

[研究紹介] 分子病態解析学 (附属病院検査部)

朝 長 毅 野 村 文 夫

平成5年に臨床検査医学講座(米満 博教授)として発足した当講座は平成13年より医学研究院分子病態解析学講座となり、臨床検査を特に分子レベルでとらえ、新しい疾患マーカーや疾患素因を見出してその情報を速やかに診療の現場に還元することをミッションとしている。当講座は附属病院検査部と一体であり、検査部門の管理・運営にあたりと同時に遺伝子検査と密にかかわる遺伝カウンセリングも担当し、大学病院にふさわしい高度先進検査部門の構築を目指している。

1. 独自のプロテオーム解析技術による種々の疾患の診断、治療法の開発 -疾患プロテオミクスセンターの設立を目指して-

ヒトゲノムの解読に代表される近年の分子生物学研究のめざましい発展により、種々の疾患のメカニズムもかなり明らかになりその臨床応用も進められている。これまでにSNPsに代表される遺伝子多型解析やDNAマイクロアレイ技術を用いた遺伝子発現解析によって、各種疾患の診断や治療に役立てようとする試みがなされてきた。しかし、生体内での種々のプロセスは一部の例外を除いてほとんどがタンパク質によって制御されていること、また、病気の早期発見や病態の把握に有用な血中や尿中のマーカーの検索は遺伝子レベルの解析では困難であることなどを考えると、臨床応用の可能性が最も高いのはタンパク質に焦点を当てた研究であることは誰もが認めることである。あらゆる疾患において、早期にしかも高い精度で診断できるマーカーができれば、治療成績の向上が期待されることは当然であるが、例えば、

現在診療の場で用いられている腫瘍マーカーはいずれも進行癌では陽性率が高いものの、早期癌の検出率は非常に低いうえ、偽陽性率も高いため早期癌の正確な診断は非常に困難である。そのため、新しい疾患マーカーの開発は急務であり、そこで威力を発揮するのが血中や尿中のタンパク質を網羅的に調べるプロテオーム解析である。

プロテオームとは細胞内において遺伝子から翻訳・生産されているタンパク質の全セットを指し、ゲノム(全DNA)、トランスクリプトーム(全RNA)に対比させた造語である。そのタンパク質を網羅的に解析することをプロテオミクスと言い、その中でも疾患の診断や治療に焦点をあてた解析を疾患プロテオミクスと言う。近年、質量分析計の急速な進歩に伴い、生体試料中の微量なタンパク質の同定も可能になり、プロテオミクス研究は急速に広まっている。しかし、それらの研究の大半は基礎的な研究であり、病気の診断や治療を目指した疾患プロテオミクス研究はまだ非常に少ない。特に、実際の臨床の現場で診療に携わっている人が行っているプロテオミクス研究は皆無と言ってよい。我々の講座は大学病院検査部として、血清、尿などの豊富な臨床検体を扱える立場にあり、それらの検体を用いて日常臨床検査を行っている検査技師が積極的に疾患プロテオミクス研究に取り組んでいる。同時に、消化器内科、循環器内科、呼吸器内科、消化器外科、肝胆膵外科、泌尿器科、耳鼻咽喉科、産婦人科などの診療科の医師が我々の講座で新しい診断マーカーや分子標的治療となるタンパク質の探索を行っている。また、北里大学や東京医科歯科大学などの他施設と共同で、プロテオミクスの新しい手法の

開発を行っている。現在までに下記に述べるような新規疾患マーカーの候補となるタンパク質を多数発見し、論文発表、特許出願を行ってきた。以上のように、我々は、実際の診療に関わっている医師や検査技師が主導する疾患プロテオミクス研究を進め、近い将来疾患プロテオミクスセンターを設立することを目標に定めている。

(1) 蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動法 (2D-DIGE) による消化器癌のプロテオーム解析

