

の領域に存在する候補遺伝子の検索、同定を行った。

(2) 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 遺伝子がある。MTF-1 遺伝子は放射線暴露を含めたストレスに応答する遺伝子であり、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。

(3) そこで、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。しかし、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は十分に想像される。

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。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。両者の抽出蛋白のレポーター活性、すなわちルシフェラーゼ活性を測定した。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、明らかに誘導活性能の高いことが示された。

次に、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 (その他のマウスの結果は省略) に γ 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。

(4) マウスでの MTF-1 多型の分布を野生マウスを用いて検討した。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。

(5) ヒト MTF-1 ハプロタイプの決定。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。詳細は

現在検討中である。

D. 考察

(1) コンジェニック系統を用いた発がん実験およびマウス系統間にみられるハプロタイプと比較から、感受性座候補領域は 1.0Mb 領域にまで限定されていた。本年度はこの領域内の遺伝子についてキャンディデイト戦略を行った。その結果、領域内に存在する 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応答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。そこで、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。

(2) 培養細胞系と *in vivo* のマウス系を用い、この多型と表現型の関連性について解析した。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が示された。したがって、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。

(3) MTF-1 遺伝子の KO マウスはすでに作製されており、ホモ個体は胎生致死を示す。興味深いことには、MTF-1 活性は蛋白量依存性を示す。すなわち、MTF-1-KO マウスから得られた繊維芽細胞の重金属や過酸化水素水への抵抗性を調べると、その抵抗性は KO マウスホ

モからの繊維芽細胞、KO マウスヘテロからの繊維芽細胞、野生型マウス由来の繊維芽細胞の順番に感受性を示すことが報告されている。この MTF-1 蛋白の量依存性は多型が存在すると、それが直ちに表現型に影響を与えることを示唆している。

(4) 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かと想像された。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。

(4) 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。

E. 結論

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 (BALB/c など) マウスの MTF-1 は転写活性化ドメインにセリン、一方抵抗性 (MSM など) はプロリンという多型がある。この多型が転写誘導能に影響することを組換えプラスミドを作製し、証明した。また、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 mRNA 誘導能を示した。従って、

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、と考えられる。

F. 健康危険情報

マウスを研究対象としたときは動物取り扱い指針に従い、実験従事者のマウスからの病原菌感染の危険性を最小限に抑える努力をしている。一方、ヒトを対象とした実験では、すでに精製された DNA がサンプルであり、実験従事者に健康危険を与えることはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 γ -ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis*. (2004) (in press).

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.* (2004) 313: 489-95.

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 γ -ray-induced but not N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas. *Carcinogenesis*. (2004) 25:143-8.

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 γ -ray-induced and N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas. *Cancer Sci.* (2003) 94:668-71.

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.* (2003) 4:533-9.

2. 学会発表

特記すべきものなし

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）

分担研究報告書

ACI/Seg ラット前立腺がん原因遺伝子のマッピング

分担研究者 山下 聡 国立がんセンター研究所 発がん研究部 研究員

研究要旨

ACI/Seg ラットは高齢で前立腺がんを高頻度に自然発症し、ヒト前立腺がんのよいモデル動物である。ACI/Seg ラットと、前立腺がん到低感受性を示す F344 ラットとから F2 intercross ラット 219 匹を作出し、2年6ヶ月の発がん実験を行った。連鎖解析の結果、強い核異型をもつ前立腺腫瘍性病変の出現に関与する遺伝子座をラット 19 番染色体に(LOD score=5.1)、前立腺腫瘍性病変の大きさに関与する遺伝子座をラット 2 番染色体に(LOD score=5.1)、マップした。

A. 研究目的

前立腺がんは欧米型のがんと言われているものの、近年、本邦においても罹患率は急増しており、その予防・診断・治療が重要な腫瘍の一つである。ACI/Seg ラット (ACI) は、高齢で前立腺がんを自然発症する点で、ヒトと類似した特徴を持つ前立腺がんモデル動物である。高齢で発症する前立腺がんの感受性・抵抗性を支配する遺伝子の同定は、前立腺がん高リスク群の同定や、前立腺がん予防の標的の同定に役立つと考えられる。

