

# 14-7 食道がん、胃がんの悪性度の分子情報の把握とそれを応用した生検診断法の確立

主任研究者 神戸大学大学院医学系研究科 横崎 宏

## 研究成果の要旨

胃がん細胞の運動/浸潤能に関与し、転移巣の成立に重要な役割を果たすフォスファターゼ PRL-3 は細胞周期に従って細胞内局在を変え、運動のみならず増殖を促進することで胃がんの悪性度に関与することが示された。IGF-I 受容体およびポリコム群転写因子 EZH2 の過剰発現が胃がんの進展に関与することを明らかにし、生検材料からの悪性度診断応用の可能性を示した。プロテオミクス解析から同定された胃がん抑制遺伝子候補 MAD1 の発現を検索したところ、腺腫と比較しがんにおいて発現および局在の変化が示され、その胃がんにおけるマーカーとしての意義が示唆された。これまでに確立した胃がん SAGE ライブラリーと生存に必須な 14 臓器のライブラリー比較により、胃がん特異的遺伝子 9 種類を同定し、その内、MMP-10 は免疫組織化学的に胃がんの 45% が陽性で、深達度と有意な相関を示し、陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良で、血清値測定では胃がん症例 94% が陽性となる一方偽陽性率は 15% で、胃がんの悪性度の良い指標になるとともに極めて感度の高い血清マーカーとなりうることを示された。

## 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
横崎 宏	神戸大学大学院医学系研究科 教授	食道がん、胃がんの生検悪性度診断に関する分子病理学的研究の総括
藤井 誠志	国立がんセンター東病院臨床開発センター 室長	胃がん産生プロテアーゼの発現解析とがん悪性度に及ぼす影響
田中 文明	九州大学病院別府先進医療センター 助手	食道がんの悪性度を規定する分子情報の解析
今井 浩三	札幌医科大学 学長	胃がんの浸潤・転移機構の分子病理学的解析と悪性度診断への応用
井藤 久雄	鳥取大学医学部 教授	胃がんの悪性度を規定する分子情報の解析
中山 宏文	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授	胃がんの悪性度に関する分子病理学的解析と診断法の確立

## 研究報告

### 1 研究目的

本研究の目的は網羅的遺伝子発現解析を通して食道

がん、胃がんの進展・転移を制御する分子情報を把握することにより、それぞれの悪性度を規定する因子を分子病理学的に明らかにし、得られた成果を基礎に生検組織を対象とした食道がん、胃がん悪性度の新しい遺伝子診

断系を確立することである。

## 2 研究方法

今年度の研究計画およびそれを遂行するための方法は、1) 転移関連フォスファターゼ PRL-3 の機能解析とシグナルネットワークの解明を試み、胃がん悪性度診断への応用を検討する。2) プロテアーゼの網羅的発現検索を行い、胃がん組織で発現の高いプロテアーゼとそのがん組織の持つ形態学的特徴を解析する。3) 術前未治療食道がんのマイクロアレイ解析を行い、リンパ節転移陽性・陰性群をわける発現プロファイルを解析する。4) マイクロアレイ解析で網羅的に E1AF の標的遺伝子を明らかにすることにより、胃がんの悪性度の分子機構を把握する。5) 胃がんを対象としたプロテオーム解析を進め、胃がん細胞の悪性度を規定する新規蛋白を探索する。6) SAGE 法で新規に同定した胃がん特異的発現遺伝子について悪性度との関連を解析するとともに、胃がん解析用カスタムアレイの生検組織における悪性度診断への導入を検討することである。

## 3 研究成果

SAGE (serial analysis of gene expression)法による網羅的遺伝子発現解析から大腸がん転移細胞において原発巣あるいは非腫瘍部大腸粘膜に比較して高発現を示す遺伝子として近年同定された PRL-3 は、22KD の低分子量チロシンフォスファターゼをコードしている。昨年度までの研究で、①胃がん原発巣における PRL-3 の過剰発現は、腫瘍径、脈管侵襲、壁深達度、リンパ節転移ならびに病期と有意に相関し、生検材料からの悪性度診断に有用な指標となりうること、②胃がん細胞に PRL-3 特異的 siRNA 発現ベクターを導入することにより、PRL-3 は胃がん細胞の運動/浸潤能に関与し、転移巣の成立に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしている。本年度はフォスファターゼ PRL-3 の機能を解析するため、GFP 融合 PRL-3 発現ベクターを COS7 細胞に導入し、局在と細胞周期の関連を検討した。まず、GFP 融合 PRL-3 発現ベクター (GFP-PRL-3) を一過性に COS7 細胞へ導入し、蛍光顕微鏡で局在を検討したところ、間期の細胞では従来の報告通り PRL-3 は主に細胞膜と核周辺に局在したが、M 期においては核内にも PRL-3 の局在が認められた。細胞周期に依存した局在変化は、細胞周期の進行に関与する分子で見られることが多いため、PRL-3 の細胞増殖に対する影響と、その核内局在との関連を検索した。PRL-3 はプレニル化を受けると細胞膜に局在し、プレニル化阻

