

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び感受性要因の
解明とその臨床応用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 齊

平成19（2007）年4月

目次

I. 総括研究報告	
疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び 感受性要因の解明とその臨床応用	1
中釜 斉	
II. 分担研究報告	
1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性および修飾要因の解明	15
中釜 斉	
2. リンパ腫感受性遺伝子の単離と発がんリスク予測	21
木南 凌	
3. トランスジェニックラットを用いた胃がん感受性候補遺伝子の解析	28
山下 聡	
4. 短期マウス大腸発がんモデルを用いた発がん感受性要因に関する研究	32
杉江 茂幸	
5. 遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究	36
庫本 高志	
6. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明	39
中島 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働省科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び感受性要因の解明とその臨床応用

主任研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 生化学部 部長

研究要旨

発がんモデル動物の構築と、これらを用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構や発がん感受性要因の解明に相補的かつ不可欠な役割を担っている。加熱した魚肉食品に含まれる発がん物質 PhIP によるラット誘発大腸がんモデルを用い、種々のラット系統を用いた ACF 誘発性とハプロタイプ解析を行い、大腸発がん感受性遺伝子の局在候補領域を約 2 Mb に限定化した。該当領域にマップされる遺伝子の発現解析により候補遺伝子を選定している。ラット大腸腫瘍のアレイ CGH による copy number aberration (CNA) のゲノム網羅的解析により、系統特異的に copy 数が増加している領域を同定した。大腸がん初期発生に寄与する新たなゲノム領域である可能性が示唆された。大腸初期病変である non-dysplastic ACF で発現上昇している *Snd1* は、細胞傷害性ストレスへの応答反応に関与している可能性が示唆された。DSS 併用マウス大腸がんモデルにおいて、非大腸発がん物質 NKK の前処理による大腸発がん促進作用を見出した。非大腸発がん物質の曝露が炎症発がんの修飾要因である可能性が示唆された。ヒト潰瘍性大腸炎でメチル化レベルが上昇している *Esrl* は、AOM および DSS を投与したラット大腸分離腺管においてもメチル化レベルが上昇していた。リンパ腫抑制遺伝子として同定された *Bcl11b* が、*Apc*^{fl/fl} マウスでの腸管腫瘍発生の修飾因子として新たに見出された。ヒト下部大腸に認められる dysplastic ACF の個数が卵巣、特に内臓副型卵巣と強く相関することが分かった。また、胃がん抵抗性候補遺伝子 *Crabp2* のトランスジェニックラット (Tg) における、MNG による胃幽門腺管傷害後の細胞増殖は、Tg と野生型と有意差がなかった。さらに、放射線照射後のマウス萎縮胸腺では、クローナル増殖する大型リンパ球が持続的に存在し、これがリンパ腫前駆体細胞の候補と考えられた。照射後の再生胸腺内での大型リンパ球の貯留の長短を介する、*Mtf-1* のリンパ腫発症へ関与が示唆された。新規の変異ラットの作成では、ENU ミュータジェネシスにより G1 ラット計 1,735 頭分のミュータントアーカイブを作製し、*Apc* 遺伝子にストップコドン変異 (S2522X) を持つ *Apc* 遺伝子ノックアウトラットを樹立した。

分担研究者

中釜 斉 国立がんセンター研究所 部長
木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授
山下 聡 国立がんセンター研究所 主任研究官
杉江茂幸 金沢医科大学 教授
庫本高志 京都大学医学研究科 助教授
中島 淳 横浜市立大学医学部 準教授

における遺伝子変異、発現変化及びゲノム変化の解明、発がんに対する環境及び遺伝的修飾要因の同定、個々人の発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。さらに、得られた成果を、がんの早期診断や遺伝子情報に基づいたテーラーメイドのがん予防策の構築、がんの新規治療薬・予防薬開発のための標的となる候補分子の同定などへの臨床応用を目指している。具体的な研究課題としては、大腸、胃、リンパ腫発がんの発がんの感受性及び抵抗性を規定する候補遺伝子の局在を限定化し、責任遺伝子を同定する。感受性の候補遺伝子として同定されたものに関しては、細胞増殖な

A. 研究目的

本研究では、発がんの動物モデルを用いて、消化器がんを中心としたがんの初期発生及び進展過程

どへの関与を解析し、ヒトがん発症への関与についても検討を開始する。また、オリゴヌクレオチドアレイを用いて、大腸がん等の初期発生や浸潤性進展過程に重要な役割を果たしているゲノム変化を突き止め、責任遺伝子を同定し、これら遺伝子のヒトがんの早期診断マーカーとしての有用性についても検討する。さらに、ミュータジェネシスの方法で、APC及びp53遺伝子等のがん関連遺伝子の変異ラットを樹立し、発がんの分子機構の解明と、新規のがん治療薬や予防薬の開発に有用な疾患モデルの開発を目指す。

B. 研究方法

(1) 大腸発がん感受性候補遺伝子 *Sct* の候補領域の限定化及び発現解析による探索

Sct の局在候補領域を、種々のラット系統を用いたACF誘発性の検討とハプロタイプ解析により限定化した。更に詳細にハプロタイプ解析するために、データベースのラットゲノム情報から、マイクロサテライト多型マーカーを新規に設定した。18種類のラット系統を用い、ACFの誘発性を検討し、ハプロタイプ解析による遺伝多型との相関性について検討した。限定化した該当領域に存在する遺伝子をラットゲノム情報から選択し、遺伝子発現解析により候補遺伝子の探索を行った。親系統であるF344及びACIラットに、PhIP含有飼料もしくは基礎飼料を投与し、投与開始から0、1及び2週後にラット正常大腸粘膜を採取し、RNAを抽出し、定量的RT-PCR法により解析した。

(2) DSS併用AOM誘発マウス大腸発がんモデルにおける大腸上皮遺伝子発現の網羅的解析

ICRマウスを用いてAOM誘発DSS併用(2%、1週間)モデルにより実験開始後5、10週の大腸非腫瘍部上皮RNAを用いて、DNAマイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を解析した。

(3) ラット大腸腫瘍のアレイCGH(aCGH)解析

F344及びACIラットにPhIPで誘発された大腸腫

瘍及び周囲の正常大腸上皮よりDNAを抽出し、185K Rat Genome CGH microarray (Agilent Technologies)を用いてcopy number aberration(CNA)についてゲノム網羅的な解析を行った。得られたデータの統計学的解析は、CGH Analytics (Agilent)を用いて行った。

(4) ヒト大腸がん細胞株RKOでのPhIP活性化体処理(細胞傷害性ストレス)によるSND1の発現誘導

Snd1は、大腸初期病変であるnon-dysplastic aberrant crypt foci(ACF)の段階から高発現している。発がんの初期過程において重要である細胞傷害性ストレスに対する応答へのSnd1の関与を検討するために、PhIPの活性化体であるアセチル化PhIP(PhIP-OAc)を5もしくは50 μ Mの濃度で、ヒト大腸がん細胞株RKOを処理し、処理後8もしくは24時間後におけるSND1及びp53蛋白質の発現誘導をimmunoblot法で解析した。