そこで今年度は、前立腺がん到低感受性を示す F344/Jcl ラット(F344)と ACI の F₂ intercross ラットを用いて連鎖解析を行い、自然発症前立腺がんの感受性・抵抗性遺伝子座を同定することを目的とした。

B. 研究方法

(F344xACI)F₂ ラット(F₂)219 匹を、無処理で2年6ヶ月飼育した。前立腺、精巣、肝臓、

脾臓について病理学的検索を行った。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。

(倫理面への配慮)

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

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%)、F₂ 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%、F2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、D2Rat161近傍はヒト4q25-q28または3q21-q27に相当した。

D. 考察

本研究により、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。これらにより、前立腺がん高感受性の原因遺伝子を同定していくための、初期段階が終了した。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検索し、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。

E. 結論

ラット染色体19番に、強い核異型をもつ前立腺腫瘍性病変の出現に関与する遺伝子座を、ラット染色体2番に、前立腺腫瘍性病変の大きさに関与する遺伝子座をマップした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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* (2003) 24: 861-7.

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* (2003) 14: 845-52.

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.

2. 学会発表

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 と 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)

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)

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

中签班「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 樋野興夫 癌研・実験病理部・部長

研究要旨

本研究では、病理遺伝学的にリファインされたユニークな疾患モデル（遺伝性腎がんモデル）を用いて、発がんの起始遺伝子とは別つに、発がん感受性遺伝子の存在を明らかにした。最終的にはヒトがんの予防に資する。

A. 研究目的

遺伝性腎がん（Eker）ラットは相同染色体の一方のTSC2ホモログにレトロトランスポゾンが挿入されており（1st hit）、腎近位尿細管上皮細胞において2nd hitが起こると前がん病変が発生する。さらにこの前がん病変の発生数に系統差があることがF1およびcongenic動物での実験により確かめられている。本研究では、遺伝性腎がんラット（Eker rat）の腎発がん感受性遺伝子を同定することでヒト発がん感受性遺伝子の同定に資する。

B. 研究方法

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を作製し、その全視野中の前がん病変数の多寡を持って決めた genotype（遺伝子型）の多様性のために実験に供するラットはEker ratと他の純系ラット（具体的には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法により作成している。また腎皮質よりmRNAを調整しDNA chipでの解析を行った。

C. 研究成果

両腎の前がん病変数10ヶ以下と100ヶ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。ちなみにLOD score3以上では有意水準5%以下となっている。これら4ヶ所の領域が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ヶずつ得ることができた。

D. 考察

phenotype と genotype の比較により遺伝子を同定する方法は単一遺伝子疾患では有効であるが、疾患感受性遺伝子のように genetic interaction が存在する場合は実験系の確立が困難もしくは時間のかかることがあり、本実験でも congenic 動物の作成後、その後の発がん実験において phenotype と genotype の不一致が見られ、複数の遺伝子座を持つ動物の作成時時間がとられた。平行して、DNA chip の High Throughput 実験を行い、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。

E. 結論

Eker rat の腎発がん感受性遺伝子同定のために安定した実験系を確立し、phenotype の検出が容易に行えるようになった。しかし genetic interaction に起因すると考えられる genotype との不一致も観察された。このため複数の遺伝子座を持つ動物の開発で克服することを試みている。同時に異なる phenotype 毎の遺伝子発現パターンを High Throughput で解析することで感受性遺伝子の同定を可能にする足がかりを得た。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Kikuchi Y, Sudo A, Mitani H and Hino O. Presence of a modifier gene(s) affected early renal carcinogenesis in the Tsc 2 mutant (Eker) rat model. *Int. J. Oncology*, 24: 75-80, 2004.
5. Mizuguchi M and Hino O. *Neuropathology, Tuberous Sclerosis complex* (Ed. Curatolo, P) (MAC Keith Press) 264-278, 2003.
6. Hino O. Hereditary renal carcinogenesis fitting Knudson's two-hit - genotype, environment, and phenotype. *Gene, Chromosomes and Cancer*, 38: 357-367, 2003.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.

