

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08669

研究課題名(和文)大腸癌の多様性を制御する「マイクロエクソン」の同定

研究課題名(英文) Identification of novel microexon involved in the regulation of colorectal cancer

研究代表者

唐澤 秀明 (Hideaki, Karasawa)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30547401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロエクソンは非常に小さなエクソンである。ヒトの神経組織や筋組織で高発現しており、選択的スプライシングによりその発現量が調節されている。本研究では、大腸癌組織と大腸正常組織のトランスクリプトームデータを使用し、マイクロエクソンのスプライシングパターンを網羅的に解析した。その結果大腸癌細胞でマイクロエクソンのスプライシングを制御するスプライシング因子RBF0X2とPTBP1を同定し、RBF0X2とPTBP1の発現変化は、マイクロエクソンのスプライシングの制御を通して、大腸癌細胞の細胞接着能および遊走能に影響を与えていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌におけるマイクロエクソンのスプライシングパターンの変化や、スプライシング異常が癌の進行に果たす役割はほとんど研究されていなかったが、本研究により、マイクロエクソンのスプライシング制御機構の破綻は、タンパク質-タンパク質間相互作用を変化させ、大腸癌細胞の接着能、遊走能、および転移能に影響しうる事が示唆され、マイクロエクソンのスプライシング変化の臨床的意義について新知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Microexons are very small exons, whose alternative splicing is frequently deregulated in a neurological disease, autism spectrum disorder. However, little is known about the splicing pattern, regulatory mechanisms, and roles of microexon in cancer. We have examined the transcriptome-wide profile of microexon splicing in matched normal colon and colorectal cancer (CRC) tissue specimens. Out of 1,492 microexons with shorter than 15 nucleotides in length, seventeen (1%) were differentially spliced between normal colon and CRC tissues. Analyses of RNA sequence motifs, an RNA-binding protein database, and subsequent shRNA-mediated knockdown identified two splicing factors, RBF0X2 and PTBP1, as regulators of microexon splicing. Our data thus suggest that the altered expression of RBF0X2 and PTBP1 might affect cell adhesion and migration of CRC cells through the regulation of microexon splicing.

研究分野：消化器外科学

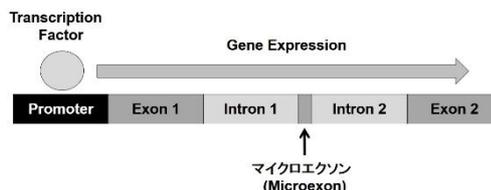
キーワード：大腸癌 マイクロエクソン

1. 研究開始当初の背景

“マイクロエクソン”は非常に小さい(3~30ヌクレオチド、1~10アミノ酸)エクソンであり(図1)ほとんどの場合小さなアミノ酸の欠失や挿入が起こるのみでタンパク質の構造を大きく変えるものではないと考えられてきた。しかし一部のマイクロエクソンはタンパク質間相互作用やナンセンスコドン介在性 mRNA 分解を引き起こし、小さな変化が大きなプロテオームへの影響を与える事が近年分かってきている。次世代シーケンサー

の登場まで網羅的解析が不可能な分野であったが、神経細胞の分化等に重要な役割を担うことが明らかとなってきており(Irimia et al. Cell 2014) 生体の多様性を担う新たな制御機構としての可能性を秘めている。しかしながら“がん”との関連を検討した報告は皆無であり、もし“がん”においてもタンパク質の構造変化を引き起こし、様々な機能を制御している“マイクロエクソン”が存在するのであれば、新規治療標的・バイオマーカーの同定に繋がる新知見が得られると考える。本研究は数塩基の小さな“マイクロエクソン”が大腸癌の多様性を制御しているかという学術的な問いに挑むものである。