(5) DSS併用AOM誘発マウス大腸発がんモデルにおけるNNKの修飾作用の検討

A/Jマウスを用いて、NNK投与1週間後から、AOM誘発DSS併用(1.5%、1週間)モデルを適用し、実験開始22週間後に全臓器について腫瘍の有無を検索し、NNK非投与群、NNK単独投与群と比較検討した。

(6) AOMとDSSを投与したラット大腸における遺伝子のメチル化レベルの解析

F344ラットにAOMを投与後、DSS(1%、1週間)を投与し、投与開始から28週間後に、大腸腺管を分離し、また大腸腫瘍を採取した。ヒト潰瘍性大腸炎でのメチル化が報告されている5遺伝子、ラット前立腺癌細胞株でメチル化していた14遺伝子について、定性的なmethylation-specific PCR(MSP)法でスクリーニング後、リアルタイムMSP法によりDNAメチル化レベルの定量解析を行った。

(7) *Apc*^{Min}マウスと*Bcl11b*-KOのダブルヘテロマウスの自然発生大腸発がん実験

Apc^{fln}マウスと *Bcl11b*-KOヘテロマウスを交配し、産仔について、変異*Apc*及び *Bcl11b* 遺伝子型の違いにおける腸管腫瘍発生への影響を観察した。

(8) ヒト ACF の下部消化管拡大内視鏡による観察

横浜市立大学病院にて下部消化管内視鏡検査を受けた400例に対して、通常下部消化管内視鏡検査後、メチレンブルーで2分間染色し、下部直腸のACFを観察した。同意の得られた50例に対し問診、採血、腹部CT検査を行い、ACFの個数と年齢、身長、体重、ウエスト、BMI、糖尿病罹患歴、HbA1c、血糖、HOMA-IR、Tcho、TG、CRP、L/S比、内臓脂肪、皮下脂肪の相関を、さらにIGF-1、レプチン、アディポネクチンなどのアディポサイトカインについても相関を解析した。

(9) 胃発がん感受性候補遺伝子の *Crabp2* のトランスジェニック (Tg) ラットの胃幽門腺管における細胞増殖の解析

雄ACI-Tgおよび野生型ACIラット各15匹にMNNG(83mg/ml)を2週間飲水投与した。BrdU投与後、屠殺し、胃幽門腺の腺管を分離し、BrdU陽性細胞数をFACS解析にて定量した。

(10) マウスの放射線発がん実験

BALB/cコンジェニックマウスをMSMマウスと交配し、そのプロジェニーに対してγ線、2.5Gyを4回照射した。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸の有無で判定した。

(11) FACS解析による胸腺細胞の性質の検討

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: dichlorofluorescein diacetate)を用い、細胞増殖能の測定はBrdU取り込みを利用し、FACSscanで蛍光を測定した。

(12) 第5番染色体上に存在するマウスリンパ腫の発がん抵抗性を規定する候補遺伝子の探索

第5番染色体上に抵抗性系統であるMSMマウス染色体を、D5MIT112~D5MIT365(約30Mb)とD5MIT204~

D5MIT158(約36Mb)の領域で持つサブコンジェニックマウス2系統を作製して、リンパ腫発症実験を行った。

(13) ラットのENUミュータジェネシス及びミュータントアーカイブの構築

雄F344ラットにENUを投与し、F344雌ラットと交配させた。雄のG1産子から、離乳時に尾の一部を採取し、DNAを抽出してDNAバンクを、12週齢時に精子を採取し、精子バンクを構築した。

(14) がん関連遺伝子変異ラットの探索

*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、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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各大学や研究機関の定める動物実験に関する規約を遵守し、動物実験に関する倫理審査委員会で承認を得た上で実施した。内視鏡検査は横浜市立大学附属病院の定める規約を遵守し、検査による苦痛には十分な配慮を払った。問診、採血、腹部CT検査については、その有用性と危険性を説明し、同意の得られた場合にのみ行った。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん感受性候補遺伝子 *Sct* の候補領域の限定化及び発現解析による探索

18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1匹当たり5個以上のACFを誘発し(高感受性)、PVG/Seac, LEA, ACI/N, DRH/Seac, NIG-IIIの5系統は1匹当たり1個以下のACFしか誘発しなかった(低感受性)。DON, WKAH/Hkm, F344, DA, BN, WKY/NCr1Cr1j, KND, LE/Stmの8系統は中等度の感受性を示した。新たにマイクロサテライトマーカーを設定し、更に詳細なハプロタイプ解析を行った結果、AU048089~D16Rat129近傍とD16Mgh6の近傍の

領域において、ACF 誘発性と遺伝多型との相関性が見出された。限定化した *Sct* 遺伝子の局在領域 (AU048089-D16Mgh6, 約2Mb) にマップされた遺伝子をラットゲノム情報から 10 数個選定し、親系統である F344 及び ACI 系統の正常大腸上皮の RNA を用いて遺伝子発現解析を行い、PhIP 投与時もしくは非投与時において両系統で発現に違いのある遺伝子の有無を検討した。PhIP 投与時に、系統特異的に発現誘導される遺伝子が、候補遺伝子の一つとして示唆された。

(2) DSS 併用 AOM 誘発マウス大腸発がんモデルにおける大腸上皮の遺伝子発現の網羅的解析

ICR マウスを用いた DSS 併用 AOM 誘発マウス大腸発がんモデルにおける非腫瘍部大腸上皮における遺伝子発現を網羅的に解析した。DNA マイクロアレイにより、遺伝子発現変動を実験開始後 5、10 週で検討した。*Wif1* (Wnt inhibitory factor 1)、*Plat* (plasminogen activator)、*Myc*、*Plscr2* (phospholipase A2, group IIA) が著明に上昇し、*Pparbp* (peroxisome proliferator activated receptor binding protein)、*Tgfb3* (transforming growth factor beta3)、*Ppar γ* が低下していた。

(3) ラット大腸腫瘍のアレイ CGH (aCGH) 解析により示唆された発がん感受性遺伝子の新たな局在候補領域

F344 及び ACI ラットに PhIP で誘発された大腸腫瘍の CAN を、オリゴヌクレオチドアレイを用いてゲノム網羅的に解析した。F344 ラットに誘発された 4 個の腫瘍 (1 個は小腸腫瘍) においては、2 番染色体上に、正常組織に比較して copy 数の増加が検出された約 0.4 Mb の領域が認められた。低感受性である ACI に誘発された腫瘍においては、当該領域での copy 数の変化は認められなかった。この領域に存在する遺伝子が、F344 と ACI の大腸発がん感受性の違いに寄与している可能性が示唆された。

(4) ヒト大腸がん細胞株 RKO での PhIP 活性化体処理 (細胞傷害性ストレス) による SND1 の発現誘導

大腸発がん物質である PhIP の活性化体を細胞に導入することにより、SND1 遺伝子発現は一過性に上昇することを見出した。これらの結果は、SND1 が発がん物質曝露など、細胞傷害性ストレスに応答する因子のひとつであることを示唆する。

(5) DSS 併用 AOM 誘発マウス大腸発がんモデルにおける NNK の促進作用

A/J マウスを用いて、NNK の前投与による AOM 誘発 DSS 併用モデルでの大腸発がんに対する修飾作用を検討した結果、大腸において、腺癌担動物数、腺癌、全腫瘍の平均個数において NNK の促進効果が認められた。NNK 単独投与では大腸腫瘍は誘発されなかった。

