

- Sakuraba, Yoichi Gondo. Dose-dependent effect of zinc finger transcription factor Bcl11b on differentiation of cytotoxic T cells. 22<sup>nd</sup> International Mammalian Genome Conference, Prague, Czech Republic (2008年11月)
24. Oshima M, Oshima H, Oguma K, Aoki M, and Taketo MM: Inflammatory responses accelerate Wnt signaling in gastric epithelial cells. 99<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), (San Diego) April, 2008.
25. 大島 正伸: 新規モデルマウスを用いた胃癌発生分子機序の解析, 第97回日本病理学会(シンポジウム), 金沢, (2008年5月)
26. Oshima H, Oguma K, Kotani H, and Oshima M. Gastric tumorigenesis through EGFR activation in Wnt and PGE<sub>2</sub> transgenic mice. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, (2008年10月)
27. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM, and Oshima M: Promotion of Wnt signaling by activated macrophage-derived TNF- $\alpha$ . 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, (2008年10月)
28. Oshima M: Inflammation accelerates tumorigenesis through promotion of Wnt signaling. 第67回日本癌学会学術総会(シンポジウム), 名古屋, (2008年10月)
29. 庫本高志 脂質代謝・糖質代謝におけるラットリゾソスの活用 日本農芸化学会2008年度大会, 名古屋, 2008.3.29
30. 庫本高志, 北斗美留賀, 真下知士, 鶴見東志子, 佐々木敬幸, 外尾亮治, 芹川忠夫 ラット LEXF/FXLE リコンビナント近交系を用いた QTL 解析 第55回日本実験動物学会総会, 仙台, 2008.5.15-17
31. 中西 聡, 庫本高志, 芹川忠夫 ラット機能多型のジェノタイプピング 第55回日本実験動物学会総会, 仙台, 2008.5.15-17
32. 吉見一人, 真下知士, 滝澤明子, 加藤めぐみ, 平林真澄, 芹川忠夫, 庫本高志 Kyoto Apc Delta ラットを用いた大腸腫瘍誘発試験 関西実験動物研究会第100回記念大会, 京都, 2008.12.5
33. Mashimo T, Tokuda S, Kuramoto T, Voigt B, Hirabayashi M, Yanagihara K, Serikawa T. Gene-targeted rat models of human diseases developed by ENU mutagenesis The 3rd AFLAS Congress & the 8th CALAS Annual Meeting, Sep.27-29, 2008 Beijing, China
34. Kuramoto T, Voigt B, Mashimo T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. Genetic dissection of the LEXF/FXLE recombinant inbred strains. 13th International SHR symposium, June 20 - 22, 2008. Prague, Czech Republic.
35. 金 美慧, 杉江茂幸, 宮本真吾, 安井由美子, 甲野裕之, 鈴木里加子, 中釜 斉, 田中卓二: AOM/DSS 誘発大腸癌に対する NNK の影響. 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 2月6-7日, 2008年.
36. Yasui Y, Miyamoto S, Kim M, Oyama T, Sugie S, Murakami A, Tanaka T. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 4<sup>th</sup> International Niigata Symposium on Diet and Health - "Integrative Functions of Diet in Anti-aging and Cancer Prevention", Niigata, Nov. 28-29, 2008.
37. 甲野裕之, 宮本真吾, 安井由美子, 金 美慧, 杉江茂幸, 村上 明, 大東 肇, 田中卓二: Lauric acid による AOM 誘発 ACF への影響. 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 2月6-7日, 2008年.
38. 安井由美子, 宮本真吾, 金 美慧, 甲野裕之, 杉江茂幸, 村上 明, 大東 肇, 田中卓二: Chrysin による azoxymethane 誘発 aberrant crypt foci の抑制作用. 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 2月6-7日, 2008年.

39. 杉江茂幸、安井由美子、金 美慧、甲野裕之、田中卓二: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)誘発ラット乳腺発癌における基礎食、高脂肪食の影響. 第24回日本毒性病理学会、名古屋、2月6-7日、2008年.
40. 杉江茂幸、田中卓二: シンポジウム4(S-4) 発がん研究の基軸を求めて-遺伝子改変動物を用いた研究-, rasH2を用いた発がんの検討. 第97回日本病理学会総会、金沢、5月15-17日、2008.
41. Mihe Kim、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二: A novel prodrug of ferulic acid suppresses AOM/DSS-induced mouse colon carcinogenesis. 第97回日本病理学会総会、金沢、5月15-17日、2008.
42. 安井由美子、金 美慧、杉江茂幸、田中卓二: Pitavastatin inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. 第97回日本病理学会総会、金沢、5月15-17日、2008.
43. 金 美慧、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二、甲野裕之、宮本真吾: Pitavastatin による4-NQO誘発 rasH2 マウス舌・食道発がん抑制. がん予防大会2008福岡(第15回日本がん予防学会、第9回日本がん分子疫学研究会、第31回がん疫学研究会)、福岡、5月22-23日、2008.
44. 安井由美子、金 美慧、杉江茂幸、田中卓二、細川雅史、宮下和夫: 炎症関連大腸発がんに対する9c,11t,13c-CLN含有ザクロ種子油の抑制効果. がん予防大会2008福岡(第15回日本がん予防学会、第9回日本がん分子疫学研究会、第31回がん疫学研究会)、福岡、5月22-23日、2008.
45. 杉江茂幸、金 美慧、安井由美子、尾山 武、田中卓二、嶋田昇二、増田佳史: パン酵母のAOM誘発ラット大腸発がんにおける修飾効果. がん予防大会2008福岡(第15回日本がん予防学会、第9回日本がん分子疫学研究会、第31回がん疫学研究会)、福岡、5月22-23日、2008.
46. 尾山 武、山田泰広、安井由美子、杉江茂幸、森 秀樹、田中卓二: *Apc*<sup>Min/+</sup>マウス大腸腫瘍形成期におけるWnt/beta-catenin転写活性化の重要性. 第23回発癌病理研究会、鳥羽、8月25-27.
47. Oyama T, Yamada Y, Hirata A, Yasui Y, Kim M, Kohno H, Hara A., Sugie S, Tanaka T, Mori H. The epigenetic transcriptional repression of Wnt antagonist genes in the development of colon tumors of *Apc*<sup>Min/+</sup> mouse. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第67回日本癌学会学術総会), Nagoya, Oct. 28-30, 2008.
48. Kim M, Yasui Y, Ishigamori-Suzuki R, Miyamoto S, Sugie S, Tanaka T. A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第67回日本癌学会学術総会), Nagoya, Oct. 28-30, 2008.
49. Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Kim M, Sugie S, Tanaka T. Pomegranate seed oil containing 9c,11t,13c-CLN inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第67回日本癌学会学術総会), Nagoya, Oct. 28-30, 2008.
50. Tanaka T, Miyamoto S, Yasui Y, Oyama T, Kim M, Murakami A, Sugie S. Dietary zerumbone inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第67回日本癌学会学術総会), Nagoya, Oct. 28-30, 2008.
51. Sugie S, Yasui Y, Kim M, Oyama T, Kohno H, Masuda Y, Shimada S, Tanaka T. Chemopreventive effects of zinc on AOM-induced colon carcinogenesis in rats. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第67回日本癌学会学術総会),



