

- quinoline in mice. *Cancer Lett*, 236:32-38, 2006.
11. 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.
 12. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H and Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27:162-169, 2006.
 13. Gunji A, Uemura A, Tsutsumi M, Nozaki T, Kusuoka O, Omura K, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. *Parp-1* deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts. *Cancer Lett* (in press)
 14. 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.
 15. 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.
 16. Fukuda H, M. Katahira, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M and Nakagama H. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UPI Protein. *Genes Cells*, 10:953-962, 2005.
 17. Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.*, 96:627-636, 2005.
 18. Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M, Taguchi A, Sugimura T and Nakagama H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett*, 220:67-74, 2005.
 19. Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J and Nakagama H. Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 26:635-640, 2005.
 20. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H and Masutani M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*. 24:1328-1337, 2005.
2. 学会発表
 1. Nakagama H, 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 β -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、 β -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、渡邊昌俊、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)
- 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 斉、田澤 大、土屋直人)
(特願 2007-50908)
 2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

リンパ腫感受性遺伝子の単離と発がんリスク予測

分担研究者 木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨 MTF-1 リンパ腫感受性遺伝子の作用機構を、照射後マウス胸腺に出現する ROS レベルの高いリンパ腫前駆体細胞との関連で検討した。放射線4回分割照射後40日-100日の萎縮胸腺にはクローナル増殖を示す大型リンパ球が出現するが、照射後7日でも大型の細胞が一過性に観察される。照射後7日の大型リンパ球の胸腺内存続性について、MTF-1 および Bcl11b がん抑制遺伝子型の違いによる影響を調べた。MTF-1 感受性マウスは抵抗性に比べ、大型リンパ球を胸腺内に長く存続させたが、Bcl11b ヘテロ感受性マウスでは存続はみられず、この存続は MTF-1 発がん感受性遺伝子と関連する現象であることが分かった。しかし、照射後7日の大型リンパ球は BrdU を活発に取り込むが、照射後80日のそれは取り込み能が低い。大型リンパ球は照射後早期に出現するが、リンパ腫形成には一定の期間がかかり、この期間に細胞周期の促進およびアポトーシスから回避する能力の獲得がなされると考えられる。

A. 研究目的

発がんリスクは個人によりバラツキがあり、その一部は遺伝的素因により影響を受ける。この素因研究の重要性は年々深まっているが、ヒトを対象とした解析は遺伝的背景が複雑であり、倫理的な問題を含むため困難が予想される。一方、モデル動物を用いた研究は連鎖解析により感受性遺伝子を単離することができ、ヒト解析の補完的役割をもつ。本研究はこの発がん素因をマウスモデルを用いて解析し、ヒトのそれへの貢献を果たそうとするものである。

マウスの系統により発がん感受性は異なり、マウスでもがん発生に遺伝的多型のあること

を示している。感受性遺伝子は組換え修復に関与する遺伝子群やがんの発生母体となる正常細胞の増殖能に違いを与える遺伝子、がん細胞の発生・進展する周りの環境を支配している遺伝子群などが考えられる。大腸がん発症に関する感受性遺伝子・Mom1 はリパーゼの一種をコードし、周辺環境を修飾すると言われているが、その寄与機構は明らかではない。発がん感受性遺伝子が同定されると、ヒトがんの発症への影響の検討、防護対策、薬物の開発が期待される。我々はすでに一つのリンパ腫発症感受性遺伝子候補として MTF-1 を同定している。そこで、この感受性遺伝子が与えるヒト発がんリスクを測定すること、およ

び感受性遺伝子の発がんへの役割を解明することを目的とする。また、マウス 5 番染色体に存在する未知の感受性遺伝子を単離する。

B. 研究方法

(1)放射線発がん実験：BALB/c コンジェニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェクトに対して 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で判定した。

(2)FACS 解析：細胞の大きさ、および CD4、CD8 発現の測定は一般的な方法に従った。 γ 線照射により発生するヒドロキシラジカルの測定は試薬 (H2DCFDA : dichlorofluorescein diacetate) を用い、細胞増殖能の測定は BrdU 取り込みを利用した。 γ 線照射後に特記したそれぞれの時期に、マウスから胸腺を摘出し、PBS 培地中で H2DCFDA と反応させた。暗所で 37°C 15 分間保温し、フィルター濾過後、FACScan で蛍光を測定した。BrdU の取り込みは、 γ 線照射 5 日後にマウスの腹腔内に 1mg 投与し、1 時間後に胸腺を取り出し、FACScan で蛍光を測定した。

(3)遺伝子型の決定および遺伝子座の多型の同定。遺伝子型の決定にはそれぞれ適当なプライマーセットを用いて PCR 法を用いた。コンジェニック領域の決定には MIT マーカーを WEB サイトから選択し、利用した。

(4)大腸、小腸の腫瘍は実体顕微鏡をもちいて観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには本学の動物実験施設要綱に準拠し研究した。また、動物倫理の理解を深めるため動物実験施設が執り行う慰霊祭への出席を義務づけている。マウス遺伝子

からヒト疾患感受性遺伝子に研究を進めたとき、すなわち正常人を対象とした MTF-1 ハプロタイプの決定を行う時には、新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会に申請書を提出し、その承認を得た (2003 年 10 月)。チェルノブイリ地方の小児甲状腺がんの解析についても、新潟大学医学部と長崎大学医学部で承認を得た。

