

# ヒトゲノム構造解析ツールとしての高密度ゲノムDNAマイクロアレイの開発と応用

●井本逸勢 ◆稲澤讓治

東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門分子細胞遺伝

## ＜研究の目的と進め方＞

ヒトゲノム解析研究はシーケンスがほぼ完了し、3-4万と予測されるヒト遺伝子もそのほとんどが発現プロファイルなどの情報と共にデータベース上で公開されるようになった現在の充実したゲノム環境下では、微細なレベルでの疾患遺伝子座の発見は疾患遺伝子の同定そのものであると言える。疾患の遺伝的要因を探索するための候補領域を決定する方法としては、単一遺伝子疾患であれば家族内集積例を用いたリンケージ解析が、また生活習慣病などの多因子疾患においては罹患者対法や伝達不均衡テストなどが用いられる。しかし、多因子疾患の場合、たとえ候補領域が決定されても、明らかな候補遺伝子がある領域内に存在するわずかな例を除いて疾患関連遺伝子が実際に同定された例は稀である。ヒト疾患における遺伝的要因、特にゲノムの一次構造の多様性や変異をhigh-throughputに検出できるツールを開発することは、このような多因子疾患の病因解明に有用であるのみならず、隣接遺伝子症候群などの先天異常や癌など同一病型であっても複雑な表現系を示すような疾患における病因・病態を分子レベルで明らかにしていく上で必須である。

DNAマイクロアレイ技術は、high-throughputな遺伝子やSNPの解析法のプラットフォームとして開発・改良されてきたが、これまで存在しなかったゲノムDNAの一次構造の変化を全ゲノムを俯瞰する形で、数10kb-数Mbの解像度で網羅的・体系的に検出し得るアレイCGH法のためのプラットフォームとしても有用であると考えられる(図1, 表1)。これまで用いられてきたcDNAアレイの転用は、感度が不十分で解析に耐えないのみならず、ゲノムの大半を占めるタンパク非コード領域の情報を得ることができないことから、今後、診断などへの応用や一次構造異常以外のエピジェネティックな解析を行う上で、専用のゲノムDNAアレイの作製は必要不可欠である。

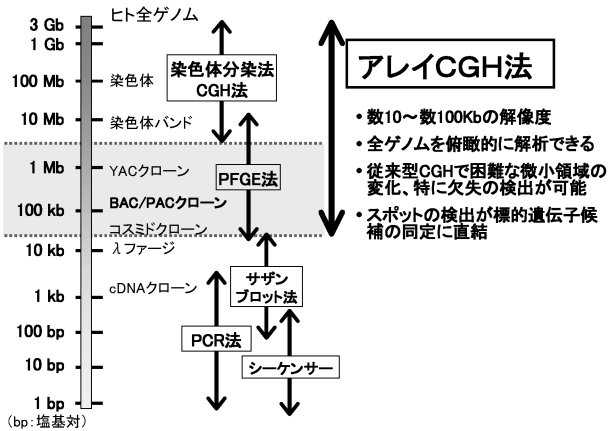


図1：各種ゲノム解析法の解像度とアレイCGH法の特徴

今回の研究では、ゲノム一次構造の多様性や変異をゲノムワイドに網羅的かつ高精度に把握できるツールの作製を目的として、(1)利用可能になった豊富なゲノムDNAク

ローンを材料にゲノムDNA断片をアレイ化した高密度かつ高感度のゲノムアレイ技術の開発と実際に使用できるゲノムアレイの作製、(2)これらアレイを用いて高精度の解析の行えるアレイCGH解析技術の開発ならびにその他の応用法の開発、さらに(3)これらを用いたサンプルの解析によるパフォーマンスの検定、一次構造異常等の情報収集、疾患関連遺伝子の同定を試みる。

	従来型CGH法	アレイCGH法
ハイブリダイゼーションの自動化	困難	可能
シグナルの解析	自動化は可能だが、throughputは低い	高速自動化が可能
分解能	2(増幅) - 10(欠失) Mb	数10 kb - 200 kb (BACアレイの場合)
ホモ欠失の検出	不可能	範囲が分解能以上であれば可能
定量性	低い (周囲の異常の範囲と程度に影響を受ける)	高い (各スポットごとに数値化が可能)
異常範囲の限局化	困難 (FISH法など他の方法による追加解析が必要)	容易
標的遺伝子候補の同定	困難であり同定に長時間を要する	ゲノムデータベースと照らし合わせることで短時間で可能

