

パ腫研究に新たな研究の観点をもたらすものとする。また、PRDM1欠失は分化の抑制がおこるため、分化促進剤のような薬剤が抗腫瘍効果を示すことが想定されるため、今後の研究の方向性において大変意義が高い。一方、FOXO3遺伝子に関してはその機能は不明であり、増殖抑制効果が認められる以外に明らかとはなっておらず、今後、発現解析などによる研究を進めていく必要がある。

2. 加齢性EBウイルス陽性リンパ増殖疾患の遺伝子発現解析による分子病態の解明

Age-related EBV+LPD については、検体量に限りがあり細胞株も存在しないため、これまで、臨床病理学的研究以外はほとんど解析が進められていない。今回、われわれの解析から Age-related EBV+LPD がほとんど ABC 型リンパ腫に属することが明らかとなったため (Liu et al., 未発表データ)、比較検討するものとして EBV 陰性 ABC 型 DLBCL8 症例との比較を行った。DLBCL は発現解析により、GCB 型と ABC 型に分けられることが知られているので、分化段階をそろえることは大変重要な判断であった。発現解析による比較の結果、発現差異の大きな遺伝子として IL6、TNFAIP3、HOPX や SLAMF1 が認められた。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、AR-EBV(+)/DLB に有意に発現の高い遺伝子群として Cytokine-cytokine receptor interaction、NOD 様受容体経路、Toll 様受容体経路および JAK-STAT 経路などが上位に抽出された。これら 3 つの pathways に共通して関連する NF- κ B の活性化の関与が示唆された。これらは、炎症・免疫反応に関与する遺伝子セットであり、Age-related EBV+LPD の発症背景であると考えられてきた加齢による何らかの免疫機能の異常がその背景にあると考えられてきたことと矛

盾する。しかしながら、患者からの末梢血を用いた免疫機能の検討では、EB ウイルスに関する強い免疫機能が保たれていることも、学会等では報告されているので、Age-related EBV+LPD の発症機序に関しては、炎症性反応の観点からの検討も必要であることが強く示唆された。今後は、炎症性反応との観点からそのシグナル伝達機構の制御異常を中心に研究を進めていく必要がある。

E. 結論

1. ENKTL 症例 39 検体について、400K oligo-array CGH でゲノム異常を調べ、20%以上の症例でゲノム異常が認められた領域は、増幅領域として 1q31.2-44, 7q11.22-36.3, 16p13.3, 11p15.5 欠失領域として 6q16.1-27 and 7p15.3-22.2 を見いだした。

2. ENKTL 症例における最も高頻度なゲノム異常領域は 6q21 領域であり、5 つの候補遺伝子のうち、FOXO3 と PRDM1 が責任遺伝子であることを発現解析との相関と機能的検討により明らかにできた。

3. Age-related EBV+LPD において、EBV 陰性 ABC 型 DLBCL との遺伝子発現の比較から、炎症性反応に関与するシグナルが有意に高く、共通する標的として NF- κ B の活性化が腫瘍発生に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kumar, V., Matsuo, K., Takahashi, A., Hosono, N., Tsunoda, T., Kamatani, N., Kong, SY., Nakagawa, H., Cui, R., Tanikawa, C., Seto, M., Morishima, Y., Kubo, M., Nakamura, Y., Matsuda K.:

- Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Genet*, in press.
2. Umino, A., Nakagawa, M., Utsunomiya, A., Tsukasaki, K., Taira, N., Katayama, N., Seto, M.: Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood*, in press.
 3. Kato, H., Kagami, Y., Kodaira, T., Oka, S., Oki, Y., Chihara, D., Taji, H., Yatabe, Y., Nakamura, T., Nakamura, S., Seto, M., Yamamoto, K., Morishima, Y.: Nodal relapse after helicobacter pylori eradication in a patient with primary localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 106: 549-551, 2011.
 4. Sung, CO., Kim, SC., Karnan, S., Karube, K., Shin, HJ., Nam, DH., Suh, YL., Kim, SH., Kim, JY., Kim, SJ., Kim, WS., Seto, M., Ko, YH.: Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-1300, 2010.
 5. Iqbal, J., Weisenburger, DD., Greiner, TC., Vose, JM., McKeithan, T., Kucuk, C., Geng, H., Deffenbacher, K., Smith, L., Dybkaer, K., Nakamura, S., Seto, M., Delabie, J., Berger, F., Loong, F., Au, WY., Ko, YH., Sng, I., Armitage, JO., Chan, WC.: International Peripheral T-Cell Lymphoma Project.: Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*, 115: 1026-1036, 2010.
 6. Ko, YH., Karnan, S., Kim, KM., Park, CK., Kang, ES., Kim, YH., Kang, WK., Kim, SJ., Kim, WS., Lee, WY., Chun, HK., Seto, M.: Enteropathy-associated T-cell lymphoma-a clinicopathologic and array comparative genomic hybridization study. *Hum Pathol*, 41: 1231-1237, 2010.
 7. Kato, H., Kagami, Y., Nakagawa, M., Karnan, S, Yatabe, Y., Morishima, Y., Seto, M.: IL-4/CD40L co-stimulation induces long-term proliferation for CD10-Positive germinal center B Cell-like diffuse large B-Cell lymphoma. *The Open Leukemia Journal*. 3: 60-68, 2010.
 8. Kato, H., Yamamoto, K., Matsuo, K., Oki, Y., Taji, H., Kuwatsuka, Y., Seto, M., Kagami, Y., Morishima, Y.: Clinical impact and predisposing factors of delayed-onset neutropenia after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for B-cell non-Hodgkin lymphoma: association with an incremental risk of infectious events. *Ann Oncol.*, 21: 1699-1705, 2010.
 9. Uchida, M., Tsukamoto, Y., Uchida, T., Ishikawa, Y., Nagai, T., Hijiya, N., Nguyen, L T., Nakada, C., Kuroda, A., Okimoto, T., Kodama, M., Murakami, K., Noguchi, T., Matsuura, K., Tanigawa, M., Seto, M., Ito, H., Fujioka, T., Takeuchi, I., Moriyama, M.: Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. *J Pathol*, 221: 96-105, 2010.
 10. Tsukamoto, Y., Nakada, C., Noguchi, T., Tanigawa, M., Nguyen, L T., Uchida, T.,

Hijiya, N., Matsuura, K., Fujioka, T., Seto, M., Moriyama, M.: MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res*, 70: 2339-2349, 2010.

