

20030142

厚生労働科学研究研究費補助金

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 斉

平成16(2004)年4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 斉	
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	12
中釜 斉	
2. P53 遺伝子欠損の与える影響を修飾する遺伝子の単離	17
木南 凌	
3. ACI/Seg ラット前立腺癌原因遺伝子のマッピング	22
山下 聡	
4. 腎がん感受性遺伝子の単離、同定	25
樋野 興夫	
5. 癌発生の遺伝的ステップ	28
日合 弘	
6. マウス肺発がん耐性遺伝子 <i>Par2</i> の解析	32
李 康弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷（別添）	

厚生労働省科学研究費補助金（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 斉 国立がんセンター研究所 生化学部部長

研究要旨 大腸、胃、肺、腎臓、前立腺、リンパ組織などの種々の臓器の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した。ラット第 16 番染色体上の大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の約 10Mb の候補領域 D16Mgh5~D16Rat40 に存在する約 50 個の遺伝子の内、30 個の遺伝子について real-time RT-PCR 法による発現を調べた。その結果、*Pcm1* と *Arhgap7* の 2 つの遺伝子が、2 系統のコンジェニックラットにおいて有意な発現誘導を示した。放射線誘発リンパ腫の感受性候補遺伝子として、メタロチオネイン (MTI) や Placental growth factor (PLGF) などの遺伝子発現を制御する転写因子 MTF-1 を同定した。プロリン型の MTF-1 をもつマウスは照射の効果をより減弱させることができ、それによってリンパ腫抵抗性を獲得する可能性が示唆された。前立腺がんでは、強い核異型をもつ腫瘍性病変の出現に関わる遺伝子座を *D19Rat75* 近傍に、腫瘍性病変の大きさに関与する遺伝子座を *D2Rat161* 近傍にマップした。マウス肺発がんの抵抗性遺伝子 *Par2* の候補遺伝子 *Polu* に関して、感受性系統 C57BL/6 由来の cDNA を導入した BALB/3T3 細胞では悪性形質転換巣が現れた。遺伝性腎発がんの変異尿管誘発の抵抗性遺伝子、および DRH 肝発がんラットの第 1, 第 4 染色体上の抵抗性遺伝子 *Drh1*, *Drh2* については、コンジェニック動物の作製を進めている。

分担研究者

中釜 斉	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
山下 聡	国立がんセンター研究所	研究員
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

B. 研究方法

(1) Dysplastic ACF 誘発性と発がん性の相関  
大腸を 0.2 % methylene blue で染色したのち、70 % methanol で脱色することにより、dysplastic ACF を高感度に検出する方法の確立を試みた。本法で検出した dysplastic ACF と大腸発がん性との相関性について検討した。

A. 研究目的

本研究班では、発がんの動物モデルを用いた遺伝解析により、発がんの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、さらに個体レベルの発がん感受性の違いにより、その過程が複雑に制御されている。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テーラーメイドな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。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。

(2) コンジェニック系統の大腸粘膜における遺伝子発現解析による候補遺伝子の同定

コンジェニック系統の作成には、marker-assisted speed congenic 法を用いた。A 系統は、抵抗性系統である ACI ラットとのバッククロスを繰り返すことにより、感受性系統 F344 に由来する D16Rat17~D16Rat15 の約 30~40 cM の領域をヘテロに含み、C 系統は D16Rat12~D16Wox3 の約 30~40 cM の領域をヘテロに含む系統として樹立した。さらに A 系統と C 系統の交配により染色体 16 番のほぼ全域をヘテロに有する (A+C) 系統、A 及び C 系統の一部にあたる D16Rat40~D16Rat34 を含む B 系統を作成し、これら 4 系統における ACF 誘発性と、網羅的な発現遺伝子解析を行った。遺伝子の発現解析には、PhIP 処理及び未処理のコンジェニック系統の大腸粘膜より抽出した RNA を用い、high-density oligonucleotide microarray (GeneChip; Affymetrix) をプローブとした、網羅的な発現解析を行った。発現あるいは発現誘導に差が見られた遺伝子に関しては、ラット 16 番染色体上の感受性 *Sct* 遺伝子座にマッ

ブされるかを検討した。

(3) Nat1/Nat2 遺伝子のゲノム構造の解析と、PhIP による発現誘導の系統差の検討

コンジェニック系統の発現解析により明らかになった Nat 遺伝子の PhIP による発現誘導の分子機構を明らかにするため、ラット Nat 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。Nat 遺伝子上流のゲノム構造の解析には、5'-RACE で得られた転写開始点に関する情報と、ラット BAC クローンの塩基配列から得られた情報を参照した。

(4) 感受性遺伝子の一つの局在候補領域 10 Mb に存在する遺伝子の発現解析と SNP 検索

コンジェニック系統の解析から絞り込んだ、D16Mgh5~D16Rat40 間の約 10 Mb にマップされた約 50 個の遺伝子のうち、D16Rat17~D16Rat40 間の約 30 個の遺伝子について、コンジェニック A 及び C 系統での遺伝子発現と、親系統 F344 及び ACI ラットにおける cSNP の有無について検討した。

(5) マウスリンパ腫感受性遺伝子の同定

染色体 4 番上の感受性遺伝子座について詳細な解析を行ってきた。平成 14 年度までに小さな染色体領域を含む 4 系統のコンジェニックマウスを作製し、D4Mit12 座近傍の感受性領域の限定化を行った。さらに限定されたゲノム領域について、マウス系統間にみられる多型染色体構造のパターン (ハプロタイプ) について SNP マッピングを用いて解析した。

(6) リンパ腫感受性の候補遺伝子 MTF-1 の転写活性の測定

セリン型 MTF-1 とプロリン型 MTF-1 遺伝子をコードする組換えプラスミドの作製には、変異 PCR プライマーを用いた PCR 変異導入法を利用した。転写誘導活性の測定には、リポフェクチンによるトランスフェクション法を行った。トランスフェクション後、48 時間後に亜鉛を培地に投与し、その 4 時間後に細胞を集め、蛋白を抽出した。レポーター活性、すなわちルシフェラーゼ活性は通常の方法を用いて測定した。各細胞群のトランスフェクション効率、 $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を同時にトランスフェクションすることにより補正した。

(7) 野生マウスの MTF-1 多型の決定

マウス DNA は遺伝学研究所の城石教授から分与された。proline-rich 領域を PCR 法で増幅し、その産物を直接塩基配列決定し、MTF-1 多型を同定した。得られた多型の確認には、多型を識別する制限酵素・Fnu4HI を利用した。ヒト MTF-1 遺伝子の SNP の検出は PCR-RFLP 法を用い、ハプロタイプを決定した。

(8) 前立腺がん感受性遺伝子のマッピング

(F344xACI) $F_2$  ラット ( $F_2$ ) 219 匹を、無処理で 2 年 6 ヶ月飼育した。前立腺腫瘍性病変については、核異型・細胞異型の程度について分類した。各病理分類について、最大断面の組織切片中の面積を測定し、大きさの指標とした。一方、全ゲノムに存在する合計 193 個のマーカー (マイクロサテライトマーカー 149 個と AP-RDA マーカー 44 個) について遺伝子型を決定した。連鎖解析は、Map Manager QTX プログラムを用いて行った。

(9) Eker 遺伝性腎がんに対する抵抗性遺伝子のマッピングと congenic ラットの作製

Phenotype (表現型) はラットより摘出した両腎を最大断面にて組織標本作製し、その全視野中の前がん病変数の多寡を持って決めた。実験に供するラットは Eker rat と他の純系ラット (Brown Norway) の交配動物とした。実験の効率化のために生後 4 週時点で ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) を 80mg/kg 腹腔内投与し、前がん病変数の増幅を行い、投与後正確に 4 週間 (すなわち生後 8 週) で、解剖を行い、腎臓および DNA の採取を行った。phenotype と genotype の比較により発がん感受性遺伝子が存在する染色体部位のマッピングと、それを保持した congenic 動物を speed congenic 法により作成した。また腎皮質より mRNA を調整し、DNA Chip での解析を行った。