表1：従来型CGH法とアレイCGH法との比較

## ＜研究開始時の研究計画＞

### (1)ゲノムアレイ作製に必要なクローンの単離

ヒトゲノム配列決定の進行と公共データベースの更新に伴うゲノム情報と利用可能なゲノム資源の充実が、全ゲノムをカバーするBAC/PACクローンの収集が可能なる状況にあること、さらに、ゲノムの大半を占めるタンパク非コード領域の情報もふくめたゲノムの一次構造異常の検出を目的のひとつとしていることからBAC (PAC) クローンをアレイ化するスポットDNAの原材料として用いる。アレイ作製に必要な種類と数のBAC/PACクローンをデータベースをもとに選別する。高純度の巨大DNA単離のための精製プロトコルを標準化する。単離するクローン数としては、当初は、既知遺伝子を含むBACを中心に総数1000個のオーダーで、さらに全ゲノムを1Mb以下の密度でカバーするため総数5000個のオーダーでの、BAC DNAの単離を行う。精度の向上のために、既知遺伝子を含むものではFISHによる正確なマッピングも行う。

### (2)ゲノムアレイ作製に必要な技術開発

ゲノムアレイにおいては1細胞あたりのコピー数とその変化が発現アレイに比較して極端に小さいために、アレイ化するDNA量を多くすることが必要となる。このため、コストと時間のかかるBACからのDNA単離を最小限に抑えることが重用であり、DNAの無尽化のためにAdaptor-PCR法を用いた加工プロトコルの開発を試みる。さらに、スポットするスライドガラスやスポット方法の選択などにより、ゲノムアレイ作製に最適な技術の集積を行う。これらの技術を試作アレイ作製仮定で試すことにより、技術の標準化を行い、その結果をもとに目的に合ったデザインの实用レベルのゲノムアレイを作製する。

### (3)ゲノムアレイのハイブリダイゼーション技術開発

上述の(1)、(2)でまず、試作レベルの小規模ゲノムア

レイを作製し、これらを用いてハイブリダイゼーションと解析システムの構築を行う。これらについては、容易で効率の良いプローブDNAの蛍光ラベルプロトコルの確立を行うこと、より簡易で再現性の高いハイブリダイゼーション法の確立と改良を専用チャンバーの開発や自動化（機械化）などを視野に入れて行う。

(4) 反応後のゲノムアレイの解析システム開発

ハイブリダイゼーション後のアレイから、蛍光を取り込み、数値化・標準化して、正常範囲の決定ならびに異常の検出の方法などを検討する。得られたデータをビジュアル化するためのソフトの開発を行う。さらに、得られたデータの体系的蓄積と解析を行うための、データベース作製と解析ソフトの開発も行う。

(5) 解析結果の評価と精度管理

これまでのCGHならびにFISH解析で、詳細なゲノム構造異常の解析の終わっている癌細胞株のゲノムDNAを中心にサンプルとして用いることで、試作ゲノムアレイの精度・分解能などパフォーマンスのテストを行う。これにより、目標のS/N比を達成できているか否か、ノイズの種類とその対処方法などを具体的に検討できる。

(6) 実際の試料からのデータの集積、異常領域の検出、標的疾患関連遺伝子の同定

実用アレイが作製できた段階で、これらを用いて実際のサンプル解析を行う。

(7) 応用解析法の開発

ゲノムアレイとMethylated CpG Island Amplification (MCA)法と組み合わせたプロモーター領域のメチル化異常の解析など新たな応用法を開発する。

〈研究期間の成果〉

(1) ゲノムアレイ作製に必要なクローンの単離

公共ゲノムデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および <http://genome.ucsc.edu/> )からの情報などをとてアレイ化するBAC/PACを選択し、DNAの単離を進めた。クローンの数や位置などの選択の基準は、主に予定した実用レベルのアレイ（表2にあげた3種類、すなわち①癌関連遺伝子を主とした800種類のクローンからなるMCG Cancer Array-800、②1p36領域のBACコンテイングを用いた高密度MCG 1p36 Contig Array、③4500種類のBACクローンでヒトゲノムを平均0.7Mb間隔でカバーするMCG Whole Genome Array-4500）のデザインに基づいて決定した。特に、①については、高精度であることを目標に、FISHにより正確に染色体上にマッピングされたクローンのみを選別した。