11. Miyata, T., Yonekura, K., Utsunomiya, A., Kanekura, T., Nakamura, S., Seto, M.: Cutaneous type adult T-cell leukemia/lymphoma is a characteristic subtype and includes erythema/papule and nodule/tumor subgroups. *Int J Cancer*, 126: 1521-1528, 2010.

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）

分担研究報告書

消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析

研究分担者 中西速夫

愛知県がんセンター研究所、腫瘍病理学部、室長

研究要旨：消化器がんの分子標的治療は本邦においては大腸がんで **Cetuximab, Bevacizumab** を用いた分子標的治療が行われ一定の成果を挙げているが、胃がんにおいては本年度からようやく **HER2** 陽性胃がんに対する **Trastuzumab** 療法が行われる予定であるが、基礎的研究は大きく立ち遅れているのが現状である。本研究では頻度は **10-20%** と比較的低いものの、**EGFR** を高発現し、従来の化学療法に抵抗性で予後不良な **HER3** 低発現の大腸低分化型腺がん、ならびにやはり転移性が高く予後不良の **HER2** 陽性胃がんを標的とする分子標的治療に関し、前臨床における抗腫瘍効果とその分子機構について独自に樹立した日本人由来の胃がん・大腸がん細胞株を用いて解析し、以下の諸点を明らかにした。1) 大腸がん患者から樹立した高転移性の低分化型腺がん細胞株 (**COLM-5**) は **EGFR, HER2** を高発現するが、**HER3** は著しい低発現を示し、**EGFR** 標的薬である **Gefitinib** に対し高感受性を示すなどユニークな性質を有する。この低分化型大腸がん細胞株 (**COLM-5**) においては **HDAC** 阻害剤により **HER3** 発現亢進と **E-cadherin** などの分化誘導が見られること、**HER3** 強制発現によっても分化が誘導されること、さらに **HER3** 強制発現により **Gefitinib** 感受性が低下することを明らかにし、**HER3** が大腸がん細胞の分化や分子標的薬感受性に関与する可能性を示唆した。一方、これも当教室で樹立した日本人由来 **HER2** 陽性（遺伝子増幅）胃がん細胞株から **Trastuzumab** 耐性株を分離し、耐性株に対する **Dual EGFR/HER2** 阻害剤 (**Lapatinib**) の抗腫瘍効果を明らかにした。その機構として **PI3K/Akt** シグナル経路の遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期 **G1** 期停止の関与を明らかにし、全く異なった作用機構にもとづく両者の併用療法が **HER2** 陽性胃がん、ならびに **Trastuzumab** 耐性胃がんに対して極めて効果的であることを明らかにした。

A. 研究目的

1. 低分化型大腸がんにおける **HER3** 低発現の分子機構とその意義の解析
2. 低分化型大腸がん細胞株を用いた **HER3** 低発現と **Gefitinib** 感受性との関連
3. **HER2** 陽性胃がんに対する **Lapatinib** の抗腫瘍効果とその機構
4. **HER2** 高発現、**Trastuzumab** 耐性胃がんに対する **Lapatinib** の抗腫瘍効果とその機構

B. 研究方法

1. **HER3** 低発現を示す低分化型大腸がん細胞株 **COLM-5** と **HDAC** 阻害剤を用いて **HER3** の発現制御機構と意義を明らかにする。
2. **HER3** 低発現の **COLM-5** 細胞株に **HER3** の強制発現ならびにノックダウン系を構築し、**HER3** の分化および **Gefitinib** 感受性に及ぼす影響を明らかにする。
3. **HER2** 遺伝子増幅胃がん細胞株 (**GLM-1-**

4)を用いて Trastuzumab, Lapatinib に対する感受性を *in vitro*, *in vivo* で明らかにし、その作用機序を明らかにする。

4. *In vivo* 選択により作成した GLM-1,-4 細胞の Trastuzumab 耐性株を用いて Lapatinib の抗腫瘍効果とその作用機序、耐性機序を明らかにする。

C. 研究結果

1. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構とその意義の解析

HER3 低発現の COLM-5 細胞株を用いて Sodium Butyrate 等の HDAC inhibitor で処理したところ、HER3 発現誘導と同時に E-cadherin などの分化誘導がタンパクレベルでも mRNA レベルでも認められた。そこで HER3 発現誘導と分化誘導の因果関係を明らかにするために HER3 発現ベクターを構築し、HER3 を COLM-5 細胞に強制発現させたところ、やはり分化が誘導されたことから HER3 が大腸がん細胞の分化や EMT に関与する可能性を示唆した。ただし、分化型大腸がんの shRNA による HER3 ノックダウン実験では一部の細胞で EMT 様形質の発現を認めたが、必ずしも有意ではなく、さらなる検討が必要と考えられた。

2. 低分化型大腸がん細胞株を用いた HER3 低発現と Gefitinib 感受性との関連の検討

Sodium butyrate(NaBT)などの HDAC 阻害剤による HER3 の発現誘導では、Akt シグナルが活性化され、COLM-5 細胞の Gefitinib 感受性は軽度ながら低下した。HER3 発現ベクターのトランスフェクションにより COLM-5 細胞に HER3 を強制的に発現させたところ、*in vitro* において Gefitinib による増殖抑制が軽度ながら低下し、また *in vivo* においても Gefitinib のヌードマウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果が有意に低下したことから HER3 の Gefitinib 感受性への関与が示唆された。一方、逆に分化

