

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。

(2) 発がん実験：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。発症は努力呼吸でもって診断する。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。

(3) 遺伝解析：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、通常の方法を用いる。

倫理配慮

実験動物の適切な取り扱い要綱に準拠し研究する。また、動物倫理の理解を深めるため実験動物の慰霊祭への出席を義務づけている。動物遺伝子からヒト疾患原因遺伝子に到達した場合、各施設の倫理委員会に審査検討をしていただく。遺伝的予防などの新規難聴、がん予防法として臨床応用される場合には、特に慎重な審査を依頼し、ヒトへの応用を押し進める。

C. 研究結果

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ならず、前年度は、確定のためにコンジェニックマウスの作製を重点的に行った。本年度はコンジェ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定した。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ェ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 番染色体のコンジェニックマウスを 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ェニッ

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今年の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ェ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なになる。

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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 染色体 2 番と 4 番のコンジェニックマウスを交配し、放射線感受性の相互作用を検討中である。

D. 考察

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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に困難な問題とされる、epistasis の存在を示唆している。

E. 結論

BALB/c 系統（感受性）と MSM 系統（抵抗性）の戻し交配マウスを用い、リンパ腫感受性・抵抗性座の詳細なマッピングを行ってきた。本年度は感受性座（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。

F. 健康危険情報

現在のところマウスが研究対象であることから、人の健康への危険性を懸念する必要はない。実験従事者のマウス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。

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Shiraishi, T. Shimura, M. Taga, N. Uematsu, Y. Gondo, M. Ohtaki, R. Kominami and O. Niwa. (2002)

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)

A. Yoshimura, K. Ura, H. Asakura, R. Kominami and Y. Mishima. (2002)

Mononucleosomes assembled on a DNA fragment containing (GGA/TCC)_n repeats can form a DNA-DNA complex. *Biochemical Biophysical Research Communications.* 290, 16-22.

R. Kominami, Y. Saito, T. Shinbo, A. Matsuki, H. Kosugi-Okano, Y. Ochiai, Y. Kodama, Y. Wakabayashi, Y. Takahashi, Y. Mishima and O. Niwa. (2001)

Genetic analysis of radiation-induced thymic lymphoma. *International Congress Series.* 715, 224-231.

Y. Saito, Y. Ochiai, Y. Kodama, Y. Tamura, T. Togashi, H. Kosugi-Okano, T. Miyazawa, Y. Wakabayashi, K. Hatakeyama, S. Wakana, O. Niwa and R. Kominami. (2001)

Genetic loci controlling susceptibility to *r*-ray-induced thymic lymphoma. *Oncogene.* 20, 5243-5247.

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 庫本 高志 国立がんセンター研究所 発がん研究部室長

研究要旨 ACIラットと BUF ラットの MNNG 胃癌感受性を規定する遺伝子 Gastric cancer susceptible gene 1 (*Gcs1*), Gastric cancer resistance gene 1, 2, 3 (*Gcr1*, *Gcr2*, *Gcr3*)について、コンジェニック系統 BUF.ACI-*Gcs1*, BUF.ACI-*Gcr1a*, BUF.ACI-*Gcr1b*, BUF.ACI-*Gcr2*, BUF.ACI-*Gcr3* と ACI.BUF-*Gcs1* を作製した。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第 20 番染色体 MHC 領域にマップ(*D20Rat1*, LOD=2.5)した。この座位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。

A. 研究目的

ラットに *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) を飲水投与すると、ヒト分化型胃癌に類似の胃癌が誘発される。この胃発癌モデルにおいて、ACIラットは感受性を BUFラットは抵抗性を示す。現在までに、MNNG 胃癌感受性を規定する遺伝子座 Gastric cancer susceptible gene 1 (*Gcs1*), Gastric cancer resistance gene 1, 2, 3 (*Gcr1*, *Gcr2*, *Gcr3*)が同定されている。また、短期 MNNG 投与による胃幽門粘膜障害後の細胞増殖反応は、ACIラットの方が BUFラットよりも強い。細胞増殖が突然変異の誘発に重要であることを考えると、この細胞増殖反応を規定する遺伝子の一部は、胃癌感受性を規定している遺伝子でもある可能性がある。

