

neuroblastoma. Cancer Sci 2011.

学会発表

1. Yusuke Sato, Aiko Matsubara, Masashi Sanada, Hauki Kume, Yukio Homma, Seishi Ogawa. Genome-wide analysis of copy number alterations and gene mutations in renal cell carcinoma, AACR 102nd Annual Meeting, 2011
2. 佐藤悠佑、松原亜以子、永田安伸、吉田健一、川幡亮一郎、真田昌、久米春喜、小川誠司、本間之夫. 腎細胞癌における網羅的ゲノム解析 第99回日本泌尿器科学会総会、2011
3. 佐藤悠佑、松原亜以子、永田安伸、吉田健一、白石友一、真田昌、久米春喜、本間之夫、小川誠司. Genome-wide analysis of copy number alterations and gene mutations in renal cell carcinoma 第70回日本癌学会学術総会、2011

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。

難治性白血病に対する多段階発癌機構の解明

研究分担者 森下 和広 宮崎大学・医学部・教授

研究要旨

難治性急性骨髄性白血病(AML)の新規治療法の開発のため、網羅的遺伝子発現解析並びに統合的ゲノム解析を行い、白血病原因遺伝子の単離と分子標的遺伝子群の単離を行っている。AML 骨髄ニッチジャックに関わる遺伝子として CD52、Integrin $\alpha 6$ (ITGA6)、及び GPR56 を同定し、骨髄でのニッチ接着性との関連性を同定した。また Angiopoietin 1(ANG1)は細胞周期 G0 期への集積に必要であり、Integrin $\alpha 6$ (ITGA6)、及び GPR56 は *in vivo* 実験や遺伝子欠損マウスの実験により骨髄ニッチでの白血病幹細胞維持に必要な因子である事がわかった。CD52 は治療法として抗体療法としての可能性が出てきた。また Monosomy 7 の原因遺伝子候補を単離し、その機能解析を行っている。

A. 研究目的

難治性白血病はゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。この難治性を凌駕する新規治療法の開発のためには、その原因となる遺伝子群を複数個同定する必要がある。我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、EVI1高発現白血病に伴う7番染色体欠失に対して候補遺伝子群の単離を行っている。また比較のため、口腔癌を対象として同様にゲノム解析を行っている。これらの遺伝子群の機能異常の一つの特徴として白血病細胞の骨髄ニッチジャックが上げられる。その特徴に関連する遺伝子群を単離し、*in vitro*並びに*in vivo*実験により解析し、その結果に基づいた疾患特異的診断治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

染色体3q26並びに7番染色体異常を有するAML患者検体24例、AML細胞株18株を用いてSNPアレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を行い、7番染色体を中心としたゲノム解析、並びに遺伝子発現解析を行う。7番染色体においてゲノム欠失領域から候補遺伝子としてSaitolを単離しており、その情報伝達解析からGPR56を同定、遺伝子発現解析、ならびに機能解析を行う。白血病関連遺伝子MEL1遺伝子欠損マウスの発がん機構を明らかにする。また同時にこれまで行ってきた口腔癌のゲノム解析から単離した遺伝子群(IF1遺伝子群)についての機能解析を行い、両者の発癌機構の解明を目指す。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 606、540)をうけ、同意(インフォームド consent)の上で使用を行っている。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2009-520、2009-515-2)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究成果

3q26染色体異常に伴うEVI1転写因子の発現亢進に加えて、monosomy7の合併率が高く、どちらの異常があっても5年生存率が10%を下回る難治性白血病である。EVI1高発現白血病細胞の特徴として細胞接着性の亢進と細胞周期G0期分画の増加を同定しているが、それぞれ骨髄ニッチジャックし白血病幹細胞維持に重要な要因として考えられた。そこで網羅

