

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.

8. 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.

## (2) 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Kanemoto, K., Fukuta, K., Fukuda, H., Ochiai, M., Kohri, K., Sugimura, T., Nakagama, H.: BHN 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)
7. 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)
8. 金本一洋、岡本康司、福田博政、落合雅子、杉村隆、中釜 查: BHN 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)
9. 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)
10. 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)

## 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

アレイ CGH 法を用いた癌細胞の遺伝子増幅メカニズムの解析

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

**研究要旨** がん細胞における遺伝子増幅のメカニズムを解析する目的で、c-myc 遺伝子増幅を持つ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。

A. 研究目的

各種癌細胞株における、がん遺伝子の増幅領域に関して、SNP チップおよびオリゴ CGH アレイを用いた CGH 法により詳細に検討し、がん遺伝子増幅単位の構造をシーケンスレベルで解明するとともに、その生成のメカニズムに関して検討を加えることを目的とする。今年度は、8 番染色体特異的 CGH アレイを作製し、各種細胞株の c-myc 領域の増幅様式を比較することを目的とした。

B. 研究方法

1. 使用した細胞株

c-myc がん遺伝子を含む 8q24 領域に増幅があることが知られている 20 種類のヒトがん由来細胞株 MEG-01、SKM-1、KURAMOCHI、LU65、WiDr、KP-4、MCF-7、MG-63、COLO320 DM、P39/TSU、SCC-3、Hu0-3N1、HL60、KY821、Kasumi-1、J-111、KYSE180、RERF-LC-FM、MKN7 を 独立行政法人医薬基盤研究所、細胞バンク (JCRB) 小原有弘博士より入手した。所定の培養法により、培養した後、ゲノム DNA を抽出し、解析に使用した。

用いた細胞に関する情報を、表 1 にまとめた。

2. 細胞からの DNA の抽出

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

3. 使用したオリゴ CGH アレイ

アレイ一枚あたり約 4 万 3 千個のオリゴヌクレオチド (60mer) プローブをカスタムデザイン可能である Agilent 社 CGH アレイを用い、8 番染色体特異的アレイを作成した。用いたアレイ上のプローブデザインを表 2 に示す。これまでの解析から、増幅が予想される 8 番染色体 8q24 領域に対して、連続的に 60mer のプローブを配置し、その外側の領域には一定間隔をおいて、プローブを配置した。このデザインに基づいて、Agilent 社においてオリゴマーがアレイ上に固相合成され、カスタムメイドマイクロア

レイを得た。アレイのフォーマットに関しては、1スライド上で4検体処理が可能な4x4x4Kフォーマットを採用した。

#### 4. CGH解析

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

#### C. 結果

60merのオリゴDNAを、8番染色体上にmyc領域を中心としてデザインして約44,000配置した、4x4x4KフォーマットのCGHアレイを作製し、実験に用いた。各細胞から抽出したゲノムDNAを、正殿酵素にて消化後、ヒトリファレンスDNAと競合的にハイブリさせ、それぞれ異なる蛍光色素にてラベルしたシグナル強度の差より、染色体上のゲノムコピー数を求めた。

シグナル強度の解析にはCGH Analytics software (Agilent)を用い、得られた結果に関して、解析が終了している12細胞分のデータを図に示した。シグナルが上部(赤色)に動いている場合がコピー数の増加であり、下部への変化(緑色)は減少となる。以下、各細胞に関しての結果をまとめる。

##### 1. Colo320DM

大腸がん由来の細胞株で、c-myc遺伝子増幅をDouble Minute染色体として持つことが知られている。近2倍体で染色体数は47-53である。CGH解析についてはすでに昨年度にSNPアレイを用いた結果を報告しているが、オリゴCGHアレイを用いた場合

もほぼ同様な結果が得られた。Colo320DM細胞での増幅単位は連続な1単位からなっており、そのサイズは約1.5Mbである。比較的増幅度が高くシグナルが飽和しているためか変化は均一に見えるが、SNPチップの結果からは、増幅領域の中でコピー数の差がある可能性もある。その他8番染色体上では、増幅単位よりテロメア側に一箇所シグナルの減少領域があり、さらにテロメア側では、逆に増加傾向が認められた。この変化はSNPアレイ解析においても認められている。

##### 2. P39/TSU

日本人由来急性骨髄性白血病細胞株で、STR解析の結果から、HL60細胞のクロスコンタミネーションが示唆されている。CGHのパターンをみると、やはり昨年度報告したHL60細胞のもの一致し、この細胞はHL60と同一であることが確認できた。増幅は6つの領域からなり、SNPチップで確認された一部コピー数の違う領域は、シグナルが飽和したため判別できなかった。また、シーケンズ解析の結果明らかとなったテロメア側の非常に小さな増幅領域はアレイでは確認できなかった。この結果より、CGH解析はクロスカルチャーコンタミネーションのチェックにも有用であることが確認できた。

##### 3. SCC-3

SCC-3はnon-Hodgkin's Lymphoma由来細胞株であり、IL2レセプターを発現している。増幅単位は比較的c-myc遺伝子の近傍に極限されており、そのサイズは1.5Mb程度である。また、増幅単位の両側では比較的広範な領域にわたってコピー数の減少が認められた。その他、8番染色体の領域は正常であった。また、増幅単位のコピー数はc-myc遺伝子の前後で変化していた。

##### 4. Hu0

Hu0-3N1は、オステオサルコーマ由来の細胞株。シグナル増幅は比較的広い範囲にわたっており、増幅度の異なる複数の単位から構成されていた。部分

的に正常コピー数と思われる領域も含まれており、HL60細胞と類似した傾向が見られた。その他の8番染色体領域に関しては、全般にシグナルの減少傾向がみられた。

#### 5. MEG-01

MEG-01はClonic Leukemia由来の細胞株、巨核芽球系。増幅単位はc-myc遺伝子を含むテロメア末端近傍までの比較的広い範囲に及ぶ。それ以外の8番染色体領域においてはシグナルの減少が観察された。増幅領域内は比較のコピー数が均一だが、一部変化を伴う可能性がある。テロメア末端は他の8番染色体領域と同じく減少傾向。