平成 13 年度は、個々の感受性・抵抗性遺伝子の正確な評価を行うために、均一な遺伝的背景に各胃癌感受性遺伝子座位に関するコンジェニック系統を作製すること。さらには、細胞増殖反応を規定する遺伝子座の同定を目的とした。

B. 研究方法

(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。

倫理配慮

ラットの飼育、発がん実験、屠殺は「国立がんセンター実験動物に関する指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

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。各コンジュニク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。

D. 考察

本年度作製したコンジュニク系統は、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これらコンジュニク系統から選抜ゲノム領域を細分化したサブコンジュニク系統を作製し、*Gcs1*, *Gcr1*, *Gcr2*, *Gcr3* 座位の絞り込みを行うことができる。③コンジュニ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。

本年度同定できた短期 MNNG 投与後の細胞増殖に関する遺伝子座は、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuramoto, T., Kitada, K., Inui, T., Sasaki, Y., Ito, K., Hase, T., Kawaguchi, S., Ogawa, Y., Nakao, K., Barsh, G. S., Nagao, M., Ushijima, T. and Serikawa, T. Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical

role in myelination of the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 559-564, 2001.

Kuramoto, T., Nomoto, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. Mamm Genome 12: 469-471, 2001.

Kuramoto, T., Nomoto, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. Linkage mapping of the rat interleukin 1 receptor antagonist gene on chromosome 3. Exp Anim 50: 359-361, 2001.

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.

1. 学会発表

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省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班」
分担研究課題：腎がん感受性遺伝子の単離、同定

分担研究者 樋野興夫 癌研究会癌研究所 実験病理部 部長

研究要旨

「疾患モデル」の意義の一つとして、「strain differences in phenotype to find genetic modifiers of phenotype」が考えられる。我々は、既に遺伝性腎癌ラット (Eker rat) の原因 (起始) 遺伝子の単離、同定に成功しているが、その後、重要なことに腎がん発生に、ドラマチックな系統差があることを見いだした [つまり Brown Norway (BN) では腎腫瘍発生が強く抑制される]。本研究では、ヒトでは未知の腎発がんの modifier gene(s) の単離、同定を、癌化の起始遺伝子 (Tsc2) が明確な本ラットモデルを用いて迫ろうとするものである。今年度、その大きなステップとしてラット染色体 5 番に腎発がんの modifier gene が存在することが明らかになった。

A. 研究目的

「遺伝性癌」でも「単因子病でありながら多因子病」である。特定の変異を遺伝子型 (genotype) に持つ疾患モデルの表現型 (phenotype) に実験処置を加えると、ドラマが演じられる。この演出型 (dramatype) 発現のメカニズムの解明は、癌の予防・治療法の開発につながる。我々は、既に遺伝性腎癌ラット (Eker rat) の原因 (起始) 遺伝子 (Tsc2) の単離、同定に成功しているが、その後、腎がん発生には明らかな系統差がある [Brown Norway (BN) では腎腫瘍発生が抑制される] ことを見いだした。

本研究の目的は、ヒトでは未知の腎発がんの modifier gene(s) の単離、同定を、遺伝学的にリファインされ、起始遺伝子が同定されているユニークな遺伝性腎癌ラット (Eker rat) を用いて迫ろうとするものである。

B & C. 研究方法と研究結果

Mapmanager での解析：戻し交配ラット [Eker x F1 (Eker x BN)] (143 匹→96 匹キャリアー→22 匹解析) の遺伝解析を行った。ラット染色体 5 番のマーカー D5Rat12 で lod score 3.13 を得た。ラット染色体 2 番でも lod score は低いもののピークが見られた。しかしラット染色体 10 番と 14 番はデータが得られなかった。ラット染色体 5 番目に関しては、少数の戻し交配ラットでも mapping が出来る程の相関が見られたことになる。さらに戻し交配ラットの数を増やし他の領域 (例えば、ラット染色体 2 番、10 番と 14 番など) についても確認する予定である (目標キャリアー 500 匹)。

