

乳癌の遺伝子変異と遺伝子診断の研究

《研究の概要》

欧米では家族性乳癌の約 60%が BRCA1、または BRCA2 遺伝子の変異により発生すると推測されており、この結果は家族性乳癌の発症前診断を確立するためには第 3（あるいは第 4）の原因遺伝子の同定が必要であることを示唆している。まず、家族性乳癌の診断基準により家族性乳癌と思われる日本人家系を選び出し、BRCA1、BRCA2 遺伝子変異のスクリーニングを行った。家族性乳癌 78 症例を対象に、PCR-SSCP 法により BRCA1、BRCA2 遺伝子変異のスクリーニングを行った。BRCA1 遺伝子の変異を有するもの 15 例、BRCA2 遺伝子の変異を有するもの 14 例、計 30 例（29/78、37%）を同定した。その中で BRCA1、BRCA2 遺伝子のミスセンス変異はそれぞれ 8 例（8/15、53%）、7 例（7/14、50%）であり、欧米に比べ頻度が高いことが判明し、日本人家系においてミスセンス変異が乳癌発生に重要な意味を持つことが示唆された。BRCA1、BRCA2 蛋白は結合すること、また、両遺伝子とも DNA 損傷修復機能、細胞周期のチェックポイント機能を有する類似した遺伝子であることが報告され、これにより BRCA1、BRCA2 の関連遺伝子の中に第 3 の原因遺伝子が存在する可能性を考え、BRCA2 に注目し酵母の Two-hybrid 法によりこの遺伝子産物に特異的に結合する標的蛋白の検出を試みた。検討の結果、BRCA2 結合タンパク質として RAD51 を発見し、家族性両側性乳癌症例において、胚細胞変異を同定した。さらに、BRCA2 結合タンパク質の中から乳癌組織で発現低下を呈する BRAP1 および BIN1 遺伝子をクローニングした。散发性乳癌については、乳癌切除例を用いたヒト染色体領域の染色体欠失の解析により術後再発、生存率に相関する染色体欠失領域を同定し、乳癌術後予後遺伝子診断法を検討した。共通欠失領域内に存在し高頻度な LOH を検出する 18 カ所のマイクロサテライトマーカーを同定したので、これらの DNA マーカーを用いて、1992 年の研究開始以降術後死亡した 57 例（死亡群、平均年齢 51 歳、術後生存期間 762 日±SD469 日）と年齢、時期を合わせた生存例 95 例（生存群、平均年齢 52 歳）について各 DNA マーカーでの LOH の有無を検索した。その結果 1p34-p35、3p14.3-p21.1、8p21-p22、13q12、13q14、17p13.1、17p13.3、17q21.1 の各領域にて、死亡群では各々 52~89%と生存群に比して有意に高頻度な LOH を認めた。さらに 264 症例について術後 5 年間の再発、転移、癌死などの予後を調査し、上記マーカーにおける LOH の有無との関連性を検討した。その結果、1p34、17p13.3、13q12、17q21.1 の 4 領域において LOH (+) 群において不良な予後が Kaplan-Meier および Log-rank 検定において認められた。また、これらの複数の領域においてともに LOH を示した症例では、5 年後の乳癌再発死亡の相対危険率は、LOH (-) 群に比べ、8=10 倍に上昇することが明らかになった。また、n0 乳癌の予後予測因子として、1p34-36 の LOH が術後予後における高危険群の選別に有用であることが判明した。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
江見充	日本医科大学 老人病研究所 教授	※散発性乳癌の解析
三木義男	(財) 癌研究会癌研究所 遺伝子診断部 部長	※家族性乳癌の解析
中村祐輔	東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター センター長・教授	※乳癌抑制遺伝子の解析

研究報告

I 研究目的

家族性および散発性乳癌における遺伝子・染色体異常を明かにするとともに、それらの知見の遺伝子診断への応用を目指す。課題としては、家族性乳癌の発症前診断を確立するために日本の家族性乳癌家系における BRCA1、BRCA2 遺伝子の変異の頻度、種類、浸透率を明かにするとともにその他の原因遺伝子を探索する。特に、家族性乳癌の発症前診断を行うためには、日本における原因遺伝子に関する情報を知ること、またその存在が確実な第3原因遺伝子を同定することが必須である。これらの点から家族性乳癌は頻度は少ないが、癌の高危険度群であり、遺伝子レベルによる発症前診断により、保因者同定、早期発見、早期治療へと進めることにより患者を癌死から救うことが可能となる。散発性乳癌については、多数の乳癌組織を用いた染色体の欠失・増幅の解析から各種の臨床病理学的性格、各種治療への反用性、転移、局所再発、生命予後に関わる遺伝的变化を特定し、予知的遺伝子診断への臨床応用を目指す。また、乳癌においては、個々の癌の悪性度の客観的な評価にもとづく予後の予測法と適切な治療方針の選択基準を開発することが急務となっており、従来臨床病理学的診断に加えて、染色体・遺伝子の変化を正確にとらえる遺伝子診断を実施し、悪性度、予後、治療への反応性などの意義の評価を行うことを試みる。

