

200804006A

厚生労働科学研究費補助金

社会保障国際協力推進研究事業(国際医学協力研究事業)

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究
平成 20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 若林 敬二

平成 21 (2009) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の 解明に関する研究 若林敬二	----- 1
-----------------------------------------	---------

II. 分担研究報告

1. 環境中の化学発がん要因の検索と生体影響の解明 渡辺徹志	----- 10
2. 大気中粒子状物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討 島正之	----- 11
3. ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響 高野裕久	----- 13
4. 新規変異原・がん原物質の検索 若林敬二	----- 14
5. がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明 中釜斉	----- 17
6. アレイCGH法を用いたがん細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析 鈴木孝昌	----- 20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
---------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金
(社会保障国際協力推進研究事業(国際医学協力研究事業))
総括研究報告書

環境中の発がん及び発がん抑制要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

研究代表者 若林 敬二 国立がんセンター研究所所長

研究要旨

本研究は、環境中の変異原や発がん及び疾病要因物質を明らかにすると共にヒトのがんやその他疾病発生要因及び感受性要因を総合的に把握し、最終的にはがんを含む疾病の第一次予防推進の為の基礎的研究成果をあげることを目的とする。ディーゼル排出粒子、焼却炉煤じん中から強変異原物質 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(DNBeP)が検出され、それらが3,6-DNBePの発生源であることが示唆された。3,6-DNBePが微小大気粉じんから検出され、3,6-DNPが肺胞に達している可能性のあることがわかった。女子大学生の肺機能検査を毎日朝と夜に繰り返し実施したところ、10月の朝の1秒量は大気中粒子状物質濃度をはじめとする汚染物質濃度との間に有意な負の相関が認められ、アレルギー要因を有する者ではその傾向が顕著であった。しかし、検査の時期や実施する時間帯により、必ずしも一貫性のある結果は得られなかった。Vehicle、カーボンナノ粒子(14nm, 56nm)、アレルギー(卵白アルブミン)、ナノ粒子とアレルギーの併用群を設定し、マウスに経気道曝露した。肺組織中の細胞の抗原提示に関わる分子の発現と抗原提示細胞数は、vehicle群に比較して、14nmナノ粒子の単独およびアレルギーとの併用曝露群で有意に増加した。ナノ粒子の影響は、より小さい粒径で著明に観察され、アレルギーの併用により亢進した。

胆汁酸抱合体のニトロノ化合物である、N-ニトロソグリココール酸(NO-GCA)及びN-ニトロソタウロコール酸(NO-TCA)由来のDNA付加体である θ -CmDG及び3-ESA-dCのin vivoにおける生成について、ラット十二指腸液逆流モデルを用いて検討した。その結果、これら付加体はいずれも逆流モデルの腸胃中に検出され、そのレベルは偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高いことがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、 θ -CmDG及び3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下することがわかった。このことから、 θ -CmDG及び3-ESA-dCの生成には、十二指腸液逆流モデルラットの胃内でニトロノ化された胆汁酸抱合体の生成が関与している事が示唆された。

加熱した魚・肉食品中に含まれる変異原性・がん原性物質であるヘテロサイクリックアミン類(HCAs)の中で最も含量が多い2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)により誘発されるラット大腸がんモデルを用いた解析により、PhIP誘発大腸がんを高感受性を示すF344系統では、抵抗性ACI系統に比較し、高TG血症、高グルコース血症、及び高内臓脂肪を示すことが分かった。大腸上皮における網羅的な遺伝子発現プロファイルを用いたGSEA解析の結果、大腸上皮において、PI3K/mTORのシグナル活性化に重要な役割を果たすAKTが高感受性のF344系統で有意に活性化していることが分かった。さらに、感受性系統におけるPI3K/mTOR経路の活性化は、ACF誘発数を量的形質とした遺伝的連鎖解析(QTL解析)により同定した感受性遺伝子Xとは独立して、発がん感受性の賦与に寄与することが示唆された。

がん細胞における遺伝子増幅のメカニズムを解析する目的で、c-myc遺伝子増幅を持つ広範なヒトがん細胞株に関して、アレイCGH法による増幅部位の解析を行った。カスタムCGHアレイを用いたコピー数解析により、8番染色体上のc-myc遺伝子領域の増幅の様式を広範な細胞株に関して詳細に検討することができた。コピー数変化は染色体上の比較的広い範囲におよび、複数の増幅単位が分断された複雑な様式をとるものも多く見られた。カスタムオリゴを用いたCGHアレイは、染色体のコピー数変化の詳細な解析に有効であることがわかるとともに、得られたゲノムの位置情報を元に、さらにシークエンスレベルでの増幅単位の解析へとつなげることができることがわかった。今後、他の癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠失領域の解析から、染色体変化を介した発がんのメカニズム解析へとつなげたい。

分担研究者

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

A. 研究目的

がんは遺伝子の病気であり、その発生には多くの遺伝子変化が関与している。がん発生の原因と

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

B. 研究方法

(1) 環境中の化学発がん要因の検索と生体影響の解明

ディーゼル排出粒子 2 試料、焼却炉煤じん 5 試料及び大気粉じんから有機物を超音波抽出法により抽出した。抽出物を順相カラム及び各種逆相カラムを用い、予備精製した後、3,6-DNBeP を還元カラムによりオンライン還元しジアミノ体として蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフにより定量分析した。

本研究では、変異原物質や発がん性が予想される化合物を扱うことから、それらによる環境汚染を起こさないよう、取扱いに十分注意して実験を行った。

(2) 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

女子大学生 12 名 (18~22 歳) に電子式ピークフローメータを 1 台ずつ渡し、2008 年 7 月と 10 月に各 2 週間ずつ連続して毎日朝と夜の 1 日 2 回、最大呼気流量 (PEFR) と 1 秒量 (FEV_1) の自己測定を行ってもらった。

解析は一般化推定方程式 (GEE) を用いて、対象者の年齢、身長、アレルギー素因の有無、気温、湿度の影響を調整し、居住地の近傍の測定局における大気中浮遊粒子状物質 (SPM)、二酸化窒素 (NO_2)、光化学オキシダント (Ox) 濃度との関連性を評価した。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

ICR マウス (♂, 5 週齢) を、vehicle または 14nm カーボンブラック (CB)、56nm カーボンブラック (CB)、卵白アルブミン (OVA: アレルゲン)、OVA+14nm CB、OVA+56nm CB の 6 処置群に分け、CB は毎週、OVA は隔週で 6 週間気管内投与した。最終投与 24 時間後の肺における抗原提示細胞数とそれに関わる細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。すべての動物実験は、米国 NIH のガイドラインを遵守し、当該施設の担当委員会の承認の基に遂行した。また、動物数は最小限にとどめた。

(4) 新規変異原・がん原物質の検索

雄性 Wistar ラットに十二指腸液逆流手術および偽手術を施した。術後 1 ヶ月の間観察し、生き残ったラットを 2 群に分け (一群各 6 匹)、グループ 1 には通常食を、グループ 2 には 0.5% チオプロリンを含む餌を摂取させた。実験開始から 4 週および 8 週目にラットを屠殺・解剖し、それぞれのモデルの腺胃より DNA を抽出した。DNA を核酸分解酵素で消化した後、HPLC で分離し、 3H -CMDG および 3-ESA-dC を含む画分を分取し、 ^{32}P -ポストラベル法で解析し、付加体の生成について調べた。

(5) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

PhIP 誘発大腸発がんに対する高感受性系統である F344 ラットと抵抗性系統の ACI ラットにおける血中 TG (中性脂肪) 及び内臓脂肪量を経時的に比較し、大腸上皮、肝臓、及び内臓脂肪における遺伝子発現プロファイルの変化との関連性を調べた。さらに、遺伝子発現プロファイルの Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行い、発がん促進的に作用するシグナル経路を解析した。

(6) アレイ CGH 法を用いたがん細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

c-myc 遺伝子の増幅を詳細に検討するため、8q24 領域を中心とした 8 番染色体に特異的にオリゴヌクレオチドプローブを設計した 44kx4 フォーマットのカスタム CGH アレイを Agilent 社にて作製した。c-myc の増幅を持つことが知られているがん細胞株 16 種類を JCRB 細胞バンクより入手し、抽出したゲノム DNA を上記 CGH アレイにて標準 DNA と競合的にハイブリダイズさせ、増幅領域を検出した。