#### 6. SKM-1

Myelo hyperplastic syndrome由来白血病様細胞。ミエロパーオキシダーゼを分泌。前述のMEG-01細胞と非常に近いパターンを示す。増幅開始点も非常に近いが、微妙に異なる。また増幅単位に微妙にコピー数の違う複数のユニットを含む。テロメア末端は正常に近い。その他の領域は、均一に減少。

#### 7. KURAMOCHI

日本人由来、未分化型子宮ガン由来細胞株。8番染色体全体にわたって複雑な増減を示した。c-myc近傍の領域はやや変化が不明瞭ではあるが、増幅領域の一部に正常コピー数と思われる部分有り。

#### 8. LU65

分断された3つ以上の増幅領域からなる。テロメア側の増幅領域は、テロメアに向かってコピー数が漸減し、階段状の変化を示した。非常に細かい領域でコピー数が変化した複雑な増幅様式を示した。8番染色体の他の領域は全体に渡って減少傾向を示したが、両テロメア末端は正常に近い。

#### 9. WiDr

大腸のadenocarcinoma由来。染色体解析より、ヒト大腸がん細胞株HT-29由来であると考えられる。

増幅様式は単純に連続した1単位の増幅であり、サイズは約30Mbと広い。c-myc遺伝子はそのほぼ中心に位置する。テロメア側ではシグナルは減少を示した。短腕全体に渡りコピー数の減少が見られ、転座の関与を含めた短腕のロスが考えられる。長腕の他の部分も減少傾向を示した。短腕、長腕とも一部狭い領域で他よりもコピー数の減少を示す領域があった。

#### 10. KP-4

日本人由来、すい臓のductal cell carcinoma細胞株。c-myc周辺は連続した1単位の増幅様式であり、そのサイズは約25Mb。セントロメア近傍および短腕側に部分的にコピー数の変化領域有り。増幅単位内では、微妙にコピー数の変化がある可能性あり。

#### 11. MCF7

比較的良好に用いられる乳がん由来細胞株。染色体モードはhypotriploid (58-68)。コピー数変化は比較的狭い領域。一部に正常シグナル部分を含み、セントロメア側にかけての増幅領域は、漸減性を示した。これよりセントロメア側のより広範な領域においてもシグナルの増加が見られ、転座を伴った染色体数の変化の関与が示唆された。

#### 12. MG63

Osteosarcoma由来細胞株。最も複雑な増幅パターンを示した。約40Mbの範囲にわたり、分断された非常に細かい増幅単位が繰り返し、正常さらにはコピー数減少部分を含む。c-myc遺伝子は増幅部分に含まれた。全体としてHL60細胞に近い様式を示した。その他の部分に関しては、シグナルは安定しているが、全体に減少傾向にあった。

以上、細胞株により様々な増幅様式を示したが、大別して、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, HuO-3N1,

MCF-7, MG-63, P39/TSU)に分かれた。いずれの場合も c-myc 遺伝子は増幅していた。増幅の度合いに関しても、特に後者で一定ではなく、連続的に漸減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

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 次元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、切断点のシークエンス解析などから、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。核型解析のデータがあれば、より詳細な分析が可能である。染色体の数的異常 (aneuploidy) は発がんの引き金になるとも考えられており、結果かもしれないが、がん細胞株では単純な数の異常だけではなく、転座等複雑な染色体のリアレンジメントを伴う場合が一般的であり、その生成のメカニズムと発がんとの関連に興味を持たれる。

CGH アレイで検出される異常は、それが細胞集団の中で多勢となる必要があり、増殖性の変化出る必要がある。多くの場合には、数的異常も含めた染色体の変化 (異常) は、増殖にとって不利に働くため、細胞集団の中で淘汰されていくと考えられるが、まれに変化が増殖性に結びつく場合、例えば今回のよ

うな c-myc 遺伝子コピー数の増加といったがん遺伝子の活性化につながる場合には、そういった危険性があるといえる。逆に、がん抑制遺伝子のコピー数の減少も、増殖性を持たずと考えられる。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、その発生のメカニズムを追うことが、発がんのイニシエーションのメカニズムを理解する上で重要であると考えられる。今後、今回のデータをもとに、さらに詳細な検討を加え、シークエンスレベルで変化を明らかにしたい。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Watanabe, T., Tanaka, G., Hamada, S., Namiki, C., Suzuki, I., 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.

2. 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. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 田邊恵帆里、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)
5. 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、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)
6. 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)
7. 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: ジェ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)

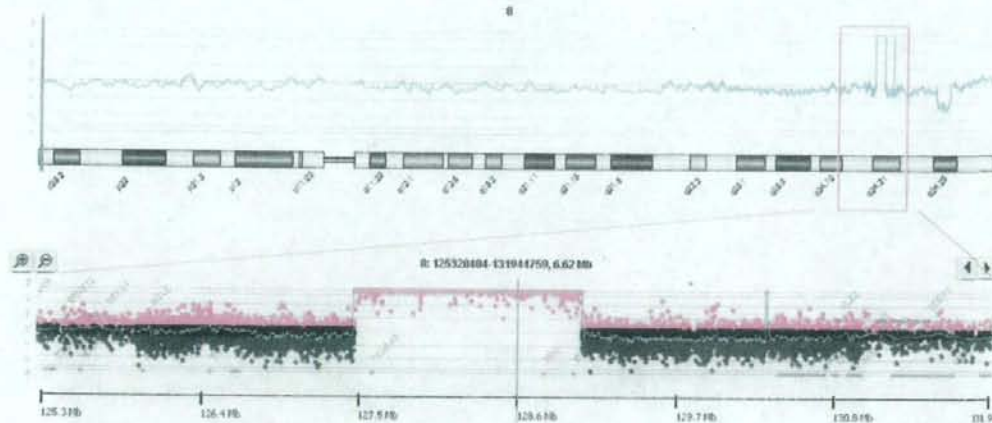
8. スレッシュ ティルパッティ、ラメッシュ ドス、押澤 正、鈴木和博、鈴木孝昌: プロテオミクス手法を用いた遺伝子傷害性の新しいバイオマーカー探索. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
  9. 鈴木孝昌、降旗千恵: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
  10. 鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵: トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子障害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
  11. 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、須藤鎮史、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)
  12. 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-開発と検証-. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)
  13. 鈴木孝昌、田邊恵帆里、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. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