的遺伝子発現解析の結果から、CD52、Integrin $\alpha 6$ (ITGA6)、及びGPR56を細胞接着能に関与する因子として同定した。それぞれの遺伝子発現のレベルに応じた細胞接着能の変動が見られ、特にITGA6とGPR56は対側の接合分子としてlaminin接合性が予測された。ITGA6はその転写低下により細胞死を引き起こし、細胞に必須の情報伝達系を促進していた。ITGA6はITGB4とヘテロダイマーを作り働くことから、shITGB4を導入細胞株を作成、免疫不全マウスに移植すると有意に増殖性に影響が出てきた。またGPR56とITGA6は相互作用して働いている可能性もあり、さらなる検討が必要である。またG0細胞周期の亢進についてはANG1の転写亢進に依存しており、細胞外分泌されたANG1は細胞表面レセプターであるTie2に結合し、autocrine的に情報が伝えられ、細胞周期調節因子p18の転写を亢進させ、G0期での細胞分画を増加させていた。このように難治性白血病の骨髄組織内での維持に関わることから、これらの因子が分子標的として重要である事が示唆される。また口腔癌のゲノム解析から1p21ゲノム増幅領域よりIFI16/AIM2遺伝子群の高発現を同定、p53不活化に伴いNF- κ B活性化による増殖促進を行うことがわかり、新たながんの情報伝達系の存在がわかってきた。

D. 考察

EVI1 高発現白血病のゲノム並びに網羅的遺伝子発現解析により、白血病幹細胞異常の原因となる遺伝子群を複数個単離しその機能解析を行った。その結果抗がん剤耐性は骨髄ニッチでの細胞接着性や遊走能に関与する CD52、GPR56、ITGA6 が働き、G0 期での細胞保持機構には ANG1 が重要な役割を持つことがわかった。以上の内容は難治性の本質が骨髄ニッチジャックに依存することの査証になっており、きわめて分子標的としての重要性が示唆される結果となった。口腔癌で同定した遺伝子群はインターフェロン誘導因子群であり、これらの遺伝子群の発がんの関与は口腔癌発症に感染とがんの関連性が強いことがわかってきた。

E. 結論

EVI1 高発現難治性白血病の骨髄ニッチ接着性に関係する CD52、Integrin $\alpha 6$ 、GPR56 を、細胞周期を停止させる Angiopoietin1 を同定し、それぞれ難治性に関わる因子群としての機能が明らかになって来た。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 416:239-45. 2011

2) Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene*. 30:4194-207. 2011

3) Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia*. 25:921-31 2011

4) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *J Nat Med*. 65:651-5. 2011

5) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 128:1335-43. 2011

2. 学会発表

1) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用。第 32 回日本炎症・再生医学会。京都市左京区。2011.6.3 (ポスター)

2) Morishita K : the 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses ATL 関連の発表 Belgium(Leuven) 2011.June.5-8

3) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19

4) 大隈和、舘山誠司、森下和広、広瀬国孝、山本直樹、山口一成、浜口功：腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL にたいする TSLC1 分子標的療法の開発。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19

5) 市川朝永、中畑新吾、山口良二、西片一朗、森下和

広：T 細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様病態を示す。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19

6) 市原絵美、兼田加珠子、齋藤祐介、森下和広：EVI1 高発現白血病細胞において自己分泌型 Ang1/Tie2 シグナル亢進は細胞周期を負に制御している。第 84 回日本生化学会大会。京都府左京区。2011.9.22.

7) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：成人 T 細胞白血病におけるがん抑制遺伝子候補 NDRG2 の同定。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3

Identification of NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene in adult T-cell leukemia Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, and Morishita K 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3

8) 近藤雄大、中畑新吾、長井健太郎、齋藤祐介、市川朝永、滝智彦、岩川麗香、江成政人、谷脇雅史、横田純、迫田隅男、森下和広：DNA センサータンパクである AIM2 と IFI16 の高発現が、p53 の不活化している口腔扁平上皮癌の癌化に寄与している。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3 (ポスター)

Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC with p53 inactivation. Kondo Y, Nakahata S, Nagai K, Saito Y, Ichikawa T, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3

9) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 の炎症反応制御機構。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3 (ポスター)

A critical role of tumor-suppressor NDRG2 for anti-inflammatory function in oral squamous-cell carcinoma Ichikawa T, Nakahata S, Kondo Y, Nagai K, Sakoda S, Morishita K. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3

10) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, and Morishita K : GPR56 integrate signals regulating HSC and EVI1 high AML niche interaction in the bone marrow. 第 73 回日本血液学会学術集会。名古屋市熱田区。2011.10.14.

11) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, and Morishita K. : Autocrine angiopoietin-1/Tie2 signaling promotes cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. 第 73 回日本血液学会学術集会。名古屋市熱田区。2011.10.15 (ポスター)

12) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Mizuno N, Itoh H, Morishita K : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第 34 回日本分子生物学会年会。横浜。2011.12.13. (Talk, ポスター)

13) Kaneda-Nakashima K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K. : Modulation of drug-resistance derived from high expression of ITGA6 and ITGB4 via EVI1 in leukemia cell lines s. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011.12.15. (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞接着阻害剤、細胞増殖阻害剤、並びに癌の検査方法および検査用キット、特許申請 2011-108685

2. 実用新案登録

3. その他

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

難治がんにおける包括的ゲノム解析

研究分担者 柴田 龍弘 国立がんセンター研究所

がんゲノミクス研究分野・分野長

研究要旨

悪性リンパ腫の1亜型である MALT リンパ腫 19 症例について全エクソン解読による変異解析を行った結果、既知の A20 遺伝子変異に加えて NFkB 活性化に関与すると考えられる遺伝子並びにエピゲノム関連遺伝子の変異を複数症例で同定した。非ウイルス性肝がん 50 症例における染色体コピー変化、非コード RNA を含む網羅的な遺伝子発現変化並びに全エクソンシーケンス解析を行い、その発癌分子機構の解明と診断マーカー同定を進めた。胆道がんにおける新規分子標的として VEGFR 阻害剤の有効性について検討を進めた。

A. 研究目的

多段階発がん過程においてがん細胞に蓄積するゲノム異常プロファイルは、多様な病態や臨床像を規定するのみならず、がん細胞が強く依存している特定のゲノム異常を遮断する分子標的薬の感受性と強く相関している。本研究では、新型シーケンサー等の新技術を積極的に導入し、とりわけ有効な治療標的の同定が強く望まれている難治がんにおけるゲノム異常の同定をすすめ、有効な分子診断や新しい治療法の実現を加速させることを目的とする。

B. 研究方法

1) 悪性リンパ腫・胃がん・転移乳がん・卵巣がん・胆道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、エクソンキャプチャー法により、ゲノムの全エクソン領域を濃縮し、新型シーケンサーを用いてゲノム異常を広く検出する。がん検体の全トランスクリプトーム解析を行ない、融合遺伝子等のがん遺伝子検出も進める。解析に使用する新型シーケンサーについては、国立がん研究センター研究所に設置された Genome analyzer IIX 並びに HiSeq2000 を使用する。シーケンスデータ解析に関しては、シーケンス情報解析を専門とするチーム（3名）にて進める。

2) 非ウイルス性肝臓がんにおける新規診断マーカー開発研究

本邦において急速に増加している非ウイルス性肝臓がんについて、非コード RNA を含めた網羅的な発現解析を行い、新たな治療標的や診断分子マーカーの同定を進めた。非ウイルス性肝がんにおける miRNA 生合成経路の異常について検討を進めた。

3) 胆道がん細胞株バンクの分子プロファイル取得

と新規分子標的治療の検討

当センターにて樹立された胆道がん細胞株を用いて、遺伝子発現解析並びに遺伝子変異プロファイルを取得した。それらの細胞株を用いて、新規分子標的治療薬の効果を in vivo で評価すると共に、その奏功性と相関するような分子マーカーの同定を進めた。

（倫理面への配慮）

本研究は疫学研究の指針に基づき国立がんセンター倫理審査委員会にてすでに承認が得られている。病理診断・検査の残余を研究に用いるため、提供者に新たに侵襲を与えず、また診断への影響や治療への介入はない。臨床検体の提供者には、臨床検体が医学研究に使われることについて文書および口頭で説明し、臨床検体は連結可能匿名化を行い、個人を特定することができるような情報はいっさい付加されずに実験に使用する。本研究所は国立がんセンターの実験動物倫理委員会の指針およびカルタヘナ法のもと、動物の愛護および管理に関する法律、実験動物の飼養および保管等に関する基準にしたがって行う。実験動物に使用に際しては、研究上の目的を達するに必要最小限の数の実験動物を使用し、その苦痛の軽減には最大限の配慮を払う。

