

The 23rd Lung Cancer Workshop

Combined transcriptome approach による肺癌転移関連遺伝子
発現パターンと転移関連遺伝子の同定柳澤 聖^{1,2}・富田秀太¹・高橋 隆¹Identification of Lung Cancer Metastasis Related Gene Expression Profile
Using Combined Transcriptome AnalysisKiyoshi Yanagisawa^{1,2}; Shuta Tomida¹; Takashi Takahashi¹¹Division of Molecular Carcinogenesis, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan; ²Institute for Advanced Research, Nagoya University, Japan.

ABSTRACT — While widespread metastasis is the major cause of human lung cancer-related deaths, its underlying mechanism remains largely unclear. Our genome-wide comparison of the expression profiles of a highly metastatic lung cancer cell line, NCI-H460-LNM35 (LNM35), and its parental clone NCI-H460-N15 (N15), resulted in the identification of a cancer metastasis signature composed of 45 genes. Through gene ontology analysis, our study also provided insights into how this 45-gene metastasis signature may contribute to the acquisition of metastatic potential. Furthermore, we were able to show that enforced expression of the DLX4 homeobox gene, which was identified as a gene with significant down-regulation in LNM35 as well as with significant association with favorable prognosis for lung cancer patients, markedly inhibited *in vitro* motility and invasion as well as *in vivo* metastasis via both hematogenous and lymphogenous routes. We further identified a novel gene, uncharacterized gene, which is associated with lung cancer metastasis. We confirmed upregulation of its gene expression in a significant fraction of human lung adenocarcinomas cases as well as lung cancer cell lines. Taken together, these findings indicate that our combined transcriptome analysis is an efficient approach to searching for genes possessing both clinical usefulness in terms of prognostic prediction in human cancer cases and clear functional relevance for studying cancer biology in relation to metastasis.

(JLCC. 2009;49:902-909)

KEY WORDS — Lung cancer, Metastasis, Expression profile, Microarray, Gene ontology

Reprints: Kiyoshi Yanagisawa, Institute for Advanced Research, Nagoya University, Furouchou, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan (e-mail: kyana@med.nagoya-u.ac.jp).

要旨 — 遠隔転移は、癌関連死の主要因であるにもかかわらず、その分子機構については、依然として不明な点が多く、詳細な機構をさらに明らかにする必要がある。我々は、高転移性肺癌細胞株である NCI-H460-LNM35 とその親株由来低転移性肺癌細胞株 NCI-H460-N15 を用いたゲノムワイド遺伝子発現プロファイル解析を行い、45 種類の遺伝子で構成される肺癌転移関連遺伝子発現パターンの同定に至った。さらに我々は、これら 45 遺伝子に対してジーンオンロジー解析を施行し、肺癌がどのような機構で転移能を獲得するのかに関する検討を加えた。また、肺癌転移関連遺伝子群の中で肺癌術後予後と関連の深い遺伝子群の同定を進めることにより、ホメ

オボックス遺伝子である DLX4 の同定に至っている。DLX4 の発現は、高転移性肺癌細胞株である NCI-H460-LNM35 細胞において低下が認められ、また、低発現症例では、術後予後の短縮と深く関連することが確認されている。さらに、NCI-H460-LNM35 を用いて、DLX4 の安定発現細胞株を作成し、その機能解析を進めたところ、*in vitro* の細胞運動能・浸潤能のみならず、*in vivo* の血行性・リンパ行性転移をも抑制することが確認された。最後に、これまで機能解析のなされていない肺癌転移関連遺伝子の探索を行うことにより、新規肺癌転移関連遺伝子を同定し、肺癌組織におけるその発現増強を明らかとした。我々の進める combined transcriptome approach

