

200904006A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中釜 斉

平成22（2010）年 5月

目 次

I.	総括研究報告	
	環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究 中釜 斉	----- 1
II.	分担研究報告	
1.	がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明 中釜 斉	----- 15
2.	新規変異原・がん原物質の検索 若林敬二	----- 19
3.	バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンAの遺伝子傷害性の比較 鈴木孝昌	----- 25
4.	外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価 渡辺徹志	----- 37
5.	大気中粒子状物質が気道炎症に及ぼす影響に関する疫学的検討 島 正之	---- 41
6.	ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響 高野裕久	----- 45
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 51
IV.	研究成果の刊行物・別刷	----- 55

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業))
総括研究報告書

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

研究代表者 中釜 齊 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

環境中に存在する変異原や発がん物質について、新規の物質を明らかにすると共に、これらの環境中発がん要因によるがん発生の分子機構を解明することを目的とする。

内因性・外因性新規発がん物質に関しては、胆汁酸ニトロソ抱合体由来のDNA付加体をラット十二指腸液逆流モデルの腺胃から検出し、胆汁酸が内因性発がん要因である可能性を示した。また、遺伝子傷害性の解析から、自生植物由来の物質を地域性腎症の原因物質として特定した。大気汚染物質の健康影響に関しては、大気粉塵の主要な変異原物質は燃焼機関由来であり、中国大陸から飛来する黄砂により日本に影響する可能性を示した。また、健常者でもアレルギー素因がある場合には、大気汚染物質の一つであるNO₂の肺機能への影響が示された。日米、アジアでもリスクが危惧されているナノマテリアルは、マウスを用いた経気道暴露実験から、感染症に関連する肺炎を増悪する可能性がある。生活習慣病等の生体側因子のヒト発がんへの影響では、糖尿病モデル反応系からリスク原因となりうる新規変異原物質を単離した。ラット大腸発がんモデルを用いて、高内臓脂肪等と関連して発がん促進的に作用するシグナル経路の候補を見出し、がん発生の初期に関わりうる発がん物質特異的に変動する候補microRNAを選定した。

今後は、これらの知見の、発がん物質のリスク評価やがんの予防、大気汚染の健康影響への予防など、がん等の疾病予防対策への活用を目指す。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

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

景が深く関与している。環境要因のヒトの健康への影響の中で重要なものの一つは、体細胞及び生殖細胞における突然変異及びゲノム不安定性の誘発である。エピジェネティックな変化や免疫系等への影響もヒトの健康に対し多大な損傷を及ぼし、これらの総合的な結果として、がん等の種々の疾病が発生する。本研究では、環境中に存在する変異原や発がん物質について、新規の変異原性・がん原性物質を明らかにすると共に、これらの環境中発がん要因によるがん発生の分子機構を解明することを目的とする。大気汚染物質やナノ

A. 研究目的

ヒトの疾病発生には、環境要因と遺伝的背

マテリアルの呼吸器系及び免疫系への影響についても検討する。本研究で得られる成果は、日米両国のみならず、アジア諸国のがん等の疾病予防対策を講ずる上で有用な基礎的研究資料となる。具体的には、下記項目について解析した。

外因性及び内因性の新しい変異・がん原物質を検索、分離・同定し、ヒト発がんへの関与およびそのメカニズムを解明する。まず、生体内分子である胆汁酸のヒト発がんへの関与を検討した。また、しばしば癌にまで発展するバルカン半島の地域性の腎障害（バルカン腎症, BEN）の原因が、カビ毒オクラトキシン A (OTA) による穀物汚染の関与か、この地方に自生するウマノスズクサ科の植物由来のアリストロキア酸 (AA) かを、遺伝子傷害性の解析から検討した。(2)粒子状物質の健康被害に関する正確な情報を蓄積し、生体を与える影響に関連する因子を解明することを目的とする。まず、中国大陸から飛来する発がん関連物質の日本における大気汚染を解析した。また、糖尿病罹患者の高発がんリスクの原因を明らかにするため、同病態時に生体内で発生する変異原物質の構造を解析した。(3)大気中粒子状物質及びオゾン等の大気汚染物質が呼吸器系に及ぼす影響と、それに関連する因子を、健常成人を対象にした肺機能検査から疫学的に評価した。(4)ナノマテリアルの健康影響とメカニズムの解明のため、免疫・アレルギーを中心に検討した。まず、感染症関連疾患に及ぼす影響とそのメカニズムを解析した。(5)加熱魚肉食品中の変異原物質ヘテロサイクリックアミン(HCA)の1種である PhIP により誘発されるラット大腸がんモデルを用いて、高内臓脂肪及び高トリグリセライド(TG)血症の大腸発がんへの影響を、