型大腸がん細胞株 (HT-29)を shHER3 発現ベクターにより HER3 をノックダウンしたが、明瞭な Gefitinib 感受性増強は見られなかった。

3. HER2 陽性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

HER2 陽性胃がん細胞株に対する Trastuzumab 感受性を調べたところ、*in vitro* における増殖抑制は極く軽度で、有為なアポトーシス誘導および Akt のリン酸化抑制は認められなかった。一方、ヌードマウス皮下腫瘍系および腹腔内接種による腹膜転移に対しては抗体単独でも有意な増殖抑制、転移抑制が認められた。ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞を Effector 細胞として Trastuzumab による抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を 51Cr release assay により検討したところ、HER2 低発現胃がん細胞に比べて、HER2 高発現胃がん細胞では ADCC 活性が有意に高かった。以上のことから *in vivo* における抗腫瘍効果には主として抗体依存性細胞障害(ADCC)が関与する可能性が示された。

一方、Lapatinib (Dual EGFR/HER2阻害剤)は*in vitro*, *in vivo*ともに有為な抗腫瘍効果を示し、その機構としてPI3K/Aktシグナル経路の強力な遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期G1期停止が関与することを示し、Trastuzumabとは全く異なる機構によることを明らかにした。

4. HER2 高発現、Trastuzumab 耐性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

HER2 陽性 (遺伝子増幅) 胃がん細胞株 (GLM-1)は *in vitro* では Trastuzumab 抵抗性のため耐性株を得ることが困難である。そこで *in vivo* 選別により耐性株(GLM1-R1, -R2)を作成した。親株ならびにこの耐性株に対する Lapatinib の抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro*, *in vivo* ともに有為な抗腫瘍効果を示し、さらに併用療法において additive な抗腫瘍効果を明らかにした。また

耐性機序の検討では GLM1-R2 耐性細胞において FACS でははっきりしなかったが、ウエスタンブロットでは HER2 タンパクのダウンレギュレーションが見られ、これが耐性に関与する可能性を示唆した。

D. 考察

1. 低分化型大腸がんにおける HER3 低発現の分子機構とその意義の解析

低分化型大腸がん細胞株COLM-5の大きな特徴はHER3の発現が極めて低レベルであり、FACSやWestern blotでは殆ど痕跡程度しか検出できないことである。HER3低発現の原因に関しては、Sodium butyrateやトリコスタチンにより発現が誘導されることからヒストン脱アセチル化によるgeneサイレンシングが関与しているものと考えられる。上記処理により同時に分化も誘導されるのでHER3が上皮分化制御に関与している可能性が考えられた。実際、他の低分化型大腸がん細胞株であるRKO細胞でもトリコスタチン処理によりHER3と同時に腸分化マーカーであるMUC2の発現誘導がおこることを確認している。そこで次に発現ベクターを用いてHER3を強制発現させたところHER3安定発現株ではE-cadherin, CK20などの発現が亢進し、分化が誘導されることが明らかとなり、HER3が大腸がん細胞の分化やEMTに関与する可能性が示唆された。ただし、逆に分化型大腸がん細胞株HT-29のshRNAによるHER3ノックダウンではin vitroにおいて一部の細胞でEMT様形質発現が認められたが、現在までの検討ではヌードマウス移植腫瘍において明らかなEMTは認められていない。この原因としてはHER3のノックダウンが不十分である可能性が高く、今後新しいベクター系を用いて詳細な検討が必要である。

HDAC阻害剤は大腸低分化型腺がん株COLM-5細胞に対して本研究で明らかにした分化誘導と同時に強いアポトーシスも誘導す

ることも見いだしており、大腸低分化型腺がんに対する新しい治療法となる可能性も示唆された。

2. 低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)を用いたHER3低発現とGefitinib感受性との関連

HER3高発現とGefitinib抵抗性の関連に関してはこれまでに肺がんモデルでの報告はあるが、大腸がんでは報告されていない。HER3は細胞内のチロシンキナーゼが不活性化のため、EGFRやHER2とヘテロダイマーを形成し、Trans-phosphorylationを受けなければ自分自身だけでは下流にシグナルを伝達することができない。しかし、HER3はC末端にPI3Kp85サブユニットに対するドッキングサイトを持ち、PI3K/Aktシグナル経路の活性化に極めて重要な役割を果たしていることが知られている。これまでいくつかのがんでHER2の過剰発現やHER3の高発現がGefitinibなどの分子標的薬に対する耐性に関連するという報告がなされているが、これはHER2/HER3の高発現によりヘテロダイマーの形成が促進され、PI3K/Akt経路が構成的に活性化されるためGefitinib等による上記経路の効果的なブロックが困難であることに起因すると考えられる。これに対し、COLM-5細胞では逆にHER3の発現レベルが著しく低く、Gefitinib等によるAktシグナル経路のブロックが容易なため、GefitinibによりP27が発現誘導され、細胞周期停止により抗腫瘍効果がもたらされるものと考えられる。

以上のことから、HER3は大腸がんの分化およびgefitinib抵抗性の両面に関与し、両者が関連している可能性が示唆される。実際、分化型大腸がんではHER3の発現陽性頻度が高く、EGFR+/HER2+/HER3+パターンを示すがんが多い。このことが恒常的なHER3/PI3K/Aktシグナル経路の活性化をもたらし、Gefitinib抵抗性のひとつの原因になっている可能性が考えられる。そこで今回、分化型大腸がん細胞のHER3をノックダウン

してGefitinib感受性増強ならびに分化抑制がおこるか否かについて検討したが、現時点では有為な結果は得られていない。今後別のベクター系を構築してさらに詳細に検討を進める予定である。

3-4. HER2 陽性胃がん、Trastuzumab 耐性 HER2 陽性胃がんに対する Lapatinib の抗腫瘍効果とその機構

Trastuzumabは遺伝子増幅を伴うHER2高発現胃がん細胞に対してはin vitroではアポトーシス誘導を示さず、軽度の増殖抑制しか示さないが、in vivoの皮下腫瘍、腹膜転移に対しては単独でも有為な抗腫瘍効果、転移抑制効果を有することからシグナル伝達経路の抑制よりも抗体依存性細胞障害活性(ADCC)が主として関与する可能性をこれまでに明らかにしている。

本研究では上記 Trastuzumab とは全く抗腫瘍効果の作用機序が異なり、PI3K/Akt シグナル経路の遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止を作用機序とする Lapatinib の単独あるいは Trastuzumab との併用療法が HER2 陽性胃がんならびに Trastuzumab 耐性胃がんに対して極めて有効であることを実験的に初めて明らかにした。

