

性がわずかでも、飼料中濃度を 400 ppm に増量した結果、dysplastic ACF が誘発された。ACF 誘発性をわずかでも示す物質は、投与量が多くなれば、dysplastic ACF を誘発する可能性が示された。

(2) Trp-P-2 と他の大腸発がん性 HCA との違いや MeA $\alpha$ C と A $\alpha$ C との違いを解析するために、GSEA により更に詳細に解析した。その結果、炎症やストレスに関与する遺伝子群が、HCA 類の大腸発がん性に寄与している可能性が示唆された。網羅的遺伝子発現解析において、これらの遺伝子群の発現変動にも注目して大腸発がん性を推測する必要がある。但し、Trp-P-2 において dysplastic ACF が誘発されたのは、飼料中濃度が 400 ppm であり、網羅的遺伝子発現解析は 100 ppm 投与群の検体であったので、400 ppm 投与群の検体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、炎症やストレス。に関与する遺伝子群が発現変動しているか検証する必要がある。

#### E. 結論

種々のがん原性化合物を用いて、大腸組織における遺伝子発現プロファイルへの影響をゲノムワイドに解析することにより、少なくとも、HCA において大腸発がん性 HCA と同一のクラスターに属する場合には、dysplastic ACF 誘発性を持つ可能性があることが示唆された。大腸がん誘発性に関しては、炎症やストレスに関する遺伝子群の発現変動が重要な可能性がある。今後、さらにデータを集積することにより、既知及び未知の環境中化合物

について、それらの大腸発がん性の予測やヒトへのリスク評価が短期間の暴露実験で可能にできると期待される。

#### F. 健康危機情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Ogawa K, Masutani M, Kato K, Tang M, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Shirai T. Parp-1 deficiency does not enhance liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline in mice. *Cancer Lett*, 236:32-38, 2006.
- 4) 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*, 241:87-92, 2006.
- 5) 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.*, 25:598(1-2):120-131, 2006
- 6) Takahashi H, Masuda T, Schaefer K, Saubermann LJ, Fujisawa N, Fujisawa T, Fujita N, Yoneda M, Ikeda I, Shimamura T, Saito S, Tachibana M, Wada K, Nakagama H, Kadowaki T and Nakajima A. Inhibition of PPAR $\gamma$  activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of adhesive and invasive properties followed by an induction of apoptotic cell death. *Cancer Sci*, 97:854-860, 2006.
- 7) Uchida S, Kubo A, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y and Yamashita K. Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochem*, 139:761-769, 2006.
- 8) Nakanishi M, Tazawa H, Tanaka T, Sugimura T, Nakagama H. Pathological studies on PhIP and DSS-induced colon carcinogenesis in mice. *Proc Jpn Soc Anim Mod Hum Dis.*, 22:1-7. 2006.
- 9) Ogino H, Shibata A, Gunji A, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Masutani M. Agent-dependent effects of PARP-1 deficiency on DNA damage responses and genomic stability in mouse ES cells. *In: New Developments in Stem Cell Research* (Edited by Erik V. Grier) Nova Science Publishers, Inc. pp133-147, 2007.
- 10) Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagam H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc*, 39 (1):70-74, 2007.
- 11) Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem* (in press)
2. 学会発表
- 1) 1) Dohi T, Nakagama H, Nakajima A, Predominant T helper type 2 in inflammatory responses promote murine colon cancers. 第6回CSDGS (大阪) 2006年1月14日。

