

影響について HO-1 プロモーターのルシフェラーゼレポーターやクロマチン免疫沈降法により検討した。Loss of function による検討のために見出した制御因子に対する siRNA を用いて検討を行った。

特定の Smad2/3 結合部位群に共通するモチーフの算出は分担研究者らの用いたこれまでの方法に基づき行った(Mizutani et al, J Biol Chem, 2011)。RNA-sequencing は確立している方法を用いて Proton sequencer (Life technologies)によりデータ取得を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では臨床検体は用いない。

### C 研究結果

NMuMG 細胞は TGF- $\beta$  により EMT を起こすモデル上皮細胞である。求電子剤である tBHQ はこの細胞においても HO-1 遺伝子の転写を増強させたが、TGF- $\beta$  はこれを抑制した。Nrf2 が HO-1 の転写に重要な役割を果たすことが知られているが、TGF- $\beta$  は Nrf2 の安定性や核内移行に影響を与えなかったことから、次に Nrf2 の co-factor の制御に着目した結果、TGF- $\beta$  が MafK と Bach1 の発現を上昇させることを見出した。これらの因子の高発現はむしろ Nrf2 による転写活性化を抑制することが知られており、実際に HO-1 プロモーターの転写レポーターアッセイにより MafK やそのファミリー分子 MafG は Nrf2 による転写増強を抑制した。そこで MafK、Bach1 それぞれに対する siRNA を用いて tBHQ 誘導 HO-1 発現の TGF- $\beta$  による抑制に対する影響を検討した。その結果 TGF- $\beta$  による抑制作用はこれらの siRNA によってキャンセルされた。クロマチン免疫沈降法による検討により HO-1 プロモーターへの Nrf2 の結合は TGF- $\beta$  により抑制される一方で MafK、Bach1 の結合は変化しなかった。さらに MafK、Bach1 は Smad3 と結合した。分担研究者のこれまでの Smad2/3 の ChIP-sequencing データ (未発表) から、Smad2/3 自身も HO-1 プロモーターに結合して制御することが示唆された。以上を論文報告した(Okita et al, J Biol Chem, 2013)。

また分担研究者らのこれまでの肺腺がん細胞における Smad2/3 結合部位の ChIP-sequencing 解析に関連して TGF- $\beta$  による遺

伝子発現変化を RNA-sequencing により網羅的に取得し ncRNA を含めた今後の定量解析が可能になった。さらに Smad3 結合が長時間にわたり持続する領域と一過性に過ぎない領域の存在に着目してその特徴を解析した結果、肺腺がんにおいてその発現が予後に相関する、ある転写因子を見出した。この転写因子を siRNA によってノックダウンして TGF- $\beta$  による遺伝子発現変化についてあわせて RNA-sequencing データを取得した。

### D&E 考察及び結論

本検討により肺がん発がんの抑制因子 HO-1 の Nrf-2 による制御の阻害を通して TGF- $\beta$  が新たながん促進的な役割を果たす可能性が示唆された。この結果はこれまでの EMT における役割とあわせ、肺腺がんにおいて TGF- $\beta$  ががんの進展のみならず発がんにおいても促進的役割を果たす可能性を示唆するものとして重要な知見であると考えられ今後更なる検討が必要である。

また本検討で見出した肺腺がんでの新たな Smad2/3 の制御因子について今後 RNA-sequencing データの網羅的解析を行うことで、如何に TGF- $\beta$  シグナルが肺がん細胞に利用されているか、その鍵となる機構を明らかにすることが期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, & Kato M. “Transforming growth factor- $\beta$  induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the Heme Oxygenase-1 gene” *J Biol Chem*, **288**: 20658-20667, 2013

