

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

遺伝性腫瘍の新しい遺伝子診断法の開発に関する研究

分担研究者 塚田 俊彦 国立がん研究センター研究所腫瘍内分泌プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨 多内分泌腺腫瘍症1型(MEN1型)の原因遺伝子 *MEN1* の生殖細胞系列における遺伝子変異のうち、ミスセンス変異を有する者の予後を推定する方法を開発した。ミスセンス変異により生じる変異型遺伝子産物メニンの細胞内安定性を計測する方法により、典型的な MEN1 型やその軽症型である家族性副甲状腺機能亢進症患者などに見られる変異メニンの安定性を比較したところ、比較的安定性の高い変異メニンを有する者は、副甲状腺以外に腫瘍が発生しにくい傾向を認めた。変異メニンの細胞内安定性が低い場合は典型的な MEN1 型に進展する可能性があり、内分泌腫瘍の定期的スクリーニングが必要と考えられた。

A. 研究目的

MEN1 型の原因遺伝子 *MEN1* の変異情報をもとに、保因者の将来の臨床像を予測する方法を開発し、遺伝子診断後の経過観察や遺伝カウンセリングに役立つ技術として確立する。また MEN1 型患者に発生する腫瘍に有効な治療法を開発するために、*MEN1* 遺伝子の機能を完全に喪失した腫瘍の特徴を明らかにする。

今年度は、以前より我々が開発してきた変異型メニンの細胞内安定性を計測する方法をさらに改良するとともに、解析する変異の数を増すことにより、変異メニンの細胞内安定性と臨床像との相関をより詳細に検討することとした。また、メニンの有無と放射線感受性の相関を調べた。

B. 研究方法

(1) 変異メニンの細胞内安定性の計測と *MEN1* 遺伝子変異保持者の予後の推定。

発現ベクター pCMV-BICEP-4 を用いて、1 本の mRNA により変異型メニンと野生型メニンの双方を

発現するプラスミドを作成し、培養細胞に導入して変異型及び野生型メニンのタンパク発現量を免疫ブロット法と蛍光免疫組織化学法により定量した。まず、野生型メニンを myc タグ付加タンパクとし、変異型メニンを FLAG タグ付加タンパクとして培養細胞に発現させ、それぞれのタンパクを各タグに対する特異抗体を用いて検出した。また、上記のプラスミドとは逆に、野生型メニンに FLAG タグを付加し、変異型メニンに myc タグを付加した構造の発現プラスミドも作製して、発現するメニンの量を測定した。

免疫ブロット法では、myc タグを alkaline phosphatase 標識抗体を用いて、また、FLAG タグを peroxidase 標識抗体を用いて検出した。各酵素反応により生じる X 線フィルム上の特異的バンドをデンストメトリーにより数値化した。定量化のために、野生型メニンの希釈試料による標準曲線を作成して較正に用いた。

蛍光免疫組織化学法では、各タグを fluorescein または Cy3 で標識した抗体で染色し、蛍光顕微鏡

により撮影したデジタル映像を画像解析ソフトで解析した。この方法では、野生型メンンが集積する核のみを解析対象とし、同一核における野生型及び変異型メンンの蛍光強度を測定した。蛍光物質質量と蛍光強度が正比例する強度範囲をキャリブレーションキットを用いて確認し、その範囲内で計測を行った。

免疫プロット法および蛍光免疫組織化学法のいずれにおいても、変異型メンンの量を同時発現させた野生型メンンの量で除することにより補正した。種々の正常多型および変異メンンについて、各方法により推定される発現量を比較したところ、良好な比例相関が得られた(図1)。また、変異型メンンと野生型メンンに付加するタグを入れ替えたプラスミドでも、ほぼ同様の結果を得た。