¹名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター分子腫瘍学分野；²名古屋大学高等研究院。

別刷請求先：柳澤 聖，名古屋大学高等研究院，〒464-8601 名古屋市中種区不老町 (e-mail: kyana@med.nagoya-u.ac.jp)。

は、非常に有効な解析法であり、肺癌術後予後予測を可能とするなど、臨床的に有用性の高い遺伝子群の抽出のみならず、肺癌転移の分子機構解明へ大きく貢献すること

とが示唆された。

索引用語——肺癌、転移、発現プロファイル、マイクロアレイ、ジーンオントロジー

目的

癌は、遺伝子と環境因子が複雑に絡んだ多因子疾患であり、その発症メカニズムの複雑さゆえに、外科療法・化学療法・放射線療法・免疫療法などの種々の治療法が導入される現在においても、その治療成績は満足のいくものではなく、完全治癒が期待される根治切除術が施行された症例においても、半数以上において転移・再発を認め、最終的には死に至ることとなる。このような癌の治療を妨げる最大の原因が遠隔臓器への転移であり、その機構は、多くの分子異常に基づいた癌細胞の運動能・浸潤能・接着能などの亢進によるものと考えられている。¹ これまでにも、肺癌の分子病態に対する多くの研究成果により、肺癌発症・進展の分子機構は次第に明らかとされつつあるが、² 依然として、肺癌は日本を含めた先進諸国において癌死亡原因の第一位を占めており³ 転移を含めた発症・進展の分子メカニズムの全体像は、未だ、ほとんど解明されていないのが現状である。本研究では、肺癌転移の分子メカニズムの詳細を解明し、その機構に基づいた早期診断法・効率的治療法の開発基盤構築を行うため、我々が樹立した高転移性肺癌細胞株 NCI-H460-LNM35 (以降 LNM35)⁴ と低転移性亜株 NCI-H460-N15 (以降 N15)⁴ を用いたマイクロアレイ解析を推進し、肺癌転移関連遺伝子群を網羅的に探索・同定することを目的としている。

研究方法

細胞株と実験動物

高転移性ヒト肺癌細胞株である LNM35 細胞と低転移性亜株である N15 細胞の樹立は既報のごとくである。⁴ これらは、10% ウシ血清添加 RPMI 1640 メディウム中で培養を行った。5 週齢の SCID マウス (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) は無菌飼育器にて飼育を行った。

マイクロアレイ解析とデータ解析

既報の方法に従って、⁵ Gene Filter マイクロアレイ (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、LNM35 株と N15 株との間で網羅的遺伝子発現解析を行った。取得データは、発現強度が 0.1 未満の遺伝子は、以降の解析から除外している。さらに、各実験間のデータ補正を R package 中 loess non-linear normalization 法 (<http://www.R-project.org>)⁶ を用いて行っている。LNM35 と

N15 細胞間における遺伝子発現差が、全体平均の 2.0 SD 以上あるものを転移関連遺伝子として、以降の解析に用いた。

階層的クラスタ解析と肺癌術後予後統計解析

ヒト肺癌 50 症例における、肺癌転移関連 45 遺伝子に関する発現データは、Gene expression omnibus (GEO) 登録 GSE4705, GSE4716 から取得した。⁵ 症例と遺伝子発現パターンを用いた階層的クラスタ解析には、The CLUSTER プログラム⁷ を用い、その結果は TREEVIEW プログラム⁷ により描出した。統計解析は、Stata software (version 7; Stata Corp., College Station, TX) を用いた。

バイオインフォマティクス解析

ジーンオントロジー (gene ontology; GO)⁸ 解析は機能的に分類された遺伝子セットを解析単位として、疾患関連パスウェイの抽出を行うもので、肺癌転移に関連の深い遺伝子群の特定を目的に、既報のごとくに⁹ 解析を行った。

肺癌術後予後関連遺伝子の同定を目的として、Permutation t-test 解析を施行した。ランダムな症例の入れ替えによる再解析を計 1000 回行った。

DLX4 遺伝子発現ベクターの作成とウェスタンブロット解析

全長の DLX4 遺伝子を有する IMAGE クローン (clone ID 3907376, Invitrogen) から、SmaI 制限酵素を用いて DLX4 DNA 断片を切り出し、pcDNA3 の EcoRV 制限酵素サイトに挿入し、DLX4 発現ベクターを作成した。DLX4 安定発現 LNM35 細胞 (LNM35-DLX4, clones 17 and 19) は、2 μg の pcDNA3-DLX4 を FuGENE 6 試薬 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用いて導入することにより得た。ウェスタンブロット解析は抗 DLX4 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を用いて行った。

in vitro 細胞運動能・浸潤能解析と、in vivo 転移解析

in vitro 細胞運動能・浸潤能解析には、8-micrometer ポアを有する 6.4 mm 径膜トランスウェルチャンバーステム (BD Biosciences, Bedford, MA) を用いた。浸潤能解析では、チャンバ膜を 0.1 ml の 0.1 mg/ml マトリジェル (Collaborative Research Inc., Bedford, MA) によりコートしている。in vivo 転移解析では、 1.0×10^7 細胞を 0.1 ml の無血清培養液に懸濁し 6 週齢 SCID

