

法により調べた。

(3) SND1 過剰発現による小腸上皮細胞 IEC-6 の細胞間接着および増殖能への影響

ラットの腸上皮由来細胞 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を調べた。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も免疫染色法により検討した。

(4) 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、これら領域の部分領域を含むサブコンジェニック系統を作製し、PhIP による ACF の誘発性を検討し、さらなる限定化を試みた。

(5) 種々のラット系統の ACF 誘発性とハプロタイプ解析による *Sct* 遺伝子の限定化

10 数種類のラット系統を用い、PhIP400ppm 含有飼料を 2 週間投与したのちに高脂肪食のみを 4 週間投与し、ACF の誘発性を検討した。それぞれのラット系統の尻尾から DNA を抽出し、C32 及び C34 領域にマップされたマイクロサテライト多型マーカーによるハプロタイプ解析を行い、ACF 誘発性と遺伝子多型との相関性について検討した。

(6) PhIP 大腸発がん抵抗性遺伝子の検索

大腸発がんの抵抗性遺伝子に関しては、ラットを用いた ACF 誘発性の遺伝学的解析からマップされた染色体 6 番及び 9 番上の 2 つの候補遺伝子座 (*Rct1*, *Rct2*) について、マウスの相同染色体 1, 12, 17 番に焦点を絞り、コンソミックマウス系統を用いた解析を行うことを計画した。コンソミック系統は、

PhIP+DSS (デキストラン硫酸塩) 誘発大腸炎による大腸発がん感受性を示す C57BL/6J マウス系統に、PhIP+DSS 誘発大腸がん抵抗性系統を示す MSM/Ms マウス由来の染色体を導入したものである。そこでまず、PhIP 及び DSS の至適投与方法について検討した。PhIP は 100 mg/kg B. W. ないし 200 mg/kg B. W. を 1 回或いは 2 回、数週間の間隔を置いて胃内強制経口投与した。PhIP 投与 1 週間後から 2 % DSS の飲水投与 (1 週間単位を 1 クール) を 1 クール、或いは 2~3 週間の間隔を置いて 2 クール実施した。実験開始後 20 週目にマウスを解剖し、大腸腫瘍の発生数を調べた。

(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、実験に用い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、塗擦は全身麻酔下で行った。

C. 研究結果

(1) 大腸の早期微少病変

AOM や PhIP 等の化学発がん物質により誘発される大腸がんモデルにおいて、分別染色法により染色される dysplastic ACF (ACF-D) は、通常の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 SND 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 が大腸発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 を恒常的に過剰発現した IEC-6 細胞における増殖能の亢進

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 番染色体の C32 と C34 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。

(5) 種々のラット系統を用いたハプロタイプ解析による *Sct* 遺伝子の限定化

11 種類のラットを用いて 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。

(6) PhIP 大腸発がん抵抗性遺伝子の検索

PhIP+DSS 腸炎併発による大腸発がんモデルでは、C57BL/6J 系統が発がん感受性を、MSM/Ms 系統が抵抗性を示すことが分かった。PhIP 及び DSS の投与方法としては、200 mg/kg B.W. の胃内強制投与を 1 回投与したのち、1 週後に 2 % DSS を 1 週間飲水投与、さらに 4 週後に PhIP を再投与したのち、5-6 週目に 2 % DSS を 1 週間飲水投与する方法が最も有効に大腸腫瘍を誘発することが分かった。現在、本プロトコルを適応し、C57BL/6J-MSM/Ms コンソ

ミック系統を用いた発がん実験を開始した。

D. 考察

PhIP 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 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。

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 \geq 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 領域内の数カ所の数 Mb 領域に限定化されることが強く示唆された。

E. 結論

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で、感受性遺伝子の局在候補領域を数 Mb (数カ所) に限定化できたことにより、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により、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、大腸の早期微少病変（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。

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. 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.

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、中釜 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)

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

リンパ腫感受性遺伝子の単離と発がんリスク予測
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 ヒトがん発症に影響を与える遺伝素因をマウスモデルを用いて解析する。すでに一つのリンパ腫発症感受性遺伝子候補として Mtf-1 を同定しているが、この感受性遺伝子座の発がんへの役割を解明する。(1) Mtf-1(+/-)マウスを用いて、Mtf-1 が感受性遺伝子である確認実験を行ったが、確かめられなかった。(2)発がん感受性系統は抵抗性系統と比べ照射後のリンパ球の細胞数、分化状態で回復の遅いことが分かった。すなわち、ラジカル濃度の高い大リンパ球が胸腺内に長く存続し、この胸腺環境が発がん感受性を担うと考えられた。(3)マウス 5 番染色体上の抵抗性遺伝子領域を約 5Mb 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症母体となる正常細胞の増殖能に違いを与える遺伝子、がん発症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。我々はすでに一つのリンパ腫発症感受性遺伝子候補として Mtf-1 を同定している。そこで、この感受性遺伝子が与えるヒト発がんリスクを測定すること、および感受性遺伝子の発がんへの役割を解明することを目的とする。また、マウス 5 番染色体に存在する未知の感受性遺伝子を単離する。