II 研究計画及び材料と方法

1. 家族性乳癌

癌研究所附属病院乳癌外科での手術症例中、家族性乳癌と思われる症例を選択し、BRCA1、BRCA2 遺伝子の変異を検討した。家族性乳癌の約 60%は BRCA1、または BRCA2 遺伝子変異により発症すると推測されている。これらの結果は第3の原因遺伝子が存在する可能性を強く示唆するものであり、発症前遺伝子診断の確立のためにはこの第3の原因遺伝子の同定が必須である。具体的には、BRCA2 の関連遺伝子を単離し、その機能解析により BRCA2 遺伝子自身の機能を検討した。また、単離された関連遺伝子については癌研究所附属病院乳癌外科を受診した患者の中で家族性乳癌と判断される症例を対象に遺伝子変異のスクリーニングを行い第3の原因遺伝子である可能性を検討した。即ち、この遺伝子が BRCA1、あ

るいは BRCA2 関連遺伝子の中に存在する可能性を考え、酵母の Two-hybrid 法により BRCA2 遺伝子産物に結合するタンパク質の同定を試みた。この BRCA2 結合分子の単離は BRCA2 の機能解析にもつながるものである。さらに相互作用が確認された Rad51 については家族性乳癌系にいける遺伝子変異をスクリーニングすることにより、新しい家族性乳癌の原因遺伝子である可能性を検討した。

2. 散発性乳癌

1p、3p、11p、13q、16q、18q、21q、22q など乳癌において欠損を認めた染色体について、200 例以上の乳癌発症を対象に 1~3cM 間隔に位置した多形成 DNA マーカー約 150 個を用いて、これらの染色体上の遺伝的变化を検索し、乳癌の発生・進展にとって重要な欠失領域を同定するとともに、それらの欠失とリンパ節転移を始めとする種々の臨床病理学的諸因子との相関を調べた。散発性乳癌については、多数の乳癌組織を用いた染色体の欠失・増幅の解析から各種の臨床病理学的正確、各種治療への反応性、転移、局所再発、生命予後に関わる遺伝的变化を特定し、予知的遺伝子診断への臨床応用を目指した。散発性乳癌においては、染色体・遺伝子の変化を各々個性の異なる癌一例ごとに客観かつ質的に検出する新しい診断法の確立と、その予後因子としての有効性を術後の再発、生存率の追跡検査などにより明らかにすることができると考えられる。特に乳癌組織において高頻度な LOH を示した染色体について多くのマイクロサテライト DNA 多形マーカーを用いて詳細な染色体地図を作製し共通欠失領域を同定するとともに、これらの領域の LOH と乳癌の生物学的特製をあらわす種々の臨床病理学的因子および術後予後との間の関連性を Retrospective study として検討した。また、Prospective study として癌研病院にて乳癌根治手術を施行し DNA 抽出をなし得た全症例を対象として、その生存率と各染色体領域における LOH の有無とを比較検討した。各症例毎に、染色体 1p、3p、6q、8p、9q、11p、11q、13q、16q、17p、17q、18q、22q から計 18 領域、各領域ごとに 1 個の DNA 多型マーカーを選定して LOH の有無を調べ、生存率を比較検討した。なお、生存分布にあたり、生存期間は死亡群では手術日から乳癌死日まで、生存群では各症例毎に最終外来来院日までとする。術後予後の解析には、Kaplan-Meier 解析および Log-rank 検定にて検定し、術後再発死亡の相対危険率の算出を試みた。

III 研究成果

1. 家族性乳癌の BRCA 遺伝子異常

日本において家族性乳癌家系の発症前診断を行うためには、日本人乳癌家系における原因遺伝子変異の頻度や、その臨床病理学的特徴が非常に重要な情報となる。そこで、家族性乳癌の診断基準により家族性乳癌と思われる日本人家系を選び出し、BRCA1、BRCA2 遺伝子変異のスクリーニングを行った。家族性乳癌 78 症例を対象に、PCR-SSCP 法により BRCA1、BRCA2 遺伝子変異のスクリーニングを行った。BRCA1 遺伝子の変異を有するもの 15 例、BRCA2 遺伝子の変異を有するもの 14 例、計 30 例 (29/78、37%) を同定した。その中で BRCA1、BRCA2 遺伝子のミスセンス変異はそれぞれ 8 例 (8/15、53%)、7 例 (7/14、50%) であり、欧米に比べ頻度が高いことが判明し、日本人家系においてミスセンス変異が乳癌発生に重要な意味を持つことが示唆された。

