

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）
平成21-23年度分担研究報告書

レトロウイルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定とがんの早期診断治療への応用に関する研究

研究分担者 東京大学医科学研究所 細胞療法分野
教授 北村俊雄

研究要旨

本研究プロジェクトにおいて、1年目は主に難治疾患性の高い膵臓がんについて、2年目は前立腺がん、膵臓がん、胃がん、グリオブラストーマ、膀胱がん、そして3年目は腎臓がんと大腸がんを加え、さらに全がん種についての解析数を増やし、よりよいがん細胞マーカーを見つける事を目的とした。3年間の継続解析の結果、総計3804クローンの解析を行い、のべ963種類の遺伝子同定を行った。これらががん細胞マーカー候補分子の一部に対して抗体を作製した。SST-REX法で得られるSSTクローン（ヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞膜上に発現しているマウス細胞）を利用することによって効率良くモノクローナル抗体を作製できることが確認され、さらには得られた抗体が抗腫瘍活性などの生理活性機能を有する事が確認された。つまり、膜蛋白質や分泌蛋白質といったターゲットを探索しそれと同時に免疫原となるSSTクローンを樹立できるSST-REX法、さらにはSSTクローンの特徴である、動物細胞由来の翻訳後修飾、マウス細胞(Ba/F3)表面へのヒト蛋白質の発現などから、native proteinを認識し、生理活性を持つモノクローナル抗体を効率よく作製できるのである。

組織に特異的に発現を認める蛋白質、あるいはがん診断に適した抗体を探索する目的で、分担研究者である研究分担者福岡らが作製した高集積がん組織アレイによる、正常組織、がん組織における発現プロファイリングを行った。

これらの研究を通じて、がん種特異的な染色パターンを示し、担がんモデルマウスにおける動物試験においてがん細胞増殖抑制効果を有する抗体を2種樹立することができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、がん疾患を対象とした抗体を用いた治療、診断を目指している。in vitroでの培養細胞系での機能試験、あるいは担がんモデルマウス等を用いた in vivo 試験により治療効果を評価する。

平成23年度は、開発したモノクローナル抗体の薬効機能を評価した。また、平成22年度までの結果で、取得したモノクローナル抗体が固定標本である高集積がん組織アレイでは使用できないことが多く、平成22年度は免疫法に工夫をしてモノクロー

一ナル抗体を再度作製したが、平成23年度はこれらの抗体の高集積がん組織アレイでの解析も併せて行なった。

B. 研究方法

研究代表者の北村は、SST-REX法を利用して各種癌抗原に対するモノクローナル抗体を網羅的に作製し、これらの抗体の染色特異性、がん細胞株に対する増殖抑制効果を調べる。

<シグナルシークエンストラップ法 SST-REX を利用した網羅的モノクローナル抗体作製法>

本研究では、研究代表者らが開発した高効率かつ正確なシグナルシークエンストラップ法 SST-REX を利用して、がん特異的抗原を同定し、モノクローナル抗体を網羅的に作成する。特定のがん細胞からシグナルシークエンストラップ用のライブラリーを作成し SST-REX 法でスクリーニングを行うと、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 にヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質がサイトカインレセプター-MPL との融合蛋白質として一種類ずつ発現する細胞カタログが得られる。SST-REX 法では、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞の自律増殖能獲得を指標としてライブラリーをスクリーニングする。実験の原理は、シグナルシークエンスを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が恒常的活性型サイトカインレセプター-MPL と融合して Ba/F3 表面に発現された場合は細胞の自律増殖が誘導されることである。自律増殖能を獲得した細胞に挿入されている cDNA は PCR で容易に回収できる。シグナルシークエンスを持たない蛋白質が恒常的

活性型 MPL と融合しても細胞の自律増殖は誘導できない。

<モノクローナル抗体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性の検定>

取得したモノクローナル抗体の各種がん細胞株に対する増殖抑制公開を評価するため、培養系に抗体を添加しがん細胞株の増殖に対する影響を WST 法で調べた。がん細胞株は、各がん種について下記の細胞株を選択した。

脳腫瘍細胞：U251、U87MG、T98G

すい臓がん細胞：BxPC3、AsPC1

胃がん細胞：MKN1

スキルス胃がん細胞：GCIY

前立腺がん細胞：PC3、Du145

膀胱がん細胞：T24

各細胞株を 3000 個/well になるように、96well マイクロプレートに播種後、1 晩培養し細胞の接着を確認した。培養液に抗体の培養上清を添加し、抗体添加後 3 日間培養した後、培養液をアスピレーターで除去し、WST-1 試薬入りの培地に培地交換した。5% CO₂/37°C インキュベーターで 4 時間培養し、吸光度 A_{450nm} を測定した。3 日間培地のみで培養したウエルを陰性コントロールとして使用し、吸光度を 100% として抗体添加ウエルならびに陽性コントロール添加ウエルの吸光度の割合を計算した。

<モノクローナル抗体の *in vivo* 細胞増殖抑制活性の検定>

上記試験で活性を認めたモノクローナル抗体について、担がんモデルマウスによる動物試験を行なった。SCID マウスを購入後 1 週間、環境馴化のため飼育した。その

後各細胞株をマウス頸背部皮下に接種し、約5mm角の腫瘍形成を認めるまで3~4週間飼育した。5mm角の腫瘍を確認し、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、抗体治療群の各群の均等性を保つため、群分けを行った。

ネガティブコントロールとして生理食塩水、ポジティブコントロールとして抗がん剤 (Taxotere) を使用し、抗体を 10mg/kg の投与量で1週間に1回ずつ3週間 (合計3回) 投与し、治療した。

投与開始を0週として計算し、ノギスでの短径、長径測定による体積変化を測定し、最終治療の1週間後に剖検した。

<再度作製した抗体の高集積がん組織アレイでの検定>

本プロジェクトによって作製したモノクローナル抗体は生細胞を免疫源としているために高率に機能抗体が含まれているという利点がある一方で、固定した標本を染色しにくいという欠点がある。そこで昨年度、固定した細胞を免疫源として再度作製したモノクローナル抗体および各ドメイン毎に発現して免疫を行なって作製したモノクローナル抗体が分担研究者の福岡が作製した高集積がん組織アレイに使用可能かを検定した。