C. 研究結果

C-1 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の発症に影響する因子：放射線照射による発がん感受性をもつ BALB/c マウスと抵抗性の MSM 系統マウスを用い、発がん感受性遺伝子候補として MTF-1 を同定し、報告した。MTF-1 は細胞内の活性酸素・ROS (reactive oxygen species) に応答し、ROS 量の調節系に関与することが知られ、確かに発がん感受性遺伝子候補としての必要条件を満たすが、その作用機構は不明のままである。そこで、BALB/c に約 3Mbp の MSM マウス由来 MTF-1 遺伝子座領域を導入したコンジェニックマウスを利用し、MTF-1 抵抗性座と ROS 調節などの胸腺細胞の性質との関連性を詳細に検討した。予備的な結果を一部前年度に報告した。

C-1-1 γ 線の4回分割照射後の萎縮胸腺にみられる前リンパ腫細胞：リンパ腫を誘発させる一般的な照射プロトコールは、 γ 線を4回に分割し照射するものである。第1回目の照射によって胸腺のリンパ球の大半は細胞死を起し、その結果両葉に同程度の萎縮が見られる。引き続き再生が起こるが、再生のもとになる細胞は骨髓から供給される。この照射を1週毎に4回行うので、この分割照射過程では胸腺の萎縮と再生が繰り返されることになる。照射終了後は萎縮した胸腺の状態がしばらく続き、その後左右どちらか一葉の皮質に局限してリンパ腫細胞が出現する。照射後約 100 日

目から一部のマウスで胸腺リンパ腫は発症し始め、照射後 300 日には照射マウスの 60-70%がリンパ腫を発症する。

8 頭のマウスに γ 線を分割照射した 80 日後、まだリンパ腫を発症していない萎縮胸腺から胸腺細胞を取り出し、その性質を検討した。検討内容は、細胞数、細胞の大きさ、細胞内の ROS 量、細胞内への BrdU の取り込み、および VDJ 組換えパターンへの単一性である。細胞数は $0.15-2.9 \times 10^7$ とバラツキを示し、正常胸腺 ($4-20 \times 10^7$) と比べるとすべて減少していた。FACS (FSC-H 解析) による細胞の大きさでは、2/8 の胸腺で broad なパターンを示し、この結果は正常胸腺の大半を占める小型リンパ球に混じって、大型のリンパ球が出現していることを示している。これらの萎縮胸腺では高い ROS 量をもつ細胞の割合が上昇し、大型リンパ球が高い ROS 濃度をもつことを示唆する。一方、BrdU の細胞内取り込み測定では、予想外の結果を得た。取り込みは大型リンパ球と小型リンパ球に分画して測定した。正常胸腺では大型リンパ球は高い取り込み (約 50%の細胞が取り込む) を示し、小型リンパ球は全く取り込みを示さない。一方、萎縮胸腺にみられた ROS レベルの高い大型リンパ球は低い BrdU 取り込みを示し、小型リンパ球はわずか (3-5%) ではあるが取り込みを示した。クローナル増殖の指標となる VDJ 組換えパターンの単一性の解析では、FACS 解析で broad なパターンを示す萎縮胸腺 (2/8) にみられた。

照射後 40 日と 100 日の胸腺では、細胞数、細胞の大きさ、および VDJ 組換えパターンの単一性を調べた。細胞数はそれぞれ $0.35-1.7 \times 10^7$ 、 $0.06-0.12 \times 10^7$ と時間経過に従って減少する傾向にあった。一方、broad なサイズ・パターンを示す萎縮胸腺の割合は照射後 40 日で 3/6、照射後 100 日で 7/14 とあまり変わりがなく、VDJ 組換えパターンの単一性を与える萎縮胸腺の割合もそれぞれ 3/6 と 8/14 であり、大きな変化はみられな

かった。以上のことから、照射 40 日-100 日後に観察される大型リンパ球が前リンパ腫細胞の候補と考えられるが、その内容は一様ではないと思われる (考察参照)。

C-1-2 3Gy 一回照射後の胸腺の解析 : BALB/c マウスに 3Gy の γ 線を照射すると、重篤な胸腺細胞死が観察される。その 3 日から 5 日後の胸腺では多くの死細胞と 1/10 以下に細胞数が低下した胸腺細胞がみられる。その後、骨髄から供給される未分化血球細胞や残存する胸腺細胞が急激に細胞分裂を始め、胸腺内の細胞数は照射後 7 日目には回復がみられ、10 日目以後からはほぼ細胞数は一定の数となる。3Gy 一回照射後 30 日にマウスから胸腺細胞を取り出し、20 サンプルを対象にまず VDJ 組換えの偏り・単一性を指標にクローナリティーを検討した。VDJ 組換えのパターンはすべて正常胸腺細胞のそれと変わりがなく、クローナルな増殖を示す細胞が胸腺の大部分を占めるというサンプルは検出されなかった。そこで、クローナルな増殖を示す細胞が胸腺の一部にでも存在するかを調べるため、Rit1/Bcl11b の内部欠失の存在の有無を Nested-PCR 法で検討した。約半分の胸腺で内部欠失が観察され、この時期にはすでにクローナルな増殖をする細胞が、割合としては少ないが、明らかに存在することが示された。