2. 家族性乳癌遺伝子の探索

家族性乳癌の原因遺伝子の一つである BRCA2 のタンパク産物に関わる結合タンパクの解析から、その N 端付近の領域 1 から AMP-activated protein kinase、Phosphomannomutase が、また、C 端付近の領域 8 では、PPAR-1 が、結合候補遺伝子として同定された。酵母 two Hybrid 法で単離された候補 clone は疑陽性の判定が重要である。そこで、in vitro または in vivo による binding assay、ヒト培養細胞を用いた Two Hybrid 法の検討、免疫沈降、および細胞内局在の解明などにより、これら分子と BRCA2 の結合の確認を進めている。また、昨年、BRCA2 との相互作用を報告した RAD51 遺伝子は、組織発現パターンが BRCA2 ときわめて類似していることなどから遺伝性乳癌の原因遺伝子である可能性が強いことから、エクソン-イントロン境界領域を含むゲノム構造を決定し、遺伝性乳癌家系での胚細胞遺伝子変異のスクリーニングを行った。その結果、2 例の同時性両側性乳癌患者において、コドン 150 のアミノ酸置換を同定した。一般の約 300 名ではこの変化がまったく認められないことから、この置換は、発癌の原因となる遺伝子変異と考えられた。さらに、BRCA2 は 380kDa におよぶタンパク質であるため 8 領域（領域 1-8）に分け、酵母の転写因子である GAL4 DNA-binding domain との融合タンパク質の発現ベクターを構築した。領域 3（コドン 664-1534）に RAD51 が結合すること、RAD51 遺伝子のノーザンブロット法による組織の発現パターンは BRCA2 と極めて類似していること、家族性乳癌家系での胚細胞遺伝子変異を検討した結果、2 例の同時性両側性乳癌患者において塩基 G の A への変化によるコドン 150Arg の Gin へのアミノ酸置換を同定したことはすでに報告したが、GFP との融合蛋白の解析により、正常 RAD51 蛋白は核内に存在したがこの変異蛋白は細胞質に認められ乳癌発生の原因となる変化である可能性が高いと考えている。また、BRCA2 の C 端には核移行シグナル（Nuclear localization signal）が存在することを報告したが、この部位を含む領域 8（コドン 3119-3418）に結合する分子候補として、Amphiphysin および BIN1 と高度の相同性を認め構造的に類似した蛋白が同定され、これを BRAP1 とした。Amphiphysin は乳癌を伴う Stiff-man syndrome の自己抗原である。Stiff-man syndrome とは、体幹の筋肉の硬直を主症状とするまれな神経性疾患で、Amphiphysin の C 末端領域に対する自己抗体を有する症例が判明しており、この患者すべてが女性で乳癌を発症していたと報告されている。BIN1 は myc に結合する新しい蛋白として単離され、悪性細胞の myc による transformation を阻害し多くの癌細胞株や乳癌組織での発現の低下が報告された。BRAP1 は 565 個のアミノ酸からなり、Amphiphysin、BIN1 と N 端 250 アミノ酸において 70% 以上の相同性を認めたことから、乳癌の発生に関与していると推測した。BRAP1 は 12q12 にマップされ、ゲノム構造を解析し原発性乳癌組織、および家族性乳癌家系における体細胞変異、胚細胞変異の解析をそれぞれ進めたが、明らかな遺伝子変異は検出されなかった。しかし、各種ヒト癌細胞株における BRAP1 の発現を RT-PCR 法で検討した結果、乳癌細胞株、膵臓癌細胞株の、それぞれ 5/6 (83%)、4/6 (67%) において発現の低下が認められ、これらの癌の発生機構に関与する遺伝子と考え解析を進めている。

3. 散発性乳癌における染色体欠失（LOH）解析

乳癌の癌抑制遺伝子の存在部位を調べるために、約 200 症例を対象に、広範な染色体領

域について各々15~20個のマイクロサテライトマーカーを用いて LOH の有無を検索し乳癌において共通して高頻度な LOH を示す染色体領域の同定を行った。その結果 1p では 1p36、1p34-p35、1p22-p31 の 3 カ所で高頻度な LOH を示す共通欠失を同定した。3p では 3p25.1 と 3p14.3-p21.1 の 2 カ所に、8p では 8p21-p22 の 1 カ所に、11p では 11p15.5 と 11p11 の 2 カ所に、13q では 13q12 と 13q14 の 2 カ所に、16q では 16q22.2 と 16q24.3 の 2 カ所に、18q では 18q21.1-q21.2 の 1 カ所に、22q では 22q13 の 1 カ所に各々、高頻度な LOH を示す共通欠失領域を同定した。さらに、1q および 8q では高頻度な染色体増幅を示す領域を同定するとともに、6q では 6q26-6q27 に、7p では 7p14-7p15 に、7q では 7q31 に、8p では 8p21-8p22 に、9p では、9p21 に、9q では 9q22.3 と 9q33 の 2 カ所に、17q では 17q21.1 と 17q25.1 の 2 カ所に、21q では 21q21 の 1 カ所に、各々、高頻度な LOH を示す共通欠失領域を同定した。

4. LOH と術後の予後の相関

共通欠失領域内に存在し高頻度な LOH を検出する 18 カ所のマイクロサテライトマーカーを同定したので、これらの DNA マーカーを用いて、1992 年の研究開始以降術後死亡した 57 例（死亡群、平均年齢 51 歳、術後生存期間 762 日±SD469 日）と年齢、時期を合わせた生存例 95 例（生存群、平均年齢 52 歳）について各 DNA マーカーでの LOH の有無を検索した。その結果 1p34-p35、3p14.3-p21.1、8p21-p22、13q12、13q14、17p13.1、17p13.3、17q21.1 の各領域にて、死亡群では各々52~89%と生存群に比して有意に高頻度な LOH を認めた。さらに 264 症例について術後 5 年間の再発、転移、癌死などの予後を調査し、上記マーカーにおける LOH の有無との関連性を検討した。その結果、1p34、17p13.3、13q12、17q21.1 の 4 領域において LOH (+) 群において不良な予後が Kaplan-Meier および Log-rank 検定において認められた。また、これらの複数の領域においてともに LOH を示した症例では、5 年後の乳癌再発死亡の相対危険率は、LOH (-) 群に比べ、8~10 倍に上昇することが明らかになった。