<がん遺伝子の発現クローニングとその解

析>

各種がん細胞から作成した発現型ライブラリーから機能性発現クローニング法によってオンコジーンとしてホメオボックス分子 RHOXF2 を同定し、高集積がんマイクロアレイを利用して発現、予後との関連などを調べた。

C. 研究成果

<各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法(SST-REX法)の実施>

平成21-23年度で膵臓がん、前立腺がん、グリオーマ、胃がん、膀胱がん、腎臓がん、大腸がんなど、7種類のがん種について、細胞株22種のシグナルシーケンストラップを行い、3804クローンを解析した。その結果、それぞれの細胞株に発現する膜蛋白質・分泌蛋白質として、合計963種類の同定を行った。下記にがん種ごとの内訳並びにTable1で一覧表を示す。

前立腺ガンについては、Du145、PC3、LNCapの3種類のcDNAライブラリーを作製、解析を行い、518クローンを得て、145種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

膵臓がんについては、AsPC1、BxPC3、Capan1の3種類のcDNAライブラリーを作製、解析を行い、602クローンを得て、106種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

グリオーマについては、T98G、U251、U87MG の 3 種類の cDNA ライブラリーを 遺伝子発現リストを作成した。

ガン種	細胞種	解析クローン数	遺伝子数
前立腺ガン	Du145, PC3, LNCap	518	145
膵臓ガン	AsPC1, BxPC3, Capan1	602	106
グリオーマ	T98G, U251, U87MG	442	99
胃ガン	MKN1, GCIY, KATOIII	532	114
膀胱ガン	T24, UM-UC-3, 5637	582	215
腎臓ガン	Caki1, KMRM-M1, KMRC2	620	130
大腸ガン	HCT116, DLD1, SW480, WiDr	508	154
合計		3804	963

Table1. 各がん種における SST-REX 法の解析クローンおよび同定遺伝子数

作製、解析を行い、442 クローンを得て、99 種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

胃ガンについては、GCIY、MKN1、KATOIII の 3 種類の cDNA ライブラリーを作製、解析を行い、532 クローンを得て、114 種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

膀胱がんでは、T24、UMUC3、5637 の 3 種類の cDNA ライブラリーを作製、解析を行い、582 クローンを得て、215 種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

腎臓がんについては、Caki1、KMRM-M1、KMRC2 の 3 種類の cDNA ライブラリーを作製、解析を行い、620 クローンを得て、130 種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の遺伝子発現リストを作成した。

大腸がんについては、HCT116、DLD1、SW480、WiDr の 4 種類の cDNA ライブラリーを作製、解析を行い、508 クローンを得て、154 種類の膜蛋白質・分泌蛋白質の

<がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作製>

本研究プロジェクトの特徴は、マウス細胞がヒト癌細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを免疫原として簡便にマウスモノクローナル抗体を作製する点である。上記の SST クローンを直接マウスへ免疫し、マウスミエローマ細胞と PEG 法を用いて細胞融合を行い、抗体産生ハイブリドーマクローンを得た。得られた抗体の特異性確認は、抗原とした SST クローンに反応し、非免疫発現のコントロール細胞 (Mock クローン) には反応しない事を指標に、フローサイトメトリー法にて解析を行った。

前立腺がんに対して 21 遺伝子(75 クローン)、膵臓がんに対して 12 遺伝子(34 クローン)、グリオーマに対して 7 遺伝子(14 クローン)、胃がんに対して 7 遺伝子(17 クローン)の特異的モノクローナル抗体を得た。

ガン種	抗体数	抗体作製遺伝子数
前立腺ガン	75	21
膵臓ガン	34	12
グリオーマ	14	7
胃ガン	17	7
合計	140	47

Table2 作製したモノクローナル抗体一覧

<樹立したモノクローナル抗体の解析>

各がん由来膜蛋白質および分泌蛋白質に対して作製したモノクローナル抗体 47 種類について、native protein への反応性などについて、フローサイトメトリー法、細胞染色法、ELISA 法などで確認し、細胞株を用いた *in vitro* の機能解析として、予備的な解析を行った。そのうち前立腺がん細胞株に対して 4 種類、膵臓がん細胞株に対して 5 種類、グリオーマに対して 8 種類、胃がんに対して 9 種類の抗体は、各がん細胞株の増殖を抑制する事が明らかとなった。それぞれの抗体については、SCID マウス (重度免疫不全マウス) にヒトガン細胞を移植・定着させた担がんモデルマウスを作製し、*in vivo* における抗腫瘍効果について検討を行った。その結果、3 種類の抗体で *in vivo* における抗腫瘍効果を発揮する事が明らかとなった。

Table3 抗体の Characterization

がん種	<i>in vitro</i> 活性	<i>in vivo</i> 活性
前立腺がん	4	2
すい臓がん	5	0
脳腫瘍	8	1
胃がん	9	0

D. 考察

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質

質の同定ならびにターゲット検索、SST クローン免疫法によるモノクローナル抗体作製は、一定の成果を得る事ができたと考えている。SST-REX 法の実施は、ハイスループットな解析が可能であり、本プロジェクト期間で 3800 クローン以上を解析し、1000 種類近い遺伝子を同定した。また、モノクローナル抗体開発では、既存法に比べての効率化が認められ、*in vitro*、*in vivo* でがんの増殖抑制活性を有する抗体を開発した。さらに、パラフィン切片染色用の抗体作製などにも応用できることが明らかとなった。

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質の同定および、モノクローナル抗体の開発との連動は、高い効果を有する事を、*in vitro*、*in vivo* 機能試験のレベルで裏付ける結果となった。また、いくつかの抗体で統計有意に抗がん作用を認めたことは、機能抗体創出技術として優位なテクノロジーと考えられる。また、いずれのモデルもタキソテールに見られる体重減少のような副作用が見られなかった。このことから、抗体医薬品に期待される、副作用の少ない特異的な治療薬としての可能性を裏付けるものとなった。

