

200500450 A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 斉

平成18（2006）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	_____	17
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	_____	22
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	_____	27
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	_____	31
杉江 茂幸		
5. 遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究	_____	36
庫本 高志		
6. 大腸癌における PPAR γ の役割に関する研究	_____	38
中島 淳		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷		

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

発がんモデル動物の構築と、これらのモデル動物を用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構や発がん感受性要因の解明に相補的かつ不可欠な役割を担っている。加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 PhIP により誘発される大腸発がんモデルを用いて、発がんの初期病変である dysplastic ACF において DNA/RNA 結合蛋白質である SND1 が過剰発現されることを見いだした。SND1 の過剰発現は、腸管上皮細胞の細胞間接触による contact inhibition を解消することにより、軟寒天培地内でのコロニー形成能を賦与することが分かった。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統を用いた ACF 誘発性実験と種々のラット系統を用いたハプロタイプ解析により、感受性遺伝子の局在候補領域を数 Mb の範囲数カ所に限定化できた。DSS 腸炎併発の PhIP 誘発マウス大腸がんモデルでは、マウス系統間で発がん感受性に差があることが分かり、C57BL/6J-MSM/Ms 或いは A/J-SM/J のコンソミック系統を用いた抵抗性遺伝子の効率的なマッピングと責任遺伝子の同定が可能となった。マウスリンパ腫の感受性遺伝子に関しては遺伝学的な解析により Mtf-1 遺伝子を候補遺伝子として同定したが、未だ完全な証明には至っていない。感受性である BALB/c マウスのセリン型 Mtf-1 遺伝子を抵抗性のプロリン型 Mtf-1 遺伝子に置換したマウスを作製し再検討する必要がある。興味深いことに、感受性の BALB/c 系統では放射線照射後に大型リンパ球の割合も多く、酸化ストレス量の指標となる DCF 量 (ROS 量) を多くもちことが分かった。Mtf-1 の機能的多型と大型リンパ球誘導性の差異との関連性について検討する必要がある。胃がんの感受性遺伝子に関しては、感受性系統 ACI を用いて *Crabp2* のトランスジェニックラットを2系統樹立できた。現在、発がん実験を進めている。ENU 及び CHL を用いたラットのミュータジェネシスでは、これまでのところ Apc 遺伝子或いは p53 遺伝子の変異体は得られていない。ヒト大腸に認められる ACF は、ラットに誘発される ACF と同様の組織学的特徴を有することが分かった。同意の得られた14症例に対し Pioglitazone 1~8 か月投与したところ、大きい ACF や ACF の数の多い症例では Pioglitazone による抑制効果を認めなかったが、小さい ACF や ACF の数の少ない症例においては減少する傾向にあった。

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
蔵本高志	京都大学医学研究科	講師
中島 淳	横浜市立大学医学部	助教授

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、大腸発がん課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

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

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

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

発がんモデル動物の構築と、これらのモデル動物を用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構や発がん感受性要因の解明に相補的かつ不可欠な役割を担っている。加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 PhIP により誘発される大腸発がんモデルを用いて、発がんの初期病変である dysplastic ACF において DNA/RNA 結合蛋白質である SND1 が過剰発現されることを見いだした。SND1 の過剰発現は、腸管上皮細胞の細胞間接触による contact inhibition を解消することにより、軟寒天培地内でのコロニー形成能を賦与することが分かった。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統を用いた ACF 誘発性実験と種々のラット系統を用いたハプロタイプ解析により、感受性遺伝子の局在候補領域を数 Mb の範囲数カ所に限定化できた。DSS 腸炎併発の PhIP 誘発マウス大腸発がんモデルでは、マウス系統間で発がん感受性に差があることが分かり、C57BL/6J-MSM/Ms 或いは A/J-SM/J のコンソミック系統を用いた抵抗性遺伝子の効率的なマッピングと責任遺伝子の同定が可能となった。マウスリンパ腫の感受性遺伝子に関しては遺伝学的な解析により Mtf-1 遺伝子を候補遺伝子として同定したが、未だ完全な証明には至っていない。感受性である BALB/c マウスのセリン型 Mtf-1 遺伝子を抵抗性のプロリン型 Mtf-1 遺伝子に置換したマウスを作製し再検討する必要がある。興味深いことに、感受性の BALB/c 系統では放射線照射後に大型リンパ球の割合も多く、酸化的ストレス量の指標となる DCF 量 (ROS 量) を多くもちことが分かった。Mtf-1 の機能的多型と大型リンパ球誘導性の差異との関連性について検討する必要がある。胃がんの感受性遺伝子に関しては、感受性系統 ACI を用いて *Crabp2* のトランスジェニックラットを2系統樹立できた。現在、発がん実験を進めている。ENU 及び CHL を用いたラットのミュータジェネシスでは、これまでのところ Apc 遺伝子或いは p53 遺伝子の変異体は得られていない。ヒト大腸に認められる ACF は、ラットに誘発される ACF と同様の組織学的特徴を有することが分かった。同意の得られた14症例に対し Pioglitazone 1~8 か月投与したところ、大きい ACF や ACF の数の多い症例では Pioglitazone による抑制効果を認めなかったが、小さい ACF や ACF の数の少ない症例においては減少する傾向にあった。

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
蔵本高志	京都大学医学研究科	講師
中島 淳	横浜市立大学医学部	助教授

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、大腸発がん課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

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

伝子変化、消化器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。

B. 研究方法

(1) 大腸早期微小病変の包括的解析法

PhIPやAOMなどの大腸発がん物質による大腸発がんモデルでは、異常腺窩 (ACF)、異型を伴う ACF (dysplastic ACF)、mucin-depleted foci (MDF)、flat dysplastic ACF などの種々の早期微小病変 (前がん病変) の存在が指摘されている。いずれの病変も大腸発がん性との強い相関性を示すことから、これら微小病変の相違点や相互の関連性を調べるため、メチレンブルーの短時間染色による flat dysplastic ACF の検出、通常メチレンブルー染色、dysplastic ACF を描出する分別染色法 (落合-中签法)、さらに mucin 染色法を組み合わせた包括的な組織学的解析を行った。尚、解析には十分な数の微小病変が必要なこともあり、AOM 投与によりラットに誘発される病変を用いた。

(2) 大腸早期病変における SND1 蛋白質の発現解析と SND1 過剰発現による細胞増殖への影響

G/C-rich な DNA/RNA 結合蛋白質 SND1 の大腸発がんにおける意義を明らかにするため、PhIP 及び AOM により誘発される大腸発がんの早期微小病変における SND1 の発現を、抗 SND1 抗体を用いた免疫組織学染色法により調べた。また、ラットの小腸上皮由来細胞 IEC-6 に SND1 cDNA を導入し、SND1 を恒常的に過剰発現した細胞クローンを複数樹立した。これら IEC-6 細胞クローンの増殖能、及び軟寒天培地内でのコロニー形成能、細胞間接着分子である E-カドヘリンの細胞内での局在変化について検討した。

(3) PhIP 大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の局在限定化

大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の 2 か所の局在候補領域 C32 (D16Wox7 -D16 Wox3) 及び C34 (D16Mit3 -D16Rat17) についてサブコンジェニック系統を作製し、遺伝子の局在領域の更なる限定化を試みた。さらに、11 種類のラット系統の ACF 誘発性とハプロタイプ解析との併用により、*Sct* 遺伝子の効率のよい限定化を推進した。

