

## Collaborators

### *Kyorin Univ.*

#### *Dept. Pharmacol. & Toxicol.*

Promsuk Jutabha

Tomoko Muto

Naohiko Anzai

Katsuko Shiraya

Sachiko Nakamura

Hiroshi Uchino

Ellappan Babu

Raiqul Islam

Michio Takeda

Arthit Chairoungdua

Yuji Iribe

Taku Hirata

Do Kyung Kim

Ho Jung Shin

Hiroko Segawa

Nasar Ahmed

Yuewei Li

Hitoshi Endou.

### *Univ. Rochester*

Michael F. Wempe

MW Anders

### *Tanabe R&D*

*Service, Inc.*

Kunio Saito

Koji Oda

### *Dept. Surgery*

Takuma Kuroda

Nobuaki Matsumoto

Hideo Teraoka

Yukari Kobayashi

Jun-ichi Fukushima

Osamu Yanagida

Tomoyuki Goya

Yutaka Atomi

### *Dept. Otolaryngol.*

Akifumi Matsuda

Naoyuki Kohno

Makoto Hasegawa

大腸の前がん病変および腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所

研究要旨 ラットでの大腸発がん性が認められていない 3 種類の HCA 類 (Trp-P-2, MeAαC, AαC) について、「短期投与法」による ACF の誘発性を検討した結果、MeAαC でも低頻度ながら ACF が誘発された。Trp-P-2 の遺伝子発現プロファイルは、階層型クラスター解析の結果、大腸発がん性を示す MeIQx と一つのクラスターを形成することが分かった。Trp-P-2 及び MeAαC は、「短期間歇投与法」を用いることにより大腸発がん性を示す可能性が示唆された。又、大腸がん組織において PGE<sub>2</sub> 受容体 EP<sub>3</sub> の発現低下が起きていることを見出した。

A. 研究目的

加熱調理した肉や魚に含まれるヘテロサイクリックアミン (HCA) 類を始めとして、環境中に存在する種々の変異原・がん原性物質はヒトのがんの原因物質である可能性が考えられる。しかしながら、その詳細については未だ不明な点が多い。又、これら化合物による傷害に対する個体の感受性あるいは抵抗性を規定している遺伝的な要因の本態も殆ど解明されていない。本研究は、環境中の種々の変異原・がん原性物質により誘発される動物の発がんモデルを用いて、① 化合物特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化、及び② その用量相関性、③ 発がん感受性の異なる動物系統におけ

る発現プロファイルの差異について GeneChip (Affymetrix) を用いた包括的解析を行い、各化合物に特徴的な遺伝子発現プロファイルや遺伝子変異に関するデータを集積する。これにより、発がんに重要な遺伝子変化の解明、既知化合物の低用量曝露による発がん性の予測、化合物曝露後の早期段階での遺伝的指標による発がん性予測が可能となる。さらに、遺伝情報に基づいたヒトの発がんリスク評価や、発がん感受性を規定する遺伝的要因の解明による発がん高危険度群の掌握が可能となる。

B. 研究方法

(1) 種々の HCA の「短期投与法」に

よる aberrant crypt foci (ACF)の誘発

大腸発がん性が報告されていない HCA 類 (非大腸発がん物質) として、新たに MeAαC (飼料中の濃度、200 ppm), AαC (500 ppm)による ACF の誘発性を検討した。雄 F344 ラットに、「HCA の短期投与方法」(HCA 含有普通食を 2 週間+高脂肪食のみを 4 週間投与)を用いて MeAαC, AαC を投与し、大腸がんの前がん病変と推定される ACF の誘発性を検討した。長期連続投与で大腸発がん性が報告されている HCA 類 (大腸発がん物質) である PhIP (400 ppm), IQ (300 ppm), MeIQ (300 ppm), Glu-P-1 (500 ppm)、大腸発がん性が報告されていない HCA 類 (非大腸発がん物質) Trp-P-2 (100 ppm)、短期間歇投与方法で大腸発がん性が報告された MeIQx (400 ppm)の結果と比較した。また、HCA の 2 週間投与終了後の体重を対照群と比較して、用量の妥当性についても検討した。

(2) 種々の HCA の「短期投与方法」により発現変動する遺伝子群の網羅的解析

MeAαC, AαC を「短期投与方法」により投与し、投与開始後 6 週において大腸粘膜を採取した。組織より RNA を採取し、cDNA に転写したものをビオチン標識して cRNA プローブを作成した。GeneChip (RG34A, Affymetrix 社)を用い、約 8800 個の遺伝子について、ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現解析を行ない、他の HCA の結果と比較した。対照群としては、普通食のみを投与したラットの大腸粘膜を解析した。各群 4 匹のラットを用いた。

(3) マウス、ラットおよびヒトの大腸が

ん組織における PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプ EP<sub>1-4</sub> の発現

AOM 投与によって誘発した C57BL/6J マウス及び F344 ラットの大腸がん及び周辺非がん部大腸粘膜サンプル、及び、ヒトの大腸がん組織と周辺非がん部粘膜より RNA を抽出し、RT-PCR 法によって PGE<sub>2</sub> 受容体 EP<sub>1-4</sub> の発現レベルを解析し、大腸発がんにおける PGE<sub>2</sub> 受容体の発現変化について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物数も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いる。動物の苦痛に対する配慮も十分に払う。

### C. 研究結果

(1) 種々の HCA の「短期投与方法」による ACF の誘発

MeAαC, AαC を、「短期投与方法」によりラットに投与すると、1 匹当たり各々、平均 0.4 および 0 個の ACF を誘発した。PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1, MeIQx, Trp-P-2 投与群では、1 匹当たり各々 2.7, 1.8, 5.6, 2.7, 1.8, 5.6, 1.8, 1.6, 0 個の ACF を誘発する。2 週間の HCA 投与直後の体重は、対照群と比較して、MeAαC, AαC 投与群は、各々 97, 96%であり、PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1, MeIQx, Trp-P-2 投与群は、78, 95, 93, 86, 88, 100%であった。ACF 誘発性が低いか或いは認められなかった HCA の中で、MeAαC (200 ppm), Trp-P-2 (100 ppm) ではいずれも体重抑制が対照群に比べて 5 %未満であったこ