Congenic rat 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 代が誕生しており年度内に 4 代の誕生が期待できる。lod score が低いものの症例数の増加によって 3 をこえると期待されるラット染色体 2 番

についても、また、ラット染色体 10 と 14 番にいても 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 : 両染色体に BN を残すラット F2/11L を選択し Eker rat 雌 3 匹と交配した。16 匹の雄のうち、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 に戻っていた。現在、F4 の種々の遺伝子パターン (例えば遺伝子型が候補領域で BN/BN 型など) を得るためにラットを選択中である。

2) 染色体 10 番と 14 番 : F2 キャリアー雄 4 匹を解析し、ラット F2(10-14)/2L を選択して交配中である。

Congenic 4 代目で、それぞれについて発がん実験を行う予定である。

F2 作製 : F1(Eker x BN) 雌ラットと F1(Eker x BN) 雄ラットを交配し現在約 500 匹解析中である。

(倫理面への配慮は特になし)

D. 考察

Eker rat において現象的には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、症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同定が今後期待される。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。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、我々の用いた発がんシステム (初期の前がん病変の数) から、むしろ腫瘍の数 (起始: initiation) を規定するものと考えている。

E. 結論

ヒトの Pathology と Pathogenesis の知識、癌で言うならば癌の個性、癌の自然史、病気としての癌に関する知識を持った人が動物の病気を観察することが重要である。ヒトでの知識はそのまま動物にはあてはめられぬ。その逆も真。双方に通暁すべきである。これからは良い実験病理学者がますます必要になると考える。

F. 健康危険情報

発がん研究の目的は、『癌の原因論』を明確にし、『癌の制御』の根拠を示し、『癌の進展阻止』の実際を示すことであり、当面する最大の目標の一つは、『ある年齢以前の癌死をなくす』ことであると考え。発がん感受性遺伝子の同定およびその相互作用の解明はヒトの発がんの「予防・進展阻止」に有用な情報をもたらすものと考え。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto, T., Momose, S. and 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.

2. Hino, O., Majima, S., Kobayashi, T.,

Honda, S., Momose, S., Kikuchi, Y. and 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.

3. Kobayashi, T., Minowa, O., Sugitani, Y., Takai, S., Mitani, H., Kobayashi, E, Noda, T. and **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.

4. **Hino, O.**, Okimoto, k., Kouchi, M. and 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.

5. Wataya-kaneda, M., Kaneda, Y., **Hino, O.**, Adachi, H., Hirayama, Y., Seyama, K., Satou, T. and 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..

6. **Hino, O.**, Kobayashi, T. and Mitani, H.: Prevention of hereditary carcinogenesis. *Proc. Japan. Acad.* 78 (B), 31-33, 2002.

7. **Hino, O.**, Mitani, H. and 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).

8. Satake, N., Miyagawa, M., Sakurai, J., Mitani, H., Kobayashi, T., Tamura, H. and **Hino, O.**: N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)-induced renal and hepato-carcinogenesis in the tumor suppressor *Tsc2* transgenic rat. *Cancer letters* (in press).

9. **Hino, O.**: Molecular pathogenesis of TSC mutant models-Genotype, Phenotype and Dramatype- (in press)

2. 学会発表

1. **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）

2. 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）

3. 菊地泰、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）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