(6) AOM 及び DSS を投与したラット大腸における遺伝子のメチル化レベルの解析

AOM 及び DSS を投与したラット大腸分離腺管における DNA メチル化を、ヒト潰瘍性大腸炎での DNA メチル化が知られている遺伝子 5 個 (7 部位)、ラット前立腺癌細胞株でメチル化していた遺伝子 14 個について定性的な MSP で解析した。*Esr1* の exon 2 が DSS 処理と未処理とで異なるメチル化程度を示し、12 個の腫瘍で全てメチル化を示した。リアルタイム MSP により定量解析を行った結果、AOM および DSS を投与したラット大腸分離腺管肛門側において、*Esr1* (exon 2) のメチル化レベルが有意に上昇 (対照 0.2%、投与群 1.5%) していることを見出した。

(7) *Apc^{flin}* マウスの自然発生大腸発がんに対する *Bcl11b* 遺伝子の修飾作用

Apc^{flin} マウスにおける *Bcl11b* 遺伝子型の違いによる腸管腫瘍発生への影響を調べた。18 週令マウスにおける腸管腫瘍発生を調べた。*Apc* が野性型の場合は、*Bcl11b* 遺伝子型に関係なく全く腫瘍は観察されなかった。*Apc^{flin}* がヘテロであるマウスでは、*Bcl11b* が野生型の場合は、平均腫瘍個数は 6.0、ヘテロ型は 14.5 と有意に上昇していた。腫瘍のサイズに有意な差はなかった。

(8) ヒト dysplastic ACF と内臓脂肪型肥満との関

連

下部消化管拡大内視鏡を行った400例のうち、同意の得られた50例に対しては、問診、採血、腹部CT検査を行い、ACFの個数と各種臨床データとの相関及びアディポサイトカインについての相関性を検討した。その結果、dysplastic ACFと肥満、特に内臓脂肪型肥満に強い相関が認められた。

(9) 胃発がん感受性候補遺伝子 *Crabp2* のトランスジェニック (Tg) ラット胃幽門腺管における MNNG 処理後の細胞増殖の解析

Crabp2 の Tg ラットを用いて、MNNG 二週間投与時における胃幽門腺管における細胞増殖をフローサイトメーターで計測した。MNNG 投与により、BrdU 標識細胞の割合が Tg で 1.8% から 9.6% に、野生型で 2.2% から 11.8% に増加していたが、Tg ラットと野生型とでは有意な差がなかった。

(10) 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫発症における前リンパ腫細胞の候補としての大型リンパ球の解析

放射線 4 回分割照射 80 日後の萎縮胸腺の胸腺細胞の性質を検討した。FACS 解析により、8 例中 2 例の胸腺で正常胸腺の大半を占める小型リンパ球に混じって、大型リンパ球の出現が示された。また、高い ROS 量を持つ細胞の割合が上昇し、大型リンパ球が高い ROS 濃度を持つことが示唆されたが、大型リンパ球は BrdU 取り込み能が低かった。VDJ 組換えパターンは、大型リンパ球の出現した萎縮胸腺に認められた。照射後 40 日と 100 日の胸腺において、大型リンパ球が出現した萎縮胸腺の割合は、40 日で 6 例中 3 例、照射後 100 日で 14 例中 7 例であり、VDJ 組換えパターンが単一である萎縮胸腺の割合も大きな変化はみられなかった。この大型リンパ球が前リンパ腫細胞の候補と考えられた。

3Gy 一回照射後 30 日の胸腺では、VDJ 組換えのパターンは正常胸腺と違いが認められなかった。クローナルな増殖を示す細胞の存在を、Nested-PCR 法による *Rit1/Bcl11b* の内部欠失の有無で検討した結果、割合としては少ないが、約半分の胸腺で内部欠失が観察され、クローナルな増殖をする細胞の存在が示された。

(11) 大型リンパ球の胸腺内貯留に対する *Mtf-1* 及び *Bcl11b* の遺伝子型の影響

BALB/c (C; 感受性) 系統と、BALB/c に約 3Mbp の MSM マウス (M; 抵抗性) 由来 *Mtf-1* 遺伝子座領域を導入したコンジェニックマウス (ヘテロ型) を交配した。C/M 型および C/C 型の MTF-1 型を持つ 2 種類のプロジェニーに 3Gy の γ 線を照射し、照射後 7 日目の胸腺細胞の細胞数と ROS 量を両系統間で比較した。感受性系統 (C/C) は抵抗性系統 (C/M) に比べ、高い ROS 活性をもつ大型リンパ球を多く胸腺内に存続させた。発がん感受性を与える *Bcl11b* 遺伝子のヘテロ型マウスでは大型リンパ球の持続性は認められず、この存続は MTF-1 発がん感受性遺伝子にみられる現象であることが分かった。

(12) 第 5 番染色体上のマウスリンパ腫発がん抵抗性の候補遺伝子の局在

抵抗性系統である MSM マウス染色体を、第 5 番染色体上の D5MIT112-D5MIT365 (約 30Mb) と D5MIT204-D5MIT158 (約 36Mb) の領域で持つサブコンジェニックマウス 2 系統を作製して、リンパ腫発がん実験を行った。結果は前者には有意差はなく ($P=0.48$)、後者にはあるという結果が得られた ($P=0.038$)。これらの結果から、D5MIT365-D5MIT158 の約 10 Mb に抵抗性を規定する遺伝子の候補領域が限定化された。

(13) ラットの ENU ミュータジェネシス及びミュータントアーカイブの構築

ENU 投与 F344/NS1c 雄ラットに同系統の雌ラットを交配し、518 頭の G1 産子を得て、平成 17 年度分とあわせて、計 1,735 頭と G1 産子を得た。DNA と精子を採取し、G1 産子 1,735 検体分の DNA バンクと凍結精子バンクからなるラットミュータントアーカイブを整備した。

(14) がん関連遺伝子変異ラットの探索

p53 遺伝子と *Apc* 遺伝子の変異検出用マーカーを用いて、平成 18 年度作製分の G1 産子をスクリーニングした結果、*Apc* 遺伝子にストップコドン変異 (S2522X) を持つ個体を見出した。*Apc* 遺伝子に変異をもつ G1 ラットを親動物として、F344/NS1c と交

配し、*Apc* 遺伝子ノックアウトラット (F344-*Apc*^{1588Kro}) として系統化した。

D. 考察

(1) 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ラットの ACF 誘発性と多種類のラット系統を用いた詳細なハプロタイプ解析の結果から、C34 領域内の約 2Mb 領域に *Sct* 遺伝子の局在が限定化された。また、当該領域にマップされている遺伝子に関して、親系統である F344 及び ACI を用いた遺伝子発現解析を行った結果、PhIP 反応性に両系統間で違いのある遺伝子が見出され、これが候補遺伝子の一つである可能性が示唆された。

(2) DSS 併用マウス大腸がんモデルの大腸上皮での遺伝子発現変化を明らかにすることは、このモデルを用いた発がん抵抗性候補遺伝子の同定に役立つものと考えられる。

