

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

大腸癌層別化による発がん分子基盤の解明と配列特異的標的治療薬開発への応用

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 金田 篤志

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人千葉大学が実施した平成26年度「大腸癌層別化による発がん分子基盤の解明と配列特異的標的治療薬開発への応用」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I . 委託業務成果報告（総括）	
大腸癌層別化による発がん分子基盤の解明と配列特異的標的治療薬開発への応用	----- 1
金田篤志	
II . 委託業務成果報告（業務項目）	----- 8
1 . 大腸がん層別化	----- 8
金田篤志	
2 . 小分子化合物開発	----- 12
永瀬浩喜	
III . 学会等発表実績	----- 17
IV . 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

大腸癌層別化による発がん分子基盤の解明と配列特異的標的治療薬開発への応用

業務主任者 金田 篤志 千葉大学大学院医学研究院教授

研究要旨

本研究は網羅的解析による層別化に基づいて大腸がんの本態解明を行い、各症例群の治療・早期発見のためのイノベティブな標的の探索、及びリード化合物開発などその成果の医療応用推進を目的とする。大腸癌層別化の業務では、網羅的解析による層別化に基づいて大腸がんの本態解明を行い、各症例群の治療・早期発見のためのイノベティブな標的を探索する。小分子化合物開発の業務では、創薬候補としての配列特異的小分子化合物の開発を行う。本年度は大腸癌層別化として、側方進展型腫瘍、鋸歯状腺腫を対象に層別化を行った。側方進展型腫瘍は KRAS 変異(+)中メチル化群と癌遺伝子変異(-)低メチル化群の2群に層別化され、両者は肉眼形態上も異なる、全く発癌経路の異なる症例群であった。鋸歯状腺腫も高メチル化群、中メチル化群の2群に層別化され、高メチル化群を示した SSA/P が高メチル化大腸癌の前癌病変と考えられた。これらの症例で、腺腫から癌化への進展に関わる分子異常を同定したが、それらを標的とする配列特異的小分子化合物を開発するための有用な候補と考えられた。小分子化合物開発について、先行開発していた KRAS 変異に対する配列特異的小分子化合物の安全性を検証し、また KRAS 変異以外で大腸癌で変異が認められる遺伝子、異常メチル化が認められる遺伝子について、それぞれ小分子化合物を合成した。診断への応用では、どの大腸癌サブタイプでも共通してメチル化が認められる遺伝子を利用し、大腸癌存在診断を可能とする血漿中の癌由来 DNA を同定する高感度・高特異度のマーカーを樹立した。

業務項目

1. 大腸癌層別化

金田篤志

千葉大学大学院医学研究院・教授

2. 小分子化合物開発

永瀬浩喜

千葉県がんセンター研究所・所長

A. 研究目的

網羅的ゲノム解析情報に基づく個別化医療の普及・開発は、疾患の予後を改善し、有効な治療法がないがんへの対策として、社会上強く要請されている。本研究は網羅的解析による層別化に基づいて大腸がんの本態解明を行い、各症例群の治療・早期発見のためのイノベティブな標的の探索、及びリード化合物開発などその成果の医療応用推進を目的とする。大腸癌層別化業務では、網羅的解析による層別化に基づいて大腸がんの本態解明を行い、各症例群の治療・早期発見のためのイノベティブな標

的を探索する。小分子化合物開発業務では、ピロール・イミダゾールポリアミド (PIP) が、2本鎖 DNA のマイナーグループへ配列特異的に結合することを応用し、創薬候補としての配列特異的小分子化合物の開発を行う。

B. 研究方法

3年間で 600-1000 症例の病変を解析予定である。必要に応じてダイセクションを行い、核酸を抽出する。

我々の開発した層別化マーカーを用いて次世代シーケンサーを用いた Bisulfite-seq あるいはパイロシーケンスにより定量的メチル化解析を行い、階層的クラスタリングにて症例層別化する。

がんドライバー変異遺伝子 125 個 (Vogelstein ら, Science 2013)、ミスマッチ修復遺伝子、Wnt シグナル・TGF-β シグナル等大腸がん重要シグナル関連遺伝子、エピゲノム修飾因子など含む約 200 遺伝子のエクソン全領域についてキャプチャ・シー