とから、「短期投与法」を用いることにより、投与量を他の HCA 類と同程度の 300 ~ 400 ppm まで増量できる可能性が示唆された。

(2) 種々の HCA の「短期投与法」により発現変動する遺伝子群の網羅的解析

大腸発がん物質に特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化を観察するために、種々の HCA を「短期投与法」で投与し、投与開始後 3 及び 6 週での大腸粘膜での遺伝子発現を網羅的に解析した。投与 3 週目において、IQ、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2 投与群では、対照群と比較して発現量が抑えられた遺伝子が多かった。これら 5 種の HCA はいずれも肝発がん性を示す物質であることから、その肝毒性による全身状態の悪化に伴い、大腸粘膜での遺伝子発現が低下した可能性が考えられた。従って、以後の解析は投与後 6 週目のサンプルのみで行った。非大腸発がん物質として、MeAαC、AαC 投与群の結果を加えて、①HCA 投与群及び対照群の遺伝子発現の階層型クラスター解析によるゲノムワイドな遺伝子発現の変動、および②大腸発がん物質に特異的に発現変動する遺伝子について検討した。

① 階層型クラスター解析の結果、非大腸発がん物質の MeAαC、AαC 投与群は一つのクラスターを形成した。Trp-P-2 投与群は、MeIQx 投与群と一つのクラスターを形成し、さらに Glu-P-1、MeIQ、IQ 投与群とも一群のクラスターを形成することが分かった。PhIP 投与群は他の 7 種の HCA 投与群とは異なり、対照群により類似した別のクラスターを形成した。

② 次に、大腸発がん物質に特異的に発現変動している遺伝子について解析を行った。IQ 投与群は、投与 6 週目においても遺伝子発現がゲノムワイド全般に抑えられている傾向が認められたため、以後の解析からは除外した。各種の HCA 投与群について、対照群と比較して有意に遺伝子発現が変動（上昇或いは低下）している遺伝子について検討した。PhIP 投与群の遺伝子発現プロファイルは、他の HCA 投与群よりは対照群と類似していたため、大腸発がん物質の代表として MeIQx、MeIQ、Glu-P-1 の 3 種を選択し、これらの遺伝子発現プロファイルを他の HCA 類と比較した。これら 3 種の化合物に共通して対照群と比較して有意に発現上昇が認められた遺伝子 38 個のうち、非大腸発がん物質である Trp-P-2、MeAαC 及び AαC 投与群の各群で発現が増加していた遺伝子は、各々 34、5、7 個であった。さらに、共通して低下した遺伝子 86 個のうち、Trp-P-2、MeAαC 及び AαC 投与群で発現低下が認められた遺伝子は、各々 82、51、34 個であった。即ち、大腸発がん物質群に共通して発現変動していた遺伝子の大部分は、Trp-P-2 投与でも同様の発現変動を示したことになる。さらに、大腸発がん物質として PhIP、MeIQ、Glu-P-1 の 3 種類を選び、遺伝子発現のプロファイルを比較したところ、3つの化合物に共通して発現上昇した遺伝子が 6 個、発現低下した遺伝子は 16 個であった。これら 24 個の遺伝子について、MeIQx、Trp-P-2、MeAαC 及び AαC 投与群での発現変化を比較すると、Trp-P-2 投与群での遺伝子発現のプロフ

ファイルは MeIQx 投与群に類似していることがわかった。MeAaC 及び AaC 投与群での遺伝子発現の変動とは相違が認められた。

(3) マウス及びラットのアゾキシメタン誘発大腸がんとはヒトの大腸がんサンプル、及び、それぞれの非がん粘膜における PGE<sub>2</sub> 受容体の EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub> の発現を RT-PCR により調べた結果、EP<sub>1</sub> の発現は、マウス及びラットでは正常粘膜で低く、大腸がん組織で顕著に上昇していた。ヒトの EP<sub>1</sub> の発現は、増加する例も低下する例も見られた。マウス、ラット及びヒトで、EP<sub>2</sub> の発現は正常粘膜で低く、大腸がん組織で顕著に上昇していた。EP<sub>3</sub> の発現は正常粘膜で高く、がん組織では明らかに減少していた。EP<sub>4</sub> は正常粘膜、大腸がんともに発現しており、変化は特に認められなかった。これらの結果より、大腸発がんにおいて EP<sub>2</sub> の発現上昇とともに、EP<sub>3</sub> の発現低下が重要であることが示唆された。EP<sub>3</sub> の発現低下に関しては、さらにリアルタイム PCR 法により定量化して確認した。

#### E. 結論

種々のがん原性化合物を用いて大腸組織における遺伝子発現プロファイルへの影響をゲノムワイドに解析することにより、これまでとは全く異なった視点から、これら化合物による大腸発がんの分子機構について解析する手掛かりを得ることができた。今後さらにデータを集積することにより、既知および未知の環境中化合物について、それらの大腸発がん性の予測やヒトへのリスク評価が短期間の曝

露実験で可能にできると期待される。また、PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプ EP<sub>1</sub>-4 のうち、EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub> は大腸発がん促進的に働くが、EP<sub>3</sub> は抑制的に働くことが示唆された。

#### F. 健康危機情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shoji, Y., Takahashi, M., Kitamura T., Watanabe K., Kawamori, T., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Narumiya, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Down-regulation of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> during colon cancer development. *Gut* (2004), 53: 1151-1158.
- 2) Matsubara, S., Shibata, H., Takahashi, M., Ishikawa, F., Yokokura T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H.pylori* infection. *Cancer Sci.*(2004), 95: 798-802.
- 3) Kawamori, T., Totsuka, Y., Uchiya, N., Kitamura, T., Shibata, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Carcinogenicity of aminophenylnorharman, a possible novel endogenous mutagen, formed from norharman and anilin, in F344 rats. *Carcinogenesis.* (2004), 25: 1967-1972.
- 4) Takahashi, M., Wakabayashi, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon

carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.*(2004), 95: 475-480.