(10) マウスリンパ腫発生における Bomb1 遺伝子座の関与について

化学発がん抵抗性 DRH 系ラットと感受性 F344 ラットの F2 に肝発癌剤 3'-Me-DAB を経口投与し、前がん、発がん段階でそれぞれの病変の数、サイズなどをパラメーターとして量的形質の遺伝解析を行った。当研究室で開発した Pre-B リンパ腫好発系 SL/Kh マウスのリンパ腫 DNA から inverse PCR 法でウイルス・宿主ジャンクション配列を増幅させ、ウイルス挿入部位の構造、近傍で活性化されている癌関連遺伝子の分子生物学的解析を行った。多数の挿入部位の塩基配列を検討しコンセンサス配列を検索した。動物実験については京都大学大学院医学研究科動物実験施設に届け出、同施設が定めるガイドラインに沿って実施した。

(11) 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

C57BL/6 マウス由来の *Polu* cDNA をサイトメガロウイルス由来プロモーターの下流に連結し、neo 遺伝子とともに BALB/3T3 細胞へトラ

ンスフェクションし、G418 によって遺伝子導入細胞を選択した。肺胞 2 型上皮特異的に発現する surfactant protein C 遺伝子由来プロモーターの下流に C57BL/6 由来 *Poli* cDNA を連結した組換え遺伝子を BALB/c マウス受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製した。

#### (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。動物の苦痛に対しても十分な配慮を払った。動物遺伝子からヒトの原因遺伝子に到達した場合や、ヒト腫瘍サンプルを用いる解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、指針適用範囲に該当する研究計画については、各研究施設や大学の遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

#### (1) Dysplastic ACF 誘発性と発がん性の相関

Dysplastic ACF の検出は、従来の 0.2 % methylene blue 染色に、70 % methanol による脱色法を加えることにより、容易に描出できることが分かった。その結果、F344 と ACI 系統間では従来の ACF, dysplastic ACF, 大腸がんの誘発性が互いに良く相関することが分かった。

#### (2) コンジェニック系統を用いた感受性遺伝子座 (*Sct*) の絞り込み

作成した 4 種類のコンジェニックラットにおける ACF 誘発数を計測した。コンジェニック A 系統では、一匹平均  $2.0 \pm 1.2$  個の ACF が誘発されたのに対し、対象群では平均  $0.6 \pm 0.8$  個であった。C 系統では平均  $2.1 \pm 1.2$  個、対象群では平均  $0.8 \pm 0.4$  個とほぼ A 系統と同程度の ACF 誘発数を示した。(A+C) 系統では平均  $1.9 \pm 1.3$  個 (対象群の平均  $1.0 \pm 0.0$  個) と、A 系統および C 系統とほぼ同程度であった。この結果は、*Sct* が A 系統と C 系統とのオーバーラップする領域に存在することを示唆した。さらに、A 及び C 系統の一部にあたる D16Rat40 ~ D16Rat34 を含む B 系統では対象群と同程度の ACF 数であったことから、*Sct* の局在は、D16Mgh5 ~ D16Rat40 間の約 10 Mb の領域に存在することが示唆された。

#### (3) コンジェニック系統の大腸粘膜における遺伝子発現解析による候補遺伝子の同定

コンジェニック A, C および A+C 系統における ACF 誘発性の検討から、感受性遺伝子 (*Sct*) は、A 領域と C 領域がオーバーラップする領域 (A∩C) に散在する可能性が強く疑われた。両コンジェニック系統の PhIP 投与前後の大腸粘膜より RNA を抽出し、網羅的発現解析を行った。その結果、両系統間で発現差を認め、かつ、A∩C 領域に局在したものは、glutathione reductase (GR) を含めて 3 種類のみであった。このうち、real-time RT-PCR でも系統間での発現差を再現できたのは、GR のみであった。現在、GR の遺伝子多型の有無、大腸発がん感受性 (或いは抵抗性) における意義について検討を進めている。

#### (4) 感受性遺伝子の一つの局在候補領域 10 Mb に存在する遺伝子の発現解析と SNP 検索

網羅的な遺伝子発現解析では有力な候補遺伝子が得られなかった。理由の一つとして、GeneChip 上にエントリーされている遺伝子数 (遺伝子の coverage) が不十分である可能性を考え、gene-oriented な候補遺伝子の絞り込みを開始した。上記の A∩C 領域を一部含んでいるコンジェニック B 系統では ACF の誘発性が高くなかったことから、*Sct* の局在を A∩C 領域で B に含まれない D16Mgh5 ~ D16Rat40 の約 10 Mb に限定し、当該領域に既にマップされている約 50 個の遺伝子の内、D16Rat17 ~ D16Rat40 間に含まれる約 30 個の遺伝子について、発現解析および cSNPs の検索を行った。その結果、*Pcm1* 遺伝子と *Arhgap7* 遺伝子の 2 つのみが、両コンジェニック系統 (A および C) で共通に発現が上昇していた。これら 2 つの遺伝子について cSNPs の検索を進めている。

#### (5) *Nat1/Nat2* 遺伝子のゲノム構造の解析と、PhIP による発現誘導の系統差の検討

*Nat* の遺伝子発現は、F344 系統やコンジェニック系統において PhIP による有意な発現誘導を示すが、*Sct* 領域にはマップされないことから、*Sct* 遺伝子により 2 次的に発現制御されている可能性がある。*Nat1*, *Nat2* 遺伝子の転写産物の 5'-末端の配列 (転写開始点) を決定するため、5'-RACE による解析を行った。大変興味深いことに、*Nat1* と *Nat2* はゲノム中に head-to-tail にタンデムに配置されていることが分かった。*Nat1* の 3 種類の転写産物は、*Nat1* 固有のプロモーターにより転写されていることが分かった。これに対し、*Nat1* の下流に位置する *Nat2* 遺伝子は、*Nat2* 固有のプロモーターからの転写産物に加え、*Nat1* のプロモーターをつかった転写産物も一部存在することが分かった。*Nat1* および *Nat2* 遺伝子に特異的な配列を用いた real-time PCR により、*Nat2*

遺伝子のみ有意な発現誘導が認められた。Nat2 は感受性遺伝子 Sct による発現制御を受けている可能性があり、Nat2 遺伝子上流域の解析により、Sct の候補遺伝子を絞り込める可能性がある。或いは、Sct の候補遺伝子について、「コードされる蛋白質の Nat2 プロモーター配列への結合による転写制御」という機能の有無で絞り込める可能性がある。

#### (6) リンパ腫感受性の候補遺伝子 MTF-1 の同定と機能解析

D4Mit12 座近傍の感受性領域の限定化を行い、約 2.5Mb 領域内に感受性座の存在することを明らかにした。次に、マウス系統間にみられる多型染色体構造のパターンを SNP マッピングを用いて解析した。その結果、2.5Mb 領域は 2 つの領域に分割できることが分かった。MSM 由来の染色体断片が入り込んでいるセントロメア側 1.0Mb 領域と、ヨーロッパ系とアジア系ゲノムが完全に分離できるテロメア側 1.5Mb 領域である。感受性を示すと考えられるマウス系統と抵抗性のそれとの比較から、感受性座は前者の 1.0Mb 領域に存在することが示唆された。マウスおよびヒトのデータベースを検索すると、1.0Mb の感受性座領域内には 8 つの既知遺伝子があり、その一つに MTF-1 遺伝子が見いだされた。

MTF-1 遺伝子は放射線暴露を含めたストレスにตอบสนองする遺伝子であり、その下流のメタロチオネイン (MTI)、Placental growth factor (PlGF) などの遺伝子発現を制御する転写因子をコードする。MTI はラジカル・スカベンジャーであり、PlGF は抗アポトーシス作用をもつ。MTF-1-mRNA の発現を感受性系統と抵抗性系統のマウス間で比較したが、両者に発現の差は見られなかった。次に、MTF-1 遺伝子多型を検索した。その結果、424 番目のアミノ酸が、BALB/c ではセリン、MSM ではプロリンに変化するという多型の存在が明らかとなった。この領域は転写活性化ドメインである proline-rich ドメイン領域であり、一つのプロリンがセリンに変換することで、その活性が低下する可能性が十分に想像された。この可能性をテストするために、セリン型 MTF-1 とプロリン型 MTF-1 遺伝子をコードする組換えプラスミドを作製し、その転写誘導活性の違いを検討した。これらのプラスミドと MTF-1 転写因子結合配列をもつレポーター遺伝子を MTF-1 欠損マウス細胞株に同時にトランスフェクションした。セリン型 MTF-1 をトランスフェクションした細胞は亜鉛で誘導した前後で約 2.5 倍の活性の違いを示したが、一方プロリン型 MTF-1 遺伝子をトランスフェクションした細胞のそれは約 4 倍であり、明らかに誘導活性の高いことが示された。さらに、MTF-1 多型と遺伝子機能との関連性をマウスを使って検討した。BALB/c と BALB/c コンジェニックマウスに $\gamma$ 線を照射し、16 時間後に胸腺細胞での MTI-mRNA および PlGF-mRNA の発現量を RT-PCR で測定した。抵抗性を示すコン

