

**総説**

## 染色体工学技術を用いたがん抑制遺伝子の同定

鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体機能医工学講座遺伝子機能工学部門

久郷裕之

### Identification of a tumor suppressor gene using chromosome engineering

Hiroyuki KUGOH

*Department of Biomedical Science, Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Nishi-cho 86, Yonago, Tottori, 683-8503, Japan*

#### ABSTRACT

Many tumor suppressor genes are involved in the multistep process of neoplastic development. However, the signaling mechanism that underlies the development of tumors has not yet been completely elucidated. Therefore, Discovery of a novel tumor suppressor gene plays a crucial role in our understanding of the development and progression of malignant tumors.

Chromosome engineering technique that base on Microcell-mediated chromosome transfer (MMCT), which can be generally used to the introduction of a single chromosome to a variety of tumor cells, is one of effective approach for mapping and identification of tumor suppressor genes. We have identified paired-like homeodomain 1 (*PITX1*) gene as a novel telomerase negative regulatory factor that inhibit the expression of telomerase reverse transcriptase (*TERT*) using chromosome engineering technique. Here, we describe a unique strategy from mapping to identification of tumor suppressor gene by using MMCT approach.

(Accepted on October 21, 2015)

**Key words :** MMCT, PITX1, Chromosomal engineering, Telomerase, Tumor suppressor gene

#### 1. はじめに

がんの発生は、特定遺伝子の変異やエピジェネティック制御機構の破綻などの蓄積が原因であることが知られている<sup>1)</sup>。その中でも、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子は、がんの発生に重

要な役割を担っている<sup>2,4)</sup>。がん抑制遺伝子の概念は、がん細胞および正常細胞との細胞融合によるがん形質抑制効果（細胞増殖抑制、増腫瘍性抑制など）とヘテロ接合性の消失（LOH; loss of heterozygosity）の発見にも繋がった2ヒット仮説から提唱された<sup>5,11)</sup>。これらの結果から、がん

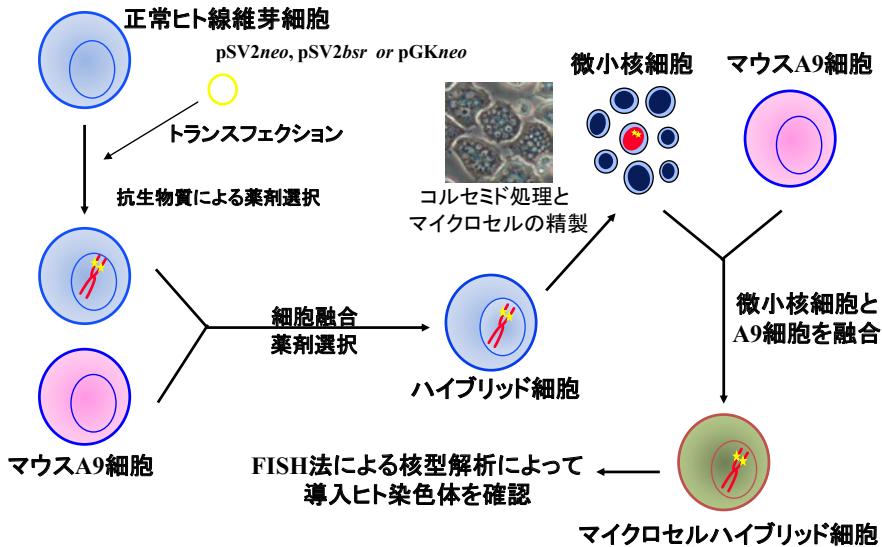


図1 ヒト単一染色体保持A9細胞ライブラリーの作製

抑制遺伝子は、劣性形質であることが明らかにされた。また、がん形質の抑制効果を示したがん細胞と正常細胞との雑種細胞において、再びがん形質を獲得したリバート細胞の出現が認められた。興味あることに、複数のリバート細胞の染色体解析を行った結果、共通に消失している染色体の存在が明らかにされたことから、その染色体上にがん抑制遺伝子の存在が示唆された<sup>12,13</sup>。

一方、1971年、Alfred Knudsonは、小児がんの一つとして知られている網膜芽細胞腫の遺伝性および非遺伝性の発症メカニズムを統計的モデル解析により、親から受け継いだ2つのアレルにおける変異の蓄積が発がん機構に関与する2ヒット仮説を提唱した<sup>14</sup>。つまり、遺伝性の場合、すでに生まれたときに原因遺伝子の変異を持っていて、残されたアレル側の1回の変異で発がんする。一方、非遺伝性の場合では、体細胞で両対立遺伝子の2回の変異が発がんに必要なことを突き止めた。さらに、制限酵素断片多型 (RFLP; restriction fragment of length polymorphism) を利用した遺伝子解析によりヒト13番染色体上に存在するRB (*retinoblastoma*) がん抑制遺伝子が発見された<sup>17</sup>。RBがん抑制遺伝子は、細胞周期の主要調節因子として働き、多くの腫瘍細胞での不活性化が認められた<sup>18</sup>。これらのアプローチに

よる研究は、飛躍的ながん研究の発展につながった<sup>19,25</sup>。

微小核細胞融合 (MMCT; microcell mediated chromosome transfer) を用いたがん細胞への正常染色体導入研究は、より効率的ながん抑制遺伝子の存在領域あるいは同定方法として確立された<sup>26-40</sup>。本総説においては、MMCTを利用したアプローチによるがん抑制遺伝子のマッピングから同定までを紹介する。

## 2. 正常ヒト正常由来染色体を保持するマウスA9細胞の作製

染色体導入研究を用いてがん抑制遺伝子を効率よく同定するためには、システム化の確立が重要な課題と考えられる。そこで、我々は、はじめにすべてのヒト染色体を各々保持するマウスA9細胞のライブラリーの作製を行った。図1に示したように、はじめにヒト正常繊維芽細胞へpSV2neo, bsrおよびpGKneo遺伝子などの薬剤耐性遺伝子をトランスフェクションした。その結果、これらの遺伝子は、優性薬剤耐性マーカーとしてランダムに染色体上に組み込まれる。各抗生物質耐性細胞クローンを単離し、マウスA9細胞と細胞融合後、ヒト×マウスA9細胞を樹立した。次に、薬剤選択マーカーが標識されたヒト染色体だけを

表1 種々のがん細胞への染色体導入によるがん形質抑制効果

| 導入染色体 | 細胞株   | Type1 | Type2 | Type3 | Type4 | Type5 | マッピング領域              | 文献               |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|------------------|
| 1     | HT1080 (fibrosarcoma)                           |       | +     | +     |       |       |                      | [29]             |
|       | TE85 (osteosarcoma)                             | +     |       |       |       |       |                      | [43]             |
|       | 143 B TK- Ki-Ras-transformed TE85)              | +     |       |       |       |       |                      | [43]             |
|       | CMV-Mj-HEL-1 (CMV-transformed lung fibroblasts) | +     |       |       |       |       |                      | [43]             |
|       | 10W-2 (immortal Syrian hamster fibroblasts)     | +     |       |       |       |       |                      | [50]             |
|       | Isikawa (uterine endometrial carcinoma)         | +     |       |       |       |       |                      | *                |
|       | HHUA (uterine endometrial carcinoma)            | +     | +     |       |       |       |                      | [44]             |
| 2     | SiHa (cervical cancer)                          | +     |       |       |       |       | 2q37                 | [30], [31]       |
| 3     | RCC23 (renal cell carcinoma)                    | +     |       |       | +     |       | 3p21.3               | [39], [45], [76] |
|       | KC12 (renal cell carcinoma)                     | +     |       |       | +     |       | 3p14.2-p21.1         | [32]             |
|       | HSC3 (oral squamous cell carcinoma)             |       | +     | +     | +     |       | 3p21.2-p21.3 or 3p25 | [40], [77]       |
|       | TS1 (lung adenocarcinoma)                       | +     |       |       |       |       |                      | *                |
| 4     | HeLa (cervical cancer)                          | +     |       |       |       |       |                      | [46]             |
|       | J82 (bladder cancer)                            | +     |       |       |       |       |                      | [46]             |
|       | T98G (glioblastoma)                             | +     |       |       |       |       |                      | [46]             |
| 5     | A2058 (melanoma)                                |       | +     |       | +     |       |                      | [26], [38]       |
| 6     | HALneo (immortal fibroblasts)                   | +     |       |       |       |       |                      | [47]             |
|       | LCS-AF.1-3 (immortal fibroblasts)               | +     |       |       |       |       | 6p23-p24             | [75]             |
|       | 39neo (immortal fibroblasts)                    | +     |       |       |       |       |                      | [47]             |
|       | SV/HF (SV40-transformed fibroblasts)            | +     |       |       |       |       |                      | [47]             |
|       | HPV-16 (HPV-immortalized keratinocyte)          |       |       |       | +     |       |                      | [52]             |
| 7     | KMST-6 (immortal fibroblasts)                   | +     |       |       |       |       |                      | [48]             |
|       | SUSM-1 (immortal fibroblasts)                   | +     |       |       |       |       |                      | [48]             |
|       | CC1 (choriocarcinoma)                           | +     |       |       |       |       |                      | *                |
|       | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     | 7q21-22, 7q31.2-32   | [78]             |
| 8     | MeT5A (mesothelial cells)                       | +     |       |       | +     |       |                      | [51]             |
|       | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     | 8p21-q12             | [78]             |
| 10    | Li7HM (hepatocellular carcinoma)                | +     |       |       | +     |       | 10p15.1              | [34]             |
|       | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     | 10q11-22             | [78]             |
| 11    | HeLa (cervical cancer)                          |       |       | +     |       |       |                      | [79]             |
|       | G401 (wilm's tumor)                             |       | +     | +     |       |       |                      | [80]             |
|       | SiHa (cervical cancer)                          |       |       | +     |       |       |                      | [28]             |
|       | A204 (rhabdomyosarcoma)                         |       |       | +     |       |       |                      | [28]             |
|       | HHUA (uterine endometrial carcinoma)            |       |       | +     |       |       |                      | [28]             |
|       | HT1080 (fibrosarcoma)                           |       |       | +     |       |       |                      | [29]             |
|       | RD (rhabdomyosarcoma)                           | +     |       |       |       |       |                      | [49]             |
|       | H15 (bladder cancer)                            | +     |       |       |       |       |                      | *                |
| 13    | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     | 11p13-11.2           | [78]             |
|       | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     |                      | [81]             |
| 17    | R-3327 (rat prostatic cancer cells)             |       |       |       |       | +     | 12p11-q13, 12q24-ter | [78]             |
| 18    | HHUA (uterine endometrial carcinoma)            | +     | +     |       |       |       |                      | [44]             |
| X     | HocB (ovarian carcinoma)                        | +     |       |       |       |       |                      | *                |
|       | ELCO (breast carcinoma)                         | +     |       |       |       |       |                      | *                |

Type1: 細胞老化誘導

Type2: *in vitro* がん形質抑制

Type3: 造腫瘍性抑制

Type4: テロメラーゼ抑制

\* 未発表データ

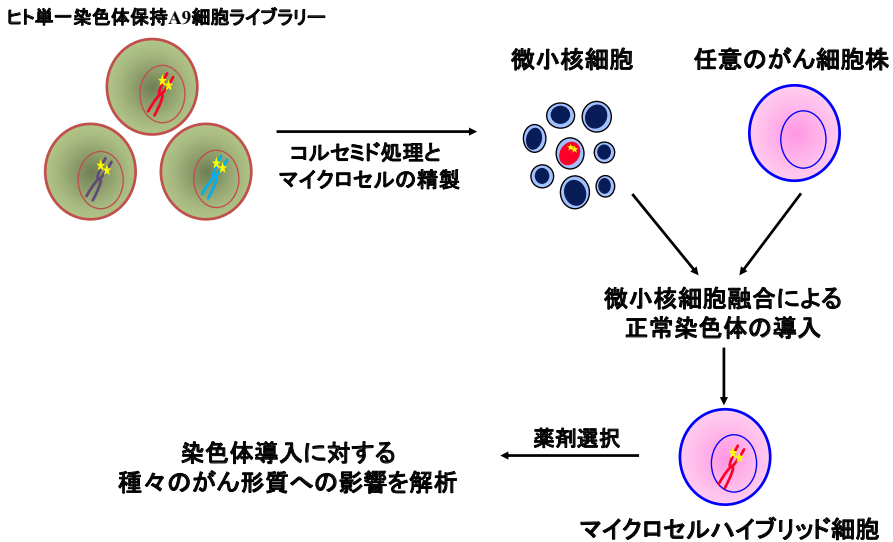


図2 微小核融合法による正常ヒト染色体のがん細胞への導入

表2 マウス悪性黒色腫B16-F10細胞への染色体導入によるがん形質抑制効果

|       | Type1 | Type2                                 | Type3  | Type4 | 文献               |
|-------|-------|---------------------------------------|--|-------|------------------|
| 導入染色体 | 1, 2  | 5, 7, 9, 10, 11, 15, 16, 19, 20 or 22 | 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22 or X | 5     | [35], [36], [37] |

Type1: 細胞老化誘導

Type2: *in vitro* がん形質抑制

Type3: 造腫瘍性抑制

Type4: テロメラーゼ抑制

保持するマウス細胞を作製するためにMMCTによりマウスA9細胞へ導入した。得られたマイクロセルハイブリッドクローンにおいて、導入ヒト染色体の状態を把握するためにPCR (polymerase chain reaction) およびFISH (fluorescence in situ hybridization) 解析を行った結果、Y染色体を除いた完全長な染色体を各々保持する単一ヒト染色体ライブラリーの作製に成功した<sup>35,41,42</sup>。

### 3. がん抑制遺伝子が存在する染色体の同定とその機能特性の解明

これまで我々を含め多くの研究者がMMCTを用いた染色体導入研究により、細胞老化関連遺伝子、転移抑制遺伝子などのがん抑制遺伝子が様々な染色体上に存在していることが明らかにされた(表1)。たとえば、細胞老化関連遺伝子においては、

少なくとも10個のがん細胞の不死化能を抑制する遺伝子の存在が示唆された<sup>43,50</sup>。加えて、ヒト3, 6, 7, 10番染色体においては、細胞老化の誘導に伴いテロメラーゼの抑制効果を示した<sup>32,34,51,52</sup>。さらに、我々は、がん抑制遺伝子の機能を含めた全体像を把握するために、一つのマウス黒色腫細胞株B16-F10細胞へY染色体を除くすべての染色体を各々導入した(図2)<sup>35</sup>。その結果、次に示す4つのがん形質抑制タイプに分類された。1. 細胞老化の誘導, 2. *in vitro* 細胞増殖特性の抑制効果, 3. 造腫瘍性抑制効果, 4. テロメラーゼ活性抑制効果(表2)が認められた。このように、種々のがん細胞への染色体導入研究により、機能の異なる複数のがん抑制遺伝子が多段階で生じるがん発生過程において重要な役割を担っていることが明らかにされた。

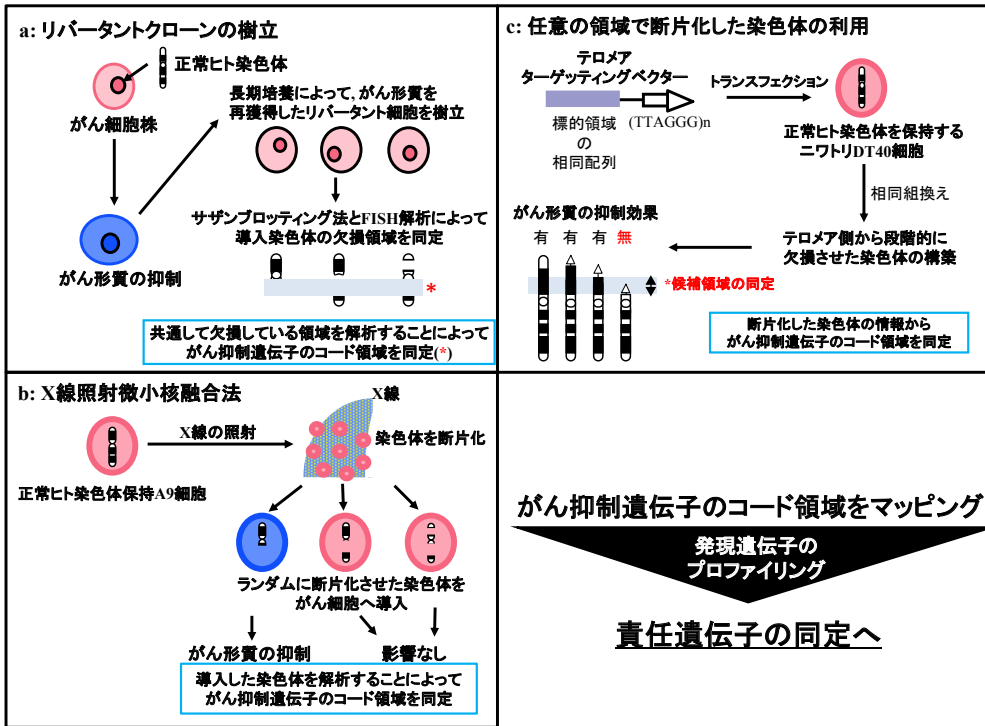


図3 微小核融合法によるがん抑制遺伝子領域の染色体マッピング

#### 4. がん抑制遺伝子のマッピング

特定染色体領域上に存在するがん抑制遺伝子を同定するために、代表的な3種類のアプロート方法を紹介します。

a. リバート細胞を用いた共通欠失領域の解析

染色体導入により認められたがん形質抑制クローンの中から、長期継代培養などにより一定頻度の割合でがん形質を再獲得したリバート細胞が出現する。これは、導入した染色体上に存在するがん抑制遺伝子領域上で欠失などを含む機能不全が原因と考えられる(図3a)。したがって、このようなリバートクローンにおける導入染色体共通欠失領域の解析は、がん抑制候補遺伝子の同定のための重要な情報となる(表1)<sup>32,34</sup>。

b. X線照射によるフラグメント化した染色体の機能解析

これまでリバートにおける導入染色体の遺

伝子解析の結果、多くの場合欠失をとまなう染色体異常が確認された。しかし、これらの染色体異常は、継代培養などを含めた方法により偶然性に依存するために労力的、時間的にも効率の良い解析方法ではない。我々は、効率の高いがん抑制遺伝子存在領域の同定方法を確立するために、X線放射線を用いた断片化染色体(STFs; subchromosomal transferable fragments)による機能解析を行った(図3b)。その結果、リバート細胞を用いた共通欠失領域の解析と組み合わせたアプローチにより、ヒト1q42領域内の450-600kb上にマウス悪性黒色腫B16-F10細胞の細胞老化を誘導に関わるがん抑制遺伝子の存在することを明らかにした<sup>37)</sup>。さらに、ヒト子宮頸癌においては、同様なアプローチにより2q37領域に細胞老化関連遺伝子の存在を明らかにした<sup>31)</sup>。このように、STFsによる機能解析は、がん抑制遺伝子を同定するための有用なアプロート方法であることが示唆された。

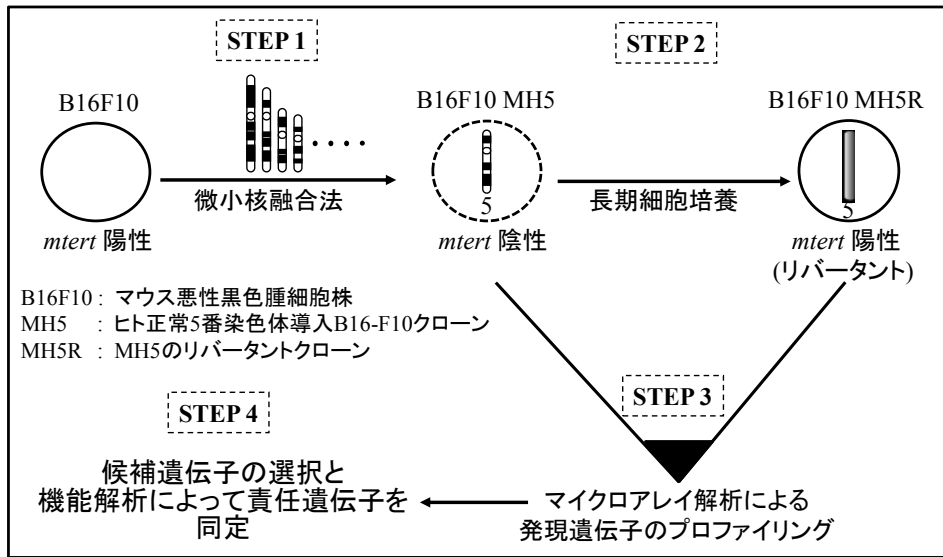


図4 微小核融合法とマイクロアレイ解析の技術融合によるがん抑制遺伝子の同定

### c. 染色体工学技術を用いた改変染色体による機能解析

染色体末端に存在するテロメアの維持にはたらいっているテロメラーゼは、不死化能をもつがん細胞にとって重要な因子であり、およそ80%以上のがん細胞で活性化が認められる。Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) は、テロメラーゼを構成する中で触媒サブユニットとして働いている<sup>53,56)</sup>。一方、ヒト体細胞においては、テロメラーゼ活性は認められないことから、発がん抑制メカニズムとして厳密に調整されていると考えられる。これまでMMCTを用いて、我々と他のグループにより、ヒト3, 5, 6, 7, 10番染色体上に*TERT*を抑制する遺伝子の存在が示唆された<sup>32,34,36,38,40,51,52)</sup>。本総説では、我々が新規に開発した染色体工学技術による改変染色体により機能解析からヒト3番染色体上に存在する*TERT*抑制遺伝子の詳細なマッピング情報について述べる。改変染色体の作製には、相同組み換え能が高いニワトリB細胞由来DT40細胞を利用した<sup>57)</sup>。はじめにヒト3番染色体を保持するDT40細胞 (DT40#3) を作製した。次に、DT40#3内で染色体を改変するためのターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターは、3種類の異なる相同領域 (3p24から10kb, 3p22から4kb, 3p21.3から8kb) でデザインされた塩基配列およびテロメア

配列を含み、このベクターをDT40#3へ導入することにより、#3delp24-pter, #3delp22-pter, #3delp21.3-pterの改変染色体を創出した。これらの改変染色体を腎細胞がん細胞株RCC23細胞へ導入した結果、#3delp24-pter, #3delp22-pter改変染色体では、*TERT*の著しい抑制効果が認められた。一方、#3delp21.3-pter改変染色体の導入では、抑制効果が認められなかった。これらのことから、*TERT*の抑制効果が認められた改変染色体共通保持領域3p21.3-p22に*TERT*抑制遺伝子の存在が示唆された。さらに、この領域内に存在するSequences-Tagged-Sites (STSs) マーカーを用いて解析した結果、D3S3597とD3S1573間のおよそ7Mb内の狭い範囲に*TERT*抑制遺伝子の存在領域の同定に成功した<sup>39)</sup>。このように、染色体工学技術を利用した改変染色体による機能解析は、詳細ながん抑制遺伝子領域を同定するための有効なアプローチであることを明らかにした。

### 5. がん抑制遺伝子の同定

MMCTを利用してY染色体を除くすべての染色体を各々B16-F10細胞へ導入した結果、1番および2番染色体導入クローンでは、細胞老化の誘導が認められた。また、5番, 7番, 9番, 10番, 11番, 13番, 14番, 15番, 16番, 19番, 20番, 21番, 22番, X染色体においては、細胞増殖特性の



抑制効果が認められた。これらのことから、多くのがん抑制遺伝子が複雑ながんの発生過程に関与していることが示唆された<sup>35)</sup>。さらに、これらの染色体導入細胞においてテロメラーゼ活性を解析した結果、5番染色体導入クローンのみで顕著な低下を示し、*TERT*の発現抑制を伴うものであった<sup>36)</sup>。このことより、5番染色体上に*TERT*を制御しているがん抑制遺伝子の存在が示唆された。そこで、親細胞 (B16-F10)、5番染色体導入クローン (MH5) および長期継代培養により再びテロメラーゼ活性を獲得したリパータント細胞 (MH5R) を用いて、マイクロアレイ解析により発現動態を比較検討した。本研究では、マウスの細胞へヒト5番染色体を導入させているために、5番染色体上に存在している遺伝子の中に絞って発現変動を解析した結果、親細胞およびMH5Rで発現が低下しており、MH5で発現が上昇している遺伝子として*paired-like homeodomain 1 (PITX1)* がテロメラーゼ活性の候補抑制遺伝子として同定した。*PITX1*は、*pro-opiomelanocortin (POMC)*の発現を制御する転写因子として脳下垂体上で発現亢進が認められた<sup>58)</sup>。また、ノックアウトマウスの解析から後ろ足の形成に関与している遺伝子として知られていた<sup>59,60)</sup>。さらに、最近*RAS*の抑制因子および*p53*の活性化因子であることが明らかにされ、大腸がん、前立腺がん、膀胱がん、肺がん、胃がん、食道がん、口腔がん、悪性黒色腫など様々なヒトがん組織で*PITX1*の高頻度な発現低下が認められたことから、発がん過程において、重要な役割を担っていることが示唆された<sup>61-67)</sup>。我々は、*PITX1*が*TERT*を制御するがん抑制遺伝子であるかどうか確認するために、*PITX1*の高発現あるいはノックダウンにおける*TERT*への影響を解析した。その結果、ヒトおよびマウス悪性黒色腫細胞 (A2058, B16-F10) への*PITX1*高発現誘導では、*TERT*の発現低下が認められた。一方、MH5における*PITX1*のsiRNAによるノックダウン解析においては、*TERT*の発現上昇が認められた。加えて、*PITX1*は、*TERT*プロモーター上に存在する*PITX1*結合領域を介して直接的に発現を制御していることが示唆された。これらのことから、*PITX1*は、*TERT*の発現を直接的に制御する新規のがん抑制遺伝子であることが強く示唆された。このように、染色体導入および発現動態解析を組み合わせたアプローチ

は、内在性すなわち真のがん抑制遺伝子を同定するための重要な解析方法だと考えられる。最近、我々は、*PITX1*を抑制するオンコジェニックに働く因子としてマイクロRNA (*miR-19b*) を見出した<sup>68)</sup>。

## 6. 結語

本稿において、染色体工学技術を用いたがん抑制遺伝子のマッピングから同定について紹介した。一方、最近では、多くの非コードRNAが標的遺伝子群の発現制御に関与していることが明らかにされてきた。今後は、今回紹介した染色体工学技術と次世代シーケンサーを組み合わせたハイスループットスクリーニングが未知のがん抑制遺伝子の同定するための強力な方法になることが示唆される。これらの研究を通して見出されるがん抑制遺伝子の機能解析は、発がんの分子機構解明から新規の創薬事業に繋がると考えられる。

本稿を終えるに当たり、研究に参加された多くの先生方・学生さんに深く感謝し、厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* 2015; **349** (6255): 1483-1489.
- 2) Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; **116** (2): 235-246.
- 3) Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 2002; **21** (21): 3475-3495.
- 4) Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2** (5): 331-341.
- 5) Sidebottom E. The analysis of malignancy by cell fusion. *In Vitro* 1980; **16** (1): 77-86.
- 6) Bouck N, di Mayorca G. Chemical carcinogens transform BHK cells by inducing a recessive mutation. *Mol Cell Biol* 1982; **2** (2): 97-105.
- 7) Sidebottom E, Clark SR. Cell fusion segregates progressive growth from metastasis. *Br J Cancer*. 1983; **47** (3): 399-405.

- 8) Pereira-Smith OM, Stein GH, Robetorye S, Meyer-Demarest S. Immortal phenotype of the HeLa variant D98 is recessive in hybrids formed with normal human fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1990; **143** (2): 222-225.
- 9) Johnson TL, Moyer MP. Normal human colon cells suppress malignancy when fused with colon cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990; **26** (11): 1095-1100.
- 10) Zajchowski DA, Band V, Trask DK, Kling D, Connolly JL, Sager R. Suppression of tumor-forming ability and related traits in MCF-7 human breast cancer cells by fusion with immortal mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; **87** (6): 2314-2318.
- 11) Chuprin A, Gal H, Biron-Shental T, Biran A, Amiel A, Rozenblatt S, Krizhanovsky V. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev.* 2013; **27** (21): 2356-2366.
- 12) Karlsson C, Stenman G, Vojta PJ, Bongcam-Rudloff E, Barrett JC, Westermarck B, Paulsson Y. Escape from senescence in hybrid cell clones involves deletions of two regions located on human chromosome 1q. *Cancer Res.* 1996; **56** (2): 241-245.
- 13) Oshimura M, Koi M, Ozawa N, Sugawara O, Lamb PW, Barrett JC. Role of chromosome loss in ras/myc-induced Syrian hamster tumors. *Cancer Res.* 1988; **48** (6): 1623-1632.
- 14) Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; **68** (4): 820-823.
- 15) Weir B, Zhao X, Meyerson M. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell.* 2004; **6** (5): 433-438.
- 16) Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet.* 2003; **33**: 238-244.
- 17) Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature.* 1983; **305** (5937): 779-784.
- 18) Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 2006; **25** (38): 5220-5227.
- 19) Kohno T, Takayama H, Hamaguchi M, Takano H, Yamaguchi N, Tsuda H, Hirohashi S, Vissing H, Shimizu M, Oshimura M, et al. Deletion mapping of chromosome 3p in human uterine cervical cancer. *Oncogene.* 1993; **8** (7): 1825-1832.
- 20) Tomlinson IP, Lambros MB, Roylance RR. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; **34** (4): 349-353.
- 21) Muzumdar MD, Luo L, Zong H. Modeling sporadic loss of heterozygosity in mice by using mosaic analysis with double markers (MADM). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; **104** (11): 4495-4500.
- 22) Mao JH, Perez-Losada J, Wu D, Delrosario R, Tsunematsu R, Nakayama KI, Brown K, Bryson S, Balmain A. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature.* 2004; **432** (7018): 775-779.
- 23) Sibley K, Cuthbert-Heavens D, Knowles MA. Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma. *Oncogene.* 2001; **20** (6): 686-691.
- 24) Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 2004; **431** (7004): 80-84.
- 25) Lo KC, Bailey D, Burkhardt T, Gardina P, Turpaz Y, Cowell JK. Comprehensive analysis of loss of heterozygosity events in glioblastoma using the 100K SNP mapping arrays and comparison with copy number abnormalities defined by BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008; **47** (3): 221-237.
- 26) Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M, Kugoh H. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located



- on human chromosome 5. *Mol Cell Biol.* 2011; **31** (8): 1624-1636.
- 27) Oshimura M, Kugoh H, Shimizu M, Yamada H, Hashiba H, Horikawa I, Sasaki M. Multiple chromosomes carrying tumor suppressor activity, via microcell-mediated chromosome transfer, for various tumor cell lines. *Princess Takamatsu Symp.* 1989; **20**: 249-257.
- 28) Oshimura M, Kugoh H, Koi M, Shimizu M, Yamada H, Satoh H, Barrett JC. Transfer of a normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of some but not all tumor cell lines. *J Cell Biochem.* 1990; **42** (3): 135-142.
- 29) Kugoh HM, Hashiba H, Shimizu M, Oshimura M. Suggestive evidence for functionally distinct, tumor-suppressor genes on chromosomes 1 and 11 for a human fibrosarcoma cell line, HT1080. *Oncogene.* 1990; **5** (11): 1637-1644.
- 30) Uejima H, Mitsuya K, Kugoh H, Horikawa I, Oshimura M. Normal human chromosome 2 induces cellular senescence in the human cervical carcinoma cell line SiHa. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995; **14** (2): 120-127.
- 31) Uejima H, Shinohara T, Nakayama Y, Kugoh H, Oshimura M. Mapping a novel cellular-senescence gene to human chromosome 2q37 by irradiation microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog.* 1998; **22** (1): 34-45.
- 32) Tanaka H, Shimizu M, Horikawa I, Kugoh H, Yokota J, Barrett JC, Oshimura M. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; **23** (2): 123-133.
- 33) Kugoh H, Fujiwara M, Kihara K, Fukui I, Horikawa I, Schulz TC, Oshimura M. Cellular senescence of a human bladder carcinoma cell line (JTC-32) induced by a normal chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; **116** (2): 158-163.
- 34) Nishimoto A, Miura N, Horikawa I, Kugoh H, Murakami Y, Hirohashi S, Kawasaki H, Gazdar AF, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M. Functional evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene.* 2001; **20** (7): 828-835.
- 35) Kugoh H, Nakamoto H, Inoue J, Funaki K, Barrett JC, Oshimura M. Multiple human chromosomes carrying tumor-suppressor functions for the mouse melanoma cell line B16-F10, identified by microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog.* 2002; **35** (3): 148-156.
- 36) Kugoh H, Shigenami K, Funaki K, Barrett JC, Oshimura M. Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; **36** (1): 37-47.
- 37) Yawata T, Kamino H, Kugoh H, Katoh M, Nomura N, Oishi M, Horikawa I, Barrett JC, Oshimura M. Identification of a 600-kb region on human chromosome 1q42.3 inducing cellular senescence. *Oncogene.* 2003; **22** (2): 281-290.
- 38) Qi DL, Ohhira T, Oshimura M, Kugoh H. Human chromosome 5 carries a transcriptional regulator of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; **398** (4): 695-701.
- 39) Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Fujisaki C, Qi DL, Ohhira T, Gilley D, Oshimura M, Kugoh H. Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integr.* 2010; **1** (1): 6.
- 40) Nishio S, Ohira T, Sunamura N, Oshimura M, Ryoike K, Kugoh H. Repression of hTERT transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.
- 41) Koi M, Morita H, Shimizu M, Oshimura M. Construction of mouse A9 clones containing a single human chromosome (X/autosome translocation) via micro-cell fusion. *Jpn J Cancer Res.* 1989; **80** (2): 122-125.

- 42) Koi M, Shimizu M, Morita H, Yamada H, Oshimura M. Construction of mouse A9 clones containing a single human chromosome tagged with neomycin-resistance gene via microcell fusion. *Jpn J Cancer Res.* 1989; **80** (5): 413-418.
- 43) Hensler PJ, Annab LA, Barrett JC, Pereira-Smith OM. A gene involved in control of human cellular senescence on human chromosome 1q. *Mol Cell Biol.* 1994; **14** (4): 2291-2297.
- 44) Sasaki M, Honda T, Yamada H, Wake N, Barrett JC, Oshimura M. Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res.* 1994; **54** (23): 6090-6093.
- 45) Ohmura H, Tahara H, Suzuki M, Ide T, Shimizu M, Yoshida MA, Tahara E, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M. Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. *Jpn J Cancer Res.* 1995; **86** (10): 899-904.
- 46) Ning Y, Weber JL, Killary AM, Ledbetter DH, Smith JR, Pereira-Smith OM. Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a cell senescence-related gene (s) on human chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; **88** (13): 5635-5639.
- 47) Sandhu AK, Hubbard K, Kaur GP, Jha KK, Ozer HL, Athwal RS. Senescence of immortal human fibroblasts by the introduction of normal human chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; **91** (12): 5498-5502.
- 48) Ogata T, Ayusawa D, Namba M, Takahashi E, Oshimura M, Oishi M. Chromosome 7 suppresses indefinite division of nontumorigenic immortalized human fibroblast cell lines KMST-6 and SUSM-1. *Mol Cell Biol.* 1993; **13** (10): 6036-6043.
- 49) Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PF, Nakamura Y, Feinberg AP. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science.* 1993; **260** (5106): 361-364.
- 50) Sugawara O, Oshimura M, Koi M, Annab LA, Barrett JC. Induction of cellular senescence in immortalized cells by human chromosome 1. *Science.* 1990; **247** (4943): 707-710.
- 51) Nakabayashi K, Ogino H, Michishita E, Satoh N, Ayusawa D. Introduction of chromosome 7 suppresses telomerase with shortening of telomeres in a human mesothelial cell line. *Exp Cell Res.* 1999; **252** (2): 376-382.
- 52) Steenbergen RD, Kramer D, Meijer CJ, Walboomers JM, Trott DA, Cuthbert AP, Newbold RF, Overkamp WJ, Zdzienicka MZ, Snijders PJ. Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. *J Natl Cancer Inst.* 2001; **93** (11): 865-872.
- 53) Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* 2013; **29** (9): 513-520.
- 54) Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005; **6** (8): 611-622.
- 55) Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; **214** (2): 99-106.
- 56) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990; **345** (6274): 458-460.
- 57) Kuroiwa Y, Shinohara T, Notsu T, Tomizuka K, Yoshida H, Takeda S, Oshimura M, Ishida I. Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; **26** (14): 3447-3448.
- 58) Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev.* 1996; **10**