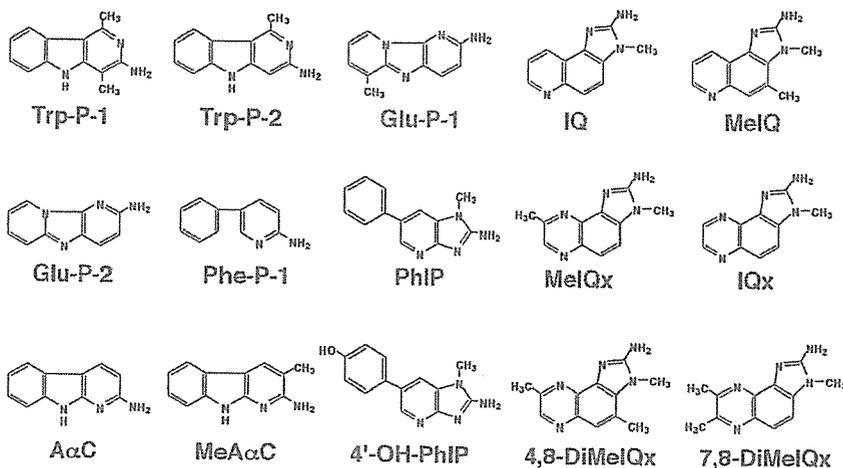
- 2) 中西雅子、桑村 充、吉田 緑、前川昭彦、中釜 斉、C57BL/6J マウスに認められた、肝細胞の顆粒状変性／脂肪化と細胞周囲性繊維化を特徴とする肝病変の1例。第22回日本毒性病理学会（鹿児島） 2006年1月26-27日。
- 3) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、安井由美子、中釜 斉、田中卓二、A/J、SM/J マウスを用いたヘテロサイクリックアミン/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第3回日本癌学会カンファランス（蓼科） 2006年3月9-11日。
- 4) Nakagama H, Ochiai M, Sugimura T, Nakashima K, Tsuchiya N, SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. CSHL Symposium, Mechanisms & Models of Cancer. Cold Spring Harbor, NY, USA. August 16-20, 2006.
- 5) 落合雅子、泉谷昌志、佐々木美穂、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発大腸発がんの1分子機構と系統差。第21回発癌病理研究会（徳島）2006年8月28-30日。
- 6) 落合雅子、渡辺昌俊、田澤 大、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がんの初期病変と、 $\beta$ -catenin 遺伝子変異及び遺伝子発現プロファイルの系統差。第17回日本消化器癌発生学会総会（名古屋）2006年9月14-15日。
- 7) 中釜 斉、落合雅子、中島克彦、土屋直人、大腸発がん初期過程における翻訳関連因子 SND1 の関与。第17回日本消化器癌発生学会総会（名古屋） 2006年9月14-15日。
- 8) 樋口久美子、中釜 斉、ゲノム中に散在する G-rich リピート配列を安定に複製する因子の探索。第65回日本癌学会総会（横浜）、（口演）。 2006年9月28-30日。
- 9) 土屋直人、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、新規翻訳抑制因子 SND1:大腸発がん初期過程への関与。第65回日本癌学会総会（横浜）、（口演）。 2006年9月28-30日。
- 10) 落合雅子、渡辺昌俊、田澤 大、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸がんにおける  $\beta$ -catenin 遺伝子変異及び遺伝子発現プロファイルの系統差。第65回日本癌学会総会（横浜）、（口演）。 2006年9月28-30日。
- 11) 福田博政、田中悦子、杉村隆、清宮啓之、中釜 斉、hnRNP A3 のテロメア維持への関与の可能性について。第65回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。 2006年9月28-30日。
- 12) 田澤 大、土屋直人、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、ヒト大腸がん細胞株において DNA 損傷誘発剤アドリマイシン処理により発現変化する microRNA の探索。第65回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。 2006年9月28-30日。
- 13) 泉谷昌志、落合雅子、土肥多恵子、杉村 隆、中釜 斉、化学発がんモ

- デルを用いたマウス大腸腫瘍の genome-wide array CGH 解析。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 14) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がん感受性遺伝子の探索。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 15) 阿部浩一郎、近藤靖之、中西雅子、落合雅子、久山 泰、杉村 隆、中釜 斉、ゲノム網羅的なアレイ CGH を用いた PhIP 誘発ラット大腸腫瘍における遺伝子増幅、欠失の解析。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 16) 中釜 斉、ラット大腸がんモデルを用いた発がん分子機構の解明。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、シンポジウム。2006 年 9 月 28-30 日。
- 17) 土肥多恵子、川島 麗、河村由紀、中島 淳、中釜 斉、T-ヘルパー2 型サイトカインによる消化管上皮修復の遅延と発癌の促進。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（口演）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 18) 今井俊夫、福田勝洋、蓮村麻衣、曹永晚、太田世志雄、高見成昭、中釜 斉、広瀬雅雄、DMH-dextran sodium sulfate ラット大腸発がんモデルにみられる再生粘膜における  $\beta$ -catenin の異常発現。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（口演）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 19) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、安井由美子、中釜 斉、田中卓二、A/J、SM/J マウスを用いたヘテロサイクリックアミン/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第 65 回日本癌学会総会（横浜）、（示説）。2006 年 9 月 28-30 日。
- 20) Takahashi H, Ikeda I, Fujisawa T, Takayama T, Nakagama H, Nakajima A, Pilot study of chemopreventive effect of pioglitazone for CRC using aberrant crypt foci as a biomarker. 第 15 回日本消化器関連学会週間（札幌）2006 年 10 月 11-15 日。
- 21) Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H., *in vitro* DNA replication on an oligonucleotide template containing site-specific 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) adduct in the G-rich repetitive sequence. 第 18 回 DNA 複製・分配ワークショップ（熱海）2006 年 10 月 30 日-11 月 1 日。
- 22) 中釜 斉、PhIP 誘発大腸発がんモデルー初期発生から浸潤性進展まで一。第 23 回日本疾患モデル学会総会（伊香保）、（口演）。2006 年 11 月 30 日-12 月 1 日。
- 23) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用いた大腸がん感受性遺伝子の探索。第 23 回日本疾患モデル学会総会（伊香保）、（示説）。2006 年 11 月 30 日-12 月 1 日。
- 24) 泉谷昌志、落合雅子、土肥多恵子、杉村 隆、中釜 斉、化学発がんモ

