

膵癌の発生と原因遺伝子の研究

《研究の概要》

膵癌は極めて予後不良の癌である。近年、遺伝子異常の検索が多くなされ、比較的大きな浸潤性膵癌に関しては、高頻度に起こっている遺伝子異常が明らかにされてきた。しかし、これら高頻度に異常が見られる遺伝子が、膵癌の初期の段階で起こっているかの報告はほとんどない。浸潤性膵癌に高頻度に見られる遺伝子異常が膵癌の初期段階から起こっているか否かを明らかにすることは、遺伝子による膵癌の早期診断に大いに役立つと言える。この研究では、膵癌のなかでは比較的良好な予後が期待される大きさ 2cm 以下の浸潤性小膵癌および通常型膵癌の非浸潤部について、浸潤性膵癌に高頻度に見られる遺伝子異常がみられるか検索した。その結果、小膵癌および通常型膵癌の非浸潤部であっても、大きな浸潤性膵癌と同様の遺伝子異常が高頻度で起こっていた。つぎに、発生過程の相違による遺伝子異常の相違を求めた。膵癌の発生過程には腺腫を経て癌になる過程と腺腫を経ず正常の膵管上皮より癌になる過程がある。両者の非浸潤部の遺伝子異常を検索した結果、後者では 17p、9p、18q の LOH がいずれも高頻度に見られたが、前者では 9p の LOH のみ高頻度に見られた。すなわち、両者の初期に起こる遺伝子異常は異なっていた。臨床的には腺腫を経て癌化した浸潤癌は、腺腫を経ずに癌化した浸潤癌と比較し予後がよいとの報告がある。今後、腺腫をへて浸潤癌になった癌において浸潤部の遺伝子異常を検索することにより、癌の予後に関わる遺伝子が明らかになる可能性がある。また、LOH と予後との追跡調査によると、12q、17p、18q の LOH が見られた症例では、LOH の見られない症例より有意に予後不良であった。12q、17p、18q の LOH が見られなかった症例が、腺腫由来の癌であったか興味のあるところである。

原発性膵癌手術例を用い全染色体から 46 個のマイクロサテライトマーカーを使用して LOH 解析を行い、1p、6q、9p、12q、17p、18q において 30%以上の欠失を認めていたことからこれらいくつかの染色体欠失領域の責任遺伝子は何かを検索し、膵癌との関係について検討した。1p では RIZ 遺伝子があり、この遺伝子は MSI 陽性の胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、膵癌で異常が検出され、これら腫瘍の共通の標的遺伝子である可能性を明らかにした。12q では Gnt-IV-H 遺伝子、hHDC 遺伝子を単離したが、膵の発癌過程には関わっていなかった。DUSP6 遺伝子は膵癌において高度に発現が抑制されていた。この遺伝子の導入により細胞増殖は抑制され、同時にアポトーシスも誘導された。18q では、SMAD4 遺伝子異常が発癌の late event であり、これ以外にも癌抑制遺伝子が局在する可能性を明らかにした。

柳澤 昭夫	(財) 癌研・病理部主任研究員	膵癌の発育進展解析
加藤 洋	(財) 癌研・病理部部長	膵癌の遺伝子解析
堀井 明	東北大・院・医学系研究科教授	膵癌の遺伝子解析

研究報告

I. 研究目的

膵癌は難治がんの代表格であり、膵がんの治療成績は極めて悪く、5年生存率は未だに10%未満、診断後の平均生存期間は約1年半である。また、膵癌の罹患数、死亡数は、ともに最近30年間で約6倍に跳ね上がっており、かつ、壮年で発症する患者も多く、膵癌克服はいまや社会的急務である。しかし、近年の医学の進歩にも関わらず、その治療成績には改善の兆しも見られない。膵がんを克服するには膵がんの発生・進展機構を分子生物学的に理解することが必要不可欠である。本研究では、初めに膵癌において高頻度に生じている遺伝子異常を明らかにし、引き続きそれらの異常の発がん・進展過程における役割を明らかにする。さらに、これらの研究成果の診断・治療への応用を検討する。