樋野先生研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto, T., Momose, S. and **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.
2. **Hino, O.**, Majima, S., Kobayashi, T., Honda, S., Momose, S., Kikuchi, Y. and 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.
3. Kobayashi, T., Minowa, O., Sugitani, Y., Takai, S., Mitani, H., Kobayashi, E., Noda, T. and **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.
4. **Hino, O.**, Okimoto, K., Kouchi, M. and 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.
5. **Wataya-kaneda, M.**, Kaneda, Y., **Hino, O.**, Adachi, H., Hirayama, Y., Seyama, K., Satou, T. and 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.
6. **Hino, O.**, Kobayashi, T. and Mitani, H.: Prevention of hereditary carcinogenesis. *Proc. Japan. Acad.* 78 (B), 31-33, 2002.
7. **Hino, O.**, Mitani, H. and 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).
8. Satake, N., Miyagawa, M., Sakurai, J., Mitani, H., Kobayashi, T., Tamura, H. and **Hino, O.**: N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)-induced renal and hepato-carcinogenesis in the tumor suppressor *Tsc2* transgenic rat. *Cancer letters* (in press).
9. **Hino, O.**: Molecular pathogenesis of TSC mutant models-Genotype, Phenotype and Dramatype- (in press).

2. 学会発表

1. 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）
2. 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）
3. 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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

癌発生の遺伝的ステップ

分担研究者 日合 弘 京都大学大学院医学研究科基礎病態学講座病態生物医学教授

研究要旨 SL/Kh マウスのリンパ腫は骨髄 Pre-B 細胞のポリクローナル増殖を基礎病変として、内在性レトロウイルスゲノム挿入によるモノクローナル増殖が誘導される2段階の遺伝的癌である。Inverse PCR 法を用いて増幅したウイルス・宿主ジャンクションを精査した結果、数カ所のウイルスゲノム挿入ホットスポットを同定し、そのうち1つは Stat5a であった。Stat5a の活性化の機構とそのトランスクリプション活性を明らかにし、Pre-B 細胞の表現型決定機構に考察を加えた。また、活性化 Stat5a mutant cDNA を SL/Kh 骨髄細胞に導入し、Pre-B 細胞の不死化と軟寒天培地内でコロニー状増殖がおこることを示し、Stat5a の持続的活性化が細胞の癌化を起し得ることを示した。

分担研究者 日合 弘 京都大学大学院医学研究科基礎病態学講座病態生物医学教授

く2段階的過程であることを示すこと、さらにウイルスゲノムの挿入機構を解明することを目的としている。

A. 研究目的

マウスリンパ腫の多くは内在性レトロウイルスのゲノムが標的細胞のホットスポットに組み込まれウイルスのプロモーターあるいは縁半サーによって下流の宿主遺伝子が活性化されることにより発病する。最近 Inverse PCR 法が開発されウイルス・宿主ジャンクション塩基配列を容易に増幅できるようになり、ウイルス挿入部で活性化される遺伝子を同定することが比較的容易になった。この方法により、我々が研究してきた SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫についてホットスポット配列を分離し、そこで活性化される宿主遺伝子とその機能を明らかにすること、これにより Pre-B リンパ腫の発生が宿主・ウイルス相互関係にもとづ

B. 研究方法

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。

今年度の研究についてはマウスにおける自然発生リンパ腫を材料としているため、京都大学動物実験指針に従う届け出のみとした。ヒト材料は取り扱わなかった。

C. 研究結果

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

このうち 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, Ig α , 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 日後には骨髓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髓では培養 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、骨髓内で 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。

D. 考察

Svi1 以外へのレトロウイルス挿入については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 と骨髓のみに局限して増殖する Minor type に二分される。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。

E. 結論

我々の一連の研究により、Stat5a は潜在的な癌遺伝子のひとつであることが明らかになった。SL/Kh 系マウスには B 細胞系統に遺伝的な分化異常があり、このため標的細胞の一過性増殖をきたすが、その DNA に内在性レトロウイルスゲノムがしかるべき遺伝子近傍に挿入されると、後者の活性化により、分化異常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、ホットスポットの分子生物学的解析が進むにつれ、さらにこの仮説を修正・補強していきたい。また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。

