

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

環境中の発がん及び発がん抑制要因の検索と
その作用機構の解明に関する研究

(H18-国医-指定-006)

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 若林 敬二

平成 19 (2007) 年 4 月

I. 総括研究報告		
環境中の発がん及び発がん抑制要因の検索と その作用機構の解明に関する研究 若林敬二	—————	1
II. 分担研究報告		
1. 新規変異原・がん原物質の検索 若林敬二	—————	11
2. DNA変異を指標にした発がん及び発がん抑制要因 の検索と作用機構の解明に関する研究 能美健彦	—————	14
3. 脂質過酸化により生成する変異原の同定 葛西 宏	—————	17
4. 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明 中釜 斉	—————	21
5. 酸化的DNA傷害修復遺伝子MYHの新規多型と 胃がん症例対照研究における評価 梶村 春彦	—————	26
6. 沖縄産薬草のNO合成酵素に及ぼす影響 安仁屋洋子	—————	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	32

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
 総括研究報告書
 環境中の発がん及び発がん抑制要因の検索とその作用機構の解明に関する研究
 主任研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所副所長

研究要旨

本研究は、環境中の変異原や発がん物質を明らかにすると共にヒトのがん発生要因及び感受性要因を総合的に把握し、最終的にはがんの第一次予防推進の為に基礎的研究成果をあげることを目的とする。強い変異原性を示した3府県5都市の表層土壌抽出物から共通に5種類の変異・がん原性ニトロアレーンが主な汚染物質として検出された。各ニトロアレーンの土壌抽出物の変異原性に対する寄与率は、泉大津市と碧南市の土壌抽出物では類似していたが他の地点の土壌中抽出物では異なっていた。不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生成する新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE) が使用済み食用油から検出された。食品調理・加工業労働者への曝露リスク評価への応用が期待される。酸化ストレスは発がんの主要要因の一つであり、ヌクレオチドプールの酸化は酸化ストレス発がん、酸化ストレス突然変異の原因となっている。ヒト DNA ポリメラーゼ η は、酸化損傷 dNTP (8-OH-dGTP、2-OH-dATP) を誤って DNA 中に取り込むことにより、さまざまな突然変異を誘発することが示された。PhIP により誘発されるラット大腸がんモデルを用いた解析により、RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つで新規の翻訳抑制因子の可能性のある SND1 蛋白質が、大腸発がんの極めて早期の病変である non-dysplastic ACF において発現亢進していることが分かった。さらに、microRNA-X が大腸上皮細胞の増殖抑制に関与することや、その発現誘導の系統差が PhIP による大腸発がんの感受性にも寄与している可能性が示唆された。DNA 修復遺伝子 MYH の上流に、新たな遺伝子多型を見いだし大腸癌の症例対照で環境因子を考慮したロジスティック解析をおこなうとリスク上昇との関連を見いだした。また、肺癌の早期病変とされる腺腫様過形成における染色体数の異常をパラフィンブロックで解析することを可能にし、早期からの染色体異常を同定した。更に、これらの病変と喫煙歴との関連はなかった。沖縄産葉草ベニバナボロギクの肝薬物代謝酵素への作用を検討し、シトクロム P450 の 1A2 と 2E1 の活性及び発現を選択的に抑制することを明らかにした。

分担研究者

若林敬二	国立がんセンター研究所	副所長
能美健彦	国立医薬品食品衛生研究所	室長
葛西 宏	産業医科大学	教授
中釜 斉	国立がんセンター研究所	部長
梶村春彦	浜松医科大学	教授
安仁屋洋子	琉球大学大学院医学研究科	教授

A. 研究目的

がんは遺伝子の病気であり、その発生には多くの遺伝子変化が関与している。がん発生の原因となる遺伝子変化を引き起こすものには多くの外的及び内的要因があり、中でも喫煙、食事性要因及び感染症が大きな役割を果たしていることが指摘されている。これらの要因に加えて、遺伝的背景も発がんに多大な影響を及ぼしている。しかしながら、どのような変異原・がん原物質がヒトのがん関連遺伝子の変異や発現異常に関与しているかについてはほとんど判っていない。又、発がん感受性因子も十分には解明されていない。本研究においては、ヒトのがん発生要因及びがん感受性要因を総合的に把握し、最終的にはヒトのがんの第一次予防推進のための基礎的研究成果をあげることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

大阪府高槻市、泉大津市、京都府京都市、愛知県名古屋市及び碧南市の一般居住地域において採取した表層土壌から有機物をソックスレー抽出法により得た。各抽出物は各種カラムを用いたクロマトグラフィーにより変異原物質を分離・精製した。単離した変異原物質の構造の同定はMS分析、UV 吸収スペクトル解析等により行った。

(2) 脂質過酸化により生成する変異原の同定

食用油を、酢酸エチルエステルで 100 倍希釈して GC-MS 分析の試料とした。GC-MS 装置は、Hewlett-Packard HP 6890 ガスクロマトグラフィーと JEOL JMS-BU 20 質量分析計を用いた。ガスクロマトグラフィーのカラムには、CP-CIL5CB (Chromopack) を使用し、サンプル注入後、60℃に 1 分保った後、150℃まで 1 分間に 10℃、270℃まで 1 分間に 40℃昇温した。4-OHE の定量は、それぞれの標準品を用いて作製した検量線に基づいて行った。

(3) DNA 変異を指標にした発がん及び発がん抑制要因の検索と作用機構の解明に関する研究

バクテリオファージ M13mp2 DNA の二重鎖環状 DNA の一部を単鎖としたギャップ DNA を調製した。この DNA のギャップ部分を Pol η が試験管内で埋める際に、8-OH-dGTP あるいは 2-OH-dATP を 4 種類の正常 dNTPs と共存させ、生じた塩基配列変化を大腸菌に導入後に検出した。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

① SND1 に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色により、PhIP 誘発大腸発がん過程における各種の微小病変における SND1 の発現を調べた。

② ラット腸管上皮細胞由来の IEC-6 細胞を用いて、SND1 の過剰発現細胞クローンを複数樹立した。SND1 過剰発現による細胞増殖への影響や細胞間接着に関わる分子種の挙動を調べた。

③ 細胞傷害性のストレス応答性の microRNA として同定した microRNA-X が、PhIP を投与したラットの大腸上皮でも発現誘導されるかについて、real-time RT-PCR で調べた。

④ microRNA-X の過剰発現による細胞増殖への影響について、ヒト大腸がん細胞株 (HCT116, RK0) に一過性に導入して調べた。

(5) 酸化的 DNA 傷害修復遺伝子 MYH の新規多型とがん症例対照研究における評価

喫煙歴などの情報のある、マッチさせた症例対照 DNA を用いて、遺伝子多型とがんとの関連をロジスティック解析をおこなって調整オッズ比を用いて算出した。また、病理保存標本における FISH 法の感度を上昇させる方法を開発し、その方法で、5 mm までの小病変や早期癌病変の染色体変化を検出した。

(6) 沖縄産薬草の NO 合成酵素に及ぼす影響

ベニバナボロギク (BB) は熱水抽出液の凍結乾燥品を用いた。無処置または各種 P450 誘導剤を投与したラットの肝ミクロソームに *in vitro* で BB 抽出液を作用させ、P450 活性を測定した。また、無処置および 3-methylcholanthrene を投与したラットに BB 100mg/kg またはイソクログエン酸 40mg/kg を 2 日間腹腔内投与し、経時的に肝ミクロソームの P-450 活性、蛋白ならびに mRNA の発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする研究はすべて厳密なインフォームド・コンセントを本人から得て、倫理委員会の承諾後に進めている。有害事象が生じて研究を中止する場合も本人に十分な説明をし、了解を得ている。また、動物実験は各研究者の所属施設の実験動物取り扱い (倫理) 規定を遵守して行っている。