C. 研究結果

1) 難治がん臨床検体における新たなゲノム異常探索

悪性リンパ腫における新たなゲノム異常探索のため眼付属器 MALT リンパ腫 (OAL) 臨床検体 19 症例について全エクソン解読を進め、2 症例以上で mutation を認めた遺伝子とし A20/TNFAIP3 に加えて NFkB 活性化に関与すると考えられる遺伝子並びにエピゲノム関連遺伝子の変異を複数症例で同定した。

転移性乳がんとその原発巣について全エクソーム

解読を行い、転移病変特異的な変異を複数同定した。そのうち複数の症例で共通して突然変異が認められる転移関連遺伝子を同定した。

低分化胃癌並びに卵巣がんの全トランスクリプトーム解読を行い、新規融合遺伝子の同定を進めた。

2) 非 B 型非 C 型肝細胞がんの解析

非 B 型非 C 型肝細胞がん 50 症例を集積し、網羅的発現解析並びに arrayCGH 解析を行い、非ウイルス性肝がんの特徴的な遺伝子発現並びに染色体コピー数異常プロファイルを取得した。mRNA に加え長鎖非翻訳 RNA (long intergenic non-coding RNA:linc RNA) の解析を行い、血中診断マーカーの候補に加えて非 B 型非 C 型で特異的に発現上昇する linc RNA も同定した。同一検体で全エクソン解読による変異解析を進めた。非ウイルス性肝臓がんにおいて、miRNA 生合成関連分子の発現が有意に減少し、喫煙や糖尿病といった臨床背景、悪性度、予後と関連することを見出した。

3) 胆道がんにおける新規分子標的治療の検討

当センターにおいて独自に樹立した胆道がん細胞株 10 種について、発現解析並びに遺伝子変異プロファイルを取得した。製薬会社との共同研究により、VEGFR 阻害剤について in vivo xenograft model を用いてその有効性評価を行った結果、複数の細胞株で有意に腫瘍縮小効果が見られた。更に上述の分子プロファイルを用いて、その奏功性と関連するような分子マーカーの同定を進めた。

D. 考察

1) 難治がん臨床検体における新たなゲノム異常分子マーカー探索

悪性リンパ腫のゲノム解析から同定された新規変異については、より詳細な分子機構の解明と多数検体での変異頻度を調べ、特に NFkB 阻害剤の有効性バイオマーカーとなる可能性について検討を進める。

転移性乳がんにおける新規がん関連遺伝子については、その機能解析を更に進め、転移性乳がんの治療標的としての可能性について検討を進める。

これまで非ウイルス性肝がんを検出するためのスクリーニングマーカーが存在していないことから、本研究における遺伝子発現解析から得られた血中バイオマーカーはその有望な候補と考えられる。更に肥満や糖尿病といったメタボリック症候群と肝発がんの関連検討から、がん予防や治療の新戦略を開発する。

2) 高速シーケンサー技術を導入したがんゲノム解析

新型シーケンサー等の新技術を積極的に導入し、とりわけ有効な治療標的の同定が強く望まれている難治がんにおけるゲノム異常の同定をすすめ、有効な分子診断や新しい治療法の実現を加速させることを目的として、症例の集積並びに解析を今後も継続して進める。これまでの解析の結果、治療標的とな

りうる遺伝子変異や血中バイオマーカー候補が同定されており、今後更なる検証を行う予定である。

E. 結論

悪性リンパ腫 MALT リンパ腫について全エクソン解読から新規遺伝子の変異を複数症例で同定した。非ウイルス性肝がんにおける染色体コピー変化、非コード RNA を含む網羅的な遺伝子発現変化並びに全エクソンシーケンサー解析を行い、その発癌分子機構の解明と診断マーカー同定を進めた。転移性乳がんとその原発巣について全エクソーム解読を行い、転移関連遺伝子を同定した。胆道がん細胞株の分子プロファイルを取得し、VEGFR 阻害剤の奏功性について検討を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Shibata T**, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito N, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia*, 2011, 13, 864-873.
- 2) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Hiroki U, Murayama-Hosokawa S, **Shibata T**, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*, 2012, 22, 208-219.
- 3) Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, **Shibata T**, Ligon K, Fukami K, Hahn W, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011, 108, 20388-20393.
- 4) Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, **Shibata T**, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, 2011, 30:783-795
- 5) Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, **Shibata T**, Furuta K, Tsuda H. Comprehensive histological analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2011, 35:1226-34.
- 6) Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, Kosuge T, Yoshikawa D, Kono T, Furukawa H, **Shibata T**. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 2011, 105:131-138.
- 7) **Shibata T**, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki Y. Mutant IDH1 confers an in vivo

growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol.* 2011, 178:1395-1402.