図1. マイクロエクソンとは



2. 研究の目的

大腸癌組織と大腸正常組織のトランスクリプトームデータを解析し、大腸癌組織でスプライシングパターンが変化するマイクロエクソン(ME)を同定する。MEの構造的・機能的な特徴を解析し、MEのスプライシング変化が大腸癌の進行に果たす役割を明らかにする。また、大腸癌細胞でMEのスプライシングを制御するスプライシング因子を同定し、MEのスプライシング制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体

本研究は本学医学系研究科倫理委員会よりヒトゲノム研究として承認を受けた。本学大学病院消化器外科で2013年から2015年に手術を行った8例の大腸癌患者の手術検体より、癌組織とその周囲の大腸正常組織を採取した。

(2) 大腸癌細胞株

COLO 205、HCT 116、HCT-15、HT-29、SW620の5種類のヒト大腸癌細胞株とHEK293T細胞株を用いた。

(3) RNA-Sequencing データセットを用いたMEのスプライシングパターンの解析

日本DNAデータバンク(DNA Data Bank of Japan, Shizuoka, JAPAN)または米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)のwebsite(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)から、以下の2つのRNA-sequencing(RNA-seq)解析のデータセットを取得した。

データセット1: DRA004011 (DDBJ) 18)

データセット2: GSE50760 (NCBI) 19)

今回、MEはVAST-TOOLS(<https://github.com/vastgroup/vast-tools.git>)ソフトウェアと内包するexon-ME-exonジャンクションデータベースを用いて選択的スプライシングイベントを参照し検索した。このデータベースはヒトのレファレンストランスクリプトの既知イントロンに含まれる5'および3'スプライスサイト配列で区切られた3-15ntの配列を候補MEと定義しin silicoで探索することで作成された15)。シーケンサーで得られたショートリードをこのライブラリにマッピングし、1492マイクロエクソンを同定した。

MEのスプライシングパターンはvast-toolsを用いて解析し、MEが成熟mRNAに取り込まれた頻度(inclusion level)と成熟mRNAに取り込まれなかった頻度(exclusion level)を算出した。これらの値と以下の計算式を用いて、MEが成熟mRNAに取り込まれた割合PSI(percent spliced-in)値を算出した。

$$PSI = (\text{inclusion level}) / (\text{inclusion level} + \text{exclusion level}) \times 100$$

(4) RT-PCRによるMEの発現解析

complementary DNA(cDNA)の合成はPrimeScript RT Reagent Kit(タカラバイオ, Shiga, Japan)を用いて行った。PCR酵素はKOD FX Neo(東洋紡, Osaka, Japan)を使用した。PCRプライマーはMEに隣接するエクソンに設計した。PCR増幅産物に1/10量の10x Sucrose Gel Loading Dyeを添加し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、SYBR Gold(Thermo Fisher Scientific)で15分間染色した。染色したゲルをGel Doc EZ imager(BioRad)で測定し、PCR増幅産物を定量した。

(5) shRNA発現ベクターの作製

shRNA の発現ベクターをレンチウイルスベクター-pRS19-U6-(sh)-UbiC-TagRFP-2A-Puro (以下、pRS19 と記す) 上で構築した。

(6) RBFOX2 および PTBP1 の発現ベクターの作製

ヒト RBFOX2 (NM_001082579) およびヒト PTBP1 (NM_002819) の cDNA を、それぞれ線維芽細胞 IMF および大腸癌細胞 HCT 116 の cDNA から PCR 増幅し、pBluescript II SK+ベクターへサブクローニングして、塩基配列を決定した。その後、cDNA をレンチウイルスベクター-CSII-EF-MCS-IRES-neo (以下、CSIIneo と記す) および CSII-EF-MCS-IRES-neo-3xFLAG へ挿入し、発現ベクターを作製した。