- Nagoya, Oct. 28-30, 2008.
52. 安井由美子, 尾山 武, 杉江茂幸, 田中卓二, 細川雅史, 宮下和夫: 9c,11t,13c-CLN 含有ザクロ種子油による炎症関連マウス大腸発がんの化学予防. 第 13 回日本フードファクター学会学術集会、東京、11 月 17-18 日、2008.
53. Takahashi H, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Abe Y, Inamori M, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A Correlation of the plasma level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) with the number of aberrant crypt foci in men 2008 16<sup>th</sup> UEGW Vienna (2008.10.20)
54. Suzuki K, Endo H, Kato S, Uchiyama T, Iida H, Mawatari H, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A Metformin suppresses the colorectal carcinogenesis via activating AMP protein kinase 2008 DDW San Diego (2008.05.21)
55. Fujisawa N, Takahashi H, Hosono K, Shinohara Y, Sugiyama M, Endo H, Nozaki Y, Akiyama T, Yoneda K, Fujita K, Yoneda M, Nakajima A Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis induced by high-fat diet via AMP protein kinase 2008 DDW San Diego (2008.05.18)
56. Hirokazu Takahashi, Kyoko Yoneda, Hiroki Endo, Hiroshi Iida, Tomoyuki Akiyama, Yasunobu Abe, Masahiko Inamori, Atsushi Nakajima Visceral fat obesity and abnormal glucose tolerance correlate with dysplastic aberrant crypt foci in colorectal tumor free male (oral session) 2008 DDW San Diego (2008.05.18)
57. 細野邦広, 遠藤宏樹, 加藤真吾, 内山 崇, 飯田 洋, 馬渡弘典, 野崎雄一, 秋山智之, 米田恭子, 藤田浩司, 米田正人, 高橋宏和, 稲森正彦, 阿部泰伸, 桐越博之, 小林規俊, 窪田賢輔, 齊藤 聡, 中島 淳 メトホルミンによる大腸ポリープ抑制作用の解析-発癌モデルマウスにおける検討- 一般演題22 大腸腫瘍 第5回 日本消化管学会総会学術集会東京(2009.02.13)
58. Takahashi H, Hosono K, Yoneda K, Endo H, Nozaki Y, Akiyama T, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A Abnormal glucose tolerance and plasma IGF-1 correlate with dysplastic aberrant crypt foci in colorectal tumor free male 2008 JCA Nagoya (2008.10.29)
59. Nakajima A, Takahashi H Life style and colon carcinogenesis; the role of adiponectin in colon carcinogenesis 2008 JCA symposium Basic and Clinical Advances in Colon Cancer Research Nagoya (2008.10.29)
60. Hosono K, Sugiyama M, Takahashi H, Endo H, Yoneda K, Saito S, Nakajima A Adiponectin-induced cell growth inhibition of colorectal cancer and analysis of its signaling pathway 2008 JCA Nagoya (2008.10.28)
61. 高橋宏和, 細野邦広, 中島 淳 内臓脂肪およびアディポネクチンと大腸発癌における性差 パネルディスカッション4 性差からみた消化器疾患の病態と予後 第50回日本消化器病学会大会東京(2008.10.01)
62. 細野邦広, 遠藤宏樹, 杉山美智子, 野崎雄一, 米田恭子, 秋山智之, 藤田浩司, 高橋宏和, 中島 淳 肥満モデルマウスにおける大腸発癌促進メカニズムの検討 第50回日本消化器病学会大会東京(2008.10.01)
63. 冨本彩子, 藤澤聡郎, 遠藤宏樹, 米満恭子, 野崎雄一, 秋山智之, 藤田浩司, 高橋宏和, 齊藤 聡, 中島 淳 高脂肪食による大腸発癌の促進とアディポネクチン、炎症性サイトカインの関係についての検討 コアシンポジウム 第4回 日本消化管学会総会学術集会大阪(2008.02.07)
64. 米満恭子, 高橋宏和, 日暮琢磨, 飯田 洋,

