

200704006A

厚生労働科学研究費補助金

社会保障国際協力推進研究事業

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究
平成 19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 若林 敬二

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告		
環境中の疾病要因の検索とその作用機構の 解明に関する研究 若林敬二	—————	1
II. 分担研究報告		
1. 新規変異原・がん原物質の検索 若林敬二	—————	9
2. 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明 中釜 斉	—————	11
3. アレイCGH法を用いたがん細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析 鈴木 孝昌	—————	13
4. 発がん因子特異的なDNAメチル化異常誘発の解明 牛島 俊和	—————	28
5. 大気汚染物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討 島 正之	—————	30
6. ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響 高野 裕久	—————	32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	33

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

研究要旨

本研究は、環境中の変異原や発がん及び疾病要因物質を明らかにすると共にヒトのがんやその他の疾病発生要因及び感受性要因を総合的に把握し、最終的にはがんを含む疾病の第一次予防推進の為に基礎的研究成果をあげることが目的とする。強変異原性物質 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン (DNBeP) の分布状況を三大都市圏（関東、東海、近畿）において採取した大気粉じん及び表層土壌について分析した結果、すべての試料から 3,6-DNBeP が検出され、環境中に広く分布していることが示唆された。大気中浮遊粒子状物質への短期的な曝露によって、炎症の指標である血清 CRP 値の上昇が認められた。また、気道炎症同様、気道過敏性を含む肺機能を、ナノ粒子が増悪しうることを、高性能呼吸解析システムを用いた詳細な検討により明らかとした。PhIP により誘発されるラット大腸がんモデルを用いた解析により、翻訳抑制因子 SND1 および microRNA を介する翻訳制御機構が大腸がんの発生・成立に重要な役割を果たしていることが分かった。翻訳制御機構の発がんにおける役割を明らかにすることにより、がんの発生・成立の新たな分子機構を明らかに出来るだけでなく、大腸がんの新規予防法や診断法、新たな治療法の開発に寄与することが期待される。がん細胞における遺伝子増幅のメカニズムを解析する目的で、c-myc 遺伝子増幅を持つ細胞株に関して、アレイ CGH 法による増殖部位の解析を行った結果、がん種およびがん細胞ごとに異なった Double Minute (DM) 染色体上の c-myc 増幅様式が存在することが明らかとなった。H. pylori 感染により容易にメチル化される遺伝子と、メチル化に抵抗性の遺伝子とがあることが明らかになった。さらに、その特異性は、H. pylori 感染時の遺伝子発現が低いことと強い相関があった。

分担研究者

若林敬二	国立がんセンター研究所	所長
島 正之	兵庫医科大学	教授
高野裕久	国立環境研究所	領域長
中釜 斉	国立がんセンター研究所	副所長
鈴木孝昌	国立医薬品食品衛生研究所	室長
牛島俊和	国立がんセンター研究所	部長

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

関東、東海及び近畿において表層土壌及び大気粉じんを採取し、メタノールを用い超音波抽出法により各抽出物を得た。抽出物を予備精製した後、3,6-DNBeP を還元カラムによりオンライン還元シジアミノ体として蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフにより定量分析した。土壌抽出物については Ames 試験も行った。本研究では試薬による環境汚染を起こさないよう、取り扱いに十分注意して実験を行った。

(2) 大気汚染物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討

大気汚染物質への長期的影響を評価するための断面研究として、大気汚染濃度の異なる地区の小中学生を対象に、炎症の指標である血清 CRP 濃度と大気中浮遊粒子状物質 (SPM)、二酸化窒素 (NO₂) 濃度との関連を検討した。さらに、同地区で 4 年間継続して実施した縦断的研究の結果を用いて、

大気環境濃度の変動と血清 CRP 濃度の変化との関係、及びアレルギー素因との関連性を検討した。

実施に際しては、千葉大学大学院医学研究院(分担研究者の前所属機関)倫理審査会の承認を得て、児童の保護者及び本人から文書による同意を得た。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

ナノマテリアルを単独、あるいはアレルゲンと複合して経気道曝露した。ナノマテリアルが、単独、あるいは他の環境要因と複合して及ぼす影響を、分子生物学的、生理学的に検討した。なお、動物実験は、米国 NIH のガイドラインを遵守し、当該施設の担当委員会の承認の基に実施し、動物数はできる限り最小限にとどめた。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

細胞傷害性ストレスに対する翻訳抑制因子 SND1 の発現誘導、および SND1 の過剰発現による WNT シグナルの活性化について検討した。加熱魚肉食品中の発がん性化合物の一つである PhIP の連続投与により、増殖抑制作用を有する翻訳制御因子 SND1 の大腸上皮での発現誘導を検討した。F344 系統に PhIP (50 mg/kg 体重)を2週間連続して胃内投与 (*i.g.*) したのち、高脂肪食のみを4週間投与、これを2回繰り返し、最後に PhIP のみを2週間投与した。PhIP 投与終了後、24 時間後にラットを屠殺し、大腸上皮を採取した。一部はホルマリン固定したのちパラフィン包埋し、約5mm厚の組織切片を作成したのち抗マウス Snd1 抗体による免疫組織学的解析を行った。さらに、SND1 をヒト大腸がん細胞株に一過性に過剰発現させ、WNT シグナル活性化への関与を検討した。

(5) アレイ CGH 法を用いたがん細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

DM 染色体上に c-myc 遺伝子の増幅を有する HL60, Colo320DM, KY821 の3細胞株に関して、ゲノム DNA を抽出し、蛍光ラベル後、Affymetrix SNP 250K アレイおよび Agilent Human Genome CGH マイクロアレイ 244K 等のオリゴ CGH アレイ上へハイブリダイズさせた。シグナル強度の解析により、ゲノム上のコピー数増減領域を検出した。また、ジャンクションのシーケンス配列を決定した。

(6) 発がん因子特異的な DNA メチル化異常誘発の解明

H. pylori 感染陰性及び陽性の健常者及び胃がん患者各 11 例 (合計 44 例) から、通常の内視鏡検査の際に、同意を得て胃粘膜生検標本を採取し、H. pylori 感染によりメチル化される遺伝子を同定するため、胃がん細胞株 AGS を脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) で処理し、発現上昇した遺伝子をマイクロアレイ解析

により探索した。DNA メチル化解析は、候補遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドについて、methylation-specific PCR (MSP) 法により行ない、遺伝子発現レベルは、定量的 RT-PCR 法により行なった。