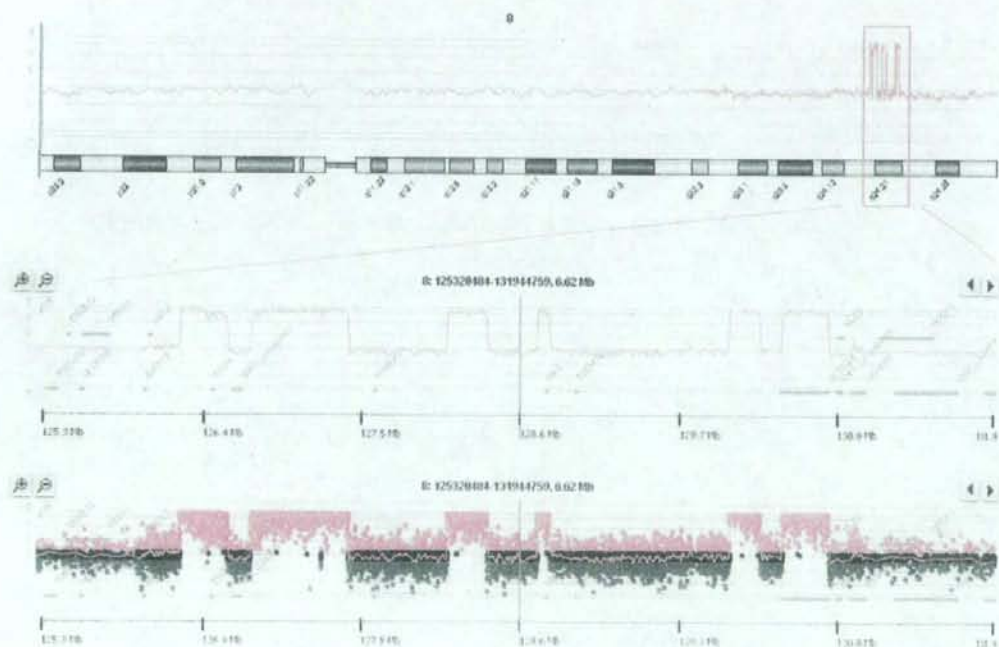
1. 特許取得  
該当しない
2. 実用新案登録  
該当しない
3. その他  
なし

図 各種ヒトがん細胞株における8番染色体上のコピー数変化

Colo320DM

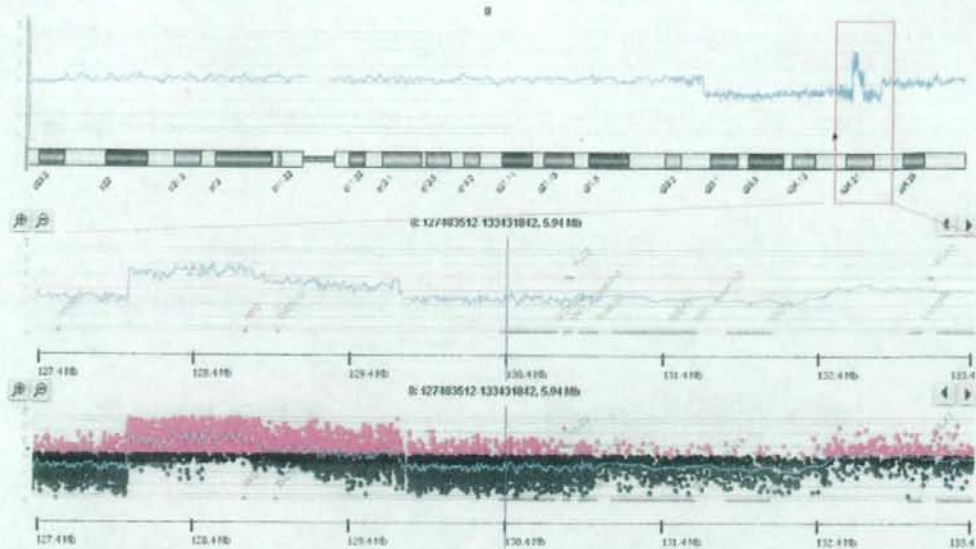


P39/TSU

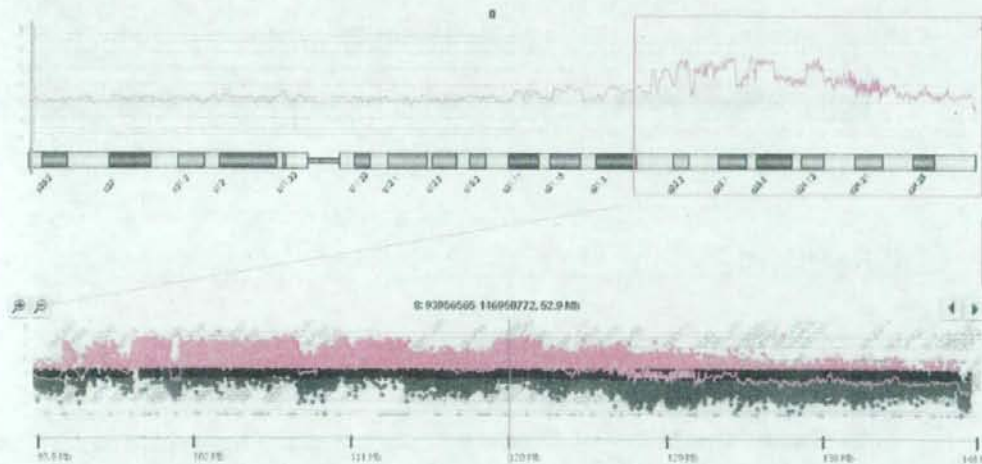




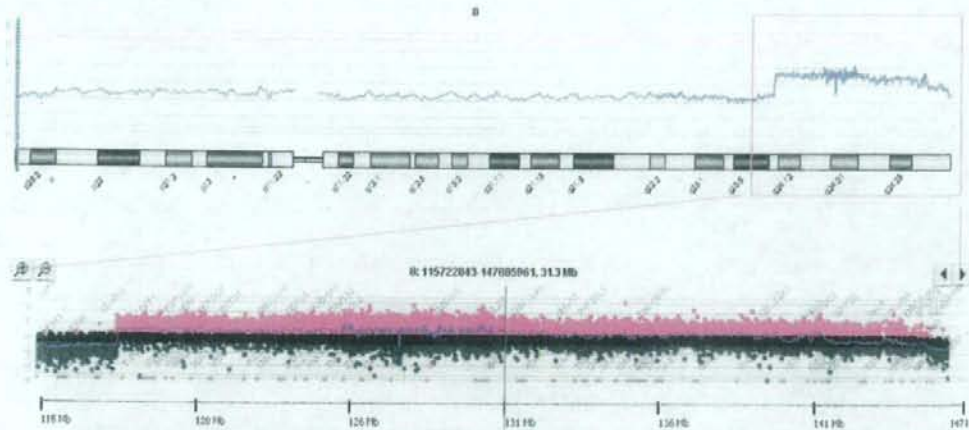
### SCC-3



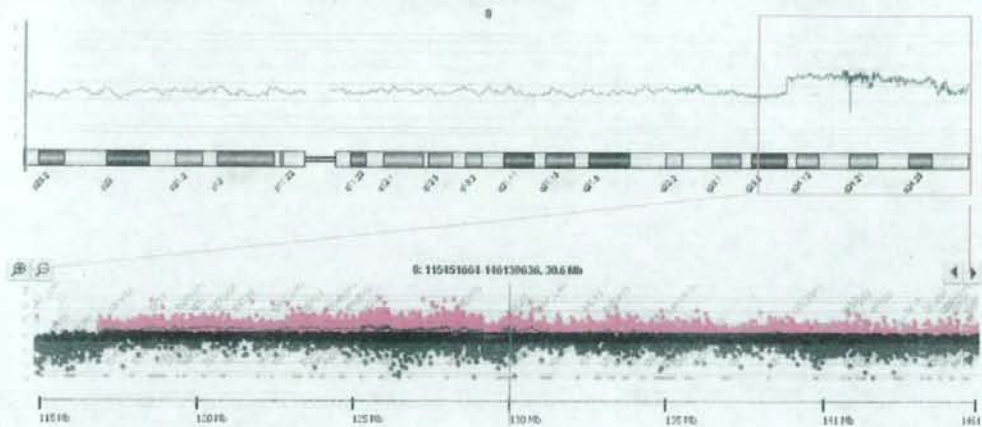
### HuO



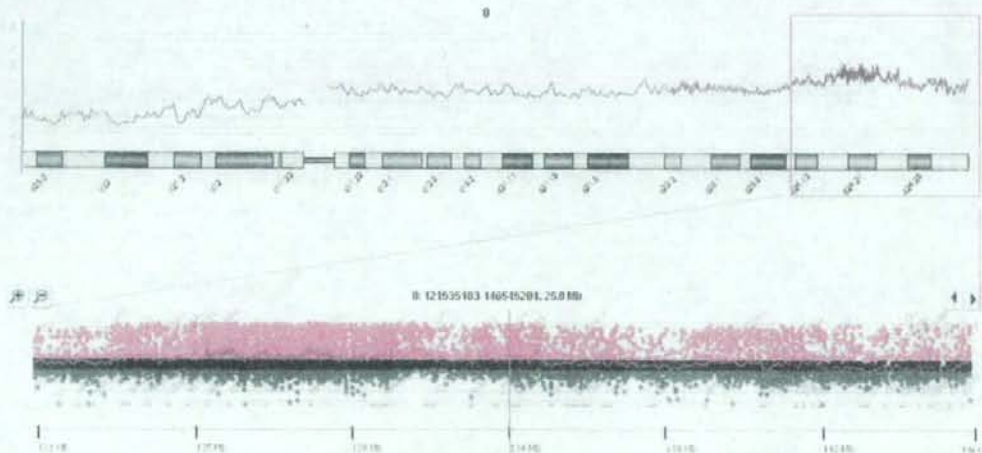
## MEG-01



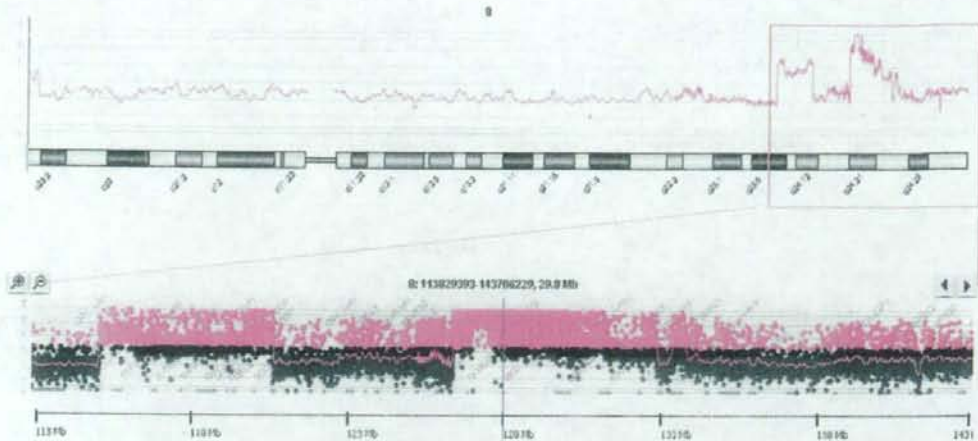
## SKM-1



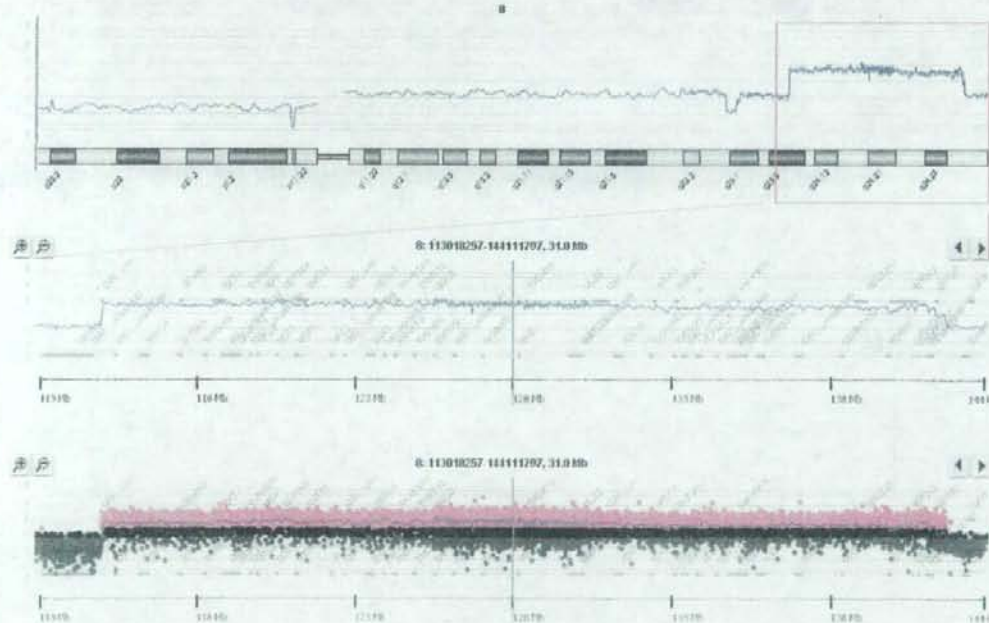
## KURAMOCHI



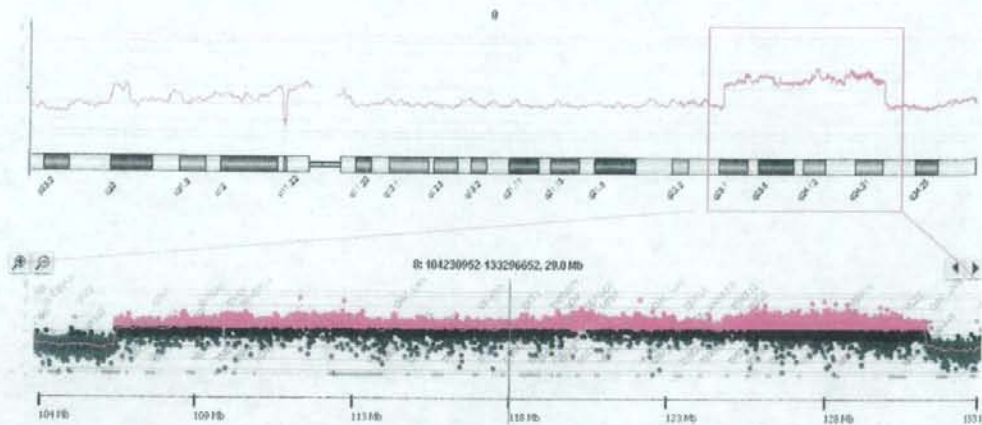
## LU65



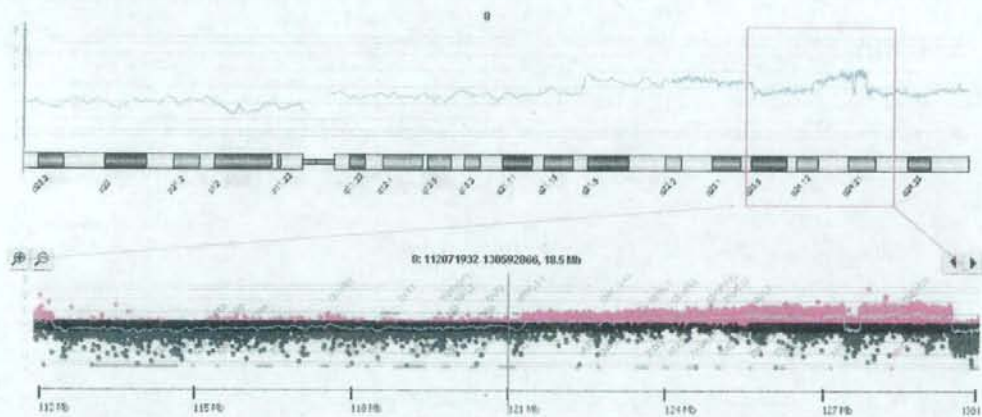
## WiDr



### KP-4



### MCF7



### MG63

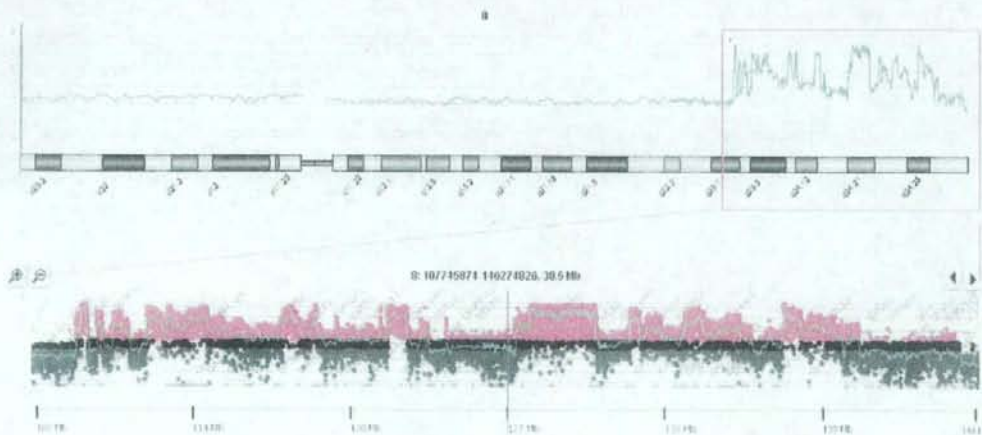


表1 c-myc 遺伝子領域(8q24)に増幅が見られるヒト由来がん細胞株

Cell Line	MEM-61	SKM-1	KUMAMOTO	LVP	MDP	IP-4	MDP-3	MG-83	COLO205 DR	FR1739	SGC-4	NCI-881	HEL	K562	JAR	KB	J-11	NCI-639	HEP-2C-7H	MM1
Cell ID	FO0814	JCR0111	JCR009	JCR0070	JCR0112	JCR0114	JCR0114	FO0814	JCR025	JCR006	JCR0114	JCR0013	JCR0013	JCR0016	JCR0114	JCR0114	JCR0112	JCR0114	JCR0112	JCR0112
Sex	M	M	M	M	M	M	M	M	F	M	M	F	F	M	M	M	M	M	M	M
Origin of Tumor	ovary dysplasia (ovary epithelium)	breast (breast epithelium)	breast (breast epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	breast (breast epithelium)	breast (breast epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)
Genetic	MEG-1/NAK1-7-DEL																			
Characteristics	ovary dysplasia (ovary epithelium)	breast (breast epithelium)	breast (breast epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	breast (breast epithelium)	breast (breast epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)	ovary (ovary epithelium)
Cell ID	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865	0401865
Comment																				
Source																				
Experiments																				

表2 8番染色体特異的カスタムCGHアレイのプロローブデザイン

Position (Mb)	Pter	1-20	-40	-60	-80	-100	-110	-126	-131*	-146.3	Total
No. probes	25	1696	1835	1423	1823	1806	4057	7778	15281	7378	43102
Intervals	200-500	10000	10000	10000	10000	10000	1870	1500	0	1500	

\* c-myc 遺伝子領域

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe, T., Takahashi, K., Kobishi, E., Hoshino, Y., Hasei, T., Asanoma, M., Hirayama, T., Wakabayashi, K.	Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens.	Mutation Research	649	201-212	2008
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., and Nakagama, H.	Inhibition of peroxisome proliferators-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility	Cancer Sci.	99	1892-1900	2008
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., and Nakajima, A.	Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition	Gut	57	1531-1538	2008
Wang, R., Dashwood, W.M., Lohr, C.V., Fischer, K.A., Nakagama, H.,	b-Catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-	Cancer Sci	99	1754-1759	2008

Williams, D.E. and Dashwood, R.H.	[4,5-b]-pyridine (PhIP) and a high fat diet				
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
Wang, R., Dashwood, W.M., Lohr, C.V., Fischer, K.A., Pereira, C.B., Louderback, M., Nakagama, H., Bailey, G.S., Williams, D.E., and 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
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
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
Ma, L., Shima, M., Yoda, Y., Yamamoto, H., Nakai, S., Tamura, K., Nitta, H., Watanabe, H., Nishimuta, T.	Airborne particulate matter and respiratory morbidity in asthmatic children	J. Epidemiol.	18	97-110	2008
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
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