5) Nishigaki, R., Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Identification of cytochrome P-450s involved in the formation of APNH from norharman and aniline. *Mutat. Res.* (2004), 562: 19-25.

6) Kitamura, T., Itoh, M., Noda, T., Matsuura, M., Wakabayashi, K. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in *adenomatous polyposis coli* gene knockout mice. *Int. J. Cancer* (2004), 109: 576-580.

7) Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., Nishigaki, R., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Mutagens formed from  $\beta$ -carbolines with aromatic amines. *J. Chromatography B* (2004), 802: 135-141

## 2. 学会発表

1) 高橋真美、坂野克久、仁保直子、杉村 隆、若林敬二。高脂血症／糖尿病モデル OLETF ラットにおけるアゾキシメタン誘発大腸アヘラントクリプトの形成。第 11 回日本がん予防研究会 (東京)、O-3(口演)。2004 年 7 月 16 日。

2) 仁保直子、北村知宏、武藤倫弘、高橋真美、杉村 隆、若林敬二。EP1 選択的阻害剤 ONO-8711 の AOM 誘発ラット大腸発がん抑制作用。第 11 回日本がん予防研究会 (東京)、WS2(口演)。2004 年 7 月 16 日。

3) 竹内良人、高橋真美、仁保直子、杉村 隆、若林敬二。BOP 誘発ハムスター膵発がんにおける基礎飼料の影響。第 63 回日本癌学会総会 (福岡)、P-0063 (示説)。2004 年 9 月 29 日。

4) 松原智史、柴田英之、高橋真美、石川文保、横倉照男、杉村 隆、若林敬二。スナネズミの *H. pylori* 誘発胃炎における炎症性蛋白質の発現。第 63 回日本癌学会総会 (福岡)、P-0169 (示説)。2004 年 9 月 29 日。

5) 庄司 豊、高橋真美、高須賀信夫、仁保直子、成宮 周、杉村 隆、若林敬二。マウス皮膚発がんにおけるプロスタグランジン E2 受容体 EP3 欠損の影響。第 63 回日本癌学会総会 (福岡)、P-0069 (示説)。2004 年 9 月 29 日。

6) 仁保直子、武藤倫弘、高橋真美、杉村 隆、若林敬二。Apc 遺伝子欠損マウスにおける高脂血症と腸ポリープ形成との関連。第 63 回日本癌学会総会 (福岡)、P-1540 (示説)。2004 年 10 月 1 日。

7) 武藤倫弘、仁保直子、北村知宏、高橋真美、杉村 隆、若林敬二。AOM 誘発ラット大腸発がんに対する EP1 選択的阻害剤 ONO-8711 の発がん抑制作用。第 63 回日本癌学会総会 (福岡)、P-1541 (示説)。2004 年 10 月 1 日。

8) Mutoh, M., Niho, N., Takahashi, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by a PPAR gamma ligand, pioglitazone, in Apc-deficient mice. The 3rd Annual AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research, #C41 (poster). Seattle, Washington,

USA. October,16-20, 2004.

H. 知的財産権の出願／登録状況

1. 特許取得

無

2. 実用新案登録

無

3. その他

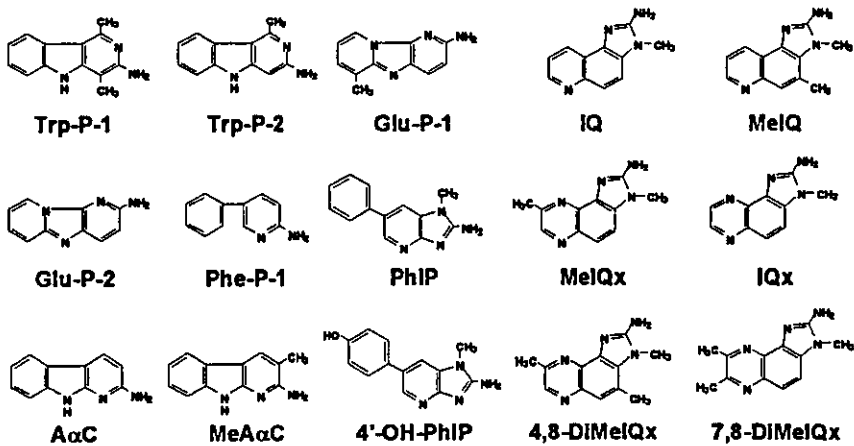
特に無し

「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究・報告会」

## 大腸発がん過程における遺伝子発現解析

国立がんセンター研究所  
中釜 斉、若林 敬二

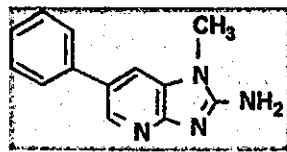
### Various HCAs Produced in Cooked Foods



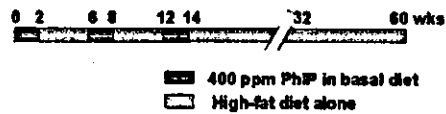
\* HCAs; heterocyclic amines



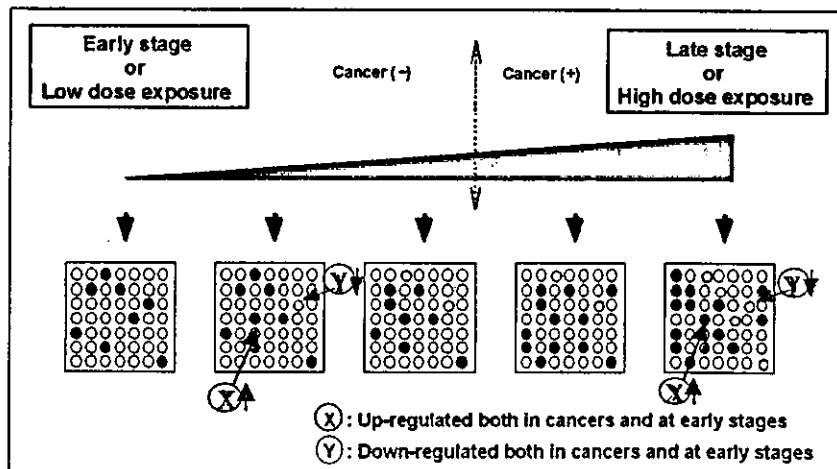
## A Model of Sequential Progression from ACF to Cancer