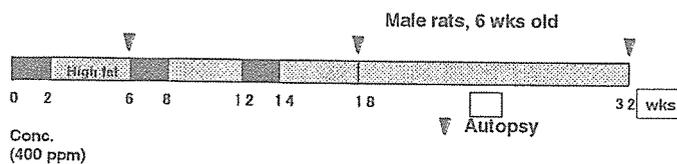
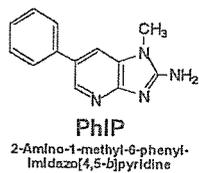
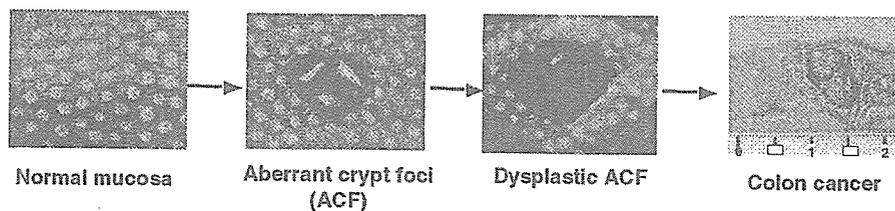
- デルを用いたマウス大腸腫瘍の genome-wide array CGH 解析。第 23 回日本疾患モデル学会総会 (伊香保)、(示説)。2006 年 11 月 30 日-12 月 1 日。
- 25) 阿部浩一郎、落合雅子、久山 泰、杉村 隆、中釜 斉、オリゴヌクレオチド CGH マイクロアレイを用いた PhIP 誘発ラット消化管腫瘍における遺伝子コピー数変化のゲノム網羅的解析。第 23 回日本疾患モデル学会総会 (伊香保)、(示説)。2006 年 11 月 30 日-12 月 1 日。
- 26) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用いた大腸がん感受性遺伝子の探索。分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋)、(示説)。2006 年 12 月 6-8 日。
- 27) 土屋直人、中島克彦、宮本 恵、細川元靖、杉村 隆、中釜 斉、RISC 複合体構成因子 SND1/Tudor-SN による翻訳制御の分子機構。分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋)、(示説)。2006 年 12 月 6-8 日。
- H. 知的財産権の出願/登録状況
1. 特許取得  
無
  2. 実用新案登録  
無
  3. その他

## Various Heterocyclic Amines (HCAs) Produced in Cooked Foods

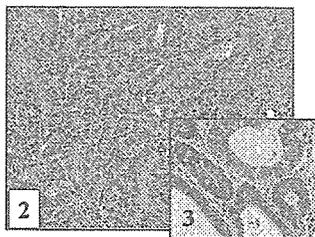
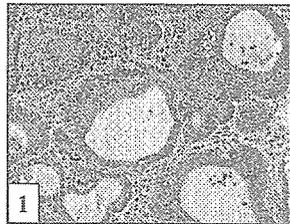
Colon carcinogen



## Sequential Progression Model from ACF to Cancer



## Histopathological Findings and Genetic Alterations Observed in PHP-Induced Colon Tumors



Tubular growth pattern (No. 1, 2), and differentiation into Paneth cells (No. 3)

*Apc* (approx. 10 - 15 %)

Exon 14 or 15  
 5'-GTGGGAT-3' to 5'-GTGGAT-3'  
 (G deletion)

Intron 10 & exon 11 junction  
 5'-tagGGGGG-3' to 5'-tatGGGGG-3'  
 (G to T)

5'-tagGGGGG-3' to 5'-tagGGGG-3'  
 (G deletion)

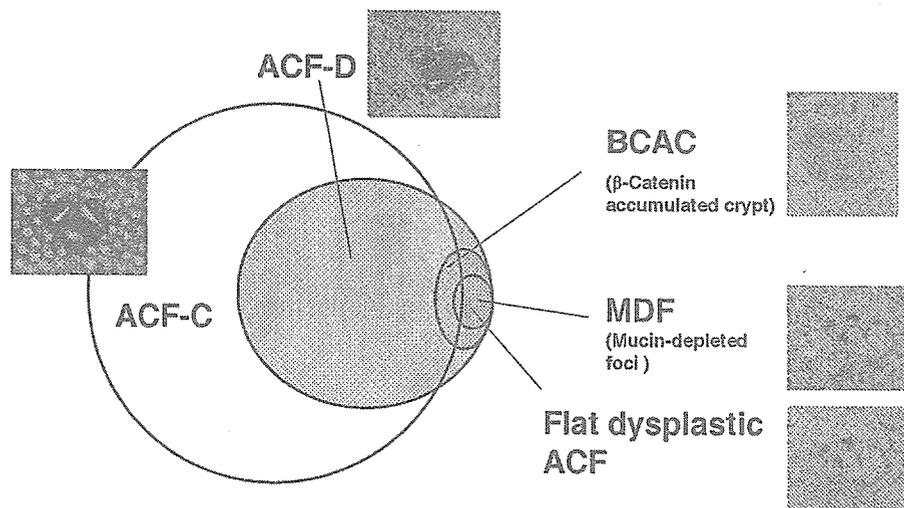
*β-catenin* (25 - 50 %)

Codons 32, 34, 36, 37, 38 (mainly G to T/A)

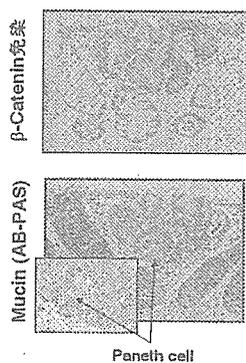
➡ Accumulation of *β-catenin*  
 Paneth cell dis differentiation

*K-ras* and *p53* mutations are rarely observed.  
 Genomic instability (MSI) is not evident.