(7) レンチウイルスを用いた発現ベクターの導入

shRNA および cDNA の発現ベクターは、レンチウイルスを用いて HCT 116 細胞および HCT-15 細胞に導入した。

(8) Immunoblotting

大腸組織および大腸癌細胞株から抽出したタンパク質に 2 × SDS Sample Buffer を加えてタンパク質濃度を調整した後、95°C で 5 分間加熱変性した。2 × SDS Sample Buffer: 100 mM Tris-HCl pH 6.8 (富士フィルム和光純薬)、4% w/v SDS (富士フィルム和光純薬)、20% w/v グリセロール (富士フィルム和光純薬)、微量のプロモフェノールブルー (Sigma-Aldrich)、10% v/v 2-メルカプトエタノール (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)。ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った後、24 V で 1 時間かけてイモビロン-P PVDF 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) に転写した。メンブレンを 0.5% w/v スキムミルクで 30 分間振盪し、ブロッキングを行った。以下に示す一次抗体を用いて 4 °C で一晩振盪し、抗原抗体反応を行った。TBS-T Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4 (富士フィルム和光純薬)、150 mM NaCl (富士フィルム和光純薬)、0.1% v/v Tween 20 (MP Biomedicals)) を用いて室温で 3 分間 x 2 回洗浄した後、以下に示す二次抗体を用いて室温で 1 時間振盪し、抗原抗体反応を行った。反応後に TBS-T Buffer を用いて室温で 3 分間 x 2 回洗浄した後、Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution (Thermo Fisher Scientific) または Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて化学発光反応を行い、ChemiDoc Touch イメージングシステム (Bio-Rad) を用いてシグナルを検出した。使用した一次抗体および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体: 抗 RBFOX2 抗体 (HPA006240, Atlas Antibodies, Bromma, Sweden)、抗 PTBP1 抗体 (72669S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗 α -Actin 抗体 (3700, Cell Signaling Technology)、抗 FLAG 抗体 (F3165, Sigma-Aldrich)

二次抗体: 抗 Rabbit IgG (W401B, Promega)、抗 Mouse IgG (W402B, Promega)

(9) 統計解析

データは平均値 (Mean) または中央値 (Median) \pm 標準誤差 (S.E.) として表した。統計解析は R ver. 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)、Python ver. 3.5 (Python ソフトウェア財団, Wilmington, DE, USA)、または Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を使用した。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

4. 研究成果

(1) 大腸癌関連 ME の構造的特徴

大腸癌組織と大腸正常組織との間でスプライシングパターンが変化する ME を同定するために、大腸癌切除検体から得た 2 つの RNA-seq データセットを解析した (図 1A)。データセット 1 は 3 人、データセット 2 は 18 人の大腸癌患者から採取した、大腸癌組織および大腸正常組織のトランスクリプトームデータである。また、データセット 1 は 5 種類の大腸癌由来細胞株のデータも含んでいるが大腸癌組織と大腸正常組織との間の PSI 値の変化量 (Δ PSI) の算出を伴う解析、すなわち ME の分類には用いなかった。これらの RNA-seq データセットを選択的スプライシングの解析プログラム vast-tools により解析し、ME が mRNA に取り込まれた割合を PSI (percent spliced-in) 値として算出した。さらに、大腸癌組織と大腸正常組織との間の PSI 値の変化量 (Δ PSI) を算出し、PSI 値の変化に有意な差があるか統計解析を行った。

解析の結果、ヒトゲノムには長さが 3~15 nt の ME が 1492 個、存在することが明らかになった (図 1A)。これらの ME を、PSI 値、 Δ PSI 値、および統計検定の結果に基づいて以下のように 3 つのカテゴリーに分類した。1) いずれの検体でも PSI 値が 99% より高い ME、または 1% 未満の ME (1250 個、84%) は、それぞれ構造的に mRNA に取り込まれる ME (constitutive ME) またはイントロンの可能性が高いと考え、