ジェニックマウスでは BALB/c と比べ、有意に高い MTI-mRNA 誘導能がみられた。PlGF-mRNA の誘導能もよく似た違いを示したが、発現量の程度は低かった。この違いの理由については異なったプロモーター構築や異なった転写因子セットの関与が想定される。これらの結果は、上述した培養細胞系での結果とよく一致し、プロリン型の MTF-1 をもつマウスはセリン型に比べ高い放射線による誘導能をもつことを示している。

#### (7) 野生マウス及びヒトの MTF-1 多型の分布

BALB/c マウスなどの実験室マウスのゲノムは概ねヨーロッパに生息する野生マウスのゲノムに由来することが分かっているが、予想通りヨーロッパ野生マウス (*Mus musculus domesticus*) はセリン型 MTF-1 をもっていた。一方、ロシアからアジアにかけて生息する *Mus musculus musculus* はプロリン型の MTF-1 をもち、西アジア、東南アジアに生息する *Mus musculus castaneus* もプロリン型の MTF-1 をもっていた。このことは MTF-1 多型の起源は古いということを示している。ヒト MTF-1 ハプロタイプについては、データベースの登録されている多型から 3 種類の SNPs を選択し、日本人でのハプロタイプの種類と頻度を決定した。

#### (8) ラット前立腺発がん感受性・抵抗性遺伝子のマッピング

F344, ACI, および F<sub>2</sub> ラットを 2 年 6 ヶ月飼育終了時、ACI は 21 匹中 12 匹 (57%)、F344 は 22 匹中 8 匹 (36%)、F<sub>2</sub> は 219 匹中 118 匹 (54%) が生存した。ACI に観察される片腎無形成による腎不全や、F344 に観察される白血病が、途中死亡の主な原因であった。前立腺がんによる途中死亡と考えられた例は無く、前立腺がんの連鎖解析には、最終解剖例のみを用いた。腫瘍性病変は ACI の 100%、F344 の 50%、F<sub>2</sub> の 89%に観察された。ACI で観察された腫瘍性病変は、構造異型・核異型が強いという特徴があった。各病理分類の病変の有無、数、面積を指標に連鎖解析を行った。ラット 19 番染色体 D19Rat75 近傍に、強い核異型をもつ腫瘍性病変の出現に関与する遺伝子座 (Lod score 5.1) がマップされた。強い核異型を持つ病変が出現した頻度は、D19Rat75 で ACI アレルを持つ個体の 90%であったのに対し、F344 アレルをホモにもつ個体では 52%であった。また、ラット 2 番染色体 D2Rat161 近傍に、腫瘍性病変の大きさに関与する遺伝子座 (Lod score 5.1) をマップした。腫瘍性病変が前立腺に占める割合は、D2Rat161 で ACI アレルを持つ個体では平均 1.1%であったのに対し、F344 アレルをホモにもつ個体では平均 3.0%であった。本座位では、逆説的に F344 アレルをもつと腫瘍が大きくなるという表現型を示した。両座

位の影響力は、それぞれ、全分散の 24%、18% を説明するものであった。D19Rat75 近傍はヒト 16q13 または 4q28 に相当し、D2Rat179 近傍はヒト 4q25-q28 または 3q21-q27 に相当した。

#### (9) 遺伝性腎がんに対する抵抗性遺伝子のマッピングとコンジェニック動物の作製

両腎の前がん病変数 10 個以下と 100 個以上を検索対象とし、ラット染色体上のマーカーを約 100 個用いた結果、LOD score3 以上となった 5 番染色体を始めとし、2、10、14 番染色体上に発がん感受性遺伝子の存在する可能性のある部位を見いだした。LOD score3 以上では有意水準 5% 以下となっている。これら 4 か所の領域が Brown Norway から由来しその他の部分が Eker rat に戻った congenic 動物を別々に作成中で、現在 7 代目に至っている。4 代目より使用しているマーカーすべてが Eker rat のパターンとなっている。5 代目を対象とした ENU 投与後の発がん実験では phenotype と genotype の不一致が認められ、複数の遺伝子の相互作用いわゆる genetic interaction の存在が示唆されたため 7 代目で複数の遺伝子座を持つように congenic 動物間の交配を行っている途中である。Eker rat と mutation 以外を BN にした congenic 動物の DNA chip による比較では 2 倍以上もしくは 1/2 以下の発現量になった遺伝子をそれぞれ約 50 個ずつ得ることができた。

#### (10) DRH ラットの肝がん抵抗性遺伝子 Drh1, 2

Donryu ラットに肝発癌剤 3'-Me-DAB を 20 世代にわたり連続投与し得られた近交系 DRH は発癌剤に対し強力な遺伝的抵抗性を示した。感受性 F344 ラットの F2 に肝発癌剤 3'-Me-DAB を経口投与し前癌、発癌段階で、それぞれの病変の数、サイズなどをパラメーターとして量的形質遺伝解析を行った。感受性 F344 ラットの F2 に 3'-Me-DAB を経口投与し前癌 (7 週)、発癌段階 (20 週) で、それぞれの病変の数、サイズなどをパラメーターとして量的形質遺伝解析を行った。QTL 解析の結果、第 1、第 4 染色体に強い優性抵抗性 QTL を検出し、Drh1, Drh2 と命名した。前癌病変である酵変異巢は両遺伝子座により抑制されていたが、肝癌の発生そのものは Drh2 のみが有効であった。

(DRH x F344) F1 の肝癌では LOH はみられなかった。Drh1 のコンジェニック系を作成し前癌病変に対する効果を確認した。

#### (11) SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発生の分子機構

SL/Kh は内在性 ecotropic MuLV のゲノム再挿入により高率に Pre-B リンパ腫を発生する

近交系マウスである。リンパ腫 DNA から inverse PCR 法でウイルス・宿主ジャンクション配列を増幅させ、宿主塩基配列を解析した。その結果、Stat5a, Evi3, c-Myc などの遺伝子内あるいはその近傍への挿入と、発現増幅が認められた。特に Stat5a の持続活性型ミュータント cDNA を骨髄細胞に導入することにより、試験管内で Pre-B 細胞のコロニー増殖を誘発できた。多数のゲノム挿入部位の塩基配列を検討した結果、ウイルスインテグラーゼは宿主 DNA の CA(GT) dinucleotide とループ状の二次構造を認識して熱力学的に安定な複合体を形成し、ゲノム挿入がおこること、コンセンサス配列を持つ合成オリゴヌクレオチドへも挿入がおこることを見出した。この挿入機構はマウスレトロウイルスに限らず、ヒトのウイルスなどとも共通であった。

#### (12) マウス肺発がんの抵抗性遺伝子 *Polu* の機能解析

*Polu* cDNA と neo 遺伝子を同時にトランスフェクションされた BALB/3T3 細胞では、2 回の継代後から複数の悪性転換巣が現れた。neo 遺伝子のみをトランスフェクションした対照群では有意な悪性転換巣の増加は認めなかった。*Polu* cDNA のトランスジェニックマウスは、現在までに 3 匹 (いずれも雌) の founders が得られた。

#### D. 考察

(1) PhIP 誘発ラット大腸発がんでは、感受性候補遺伝子 *Sct* がマップされた約 10 Mb の領域に存在する 2 個の遺伝子 (*Pcm1*, *Arhgap7*) が、コンジェニック系統間で遺伝子発現に差があることが分かった。また、PhIP の代謝活性化に関与する *Nat2* の発現誘導が系統間で差が見られたことから、*Sct* 遺伝子は *Nat2* 遺伝子の発現制御に影響する可能性が示唆された。また、PhIP により誘発される ACF 総数よりも dysplastic ACF の誘発数がより発がん性を反映することが分かり、今後、dysplastic ACF を指標とした大腸発がん感受性遺伝子のマッピングを検討する必要性が示唆された。

(2) 放射線誘発マウスリンパ腫の感受性に関して、MTF-1 遺伝子が候補遺伝子であることが分かった。MTF-1 は放射線暴露を含めたストレスにตอบสนองする転写因子をコードする遺伝子であり、ラジカル・スカベンジャーであるメタロチオネインや、抗アポトーシス作用をもつ PIGF などの発現を制御する。感受性マウス (BALB/c など) と抵抗性マウス (MSM) 間での MTF-1 遺伝子多型を検索した結果、転写活性化ドメインである proline-rich ドメイン領域に、感受性マウスの MTF-1 はセリン、一方抵抗性