馬渡弘典, 野崎雄一, 遠藤宏樹, 冨本彩子,  
秋山智之, 藤田浩司, 米田正人, 稲森正彦,  
阿部泰伸, 桐越博之, 小林規俊, 窪田賢輔,  
齊藤 聡, 上野規男, 中島 淳, ヒト大腸に  
おけるアディポネクチンレセプター1およ  
び2(AdipoR1およびAdipoR2)の発現解析 第  
4回 日本消化管学会総会学術集会大阪  
(2008.02.07)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性及び修飾要因の解明

分担研究者 中釜 齊 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)により誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、大腸がん発生の初期過程における分子機構、および大腸発がん過程を修飾する種々の環境要因や、発がん感受性を規定する遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。大腸発がんの感受性遺伝子に関しては、高感受性および低感受性系統間で発現量の異なる候補遺伝子 X において、3'側非翻訳領域に存在する15箇所の多型が、遺伝子 X の mRNA の翻訳制御に関与している可能性が示唆された。現在、低感受性系統由来の遺伝子 X を含む BAC construct を高感受性系統に組み込んだ transgenic ラットを作成中である。さらに、RNA 干渉のエフェクター複合体である RISC の構成因子であり、大腸発がんの早期段階から発現上昇を示す SND1 と特異的に相互作用する microRNA (miRNA)分子の探索を進めている。がん細胞の増殖抑制効果を有する microRNA (miR-34a)の標的遺伝子の解析を行ない、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 を同定した。miR-34a による p53 のアセチル化が SIRT1 により調節されることを明らかにした。SND1 及び 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示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) 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 (〜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 分子のスクリーニング：

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：

(5-1) miR-34a による p53 活性化：

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。

(5-2) miR-34a により誘導される p53 翻訳後

修飾の解析：

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。

(5-3) miR-34a と相互作用する細胞内 mRNA の解析：

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。

(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) 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誘発性に関連する可能性が示唆された。

(2) 大腸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ラット由来の大腸がん感受性候補遺伝子Xを含む領域を導入した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 (NCI267B17, 約165 kb)を用いてBAC transgenic ラットを作成することにした。BAC constructからNot I digestionにより切り出す過程で、遺伝子Xを含む領域は切断され、約80 kbとなった。このDNA断片を精製して、遺伝子導入を行った。

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匹の雌乳仔のうち、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コピーが各々2, 4, 1, 1匹であった。これらのfounderを各々F344ラットと交配させ、遺伝子Xを含む領域が次世代へ伝播するか否かを解析中である。現在、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個および3個なのが各々1系統ずつ、約30コピーが2系統であった。

(4) 翻訳制御因子SND1と相互作用するmiRNAのスクリーニング:

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。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。また、SND1はAPCの発現を翻訳レベルで調整している可能性を報告している。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)。SND1の大腸がん初期過程における役割を解明するため、SND1と相互作用するmRNA及びmiRNA分子のスクリーニングを行った。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。SND1は、肺がんのがん抑制的miRNAであるLet-7や、miR-630などと優位に相互作用していることが判明した。

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

細胞のストレス応答として発現誘導される



microRNA の生物学的機能を検討した。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。また、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、apoptosis inducing protein (AIP)由来の 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 は、種々の蛋白のアセチル化に関与し、特に SIRT1 は p53K382 の脱アセチル化酵素であると報告されている。ブルダウンアッセイの結果は、SIRT family のうち SIRT1 mRNA が miR-34a と相互作用し、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 を組み込んだリポ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わかった。さらに、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。

#### D. 考察

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。現在、ACI 由来の遺伝子 X を含む領域を F344 ラットに組み込んだ BAC transgenic ラットを作成中である。BAC transgene の次世代への伝達を確認できた系統が既に 4 系統あり、transgene の大腸における発現

が確認できたならば、transgene の ACF 誘発性及び発がん性に及ぼす影響を検討し、遺伝子 X が大腸発がん性遺伝子であることを確認する予定である。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。

DNA/RNA 結合蛋白質として同定した SND1 は、microRNA の制御複合体である RISC の構成因子であり、大腸発がんの早期から発現亢進が認められる。SND1 の過剰発現は、大腸がん抑制因子である APC の発現を翻訳レベルで制御している可能性を報告している。SND1 は、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ことが判明した。このことから、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が生じ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。

当研究グループで単離した、がん抑制的 miR-34a は、細胞傷害性ストレスに伴い p53 によって発現が誘導される。興味深いことに、miR-34a の発現は p53 経路の活性化を引き起こす可能性も以前に報告している。本年度は、miR-34a の新しい標的遺伝子として SIRT1 を同定し、miR-34a による p53 経路の活性化の分子機構を解明した。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明らかとなった。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る。このことは、miR-34a の機能破綻が大腸がんの発生と関連している可能性を示している。

がん発生の極く初期段階における翻訳制御機構の関与が明らかになれば、がんの新たな予防法・早期診断法の開発、さらには薬物療法の分子標的としての可能性などが明らかになることが期待される。

#### E. 結論

大腸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わない、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。SND1、microRNA を介する翻訳制御機構のがん発生における役割を明らかにすることで、がんの発生・成立の新たな分子機構が明らかに出来るだけでなく、新規予防法や診断法、さらには新たな治療法の開発にも寄与できる可能性がある。

#### 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 pro-

liferator-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-phenylimidazo[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.

##### 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 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, BBN 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, Matsutani 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 齊、BBN 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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願  
なし
  2. 実用新案登録  
なし

## 分担研究報告書

ポリ ADP-リボシル化の発がんにおける意義の解明とその臨床応用に関する研究

研究分担者 益谷 美都子 国立がんセンター研究所・生化学部・部長

## 研究要旨

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (*Parp-1*) 欠損マウス ES 細胞において *H19-Igf2* imprinting 制御領域における DNA メチル化レベルの顕著な低下と *H19* 遺伝子の発現亢進を認めた。*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可能性が示唆された。*Parp-1* 欠損下ではガンマ線誘発 DNA 損傷の修復系のうち欠失変異につながる不正確な修復経路が阻害されている可能性が示唆された。ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (Parg) の機能阻害は、ES 細胞移植後の腫瘍形成の初期過程で抑制的な効果を有し、がん予防的ターゲットとなる可能性が考えられる。

## A. 研究目的

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (*Parp-1*) は DNA 損傷修復経路のうち塩基除去修復、DNA 鎖切断修復、相同組み換え修復に機能し、DNA 損傷後の細胞死を誘導し、転写制御にも関わることが示唆されている。*Parp-1* の機能異常ががん化に関与することが判ってきたがその機構は十分に解明されていない。また、*Parp* ファミリー分子、*Parp-9*、*Parp-10*、及びポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (Parg) はがん化との関連が示唆されている。*Parp-1*、*Parp-9*、*Parp-10*、及び Parg について発がん感受性や遺伝子安定性への関与について動物モデル、細胞系を用いて解明する。ポリ ADP-リボシル化関連酵素変異マウスについてがん化の疾患モデルとなる可能性についても検討する。ヒト発がんにおけるポリ ADP-リボシル化修飾の異常の意義を明らかにし、新規のがん予防法の開発を試みる。

## B. 研究方法

1) 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<sup>-/-</sup>*) 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。

2) 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。

3) *Parp-1* 欠損や *Parp-1* 阻害下ではアルキル化剤処理やガンマ線照射に対する致死感受性が亢進する。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。

4) 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。

5) *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)

本研究で行う動物実験については、国立がんセンターの「動物実験に関する指針」を遵守した。ヒト腫瘍サンプルを用いる解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、指針適用範囲に該当する研究計画については、各機関の遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施する。

### C. 研究結果

1) *Parp-1* 欠損下でのトロホプラスト系譜誘導の機構を検討した。トロホプラスト系譜分化時に発現が誘導される *H19* 遺伝子の発現が未分化 *Parp-1<sup>-/-</sup>* ES 細胞において上昇し、共にインプリンティング制御を受ける *insulin-like growth factor 2 (Igf2)* 遺伝子発現レベルは *Parp-1<sup>-/-</sup>* ES 細胞において野生型と比較して低下する。Leukemia inhibitory factor (LIF) 除去による分化誘導後、*H19* 遺伝子は *Parp-1<sup>-/-</sup>* ES 細胞において顕著に発現が亢進する。*H19* 遺伝子の転写制御状態を更に検討した。未分化状態の *Parp-1<sup>-/-</sup>* ES 細胞における、*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、CTCF (CCCTC-binding factor) 結合領域周辺はほぼ完全にメチル化されていた。一方、*Parp-1<sup>-/-</sup>* ES 細胞では、CTCF 結合領域周辺で約 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。

2) 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。

3) 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一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。

4) *Parg* 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 *Parg* 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。*Parg* の機能阻害は、ES 細胞移植後の腫瘍形成の初期過程で抑制的な効果を有すると考えられる。

5) *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)- $\gamma$  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- $\gamma$  に対する応答性発現を示す可能性が示唆された。マウス及びヒト *Parp-9* 遺伝子転写開始点上流には、GC-box が存在し、TATA-less プロモーターであると考えられた。また、マウス各組織において mRNA の発現を調べたところ、*Parp-9* は *Dtx3l* と同様の遺伝子発現パターンを示し、機能

的相互作用を示す可能性が考えられた。

#### D. 考察

*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。

*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 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。

*Parg* の機能は、ES 細胞由来の腫瘍形成の初期増殖あるいは細胞死抑制過程に必要と考えられ、がんの予防的ターゲットとなりうるかどうかについての検討を行う予定である。

*Parp-9* は近接し発現制御領域が重複する *Dtx3l* と同様の遺伝子発現パターンを示し、機能的相互作用を示す可能性が考えられる。

#### E. 結論

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が示唆された。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

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

##### 2. 学会発表

1. 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-ribosylation), Tucson (米国), (2008年5月)
2. 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-ribosylation), Tucson (米国), (2008年5月)
3. 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-ribosylation), Tucson (米国), (2008年5月)
4. 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 $\gamma$ 線照射後の突然変異の解析, 第52回日

- 本葉学会関東支部大会、野田、(2008年10月)
5. 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回日本葉学会関東支部大会、野田、(2008年10月)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし



## 分担研究報告書

## リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測

研究分担者 木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

## 研究要旨

モデルマウスを用い、発がんリスクを担う発がん感受性遺伝子の単離とその寄与を解析することによって、ヒトへの貢献を果たすことを目的とした。マウス5番染色体上に存在するがん感受性遺伝子座を4Mb領域内にまで限定した。データベース検索から、多型をもつ遺伝子は *Ssh1* と *Sirt4* のみであり、それらが候補遺伝子として考えられた。同時に、感受性の早期診断法を開発するために、照射後萎縮胸腺内の前リンパ腫細胞の特徴を解析した。照射後40日でも約40%の萎縮胸腺でクローナル増殖する細胞が観察され、しかも分化を停止した状態であった。興味深いことに、このクローナル増殖を示す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* のアリル消失が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。分化能を保持し、クローナル増殖を示す血液前がん細胞として CML が知られており、そのモデルとしての可能性を示す。一方、ヒト大腸がん DNA での *Bcl11b* 変異解析から、2/20 の頻度で変異を発見した。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った。野生型のアレルは保持され、これはハプロ不全として寄与する可能性を示す。このことは、ヒト大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要である。

## A. 研究目的

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

マウスは系統により発がん感受性が異なり、遺伝的多型が存在する。感受性遺伝子はがんの発生母体となる正常細胞の増殖能に違いを与える遺伝子や、がん細胞の発生・進展する周りの環境を支配している遺伝子群などが考えられる。遺伝子型としてはホモ型・ヘテロ型、どちらも関与し得る。大腸がん発症に関しては、リパーゼの一種をコードする感受性遺伝子・*Mom1* が単離され、それは周辺環境を修飾すると言われているが、その寄与機構は未だに不明確である。発がん感受性遺伝子が同定されると、ヒトがんの発症への影響の検討、防護対策、薬物の開発が期待される。我々は *Bcl11b/Rit1* 遺伝子が腸管腫瘍修飾遺伝子であることを見だし、またリンパ腫

発症感受性遺伝子候補として MTF-1 を同定している。そこで、これらの感受性遺伝子の発がんへの役割を解明するとともに、感受性遺伝子が与えるヒト発がんリスクを測定することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) コンジェニックマウスの作製と発がん実験：5番染色体 BALB/c コンジェニックマウス (line G: 98.11Mb-116.12Mb が MSM と置換) 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。この IVF・ET 胚操作は新潟大学脳研究所動物実験施設に委託して行った。生後4週目より週に1度、2.5Gy の  $\gamma$  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。照射には新潟大学アイソトープ総合センターの Cs-137 線源内部照射型照射装置 (PS-3000SB; ポニー工業) を使用した。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸で判定した。

(2) FACS 解析：胸腺細胞分化マーカーである CD4、CD8 の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



腺細胞を取り出し測定した。DNA量とBrdU取り込み量とを指標にFACSscanで2次元に展開し、G1期分画、S期分画、G2/M期分画に分けた。さらに、この実験系を利用し、細胞の大きさをFACS-FSC解析で行った。すなわち、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。

(3)V(D)J組換え型の決定：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を設定した。PCR反応は3種類のプライマーの組み合わせ、すなわちF-D1 R-J1、F-D2 R-J2、F-D1 R-J2のプライマーセットで行った。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。

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

(5)ウエスタンブロット解析：通常の解析法に従った。抗体は市販されているものを用いた。

(6)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方法を用いた。組織固定にはパラホルムアルデヒドを用い、3種類のBcl11b抗体を用いた。Bcl11b-Zは今まで主に使ってきた抗体で、zinc-fingerドメインを抗原に用いたものであり、Bcl11b-CはC末端領域に対する抗体、Bcl11b-NはN末端領域に対する抗体である。すべてポリクローナル抗体である。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには本学の動物実験施設要綱に準拠し研究した。また、動物倫理の理解を深めるため動物実験施設が執り行う慰霊祭への出席を義務づけている。ヒト大腸組織でのBcl11bタンパク質発現の解析に関しては、新鮮組織の入手について新潟大学医学部倫理審査委員会に申請書を提出し、許可を得た。一方、ヒト大腸がんでのBcl11b変異解析では審査対象外であるが、新潟大学医学部ヒト遺伝子倫理審査委員会に申請書を提出し、審査対象外としての認定を得た。

## C. 研究結果

C-1 第5番染色体上の発がん抵抗性遺伝子領域のマッピングと候補遺伝子の検索：昨年度まで4種類のコンジェニックマウスを作製し、発がん実験を行ってきた。その結果、候補領域を104.47Mb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、前回と同様に発がん実験を行った。J1ではγ線照射したF1マウス93頭中、50頭が胸腺リンパ腫発症、33頭がリンパ腫未発症、10頭が不明死であった。またJ2では、F1マウス103頭中

55頭が胸腺リンパ腫発症、36頭がリンパ腫未発症、12頭が不明死であった。Kaplan-Meier解析の結果、J1、J2ともに、コンジェニック領域がC/M遺伝子型でもM/M遺伝子型でも発がん頻度に有意差はみられなかった。これらの結果から、感受性遺伝子候補領域は98.11Mb-112.32Mbには存在せず、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。従って、当初の12Mb(104.47Mb-116.12Mb)よりも8Mb短い領域に限定された。

そこで、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マウスデータベースから探索した。このとき、MSMと系統の近いMOLFのSNP情報をMSMとみなして比較した。その結果、*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た。MSM系統の塩基配列を決定し、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BALB/cやC57BL/6ではleucine、MOLFでは終止コドンとなっていることが報告されていた。同様にMSMの配列決定を行い、この多型の存在が間違いないことを確認した。