C-1-3 照射後 7 日目の胸腺細胞の ROS 量の測定 : 照射後の細胞数の経過から、胸腺が回復する時期は 5 日から 10 日の期間であることが明らかとなった。そこで、感受性の BALB/c 系統と BALB/c に約 3Mbp の MSM マウス由来 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、そのプロジェニーを解析に使用した。昨年は市販の BALB/c マウスを感受性系統として利用したため、結果とその解釈に誤りを生じることになった。C/M 型および C/C 型の MTF-1 型をもつ 2 種類のプロジェニーに 3Gy の γ 線を照射した後 7 日目に胸腺細胞を取り出し、両系統間で細胞数と ROS 量を比

較した。その結果、細胞数は感受性系統と抵抗性系統に変化はない（前回差を示した）が、感受性系統は抵抗性系統に比べ高い ROS 活性をもつ大型リンパ球を多く胸腺内に存続させることが分かった。大型リンパ球が持続すると、その細胞は DNA 変異を蓄積する可能性が高く、それが MTF-1 座感受性と関連すると考えられた。すなわち、この差が発がん感受性の差（70%と 40%の違い）を担う可能性が示唆された。

C-1-4 照射後の大型リンパ球の特徴：高い ROS 活性をもつ大型リンパ球は CD4-CD8 の表面マーカをもつダブルポジティブ（DP）の細胞が多いが、照射後ではダブルネガティブ（DN）の未分化細胞の割合が多くなっていった。一方、BrdU の取り込み活性をみると、正常胸腺細胞と比べ変化はなかった。すなわち、大型リンパ球ではその半分が取り込みを示し、一方小型リンパ球ではほとんど取り込みがなく分裂を停止している細胞であることが分かった。この大型リンパ球は「C-1-1」で観察された大型リンパ球とは異なる性質もつはずだが、両者の関連性は不明である。

C-1-5 Bcl11b がん抑制遺伝子の ROS 量への影響：Bcl11b ヘテロ型マウスはその野生型マウスに比べ放射線誘発胸腺リンパ腫の発症頻度が高い、すなわち感受性を与える。そこで、Bcl11b がん抑制遺伝子ヘテロ型と野生型のマウスで上記と同様の実験を行った。Bcl11b ヘテロ型と野生型の BALB/c マウスに 3Gy の γ 線を照射し、両者の胸腺内で大型リンパ球が占める割合を調べた。その結果、両者に差は観察されなかった。すなわち、Bcl11b がん抑制遺伝子型はリンパ腫発症に影響するが、大型リンパ球の消長には影響しないことが示された。

C-2 ヒト MTF-1 遺伝子多型と甲状腺がん発症：ヒト MTF-1 の主要ハプロタイプは 3 タイプに分類される。この結果をもとに、チェル、ブイリでのヒト被ばく試料をタイピングを長崎大学（山下教授）が担当し、行なっているが、まだ結果を得て

いない。

C-3 第 5 番染色体上の発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析：MSM マウス染色体 5 番染色体を一部もつサブコンジェニックマウスを作製し、その発がん実験を行ってきた。D5MIT300（セントロメアから 49Mb）から D5MIT336（81Mb）の領域を MSM ゲノムを導入した系統、D5MIT110（66Mb）から D5MIT20（95Mb）の領域に MSM ゲノムを導入した系統の連鎖解析では、両群（C/M 型と M/M 型）にリンパ腫発症頻度に有意な差はみられなかった（ $P=0.80$ ）。そこで、D5MIT112（75Mb）から D5MIT365（104Mb）と D5MIT204（78Mb）から D5MIT158（114Mb）までという新しい 2 系統を作製し、発がん実験を行なった（マーカ位置はデータベースの更新に伴って変更される）。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、候補領域は 5 番染色体上の D5MIT365（104Mb）から D5MIT158（114Mb）までの約 10Mb にまで限定されたと考えられる。

C-4 APC 遺伝子変異をもつ大腸がんモデル・Min マウスと Bcl11b 遺伝子：ヒト大腸がんでは第 14 番染色体上の Bcl11b 遺伝子座で高頻度に LOH が観察される。これは大腸がんの発症に Bcl11b 遺伝子が関与する可能性を示唆する。そこで、Min マウスと Bcl11b-KO ヘテロマウスを交配し、Bcl11b 遺伝子型の違いによる大腸・小腸がん発症への影響を調べた。まだ予備的な結果だが、興味深い結果を得たので報告する。生後 18 週でマウスを安楽死させ、腸管を固定後、腸管内の腫瘍（腫瘍）を肉眼および顕微鏡下で観察した。変異 APC が遺伝しなかったマウスでは Bcl11b 遺伝子型の違いによらず、全く腫瘍が観察されなかった。一方、変異 APC が遺伝したマウスでは予想通り腫瘍が観察され、その数は Bcl11b 遺伝子型の違いに影響を受けた。すなわち、Bcl11b 遺伝子が野生型のときは 8 個体平均腫瘍個数は 6.0 であるのに対し、ヘテロ型の 8 個体平均腫瘍個数は 14.5 と有意に上昇して

いた。しかし、腫瘍の平均サイズはどちらも 1.21mm であり、変化はなかった。この結果は、一つの Bcl11b 遺伝子に欠損があると腫瘍形成の進展を早めることはないが、腫瘍発生の頻度を上げる、ということを示唆する。