脂肪性サイトカイン、或いは特定の細胞内シグナルの関与について調べた。(6)大腸発がん性の異なる各種 HCA をラットに投与し、大腸腺管において大腸発がん性物質特異的な発現様式を示す microRNA (miRNA)種を解析し、大腸がんの発生・成立における役割を解明する。

B. 研究方法

(1) 外因性及び内因性の新しい変異・がん原物質の検索

1a. 生体内分子である胆汁酸のヒト発がんへの関与

ラット十二指腸液逆流モデルおよび偽手術ラット各群 3 匹の腺胃 DNA を用いて、ニトロソ胆汁酸抱合体由来の DNA 付加体である β -カルボキシメチルデオキシグアノシン (β -CMdG) および 3-エタンスルホン酸デオキシシチジン (3-ESA-dC)、 N^6 -コール酸デオキシシチジン (N^6 -cholyI-dC) を定量した。DNA を核酸分解酵素で消化した後、HPLC で付加体を含む画分を分取し、 ^{32}P -ポストラベル法で解析した。

1b. バルカン腎症の原因物質の特定

lacZ、*cII* を標的遺伝子として持つ MutaTMMouse に AA、OTA 15 mg/kg を週 1 回、4 週間経口投与し、最終投与 7 日後にマウスより各種臓器を回収し、変異頻度を解析し、*cII* 変異体については、変異スペクトルを解析した。また、初回投与 48 時間後の末梢血を用いて小核試験を行った。OTA については、ddY マウスを用いたコメットアッセイにより腎臓における DNA 傷害性を検討した。

(2) 外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

2a. 大気粉塵の特性及びそれを含む気塊の移

動状況の解析

全国において、1年間を通して大気粉塵を捕集した。8月(夏期)、12月(冬期)、3月(黄砂期)に採取した大気粉塵のメタノール抽出物について、変異原性を Ames 法[YG1024 株、YG1029 株、S9 mix 存在下(+S9mix)及び非存在下(-S9mix)]により検討した。また、大気粉塵中の化学成分(金属、イオン類等)の定量分析を行なった。米国海洋大気庁(NOAA)の HYSPLIT を使用して後方流跡線解析を行った。

2b. 糖尿病病態時に生体内で発生する変異原物質の解析

糖尿病モデル反応系であるグルコースとトリプトファンのメイラード反応の反応物から、主要な変異原物質を各種分画方法により分離後、構造解析を行った。アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体(ABAQ)を合成した後に標準品として用いて、新規変異原物質と機器分析により比較した。ABAQは、Ames 法により変異原性を検討した。

(3) 大気中粒子状物質及びオゾンが呼吸器系に及ぼす影響に関する疫学的検討

東京都在住の健常な大学生 20 名(女性、18~23 歳)について、2009 年 4、7、10 月及び 2010 年 1 月に各 2 週間ずつ連続して毎日朝と夜の 1 日 2 回、電子式ピークフローメーターにより最大呼気流量(PEF)と 1 秒量(FEV₁)を測定した。近接する一般環境大気測定局における大気中浮遊粒子状物質(SPM)、二酸化窒素(NO₂)、光化学オキシダント(Ox)濃度の結果と合わせて、対象者の大気汚染物質への曝露量を評価して肺機能との関連を解析し、また、アレルギー素因の有無等の影響を調べた。

(4) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響

粒径の異なる TiO₂(15nm、50nm、100nm)

を使用し、単独あるいはグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖(LPS)と複合して、ICR マウス(♂, 6 週齢)に経気道曝露した。24 時間後に、肺胞洗浄液中の細胞構成、肺の血管透過性、肺または血中のサイトカイン・ケモカイン、凝固因子等について解析した。

(5) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

PhIP 誘発ラット大腸発がん感受性系統である F344 と抵抗性である ACI において、F344 は高内臓脂肪・高 TG 血症である。この動物モデルを用いて、F344 及び ACI における、肝臓、大腸腺管での脂肪細胞性サイトカインの遺伝子発現や特定の細胞内シグナル関連蛋白質の発現を解析した。