## Histopathological Relationship among Various Precancerous Lesions in the Colon



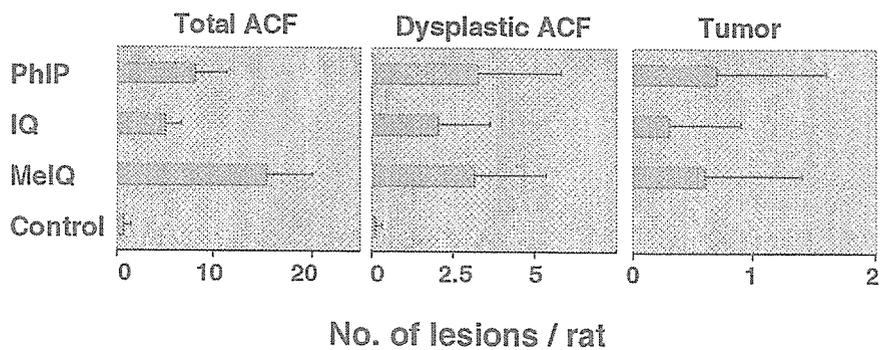
### Mutation Spectra in the $\beta$ -catenin Gene Observed in Dysplastic ACF and Colon Tumors induced by PhIP



病変	変異スペクトラム			変異が検出された病変の数	解析した病変の数
	コドン	変異タイプ	アミノ酸置換		
Dysplastic ACF	32	GAT → GGT	Asp → Gly	1	29
	34	GGA → GTA	Gly → Val	5	
	36	CAC → TAC	His → Tyr	1	
Tumor	32	GAT → AAT	Asp → Asn	1	6
	34	GGA → GTA	Gly → Val	2	
		GGA → GAA	Gly → Glu	1	
	36	CAC → GCC	His → Pro	1	
	38	GGT → CGT	Gly → Arg	1	

Histopathological features of dysplastic ACF

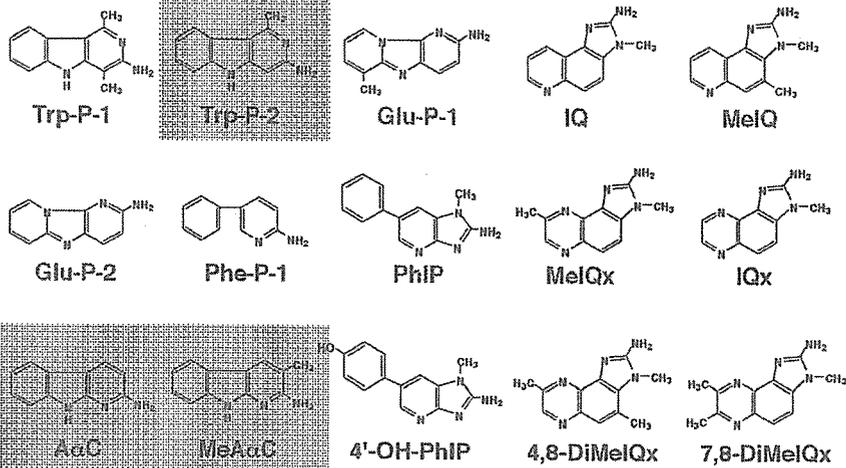
### Numbers of Dysplastic ACF, but Total ACF, induced by PhIP, IQ and MeIQ Well Represent Their Carcinogenic Potentials in the Colon



## Various Heterocyclic Amines (HCAs) Produced in Cooked Foods

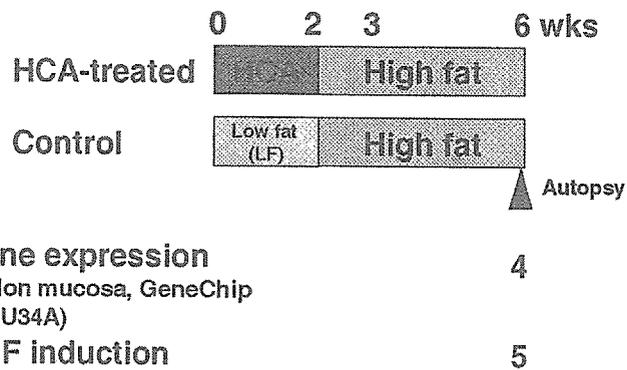
Colon carcinogen

Colon non-carcinogen

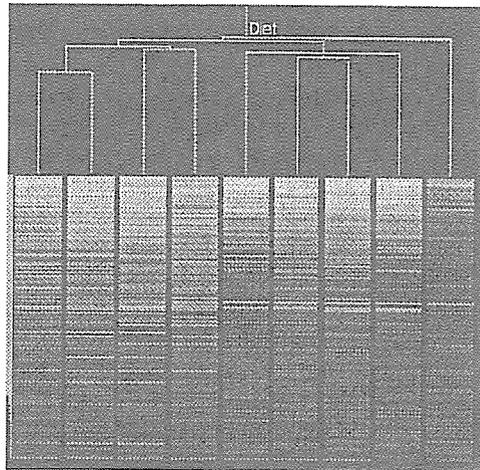


## Experimental Design

F344 male rats (6 wks old)



## Hierarchical Gene Expression Clustering (I)

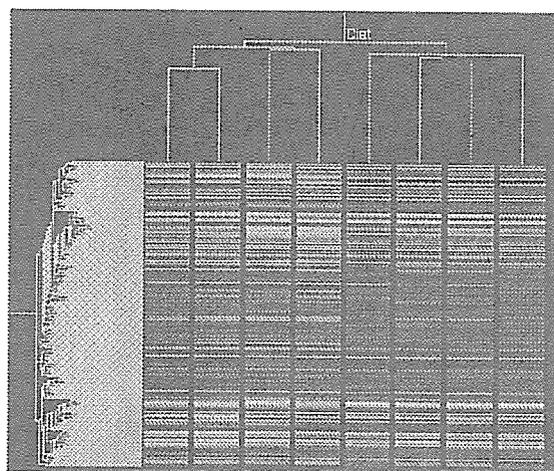


4687 genes were used for the analysis. The flags of selected genes were presence or marginal in more than one sample out of 41 samples

In IQ-treated group, the expression levels were low on the whole compared to those in other HCA- treated and untreated groups.