2-Amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [4,5-b ] pyridine (PhIP)



## Application of Compiled Toxicogenomics Data for Risk Assessment of Environmental Mutagens and Carcinogens



- Identification of predictable signature markers for human carcinogenesis
- Risk assessment for humans at low doses

## Histopathological Findings and Genetic Alterations Observed in PhIP-Induced Colon Tumors



***β-catenin* (25 ~ 50 %)**  
Codons 32, 34, 36, 37, 38  
(G to T, A or C)

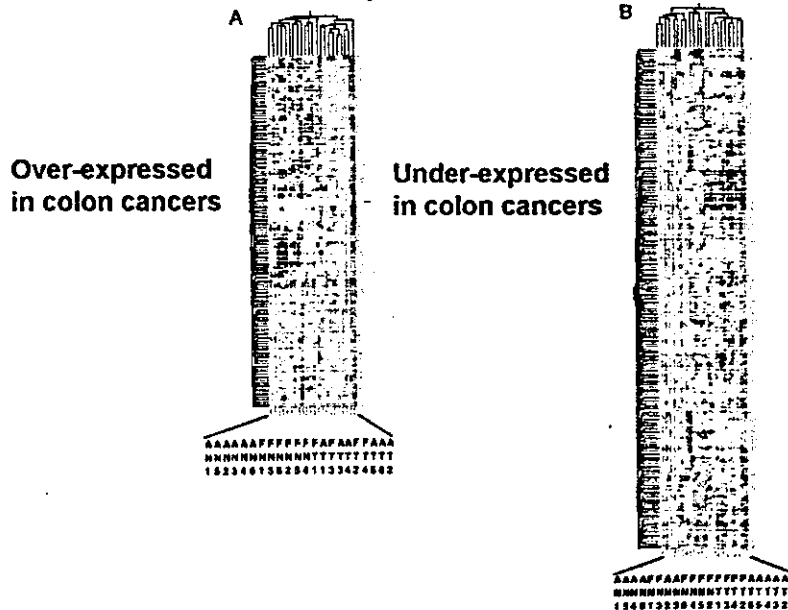


***Apc* (approx. 10 ~ 20 %)**  
Exon 14 or 15  
5'-GTGGGAT-3' to 5'-GTGGAT-3'  
(G deletion)

Junction of intron 10/exon 11  
5'-tagGGGGG-3' to 5'-taGGGGG-3'  
(G to T)  
5'-tagGGGGG-3' to 5'-tagGGGGG-3'  
(G deletion)

Neoplastic cells showed tubular growth pattern (No. 1, 2).  
Differentiation into Paneth cells (No. 3) was also detected.

## Hierarchical Clustering Analysis of Genes Expressed in Normal Colon Epithelium and Colon Cancers



### Genes Over-expressed in Colon Cancers of both F344 and ACI strains

Genes	Signal Primary		<<F344>>		Fold change	
	NORMAL	TUMOR	NORMAL	TUMOR	F344/TN	ACI/TN
<EST> defensin like transcript	195.49	5.50e+4	1785.02	3.58e+4	281.54	20.29
* Metylsyn (MMP-7) mRNA	182.46	1.52e+4	187.24	5823.69	83.63	34.82
<EST> M. musculus mRNA for type I keratin (MHR a-1)	22.32	1440.44	47.2	3584.6	64.54	75.94
Intracellular calcium-binding protein (MRP14) mRNA	38.73	2011.03	48.03	1004.28	51.93	21.82
<EST> ?	13.97	584.13	123.58	442.79	42.54	3.58
Anti-acetylcholine receptor antibody gene	129.58	3929.87	248.73	3738.53	30.33	15.16
<EST> AC078860 Homo sapiens 12q BAC RP11-186F10	261.35	8924.12	572.42	5572.5	23.57	9.73
Interleukin-1 alpha mRNA	82.7	1411.28	63.72	474.34	22.51	7.44
Receptor-linked protein tyrosine phosphatase (PTP-P1) mRNA	168.9	2747.78	281.53	2171.51	18.48	7.71
* Macrophage metalloelastase (MME)	133.58	1990.87	50.28	2047.38	14.81	40.72
* Cyclin D2	9.08e+1	1.21e+3	1.45e+2	1.28e+3	1.34e+1	8.03e+0
Defensin 3a (RatNP-3a) gene	919.32	1.21e+4	898.73	1.47e+4	13.17	18.42
Platelet phospholipase A2	7630.13	9.95e+4	8078.53	5.44e+4	13.05	9.98
MASH-2 mRNA expressed in neuronal precursor cells	303.83	3381.59	41.14	2887.48	11.13	69.7
C-HA-ras proto-oncogene mechanism sequence	2928.38	2.63e+4	4157.4	3.21e+4	9.01	7.74
Cation transporter	756.38	6553.23	1180.79	6642.65	6.86	5.63
Interleukin 1-beta mRNA	186.32	1858.88	183.58	1225.78	8.45	7.48
Id3a mRNA, complete cds	186.25	1437.44	327.7	1491.08	7.72	4.55
Alpha-2-macroglobulin gene	1023.8	6303.21	903.14	5880.35	6.15	6.51
Organic cation transporter OCT1A mRNA	123.63	898.84	185.68	1389.64	5.58	8.45
CC chemokine ST3d precursor, mRNA, complete cds	582.04	3178.28	573.8	2328.28	5.48	4.08
* <EST> similar to rat cyclin D2	3389.28	1.83e+4	5132.35	1.92e+4	5.4	3.74
<EST>	1084.52	5774.83	959.18	4081.88	5.28	4.25
Glutathione S-transferase M5 mRNA	259.33	1366.9	334.82	2013.2	5.27	6.01
VL30 element mRNA	1234.82	6470.7	1055.79	10942	5.24	10.38
<EST> Mus musculus inhibitor of DNA binding 3 (Idb3)	1818.88	9418.78	1585.27	7558.28	5.18	4.77
Sp. (mob-1) mRNA, complete cds	180.41	978.33	214.46	758.8	5.14	3.54
Hypertension-regulated vascular factor-1 (HRVF-1) mRNA	861.72	4728.72	1958.67	7038.98	4.82	3.6
Rattus norvegicus maspin mRNA	637.72	2857.5	677.18	1954.74	4.64	2.89
VL30 element mRNA	1830.23	6831.23	2421.75	1.04e+4	4.07	4.3
<EST>	385.28	1598.49	282.03	1075.18	4.04	4.1
Beta-tubulin T beta15	3252.25	11450.9	2178.01	8522.65	3.52	3.82