HER2 陽性進行胃がんに対しては、化学療法に Trastuzumab を併用する群としない群の2アームの国際共同の大規模な第 III 相試験 (TOGA study)の結果に続いて、現在、化学療法に Lapatinib を併用する群としない群の2アームの大規模な第 III 相試験 (LOGiC Trial)が進められている。今回の我々の前臨床試験の結果からも、Lapatinib の臨床試験の結果が待たれるところである。胃がん肝転移の約半分は HER2 高発現と考えられ、そのうちかなりの症例が HER2 遺伝子増幅を有すると予想されることから、HER2 を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不

良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、Trastuzumab、Lapatinib などの分子標的薬など作用機序の異なる薬剤を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待できる。

E. 結論

低分化型大腸がん細胞株(COLM-5)において HDAC 阻害剤により HER3 発現亢進と分化誘導が見られること、HER3 強制発現により分化が誘導されることから HER3 が大腸がん細胞の分化や EMT に関与する可能性を示唆した。ただし、分化型大腸がんの HER3 ノックダウンにより一部の細胞に EMT 様形質が発現する傾向が見られたが必ずしも有意ではなく、今後更なる検討が必要と考えられた。一方、当教室で樹立した日本人由来 HER2 陽性胃がん細胞株から Trastuzumab 耐性株を分離し、耐性株に対する Dual EGFR/HER2 阻害剤 (Lapatinib) の抗腫瘍効果ならびにその機構として PI3K/Akt 経路の遮断によるアポトーシス誘導と細胞周期 G1 期停止の関与を明らかにし、Lapatinib と Trastuzumab の併用療法が HER2 陽性胃がんならびに Trastuzumab 耐性胃がんに対する新しい治療法となりうることを示唆した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ito, Y., Nakanishi, H., Kodera, Y., Hirai, T., Nakao, A. Kato, T. Characterization of a novel lymph node metastasis model from human colonic cancer and its preclinical use for comparison of anti-metastatic efficacy between oral S-1 and UFT/LV. Cancer Sci, 101: 1853-1860,

- 2010.
2. Matsui, M., Shimizu, Y., Ikehara, Y., Kondo, E., Kodera, Y., Nakanishi, H. Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci*, 101: 1670-1677, 2010
 3. Nakanishi, H., Ito, S, Matsui, M, Murakami, H, Kodera, Y.: "In Vivo Imaging" *Methods and Protocols*, Hoffman, R. M. (ed.), Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. Humana Press, Totowa, NJ. in press.

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)
分担研究報告書

胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究

研究分担者 関戸好孝

愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨 悪性腫瘍は様々なジェネティック異常およびエピジェネティック変化の蓄積により発生・進展する。胸部腫瘍の中でも悪性胸膜中皮腫は標準的な化学療法、放射線療法に対して極めて抵抗性が高く、患者予後は不良である。悪性中皮腫細胞株に対して TGF-beta シグナル伝達系の刺激は悪性中皮腫細胞の細胞増殖を促進することを認め、TGF-beta 阻害薬は *in vitro* および *in vivo* にて悪性中皮腫細胞の増殖を抑制することを明らかにした。TGF-beta 刺激により結合組織成長因子(CTGF)をはじめとする各種の細胞間基質に関わる遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。一方、アレイ CGH 解析を行い、染色体 13q12 領域にホモザイガス欠失を同定した。欠失領域内に Merlin(NF2 遺伝子産物)-Hippo シグナル伝達系の構成分子である LATS2 遺伝子が局在しており、中皮腫細胞株 20 株中 7 株において不活性化変異を認め LATS2 遺伝子は悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした。Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベーターであるがん遺伝子 YAP の恒常的活性化を引き起こし、同様に CTGF の発現を誘導した。これらの結果は悪性中皮腫細胞における TGF-beta シグナル伝達系の活性化と Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は共に中皮腫細胞の増殖や進展にポジティブに関与するだけでなく、協調して CTGF の転写を亢進し細胞間質における線維化の増強などにも関与することを強く示唆した。

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫は極めて難治の胸部悪性腫瘍である。ゲノム変異やエピジェネティック異常、さらにそれらによって引き起こされる細胞内シグナル伝達系の異常に関する知見も他の頻度の高い腫瘍に比べて極めて乏しい。本研究では悪性中皮腫における新たなゲノム異常を同定し、その遺伝子産物に関わる細胞内シグナル伝達系を標的とした新規治療戦略を構築することを目的とする。同時に小分子化合物や既知の阻害剤に対する中皮腫細胞の感受性や細胞特性を検討する。これらのアプローチにより、より有効な治療標的分子・標的シグナル伝達系を見出すとともに、複数の小分子化合物・阻害剤

の組み合わせによる合理的な併用療法を確立し、悪性中皮腫に対する新たな治療戦略開発を試みる。

B. 研究方法

中皮腫細胞株は当部で樹立した中皮腫細胞株(Y-MESO-9, Y-MESO-14, Y-MESO-27 など 14 株)、Dr. Adi F. Gazdar あるいは ATCC から供与を受けた中皮腫細胞株(NCI-H290, MSTO-211H など 5 株)および不死化正常中皮細胞(MeT-5A)を使用した。

アジレント社の 44K オリゴアレイを用いて網羅的発現解析、また 244K ヒト全ゲノムオリゴアレイを用いて comprehensive genomic hybridization (CGH) 解析を行った。遺伝子

変異はシーケンシング法にて検討した。個々の遺伝子・蛋白発現およびリン酸化修飾は **real-time RT-PCR** 法、ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色法などを用いた。

細胞内への遺伝子導入は、**plasmid** 発現ベクターおよびレンチウイルス (**pLL3.7**) を用いた。細胞増殖は細胞数および **MTT** アッセイ法にて検討した。動物移植モデルは **KSN/Sc1** ノードマウス (6-8 週、雌) を用いた。細胞株 5×10^6 個を皮下移植し、皮下腫瘍径は隔日に測定した。胸腔および腹腔へは同様に細胞株 5×10^6 個を移植し、隔日にマウスの体重および生存をモニターし、生存曲線はカプランマイヤー法にて記載し、**log-rank** 法にて有意差を検定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. TGF- β 阻害による悪性中皮腫細胞の腫瘍抑制効果

悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-14, Y-MESO-27, NCI-H290) および不死化正常中皮細胞 (MeT-5A) に対して、TGF- β 刺激により SMAD2 のリン酸化が増強し、細胞増殖が誘導されることを明らかにした。TGF- β 投与により発現される遺伝子をアジレント社のオリゴアレイを用いて解析し、MMP-2, CTGF, Col1A1, TGF- β など細胞間質に関わる遺伝子群が有意に発現誘導されることを明らかにした。一方、TGF- β 阻害剤 (SD208) を *in vitro* で細胞株に添加したところ中皮腫細胞株の増殖が抑制されることが明らかとなった。さらに、中皮腫細胞株をヌードマウスの胸腔内に移

植し、SD208 を隔日経口投与したところ対象群に比べて有意に生存が延長した。

2. 悪性中皮腫における LATS2 遺伝子異常の同定

中皮腫細胞株を用いたアレイ CGH 解析により、染色体 13q11 領域のホモザイガス欠失を 3 株で同定し、欠失領域内に LATS2 遺伝子が局在することを明らかにした。さらにゲノム PCR およびシーケンシング法により複数の遺伝子変異を見出し、合計 20 細胞株中 7 株において LATS2 遺伝子の欠失・不活型変異が認められることを明らかにした。LATS2 遺伝子が不活性化していた中皮腫細胞株に対して LATS2 遺伝子を導入したところ、細胞増殖能、コロニー形成能および浸潤能を抑制することを確認し、LATS2 遺伝子が中皮腫における新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした。LATS2 遺伝子産物は Hippo 細胞内シグナル伝達系の構成分子であり、転写コアクチベーターである YAP がん遺伝子産物を制御することが知られている。LATS2 遺伝子が不活性化した細胞株では、細胞培養条件下で細胞密度が上昇しても YAP の低リン酸化 (転写コアクチベーターとして活性型) および核内局在が保持され、細胞増殖が抑制されないことが明らかになった。

3. TGF- β 系の活性化および Hippo シグナル伝達系の不活性化による CTGF の発現増強

CTGF のプロモーター領域に YAP および SMAD2 が結合することをクロマチン免疫沈降法等によって明らかにした。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、CTGF は YAP および SMAD2 によって転写が亢進することが明らかとなった。

4. HDAC 阻害剤による中皮腫細胞抑制効果の検討

複数の中皮腫細胞株に対して SAHA などの

HDAC 阻害剤を *in vitro* において投与してその増殖抑制能を検討した。効果の認められた細胞株をヌードマウスに皮下移植して HDAC 阻害剤を腹腔内投与して腫瘍体積の変化を観察した。その結果、*in vitro* に比べ *in vivo* において HDAC 阻害剤の腫瘍抑制効果は限定的であることが明らかになった。

D. 考察

悪性中皮腫細胞において新規の腫瘍抑制遺伝子 LATS2 を同定し、約20%の細胞株で不活型変異を来していることを明らかにした。Merlin (NF2 腫瘍抑制遺伝子産物)が約40–50%の症例で不活性化していることを考えると、Merlin-Hippo シグナル伝達系は中皮腫の70–80%において不活性化しており、中皮腫の発症・進展に極めて重要な役割を占めていることが明らかとなった。この不活性化により、転写コアクチベーターとして機能する YAP が不遺伝子産物が恒常的に活性化され、腫瘍細胞の増殖に関わる様々な遺伝子の転写に関わり、CTGF 遺伝子もその一つであることが示唆された。一方、TGF- β シグナル伝達系は悪性中皮腫細胞の増殖にポジティブに働き、このシグナル伝達系を抑制することは悪性中皮腫の有力な治療戦略になるものと考えられた。TGF- β 系は中皮腫細胞において細胞間質に関わる各種の遺伝子の転写に関わることが明らかとなったが、CTGF もその遺伝子の一つであることが明らかとなった。以上により、TGF- β 系の活性化、Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化は、それぞれ悪性中皮腫細胞の増殖を促進するだけでなく、協調して CTGF の発現を亢進し、悪性中皮腫の線維化など癌間質の形成にも関わることが示唆された。

E. 結論

悪性中皮腫において Merlin-Hippo シグナル伝達系に関わる LATS2 遺伝子が新規腫瘍抑

制遺伝子であり、悪性中皮腫の約 20%で不活性化していることを明らかにした。NF2 遺伝子異常を含めると、Merlin-Hippo 伝達系は中皮腫の約80%で不活性化し、YAP 転写コアクチベーターの恒常的活性化が引き起こされていることを明らかにした。

TGF- β 系は中皮腫細胞の増殖促進に働き、TGF- β 阻害剤は *in vitro* および *in vivo* において中皮腫の細胞抑制を誘導することが明らかとなった。中皮腫細胞における TGF- β 系の活性化は細胞間質に関わる遺伝子群を有意に発現増強していることが明らかとなった。

CTGF 遺伝子は Merlin-Hippo シグナル伝達系の不活性化および TGF- β 系の活性化による両者の協調によって発現が著しく増強され、悪性中皮腫の線維化を含む癌間質の形成に関与していることが示唆された。これらの知見を元に、両シグナル伝達系を制御することが悪性中皮腫の新たな併用分子標的治療法につながることを示唆された。

一方、HDAC 阻害剤は *in vitro* における細胞増殖抑制効果は認められたものの、*in vivo* における効果は限定的であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tajima, K., Ohashi, R., Sekido, Y., Hida, T., Nara, T., Hashimoto, M., Iwakami, S., Minakata, K., Yae, T., Tahahashi, F., Saya, H., Takahashi, K.: Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. *Oncogene*, 29: 1941–1951, 2010.

