

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び感受性要因の
解明とその臨床応用に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 斉

平成17(2005)年4月

目次

I. 総括研究報告

- 疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び
感受性要因の解明とその臨床応用 _____ 1
中釜 斉

II. 分担研究報告

1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性および修飾要因の解明 _____ 14
中釜 斉
2. リンパ腫感受性遺伝子の単離と発がんリスク予測 _____ 19
木南 凌
3. トランスジェニックラットを用いた胃がん感受性候補遺伝子の解析 _____ 25
山下 聡
4. 短期マウス大腸発がんモデルを用いた発がん感受性要因に関する研究 _____ 29
杉江 茂幸
5. 遺伝子改変技術を用いたがんモデルラットの開発 _____ 33
庫本 高志
6. 大腸癌における PPAR γ の役割に関する研究 _____ 35
中島 淳

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び感受性要因の解明とその臨床応用

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

種々の発がんモデル動物の構築とそれらを用いた遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構や感受性要因の解明に向けて、補完的かつ不可欠な役割を担うものであると期待される。本年度は、遺伝子変異スペクトラムがことなる大腸発がん性変異原化合物 PhIP と AOM との併用により、低分化で粘膜下組織への顕著な浸潤性進展を示す大腸がんを誘発することができた。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、ラット第 16 番染色体上の異常腺窩巣誘発の感受性遺伝子 *Set* の局在候補領域の一つを D16Wox3-D16Wox7 を含む数 Mb の領域に絞り込んだ。胃発がん感受性に関しては、感受性遺伝子の候補である *Crabp2* 遺伝子のトランスジェニックラットを 2 系統作製できた。前立腺がんの感受性候補遺伝子として、遺伝学的解析と網羅的遺伝子発現解析の結果を統合することにより *Mme* と *Cdkn1a* の 2 つの遺伝子を同定した。PPAR γ を介する足場消失による細胞死（アノイキス）が誘導されることを明らかにした。また、大腸がん細胞のマトリゲル浸潤能が PPAR γ 阻害で有意に抑制され、肝転移能も有意に抑制されることが分かった。マウスリンパ腫の感受性候補遺伝子 *Mtf-1* に関しては、Ser462Pro の遺伝子多型による下流遺伝子制御の違いが明らかとなり、プロリン型 Mtf-1 は放射線による酸化ストレス等の作用を減弱し、リンパ腫発がんに対して抵抗性を賦与することが示唆された。ラットのミュータジェネシス研究に関しては、点変異誘発型の ENU 及び欠失変異誘発型の CHL について、投与時期や投与量・投与回数等について基礎的検討を行った結果、至適投与量および使用するラット系統を決定することができた。

分担研究者

中釜 斉	国立がんセンター研究所	部長
木南 凌	新潟大学大学院医学部	教授
山下 聡	国立がんセンター研究所	研究員
杉江茂幸	金沢医科大学	助教授
庫本高志	京都大学医学研究科	講師
中島 淳	横浜国立大学医学部	助教授

臨床応用を目指している。具体的な研究課題としては、大腸、胃、前立腺がんの発がん感受性遺伝子の同定、大腸発がん過程を修飾する環境及び遺伝的要因の同定、消化器がんの初期病変における遺伝子変異、消化器発がんにおける炎症の意義の解明、リンパ腫及び肺がんの感受性遺伝子の同定を目指す。さらに、ミュータジェネシスの方法を用いて、種々のがん関連遺伝子に変異を導入したラット系統の作製を試み、発がんの分子機構や、新規のがん治療薬や予防薬の開発に有用な疾患モデルの開発を目指す。

A. 研究目的

本研究は発がんの動物モデルを用いて、消化器がんを中心とした発がんの分子機構、特に初期段階における遺伝子変異や発現変化の解明、発がんに対する環境及び遺伝的修飾要因の同定、さらには個体レベルの発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。最終的には、得られた成果をがんの早期診断や遺伝子情報に基づいた個人対応型のがん予防策の構築、がんの新規治療薬・予防薬開発のための標的となる候補分子の同定などへの

B. 研究方法

(1) 大腸微小病変の分別染色法

大腸発がんモデルにおける異常腺窩 (aberrant crypt foci; ACF) 等の微小病変の検出には、従来より 0.2% methylene blue による染色が用いられて来た。今回、従来法に 70% メタノールによる脱色法を加えることにより、異型な異常腺窩 (dysplastic

ACF) を簡便に検出できる分別染色法 (中釜-落合法) を確立できた。本法により、単一腺管より成るごく微小な異型腺管までが簡便かつ迅速に検出ことが出来ることが分かった。

(2) PhIP と AOM による発がん共同効果

PhIP と azoxymethane (AOM) は、いずれもラットおよびマウスに効率良く大腸がんを誘発する。しかしながら、PhIP 及び AOM の活性化機序や得られる腫瘍での変異スペクトラムは異なる。そこで、PhIP と AOM を併用した場合の大腸発がんに及ぼす影響、および腫瘍の病理組織学的変化及び遺伝子変化について検討した。6 週齢 F344 雄ラットを用い、対照群 (n=10) として普通食 2 週+高脂肪食 4 週の投与を 3 回繰り返す、AOM 投与群 (n=20) には実験開始後 3 週時に AOM の単回皮下投与 (20 mg/kg, s. c.) を行った。PhIP 投与群としては普通食に 400 ppm PhIP を混餌して投与し (n=21)、さらに 3 週時に AOM 投与を行う PhIP+AOM 併用群 (n=22) を作成した。実験開始後 32 週に全ての群の大腸病変を実体顕微鏡下に観察した。

(3) PhIP 大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の局在の限定化

ラット 16 番染色体上の D16Rat12-D16Wox3 間に含まれるゲノム領域を断片的に含むコンジュニック系統を複数系統作成した。各系統を用い、PhIP 400 ppm 混餌普通食 2 週間+高脂肪食 4 週間投与による ACF 誘発数を調べることにより、感受性遺伝子 *Sct* のゲノム上の局在の限定化を試みた。

(4) PhIP 大腸発がん抵抗性遺伝子の同定

ラット 6 番及び 9 番にマップされた大腸発がん抵抗性遺伝子は、マウスでの相同染色体領域が 1, 12, 17 番であることが明らかとなっている。そこで、大腸発がんに対して抵抗性を示すマウス系統由来の相同染色体を感受性系統に導入したコンソミックマウスを用いることで、大腸発がんの抵抗性遺伝子を同定する方法を取ることとした。C57BL/6J と MSM/Ms の 2 系統を用い、PhIP 200 mg/kg i. g. 投与一週間後から 1-2 % dextran sodium sulfate (DSS) の飲水投与 (1 週間) を開始した。実験開始後、5、10、15 及び 20 週時における腸炎や粘膜再生の程度、上皮細胞の異型増殖巣等について組織学的検討を行った。異型腺管や腫瘍性結節を確認した場合には、 β -catenin の免疫組織染色を行った。

(5) Mtf-1 の KO マウスを用いた照射実験と γ 線照射により発生するヒドロキシラジカルの測定。

生後 4 週から 6 週齢の Mtf-1 欠損 (+/-) B6 マウス (スイスの W. Schaffner 教授より分与) を B6 マウスと交配し、そのプロジェニーに対してガンマ線、1.7Gy を 4 回照射した。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸で判定した。 γ 線照射 16 時間後に、マウスから胸腺を摘出し、採取した胸腺細胞を MEM-HEPES 溶液中に溶出させる。この細胞をファルコン・チューブに移し、1500rpm 10 分間遠心した。沈殿した細胞 (2×10^6 cells/ml) に H2DCFDA-MEM-HEPES 溶液 (H2DCFDA: dichlorofluorescein diacetate) を加え、暗所で 37°C 45 分間保温した。PBS で 3 回洗浄後、PBS 500 μ l にサスペンドしフィルター通過後、FACScan で蛍光を測定した。