(3) 大腸腫瘍を用いた aCGH 解析の結果から、ラット 2 番染色体上に F344 誘発腫瘍において特異的に copy 数が増加している領域の存在が示唆され、この領域に存在する遺伝子が大腸発がん感受性に関与している可能性が示唆された。

(4) *Snd1* は、大腸発がんの初期病変である non-dysplastic ACF の一部や dysplastic ACF の大部分で高発現しており、また、*Apc* 蛋白質の発現を翻訳レベルで調節していることが示唆されている。PhIP 活性化体である PhIP-OAc 処理により、ヒト大腸がん細胞株において *SND1* が発現誘導されることから、発がんの早期過程において重要な役割を果たすと考えられる、細胞傷害性ストレスに対する応答反応に、*SND1* が関与している可能性が示唆された。

(5) DSS 併用マウス大腸がんモデルに対する、非大腸発がん物質 NNK の発がん促進作用の発見は、非大腸発がん物質の曝露が炎症発がんの修飾要因である可能性が示唆され、炎症のヒト発がんへの影響を考える上で有用と考えられる。

(6) ヒト潰瘍性大腸炎で DNA メチル化レベルの上昇が知られている *Esr1* のメチル化は、AOM および DSS を投与したラット大腸分離腺管において、上昇して

いた。AOM および DSS を投与したラット大腸は、炎症とエピジェネティックな変化の関連を解析するために有用なモデルと考えられた。

(7) *Bcl11b* 遺伝子のヘテロ欠損が、*Apc*^{Min} マウスの腫瘍発生頻度を上昇させることを見出し、新規の大腸がん修飾因子として同定した。) *Bcl11b* 遺伝子の大腸発がんへの修飾機構などについて、更に解析を進める必要がある。

(8) dysplastic ACF と内臓脂肪型肥満との相関を見出し、このメカニズムとして内臓脂肪の分泌するアディポネクチンなどのアディポサイトカインの関与、さらにこれらが細胞増殖に積極的に関与している可能性が示唆された。

(9) *Crabp2* の Tg と野生型 ACI とでは細胞増殖に差が無かったことから、*Crabp2* の発現量は幽門粘膜障害後の細胞増殖に影響を及ぼさないと考えられた。*Crabp2* の発現量が胃発がん感受性に関与しない可能性、または、細胞増殖の程度は、発がん感受性のあくまで一要因であり、細胞増殖以外のその他の要因で *Crabp2* が胃発がん感受性に関与している可能性が考えられた。

(10) 放射線 4 回分割照射後 40 日-100 日の胸腺で大型リンパ球が持続的に出現するが、この細胞が VDJ 組換えパターンの特異性を示し、BrdU の取り込み能が低く、前リンパ腫細胞の候補と考えられる。照射後早期からクローナル増殖するリンパ腫前駆細胞は出現するが、その細胞は分裂速度が低いかアポトーシスを受けるため、リンパ腫を形成するためには、細胞周期の促進およびアポトーシスを阻害する性質の獲得が必要と考えられる。

(11) Balb/c と、Balb/c に MSM マウス由来の *Mtf-1* 遺伝子座領域を導入したコンジェニックマウスにおいて、感受性マウスは抵抗性マウスに比べ、大型リンパ球の胸腺内の貯留が長かった。大型リンパ球は高い ROS をもつため、DNA 変異を蓄積する可能性が高く、この差がリンパ腫発症の感受性を担うと考えられた。また、照射後に出現、貯留する大型リンパ球は *Bcl11b* ががん抑制遺伝子型には影響されなかった。これらの結果は、放射線発がんにおける発がん感受性遺伝子とがん抑制遺伝子との作用機構の

違いを検討する上で重要と考えられる。

(12) 候補領域は5番染色体上のD5MIT365-D5MIT158の約10Mbにまで限定されたと考えられ、さらに、候補遺伝子の探索を行う予定である。

(13) ENU ミュータジェネシス法により作製した1,735頭分のDNAバンクと凍結精子バンクは、遺伝子改変ラット作製のためのリソースとして有用と考えられる。

(14) Apc 遺伝子ノックアウトラット (F344-Apc^{1588Kyo})を開発した。このラットは、APC蛋白質2843残基のC末側321残基を欠失していると予測され、この欠失領域には、Basicドメインの一部、EB1結合ドメイン、HDLG結合サイトが含まれている。APC蛋白質のC末部分を欠失するF344-Apc^{1588Kyo}ラットを詳細に解析することによって、大腸上皮細胞やApc遺伝子の新たな機能が発見される可能性がある。

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の一つを約2Mbに限定化し、当該領域に存在する遺伝子の発現解析を行うことにより、感受性を規定する候補遺伝子の同定が進みつつある。DSS併用マウス大腸がんモデルの大腸上皮での遺伝子発現変化を明らかにすることは、このモデルを用いた発がん抵抗性候補遺伝子の同定に役立つものと考えられる。

大腸腫瘍のaCGH解析により、F344系統に誘発された腫瘍のみで、copy数の増加が認められた領域があり、この領域に該当するヒトの領域が同定でき、ヒト大腸腫瘍でのCNAが認められれば、ヒト大腸発がんに関与する新たな機構を見出す可能性がある。大腸の早期微小病変（前がん病変）におけるラット*Snd1*過剰発現の生物学的意義や、ヒト大腸がん細胞株の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。DSS併用マウ

ス大腸がんモデルにおいて、非大腸発がん物質の曝露が炎症発がんの修飾要因である可能性が示唆され、炎症のヒト発がんへの影響を考える上で有用なモデルと考えられた。AOMおよびDSSを投与した大腸発がんモデルは、炎症とエピジェネティックな変化の関連を解析するために有用と考えられた。リンパ腫感受性遺伝子として同定した*Bcl11b*を、大腸発がん修飾因子として新たに見出した。ヒトのdysplastic ACF誘発に内臓脂肪型肥満が及ぼす影響が明らかになれば、生活習慣の改善による内臓脂肪型肥満の抑制という点からのヒト大腸がんの予防に有用と考えられる。

ラット胃がん感受性の候補遺伝子である*Crabp2*遺伝子について、トランスジェニックラットを作製、MNGによる幽門粘膜障害後の細胞増殖には差がなかったが、細胞増殖の昂進以外の要因で感受性二関与している可能性があり、長期胃発がん実験を進めている。

放射線4回分割照射後40日-100日の萎縮胸腺で大型リンパ球が出現する。この細胞はVDJ組換えパターン単クローン性を示し、BrdUの取り込み能が低く、リンパ腫前駆体細胞の候補と考えられた。*Mtf-1*のリンパ腫発症への関与が、照射後の再生胸腺内における大型リンパ球貯留の長短にあるとの示唆を得た。大型リンパ球は高いROSをもつため、DNA変異を蓄積する可能性が高く、この差がリンパ腫発症の感受性を担うと考えられた。*Bcl11b*の遺伝子型の違いでは大型リンパ球の貯留に違いはなかった。

ENUミュータジェネシス法により作製した1,735頭分のDNAアーカイブ、精子アーカイブは、特定の遺伝子ノックアウトラットを開発するためのリソースとして活用でき、ヒト発がん研究に有用と考えられる。作製したアーカイブから得られたApc遺伝子ノックアウトラットで大腸がんが誘発されることが明らかになれば、大腸がんモデル動物としてがんの発生・進展における非観血的な経時的観察が可能となり、治療や予防薬の開発に有用である。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報（健康危険情報）は特になし。