Table 1. Genes Differently Expressed in LNM35 vs. N15

Rank	UniGene cluster	Gene symbol	Description	Ratio
<i>Genes up-regulated in LNM35</i>				
1	Hs. 789	CXCL1	CXCL1: Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	17.4
2	Hs. 509585		Transcribed sequences	9.2
3	Hs. 193235	CPLX2	Complexin 2	8.6
4	Hs. 518464	PSMD2	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	6.2
5	Hs. 478481	ALG3	Asparagine-linked glycosylation 3 homolog (yeast, alpha-1, 3-mannosyltransferase)	6.1
6	Hs. 503749	H2-ALPHA	Alpha-tubulin isotype H2-alpha	5.9
7	Hs. 533059	TUBB	Tubulin, beta	5.5
8	Hs. 522584	TMSB4X	Thymosin, beta 4, X-linked	4.7
9	Hs. 74368	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	4.2
10	Hs. 234074	DNER	Delta-notch-like EGF repeat-containing transmembrane	3.9
11	Hs. 509736	HSPCB	Heat shock 90kD protein 1, beta	3.7
12	Hs. 533273	UBE1	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)	3.1
13	Hs. 196176	ECH1	Enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	3.0
14	Hs. 14074	MRPS22	Mitochondrial ribosomal protein S22	2.9
15	Hs. 75318	TUBA1	Tubulin, alpha 1 (testis specific)	2.8
16	Hs. 349695	TUBA2	Tubulin, alpha 2	2.8
17	Hs. 77269	GNAI2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	2.7
18	Hs. 76095	IER3	Immediate early response 3	2.7
19	Hs. 516539	HNRPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2.5
20	Hs. 350966	PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1	2.5
21	Hs. 82890	DAD1	Defender against cell death 1	2.5
22	Hs. 155218	HNRPUL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	2.4
23	Hs. 499709	SLC16A9	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 9	2.3
24	Hs. 444986	METAP2	Methionyl aminopeptidase 2	2.3
25	Hs. 105465	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	2.3
26	Hs. 519880	TFAP2A	Transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	2.3
27	Hs. 125898	GNAS	Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating activity polypeptide complex locus	2.3
<i>Genes down-regulated in LNM35</i>				
28	Hs. 150580	SUI1	Suppressor of initiator codon mutations	0.5
29	Hs. 503787	DARS	Aspartyl-tRNA synthetase	0.5
30	Hs. 406013	KRT18	Keratin 18	0.5
31	Hs. 461086	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.4
32	Hs. 390738	FLJ20366	Hypothetical protein FLJ20366	0.4
33	Hs. 524430	NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0.4
34	Hs. 172648	DLX4	Distal-less homeobox 4	0.4
35	Hs. 511915	ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	0.4
36	Hs. 348883	FOXC1	Forkhead box C1	0.4
37	Hs. 418123	CTSL	Cathepsin L-like 3	0.3
38	Hs. 534360	TRIP6	Thyroid hormone receptor interactor 6	0.3
39	Hs. 28988	GLRX	Glutaredoxin (thioltransferase)	0.3
40	Hs. 531081	LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	0.3
41	Hs. 433732	CLK1	CDC-like kinase 1	0.3
42	Hs. 28491	SAT	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	0.2
43	Hs. 531176	SARS	Seryl-tRNA synthetase	0.2
44	Hs. 404321	GARS	Glycyl-tRNA synthetase	0.2
45	Hs. 497599	WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	0.1

マウスの単徑部に皮下移植し、40日後に原発腫瘍・腹腔内リンパ節転移・肺転移解析に対して評価を行った。

結 果

肺癌転移関連遺伝子の同定

マイクロアレイ解析により、高転移性肺癌細胞株であ

Table 2. Gene Ontology (GO) Terms Significantly Related to the Metastasis Signature

GO aspect	GO term	GO accession	P
Biological processes	microtubule polymerization	GO:0046785	<0.0001
	microtubule-based movement	GO:0007018	<0.0001
	protein biosynthesis	GO:0006412	0.0020
	morphogenesis	GO:0009653	0.0029
Molecular functions	GTPase activity	GO:0003924	<0.0001
	ligase activity	GO:0016874	0.0012
	GTP binding	GO:0005525	0.0015
Cellular component	tubulin	GO:0045298	<0.0001

