

がんのゲノム研究

所属機関 癌研究会・癌化学療法センター
研究者名 矢守 隆夫

《研究の概要》

ヒトゲノムプロジェクトによるヒト遺伝情報の解析が終了し、遺伝情報の分子生物学的解析手法における技術革新にも目を見張るものがある現在、癌の遺伝学的個性の把握が可能となりつつある。癌の遺伝学的個性はそれぞれの癌の様々な抗がん剤への感受性の違いや悪性度の違いなどを規定するものであり、遺伝学的個性を理解することにより、それぞれの癌において最も効果的な治療法を選択することが可能となるものと期待される。しかし、どのような遺伝子が癌の個性を規定するかをより正確に理解するためにはそれぞれの遺伝子の機能とそれぞれの遺伝子ネットワークを十分に解き明かす必要がある。このためには臨床および病理学的に正確な記述を備えた各種癌組織を用いて、マイクロアレイなどによる RNA レベルでの網羅的な遺伝子発現データをより多く集積するとともに同一の癌組織からタンパクレベルでのデータの集積を行うことが必要と考えられる。そこで本研究は、DNA microarray を用いて、各患者に発生する癌における網羅的遺伝子発現情報の収集を行うとともに、特に同一癌検体よりプロテインチップを用いてタンパクの発現解析を行う系の確立を行った。プロテインチップのシステムはチップの担体上でタンパクの吸着・部分精製を行い、時間飛行型の質量分析計を用いてタンパクの定量的プロファイルを行うものであり、様々な検討の結果、おおよそ 2 千個の細胞という微量なサンプルからの解析が可能であった。乳癌 40 例、大腸癌 45 例、食道癌 20 例についてそれぞれマイクロアレイとプロテインチップとでの解析を行った。特に高分化型進達度 ss の大腸癌 18 例（リンパ節転移あり、なしそれぞれ 9 例）を用いた解析では、顕微鏡下で正確な癌部の回収（マイクロダイセクション）を行った後に同一サンプルより RNA とタンパクとについてそれぞれマイクロアレイ、弱陽イオン交換樹脂を担体とするプロテインチップでの解析を行った。プロテインチップを用いた解析では、149 本のピークを検出し、Ada Boost の手法を用いて大腸がんのリンパ節転移を予測する 7 本のピーク（M/z1283、3460、5352、5871、6124、7208、8104）の組み合わせを選択した。このピークの組み合わせによる誤判別率は、5.56% (1/18) であった。現在、マイクロアレイの結果との照合および統合を行うことでより正確な癌の個性の理解を目指している。このような RNA、タンパクの多層的な情報の集積により、今後効果的な治療法へと結びつくことを期待している。また、癌早期発見のための血漿タンパクのプロテインチップを用いた解析では、正常人 94 サンプル、肺癌 48 サンプル、乳癌 73 サンプルの解析を逆相プロテインチップでの解析を行い、肺癌、乳癌にそれぞれ特異的なピークを見出し、それらピークの検証と同定との解析をすすめている。

共同研究者の氏名、所属機関名

| 氏名 | 所属機関名 | 分担研究テーマ |
|-------|-----------------------|-------------|
| 矢守 隆夫 | (財) 癌研究会・癌化学療法センター・部長 | 研究統括 |
| 野田 哲生 | (財) 癌研究会・癌研究所・副所長 | 癌組織の遺伝的個性解析 |
| 三木 義男 | (財) 癌研究会・癌研究所・部長 | DNA チップの作製 |

研究報告

I. 研究の目的

がん化学療法の理想は、個々のがんとがん患者の薬剤感受性や薬剤代謝系の特徴を把握して、最も有効な薬剤を選択し、副作用を避けつつ患者一人一人に適したがん化学療法（オーダーメイド治療法）を実施することにある。ヒトゲノムプロジェクトによるヒト遺伝情報の解析が終了し、遺伝情報の分子生物学的解析手法における技術革新にも目を見張るものがある現在、がんの遺伝学的個性の把握が可能となっている。そこで本研究は、DNA microarray（以下 DNA チップ）とプロテインチップを用いることにより、各患者に発生する癌における各種遺伝子の発現パターンの変化を解析することにより「癌の遺伝学的個性の診断」を行ない、これにより得られる情報を基にして、がんの「オーダーメイド治療法」を確立することを目的とする。

II. 研究計画および材料と方法

癌研病院において手術の対象となる患者のがんの遺伝的個性の解析を目的として、がん組織より RNA を採取し、その遺伝子発現プロファイルを解析すると同時にタンパクの抽出も行いプロテインチップによるタンパクプロファイル解析を行う。これを患者の臨床病理学的データと対照することにより、薬物応答性および悪性度などがんの各種形質を規定している遺伝学的マーカーの同定を行った。