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は殆どない。マウス・ラットを研究対象としたときは動物取り扱い指針に従い、実験従事者の飼育動物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。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。内視鏡検査は横浜市立大学附属病院の定める規約を遵守し、検査による苦痛には十分な配慮を払った。問診、採血、腹部CT検査については、その有用性と危険性を説明し、同意の得られた場合にのみ行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li Q, Dashwood WM, Zhong X, Nakagama H, Dashwood RH. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat Bcl-2 promoter and characterization of a pathway involving β -catenin, c-Myc and E2F1. *Oncogene* (in press)
2. Motoyama JPL, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K, Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestation tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press)
3. Shirato M, Tozawa S, Maeda D, Watanabe M, Nakagama H, Masutani M. Poly(etheno ADP-ribose) blocks poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:451-456, 2007.
4. Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by over-expression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem* (in press)
5. Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagama H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sport Exer*, 39:70-74, 2007.
6. Uchida S, Kubo A, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, 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.
7. 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, Nakajima A. Inhibition of PPAR γ 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.
8. 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*, 598:120-131, 2006.
9. 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.
10. Ogawa K, Masutani M, Kato K, Tang M, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Shirai T. Parp-1 deficiency does not enhance liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in mice. *Cancer Lett*, 236:32-38, 2006.

11. 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.
12. 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.
13. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun*, 355: 538542, 2007.
14. Kamimura K, Mishima Y, Obata M, Endo T, Aoyagi Y, Kominami R. Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene*. (2007) doi:10.1038/sj.onc.1210388.
15. Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K, Kominami R. Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ -irradiation. *Oncogene*. (2007) doi:10.1038/sj.onc.1210325.
16. Maruyama M, Yamamoto T, Kohara Y, Katsuragi Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Kominami R. Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after γ -irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:209-215, 2007.
17. Narai S, Kodama Y, Maeda Y, Yokoyama M, Takagi R, Kominami R. Trp53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate in irradiated mouse embryos but not clefts of the lip with or without the palate. *Radiation Research*, 166:877-882, 2006.
18. Suzuki R, Kohno H, Yasui Y, Hata K, Sugie S, Miyamoto S, Sugawara K, Sumida T, Hirose Y, Tanaka T. Diet supplemented with citrus unshiu segment membrane suppresses chemically induced colonic preneoplastic lesions and fatty liver in male db/db mice. *Int J Cancer*, 120:252-258, 2007.
19. Mori Y, Tatematsu K, Koide A, Sugie S, Tanaka T, Mori H. Modification by curcumin of mutagenic activation of carcinogenic N-nitrosamines by extrahepatic cytochromes P-450 2B1 and 2E1 in rats. *Cancer Sci*, 97: 896-904, 2006.
20. Miyamoto S, Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Murakami A, Ohigashi H, Tanaka T. Preventive effects of chrysin on the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Oncol Rep*, 15: 1169-1173, 2006.
21. 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.
22. 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: 25-34, 2006.
23. Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka T, Kaneko S, Takeuchi IK, Sasa M, Serikawa T. The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage gated Ca²⁺ channel α 1A subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res*, 1133:168-177, 2007.
24. Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM, Narris G, Barton S, Osawa E, Nakajima A, Saubermann

- LJ. PPAR γ inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPAR γ PPAR δ and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 120:702-713, 2006.
25. Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, Yonemitsu K, Tomimoto A, Ikeda I, Yoneda M, Masuda T, Schaefer K, Saubermann LJ, Shimamura T, Saitoh S, Tachibana M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Inhibition of peroxisome proliferators-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci*, 97:854-860, 2006.
 26. Wada K, Arita M, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Kamisaki Y, Serhan CN. Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *FASEB J*, 20:1785-1792, 2006.
 27. Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clin Cancer Res*, 12:3257-3264, 2006.
 28. Hayashi M, Inamori M, Goto K, Akiyama T, Fujita K, Ikeda I, Fujisawa T, Takahashi H, Yoneda M, Hara K, Abe Y, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Ueno N, Nakajima A, Hamada Y, Fukutomi H, Satsuta H. *Blastocystis hominis* infection in patient with regular dialysis. *J Gastroenterol*, 41:605-606, 2006.
 29. Wada K, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, Terauchi Y, Tachibana M, Miyoshi H, Kamisaki Y, Mayumi T, Kadowaki T, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*, 281:12673-12681, 2006.
 30. Kayama H, Inamori M, Togawa J, Shimamura T, Tokita Y, Umezawa T, Sakaguchi T, Naitoh M, Nagase H, Nakajima A, Saito T, Tominaga S, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H. Pleural effusions following endoscopic injection sclerotherapy for cirrhotic patients with exophageal varices. *Hepato-Gastroenterology*, 53:376-380, 2006.
 31. Inamori M, Shimamura T, Nagase H, Abe Y, Umezawa T, Nakajima A, Saito T, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H, Togawa J, Kaifu H, Tsuboi H, Kayama H, Tominaga S. mRNA expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in exophageal mucosa biopsy specimens from patients with reflux exophagitis. *Hepato-Gastroenterology*, 53:361-365, 2006.
 32. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, 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.
 33. Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Terauchi Y. Relationship between the serum concentrations of C-reactive protein and parameters of adiposity and insulin resistance in patients with type2 diabetes mellitus. *Endocr J*, 53:345-356, 2006.
 34. Abe Y, Inamori M, Fujita K, Fujisawa T, Fujisawa N, Yoneda M, Takahashi H, Ikeda T, Hara K, Akiyama T, Kawamura H, Kato A, Kirikoshi H, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Sasaki T, Inayama Y, Ueno N, Nakajima A.

- Gastrointestinal:Rectal polyp associated with schistosomiasis. J Gastroenterol Hepatol, 21:1216, 2006.
35. Inamori M, Ueno N, Fujita K, Fujisawa N, Yoneda M, Takahashi H, Ikeda T, Kawamura H, Abe Y, Kato A, Kirikoshi H, Kobayashi N, Shimamura T, Kubota K, Saito S, Sakaguchi T, Yamanaka S, Inayama Y, Nakajima A. Gastrointestinal:Gastrointestinal metastases from malignant melanoma. J Gastroenterol Hepatol, 21:327, 2006.
 36. Inamori M, Akiyama T, Akimoto K, Takahashi H, Abe Y, Nakajima A. Evaluation of postprandial 3 h pH monitoring for gastroesophageal reflux disease:is there a possibility of streamlining the 24 h test? J Gastroenterol Hepatol, 21:1761-1762, 2006.
 37. Kubota K, Kakuta Y, Kawamura s, Abe Y, Inamori M, Kawamura H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Saito S, Nakajima A. Undifferentiated spindle-cell carcinoma of the gallbladder: an immunohistochemical study. J Hepatobiliary Pncreat Surg, 13:468-471, 2006.
 38. Nagaishi T, Pao L, Lin SH, Iijima H, Kaser A Qiao SW, Chen Z, Glickman J, Najjar SM, Nakajima A, Neel BG, Blumberg RS. SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms. Immunity, 25:769-781, 2006.
 39. 高橋宏和, 中島淳 PPARと大腸癌 医学のあゆみ、220:81-86, 2006.
 40. 藤澤聡郎, 高橋宏和, 富本彩子, 米満恭子, 中島淳 大腸癌とPPAR γ 最新医学、61:2021-2029, 2006.
2. 学会発表
1. Nakagama H, Ochiai M, Sugimura T, Nakashima K, Tsuchiya N. A component of RNA-induced silencing complex, SND1, is up-regulated in human colon cancers and implicated in colon carcinogenesis at early stages. 7th Joint Conference of the AACR and the JCA, Hawaii (2007年1月)
 2. 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 名古屋第23回日本疾患モデル学会総会、伊香保 (2006年12月)
 3. 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、名古屋第23回日本疾患モデル学会総会、伊香保 (2006年12月)
 4. 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 (2006年11月)
 5. 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 (2006年11月)
 6. 中釜 斉 PhIP 誘発大腸発がんモデル—初期発生から浸潤性進展まで— 第23回日本疾患モデル学会総会、伊香保 (2006年11月)
 7. 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 (2006年9月)
 8. 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 (2006年9月)
 9. 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(2006年9月)
 10. 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