(6) MTF-1 ハプロタイプの解析

遺伝子多型の解析に使用したサンプル数は、日本人が 42、ウクライナ人が 71、ドイツ人が 287 人であった。日本人サンプルにおいては MTF-1 の 10 が所で SNPs (fsNP, iSNP, cSNP) を確認することができた。このうち 3 か所は ensembl データベースには登録されていない多型である。最終的なハプロタイプ解析には 6 か所の SNPs を使用し、SNP の検出には PCR-RFLP 法を用いた。

(7) 放射線照射により誘発されるマウスリンパ腫発がん抵抗性遺伝子座の解析

コンジュニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェニーに対してガンマ線、2.5Gy を 4 回照射し、生存率およびリンパ腫の発生率を調べた。尚、胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸の有無で判定した。

(8) *Crabp2* コンストラクト作製とトランスジェニック (Tg) ラットの作成

pBluescript に SV40 splicing donor 及び acceptor 部位と、polyA を組み込んだベクターに、ヒト *EEF1A1* プロモーター、およびラット *Crabp2* cDNA を挿入した。ACI/N ラットおよび Wistar ラットの受精卵に作成したコンストラクトを注入し、胚を移植した。プロモーターと *Crabp2* cDNA に跨るプライマーを用いて PCR を行った。導入遺伝子の存在の可能性が高い個体について、導入遺伝子の存在確認およびコピー数の測定のため、*Crabp2* cDNA をプローブとしてゲノム DNA のサザンブロッティングを行った。

(9) 前立腺の網羅的遺伝子発現解析

8週齢および48週齢のACI/SegおよびF344ラット各群3匹の前立腺からRNAを抽出し、8 μ gのtotal RNAをテンプレートにビオチン化cRNAを合成して、オリゴヌクレオチドアレイGeneChip Rat Genome U34A (Affymetrix)にハイブリダイズした。MicroArray Suiteを用いてACI/SegおよびF344ラット間で1.8倍以上発現量の異なる遺伝子を検索した。その中で、昨年度までに同定した4個の前立腺がん感受性遺伝子座位(ラット染色体19q11-12, 2q23-32, 20p12-11, 1p12-q11)に該当する遺伝子中を検索した。*Membrane metalloendopeptidase (Mme, Cd10)*および*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a, p21, Cip1)*について発現量系統差を確認するため、SYBR Greenを用いてリアルタイムRT-PCRを行った。

(10) PhIP+DSS 腸炎モデルにおけるマウス大腸がんの系統差の検討

4系統雄マウス(Balb/c, C3H/HeN, C57BL/6N, DBA/2N)を用いて、各系統の6週齢雄マウスにazoxymethane (AOM) (10mg/kg 体重)を1回、胃内強制投与し、その1週間後より1% DSS 飲水投与を4日間行った。実験開始18週で実験終了した。また、各系統の6週齢雄マウスにPhIP或いはMeIQxを胃強制投与し、その1週間後より1% DSS 飲水投与を4日間行った。実験開始20週で実験終了した。各実験群の腸管病変を肉眼で観察し、腫瘍性病変部を病理組織学的に検討した。

(11) PPAR γ 阻害による大腸がんの抑制効果

大腸がん培養細胞(HT29)に対しPPAR γ の特異的阻害剤(T0070907, GW9662)およびsiRNAを導入し、形態変化を顕微鏡下に観察した。細胞増殖はMTTアッセイにて経時的に評価した。形態変化を起こした細胞に対し、アクチン、パキシリンなど細胞骨格の変化を共焦点顕微鏡により観察した。PPAR γ 阻害剤によるアポトーシス誘導と細胞浸潤に与える影響を、それぞれFACSとマトリゲルアッセイで解析した。さらに、大腸がんマウス肝転移モデルに対しPPAR γ 阻害剤を1か月経口投与し、転移巣に与える影響を観察した。

(12) ENU 及び CHL ミュータジェネシス

ENUは精粗細胞に点変異を誘発する。G1個体におけるENU誘発点変異の検出効率を考慮すると、近交

系にENUを投与し同一系統と交配、産子を得るのが望ましい。平均産子数の異なる近交系を用いて、各系統における最適ENU投与量を求めた。ACI/NS1c、BN/SsNS1c、F344/NS1c各系統に20mg/kgを2回(9匹)、30mg/kgを2回(6匹)、45mg/kgを2回(5匹)の投与群を設け、9週齢時と10週齢時にENUを投与した。20週齢時に同一系統の雌と3週間交配した。

一方、CHLは精子細胞に欠失変異を誘発する。欠失変異の検出は、G1個体ゲノムのLOH検出によることから、G1個体の親系統には遺伝的にできるだけ離れた系統を用いることとした。従って、CHLを投与する系統としてBNラットを選択した。また交配相手には平均産子数が13.9匹のWistar/STを選択した。10週齢のBNラットに0mg/kg(3匹)5mg/kg(6匹)、10mg/kg(6匹)、15mg/kg(8匹)の投与群を設け、投与直後から11週目にかけて1週毎に別のWistar/ST雌ラットと交配しそのG1産子を得た。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各大学や研究機関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飛鳥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行った。

C. 研究成果

(1) 異型微小病変の分別染色法の確立

70%メタノールによる脱色法の併用による分別染色法(中釜-落合法)により、異型腺管を簡便かつ容易に検出することができることが分かった。各病変の染色強度をデジタル化することにより定量化したところ、シグナル強度(signal density)が1.5以上の病変は全て異型を伴った腺管(dysplastic ACF)であったのに対し、1.4以下の病変は全て異型を伴わない腺窩(non-dysplastic ACF)であった。シグナル強度が1.4以上-1.5以下の病変でも、各腺管のシグナルの強度や陰窩口の大きさ、ACFを構成する腺窩細胞のサイズの不規則性などの特徴から、異型な腺管(dysplastic ACF)と異型を伴わない腺窩(non-dysplastic ACF)とを9割以上の正確さで識別できることが分かった。Dysplastic ACF(43例)の半数以上で β -cateninの細胞質内のみ(20例)或いは核内(5例)への蓄積を認めた。Mucinの欠失した病変も15例(35%)に認められた。一方、non-dysplastic ACFでは解析した31例中3例(10%)で細胞質内に β -cateninの蓄積を認めるのみであ

った。

(2) PhIP と AOM の併用による浸潤性大腸がんの誘発

今回の実験では、PhIP 及び AOM の単独投与では、それぞれ一匹当たり 0.1 個、0.75 個の肉眼的な大腸腫瘍が誘発された。何れも高分化型腺がんの組織像を呈していた。これに対し、PhIP+AOM 併用群では平均 2.8 個の腫瘍が誘発され、腫瘍発生数において相乗的効果が得られた。さらに、62 個の腫瘍のうち 2 個は分化度が低く、漿膜面にまで至る強い浸潤性の進展様式を示した。免疫組織学的解析では、腫瘍細胞における β -catenin の細胞質内及び核内への集積が認められた。特に、浸潤先端部において、核内に限局した β -catenin の強い陽性像が認められ、ヒト大腸がんにおける β -catenin の染色像と酷似する像を呈した。誘発された大腸腫瘍の遺伝子解析では、PhIP (2/2) 及び AOM 単独投与群 (4/10) の腫瘍と同様に、PhIP+AOM 併用群の大腸腫瘍においても β -catenin の変異が高頻度に認められたが (解析した 15 例中 10 例)、*Apc*, *K-ras*, *p53* 変異に関しては、浸潤性腫瘍の 2 例中 1 例において、*K-ras* codon 12 の GGT (Gly) \rightarrow GAT (Asp) への変異を認めるのみであった。

