

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 齊

平成14（2002）年5月

目 次

I. 総括研究報告	
動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究	1
中釜 齊	
II. 分担研究報告	
1. 大腸発がん感受性及び抵抗性を規定する遺伝的要因に関する研究	13
中釜 齊	
2. P53 遺伝子欠損の与える影響を修飾する遺伝子の単離	18
木南 凌	
3. 胃がん感受性遺伝子の影響力と相互作用に関する研究	23
庫本 高志	
4. 腎がん感受性遺伝子の単離、同定	26
樋野 興夫	
5. 癌発生の遺伝的ステップ	31
日合 弘	
6. マウス肺発癌耐性遺伝子 <i>Par2</i> の解析	36
李 康弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究
主任研究者 中釜 齊 国立がんセンター研究所 生化学部部長

研究要旨 本研究は、発がんの動物モデルを用いた遺伝解析により、胃、大腸、肺、腎臓、リンパ組織などの種々の臓器を対象に発がん感受性および抵抗性を規定する遺伝的要因を解明することを目的とする。本年度の研究成果としては、ラット大腸発がん感受性の *Scf* 遺伝子座により *Nat2* 遺伝子の発現誘導が制御されることが判った。MNNG 誘発ラット胃発がんに関しては、胃腺窩の細胞増殖を規定する遺伝子座を染色体 20 番にマップした。ウレタン誘発マウス肺発がん抵抗性の候補遺伝子として、DNA pol ϵ を同定した。放射線誘発マウスリンパ腫に関しては、複数の遺伝子座についてコンジェニック系統の作製を継続して進めると同時に、p53 遺伝子欠損を修飾する 2 つの遺伝子座を同定した。遺伝性腎発がんにおいては、早期の変異尿管の誘発性を指標として抵抗性の候補遺伝子座を染色体 5 番にマップした。SK/Kh pre-B マウスリンパ腫の発生に *Stat5a* 遺伝子の活性化が関与することを明らかにした。

分担研究者

中釜 齊	国立がんセンター研究所	部長
木南 凌	新潟大学医学部	教授
庫本高志	国立がんセンター研究所	室長
樋野興夫	癌研究会癌研究所	部長
日合 弘	京都大学医学部	教授
李 康弘	虎ノ門病院病理部	医員

A. 研究目的

本研究は、発がんの動物モデルを用いた遺伝解析により、発がん感受性および抵抗性を規定する遺伝的要因を解明することを目的とする。発がんは多段階の遺伝子変異の蓄積により引き起こされるが、最近個体レベルの発がん感受性の違いにより、その過程がさらに複雑に制御されることが判ってきた。発がん感受性および抵抗性を規定する遺伝的要因を明らかにすることは、がんの本態を把握し、個々人の発がん感受性に応じたがん予防戦略を確立するためにも不可欠である。本研究班では、胃、大腸、肺、肝臓、腎臓、リンパ組織などの種々の臓器を対象に動物個体の遺伝的背景の違いが発がん性に与える影響を解析し、個体レベルの発がん性を規定する遺伝子座を連鎖解析によりマップする。最終的には責任遺伝子を同定・単離し、感受性遺伝子のヒト発がんへの関与について解明する。さらに本研究の成果を最終的にはヒト集団に外挿し、個々人の発がん感受性に応じたがん予防や新規治療法の開発へと応用する。

B. 研究方法

(1) 大腸発がん感受性および抵抗性遺伝子のマッピング

PhIP による ACF 誘発性において高感受性を示す F344 と抵抗性 ACI ラットとの間でバッククロスラット [N2: (F344xACI)F1 x ACI] を 290 匹作製した。これら N2 ラットに PhIP400 ppm 含有 AIN-93G 基礎飼料を 2 週間投与したのち高脂肪食のみを 4 週間投与し、ACF 誘発数を計測した。個々の N2 ラットに誘発される ACF 数を感受性の指標として、発がん感受性遺伝子の連鎖解析を行った。抵抗性遺伝子のマッピングに関しても同様に、高感受性 BUF ラットと抵抗性 ACI ラットとの間で、N2 ラット [(ACI x BUF) F1 x BUF] 202 匹を作製し、PhIP による ACF 誘発数を計測した。202 匹のうち、誘発 ACF 数が 1 個以下の 35 匹と ACF 数 6 個以上の 34 匹を用いて連鎖解析を行った。QTL 解析には MapManager ver. 3.0 を用いた。

(2) ACF 誘発感受性遺伝子を有するコンジェニックラット 3 系統の作製と ACF 誘発性の検討

第 16 番染色体上の感受性遺伝子 (*Scf*) を有するコンジェニック A, B 及び C 系統の作製を完成し、「PhIP の短期投与」による ACF 誘発性を検討した。さらに、コンジェニック A 系統の N8 世代の兄妹交配により、F344 由来の高感受性 *Scf* アレル (*Scf_{F344}*) をホモに有する個体 (*Scf_{F344}/Scf_{F344}*) と、ACI 由来の低感受性アレル (*Scf_{ACI}*) をホモに有する個体 (*Scf_{ACI}/Scf_{ACI}*) を作製した。

(3) GeneChip を用いた大腸粘膜における網羅的遺伝子発現解析

PhIP による ACF 誘発性の高感受性系統 F344 と低感受性系統 ACI の両親系統の大腸粘膜上皮における遺伝子発現解析、およびコンジェニック A 系統 (N8 世代) の兄妹交配により得られた Sct_{F344}/Sct_{F344} ラットと Sct_{ACI}/Sct_{ACI} ラットの大腸粘膜上皮における発現遺伝子の差異について、GeneChip (Affymetrix 社) を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られたデータの解析には、Gene Spring Ver 4 (Silicon Genetics) を用いた。

(4) マウス D4Mit12 近傍のリンパ腫感受性座の詳細なマッピング

染色体 4 番上の感受性遺伝子座領域、すなわち D4Mit9(39cM) から D4Mit338(58cM) の MSM 染色体領域を BALB/c マウスに導入したコンジェニックマウスを作製してきた。今年度はさらに詳細な 1-2 cM レベルのマッピングを計画、実行した。このためには、コンジェニックマウスを BALB/c マウスに戻し交配し、100 頭以上の組み換え体を作製し、Mit マーカーを用いて領域を選別する。詳細に遺伝子座が特定されると、その領域の物理地図、ヒト物理地図との対照表を作製する。

(5) マウス胸腺リンパ腫発がん実験と遺伝解析

従来通り、4 週令のマウスにガンマ線を分割照射し (2.5Gy を 1 週間毎に 4 回照射した)、リンパ腫を誘発する。発症は努力呼吸をもって診断する。一方、異なる変異原により異なる感受性を示すかどうかを検討するため、化学発がん剤誘発胸腺リンパ腫を作製する。すなわち、メチルニトロソウレア (75mg/kg body weight) を腹腔内一回投与し、胸腺リンパ腫を誘発する。マーカー座および p53 遺伝子座のタイピングは一般的な方法を用いる。統計解析についても市販のソフトを用い、通常の方法による遺伝解析を行う。

(6) MNNG 誘発胃がんの感受性および抵抗性遺伝子を有するコンジェニック系統の作製

コンジェニックラットの各世代に用いる個体 [super male] の選抜には、maker-assisted selection すなわち、各世代の雄個体全てをマイクロサテライトマーカーによりタイピングすることにより行った。短期 MNNG 投与による胃幽門粘膜障害後の細胞増殖反応を規定する遺伝子を同定するために、8 週齢の ACI x

(ACIxBUF)F₁ 戻し交雑子 94 匹を作製した。これらに 42mg/L の MNNG を 2 週間飲水投与したのち、BrdU を腹腔内投与し胃幽門部を採取した。幽門部粘膜の BrdU 陽性細胞数を 20 個の腺窩について計測、平均値を各個体の値とし、全ゲノムに散在する 162 個のゲノムマーカーとの連鎖解析を Mapmaker/QTL にて行った。

(7) コンジェニックラットを用いた遺伝性腎発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析

Eker ラットと Brown-Norway (BN) ラットとの F₁ を作製し、さらに BN ラットとのコンジェニックラット (N2) を作製し、ENU による腎発癌性を解析した。ENU 投与後、早期から出現する変異尿細管が腎発癌性の指標となりうるかについて検討した。実験は、4 週齢の段階で 80mg/Kg body weight をラット腹腔内に投与し、8 週齢で屠殺解剖し誘発された変異尿細管数を比較する方法を用いた。バッククロスラット 239 匹を用いた抵抗性遺伝子の遺伝解析を行った。239 匹の内、変異病細管の誘発数が 100 以上と極端に多かったラットと、逆に 10 個以下と極端に少なかったラット 11 匹を用いて、マイクロサテライト多型マーカーによる連鎖不平衡解析を行った。解析には MapManager を用いた。

(8) SK/Kh pre-B リンパ腫におけるウイスルゲノム挿入 hot spot と活性化遺伝子の同定

SL/Kh Pre-B リンパ腫の 60 症例の genomic DNA を収集した。DNA を SacI などの制限酵素で消化後、ligase により環状化した DNA をプライマーとし、ウイルス Env gene 内に設定した正逆のプライマーによりウイルス・宿主ジャンクション配列を増幅した。この DNA の塩基配列を決定し、database 検索により部位を決定した。この方法で十ヶ近い宿主側遺伝子を決定した。リンパ腫の表現型は FACS 解析、RT-PCR、ノーザン、ウエスタン、サザン法などによる。活性化された Stat5a の細胞増殖に対する効果をみるため、Stat5a の持続活性化ミュータントの cDNA を骨髄細胞にトランスフェクトし、IL-7 を含む軟寒天培地中で培養しコロニー数、分化マーカーの発現などを調べた。

