

骨肉腫の発生・進展に関与する 新規癌関連遺伝子の機能解析

(研究課題番号 12470307)

平成 12～13 年度科学研究費補助金 [基盤研究(B)(2)]

研究成果報告書



平成 14 年 3 月

研究代表者 戸口田 淳也

(京都大学再生医科学研究所)

科研

2001

188

はしがき

研 究 組 織

研究代表者： 戸口田淳也 (京都大学再生医科学研究所)

研究分担者： 中村 孝志 (京都大学大学院医学研究科)

研 究 経 費

平成 12 年度 9,100 千円

平成 13 年度 4,100 千円

合計 13,200 千円

はじめに

我々は、ヒト骨肉腫における網膜芽細胞腫(Rb)遺伝子、p53 遺伝子及びそれぞれの両者の pathway の関連するカスケードの変異スペクトラムをほぼ明らかにし、その結果より骨肉腫の発生・進展にこれらの癌抑制遺伝子以外の遺伝子が関与している可能性を見いだした。そしてこの命題を検証するために、平成 8 年及び 9 年度の科学研究費補助金研究として p53^{-/-}マウス由来骨芽細胞(MMC2)に HPV16E7 を導入することで Rb 蛋白を不活化するという in vitro transformation の実験系でアプローチした。その結果、臨床サンプルで観察された結果と一致して、骨芽細胞において p53 と Rb を不活化しても骨肉腫細胞は形成されず、最終的な癌形質の獲得には更なる変異が必要であることが証明された。この実験系において p53 と Rb を不活化した細胞(MMC2E7)はヌードマウスでの腫瘍形成能は認められないが、稀に長期間経過したのち腫瘍性増殖を開始したものがあり、この腫瘍組織から細胞系を樹立した(MMC2TC)。

MMC2TC は in vivo においてポリクローナルな細胞系である MMC2E7 の中の稀な形質転換クローンか、あるいは in vivo の環境で何らかの付加的な変異が生じたため完全な癌形質の獲得に至ったクローンと考えられる。いずれの場合にしろ、parental の MMC2E7 とは遺伝子が異なっており、その変化が癌化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで本研究では 骨肉腫に最終癌化に関与している遺伝子の候補を MMC2TC と MMC2E7 との間で発現が変化した遺伝子として Differential Display 法を用いて単離し、その機能を解析することを目的とした。

成 果

1. DDM23/RGL3

1) cDNA クローニング

Differential Display 法によるスクリーニングにより、MMC2 及び MMC2E7 において発現が認められず、TC においてのみ発現が検出された cDNA 断片としてまず単離された。その断片をもとに、マウス brain cDNA library を用いたスクリーニング及び 5'RACE 法により全長をクローニングした。cDNA 全長は 2,507bp で 2,130bp の ORF を含み、710 個のアミノ酸をコードする。homology 検索より、ras シグナル伝達系における Ral の GEF(guanine exchange factor)である RalGDS の family (RalGDS, RalGDS-like, RalGDS like factor)に属するものであると考えられ、最近クローニングされた新たなメンバーである RGL3 と同一のものであることが判明した。

2) スプライシングバリエーションの存在

RT-PCR を用いた解析により DDM23/RGL3 はスプライシングにより 3 種類の転写産物が産生されることが判明した (図 1)。バリエーションの一つはイントロン 1 がスプライスされずエクソン 2 へつながるもので (DDM23O)、これはすぐ下流に premature termination codon が生じることから、機能をもつ蛋白は産生されない可能性があるものであった。もう一つのバリエーションはやはりイントロン 1 がスプライスされずにエクソン 2 に連続するが、エクソン 3 がスプライスアウトされエクソン 2 からエクソン 4 へ連続するものであった (DDM23V)。この場合、通常の翻訳開始部位からの ORF では、やはり premature termination codon を生じるが、イントロン 1 内の Met を first Met と認識すると N 端が異なりエクソン 4 以降が通常の蛋白と同じ構造をもつ蛋白を産生することになる。。この場合、RalGDS family に共通しているキナーゼ活性を持つと予測される CDC45 ドメインを欠いて、C 端の ras interacting domain のみをもつ蛋白が産生されることになり、Ras のシグナルに対して dominant negative に作用する可能性が考えられる。

3) マウス組織及び培養細胞での発現

Multiple tissue blot によるマウス正常組織の解析では、腎臓、肝臓で発現が認められた。培養細胞での発現をみると骨芽細胞 MC3T3-E1、脂肪前駆細胞 3T3-L1 などの正常細胞では発現は認められず、クローニングした MMC2TC に加えてマウス骨肉腫細胞株である Dunn で発現が認められた (図 2)。

4) ヒトオルソログ hDDM23/RGL3 のクローニング

マウス遺伝子との homology により、データベースよりヒト EST を同定し、それを手がかりとしてヒトオルソログ (hDDM23/RGL3) の全長をクローニングした。hDDM23/RGL3 は cDNA で 2,582bp で 2,133bp の ORF によりマウスより一つ多い 711 個のアミノ酸をコードする蛋白であった。マウスとの類似性は、塩基配列で 81.0%、アミノ酸では 80.0%が同一で 95.0%が類縁であった。