(3) サブコンジェニック系統を用いた感受性遺伝子座 (*Sct*) 局在の限定化

遺伝学的方法によりマップした大腸がん感受性遺伝子 *Sct* の候補領域に関して、当該ゲノム領域を含むコンジェニック C 系統を起始動物として作製した複数のサブコンジェニック系統を用いて、PhIP による ACF の誘発性を検討した。その結果、C32 領域 (D16Wox7-D16Wox3) を含むサブコンジェニック系統において、遺伝子型 (ゲノタイプ) が F/A 及び A/A の個体間での ACF 誘発性は各々、平均 1.75 ± 0.86 個と 0.80 ± 0.79 個 ($P < 0.05$)、C34 領域 (D16Mit3-D16Rat17) を含むサブコンジェニック系統では各々 2.22 ± 1.39 個と 0.71 ± 0.49 個 ($P < 0.05$) であった。C32 と C34 領域に挟まれたゲノム領域の一部を含む C17, C19 及び C20 系統ではゲノタイプ間で ACF の誘発性に有意な差を認められなかった。C34 の短腕側の一部を含む C33 系統でも ACF 誘発性の有意な差を認めなかった。以上の結果より、*Sct* 遺伝子局在の候補領域として、C32 (D16Wox7-D16Wox3) 及び C34 (D16Mit3-D16Rat17) の長腕側の一部の領域が同定できた。

(4) PhIP 大腸がんの抵抗性遺伝子

PhIP+DSS 併用によるマウスの大腸がんモデルを用いて、MSM/Ms 系統と C57BL/6J 系統における発がん性を検討した。MSM/Ms 系統は DSS 腸炎に対して強い感受性を示し、5 週時までに死亡する個体が相次ぎ、5 週時の大腸腫瘍発生数は 2 匹中 0 匹であった。1.5% DSS では 20 週時に 5 匹中 1 匹に異型度の強い微小病変が誘発された。1.0% DSS の濃度では 20 週時に大腸腫瘍を誘発したマウスは 14 匹中 0 匹であった。MSM/Ms 系統では、PhIP+DSS 処理により腫瘍の発生が殆ど認められなかったことから、PhIP 大腸がんに対して低感受性である可能性が示唆された。一方、C57BL/6J 系統では、PhIP+1% DSS により 20 週時において 17 匹中 1 匹に、1.5% DSS では 18 匹中 3 匹、2.0% DSS では約半数 (6 匹中 3 匹) の動物に腫瘍が誘発され、腫瘍発生数は DSS の濃度依存性であることが分かった。

(5) Mtf-1 の KO マウスを用いた放射線誘発リンパ腫発がん実験

コンジェニックマウスを用いた詳細な遺伝解析と候補遺伝子の検索から、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 は放射線曝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 PLGF 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 に比べ照射による高い mRNA 誘導能を示した。この違いは MTF-1 多型に帰せられ、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。さらに、Mtf-1-KO マウスを入手し、Mtf-1 多型が感受性遺伝子であることを同定する実験を開始した。Mtf-1 (+/-) マウスと B6 マウスを交配し、その仔マウス (プロジェニー) を放射線照射による発がん実験に用いた。生まれてくるマウスの半分は Mtf-1 (+/-) マウスで、残り半分が Mtf-1 (+/+) マウスである。後者はコントロールマウス群で、この結果を対照とすることにより正確な発がん感受性が測定できる。現在、照射後約 5 カ月が経過するが、野生型マウスを用いた発がん実験と比較すると、早期に胸腺リンパ腫が発生しているという印象をもった。

(6) 放射線曝露により生じるラジカルの測定

MTF-1 は放射線曝露を含めたストレスに応答する遺伝子であることから、Mtf-1 (+/-) マウスと

Mtf-1(+/-)マウスを比較し、放射線影響がどの程度違うかを検討した。γ線照射により発生するヒドロキシラジカルをH2DCFDA試薬を用いた蛍光発色法により測定した。0.5Gy、1.5Gy、3.0Gyのγ線を照射し、16時間後に胸腺を取り出し測定したところ、0.5Gy照射では両者の差はわずかであるが、1.5Gy照射群ではMtf-1(+/-)マウスの胸腺細胞で高い蛍光を発する細胞の割合が約30%であったのに対し、Mtf-1(+/+)マウスからの胸腺細胞での割合は約19%と明らかな差が認められた。

(7) ヒトMTF-1遺伝子のハプロタイプ解析

ヒトで同定した10か所のSNPsのうちその6か所を用いて、ヒトMTF-1のハプロタイプを決定した。連鎖不平衡ブロックを測定すると、プロモーター領域から約15kb内部までの領域は一つのハプロタイプブロックを形成することが判明した。頻度の高いハプロタイプは主要な3タイプに分類することができた。それらのハプロタイプ頻度は66%、19%、9%であった。この結果をもとに、ヒト被ばく試料をタイプピングする予定である。

(8) 第5番染色体上のリンパ腫発がん抵抗性遺伝子に関する遺伝学的解析

新しく2種類のBALLB/cバックグラウンドをもつサブコンジェニックマウス(系統1と系統2)を作製し、発がん実験を行った。系統1はD5MIT300(セントロメアから49Mb)からD5MIT336(81Mb)の領域をMSMゲノムに導入したもので、系統2はD5MIT110(66Mb)からD5MIT20(95Mb)の領域をMSMゲノムを導入したものである。系統1のコンジェニックマウスをMSMと交配し、そのプロジェニー(仔マウス)を照射し、300日観察した。リンパ腫の発症頻度を2つの遺伝子型(C/MとM/M)でログ-ランク検定したが、両群に有意な差はなかった(P=0.123)。この結果から、抵抗性遺伝子の候補領域を5番染色体上のD5MIT336(81Mb)~D5MIT10(102Mb)までの約20Mbの領域にまで限定できた。系統2のサブコンジェニックマウスについても同様の解析を進めている。今後さらに詳細なサブラインを作製し、474頭のマウスを解析することにより、第一候補領域(D5Mit7座)を含む数ラインが系統化できる見込みである。

(9) 胃がん感受性遺伝子のTgラット作成

ユビキタスに発現させるプロモーターとして頻用されるヒト*EEF1A1*プロモーター下流に、ラット

*Crabp2*を連結したコンストラクトを、遺伝子発現が低く、胃がん高感受性のACI/NラットおよびWistarラットの受精卵に注入した。ACI/Nラットについては、第一回目(10/1分娩)は、151個の受精卵に注入、84個の胚を移植したが、産仔が得られなかった。第二回目(10/1-8分娩)は、採卵時期を早め、183個の受精卵に注入、136個の胚を移植、29匹の産仔を得た。しかし、トランスジェニック動物は得られなかった。第三回目(11/18-24分娩)は、235個の受精卵に注入、207個を移植、44匹の産仔が得られた。これら44匹中2匹(メス)に1コピーおよび10コピーの遺伝子が導入されていた。Wistarラットについては、115個の受精卵に注入、102個の胚を移植、18匹の産仔を得た。導入コピー数については解析中である。

(10) 前立腺における発現遺伝子プロファイルの系統差に関するオリゴヌクレオチドアレイ解析

8週齢のラット前立腺において、ACI/Segの方がF344よりも1.8倍以上発現が高いプローブは219個、逆に、ACI/Segの方が1.8倍以上発現が低いプローブは143個であった。48週齢の前立腺においては、それぞれ371および154個であった。これらの中で8週齢、48週齢の両時点でACI/Segで発現が高い遺伝子は48個、低い遺伝子は34個であった。これらの遺伝子の中で、昨年度までに同定した4個の前立腺がん感受性遺伝子座位と染色体上の位置が一致したものは*Mme*(2q31)および*Cdkn1a*(20p12)の2つであった。リアルタイムRT-PCRによりmRNA発現量を測定し、*Mme*はACIラットの前立腺で2.0-5.5倍発現が高いこと、*Cdkn1a*はF344ラットの前立腺で1.5-4.5倍発現が高いことを確認した。これら2つの遺伝子が、ACI/Seg系統の前立腺発がんの高感受性に寄与している可能性がある。

(11) DSS誘発の炎症背景下でのマウス大腸発がん

DSSを用いた炎症背景マウス大腸発がんモデルを用い、AOM、PhIP、MeIQx投与による4系統雄マウス(Balb/c、C3H/HeN、C57BL/6N、DBA/2N)における系統差を検討した。AOM/DSSでは系統間に大腸腫瘍発生率の明らかな差を認めしたが、大腸の炎症程度との間に相関は認めなかった。PhIP/DSSは1系統のみに腫瘍が発生し、MeIQx/DSSでは2系統に腫瘍が発生したが、低腫瘍発生率だった。