表2：研究期間に作製した実用ゲノムアレイ

種類	名称	特徴
癌関連遺伝子特異的アレイ	MCG Cancer Array-800	癌関連遺伝子を中心とした800種類のBACクローンを搭載したアレイ
1p36領域特異的高密度アレイ	MCG 1p36contig Array	1p36の20Mbの染色体領域を212箇のBAC contigでカバーしたアレイ
全ゲノムスクリーニングアレイ	MCG Whole Genome Array-4500	全染色体を4523箇のBACクローンでカバーしたアレイ

これらの実用アレイ作製に先駆けて、100、200、500クローンレベルのBAC DNAを用いた試作レベルの小規模アレイを、Ver.1-Ver.3として作製した。これらを用いて、アレイ化するDNAの加工方法、アレイ化の方式やスライドガラスの選別、ハイブリダイゼーションや蛍光の取り込みや数値の解析の方法と結果の検討を行った。

実際にアレイ化したBACクローンを含む総数6000を

超えるBAC DNAの単離には3年以上を費やし完遂した。これらクローンとそのDNAは、本研究期間中のアレイ作製の基本資源になったのみならず、単離技術とともに以後企画する新たなアレイ作製において有用なリソースとなった。

(2) ゲノムアレイ作製に必要な技術開発

スポットに用いるDNAとしては、通常100-200kbのヒトゲノム断片をクローン化したBACクローンそのものや、BACを鋳型にDOP-PCR法、アダプターPCR法、Rolling circularなどでゲノム断片を増幅したものが標準的であるが、本研究ではBACクローンからプラスミド精製用カラムを用いて単離した高純度DNAを無尽化するアダプターPCR法を用いた加工プロトコルを作成して用いた（図2）。コピー数変化の小さいゲノムDNAにおいて、1コピーの変化まで捉えるためには、高い特異蛍光シグナルおよびS/N比が要求されるため、スポットに用いるDNAの条件として量と複雑性を高く設定できるBAC DNAを増幅して用いる方法はメリットが大きいと考えられた。結果的には、試行錯誤の上でこの方式を採用したことにより、どのタイプのアレイであっても、研究の進行に伴い追加作製が必要な場合、比較的容易にほぼ同じ品質で製造することが可能になり、安定して研究に必要な枚数のアレイを供給し続けることができる体制を構築することのできた最大の要因となった。

一方、作製したDNAのスポットティングに関しても、試作アレイ作製の過程で、様々な試行を繰り返した。高いS/N比を達成するため、できるだけ厳しい条件でハイブリダイゼーションあるいはその後の洗浄が行えることが望ましいことから、スポットティングにおいてもスライドガラス上でスポットしたDNAが安定して存在できるように共有結合でスライド面に付着させる方式を採用した。このため、PCRでDNAを調整する際アダプターPCR用のプライマーの5'末端をアミノ化し、アミノ化オリゴDNA固定用スライドガラス（マツナミあるいはモトローラ）上で安定化させることができた。さらに、接触式（ピン式）のスポッターでは、高濃度のゲノムDNAがスライドガラス上で一定の量で一定の面積を占める（径を一定にする）ように調節することが困難であったため、最終的に非接触式の高精度インクジェット式スポッター（日本ガイシ）を採用した。これにより、高濃度のDNA液であっても、径・形状・位置が均一になるようにスライドガラス上にスポットが可能になり、後に測定値が安定に得られることになりかつ解析時におけるスポット位置補正のための手間を最小限に押さえられることから、多数のサンプルを扱う際に高速での処理が可能になった。

