

特別講演

癌研究の新展開

History and new approach of cancer research

黒田 雅彦
Masahiko KURODA

東京医科大学分子病理学講座
Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

はじめに

がんはなぜ起こるのか？ この制御不能な細胞の増殖は、最終的には人間を死に至らしめる。無秩序に異常増殖していく癌細胞を制圧することは、がんの研究にたずさわる研究者の悲願である。これまでに、多くの研究者がこの癌細胞の制圧のために研究を積み重ねて、少しずつ癌細胞の実態が明らかになってきた。本稿においては、これまでの癌研究を振り返りながら、私自身のデータを加え、がん研究の展望をしたい。

1. 癌遺伝子の発見

近代のがん研究の歴史は、まず化学物質を用いてがんを作る、いわゆる化学発がんの研究からはじまっている。この研究のはじまりは、山極勝三郎教授（東京大学病理学教室教授 1863～1930）の研究が有名である。山極教授らのグループは、ウサギの耳にコールタールを繰り返し塗り、1915年、世界で初めて人工的に皮膚癌を発生させた。この研究が契機となり、がんは化学物質やある刺激によっておこるものと理解されたが、がんの本質である「遺伝子の異常（病気）」の解明にはまだ遠い道のりであった。一方、山極先生の研究グループが、化学発がん

を研究した頃、ロックフェラー大学の病理学者であるペイトン・ラウス（Francis Peyton Rous、1879-1970、1966 ノーベル生理学・医学賞受賞）は、ニワトリにがんを発症させる濾過性病原体を1911年に発見した。のちにラウス肉腫ウイルスとよばれる偉大な発見となったこのウイルスはRNAを遺伝情報として持つレトロウイルスであった。1970年には、このウイルスから、ハワード・マーティン・テミン（Howard Martin Temin、1975年ノーベル生理学・医学賞）とデビッド・ボルティモア（David Baltimore、1975年ノーベル生理学・医学賞）が、逆転写反応（reverse transcription）を発見している¹⁾²⁾。その後がんウイルスの研究は、隆盛をきわめ、マウスのがんから次々と原因となるウイルスが単離された。それでは、ラウス肉腫のようなRNAを遺伝情報としてもつウイルスはどのような方法で、細胞を癌化させるのだろうか。ハロルド・エリオット・ヴァーマス（Harold E. Varmus、1989年ノーベル生理学・医学賞受賞）とJ・マイケル・ビショップ（J. Michael Bishop、1989年ノーベル生理学・医学賞受賞）は、1980年に、このラウス肉腫ウイルスの遺伝情報をなうRNAから、がんの原因となる遺伝子を単離³⁾、この遺伝子は、肉腫（sarcoma）の意からsrcと命名された。srcは後にウイルス自身だけでな

2010年6月5日 第165回東京医科大学医学会総会における特別講演

キーワード：がん遺伝子、がん抑制遺伝子、miRNA、hWAPL、がん幹細胞

（別冊請求先：〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学分子病理学講座 主任教授 黒田 雅彦）

く、ニワトリ（宿主）のゲノムにも存在していることが示され、科学者たちに衝撃をあたえた。一方、このRSVウイルスのがん遺伝子 src は、ウイルスが本来持っていたものなのか、あるいは、細胞が持っていたものなのか、どちらが先であるか大きな問題であったが、ロックフェラー大学の花房秀三郎教授（ロックフェラー大学名誉教授、大阪バイオサイエンス研究所名誉所長、1929-2009、1982年アルバート・ラスカー基礎医学研究賞）は、ラウス肉腫ウイルスが、宿主であるトリの src 遺伝子をとりにこんでいたことを明らかにした。

しかし、この時点では、ヒトのがん遺伝子はまだ単離されてなかった。現代のように、遺伝子工学が発達しておらず、PCR法もなく、簡単に遺伝子を細胞に導入できない当時の苦労は想像に難くない。このような状況のなかで、マサチューセッツ工科大学（MIT）ロバート・ワインバーグ（Robert A. Weinberg）、コールド・スプリング・ハーバー研究所のマイケル・ウィグラー（Michael Wigler）、米国立がん研究所のマリアノ・バルバシッド（Mariano Barbacid）のグループが、ヒト膀胱癌の腫瘍細胞株から、はじめてのヒト癌遺伝子である Ras 遺伝子を単離した^{4,6)}。これ以後、ヒトがん細胞から100種類以上のがん遺伝子が単離されている（以上の史実は、黒木登志夫著「がん遺伝子の発見」、Robert A. Weinberg 著「The biology of CANCER」を参考にした）。

2. 癌抑制遺伝子の発見と多段階発がん

がん化を促進する機能（細胞の増殖を促進する作用）を持つがん遺伝子が発見されて以来、発がんを抑制する遺伝子、すなわちがん抑制遺伝子の存在が予想されてきた。このような背景の中で、マサチューセッツ総合病院の眼科医ドライジャ（Thaddeus P. Dryja）とフレンド（Stephen H. Friend）が網膜芽細胞腫の発生に深く関与する遺伝子として Rb 遺伝子（網膜芽細胞腫遺伝子（Rb））の単離に成功した⁷⁾。その後がん抑制遺伝子として同定されたのが p53 遺伝子である。p53 は 1979 年に単離されて以来がん遺伝子と考えられていたが、がん遺伝子として機能するのは変異を起こした p53 であり、生体内の野生型 p53 遺伝子のがん抑制遺伝子であることが示された⁸⁾。また、1991 年には、中村祐輔教授（東京大学医科学研究所、現国立がんセンター研究所長）らのグループとジョンズ・ホプキンス大学のボーゲルス

タイン（Bert Vogelstein）らが大腸癌抑制遺伝子 APC を発見した⁹⁾¹⁰⁾。これらの発見から、がんの発生には、複数のがん遺伝子とがん抑制遺伝子の変異が必要であることが明らかになり、大腸癌の腫瘍発生におけるアデノーマ・カルチノーマ・シークエンス発がん説も定説として受け入れられるようになった。一方で、ヒトゲノムの変異率と、がんの発生年齢から、体細胞の遺伝子変異率を考慮すると、がんの発生には、単純な遺伝子の変異では矛盾が生じるようになった。何より、がん細胞は、きわめて染色体が不安定であり、染色体の異数体も頻繁に観察される。このがん細胞の特徴である染色体不安定性（chromosomal instability, CIN）の原因は不明であったが、細胞周期のチェックポイントの異常により、CIN が誘導されることが、1998 年にボーゲルス・タインらのグループによって明らかにされた¹¹⁾。

以上の発見から、がん細胞の発生には、がん遺伝子の変異、がん抑制遺伝子の変異に加え、細胞周期を制御する分子の変異が必要である。これらの分子の変異が段階を経て蓄積することによりがんが発生する、いわゆる多段階発がんの考え方が定説となっている。