1) cDNA チップを用いた解析

DNA 約 25,000 種は Amersham 社より購入し、同社スポッターを用いてスライドガラスに載せ、作製した。各スライドガラスには約 4,000 種の cDNA がそれぞれ duplicate で載せられ、6 枚 1 セットとして発現解析に用いた。癌研病院から得られる検体（すべて患者の同意を得たもので、癌研倫理審査委員会にて承認を得られたもののみを使用）は、RNA の分解を防ぐために迅速に処理を行い、回収時まで超低温（-145 度）で保存した。検体から目的の部位の回収には薄切後に病理医の指示のもとで顕微鏡下でレーザーを基本としたいわゆるマイクロダイセクション法により正確に癌部（および正常部）の回収を行った。回収された部位からの RNA の回収には QIAGEN 社の RNeasy を用いて行い、ENA の量と質のチェックには nanodrop（アサヒテクノグラス）、バイオアナライザー（Agilent）を用いた。RNA からラベル化体の作製は cDNA 合成/T7polymerase 法で増幅を 2 回繰り返した後、cDNA 合成時に Cy3、Cy5 の取り込みにより行う。ハイブリは Amersham 社の Auto Slide Processor を用いて行い、それぞれの蛍光強度は同社 GenePix を用いて行った。このシステムについては各遺伝子の発現はレファレンスとの比として測定されるために、それぞれのプロジェ

クトに応じたレファレンスを用いた。(正常部 RNA を Cy5 vs 癌部 Cy3)

2) oligo DNA チップを用いた解析

Agilent 社にて約 23,000 種のカスタムメイド oligoDNA (60mer) の作製を行い、解析に用いた。上記 cDNA チップとの主な相違点はハイブリダイゼーションに供するラベル体の作製が cDNA チップの場合が DNA 合成時に蛍光色素の取り込みを行うのに対して oligo DNA チップの場合には T7polymerase での RNA 合成時に行う点であり、その他の RNA の回収等は上記方法に準じた。

3) プロテインチップを用いた解析

がん患者血漿タンパク・ペプチドの解析による早期診断の為の新規腫瘍マーカー探索と、がん組織より抽出したタンパク・ペプチドの解析によるがんの遺伝学的個性診断の為にプロファイリングパターンの認識とを、プロテインチップのシステムを用いて行った。プロテインチップ (Ciphergen 社) は、順相や逆相、イオン交換樹脂を担体とするチップで、この上にサンプルを添加して吸着・部分精製を行い、飛行型の質量分析計 (TOF-MS) でタンパクのプロファイリングを行うシステムである。がん患者血漿タンパク・ペプチドの解析では、乳がん、大腸がん、肺がんを中心とした様々ながん患者から血液を採取した。(すべて患者の同意を得たもので、癌研倫理審査委員会にて承認を得られたもののみを使用) 得られた血液は、遠心して血漿成分のみを -80 度にて解析時まで保存した。解析は、血漿 $10 \mu\text{l}$ に尿素、アセトニトリルを加えて逆相のチップ (H4) に結合させ、2%アセトニトリルで洗浄後、マトリックを添加し、質量分析計による測定を行った。また、がん組織より抽出したタンパク・ペプチドの解析では、細胞数 1,000~2,000 個程度のマイクロアレイと同一のサンプルから、RNA 抽出後のタンパクを含んだ画分を用い、50mM Tris-HCl (pH 9.0) で 5 倍に希釈して弱陽イオン交換のチップ (WCX2) に結合させ、50mM Tris-HCl (pH 9.0) で洗浄後、血漿タンパクと同様の解析を行った。

4) 総合的データベースの構築と解析プログラムの開発

遺伝子および蛋白発現変化情報と患者情報とを併せた総合的データベースの構築を行い、既存のプログラムあるいは独自に開発を行うプログラムを用いて解析を行った。

III. 研究成果

1) 癌部および非癌部からの細胞の正確な回収法の確立

ARCTURUS 社製 PixCell LM200 装置は顕微鏡下で目的の細胞群にのみレーザーを照射し、フィルムに吸着させることで癌部および非癌部の正確な回収を可能とする。この際、組織切片の厚みや堅さによって最適な条件が異なってくる。そこでこれまでにヒト大腸癌、ヒト胃癌などを用いて、最適な条件の確立を行なった。また、Cell Robotics 社製 Laser Scissors Pro300 は前述の装置とは異なり、非常に細いレーザーにより目的の組織を切り出すことが出来る。この装置は広範に存在する組織をより迅速に回収する場合に適しており、癌種やそれぞれの癌の密集度に応じた使い分けを行なうことにした。

2) cDNA マイクロアレイシステムの安定運用のためのチェックシステムの構築

cDNA チップはいわゆるホームメイドのアレイであり、約 2 万 5 千種類の cDNA をスライドガラス上にスポットすることにより作製する。また、針生検などから得られる微量の RNA は T7polymerase 法を 2 度繰り返して増幅することでマイクロアレイでの解析を可能にし