II. 研究計画および材料と方法

膵管癌は膵管上皮に発生し大きくなるに伴い浸潤癌へと進展する。膵癌の遺伝子異常の検索は、大きな浸潤性膵管癌が大部分であり、浸潤性膵管癌よりも予後がよいことが期待される大きさ2cm以下の小膵癌や、大きな浸潤性膵管癌の浸潤していない部分の検索はほとんどなされていない。遺伝子異常について比較的大きな浸潤性膵管癌に高頻度に見られる遺伝子異常が、予後がよいことが期待される大きさ2cm以下の小膵癌に高頻度に見られるか検索した。つぎに、浸潤性膵管癌の同一病変内に存在する非浸潤部の浸潤性膵管癌の遺伝子異常についても検索した。また、通常の浸潤性膵管癌にいたる経路には、腺腫を経て癌が発生し浸潤癌に至る経路と、腺腫を経ずに膵管上皮からいきなり癌が発生する経路があるが、両者の非浸潤部の癌の遺伝子異常についても検索した。

小膵癌の遺伝子異常検索の材料と方法であるが、大きさ2cm以下の小膵癌は7例であり、癌部より、micro-dissection法を用い厳密に膵癌細胞を採取しDNAを抽出し遺伝子異常を検索した。遺伝子異常の検索は膵癌に高頻度に見られる *p53*、*p16* のそれぞれが存在する染色体17p、9p、のLOHの有無について行った。LOHの検索は蛍光標識された microsatellite marker を primer として用いPCRを施行後、蛍光シーケンサーにて行った。LOH陽性の判定は、正常組織と癌組織を比較し、片方のアレルのシグナルが90%以上減弱しているものを陽性とした。LOHの検索部位は9pがD9S157、D9S162、D9S165、17pがD17S570、D17S786、D17s1176である。

浸潤性膵管癌非浸潤部遺伝子異常検索の材料は外科的に切除され全割にて組織学的に検索された非浸潤部が明らかに存在する通常型浸潤性膵管癌16例、および膵管内乳頭腺癌12例（膵管内乳頭腺腫由来の浸潤性膵管癌を含む）である。これらの膵管癌の非浸潤部、浸潤部より micro-dissection法を用い厳密に膵癌細胞を採取しDNAを抽出し遺伝子異常を検索した。遺伝子異常の検索は膵癌に高頻度に異常がみられる *Ki-ras*、*p53*、*p16*、*SMAD4* についておこなった。*Ki-ras* については、突然変異の有無、*p53*、*p16*、*SMAD4* について

は、それぞれが存在する染色体 17p、9p、18q の LOH の有無について行った。LOH の検索は蛍光標識された microsatellite marker を primer として用い PCR を施行後、蛍光シーケンサーにて行った。LOH 陽性の判定は、正常組織と癌組織を比較し、片方のアレルのシグナルが 90% 以上減弱しているものを陽性とした。LOH の検索部位は 9p が D9S157、D9S162、D9S165、17p が D17S570、D17S786、D17s1176 である。I と同様の方法で行った。LOH の検索部位は 9p が D9S157、D9S162、D9S165、17p が D17S570、D17S786、D17s1176、18p が D18S474 である。

原発性膵癌では全染色体から 46 個のマイクロサテライトマーカーを用いて LOH 解析結果を行い、1p、6q、9p、12q、17p、18q において 30% 以上の欠失が認められることを報告してきたが、これらの欠失と予後との相関について外科手術材料 55 例を用い検索した。予後と LOH の関係は Kaplan-Meier 法で調べた。また、前述の LOH が高頻度に見られる遺伝子のそれぞれの欠失領域の責任遺伝子は何かについても検索した。浸潤性膵癌には MSI も少なからぬ頻度で認めたことをふまえ、MSI の原因、ならびに標的ゲートキーパー遺伝子は何かについても検索した。

