

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 斉

平成21（2009）年4月

目次

I. 総括研究報告	
疾患モデル動物を用いた環境発がんの初期発生過程及び感受性要因の 解明とその臨床応用に関する研究	1
中釜 斉	
II. 分担研究報告	
1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性および修飾要因の解明	23
中釜 斉	
2. ポリ ADP-リボシル化の発がんにおける意義の解明と その臨床応用に関する研究	29
益谷 美都子	
3. リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測	33
木南 凌	
4. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明	38
大島 正伸	
5. 遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究	42
庫本 高志	
6. コンソミックマウスを用いた DSS/PhIP 大腸発がんの研究	44
杉江 茂幸	
7. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明	48
中島 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	52
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

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

主任研究者 中釜 齊 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

疾患モデル動物を用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構やがんの進展に関わる環境及び遺伝的修飾要因や発がん感受性要因の解明に相補的かつ不可欠な役割を担っている。PhIPにより誘発されるラット大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、感受性の異なる系統間で発現量の異なる候補遺伝子Xを同定した。遺伝子Xの解析により、3'側非翻訳領域に存在する多型がmRNAの発現及び翻訳制御に寄与している可能性が示唆された。翻訳抑制因子のSND1と、増殖抑制作用を有するmicroRNA(miR-34a)を介する翻訳制御機構の機能破綻が、大腸発がんの発生・成立に重要な役割を果たすことが示唆された。コンソミックマウスの解析より、B6-2C57MSMは、B6-2TMSMと比べてPhIP誘発DSS併用大腸発がんにおいて高感受性であり、雌がより高感受性である傾向と推定された。ヒト下部大腸に認められるdysplastic ACFの個数はAMPKの活性化薬であるmetforminにより減少する傾向を示し、アディポネクチンの標的分子であるAMPKが大腸発がんに寄与することが示唆された。Apc遺伝子に変異を導入したKyoto Apc delta (KAD) ラット(F344-Apc^d²⁵⁰⁰)は、AOM誘発DSS併用大腸発がんにおいて短期間で大腸腫瘍を形成し、抗がん剤開発などのモデルラットとして有用であると考えられた。WntシグナルとCOX-2/PGE₂経路を同時に活性化させた胃がん発生マウスモデルでは、マウス胃がんの遺伝子発現プロファイルがヒト胃がんに極めて類似していた。さらに、感染により活性化されたマクロファージや炎症性プロスタグランジンPGE₂によるEP4を介したシグナルが胃がん発生に重要であることが示された。放射線誘発リンパ腫モデルでは、がん感受性遺伝子座を4Mb領域内まで限定した。リンパ腫抑制遺伝子*Bcl11b*は、前リンパ腫細胞においてアリル消失が、またヒト大腸がんにおいて変異が認められ、ハプロ不全型のがん抑制遺伝子として働くことが示唆された。Parg-1欠損細胞においてH19-Igf2 imprinting制御領域におけるDNAメチル化レベルの低下と遺伝子発現亢進が認められ、エピジェネティック異常を介してがん化に関わる可能性が示唆された。Pargの機能欠損はES細胞の造腫瘍能に抑制的に働いた。

分担研究者

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

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

A. 研究目的

本研究では、消化器発がんを中心としたが

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

B. 研究方法

(1) 大腸発がん感受性候補遺伝子 X の多型解析:

高感受性系統 F344 及び低感受性系統 ACI 間で遺伝子発現量に差を認めた遺伝子 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' 側の非翻訳領域に関して全塩基配列を決定した。F344 及び ACI 系統間で多型が認められた領域に関しては、aberrant crypt foci (ACF) 誘発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。

(2) 大腸発がん感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR における多型が mRNA の翻訳制御に及ぼす影響の解析:

F344 もしくは ACI の感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイを行い、遺伝子 X の 3'-UTR が mRNA の翻訳制御に及ぼす影響を解析した。

(3) ACI ラット由来の大腸発がん感受性候補遺伝子 X を含む流域を導入した BAC transgenic ラットの作成:

F344 及び ACI ラットの DNA から BAC

library を作成し (ジェノテックス社)、ACI ラットの library から遺伝子 X を含む BAC クローンを選抜した。BAC construct から Not I digestion により遺伝子 X 含む領域 (約 80 kb) の断片を精製し、F344 ラットの受精卵に導入後、F344 ラットに移植した。得られた産子について、BAC transgene の有無をサザンブロット法により判定した。得られた founder を F344 ラットと交配させて、遺伝子 X 含む領域の次世代への伝播を調べた。

(4) 翻訳制御因子 SND1 と相互作用する miRNA 分子の検索 (スクリーニング):

SND1 は、RNA 干渉のエフェクター複合体である RNA-induced silencing complex (RISC) の構成因子の一つである。HCT 116 大腸がん細胞株へ、HA-タグを組み込んだリコンビナント SND1 (HA-SND1) を導入し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、SND1 と相互作用する miRNA 及び mRNA を免疫沈降産物より精製した。精製した RNA を Cy3 でラベルし、miRNA マイクロアレイを用いて、SND1 と相互作用している miRNA を網羅的に解析した。

(5) ストレス応答性 microRNA (miR-34a) の標的遺伝子の同定:

HCT 116 及び p53 ノックアウト HCT 116 細胞株へ、miR-34a とともに p53 応答配列を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し、miR-34a による p53 依存的転写活性化をルシフェラーゼの発現を指標として解析した。HCT 116 細胞へ、miR-34a を導入し 3 日間培養し、イムノブロット解析の試料を調製した。p53 のリン酸化に関しては、Ser15 及び 46 の特異的抗体を用いて検出を行った。また、アセチル化は K382 のアセチル化特異抗体を用いて検出した。

miR-34a と相互作用する細胞内 mRNA を同

定・解析するため、affinity based pull-down 法を樹立した。3' 末端をビオチン標識し、2 本鎖とした miR-34a を HCT 116 細胞へ導入し、24 時間培養後、細胞を回収した。細胞を溶解したのちに、ビオチン化 miR-34a と相互作用する mRNA 及びタンパク質を、アビジンビーズを用いて精製した。精製した RNA を鋳型として、miR-34a の標的候補 mRNA を RT-PCR 法で増幅し、電気泳動により確認を行った。

(6) B6-MSM コンソミックマウスを用いた DSS/PhIP 大腸発がんの研究:

雌雄コンソミックマウス 2番C (2C) 及び 2番T (2T) 及び C57BL/6J (WT) を各 4 群に分け、第 1 群に PhIP 200mg/kg 体重胃内強制投与し、1 週間後から 5 日間 1.5% DSS を飲水投与し、PhIP 投与後 4 週間後、同処置を再度繰り返した。第 2 群には、PhIP 2 回投与のみ、第 3 群には、DSS 2 回投与のみ、第 4 群は、無処置群とした。実験開始 20 週間後実験終了し、安楽死ののち、剖検した。

(7) 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明:

APC^{Min/+} マウスおよびアゾキシメタン誘発腸炎モデルマウスに対し metformin を投与し、ACF やポリープ形成に対する作用を解析した。拡大内視鏡を用い ACF の数を大腸発がんのサロゲートマーカーとし、AMPK 活性化薬 (metformin) を用いた化学発がん予防の研究を行う。metformin をヒトに対し 1 ヶ月内服後の ACF の数の変化を解析した。