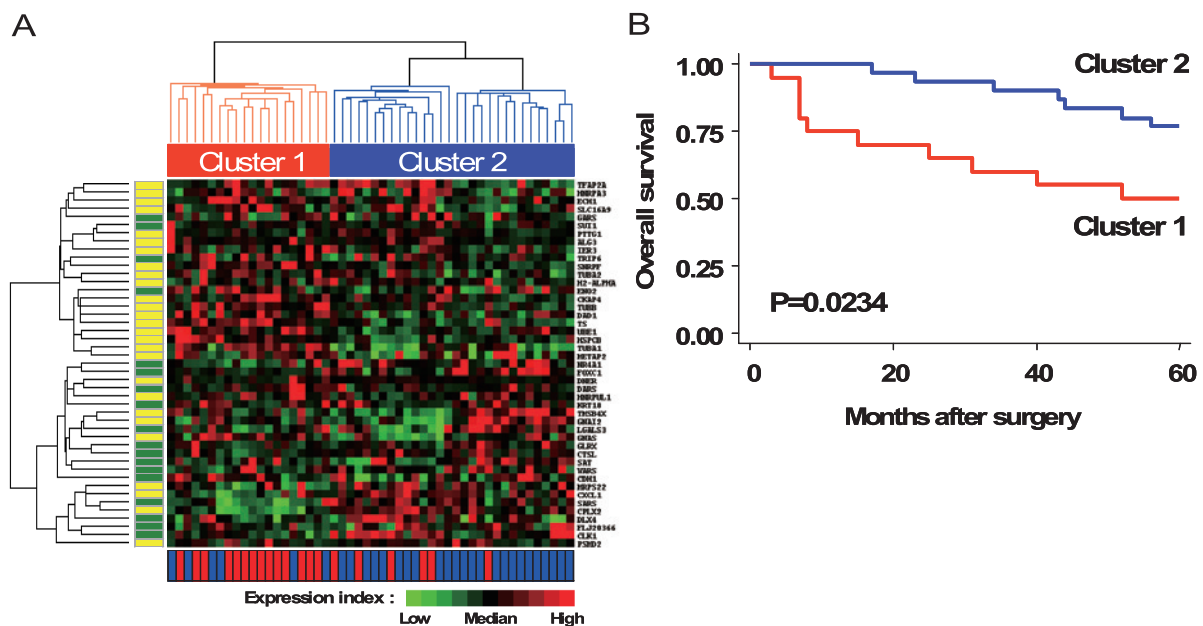


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves based on favorable/unfavorable categorization of hierarchical clustering analysis using the 45-gene metastasis signature. (A) Analysis of the dataset comprising 50 non-small cell lung cancer (NSCLC) cases, showing clear distinctions between the two resulting clusters. Columns represent individual patients and rows represent genes constituting the 45-gene metastasis signature. Yellow and green boxes on the left indicate, respectively, up-regulated and down-regulated expression in LNM35 in comparison with N15. Boxes below indicate the results of prognosis prediction (red for fatal and blue for favorable) using our previous 25-gene prognosis classifier for NSCLC constructed with the Aichi dataset. (B) Kaplan-Meier survival curves of cluster 1 and cluster 2 for 50 NSCLC cases.

Table 3. Multivariate Cox Regression Analysis of Potential Prognostic Factors for Survival 5 Years After Surgery

Variables	Unfavorable/Favorable	Hazard Ratio	95% CI *	P
Age	>63/=63	1.21	0.43-3.38	0.72
Sex	Male/Female	4.64	0.56-38.6	0.16
Smoking	Current & Former/Never	0.49	0.07-3.44	0.47
Stage	II-III/I	2.15	1.16-3.98	0.014
Histology	Squamous/Non-squamous	0.89	0.27-2.98	0.86
Metastasis signature	Cluster 1/Cluster 2	3.12	1.06-9.17	0.039

* Confidence interval.

る LNM35 細胞と低転移性肺癌亜株である N15 細胞との間に、有意な発現差を認める 45 遺伝子を同定した。それらは、LNM35 が高転移性を獲得する過程において発

現の変化を認めた遺伝子と考えられ、それらのうち、27 遺伝子は、LNM35 細胞において高発現を認め、残り 18 遺伝子は、低発現を認めた (Table 1)。LNM35 細胞において高発現を認めた 27 遺伝子には、転移に深く関連することが既に報告されている様々な遺伝子が含まれており、それらには、chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1),^{10,11} pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1),^{12,13} immediate early response 3 (IER3),^{14,15} defender against cell death 1 (DAD1),¹⁵⁻¹⁷ methionyl aminopeptidase 2 (METAP2)^{18,19} などが含まれる。LNM35 細胞において低発現を認めた 18 遺伝子にも、cadherin 1 (E-cadherin),²⁰ lectin galactoside-binding soluble 3 (galectin 3)²¹ など、転移・浸潤に関連の深い遺伝子が含まれていた。

Table 4. *In Silico* Screening by Permutation t-test

Gene symbol	<i>P</i> for permutation t-test
<i>Genes up-regulated in favorable samples</i>	
DLX4	0.0234
<i>Genes up-regulated in unfavorable samples</i>	
CKAP4	0.0281
DAD1	0.0136
DNER	0.0420
TYMS	0.0152

TYMS, thymidylate synthetase.