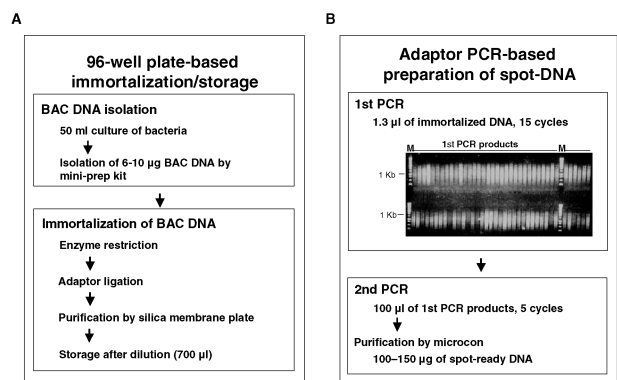


図2：ゲノムアレイ作製に必要なスポットDNAの調整法の概略。(A) BACクローンから抽出したDNAは制限酵素

切断後にアダプターを付加し精製して保存する。(B) 無  
 尽化したBAC DNAは、アダプターPCRにより必要量を増  
 幅し、精製の後スポットに供する。

(3)ゲノムアレイのハイブリダイゼーション技術開発

アレイCGH法は、Cy3とCy5でランダムラベルした  
 テストならびにコントロールDNAを、ヒトCot-1 DNA  
 とともにアレイ上で競合的にハイブリダイズさせた  
 (図3)。ハイブリダイゼーションは、プローブDNAと  
 アレイ化したDNAの衝突を増やすことを目的に、自作  
 のチャンバーなどを開発して行なった。使用数や使用  
 者の増加に伴い、ハイブリダイゼーションの標準化・  
 機械化が必要となったために、市販のハイブリダイゼ  
 ーション装置を導入して対応した。

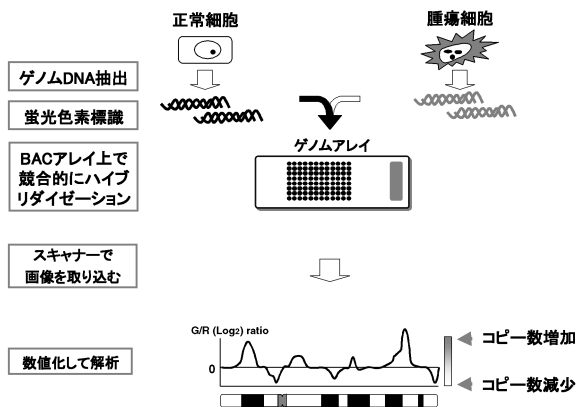


図3：アレイCGH法の概略

(4)反応後のゲノムアレイの解析システム開発

洗浄した各アレイは、共焦点あるいは非共焦点レー  
 ザー方式のスクャナーで取り込み、各スポットの蛍光  
 シグナル比を標準化した上で染色体上の位置に従って  
 可視的に分析できる形で出力させ、より多くの情報と  
 の統合が可能なシステムの構築を行った(図3)。そ  
 のために、解析ソフト(MCG Array Viewer)ならび  
 にデータベース(MCG Array Data Manager)を自作  
 した(図4)。

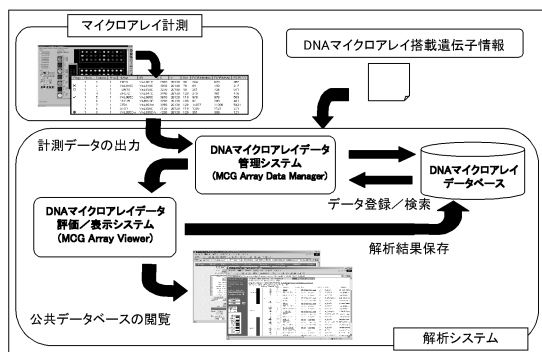


図4：ゲノムアレイ解析支援システムの概要(MCG  
 Array MapならびにMCG Array Data Manager)

データベースは、①DNAマイクロアレイにより得ら  
 れた計測データをデータベースに保管/管理し、②任  
 意の測定データの検索機能を提供する機能を実現して  
 いる。一方解析ソフトは、①DNAマイクロアレイの計  
 測データの有効性を評価し、不良スポットの検出を行  
 う(精度チェック)、②DNAマイクロアレイの計測デ  
 ータの補正ならびに異常部位(Gain, Loss)の判定を行

う、③各クローンとその計測データを染色体地図上に  
 マッピングし、異常領域を視覚的に確認できる機能を  
 提供する、④インターネット経由で各クローンの遺伝  
 子あるいは領域情報の収集を行う、などの機能を持た  
 せた。これらの機能により、データを整理して効率の  
 いい解析を行えるにとどまらず、アレイCGH法による  
 分析から得られる膨大なデータの中から、例えば特定  
 の領域に異常を持つサンプルを抽出したり、同じ病型  
 の腫瘍で共通する異常を持つ症例を選び出したりでき  
 るようになった。