- 8) Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, **Shibata T**, Ohata H, Nakagama H, Taya Y, Sata H. Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J. Bio Chem.*, 2012, in press
- 9) Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology.* 2011, 78:1-9.
- 10) Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, **Shibata T**, Tsukamoto T, Yokoi Y, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 2011, 32:462-469.

2. 学会発表

1) 全ゲノム解読から見える新たながんゲノム像 柴田 龍弘、第3次対がん10カ年総合戦略・文科省がん支援活動 合同公開シンポジウム

2) Whole genome sequencing analysis of virus-associated hepatocellular carcinoma

柴田 龍弘、第70回日本癌学会、シンポジウム

3) Integrated genome and transcriptome analyses of virus-associated hepatocellular carcinoma

柴田 龍弘、Cancer Genomics, EMBO/EMBL Symposium

4) 肝がんにおける microRNA 生合成経路因子の発現異常とその制御

柴田 龍弘、第100回日本病理学会、ワークショップ

H. 知的財産権の出願・登録情報

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

諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

研究分担者 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データや特定の表現型と比較することで、新規のがん関連遺伝子を同定するとともに病態形成機構を解明し、個別化がん医療に資する診断、治療、予防の開発に資する成果を上げる。

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

独自開発の高精度ゲノムアレイと応用技術に加えて高スループット miRNA 機能アッセイ法を確認し、難治がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析を実施することで、がん抑制性マイクロ RNA (TS-miR) の複数を同定した。その結果、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。さらに、高スループット機能アッセイ法により 327 種類の miRNA の中からがん関連遺伝子を探索する方法を構築し、子宮体がん (EC) TS-miRNA

として *miR-152* を同定した。*miR-152* は *COP22* 遺伝子 (17q21.32) の intron 1 に座位し、標的遺伝子として *E2F3*, *MET*, *Rictor* を新規に同定した。EC の症例解析においても *miR-152* は DNA 過剰メチル化により高頻度に発現抑制されており、また、EC 細胞株移植 SCID マウスへの *miR-152* 投与実験から *miR-152* の補充療法が新規がん治療法となる可能性が示された。(Tsuruta *et al.*, *Cancer Res*, 71:6450-62, 2011)

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

独自開発の高精度ゲノムアレイと応用技術に加え高スループット miRNA 機能アッセイにより難治がんのゲノム・エピゲノム解析を実施して、がん関連マイクロ RNA を含む複数のがん関連遺伝子を同定した。がん個別化医療のバイオマーカーや分子標的治療法のシーズとして期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le

Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, Nakagawa H: Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet*. 2012 [Epub ahead of print]

2. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O: ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology*. 2012 [Epub ahead of print]
3. Kozaki K, Inazawa J: Tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Cancer Sci*. 2012 [Epub ahead of print]
4. Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*. 2012 [Epub ahead of print]
5. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*. 2012 [Epub ahead of print]
6. Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi Y: Gene amplification of ESR1 in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex

- ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol.* 2011[Epub ahead of print]
7. Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem.* 286:44086-94. 2011
 8. Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J: Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene.* 2011[Epub ahead of print]
 9. Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J: miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res.* 71:6450-62. 2011
 10. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J: The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.* 71:5765-78. 2011
 11. Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology.* 78:1-9.2011
 12. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y: Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol.* 2011:780836. 2011
 13. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y: Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis.* 32:462-9.2011
 14. Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 32:389-98. 2011
2. 学会発表
 1. Inazawa J: Copy-number variation (CNV) in Japanese patients with multiple congenital anomalies and mental retardation (MCA/MR) by array-based comparative genomic hybridization analysis. Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. The 50th Annual Meeting of the Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. The Grand Hi Lai Hotel. Taipei, Taiwan. 13/March/2011
 2. Inazawa J: Function-based screening of tumor-suppressor microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer. The 8th Nikko International Symposium 2011. Jichi Medical University. Tochigi, Japan. 21/October/2011