5. 3p25.1 および 8p22 の LOH と散発性の乳癌術後生存率

対象を 504 例（癌死亡は 63 例）に増やし検討した結果、3p25.1 の LOH (+) 群の 5 年生存率が 78%に対し LOH (-) 群は 91%と有意差を認めた ($p=0.0014$)。多変量解析では t, n 同様 3p25.1 の LOH が独立した予後因子 ($p=0.0024$) であり、3p25.1 LOH の死亡に関する相対危険度は 4.1 であった。同対象症例で検討した結果、8p22 の LOH (+) 群の 5 年生存率が 82%に対し LOH (-) 群は 93%と有意差を認めた ($p=0.0177$)。乳癌のなかで比較的予後不良とされている T2 以上、リンパ節転移陽性、ER (-) 乳癌において 8p22 LOH の予後因子としての意義が、より重要であった。総合すると、特定の染色体領域における LOH の有無と術後予後（再発、癌死亡）との間に有意な相関が存在することが判明した。再発率、生存率の両面からの解析により、再発には関与しないが癌死には有意な領域が存在することがわかった。

6. n0 乳癌の LOH 診断と術後再発率

癌研病院・乳腺外科において根治手術を受けた n0 乳癌手術患者（非浸潤癌、他病死、重

複癌は除く)228例を対象に各染色体欠失(LOH)と術後再発との関連についてKaplan-Meier法、Log rank検定を用い検討した。n0乳癌228例中再発14例であった。LOHが再発率に有意に差を認めた染色体領域は1p36、1p34であった。従来の臨床病理学的因子でn0乳癌の有用な予後因子は少ないとされており、t(腫瘍径)、ER、PgRに1p34-36のLOH加えた4因子についてCox's hazard regression modelを用いて多変量解析を行うと1p34-36のLOH(p=0.0117)のみが独立した予後因子であり、Retentionに対するLOHの再発に関する相対危険度は5.8(95%CI; 1.8-18.8)であった。n0乳癌の予後予測因子として、1p34-36のLOHが術後予後における高危険群の選別に有用であることが判明した。

IV 考察

家族性乳癌は頻度は少ないが、癌の高危険度群であり、遺伝子レベルによる発症前診断により、保因者同定、早期発見、早期治療へと進めることにより患者を癌死から救うことが可能となる。また、散発性乳癌においては、染色体・遺伝子の変化を各々個性の異なるがん一例ごとに客観的かつ質的に検出する新しい診断法の確立と、その予後因子としての有用性を術後の再発、生存率の追跡調査などにより明らかにすることができる。個々の乳癌において様々の染色体欠失がおこり進行進展上の種々の性質が決定されると考察されるが、特定の領域の染色体欠失が再発、癌死亡を反映することから、本研究で用いたDNAマーカーによる手術時の切除乳癌の遺伝子診断は乳癌の再発と生命予後の判定において有用と考えられる。今後、癌の悪性度の客観的評価に基づき予後の予測と適切な治療方針の選択に応用可能と考えている。

V 研究成果の発表

1. Matsumoto, S., Kasumi, F., Sakamoto, G., Onda, M., Nakamura, Y. & Emi, M.: Detailed deletion mapping of chromosome arm 3p in breast cancers: A 2-cM region on 3p14.3-21.1 and a 5-cM region on 3p24.3-25.1 commonly deleted in tumors. *Genes, Chrom. Cancer* 20, 268-274, 1997.
2. Yokota, T., Matsumoto, S., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. & Emi, M.: Mapping of a breast cancer tumor suppressor gene locus to a 4-cM interval on chromosome 18q21, *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 959-964, 1997.
3. Emi, M., Matsumoto, S., Iida, A., Tsukamoto, K., Nakata, T., Yokota, T., Sakanloto, G., Kasumi, F. & Nakamura, Y.: Correlation of Allelic Losses and Clinicopathological Factors in Primary Breast Cancers. *Breast Cancer* 4, 243-247, 1997.
4. Liao, H-S., Kodama, T., Doi, T., Emi, M., Asaoka, H., Itakura, H. & Matsumoto, A.: Novel elements located at -504 to -399 bp of the pronotor region regulated the expression of the human macrophage scavenger receptor gene in murine macrophages. *J. Lipid Res.* 38, 1433-1444, 1997.
5. Emi, M., Matsushima, M., Katagiri, T., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Yokota, T., Nakata, T., Miki, Y. & Nakamura, Y.: Multiplex mutation screening of the

- BRCA1 gene in 1000 Japanese breast cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 12-16, 1998.
6. Watanabe, I., Tsukamoto, K., Shiba, T., Emi, M.: Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human matrix Gla protein (MGP) locus. *J. Hum. Genet.* 43, 75-76, 1998.
 7. Tsukamoto, K., Ito, N., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. & Emi, M.: Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer*, 82, 317-322, 1998.
 8. Tsukamoto, K., Haruta, K., Shiba, T. & Emi, M.: Isolation and mapping of a polymorphic CA repeat sequence at the human interleukin 6 locus. *J. Hum. Genet.* 43, 71-72, 1998.
 9. Iida, A., Kurose, K., Isobe, R., Akiyama, F., Sakamoto, G., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Nakamura, Y. & Emi, M.: Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes, Chrom. Cancer* 21, 108-112, 1998.
 10. Tsukamoto, K., Inoue, S., Hosoi, T., Orimo, H., Emi, M.: Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J. Hum. Genet.* 43, 73-74, 1998.
 11. Nakata, T., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. & Emi, M.: Identification of a new commonly deleted region within a 2-cM interval of 11p11 in breast cancers. *Eur. J. Cancer*, 34, 417-421, 1998.
 12. Tsukamoto, K., Emi, M.: A Polymorphic CA Repeat Sequence at the Human Calcitonin Locus. *J. Hum. Genet.* 43, 127-130, 1998.
 13. Kamigaki, M., Tsuji, M., Ishii, J., Hata, A., Chiba, H., Akita, H., Hirayama, T. & Emi, M.: Familial hypercholesterolemia with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Intern. Med.* 37, 523-527, 1998.
 14. Bando, K., Matsumoto, S., Onda, M., Akiyama, F., Sakamoto, G., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Nakamura, Y., Emi, M.: Frequent allelic loss at 6q26-27 in breast cancer of the solid tubular histologic type. *Breast Cancer*, 5, 127-130, 1998.
 15. Nomozu, T., Tsuchiya, A., Kanno, M., Katagata, N., Watanabe, F., Yamaki, Y., Abe, R., Miki, Y. Clinicopathological features of hereditary breast cancer. *Breast Cancer*, 4, 239-242, 1997.
 16. Katagiri, T., Nakamura, Y., Miki, Y., High proportion of nonsense mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in Japanese breast cancer families. *J. Human Genet.*, 43, 42-48, 1998.
 17. Katagiri, T., Saito, H., Shinohara, A., Ogawa, H., Kamada, N., Nakamura, Y., Miki, Y. Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein Rad51. *Genes, Chromosomes & Cancer*; 21: 217-222, 1998
 18. Katagiri, T., Nakamura, Y., Miki, Y. High proportion of nonsense mutations of the BRCA1 and BRCA2 gene in Japanese breast cancer families. *J. Human*