ケンス法により網羅的変異解析する。

以上について平成 26 年度は、鋸歯状腺腫、顆粒状・無顆粒状側方進展型腫瘍の腺腫、早期がんについて先行解析し、各サブタイプの分子基盤を解明する。以降、進行がん 400 症例について解析を加え、癌進展に重要な因子を同定する。

またほぼ全ての大腸がん、あるいは各サブタイプのほぼ全例で早期病変からメチル化を認めるマーカーに対し、血漿 DNA におけるメチル化を検討し、感度・特異度ともに非常に高いがん存在診断マーカーを樹立する。

先行して開発が進んでいた、KRAS コドン 12 変異を認識する PIP にアルキル化剤 KR12 について、抗腫瘍効果の得られる投与量でマウスに投与し安全性の検証を行う。

さらに、KRAS 以外の標的として、大腸癌で変異が認められた遺伝子および異常メチル化が認められた遺伝子に対して配列特異的 PIP を合成する。前者は KR12 と同様にアルキル化剤を結合し、細胞への抗腫瘍効果を検証。後者は今後異常メチル化抑制効果を検証する予定であるが、まずはオリゴ DNA に対して配列特異的結合の検証を行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体の入手については、倫理委員会を設置した施設からインフォームドコンセントのもとで得られた検体についてのみ行う。また解析は当該実施場所の倫理委員会の許可が得られた場合にのみ実施し、必ず施設長が定めた倫理委員会の承認を受ける。施設が定める倫理規定を遵守して行う。患者情報の取り扱いに関し、いかなる場合も個人情報情報の漏洩に最大言の配慮を払う。医療機関より臨床材料を入手する場合には、匿名化・番号化されたものを用い、個人に関連付けできる情報は一切受け取らない。動物実験は機関の承認を得て行い、必要最小限の動物数で実験を行い、苦痛を最小限度にとどめるなど施設が定める規定を遵守して行う。遺伝子組み換え実験に関しても第二種使用等拡散防止措置の機関確認の申請を行い承認を得る。

C. 研究結果

(1) 臨床大腸癌標本の解析

顆粒状・無顆粒状側方進展型腫瘍 125 症例、鋸歯状腺腫 70 例の標本から十分な量の DNA が採取できた計 167 例について DNA メチル化を解析した。142 症例についてはエクソン変異解析を終了した。顆粒状側方進展型腫瘍は腺腫の段階で中メ

チル化群および KRAS 変異を示し、癌を含めて CTNNB1 の強染色は示さなかった。無顆粒状側方進展型腫瘍は腺腫・癌ともに低メチル化群を呈し KRAS 変異(-)であるが腺腫の段階から CTNNB1 の強染色を示し、癌で特異的に高頻度の遺伝子変異を認めた⁽¹⁾。

鋸歯状腺腫は、SSA/P および TSA と呼ばれる鋸歯状腺腫症例の解析を行った。TSA が中メチル化群を呈するのに対し、SSA/P は高メチル化群および BRAF 変異(+)を呈し、高メチル化大腸癌の前癌病変と考えられた。腺腫から癌化の段階でメチル化頻度が上昇する遺伝子が存在し、またエクソン変異解析の結果、癌では有意に高頻度に遺伝子変異が起き、また特徴的なシグナルの遺伝子に有意に変異が起きていた (Sakai et al. *submitted*)。

家族性大腸ポリポーシス症例から 92 検体の DNA を採取し、メチル化解析を進行中である。

(2) 血漿マーカーの開発

120 症例の大腸がん患者、96 症例の非がん患者から血漿 DNA を抽出し、異常メチル化を検討した。ほぼ全ての大腸がん症例でメチル化される候補遺伝子 12 個中、PPP1R3C、EFHD1 の 2 遺伝子が有効であった。特に PPP1R3C メチル化は単独で高感度・高特異度を示した(図 1)。早期がんにおける既存腫瘍マーカーの低い陽性率 (CEA 17%, CA19-9 0%, Stage I) と比較し、PPP1R3C は単独で 92%、EFHD1 メチル化と組み合わせると 100%の陽性率を示し、早期大腸がん中で特に有意ながん存在診断マーカーと考えられた⁽²⁾。

	PPP1R3C	EFHD1	PPP1R3C or EFHD1	PPP1R3C and EFHD1
Sensitivity	81%	63%	90%	53%
Specificity	81%	78%	64%	96%