3. がん幹細胞と軟部腫瘍発生

上述したように、癌細胞は、多数の遺伝子変異をもってがん化する。これがいわゆる多段階発がんである。この過程には、細胞内での DNA 修復や染色体の維持機構、また、細胞免疫によるがんの排除などの複雑なプロセスが存在する。一方、がん幹細胞の存在は、がん発生のメカニズムを考える上で極めて重要である（図1）。がん細胞は、一つの細胞から発生した集団であるが、この細胞集団は、一種類ではなく多様性があると考えられている。すなわち、がん細胞は、無限の増殖力と周辺組織への浸潤能や、転移、そして低酸素状態でも増殖できるという大きな特徴を持っている。しかし、がん胞巣を構成しているがん細胞のすべてが、これらの特徴を兼ね備えているわけではなく、造腫瘍能があるものは、全体のごく一部である。これらの一部のがん細胞は、自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能と、多種類の細胞に分化しうる多分化能という、胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞に共通して見られる二つの特徴を持ち、がん組織中で自己複製により自分と同じ細胞を維持しながら、分化によって周辺の大多数

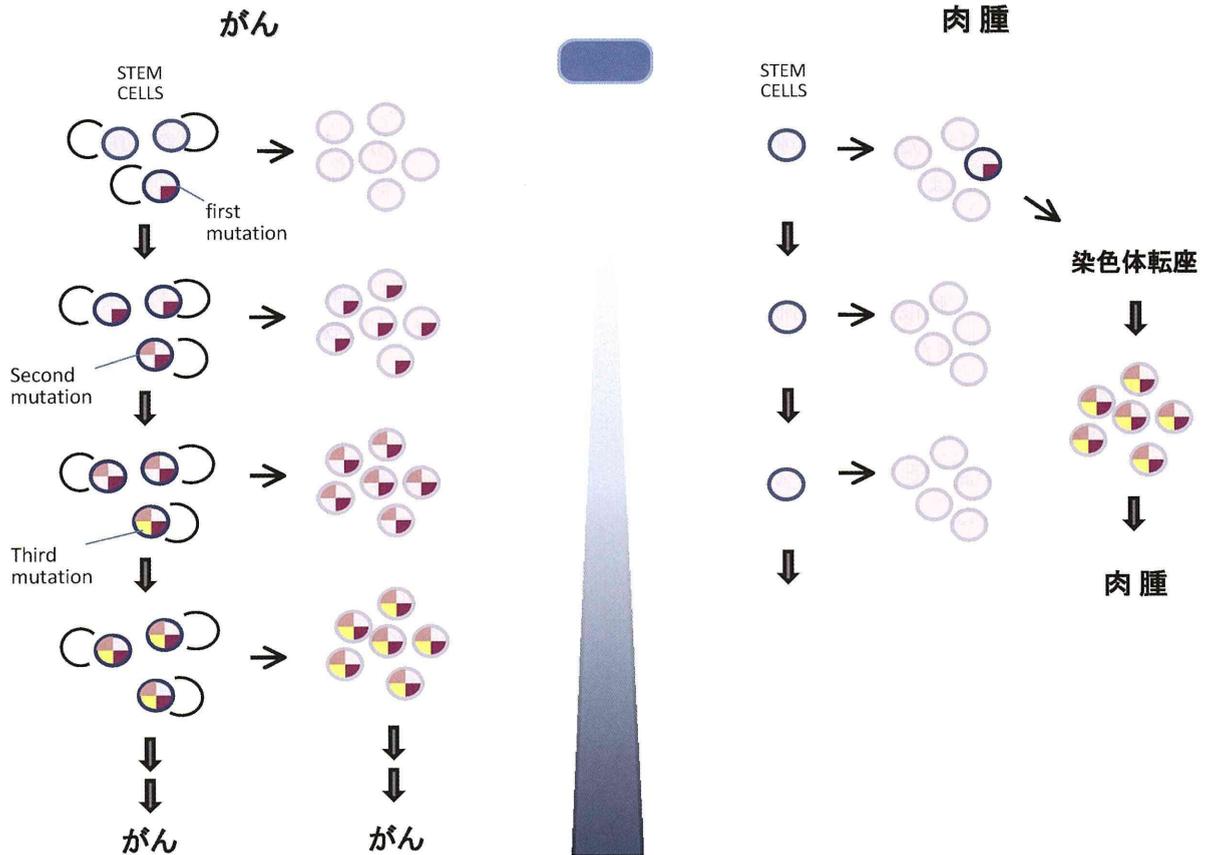
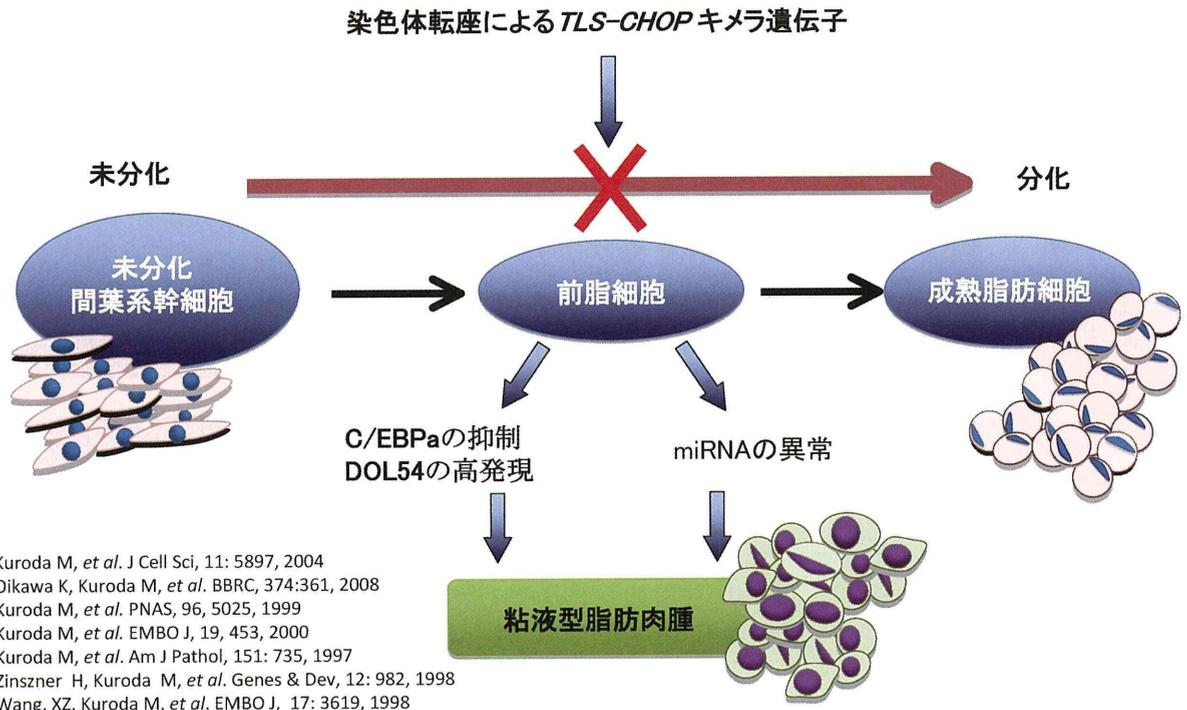