- 誘発剤アドリア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 (2006 年 9 月)
11. 落合雅子、渡邊昌俊、田澤 大、杉村 隆、中釜 斉 PhIP 誘発ラット大腸がんにおける *b-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 (2006 年 9 月)
 12. 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 (2006 年 9 月)
 13. 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. 落合雅子、渡邊昌俊、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、*b-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)
 15. 落合雅子、泉谷昌志、佐々木美穂、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉 PhIP 誘発大腸発がんの分子機構と系統差 第 21 回発癌病理研究会、徳島 (2006 年 8 月)
 16. 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 (2006 年 8 月)
 17. Kominami R. MULTI-STEP CARCINOGENESIS IN g-RAY INDUCED MOUSE THYMES LYMPHOMAS (The 11th Japan-Korea Cancer Research Workshop Cancer Research in Post-Genomic Era) at Busan, Korea (2006年12月)
 18. Yamashita, S. Silencing of *Tgfbr2* in Rat Prostate Cancers. 11th Korea-Japan Cancer Research Workshop. Busan, Korea (2006 年 12 月)
 19. 山下 聡, 辻野好美, 高橋 智, 白井智之, 杉村 隆, 牛島俊和 ラット前立腺がんにおける *Tgfbr2* のメチル化サイレンシング, 日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋 (2006 年 12 月)
 20. 山下 聡, 高橋 智, 辻野好美, 白井智之, 杉村 隆, 牛島俊和 ラット前立腺がんにおけるサイレンシング遺伝子の同定, 第 65 回日本癌学会総会、横浜 (2006 年 9 月)
 21. 山下 聡, 高橋 智, 辻野好美, 白井智之, 杉村 隆, 牛島俊和 ラット前立腺がん及びヒト腫瘍における *Tgfbr2* のサイレンシング 第 21 回発癌病理研究会、徳島 (2006 年 8 月)
 22. Yasui Y, Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Niho N, Takahashi M, Wakabayashi K, Tanaka T. : Dextran sodium sulfate strongly promotes colon carcinogenesis in *Apc^{Min/+}* mice. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (The 2nd InSiGHT). Yokohama (2007 年)
 23. Yasui Y, Kohno H, Suzuki R, Miyamoto S, Sugie S, Curini M, Epifano F, Maltese F, Gonzales SP, Tanaka T. : Inhibition of colitis-related mouse colon carcinogenesis by dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin. The Kadota Fund International Forum 2006 (KIF2006) : The Scientific Substantiation of Functional Foods: Human Studies Toward the Global Standard, Inuyama (2006 年)
 24. Kohno, H., Suzuki, R., Miyamoto, S., Sugie, S., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S. P., Tanaka, T. : Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin. 97th Annual Meeting of American

- Association for Cancer Research,
Washington, DC (2006年)
25. Sugie S., Okamoto K., Watanabe T., Nakamura Y., Suzuki R., Kohno H., Tanaka T., and Mori H. Modifying effect of thiol compounds on diethylnitrosamine (DEN) -phenobarbital (PB) induced rat hepatocarcinogenesis. 97th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Washington, DC. (2006年)
 26. Tanaka T., Suzuki R., Kohno H., Hata K., Sugie S., Miyamoto S., Sugawara K., Sumida T., Hirose Y. Diet supplemented with citrus unshiu segment membrane suppresses azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts in male db/db mice. 97th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Washington, DC. (2006年)
 27. 杉江茂幸, 甲野裕之, 鈴木里加子, 安井由美子, 宮本真吾, 田中卓二: APNH/DSS誘発大腸発がん とDNA adduct形成との関連性. 第23回日本毒性病理学会、東京 (2007年1月)
 28. 甲野裕之, 安井由美子, 鈴木里加子, 杉江茂幸, 田中卓二: rasH2マウスにおけるDENとMeIQxの発がん性について. 第23回日本毒性病理学会、東京 (2007年1月)
 29. 宮本真吾, 安井由美子, 鈴木里加子, 甲野裕之, 杉江茂幸, 田中卓二: CB6F1-Tg-rasH2マウスにおける4-NQO誘発舌発がん感受性. 第23回日本毒性病理学会、東京 (2007年1月)
 30. 宮本 真吾, 林 圭, 鈴木里加子, 吉谷新一郎, 甲野裕之, 杉江茂幸, 高島茂樹, 田中卓二: Azoxymethane 誘発 db/db マウス ACF および BCAC に対する auraptene の抑制作用の検討. 第 11 回日本フードファクター学会 (JSoFF)、(2006年11月)
 31. 安井由美子, 甲野裕之, 宮本真吾, 杉江茂幸, 田中卓二: ウルソデオキシコール酸による炎症関連マウス大腸発がん修飾作用. 第65回日本癌学会総会、横浜(2006年9月)
 32. 宮本真吾, 鈴木里加子, 安井由美子, 甲野裕之, 畑 和也, 杉江茂幸, 廣瀬善信, 田中卓二: Azoxymethane誘発 db/dbマウスACFおよびBCACに対する柑橘類じょうのう膜の抑制作用. 第65回日本癌学会総会、横浜(2006年9月)
 33. 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(2006年9月)
 34. 田中卓二, 甲野裕之, 鈴木里加子, 宮本真吾, 安井由美子, 杉江茂幸: Statin製剤(ピタバスタチン)による炎症関連マウス大腸発がん抑制. 第65回日本癌学会総会、横浜(2006年9月)
 35. 甲野裕之, 戸塚ゆ加里, 安井由美子, 鈴木里加子, 山口かずえ, 杉江茂幸, 若林敬二, 田中卓二: 炎症関連マウス大腸発がんモデルにおけるAPNHのイニシエーション作用. 第65回日本癌学会総会、横浜(2006年9月)
 36. 杉江茂幸, 浅野奈美, 宮本真吾, 安井由美子, 甲野裕之, 田中卓二, 森 秀樹: シンポジウム「消化器癌の発生と抑制 動物モデルから」-AOM誘発ラット大腸発がんにおけるDITCの修飾効果. 第17回日本消化器癌発生学会総会、名古屋(2006年9月)
 37. 杉江茂幸, 宮本真吾, 安井由美子, 甲野裕之, 森 幸雄, 原 明, 森 秀樹, 若林敬二, 田中卓二: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)誘発ラット乳腺発癌に対する α -naphthyl isothiocyanate (ANIT)の修飾効果. 第21回発癌病理研究会、徳島(2006年8月)
 38. 杉江茂幸, 浅野奈美, 宮本真吾, 安井由美子, 甲野裕之, 田中卓二: AOM誘発ラット大腸発がんにおけるDITCの修飾効果. 第13回日本がん予防学会、京都(2006年7月)
 39. Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka K, Kaneko K, Takeuchi I, Sasa M, Serikawa T. The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage gated Ca²⁺ channel α 1A