- Genet. 43: 42-48, 1998
19. Kuno, T., Fukutomi, T., Akashi-Tanaka, S., Nanasawa, T., Kanai, Y., Tsuda, H., Nomizu, T. and Miki, Y. Bilateral nonpalpable breast carcinomas in a patient with BRCA2 germ line mutation and past history of osteosarcoma. *Breast Cancer*; 6: 51-54, 1999
 20. Katagiri, T., Saito, H., Shinohara, A., Ogawa, H., Kamada, N., Nakamura, Y., Miki, Y. Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein Rad51. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 21, 217-222, 1998
 21. Katagiri, T., Nakamura, Y., Miki, Y. High proportion of nonsense mutations of the BRCA1 and BRCA2 gene in Japanese breast cancer families. *J. Hum. Genet.*, 43, 42-48, 1998
 22. Emi M, Matsushima M, Katagiri T, Yoshimoto M, Kasumi F, Yokota T, Nakata T, Miki Y, Nakamura Y: Multiplex mutation screening of the BRCA1 gene in 1000 Japanese breast cancers. *Jpn. J. Cancer Res*; 89: 12-16, 1998
 23. Tsukamoto K, Ito N, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M: Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer*; 82: 317-322, 1998
 24. Iida A, Kurose K, Isobe R, Akiyama F, Sakamoto G, Yoshimoto M, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes, Chrom. Cancer*; 21: 108-112, 1998
 25. Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M: Isolation, and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J. Hum. Genet.* 43: 73-74, 1998
 26. Nakata T, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M: Identification of a new commonly deleted region within a 2-cM interval of 11p11 in breast cancers. *Eur. J. Cancer*; 34: 417-421, 1998
 27. Bando K, Matsumoto S, Onda M, Akiyama F, Sakamoto G, Yoshimoto M, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Frequent Allelic Loss at 6q26-27 in Breast Carcinomas of the Solid-tubular Histologic Type. *Breast Cancer*; 5: 127-130, 1998
 28. Kurose K, Iida A, Araki T, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Frequent Allelic Loss at 7p14-15 Associated with Aggressive Histologic Types of Breast Cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 89 :533-538, 1998
 29. Orimo H, Ikejima M, Nakajima E, Emi M, Shimada T: A novel missense mutation and frameshift mutations in the type II receptor of transforming growth factor- β gene in sporadic colon cancer with microsatellite instability. *Mutation Research Genomics*; 382: 115-120, 1998
 30. Minobe K, Onda M, Iida A, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M: Allelic Loss on Chromosome 9q Is Associated with Lymph Node Metastasis of Primary Breast Cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* ;89 :916-922, 1998

31. Kurose K, Bando K, Fukino K, Sugisaki Y, Araki T, Emi M: Somatic Mutations of the PTEN/MMAC1 Gene in Fifteen Japanese Endometrial Cancers: Evidence for Inactivation of Both Alleles. *Jpn. J. Cancer Res.*; 89: 842-848, 1998
32. Tsukamoto K, Watanabe I, Shiba T, Emi M: Isolation of a polymorphic CA repeat sequence at the human progesterone receptor (PGR) locus. *J. Hum. Genet.* 43 :287-288, 1998
33. Ueda T, Emi M, Suzuki H, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T, Shiraishi T, Masai M, Igarashi T, Ito H: Identification of a 1-cM Region of Common Deletion on 13q14 Associated with Metastasis of Human Prostate Cancer. *Genes. Chrom. Cancer* ;24: 183-190, 1999
34. Ogaki K, Iida A, Kasumi F, Sakamoto G, Akimoto M, Nakamura Y, Emi M: Mapping of a New Target Region of Allelic Loss to a 6-cM Interval at 21q21 in Primary Breast Cancers. *Genes, Chrom. Cancer* ;23 :244-247, 1998
35. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Localization of a Tumor Suppressor Gene Associated with Progression of Human Breast Cancer Within a 1-cM Interval of 8p22-p23. *1. Cancer*; 83: 447-452, 1999
36. Fukino K, Iida A, Teramoto A, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Frequent Allelic Loss at the TOC locus on 17q25.1 in Primary Breast Cancers. *Genes, Chrom. Cancer* ;24 :345-350, 1999
37. Ohgaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M: Localization of Tumor Suppressor Gene Associated with Distant Metastasis of Urinary Bladder Cancer to a 1-Mb Interval on 8p22. *Genes, Chrom. Cancer*; 25: 1- 5, 1999
38. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Frequent Multiplication of chromosomal region 8q24.1 associated with aggressive histologic types of Breast Cancers. *Cancer Lett.*; 137: 1-7, 1999
39. Tsukamoto K, Ota N, Shirai Y, Emi M: A highly polymorphic CA repeat marker at the human interleukin 6 receptor (IL6R) locus. *J. Hum. Genet.*; 43: 289-290, 1998
40. Tsukamoto K, Ota N, Shirai Y, Emi M: A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNF α) locus. *J. Hum. Genet.*; 43: 278-279, 1998
41. Kurose K, Araki T, Matsunaka T, Takada Y, Emi M: Variant manifestation of Cowden Disease in Japan: Hamartomatous polyposis of the Digestive Tract with Mutation of the PTEN Gene. *Am. J. Hum. Genet.* ;64: 308-310, 1999
42. Ohgaki K, Minobe K, Kurose K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M: Two Target Regions of Allelic Loss on Chromosome 9i n Urinary Bladder Cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* ;90, 1999
43. Nakata T, Kitamura Y, Shinlizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M: Fusion of a Novel Gene, ELKS, to c-ret due to Translocation t (10; 12)