### 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（創薬基盤推進研究事業）  
 分担研究報告書  
 「臨床検体における診断法開発」に関する研究

分担研究者： 竹内 賢吾 がん研究会がん研究所 病理部

研究要旨：ALK 肺癌診断の一般化と普及のため、判定クライテリアと運用法を明文化した ALK 陽性肺癌病理診断評価システム iScore の確立、検証を試みた。360 例の肺癌検体を用い、全例に FISH および抗 ALK iAEP 法免疫染色 (iAEP IHC) を、207 例に multiplex RT-PCR 法を行った。iAEP IHC の結果は iScore にて判定した。現段階で ALK 融合遺伝子検出のスタンダードとされている FISH 法と iScore は、iScore 3 を陽性とし、2, 1, 0 を陰性と定義した場合 100%一致した。病理組織が利用できる場合、iAEP IHC によりスクリーニングをかけ、iScore 0, 3 はそれぞれ ALK 融合遺伝子陰性、陽性として良く (FISH で確認できればさらに確実)、iScore 1, 2 では FISH での確認が望ましい、という診断アルゴリズムは妥当であると考えられた。

A. 研究目的

主任研究者らは 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果、新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した (Nature 448: 561-566)。これを受け、病理診断医である分担研究者らは、ALK 陽性肺癌の簡便な診断法として multiplex RT-PCR 法 (Clin Cancer Res. 2008;14:6618-6624.)、高感度免疫染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法 (Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149.)、FISH 法を開発した。その後、iAEP 法の結果を 4 段階にスコアリングし、そのスコアによっては FISH 法により補完し総合判定するというアルゴリズムを検討した (H22 年度本分担研究)。

本分担研究の今年度の目的は、ALK 肺癌診断の一般化と普及のため、判定クライテリアと運用法を明文化した ALK 陽性肺癌病理診断評価システム iScore を確立し検証することである。

B. 研究方法

学習セットとして 202 例の肺癌検体 (腺癌 148 例、扁平上皮癌 39 例、腺扁平上皮癌 6 例、大細胞神経内分泌癌 4 例、小細胞癌 3 例、および多形癌 2 例)、検証セットとして 158 例の EGFR 変異陰性かつ KRAS 変異陰性肺腺癌を用いた。学習セットには全例、multiplex RT-PCR (凍結検体)、FISH、および抗 ALK iAEP 法免疫染色 (iAEP IHC) が行われた。検証セットには全例、FISH、iAEP IHC が行われ、陽性例のうち凍結検体が存在するものについて multiplex RT-PCR が施行された。

iAEP IHC の結果は、表 1 の基準により iScore を付与された。

iScore for ALK iAEP IHC Informative Score for anti-ALK iAEP immunohistochemistry, Ver. 3				
	ALK iScore 3	ALK iScore 2	ALK iScore 1	ALK iScore 0
<b>inclusion criteria</b>	ALK iScore 3 陽性腫瘍細胞率>90% (checker board patternの場合、iScore 2とする)	ALK iScore 2 a. 80%≧陽性腫瘍細胞率<90% b. 陽性腫瘍細胞率>80%だが checker board pattern (陽性・陰性細胞が混在し隣り合う)を呈する場合	ALK iScore 1 50%≧陽性腫瘍細胞率<80% 陽性腫瘍細胞なし	ALK iScore 0 陽性腫瘍細胞なし
<b>interpretation</b>	Positive for ALK fusion 腺癌ならば ALK 融合遺伝子陽性 大細胞神経内分泌癌ならば全長 ALK 免疫の可能性ありし 小細胞癌ならば全長 ALK 免疫	Probably negative for ALK fusion ALK 融合遺伝子が陰性にもかかわらず、一部あるいはすべての細胞が神経内分泌系への分化を呈している。あるいは ALK 融合遺伝子が陽性にもかかわらず、扁平上皮への分化を呈する部などで ALK 融合遺伝子量が低下している。など	Probably negative for ALK fusion ALK 融合遺伝子陰性であるが、一部あるいはすべての細胞が神経内分泌系への分化を呈している。など	Negative for ALK fusion ALK 融合遺伝子陰性であるが、一部あるいはすべての細胞が神経内分泌系への分化を呈している。など
<b>instruction</b>	腺癌ならば FISH 等での ALK 融合遺伝子確認不要。確認できればさらに確実、明らかな腺癌以外では FISH 等での確認を要する。	FISH 等での ALK 融合遺伝子確認が望ましい。	FISH 等での ALK 融合遺伝子確認が望ましい。	FISH 等での ALK 融合遺伝子確認不要。陰性確認できればさらに確実。