E. 結論

我々は SST-REX を様々ながん細胞株から樹立したライブラリーで行い、効率良く SST クローン (がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質とヒトサイトカインレセプターMPL の細胞内、膜貫通ドメインの融合蛋白質を発現している Ba/F3 細胞) を樹立した。これらの SST クローンのうち一部をマウスに免疫することにより、効率良くモノクローナル抗体を作製することができた。

作製した抗体の一部は、がん細胞の増殖を *in vitro*, *in vivo* で抑制する機能を有しており、がんの治療用抗体シーズとして期待の持てる成果を得た。

これらの結果から、SST-REX 法を利用した分子標的探索と SST クローンを用いたモノクローナル抗体作製は、単に作製効率が良いというだけでなく、機能を有する抗体の取得にも有効な手段である事が示唆された。

今後は、本結果に満足することなく、より多くのがんマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体を樹立することによって、がんの早期診断法の開発およびがん治療の分子標的となりうる分子の同定を目指すと共に、本プロジェクトの成果を臨床現場に活かせるよう、臨床応用へ向けた研究を継続したい。

F. 研究発表

1. 論文

1. Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Takahashi, N., Nosaka, T., Inoue, M., Sato, T., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. **Mol Cell Biol.** 29:1796-1813.
2. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2009) Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. **Stem cells** 27:183-190.
3. Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009) Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. **Science** 323:388-393.
4. Komeno, Y., Kitaura, J. and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models. **J Cell. Physiol.** 219:529-534.
5. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. **Int J. Hematology** 89: 470-481.
6. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T. and Kitamura, T. (2009) Activating and inhibitory signals from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcRg in mast cells. **J. Immunol.** 183:925-936.
7. Doki, N., Kawashima, T., Nomura, Y., Tsuchiya, A., Oneyama, C., Akagi, T.,

- Nojima, Y. and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is constitutively phosphorylated on serine 387 in the v-Src-transformed NIH3T3 cells. **Cancer Science**, 100:1675-1679.
8. Miyazaki, K., Yamasaki, N., Oda, H., Kuwata, T., Kanno, Y., Miyazaki, M., Komeno, Y., Kitaura, J., Honda, Z., Warming, S., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kitamura, T., Nakamura, T., and Honda, H. (2009) Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood** 113:4702-4710.
 9. Nakajima, H., Ito, M., Morikawa, Y., Komori, T., Fukuchi, Y., Shibata, F., Okamoto, S., and Kitamura, T. (2009) Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 390:65-70.
 10. Oki, T., Eto, K., Izawa, K., Yamanishi, Y., Inagaki, N., Frampton, J., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2009) Evidence that integrin alpha 2b beta 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. **J. Biol. Chem.** 284:31463-31472.
 11. Ono, R., Kumagai, H., Nakajima, H., Hishiya, A., Taki, T., Horikawa, K., Takatsu, K., Satoh, T., Hayashi, Y., Kitamura, T., and Nosaka T. (2009) Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. **Leukemia** 23:2197-2209.
 12. Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T., and Furukawa, Y. Expression levels of histone deacetylases determine the hematopoietic progenitors. (2009) **J. Biol. Chem.** 284:20673-30683.
 13. Kubagawa, H., Oka, S., Kubagawa, Y., Torii, I., Takayama, E., Kang, D.W., Gartland, G.L., Bertoli, L.F., Mori, H., Kitamura, T., Ohno, H., and Wang, J-Y. (2009) Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcμR) in humans. **J. Exp. Med.** 206:2773-2793.
 14. Yoshimi, Y., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshiki, Y., Nannya, Y., Nitta, E., Arai, S., Sato, T., Shimabe, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Kitamura, T. and Kurokawa, M. (2011) Evf1 represses PTEN expression by interacting with polycomb complexes and activates PI3K/AKT/mTOR signaling. **Blood** 117:3617-3628.
 15. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPa mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. **Blood** 117:221-233.
 16. Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garçon, L., Lécluse, Y., Larbret, F.,

- Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., Debili, N. and Vainchenker, W. (2011) Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. **Blood** 116:3245-3255.
17. Nakajima, H., Ito, M., Smookler, D.S., Shibata, F., Fukuchi, Y., Morikawa, Y., Ikeda, Y., Arai, F., Suda, T., Khokha, R. and Kitamura, T. (2010) TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. **Blood** 116:4474-4482.
 18. Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takahashi, M., Maehara, A., Oki, T., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2010) Characterization of leukocyte mono-Ig receptor 7 (LMIR7)/CLM3 as an activating receptor: Its similarities to and differences from LMIR4/CLM5. **J. Biol. Chem.** 285: 35274-35283.
 19. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T. (2010) Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. (2010) **Int. J. of Oncol.** 37:569-581.
 20. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b and LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. **J. Exp. Med.** 207:1501-1511.
 21. Ikeya, M., Fukushima, K., Kawada, M., Onishi, S., Furuta, Y., Yonehara, S., Kitamura, T., Nosaka, T., and Sasai, Y. (2010) Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. **Dev. Biol.** 337:405-414.
 22. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., *Kitamura, T., and *Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 115: 2872-2881.
 23. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. **Leukemia** 24:1018-1024.
 24. Komori, K., Doi, A., Nosaka, T., Furuta, H., Akamizu, T., Kitamura, T., Senba, E., and Morikawa, Y. Regulation of AMP-activated protein kinase signaling by AFF4, a member of the AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4) family of transcription factors, in hypothalamic neurons. **J. Biol. Chem.** in press.