(8) Kyoto Apc Delta (KAD) ラットを用いた抗がん剤開発のための薬効評価系の開発:

5 週齢の雄 KAD ラットに AOM (20mg/kg, bw) を皮下投与した。その 1 週間後から 2% DSS を 1 週間飲水投与した。各動物は、毎週 1 回、体重測定と肛門部の観察をおこなった。AOM 投与 15 週後に安楽死処置後、大腸を摘出し、大

腸管腔内の腫瘍の発生の有無、個数を記録した。大腸はホルマリン固定後、病理検査した。AOM 投与 8 週間後より、毎週 1 回、大腸内腔をヒト気管支内視鏡 (オリンパス社 OTV-S7V) を用いて観察した。その際、腫瘍の位置と個数を記録した。

(9) 胃がん組織における遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析:

30 週齢の野生型マウス及び

K19-Wnt1/C2mE マウスそれぞれ 3 匹から、正常胃組織および胃がん組織を採取して RNA を抽出し、Affymetrix Gene Chip (Mouse Genome 430 2.0 array) にて遺伝子発現プロファイルを解析した。また、野生型マウスに比較して発現変化の認められる遺伝子について、ヒト胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、腎臓がんの各遺伝子発現プロファイルと比較解析した。

(10) 胃がん細胞での Wnt シグナル強度の解析:

Wnt シグナルにより転写が活性化するように、TCF 結合 DNA 配列を含むミニマムプロモーターに EGFP 遺伝子をつなげたレポーター発現ベクター (TOPEGFP) を、胃がん細胞 Kato-III および AGS に導入し、Wnt シグナル強度を GFP 蛍光により測定できる細胞株を作製した。この細胞を、LPS で活性化させたマクロファージ (RAW264) の培養上清や IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインで刺激し、Flow cytometry により Wnt シグナル強度の変動を解析した。

(11) 腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析:

K19-Wnt1 マウスの前がん病変でのマクロファージ浸潤を免疫組織学的に解析した。また、マクロファージ欠損マウス (op/op) を *Apc^{Δ716}* マウスと交配させて複合変異マウ

スを作製して15週齢で病理解剖し、腸管ポリープの発生数と大きさを計測し、マクロファージ欠損による腸管ポリープ発生への影響を解析した。

(12) 感染刺激による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1 マウスは、胃粘膜で Wnt シグナルは活性化しているが、 PGE_2 を産生してないために胃がんを発生しない。そこで、*K19-Wnt1* マウス (6週齢) に、*H. pylori* の類縁菌である *H. felis* を感染させて8週間、20週間後に病理解剖し、マクロファージ浸潤および上皮細胞の Wnt シグナル亢進の有無について免疫組織学的に解析した。また、腫瘍病変の有無についても解析した。

(13) 無菌化による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウス胎仔を無菌的に帝王切開して摘出し、ビニールアイソレーター内の無菌環境で飼育した。無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスは30週齢で病理解剖し、発生する胃がんの大きさを一般 SPF で飼育した対照群マウスと比較解析した。

(14) EP4 阻害薬の胃がん発生への影響の解析:

45週齢の *K19-Wnt1/C2mE* マウスに PGE_2 受容体の EP4 に対する阻害薬を3週間連続投与した。各個体の胃がんの大きさを、薬物投与前と後に X 線 CT で検査し、撮影画像から比較解析した。

(15) コンジェニックマウスを用いた胸腺リンパ腫感受性遺伝子座の解析:

5番染色体 BALB/c コンジェニックマウスを BALB/c と交配し、新しく2系統 (J1 と J2) を作製した。J1-line は 98.11Mb - 112.32Mb 領域が MSM と置換、J2-line は 98.11Mb - 104.59Mb 領域を MSM と置換されていた。これ

ら J1 と J2 コンジェニックマウスを MSM マウスと自然交配、または IVF・ET (in vitro fertilization・embryo transfer) して得られた F1 マウス群を用いた。生後4週目より週に1度、2.5Gy の γ 線照射を計4回行い、萎縮胸腺および胸腺リンパ腫を誘発した。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸の出現で判定した。

(16) 放射線照射後の胸腺細胞の解析:

胸腺細胞分化マーカーである CD4、CD8 の FACS による発現測定には一般的な方法に従った。細胞周期の測定は、マウス腹腔に BrdU 投与して1時間後、胸腺細胞を取り出し FACS により測定した。さらに、細胞の大きさを FACS で測定し、非照射正常胸腺の G1 期分画の中型細胞が約 5% とする基準で、萎縮胸腺の中型細胞の割合を測定した。胸腺細胞の V(D)J 組換え型を決定するため、D1 領域と D2 領域の 5' 側にそれぞれ F-primers を設定し、一方 J1 領域と J2 領域の 3' 側にそれぞれ R-primers を設定し、PCR 反応を行った。PCR 産物の分離、解析にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

(17) 大腸がん候補遺伝子 *Bcl11b/Rit1* の腸管腫瘍発生への影響の検討:

遺伝子型の決定および野生型アレル消失を判定する目的で、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。ウエスタンブロット解析及び、ヒトおよびマウスの大腸、小腸の免疫組織学的解析は、通常の解析法を用いた。

(18) *Parp-1* による、ES 細胞のトロホブラスト系譜誘導の機構の解析:

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (*Parp-1*) は、クロマチン構造変化を介した転写調節に機能する。*Parp-1* 欠損 (*Parp-1^{-/-}*) マウス ES 細胞をヌードマウス

皮下に移植後、テラトーマ形成時にトロホブラスト系譜への分化が亢進し、trophoblast giant cell が高頻度に出現する。*Parp-1* 欠損下でのトロホブラスト系譜誘導の機構を検討した。

(19) PARP 阻害剤の細胞増殖抑制効果の検討：

5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)はDNAメチル基転移酵素を阻害すると共にDNA複製ブロックや1本鎖DNA切断を誘導し、骨髄異形成症候群の治療に用いられている。ヒト大腸がん細胞株における、PARP 阻害剤の単剤処理、あるいは5-aza-dC との併用処理による細胞増殖抑制効果について検討した。

(20) DNA 損傷に対する *Parp-1* 機能阻害の影響の解析：

ガンマ線によるDNA損傷に対する *Parp-1* 機能阻害の影響を明らかにするため、*Parp-1* 欠損マウスの肝臓及び脳におけるガンマ線照射後の突然変異の頻度について検討した。*gpt delta* マウスと *Parp-1* 欠損マウスの交配体を作成し、ガンマ線 8 Gy の全身照射を行い3日後、肝臓及び脳よりゲノムDNAを調製し、*red/gam* 遺伝子における変異頻度とスペクトラムを解析した。

(21) *Parg* の造腫瘍過程における解析：

マウスのES細胞は全分化能を示し腫瘍形成能を有する。*Parg* の発がんへの関与を調べるためにマウスの皮下に野生型ES細胞または *Parg* 欠損ES細胞を移植し造腫瘍過程を解析した。