ている。これらのことは一つの結果を出すために非常に多くのステップを必要とし、いずれのステップにおいての小さな効率の低下や一つのトラブルも結果全体に反映されてしまうことになる。そこで、スポットターの管理やスポット後のアレイの品質管理、試薬の納品および保存時の活性のチェック、ハイブリおよびスキャナー等の機器類の管理等、50以上のチェック項目を導入し、それらを徹底することで安定したマイクロアレイシステムの運用が可能になった。

3) マイクロアレイデータのクリーニング

マイクロアレイで得られた生のデータは解析を行う前に、チップに付着した微量のごみなどのデータが混入しないようにデータクリーニングと呼ばれる処理が必要になる。さらにシグナルの強度が正確に RNA の量を反映する範囲にあり、飽和していないかどうか判定を行う必要がある。当初これらの作業を手作業で行って来たが数時間から数日かかると同時に人的ミスが生じる可能性も排除できないことから新たにこれらの作業を自動化するプログラムの作成を行った。様々な試行錯誤の結果これらの作業を完全に自動化するプログラムが完成し、数分で人的ミスのないデータクリーニングが可能になった。

4) プロテインチップシステムによる血漿および癌組織タンパクの解析法の確立

プロテインチップはイオン交換などの樹脂を付着したチップに目的のサンプルを載せ、部分精製した後に質量分析計を用いて微量蛋白の正確な検出を行うものであり、がん早期発見のための血液マーカーの探索に有用であることが示唆されている。使用可能なプロテインチップの種類は、順相、逆相、陽・陰イオン交換、金属結合などを担体とするチップがあり、まず、チップの選択とそれぞれにおける結合条件・wash の条件などの詳細な検討を行った。その結果、もっとも検出ピーク数の多い、再現性の高い逆相チップ (H4) を用いて以下の血漿タンパクの解析を行うこととした。

一方、臨床検体を用いた RNA レベルでの網羅的解析と組織内タンパクレベルの解析とを同一のサンプルから行うことは非常に難しいとされている。この理由として RNA サンプルでは微量サンプルからの増幅が可能であるのに対して、タンパクでは増幅が不可能であり、それぞれの分離とその検出がマイクロアレイに比べて非常に難しいということが挙げられる。そこでわれわれはプロテインチップを用いて癌組織内タンパクの解析への応用を試みた。はじめに RNA の回収と同時に蛋白の抽出を行い、RNA 発現とまったく同じ検体からの蛋白レベルでの解析が可能であるかについて様々な条件検討を行った。その結果、細胞数 1,000~2,000 個程度という微量組織から抽出した微量タンパクを、プロテインチップシステムを用いたタンパクのプロファイリングが可能であることがわかった。使用するチップは、血漿タンパクと同様の条件検討を行った結果、弱陽イオン交換プロテインチップが最も再現性、および情報量が多かったため、これを用いることとした。

5) 患者臨床情報データベースの構築

薬物応答性を始めとする癌の各種形質を規定している癌の遺伝学的マーカーを 2 万種以上のマイクロアレイデータの中から検索するためには、コンピューターを用いた解析が避けられなく、このためには患者臨床情報を出来る限り数値化してデータベースの構築を行うことが必須である。また、これらのデータはセキュリティーの面からも厳重に保管されなければならない。そこでこれら条件を満たすデータ入力システムと保管システムの構築とを行い、データの入力を行った。

6) 大腸癌のリンパ節転移予測

癌の外科的治療の際には切除部位の決定が最も重要であり、患者にとってリスクを最小限にし、かつ予後の QOL を十分に考えて決定される。特にリンパ節の転移の有無を知ることが出来れば適切な術式の選択が可能となる。そこでリンパ節転移を予測可能な遺伝子、およびタンパクの抽出を試みた。高分化型で深達度 ss の大腸がんからリンパ節転移・非転移各 9 例の手術材料を用いて、マイクロアレイでの解析を行った。転移有無の群での遺伝子発現の比較をマンホイットニーU 検定を用いて行い、17 遺伝子が抽出された。CART 法を用いて、判別能力の高い遺伝子の順位をつけ上位 4 番まででの判別能力を調べたところ、誤判別率はそれぞれ 0/18~3/18 と高いものであった。同一サンプルを用いたプロテインチップでのタンパクの解析ではマイクロアレイと同一のサンプルから、RNA を抽出した残りのタンパクを含む画分 40 μ L (細胞数 2000 個程度) を 50mM Tris-HCl (pH 9.0) で希釈して陽イオン交換チップに添加し、タンパクをチップに結合させた。チップは 50mM Tris-HCl (pH 9.0) で洗浄し、EAM を添加して質量分析計による解析を行った。MS のデータから 149 本のピークを検出し、Ada Boost の手法を用いて大腸がんのリンパ節転移を予測する 7 本のピーク (M/z 1283, 3460, 5352, 5871, 6124, 7208, 8104) の組み合わせを選択した。このピークの組み合わせによる誤判別率は、5.56% (1/18) であった。