iScoreとは、iAEP (intercalated antibody-enhanced polymer)法による免疫染色 (immunohistochemistry)の結果を、適合条件 (inclusion criteria)に従い評価することで、結果の解釈 (interpretation)と今後の指針 (instruction)が得られるスコアリングシステムです。ここには腫瘍に対する抗ALK iAEP免疫染色のiScore、すなわちiScoreが示されています。

1. 陰性コントロールと比較して染色強度が高い細胞を陽性細胞とする。
2. 陽性・陰性コントロールの染色所見が異常である場合、iScoreは適用できない。
3. 印痕細胞など高濃度に染色を有する細胞に染色されるべき細胞質の領域が少なく、ALK融合遺伝子陽性であっても染色されない (陽性細胞が見えない) 高度増殖を有する細胞が陰性である場合、それらは陽性細胞率の算入には加えない。
4. iScore 2では、適合した条件によりまたはbを付記する。例 iScore 2a
5. 確定を望まない場合は、「判定不能」とするか、推定されるiScoreに「U」を付記のうえ確定困難な理由を記載する。例「ALK iScore 3理由：腫瘍と思われる細胞はすべて陽性であるが、数個しか検体中に存在しないため」

Copyright (C) 2012-2013 Takeuchi. All Rights Reserved.

表1

C. 研究結果

学習セット 202 例において、FISH および multiplex RT-PCR の結果は一致し、陽性例は 2 例であった。iScore に関しては 3 が 2 例、2 が 1 例、および 1 が 2 例であった。iScore 3 の 2 例は FISH および multiplex RT-PCR 陽性の 2 例に一致した。陽性例は腺癌であり、他の組織型に陽性例はなかった。

検証セット 158 例において、iScore 3 の 8 例は FISH 陽性の 8 例に一致した。このうち 5 例に multiplex RT-PCR が施行され、すべてに EML4-ALK の発現が確認された (図 1)。また、学習セットの ALK 陽性率 1% に比し、EGFR 変異陰性かつ KRAS 変異陰性肺腺癌に絞った検証セットにおいて、ALK 陽性率は 5.1% であった。

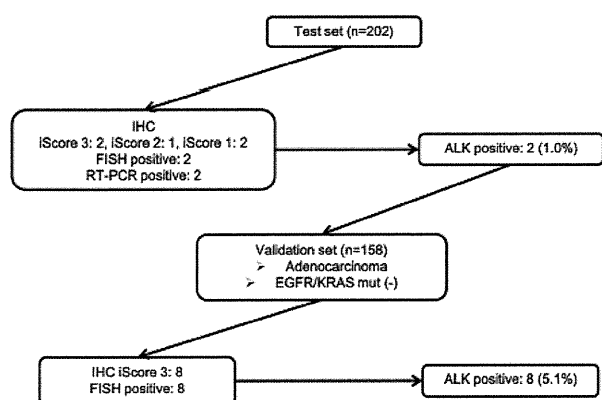


図 1

#### D. E. 考察&結論

360例の肺癌検体において、FISHの結果とiScore 3を陽性と定義した場合のiAEP IHC結果は完全に一致した。これらの結果から、iAEP IHCの判定基準、解釈、その後とるべき方針をまとめたiScoreの妥当性が確認された。

病理組織が利用できる場合、iAEP IHCによりスクリーニングをかけ、iScore 0, 3はそれぞれALK融合遺伝子陰性、陽性として良いこと (FISHで確認できればさらに確実)、iScore 1, 2ではFISHでの確認が望ましいこと、すべての肺癌検体においてALKを検索することが望ましいものの、何らかの理由により検索の対象を制限しなければならない場合、EGFR変異かつKRAS変異陰性肺腺癌に対象を絞ったとしても、陽性症例を取りこぼす可能性は低いこと、を表したフローチャートを作製した (図2)。