(4) PhIP+DSS 誘発大腸がんに対するマウス系統間の感受性差の検討

2 系統 (SM/J、A/J) 雌雄マウスを用いて、各系統 6 週齢雌雄マウスに PhIP (200mg/kg 体重) を胃内強制経口投与し、その 1 週間後より 1.5% DSS 飲水投与を 7 日間行った。実験開始 20 週で実験終了した。実験終了後、安楽死のうえ剖検に供した。腸管病変は肉眼的に観察し、腫瘍数を計測した。固定後、大腸の病変部は、病理組織学的に診断、検索した。

(5) マウスの放射線発がん実験

生後 4 週から 6 週齢の Mtf-1 (+/-) B6 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 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。コンジェニックマウスを用いた発がん実験 (ガンマ線、2.5Gy を 4 回照射) もほぼ同様に行った。

(6) FACS 解析

γ 線照射により発生するヒドロキシラジカルの測定は試薬 (H2DCFDA : dichlorofluoresin diacetate) を用い、細胞増殖能の測定は BrdU 取り込みを利用した。 γ 線照射 5 日後に、マウスから胸腺を摘出し、PBS 培地中で H2DCFDA と反応させた。暗所で 37°C 45 分間保温し、フィルター通過後、FACSscan で蛍光を測定した。BrdU の取り込みは、 γ 線照射 5 日後にマウスの腹腔内に 1mg 投与し、1 時間後に胸腺を取り出し、FACSscan で蛍光を測定した。

(7) リンパ腫発がん感受性関連遺伝子座の多型解析

コンジェニック領域の決定には PCR 法を用いた。マーカーは MIT の WEB サイトから選択した。

(8) 胃発がん感受性遺伝子の Tg ラットの作製
導入した Tg のコピー数の測定のため、*Crabp2* cDNA をプローブとしてゲノム DNA のサザンブロットティングを行った。

(9) ラット前立腺がんの発がん実験

前立腺における eQTL (expression QTL) 解析には、10 週齢、雄の ACI/N, BUF/Nac Rat (各 n=3), ACI x (ACI x BUF)_{F1} backcross ラット (n=97) を用いた。コンジュニク ラットは、以前に樹立したものをを用いた。発がん実験は、8 週齢の ACI-Tg2 および野生型 ACI ラット各 50 匹に MNNG (83mg/mL) を 32 週間飲水投与し、その後 40 週間非投与で飼育する。

(10) ラット前立腺がん感受性遺伝子の eQTL 解析

全 RNA から合成した cDNA を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。胃における解析では、*Actb* により、前立腺における解析では、3 種の遺伝子 (*Actb*, *Gapd*, *Ppia*) により、標準化を行った。マイクロアレイ解析では、近交系ラット各 3 匹分の RNA をプールし、GeneChip RatU34A (8, 800 probes) による網羅的解析を行った。ACI x (ACI x BUF)_{F1} ラット (n=97) について、ラット常染色体を網羅するマイクロサテライトマーカー 146 個で遺伝子型を決定した。量的表現形質との連鎖解析は、MAPMAKER/EXP, QTL software を用いて行った。

(11) ラットの ENU ミュータジェネシス

F344/NS1c 系統の雄ラットに 40mg/kg の ENU を 9 週齢と 10 週齢時の 2 回投与し、20 週齢時に同一系統と交配した。p53 と Apc 遺伝子についてエクソン領域を増幅するように 9 セットのプライマーを設定した。PCR により増幅後、ミスマッチ変異を特異的に検出する MuT-POWER 法により、点突然変異のスクリーニングを行った。

(12) CHL ミュータジェネシス

BN/SsNS1c 系統の雄ラットに 5mg/kg 又は 10mg/kg の CHL を投与し、投与後 5 週目に F344/NS1c と交配した。CHL による欠失変異の検出は、p53 と Apc 遺

伝子座にそれぞれ設定した SSLP マーカーと全ゲノムに散在する 196 個の SSLP マーカーの LOH の検出により行った。

(13) DNA バンクと精子バンクの構築

ゲノム DNA は G1 産子離乳後尾の先端から抽出した (DNA バンク)。精子は性成熟後精巣上体尾部より採取し、凍結保存した (精子バンク)。

(14) ヒト ACF の下部消化管拡大内視鏡による観察
通常の下消化管内視鏡検査後、メチレンブルーで 2 分間染色した下部直腸の ACF を観察した。同意の得られた対象患者に対し 1~8 か月間 PPAR γ リガンドである pioglitazone を投与し ACF の変化を解析した。

(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、動物実験に関する倫理審査委員会で承認を得た上で実施した。内視鏡検査は横浜市立大学附属病院の定める規約を遵守し、検査による苦痛には十分な配慮を払った。さらに、pioglitazone 投与は十分にその有用性と危険性を説明し、同意の得られた場合にのみ投与を行った。

C. 研究結果

(1) 大腸の早期微小病変

AOM や PhIP 等の化学発がん物質により大腸に誘発される早期微小病変において、分別染色法により染色される dysplastic ACF (ACF-D) は、通常メチレンブルー染色により検出される ACF の約 4~5 割程度であることが分かった。3 個以上の AC から構成される MDF (MDF \geq 3) は flat dysplastic ACF と一致し、MDF \geq 3 及び flat dysplastic ACF は全て dysplastic ACF に含まれ、dysplastic ACF の一部であることが分かった。3 個未満の AC から成る MDF (MDF $<$ 3) はいずれも ACF-D ではなかった。即ち、MDF \geq 3 や flat dysplastic ACF は ACF-D の中でもより異型度の高い、より進行した病変である可能性が示唆された。

(2) Dysplastic ACFにおけるSND1の発現

抗SND1抗体を用いた免疫組織染色により、種々の異型度のACFにおけるSND1蛋白質の発現を調べたところ、 β -cateninの細胞内蓄積を認めるdysplastic ACFにおいてはSND1が高発現していることが分かった。 β -cateninの蓄積が認められないnon-dysplastic ACFの一部でもSND1蛋白質が高発現している例が認められたことから、SND1が大腸がんの初期課程において重要な役割を果たしていることが分かった。

(3) SND1の過剰発現によるIEC-6細胞の増殖能亢進

ラット小腸上皮由来のIEC-6細胞にSND1を過剰発現させると、contact inhibitionによる増殖抑制効果が失われた。細胞同士が接触したのちにも、接触による増殖抑制が認められず細胞は増殖を続けることが分かった。この際、E-カドヘリンの細胞内局在が変化し、細胞-細胞間の接触部位ではなく細胞質に広く分布することが分かった。さらに、SND1過剰発現IEC-6細胞は軟寒天培地内ではコロニーを形成することがわかった。以上の結果は、SND1の過剰発現が、腸管上皮細胞のもつcontact inhibition効果に抑制的に作用し、その結果、細胞の軟寒天培地内でのコロニー形成能や増殖能の亢進に寄与することが分かった。SND1の過剰発現細胞ではAPCの発現低下が認められたものの、APC mRNA量に顕著な変化が認められなかったことから、SND1が何らかの機序でAPC mRNAの翻訳抑制に関与している可能性が示唆された。