- (10): 1284-1295.
- 59) Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development*. 1999; **126** (9): 1805-1810.
- 60) Shang J, Luo Y, Clayton DA. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev Dyn*. 1997; **209** (2): 242-253.
- 61) Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. A genetic screen identifies *PITX1* as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*. 2005; **121** (6): 849-858.
- 62) Liu DX, Lobie PE. Transcriptional activation of p53 by *Pitx1*. *Cell Death Differ*. 2007; **14** (11): 1893-1907.
- 63) Chen Y, Knösel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. Decreased *PITX1* homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer*. 2007; **55** (3): 287-294.
- 64) Chen YN, Chen H, Xu Y, Zhang X, Luo Y. Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*. 2008; **14** (2): 292-297.
- 65) Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, Danenberg PV, DeMeester TR. Increased *CDX2* and decreased *PITX1* homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery*. 2005; **138** (5): 924-931.
- 66) Nakabayashi M, Osaki M, Kodani I, Okada F, Ryoike K, Oshimura M, Ito H, Kugoh H. *PITX1* is a reliable biomarker for predicting prognosis in patients with oral epithelial dysplasia. *Oncol Lett*. 2014; **7** (3): 750-754.
- 67) Osaki M, Chinen H, Yoshida Y, Ohhira T, Sunamura N, Yamamoto O, Ito H, Oshimura M, Kugoh H. Decreased *PITX1* gene expression in human cutaneous malignant melanoma and its clinicopathological significance. *Eur J Dermatol*. 2013; **23** (3): 344-349.
- 68) Ohira T, Naohiro S, Nakayama Y, Osaki M, Okada F, Oshimura M, Kugoh H. miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting *PITX1* mRNA in melanoma cells. *Sci Rep*. 2015; **5**: 8201.
- 69) Ling H, Vincent K, Pichler M, Fodde R, Berindan-Neagoe I, Slack FJ, Calin GA. Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene*. 2015; **34** (39): 5003-5011.
- 70) Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009; **10** (10): 704-714.
- 71) Fatima R, Akhade VS, Pal D, Rao SM. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*. 2015; **3**: 5
- 72) Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, Beringer G, Brikbak NJ, Yuan X, Cantley LC, Richardson AL, Pandolfi PP. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*. 2013; **154** (2): 311-324.
- 73) Valeri N, Braconi C, Gasparini P, Murgia C, Lampis A, Paulus-Hock V, Hart JR, Ueno L, Grivennikov SI, Lovat F, Paone A, Cascione L, Sumani KM, Veronese A, Fabbri M, Carasi S, Alder H, Lanza G, Gafa' R, Moyer MP, Ridgway RA, Cordero J, Nuovo GJ, Frankel WL, Rugge M, Fassan M, Groden J, Vogt PK, Karin M, Sansom OJ, Croce CM. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell*. 2014; **25** (4): 469-483.
- 74) Yuan JH, Yang F, Wang F, Ma JZ, Guo YJ, Tao QF, Liu F, Pan W, Wang TT, Zhou CC, Wang SB, Wang YZ, Yang Y, Yang N, Zhou WP, Yang GS, Sun SH. A long noncoding RNA activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular

- carcinoma. *Cancer Cell*. 2014; **25** (5): 666-681.
- 75) Kumata M, Shimizu M, Oshimura M, Uchida M, Tsutsui T. Induction of cellular senescence in a telomerase negative human immortal fibroblast cell line, LCS-AF.1-3, by human chromosome 6. *Int J Oncol*. 2002; **21** (4): 851-856.
- 76) Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC. Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol Carcinog*. 1998; **22** (2): 65-72.
- 77) Uzawa N, Yoshida MA, Hosoe S, Oshimura M, Amagasa T, Ikeuchi T. Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; **107** (2): 125-131.
- 78) Ichikawa T, Hosoki S, Suzuki H, Akakura K, Igarashi T, Furuya Y, Oshimura M, Rinker-Schaeffer CW, Nihei N, Barrett JC, Isaacs JT, Ito H. Mapping of metastasis suppressor genes for prostate cancer by microcell-mediated chromosome transfer. *Asian J Androl*. 2000; **2** (3): 167-171.
- 79) Saxon PJ, Srivatsan ES, Stanbridge EJ. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J*. 1986; **5** (13): 3461-3466.
- 80) Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG, Stanbridge EJ. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science*. 1987; **236** (4798): 175-180.
- 81) Hosoki S, Ota S, Ichikawa Y, Suzuki H, Ueda T, Naya Y, Akakura K, Igarashi T, Oshimura M, Nihei N, Barrett JC, Ichikawa T, Ito H. Suppression of metastasis of rat prostate cancer by introduction of human chromosome 13. *Asian J Androl*. 2002; **4** (2): 131-136.