- subunit gene and exhibits absence seizures. XVIth International Workshop on Rat Genetic Systems, Melbourne (2006年12月)
40. Kuramoto T, Voigt B, Tsurumi T, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. The LEXF/FXLE rat recombinant inbred strain set: a newly enhanced tool for genetic dissection of complex traits. The 2nd Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations, Jeju, Korea (2006年8月)
41. 庫本高志、Birger Voigt、鶴見東志子、真下知士、佐々木敬幸、外尾亮治、芹川忠夫 ラット FXLE/LEXF リコンビナント近交系を用いた量的形質の遺伝解析 第23回 日本疾患モデル学会、渋川(2006年11月)
42. 庫本高志、郷間宏史、桑村 充、中西 聡、北田一博、赤尾昌治、牧山 武、北 徹、笹征史、芹川忠夫 電位依存性カリウムチャンネル Kcnq1 遺伝子変異ラット (deafness Kyoto ラット) 第53回 日本実験動物学会総会、神戸(2006年5月)
43. 米田正人、藤田浩司、中島淳、和田孝一郎 PPAR γ リガンドを用いた非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の治療戦略 第79回日本薬理学会年会、横浜(2006年3月)
44. 高橋宏和、中島淳、中釜齊 PPAR α 阻害による癌細胞でのアノキス誘発と浸潤・転移抑制への応用、横浜(2006年3月)
45. 中島淳 クローン臨床 座長 第92回日本消化器病学会総会、福岡(2006年4月)
46. 稲森正彦、藤澤信隆、秋山智之、池田郁子、藤澤聡郎、藤田浩司、米田正人、高橋宏和、原浩二、安崎弘晃、河村晴信、阿部泰伸、目下部明彦、桐越博之、川口義明、窪田賢輔、齊藤聡、川名 一朗、上野規男、中島淳 Peppermint oil 投与による胃排出能の変化について: Breath ID system を用いた連続呼吸採取による評価 第92回日本消化器病学会総会、福岡(2006年4月)
47. 高橋宏和、高山哲治、中島淳、池田郁子、藤澤聡郎、藤田浩司、秋山智之、米田正人、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、齊藤聡、上野規男、大腸前癌病変と生活習慣病 第92回日本消化器病学会総会、福岡(2006年4月)
48. Kirikoshi H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A. The Outcome of the Combined Trans Arterial Chemo Embolization (TACE) and Percutaneous Ethanol Injection (PEI) therapies for Hepatocellular Carcinoma (HCC) DDW 2006, Los Angels (2006年5月)
49. Masato Yoneda, Koji Fujita, Hiroyuki Kirikoshi, Satoru Saito, Atstushi Nakajima Hiroyuki Abratani Global Gene Expression Analysis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) compared with nonalcohol steatosis DDW 2006, Los Angels (2006年5月)
50. Koji Fujita, Hiroyuki Kirikoshi, Masato Yoneda, Satoru Saito, Atsushi Nakajima Crucial role of extra hepatic derived Nitric Oxide in the development of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) DDW 2006, Los Angels (2006年5月)
51. 高橋宏和、高山哲治、中島淳 大腸前癌病変と生活習慣病 第65回日本癌学会学術総会、横浜(2006年9月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
「マイクロ RNA を有効成分として含有する腫瘍増殖抑制剤、及び癌治療用医薬組成物」(中釜 齊、田澤 大、土屋直人)
(特願 2007-50908)
2. 実用新案登録
なし

分担研究報告書

ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性及び修飾要因の解明

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 生化学部 部長

研究要旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) により誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、大腸発がんの分子機構（特に初期段階）及び大腸発がん過程を修飾する種々の環境中の修飾要因や、個体レベルの発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。Snd1 は初期病変である non-dysplastic ACF から発現上昇が認められる。PhIP 活性化体でヒト大腸がん細胞株を処理すると Snd1 が発現誘導されることから、Snd1 が細胞傷害性ストレスへの応答反応に関与している可能性が示唆された。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、種々のラット系統を用いた ACF 誘発性と詳細なハプロタイプ解析の結果から、感受性遺伝子の局在候補領域の一つを約 2 Mb に限定化できた。局在候補領域に存在する遺伝子に関して、発がん感受性の異なる親系統を用いた遺伝子発現解析を行い、候補遺伝子の選定を行っている。更に、F344 及び ACI に誘発された大腸腫瘍の aCGH 解析により、F344 誘発腫瘍のみで copy 数が増加している領域がラット 2 番染色体上に同定され、新たにこの領域も大腸発がん感受性に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) により誘発されるラット大腸がんモデルを用いて、大腸発がんの分子機構、特に初期段階における遺伝子変異や発現変化及び細胞傷害性ストレスの関与などを解明する。さらに、大腸発がん過程を修飾する種々の環境中修飾要因や、個体レベルの発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。本研究で得られる成果はヒト発がん研究の補完的な役割を担うものであり、最終的にはヒトがんの早期診断、遺伝子情報に基づいたテーラーメイドがんの予防策の構築、さらにはがんに対する新規治療薬・予防薬開発のための標的候補分子の同定などへの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) ヒト大腸がん細胞株 RKO での Snd1 蛋白質の PhIP 活性化体処理による発現誘導

Snd1 蛋白質は G/C-rich な DNA/RNA 結合蛋白質として同定したが、抗マウス Snd1 抗体を用いた免疫組織学的染色により、PhIP 誘発ラット大腸がんモデルにおいて、大腸初期病変である non-dysplastic aberrant crypt foci (ACF) の一部及び dysplastic ACF の大部分で Snd1 が高発現していることを見出した。発がんの初期過程において重要である細胞傷害性ストレスに対する応答への Snd1 の関与を検討するために、PhIP の活性化体であるアセチル化 PhIP (PhIP-OAc) を 5 もしくは 50 μ M の濃度で、ヒト大腸がん細胞株 RKO を処理し、処理後 8 もしくは 24 時間後における Snd1 及び p53 蛋白質の発現誘導を immunoblot 法で解析した。代表的な細胞傷害性ストレスとしてア

ドリアマイシン処理を行い、アドリアマイシンに対する反応性と PhIP-OAc に対する反応性を比較した。

(2) 種々のラット系統を用いた ACF 誘発性の検討とハプロタイプ解析による大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* 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* の局在候補領域 C34 (D16Mit3-D16Got50, 約 11 Mb) において、遺伝多型と ACF 誘発性の間に相関性が認められる領域 (D16Mit3-D16Mgh5) があることを、昨年度報告した。当該領域に関して、更に詳細にハプロタイプ解析するために、データベースのラットゲノム情報から、マイクロサテライト多型マーカーを新規に設定した。18 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尾検体から DNA を抽出し、当該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 誘発性と遺伝多型との相関性について検討した。

