murakami Y. Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:977-982, 2009.
- 3) Hagiwara M, Ichiyanagi N, Kimura BK, 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*, 174:2278-89, 2009.

2. 学会発表

- 1) 村上善則, Involvement of a cell adhesion molecule CADM1/TSLC1 in oncogenesis, 日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
- 2) 伊藤彰彦、萩山満、村上善則, Estimation of intercellular adhesive strength using laser-induced impulsive force under general culture condition, 日本

- 癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
- 3) 永田正義、山田大介、河合剛人、岩井美和子、桜井美佳、伊藤彰彦、村上善則、Estimation of intercellular adhesive strength using laser-induced impulsive force under general culture condition、日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
 - 4) 伊東剛、桜井美佳、村上善則、Mechanism of transcriptional regulation of the *CADM1* gene during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma cells, P19, induced by retinoic acid、日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
 - 5) 萩山満、一柳直希、伊藤彰彦、村上善則、Expression of a soluble form of *CADM1* in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth、日本癌学会総会、横浜市、2009年10月1-3日
 - 6) 村上善則、がんの遺伝子・ゲノム研究の意義と家族性腫瘍、日本癌治療学会総会、横浜市、2009年10月23日
 - 7) 櫻井(八下田)美佳、丸山智子、村上善則、Dynamics of *CADM1* protein in the membrane of stable adhesion and in the process of cell-cell contact formation、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月9-12日
 - 8) 坪井裕見、伊藤彰彦、村上善則、Proteomic analysis of cell adhesion molecule 1 (*CADM1*) complex、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月9-12日
 - 9) 一柳直希、伊藤彰彦、村上善則、Suppression of excessive glucagon secretion from pancreatic islet α cells by cell adhesion molecule-1-mediated gap junction formation、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月9-12日
 - 10) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Iwai M, Kawai T, Murakami S, Ito T, Ito A, Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule *CADM1/TSLC1* in oncogenesis, The First Formosan Symposium on Structural Biology of Membrane Proteins and Biomembranes, 台湾、台北市、2009年12月9, 10日
 - 11) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Kawai T, Ito T, Ito A, Yoshida M, Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule *CADM1/TSLC1* in oncogenesis, The 8th AACR-JCA Joint Conference on Cancer Research, 米国、ハワイ州コナ市、2010年2月5-10日
 - 12) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Iwai M, Kawai T, Murakami S, Ito T, Ito A, Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule *CADM1/TSLC1* in oncogenesis, The 15th Charles Heidelberger International Symposium on Cancer Research, タイ、ピサヌロックス市、2010年1月18-21日
 - 13) Murakami Y., Possible function of a cell adhesion molecule, *CADM1*, as a dependence receptor, The 4th Dependence Receptor Meeting, フランス、ニース市、2010年3月22-26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

10p11.2領域のゲノム解析により同定したZEB1の機能解析により、ZEB1発現抑制によるATL細胞におけるTGFbeta不能性機構の一端を明らかにした。また同領域よりenhancer of polycomb 1 (EPC1)がAXSL2と融合遺伝子を形成することを同定した。この融合遺伝子を持つ症例の頻度は少ないものの、解析の途中でさらにPolycomb遺伝子群のEZH2遺伝子が高頻度の高発現していることを同定し、Polycomb遺伝子群の異常はATL発症に関与していることが示唆された。また網羅的遺伝子解析から同定したTSLC1についてin vitro細胞接着、in vivoにおけるNOG免疫不全マウスへの移植実験の解析により、TSLC1高発現とATL細胞の特徴である高頻度臓器浸潤性との関連性を明らかにした。この様に複数個のATL発症因子を同定し、その機能解析によりATLの有する病態解析が進行しており、新規診断治療法開発につなげる。

A. 研究目的

ATLを含む難治性白血病は固形癌に近いゲノム異常の複雑さを示す。これら難治性白血病関連遺伝子群を多数単離し機能解析を行い、白血病発症機構を検討する。これまでATLにおいてTSLC1、ZEB1、NDRG2遺伝子を同定し機能解析を行っている。またAML特異的7番欠失領域より遺伝子Xを単離し機能解析を行っている。その機能異常を白血病並びに固形がんとの共通点・相違点を明確にすることで、白血病を含むがん発症機構の解明、さらには疾患特異的治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