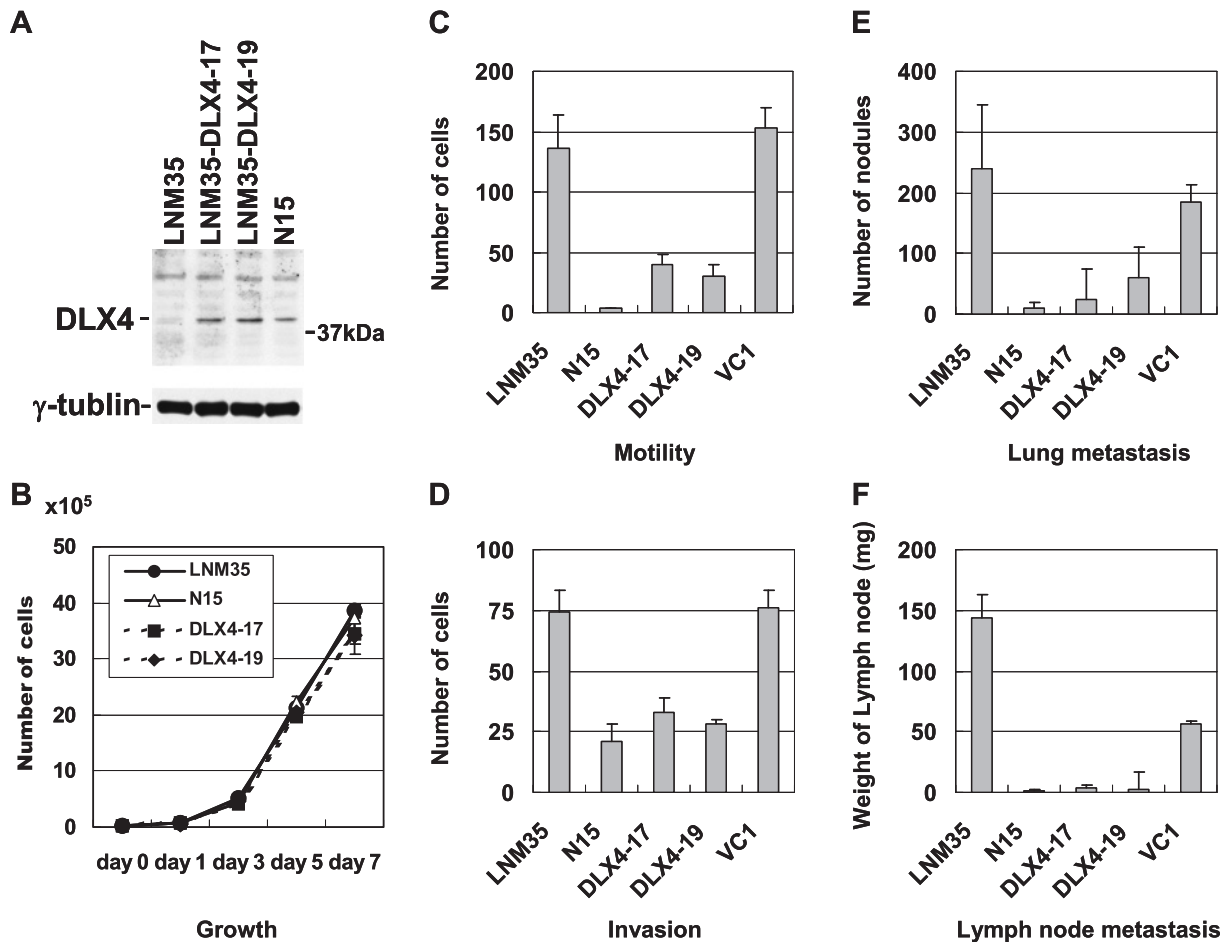


Figure 2. Introduction of DLX4 into the highly metastatic LNM35 cells, showing inhibition of the invasive and metastatic phenotype. (A) DLX4 protein expression in LNM35, DLX4-transfected LNM35 clones 17 and 18 as well as in the low-metastatic N15, a parental clone of LNM35. (B) Comparison of *in vitro* growth characteristics. (C, D) Comparison of *in vitro* motility and invasion. Marked reduction is evident in DLX4-transfected clones 17 and 18, but not in vector control (VC1), to levels comparable with those for N15. Significant reduction of *in vivo* metastasis via both hematogenous (E) and lymphogenous (F) routes with DLX4-transfected LNM35 clones 17 and 18.