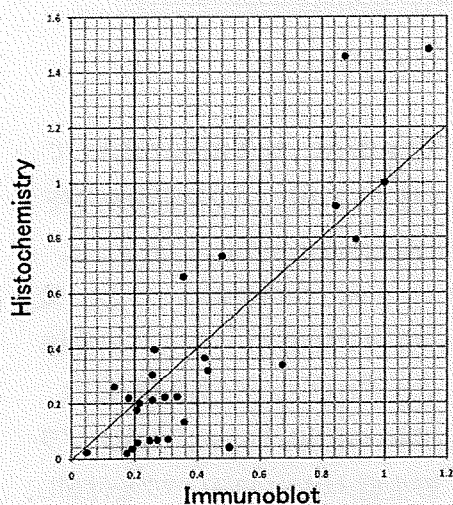


図1. 免疫プロット法と蛍光免疫化学法によるメンンタンパク量推定値の相関。野生型メンンの推定発現量を1とした。

(2) メンン欠失細胞の放射線感受性。

メンンの欠失が細胞の放射線感受性を高めるか否かを検討するために、ヒト培養細胞にメンンの siRNA を導入して、特異的にメンンをノックダウンし、細胞増殖及び放射線感受性への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

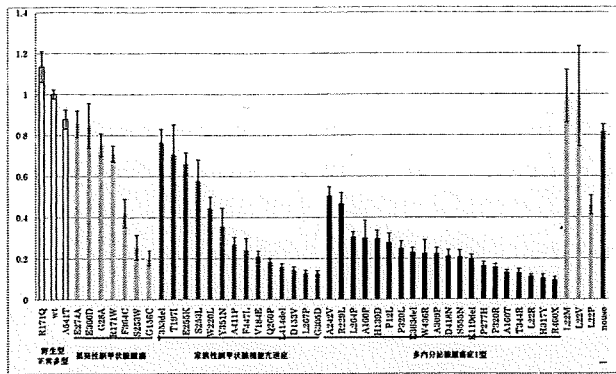
ヒトおよび動物の試料等を利用する上で倫理指針

の対象となる研究を行わなかった。

C. 研究結果

(1) 変異メンンの細胞内安定性の計測と *MEN1* 遺伝子変異保持者の予後の推定。

野生型メンンに FLAG タグを付加し、変異型メンンに myc タグを付加した構造のプラスミドを用いた実験で、蛍光免疫化学法を用いた解析の結果を図2に示す。正常多型2種類(R171Q, A541T)、孤発性副甲状腺腫瘍患者に認められた生殖細胞系列ミスセンス変異7種類、家族性副甲状腺機能亢進症の原因として報告されたミスセンス変異14種類、典型的 *MEN1* 型の原因となるミスセンス変異20種類、疾患の原因として報告のない任意に作成したミスセンス変異3種類(L22M, L22V, L22P)、およびマウスメンンの発現量を野生型メンン(wt)の発現量を1として表した。その結果、正常多型は野生型とほぼ同様の発現量を示したが、その他のミスセンスメンンの発現量は多様であった。一見孤発性に見える副甲状腺腫瘍患者や家族性副甲状腺機能亢進症の家系に見られるミスセンス型変異メンンは、比較的発現量が高いものが多かったが、典型的な *MEN1* 型の原因となる変異メンンは概ね発現量が低かった。また、典型的 *MEN1* の原因となる変異 L22R と同じコドンに、疾患との関係が報告されていない L22M, L22V, L22P を作成し本実験系で発現量をみたところ、その発現量は多様であった。さらに、マウスメンンは発現量が高く、ヒト細胞内でもヒトメンンと同様の安定性があることが推定された。以上の結果より、ミスセンス型メンンの細胞内安定性は臨床像と相関があり、安定性の高い変異メンンは軽症型の臨床像になりやすいことが確認できた。また、メンンの安定性は同じコドンでも置換するアミノ酸の種類により大きく異なることが明らかになった。さらに、ヒトのメンンと比べて20アミノ酸置換と1アミノ酸挿入があるマウスメンンが高い安定性を示すことから、本法により評価される細胞内安定性はメンンの分子機能と相関することが示唆された。