図 1. 大腸がん血漿マーカー。PPP1R3C、EFHD1 の 2 遺伝子の DNA メチル化が大腸がん存在診断に有効と考えられた。

(3) KR12 の安全性検証

KRAS 変異配列を認識する PIP にアルキル化剤を付加した KR12 の抗腫瘍効果と安全性を検証するため、KR12 を 3.4nmol/mouse で静脈注射により投与した。KRAS G12V 変異を持つ大腸癌細胞株 SW480 の担癌マウスに対し投与すると、アルキル化単剤よりも強い抗腫瘍効果を認めた。その一方で、アルキル化単剤では体重減少が認められるが、KR12 では体重減少は一過性にとどまり早期に回復した。

ネティック異常部位についても、順次小分子化合物を合成していく予定である。

E . 結論

早期大腸病変として側方進展型腫瘍、鋸歯状腺腫の解析を行い、BRAF 変異(+)高メチル化群、KRAS 変異(+)中メチル化群、癌遺伝子変異(-)低メチル化群に層別化した。それぞれ肉眼形態上も異なる、全く発癌経路の異なる症例群であった。

これらの症例で、腺腫から癌化への進展に関わる分子異常を同定した。

アルキル化剤を結合した PIP の安全性を検証するとともに、KRAS 変異以外でも、同様の手法による変異配列特異的薬剤は開発可能と考えられ、開発を進める。

大腸癌存在診断への応用として、血漿中の癌由来 DNA を同定できる、高感度・高特異度のマーカーを樹立した。

F . 健康危険情報
特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsubashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. **Int J Cancer**, 135:1586-95, 2014.
- (2) Takane K, Midorikawa Y, Yagi K, Sakai A, Aburatani H, Takayama T, Kaneda A. Aberrant promoter methylation of PPP1R3C and EFHD1 in plasma of colorectal cancer patients. **Cancer Med**, 3:1235-45, 2014
- (3) Kaneda A, Matsusaka K, Sakai E, Funata S. DNA methylation accumulation and its predetermination of future cancer phenotypes. **J Biochem**, 156:63-72, 2014.
- (4) Kaneda A, Yagi K. Quantitative DNA methylation analysis for epigenotyping of colorectal cancer. **Methods Mol Biol**. 1238:289-99, 2015
- (5) Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinojima Y, Igarashi J, Ghosh S, Wang X, Fujiwara K, Ikeda T, Koshinaga T, Soma M and Nagase H. Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpGi methylation within the third exon. **Int J Oncol** 44:1669-77, 2014. doi: 10.3892/ijco.2014.2340.
- (6) Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. **J Mol Med**. 92:509-21, 2014. doi: 10.1007/s00109-013-1118-x.
- (7) Kojima T, Wang X, Fujiwara K, Osakaa S, Yoshida Y, Osaka E, Taniguchi M, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Tokuhashi Y, Nagase H. Inhibition of human osteosarcoma cell migration and invasion by a gene silencer, Pyrrole-Imidazole polyamide, targeting to the human MMP9 NFkB binding site. **Biol Pharm Bull** 37:1460-5, 2014.
- (8) Hasegawa R, Fujiwara K, Obinata D, Kawashima H, Shinojima Y, Igarashi J, Wang X, Ghosh S, Nagase H, Takahashi S. Identification of Frequent Differentially Methylated Region in Sporadic Bladder Cancers. **Urol Int**. 2014 Sep 6. [Epub ahead of print]
- (9) Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. **Cancer Sci** 105:1272-78, 2014.
- (10) Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. **Mol Carcinog** 54:178-88, 2015. doi: 10.1002/mc.22085.
- (11) Akter J, Takatori A, Islam S, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. **Biochemi Biophys Res Commun**