C. 研究結果

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

3,6-DNBeP は NP pak RL 還元カラムと分析用 Inertsil ODS-EP カラムを連結した HPLC に注入し、3,6-DABeP に還元後、夾雑物質を分離し、蛍光検出器で測定した。3,6-DNBeP 0.2~200 pg の間で 3,6-DABeP の蛍光強度は直線性を示した。また、3,6-DNBeP の検出限界は 0.2 pg であった。分析した三大都市圏のすべての大気粉じん (5 検体) 及び表層土壌試料 (5 検体) から 3,6-DNBeP が検出された。3,6-DNBeP 濃度は、大気粉じんでは数十~数百 fg/m³ であり、表層土壌では数十 pg~数 ng/g 土壌であった。土壌抽出物のネズミチフス菌 TA98 に対する変異原性は 150~26500 revertants/g 土壌であり、これら変異原性に対する 3,6-DNBeP の寄与率は 10~35% であった。

(2) 大気汚染物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討

断面研究は 5 地区 6 小学校で実施し、解析対象者は 2,097 名 (同意率 82.4%) であった。血清 CRP 高値 (1.4 mg/L) 以上と有意な関連が認められた因子は、母親の喫煙 (オッズ比 [OR] 1.49, 95% 信頼区間 [CI] 1.06-2.08)、喘鳴症状 (OR: 1.86, 95% CI: 1.12-3.10) であり、SPM 濃度との関連も有意であった (最大/最小値の OR: 1.94, 95% CI: 1.08-3.50)。

縦断研究の対象者は 1,766 名であり、のべ 4,065 回の採血が実施できた (同意率 87.4%)。血清 CRP 濃度は学年とともに低下し、家庭内に喫煙者がいるもの、喘息・喘鳴症状があるものは有意に高かった。血清 CRP 濃度は採血前 1~3 日間の居住地域における SPM 濃度が高くなると有意に高くなるという関連が認められ、3 日平均濃度との関連が最大であった。一方、NO₂ については、採血前 6 ヶ月及び 1 年間の平均濃度との関連が有意であった。血清総 IgE 高値のものでは母親の喫煙、SPM 及び NO₂ 濃度との関連が大きかった。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

マウスに、vehicle、カーボンナノ粒子 (14nm、56nm)、卵白アルブミン (アレルゲン)、ナノ粒子とアレルゲンの併用投与群を設定し、経気道曝露を行った。気道の粘液産生に関与する Muc5ac 遺伝子発現は、vehicle 曝露に比較してアレルゲン曝露

により亢進し、ナノ粒子との併用は一層の発現亢進を示し、より小さな粒子で顕著であった。気道のメサコリン反応性を指標とする肺機能も、vehicle に比較してアレルゲン曝露により亢進し、ナノ粒子との併用は一層の亢進をもたらした。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

i) PhIP 投与による細胞傷害性ストレスに対する大腸上皮での Snd1 の発現誘導：PhIP により誘導された大腸がん及び異型な異常腺管で Snd1 が過剰発現していることを既に報告したが、PhIP 投与により、ラット大腸上皮に Snd1 が一過性に発現誘導されることを明らかにした。Snd1 が発がん物質曝露などの細胞傷害性ストレスに应答して発現誘導される、ストレス応答性の翻訳制御因子であることが示唆された。

ii) SND1 の過剰発現による APC の発現抑制：SND1 を過剰発現させた種々のヒトがん細胞株 (HCT116, SW48, HeLa) で、APC 蛋白質の発現量が APC mRNA の発現量に影響を与える事なく有意に減少した。一方、SW48 細胞で SND1 をノックダウンさせると、APC 蛋白質量は増加した。以上の結果より、SND1 が何らかの転写後制御機構により、APC 蛋白質の発現量を負に制御することが分かった。SND1 は RNA 干渉のエフェクター複合体 RISC の構成因子であることが報告されている。実際我々も、SND1 が FMRP, Gemin3 などの RISC の構成因子と相互作用することや、let-7 等の microRNA と相互作用することを明らかにした。SND1 がある種の microRNA を介して標的遺伝子の翻訳を抑制していることが示唆された。

(5) アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

Double Minute (DM) 染色体として c-myc 遺伝子増幅を持つ HL-60 細胞において、8 つの領域からなる増幅単位的全構造をシーケンズレベルで明らかにし、DM が環状構造を持つことを証明した。また同様に DM を持つ Colo 320DM 細胞における c-myc 増幅部位は、HL60 細胞とは異なり 1.5-1.9Mb の連続した一単位の領域として観察された。一方、KY821 細胞においては、位置は異なるものの、4 Mb 以上にわたる正常領域を含んだ分断された複数の増幅単位として観察された。これらの結果より、がん種およびがん細胞ごとに異なった DM 染色体上の c-myc 増幅様式が存在することが明らかとなった。また、同時に SNP チップや CGH アレイを用いたアレイ CGH 解析により、従来検出できなかった微細な領域の変化を検出でき、シーケンズレベルで詳細な増幅、

欠失単位の同定が可能となり、リピート構造や回文構造などが組み換えを誘発する可能性が示唆された。

(6) 発がん因子特異的な DNA メチル化異常誘発の解明

AGS 胃がん細胞株を脱メチル化剤 5-aza-dC で処理、発現上昇する遺伝子の中から、胃がん細胞株でメチル化される遺伝子 48 個を見出した。これらについて、*H. pylori* 感染陰性及び陽性の健常者及び胃がん患者各 11 例 (合計 44 例) の胃粘膜でメチル化を検討した。その結果、26 遺伝子は *H. pylori* 陰性健常者ではメチル化されず、*H. pylori* 感染により容易にメチル化され、その変化は永続した。一方、9 遺伝子は全くメチル化されていなかった。残り 12 遺伝子はランダムにまたは胃がん患者でやや高頻度にメチル化され、1 遺伝子は 4 群全てでメチル化されていた。DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性の機構を検討するため、メチル化感受性遺伝子 15 遺伝子、メチル化抵抗性遺伝子 8 遺伝子について、健常者胃粘膜での遺伝子発現レベルを検討した。メチル化抵抗性の遺伝子は、メチル化感受性の遺伝子に比べて明らかに高い発現レベルを示した ($P = 0.002$)。さらに、*H. pylori* 感染による維持メチル化酵素 DNMT1、*de novo* メチル化酵素 DNMT3A 及び DNMT3B の発現変化を検討したが、有意な発現変化は認められなかった。

D. 考察

(1) 新規変異原・がん原物質の検索

分析した三大都市圏のすべての大気粉じん及び表層土壌試料から 3,6-DNBeP が検出されたことから 3,6-DNBeP が広く環境中に分布していると考えられた。但し、大気粉じん中の濃度は大阪市の 2 日間で 9 倍程度の差がみられたことから日間変動がやや大きいと予想された。表層土壌抽出物の変異原性に対する 3,6-DNBeP の寄与率が 10~35% と高かったことから 3,6-DNBeP は表層土壌中の主要な変異原性物質であると考えられた。3,6-DNBeP の類似化合物であるニトロアレーンが各種燃焼機関において発生し、大気汚染物質として検出されていることから、3,6-DNBeP も、それら機関により生成し、大気中に放出されたの