マウスではプロリンをコードするという多型のあることが判明した。プロリン型の MTF-1 をもつマウスはセリン型に比べ高い放射線による誘導能をもつことから、プロリン型の MTF-1 をもつマウスは照射の効果をより減弱させることができ、それによってリンパ腫抵抗性を獲得するという解釈が与えられる。地球上で生息するマウスの分布の調査から、MTF-1 多型はマウスの亜種間ですでに違いが見られ、2種類のアレルは広範囲に分布することが分かった。すなわち、多型の起源は古く、約百万年前に遡ることができると思われた。発がんリスクを左右する「ありふれた」遺伝因子は「古い起源をもつ、ありふれたアレル」に由来すると考えられているが、この仮説に合致することが分かった。ヒトでも MTF-1 多型が深く関与するかどうかは重要な次の課題である。現在、小児甲状腺がんなどのヒトがん感受性を対象に、MTF-1 多型の関与を計画中である。

(3) ACI/Seg ラットの前立腺発がんに関して、強い核異型をもつ腫瘍性病変の出現に関与する遺伝子座、および、腫瘍性病変の増殖に関与する遺伝子座がマップされた。マップされた領域に存在し、かつ、機能的に前立腺がんの発症に関与すると考えられる遺伝子があって、その発現量あるいはアミノ酸配列が ACI/Seg ラットと F344 ラットで異なるならば、ラット自然発症前立腺がんの原因遺伝子の有力な候補と考えられる。このような遺伝子を探索し、トランスジェニックラットを作製、検討することにより、ラット自然発症前立腺がんの原因遺伝子を同定できる可能性がある。

(4) Eker ラットを用いた遺伝性腎がんの抵抗性遺伝子の同定に関しては、DNA chip を用いて phenotype を示す交配動物の遺伝子発現パターンを大規模に解析した。このパターン分析により発がん感受性遺伝子の同定にすすみ、congenic 動物にて確認を行う体制が整った。

(5) DRH ラットの肝がん抵抗性遺伝子 Drh1, Drh2 に関して、クローズドコロニーラットに発癌剤を長期投与して強力な遺伝的抵抗性システムを確立することは長期の忍耐のいる方法であるが、発癌の遺伝的ステップを解明する上で有用な方法である。2つの強力な優性抵抗性 QTL が同定され、コンジェニック系統も樹立された。Drh1 近傍には GST-P, Drh2 近傍には TGF- $\alpha$  がマップされているが、その責任遺伝子は未確定で今後の研究をまたねばならない。

(6) SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発がん関連遺伝子の同定に有用なツールであり、次々に新しい挿入部位が同定されている。またそ

の多くは Pre-B 細胞の分化・増殖に関わるシグナル系列に関わっていることから、発癌機構とともに初期 B 細胞の分化の研究にも有用である。この研究を通じて明らかになったウイルスゲノム挿入の分子機構は、ウイルス感染過程の重要な機構の理解のみならず、ウイルス病の予防、治療に重要な示唆をもっており、将来ヒトレトロウイルスに対する創薬に繋がる可能性が高く、現在特許申請中である。

(7) 肺がんの抵抗性遺伝子 Par2 については、キメラマウスの実験結果より、Par2 形質の責任因子は腫瘍化標的細胞自身に存在することが判った。また、Par2 形質の責任因子は二段階発がん説における initiation への感受性を修飾するものと考えられた。ウレタン誘発マウス肺腫瘍の大部分では、Kras codon61 の第二塩基が A から G ないし T に変異しているが、これは initiation に伴う現象と考えられている。興味深いことに、Poli は T を template とする場合、正しい塩基である A を挿入する確率に比べ、誤って G あるいは T を挿入する確率が 10 倍程度高いことが知られている。今回発見された Poli の SNPs は、例えば fidelity の多様性の原因となり、発がん感受性の決定に関わっている可能性が考えられる。今後、Poli トランスジェニックマウスないしノックアウトマウスを作製し、Poli のウレタン誘発肺がん感受性への影響を検討する。

## E. 結論

PhIP 誘発ラット大腸発がんでは、PhIP の代謝活性化に関与する Nat2 の発現誘導が系統間で差が見られた。この結果は、Sct 遺伝子が Nat2 遺伝子の発現制御に直接、あるいは間接的に関与する可能性を示唆するものであり、Nat2 遺伝子のプロモーター領域の解析により Sct の候補遺伝子を絞り込める可能性が期待された。

リンパ腫感受性を担う遺伝子候補として MTF-1 を同定した。MTF-1 は放射線暴露を含めたストレスに応答する遺伝子で、ラジカル・スカベンジャーであるメタロチオネイン (MT) や、抗アポトーシス作用をもつ PIGF などの発現を制御する。BALB/c に MSM の抵抗性領域を導入したコンジェニックマウスは BALB/c に比べ高い放射線による MT および PIGF mRNA 誘導能を示したことから、プロリン型 MTF-1 マウスは照射の効果をより減弱させることができ、それによってリンパ腫抵抗性を獲得すると考えられた。

肝発癌抵抗性 DRH ラットの遺伝解析から 2 つの優性抵抗性座位をマップし、発癌過程における役割を定量的に解析した。このうち Drh1 についてコンジェニック系を作出した。

内在性レトロウイルスによる Pre-B リンパ



腫の発生の分子機構を解明し、ウイルスゲノムと宿主染色体 DNA との相互作用の解析からウイルスゲノム挿入が一定のコンセンサス構造を選んでおこることを明らかにした。

*Par2* の有力な候補遺伝子である *Polu* が培養細胞の形質転換を誘発する可能性が示唆された。今後、*Polu* による形質転換の分子機序について明らかにし、生体内における肺腫瘍発生との関わりについても追求して行く。また、作製した *Polu* トランスジェニックマウスを繁殖させ、ウレタン誘発肺発癌実験を行なう。仮説が正しければ、トランスジェニックマウスにおける肺腫瘍の発生は対照に比べ増加する筈である。

#### F. 健康危険情報

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. Fujiwara K, Ochiai M, Ohki M, Ohta T, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, -b]pyridine. *Carcinogenesis*, in press.
2. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H and Nagao M. Science of food borne mutagens/Carcinogens, heterocyclic amines: How should we deal with unnegligible risk of unavoidable exposure to carcinogens under ordinaly life style. *Cancer Sci.*, 95: 290-299, 2004.
3. Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, plays a role in the nucleo-cytoplasmic export of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 736-43, 2004.
4. Enokizono Y, Matsugami A, Uesugi S, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H, Katahira M. Destruction of quadruplex by proteins, and its biological implications in replication and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res. (Suppl)*, 3: 231-232, 2003.
5. Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M and

Nakagama H. Characterization of aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Am. J. Pathol.*, 163: 1607-1614, 2003.

6. Masutani M, Nakagama H and Sugimura T. Poly (ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38: 339-348, 2003.
7. Fujiwara K, Ochiai M, Ubagai T, Ohki M, Ohta T, Nagao M, Sugimura T and Nakagama H. Differential gene expression profiles in the colon of two rat strains with distinct susceptibilities to 2-amino-1-methhyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Science*, 94: 672-678, 2003.
8. Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Masutani M. Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Science*, 94: 497-500, 2003.
9. Fukuda H, Tsuchiya N, Sato M, Yamaguchi A, Tanaka N, Nagao M and Nakagama H. DNA-binding activity of p100, a transcriptional coactivator, to single-stranded C-rich sequences. *Proc. Japan Acad.*, 79. Ser. B: 120-123, 2003.
10. Yonezawa K, Nunomiya S, Daigo M, Ogura Y, Suzuki K, Enomoto K, Nakagama H and Yoshikawa K and Nagao M. Soy protein isolate enhances hepatic copper accumulation and cell damage in LEC rats. *J. Nutr.*, 133: 1250-1254, 2003.
11. Yonezawa K, Nakagama H, Tajima R, Ushigome M, Ogura Y, Suzuki K, Yoshikawa K and Nagao M. Effect of soy protein isolate on LEC rats, a model of Wilson disease: mechanisms underlying enhancement of liver cell damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302: 271-274, 2003.
12. Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsubashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H and Nakagama H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology*, 124: 361-367, 2003.
13. Sakata J, Inoue J, Ohi H, Kosugi-Okano H, Mishima Y, Hatakeyama K, Niwa O and