2. 学会発表

1. 菊地泰、加藤美由紀、樋野興夫: ラット遺伝性腎癌の modifier 遺伝子 日本病理学会会誌 第 89 巻 1 号 145 頁 2000 年
2. 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) 日本病理学会会誌 第 91 巻 1 号 177 頁 2002 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

動物モデルを用いた発癌感受性に関する研究

分担課題 発癌の遺伝的ステップ

分担研究者 日合 弘

京都大学大学院医学研究科病態生物医学 教授

研究要旨 発癌に関わる実験動物モデルの遺伝的特性を利用し、発癌感受性、抵抗性に関わる遺伝的ステップを研究した。2つのモデルをとりあげた。このうち、化学発癌剤を連続投与しつつ近交系化した DRH 系ラットでは、2つの発癌抵抗性遺伝子座をマップし、前癌と発癌段階に対する効果を明らかにした。内在性レトロウイルスによる Pre-B リンパ腫を高率に発生する SL/K h マウスではウイルスゲノム挿入のホットスポット多数を同定し、発癌の分子機構が初期 B 細胞の細胞内シグナル伝達の異常によることを解明した。またウイルス感染過程でウイルスゲノムは宿主 DNA の一定のコンセンサス構造を認識しておこることを明らかにした。

A. 研究目的

個体別の発癌感受性の理解は発癌リスクグループの同定、二次、三次予防、さらにテイラーメイド治療を考える上で不可欠である。発癌の動物モデルの遺伝的特性を利用してその遺伝的ステップを明らかにし、その基礎的理解に資することを目的とする。

B. 研究方法

東らが開発した化学発癌抵抗性 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。当研

究室で開発した Pre-B リンパ腫好発系 SL/K h 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。

C. 研究結果

1. DRH ラットの肝癌抵抗性

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。前癌病変である酵素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 のコンゲニック系を作成し前癌病変に対する効果を確認した。

2. 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。

D. 考察

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系統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、コンゲニック系統も樹立された。Drh1 近傍には GST-P, Drh2 近傍には TGF- α 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。動物はナショナルラットリソース（京大）に寄託して利用希望をまっている。SL/Kh マウスは癌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つながる可能性が高い。現在特許申請中である。

E. 結論

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 についてコンゲ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。

F. 健康危険情報

G. 研究成果

(1) 論文発表

1. Yamamoto N, Tanigaki K, Han H, Hiai H, Honjo T. Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicle stem cells. *Curr. Biol.* 13: 333-338, 2003.
2. Okazaki I, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 197: 1173-1181. 2003.
3. Liu H, Nobumoto K, Yamada Y, Higashi K, Hiai H. Modulation of genetic resistance to hepatocarcinogenesis in DRH rats by partial hepatectomy. *Cancer Lett.* 196: 13-16, 2003.
4. Ishida D, Yang H, Hattori M, Kometani K, Iwai K, Suzuki M, Itohara S, Hiramatsu H, Nakano T, Nakahata T, Hiai H, 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.
5. Jin G, Tsuruyama T, Yamada Y, Hiai H. Svi3: a provirus common integration site in c-myc of SL/Kh pre-B lymphomas. *Cancer Sci.* 94: 791-795, 2003.
6. Hiai H, Tsuruyama T, Yamada Y. Pre-B lymphomas in SL/Kh mice: A multifactorial disease model. *Cancer Sci.* 94: 847-850. 2003.
7. Ohyama M, Hirayama Y, Tanuma J, Hirano M, Semba I, Shisa H, Hiai H, Sugihara K, Kitano M. Expression of junB and c-fos are enhanced in 4-nitroquinoline 1 oxide-induced rat tongue cancers. *Pathol. Int.* 54: 35-40, 2004.
8. Higashi K, Hiai H, Higashi T, Muramatsu M. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: Old wine in a new bottle. *Cancer Lett.* (in press)
9. Higashi K, Denda A, Higashi T,