(3) 大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の発現解析による探索

限定化した約 2 Mb の候補領域に存在する遺伝子をラットゲノム情報から選択し、遺伝子発現解析により候補遺伝子の探索を行った。親系統である F344 及び ACI ラットに、PhIP 含有飼料もしくは基礎飼料を投与し、投与開始から 0, 1 及び 2 週後にラット正常大腸粘膜を採取した。正常大腸粘膜から RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、定量的 RT-PCR 法により解析した。

(4) ラット大腸腫瘍のアレイ CGH (aCGH) 解析

F344 及び ACI ラットに PhIP で誘発された大腸腫瘍及び周囲の正常大腸上皮より DNA を抽出した。*Alu I* と *Rsa I* で制限酵素消化後、

Cy3-dUTP (reference, 正常大腸) もしくは Cy5-dUTP (腫瘍) を加えてランダムプライマーと Exo-Klenow により標識した。標識化した腫瘍 DNA と正常大腸 DNA を混合し、185K Rat Genome CGH microarray (Agilent Technologies) を用いて copy number aberration (CNA) についてゲノム網羅的な解析を行った。得られたデータの統計学的解析は、CGH Analytics (Agilent) を用いて行った。

(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、屠殺は麻酔と放血の併用で行った。

C. 研究結果

(1) ヒト大腸がん細胞株 RKO での PhIP 活性化体処理 (細胞傷害性ストレス) による SND1 の発現誘導

大腸発がん物質である PhIP の活性化体を細胞に導入することにより、SND1 遺伝子発現は一過性に上昇することを見出した。これらの結果は、SND1 が発がん物質曝露など、細胞傷害性ストレスに応答する因子のひとつであることを示唆する。

(2) 種々のラット系統における ACF 誘発性とハプロタイプ解析による多型との相関性から検討した大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の限定化

18 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 1 匹当たり 5 個以上の ACF を誘発し (高感受性)、PVG/Seac, LEA, ACI/N, DRH/Seac, NIG-III の 5 系統は 1 匹当たり 1 個以下の ACF しか誘発しなかった (低感受性)。DON, WKAH/Hkm, F344, DA, BN, WKY/NCr1Cr1j,

KND, LE/Stm の 8 系統は中等度の感受性を示した。昨年度、ACF 誘発性とハプロタイプ解析による遺伝多型との間の相関性を報告した領域 (D16Mit3~D16Mgh5) に、新たにマイクロサテライトマーカを設定し、18 系統のラットを用い、更に詳細なハプロタイプ解析を行った。その結果、AU048089~D16Rat129 近傍と D16Mgh6 の近傍の領域において、ACF 誘発性と遺伝多型との相関性が見出された。

(3) 大腸がん感受性遺伝子 *Sct* の遺伝子発現解析による探索

限定化した *Sct* 遺伝子の局在領域 (AU048089~D16Mgh6, 約 2Mb) にマップされた遺伝子をラットゲノム情報から 10 数個選定した。これらに関して、親系統である F344 及び ACI 系統の正常大腸上皮より抽出した RNA を用いて、遺伝子発現解析を行い、PhIP 投与時もしくは非投与時において両系統で発現に違いのある遺伝子の有無を検討した。PhIP 投与時に抵抗性系統である ACI で発現誘導されるが、感受性系統 F344 では発現誘導されない遺伝子が 1 個見つかり、これが候補遺伝子の一つであることが示唆された。

(4) ラット大腸腫瘍のアレイ CGH (aCGH) 解析により示唆された発がん感受性遺伝子の新たな局在候補領域

185K アレイを用いた aCGH 解析により、F344 及び ACI ラットに PhIP で誘発された大腸腫瘍の CNA のゲノム網羅的解析を行った。F344 ラットに誘発された 4 個の腫瘍 (1 個は小腸腫瘍) においては、2 番染色体上に、正常組織と比較して copy 数の増加が検出された約 0.4 Mb の領域が認められた。低感受性である ACI に誘発された腫瘍においては、当該領域での copy 数の変化は認められなかった。この領域に存在する遺伝子が、F344 と ACI の大腸がん感受性の違いに寄与している可能性が示唆された。

D. 考察

DNA/RNA 結合蛋白質として同定した SND1 は、RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つであり、新規の翻訳抑制因子の可能性があり、大腸がんの初期病変である non-dysplastic ACF の一部や dysplastic ACF の大部分で高発現している。また、Snd1 は Apc 蛋白質の発現を翻訳レベルで調節していることが示唆されている。PhIP 活性化体である PhIP-OAc 処理により、ヒト大腸がん細胞株において SND1 が発現誘導されることから、発がんの早期過程において重要な役割を果たすと考えられる、細胞傷害性ストレスに対する応答反応に、SND1 が関与している可能性が示唆された。

大腸がんの感受性遺伝子に関しては、サブコンジュニクラットの ACF 誘発性と多種類のラット系統を用いた詳細なハプロタイプ解析の結果から、C34 領域内の約 2Mb 領域に *Sct* 遺伝子の局在が限定化された。また、当該領域にマップされている遺伝子に関して、親系統である F344 及び ACI を用いた遺伝子発現解析を行った結果、PhIP 反応性に両系統間で違いのある遺伝子が見出され、これが候補遺伝子の一つである可能性が示唆された。

大腸腫瘍を用いた aCGH 解析の結果から、ラット 2 番染色体上に F344 誘発腫瘍において特異的に copy 数が増加している領域の存在が示唆され、この領域に存在する遺伝子が大腸がん感受性に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

大腸の早期微小病変 (前がん病変) におけるラット Snd1 過剰発現の生物学的意義や、ヒト大腸がん細胞株の 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。PhIP 誘発の大腸がん

モデルを用いた遺伝的解析とハプロタイプ解析を組み合わせることにより、感受性遺伝子の局在候補領域の一つを約 2Mb に限定化し、当該領域に存在する遺伝子の発現解析を行うことにより、感受性を規定する候補遺伝子の同定が進みつつある。さらに、大腸腫瘍の aCGH 解析により、F344 系統に誘発された腫瘍のみで、copy 数の増加が認められた領域があり、この領域に該当するヒトの領域が同定でき、ヒト大腸腫瘍での CNA が認められれば、ヒト大腸発がんに関与する新たな機構を見出す可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li Q, Dashwood WM, Zhong X, Nakagama H and Dashwood RH. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat *Bcl-2* promoter and characterization of a pathway involving β -catenin, c-Myc and E2F1. *Oncogene* (in press)
2. Motoyama JPL, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K and Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestation tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press)
3. Shirato M, Tozawa S, Maeda D, Watanabe M, Nakagama H, Masutani M. Poly(etheno ADP-ribose) blocks poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 355:451-456, 2007.
4. Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, and Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by over-expression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem* (in press)
5. Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagama H and Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sport Exer*, 39:70-74, 2007.
6. 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.
7. 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 γ 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.
8. 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.
9. Gunji A, Uemura A, Tsutsumi M, Nozaki T, Kusuoka O, Omura K, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and 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.
10. 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]-