(4) 大腸がん感受性遺伝子Sctの局在の限定化

ラット16番染色体のC32(D16Wox7-D16Wox3)とC34(D16Mit3-D16Rat17)の両領域を含むコンジェニック系統(C32+C34)では、C32単独或いはC34単独のコンジェニック系統のACF誘発性と比較して有意に高いACF誘発性を示したことから、C32或いはC34領域のいずれか、もしくは両方に感受性遺伝子が存在することが強く示唆された。さらに、C32領域の一部を含むC35-サブコンジェニック系統、C34領域の一部を含むC38-, C40-サブコンジェニック系

統を用いたACF誘発性の検討により、C32のC35に含まれない領域(D16G5.1-D16G29.24)と、C34とC40の共通部分であるD16Mit3-D16Rat129領域(約3 Mb程度)に感受性遺伝子が存在する可能性が強く示唆された。さらに11種類のラット系統を用いてACF誘発性を検討した結果、BUF/Nac, WK/Kop, SDJ, OM/N, LEWの5系統はACF \geq 5以上の高感受性を、PVG/Seac, LEA, ACI/Nの3系統はACF \leq 1以下の低感受性を示すことが分かった。F344, DA, BNの3系統は中等度の感受性を示した。これらの11系統のラットを用い、C32及びC34領域にマップされた各々10数個のマイクロサテライト多型マーカーを用いてハプロタイプ解析を行った結果、C32領域ではD16Wox7近傍とD16G29.24近傍が発がん感受性と相関する可能性が示唆された。一方C34領域では、D16Rat129-D16Mgh6近傍の遺伝多型との相関性が示唆された。この結果は、サブコンジェニック系統を用いたACF誘発性から限定化した感受性遺伝子の局在と矛盾しないものであった。

(5) PhIP+DSS誘発大腸がんに対するマウス系統間の感受性差

大腸腫瘍発生個体数、大腸腫瘍発生個数は、A/Jマウス雄 60%、 1.40 ± 1.43 。A/Jマウス雌 64%、 2.64 ± 2.91 。SM/Jマウス雄 10%、 0.10 ± 0.32 。SM/Jマウス雌 23%、 0.23 ± 0.44 であった。雌雄共SM/Jマウスに比べ、A/Jマウスは、感受性が高く、系統間に大腸腫瘍発生率の明らかな差を認めた。しかし、SM/Jマウス、A/Jマウス共に雌雄間に有意差は見られなかった。また、腫瘍発生と大腸の炎症程度との間に相関は認めなかった。

(6) 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。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と考えられる。遺伝解析によりマップされた領域に存在する 10 種以上の遺伝子の中から、Mtf-1 遺伝子が感受性遺伝子であることを証明するには、感受性である BALB/c マウスのセリン型 Mtf-1 遺伝子を抵抗性のプロリン型 Mtf-1 遺伝子に置換したマウスを作製し、再検討する必要がある。しかし、BALB/c マウスに由来する ES 細胞は現在まで樹立されておらず、当面 Mtf-1 遺伝子の KO マウスを用いた発がん実験を行うことにした。Mtf-1-KO マウスを入手し、Mtf-1(+/-) マウスと B6 マウスを交配し、そのプロジェニーを発がん実験に用いた。予想に反し、Mtf-1(KO/+) と (+/+) 遺伝子型の B6 マウス、両者に放射線発がんリンパ腫の発生に有意差はみられなかった。これは Mtf-1 が感受性遺伝子ではない可能性を示唆するが、結論は更なる研究を待つ必要がある。

(7) 発がん感受性遺伝子と放射線照射の影響

BALB/c マウスに 1.5Gy の γ 線を照射すると、その 3 日から 5 日後の胸腺細胞数は 1/10 以下に低下する。これは照射により ROS (reactive oxygen species) が細胞内で産生され、その ROS が p53 依存性のアポトーシス (および細胞分裂周期の停止) を誘発することによると考えられている。そこで、照射後の胸腺内の ROS 濃度が感受性の BALB/c 系統と抵抗性系統である染色体 4 番コンジェニックマウスで違いがあるかどうかを検討した。照射後 5 日目にマウスから胸腺内リンパ球を取り出し、ROS 濃度変化のマーカとなる蛍光色素・DCF の入った培地で 15 分間培養し、30 分以内に細胞内 DCF 量を FACS 解析で測定した。胸腺細胞全体では、明らかに BALB/c マウス細胞の方がコンジェニックマウス細胞より高い DCF 量をもつ細胞が多かったが、同時に大型リンパ球の割合も多くなっていた。そこで、大型リンパ球

と小型リンパ球の分画に分け、再度測定すると、大型リンパ球は小型リンパ球に比べ、DCF 量 (ROS 量) を多くもち、BALB/c マウスとコンジェニックマウスの間では違いのないことが分かった。

照射後の大型リンパ球が高い ROS 活性をもつので、この細胞の特徴を調べた。CD4-CD8 の表面マーカーではダブルポジティブ (DP) の細胞が多いが、照射後ではダブルネガティブ (DN) の未分化細胞が多くなっていた。一方、BrdU の取り込み活性をみると、大型リンパ球ではその半分が取り込みを示し、細胞増殖を行っていたが、一方小型リンパ球ではほとんど取り込みがなく分裂を停止している細胞であることが分かった。胸腺内の細胞分裂・分化の定説に従い、大型リンパ球が細胞分裂を行い、小型リンパ球へと分化することが照射後でも確認された。

感受性の BALB/c 系統とそのコンジェニックマウス抵抗性系統で、照射後の胸腺内大型リンパ球の出現と消失、細胞数の変化を検討した。照射は 1.5Gy と 3Gy を用い、照射後は 3 日目、5 日目、7 日目にマウスから胸腺細胞を取り出しアッセイした。その結果、感受性系統は抵抗性系統に比べ、大型リンパ球が照射後胸腺内に持続し、小型リンパ球への移行が遅れることが明らかとなった。高い ROS 活性をもつ大型リンパ球が長く持続すると、その細胞は DNA 変異を蓄積する可能性が高く、それが感受性と関連すると解釈される。

(8) 第 5 番染色体上のリンパ腫発がん抵抗性遺伝子

5 番染色体を一部もつサブコンジェニックマウスを作製し、その発がん実験を行ってきた。マウス系統 1 は D5MIT300 (49Mb) から D5MIT336 (81Mb) の領域を MSM ゲノムを導入したもので、リンパ腫発症頻度については両群 (C/M 型と M/M 型) に有意な差はなかった ($P=0.123$)。系統 2 のサブコンジェニックマウスは D5MIT110 (66Mb) から D5MIT20 (95Mb) の領域に MSM ゲノムを導入したもので、以前の連鎖解析で得られた LOD 値ピークの MIT7 座 (92Mb) を含む。MSM と交配したプロジェニーを照射し、300 日間リンパ腫発症を観察した。期待に反し、両群 (C/M 型と M/M 型) にリンパ腫発症頻度に有意な差はみられなかった ($P=$

0.80)。これらの結果から、候補領域は5番染色体上のD5MIT20(95Mb)からD5MIT10(102Mb)までの約7Mbにまで限定されたと考えられる。更に新しく2系統を作製し、発がん実験を行っている。系統3はD5MIT112(75Mb)からD5MIT10(102Mb)まで、系統4はD5MIT204(78Mb)からD5MIT315(106Mb)までである。発がん実験は平成18年夏に終了予定である。