- 453:86-93, 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.065.
- (12) Ozaki T, Sugimoto H, Nakamura M, Hiraoka K, Yoda H, Sang M, Fujiwara K, Nagase H. Runx2-related transcription factor 2 attenuates the transcriptional activity as well as DNA damage-mediated induction of pro-apoptotic TAp73 to regulate chemo-sensitivity. *FEBS J* 282: 114-28, 2015. doi: 10.1111/febs.13108.
- (13) Mishra R, Watanabe T, Kimura M, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp C, Ohira M, Verma N, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. Identification of a novel E-box binding PI polyamide inhibiting MYC-driven cell-proliferation. *Cancer Sci* 2015 Jan 22. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/cas.12610.
- (14) Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Hiroyuki, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. *Nat Commun*, in press. doi: 10.1038/ncomms7706
2. 学会発表
- (1) 金田篤志. 「エピゲノム異常と消化器発癌」. 第15回 京都消化器カンファレンス 京都、平成26年4月1日
- (2) 金田篤志. 「エピゲノム異常特性に基づいた発癌機構の解明」 Takeda Genome Urology 2014、東京、平成27年2月7日
- (3) Kaneda A, “Epigenetic alteration accumulated in gastrointestinal carcinogenesis.” RIKEN IMS Summer Program 2014, Yokohama June 20, 2014
- (4) Kaneda A, “Comprehensive analysis of the cancer genome and epigenome to clarify and manage cancer”. 11th JGFoS Symposium. Bremen. Oct 31, 2014
- (5) Kaneda A, “Epstein-Barr virus infection is an epigenomic driver of gastric tumorigenesis”. Japan-German Workshop. Kyoto. March 1, 2015.
- (6) Atsushi Kaneda, Keisuke Matsusaka, Eiji Sakai, Koichi Yagi, Sayaka Funata, Hiroyuki Aburatani, Atsushi Nakajima, Masashi Fukayama. “DNA methylation accumulation at early stage of carcinogenesis, predetermining future cancer phenotypes”. 73rd Annual Meeting of Japan Cancer Association. Yokohama. Sept 25, 2014.
- (7) 高根希世子、緑川 泰、八木浩一、酒井綾子、油谷浩幸、高山忠利、金田篤志. 「大腸癌患者の末梢血における新規 DNA メチル化マーカーの確立」 第69回日本消化器外科学会総会. 福島、平成26年7月17日
- (8) 高根希世子、緑川 泰、八木浩一、酒井綾子、油谷浩幸、高山忠利、金田篤志. Aberrant promoter methylation of PPP1R3C and EFHD1 in plasma of colorectal cancer patients. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月25日
- (9) 酒井英嗣、梅沢翔太郎、内山詩織、大久保秀則、日暮琢磨、遠藤宏樹、松坂恵介、船田さやか、高根希世子、金田篤志、油谷浩幸、中島淳. 「大腸前がん病変の遺伝子変異およびエピジェネティック異常の解析」 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月25日
- (10) 藤本舞、穴井元暢、藤田隆教、山本尚吾、山中遼太、油谷浩幸、金田篤志. 「Ras/Raf 誘導性細胞老化における重要因子のゲノム探索」 第37回日本分子生物学会 横浜 2014年11月25-27日
- (11) Hiroki Nagase, Kiriko Hiraoka, Takahiro Inoue, Takayoshi Watanabe, Ken-Ichi Shinohara, Nobuko Koshikawa, Ozaki Toshinori. “KRAS G12D and G12V Specific Alkylating Agent (KR12) inhibits growth of colon cancer with those KRAS mutations in vitro as well as in vivo.” AACR American Association for Cancer Research ANUAL MEETING 2014 サンディエゴ 米国 平成26年4月5日-9日.
- (12) 永瀬浩喜、平岡桐子、井上隆博、渡部隆義、越川信子、尾崎俊文 「Precision Medicine を目指したオンコジェニックドライバーを標的とした治療」 第23回癌病態治療研究会. 岐阜 平成26年6/12-13