従来のプロテオーム解析は一次元目に固定化 pH 勾配 (Immobilized pH gradient: IPG) ゲルを用いた二次元電気泳動法 (2-DE) が主流であり、その扱いやすさや再現性が良好なことから、現在でもなお広く用いられている。その反面、従来の 2-DE では発現量の多いタンパク質しか解析できず、また分子量が 200kDa を越える大きなタンパク質の分離は困難である。そのため、今までの 2-DE で同定されるタンパク質の種類は限られたものであった。それを解決するために我々は一次元目にアガロースゲルを用いている (アガロース 2-DE)。この手法は北里大学理学部生体分子動力学研究室、前田、大石らによって提唱されているもので、IPGゲルに比較して 10 倍以上の量のタンパク質を分離でき、かつ IPGゲルでは分離困難な高分子量のタンパク質を同定できると言われている [1]。最初に一次元目のゲルに載せるタンパク質が多ければ、当然同定できるタンパク質の数も増えるわけで、我々はこれまでこの手法を用いて、千葉大学大学院医学研究院先端応用外科で収集された大腸癌手術標本の癌部、非癌部組織からタンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行った [2]。複数の症例の癌部、非癌部で共通して発現の違いの見られるスポットを選び出し、それぞれのスポットをトリプシンによるインゲル消化後、イオントラップ型 LC-MS/MS 装置 (ThermoQuest 社 LCQ-Deca) にてタンパク質の同定を行った (図 1)。その結果、同定を試みた 107 個のスポットのうち 97 個 (90.7%) のタンパク質を同定することができ、その中には、過去に大腸癌との関連が全く指摘されていないタンパク質が多数認められた [2]。また、同一のタンパク

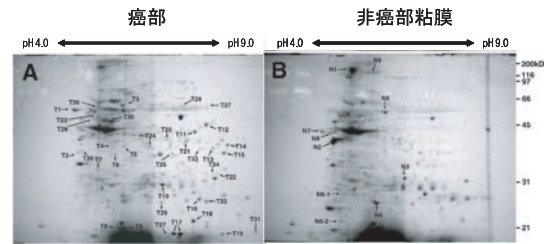


図 1 アガロース 2-DE を用いた大腸癌組織のプロテオーム解析

大腸癌組織の癌部、非癌部で発現の違いのあるスポットを調べた。計 107 個の違いのあるスポットが検出され、そのうち 97 個 (90.7%) が同定できた。その中で癌部、非癌部での発現の違いが各症例間で共通して有意差の認められたタンパク質 46 個が矢印で示してある。左: 癌部で発現増大しているタンパク質 (T1-37)、右: 非癌部で発現増大しているタンパク質 (N1-9)

質と同定されたスポットが、癌部と非癌部で位置 (pI 値や分子量) が異なった例がいくつか認められ、翻訳後修飾の可能性が示唆された [2]。これらの結果は、アガロース 2-DE が種々の疾患のプロテオーム解析を行う上で強力な武器と成りうることを示している。

このアガロース 2-DE は多量のタンパク質を分離できるという利点がある反面、IPG に比して再現性に劣るという欠点があった。もともと、2-DE で分離したタンパク質のスポットの位置や染色の強さの再現性を確保することが難しいと言われていたが、その問題点を克服する方法として、最近、タンパク質を蛍光色素で標識して 2-DE で分離する手法 (2D-DIGE) が開発された [3]。この方法は二種類のタンパク質試料を異なる蛍光試薬であらかじめ標識してから混合し、一枚のゲルで泳動することで、二種類の試料内の相対的タンパク量を精密に比較できることが特長である。このアプローチにより、タンパク質の検出感度が上がり、ディファレンシャル解析が再現性よくできるようになった。この手法をアガロース 2-DE に応用することで、感度および再現性を飛躍的に向上させることが可能となった (アガロース 2D-DIGE)。我々はこれまでこのアガロース 2D-DIGE の手法を用いて、先端応用外科との共同研究として食道癌組織のプロテオーム解析を行った [4]。複数の食道癌症例の