〔高頻度欠失領域の責任遺伝子について〕

9p には *p16* が局在し、17p には *p53* が局在する。それ以外の領域について検討を加えた。

1p に関しては、1p36-p35 領域のコンティグを BAC を用いて構築した。その際、公表されているマーカーや自力でマップしたコスミドクローンの末端の配列などを STS として用い、PCR スクリーニングでコンティグを作成した。この領域には RIZ 遺伝子があり、蛋白コード領域中にマイクロサテライトがあるため、種々のがんでの異常を検討した。

6q に関しては、LOH 解析に FISH 法を併用し、3 箇所共通欠失領域を同定した。うち 2 箇所は BAC によるコンティグを作成し、候補遺伝子の同定も試みた。

12q では、LOH 解析に FISH 法を併用し、2 箇所共通欠失領域を同定した。これらの領域は BAC によるコンティグを作成し、候補遺伝子の同定も試みた。DUSP6 はこの領域にあり、この遺伝子の膵癌株での発現の検討、さらに発現抑制されている膵癌株における遺伝子導入による解析も行った。

18q には SMAD4 が局在するが、アデノウイルスベクターを用い、この遺伝子を正常に発現している膵癌細胞株とホモ欠失のある膵癌細胞株に導入し、in vitro での増殖抑制効果の検討を加えた。また、染色体 18 番を SMAD4 が正常に発現している膵癌細胞株とホモ欠失のある膵癌細胞株に導入し、増殖へのかかわりの検討を加えた。さらに、膵の前癌病変の一つと考えられている IPMT についても 18q の欠失、ならびに SMAD4 の異常の検討を遺伝子（変異の検索）、蛋白（免疫染色）の両面から調べた。

〔MSI について〕

散発性腫瘍において MSI の主要な原因は hMLH1 のプロモーター領域のメチル化であるため、膵癌におけるこの遺伝子のメチル化の状況を調べ、また、標的ゲートキーパー遺伝子の候補スクリーニングした。

III. 研究成果

(1) 小膵癌と浸潤性膵管癌の非浸潤部遺伝子異常の研究結果

大きさ 2cm 以下の小膵癌に 17p、9p の LOH が高頻度に認められ、小膵癌の段階ですでに

通常見つけられる浸潤性膵管癌とほぼ同じ遺伝子異常が見られることが明らかにされた。通常型浸潤性膵管癌の非浸潤部と腺腫をへて癌化する膵管内乳頭腺癌の非浸潤部の遺伝子異常は、前者では 17p、9p、18q の LOH がいずれも高頻度に見られたが、後者では 9p の LOH のみ高頻度に見られた。すなわち、遺伝子異常検索からも両者の初期に起こる遺伝子異常は異なっている可能性が明らかになった。なお、Ki-ras の遺伝子異常は両者に高頻度に見られ、この遺伝子異常は膵管上皮が腫瘍化するとき大きく関与することが示唆された。

(2) 欠失と予後

これまでに同定した高頻度 LOH 領域において、膵がん切除症例を検討し、予後と関連する遺伝子の局在領域を同定した。その結果、3 染色体領域が特定された (12q, $p=0.010$; 17p, $p=0.003$; 18q, $p=0.025$)。また、6q と 17p、12q と 18q の欠失が相関する事も発見した。

(3) 高頻度欠失領域の責任遺伝子

1p には様々な腫瘍に関連する遺伝子が局在しており、発がん、あるいは進展に関わっているものと考えられている。それら遺伝子の単離・解析を目指し、1p36-p35 のほぼ全長にわたる BAC による contig を作成した。この領域の RB と結合するタンパクをコードする RIZ 遺伝子は MSI 陽性の胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、膵癌のいずれでも異常が検出されたことから、これらの腫瘍における共通の標的遺伝子である可能性も考えられる。これまで MSI 陽性の膵癌では標的 gatekeeper があるのか否かも含めて不明であったが、RIZ に異常が見られたことからある種の遺伝子が標的 gatekeeper であると考えられた。