(2) メニン欠失細胞の放射線感受性。

ヒト培養細胞 WI38VA13 及び GM0639 にメニン特異的 siRNA を導入してメニンをノックダウンした。これらの細胞のメニン mRNA およびメニンタンパク量の減少を定量的 PCR 及び免疫ブロット法で確認できた。細胞増殖能を指標にしてこれらの細胞の放射線感受性を検討した結果、メニンのノックダウンにより両細胞株とも細胞増殖速度の上昇がみられた。しかし、電離放射線 (10 Gy) に対する感受性の変化は認められなかった。

D. 考察

多内分泌腺腫瘍症 1 型は副甲状腺、膵腸管内分泌腫瘍、下垂体などに種々のホルモン産生腫瘍が発生する常染色体優性の家族性腫瘍症候群であり、原因遺伝子 *MEN1* の生殖細胞系列における機能喪失型変異が原因となる。近年、副甲状腺腫瘍のみが発生した患者においても *MEN1* 遺伝子の変異が同定され、このような患者においては下垂体腫瘍、膵腸管内分泌腫瘍、カルチノイドなどの腫瘍が発生する可能性を考慮して精密検査を進め、さらに腫瘍の定期的スクリーニングを生涯にわたり行う必要がある。しかし、*MEN1* 遺伝子のミスセンス変異の中には、副甲状腺腫瘍のみが発生する変異があると考えられ、このような変異を同定することは長期にわたる不要な検査を回避することにつながる。本研究の結果、MEN1 型の軽症型とされる孤発性副甲状腺腫瘍や家族性副甲状腺機能亢進症

家系に見られるミスセンス変異は、細胞内で安定性が高いものがあることが明らかになった。一方、このような家系に見られるミスセンス変異であっても、非常に安定性が低いものがあることが判明した。これらの不安定メニンを有する患者は、副甲状腺のみならず他の内分泌腫瘍の発生を予測して、定期的なスクリーニング検査を行う必要があると考えられる。

MEN1 遺伝子産物メニンを欠損する細胞は放射線感受性が高いとする報告がある。MEN1 型患者の腫瘍細胞はメニンを完全に欠損しているため、放射線治療が他の腫瘍より有効である可能性がある。そこで、培養ヒト細胞においてメニンをノックダウンし、放射線感受性の変化を検討したが、既報のような感受性増大を確認できなかった。既報の方法とは手技上の相違もあり、メニン欠損細胞の放射線感受性に関しては現段階では明確な結論は得られないが、MEN1 型患者の腫瘍に放射線治療が特に有効であることを示唆する結果は得られなかった。

E. 結論

MEN1 遺伝子のミスセンス変異のうち、その変異をもつ遺伝子産物メニンの細胞内安定性が高いものは、MEN1 型の軽症型である家族性副甲状腺機能亢進症の表現型をとる可能性が示唆された。開発した細胞内安定性の計測法は、*MEN1* 遺伝子のミスセンス変異をもつ患者の予後の推定に役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukada, T., Nagamura, Y., Ohkura, N. *MEN1* gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer Sci* 100: 209–215, 2009.
- 2) Okamoto, T., Iihara, M., Obara, T., Tsukada, T. Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Sug* 33: 2343–2354, 2009.
- 3) Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N.,

Yamaguchi, T., Yaguchi, H., Kitabayashi, I.,
Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., Taniuchi,
Y., Sakaguchi, S. Indispensable role of the
Runx1-Cbf β transcription complex for in
vivo-suppressive function of Foxp3⁺ regulatory
T cells. *Immunity* 31: 609-620: 2009.