害剤 FTI-277 添加により核内に移行すること、PRL family の1つである PRL-2 では、C 末端を欠失させると核内に局在することが証明されている。そこで、PRL-3 の C 末端プレニル化部位を欠損させた変異体 PRL-3ΔC を作成し COS7 細胞へ導入・発現させると、間期においても核内に局在することが明らかとなった。GFP、GFP-PRL-3、PRL-3ΔC を HeLa 細胞と COS7 細胞に一過性遺伝子導入し、増殖能を評価したところ、いずれの細胞においても GFP-PRL-3ΔC を発現細胞は、GFP のみや、GFP-PRL-3 を発現させた細胞よりも増殖能が高い傾向が認められた。導入細胞の細胞周期の変化に関しては、GFP-PRL-3ΔC 導入 HeLa 細胞では S 期が増加する傾向を認めた。今後これらの恒常的発現系を確立し、増殖能ならびに細胞周期に対する影響を確認する予定である。次に、PRL-3 核内局在の意義を 49 例の胃がん切除検体ホルマリン固定、パラフィン包埋切片について検討した。使用した抗ヒト PRL-3 抗体は Sigma 社 (P0498、家兎ポリクローナル) で、アビジン・ビオチン法にて可視化を行った。PRL-3 核内免疫活性は 14 例 (28.6%) に認められ、高分化型腺がん (乳頭状腺がん、管状腺がん) に比較して低分化型腺がん (低分化腺がん、印環細胞がん) で有意 ( $P = 0.0249$ ) にその頻度が高かった。以上、本年度の研究から PRL-3 の核内局在が細胞増殖能の亢進に影響を及ぼす可能性が示唆された。がん組織における PRL-3 の核内局在と悪性度の関連について、今後症例数を増やして検討するとともに、伊がん細胞における PRL-3 プレニル化部位変異の有無を解析する予定である。(横崎)

ポリコーム群転写抑制因子 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) の過剰発現は、前立腺がんをはじめ様々なヒト悪性腫瘍で悪性度と有意に相関することが報告されている。本年度の研究では胃がんにおける EZH2 の発現を解析し、手術症例における臨床病理学的因子ならびに予後との相関を解析した。ヒト胃がん培養細胞 13 株 (HSC-40A, HSC-42, HSC-44PE, HSC-45, HSC-57, HSC-58, HSC-59, HSC-60, MKN-1, MKN-7, MKN-74, TMK-1, SH101-P4) から抽出した total RNA および可溶性蛋白について、それぞれ定量的 RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により EZH2 mRNA および蛋白の発現状態を解析した。対象には新鮮剖検例より採取した正常胃粘膜を用いた。定量的 RT-PCR 法には SYBER Green real-time Quantitative RT-PCR assay kit (QuiaGen 社) を用い、ABI PRISM7700 Detection System にて計測を行った。ウエスタンブロット法に用いた EZH2 特異的家兎ポリクローナル抗体は Upstate 社より入手した。検討した 13 株

の胃がん細胞いずれにも *EZH2* mRNA 発現は確認され、HSC-40A, HSC-44PE, HSC-45, HSC-59, HSC-60, MKN-74, TMK-1, SH101-P4 の 8 株は正常胃粘膜の 20 倍以上の発現レベルを示し、これらはウエスタンブロット法による蛋白発現レベルとよく相関していた。次に、神戸大学医学部附属病院にて手術的に切除された 83 例のヒト胃がん切除検体のホルマリン固定・パラフィン包埋切片に対し、ウエスタンブロット法に使用した抗体を一次抗体とし、ABC 法による免疫組織化学を施行した。*EZH2* 免疫活性の評価は、50% 以上のがん細胞核に強い免疫活性を認めるものを高発現群、それ以外を低発現群とした。*EZH2* 免疫活性は正常粘膜に比較して胃がん組織で強く観察され、臨床病理学的にはその発現レベルは腫瘍径、壁深達度、脈管侵襲、リンパ節転移および病期と有意に相関した。さらに、*EZH2* 高発現群は原発巣の組織型に関係なく低発現群に比較して有意に不良な予後を示した。以上から、*EZH2* の過剰発現は胃がんの増殖、進展に関与し、免疫組織化学的発現解析は臨床検体における新たな悪性度診断の指標となる可能性が示された。(横崎)