(12) PPARγ阻害による大腸発がんの抑制機構

PPAR γ の阻害剤を大腸がん培養細胞 (HT29) に投与すると、24 時間ころより剥離し始め、48 時間後にはほとんどの細胞が剥離した。この作用は PPAR γ siRNA においても認められたことから、PPAR γ 阻害剤の特有の作用ではなく PPAR γ の活性抑制が強く関与していることが示唆された。PPAR γ 阻害剤投与前の大腸がん培養細胞ではアクチンストレスファイバー、膜アクチンおよびパキシリンが認められたが、12 時間後にそれらは減弱・消失し 24 時間後には細胞は球形に形態変化を起こし、投与後 48 時間にはアポトーシス細胞の増加を認めた。

(13) PPAR γ 阻害剤による細胞の浸潤・転移の抑制

PPAR γ 阻害剤により浸潤細胞は著明な減少を認めたことから、PPAR γ の活性阻害が接着阻害・細胞増殖抑制作用のみならず細胞浸潤抑制作用を有することが示唆された。また、PPAR γ 阻害剤によりマウス大腸がん肝転移巣数・体積ともに有意な減少を認めた。PPAR γ 阻害剤は *in vitro* のみならず *in vivo* においても転移抑制作用を示すことが分かった。

(13) ENU 及び CHL によるラットミュータジェネシス

ENU 投与雄ラットの産子数 (雌 1 匹当り) を以下に示す。

ENU 投与雄と交配した各系統雌の平均産子数

	0mg/kg	20mg/kg	30mg/kg	45mg/kg
ACI	4.2	5.6	2.0	0.0
BN	4.0	4.3	5.0	0.0
F344	8.5	8.6	7.7	5.6

0mg/kg のデータは日本 SLC 社による。

CHL 投与によるミュータジェネシスでは、CHL 投与後 3, 4, 5, 6 週目において、CHL 投与雄ラット由来の産子数 (雌 1 匹当り) が非投与群に比べ減少した。1, 2 週目、7 週目以降に交配した雄ラット由来の産子数は、非投与群に比べ差はなかった。

CHL 投与 BN 雄と交配した Wistar/ST の平均産子数

CHL 投与量	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
0mg/kg	12.0	8.5	6.2	9.5
5mg/kg	7.5*	0.6**	2.2***	7.6
10mg/kg	6.7***	0.25***	0.17***	1.6***
15mg/kg	7.4**	0.08***	0.0***	5.1

(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005)

D. 考察

(1) 分別染色法の確立により、methylene blue に対する染色性の違いで異型性の高い病変を簡便に検出出来ることが分かった。異型腺管が分別染色される原因としては、構造異型に伴った細胞密度の増加や、細胞異型に伴う DNA 量の増加による要因が考えられた。

(2) 作用機序の異なる PhIP と AOM の併用により誘発された浸潤性大腸がんにおいて、p53 或いは K-ras 遺伝子の変異との関連性は認められなかったことから、他の遺伝子変化の関与の可能性が示唆された。

(3) 感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統の解析から局在領域を確実に限定してきている。今後、さらに 1-2Mb の範囲にまで局在を限定できた場合には、当該領域に存在する遺伝子の SNPs 情報を用いたハプロタイピングにより、候補遺伝子を絞り込むことができる。また、抵抗性遺伝子については、C57BL/6J と MSM/Ms 系統間での発がん性の有意な差が確認でき次第、コンソミック系統を用いた遺伝学的解析を開始できることが期待される。

(4) マウスリンパ腫発がんにおいて Mtf-1 遺伝子を感受性遺伝子と推定してきたが、その確証はまだ得られていない。最終的には、Mtf-1-KO マウスを利用して野生遺伝子型マウスとヘテロ型マウス間で、 γ 線照射によるリンパ腫発症の頻度に違いのあることを示す必要がある。更にコンディショナル Mtf-1 KO マウスの作製と利用が確証には必要という議論もあるが、現在のところそのようには考えていない。また、Mtf-1 遺伝子は肝臓などの他の組織でも発現していることから、肝発がんにも関与している可能性がある。Mtf-1 の KO マウスを用いて、放射線による肝発がん実験を同時に始めている。

(5) 放射線曝露により生じるラジカルの測定では、Mtf-1 (+/+) と (+/-) とで放射線照射後のラジカル消去の程度が異なることが明らかとなり、この違いが感受性を担うと考えられた。今後より直接的な検定法として、p53 がん抑制蛋白質のリン酸化の違いも検討する。照射によるラジカルの消去に MTF-1 が働くことが確定出来れば、日常診療で用いられている放射線診断時の防御方法、放射線治療プロトコルに一石を投じるものと考えている。

(6) ヒト MTF-1 遺伝子の頻度の高いハプロタイプを主要な 3 タイプに分類することができたことで、MTF-1 遺伝子のヒトがん感受性遺伝子としての役割を検討する基盤が与えられたことになる。検討対象としては、放射線汚染により多発しているチェルノブイリ地方の小児甲状腺がんを考えているが、サン

プルの入手に手間取っている。一方、放射線治療後に生じる2次がんのリスク検定に用いられないかという点についても検討を開始する。

(7) 第5番染色体上の放射線誘発リンパ腫の発がん抵抗性遺伝子についても、D5MIT336(81Mb)からD5MIT10(102Mb)までの約20Mbにまで限定できた。近々、第一候補領域(D5Mit7座)を含むサブコンジェニックの数ラインが系統化できる見込みである。

(8) 胃発がん感受性のTgラットの作成に関しては、ACI/N系統の受精卵を使用するのは今回初めてであり、Wistar系統とは異なる採取時期が良いことが示唆された。採取時期を早めた第二回、第三回の注入は、産仔を得ることが出来ており、トランスジェニック動物の比率も、*Crabp2*以外の遺伝子の場合と変わらないと考えられる。今後、トランスジェニック動物の子孫を得ることが出来れば、胃粘膜での*Crabp2*発現量を解析する。発現量の増加が確認されれば、*Crabp2*発現量の大小が胃がん感受性に影響するか否かを明らかにする。

(9) 前立腺がんの感受性に関するオリゴヌクレオチドアレイ解析では、*Mme*および*Cdkn1a*の2個の遺伝子が、ACI/Seg及びF344の交雑仔で得られた感受性・抵抗性座位に存在し、かつ、両系統の前立腺でmRNA発現量が異なることを同定した。*Mme*は、ACI/Segアレルが前立腺がんの大きさを抑制する逆説的遺伝子座*Pcr1*(ラット染色体2番)に存在し、ACI/Segラットで高発現を示した。*Mme*は、アンドロゲン非依存性のヒト前立腺がん細胞株の増殖を抑制する効果を持つことが知られており、*Pcr1*の有力な候補と考えられた。*Cdkn1a*は、ACI/Segアレルが前立腺がんの大きさを増大させる*Pcs2*(ラット染色体20番)に存在し、F344ラットで高発現を示した。*Cdkn1a*は細胞周期を抑制することでよく知られるがん抑制遺伝子であり、*Pcs2*の有力な候補と考えられた。

今回、がん感受性遺伝子座位と網羅的遺伝子発現解析を併用して、候補遺伝子を同定する方法は有力であった。GeneChip Rat Genome U34Aは、4個の前立腺がん感受性遺伝子座位に存在すると考えられる遺伝子の約30%をカバーしていた。より多くの遺伝子をカバーするアレイを用いることで、感受性遺伝子の発現量が異なる場合には、容易に同定可能になると思われる。

(10) 炎症を背景としたマウス大腸発がんモデルにおいて、化学がん物質にたいする発がん性の系統差が存在することが明らかになった。本モデルは、

大腸発がんの感受性或いは抵抗性遺伝子の同定に寄与するのみならず、大腸発がんに対する炎症の関与についての遺伝学的解析にも、有用なモデルと期待される。

(11) PPAR γ 阻害による細胞浸潤能の低下、肝転移モデルにおける転移巣の数・体積の減少は、PPAR γ 活性化剤に加え、抑制剤の臨床応用の可能性を示唆するものである。今後、PPAR γ を介するシグナルのがん化における役割に関して、さらに詳細かつ注意深い考察が必要と考えられた。