2.学会発表

- 1) 塚田俊彦 内分泌腫瘍の発生に関わる遺伝子、
第 68 回日本癌学会学術総会、2009

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

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

がんの転移や薬剤応答性を規定する分子を標的にした RNAi 治療の開発の研究

分担研究者 竹下 文隆 国立がん研究センター研究所がん転移研究室 研究員

研究要旨 がんの治療応用研究における RNAi 創薬の意義を追求するために、ヒト乳がんおよび前立腺がんの転移モデル動物を用いて、RNAi 治療により標的遺伝子やその下流の分子の制御が可能であることを示した。MicroRNA をモデル動物に投与した際のがん細胞へのデリバリー効果の評価系を構築した。

A. 研究目的

がんの治療において、薬剤耐性をいかに克服し、また転移をどう制御するかは大きな課題である。本研究の今年度の目的は、乳がんのリンパ節転移や前立腺がんの骨転移モデル動物に small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) による RNAi 治療を施した際に、がん組織において標的遺伝子およびその下流の分子を制御可能なことを証明し、がんの転移を規定する分子の解明と RNAi を応用した新たな治療方法を開発することにある。

B. 研究方法

乳がんのリンパ節転移のある患者で発現の高い遺伝子に対する siRNA の投与による、乳がんモデルマウスのリンパ節転移抑制効果の分子機序を検討するため、siRNA 投与後にモデルマウスの原発腫瘍を摘出し、標的および上皮間葉移行に関与する遺伝子の mRNA の発現を定量的 PCR 法により解析し、タンパクの発現を免疫組織化学染色により検討し、siRNA 治療としての特異性の評価を行った。

前立腺がんモデルマウスに投与し骨転移抑制効果を示した microRNA-16 (miR-16) について、がん細胞における発現低下の原因を解明するため、miR-16 の染色体上コード領域のコピー数を PCR

法により検討した。

骨転移モデルマウスに miRNA を全身性に投与した際の、転移がん細胞における miRNA の機能を、マウスを生かした状態でリアルタイムでの評価を可能にするため、RNAi 効果が発光の低下として現れる、miRNA のレポーター遺伝子を発現する細胞を移植してモデルマウスを作成し、in vivo イメージング技術によって解析した。

C. 研究結果:

(1) slug-siRNA 投与による乳がん原発巣における標的および上皮間葉移行に関与する遺伝子の発現解析: 乳がんリンパ節転移モデルマウスにおいて、slug-siRNA の投与により原発巣での slug の発現は抑制され、E-cadherin をはじめとした上皮間葉移行に関与する遺伝子の発現の上昇が、mRNA、タンパク共に確認された。(2) ヒト前立腺がんにおける miR-16 の発現低下機構の解明: ヒト前立腺がん骨転移モデルマウスの作成に用いた PC-3M-luc 細胞のゲノム DNA を鋳型にし miR-16 をコードする領域の定量的 PCR を行い、正常ヒト前立腺細胞と比較し、コピー数が 1/2 であることを見いだした。(3) miRNA の全身性デリバリー効果の評価: ルシフェラーゼ遺伝子の下流に miR-16 の標的遺伝子の 3' 末端側非翻訳領域 (3' UTR) を結合させた配列を導入した細胞を移植して作成した、ヒト

前立腺がん骨転移モデルマウスにmiR-16をアテロコラーゲンを担体として全身性に投与し、骨転移巣における発光の低下が確認された。この結果から骨組織に転移した細胞へmiRNAがデリバリー可能なことが示された。

D. 考察:

乳がんのモデルマウスへのsiRNAの投与による結果から、siRNAによるRNAi治療は従来の低分子化合物では困難であった、遺伝子、パスウェイを標的とした治療の有効性を示した。

前立腺がん細胞株で、過去にがん患者サンプルで報告されたゲノム異常がmiRNAの発現に変化を及ぼしていること見だし、さらにそのmiRNAを投与することによりがんの転移抑制効果を発揮させるという、全く新しいがんの治療戦略の可能性を示した。さらに転移したがん組織における、全身性に投与したmiRNAのデリバリー効果を評価できるモデル動物は、今後も改良が必要とされる、がん細胞特異的RNAi治療のデリバリーシステムの開発に極めて有用であると考えられる。