胃がん細胞におけるプロテアーゼの発現と胃がん細胞への生物学的な影響については殆ど解明がなされていない。プロテアーゼ産生を制御している可能性が示唆されるポリコム遺伝子群の発現を、8 種類の胃がん細胞株 (HSC-43, HSC-44PE, HSC-57, HSC-58, HSC-59, HSC-60, MKN-28, MKN-45) ならびに国立がんセンター東病院で切除された胃がん 22 症例凍結組織からマイクロダイセクション法により抽出した高分化管状腺がん 3 病巣、中分化管状腺がん 9 病巣、低分化及び印環細胞がん 12 病巣と対応する非腫瘍性胃粘膜組織 31 箇所について、哺乳類ポリコム遺伝子群 10 種類 (*PRC2*: *EZH2*, *EED*, *PRC1*: *BM11*, *RING1*, *CBX7*, *PHC1*, *RNF134*, *RNF18*, *L3MBTL*, *CBX4*) の mRNA の発現を real time PCR 法にて検討した。なお、比較対象細胞株として WI38 (ヒト線維芽細胞株) と 4 種類の食道がん細胞株 (TE4, TE7, TE10, TE11) を用いた。8 種類の胃がん細胞株 (分化型腺がん由来並びに未分化型腺がん由来株) いずれも、*CBX7* と *RNF18* を除く 8 種類のポリコム遺伝子群の mRNA の発現を認めた。*RING1* のみが線維芽細胞株と胃がん細胞株がほぼ同じレベルで発現していたが、他のポリコム遺伝子群は胃がん細胞株で高い発現を示した。その内、*EZH2* は著しく高いレベルで発現され、胃がん細胞株では低分化がん由来株が高分化がん由来株に比較して高い傾向を示した。一方、ヒト胃がん患者 22 症例中 17 例 (77.3%) において、がん組織において対応する非

腫瘍性胃粘膜より高い *EZH2* mRNA の発現が認められた。また、*EZH2* mRNA の発現を胃がんの分化度別に検討すると、高分化管状腺がんでは、腫瘍組織と非腫瘍組織では差異が殆どなかったが、中分化管状腺がんではがん組織でより高い傾向を示し ( $P = 0.0576$ )、低分化腺がん或いは印環細胞がんではがん組織で有意に高い発現を示した ( $P = 0.0022$ )。以上から、*EZH2* の発現は胃がんの悪性度に関連する可能性が示唆された。今後その発現とプロテアーゼ産生関連遺伝子やその機能調節に関わる遺伝子の発現調節との関連について検討する予定である。(藤井)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する分子標的治療剤として有望視されているゲフィチニブ投与の胃がん、大腸がんにおける適応の可能性を検討する目的で、おのおの 39 例、33 例の臨床検体における EGFR の突然変異を検索した。がん部に対しては特に正常組織の混入を避けるために、レーザーマイクロダイセクションを用いてがん細胞のみを選択的に採取、抽出した DNA を PCR で増幅後、EGFR キナーゼ・ドメインであるエクソン 18 から 21 にわたり直接塩基配列決定法にて突然変異の有無を確認した。胃がんでは 2 例 (5.1%) で *EGFR* 遺伝子エクソン 20 にグアニンからアデニンへの点変異を認めたが、アミノ酸の変化を伴わなかった。一方、大腸がんでは 4 例 (12%) にアミノ酸置換を伴う *EGFR* 遺伝子点変異が確認された。その内訳は、2 例でコドン 749 のグルタミン酸からリシンへの置換、1 例でコドン 762 のグルタミン酸からグリシンへの置換、残る 1 例でコドン 767 のアラニンからトレオニンへの置換であった。大腸がんでの *EGFR* 変異率は非小細胞性肺がんのそれとほぼ同等であった。従って、胃がんではゲフィチニブ感受性例は極めてまれであるが、大腸がんには奏功する症例が存在する可能性が示唆された。(田中)