F. 健康危険情報

細胞内の増殖シグナル分子もレトロウイルスなどにより持続的に活性化されると、B細胞系の免疫不全症では潜在的な癌遺伝子として働く。直ちにヒトに外挿はできない。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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.
2. Seno, H, Sawada, M., Fukuzawa, H., Morita, Y., Takaishi, S., Hiai, H., Chiba T.: Enhanced expression of transforming growth factor (TGF)- α -precursor and TGF- β 1 during paneth cell regeneration. *Dig. Dis. Sci.* 46:1004-1010, 2001.
3. Mishima, M., Hirano, M., Morohashi, T., Arase, N., Shisa, H., Hiai, H., Ato, M., Onoe, K.: Tolerogen-producing cells in allogenic bone marrow chimeras established with spontaneous leukemia prone mice. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* (In press).
4. 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.
5. 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.
6. Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A, Nishi T, Iwano H, Inai M, Uose S, Nakase H, Ohana M, Oshima C, Matsushima Y, Kawanami C, Hiai H, Masuda T, Chiba T.: Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in Helicobacter pylori-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. *Infect. Immun.* 69: 6749-54, 2001.
7. 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. *Amer. J. Pathol.* 159: 2347-2353, 2001.
8. 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.
9. Tachibana, M., Adachi, W., Kinoshita, S., Kobayashi, K., Honma, Y., Hiai, H., Matsushima, Y.: Androgen-dependent mouse keratoconus links to a MHC

- region including the *sex-limited protein* gene. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 51-57, 2002.
10. Yan, Y., Zeng, Z.Z., 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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)
- (2) 学会発表
1. 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
2. 日合 弘 発癌の多因子遺伝的感受性。
日本癌学会シンポジウム 平成 13 年 9 月
横浜
3. 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
4. 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, 2002. Paris, France,

厚生科学研究費補助金（がん克服研究事業）
分担研究報告書

マウス肺発がん耐性遺伝子 *Par2* の解析

分担研究者 李 康弘
虎の門病院 病理部医員 兼（財）冲中記念成人病研究所 研究員

研究要旨： マウス肺発がん耐性遺伝子 *Par2* の候補遺伝子として *Polt* 遺伝子に注目し、その多型解析を行った。

A. 研究目的

マウスのウレタン誘発肺発癌耐性遺伝子である *Par2* は 18 番染色体上の約 0.5 cM の領域に存在する。BALB/cByJ (BALB) マウスの *Par2* allele は additive に肺腫瘍数を減少させるが、A/J、C57BL/6J (B6) および C3H/HeJ (C3H) マウスの allele は肺腫瘍数に影響を及ぼさない。本年度は *Par2* の染色体位置情報に従い、同領域に既にマップされている *Dcc* (Deleted in colorectal cancer)、*Mbd2* (methyl-CpG binding domain protein) ならびに *Polt* (DNA polymerase iota) 遺伝子を *Par2* の候補遺伝子と考え、上記 4 系統の肺由来 cDNA の塩基配列を決定した。

B. 研究方法

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 *Polt* (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)

マウスは統計学的検定に必要最小限の匹数を用了。また、屠殺は全身麻酔により行なった。

C. 研究結果

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

Polt は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 *Polt* 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。*Polt* の機能については未だ不明な点が多いので、今後さらに *Polt* 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

マウス肺発がん耐性遺伝子 *Par2* の候補遺伝子として、*Polt* を提案する。しかし、最終的な証明にはノックアウトマウス等のさらなる解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Lee, G.-H., Matsushita, H., and Kitagawa, T. Fine chromosomal localization of the mouse *Par2* gene that confers resistance against urethane-induction of pulmonary adenomas. *Oncogene* 20: 3979-3985 (2001).

Kojima, T., Srinivas, M., Fort, A., Urban, M., Lee, G.-H., Sawada, N., and Spray, D. C. Growth-suppressive function of human connexin32 in a conditional immortalized mouse hepatocyte cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 37: 589-598 (2001).