- (13) 永瀬浩喜 「これからのがん予防とがん治療 — 個人個人に合わせたがんの予防と治療の考え方 —」市民公開講座 千葉 平成 26 年 6 月 8 日
- (14) 永瀬浩喜、平岡桐子、井上貴博、越川信子、渡部隆義 「KRAS コドン 12 変異を標的とした分子標的アルキル化剤」第 18 回 日本癌分子標的治療学会 2014 年 6 月 26 日 仙台
- (15) 永瀬浩喜、平岡桐子、井上貴博、越川信子、渡部隆義 「がんドライバーミューテーション特異的アルキル化剤の開発」第 28 回 モロシヌス研究会・修善寺 平成 26 年 6 月 28 日
- (16) 永瀬浩喜、篠原憲一、渡部隆義、高取敦志 「ゲノム領域特異的ヒストン修飾の変更技術による新たながんエピゲノムのシステム理解」システムがん 班会議 東京 平成 26 年 8 月 25 日
- (17) 井上貴博、平岡桐子、養田裕行、丸喜明、鈴木有生、杉本博一、篠原憲一、渡部隆義、高取敦志、越川信子、板東俊和、杉山弘、尾崎俊文、永瀬浩喜。
"Antitumor efficacy of a novel alkylating agent targeting KRAS codon 12 mutations in murine xenograft models of human colorectal cancer" 平成 26 年度 がん若手研究者ワークショップ 蓼科 平成 26 年 9 月 3 日~9 月 6 日
- (18) 井上貴博、平岡桐子、養田裕行、丸喜明、杉本博一、篠原憲一、渡部隆義、高取敦志、越川信子、板東俊和、杉山弘、尾崎俊文、永瀬浩喜 「変異型 KRAS を標的とした塩基配列特異的アルキル化剤によるヒト大腸癌細胞移植マウスの抗腫瘍効果」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (19) 平岡桐子、井上貴博、養田裕行、杉本博一、篠原憲一、渡部隆義、越川信子、高取敦志、板東俊和、杉山弘、尾崎俊文、永瀬浩喜 「変異型 KRAS 遺伝子を標的とした新規アルキル化剤による大腸がん抗腫瘍効果の検討」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (20) 養田裕行、高取敦志、渡部隆義、篠原憲一、井上貴博、平岡桐子、越川信子、尾崎俊文、永瀬浩喜 「ZEB1/E-cadherin 転写制御を標的とした新規ピロールイミダゾールポリアミドの開発」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (21) 杉本博一、中村瑞代、下里修、永瀬浩喜、尾崎俊文「RUNX2 によるヒト膵臓がん細胞のゲムシタピン耐性獲得機構の解析」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (22) 渡部隆義、越川信子、尾崎俊文、板東俊和、杉山弘、永瀬浩喜「MMP-9 を標的とした脂肪族/芳香族アミノ酸ペアを有する PI ポリアミドによる遺伝子抑制」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (23) 尾崎俊文、杉本博一、中村瑞代、下里修、永瀬浩喜「RUNX2 による TAp73 の抑制を介した DNA 損傷応答機構の制御」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 26 年 9 月 25-27 日
- (24) Hiroki nagase, Kiriko Hiraoka, Takahiro Inoue, Nobuko Koshikawa, Takayoshi Watanabe "A novel anti-cancer agent of DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole polyamide conjugate targeting KRAS Codon 12 Mutant DNA" 52st JSCO 2014, 横浜、平成 26 年 8 月 28-30 日
- (25) Hiroki Nagase "Pyrrole-Imidazole Polyamide Drug Conjugate (PDC)" 「DNA 結合化合物によるゲノム・エピゲノムの変更-新たな抗がん治療薬開発へのアプローチ-」東京医科歯科大学大学院講義セミナー・東京・平成 26 年 10 月 9 日
- (26) Atsushi Takatori, Hiroyuki Yoda, Kiriko Hiraoka, Kenichi Shinohara, Takayoshi Watanabe, Nobuko Koshikawa, and Hiroki Nagase. "Targetingspecific DNA sequences by N-methylpyrrole and N-methylimidazole polyamides provides insights for the development of novel diagnostic and therapeutic drugs." The 28th International Mammalian Genome Conference. Bar Harbor, ME. October 26-29th, 2014.
- (27) Atsushi Takatori, AKiriko Hiraoka, Takahiro Inoue, Takayoshi Watanabe, Ken-Ichi Shinohara, Nobuko Koshikawa, Ozaki Toshinori, and Hiroki Nagase. "Allele-specific knock-down of KRAS mutations in cancers by using a novel alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide (KR12)." The 28th International Mammalian Genome Conference. Bar Harbor, ME. October 26-29th, 2014.
- (28) 永瀬浩喜、渡部隆義、養田裕行、越川信子、高取敦志 「ゲノム認識エピジェネティック変更化合物の開発」文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究 「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 2 回公開シンポジウム、福岡、平成 26 年 10 月