- Kominami R. Involvement of V(D)J recombinase in generation of intragenic deletions of *Rit1/Bcl11b* tumor suppressor gene in  $\gamma$ -ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis*, in press.
14. Togashi T, Obata M, Aoyagi Y, Kominami R and Mishima Y. Two distinct methods analyzing chromatin structure using centrifugation and antibodies to modified histone H3: both provide similar chromatin states of the *Rit1/Bcl11b* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 489-95, 2004.
  15. Kodama Y, Yoshikai Y, Tamura Y, Wakana S, Takagi R, Niwa O and Kominami R. The D5Mit7 locus on mouse chromosome 5 provides resistance to  $\gamma$ -ray-induced but not N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas. *Carcinogenesis*, 25: 143-8, 2004.
  16. Sato H, Tamura Y, Ochiai Y, Kodama Y, Hatakeyama K, Niwa O and Kominami R. The D4Mit12 locus on mouse chromosome 4 provides susceptibility to both  $\gamma$ -ray-induced and N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas. *Cancer Sci.*, 94: 668-71, 2003.
  17. Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S and Kominami R. *Bcl11b* is required for differentiation and survival of  $\alpha\beta$  T lymphocytes. *Nat. Immunol.*, 4: 533-9, 2003.
  18. Yamashita S, Nomoto T, Abe M, Tatematsu M, Sugimura T and Ushijima T. Persistence of gene expression changes in stomach mucosae induced by short-term N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment and their presence in stomach cancers. *Mutat Res.*, in press.
  19. Yamashita S, Nomoto T, Ohta T, Ohki M, Sugimura T and Ushijima T. Differential expression of genes related to levels of mucosal cell proliferation among multiple rat strains by using oligonucleotide microarrays. *Mamm. Genome*, 14: 845-52, 2003.
  20. Abe M, Yamashita S, Kuramoto T, Hirayama Y, Tsukamoto T, Ohta T, Tatematsu M, Ohki M, Takato T, Sugimura T and Ushijima T. Global expression analysis of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas using oligonucleotide microarrays. *Carcinogenesis*, 24: 861-7, 2003.
  21. Adachi H, Majima S, Kon S, Kobayashi T, Kajino K, Mitani H, Shiina H, Igawa M and Hino O. The *Niban* gene is commonly expressed in renal tumors: A new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene*, in press.
  22. Okimoto K, Sakurai S, Kobayashi T, Mitani H, Hirayama Y, Nickerson ML, Warren MB, Zbar B, Schmidt LS and Hino O. A germline insertion in the *Birt-Hogg-Dubé (BHD)* gene gives rise to the *Nihon Rat* model of inherited renal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 2023-2027, 2004.
  23. Mizuguchi M, Mori M, Nozaki Y, Momai MY, Ithoh M, Takashima S and Hino O. Absence of allelic loss in cytomegalic neurons of cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 107: 47-52, 2004.
  24. Kikuchi Y, Sudo A, Mitani H and Hino O. Presence of a modifier gene(s) affecting early renal carcinogenesis in the *Tsc 2* mutant (Eker) rat model. *Int. J. Oncology*, 24: 75-80, 2004.
  25. Mizuguchi M and Hino O. *Neuropathology, Tuberous Sclerosis complex* (Ed. Curatolo, P) (MAC Keith Press) 264-278, 2003.
  26. Hino O. Hereditary renal carcinogenesis fitting Knudson's two-hit - genotype, environment, and phenotype. *Gene, Chromosomes and Cancer*, 38: 357-367, 2003.
  27. Kajino K and Hino O. Knudson's two hits, both associated with the insertions of genetic mobile elements in a rat pituitary adenoma. *Proc. Japan Acad.*, 79 (B): 108-113, 2003.
  28. Honda S, Kobayashi T, Kajino K, Urakami S, Igawa M and Hino O. Ets protein *Elf-1* bidirectionally suppresses transcriptional activities of the tumor suppressor *Tsc2* gene and the repair-related *Nth1* gene. *Molecular Carcinogenesis*, 3: 122-129, 2003.
  29. Adachi H, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Shigeno K and Hino O. Human bladder tumors with 2-hit mutations of the tumor suppressor gene *TSC 1* and decreased expression of p27. *J. Urology*, 170: 601-604, 2003.

30. Hino O, Kobayashi T, Momose S, Kikuchi Y, Adachi H and Okimoto K. Renal carcinogenesis-genotype, phenotype and dramatype. *Cancer Science*, 94: 142-147, 2003.
31. Okamoto T, Hara A and Hino O. Down-regulation of cyclooxygenase-2 expression but up regulation of cyclooxygenase-1 in renal carcinomas of the Eker (TSC2 gene mutant) rat model. *Cancer Science*, 94: 2225, 2003.
32. Kobayashi T, Adachi H, Mitani H, Hirayama Y and Hino O. Toward chemotherapy for Tsc2-mutant renal tumor. *Proc. Japan Acad.*, 79B: 22-25, 2003.
33. Fujishita T, Doi Y, Sonoshita M, Hiai H, Oshima M, Taketo MM, Huebner K and Croce CM. Development of spontaneous tumors and intestinal abnormalities in Fhit gene knockout mice. *Brit. J. Cancer*, in press.
34. Miyagawa-Hayashino A, Tsuruyama T, Hiai H, Haga H, Egawa H, Sakurai T, Manabe and T. Arteriopathy in Chronic Allograft Rejection in Liver Transplantation. *Liver Transpl.*, in press.
35. Higashi K, Denda A, Higashi T and Hiai H. DRH strain rats: Genetic resistance to chemical hepatocarcinogenesis. *Comp. Med.*, in press.
36. Higashi K, Hiai H, Higashi T and Muramatsu M. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: Old wine in a new bottle. *Cancer Lett.*, in press.
37. Hiroyasu M, Akatsuka S, Shirase T, Toda Y, Hiai H and Toyokuni S. Detection of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase messenger RNA using a peptide nucleic acid probe in paraffin-embedded archival specimens. *Pathol Int.*, 54: 251-265, 2004.
38. Ohyama M, Hirayama Y, Tanuma JI, Hirano M, Semba I, Shisa H, Hiai H, Sugihara K and Kitano M. Expressions of junB and c-fos are enhanced in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue cancers. *Pathol Int.*, 54: 35-40, 2004.
39. Okazaki K, Ohana M, Oshima C, Uchida K, Nishi T, Iwano M, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, Tamaki H, Hiai H and Chiba T. Interaction of Helicobacter pylori-induced follicular gastritis and autoimmune gastritis in BALB/c mice with post-thymectomy autoimmune gastritis. *J. Gastroenterol.*, 38: 1131-1137, 2003.
40. Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S, Hiai H, Aruoma OI and Bahorun T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic. Res.*, 37: 1215-1224, 2003.
41. Hiai H, Tsuruyama T and Yamada Y. Pre-B Lymphomas in SL/Kh Mice: A Multifactorial Disease Model. *Cancer Sci.*, 94: 847-850, 2003.
42. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N and Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat. Med.*, 12: 1477-1483, 2003.
43. Jin G, Tsuruyama T, Yamada Y and Hiai H. Svi3: a provirus common integration site in c-myc of SL/Kh pre-B lymphomas. *Cancer Sci.*, 94: 791-795, 2003.
44. Ishida D, Yang H, Hattori M, Kometani K, Iwai K, Suzuki M, Itohara S, Hiramatsu H, Nakano T, Nakahata T, Hiai H and Minato N. Dysregulated Rap1 activation, T-cell anergy and myeloproliferative disorders of late onset in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell*, 4: 55-65, 2003.
45. Ohana M, Okazaki K, Oshima C, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Uose S, Nakase H, Iwano M, Matsushima Y, Hiai H and Chiba T. Inhibitory effects of Helicobacter pylori infection on murine autoimmune gastritis. *Gut.*, 52: 1102-1110, 2003.
46. Liu H, Nobumoto K, Yamada Y, Higashi K and Hiai H. Modulation of genetic resistance to hepatocarcinogenesis in DRH rats by partial hepatectomy. *Cancer Lett.*, 196: 13-16, 2003.
47. Okazaki I, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K and Honjo T. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *H. Exp. Med.*, 197: 1173-1181, 2003.
48. Toyokuni S, Kawaguchi W, Akatsuka S, Hiroyasu M and Hiai H. Intermittent microwave irradiation facilitates antigen-antibody reaction in Western