ち表層土壌に蓄積したものと予想される。今後、3,6-DNBp による環境汚染を防止するため、その発生源を解明する必要がある。

(2) 大気汚染物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討

自動車排出ガス等による大気中粒子状物質が健康に与える影響が懸念されている。これまでに行われた多くの疫学研究では、主として大気汚染と呼吸器疾患及び症状に与える影響が検討されてきた。大気汚染の健康影響の評価指標として確立されたバイオマーカーは存在しないが、近年は血清高感度 CRP 濃度と大気汚染濃度の変動との関連を示唆する報告がある。

本研究では、大気汚染濃度が異なる地域に居住する小学生の血清 CRP 濃度について検討したところ、学年、乳児期の栄養法、母親の喫煙、喘鳴症状による差が認められた。これらの因子を調整すると、小学生の血清 CRP 濃度と居住地の大気中 SPM 及び NO₂ 濃度との間に有意な関連が認められた。特に、血清総 IgE が高値のものでは、家庭内喫煙、大気中 SPM 及び NO₂ 濃度と血清 CRP 濃度との関連が大きく、アレルギー素因を有するものは大気汚染の影響を受けやすい可能性が示唆された。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

これまでの我々の研究にて、ナノ粒子曝露により（抗原誘発）アレルギー性気道炎症を増悪することは明らかとされていたが、肺機能への影響を検討した研究はなかった。今回気道炎症同様、気道過敏性を含む肺機能を、ナノ粒子が増悪しうることを、高性能呼吸解析システムを用いた詳細な検討により明らかとした。そのメカニズムには、1) 粘液産生に関わる遺伝子 Muc5ac、2) Th2 サイトカインの肺での発現、3) 酸化ストレス、4) EGF-EGFR によるシグナル伝達、5) 補体の関与が考えられた。

(4) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

PhIP をラットに投与すると、大腸上皮に SND1 及び腫瘍抑制的な microRNA が一過性に発現誘導されることが分かった。SND1 は大腸

前がん病変や大腸がんにおいても高発現していることが分かった。一方、翻訳制御機構に関わる microRNA と翻訳抑制因子 SND1 が相互作用することから、PhIP 等の細胞傷害性ストレスによる発がん過程の初期段階において、SND1 や microRNA を介した翻訳制御機構による増殖抑制作用が、細胞のがん化に対してバリア的な機能を果たしている可能性が考えられる。さらに、増殖抑制作用を有する microRNA の発現低下による翻訳制御機構の機能破綻が、がんの発生・成立に重要な役割を果たすことが示唆された。

(5) アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

HL60細胞を用いた解析には、カスタムメイドのオリゴCGHアレイの採用により、かなり詳細な増幅領域の限定が可能になった。ヒトゲノム情報より、目的配列を増幅するためのプライマーの設計は容易であり、これらの要素が重なり合って、DM染色体の全容の解明につながった。Colo320DMとKY821細胞におけるDM染色体の構造は、HL60細胞とは異なった様式を示しており、これらが環状であるかを含め、さらに検討を加える必要がある。HL60細胞の場合には、染色体DNAがループアウトしたような構造ができ、DNA複製がDNA鎖を乗り越えて進み、最終的に環状化されて切り出されるため、分解を受けずDMの生成へとつながったのではないかと予想している。おそらく、がん遺伝子の増幅、およびDM染色体の生成様式には複数の経路が存在すると予想され、その全容を解明するためには、より多くの細胞に対して同様な解析を進めていくことが今後望まれる。

(6) 発がん因子特異的な DNA メチル化異常誘発の解明

H. pylori 感染により DNA メチル化異常が誘発される遺伝子に特異性があることが明らかになった。さらに、その特異性は、*H. pylori* 感染時の遺伝子発現が低いことと極めて強い相関があった。発がん因子毎に組織が示す反応が異なることを考えると、発がん因子特異的に DNA メチル化のパターンが形成される可能性が高い。今後、各個人の胃粘膜

の DNA メチル化パターンを解析することで、例え血清抗体が消失していても、過去の感染歴を判定できるようになる可能性を示す重要な知見である。

E. 結論

最近、大阪府の表層土壌から主要な変異原性物質として分離・同定した新規強変異原性物質 3,6-DNBeP の環境中における分布状況を明らかにするため 3,6-DNBeP の分析法を開発し、三大都市圏において採取した表層土壌及び大気粉じんについて定量を行った。3,6-DNBeP は還元カラムと分析用 ODS 系カラムを連結した HPLC に注入し、3,6-DABeP に還元後、蛍光検出器で測定することにより高感度で分析可能であることがわかった。本分析法を用いて分析した三大都市圏のすべての大気粉じん(5 検体、数十～数百 fg/m³) 及び表層土壌(5 検体、数十 pg～数 ng/g 土壌) から 3,6-DNBeP が検出されたことから 3,6-DNBeP が広く環境中に分布していると考えられた。

小学生の血清 CRP 濃度は、学年の進行とともに低下するが、喘息・喘鳴症状があるものは有意に高かった。環境因子との関連では、家庭内に喫煙者がいると有意に高く、居住地域の大気中 SPM への短期的な曝露、NO₂ への長期的な曝露によっても有意に高くなることが明らかとなった。アレルギー素因を有する者は、家庭内喫煙、大気中 SPM 及び NO₂ 濃度と血清 CRP との関連が大きく、環境因子の影響を受けやすい可能性が示唆された。血清 CRP は、軽度の変化であっても心血管系疾患や動脈硬化の危険因子であることが指摘されており、大気汚染物質への曝露との関連についてはさらに検討する必要があると考えられた。

カーボンナノ粒子の経気道曝露は、特にアレルギーに関連する肺機能を増強(悪)する。これまでの知見もふまえ、当該粒子の喘息への修飾影響が実験的に示された。ナノマテリアルの hazard identification と hazard characterization として、ナノマテリアルのアレルギー喘息の病態増悪の可能性を指摘し、部分的にそのメカニズムを解明することができた。

大腸がんの発生及び成立のごく初期段階における遺伝的変化については不明な点が多

い。翻訳抑制因子 SND1 の発現異常により WNT シグナルの活性化が起こり得るという全く新規の分子機構が、ラットだけではなく、ヒト大腸がんの初期発生に重要な役割を果たしている可能性がある。翻訳抑制因子 SND1 および microRNA を介する翻訳制御機構の発がん過程における役割を明らかにすることにより、がんの発生・成立の新たな分子機構が明らかになるだけでなく、大腸がんの新規予防法や診断法、新たな治療法の開発にも寄与できることが期待される。