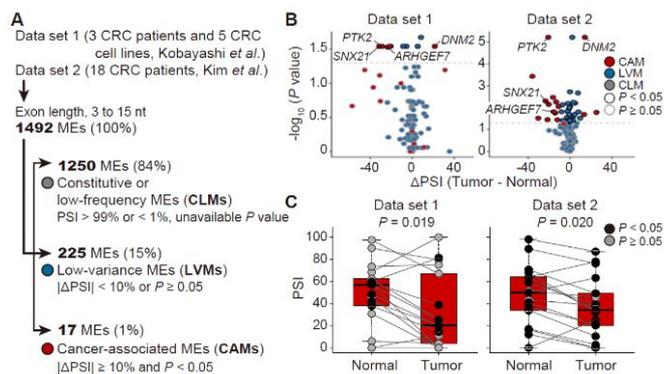


図1

Constitutive or low-frequency ME (CLM) に分類した。また、ME をもつ遺伝子が大腸組織で発現していないため、PSI 値を算出できなかった ME も CLM に分類した。2) □PSI 値が 10%未満または統計検定の結果 P 値が 0.05 以上の 225 個 (15%) の ME は、大腸癌組織と大腸正常組織との間でスプライシングパターンに変化があるものの、その変化量は小さく、low-variance microexon (LVM) に分類した。3) 2つのデータセットのうちどちらか一方で、□PSI 値が 10%以上かつ P 値が 0.05 未満だった 17 個 (1%) の ME を、大腸癌組織と大腸正常組織との間でスプライシングパターンが大きく変化する大腸癌関連 ME として Cancer-associated ME (CAM) に分類した。

同定した 17 個の CAM は 17 個の異なる遺伝子をもつエクソンであった。中でも PTK2、DNM2、ARHGEF7、および SNX21 遺伝子をもつ 4 つの CAM は、2 つの RNA-seq データセットの両方で取り込み量が大きく変化していた (図 1B)。CAM の PSI 値は大腸正常組織より大腸癌組織で低くなる傾向があり、CAM の mRNA への取り込みは大腸癌組織で低下することが明らかになった (図 1C)。また、CAM はエクソン長に 3 の倍数の周期性をもつことから、多くの CAM は mRNA の読み枠に影響を与えず、タンパク質として翻訳されることが示された。ME とその周辺の塩基配列の脊椎動物での保存性を調べた結果、CLM と LVM に比べて CAM では上流のイントロン 100 nt において保存性が高く、CAM の上流にはタンパク質結合配列のような機能的な塩基配列が存在する可能性が考えられた。ME のこれらの構造的な特徴は神経細胞特異的に発現している ME の特徴と類似していた (16)。さらに、Gene ontology (GO) 解析の結果、CAM をもつ遺伝子と特異的に関連する 17 個の GO term があり、これらは focal adhesion や lamellipodium など、細胞接着や遊走に関わることが明らかになった。これらの結果から、大腸癌の発生・進展の過程で起こる細胞接着能や遊走能の変化に、CAM のスプライシングパターンの変化が関与している可能性が考えられた。

(2) RT-PCR による ME の取り込み変化の解析

RNA-seq データの妥当性と再現性を確かめるために、ME のスプライシング変化を RT-PCR により解析した (図 2)。はじめに、大腸癌細胞株から抽出した total RNA の RT-PCR 解析を行って PSI 値を測定し、これを RNA-seq データセット 1 の PSI 値と比較することで、RT-PCR の実験系を評価した。CAM をもつ 17 遺伝子の中から、2 つの RNA-seq データセットで共通して観察された 4 遺伝子 PTK2、DNM2、ARHGEF7、および SNX21 を選択し、ME に隣接するエクソン上にプライマーを設計して RT-PCR を行った (図 2A)。PTK2、DNM2、および ARHGEF7 の 3 遺伝子では、予想されたサイズの 2 つのバンドが観察され、上のバンドが ME を取り込んだ mRNA、下のバンドが ME を取り込まなかった mRNA に由来する増幅産物と考えられた (図 2B)。これらのバンドを定量し、PSI 値を算出した結果、RT-PCR と RNA-seq の PSI 値には強い正の相関があり、ME の mRNA への取り込みを RT-PCR で計測できることを確認した (図 2C)。しかしながら、SNX21 遺伝子では 4 つの PCR 増幅産物が観察された (図 2B)。RNA-seq データセット 1 の配列データとヒトリファレンス配列を詳細に調べた結果、SNX21 ME の上流には 7 bp の差を生じる選択的 3' スプライス部位があることが明らかになった。得られた情報に基づいて PSI 値を算出したが、RT-PCR と RNA-seq の PSI 値の間には相関が認められなかった。そこで以降の解析では、PTK2、DNM2、および ARHGEF7 の 3 遺伝子に焦点を絞り、解析を進めた。