癌部、非癌部で共通して発現の違いの見られるスポット74個の解析を行い、33種類のタンパク質を同定することが出来た[4]。その中で、195kDaのタンパク質periplakinが癌組織で発現が著明に低下していることを見出した。このような高分子量のタンパク質の同定は、従来の2-DEでは困難であると推測される。さらに、抗periplakin抗体を用いた免疫染色を食道正常粘膜、dysplasia、早期食道癌、進行食道癌で行ったところ、正常粘膜やdysplasiaでは細胞境界部が強く染まるのに対し、早期食道癌ではその染色部位が細胞質に移行し、最終的に進行食道癌ではほとんど染まらなくなるという非常に興味深い知見を得た[4](図2)。Periplakinは細胞膜の裏打ちタンパク質と言われており、食道癌が進行するにつれてこのタンパク質の発現が低下することは、periplakinが食道癌の進行、浸潤、転移などを抑制している可能性が示唆され、食道癌の新しい治療法として応用できるかもしれない。我々は、このアガロース2D-DIGEを用いて臓器制御外科学、腫瘍内科学と共同で膀胱癌、肝臓癌のプロテオーム解析を行っており、現在までに過去に報告のない新規タンパク質の同定に成功している(論文準備中)。以上のように、アガロース2-DE、アガロース2D-DIGEは

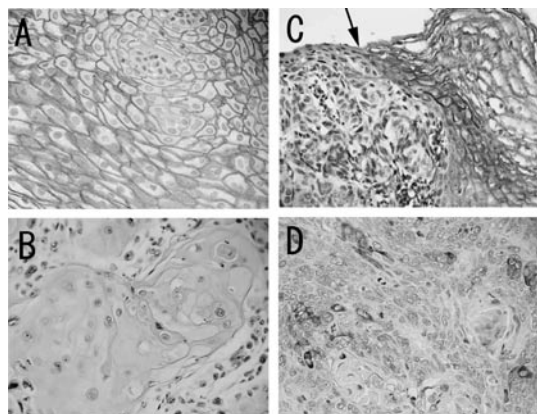


図2 食道癌組織の抗periplakin抗体を用いた免疫染色

食道癌組織の癌部非癌部を抗periplakin抗体を用いて免疫染色を行った。periplakinは非癌部では細胞の周囲に局在するのに対して(A)、癌部ではほとんど染色されない(B)か、または一部染色されるが、局在が細胞周囲ではなく細胞質である(D)。(C) periplakinの染色により、癌部非癌部の境界が明瞭に区別できる。

新規の腫瘍マーカーあるいは分子標的治療のターゲットとなるタンパク質を同定することが可能な強力な武器であると考えられる。癌部で発現増大しているタンパク質は、血清中にも存在している可能性もあるため、そのタンパク質に対する特異的抗体を用いたELISA法などの検出法の開発により、癌の早期診断や再発の予測に役立つと思われる。最近、2-DEを用いたプロテオーム解析により、肺腫瘍に特異的に発現しているタンパク質を同定し、そのタンパク質に対する特異的抗体をアイソトープでラベルすることにより、癌の局在診断と治療が同時に行えるとの報告も見られ[5]、プロテオーム解析の臨床応用の可能性が見え始めている。

(2) プロテインチップシステムによる新規腫瘍マーカーの探索

近年の質量分析計の急速な進歩に伴い、上記のようなゲルを用いた解析手法に頼らないプロテオーム解析が盛んになってきた。その一つが、表面増強レーザー脱離イオン化(SELDI)と飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を組み合わせたプロテインチップシステムTMであり、田中耕一氏が開発した手法を臨床応用に向けて改良した手法と言える。このシステムの特徴であるプロテインチップは、金属板の表面に様々な化学的(ケミカルチップ)、生物学的(バイオリジカルチップ)修飾を施したものであり、このチップに直接生体試料を添加した後、チップ表面に親和性のあるタンパク質のみを分離・捕捉し、選別されたタンパク質群を質量分析計で測定し、分子量と発現量の情報を得るものである。このシステムは、血清、尿などの生体試料に含まれる多数のタンパク質を複雑な前処理なしに直接検出できるところが画期的である。また、同一チップ上に異なる条件下の生体試料を添加できるので、ある病態下で発現が特異的に変化するタンパク質を健常時と比較解析することが可能である。上記で述べたように、2-DEでは分子量が20kDa以上の比較的大きなタンパク質の解析に適しているが、それに比較して、プロテインチップシステムは2-DEが苦手とする低分子量領域のペプチドの解析に威力を発揮する。これまで我々はこのプロテインチップシス