(9) ヒト MTF-1 遺伝子のハプロタイプ解析

ヒト MTF-1 の主要ハプロタイプは3タイプに分類される。この結果をもとに、チェルブイリでのヒト被ばく試料をタイピングする予定であったが、トラブルが重なり DNA 試料が最近到着した。機能 SNP については、新しくアミノ酸185のチロシンとヒスチジン多型が同定された。

(10) 胃がん感受性遺伝子

昨年度までに得た3系統の Tg のうち、ACI-Tg1 では1コピー、ACI-Tg2 では8コピー、Wistar-Tg では13コピーのトランスジーンが導入されていた。ACI-Tg1 は不妊であり、以降の産仔が得られなかった。Wistar-Tg では、幽門において、内在性の *Crabp2* mRNA が発現する個体と、ほとんど発現しない個体が存在した。また、トランスジーンが導入され、*Crabp2* mRNA が十分発現している個体間でも、蛋白質の発現が多い個体と非常に少ない個体が存在、個体間で *Crabp2* の翻訳効率が異なることが明らかになった。ACI-Tg2 は、幽門において mRNA、蛋白共に BUF と同等以上の *Crabp2* が発現していた。繁殖を行い、MNNG による長期発がん実験を開始した。

(11) ラット前立腺 eQTL 解析

ACI, BUF ラット前立腺において、2倍以上発現量が異なる遺伝子195個をマイクロアレイ解析によって同定した。この中から、定量的 RT-PCR により発現量の系統差が確認され、発現量と遺伝子機能が広範にわたるように、13個の遺伝子(重要ながん抑制遺伝子 *p21* を含む)を選別した。これら13個の遺伝子について発現量を量的形質とした連鎖解析を行った結果、LOD score = 1.9 を超える遺伝子座を、

発現量の大小にかかわらず、全ての遺伝子について同定できた。9個が cis, 4個が trans に、発現量系統差が制御されていた。標準化遺伝子3種 (*Actb*, *Gapd*, *Ppia*) について標準化後の連鎖解析結果を比較した結果、一部の遺伝子 (*Kc1r*, *Psat*) は標準化遺伝子によって、連鎖解析結果に違いを生じた。コンジュニックラットの発現解析により、3番染色体に *Kc1r*, *Psat1* の発現量を制御する因子が存在することが示され、この結果を最も反映している標準化遺伝子は *Actb* であった。前立腺特異的に発現する遺伝子で、トランスジェニック動物に前立腺特異的に遺伝子を発現させる目的にそのプロモーターが用いられている *probasin* は、trans に支配され、8番染色体に発現量を制御する因子が存在した。

cis に制御されることが判明した *p21* においては、既知のプロモーター領域およびコーディング領域に ACI-BUF 間の多型は存在しなかった。しかし、発現が高い BUF 系統では、5' 上流域に 119bp の挿入 (AB194279) が存在した。5種のラット系統 (ACI, BUF, (ACI x BUF) F₁, BN, F344) 間で挿入配列の存在と *p21* 発現量が相関した。挿入配列を用いたルシフェラーゼアッセイにより、この挿入配列が下流遺伝子の発現量を平均1.5倍増強することがわかった。

(12) ENU ミュータジェネシス

ENU 投与 F344/NS1c 雄ラットに同系統雌ラットを交配して、1,217頭のG1産子を得た。この中には、尾部および腰椎の形態異常、被毛異常、行動異常、てんかん様発作など、ENUにより突然変異を誘発されたと考えられるさまざまな個体が確認された。Mut-POWER 法に基づく突然変異の検出は14.5 Mbに1つであり、突然変異率は 0.69×10^{-7} であった。得られたG1個体全てかあゲノムDNAを抽出しDNAバンクを構築した。p53とApc遺伝子の9個のマーカー(4,296 bp)で全G1産子をスクリーニングしたが(延べ約5.2 Mb)、点突然変異を検出することはできなかった。1,046頭のG1雄ラットについては、12週齢時に剖検後、精巣上部尾部より精子の採取、凍結保存を行い精子バンクを構築した。

(13) CHL ミュータジェネシス

CHL 5mg/kg 投与実験を 2 回行い、43 頭の G1 個体を得た。10mg/kg 投与実験を 4 回行い 50 頭の G1 個体を得た。総計 93 頭の G1 個体のゲノム DNA を抽出し、p53、Apc 遺伝子座他に設定した 13 個の SSLP マーカーの LOH を検索したが、LOH は検出できなかった。さらに、5mg/kg 投与により得られた産子の一部 (11 頭) と 10mg/kg で得られた産子の計 61 頭について、全ゲノムスキャンを行ったところ、いずれの個体においても LOH は検出できなかった。

劣勢遺伝変異の存在を調べるために、5mg/kg 投与により得られた産子の一部 (11 頭) と 10mg/kg 投与により得られた産子の一部 (3 頭) を F344 と交配し、得られた雌産子を親の CHL 投与個体に戻し交配した。雌雄合わせて総計 404 頭の G3 産子が得られた。6 週齢時から 12 週齢時にかけて毎週体重測定とケージ交換時の行動観察を行い、12 週齢時で剖検を行った。両眼球欠損、白内障、矮小を示す個体がそれぞれ得られた。

(14) ヒト ACF に対する pioglitazone の効果

同意の得られた 14 症例に対し Pioglitazone 1~8 ヶ月投与した。ACF は拡張した異型腺管の集簇であるが、大きい ACF や ACF の数の多い症例では変化を認めることはできなかったが、小さい ACF や ACF の数の少ない症例においては減少する傾向にあった

D. 考察

(1) PhIP や AOM 等の化学発がん物質による大腸発がんでは、PhIP 投与後に誘発される non-dysplastic ACF の一部が dysplastic ACF (ACF-D) へと変化し、さらに一部の dysplastic ACF がより異型度の高い MDF 或いは flat dysplastic ACF へと変化し、最終的に大腸腺腫・大腸がんへと推移する可能性が示唆された。

(2) DNA/RNA 結合蛋白質として同定した SND1 が、大腸発がんの初期病変である non-dysplastic ACF の一部や dysplastic ACF, MDF_{≥3}, flat dysplastic ACF 等で高発現していることや、SND1 を過剰発現させた腸管上皮細胞 IEC-6 では細胞増殖における

contact inhibition の解消、軟寒天培地内でのコロニー形成能を獲得することから、SND1 の過剰発現が大腸発がんの初期段階において重要な役割を果たしていることが分かった。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統を用いた解析とハプロタイプ解析の結果から、C32 領域及び C34 領域内の数か所の数 Mb 領域に限定化されることが強く示唆された。

(3) マウスを用いた PhIP+DSS による大腸発がんの感受性に関する実験結果は、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。SMXARI 系において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的背景や分子機構を解明する端緒となると考えられる。

(4) Mtf-1 (+/-) B6 マウスを用いた放射線発がん感受性の検討では、予想に反し Mtf-1 (+/+) B6 マウスとリンパ腫発生に有意差はみられなかった。単純に解釈すると、Mtf-1 (KO/+) は感受性を与えないということになる。しかし、発がん感受性の高い B6 バックグラウンドを遺伝的背景としたため、Mtf-1 のもつ感受性が B6 の遺伝的背景にマスクされた可能性がある。現在 Mtf-1 (+/-) マウスのバックグラウンドを BALB/c に変換する作業を行っている。一方、BALB/c マウスの感受性はセリン型 Mtf-1 遺伝子 (抵抗性はプロリン型) にあり、本来 Mtf-1 (+/-) マウスでは表現されない可能性もある。