これまでのATLに対するゲノム解析により、同定した遺伝子群において10p11.2領域より転写因子ZEB1、網羅的遺伝子発現解析より細胞接着因子TSLC1、14q11領域より情報伝達因子NDRG2、それぞれの遺伝子の機能解析を中心に検討する。またATL-14q32領域、AML-7番染色体より新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子同定を行う。さらにこれらの異常を踏まえ、各遺伝子異常による白血病発症機構を明らかにする。In vivoにおいて各種白血病細胞、ならびにマウス並びにヒト骨髄細胞を用い遺伝子導入、もしくはshRNA発現ベクターの導入により増殖分化アポトーシス解析を行う。さらにin vivoマウスモデル系を用いて白血病発症機構、さらには発癌機構を検討する。特にNDRG2欠損マウスを作成しがん発症機構の解明を行う。次にこれらの遺伝子群の相乗的な効果を検討し、難治性白血病における多段階発癌機構を明らかにする。

C. 研究結果

SNPアレイ解析から10p11.2領域の解析により同定したZEB1に関してTGFbeta情報伝達系への関与からI-Smadとの結合と機能抑制を明らかにし、Smad7の高発現とZEB1発現抑制によるATL細胞におけるTGFbeta不能性機構の一端が明らかになった。また同領域よりenhancer of polycomb 1 (EPC1)がAXSL2と融合遺伝子を形成することを同定した。頻度は少ないもののPolycomb遺伝子異常の存在がわかり、解析の途中でさらにEZH2遺伝子が高頻度高発現を同定、Polycomb遺伝子群の異常はATL発症に関与していることが示唆された。また網羅的遺

伝子解析から同定したTSLC1においてはin vitro、in vivo解析によりATLの有する臓器浸潤との関連性が明らかになった。14q11のゲノム解析と遺伝子発現解析によりNDRG2がATLでプロモーターメチル化により特異的に発現低下しており、癌抑制遺伝子候補とした。この遺伝子は固形がんにおいて癌抑制遺伝子として知られており、口腔がん症例を用いて遺伝子発現解析と機能解析を行なったところ、特異的な遺伝子発現低下とPI3K/AKT情報伝達系の活性化との関わりが明らかになった。

D. 考察

ATLのゲノム解析から白血病化に係わるATL特異的なゲノム異常から複数の因子を同定し、ATLの病態を行っている。その中でNDRG2は口腔がんにおいても癌抑制遺伝子として働いており白血病と固形がんにおける共通の発がん機構として考えられる。

E. 結論

ATLの多段階発がんにおいて、白血病特異的な転写因子異常と同時に、固形がんで見られる情報伝達系異常が存在し、一般的な発がん機構が関与していることが示唆された。従って治療法の開発においてもこれらの病態を踏まえた開発が必要である。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahata, M., Inoue, Y., Tsuda, H., Imoto, I., Koinuma, D., Hayashi, M., Ichikura, T., Yamori, T., Nagasaki, K., Yoshida, M., Matsuoka, K., Morishita, K., Yuki, K., Hanyu, A., Miyazawa, K., Inazawa, J., Miyazono, K., Imamura, T : SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- β signal in gastric cancer cells. J Biol. Chem. 285. 3334-3344. 2009.

2) Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T.,

Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M., Morishita, K.: Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 48. 768-776. 2009.

3) Furuta, H., Kondo, Y., Nakahata, S., Hamasaki, M., Sakoda, S., Morishita, K.: NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391. 1785-1791. 2010.

2. 学会発表

1) 山川哲生, 齋藤祐介, 森下和広: Evi 1 による細胞接着機構. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム. 宮崎市. 2009. 5. 11.

2) 島原明子, 山川哲生, 齋藤祐介, 西片一朗, 森下和広: 急性骨髄性白血病の原因遺伝子 EVI 1 による GATA-2 転写活性化の機能解析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム. 宮崎市. 2009. 5. 11.

3) 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-beta1 不能性を解除する. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム. 宮崎市. 2009. 5. 11.

4) 古田浩史, 近藤雄大, 濱崎誠, 中畑新吾, 迫田隼男, 森下和広: 口腔扁平上皮癌における NDRG2 遺伝子の発現とその制御機構の解析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム. 宮崎市. 2009. 5. 11.

5) 黒澤仁, 住友万里子, 村松千徳, 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: Human phage antibody library を用いた癌細胞表面キヤラクターの解析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム. 宮崎市. 2009. 5. 11.

6) Morishita, K., Taniwaki, M., and Nakahata, S.: Identification and characterization of tumor suppressor genes in ATL by chromosomal and genetic analyses. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜市. 2009. 10. 1.