- (29) 永瀬 浩喜 「千葉県がんセンターにおける Clinical Genomics の視点に基づく治療法開発の取り組み」 千葉がんシンポジウム 臨床研究総合センターシンポジウム. 千葉 平成 26 年 12 月 13 日
- (30) 永瀬 浩喜 「RAS コドン 12 変異を標的とした分子標的アルキル化剤」 革新的がん医療シーズ育成領域 革新的シーズ育成分野 7 「転写機能をターゲットとした創薬」会議 . 東京 平成 26 年 12 月 23 日
- (31) 永瀬 浩喜 「ドライバー遺伝子変異を標的としたアルキル化剤による治療法の開発」第 37 回近畿小児血液・がん研究会 . 京都 平成 27 年 2 月 14 日
- (32) 永瀬浩喜 “PI polyamide-drug-conjugates(PDC) towards clinical application“ 「武装 PI ポリアミド (PI ポリアミド薬物複合体) の臨床応用に向けた取り組み」京都大学学術講演会 . 京都 平成 27 年 2 月 13 日
- (33) 永瀬浩喜 “Alkylating agents targeting oncogenic driver mutations” 「ドライバー遺伝子変異を標的としたアルキル化剤」私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」平成 26 年度報告会 平成 27 年 2 月 28 日
- (34) 横井左奈、鶴岡成一、滝口伸浩、伊丹真紀子、巽康年、大平美紀、山口武人、永瀬浩喜 「千葉県がんセンターキャンサーバイオバンク -Clinical Genomics への活用-」 クリニカルバイオバンク ネットワーキング会合 . 京都 . 平成 27 年 3 月 8 日

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1 . 特許取得
癌特異的な配列、それに対して開発した小分子化合物で効果の確認できたものについて出願する予定である。

2 . 実用新案登録
特になし

3 . その他
特になし

研究成果の刊行

- (1) Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsubashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. **Int J Cancer**, 135:1586-95, 2014.
- (2) Takane K, Midorikawa Y, Yagi K, Sakai A, Aburatani H, Takayama T, Kaneda A. Aberrant promoter methylation of PPP1R3C and EFHD1 in plasma of colorectal cancer patients. **Cancer Med**, 3:1235-45, 2014
- (3) Kaneda A, Matsusaka K, Sakai E, Funata S. DNA methylation accumulation and its predetermination of future cancer phenotypes. **J Biochem**, 156:63-72, 2014.
- (4) Kaneda A, Yagi K. Quantitative DNA methylation analysis for epigenotyping of colorectal cancer. **Methods Mol Biol**. 1238:289-99, 2015
- (5) Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinojima Y, Igarashi J, Ghosh S, Wang X, Fujiwara K, Ikeda T, Koshinaga T, Soma M and Nagase H. Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpGi methylation within the third exon. **Int J Oncol** 44:1669-77, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2340.
- (6) Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. **J Mol Med**. 92:509-21, 2014. doi: 10.1007/s00109-013-1118-x.
- (7) Kojima T, Wang X, Fujiwara K, Osakaa S, Yoshida Y, Osaka E, Taniguchi M, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Tokuhashi Y, Nagase H. Inhibition of human osteosarcoma cell migration and invasion by a gene silencer, Pyrrole-Imidazole polyamide, targeting to the human MMP9 NFkB binding site. **Biol Pharm Bull** 37:1460-5, 2014.
- (8) Hasegawa R, Fujiwara K, Obinata D, Kawashima H, Shinojima Y, Igarashi J, Wang X, Ghosh S, Nagase H, Takahashi S. Identification of Frequent Differentially Methylated Region in Sporadic Bladder Cancers. **Urol Int**. 2014 Sep 6. [Epub ahead of print]
- (9) Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. **Cancer Sci** 105:1272-78, 2014.
- (10) Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. **Mol Carcinog** 54:178-88, 2015. doi: 10.1002/mc.22085.
- (11) Akter J, Takatori A, Islam S, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation.

- Biochemi Biophys Res Commun**
453:86-93, 2014.
doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.065.
- (12) Ozaki T, Sugimoto H, Nakamura M, Hiraoka K, Yoda H, Sang M, Fujiwara K, Nagase H Runt-related transcription factor 2 attenuates the transcriptional activity as well as DNA damage-mediated induction of pro-apoptotic TAp73 to regulate chemo-sensitivity. **FEBS J** 282: 114-28, 2015. doi: 10.1111/febs.13108.
- (13) Mishra R, Watanabe T, Kimura M, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp C, Ohira M, Verma N, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. Identification of a novel E-box binding PI polyamide inhibiting MYC-driven cell-proliferation. **Cancer Sci** 2015 Jan 22. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/cas.12610.
- (14) Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Hiroyuki, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. **Nat Commun**, in press. doi: 10.1038/ncomms7706