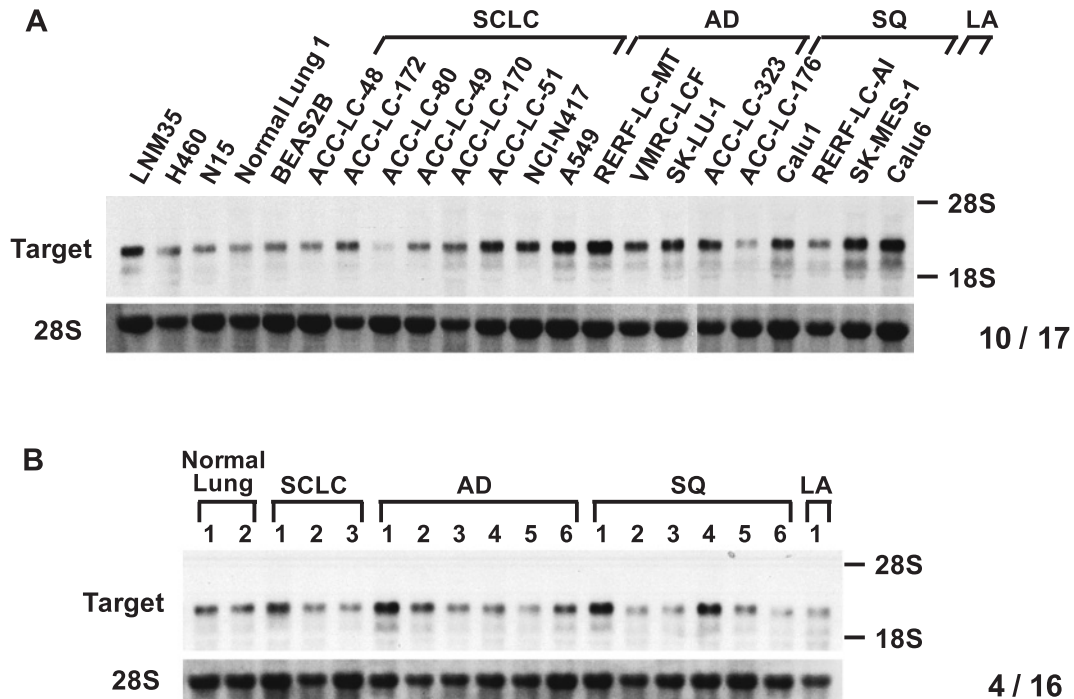


Figure 3. Significant up-regulation of novel lung cancer metastasis related gene in the highly metastatic LNM35 subline as well as in primary lung cancers. (A) Significantly more abundant CIM expression in highly metastatic LNM35 in comparison with that in its representative parental clone, N15. (B) Increased expression of novel lung cancer metastasis related gene in primary lung cancers *in vivo*. SCLC, small cell lung cancer; AD, adenocarcinomas; SQ, squamous cell carcinoma; LA, large cell carcinoma.

GO 解析による肺癌転移関連遺伝子群の特徴抽出

同定した肺癌転移関連 45 遺伝子が、どのように LNM35 細胞の高転移能獲得に寄与しているのか、機能的特徴抽出を行う目的で、ジーンオントロジー (GO) 解析⁹を施行したところ、5つの生物学的活性、3つの分子生物学的機能、3つの細胞構成因子に関連する GO 分類が、有意に ($P < 0.005$) 肺癌転移関連遺伝子群に高頻度に認められることが明らかとなった (Table 2)。これらの GO 分類は、微小管関連生物学的活性 (重合; $P < 0.0001$, 運動; $P < 0.0001$)、GTP 関連分子機能 (GTPase 活性; $P < 0.0001$, GTP 結合; $P = 0.0015$)、器官形成関連 ($P = 0.0029$) などを含み、これらの機構が、LNM35 細胞の転移能獲得に重要な働きを有していることを示唆するものと考えられる。

肺癌転移関連遺伝子群の発現パターンを用いた、肺癌術後予後の予測

次に、同定した肺癌転移関連 45 遺伝子が、肺癌の臨床病態と関連するか否かに関する検討を進めた。50 例の非小細胞肺癌手術患者遺伝子発現データベース⁵を基盤情報として、肺癌転移関連 45 遺伝子発現パターンを用いた unsupervised hierarchical cluster 解析を施行したところ、これらの症例が 2 群 (Cluster 1, 2) に判別されるこ

とが明らかとなり (Figure 1A)、さらなる検討により、Cluster 1 に属する症例は、有意に予後不良であることが明らかとなった (Figure 1B; $P = 0.0234$, log-rank test)。多変量解析を行った結果、肺癌転移関連 45 遺伝子は、臨床病期などと独立した予後因子であることが明らかとなった (Table 3)。以上から、LNM35 細胞から抽出された、肺癌転移関連 45 遺伝子は、肺癌組織における転移能とも深く関与することが示唆された。

DLX4 遺伝子の同定とその機能解析

in vitro 実験系と *in vivo* 臨床検体から取得された遺伝子発現情報に対する combined transcriptome 解析は、ヒト肺癌の臨床的並びに機能的に有意性の高い遺伝子群を同定することを目的としている。そこで、我々は、permutation t-test 解析を施行し、distal-less homeobox 4 (DLX4) が最も肺癌術後予後と関連が深いことを明らかとした ($P = 0.0234$, Table 4)。まず、LNM35, N15 細胞における DLX4 の発現をウェスタンブロット法により検討したところ、LNM35 細胞において DLX4 遺伝子産物の低発現が確認された (Figure 2A)。続いて、DLX4 遺伝子を安定的に発現する LNM35-DLX4 細胞株を樹立し (DLX4-17, DLX4-19)、種々の解析を施行した。これらの細胞株の増殖速度は、親株である LNM35 細胞、ある