5) hDDM23/RGL3 のヒト組織及び培養細胞での発現

培養ヒト細胞での発現をみると、骨肉腫培養細胞株 8 株中 3 株で発現が認められた。その他に軟骨肉腫、線維肉腫の細胞株でも発現が確認された。正常組織由来の細胞での発現は、胎児組織からの細胞では発現が認められたが成人組織から樹立された細胞株では発現は認められなかった (図 3)。

6) ヒト骨肉腫組織における発現

ヒト骨肉腫の手術標本における発現解析では 16 例中、5 例で明確な発現が確認できたが、発現が低い全く認められない腫瘍も存在していた (図 4)。

7) hDDM23/RGL3 の発現導入による形質転換

二つのバリエーションを含む 3 種類の hDDM23/RGL3 をレトロウィルスベクターに組み込み、前駆細胞である MMC2E7 に導入、stable transformant を得た。導入した hDDM23/RGL3 の発現はノザンプロットで確認できたが、血清依存性、足場依存性に変化はなく、ヌードマウスにおける造腫瘍能も認められず、導入した遺伝子が癌化形質の獲得に寄与する証拠は得られなかった。

2. DDM36

1) cDNA クローニング

MMC2 及び MMC2E7 で約 6.5kb の転写産物を検出し、その発現が MMC2TC で消失した cDNA 断片として単離されたものである。DDM23 同様に、マウス brain cDNA ライブラリーのスクリーニング及び 5'RACE によって 6,220bp の全長 cDNA をクローニングした。ORF は 3,756bp であり、1,252 個のアミノ酸をコードする。その一次構造より Immunoglobulin (IgG) superfamily に属する膜 1 回貫通型の受容体蛋白と考えられ、DCC、Neogenin、Punc と subfamily を形成すると考えられた。その後マウス 7 番染色体ゲノム上に位置する Punc の上流に存在する遺伝子としてクローニングされた Nope と同一のものであることが判明した。

2) マウス培養細胞での発現

マウス培養細胞での発現を解析すると、MMC2 同様に骨芽細胞株である MC3T3-E1 では発現が認められたが、骨肉腫細胞である Dunn でも発現が認められ、正常細胞であっても NIH3T3 や 3T3-L1 では発現が認められなかった (図 5)。

3) ヒトオルソログ(hDDM36/hNope)のクローニング

マウス遺伝子との homology でいくつかのヒト EST を同定し、さらにヒトゲノムドラフトシーケンスの情報より、15 番染色体長腕上の二つのオーバーラップする contig 内に hDDM36/hNope の遺伝子座が含まれることが判明した。これらの情報と RT-PCR、5'RACE 等により、hDDM36/hNope の全長をクローニングした。ノザンプロットでの転写産物のサイズは約 5.2kb でマウスより約 1kb 短い、ORF は 3,750bp とほぼ等しく、1,250 アミノ酸をコードする。アミノ酸は 87.5%が同一で、97.4%の類縁であった。

4) hDDM36/Nope のヒト正常組織及び培養細胞での発現

ヒト正常組織での発現を MTB で解析したところ、マウス Nope での報告と類似した発現パターンで特に骨格筋で高い発現が認められた (図 6)

5) ヒト培養骨肉腫細胞株での発現及び変異解析

骨肉腫培養細胞株では 2/8 種類の細胞株で発現が消失していた (図 7)。ヒト遺伝子の各エクソンを増幅できる PCR プライマーセットを設定して SSCP によるスクリーニングによる変異解析を行ったが、明らかな変異は検出されなかった。

6) ヒト骨軟部悪性腫瘍組織における発現解析

ヒト骨軟部悪性腫瘍組織における発現を、TaqMan 法を用いた定量的 RT-PCR 法で解析し間葉系幹細胞における発現を基準として比較検討した。腫瘍別でみると、滑膜肉腫では大部分で発現が低下していたのに対し、骨肉腫、MFH、平滑筋肉腫では陽性、陰性の両者が存在していた (図 8)。

考察と今後の課題

1. DDM23/RGL3 について

骨肉腫において ras 遺伝子の変異は非常に稀であることが諸家の報告で明らかにされている。しかし ras シグナル伝達系の癌化における重要性を考慮すると何からの変異が存在する可能性は十分考えられる。その意味で ras の下流に位置すると考えられる ralGEF に属する遺伝子が DD により検出されたことは非常に興味深い事実であった。しかしながら遺伝子導入実験では stable transformant は複数得られてものの、これらは明確な癌細胞としての形質は示しておらず、DDM23/RGL3 が骨肉腫においていわゆる癌遺伝子として作用しているのかについては、更なる検討が必要である。通常の癌形質の assay (足場依存性増殖など) 以外の解析が必要である可能性があり、また骨肉腫における他の RalGDS family のメンバーの発現も検討する必要がある。マウスにおいて検出されたスプライシングバリエントはヒトでも存在しており、特にキナーゼドメインを欠くバリエントは ras シグナルの dominant negative に作用する可能性があり、その存在意義についてシグナル伝達系の解析が必要であると考えられる。