3. 小崎健一、稲澤讓治：がん細胞において DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の機能的スクリーニング. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 4 日
4. 稲澤讓治：がんのテーラーメイド医療－診断、治療、予防の最前線－. 平成 23 年度国立大学附置研究所・センター長会議第 2 部会 (医学・生物学) シンポジウム. 東京医科歯科大学 5 号館 4 階講堂. 東京. 2011 年 11 月 18 日
5. 稲澤讓治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析の最近の進歩. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 5 日
6. 遠藤寛則、小崎健一、古田繭子、天笠光雄、稲澤讓治：Methylation-based screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in oral cancer. 平成 23 年度文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」. がん若手研究者ワークショップ. アートランドホテル 蓼科. 長野. 2011 年 8 月 31 日
7. 稲澤讓治：「パーソナルゲノム医療の時代は既に始まっている」. 2011 年度東京医科歯科大学オープンキャンパス. M&D タワー 2 階共用講義室 2. 東京. 2011 年 7 月 28 日
8. 三木大樹、久保充明、角田達彦、鎌谷直之、茶山一彰、高橋隆、稲澤讓治、中村祐輔、醍醐弥太郎：日本人と韓国人の肺腺癌発症に関連する TP63 の一塩基多型の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 5 日
9. 小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、津田均、杉原健一、稲澤讓治：大腸癌において SIX1 は ZEB1 を介し上皮間葉転換を誘導する. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 3 日
10. 宇野雅哉、斉藤愛記、井本逸勢、稲澤讓治、山岡昇司：卵巣癌細胞における恒常的 NF- κ B 活性化と足場非依存性増殖能に対する NIK の寄与. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 3 日
11. 原園陽介、小崎健一、村松智輝、倉沢泰浩、天笠光雄、稲澤讓治：膀胱癌細胞株における E-cadherin の発現変化を指標とした機能的スクリーニングによる EMT 関連 microRNA の探索. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 3 日
12. 上杉篤史、小崎健一、鶴田智彦、古田繭子、井本逸勢、小村健、稲澤讓治：機能的スクリーニングと DNA メチル化解析による口腔癌関連新規癌抑制遺伝子型 microRNA の探索. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 4 日
13. 遠藤寛則、小崎健一、古田繭子、天笠光雄、稲澤讓治：腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化によって発現抑制される口腔扁平上皮癌抑制遺伝子型 microRNA の探索. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 4 日
14. 細田文恵、新井康仁、宮本正之、北川敬之、片井均、谷口浩和、柳原五吉、井本逸勢、稲澤讓治、大木操、柴田龍弘：胃がんにおける新規がん遺伝子グリオキサラーゼ I の機能解析. 第 70 回日本癌学会