7) 乳がんにおける抗癌剤感受性予測

癌における化学療法の施行前に、その癌の特定の抗がん剤への感受性を予測することは、患者の負担を減らすだけではなく、他の治療法の選択を可能とし、治癒率の向上につながるものと期待される。パクリタキセル (タキソール) 単剤化学療法前の乳がん検体を用いた遺伝子発現情報を用いて、病理および臨床効果判定をもとにパクリタキセルへの感受性、非感受性を予測する遺伝子の検索を行った。まず、病理効果・臨床効果判定を用いて、全体を治療効果に応じて 5 つの群に分類を行った。最も効果の高かった群と効果のほとんど見られなかった群とで発現に 1.4 倍以上差のある遺伝子群の抽出をマンホイットニーU 検定を用いて行い、さらにこの遺伝子群から全体の検体の感受性、非感受性を判定できる遺伝子セットの抽出を AdaBoost 法を用いて行った。その結果、得られた遺伝子のセットを用いて、解析に用いた検体では完全に (誤判別率 0/40) 感受性の予測を行うことが可能であることが分かった。現在、これらの結果についてオリゴマイクロアレイを用いて、追試を行うとともに、Real Time PCR 法を用いた検証を行っている。

プロテインチップを用いた解析では、大腸がんと同様の手法により、マイクロアレイと同一のサンプルから、RNA を抽出した残りのタンパクを含む画分 40 μ L (細胞数 1000 個程度) から解析を行った。MS のデータから 166 本のピークを検出し、AdaBoost の手法を用いてパクリタキセルに対して著効・非著効を判別する 8 本のピーク (M/z1050, 1094, 1280, 1356, 1513, 3654, 4304, 11334) の組み合わせを選択した。このピークの組み合わせによる誤判別率は、11.4% (4/35) であった。

8) 骨軟部腫瘍の悪性度分類

軟骨系腫瘍は、病理学的分類に難渋する代表的な骨軟部腫瘍のひとつである。悪性度の低い軟骨肉腫と良性病変である内軟骨腫との病理学的に鑑別診断には現在、病理組織像に加えそれらが発生する部位の情報を用いて診断を行っているが、時として両者の判別が難しい境界病変が存在する。そこで我々は、軟骨系腫瘍のこういった境界病変の鑑別診断を

正確に行うことを目的として、43例の軟骨系腫瘍に対して、マイクロアレイを用いての網羅的な遺伝子発現解析研究をおこなった。その結果軟骨肉腫と内軟骨腫との間で発現レベルが異なる遺伝子を、マンホイットニーU検定を用いて選定した。さらにAdaBoostプログラムを用いて、マンホイットニー検定にて選定された遺伝子を対象に、良性病変と悪性病変を鑑別する能力の高い遺伝子セットを抽出した。この遺伝子セットの診断能力の評価を、この遺伝子セットの抽出に用いていない他の症例にて行った所、ほぼ正確に良性と悪性腫瘍とを鑑別することに成功した。現在、これら症例についてもプロテインチップのデータの収集を終了し、ピークの解析をすすめている。

9) 食道扁平上皮癌の放射線化学療法感受性を規定する遺伝子群の抽出

StageIII から IVa の食道扁平上皮癌の放射線化学療法における CR 率はおおよそ 50% 程度である。そこで放射線化学療法の効果を治療施行前に予測することにより、それぞれの患者に適した治療の選択を可能とすることを目的として、化学療法前に内視鏡にて得られた生検サンプル 24 例 (CR12 例 vs non-CR12 例) についてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。現在、これらを判別する遺伝子セットの抽出を行うとともにプロテインチップのデータ収集を終了し、ピークの解析をすすめている。

10) 患者血漿蛋白のプロテインチップを用いた解析

正常人 98 検体、各種がん患者 151 検体 (乳がん 73、肺がん 48、大腸がん 20、直腸がん 3、卵巣がん 2、胃がん、子宮体がん、十二指腸、S 状結腸、非ホジキンリンフォーマ各 1) について血漿タンパクの解析を行った。これらの解析では電荷あたりの分子量 (M/z) 1,000-15,000Da の範囲で 399 本のピークを検出し、t 検定により各がん種で特異的に検出され、かつ正常サンプルで強いピークの検出されないものを早期診断の為のマーカーの候補として探索した。この結果、乳がんでは M/z3324.94 ($P=5.93219255648613E-14$)、肺がんでは M/z1660.55 ($P=1.71263710786645E-06$) のピークを選出した。

11) プロテインチップの新規ピークデータ処理システムの構築

プロテインシステムに組み込まれたソフトウェアを用いた場合には、これまでに集積された患者血漿および癌組織の蛋白プロファイルデータ解析は強度の比較的強いピークに限って可能であった。そこで比較的弱いピークに関して、より詳細に解析を行うためにそれぞれのイオンピークの位置 (m/z) と強度とを補正し、それぞれの帰属について明らかにする必要がある。そのため、主だったピークを用いてそれらを補正し、定量化するアルゴリズムの開発を行った。このアルゴリズムの導入により、これまではピークとみなされなかった小さなピークの検出と、非常に近い複数のピークの分離などが可能となり、より詳細で正確なプロファイルデータの解析が可能となった。現在、このアルゴリズムを用いた再解析を開始し、これらの蛋白データと上記マイクロアレイの発現情報との統合を行っている。