7) Hamasaki, M., Nakahata, S., Saito, Y., Kawano, Y., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M., and Morishita, K.: NDRG2 is a candidate tumor suppressor gene in adult-T cell leukemia/lymphoma 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜市. 2009. 10. 1.

8) Nakahata, S., Hamasaki, M., Watanabe, M., and Morishita, K.: Down-regulation of CDKN1A transcription by ZEB1/TCF8 inactivation in adult T-cell leukemia. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜市. 2009. 10. 1.

9) Manabe, K., Takamatsu, N., Hidaka, T., Nakahata, S., Naeda, K., Hamasaki, M., Iwata, T., Ukai, Y., Okayama, A., Horiuchi, H., Kurosawa, G., Utsunomiya, A., and Morishita, K.: Diagnostic application using TSLC1/IgSF4 antibodies to Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 68th Annual Meeting of the

Japanese Cancer Association. 横浜市. 2009. 10. 2.

10) Morituchi, T., Kohno, T., Iwagawa, R., Kiyono, T., Morishita, K., Akiyama, T., and Yokota, J.: Involvement of LKB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Human Lung Cancer. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜市. 2009. 10. 3.

11) 森下和広, 山川哲生, 中畑新吾: CtBP 結合型転写因子群による白血病発症機構の解析. 第82回日本生化学会大会. 神戸市. 2009. 10. 21.

12) 山川哲生, 齋藤祐介, 島原明子, 森下和広: Evi1 による細胞接着機構. 第82回日本生化学会大会. 神戸市. 2009. 10. 24.

13) 齋藤祐介, 山川哲生, 島原明子, 森下和広: EVI1 による細胞接着制御機構. 第71回日本血液学会学術集会. 京都市. 2009. 10. 24.

14) 中畑新吾, 濱崎誠, 渡邊正明, 森下和広: 成人T細胞白血病リンパ腫 (ATLL) における ZEB1/TCF8 転写抑制は CCNG2 及び CDKN1A の転写抑制をもたらす. 第71回日本血液学会学術集会. 京都市. 2009. 10. 24.

15) 眞鍋香澄, 高松尚文, 日高智徳, 中畑新吾, 前田宏一, 濱崎誠, 岩田喬子, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 坪内博仁, 黒沢仁, 宇都宮興, 森下和広: 成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) の TSLC1/IgSF4 による診断応用. 第71回日本血液学会学術集会. 京都市. 2009. 10. 24.

16) Yamakawa, N., Saito, Y., and Morishita, K.: ITGA6/ITGB4 dependent-cell adhesion ability in EVI1 (+) leukemia. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜市. 2009. 12. 9.

17) Kurosawa, G., Sumitomo, M., Muramatsu, C., Ogawa, K., Hashiba, M., Sugiura, M., Akahori, Y., Manabe, K., Ukai, Y., Morishita, K., and Kurosawa, Y.: Comprehensive isolation and characterization of anti-cancer Abs, using the human phage-Abs display system. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜市. 2009. 12. 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他 (出願)

1. 森下和広, 山川哲生: 細胞接着阻害剤およびその用途. 特願 2009-41204
2. 森下和広, 中畑新吾, 濱崎誠: PI3K/AKT 情報伝達系に関連する疾病の予防薬, 進展抑制薬, または治療薬. 特願 2009-95147

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。我々はSNPアレイを用いたMDSの網羅的なゲノム解析を通じて、MDSでは11番染色体の後天的な片親性二倍体(aUPD)によって特徴づけられる一群の亜型が存在すること、またその遺伝子標的が変異CBL遺伝子であることを明らかにした。本年度の研究においては、マウスモデルを用いた一連の解析によって、CBLが本来はチロシンキナーゼの活性化を負に制御する癌抑制遺伝子として機能すること、変異CBLは機能獲得型の変異であって、造血前駆細胞のサイトカイン感受性を亢進させること、またこの効果は正常CBLの非存在下で強調されることを明らかにした。これらの結果より、CBL変異と正常CBLアレルの喪失による造血前駆細胞のサイトカイン感受性の亢進がCBL変異を有するMDSの病態に重要な役割を担っていると考えられた。また、サイトカインのシグナル伝達経路の遮断がこれらのMDSの治療に有用な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。われわれは、昨年度までのSNPアレイを用いたMDSの網羅的なゲノム解析によって、11染色体長腕のaUPDによって特徴づけられる一群の亜型を同定し、その分子標的として変異CBL遺伝子を同定した。本年度の研究においては、本MDS亜型に対する新たな分子標的治療法を開発することを目的として、CBL変異を有するMDSの発症の分子メカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