次に、大腸癌患者から採取した大腸癌組織および大腸正常組織を用いて RT-PCR 解析を行なった (図 3A)。その結果、ME の取り込みは PTK2 と ARHGEF7 遺伝子で低下し、DNM2 遺伝子で増加しており、その変化は RNA-seq の結果とよく一致していた (図 3B-D)。以上の結果から、大腸癌組織

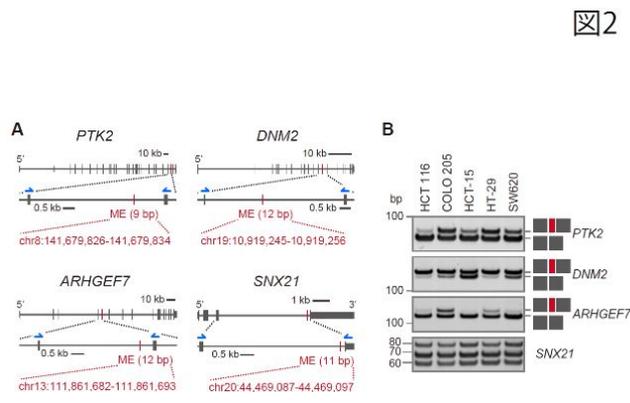


図2

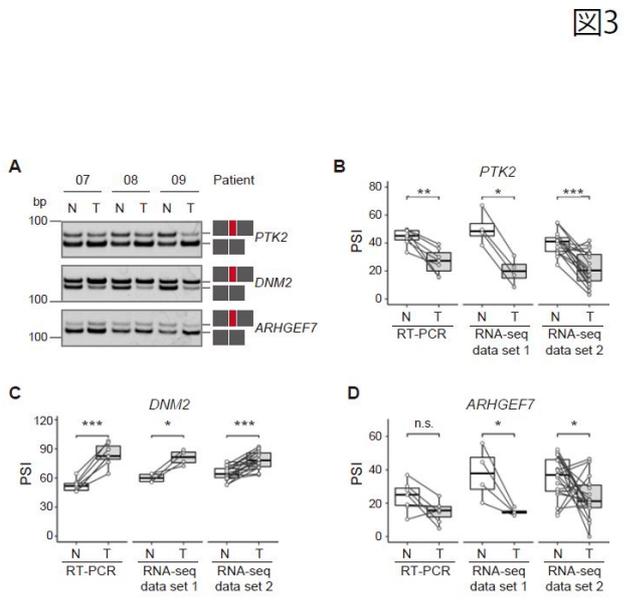


図3

と大腸正常組織とでは ME のスプライシングパターンが変化していることが明らかになった。

(3) 大腸癌細胞で CAM のスプライシングを制御するスプライシング因子の同定
スプライシングは pre-mRNA にスプライシング因子が結合することにより制御される。CAM の上流 100 nt の塩基配列は LVM と CLM に比べて系統学的な保存性が高いことから、CAM の周辺には何らかのスプライシング因子が結合して、ME の取り込みを制御していると考えた。そこで、CAM の周辺の塩基配列に結合するスプライシング因子を探索した。CAM の周辺 ±250 bp の塩基配列を取得し、MEME ソフトウェアを用いた motif-based enrichment 解析を行った。その結果、CAM 周辺で高頻度に見られる 2 つのモチーフ配列、GGSMDDGGG と CYYUYYCU が明らかになった。次に、RNA 結合タンパク質のデータベース AtTRACT を用いて、これらのモチーフ配列に結合するタンパク質を探索し、8 個の RNA 結合タンパク質の候補を得た。CAM 周辺に比較的高頻度で見られるモチーフ配列、GCMUGG と選択的に結合することが知られている RNA 結合タンパク質 FBROX ファミリーのうち、特に神経細胞特異的な ME を制御するスプライシング因子 RBFOX2 (20) を候補として追加し、合計 9 個の RNA 結合タンパク質の候補を得た。これらの候補タンパク質が PTK2 ME のスプライシング制御に関わっているかを調べるために、HCT 116 細胞と HCT-15 細胞を用いたノックダウン実験を行った。その結果、HCT 116 細胞では、RBFOX2 と PTBP1 の発現抑制により PTK2 ME の取り込みが増加した。一方、HCT-15 細胞では、PTBP1 の発現抑制により PTK2 ME の取り込みが増加した。

(4) RBFOX2 と PTBP1 は PTK2 ME のスプライシングを制御する