(5)解析結果の評価と精度管理

試作アレイでの経験をもとに作製した実用アレイ  
 を、確立したハイブリダイゼーション法で解析した結  
 果、各スポットから十分な蛍光量が得られ高い  
 S/N比を達成できた(図5)。

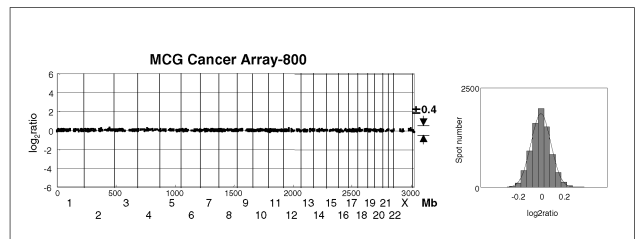


図5：正常2倍体細胞から抽出したゲノムDNAをCy3と  
 Cy5でそれぞれ標識しゲノムアレイ上で競合的ハイブ  
 リダイゼーションして得たコピー比(左)とそのヒストグ  
 ラム(右)(成果番号0602100857)。

これまでならびに本研究においてCGHならびに  
 FISH解析で、詳細なゲノム構造異常の解析を終了して  
 いる様々な癌細胞株あるいは遺伝疾患由来の細胞株や  
 DNAのデータを蓄積してきていることから(成果番号  
 0202171521 - 0602100950)、それらのゲノムDNAをサ  
 ンプルとして用いることで、ゲノムアレイの精度・分  
 解能などパフォーマンスのテストを行うことができ  
 ました。その結果、1コピーの変化であっても検出が可能  
 な精度を持つことが確認された(図6および成果番号  
 0602100857)。

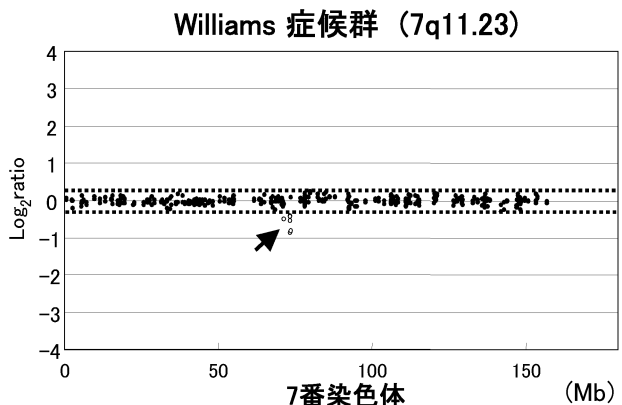


図6：Cy3標識のWilliams症候群患者リンパ球DNAとCy5  
 標識の正常2倍体細胞DNAをMCG Whole Genome Array-  
 4500に競合的ハイブリダイゼーションして得た各スポ  
 ットのコピー比をlog2スケールでプロットした中で、7番  
 染色体のみを示した。矢印で示した責任領域に座位する  
 スポットでは正常範囲(点線の間、±0.4)以下となり、1  
 コピーの欠失が生じていることが特異的かつ高感度に検  
 出されている。

さらに、従来のCGH法では検出できなかった、微細な欠失、特にホモ欠失や増幅が検出されることも確認できた（成果番号0602100834、0602100857、0602100950）。

#### (6) 実際の試料からのデータの集積、異常領域の検出、標的疾患関連遺伝子の同定

(1)-(5)の各開発段階を経て、2004年には3種類のアレイとも、実際の運用を開始することができた。その結果、遺伝疾患の臨床検体、癌細胞株ならびに癌の臨床検体などの潜在的ゲノム一次構造（コピー数）異常解析が可能になった。検出した異常に関する情報を蓄積するとともに、臨床検体であれば臨床病理学的情報との比較検討による異常領域の意義付け、あるいは微細異常領域内の標的疾患関連遺伝子候補の同定などを進めることができた（成果番号0602100834、0602100857、0602100950）。

一方、正常検体あるいは非特異的な先天異常症例などの解析を進める中で、従来知られていたSNPなどの多型とは異なる、数10kbから数Mbレベルの大きなコピー数多型（large-scale copy-number polymorphism, LCV）が見つかった。病的あるいは生物学的意義などは不明であるが、これらを明らかにするためならびに異常を多型と区別して検出するために、日本人LCVデータの収集を進めた。