6q、12q については、これまで既知のがん抑制遺伝子が報告されておらず、また、12q の欠失も膵癌の予後に相関したため、さらなる検討を加えた。12q から Gnt-IV-H 遺伝子、hHDC 遺伝子を同定し、それぞれ検討を加えたが、膵の発がんにはあまり関わっていないものと考えられた。また、DUSP6 遺伝子も同定したが、この遺伝子は膵癌において高度に発現抑制されている。この遺伝子の導入により、細胞増殖は抑制され、同時にアポトーシスも誘導された。遺伝子治療に使える可能性もあり、さらに検討を加えている。

種々の検討を加える材料として膵癌細胞株に注目し、15 株において K-ras、p16、p53、SMAD4 の遺伝子変異を明らかにした。

上記で遺伝子変異を明らかにした膵癌の細胞株のうち SMAD4 の異常のあるものと正常に発現しているものをそれぞれ 2 株ずつ用い、SMAD4 遺伝子の導入を行ったところ、in vitro で全く増殖に影響は及ばされなかった。ところが、染色体 18 番を導入したところ、SMAD4 遺伝子の状態に依らず、in vitro で増殖抑制効果が見られた。この事実も、18q には SMAD4 以外に新規の癌抑制遺伝子が存在することを示している。さらに、18q の導入により、転移抑制作用のあることも判明したが、これは、現在論文投稿中である。

IV. 考察

通常臨床的に見つかる浸潤性膵癌は予後の悪い癌として知られている。近年、これらの癌に高頻度に見られる遺伝子異常が多く報告されるようになってきた。今回、これらの癌に高頻度に見られる p53、p16 遺伝子の存在する染色体の欠失の有無を大きさ 2cm 以下の小膵癌について検索した結果、小膵癌においてもこれらの遺伝子が存在する染色体の欠失が高頻度に見られることが明らかとなった。また、浸潤癌内にみられる非浸潤部病巣について p53、p16、SMAD4 遺伝子の存在する染色体の欠失の有無を検索した結果、いずれも高

頻度に欠失がみられた。すなわち、これら遺伝子の存在する染色体の欠失は癌が浸潤する以前に起こっていることが明らかとなった。すなわち、これらの遺伝子異常は膵癌の初期の段階に起こることが示唆された。また、通常型浸潤性膵管癌に至る過程には腺腫を経て癌になる adenoma-carcinoma sequence が成り立つ癌と腺腫を経ないで通常の膵管上皮から癌になる経路が知られている。adenoma-carcinoma sequence が成り立つ癌の非浸潤部について、同様に *p53*、*p16*、*SMAD4* 遺伝子の存在する染色体の欠失の有無を検索した結果、9p の LOH の頻度は高く、17p、18q の LOH の出現頻度は低かった。この結果は、腺腫を経て癌化する膵癌と腺腫を経ない癌に起こっている初期の段階の遺伝子異常が異なっている可能性を示唆している。実際、腺腫を経て癌化した浸潤癌は、腺腫を経ずに癌化した浸潤癌と病理組織学的には区別つかないが、前者が後者に比し予後がよいとの報告もある。今後、腺腫をへて浸潤癌になった癌についての浸潤部の遺伝子異常を検索することにより癌の予後に関わる遺伝子が明らかになる可能性がある。また、LOH と予後との追跡調査によると、12q、17p、18q の LOH が見られた患者では LOH の見られない患者より有意に予後不良であった。12q、17p、18q の LOH が見られなかった患者が、腺腫由来の癌であったか興味のあるところである。17p、18q の欠失領域にはそれぞれ *p53*、*SMAD4* がある。これらの遺伝子の不活性化は予後不良因子である可能性が考えられる。Nakamori らも膵癌において *p53* の異常と予後不良が相関していることを報告しており (JJCR86、178-181、1995)、我々の結果と一致している。

散发性腫瘍では、*hMLH1* のプロモーター領域のメチル化が MSI の主要な原因であることが胃癌、大腸癌、子宮内膜癌において報告されていた。膵癌でのメチル化の状況を調べると、*hMLH1* の主要な不活性化の機構ではなかった。一方、少なからぬ数の膵癌が MSI を示すことから、胃癌、大腸癌、子宮内膜癌とは別の機構で MSI が生じているものと考えられる。