Okada, C., Kura, F., Wada, A., Inagawa, H., Lee, G.-H., and 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

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の場合は論題、雑誌名、巻・頁数の順）	刊行年	刊行者（書籍のみ）	執筆者氏名
Early detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP) induced mutations within the <i>Apc</i> gene of rat colon. <i>Carcinogenesis</i> , 22:329-335.	2001		Burnouf D, Nakagama H, et al.
High susceptibility of Scid mice to colon carcinogenesis induced by azoxymethane indicates a possible caretaker role for DNA-dependent protein kinase. <i>Carcinogenesis</i> 22:1551-1555.	2001		Ochiai M, Nakagama H, et al.
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- <i>b</i>]pyridine in combination with a high fat diet. <i>Carcinogenesis</i> 23:197-200.	2002		Ubagai T, Nakagama H, et al.
Studies on mammary carcinogenesis induced by a heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine, in mice and rats. <i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i> 39:158-164.	2002		Nagao M, Nakagama H, et al.
Frequent and multiple mutations at minisatellite loci in sporadic human colorectal and gastric cancers – possible mechanistic differences from microsatellite instability in cancer cells. <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 93: 382-388.	2002		Inamori H, Nakagama H, et al.
Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-forne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine. <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 93:478-483.	2002		Ochiai M, Nakagama H, et al.
Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA). <i>Life Sciences</i> 70:2623-2630.	2002		Osawa E, Nakagama H, et al.
Genetic loci controlling susceptibility to <i>r</i> -ray-induced thymic lymphoma. <i>Oncogene</i> 20:5243-5247.	2001		Saito Y, Kominami R, et al.
Genetic analysis of radiation-induced thymic lymphoma. <i>International Congress Series</i> 715:224-231.	2001		Kominami R, et al.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の場合は論題、雑誌名、巻・頁数の順）	刊行年	刊行者 (書籍のみ)	執筆者氏名
Mononucleosomes assembled on a DNA fragment containing (GGA/TCC) _n repeats can form a DNA-DNA complex. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 290:16-22.	2002		Yoshimura A, <u>Kominami, R.</u> , et al.
Persistent induction of somatic reversions of the pick-eyed unstable mutation in <i>F1</i> mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage. <i>Radiation Research</i> .	(in press)		Shiraishi K, <u>Kominami, R.</u> , et al.
Insertional mutation of the <i>Attractin</i> gene in the black tremor hamster. <i>Mamm. Genome</i> 13:36-40.	2002		<u>Kominami, R.</u> , et al.
Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 98:559-564.	2001		<u>Kuramoto, T.</u> , et al.
Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. <i>Mamm. Genome</i> 12:469-471.	2001		<u>Kuramoto, T.</u> , et al.
Linkage mapping of the rat interleukin 1 receptor antagonist gene on chromosome 3. <i>Exp. Anim.</i> 50:359-361.	2001		<u>Kuramoto, T.</u> , et al.
Insertional mutation of the <i>Attractin</i> gene in the black tremor hamster. <i>Mamm. Genome</i> 13:36-40.	2002		<u>Kuramoto, T.</u> , et al.
Suppression of cytochrome P450 1A1 and 4A1 gene expression in renal carcinomas of <i>TSC2</i> gene mutant (Eker) rats. <i>Int. J. Oncology</i> 18:147-149.	2001		Okamoto T, <u>Hino, O.</u> , et al.
Multistep renalcarcinogenesis as gene expression disease in tumor suppressor <i>TSC2</i> gene mutant model – genotype, phenotype and environment. <i>Mutation Res.</i> 477:155-164.	2001		<u>Hino, O.</u> , et al.
A germ-line <i>Tsc1</i> mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by <i>Tsc2</i> mutation in mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 98:8762-8767.	2001		Kobayashi T, <u>Hino, O.</u> , et al.
A novel renal carcinoma predisposing gene of the Nihon rat maps on the same chromosome 10, but different locus, as the <i>Tsc2</i> mutant (Eker) rat. <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 92:1147-1149.	2001		<u>Hino, O.</u> , et al.
Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. <i>Arch. Dermatol. Res.</i> 293:460-469.	2001		Wataya-kaneda M, <u>Hino, O.</u> , et al.