図3 プロテインチップシステムを用いた消化器癌患者血清の解析例

消化器癌患者3例の術前術後でのパターンを比較したところ、図の枠で囲ってあるピークが術後に比して、術前に高い傾向にあった。

テムを用いて、食道癌などの消化器癌のリスクを高めることが知られている習慣飲酒のマーカーの候補となるペプチドをいくつか見出し、そのうち3つのペプチドについて同定を行い報告した[6]。そのノウハウを生かして、我々は、食道癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌など種々の消化器癌の患者血清中に存在する新しい腫瘍マーカーの探索を行い、マーカー候補となる複数のペプチドの同定に成功している(図3)(論文準備中)。また、患者検体と正常検体で明らかに違いの見られる単一のピークが見つからない場合でも、複数のピークのパターンの違いを専用の解析ソフトウェア(サイファーゼン・バイオシステムズ社: Biomarker Pattern Software)を用いて多変量解析を行い、そのプロファイルの違いによる癌の早期診断が可能であることを見出している(論文準備中)。最近、卵巣癌、前立腺癌などの種々の悪性腫瘍においても疾患特異的な血清タンパクプロファイルが報告されており[7]、この解析方法は今後広く臨床応用されると期待される。

2. 癌のhallmarkである染色体不安定性の分子機構の解析 —染色体分配制御機構の関与について—

以前より、癌や先天性疾患において染色体の数の異常、欠失、転座など広範囲にわたる染色体の構造異常が知られていたが、最近FISHの技術の進歩により、今まで知られている白血病だけでな

く、多くの固形腫瘍でも染色体数や広範囲な染色体構造異常が見い出された。これを称して染色体不安定性と呼ぶが、今ではそれが癌の代名詞にまでなっており、発癌の原因として重要であると考えられている。その染色体不安定性は、主に、細胞分裂時における姉妹染色体の均等分配を保証するメカニズムの破綻によって起こっていることが示唆され、染色体の安定性に、染色体均等分配制御機構が重要な役割を果たしていると考えられる[8]。近年、その染色体均等分配の制御には姉妹染色体対合、染色体凝縮、動原体、セントロソーム、微小管、細胞周期チェックポイント機構など多くの複雑なプロセスが関わっていることが明らかとなったが、その中でもセントロソームの機能に重要なSTK15/BTAK/auroraAやスピンドルチェックポイントタンパク質Mad2やBub1などの異常が染色体異数性をもたらす癌化を引き起こすことが最近報告された[9-11]。さらに最近では、癌抑制遺伝子として最もよく知られているものの一つAPCの遺伝子産物が動原体に局在し、その遺伝子の変異はAPCタンパク質の局在の異常をもたらす、染色体異数性を引き起こすという報告もなされ、癌化と染色体均等分配制御機構との関わりがますます重要視されてきた[12,13]。そこで我々は、この染色体分配制御機構の異常が染色体不安定性にどのように関与しているか解明することにより、癌の新しい分子標的治療のターゲットを発見することを目的とした。

(1) 動原体タンパク質の発現異常が染色体不安定性を誘発する。

染色体はM期中期に赤道面に並び、後期にいつせいに両極に引っ張られていく。それらの役割を担っているのが紡錘体微小管である。この紡錘体微小管が染色体のセントロメア領域に形成された動原体というタンパク質複合体に付着することにより、染色体が両極に引っ張られる。動原体は電子顕微鏡の観察から三層構造を形成することが分かり、セントロメアタンパク質(CENP)をはじめとする多数のタンパク質が集積している。これらのタンパク質に異常が起こると姉妹染色体が正常に分配されないことが最近の酵母の研究によって示され、このことから動原体が正常な染色体の