E. 結論:

ヒト乳がんや前立腺がんの転移に関与する遺伝子に対し、RNAi治療による抑制がその下流に存在する遺伝子の発現をも制御し、転移の抑制につながることを、動物モデルを用いて実証することが出来た。本研究から、RNAi治療のデリバリー効果、標的分子の抑制効果、転移がんの治療効果まで、前臨床試験に必要な評価系の構築が完了した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T.: Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. J. Biol. Chem., in press.
- 2) Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M.,

Takahashi, R., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A.G., Brown, D. and Ochiya, T.: Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell cycle genes. Mol. Ther., 18: 181-187, 2010.

- 3) Tanooka, H., Tatsumi, K., Tsuji, H., Noda, Y., Katsube, T., Ishii, H., Ootsuyama, A., Takeshita, F. and Ochiya, T.: Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. Cancer Gene Ther., 17: 1-10, 2010.
- 4) Honma, K., Takemasa, I., Matoba, R., Yamamoto, Y., Takeshita, F., Mori, M., Monden, M., Matsubara, K. and Ochiya, T.: Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. Int. J. General Med., 2: 243-257, 2009.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T.: Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells in vitro and in vivo. Keystone Symposia, 2010, British Columbia, Canada
- 2) Ochiya T and Takeshita F. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen, Denmark. July 16-24, 2009
- 3) Ochiya T and Takeshita F. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009

(国内)

- 1) Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits prostate tumor metastasis via downregulation of multiple cell cycle genes. Fumitaka Takeshita, Mitsuhiko Osaki, Ryu-u Takahashi, Nobuyoshi Kosaka, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 32 回日本分子生物学会 (2009.12.9-12 横浜)
- 2) Studies on RNA interference-mediated inhibition of cancer metastasis. Fumitaka Takeshita and Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 3) MicroRNA regulation of anti-cancer drug resistance in human breast cancer. Fumitaka Takeshita, Ryou-u Takahashi, Yusuke Yamamoto, Kaho Minoura, Toshiki Taya, Kosaka Nobuyoshi, Kimi Honma, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 4) RPN2 exerts a functional role in supporting cancer stem cell phenotype. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 5) Experimental therapy of autochthonous MCA-induced tumors by gene silencing with siRNA in mutant p53 transgenic mice. Hiroshi Tanooka, Kouichi Tatsumi, Hideo Tsuji, Yuko

- Noda, Hiroko Ishii, Akira Ootsuyama, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
- 6) Screening of potential molecular targets for colon cancer therapy. Kimi Honma, Ichiro Takemasa, Ryo Matoba, Fumitaka Takeshita, Masaki Mori, Morito Monden, Kenichi Matsubara, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
 - 7) Identification of lung metastasis inhibitory microRNA in human osteosarcoma cells. Mitsuhiko Osaki, Fumitaka Takeshita, Ryu-u Takahashi, Nobuyoshi Kosaka, Eisuke Kobayashi, Tesshi Yamada, Hisao Ito, Mitsuo Oshimura, Takahiro Ochiya. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.1-3 横浜)
 - 8) 合成ペプチドをキャリアとした siRNA の新規デリバリー方法の開発. 小林智、竹下文隆、落谷孝広. 遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (2009.7.9-11 大阪)

H. 知的財産の出願・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

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野康吉	家族性乳癌の最新知見	園尾 博司	これからの乳癌診療 2009~2010	金原出版株式会社	東京	2009	102-109
菅野康吉	遺伝カウンセリング	藤原康弘、古瀬純司、大山優	What's New in Oncologyがん治療エッセンシャルガイド	株式会社南山堂	東京	2009	112-118
菅野康吉	膀胱がんにおける遺伝子検査	石井 勝	腫瘍マーカーハンドブック 改訂版	株式会社 医薬ジャーナル社	大阪	2009	284-288
菅野康吉	家族性大腸腺腫症	幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊	今日の消化器疾患治療指針 第3版	株式会社 医学書院	東京	2010	506-508