- (q11; p13) in a Papillary Thyroid Carcinoma. *Genes, Chrom. Cancer*; 24 1999.
44. Tsukamoto K, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakanmra Y, Emi: Frequent Multiplication of Chromosome 1q in Non-invasive and Papillotubular Carcinoma of the Breast. *Cancer. Lett.*139, 1999.
 45. Kitamura Y, Nakata T, Minobe K, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Onda M, Emi M: Ret/PTC3 is the most frequent form of gene rearrangement among papillary thyroid carcinomas in Japan. *J. Hum. Genet.*; 44 :96-102, 1999
 46. Ota N, Nakajima T, Takeuchi T, Shirai Y, Emi M: Isolation and radiation hybrid mapping of a highly polymorphic CA repeat sequence at the human nuclear factor kappa-beta subunit 1 (NFKB1) locus. *J. Hum. Genet.*; 44: 129-130, 1999
 47. Tsukamoto K, Haruta K, Shiba T, Emi M: Isolation and mapping of a polymorphic CA repeat sequence at the human interleukin 6 locus. *J. Hum. Genet.* 43: 71-72, 1998
 48. Bando K, Nagai H, Matsumoto S, Koyanla M, Kawamura N, Tajiri T, Onda M, Emi M: Localization of a Tumor Suppressor Gene Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma Within a 1-cM Region on 4q35. *Genes. Chrom. Cancer.*; 25, 1999
 49. Kawamura N, Nagai H, Bando K, Koyama M, Mtsumoto S, Tajiri T, Onda M, Fujimoto J, Ueki T, Konishi N, Shiba T, Emi M: PTEN/MMAC1 Mutations in Hepatocellular Carcinomas: Somatic Inactivation of Both Alleles in Tumors. *Jpn J. Cancer Res.* 90: 413-418, 1999
 50. 美濃部かおり, 松本智司, 江見 充: 切除乳癌組織の遺伝子診断 (特集一乳癌の発生・進展・転移機構). *乳癌の臨床* ;13: 541-546, 1998
 51. 野口慎三郎, 野水 整, 福富 隆, 三木義男, 江見 充, 秋山 太, 春日井努, 小山博記: 遺伝性乳癌 (特集一乳癌をめぐる最近の話題). *Pharma Medica*; 16: 83-88, 1998
 52. 吹野晃一, 江見 充, 中村祐輔: 癌と遺伝子 (特集一臨床医に必要な遺伝医学). *臨床医* ; 25, 1999
 53. 坂東功一, 江見 充, 中村祐輔: 乳癌の遺伝子から見たハイリスクグループ. *日本乳癌検診学会誌* ; 7 : 247-256, 1998
 54. 北村 裕, 田中茂夫, 江見 充: 癌の遺伝子診断法の進歩. 癌化のメカニズムを解く (横田 淳編); 羊土社 1998
 55. 黒瀬圭輔, 江見 充: BRCA1、BRCA2 と乳癌. *がん遺伝子・がん抑制遺伝子* (渋谷正史, 山本 雅編); pp. 268-272. 中外医学社, 1998
 56. Koyama, M., Nagai, H., Bando, K., Ito, M., Moriyama, Y., Emi, M. Localization of a Target Region of Allelic Loss to a 1-cM Interval on Chromosome 16p.13.13 in Hepatocellular Carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 951-956, 1999.
 57. Bando, K., Nagai, H., Matsumoto, S., Koyama, M., Kawamura, N., Onda, M., Emi, M.: Identification of a 1-cM Region of Common Deletion on 4q35 Associated With Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Genes, Chrom. Cancer.* 25. 284-