2. DDM36/Nope について

形質転換した細胞で発現が消失していたことより、当初は癌抑制遺伝子である可能性を考慮していたが、正常細胞、癌細胞での発現解析から単純に増殖等に関連した遺伝子ではないことが予想された。MMC2TC は癌化とともに MMC2 及び MMC2E7 が有していた骨芽細胞としての形質を失い、未分化肉腫の像を呈していた。DDM36/Nope の発現は間葉系幹細胞で認められるが、一部の肉腫細胞では低下～消失しており、特に滑膜肉腫では大多数で低下していた。細胞起源に関連したもので、ある特定の細胞系譜に属する腫瘍で発現していることが考えられる。Neogenin がそのリガンドである Netrin の結合により、cell fate を決定するように、DDM36/Nope が細胞分化に関連し多量である可能性を解析する必要がある。

3. 癌化過程に関連する遺伝子の解析

今回の DD 解析によって得られた cDNA 断片からクローニングされた二つの遺伝子が骨肉腫の癌化に関連したものであることを示すデータは得られておらず、他の遺伝子の関与が考えられる。骨肉腫に治療を考える上で、そのような遺伝子の中には、分子標的治療の標的候補となる遺伝子が存在すると考えられ、その単離が望まれる。現在、MMC2 から自然形質転換により骨肉腫を形成した 3 種類の細胞系を樹立した。本研究での成果を踏まえて、現在これらの細胞における遺伝子変異を MMC2 と比較解析している。

結 語

1. p53^{-/-}マウス由来の骨芽細胞株 MMC2 をスタートとした形質転換実験により、骨肉腫の癌化過程で発現が変化した新規遺伝子として DDM23 及び DDM36 を単離し、それぞれのヒトオルソログもクローニングした。
2. 発現が亢進していた遺伝子である DDM23 は RalGDS family に属する ras シグナルの effector であり、RGL3 と同一であった。骨肉腫の一部で発現が認められたが、強制発現による形質転換能は認められなかった。
3. 発現が低下した DDM36 は IgG superfamily に属する受容体蛋白であり、Nope と同一であった。骨軟部腫瘍における発現解析により、間葉系細胞の特定の系統から発生した腫瘍の決定に関連しているのではないかと考えられら。

研究成果の発表

I. 論文発表

1) 英文論文

1. Yamamoto, H., Nakayama, T., Murakami, H., Hosaka, T., Nakamata, T., Tsuboyama, T., Oka, M., Nakamura, T., Toguchida, J. High incidence of SV40-like sequences detection in tumour and peripheral blood cells of Japanese osteosarcoma patients. Br. J. Cancer, 82:1677-1681, 2000.
2. Tsuboyama, T., Toguchida, J., Kotoura, Y., Kasahara, K., Hiraoka, M., Nakamura, T. Intra-operative radiation therapy for osteosarcoma in the extremities. Int Orthop., 24:202-207, 2000.
3. Hosaka, T., Kanoe, H., Nakayama, T., Murakami, H., Yamamoto, H., Nakamata, T., Tsuboyama, T., Oka, M., Kasai, M., Sasaki, M. S., Nakamura, T., Toguchida, J. Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;16). Oncogene, 19:5821-5825, 2000.
4. Oya, N., Kokubo, M., Mizowaki, T., Shibamoto, Y., Nagata, Y., Sasai, K., Nishimura, Y., Tsuboyama, T., Toguchida, J., Nakamura, T., Hiraoka, M. Definitive intraoperative very high-dose radiotherapy for localized osteosarcoma in the extremities. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 51:87-93, 2001.
5. Kumar, P., Oka, M., Toguchida, J., Kobayashi, M., Uchida, E., Nakamura, T. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. J. Anat., 199:241-250, 2001.
6. Kobayashi, M., Toguchida, J., Oka, M. Development of the sheilds for tendon injury repair using polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H). J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomed.), 58:344-351, 2001.
7. Kobayashi, M., Toguchida, J., Oka, M. Development of polyvinyl alcohol-hydrogel (pva-h) shields with a high water content for tendon injury repair. J. Hand Surg. [Br]., 26:436-40, 2001.
8. Kobayashi, M., Toguchida, J., Oka, M. Study on the lubrication mechanism of natural joints by confocal laser scanning microscopy. J. Biomed. Mater. Res., 55:645-51, 2001.
9. Hosaka, T., Nakashima, Y., Kusuzaki, K., Murata, H., Nakayama, T., Nakamata, T., Aoyama, T., Okamoto, T., Nishijo, K., Araki, N.,

- Tsuboyama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. A novel type of EWS-CHOP fusion gene in two cases of myxoid liposarcoma. J. Mol. Diagn., in press.
10. Murakami, H., Nakayama, T., Nishijo, K., Hosaka, T., Nakamata, T., Aoyama, T., Okamoto, T., Tsuboyama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Morphological and biological heterogeneity of three tumorigenic cell lines derived from a single p53-/- osteoblast-like cell line, MMC2. Cancer Letters, in press.
11. Aoyama, T., Nagayama, S., Okamoto, T., Hosaka, T., Nakamata, T., Nishijo, K., Tsuboyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Mutation analyses of the NFAT1 gene in chondrosarcomas and enchondromas. Cancer Letters, in press.