### Genes Under-expressed in Colon Cancers of both F344 and ACI Strains

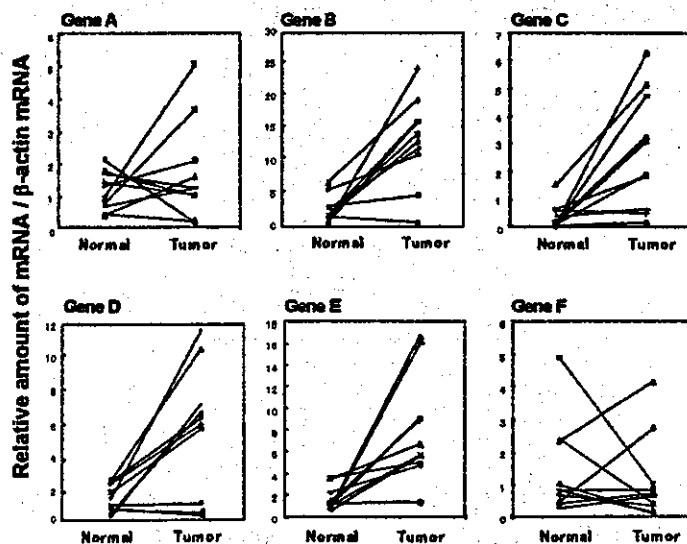
Genes	Signal Primary		<<F344>>		Fold change	
	NORMAL	TUMOR	NORMAL	TUMOR	F344/TN	ACI/TN
<EST> Similar to phosphoglucomutase 6 (LOC92652)	1.85e+4	140.28	1.73e+4	829.28	118.13	27.55
SM22 mRNA	9714.88	158.83	2.58e+4	1742.58	61.24	14.9
<EST> similar to human hox B2	952.02	15.84	1017.45	164.83	60.86	6.17
Genome-wide smooth muscle actin isoform mRNA	6.44e+4	1.23e+3	1.07e+6	5.93e+3	52.18	18.12
PER-18 mRNA	2721.96	54.87	3126.88	147.81	48.79	21.15
Alanine aminotransferase	1.55e+3	3.33e+1	2.07e+3	0.001	4.88e+1	2.07e+0
<EST> ?	3981.43	87.8	5811.57	849.04	45.12	6.91
Calponin, complete cds	1.47e+4	349.475	2.23e+4	1.28e+3	4.22e+1	1.73e+1
Myosin regulatory light chain isoform C	2.14e+4	678.02	32928.3	1592.13	37.22	20.88
Muscle beta-tropomyosin and fibroblast tropomyosin 1 gene	8208.4	3.31e+2	1.50e+4	578.125	24.78	28.01
Dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel alpha-2 subunit (CCHL2A)	3067.4	131.08	1420.65	229.11	23.4	6.2
Myosin heavy chain (clone RAMHC21)	1.35e+4	591.39	2.18e+4	1829.01	22.87	13.29
Alpha b crystallin-related protein	3731.25	180.08	4322.27	375.25	20.72	11.52
Insulin growth factor-binding protein mRNA	3.25e+3	1.69e+2	2448.05	2.40e+2	1.91e+1	1.01e+1
Hsp70.2 mRNA for heat shock protein 70	3572.83	210.58	766	196.84	18.37	4.1
SM22 mRNA	2.85e+4	1631.89	8.40e+4	4408.8	16.33	14.53
Monoamine oxidase B (Maob3) mRNA	818.83	61.82	680.05	104.83	14.81	8.45
D-binding protein mRNA	1038.95	73.85	1368.84	79.31	14.11	17.28
Z30584 R. norvegicus (Mistar) mRNA for ZQ-18p Acds=(60,506)/gb+Z30584	25128.9	1814.36	14871.8	2743.83	13.65	6.48
<EST> X06801 Rat mRNA for vesicular alpha actin	2.80e+4	2126.16	2.80e+4	4213.16	13.18	8.65
H36-alpha7 integrin alpha chain	4844.89	382.89	11058.7	501.83	12.53	22.03
SC1 protein mRNA	2.43e+4	1981.58	4.53e+4	3784.08	12.31	12
Carbonic anhydrase IV	2651.28	220.07	2487.84	302.4	12.06	8.18
Carbonic anhydrase IV	2.85e+3	2.20e+2	2487.84	3.02e+2	12.05	8.15
<EST> ?	950.38	88.42	1290.58	40.4	10.78	31.84
Lipoprotein lipase mRNA	2.31e+3	2.29e+2	2259.29	8.84e+2	10.29	3.3
Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase mRNA	8434.23	838.58	8830.98	2414.48	10.04	3.86
<EST> AF119148 Rattus norvegicus C3H11a11a11	8571.78	558.87	4300.88	387.96	8.87	11.09
Endopeptidase-24.18 alpha subunit	6878.14	570.71	3327.41	773.68	8.86	4.3
<EST> BC004055 Mm similar to survivin	3353.2	360.25	3155.42	368.83	9.31	8.81
<EST> AA800735 EST180232 Rattus norvegicus cDNA	3353.2	3.80e+2	3155.42	388.825	9.31	8.81
<EST> NM_023278 Mm TC10-like Rho GTPase (Tc10)	4295.6	611.18	2287.18	582.84	8.4	3.83