図1 がんと肉腫の腫瘍発生
 いわゆる‘がん’は、がん幹細胞から発生するために、中高年以降に発生する。これに対して、染色体転座などが主因となる肉腫は、若年から発生する。
 「The biology of CANCER (Robert A. Weinberg)」より改変



Kuroda M, et al. J Cell Sci, 11: 5897, 2004
 Oikawa K, Kuroda M, et al. BBRC, 374:361, 2008
 Kuroda M, et al. PNAS, 96, 5025, 1999
 Kuroda M, et al. EMBO J, 19, 453, 2000
 Kuroda M, et al. Am J Pathol, 151: 735, 1997
 Zinzner H, Kuroda M, et al. Genes & Dev, 12: 982, 1998
 Wang, XZ, Kuroda M, et al. EMBO J, 17: 3619, 1998

図2 粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の腫瘍発生モデル
 粘液型/円形細胞型脂肪肉腫は、未分化間葉系幹細胞から、前脂肪細胞の分化段階の途中で染色体転座がおこること
 で発生する。

のがん細胞を生み出すもとになっていると考えられている。また、がんの大きな特徴として、発生母地の組織に類似する事があげられる。これらの事を考慮すると、がん細胞は、特定の臓器の幹細胞において、遺伝子変異の蓄積により発生すると考えることが妥当であろう。

これまでに我々は、軟部肉腫の腫瘍発生を明らかにし、その中でも特に、粘液型脂肪肉腫の腫瘍発生に関して検討を行ってきた(図2)¹²⁻¹⁹⁾。粘液型/円形細胞型脂肪肉腫は、t(12;16)あるいは、t(12;22)による *TLS/FUS-CHOP* キメラ遺伝子または *EWS-CHOP* キメラ遺伝子が原因となるが、これらのキメラ遺伝子の造腫瘍活性は、前脂肪細胞の特徴をもった細胞でしか確認できない²⁰⁾。ユーイング肉腫の原因遺伝子である *EWS-Fli-1* キメラ遺伝子や、胞巣型横紋筋肉腫の原因遺伝子である *PAX3-FKHR* キメラ遺伝子でも、特定の分化段階の細胞においてのみ腫瘍活性を持つ事が観察されており、また、発症年齢も上皮性腫瘍の癌とは異なる²¹⁾。したがって骨軟部腫瘍の多くは、体性幹細胞から発生するというより、発生分化段階の異常細胞から、腫瘍の発生がおこると考えられる。興味深いことに、分化段階の細胞における染色体転座によって発生したこれらの腫瘍細胞は、上皮性の癌と同様に自己複製能と多分化能を

もっていることが、滑膜肉腫において報告されている²²⁾。これらの染色体転座によって起こるキメラ遺伝子が、幹細胞ではなく分化段階の細胞において、幹細胞の機能をもたらすことは非常に興味深く、またキメラ遺伝子が腫瘍発生に極めて重要であることを示している。

4. 内分泌かく乱物質と発がん(子宮頸癌がん遺伝子 *hWAPL*)

一方、近年、内分泌かく乱物質が、地球上の生命の連続性という生殖細胞を介した世代から世代への遺伝情報に影響を与えることが明らかになってきている。しかし、どのようなメカニズムで内分泌かく乱物質が生殖細胞に作用するか、また発がんに影響するかは不明であった。このような背景の中、我々は、科学技術振興機構(JST)の戦略的創造推進事業(CREST)に選ばれ、内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えの機構を通じて、発がん過程に影響を与えるか検討を行ってきた。その研究過程の中で、ダイオキシンに応答する分子として *Dorosophila-WAPL* 遺伝子のヒトホモログである *hWAPL* を単離した²³⁾。我々は、*hWAPL* は、精子形成のパキテン期に強く発現し、精子形成の第一期減数分裂のシナプトネマ構造体に局在することを確認したが²⁴⁾²⁵⁾

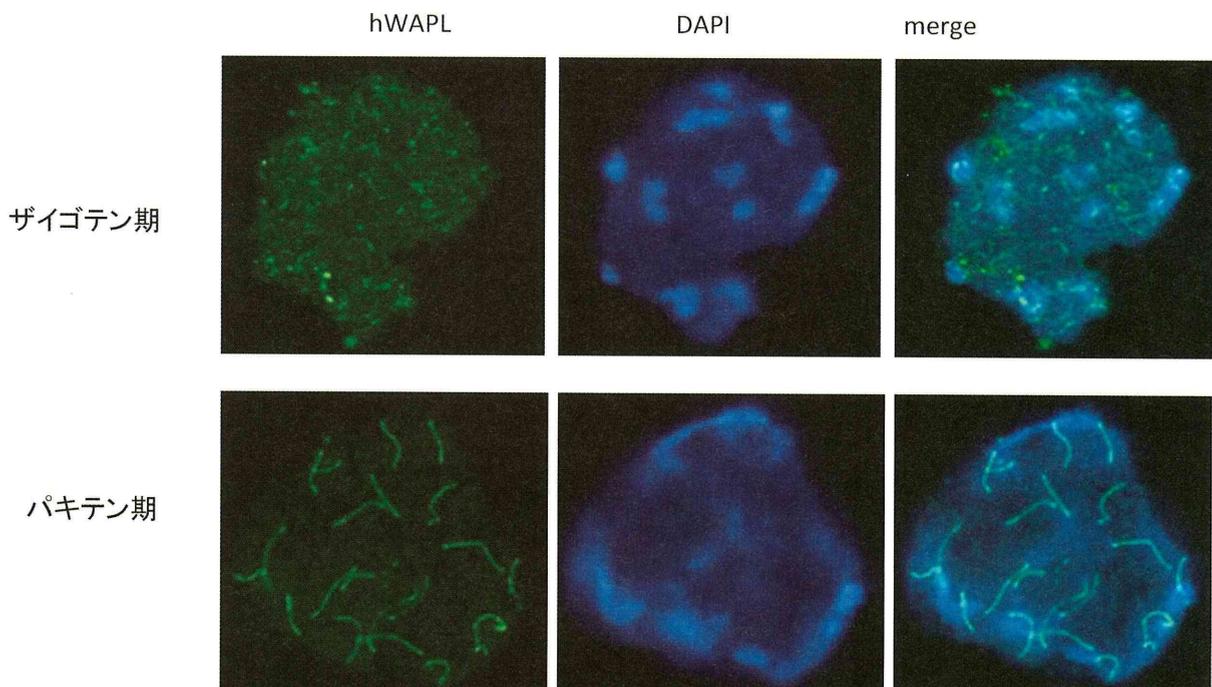


図3 精巣染色体における *hWAPL* の局在
 マウス精巣染色体標本において *hWAPL* 抗体を用いて染色を行った。*hWAPL* は、ザイゴテン期、パキテン期の染色体に強く発現がみられる。文献24より改変。