25. Doki, N., Kitaura, J., Inoue, D., Kato, N., Kagiya, Y., Uchida, T., Togami, K., Isobe, M., Ito, S., Maehara, A., Izawa, K., Oki, T., Harada, Y., Nakahara, F., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. **Int. J. Hematol.** 95:167-175.
26. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. **Leukemia** in press.
27. Tran, P.T., Bendapudi, P.K., Lin, H.J., Choi, P., Koh, S., Chen, J., Horng, G., Hughs, N.P., Schwartz, L.H., Miller, J.H., Kawashima, T., Kitamura, T., Paik, D., and Felsher, D.W. (2012) Survival and death signals can predict tumor response to therapy after oncogene inactivation. **Science Translational Medicine**, in press.
28. Nakamura, M., Kitaura, J., Enomoto, Y., Lu, Y., Nishimura, K., Isobe, M., Ozaki, K., Komeno, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kume, H., Homma, Y., and Kitamura, T. (2012) TSC-22 is a negative-feedback regulator of Ras/Raf signaling: Implications for tumorigenesis. **Cancer Science** 103:26-33.
29. Suzuki, K., Ono, R., Ohishi, K., Masuya, M., Kataoka, I., Liu, B., Nakamori, Y., Ino, K., Monma, F., Hamada, H., Kitamura, T., Katayama, N., and Nosaka, T. (2012) IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. **Int J Oncology** 40:53-62.
30. Shibata-Minoshima, F., Oki, T., Doki, N., Nakahara, F., Kageyama, S., Kitaura, J., Fukuoka, J. and Kitamura, T. (2012) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. **Int J Oncology** 40:93-98.
31. Kawamura, S., Sato, I., Wada, T., Yamaguchi, K., Li, Y., Li, D., Zhao, X., Ueno, S., Aoki, H., Tochigi, T., Kuwahara, M., Kitamura, T., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2012) Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. **Cell Death and Differentiation** 19:170-179.

2. 学会発表

1. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽一、北村俊雄、黒川峰夫（2009年10月京都） EVI1 Downregulates PTEN Transcription and Activates AKT/mTOR Through Interaction with Polycomb Group. 第71回日本血液学会学術集会、口演
2. 中島秀明、森川吉博、小森忠介、福地由美、柴田文、岡本真一郎、北村俊雄（2

- 009年10月京都) Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 differentially regulate hematopoietic stem cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演
3. 和田妙子、北村俊雄 (2009年10月京都) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による血球分化の制御と白血病発症への関与の説明. 第71回日本血液学会学術集会、口演
 4. 土岐典子、川島敏行、殿塚行雄、箕嶋幸範、北村俊雄 (2009年10月京都) Constitutive phosphorylation of a RacGAP is involved in v-Src-induced transformation of NIH3T3 cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演
 5. 小埜良一、榊屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉 (2009年10月京都) MLL-ENL 融合遺伝子は造血幹細胞のみを標的として形質転換を生じる. 第71回日本血液学会学術集会、口演
 6. 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺直子、中原史雄、土岐典子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄 (2009年10月京都) Analysis of C/EBPA mutations in AML, MDS by a mouse BMT model. 第71回日本血液学会学術集会、口演
 7. 中原史雄、北浦次郎、坂田-柳本麻美子、米野由希子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄 (2009年10月京都) Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and induces CML BC-like disease. 第71回日本血液学会学術集会、口演
 8. 中原史雄、坂田-柳本麻美子、米野由紀子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄 (2009年10月横浜) Hes1 による骨髓前駆細胞への自己複製能付与と、慢性骨髄性白血病における急性転化の誘導. 第68回日本癌学会学術総会、口演
 9. 小埜良一、榊屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉 (2009年10月横浜) MLL-ENL 融合遺伝子による形質転換は造血幹細胞のみを標的として生じる. 第68回日本癌学会学術総会、口演
 10. 土岐典子、川島敏行、小根山千歳、赤城剛、北村俊雄 (2009年10月横浜) MgcRacGAP の恒常的リン酸化は v-Src による NIH3T3 細胞の transform に関与する. 第68回日本癌学会学術総会、ポスター
 11. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽一、北村俊雄、黒川峰夫 (2009年10月横浜) EVI1 はポリコーム群を介して PTEN の転写を抑制し AKT/mTOR シグナルを活性化する. 第68回日本癌学会学術総会、口演
 12. 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、貝谷綾子、榎本豊、沖俊彦、秋葉久弥、高井俊行、北村俊雄 (2009年12月大阪) LMIR5 のリガンドとして TIM1 および TIM4 を同定した. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
 13. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 (2009年12月大阪) LMIR3 ノックアウトマウスの解析; LMIR3 欠損はマウス腹膜炎モデルにおける致死率を改善する. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
 14. 沖俊彦、北浦次郎、山西吉典、北村俊雄

- (2009年12月大阪) マスト細胞上のインテグリン α IIb β 3 と慢性炎症. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
15. 高橋まり子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、榎本豊、貝谷綾子、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 (2009年12月大阪) ヒト LMIR/CD300 ファミリー分子の解析: CD300C は FcR γ と会合して活性化シグナルを伝達する. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
 16. 貝谷綾子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 (2009年12月大阪) LMIR8/CLM-6 は pDC マーカーである. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
 17. 榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 (2009年12月大阪) 活性化レセプター LMIR7 と LMIR4 の比較解析: FcR γ との会合から得られた知見. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター
 18. 前原明絵、伊沢久未、山西吉典、貝谷綾子、高橋まり子、榎本豊、沖俊彦、高井俊行、北浦次郎、北村俊雄 (2009年12月大阪) An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcR γ in mast cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター
 19. Kitamura, T. “Learning from mouse BMT models for MDS and MPD” MDS/MPD シンポジウム 招待講演 ヒューストン 2009年4月
 20. Kitamura, T. “Lessons from mouse BMT models for leukemia, MDS and MPD” 日米血液腫瘍ワークショップ 招待講演 ハワイ島 2009年3月
 21. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., and Kitamura, T. 「TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
 22. Enomoto, Y., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Izawa, K., Takai, Y., and Kitamura, T. 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcR γ .」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
 23. Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第39回国際実験血液学会招待講演 2010年9月16日メルボルン
 24. 榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄 「A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月栃木