分配に必須であることが明らかになった。

我々はこれまで種々の癌手術標本の癌部、非癌部から抽出したタンパク質を用いて、上述した染色体均等分配の制御機構に関わる因子の発現を調べてきたが、その中で、動原体の核となるタンパク質CENP-AとCENP-Hが、解析した大腸癌組織すべてで発現増大していることを見出した[14,15](図4)。CENP-AやHはmRNAレベルでも増加していることからこれらの動原体タンパク質の発現増大は転写レベルで起こっていると考えられた。また、大腸癌組織をそれぞれのタンパク質の抗体（名古屋大学依田博士からの供与）を用いて免疫染色を行ったところ、大腸癌細胞の核では正常な大腸粘膜細胞に比べ、セントロメア独特のドット状シグナルが著明に増加していた(図5)。さらに、これらの動原体タンパク質の発現増大が、染色体不安定性の原因であるか調べるために、染色体が正常2倍体を示す大腸癌培養細胞HCT116にCENP-AやCENP-Hを強制発現させてFISHを用いて染色体数を調べたところ、CENP-AやCENP-Hの発現増大が見られた細胞は染色体異数性を示した(図6)。この染色体異数性の原因を調べるために、CENP-AやCENP-Hを強制発現させた細胞でのM期染色体上でのそれぞれの局在を調べたところ、CENP-Aは染色体全体にわたって存在していたのに対し、CENP-Hはセントロメアから消失した。これらの結果から、セントロメアタンパク質の発現増大はその局在の

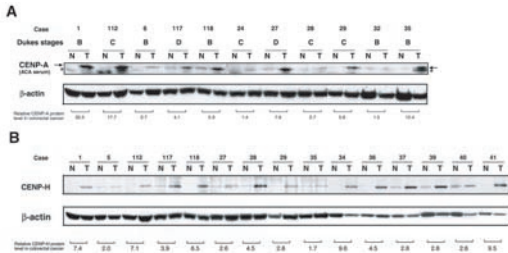


図4 大腸癌組織でのCENP-A, CENP-Hタンパク質の発現増大

大腸癌手術標本の癌部と非癌部からそれぞれタンパク質を抽出し、抗セントロメア抗体（ANA血清）および抗CENP-H抗体を用いてウエスタンブロットを行った。癌部非癌部におけるCENP-Aの発現(A)とCENP-Hの発現(B)を示す。CENP-A, CENP-H両者とも、ほとんどの症例で癌部での発現が高いことが分かる。

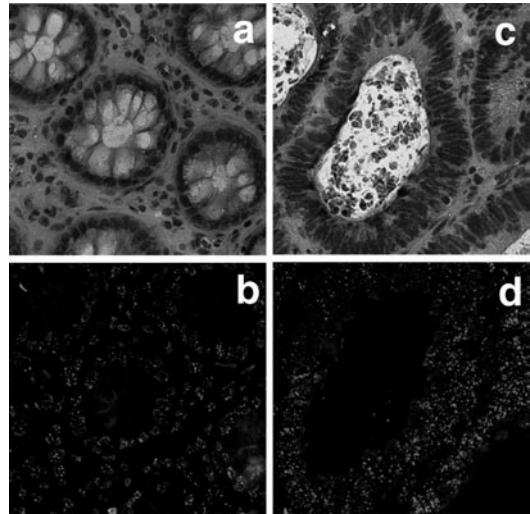


図5 大腸癌組織の抗CENP-A抗体を用いた免疫染色

大腸癌組織の癌部非癌部を抗CENP-A抗体を用いて免疫染色を行った。非癌部に比べて、癌部ではセントロメア独特のドット状シグナルが著明に増加していた。(a) (b) 非癌部, (c) (d) 癌部, (a) (c) HE染色, (b) (d) 抗CENP-A抗体を用いた免疫染色。