RIZ 遺伝子は、RB 結合蛋白であるが、種々のがんでの異常を検討したところ、MSI 陽性の胃癌、大腸癌、子宮内膜癌において、*RIZ* 遺伝子の蛋白コード領域内のマイクロサテライトで高頻度の異常がみられ、さらに膵癌でも異常が見られたことから、ケアテイカーの異常の際の標的ゲートキーパーの一つであると考えられた。

12q の *DUSP6* は、発現が抑制されている膵癌細胞株に導入したところ、増殖抑制効果が見られ、その原因の一つにアポトーシスの誘導があるようであり、遺伝子治療の標的遺伝子として有用である可能性が考えられた。

18q の欠失は初期変化であることを報告してきた (Fukushige et al., Cancer Res. 58、4222-4226、1998) が、同部の *SMAD4* は遺伝子導入しても *in vitro* での増殖抑制効果がみられないこと、IPMT では 18q の欠失が膵癌と同程度の頻度で見られるにも関わらず、遺伝子変異もなく、かつ、免疫染色では蛋白の発現も正常に見られること、ならびに、染色体 18 番を導入すると *in vitro* での増補区抑制効果が見られることなどから、18 番には *SMAD4* のほかにも癌抑制遺伝子が局在する可能性があるものと考えられた。そして、*SMAD4* の異常は late event、未知の遺伝子の変異は early event であることが考えられた。Hilgers らは *SMAD4* から distal の部位にホモ欠失領域をみつけている (Genes Chromosomes Cancer. 25、370-375、1999)。これらの事実は、18q に未知の癌抑制遺伝子が局在し、その異常が膵の発癌過程の初期段階であることを強く示唆している。

V. 研究成果の発表

1. Hidaka E, Yanagisawa A, Seki M, Takano K, Setoguchi T, Kato Y. High Frequency of K-ras Mutations in Biliary Duct Carcinomas of Cases with a Long Common Channel in the Papilla of Vater. *CANCER RESEARCH* 60:522-524, 2000
2. Sakai Y, Yanagisawa A, Kato Y. K-ras gene mutations and loss of heterozygosity at the p53 gene locus relative to histological characteristics of mucin-producing tumors of pancreas. *Hum Pathol* 31:795-799, 2000
3. Sakai Y, Kupelioglu AA, Yanagisawa A, Yamaguchi K, Hidaka E, Matsuya S, Ohbuchi T, Tada Y, Saisho H, Kato Y. Origin of Giant Cells in Osteoclast-Like Giant Cell Tumors of the Pancreas. *HUMAN PATHOLOGY*:31(10):1223-1229, 2000
4. Yamao K, Ohashi K, Nakamura T, Suzuki T, Shimizu Y, Nakamura Y, Horibe Y, Yanagisawa A, Nakao A, Nimura Y, Naito Y, Hayakawa T. The Prognosis of Intraductal Papillary Mucinous Tumors of the Pancreas. *Hepato-Gastroenterology* 47:1129-1134, 2000
5. 関誠, 二宮栄司, 太田博俊, 上野雅資, 新井正美, 国土典宏, 高橋孝, 有賀明子, 山田恵子, 高野浩一, 佐藤栄一, 村上義史, 堀雅晴, 佐々木恵子, 柳澤昭夫, 加藤洋. 膵管造影による膵内分泌腫瘍の主膵管像の特徴 - 浸潤性膵管癌との鑑*を中心に -. *膵臓* 2001;16(5):438-447.
6. 関誠, 柳澤昭夫, 二宮栄司, 二宮康郎, 太田博俊, 高野浩一, 有賀明子, 池田真幸, 佐々木恵子, 加藤洋. 浸潤癌となった症例からみた治療適応 - 外科病理学的見地から -. *胆と膵* 22(10):847-858, 2001
7. 関誠, 太田博俊, 柳澤昭夫, 加藤洋. 治せる膵癌 - 臨床病理学的見地から -. *胆と膵* 22(9):739-748, 2001
8. 山本智理子, 柳澤昭夫. 微小リンパ節転移の臨床的意義. *早期大腸癌* 5(3):275-278, 2001
9. 山雄健次, 大橋計彦, 渡辺吉博, 澤木明, 福富晃, 清水泰博, 松枝清, 渡辺典子, 柳澤昭夫. 膵管内乳頭腫瘍と粘液性嚢胞腫瘍の臨床診断. *消化器画像* 3(3):322-328, 2001
10. Hidaka E, Yanagisawa A, Seki M, Kato Y. Genetic alterations and growth pattern in biliary duct carcinomas: loss of heterozygosity at chromosome 5q bears a close relation with polypoid growth. *GUT* 48(5):656-659, 2001
11. 柳澤昭夫. 消化器(食道・胃・大腸・胆・膵)の術中迅速診断. *病理と臨床* 19:46-52, 2001
12. 有賀明子, 小泉満, 山田恵子, 澤野誠志, 河野敦, 小倉敏裕, 関誠, 柳澤昭夫. 膵腫瘍のマルチスライス CT. *映像情報* 8:33(9):852-857, 2001
13. Hatada, I., Kato, A., Morita, S., Obata, Y., Nagaoka, K., Sakurada, A., Sato, M., Horii, A., Tsujimoto, A., and Matsubara, K. A microarray-based method for detecting methylated loci. *J. Hum. Genet.* in press
14. Duda, D. G., Sunamura, M., Lozonchi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., and Matsuno, S. Brain