25. 榎本豊、北浦次郎、西村耕太郎、北村俊雄 「Development of new pMXs-based retrovirus vectors expressing shRNA」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月 栃木
26. 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 「MiR125 induces hematological malignancies in vivo」第72回日本血液学会学術集会 プレナリー 2010年9月 横浜
27. 中村真樹、北村俊雄 「TSC-22 の発現は Ras/MAPK の活性化により上昇する」第69回日本癌学会学術総会 ポスター 2010年9月22日~24日 大阪
28. 北村俊雄 Lessons from mouse models for myelodysplastic syndromes/overt leukemia and chronic myelogenous leukemia in blast crisis: Insertional mutagenesis induced Evi-1 expression but not Hes1 expression 日本学術振興会 二国間交流事業セミナー (2011年7月14日 九州大学 百年講堂)
29. 北村俊雄 Animal models for AML, MDS and MPN 日本遺伝子治療学会教育講演 (2011年7月14日 九州大学 百年講堂)
30. Oki, T., Watanabe-Okouchi, N., Nishimura, N., Komeno, Y., Nakahara, F., Kitaura, J., and Kitamura, T. "The Roles of RasGRPs in Hematological Malignancies" 40th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology (2011年8月25日28日 Westin Bayshore Hotel, Vancouver, Canada)
31. 北村俊雄 Two types of C/EBPa mutations collaborate in inducing leukemia in a mouse BMT model. 第25回 IACRLRD (2011年9月15-17日 東京大学本郷キャンパス)
32. 北村俊雄 Molecular basis of leukemia, MPN and MDS 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月3-5日名古屋国際会議場)
33. 中原史雄、北村俊雄 Molecular mechanisms of blast crisis in chronic myelogenous leukemia 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月3-5日名古屋国際会議場)
34. 北村俊雄 Mouse models for MDS/overt leukemia and CML-BC 第73回日本血液学会学術集会 (2011年10月14-16日 名古屋国際会議場)
35. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、沖俊彦、奥村康、北村俊雄 LMIR3 ノックアウトマウスにおけるアレルギー反応の亢進 日本免疫学会 (2011年11月29日 幕張メッセ)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

多種がんの高集積アレイを用いた分子標的抗体薬候補の特異性検討、および全身がんにおける横断的分布の観察と機能の評価に関する研究

研究分担者 富山大学附属病院外科病理学講座

客員教授 福岡順也

研究要旨

がんの治療は大きく分子標的薬へとシフトしており、新薬の開発は、がん細胞で活性化しているシグナル伝達系を抑制、もしくは正常化する小分子か、抗体薬へと絞られてきている。分子の検討を行う為には、標的とする分子がどの程度、治療対象としている疾患に発現しており、その局在がどこに存在するかを観察することは極めて重要である。また、標的分子の発現が対象疾患でどのような生物学的機能を有しているかの検討も治療デザインの観点から極めて重要である。しかし、このような網羅的解析を組織上にて行う事の出来るツールである組織アレイは、ホルマリン固定後のパラフィン包埋ブロックを用いて作製されるため、作製抗体が、うまく特異的な染色性を示すことの出来る頻度は低い。しかし、分子標的薬は、その効果を期待できる分子の発現を見なければ無意味であることが証明されており、同時にヒト組織での発現を検討する必要がある。今回、腫瘍細胞の増殖抑制を行う事が分かっている分子のヒト腫瘍における発現を観察した。ホルマリン固定された標的分子を発現する細胞株上のエピトープを認識する複数のクローンを作製し、これらが組織アレイ上で染色されるものを選定し、その発現パターンと機能を検討した。試されたハイブリドーマ培養上清抗体は19クローン(7種抗体)。染色条件検討用組織アレイを作製し、これらの上清抗体に対して7種類の染色プロトコルを施行し、特異性と感受性の高い染色条件を有するクローンを選定、選定したクローンについて、精製抗体を作製依頼した。作製された精製抗体を使用して、他腫瘍を含む組織アレイへの染色、検討を行った。その結果、3クローンにおいて精製抗体での特異的と考えられる腫瘍染色性が確認された。標的因子の発現を検討出来る抗体の候補と言える。また、組織アレイへの染色を検討し、EphA2が、大腸癌と肺腺癌の予後因子の候補であることを同定した。

A: 研究目的

がんの治療は大きく分子標的薬へとシフトしており、新薬の開発は、がん細胞で活性化しているシグナル伝達系を抑制、もしくは

は正常化する小分子か、抗体薬へと絞られてきている。分子の検討を行う為には、標的とする分子がどの程度、治療対象としている疾患に発現しており、その局在がどこ

に存在するかを観察することは極めて重要である。また、標的分子の発現が対象疾患でどのような生物学的機能を有しているかの検討も治療デザインの観点から極めて重要である。しかし、このような網羅的解析を組織上にて行う事の出来るツールである組織アレイは、ホルマリン固定後のパラフィン包埋ブロックを用いて作製されるため、作製抗体が、うまく特異的な染色性を示すことの出来る頻度は低い。また、今までの分子標的薬の治療成績を見てみると、治療効果は明瞭なバイオマーカーの発現によって規定されており、同時に投薬の指標となる組織上の染色性検討など、患者群の選定を検討することが必須である。今回、ホルマリン固定された標的分子を発現する細胞株上のエピトープを認識する複数のクローンを作製し、これらが組織アレイ上で染色されるかどうかにつき検討した。

B：研究方法

<高集積組織アレイおよびクリニカルデータの収集>

1) 脳腫瘍 95 例より作製された高集積組織アレイおよび 14 種類の癌腫 1150 症例を有する高集積アレイについて、臨床データの収集を行い、年齢、性別、組織型、overall survival (OS)、progression free survival (PFS)、治療方針、治療効果についての情報を収集した。

2) 抗体の染色条件を決定するため、28 症例の腫瘍組織を有する検討用アレイの症例を選定し、アレイブロックを作製した。含まれた腫瘍は、1999 年から 2006 年までの

富山大学における病理アーカイブにおける肺扁平上皮癌、乳癌、胆管癌、肝臓癌、胃癌、肺腺癌、腎癌、甲状腺癌、大腸癌、前立腺癌、膵癌、膀胱癌、卵巣癌および子宮体部癌である。4 μ 薄切切片を用いて染色条件検討に使用した。

<ハイブリドーマ培養上清抗体による免疫染色の条件検討>

SST-REX 法で得られるクローンをホルマリン固定化してから利用することで、よりホルマリン固定パラフィンブロックにおける染色頻度を上げる工夫がおこなわれた。それにより得られた培養上清を、検討用アレイにて染色して評価を行った。抗体薬がどの程度腫瘍を認識し、その腫瘍のなかで標的分子がどのような機能を有するのかを認識することは抗体薬作製の際に必須の項目である。病理検体を用いて抗体薬の評価を行う事が想定されるため、標的分子の存在を確認する手技として、ホルマリン固定パラフィン切片上における染色性を確保することが重要である。