AoC  
MeAoC  
LF  
PhIP  
Glu-P-1  
MeIQx  
Trp-P-2  
MeIQ  
IQ

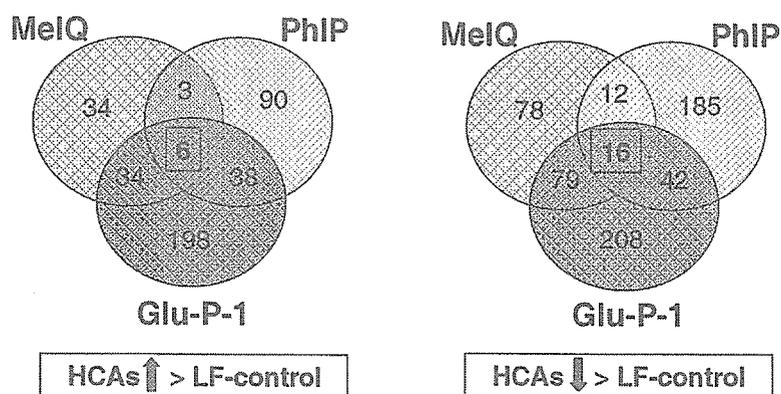
## Hierarchical Gene Expression Clustering (II)



4663 genes were used for the analysis. The flags of selected genes were presence or marginal in more than one sample out of 37 samples

AoC  
MeAoC  
LF  
PhIP  
Glu-P-1  
MeIQx  
Trp-P-2  
MeIQ

Number of Genes Commonly Up- or Down-regulated by PHIP, MeIQ and Glu-P-1



(1-Way ANOVA;  $p < 0.05$ )

Six Genes Commonly Up-regulated in PhIP, MeIQ and Glu-P-1-treated Colon Epithelium of F344 Rats

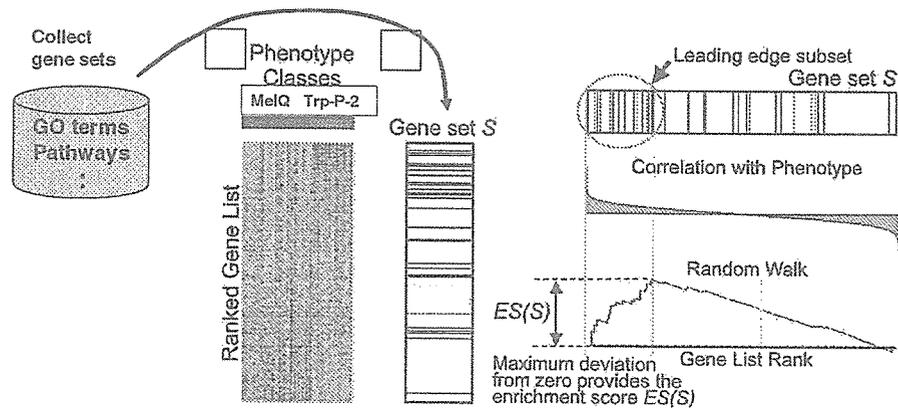
		MeIQx		AαC	MeAαC
L13025UTR	Rattus norvegicus mRNA, 3' end GAA-triplet repeat	+			
J01435cgs	Rattus norvegicus mitochondrial cytochrome oxidase subunits (Cox1)	++			
M81920	Rat mucin-like protein mRNA	++		+	+
rc_AA893485	Unkown Glu-Pro depeptide repeat protein	++		±-+	
U02506UTR	Rattus norvegicus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	+		±	±
X06801cgs	Rat mRNA for vascular alpha-actin	+++		++	+++

+++ > 10-fold; ++ > 3-fold; + > 2-fold; ± > 1.5-fold

### 16 Genes Commonly Down-regulated in PhIP, MeIQ and Glu-P-1

		MeIQx	Trp-P-2	AαC	MeAαC
rc_AI639342	ESTs, highly similar to YS64	+		+	+
rc_AI103911	ESTs, highly similar to Ubiquitinol-	+		+	+
rc_AA859806	ESTs	+			
D83796	UDP glycosyltransferase 1 family	+		±	±
rc_AA891422	Hypoxia induced gene 1 (HIG1)	+		±	±
rc_AA804330	Calmodulin-depend. protein kinase II	+		±	+
M94918mRNA	Rat beta-globin gene 1	±			±
rc_AA684641	ESTs	±		+	±
L07073	Adaptor-related protein complex AP3	+		±	+
M15562	Rat MHC class II alpha chain RT1.D	+			
rc_AI176491	ESTs	+		±	±
rc_AA944324	ADP-ribosylation factor 6	+			
rc_AA893147	ESTs	++		+	++
rc_AI172017	Aldehyde dehydrogenase 2 (mt)	+		+	+
AB010467	mRNA for MDR-associated protein			+	+
D90265	Proteasome subunit alpha type 1	+		±	±

### Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)



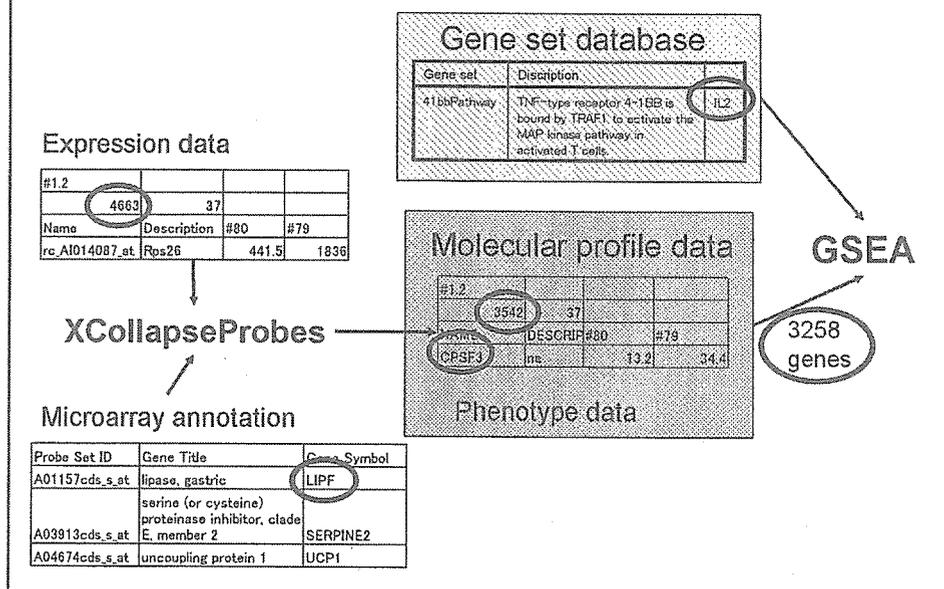
Subramanian et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550

## The sources for Functional Set (C2)

- BioCarta: [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com).
- Signaling pathway database: [www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/menu.html](http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/menu.html).
- Signaling gateway: [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org).
- Signal transduction knowledge environment: <http://stke.sciencemag.org>.
- Human protein reference database: [www.hprd.org](http://www.hprd.org).
- GenMAPP: [www.genmapp.org](http://www.genmapp.org).
- Gene ontology: [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org).
- Sigma-Aldrich pathways: [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Key\\_Resources.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources.html).
- Gene arrays, BioScience Corp.: [www.superarray.com](http://www.superarray.com).
- Human cancer genome anatomy consortium: <http://cgap.nci.nih.gov>.

Subramanian et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550

## GSEA for Comprehensive Gene Expression Data of Rats; Generation of Functional Set (C2) of Rat version



## Number of Gene Sets Used for GSEA

-Comparison of Carcinogenic and Non-carcinogenic HCAs in the Colon-

	No. of probes	No. of genes applied to GSEA	No. of gene set used GSEA	
			≥ 10	≥ 15
<b>Original<sup>*1</sup></b>			<b>429</b>	<b>328</b>
<b>RG-U34A</b>	<b>8800</b>	<b>6256</b>	<b>300</b>	<b>191</b>
<b>Analyzed<sup>*2</sup></b>	<b>4663</b>	<b>3258</b>	<b>218</b>	<b>126</b>

<sup>\*1</sup>; Fictional set (C2) of human contained 522 gene sets.

<sup>\*2</sup>; The flags were presence or marginal in more than one sample out of 37 samples.

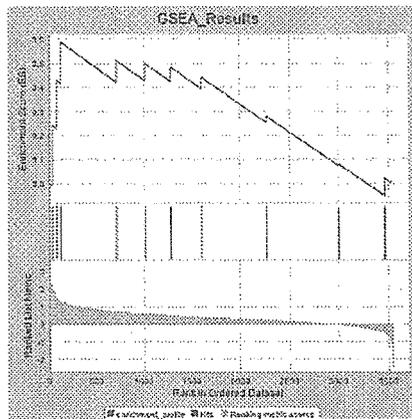
## Comparison of Carcinogenic and Non-carcinogenic HCAs in the Colon by GSEA