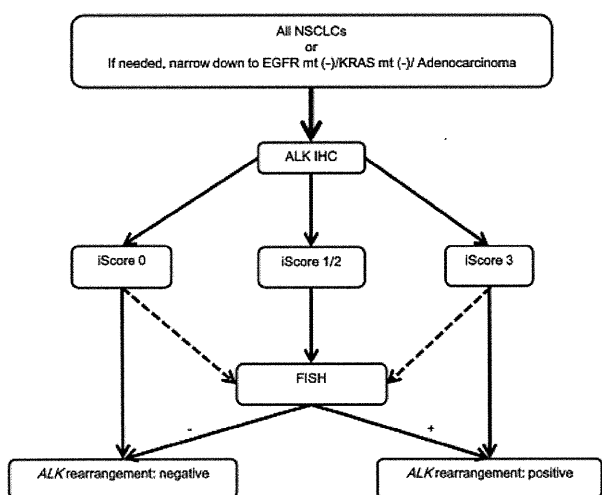


図2

F. 健康危険情報  
該当せず。

#### G. 研究発表

1. Hong M, Kim RN, Song JY, Choi SJ, Oh E, Lira ME, Mao M, Takeuchi K, Han J, Kim J, Choi YL. HIP1-ALK, a Novel Fusion Protein Identified in

Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*;9:419-422.2014.

2. Lee SE, Kang SY, Takeuchi K, Ko YH. Identification of RANBP2-ALK fusion in ALK positive diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*.2014. in press

3. Li J, Yin WH, Takeuchi K, Guan H, Huang YH, Chan JK. Inflammatory myofibroblastic tumor with RANBP2 and ALK gene rearrangement: a report of two cases and literature review. *Diagn Pathol*;8:147.2013.

4. Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLoS One*;8:e69794.2013.

5. Takeuchi K. Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. *J Thorac Oncol*;8:e67-68.2013.

6. Miyana A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosai Hira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. *BMC Cancer*;13:262.2013.

7. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*;14:590-598.2013.

8. Matsuda I, Takeuchi K, Mizuguchi S, Kaji M, Ueda K, Teramura K, Hirota S. A case of synchronous bilateral lung cancers: EML4-ALK positive adenocarcinoma in the right lung and adenocarcinoma in situ (the former bronchioloalveolar carcinoma) in the left lung. *BMC Pulm Med*;13:25.2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当せず。

## 東京大学

## 間野博行 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ando K, Tsushima H, Matsuo E, Horio K, Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M & Miyazaki Y	Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation	J Biol Chem	288	9457-9467	2013
Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H	Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling	Cancer Sci	104	1002-1008	2013
Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H	STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function	Oncol Rep	30	1542-1548	2013
Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R	Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils	Cell Signal	25	666-673	2013
Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H	Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers	Proc Natl Acad Sci U S A	110	3029-3034	2013
Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y & Gemma A	Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation	BMC Cancer	13	262	2013
Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y	Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes	BMC Cancer	13	8	2013

Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K	Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes	Leukemia	27	2107-2111	2013
Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H	Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation	Leukemia	28	426-428	2014

## 自治医科大学

## 仁木利郎 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T & Yasuda Y	The Hsp 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway.	Oncol Rep	31	619-624	2014
Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M & Niki T.	Lung Cancer with Loss of BRG1/BRM, shows Epithelial Mesenchymal Transition Phenotype and Distinct Histologic and Genetic Features	Cancer Sci	104	266-273	2013
Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, Saito H, Nakayama H, Kameda Y, Yokose T, Oguni S, Niki T & Miyagi Y	Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells	Lab Invest	93	1137-1146	2013