(5) さらに、放射線照射後、感受性系統では抵抗性系統と比べ大リンパ球が胸腺内に長く存続し、小リンパ球への移行の遅れることが明らかとなった。この結果は、発がん感受性を担う細胞は分裂能をもつ ROS 濃度の高い大リンパ球であることを示唆する。感受性系統では大リンパ球から小リンパ球への移行が遅れるが、その機構は不明である。高い ROS 活性をもつ大型リンパ球が長く持続すると、その細胞は DNA 変異を蓄積する可能性が高く、それが感受性と関連するのではないかと解釈される。

(6) マウス 5 番染色体上の抵抗性遺伝子領域の解析では、5 番染色体の抵抗性コンジェニックマウスを用いて発がん実験を行ったその結果、候補領域は 5 番染色体上の

D5MIT20 (95Mb) から D5MIT10 (102Mb) までの約 7Mb にまで限定されたと考えられる。更に新しく 2 系統を作製し、発がん実験を行っている。系統 3 は D5MIT112 (75Mb) から D5MIT10 (102Mb) まで、系統 4 は D5MIT204 (78Mb) から D5MIT315 (106Mb) までである。発がん実験終了後は、ハプロタイプ解析から候補遺伝子の検索を行う。

(7) 胃がん感受性遺伝子に関する Tg ラットの作製では、Wistar 背景の Tg ラットにおいて発現量の個体差が大きかった。この原因としては遺伝的なヘテロ性が関与していると考えられた。一方、ACI-Tg2 は、安定してトランスジーンを発現しており、その発現量は、胃発がん抵抗性の BUF と同等以上であることから、*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ためには ACI-Tg2 は好適である。

(8) ラット前立腺 eQTL 解析では、ACI, BUF ラット前立腺において発現量が異なると確認できた 13 個の遺伝子について、発現量を量的形質とした連鎖解析を行った結果、suggestive linkage を超える遺伝子座を、発現量の大小にかかわらず全ての遺伝子について同定できた。標準化遺伝子 3 種 (*Actb*, *Gapd*, *Ppia*) の間では、系統間比較において使用するのには *Actb* が適切と考えられた。同一系統における薬物投与前後などの比較では *Ppia* が有望であるとされており、リアルタイム PCR の標準化遺伝子は実験内容に応じた選別が必要であると考えられた。今後、eQTL 解析は、例えばラット幽門における *Crabp2* などの、様々な応用が可能である。

(9) *p21* の発現は ACI-BUF 間で 4.5 倍異なった。その発現量系統差は、eQTL 解析の結果、cis に制御され、88% が説明可能であった。しかし、ルシフェラーゼ解析の結果、BUF 系統の 5' 上流域に存在する挿入配列は 1.5 倍の影響しか示さなかった。その違いの原因としては、今回多型の存在を検討した領域よりもさらに 5' 上流域にエンハンサーが、3' 上流域にサイレンサーが存在することが知られており、これらの配列にも系統間多型が存在する可能性が考えられる。*p21* (*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、昨年度報告し

た、ラット前立腺がん抵抗性遺伝子 *Pcs2* の有力な候補でもある。ヒトにおいても *p21* の発現量に關与する多型と前立腺がん感受性とが關連している可能性が示唆される。

(10) ENU ミュータジェネシスのプロジェクトでは、標的遺伝子に変異を有する個体を検出する方法として Mu トランスポゾンを利用した MuT-POWER 法を採用した。本法はシーケンス法に比べて、G1 ラットの DNA スクリーニングにかかる費用、時間、労力を大幅に削減することができる。MuT-POWER 法での変異検出は、シーケンス法に比べ 10 分の 1 程度であったが、スクリーニングに要する時間、労力を考慮すると、シーケンス法に比べ遜色ない方法と考えられた。今後、さらなる ENU 投与による突然変異誘導 G1 ラットの作製と MuT-POWER 法の改良により、*p53* と *Apc* 遺伝子に変異を持つ変異個体を作出できると考えられた

(11) CHL ミュータジェネシスでは、CHL 投与雄から得られた G1 産子のゲノム欠失を、PCR 法によるジェノタイピングによって行った。用いた SSLP マーカーは全て BN と F344 間で明確な多型を示す。延べ 13, 165 座位をスクリーニングしたが、明確なゲノム欠失を示す座位は得られなかった。マウスでは 1 座位あたり約 1.0×10^{-3} の頻度で染色体欠失や再構成変異が誘発されると報告されている。この CHL による変異誘発頻度をラットにも当てはめれば、今回のスクリーニングでは約 10 個の染色体欠失が観察されると予測された。実際にはゲノム欠失は検出できなかった理由として、CHL によるゲノム欠失は甚大であるのでゲノム欠失を持つ個体はそもそも誕生できないことが考えられる。欠失変異を有する個体をミュータジェネシス法により作出することは、遺伝子の機能を理解する上で重要である。CHL に代わる欠失変異誘発物質の検討が必要であると考えられた。

(12) ヒト集団に対する大腸がん化学発がん予防は、がん発生の減少をメルクマールに行うため大変長い時間を要する研究になるのが通常である。与えられた短期間で臨床研究成果を出すために、ACF を指標としたのは大変有用であった。今後ヒト ACF において、pioglitazone 投与前後

の発現遺伝子の網羅的解析をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いて採取したサンプルから行い、作用メカニズムの解明、さらには新しい化学発がん予防の分子標的の同定を目指すことを検討する。

E. 結論

(1) PhIP誘発の大腸がんモデルを用いた遺伝的解析とハプロタイプ解析を組み合わせることにより、感受性遺伝子の局在候補領域を数 Mb (数カ所) に限定化できた。この研究成果により、当該領域に存在する遺伝子の発現解析及び多型解析を行うことで、感受性遺伝子を同定することが大いに期待される。抵抗性遺伝子に関しては、コンソミックマウス系統を用いた方法により、より迅速かつ容易に遺伝子局在の候補領域を限定化できる可能性がある。さらに、大腸の早期微小病変（前がん病変）における SND1 過剰発現の生物学的意義や、PhIP 等の化学発がん物質への曝露による SND1 の遺伝子発現への影響を明らかにすることにより、SND1 を標的としたがんの分子予防策や新規の治療法が開発される可能性が期待される。

(2) 炎症を背景としたマウス大腸発がんモデルにおいて、発がん性に対する系統差の存在が明らかになった。雌雄間では差はなく、雌においても同様に系統差が存在した。発がん性が炎症の程度よりも系統差に、より左右されることを明らかにできた。

(3) Mtf-1(+/-)B6 マウスを用いて放射線発がん感受性の検討では、予想に反し Mtf-1 (+/+)B6 マウスとリンパ腫発生に有意差はみられず、Mtf-1 が感受性遺伝子である確証には更なる検討が必要となった。ヒト MTF-1 ハプロタイプを用いた関連解析はサンプルが入手できやうと始まった。

(4) マウス 4 番染色体上のリンパ腫発がん感受性が支配する表現型の検討では、照射後 7 日目の胸腺リンパ球の数は発がん抵抗性系統ではほぼ正常に戻るが、感受性系統のそれは戻りが悪く、しかも分化度も低いままであった。この快復の遅い大リンパ球は ROS 濃度が高く、胸腺内に長く存続することが発がん感受性を担うと考えられた。