C. 研究結果

(1) 環境中の化学発がん要因の検索と生体影響の解明

分析したすべての試料から 3,6-DNBEP が夾雑物質の影響なく検出された。ディーゼル排出粒子では粒子 1 g 当たり 29 及び 90 ng であった。焼却炉煤じんでは堆積煤じん 4 種類において、煤じん 1 g 当たり 3~5,898 pg であり、飛煤では煤じん 1 g 当たり 51 pg であった。また 3,6-DNBEP は粒径別に <1.1、1.1~2.0、2.0~3.3、3.3~7、>7 mm の 5 種類に分級した大気粉じんすべてから検出され、その量は 188~530 fg/m³ air であり、5 種類の大気粉じんでの合計は 1,433 fg/m³ air であった。3,6-DNBEP は粒径 2.0~3.3 mm の粒子に最も多く検出され、次いで 3.3~7 mm 及び >7 mm の順であった。微小大気粉じん (<2.0 mm) では 386 fg/m³ air であった。

(2) 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

対象者のうち、血清総 IgE 値が 170 IU/ml 以上でアレルギー素因を有すると考えられる者は 7 名、170 IU/ml 未満のものは 5 名であった。7 月には朝のべ 170 回、夜のべ 155 回、10 月にはそれぞれのべ 216 回、195 回の測定結果が得られた。10 月の朝の FEV1 値は、大気中 SPM、NO₂、O₃ の 24 時間平均濃度（前日午前 6 時~当日午前 6 時）が増加すると、有意に低下するという負の関連性が認められた。しかし、夜の FEV1 値はいずれの大気汚染物質濃度とも有意な関連はなく、PEF は朝、夜ともに大気汚染との関連性はみられなかった。一方、7 月には大気中 SPM 濃度が増加すると、夜の PEF、FEV1 値の有意な増加が観察された。

アレルギー素因の有無別にみたところ、アレルギー素因を有する者では、10 月の朝の FEV1 値は、大気中 SPM、NO₂、O₃ との間に有意な負の関連が認められたが、アレルギー素因のない者ではいずれの汚染物質との関連も有意ではなかった。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

14nm CB の単独および OVA との併用曝露は、vehicle 曝露と比較して、肺組織中の総細胞数を有意に増加させた。56nm CB は OVA との併用曝露においてのみ、同様の結果を誘導した。また、14nm CB 曝露は、vehicle 曝露と比較して、肺における抗原提示に関わる MHC class II と補助刺激分子 (CD80、CD86) の発現および抗原提示細胞（樹状細胞、マクロファージ、B 細胞）の数を有意に増加させた。これらの増加は OVA との併用曝露によりさらに増強された。一方、56nm CB 曝露では、これらの影響は観察されなかった。

(4) 新規変異原・がん原物質の検索

ニトロソ胆汁酸抱合体由来の DNA 付加体の解析は、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃 DNA を抽出し、³²P-ポストラベル法と HPLC を組み合わせた方法で行った。その結果、NO-GCA 由来の付加体として *O*⁶-CmG が、また NO-TCA 由来の付加体として 3-ESA-dC が観測され、その付加体レベルはそれぞれ 10⁸ ヌクレオチドあたり 56.3 及び 8.9 個であった。一方、コントロール群におけるこれら付加体のレベルは 5.9 及び 2.0 個であった。また、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した十二指腸液逆流モデル群を用い、その腺胃における DNA 付加体を測定した結果、*O*⁶-CmG 及び 3-ESA-dC のレベルがコントロール群に近い値まで低下する事がわかった。

(5) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

(1) F344 系統は ACI 系統に比較し、PhIP 投与開始後 6 週目から既に ACF 誘発の高感受性を示すが、血中 TG 及び内臓脂肪量においても F344 系統が有意に高値を示すことが分かった。

(2) ACF 誘発数を量的形質とした遺伝連鎖解析により同定したラット染色体 16 番上の大腸発がん感受性遺伝子 X は、高 TG 血症、或いは内臓脂肪蓄積には寄与しないことが分かった。

(3) 大腸上皮における網羅的な遺伝子発現プロファイルを用いた GSEA 解析の結果、高感受性の F344 系統において PI3K シグナル経路が活性化している可能性が示唆された。脂肪性サイトカイン遺伝子群の発現量は系統間で有意な差を認めなかった。

(4) PI3K シグナル経路は系統間で有意な差を認めなかった。脂肪性サイトカイン遺伝子群の発現量は系統間で有意な差を認めなかった。

(4) PI3K シグナル経路は系統間で有意な差を認めなかった。脂肪性サイトカイン遺伝子群の発現量は系統間で有意な差を認めなかった。

(6) アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

全ての細胞において、c-myc 遺伝子を含む 8 番染色体上の領域のコピー数の増加が確認された。増幅される領域および程度に関しては様々なパターンがあり、主に連続した単純な増幅様式 (WiDr, KP-4, Colo320DM, MEG-01, SKM-1) および分断された複数の領域からなる複雑な増幅様式 (LU-65, Hu0-3N1, MCF-7, MG-63, P39/TSU) に大別された。増幅の度合いに関しても、特に後者で一定ではなく、連続的に変化する領域も存在した。増幅領域の範囲に関しては、数 Mb から数十 Mb にわたる広範な領域にわたるものもあり、比較的長い領域に渡る場合が多かった。また、c-myc 領域以外の 8 番染色体上に別のコピー数変化が見られる細胞もあった。これらの結果から、c-myc 遺伝子の増幅には、異なるメカニズムが存在し、単純な遺伝子の増幅ではなく、染色体の広範な領域にわたる複雑な変化が起きていることがわかった。

D. 考察

(1) 環境中の化学発がん要因の検索と生体影響の解明

3,6-DNBeP の分析を行ったディーゼル排出粒子は工業用フォークリフト及び一般自動車に用いられるディーゼルエンジンから得た排出粒子であり、両方のエンジンからの排出粒子中から 3,6-DNBeP が検出された。また、焼却炉煤じんでは、3,6-DNBeP は堆積煤じんのみならず大気中に直接される飛煤からも検出された。以上の結果から、ディーゼルエンジン及び焼却炉は 3,6-DNBeP の発生源であり、それらでの燃焼により生成した 3,6-DNBeP が大気中に放出されていることが示唆された。大気中の粉じんの内、粒径 1.1~2.0 μm 以下の微小粒子が肺胞まで到達することが知られている。3,6-DNBeP が 2.0 μm 以下の微小粒子からも検出されたことから、3,6-DNBeP が肺胞に達する可能性があると考えられた。今後、さらに 3,6-DNBeP の健康影響について検討する必要がある。

(2) 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

自動車排出ガス等による大気中粒子状物質が健康に与える影響が懸念されている。これまでに行われた多くの疫学研究では、主として大気汚染物質が呼吸器疾患及び症状に与える影響が検討されてきた。特に、大気中の粒子状物質濃度の変動が呼吸器系に及ぼす短期的影響については、気管支喘息等の呼吸器疾患を有する患者については数多く報告されているが、健康者についての知見は乏しい。

本研究では、東京都内で生活している女子大学生を対象に、7 月と 10 月に肺機能の測定を繰り返し実施してもらい、その間の大気汚染物質濃度の変動との関連性を検討した。10 月には、大気中 SPM をはじめとする汚染物質濃度の増加により、朝の FEV₁ 値の有意な低下が認められ、特にアレルギー素因を有する者ではその傾向が顕著であった。しかし、7 月には大気中 SPM 濃度が増加すると、夜の PEF、FEV₁ 値の有意な増加がみられるなど、大気汚染物質の呼吸器系への短期的影響は時期や時間帯により、一貫性が認められなかった。

(3) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

これまでに、我々は、CB がアレルギー性気道炎症の増悪や抗体産生の増加を誘導することを報告してきた (Inoue K. et al, 2005 *Respir Res* 6: 106)。本研究では、肺の抗原提示細胞の動態や機能について検討した。その結果、14nm CB、特に 14nm CB とアレルギーとの併用曝露は、肺内の MHC class II と補助刺激分子の発現および抗原提示細胞数を増加させることが明らかとなった。CB は粒径が小さいほど強い酸化能を持つことが指摘されていることなどから、CB 曝露は酸化ストレス等を介して、抗原提示細胞の上記分子を増加させた可能性も示唆される。また、その増加により、T 細胞への抗原提示機能が亢進され、それに続くアレルギー反応を促進することも推察される。