C. 研究結果

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

表層土壌抽出物は TA98 株に対し、S9 mix 非存在下において非常に強い変異原性を示した

(5280~233000 revertants/mg 抽出物)。各土壌抽出物から LH-20 カラム及びシリカゲルカラムにより分画して得た変異原性画分を ODS 中圧カラムにより分画し、変異原性画分 Fr. 1~5 を得た。いずれの抽出物も Fr. 1 が最も高い変異原性寄与率を示した (43~67%)。各 Fr. 1 を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて分画したところ、それぞれ 4 種類の変異原物質が単離され、それらは MS 分析、UV 吸収スペクトル及び HPLC における保持時間から、変異・がん原物質である 1,6-及び 1,8-dinitropyrene (DNP)、3,9-dinitrofluoranthene (DNF)、1,3,6-trinitropyrene と同定された。また、いずれの土壌においても Fr. 1 に次いで Fr. 3 が強い変異原性を示し、主な変異原物質として 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene が検出された。各ニトロアレーンの土壌抽出物の変異原性に対する寄与率は 1~31% であり、寄与率の合計は 54~62% であった。

(2) 脂質過酸化により生成する変異原の同定

使用済みの食用油を分析した結果、8 種の食用油のうち 7 種から 4-OHE が検出された。その量は、多いもので食用油 1 ml あたり 4.2 μ g であった。4-OHE のアポトーシス誘導能は、ヒト白血病細胞 HL-60 を、4 μ M の 4-OHE を含む培地で 4 時間処理すると、約 50% の細胞にアポトーシスに伴うクロマチン凝集が見られた。この時、同時に caspase 3 活性の上昇が観察された。また、HL-60 細胞 DNA の 8-OH-dG レベルは 4-OHE の処理時間に伴って経時的に増加した。

(3) DNA 変異を指標にした発がん及び発がん抑制要因の検索と作用機作の解明に関する研究

反応混液中に 4 種類の正常 dNTP と等濃度 (200 μ M) の 2-OH-dATP を加えると、G \rightarrow T 変異頻度が対照 (正常 dNTP のみで 2-OH-dATP を加えない場合) に比べ約 8 倍増加した。2-OH-dATP の代わりに 8-OH-dGTP を加えると、A \rightarrow C 変異頻度が対照に比べ 17 倍以上増加し、C \rightarrow A 変異頻度も約 2 倍増加した。8-OH-dGTP を加えると、塩基置換以外に、C あるいは T の一塩基欠失頻度が 8 倍あるいは 5 倍、100 塩基以上の欠失も 10 倍以上増加した。反応混液に加える 8-OH-dGTP の濃度を正常な dNTP の 1/1000 にまで低下させても、変異頻度は有意に上昇した。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

① 大腸発がん過程における Snd1 発現について、

初期病変である ACF における発現を免疫組織染色法により検討した。 β -catenin の細胞質内蓄積が極く軽微な早期病変や non-dysplastic ACF においても約半数の病変で Snd1 の過剰発現が認められた。

② ラット IEC-6 細胞を用いて Snd1 を恒常的に過剰発現している 5 つのクローンを樹立した。いずれのクローンも細胞増殖能が亢進し、Snd1 過剰発現による contact inhibition の消失が示唆された。

③ Snd1 過剰発現 IEC-6 細胞クローンにおいて、Apc 蛋白質の発現低下が認められた。Snd1 蛋白質を一過性に過剰発現させた場合にも同様に、Apc 蛋白質の発現低下を認めた。Apc 遺伝子の mRNA 発現量には有意な変化を認めないことから、post-transcriptional な分子機構による Apc 蛋白質の発現制御が示唆された。

④ PhIP400ppm 含有飼料を F344 ラットに投与すると、ストレス応答性 microRNA (microRNA-X) の発現が腸管上皮で有意に上昇することが分かった。microRNA-X が腫瘍抑制的な作用を有することや、PhIP 誘発大腸がんの抵抗性系統 (ACI ラット) では、microRNA-X の発現誘導が感受性系統 (F344 ラット) に比較して顕著に高いことから、microRNA-X が発がん感受性にも寄与している可能性が示唆された。

(5) 酸化 DNA 傷害修復遺伝子 MYH の新規多型とがん症例対照研究における評価

DNA 修復酵素 MYH に新たな多型を発見し、その多型の variant で、散发性大腸癌のリスクの有意な上昇をみた。また、肺癌の前癌病変とされる小病変の一部で染色体数の増加がすでにおこっていること、喫煙などとの関連がみられないことを示した。

(6) 沖縄産葉草の NO 合成酵素に及ぼす影響

BB 熱水抽出液をラット肝ミクロソームに作用させると、特に CYP2E1 および 1A2 活性の阻害が見られた。BB 100mg/kg をラットに投与した場合、CYP 1A1、3A1/2、2B1 および 2C 活性に変化は見られなかったが、CYP2E1 および 1A2 活性は有意に低下し、蛋白の発現量も低下していた。BB の 20mg/kg 投与でも CYP2E1 および 1A2 の活性抑制が見られたが、BB の抗酸化成分として単離されたイソクロゲン酸投与ではこれらの CYP 活性の低下は見られなかった。これより、BB は選択的に CYP2E1 と 1A2 を抑制し、この抑制作用にはイソクロゲン酸はほとんど寄与していないことが示唆された。

D. 考察

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

5 都市において採取した表層土壌中の変異原物質として、5 種類のニトロアレーンを分離・同定

した。このうちの 1,6-DNP、1,8-DNP 及び 3,9-DNF は発がん性を示し、国際がん研究機関 (IARC) によりヒトに対する発がん性を有する可能性のある物質 (Group 2B) に分類されている。

各ニトロアレーンの土壌抽出物の変異原性に対する寄与率は、泉大津市と碧南市の土壌抽出物では類似していたが他の地点の土壌中抽出物では異なっていた。今回検出されたニトロアレーンは採取地点に隣接する工業地域において生成し表層土壌に蓄積したものと考えられる。

(2) 脂質過酸化により生成する変異原の同定

4-OHE は、 ω -3 不飽和脂肪酸の脂質過酸化に伴って生成すると考えられる。変異原性を有する 4-OHE が、 ω -3 不飽和脂肪酸を多く含むシソ油や魚の加熱調理食品から多量に検出されたことから、加熱調理に伴って生成する代表的な変異・発がん物質ヘテロサイクリックアミン類に継ぐ新たな変異原と言える。ヒトの発がん要因としての関わりが注目される。さらに、使用済み食用油から検出された結果は、4-OHE が揮発性であることを考えると、油脂の製造、食品の加工、調理に携わる労働者の職業がん発生の要因となっている可能性も考えられる。HL-60 細胞 DNA の 8-OH-dG レベルが 4-OHE の処理により増加したことから、4-OHE の毒性発現には、DNA 付加体の生成に加えて酸化ストレスが関与していると考えられる。