- 289, 1999.
58. Minobe K, Bando K, Fukino K, Soma S, Kasumi F, Sakamoto G, Furukawa K, Higuchi K, Onda M, Nakamura Y, Emi M.: Somatic Mutation of the PTEN /MMAC gene in Japanese Breast Cancer with Microsatellite Instability. *Cancer. Lett.* 144, 9-16, 1999.
 59. Koyama M, Ito M, Nagai H, Emi M, Moriyama Y.: Inactivation of Both Alleles of the DPC4/SMAD4 Gene in Advanced Colorectal Cancers: Identification of Seven Novel Somatic Mutations in Tumors from Japanese Patients. *Mutation Res. Genom.* 406, 71-77, 1999.
 60. Noguchi K, Kasugai K, Miki Y, Fukutomi T, Emi M, Nomizu T: Clinicopathologic Analysis of BRCA1 -or BRCA2- Associated Hereditary Breast Carcinoma in Japanese Woman. *Cancer.* 85, 2200-2205, 1999
 61. Ota, N., Nakajima, T., Takeuchi, T., Shirai, Y., Emi, M.: A highly polymorphic CA repeat marker at the interleukin-11 locus. *Genes, Immunity.* 1, 159-160, 1999.
 62. Nakajima, T., Hamakubo, T., Kodama, T., Inazawa, J., Emi, M.: Genomic structure and chromosomal mapping of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 402-407, 1999.
 63. Fukino, K., Kitamura, H., Sanno, N., Teramoto, A., Emi, M.: Analysis of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas from Japanese patients. *Cancer Lett.* 144, 85-92, 1999.
 64. Iwaki, K., Nakajima, T., Ota, N., Emi, M.: A common Ile796Val polymorphism of the human SREBP cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 421-422, 1999.
 65. Mine, N., Bando, K., Utada, Y., Nagai, H., Araki, T., Emi, M.: Two single nucleotide polymorphisms of the hSNF5/INI1 gene. *J. Hum. Genet.* 1999, 44, 354-355.
 66. Nakajima, T., Ota, N., Kodama, T., Emi, M.: Isolation and radiation hybrid mapping of a highly polymorphic CA repeat sequence at the SREBP cleavage-activating protein (SCAP) locus. *J. Hum. Genet.* 44, 350-351, 1999.
 67. Emi, M., Utada, Y., Yohimoto, M., Sato, T., Minobe, K., Matsumoto, S., Akiyama, F., Iwase, T., Haga, S., Kajiwara, T., Sakamoto, G., Kasumi, F., Nakamura, Y.: Correlation of Allelic Loss with Poor Postoperative survival in Breast Cancer. *Breast Cancer.* 6, 351-356, 1999.
 68. Nagai, H., Baba, M., Konishi, N., Kim, Y., Nogami, M., Okumura, K., Emi, M., Matsubara, K.: Isolation of Not I Clusters Hypomethylated in HBV-integrated Hepatocellular Carcinomas by Two-Dimensional Electrophoresis. *DNA Res.* 6, 219-225, 1999.
 69. Ueda T, Emi M, Suzuki H, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T, Shiraishi T, Masai

- M, Igarashi T, Ito H.: Identification of a 1-cM Region of Common Deletion on 13q14 Associated with Metastasis of Human Prostate Cancer. *Genes, Chrom. Cancer.* 24, 183-190, 1999.
70. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M.: Localization of a Tumor Suppressor Gene Associated with Progression of Human Breast Cancer Within a 1-cM Interval of 8p22-p23. *Cancer.* 85, 447-452, 1999.
71. Fukino K, Iida A, Teramoto A, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M.: Frequent Allelic Loss at the TOC locus on 17q 25.1 in Primary Breast Cancers. *Genes, Chrom. Cancer.* 24, 345-350, 1999.
72. Ohgaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M.: Localization of Tumor Suppressor Gene Associated with Distant Metastasis of Urinary Bladder Cancer to a 1-Mb Interval on 8p22. *Genes, Chrom. Cancer.* 25, 1-5, 1999.
73. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M.: Frequent Multiplication of chromosomal region 8q24.1 associated with aggressive histologic types of Breast Cancers. *Cancer Lett.* 139, 7-13, 1999.
74. Kurose K, Araki T, Matsunaka T, Takada Y, Emi M.: Variant manifestation of Cowden Disease in Japan: Hamartomatous polyposis of the Digestive Tract with Mutation of the PTEN Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 308-310, 1999.
75. Ohgaki K, Minobe K, Kurose K, Iida A, Habuchi T, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M.: Two Target Regions of Allelic Loss on Chromosome 9 in Urinary-bladder Cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 957-964, 1999.
76. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M.: Fusion of a Novel Gene, ELKS, to c-ret due to Translocation t (10; 12) (q11; p13) in a Papillary Thyroid Carcinoma. *Genes, Chrom. Cancer.* 25, 97-103, 1999.
77. Tsukamoto K, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M.: Frequent Multiplication of Chromosome 1q in Non-invasive and Papillotubular Carcinoma of the Breast. *Cancer. Lett.* 141, 21-28, 1999.
78. Kitamura Y, Nakata T, Minobe K, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Onda M, Emi M.: Ret/PTC3 is the most frequent form of gene rearrangement among papillary thyroid carcinomas in Japan. *J. Hum. Genet.* 44, 96-102, 1999.
79. Emi M, Yoshimoto M, Sato T, Matsumoto S, Utada Y, Iwase T, Ito I, Minobe K, Tada T, Katagiri T, Bando K, Akiyama F, Harada Y, Fukino K, Sakamoto G, Matsushima M, Iida A, Saito H, Miki Y, Kasumi F, Nakamura Y.: Allelic loss at 1p34, 13q12, 17p13.3, and 17q21.1 Correlates with Poor Postoperative Prognosis in Breast Cancer. *Genes, Chrom. Cancer.* 26, 134-141, 1999.
80. Kawamura N, Nagai H, Bando K, Koyama M, Matsumoto S, Tajiri T, Onda M, Fujimoto J, Ueki T, Konishi N, Shiba T, Emi M.: PTEN/MMAC1 Mutations in Hepatocellular Carcinomas: Somatic Inactivation of Both Alleles in Tumors. *Jpn J. Cancer*