D. 考察

放射線は予期せぬ被爆により発がんの原因となるが、一方がん治療の分野では有益な方法論を提供する有用な物質である。従って、放射線の性質、生体の応答、生体損傷の多様性（感受性）への理解は放射線の有効利用を考える上で重要である。本研究は放射線誘発胸腺リンパ腫の感受性遺伝子の単離とその作用機構の解明を一つの目標としている。

D-1 放射線照射により誘発された萎縮胸腺内のリンパ腫前駆細胞：放射線 4 回分割照射後 2 週間以内（照射を始めて 5 週間後）に萎縮胸腺にはリンパ腫前駆細胞が存在するという報告がある。これは、その時期の胸腺細胞を正常マウスの胸腺に注入するとリンパ腫が 10-20% という低頻度ながら発症するという結果に基づく。しかし、リンパ腫前駆細胞の実体は不明である。我々は VDJ 組換えパターンの単一性を示す細胞がその候補であると考え、その性格付けを行ってきた。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、この細胞が前リンパ腫細胞の候補と考えられる。実際、高い頻度でクローナル増殖の指標となる VDJ 組換えパターンの単一性を示し、しかもリンパ腫細胞がもつ一つの特色、大型の細胞であるという性質をもつ。しかし、この大型リンパ球の内容は時期により一様ではない（遺伝的な変化が進行していると思われる）。照射後 7 日に一過性にみられる大型リンパ球は BrdU の細胞内取り込みを盛んに行なうが、照射後 80 日の萎縮胸腺内の大

型リンパ球は BrdU 取り込み活性が低い。胸腺内の細胞数は照射後日数の経過とともに低下するが、この BrdU の取り込み低下がその原因だと考えられる。クローナル増殖するリンパ腫前駆細胞が出現することと、この細胞の示す BrdU の取り込み低下は一見矛盾する現象と思われる。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、増殖ができない。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。

D-2 感受性遺伝子によるリンパ腫発症の修飾機構：照射後 7 日の胸腺を取り出し、大型リンパ球の出現、存在と発がん感受性を修飾する MTF-1 遺伝子座との関連を検討した。発がん感受性遺伝子アレル（約 3Mbp の MSM マウス由来 MTF-1 遺伝子座領域をもつ）をもつヘテロ型マウスは MSM ホモ型の抵抗性マウスに比べ、大型リンパ球を多く胸腺内に存続させることが分かった。この大型リンパ球は分化度が低く、高レベルの ROS をもっていた。ラジカル濃度の高い大型リンパ球が胸腺内に長く持続すると、その細胞は DNA 変異を蓄積する可能性が高く、この胸腺環境が発がん感受性を担うと考えられる。

Bcl11b ヘテロ型マウスは放射線誘発胸腺リンパ腫の発症頻度が高く、潜伏期の短縮が観察される。これはすでにがん抑制遺伝子に one-hit が起こっているためと考えられる。上記の MTF-1 遺伝子座ではこのような潜伏期の短縮は観察されない。Bcl11b ヘテロ型と野生型マウスの照射後 7 日の胸腺を取り出し比較したが、大型リンパ球の占める割合には変化はみられなかった。すなわち、照射後に出現、存続する大型リンパ球は Bcl11b がん抑制遺伝子型には影

響されなく、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。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 in vivo で検討する系を与え、放射線感受性を検討するよい系になると期待している。

D-3 ヒト MTF-1 の関連解析、第 5 番染色体上の新規感受性遺伝子の単離については今後も継続する。

D-4 Bcl11b 遺伝子の犬腸がん修飾遺伝子としての役割についてポジティブな示唆を得たが、さらに解析を進める必要がある。

E. 結論

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 組換えパターンの単一性を示し、クローナル増殖が示唆されるため、リンパ腫前駆体細胞の候補と考えられる。照射後 7 日でも大型の細胞が観察されるが、一部の表現型は異なる。照射後 7 日の大型リンパ球は BrdU の細胞内取り込みを盛んに行なうが、照射後 80 日はその取り込み活性が低い。発がん感受性遺伝子アレル (約 3Mbp の MSM マウス由来 MTF-1 遺伝子座領域) をもつヘテロ型マウスと MSM ホモ型の抵抗性マウスの照射後 7 日の胸腺を解析した。感受性マウスは抵抗性に比べ、大型リンパ球を多く胸腺内に存続させることが分かった。この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、この差が発がん感受性を担うと考えられる。同様の実験を発がん感受性を与える Bcl11b がん抑制遺伝子のヘテロ型マウスを用いて検討したが、Bcl11b 遺伝子型の違いでは大型リンパ球の占める割合に影響を示さなかった。照射後の大型リンパ球の存続は 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.* (2007) 355: 538-542.

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.* (2007) 354: 209-215.

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*. (2006) 166: 877-882.