(3) DNA 変異を指標にした発がん及び発がん抑制要因と作用機作の解明に関する研究

Pol η は、当初、紫外線損傷の誤りのない乗り越えに関わる DNA ポリメラーゼとして同定されたが、近年は、相同組換え、免疫グロブリンの突然変異誘発にも関与することが示されている。また Pol η は細胞に損傷がない場合でも、一定量、複製装置に存在しており、内因性の DNA 損傷の乗り越えに関与することが示唆されている。今回の研究により、Pol η は酸化損傷 dNTP を効率よく DNA に取り込み、さまざまな突然変異を誘発する能力を持つことが明らかにされた。8-OH-dGTP や 2-OH-dATP は、複製型 DNA ポリメラーゼによっては DNA 中に取り込まれにくいことが報告されており、酸化ストレスが高まり dNTP の酸化が起きた時には、Pol η が 8-OH-dGTP や 2-OH-dATP を DNA 鎖中に取り込むことにより複製の進行を助けている可能性が考えられる。ヌクレオチドプールの酸化に基づく突然変異誘発への Pol η の関与については、細胞遺伝学的手法を用いて更に検討する必要がある。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明
RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つで、新規の翻訳抑制因子の可能性があり SND1 蛋白質が、大腸発がんの極めて早期の病変で

ある non-dysplastic ACF において発現亢進していることから、SND1 の過剰発現を介した新たなエピジェネティック機構による WNT シグナル経路の活性化が、大腸発がんの初期発生過程において重要な役割を果たしている可能性がある。また、PhIP への曝露により大腸上皮に発現誘導されるストレス応答性 microRNA の発現誘導の差異が、PhIP による大腸発がんの感受性に寄与している可能性がある。

(5) 酸化 DNA 傷害修復遺伝子 MYH の新規多型とがん症例対照研究における評価

MYH は非密生型のポリポーシスの原因遺伝子としてその変異が認められている。しかし、本邦をふくむアジア諸国での同様の変化がいつものところ検出されておらず、かわりにいくつかの多型が見いだされている。そのなかで、上流部の新規多型が大腸癌のリスクであることを示し、その機序や、普遍性に関心がもたれる。肺癌など頻度の高い腫瘍での前癌病変の染色体変化と環境要因、遺伝要因との相関が興味深い。

(6) 沖縄産葉草の NO 合成酵素に及ぼす影響

沖縄産食用・薬用素材であり強い抗酸化作用を有する BB 熱水抽出液が薬物代謝酵素の特に CYP1A2、2E1 を抑制することが確認された。CYP1A2、2E1 は医薬品のみならず多くの発がん物質の代謝的活性化に関与している。化学発がんは発がん物質の代謝過程で生じた活性酸素、フリーラジカルが DNA の変異を起こすことが大きな要因であり、これらを消去したり、産生を抑制する物質はがん化学予防となりうる。これまでに共同研究で BB の抗酸化作用、ラットの大腸がん予防効果が確認されており、今回得られた BB の CYP1A2、2E1 抑制作用は抗酸化作用に加え、BB ががん原物質の代謝的活性化を抑制することによりがん化学予防に寄与する可能性を示唆している。

E. 結論

強い変異原性を示した 3 府県 5 都市の表層土壌抽出物から共通に 5 種類の変異・がん原性ニトロアレーンが主な汚染物質として検出された。各ニトロアレーンの土壌抽出物の変異原性に対する寄与率は、泉大津市と碧南市の土壌抽出物では類似していたが他の地点の土壌中抽出物では異なっていた。

ω -3 不飽和脂肪酸は、癌予防に重要な役割を持つ脂肪酸として知られている。また一方で、酸化を受けやすい脂質としても有名であるが、その酸化分解産物の変異原性についてはほとんど研究されてこなかった。最近我々は、 ω -3 不飽和脂肪酸の過酸化反応に伴って生成する新規変異原物質として 4-OHE を見出した。4-OHE を実験動物に投与す

ると、組織の DNA に付加体を生成する。今回、実際の加熱調理食品や使用されている食用油の中に比較的多量の 4-OHE を検出した。4-OHE がヒトが日常的に摂取している食品中に存在していることを考えると、ヒトへの健康影響を考えるうえで、今後さらに毒性データの蓄積が必要である。特に食生活は、ヒト発がんの大きな要因の一つであることから、4-OHE のヒト発がんへの関わりに注目したい。

酸化ストレスは発がんの主要要因の一つであり、ヌクレオチドプールの酸化は酸化ストレス発がん、酸化ストレス突然変異の原因となっている。ギャップを持ったバクテリオファージ M13mp2 DNA を用いた in vitro DNA 合成系を用い、反応混液中に酸化 dNTP (8-OH-dGTP, 2-OH-dATP) を加えた時に Pol η が誘発する突然変異を解析した。反応混液中に 4 種類の正常 dNTP と等濃度の 2-OH-dATP を加えると G→T 変異が増加した。8-OH-dGTP を加えると、A→C 変異、C→A 変異、一塩基欠失、100 塩基以上の欠失が有意に増加した。8-OH-dGTP の濃度を正常な dNTP の 1/1000 にまで低下させても、変異頻度は有意に上昇した。Pol η は、酸化損傷 dNTP (8-OH-dGTP, 2-OH-dATP) を誤って DNA 中に取り込むことにより、さまざまな突然変異を誘発することが示唆された。

本研究結果により、Apc 遺伝子や β -catenin 遺伝子変異の有無に依存せず、翻訳抑制因子 SND1 の発現異常により WNT シグナルの活性化が起こり得るという全く新規の分子機構が、ラットだけでは無くヒト大腸がんの初期発生に重要な役割を果たしている可能性がある。SND1 発現誘導の分子機構及び発現誘導の程度の個体差の機構を明らかにすることにより、大腸発がんの高リスク群の掌握に資することが期待される。

本邦で新たに見られた修復遺伝子多型が、大腸癌のリスクになる可能性を示した。また、病理ブロックを用いた微少病変の染色体異常の検索に道を開いた。

BB の熱水抽出液は薬物代謝酵素の CYP1A2 ならびに 2E1 を選択的に抑制することが確認された。このことから BB が抗酸化作用に加え、この代謝酵素抑制作用により、がん化学予防に寄与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究論文

1. 論文発表

1. Watanabe T, Hasei T, Takahashi T, Asanoma M, Murahashi T, Hirayama T, Wakabayashi K. Detection of a novel mutagen, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, as a major contaminant in surface soil in Osaka and

- Aichi prefectures, Japan. *Chem Res Toxicol.* 18:283-289, 2005.
2. Totsuka Y, Nishigaki R, Enomoto S, Takamura-Enya T, Masumura K, Nohmi T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K. Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates. *Chem Res Toxicol.* 18:1553-1562, 2005.
 3. Takamura-Enya T, Mano N, Kawahara N, Goto J, Wakabayashi K. Formation of DNA adducts with cholyl adenylate, a putative intermediate for biosynthesis of cholyl-CoA. *Chem Res Toxicol.* 18:1715-1720, 2005.
 4. Matsui K, Yamada M, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. *DNA Repair.* in press, 2006.
 5. Sato Y, Takahashi S, Kinouchi Y, Shiraki M, Endo K, Matsumura Y, Kakuta Y, Tosa M, Motida A, Abe H, Imai G, Yokoyama H, Nomura E, Negoro K, Takagi S, Aihara H, Masumura K, Nohmi T, Shimosegawa T. IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis.* in press, 2006.
 6. Yamada M, Matsui K. Nohmi T. Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Genes and Environ.* 28: 23-30, 2006.
 7. Mazaki M, Kataoka K, Kinouchi T, Vinitketkumnuen U, Yamada M, Nohmi T, Kuwahara T, Akimoto S, Ohnishi Y. Inhibitory effects of caraway (*Carum carvi* L.) and its component on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenicity. *J. Med. Invest.* 53: 123-133, 2006.
 8. Asami Y, Murakami M, Shimizu M, Pisani F M, Hayata I, Nohmi T. Visualization of the interaction between archaeal DNA polymerase and uracil-containing DNA by atomic force microscopy. *Genes to Cells.* 11: 3-11, 2006.
 9. Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, Son H Y, Kanki K, Nakajima M, Kinoshita N, Nohmi T, Trosko J E, Inoue T, Hirose, M. MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in gpt delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Env. Mol. Mutagen.* 47: 48-55, 2006.
 10. Miyazaki M, Yamazaki H, Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, Masumura K, Nohmi T, Funae Y, Imaida K, Kamataki T. Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas. *Carcinogenesis.* 26: 1947-1955, 2005.
 11. Kim S R, Kokubo K, Matsui K, Yamada N, Kanke Y, Fukuoka M, Yamada M, Nohmi T. Light-dependent mutagenesis by benzo[a]pyrene is mediated via oxidative DNA damage. *Env. Mol. Mutagen.* 46: 141-149, 2005.
 12. Satou K, Yamada M, Nohmi T, Harashima H, Kamiya H. Mutagenesis induced by oxidized DNA precursors: roles of Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Chem. Res. Tox.* 18: 1271-1278, 2005.
 13. Hashimoto A, Amanuma K, Hiyoshi K, Takano H, Masumura K, Nohmi T, Aoki Y. In vivo mutagenesis caused by benzo[a]pyrene instilled into the lung of gpt delta transgenic mice. *Env. Mol. Mutagen.* 45: 365-373, 2005.
 14. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H, 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.
 15. Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. In vivo mutational analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol. Carcinog.* 42: 9-17, 2005.
 16. Kokubo K, Yamada M, Kanke Y, Nohmi T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. *DNA Repair.* 4: 1160-1171, 2005.