(1) CBL欠失マウスの解析

CBL遺伝子の欠失マウスを作成し、それらの造血前駆細胞分画数を正常マウスと比較検討した。また、CBLノックアウトマウスとbcr/ablトランスジーンによるCMLモデルマウスを交配させることにより、CBL遺伝子が急性転化におよぼす効果を検討した。また、CBL欠失マウスにおける造腫瘍性について検討した。

(2) CBLおよび変異CBLの機能解析

正常および変異CBLを、ヒト上皮細胞増殖因子(EGF)受容体を導入したNIH3T3細胞に遺伝子導入し、EGF刺激後の受容体のユビキチン化をウェスタンブロットにて解析した。同様に正常ないし変異CBLを遺伝子導入した造血細胞株を、erythropoietin(EPO)、SCF、FLT3リガンドで刺激した後、これらのサイトカイン受容体ないしJAK2キナーゼのユビキチン

化およびリン酸化を解析した。

(3) 変異CBLが造血前駆細胞のサイトカイン感受性に及ぼす効果の解析

CBL+/+および-/-マウスから未分化な造血前駆細胞(Lineage-Scal+c-Kit+細胞; LSK細胞)をFACSにより回収し、レトロウイルスベクターによる正常および変異CBL遺伝子の遺伝子導入を行った後、種々のサイトカイン存在下における細胞増殖能を定量することにより、変異CBLが造血前駆細胞のサイトカイン感受性に及ぼす効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物愛護の観点から、平成18年文部科学省告示第71号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び各機関の定める動物実験倫理規定を遵守し、予め各機関に届け、機関長の承認を得て行った。

C. 結果

(1) CBL欠失マウスの解析

CBL欠失マウスは既存の報告に一致して脾腫をみとめ、また、骨髄および脾臓におけるLSK細胞およびCD34(-)LSK細胞の増加に示される造血前駆細胞プールの拡大が認められた。また、bcr/ablトランスジェニックマウスではCBL-/-ないしCBL+/-の遺伝的背景において急性転化の促進が認められた。さらにCBL-/-マウスは長期の観察により全例でHarderian tumorを主体とする悪性腫瘍の発症が確認された。このことから、CBLは癌抑制遺伝子として作用することが示された。

(2) CBLおよび変異CBLの機能解析

正常 CBL を過剰発現させた NIH3T3 細胞においては、EGF 刺激後の EFF 受容体のユビキチン化の増強が認められたが、変異 CBL ではこの増強効果は認められなかった。さらに、正常 CBL の過剰発現によるユビキチン化の増強効果は、変異 CBL を共発現させることにより顕著に抑制された。このことから、変異 CBL では E3 ユビキチン活性が著明に低下しているのみならず、正常 CBL の E3 ユビキチン活性を抑制すること明きからとなった。また変異 CBL を導入した種々の造血細胞では、正常 CBL を導入した対照と比較して、EPO、SCF ないし FLT3 リガンドで刺激後の JAK2 キナーゼ、c-Kit、ないし FLT3 のユビキチン化の減弱をみとめ、また、これらのキナーゼのリン酸化の遷延化が観察された。

(3) 変異 CBL が造血前駆細胞のサイトカイン感受性に及ぼす効果の解析

CBL+/+マウス由来の LSK 細胞は、SCF 存在下においても、培養により細胞死が誘導されるが、この細胞死は変異 CBL の遺伝子導入することにより抑制された。SCF 存在下における細胞死の抑制は、CBL-/-由来の LSK 細胞においても同程度に観察されたが、興味深いことに、CBL-/-の LSK 細胞では変異 CBL の導入により、SCF に対する感受性の増強が確認され、この現象は IL-3、thrombopoietin、および FLT3 リガンド刺激においても確認された。