(4) 新規変異原・がん原物質の検索

ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃 DNA から、ニトロソ胆汁酸抱合体由来の DNA 付加体である、*O*⁶-CMdG 及び 3-ESA-dC が検出された。これら付加体のレベルは、偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21 及び 4.5 倍高いことがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、*O*⁶-CMdG 及び 3-ESA-dC のレベルが偽手術群に近い値まで低下したことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロソ化が起こり、付加体の生成を増加させることが推測された。このことから、これらの DNA 付加体の生成にニトロソ胆汁酸抱合体の生成が関与している事が示唆された。

(5) 大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

PhIP誘発のラット大腸がんモデルにおいて、高感受性を示すF344系統では高TG血症、高血糖、及び内臓脂肪量の有意な蓄積を伴うことが分かった。これらの生活習慣病関連の要因がラットモデルにおいても、大腸発がん促進的に作用していることが示唆された。発がん促進の分子基盤としては、mTOR/PI3Kシグナル経路の活性化が示唆される。さらに、ACF誘発数を指標としたQTL解析で同定された感受性遺伝子X (Set) との関連では、遺伝子Xを抵抗性系統ACIに導入したコンジュニク系統は高TGや内臓脂肪量の増加を示さなかったことから、PhIP誘発大腸発がんには両要因が独立して作用していることが示された。

(6) アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

昨年度のHL60細胞での詳細な検討結果とあわせ、癌遺伝子の増幅には、複雑な染色体上の変化を伴う場合が多いことが明らかとなったが、そこには、おそらく3次的に近接したホモロジーを持った遠隔領域が空間的に近接していたために起きた、遺伝子の乗り越え複製が引き金となる場合があると考えられる。今後、切断点のシーケンス解析などから、その生成のメカニズムに検討を加えたい。また、染色体の比較的末端部位で、コピー数が段階的に変わる場合があることから、染色体のBreakage-fusionサイクルが関与している可能性も考えられる。また、単純型の増幅に関しては、染色体転座を伴う、異数性の関与がそのメカニズムの一つとして考えられる。CGHアレイでの異常の検出はそれが細胞集団の中で多勢となる必要があり、いずれの場合も最初の一つの細胞に起きた安定な変化が、癌遺伝子の増加に伴う増殖性の獲得により細胞集団へと拡大したと考えられる。

E. 結論

3,6-DNBEPをディーゼル排出粒子及び焼却炉煤じん中からそれぞれ29~90 ng/g of diesel particle及び3~5,898 pg/g of incinerator dustの範囲で検出した。3,6-DNBEPがディーゼルエンジン及び焼却炉での燃焼により生成し、環境中に排出されることが示唆された。3,6-DNBEPのディーゼル排出粒子及び焼却炉煤じん中における存在に関する報告は本研究がはじめてである。また、3,6-DNBEPは微小大気粉じん (<2.0 μm) 中に存在することが明らかとなった。呼吸によりヒトは3,6-DNBEPを吸引し、3,6-DNBEPが肺胞に達する可能性のあることが示唆された。

東京都内で生活している女子大学生を対象に、7月と10月に肺機能の測定をそれぞれ2週間ずつ繰り返し実施してもらい、その間の大気汚染物質濃度の変動との関連性を検討した。10月の朝のFEV₁値はSPMをはじめとする大気汚染物質濃度との間に有意な負の相関が認められ、アレルギー素因を有する者ではその傾向が顕著であった。しかし、夜のFEV₁値はいずれの大気汚染物質濃度とも有意な関連はなく、PEF値は朝、夜ともに大気汚染との関連性はみられなかった。一方、7月には大気中SPM濃度が増加すると、夜のPEF、FEV₁値の有意な増加が観察されるなど、検査時期や時間帯により一致した関連性は得られなかった。大気汚染物質以外の因子についてさらに検討する必要があると考えられた。

肺組織中の細胞の抗原提示に関わる分子の発現と抗原提示細胞数は、vehicle群に比較して、14nmナノ粒子の単独およびアレルギーとの併用曝露群で有意に増加した。ナノ粒子曝露による肺の抗原提示細胞数の増加および活性化は、抗原特異的な抗体産生を含む免疫応答および気道炎症の亢進に寄与している可能性が示唆された。

胆汁酸の逆流は胃切除手術後の残胃癌の発生等に関与していることが示唆されている。本研究では、胆汁酸抱合体のニトロソ化合物である、NO-GCA及びNO-TCA由来のDNA付加体である β -CMdG及び3-ESA-dCのin vivoにおける生成について、ラット十二指腸液逆流モデルを用いて検討した。その結果、これら付加体は偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高いレベルで逆流モデルの腺胃中に検出されることがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、 β -CMdG及び3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下することがわかった。このことから、 β -CMdG及び3-ESA-dCの生成は、十二指腸液逆流モデルラットの胃内でニトロソ化された胆汁酸抱合体の生成に関与している事が示唆された。

高TG血症および高内臓脂肪の蓄積を示す高感受性系統F344では、抵抗性のACI系統に比較してPI3K/mTORシグナル経路が有意に活性化している可能性が示唆された。大腸発がん感受性の異なる2系統のラットを用いた遺伝的連鎖解析により同定した感受性候補遺伝子X (ラット染色体16番)とは独立した遺伝要因として、発がん感受性に寄与する可能性が考えられる。今後、AKTの活性化に関わる分子群およびPI3K/mTORの下流に存在する種々の分子群とACF誘発性との関連性について、遺伝学的解析及び分子生物学的な方法により明らかにする。

カスタム CGH アレイを用いたコピー数解析により、8 番染色体上の *c-myc* 遺伝子領域の増幅の様式を広範な細胞株に関して詳細に検討することができた。コピー数変化は染色体上の比較的広い範囲におよび、複数の増幅単位が分断された複雑な様式をとるものも多く見られた。カスタムオリゴを用いた CGH アレイは、染色体のコピー数変化の詳細な解析に有効であることがわかったとともに、得られたゲノムの位置情報を元に、さらにシーケンスレベルでの増幅単位の解析へとつなげることができることがわかった。今後、他の癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠失領域の解析から、染色体変化を介した発がんのメカニズム解析へとつなげたい。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究論文

(1) 発表論文

1. Watanabe, T., Takahashi, K., Konishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. *Mutation Research*, 649: 201-212, 2008.
2. Ma, L., Shima, M., Yoda, Y., Yamamoto, H., Nakai, S., Tamura, K., Nitta, H., Watanabe, H., Nishimuta, T.: Effects of airborne particulate matter on respiratory morbidity in asthmatic children. *J Epidemiol*, 18: 97-110, 2008.
3. Hirano, Y., Shima, M., Hata, A., Kuriyama, T.: Age-related changes in allergic symptoms and serum TARC concentration in school children. *Chiba Med J*, 84: 187-195, 2008.
4. Yamamoto, R., Nozaki, J., Ma, L., Shima, M., Hatayama, F.: Determination of gaseous organic compounds in Hyogo Prefecture, Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39: 1155-1163, 2008.
5. 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*, 21: 35-42, 2008.
6. Inoue, K., Takano, H., Ohnuki, M., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Shimada, A., Mizushima, K., Yoshikawa, T.: Size effects of nanomaterials on lung inflammation and coagulatory disturbance. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 21: 197-206, 2008.
7. Matsumoto, Y., Nakano, T., Yamamoto, M., Matsushima-Hibiya, Y., Odagiri, K., Yata, O., Koyama, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Distribution of cytotoxic and DNA ADP-ribosylating activity in crude extracts from butterflies among the family Pieridae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2516-2520, 2008. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008 Apr 8; 105: 5649.
8. Mutoh, M., Niho, N., Komiya, M., Takahashi, M., Ohtsubo, R., Nakatogawa, K., Ueda, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice. *Carcinogenesis*, 29: 824-829, 2008.
9. Kitahashi, T., Takahashi, M., Yamada, Y., Oghiso, Y., Yokohira, M., Imaida, K., Tsutsumi, M., Takasuka, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Occurrence of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in X-ray-induced rat lung tumors. *Cancer Sci*, 99: 241-245, 2008.
10. Ueda, N., Maehara, Y., Tajima, O., Tabata, S., Wakabayashi, K., Kono, S.: Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-2 and colorectal adenoma risk: The self defense forces health study. *Cancer Sci*, 99: 576-581, 2008.
11. Oda, Y., Watanabe, T., Terao, Y., Nukaya, H., Wakabayashi, K.: Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* umu strains. *Mutat Res*, 654: 52-57, 2008.
12. Hirata, A., Tsukamoto, T., Sakai, H., Takasu, S., Ban, H., Imai, T., Totsuka, Y., Nishigaki, R., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T., Tatenatsu, M.: Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - assessment with a liver initiation model. *Food Chem Toxicol*, 46: 2003-2009, 2008.
13. Takahashi, M., Kitahashi, T., Ishigamori, R., Mutoh, M., Komiya, M., Sato, H., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced hamster pancreatic carcinogenesis and