(12) ラットにおけるミュータジェネシス研究においては、ENUは将来精子となる精粗細胞のゲノムに点変異を誘発し、CHLは精子細胞ゲノムに欠失変異を誘発する。ともに投与量を増加すると変異の誘発率は上昇する。一方で、ENU・CHLによる精粗細胞・精子細胞以外の精巣組織への影響もあり、妊娠率、平均産子数に反映される。従って今年度明らかにしたENU, CHL投与ラットの妊娠率、平均産子数はENU, CHLの遺伝子変異誘発効率と精巣毒性を合わせたものとして扱わなければならない。ENU投与後の産子数の検討から、ENUミュータジェネシスはF344ラットに40mg/kgを投与するのが至適と判断された。投与することとした。一方、CHLはENUよりも低濃度でかつ重篤な変異(欠失)を引起すので、変異誘発率のコントロールが困難であった。投与4,5週目ではいずれの投与群においても非投与群に比べ産子数が激減した。投与6週目の5mg/kg群で産子数が回復したことから、CHLミュータジェネシスは投与後4,5週目で得られるG1個体に最も高頻度に変異が誘発されていることが示唆された。

E. 結論

PhIP誘発のラット及びマウス大腸がんモデルを用いた遺伝学的解析により、今後、発がん感受性の系統差を規定している遺伝的要因の候補遺伝子について解明できる可能性が大いに期待される。また、PhIPとAOMの併用によりヒト大腸がん類似した浸潤性の進展様式をとる大腸がんを誘発できたことから、このモデル系を用いた遺伝的解析により、大腸がんの浸潤性進展に重要な役割を果たす原因遺伝子を同定できる可能性がある。さらには、大腸がんの浸潤或いは転移を抑制する化合物の検索にも有用なモデルを提供できるものとする。

Mtf-1遺伝子型(+/+)と(+/-)のマウスに γ 線を照射し、生じたラジカルの消去の程度に差があることが明らかとなった。これはMtf-1遺伝子を感受性遺伝子候補であることを支持する結果である。照

射によるラジカルの消去に MTF-1 が働くことは、薬物ターゲットとしての利用、ラジカル消去薬の開発が期待される。また、ヒト MTF-1 遺伝子のハプロタイプの同定は、ヒトがん感受性遺伝子としての役割を検討する基盤を与える。

ラット胃がん高感受性の原因遺伝子の一つの候補である *Crabp2* 遺伝子について、トランスジェニックラットを作製した。また、網羅的遺伝子発現解析と遺伝学的解析の結果の総合的活用が、ACI/Seg ラットの前立腺がん抵抗性候補遺伝子を同定するのに極めて有効であった。系統間の発がん感受性の差異の遺伝的要因を明らかにすることによって、発がん機構における遺伝子的背景や分子機構を解明する端緒となると考えられる。

PPAR γ はその発現を亢進させた場合、大腸がん細胞の増殖を抑制し大腸がん前がん病変を減少させた。この作用には細胞増殖関連遺伝子の減少を伴っていた。発現を抑制した場合、細胞の形態変化を伴うアポトーシスを誘導した。PPAR γ は大腸がんの発がんおよび転移に重要な役割を演じていることが明らかとなった。今後、既存の抗がん剤との併用による相乗効果の誘導、副作用の軽減、QOL の維持、がん死の減少など臨床応用されることが期待される。

ENU または CHL を投与した雄ラットの生殖能力を指標にして、変異誘発プロトコールを定めた。ENU ミュータジェネシスでは、F344 雄ラットに 40mg/kg の ENU を 9 週齢時と 10 週齢時の 2 回投与し、20 週齢時で同一系統と交配する。CHL ミュータジェネシスでは BN 雄ラットに 5mg/kg の CHL を投与し、投与後 5 週目に F344 と交配する。

F. 健康危険情報

本研究の方法、材料、実験結果、及び動物個体が人体の環境に影響を及ぼす可能性は殆どない。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。また、危険物、動物の使用については、研究所の危険物、動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. Masutani M, Gunji A, Tsutsumi M, Ogawa K,

Kamada N, Shirai T, Jishage K, Nakagama H and Sugimura T. PolyADP-ribosylation in relation to cancer and autoimmune disease. *In: Poly(ADP-ribosylation), Edited by Alexander Burklee.* Cell Mol Life Sci. (CMLS, in press)

2. Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M, Taguchi A, Sugimura T and Nakagama H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett*, 220:67-74, 2005.
3. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H and Masutani M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*. 24:1328-1337, 2005.
4. Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J and Nakagama H. Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 26:635-640, 2005.
5. Shiokawa M, Masutani M, Fujihara H, Ueki K, Nishikawa R, Sugimura T, Kubo H and Nakagama H. Genetic alteration of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in human germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 35:97-102, 2005.
6. 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* 25: 1495-1505, 2004.
7. 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 ordinal life style. *Cancer Sci*, 95:290-299, 2004.
8. Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, localizes at the

- outer nuclear and endoplasmic reticulum membranes, and interacts with mRNA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:736-43, 2004.
9. Shibata A, Masutani M, Kamada N, Masumura K, Nakagama H, Kobayashi S, Teraoka H, Suzuki H and Nohmi T. Efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutation in gpt delta mice using Southern blot analysis with oligo DNA probe. *Environ Mol Mutagen.* 43:204-207, 2004.
 10. Kubota T, Yoshikai Y, Tamura Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Niwa O, Kominami R. Genetic features of thymic lymphomas spontaneously developed in p53-deficient mice: comparison to those induced by g-radiation. *Rad Research*, in press.
 11. Tamura Y, Maruyama M, Mishima Y, Fujisawa H, Obata M, Kodama Y, Yoshikai Y, Aoyagi Y, Niwa O, Schaffner W, Kominami R. Predisposition to mouse thymic lymphomas in response to ionizing radiation depends on variant alleles encoding metal-responsive transcription factor-1 (Mtf-1). *Oncogene.* (2005) 24 :399-406.
 12. Kubota T, Yoshikai Y, Tamura Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Niwa O, Kominami R. Comparison of properties of spontaneous and radiation-induced mouse thymic lymphomas: role of Trp53 and radiation. *Radiat Res.* (2005) 163: 159-164.
 13. Okazuka K, Wakabayashi Y, Kashihara M, Inoue J, Sato T, Yokoyama M, Aizawa S, Aizawa Y, Mishima Y, Kominami R. p53 prevents maturation to the immature CD4-CD8+stage of T cell development in Bcl1 1b-/- mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:545-549, 2005.
 14. Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, MacKlis, JD. Neural subtype-specific genes that control corticospinal moter neuron development in vivo. *Neuron* 45:207-221, 2005.
 15. Kodama Y, Yoshikai Y, Tamura Y, Wakana S, Takagi R, Niwa O, Kominami R. The D5Mit7 locus on mouse chromosome 5 provides resistance to g-ray-induced but not *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced thymic lymphomas. *Carcinogenesis* 25:143-148, 2004.
 16. Togashi T, Obata M, Aoyagi Y, Kominami R, Mishima Y. Two distinct methods analyzing chromatin structure using centrifugation and antibodies to modified histone H3: both provide similar chromatin states of the Rit1/Bcl1 1b gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:489-495, 2004.
 17. Sakata J, Inoue J, Ohi H, Kosugi-Okano H, Mishima Y, Hatakeyama K, Niwa O, Kominami R. Involvement of V(D)J recombinase in the generation of intragenic deletions in the Rit1/Bcl1 1b tumor suppressor gene in gamma-ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis* 25:1069-1075, 2004.
 18. Yamashita S, Suzuki S, Nomoto T, Kondo Y, Wakazono K, Tsujino Y, Sugimura T, Shirai T, Homma Y and Ushijima T. Linkage and microarray analyses of susceptibility genes in ACI/Seg rats: a model for prostate cancers in the aged. *Cancer Res.* in press.
 19. 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*-nitroso-guanidine treatment and their presence in stomach cancers. *Mutat Res.* (2004) 549: 185-193.
 20. 山下 聡, 牛島 俊和: ラット. ゲノム研究実験ハンドブック (辻本豪三、田中利男監修) 羊土社、2004, pp. 250-257.
 21. Sugie S, Ohnishi M, Ushida J, Yamamoto T, Hara A, Koide A, Mori Y, Kohno H, Suzuki R, Tanaka T, Wakabayashi K, Mori H. Effect of alpha-naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 2005 Feb 1; [Epub ahead of print]
 22. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2005 Feb;96(2):69-76.
 23. Mori Y, Koide A, Tatematsu K, Sugie S, Mori H. Effects of alpha-naphthyl isothiocyanate