2. Takemura, Y., Satoh, M., Satoh, K., Hamada, H., Sekido, Y., Kubota, S: High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *BBRC*, 394: 249-253, 2010.
 3. Hwang, JH., Takagi, M., Murakami, H., Sekido, Y., Shin-Ya, K.: Induction of tubulin polymerization and apoptosis in malignant mesothelioma cells by a new compound JBIR-23. *Cancer Lett*, 300: 189-196, 2011.
 4. Murakami, H., Mizuno, T., Taniguchi, T., Fujii, M., Ishiguro, F., Fukui, T., Akatsuka, S., Horio, Y., Hida, T., Kondo, Y., Toyokuni, S., Osada, H., Sekido, Y.: LATS2 Is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma. *Cancer Res*, 71: 873-883. 2011.
 5. Ali, AH., Takizawa, H., Kondo, K., Matsuoka, H., Toba, H., Nakagawa, Y., Kenzaki, K., Sakiyama, S., Kakiuchi, S., Sekido, Y., Sone, S., Tangoku, A.: 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor. *Lung Cancer*, in press.
2. 学会発表
1. Sekido Y., Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Murakami H: Inactivation of LATS2 indicates frequent dysregulation of the Merlin-Hippo signaling pathwa in malignant mesothelioma. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (京都) (ポスター)
 2. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Ueda Y, Yokoi K, Osada H, Sekido Y.: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation via induction of CCDN1 expression. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (京都) (ポスター)
 3. Murakami H, Kawata S, Taniguchi T, Kawaguchi K, Misuno T, Ishiguro F, Fujii M, Kondo Y, Osada H, Sekido Y.: Expression and functional analysis of Hairy Enhancer Split 1 (HES1) in human malignant mesothelioma cell lines. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (京都) (ポスター)
 4. Horio M, Sato M, Takeyama Y, Hase T, Yoshida K, Sekido Y., Kondo M, Hasegawa Y: Knockdown of ZEB1, a master epithelial mesenchymal transition (EMT) inducing gene, suppresses growth of pleural mesothelioma cell lines. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (京都) (ポスター)
 5. Ishiguro F, Murakami H, Misuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y.: Activated leukocyte cell adhesion molecule is involved in motility and invasion of malignant pleural mesothelioma. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (京都) (ポスター)
 6. 藤井万紀子、豊田武士、長田啓隆、谷田

- 部恭、松平康枝、村上秀樹、近藤豊、樋田豊明、関戸好孝: TGF-beta controls the Malignant Mesothelioma cell growth synergistically with YAP。第 69 回日本癌学会学術総会 2010(大阪)(口演)
7. 村上秀樹、谷口哲郎、藤井万紀子、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝: 悪性中皮腫の増殖および浸潤における転写コアクチベーターYAP/TAZ の生物学的役割。第 69 回日本癌学会学術総会 2010(大阪)(ポスター)
 8. 村上秀樹、谷口哲郎、水野鉄也、石黒太志、関戸好孝: 高密度 CGH アレイを用いた悪性中皮腫細胞株における染色体欠失・増幅領域の網羅的解析。第 51 回日本肺癌学会総会 2010 (広島)(口演)
 9. 石黒太志、村上秀樹、水野鉄也、宇佐美範恭、横井香平、関戸好孝: 悪性中皮腫における ALCAM/CD166 発現の解析。第 51 回日本肺癌学会総会 2010 (広島)(ポスター)
 10. 水野鉄也、村上秀樹、石黒太志、豊國伸哉、横井香平、関戸好孝: 悪性胸膜中皮腫における YAP を介した細胞増殖機構の解析。第 51 回日本肺癌学会総会 2010 (広島)(ポスター)
 11. Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. 2nd Workshop on the Hippo Tumor Suppressor Pathway. 2010 (イタリア、ローマ)(ワークショップ)
 12. 関戸好孝: 悪性中皮腫細胞における NF2 (マーリン)-Hippo シグナル伝達系の異常 BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同学会) 2010 (神戸)(ワークショップ)

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）
分担研究報告書

ヒト腫瘍の発生・進展・悪性化に関わる細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索

研究分担者 稲垣 昌樹
愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨：正常上皮細胞の分化の特徴は、はっきりした極性や細胞間接着などに見られ、またこのような分化と増殖は相反する。一方がんではこれらの分化の特徴がしばしば消失し、また無秩序な増殖が起こる。ケラチンは分化上皮細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白質であるにも関わらず、がんに関わりの深い上皮分化制御についての研究は立ち遅れていた。私どもは、ケラチン結合蛋白質アルバトロスとトリコプレインの解析を通じてケラチンおよびこれらの分子が上皮細胞の分化制御に関わるという新知見を増やしつつある。この2つの分子をそのアミノ酸配列から **TPHD**（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン）分子群と名付けた。**TPHD** 分子群の特徴は、分化状態では主に細胞間接着部位に、そして増殖中は主に中心体に局在を変えていくことである。このことは、**TPHD** 分子群が分化と増殖の両方の分子メカニズムに関わる **bi-player** 分子であることを示唆している。つまり個々のメカニズムの解析と統合により、がん化に関わる新たなメカニズムの解明が期待できる。本年はこの **TPHD** 分子群の主にトリコプレインの中心体機能解析について、以下の進展を見た。トリコプレインは中心体、詳細には母中心小体遠位端で微小管の係留を行っており、その分子基盤はナイニン、**Odf2** を介していることを報告した。続いて、トリコプレインの中心体での一次線毛形成抑制について、その分子機構となるオーロラ **A** キナーゼ活性化および **Odf2** 機能抑制に必要なドメイン配列の絞り込みを進めた。さらに一次線毛が生じない処理により、トリコプレイン機能を欠失させても細胞周期休止が停止しなくなることも明らかにしつつある。これは分化を含めた細胞周期制御機構全体におけるトリコプレイン-**Aurora-A** キナーゼ活性系の特異性を示す重要な知見である。

A. 研究目的

発がんに関わりの深い上皮細胞の極性形成・維持の調節機構の研究では、アクチンや微小管細胞骨格系の視点によるものに比べ、ケラチン（中間径フィラメント）細胞骨格系およびその結合蛋白質の視点から行われた研究が立ち遅れていた。私どもは、新規ケラチン結合蛋白質分子群として、**TPHD**（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン）を有するアルバトロス、トリコプレインを同定した。