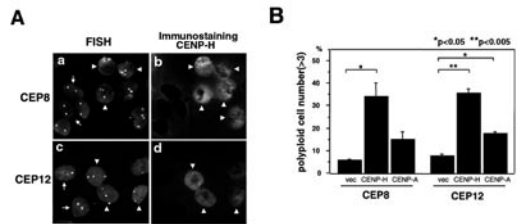


図6 CENP-A, CENP-Hの強制発現による染色体異数性の誘導

染色体が正常2倍体を示す大腸癌培養細胞HCT116にCENP-AやCENP-Hを強制発現させ、それらのタンパク質が強発現した細胞をそれぞれの抗体を用いた免疫染色で確認した。同時に、8, 12番染色体のセントロメアプローブを用いてFISHを行った。(A) CENP-Hが強発現している細胞では染色体異数性が認められる(矢頭)。一方、CENP-Hが強発現していない細胞では染色体は正常2倍体を示している(矢印)。(a) (c) FISH, (b) (d) 抗CENP-H抗体による免疫染色。(B) CENP-AやCENP-Hが強発現している細胞での染色体異数性を示す割合。CENP-Hの強制発現により、30%以上の細胞が染色体異数性を示した。一方、CENP-Aが強発現している細胞での染色体異数性の割合は10-20%にとどまった。

異常をもたらし、その結果、染色体異数性を引き起こすと考えられた。ヒトの癌組織で、染色体均等分配到直接関わっている動原体タンパク質が発現増大している報告は初めてであり、癌化のメカニズムを理解する上で重要な知見と思われる。以上の結果から、動原体タンパク質の発現異常が癌化の原因であることが示唆され、今後新しい分子標的治療のターゲットとなる可能性があると考えられた。

3. 習慣飲酒の発癌促進作用における個体差の原因の解明

長期にわたる習慣飲酒が、種々の臓器の発癌を促進させ得ることは疫学的に知られ、動物実験モデルにおいても確認されている。しかし、ヒトにおける飲酒の発癌促進作用は個体差が大きく、しかもその個体差を客観的に評価する手段は少ない。近年、アルコール代謝関連酵素群、特に *ALDH2*、*ADH* の遺伝的多型と飲酒による食道癌のリスクとの関連が指摘されており、われわれは効率的な遺伝子診断法の開発を行った[16,17]。しかし、それらの多型のみでは、例外も多数あり飲酒が発癌を促進しうるハイリスクグループを同定するためには、さらに多くの知見が必要と考えられる。

われわれは、*CYP2E1* 遺伝子の5'末端上流域に新たな反復配列多型を見出し[18]、この多型と食道癌、肺癌のリスクとの関連を明らかにした[19]。*CYP2E1* 遺伝子は翻訳領域が保存されているため[20]、*CYP2E1* の発現量の差は遺伝子調節領域の多型による可能性がある。そこで、反復配列多型と転写活性との関連を調べたところ HeLa 細胞において *CYP2E1*1D* (8 回繰り返し) は **1C* (6 回繰り返し) より転写活性が有意に高かった[21]。さらに、5'上流領域の欠失体を作製し転写活性を調べたところ、*CYP2E1* 遺伝子5'上流の反復配列多型を含む領域 (-2520~-1307) は転写を抑制的に調節することが示唆された。また、*CYP2E1*1D* は **1C* に比べ転写活性への抑制力が弱く、その結果 *CYP2E1*1D* の転写活性が高くなると推測された[22]。現在、関連する領域と転写制御因子の特定を行っている。

CYP2E1 遺伝子5'上流の反復配列多型と *CYP2E1* の酵素誘導と関連が証明できれば *CYP2E1* 活性の個体差を生じる原因の一つの解明となり、ひいては発癌とアルコール感受性の個体差の解明につながり、それらのリスクによる高危険群の設定を行うことができる。