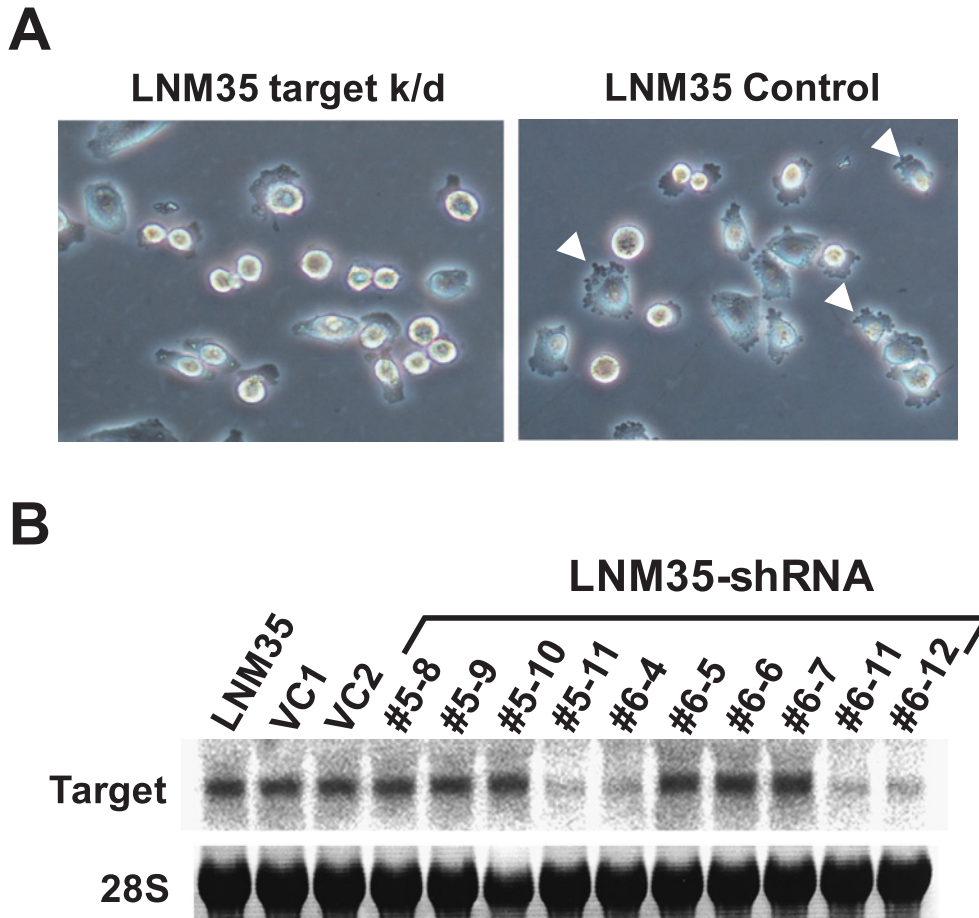


Figure 4. Introduction of lung cancer metastasis related gene-specific shRNA into the highly metastatic LNM35 cells, showing inhibition of the formation of filopodia and cell migration *in vitro* invasive and metastatic phenotype. **(A)** Marked reduction in formation of filopodia is evident in target gene-specific shRNA-transfected LNM35 clones, in comparison with those for vector controls. Multiple red arrowheads indicating filopodia were observed in LNM35 control cells. **(B)** Significant reduction of target gene expression in specific shRNA-transfected LNM35 clones #5-11, #6-4, -11 and -12, in comparison with those for vector controls (VC1 and VC2).

いは低転移性細胞株である N15 細胞と比較して、有意な変化を認めなかったが(Figure 2B), 細胞運動能・浸潤能に関して有意に低下していることが明らかとなった(Figure 2C, 2D). さらに、DLX4 遺伝子の導入により、LNM35 細胞の *in vivo* における血行性並びにリンパ行性転移が著明に抑制されることが明らかとなった(Figure 2E, 2F).