17. Nohmi T, Kim S R, Yamada M. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* 591: 60-72, 2005.
18. Nohmi T, Masumura K. Molecular dissection of in vivo DNA rearrangements induced by radiation and chemical mutagens, International Congress Series (High Levels of Natural Radiation and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects). 1276: 25-28, 2005.
19. Nohmi T, Masumura K. Molecular natural of intra-chromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Evn. Mol. Mutagen*, 45: 150-161, 2005.
20. Kasai H, Maekawa M, Kawai K, Hachisuka K, Takahashi Y, Nakamura H, Sawa R, Matsui S, Matsuda T. 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by w-3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. *Ind Health*, 43:699-701, 2005.
21. Maekawa M, Kawai K, Takahashi Y, Nakamura H, Watanabe T, Sawa R, Hachisuka K, Kasai H, Identification of 4-oxo-2-hexenal and other direct mutagens formed in model lipid peroxidation reactions as dG-adducts, *Chem. Res. Toxicol.* 19:130-138, 2006.
22. Kawai K, Matsuno K, Kasai H. Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. *Mutat. Res.*, 603:186-92 (2006).
23. Nakagama H, Higuchi K, Tanaka E, Tsuchiya N, Nakashima K, Katahira M, Fukuda H. Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures. *Mutat Res.* in press, 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*. in press, 2006.
25. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura Y, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J. Cancer.* 118: 2232-2236, 2006.
26. Fukuda H, M. Katahira, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M, Nakagama H. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UP1 Protein. *Genes Cells.* 10: 953-962, 2005.
27. Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.* 96: 627-636, 2005.
28. Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M, Taguchi A, Sugimura T, 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.
29. Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J, Nakagama H. Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 26: 635-640, 2005.
30. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H, 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.
31. Shinmura K, Goto M, Tao H, Shimizu S, Otsuki Y, Kobayashi H, Ushida S, Suzuki K, Tsuneyoshi T, Sugimura H. A novel STK11 germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndrome complicated by primary gastric cancer *Clinical Genetics*, 67 :81-86, 2005.
32. Nakamura R, Kataoka H, Sato N, Kanamori M, Ihara N, Igarashi H, Ravshanov S, Wang Y, Li Z, Shimamura T, Kobayashi T, Konno H, Shinmura K, Tanaka M, Sugimura H. EPHA2/EFNA1 expression in human gastric cancer *Cancer Science.* 96: 42-47, 2005.
33. Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda, T, Sugimura H, Kamijo T, Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J*, 24:160-169, 2005.
34. Aoki M, Yamamura Y, Noshiro H, Sakai, K, Yokota J, Kohno T, Tokino T, Ishida S, Ohyama S, Ninomiya I, Uesaka K, Kitajima M, Shimada S, Matsuno S, Yano M, Hiratsuka M, Sugimura H, Itoh F, Minamoto T, Maehara Y, Takenoshita S, Aikou T, Katai H, Yoshimura K, Takahashi T, Akagi K, Sairenji M, Yamamoto K, Sasazuki T. A full genome scan for gastric cancer. *J. Med.*

- Genet. 42: 83-87, 2005.
35. Shimamura T, Ito H, Shibahara J, Watanabe A., Hippo Y, Taniguchi H, Chen Y, Kashima T, Ohtomo T, Tanioka F, Iwanari H, Kodama T, Kazui T, Sugimura H, Fukayama M, Aburatani H. Over-expression of MUC13 Is Associated with Intestinal Type. *Cancer Sci.* 96: 265-273, 2005.
 36. Wang J, Kataoka H, Suzuki M, Sato N, Nakamura R, Tao H, Nakamura T, Maruyama K, Isogaki J, Kanaoka S, Ihara M, Tanaka M, Kanamori M, Shinmura K, Sugimura H. Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer. *Oncogene.* 24: 5637- 5647, 2005.
 37. Maekawa M, Taniguchi T, Uramoto T, Higashi H, Horii T, Takeshita A, Sugimura H, Kanamori M. Pilot study of arbitrarily primed PCR-single stranded DNA conformation polymorphism analysis for screening genetic polymorphisms related to specific phenotypes. *Clinica Chimica Acta.* 355: 181-184, 2005.
 38. Yamada H, Sugimura H, Tsuneyoshi T. Suppressive effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on DNA methylation in mice: Detection by methylation sensitive restriction endonuclease digestion and PCR. *J. Food, Agriculture & Environment.* 3: 73-76, 2005.
 39. Yamada H, Shinmura K, Tsuneyoshi T, Sugimura H. Effect of splice-site polymorphisms of the TMPRSS4, NPHP4, and ORCTL4 genes on their mRNA expression. *J. Genetics.* 84: 131-136, 2005.
 40. Aoki M, Yamamoto K, Ohyama S, Yamamura Y, Takenoshita S, Sugano K, Minamoto T, Kitajima M, Sugimura H, Shimada S, Noshiro H, Hiratsuka M, Sairenji M, Ninomiya I, Yano M, Uesaka K, Matsuno S, Maehara Y, Aikou T, Sasazuki T. A genetic variant in the gene encoding the stress70 protein chaperone family member STCH is associated with gastric cancer in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 335: 566-574 , 2005.
 41. Raimondi S, Boffetta P, Anttila S, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper M L, Dragani T A, Garte S, Gsur A, Haidinger G, Hirvonen A, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Lan Q, Leoni V P, Marchand L L, London S J, Neri M, Povey A C, Rannug A, Reszka E, Ryberg D, Risch A, Romkes M, Ruano-Ravina A, Schoket B, Spinola M, Sugimura H, Wu X, Taioli E. Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers An update of the GSEC study. *Mutat Res.* 592: 45-57, 2005.
 42. Igarashi H, Yamashita K, Suzuki M, Kitayama Y, Isogaki J, Maruyama K, Sunayama K, Tsuda H, Ozawa T, Kiyose S, Sugimura H. Simultaneous imaging of membrane antigen and the corresponding chromosomal locus in pathology archives. *Pathol. Int.* 55: 753-756, 2005.
 43. Kitayama Y, Sugimura H. A nonrandom chromosomal numerical abnormality as a new molecular cytogenetic tumor marker. A retrospective study of 60 gastric cancer cases. *Jpn J Lab Med (Rinsho Byori).* 53: 881-886, 2005.
 44. Sano T, Kitayama Y, Igarashi H, Suzuki M, Tanioka F, Chida K, Okudela K, Sugimura H. Chromosomal numerical abnormalities in early stage lung adenocarcinoma. *Pathol Int.* 56:117-125, 2006.
 45. Kikuchi H, Yamashita K, Kawabata T, Yamamoto M, Hiramatsu Y, Kondo K, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Suzuki S, Kitagawa K, Kitagawa M, Sugimura H, Konno H. Immunohistochemical and genetic features of gastric and the metastatic liver GISTs, sequential analyses. *Cancer Sci.* 97: 127-132, 2006.
- ## 2. 学会発表
- 1) 戸塚ゆ加里、西垣玲奈、高村岳樹、杉村隆、若林敬二、N-ニトロソ胆汁酸抱合体より生成されるDNA付加体の構造解析、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)
 - 2) 高村岳樹、石川さと子、望月正隆、杉村隆、若林敬二、変異・がん原性アミノ-, ニトロ-芳香族化合物のDNA付加体の効率的合成法、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)
 - 3) 西垣玲奈、戸塚ゆ加里、牛山博文、後藤純雄、杉村隆、若林敬二、ヒト尿中のaminophenylnorharman (APNH)の検出、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)
 - 4) 大江武、水野智子、戸塚ゆ加里、高村岳樹、小田美光、若林敬二、N-hydroxy-aminophenylnorharmanの染色体異常誘発能及び突然変異スペクトル、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
 - 5) 戸塚ゆ加里、西垣玲奈、榎本茂樹、高村(塩谷)岳樹、増村健一、能美健彦、杉村隆、若林敬二、