(9) ウレタン誘発肺発がんの抵抗性遺伝子を有するコンジェニックマウスの作製

D18Mit123 と D18Mit144 に挟まれた Par2 領

域を C57BL/6 (B6) マウスから BALB マウスへ移入した *Par2*-congenic マウスを backcross により作成した。B6 は A/J と同じく、*Par2* の劣性アレル、つまり、発癌抑制作用のないアレルを有することが知られている。*Par2* の fine mapping を行うため、backcross による *Par2*-congenic マウス作成の N_7 ないし N_8 の段階で、*D18Mit123* と *D18Mit144* の間に recombination を有する個体を 9 匹選択した。これらを雌 A/J マウスと交配させ、各 recombinant について雄の (A/J x recombinant) F_1 マウスを 20 数匹ずつ作成した。これら子マウスをウレタンにて処理した後、発生肺腫瘍数に関する連鎖解析を *Par2* に連鎖する informative な microsatellite marker 遺伝子座において行ない、各 recombinant の *Par2* 遺伝子型を決定し、recombinant の詳細な recombination 位置の情報と照らし合わせ、*Par2* 遺伝子の fine mapping を進めた。

(10) ウレタン誘発肺がん抵抗性の候補遺伝子の検索

BALB、A/J、B6 および C3H マウスの肺より全 RNA を抽出し、既に発表されている塩基配列情報に従い、*Dcc* (Deleted in colorectal cancer)、*Mbd2* (methyl-CpG binding domain protein) ならびに *Poli* (DNA polymerase iota) cDNAs の塩基配列を RT-PCR と direct sequencing により決定した。

(倫理面への配慮)

平成 12 年度はヒトを対象にした研究は行わない。マウスおよびラットを用いた動物実験については、各研究施設の定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いる。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は全身麻酔下でおこなった。

C. 研究結果

(1) ACF を指標とした大腸がん抵抗性遺伝子のマッピング

BUF ラットが有する抵抗性遺伝子に関して、(ACIxBUF) F_1 xBUF のバッククロス (N_2) ラット 202 匹の内、PhIP による ACF 誘発数が 1 個以下と極端に少なかった個体と、逆に 6 個以上と極端に多かった個体の計 69 匹を用いた連鎖解析により、抵抗性の候補遺伝子座を第 6、第 9 および第 11 番染色体にマップした。Lod 値は何れも 2.0~3.0 以上の値を示した。また、染色体 6 番では、QTL 解析により lod 値は約 1.0

と低値ながら第 2 のピークが認められ、この領域にはミスマッチ修復系酵素である *Msh2* 遺伝子がマップされることが判った。現在、 N_2 ラット 202 匹の全てを用いた QTL 解析により、*Msh2* 遺伝子と感受性との関連性について検討している。

(2) 感受性遺伝子座を有するコンジェニックラット系統の ACF 誘発性の検討

これまでに、第 16 番染色体上の感受性遺伝子座 (*Sct*) を有する 3 種類のコンジェニック系統 (A, B および C) を作製した。コンジェニック A は、*D16Rat40* - *D16Rat60* 間、および *D16Rat60* の遠位側を含む約 30 cM の領域を、系統 B は *D16Rat40* と *D16Rat60* を中心とする 10 - 15 cM の領域、系統 C は *D16Rat60* およびその近傍は含まず、*D16Rat40* およびその近位側を含む約 30 cM の領域を含んでいる。系統 A に関しては、F344 由来の *Sct* アレルを有するヘテロ個体 (*Sct_{F344}*/*Sct_{ACI}*) は、ACI ラット由来のアレルのホモ個体 (*Sct_{ACI}*/*Sct_{ACI}*) に比較して、PhIP による ACF 誘発性が高感受性を示すことを既に示してきたが⁸、コンジェニック C 系統についても同様に、ACI ラット由来のアレルのみを有するホモ個体 (*Sct_{ACI}*/*Sct_{ACI}*) に比較して ACF 誘発数が有意に多かった。以上の結果から、領域 A および領域 C に ACF 誘発の感受性遺伝子が存在することが実証され、A および C の共通領域に感受性遺伝子が存在する可能性が強く示唆された。

(3) 感受性領域 A により発現制御される *N-acetyltransferase 2* 遺伝子の親系統における発現

N_8 世代のコンジェニック A 系統の兄妹交配により、F344 由来の *Sct* のアレルをホモに有する個体 (*Sct_{F344}*/*Sct_{F344}*) と、ACI 由来のアレルをホモに有する個体 (*Sct_{ACI}*/*Sct_{ACI}*) を作製し、PhIP 投与後の大腸粘膜において発現量が両系統間で 2 倍以上に増減する遺伝子を、GeneChip RGU34A を用いて同定した。8740 種類の遺伝子/EST のうち、PhIP 投与前で 5 種類、PhIP400ppm 投与後において 25 種類の遺伝子が両系統間において 2 倍以上の発現量の差を認めた。何れの遺伝子もコンジェニック系統が有する感受性領域 A にはマップされなかったが、PhIP の代謝活性化に重要な役割を果たしている *Nat2* 遺伝子が⁸、感受性アレルをホモに有する個体 (*Sct_{F344}*/*Sct_{F344}*) において PhIP 投与後の発現が上昇していることが判った。F344、ACI 親系統における *Nat2* 遺伝子の発現につい

ても調べた結果、PhIP 投与前の 6 週齢および PhIP 非投与後の 9 週齢のラットでは、ACI 系統で *Nat2* 遺伝子の発現が高い傾向が認められたが、PhIP 投与後の 9 週齢では、逆に F344 系統において発現が 2 倍以上高くなることが判った。以上の結果から、PhIP 投与後の大腸上皮における *Nat2* 遺伝子の発現誘導が感受性 *Sci* 遺伝子座により制御されている可能性が示唆され、感受性 F344 ではこの誘導性が高いことが判った。

(4) F344 及び ACI 親系統ラットの大腸粘膜における遺伝子発現プロファイルの解析

感受性アレルを有するコンジュニック A 系統を用いて PhIP による ACF の誘発実験を行った結果、A 系統は低感受性の ACI に比較して有意に感受性が亢進していることを示したが、F344 よりは有意に低値であった。このことは、マップされた感受性遺伝子以外にも ACF の誘発性に関わる遺伝子が存在することを示唆している。そこで、高感受性の F344 と低感受性の ACI 系統を用いて、大腸粘膜上皮における発現遺伝子の差異を解析した。各系統において、PhIP400ppm 含有飼料を 2 週間投与した後に高脂肪食のみを 4 週間投与したラットの大腸上皮、および普通食のみの群の大腸上皮より RNA を採取し、GeneChip を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。8470 個の遺伝子のうち、PhIP 投与群および普通食群に共通して、両系統間で発現量に 2 倍以上の差がある遺伝子が 42 個認められた。F344 系統では *immunoglobulin* や *pancreatitis-associated protein* など免疫や炎症に係わる一群の遺伝子の発現が高かった。一方、ACI 系統においては *catechol-O-methyltransferase* や *GST mu1* など解毒関連の酵素の発現が目立った。このうちいくつかの遺伝子は 60~70 週令においても発現の系統差が保たれていた。さらに PhIP+高脂肪食投与による遺伝子発現誘導のパターンの違いで分類した結果、普通食群に比較して発現が上昇する遺伝子のうち、F344 に特異的なものとして細胞増殖や細胞死にかかわる *Pkb kinase* などの 9 個の遺伝子が同定できた。ACI に特異的なものとしてはストレス応答などにかかわる *immediate early gene* のカテゴリーに属する遺伝子 2 個を含む 5 個が同定できた。これら 56 個の遺伝子のうち遺伝子座を確認できた 40 個の中には、異常陰窩の誘発性を指標としてマップした第 16 番染色体上の感受性遺伝子座や、第 6、9、11 番染色体上の抵抗性遺

伝子座に位置するものは含まれていなかった。これら遺伝子と ACF 誘発感受性との関連について、現在、さらに詳細な解析を進めている。

(5) 放射線によるマウスリンパ腫誘発の系統差

BALB/c 系統 (感受性) と MSM 系統 (抵抗性) の F1 マウスを BALB/c マウスおよび MSM マウスに戻し交配した N2 マウス (それぞれを N2C、N2M マウスと呼ぶ) に放射線を照射し、リンパ腫、皮下腫瘍を誘発した。それらの腫瘍を対象とし連鎖非平衡解析を行った結果、染色体 2 番、4 番、5 番にそれぞれ感受性遺伝子が、染色体 19 番には p53 修飾遺伝子座の存在することが示唆されていた。しかし、戻し交配マウスの解析では有意な結果にまではいたらず、前年度は、確定のためにコンジュニックマウスの作製を重点的に行った。本年度はコンジュニックマウスを利用し、5 番上の感受性遺伝子座と 19 番上の p53 修飾遺伝子座の存在を確認した。一方、第 4 番染色体の感受性座については、詳細なマッピング用のコンジュニックマウスの作製を行った。

① D4Mit12 座近傍の感受性座の確認：第 4 番染色体のコンジュニックマウスを MSM マウスと交配し、得られた 78 頭を用いて確かにその領域内に感受性遺伝子が存在するかどうかを検定した (昨年度からの継続)。その結果、感受性遺伝子の存在を確認することができた。