RBFOX2 と PTBP1 が CAM のスプライシングに果たす役割をさらに調べた。ここでは、RBFOX2 と PTBP1 を標的とする 2 種類の shRNA (A, B) を使用した。また、RBFOX2 と PTBP1 の過剰発現が CAM のスプライシングに与える影響を調べた。RBFOX2 と PTBP1 の発現量を immunoblotting (IB) により確認し、CAM の mRNA への取り込みを RT-PCR により解析した。HCT 116 細胞では、RBFOX2 の発現抑制は PTK2 ME の取り込みを増加させた。逆に、RBFOX2 の過剰発現は PTK2 ME の取り込みを減少させた。同様に、PTBP1 の発現抑制では PTK2 ME の取り込みの増加が、過剰発現では取り込みの減少が認められた。これらの結果は、RBFOX2 と PTBP1 が PTK2 ME の取り込みを抑制することを示している。DNM2 遺伝子の ME では、RBFOX2 の発現抑制は ME の取り込みに影響を与えなかったが、過剰発現は取り込みを低下させた。一方で、PTBP1 の発現抑制と過剰発現はどちらも ME の取り込みを減少させたが、その影響は発現抑制の方が強い傾向にあった。DNM2 ME のスプライシングに対する影響は RBFOX2 と PTBP1 とで異なっており、その役割については不明であった。ARHGEF7 遺伝子の ME の取り込みは、RBFOX2 の発現抑制によって低下し、過剰発現によって増加した。この結果は、RBFOX2 が ARHGEF7 ME の取り込みを促進することを示している。PTBP1 の発現抑制では明らかな効果は認められず、過剰発現は取り込みを低下させた。DNM2 ME の場合と同様に、PTBP1 が ARHGEF7 ME の取り込みに与える影響は不明であった。なお、PTK2 ME の取り込みに対する RBFOX2 および PTBP1 の発現抑制の効果は、3xFLAG-RBFOX2 および 3xFLAG-PTBP1 の発現により回復した。したがって、shRNA による発現抑制の効果は、shRNA のオフターゲット効果ではなく、RBFOX2 および PTBP1 の発現低下によるものと考えられた。RBFOX2 と PTBP1 のスプライシング制御に細胞種依存性が見られるかを調べるために、HCT-15 細胞を用いて HCT 116 細胞と同様の実験を行った。HCT 116 細胞と異なり、RBFOX2 の発現抑制は PTK2 ME の取り込みに影響を与えなかったが、過剰発現は ME の取り込みを抑制した。PTBP1 の発現抑制および過剰発現は、PTK2 ME の取り込みに対して HCT 116 細胞と同様の効果を示した。DNM2 および ARHGEF7 遺伝子の ME では、RBFOX2 と PTBP1 の発現変化は HCT 116 細胞と類似した効果を示した。以上の解析から、RBFOX2 および PTBP1 は大腸癌細胞で ME の取り込みを制御していること、その制御は ME の種類により効果が異なること、さらに、その効果は細胞種によっても異なることが明らかとなった。