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、DM 染色体の増幅様式の詳細な検討が可能となった。HL60, Colo320DM, KY821 細胞はいずれも c-myc 遺伝子の増幅を DM 染色体として持つが、その増幅単位の様式に関しては細胞ごとに差があり、単一な増幅領域を持つ場合と、複数の分断された増幅単位が複雑に構築された様式をとる場合とがあることがわかった。また、増幅単位のジャンクションの特徴として、短いリピート単位や回文構造などの存在が明らかとなり、高次構造として離れた単位が近接して複製が乗り越えることにより DM の生成へとつながる可能性が示唆された。今後、アレイ CGH 法を用いてさらに他のがん遺伝子の増幅およびがん抑制遺伝子の欠失の様式を探ることで、それらの生成メカニズムに迫ることができると期待できる。

H. pylori 感染により DNA メチル化異常が誘発される遺伝子に特異性があることが明らかになった。さらに、その特異性は、*H. pylori* 感染時の遺伝子発現が低いことと極めて強い相関があった。発がん因子毎に組織が示す反応が異なることを考えると、発がん因子特異的に DNA メチル化のパターンが形成される可能性が高い。今後、各個人の胃粘膜の DNA メチル化パターンを解析することで、例え血清抗体が消失していても、過去の感染歴を判定できるようになる可能性を示す重要な知見である。

F. 健康危険情報
なし

G. 論文発表

1. Watanabe, T., Takahashi, K., Kobishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K. Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens. *Mutation Research*, 649: 201-212 (2008).
2. Wang R, Dashwood WM, Lohr CV, Fischer KA, Pereira CB, Louderback M, Nakagama H, Bailey GS, Williams DE, and Dashwood RH. Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and b-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29:834-839, 2008.
3. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M and Nakagama H. Tumor suppressive *miR-34a* induces senescence-like growth arrest through modulation of E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:15472-15477, 2007.
4. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T and Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 67:9568-9576, 2007.
5. Nakanishi M, Tazawa H, Sugimura T, Tanaka T and Nakagama H. Mouse strain differences in chronic-phase inflammatory responses in colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP-induced large bowel carcinogenesis. *Cancer Sci*, 98:1157-1163, 2007.
6. Takahashi H, Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Fujisawa T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Ikeda T, Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A, Nakagama H. Life style-related diseases of the digestive system: colorectal cancer as a life style-related disease: from carcinogenesis to medical treatment. *J Pharmacol Sci.*, 105:129-132, 2007.
7. Watanabe T, Tobé K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127, 2007.
8. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res.*, 619:113-123, 2007.
9. Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.*, 282:33507-33514., 2007.
10. Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*. 21:2344-2353, 2007.
11. Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.
12. 延山嘉真, 牛島俊和. エピジェネティクスと発がん. *臨床化学*, 36:288-295, 2007.
13. 榎本祥太郎, 牛島俊和. 発癌リスク診断へのエピジェネティクスの応用. *実験医学*, 25:2686-2692, 2007.
14. 牛島俊和. エピジェネティクスの診断への応用と癌細胞の鋭敏な検出. *実験医学*, 25:2670-2677, 2007.
15. 牛島俊和. DNAメチル化による生命現象・疾患とその解析. *実験医学*, 25:287-293,

- 2007.
16. 牛島俊和, 延山嘉眞. ゲノムで進むがん研究 がんのエピゲノム. 最新医学, 62:2087-2098, 2007.
 17. Shima, M. Air pollution and serum C-reactive protein concentration in children. *J Epidemiol*, 17: 169-176, 2007.
 18. Ando, M. and Shima M. The relationship between serum IL-12, IL-18, and IgE concentrations and allergic symptoms in Japanese schoolchildren. *J Invest Allergol Clin Immunol.*, 17: 14-19, 2007.
 19. Shima, M. and Tsunetoshi, Y. Air Pollution and Biological Markers: Serum C-reactive Protein Concentrations and Respiratory Symptoms in Children Living in Japanese Communities with different Air Pollution Levels, (Balduino, S.P. ed.) *Progress in Air Pollution Research*. 25-42, Nova Science Publishers, New York, 2007.
 20. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T: Effects of nanoparticles on lung physiology in the presence or absence of antigen. *Int J Immunopathol Pharmacol* (in press)
 21. Koike E, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Sakurai M, Aoyagi H, Shinohara R, Kobayashi T: Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles increases the number of antigen-presenting cells in murine lung. *Int J Immunopathol Pharmacol* (in press)
- mice, 第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007 年 10 月)
3. 田澤 大、土屋直人、泉谷昌志、竹下文隆、落谷孝広、杉村 隆、中釜 斉、Tumor suppressive miR-34a inhibits cell proliferation through modulation of E2F and p53 in human colon cancer cells, 第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007 年 10 月)
 4. 中釜 斉、ラットモデルを用いた環境要因による大腸発がん初期過程の分子機構の解析、第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007 年 10 月)
 5. 落合雅子、近藤靖之、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がん感受性遺伝子の探索、第 24 回日本疾患モデル学会総会、つくば、(2007 年 8 月)
 6. 田澤 大、土屋直人、泉谷昌志、近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、新規がん抑制遺伝子としての細胞障害誘導性マイクロ RNA-34a の同定とラット大腸発がん及び発がん感受性への関与、第 24 回日本疾患モデル学会総会、つくば、(2007 年 8 月)
 7. 田邊思帆里、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博、佐藤陽治: 細胞治療薬応用を目的とした骨髄由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング日本ケミカルバイオロジー研究会 第 2 回年会(2007 年 5 月)
 8. 鈴木孝昌 生殖細胞特異的変異原物質は存在するか? ~トランスジェニックマウスを用いた突然変異試験結果より~第 34 回日本トキシコロジー学会 (2007 年 6 月)
 9. Y. Luan, T. Suzuki, M. Honma, J. Ren Application of SNP and CGH arrays for Chromosome analysis. *International Congress on Toxicology* (2007 年 7 月)

学会発表

1. Tsuchiya N, Tazawa H, Izumiya M, Sugimura T, Nakagama H, MicroRNA-34a, a potential tumor suppressor, induces senescence-like growth arrest in human colon cancer cells, 日韓癌ワークショップ、札幌、(2007 年 12 月)
2. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H, Genome-wide array CGH analysis revealed microdeletions in inflammation-associated colon tumors in
10. T. Suzuki, Y. Luan, D. Prabha, M. Kogi, M. Honma, T. Koizumi, S. Tanabe, Y. Sato, K. Suzuki, and T. Yamaguchi CGH and SNP Arrays; as New Tools for Detailed Analysis of Chromosome The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007 年 10 月)
11. T. Suzuki, T. Koizumi, D. Prabha, M. Honma, S. Hamada, M. Nakajima, T. Watanabe, C. Furihata Collaborative