(6) 環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における miRNA の関与

雄 8 週令 F344 ラットに、大腸発がん性 HCA 4 種(PhIP, IQ, Glu-P-1, MeIQx)、非大腸発がん性 HCA 2 種(MeAαC, Trp-P-2)及び溶媒のみを各群 4 匹に胃内投与した。大腸腺管における miRNA の網羅的発現解析を行い、大腸発がん物質特異的に発現変動している miRNA を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト肺機能の測定は、所属する研究機関の倫理委員会の承認を得て、対象者から文書による同意を得て行った。

動物実験は、所属する研究機関の倫理委員会に対して研究開始前に所定の手続きを行い、承認を得た後に実施した。実験に用いる動物に関しても統計学的検定に必要な最小限の個体数を用いた。実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

(1) 外因性及び内因性の新しい変異・がん原物質の検索

1a. 生体内分子である胆汁酸のヒト発がんへの関与

ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃 DNA の全検体からコール酸由来の DNA 付加体である N^6 -cholylyl-dC が検出された。その付加体量は、 10^{11} ヌクレオチドあたり 0.8 ± 0.8 個であり、 O^6 -CmdG や 3-ESA-dC の付加体量と比較して少なかったが、偽手術群の腺胃 DNA からは N^6 -cholylyl-dC に相当する付加体スポットは検出されなかった。

1b. バルカン腎症の原因物質の特定

AA は、MutaTMMouse を用いた *in vivo* 変異原性試験において、腎臓、膀胱、前胃、大腸で、その他の腺胃、肺、肝臓、骨髄、脾臓、精巣と比較して非常に強い変異原性を示した。OTA は、いずれの臓器においても有意な変異頻度の増加は認められなかった。腎臓、膀胱における *cII* 変異体の変異スペクトルに関しては、AA では、AT to TA トランスバージョン変異が最も多く約半数を占めるのに対し、対照群では CpG 配列における GC to AT トランジション変異が約 3 割と最も多く、特徴的な変異スペクトルを示した。

OTA は腎臓におけるコメットアッセイでは陽性結果を示した。また、末梢血を用いた小核試験結果は、AA、OTA ともに陰性であった。

(2) 外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

2a. 大気粉塵の特性及びその移動状況の解析

大気粉塵抽出物は、YG1024 株 (-S9 mix) > YG1024 株 (+S9 mix) > YG1029 株 (-S9 mix) > YG1029 株 (+S9 mix) の順に陽性率が高く、

YG1024 株に対しては、ほぼすべての試料が変異原性を示した。多くの試料が、YG1024 株 (-S9 mix) の条件で、最も強い変異原活性を示し、全国的に冬期及び黄砂期の粉塵抽出物が強い変異原性を示した。変異原性は粉塵濃度と相関する傾向があった。また、燃焼由来の化学成分である SO_4^{2-} 濃度や Pb 濃度と正の相関性を示す傾向がみられた。

後方流跡線解析の結果、強い変異原性を示した大気粉塵が捕集された日の気塊の多くは、96 時間以内に中国大陸から移動してきたことが示唆された。

2b. 糖尿病病態時に生体内で発生する変異原物質の解析

糖尿病モデル反応系であるメイラード反応の反応物から得られた変異原物質を、ABAQ を標準品として各種機器解析で検討した結果、ABAQ と同定した。ABAQ は、Ames 試験で+S9mix で変異原性を示し、特に YG1024 で強い活性を示した。

(3) 大気中粒子状物質及びオゾンが呼吸器系に及ぼす影響に関する疫学的検討

朝の PEF 値は、2009 年 7 月は大気中 SPM 及び NO_2 、2009 年 10 月は O_3 の 24 時間平均濃度が増加すると有意な低下が観察された。夜の PEF 値は、2010 年 1 月に SPM 濃度が増加すると有意に低下した。FEV₁ 値も時期によって大気汚染物質濃度の増加により有意な低下が観察された。全期を合わせた解析では、朝、夜の PEF 値、FEV₁ 値ともに大気汚染物質濃度との間に有意な関連は認められなかった。

アレルギー素因を有する者では、 NO_2 の 24 時間平均濃度が 10ppb 増加すると、朝の FEV₁ 値が 24.7ml (95%信頼区間 4.1, 45.3) 低下し、夜の PEF 値が 2.85L/min (95%信頼区間 0.49, 5.22) 低下する有意な負の関連が認められた。