Hiai H. DRH strain rats: genetic resistance to chemical hepatocarcinogenesis. *Comp. Med.* (in press)

II. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(2) 学会発表

1. Hiai H, Yamada Y, Lu LM, 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.
2. 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. Japanese Cancer Association Special Symposium on "Mouse Models for Hematopoietic Neoplasm". Kyoto, January, 2003.
3. 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 名古屋 平成 15 年 9 月
4. Hiai H, Okazaki I, Nishio S, Honjo T. Microadenomas in AID transgenic mice: A mouse model of atypical alveolar hyperplasia. The 4th International Conference on Mouse Lung Tumor. Bar Harbor, USA. October, 2003.

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 副部長、（財）沖中記念成人病研究所 主任研究員

研究要旨： マウス肺発がん耐性遺伝子 *Par2* の候補遺伝子である *Poli* 遺伝子の試験管内における形質転換能を検討した。また、*Poli* 遺伝子の生体内肺発がんにおける働きを解析する目的で、同遺伝子のトランスジェニックマウスの作製を試みた。

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。これまでに、極めて fidelity が低い DNA 合成酵素遺伝子である *Poli* (DNA polymerase iota) が、*Par2* の有力な候補遺伝子であることを明らかにしてきた。今年度は、*Poli* 遺伝子の形質転換能を調べる目的で、BALB/3T3 細胞に同遺伝子を導入し、強制発現させた。また、*Poli* のウレタン誘発肺発癌における働きを直接的に解析する目的で、*Poli*-transgenic mice の作製を試みた。

B. 研究方法

1) C57BL/6 マウス由来の *Poli* 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。
2) 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)

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

C. 研究結果

1) *Poli* 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。
2) *Poli* 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

今年度の我々の実験により、*Par2* の有力な候補遺伝子である *Poli* 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、この試験管内モデルを利用して *Poli* による形質転換の分子機序について明らかにし、さらには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 *Poli* 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。我々の仮説によれば、トランスジェニックマウスにおいては、肺腫瘍の発生が対照に比べ増加する筈である。

E. 結論

Poli が細胞の悪性形質転換を誘発する能力を有することが示唆された。

Poli cDNA トランスジェニックマウスの founders を 3 匹得た。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Lee, G.-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