2) 邦文論文

1. 吹上謙一、戸口田淳也、坪山直生、中村孝志、琴浦良彦. 恥骨発生の分化型骨肉腫の臨床経過. 中部整災、43:257-258, 2000.
2. 布留守敏、戸口田淳也、坪山直生、中村孝志、琴浦良彦. 当科における軟部原発平滑筋肉腫の臨床経過と治療成績. 中部整災誌、43: 321-322, 2000.
3. 戸口田淳也、長山聡. 多発性外骨腫. 日本臨床、58:1473-1478, 2000
4. 戸口田淳也、村上弘、山本博史、仲俣岳晴. 骨肉腫の分子生物学、小児外科、32:2000-2010, 2000.
5. 戸口田淳也. 多発性外骨腫(EXT)遺伝子. 整形外科 52 : 7, 2001
6. 戸口田淳也. 骨軟骨腫と EXT1 および EXT2 遺伝子. 整形・災害外科 44 : 984-985, 2001
7. 戸口田淳也、坪山直生、中村孝志、琴浦良彦. 仙尾骨脊索腫の治療成績. 中部整災誌、44 : 731-732, 2001
8. 戸口田淳也、坪山直生、中山富貴、中村孝志. 多発癌、多重癌の分子生物学的特性. 骨腫瘍. 癌の臨床、47 : 277-283, 2001
9. 戸口田淳也、仲俣岳晴、青山朋樹. 腫瘍性増殖と組織再生の接点. 遺伝子医学、5 : 637-641, 2001

II. 学会発表

1. 戸口田淳也、坪山直生、平岡眞寛、中村孝志. 荷重部術中照射骨軟骨の経時的変化について. 第33回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、熊本、2000.7.14
2. 村上弘、仲俣岳晴、保坂泰介、山本博史、中山富貴、坪山直生、中村孝志、

- 戸口田淳也. マウス骨芽細胞の悪性化に関わる新規がん遺伝子のクローニング. 第 33 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、熊本、2000.7.15
3. 山本博史、村上弘、保坂泰介、仲俣岳晴、中山富貴、坪山直生、日下部守昭、中村孝志、戸口田淳也. キメラマウスを用いた Rb(-/-)骨芽細胞系の樹立. 第 33 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、熊本、2000.7.15
 4. 仲俣岳晴、村上弘、山本博史、保坂泰介、仲俣岳晴、坪山直生、中村孝志、相澤慎一、戸口田淳也. p53 ノックアウトマウスからの軟骨細胞様細胞株の樹立. 第 33 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、熊本、2000.7.15
 5. 保坂泰介、鹿江寛、中山富貴、村上弘、山本博史、仲俣岳晴、坪山直生、中村孝志、岡正典、戸口田淳也. TLS-CHOP 融合遺伝子の癌化能の解析. 第 33 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、熊本、2000.7.15
 6. 戸口田淳也、坪山直生、琴浦良彦、中村孝志. 仙骨脊索腫の治療成績. 第 95 回中部日本整形外科災害外科学会、高松、2000.10.13
 7. 松下 睦、根尾昌志、飯田寛和、中村孝志、戸口田淳也. 腰仙椎部の giant schwannoma. 第 95 回中部日本整形外科災害外科学会、高松、2000.10.13
 8. 坪山直生、中村孝志、戸口田淳也、笠原勝幸. 骨肉腫に対するシスプラチン、アドリアマイシン併用化学療法 of 長期成績. 第 95 回中部日本整形外科災害外科学会、高松、2000.10.13
 9. 保坂泰介、鹿江寛、中村孝志、戸口田淳也. 粘液型脂肪肉腫における CHOP 関連遺伝子の臨床病理学的及び生物学的解析. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.4
 10. 山本博史、日下部守昭、中村孝志、戸口田淳也. Rb キメラマウスからの Rb(-/-)骨芽細胞様細胞系の樹立. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.4
 11. 村上弘、中山富貴、仲俣岳晴、中村孝志、戸口田淳也. 骨肉腫発癌過程に関与する新規癌遺伝子の単離. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.6
 12. 仲俣岳晴、村上弘、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也. 骨肉腫発癌過程に関与する新規癌抑制遺伝子の単離. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.6
 13. 戸口田淳也、保坂泰介、鹿江寛. 脂肪肉腫における CHOP 関連染色体転座の分子機構. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.4
 14. 仲俣岳晴、青山朋樹、戸口田淳也、坪山直生、中村孝志. p53 遺伝子欠損マウスを用いた軟骨細胞系の樹立. 第 20 回骨・カルシウム代謝研究会、京都、2000.10.6
 15. 戸口田淳也、長山聡、仲俣岳晴、坪山直生、岡正典、中村孝志. 多発性外骨腫(EXT)遺伝子の変異解析. 第 15 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2000.9.28
 16. Toguchida, J, Murakami, H., Nakamata, T., Nakayama, T., and