現在までに、**TPHD** 分子群が細胞の分化相と増殖相に応じて、細胞間接着部位あるいは中心体に局在する **bi-player** 分子であることを見出し、その機能的知見を増やしつつある。最終目標は、これらの分子の分化と増殖状態のそれぞれにおける細胞機能制御機構の解明であり、さらに **TPHD** 分子群の解析を通して得られる結果を統合していくことで、細胞分化と増殖の二律背反を分子レベルで理解し、がん化に関わる新たなメカニズムの解明を目指す。本年

は、特にトリコプレインの中心体での分化増殖制御機能の解析に焦点を置いた。

B. 研究方法

1. トリコプレインの中心体局在の解析

それぞれに特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を高解像度顕微鏡（デルタビジョン）により確認した。また、分画を調整しそのイムノブロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。

2. 分子間結合実験

イーストハイブリッド法、免疫沈降法、リコンビナント精製蛋白質による *in vitro* 結合実験を適宜行った。

3. オーロラ A キナーゼアッセイ

HeLa 細胞を用い、トリコプレインとオーロラ A の共発現によるオーロラ A リン酸化 (pT288) の変化を検討した。また *in vitro* のキナーゼ活性変化はトリコプレインとオーロラ-A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン H3 を基質にすることで検討した。

4. トリコプレインの中心体機能の解析

siRNA による機能欠失、すなわちノックダウンを HeLa あるいは RPE1 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色により解析必要な分子の検討をした。トリコプレイン機能欠失による一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。表現型の確認のためには適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

5. トリコプレインの細胞周期制御の検討

RPE1 細胞では一次線毛形成と細胞周期停止は同時に起こることが知られている。そこでトリコプレインの細胞周期への直接影響の有無をみるために、一次線毛を生じない系を 2mM 抱水クロラルール 1 日間前処理により確立し、これに siRNA を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組み換え実験等安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. トリコプレインの中心体機能の解析

1-1 微小管係留機能

トリコプレインの細胞内局在については、極性化すなわち分化した上皮細胞ではケラチンフィラメント上と細胞間接着部位にあるが、増殖中の細胞では中心体、詳細には母中心小体にもあることを見出した。母中心小体の機能は、その付属器への微小管の係留と増殖休止期における一次線毛形成が知られている。

そこで、微小管係留との関連について検討した。RNA 干渉法によりトリコプレインを HeLa 細胞でノックダウンし、免疫染色と微小管再生実験を行ったところ、母中心小体付属器へのナイニンの局在化障害とそれによる微小管係留の障害が確認された。トリコプレインとナイニンの結合は、イーストハイブリッド法、免疫沈降法および *in vitro* 結合実験により示された。また、このトリコプレインの局在化は Odf2 に依存することと、トリコプレイン、ナイニン、Odf2 は複合体を形成することを同様に確認した。

1-2 一次線毛形成抑制機能

一次線毛形成との関連については以下のような結果を得た。血清飢餓による増殖停止で一次線毛が形成されると RPE1 細胞ではトリコプレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコプレインを強制発現すると、一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態でトリコプレインノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。同時に細胞周期の停止を認めた。この時オーロラ A キナーゼの活性化の指標である T288 の

リン酸化は免疫染色およびイムノブロットで減弱した。この一次線毛形成はオーロラ・A ノックダウンでも見られた。さらに、トリコプレインとオーロラ A キナーゼの直接結合を *in vitro* で確認し、*in vitro* キナーゼアッセイではトリコプレインがオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。また、この一次線毛形成が **Odf2** 依存的事であることをトリコプレインと **Odf2** のダブルノックダウンにより確認した。これらの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化および **Odf2** 機能抑制に必要なドメインが、少なくともトリコプレインの 1-130 アミノ酸残基内にあるところまで絞り込んだ。

1-3 細胞周期制御との関与

さらに一次線毛形成と細胞周期停止は同時に起こることが知られていたため、一次線毛を除去する系を確立し、その条件下でトリコプレイン機能抑制を行ったところ、細胞周期休止にはいたらないことが増殖マーカーすなわち **Cyclin A** の発現、**BrdU** の取り込み、**FACS** での **S, G2/M** 期の存在により明らかになった。つまり、トリコプレイン機能抑制は一次線毛形成をおこすがそれは細胞周期休止に因らないことを示唆している。従来より **Aurora-A** の活性化は細胞周期制御において特に紡錘体形成のための中心体成熟に必要と言われてきたが、この度の結果はトリコプレイン・**Aurora-A** キナーゼ活性系による一次線毛形成抑制の特異性を表しており、分化と増殖の転換機構における新たな発見といえる。

D. 考察

トリコプレインの中心体機能の特異性が、一次線毛形成抑制を含めた分化・増殖制御との関わりにおいて示せつつある。オーロラ A キナーゼの機能は活性化因子に依存して多様で、細胞分裂に伴う紡錘体形成のための中心体成熟に加え、非対称分裂や一次線毛形成

抑制等、様々な分化・増殖制御との関連の報告が増えつつあるが、トリコプレイン・オーロラ A 活性化経路による一次線毛形成抑制の特異性を示せることの意味は大きい。特に一次線毛は増殖シグナルが入るアンテナとしても機能しており、より特異性の高いがん関連増殖機構の解明にもつながり得るため、確証を得るための多角的検討が必要である。

E. 結論

現時点での解析結果を統合すると、分化上皮細胞の細胞間接着部位にアルバトロスとトリコプレインは局在し、そのうちアルバトロスは極性化分子 **Par3** と複合体を形成し、細胞極性を制御している。また、ケラチンはこの機能に対し促進的に働いている。中心体での分化増殖制御としては、アルバトロスは微小管重合核制御、トリコプレインは微小管係留そして細胞周期制御に因らない一次線毛形成抑制が明らかになりつつある。

今後、これらの未解決な分子機構を結合分子の検索等も駆使して補完し、その分子メカニズムの相違点を明らかにし、統合していくことで、**bi-player** 分子群およびケラチンによる上皮細胞の新規分化増殖制御機構の全容解明につなげたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M., Mizutani, S. and Teraoka, H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5: e8821, 2010

2. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Dimova, N., Trucchi, B., Srinivasan, C., Elliott, G.I., Zhan, C.G., Lau, D.L., Zhu, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Cambi, F. and Mohan, R. Withaferin A targets intermediate filaments glial fibrillary acidic protein and vimentin in a model of retinal gliosis. *J. Biol. Chem.* 285:7657-7669, 2010
 3. Kawase, T., Matsuo, K., Suzuki, T., Hirose, K., Hosono, S., Watanabe, M., Inagaki, M., Iwata, H., Tanaka, H. and Tajima, K. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci.* 101: 1234-1240, 2010
 4. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 γ mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* 29: 2802-2812, 2010
 5. Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H. and Inagaki, M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome through its binding to centriolar proteins, Odf2 and ninein. *J. Cell Sci.* 124: 857-864, 2011
 6. Helfand, B.T., Mendez, M.G., Murthy, S.N., Shumaker, D.K., Grin, B., Mahammad, S., Aebi, U., Wedig, T., Wu, Y.I., Hahn, K.M., Inagaki, M., Herrmann, H. and Goldman, R.D. Vimentin Organization Modulates the Formation of Lamellipodia. *Mol. Biol. Cell* in press
 7. Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N. and Inagaki, M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J. Cell Sci.* in press
2. 学会発表
1. 稲垣昌樹, 笠原広介, 李萍, 後藤英仁: 抗リン酸化ペプチド抗体とチェックポイントシグナル. H22 生化学会中部支部例会, 2010, (名古屋), [シンポジウム]
 2. 稲垣昌樹: 多彩なリン酸化によってチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) は機能修飾される. 日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム, 2010, (松島), [シンポジウム]
 3. Izawa, I., Hayashi, Y., Inagaki, M.: Interaction of Scribble, a LAP family protein, with p0071. Interaction of Scribble, a LAP family protein, with p0071. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010, (大阪), [ポスター]
 4. Inoko, A., Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuyama, M., Enomoto, M., Zou, P., Ibi, M., Kiyono, T., Yonemura, S., Goto, H., Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin-binding protein, suppresses a cilia assembly program. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010, (大阪), [ポスター]
 5. Kasahara, K., Goto, H., Kiyono, T., Inagaki, M.: PP2A antagonizes Chk1 phosphorylation by ATR through 14-3-3 proteins in DNA damage checkpoint. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010, (大阪), [ポスター]
 6. Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Kiyono, T., Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation at Ser280 by p90 ribosomal S6 kinase

- (RSK). 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010, (大阪), [ポスター]
7. 李萍, 後藤英仁, 笠原広介, 松山誠, 清野透, 稲垣昌樹: 増殖刺激応答における Chk1-Ser280 のリン酸化反応. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010, (神戸), [ポスター]
 8. 松山誠, 後藤英仁, 笠原広介, 川上和孝, 井澤一郎, 榎本将人, 小堀恭子, 中西真, 清野透, 五島直樹, 稲垣昌樹: 中心体ではなく核に局在する Chk1 が細胞周期において重要な役割を果たす. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010, (神戸), [ポスター]
 9. 李萍, 後藤英仁, 笠原広介, 松山誠, 稲垣昌樹: Chk1 is phosphorylated at Ser280 by p90 ribosomal S6 kinase (RSK) in response to serum stimulation. 第 3 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2011, (大府), [ポスター]
 10. Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Ibi, M., Hayashi, Y., Kiyono, T., Yonemura, S., Urano, T., Izawa, I., Inagaki, M.: Trichoplein, the centriolar Aurora-A and Odf2 partner, blocks cilia assembly. 第 3 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2011, (大府), [ポスター]
 11. 稲垣昌樹: 癌治療に向けての新しい標的分子の探索. 第 32 回泌尿器科分子・細胞研究会, 2011, (津), [シンポジウム]

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kumar, V., Matsuo, K., Takahashi, A., Hosono, N., Tsunoda, T., Kamatani, N., Kong, SY., Nakagawa, H., Cui, R., Tanikawa, C., <u>Seto, M.</u> , Morishima, Y., Kubo, M., Nakamura, Y., Matsuda K.	Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility.	J Hum Genet	in press		
Umino, A., Nakagawa, M., Utsunomiya, A., Tsukasaki, K., Taira, N., Katayama, N., <u>Seto, M.</u>	Clonal evolution of adult T-cell leukemia/ lymphoma takes place in lymph node.	Blood	in press		
Ali, AH., Takizawa, H., Kondo, K., Matsuoka, H., Toba, H., Nakagawa, Y., Kenzaki, K., Sakiyama, S., Kakiuchi, S., <u>Sekido, Y.</u> , Sone, S., Tangoku, A.	5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor.	Lung Cancer	in press		
Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N. and <u>Inagaki, M.</u>	Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry.	J Cell Sci	in press		
Helfand, B.T., Mendez, M.G., Murthy, S.N., Shumaker, D.K., Grin, B., Mahammad, S., Aebi, U., Wedig, T., Wu, Y.I., Hahn, K.M., <u>Inagaki, M.</u> , Herrmann, H., Goldman, R.D.	Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia.	Mol Biol Cell	in press		
Kato, H., Kagami, Y., Kodaira, T., Oka, S., Oki, Y., Chihara, D., Taji, H., Yatabe, Y., Nakamura, T., Nakamura, S., <u>Seto, M.</u> , Yamamoto, K., Morishima, Y.	Nodal relapse after helicobacter pylori eradication in a patient with primary localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.	Am J Gastroenterol	106	549-551	2011
Murakami, H., Mizuno, T., Taniguchi, T., Fujii, M., Ishiguro, F., Fukui, T., Akatsuka, S., Horio, Y., Hida, T., Kondo, Y., Toyokuni, S., Osada, H., <u>Sekido, Y.</u>	LATS2 Is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma.	Cancer Res	71	873-883	2011
Hwang, JH., Takagi, M., Murakami, H., <u>Sekido, Y.</u> , Shin-Ya, K.	Induction of tubulin polymerization and apoptosis in malignant mesothelioma cells by a new compound JBIR-23.	Cancer Lett	300	189-196	2011
Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H. and <u>Inagaki, M.</u>	Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome through its binding to centriolar proteins, Odf2 and ninein.	J Cell Sci	124	857-864	2011