(図3)、興味深いことに、*hWAPL* が染色体の構造維持にきわめて重要な、コヒーシンと結合していることも明らかになった²⁶⁻²⁸⁾。

一方、ダイオキシシクシクが発がんに関与することが指摘されているため、各種癌組織において *hWAPL* の発現を検討した。その結果、*hWAPL* が子宮頸癌に

において有意に高発現していることを発見し、さらに子宮頸癌の前癌状態である、異型性上皮 (dysplasia) における *hWAPL* の発現を検討した。結果、*hWAPL* は軽度異形上皮 (CIN1、mild dysplasia) から高度異形上皮 (CIN3、severe dysplasia) において、発現が上昇することが確認された²³⁾²⁹⁾ (図4、5)。

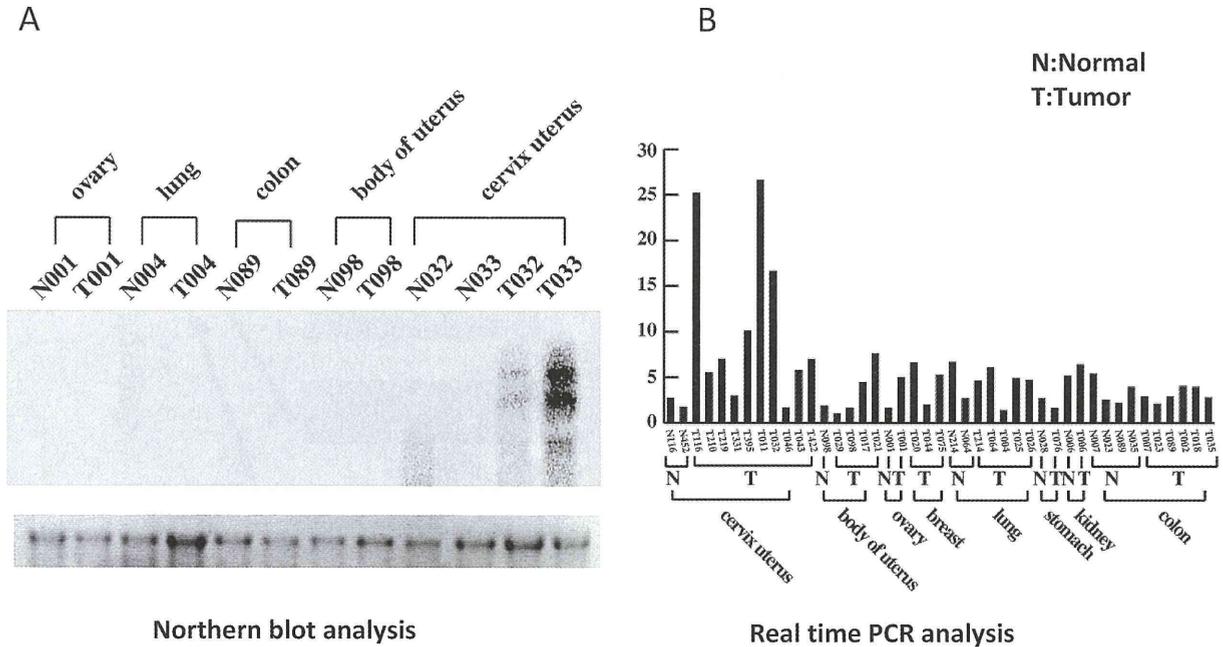


図4 子宮頸癌における *hWAPL* の発現
 A: Northern blot analysis を示す。子宮頸癌の腫瘍組織にのみ強い発現がある。
 B: Real time PCR analysis 子宮頸癌に腫瘍組織に強い発現がある。
 文献 23 より改変。

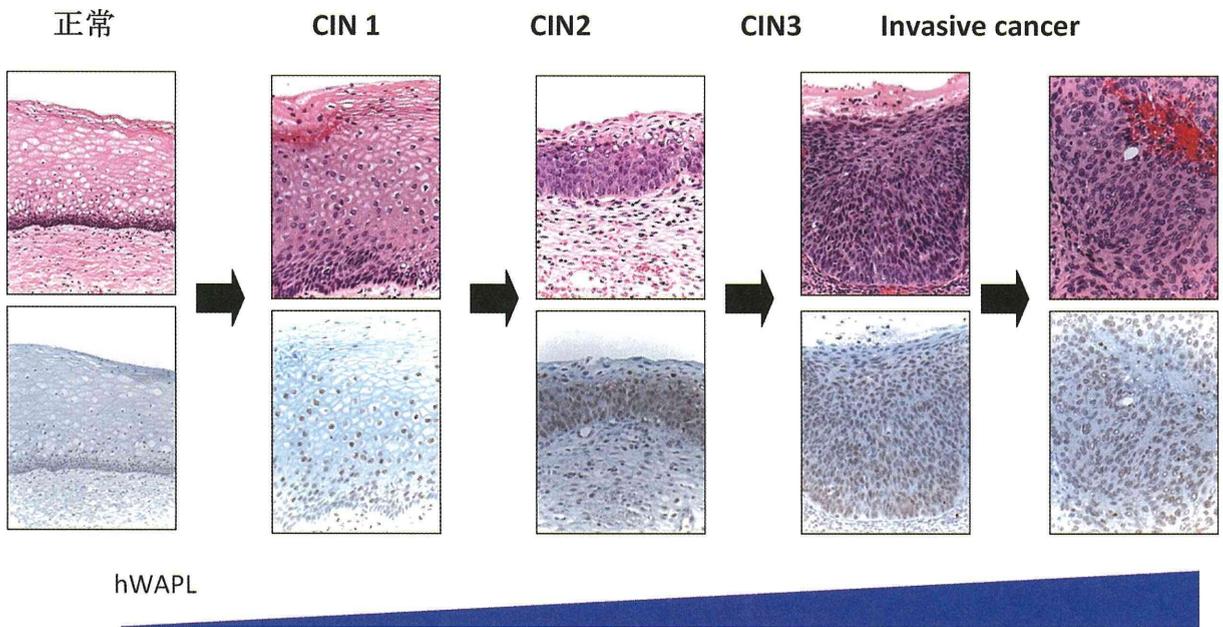


図5 子宮頸部腫瘍化過程における *hWAPL* の発現
 上段は H & E 染色、下段は *hWAPL* を用いた免疫染色を示す。異型度があがるにつれて *hWAPL* のタンパク量も増加している。文献 23 より改変。