IV. 考察

癌の遺伝学的個性はそれぞれの癌の様々な抗がん剤への感受性の違いや悪性度の違いなどを規定するものであり、遺伝学的個性を理解することにより、それぞれの癌において最も効果的な治療法を選択することが可能となるものと期待される。しかし、どのような遺伝子が癌の個性を規定するかをより正確に理解するためにはそれぞれの遺伝子の機能と

それぞれの遺伝子ネットワークを十分に解き明かす必要がある。このためには臨床および病理学的に正確な記述を備えた各種癌組織を用いて、マイクロアレイなどによる RNA レベルでの網羅的な遺伝子発現データをより多く集積するとともに同一の癌組織からタンパクレベルでのデータの集積を行うことが必要と考えられる。そこで本研究は、DNA microarray を用いて、各患者に発生する癌における網羅的遺伝子発現情報の収集を行うとともに、同一癌検体よりプロテインチップを用いてタンパクの発現解析を行う系の確立を行った。大腸癌におけるリンパ節転移の予測ではマイクロアレイの結果とほぼ同様にプロテインチップを用いてのほぼ正確な予想が可能であることが示された。このように微量のサンプルから RNA とタンパクとの解析が可能となったことは今後これらのデータを統合していくことにより、より正確で詳細な解析が可能となっていくものと期待される。

また、マイクロアレイを用いた乳がんにおけるパクリタキセルの効果予測においては今後の検証が必要ではあるものの極めて高い精度での効果予測が可能であることが示唆された。これと同様にプロテインチップを用いたタンパクプロファイル解析においてもピークの組み合わせにより高い効果予測が可能であることが分かった。現在用いているプロテインチップのシステムではそれぞれのピークがどのようなタンパクであるかを同定することにはハードウェア的な限界がある。そこで、今後他のシステムを用いていくことにより、それら分子の同定を行い、マイクロアレイのデータとリンクした形での解析をすすめていくことが、必要と考えられる。また、現在進行中であるエピルビシン、ドセタキセルの効果予測についても同様に効果予測が可能となれば、各個人に最も効果の高い治療法を選択することが出来るようになるものと考えられる。また、このように各薬剤に対する効果予測システムを確立しておけば、今後奏効率がより高いとされる新たな抗癌剤の出現した場合においても現在の治療法を一つの選択肢として残すことができるため、それぞれのがんに対するより高い治療効果が期待できる。

プロテインチップを用いた血漿サンプルの解析は早期診断のためのマーカーの検索に有効と考えられ、今後より多くのデータの集積を行っていきたい。また、同様にプロテインチップを用いた癌組織蛋白の解析法は現時点では最も微量な組織からの蛋白解析が可能で方法の一つであり、また、マイクロアレイの解析を行ったサンプルと同一の部位のものであることは RNA レベルでの遺伝子発現情報と蛋白発現情報を合わせることで今後、多次元的な解析へつながるものと考えられる。

V. 研究成果の発表

1. J. Bai, M. Kitabatake, K. Toyozumi, L. Fu, S. Zhang, J. Dai, J. Sakai, K. Hirose, T. Yamori, A. Tomida, T. Tsuruo and M. Ando. Production of biologically active taxoids by a callus culture of taxus cuspidate. J. Nat. Prod. 67: 58-63, 2004.
2. K. Hama, J. Aoki, M. Fukaya, Y. Kishi, T. Sakai, R. Suzuki, H. Ohta, T. Yamori, M. Watanabe, J. Chun and H. Arai. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. J. Biol. Chem. 279: 17634-17639, 2004.
3. W. Rengifo-Cam, A. Konishi, N. Morishita, H. Matsuoka, T. Yamori, S. Nada and