#### (7) 応用解析法の開発

ゲノムアレイは、ハイブリダイゼーションに用いるサンプルを変えることにより、様々な応用が可能であることから、メチル化領域のDNA配列を特異的に増幅するMethylated CpG Island Amplification (MCA)法で得られるDNAをゲノムアレイにハイブリダイズさせることにより、癌や遺伝疾患におけるプロモーター領域のメチル化異常の解析を行う応用法（BAC array-based MCA, BAMCA法）を開発した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

本研究において、基本技術の開発を行い実用化に至ったBACアレイ（ゲノムアレイ）ならびにこれを用いるアレイCGH法の確立は、世界的に見てもドイツ、アメリカ、カナダなど数箇所のみで同時期に行なわれてきたゲノムアレイ開発と規模や精度の面で肩を並べるものである。規模としてはタイリング化に成功したカナダ・コロンビア大の例には及ばないものの、実際にコピー数異常部位の検出からの標的遺伝子の同定においては、他を圧倒している（成果番号0602100834、0602100857、0602100950）。上述のように、①長く研究に使い続けてもデータに一貫性を持たせられるように、同じ品質の優れたアレイを繰り返し補充しながら作りつづけることができると、②1コピーの異常を検出できるパフォーマンスを持つこと、を条件にDNAの加工技術やアレイ化技術を開発したことが、安定して正確なデータの蓄積が可能なシステムの構築に繋がり、その結果多数の検体を世界に先駆けて継続的に解析しつづけることができたことが一つの要因である。さらに、安定した品質でかつ目的に応じた多種類のアレイを作製・供給しつづけている施設が極めて少ないことが、我々の施設が、本態不明の遺伝疾患の原因遺伝子同定を目的としたコンソーシアムなどにおける重要な研究拠点として機能する理由となっている。

競合するはずであった、BACクローンを用いた市販のゲノムアレイの多くは、設計の不十分さやスポット用のDNA作製技術あるいはアレイ化技術の不安定さなどが

ら、解析に十分なパフォーマンスを持つアレイを継続することができず、その結果充分な結果を残せないで多くは広く使われることなく現在に至っている。

一方、最近ゲノム解析用のオリゴアレイ（オリゴチップ）が市販品として広く使用されるようになってきている。しかし、本研究で用いているBACをベースにしたゲノムアレイは、解像度の限界があるものの、得られるデータの処理の容易さや反応の安定性・簡便性などオリゴアレイと比較して多くの利点があるため、臨床検査など実用的な使用に適している。さらに、メチル化解析やタンパク非コード領域の解析などへの応用もフォーマットを大きく変更することなく可能である点からも今後ますます用いられていくものと考えられる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究計画に沿って、BAC/PACクローンの単離とこれを用いたDNA断片の作製、ゲノムアレイの段階的試作、用途に応じたデザインによる実用レベルのゲノムアレイの作製、高感度アレイCGH法の開発、改良と応用法の開発、ならびに解析ソフトの整備など総合的解析・データベース化のためのシステム構築を、研究期間内に達成できた。さらに、これらを用いて遺伝疾患や癌などを対象に実際の解析とデータの収集を開始することができ、特に予想を上回る困難さはなかった。

#### <今後の課題>

本研究により、ゲノムアレイプラットフォームの整備のための基本ならびに応用技術開発と実用化が達成された。今後は、本システムを活用して、本態不明の遺伝疾患、多因子疾患、癌などの疾患の病因・病態に関わる遺伝子を同定していくことが最大の課題になる。

このため、多くの細胞株や症例のゲノムアレイ解析を行っていくことはもちろん、ゲノムアレイにより検出される潜在的ゲノム異常と表現型との関連付けを注意深く行っていくための、詳細かつ信頼性の高い臨床データベースの構築あるいは組織マイクロアレイなどの病理リソースの整備を行う必要がある。

また、日本人におけるLCVデータの収集とそのデータベース化を進めていくことは、検出されてくるコピー数異常領域の病態との対応付け上重用であり、急務の課題である。

さらに、ゲノム異常のみならずエピゲノム異常をはじめ蛋白非コード領域を対象に解析を行い、それらの意義あるいは病態との関連を解明していくために、引き続きゲノムアレイの応用法の開発、新しいデザインのアレイ作製、ならびにそれらの評価を行う必要がある。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

