

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.

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.

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.

Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C $\delta$  in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

## 2. 学会発表

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髓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)

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)

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)

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)

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 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens(2007年11月)

C. 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.

The 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens (2007 年 11 月)

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

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)

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 カスタム oligo-CGH アレイのプロープデザイン

|                        | Physical position                                 | Size (Mb) | No. of probes | Interval (kb) |
|------------------------|---------------------------------------------------|-----------|---------------|---------------|
| MVC amplification area |                                                   |           |               |               |
| 1                      | sense: 123,800,000-130,950,000                    | 5.15      | 46377         | continuous    |
| 2                      | sense: 130,950,000-137,800,000                    | 6.83      | 5341          | 1             |
| 3                      | sense: 137,800,000-138,000,000                    | 0.2       | 1688          | continuous    |
| 4                      | sense: 138,000,000-146,214,826                    | 8.27      | 6326          | 1             |
| 5                      | sense: 146,214,826-146,274,826(telomere)          | 0.06      | 181           | continuous    |
| 6                      | antisense: 123,822,452-127,032,094                | 1.21      | 11230         | continuous    |
| 7                      | antisense: 127,252,004-127,923,887                | 0.67      | 5187          | continuous    |
| 8                      | antisense: 128,116,770-128,139,631                | 0.02      | 239           | continuous    |
| 9                      | antisense: 128,306,003-128,519,403                | 0.21      | 2031          | continuous    |
| 10                     | antisense: 129,909,921-130,528,321                | 0.62      | 5955          | continuous    |
| 11                     | antisense: 130,591,690-130,945,617                | 0.35      | 2653          | continuous    |
| total                  |                                                   |           | 87408         |               |
| Chr.10                 |                                                   |           |               |               |
| 1                      | 25,000,000-26,000,000                             | 1         | 8993          | continuous    |
| 2                      | 1-200,000                                         | 0.2       | 1166          | continuous    |
| 3                      | 200,000-25,000,000;<br>26,000,000-38,000,000      | 36.8      | 28389         | 1             |
| total                  |                                                   |           | 38550         |               |
| Chr.5                  |                                                   |           |               |               |
| 1                      | 53,310,000-53,360,000                             | 0.05      | 573           | continuous    |
| 2                      | 139,300,000-139,600,000                           | 0.3       | 3283          | continuous    |
| 3                      | 53,360,000-139,300,000                            | 85.94     | 15122         | 5             |
| total                  |                                                   |           | 18980         |               |
| Chr.9                  |                                                   |           |               |               |
| 1                      | 11,600,000-12,000,000                             | 0.4       | 3422          | continuous    |
| 2                      | 32,500,000-32,900,000                             | 0.4       | 3515          | continuous    |
| 3                      | 12,000,000-32,500,000                             | 20.5      | 3609          | 5             |
| 4                      | 101,000,000-104,500,000<br>(Novel small deletion) | 3.5       | 32446         | continuous    |
| total                  |                                                   |           | 42992         |               |

|                       |                       |       |       |            |
|-----------------------|-----------------------|-------|-------|------------|
| Chr.11                |                       |       |       |            |
| 1                     | 1-200,000             | 0.2   | 1292  | continuous |
| 2                     | 2,380,000-2,880,000   | 0.5   | 5906  | continuous |
| 3                     | 44,800,000-45,200,000 | 0.4   | 4072  | continuous |
| total                 |                       |       | 11270 |            |
| Chr.16                |                       |       |       |            |
| 1                     | 83,500,000-84,500,000 | 1     | 11583 | continuous |
| 2                     | 88,767,254-88,827,254 | 0.06  | 557   | continuous |
| 3                     | 84,500,000-88,767,254 | 4.27  | 3575  | 1          |
| total                 |                       |       | 15713 |            |
| Chr.17                |                       |       |       |            |
| 1                     | 1-60,000              | 0.06  | 639   | continuous |
| 2                     | 60,000-20,000,000     | 19.94 | 3655  | 5          |
| 3                     | 20,000,000-22,500,000 | 2.5   | 20759 | continuous |
| total                 |                       |       | 25053 |            |
| Chr.15                |                       |       |       |            |
| 1                     | 28,200,000-29,200,000 | 1     | 9861  | continuous |
| total                 |                       |       | 9861  |            |
| Chr.14                |                       |       |       |            |
| 1                     | 62,600,000-64,600,000 | 2     | 19386 | continuous |
| 2                     | 80,500,000-81,000,000 | 0.5   | 4661  | continuous |
| 3                     | 64,600,000-80,500,000 | 15.9  | 2890  | 5          |
| total                 |                       |       | 26937 |            |
| Chr.18 (1-76,117,153) |                       |       |       |            |
| 1                     | sense                 | -     | 13468 | 5          |
| 2                     | antisense             | -     | 13468 | 5          |
| total                 |                       |       | 26936 |            |
| Chr.22                |                       |       |       |            |
| 1                     | sense                 |       | 6365  | 5          |
| total                 |                       |       | 6365  |            |
| Chr.X                 |                       |       |       |            |
| 1                     | sense                 |       | 23884 | 5          |
| total                 |                       |       | 23884 |            |