② D4Mit12 座近傍の感受性座の詳細なマッピング：染色体 4 番上の最も高い P 値を与えるリンパ腫発症感受性領域 (D4Mit12 近傍、セントロメアから 54.6 cM の位置にある) を中心に、2-4 cM 毎に異なる染色体構成をもつコンジュニックマウス・5 系統が本年度完成した。第 1 グループはセントロメアから Mit278(53.6 cM)まで、第 2 グループは Mit332(52.5 cM)から Mit12(54.6 cM)まで、第 3 グループは Mit12(54.6 cM)からテロメアまで、第 4 グループは Mit338(55.9 cM)からテロメアまで、第 5 グループは Mit336(56.6 cM)からテロメアまでである。現在、それぞれの系統を用い、発がん実験を行っている。第 1 グループのそれは一番進行しているが、92 頭のマウスを用い、実験を完了するのが平成 14 年度の 8 月末となっている。

③ D5Mit5 座近傍の抵抗性座の確認：昨年度は抵抗性遺伝子座を含む染色体領域のコンジュニックマウスを作製した。すなわち、D5Mit243 から D5Mit101 までの 12 cM 領域を MSM に置き換えられたもの、および D5Mit242

から D5Mit409 までの 22 cM 領域を MSM に置き換えられたものの 2 種類である。これらのマウスを利用し、放射線照射による発がん実験を行った。その結果、D5Mit5 座にピークを示す抵抗性座の存在を確認した。マーカー座とカイ 2 乗値を列挙すると以下のようになる。D5Mit4(15.3 cM) - 7.0, D5Mit81(18.6 cM) - 7.8, D5Mit5(26.1 cM) - 11.8, D5Mit7(32.7 cM) - 11.8, D5Mit10(37.1 cM) - 8.5, D5Mit239(40.3 cM) - 5.1, D5mit315(43.6 cM) - 4.0。D5Mit5 座の P 値 0.0008(カイ 2 乗値、11.8) は Lander & Kruglyak の厳しい評価基準で有意と認められるものである。

(6) p53 修飾遺伝子座の確認

p53 遺伝子欠損を修飾する遺伝子座についてもコンジェニック化を行ってきた。これは p53 遺伝子が不活性化したリンパ腫、皮下腫瘍の発症を遅らせる (抵抗性) 作用をもつという遺伝子座である。さらに詳細な連鎖解析を今回行くと、異なった作用をもつ 2 つの遺伝子座からなるという複雑な遺伝子座であることが示唆された。第 1 は D19Mit90 座 (28.4 cM) 近傍に存在するもので、リンパ腫の発症を遅らせる効果を示し (P 値、0.0007)、もう一方は D19Mit123 座 (38.3 cM) 近傍に存在し、リンパ腫の発症と皮下腫瘍の発症を遅らせる効果を示すものである (P 値はそれぞれ、0.0003 と 0.0008)。前年度は染色体 19 番上のコンジェニックマウスは D19Mit5 から D19Mit103 までの約 16cM 領域を含むもの、19 番染色体全域を含むもの 2 種類を作製した。今回、19 番染色体全域を含むコンジェニックマウスを利用し、発がん実験を行った。その結果、D19Mit90 座 (28.4 cM) の作用を確認することができた。P 値は 0.0026(カイ 2 乗値、9.04) で、この値は Lander & Kruglyak の厳しい評価基準で有意と認められるものである。しかしながら、後者の D19Mit123 座 (38.3 cM) には全く連鎖非平衡はみられず、その存在を確認することはできなかった。

(7) 放射線誘発マウスリンパ腫の LOH 解析

感受性座 (抵抗性座) はいわゆるがん抑制遺伝子の弱い変異により形成される可能性がある。そこで、D4Mit12 座、D5Mit5 座、D19Mit90 座について、コンジェニックマウスに生じたリンパ腫を対象に、LOH を調べた。D4Mit12 座、D5Mit5 座ではほとんど LOH は検出されず、前述の可能性の少ないことが分かった。同時に、C/M、M/M という異なる遺伝子型

がリンパ腫で LOH 頻度に影響しないことが示唆された。一方、D19Mit90 座近傍では中程度の LOH が検出された (15.8%、59/387)。しかし、そのアレル消失には C アレル、M アレルへの偏りがなく、この近傍にがん抑制遺伝子が存在したとしても、今回の p53 修飾遺伝子座とは別物と考えられた。

(8) MNNG 誘発ラット胃がんの感受性遺伝子のマッピングとコンジェニック系統の作製

昨年度までに完成していた 4 系統

(BUF.ACI-Gcs1, ACI.BUF-Gcs1, BUF.ACI-Gcr2, BUF.ACI-Gcr1a) に加え、BUF.ACI-Gcr1b, BUF.ACI-Gcr3 の 2 系統が完成した。これら 6 系統は全ゲノムをカバーするおよそ 170 遺伝子座について、BUF ラットもしくは ACI ラットのゲノムに置き換わっていることを確認した。各コンジェニックラット系統の発癌感受性を検討するために、各系統 10 匹ずつを用いて発癌実験を開始した。

腺窩当たりの BrdU 陽性細胞数は ACI では 6.9 ± 0.5 個、BUF では 3.7 ± 0.7 個であったのに対し、戻し交雑子では 6.2 ± 1.6 個であった。連鎖解析の結果、第 20 染色体 MHC 領域に細胞増殖を規定する遺伝子をマップ (*D20Rat1*, LOD=2.5) した。*D20Rat1* において、ACI ホモの個体の BrdU 陽性細胞数は、腺窩当たり 5.7 ± 1.4 個、ヘテロの個体は 6.8 ± 1.6 個であり、統計学的に有意 ($P < 0.001$, t 検定) な差を示した。

(9) 変異尿管誘発を指標とした Eker 腎がんラットの抵抗性遺伝子座のマッピング

[Eker x F1 (Eker x BN)] 143 匹のうち、変異尿管数の極端に多かった個体と少なかった個体の計 22 匹を用いて連鎖解析を行った結果、ラット染色体 5 番の D5Rat12 で lod 値 3.13 を得た。染色体 2 番でも、lod 値は低いもののピークが認められた。特に染色体 5 番のピークに関しては、少数の戻し交配ラット数でもマッピング出来る程の創刊が見られることが確認できた。さらに、バッククロスラット数を増やして、他の遺伝子座についても検討する予定である。

(9) 腎がん抵抗性遺伝子座のコンジェニックラットの作製

ラット染色体 5 番をターゲットにした congenic ラットの作製を開始した。現在 3 代目が誕生しており、年度内に 4 代目の誕生が

期待できる。現地点で Lod 値が低いものの、症例数の増加によって 3 を越えると期待される染色体 2 番、10 番および 14 番についても congenic ラットの作製を同時に開始した。

① ラット染色体 2 番と 5 番の両染色体について、BN 由来のアレルを残すラット F2/11L を選択し、Eker ラット雌 3 匹と交配した。16 匹の雄ラットのうち、キャリアーは 4 匹であった。F3 (2-5)/2L は 2 番および 5 番染色体に BN を残す上に、その他の領域の 97% 以上まで Eker 由来のアレルに置き換わっていた。現在、F4 世代のラットを用いて、変異尿細管数とゲノムタイプとの相関から候補遺伝子座の解析を進めている。

② 染色体 10 番と 14 番については、現在 F2 世代 [F2 (10-14)/2L] の交配を進めており、これらを用いた発がん実験を計画している。

(10) SK/Kh pre-B マウスリンパ腫におけるウイルスゲノム挿入ホットスポットの同定

Inverse PCR 法により、SL/Kh マウスリンパ腫 DNA の全てから、ウイルス・宿主ジャンクション配列が増幅された。これを順次塩基配列を決定し挿入箇所とそこで活性化されている遺伝子を決定しつつある。これまで、表にみられるように 9 種類のホットスポットについて遺伝子が同定され、Svi1~9 (SL/Kh virus Integration 1~9) と命名された。それぞれの挿入はクローナルにおこっているものが多いが、複数サイトへの挿入も稀でない。

表 1 SL/Kh pre-B リンパ腫のウイルスゲノム挿入ホットスポットと活性化遺伝子

Svi1	Stat5a
Svi2	Zinc finger protein (novel gene)
Svi3	C-myc
Svi4	N-myc
Svi5	Stat5b
Svi6	Fiz1 (Flt3 interacting protein)
Svi7	Homeodomain interacting protein kinase2 (HIPK2)
Svi8	RNA helicase
Svi9	L35 ribosomal protein

(11) ウイルスゲノム挿入による活性化遺伝子 Stat5a (Svi1) の機能解析

前述の、ウイルスゲノム挿入部位のうち、Stat5a(Svi1) は T, B 細胞の増殖因子レセプターの下流のシグナル伝達因子、かつトランスクリプションファクターである。B 細胞系においては初期 Pre-B 細胞で発現している IL-7R のシグナルを伝達している。Svi1 は Stat5a のペプチドコーディングがはじまる第 3 エクソンの前の第 2 イントロンの数百ベースで 60 例中 3 例でクローナルな挿入があり、さらに約 25 例から同所へのオリゴクローナル挿入を示す PCR 産物が得られた。Svi1 へのモノクローナル挿入のあるリンパ腫を Svi1 リンパ腫とした。