- blot analysis. *Pathol. Int.*, 53: 259-261, 2003.
49. Nishi T, Okazaki K, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Watanabe T, Uchida K, Watanabe N, Nakase H, Ohana M, Hiai H and Chiba T. Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice. *Infect. Immun.*, 71: 2153-2162, 2003.
  50. Yamamoto N, Tanigaki K, Han H, Hiai H and Honjo T. Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells. *Curr. Biol.*, 13: 333-338, 2003.
  51. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H and Chiba T. Candidate markers for stem and early progenitor cells, *Musashi-1* and *Hes1*, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett.*, 535: 131-135, 2003.
  52. Lee C-H, Nishimori H, Sasaki Y, Matsushita H, Kitagawa T and Tokino T. Analysis of lung tumorigenesis in chimeric mice indicates the *Pulmonary adenoma resistance 2 (Par2)* locus to operate in the tumor-initiation stage in a cell-autonomous manner: detection of polymorphisms in the *Poli* gene as a candidate for *Par2*. *Oncogene*, 22: 2374-2382 (2003).
2. 学会発表
1. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T and Nakagama H. Gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Keystone Symposia Meeting, Keystone, Colorado. February 17-22, 2004.
  2. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Nagao M, Sugimura T and Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. 6th Joint Conference of the AACR and the JCR, Hawaii, January 25-29, 2004.
  3. 落合雅子、渡辺昌俊、田口紋子、杉村 隆、中釜 斉 大腸多段階発がん過程における dysplastic ACF の重要性とその効率的な検出法 蓼科「個体レベル」若手ワークショップ 2004年1月(蓼科)
  4. 落合雅子、瀬尾友子、上田乙也、鈴木宏志、増村健一、能美健彦、杉村 隆、中釜 斉 自然発生及び azoxymethane 誘発の欠失型突然変異に *scid* 変異が及ぼす影響 第32回日本環境変異原学会 2003年11月(三重)
  5. 牛込充則、福田博政、土屋直人、祖母井庸之、高塚 純、柴 忠明、杉村 隆、中釜 斉 ミニサテライト結合蛋白質 hnRNP A1 および LRP130 のヒト大腸がんにおける遺伝子発現解析 第62回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋)
  6. 祖母井庸之、落合雅子、藤原恭子、牛込充則、白井智之、杉村 隆、長尾美奈子、中釜 斉 2003PhIPによるACF誘発性の異なるラット2系統間でのアセチル基転移酵素 *Nat2* の遺伝子発現解析 第62回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋)
  7. 落合雅子、牛込充則、藤原恭子、田口紋子、祖母井庸之、杉村 隆、長尾美奈子、中釜 斉 ヘテロサイクリックアミン(HCA)の大腸発癌性評価における短期間投与法の有用性の検討 2003年9月(名古屋)
  8. 山下 聡, 阿部雅修, 野本朋子, 杉村隆, 牛島 俊和 *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* 短期投与後のラット胃粘膜と長期投与による胃癌での発現プロファイルの共通性 第62回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋市)
  9. 野本朋子, 山下 聡, 塚本徹哉, 山本昌美, 庫本高志, 阿部雅修, 藤田博文, 松島泰次郎, 杉村 隆, 立松正衛, 牛島俊和 (ACIxBUF)<sub>2</sub> ラットを用いた胃癌感受性遺伝子のラット染色体1番へのマッピングと候補遺伝子の解析 第62回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋市)
  10. 山下 聡, 阿部雅修, 野本朋子, 杉村隆, 牛島俊和 MNNG 長期投与後胃がん短期投与後胃粘膜での発現プロファイル比較 第18回発癌病理研究会 2003年8月(高山市)
  11. Hiai H, Okazaki I, Nishio S, Honjo T. Microadenomas in AID transgenic mice: A mouse model of atypical alveolar hyperplasia. The 4<sup>th</sup> International Conference on Mouse Lung Tumor. Bar Harbor, USA. October, 2003.
  12. 日合 弘 発癌モデルによる遺伝的要因の解析 第62回日本癌学界シンポジウム 平成15年9月(名古屋)

13. Hjai H, Yamada Y, Lu LM and Tsuruyama T. Genetic factors predisposing pre-B lymphomas in SL/Kh mice. Japanese Cancer Association Special Symposium on "Mouse Models for Hematopoietic Neoplasm". Kyoto, January 24-25, 2003.
14. Tsuruyama T, Nakamura T, Jin G, Ozeki M, Yamada Y and Hjai H. Constitutive activation of Stat5a by retrovirus integration in early pre-B lymphomas of SL/Kh strain mice. Japanese Cancer Association Special Symposium on "Mouse Models for Hematopoietic Neoplasm". Kyoto, January, 2003.

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）  
— 動物モデルを用いた発がん感受性に関する研究 —  
分担研究報告書

「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」  
分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 生化学部部長

研究要旨 PhIP により誘発される大腸前がん病変 aberrant crypt foci (ACF) を指標とした遺伝学的解析により、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。コンジェニックラットを用いた解析により、感受性遺伝子 *Sct* の候補領域を D16Mgh5~D16Rat40 の約 10 Mb の領域に限定した。コンジェニック系統を用いた大腸粘膜での網羅的な遺伝子発現解析の結果、上記 10 Mb の領域にマップされる遺伝子は同定できなかったが、PhIP の代謝活性化に関わる *N-acetyltransferase (Nat2)* の発現が、コンジェニック系統で PhIP 投与により有意に誘導されることが分かった。*Nat2* の発現が感受性遺伝子 *Sct* により 2 次的に制御されている可能性が示唆された。*Sct* 候補領域のうち、D16Rat17~D16Rat40 に存在する約 30 個の遺伝子について real-time RT-PCR 法による発現解析の結果、*Pcm1* と *Arhgap7* の 2 つの遺伝子が、A および C 系統に共通に有意な発現誘導を示した。

A. 研究目的

がんは種々の環境要因により誘発される遺伝子変異が多段階的に蓄積することにより発生するが、遺伝的に規定された個々の発がんに対する感受性の違いにより、この多段階の発がん過程はさらに複雑に制御されている。本研究では、大腸前がん病変と考えられる異常陰窩 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を規定している遺伝的要因を遺伝学的に解明し、その責任遺伝子を同定・単離することを目的とする。実験には加熱魚肉食品中に含まれる変異原・がん原性物質である 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) により誘発されるラット大腸がんモデルを用いている。感受性および抵抗性を規定する遺伝子群の染色体座を決定し、これら感受性・抵抗性遺伝子座を有するコンジェニック動物を作製する。感受性遺伝子の局在を 1-2 Mb にまで絞り込むことにより責任遺伝子を同定・単離し、大腸発がん感受性および抵抗性を規定する遺伝的要因の全貌を明らかにする。

B. 研究方法

(1) Dysplastic ACF 誘発性と発がん性の相関  
大腸を 0.2 % methylene blue で染色した後、70 % methanol で脱色することにより、dysplastic ACF を高感度に検出する方法の確立を試みた。本法で検出した dysplastic ACF と大腸発がん性との相関性について検討した。

(2) 感受性遺伝子座を有するコンジェニックラット 4 系統における ACF 誘発性の検討  
第 16 番染色体上の感受性遺伝子 (*Sct*) を有するコンジェニックラット 4 系統の作製を完了した。コンジェニック系統の作成には、marker-assisted speed congenic 法を用いた。A 系統は、抵抗性系統である ACI ラットとのバッククロスを繰り返すことにより、感受性 F344 系統に由来する D16Rat17~D16Rat15 の約 30~40 cM の領域をヘテロに含み、C 系統は D16Rat12~D16Wox3 の約 30~40 cM の領域をヘテロに含む系統として樹立した。さらに A 系統と C 系統の交配により染色体 16 番のほぼ全域をヘテロに有する (A+C) 系統、A 及び C 系統の一部にあたる D16Rat40~D16Rat34 を含む B 系統を作成

し、これら4系統におけるACF誘発性を検討し、感受性遺伝子の局在を絞り込む方法をとった。PhIPの投与法は、PhIP400ppm含有基礎食を2週間投与したのち、高脂肪色のみを4週間投与する方法をとった。実験第6週にラットを屠殺し、大腸に誘発されたACFを0.2% methylene blueで染色し計測した。