- prevention of cancer development by ONO-1714, an iNOS inhibitor. *Carcinogenesis*, 29: 1608-1613, 2008.
14. Terasaki, M., Totsuka, Y., Nishimura, K., Mukaisho, K.I., Chen, K.H., Hattori, T., Takamura-Enya, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Detection of endogenous DNA adducts, O(6)-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. *Cancer Sci*, 99: 1741-1746, 2008.
 15. Hori, Y., Takasuka, N., Mutoh, M., Kitahashi, T., Kojima, S., Imaida, K., Suzuki, M., Kohara, K., Yamamoto, S., Moriyama, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Periodic analysis of urethane-induced pulmonary tumors in living A/J mice by respiration-gated X-ray microcomputed tomography. *Cancer Sci*, 99: 1774-1777, 2008.
 16. Ohe, T., Watanabe, T., Nonouchi, Y., Hasei, T., Agou, Y., Tani, M., Wakabayashi, K.: Identification of a new mutagen, 4,4'-diamino-3,3'-dichloro-5-nitrobiphenyl, in river water flowing through an industrial area in Wakayama, Japan. *Mutat Res*, 655: 28-35, 2008.
 17. Deguchi, Y., Wu, N.X., Toyozumi, T., Masuda, S., Nagaoka, H., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Kinoshita, N.: Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. *Environ Toxicol*, 23: 720-727, 2008.
 18. Amanuma, K., Tone, S., Nagaya, M., Matsumoto, M., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Aoki, Y.: Mutagenicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rps1 transgenic zebrafish. *Mutat. Res*, 656: 36-43, 2008.
 19. Takasuka, N., Takahashi, M., Hori, Y., Kitahashi, T., Iigo, M., Imai, T., Yoshimi, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett*, 275: 150-157, 2009.
 20. Kuriki, K., Mutoh, M., Tajima, K., Wakabayashi, K., Tatematsu, M.: Relationships between intestinal polyp formation and fatty acid levels in plasma, erythrocytes, and intestinal polyps in Min mice. *Cancer Sci*, 2009, (in press)
 21. Paramasivam, M., Membrino, A., Cogoi, S., Fukuda, H., Nakagama, H., Xodo, L.: Protein hnRNP A1 and its derivative Upl disrupt quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acid Res*, (in press)
 22. Nakajima, A., Tomimoto, A., Fujita, K., Sugiyama, M., Takahashi, H., Ikeda, I., Hosono, K., Endo, H., Yoneda, K., Iida, H., Inamori, M., Kubota, K., Saito, S., Nakajima, N., Wada, K., Nagashima, Y., Nakagama, H.: Inhibition of peroxisome proliferators-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci*, 99: 1892-1900, 2008.
 23. Tomimoto, A., Endo, H., Sugiyama, M., Fujisawa, T., Hosono, K., Takahashi, H., Nakajima, N., Nagashima, Y., Wada, K., Nakagama, H., Nakajima, A.: Metformin suppresses intestinal polyp growth in Apc(Min/+) mice. *Cancer Sci*, 99: 2136-2141, 2008.
 24. Fujisawa, T., Endo, H., Tomimoto, A., Sugiyama, M., Takahashi, H., Saito, S., Inamori, M., Nakajima, N., Watanabe, M., Kubota, N., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Wada, K., Nakagama, H., Nakajima, A.: Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut*, 57: 1531-1538, 2008.
 25. Wang, R., Dashwood, W.M., Lohr, C.V., Fischer, K.A., Nakagama, H., Williams, D.E., Dashwood, R.H.: b-Catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]-pyridine (PhIP) and a high fat diet. *Cancer Sci*, 99: 1754-1759, 2008.
 26. Fukuda, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T., 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.
 27. Fukuda, T., Kondo, Y., 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.
 28. Wang, R., Dashwood, W.M., Lohr, C.V., Fischer, K.A., Pereira, C.B., Louderback,

- M., Nakagama, H., Bailey, G.S., Williams, D.E., Dashwood, R.H.: Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and b-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29: 834-839, 2008.
29. Watanabe, T., Tanaka, G., Hamada, S., Namiki, C., Suzuki, T., Nakajima, M., Furihata, C.: Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.* 673: 9-20, 2009.
30. Tanabe, S., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Nagao, T., Yamaguchi, T.: Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem*, 144: 399-408, 2008.
- (2) 学会発表
1. 渡辺徹志: 変異原性物質による大気及び土壌の汚染と肺がんの関連性. 日本環境変異原学会第 37 回大会、神縄宜野湾市 (2008 年 12 月)
 2. 長谷井友寿、渡辺徹志、平山晃久: 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene に対する暴露評価法の開発並びにその発生源の解明. 日本薬学会第 128 年会、横浜市 (2008 年 3 月)
 3. 島 正之、余田佳子、山本絃乃、中井里史、田村憲治、新田裕史: 粒子状物質濃度と喘息児のピークフロー値との関連: 時期による影響の違い. 第 78 回日本衛生学会総会、熊本市 (2008 年 3 月)
 4. 島 正之、余田佳子、俵 健二: 大気中粒子状物質が小児の血清 C 反応性蛋白濃度に及ぼす短期的影響. 第 49 回大気環境学会年会、金沢市 (2008 年 9 月), (大気環境学会年会講演要旨集, 315, 2008.)
 5. 井上健一郎、柳澤利枝、小池英子、高野裕久: ナノ粒子が呼吸器・血管系の脆弱状態へ及ぼす複合影響. 第 15 回日本免疫毒性学会、東京 (2008 年 9 月)
 6. 高野裕久、井上健一郎、小池英子、柳澤利枝: 環境化学物質によるアレルギー疾患の憎悪. 第 17 回日本臨床環境医学会学術集会、旭川 (2008 年 7 月)
 7. 高野裕久: 環境化学物質によるアレルギーの修飾. 化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム、東京 (2008 年 12 月)
 8. 西村興一、戸塚ゆ加里、寺崎 将、向所賢一、服部隆則、杉村 隆、若林敏二: ラット十二指腸液逆流モデルにおける N-ニトロ胆汁酸抱合体由来の DNA 付加体の解析. 第 67 回 日本癌学会 (2008 年)
 9. Ogata-Kawata, H., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Nakagama, H.: MicroRNA profiling in human fetal normal colonic mucosa and colon cancer cell lines. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 31 回日本生化学会大会合同大会、神戸、(2008 年 12 月)
 10. Ochiai, M., Kondo, Y., Igarashi, M., Sugimura, T., Nakagama, H.: Identification of a candidate susceptibility gene in PhIP-induced rat colon carcinogenesis. *Rat & Genomics & Models*, UK, (2008 年 12 月)
 11. Fukuda, H., Takamura, T., Nakagama, H.: PhIP-dG 付加体部位での損傷乗り越え DNA 修復の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
 12. Izumiya, M., Ochiai, M., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Nakagama, H.: ヒト大腸がんにおける microRNA-34a 発現異常の検討. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
 13. Kondo, Y., Ochiai, M., Igarashi, M., Sugimura, T., Nakagama, H.: PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用いた感受性遺伝子の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
 14. Kanemoto, K., Fukuta, K., Fukuda, H., Ochiai, M., Kohri, K., Sugimura, T., Nakagama, H.: BHEN 誘発浸潤膀胱がんモデルマウスにおけるゲノム DNA コピー数の変化. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
 15. Ochiai, M., Tsuchiya, N., Igarashi, M., Masutani, M., Sugimura, T., Nakagama, H.: 細胞傷害性ストレスに関連した microRNA の発現プロファイルの変化と大腸発がんとの関連性に関する解析. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
 16. 金本一洋、岡本康司、福田博政、落合雅子、杉村 隆、中益 亘: BHEN 誘発マウス浸潤性膀胱がんにおけるゲノム DNA コピー数の変化. 第 23 回発癌病理学会、三重・鳥羽市、(2008 年 8 月)
 17. Nakagama, H., Izumiya, M., Tsuchiya, N.: Positive feedback loop for activation of TP53 by a potential tumor suppressor microRNA, MIR-34a. *Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms & Models of Cancer meeting*, Long Island, NY, (2008 年 8 月)
 18. Tsuchiya, N., Izumiya, M., Tazawa, H., Sugimura, T., Nakagama, H.: Positive feedback loop for the activation of p53 by the potential tumor suppressor microRNA-34a. *AACR Annual Meeting*, San Diego, (2008 年 4 月)
 19. Suzuki, T., Suresh, T., Oshizawa, T., Ramesh, K., Suzuki, K.: Proteomics

- approach to find new biomarkers for genotoxicity in mouse urine. 欧州環境変異原学会 2008 (2008年9月)
20. Suzuki, T., Kogi, M., Honma, M., Tanabe, S., Yamaguchi, T.: SNP and CGH array analysis on amplification profile of the c-myc gene. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008年10月)
 21. 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 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする (その2). BMB2008 (2008年12月)
 22. 田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英: ヒト間葉系幹細胞における培養分化マーカー同定に関する遺伝子発現プロファイリング. BMB2008 (2008年12月)
 23. 多田隈英未、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌、成見香瑞範、浜田修一、平山満朝、真田尚和、小枝暁子、中嶋圓、大信田系裕、佐久間智宏、降旗千恵: 遺伝子傷害性肝発がん物質および非遺伝子傷害性肝発がん物質投与マウス肝臓における遺伝子発現の比較解析. BMB2008 (2008年12月)
 24. 櫻井幹也、多田隈英未、花原泉、渡辺貴志、鈴木孝昌、降旗千恵: マウス肝臓における遺伝子傷害性肝発がん物質 Chrysene 投与後短時間での遺伝子発現解析. BMB2008 (2008年12月)
 25. 新井祐子、多田隈英未、渡辺貴志、浜田修一、鈴木孝昌、中嶋圓、降旗千恵: ジエチルニトロソアミン投与マウス肝臓における、遺伝子発現の経時変化および用量依存性変化の解析. BMB2008 (2008年12月)
 26. スレッシュ ティルパッティ、ラメッシュドス、押澤正、鈴木和博、鈴木孝昌: プロテオミクス手法を用いた遺伝子傷害性の新しいバイオマーカー探索. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
 27. 鈴木孝昌、降旗千恵: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
 28. 鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵: トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子障害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
 29. 降旗千恵、渡辺貴志、夏目匡克、中嶋圓、濱田修一、多田隈英未、櫻井幹也、花原泉、小枝暁子、佐久間智宏、大信田系裕、前田晃央、成見香瑞範、真田尚和、平山満朝、大山ワカ子、岡田恵美子、本田大士、須藤鎮世、鈴木孝昌: トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 (2008年): 遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝がん原物質についての精選した 27 遺伝子に関する qPCR 法による遺伝子発現解析. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
 30. 浅野哲秀、西川貴史、笠松俊夫、青嶋巧、岡宏明、小島肇、伊東悟、鈴木孝昌、原巧、D. Gibson, 林 真: 皮膚細胞を用いる小核試験一開発と検証一. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
 31. 鈴木孝昌、田邊思帆里、小木美恵子、押澤正、佐藤陽治、山口照英、鈴木和博: ヒト間葉系幹細胞継代培養時の染色体安定性の解析. 第8回日本再生医療学会総会
- H. 特許取得、実用新案登録
なし

分担研究報告書

環境中の化学発がん要因の検索と生体影響の解明

分担研究者 渡辺徹志 京都薬科大学准教授

研究要旨 ディーゼル排出粒子、焼却炉煤じん中から強変異原物質 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(DNBeP)が検出され、それらが3,6-DNBePの発生源であることが示唆された。3,6-DNBePが微小大気粉じんから検出され3,6-DNPが肺胞に達している可能性のあることがわかった。

A. 研究目的

最近、土壌中から分離・同定された強変異原物質 3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(DNBeP)の発生源及びヒト曝露経路等を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ディーゼル排出粒子、焼却炉煤じん及び大気粉じん中から有機物を抽出し、クリーンアップ後、3,6-DNBePをオンライン還元シアンノ体として定量分析した。
(倫理面への配慮)

取り扱う物質による環境汚染を起さぬよう取扱いに十分注意して実験を行った。

C. 研究結果

分析したすべての試料から3,6-DNBePが検出された。ディーゼル排出粒子及び焼却炉煤じんでは、それぞれ1 g当たり 29~90 ng及び3~5,898 pgであり、微小大気粉じん (<2.0 mm) では386 fg/m³ airであった。

D. 考察

ディーゼルエンジン及び焼却炉は3,6-DNBePの発生源であり、それらでの燃焼により3,6-DNBePが生成し、大気中に放出されると考えられた。3,6-DNBePは大気粉じん中の微小粒子中に存在し、呼吸により吸引され、肺胞に達する可能性があると考えられた。今後、更に3,6-DNBePの健康影響について検討する必要があると考えられた。

E. 結論

3,6-DNBePをディーゼル排出粒子及び焼却炉煤じん中からはじめて検出した。3,6-DNBePは微小大気粉じん (<2.0 mm) 中に存在することが明らかとなった。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Watanabe, T., Takahashi, K., Konishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. *Mutation Research*, 649: 201-212, 2008.

(2) 学会発表

1. 渡辺徹志: 変異原性物質による大気及び土壌の汚染と肺がんの関連性. 日本環境変異原学会第37回大会、沖縄宜野湾市(2008年12月)
2. 長谷井友尋、渡辺徹志、平山晃久: 3,6-Dinitrobenzo[e]pyreneに対する曝露評価法の開発並びにその発生源の解明. 日本学第128年会、横浜市(2008年3月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他
なし

分担研究報告書

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 女子大学生の肺機能検査を毎日朝と夜に繰り返し実施したところ、10月の朝の1秒量は大気中粒子状物質濃度をはじめとする汚染物質濃度との間に有意な負の相関が認められ、アレルギー素因を有する者ではその傾向が顕著であった。しかし、検査の時期や実施する時間帯により、必ずしも一貫性のある結果は得られなかった。

A. 研究目的

大気中粒子状物質をはじめとする大気汚染物質が気道に及ぼす影響を疫学的に評価することを目的とした。従来、気管支喘息患者においては、大気中粒子状物質濃度が増加するとピークフロー値が低下することが報告されているが、健康者については一致した知見がみられていない。本研究では毎日繰り返し肺機能検査を行うことにより、大気汚染物質が健康者の気道に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

東京都内に居住し、都内の大学に通学している女子大学生12名(18~22歳)に電子式ピークフローメータを1台ずつ渡して、2008年7月と10月に各2週間ずつ連続して毎日朝と夜の1日2回、最大呼気流量(PEF)と1秒量(FEV₁)の自己測定を行ってもらった。また、アレルギー素因の有無を評価するために調査開始時には採血を行い、血清総IgE値を測定した。

大気汚染濃度は、対象者居住地の近傍にある大気環境測定局で測定されている浮遊粒子状物質(SPM)、二酸化窒素(NO₂)、光化学オキシダント(O₃)濃度を用いた。また、同測定局における気温、湿度も解析に用いた。解析は一般化推定方程式(GEE)により、対象者の身長、アレルギー素因の有無、気温、湿度の影響を調整し、大気汚染物質濃度が増加した時のPEF及びFEV₁値の変化量を評価した。

(倫理面への配慮)

兵庫医科大学倫理委員の承認を得て、対象者から文書による同意を得た。

C. 研究結果

対象者のうち、血清総IgE値が170 IU/ml以上でアレルギー素因を有すると考えられる者は7名、170 IU/ml未満のものは5名であった。7月には朝のべ170回、夜のべ155回、10月にはそれぞれのべ216回、195回の測定結果

が得られた。

10月の朝のFEV₁値は、大気中SPM、NO₂、O₃の24時間平均濃度(前日午前6時~当日午前6時)が増加すると、有意に低下するという関連性が認められた。しかし、夜のFEV₁はいずれの大気汚染物質濃度とも有意な関連はなく、PEFは朝、夜ともに大気汚染との関連性はみられなかった。一方、7月には大気中SPM濃度が増加すると、夜のPEF、FEV₁の有意な増加が観察された。

アレルギー素因の有無別にみたところ、アレルギー素因を有する者では、10月の朝のFEV₁値は、大気中SPM、NO₂、O₃との間に有意な負の関連が認められたが、アレルギー素因のない者ではいずれの汚染物質との関連も有意ではなかった。しかし、7月にはアレルギー素因のない者の朝のFEV₁値は大気中NO₂、O₃との間に有意な負の関連、SPMとの間に有意な正の関連を示した。

D. 考察

自動車排出ガス等による大気中粒子状物質が健康に与える影響が懸念されている。これまでに行われた多くの疫学研究では、主として大気汚染と呼吸器疾患及び症状に与える影響が検討されてきた。特に、大気汚染物質濃度の変動が呼吸器系に及ぼす短期的影響については、気管支喘息等の呼吸器疾患を有する患者については数多く報告されているが、健康者についての知見は乏しい。

本研究では、東京都内で生活している女子大学生を対象に、7月と10月に肺機能の測定を繰り返し実施してもらい、その間の大気汚染物質濃度の変動との関連性を検討した。10月には、大気中SPMをはじめとする汚染物質濃度の増加により、朝のFEV₁値の有意な低下が認められ、特にアレルギー素因を有する者ではその傾向が顕著であった。しかし、7月には大気中SPM濃度が増加すると、夜のPEF、FEV₁値の有意な増加がみられるなど、大気汚染物質の呼吸器系への短期的影響は時期や

時間帯により、一貫性が認められなかった。肺機能には様々な因子が影響していると考えられることから、大気汚染物質以外の因子についてさらに検討する必要があると考えられた。

E. 結論

東京都内で生活している女子大学生を対象に、7月と10月に肺機能の測定をそれぞれ2週間ずつ繰り返し実施してもらい、その間の大気汚染物質濃度の変動との関連性を検討した。10月の朝のFEV₁値はSPMをはじめとする大気汚染物質濃度との間に有意な負の相関が認められ、アレルギー素因を有する者ではその傾向が顕著であった。

しかし、夜のFEV₁値はいずれの大気汚染物質濃度とも有意な関連はなく、PEF値は朝、夜ともに大気汚染との関連性はみられなかった。一方、7月には大気中SPM濃度が増加すると、夜のPEF、FEV₁値の有意な増加が観察されるなど、検査時期や時間帯により一致した関連性は得られなかった。

大気汚染物質以外の因子について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

1. Ma, L., Shima, M., Yoda, Y., Yamamoto, H., Nakai, S., Tamura, K., Nitta, H., Watanabe, H., Nishimuta, T.: Effects of airborne particulate matter on respiratory morbidity in asthmatic children. *J Epidemiol*, 18: 97-110, 2008.
2. Hirano, Y., Shima, M., Hata, A., Kuriyama,

T.: Age-related changes in allergic symptoms and serum TARC concentration in school children. *Chiba Med J*, 84: 187-195, 2008.

3. Yamamoto, R., Nozaki, J., Ma, L., Shima, M., Hatayama, F.: Determination of gaseous organic compounds in Hyogo Prefecture, Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39: 1155-1163, 2008.

(2) 学会発表

1. 島 正之、余田佳子、山本絃乃、中井里史、田村憲治、新田裕史： 粒子状物質濃度と喘息児のピークフロー値との関連：時期による影響の違い、第78回日本衛生学会総会、熊本（2008年3月）。(日本衛生学雑誌, 63, 353, 2008.)
2. 島 正之、余田佳子、俵 健二： 大気中粒子状物質が小児の血清C反応性蛋白濃度に及ぼす短期的影響。第49回大気環境学会年会、金沢（2008年9月）。(大気環境学会年会講演要旨集, 315, 2008.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他
なし

分担研究報告書

ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫影響

分担研究者 高野裕久 独立行政法人 国立環境研究所 環境健康研究領域 領域長

研究要旨 Vehicle、カーボンナノ粒子(14nm、56nm)、アレルゲン(卵白アルブミン)、ナノ粒子とアレルゲンの併用群を設定し、マウスに経気道曝露した。肺組織中の細胞の抗原提示に関わる分子の発現と抗原提示細胞数は、vehicle群に比較して、14nm ナノ粒子の単独およびアレルゲンとの併用曝露群で有意に増加した。ナノ粒子の影響は、より小さい粒径で著明に観察され、アレルゲンの併用により亢進した。

A. 研究目的

本研究では、粒径の異なるカーボンナノ粒子(CB)の曝露がマウス肺の抗原提示細胞に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

ICRマウス(♂, 5週齢)を、vehicleまたは14nm CB、56nm CB、卵白アルブミン(OVA)、OVA+14nm CB、OVA+56nm CBの6群に分け、CBは毎週、OVAは隔週で6週間気管内投与した。最終投与24時間後の肺における抗原提示細胞に関わる細胞表面分子の発現を解析した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、動物愛護に配慮し、当該施設の担当委員会の承認の基に遂行した。

C. 研究結果

14nm CBの経気道曝露は、マウス肺における抗原提示に関わるMHC class IIと補助刺激分子(CD80, CD86)の発現および抗原提示細胞(樹状細胞、マクロファージ、B細胞)の数を有意に増加させた。また、これらの増加はOVAの併用曝露により増強された。一方、56nm CB曝露によるこれらの影響は誘導されなかった。

D. 考察

これまでに我々は、CBがアレルギー性気道炎症の増悪や抗体産生の増加を誘導することを報告してきた(Inoue K. *et al*, 2005 *Respir Res* 6: 106)。本研究では、肺の抗原提示細胞について検討した結果、14nm CBは特にアレルゲンの併用曝露により、肺細胞のMHC class IIと補助刺激分子の発現および抗原提示細胞数を増加させることが明らかとなった。上記分子の増加は、T細胞への抗原提示を亢進させ、それに続くアレルギー反応・炎症を促進する可能性

が示唆される。

E. 結論

ナノ粒子曝露による肺の抗原提示細胞数の増加および活性化は、抗原特異的な抗体産生をはじめとする免疫応答および気道炎症の亢進に寄与している可能性が示唆された。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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*, 21: 35-42, 2008.

(2) 学会発表

1. 井上健一郎、柳澤利枝、小池英子、高野裕久: ナノ粒子が呼吸器・血管系の脆弱状態へ及ぼす複合影響. 第15回 日本免疫毒性学会 抄録p32 (2008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
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他
なし

分担研究報告書

新規変異原・がん原物質の検索

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 所長

研究要旨 胆汁酸の逆流は胃切除手術後の残胃癌の発生等に関与していることが示唆されている。胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、そのほとんどがグリシンやタウリン抱合体として存在している。そのニトロソ化合物である、N-ニトロソグリココール酸(NO-GCA)及びN-ニトロソタウロコール酸(NO-TCA)は変異原性及び発がん性を示すことが報告されている。また、これらニトロソ胆汁酸抱合体は β -カルボキシメチルデオキシグアノシン(β -CMdG)や3-エタンスルホン酸デオキシシチジン(3-ESA-dC)等の付加体を生成する。本研究では、ニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体である β -CMdG及び3-ESA-dCの*in vivo*における生成について、ラット十二指腸液逆流モデルを用いて検討した。その結果、これら付加体はいずれも逆流モデルの腺胃中に検出され、そのレベルは偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高いことがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、 β -CMdG及び3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下することがわかった。このことから、 β -CMdG及び3-ESA-dCの生成には、十二指腸液逆流モデルラットの胃内でニトロソ化された胆汁酸抱合体の生成が関与している事が示唆された。

A. 研究目的

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、そのほとんどがグリシンやタウリン抱合体として存在している。胆汁酸抱合体は、酸性条件下で亜硝酸ナトリウムにより、N-ニトロソ化され、N-ニトロソグリココール酸(NO-GCA)及びN-ニトロソタウロコール酸(NO-TCA)を生成し、これら化合物はサルモネラ菌やほ乳動物培養細胞に対して変異原性を示すことが知られている。さらにNO-GCA及びNO-TCAをラットに投与すると、肝臓及び胃に腫瘍を誘発する事も報告されている。また、NO-GCA及びNO-TCAをDNAと反応させると β -カルボキシメチルデオキシグアノシン(β -CMdG)や3-エタンスルホン酸デオキシシチジン(3-ESA-dC)等のDNA付加体が生成される事も明らかとなっている。これらのことから、胆汁酸は生体内でN-ニトロソ化され、ニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体の形成を介してヒト発がんに関与する事が推測される。本研究では、胆汁酸のヒト発がんへの関与を明らかにするために、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAを用いてNO-GCA及びNO-TCA由来のDNA付加体の生成の有無を調べた。

B. 研究方法

雄性Wisterラットに十二指腸液逆流手術および偽手術を施した。術後1ヶ月の間観察し、生き残ったラットを2群に分け(一群各6匹)、グループ1には通常食を、グループ2には0.5%

チオプロリンを含む餌を摂取させた。実験開始から4週および8週目にラットを屠殺・解剖し、それぞれのモデルの腺胃よりDNAを抽出した。DNAを核酸分解酵素で消化した後、HPLCで分離し、 β -CMdGおよび3-ESA-dCを含む画分を分離し、 32 P-ポストラベル法で解析し、付加体の生成について調べた。

C. 研究結果

ニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体の解析は、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAを抽出し、 32 P-ポストラベル法とHPLCを組み合わせた方法で行った。その結果、NO-GCA由来の付加体として β -CMdGが、またNO-TCA由来の付加体として3-ESA-dCが観測され、その付加体レベルはそれぞれ 10^5 ヌクレオチドあたり56.3及び8.9個であった。一方、コントロール群におけるこれら付加体のレベルは5.9及び2.0個であった。また、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した十二指腸液逆流モデル群を用い、その腺胃におけるDNA付加体を測定した結果、 β -CMdG及び3-ESA-dCのレベルがコントロール群に近い値まで低下する事がわかった(表1)。

表1 ラット腺胃における β -CMdG及び3-ESA-dCのレベル

Group	Weeks after surgery	Adduct levels (adducts/10 ⁶ nucleotides)	
		O ⁶ -CMdG	3-ESAdC
Sham operation	4	5.8 ± 2.3	3.1 ± 0.5
	8	5.9 ± 0.5	2.0 ± 1.0
Duodenal reflux	4	40.8 ± 9.4	11.2 ± 1.0
	8	50.3 ± 3.2	8.9 ± 1.0
Duodenal reflux + TPRO	4	7.0 ± 2.6	3.6 ± 3.0
	8	3.3 ± 3.4	1.0 ± 0.3

Detection limit: 1 adduct/10⁶ nucleotides
Mean ± S.D. (n=3) TPRO (Thioprotina): 0.9%

D. 考察

ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAから、ニトロ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体である、O⁶-CMdG及び3-ESA-dCが検出された。これら付加体のレベルは、偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高いことがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、O⁶-CMdG及び3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下したことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロ化が起こり、付加体の生成を増加させることが推測された。このことから、これらのDNA付加体の生成にニトロ胆汁酸抱合体の生成が関与している事が示唆された。

E. 結論

胆汁酸の逆流は胃切除手術後の残胃癌の発生等に関与していることが示唆されている。本研究では、胆汁酸抱合体のニトロ化合物である、NO-GCA及びNO-TCA由来のDNA付加体であるO⁶-CMdG及び3-ESA-dCの*in vivo*における生成について、ラット十二指腸液逆流モデルを用いて検討した。その結果、これら付加体は偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高いレベルで逆流モデルの腺胃中に検出されることがわかった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、O⁶-CMdG及び3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下することがわかった。このことから、O⁶-CMdG及び3-ESA-dCの生成は、十二指腸液逆流モデルラットの胃内でニトロ化された胆汁酸抱合体の生成に関与している事が示唆された。

F. 健康危険情報 該当しない。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Matsumoto, Y., Nakano, T., Yamamoto, M., Matsushima-Hibiya, Y., Odagiri, K., Yata,

O., Koyama, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Distribution of cytotoxic and DNA ADP-ribosylating activity in crude extracts from butterflies among the family Pieridae. Proc Natl Acad Sci U S A. (2008) 105: 2516-2520. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 8; 105: 5649.

2. Mutoh, M., Niho, N., Komiya, M., Takahashi, M., Ohtsubo, R., Nakatogawa, K., Ueda, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice. Carcinogenesis, 29: 824-829, 2008.
3. Kitahashi, T., Takahashi, M., Yamada, Y., Oghiso, Y., Yokohira, M., Imaida, K., Tsutsumi, M., Takasuka, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Occurrence of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in X-ray-induced rat lung tumors. Cancer Sci, 99: 241-245, 2008.
4. Ueda, N., Maehara, Y., Tajima, O., Tabata, S., Wakabayashi, K., Kono, S.: Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-2 and colorectal adenoma risk: The self defense forces health study. Cancer Sci, 99: 576-581, 2008.
5. Oda, Y., Watanabe, T., Terao, Y., Nukaya, H., Wakabayashi, K.: Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in Salmonella typhimurium umu strains. Mutat Res, 654: 52-57, 2008.
6. Hirata, A., Tsukamoto, T., Sakai, H., Takasu, S., Ban, H., Imai, T., Totsuka, Y., Nishigaki, R., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T., Tatsumatsu, M.: Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - assessment with a liver

- initiation model. *Food Chem Toxicol*, 46: 2003-2009, 2008.
7. Takahashi, M., Kitahashi, T., Ishigamori, R., Mutoh, M., Komiya, M., Sato, H., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced hamster pancreatic carcinogenesis and prevention of cancer development by ONO-1714, an iNOS inhibitor. *Carcinogenesis*, 29: 1608-1613, 2008.
 8. Terasaki, M., Totsuka, Y., Nishimura, K., Mukaisho, KI., Chen, KH., Hattori, T., Takamura-Enya, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Detection of endogenous DNA adducts, O(6)-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. *Cancer Sci*, 99: 1741-1746, 2008.
 9. Hori, Y., Takasuka, N., Mutoh, M., Kitahashi, T., Kojima, S., Imaida, K., Suzuki, M., Kohara, K., Yamamoto, S., Moriyama, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Periodic analysis of urethane-induced pulmonary tumors in living A/J mice by respiration-gated X-ray microcomputed tomography. *Cancer Sci*, 99: 1774-1777, 2008.
 10. Ohe, T., Watanabe, T., Nonouchi, Y., Hasei, T., Agou, Y., Tani, M., Wakabayashi, K.: Identification of a new mutagen, 4,4'-diamino-3,3'-dichloro-5-nitrobiphenyl, in river water flowing through an industrial area in Wakayama, Japan. *Mutat Res*, 655: 28-35, 2008.
 11. Deguchi, Y., Wu, NX., Toyozumi, T., Masuda, S., Nagaoka, H., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Kinoshita, N.: Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. *Environ Toxicol*, 23: 720-727, 2008.
 12. Watanabe, T., Takahashi, K., Konishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. *Mutat. Res*, 649: 201-212, 2008.
 13. Amanuma, K., Tone, S., Nagaya, M., Matsumoto, M., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Aoki, Y.: Mutagenicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rps1 transgenic zebrafish. *Mutat. Res*, 656: 36-43, 2008.
 14. Takasuka, N., Takahashi, M., Hori, Y., Kitahashi, T., Iigo, M., Imai, T., Yoshimi, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett*, 275: 150-157, 2009.
 15. Kuriki, K., Mutoh, M., Tajima, K., Wakabayashi, K., Tatematsu, M.: Relationships between intestinal polyp formation and fatty acid levels in plasma, erythrocytes, and intestinal polyps in Min mice. *Cancer Sci*, 2009, in press.
- (2) 学会発表
1. 西村興一、戸塚ゆかり、寺崎 将、向所賢一、服部隆則、杉村 隆、若林敏二：ラット十二指腸液逆流モデルにおけるN-ニトロ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体の解析。第67回 日本癌学会 (2008年)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
該当しない
 2. 実用新案登録
該当しない
 3. その他
なし