- N-ニトロソタウロコール酸より生成されるDNA付加体の構造解析、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
- 6) 高村岳樹、眞野成康、川原信夫、後藤順一、若林敬二、胆汁酸アデニレートより生成するDNA付加体の解析、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
 - 7) 渡辺徹志、長谷井友尋、麻野間正晴、若林敬二、平山晃久、大阪府及び愛知県の表層土壌中の主要な変異原物質の同定、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
 - 8) 麻野間正晴、寺田久屋、田村征男、高橋和彦、渡辺徹志、平山晃久、寺尾良保、塩澤竜志、糠谷東雄、高村岳樹、若林敬二、中部地方における河川水中の変異原の分離・同定、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
 - 9) 日高勝彦、山田雅巳、紙谷浩之、益谷央豪、原島秀吉、花岡文雄、能美健彦、DNAポリメラーゼ η による酸化損傷dNTP取り込みで生ずる突然変異の特徴、第28回日本分子生物学会年会、福岡、(2005年12月)
 - 10) 山田雅巳、松井恵子、今井勝、山本和生、能美健彦、DNAポリメラーゼのヒエラキー、第28回日本分子生物学会年会、福岡、(2005年12月)
 - 11) Hashimoto A H, Amanuma K, Masumura K, Nohmi T, Aoki Y. In vivo mutagenicity of diesel exhaust inhalation in the testis of gpt delta mice, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 13) Sakamoto Y, Masumura K, Ikeda M, Hirat, A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Nohmi T. Mutational analyses of p53 deficient gpt delta transgenic mice treated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) and 2-amino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 14) Yamada M, Matsui K, Nohmi T. Development of bacterial tester strains to detect the mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons sensitively and specifically, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 15) Sui H, Kawakami K, Ohyama N, Hara T, Nohmi T. Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (FAT): the effects of dinB plasmid (IV), 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 16) Nishigaki R, Totsuka Y, Mori Y, Masumura K, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Analysis of N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine (BOP) and its metabolites in pancreatic juice of Syrian golden hamsters treated with BOP, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 17) Horiguchi M, Aoe S, Tanaka C, Tutuki H, Yamada M, Matui K, Nohmi T, Ikegami S. Evaluation of inhibitory effects of food components on genotoxicity of chemicals by Ames test, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 18) Masumura K, Ikeda M, Sakamoto Y, Wang B, Neno M, Sakuma K, Hayata I, Nohmi T. Effect of low dose-rate gamma-irradiation on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induced mutagenesis in gpt delta mice, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 19) Sakamoto Y, Masumura K, Ikeda M, Hirata A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Nohmi T. Mutational analysis of p53 deficient gpt delta mice treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 20) Matsui K, Yamada M, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of Salmonella typhimurium strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens, 日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
 - 21) 増村健一、坂元康晃、池田 恵、平田暁大、塚本徹哉、立松正衛、能美健彦、p53欠損gpt deltaマウスにおけるN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine誘発突然変異の解析、第64回日本癌学会学術総会、札幌 (2005年9月)
 - 22) 神吉けい太、西川秋佳、梅村隆志、増村健一、石井雄二、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄、p53^{+/-}/gpt deltaマウス肝臓におけるアクロレイン経口投与によるin vivo遺伝子変異の検索、第64回日本癌学会学術総会、札幌 (2005年9月)
 - 23) 柴田淳史、能美健彦、寺岡弘文、中釜 斉、杉村 隆、鈴木 宏志、益谷美都子、Parp-1欠損マウスの加齢個体における自然突然変異の解析、第64回日本癌学会学術総会、札幌 (2005年9月)
 - 24) 梅村隆志、神吉けい太、黒岩有一、石井雄二、岡野圭太、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄、ラット腎発がん剤臭素酸カリウム(KBrO₃)による酸化的DNA損傷、in vivo変異原性およびイニシエーション活性、第64回日本癌学会学術総会、

- 札幌(2005年9月)
- 25) 西川秋佳、神吉けい太、梅村隆志、増村健一、石井雄二、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄、Pentachlorophenol投与マウス肝における遺伝子突然変異の解析、第64回日本癌学会学術総会、札幌(2005年9月)
 - 26) 能美健彦、SOS DNAポリメラーゼ：環境とゲノム進化を結ぶ架け橋、第7回日本進化学会大会、仙台(2005年8月)
 - 27) 能美健彦、ハイ・スループット遺伝毒性試験系の構築、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、東京(2005年6月)
 - 28) Nohmi T. Roles of multiple DNA polymerases in mutagenic bypass of DNA lesions by various environmental chemicals. Gordon Research Conference “DNA damage, mutation and cancer”, Ventura, U.S.A., (March 2006).
 - 29) Nohmi T. Environmental mutagenesis: from molecules to man. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 30) Satou K, Yamada M, Nohmi T., Harashima H, Kamiya H. Roles of the Escherichia coli DinB and UmuDC proteins in mutations induced by oxidized DNA precursors. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 31) Totsuka Y, Takamura T, Enomoto S, Nishigaki R, Kawahara N, Masumura K, Nohmi T., Sugimura T, Wakabayashi K. Structures of DNA adducts derived from N-nitrosotaurocholic acid. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 32) Shibata A, Nohmi T., Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H, Masutani M. increased mutations in Parp-1 knockout mice after treatment with an alkylating agent and with aging. 9th international Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 33) Kokubo K, Yamada M, Kanke Y, Nohmi T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of Salmonella typhimurium strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 34) Aoki Y, Hashimoto A, Amanuma K, Hiyoshi K, Yanagisama T, Takano H, Masumura K, Nohmi T. In vivo mutagenicity of diesel exhaust and its components, benzo(a)pyrene and 1,6-dinitropyrene in the lungs of gpt delta mice. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 35) Masumura K, Hoshino M, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T. Non-homologous end-joining in X-ray-irradiated scid/gpt delta transgenic mouse. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 36) Takeiri A, Mishima M, Tanaka K, Shioda A, Harada A, Watanabe K, Deki T, Masumura K, Nohmi T. Molecular characterization of cisplatin and transplatin-induced base substitutions and deletion mutations in newly established gpt delta L1 cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 37) Nakagama H, Ochiai M, Shibata A, Masumura K, Nohmi T., Sugimura T, Masutan M. In vivo mutation spectrum in gpt delta transgenic mice after treatment with alkylating agents under Parp-1-deficient and DNA-PKcs-deficient conditions. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 38) Hayashi H, Shindo Y, Nohmi T. Carcinogenic risk estimation of organ specific mutagenicity induced by phenacetin using gpt delta transgenic rats. 9th International Conference on Environmental Mutagens (9th ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005).
 - 39) Nohmi T. Y-family DNA polymerases in archaea and eubacteria, and their roles in genome maintenance. Gordon Research Conference “Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology”, Oxford, U.K., (August 2005).
 - 40) 河井 一明、前川 宗之、松田 知成、松井 三郎、葛西 宏 過酸化脂質由来変異原によるマウス臓器DNA付加体の形成 第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月
 - 41) 前川 宗之、河井 一明、葛西 宏 過酸化脂質モデル反応により生成する変異原・dG付加体の構造 第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月
 - 42) Kawai K, Maekawa M, Hachisuka K, Matsui M, Matsuda T, Kasai H. 4-Oxo-2-hexenal in cooked foods and DNA adduct formation in mouse organs after oral administration. 9th