Trp-P-2 ↔ MeIQx, Glu-P-1, MeIQ, PhIP

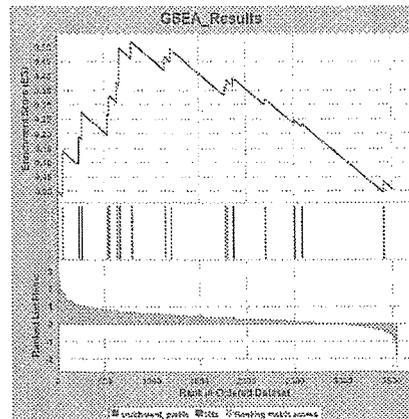
MeAαC ↔ AαC

LF ↔ Trp-P-2, MeIQx, Glu-P-1, MeIQ, PhIP, MeAαC, AαC

## Enrichment Score and the Leading-edge Subsets in MeIQ vs Trp-P-2



Inflammatory response pathway



Erk pathway

## Leading-edge Subset of Genes involved in Inflammatory Response and Erk Pathways

(a) Inflammatory Response

- FN1
- COL3A1
- COL1A1

(b) Erk pathway

- PDGFRA
- HRAS
- NGFB
- RAF1
- GNAS
- PPP2CA
- GRB2
- MAP2K1
- RPS6KA1

## Gene Sets and their FDR q-value of Those Enriched in Trp-P-2 Phenotypes

Gene set	No. of genes	Size of gene set	Trp-P-2 > PhIP		Trp-P-2 > Glu-P-1
			≥ 10	≥ 15	≥ 15
cell_growth_and_or_maintenance	14		0.00199		
MAP00910_Nitrogen_metabolism	10		0.03428		
ST_JNK_MAPK_Pathway	11		0.04583		
HEMO_TF_LIST_JP	24		0.07873	0.16873	
MAP00230_Purine_metabolism	26		0.1239	0.143138	
par1Pathway	10		0.14213		
vegfPathway	19		0.21316	0.235336	
cell_adhesion	34		0.21975	0.176604	
ptdinsPathway	16		0.2293	0.204085	
Electron_Transport_Chain	42				0.195

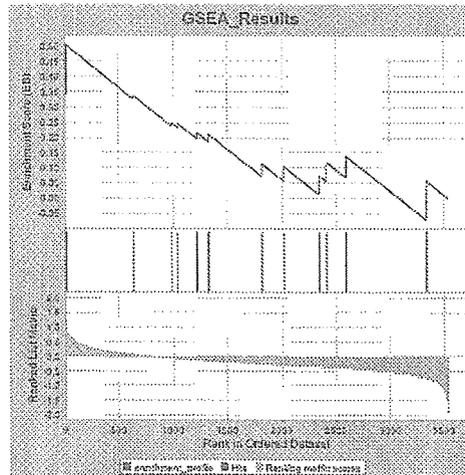
FDR q-value < 0.25 and Normal *P* value < 0.05

## Preneoplastic Lesions Induced in the Colon by PhIP, Trp-P-2, MeAαC and AαC

Compounds	No of rats	Dose (ppm)	ACF	ACs/ACF	Dysplastic ACF
PhIP	10	400	2.7 ± 1.5	2.3 ± 1.2	~1.0
Trp-P-2	4	400	2.8 ± 1.5	3.6 ± 1.0	1.3 ± 1.5
MeAαC	4	400	2.0 ± 1.2	2.3 ± 0.9	1.5 ± 1.3
AαC	4	500	0	0	0

\* N.A.; Data not available

## Enrichment Score and the Leading-edge Subsets in MeA $\alpha$ C vs A $\alpha$ C



ST Interleukin 4 pathway

FDR q-value = 0.25 and Normal P value < 0.001

## Summary

- In order to elucidate the differences of biological properties between Trp-P-2 and other colon carcinogens, we conducted detailed gene expression analysis using GSEA with functional gene set (C2).
- Four gene sets (erkPathway, RAP DOWN, and Inflammatory\_Response\_Pathway, sppaPathway, ) were identified in common as enrichment phenotypes in colon epithelium treated with MeIQ or MeIQx compared to those treated with Trp-P-2.
- Enrichment phenotype in MeA $\alpha$ C-treated colon epithelium compared to A $\alpha$ C is ST Interleukin 4 Pathway (FDR q-value; 0.100).
- Genes involved in cellular stresses and inflammatory responses could have a substantial impact on chemically-induced colon carcinogenesis.

厚生労働科学研究費補助金(トキシコゲノミクス研究事業)  
分担研究報告書

恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長  
協力研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所・病理部第二室長

研究要旨

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究課題として、恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析、及びその検証に必要な生物学的基礎研究を行った。具体的なテーマとして、(1)恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究と(2)発がんプロモーション過程における甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析を設定した。

エピジェネティック制御機構障害研究については、本研究で構築した胎児神経幹細胞の2種類の基盤データベース(胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベース、発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース)を活用し、経胎盤的に AzaC を暴露した胎児終脳の Percellome 解析を行った。その結果、AzaC によりインターフェロン応答遺伝子群の発現が上昇すること、それが Stat1 遺伝子プロモーターに存在する CpG island の脱メチル化がきっかけになっている可能性があることを明らかにした。発がんプロモーション研究については、抗甲状腺作用に続くネガティブフィードバックにより分泌される TSH により甲状腺濾胞上皮の腫瘍性増殖を促進する kojic acid (KA)を用いて、DHPN 誘発ラット甲状腺発がんモデルでの KA による発がんプロモーションの結果生じた増殖性病変、即ち、濾胞上皮限局性過形成 (FFCH)、腺腫、腺がんでのマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、「非腫瘍部」に比し、「FFCH+腺腫」または「腺がん」で 5 倍以上の発現の増減を認めた遺伝子を複数同定し、KA による腫瘍進展過程に、鉄や銅の輸送亢進、IL-6 が関与する補体の活性化、がん抑制作用の破綻や癌遺伝子の活性化の関与する可能性があることを明らかにした。

A. 研究の目的

(1)恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

個体を構成する細胞はその種類に応じて

異なる特性を示すが、ゲノム DNA は同じである。特性の違いは遺伝子発現パターンの差異によって生じ、エピジェネティック制御機構がその基盤となる。エピジェネティック制御機構には、ゲノム DNA の修飾を介する