しかし、SPM 及び O_x 濃度との間に有意な関連は認められなかった。

(4) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響

マウスへの LPS および TiO_2 の単独曝露は、溶媒投与群に比べて、肺炎症と血管透過性を亢進させるが、LPS と 50 nm 以下の TiO_2 の併用曝露でより顕著にであった。また、LPS および TiO_2 の単独曝露は、肺組織及び血中におけるサイトカイン・ケモカインの発現も誘導した。さらに、LPS と TiO_2 の併用曝露では、LPS 単独曝露に比べて、肺組織中および血中の炎症性サイトカイン・ケモカインや、血中の凝固系因子のレベルが増加すること、粒径の小さい TiO_2 ほどその活性が強かった。

(5) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

大腸発がん感受性の違うラット 2 系統において、肝臓では脂肪代謝酵素の一つである *Lipoprotein lipase (Lpl)* 遺伝子の発現が、内臓脂肪の少ない ACI で高かった。大腸腺管の蛋白質発現では、リン酸化 Akt が F344 で高く、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示唆された。

(6) 環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における miRNA の関与

大腸発がん性の異なる HCA6 種を各々投与した F344 ラットの腺管で miRNA の網羅的発現解析を行った。約 130 種の miRNA が腺管で発現しており、クラスター解析により発がん物質とそれ以外の投与群に分類可能であった。更に、大腸発がん物質特異的に発現変動している miRNA として 14 種を選別し、これらを用いたクラスター解析においても、発がん物質とそれ以外の 2 群に分類可能であった。

D. 考察

(1) 外因性及び内因性の新しい変異・がん原物質の検索

1a. 生体内分子である胆汁酸のヒト発がんへの関与

ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃 DNA から、ニトロソ胆汁酸抱合体由来の DNA 付加体として β -CMdG 及び 3-ESA-dC を検出し、薬剤投与により、DNA 付加体量が偽手術群に近い値まで低下することを報告した。しかし、 β -CMdG 及び 3-ESA-dC の生体内生成には、グリシンやタウリン等の胆汁酸以外のニトロソ化合物の関与も示唆されている。今回、コール酸由来の DNA 付加体である N^1 -choly1-dC を生体試料から検出し、このことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロソ化が起り、 β -CMdG、3-ESA-dC 及び N^1 -choly1-dC の生成に関与することが示唆された。

1b. バルカン腎症の原因物質の特定

AA の変異原性は、発癌物質であるベンツピレンやジメチルニトロソアミンなどと同程度もしくはそれ以上であるが、OTA の活性は AA に比べると非常に弱く、原因物質の可能性は低い。しかし、OTA はコメットアッセイ陽性であり、DNA の初期損傷を誘発する可能性があり、AA と複合的に作用してその遺伝子傷害性を助長する可能性も考えられる。

AA 投与により MutaTMMouse で検出された AT to TA トランスポージョン変異が、BEN 患者に誘発された癌組織の *p53* 遺伝子の変異の特徴と一致すること及び患者から AA 由来付加体が検出されたことが報告され、AA が主な原因物質と考えられた。

(2) 外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

2a. 大気粉塵の特性及びそれを含む気塊の移動状況の解析

全国において捕集した大気粉塵の多くが YG1024(-S9 mix) で強い変異原性を示し、特に冬期や黄砂期に捕集した大気粉塵が強い活性を示した。また、大気粉塵中の燃焼由来物質量の指標になる、大気粉塵濃度、 SO_4^{2-} 濃度及び Pb 濃度と、変異原性の強さは相関する傾向がみられた。そして、後方流跡線解析から、強い変異原性を示した大気粉塵が含まれる気塊が中国大陸から移動して来たことが示唆された。これらより、燃焼機関より放出された物質が大気粉塵中の主要な変異原物質であり、それらの発生源は、大気粉塵を捕集した地域及び中国大陸に存在する燃焼機関であることが示唆された。

今後、1年間を通して捕集した大気粉塵の、他の時期の検体についても同様な解析を行ない、長距離を移動する大気粉塵中の発がん関連物質のヒトへの影響について解明する必要がある。

2b. 糖尿病病態時に生体内で発生する変異原物質の解析

糖尿病モデル反応系から、新規変異原物質 ABAQ を分離・同定した。ABAQ の Ames 試験における変異原性は、変異原・がん原性 HCA である PhIP と同程度であった。今後、ABAQ の生物活性を調べると共に、ヒト体内、特に糖尿病状態野進行との関連について明らかにする必要がある。

(3) 大気中粒子状物質及びオゾンが呼吸器系に及ぼす影響に関する疫学的検討

東京都在住の健康な大学生 20 名について、各季節に約 2 週間ずつ、毎日朝と夜の 1 日 2 回 PEF_R と FEV₁ を測定し、大気汚染物質濃度の変動との関連を検討した。PEF 値及び

FEV₁ 値は大気中粒子状物質濃度等の汚染物質濃度との間に有意な負の相関が認められる時期があった。アレルギー素因を有する者では全期を通した解析で、大気中 NO₂ 濃度との関連が有意であったが、SPM 及び O_x 濃度と肺機能とに有意な関連は認められなかった。健康者では、大気汚染の肺機能への影響が認められにくいと考えられるが、肺機能には様々な因子が影響しているため、大気汚染物質以外の因子についてさらに検討する必要がある。

(4) ナノ粒子・ナノマテリアルの呼吸器、免疫への影響

マウスへの TiO₂ の経気道曝露が、LPS に誘導される肺炎症と肺の血管透過性を亢進し、肺局所での炎症性サイトカイン・ケモカインの増加に寄与することが示唆された。さらに、LPS と TiO₂ の併用曝露は、LPS 単独曝露に比べて、血中の凝固因子と炎症性サイトカイン・ケモカインを増加させた。これらの増悪影響は、粒径が小さいほど強い可能性が示された。ラテックスやカーボンナノ粒子を用いた検討でも、同様の結果を見出ししており、また、粒径の小さいものほど、肺の深部に侵入し、血中に入って循環器系に影響を及ぼす可能性があることが報告されている。環境中に存在するナノマテリアルの曝露は、炎症性因子の増加や凝固系障害を介して、LPS に誘導される肺の炎症と血管透過性を亢進し、呼吸器・循環器系疾患を増悪する可能性が示唆された。

(5) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

PhIP 誘発ラット大腸発がん感受性の異なる F344 及び ACI では、内臓脂肪量等に違いがある。肝臓において、ACI では脂質代謝

酵素の一つである *Lpl* の遺伝子発現が高く、これが内臓脂肪量等の違いに寄与している可能性がある。但し、ACF 誘発性を指標とした遺伝学的解析から、*Lpl* 遺伝子発現の違いは、ゲノム構造の違いではなく、遺伝子発現の制御機構等に起因する可能性が考えられた。

F344 及び ACI の大腸腺管における蛋白質発現では、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示唆された。ラット系統間の内臓脂肪量等の違いが、大腸腺管における PI3K-Akt シグナル経路の活性化を誘発し、大腸発がん促進的に作用する可能性がある。ヒトにおいても肥満・高脂血症等の生活習慣病と関連して、発がん促進的に作用しているシグナル経路の候補と考えられる。

(6) 環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における miRNA の関与

大腸発がん性の異なる各種 HCA を投与したラット大腸腺管での miRNA の網羅的発現解析から、大腸発がん性 HCA 特異的に変動する 14 種の miRNA を選択し、これらが発がんの初期過程に寄与する可能性が示唆された。これらの miRNA 種を更に絞り込み、大腸発がん物質を効率的に判定できる新規判定法への応用を検討する。また、特定した miRNA の発現を発がん感受性の異なるラット系統間で比較し、遺伝的要因としての可能性も検討する。

E. 結論

内因性・外因性の新規発がん性物質の同定に関して、コール酸由来の DNA 付加体がラット十二指腸液逆流モデルの腺胃 DNA より検出され、胃内で胆汁酸のニトロソ化が起こり、内因性の DNA 付加体の生成に関与し、胃発がんを誘発することが示唆された。また、自生

植物由来の物質を地域性腎症であるバルカン腎症の原因物質として特定し、環境中の変異原の探索の重要性を示した。

経済発展の著しいアジアでは粒子状物質による大気汚染が深刻だが、日本の大気粉塵中の主要な変異原物質は全国的に燃焼機関由来の物質であることが示唆された。その量は冬期や黄砂期に多くなる傾向があり、中国大陸から飛来する黄砂による大気中粒子状物質の日本への影響が示唆された。また、健常者でもアレルギー素因がある場合には、NO₂ が肺機能へ影響することが示唆された。大気中粒子状物質のヒトへの曝露状況を解明するとともに、生体側の肺機能への影響因子など大気汚染物質以外の因子についても検討する必要がある。

