

- 年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、(2007 年 12 月)
27. 長田 智治、益谷美都子ら、マウス卵の受精刺激後に活性化するポリ ADP-リボシル化反応とクロマチンリモデリングとの関連、第 30 回日本分子生物学学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、(2007 年 12 月)
28. 藤原久子、益谷美都子ら、Spontaneous changes of maxillary incisor in aged poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) knockout mice. Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007、東京、(2007 年 12 月)
29. 安藤 亮、益谷美都子ら、*Parp-1* 欠損マウス由来不死化胚性線維芽細胞の移植により発生した腫瘍の病理組織学的特徴。第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、名古屋、(2008 年 2 月)
30. Kominami R, Ohi H, Maruyama M, Kamimura K, Mishima Y, Niwa O. ROS levels and mutations in atrophic thymuses after γ -irradiation. The 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco (2007 年 7 月)
31. Oshima M, Oshima H and Taketo MM. Mouse model of gastric cancer by simultaneous activation of Wnt and PGE₂ pathways. Annual Meeting of AACR, Los Angeles, (2007 年 4 月)
32. 大島正伸、大島浩子、武藤 誠、Wnt シグナルと PGE₂ 経路の活性化による胃がん発生モデルマウス、第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、(2007 年 10 月)
33. 大島正伸、消化器がん発生における PGE₂ とマクロファージの役割の解析、第 30 回日本分子生物学学会第 80 回日本生化学会合同大会、横浜、(2007 年 12 月)
34. 庫本高志、芹川忠夫、毛胞と乳腺の発育不全を示す Sparse and wavy hair ラットの原因遺伝子の同定、第 54 回日本実験動物学会総会、東京、(2007 年 5 月)
35. Voigt B, Mashimo T, Kuramoto T, Takizawa A, Yamasaki K, Nakanishi S, Serikawa T. Genetic dissection of the LEXF/FXLE recombinant inbred strains: A SNP based QTL study. The 2007 meeting on Rat Genomics & Models, Cold Spring Harbor, (2007 年 12 月)
36. Miyamoto S, Hayashi K, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takashima S, Murakami A, Ohigashi H, and Tanaka T, : Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplasia in *db/db* mice. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Los Angeles, (2007 年 4 月)
37. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Miyamoto S, Sugie S, Tanaka T, Ursodeoxycholic acid inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Gifu, (2007 年 8 月)
38. Yasui Y, Suzuki R, Kohno H, Miyamoto S, Sugie S, Tanaka T, A lipophilic statin, pitavastatin inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Gifu, (2007 年 8 月)
39. Tatematsu K, Mori Y, Sugie S, Tanaka T, and Mori H, Tissue-specific modification by curcumin of mutagenic activation of carcinogenic *N*-nitroso compounds by CYP2B1 and 2E1 in rats. 3rd International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2007),

- Kyoto, (2007年11月)
40. Yasui Y, Kim M, Miyamoto S, Ishigamori-Suzuki R, Sugie S, and Tanaka T, The inhibitory effect of pitavastatin on colitis-related colon carcinogenesis in mice. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007), Jeju Island, Korea, (2007年12月)
41. Kim M, Yasui Y, Miyamoto S, Sugie S, Murakami A, Ishigamori-Suzuki R, and Tanaka T, Dietary pitavastatin inhibits 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis in the upper-digestive organs of *rasH2* mice. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007), Jeju Island, Korea, (2007年12月)
42. 甲野裕之、高橋真美、安井由美子、鈴木里加子、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二、AOM/DSS誘発マウス大腸発がんに対する iNOS 阻害剤 ONO-1714 による修飾効果、がん予防大会 in TOKYO 2007 (第14回日本がん予防学会、第8回日本がん分子疫学研究会、第30回がん疫学研究会)、東京、(2007年7月)
43. 杉江茂幸、甲野裕之、安井由美子、宮本真吾、田中卓二、BBN誘発マウス膀胱発がんにおける β -cryptoxanthin の抑制効果、がん予防大会 in TOKYO 2007 (第14回日本がん予防学会、第8回日本がん分子疫学研究会、第30回がん疫学研究会)、東京、(2007年7月)
44. 安井由美子、甲野裕之、宮本真吾、杉江茂幸、田中卓二、ウルソデオキシコール酸による炎症関連マウス大腸発がん抑制、第18回西日本臨床胆汁酸研究会、大阪、(2007年7月)
45. Sugie S, Miyamoto S, Yasui Y, Kohno H, Suzuki R, Nakagama H, Tanaka T, Modifying effects of NNK on AOM/DSS colon carcinogenesis model in A/J mice. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, (2007年10月)
46. Tanaka T, Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, Kohno H, Sugie S, Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, (2007年10月)
47. 安井由美子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二、プロポリスの水抽出物およびエタノール抽出物による AOM 誘発ラット大腸 aberrant crypt foci の抑制効果、第18回日本消化器癌発生学会総会、札幌、(2007年11月)
48. Tomimoto A, Fujisawa T, Takahashi H, Nakagama H, Nakajima A, PPAR γ attenuates cancer cell migration and invasion through activation of small GTPase protein, Cdc42/Rac1 in pancreatic cancer, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, (2007年4月)
49. Fujisawa T, Tomimoto A, Takahashi H, Yonemitsu K, Nakajima A, Adiponectin prevents colorectal carcinogenesis through suppressing mTOR signaling pathway stimulated by high fat diet. AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, (2007年4月)
50. Takahashi H, Toshio Fujisawa, Kyoko Yonemitsu, Ayako Tomimoto, Hiroki Endo, Atsushi Nakajima. Visceral fat obesity increase dysplastic aberrant crypt foci. AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, (2007年4月)
51. 富本彩子、藤澤聡郎、米満恭子、高橋宏和、藤田浩司、遠藤宏樹、野崎雄一、秋山智之、馬渡弘典、飯田洋、米田正人、廣