- and a heterocyclic amine, PhIP, on cytochrome P-450, mutagenic activation of various carcinogens and glucuronidation in rat liver. *Mutagenesis*. 2005 Jan;20(1):15-22. Epub 2004 Dec 14.
24. Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takahashi M, Wakabayashi K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*. 2005 Jan;26(1):229-38. Epub 2004 Sep 30.
 25. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 2004 Sep;95(9):721-7.
 26. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Sasaki K, Yoshimura T, Wada K, Tanaka T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett*. 2004 Jul 16;210(2):159-69.
 27. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Sugie S. Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*. 2004 Jul 16;210(2):129-37.
 28. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Lack of modifying effects of 4-tert-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci*. 2004 Apr;95(4):300-5.
 29. Kitayama K, Wada K, Nakajima A, Kamisaki Y, Mayumi T. Nuclear receptors on stem cells: the role of nuclear receptors during neural stem cell proliferation and differentiation. *J. Pharmacol Sci.*, in press.
 30. Nakajima A, Wada K. Nuclear receptors on diseases; Nuclear receptors as targets for drug development. *J. Pharmacol Sci*, in press.
 31. Yoshii T, Mizuno K, Hirose T, Nakajima A, Sekihara H, Ohno S. sPAR-3, a splicing variant of PAR-3, shows cellular localization and expression pattern different from that of PAR-3 during enterocyte polarization. *Am J Physiol Gastro-Liver Physiol*, in press.
 32. Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsushashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} Inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 65: 2251-2259, 2005.
 33. Schaefer KL, Denevich S, Ma C, Cooley SR, Nakajima A, Wada K, Schlezinger J, Sherr D, Saubermann LJ. Intestinal Antiinflammatory Effects of Thiazolidinedione Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Ligands on T Helper Type 1 Chemokine Regulation Include Nontranscriptional Control Mechanisms. *Inflamm Bowel Dis*. 11: 244-252, 2005.
 34. Wada K, Nakajima A, Takahashi H, Yoneda M, Fujisawa N, Ohsawa E, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Matsushashi N, Saubermann LJ, Nakajima N, Blumberg RS. Protective effect of endogenous PPARgamma against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287: G452-8, 2004.
 35. Inamori M, Sakaguchi T, Yoneda M, Fujisawa N, Takahashi H, Togawa J, Kawamura H, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Shimamura T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N. The rectal administration of controlled release morphine sulfate: a case report. *Medical Postgraduates*. 42: 231-232, 2004.
 36. Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Glickman JN, Nieuwenhuis EE, Nakajima A, Chen D, Fuss IJ, Utku N, Lewicki DN, Becker C, Gallagher TM, Holmes KV, Blumberg RS. Specific Regulation of

- T Helper Cell 1-mediated Murine Colitis by CEACAM1. *J Exp Med.* 16;199(4): 471-82, 2004.
37. Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y, Mayumi T. RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Letters.* 560:178-182, 2004.
 38. Abe Y, Inamori M, Togawa J, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Kawamura H, Kobayashi N, Kirikoshi H, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H. The Comparative effects of single intravenous doses of omeprazole and famotidine on intragastric pH. *J Gastroenterol.* 39: 21-25, 2004.
 39. Matsuhashi N, Nomura S, Nakajima A, Kamisaki M. Inflammatory fibroid polyps of the stomach and *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 19: 346-347, 2004.
 40. Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, Nakajima A, Niwa H, Kamisaki Y. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *J. Neurochemistry* 88: 1416-1423, 2004.
 41. 藤沢信隆, 中島淳 PPAR γ による大腸がんの Chemoprevention. *消化器科* 38 巻 6 号 Page536-542(2004.06)
2. 学会発表
1. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 査 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第21回疾患モデル学会総会 2004年11月(京都)
 2. 中釜 査 動物モデルを用いた大腸がんの分子機構及び修飾要因の解明 第63回日本癌学会総会 2004年9月(福岡)
 3. 落合雅子、渡辺昌俊、中釜 査 Dysplastic ACF の効率的かつ選択的な検出法とその大腸発がん性評価における有用性 第63回日本癌学会総会 2004年9月(福岡)
 4. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 査 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第63回日本癌学会総会 2004年9月(福岡)
 5. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 査 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第19回発癌病理研究会 2004年8月(諏訪)
 6. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Nakagama H. Gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridine. Keystone Symposia Meeting, Keystone, Colorado, February 17-22, 2004.
 7. 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-phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridine. 6th Joint Conference of the AACR and the JCR. Hawaii, January 25-29, 2004.
 8. 落合雅子、渡辺昌俊、田口紋子、杉村 隆、中釜 査 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 蓼科 January 14-16, 2004.
 9. 山下 聡, 野本朋子, 辻野好美, 庫本高志, 渡邊直子, 杉村 隆, 牛島俊和 ラット系統間での胃がん感受性と *in vivo* 突然変異頻度とは関連しない, 第19回発癌病理研究会 2003年8月(諏訪)
 10. 山下 聡, 阿部雅修, 野本朋子, 杉村隆, 牛島俊和 ラット系統間での胃がん感受性と突然変異頻度とは関連しない, 第63回日本癌学会総会 2004年9月(福岡)
 11. 山下 聡, 若園邦子, 野本朋子, 辻野好美, 牛島俊和 遺伝子発現量を量的形質として用いた連鎖解析による発現支配座位の特定, 第27回日本分子生物学会年会 2004年12月(神戸)
 12. Yamashita S and Ushijima T. Chromosomal mapping of susceptibility genes in ACI/Seg rats: a model for prostate cancers in the aged. 9th Korea-Japan Cancer Research Workshop 2004年12月(慶州・大韓民国)