(3) コンジェニック系統の大腸粘膜における遺伝子発現解析による候補遺伝子の同定

コンジェニックA系統とC系統について、それぞれの兄妹交配により、F344由来の高感受性 *Sct* アレル (*Sct*<sub>F344</sub>) をホモに有する個体 (*Sct*<sub>F344</sub> / *Sct*<sub>F344</sub>) と、ACI由来の低感受性アレル (*Sct*<sub>ACI</sub>) をホモに有する個体 (*Sct*<sub>ACI</sub> / *Sct*<sub>ACI</sub>) を作製し、PhIP非投与および投与後の大腸粘膜における発現遺伝子の系統差について、ゲノムワイドな網羅的発現解析を行った。PhIPの代謝活性化に関与するN-acetyltransferase (*Nat*)の発現誘導の系統差についてもreal-time RT-PCRで検討した。

(4) *Nat1*/*Nat2* 遺伝子のゲノム構造の解析と、PhIPによる発現誘導の系統差の検討

コンジェニック系統の発現解析により明らかになった*Nat* 遺伝子のPhIPによる発現誘導の分子機構を明らかにするため、ラット*Nat* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。*Nat* 遺伝子上流のゲノム構造の解析には、5'-RACEで得られた転写開始点に関する情報と、ラットBACクローンの塩基配列から得られた情報を統合して行った。

(5) 感受性遺伝子の一つの局在候補領域10 Mbに存在する遺伝子の発現解析とSNP検索

コンジェニック系統の解析から絞り込んだ、D16Mgh5~D16Rat40間の約10 Mbに領域に含まれる遺伝子の内、約30個の遺伝子について、コンジェニックA及びC系統での遺伝子発現と、親系統F344及びACIラットにおけるcSNPの有無について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立がんセンターの

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) Dysplastic ACF誘発性と発がん性の相関

PhIP等の大腸発がん物質を投与すると、投与開始後、数週目頃より異常腺窩(ACF)を誘発する。一般に、化学発がん物質のACF誘発性と発がん性とは相関すると考えられているが、必ずしも一致しない場合もあり、また、ACFよりもdysplastic ACFの誘発性がより発がん性を反映しているとも考えられている。そこで、PhIPによる大腸発がん性の異なるF344, ACI系統間でのACF, dysplastic ACFおよび大腸がんの誘発性を比較した。Dysplastic ACFは、従来の0.2% methylene blue染色に、70% methanolによる脱色法を加えることにより、容易に描出できることが分かった。その結果、F344とACI系統間では従来のACF, dysplastic ACF, colon cancerの誘発性が良く相関することが分かった。今後、ACF誘発性を指標とした連鎖解析(QTL解析)とdysplastic ACFを指標にした場合とで、大腸発がんの感受性を規定する遺伝子座に差が有るか否かの検討が必要である。

(2) コンジェニック系統を用いた感受性遺伝子座(*Sct*)の絞り込み

作成した4種類のコンジェニックラットにおけるACF誘発数を計測した。コンジェニックA系統では、一匹平均 $2.0 \pm 1.2$ 個のACFが誘発されたのに対し、対象群では平均 $0.6 \pm 0.8$ 個であった。C系統では平均 $2.1 \pm 1.2$ 個、対象群では平均 $0.8 \pm 0.4$ 個とほぼA系統と同程度のACF誘発数を示した。(A+C)系統では平均 $1.9 \pm 1.3$ 個(対象群の平均 $1.0 \pm 0.0$ 個)と、A系統およびC系統とほぼ同程度であった。この結果は、*Sct*がA系統とC系統とのオーバーラップする領域( $A \cap C$ )に存在することを強く示唆した。さらに、A及びC系統の一部に

あたる D16Rat40~D16Rat34 を含む B 系統では、平均  $1.1 \pm 1.2$  個と対象群 (平均  $0.6 \pm 0.7$  個) と同程度の ACF 数であったことから、Sct の局在は、D16Mgh5~D16Rat40 間の約 10 Mb の領域に存在することが示唆された。

(3) コンジェニック系統の大腸粘膜における遺伝子発現解析による候補遺伝子の同定

コンジェニック A, C および A+C 系統における ACF 誘発性の検討から、感受性遺伝子 (Sct) は、A 領域と C 領域がオーバーラップする領域 (A∩C) に散在する可能性が強く疑われた。両コンジェニック系統の PhIP 投与前後の大腸粘膜より RNA を抽出し、網羅的発現解析を行った。その結果、両系統間で発がん差を認め、かつ、A∩C 領域に局在したものは、glutathione reductase (GR) を含めて 3 種類のみであった。このうち、real-time RT-PCR で発現差を再現よく確認できたのは、GR のみであった。現在、GR の遺伝子多型の有無、大腸発がん感受性 (或いは抵抗性) における意義について検討を行っている。

(4) 感受性遺伝子の一つの局在候補領域 10 Mb に存在する遺伝子の発現解析と SNP 検索

網羅的な遺伝子発現解析では有力な候補遺伝子が得られなかった。その理由の一つとして、GeneChip 上にエンタリーされている遺伝子数 (遺伝子の coverage) が不十分である可能性を考え、gene-oriented な候補遺伝子の絞り込みを開始した。上記の A∩C 領域を一部含んでいるコンジェニック B 系統では ACF の誘発性が高くなかったことから、Sct の局在を A∩C 領域で B に含まれない D16Mgh5~D16Rat40 の約 10 Mb に限定し、当該領域に既にマップされている約 50 個の遺伝子の内、D16Rat17~D16Rat40 間に含まれる約 30 個の遺伝子について、発現解析および cSNPs の検索を行った。その結果、Pcml 遺伝子と Arhgap7 遺伝子の 2 つのみが、両コンジェニック系統 (A および C) で共通に発現が上昇していた。これら 2 つの遺伝子について cSNPs の検索を進めているが、これまでに調べた範囲では、両遺伝子ともに

系統間で有意な差を認めていない。今後さらに詳細に検討する予定である。

(5) Nat1/Nat2 遺伝子のゲノム構造の解析と、PhIP による発現誘導の系統差の検討

Nat 遺伝子 (Nat1 & Nat2) は、HCA 類の代謝活性化に重要な役割を果たしている。Nat の発現は、F344 系統、コンジェニック A および C 系統において PhIP 投与による有意な発現誘導を示すものの、Sct 領域にはマップされないことから、Sct 遺伝子により 2 次的に発現制御されている可能性がある。Nat1, Nat2 遺伝子の転写産物の 5'-末端の配列 (転写開始点) を決定するため、5'-RACE による解析を行った。大変興味深いことに、Nat1 と Nat2 はゲノム中に head-to-tail にタンデムに配置されていることが分かった。さらに、Nat1 は主として 3 種類の転写産物を持ち、いずれも Nat1 固有のプロモーターにより転写されていることが分かった。これに対し、Nat1 遺伝子の下流に位置する Nat2 遺伝子は、Nat2 固有のプロモーターからの主たる転写産物に加え、一部 Nat1 のプロモーターをつかっただけの転写産物も存在することが分かった。Nat1 および Nat2 mRNA に特異的な配列を用いて、Nat 遺伝子の PhIP による発現誘導を F344, ACI 両系統で知らべた結果、感受性系統において Nat2 の有意な発現誘導 (2 倍以上) が認められた。Nat1 の誘導には系統差を認めなかった。これらの結果から、Nat2 は感受性遺伝子 Sct による発現制御を受けていることが分かり、Nat2 遺伝子上流の転写制御領域の解析により、Sct の候補遺伝子を絞り込むことが出来る。或いは、上記 (4) のアプローチにより得られた遺伝子がコードする蛋白質の機能を、Nat2 プロモーターへの結合、或いは転写制御という観点から絞り込むことができることが期待される。

#### D. 考察

PhIP 誘発大腸発がんの感受性遺伝子 (Sct) に関しては、コンジェニック A, C 及び C 系統を用いた解析から、D16Mgh5-D16Rat40 間の約



10 Mb の範囲に候補遺伝子が存在する可能性が示唆された。当該領域に既にマップされている約 50 個の遺伝子の内、D16Rat17~D16Rat40 間に含まれる約 30 個の遺伝子のうち、コンジェニック A および C 系統のいずれにおいても PhIP 投与後に有意な発現誘導を示した *Pcm1* 遺伝子と *Arhgap7* 遺伝子の 2 つに関して、さらに詳細な解析を進める必要がある。また、*Nat2* 遺伝子が *Sct* 遺伝子産物により、直接的或いは間接的に発現制御されている可能性があり、*Nat2* 遺伝子のプロモーター領域の解析により *Sct* の候補遺伝子を絞り込める可能性がある。