川 智、後藤 歩、阿部泰伸、稲森正彦、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、中島 淳、メトフォルミンによるAPC Min マウスのポリープの形成抑制効果の検討、JDDW2007 (消化器病学会)、神戸、(2007 年 10 月)

52. 富本彩子、藤澤聡朗、遠藤宏樹、野崎雄一、米田恭子、秋山智之、高橋宏和 斉藤 聡、中島 淳、高脂肪食による大腸発生癌促進と、mTOR 経路を介したアディポネクチンの発癌抑制作用の検討、第 18 回日本消化器癌発生学会総会、札幌、(2007 年 11 月)

53. 高橋宏和、米田恭子、富本彩子、遠藤宏樹、稲森正彦、阿部泰伸、中島 淳、メタボリッ

クシンドロームと aberrant crypt foci について、2007 AACR frontiers in cancer prevention research, Philadelphia, (2007 年 12 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

「マイクロ RNA を有効成分として含有する腫瘍増殖抑制剤、及び癌治療用医薬組成物」
(中釜 斉、田澤 大、土屋直人)
(特願 2007-50908)

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金 (第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性及び修飾要因の解明

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP)により誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、大腸がん発生の初期過程における分子機構、および大腸がん過程を修飾する種々の環境要因や、発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。大腸がんの感受性遺伝子に関しては、ACF誘発性と詳細なハプロタイプ解析により限定化した約2 Mbの領域から、高感受性および低感受性系統間で発現量の異なる候補遺伝子Xを同定した。遺伝子Xの3'側非翻訳領域に存在する10箇所の多型が、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。さらに、RNA干渉のエフェクター複合体であるRISCの構成因子で、翻訳抑制因子の一つであるSND1と増殖抑制作用を有するmicroRNA(miR-34a)が、PhIP等の細胞傷害性物質への曝露により大腸上皮に発現誘導されることが分かった。SND1は、PhIP誘発のラット大腸前がん病変及び大腸がんやヒト大腸がんで高頻度に過剰発現し、APC遺伝子の翻訳を負に制御する。また、miR-34aがヒト大腸がんの一部でコピー数の減少および発現の低下を示すことから、SND1及びmiR-34aを介する翻訳制御機構の機能破綻が、大腸がんの発生・成立に重要な役割を果たすこと示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1)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:

ラット16番染色体上の大腸がん感受性遺伝子 *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発現解析を行った。発現解析に用いたRNAは、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RNAを抽出した。得られたRNA試料からそれぞれ逆転写酵素によりcDNAを作成し、定量的RT-PCR法によりF344及びACI

系統間での発現差を定量的に検討した。

(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' 側の非翻訳領域にシークエンス用プライマーを設計し、当該領域の全塩基配列を決定した。F344 及び ACI 系統間で遺伝子配列の違いを認めた場合には、感受性の異なる種々のラット系統を用いて、遺伝的多型と ACF 誘発性の感受性の関連性について検討した。

(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:

昨年度までに、miRNA/siRNA などの短い RNA を介する遺伝子の翻訳制御因子 RISC の構成成分の一つである SND1/Snd1 蛋白質が、ヒト大腸がんで高発現していることを示してきた。さらに、PhIP 誘発大腸がんモデルにおいて、抗マウス Snd1 抗体を用いた免疫組織学的染色により、発がん過程の早期段階(早期微小病変)から SND1/Snd1 が過剰発現していることを明らかにした。今年度は、発がん過程のどの段階において Snd1 蛋白質が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 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、このサイクルを 2 回繰り返したのち、さらに PhIP のみを 2 週間投与した。PhIP を最終投与した 24 時間後にラットを屠殺し、大腸をホルマリン固定したのちパラフィン包埋した。約 5 μ m 厚の組織切片を作成し、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の検討:

細胞傷害性ストレスへの曝露により、大腸上皮細胞及び大腸がん細胞株に p53 依存的に発現誘導される microRNA として miR-34a を同定した。MiR-34a の大腸発がんへの関与を調べるため、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 Agilent Technologies 社の DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、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 の発現変化についても TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法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。

(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) 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:

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、低感受性系統 (ACI) において高感受性系統 (F344) の約 2 倍の発現量を示した。さらに、PhIP による ACF 誘発性に高感受性を示す (F344xACI) F1 系統においても、遺伝子 X の発現量が感受性系統 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 大腸発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 の多型解析の結果、プロモーター領域およびエキソン 1-6 には F344 と ACI 系統間で配列の違いは無かった。最終エキソン 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。10 箇所のうち 8 箇所は塩基置換型の多型であったが、1 箇所は 4 塩基の欠失型多型、もう 1 箇所は 2 塩基挿入型の多型であった (いずれも F344 系統での多型)。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 型の多型を示すことが分かった。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

(dysplastic ACF) に過剰発現していることを見出した。我々は既に、PhIP の活性化体 (アセチル化体; PhIP-OAc) 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見出し報告してきたが、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。以上の結果より、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 を過剰発現させたラット腸管由来の上皮細胞 (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 (データは示さず)、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。逆に、SW48 細胞で SND1 をノックダウンさせると、APC 蛋白質量が増加することが分かった。以上の結果より、SND1 が何らかの転写後制御機構により、APC 蛋白質の発現量を抑制的に制御することが分かった。

(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ることが既に報告されており (Caudy et al. *Nature*, 2003)、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。さらに、SND1 が PhIP 等の細胞傷害性ストレスにより発現誘導されることから、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。

まず、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, b, c を同定した。これらのうち、miR-34b, c は大腸上皮における発現量が極端に少ないことから、今回の解析には主として miR-34a を用いることとした。野生型 p53 を有するヒト大腸がん細胞株 (HCT116, Lovo, RKO) では ADR 処理により、いずれも miR-34a の発現誘導を認められたが、変異型 p53 遺伝子を有する細胞株 (HCT116 p53⁺, DLD1, HT28) では miR-34a の誘導は認められなかった。さらに、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- β -galactosidase の陽性細胞が多数誘導された。

(6) miR-34a の標的遺伝子の同定:

miR-34a を導入した HCT116 及び RKO 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析により、E2F 転写因子ファミリーの発現が抑制された。逆に、がん抑制遺伝子 p53、及び p21 や TP53INP1, ATF3, IKIP 等の p53 の標的遺伝子群が発現誘導されることが分かった。ウェスタンブロット解析でも、miR-34a の導入により E2F1 および E2F3 蛋白質の発現が強く抑制されることが示され、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。さらに、p53 及び p21 蛋白質の発現も認められた。興味深いことに、PhIP 投与したラット大腸上皮における miR-34a の発現を調べたところ、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。

D. 考察

DNA/RNA 結合蛋白質として同定した SND1 は、RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つであり、新規の翻訳抑制因子の可能性はある。PhIP 活性化体である PhIP-0Ac 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。

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。

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なるだけでなく、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。

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 β -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 β -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 b-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, Nakagama H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc*, 39 (1):70-74, 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 susceptibility 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

「マイクロRNAを有効成分として含有する腫瘍増殖抑制剤、及び癌治療用医薬組成物」(中釜 斉、田澤 大、土屋直人)
(特願 2007-50908)

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金 (第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 益谷 美都子 国立がんセンター研究所生化学部 部長

研究要旨

ジーンターゲット法により (ADP-リボース)合成酵素 (*Parp*)-10 及び *Parp*-9 遺伝子破壊マウス ES 細胞を各々樹立した。*Parp*-10 及び *Parp*-9 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しつつある。*Parp*-10 の mRNA 発現レベルはマウスでは精巣で高く他の主要臓器でも認められ、*Parp*-9 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。*Parp*-10 及び *Parp*-9 はがん化との関連が示唆されており、これらの欠損マウスは疾患モデルとなる可能性がある。ガンマ線照射後の *Parp*-1^{-/-} 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る。ポリ ADP-リボシル化関連酵素変異マウスや細胞を用いて、またタンパク質レベルでもポリ ADP-リボシル化異常とがん化の関連について解析予定である。

A. 研究目的

ポリ ADP-リボシル化反応の発がんへの関与の分子機構についてポリ(ADP-リボース)合成酵素 (*Parp*)-1 がゲノムの損傷応答に関与し、その機能異常ががん化に関与することが判ってきたが、他の *Parp* ファミリー分子の発がんとの関連は解明されていない。*Parp*-10 は c-Myc による細胞のトランスフォーメーションの抑制に関与することが示唆される。*Parp*-9 は悪性度の高い B 細胞リンパ腫において発現亢進を示し、がん化との関連が示唆される。国内外で *Parp*-1 以外の *Parp*-9、及び *Parp*-10 等の新規 PARP ファミリー分子の変異マウスモデルは作製されておらず、発がんとの関連性は調べられていない。本研究により個体レベル、及び細胞レベルで *Parp*-9、及び *Parp*-10 の機能異常の発がんへの関与を調べる。

DNA 損傷後に核内で *Parp*-1 は活性化され、NAD を基質としたポリ(ADP-リボース)合成が起きる。*Parp*-1 は DNA 修復、DNA 組み換えに関与することが示唆されている。また、*Parp*-1 は NAD の枯渇を介した AIF (apoptosis-inducing factor)依存性のアポトーシスをはじめとする細胞死を誘導する。ポリ(ADP-リボース)は、DNA 損傷後一過性に存在し、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドrolラーゼ (*Parg*) により ADP-リボースへと分解される。本研究においては、*Parp*-1 と *Parg* の発がんにおける役割についても欠損マウスモデルを用いて研究を進める。また、ヒト腫瘍組織やがん細胞株におけるポリ ADP-リボシル化の機能及び遺伝子異常を検索する。これによりポリ ADP-リボシル化の異常ががん化過程にどのように関与するかについて明らかになれば、がん発生機構の理解

につながり、がんの予防を考える上で、有用な基礎的資料となると考えられる。

B. 研究方法

1) マウス *Parp-10* のコンディショナルターゲットベクターを作製しマウスES細胞に導入し、*Parp-10* 欠損マウス系統を作出する。まずマウス *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ニングした。*loxP* 配列 3 カ所と薬剤選択用のマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子カセット、さらにES細胞に導入後のネガティブセレクション用に *DT-A* (ジフテリアトキシン A フラグメント)カセット を有するコンディショナルターゲット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 細胞へ導入した。G-418 (ジェネティシン) 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。

2) マウス *Parp-10* cDNA をクローニングした。N 末 EGFP 融合型 *Parp-10* (EGFP-m*Parp-10*) 発現ベクターを構築後、これを一過性に 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。

3) マウス *Parp-9* のコンディショナルターゲットベクターを作製しマウスES細胞に導入し、*Parp-9* 欠損マウス系統を作出する。マウス *Parp9* 遺伝子を含む bacmid から exon 1-4 までを含む領域を切り出しサブクロニングを行った。*loxP* 配列 3 カ所とネオマイシン耐性遺伝子カセット、さらに *DT-A* カセットを有するコンディショナルターゲット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 細胞へ導入した。G-418耐性クローンを選択し、サザンブロット法によりスクリーニングした。

4) マウスのがん化過程及びヒトの腫瘍にお

ける *Parp-10* の蛋白質レベルでの発現変動及び異常を調べるために *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。

5) ガンマ線照射後の *Parp-1^{-/-}* 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、ガンマ線照射後の *Parp-1^{-/-}* マウスを *gpt* 遺伝子を変異マーカーとして有する *gptdelta* マウスとの交配体の組織における突然変異の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、国立がんセンターの「動物実験に関する指針」を遵守した。ヒト腫瘍サンプルを用いる解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) マウス *Parp-10* 遺伝子を含む bacmid から exon 1-9 までを含む領域を切り出し、*loxP* 配列 3 カ所と薬剤選択用のマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子カセット、*DT-A* カセット を有するコンディショナルターゲットベクターを調製し、マウス ES 細胞へ導入した。G-418 (ジェネティシン) 耐性クローンを選択し、サザンブロット法によりスクリーニングした結果、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。現在 *Parp-10^{+3loxP}* マウス系統の作出を行っている。

2) クローニングしたマウス *Parp-10* cDNA を pEGFP vector に挿入し、N 末 EGFP 融合型 *Parp-10* (EGFP-m*Parp-10*) 発現ベクターを構築した。pEGFP-m*Parp-10* を一過性に HeLa 細胞に導入したところ、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-mParp-10deltaUIM 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。

- 3) マウス *Parp-9* 遺伝子を含む bacmid から exon 1-4 までを含む領域を切り出し、これを用いてコンディショナルターゲットベクターターゲットベクターを調製し、マウス ES 細胞へ導入した。G-418 耐性クローンを選択し、サブプロット法によりスクリーニングした結果、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成する予定である。
- 4) マウスのがん化過程及びヒトの腫瘍における *Parp-10* の蛋白質レベルでの発現変動及び異常を調べるためにペプチド抗体の作製を行い、*Parp-10* に対する特異性を western blot 法により検討した。*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。*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。
- 5) ガンマ線照射後の野生型及び *Parp-1^{-/-}* 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、腫瘍発生の検討を開始した。ガンマ線照射後の *Parp-1^{-/-}* マウス脳における変異マーカー遺伝子 *gpt* における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^{-/-}* 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^{-/-}* 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

Parp-9、*Parp-10*、及び *Parp-1* はがん化との関連が示唆されており、昨年度より作成しつつある *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。これらの欠損マウスはがん化の疾患モデルとなる可能性がある。*Parp-9* 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。マウス *Parp-10* の遺伝子発現は精巣で高いが、小腸や肺以外では低い傾向を認めた。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を抗体を用いて調べる。また、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必要がある。本研究で *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。ユビキチン相互作用モチーフはポリユビキチン鎖を認識することから *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ためこの点も検討していく。

ガンマ線照射後の *Parp-1^{-/-}* 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る。一方、アルキル化剤 BHP 投与後 *Parp-1* 欠損下では、BER の遅滞が起こり、二本鎖 DNA 切断に移行し、不正確な非相同的 end-joining 型修復 (NHEJ) が起こる頻度が増加し、欠失型及び挿入型変異頻度が上昇すると考えられる。ガンマ線照射後、変異につながる不正確な修復が起きにくいことから *Parp-1* の機能異常は放射線発がんに寄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^{-/-}* マウスにおける胸腺リンパ腫の発生や他の腫

瘍発生を検討していく。

E. 結論

ジーンターゲット法により *Parp-10* 及び *Parp-9* 遺伝子破壊マウス ES 細胞を各々樹立した。*Parp-10* 及び *Parp-9* 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しつつある。*Parp-10* 及び *Parp-9* はがん化との関連が示唆されており、これらの欠損マウスは疾患モデルとなる可能性がある。

Parp-10、*Parp-9* 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しつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Miwa M and Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.*, 98(10): 1528-1535, 2007.
3. 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.
4. Sugo N, Niimi N, Aratani Y, Masutani M, Suzuki H, Koyama H. Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but at-

tenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase beta-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354:656-661, 2007.

5. 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.

2. 学会発表

1. 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 (神奈川)、(2007 年 6 月)、第 26 回分子病理学研究会湘南シンポジウムプログラム・要旨集、p. 32、2007
2. 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 (神奈川)、(2007 年 8 月)、第 22 回発癌病理研究会プログラム、p. 25、2007
3. 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)、66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association –PROCEEDINGS–、p. 49、2007
4. 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)、66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association –PROCEEDINGS–、p. 235、2007
5. 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)、66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association –PROCEEDINGS–、p. 321、2007
6. 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)、66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association –PROCEEDINGS–、p. 497、2007
7. 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年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、(2007 年 12 月)、第 30 回日本分子生物学学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)・プログラム、p. 881、2007
8. 長田 智治、益谷美都子ら、マウス卵の受精刺激後に活性化するポリ ADP-リボシル化反応とクロマチンリモデリングとの関連. 第 30 回日本分子生物学学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、(2007 年 12 月)、第 30 回日本分子生物学学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)・プログラム、横浜 (神奈川)、p. 137 and p. 526、2007
9. 藤原久子、益谷美都子ら、Spontaneous changes of maxillary incisor in aged poly(ADP-ribose) polymerase-1 (*Parp-1*) knockout mice. Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007、東京、(2007 年 12 月)、Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007 Program & Abstract、p. 137、2007
10. 安藤 亮、益谷美都子ら、*Parp-1* 欠損マウス由来不死化胚性線維芽細胞の移植により発生した腫瘍の病理組織学的特徴. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、名古屋 (愛知)、(2008 年 2 月)、第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集、p.64、2008
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測

分担研究者 木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨 発がんリスクを担う発がん感受性遺伝子の単離と寄与をモデルマウスを用い解析し、ヒトへの貢献を果たすことを目的とした。放射線照射後40日に現れる大型リンパ球の多くはクローナル増殖を示し、前リンパ腫細胞であることがわかった。このリンパ球は正常胸腺細胞より大きく不均一で、リンパ腫細胞に類似し、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効率が放射線発がん感受性の鍵となると考えられた。ヒト MTF-1 座多型とチェルノブイリ地方の小児甲状腺がん発症との関連解析を行った。しかし、強い相関は示されなかった（長崎大学との共同研究）。一方、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を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るが、野生型アレルの消失がなくても腫瘍発症を促進した。このことは、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と考えられる。

A. 研究目的

発がんリスクは個人によりバラツキがあり、その一部は遺伝的素因により影響を受ける。遺伝的素因を担う感受性遺伝子およびその遺伝子型の影響については不確定な点が多い。これは、ヒトを対象とした解析では遺伝的背景が複雑であり、倫理的な問題を含む困難による、と予想される。一方、モデル動物を用いた研究は連鎖解析により感受性遺伝子を単離することができ、ヒト解析の補完的役割をもつ。本研究はマウスモデルを利用し、発がん感受性遺伝子の単離とその遺伝子型の影響を解明し、ヒトへの貢献を果たそうとするものである。

マウスは系統により発がん感受性が異なり、遺伝的多型が存在する。感受性遺伝子はがんの発生母体となる正常細胞の増殖能

に違いを与える遺伝子や、がん細胞の発生・進展する周りの環境を支配している遺伝子群などが考えられる。遺伝子型としてはホモ型・ヘテロ型、どちらも関与し得る。大腸がん発症に関しては、リパーゼの一種をコードする感受性遺伝子・Momi1 が単離され、それは周辺環境を修飾すると言われていたが、その寄与機構は未だに不明確である。発がん感受性遺伝子が同定されると、ヒトがんの発症への影響の検討、防護対策、薬物の開発が期待される。我々は Bcl11b/Rit1 遺伝子が腸管腫瘍修飾遺伝子であることを見だし、またリンパ腫発症感受性遺伝子候補として MTF-1 を同定している。そこで、これらの感受性遺伝子の発がんへの役割を解明するとともに、感受性遺伝子が与えるヒト発がんリスクを測定す

ることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 発がん実験：BALB/c コンジェニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェニーに対して γ 線、2.5Gy を 4 回照射した。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で判定した。

一方、腸管腫瘍発生では自然発症を観察した。大腸がんモデル・Min マウスと Bcl11b-KO ヘテロ型マウスを交配し、49 頭のマウスを得た。生後 18 週でマウスを安楽死させ、腸管を固定後、腸管内の腫瘍(腫瘍)を肉眼および顕微鏡下で観察し、その数と大きさを測定した。

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

(3) 遺伝子型の決定および野生型アレル消失の判定。遺伝子型の決定にはそれぞれ適当なプライマーセットを用いて PCR 法を用いた。コンジェニック領域の決定には MIT マーカーをの WEB サイトから選択し、利用した。

(4) マウスの大腸、小腸の腫瘍は実体顕微鏡を用いて観察した。免疫組織学的解析は通常の方法を用いたが、組織固定にはパラホルムアルデヒドを用いた。用いた Bcl11b 抗体は 3 種類あり、Bcl11b-Z は今まで主に使ってきた抗体で、zinc-finger ドメインを抗

原に用いたものであり、Bcl11b-C は C 末端領域に対する抗体、Bcl11b-N は N 末端領域に対する抗体である。すべてポリクローナル抗体である。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには本学の動物実験施設要綱に準拠し研究した。また、動物倫理の理解を深めるため動物実験施設が執り行う慰霊祭への出席を義務づけている。マウス遺伝子からヒト疾患感受性遺伝子に研究を進めたとき、すなわち正常人を対象とした MTF-1 ハプロタイプの決定を行う時には、新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会に申請書を提出し、その承認を得た(2003年10月)。チェルノブイリ地方の小児甲状腺がんの解析についても、新潟大学医学部と長崎大学医学部で承認を得た。Bcl11b タンパク質発現についての新鮮ヒト大腸組織の入手に関しては、現在新潟大学医学部倫理審査委員会に申請書を提出しているところである。

C. 研究結果

C-1 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：発がん感受性を担う生物学的基盤を明らかにするため、放射線照射後の胸腺を解析してきた。具体的には、マウスに電離放射線 2.5Gy を 4 回分割照射し、初回照射後 40 日と 80 日のマウスから萎縮した胸腺を取り出し、その胸腺内のリンパ球の特徴を調べた。注目点は大型リンパ球の出現である。今年度ほぼ最終的な結果が得られた。さらに、放射線 3Gy 1 回照射の結果も得られたので、両者の影響を比較検討した。

C-1-1 非照射の正常胸腺と照射により誘発された胸腺リンパ腫の間で、細胞の大きさを比較した。まず BrdU をマウスに投与し、1 時間後に胸腺を取り出し、胸腺細胞を採取した。胸腺細胞を DNA 量と BrdU 取り込み量とで FACS で 2 次元に展開し、G1 期分画、S 期分画、G2/M 期分画に分けた。次に

それぞれの分画にある細胞の大きさを測定した。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 (DNA 合成過程を反映する)、G1 期細胞と比べるとかなり大きくなっていった (FSC の数値で単純計算すると約 6 倍の大きさになっていた)。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。リンパ腫細胞は染色体 2 倍体構成をほぼ保っているため、この大きさの違いは DNA 含量の差に基づくのではなく、細胞自身のサイズの肥大化を反映している。また、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る。

C-1-2 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、胸腺は萎縮していた。この萎縮状態はしばらく進行し、萎縮の程度は 80 日の方が強かった。しかし、80 日の萎縮胸腺では再び肥大化し始めるものが少数みられ、これはリンパ腫への進展の始まりと想像された。照射後 40 日萎縮胸腺に存在する大型のリンパ球と小型のリンパ球の割合を測定した。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のそれと比べ上昇していた。また、その頻度は照射後時間経過とともに増大した。そこで、大型リンパ球の割合が上昇した萎縮胸腺での細胞の大きさを細胞周期毎に測定した。G1 期細胞の大きさはリンパ腫のそれと同様に不均一で、G1 期正常細胞と比べると大きい。一方、S 期細胞はやはり DNA 合成過程を反映し不均一であるが、大きさは正常 S 期細胞のそれと大きな違いはみられなかった。すなわち、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に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る。

細胞分裂周期を経るとき細胞は必ず G1

期で成長し、大型化する必要がある。この過程で細胞分裂に必要な物質とエネルギーを蓄積させる。正常胸腺内の小型リンパ球は常に BrdU の取り込みをせず、細胞分裂周期では静止状態 (early G1) にあるように制御されている。一方、観察された G1 期大型リンパ球は、細胞分裂後静止状態 (early G1) 期には長く存在せず、直ちに late G1 期から early S 期に細胞が移行する細胞が出現してきている、と考えられる。すなわち、細胞増殖に向かって活性化された状態の細胞が出現すると考えられる。

C-1-3 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が存在しているかどうかを判定した。実際には、クローナル増殖する細胞が胸腺細胞のどの程度を占有しているかを検討した。大型リンパ球が占める割合の高い胸腺では、VDJ 組換え判定によるクローナル増殖細胞が高頻度に検出され、高い割合でその細胞が胸腺を占めていた。すなわち、前がん状態になっている確率が高いと考えられた。この種の萎縮胸腺で、大型のリンパ球と小型のリンパ球に分画して VDJ 組換えを調べたが、両者は同じパターンを示した。これは、同じ起源をもつ前がん細胞が細胞周期により、大型リンパ球と小型リンパ球に分けられたことを示し、両者は単なる細胞周期の異なる過程にあることを反映しているに過ぎなかった。一方、その割合が低いときには VDJ 組換え判定でクローナル増殖している細胞の割合が少ない、もしくは検出されないケースが多かった。クローナル増殖の検出頻度は照射後 40 日より 80 日の方が高くなっており、またクローナル増殖細胞の占める割合も多くなっていた。

C-1-4 3Gy 1 回照射という条件で照射を行ない、同様の指標で解析した。こ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する。この間は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。照射後300日の胸腺から細胞を取り出し、細胞の大きさ、VDJ組換えを調べた。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。すなわち、細胞数の減少は初期には起こらず（照射後回復する）、大型化の時期と平行して、その数が減少することを示していた。3Gy 1回照射という条件では、リンパ球の大型化時期が4回分割照射と比べ遅れるが、このリンパ球の大型化がやはり鍵となることには変わりがなかった。

C-2 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と事故とは関係のない甲状腺がん患者および正常人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）。その数はそれぞれ113名、243名、527名であった。Rs567多型では、A/A 遺伝子型が事故による甲状腺がん患者では9.7%、事故とは関係のない甲状腺がん患者では12.8%、正常人では17.5%であった。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に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、同様の傾向を示すことがわかった。

C-3 第5番染色体上の発がん抵抗性遺伝子の遺伝解析：現在まで4種類のコンジェニックマウスを作製し、発がん実験を行ってきた。その結果、候補領域を104.6Mb-115.5Mbにまで限定した。現在、105.0Mbまでと112.3Mbまでのコンジェニ

ックマウスを作製し、発現実験を行っている。

C-4 Bcl11b/Rit1 遺伝子の腸管腫瘍発生への修飾効果：ヒト大腸がんでは第14番染色体上の Bcl11b 遺伝子座で高頻度に LOH が観察される。これは大腸がんの発症に Bcl11b 遺伝子が関与する可能性を示唆する。そこで、Bcl11b 遺伝子型の違いによる大腸・小腸がん発症への影響を検討した。

C-4-1 APC 遺伝子に変異をもつ大腸がんモデル・Min マウスと Bcl11b-KO ヘテロ型マウスを交配し、4種類の異なった遺伝子型をもつマウスを作製した。生後18週でマウスを安楽死させ、腸管を固定後、腸管内の腫瘍（腫瘍）を肉眼および顕微鏡下で観察した。変異 APC が遺伝しなかったマウスでは Bcl11b 遺伝子型の違いによらず、全く腫瘍が観察されなかったが、変異 APC が遺伝したマウスでは予想通り腫瘍が観察された。腫瘍数を観察すると、Bcl11b 遺伝子型の違いにより影響されるという結果が得られていた。今年度は再実験を行ない、腫瘍の詳細を検討した。変異型 APC・野生型 Bcl11b マウスでは13個体平均腫瘍個数は14.2であるのに対し、変異型 APC・ヘテロ型 Bcl11b マウスの10個体平均腫瘍個数は33.1と有意に上昇していた ($P < 0.01$)。この結果は前回の結果（前者の個数6.0で、後者が14.5であった）と一致し、ヘテロ型 Bcl11b マウスは野生型に比べ、有意に腫瘍個数を上昇させることが確認された。しかし、前回の予備的な結果では腫瘍の平均サイズには変化はみられなかったが、今回の結果ではヘテロ型 Bcl11b は有意に腫瘍の大きさも増大させることが分かった。

C-4-2 腫瘍細胞の Apc 遺伝子および Bcl11b 遺伝子の野生型アレルの欠失を解析した。用いた多型マーカーは、Apc 遺伝子座近傍の D18Mit14 と D18Mit59 および Bcl11b 遺伝子座近傍の D12Mit122 である。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なかった。これは 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に起因すると考えられる。

C-4-3 3種類の Bcl11b 抗体を用い、Bcl11b タンパク質の発現細胞を観察した。Bcl11b-Z は今まで主に使ってきた抗体で、zinc-finger ドメインを抗原に用いたものであり、Bcl11b-C は C 末端領域に対する抗体、Bcl11b-N は N 末端領域に対する抗体である。Bcl11b-Z では、マウス小腸の crypt 内の上部 2/3 の細胞の核が染まり、villi に向かって先端に行くにつれ染まり方が弱くなっていた。染色されている細胞群の下半分は BrdU を取り込んでいる細胞で、Transit amplifying cells (TA 細胞) と考えられる。Bcl11b-C および Bcl11b-N 抗体では Bcl11b-Z 抗体より染まりは弱い、同様の傾向がみられた。crypt の下部、TA 細胞群の下方には Lgr-5 陽性の stem cells が存在しているが、この stem cells にも発現が観察された。3種類の Bcl11b 抗体を用いた結果は Bcl11b 発現を反映していると考えられ、発現は TA 細胞が中心で、stem cells でも一部発現があると考えられる。TA 細胞から villi に向う細胞群の染色は残存するタンパク質の観察と考えられる。

新生マウスの腸管は成人マウスのものと比べて crypt の長さが短く、絨毛の基部が扁平に近い状態となっているところが多い。この基部扁平部位に Bcl11b 発現が強く見られた。その扁平部位の染まりは、成人マウスでみられる crypt 内の染まりと同等のものと考えられる。Bcl11b-null マウスの小腸染色も行った。Bcl11b-null の腸管では crypt 内の染まりは見られず、crypt 内細胞の核の染まりが Bcl11b タンパクの発現であることが確認された。

D. 考察

D-1 放射線発がん感受性を担う遺伝子の働きを明らかにするため、放射線照射後の胸腺を解析してきた。注目点は大型リンパ球の出現であり、クローナル増殖を示すこの細胞がリン

パ腫前駆体細胞であることが分かった。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ことがわかった。しかし、感受性と出現の効率との関連性については不明確である。ただ、予備的な実験では感受性を示すコンジェニックマウス (Mtf-1 遺伝子座領域の) は抵抗性マウスに比べ、出現頻度が高いという結果が得られている。従って、この関連性については次年度に結果が得られる計画である。

Mtf-1 遺伝子が感受性遺伝子候補と同定したが、その後 Mtf-1 KO マウスを用いた発がん実験でこの結論が確認できなかった。そこで、さらにコンジェニック領域を絞り込んだマウスを作製し、再び発がん実験を行っている。マウスのデータベースが充実し、SNIP1 も候補遺伝子の一つと考えられるようになった。両遺伝子を視野に入れた検討が今後の課題である。これらの考察と関連する結果として、ヒト MTF-1 遺伝子座領域の発がんリスクとの関連解析結果がある (長崎大学との共同研究)。ヒト MTF-1 座は強い甲状腺発がん感受性との関連性を示さなかった。

リンパ腫発症の母体細胞として、CD4-CD8 ダブルネガティブ細胞 (DN3b、DN4、ISP を含む) を想定してきた。これらの細胞群は細胞が大きく、増殖周期・S/G2/M 期にあるからという理由である。しかし、多くの胸腺リンパ腫は増殖をしないダブルポジティブ DP 細胞の性質をもつ。最近、DP 細胞は CD4SP 細胞と比べ、細胞周期を活性化させるタンパク質群 (cyclinA や CDK2 など) および Ki67 の増加、リン酸化 p53 が増加し、non-G0 状態にあるとの報告がある。照射後にみられる大型 DP 様リンパ球の分子表現型の解析が今後の課題である。これには、活性化された大型リンパ球を支えると想定される Myc の活性化や PI3K-Akt-mTOR 経路の活性化も含まれる。

D-2 APC 遺伝子変異をもつ Min マウスはヒト大