- specific angiogenesis inhibitor 1 mediates the p53 inhibitory effect on tumor angiogenesis by the downregulation of collagenase expression. *Br. J. Cancer* 86, 490-496, 2002
15. Lefter, L. P., Furukawa, T., Sunamura, M., Duda, D. G., Takeda, K., Kotobuki, N., Oshimura, M., Matsuno, S., and Horii, A. Suppression of the tumorigenic phenotype by chromosome 18 transfer into pancreatic cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 234-242, 2002
 16. Kondo, E., Horii, A., and Fukushima, S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino-acid residues within hMLH3, hPMS1, and hPMS2. *Nucl. Acids Res.* 29, 1695-1702, 2001
 17. Kaneko, K., Nagasaki, Y., Furukawa, T., Mizutamari, H., Sato, A., Masamune, A., Shimosegawa, T., and Horii, A. Analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene mutations in Japanese patients with chronic pancreatitis. *J. Hum. Genet.* 46, 293-297, 2001
 18. Chen, Y. Z., Hayashi, Y., Wu, J. G., Takaoka, E., Maekawa, K., Watanabe, N., Inazawa, J., Hosoda, F., Arai, Y., Ohki, M., Mizushima, H., Morohashi, A., Ohira, M., Nakagawara, A., Liu, S.-Y., Hoshi, M., Horii, A., and Soeda, E. A BAC-based STS-content map spanning a 35-megabase region of human chromosome 1p35-36. *Genomics* 74, 55-70, 2001
 19. Inoue, H., Furukawa, T., Sunamura, M., Takeda, K., Matsuno, S., and Horii, A. Exclusion of *SMAD4* mutation as an early genetic change in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 31, 295-299, 2001
 20. Makino, N., Yamato, T., Inoue, H., Furukawa, T., Abe, T., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Fukushima, S., Orikasa, S., Takahashi, T., and Horii, A. Isolation and characterization of the human gene homologous to the *Drosophila* Headcase (*hdc*) gene in chromosome bands 6q23-q24, a region of common deletion in human pancreatic cancer. *DNA Seq.* 11, 547-553, 2001
 21. Youssef, E. M., Kaneko, K., Yatsuoka, T., Hayashi, Y., Hoshi, M., Horii, A., and Furukawa, T. Human BAC contig covering the deleted region in pancreatic cancer at 12q21. *DNA Seq.* 11, 541-546, 2001
 22. Sakurada, K., Furukawa, T., Kato, Y., Kayama, T., Huang, S., and Horii, A. *RIZ*, the retinoblastoma protein interacting zinc finger gene, is mutated in genetically unstable cancers of the pancreas, stomach, and colorectum. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 207-211, 2001
 23. Sun, C., Yamato, T., Furukawa, T., Ohnishi, Y., Kijima, H., and Horii, A. Characterization of the mutations of the *K-ras*, *p53*, *p16*, and *SMAD4* genes in 15 human pancreatic cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 8, 89-92, 2001
 24. Schutte, B. C., Carpten, J. D., Forus, A., Gregory, S. G., Horii, A., and White P. S. Report of the sixth international workshop on human chromosome 1 mapping 2000. *Cytogenet Cell Genet* 92, 23-41, 2001