Total:333961

\*Chr10 および Chr11 の末端領域を、1-200,000 に変更して設計しました。

\*Chr22 および ChrX を、5kbp のインターバルにて追加設計しました。

図1 HL60 細胞 8 番染色体 8q24 c-myc 近傍領域の CGH 解析の結果

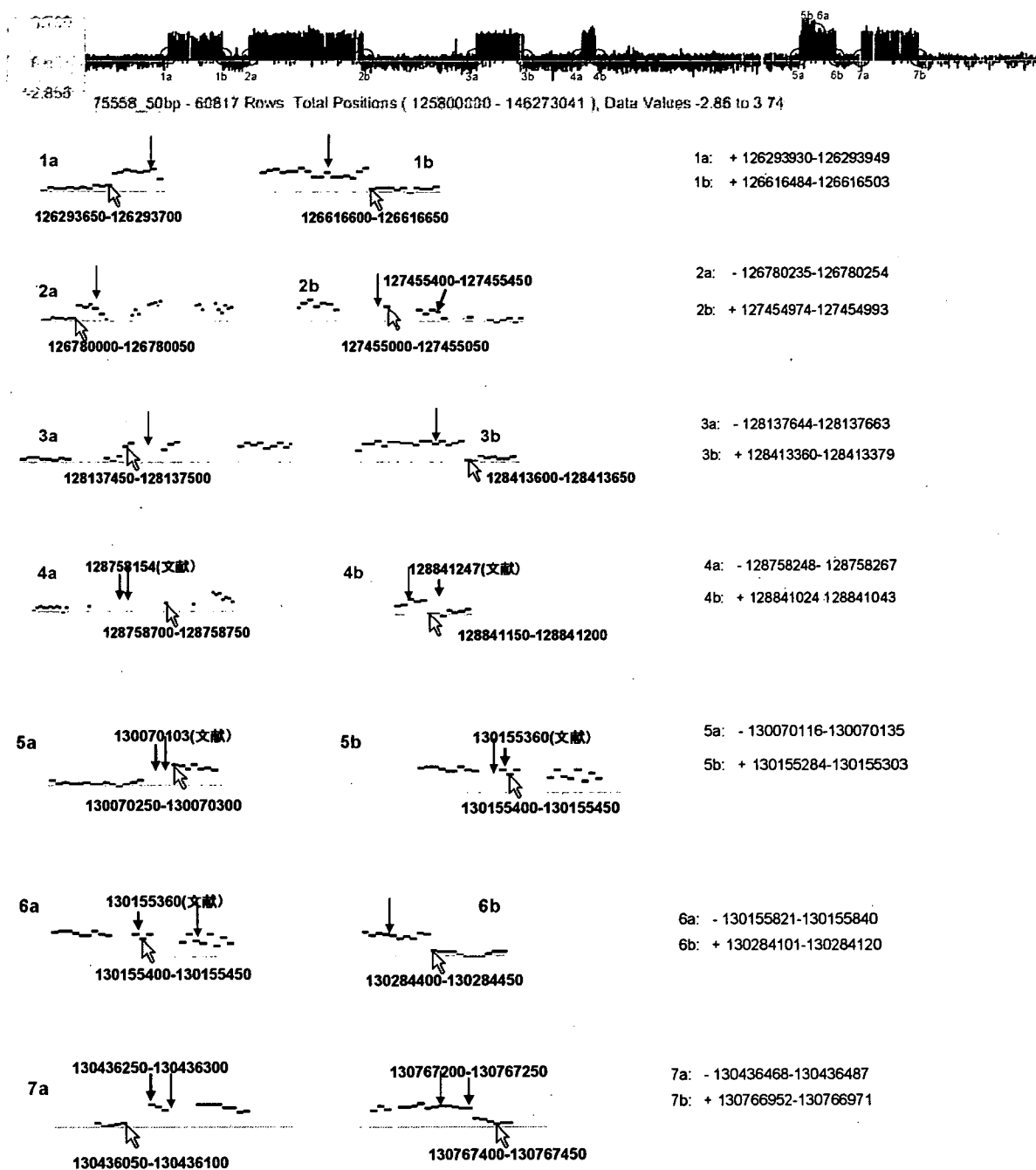


図2 総当たり PCR による増幅結果

|    | 1a | 1b | 2a | 2b | 3a | 3b | 4a | 4b | 5a | 5b | 6a | 6b | 7a | 7b |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1a | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1b | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 2a | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 2b | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 3a | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 3b | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 4a | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |    |
| 4b | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |    |
| 5a | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |    |
| 5b | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |    |
| 6a | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |    |
| 6b | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |    |
| 7a | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |
| 7b | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