#### E. 結論

PhIP 誘発ラット大腸がんモデルを用いて、大腸がんの感受性に関わる遺伝子の局在を約 10 Mb の領域に限定することが出来た。本領域に存在する全ての遺伝子に関して、発現解析や eSNPs 解析等を統合的に進めることにより、感受性遺伝子の本体を明らかに出来るものと期待される。

#### F. 健康危険情報

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. Fujiwara K, Ochiai M, Ohki M, Ohta T, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,-b]pyridine. Carcinogenesis (in press)
2. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H and Nagao M. Science of food borne mutagens/Carcinogens, heterocyclic amines: How should we deal with unnegligible risk of unavoidable

exposure to carcinogens under ordinary life style. *Cancer Sci*, 95:290-299, 2004

3. Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, plays a role in the nucleo-cytoplasmic export of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 317:736-43, 2004.
4. Enokizono Y, Matsugami A, Uesugi S, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H, Katahira M. Destruction of quadruplex by proteins, and its biological implications in replication and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res (Suppl)*, 3:231-232, 2003.
5. Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Characterization of aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Am. J. Pathol*, 163:1607-1614, 2003.
6. Masutani M, Nakagama H and Sugimura T. Poly (ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38:339-348, 2003.
7. Fujiwara K, Ochiai M, Ubagai T, Ohki M, Ohta T, Nagao M, Sugimura T and Nakagama H. Differential gene expression profiles in the colon of two rat strains with distinct susceptibilities to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Science*, 94:672-678, 2003.
8. Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Masutani M. Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Science*, 94:497-500, 2003.
9. Fukuda H, Tsuchiya N, Sato M, Yamaguchi A, Tanaka N, Nagao M and Nakagama H. DNA-binding activity of p100, a transcriptional coactivator, to single-stranded C-rich sequences. *Proc. Japan Acad.* 79. Ser. B:120-123, 2003.
10. Yonezawa K, Nunomiya S, Daigo M, Ogura Y, Suzuki K, Enomoto K, Nakagama H and

- Yoshikawa K and Nagao M. Soy protein isolate enhances hepatic copper accumulation and cell damage in LEC rats. *J Nutr*, 133:1250-1254, 2003.
11. Yonezawa K, Nakagama H, Tajima R, Ushigome M, Ogura Y, Suzuki K, Yoshikawa K and Nagao M. Effect of soy protein isolate on LEC rats, a model of Wilson disease: mechanisms underlying enhancement of liver cell damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302:271-274, 2003.
  12. Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsubashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H and Nakagama H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology*, 124:361-367, 2003.
2. 学会発表
1. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T and Nakagama H. Gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Keystone Symposia Meeting, Keystone, Colorado. February 17-22, 2004.
  2. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Nagao M, Sugimura T and Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. 6th Joint Conference of the AACR and the JCR, Hawaii, January 25-29, 2004.
  3. 落合雅子、渡辺昌俊、田口紋子、杉村 隆、中釜 齊 大腸多段階発がん過程における dysplastic ACF の重要性とその効率的な検出法 薬科「個体レベル」若手ワークショップ 2004年1月(薬科)
  4. 落合雅子、瀬尾友子、上田乙也、鈴木宏志、増村健一、能美健彦、杉村 隆、中釜 齊 自然発生及び azoxymethane 誘発の欠失型突然変異に *scid* 変異が及ぼす影響 第 32 回日本環境変異原学会 2003年11月(三重)
  5. 牛込充則、福田博政、土屋直人、祖母井庸之、高塚 純、柴 忠明、杉村 隆、中釜 齊 ミニサテライト結合蛋白質 hnRNP A1 および LRP130 のヒト大腸がんにおける遺伝子発現解析 第 62 回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋)
  6. 祖母井庸之、落合雅子、藤原恭子、牛込充則、白井智之、杉村 隆、長尾美奈子、中釜 齊 2003PhIP による ACF 誘発性の異なるラット 2系統間でのアセチル基転移酵素 Nat2 の遺伝子発現解析 第 62 回日本癌学会総会 2003年9月(名古屋)
  7. 落合雅子、牛込充則、藤原恭子、田口紋子、祖母井庸之、杉村 隆、長尾美奈子、中釜 齊 ヘテロサイクリックアミン(HCA)の大腸発癌性評価における短期間歇投与方法の有用性の検討 2003年9月(名古屋)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(なし)

# 厚生労働科学研究費補助金（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、感受性マウス（BALB/c）と抵抗性マウス（MSM）を利用し解析してきた。本年度の成果として、胸腺リンパ腫感受性遺伝子候補として、放射線暴露を含めたストレス応答遺伝子である MTF-1 を同定した。感受性マウス（BALB/c など）の MTF-1 は転写活性化ドメインにセリン、一方抵抗性マウスではプロリンをコードする。培養細胞系およびマウスを用いた実験から、この多型は MTF-1 の遺伝子発現誘導能に影響することが分かった。プロリン型 MTF-1 マウス、すなわち抵抗性マウスは放射線照射の効果をより強く減弱させることができ、それによってリンパ腫抵抗性を獲得する、という機構が考えられた。放射線の効率的な防護および治療へ向け、ヒト MTF-1 多型の役割を検討する基盤が整った。

### 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要素をなすためである。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、これはがん発症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。本研究では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。具体的目標は胸腺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) マウス照射実験。生後 4 週から 6 週齢のマウスにガンマ線、4Gy を 1 回照射した。照射 16 時間後に、マウスから胸腺を摘出し、RNA を抽出した。

(2) 遺伝子発現の測定。抽出された RNA に含まれる各遺伝子の mRNA 量は RT-PCR 法を用いて測定した。コントロールとして、 $\alpha$  カテニン遺伝子を用いた。

(3) MTF-1 クローンの作製と転写活性の測定。セリン型 MTF-1 とプロリン型 MTF-1 遺伝子をコードする組換えプラスミドの作製には、変異 PCR プライマーを用いた PCR 変異導入法を利用した。得られたクローンに余分な変異が導入されていないことは塩基配列決定により確認した。転写誘導活性の測定には、リポフェクションを用いたトランスフェクションを行った。この時を用いた MTF-1 転写因子結合配列をもつレポーター遺伝子と MTF-1 欠損マウス細胞株はスイスの W. Schaffner 教授から分与された。トランスフェクション 48 時間後に亜鉛を培地に投与し、その 4 時間後に細胞を集め、蛋白を抽出した。レポーター活性、すなわちルシフェラーゼ活性は通常の方法を用いて測定した。各細胞群のトランスフェクション効率の補正は、 $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子を同時にトランスフェクションすることにより行った。

(4) 野生マウスの MTF-1 多型の決定。マウス DNA は遺伝学研究所の城石教授から分与された。proline-rich 領域を PCR 法で増幅し、その産物を直接塩基配列決定し、MTF-1 多型を同定した。得られた多型の確認には、多型を識別する制限酵素・*Fnu4H1* を利用した。

(5) ヒト MTF-1 ハプロタイプの決定。SNP の検出には PCR-RFLP 法を用いた。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには本学の動物実験室要綱に準拠し研究した。また、動物倫理の理解を深めるため動物実験室が執り行う慰霊祭への出席を義務づけている。マウス遺伝子からヒト疾患感受性遺伝子に研究を進めたとき、すなわち正常人を対象とした MTF-1 ハプロタイプの決定を行う時には、新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会に申請書を提出し、その承認を得た(2003年10月)。小児甲状腺がんの解析については現在申請し、審議中である。

### C. 研究結果

(1) 染色体 4 番上の感受性遺伝子座について詳細な解析を行ってきた。前年度までの結果は以下の通りである。小さな染色体領域を含む 4 系統のコンジュニックマウスを作製し、D4Mit12 座近傍の感受性領域の限定化を行った。その結果、約 2.5Mb 領域内に感受性座の存在することを明らかにした。次に、マウス系統間にみられる多型染色体構造のパターンを SNP マッピングを用いて解析した。その結果、2.5Mb 領域は 2 つの領域に分割できることが分かった。MSM 由来の染色体断片が入り込んでいるセントロメア側 1.0Mb 領域と、ヨーロッパ系とアジア系ゲノムが完全に分離できるテロメア側 1.5Mb 領域である。感受性を示すと考えられるマウス系統と抵抗性のそれとの比較から、感受性座は前者の 1.0Mb 領域に存在することが示唆された。本年度はこ