(22) *Parp-9* 遺伝子発現の解析：

Parp-9 遺伝子発現制御領域の構造とマウス組織における発現解析を行った。*Parp-9* 遺伝子領域をNCBIデータベースから検索し、遺伝子発現制御領域については、検索ソフトウェア TFBIND を用いて調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各大学や研究機関の定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用い、動物実験に関する倫理審査委員会で承認を得た上で実施した。ヒト試料を用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。内視鏡検査は横浜市立大学附属病院の定める規約を遵守し、検査による苦痛には十分な配慮を払った。*metformin* 投与は十分にその有用性、危険性を説明し同意の得られた場合のみ投与を行った。問診、採血、腹部CT検査については、その有用性と危険性を説明し、同意の得られた場合にのみ行った。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん感受性候補遺伝子 X の多型解析：

大腸発がん感受性候補遺伝子 X についての多型解析の結果、プロモーター領域、コーディング領域の最終エクソン以外では、F344 及び ACI 系統間で遺伝子配列の違いを無かった。最終エクソンの 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15箇所の多型を認めた。15箇所のうち11箇所は塩基置換型の多型であったが、3箇所は各々1, 2, 4塩基の欠失型多型、もう1カ所は2塩基挿入型の多型であった(いずれもF344系統での多型)。ACF誘発性の異なる16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、この領域がハプロタイプブロックを形成していることが示唆された。PhIP 400 ppm含有飼料の2週間投与+高脂肪食4週間投与によるACFの誘発数が5個以上を示した高

感受性系統は、全て F344 型の多型を示し、この 3'-UTR の多型が ACF 誘発性と関連する可能性が示唆された。

(2) 大腸発がん感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR が mRNA の翻訳制御に及ぼす影響の解析:

F344 もしくは ACI の感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。ACI 由来の遺伝子 X の 3'-UTR の一部の配列を組み込んだ場合の方が、F344 由来の配列を組み込んだ場合よりも蛍光強度が約 2 倍に増強し、遺伝子 X の 3'-UTR の多型が、mRNA の翻訳制御に関与している可能性が示唆された。

(3) ACI ラット由来の大腸発がん感受性候補遺伝子 X を含むゲノム領域を導入した BAC transgenic ラットの作成:

ACI ラット由来の BAC ライブラリーより、遺伝子 X を含む BAC クローンを 2 個選抜し、遺伝子 X 周囲の配列をより多く含む construct を用いて BAC transgenic ラットを作成した。

遺伝子 X を含む領域の DNA 断片を F344 ラットの受精卵に導入後、F344 ラットに計 307 個の胚を移植した。得られた 43 匹の離乳仔のうち、BAC transgene が 9 匹に確認された。1 匹は死亡したが、♂4 匹、♀4 匹の founder が得られ、transgene のコピー数は概ね 1, 3, 10, 30 コピーで、各々 2, 4, 1, 1 匹であった。次世代への伝播が 4 系統で確認され、transgene のコピー数が約 1, 3 個のものが各 1 系統、約 30 コピーが 2 系統であった。

(4) 翻訳制御因子 SND 1 と相互作用する miRNA のスクリーニング:

ヒト大腸がん検体では、SND1 の発現亢進が高頻度に検出される。興味深いことに、大腸化学発がん物質によりラット大腸に誘発される早期病変においても、 β -カテニンの蓄積に先んじて発現上昇を示す。SND1 は PhIP など

の化学発がん物質による細胞傷害後、速やかに大腸上皮細胞で、mRNA 及びタンパク質レベルで発現亢進することを明らかにした

(オレゴン大学・Dashwood 博士との共同研究)。HA タグを導入したリコンビナント SND1 (HA-SND1) を用いて、免疫沈降法により SND1 と相互作用する RNA を精製し、miRNA マイクロアレイにより、SND1 と相互作用している miRNA 分子を網羅的に解析した。その結果、SND1 は、肺がんのがん抑制的 miRNA である Let-7 や、miR-630 などと選択的に相互作用していることが判明した。

(5) miR-34a の標的遺伝子の同定:

miR-34a は、HCT116 細胞を細胞傷害性ストレスの一つであるアドリアマイシン (ADR) で処理した際に、p53 依存的に発現が誘導される microRNA として同定されたが、miR-34a により p53 の活性化が生じている可能性が示された。miR-34a による p53 活性化の分子機構を解析するため、p53-responsible elements を含む luciferase reporter 遺伝子を用いて、miR-34a により p53 が活性化されることを確認した。この活性化は、miR-34a の導入後に、p53 の lysine 382 (K382) のアセチル化が誘導され、アセチル化体の核への移行に起因すると考えられた。

miR-34a による p53K382 のアセチル化は、trichostatin A [class I & II histone deacetylase (HDAC) inhibitor] により変化しないことから class III HDAC の関与が示唆された。class III HDAC である SIRT family の中でも、SIRT1 は p53K382 の脱アセチル化酵素であると報告されているが、miR-34a により誘導される p53 の活性化は、SIRT1 の過剰発現により阻害された。プルダウンアッセイにより SIRT1 mRNA が miR-34a と特異的に相互作用し、miR-34a の標的になっていることが示唆された。SIRT1 遺伝子の

3'-UTRを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにおいても、SIRT1がmiR-34aの標的であることが確認された。

(6) B6-2C57BL/6J コンソミックマウスを用いた DSS/PhIP 大腸発がんの研究:

体重は、コンソミックマウス 2C に高い傾向を認め、2T に比し、2C は、肥満傾向にあった。大腸に過形成、腫瘍が発見された。各群の大腸腺腫、腺がん、全腫瘍の発生率、平均個数は、2T 雄 PhIP-DSS 群 2/10 (0.50±1.27)、1/10 (0.10±0.32)、3/10 (0.60±1.26)、2T 雄 PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。2T 雌 PhIP-DSS 群、PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。2C 雄 PhIP-DSS 群 5/14 (0.50±0.85)、7/14 (1.36±1.55)、8/14 (1.86±1.92)、2C 雄 PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。2C 雌 PhIP-DSS 群 3/13 (0.23±0.44)、10/13 (2.54±2.50)、10/13 (2.77±2.55)、2C 雄 PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。WT 雄 PhIP-DSS 群 1/12 (0.08±0.29)、2/12 (0.17±0.39)、2/12 (0.25±0.62)、WT 雄 PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。WT 雌 PhIP-DSS 群 1/12 (0.08±0.28)、4/12 (0.75±1.23)、4/12 (0.83±1.40)、WT 雌 PhIP 群、DSS 群、陰性対照群には腫瘍の発生を見なかった。であった。2C 雌が最も腫瘍発生が効率であった。血清総コレステロール値は、2T 雄 85.77±31.87、2C 雄 119.68±17.61、WT 雄 187.31±25.39。トリグリセリド値は、2T 雌 49.71±36.96、2C 雌 96.47±33.10、WT 雌 41.01±7.51 と 2C に高い傾向を認めた。

(7) 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明:

APC^{Min/+}マウスを用いた検討では通常食に比し高脂肪食群においてACFならびにポリープ形成が増加しこれに対しmetforminは細胞増殖抑制作用を有することがBrdU index, PCNAの解析

により明らかとなった。メカニズムとしてAMPKを活性化させmTOR経路への作用が示唆された。アゾキシメタン誘発腸炎モデルマウスにおいても同様の結果が得られた。ヒトACFの数を大腸発がんのサロゲートマーカーとしたmetforminのパイロットスタディーは現在進行中であるが、ACFを減少させる傾向にある。

(8) KAD ラットを用いた抗がん剤開発のための薬効評価系の開発:

大腸腫瘍誘発試験において、KAD ラットで100% (6/6 頭)、対照群で83% (5/6 頭)に大腸腫瘍を検出した。剖検時の1頭当たりの腫瘍数はKAD ラットの方が有意に多く (9.5 ± 0.7 個 vs 1.3 ± 0.3 個、p<0.001)、腫瘍1個当たりの体積もKAD ラットの方が有意に大きかった (33.9 ± 9.4 mm³ vs 10.3 ± 5.6 mm³、p<0.003)。また、KAD ラットの腫瘍では、βカテニン遺伝子の変異とβカテニンの核内移行が認められた。内視鏡による観察では、AOM 投与8週後において、すでに1頭当たり3.3 ± 0.5個の腫瘍を認め、11週後で5.8 ± 0.9個、14週後で17.3 ± 1.8個と、腫瘍数の増加とサイズの増大を経時的に観察することができた。

(9) 胃がん組織における遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析:

K19-Wnt1/C2mEマウス胃がん組織では、予想通りにCD44やEphrinB3などのWnt標的遺伝子の発現誘導が観察された他、Wnt以外の複数のシグナル経路の活性化も認められた。野生型マウスと比較して発現変化を認めた3000個前後の遺伝子発現プロファイルを、ヒトの各臓器由来がん組織と比較解析した結果、ヒトの大腸がんや胃がんに近い事が明らかとなり、とくにヒト胃がん組織と類似した発現プロファイルを示していた。ヒト乳がん、肺がん、腎臓がんとの類似性は低かった。したがって、

K19-Wnt1/C2mE マウスは分子発生機序、組織病理像および遺伝子発現プロファイルの各観点から、ヒト胃癌を外挿したモデルマウスであることが確認された。

(10) 胃癌細胞での Wnt シグナル強度の解析:

TOPEGFP ベクターの導入により、GFP 蛍光強度で Wnt 活性を Flow cytometry で測定できる 2 種類の胃癌細胞株、AGS-GFP と Kato-III-GFP を作製した。48 時間のタイムラプス観察により、遺伝子変異によりすでに Wnt シグナルが恒常的に活性化されたこれらの胃癌細胞でも、Wnt シグナル強度が変動していることを初めて動画撮影により明らかにした。これらの細胞を、LPS 刺激により活性化させた RAW264 マクロファージ細胞の培養上清で刺激すると、Wnt シグナル強度がさらに強くなった。この作用は、TNF- α 中和抗体の処理により阻害された。さらに、AGS-GFP と Kato-III-GFP 細胞を炎症性サイトカインで直接刺激すると、TNF- α に反応して濃度依存的に Wnt シグナルが亢進した。一方、IL-1 β や IL-6 には Wnt シグナル亢進作用は認められなかった。以上の結果から、活性化マクロファージ由来の TNF- α が胃癌細胞の Wnt シグナルを亢進して、腫瘍発生に作用している可能性が考えられた。

(11) 腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析:

K19-Wnt1 マウスの胃では PGE₂ を産生していないために胃癌が発生しないが、散発性に前がん病変を発生する。免疫組織学的解析の結果、前がん病変を構成する上皮細胞では β -catenin の細胞内蓄積が強くなっており、Wnt シグナルが亢進していた。また、前がん病変の胃粘膜には著しいマクロファージ浸潤が認められた。*Apc^{Δ716}* マウスでは、*Apc* 遺伝子欠損による Wnt シグナル亢進に起因して腸管ポリープを自然発生し、腫瘍組織間質にはマクロファージ浸潤が認められる。op/op マウス

との交配によりマクロファージを欠損した *Apc^{Δ716}* マウスを作製すると、腸ポリープの発生数に大きな変化は観察されなかったが、腫瘍サイズの顕著な減少が認められた。したがって、腫瘍組織へのマクロファージ浸潤は、腫瘍細胞の増殖に重要であると考えられた。

(12) 感染刺激による胃癌発生への影響の解析:

H. felis を経口的に感染させて 8 週間経過後の *K19-Wnt1* マウス胃粘膜では、感染が成立して炎症を起こしている領域が認められた。免疫組織解析の結果、炎症領域では粘膜へのマクロファージ浸潤とその活性化および胃上皮細胞での β -catenin 蓄積をともなう Wnt シグナル亢進が認められた。一方、非炎症領域では細胞浸潤は観察されず、 β -catenin の弱い染色が腺管頸部増殖帯の正常未分化上皮細胞だけで確認された。したがって、感染による炎症反応が胃上皮細胞の Wnt シグナルを亢進させることが明らかになった。また、感染 20 週間経過後に病理解剖すると、胃粘膜全体で炎症反応が認められ、病理組織学的にも異形成をともなう上皮細胞から構成される腫瘍性病変が認められた。以上の結果から、*Helicobacter* 感染に対する炎症反応により粘膜に浸潤したマクロファージは、周囲の胃上皮細胞の Wnt シグナルを亢進させる事で、腫瘍発生促進に作用する可能性が考えられた。

(13) 無菌化による胃癌発生への影響の解析:

感染刺激による腫瘍発生への影響を解明するために、無菌化した *K19-Wnt1/C2mE* マウスをビニールアイソレーターで飼育し、30 週齢で病理解剖を施した。その結果、SPF で飼育した対照群のマウス胃癌組織では、粘膜下細胞浸潤をともなう炎症反応が観察

されるが、無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃粘膜では炎症細胞浸潤を認めなかった。real-time RT-PCR による解析でも、SPF で飼育した *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がんでは、TNF- α 遺伝子の強い発現誘導が認められたのに対して、無菌化した *K19-Wnt1/C2mE* マウス胃粘膜での TNF- α 発現は、野生型マウスと同レベルまで低下していた。したがって、PGE₂ 産生誘導だけでは胃がん発生に重要な炎症反応は惹起されず、PGE₂ シグナルと感染刺激の相互作用が炎症反応の誘導に必要であると考えられた。

(14) EP4 阻害薬の胃がん発生への影響の解析:

PGE₂ には EP1~EP4 の 4 種類の G 蛋白共役型受容体が知られており、これまでに EP2 および EP4 を介したシグナルが腫瘍発生に関与している可能性が報告されている。real-time RT-PCR 解析により、*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織では EP4 の発現が上昇していた。これまでの EP4 阻害薬投与実験により、EP4 阻害による胃がん組織の縮小傾向を認めている。

(15) コンジェニックマウスを用いた胸腺リンパ腫感受性遺伝子座の解析:

昨年度までの 4 種類のコンジェニックマウスを用いた発がん実験により、リンパ腫感受性遺伝子座の候補領域を 104.47Mb から 116.12Mb にまで限定した。今回、さらに Line-J1 (98.11Mb-112.32Mb) 系統と Line-J2 (98.11Mb-104.59Mb) 系統のコンジェニックマウスを作製し、前回と同様に γ 線照射による胸腺リンパ腫の発がん実験を行った所、感受性遺伝子候補領域は 5 番染色体上の約 4Mb (112.32Mb-116.12Mb) に存在することが明らかになった。この 112.32Mb-116.12Mb 領域内に存在する遺伝子の中で、BALB/c と MSM 系統で多型のみられる遺伝子をデータベースから探索した結果、*Ssh1* (protein phosphatase Slingshot homolog 1) と *Sirt4*

(NAD-dependent deacetylase sirtuin-4) が候補遺伝子として選択された。*Ssh1* では 1042 個中 1034 番目のアミノ酸が MOLF や C57BL/6 では serine、BALB/c では asparagine になっていることが報告されているが、MSM でもこの多型が存在することを確認した。一方 *Sirt4* では 333 個中 106 番目のアミノ酸が leucine 又は終止コドンとなっている多型が報告されていたので、MSM の配列決定を行った所、この多型の存在を確認した。

(16) 放射線照射後の胸腺細胞の解析:

照射後 40 日の萎縮胸腺では 95 胸腺の内、43 がクローナル増殖を示唆する単一の DJ 組換えパターン (C type とする)、52 が正常胸腺細胞と類似の DJ 組換えパターン (T type とする) を示した。CD4、CD8 胸腺細胞分化マーカーの発現測定では C type 胸腺細胞多くの細胞がダブルポジティブ (DP) 細胞から成っており、C type 細胞は DP 段階で分化を停止し、胸腺内に留まっていることを示唆した。照射後萎縮胸腺の細胞の S 期細胞数の割合は 40 日、80 日で低下する傾向にあったが、80 日の一部では割合が高くなるものが観察された。 γ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化をウエスタン法により解析した所、すなわちリン酸化の亢進はみられず、DNA 複製ストレスおよびそのチェックポイントは働いていないと考えられた。これらの結果より、照射後萎縮胸腺の前リンパ腫細胞は、ヒト前がん組織の特徴として知られている細胞増殖亢進、DNA 複製ストレスという特色を示さないことが分かった。

(17) 大腸がん候補遺伝子 *Bcl11b/Rit1* の腸管腫瘍発生への修飾効果:

Bcl11b 抗体を用い、*Bcl11b* タンパク質のヒト大腸組織での発現細胞を観察した所、ヒト大腸の crypt 下部の細胞の核内に発現が観察され

た。マウス大腸のcrypt内での発現を検討した結果、ヒト組織と同様にcrypt下部の細胞核の染色が確認された。ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異の有無を調べた所、22 サンプル中、2つの変異を見いだした。変異の一つはエクソン4の変異で、569番目のアミノ酸・グリシンをアスパラギン酸に置換する変異で、もう一つの変異はエクソン4の655番目のアミノ酸からのフレームシフト変異であった。

(18) *Parp-1* による、ES細胞のトロホプラスト系譜誘導の機構の解析：

Leukemia inhibitory factor (LIF) 除去によるES細胞の分化誘導後、野生型に比し *Parp-1*^{-/-} 細胞において *H19* 遺伝子の発現が顕著に亢進する。*H19* 遺伝子上流の *H19-Igf2* インプリンティング調節領域 (ICR) のDNAメチル化レベルを調べたところ、野生型ES細胞では、ほぼ完全にメチル化されていたが、*Parp-1*^{-/-} ES細胞では、約20-50%程度までDNAメチル化レベルが低下していた。LIF除去による分化誘導後、CTCF結合領域周辺のDNAメチル化レベルは各細胞において未分化状態と同程度であった。

(19) PARP阻害剤の細胞増殖抑制効果の検討：
ヒト大腸がん細胞株 HCT116 において PARP 阻害剤により、5-aza-dC の細胞増殖抑制効果が増強された。PARP 阻害剤の併用により 5-aza-dC による 1 本鎖 DNA 切断や DNA ラダー形成の亢進は認めなかった。一方、両薬剤の処理により広範な遺伝子発現変化を認めた。両薬剤併用による遺伝子発現変化が細胞増殖抑制効果増強と関連する可能性が考えられる。

(20) DNA 損傷に対する *Parp-1* 機能阻害の影響の解析：

ガンマ線 8 Gy 照射 3 日後の欠失型変異体頻度は *Parp-1* 欠損マウス肝臓において野生型よりも低い傾向を示した。さらに変異のホットスポットである 4-6 塩基の単塩基配列上の

塩基欠失変異頻度が肝臓及び脳において各々低下していた ($p < 0.05$)。従って *Parp-1* 欠損下ではガンマ線誘発 DNA 損傷の修復系のうち不正確な修復経路が阻害されている可能性が考えられる。

(21) *Parp* の造腫瘍過程における解析：

Parp の発がんへの関与を調べるためにヌードマウス皮下に野生型または *Parp* 欠損 ES 細胞を移植し、造腫瘍性を比較した。移植後 2、3 週の比較的初期の段階で野生型に比較して腫瘍成長の遅延が認められた。

(22) *Parp-9* 遺伝子発現の解析：

Parp-9 遺伝子発現制御領域解析の結果、哺乳類、鳥類では *Parp-9* 遺伝子は *Dtx3l* (*Bbap*) 遺伝子に近接して存在し、ヒト、マウスでは、*Parp-9* 及び *BBAP* 両遺伝子のイントロン 1 において各々一部重複していた。マウスにおいて *PARP-9* 及び *BBAP* 両遺伝子のインターフェロン (IFN)- γ 応答性発現に寄与する IFN 応答配列及び STAT 結合配列が重複領域近傍に存在し、IFN- γ に対する応答性発現を示す可能性が示唆された。

D. 考察

(1) 大腸発がん感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR の多型が遺伝子 X の mRNA の翻訳制御に影響し、遺伝子発現の系統間の違いに寄与している可能性が示唆された。遺伝子 X の 3'-UTR における多型とヒト大腸がんとの関連を検討し、ヒト大腸がん感受性への関与が明らかになれば、ヒト高危険度群の推定に役立つものと考えられる。

(2) *SND 1* は、大腸発がんの早期から発現亢進が認められ、また大腸化学発がん物質である PhIP をラットに胃内投与すると、速やかに大腸上皮細胞において mRNA 及びタンパク質レベルで発現上昇する。従って、*SND 1*

は大腸発がんの極めて早期段階において、miRNA やその制御因子による遺伝子発現制御異常に關与している可能性が考えられる。SND1 が相互作用する miRNA 及び mRNA を同定し、大腸発がんの早期段階における意義を解明することにより、新たな発がんの分子機構を提唱できると考えられる。

(3) miR-34a の発現が p53 経路の活性化を引き起こす可能性も以前に報告したが、本年度は、SIRT1 が miR-34a の標的遺伝子である事を解明した。これらの結果から、miR-34a と p53 の間には、正のフィードバック機構が存在することが考えられた。このシステムは、正常細胞において、発がん物質などの細胞外ストレスに応答して、がん抑制ネットワークの迅速な活性化に必要であると考えられ、発がん過程の初期段階におけるバリアー機構として機能している可能性を示している。約 40% のヒト大腸がんでは、miR-34a の発現低下が認められ、miR-34a の機能破綻が大腸がんの発生と關連している可能性を示している。

(4) B6-2CMSM コンソミックマウスの系統間で明らかな感受性の違いが認められたが、同じ染色体上のみ差異のある系統間で顕著な感受性の違いが発見された事より、PhIP 誘発炎症性大腸発がんの責任遺伝子の発見に近づいたものと考えられる。

(5) 大腸がんは生活習慣病の一側面を持ち、肥満や糖尿病を改善させることが発がん予防につながる事が明らかにされてきているが、現在のところ化学発がん予防における安全かつ効果的な薬剤は見出されていない。NSAIDs はある程度の抗腫瘍作用を有するものの心血管イベントが増加するため本邦における臨床応用は困難が予想される。APC^{Min/+}マウスおよびアゾキシメタン誘発腸炎モデルマウスを用いた検討では metformin は AMPK/mTOR 経路に作用し細胞増殖抑制効果を示したが、与えられた短期間で臨床研究成果を出すためメルクマールとして ACF を用いたのは大変有用であった。

Metformin など安全性の高い薬剤における検討および詳細なメカニズムの解析により増加を続ける大腸がんの罹患率、死亡率の低下が望まれる。

(6) KAD ラットに対して、15 週間という比較的短期の試験期間で、大腸腫瘍を確実に複数個誘発でき、内視鏡観察によって腫瘍の発生過程を経時的に追跡できる試験系を開発した。KAD ラットに誘発される腫瘍は、Wnt シグナル系の昂進による分化異常がその引き金となっていると考えられた。また、KAD ラットでは、DSS による下痢症状が激しかったことから、大腸粘膜障害の感受性に差異があると考えられた。KAD ラットにおけるこの高感受性が、腫瘍数の増大につながっていると考えられ、APC タンパク質が、Wnt シグナル系の昂進だけでなく、大腸粘膜障害に対する感受性にも關与している可能性が示された。

(7) Wnt シグナル亢進と COX-2/PGE₂ 経路の誘導により胃がんを発生する *K19-Wnt1/C2mE* マウスは、腫瘍発生分子機構がヒト胃がんと類似しており、腫瘍病理組織もヒト腺管型胃がんに似ている事から、ヒト胃がんを外挿するモデルとして位置づけられている。マイクロアレイによる研究成果は、発生した腫瘍組織の遺伝子発現プロファイルもヒト胃がんに近い事を示しており、*K19-Wnt1/C2mE* マウスはヒト胃がん発生を高精度に再現したマウスモデルとして、基礎研究だけでなく、薬効評価などの応用研究にも有用な研究資材である事が確認された。

(8) Wnt シグナルは、消化管上皮幹細胞や未分化上皮細胞を未分化に維持する作用があるため、遺伝子変異などによる恒常的な Wnt シグナル亢進は胃がんや大腸がん発生の主要な原因と考えられている。しかし、これまでの遺伝学的研究結果から、Wnt シグナル活性化と同時に COX-2/PGE₂ 経路の誘導も消

化器がん発生に必須である事が知られており、COX-2/PGE₂経路は胃がん、大腸がんの予防薬の標的としても重要と考えられている。今年度の研究成果は、PGE₂シグナル依存的に発生する炎症反応でマクロファージが活性化し、マクロファージが産生するTNF- α が胃上皮細胞のWntシグナルを亢進させる経路を初めて示した。本研究で明らかになった、マクロファージ由来TNF- α によるWntシグナル亢進も、PGE₂による重要な発がん促進機構のひとつであると考えられる。

(9) *K19-Wnt1/C2mE* マウス胃粘膜では、WntとPGE₂双方のシグナル経路が活性化しているにも関わらず、無菌化にする事で腫瘍発生が抑制された。無菌化により炎症反応も抑制されていた事から、腫瘍発生にはCOX-2/PGE₂経路の誘導と感染刺激の相互作用による炎症反応が必要であると考えられた。これまでの概念では、*H. pylori*感染によりCOX-2発現が誘導され、下流で産生されるPGE₂がさまざまな生体反応を引き起こして発がんに関与すると考えられている。しかし本研究成果は、PGE₂の産生が誘導されても、感染刺激が依然として必要である事を示しており、これに関わる分子機構の解明は今後の研究課題として重要である。

(10) 今年度の成果から、EP4受容体を介したPGE₂シグナルが胃がん発生に必要である可能性が考えられた。EP4シグナルの胃発がんにおける役割の分子機構は未だ不明であり、腫瘍組織の中でEP4を発現細胞の特定から行なう必要がある。これまでの研究成果から、TNF- α やEP4などが胃がんの化学予防薬の標的として考えられる。

(11) 発がん感受性遺伝子候補として、*Ssh1*と*Sirt4*を選択した。*Ssh1*はSlingshot phosphate familyに属し、cofilinのSer-3脱リン酸化を行なう事により再活性化させる。cofilinはアクチンの脱重合を行うたんぱく質で、細胞分裂や細胞の移動に重要な役割を

果たしているが、*Ssh1*の変異により未分化T細胞の細胞分化、細胞の移動に異常が起こり、その結果細胞の異常増殖を引き起こす可能性が考えられる。一方、*Sirt4*の属するsirtuin (or Sir2: silent information regulator 2 protein) familyは、細胞内の代謝から老化やがん化、DNA修復に至るまで多くの生命機能に関与すると考えられているが、*Sirt4* KOマウスの血中インシュリンレベルが上昇しているとの報告があり、従って*Sirt4*は胸腺に直接作用するのではなく、周りの環境(例えば血中インシュリン濃度の上昇など)から間接的にがん化を促す可能性が推測される。

(12) 放射線照射後の胸腺細胞の解析により、C型細胞がDP段階で分化を停止し、胸腺内に留まっていることが示唆された。胸腺内の細胞は未分化多機能細胞からCD4/CD8ダブルポジティブ(DP)細胞、CD4またはCD8 SP細胞へと分化し速やかに末梢に移出する。従って、胸腺リンパ腫が成立する一つの要件として、前リンパ腫細胞がSP細胞に分化しない、もしくは移出する機構に欠損がある可能性が考えられた。

(13) 正常胸腺細胞と同様に6種類のDJ組換えパターンを示すT型胸腺細胞に*Bcl11b*のアリル消失が高頻度に検出された。T型胸腺細胞はまだ分化能を保持していることから、*Bcl11b*のアリル消失がDJ組換え前のプロジェニター細胞内で起こり、それがクローナル増殖を引き起こすという可能性が考えられる。

(14) *Parp-1*欠損による*H19*遺伝子の発現亢進は、胚体外組織への分化に関連する可能性が考えられる。また、*Parp-1*欠損下での*H19-Igf2* ICRにおけるDNAメチル化レベルの低下は*H19*遺伝子の発現亢進に関与すると考えられ、*Parp-1*の機能欠損がエピジェネティック異常を誘発することを示した。ヒトのがん化における*H19-Igf2*遺伝子座の

制御異常との関連を今後調べる必要がある。また、PARP 阻害剤により、5-aza-dC の細胞増殖抑制効果が増強され、遺伝子発現変化が細胞増殖抑制効果増強と関連する可能性が考えられる。

(15) *Parp-1* 欠損下ではアルキル化剤による DNA 損傷の場合とは異なり、ガンマ線誘発 DNA 損傷の修復系のうち不正確な修復経路が阻害されている可能性が考えられる。4-6 単塩基配列上の一塩基欠失型変異は slippage 型複製エラーによる可能性があり、*Parp-1* がガンマ線照射後の slippage 型複製エラー誘発に関わる可能性が考えられる。

E. 結論

大腸がん感受性候補遺伝子 X の 3'-UTR の多型が遺伝子 X の mRNA の翻訳制御に影響し、遺伝子発現の系統間の違いに寄与している可能性が示唆された。遺伝子 X の 3'-UTR における多型とヒト大腸がん感受性への関連が明らかになれば、ヒト高危険度群の推定に役立つものと考えられる。翻訳抑制因子の一つである SND1 や miR-34a の標的遺伝子の解析を行ない、miR-34a による p53 のアセチル化が SIRT1 で調節されることが示唆された。

B6-2C5MSM コンソミックマウスの 3 系統共に PhIP-DSS 処置群でのみ腫瘍が発生し、他群での腫瘍発生はなかった。雌雄共に 2C に大腸腫瘍発生率が高く、大腸がん感受性が高いことが推定される。総コレステロール、トリグリセリド値も 2T に比べ、2C に高い傾向を認め、その関与が示唆された。

metformin はその安全性が確立しており、大腸がん予防薬の有望な候補として期待される。社会問題となっている生活習慣病は同時に大腸がんを引き起こすことが示唆されており、詳細な分子標的の解析が必要である。

KAD ラットは、大腸腫瘍の発症機構の解明、診断・治療・予防方法、抗がん剤の開発など

に、有用なモデルラットになると期待される。

K19-Wnt1/C2mE マウスはヒト腺管型胃がんを外挿するモデルマウスとして有用である。本モデルの解析から、感染刺激にともなってマクロファージが胃粘膜に浸潤し、活性化したマクロファージ由来の TNF- α が胃上皮細胞の Wnt シグナルを亢進させて腫瘍発生に関与していると考えられた。さらに、PGE₂ シグナルと感染刺激の相互作用、そして PGE₂ 受容体の EP4 を介したシグナルが胃がん発生に必要である可能性が示された。

放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん実験、遺伝学的解析から、マウス 5 番染色体上に存在するがん感受性遺伝子候補として、*Ssh1* と *Sirt4* を選択した。また、照射後萎縮胸腺内の前リンパ腫細胞の特徴を明らかにした。萎縮胸腺では分化停止した細胞がクローナルに増殖し、胸腺に留まることの重要性が明らかになった。

前がん細胞のみならず、分化能を保持した胸腺細胞においても *Bcl11b* が抑制遺伝子座でアリル消失が高頻度に検出された。この結果は、*Bcl11b* のアリル消失は未分化胸腺細胞で起こり、細胞増殖能の付与に関与することを示唆する。一方、ヒト大腸がん DNA での *Bcl11b* 変異解析から、2/20 の頻度で変異が見いだされた。進化的に保存されたアミノ酸の置換とのフレームシフト変異であり、後者は機能欠失を意味する。野生型のアレルは保持され、ハプロ不全として貢献する可能性がある。

ポリ ADP-リボシル化の異常として *Parp-1* の機能欠損がエピジェネティック異常を誘発しがん化過程に関わることを示唆された。また *Parp-1* 欠損下ではガンマ線誘発 DNA 損傷の修復系のうち不正確な修復経路が阻害されている可能性が考えられる。*Parg* の機能は、ES 細胞由来の腫瘍形成の初期過程に

必要と考えられることからがん予防的ターゲットとなる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Paramasivam M, Membrino A, Cogoi S, Fukuda H, Nakagama H, and Xodo LE. Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acids Res*, [Epub ahead of print] Mar 12, 2009.
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, and Nakagama H. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci*, 99(10):1892-900, 2008.

3. Nagata T, Takada Y, Ono A, Nagata K, Konishi Y, Nukina T, Ono M, Matsugami A, Furukawa A, Fujimoto N, Fukuda H, Nakagama H, and Katahira M. Elucidation of the mode of interaction in the UPI-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity. *Nucleic Acids Res*, 36(21):6816-24, 2008.
4. Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Nakagama H, Williams DE, and Dashwood RH. beta-catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and a high-fat diet. *Cancer Sci*, 99(9):1754-9, 2008.
5. Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T, and Nakagama H. Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci*, 99(5):1055-62, 2008.
6. 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*, 12;3(3):e1776, 2008.
7. Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Pereira CB, Louderback M, Nakagama H, Bailey GS, Williams DE, and Dashwood RH. Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and beta-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29(4):834-9, 2008.
8. Shimokawa T, Ogino H, Maeda D, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M. Poly(ADP-ribose) preparation using anion-exchange column chromatography. *Organic Chemistry Insights*, in press, 2009.

9. Shibata A, Maeda D, Ogino H, Tsutsumi M, Nohmi T, Nakagama H, Sugimura T, Teraoka H, and Masutani M. Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. *Mutat Res*, in press, 2009.
10. Nakayama R, Sato Y, Masutani M, Ogino H, Nakatani F, Chuman H, Beppu Y, Morioka H, Yabe H, Hirose H, Sugimura H, Sakamoto H, Ohta T, Toyama Y, Yoshida T, and Kawai A. Association of a missense single nucleotide polymorphism, Cys1367Arg of the WRN gene, with the risk of bone and soft tissue sarcomas in Japan. *Cancer Sci*, 99(2):333-339, 2008.
11. 益谷美都子, 前田大介, 荻野秀樹. PARP 阻害剤、がん分子標的治療、6(1):50-58、2008.
12. Kominami R, Ohi H, Kamimura K, Maruyama M, Yamamoto T, Takaku K, Morita S, Go R, and Mishima Y. γ -Ray-Induced mouse Thymic Lymphomas: Bcl11b Inactivation and Prelymphoma cells. *Radiation Health Risk Sciences* (Eds, Nakashima et al.), Springer Library of Congress Control Number: 2008937558, 2009.
13. Yoshikai Y, Sato T, Morita S, Kohara Y, Takagi R, Mishima Y, and Kominami R. Effect of Bcl11b genotypes and gamma-radiation on the development of mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 373:282-5, 2008.
14. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E₂ pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res*, in press, 2009.
15. Piao Y-S, Du Y-C, Oshima H, Jin J-C, Nomura M, Yoshimoto T, and Oshima M. Platelet 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis*, 29: 440-447, 2008.
16. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM, and Oshima M. Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cell. *EMBO J*, 27: 1671-1681, 2008.
17. Guo X, Oshima H, Kitamura T, Taketo, MM, and Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem*, 283: 19864-19871, 2008.
18. Takagi Y, Kuramoto T, Voigt B, Tsurumi T, Nakanishi S, Mashimo T, Masui N, Serikawa T. An informative set of SSLP markers and genomic profiles in the rat MHC, the *R7I* complex. *Immunogenet.* (in press)
19. Naoi K, Kuramoto T, Kuwamura Y, Gohma H, Kuwamura M, Serikawa T. Characterization of the Kyoto circling (KCI) rat carrying a spontaneous nonsense mutation in the protocadherin 15 (*Pcdh15*) gene. *Exp Anim* 58(1): 1-10, 2009.
20. Voigt B, Kuramoto T, Mashimo T, Tsurumi T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. Evaluation of LEXF/FXLE rat recombinant inbred strains for the genetic dissection of complex traits. *Physiol Genomics*, 32(3): 335-342, 2008.
21. Kuramoto T, Nakanishi S, Serikawa T. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiol Genomics*, 33: 205-211, 2008.
22. The STAR Consortium*, Saar K, Beck A, Bihoreau MT, Birney E, Brocklebank D, Chen Y, Cuppen E, Demonchy S, Dopazo J, Flicek P, Foglio M, Fujiyama A, Gut IG, Gauguier D, Guigo R, Guryev V, Heinig M, Hummel O, Jahn N, Klages S, Kren V, Kube M, Kuhl H,