図3 HL60 細胞における増幅単位の構造

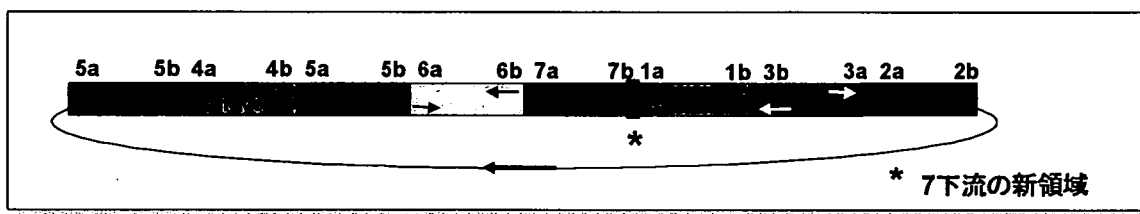


図4 各増幅単位のつながり

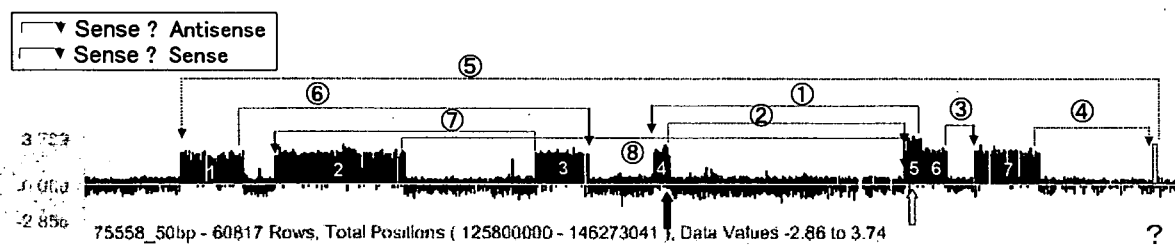


図5 各ジャンクションの配列とその特徴

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1b-3b</b>   | <p>5'→<br/> CTTCTCAGA TTGCACTTCA CTCTCTTCAI TGAGTCAGC TCTTGGCTTG GATCTTCTTC TCCCTTACTC ATTCCACTCA TTTCATGCCA ATGCTTTGAG GCAACACAAT GAAAAACTGG 128413727 3<br/> CTTCTCAGA TTGCACTTCA CTCTCTTCAI TGAGTCAGC TCTTGGCTTG ATATATTATG GGGTATGAT AATTAGGTGC ACATGCTATC TATGGACCA GAGAAAGACA GCAGAGATA HL60<br/> ACACTGTCT OCTTCAGAA CAAGTCGAAA TATGAAATCA CTTTTITAAG TCAACACATG TGAATATAT AATTAGGTGC ACATGCTATC TATGGACCA GAGAAAGACA GCAGAGATA 126616379 1<br/> 3'←</p> <p>3-3'のBREAKPOINTのところの一つ回文構造がある。1-3'のBREAKPOINTの下流に8塩基の回文構造がある。<br/> 挟んだ19塩基の由来は分からないが、両端のCATAとTATGはLOOP構造を作りうる</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>3a-2a</b>   | <p>3'←<br/> AAGCCACGCT AAGTGTCCG AAAAGGTCAA ATGGATCAT CACAGAGCT GCGGGGGTGA CTGGGCTTG TCTTTACAC AGAAGTGTAG CATGCCCTGC CACAGAGTAT TTGGACAAGG 126779995 2<br/> AAGCCACGCT AAGTGTCCG AAAAGGTCAA ATGGATCAT CACAGAGCT CTTATGTTT TACGGGACA TTGGTATGT TTCAAAAT TTCAATGGA GGAATATGA CTTCAGCTGT HL60<br/> ATAAAAGGA CAGGATTACA GTTGTGTTT GGAAGAGAC CTTCAGTAA TACTAAGA CAGGGGACA TTGGTATGT TTCAAAAT TTCAATGGA GGAATATGA CTTCAGCTGT 128137504 3<br/> 5'→</p> <p>JOINT部分にあるTATGTTTは後ろの部分が重複した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>2b-6a</b>   | <p>5'→<br/> GATCTCTTC CTCTGAAAT GTGTAAATG AAAAATTT GCAATATAA AACATACAG TAGTGTAA ACCAGACTA GGATTATGC TTCTGAGT ATCCAGACT TTTAACTAT 127455529 2<br/> GATCTCTTC CTCTGAAAT GTGTAAATG AAAAATTT GCAATATAA AACATACAG CTACACAGT CATTTTGTG AGGCAAGACA CACATACACA CATATATACA TACACACACA HL60<br/> AAGCAATC CAATTTGTA CAGATAACTG CACTCATTC GGATGCTGT TTAGAGAAAT CTACACAGT CATTTTGTG AGGCAAGACA CACATACACA CATATATACA TACACACACA 130081014 6<br/> 5'→</p> <p>JOINT部分の両側に相補配列。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>6b-4a</b>   | <p>5'→<br/> ACTTAAATG TTGATCTG AGACAGATG TTCTTACCT TAAGCTCAG GGTGTCTG CCGATGCA CCTGACCA CTGATGCCA CTGGCTTAG TCAGTGTAC AGAGTCACAG GCGCTATTT 130155424 6<br/> ACTTAAATG TTGATCTG AGACAGATG TTCTTACCT TAAGCTCAG GGTGTCTG TCTGAGATA TTGCTATG TTTATATGT ATATGTTAT AGGCAAGCT CTACACAG HL60<br/> TGTTCCTGGA ACATTTCTAG CATGCCCTCA ACTGAGCAGC TTCTCTCTG GATTCTGT TCTGAGATA TTGCTATG TTTATATGT ATATGTTAT AGGCAAGCT CTACACAG 128758252 4<br/> 5'→</p> <p>JOINT部分に2bpのShort Homology。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>4b-5a</b>   | <p>3'←<br/> TGACCTATGA CATCAAGACT AGGAAGGCA AGAGTCAGG TTGAAGGCA GCGCTCTG CTTCGATATG GTGGTGTG GCTTTCTGCC TTTTGTAG ACTTCAGAT GGTACCAT 130070039 5<br/> TGACCTATGA CATCAAGACT AGGAAGGCA AGAGTCAGG TTGAAGGCA GCGCTCTG CTTCGATATG GTGGTGTG GCTTTCTGCC TTTTGTAG ACTTCAGAT GGTACCAT HL60<br/> GGACATCAG ATCAGATAC ATACGGCTC CTTAAAGT TCATTCAAG CCGGAAGG GAGGAAGAA AGAAGAGG CAGGAAGGT GGGTGGGAG CAGGAAGAA AAGCATGT 128841158 4<br/> 3'←</p> <p>JOINT部分に3bpのShort Homology。両側にも6bpのShort Homology。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>5b-7a</b>   | <p>5'→<br/> TATCTCTCA GCGCAAGT TGTAAATG CTTCTTAT GCTTTCTT CTACACAT CTTTCTCTG CTCTCTAG TACAAAAAT GGCATCTC TAATTGAAA ATTACATCT 130284510 5<br/> TATCTCTCA GCGCAAGT TGTAAATG CTTCTTAT GCTTTCTT CTACACAT GAGGCTGG CTTCTCTAT CTATCACT TCTGCTG CTAGAACAG CAATAATA HL60<br/> TGTGTTAAA TATTTGTGA TGTTAATAT CTGCTCTGC ACTAAGATAT AAGTCTAGT AGAGGTTGG CTTCTCTAT CTATCACT TCTGCTG CTAGAACAG CAATAATA 130436264 7<br/> 5'→</p> <p>JOINT近傍に7bpのShort Homology。その近傍に回文構造。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>7b-8-1a</b> | <p>3'←<br/> CTAACTCAG CAGCTCTCA GAGTGAACG AGAAGACTC TATCTGGGC TACGAGAAA CAGGTCATAA AATCTTATT ATACCTTAA ATGAATAT GTTGGCTTG CTAACAAGT 126293633 1<br/> CTAACTCAG CAGCTCTCA GAGTGAACG AGAAGACTC TATCTGGGC TACGAGAAA CAGGTCATAA AATCTTATT ATACCTTAA ATGAATAT GTTGGCTTG CTAACAAGT HL60<br/> AATCAAGAC CTACTTTTA GAGTGTCTA TTGATGACC CTCTTTGCC CTAATTTCA CTAATGAGT GAAAAAAT GTTTAAAT CTGTAACCT ACTGGAAT ATTAATATC TAAATGAG 8<br/> 5'→</p> <p>3'←<br/> GTTTCTTCA AACACATTA AGTTGAGCA AGGCTGGAG GAGCTCAG AAGTCTCT TCTCTGAG TGGGGCTC GGAAGGCTG TTGAATGC CTGCGCTG GGTCTTCT 130767297 7<br/> AATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAAGATCG AGAATATCG ATTATAAAG CTTGGAGGG AGTAAAG GTTAAAGC CTGCGCTG GGTCTTCT HL60<br/> AGATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAAGATCG AGAATATCG ATTATAAAG CTTGGAGGG AGTAAAG GTTAAAGC CTGCGCTG GGTCTTCT 136650022 3<br/> 5'→</p> <p>7-3'と1-5'は逆方向の8を挟む。1のBREAKPOINTは回文構造で8とShort Homologyを持つ。8と7のJOINTもGTGTTの5塩基が重なっている。</p> |

図 6 Colo320DM および KY821 細胞株に関する情報

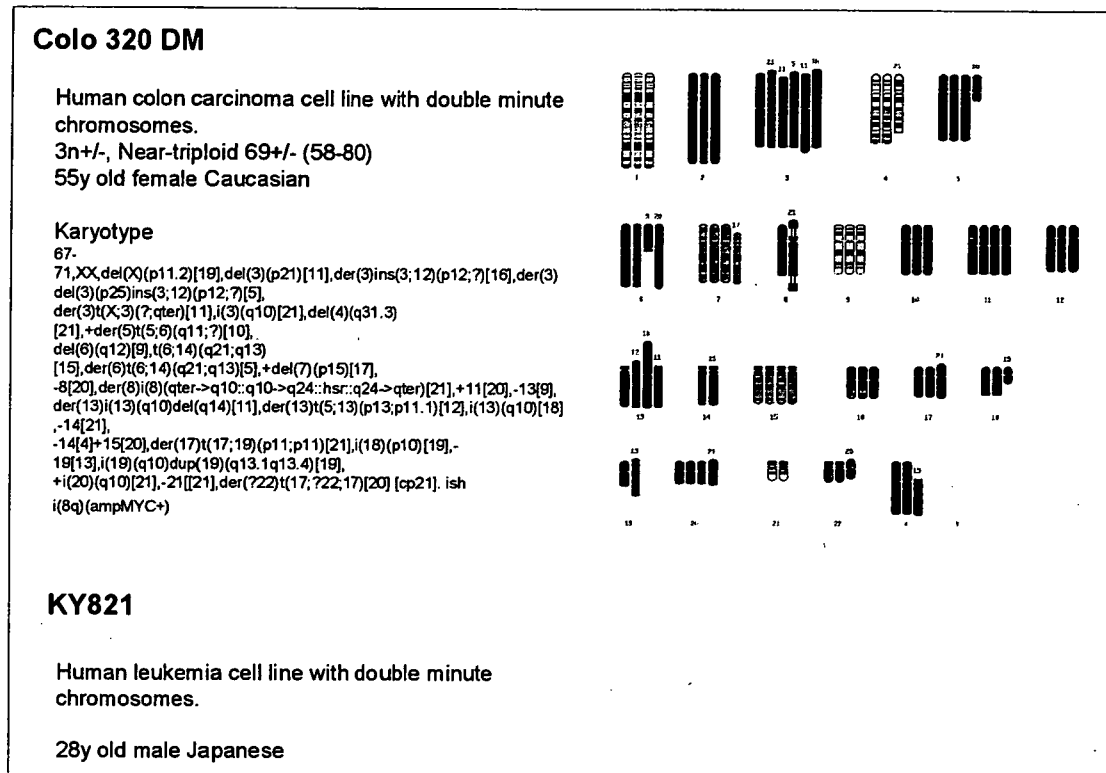


図 7 Colo320DM 細胞の SNP Chip による CGH 解析結果

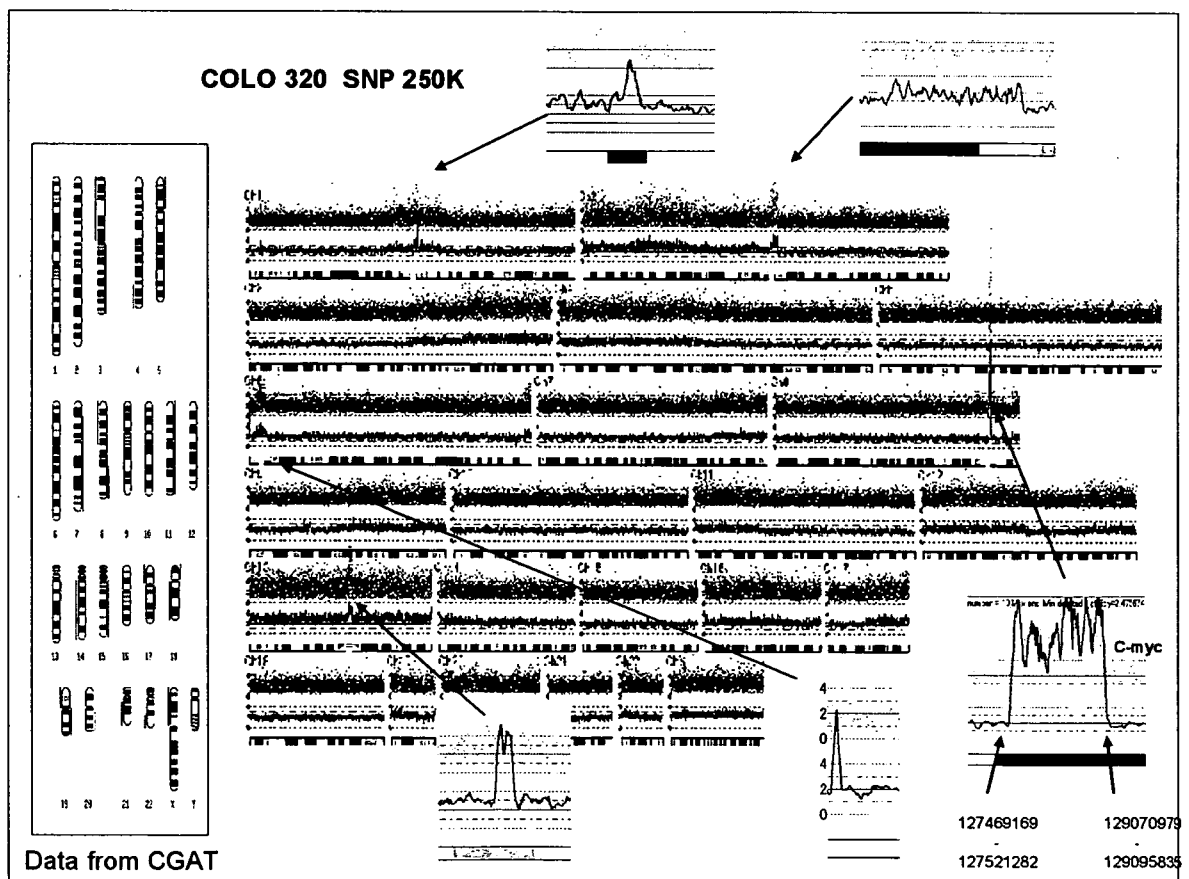


図 8 KY821 細胞の SNP Chip による CGH 解析結果

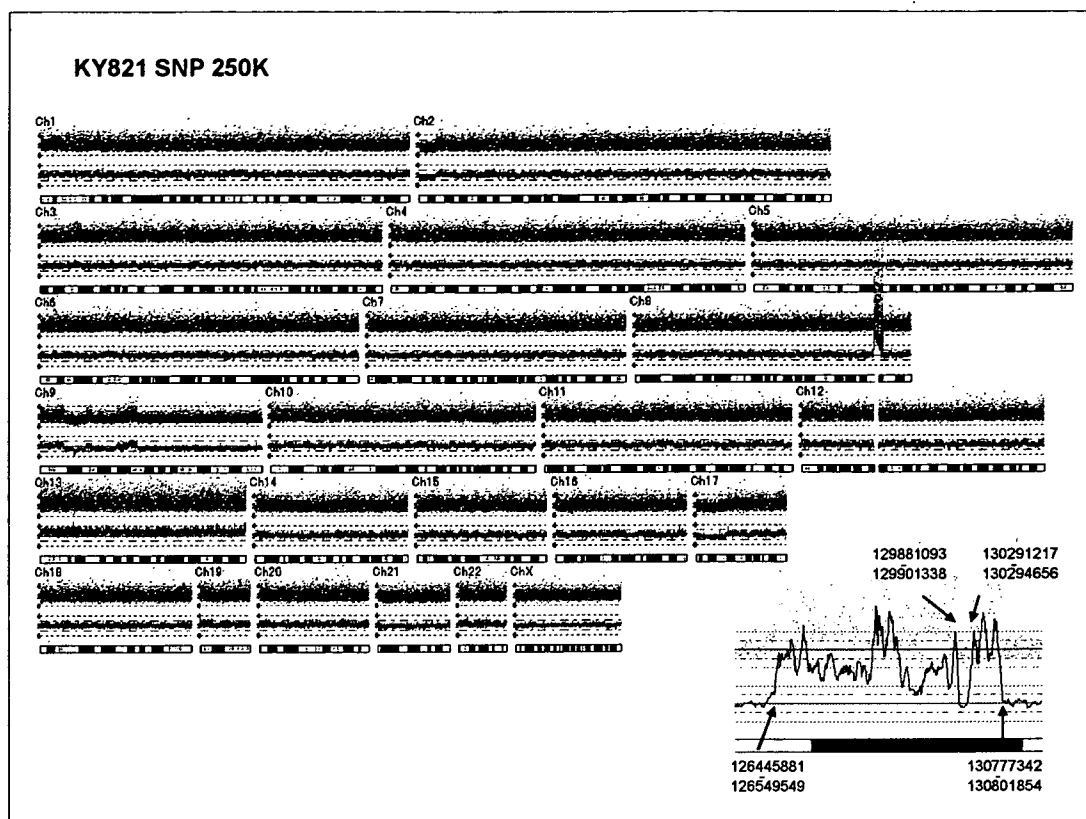


図 9 Colo320DM 細胞の Agilent CGH244K アレイによる CGH 解析結果

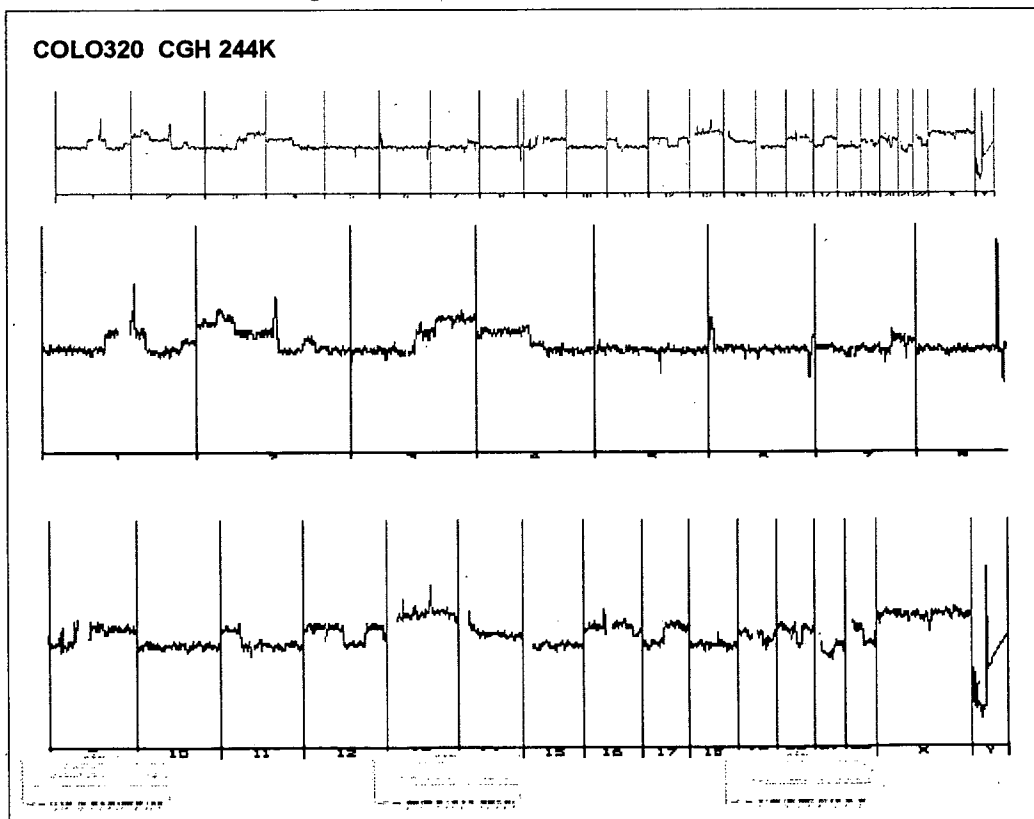
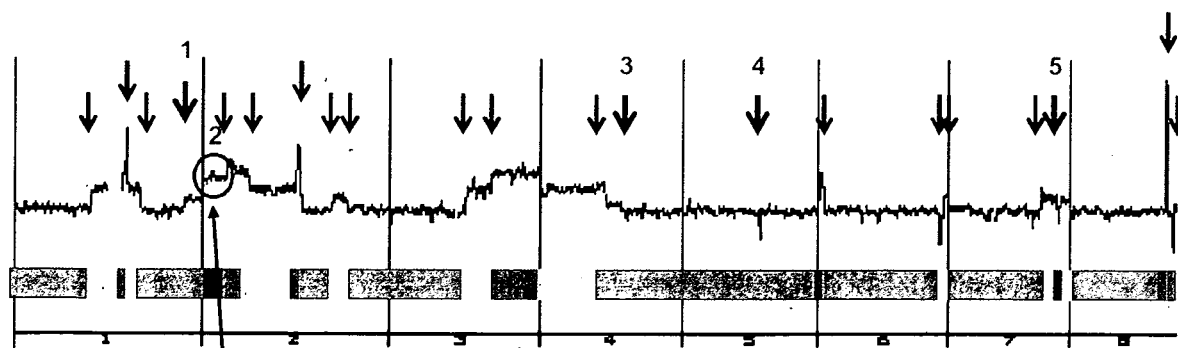
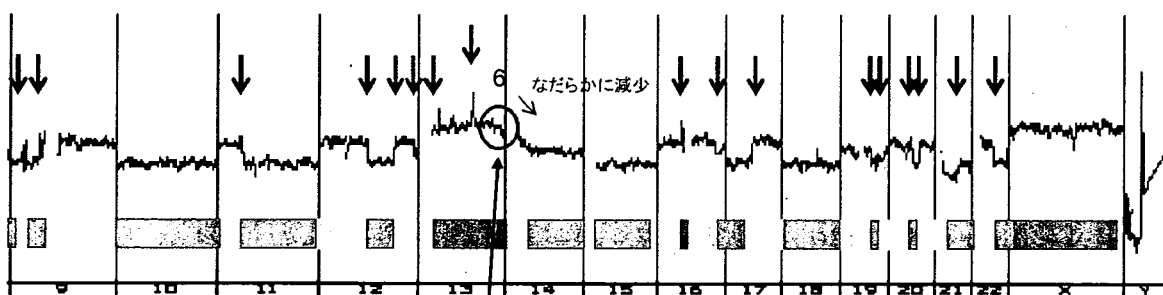


図 10 Colo320DM 細胞の SNP 500K および CGH244K アレイによる CGH データの比較

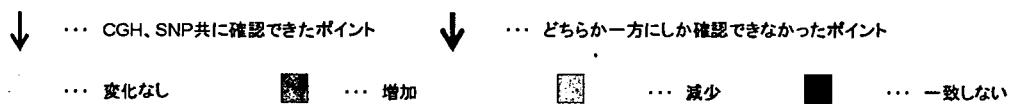
CGHの0を基準として増加、減少を示した



CGHでは増加しているがSNPでは増加していない



CGHではなだらかに減少しているがSNPでは増加している



発がん因子特異的なDNAメチル化異常誘発の研究

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部 部長

研究要旨 *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か否かを明らかにするために、48個の胃がん細胞株でメチル化されうる遺伝子について、*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）の胃粘膜でのDNAメチル化の有無を検討した。その結果、*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。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、例えば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。

A. 研究目的

ヒト腫瘍の発生に関与した因子を同定することは、発がん因子を除去し、がんを予防するために重要である。しかし、個々の腫瘍に関与した発がん因子を同定することは、高度の曝露歴がある場合を除き、一般に困難である。

分担者らは、最近、胃発がん因子である*H. pylori*感染が胃粘膜でDNAメチル化異常を誘発することを見出した。本研究では、*H. pylori*感染がDNAメチル化異常を誘発する遺伝子に特異性があるのか、また、ある場合、その特異性はどのようにして決定されているのかを明らかにする。

発がん因子特異的にDNAメチル化異常が誘発されることが明らかになれば、発がん因子自体が消失した後でも、過去の発がん因子への曝露を推定することができる。世界各地域でヒトが曝露している発がん因子を明らかにすることは、国際協力上重要な課題である。

B. 研究方法

材料として、*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）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する。