- Nakamura, T. Molecular cloning of putative oncogene and antioncogene involved in the development of osteosarcoma. 6th Annual Connective Tissue Oncology Society Conference, Amsterdam, 2000.11.3
17. Hosaka, T., Kanoe, H., Nakamura, T., Toguchida, J. Clinico-pathological and biological analyses of the CHOP-related fusion genes in myxoid liposarcomas. 6th Annual Connective Tissue Oncology Society Conference, Amsterdam, 2000.11.3
 18. Toguchida, J., Murakami, H., Yamamoto, H., Nakayama, T., Aizawa, S., Kusakabe, M., Nakamura, T. Sequential inactivations of the Rb and p53 genes in osteoblasts are not sufficient to create osteosarcoma in vitro. 2nd Cold Spring Harbor Meeting on Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes, Cold Spring Harbor, 2000.8.19
 19. Murakami, H., Nakayama, T., Nakamata, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Molecular cloning of a novel putative oncogene involved in the development of osteosarcoma. 2nd Cold Spring Harbor Meeting on Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes, Cold Spring Harbor, 2000.8.18
 20. 伊藤裕美, 戸口田淳也, 坪山直生, 柿木良介, 村上弘, 中村孝志, 真多俊博, 飯田寛和. 多発性外骨腫に続発した腸骨軟骨肉腫の1症例. 第366回京阪神整形外科集談会, 大阪, 2001.1.20
 21. Toguchida, J., Nakayama, T., Murakami, H., Okamoto, T., Aoyama, T., Nakamura, T., M. Oka. Establishment of bone and cartilage-derived cell lines from p53^{-/-} mice. Symposium on Tissue Engineering: National Taiwan University & Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 2001.1.20
 22. 青山朋樹, 仲俣岳晴, 岡本健, 中山富貴, 坪山直生, 中村孝志, 戸口田淳也. p53^{-/-}マウスからの軟骨細胞系の樹立. 第14回日本軟骨代謝学会, 岐阜, 2001.3.8
 23. Toguchida, J. SV40-like sequences detection in tumor and PBCs in osteosarcoma patients. Malignant mesothelioma - Therapeutic options and role of SV40: An update, Chicago, 2001.4.21
 24. 青山朋樹, 長山聡, 村上弘, 山本博史, 保坂泰介, 仲俣岳晴, 岡本健, 中山富貴, 坪山直生, 中村孝志, 戸口田淳也. 軟骨肉腫における NFAT1 遺伝子の変異解析. 第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会, 宇都宮, 2001.7.19

25. 村上弘、仲俣岳晴、中山富貴、保坂泰介、山本博史、青山朋樹、岡本健、坪山直生、中村孝志、戸口田淳也。マウス骨芽細胞の悪性化に関わる癌遺伝子のクローニング。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.19
26. 中山富貴、鹿江寛、坪山直生、戸口田淳也、中嶋安彬、田中千晶、四方実彦、琴浦良彦、中村孝志。術中照射後に発生した骨肉腫の2例。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.19
27. 仲俣岳晴、村上弘、中山富貴、山本博史、保坂泰介、青山朋樹、岡本健、中村孝志、戸口田淳也。骨芽細胞の形質転換に関与する新規癌遺伝子の単離。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.19
28. 朝田尚宏、土屋弘行、山本憲男、富田勝郎、長山聡、戸口田淳也。家族性骨肉腫の1家系の報告 - p53 遺伝子の塩基配列の解析から。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.19
29. 保坂泰介、鹿江寛、中山富貴、村上弘、山本博史、仲俣岳晴、青山朋樹、岡本健、中嶋安彬、中村孝志、坪山直生、戸口田淳也。粘液型脂肪肉腫におけるCHOP 関連融合遺伝子の臨床病理学的・生物学的解析。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.19
30. 戸口田淳也、坪山直生、中山富貴、中嶋安彬、中村孝志。四肢発生骨肉腫M1症例の臨床像。第34回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、宇都宮、2001.7.20
31. 戸口田淳也。骨軟部腫瘍の遺伝子診断の現況と問題点。第8回東北地区骨軟部腫瘍研究会、新潟、2001.9.22
32. 中山富貴、村上弘、中村孝志、戸口田淳也。p53 欠損マウス骨芽細胞からの骨肉腫細胞の確立。第60回日本癌学会、横浜、2001.9.26
33. 青山朋樹、長山聡、岡本健、保坂泰介、仲俣岳晴、西庄功一、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。軟骨肉腫におけるNFAT1 遺伝子の変異解析。第60回日本癌学会、横浜、2001.9.27
34. 長山聡、片桐豊雄、戸口田淳也、中村祐輔。DNA マイクロアレイを用いた軟部肉腫の発現遺伝子プロファイルの解析。第60回日本癌学会、横浜、2001.9.27
35. 保坂泰介、中山富貴、仲俣岳晴、青山朋樹、岡本健、西庄功一、中村孝志、戸口田淳也。粘液型脂肪肉腫におけるCHOP 関連融合遺伝子の臨床病理学的及び生物学的解析。第60回日本癌学会、横浜、2001.9.27
36. 仲俣岳晴、村上弘、青山朋樹、中山富貴、保坂泰介、岡本健、西庄功一、中村孝志、戸口田淳也。骨肉腫発癌過程に関与する新規癌抑制遺伝子の単離。第60回日本癌学会、横浜、2001.9.28