2. 学会発表

MULTI-STEP CARCINOGENESIS IN γ -RAY INDUCED MOUSE THYMES LYMPHOMAS

(The 11th Japan-Korea Cancer Research
Workshop Cancer Research in Post-Genomic
Era) at Busan, Korea, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

トランスジェニックラットを用いた胃がん感受性候補遺伝子の解析

分担研究者 山下 聡 国立がんセンター研究所 発がん研究部 主任研究官

研究要旨

胃がん抵抗性候補遺伝子 *Cellular retinoic acid binding protein 2 (Crabp2)* の発現量と胃がん感受性との関連を解析するため、*Crabp2* のトランスジェニックラット (Tg) を作製した。MNNG 二週間投与時における胃幽門腺管における細胞増殖の程度は、Tg と野生型とで有意差がなかった。6群 170 匹の長期発がん試験を進めており、2007 年 9 月終了予定である。個体レベルにおいて炎症とメチル化の関連を解析する系を構築するため、AOM および DSS を投与したラット大腸分離腺管における DNA メチル化レベルを解析した。ヒト潰瘍性大腸炎での上昇が知られている *Esr1* のメチル化レベルが、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 (対照 0.2%、投与群 1.5%) していることを見出した。

A. 研究目的

発がん感受性・抵抗性を支配する遺伝子を同定することは、発がん高リスク群の同定や、新たながん予防の標的の同定に役立つため、重要な課題である。しかし、ヒトでは、遺伝的背景が複雑であり、また、個体ごとに環境因子への暴露が異なるために、発がん感受性・抵抗性遺伝子を同定することは容易ではない。そこで、ラット発がんモデルを用いて、発がん感受性遺伝子の同定を進めている。

(1) 胃がん感受性遺伝子

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

本研究申請時 (平成 15 年度) までに、ACI/N ラットと BUF/Nac ラットの胃粘膜で発現量が異なる遺伝子を網羅的に検索し、*Crabp2* mRNA は、BUF/Nac ラットの胃粘膜で ACI/N ラットに比べて 100 倍以上高発現することを見いだした。*Crabp2* 遺伝子は、細胞分化制御に重要な役割を果たすことが知られており、

その発現量の違いが胃がん感受性に関与している可能性が高い。そこで、*Crabp2* 遺伝子トランスジェニック (Tg) ラットを作成し、*Crabp2* の発現量と胃がん感受性との関連を解析することとした。

平成 17 年度までに、ヒト *EEF1A1* プロモーターとラット *Crabp2* cDNA を連結したコンストラクトを ACI/N ラットの受精卵に注入した Tg ラットを 2 系統 (ACI-Tg1, ACI-Tg2)、Wistar ラットの受精卵に注入した Tg ラットを 1 系統 (Wistar-Tg) 樹立した。これらの系統の胃粘膜における *Crabp2* の発現量を解析した結果、ACI-Tg2 系統のみが、胃発がん抵抗性の BUF と同等以上のトランスジーンを安定して発現していた。

本年度は、ACI-Tg2 系統を用いて長期胃発がん試験を開始した。同時に、発がん感受性との相関が知られる MNNG 二週間投与時における胃幽門腺管における細胞増殖の程度を解析した。

(2) 潰瘍性大腸炎モデルの DNA メチル化解析

DNA メチル化異常によるがん抑制遺伝子の不活化はヒト発がんに関与する。従って、

DNA メチル化異常の誘発されやすさが、発がん感受性の原因となっている場合もあると考えられる。しかし、これまで、DNA メチル化異常が関与することが明らかな実験動物腫瘍は極めて限られていた。そのような腫瘍を探索するには、ヒトでは DNA メチル化異常誘発への関与が強く示唆されている炎症が関係する実験動物腫瘍を用いるのが良いと考えられる。

そこで、本年度は、潰瘍性大腸炎モデルである azoxymethane (AOM) および dextran sodium sulfate (DSS) を投与したラット大腸分離腺管における DNA メチル化レベルについて検討した。

B. 研究方法

(1) ラット及び発がん実験

Tg ラットは、昨年までに作成したものをを用いた。

MNNG の短期投与においては、雄 ACI-Tg2 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、その後 1 日非投与で飼育して、幽門粘膜腺管を腺管分離した。

発がん実験では、8 週齢の ACI-Tg2 および野生型 ACI ラット、BUF ラット各 45, 48, 39 匹に MNNG (83mg/mL) を 32 週間飲水投与した。その後 40 週間非投与で飼育する。MNNG 非投与群は各 10, 12, 12 匹飼育している。

潰瘍性大腸炎モデルとしては、4 週齢、雄の F344 Rat に AOM (10 mg/kg bw) を 1 回あるいは 2 回皮下投与後、1% DSS を 1 週間飲水投与し、32 週齢のラットの大腸腺管を分離した。大腸は吻側、中間部、肛門側で分割した。

(2) 細胞増殖の測定

屠殺 1 時間前に、BrdU (20mg/kg bw) を腹腔内投与し、胃幽門腺領域を切り出し、腺管分離、アクチナーゼ処理後、70%エタノールで固定した。塩酸により DNA を変性して FITC 標識-抗 BrdU マウスモノクローナル抗

体で処理、フローサイトメーターを用いて BrdU 陽性細胞数を計測した。

(3) リアルタイム MSP

ラットの大腸腺管から定法により DNA を抽出、Bisulfite 処理を行った。各遺伝子領域のメチル化 DNA 特異的プライマーおよびメチル化・非メチル化共通プライマーそれぞれについて、リアルタイム methylation-specific PCR(MSP)を SYBR Green I を用いて行った。計測したメチル化 DNA 分子数、およびメチル化・非メチル化共通 DNA 分子数から、メチル化レベルを算出した。

(倫理面への配慮)

ラットの飼育、発がん実験、屠殺はラットを用いた発がん実験は、実験動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 胃がん感受性遺伝子