4. 遺伝子検査室の充実と遺伝カウンセリング室の運営

あらゆる領域の疾患の遺伝的要因が日々明らかにされつつある現在、全ての診療科の日常診療が遺伝子・染色体を含む遺伝学的検査や遺伝医学と密接に関わってきている。その結果、個人の遺伝情報を扱う遺伝子検査を適切に実施できる体制を整えることが求められ、平成16年12月に制定された「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取り扱いのためのガイドライン」においても医療機関などが遺伝学的検査を行う場合には、遺伝カウンセリング体制を整備することが義務付けられている。このような流れの中で、千葉大学医学部附属病院においても、関連各科の話し合いの結果、2003年4月に遺伝カウンセリング室が遺伝子検査室とリンクさせて検査部内に立ち上がり、約2年が経過した。1) 遺伝病とその遺伝形式、発症リスクに関する説明、2) 最新の遺伝子検査関連情報の提供と検査の実施、3) 遺伝子検査前後の心理的・社会的サポートなど、学内の症例だけでなく104症例と徐々に軌道にのってきたため、病院のホームページに遺伝カウンセリング室の案内を掲載した結果、一般の方からの問い合わせも増えている。遺伝カウンセリングの対象領域はきわめて多岐にわたるため、神経内科、周産期母性科、小児科、泌尿器科、医療福祉部、薬剤部、耳鼻科、眼科などの関連領域の先生方との連携が重要と考えている。詳細については検査部遺伝カウンセリング室 (043-226-2325または内線6273) にお問い合わせください。

文 献

- 1) Oh-Ishi M, Satoh M, Maeda T. Preparative two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension for high molecular mass

- proteins. *Electrophoresis* 2000; 21: 1653-69.
- 2) Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Mseda T, Shimada H, Ochiai T, Nomura F. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2007-14.
 - 3) Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 18: 2071-7.
 - 4) Nishimori T, Tomonaga T, Matsushita K, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Nomura F, Matsubara H, Shimada H, Ochiai T. Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin. *Proteomics* in press.
 - 5) Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 2004; 429: 629-35.
 - 6) Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, Ohashi T, Nezu M, Sunaga M, Kondo N, Iyo M, Shimada H, Ochiai T. Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4: 1187-94.
 - 7) Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-7.
 - 8) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
 - 9) Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998; 20: 189-93.
 - 10) Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 1998; 17: 3052-65.
 - 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* 1998; 392: 300-3.
 - 12) Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 429-32.
 - 13) Green RA, Kaplan KB. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 2003; 163: 949-61.
 - 14) Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3511-6.
 - 15) Tomonaga T, Matsushita K, Ishibashi M, Nezu M, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. Centromere protein H is upregulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. *Cancer Res*, 2005; 65: 4683-9.
 - 16) Nomura F, Itoga S, Tamura M, Harada S, Iizuka Y, Nakai T. Biological markers of alcoholism with respect to genotypes of low-km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in Japanese subjects. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 30S-33S.
 - 17) Itoga S, Nanmoku T, Uchimoto T, Sunaga M, Nezu M, Tomonaga T, Harada S, Nomura F. Comparative analyses of four different methods of genotyping *ALDH2*. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 117S-122S.
 - 18) Itoga S, Harada S, Nomura F. Polymorphism of the 5'-flanking region of the *CYP2E1* gene: an association study with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 11S-15S.
 - 19) Itoga S, Nomura F, Makino Y, Tomonaga T, Shimada H, Ochiai T, Iizasa T, Baba M, Fujisawa T, Harada S. Tandem repeat polymorphism of the *CYP2E1* gene: an association study with esophageal cancer and lung cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 15S-19S.
 - 20) Itoga S, Nomura F, Harada S, Tsutsumi M, Takase S, Nakai T. Mutations in the exon and exon-intron junction regions of human cytochrome P-450 2E1 gene and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 13S-16S.
 - 21) Nomura F, Itoga S, Uchimoto T, Tomonaga T, Nezu M, Shimada H, Ochiai T. Transcriptional activity of the tandem repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the human *CYP2E1* gene. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 42S-46S.
 - 22) Uchimoto T, Itoga S, Nezu M, et al: Role of the genetic polymorphisms in the 5'-flanking region for transcriptional regulation region of the human *CYP2E1* gene. *Alcohol Clin Exp Res* in press.