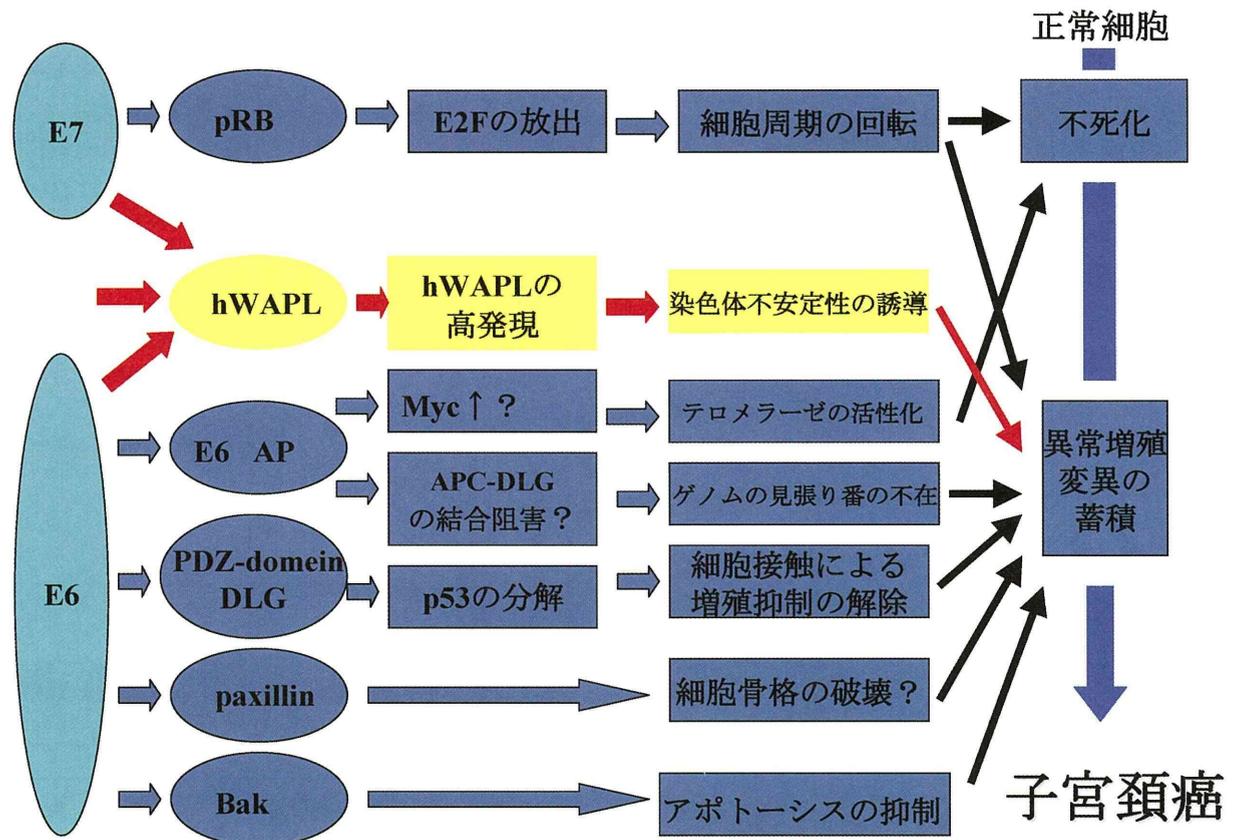


図6 子宮頸癌の発生機構
子宮頸癌の発生機構のモデル図を示す。hWAPLは、HPV E6、E7の下流に存在し、子宮頸癌細胞の染色体不安定性(CIN)の獲得に関与する。

子宮頸部の悪性病変には Human Papilloma Virus (HPV) が大変重要な役割をはたすが、*hWAPL*はこのHPVが持つがん関連タンパク質のE6とE7によって誘導されることも明らかにした³⁰⁾。また、子宮頸癌における、*hWAPL*の高発現は、HPVが感染した細胞に染色体不安定性をもたらすことも明らかになった³¹⁾。以上のことを考慮すると、子宮頸癌の発生は、図6のように推定される。これまで、HPVのがん遺伝子のE6とE7による、p53、Rbに対する作用が問題になってきた。しかしながら、我々の研究によって、HPV感染によって高発現する*hWAPL*が、染色体不安定性を誘導し、新たに子宮頸部の細胞ががん化していく分子メカニズムが明らかになった。特に*hWAPL*はダイオキシン以外にも、タバコに含まれる、3-Methylcholanthrene (3-mc)によっても誘導されることが確認されたことから³²⁾、本分子の発現制御は、重要である。

5. マイクロRNA (miRNA) とがん

がん医療において早期癌の根治治療が可能になっ

た今日、特に早期に癌を診断することの重要性が再認識されている。microRNA (miRNA) は、遺伝子の発現を調節する機能を有する ncRNA (ノンコーディング RNA: タンパク質への翻訳はされない) の一種であるが、最近の研究から、この miRNA は正常なヒトの成長および発達に重要な影響を与えていることが分かってきた。一方、2005年に miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18、miR-19a、miR-20、miR-19b-1、miR-92-1 の7つの miRNA が同一の RNA 前駆体に含まれる *mir-17-92 cluster* が癌遺伝子として機能するものとして同定され³³⁾、また、let-7 miRNA family が、癌遺伝子である RAS³⁴⁾ や HMGA2³⁵⁾ を標的としている事が明らかになってきた。さらに、癌抑制遺伝子 p53 を標的にしている miR-34 family も同定され³⁶⁾、近年 miRNA と癌との関連が注目され始めている。さらに、細胞間、体液(血液)を介した miRNA の液性因子としての役割の可能性が持ち上がってきた。血清中には RNase が存在することから、血中に入った RNA は短時間で分解されることが知られている。したがって血清

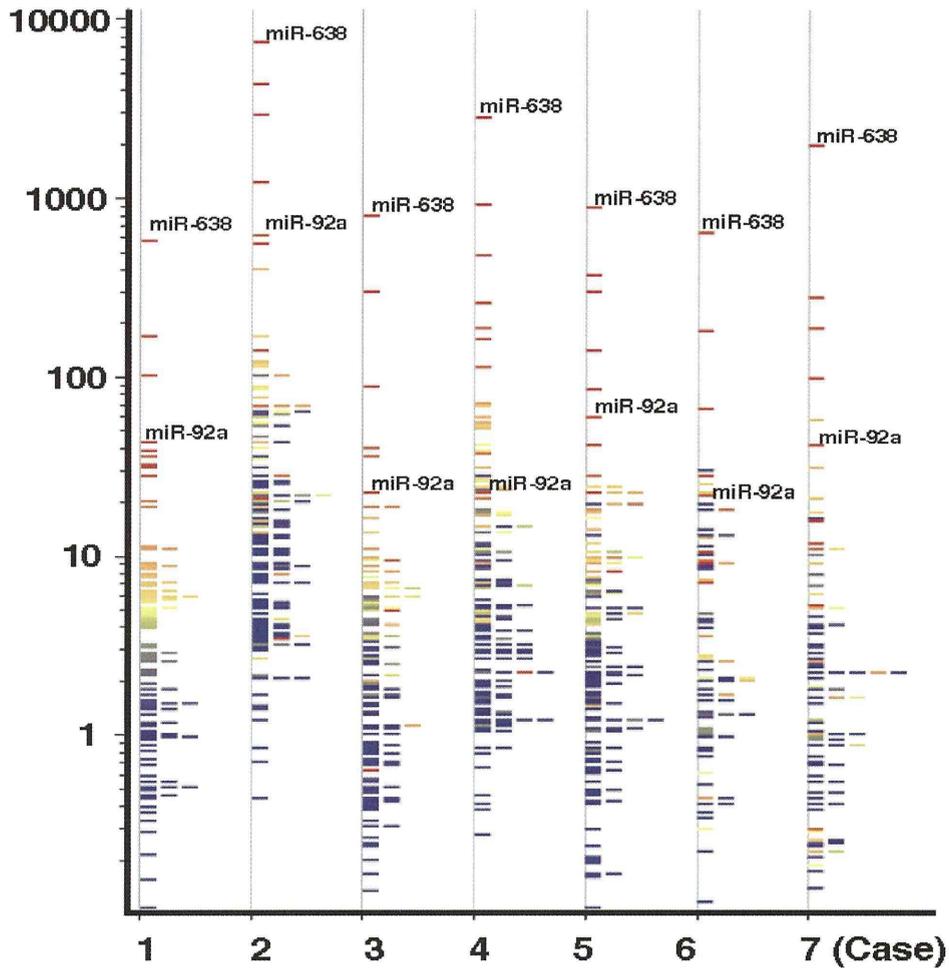


図7 正常人の血清7例におけるmiRNAのマクロアレイ解析
血清中からmiRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行った。Y軸は、発現レベルの相対値を示す。miR-638はすべての症例において最も高い値を示す。miR-92も、すべての症例で高発現を示す。文献44を改変。

中にmiRNAが存在することはありえないと考えられてきた。ところが、このような中、まず2つの研究グループが胎盤由来のmiRNAの存在を母胎の血清中で確認した³⁷⁾³⁸⁾。つづいてMitchellらが、血清中に存在するmiRNAを網羅的に解析している³⁹⁾。さらに、我々の研究グループも独自に血清中からmiRNAが検出できることを見だし、マイクロアレイを用いて血清miRNAの網羅的な解析を行った(図7)。特にmiR-638は、我々が検討したすべての正常血清において最も存在量が多いmiRNAであり、その生理的な機能は興味深い。一方、このような血清中のmiRNAは、RNaseが存在する血液中にどのような形で存在するのか議論されてきたが、現在までの研究では、エクソソームという二重膜脂質タンパク質に被胞化され細胞外に分泌されていることが確認されている⁴⁰⁻⁴²⁾。

このように、血清中に多種のmiRNAがエクソソ-

ームに被胞化されて存在することが明らかになってきたが、さらに、がん患者において特異的に血清中の存在量に変動しているmiRNAもいくつか報告されている。Lawrieらは、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫患者の血清中のmiR-21の発現レベルと予後との相関を報告している⁴³⁾。また、Mitchellらも前立腺癌患者血清中にmiR-141の上昇を報告している³⁹⁾。我々もこれまでにいくつかの癌腫に関して患者の血清中の各種miRNA存在量について検討を加えてきたが、最近、急性白血病において興味深い結果を得た。我々は、マイクロアレイ法にて急性白血病と正常群での比較検討を行った結果、白血病患者の血清中においては、正常群に比べて発現の上昇しているmiRNAよりも発現の低下しているmiRNAが多くみられた。その中でも特に、miR-92の発現量が劇的に低下していたことから、さらに多数の検体においてTaqMan qRT-PCR法を用いて、miR-92

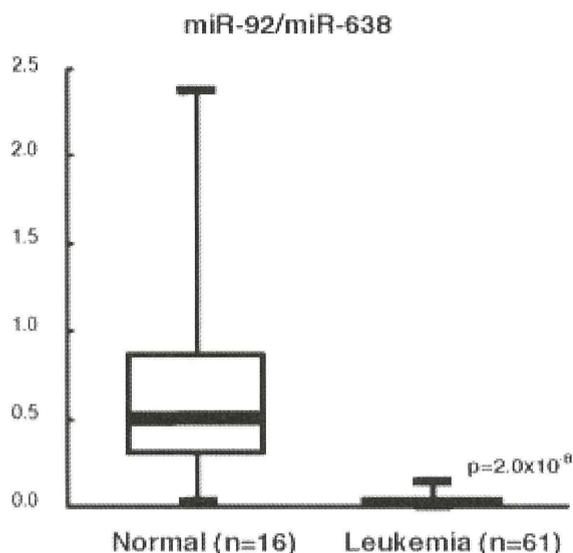


図8 正常および白血病患者血清中の miR-92/miR-638 の発現解析
 正常および白血病患者の血清から total RNA を抽出し、TaqMan qRT-PCR 法による miRNA 発現量の定量から miR-92/miR-638 の比を求めた。Y 軸は、相対値を示す。図に示すように、白血病患者血清中において miR-92/miR-638 比の有意な低下がみられた。有意差の検定は Mann-Whitney's U test を用いている。文献 44 を改変。

の発現状況の詳細な検討を行った。具体的には、54 例の急性骨髄性白血病と 7 例の急性リンパ性白血病を対象に検討を行った。その際、我々は血清中で恒常的に高発現している miR-638 を用いてデータの標準化を行い、miR-92 の発現を検討した。その結果、図 8 に示すように、急性白血病にて miR-92/miR-638 の値が極端に減少していることが確かめられた ($p=2.0 \times 10^{-8}$)⁴⁴⁾。また、さらに我々は肝臓癌患者血清中にも、同様に腫瘍特異的に発現が変動する miRNA を確認している⁴⁵⁾。

一方、このように血清中で減少している miR-92 が、腫瘍組織ではどのような発現を示しているかを検討した。具体的には、白血病患者の骨髄組織に対して miR-92 に対する LNA probe を用い、in situ hybridization 法を行った (図 9)。その結果、血清中で減少している miR-92 は、癌細胞では反対に高発現していることが明らかになった。この事実は、血液中に存在する miRNA の発現制御機構を考える上で非常に興味深い。すなわち、この現象の理由として 2 つの可能性が考えられる。1 つは癌細胞から miR-92 含有エクソソームの分解を促進する分子が