昨年までに作製した ACI-Tg2 は、8 コピーのトランスジーンが導入されており、幽門において mRNA, 蛋白共に、BUF と同等以上の *Crabp2* が発現しているものである。昨年、繁殖を行い、MNNG による長期発がん実験を開始した。本年は発がん実験を継続しており、合計 6 群 170 匹の発がん実験は、2007 年 9 月解剖予定である。2007 年 3 月現在で MNNG の投与は終了しており、片腎などによる途中死亡はみられるものの、これまでの発がん試験と同様に順調に進行している。

胃幽門腺管における細胞増殖においては、これまでは BrdU の免疫染色を行い、切片上で陽性細胞数を計数していた。しかし、しばしば MNNG 投与の影響で腺管構造が崩れると共に薄切方向がずれた場合、正確な計数が困難であることが問題になっていた。そこで本研究ではフローサイトメーターで BrdU 陽性細胞数を計測した。

フローサイトメーターの条件設定において、まず、BrdU を投与しない個体を分析し、非特

異的蛍光を発する細胞の分布を測定した。FSC（前方散乱光）と SSC（側方散乱光）でゲートをかけることにより、その範囲以外に存在する、非特異的蛍光を発する細胞を除いた。

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ところ、MNNG 投与により、BrdU で標識された細胞、すなわち増殖している細胞の割合が Tg で 1.8% から 9.6% に、野生型で 2.2% から 11.8% に増加していることがわかった。一方で、Tg ラットと野生型とは有意な差がなかった。

(2) 潰瘍性大腸炎モデルの DNA メチル化解析

AOM および 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）、我々が同定した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。未処理の粘膜と DSS 処理粘膜と腫瘍とでメチル化している分子の割合が同じものがほとんどであったが、唯一、*Esr1* の exon 2 が未処理と DSS 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ていた。

そこで、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。

D. 考察

(1) 胃がん感受性遺伝子

ACI ラットと BUF ラットでは MNNG により傷害された幽門粘膜の修復過程における細胞増殖の程度に差があり、かつ、胃発がん感受性に差があったことから、発がん感受性と細胞増殖の程度とは相関するとされてきた。

今回、Tg と野生型 ACI とでは細胞増殖の程度に差が無かったということから、*Crabp2* の発現量は幽門粘膜障害後の細胞増殖の程度に影響を及ぼさないと考えられた。以上から、*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。

ACI-Tg2 は、安定してトランスジーンを発現しており、その発現量は、胃発がん抵抗性の BUF と同等以上である。*Crabp2* 発現量の大小と胃がん感受性との関係を明らかにするためには ACI-Tg2 は好適である。そこで、本システムを用いて、長期の胃発がん実験を実施している。その結果により、*Crabp2* が胃がん抵抗性遺伝子か否か結論できると期待される。*Crabp2* の発現量が胃がん感受性に関与することが明らかになれば胃がんのリスク診断に有用と考えられる。

(2) 潰瘍性大腸炎モデルの DNA メチル化解析

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* のメチル化が、AOM および DSS を投与したラット大腸分離腺管において、上昇していることを見出した。特に肛門側で有意な上昇が見られたことは、吻側よりもむしろ肛門側で AOM および DSS によるダメージが大きく、腫瘍発生頻度も高いこととよく合致している。ゆえに、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。

E. 結論

ラット胃がん高感受性の原因遺伝子の一つの候補である *Crabp2* 遺伝子について、トランスジェニックラットを作製、幽門粘膜障害後の細胞増殖の程度には差が無かったが、長期胃発がん実験を進めている。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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 2006年8月(徳島)

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 2006年9月(横浜)

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 2006年12月(名古屋)

Yamashita, S. Silencing of *Tgfbr2* in Rat Prostate Cancers. 11th Korea-Japan Cancer Research Workshop. Busan, December, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

短期マウス大腸発がんモデルを用いた発がん感受性要因に関する研究

分担研究者 杉江茂幸・金沢医科大学・腫瘍病理学・教授

研究要旨

1) DNA マイクロアレイによる ICR マウス AOM/DSS 発がんモデルにおける非腫瘍大腸粘膜の遺伝子発現の網羅的変動を実験開始5週、10週で検討した。Wif1 が5週、10週共、Plat と Myc が5週、Plscr2 が10週で著明に上昇し、Pparbp と Tgfb3 が10週、Ppar γ が5週で低下していた。AOM/DSS 発がんモデルにおける背景粘膜の発がん関与遺伝子が明らかになった。今回の遺伝子変動の結果は、発癌感受性、抵抗性遺伝子解析、発癌物質の発がん要因の解明の端緒となるものである。2) A/J マウスを用い、AOM/DSS 発がんモデルにおいて NNK 前投与による修飾作用を検討した。大腸では、腺癌担動物数、腺癌、全腫瘍の平均個数に NNK の促進効果が認められた。NNK 単独投与では大腸腫瘍発生はなかった。肺腫瘍は群間で有意差を認めなかった。NNK は、本来肺発がん物質であり、大腸発がんに関連の報告はない。前投与で促進作用を示す大腸発がん修飾作用が発見された。このことは、このモデルの発がん機序解明に一助となる。