13. Sugie, S., Kohno, H., Tanaka, T. Chemoprevention of Oral Cancer. Second Regional Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP) Conference - South East Asia, Khon Kaen, Thailand, 2004.
14. Sugie, S., Vinh, P. Q., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Sakata, K., Kato, K., Mori, H. : Modifying effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. 95th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Orlando, 2004.
15. Sugie S., Kato K., Kohno H., Mori H., Sakata K., Suzuki R., Tanaka T., Vinh P. Q. Modifying effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine on urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. 95th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Orlando, 2004.
16. Tanaka T., Kohno H., Suzuki R., Sugie S. Rapid induction of colonic neoplasms in ICR mice treated with azoxymethane followed by dextran sodium sulfate. 95th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Orlando, 2004.
17. Kohno H., Suzuki R., Yasui Y., Hosokawa M., Miyashita K., Sugie S., Tanaka T. Dietary pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid increases colonic PPAR γ expression and decreases malignancy induced by azoxymethane in rats. 95th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Orlando, 2004.
18. Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Tanaka, T. : Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis 228th American Chemical Society National Meeting.
19. 杉江茂幸、甲野裕之、田中卓二 トリアジン系除草剤 atrazine のラット卵巣発がんに対する修飾効果 第93回日本病理学会総会、2004.
20. 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、加藤恵三、吉田浩二郎、北折奈美、盛弘強、坂田圭子、久野寿也、片山雅貴、森秀樹、嶋田昇二 : パン酵母、亜鉛、亜鉛強化パン酵母の 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発舌発がんにおける抑制効果。第12回癌予防研究会、2004.
21. 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、森秀樹、若林敬二 : MeIQx の高脂肪食混餌投与によるラットにおける発癌性の検討。第63回日本癌学会総会、2004.
22. 杉江茂幸、山田泰広、鄭嬌、森下由起夫、田中卓二、森秀樹 : DL-Alanine の慢性毒性。第21回日本毒性病理学会総会、2005.
23. 鈴木里加子、高橋真美、甲野裕之、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二 : 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) あるいは 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を用いた炎症関連大腸発がん。第21回日本毒性病理学会総会、2005.
24. Chairman: Atsushi Nakajima, Gary Wu. Research Forum. DDW 2004, New Orleans, LA
25. 消化器癌における PPAR γ の分子標的治療への応用 高橋宏和、藤田浩司、藤沢聡郎、藤沢信隆、米田正人、池田多聞、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、寫村健、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口隆、斎藤聡、上野規男、中島淳 第1回日本消化管学会総会 平成17年1月29日 (名古屋)
26. アレルギー性紫斑病の大腸病変の一例 細野邦広、島村健、高橋宏和、稲森正彦、小林規俊、阿部泰伸、河村晴信、桐越博之、坂口隆、高邑知生、中島淳、上野規男 第46回日本消化器病学会大会 平成16年10月 (福岡)
27. PPAR γ inhibitor による anoikis および癌転移抑制作用機序解析 高橋宏和、寫村健、藤田浩司、藤沢聡郎、藤沢信隆、米田正人、池田多聞、稲森正彦、河村晴信、阿部泰伸、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、斎藤聡、坂口隆、上野規男、中島淳 第63回日本癌学会学術総会 平成16年9月29日 (福岡)
28. 治療に難渋した潰瘍性大腸炎合併膝関節炎の1例 柳澤昇吾、稲森正彦、藤田浩司、藤澤聡郎、藤澤信隆、米田正人、高橋宏和、池田多聞、阿部泰伸、河村晴信、島村健、小林規俊、桐越博之、森田幸恵、中戸川満智子、中村ちの、窪田賢輔、坂口隆、斎藤聡、上野規男、中島淳 第281回日本消化器病学会関東支部例会 平成16年9月 (東京)
29. ワークショップ; 大腸発癌における PPAR γ の役割 - β -catenin と APC との関係 藤沢信隆、中島淳

第 15 回日本消化器癌発生学会 平成 16 年 8 月
(札幌)

30. ワークショップ；大腸発癌における PPAR γ ,
 β -catenin のクロストーク 藤沢信隆, 米田正人,
中島淳 第 90 回日本消化器病学会総会 平成 16
年 4 月 (仙台)
31. シンポジウム座長；核内レセプターと疾患 中

島淳, 和田孝一郎 第 77 回日本薬理学会年会 平
成 16 年 3 月 (大阪)

- 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（第3次対がん総合戦略研究事業）

- 疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び感受性要因の解明とその臨床応用 -
分担研究報告書

「ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性及び修飾要因の解明」
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

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) により誘発される大腸発がんモデルを用いて、大腸発がんの分子機構、大腸発がん過程を修飾する種々の環境中の修飾要因や、個体レベルの発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。今年度は、PhIP 大腸がんの前がん病変 dysplastic ACF における種々の遺伝解析を可能とするため、dysplastic ACF を迅速かつ簡便に同定できる分別染色法を確立した。さらに、作用機序の異なる PhIP と AOM の併用により、ヒト大腸がんに類似した浸潤性進展様式を示す大腸がんの誘発に成功した。PhIP 大腸発がんの感受性遺伝子 *Sct* については、サブコンジェニック系統 C32 (D16Wox7-D16Wox3), C34 (D16Mit3-D16Rat17) を用いた ACF 誘発実験により、*Sct* 局在の候補領域を C32, C34 の領域に限定することが出来た。抵抗性遺伝子のマッピングに関しては、C57BL/6J と MSM/Ms 系統のコンソミック系統を用いた PhIP+DSS 腸炎併発モデルの有用性が示唆された。

A. 研究目的

加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) により誘発される大腸発がんモデルを用いて、大腸発がんの分子機構、特に初期段階における遺伝子変異や発現変化を解明する。さらに、大腸発がん過程を修飾する種々の環境中修飾要因や、個体レベルの発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。本研究で得られる成果は、ヒト発がん研究の補完的な役割を担うものであり、最終的には、ヒトがんの早期診断、遺伝子情報に基づいたテーラーメイドながん予防策の構築、さらにはがんに対する新規治療薬・予防薬開発のための標的候補分子の同定等への臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) 大腸微小病変の分別染色法

大腸発がんモデルにおける異常腺窩 (aberrant crypt foci; ACF) 等の微小病変の検出には、従来より 0.2% methylene blue による染色が用いられて来た。今回、従来法に 70% メタノールによる脱色法を加えることにより、異型な異常腺窩 (dysplastic ACF)

を簡便に検出できる分別染色法 (中釜-落合法) を確立できた。本法により、単一腺管より成るごく微小な異型腺管までが簡便かつ迅速に検出ことが出来ることが分かった。

(2) PhIP と AOM による発がん共同効果

PhIP と azoxymethane (AOM) は、いずれもラットおよびマウスに効率良く大腸がんを誘発する。しかしながら、PhIP 及び AOM の活性化機序や得られる腫瘍での変異スペクトラムは異なる。そこで、PhIP と AOM を併用した場合の大腸発がんに及ぼす影響、および腫瘍の病理組織学的変化及び遺伝子変化について検討した。6 週齢 F344 雄ラットを用い、対照群 (n=10) として普通食 2 週+高脂肪食 4 週の投与を 3 回繰り返す、AOM 投与群 (n=20) には実験開始後 3 週時に AOM の単回皮下投与 (20 mg/kg, s. c.) を行った。PhIP 投与群としては普通食に 400 ppm PhIP を混餌して投与し (n=21)、さらに 3 週時に AOM 投与を行う PhIP+AOM 併用群 (n=22) を作成した。実験開始後 32 週に全ての群の大腸病変を実体顕微鏡下に観察した。

(3) PhIP 大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の局在

の限定化

ラット 16 番染色体上の D16Rat12~D16Wox3 間に含まれるゲノム領域を断片的に含むコンジェニック系統を複数系統作成した。各系統を用い、PhIP 400 ppm 混餌普通食 2 週間+高脂肪食 4 週間投与による ACF 誘発数を調べることにより、感受性遺伝子 *Sct* のゲノム上の局在の限定化を試みた。

(4) PhIP 大腸発がん抵抗性遺伝子の同定

ラット 6 番及び 9 番にマップされた大腸発がん抵抗性遺伝子は、マウスでの相同染色体領域が 1, 12, 17 番であることが明らかとなっている。そこで、大腸発がんに対して抵抗性を示すマウス系統由来の相同染色体を感受性系統に導入したコンソミックマウスを用いることで、大腸発がんの抵抗性遺伝子を同定する方法を取ることにした。C57BL/6J と MSM/Ms の 2 系統を用い、PhIP 200 mg/kg i. g. 投与一週間後から 1~2 % dextran sodium sulfate (DSS) の飲水投与 (1 週間) を開始した。実験開始後、5、10、15 及び 20 週時における腸炎や粘膜再生の程度、上皮細胞の異型増殖巣等について組織学的検討を行った。異型腺管や腫瘍性結節を確認した場合には、 β -catenin の免疫組織染色を行った。

(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飛鳥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行った。

C. 研究成果

(1) 異型微小病変の分別染色法の確立

70 %メタノールによる脱色法の併用による分別染色法 (中签-落合法) により、異型腺管を簡便かつ容易に検出することができることが分かった。各病変の染色強度をデジタル化することにより定量化したところ、シグナル強度 (signal density) が 1.5 以上の病変は全て異型を伴った腺管 (dysplastic ACF) であったのに対し、1.4 以下の病変は全て異型を伴わない腺窩 (non-dysplastic ACF) であった。シグナル強度が 1.4 以上~1.5 以下の