International Conference on Environmental Mutagens. San Francisco, U.S.A, (Sep. 2005) .

- 43) Maekawa M, Kawai K, Hachisuka K, Takahashi Y, Nakamura H, Sawa R, Kasai H. Identification of 4-oxo-2-hexenal as adduct in a model lipid peroxidation reaction and its mutagenicity to TA 100 and 104. 9th International Conference on Environmental Mutagens. San Francisco, U.S.A, (Sep. 2005) .
- 44) 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).
- 45) 46) 落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 査. 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)
- 47) 阿部浩一郎、田澤 大、落合雅子、杉村 隆、久山 泰、中釜 査. 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)
- 48) 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)
- 49) 中西雅子、田澤 大、田中卓二、杉村 隆、中釜 査. 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)
- 50) 落合雅子、中西雅子、藤原恭子、杉村 隆、中釜 査. 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)
- 51) 中西雅子、桑村 充、吉田 緑、前川昭彦、中釜 査. 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)
- 52) 山田英孝、新村和也、陶弘、池田仁子、花岡知之、津金昌一郎、常吉俊宏、梶村春彦. CDH1 遺伝子の遺伝子多型と胃癌リスクとの関連. 第 64 回 日本癌学会総会 (札幌)
- 53) 高松玲佳、安仁屋洋子、吉見直己、沖縄産ベニバナボロギクの誘導型一酸化窒素合成酵素

(iNOS) に及ぼす影響、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2005 年 6 月)

H. 特許取得状況

(1) 特許取得

発明者 梶村 春彦

特願 2006-59424 パラフィン切片保存シート
国際共同研究で病理切片の交換や送付に便利
である

特許出願中

「癌細胞増殖抑制剤」(特願 2005-15915)

(2) 実用新案登録

なし

(3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
（分担）研究報告書

新規変異原・がん原物質の検索

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨 河川水中の強変異原物質であるPBTA化合物の非塩素化誘導体（non-C1PBTA-2, -3, -4 及び-7）が静岡県の染色工場地域を流れる河川水から検出された。これら化合物はPBTAと同様に染色過程でアゾ色素から生成し河川水中に放出されたと思われた。

A. 研究目的

がんは遺伝子の病気であり、その発生には多くの遺伝子変化が関与している。がん発生の原因となる遺伝子変化を引き起こすものには多くの外的及び内的要因があり、中でも喫煙、食事性要因及び感染症が大きな役割を果たしていることが指摘されている。これらの要因に加えて、遺伝的背景も発がんに多大な影響を及ぼしている。しかしながら、どのような変異原・がん原物質がヒトのがん関連遺伝子の変異や発現異常に関与しているかについてはほとんど判っていない。新規環境変異原・がん原物質の分離同定は一次予防の観点から重要な研究課題である。また、これら変異原物質の環境中の分布の程度についても明らかにすることがヒトの曝露レベルを考える上で必要である。そこで我々は河川水中に存在する新規変異原物質に注目し、分離同定を試みた。

B. 研究方法

浜松市内を流れる芳川河川中の変異原物質をブルーレーヨンを用いて吸着、濃縮した。吸着成分をメタノール/アンモニアで溶出し、減圧蒸溜乾固した後、各種カラムを用いたクロマトグラフィーにより変異原物質を分離・精製した。単離した変異原物質の構造の同定はLC-MS解

析及び別途合成により行った。また、これら河川水中の新規変異原物質の突然変異原性についても検討した。

C. 研究結果

芳川河川水抽出物はYG1024株に対し、S9 mix存在下において強い変異原性を示した。LH-20カラムを用いて分画したとこ

Table 1 Mutagenicities of non-C1PBTA and PBTA congeners toward *Styphimutium* strains with S9 mix.

Compound	Numbers of revertants per microgram ^a			
	TA98	TA100	YG1024	YG1029
non-C1PBTA-3	1,060	36	159,000	640
non-C1PBTA-7	1,520	512	178,000	1,100
PBTA-3	81,000 ^b	N/A ^c	3,000,000 ^b	N/A
PBTA-7	43,000 ^d	393 ^e	1,430,000 ^d	64 ^e

^aThe mutagenicities of samples were calculated from linear portions of the dose-response curves in two independent experiments.

^bFrom reference [9].

^cFrom reference [12].

^dN/A: not available

ろ、Kd値1.50~2.75の画分が強い活性を示した。この画分をODS-AMカラムを用いたHPLCで分画し、強変異原性画分Fr. 15, 21, 36を得た。Fr. 21をPhenyl-Hexylカラムを用いたHPLCで分画した結果、変異原性活性本体である化合物が単離され、その化合物はHPLCにおける保持時間、UV吸収スペクトルおよびMSから塩素非置換のPBTA-2 (nonC1-PBTA-2)と同定された。また、Fr. 15および36についても同様に検討を行い、Fr. 15中からnonC1-PBTA-3および-4を、Fr. 36からnonC1-PBTA-7を主要な変異原性物質として単離・同定した。これらnonC1-PBTA化合物類のうち、

nonCl-PBTA-3 および nonCl-PBTA-7 は YG1024 に株に対して非常に強い変異原性を示した。しかし、これら変異原性はその塩素置換体である PBTA-3 及び PBTA-7 に比べてそれぞれ 19 及び 8 倍低いことがわかった。(表 1)

D. 考察

芳川河川中の変異原物質として、non-ClPBTA-2, -3, -4 及び-7 を分離・同定した。このうちの nonCl-PBTA-3 および nonCl-PBTA-7 は YG1024 株に対して強い変異原性を示した。しかし、これら変異原性はその塩素置換体である PBTA-3 及び PBTA-7 に比べて低いことから、塩素原子が変異原性の増強に関与していると思われる。その理由として、塩素原子が存在する事により、化合物の脂溶性が増し、細胞内への取込みが上昇することから、塩素非置換の nonCl-PBTA-3 および nonCl-PBTA-7 では変異原活性が塩素置換体のそれらと比較して減少することが示唆された。

また、これらの nonCl-PBTA は染色工場などにおいて対応するアゾ染料から生成し、河川中に排出されたものと考えられる。

E. 結論

河川中の強変異原物質である PBTA 化合物の非塩素化誘導体(non-ClPBTA-2, -3, -4 及び-7)が静岡県の染色工場地域を流れる河川水から検出された。これら化合物は PBTA と同様に染色過程でアゾ色素から生成し、河川中に放出されたと思われた。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究論文