Svi1 リンパ腫ではウイルスゲノムは転写開始点の前に挿入されるため、コーディング配列そのものには変異はない。発現された STAT5A は高度にリン酸化され、二量体となって核内に移行していることが示された。Gel Shift assay により GAS element をもつ DNA に親和性を示し、c-Myc, Bcl-XL などの転写を促進していた。Svi5 では Stat5b への挿入があること、Svi3 は c-Myc そのものであることなどから、一連のシグナル伝達系遺伝子の転写促進が Pre-B 細胞の腫瘍化に重要であると推定できた。Svi1 リンパ腫は B220, Bp-1 のほか c-kit, CD19, CD24, CD43, Igα, IL-7R のような初期 Pre-B 細胞特有のマーカーを発現し、また Ig 重鎖遺伝子の組み換えも未熟 B 細胞に特徴的であった。培養 Svi1 リンパ腫細胞は IL7 で刺激すると、IL7R, STAT5A のリン酸化が観察された。

Stat5a の持続的発現が発癌に関連することを確認するため Constitutively active mutant である 1-6* Stat5a cDNA を SL/Kh 骨髄細胞にトランスフェクションし IL7 を加えたメチルセルロース培地中で培養すると、4~5 日後には骨髄細胞のコロニー状の増殖がみられた。免疫染色でこの細胞は BP1, CD43 が陽性の初期 pre-B 細胞であることが確認された。このような増殖は初期には IL7 に依存しているが、培養後期には自律的に増殖するようになり不死化した。

一方、SL/Kh 以外の系統のマウス骨髄では培養 2~3 日めに少数の細胞からなるクラスターが形成されるが、まもなくアポトーシスにおちいり、コロニー増殖は誘導されなかった。このことは Stat5a による Pro-B 細胞増殖は SL/Kh の遺伝的背景に強く依存していることが示唆される。SL/Kh マウスはリンパ腫の発生に先立ち、骨髄内で Pre-B 細胞の一過性ポリ

クローナル増殖がみられ、その責任遺伝子 *Bomb1* を第3染色体にマップした。SL/Kh の胸腺 T 細胞は ConA に対する反応性を欠いている。これらの所見から SL/Kh は *Bomb1* による免疫系の遺伝的欠損動物であり、ウイルスによるシグナル増幅などにより補完されれば Pre-B 細胞の不死化がおこる系と考えている。このことを実証するため、*Bomb1* の候補遺伝子を調べる他、*Bomb1* のコンゲニック系統を作成し検討中である。

(12) ウレタン誘発マウス肺発がんの抵抗性候補遺伝子についての SNP 解析

BALB、A/J、B6、C3H の4系統で配列を比較したところ、*Dcc* と *Mbd2* に有意な多型は見出せなかったが、*Polt* には 25 箇所もの SNPs (single nucleotide polymorphisms) を発見した。比較した4系統では唯一 BALB のみが *Par2* の耐性 allele を有するが、SNPs およびその結果としてのアミノ酸変異の観点から、BALB の *Polt* allele は他の3系統と大きく異なっていた。

D. 考察

(1) PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルでは、ACF の誘発性を指標としてマップされた第16染色体上の感受性遺伝子座 *Sct* のコンジェニック系統を用いた解析により、*Sct* 遺伝子座により発現制御されている遺伝子の一つとして、*N-acetyltransferase2* (*Nat2*) を同定した。*Nat2* は PhIP の代謝活性化に関与していることから、PhIP による発がん感受性の系統差に寄与している可能性が示唆された。今後、作製したコンジェニック系統を起始動物として、組み換え体ラットを複数系統作製し、感受性遺伝子の存在領域を 1~2 cM の範囲にまで絞り込むことが必須である。高感受性の *Sct*_{F344}/*Sct*_{F344} 系統と低感受性の *Sct*_{ACI}/*Sct*_{ACI} 系統、および親系統である F344 と ACI ラットの大腸粘膜における遺伝子発現量に差の見られた遺伝子についても、F344 と ACI 間での遺伝的多型の有無や、他の感受性系統での発現について検討し、大腸発がん感受性との関連について追究する。

(2) 放射線誘発マウスリンパ腫モデルでは、発がん感受性座・抵抗性遺伝子座および p53 遺伝子の修飾遺伝子座を含むコンジェニックマウスを作製し、少頭数のコンジェニックマウスを用いて感受性遺伝子座の確認実験を行ってきた。その結果、D4Mit12 座近傍の感受性座、D5Mit5 座近傍の抵抗性座の存在を確認し

た。リンパ腫感受性・抵抗性遺伝子座を含む領域の限定化作業が、申請時の計画通り進展している。D4Mit12 座近傍に存在する感受性座については、約一年後に詳細なマッピング (2-3 cM 以下に限定された) が完成する。この基盤形成は領域内に存在するエクソン・EST、候補遺伝子の検索を実質的なものとする。D5Mit5 の抵抗性座についても、同様の戦略で限定化を行っている。また、19 番染色体上に予想された p53 修飾遺伝子座の一つが確認された。遺伝子の単離に至っていないが、この修飾因子は p53 欠失時に働くもので、将来の遺伝子治療、発現誘導薬品による治療につながるものとして期待できる。一方、戻し交配マウスの解析から予想された D19Mit123 座 (38.3 cM) については、全くその存在を確認できなかった。この結果は、p53 欠損と D19Mit123 座の働きでは発症に不十分で、さらに別の遺伝子の作用の加わる必要を示唆している。すなわち、発がん感受性座・抵抗性遺伝子座や修飾遺伝子座を解析するとき困難な問題とされる、epistasis の存在を示唆している。

(3) MNNG 誘発ラット胃がんモデルに関しては、本年度作製したコンジェニック系統は遺伝学的アプローチにより胃癌感受性遺伝子を同定するための必要不可欠なツールである。①これらを用いた発癌実験により、*Gcs1*, *Gcr1*, *Gcr2*, *Gcr3* の効果を均一な遺伝的背景のもとで検定できる。②これらコンジェニック系統から選抜ゲノム領域を細分化したサブコンジェニック系統を作製し、*Gcs1*, *Gcr1*, *Gcr2*, *Gcr3* 座位の絞り込みを行うことができる。③コンジェニック系統胃幽門粘膜における遺伝子発現プロファイルを作製、対照系統と比較することにより、胃癌感受性遺伝子の候補遺伝子を抽出できる可能性がある。また、本年度同定できた短期 MNNG 投与後の細胞増殖に関与する遺伝子座は、逆説的な効果をもち、この座位がヘテロ (ACI/BUF) の個体は、ホモ (ACI/ACI) の個体に比べ腺窩当たりの BrdU 陽性細胞数が 1.1 個増加していた。しかしながら、この座位は全表現型分散の 10% ほどを説明するに過ぎない。ACIの方が BUF よりも細胞増殖反応性が高いことを考えると、短期 MNNG 投与後の細胞増殖を規定する遺伝子は複数の遺伝子の効果が複雑に関与している結果であると考えられる。

(5) Eker rat において現象的に確認されていた腎発がん感受性遺伝子の存在が、今年度、統計学的にも実証された成果は大きい。Eker 形質を前がん病変である変異尿細管数で 100 個以上、BN 形質を同じく 10 個未満に規定しているために backcross 実験で全症例数の 15% 程度、F2 実験で同じく 5% 程度が有効症例となっており高い lod score は得られていないが、書例を増加させることが可能になってきており、複数の遺伝子座の congenic ラットの樹立により、発がん感受性遺伝子の同定に寄与するものと考えられる。Modifier gene(s)は、腫瘍の数（起始：initiation）とサイズ（促進：promotion）を規定しているものが、それぞれ存在すると考えられるので、その観点からも考察する。今回のラット染色体 5 番に存在する modifier gene は、我々の用いた初期の前がん病変の数から、むしろ腫瘍数（起始：initiation）を規定するものと考えている。

(6) SK/Kh pre-B マウスリンパ腫に関しては、Svi1 以外へのレトロウイルス挿入についても現在精力的な研究を進めている。特に Svi2 は Pre-B 細胞の分化調節に重要なシグナル分子と会合する未知のペプチドの遺伝子と考えられる。そのほかの Svi 遺伝子産物の発癌における意義はまだ未解決である。SL/Kh のリンパ腫は典型的な Pre-B 細胞型である Major type と骨髄のみに限局して増殖する Minor type に二大別される。高度なウイルス血症を背景に 10 以上の分子標的があることは我々も予測しなかったところである。各標的がリンパ腫の分化レベル、増殖挙動にどのように関わっているかについては新しい研究分野を提供したとさえいえる。さらに Inverse PCR 法による包括的なホットスポットの同定は Pre-B 細胞の分化に関わるシグナル経路について鋭いプローブを提供したともいえる。この研究により多数のレトロウイルス挿入部位の塩基配列を決定したところ、レトロウイルスが挿入される宿主側塩基配列に一定のコンセンサスがあり、DNA 鎖のユニークな三次元構造に対応していることが分かった。レトロウイルスインテグラーゼの基質認識と深く関わっていることが明らかになってきた。

(7) ウレタン誘発マウス肺発がんモデルでは、*Poh*が比較的最近単離された DNA 合成酵素遺伝子であり、*in vitro*での fidelity が非常に低い

ことが知られている。従って、この酵素が発癌の initiation 時に働き、癌関連遺伝子に点突然変異を生じさせる可能性がある。今回発見された *Poh*の SNPs は、例えば fidelity の多様性の原因となり、発癌感受性の決定に関わっているかも知れない。よって、現時点では *Par2*の最も有力な候補遺伝子と考える。*Poh*の機能については未だ不明な点が多いので、今後さらに *Poh*多型がその機能に及ぼす影響につき解析を加える。