明瞭な細胞内極性（細胞膜、細胞質、核膜、核内、細胞外マトリックス）を有したシグナルを示すものを陽性と評価し、同一コア内で、陽性細胞と陰性細胞が混在しないものは、非特異的染色と評価した。

<高集積組織アレイにおける染色と評価>

染色条件検討にて十分に特異性と感受性を有すると判断したものにおいて、精製抗体を作製し、さらに染色プロトコルを最適化したのちに高集積アレイへの染色を行った。染色スライドは全てパーチャルスライドにてスキャンを行い、ビューワー上にてスコ

アリングを行った。評価は細胞の局在毎に評価した。それぞれの局在部位毎に強度と分布（染色範囲）を検討し、それぞれ、強度スコア：0:染色性なし、1:弱陽性、2:中等度、3:強陽性、分布スコア：0:染色性無し、1:50%未満の腫瘍細胞が陽性、2:50%以上の腫瘍細胞が陽性 と評価した。強度スコアと分布スコアの総和が3以上を基本的に陽性とみなした。

<統計解析>

染色性と組織型、分化度、性別、年齢、Stage、脈管侵襲（癌腫）の相関を χ 自乗検定およびフィッシャー検定を用いて評価した。生命予後情報のある癌腫では、ログランクテストを用いて生存解析を行い、カプランマイヤー曲線をプロットした。P値<0.05未満を統計学的に優位と認識した。

C: 研究成果

SST-REX 法にホルマリン固定を加えた変法にて研究代表者の北村らが作製した抗体のうち、培養上清抗体として、EphA2 に対する抗体、ACT00140-0065 (clone 1CBE6-3)、ACT00234-0007 (clone 6B10)、Endoglin に対する抗体、ACT00230-0021 (clone 544H1B2H10)、Clorf56 に対する抗体 ACT230-0015: (clone 4B10, 1C12, 4C12, 3B11, 2A1)、FSTL1 に対する抗体、ACT41-385: (clone 9C8H7)、GPNMB に対する抗体、ACT36-149: (clone 2F2, 1E5, 3C6, 3B3C)、MPZL1 に対する抗体、ACT208-18: (clone 5B3E2A)、GRP56 に対する抗体、ACT88-84: (clone 10A5A)、GFBP1 に対する抗体、ACT230-84: (clone 2H31, 2E9D, 2D12C, 1A8G)の検討を行った。

これらの中で、特異性を有する染色が観察され、精製抗体を作製したもので組織アレイにて検討を行い、特異的と考えられる染色性が確認された抗体は、EphA2 に対する抗体 ACT00234-0007 (clone 6B10)、ACT230-0015: (clone 2A1)、FSTL1 に対する抗体、ACT41-385: (clone 9C8H7)の3クローンであった。

上記3クローンにおいて、腫瘍横断的に発現の検討を行った。

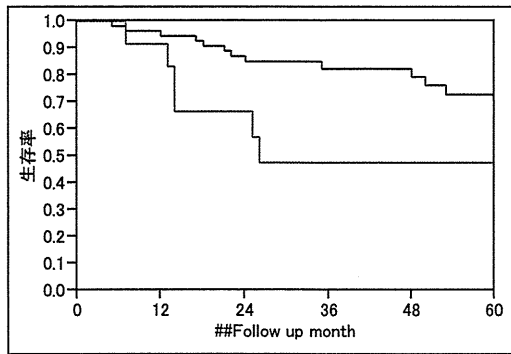
脳腫瘍（グリオーマ）を標的にして作製された抗体のうち、抗 Clorf56 抗体、ACT230-0015: (clone 2A1)、抗 FSTL1 抗体、ACT41-385: (clone 9C8H7))にて特異的陽性像が見られ、精製抗体を用いて脳腫瘍の高集積アレイで検討したが、抗 Clorf56 抗体 ACT230-0015: (clone 2A1)では特異性を有する染色性を確認することが出来た。

<精製抗体による高集積アレイ染色結果>

1) ACT-00234-0007 (clone 6B10)では、脳腫瘍における発現を検討した。その結果、脳腫瘍において細胞質優位の染色性を確認した。核における染色性も観察された。細胞質の染色性はほぼ均一で、中等度から強度の染色が主体であり、核の染色性は不均一で腫瘍の一部を染めるものが主体であった。細胞質の陽性は93%の腫瘍に観察されたが、特に強い陽性をしめすもの（スコア4, 5）が68%に観察され、それらとより弱い染色性を示す腫瘍との予後を検討したが、差異は見られなかった。核の陽性は55%に観察された、同様に予後との関連性は観察されなかった。

多種癌のアレイでは、核における染色性が

大腸癌において、陽性例が予後不良である結果を得た($p=0.02$)。肺腺癌では、やや予後良好の傾向を示したが、明瞭な統計学的有意差は出なかった。細胞質にも高頻度の発現が観察されたが、予後との相関は見られなかった。

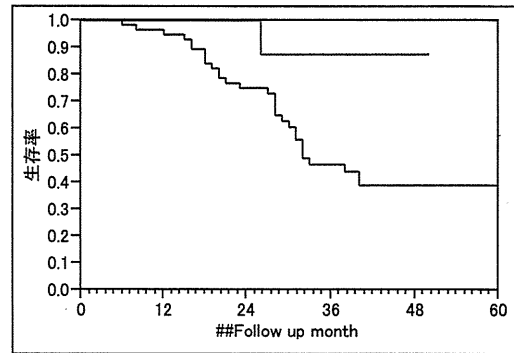


細胞質の発現において、他の癌腫（肺癌、乳癌、胃癌、膵癌）には、予後との相関を認めなかった。

2) ACT00140-p065 (clone 1CBE6-3)では、脳腫瘍において、核、細胞質のいずれもが染色されたが、核が優位の染色性を示した。いずれもびまん性の染色を認め、染色は腫瘍内ではほぼ均一であった。核では中等度から高度の陽性が観察され、陽性率は86%であった。細胞質ではより弱い陽性が同じく86%に観察された。いずれも予後との関連性は見られなかった。