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レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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[4,5-b]pyridine.	Carcinogenesis		in press	2004
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
Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H.	LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, plays a role in the nucleocytoplasmic export of mRNA.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	317	736-43	2004
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
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., USA	163	1607-1614	2003
Masutani M, Nakagama H and Sugimura T.	Poly (ADP-ribose) and carcinogenesis.	Genes, Chromosomes and Cancer	38	339-348	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujiwara K, Ochiai M, Ubagai T, Ohki M, Ohta T, Nagao M, Sugimura T and <u>Nakagama H.</u>	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
Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, <u>Nakagama H,</u> Sugimura T and Masutani M.	Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane.	Cancer Science	94	497-500	2003
Fukuda H, Tsuchiya N, Sato M, Yamaguchi A, Tanaka N, Nagao M and <u>Nakagama H.</u>	DNA-binding activity of p100, a transcriptional coactivator, to single-stranded C-rich sequences.	Proc. Japan Acad Ser. B	79.	120-123	2003
Yonezawa K, Nunomiya S, Daigo M, Ogura Y, Suzuki K, Enomoto K, <u>Nakagama H</u> 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
Yonezawa K, <u>Nakagama H,</u> 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H and Nakagama H.	Peroxisome proliferator-activated receptor α ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice.	Gastro-enterology	124	361-367	2003
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 γ -ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse	Carcinogenesis		in press	2004
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
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 γ -ray-induced but not N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas.	Carcinogenesis	25	143-8	2004
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 γ -ray-induced and N-methyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas.	Cancer Sci.	94	668-71	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S and <u>Kominami R.</u>	Bcl11b is required for differentiation and survival of $\alpha\beta$ T lymphocytes.	Nat. Immunol.	4	533-9	2003
Ochiai Y, Tamura Y, Saito Y, Matsuki A, Wakabayashi Y, Aizawa Y, Niwa O and <u>Kominami R.</u>	Mapping of genetic modifiers of thymic lymphoma development in p53-knockout mice.	Oncogene	22	1098-102	2003
Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T, Mishima Y, Niwa O and <u>Kominami R.</u>	Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in γ -ray induced mouse thymic lymphomas.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	301	598-603	2003
<u>Yamashita S</u> , Nomoto T, Abe M, Tatematsu M, Sugimura T and Ushijima T.	Persistence of gene expression changes in stomach mucosae induced by short-term <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine treatment and their presence in stomach cancers.	Mutat Res.		in press	2004
<u>Yamashita S</u> , 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
Abe M, <u>Yamashita S</u> , Kuramoto T, Hirayama Y, Tsukamoto T, Ohta T, Tatematsu M, Ohki M, Takato T, Sugimura T and Ushijima T.	Global expression analysis of <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas using oligonucleotide microarrays.	Carcinogenesis	24	861-7	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Adachi H, Majima S, Kon S, Kobayashi T, Kajino K, Mitani H, Shiina H, Igawa M and <u>Hino O.</u>	The Niban gene is commonly expressed in renal tumors: A new candidate marker for renal carcinogenesis.	Oncogene.		in press	2004
Okimoto K, Sakurai S, Kobayashi T, Mitani H, Hirayama Y, Nickerson ML, Warren MB, Zbar B, Schmidt LS and <u>Hino O.</u>	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
Mizuguchi M, Mori M, Nozaki Y, Momai MY, Ithoh M, Takashima S and <u>Hino O.</u>	Absence of allelic loss in cytomegalic neurons of cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis.	Acta Neuropathologica	107	47-52	2004
Kikuchi Y, Sudo A, Mitani H and <u>Hino O.</u>	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
Mizuguchi M and <u>Hino O.</u>	Neuropathology, Tuberous Sclerosis complex (Ed. Curatolo, P)	MAC Keith Press	12	264-278	2003
<u>Hino O.</u>	Hereditary renal carcinogenesis fitting Knudson's two-hit - genotype, environment, and phenotype.	Gene, Chromosomes and Cancer	38	357-367	2003
Kajino K and <u>Hino O.</u>	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
Honda S, Kobayashi T, Kajino K, Urakami S, Igawa M and <u>Hino O.</u>	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Adachi H, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Shigeno K and <u>Hino O</u> .	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
<u>Hino O</u> , Kobayashi T, Momose S, Kikuchi Y, Adachi H and Okimoto K.	Renal carcinogenesis-genotype, phenotype and dramatype.	Cancer Science	94	142-147	2003
Okamoto T, Hara A and <u>Hino O</u> .	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
Kobayashi T, Adachi H, Mitani H, Hirayama Y and <u>Hino O</u> .	Toward chemotherapy for Tsc2-mutant renal tumor.	Proc. Japan Acad.	79B	22-25	2003
Fujishita T, Doi Y, Sonoshita M, <u>Hiai H</u> , Oshima M, Taketo MM, Huebner K and Croce CM.	Development of spontaneous tumors and intestinal abnormalities in Fhit gene knockout mice.	Brit. J. Cancer	75	in press	2004
Miyagawa-Hayashino A, Tsuruyama T, <u>Hiai H</u> , Haga H, Egawa H, Sakurai T, Manabe and T.	Arteriopathy in Chronic Allograft Rejection in Liver Transplantation.	Liver Transpl.	80	in press	2004
Higashi K, Denda A, Higashi T and <u>Hiai H</u> .	DRH strain rats: Genetic resistance to chemical hepatocarcinogenesis.	Comp. Med.		in press	2004
Higashi K, <u>Hiai H</u> , 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	2004