- 学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月4日
15. 小西博貴、井上純、市野瀬志津子、津田均、河野辰幸、市川大輔、大辻英吾、井本逸勢、稲澤讓治：食道癌におけるオートファジーATG7の不活性化. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月4日
16. 井上純、白樺、河野辰幸、稲澤讓治：癌におけるオートファジー関連遺伝子LC3Avariant-1の不活性化. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月4日
17. 宮脇豊、井本逸勢、春木茂男、小崎健一、河内洋、嶋田裕、河野辰幸、稲澤讓治：食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制される新規癌関連プロトカドヘリン遺伝子の同定. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月4日
18. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤讓治：Functionalスクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性microRNAの同定. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月5日
19. 三木大樹、久保充明、角田達彦、鎌谷直之、茶山一彰、高橋隆、稲澤讓治、中村祐輔、醍醐弥太郎：日本人と韓国人の肺腺癌発症に関連するTP63の一塩基多型の同定. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月5日
20. 田中真二、藍原有弘、茂榑薫、落合高德、ヤセン・マハムット、稲澤讓治、田中博、有井滋樹：肝癌再発を予測するオミックス解析と分子標的治療への応用. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月5日
21. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、松井毅、古田繭子、田中真二、坂元亨宇、有井滋樹、稲澤讓治：統合的アレイ解析による肝細胞癌の新規がん抑制遺伝子候補PACAPの同定. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011年10月5日
22. 醍醐弥太郎、三木大樹、久保充明、角田達彦、鎌谷直之、茶山一彰、高橋隆、稲澤讓治、中村祐輔：Genome-wide association study of lung cancer: Association of variation in TP63 with lung adenocarcinoma susceptibility. 日本人類遺伝学会第56回大会/第11回東アジア人類遺伝学会. 幕張メッセ. 千葉. 2011年11月11日
23. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤讓治：Functionalスクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性microRNAの同定. 第34回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2011年12月14日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 国内出願
特許第4740621号「食道癌の検出方法、および、抗食道癌物質のスクリーニング法」
稲澤讓治、井本逸勢平成23年5月13日
- 海外出願
Canadian patent No. 2,411,249
European patent No. 1291424
2. 実用新案登録
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 1) Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. MYC amplification as a prognostic marker of early stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*, 17:1481-1489, 2011.
- 2) Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI3K/AKT/NFκB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 73:302-309, 2011.
- 3) Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, Kohno T, Skaug V, Bowman ED, Mathe E, Takenoshita S, Yokota J, Haugen A, Harris CC. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin Cancer Res*, 17:1875-1882, 2011.
- 4) Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Niida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Goto N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res*, 1:823-833, 2011.
- 5) Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol*, 6:2011-2017, 2011.
- 6) Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 72:100-111, 2012.
- 7) Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:462-472, 2012.
- 8) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Med*, 18:375-377, 2012.
- 9) Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci.*, 103:782-90, 2012.
- 10) Chen LS, Saccone NL, Culverhouse RC, Bracci PM, Chen CH, Dueker N, Han Y, Huang H, Jin G, Kohno T, Ma JZ, Przybeck TR, Sanders AR, Smith JA, Sung YJ, Wenzlaff AS, Wu C, Yoon D, Chen YT, Cheng YC, Cho YS, David SP, Duan J, Eaton CB, Furberg H, Goate AM, Gu D, Hansen HM, Hartz S, Hu Z, Kim YJ, Kittner SJ, Levinson DF, Mosley TH, Payne TJ, Rao DC, Rice JP, Rice TK, Schwantes-An TH, Shete SS, Shi J, Spitz MR, Sun YV, Tsai FJ, Wang JC, Wrensch MR, Xian H, Gejman PV, He J, Hunt SC, Kardia SL, Li MD, Lin D, Mitchell BD, Park T, Schwartz AG, Shen H, Wiencke JK, Wu JY, Yokota J, Amos CI, Bierut LJ. Smoking and genetic risk variation across population of European, Asian, and African American ancestry - A meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol*, 36:340-351, 2012.
- 11) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6:244-285, 2011.
- 12) Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of Stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 1) Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. MYC amplification as a prognostic marker of early stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*, 17:1481-1489, 2011.
- 2) Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI3K/AKT/NFκB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 73:302-309, 2011.
- 3) Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, Kohno T, Skaug V, Bowman ED, Mathe E, Takenoshita S, Yokota J, Haugen A, Harris CC. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin Cancer Res*, 17:1875-1882, 2011.
- 4) Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Niida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Goto N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res*, 1:823-833, 2011.
- 5) Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol*, 6:2011-2017, 2011.
- 6) Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 72:100-111, 2012.
- 7) Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:462-472, 2012.
- 8) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Med*, 18:375-377, 2012.
- 9) Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci.*, 103:782-90, 2012.
- 10) Chen LS, Saccone NL, Culverhouse RC, Bracci PM, Chen CH, Dueker N, Han Y, Huang H, Jin G, Kohno T, Ma JZ, Przybeck TR, Sanders AR, Smith JA, Sung YJ, Wenzlaff AS, Wu C, Yoon D, Chen YT, Cheng YC, Cho YS, David SP, Duan J, Eaton CB, Furberg H, Goate AM, Gu D, Hansen HM, Hartz S, Hu Z, Kim YJ, Kittner SJ, Levinson DF, Mosley TH, Payne TJ, Rao DC, Rice JP, Rice TK, Schwantes-An TH, Shete SS, Shi J, Spitz MR, Sun YV, Tsai FJ, Wang JC, Wrensch MR, Xian H, Gejman PV, He J, Hunt SC, Kardina SL, Li MD, Lin D, Mitchell BD, Park T, Schwartz AG, Shen H, Wiencke JK, Wu JY, Yokota J, Amos CI, Bierut LJ. Smoking and genetic risk variation across population of European, Asian, and African American ancestry - A meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol*, 36:340-351, 2012.
- 11) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6:244-285, 2011.
- 12) Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of Stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma.