日米、アジアでもリスクが危惧されているナノマテリアルが感染症に関連する肺炎を増悪すること、さらにその増悪影響のリスクは、粒径が小さいほど高いことを明らかにした。環境中に存在するナノサイズの粒子や工業的に生産されるナノマテリアルの経気道曝露は、循環器・呼吸器系疾患を持つ高感受性集団に対して、増悪影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更なる詳細なナノマテリアルの健康影響評価が必要である。

生活習慣病等の生体側因子のヒト発がんへの影響では、糖尿病モデルからリスク原因となりうる新規変異原物質を単離し、肥満・高脂血症と関連して発がん促進的に作用するシグナル経路の候補を見出した。発がんの分子機構の解明では、がん発生の初期に関わりうる発がん物質特異的に変動する候補 miRNA を選定した。

今後は、これらの知見の、発がん物質のリスク評価やがんの予防、大気汚染の健康影響

への予防など、がん等の疾病予防対策への活用を目指す。

F. 健康危険情報

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. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H, Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in Vitro: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus. *J Biol Chem*, 284: 25585-25592, 2009.
2. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, 583: 2710-2714, 2009.
3. Endo H, Hosono K, Fujisawa T, Takahashi H, Sugiyama M, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary conditions. *Gut*, 58: 1637-1643, 2009.
4. Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, Gaiddon C, Nakagama H, Jochemsen AG, Taya Y, Okamoto K Cytoplasmic tethering is involved in synergistic inhibition of p53 by Mdmx and Mdm2. *Cancer Sci*, 100:1291-1299, 2009.
5. 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.
6. 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.
7. Takasuka N, Takahashi M, Hori Y, Kitahashi T, Iigo M, Imai T, Yoshimi N, Sugimura T, Wakabayashi K, Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett.*, 275: 150-157, 2009.
8. Kawanishi M, Nishida H, Totsuka Y, Nishimura K, Wakabayashi K, Yagi T, Mutagenic specificity of N-nitrosotaurocholic acid in supF shuttle vector plasmids. *Genes Environ.*, 31: 9-14, 2009.
9. Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Totsuka Y, Wakabayashi K, Imaida K, Enhancing effects of a high fat diet on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-

- quinoxaline-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Mol. Med. Rep.*, 2: 701-706, 2009.
10. Ohe T, Suzuki A, Watanabe T, Hasei T, Nukaya H, Totsuka Y, Wakabayashi K, Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl-derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. *Mutat. Res.*, 678: 38-42, 2009.
 11. Ozeki M, Muroyama A, Kajimoto T, Watanabe T, Wakabayashi K, Node M, Synthesis of a new mutagenic benzoazepinoquinolinone derivative. *Synlett*, 11: 1781-1784, 2009.
 12. Yamamoto M, Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Totsuka Y, Takahashi-Nakaguchi A, Matsumoto Y, Sugimura T, Wakabayashi K, Molecular cloning of apoptosis-inducing Pierisin-like proteins, from two species of white butterfly, *Pieris melete* and *Aporia crataegi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 154: 326-333, 2009.
 13. Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K, Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part. Fibre. Toxicol.*, 6: 23, 2009.
 14. Nishigaki R, Watanabe T, Kajimoto T, Tada A, Takamura-Enya T, Enomoto S, Nukaya H, Terao Y, Muroyama A, Ozeki M, Node M, Hasei T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Isolation and identification of a novel aromatic amine mutagen produced by the Maillard reaction. *Chem. Res. Toxicol.*, 22: 1588-1593, 2009.
 15. Nishimura K, Totsuka Y, Higuchi T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K, Analysis of an RNA adduct formed from aminophenylnorharman. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*, 53: 211-212, 2009.
 16. Mutoh M, Komiya M, Teraoka N, Ueno T, Takahashi M, Kitahashi T, Sugimura T, Wakabayashi K, Overexpression of low-density lipoprotein receptor and lipid accumulation in intestinal polyps in Min mice. *Int. J. Cancer*, 125: 2505-2510, 2009.
 17. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Kurahashi N, Mutoh M, Yamamoto S, Suzuki M, Moriyama N, Wakabayashi K, Tsugane S, Visceral fat volume and the prevalence of colorectal adenoma. *Am. J. Epidemiol.*, 170: 1502-1511, 2009.
 18. Wakabayashi, K, Chemical and biological approaches for detecting environmental causes of cancer. *Genes Environ.*, 31: 87-96, 2009.
 19. Murakami Y, Imai N, Miura T, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y, Hada N, Yokoyama Y, Suzuki H, Mitsunaga K, Chemical confirmation of the structure of a mutagenic aminophenylnorharman, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole: An authentic synthesis of