A. 研究の目的

死亡原因の第1位であるがんの制圧は、国民的課題であり、発がん物質、特に環境中発がん物質へのヘテロサイクリックアミンに対する感受性要因の解明は重要である。中でも PhIP、MeIQx は、動物実験において多臓器に発がん性が確認されている。このような環境中発がん物質に対する発がん感受性や抵抗性遺伝子の同定、解析を行うことは発がんの機序、種差、個体差の原因解明に必須であり、得られる成果はがん予防、治療に有用と考えられる。今回、新たに開発した dextran sulfate sodium (DSS) 発癌剤併用短期マウス大腸発がんモデルを用いて、ヘテロサイクリックアミンによる種々の異なる系統のマウスでの発癌感受性の差異を検討し、発癌感受性遺伝子、発癌抵抗性遺伝子の同定のための動物実験を行う。特に、ヘテロサイクリックアミンに関する感受性遺伝子の同定、解明を最終目標とする。

B. 研究の方法

[ICR マウス AOM/DSS 発がんモデルにおける大腸粘膜遺伝子発現変動の網羅的解析遺伝子解析] 6週齢雄 ICR マウスに AOM10mg/kg 体重皮下投与し、1週間後から1週間2%DSS を飲水投与した。実験開始5週間後、10週間後犠牲死、剖検し、大腸非腫瘍部粘膜を採取、DNA マイクロアレイにかけ、遺伝子の変動を解析した。

[A/JマウスAOM/DSS発がんモデルにおけるNNKの修飾作用の検討] 5週齢雄A/JマウスにNNK10 μ mol/Kg体重を腹腔内投与、1週間後AOM10mg/kg体重皮下投与し、1週間後から1週間1.5%DSSを飲水投与した。実験開始22週間後、実験終了、犠牲死、剖検し、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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、金沢医科大学動物実験指針のガイドラインに準拠して行う。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に配慮し、安楽死は、深麻酔下、苦痛に配慮する。

C. 研究結果

1) ICR マウス AOM/DSS 発がんモデルにおける非腫瘍大腸粘膜における遺伝子発現の網羅的変動を実験開始 5 週、10 週で検討した。Wif1 (Wnt inhibitory factor 1) が 5 週、10 週共 Plat (plasminogen activator) と Myc (myelocytomatosis oncogene) が 5 週で、Plscr 2 (phospholipase A2, group IIA) が 10 週で著明に上昇し、Pparbp (peroxisome proliferator activated receptor binding protein) と Tgfb3 (transforming growth factor beta3) が 10 週で、Ppar γ が 5 週で低下していた。

2) A/J マウスを用いて、AOM/DSS 発がんモデルにおいて NNK の前投与による修飾作用を検討した結果、大腸では、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発生はなかった。肺腫瘍においては各群間で有意差を認めなかった。

D. 考察

今回の結果は、AOM/DSS 発がんモデルにおける背景粘膜の発がんに関連する複数の遺伝子の変動が明らかになったことで発癌感受性、抵抗性遺伝子解明の端緒となるものであり、さらに、発癌物質の発がん要因の解明に繋がる。本来肺発がん物質であり、大腸発がんに関連の報告のない NNK の大腸発がん修飾作用の発見は、殊に、前投与による促進作用であることが、このモデルの発がん機序解明に一助となる。

E. 結論

DNA マイクロアレイによる今回の活性遺伝子変動の結果は、AOM/DSS 発がんモデルにおける背景粘膜の発がん関連遺伝子を明らかにした。発がん機構における遺伝子的背景や分子機構を解明する端緒となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M, Wakabayashi K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 118(1): 25-34, 2006.
- 2: Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 27(1):162-169, 2006.
- 3: 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(5): 1169-1173, 2006.
- 4: 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(9): 896-904, 2006.
- 5: 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(2):252-258, 2007.

2. 学会発表

国際学会・外国学会

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 b-catenin

accumulated crypts in male db/db mice. 97th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Washington, DC., 2006.

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.

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.

Yasui, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Miyamoto, S., Sugie, S., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S.P., 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.

Yasui, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Niho, N., Takahashi, M., Wakabayashi, K. and 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.

国内学会

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、7月6-7日、2006年

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、8

月28-30日、2006年

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、9月14-15日、2006年

甲野裕之、戸塚ゆかり、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、9月28-30日、2006年

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、9月28-30日、2006年

杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、安井由美子、中釜 齊、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、(9月28-30日、2006年

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、9月28-30日、2006年

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、9月28-30日、2006年

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)、11月20-21日、2006年

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、1月29-30日、2007年

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、1 月 29-30 日、2007 年

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、1 月 29-30 日、2007 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

(なし)

遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究

分担研究者 庫本 高志 京都大学大学院医学研究科 助教授

研究要旨 エチルニトロソウレア (ENU) ミュータジェネシス法により作製した G1 ラットを増産し、1,735 頭分のラットミュータントアーカイブ Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA)を整備した。Apc 遺伝子にストップコドン変異 (S2522X) を持つ個体を見出し、Apc 遺伝子ノックアウトラット (F344-Apc^{i588Kyo}) として系統化した。F344-Apc^{i588Kyo} は、APC 蛋白質の Basic ドメインの一部、EB1 結合ドメイン、HDLG 結合サイトを欠失していると予測された。本系統を詳細に解析することによって、Apc 遺伝子の新たな機能が発見される可能性がある。

A. 研究目的

エチルニトロソウレア (ENU) ミュータジェネシス法により作製した G1 ラットを増産すること。さらにこれら G1 ラットの DNA と精子を整理・保存し、ラットミュータントアーカイブを構築すること。これら G1 ラットから p53 遺伝子、Apc 遺伝子に変異を持つ個体を選抜し、系統化することを目的とした。

B. 研究方法

ENU ミュータジェネシス

F344/NS1c 系統の雄ラットに 40mg/kg の ENU を 9 週齢と 10 週齢時の 2 回投与し、20 週齢時に同一系統と交配した。

p53 と Apc 遺伝子についてエクソン領域を増幅するように 9 セットのプライマーを設定した。PCR により増幅後、ミスマッチ変異を特異的に検出する MuT-POWER 法により、点突然変異のスクリーニングを行った。

ラットミュータントアーカイブの構築

雄の G1 産子から、離乳時に、尾の一部を採取し、DNA を抽出した (DNA バンク)。12 週齢時に、精巢上体尾部から精子を採取し、保存液に懸濁後、超

音波処理して、-80℃にて凍結保存した (精子バンク)。

保存精子からの個体復帰

精子保存方法が有効か否かを検討するために、顕微授精法による個体復帰を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験は、「京都大学動物実験に関する指針」に基づき行った。

C. 研究結果

Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) 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 産子を得た。平成 17 年度の実績とあわせて、延べ 1,735 頭となった。

これらの G1 産子すべてから、DNA と精子を採取し、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。このアーカイブを Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) と名付けた。

Apc 遺伝子ノックアウトラットの開発

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（延べ約 2.2 Mb に相当）。

その結果、Apc 遺伝子の最終エクソンに点変異を持つ個体(#1588)を検出した。この点変異により、2523 番目のアミノ酸残基部位にストップコドンが生じていた。従って、このラットでは、APC 蛋白質の 2523 番目以降のアミノ酸を欠失していると予測された。

Apc 遺伝子に変異をもつ G1 ラット#1588 を親動物として、F344/NS1c と交配し、系統化を行った。

顕微授精による個体復帰

精子保存方法の検定を行うために、#1588 を含む 6 匹の G1 ラットの凍結精子を用いて、顕微授精法による個体復帰を行った。

未成熟の雌 F344/NS1c ラットに過排卵処置をし、卵を採取した。延べ 244 個の胚に精子を顕微注入し授精させた。培養後分裂している胚をレシピエントラットに移植した。215 個の胚を移植し、すべてのラインで少なくとも 3 頭以上の産子が得られた。

D. 考察

Apc 遺伝子ノックアウトラット

Apc 遺伝子ノックアウトラット(F344-Apc^{1588Kyō})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た。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。

ヒト大腸癌の Apc 遺伝子変異は、Mutation Cluster Region (MCR) と呼ばれる 1300 アミノ酸残基から 1500 アミノ酸残基にわたる約 200 残基の領域に集中している。MCR より N 末側での変異は、ヘテロで大腸腫瘍を高率に誘発し、ホモでは致死となる。MCR より C 末側では大腸腫瘍はほとんど誘発されず、ホモでも生存可能である。従って、APC 蛋白質の MCR を含む N 末側が、大腸癌腫瘍の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。

F344-Apc^{1588Kyō} のホモ接合体は、生存可能であり、目立った大腸腫瘍は観察されていない。7 ヶ月齢のヘテロにおいても、大腸腫瘍は観察されていない。この知見は、上記の APC 蛋白質の大腸腫瘍発生に係わる役割を再確認するものと考えられる。APC とベータカテニン複合体は、APC 蛋白質の C 末にある HDLG ドメインを介して DLG 蛋白質と結合する。APC と DLG は、共に、ラット大腸上皮細胞と培養海馬ニューロンシナプ스에発現している。以上のことから、APC-DLG 複合体は細胞サイクルと神経機能に係わることを示唆されている。

APC 蛋白質の C 末部分を欠失する F344-Apc^{1588Kyō} ラットを詳細に解析することによって、大腸上皮細胞や海馬における Apc 遺伝子の新たな機能が発見される可能性がある。

Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA)

KURMA は 1,735 頭分の DNA バンクと凍結精子バンクからなる。DNA バンクは個々に保管されているだけでなく、8 頭分ずつプールされ、Mut-POWER 法による変異遺伝子のスクリーニングに利用できるよう整備されている。

-80°C で凍結保存された精子を用いて、顕微授精法により個体復帰ができた。KURMA を有効利用するには、凍結精子による個体復帰が必須であるが、その保管方法として -80°C での凍結で十分であることが示された。

KURMA は、遺伝子改変ラット作製のためのリソースとして利用価値が高い。

E. 結論

Apc 遺伝子ノックアウトラット(S2522X)を作製した。

このラットは、APC 蛋白質の Basic ドメインの一部、EB1 結合ドメイン、HDLG 結合サイトを欠失していると予測された。ラットミュータントアーカイブ KURMA を整備した。このアーカイブは 1,735 頭分の DNA アーカイブと凍結精子アーカイブから

なり、遺伝子改変ラットの開発に利用できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka T, Kaneko S,
Takeuchi IK, Sasa M, and 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(1):168-177, 2007

2. 学会発表

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、
2006.5.11-13

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、
2006.11.30

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,
Aug29-Sep1, 2006

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
December 1-2

H. 知的財産の出願・登録状況

なし