- Int J Cancer, 129:2445-2453, 2011.
- 13) Behjati R, Kawai K, Inadome Y, Kano J, Akaza H, Noguchi M. APAF-1 is related to an undifferentiated state in the testicular germ cell tumor pathway. *Cancer Sci*, 102:267-274, 2011.
 - 14) Sakashita S, Li D, Nashima N, Minami M, Furuya S, Morishita Y, Tachibana K, Sato Y, Noguchi M. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance. *Pathol Int*, 61:130-137, 2011.
 - 15) Li D, Sakashita S, Morishita Y, Kano J, Shiba-Ishii A, Sato T, Noguchi M. Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res*, 31:529-534, 2011.
 - 16) Sugita S, Morishita Y, Kano J, Furuya S, Shiba-Ishii A, Noguchi M. IGFBP-1 is expressed specifically in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Histopathol*, 58:729-738, 2011.
 - 17) Satomi K, Morishita Y, Sakashita S, Kondou Y, Furuya S, Minami Y, Noguchi M. Specific expression of ZO-1 and N-cadherin in rosette structures of various tumors: possible recapitulation of neural tube formation in embryogenesis and utility as a potentially novel immunohistochemical marker of rosette formation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*, 459:399-407, 2011.
 - 18) Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor levels in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Int J Cancer*, 129:1410-1416, 2011.
 - 19) Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a signal center retrospective analysis. *J Clin Exp Hematopathol*, 51:109-114, 2011.
 - 20) Tachibana K, Minami Y, Shiba-Ishii A, Kano J, Nakazato Y, Sato Y, Goya T, Noguchi M. Abnormality of the hepatocyte growth factor/MET pathway in pulmonary adenocarcinogenesis. *Lung Cancer*, 75:181-188, 2012.
 - 21) Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol*, in press.
 - 22) Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478:64-69, 2011.
 - 23) Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*, in press.
 - 24) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci*, in press.
 - 25) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. A ngiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 416:239-245, 2011.
 - 26) Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene*, 30:4194-4207, 2011.
 - 27) Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia*, 25:921-931, 2011.
 - 28) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *J Nat Med*, 65:651-655, 2011.
 - 29) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 128:1335-1343, 2011
 - 30) Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito N, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia*, 13:864-873, 2011.
 - 31) Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki Y. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol*, 178:1395-1402, 2011.
 - 32) Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, Kosuge T, Yoshikawa D, Kono T, Furukawa

- H, Shibata T. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 105:131-138, 2011.
- 33) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Hiroki U, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*, 22:208-219, 2012.
- 34) Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon K, Fukami K, Hahn W, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:20388-20393, 2011.
- 35) Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H. Comprehensive histological analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 35:1226-1234, 2011.
- 36) Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi Y, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32:462-469, 2011.
- 37) Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagawa H, Taya Y, Sata H. Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J Biol Chem*, 2012, in press.
- 38) Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, 30:783-795, 2011.
- 39) Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, Nakagawa H. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet*, 2012 [Epub ahead of print]
- 40) Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology*. 2012 [Epub ahead of print]
- 41) Kozaki K, Inazawa J. Tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Cancer Sci*, 2012 [Epub ahead of print]
- 42) Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J. SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*, 2012 [Epub ahead of print]
- 43) Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*, 2012 [Epub ahead of print]
- 44) Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi Y. Gene amplification of ESR1 in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol*, 2011 [Epub ahead of print]
- 45) Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J. The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem*, 286:44086-44094. 2011.
- 46) Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J. Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene*, 2011 [Epub ahead of print]
- 47) Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*, 71:6450-6462. 2011.
- 48) Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res*, 71:5765-5778, 2011
- 49) Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*, 78:1-9, 2011.

- 50) Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*, 780836, 2011.
- 51) Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32:389-398. 2011.