- 9-(4'-nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole as its relay compound. *Heterocycles*, 80: 455-462, 2010.
20. 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.
21. Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 298: C140-C148, 2010.
22. Hasei T, Watanabe T, Endo O, Sugita K, Asanoma M, Goto S, Hirayama T. Determination of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in surface soil and airborne particles, and its possible sources, diesel particles and incinerator dusts, *Journal of Health Science*, 55, 567-577, 2009.
23. Kawanishi M, Watanabe T, Hagio S, Ogo S, Shimohara C, Jouchi R, Takayama S, Hasei T, Hirayama T, Oda Y, Yagi T, Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *invitro* and *in vivo*, *Mutagenesis*, 24, 279-284, 2009.
24. Oda Y, Hirayama T, Watanabe T, Genotoxic activation of the environmental pollutant 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in *Salmonella typhimurium* umu strains expressing human cytochrome P450 and *N*-acetyltransferase, *Toxicology Letters*, 188, 258-262, 2009.
25. Yamazaki S, Shima M, Ando M, Nitta H. Modifying effect of age on the association between ambient ozone and nighttime primary care visits due to asthma attack. *J Epidemiol* 19: 143-151, 2009.
26. Shima M, Yoda Y. An ecological study of lung cancer mortality and severe air pollution in the 1960s in an industrial city in Japan. *Asian Journal of Atmospheric Environment* 3: 9-18, 2009.
27. 島正之. 微小粒子状物質の健康影響. *日本医事新報* 4442, 60-64, 2009年
28. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Koike E, Shimada A. Size effects of latex nanomaterials on lung inflammation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 234: 68-76, 2009.
29. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Hirano S, Nishikawa M, Takano H. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237: 306-316, 2009.
30. Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Koike E, Kamachi T, Sadakane K, Ichinose T: Titanium dioxide nanoparticles aggravates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Exp Biol Med*, 234: 314-322, 2009.

2. 学会発表

1. 五十嵐麻希、筆宝義隆、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、ラットモデルを用いた大腸発がん感受性とメタボリック症候群を関連づける遺伝子探索の試み、第68回日本癌学会学術総会、2009年
2. 落合雅子、五十嵐麻希、益谷美都子、杉村 隆、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第68回日本癌学会学術総会、2009年
3. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現変動とその大腸発がんへの関与、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
4. 寺岡直哉、武藤倫弘、高橋真美、上野俊也、荒木智子、杉村 隆、若林敬二、HMG-CoA還元酵素阻害薬 Pitavastatin の Min マウス腸ポリープ生成に対する抑制作用、がん予防大会 2009 (第16回がん予防学会)、2009年
5. 武藤倫弘、飯郷正明、寺岡直哉、高橋真美、北橋 宗、上野俊也、杉村 隆、若林敬二、窪田直人、門脇 孝、Azoxymethane 誘発マウス大腸発がんに対する adiponectin 遺伝子欠損の影響、がん予防大会 2009 (第16回がん予防学会)、2009年
6. 山本健一、小林昌彦、塩谷文章、若林敬二、NBS1 は ATR 活性化に直接関わる、第68回日本癌学会学術総会、2009年
7. 戸塚ゆ加里、今井俊夫、西川秋佳、能美健彦、川西優喜、八木孝司、市瀬孝道、杉村隆、若林敬二、ナノ粒子により誘発される遺伝毒性：in vitro 小核、in vivo コメックトおよび変異原性の解析、第68回日本癌学会学術総会、2009年
8. 山本真史、日比谷優子、戸塚ゆ加里、中野毅、中口 梓、杉村 隆、若林敬二、メソテリンプロモーターを用いたピエリシン-1 遺伝子発現による抗がん活性、第68回日本癌学会学術総会、2009年
9. 武藤倫弘、飯郷正明、寺岡直哉、上野俊也、高橋真美、高須伸二、堀 美香、杉村 隆、若林敬二、アディポネクチンの腸発がんにおける役割、第68回日本癌学会学術総会、2009年
10. 樋口 孝、戸塚ゆ加里、西村興一、杉村隆、若林敬二、内因性変異原・がん原物質アミノフェニルノルハルマンの RNA 付加体形成による miRNA 機能の修飾、第68回日本癌学会学術総会、2009年
11. 西村興一、戸塚ゆ加里、川原信夫、杉村隆、若林敬二、アミノフェニルノルハルマン由来の DNA リン酸付加体の解析、第68回日本癌学会学術総会、2009年
12. 寺岡直哉、武藤倫弘、上野俊也、高橋真美、杉村 隆、若林敬二、肥満マウスにおけるアゾキシメタン誘発大腸発がんの促進、第68回日本癌学会学術総会、2009年
13. 北橋 宗、武藤倫弘、杉村 隆、若林敬二、今井俊夫、小動物用 X 線 CT を用いたシリアンハムスターの BOP 誘発脾臓腫瘍の画像化、第68回日本癌学会学術総会、2009年
14. 上野俊也、北橋 宗、武藤倫弘、寺岡直哉、谷中昭典、杉村 隆、若林敬二、ウレタン誘発マウス肺腫瘍生成に対するインドメタシンの影響と micro-CT を用いた評価、第68回日本癌学会学術総会、2009年
15. Wakabayashi K. Causes and Mechanisms of