(5) 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、幽門における発現量を確認、長期胃発がん実験を進めている。遺伝子発現量を量的表現形質とした連鎖解析を行い、様々な発現量の遺伝子についてその有用性を明らかにした。

(6) ENU および CHL ミュータジェネシス法により、それぞれ 1,217 頭、93 頭の G1 ラットを得た。p53 遺伝子、Apc 遺伝子を対象にスクリーニングを行ったが、両遺伝子に変異を有する個体は見出せなかった。ENU ミュータジェネシスではさらなる個体の増産が必要と考えられた。欠失変異の誘発には CHL に代わる誘発物質の検討が必要であると考えられた。

(7) ヒト大腸がんに対する 2 次予防としては、免疫学的便潜血法によるスクリーニングとハイリスクグループの内視鏡によるサーベイランスが行われているが、米国ではこれに加えハイリスクグループに対する化学発がん予防の大規模試験が行われている。現在までに行われている大腸がんに対する化学予防の研究は主にアスピリンやスリダクなど NSAIDs を用いたものであったが最近では米国において COX-2 選択的阻害薬を用いた大規模臨床試験がその重篤な副作用で頓挫したことは記憶に新しく、NSAIDs 以外の有望な候補薬が求められている。PPAR γ リガンドは抗糖尿病薬として世界的臨床応用され安全性が確立しており、このような背景から化学発がん予防薬として PPAR γ のリガンドを用い、ACF をメルクマールとしたアプローチは世界的に見ても独創性が高い。

F. 健康危険情報

本研究の方法、実験材料、実験結果、及び実験に用いる動物個体が人体に悪影響を及ぼす可能性が殆どない。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害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. Nakagama H, Higuchi K, Tanaka E, Tsuchiya N, Nakashima K, Katahira M, and Fukuda H. Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures. *Mutat Res* (in press)
2. Gunji A, Uemura A, Tsutsumi M, Nozaki T, Kusuoka O, Omura K, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. *Parp-1* deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts. *Cancer Lett* (in press)
3. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura Y, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H and Dohi T. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer*, 118:2232-2236, 2006.
4. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27:162-169, 2006.
5. Fukuda H, M. Katahira, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M and Nakagama H. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UPI Protein. *Genes Cells*, 10:953-962, 2005.
6. Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.*, 96:627-636, 2005.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Inoue J, Kanefuji T, Okazuka K, Watanabe H, Mishima Y, Kominami R. Expression of TCRab partly rescues developmental arrest and apoptosis of abT cells in Bcl11b^{-/-} mice. *J. Immunology*. (in press)
11. Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Science*. (in press)
12. Yamashita S, Wakazono K, Nomoto T, Tsujino Y, Kuramoto T, Ushijima T. Expression quantitative trait loci analysis of 13 genes in the rat prostate. *Genetics*, 171(3): 1231-8, 2005.
13. 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.*, 65(7): 2610-6, 2005.
14. 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 β -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for β -catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase.

- Carcinogenesis 26(1):229-238, 2005.
15. 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* 20(1):15-22, 2005.
 16. 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* 115(3):346-350, 2005.
 17. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol Histopathol* 20(2):483-492, 2005.
 18. 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* 96(2):69-76, 2005.
 19. Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, Hara A, Sugie S, Shibata T, Mori H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 221(1):29-39, 2005.
 20. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer* 5(1): 46, 2005.
 21. 8: Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin Cancer Res* 11(13):4962-4967, 2005.
 22. Sugie S, Vinh PQ, Rahman KM, Ushida J, Kohno H, Suzuki R, Hara A, Quang le B, Tanaka T, Mori H. Suppressive effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* 117(4):524-530, 2005.
 23. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M, Wakabayashi K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 118(1):25-34, 2006.
 24. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 27(1):162-169, 2006.
 25. Gohma H, Kuramoto T, Kuwamura M, Okajima R, Tanimoto N, Yamasaki K, Nakanishi S, Kitada K, Makiyama T, Akao M, Kita T, Sasa M, Serikawa T. WTC deafness Kyoto (dfk): a rat model for extensive investigations of Kcnql functions. *Physiol Genomics* 24(3):198-206, 2006.
 26. Kuramoto T, Gohma, H, Kimura, K, Wedkind, D, Hedrich, HJ, Serikawa, T. The rat pink-eyed dilution (p) mutation: An identical intragenic deletion in pink-eye dilute-coat strains and several Wistar-derived albino strains. *Mammal Genome* 16: 712-719, 2005.
 27. Kuramoto T, Morimura K, Nomoto T, Namiki C, Hamada S, Fukushima S, Sugimura T, Serikawa T, Ushijima T. Sparse and wavy hair: a new model for hypoplasia of hair follicle and mammary glands on rat chromosome 17. *J Hered.* 96:339-345, 2005.

28. Katayama K, Wada K, Nakajima A, Kamisaki Y, Mayumi T. Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: The Role of Nuclear Receptors During Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Journal of Pharmacological Sciences* 171-176, 2005.
29. Nakajima A, Wada K. Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: *Journal of Pharmacological Sciences* 163-170, 2005. (英文総説)
Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, et al. Chemopreventive Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ on Gastric Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 2005.
30. PPAR γ と大腸癌. 藤澤信隆, 藤澤聡郎, 藤田浩司, 高橋宏和, 中島淳. *日本消化器病学会雑誌*. 102(8), 994-1003, 2005. (和文総説)
31. Inamori M, Abe Y, Nakajima A. Early effects of lafutidine or rabeprazole on intragastric acidity: which drug is more suitable for on-demand use? *Journal of Gastroenterology* 40:453-458, 2005.
32. Masuda T, Wada K, Nakajima A et al. Critical Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ on Anoikis and Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 11(11):4012-4021, 2005.
33. Togawa J, Inamori M, Abe Y, Nakajima A et al. Efficacy of a Triple Therapy with Rabeprazole, Amoxicilin, and Faropenem as second-line Treatment after Failure of Initial *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. *Hepato-Gastroenterology* 52:645-648, 2005.
34. Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsuhashi 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.* 15:65(6):2251-9, 2005.
35. Iwasaki T, Sekihara H, Nakajima A. Marked Attenuation of Production of Collagen Type I from Cardiac Fibroblasts by Dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E1222-8, 2005.
36. Schaefer KL, Denevich S, Ma C, Cooly SR, Nakajima A, Wada K, Sclezinger J, Sherr D, Saubermann LJ. Intestinal anti-inflammatory effects of thiazolidinedione peroxisome proliferators-activated receptor- γ ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. *Inflamm Bowel Dis.* 11:244-52, 2005.
2. 学会発表
1. Nakagama H. Carcinogenicity of mutagens/carcinogens from cooked food 9th ICEM & 36th Annual meeting of the Environmental Mutagen Society (San Francisco, CA, 9.03-9.08, 2005)
 2. Nakagama H, Higuchi H, Tanaka E, Nagao M, Fukuda, H. Maintenance of genomic stability at G/C-rich repetitive DNA sequences 9th ICEM & 36th Annual meeting of the Environmental Mutagen Society (San Francisco, CA, 9.03-9.08, 2005)
 3. 落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉 分別染色法により検出される異型 ACF と MDF 及び flat dysplastic ACF との関連性の検討 第 64 回日本癌学会総会 (札幌、9.14-9.16, 2005)
 4. 阿部浩一郎、田澤 大、落合雅子、杉村 隆、久山 泰、中釜 斉 発がん感受性の異なるラット系統間で誘発される PhIP 大腸腫瘍の遺伝子発現における質的違いの検討 第 64 回日本癌学会総会 (札幌、9.14-9.16, 2005)
 5. Ochiai M, Nakanishi M, Fujiwara K, Sugimura T, Nakagama H. Toxicogenomic approach to the prediction of carcinogenic potentials of heterocyclic amines in rat colon 第 34 回日本環境変異原学会大会 (東京、11.16-11.18, 2005)
 6. 中西雅子、田澤 大、田中卓二、杉村 隆、中釜 斉 PhIP と DSS により誘発されるマウス大腸発がんモデルの病体解析 第 22 回日本疾患モデル学会総会 (伊香保、11.24-11.25, 2005)
 7. 落合雅子、中西雅子、藤原恭子、杉村 隆、中釜 斉 網羅的遺伝子発現解析によるヘテロサイクリックアミン類の大腸発がん性予測の検討 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡、12.07-12.10, 2005)
 8. Dohi T, Nakagama H, Nakajima A. Predominant T helper type 2 in inflammatory