前年度までに食道がん、大腸がんなどで Insulin-like growth factor (IGF) 等の増殖因子とその受容体からのシグナル変化は細胞周期に影響し、がん細胞の増殖や浸潤を引き起こし、IGF-I receptor (IGF-Ir) を阻害すると、がん化抑制・浸潤抑制・腫瘍退縮等がもたらされること明らかにしてきたが、本年度は生検組織を用いて胃がんにおける IGF/IGF-Ir axis 発現の浸潤・転移との関連を明らかにし、悪性度診断への応用を検討するとともに、胃がんにおいて IGF-Ir を分子標的とした浸潤抑制、治療効果を検討することを目的とした。ヒト胃がん細胞株に dominant negative (dn) として働く IGF-Ir (IGF-Ir/dn) を発現させ、IGF-Ir 阻害による腫瘍増殖抑制、アポトーシス誘導、浸潤抑制を生体内・外で検討するとともに、下流のシグナ

ル伝達に与える効果を検討した。胃がん組織における IGF/IGF-Ir 発現の検討では、IGF-II および IGF-Ir の過剰発現を約半数程度に認め、深達度、リンパ節転移、pTNM 病期との相関が認められるとともに、IGF-II および IGF-Ir の共発現を認めた症例は悪性度が高かった。胃がん培養細胞では、検討した 12 株の内 10 株で IGF-Ir および IGF-II の高発現が確認された。そこで、高発現胃がん細胞株 MKN-45、MKN-74、NUGC4 にドミナントネガティブ IGF-Ir (IGF-Ir/dn) をアデノウイルスベクターにより導入・発現させると、PI3K/Akt シグナル伝達系を介して *in vitro* での増殖抑制、浸潤能抑制が認められ、ヌードマウス皮下移植モデル、腹膜播種モデルにおいても腫瘍形成抑制を示した。また、胃がん細胞株に IGF-Ir/dn を発現させると、種々のストレス刺激 (エタノール、飢餓、熱、放射線、薬剤) によるアポトーシスの誘導が増強された。さらに、IGF-Ir/dn の導入により IGF で胃がん細胞に誘導されるマトリライシン発現が抑制された。従って、IGF-Ir は胃がんの増殖・生存の他に浸潤においても重要であり、生検組織を用いた IGF/IGF-Ir axis ならびにマトリライシンの発現解析は胃がんの悪性度診断に有用となる可能性が示されるとともに、IGF-Ir/dn は胃がんの増殖、浸潤抑制に有用な手段となる可能性が示唆された。(今井)

プロテオミクス解析から同定された胃がん抑制遺伝子候補 *MAD1* の発現を検索したところ、胃がんでは、深達度別では早期がんと比較し進行がんで、また組織型別では低分化型と比較し高分化型で有意に低値であった。一方、腺腫では主として核上部に局在し腫瘍腺管の内腔に一致していたが、がんでは細胞質に点状・複数個観察され、腺腫と比較しがんにおいて発現および局在の変化が示されたことから、*MAD1* の胃がんにおけるマーカーとしての意義が示唆された。次に、*MAD1* 発現のヒト胃がん細胞に対する増殖抑制効果の検討および細胞内局在の同定を *in vitro* の系でおこなった。GFP 融合ヒト *MAD1* 発現ベクターを伊がん細胞株 MKN-1 に導入するとコントロールと比較して有意に増殖抑制がもたらされ、位相差顕微鏡観察では浮遊した細胞の増加は見られず、*MAD1* 発現による細胞増殖抑制効果は、細胞死誘導とは異なるメカニズムであることが示唆された。導入 *MAD1* 蛋白は核あるいは核周囲で点状に 1 個ないしは複数個局在し、γ チューブリンと共局在することが確認され、*MAD1* 蛋白の局在の乱れは、中心体の局在の異常を反映していることが推察された。従って、*MAD1* 蛋白はヒト胃においてがん抑制遺伝子として機能している可能性が示唆され、その発現低下が胃における腫瘍化とその進展