川崎医科大学 中田昌男 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiramami Y, Shimizu K, <u>Nakata M</u>	Role of 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography in preoperative management of solid-type small-sized lung cancer	Ann Nucl Med	27	515-22	2013
Shimizu K, Yukawa T, Hiramami Y, Okita R, Saisho S, Maeda A, Yasuda K, <u>Nakata M</u>	Heterogeneity of the EGFR mutation status between the primary tumor and metastatic lymph node and the sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer	Target Oncol	8	237-42	2013
Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiramami Y, Shimizu K, <u>Nakata M</u>	Post-recurrence survival of patients with non-small-cell lung cancer after curative resection with or without induction/adjvant chemotherap	Interact Cardiovasc Thorac Surg	16	166-72	2013
Maeda A, <u>Nakata M</u> , Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hiramami Y, Shimizu K	Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis	Oncol Rep	29	39-44	2013
Maeda A, <u>Nakata M</u> , Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hiramami Y, Shimizu K	Unknown primary large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) in the mediastinum	Gen Thorac Cardiovasc Surg	61	542-5	2013
Yukawa T, Shimizu K, Hiramami Y, Maeda A, Yasuda K, <u>Nakata M</u> .	Lung cancer with sarcoid reaction in the lymph nodes following chemoradiotherapy	Asian Cardiovasc Thorac Ann	21	732-4	2013
Shimizu K, Okita R, <u>Nakata M</u>	Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer	Ann Transl Med	1	doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2013.06.01	2013

## 東京医科大学 池田徳彦 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeda N, Yoshimura A, Hagiwara M, Akata S, Saji H	Three Dimensional Computed Tomography Lung Modeling is Useful in Simulation and Navigation of Lung Cancer Surgery	Ann Thorac Cardiovasc Surg	19(1)	1-5	2013
Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N.	Prognostic factors and the significance of treatment after recurrence in completely resected stage I non-small cell lung cancer	CHEST	143(6)	1626-2634	2013
Shimada Y, Saji H, Nomura M, Matsubayashi J, Yoshida K, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N	Cancer stem cell-related marker expression in lung adenocarcinoma and relevance of histologic subtypes based on IASLC/ATS/ERS classification	Onco Targets and Therapy	6	1597-1604	2013
Saji H, Inoue T, Kato Y, Shimada Y, Hagiwara M, Kudo Y, Akata S, Ikeda N	Virtual segmentectomy based on high-quality three-dimensional lung modelling from computed tomography images	Interact Cardiovasc Thorac Surg	17(2)	227-232	2013
Kudo Y, Saji H, Shimada Y, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N	Proposal on incorporating blood vessel invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I non-small cell lung cancer	Lung Cancer	81(2)	187-193	2013
Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Nomura M, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N	A proposal for Combination of Total Number and Anatomical Location of Involved Lymph Nodes for Nodal Classification in Non-small Cell Lung Cancer	CHEST	143(6)	1618-1625	2013
Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N	Prognostic factors and the significance of treatment after recurrence in completely resected stage I non-small cell lung cancer	CHEST	143(6)	1626-1634	2013
Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Hamanaka W, Kudo Y, Yoshida K, Matsubayashi J, Usuda J, Ohira T, Ikeda N	Gene expression profiling and molecular pathway analysis for the identification of early-stage lung adenocarcinoma patients at risk for early recurrence	Oncol Rep	29(5)	1902-1906	2013
Kurata A, Saji H, Ikeda N, Kuroda M	Intracaval and intracardiac extension of invasive thymoma complicated by superior and inferior vena cava syndrome	Pathology International	63(1)	56-62	2013



Ikeda N, Saji H, Hagiwara M, Ohira T, Usuda J, Kajiwara N	"Recent advances in video-assisted thoracoscopic surgery for lung cancer"	Asian J Endosc Surg	6(1)	9-13	2013
---	---	---------------------	------	------	------

## 東京大学

## 鯉沼代造 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, & Kato M	Transforming growth factor- $\beta$ induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the Heme Oxygenase-1 gene	J Biol Chem	288	20658-20667	2013