- responses promote murine colon cancers 第6回 CSDGS (大阪、1.14, 2006)
9. 中西雅子、桑村 充、吉田 緑、前川昭彦、虫釜 斉 C57BL/6J マウスに認められた、肝細胞の顆粒状変性/脂肪化と細胞周囲性繊維化を特徴とする肝病変の1例 第22回日本毒性病理学会 (鹿児島、1.26-1.27, 2006)
 10. 山下 聡, 鈴木周五, 野本朋子, 近藤靖司, 若園邦子, 辻野好美, 杉村 隆, 白井智之, 本間之夫, 牛島俊和 高齢で前立腺がんを自然発症するACI/Seg ラットを用いた前立腺がん感受性遺伝子の連鎖およびマイクロアレイ解析, 第64回日本癌学会総会 2005年9月 (札幌)
 11. 山下 聡, 辻野好美, 高橋智, 白井智之, 杉村隆, 牛島俊和 自然発症及びDMAB誘発ラット前立腺がんにおける特異的サイレンシング遺伝子の同定, 第28回日本分子生物学会年会 2005年12月 (福岡)
 12. Shigeyuki Sugie, Keizo Kato, Nami Kitaori, Koujiro Yoshida, Hiroyuki Kohno, Rikako Suzuki, Shoji Shimada, Hideki Mori, Takuji Tanaka. : Chemopreventive effects of yeast, Zinc (Zn) and enriched Zn yeast on 4-nitroquinoline oxide-induced rat tongue carcinogenesis. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, April 16-20, 2005.
 13. Takuji Tanaka, Hiroyuki Kohno, Rikako Suzuki, Kazuya Hata, Shigeyuki Sugie, Naoko Niho, Katsuhisa Sakano, Mami Takahashi, Keiji Wakabayashi: Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, April 16-20, 2005.
 14. Rikako Suzuki, Hiroyuki Kohno, Shigeyuki Sugie, Yoshinobu Hirose, Hitoshi Nakagama, Takuji Tanaka: Strain difference in sensitivity to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, April 16-20, 2005.
 15. Hiroyuki Kohno, Rikako Suzuki, Shigeyuki Sugie, Mami Takahashi, Keiji Wakabayashi, Takuji Tanaka: b-Catenin mutations in colonic adenocarcinomas in male ICR mice initiated with three different colonic carcinogens (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, azoxymethane and 1,2-dimethylhydrazine) and promoted by dextran sodium sulfate. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, April 16-20, 2005.
 16. Hiroyuki kohno, Rikako Suzuki, Shigeyuki Sugie, Hiroyuki Tsuda, and Takuji Tanaka: Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention", Kyoto, May 20-21, 2005.
 17. Rikako Suzuki, Hiroyuki Kohno, Kazuya Hata, Takashi Sumida, Kuniaki Sugawara, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: Modifying effect of citrus unshiu segment membrane on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in C57BL/KsJ-*db/db* mice. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention", Kyoto, May 20-21, 2005.
 18. Shigeyuki Sugie, Keizo Kato, Nami Kitaori, Koujiro Yoshida, Hiroyuki Kohno, Rikako Suzuki, Shouji Shimada, Takuji Tanaka, and Hideki oMri: Chemopreventive effects of yeast, Zinc and zinc-enriched yeast on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. ISCaP "Molecular

- Targeting Cancer Chemoprevention”, Kyoto, May 20-21, 2005.
19. 杉江茂幸、山田泰広、釘 僑、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、浜松、1 月 20-21 日、2005 年。
 20. 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-imidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP)あるいは1,2-dimethylhydrazine (DMH)を用いた炎症関連マウス大腸発がん。第 21 回日本毒性病理学会、浜松、1 月 20-21 日、2005 年。
 21. 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、中釜 齊:AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。日本癌学会カンファレンス「がんゲノム研究の新戦略 - オーダーメイド医療を目指して-」、蓼科、3 月 11-13 日、2005 年。
 22. 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二: Azoxymethane/dextran sodium sulfate (DSS) 誘発マウス大腸発がんに及ぼす DSS 投与期間の影響。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、4 月 14-16 日、2005 年。
 23. 杉江茂幸、ビーン・ファン・クワン、盛 弘強、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、森 秀樹。OH-BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzyliothiocyanate、phenylethyl isothiocyanate の修飾効果。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、4 月 14-16 日、2005 年。
 24. 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、津田洋幸、田中卓二: Silymarin による 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl 誘発ラット前立腺発がん修飾効果。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、4 月 14-16 日、2005 年。
 25. 浅野奈美、加藤恵三、杉下 毅、高橋京子、原 明、廣瀬善信、坂田佳子、杉江茂幸、田中卓二: 肝外胆管原発小細胞癌の一例。第 46 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会)、福岡市、5 月 26-28 日、2005 年。
 26. 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二: AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対するクマリン系フラボノイドによる修飾効果。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、7 月 14-15 日、2005 年。
 27. 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森 秀樹: α -Naphthyl isothiocyanate の実験発がん抑制作用における代謝活性化の役割。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、7 月 14-15 日、2005 年。
 28. 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二、津田洋幸: ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの 4-NQO 誘発舌発がんとその抑制。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、7 月 14-15 日、2005 年。
 29. 久野壽也、廣瀬善信、山田泰広、浅野奈美、尾山 武、原 明、森 秀樹、杉江茂幸、田中卓二: 玄米発酵食による N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 誘発マウス膀胱癌抑制効果の検討。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、7 月 14-15 日、2005 年。
 30. 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、盛 弘強、森 秀樹: BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzyliothiocyanate (BITC)、phenylethyl isothiocyanate (PEITC) の修飾効果。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、7 月 14-15 日、2005 年。
 31. 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二: *ApcMin*+/+マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第 20 回発癌病理研究会 旭川、8 月 23-25 日、2005 年。
 32. 鈴木里加子、甲野裕之、畑 和也、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二: *ApcMin*+/+マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第 64 回日本癌学会ワークショップ W3-8「炎症とがん」、札幌、9 月 14-16 日、2005 年。
 33. 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二: AOM/DSS 誘発マウス