B. 研究方法

(1)放射線発がん実験： 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 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もほぼ同様に行った。このプロジェニーに対してはガ

ンマ線、2.5Gy を 4 回照射した。

(2) FACS 解析：細胞の大きさ、および CD4、CD8 発現の測定は一般的な方法に従った。 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、FACScan で蛍光を測定した。BrdU の取り込みは、 γ 線照射 5 日後にマウスの腹空内に 1mg 投与し、1 時間後に胸腺を取り出し、FACScan で蛍光を測定した。

(3) ウェスタンブロット法による p53 蛋白量の測定は通常の方法を用いた。

(4) 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。

(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 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。

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、現在 BALB/c マウスに由来する ES 細胞は樹立されておらず、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。そこで、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。期待(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、多くの違いがあり、結論は更なる研究を待つ必要がある (議論の項目を参照)。

(2) 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って考えられている。その後、骨髄から供給される未分化血球細胞や残存する胸腺細胞が急激に細胞分裂を始め、胸腺内の細胞数は照射後 7 日目にはほぼ照射前の数まで回復する。正常胸腺内では細胞品質管理機構が存在すると想定されているが、照射後の分裂細胞の一部にはこの機構を逃れ、DNA 損傷をもった細胞、通常ならこの細胞品質管理機構でアポトーシスを引き起こす細胞の生存・存続が可能になる、と考えられている。実際、正常胸腺では分裂した胸腺細胞の約 97% はアポトーシス機構により細胞死を引き起こす。

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。すなわち、発がん感受性遺伝子が ROS 濃度を調整する作用があるかどうかを調べた。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も確認された。次に、p53 蛋白の発現を調べた。小型リンパ球に比べ、大型リンパ球では多くの p53 蛋白が存在し、大型リンパ球にみられた ROS 量の高さに相関すると考えられた。

ここまでの実験経過から、検討すべき対象は分裂能をもつ ROS 濃度の高く、p53 を高発現する大型リンパ球であることが分かった。そこで、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。

最後に、Mtf-1 遺伝子多型がここでみられた現象を担うと予想されるが、両者の関連性については現在検討中である。

(3) 第 5 番染色体上の発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析 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 (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、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年の夏には終了する予定である。

(4)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試料の到着が今現在となった。機能SNPについては、新しく検出されたアミノ酸185のチロシンとヒスチジン多型が同定された。

D. 考察

(1)Mtf-1(+/-)B6マウスを用いて放射線発がん感受性を検討したところ、予想に反しMtf-1(+/-)B6マウスとリンパ腫発症に有意差はみられなかった。これを単純に解釈すると、Mtf-1(KO/+)は感受性を与えないということになる。しかし、実験プロトコールに不完全さがある。すなわち、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(+/-)は元々B6マウスで作製されている)、Mtf-1のもつ感受性がマスクされた可能性がある。実際、どちらの

遺伝子型も早期にしかも高頻度にリンパ腫を発症したことから、それが示唆される。そこで、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。

(2)照射後、感受性系統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。細胞内の高いROS量はp53を活性化し、細胞周期を停止することが知られているが、実際大リンパ球は小リンパ球と比べ高いp53量をもつことが分かった。しかし、感受性と抵抗性系統でのp53の活性化程度の違いは不明である。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。

照射後に起こる胸腺細胞死がどのように発がんに貢献するかは不明であるが、一つの説明がなされている。照射により胸腺細胞死が誘発され、その後起こる未分化細胞が「チェック機構がないままに」増殖することが重要要素であり、変異をもったリンパ球の生存を助け、リンパ腫の発症に導く、と議論されている。照射後すぐに正常骨髄細胞を注入すると、リンパ腫発症が抑えられるのが一つの根拠となっている。ROS濃度の高い大リンパ球が「チェック機構がないままに」増殖するリンパ球と一致するかどうか不明であるが、この大リンパ球の一部が将来リンパ腫前駆体細胞へと進展する可能性を現在考えている。最

後に、Mtf-1 遺伝子多型がここでみられた現象を担うと予想されるが、両者の関連性については現在検討中である。

(3)マウス 5 番染色体上の抵抗性遺伝子領域の解析：5 番染色体の抵抗性コンジェニックマウスを用い、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。発がん実験は平成 18 年の夏には終了する予定である。これをもとに、ハプロタイプ解析から候補遺伝子の検索を行う。