37. 戸口田淳也. 骨軟部腫瘍におけるヒトゲノム情報の応用. 第97回中部日本整形外科災害外科学会、岐阜、2001.10.12
38. 戸口田淳也、長山聡、中村祐輔、中山富貴、坪山直生、中村孝志. 骨軟部腫瘍とゲノム解析. 第16回日本整形外科学会基礎学術集会、広島、2001.10.18
39. 青山朋樹、仲俣岳晴、岡本健、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也. p53-/-マウスからの関節軟骨由来軟骨細胞株の樹立. 第16回日本整形外科学会基礎学術集、広島、2001.10.18
40. Okamoto, T., Hosaka, T., Nakashima, Y., Kusuzaki, K., Nakamata, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Nakamura, T., Toguchida, J. Novel type of EWS-CHOP fusion genes in two cases of liposarcomas with aggressive clinical features and atypical histopathologic findings. 7th Annual Connective Tissue Oncology Society Conference, Palm Beach, 2001.11.2
41. Aoyama, T., Nagayama, S., Okamoto, T., Hosaka, T., Nakamata, T., Nishijo, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. The mutation analysis of NFAT1 in chondrosarcoma. 7th Annual Connective Tissue Oncology Society Conference, Palm Beach, 2001.11.2
42. 渡邊健一郎、塩田光隆、東ゆり、梅田雄嗣、足立壮一、中畑龍俊、戸口田淳也、中山富貴、坪山直生. 骨肉腫治療における当院での取り組み. 第8回西日本小児がんセミナー、京都、2002.2.16
43. 戸口田淳也. 組織工学と細胞の不老化・癌化. 日本バイオマテリアル学会、京都、2002.2.28
44. 岡本健、仲俣岳晴、青山朋樹、西庄功一、保坂泰介、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也. 不老化ヒト骨髄間葉系幹細胞株の樹立と多分化能の解析. 第15回日本軟骨代謝学会、前橋、2002.3.8
45. 青山朋樹、仲俣岳晴、岡本健、保坂泰介、西庄功一、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也. p53-/-マウス由来軟骨細胞株を用いた成長軟骨における細胞間相互作用の再現. 第15回日本軟骨代謝学会、前橋、2002.3.8