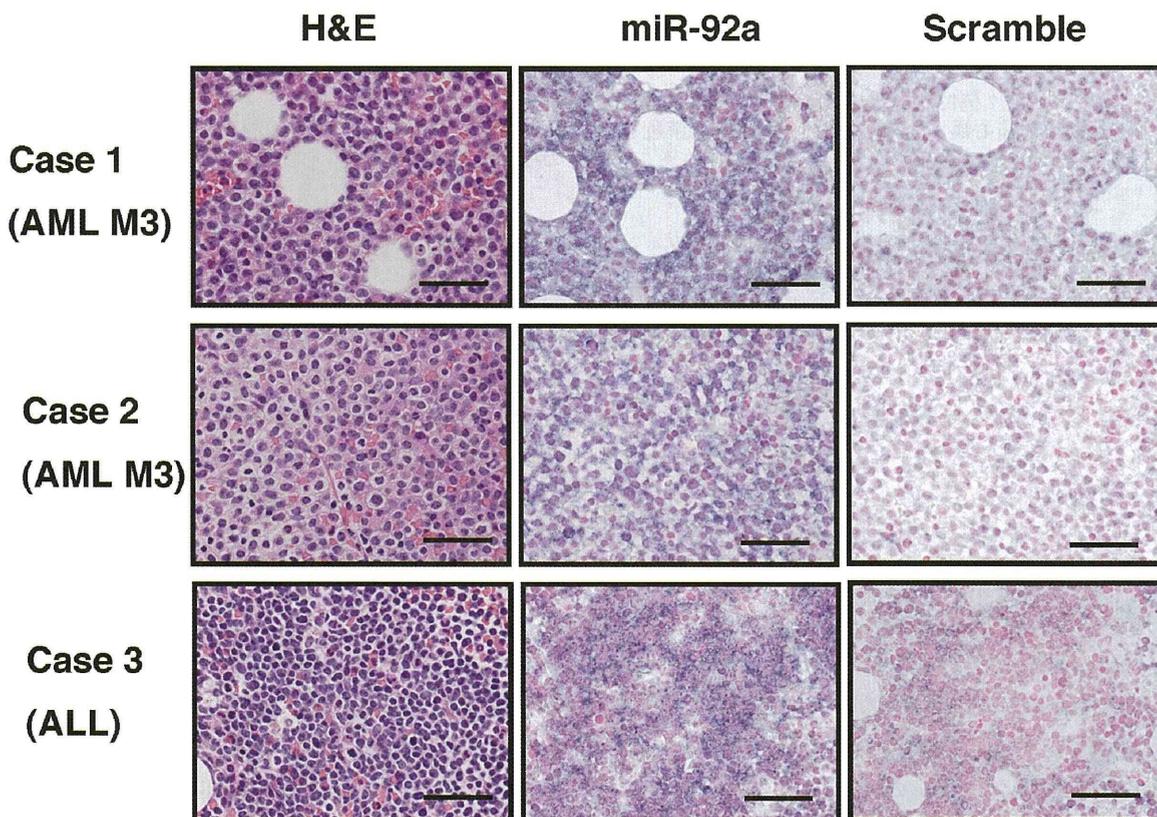


図9 白血病骨髄組織における miR-92 の発現
 miR-92 に対する LNA probe を用いた in situ hybridization 法を行った。青色が陽性シグナルを示す。3 つの症例ともに miR-92 は強陽性であった。スケールバーは 50 μm を示す。文献 44 を改変。

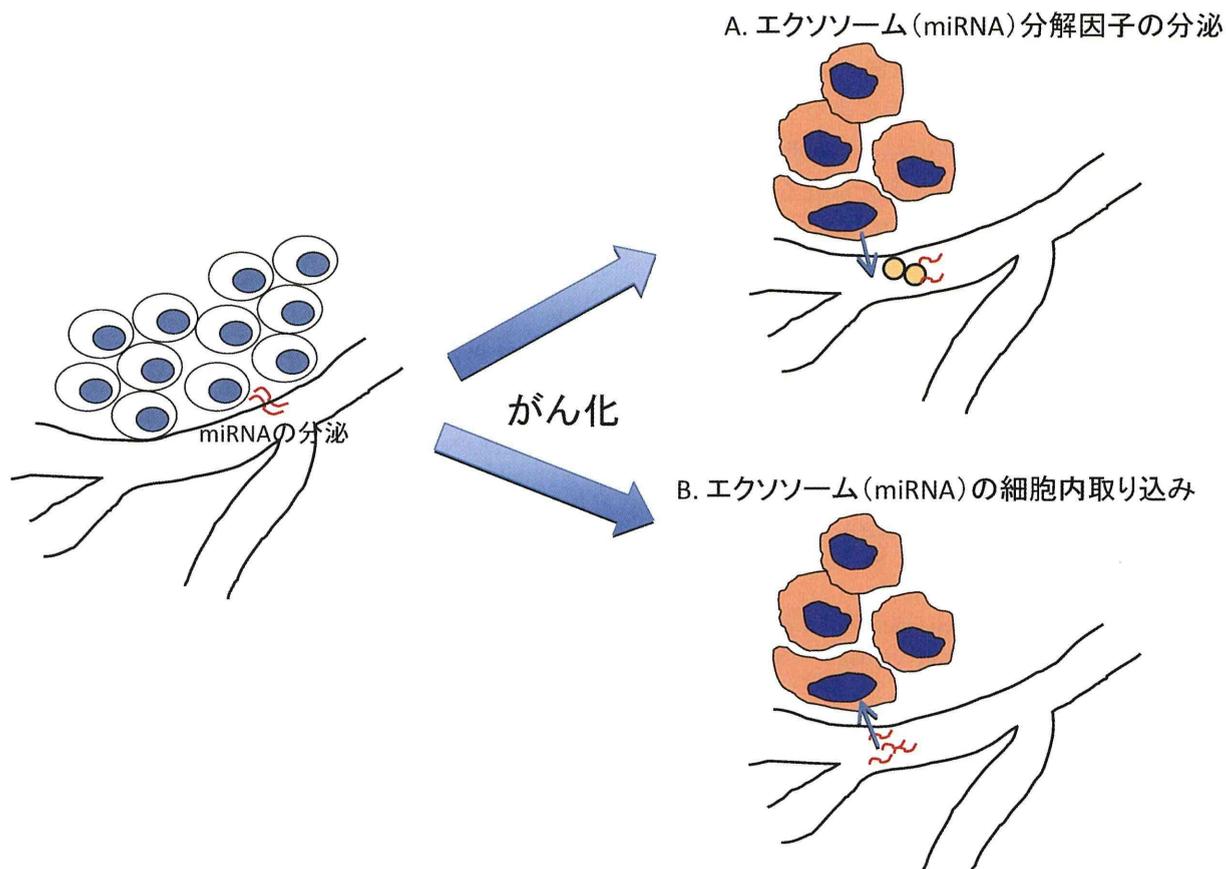


図 10 癌細胞における血液中の miRNA のモデル図
 (A) 癌細胞が miR-92 を分解する因子を放出する仮説
 (B) 癌細胞が miR-92 を選択的に取り込む仮説

分泌されている可能性 (図 10A)。もう一つは癌細胞が血液中の miR-92 含有エクソソームを選択的に取り込んでいる可能性である (図 10B)。今後の詳細な検討が重要になってくるが、以上の結果は、腫瘍発生に関与する miRNA が、細胞内のエクソソームによって分泌され miRNA が液性因子として全身的に作用することにより、組織の発がんに関与するという新たな概念を提唱するものである。

6. 生命の多様性

私が分子生物学を学びはじめた 1990 年代は、まさに、‘がん’ が遺伝子の病気であることが判明し、ゲノムが解読され、がんの根絶が数年で可能であろうと信じられていた時代である。ところが、現実的には、我々がもつ治療薬は、分子標的薬でさえ、がん細胞の根絶は難しい。その原因は、がんの増殖のメカニズムが極めて複雑であり、生命の完全なメカニズムの解明なしには不可能であるということにある。そして、その生命のメカニズムは、きわめて、

複雑で神秘的であるということも強調しておきたい。

私は、これまでに 7 種類の遺伝子に関してノックアウトマウスを作製した。ところが、7 個の遺伝子のうち、三つの遺伝子しか、個体レベルではマウスの異常が観察できなかった¹⁵⁻¹⁷⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。疾患の発症にかかわる重要な遺伝子をもたなくても、細胞や個体には、なにも起こらないのは非常に意義深い現象である。たとえば CHOP 遺伝子は、アポトーシスを制御するブレーキのような分子である。もしこれを機械に例えるとブレーキの部品がひとつない車といえる。車なら当然ブレーキがないので止まることもスピードを制御することも出来ない欠陥品となるが、CHOP 遺伝子をノックアウトしたマウスは、細胞死のブレーキ機能を欠失させたにも関わらず、個体レベルでの機能の変化は、発生という点に関しては、何もあらわれなかった。これは何を意味しているのだろうか。これは、生命の持つ柔軟性、多様性によるものと考えられる。私たちの体・生命は、こ

の極めて複雑で神秘的なバランスの基に成っていると考えられる。60兆個の細胞は、お互い連絡をとりあって、生命を営んでいるのであろう。たとえばCHOPノックアウトマウスでは、CHOP分子の欠失を補って生命を営んでいると考えられる。発生の段階から、1つ1つの細胞が、お互いの会話を通して、CHOPがないことを認識しているのであろう。そしてこの細胞どうしの会話の破綻が‘がん’のはじまりであり、この会話の本質を知ることが、がんの完全な解明につながると確信している。

文 献

- 1) Temin HM, Mizutani S : RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226** : 1211-1213, 1970
- 2) Baltimore D : RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226** : 1209-1211, 1970
- 3) Czernilofsky AP, Levinson AD, Varmus HE, Bishop JM, Tischler E, Goodman HM : Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* **287** : 198-203, 1980
- 4) Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA : Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* **297** : 474-478, 1982
- 5) Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M : Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* **300** : 762-765, 1982
- 6) Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M : Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* **296** : 404-409, 1982
- 7) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323** : 643-646, 1986
- 8) Lane DP : Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15-16, 1992
- 9) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P : Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253** : 665-669, 1991
- 10) Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D : Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253** : 661-665, 1991
- 11) Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B : Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392** : 300-303, 1998
- 12) Kuroda M, Ishida T, Horiuchi H, Kida N, Uozaki H, Takeuchi H, Tsuji K, Imamura T, Mori S, Machinami R, Watanabe T : Chimeric TLS/FUS-CHOP gene expression and the heterogeneity of its junction in human myxoid and round cell liposarcoma. *Am J Pathol* **147** : 1221-1227, 1995
- 13) Oikawa K, Ishida T, Imamura T, Yoshida K, Takanashi M, Hattori H, Ishikawa A, Fujita K, Yamamoto K, Matsubayashi J, Kuroda M, Mukai K : Generation of the novel monoclonal antibody against TLS/EWS-CHOP chimeric oncoproteins that is applicable to one of the most sensitive assays for myxoid and round cell liposarcomas. *Am J Surg Pathol* **30** : 351-356, 2006
- 14) Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D : CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol* **19** : 495-504, 1999
- 15) Wang XZ, Kuroda M, Sok J, Batchvarova N, Kimmel R, Chung P, Zinzner H, Ron D : Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J* **17** : 3619-3630, 1998
- 16) Zinzner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D : CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12** : 982-995, 1998
- 17) Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D : Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS (-/-) mice. *EMBO J* **19** : 453-462, 2000
- 18) Kuroda M, Tanabe H, Yoshida K, Oikawa K, Saito A, Kiyuna T, Mizusawa H, Mukai K : Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J Cell Sci* **117** : 5897-5903, 2004
- 19) Kuroda M, Wang X, Sok J, Yin Y, Chung P, Giannotti JW, Jacobs KA, Fitz LJ, Murtha-Riel P, Turner KJ, Ron D : Induction of a secreted protein by the myxoid liposarcoma oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 5025-5030, 1999
- 20) Kuroda M, Ishida T, Takanashi M, Satoh M, Machinami R, Watanabe T : Oncogenic transformation and inhibition of adipocytic conversion of preadipocytes by TLS/FUS-CHOP type II chimeric protein. *Am J Pathol* **151** : 735-744, 1997
- 21) Lagutina I, Conway SJ, Sublett J, Grosveld GC : Pax3-FKHR knock-in mice show developmental aberrations but do not develop tumors. *Mol Cell Biol* **22** : 7204-7216, 2002
- 22) Naka N, Takenaka S, Araki N, Miwa T, Hashimoto N, Yoshioka K, Joyama S, Hamada K, Tsukamoto Y, Tomita Y, Ueda T, Yoshikawa H, Itoh K : Synovial

- sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem Cells* **28** : 1119-1131, 2010
- 23) Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M, Mukai K : Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* **64** : 3545-3549, 2004
- 24) Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T, Yoshida K, Yamada K, Mimura J, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, Mukai K : A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett* **579** : 167-172, 2005
- 25) Zhang J, Hakansson H, Kuroda M, Yuan L : Wapl localization on the synaptonemal complex, a meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes, in the female mouse. *Reprod Domest Anim* **43** : 124-126, 2008
- 26) Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T : Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* **16** : 2406-2417, 2006
- 27) Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, Peters JM : Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* **127** : 955-967, 2006
- 28) Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, Bando M, Shirahige K, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM : Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing wapl. *Cell* **143** : 737-749, 2010
- 29) Oikawa K, Akiyoshi A, Tanaka M, Takanashi M, Nishi H, Isaka K, Kiseki H, Idei T, Tsukahara Y, Hashimura N, Mukai K, Kuroda M : Expression of various types of alternatively spliced WAPL transcripts in human cervical epithelia. *Gene* **423** : 57-62, 2008
- 30) Kuroda M, Kiyono T, Oikawa K, Yoshida K, Mukai K : The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. *Br J Cancer* **92** : 290-293, 2005
- 31) Ohbayashi T, Oikawa K, Yamada K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Satoh H, Mukai H, Mukai K, Kuroda M : Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability. *Biochem Biophys Res Commun* **356** : 699-704, 2007
- 32) Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K : Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer Lett* **221** : 21-28, 2005
- 33) He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM : A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435** : 828-833, 2005
- 34) Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ : RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120** : 635-647, 2005
- 35) Lee YS, Dutta A : The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* **21** : 1025-1030, 2007
- 36) He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ : A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447** : 1130-1134, 2007
- 37) Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM : Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* **54** : 482-490, 2008
- 38) Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A : Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* **3** : e3148, 2008
- 39) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M : Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105** : 10513-10518, 2008
- 40) Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C : Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12** : 19-30 ; sup pp. 1-13, 2010
- 41) Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T : Circulating microRNA in body fluid : a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* **101** : 2087-2092, 2010
- 42) Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T : Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* **285** : 17442-174452, 2010
- 43) Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggin AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL : Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* **141** : 672-675, 2008
- 44) Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M : Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for

- acute leukemia patients. *PLoS ONE* **4**: e5532, 2009
- 45) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M: Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int* **60**: 351-357, 2010
- 46) Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D: Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* **17**: 5708-5717, 1998
- 47) Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**: 595-599, 1998