

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）
分担研究報告書

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 (1) Mtf-1 遺伝子を受容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。そこで、Mtf-1-KO マウスを入手し、 γ 線照射による発がん実験を行っている。一方、Mtf-1 遺伝子が与える発がん感受性の機構を検討した。Mtf-1 (+/+) と (+/-) 遺伝子型によりラジカル消去の程度の異なることが明らかとなり、この違いが感受性を担うことが示唆された。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、開発が期待される。(2) 6 カ所の SNPs を用いヒト MTF-1 のハプロタイプを決定した。主要な 3 タイプに分類され、その頻度は 66%、19%、9%であった。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。(3) サブコンジェニックマウスの発がん実験から、5 番染色体上の抵抗性遺伝子領域を約 20Mb にまで限定できた。

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。しかし、遺伝的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およびその感受性遺伝子が与えるヒト発がんリスクの測定である。

B. 研究方法

(1) Mtf-1 の KO マウスを用いた照射実験。

Mtf-1 欠損マウスはスイスの W. Schaffner 教授から分与された。生後 4 週から 6 週齢の Mtf-1(+/-)B6 マウスを B6 マウスと交配し、そのプロジェクトに対してガンマ線、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。

(2) γ 線照射により発生するヒドロキシラジカルの測定。 γ 線照射 16 時間後に、マウスから胸腺を摘出し、培地中で試薬 (H2DCFDA : dichlorofluorescein diacetate) と反応させる。具体的には、胸腺採取後、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 分間遠心する。沈殿した細胞 (2×10^6 cells/ml) に H2DCFDA-MEM-HEPES 溶液を加え、暗所で 37°C 45 分間保温する。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。

(3) MTF-1 ハプロタイプの解析。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 カ所で SNPs (fSNP, iSNP, cSNP) を確認することができた。その内 3 カ所は 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 カ所の SNPs を使用した。SNP の検出には PCR-RFLP 法を用いた。

(4) 発がん抵抗性遺伝子座の解析。コンジェニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェクトに対してガンマ線、2.5Gy 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。

(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)。チェルノブイリ地方の小児甲状腺がんの解析についても、新潟大学医学部と長崎大学医学部で承認を得た。

C. 研究結果

(1) Mtf-1 の KO マウスを用いた発がん実験：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。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。

しかし、コンジェニックマウスを用いた実験からでは MTF-1 遺伝子が感受性遺伝子であるという最終的な結論に至ることは難しい。それは、コンジェニック領域には未知遺伝子を含め他の遺伝子が約 10 種類存在するからである。最終的には Mtf-1 の KO マウスを用いた発がん実験を行う必要がある。そこで、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、そのプロジェクトを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ている。最終的な結果は本年の10月にでる予定である。

(2) 放射線暴露により生じるラジカルの測定：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ことが分かっているが、発がん感受性はこの経路を利用しているのかどうか明らかでない。実際、メタロチオネイン遺伝子やPIGF遺伝子のKOマウスを用いた実験では顕著な発がん感受性を示す実験結果は報告されていない。したがって、その他の経路を利用している可能性がある。そこで、MTF-1が確かに照射の効果に影響を与えるかどうかを Mtf-1-KO マウスを用いて検討した。

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。具体的には、 γ 線照射によりヒドロキシラジカルが発生するが、このラジカルに反応する試薬(H2DCFDA)を用い測定した。H2DCFDAはヒドロキシラジカルにより(他の細胞内のreactive oxidantsでも起こる)酸化され、その結果蛍光を発する。したがって、この蛍光をFACSscanで測定・定量することにより、間接的に細胞内ラジカルを測定することができる。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。0.5Gy照射では両者の差はわずかであるが、1.5Gy照射

群では明らかな差が認められた。すなわち、Mtf-1(+/-)マウスの胸腺細胞で高い蛍光を発する細胞の割合は約30%、一方Mtf-1(+/+)マウスからの胸腺細胞での割合は約19%と低かった。

(3) ヒトMTF-1遺伝子のハプロタイプ解析：

同定した10カ所のSNPsのうちその6カ所を用いてヒト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ピングする予定である。報告されている機能的SNPについて、日本人とコーカシアンそれぞれ200人を対象に検討した結果、多型の存在は確認できなかった。

(4) 第5番染色体上の発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析：

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、発がん実験を行ってきた。系統1はD5MIT300(セントロメアから49Mb)からD5MIT336(81Mb)の領域をMSMゲノムを導入したもので、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、そのプロジェニーを照射し、300日観察した。リンパ腫発症頻度を2つの遺伝子型(CMとMM)でログランク検定したが、両群に有意な差はなかった($P=0.123$)。したがって、候補領域は5番染色体上のD5MIT336(81Mb)からD5MIT10(102Mb)までの領域、約20Mb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実験を行っているが、結果の出るのは、今年の夏頃となる。更に詳細なサブラインを作製中である。474 頭のマウスを解析し、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。

D. 考察

(1) Mtf-1 の KO マウスを用いた発がん実験：

Mtf-1 遺伝子を受容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、その野生遺伝子型マウスとヘテロ型マウスで、 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。現在その発がん実験を行っているところである。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。

Mtf-1 遺伝子は肝臓などの他の組織でも発現している。したがって、肝発がんにも関与している可能性がある。そこで、Mtf-1 の KO マウスを用いた放射線による肝発がん実験を始めている。これにより、Mtf-1 遺伝子が感受性遺伝子としてどの程度の組織特異性を示すかを知らることができると考えている。

(2) 放射線暴露により生じるラジカルの測定：

Mtf-1 (+/+) と (+/-) 遺伝子型のマウスを照射し、16 時間後に生じたラジカルを測定し比較した。ラジカル消去の程度の異なることが明らかとなり、この違いが感受性を担うことが示唆された。照射後 16 時間しか測定していないが、ラジカルは長期存続するとの報告もあり、時間経過を詳細に検討する必要がある。また、直接的な検定法として、p53 がん抑制蛋白のリン酸化の違いを測定することも考えて

いる。

照射によるラジカルの消去に MTF-1 が働くことが確定すると、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と考えている。また、MTF-1 蛋白が薬物ターゲットとして利用されるはずと考えている。それは照射の効果を修飾するからである。MTF-1 蛋白の阻害剤の開発が期待される。

(3) ヒト MTF-1 遺伝子のハプロタイプ解析：

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、ハプロタイプ頻度はそれぞれ 66%、19%、9%であった。これにより、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であるが、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 次がんのリスクの検定に用いられないか、と検討している。すなわち、この多型と第 2 項で述べたラジカルの測定 (ヒト白血球を単離し用いる) を組み合わせて、照射感受性とハプロタイプ多型との関連を調べる計画である。

(4) 第 5 番染色体上の発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析：

候補遺伝子領域は 5 番染色体上の D5MIT336 (81Mb) から D5MIT10 (102Mb) までの領域、約 20Mb にまで限定できた。

更に詳細なサブラインを作製中で、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。系統 2 の結果を参考にさらに新しい系統を選別し、発がん実験を行い、来年度末にはハプロタイプ解析に進めると期待している。

E. 結論

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のあることが明らかとなった。これは Mtf-1 遺伝子を受容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。ヒト MTF-1 のハプロタイプを 6 カ所の SNPs を用いて決定した。主要な 3 タイプに分類され、その頻度は 66%、19%、9%であった。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。マウス染色体 5 番上に存在する発がん抵抗性遺伝子座を、サブコンジェニックマウスの発がん実験から約 20Mb にまで限定できた。

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

1. 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 γ -radiation. Rad Research, in press.
2. 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.
3. 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.
4. Kazuka K, Wakabayashi Y, Kashiwara 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 Bcll 1b-/- mice. Biochem Biophys Res Commun. 328:545-549, 2005.
5. 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.
6. Kodama Y, Yoshikai Y, Tamura Y, Wakana S, Takagi R, Niwa O, 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 25:143-148, 2004.
7. 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/Bcll 1b gene. Biochem Biophys Res Commun. 313:489-495, 2004.

8. 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.

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

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

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/N ラットの胃がん高感受性の原因遺伝子の一つの候補である *Cellular retinoic acid binding protein II (Crabp2)* 遺伝子について、トランスジェニックラットを作製、導入コピー数の異なる2系統を得た。今後、トランスジェニック動物の繁殖を行い、*Crabp2* 遺伝子発現量の違いが胃がん感受性に与える影響を解析する。ACI/Seg ラットの自然発症前立腺がん高感受性の原因遺伝子を同定するため、連鎖解析と網羅的な遺伝子発現解析とを行った。前立腺がん抵抗性候補遺伝子として、*Mme* および *Cdkn1a* を同定した。

A. 研究目的

発がん感受性・抵抗性を支配する遺伝子を同定することが出来れば、発がん高リスク群の同定や、新たながん予防の標的の同定に役立つ。しかし、ヒトでは、遺伝的背景が複雑であり、また、個体ごとに環境因子への暴露が異なるために、発がん感受性・抵抗性遺伝子を同定することは容易ではない。そこで、本邦でのがん死の原因として重要な胃がんについて、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発ラット胃発がんモデルを用いて、また、近年増加が著しい前立腺がんについて、ACI/Seg ラットでの自然発症前立腺がんモデルを用いて、発がん感受性・抵抗性遺伝子の同定を試みている。

MNNG 誘発胃発がん、ACI/N ラットは感受性、BUF/Nac (BUF) ラットは抵抗性を示す。昨年度まで、ACI/N ラットと BUF ラットの胃粘膜で発現量が異なる遺伝子を cDNA サブトラクション及びオリゴヌクレオチドマイクロアレイにより、網羅的に検索した。その結果、*Cellular retinoic acid binding protein 2 (Crabp2)* mRNA は、BUF ラットの胃粘膜で ACI/N ラットに比べて、100 倍以上高発現することを見いだした。*Crabp2* 遺伝子の発現量の違いが

胃がん感受性に関与しているか否かを明らかにするため、本年度は、そのトランスジェニック (Tg) ラットを作製することを目的とした。

高齢 (24-33 ヶ月齢) で前立腺がんを自然発症する ACI/Seg ラットは、ヒト前立腺がんの良いモデルである。昨年度まで、前立腺がん比較的抵抗性である F344 ラットと交配、F₂ 交雑仔 118 匹についての連鎖解析を行った。本年度は、両系統の前立腺での網羅的発現解析により、連鎖解析により同定された座位に存在し、かつ、両系統で発現量が異なる、前立腺がん感受性・抵抗性遺伝子候補を同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) *Crabp2* コンストラクトの作製

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。

(2) Tg ラットの作成

上記コンストラクトを ACI/N ラットおよび Wister ラットの受精卵に注入、胚を移植した。得られた産仔 (3 週齢) から尾を採取し、常法に従いゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA をテンプレートとし、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。PCR 産物が得られ、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。

(3) 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 匹から前立腺を採取し、ISOGEN を用いて RNA を抽出した。精製後、8 μ g の total RNA をテンプレートにビオチン化 cRNA を合成、6,600 プローブを持つ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。

(倫理面への配慮)

ラットの飼育、発がん実験、屠殺はラットを用いた発がん実験は、実験動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) Tg ラットの作成

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 分婉) 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 分婉) 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 分婉) 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。

(2) オリゴヌクレオチドアレイ解析

8 週齢の前立腺において、ACI/Seg ラットの方が F344 ラットよりも 1.8 倍以上発現が高いプローブは 219 個、ACI/Seg ラットの方が 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 ラット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) 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。

D. 考察

(1) Tg ラットの作成

ACI/N ラット受精卵への第一回目の注入では、産仔を得ることが出来なかった。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。発現量を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。

(2) オリゴヌクレオチドアレイ解析

Mme および *Cdkn1a* の 2 個の遺伝子について、ACI/Seg 及び F344 ラット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癌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。

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。今回用いた 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。

E. 結論

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。ACI/Seg ラットの前立腺がん抵抗性候補遺伝子として、*Mme*

および *Cdkn1a* を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.
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.

2. 学会発表

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* 突然変異頻度とは相関しない, 第 19 回発癌病理研究会 2003 年 8 月 (諏訪)

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)

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)
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)

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)
分担研究報告書

分担研究課題「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」

分担研究者 杉江茂幸・金沢医科大学・腫瘍病理学・教授

研究要旨

Dextran sulfate sodium (DSS)を用いた炎症背景マウス大腸短期発がんモデルを用い、3つの大腸への発癌性の強さの違う発がん剤、azoxymethane (AOM)、2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)を4系統雄マウス (Balb/c、C3H/HeN、C57BL/6N、DBA/2N) に投与して、系統間での発がん感受性の差を検討した。その結果、Balb/cが最も感受性が高く、C3H/HeN、DBA/2Nは感受性が低く、今回の炎症を背景としたマウス大腸発がんモデルにおいて発癌性に明らかな系統差を認めた。発癌性が炎症の程度よりも系統差に、より左右されることも判明した。これは、遺伝的背景が、発がんには重要であることを示すものと考えられる。

A. 研究目的

死亡原因の第1位であるがんの制圧は、国民的課題であり、発がん物質、特に環境中発がん物質のヘテロサイクリックアミンに対する感受性要因の解明は重要である。中でも2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)は、動物実験において多臓器に発がん性が確認されている。このような環境中発がん物質に対する発がん感受性や抵抗性遺伝子の同定、解析を行うことは発がんの機序、種差、個体差の原因解明に必須であり、得られる成果はがん予防、治療に有用と考えられる。今回、新たに開発した dextran sulfate sodium (DSS) 発癌剤併用短期マウス大腸発がんモデルを用いて、ヘテロサイクリックアミンによる種々の異なる系統のマウスでの発癌感受性の差異を検討し、発癌感受性遺伝子、発癌抵抗性遺伝子の同定のための動物実験を行う。特に、ヘテロサイクリックアミンに関する感受性遺伝子の同定、解明を最終目標とする。

B. 研究方法

4系統雄マウス (Balb/c、C3H/HeN、C57BL/6N、DBA/2N) を用いて、以下の実験を行った。実験1：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。実験2：各系統の6週齢雄マウスに PhIP 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。実験3：各系統の6週齢雄マウスに 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。各実験共安楽死、剖検後、腸管病変を肉眼観察し、大腸の病変部を病理組織学的に検索した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、金沢医科大学動物実験指針のガイドラインに準拠して行う。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に配慮し、安楽死は、深麻酔下、苦痛に配慮する。

C. 研究結果

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。

D. 考察

炎症を背景としたマウス大腸発がんモデルにおいて、発癌性に対する系統差の存在が明らかになった。また、発癌性が炎症の程度よりも系統差に、より左右されることが明らかになった。

E. 結論

この実験結果は、遺伝的背景が、発がんには重要であることを示すものである。系統間の発癌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的背景や分子機構を解明する端緒となると考えられる。

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 : Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Lack of modifying effects of

4-ter t-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 Apr;95(4):300-5.

2: 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.

3: 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.

4: 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.

5: 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.

6: 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.

7: 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.

8: 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]

2. 学会発表

国際学会・外国学会

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.

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.

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.

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.

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.

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. : Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis 228th American Chemical Society National Meeting.

国内学会

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.

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.

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.

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.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(なし)

遺伝子改変技術を用いたがんモデルラットの開発

分担研究者 庫本 高志 京都大学大学院医学研究科 講師

研究要旨 エチルニトロソウレア (ENU)、クロラムブチル (CHL) を用いたミュータジェネシス法をラットに適用するための基礎研究を行った。ENU、CHL を用いて効率的に変異を誘発するプロトコルを確立した。ENU、CHL に対する感受性、繁殖能力を考慮して、ENU では F344、CHL では BN が投与対象系統として優れていると判断した。

A. 研究目的

平成 18 年度までに Apc 遺伝子変異ラットと p53 遺伝子変異ラットをミュータジェネシス法により作製することを目標としている。平成 16 年度は 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、効率的な変異誘発プロトコルの開発を目的とした。

B. 研究方法

ENU ミュータジェネシス

ENU は精粗細胞に点変異を誘発する。ENU に対する系統間（アウトブリード含む）の感受性の差異が報告されている。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。

CHL ミュータジェネシス

CHL は精子細胞に欠失変異を誘発する。ラットにおける CHL ミュータジェネシスの報告はない。欠失変異の検出は、G1 個体ゲノムの LOH 検出による。従って、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必要がある。現在用いられているラット系統のうち、最も遺伝的に離れている系統は BN である。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）動物実験は、「京都大学動物実験に関する指針」に基づき行った。

C. 研究結果

ENU 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 ミュータジェネシス

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

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。変異が生存に係る遺伝子の機能を阻害するほど多く誘発されると、その精子・胎児は致死となり、妊娠率、平均産子数に反映される。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る。その影響も、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。ミュータジェネシスを効率よく実施するには、できるだけ多くの変異を持つ G1 産子をできるだけ多く得る必要がある。今年度の結果をもとに効率的な変異誘発プロトコルを決定した。

ENU ミュータジェネシス

ENU は投与量依存的に、変異誘発率が上昇する。ENU による精巣毒性をできるだけ抑えるために、必要量を 2 回に分けて投与するプロトコルが開発されている。最適な投与濃度は、投与濃度の増加に伴い段階的に産子数が減少する濃度範囲を見出し、その中でより多くの産子が得られる濃度とした。各系統の最適投与濃度は、ACI で 30mg/kg、BN で 40mg/kg、F344 で 45mg/kg であった。ENU30mg/kg、45mg/kg 投与での BN の妊娠率（14%と 0%）と産子数を考慮すると、BN 系統はミュータジェネシスに不相当であると結論した。またより多くの産子を得るには ACI よりも F344 を用いた方がよいと結論した。従って、ENU ミュータジェネシスには F344 ラットに 40mg/kg の ENU を 9 週齢時と

10 週齢時に投与することとした。

CHL ミュータジェネシス

CHL は ENU よりも低濃度でかつ重篤な変異 (欠失) を引き起こすので、変異誘発率のコントロールが困難である。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。よって、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。得られた産子数を考慮し、CHL 投与濃度は 5mg/kg とし、投与後 5 週目の産子を得ることとした。

G1 の LOH を効率よく検出するには、交配相手は近交系の方がよい。繁殖能力の高い市販の近交系として F344 (平均産子数 8.5) を選択することとした。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産の出願・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）
分担研究報告書

大腸癌における PPAR γ の役割に関する研究

分担研究者 中島 淳 横浜市立大学大学院医学研究科 分子消化管内化学

研究要旨 脂肪細胞の分化誘導因子として研究されてきた PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activator Receptor gamma)は脂肪細胞および腸管に発現が認められているが、近年ほとんどすべての癌において多量に発現していることが報告されており、PPAR γ が癌に対し何らかの作用を有することが示唆されている。PPAR γ は活性化により細胞増殖・分化誘導・アポトーシス誘導作用を有することが報告されているが、抑制した場合その作用は明らかにされていない。我々はこれまで PPAR γ の活性化が抗炎症作用・発癌抑制作用を示すことを報告してきたが、PPAR γ の阻害剤および siRNA の大腸癌培養細胞に対する作用を検討した。PPAR γ 阻害剤により大腸癌培養細胞はアクチンファイバーの消失を伴った形態変化を起こした後剥離し、アポトーシスに至った。また、細胞浸潤能を有意に低下させ、大腸癌マウス肝転移モデルにおいて転移巣の数・体積を減少させた。PPAR γ は、その活性を抑制することによりアポトーシス誘導しており、大腸癌の発癌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、既存の抗癌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、癌死の減少など臨床応用されることが期待される。

A. 研究目的

核内受容体型転写因子である PPAR γ は脂肪細胞や大腸癌細胞などに多く発現しており、大腸癌細胞では細胞増殖抑制・分化誘導・アポトーシス誘導作用などが明らかにされている。我々はこれまで PPAR γ リガンドは NF- κ B の活性化を抑制して腸管の炎症を抑え、マウス・アゾキシメタン化学発癌モデルにおいて発癌を抑制し、PPAR γ 阻害剤が培養がん細胞の増殖を抑制することを最近発見した。これまで PPAR γ を抑制した場合の細胞に与える影響に関する報告はなく、PPAR γ 阻害剤および siRNA の大腸癌培養細胞に対する作用を検討した。

B. 研究方法

(1)大腸癌培養細胞(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。

(2)細胞増殖を MTT アッセイにて経時的に評価した。

(3)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。

(4)PPAR γ 阻害剤によるアポトーシス誘導作用を FACS により解析した。

(5)PPAR γ 阻害剤の細胞浸潤に与える影響をマトリゲルアッセイにより解析した。

(6)大腸癌マウス肝転移モデルに対し PPAR γ 阻害剤を一ヶ月経口投与し転移巣に与える影響を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、横浜市立大学附属動物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) 大腸癌培養細胞(HT29)は 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より、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。

(2) PPAR γ 阻害剤の濃度が 50 μ M 以上、また投与後 48 時間以上で増殖抑制作用を認めた。この作用は濃度・時間依存的であった。

(3) PPAR γ 阻害剤投与前の大腸癌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た。

(4) PPAR γ 阻害剤投与後 48 時間においてアポトーシス細胞の増加を認めた。

(5) 浸潤細胞は PPAR γ 阻害剤により著明な減少を認めた。PPAR γ は接着阻害・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。

(6) PPAR γ 阻害剤によりマウス大腸癌肝転移巣数・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した。

D. 考察

PPAR γ 阻害剤および siRNA により、接着していた大腸癌培養細胞はアクチンファイバーの消失を伴った形態変化を起こした後剥離し、アポトーシスに至った。また、PPAR γ 阻害剤は細胞浸潤能を有意に低下させ、大腸癌マウス肝転移モデルにおいて転移巣の数・体積を減少させた。PPAR γ は抑制することによりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

E. 結論

PPAR γ はその発現を亢進させた場合、大腸癌細胞の増殖を抑制し大腸癌前癌病変を減少させた。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 は大腸癌の発癌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、既存の抗癌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、癌死の減少など臨床応用されることが期待される。

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. Kitayama K, Wada K, Nakajima A, Kamisaki Y, Mayumi T. Nuclear receptors on stem cells: the role of nuclear receptors during nural stem cell proliferation and differentiation. J. Pharmacol Sci., in press.
2. Nakajima A, Wada K. Nuclear receptors on diseases; Nuclear receptors as targets for drug development. J. Pharmacol Sci, in press.
3. 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.
4. Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsushashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (γ) Inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells. Cancer Res. 65: 2251-2259, 2005.
5. 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.
6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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 PPARgamma pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Letters.* 560:178-182, 2004.
 10. 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.
 11. Matsushashi 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.
 12. 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.
 13. 藤沢信隆, 中島淳 PPAR γ による大腸癌の Chemoprevention. *消化器科* 38 巻 6 号 Page536-542 (2004. 06)
2. 学会発表
 1. Chairman: Atsushi Nakajima, Gary Wu. Research Forum. DDW 2004, New Orleans, LA
 2. 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, 瀧村健, 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)
 3. 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)
 4. 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, 瀧村健, 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)
 5. 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, 藤沢信隆, 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)
 6. 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)
 7. 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)
 8. 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)