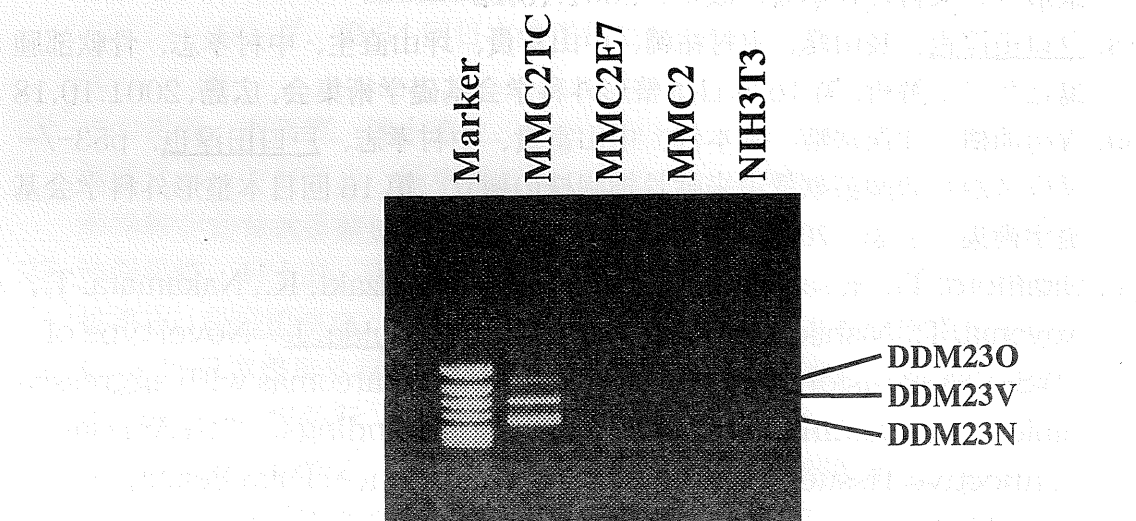


図1. MMC2TCでのスプライシングバリエント

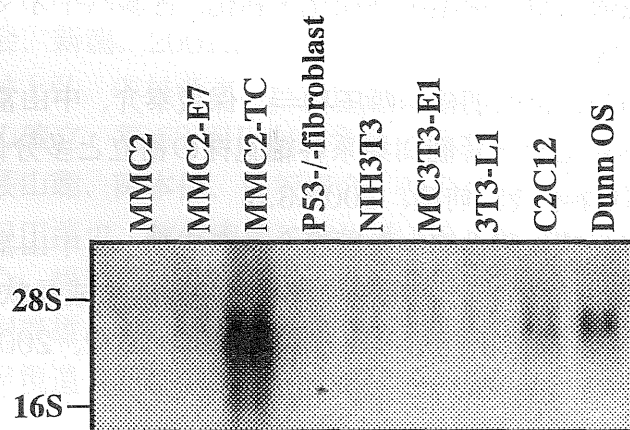


図2. マウス培養細胞におけるDDM23/RGL3の発現

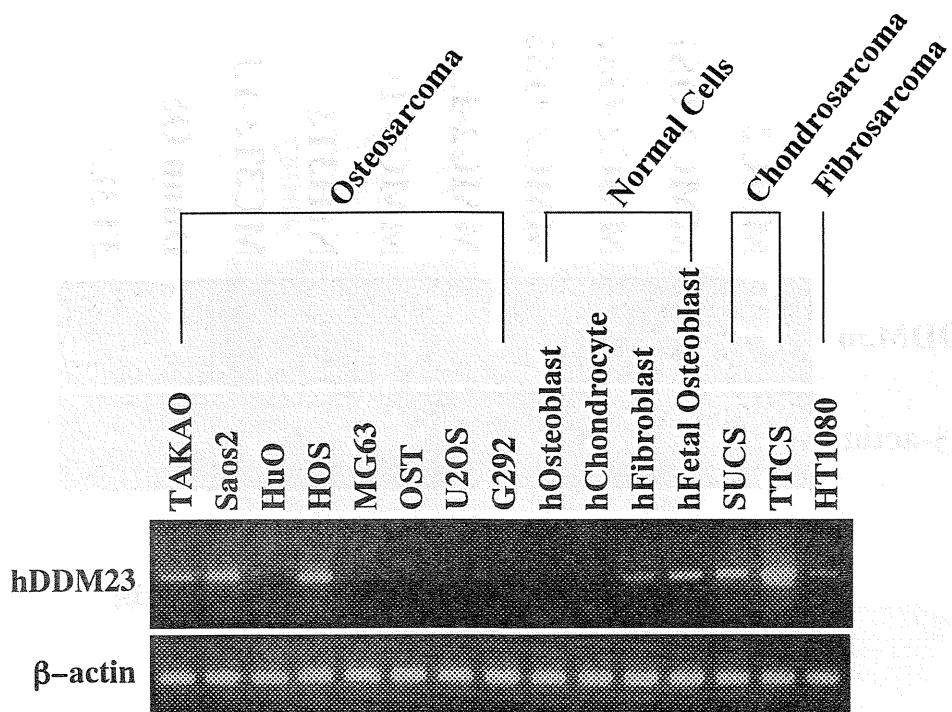


図3. hDDM23/RGL3のヒト培養細胞での発現

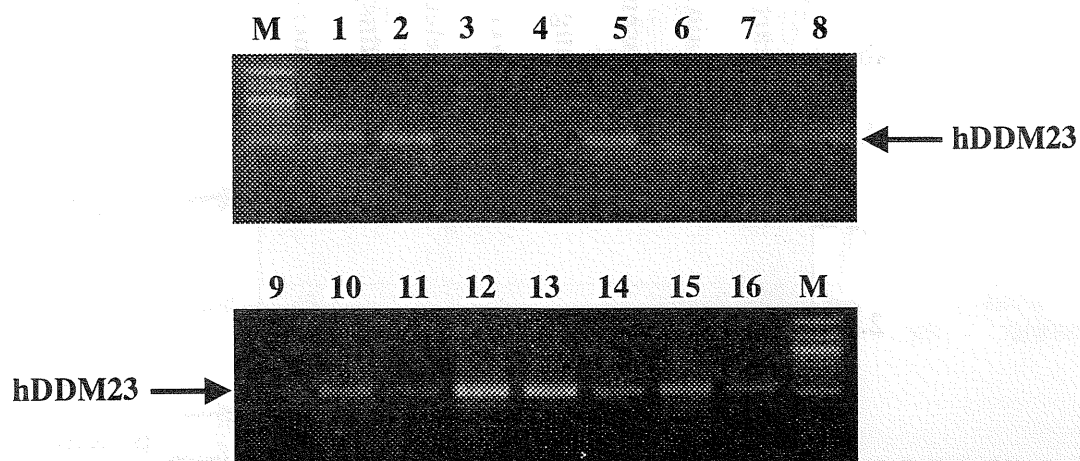


図4. ヒト骨肉腫切除組織におけるhDDM23/RGL3の発現.
M, Marker; 1~16, Osteosarcoma

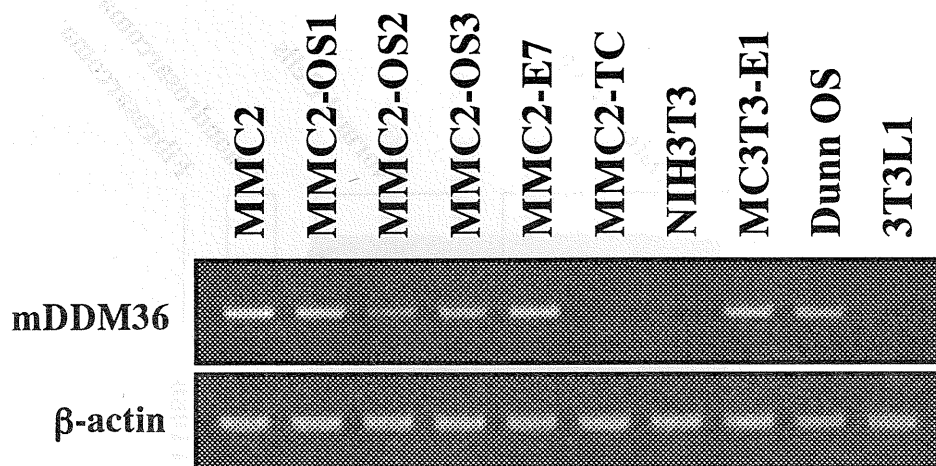


図5. マウス培養細胞におけるDDM36/Nopeの発現

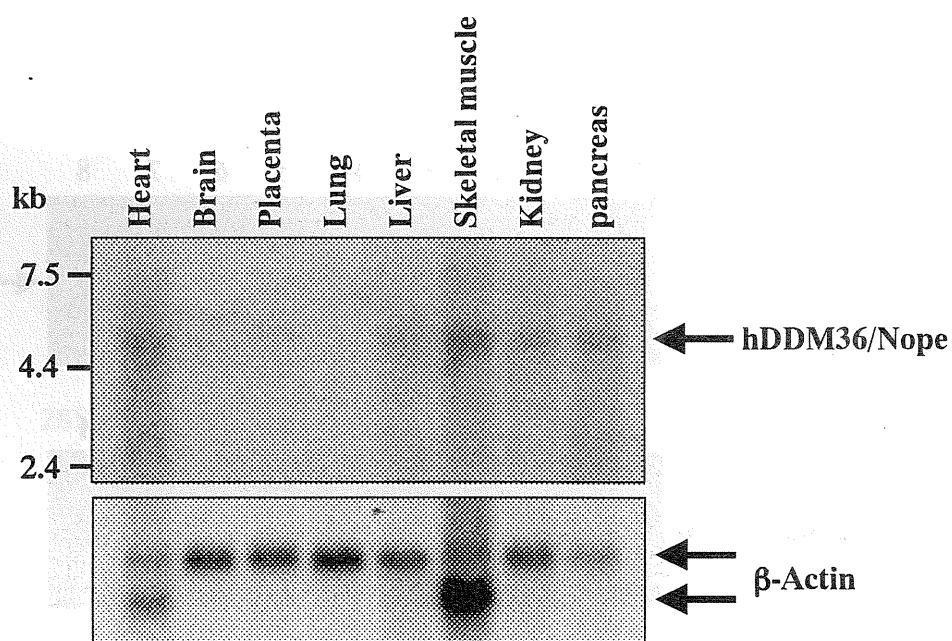