(5) 大腸癌組織では RBFOX2 と PTBP1 の発現量が変化する
PTK2 および ARHGEF7 遺伝子の ME の取り込みは、大腸癌組織と大腸正常組織との間で変化していた (図 3)。この ME の取り込み変化が、RBFOX2 または PTBP1 の発現量の変化による可能性を検証するために、大腸組織検体を用いて RBFOX2 と PTBP1 のタンパク質発現量を解析した。その結果、RBFOX2 は大腸癌組織で発現量が低下する一方、PTBP1 は増加していた。また、RBFOX2 と PTBP1 の発現量の間には、負の相関が認められた。これらの結果から、大腸癌における PTK2 および ARHGEF7 遺伝子の ME の取り込み変化は、少なくとも部分的には、RBFOX2 と PTBP1 の発現変化により引き起こされていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Hideyuki, Watanabe Kazuhiro, Kohyama Atsushi, Ohnuma Shinobu, Karasawa Hideaki, Kajiwara Taiki, Kobayashi Minoru, Hatsuzawa Yuuri, Kamei Takashi, Unno Michiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Resection rate curves by location along the small intestine provide perspectives on characteristics of Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/codi.15487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kajiwara Taiki, Naitoh Takeshi, Suzuki Yusuke, Kohyama Atsushi, Karasawa Hideaki, Suzuki Hideyuki, Akiyama Masatoshi, Saiki Yoshikatsu, Watanabe Kazuhiro, Ohnuma Shinobu, Kamei Takashi, Unno Michiaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Laparoscopic right hemicolectomy for an ascending colon cancer patient with an implantable left ventricular assist device: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-020-01064-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Jun, Karasawa Hideaki, Suzuki Takashi, Nakayama Shun, Katagiri Munetoshi, Maeda Shimpei, Ohnuma Shinobu, Motoi Fuyuhiko, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki	4. 巻 38
2. 論文標題 The Function and Prognostic Significance of Cripto-1 in Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 214 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07357907.2020.1741604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanehara Keigo, Ohnuma Shinobu, Kanazawa Yoshitake, Sato Keisuke, Kokubo Shoji, Suzuki Hideyuki, Karasawa Hideaki, Suzuki Takehiro, Suzuki Chitose, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki, Abe Takaaki	4. 巻 9
2. 論文標題 The indole compound MA-35 attenuates tumorigenesis in an inflammation-induced colon cancer model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48974-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Takashi, Karasawa Hideaki, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Suzuki Takashi, Maeda Shimpei, Suzuki Hideyuki, Yamamura Akihiro, Naitoh Takeshi, Nakayama Keiko, Unno Michiaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cancer associated fibroblasts secrete Wnt2 to promote cancer progression in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6370 ~ 6382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenami Tsutomu, Maeda Shimpei, Karasawa Hideaki, Suzuki Takashi, Furukawa Toru, Morikawa Takanori, Takadate Tatsuyuki, Hayashi Hiroki, Nakagawa Kei, Motoi Fuyuhiko, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Novel biomarkers distinguishing pancreatic head Cancer from distal cholangiocarcinoma based on proteomic analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5548-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 望月保志、舟山亮、城田松之、唐澤秀明、中山啓子
2. 発表標題 大腸癌の多様性に関わる新規マイクロエクソンの同定
3. 学会等名 第12回リトリート大学院生研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内藤 剛 (Naitoh Takeshi) (50291258)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大沼 忍 (Ohnuma Shinobu) (70451565)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	中山 啓子 (Nakayama Keiko) (60294972)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	舟山 亮 (Funayama Ryo) (20452295)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関