- M. Okada. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene*, 23: 289-297, 2004.
4. T. Mashino, D. Nishikawa, K. Takahashi, N. Usui, T. Yamori, M. Seki, T. Endo and M. Mochizuki. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13: 4395-4397, 2003.
 5. Y. Sugiyama, S. Dan, Y. Yoshida, F. Akiyama, K. Sugiyama, Y. Hirai, M. Matsuura, S. Miyata, M. Ushijima, K. Hasumi and T. Yamori. A large-scale gene expression comparison of microdissected, small-sized endometrial cancers with or without hyperplasia matched to same-patient normal tissue. *Clin. Cancer. Res.*, 9: 5589-5600, 2003.
 6. S. Dan, M. Shirakawa, Y. Mukai, Y. Yoshida, K. Yamazaki, T. Kawaguchi, M. Matsuura, Y. Nakamura and T. Yamori. Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines. *Cancer Sci.*, 94: 1074-1082, 2003.
 7. M. Tanabe, H. Izumi, T. Ise, S. Higuchi, T. Yamori, K. Yasumoto and K. Kohno. Activating transcription factor 4i ncreases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 63: 8592-8595, 2003.
 8. T. Bando, H. Iida, Z. F. Tao, A. Narita, N. Fukuda, T. Yamori and H. Sugiyama. Sequence specificity, reactivity, and antitumor activity of DNA-alkylating pyrrole-imidazole diamides. *Chem. Biol.*, 10: 751-758, 2003.
 9. M. Shiwa, Y. Nishimura, R. Wakatabe, A. Fukawa, H. Arikuni, H. Ota, Y. Kato and T. Yamori. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309: 18-25, 2003.
 10. M. Matsuda, T. Yamori, M. Naitoh and K. Okutani. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 5: 13-19, 2003.
 11. K. Umemura, K. Yanase, M. Suzuki. K. Okutani. T. Yamori and T. Andoh. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 481-487, 2003.
 12. M. Suzuki, K. Watanabe, S. Fujiwara, T. Kurasawa, T. Wakabayashi, M. Tsuzuki, K. Iguchi and T. Yamori. Isolation of peridin-in-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of symbiodinium sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 51: 724-527, 2003.
 13. T. Yamori. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for

- drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52 Suppl 1: 74-79, 2003.
14. L. Yang, T. Mashima, S. Sato, M. Mochizuki, H. Sakamoto, T. Yamori, T. Oh-Hara and T. Tsuruo. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res.*, 63: 831-837, 2003.
 15. M. Iwashima, Y. Matsumoto, Y. Takenaka, K. Iguchi and T. Yamori. New marine diterpenoids from the Okinawan soft coral *Clavularia koellikeri*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1441-1446, 2002.
 16. M. Iwashima, I. Terada, K. Iguchi and T. Yamori. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the Okinawan sponge of the genus *axinyssa*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 50: 1286-1289, 2002.
 17. A. Inoue, N. Yoshida, Y. Omoto, S. Oguchi, T. Yamori, R. Kiyama and S. Hayashi. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J. Mol. Endocrinol.*, 29: 175-192, 2002.
 18. K. Umemura, T. Mizushima, H. Katayama, Y. Kiryu, T. Yamori and T. Andoh. Inhibition of DNA topoisomerases II and/or I by pyrazolo [1, 5-a] indole derivatives and their growth inhibitory activities. *Mol. Pharmacol.*, 62: 873-880, 2002.
 19. T. Sasaki, K. Yamazaki, T. Yamori and T. Endo. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *Br. J. Cancer*, 87: 918-923, 2002.
 20. T. Owa, A. Yokoi, K. Yamazaki, K. Yoshimatsu, T. Yamori and T. Nagasu. Array-based structure and gene expression relationship study of antitumor sulfonamides including N-[2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide and N(3-Chloro-7-indolyl)-1, 4-benzenedisulfonamide. *J. Med. Chem.*, 45: 4913-4922, 2002.
 21. S. Hashimoto, Y. Xu, Y. Masuda, T. Aiuchi, S. Nakajo, Y. Uehara, M. Shibuya, T. Yamori and K. Nakaya. β -Hydroxyisovalerylshikonin is a novel and potent inhibitor of protein tyrosine kinases. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 944-951, 2002.
 22. M. Umezu-Goto, Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G.B. Mills, K. Inoue, J. Aoki and H. Arai. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.*, 158: 227-233, 2002.
 23. I. Naasani, T. Yamori and T. Tsuruo. Screening with COMPARE analysis for telomerase inhibitors. *Methods. Mol. Biol.*, 191: 197-207, 2002.
 24. S. Uesato, M. Kitagawa, Y. Nagaoka, T. Maeda, H. Kuwajima and T. Yamori. Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 1347-1349, 2002.