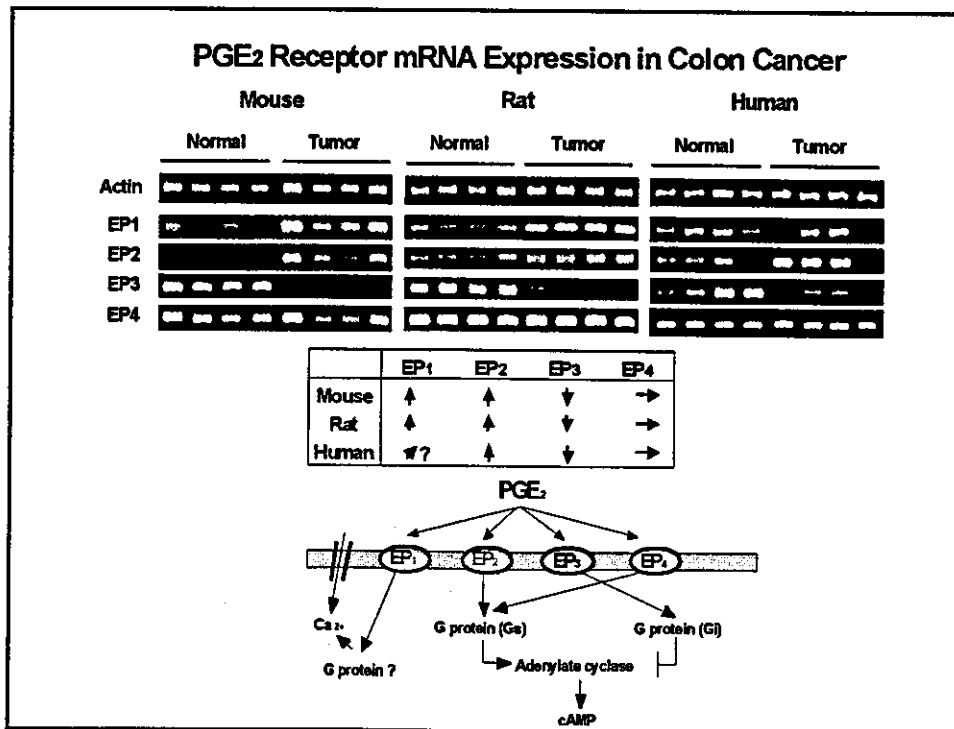
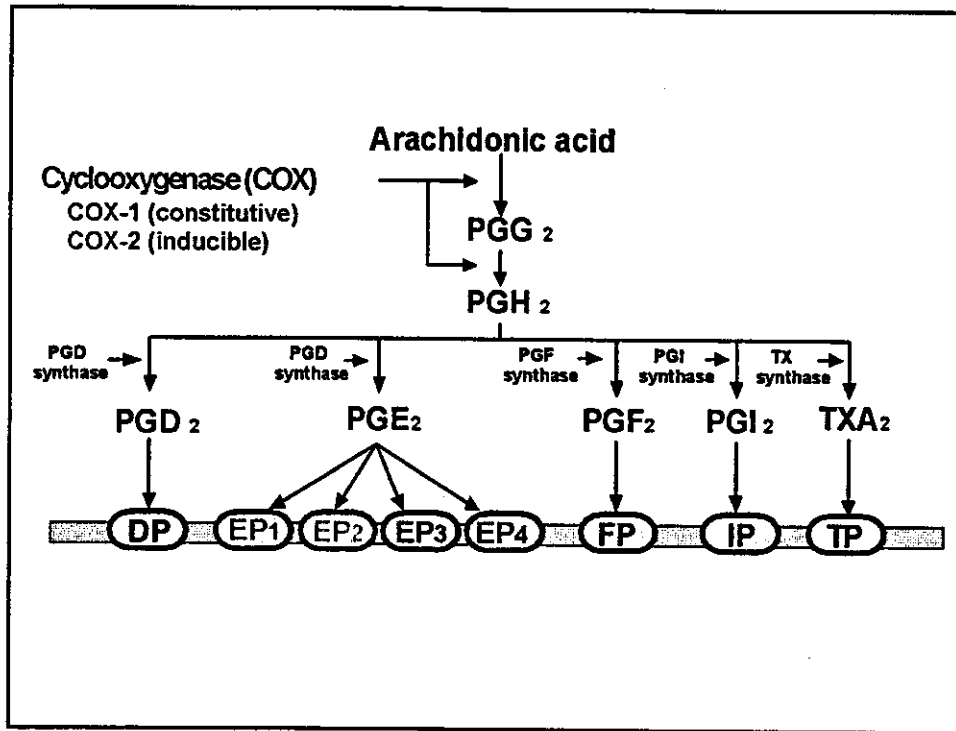
### Comparison of Over-expressed Genes in Tumors of Rat and Human

Gene name	Ret	Human	
	Fold	DNA chip <sup>1)</sup>	SAGE <sup>2)</sup> or Other data
Defensin NP1 (a1) like protein	53.30	not changed	
Matrilysin (Mmp-7) mRNA	41.89	8.00	over-expressed <sup>3, 4)</sup>
<EST> AAB59937	14.37	NA	
Defensin NP3 (a3) gene	13.47	not changed	
Platelet phospholipase A2	12.02	not changed	over-expressed <sup>5)</sup>
Type I keratin (Mhr a-1)	9.86	NA	
Anti-acetylcholine receptor antibody gene	9.63	NA	
Mash-2	9.62	NA	9/0 <sup>2)</sup>
c-Ha-ras proto-oncogene mechanism sequence	8.90	NA	
Intracellular calcium-binding protein Mrp14	8.18	not changed	11/0 <sup>2)</sup>
Receptor-linked protein tyrosine phosphatase	8.06	NA	
Macrophage metalloelastase (Mme)	7.45	5.10	
Cation transporter Oat1A	7.43	NA	
VL30 element	6.75	NA	
Interleukin 1-beta mRNA	6.05	not changed	
Cyclin D2	5.60	not changed	8/0 <sup>2)</sup> , over-expressed <sup>6)</sup>
Alpha-2-macroglobulin	5.55	NA	over-expressed <sup>7)</sup>