C-2 リンパ腫前駆体細胞の解析：放射線萎縮胸腺前リンパ腫細胞の解析を行ってきた。これは感受性のアッセイを初期に行う系の開発のものである。前年度までの結果から、前リンパ腫細胞の特徴の一部を明らかにした。それは、特定のV(D)J組み換え鎖のみをもつクローナルな細胞増殖や、G1期中型細胞(少し大型の細胞で細胞周期に以上があると推量される)の増加傾向などである。今回は照射後40日、80日の萎縮胸腺、それぞれ95、43のサンプルを用い、それらの特徴解析の集大成を行った。クローナル増殖の有無にはDJ組み換えパターンを、G1期中型細胞の大きさおよびS期細胞の検出とその割合測定には、FACS解析を行った(方法参照)。また、ヒト前がん組織の解析から、前がん細胞は細胞増殖亢進、それによるDNA複製ストレスが重要な特色と考えられている。そこで、前リンパ腫細胞にもその特徴がみられるかどうかを検討した。

C-2-1 クローナル増殖とBcl11bアレル消失：DJ組み換えによる解析では、照射後40日の萎縮胸腺では95胸腺の内、43が単一のDJ組み換えパターン、すなわちクローナル増殖を示唆する組み換えパターンを示した(C typeとする)。また、52が正常胸腺細胞と類似のDJ組み換えパターン(T typeとする)を示した。前者が示唆するクローナル増殖は前リンパ腫細胞の一つの特色と考えられる。一方、CD4、CD8胸腺細胞分化マーカーの発現測定では多くの細胞がダブ



ルポジティブ (DP) 細胞から成っていた。クローナル増殖を示す C type 胸腺細胞が DP 細胞であるという結果は、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する。

クローナル増殖という性質を付与する一つの要因に、遺伝子変化が考えられる。そこで、Bcl11b 遺伝子座のアレル消失 (LOH) 解析を行った。Bcl11b 遺伝子は胸腺リンパ腫で高頻度にアレル消失 (LOH) が観察され、しかもこのアレル消失は照射後初期から高頻度に観察されるからである (Ohi et al., 2007)。この解析では 95 サンプル中、38 が Bcl11b アレル消失パターンを示し、残りの 57 には変化がみられなかった。すなわち、C type 胸腺で 49% (21/43) に、T type 胸腺では 33% (17/52) に LOH が観察された。C type 胸腺細胞はすでにクローナルな細胞集団なので、高頻度に LOH が観察されることは想像の範囲内であったが、T type でも高頻度に LOH が検出されたのは予想外の結果であった。T type 細胞は色々な DJ 組換えパターンを示すことから、まだ分化能を保持していると考えられる。従って、これらの LOH (+) T type 細胞では Bcl11b のアレル消失が DJ 組換え前のプロジェクター細胞内で起こり、それがクローナル増殖を引き起こしていることを示唆する。

照射後 40 日と 80 日の萎縮胸腺で LOH (+) T type 細胞の割合を比較したところ、40 日では T type の LOH が 33% であったのに対し、80 日のそれは 5% (1/22) と有意に減少していた。一方、C type 胸腺では LOH の頻度に 40 日と 80 日では差がみられなかった。80 日での LOH (+) T type 細胞の減少は、40 日で検出された LOH (+) T type 細胞が正常に分化し、成熟 T 細胞となって末梢へ移出してしまったことによると考えられる。このシナリオに従えば、照射後 40 日から 80 日の間に骨髄から新しく胸腺に供給される造血系幹細胞は変異をもたず、胸腺内の変異をもった前駆細胞はそれに置き換えられていったと考えられる。一方、LOH (+) C type 細胞の割合は一定もしくはやや増加していたので、これらの前がん細胞は胸腺内に留まっていたと考えられる。

C-2-2 細胞増殖の亢進と DNA 複製ストレスチェックポイント制御：照射後 40 日と 80 日の前リンパ腫胸腺細胞に細胞増殖亢進、それによる DNA 複製ストレスがみられるかどうかを検討した。増殖亢進の指標としては、S 期分画にある細胞数の割合 (%) を FACS で測定した。また、G1 分画にある細胞の大きさを、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、萎縮胸腺のその割合を測定した。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。G1 期中型細胞の割合は 40 日、80 日ともに増える傾向にあった。この増加傾向は 80 日で顕著であった。これらの結果は、細胞増殖亢進はみられないものの、細胞周期の進行につ

いては部分的に亢進が観察されていることを示唆する。

一方、DNA 複製ストレスはこのチェックポイントに関与する  $\gamma$ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化をウエスタンブロット法でみた。  $\gamma$ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化、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ことを示唆する。総合すると、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重要な特色を示さないことが分かった。C-3 Bcl11b/Rit1 遺伝子の腸管腫瘍発生への修飾効果：ヒト大腸がんでは第 14 番染色体上の Bcl11b 遺伝子座で高頻度に LOH が観察される。これは大腸がんの発症に Bcl11b 遺伝子が関与する可能性を示唆する。そこで、大腸がんモデル・Min マウスと Bcl11b-KO ヘテロ型マウスを交配させ、ヘテロ型 Bcl11b マウスが野生型に比べ、Min マウスの腫瘍発生に違いをもたらすかを検討してきた。前年度までの結果は、Bcl11b-KO ヘテロ型が有意に大腸・小腸がん発症を促進することを明らかにしていた。また、Bcl11b タンパク質がマウス小腸の stem cells から TA 細胞に発現していることを示した。そこで、今年度はマウスからヒトを対象を移し、ヒト組織での発現、ヒト大腸がんでの Bcl11b 遺伝子変異の有無を調べた。

C-3-1 3 種類の 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。Bcl11b-Z は今まで主に使ってきた抗体で、zinc-finger ドメイン間の中間領域を抗原に用いたものであり、Bcl11b-C は C 末端領域に対する抗体、Bcl11b-N は N 末端領域に対する抗体である。Bcl11b-Z では、ヒト大腸の crypt 下部の細胞の核内に発現が観察された。この染色は Bcl11b-C 抗体を用いても確認された。ヒト組織と同様に、マウス大腸の crypt 内での発現を検討した結果、crypt 下部の細胞核が染まっていた。

C-3-2 ヒト大腸がんでの Bcl11b 遺伝子変異の有無を調べた。Bcl11b は 4 つのエクソンからなり、エクソン 1, 2, 3 は短くそれぞれ一組の primer set で PCR 反応を行った。一方、エクソン 4 は長いため、三組の primer sets を用いた。PCR 産物をダイレクトシーケンスした結果、現在まで 22 サンプルを検査したところ、2 つの変異を見いだした。ダイレクトシーケンスの結果は野生型と変異型が混在する結果だったので、変異を確認する目的で、それぞれの PCR 断片を T ベクターに組み込み、プラスミド DNA レベルで塩基配列を決定した。その結果、これらの変異が確認された。さて、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 (国立がんセンター、中釜先生との共同研究)。



#### D. 考察

D-1 発がん感受性遺伝子候補として、*Ssh1* と *Sirt4* を選択した。前者では 1042 個中 1034 番目のアミノ酸置換が、後者では 333 個中 106 番目のアミノ酸が終止コドンとなっていた。これらの変異は UniProt 解析からタンパク質の機能に直接影響を及ぼす可能性の高い nonsynonymous SNPs であることが明らかとなった。

*Ssh1* は Slingshot phosphate family に属し、LIM-Kinase による Ser-3 のリン酸化によって活性が抑えられる cofilin の脱リン酸化を行い、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。T 細胞は分化の過程で胸腺ストローマ細胞と相互作用することによって、細胞分化、細胞の移動を行う。従って、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、近年長寿遺伝子として注目を浴びている遺伝子で、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。*Sirt4* KO マウスを用いた実験では、すい臓の  $\beta$  細胞の GDH 活性が wild-type のそれと比べて上昇し、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る。血中インシュリン濃度の高い MSM ではアミノ酸合成が盛んに行われ、細胞増殖が行われやすい状況にあると予想される。このことから *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。この仮説を証明するには *Sirt4* の KO マウス (KO/KO) と KO ヘテロ (KO/-) を交配してえられた F1 マウスを用いて発がん実験を行い、感受性を含む S4 系統と同様の結果が得られるか確認する必要がある。

D-2 萎縮胸腺内に高頻度にクローナル増殖を示す C type 胸腺細胞が検出された。しかもその細胞のほとんどは DP 細胞であるという結果が得られた。このことは、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する。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、その SP 細胞は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必要がある。LOH (+) C type 細胞の多くは DP 細胞からなり、その DP 細胞がクローナルに増殖している。従って、LOH (+) C type 細胞は DP 分化段階で停止した状態にあり、末梢への移出停止の状態にあるはずである。この分化停止が LOH (+) C type 前がん細胞が胸腺内に留まる機構であると推量される。LOH (+) T type 細胞が C type となるには、*Bcl11b* 以

外の DNA 変異が必須であり、それらの候補として *Myc*, *Notch1*, *Ikaros*, *Pten* 等の遺伝子の変異などが考えられるが、これらは今後の検討課題である。

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 type 胸腺細胞に *Bcl11b* のアレル消失が高頻度に検出された。T type 胸腺細胞はまだ分化能を保持していることから、*Bcl11b* のアレル消失が 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。*Bcl11b* 以外の遺伝子異常でも T type 胸腺細胞のクローナル増殖を引き起こす可能性があるが、それらの遺伝子については不明である。今後は胸腺だけでなく末梢でもクローナリティや LOH 解析を行う必要がある。もし LOH (+) T type 細胞が本当に正常な分化を遂げ、末梢に移出しているなら、末梢の T リンパ球で *Bcl11b*-LOH が高頻度に検出されるはずである。また、もしこれらの細胞が成熟した後にがん化するとすれば、放射線発がん実験の末期にしばしば観察される脾臓やリンパ節の肥大化、リンパ腫の形成も説明可能となるだろう。

LOH (+) T type 細胞と CML とに類似性があげられる。どちらも分化能を保持し、細胞のクローナル増殖を示す。一方、ALL への Blast crisis は分化停止が要求されるが、LOH (+) C type 前がん細胞への移行も分化停止に関与するという点でもやはり類似性がある。LOH (+) T type 細胞は CML モデルとしての可能性が示された。

ヒト固形がんの前がん組織の特徴として、細胞増殖亢進と DNA 複製ストレス、それによるチェックポイントの活性化が知られている。この活性化は細胞のアポトーシスや老化を誘導し、がん化の初期段階でのバリアーとなっている。チェックポイント遺伝子としては、 $\gamma$ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 があり、これらの遺伝子はこの条件下では変異の選択圧がかかっている。実際、腫瘍化するとこれらの遺伝子に高頻度に変異が観察される。そこで、C type 前がん胸腺細胞のウェスタンブロット解析を行った。その結果、予想に反し  $\gamma$ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化、リン酸化の亢進は検出されなかった。すなわち、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ことを示唆する。総合すると、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重要な特色を示さないことが分かった。

D-3 *Bcl11b* タンパク質のヒトおよびマウスの大腸組織での発現細胞を調べた。大腸がん発症との関連を議論するとき、この発現の確認は必須である。その結果、ヒト大腸の crypt 下部の細胞の核内に発現が観察された。ヒト大腸と同様に、マウス大腸の crypt 内下部の細胞でも細胞核内で発現が観察された。これらの発現は、前回報告したマウス小腸 crypt 内の上部 1/3 の TA 細胞での発現とよく似た染色パターンであった。

次に、ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異の有無を調べた。その結果、2つの変異、一つは569番目のグリシンからアスパラギン酸への置換を、もう一つの変異は655番目のアミノ酸からのフレームシフト変異をもつ大腸がんを見いだした。前者の変異は進化的に保存されたアミノ酸の変異であるが、その変異が機能にどのような影響をもたらすかは不明である。一方、655番目のアミノ酸からのフレームシフト変異は *Bcl11b* の機能を null にする変異と考えられる。それは *Bcl11 C* 末端にある3つの Zinc finger domains を消失するからである。我々の変異マウスを用いた研究からC末端の Zinc finger domains を一つでも消失すると、マウスはKO変異と同様に致死となることが分かっている。

大腸がんDNAのダイレクトシーケンスの結果は野生型と変異型が混在する結果だった。これは野生型のアレルが残っている可能性を示唆する。大腸がんDNAでの詳細なLOH解析を変異解析後に行う必要があるが、野生型アレルの保持はハプロ不全を示す可能性がある。大腸がんモデル・Minマウスに *Bcl11b*-KOヘテロ型を導入したマウスに発症した小腸がんでは、やはり野生型のアレルは残存していた。従って、*Bcl11b* はハプロ不全大腸がん修飾遺伝子、またはがん抑制遺伝子として機能している可能性が高い。このことは、ヒトの大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要な点である。

## E. 結論

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増殖し、胸腺に留まることの重要性が明らかになった。また、この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* がん抑制遺伝子座でアレル消失が高頻度に検出された。この結果は、*Bcl11b* のアレ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り、このことはヒトの大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要な点である。

## F. 健康危険情報 特記することなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kominami R, Ohi H, Kamimura K, Maruyama M, Yamamoto T, Takaku K, Morita S, Go R, and Mishima Y.  $\gamma$ -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.

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.

### 2. 学会発表

Kominami R, Hirose S, Ishizawa R, Katsuragi Y, Sakuraba Y, Gondo Y. Dose-dependent effect of zinc finger transcription factor *Bcl11b* on differentiation of cytotoxic T cells. 22<sup>nd</sup> International Mammalian Genome Conference, Prague, Czech Republic (2008年11月)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

特記することなし。

### 2. 実用新案登録

特記することなし。

### 3. その他

なし



## 分担研究報告書

## 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明

研究分担者 大島 正伸, 金沢大学がん研究所, 教授

*K19-Wnt1/C2mE* マウスは、Wnt シグナルと  $\text{PGE}_2$  経路の活性化により胃がんを自然発生する。マイクロアレイ解析により、*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織の遺伝子発現プロファイルは、ヒト胃がん組織と類似していることが明らかとなり、このマウスモデルは発生の分子機構から腫瘍組織の性質までヒト胃がんを再現していることが確認された。このマウスモデルを用いた解析により、感染刺激に起因したマクロファージ活性化が胃発がんに重要であり、とくにマクロファージ由来  $\text{TNF-}\alpha$  が、胃上皮細胞の Wnt シグナルを亢進させる事を明らかにし、炎症反応による発がん促進機構の新しいメカニズムであると考えられた。さらに、 $\text{PGE}_2$  受容体の EP4 を介したシグナルが、胃がん発生に重要である可能性も示した。

## A. 研究目的

胃がん発生には、*Helicobacter pylori* 感染が密接に関わっており、感染にともなう炎症反応が胃がん発生に重要な役割を果たしていると考えられている。炎症で重要なプロスタグランジン合成酵素である COX-2 の発現誘導が、胃がん・大腸がんなどの消化器がん発生でも重要である事が疫学研究や遺伝学的解析などから明らかにされている。COX-2 の下流で産生されるプロスタノイドの中でも、プロスタグランジン  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) の腫瘍組織での産生量が高く、腫瘍発生に重要である可能性が指摘されている。一方で、ヒト胃がん症例の約 30-50% では Wnt シグナルの亢進が検出されており、Wnt シグナル活性化は、主要な胃がん発生原因の一つと考えられている。しかし、これまでのマウスモデルを用いた解析から、Wnt シグナルだけを活性化しても胃がんは発生せず、Wnt 亢進と同時に COX-2/ $\text{PGE}_2$  経路を誘導した *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃粘膜で、ヒトの腺管型胃がんと病理組織学的に類似した胃がんが自然発生することが明らかになっている。したがって、細胞の未分化性維持に重要な Wnt シグナルと、COX-2/ $\text{PGE}_2$  経路による炎症性反応の双方の作用が胃発がんに必要なと考えられる。しかし、 $\text{PGE}_2$  産生誘導にともなう炎症反応が、どのような分子機構により消化器がんに関与しているのかは未だ不明である。

本研究では、*K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がん組織が、遺伝子発現プロファイルにおいてもヒト胃がんを外挿しているか最初に解析し、モデルの有用性について検討する。さらに、感染刺激による  $\text{PGE}_2$  産生誘導や炎症反応が胃発がんに及ぼす影響を解明する事を目的として、*K19-Wnt1/C2mE*

マウスを用いた薬物投与実験、感染実験、および無菌化実験などを実施し、病理学および分子生物学的解析を行なう。

## B. 研究方法

## [胃がん組織マイクロアレイ解析]

30 週齢の野生型マウスおよび *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。

## [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 $\beta$ 、IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$  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。

## [腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析]

*K19-Wnt1* マウスの前癌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<sup>Δ716</sup>* 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