25. T. Yamada, C. Iwamoto, N. Yamagaki, T. Yamanouchi, K. Minoura, T. Yamori, Y. Uehara, A. Toshiwo, K. Umemura and A. Numata. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*, 58: 479-487, 2002.
26. M. Sawada, S. Moriya, S. Saito, R. Shineha, S. Satomi, T. Yamori, T. Tsuruo, R. Kannagi and T. Miyagi. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int. J. Cancer*, 97: 180-185, 2002.
27. K. Iguchi, H. Sawai, H. Nishimura, M. Fujita and T. Yamori. New Dolabellane-Type Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral of the Genus *Clavularia*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 75: 131-136, 2002.
28. S. Dan, T. Tsunoda, O. Kitahara, R. Yanagawa, H. Zembutsu, T. Katagiri, K. Yamazaki, Y. Nakamura and T. Yamori. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 62: 1139-1147, 2002.
29. H. Saji, M. Koike, T. Yamori, S. Saji, M. Seiki, K. Matsushima and M. Toi. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*, 92: 1085-1091, 2001.
30. H. Sakamoto, T. Mashima, S. Sato, Y. Hashimoto, T. Yamori and T. Tsuruo. Selective activation of apoptosis program by s-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase i-overexpressing human lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2513-2518, 2001.
31. K. Iwasa, M. Moriyasu, T. Yamori, T. Tsuruo, D. U. Lee and W. Wiegrebe. In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 64: 896-898, 2001.
32. Y. Omoto, Y. Kobayashi, K. Nishida, E. Tsuchiya, H. Eguchi, K. Nakagawa, Y. Ishikawa, T. Yamori, H. Iwase, Y. Fujii, M. Wamer, J. Gustafsson and S. Hayashi. Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285: 340-347, 2001.
33. Y. Komatsu, K. Y. Tomizaki, M. Tsukamoto, T. Kato, N. Nishino, S. Sato, T. Yamori, T. Tsuruo, R. Furumai, M. Yoshida, S. Horinouchi and H. Hayashi. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res.*, 61: 4459-4466, 2001.
34. S. Fukushima, Y. Takeuchi, S. Kishimoto, S. Yamashita, K. Uetsuki, S. Shirakawa, M. Suzuki, K. Furuta, R. Noyori, H. Sasaki, Y. Kikuchi, T. Kita, T. Yamori, J. Sawada, M. Kojima, A. Hazato, S. Kurozumi and M. Fukushima.

- Antitumor activity, optimum administration method and pharmacokinetics of 13, 14-dihydro-15-deoxy-delta⁷-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) integrated in lipid microspheres (Lipo TEI-9826). *Anticancer Drugs*, 12: 221-234, 2001.
35. F. Miyata, S. Yoshida, T. Yamori and K. Katoh. An efficient and expeditious synthesis of a novel 5H-naphth [1', 2': 5, 6] [1, 4] oxazino [2, 3-b] quinoxalin-5-one and its unique inhibitory activity against a panel of human cancer cell lines. *Heterocycles*, 54: 619-622, 2001.
 36. W. Su, T. Ito, T. Oyama, T. Kitagawa, T. Yamori, H. Fujiwara and H. Matsuda. The direct effect of IL-12 on tumor cells: IL-12 acts directly on tumor cells to activate NF-kappaB and enhance IFN-gamma-Mediated STAT1 Phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 503-512, 2001.
 37. S. Dan and T. Yamori. Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 861-867, 2001. 7
 38. T. Iinuma, S. Homma, T. Noda, D. Kufe, T. Ohno, G. Toda. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine. *J. Clin. Invest.* 113: 1307-1317, 2004.
 39. T. Nakamura, R. Yao, T. Ogawa, T. Suzuki, C. Ito, N. Tsunekawa, K. Inoue, R. Ajima, T. Miyasaka, Y. Yoshida, A. Ogura, K. Toshimori, T. Noce, T. Yamamoto and T. Noda. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nature Genetics*, 36: 528-533, 2004.
 40. T. Kitamura, M. Ito, T. Noda, M. Matsuura and K. Wakabayashi. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. *Int. J. Cancer*, 109: 576-580, 2004.
 41. N. Niho, M. Takahashi, T. Kitamura, Y. Shoji, M. Itoh, T. Noda, T. Sugimura and K. Wakabayashi. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.*, 63: 6090-6095, 2003.
 42. S. Nakai, Y. Sugitani, H. Sato, S. Ito, Y. Miura, M. Ogawa, M. Nishi, K. Jishage, O. Minowa and T. Noda. Crucial roles of Brnl in distal tubule formation and function in mouse kidney. *Development*, 130: 4751-4759, 2003.
 43. Y. Yoshida, T. Nakamura, M. Komoda, H. Satoh, T. Suzuki, J. K. Tsuzuku, T. Miyasaka, E. H. Yoshida, H. Umemori, R. K. Kunisaki, K. Tani, S. Ishii, S. Mori, M. Suganuma, T. Noda and T. Yamamoto. Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes Dev.*, 17: 1201-1206, 2003.
 44. K. Shiba, T. Shirai, T. Honma and T. Noda. Translated products of tandem microgene repeats exhibit diverse properties also seen in natural proteins. *Protein. Eng.*, 16: 57-63, 2003.