E. 結論

(1)Mtf-1(+/-)B6 マウスを用いて放射線発がん感受性を検討した。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まと始まった。

(2)マウス 4 番染色体上の発がん感受性が支配する表現型を検討した。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。

(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 5Mb 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

Inoue J, Kanefuji T, Okazuka K, Watanabe H, Mishima Y, Kominami R. Expression of TCR $\alpha\beta$ partly rescues developmental arrest and apoptosis of $\alpha\beta$ T cells in Bcl11b $^{-/-}$ mice. J. Immunology. (in press)

Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. Cancer Science. (in press)

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

胃がん抵抗性のBUF ラットの胃粘膜では高発現、感受性のACI ラットの胃粘膜では低発現している胃がん感受性候補遺伝子 *Cellular retinoic acid binding protein 2* (*Crabp2*) について、トランスジェニックラット(Tg)を作製し、幽門における *Crabp2* の発現を確認した。抵抗性BUF ラットと同等量以上 *Crabp2* を安定して発現するACI 背景のTgについて、長期発がん試験を開始した。発がん感受性の原因遺伝子のシグナル経路にある遺伝子は、発がん感受性が異なる系統間で異なる発現量を示すと考えられる。異なるラット系統の前立腺で発現量が異なる遺伝子 (*p21* を含む13個) について、発現量を量的表現形質とした連鎖解析(eQTL解析)を行い、cisに支配されるものとtransに支配されるものが同定できることを示した。

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は、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ため、重要な課題である。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、ラット発がんモデルを用いて、発がん感受性遺伝子の同定を進めている。

(1) 胃がん感受性遺伝子

N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発ラット胃発がんモデルは、ヒト分化型胃がんの良いモデルとされる。MNNG 誘発胃発がん、ACI/N ラットは感受性、BUF/Nac ラットは抵抗性を示す。

本研究申請時(平成15年度)までに、ACI/N ラットとBUF/Nac ラットの胃粘膜で発現量が異なる遺伝子を網羅的に検索し、*Cellular retinoic acid binding protein 2* (*Crabp2*) mRNA は、BUF/Nac 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* 遺伝子は、細胞分化制御に

重要な役割を果たすことが知られており、その発現量の違いが胃がん感受性に関与している可能性が高い。そこで、*Crabp2* 遺伝子トランスジェニック(Tg)ラットを作成し、その意義を明らかにすることにした。

平成16年度までに、ヒト *EEF1A1* プロモーターとラット *Crabp2* cDNA を連結したコンストラクトをACI/N ラットの受精卵に注入したTgラットを2系統(ACI-Tg1, ACI-Tg2)、Wistar ラットの受精卵に注入したTgラットを1系統(Wistar-Tg)樹立した。

本年度は、Tgラットの胃粘膜における *Crabp2* の発現量を調べ、長期胃発がん試験を開始した。

(2) ラット前立腺 eQTL 解析

Crabp2 のように、発がん感受性が異なる系統間で発現量が異なる遺伝子は、発がん感受性に関与するシグナル経路に位置する可能性がある。ある遺伝子の発現量の違いが、その遺伝子自身によるのか、そのシグナル経路上流の遺伝子によるのかを明らかにし、発がん感受性遺伝子についての連鎖解析の結果と照合することは重要である。

そこで、本年度は、異なるラット系統の前立腺で発現量が異なる遺伝子について、発現量を量的表現形質とした連鎖解析 (eQTL 解析) を行い、高発現量域及び低発現量域での eQTL 解析の有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) ラット及び発がん実験

Tg ラットは、昨年までに作成したものを用いた。前立腺における eQTL 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。コンジュニックラットは、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。

(2) Tg ラットのコピー数の測定

導入遺伝子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 のサザンブロッティングを行った。

(3) 定量的 RT-PCR

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。

(4) マイクロアレイ解析

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。

(5) Western blotting

幽門分離腺管から抽出した全蛋白質を用いて、抗 *Crabp2* 抗体 (SANTA CRUZ) を用いた。

(6) 連鎖解析

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。

(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) 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、予定通り、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。従って、繁殖を行い、MNNG による長期発がん実験を開始した。

(2) 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、トランスジュ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。

D. 考察

(1) 胃がん感受性遺伝子

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原因として、遺伝的なヘテロ性が関与していると考えられた。Tg ラットを用いた遺伝子機能に関する研究では、複数の founder 系統があることが必須なので、ACI 系統に戻し交配を行った後、表現形質を解析することとした。

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。そこで、本系統を用いて、まず、長期の胃発がん実験を実施中である。

(2) ラット前立腺 eQTL 解析

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。このことは、リアルタイム PCR により発現量を精密に定量することにより、発現量が低い遺伝子でも eQTL 解析が可能であることを示している。

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。

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 (機能ばかりでなく) 発現量に関与する多型と、前立腺がん感受性とは関連している可能性が示唆され、興味深い。

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、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。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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* (2005) 171(3): 1231-8.