図6. ヒト正常組織におけるDDM36/Nopeの発現

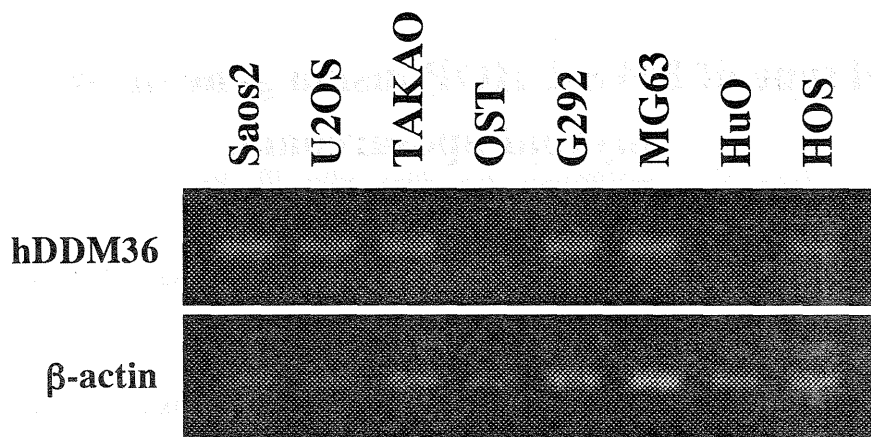


図7.. ヒト培養細胞におけるhDDM36/Nopeの発現

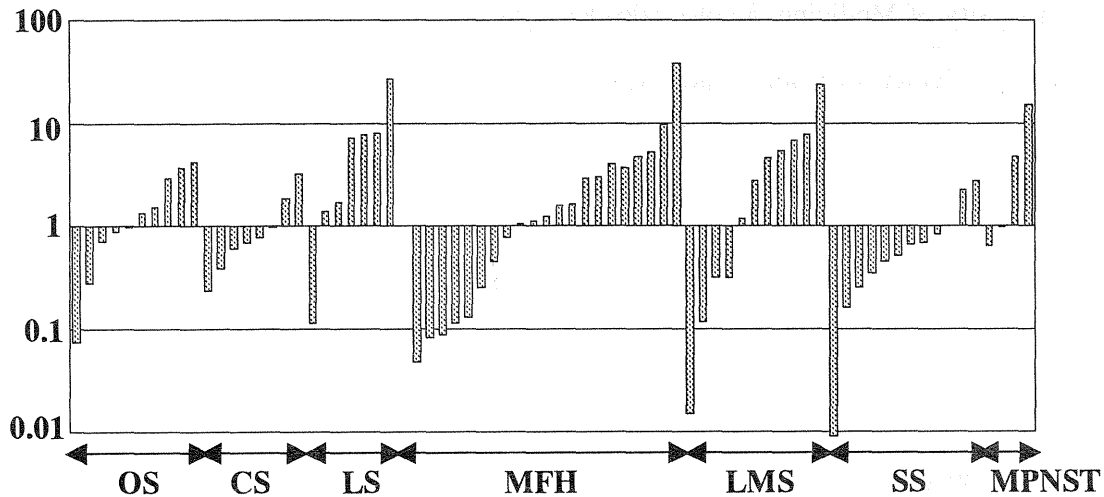


図8. ヒト骨軟部肉腫におけるhDDM36/Nopeの発現.

間葉系幹細胞における発現を1とした場合の各腫瘍における相対的発現量を表す.

OS, osteosarcoma; CS, chondrosarcoma; LS, liposarcoma (pleomorphic or dedifferentiated); MFH, malignant fibrous histiocytoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor.