

200720018A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

疾患モデル動物を用いた環境発がんの初期発生過程及び感受性要因の  
解明とその臨床応用に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 齊

平成20(2008)年4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 疾患モデル動物を用いた環境発がんの初期発生過程及び感受性要因の  
解明とその臨床応用に関する研究 \_\_\_\_\_ 1  
中釜 齊

### II. 分担研究報告

1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性および修飾要因の解明 \_\_\_\_\_ 22  
中釜 齊
2. ポリ ADP-リボシル化の発がんにおける意義の解明とその臨床応用に関する研究 — 29  
益谷 美都子
3. リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測 \_\_\_\_\_ 34  
木南 凌
4. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明 \_\_\_\_\_ 41  
大島 正伸
5. 遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究 \_\_\_\_\_ 46  
庫本 高志
6. コンソミックマウスを用いた DSS/PhIP 大腸発がんの研究 \_\_\_\_\_ 49  
杉江 茂幸
7. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明 \_\_\_\_\_ 53  
中島 淳

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 58

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働省科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

疾患モデル動物を用いた環境発がんの初期発生過程及び感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

疾患モデル動物を用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構やがんの進展に関わる環境及び遺伝的修飾要因や発がん感受性要因の解明に相補的かつ不可欠な役割を担っている。PhIP により誘発されるラット大腸発がんの感受性遺伝子に関して、遺伝学的解析により限定化した約2 Mb の領域から、感受性の異なる系統間で発現量の異なる候補遺伝子 X を同定した。3'側非翻訳領域に存在する多型が、遺伝子 X の mRNA の安定性に寄与している可能性が示唆された。翻訳抑制因子の SND1 と、増殖抑制作用を有する microRNA (miR-34a) を介する翻訳制御機構の機能破綻が、大腸発がんの発生・成立に重要な役割を果たすことが示唆された。コンソミックマウス B6-2C57BL/6J は、B6-2TMSM と比べて PhIP 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて高感受性であることが示唆された。ヒト下部大腸に認められる dysplastic ACF の個数、肝臓、膵臓、脂肪、膵臓と有意な相関を示すことを明らかにし、アディポネクチン及び IGF1 が大腸発がんに寄与することが示唆された。Apc 遺伝子に変異を導入した Apc delta ラット (F344-Apc<sup>Δ282</sup>) は、AOM 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて、ホモ欠損ラットがヘテロ欠損ラットに比べ高感受性を示した。Wnt シグナルと COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路を同時に活性化させた胃がん発生マウスモデルでは、マウス胃がんの遺伝子発現プロファイルがヒト胃がんに極めて類似していた。さらに、炎症性プロスタグランジン PGE<sub>2</sub> が EGFR シグナルを活性化していることや、EGFR シグナル活性化が胃がん発生に重要であることが示された。放射線誘発リンパ腫モデルでは、放射線照射後早期に現れる大型リンパ球が、前リンパ腫細胞であり、その出現効率が放射線発がん感受性の鍵となると考えられた。リンパ腫抑制遺伝子 *Bcl11b* は、Apc<sup>Min</sup> マウスでの腸管腫瘍発生の修飾因子であり、腸管でもハプロ不全型のがん抑制遺伝子として働くことが示唆された。DNA 修復に関わるポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (*Parp*)-9 及び *Parp*-10 遺伝子破壊マウス ES 細胞を各々樹立した。ガンマ線照射後の二本鎖 DNA 切断の不正確な修復が *Parp*-1 欠損下では起きにくい可能性が示唆された。

分担研究者

中釜 斉 国立がんセンター研究所 副所長  
益谷美都子 国立がんセンター研究所 部長  
木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授  
大島正伸 金沢大学がん研究所 教授  
庫本高志 京都大学医学研究科 准教授  
杉江茂幸 金沢医科大学 教授  
中島 淳 横浜市立大学医学部 准教授

伝子変異や発現変化のゲノム網羅的解析による発がん分子機構の解明、がんの進展に関わる環境及び遺伝的修飾要因の同定とその機序、さらには個々人の発がん感受性を規定する遺伝的要因など、がん発生・成立から浸潤性進展にいたる分子機構の全容を明らかにし、その成果を基に臨床へと展開することを目的とする。具体的な研究課題としては、大腸がん、胃がん、及びリンパ腫を中心に発がんの動物モデルを用いて、がんの発生・成立に関わる環境要因の同定と遺伝子変化について、また発がんの感受性を規定する遺伝的な要因を網羅的に解明

A. 研究目的

本研究では、消化器発がんを中心としたがんの発生初期における環境要因の関与や、遺

する。発がんへの関与が強く示唆される遺伝子に関しては、種々の環境要因への曝露による細胞増殖やアポトーシス誘導、大腸上皮細胞の形質転換能への影響を調べ、ヒトがん発症への関与についても検証する。がん発生に関わる遺伝子の変異ラットを樹立することにより、発がんの分子機構の解明と、新規のがん治療薬や予防薬の開発に有用なモデルとして資することも期待される。

## B. 研究方法

(1)ハプロタイプ解析による大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の局在の限定化と発現解析による候補遺伝子の同定:

ラット 16 番染色体上の大腸発がん感受性遺伝子 *Sct* の局在候補領域 C34 (D16Nkg9ーD16Nkg38)において、PhIP による ACF 誘発性の感受性が異なる 18 種類のラット系統を用いたハプロタイプ解析を行った。遺伝的多型と ACF 誘発性の間に相関性が認められた約 2 Mb の領域(D16Mit3ー D16Mgh5)に存在する 13 個の遺伝子について定量的 PCR による発現解析を行った。高感受性系統 F344 及び低感受性系統 ACI ラットに PhIP 含有飼料を投与し、投与開始から 0, 1 及び 2 週後に採取した正常大腸粘膜から抽出した RNA を用いた。

(2)感受性候補遺伝子 X の多型解析:

上記で限定化した約 2 Mb の領域に存在し、F344 及び ACI 系統間で遺伝子発現量に差を認めた唯一の遺伝子 X について、プロモーター領域(約 1.8 kb)、コーディング領域、及び cDNA の 5' および 3' 側の非翻訳領域の全塩基配列を決定した。F344 及び ACI 系統間で検出された多型について、感受性の異なる種々のラット系統を用いて、ACF 誘発性の感受性との関連性を検討した。

(3)翻訳制御因子 SND1/Snd1 蛋白質の大腸微小

病変における過剰発現と細胞傷害性ストレスに対する SND1/Snd1 の発現誘導:

Snd1 蛋白質が発がん過程のどの段階において発現誘導されるのかを明らかにするため、PhIP 連続投与による Snd1 の大腸上皮での発現誘導を検討した。F344 に PhIP (50 mg/kg 体重)を 2 週間連続して胃内投与したのち、高脂肪食のみを 4 週間投与、このサイクルを 2 回繰り返したのち、更に PhIP のみを 2 週間投与した。PhIP を最終投与した 24 時間後のラット大腸粘膜を採取し、抗マウス Snd1 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

(4)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種々の大腸発がん関連蛋白質への影響を解析した。

(5)ストレス応答性 microRNA (miR-34a) の標的遺伝子の同定と大腸発がんへの関与:

PhIP 処理した大腸上皮における miR-34a の発現誘導の有無や、miR-34a の導入による細胞増殖、細胞死への影響を検討した。miR-34a を導入した 2 種類の大腸がん細胞株 HCT116 及び RKO において発現変化する遺伝子を網羅的に解析し、miR-34a の標的候補遺伝子の同定を試みた。さらに、ヒト大腸がんにおける miR-34a の発現についてもリアルタイム PCR による定量的解析を行い、miR-34a のヒト大腸発がんにおける役割について検討した。

(6)コンソミックマウス B6-2TMSM 及び B6-2CMSM を用いた大腸発がん感受性候補遺

伝子の探索:

城石 (遺伝研) らが開発したコンソミックマウス B6-2TMSM (C57BL/6J 系統の 2 番染色体テロメア側を MSM 系統の相同領域に置換したマウス) 及び B6-2CMSM (C57BL/6J 系統の 2 番染色体セントロメア側を置換したマウス) を用いて、PhIP 誘発 dextran sulfate sodium (DSS) 併用発がん実験を行った。8 週齢 B6-2TMSM 及び B6-2CMSM を各 4 群に分け、第 1 群に PhIP (200mg/kg bw) を胃内強制投与し、1 週間後から 5 日間 1.5% DSS を飲水投与し、PhIP 投与後 4 週間後、同処置を再度繰り返した。第 2 群には、PhIP 投与のみ、第 3 群には、DSS 投与のみ、第 4 群は、無処置群とした。実験開始 20 週間後実験終了し、組織学的解析を行った。

(7) ヒト ACF の下部消化管拡大内視鏡による観察:

下部消化管内視鏡を行った 500 例に対し dysplastic ACF を観察した。そのうち同意の得られた 80 例に対して、問診、採血、腹部 CT 検査を行い、ACF の個数と年齢、身長、体重、ウエスト、BMI、糖尿病罹患歴、HbA1c、血糖、HOMA-IR、Tcho、TG、CRP、L/S 比、内臓脂肪、皮下脂肪の相関を、さらに IGF-1、レプチン、アディポネクチンなどとのアディポサイトカインについても相関を解析した。更に、同意の得られた対象患者に対して 1~8 ヶ月間 PPAR $\gamma$  リガンドである pioglitazone を投与し ACF の変化を解析した。

(8) Apc delta ラット (F344-Apc <sup>$\Delta$  2522</sup>) を用いた DSS 併用 AOM 誘発大腸発がん性の検討:

9 週齢の Apc delta ホモラット (n=9) とヘテロラット (n=9) に azoxymethane (AOM, 20mg/kg bw) を皮下投与した。AOM 投与後 1 週目から、2% DSS を 1 週間飲水投与した。実験開始後 20 週目に剖検し、大腸を摘出し、腫瘍のサイズと個数を測定した。組織学的解析を行なうと

ともに、免疫組織学的解析により、 $\beta$ -Catenin の細胞内局在を検討した。64 個 (ホモ; 38 個、ヘテロ; 26 個) の腫瘍を対象に、DNA を抽出し、 $\beta$ -Catenin と *K-ras* 遺伝子について変異の有無をシーケンス法により検索した。

(9) 胃がん組織における EGFR 活性化の解析:

Wnt と PGE<sub>2</sub> 双方のシグナルを活性化させた K19-Wnt1/C2mE マウス (n=5) の胃がん組織、PGE<sub>2</sub> シグナルだけを活性化させた K19-C2mE マウス (n=3) の胃組織、および野生型マウス (n=3) の胃組織それぞれを用いて、EGFR リガンド (EGF、TGF- $\alpha$ 、Amphiregulin、Epiregulin、HB-EGF、betacellulin)、及び ADAM ファミリープロテアーゼ (Adam1a~Adam32) の遺伝子発現レベルをマイクロアレイにて解析した。遺伝子発現については RT-PCR で、EGFR 活性化は免疫染色により確認した。また、ヒト胃がん組織の遺伝子発現データベース (PNAS, 99: 16203, 2002) を用いて、マウスとヒトでの EGFR 活性化に関わる遺伝子発現変化について比較検討した。

(10) EGFR 阻害による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウス (各群 n=4) を用いて、EGFR 阻害薬 (gefitinib; 100mg/kg) を、27 週齢から 30 週齢まで 3 週間連続投与実験を行なった。対照として、COX-2 阻害薬 (NS-398; 10mg/kg) の 3 週間投与群と薬剤非投与群を設けた。胃がん組織の経時的変化は X 線 CT により解析した。投与終了の 30 週齢で、腫瘍組織の大きさを比較解析し、EGFR シグナル阻害による作用を、腫瘍組織を用いた RT-PCR および western blotting などにより解析した。

(11) リポキシゲナーゼ (p12-LOX) の作用の解析:

p12-LOX のマウス腸管腫瘍、胃がん組織及びヒト大腸癌細胞での遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。更に、表皮由来細胞の JB6 を用いて、p12-LOX 阻害薬存在下及び非存在下での軟寒天コロニー形成、及び cloning efficiency 実験を行ない、腫瘍発生プロモーション過程での p12-LOX の作用を解析した。

(12) COX-2 及びケモカインの作用の解析:

COX-2 の下流では血管新生因子の VEGF-A の発現が誘導されている可能性がある。炎症性ケモカイン受容体 CXCR3 を介したシグナルが悪性黒色腫の転移に重要であることが明らかにされているので、同様の効果について大腸がん細胞を使って解析した。

(13) マウスの放射線発がん実験:

BALB/c コンジュニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェニーに対して  $\gamma$  線、2.5Gy を 4 回照射した。また、3Gy を 1 回照射するという条件も用いた。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸の有無で判定した。

(14) FACS 解析による胸腺細胞の性質の検討:

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。 $\gamma$  線照射により発生する活性酸素種 (ROS) の測定は試薬 (H2DCFDA : dichlorofluorescein diacetate) を用い、細胞増殖能の測定は BrdU 取り込みを利用し、FACSscan で蛍光を測定した。

(15) *Apc*<sup>Min</sup> マウスと *Bcl11b*-KO のダブルヘテロマウスの自然発生大腸発がん実験:

*Apc*<sup>Min</sup> マウスと *Bcl11b*-KO ヘテロマウスを交配し、産出仔について、変異 *Apc* 及び *Bcl11b* 遺伝子型の違いにおける腸管腫瘍発生への影響を観察し、免疫組織学的解析を行った。3 種類の *Bcl11b* 抗体を使用した。*Bcl11b*-Z は zinc-finger ドメ

イン、*Bcl11b*-C は C 末端領域、*Bcl11b*-N は N 末端領域に対する抗体である。

(16) *Parp*-9欠損マウスの作出:

マウス *Parp*9 遺伝子を含む bacmid から exon 1-4 までを含む領域をサブクローニングし、*loxP* 配列 3カ所と *neo* カセット、さらに *DT-A* カセットを有するコンディショナルターゲティングベクターを調製した。エレクトロポレーション法を用いてマウス ES 細胞へ導入し、G-418耐性クローンを選択し、サザンブロット法により陽性クローンのスクリーニングを行った。

(17) *Parp*-10 欠損マウスの作出:

マウス *Parp*-10 遺伝子を含む bacmid から exon 1-9 までを含む領域をサブクローニングし、「*Parp*-9欠損マウスの作出」の場合と同様に、陽性クローンのスクリーニングを行った。

(18) *Parp*-10の細胞内局在の解析:

N末EGFP融合型*Parp*-10 (EGFP-m*Parp*-10) 発現ベクターを構築後、一過性にHeLa細胞内に導入し、EGFP-m*Parp*-10の局在を観察した。また EGFP-*Parp*-10 の過剰発現下での細胞の機能異常を観察した。

(19) 抗*Parp*-10の作成及び特異性の検討及び*Parp*-10及び*Parp*-9の各組織での遺伝子発現の検討:

*Parp*-10のペプチド断片を抗原として抗体の作製を行い、*Parp*-10の検出の特異性を western blot 法により検討した。また、*Parp*-10及び*Parp*-9の各組織での遺伝子発現を検討した。

(20) ガンマ線照射後の *Parp*-1<sup>-/-</sup> マウスの発がん性試験のための予備的検討及び *in vivo* 突然変異原性の検討:

ガンマ線照射後の *Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスにおける胸腺リンパ腫の発生や他の腫瘍発生を調べるために予備的検討を行った。また、*Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスと *gpt delta* マウスとの交配体を作成し、ガンマ線照射した後、脳組織における *in vivo* 突然変異原性を検討した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

(1) ハプロタイプ解析による大腸がん感受性遺伝子 *Sct* の局在の限定化と発現解析による候補遺伝子の同定:

D16Mit3 ~ D16Mgh5 に存在する 13 個の遺伝子について PhIP 投与前後の大腸上皮における遺伝子発現を解析した結果、唯一、遺伝子 X のみが、ACI において F344 の約 2 倍の発現量を示した。さらに、(F344xACI)F1 系統においても、遺伝子 X の発現量が F344 と同程度の発現量を示したことから、常染色体優性の遺伝形式を示す PhIP 大腸がん感受性の候補遺伝子として、遺伝子 X が矛盾しないことが示された。

(2) 感受性候補遺伝子 X の多型解析:

感受性候補遺伝子 X の最終エクソン 7 の coding 領域に 1 箇所のアミノ酸置換を伴わない多型と、3' 側の非翻訳領域

(un-translated region; UTR) に 10 箇所の多型を認めた。ハプロタイプ解析に用いた 18 種類のラット系統は、F344 型あるいは ACI 型のいずれかのハプロタイプを示し、PhIP 400ppm 含有飼料の 2 週間投与 + 高脂肪食 4 週間投与による ACF の誘発数が 5 個以上を示した高感受性系統は、全て F344 型の多型を示した。この 3' -UTR の多型が、転写された mRNA の安定性に寄与している可能性が示唆された。

(3) 翻訳制御因子 SND1/Snd1 蛋白質の大腸微小病変における過剰発現と細胞傷害性ストレスに対する SND1/Snd1 の発現誘導:

SND1/Snd1 がヒト大腸がん、PhIP により誘発された大腸がん及び異型な異常腺管に過剰発現していることや、PhIP 活性化体でヒト大腸がん細胞株を処理することにより、SND1 遺伝子が一過性に発現上昇することを、既に見出した。PhIP に曝露されたラット大腸上皮においても *Snd1* が一過性に発現誘導されることを認めた。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。

(4) SND1 による翻訳抑制機構を介した APC 遺伝子の発現制御:

SND1/Snd1 の過剰発現によりラット IEC6 細胞において E-カドヘリンの細胞内局在が変化したことから、細胞-細胞間相互作用に関わる蛋白質の挙動について検討した。その結果、SND1 を過剰発現させた種々のヒトがん細胞株 (HCT116, SW48, HeLa) では、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することが分かった。SND1 が何らかの転写後制御機

構により、APC 蛋白質の発現量を抑制的に制御することが示唆された。

(5) ストレス応答性 microRNA (miR-34a) の標的遺伝子同定と大腸発がんへの関与の検討:

SND1 蛋白質は、RNA 干渉のエフェクター複合体である RISC の一つの構成因子であり、SND1 の過剰発現や発現減少が、ある種の microRNA を介して標的遺伝子の翻訳を制御していることが予想された。細胞のストレス応答として発現誘導される microRNA の生物学的機能と、これら microRNA と SND1 蛋白質との機能的相互作用の可能性について検討した。HCT116 細胞をアドリアマイシン (ADR) で処理した際に、p53 依存的に発現が誘導される microRNA として miR-34a を同定した。野生型 p53 を有するヒト大腸がん細胞株では ADR 処理により、いずれも miR-34a の発現誘導を認めしたが、変異型 p53 遺伝子を有する細胞株では認められなかった。更に、miR-34a を細胞へ導入すると強い増殖抑制効果が認められ、老化の指標である SA- $\beta$ -galactosidase の陽性細胞が多数誘導された。

miR-34a を導入した HCT116 及び RKO 細胞における網羅的遺伝子発現解析により、E2F 転写因子ファミリーの発現が抑制され、逆に、がん抑制遺伝子 p53、及び p21 や p53 の標的遺伝子群が発現誘導されていた。ウェスタンブロット解析からも、E2F ファミリー蛋白質が miR-34a の標的遺伝子であることが示唆された。ラット大腸上皮において、PhIP 投与により miR-34a が発現誘導されることや、ラット系統間 (F344 系統と ACI 系統間) で発現誘導に差があることが分かった。がん抑制的な機能を有する miR-34a の発現量の差が、両系統間の PhIP に対する発がん感受性の差に寄与している可能性がある。

(6) コンソミックマウス B6-2CMSM 及び B6-2TMSM を用いた大腸発がん感受性候補遺伝

子の探索;

B6-2TMSM に比し、B6-2CMSM は肥満傾向にあった。大腸に過形成、腫瘍が誘発され、各群の大腸過形成、腫瘍の発生率、平均個数は、B6-2TMSM 雄 PhIP-DSS 群、1/6 (0.67  $\pm$  0.41)、2/6 (0.67  $\pm$  1.21)、PhIP 群、0/2、0/2、B6-2TMSM 雌 PhIP-DSS 群、7/14 (0.50  $\pm$  0.52)、0/14、PhIP 群 2/3 (0.67  $\pm$  0.58)、0/3、DSS 群 1/3 (0.33  $\pm$  0.58)、0/3、陰性対照群 0/3、0/3、B6-2CMSM 雄 PhIP-DSS 群 1/3 (0.33  $\pm$  0.58)、2/3 (2.33  $\pm$  2.08)、DSS 群 2/3 (0.67  $\pm$  0.58)、2/3 (1.00  $\pm$  1.00)、B6-2CMSM 雌 PhIP-DSS 群 3/7 (0.43  $\pm$  0.53)、6/7 (2.86  $\pm$  1.77) であった。B6-2CMSM 雌が最も腫瘍発生が高率であった。

(7) ヒト ACF の下部消化管拡大内視鏡による観察:

拡大内視鏡を用いヒト大腸の dysplastic aberrant crypt foci (ACF) を観察し、生活習慣病を起こしうる各因子との相関を検討したところ、内臓脂肪と有意な相関を認めた。この分子機構としてアディポネクチンが逆相関を IGF-1 が正相関認め、これらが腸発癌に関わるが示唆された。同意の得られた 14 症例に対し Pioglitazone 1~8 ヶ月投与した。ACF は拡張した異型腺管の集簇であるが、これらの減少する傾向を認めた。

(8) Apc delta ラットを用いた DSS 併用 AOM 誘発大腸発がん性の検討:

ホモ、ヘテロとも全ての個体で、少なくとも 4 個以上の腫瘍が観察され、腫瘍の体積 (平均値  $\pm$  SD) は、ホモで 53.5  $\pm$  15.1 mm<sup>3</sup>、ヘテロで 50.8  $\pm$  48.7 mm<sup>3</sup> であり有意差はなかった。組織学的解析を行った結果の一個体あたりの異形性腺窩、腺腫、腺癌の平均個数を表 1 にまとめる。Apc delta ホモラットの直腸、結腸に誘発される大腸腫瘍は、ヘテロラット比べ、有意に多かった。また、



腺癌において  $\beta$ -Catenin の核内移行が観察された。

表 1

	ホモ	ヘテロ	
異形性腺窩 (個)	15.78 ± 8.21	4.89 ± 2.32	$P < 0.002$
腺腫 (個)	9.11 ± 5.64	3.56 ± 3.78	$P < 0.05$
腺癌 (個)	20.67 ± 10.56	6.33 ± 2.87	$P < 0.002$
全腫瘍 (個)	29.78 ± 15.46	9.87 ± 6.13	$P < 0.005$

大腸腫瘍の遺伝子変異解析では、*K-ras* 遺伝子の変異は、ホモ、ヘテロとも検出されなかった。 $\beta$ -Catenin 遺伝子の変異は、ホモでは 28 個 (73.7%)、ヘテロでは、23 個 (88.5%) の腫瘍で検出され、コドン 32, 33, 34, 37, 41, 44 及び 45 に局在していた。

(9) 胃がん組織における EGFR シグナル活性化:

K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織では、Epiregulin、Amphiregulin、HB-EGF の発現が野生型マウスに比較して顕著に上昇しており、これらは K19-C2mE マウス胃粘膜でも発現誘導されており、PGE<sub>2</sub> シグナルに依存的であった。K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織では、EGFR シグナル伝達を活性化する ADAM ファミリーの中でも ADAM8、ADAM9、ADA10、ADAM17 の発現が亢進しており、K19-C2mE マウスでも同様であり、プロテアーゼの産生も PGE<sub>2</sub> 依存的に誘導されていた。

これらの結果を、ヒト胃がん組織の遺伝子発現プロファイルと比較すると、ADAM ファミリーと EGFR リガンドである Epiregulin の発現パターンがマウスと極めて類似していた。ヒト胃がんの 70% 以上で COX-2 経路が誘導されており、ヒト胃がん組織では COX-2 誘導にともなう PGE<sub>2</sub> 産生が、EGFR リガンドと ADAM ファミリー双方の発現誘導を介して EGFR シグナルを亢進している可能性が考えられた。

(10) EGFR 阻害薬投与による胃がん発生への影

響:

K19-Wnt1/C2mE マウスに、EGFR 阻害薬である gefitinib を投与すると、投与前に X 線 CT にて確認した胃がん組織の体積は非投与群マウスの 10% 以下まで減少した。従って、Wnt と PGE<sub>2</sub> により発生する胃がん組織では、PGE<sub>2</sub> 依存的に活性化する EGFR シグナルが腫瘍組織の維持・増殖に重要である。COX-2 阻害薬よりも gefitinib の方が効果的であった。

Western blotting および RT-PCR による解析により、gefitinib 投与マウスの胃がん組織では、COX-2 発現が低下しており、非リン酸化  $\beta$ -catenin 量の有意な減少も認められた。PGE<sub>2</sub> 依存的に活性化した EGFR シグナルが、さらに COX-2 を誘導して PGE<sub>2</sub> 経路を亢進し、同時に Wnt シグナルを活性化している可能性を示している。

(11) p12-LOX の作用の解析:

*Apc* 遺伝子ノックアウト (*Apc*<sup>Δ716</sup>) マウスに発生する腸管腫瘍組織、および K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織では、発がんに関与する可能性が示唆されている p12-LOX の発現が誘導されていた。また、大腸癌細胞でも広く p12-LOX の発現誘導が認められ、p12-LOX 発現は NF- $\kappa$ B シグナルを介した炎症性刺激により発現誘導される事も確認した。

マウス表皮由来の JB6 細胞はすでにインシベーションされた状態のため、TPA や EGF 刺激により軟寒天中でコロニーを形成する。しかし、p12-LOX 阻害薬である baicalein 存在下では TPA 刺激した JB6 によるコロニー形成が抑制され、クローニング効率実験でも増殖が著しく抑制された。即ち、インシベーションされた上皮細胞が増殖して腫瘍組織を形成する過程で、炎症に起因した NF- $\kappa$ B が p12-LOX を誘導し、その代謝産物である 12-HETE が何らかの役割を果たして

いる事が考えられた。炎症に関与するアラキドン酸カスケードでは、COX-2 経路だけでなく p12-LOX 経路も腫瘍発生には必要である可能性がある。

#### (12) COX-2 およびケモカインの作用の解析:

マウス生体内で COX-2 発現を誘導させる負荷を与えると、血中 VEGF-A 濃度の上昇が認められ、炎症に起因した COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路が腫瘍組織内の血管新生に関与している可能性を示している。また、炎症性ケモカインの受容体である CXCR3 を強制発現させた大腸がん細胞 (DLD-1) を免疫不全マウスの結腸に移植すると、親株を移植した場合と比較して、肝臓や肺への転移が有意に亢進した。K19-Wnt1/C2mE CXCR3 などの炎症性ケモカイン受容体を介した刺激が、胃発がん過程にも関与する可能性が示唆された。

#### (13) 放射線発がん感受性と放射線誘発萎縮胸腺内大型リンパ球の出現:

非照射の正常胸腺と放射線誘発胸腺リンパ腫の間で、細胞の大きさを比較した結果、正常胸腺 G1 期細胞はほとんどが小型で均一な細胞集団からなるが、S 期細胞の大きさは不均一で、G1 期細胞と比べるとかなり大きくなっていった。一方、リンパ腫 G1 期細胞は正常のそれと比べると、不均一で大きく、S 期細胞はさらに大きくなっていった。大きさの不均一性は G1 期での細胞成長の制御に異常があると考えられた。

電離放射線照射後 40 日と 80 日のマウス胸腺を解析した。細胞数は減少し、胸腺は萎縮し、萎縮の程度は 80 日の方が強かった。照射後 40 日萎縮胸腺では、約 3 分の 1 の萎縮胸腺で大型リンパ球の割合が正常胸腺と比べ上昇し、その頻度は照射後時間経過とともに増大した。大型リンパ球の割合が上昇した萎縮胸腺では、小型の G1 期細胞の比率が減少しており、late G1 期から early S 期細胞が増加している。すな

わち、G1 期での細胞成長の制御の異常がこの萎縮胸腺内の大型リンパ球にも存在すると考えられた。

VDJ 組換えを調べることにより、クローナル増幅する前がん細胞の胸腺内での割合を検討した。大型リンパ球が占める割合の高い胸腺では、クローナル増殖細胞が高い割合であり、前がん状態である確率が高いと考えられた。この種の萎縮胸腺で、分画した大型のリンパ球と小型のリンパ球は、VDJ 組換えで同じパターンを示し、同じ起源をもつ前がん細胞が細胞周期の異なる過程にあると考えられる。一方、大型のリンパ球の割合が低いときには、クローナル増殖している細胞の割合が少ないケースが多かった。クローナル増殖細胞の検出頻度は照射後 40 日より 80 日の方が高かった。

3Gy 1 回の照射条件下では照射後 10 日には胸腺は一定の細胞数にまで回復し、その後は安定した状態が 150 日まで少なくとも持続し、大型のリンパ球の割合、クローナル増殖の検出頻度とも非照射群と比較し変化はみられなかった。経過観察した 300 日間ではリンパ腫の発症はみられなかったが、胸腺の約半数で大型リンパ球の割合の増加、その大半はクローナル増殖していることが観察された。

#### (14) ヒト MTF-1 遺伝子多型とチェルノブイリ原子力発電所事故患者の甲状腺がんとの関連解析:

ヒトの 2 カ所の MTF-1 遺伝子多型を利用し、チェルノブイリ原子力発電所事故による小児甲状腺がん患者 (I 群、113 名) と、事故とは無関係の甲状腺がん患者 (II 群、243 名) および正常人 (III 群、527 名) の間で関連解析を行った (長崎大学・山下教授との共同研究)。Rs567 多型では、A/A 遺伝子型が I 群では 9.7%、II 群では 12.8%、III 群では 17.5% であり、統計学的には有意ではないが、

A/A 遺伝子型をもつヒトはチェルノブイリ原子力発電所事故による甲状腺がん抵抗性を示すことが示唆された。もう一つの Rs368 多型でも、A/A 遺伝子型をもつヒトの発症は 6.4%で、正常人のそれは 11.7%で、同様の傾向を示した。

(15) *Bcl11b/Rit1* 遺伝子の腸管腫瘍発生に対する修飾効果:

APC 遺伝子に変異をもつ Min マウスと *Bcl11b*-KO ヘテロ型マウスを交配して、4種類の異なる遺伝子型をもつマウスを作製し、生後 18 週での自然発生腸管腫瘍を観察した。今年度は再実験を行い、変異型 APC・野生型 *Bcl11b* マウス(13 匹)では平均腫瘍個数は 14.2 であるのに対し、変異型 APC・ヘテロ型 *Bcl11b* マウス(10 匹)では 33.1 と有意に上昇しており ( $P < 0.01$ )、昨年度と同様の結果が得られた。今回の結果では、ヘテロ型 *Bcl11b* では有意に腫瘍の大きさも増大していた。

腫瘍において、*Apc* 遺伝子の野生型アレルはほとんどの腫瘍で欠失していたが、*Bcl11b* 遺伝子の野生型アレルの欠失はみられず、*Bcl11b* 遺伝子がハプロ型不全のがん抑制遺伝子として働くことが示唆された。

*Bcl11b* タンパク質の小腸での発現を、*Bcl11b* 抗体を用いて観察した結果、小腸の crypt 内の上部 2/3 の細胞の核が染まり、これら染色細胞群の下部半分は BrdU 陽性細胞で、Transit amplifying cells (TA 細胞) と考えられる。crypt の下部、TA 細胞群の下方には *Lgr-5* 陽性の stem cells が存在するが、この stem cells の一部にも発現が観察された。

(16) *Parp-9* 欠損マウスの作出:

*Parp-9* 欠損マウスの作出のため、コンディショナルターゲティングベクターを導入した ES 細胞のスクリーニングを行った結果、7/144 クローンで陽性を示した。染色体数及び細胞分化度を検査後、陽性 ES 細胞を用いてキメラマウスを作出する予定である。

(17) *Parp-10* 欠損マウスの作出:

*Parp-10* 欠損マウスの作出のため、コンディショナルターゲティングベクターを導入した ES 細胞のスクリーニングを行った結果、15/153 クローンで陽性を示した。染色体数及び細胞分化度を検査した後、陽性 ES 細胞を用いてキメラマウスを作出した。

(18) *Parp-10* の細胞内局在の解析:

pEGFP-m*Parp-10* を一過性に導入した HeLa 細胞では、GFP-m*Parp-10* は細胞質中の局所に点状に強く集積した。一方、ユビキチン相互作用モチーフを欠損した GFP-m*Parp-10*ΔUIM は細胞質中にほぼ均一に存在し、集積傾向は観察されなかった。従って *Parp-10* の細胞質での局在性はユビキチン相互作用モチーフに依存することが示唆された。

(19) 抗 *Parp-10* の作成及び特異性の検討及び *Parp-9* 及び *Parp-10* の各組織での遺伝子発現の検討:

*Parp9* の mRNA 発現レベルは肝臓、肺、小腸で高くマウス ES 細胞では分化に伴い上昇した。*Parp-10* の mRNA 発現レベルはマウスでは精巣で高く小腸や肺以外の他の主要臓器では低い傾向を認めた。

(20) ガンマ線照射後の *Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスの発がん性試験のための予備的検討及び *in vivo* 突然変異原性の検討:

ガンマ線照射後の *Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスの発がん性試験のための照射条件として予備的検討結果を踏まえて、4 Gy を 4 週間の間隔で 2 回全身照射する系を選択し、発がん性試験を開始した。*Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスと *gpt* Δ Maus との交配体のガンマ線照射後の脳における変異マーカー遺伝子 *gpt* での突然変異の解析を行った。塩基置換型変異の頻度は遺伝子型間で差を認めなかったが、

*Parp-1<sup>-/-</sup>* マウスにおいて欠失変異や挿入変異の低下傾向を観察した。この傾向は *Parp-1<sup>-/-</sup>* マウス肝臓における欠失変異頻度の低下傾向と一致した。

#### D. 考察

(1) DNA/RNA 結合蛋白質として同定した SND1 は、RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つであり、新規の翻訳抑制因子の可能性がある。PhIP 活性化体である PhIP-OAc 処理によりヒト大腸がん細胞株で SND1 および miR-34a が発現誘導されること、ラットに PhIP 投与した場合でも投与直後より大腸上皮に SND1 及び miR-34a が発現誘導されることから、翻訳制御機構の異常（機能破綻）が発がんの早期過程に重要な役割を果たすことが示唆された。即ち、細胞が細胞傷害性ストレスに曝露された場合に、腫瘍抑制的（増殖抑制的）な機能を有する遺伝子（p53 など）や、microRNA 遺伝子（miR-34a など）が発現誘導されることにより、発がんに対するバリア的機能が誘導されることが分かった。同時に、細胞傷害性ストレスにより oncogenic な機能を有する翻訳制御因子 SND1 が発現されることも分かった。

(2) 細胞傷害性ストレスへの曝露によるバリア機能および oncogenic シグナルの両方の誘導が、がんの発生初期過程に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。何らかの原因によりバリア機能の破綻が生じた場合に、同時に存在する oncogenic シグナルの存在が、細胞の腫瘍化を促している可能性がある。今後、SND1 および miR-34a の標的遺伝子の全容を解明することにより、がん発生の極く初期段階における翻訳制御機構の関与が明らかになり、がんの新たな予防法・早期診断法の開発、さらには薬物療法の分子標的としての可能性などが明らかになることが期待される。

(3) コンソミックマウス B6-2CMSM は、B6-2TMSM と比べて PhIP 誘発 DSS 併用大腸発がんにおい

て高感受性であることが示唆された。肥満との関連も含めて更に詳細に検討する必要がある。

(4) PPAR $\gamma$  を抑制することによりアポトーシスを誘導することが明らかとなっており、ACF を発がん性の指標として用いることにより、短期間で臨床研究成果が得られた。大腸がんはこれまで多段階で進展するがんとして、特に遺伝的な関与が強く考えられていたが、内臓脂肪など内的環境も発癌を促進する因子として考えることが必要である。詳細なメカニズムの解析により今後大腸化学発癌予防などへの応用が期待される。今後ヒト ACF において pioglitazone 投与前後の発現遺伝子の網羅的解析をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により得られたサンプルから作用メカニズムの解析、さらには新しい化学発癌予防の分子標的の同定を目指すことを検討する。

(5) AOM と DSS の投与による大腸がん誘発試験において、Apc delta ホモラットは、ヘテロラットと比べ、高感受性を示した。野生型 F344 ラットを対象とした AOM と DSS による発がん実験の報告を参考にすると、腫瘍の大きさは、F344、Apc delta ヘテロ、ホモともに差はなかった。腫瘍数は、F344 と Apc delta ヘテロが同等であり、ホモラットはそれらに比べ有意に多かった。従って、Apc delta ホモラットは、野性型に比しても高感受性を示すと考えられた。

(6) Apc delta ラットに誘発された大腸腫瘍では、 $\beta$ -catenin 遺伝子に高頻度に遺伝子変異があり、また、 $\beta$ -Catenin が核内に移行しており、Wnt シグナル系が昂進していることが示唆された。Apc delta ラットを用いた AOM+DSS 大腸発がん系は、ヒト大腸腫瘍、特に、Wnt シグナル系昂進による大腸腫瘍の新たなモデルになる可能性が高い。短期間（約 20 週）で高頻度（100%）に多数（約 25 個）の大腸がんが誘発できる点、また、適当な大きさがあるため、内視鏡を用いて直

腸および結腸での腫瘍発生の過程を経時的に観察が可能である点から、この実験系は、大腸がんに対する抗ガン剤、診断法、予防法の開発を効果的に進める優れたモデル系になる可能性を秘めている。

(7)大腸がんや胃がんなどの消化器がん発生過程では Wnt シグナルなどの oncogenic な経路の亢進と、COX-2 などの炎症性反応の誘導の双方が関与している。炎症性刺激の中心的役割を担う PGE<sub>2</sub> シグナルが、遺伝子発現誘導を介して EGFR シグナルを活性化し、それが発がんに関与している可能性を示し、EGFR リガンドと ADAM ファミリーの発現誘導を網羅的に初めて解明した。COX-2 阻害薬と EGFR 阻害薬のコンビネーションによる新たな大腸がん予防方法が提唱されているが、大腸がんと同様に胃がんの化学予防薬の標的としての EGFR の可能性を、マウスモデルを用いて初めて明らかにし、COX-2 阻害薬と EGFR 阻害薬のコンビネーションによる投薬は胃がん予防に対しても有効である可能性を示した。

EGFR シグナルがさらに COX-2 発現を誘導し、また Wnt シグナル活性を亢進する事から、Wnt と COX-2/PGE<sub>2</sub>、そして EGFR の各シグナル経路がポジティブフィードバックにより相互に制御し合っており、それが発がんに関与している可能性を示した。

(8)K19-Wnt1/C2mE マウスの遺伝子発現プロファイルが多くのヒト胃がん組織と類似していた。ヒト胃がんでは、30~50%で Wnt シグナル亢進が認められ、70%以上で COX-2 発現誘導が認められることから、K19-Wnt1/C2mE マウスは一部のヒト胃がんを、発生分子機序から腫瘍組織の遺伝子発現パターンを忠実に再現したモデルであると考えられる。このモデルを用いた解析結果はヒト胃がん発生を解明するために重要な知見となる事が期待できる。

炎症反応では、COX-2 だけでなく LOX 経路も誘導されて、様々な脂質メディエーターが誘導される。本研究結果から、消化器がん発生

過程での p12-LOX の役割が示唆された。Wnt と PGE<sub>2</sub> の活性化に起因して発生する胃がんや大腸癌組織で、炎症反応に由来する EGFR 活性化や p12-LOX 誘導、そしてサイトカイン、ケモカインネットワークの活性化の発がんへの関与について、マウスモデルを用いて明らかにしていく。

(9)クローナル増殖を示す大型リンパ球がリンパ腫前駆体細胞であり、大型化は細胞周期 G1 期の細胞成長制御異常を反映しており、この細胞の出現が放射線発がんの鍵となる現象である。予備的な実験では感受性を示す Mtf-1 遺伝子座領域のコンジェニックマウスは抵抗性マウスに比べ、出現頻度が高いという結果が得られており、この関連性について、現在、検討中である。

(10)Apc 遺伝子変異をもつ Min マウスが自然発症する小腸腫瘍への修飾効果が Bcl11b(+/-) 遺伝子型で認められ、Bcl11b 遺伝子型の野生型アレルが腫瘍で残存していた。Bcl11b は、マウス胸腺リンパ腫と同様、腸管発がんでもハプロ型不全のがん抑制遺伝子であった。ヒト Bcl11b 遺伝子座の LOH は進行性の大腸がんを高頻度に観察されるが、adenoma では LOH の報告はなく、進展に関与すると想像されている。しかし、大腸ポリポーシス患者では adenoma にも LOH が観察されるとの報告があり、APC 遺伝子変異と Bcl11b 遺伝子の修飾効果との深い関連性が示唆される。

(11)Parp-9、Parp-10、及び Parp-1 はがん化との関連が示唆されており、作成中の Parp-9、Parp-10 及び以前に作成した Parp-1 の欠損マウスを用いて発がん感受性やがん化と関連する機能異常を解析していく予定である。

(12)がん化の過程における Parp-9 や Parp-10 のタンパク質レベルでの発現や、遺伝子発現レベルでの変動を調べることでがん化との関連性を検討する。

(13)Parp-10 の細胞質での局在性はユビキ

チン相互作用モチーフに依存することが示唆され、Parp-10 はポリユビキチン鎖やポリユビキチン化タンパク質と相互作用する可能性があり、タンパク質分解制御に関与する可能性がある。

(14) ガンマ線照射後の *Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスの脳において欠失変異や挿入変異の低下傾向を観察し、ガンマ線照射後の二本鎖 DNA 切断の不正確な修復が *Parp-1* 欠損下では起きにくい可能性が示唆された。*Parp-1* の機能異常は放射線発がんに関与しない可能性があり、今後ガンマ線照射後の野生型及び *Parp-1*<sup>-/-</sup> マウスにおける胸腺リンパ腫の発生や他の腫瘍発生を検討する。

#### E. 結論

大腸がんの発生及び成立の極く初期段階における遺伝的变化については不明な点が多い。翻訳抑制因子の一つである SND1 や、microRNA を介する翻訳制御機構のがん発生における役割を明らかにすることで、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、新規予防法や診断法、さらには新たな治療法の開発にも寄与できる可能性がある。

コンソミックマウス B6-2CMSM は、B6-2TMSM と比べて PhIP 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて高感受性であることが示唆された。

大腸癌の二次予防として免疫学的便潜血法によるスクリーニングとハイリスクグループの内視鏡によるサーベイランスが行われているが、米国ではこれに加え化学発がん予防の大規模治験が進行中である。これにはアスピリンやスリダクなど NSAIDs が多く用いられているが、安全性が確立している PPAR $\gamma$  リガンドは化学発がん予防薬の有望な候補として期待される。生活習慣病は社会問題となっているが、大腸前がん病変がこれと関連があり、内臓脂肪が鍵を握るそのメカニズムを解明することで大腸癌の罹患率・死亡率を低下し

る可能性がある。

*Apc delta* ホモラットは、AOM と DSS 投与による大腸発がんを高感受性を示す。疾患モデル動物としてのラットの特性を考慮すると、*Apc delta* ホモラットは、大腸がんに対する抗ガン剤、診断法、予防法の開発を効果的に進めるための優れたモデルとなる。

Wnt シグナルと COX-2/PGE<sub>2</sub> シグナルの活性化により発生した K19-Wnt1/C2mE マウス胃癌組織では、ヒト胃癌と類似した遺伝子発現プロファイルが認められ、このマウスモデルはヒト胃癌を外挿するモデルと考えられる。このモデルを用いた解析により、胃癌組織では PGE<sub>2</sub> 依存的に EGFR シグナルが活性化しており、その活性化が腫瘍発生に重要である事が明らかになった。この結果は、EGFR が胃癌予防薬の重要な標的である事を示唆している。また、COX/PGE<sub>2</sub> 以外にも、炎症性経路として p12-LOX や CXCR3 などの腫瘍発生への重要性も明らかにした。

放射線4回分割照射および1回照射後の胸腺細胞を解析し、発がん感受性を担う生物学的基盤を明らかにした。照射後早期に現れる大型リンパ球が前リンパ腫細胞であり、細胞成長の制御機構に異常があると考えられた。この大型リンパ球の出現が放射線発がんの鍵となる。予備的な実験では感受性を示すコンジュニックマウス (*Mtf-1* 遺伝子座領域の) は、抵抗性マウスに比べこの出現頻度が高く、発がん感受性を担う細胞学的基盤が大型リンパ球の形成であると考えられた。感受性遺伝子の本体については *Mtf-1* 以外の可能性も示唆された。

*Bcl11b* 遺伝子がヒト大腸がんモデル・Min マウスの発症する小腸腫瘍の修飾することが明らかになった。*Bcl11b* はハプロ型不全のがん抑制遺伝子であり、野生型アレルの消失がなくても腫瘍発症を促進し、ヒトの大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要な点で

ある。

ジーンターゲット法により *Parp-9* 及び *Parp-10* 遺伝子破壊マウス ES 細胞を各々樹立した。*Parp-9* 及び *Parp-10* ヘテロ欠損 ES 細胞よりキメラマウスを作出し、ヘテロ欠損マウス系統を作製中である。*Parp-9*、*Parp-10* 及び *Parp-1* 欠損マウスや ES 細胞を用いて発がん感受性やがん化と関連する機能の異常の解析を今後進める。

ガンマ線照射後の二本鎖 DNA 切断の不正確な修復が *Parp-1* 欠損下では起きにくい可能性があり、*Parp-1* 欠損マウスのガンマ線誘発腫瘍の感受性を検討中である。

#### F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報（健康危険情報）は特にない。

本研究の方法、実験材料、実験結果、及び実験に用いる動物個体が人体に悪影響を及ぼす可能性は殆どない。マウス・ラットを研究対象としたときは動物取り扱い指針に従い、実験従事者の飼育動物からの病原菌感染の危険性を最小限に抑える努力をしている。また、危険物、動物の使用については、研究所の危険物、動物取り扱い規定に準拠した安全な取り扱いを遵守している。内視鏡検査は横浜市立大学附属病院の定める規約を遵守し、検査による苦痛には十分な配慮を払った。問診、採血、腹部 CT 検査については、その有用性と危険性を説明し、同意の得られた場合にのみ行った。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukuda T, Kondo Y, and Nakagama H. The anti-proliferative effects of the CHFR depend on the Forkhead associated domain, but not E3

ligase activity mediated by Ring Finger domain. PLoS ONE, 3:e1776, 2008.

2. Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T and Nakagama H. Induction of multinucleated cells and apoptosis in PC-3 prostate cancer cell line by low concentration of polyethylene glycol 1000. Cancer Sci, 99:1055-1062, 2008.
3. 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  $\beta$ -catenin expression in the rat. Carcinogenesis, 29:834-839, 2008.
4. 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.
5. Liu Y-T, Shang D, Akatsuka S, Ohara H, Dutta KK, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Izumiya M, Abe K, Nakagam H, Noguchi N, Toyokuni S. Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpnz1 protein tyrosine phosphatase to activate b-catenin pathway. Am J Pathol, 171:1978-1988, 2007.
6. Ikeda I, Tomimoto A, Wada K, Fujisawa T, Fujita K, Yonemitsu K, Endo H, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nagashima Y, Nakagama H, Nakajima A. 5-Aminosalicylic acid (5-ASA) administered in the remission stage of colitis suppresses colitis-associated cancer in a mouse colitis model. Clin Cancer Res., 13:6527-6531,

- 2007.
7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. Imai T, Fukuta K, Hasumura M, Cho YM, Ota Y, Takami S, Nakagama H and Hirose M. Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and  $\beta$ -catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, 28:2199-2206, 2007.
  11. Tanaka E, Fukuda H, Nakashima K, Tsuchiya N, Seimiya H and Nakagama H. HnRNPA3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 358:608-614, 2007.
  12. Lee-Motoyama JP, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K and Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 357:828-833, 2007.
  13. Li Q, Dashwood WM, Zhong X, Nakagama H and Dashwood RH. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat *Bcl-2* promoter and characterization of a pathway involving  $\beta$ -catenin, c-Myc and E2F1. *Oncogene*, 26:6194-6202, 2007.
  14. Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem*, 101:321-330, 2007.
  15. Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagam H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc*, 39:70-74, 2007.
  16. Ogino H, Masutani M, et al., Loss of *Parp-1* affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics*, 8:41 (16 pages), 2007.
  17. Miwa M and Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci*, 98: 1528-1535, 2007.
  18. Idogawa M, Masutani M, Shitashige, M, Honda, K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate  $\beta$ -catenin and T-cell factor-4-Mediated Gene Transactivation: Possible Linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*, 67:911-918, 2007.
  19. Sugo N, Niimi N, Aratani Y, Masutani M, Suzuki H, Koyama H. Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase beta-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:656-661, 2007.
  20. Shirato M, Tozawa S, Maeda D, Watanabe



- M, Nakagama H, Masutani M. Poly(etheno ADP-ribose) blocks poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity. *Biochem. Biophys Res Commun*, 355:451-456, 2007.
21. 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*, 26:5840-5850, 2007.
  22. 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  $\gamma$ -irradiation. *Oncogene*, 26:5280-5289, 2007.
  23. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun*, 355:538-542, 2007.
  24. 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  $\gamma$ -irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 209-215, 2007.
  25. Piao Y-S, Du Y-C, Oshima H, Jin J-C, Nomura M, Yoshimoto T, and Oshima M. Platelet-type 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis*, 29: 440-447, 2008.
  26. Oshima M, Suzuki H, Guo X, and Oshima H. Increased level of serum vascular endothelial growth factor by long-term exposure to hypergravity. *Exp Anim*, 564: 309-313, 2007.
  27. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, and Taketo MM. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*, 26:4679-4688, 2007.
  28. Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, Aoki M, and Taketo MM. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-MAPK signaling. *J Biol Chem*, 282: 23532-23540, 2007.
  29. Oshima M, Oshima H, and Taketo MM. Prostaglandin and TGF- $\beta$  signaling in gastric cancer. In: *Biology of Gastric Cancer*, ed. by Wang T, Springer, in press.
  30. Voigt B, Kuramoto T, Mashimo T, Tsurumi T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. Evaluation of LEXF/FXLE rat recombinant inbred strains for the genetic dissection of complex traits. *Physiol Genomics*, 32:335-342, 2008.
  31. Kuramoto T, Nakanishi S, Serikawa T. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiol. Genomics* (in press), 2008.
  32. Tanaka T, Miyamoto S, Yausi Y, Kohno H, Sugie S. Obesity: a risk for hepatocellular carcinoma. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 1. Disease Progression, pp. 57-74, Research Signpost, Kerala (India), 2007.
  33. Hayashi K, Suzuki R, Miyamoto S, Yoshitani S, Kohno H, Sugie S, Takashima S, Tanaka T. Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Nutr Cancer*, 58:75-84, 2007.
  34. Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, Sugie S,

- Tanaka T. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*, 7:84, 2007.
35. Kohno H, Totsuka Y, Yasui Y, Suzuki R, Sugie S, Wakabayashi K, Tanaka T. Tumor-initiating potency of a novel heterocyclic amine, aminophenylnorharman in mouse colonic carcinogenesis model. *Int J Cancer*, 121:1659-1664, 2007.
  36. Yasui Y, Suzuki R, Miyamoto S, Tsukamoto T, Sugie S, Kohno H, Tanaka T. A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. *Int J Cancer*, 121:2331-2339, 2007.
  37. Tanaka T, Sugie S. Inhibition of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *J Toxicol Pathol*, 20:215-235, 2007.
  38. Miyamoto S, Suzuki R, Yasui Y, Kohno H, Sugie S, Murakami A, Ohigashi H, Tanaka T. Lack of Enhancing Effect of Lauric Acid on the Development of Aberrant Crypt Foci in Male ICR Mice Treated with Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *J Toxicol Pathol*, 20:93-100, 2007.
  39. Ihara A, Wada K, Yoneda M, Fujisawa N, Takahashi H, Nakajima A. Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J Pharmacol Sci*, 103:24-32, 2007.
  40. Wada K, Sakamoto H, Nishikawa K, Sakuma S, Nakajima A, Fujimoto Y, Kamisaki Y. Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci*, 105:133-7, 2007.
  41. 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*, 105:129-32, 2007.
  42. Nakajima A, Wada K. Life style-related diseases of the digestive system: from molecular mechanisms to therapeutic strategies: preface. *J Pharmacol Sci*, 105:127-8, 2007.
  43. Ikeda I, Tomimoto A, Wada K, Fujisawa T, Fujita K, Yonemitsu K, Nozaki Y, Endo H, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nagashima Y, Nakagama H, Nakajima A. 5-Aminosalicylic Acid Given in the Remission Stage of Colitis Suppresses Colitis-Associated Cancer in a Mouse Colitis Model. *Clin Cancer Res*, 13:6527-6531, 2007.
  44. Shimamura T, Royal RE, Kioi M, Nakajima A, Husain SR, and Ouri RK. Interleukin-4 cytotoxin therapy synergizes with gemcitabine in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 67: 9903-9912, 2007.
  45. Yoneda M, Saito S, Ikeda T, Fujita K, Mawatari H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Akiyama T, Takahashi H, Abe Y, Kubota K, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, and Nakajima A. Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients. *J Viral Hepat*, 14:600-607, 2007.

46. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, and Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol*, 42:573-582, 2007.
47. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, and Nakajima A. Type IV collagen 7s domain is an independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. *J Gastroenterol*, 42:375-381, 2007.
48. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A and Hirohashi S. FOXO3+ regulatory T cell affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 13: 902-911, 2007.
2. 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. 宮本 恵、土屋直人、杉村 隆、中釜 斉、RISC 構成因子 SND1/Tudor-SN による microRNA 非依存的な翻訳制御機構、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、横浜、(2007年12月)
3. 関 千穂、土屋直人、田澤 大、杉村 隆、中釜 斉、新規がん制御因子 miR-34a の標的遺伝子の探索 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、横浜、(2007年12月)
4. Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H, Translesion DNA synthesis at PhIP-adducted dG, 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、横浜、(2007年12月)
5. Kondo Y, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H, Comprehensive approach to the identification of the genetic sensceptibility to PhIP-induced colon carcinogenesis in rats, 第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
6. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H, Genome-wide array CGH analysis revealed microdeletions in inflammation-associated colon tumors in mice, 第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
7. 福田勝洋、杉村 隆、中釜 斉、前立腺がん細胞株 PC-3 におけるポリエチレングリコールによる細胞融合を介したアポトーシス誘導、第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
8. 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)
9. 福田智一、中釜 斉、腫瘍抑制遺伝子 CHFR の抗細胞増殖抑制活性はチェックポイント活性と相関するが E3 リガーゼ活性とは関連しない、第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
10. Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H, Biological role of SND1/Tudor-SN in early stage of colon carcinogenesis, 第 66 回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)

11. 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)
12. Katsuragi Y, Sato T, Naito A, Iwasaki T, Obata M, Mishima Y, Ochiai M, Nakagama H, Kominami R, Bcl11b/Rit1 genotypes modify the incidence of intestinal tumors in APCMin/+ mice, 第66回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
13. 落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉、大腸異常腺窩におけるムチンの性状変化は大腸発がんの初期変化である、第66回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
14. Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H, Translesion DNA synthesis at PhIP-adducted dG, 第66回日本癌学会総会、横浜、(2007年10月)
15. 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)
16. 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)
17. 泉谷昌志、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、array CGHを用いたマウス化学発がんモデルの解析、第22回発癌病理研究会、箱根、(2007年8月)
18. 福田智一、中釜 斉、チェックポイント制御蛋白CHFRの抗細胞増殖活性に関する機能解析、変異機構研究会、第20回夏の学校、瀬戸、(2007年7月)
19. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H, Genome-wide array revealed possible microdeletions in inflammation-associated colon tumors in mice, 98th Annual Meeting of the AACR, Los Angeles, (2007年4月)
20. 荻野秀樹、益谷美都子ら、*Parp-1*欠損マウス細胞における*Igf2*遺伝子発現調節異常と造腫瘍性との関連、第26回分子病理学研究会湘南シンポジウム、葉山、(2007年6月)
21. 荻野秀樹、益谷美都子ら、*Parp-1*欠損マウスES細胞由来テラトーマ形成時のトロホプラスト分化誘導と*H19*遺伝子の発現亢進との関連、第22回発癌病理研究会、箱根、(2007年8月)
22. 前田大介、益谷美都子ら、Impact of *Parp-1* deficiency on instability of short nucleotide repeat sequences, 第66回日本癌学会学術総会、横浜、(2007年10月)
23. 井戸川雅史、益谷美都子ら、Regulation of the beta-catenin/TCF-4-mediated gene transactivation by Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)、第66回日本癌学会学術総会、横浜、(2007年10月)
24. 荻野秀樹、益谷美都子ら、Disregulation of *Igf2* and *H19* gene expressions in *Parp-1*-deficient cells during immortalization and tumorigenesis, 第66回日本癌学会学術総会、横浜、(2007年10月)
25. Anna Poetsch、益谷美都子ら、Effect of poly(ADP-ribose) glycohydrolase deficiency on cell death induced by DNA damage, 第66回日本癌学会学術総会、横浜、(2007年10月)
26. 戸澤俊一、益谷美都子ら、Poly(ADP-ribose) glycohydrolaseによる分解に対する耐性と阻害活性を示すpoly(ADP-ribose)誘導体のpoly(etheno ADP-ribose)、第30回日本分子生物学学会