- Kuramoto T, Kuroki Y, Lechner D, Lee YA, Lopez-Bigas N, Lathrop GM, Mashimo T, Medina I, Mott R, Patone G, Perrier-Cornet JA, Platzer M, Pravenec M, Reinhardt R, Sakaki Y, Schilhabel M, Schulz H, Serikawa T, Shikhagaie M, Tatsumoto S, Taudien S, Toyoda A, Voigt B, Zelenika D, Zimdahl H, Hubner N. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet*, 40(5):560-566, 2008.
23. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet*, 40(5):516-522, 2008.
24. Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, Kato M, Hirabayashi M, Kuramoto T, Serikawa T. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet*, 40(5):514-515, 2008.
25. Kim M, Miyamoto S, Sugie S, Yasui Y, Ishigamori-Suzuki R, Murakami A, Nakagama H, Tanaka T. A tobacco-specific carcinogen, NNK, enhances AOM/DSS-induced colon carcinogenesis in male A/J mice. *In Vivo*, 22: 557-563, 2008.
26. Miyamoto S, Epifano F, Curini M, Genovese S, Kim M, Ishigamori-Suzuki R, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer*, 60: 675-684, 2008.
27. Yasui Y, Miyamoto S, Kim M, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Aqueous and ethanolic extract fractions from the Brazilian propolis suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Oncol Rep*, 20: 493-499, 2008.
28. Miyamoto S, Yasui Y, Kim M, Sugie S, Murakami A, Ishigamori-Suzuki R, Tanaka T. A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that is highly susceptible to 4-NQO-induced tongue and esophageal carcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 29: 418-426, 2008.
29. Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, Endo H, Kato S, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int J Oncol*, 34: 339-344, 2009.
30. Fujisawa T, Sugiyama M, Tomimoto A, Wada K, Endo H, Takahashi H, Yoneda K, Yoneda M, Inamori M, Saito S, Terauchi Y, Kadowaki T, Tsuchiya N, Nakagama H, Nakajima A. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes tumorigenesis through activation of the beta-catenin / T cell factor (TCF) pathway in the mouse intestine. *J Pharmacol Sci*, 108: 535-544, 2008.
31. Takahashi H, Takayama T, Yoneda K, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with rectal dysplastic aberrant crypt foci in a clinical population. *Cancer Sci*, 100: 29-32, 2009.
32. 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 proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci*, 99: 1892-1900, 2008.

33. 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.
34. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H, Uozaki H, Fukayama M, Nakajima A. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncol Rep*, 20: 479-483, 2008.
35. 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.
36. Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, Takahashi H, Ikeda I, Tomimoto A, Yonemitsu K, Nakajima N, Kudo C, Wada K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakagama H, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway. *J Pharmacol Sci*, 106: 627-638, 2008.
2. 学会発表
1. 岡本康司、中釜 齊、田矢洋、神経芽細胞腫において、Mdmx 及び Mdm2 癌遺伝子産物は協調して p53 を細胞質に拘束する事により、その活性を抑制する、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. 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)
3. 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)
4. 岡本康司、中釜 齊、田矢洋 一 神経芽細胞腫において、Mdmx 及び Mdm2 癌遺伝子産物は協調して p53 を細胞質に拘束する事により、その活性を抑制する、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008 年 10 月)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. Kanemoto K, Fukuta K, Fukuda H, Ochiai M, Kohri K, Sugimura T, Nakagama H、BHBN 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)
9. 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)
10. 金本一洋、岡本康司、福田博政、落合雅子、杉村 隆、中釜 斎、BHBN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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. Masutani M, Maeda D, Ogino H, Poetsch A, Shirai H, Nakagama H, and Sugimura T, Function of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in DNA damage response, tumorigenesis and development of renal lesions, 17th international symposium on poly(ADP-ribosyl)ation, Tucson (米国)、(2008年5月)
 14. Maeda D, Ogino H, Sasamoto E, Shirai H, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M, Function of PARP-1 in tumorigenesis and DNA repair, 17th international symposium on poly(ADP-ribosyl)ation, Tucson (米国)、(2008年5月)
 15. Poetsch A, Maeda D, Ogino H, Bürkle A, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M, Poly(ADP-ribose) glycohydrolase in cell death regulation after DNA damage, 17th international symposium on poly(ADP-ribosyl)ation, Tucson (米国)、(2008年5月)
 16. 笹本絵里香、前田大介、安部正浩、荻野秀樹、杉本芳一、杉村隆、益谷美都子、*Parp-1*欠損マウスにおける γ 線照射後の突然変異の解析、第52回日本薬学会関東支部大会、野田、(2008年10月)
 17. 濱田健佑、荻野秀樹、寺岡弘文、村上康文、杉村隆、益谷美都子、PARP阻害剤による5-aza-dCの細胞増殖抑制効果の増強、第52回日本薬学会関東支部大会、野田、(2008年10月)
 18. Maeda D, Ogino H, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M, Effect of *Parp-1* deficiency on deletion mutation through inaccurate DNA double strand break repair, 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008年10月)
 19. Shirai H, Poetsch A, Maeda D, Ogino H, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M, Enhancement of cell death induced by DNA damage under *poly(ADP-ribose) glycohydrolase* deficiency, 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、(2008年10月)
 20. 益谷美都子、荻野秀樹、前田大介、白井秀徳、村上康文、杉村 隆、クロマチン動態制御へのポリ ADP-リボシル化の関与、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同年会 (BMB2008)、神戸、(2008年12月)
 21. 荻野秀樹、濱田健佑、清水詩保子、村上康文、杉村 隆、益谷美都子、*Parp-1*欠損ES細胞における*H19-Igf2*遺伝子座の転写制御異常と胚体外組織への分化誘導の亢進、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同年会 (BMB2008)、神戸、(2008年12月)
 22. 森田寛之、黒田泰仁、津田雅貴、益谷美都子、長谷川慎、太田恵美、三輪正直、PARPのポリ ADP-リボシル化を受ける修飾部位の特定、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同年会 (BMB2008)、神戸、(2008年12月)
 23. Ryo Kominami, Satoshi Hirose, Ryota Ishizawa, Yoshinori Katsuragi, Yoshiya