45. K. Shiba, T. Honma, T. Minamisawa, K. Nishiguchi and T. Noda. Distinct macroscopic structures developed from solutions of chemical compounds and periodic proteins. *EMBO Rep.*, 4: 148-153, 2003.
46. R. C. Gallagher, T. Hay, V. Meniel, C. Naughton, T. J. Anderson, H. Shibata, M. Ito, H. Clevers, T. Noda, O. J. Sansom, J. O. Mason and A. R. Clarke. Inactivation of Apc perturbs mammary development, but only directly results in acanthoma in the context of Tcf-1 deficiency. *Oncogene*, 21 : 6446-6457, 2002.
47. T. Kitamura, T. Kawamori, N. Uchiya, M. Itoh, T. Noda, M. Matsuura, T. Sugimura and K. Wakabayashi. Inhibitory effects of mofezolac, a cyclooxygenase-1 selective inhibitor, on intestinal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23: 1463-1466, 2002.
48. Y. Sugitani, S. Nakai, O. Minowa, M. Nishi, K. Jishage, H. Kawano, K. Mori, M. Ogawa and T. Noda. Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes. Dev.*, 16: 1760-1765, 2002.
49. R. Yao, C. Ito, Y. Natsume, Y. Sugitani, H. Yamanaka, S. Kuretake, K. Yanagida, A. Sato, K. Toshimori and T. Noda. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11211-11216, 2002.
50. N. Kubota, Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki and T. Noda. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.*, 277: 25863-25866, 2002.
51. S. Takiguchi, S. Suzuki, Y. Sato, S. Kanai, K. Miyasaka, A. Jimi, H. Shinozaki, Y. Takata, A. Funakoshi, A. Kono, O. Minowa, T. Kobayashi and T. Noda. Role of CCK-A receptor for pancreatic function in mice: a study in CCK-A receptor knockout mice. *Pancreas*, 24: 276-283, 2002.
52. S. Hasegawa, T. Sato, H. Akazawa, H. Okada, A. Maeno, M. Ito, Y. Sugitani, H. Shibata, J. Miyazaki, M. Katsuki, Y. Yamauchi, K. Yamamura, S. Katamine and T. Noda. Apoptosis in neural crest cells by functional loss of APC tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 297-302, 2002.
53. T. Kobayashi, O. Minowa, Y. Sugitani, S. Takai, H. Mitani, E. Kobayashi, T. Noda and O. Hino. A germ-line *Tsc1* mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by *Tsc2* mutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8762-8767, 2001.
54. K. Tobiume, A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda and H. Ichijo. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2: 222-228, 2001.
55. S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda and M. Shibuya. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in

- pathological angiogenesis. *Cancer Res* . 61: 1207-1213, 2001.
56. T. Nagahata, M. Onda, M. Emi, H. Nagai, K. Tsumagari, T. Fujimoto, A. Hirano, T. Sato. K. Nishikawa, F. Akiyama. G. Sakamoto. F. Kasumi, Y. Miki T. Tanaka and T. Tsunoda. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. *Cancer Sci* . 95: 218-225. 2004.
 57. H. Fujisawa, S. Eguchi, M. Ushijima, S. Miyata. Y. Miki, T. Muto and M. Matsuura. Genotyping of single nucleotide polymorphism using model-based clustering. *Bioinformatics*, 20: 718-726, 2004.
 58. K. Yoshida. H. G. Wang, Y. Miki and D. Kufe. Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J*. 22: 1431-1441, 2003.
 59. K. Yoshida, Y. Miki and D. Kufe. Activation of SAPK/ JNK Signaling by Protein Kinase C in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem* . 277: 48372-48378. 2002.
 60. N. Kokudo. Y. Miki. S. Sugai, A. Yanagisawa, Y. Kato. Y. Sakamoto. J. Yamamoto, T. Yamaguchi. T. Muto. M. Makuuchi. genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma. *Arch. Surg* . 137: 833-840. 2002.
 61. Y. Imai, M. Nakane, K. Kage, S. Tsukahara, E. Ishikawa, T. Tsuruo. Y. Miki and Y. Sugimoto. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol. Cancer Therapeutics*, 1: 611-616, 2002.
 62. M. Kato, K. Yano. K. Morotomi-Yano. H. Saito and Y. Miki. Identification and characterization of the human protein kinase-like gene *NTKL*: mitosis-specific centrosomal localization of an alternatively spliced isoform. *Genomics*, 79: 760-767, 2002.
 63. M. Takata, S. Tachiiri, A. Fujimori, L. H. Thompson, Y. Miki, M. Hiraoka, S. Takeda, M. Yamazoe. Conserved domains in the chicken homologue of BRCA2. *Oncogene*, 21: 1130-1134, 2002.
 64. K. Morotomi-Yano, K. Yano, H. Saito, Z. Sun, A. Iwama and Y. Miki. Human regulatory factor X4 (RFX4) is a testis-specific dimeric DNA-binding protein that cooperates with other human RFX members. *J. Biol. Chem.*, 277: 836-842, 2002.
 65. F. Matsuo, K. Yano, H. Saito, K. Morotomi, M. Kato, M. Yoshimoto, F. Kasumi, F. Akiyama, G. Sakamoto and Y. Miki. Mutation analysis of the mel-18 gene that shows decreased expression in breast cancer cell lines. *Breast Cancer*, 9: 33-38, 2002.
 66. S. Haga, M. Emi, A. Hirano, Y. Utada, F. Kajiwara, F. Akiyama, G. Sakamoto, K. Takahashi, T. Tada, F. Kasumi, Y. Miki and Y. Nakamura. Association of allelic losses at 3p25. 1, 13q12, or 17p13.3 with poor prognosis in breast

cancers with lymph node metasasis. Jpn. J. Cancer Res., 92: 1199-1206, 2001.