D. 考察

CBL はチロシンキナーゼの負の制御に関わるシグナル伝達分子である。このことから予測されるように、CBL 欠失マウスの表現型は、CBL が癌抑制遺伝子として機能することを示している。一方、変異 CBL は NIH3T3 細胞を強く transform するがん遺伝子であって、今回の検討の結果からは、その発がん活性の少なくとも一部はチロシンキナーゼの負の調節機構を担う CBL の E3 ユビキチンリガーゼとしての機能の喪失ないし正常 CBL 活性の阻害によるサイトカイン感受性の増強によって担われている可能性が推定される。このことは CBL 変異が骨髄増殖性の表現型を有する慢性骨髄単球性白血病ないし若年性骨髄単球性白血病で最も高頻度に観察されることとよく一致する。一方、変異 CBL を導入した際のサイトカイン感受性の増強は CBL+/+の造血前駆細胞においては著明ではなく、CBL-/-の造血前駆細胞に導入した場合に顕著に現れることは、変異 CBL の生物学的効果が単なる機能の喪失や正常 CBL の阻害のみでなく、ある種の

機能獲得によって担われていることを示唆するとともに、CBL 変異例の多くで 11qUPD によって正常 CBL アレルが失われる結果、変異アレルのホモ接合となっている事実をよく説明する。変異 CBL における機能獲得の正確な分子メカニズムは現時点では不明である。変異 CBL が造血前駆細胞でも発現する CBL の相同分子 CBL-b の E3 ユビキチンリガーゼ活性を阻害することから、一部には CBL-b の阻害で説明されると思われるが、今後の詳細な検討が必要である。

E. 結論

CBL は骨髄系腫瘍とくに CMML に分類される MDS おいてしばしば変異を来とし、その多くは 11qUPD によりホモ接合を生ずる。本年度の研究により、正常 CBL は癌抑制遺伝子として機能すること、一方、変異 CBL はがん遺伝子としての活性を有しており、その活性は、E3 ユビキチンリガーゼ活性の障害ないし正常 CBL および CBL-b の活性を阻害と密接に関連していることが示された。変異 CBL による発がん活性には正常 CBL アレルの消失によって増強される gain-of-function によるサイトカイン感受性の増強が関与していると推定され、これらのサイトカインシグナルの抑制が CBL 陽性腫瘍の治療に有用である可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 460:904-908, 2009.
2. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell

lymphomas. **Nature**. 459:712-716, 2009.

3. Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, Koeffler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. **Haematologica**. 94:1301-1306, 2009.

4. Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koeffler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. **Blood**. 113:1741-1748, 2009.

5. 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, 2009.

6. Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoenissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. **Blood**. 115:1049-1053, 2010.

7. Shiba N, Kato M, Myoung-ja P, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia, but not in pediatric myelodysplastic syndrome. **Leukemia**. in press.

8. Ogawa S, Shih L, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. **Cell Cycle**. in press.

9. Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoenissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistant chronic myeloid leukemia (CML) identifies

heterogeneous secondary genomic alterations. **Blood**. in press.

学会発表

1. Sanada M, Suzuki T, Lee-Yung S, Otsu M, Yamazaki S, Kato M, Handa H, Yanagimoto M, Kumano K, Takita J, Kawamata N, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Ozawa K, Omine M, Nakauchi H, Phillip Koeffler, S O. Gain-of-function mutations of c-Cbl tumor suppressor in MDS and MDS/MPD associated with 11q UPD. 第71回日本血液学会総会, 2009.

2. Kato M, Sanada M, Koto I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinei K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, S O. Frequent inactivation of A20 through gene mutation in B-cell lymphomas. 第71回日本血液学会総会, 2009.

3. 真田昌, 鈴木隆浩, 大津真, 山崎聡, 加藤元博, 柳元麻実子, 熊野恵城, 黒川峰夫, 千葉滋, 森啓, 小澤敬也, 中内啓光, 小川誠司. Gain-of-function of mutated c-Cbl tumor suppressor associated with 11q UPD in myeloid neoplasms. 第68回日本癌学会学術総会, 2009.

4. 松原亜以子, 加藤元博, 真田昌, 滝田順子, 千葉滋, 林泰秀, 小俣政男, 小林幸夫, 渡邊俊樹, 石川雄一, 吉野正, 小川誠司. Genome-wide analysis using high-density SNP microarrays in various types of cancer. 第68回日本癌学会学術総会, 2009.

5. 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 竹内賢吾, 丹羽明, 野本順子, 中釜斉, 石川雄一, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫, 小川誠司. Genome-wide analysis identifies frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. 第68回日本癌学会学術総会, 2009.