- Res. 90, 413-418, 1999.
81. Orimo, H., Nakajima, E., Ikejima, M., Emi, M., Shimada, T.: Frameshift mutations and a length polymorphism in the hMSH3 gene and the spectrum of microsatellite instability in sporadic colon cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 1310-1315, 1999.
 82. Utada, Y., Haga, S., Kajiwara, T., Kasumi, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y., Emi, M.: Mapping of Target Regions of Allelic Loss in Primary Breast Cancers to 1-cM intervals on genomic contigs at 6q21 and 6q25.3. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 293-300, 2000.
 83. Ota N, Nakajima T, Takeuchi T, Shirai Y, Emi M.: Isolation and radiation hybrid mapping of a highly polymorphic CA repeat sequence at the human nuclear factor kappa-beta subunit 1 (NFKB1) locus. *J. Hum. Genet.* 44, 129-130, 1999.
 84. Fukino, K., Teramoto, A., Adachi, K., Takahashi, H., Emi, M.: A family with Hydrocephalus as a Complication of Cerebellar Hemangioblastoma: Identification of Pro157Leu Mutation in the VHL Gene. *J. Hum. Genet.* 45, 47-51, 2000.
 85. Kurose, K., Mine, N., Doi, D., Ota, Y., Yoneyama, K., Konishi, H., Araki, T., Emi, M.: Novel Gene Fusion of COX6C at 8q22-23 to HMGIC at 12q15 in a Uterine Leiomyoma. *Genes, Chrom. Cancer.* 27, 303-307, 2000.
 86. Kitamura, Y., Shimizu, K., Tanaka, S., Ito, K., Emi, M.: Allelotyping of Anaplastic Thyroid Carcinoma: Frequent Allelic Losses on 1q, 9p, 11, 17, 19p, and 22q. *Genes, Chrom. Cancer.* 27, 244-251, 2000.
 87. Yokota, T., Nakata, T., Minami, S., Inazawa, J., Emi, M.: Genomic organization and chromosomal mapping of ELKS, a gene rearranged in a papillary thyroid carcinoma. *J. Hum. Genet.* 45, 6-11, 2000.
 88. Utada, Y., Haga, S., Kajiwara, T., Kasumi, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y., Emi, M.: Allelic Loss at 8p22 Region as a Prognostic Factor in Large and Estrogen Receptor Negative Breast Carcinomas. *Cancer.* 88, 1410-1416, 2000.
 89. Futamura, M., Arakawa, H., Matsuda, K., Katagiri, T., Saji, S., Miki, Y., Nakamura, Y. Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res.*, 60, 1531-1535, 2000.
 90. Noguchi, S., Kasugai, T., Miki, Y., Fukutomi, T., Emi, M., Nomizu, T. Clinicopathologic analysis of BRCA1 -or BRCA2 -associated hereditary breast carcinoma in Japanese women. *Cancer*, 85, 2200-5, 1999.
 91. Kato, M., Yano, K., Matsuo, F., Saito, H., Katagiri, T., Kurumizaka, H., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nagawa, H., Nakamura, Y., Miki, Y. Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum. Genet.* 2000, in press.
 92. Yano, K., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F., Miki, Y. Nuclear Localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000,

in press.

93. Kuno, T., Fukutomi, T., Akashi-Tanaka, S., Nanasawa, T., Kanai, Y., Tsuda, H., Nomizu, T., Miki, Y. Bilateral nonpalpable breast carcinomas in a patient with BRCA2 germ line mutation and past history of osteosarcoma. *Breast Cancer*, 6, 51-54, 1999.
94. 歌田貴仁、江見 充：乳がんの成因と発生機序．（特集－乳がん）からだの科学、209：31-34. 1999.
95. 常泉道子、歌田貴仁、江見 充：乳癌の遺伝子診断．（特集－乳癌診療の最前線）外科治療、81:669-674. 1999.
96. 吹野晃一、江見 充、中村祐輔：癌と遺伝子（特集－臨床医に必要な遺伝医学）．臨床医、25:1285-1289. 1999.
97. 霞富士男、多田隆士、林 孝子、高橋かおる、齋藤光江、藤田益次郎、内田恵博、吉本賢隆、中村祐輔、三木義男、須田幸子、江見 充：家族性乳癌の臨床－BRCA-1, BRCA-2 遺伝子を含む－（特集－家族性腫瘍と遺伝子）遺伝子医学、3：431-438. 1999.
98. 江見 充、霞富士雄、中村祐輔：多形性 DNA マーカーを用いた乳癌の予後診断．第 25 回日本医学総会会誌 1999.（印刷中）
99. 歌田貴仁、美濃部かおり、芳賀駿介、梶原哲郎、吉本賢隆、霞富士雄、秋山 太、坂元吾偉、中村祐輔、江見 充：乳癌の術後予後予測遺伝子診断の診断率向上の検討．乳癌の臨床、14：540-541. 1999.
100. 永井尚生、原田晴仁、江見 充：癌遺伝子・癌抑制遺伝子．（特集－乳癌の診断と治療）日本臨床、58：25-29. 2000.
101. 歌田貴仁、江見 充：染色体欠失の遺伝子診断．（特集－乳癌の診断と治療）日本臨床、58:473-477. 2000.