- 0202171521  
Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel Targets for the 18p11.3 Amplification Frequently Observed in Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Carcinogenesis* 23:19-24, 2002
- 0202171526  
Yasui K, Imoto I, Fukuda Y, Pimkhaokham A, Yang ZQ, Naruto T, Shimada Y, Nakamura Y, Inazawa J. Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 32:112-8, 2001

3. 0202171533  
Imoto I, Sonoda I, Yuki Y, Inazawa J. Identification and characterization of human PKNOX2, a novel homeobox-containing gene. *Biochem Biophys Res Commun* 287:270-6, 2001
4. 0202171539  
Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J. Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 61:6629-34, 2001
5. 0202171545  
Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Yang ZQ, Shimada Y, Nomura N, Hirai H, Imamura M, Inazawa J. SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun* 286:559-65, 2001
6. 0202171557  
Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Human Arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J Hum Genet* 46:342-6, 2001
7. 0303192118  
Watabnabe T, Imoto I, Katahira T, Hirasawa A, Ishiwata I, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res* 93:1114-22, 2002
8. 0303192126  
Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamkto M, Hirohashi S, Inazawa J. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* 62:4860-6, 2002
9. 0303192131  
Janssen JWG, Imoto I, Inoue J, Shimada Y, Ueda M, Imamura M, Bartram CR, Inazawa J. MYEOV, a gene at 11q13, is coamplified with CCND1, but epigenetically inactivated in a subset of esophageal squamous cell carcinomas. *J Hum Genet* 47:460-4, 2002
10. 0303192136  
Saito-Ohara F, Fukuda Y, Ito M, Agarwala KL, Hayashi M, Matsuo M, Imoto I, Yamakawa K, Inazawa J. The Xq22 inversion breakpoint interrupted a novel Ras-like GTPase gene in a DMD patient with profound mental retardation. *Am J Hum Genet* 71:637-45, 2002
11. 0303192145  
Yasui K, Arii S, Zhao C, Imoto I, Ueda M, Nagai H, Emi M, Inazawa J. TFD1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 35:1476-84, 2002
12. 0404031355  
Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 63:1876-83, 2003
13. 0404031515  
Wei Y, Inoue J, Imoto I, Matsuo Y, Karpas A, Inazawa J. GPC5 is a possible target for the 13q31-q32 amplification detected in lymphoma cell lines. *J Hum Genet* 48:331-5, 2003
14. 0404031522  
Hirasawa A, Saito-Ohara F, Inoue J, Aoki D, Susumu N, Yokoyama T, Nozawa S, Inazawa J, Imoto I. Association of 17q21-q24 gain in ovarian clear cell adenocarcinomas with poor prognosis and identification of PPM1D and APPBP2 as likely amplification targets. *Clin Cancer Res* 9:1995-2004, 2003
15. 0404031526  
Imoto I, Yuki Y, Sonoda I, Ito T, Shimada Y, Imamura M, Inazawa J. Identification of ZASC1 encoding a Krüppel-like zinc finger protein as a novel target for 3q26 amplification in esophageal squamous-cell carcinomas. *Cancer Res* 63:5691-6, 2003
16. 0404031533  
Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Turuo T, Inazawa J. Alteration in copy-numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res* 64:1403-10, 2004
17. 0602100834  
Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1B (LRP1B) Expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *Cancer Res* 64:3741-7, 2004
18. 0602100840  
Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J. Amplification and consequent overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* 165:71-81, 2004
19. 0602100851  
Tanami H, Imoto I, Hirasawa A, Yuki Y, Sonoda I, Inoue J, Yasui K, Misawa-Furihata A, Kawakami Y, Inazawa J. Involvement of over-expressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene* 23:8796-804, 2004
20. 0602100857  
Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Ichikura T, Mochizuki H, Okanoue T, Inazawa J. Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Science* 96:100-10, 2005
21. 0602100903  
Sanada T, Yokoi S, Arii S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J. Skp2 Overexpression is a p27Kip1-independent poor prognosticator in patients with biliary tract cancers. *Cancer Science* 95: 969-76, 2004
22. 0602100912  
Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, Inazawa J. Identification of a Novel Fusion Gene in a pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Science* 95:503-7, 2004

23. 0602100943  
Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 9:4705-13, 2003
24. 0602100950  
Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. *Hum Mol Genet* 14:1-11, 2005