に関連していること、加えて、*MAD1* 蛋白の一部は中心体と複合体を形成しており、その局在の異常はヒト胃上皮細胞のがん化を示すマーカーとしての可能性を示唆していると考えられた。次に、*MAD1* と同様にヒト胃がんにおいて、非腫瘍粘膜と比べ発現が低下している蛋白として同定した *CYR61* (Cysteine-rich protein 61) の発現をウエスタンブロットおよび免疫組織化学にて検索した。ヒト胃がん細胞株 7 株中における *CYR61* 陽性細胞株は 3 株 (MKN-1, MKN-28, MKN-74) であり、他の 4 株における発現は検出されなかった。胃粘膜における *CYR61* 陽性細胞は、胃体部から幽門部にかけて散在していた。他方、がん腫における *CYR61* 発現は同一組織標本の非腫瘍部における発現と比較し明らかに陽性細胞数が減少していた。胃粘膜上皮および胃がん細胞における *CYR61* 陽性細胞率はそれぞれ  $2.15 \pm 0.64$  および  $0.31 \pm 0.07$  (平均値 ± 標準偏差) であり、後者で有意に低値を示した ( $P < 0.01$ )。胃上皮細胞および胃がん細胞における *CYR61* の細胞内局在はいずれも細胞質であった。胃粘膜における *CYR61* 陽性細胞の出現パターンはクロモグラニン A 陽性細胞と類似していた。かかる所見は、胃内分泌細胞が *CYR61* 蛋白を発現し、胃上皮細胞の増殖、生存あるいは遊走を負に制御している可能性が示唆された。ヒト胃がん細胞株に対する *CYR61* 蛋白の細胞増殖抑制効果を検索するため、FLAG 融合 *CYR61* 蛋白発現ベクター (pcDNA3/FLAG-CYR61) を構築し、HeLa 細胞にトランスフェクションした結果、目的蛋白の発現が確認され、胃がん細胞株に対する *CYR61* の増殖抑制効果の検索に pcDNA3/FLAG-CYR61 が有用であることが示唆された。(井藤)

前年度までに完成した世界最大の胃がん SAGE ライブラリー (GEO accession no. GSE545) と生存に必須の 14 臓器 (心臓、肺、肝臓、脳など) のライブラリーの比較および実際の組織試料における定量的 RT-PCR 法により、*APIN*、*TRAG3*、*CYP2W1*、*MIA*、*MMP-10*、*DKK4*、*GW112*、*REGIV*、*HORMAD1* の 9 遺伝子が胃がんの特異的に発現することを見出した。*REGIV* は、炎症性腸疾患の時に発現が亢進し、粘膜防御、細胞増殖に関与する可能性が想定されており、分泌蛋白であることを確認した。抗体を作成し免疫染色で発現を検討したところ、胃がん (2936%、42/143)、大腸がん (36%、13/36)、膵がん (22%、5/23)、消化管カルチノイド (93%、14/15) に発現していたが、肺がん、乳がんには発現は全く認められなかった。胃がんにおける *REGIV* の発現は、腸型粘液形質および神経内分泌への分化と有意に関連していた。悪性度との関連

では、大腸がんではステージの進行と相関していたが、胃がんではそのような傾向はなかった。一方、胃がん細胞株を用いた機能解析により、REGIVは5-FUで誘導されアポトーシスを抑制することが判明した。尚、REGIV蛋白はELISAによって血清中で捉えられる。胃がん患者では36% (22/61) に対し、非がん対照者では1% (1/101) のみが陽性であり、ステージ1からも陽性になることから腫瘍マーカーとしては有用とみなされた。次に、細胞外基質分解酵素のひとつであるMMP-10の発現は、mRNAレベルでは胃がんの52% (23/44) において過剰発現として認められた。免疫染色では、胃がんの45% (68/151) が陽性であり、非がん部胃粘膜はほぼ陰性であった。胃がんにおけるMMP-10陽性は、がんの深達度と有意な相関を示した。58例の進行がん症例における検討では、MMP-10陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であった。胃がんの悪性度のよい指標になるとみなされる。尚、ELISAによる血清レベルの測定では、200pg/mlをcutoffとすると、胃がん症例の陽性率は94% (65/69)、非がん対照者における偽陽性は15% (9/60) であり、極めて感度の高い血清マーカーともなり得るものとみなされた。DKKはWNTのcanonicalシグナルの抑制分子とされており、我々の検討でもDKK4はWNT3a依存性Tcf活性を抑制した。DKK4免疫染色では、非がん部胃粘膜に全く発現はなかったが、胃がんにおいても陽性例はわずか(1.3%、2/151)であった。(中山)

#### 4 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に該当するものは、三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究分担各施設におけるヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認の下に実施しており、遺伝子発現解析においても指針の趣旨を踏まえた対応を行っている。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