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato Y., <u>Yoshida T.</u> , et al.	A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies	The Pharmacogenomics J	9	137-146	2009
Hiura Y., <u>Yoshida T.</u> , et al.	Identification of Genetic Markers Associated With High-Density Lipoprotein-Cholesterol by Genome-Wide Screening in a Japanese Population	Circ J	73	1119-1126	2009
Kobayashi M., <u>Yoshida T.</u> , et al.	Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of colorectal cancer: A hospital-based case-control study in Japan	Scand J Gastroenterol	44	952-959	2009
Nishimoto T., <u>Yoshida T.</u> , et al.	Oncolytic virus therapy for pancreatic cancer using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob	Gene Ther	16	669-680	2009

Hara H., <u>Yoshida T</u> , et al.	Intratumoral interferon- α gene transfer enhances tumor immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Cancer Immunol Immunother	58	1007-1021	2009
Naruse H., <u>Yoshida T</u> , et al.	Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay	Fam Cancer	8	509-517	2009
Sangrajrang S., <u>Yoshida T</u> , et al.	Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women	Int J Cancer	125	837-843	2009
Wu X., <u>Yoshida T</u> , et al.	Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer.	Nat Genet	41	991-995	2009
Isohata N., <u>Yoshida T</u> , et al.	Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus	Int J Cancer	125	1212-1221	2009
Kobayashi M., <u>Yoshida T</u> , et al.	Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of stomach cancer: a hospital-based	Gastric Cancer	12	198-205	2009
Sano M., <u>Yoshida T</u> , et al.	Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis	Int J Oncol	36	321-330	2010
Sugiyama E., <u>Yoshida T</u> , et al.	Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: Impact of genetic polymorphisms	Clinical Pharmacokinetics			in press.
Sai K., <u>Yoshida T</u> , et al.	Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients.	Br J Clin Pharmacol			in press
<u>Yoshida T</u> , et al.	Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBJ database: gastric cancer as an example	Cancer Sci			in press
Noda S., <u>Ichikawa H</u> , et al.	Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression.	Biochem Biophys Res Commun	383	210-215	2009

Miyake M., <u>Sugano K</u> , et al.	siRNA-mediated knockdown of the heme synthesis and degradation pathways: modulation of treatment effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in urothelial cancer cell lines.	Photochem Photobiol	85	1020-1027	2009
Iwama T., <u>Sugano K</u> , et al.	Identification of somatic APC mutations in recurrent desmoid tumors in a patient with familial adenomatous polyposis to determine actual recurrence of the original tumor or de novo occurrence.	Fam Cancer	8	51-54	2009
Miyake M., <u>Sugano K</u> , et al.	Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer.	Cancer Sci	101	250-258	2010
<u>Tsukada, T.</u> , et al.	<i>MEN1</i> gene and its mutations: basic and clinical implications.	Cancer Sci	100	209-215	2009
Okamoto T., <u>Tsukada T</u> , et al.	Parathyroid carcinoma: etiology, diagnosis, and treatment.	World J Surg	33	2343-2354	2009
Kitoh A., <u>Tsukada, T</u> , et al.	Indispensable role of the Runx1-Cbfb transcription complex for in vivo-suppressive function of Foxp3+ regulatory T cells.	Immunity	31	1-12	2009
Tanooka H., <u>Takeshita F</u> , et al.	Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA.	Cancer Gene Ther	17	1-10	2009
Honma K., <u>Takeshita F</u> , et al.	Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy.	Int J General Med	2	243-257	2009
<u>Takeshita F.</u> , et al.	Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell cycle genes.	Mol Ther	18	181-187	2010
Kosaka, <u>Takeshita, F.</u> , et al.	Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells.	J Biol Chem			In press