病変でも、各腺管のシグナルの強度や陰窩口の大きさ、ACF を構成する腺窩細胞のサイズの不規則性などの特徴から、異型な腺管 (dysplastic ACF) と異型を伴わない腺管 (non-dysplastic ACF) とを 9 割以上の正確さで識別できることが分かった。Dysplastic ACF (43 例) の半数以上で β -catenin の細胞質内のみ (20 例) 或いは核内 (5 例) への蓄積を認めた。Mucin の欠失した病変も 15 例 (35%) に認められた。一方、non-dysplastic ACF では解析した 31 例中 3 例 (10%) で細胞質内に β -catenin の蓄積を認めるのみであった。

(2) PhIP と AOM の併用による浸潤性大腸がんの誘発

今回の実験では、PhIP 及び AOM の単独投与では、それぞれ一匹当たり 0.1 個、0.75 個の肉眼的な大腸腫瘍が誘発された。何れも高分化型腺がんの組織像を呈していた。これに対し、PhIP+AOM 併用群では平均 2.8 個の腫瘍が誘発され、腫瘍発生数において相乗的効果が得られた。さらに、62 個の腫瘍のうち 2 個は分化度が低く、漿膜面にまで至る強い浸潤性の進展様式を示した。免疫組織学的解析では、腫瘍細胞における β -catenin の細胞質内及び核内への集積が認められた。特に、浸潤先端部において、核内に限局した β -catenin の強い陽性像が認められ、ヒト大腸がんにおける β -catenin の染色像と酷似する像を呈した。誘発された大腸腫瘍の遺伝子解析では、PhIP (2/2) 及び AOM 単独投与群 (4/10) の腫瘍と同様に、PhIP+AOM 併用群の大腸腫瘍においても β -catenin の変異が高頻度に認められたが (解析した 15 例中 10 例)、*Apc*, *K-ras*, *p53* 変異に関しては、浸潤性腫瘍の 2 例中 1 例において、*K-ras* codon 12 の GGT (Gly)→GAT (Asp) への変異を認めるのみであった。

(3) サブコンジェニック系統を用いた感受性遺伝子座 (*Sct*) 局在の限定化

遺伝学的方法によりマップした大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の候補領域に関して、当該ゲノム領域を含むコンジェニック C 系統を起始動物として作製した複数のサブコンジェニック系統を用いて、PhIP による ACF の誘発性を検討した。その結果、C32 領域

(D16Wox7-D16Wox3)を含むサブコンジェニック系統において、遺伝子型(ゲノタイプ)がF/A及びA/Aの個体間でのACF誘発性は各々、平均 1.75 ± 0.86 個と 0.80 ± 0.79 個 ($P < 0.05$)、C34領域(D16Mit3-D16 Rat17)を含むサブコンジェニック系統では各々 2.22 ± 1.39 個と 0.71 ± 0.49 個 ($P < 0.05$)であった。C32とC34領域に挟まれたゲノム領域の一部を含むC17、C19及びC20系統ではゲノタイプ間でACFの誘発性に有意な差を認められなかった。C34の短腕側の一部を含むC33系統でもACF誘発性の有意な差を認めなかった。以上の結果より、*Sct* 遺伝子局在の候補領域として、C32 (D16Wox7-D16Wox3)及びC34 (D16Mit3-D16 Rat17)の長腕側の一部の領域が同定できた。

(4) PhIP大腸がんの抵抗性遺伝子

PhIP+DSS併用によるマウスの大腸がんモデルを用いて、MSM/Ms系統とC57BL/6J系統における発がん性を検討した。MSM/Ms系統はDSS腸炎に対して強い感受性を示し、5週時までに死亡する個体が相次ぎ、5週時の大腸腫瘍発生数は2匹中0匹であった。1.5% DSSでは20週時に5匹中1匹に異型度の強い微小病変が誘発された。1.0% DSSの濃度では20週時に大腸腫瘍を誘発したマウスは14匹中0匹であった。MSM/Ms系統では、PhIP+DSS処理により腫瘍の発生が殆ど認められなかったことから、PhIP大腸がんに対して低感受性である可能性が示唆された。一方、C57BL/6J系統では、PhIP+1% DSSにより20週時において17匹中1匹に、1.5% DSSでは18匹中3匹、2.0% DSSでは約半数(6匹中3匹)の動物に腫瘍が誘発され、腫瘍発生数はDSSの濃度依存的であることが分かった。

D. 考察

分別染色法の確立により、methylene blueに対する染色性の違いで異型性の高い病変を簡便に検出出来ることが分かった。異型腺管が分別染色される原因としては、構造異型に伴った細胞密度の増加や、細胞異型に伴うDNA量の増加による要因が考えられた。

作用機序の異なるPhIPとAOMの併用により誘発された浸潤性大腸がんにおいて、*p53* 或

いは*K-ras* 遺伝子の変異との関連性は認められなかったことから、他の遺伝子変化の関与の可能性が示唆された。

感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統の解析から局在領域を限定できつつある。今後、さらに1-2Mbの範囲にまで局在を限定できた場合には、当該領域に存在する遺伝子のSNPs情報を用いたハプロタイピングにより、候補遺伝子を絞り込むことができる。抵抗性遺伝子については、C57BL/6JとMSM/Ms系統間での発がん性の有意な差が確認でき次第、コンソミック系統を用いた遺伝学的解析を開始できることが期待される。

E. 結論

PhIP誘発のラット及びマウス大腸がんモデルを用いた遺伝学的解析により、今後、発がん感受性の系統差を規定している遺伝的要因の候補遺伝子について解明できる可能性が大いに期待される。また、PhIPとAOMの併用によりヒト大腸がんに類似した浸潤性の進展様式をとる大腸がんを誘発できたことから、このモデル系を用いた遺伝的解析により、大腸がんの浸潤性進展に重要な役割を果たす原因遺伝子を同定できる可能性がある。さらには、大腸がんの浸潤或いは転移を抑制する化合物の検索にも有用なモデルを提供できるものと考ええる。

F. 健康危険情報

本研究の方法、材料、実験結果、及び動物個体が人体の環境に影響を及ぼす可能性は全くない。また、危険物、動物の使用については、研究所の危険物、動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. 発表論文

1. Masutani M, Gunji A, Tsutsumi M, Ogawa K, Kamada N, Shirai T, Jishage K, Nakagama H and Sugimura T. PolyADP-ribosylation in relation to cancer and autoimmune disease. In: *Poly(ADP-ribosylation)*, Edited by Alexander Burkle. Cell Mol Life Sci. (CMLS, in press)
2. Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M,

- Taguchi A, Sugimura T and Nakagama H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett*, 220:67-74, 2005.
3. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H and Masutani M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*. 24:1328-1337, 2005.
 4. Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J and Nakagama H. Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 26:635-640, 2005.
 5. Shiokawa M, Masutani M, Fujihara H, Ueki K, Nishikawa R, Sugimura T, Kubo H and Nakagama H. Genetic alteration of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in human germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 35:97-102, 2005.
 6. 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* 25: 1495-1505, 2004.
 7. 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 ordinal life style. *Cancer Sci*, 95:290-299, 2004.
 8. Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membranes, and interacts with mRNA *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 317:736-43, 2004.
 9. Shibata A, Masutani M, Kamada N, Masumura K, Nakagama H, Kobayashi S, Teraoka H, Suzuki H and Nohmi T. Efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutation in gpt delta mice using Southern blot analysis with oligo DNA probe. *Environ Mol Mutagen*. 43:204-207, 2004.
2. 学会発表
1. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第 21 回疾患モデル学会総会 2004 年 11 月 (京都)
 2. 中釜 斉 動物モデルを用いた大腸がんの分子機構及び修飾要因の解明 第 63 回日本癌学会総会 2004 年 9 月 (福岡)
 3. 落合雅子、渡辺昌俊、中釜 斉 Dysplastic ACF の効率的かつ選択的な検出法とその大腸発がん性評価における有用性 第 63 回日本癌学会総会 2004 年 9 月 (福岡)
 4. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第 63 回日本癌学会総会 2004 年 9 月 (福岡)
 5. 中西雅子、落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉 ラット大腸発がんにおける PhIP と AOM の相乗作用 第 19 回発癌病理研究会 2004 年 8 月 (諏訪)
 6. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, 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, Februray 17-22, 2004.
 7. 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.
 8. 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
ショップ蓼科 January 14-16, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(なし)