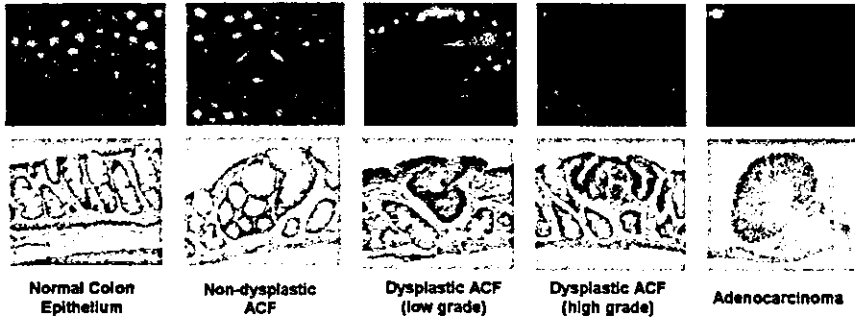
- 1) Notterman et al. (2001); 2) Buckhauks et al. (2001); 3) McDonnell et al. (1991);  
 4) Yoshimoto et al. (1993) 5) Kennedy et al. (1998); 6) Bartkova et al. (2001);  
 7) Cooper et al. (1976); NA, not assessed

### Real-time RT-PCR Analysis of Over-expressed Genes in Human Colorectal Cancers

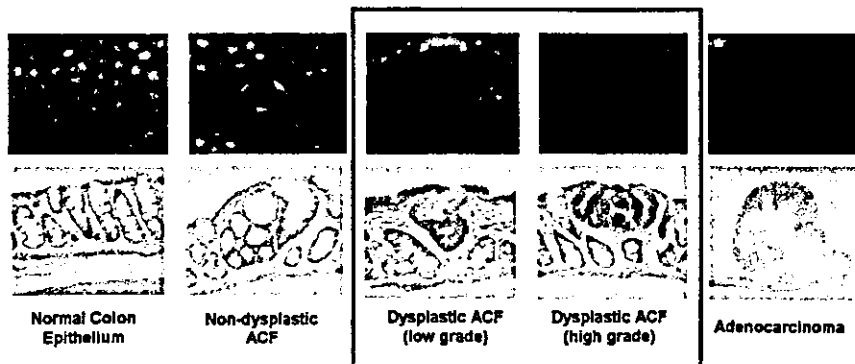




**A Multistep Model of Colon Cancer induced by Environmental Carcinogens**



**A Multistep Model of Colon Cancer induced by Environmental Carcinogens**



### Number of ACF and Dysplastic ACF induced in Rats by PhIP

Exp. periods (wks)	PhIP-exposure (wks)	No. of rats analyzed	No. of ACF	No. of large ACF ( $\geq 4$ ACFs)	Dysplastic ACF	
					No.	No. of ACF with $\beta$ -catenin accumulation
6	2	10	2.7 $\pm$ 1.5	0.6 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.5
18	6	10	3.7 $\pm$ 2.2	1.0 $\pm$ 0.9	0.8 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.7
25	6	7	4.7 $\pm$ 2.0	1.3 $\pm$ 1.4	1.4 $\pm$ 1.2	1.0 $\pm$ 0.8
32	6	10	4.7 $\pm$ 2.7	1.3 $\pm$ 2.0	0.8 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 0.8

\* Of the total 144 ACF, 19 of 27, 27 of 37, 26 of 33 and 38 of 47 ACF at weeks 6, 18, 25 and 32, respectively, were subjected to the histological evaluation.

### Alterations in AOM-Induced Colon Lesions in Rats

Gene or protein	Alteration	Frequency (%) in				
		Hyperplastic ACF	Dysplastic ACF	Adenomas	Small Carcinomas	Large Carcinomas
<i>K-ras</i>	Mutation	70	0	0	8	43
$\beta$ -Catenin	Mutation	0	66	33	75	79
$\beta$ -Catenin	Cytoplasmic & nuclear translocation	0	100	100	100	100
INOS	Increased expression in epithelial cells	0	100	100	92	100
	in stromal cells	-	-	-	-	±
COX-2	Increased expression in epithelial cells	0	0	17	42	79
	in stromal cells	+	+	++	++	+++

Small carcinomas: 1-5 mm, Large carcinomas: >5 mm.

## Colonic Lesions Induced by PhIP, IQ and MeIQ

Diet	No. of rat	Total ACF	Dysplastic ACF	Tumor
PhIP	20	8.0 ± 3.3	3.2 ± 2.6	0.7 ± 0.9
IQ	19	4.9 ± 1.7	2.0 ± 1.6	0.3 ± 0.6
MeIQ	18	15.4 ± 4.7	3.1 ± 2.2	0.6 ± 0.8
Control	20	0.6 ± 0.8	0.1 ± 0.2	0

All figures for colonic lesions are expressed as number of lesions per rat.