25. Sakamoto, Y., Taguchi, T., Honke, K., Korekane, H., Watanabe, H., Tano, Y., Dohmae, N., Takio, K., Horii, A., and Taniguchi, N. Molecular cloning and expression of cDNA encoding chicken UDP-GlcNAc: GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-2) Man α 1-R [GlcNAc to Man] β 1, 4*N*-acetylglucosaminyl transferase VI. *J. Biol. Chem.* 275, 36029-36034, 2000
26. Kondo, E., Furukawa, T., Yoshinaga, K., Kijima, H., Semba, S., Yatsuoka, T., Yokoyama, T., Fukushige, S., and Horii, A. Not *hMSH2* but *hMLH1* is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. *Int. J. Oncol.* 17, 535-541, 2000
27. Yatsuoka, T., Sunamura, M., Furukawa, T., Fukushige, S., Yokoyama, T., Inoue, H., Shibuya, K., Takeda, K., Matsuno, S., and Horii, A. Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6q/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am. J. Gastroent.* 95, 2080-2085, 2000
28. Saito, A., Furukawa, T., Fukushige, S., Koyama, S., Hoshi, M., Hayashi, Y., and Horii, A. *p24/ING1-ALT1* and *p47/ING1-ALT2*, distinct alternative transcripts of *p33/ING1*. *J. Hum. Genet.* 45, 177-181, 2000
29. Furukawa, T., Youssef, E. M., Yatsuoka, T., Yokoyama, T., Makino, N., Inoue, H., Fukushige, S., Hoshi, M., Hayashi, Y., Sunamura, M., and Horii, A. Cloning and characterization of the human UDP-*N*-acetylglucosamine: α -1, 3-D-mannoside β -1, 4-*N*-acetylglucosaminyltransferase IV-homologue (*hGnT-IV-H*) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 397-401, 1999
30. Kondo, E., Horii, A., and Fukushige, S. The human PMS2L proteins do not interact with hMLH1, a major DNA mismatch repair protein. *J. Biochem.* 125, 818-825, 1999
31. Yatsuoka, T., Furukawa, T., Abe, T., Yokoyama, T., Sunamura, M., Kobari, M., Matsuno, S., and Horii, A. Genomic analysis of the thymine-DNA glycosylase (*TDG*) gene on 12q22-q24. 1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Panc.* 25, 97-102, 1999
32. Han, S., Semba, S., Abe, T., Makino, N., Furukawa, T., Fukushige, S., Takahashi, H., Sakurada, A., Sato, M., Shiiba, K., Matsuno, S., Nimura, Y., Nakagawara, A., and Horii, A. Infrequent somatic mutations of the *p73* gene in various human cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25, 194-198, 1999
33. Abe, T., Makino, N., Furukawa, T., Ouyang, H., Kimura, M., Yatsuoka, T., Yokoyama, T., Inoue, H., Fukushige, S., Hoshi, M., Hayashi, Y., Sunamura, M., Kobari, M., Matsuno, S., and Horii, A. Identification of three commonly deleted regions on chromosome arm 6q in human pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 60-64, 1999