E. 結論

大腸がんモデルでは、感受性遺伝子座を含むコンジェニック系統や親系統のラット大腸粘膜において、特異的な発現を示す遺伝子群を 30 種類同定することができた。これらの遺伝子が複合的に作用することにより、大腸前がん病変である ACF 誘発性を制御していることが示唆された。

マウスリンパ腫の感受性・抵抗性座の詳細なマッピングを行ってきた。感受性座（染色体 4 番）をさらに限局化（2-3 cM 以下）するためのコンジェニック系を作製し、発がん実験が進行中である。一方、抵抗性座（染色体 5 番）、p53 修飾遺伝子座（染色体 19 番）の存在を確定した。p53 修飾因子は p53 欠失時に働くもので、将来の遺伝子治療、発現誘導薬品による治療につながるものと期待できる。

MNNG 誘発ラット胃癌に対する感受性遺伝子座 (*Gcs1*, *Gcr1*, *Gcr2*) については、BUF.ACI-*Gcs1*, ACI.BUF-*Gcs1*, BUF.ACI-*Gcr1a*, BUF.ACI-*Gcr2* のコンジェニック系統を作製した。

遺伝性腎癌 Eker ラットにおける腎発癌性を抑制的に制御する抵抗性遺伝子が存在することが判った。しかしながらこれまでの解析では、変異尿細管 10 個以下動物が 11 匹と少ないため、現在 F2 ラットを作成中である。並行して、当該領域のスピードコンジェニックラットを作成中である。

SK/Kh pre-B マウスリンパ腫の研究により、Stat5a が潜在的ながん遺伝子のひとつであること、Stat5a の活性化により、本来アポトーシスにより除去されるはずの標的細胞はシグナル欠損が補われてモノクローナルに増殖するという仮説が実証された。今後、レトロウイルス挿入の宿主 DNA のコンセンサス構造を追求し、レトロウイルス感染を阻害する手段の開発に進むことが期待できよう。

マウス肺発がんモデルでは、耐性遺伝子 *Par2* の候補遺伝子として *Poh* を提案する。しかし、

最終的な証明にはロックアウトマウス等のさらなる解析が必要である。

F. 健康危機情報

本研究の方法、材料、実験結果、および動物個体が人体の健康に害を及ぼす可能性は全くない。危険物、毒物の使用については研究所の危険物、毒物取り扱い規定に準拠した安全な取り扱いを遵守している。実験従事者のマウス、ラットからの病原菌の感染については、動物取り扱い指針に従って行い、その危険性を最小限に抑える努力をしている。また、レトロウイルスはB細胞系の免疫不全症では潜在的ながん遺伝子として働く可能性があるが、直ちにヒトに外挿はできない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagama H, Ochiai M, Ubagai T, Tajima R, Fujiwara K, Sugimura T and Nagao M. A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, PhIP. *Mutation Res.* (in press)
2. Tuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a protein containing nine pentatricopeptide repeat (PPR) motifs, interacts with a single-stranded cytosine-rich sequence of mouse hypervariable minisatellite Pc-1. *Eur. J. Biochem.* 269:2927-2933, 2002.
3. Suzui M, Okuno M, Tanaka T, Nakagama H and Moriwaki H. Enhanced colon carcinogenesis induced by azoxymethane in min mice occurs via a mechanism independent of β -catenin mutation. *Cancer Lett.* 183:31-41, 2002.
4. Osawa E, Nakajima A, Yoshida S, Omura M, Nagase H, Ueno N, Wada K, Matsuhashi N, Ochiai M, Nakagama H, Sekihara H. Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Life Sciences* 70:2623-2630, 2002.
5. Ochiai M, Imai H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-forne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:478-483, 2002.
6. Inamori H, Takagi S, Tajima R, Ochiai M, Ubagai T, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Frequent and multiple mutations at minisatellite loci in sporadic human colorectal and gastric cancers – possible mechanistic differences from microsatellite instability in cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:382-388, 2002.
7. Nagao M, Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Ochiai M, Nakagama H, Sugimura T. Studies on mammary carcinogenesis induced by a heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, in mice and rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 39:158-164, 2002.
8. Ubagai T, Ochiai M, Kawamori T, Imai H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Efficient induction of rat large intestinal tumors with a new spectrum of mutations by intermittent administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in combination with a high fat diet. *Carcinogenesis* 23:197-200, 2002.
9. Fukuda H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Detection and isolation of minisatellite Pc-1 binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1528:152-158, 2001.
10. Ochiai M, Ubagai T, Kawamori T, Imai H, Sugimura T, Nakagama H. High susceptibility of Scid mice to colon carcinogenesis induced by azoxymethane indicates a possible caretaker role for DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* 22:1551-1555, 2001.
11. Burnouf D, Miturski R, Nagao M, Nakagama H, Nothisen M, Wagner J, Fuchs RPP. Early detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) induced mutations within the *Apc* gene of rat colon. *Carcinogenesis.* 22:329-335, 2001.
12. Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose)polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* 22:1-3, 2001.
13. Minemoto Y, Gannon J, Masutani M, Nakagama H, Sasagawa T, Inoue M, Masamune Y, Yamashita K. Characterization of adriamycin-induced G2-arrest and its abrogation by caffeine in FL-amnion cells with or without p53. *Exp. Cell Res.* 262:37-48, 2001.
14. Shiraishi K, Shimura T, Taga M, Uematsu N., Gondo Y, Ohtaki M, Kominami R, Niwa O. Persistent induction of somatic reversions of the pick-eyed unstable mutation in F1 mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage. *Radiation Research* (in press)

15. Yoshimura A, Ura K, Asakura H, Kominami R, Mishima Y. Mononucleosomes assembled on a DNA fragment containing (GGA/TCC)_n repeats can form a DNA-DNA complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:16-22, 2002.
16. Kominami R, Saito Y, Shinbo T, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Ochiai Y, Kodama Y, Wakabayashi Y, Takahashi, Y, Mishima Y, Niwa O. Genetic analysis of radiation-induced thymic lymphoma. *International Congress Series* 715:224-231, 2001.
17. Saito Y, Ochiai Y, Kodama Y, Tamura Y, Togashi T, Kosugi-Okano H, Miyazawa T, Wakabayashi Y, Hatakeyama K, Wakana S, Niwa O, Kominami R. Genetic loci controlling susceptibility to r-ray-induced thymic lymphoma. *Oncogene* 20:5243-5247, 2001.
18. Kuramoto T, Nomoto T, Fujiwara A, Mizutani M, Sugimura T, Ushijima T. Insertional mutation of the Attractin gene in the black tremor hamster. *Mamm Genome* 13:36-40, 2002.
19. Kuramoto T, Nomoto T, Sugimura T, Ushijima T. Linkage mapping of the rat interleukin 1 receptor antagonist gene on chromosome 3. *Exp. Anim.* 50:359-361, 2001.
20. Kuramoto T, Nomoto T, Sugimura T, Ushijima T. Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. *Mamm. Genome* 12:469-471, 2001.
21. Kuramoto T, Kitada K, Inui T, Sasaki Y, Ito K, Hase T, Kawagachi S, Ogawa Y, Nakao K, Barsh GS, Nagao M, Ushijima T, Serikawa T. Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:559-564, 2001.
22. Hino O. Molecular pathogenesis of TSC mutant models-Genotype, Phenotype and Dramatype- (in press).
23. Satake N, Miyagawa M, Sakurai J, Mitani H, Kobayashi T, Tamura H, Hino O. N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)-induced renal and hepato-carcinogenesis in the tumor suppressor *Tsc2* transgenic rat. *Cancer letters* (in press).
24. Hino O, Mitani H, Sakurai J. "2nd hit" of *Tsc2* gene in radiation induced renal tumors of Eker rat model. (International Symposium on Radiation and Homeostasis: Ed. Sugawara T.) (in press).
25. Hino O, Kobayashi T, Mitani H. Prevention of hereditary carcinogenesis. *Proc. Japan. Acad.* 78 (B):31-33, 2002.
26. Wataya-kaneda M, Kaneda Y, Hino O, Adachi H, Hirayama Y, Seyama K, Satou T, Yoshikawa K. Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. *Arch. Dermatol. Res.* 293:460-469, 2001.
27. Hino O, Okimoto K, Kouchi M, Sakurai J. A novel renal carcinoma predisposing gene of the Nihon rat maps on the same chromosome 10, but different locus, as the *Tsc2* mutant (Eker) rat. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:1147-1149, 2001.
28. Kobayashi T, Minowa O, Sugitani Y, Takai S, Mitani H, Kobayashi E, Noda T, Hino, O. A germ-line *Tsc1* mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by *Tsc2* mutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8762-8767, 2001.
29. Hino O, Majima S, Kobayashi T, Honda S, Momose S, Kikuchi Y, Mitani H. Multistep renalcarcinogenesis as gene expression disease in tumor suppressor *TSC2* gene mutant model – genotype, phenotype and environment. *Mutation Res.* 477:155-164, 2001.
30. Okamoto T, Momose S, Hino, O. Suppression of cytochrome P450 1A1 and 4A1 gene expression in renal carcinomas of *TSC2* gene mutant (Eker) rats. *Int. J. Oncology* 18:147-149, 2001.
31. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322, 2001.
32. Tsuruyama T, Nakamura T, Jin G, Ozeki M, Yamada Y, Hiai H. Constitutive activation of *Stat5a* by retrovirus integration in early pre-B lymphomas of SL/Kh strain mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
33. Kondo S, Toyokuni S, Tsuruyama T, Ozeki M, Tachibana T, Echizenya M, Hiai H, Onodera H, Imamura M. Peroxynitrite-mediated stress is associated with proliferation of human metastatic colorectal carcinoma in the liver. *Cancer Lett.* 179:87-93, 2002.
34. Hiroyasu M, Ozeki M, Kohda H, Echizenya M,