ものや、クロマチンを構成するヒストン蛋白質の修飾を介するものがあり、どちらも化学物質による影響を受けることが知られている。よって、個体が外来性化学物質に対抗して恒常性を維持するためには、このエピジェネティック制御機構が適切に機能し、細胞の特性が維持されることが必須である。

エピジェネティック制御機構の中でも、ゲノムDNAの修飾を介する制御は、遺伝子発現のオンオフを恒久的に制御する特に重要性の高い制御機構であり、シトシン塩基のメチル化修飾を介することが知られている。このシトシン塩基のメチル化修飾は、臓器の形成・機能に必要な異なる特性の細胞を生み出す「幹細胞」の機能制御にとって必須である。殊に、神経幹細胞にこの異常が誘発されると、適切な神経系細胞の供給が行えなくなり、中枢神経系に恒久的な影響が残る可能性がある。しかし、メチル化修飾を攪乱する化学物質は、その毒性学的な重要性にもかかわらず、分子メカニズムの詳細は不明な点が多く、分子毒性基盤の整備は未だなされていない。

そこで、マウス胎児由来の神経幹細胞をモデルとして用い、シトシン塩基脱メチル化剤として知られる 5-アザシチジン (AzaC) を神経幹細胞に暴露することで、神経幹細胞の機能制御における DNA メチル化の役割を、我々の開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析の結果を通して検討し、メチル化修飾を攪乱する化学物質の神経幹細胞への影響の分子メカニズムを解明することを目的とした。

## (2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

医薬品として開発された化学物質の中にしばしば見受けられる発がん物質は、各種遺伝毒性試験で明らかな遺伝子傷害性を示さず、その機序が殆ど不明な非遺伝子傷害性のものが多い。

発がんの初期過程は、イニシエートされた細胞が組織臓器の構成成分としての恒常性を破綻させて、自律性の増殖形質を獲得することを起点としているが、その細胞環境に多大な影響を受ける。変異原性の知られていない医薬品等の動物に対する長期投与でしばしばみられる発がん性は、このような恒常性の破綻によって生じるものが殆どであると考えられているが、化学物質固有の生体反応性から、がん化に至る反応性を弁別するのは、初期病変と発がんの母地を区別して解析する必要があるため、現在まで殆ど研究が進んでいない。

本研究では、がん病変とその発生母地での網羅的遺伝子発現解析を行い、投与された化学物質による発がん過程特異的に誘起される遺伝子群の同定を行う。また、発がんに寄与しない化学物質特異的な遺伝子発現と弁別するために、イニシエーションの有無での遺伝子発現プロファイルと比較し、がんの発生に必要なプロファイルを同定する。このプロファイルを基に発がんに寄与する主要なメカニズムを同定する。標的臓器は肝臓と甲状腺とし、それぞれについて強力な発がんプロモーション作用を示す

phenobarbital (PB), kojic acid (KA)を用いる。部位特異的な発現解析手法として、独自に開発したパラフィン包埋切片中の微量組織からの定量的 RNA 発現解析を可能とするメタカーン固定法を用い、マイクロダイセクション法によりがん病変(あるいは前がん病変)と非がん部を分けてマイクロアレイ解析を行う。

平成 17 年度までに、PB による肝発がん早期過程での検索と同様、KA のプロモーションによる甲状腺発がん機序を解明するために、プロモーション過程早期(投与 4 週目)に特異的に発現変動する遺伝子群の同定をマイクロアレイ法により行った。平成 18 年度は更に、KA によるプロモーションの結果生じた甲状腺の増殖性病変を対象として、マイクロダイセクション法を利用して、特異的に発現変動する遺伝子群を検索し、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行った。

KA は Aspergillus、Acetobactor、Penicillium 等のカビにより生成される代謝物質で、日本では古くからみそや酒の発酵食品の生産に用いられてきた。本物質は静菌作用の他、シイタケチロシナーゼやポリフェノールオキシダーゼの阻害作用を有し、生エビやカニ等の変色防止の他、美白剤として用いられてきた。この物質は、抗甲状腺作用を示すが、その作用は、甲状腺でのヨード取り込みと有機化の抑制に起因した甲状腺ホルモン合成抑制によることが報告されている。また、本剤はラット甲状腺に対し発がん性を示し、ラット甲状腺二段階発がん

モデルにおいて、イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を投与した後、本剤の連続投与により、4 週目から甲状腺濾胞上皮細胞の過形成や腺腫が誘発され始め、その進展には血清中の高い甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルが重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、その進展過程での分子機序はほとんど解明されていない。

## B. 研究の方法

### (1) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

#### 胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベースについて

本データベースは、マウス(C57BL/6CrSlc)胎生 10.5 日から 16.5 日まで連日胎児終脳を雌雄に分けて採取し、国立衛研・毒性部において分担研究者らが開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析法によってデータを取得し構築したものである。サンプルは各群 3 サンプルとし、DNA マイクロアレイはアフィメトリクス社 GeneChip Mouse Genome430 2.0 (約 45000 プローブセット)を用いた。

#### 発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース

本データベースは、胎児発達に伴い神経幹細胞の分化能が成熟していくことを踏まえ、基盤データベースとして発生時期の異なる胎児脳の神経幹細胞の遺伝子発現を網羅