新規肺癌転移関連遺伝子の同定と機能解析

マイクロアレイによる、高転移癌細胞株 LNM35 と低転移癌細胞株 N15 を用いた遺伝子発現解析をさらに進めることにより、これまでに機能の明らかとなっていない遺伝子が肺癌転移に関連する可能性が示唆された。そこで、まず、肺癌細胞株においてこの新規肺癌転移関連遺伝子の発現をノザンプロット法により検討した結果、ヒト肺腺癌細胞株を中心に約 50% の頻度で発現増強が

認められ、さらには、肺癌手術検体における解析の結果、約 30% において発現増加が認められた(Figure 3A, 3B). この新規肺癌転移関連遺伝子産物は、細胞内局在予測プログラムにより、小胞体への局在が示唆されたため、発現ベクターを作成し、BEAS2B 細胞に外来性に発現させ、検討を加えたところ、その細胞内局在が小胞体であることが確認された(data not shown).

さらなる機能解析を行うため、新規肺癌転移関連遺伝子に対する shRNAi を安定的に発現する LNM35-shRNA 細胞株(#5-11, #6-4, #6-11, #6-12)を樹立し(Figure 4B), *in vitro* における検討を加えたところ、ノックダウン細胞において糸状仮足形成の抑制が観察され(Figure 4A), さらには運動能の低下を示すことが明らかとなった。

結 語

本研究では、癌転移制御の分子機構の詳細を明らかにするべく、肺癌細胞の運動能・転移能に関する解析を、*in vitro*あるいは小動物実験系において再現性よくかつ効率的に遂行することが可能な独自の実験系（高転移性肺癌細胞株 NCI-H460-LNM35、低転移性亜株 NCI-H460-N15）を用いることにより遂行し、肺癌転移に重要な役割を担う遺伝子群の同定に成功した。これらの遺伝子群を対象としたジーンオンロジー解析からは、微小管関連分子、GTPase 関連分子、器官形成関連分子が、肺癌転移の分子機構において重要な役割を担うことが示唆された。さらに、肺癌細胞転移に関連し、なおかつ肺癌術後予後に関連の深い DLX4 と新規遺伝子を同定し、それらの機能解析を進めた結果、これらの遺伝子産物が、肺癌細胞の *in vitro* 運動能・浸潤能に深く関与するのみならず、*in vivo* における血行性・リンパ節行性転移能にも深く関与することを見出した。以上より、我々が同定した肺癌転移関連遺伝子群は、転移能獲得における重要な役割を担っており、将来的にさらなる詳細な機能解析が進むことにより、難治癌である肺癌の実地臨床におけるブレイクスルーがもたらされるものと期待される。

REFERENCES

- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:453-458.
- Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*. 2002;21:7421-7434.
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10-30.
- Kozaki K, Miyaishi O, Tsukamoto T, Tatematsu Y, Hida T, Takahashi T, et al. Establishment and characterization of a human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 with consistent lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. *Cancer Res*. 2000;60:2535-2540.
- Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, Harano T, Ogura N, Mitsudomi T, et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene*. 2004;23:5360-5370.
- Gentleman RC, Lawless JF, Lindsey JC, Yan P. Multi-state Markov models for analysing incomplete disease history data with illustrations for HIV disease. *Stat Med*. 1994;13:805-821.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25:25-29.
- Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, et al. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol*. 2006;24:1679-1688.
- Bobrovnikova-Marjon EV, Marjon PL, Barbash O, Vander Jagt DL, Abcouwer SF. Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *Cancer Res*. 2004;64:4858-4869.
- Gallagher PG, Bao Y, Prorock A, Zigrino P, Nischt R, Politi V, et al. Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer Res*. 2005;65:4134-4146.
- Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet*. 2000;355:716-719.
- Bernal JA, Luna R, Espina A, Lázaro I, Ramos-Morales F, Romero F, et al. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet*. 2002;32:306-311.
- Nicholson BE, Frierson HF, Conaway MR, Seraj JM, Harding MA, Hampton GM, et al. Profiling the evolution of human metastatic bladder cancer. *Cancer Res*. 2004;64:7813-7821.
- Goswami S, Wang W, Wyckoff JB, Condeelis JS. Breast cancer cells isolated by chemotaxis from primary tumors show increased survival and resistance to chemotherapy. *Cancer Res*. 2004;64:7664-7667.
- Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, et al. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene*. 2006;25:130-138.
- Ayala GE, Dai H, Ittmann M, Li R, Powell M, Frolov A, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res*. 2004;64:6082-6090.
- Morowitz MJ, Barr R, Wang Q, King R, Rhodin N, Pawel B, et al. Methionine aminopeptidase 2 inhibition is an effective treatment strategy for neuroblastoma in preclinical models. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2680-2685.
- Dasgupta B, Yi Y, Hegedus B, Weber JD, Gutmann DH. Cerebrospinal fluid proteomic analysis reveals dysregulation of methionine aminopeptidase-2 expression in human and mouse neurofibromatosis 1-associated glioma. *Cancer Res*. 2005;65:9843-9850.
- Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:118-132.
- Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:29-41.