3. 論文発表

- 1) Watanabe T, Hasei T, Takahashi T, Asanoma M, Murahashi T, Hirayama T, Wakabayashi K. Detection of a novel mutagen, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, as a major contaminant in surface soil in Osaka and Aichi prefectures, Japan. *Chem Res Toxicol.* 18:283-289, 2005.
- 2) Totsuka Y, Nishigaki R, Enomoto S, Takamura-Enya T, Masumura K, Nohmi T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K. Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates. *Chem Res Toxicol.* 18:1553-1562, 2005.
- 3) Takamura-Enya T, Mano N, Kawahara N, Goto J, Wakabayashi K. Formation of DNA adducts with cholyl adenylate, a putative intermediate for biosynthesis of cholyl-CoA. *Chem Res Toxicol.* 18:1715-1720, 2005.
- 4) Matsubara S, Shibata H, Takahashi M, Ishikawa F, Yokokura T, Sugimura T, Wakabayashi K. Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H. pylori* infection. *Cancer Sci.* 95: 798-802, 2004.
- 5) Matsubara S, Shibata H, Ishikawa F, Yokokura T, Takahashi M, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 715-719, 2003.
- 6) Iimuro M, Shibata H, Kawamori T, Matsumoto T, Arakawa T, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Cancer Lett.* 187: 61-68, 2002.
- 7) Shibata H, Ohta T, Iimuro M, Kitamura T, Yokokura T, Wakabayashi K. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by urease inhibitors in Mongolian gerbils. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 29: 154-158, 2002.

2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里、西垣玲奈、高村岳樹、杉村隆、若林敬二、N-ニトロソ胆汁酸抱合体より生成される DNA 付加体の構造解析、第 64 回日本癌学会総会、札幌、(2005 年 9 月)

- 2) 高村岳樹、石川さと子、望月正隆、杉村隆、若林敬二、変異・がん原性アミノ、ニトロ-芳香族化合物のDNA付加体の効率的合成法、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)
- 3) 西垣玲奈、戸塚ゆ加里、牛山博文、後藤純雄、杉村隆、若林敬二、ヒト尿中のaminophenylnorharman (APNH)の検出、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)
- 4) 大江武、水野智子、戸塚ゆ加里、高村岳樹、小田美光、若林敬二、N-hydroxy-aminophenylnorharmanの染色体異常誘発能及び突然変異スペクトル、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
- 5) 戸塚ゆ加里、西垣玲奈、榎本茂樹、高村(塩谷)岳樹、増村健一、能美健彦、杉村隆、若林敬二、N-ニトロソタウロコール酸より生成されるDNA付加体の構造解析、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
- 6) 高村岳樹、眞野成康、川原信夫、後藤順一、若林敬二、胆汁酸アデニレートより生成するDNA付加体の解析、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
- 7) 渡辺徹志、長谷井友尋、麻野間正晴、若林敬二、平山晃久、大阪府及び愛知県の表層土壌中の主要な変異原物質の同定、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)
- 8) 麻野間正晴、寺田久屋、田村征男、高橋和彦、渡辺徹志、平山晃久、寺尾良保、塩澤竜志、糠谷東雄、高村岳樹、若林敬二、中部地方における河川水中の変異原の分離・同定、日本環境変異原学会第34回大会、東京、(2005年11月)

DNA 変異を指標にした発がん及び発がん抑制要因の検索と作用機構の解明に関する研究

分担研究者：能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第二室 室長

研究要旨 酸化ストレスは発がんの主要要因の一つであり、ヌクレオチドプールの酸化は酸化ストレス発がん、酸化ストレス突然変異の原因となっている。ヒト DNA ポリメラーゼ η は、酸化損傷 dNTP (8-OH-dGTP、2-OH-dATP) を誤って DNA 中に取り込むことにより、さまざまな突然変異を誘発することが示された。

A. 研究目的

ゲノムDNAに対する酸化ストレスは発がんの主要な原因の一つである。DNAの酸化は、DNA中の塩基が直接酸化される以外に、酸化されたdNTPがDNAポリメラーゼにより新生DNA鎖中に取り込まれることによっても誘発される。紫外線損傷の乗り越えDNA合成に関わるヒトDNAポリメラーゼ η (Pol η) は、酸化dNTPを効率よくDNA中に取り込む。本研究では、Pol η が酸化dNTP (8-OH-dGTP、2-OH-dATP) を取り込んだ時に、どのような変異を誘発するかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

バクテリオファージM13mp2 DNAの二重鎖環状DNAの一部を単鎖としたギャップDNAを調製した。このDNAのギャップ部分をPol η が試験管内で埋める際に、8-OH-dGTPあるいは2-OH-dATPを4種類の正常dNTPsと共存させ、生じた塩基配列変化を大腸菌に導入後に検出した。

(倫理面への配慮)

当該研究は *in vitro* の生化学、微生物学実験であり、倫理問題には抵触しない。

C. 研究結果

反応混液中に 4 種類の正常 dNTP と等濃度 (200 μ M) の 2-OH-dATP を加えると、G→T 変異

頻度が対照 (正常 dNTP のみで 2-OH-dATP を加えない場合) に比べ約 8 倍増加した。2-OH-dATP の代わりに 8-OH-dGTP を加えると、A→C 変異頻度が対照に比べ 17 倍以上増加し、C→A 変異頻度も約 2 倍増加した。8-OH-dGTP を加えると、塩基置換以外に、C あるいは T の一塩基欠失頻度が 8 倍あるいは 5 倍、100 塩基以上の欠失も 10 倍以上増加した。反応混液中加入する 8-OH-dGTP の濃度を正常な dNTP の 1/1000 にまで低下させても、変異頻度は有意に上昇した。

D. 考察

Pol η は、当初、紫外線損傷の誤りのない乗り越えに関わるDNAポリメラーゼとして同定されたが、近年は、相同組換え、免疫グロブリンの突然変異誘発にも関与することが示されている。またPol η は細胞に損傷がない場合でも、一定量、複製装置に存在しており、内因性のDNA損傷の乗り越えに関与することが示唆されている。今回の研究により、Pol η は酸化損傷dNTPを効率よくDNAに取り込み、さまざまな突然変異を誘発する能力を持つことが明らかにされた。

8-OH-dGTPや2-OH-dATPは、複製型DNAポリメラーゼによってはDNA中に取り込まれにくいことが報告されており、酸化ストレスが高まりdNTPの酸化が起きた時には、Pol η が

8-OH-dGTPや2-OH-dATPをDNA鎖中に取り込むことにより複製の進行を助けている可能性が考えられる。ヌクレオチドプールの酸化に基づく突然変異誘発へのPol η の関与については、細胞遺伝学的手法を用いて更に検討する必要がある。

E. 結論

酸化ストレスは発がんの主要要因の一つであり、ヌクレオチドプールの酸化は酸化ストレス発がん、酸化ストレス突然変異の原因となっている。ギャップを持ったバクテリオファージM13mp2 DNAを用いた *in vitro* DNA 合成系を用い、反応混液中に酸化 dNTP (8-OH-dGTP, 2-OH-dATP) を加えた時に Pol η が誘発する突然変異を解析した。反応混液中に4種類の正常 dNTP と等濃度の2-OH-dATP を加えると G→T 変異が増加した。8-OH-dGTP を加えると、A→C 変異、C→A 変異、一塩基欠失、100 塩基以上の欠失が有意に増加した。8-OH-dGTP の濃度を正常な dNTP の 1/1000 にまで低下させても、変異頻度は有意に上昇した。Pol η は、酸化損傷 dNTP (8-OH-dGTP、2-OH-dATP) を誤って DNA 中に取り込むことにより、さまざまな突然変異を誘発することが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Masutani, C., Xu, Y., Usui, Y., Sugiyama, H., Harashima, H., Hanaoka, F., and Nohmi, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η , *Biochem.*, in press.