*H. pylori*感染によりメチル化されう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する。

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)法により行う。

遺伝子発現レベルは、定量的RT-PCR法により行う。

（倫理面への配慮）

国立がんセンター倫理審査委員会により承認を得た計画に従い、研究を実施する。

C. 研究結果

39,000遺伝子についてのマイクロアレイ解析により、AGS胃がん細胞株を5-aza-dCで処理することにより16倍以上の発現上昇を示す遺伝子を579個同定した。これら579遺伝子のうちCpGアイランドをもつ遺伝子を32個、及び、4倍以上の発現上昇を示したがん関連遺伝子16個を選択した。10個の胃がん手術材料について、これらのメチル化を検討したところ、42個（*ABHD9*, *ADFP*, *ALDH1A3*, *ANXA5*, *AREG*, *BDNF*, *BMP7*, *CAV1*, *CDH2*, *CLDN3*, *CTSL*, *EEF1A2*, *F2R*, *FADS1*, *FSD1*, *FST*, *FYN*, *GPR54*, *GREM1*, *IGFBP3*, *IGFBP7*, *IRS2*, *KISS1*, *MARK1*, *MLF1*, *MSX1*, *MTSS1*, *NT5E*, *PAX6*, *PLAGL1*, *PLAU*, *PPIC*, *RBP4*, *RORA*, *SCRNI*, *TBX3*, *TFAP2C*, *TNFSF9*, *ULBP2*, *WIF1*, *ZNF177*, *ZNF559*）はメチル化されていた。

胃がんでのメチル化に関わりなく、これら48遺伝子のメチル化を、*H. pylori*感染陰性及び陽性の健常者及び胃がん患者各11例の胃粘膜で検討した。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*感染者（健常者、胃がん患者）及び過去に*H. pylori*感染があったと考えられる*H. pylori*陰性胃がん患者で、再現性よくメチル化されていた。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26個中15遺伝子、メチル化抵抗性遺伝子9個中8個について、*H. pylori*感染陰性及び陽性の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（ $P = 0.002$ ）。

*H. pylori*感染によりDNAメチル化制御装置の異常が誘発されている可能性を考え、維持メチル化酵素である*DNMT1*、*de novo*メチル化酵素である*DNMT3A*及び*DNMT3B*の遺伝子発現レベ

ルを、*H. pylori*感染陰性及び陽性の健常者胃粘膜で検討した。しかし有意な発現変化は認められなかった。

無し  
2.実用新案登録  
無し

#### D. 考察

*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、例えば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。

本来であれば、*H. pylori*感染以外の胃がん発がん因子に曝露した場合についての検討が必要であるが、実際問題として、そのような検体は入手不可能であり、検討不可能であった。

3.その他  
無し

#### E. 結論

発がん因子は、正常組織に誘発される反応に応じて、特異的な遺伝子のDNAメチル化異常を誘発する可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1. 延山嘉真, 生島俊和, エピジェネティクスと発がん. 臨床化学, 36:288-295, 2007.
2. 榎本祥太郎, 生島俊和, 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.
3. 生島俊和, 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.
4. 生島俊和, 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.
5. 生島俊和, 延山嘉真, 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.

##### 2.学会発表

1. 生島俊和 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
2. 生島俊和 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
3. 丹羽透、塚本徹哉、田中晴就、一瀬雅夫、杉村隆、立松正衛、生島俊和 *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
4. 生島俊和 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1.特許取得

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

分担研究者 島 正之 兵庫医科大学教授

研究要旨 小学生の血清CRP値は、大気中浮遊粒子状物質への短期的な曝露によって有意に高くなるという関連性が認められた。アレルギー素因を有する者は、家庭内喫煙および大気環境濃度と血清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。

A. 研究目的

浮遊粒子状物質をはじめとする大気汚染物質への曝露により生体に炎症性変化が生じることが示唆されている。本研究では、生体の炎症性指標として血清C反応性蛋白(CRP)に着目し、小学生の血清CRP値に関連する因子、特に大気中浮遊粒子状物質への曝露と血清CRP値変化との関連の時間性を評価するとともに、アレルギー素因の有無による影響の違いを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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学生を対象に、保護者の同意を得て採血を行い、血清総IgE値とCRP値をBehring nephrometer II (BN II)を用いて測定し、居住地域の大気中浮遊粒子状物質(SPM)、二酸化窒素( $\text{NO}_2$ )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値の変化との関係、アレルギー素因との関連性を検討した。

大気中SPM及び $\text{NO}_2$ 濃度は、国立環境研究所大気環境時間値データファイルを利用し、対象者毎の採血実施日について、居住地に最も近い大気環境測定局における採血前1日、2日、3日、7日、14日、1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年間の平均濃度を算出した。解析には、同一対象者で同一項目を反復測定したデータには自己相関があるため、それを考慮した統計モデルである一般化推定方程式を用いて、血清CRP値と採血前の大気環境濃度との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

断面研究は5地区6小学校において実施し、解析対象者は2,097名（同意率82.4%）であった。血清CRPが90パーセンタイル値(1.4mg/L)以上の高値との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、大気中SPM濃度との関連は有意であった（最大/最小のOR: 1.49, 95%CI: 1.07-2.06）。大気中 $\text{NO}_2$ 濃度との関連は有意ではなかった（最大/最小値のOR: 1.41, 95%CI: 0.87-2.28）。

縦断研究は2地区3小学校において実施し、解析対象者は1,766名、のべ4,065回の採血が実施できた（同意率87.4%）。血清CRP値は学年の進行とともに低下し、喘息・喘鳴症状があるものは有意に高かった。家庭内喫煙の有無別の血清CRP幾何平均値は、母親が喫煙する者では0.37mg/L, 母親以外の喫煙者がいるものでは0.35mg/Lであり、いずれも家庭内に喫煙者がいない者(0.32mg/L)よりも有意に高かった。大気環境濃度との関係は、採血前1～3日間の居住地域におけるSPM濃度が高くなると血清CRP値が有意に高くなるという関連性が認められ、3日平均濃度との関連が最大であった（3日平均濃度 $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加当たりの血清CRPの相対値:1.06, 95%CI:1.03-1.09）。 $\text{NO}_2$ については、採血前1日～2ヶ月平均濃度との関係は認められず、6ヶ月及び1年間の平均濃度との関連が有意であった。また、血清総IgE高値のものは、家庭内喫煙、SPM及び $\text{NO}_2$ 濃度との関連が大きかった。