多種癌のアレイにおいて、細胞質の染色性は予後との関連性を示さなかった。

核における発現では、肺腺癌において、陽性例は予後良好の結果を示した ($p=0.049$)。



他の癌腫では、類似の傾向を認めるものの、統計学的に有意な差を認めなかった。大腸癌では、6 B10D と類似の傾向を示し、陽性例が予後不良を示す傾向があるが、統計学的に優位とはならなかった。

3) ACT230-0015: (clone 2A1)では、精製抗体の特異的な染色性が確認され、発現の臨床的意義につき検討をおこなった。その結果、肺腺癌において性別との相関 ($P=0.035$) , 血管侵襲との負の相関 ($p=0.025$) が観察され、胆道癌では、年齢との相関が観察された ($P=0.040$)。また、胃癌では、リンパ管侵襲とリンパ節転移に負の相関を示した。

肝癌では、多臓器転移と負の相関を示した。膵癌ではリンパ節転移と負の相関を示した。いずれも癌の進展と負の相関をする結果であった。

予後解析では、膵癌において予後良好な傾向を示すものの、統計学的に優位な相関を示さなかった。症例数が少ないために有意差が出なかった可能性がある。(膵癌は全50症例)

E. 結論

ホルマリン固定を行ったクローン細胞株に対して作製した抗体では、組織上の陽性所見を見る頻度があがり、上清抗体の条件検討から、染色に適したクローンを選定し、精製抗体にて高集積組織アレイへの染色を行う事が出来た。また、大腸癌と肺腺癌における新たな予後因子であることを発見した。今回の評価では、この技法により、ホルマリン固定パラフィンブロックにて染色可能な精製抗体が作製される率は 16% (3/19) であった。3 つのマーカーの横断的な検討から、EphA2 の核内発現が肺腺癌と大腸癌で予後因子の候補であることを同定した。興味深いことに、肺腺癌では予後良好のマーカーとして、大腸癌では、予後不良のマーカーとして存在する可能性が高い。

G. 研究発表

原著論文

1. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, Hewitt SM, Fujii T, Cordon-Cardo C, Jen J, Travis WD. Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 16(1): 240-8, 2009.
2. Kadota M, Sato M, Duncan B, Oshima A, Yang HH, Diaz-Meyer N, Gere S, Kageyama S, Fukuoka J, Nagata T, Tsukada K, Dunn BK, Wakefield LM, Lee MP.

Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA. *Cancer Res.* 69(18): 7357-65, 2009.

3. Tsuna M, Kageyama S, Fukuoka J, Kitano H, Doki Y, Tezuka H, Yasuda H. Significance of S100A4 as a prognostic marker of lung squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 29(7): 2547-54, 2009.
4. Ozbudak IH, Shilo K, Tavora F, Rassaei N, Chu WS, Fukuoka J, Jen J, Travis WD, and Franks TJ. : Glucose transporter-1 in pulmonary neuroendocrine carcinomas: expression and survival analysis. *Mod Pathol.* 22(5): 633-8, 2009.
5. Shibuya K, Fukuoka J, Fujii T, Shimoda T, Shimizu T, Sakai H, and Tsukada K. Increase in ouabain-sensitive K(+)-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na(+),K(+)-ATPase alpha3-isoform. *Eur J Pharmacol.* 638(1-3) 42-6, 2009.
6. Kitano H, Kageyama S, Hewitt S.M, Hayashi R, Doki Y, Ozaki Y, Fujino S, Takikita M, Kubo H, Fukuoka J, Podoplanin in Cancerous Stroma Induces Lymphangiogenesis and Predicts Lymphatic Spread and Patient Survival. *Arch Pathol Lab Med.* 134:1520-7, 2010.

7. 中村さやか, 河岸由紀男, 加藤慎平, 辻博, 高川清, 福岡順也. 無治療で長期生存した Lambert-Eaton 症候群合併肺小細胞癌の 1 例 日呼吸会誌, 48(12),918-922,2010.
8. 古賀孝臣, 福岡順也【プロテオミクス-病理との関わり】病理組織標本に展開可能なプロテオーム 解析新技術組織アレイ研究の現状と展望 病理と臨床 28 (2010) 481-489.
9. Zhang C, Elkahlon AG, Robertson M, Gills JJ, Tsurutani J, Shih JH, Fukuoka J, Hollander MC, Harris CC, Travis WD, Jen J, Dennis PA. Loss of cytoplasmic CDK1 predicts poor survival in human lung cancer and confers chemotherapeutic resistance. PLoS One. 6(8):1-15, 2011.
10. Kubo A, Koh Y, Kawaguchi T, Isa S, Okamoto I, Fukuoka J, Kusunoki Y, Kitaichi M, Takada M, and Nakagawa M. Malignant pleural effusion from lung adenocarcinoma treated by gefitinib. Internal Medicine. 50(7):745-8, 2011.
11. 岡澤成祐, 河岸由紀男, 猪又峰彦, 山田 徹, 三輪敏郎, 林 龍二, 松井祥子, 菓子井達彦, 土岐善紀, 長田啓史, 福岡順也, 戸邊一之 肺過誤腫を合併した若年発症肺癌の 1 例 日呼吸会誌 2011 49(5):349-354,2011
12. Nishimizu T, Minemura M, Kajiura S, Tokimitsu Y, Itaya Y, Yamawaki H, Kawai K, Tajiri K, Nakayama Y, Hosokawa A, Takahara T, Yasumura S, Shimizu S, Fukuoka J, Ishizawa S, Sawasaki T, Yanagisawa A, and Sugiyama T. A case of pancreatic acinar cell carcinoma with a giant liver metastasis successfully treated with combination of gemcitabine and peroral s-1 癌と化学療法, 38(2): 309-12, 2011.
13. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J. Napsin A, a new marker for lung adenocarcinoma, is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: evaluation of 1674 cases by tissue microarray. Arch Pathol Lab Med. 136(2):163-71, 2012
14. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. Arch Pathol Lab Med. 136(2):155-62, 2012
15. Kanazawa Y, Shojaku H, Takakura H, Fujisaka M, Tachino H, Watanabe Y, Tomizawa G, Kawabe H, Shojaku H, Seto H, Otani K, Fukuoka J. An essential dose of cisplatin for super-selective intra-arterial infusion concomitant with radiotherapy in patient with maxillary squamous cell carcinoma.