## Differential Staining for Dysplastic ACF

### Experimental Procedure

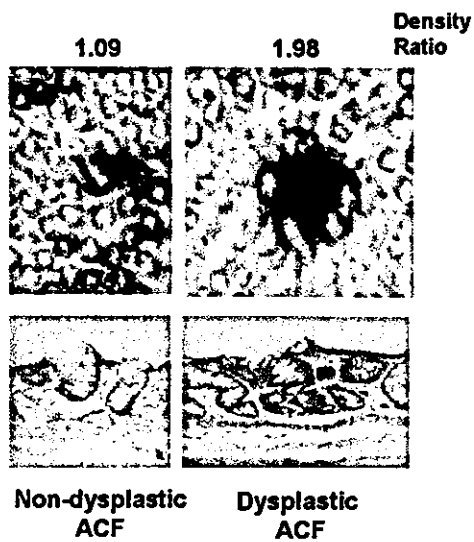
Resect the colon and cut open

Fix with 10 % neutralized formalin overnight at 4 °C

Stain with 0.2 % methylene blue in PBS for 30 min at R.T.

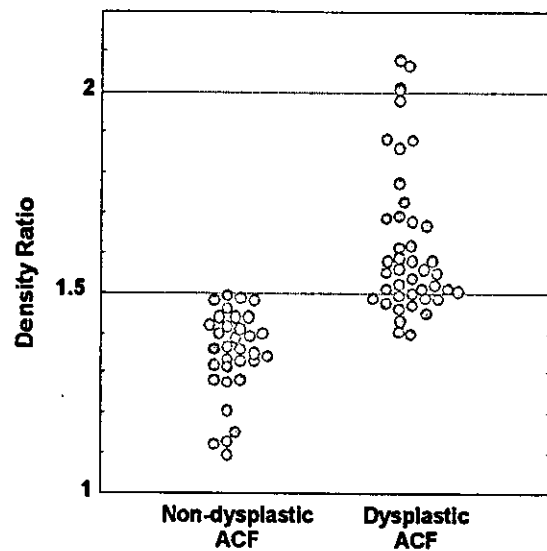
Decolorize the section with 70 % methanol for 6 min at R.T.

Capture the image by a CCD camera, and digitize the signal density





### Distribution of Density Ratio in Dysplastic and Non-dysplastic ACF



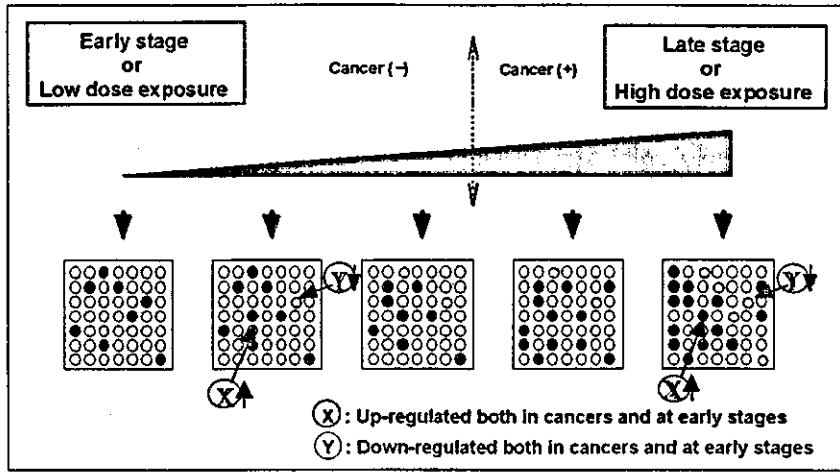
### Toxicogenomics Approach to Identifying Genes Responsible for Colon Carcinogenesis Induced by HCAs

1. 大腸がん或いは初期病変において発現変化する遺伝子を早期段階で検出することは可能か？
2. 早期に発現誘導・抑制される遺伝子リストから化合物の発がん性を予測することは可能か？

1. 大腸がん或いは初期病変において発現変化する遺伝子を早期段階で検出することは可能か？

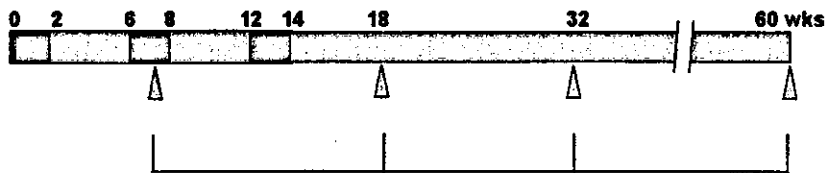
● 発がん性評価の指標として、発現変化する遺伝子のリストから化合物の発がん性を予測することは可能か？

**Application of Compiled Toxicogenomics Data for Risk Assessment of Environmental Mutagens and Carcinogens**



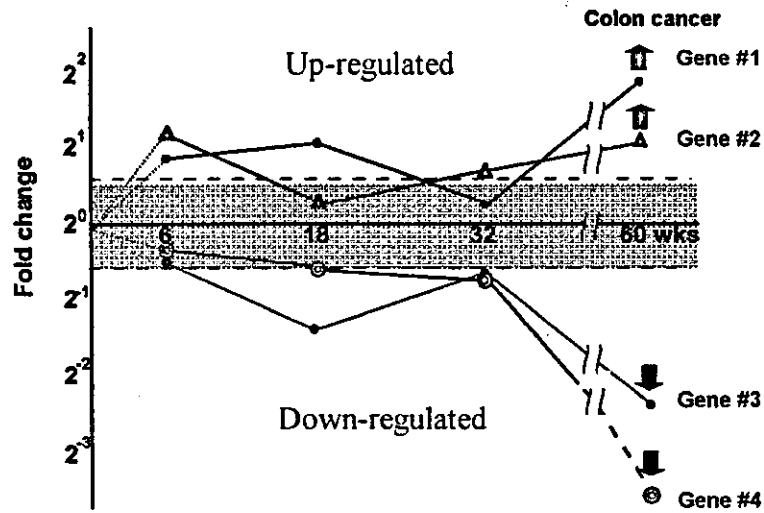
- Identification of predictable signature markers for human carcinogenesis
- Risk assessment for humans at low doses

**Experimental Protocol**



Sequential Gene Expression Analysis

PhIP誘発大腸がんで発現が亢進あるいは低下している遺伝子で、  
PhIP投与直後から発現変化を示す遺伝子の経時変化



2. 早期に発現誘導・抑制される遺伝子リストから  
化合物の発がん性を予測することは可能か？