大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

分担研究者 中益 斉 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

加熱した魚・肉食品に含まれる変異原性・がん原性物質であるヘテロサイクリックアミン類(HCAs)の中で最も含量が多い2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)により誘発されるラット大腸がんモデルを用いた解析により、PhIP誘発大腸発がんを高感受性を示すF344系統では、抵抗性ACI系統と比較し、高TG血症、高グルコース血症、及び高内臓脂肪を示すことが分かった。大腸上皮における網羅的な遺伝子発現プロファイルを用いたGSEA解析の結果、大腸上皮において、PI3K/mTORのシグナル活性化に重要な役割を果たすAKTが高感受性のF344系統で有意に活性化していることが分かった。さらに、感受性系統におけるPI3K/mTOR経路の活性化は、ACF誘発数を量的形質とした遺伝的連鎖解析(QTL解析)により同定した感受性遺伝子Xとは独立して、発がん感受性の賦与に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

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

B 研究方法

- ① PhIP誘発大腸発がんに対する高感受性系統であるF344ラットと抵抗性系統のACIラットに普通食或いは高脂肪食を投与し、両系統における血中TG(中性脂肪)、コレステロール、グルコース及び遊離脂肪を6週、8週、12週齢時と経時的に測定し両系統を比較した。
- ② ラット個体の内臓脂肪量について、EchoMRI装置及びCT等の対外測定器を用いて測定した。さらに解剖時に、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下組織、精巣上体周辺脂肪組織から脂肪組織を剥離し、重量を測定した。
- ③ 大腸発がん感受性系統F344由来の感受性遺伝子Scfを抵抗性系統ACIに導入した、ACI-F344Scf系統における内臓脂肪量をEchoMRIで測定し、F344及びACI系統と比較した。
- ④ 大腸上皮、腸間膜脂肪組織、肝臓、及び内臓脂肪

からRNAを抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を行い、感受性との関連性について検討した。さらに、脂質代謝関連遺伝子及び脂肪性サイトカイン関連遺伝子(Leptin, Pai-1, Adiponectin, LPL, 等)については定量的RT-PCRを行い、感受性差との関連性を調べた。

- ⑤ 両系統から得られた各臓器における遺伝子発現プロファイルのデータセットを用いて、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を行い、感受性の異なる両ラット系統間で有意に遺伝子発現が亢進或いは低下している遺伝子群やシグナル経路の同定を試みた。
- ⑥ GSEA解析で抽出された遺伝子に関して、当該遺伝子産物の両ラット系統間での発現差および活性化の違いをウェスタンブロット解析により検討した。

(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) F344系統はACI系統と比較し、PhIP投与開始後の早期からACF誘発の高感受性を示すが、血中TG値及び血糖(グルコース)値は6週齢時には殆ど差が認められないが、8週齢時からはTG及びグルコースともに、感受性系統のF344ラットで有意に高値を示すことが分かった。12週齢時の絶食時でのTG、コレステロール及びグルコース値は、ACI系統ではそれぞれ40.3±5.1(mg/dl)、59.3±6.0(mg/dl)、125.7

±21.2 (mg/dl)、F344 系統では 227.7±194.7 (mg/dl)、62.0±3.6 (mg/dl)、210.0±22.6 (mg/dl) と、TG 値は約 5 倍、グルコース値は約 2 倍高値を示した。コレステロール値は両系統間で有意な差を認めなかった。(2) 両系統間の組織脂肪量の比較では、内臓及び皮下脂肪量のいずれも、感受性 F344 系統が 8 週齢時より有意に高値を示すことが分かった。

(3) ACF 誘発数を量的形質とした遺伝連鎖解析により同定したラット染色体 16 番上の大腸発がん感受性遺伝子 X (Scf) は、高 TG 血症、或いは内臓脂肪蓄積には寄与しないことが分かった。

(4) 大腸上皮における網羅的な遺伝子発現解析では、感受性と相関する特徴的な遺伝子変化を特定できなかった。特に、肥満による大腸発がんとの関連で最近注目されている Adiponectin, LPL も、感受性系統の脂肪組織で高値を示し、予想とは逆の結果であった。一方、発現プロファイルを用いた GSEA 解析では、感受性との関連性が示唆される幾つかの特徴的な遺伝子群の発現差を見出すことができた。特に、高感受性の F344 系統においては、PI3K シグナル経路が活性化している可能性が示唆された。脂肪性サイトカイン遺伝子群の発現量は系統間で有意な差を認めなかった。

(5) PI3K シグナル経路に関わる分子群のタンパク質発現量を両系統間で比較した結果、大腸上皮において、PI3K/mTOR のシグナル活性化に重要な役割を果たす AKT が高感受性系統で有意に活性化していることが示唆された。

D 考察

PhIP 誘発のラット大腸がんモデルにおいて、高感受性を示す F344 系統では高 TG 血症、高血糖、及び内臓脂肪量の有意な蓄積を伴うことが分かった。これらの生活習慣病関連の要因がラットモデルにおいても、大腸発がんに促進的に作用していることが示唆された。発がん促進の分子的基盤としては、mTOR/PI3K シグナル経路の活性化が示唆される。さらに、ACF 誘発数を指標とした QTL 解析で同定された感受性遺伝子 X (Scf) との関連では、遺伝子 X を抵抗性系統 ACI に導入したコンジェニック系統は高 TG や内臓脂肪量の増加を示さなかったことから、PhIP 誘発大腸発がんには両要因が独立して作用していることが示された。

E 結論

高 TG 血症および高内臓脂肪の蓄積を示す高感受性系統 F344 では、抵抗性の ACI 系統に比較して PI3K/mTOR シグナル経路が有意に活性化している可能性が示唆された。大腸発がん感受性の異なる 2 系統のラットを用いた遺伝連鎖解析により同定した感受性候補遺伝子 X (ラット染色体 16 番) とは独立した遺伝要因として、発がん感受性に寄与する可能性が考えられる。今後、AKT の活性化に関わる分子

群および PI3K/mTOR の下流に存在する種々の分子群と ACF 誘発性との関連性について、遺伝学的解析及び分子生物学的な方法により明らかにする。

F 健康危機情報 (特になし)

G 研究発表

(1) 論文発表

1. Paramasivam, M., Membrino, A., Cogoi, S., Fukuda, H., Nakagama, H., Xodo, L.: Protein hnRNP A1 and its derivative Upl disrupt quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acid Res.* (in press)
2. Nakajima, A., Tomimoto, A., Fujita, K., Sugiyama, M., Takahashi, H., Ikeda, I., Hosono, K., Endo, H., Yoneda, K., Iida, H., Inamori, M., Kubota, K., Saito, S., Nakajima, N., Wada, K., Nagashima, Y., Nakagama, H.: Inhibition of peroxisome proliferators-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci*, 99: 1892-1900, 2008.
3. Tomimoto, A., Endo, H., Sugiyama, M., Fujisawa, T., Hosono, K., Takahashi, H., Nakajima, N., Nagashima, Y., Wada, K., Nakagama, H., Nakajima, A.: Metformin suppresses intestinal polyp growth in Apc (Min/+) mice. *Cancer Sci*, 99: 2136-2141, 2008.
4. Fujisawa, T., Endo, H., Tomimoto, A., Sugiyama, M., Takahashi, H., Saito, S., Inamori, M., Nakajima, N., Watanabe, M., Kubota, N., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Wada, K., Nakagama, H., Nakajima, A.: Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut*, 57: 1531-1538, 2008.
5. Wang, R., Dashwood, W.M., Lohr, C.V., Fischer, K.A., Nakagama, H., Williams, D.E., Dashwood, R.H.: b-Catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]-pyridine (PhIP) and a high fat diet. *Cancer Sci*, 99: 1754-1759, 2008.
6. Fukuta, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T., 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.
7. Fukuda, T., Kondo, Y., Nakagama, H.: The