#### D. 考察

自動車排出ガス等による大気中粒子状物質が住民の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、主として大気汚染が呼吸器疾患及び症状に与える影響について検討されてきた。大気汚染の健康影響を早期に把握するために客観的な評価指標の開発が望まれるが、これまでにそのようなバイオマーカーは確立されていない。近年、大気中粒子状物質は呼吸器系だけでなく、心血管系にも影響を与える可能性が指摘されており、血清高感度CRP値と粒子状物質濃度の変動との関連性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値について検討したところ、学年、母親の喫煙、喘鳴症状の有無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値と居住地域の大気中SPM及びNO<sub>2</sub>濃度との間に有意な関連性が認められた。一般化推定方程式による解析では、血清CRP値と採血前1～3日間のSPM平均濃度、採血前6ヶ月及び1年間のNO<sub>2</sub>平均濃度との関係が有意であり、大気中SPMについては短期的な曝露、NO<sub>2</sub>については長期的な曝露の影響が示唆された。

また、血清IgEが高値のものは、家庭内喫煙、大気中SPM及びNO<sub>2</sub>濃度と血清CRP値との関連性が大きく、アレルギー素因を有するものは大気汚染等の環境因子の影響を受けやすいことが示された。

#### E. 結論

小学生の血清CRP値は、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者では有意に高く、居住地域の大気中SPMへの短期的な曝露、NO<sub>2</sub>への長期的な曝露によっても有意に高くなることが示された。アレルギー素因を有する者は、家庭内喫煙、大気中SPM及びNO<sub>2</sub>濃度と血清CRP値との関連が大きく、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値は、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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shima, M. Air pollution and serum C-reactive protein concentration in children. J Epidemiol, 17: 169-176, 2007.

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.

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.

##### 2. 学会発表

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）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

分担研究者 高野裕久 独立行政法人 国立環境研究所 領域長

研究要旨

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。

A. 研究目的

2つのサイズのカーボンナノ粒子の経気道曝露が気道過敏性を含む肺機能に及ぼす影響を検討する。

B. 研究方法

マウスを6群（コントロール、14nmナノ粒子、56nmナノ粒子、抗原：OVA、抗原 + 14nmナノ粒子、抗原 + 56nmナノ粒子）に分け、それぞれ6週間気管内投与する。最終投与24時間後にメサコリン反応性を指標とする肺機能を高性能呼吸解析システムにより分析した。またその後摘出した肺より、mRNAを抽出しMuc5acの遺伝子発現をRT-PCRにて検討した。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いた研究のため、動物愛護に配慮し、実験は実験動物委員会の規定に従い遂行した。

C. 研究結果

ナノ粒子曝露によりコントロール曝露と比較して軽度の気道過敏性の増強を認めた。抗原とナノ粒子との複合曝露により、気道抵抗をはじめとする各種肺機能パラメーターの増悪を認めた。粒子サイズによるこれら肺機能増悪の差異は認めなかった。一方Muc5acの遺伝子発現は、抗原曝露によりコントロール曝露と比較して有意な増強を認め、抗原 + ナノ粒子曝露（特に14nmナノ粒子）で更なる増強を認めた。

D. 考察

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や2) Th2サイトカインの肺での発現や、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る。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

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)

2. 学会発表

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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表  
若林 敬二

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                               | 論文タイトル名                                                                                                         | 発表誌名              | 巻号  | ページ     | 出版年  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----|---------|------|
| Watanabe, T., Takahashi, K., Kobishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., <u>Wakabayashi, K.</u> | Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens. | Mutation Research | 649 | 201-212 | 2008 |

研究成果の刊行に関する一覧表  
中釜 斉

雑誌

| 発表者氏名                                                                          | 論文タイトル名                                                                                                                                                                                            | 発表誌名                   | 巻号  | ページ         | 出版年  |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----|-------------|------|
| Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M and <u>Nakagama H.</u>                         | Tumor suppressive <i>miR-34a</i> induces senescence-like growth arrest through modulation of E2F pathway in human colon cancer cells.                                                              | Proc Natl Acad Sci USA | 104 | 15472-15477 | 2007 |
| Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T and <u>Nakagama H.</u> | 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 |
| Nakanishi M, Tazawa H, Sugimura T, Tanaka T and <u>Nakagama H.</u>             | 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 |

研究成果の刊行に関する一覧表  
鈴木 孝昌

雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                  | 論文タイトル名                                                                                                                                                                                        | 発表誌名                  | 巻号  | ページ         | 出版年  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----|-------------|------|
| Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, <u>Suzuki T</u> ,                             | 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 |
| Luan Y, <u>Suzuki T</u> , Palanisamy R, Takashima Y,                                                                   | Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells.                                                                                   | Mutat Res.            | 619 | 113-123     | 2007 |
| Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, <u>Suzuki T</u> , 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 |
| Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, <u>Suzuki T</u> , 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 |
| Kanayasu-Toyoda, T, <u>Suzuki, T</u> , Oshizawa, T, Uchida, E, Hayakawa, T, Yamaguchi, T                               | Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C $\alpha$ in neutrophilic differentiation cells.                                                           | J. Cell Physiol.,     | 211 | 189-196     | 2007 |

研究成果の刊行に関する一覧表  
島 正之

書籍

| 著者氏名                         | 論文タイトル名                                                                                                                                                                               | 書籍全体の編集者名       | 書 籍 名                              | 出版社名                    | 出版地      | 出版年  | ページ   |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-------------------------|----------|------|-------|
| 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. | Progress in Air Pollution Research | Nova Science Publishers | New York | 2007 | 25-42 |

雑誌

| 発表者氏名                 | 論文タイトル名                                                                                                               | 発表誌名                           | 巻号 | ページ     | 出版年  |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----|---------|------|
| Shima, M.             | Air pollution and serum C-reactive protein concentration in children                                                  | J Epidemiol                    | 17 | 169-176 | 2007 |
| 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 |

研究成果の刊行に関する一覧表  
高野 裕久

雑誌

| 発表者氏名                                                                                    | 論文タイトル名                                                                                                        | 発表誌名                         | 巻号         | ページ        | 出版年        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|
| Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Kobayashi T, Fujitani Y, Shimada A, Yoshikawa | Effects of inhaled nanoparticles on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. 238: 99-110, 2007 | Toxicology                   | 238        | 99-110     | 2007       |
| 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) | (in press) | (in press) |