- Tanaka T, Hiai H, Toyokuni S. Specific allelic loss of p16 (INK4A) tumor suppressor gene after weeks of Iron-mediated oxidative damage during rat renal carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 160:419-424, 2002.
35. Seno H, Sawada M, Fukuzawa H, Morita-Fujisawa Y, Takaishi S, Hiai H, Chiba T. Involvement of tumor necrosis factor alpha in intestinal epithelial cell proliferation following Paneth cell destruction. *Scand J Gastroenterol.* 37:154-160, 2002.
36. Yan Y, Zeng ZZ, Higashi S, Denda A, Konishi Y, Ohnishi S, Higashi K, Hiai H. Resistance of DRH strain rats to chemical carcinogenesis of liver: Genetic analysis of later progression stage. *Carcinogenesis* 23:189-196, 2002.
37. Toyokuni S, Masumizu T, Ozeki M, Kondo S, Hiroyasu M, Kohno M, Hiai H. An electron spin resonance study on alkylperoxyl radical in thin-sliced renal tissues from ferric nitrilotriacetate-treated rats: the effect of alpha-tocopherol feeding. *Free Radic. Res.* 35:245-255, 2001.
38. Kamba H, Kamoto T, Higashi S, Shisa H, Yamada Y, Koda H, Toda Y, Ogawa O, Yoshida O, Hiai H. Failure of ureteric bud invasion : a new model of renal agenesis in mice. *Am. J. Pathol.* 159:2347-2353, 2001.
39. Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A, Nishi T, Iwano H, Inai M, Uose S, Nakase H, Ohana M, Oshima C, Matsushita Y, Kawanami C, Hiai H, Masuda T, Chiba T.: Analysis of cyto-ines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in Helico-bacter pylori-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. *Infect. Immun.* 69: 6749-54, 2001.
40. Morita Y, Sawada M, Seno H, Takaishi S, Fukuzawa H, Miyake N, Hiai H, Chiba T. Identification of xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase as a rat Paneth cell zinc-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1540:43-49, 2001.
41. Tanuma J, Fujii K, Hirano M, Matsuuchi H, Shisa H, Hiai H, Kitano M. Five quantitative trait loci affecting 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue cancer in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:610-616, 2001.
42. Mishima M, Hirano M, Morohashi T, Arase N, Shisa H, Hiai H, Ato M, Onoe K. Tolerog en-producing cells In allogenic bone marrow chimeras established with spontaneous leukemia prone mice. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* (in press)
43. Seno H, Sawada M, Fukuzawa H, Morita Y, Takaishi S, Hiai H, Chiba T. Enhanced expression of trans-forming growth factor (TGF)- α -pre-cursor and TGF- β 1 during paneth cell regeneration. *Dig. Dis. Sci.* 46:1004-1010, 2001.
44. Lee GH, Matsushita H, Kitagawa T. Fine chromosomal localization of the mouse *Par2* gene that confers resistance against urethane-induction of pulmonary adenomas. *Oncogene* 20:3979-3985. 2001.
45. Kojima T, Srinivas M, Fort A, Urban M, Lee, GH, Sawada N, Spray DC. Growth-suppressive function of human *connexin32* in a conditional immortalized mouse hepatocyte cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 37:589-598, 2001.
46. Okada C, Kura F, Wada A, Inagawa H, Lee, GH, Matsushita H. Cross reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. *Microbiol. Immunol.* 46:51-54, 2002.
2. 学会発表
1. 田島理絵、落合雅子、長尾美奈子、杉村隆、小林静子、中釜斉；PhIP 誘発ラット大腸がんの Apc 発現低下におけるメチル化の関与（第 24 回日本分子生物学会、横浜、12/9 - 12/12、2001）
2. 藤原恭子、落合雅子、祖母井庸之、田島理絵、杉村隆、長尾美奈子、中釜斉；DNA チップを用いた PhIP 誘発ラット大腸がんの遺伝子発現解析（第 24 回日本分子生物学会、横浜、12/9 - 12/12、2002）
3. Osawa, E., Nakajima, A., Sekihara, A. and Nakagama, H. PPAR γ ligands suppress the formation of ACF and colon tumors induced by azoxymethane in mice. (AACR.'02, Chemoprev. targets & biomarkers, Miami, 2001)
4. Ochiai, M., Ubagai, T., Tajima, R., Kawamori, T., Sugimura, T., Nagao, M., Nakagama, H. Morphological and genetic analysis of aberrant crypt foci in rat colon induced by 2-

- amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. (N-Aryl Meeting, Washington D.C., 2001)
5. Nakagama, H., Ubagai, T., Ochiai, M., Tajima, R., Sugimura, T., Nagao, M. Genetic analysis and expression profiling toward identification of candidate genes for susceptibility to PhIP-induced colon carcinogenesis. (N-Aryl Meeting, Washington D.C., 2001)
 6. Ochiai, M., Ubagai, T., Kawamori, T., Nagao, M., Sugimura, T., Nakagama, H. ; Development of aberrant crypt foci in F344 rat induced by PhIP: morphological characteristics and β -catenin mutations. (第60回日本癌学会総会、横浜、9.26-28、2001)
 7. Osawa, E., Nakajima, A., Sekihara, H., Matsushashi, N., Ochiai, M., Nakagama, H. ; The role of PPARgamma on coloncarcinogenesis using AOM induced ACF in mice. (第60回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 8. Nakagama, H., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Nagao, M., Fukuda, H. ; Minisatellite instability and its relevance to carcinogenesis. (第60回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 9. Ubagai, T., Ochiai, M., Ichikawa, H., Ohki, M., Nagao, M., Sugimura, T., Nakagama, H. ; Exploration of candidate susceptibility genes for colon carcinogenesis in rats induced by PhIP. (第60回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 10. Tajima, R., Ochiai, M., Ubagai, T., Sugimura, T., Kobayashi, S., Nakagama, H. ; PhIP 誘発ラット大腸がんでの Apc 遺伝子発現低下におけるメチル化の関与 (第60回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 11. 庫本高志、野本朋子、杉村 隆、牛島俊和；胃癌感受性遺伝子同定のためのコンジェニックラットの作製 (第60回日本癌学会総会2001年9月、横浜市)
 12. 若園邦子、庫本高志、野本朋子、杉村 隆、牛島俊和；MNNGによる胃粘膜傷害後の細胞増殖の強さを規定する遺伝子のマッピング (第60回日本癌学会総会2001年9月、横浜市)
 13. 樋野興夫：癌性化境遇。(第91回日本病理学会総会、平成14年3月26日—28日、横浜)
 14. 百瀬修二、小林敏之、鍋島陽一、樋野興夫：Tsc2 遺伝子産物のC末領域による腫瘍抑制効果。(第91回日本病理学会総会、平成14年3月26日—28日、横浜)
 15. 菊池泰、加藤美由紀、樋野興夫：ラット遺伝性腎癌の疾患感受性遺伝子(modifier gene) (第2報)。(第91回日本病理学会総会、平成14年3月26日—28日、横浜)
 16. 鶴山竜昭、金光、中村卓郎、日合 弘；プレBリンパ腫における Stat5a シグナル伝達の活性化 (第60回日本癌学会総会、平成13年9月、横浜)
 17. 日合 弘；発癌の多因子遺伝的的感受性。(日本癌学会シンポジウム、平成13年9月、横浜)
 18. 日合 弘；マウスリンパ腫の発病・病型決定機構。(多地点癌情報カンファレンス、平成13年11月、大阪)
 19. Hiai, H., Tsuruyama, T., Nakamura, T.; Activation of *Stat5a* by retrovirus integration induced early B-cell lymphomas in SL/Kh mice. (Intern. Symp. on Predictive Oncology., February 8-12, Paris, France, 2002)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。
- H. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究
分担研究者 中釜 齊 国立がんセンター研究所 生化学部部長

研究要旨 本研究は、PhIP により誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、大腸発がん感受性及び抵抗性を規定する遺伝的要因の全貌を解明することを目的とする。PhIP による大腸前がん病変 ACF の誘発性を規定する染色体 16 番上の感受性遺伝子 *Scf* が、PhIP の代謝活性化に関わる *N-acetyltransferase (Nat2)* 遺伝子の発現制御に関与することが判った。さらに、高感受性系統 F344 と低感受性系統 ACI の大腸粘膜での遺伝子発現解析により、F344 系統では *immunoglobulin* や *pancreatitis-associated protein* などの免疫や炎症に関わる遺伝子群や、細胞増殖・細胞死に関わる *Pkb kinase* などの遺伝子発現が高かった。一方 ACI 系統においては、*catechol-O-methyltransferase* や *GST mu1* などの解毒関連酵素や、ストレス応答に関わる *immediate-early gene*、ミスマッチ修復酵素である *Msh2* 遺伝子などの発現が目立った。系統特異的な発現を示す遺伝子の大腸発がん感受性あるいは抵抗性への関与について解析を進めている。