- Ikehara, N., Yokozaki, H., *et al.* *BRAF* mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms. *Int. J. Cancer*, 115:943-950, 2005.
- Li, D., Yokozaki, H., *et al.* Molecular pathological subclassification of mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Pathol. Int.*, 55:766-774, 2005.
- Yoshikawa, T., Yokozaki, H., *et al.* Detailed analysis of mucosal restoration of the small intestine after the cavity two-layer cold storage method. *Am. J. Transplant.*, 5:2135-2142, 2005.
- Furuno, T., Yokozaki, H., *et al.* The spermatogenic Ig superfamily/synaptic cell adhesion molecule mast-cell adhesion molecule promotes interaction with nerves. *J. Immunol.*, 174:6934-6942, 2005.
- Kanomata, N., Yokozaki, H., *et al.* Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components. *Mod. Pathol.*, 18:828-837, 2005.
- Koma, Y., Yokozaki, H., *et al.* Distinct role for c-kit receptor tyrosine kinase and SgIGSF adhesion molecule in attachment of mast cells to fibroblasts. *Lab. Invest.*, 85:426-435, 2005.
- Matsukawa, Y., Yokozaki, H., *et al.* Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.*, 2006 (in press).
- Usami, Y., Yokozaki, H., *et al.* Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.*, 2006 (in press).
- Kobayashi, I., Yokozaki, H., *et al.* Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma. *Pathobiol.*, 2006 (in press).
- Haraguchi, N., Tanaka, F., *et al.* Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 2006 (in press).
- Min, Y., Imai, K., *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut*, 54:591-600, 2005.
- Taniguchi, H., Imai, K., *et al.* Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, 24:7946-7952, 2005.
- Endo, T., Imai, K., *et al.* Study of the tumor vessels in depressed-type early gastric cancers using narrow band imaging magnifying endoscopy and cDNA array analysis. *Digestive Endoscopy*, 17:210-217, 2005.
- Murai, M., Imai, K., *et al.* Aberrant methylation and silencing of the *BNIP3* gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:1021-1027, 2005.
- Honjo, S., Ito, H., *et al.* COX-2 correlates with F-box

- protein, Skp2 expression and prognosis in human gastric carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 26:353-360, 2005.
16. Honjo, S., Ito, H., *et al.* COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell line. *DNA Cell Biol.*, 24:141-147, 2005.
  17. Nishigaki, R., Ito, H., *et al.* Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics*, 5:3205-3213, 2005.
  18. Araki, K., Ito, H., *et al.* Expression of RUNX3 protein in human lung adenocarcinoma: Implications for tumor progression and prognosis. *Cancer Sci.*, 96:227-231, 2005.
  19. Sakamoto, T., Ito, H., *et al.* Interleukin-10 expression significantly correlates with minor CD8(+) T-cell infiltration and high microvessel density in patients with gastric cancer. *Int. J. Cancer*, 118:1909-1914, 2006.
  20. Matsumura, S., Nakayama, H., *et al.* A single nucleotide polymorphism of the *MMP9* promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 131:19-25, 2005.
  21. Mitani, Y., Nakayama, H., *et al.* Histone H3 acetylation is associated with reduced *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* expression in gastric carcinoma. *J. Pathol.*, 205:65-73, 2005.
  22. Kondo, T., Nakayama, H., *et al.* Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the *PINX1* gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, 24:157-164, 2005.
  23. Ito, R., Nakayama, H., *et al.* Clinicopathological significance and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchows Arch.*, 447:717-722, 2005.
  24. Motoshita, J., Nakayama, H., *et al.* DNA methylation profile in differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotypes. *Cancer Sci.*, 96:474-479, 2005.
  25. Oue, N., Nakayama, H., *et al.* Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *J. Pathol.*, 207:185-198, 2005.
  26. Shutoh, M., Nakayama, H., *et al.* DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric cancer: expression of retinoic acid receptor-beta, cellular retinol binding protein 1, and tazarotene-induced gene 1 was associated with DNA methylation. *Cancer*, 104:1609-1619, 2005.
  27. Oue, N., Nakayama, H., *et al.* Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer*, 106:1250-1259, 2006.
  28. Sanada, Y., Nakayama, H., *et al.* Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in intestinal phenotype of gastric cancer. *J. Pathol.*, 208:633-642, 2006.
  29. Aung, P.P., Nakayama, H., *et al.* Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity (MIA) and matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene*, 2006 (in press).
  30. Aung, P.P., Nakayama, H., *et al.* Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchows Arch*, 2006 (in press).
- 外国語書籍
1. Yokozaki, H., *et al.* Adenocarcinoma with gastric mucin phenotype: The Diversity of Gastric Carcinoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy, Kaminisi, M., Takubo, K., Mafune, K. (Eds), Springer, Tokyo, pp169-181, 2005.