Barone, F., McCullouch, S.D., McPherson, P., Maga, G., Yamada, M., and Nohmi, T., Minoprio, A., Mazzei, F., Kunkel, T.A., Karran, P., and

Bignami, M. Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA substrates and recognition by human MutS alpha, *DNA Repair*, 6: 355-366 (2007).

De Felice, M., Medagli, B., Esposito, L., De Falco, M., Pucci, B., Rossi, M., Gruz, P., Nohmi, T., and Pisani, F.M. Biochemical evidence of a physical interaction between *Sulfolobus solfataricus* B-family and Y-family DNA polymerases, *Extremophiles*, 11: 277-282 (2007).

Yamada, M., Nunoshiba, T., Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Harashima, H., and Nohmi, T. Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 188: 4992-4995 (2006).

Matsui, K., Yamada, M., Imai, M., Yamamoto, K., and Nohmi, T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens, *DNA Repair*, 5: 465-478 (2006).

Asami, Y., Murakami, M., Shimizu, M., Pisani, F.M., Hayata, I., and Nohmi, T. Visualization of the interaction between archaeal DNA polymerase and uracil-containing DNA by atomic force microscopy, *Genes to Cells*, 11: 3-11 (2006).

2. 学会発表

Yamada, M., Hidaka, K., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F., and Nohmi, T. Specificity of mutations associated with misincorporation of oxidized dNTPs by human DNA polymerase eta *in vitro* Gordon Research

Conference-Mammalian DNA Repair in Ventura, CA,
U. S. A. , February 2007.

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Yamada, M. , Nunoshiha, T. , Shimizu, M. , Gruz, P. ,
Kamiya, H. , Harashima, H. , and Nohmi, T. ,
Involvement of Y-family DNA polymerases in
oxidized dNTPs-induced mutagenesis in
Escherichia coli, 37th Annual Meeting of the
Environmental Mutagen Society in Vancouver,
Canada, September 2006.

Nohmi, T. , Kokubo, K. , Yamada, M. , and Gruz, P. ,
Control of multiple DNA polymerases dealing with
lesions induced by environmental mutagens, 36th
Annual Meeting of the European Environmental
Mutagen Society in Prague, Czech, July 2006.

Gruz, P. , Niimi, N. , Sassa, A. and Nohmi, T. , New
system for the production of mammalian DNA
polymerase kappa in E. coli: purification,
characterization and immunochemistry of the
human and mouse POLK proteins, 36th Annual
Meeting of the European Environmental Mutagen
Society in Prague, Czech, July 2006.

Yamada, M. , Matsui, K. , and Nohmi, T. , Novel
Salmonella tester strains highly sensitive to
photochemical sources and oxidative damage, 36th
Annual Meeting of the European Environmental
Mutagen Society in Prague, Czech, July 2006.

Nohmi, T. , Roles of multiple DNA polymerases in
mutagenic bypass of DNA lesions by various
environmental chemicals, Gordon Research
Conference, DNA damage, mutation and cancer, in
Ventura, CA, U. S. A. , March 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

脂質過酸化により生成する変異原の同定
分担研究者 葛西宏 産業医大・産生研・教授

研究要旨

不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生成する新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE) が使用済み食用油から検出された。食品調理・加工業労働者への曝露リスク評価への応用が期待される。

A. 研究目的

4-Oxo-2-hexenal (4-OHE) は、 ω -3 不飽和脂肪酸の酸化によって生成する。4-OHE は、容易に DNA と反応して付加体を形成し、Ames test において変異原性を示す。この DNA 付加体は、4-OHE を経口投与したマウス消化管の DNA から LC/MS/MS 法や ^{32}P ポストラベル法によって検出された。近年、食品調理・加工に携わる労働者の咽頭がん、肺がん発症リスクに関わる調査研究や、レストラン厨房大気中の変異原物質に関する報告がなされており、4-OHE の関わりが注目される。本研究では、4-OHE が ω -3 不飽和脂肪酸を含む食品や食用油の加熱調理により生成すると考えられることから、食品調理・加工業労働者への曝露リスクを考え、食品関連業種で用いられている食用油中からの

4-OHE の検出を試みた。また、4-OHE の毒性発現機構を探る目的で、ヒト HL-60 培養細胞に対するアポトーシス誘導作用についても検討を行った。

B. 研究方法

4-OHE の検出は以下の様に行った。食用油を、酢酸エチルエステルで100倍希釈してGC-MS 分析の試料とした。GC-MS装置は、Hewlett-Packard HP 6890ガスクロマトグラフィーとJEOL JMS-BU 20質量分析計を用いた。ガスクロマトグラフィーのカラムには、CP-CIL5CB (Chromopack)を使用し、サンプル注入後、60℃に1分保った後、150℃まで1分間に10℃、270℃まで1分間に40℃昇温した。4-OHEの定量は、それぞれの標準品を用いて作製した検量線に基づいて行った。

C. 研究結果

使用済みの食用油を分析した結果、8種の食用油のうち7種から4-OHEが検出された(Table 1)。その量は、多いもので食用油1 mlあたり4.2 μg であった。

Table 1

	4-oxo-2-hexenal ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
レストラン A	4.19
レストラン B	0.12
レストラン C	0.27
コンビニ	N.D.
厚揚げ工場	0.17
油揚げ工場	0.1
麺工場 (液体)	0.2
麺工場 (個体)	0.07

4-OHEのアポトーシス誘導能は、ヒト白血病細胞 HL-60 を、4 μM の4-OHEを含む培地で4時間処理すると、約50%の細胞にアポトーシスに伴うクロマチン凝集が見られた。この時、同時に caspase 3 活性の上昇が観察された。また、HL-60 細胞 DNA の 8-OH-dG レベルは4-OHEの処理時間に伴って経時的に増加した。

D. 考察

4-OHEは、 ω -3 不飽和脂肪酸の脂質過酸化に伴って生成すると考えられる。変異原性を有する4-OHEが、 ω -3 不飽和脂肪酸を多く含むシソ油や魚の加熱調理食品から多量に検出されたことから、加熱調理に伴って生成する代表的な変異・発がん物質ヘテロサイクリッ

クアミン類に継ぐ新たな変異原と言える。ヒトの発がん要因としての関わりが注目される。さらに、使用済み食用油から検出された結果は、4-OHEが揮発性であることを考えると、油脂の製造、食品の加工、調理に携わる労働者の職業がん発生の要因となっている可能性を示している。HL-60 細胞 DNA の 8-OH-dG レベルが4-OHEの処理により増加したことから、4-OHEの毒性発現には、DNA付加体の生成に加えて酸化ストレスが関与していると考えられる。

E. 結論

ω -3 不飽和脂肪酸は、癌予防に重要な役割を持つ脂肪酸として知られている。また一方で、酸化を受けやすい脂質としても有名であるが、その酸化分解産物の変異原性についてはほとんど研究されてこなかった。最近我々は、 ω -3 不飽和脂肪酸の過酸化反応に伴って生成する新規変異原物質として4-OHEを見出した。4-OHEを実験動物に投与すると、組織のDNAに付加体を生成する。今回、実際の加熱調理食品や使用されている食用油の中に比較的多量の4-OHEを検出した。4-OHEがヒトが日常的に摂取している食品中に存在している