A. 研究目的

がんは遺伝子変異やエピジェネティックな変化が多段階的に蓄積することにより生じる。さらに、遺伝的に規定された個々人の発がんに対する感受性素因の違いにより、この多段階の発がん過程がさらに複雑に制御されていると考えられる。本研究班においては、大腸の前がん病変の可能性のある異常陰窩 aberrant crypt foci (ACF) の誘発性を指標として、大腸発がんの感受性および抵抗性遺伝子を同定・単離することを目的とする。加熱魚肉食品に含まれる変異原物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 400ppm を含有する資料を各種近交系ラットおよびバッククロスラットに投与し、大腸に誘発される ACF 数を解析する。ACF 誘発数を量的形質とした遺伝連鎖解析により、PhIP 誘発大腸発がんの感受性および抵抗性を規定する遺伝子群の染色体座位を決定し責任遺伝子を同定・単離することにより、大腸発がん感受性および抵抗性の遺伝的要因の全貌を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 大腸発がん感受性および抵抗性遺伝子のマッピング

PhIP による ACF 誘発性において高感受性を示す F344 と抵抗性 ACI ラットとの間でバッククロスラット [N2: (F344xACI)F1 x ACI] を 290 匹作製した。これら N2 ラットに PhIP400 ppm 含有 AIN-93G 基礎飼料を 2 週間投与したのち高脂肪食のみを 4 週間投与し、ACF 誘発数を計測した。個々の N2 ラットに誘発される ACF 数を感受性の指標として、発がん感受性遺伝子の連鎖解析を行った。抵抗性遺伝子のマッピングに関しても同様に、高感受性 BUF ラットと抵抗性 ACI ラットとの間で、N2 ラット [(ACI x BUF) F1 x BUF] 202 匹を作製し、PhIP による ACF 誘発数を計測した。202 匹のうち、誘発 ACF 数が 1 個以下の 35 匹と ACF 数 6 個以上の 34 匹を用いて連鎖解析を行った。QTL 解析には MapManager ver. 3.0 を用いた。

(2) ACF 誘発感受性遺伝子を有するコンジェニックラット 3 系統の作製と ACF 誘発性の検討

第 16 番染色体上の感受性遺伝子 (*Scf*) を有するコンジェニック A, B 及び C 系統の作製を

完成し、「PhIP の短期投与」による ACF 誘発性を検討した。さらに、コンジェニック A 系統の N8 世代の兄妹交配により、F344 由来の高感受性 *Scf* アレル (*Scf_{F344}*) をホモに有する個体 (*Scf_{F344}/Scf_{F344}*) と、ACI 由来の低感受性アレル (*Scf_{ACI}*) をホモに有する個体 (*Scf_{ACI}/Scf_{ACI}*) を作製した。

(3) GeneChip を用いた大腸粘膜における網羅的遺伝子発現解析

PhIP による ACF 誘発性の高感受性系統 F344 と低感受性系統 ACI の両親系統の大腸粘膜上皮における遺伝子発現解析、およびコンジェニック A 系統 (N8 世代) の兄妹交配により得られた *Scf_{F344}/Scf_{F344}* ラットと *Scf_{ACI}/Scf_{ACI}* ラットの大腸粘膜上皮における発現遺伝子の差異について、GeneChip (Affymetrix 社) を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られたデータの解析には、Gene Spring Ver 4 (Silicon Genetics) を用いた。

(倫理面への配慮)

マウスおよびラットを用いた動物実験については、各研究施設の定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は全身麻酔下でおこなった。

C. 研究結果

(1) ACF を指標とした大腸発がん抵抗性遺伝子のマッピング

BUF ラットが有する抵抗性遺伝子に関して、(ACIxBUF)F1xBUF のバッククロス (N2) ラット 202 匹の内、PhIP による ACF 誘発数が 1 個以下と極端に少なかった個体と、逆に 6 個以上と極端に多かった個体の計 69 匹を用いた連鎖解析により、抵抗性の候補遺伝子座を第 6、第 9 および第 11 番染色体にマップした。Lod 値は何れも 2.0~3.0 以上の値を示した。また、染色体 6 番では、QTL 解析により lod 値は約 1.0 と低値ながら第 2 のピークが認められ、この

領域にはミスマッチ修復系酵素である *Msh2* 遺伝子がマップされることが判った。現在、N2 ラット 202 匹の全てを用いた QTL 解析により、*Msh2* 遺伝子と感受性との関連性について検討している。

(2) 感受性遺伝子座を有するコンジェニックラット系統の ACF 誘発性の検討

これまでに、第 16 番染色体上の感受性遺伝子座 (*Scf*) を有する 3 種類のコンジェニック系統 (A, B および C) を作製した。コンジェニック A は、*D16Rat40* - *D16Rat60* 間、および *D16Rat60* の遠位側を含む約 30 cM の領域を、系統 B は *D16Rat40* と *D16Rat60* を中心とする 10 - 15 cM の領域、系統 C は *D16Rat60* およびその近傍は含まず、*D16Rat40* およびその近位側を含む約 30 cM の領域を含んでいる。系統 A に関しては、F344 由来の *Scf* アレルを有するヘテロ個体 (*Scf_{F344}/Scf_{ACI}*) は、ACI ラット由来のアレルのホモ個体 (*Scf_{ACI}/Scf_{ACI}*) に比較して、PhIP による ACF 誘発性が高感受性を示すことを既に示してきたが、コンジェニック C 系統についても同様に、ACI ラット由来のアレルのみを有するホモ個体 (*Scf_{ACI}/Scf_{ACI}*) に比較して ACF 誘発数が有意に多かった。以上の結果から、領域 A および領域 C に ACF 誘発の感受性遺伝子が存在することが実証され、A および C の共通領域に感受性遺伝子が存在する可能性が強く示唆された。

(3) 感受性領域 A により発現制御される *N-acetyltransferase 2* 遺伝子の親系統における発現

N8 世代のコンジェニック A 系統の兄妹交配により、F344 由来の *Scf* のアレルをホモに有する個体 (*Scf_{F344}/Scf_{F344}*) と、ACI 由来のアレルをホモに有する個体 (*Scf_{ACI}/Scf_{ACI}*) を作製し、PhIP 投与後の大腸粘膜において発現量が両系統間で 2 倍以上に増減する遺伝子を、GeneChip RGU34A を用いて同定した。8740 種類の遺伝子/EST のうち、PhIP 投与前で 5 種類、PhIP400ppm 投与後において 25 種類の遺伝子が両系統間において 2 倍以上の発現量の差を認めた。何れの遺伝子もコンジェニック系統

が有する感受性領域 A にはマップされなかったが、PhIP の代謝活性化に重要な役割を果たしている *Nat2* 遺伝子が、感受性アレルをホモに有する個体 (*Sc_{F344}*/*Sc_{F344}*) において PhIP 投与後の発現が上昇していることが判った。F344, ACI 親系統における *Nat2* 遺伝子の発現についても調べた結果、PhIP 投与前の 6 週齢および PhIP 非投与後の 9 週齢のラットでは、ACI 系統で *Nat2* 遺伝子の発現が高い傾向が認められたが、PhIP 投与後の 9 週齢では、逆に F344 系統において発現が 2 倍以上高くなることが判った。以上の結果から、PhIP 投与後の大腸上皮における *Nat2* 遺伝子の発現誘導が感受性 *Sct* 遺伝子座により制御されている可能性が示唆され、感受性 F344 ではこの誘導性が高いことが判った。

(4) F344 及び ACI 親系統ラットの大腸粘膜における遺伝子発現プロファイルの解析

感受性アレルを有するコンジェニック A 系統を用いて PhIP による ACF の誘発実験を行った結果、A 系統は低感受性の ACI に比較して有意に感受性が亢進していることを示したが、F344 よりは有意に低値であった。このことは、マップされた感受性遺伝子以外にも ACF の誘発性に関わる遺伝子が存在することを示唆している。そこで、高感受性の F344 と低感受性の ACI 系統を用いて、大腸粘膜上皮における発現遺伝子の差異を解析した。各系統において、PhIP400ppm 含有飼料を 2 週間投与した後に高脂肪食のみを 4 週間投与したラットの大腸上皮、および普通食のみの群の大腸上皮より RNA を採取し、GeneChip を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。8470 個の遺伝子のうち、PhIP 投与群および普通食群に共通して、両系統間で発現量に 2 倍以上の差がある遺伝子が 42 個認められた。F344 系統では *immunoglobulin* や *pancreatitis-associated protein* など免疫や炎症に係わる一群の遺伝子の発現が高かった。一方、ACI 系統においては *catechol-O-methyltransferase* や *GST mu1* など解毒関連の酵素の発現が目立った。このうち

くつかの遺伝子は 60~70 週齢においても発現の系統差が保たれていた。さらに PhIP+高脂肪食投与による遺伝子発現誘導のパターンの違いで分類した結果、普通食群に比較して発現が上昇する遺伝子のうち、F344 に特異的なものとして細胞増殖や細胞死にかかわる *PKB kinase* などの 9 個の遺伝子が同定できた。ACI に特異的なものとしてはストレス応答などにかかわる *immediate early gene* のカテゴリーに属する遺伝子 2 個を含む 5 個が同定できた。これら 56 個の遺伝子のうち遺伝子座を確認できた 40 個の中には、異常陰窩の誘発性を指標としてマップした第 16 番染色体上の感受性遺伝子座や、第 6、9、11 番染色体上の抵抗性遺伝子座に位置するものは含まれていなかった。これら遺伝子と ACF 誘発感受性との関連について、現在、さらに詳細な解析を進めている。