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
Inoue K, Takano H, Koike E, Yanagisawa R, Sakurai M, Tasaka S, Ishizaka A, Shimada A	Effects of pulmonary exposure to carbon nanotubes on lung and systemic inflammation with coagulatory disturbance induced by lipopolysaccharide in mice	Exp Biol Med	233	1583-1590	2008
Inoue K, Takano H.	Size effects of nanomaterials on lung	Int J	21	197-206	2008



Ohnuki M, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Mizushima K, Yoshikawa T.	inflammation and coagulatory disturbance	Immunopathol Pharmacol			
Koike E, <u>Takano H</u> , Inoue K, Yanagisawa R, and Kobayashi T	Carbon black nanoparticles promote maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells	Chemosphere	73	371-376	2008



## Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens

Tetsushi Watanabe<sup>a,\*</sup>, Kazuhiko Takahashi<sup>b</sup>, Erina Konishi<sup>a</sup>,  
Yuri Hoshino<sup>a</sup>, Tomohiro Hasei<sup>a</sup>, Masaharu Asanoma<sup>c</sup>,  
Teruhisa Hirayama<sup>a</sup>, Keiji Wakabayashi<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Public Health, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

<sup>b</sup> Department of Drug Metabolism and Disposition, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,  
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

<sup>c</sup> Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiyamacho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan

<sup>d</sup> Cancer Prevention Basic Research Project, National Cancer Center Research Institute,  
1-1 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Received 2 August 2007; received in revised form 3 September 2007; accepted 16 September 2007

Available online 22 September 2007

### Abstract

To clarify the mutagenic potential of surface soil in residential areas in Kyoto city, surface soil samples were collected twice or three times from 12 sites, and their organic extracts were examined by the Ames/Salmonella assay. Almost all (>92%) samples showed mutagenicity in TA98 without and with S9 mix, and 8/25 (32%) samples showed high (1000–10,000 revertants/g of soil) or extreme (>10,000 revertants/g of soil) activity. Moreover, to identify the major mutagens in surface soil in Kyoto, a soil sample was collected at a site where soil contamination with mutagens was severe and continual. The soil extract, which showed potent mutagenicity in TA98 without S9 mix, was fractionated by diverse column chromatography methods. Five major mutagenic constituents were isolated and identified to be 1,6-dinitropyrene (DNP), 1,8-DNP, 1,3,6-trinitropyrene (TNP), 3,9-dinitrofluoranthene (DNF), and 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene (DNBeP) by co-chromatography using high performance liquid chromatography and spectral analysis. Contribution ratios of 1,6-DNP, 1,8-DNP, 1,3,6-TNP, 3,9-DNF, and 3,6-DNBeP to total mutagenicity of the soil extract in TA98 without S9 mix were 3, 10, 10, 10, and 6%, respectively. These nitroarenes were detected in surface soil samples collected from four different residential sites in other prefectures, and their contribution ratios to soil mutagenicity were from 0.7 to 22%. These results suggest that surface soil in residential areas in Kyoto was widely contaminated with mutagens and there were some sites where surface soils were heavily polluted. 1,6-DNP, 1,8-DNP, 1,3,6-TNP, 3,9-DNF, and 3,6-DNBeP may be major mutagenic constituents that contaminate surface soil in Kyoto and other residential areas.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Surface soil; Mutagenicity; 1,6-Dinitropyrene; 1,8-Dinitropyrene; 1,3,6-Trinitropyrene; 3,9-Dinitrofluoranthene; 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene

### 1. Introduction

Diverse mutagenic/carcinogenic compounds have been released into ambient air from anthropogenic sources such as industrial power plants [1,2], furnaces

\* Corresponding author. Tel.: +81 75 595 4650;  
fax: +81 75 595 4769.

E-mail address: [watanabe@mb.kyoto-phu.ac.jp](mailto:watanabe@mb.kyoto-phu.ac.jp) (T. Watanabe).

for metal smelting [3,4], municipal incinerators [5], and engines of motor vehicles [6–8]. Epidemiological studies have shown that air pollution tends to be associated with the incidence of lung cancer [9–15]. Compounds released into air eventually deposit on the ground and can be accumulated in surface soil; therefore, surface soil is thought to be a promising material for monitoring environmental pollution with mutagens and carcinogens. Indeed, many studies showed that organic extracts of soils from roadsides [16–19], parks [19,20], agricultural land [21–23], residential sites [24,25], and so forth exhibited mutagenicity and/or DNA damaging activity. In a review of published data on the mutagenicity of soil, White et al. [26] divided the compiled data on *Salmonella* mutagenic potencies into three site categories, i.e. rural/agricultural, urban/suburban, and industrial, and compared their geometric mean values. Analysis of variance revealed a significant relationship between site category and mutagenic potency in TA98 and TA100 with and without the mammalian metabolic system (S9 mix). The geometric mean mutagenicity values of urban/suburban and industrial sites were higher than those of rural/agricultural sites.

In previous studies [27,28], we found that surface soils in five geographically different regions of Japan, i.e. Hokkaido, Kanto, Chubu, Kinki, and Kyushu regions, were largely polluted with mutagens and that organic extracts of soil samples from some sites showed remarkably high potency in TA98 without S9 mix. Moreover, mutagenic potencies of soil samples from three metropolises of Japan, i.e. Tokyo, Nagoya, and Osaka, and their environs, in TA98 without S9 mix were significantly correlated with the amount of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene (DNP) isomers. These DNP isomers are among the most potent bacterial mutagens identified so far in the literature [29] and are carcinogenic in mice [30] and rats [31]. The mean value of the total percent contributions of these DNP isomers to soil mutagenicity was about 25% [25,26]. Recently, a potent mutagen was isolated from a highly mutagenic surface soil sample, which was collected in Takatsuki in Osaka prefecture in May 2002, and was determined to be 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene (DNBeP) [32]. 3,6-DNBeP is a novel chemical, and its mutagenic activity was comparable to that of DNP isomers. The contribution ratio of 3,6-DNBeP to the total mutagenicity of the soil extract was 15%.

Kyoto is Japan's seventh largest city, with a population of about 1.5 million, and one of the cities in the Hanshin Industrial Region. Electronics is a sizable heavy industry in the city. Kyoto is one of the most historic

places in Japan, and tourism is a large base of Kyoto's economy. More than 40 million tourists visit Kyoto every year. Kyoto is an inland city and is surrounded on three sides, i.e. north, east, and west, by mountains. In a previous study [25], a few soil samples were randomly collected from a residential area in Kyoto city between February 1999 and November 2000, and one of the samples showed potent activity in TA98 with and without S9 mix. Although these results suggest that surface soil in Kyoto might be highly contaminated with mutagens, comprehensive assessment of the mutagenicity levels of surface soil in Kyoto has not been performed. In this study, to clarify the contamination levels of surface soil in residential areas in Kyoto city with mutagens, surface soil samples were collected twice or three times from 12 sites, and their organic extracts were examined for mutagenicity by the Ames/*Salmonella* assay. Moreover, to reveal the chemical structures of major mutagenic constituents, a large amount of a surface soil sample was collected from a site where soil contamination with mutagens was severe and persistent, and its organic extract was fractionated by diverse column chromatography methods. Five chemicals, which accounted for 39% of the mutagenicity of the soil extract in total, were identified. The distribution of these mutagens was also investigated in other highly mutagenic surface soil samples collected from four different residential sites in other prefectures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

1,6-DNP (CAS 42397-64-8) and 1,8-DNP (CAS 42397-65-9) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 3,9-Dinitrofluoranthene (DNF) (CAS 22506-53-2), 1,3,6-trinitropyrene (TNP) (CAS 75321-19-6), and 3,6-DNBeP (CAS 847862-64-0) were synthesized by methods described previously [32–34]. High performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile and methanol were purchased from Nacal Tesque Inc. (Kyoto, Japan). All other chemicals were of analytical grade.

### 2.2. Collection of surface soil in Kyoto prefecture and preparation of organic extracts

Sample collection and preparation of organic extracts were performed by the method described previously [27]. Soil samples were collected from parks in residential areas of Kyoto and Mukomachi cities in Kyoto prefecture between December 2003 and January 2006. The locations of the sampling sites are shown in Fig. 1. At each sampling site, soil samples were collected twice or three times. Soil from the surface of the ground to about 10 cm deep was dug up, mixed thoroughly, and

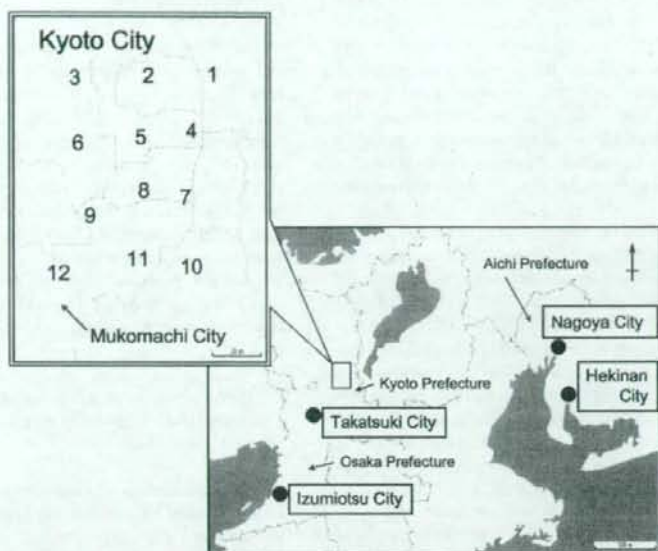


Fig. 1. Geographic locations of the sampling sites in Kyoto, Aichi, and Osaka Prefectures, Japan.

collected. After 2 days' drying at room temperature, soils were screened through a 60-mesh sieve. The sieved soil (15 g) was extracted twice with methanol using an ultrasonic apparatus (185 W) for 10 min. The extracts were combined, filtered, and evaporated to dryness for the mutagenicity test.

### 2.3. Isolation of mutagens in surface soil from Kyoto

For isolation of mutagens in surface soil from Kyoto, an organic extract was prepared from soil, which was collected at site No. 9 (Minami Ward 1) in April 2005, with Soxhlet apparatus and fractionated with a Sephadex LH-20 column, a silica gel column, and an Ultra pack ODS column as described previously [32]. In brief, soil extracts were applied to the Sephadex LH-20 column (27 mm  $\times$  800 mm) and eluted with chloroform/methanol (1:1). An aliquot of each 15 ml fraction was tested for mutagenicity. Mutagenic fractions, which were eluted at elution volumes of 240–330 ml, were combined and evaporated. The residue was applied to a silica gel column (11 mm  $\times$  300 mm) for low-pressure liquid chromatography (LPLC) and eluted with *n*-hexane, *n*-hexane/toluene, toluene, chloroform, and methanol. Aliquots of 15 ml were collected, and mutagenic fractions with elution volumes of 630–750 ml were combined and evaporated. The residue was applied to the Ultra pack ODS column (11 mm  $\times$  300 mm, Yamazen Corp., Osaka, Japan) and eluted with acetonitrile/water. Aliquots 6 ml were collected. Fractions

at elution volumes of 18–96 ml and 156–198 ml were designated Fr. A and Fr. B, respectively, and evaporated to dryness.

Fr. A was dissolved in 50% tetrahydrofuran and applied to a COSMOSIL 5C<sub>18</sub> AR-II column (10 mm  $\times$  250 mm, Nacalai Tesque Inc.) for HPLC. The materials were eluted with a gradient system of methanol in distilled water: 0–60 min, 75%; 60–70 min, a linear gradient of 75–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 ml/min. Aliquots of 3 ml were collected. Fractions with retention times of 33–37 and 44–48 min were designated Fr. A-1 and Fr. A-2, respectively, and evaporated. Fr. A-1, dissolved in 45% tetrahydrofuran, was applied to a Luna 5  $\mu$  Phenyl-Hexyl column (10 mm  $\times$  250 mm, Phenomenex, Torrance, CA) for HPLC and then eluted with the following gradient system of acetonitrile in distilled water: 0–60 min, 60%; 60–70 min, a linear gradient of 60–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 ml/min. Aliquots of 3 ml were collected, and fractions with retention times at 27–29 and 36–38 min were designated Fr. A-1-1 and Fr. A-1-2, respectively, and evaporated. Fr. A-1-1 and Fr. A-1-2 were separately dissolved in 45% tetrahydrofuran and applied to an Inertsil ODS-EP column (4.6 mm  $\times$  250 mm, GL Science Inc., Tokyo, Japan) for HPLC and then eluted with the following gradient system of acetonitrile in distilled water: 0–60 min, 60%; 60–70 min, a linear gradient of 60–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 0.7 ml/min. Fractions of 0.7 ml were collected. Two mutagenic compounds (compounds I and II) were isolated from Fr. A-1-1 as follows: compound I at a retention time of 40 min