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
なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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*, 18:1343-1352, 2009.
- 4) Blanco 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. *Hum Mutat*, 30:1199-1206, 2009.
- 5) Anami Y, Iijima T, Suzuki K, Yokota J, Minami Y, Kobayashi H, Satomi K, Nakazato Y, Okada M, Noguchi M. Bronchioloalveolar carcinoma (lepidic growth) component is a more useful prognostic factor than lymph node metastasis. *J Thoracic Oncol*, 4:951-958, 2009.
- 6) Kumamoto K, Fujita K, Kurotani R, Saito M, Unoki M, Hagiwara N, Shiga H, Bowman ED, Yanaihara N, Okamura S, Nagashima M, Miyamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int J Cancer*, 125:1306-1315, 2009.
- 7) Ohata, H, Ota N, Shirouzu M, Yokoyama S, Yokota J, Taya Y, Enari M. Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation *J Mol Biol*, 394:460-471, 2009.
- 8) Suizu F, Hiramuki Y, Okumura F, Matsuda M, Okumura AJ, Hirata N, Narita M, Kohno T, Yokota J, Bohgaki M, Obuse C, Shigetsugu H, Obata T, Noguchi M. The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell*, 17:800-810, 2009.
- 9) Kohno T, Otsuka A, Girard L, Sato M, Iwakawa R, Ogiwara H, Sanchez-Cespedes M, Minna JD, Yokota J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer*, 49:342-252, 2010.
- 10) Kodama M, Otsubo C, Hirota T, Yokota J, Enari M, Taya Y. Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol Cell Biol*, 30:1620-1633, 2010.
- 11) Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, Shiraishi K, Ishii Y, Goto K, Ohe Y, Nishiwaki Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Hirose H, Oka A, Yanagitani N, Saito R, Inoko H, Yokota J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*, 31:834-841, 2010.
- 12) Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, in press, 2010.
- 13) Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papilloma virus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, in press.
- 14) Oni H, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Saito M, Kiyono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Med*, 23:229-236, 2009.
- 15) Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis*, 30:423-431, 2009.
- 16) Yugawa T., Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*, 19:97-113, 2009.
- 17) Sugimoto N, Yoshida K, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Waga S, Kiyono T, Fujita M. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of re-replication in normal human cells. *J Cell Sci*, 122:1184-91, 2009.
- 18) Yuan H, Ito S, Senga T, Hyodo T, Kiyono T, Kikkawa F, Hamaguchi M. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. *Int J Oncol*, 35:309-14, 2009.

- 19) Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M, Kyo S. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression. *Mol Hum Reprod*, 15:693-701, 2009.
- 20) Kawai K, Egawa N, Kiyono T, Kanekura T. Epidermodysplasia-*verruciformis*-like eruption associated with gamma-papillomavirus infection in a patient with adult T-cell leukemia. *Dermatology*, 219:274-8, 2009.
- 21) Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. A novel positive feedback loop between Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. *J Biol Chem*, 284:34223-30, 2009.
- 22) Ibrahim HR, Kiyono T. Novel Anticancer Activity of the Autocleaved Ovotransferrin against Human Colon and Breast Cancer Cells. *J Agric Food Chem*, 57:11383-90, 2009.
- 23) Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J Cell Sci*, 123:225-35, 2010.
- 24) Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes*, in press 2010.
- 25) Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura M, 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.
- 26) Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubu A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30:1857-1864, 2009.
- 27) Kubo T, Kuroda Y, Kokubu A, Hosoda F, Arai Y, Hiraoka N, Hirohashi S, Shibata T. Resequencing analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 2009, e200-6, 2009.
- 28) Nakamura Y, Migita T, Okada N, Gotoh M, Arai Y, Fukushima M, Ohki M, Miyata S, Takeuchi K, Imoto I, Katai H, Yamaguchi T, Inazawa J, Hirohashi S, Ishikawa Y, Shibata T. Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer*, 125:1859-1867, 2009.
- 29) Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Hirohashi S. Oncogenic mutation of *PIK3CA* in small cell lung carcinoma: A potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Letters*, 283:203-211, 2009.
- 30) Yoshikawa D, Ojima H, Kokubu A, Ochiya T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Vandatinib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signaling, as a novel molecular target therapy against cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 100:1257-1266, 2009.
- 31) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 125:2854-2862, 2009.
- 32) Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci*, in press, 2010.
- 33) Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiating activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene*, in press, 2010.
- 34) Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, in press, 2010.
- 35) Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K. DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2009 Dec 22. [Epub ahead of print]
- 36) Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S. Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. *Surgery*. 147:405-414. 2009.
- 37) Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009 [Epub ahead of print].