- 大腸発がんに対する COX-2 阻害剤および PPAR リガンドの修飾作用。第 64 回日本癌学会、札幌、9 月 14- 16 日、2005 年。
34. 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、中釜 斉、田中卓二：AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第 64 回日本癌学会、札幌、9 月 14- 16 日、2005 年。
35. 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二：炎症関連マウス大腸発がんに対するウルソデオキシコール酸の修飾作用およびその機構解析。第 16 回日本消化器癌発生学会総会、鹿児島、10 月 13- 14 日、2005 年。
36. 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森秀樹：ナフトフラボンによるラット肝のシトクロム P450 1A、ヘテロサイクリックアミンの変異原的活性化及び UDP-グルクロン酸抱合の誘導。第 34 回日本環境変異原学会、東京、11 月 16-18 日、2005 年。
37. Kuramoto T, Gohma H, Kuwamura M, Okajima R, Tanimoto N, Yamasaki K, Nakanishi S, Kitada K, Makiyama T, Akao M, Kita T, Sasa M, Serikawa T. WTC deafness Kyoto (dfk)- A rat model for extensive investigations of Kcnql functions. Physiological Genomics & Rat Models, Cold Spring Harbor, December 8-11, 2005.
38. 庫本高志、郷間宏史、木村国雄、Dirk Wedkind、Hans Hedrich、芹川忠夫：ラットピンクアイダイリューション変異の同定。第 22 回疾患モデル学会総会、伊香保、2005. 11. 24-25
39. 桑村 充、岡島涼子、山手丈至、小谷猛夫、郷間宏史、庫本高志、芹川忠夫：ポタシウムチャンネル Kcnql 欠損 WTC deafness Kyoto (dfk) ラットの胃病変。第 22 回 日本毒性病理学会、鹿児島、2006. 1. 26-27
40. 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、鴛村 健、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：消化器癌における PPAR γ の分子標的治療への応用。第 1 回日本消化器学会総会（2005 年 1 月）
41. 高橋宏和、藤沢聡郎、藤田浩司、藤沢信隆、米田正人、中島 淳：大腸癌における PPAR γ の分子標的治療への応用。第 3 回 消化器 PPAR 研究会（2005 年 2 月）
42. Hirokazu Takahashi, Toshio Fujisawa, Nobutaka Fujisawa, Yoneda Masato, Koji Fujita, Atsushi Nakajima, Katherine Schaefer, Lawrence J. Saubermann "Inhibition of PPAR γ Activity Induced Apoptosis of Esophageal Carcinoma Cells". 96th American Association of Cancer Research (2005 年 4 月)
43. 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、鴛村 健、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：大腸癌における PPAR γ 遺伝子の分子標的治療への応用。第 91 回日本消化器病学会総会（2005 年 4 月）
44. Toshio Fujisawa, Hirokazu Takahashi, Nobutaka Fujisawa, Yoneda Masato, Koji Fujita, Atsushi Nakajima Katherine Schaefer, Lawrence J. Saubermann "Control of PPAR γ expression for suppression of Proliferation, Invasion and Metastasis in the gastric carcinoma" Congress Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. 6th International Gastric Cancer (2005 年 5 月)
45. Toshio Fujisawa, Hirokazu Takahashi, Nobutaka Fujisawa, Masato Yoneda, Koji Fujita, Atsushi Nakajima, Katherine Schaefer, Lawrence J. Saubermann "Suppression of PPAR γ expression affects the proliferation and invasion in the gastric cancer cells" McCormick Place, Chicago, IL
46. Digestive Disease Week 2005 (2005 年 5 月)
47. Nobutaka Fujisawa, Toshio Fujisawa, Hirokazu Takahashi, Koji Fujita, Masato Yoneda, Atsushi Nakajima Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Regulates Cell Proliferation, Which is an Explanation For the Anti-Tumorigenic Properties of PPAR γ Digestive Disease Week

2005 (2005 年 5 月)

48. Hirokazu Takahashi, Toshio Fujisawa, Nobutaka Fujisawa, Masato Yoneda, Koji Fujita, Atsushi Nakajima, Tomotake Masuda, Koichiro Wada, Katherine Schaefer, Lawrence J. Saubermann. Decreased PPAR γ Activity Mediated Inability of Cell Adhesion and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cells Digestive Disease Week 2005 (2005 年 5 月)
49. 藤澤聡郎, 藤澤信隆, 高橋宏和, 米田正人, 藤田浩司, 中島淳: PPAR γ 阻害剤が β カテニンの発現増加を促し大腸発癌の促進する。日本癌学会 64 回総会 (2005 年 10 月)
50. 高橋 宏和, 中島淳, 高山 哲治: 大腸癌への新たな治療戦略としての PPAR γ 。第 13 回 日本消化器関

連学会機構 (DDWJ-2005) シンポジウム (2005 年 10 月)

51. 藤澤聡郎, 藤澤信隆, 高橋宏和, 米田正人, 藤田浩司, 池田多聞, 阿部泰伸, 加藤暁, 河村晴信, 稲森正彦, 桐越博之, 小林規俊, 窪田賢輔, 坂口隆, 齊藤聡, 中島淳: PPAR γ 阻害剤による β カテニンの発現増加を介した大腸発癌の促進。第 13 回 日本消化器関連学会機構 (DDWJ-2005) (2005 年 10 月)
52. Takahashi H, Ikeda I, Fujisawa T, Nakajima A. PPAR γ ligand decreased precancerous lesions in human colon. AACR frontiers in cancer prevention research (2005 年 11 月)

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就職要因の解明」
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、大腸発がん課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した。PhIP誘発大腸発がんでは、初期病変である dysplastic ACF で SND1 蛋白質の発現上昇が認められた。SND1 の過剰発現細胞では、細胞間接触による増殖阻害の解消や軟寒天培地内でのコロニー形成能がみとめられることから、SND1 が大腸発がんの初期段階において重要な役割を果たしていることが示唆された。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、サブコンジェニック系統を用いた ACF 誘発性実験と、種々のラット系統を用いた ACF 誘発性とハプロタイプ解析の結果を組み合わせることにより、感受性遺伝子の局在候補領域を数 Mb の範囲数カ所に限定化できた。

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、大腸発がん課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の予防策の構築、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などへの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) 大腸早期微少病変の包括的解析法

PhIP や AOM などの大腸発がん物質による大腸発がんモデルでは、異常腺窩 (ACF)、異型を伴う ACF (dysplastic ACF)、mucin-depleted

foci (MDF)、flat dysplastic ACF などの種々の早期微少病変（前がん病変）の存在が指摘されている。いずれの病変も大腸発がん性との強い相関性を示すことから、これら微少病変の相違点や相互の関連性を調べるため、メチレンブルーの短時間染色による flat dysplastic ACF の検出、通常メチレンブルー染色、dysplastic ACF を描出する分別染色法（落合-中釜法）、さらに mucin 染色法を組み合わせた包括的な組織学的解析を行った。尚、解析には十分な数の微小病変が必要なこともあり、今回は AOM 投与によりラットに誘発される病変を用いた。

(2) 大腸早期病変における SND1 蛋白質の発現

SND1 蛋白質は G/C-rich な DNA/RNA 結合蛋白質として同定したが、最近、SND1 mRNA がヒト大腸がん過剰に発現していることが報告された。SND1 の大腸発がんにおける意義を明らかにするため、PhIP 及び AOM により誘発される大腸発がんの早期微少病変における SND1 の発現を、抗 SND1 抗体を用いた免疫組織学染色