D. 考察

ACF の誘発性を指標としてマップされた第 16 染色体上の感受性遺伝子座 *Sct* のコンジェニック系統を用いた解析により、*Sct* 遺伝子座により発現制御されている遺伝子の一つとして、*N-acetyltransferase2 (Nat2)* を同定した。*Nat2* は PhIP の代謝活性化に関与していることから、PhIP による発がん感受性の系統差に寄与している可能性が示唆された。今後、作製したコンジェニック系統を起始動物として、組み換え体ラットを複数系統作製し、感受性遺伝子の存在領域を 1~2 cM の範囲にまで絞り込むことが必須である。高感受性の *Sc_{F344}*/*Sc_{F344}* 系統と低感受性の *Sc_{ACI}*/*Sc_{ACI}* 系統、および親系統である F344 と ACI ラットの大腸粘膜における遺伝子発現量に差の見られた遺伝子についても、F344 と ACI 間での遺伝的多型の有無や、他の感受性系統での発現について検討し、大腸発がん感受性との関連について追究する。

E. 結論

これまでの研究成果により、感受性候補遺伝子、あるいは感受性遺伝子の修飾遺伝子の

候補を複数同定することができた。これらの遺伝子群の大腸発がん感受性への関与について更に詳細な解析を進める必要がある。

F. 健康危機情報

本研究の方法、材料、実験結果、および動物個体が人体の健康に害を及ぼす可能性は全くない。また、危険物、毒物の使用については研究所の危険物、毒物取り扱い規定に準拠した安全な取り扱いを遵守している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagama H, Ochiai M, Ubagai T, Tajima R, Fujiwara K, Sugimura T and Nagao M. A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, PhIP. *Mutation Res.* (in press)
2. Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a protein containing nine pentatricopeptide repeat (PPR) motifs, interacts with a single-stranded cytosine-rich sequence of mouse hypervariable minisatellite Pc-1. *Eur. J. Biochem.* 269:2927-2933, 2002.
3. Suzui M, Okuno M, Tanaka T, Nakagama H and Moriwaki H. Enhanced colon carcinogenesis induced by azoxymethane in min mice occurs via a mechanism independent of β -catenin mutation. *Cancer Lett.* 183:31-41, 2002.
4. Osawa E, Nakajima A, Yoshida S, Omura M, Nagase H, Ueno N, Wada K, Matsushashi N, Ochiai M, Nakagama H and Sekihara H. Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Life Sciences* 70:2623-2630, 2002.
5. Ochiai M, Imai H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:478-483, 2002.
6. Inamori H, Takagi S, Tajima R, Ochiai M, Ubagai T, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Frequent and multiple mutations at minisatellite loci in sporadic human colorectal and gastric cancers - possible mechanistic differences from microsatellite instability in cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:382-8, 2002.
7. Nagao M, Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Ochiai M, Nakagama H and Sugimura T. Studies on mammary carcinogenesis induced by a heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, in mice and rats. *Environmental Molecular Mutagenesis.* 39:158-164, 2002.
8. Ubagai T, Ochiai M, Kawamori T, Imi H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Efficient induction of rat large intestinal tumors with a new spectrum of mutations by intermittent administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in combination with a high fat diet. *Carcinogenesis*, 23:197-200, 2002.
9. Fukuda H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Detection and isolation of minisatellite Pc-1 binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1528:152-158, 2001.
10. Ochiai M, Ubagai T, Kawamori T, Imai H, Sugimura T, Nakagama H. High susceptibility of Scid mice to colon carcinogenesis induced by azoxymethane indicates a possible caretaker role for DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis.* 22:1551-5, 2001.
11. Burnouf D, Miturski R, Nagao M, Nakagama H, Nothisen M, Wagner J, Fuchs RPP. Early detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) induced mutations within the *Apc* gene of rat colon.

- Carcinogenesis. 22:329-335, 2001.
12. Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose)polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* 22:1-3, 2001.
 13. Minemoto Y, Gannon J, Masutani M, Nakagama H, Sasagawa T, Inoue M, Masamune Y, Yamashita K. Characterization of adriamycin-induced G2-arrest and its abrogation by caffeine in FL-amnion cells with or without p53. *Exp. Cell Res.* 262:37-48, 2001.
 14. 中釜 斉 発がん感受性とその臨床 「21世紀の消化器がんの内科治療—現況での問題点の総括と展望」 新興医学出版社、pp206-213, 2001
2. 学会発表
1. 田島理絵、落合雅子、長尾美奈子、杉村隆、小林静子、中釜斉；PhIP 誘発ラット大腸がんの Apc 発現低下におけるメチル化の関与（第 24 回日本分子生物学会、横浜、12/9 - 12/12、2001）
 2. 藤原恭子、落合雅子、祖母井庸之、田島理絵、杉村隆、長尾美奈子、中釜斉；DNA チップを用いた PhIP 誘発ラット大腸がんの遺伝子発現解析（第 24 回日本分子生物学会、横浜、12/9 - 12/12、2002）
 3. Osawa, E., Nakajima, A., Sekihara, A. and Nakagama, H. PPARg ligands suppress the formation of ACF and colon tumors induced by azoxymethane in mice. (AACR'02, Chemoprev. targets & biomarkers, Miami, 2001)
 4. Ochiai, M., Ubagai, T., Tajima, R., Kawamori, T., Sugimura, T., Nagao, M., Nakagama, H. Morphological and genetic analysis of aberrant crypt foci in rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. (N-Aryl Meeting, Washington D.C., 2001)
 5. Nakagama, H., Ubagai, T., Ochiai, M., Tajima, R., Sugimura, T., Nagao, M. Genetic analysis and expression profiling toward identification of candidate genes for susceptibility to PhIP-induced colon carcinogenesis. (N-Aryl Meeting, Washington D.C., 2001)
 6. Ochiai, M., Ubagai, T., Kawamori, T., Nagao, M., Sugimura, T., Nakagama, H. ; Development of aberrant crypt foci in F344 rat induced by PhIP: morphological characteristics and β -catenin mutations. (第 60 回日本癌学会総会、横浜、9.26-28、2001)
 7. Osawa, E., Nakajima, A., Sekihara, H., Matsuhashi, N., Ochiai, M., Nakagama, H. ; The role of PPARgamma on coloncarcinogenesis using AOM induced ACF in mice. (第 60 回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 8. Nakagama, H., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Nagao, M., Fukuda, H. ; Minisatellite instability and its relevance to carcinogenesis. (第 60 回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 9. Ubagai, T., Ochiai, M., Ichikawa, H., Ohki, M., Nagao, M., Sugimura, T., Nakagama, H. ; Exploration of candidate susceptibility genes for colon carcinogenesis in rats induced by PhIP. (第 60 回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001)
 10. Tajima, R., Ochiai, M., Ubagai, T., Sugimura, T., Kobayashi, S., Nakagama, H. ; PhIP 誘発ラット大腸がんでの Apc 遺伝子発現低下におけるメチル化の関与（第 60 回日本癌学会総会、横浜、9.26-9.28、2001）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業） 分担研究報告書

動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究
分担研究者 木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨 ヒトのありふれた遺伝素因である発がん感受性を捕捉するために、BALB/c 系統（感受性）と MSM 系統（抵抗性）という 2 つのモデルマウスを利用し解析してきた。染色体 4 番上の感受性座（D4Mit12 座近傍）をさらに限局化（2-3cM 以下）するため 5 系統のコンジェニックマウスを作製し、発がん実験を推進している。一方、抵抗性座（染色体 5 番）、p53 修飾遺伝子座（染色体 19 番）の存在を、コンジェニックマウスを利用し確定した。p53 修飾因子は p53 欠失時に働くと考えられ、p53 欠失の腫瘍に有効な遺伝子治療、発現誘導薬品の開発につながるものと期待される。

A. 研究目的

ヒトのがんの発症に影響を与える遺伝的素因の研究は、その影響を捉えにくいためほとんど進展していないが、素因研究の重要性は年々深まっている。その理由は人類に広く存在する、いわゆるありふれた遺伝因子のためである。本研究はこの発がん素因をマウスモデルを用いて解析し、ヒトのそれへの貢献を果たそうとするものである。

マウスの系統により発がん感受性は異なるが、これはがん発生に遺伝的多型のあることを示している。この感受性遺伝子の本体は不明であるが、組み換え修復に関与する遺伝子群やがんの発生母胎となる正常細胞の増殖能に違いを与える遺伝子、がん発生の周りの環境を支配している遺伝子群などが考えられる。大腸がん発症に関する感受性遺伝子、Mom1 遺

伝子はリパーゼの一種をコードし、周辺環境を修飾すると言われている。従って、このケースでは薬物による治療、予防に利用できるものと期待されている。本研究で放射線誘発マウスリンパ腫を対象とし、その感受性遺伝子の本体を明らかにすることを目的とする。具体的目標はリンパ腫感受性遺伝子の単離と同定である。

B. 研究方法

(1) 感受性座の詳細なマッピング:染色体 4 番上の感受性遺伝子座領域、すなわち D4Mit9(39cM)から D4Mit338(58cM)の MSM 染色体領域を BALB/c マウスに導入したコンジェニックマウスを作製してきた。今年度はさらに詳細な 1-2 cM レベルのマッピングを計画、実行した。このためには、コンジェニックマウスを BALB/c マウスに戻し交配し、100 頭以