- Eur Arch Oto-phino-l. 10.1007/s00405-011-1857-70 2011
16. Shibata-Minoshima F, Oki T, Doki N, Nakahara F, Kageyama S, Kitaura J, Fukuoka J, Kitamura T. Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. *Int J Oncol.* 40(1): 93-8, 2012
 17. Fukuoka J, Hofer MD, Hori T, Tanaka T, Ishizawa S, Nomoto K, Saito M, Uemura T, Chirieac LR. Spiral Array. A New High-Throughput Technology Covers Tissue Heterogeneity. *Arch Pathol Lab Med.* in press
 18. Farris, AB III, Demicco EG, Le LP, Finberg KE, Miller J, Mandal R, Fukuoka J, Cohen C, Gaissert HA, Zukerberg LR, Lauwers GY, Iafrate. AJ, Mino-Kenudson, M. Clinicopathologic and Molecular Profiles of Microsatellite Unstable Barrett Esophagus-associated. *Am J Surg Pathol* in press
 19. E. G Demicco, A B Farris, Y Baba, B A-Etang, K Bergethon¹, Mandal, D Daives, J Fukuoka, M Shimizu, D D-Santagata, S Ogino, A J Iafrate, H A Gaissert, and MM-Kenudson. The Dichotomy in Carcinogenesis of the Distal Esophagus and Esophagogastric Junction: Intestinal-Type vs. Cardiac-Type Mucosa-Associated Adenocarcinoma. *Modern Pathology*, in press.
 20. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer.* DOI.10.1007 /s12282-012-0357-y, 2012
- 学会発表
1. 福岡順也. 「Inter-observer agreement –Lung Cancer と IIPs-.」 Shiga Chest Disease Conference, 2010, 7, 滋賀.
 2. 福岡順也. 「NSCLC の治療を考慮した病理診断の標準化について。」 NSCLC Treatment Forum, 2010, 9, 福岡
 3. 福岡順也. 「肺がん治療における病理組織診断の重要性と標準化について。」第 69 回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー, 2010, 9, 大阪
 4. 福岡順也. 「肺がんの組織分類と一致率および治療への影響」臨床細胞学会広島県支部会 2010, 11, 広島
 5. 福岡順也. 「肺癌の個別化医療と組織型診断」第 26 回京滋肺癌研究会 2011, 02, 京都
 6. Demicco E G, Farris A B, Iafrate A J, Gaissert H A, Fukuoka J, Cohen C, Zukerberg L R, Lauwers G Y, Mino-Kenudson M. Microsatellite Unstable Barrett's Esophagus -Associated Adenocarcinomas Are Rare, but Clinicopathologically Similar to the Colonic Counterpart. 99th USCAP Annual Meeting, 2010, 3, 20-26, Washington DC, USA.

7. Demicco E G, Farris A B, AgborEang B, Fukuoka J, Daives D, Snimizu M, Gaissert H A, Mino-Kenudson M. Validation of Topographic-Anatomic Subclassification for Adenocarcinoma of the GE Junction(GEJ). 99th USCAP Annual Meeting, 2010, 3, 20-26, Washington DC, USA.
8. Tominaga S, Ohsawa R, Tanaka T, Shimizu S, Hori T, Fukuoka J. Spirl Tissue Microarray Covers Tissue Heterogeneity of NSCLC. 99th USCAP Annual Meeting, 2010, 3, 20-26, Washington DC, USA.
9. Osawa S, Shimada Y, Sekine S, Sawada S, Kashima S, Fukuoka J, Okumura T, Tsukada K. Pronostic significance of Aquaporin(AQP) expression in gastric and colorectal cancer. AACR Annual Meeting, 2010, 4, 17-21, Washington DC, USA.
10. Shimada Y, Okumura T, Osawa S, Sekine S, Moriyama M, Sawada S, Nagata T, Takahashi H, Fukuoka J, Takano Y, Fukumoto M, Tsukada K. Micro RNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded (FPE) samples. AACR Annual Meeting, 2010, 4, 17-21,
11. Kubo A, Koh Y, Hori T, Isa S, Fukuoka J, Kawaguchi T, Ando M, Okamoto I, Kitaichi M, Takada M, PHAME Study Group. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and phase II study of gefitinib in patients with malignant pleural effusion from non-small cell lung cancer. ASCO Annual Meeting, 2010, 6, 4-8, Chicago, Illinois, USA.
12. Fukuoka J, Hori T. Application of Spiral Array® technique for the core needle biopsy from breast cancer patients. CAP, 2010, 9, 26-28, Chicago, Illinois, USA.
13. Whithaus K, Fukuoka J, Jagirdar J. Evaluation of Napsin A, CK 5/6, p63, nd TTF-1 in Adenocarcinoma (ACA) vs. Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the Lung. 100th USCAP Annual meeting, Mar 1-3, 2011, San Antonio, USA
14. Fukuoka J, Sano H, Tanaka T. Central vs. Peripheral Squamous Cell Carcinoma. Are they really different morphologically?. Pulmonary Pathology Society, Biennial Meeting, 2011, 8, 18-20, New York City, USA
15. Fukuoka J, Hori T. Ki-67 is a strong prognostic marker for NSCLC when tissue heterogeneity is considered. 101th USCAP Annual meeting, Mar 19-21, 2011, Vancouver, Canada
16. Sano H, Tanaka T, Saito M, Otani K, Hori T, Nunomura S, Fukuoka J. Difference of morphology and molecular expression between central and peripheral squamous cell carcinoma 101th USCAP Annual meeting, Mar 19-21, 2011, Vancouver, Canada
17. Arora K, Zhang W, Fukuoka J, Kitano H, Jagirdar J. Detection of EGFR mutations in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using mutant specific antibodies: Are we there yet?