- study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput Quantitative Real-time PCR analysis by the TaqMan Low Density Array The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (2007年11月)
12. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Sakurai, T. Suzuki, S. Hamada, K. Narumi, M. Nakajima, A. Koeda, T. Sakuma, K. Oshida, H. Sanada, M. Hirayama Collaborative study of JEMS/MMS/Toxicogenomics: Quantitative real-time PCR analysis on mouse liver carcinogens.
13. The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (2007年11月)
14. 田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 遺伝子発現プロファイリングによる新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞継代培養時系列マーカー遺伝子の探索
15. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) (2007年12月)
16. 押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英 カルシウム結合タンパク質S100A8はHL-60細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) (2007年12月)
17. T Suzuki, T Suresh, K Ramesh, T Oshizawa, K Suzuki Searching for the hepatotoxicity-related makers in urinary proteome by the nano-LC MS/MS and original software "mzMore" International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008年1月)
18. 牛島俊和 エピジェネティクスによる発がん要因とリスクの評価 日本衛生学会シンポジウム 2007年3月
19. 牛島俊和 エピジェネティクスからみた多段階発がん 日本エピジェネティクス研究会 2007年6月
20. 丹羽透, 塚本徹哉, 田中晴就, 一瀬雅夫, 杉村隆, 立松正衛, 牛島俊和 *Helicobacter pylori*感染は胃粘膜上皮に異常DNAメチル化を誘発する. 発癌病理研究会 2007年8月
21. 牛島俊和 エピジェネティックな発がんの場 日本癌学会66回総会シンポジウム 2007年10月
22. 馬 露, 余田佳子, 山本紘乃, 中井里史, 田村憲治, 島 正之 屋内外における粒子状物質濃度と喘息児のピークフロー値との関連 第48回大気環境学会年会, 岡山市 (2007年9月)
23. 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一: ナノ粒子が呼吸器疾患に与える相乗影響 第14回日本免疫毒性学会学術大会 2007年9月20-21日 神戸
- H. 知的財産所有権の取得
- (1) 特許取得
「マイクロRNAを有効成分として含有する腫瘍増殖抑制剤、およ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
- (3) その他
なし

(分担) 研究報告書

新規変異原・がん原物質の検索

(分担) 研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 所長

研究要旨 強変異原性物質 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(DNBeP)の環境中の分布状況を明らかにするため、3,6-DNBePの分析法を開発し三大都市圏において採取した大気粉じん及び表層土壌について定量を行った。分析したすべての大気粉じん及び表層土壌試料から3,6-DNBePが検出され、3,6-DNBePが環境中に広く分布していることが示唆された。

A. 研究目的

最近、私達は大阪府の表層土壌から新規化合物 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(DNBeP)を主要な変異原性物質として分離・同定した。また、3,6-DNBePの変異活性が既知化合物中、最強の部類に属することがわかった。本研究の目的は、3,6-DNBePの環境中における分布状況を明らかにすることである。3,6-DNBePの分析法を開発し、三大都市圏において採取した大気粉じん及び表層土壌について定量を行った。

B. 研究方法

関東、東海及び近畿において表層土壌及び大気粉じんを採取し、メタノールを用い超音波抽出法により各抽出物を得た。抽出物を予備精製した後、3,6-DNBePを還元カラムによりオンライン還元しジアミノ体として蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフにより定量分析した。土壌抽出物についてはAmes試験を行った。(倫理面への配慮)本研究では試薬による環境汚染を起こさないよう、取り扱いに十分注意して実験を行った。

C. 研究結果

3,6-DNBePはNP pak RL還元カラムと分析用Inertsil ODS-EPカラムを連結したHPLCに注入し、3,6-DNBePに還元後、夾雑物質を分離し、蛍光検出器で測定した。3,6-DNBeP 0.2~200 pgの間で3,6-DNBePの蛍光強度は直線性を示した。また、3,6-DNBePの検出限界は0.2 pgであった。分析した三大都市圏のすべての大気粉じん(5検体)及び表層土壌試料(5検体)から3,6-DNBePが検出された。3,6-DNBeP濃度は、大気粉じんでは数十~数

百 fg/m³であり、表層土壌では数十 pg~数 ng/g土壌であった。土壌抽出物のネズミチフス菌TA98に対する変異原性は150~26500 revertants/g土壌であり、これら変異原性に対する3,6-DNBePの寄与率は10~35%であった。

D. 考察

分析した三大都市圏のすべての大気粉じん及び表層土壌試料から3,6-DNBePが検出されたことから3,6-DNBePが広く環境中に分布していると考えられた。但し、大気粉じん中の濃度は大阪市の2日間で9倍程度の差がみられたことから日間変動がやや大きいと予想された。表層土壌抽出物の変異原性に対する3,6-DNBePの寄与率が10~35%と高かったことから3,6-DNBePは表層土壌中の主要な変異原性物質であると考えられた。3,6-DNBePの類似化合物であるニトロアレーンが各種燃焼機関において発生し、大気汚染物質として検出されていることから、3,6-DNBePもそれら機関により生成し大気中に放出されたのち、表層土壌に蓄積したものと予想される。今後、3,6-DNBePによる環境汚染を防止するため、その発生源を解明する必要がある。

E. 結論

最近、大阪府の表層土壌から主要な変異原性物質として分離・同定した新規強変異原性物質3,6-DNBePの環境中における分布状況を明らかにするため3,6-DNBePの分析法を開発し、三大都市圏において採取した表層土壌及び大気粉じんについて定量を行った。3,6-DNBePは還元カラムと分析用ODS系カラムを

連結した HPLC に注入し、3,6-DABeP に還元後、蛍光検出器で測定することにより高感度で分析可能であることがわかった。本分析法を用いて分析した三大都市圏のすべての大気粉じん（5 検体、数十～数百 fg/m³）及び表層土壌（5 検体、数十 pg～数 ng/g 土壌）から 3,6-DNBeP が検出されたことから 3,6-DNBeP が広く環境中に分布していると考えられた。

F. 健康危険情報
該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe, T., Takahashi, K., Kobishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K.

Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens. Mutation Research, 649: 201-212 (2008).