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.* (2005) 65(7): 2610-6.

2. 学会発表

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成17年度 第3次対がん総合戦略研究事業
研究分野1「発がんの分子基盤に関する研究」
分担研究報告書

「疾患モデルを用いた発がんの分子機構およ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

ヘテロサイクリックアミンに対する発癌感受性遺伝子、発癌抵抗性遺伝子の同定を目的として、体系的な遺伝的解析に用いられている SMXA リコンビナント・インレッド (RI) 系マウスで検討するために 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利用して、ヘテロサイクリックアミンの中でも大腸への発癌性の強い 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、を SMXARI 系マウスの祖先系 2 系統 (SM/J、A/J) 雌雄マウスに投与して、系統間での発がん感受性の差を検討した。その結果、SM/J に比し、A/J は感受性が高く、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。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. 研究の目的

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、特に加熱調理食品等に含まれる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。新たに開発した dextran sulfate sodium (DSS) 発癌物質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、今回は特に、SMXA リコンビナント・インレッド (RI) 系マウスの親系統を用いて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. 研究の方法

2 系統 (SM/J、A/J) 雌雄マウスを用いて、以下の実験を行った。各系統の 6 週齢雌雄マウスに PhIP (200mg/kg 体重) を胃強制投与し、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、剖検した。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。

(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った。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、苦痛に配慮した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。SMXARI系において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。

E. 結論

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。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。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。

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: 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* 26(1): 229-238, 2005.

2: 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.

3: 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.

4: 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.

5: 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.

6: 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.

- 7: 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.
- 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.
- 9: 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.
- 10: 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.
- 11: 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.

2. 学会発表

国際学会・外国学会

- 1) 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.

2) 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 *ApcMin/+* 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.

3) 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.

4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Shigeyuki Sugie, Keizo Kato, Nami Kitaori, Koujiro Yoshida, Hiroyuki Kohno, Rikako Suzuki, Shouji Shimada, Takuji Tanaka, and Hideki Mori: 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.

国内学会

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、中釜 斉: 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。
- 4) 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。
- 5) 杉江茂幸、ビィン・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 benzylisothiocyanate、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。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) 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。

12) 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 benzylisothiocyanate (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。

13) 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。

14) 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。

15) 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。

16) 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。

17) 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。

18) 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。

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関連疾患モデルラットの開発研究

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 p53 遺伝子、Apc 遺伝子に変異を持つがんモデルラットを開発するために、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した。ENU ミュータジェネシスにより 1,217 頭の G1 ラットが得られ、その突然変異率は 0.69×10^{-7} であった。p53、Apc 遺伝子領域に点変異を持つ変異ラットは見出せなかったが、今後、個体数を増やせばそれらを得られると推定された。CHL ミュータジェネシスにより 93 頭の G1 ラットが得られた。延べ 13,165 座位をスクリーニングしたが、欠失変異を見出せなかった。本年度構築した DNA バンクと精子バンクは、遺伝子改変ラット作製のためのリソースとして活用が期待される。

A. 研究目的

平成 16 年度中に確立したエチルニトロソウレア (ENU)、クロラムブチル (CHL) を用いた変異誘発方法により、G1 ラットを千頭単位で作製し、これら G1 ラットから p53 遺伝子、Apc 遺伝子に変異を持つ個体を選抜することを目的とした。

B. 研究方法

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。

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。

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部尾部より採取し、凍結保存した (精子バンク)。

(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 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。

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 産子を得られた。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 週齢時に剖検を行った。両眼球欠損、白内障、矮小を示す個体がそれぞれ得られた。

D. 考察

ENU ミュータジェネシス

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。本法はシークエンス法に比べて、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。ラット ENU ミュータジェネシスでの変異誘発率は、シークエンス法では、 $1 \sim 0.3 \times 10^{-6}$ と報告されている。MuT-POWER 法での変異検出は、シークエンス法に比べ 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、シークエンス法に比べ遜色ない方法と考えられた。

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成できると考えられた。また、本年度構築した DNA バンク、精子バンクは、遺伝子改変ラット作製のためのリソースとして有用である。

CHL ミュータジェネシス

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プリ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。しかし、実際にはゲノム欠失は検出できなかった。その理由として、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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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 2005 16: 712-719.

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. 2005 96:339-345.

2. 学会発表

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

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

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

H. 知的財産の出願・登録状況
なし