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他

大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

加熱した魚・肉食品中に含まれる変異原性・がん原性物質であるヘテロサイクリックアミン類 (HCAs) の中で最も含量が多い 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た解析により、RNA-induced silencing complex (RISC)の構成因子の一つである翻訳抑制因子 SND1 が、大腸前がん病変及び大腸がんで高発現していることを明らかにした。ヒト大腸がん細胞株に SND1 を一過性に過剰発現させると APC mRNA 量を変えずに、APC 蛋白質の発現を抑制し、WNT シグナル経路を活性化することが分かった。抗マウス SND1 抗体を用いた免疫沈降法により、SND1 が RNA 干渉のエフェクター複合体である RISC の構成因子の一つであることや、翻訳制御に関わるマイクロ RNA とも相互作用することが分かった。翻訳抑制因子 SND1 および microRNA を介する翻訳制御機構が大腸がんの発生・成立に重要な役割を果たしていることが分かった。翻訳制御機構の発がんにおける役割を明らかにすることにより、がんの発生・成立の新たな分子機構を明らかに出来るだけでなく、大腸がんの新規予防法や診断法、新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

A. 研究目的

がんの発生には環境要因による DNA 損傷などの細胞傷害性ストレスが重要な役割を果たしている。がんの初期発生段階における遺伝子変化や、種々の細胞傷害性ストレスに対する個体間の感受性の違いを規定している遺伝的要因を明らかにする。本研究では、加熱魚・肉食品中に含まれる変異原性物質ヘテロサイクリックアミン類(HCAs)の中で最も含量が多い 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo[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、大腸発がんの感受性に寄与する種々の遺伝的要因や発がん過程の修飾要因を解明し、遺伝情報に基づいたがんの新規予防策や発がん高危険度軍の掌握を可能とするシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

① 細胞傷害性ストレスに対する翻訳抑制因子 SND1 の発現誘導、および SND1 の過剰発現による WNT シグナルの活性化の検討：加熱魚・肉食品中の発がん性化合物の一つである PhIP の連続投与により、増殖抑制作用を有する翻訳制御因子 SND1 の大腸

上皮での発現誘導を検討した。F344 系統に PhIP (50 mg/kg 体重) を 2 週間連続して胃内投与 (i.g.) したのち、高脂肪食のみを 4 週間投与、これを 2 回繰り返す、最後に PhIP のみを 2 週間投与した。PhIP 投与終了後、24 時間後にラットを屠殺し、大腸上皮を採取した。一部はホルマリン固定したのちパラフィン包埋し、約 5 mm 厚の組織切片を作成したのち抗マウス Snd1 抗体による免疫組織学的解析を行った。

② SND1 による転写後制御機構を介した APC 遺伝子の翻訳抑制：大腸上皮における SND1/Snd1 発現誘導の生物学的意義を明らかにするため、複数のヒト大腸がん細胞株 (HCT116, SW48 など) および HeLa 細胞をもちいて、SND1 の過剰発現、及び特異的な siRNA を用いた SND1 遺伝子のノックダウンによる WNT シグナル活性化への関与を検討した。

③ SND1 蛋白質の翻訳制御機構への関与：まず、SND1 と RISC 構成因子との相互作用について検討した。HeLa 細胞に HA-tagged SND1 を一過性に強制発現させ、抗マウス SND1 抗体を用いて免疫沈降させた。得られた免疫沈降物を用いて、抗 FMRP 及び抗

Gemin3 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。さらに、SND1 と microRNA との相互作用についても検討した。SND1 の免疫沈降物から RNA を抽出し、microRNA (let-7) のプローブを用いてノーザンブロット解析を行った。

(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。ヒト試料を用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

① PhIP 投与による細胞傷害性ストレスに対する大腸上皮での Snd1 の発現誘導：PhIP により誘発された大腸がん及び異型な異常腺管で Snd1 が過剰発現していることを既に報告したが、PhIP 投与により、ラット大腸上皮に Snd1 が一過性に発現誘導されることを明らかにした。Snd1 が発がん物質曝露などの細胞傷害性ストレスに応答して発現誘導される、ストレス応答性の翻訳制御因子であることが示唆された。

② SND1 の過剰発現による APC の発現抑制：SND1 を過剰発現させた種々のヒトがん細胞株 (HCT116, SW48, HeLa) で、APC 蛋白質の発現量が APC mRNA の発現量に影響を与える事なく有意に減少した。一方、SW48 細胞で SND1 をノックダウンさせると、APC 蛋白質量は増加した。以上の結果より、SND1 が何らかの転写後制御機構により、APC 蛋白質の発現量を負に制御することが分かった。

③ SND1 蛋白質の翻訳制御機構への関与：RNA 干渉のエフェクター複合体 RISC の構成因子であることが報告されている。実際我々も、SND1 が FMRP, Gemin3 などの RISC の構成因子と相互作用することや、let-7 等の microRNA と相互作用することを明らかにした。SND1 がある種の microRNA を介して標的遺伝子の翻訳を抑制していることが示唆された。

D. 考察

PhIP をラットに投与すると、大腸上皮に SND1 及び腫瘍抑制的な microRNA が一過性に発現誘導されることが分かった。SND1 は大腸前がん病変や大腸がんにおいても高発現していることが分かった。一方、翻訳制御機構に関わる microRNA と翻訳抑制因子 SND1 が相互作用することから、PhIP 等の細胞傷害性ストレスによる発がん過程の初期段階において、SND1 や microRNA を介した翻訳制御機構による増殖抑制作用が、細胞のがん化に対してバリア的な機能を果たしている可能性が考えられる。さらに、増殖抑制作用を有する microRNA の発現低下による翻訳制御機構の機能破綻が、がんの発生・成立に重要な役割を果たすことが示唆された。

E. 結論

大腸がんの発生及び成立のごく初期段階における遺伝的変化については不明な点が多い。翻訳抑制因子 SND1 の発現異常により WNT シグナルの活性化が起こり得るという全く新規の分子機構が、ラットだけではなく、ヒト大腸がんの初期発生に重要な役割を果たしている可能性がある。翻訳抑制因子 SND1 および microRNA を介する翻訳制御機構の発がん過程における役割を明らかにすることにより、がんの発生・成立の新たな分子機構が明らかに出来るだけでなく、大腸がんの新規予防法や診断法、新たな治療法の開発にも寄与できる期待される。

F. 健康危険情報

(特になし)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang R, Dashwood WM, Lohr CV, Fischer KA, Pereira CB, Louderback M, Nakagama H, Bailey GS, Williams DE, and Dashwood RH. Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and b-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29:834-839, 2008.
- 2) Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M and Nakagama H. Tumor suppressive miR-34a

アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

がん細胞における遺伝子増幅のメカニズムを解析する目的で、c-myc 遺伝子増幅を持つ細胞株に関して、アレイ CGH 法による増幅部位の解析を行った。その結果、Double Minute (DM) 染色体として c-myc 遺伝子増幅を持つ HL-60 細胞において、8つの領域からなる増幅単位的全構造をシーケンスレベルで明らかにし、DM が環状構造を持つことを証明した。また同様に DM を持つ Colo 320DM 細胞における c-myc 増幅部位は、HL60 細胞とは異なり 1.5-1.9Mb の連続した一単位の領域として観察された。一方、KY821 細胞においては、位置は異なるものの、4 Mb 以上に渡る正常領域を含んだ分断された複数の増幅単位として観察された。これらの結果より、癌種およびがん細胞ごとに異なった DM 染色体上の c-myc 増幅様式を持つことが明らかとなった

A. 研究目的

癌細胞株における、がん遺伝子の増幅領域に関して、アレイ CGH 法を用いた詳細な検討を行い、増幅単位の構造をシーケンスレベルで解明することを目的とする。

B. 研究方法

1 HL60 細胞の遺伝子増幅の解析

1-1. 使用した細胞株

国立医薬品食品衛生研究所、細胞バンク（当時）より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した。この

細胞は既に染色体解析および CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を DM 染色体および HSR として持つことが知られている。なお、分担研究者自身の血液より抽出した DNA を、正常コントロールサンプルとして用いた。

1-2. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70% Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。

1-3. 使用したオリゴ CGH アレイ

アレイ一枚あたり 39 万個のオリゴヌク

レオチド (50mer) プローブをカスタムデザイン可能である Nimblegen 社 NANDEMO アレイを用いた。用いたアレイ上のプローブデザインを表 1 に示す。これまでの BacCGH および SNP アレイを使った解析から、増幅が予想される 8 番染色体 8q24 領域に対して、連続的に 50mer のプローブを配置し、その外側の領域には一定間隔をおいて、プローブを配置した。また、これまでに HL60 細胞とその増殖性の subline である HL60-RG 株との間に変化の見られた染色体領域に関しても、一定間隔で残りのプローブを配置した。このデザインに基づいて、Nimblegen 社においてオリゴマーがアレイ上にデジタルミラーを用いたマスクレス法により固層合成され、カスタムメイドマイクロアレイを得た。

1-4. CGH 解析

細胞より抽出したゲノム DNA 1 μ g を、超音波処理によりランダムに 500-200bp のサイズに断片化した。その後、Cy3 (HL60) または Cy5 (コントロール) ラベルしたランダム nonamer の存在下 98 $^{\circ}$ C にて変性し、氷冷後、100unit の Klenow fragment および dNTP (6 mM) と 37 $^{\circ}$ C 2 時間インキュベーションしてラベル化した。0.5M EDTA (pH 8.0) を用いて反応を止め、イソプロパノールにて沈殿後水に再懸濁したのち、二つの溶液 15 μ g 相当を混合した。遠心濃縮機にて乾固後、40 μ g/l の NimbleGen Hybridization Buffer に溶解し、95 $^{\circ}$ C にて 5 分変性後 42 $^{\circ}$ C にし、18 時間マイクロアレイスライドにハイブリダイズさせた。アレイは NimbleGen Wash Buffer System にて洗浄後、遠心によりただちに乾燥させた。

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーを用いて 5 μ m の解像度にてスキャンングを行いイメージデータを取得し、NimbleScan 2.0 extraction software にて、数値データとした。データ解析には、専用の SignalMap ソフトウェアを用いて、染色体上の 2 サンプル間のシグナル比を可視化し、増減の判定を行った。

2 Colo320DM および KY821 細胞の遺伝子増幅の解析

2-1. 使用した細胞株

c-myc 由来と考えられる DM 染色体を持つヒト大腸がん由来細胞株である Colo320DM およびヒト白血病由来 KY821 株を独立行政法人 医薬基盤研究所、細胞バンク小原有弘博士より入手し、実験に使用した。

2-2. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70% Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。また一部 DNA の抽出には市販の QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用い、プロトコールに従って行った。

2-3. 使用した SNP チップ

ヒト約 5 万 SNP サイトを網羅した GeneChip $^{\circ}$ Human Mapping 250K Array Xba にて解析を行った。アレイには、フォトリソグラフィ製造法により同時合成された、配列の明らかな 25 bp オリゴヌクレ

オチドプローブが、1種類あたり100万コピー以上から構成される。各SNPには、1組が4つのプローブからなる5組のプローブが対応し、各組は、4対のパーフェクトマッチプローブとミスマッチプローブから成り、位置をずらしてSNP1個あたりの25bpオリゴヌクレオチド合計40種類により判定を行う。

2-4. ゲノムDNAの制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノムDNA250ngを制限酵素XbaIで消化し、XbaIシーケンスと続くPCR増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加したDNAフラグメントを増幅した。この際、用いたPCR条件は250~1,000bpのサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう最適化した。次に、増幅したDNAを断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 250K Arrayにハイブリダイズさせた。

2-5. チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様にAffymetrix社のGeneChip用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

2-6. SNPの判定とLOH解析

SNPの判定には、各40プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトであるGeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP判定を元に、GDASによりLOH領域が判定された。

2-7. ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) およびCNAG (Nannya et al., 2005) というソフトウェアを使用した。

2-8. Agilent CGHアレイを用いたCGH解析

Agilent社製、Human Genome CGH マイクロアレイ 244Kを使用した。業者指定の標準プロトコールに従い、解析を行った。概要は、ゲノムDNAをRsaIにて消化後、ランダムプライマーを用いたPCRによりCy3およびCy5-dUTPラベルを行った。反応液をMicrocon YM-30カラムにて精製後、専用のハイブリチャンバー内にて60°C、40時間ハイブリを行った。そして、バッファーにて洗浄後乾燥させ、GenePix 4000Bスキャナーにてシグナルを読み取り、CGH Analytics software (Agilent)にて解析を行った。なお、コントロールとして、市販のヒトリファレンスDNA (Promega)を用い、競合的にハイブリさせた。

C. 結果

1 HL60細胞の遺伝子増幅の解析

HL60 細胞より抽出したゲノム DNA を、コントロールの正常ゲノム DNA をリファレンスに表 1 に従って作成した NANDEMO アレイ上に競合的にハイブリさせた結果得られた CGH データのうち、8q24 領域の c-myc 遺伝子近傍の部分のシグナルを図 1 に示す。図より、この領域において 6 つの独立した増幅領域が確認された。さらに詳しく見ると、5 番目の増幅領域に関しては、他と比べてコピー数の多い部分があり、この部分を独立した領域と考え、全 7 領域に関して、1-7 の番号をつけその両端をセントロメア側から a,b とした(図 1)。次に各増幅における末端部を決定するために、両端に外向きに PCR 増幅用のプライマーを設計した。プライマーの設計にあたっては、図 1 の 1a-7b 領域に置ける各プローブのシグナル強度の変化より、切断点と予想される領域から少し内側に百-数百塩基対入った場所に、ゲノムの配列情報を基に約 19-20bp のプライマーを設定した。プライマーの設計にあたっては、primer3 ソフトウェアを用いて、Tm 値や 2 次構造や相互の相補性の回避などを考慮して設計した。設計したプライマーのゲノムシーケンス上の位置(UCSC ゲノムブラウザー)を図 1 に記した。赤矢印が設計したプライマーの位置であり、図中黒矢印は、シーケンス解析のためにより外側に設計したプライマーの位置である。なお、白矢印は、最終的に決定された切断点の位置である。文献と示した赤矢印は、過去の報告により用いられたプライマーの位置である。この報告では、HL60 細胞に対して、c-myc を含む領域と myc co-amplified region (MCR) の二つの領域の増幅が確認されて

おり、今回の増幅領域においては、それぞれ 4a-b、および 5a-b に相当する。

こうして設計したプライマーを用いて、どの増幅領域とどの増幅領域がつながっているかを調べるために、1a-7b の 14 種類のプライマーを用いた総当たりの PCR を行った。その結果、図 2 に示したようにいくつかの組み合わせについて増幅が認められゲノム配列より予想される配列が得られた。最終的に、2b,5a に関しては、目的のシーケンスが当初得られなかったが、ランダムプライマーを使ったウオーキング法により、この両者がつながっていることが確認できた。

以上の結果より、それぞれの増幅領域における配列の順序が図 3 のように決定でき、全ての領域がつながったことから、増幅領域は環状の構造をしていることが明らかとなった。HL60 細胞での遺伝子増幅領域は DM 染色体として存在するため、この結果より、DM 染色体が環状構造をしていることが証明できた。

各増幅単位の連結部分のシーケンス解析結果を図 5 に示すが、7b と 1a のジャンクション部分の配列解析の結果、7 と 1 の配列の間に約 200bp のどちらにも属さない新たな配列が確認できた。この由来を調べるために、ヒトゲノムシーケンスに対して相同配列検索 (BLAST サーチ) を行ったところ、同じ 8 番染色体の 7b より約 6Mbp 下流 (テロメア側) の配列と一致した。この結果より、増幅単位は全てで 8 つあることが判明した。

2 Colo320DM および KY821 細胞の遺伝子増幅の解析

Colo320DM 細胞に関して、Affymetrix SNP 250K チップを用いて CGH 解析した結果を図 7 に示す。もともと Colo320 細胞の核型は図 6 に示すようになりに変化しているため、染色体全体に渡って増減が見られた。Colo320 細胞に関しては、すでに Web 上の Cancer Genome Anatomy Project (CGAT) のページにおいて、メタフェーズ CGH 解析データに関する情報が記載されており、これらの変化は大体 CGH アレイ上でも観察されている。一方、CGH 解析においては、*c-myc* 領域も含めかなり狭い領域での増幅が認められており、これらの多くは従来の CGH 法では検出できていない。*C-myc* 領域の増幅形式について詳細を見ると、HL60 細胞の場合と異なり、ひとつの連続した領域からなり、その位置は利用可能なプローブとして 1.5-1.9Mb の範囲であった。

次に、KY821 細胞に関して、Affymetrix SNP 250K チップを用いて同様に CGH 解析した結果を図 8 に示す。Colo320 の場合と比較して全体に変化している領域は少なく、正常核型に近いことが示唆された。*c-myc* 領域以外には 9 番染色体上に増幅が認められた。増幅の程度から、DM 染色体にて増幅しているのは 8q24 の *c-myc* 領域であることが確認された。この領域の増幅様式を詳しく見てみると、増幅の程度の異なるいくつかの領域からなっており、正常コピー数に近い領域も含まれている。よって、Colo320 のような単純な増幅ではなく、複数の領域が複雑に入り組んだ HL60 に近い増幅様式をとっていることがわかった。Colo320DM 細胞については、さらに Agilent Human Genome CGH マイクロ

アレイ 244K を使って CGH 解析を行ったので、その結果を図 9 に示す。SNP チップとほぼ同様の結果が得られたが、もともと CGH 用にデザインされていることもあり、シグナルの変化量としては SNP チップよりも大きく、変化が検出しやすかった。SNP チップの結果との詳細な比較を図 10 に示した。緑矢印で示したように、大半の増減領域に関しては両者において共通に検出された。一方で、どちらかでのみ検出された領域が 6 つ存在した。

D. 考察

HL60 細胞の *c-myc* 遺伝子の増幅領域の解析においては、これまでの解析で完全に解明できなかった部分の全貌を明らかにすることができた。各増幅領域のジャンクションについては、CGH アレイからの詳細なデータを元に設計した PCR プライマーにより、シーケンズレベルでの解明に成功した。図 5 にそのジャンクション配列の特徴を示した。まず、その一つとしてジャンクションの部分の短い相同配列が見られた。これは非相同的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが立体的に高次構造を取るための原因となっていると考えられ、離れた増幅領域を結びつけるための一助になっていると考えられる。実際に得られた増幅領域のゲノム上の位置を元にモデルを作成し、各ジャンクションどうしを立体的に近傍に持ってきた際には、比較的コンパクトにまとまったタマネギ状のバブル構造を取らせること

ができ、増幅領域がループアウトしたような立体構造を作ることができた。こうした、ループアウトした高次構造が、組み換えにより切り出される、若しくはこの構造の中で、ジャンクション部分で乗り越えを起こしながら DNA 複製が行われることにより、全体として約 2Mb からなる閉じた環状の DNA 構造単位がゲノムより切り出され、これが DM 染色体の起源となったと予想される。通常、余分な DNA 断片は DNA 分解酵素により速やかに消化されると考えられるが、環状の比較的大きな構造体として生成したためにそうした分解を受けず、細胞の中に残り、DM 染色体になっていったと考えられる。そして、はじめは一つの単位であった DM 染色体が、複製、細胞分裂の過程で不均等に分配されていき、コピー数の多い細胞が増殖的優位性を持ったために、DM 染色体の数が増える方向で蓄積して行ったと考えている。また、環状の構造のために、一つの鋳型から複数コピーの複製が行われ増幅が起きたと考える事もできる。セントロメアを持たない構造でどうして DM 染色体として安定に保たれるかは謎であるが、構造単位としての DM 染色体の全貌が明らかになった意義は大きい。次に他の細胞株における DM 染色体の増幅様式を検討した。Colo320DM 細胞においては HL60 とは異なり、増幅は比較的単純な形で起こっており、細胞ごとに異なる様式を持つことがわかった。また、KY821 細胞においては比較的 HL60 細胞に近い、やや複雑な形式をとっていることがわかった。KY821 細胞は HL60 細胞と同様血球系のがん細胞であることから、細胞の種類により異なるメカニズムを持つ可能性も示唆され

た。今後、HL60 細胞と同様に、詳しいジャンクションの配列などを同定するとともに、他の c-myc 増幅をもつ細胞株についても検討を広げ、DM およびがん遺伝子増幅のメカニズムに関して検討を進めたい。

E. 結論

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、DM 染色体の増幅様式の詳細な検討が可能となった。その結果、HL60, Colo320DM, KY821 細胞はいずれも c-myc 遺伝子の増幅を DM 染色体として持つが、その増幅単位の様式に関しては細胞ごとに差があることがわかった。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127, 2007.