- Colon Cancer Development, and Strategies for Its Prevention, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
16. Totsuka, Y., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Biological activities of endogenous mutagens/carcinogens, aminophenylnorharman and N-nitrosobile acid conjugates, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
17. Totsuka Y, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Kawanishi M, Yagi T, Sugimura T, Wakabayashi K., Genotoxicity of nanoparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
18. 小林沙衣、西崎真理奈、小関 稔、梶本哲也、野出 學、長谷井友尋、渡辺徹志、戸塚ゆ加里、若林敬二、メイラド反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
19. 松本陽子、戸塚ゆ加里、増田修一、加藤竜也、能美健彦、後藤純雄、杉村 隆、若林敬二、ナノ粒子により誘発される in vivo 遺伝毒性、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
20. 桐谷 英昌、西村 興一、戸塚 ゆ加里、川原 信夫、矢島 博文、杉村 隆、若林 敬二、アミノフェニルノルハルマン (APNH) 由来のDNAリン酸付加体の構造解析、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
21. 尾後早耶佳、川西優喜、戸塚ゆ加里、若林敬二、八木孝司、微細粒子状物質のDNA損傷性の評価、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
22. 加藤竜也、増田修一、市瀬孝道、長谷井友尋、渡辺徹志、戸塚ゆ加里、若林敬二、木苗直秀、In vivo における3,6-dinitrobenzo[e]pyreneの遺伝毒性、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
23. 西村 興一、戸塚 ゆ加里、川原 信夫、杉村 隆、若林 敬二、ニトロソ胆汁酸抱合体由来タンパク質付加体の解析、日本環境変異原学会 第38回大会、2009年
24. 鈴木孝昌, Suresh Thirupathi, 押澤正, Ramesh Doss, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用、日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、2009年
25. T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
26. C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Differential gene expression and gene networks induced with genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse liver examined by quantitative

- real-time PCR, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
27. H. Takasawa, H. Suzuki, I. Ogawa, Y. Shimada, K. Kobayashi, Y. Terashima, H. Matsumoto, R. Ohta, K. Oshida, J. Tanaka, C. Aruga, N. Ikeda, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, T. Imamura, A. Miyazaki, Y. Saitou, S. Minowa, M. Kawabata, M. Hayashi Summary of collaborative studies of liver micronucleus assay in young rats - JEMS/MMS Collaborative Study Group, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
28. T. Suzuki, Y. Luan, A. Kohara, M. Kogi, S. Tanabe, M. Honma, T. Yamaguchi, K. Suzuki Patterns of c-myc amplification revealed by the CGH array, Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment, 2009
29. C. Furihata, T. Watanabe, K. Suenaga, H. Takasawa, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Comparative analysis of gene expression and network between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse and rat liver examined by quantitative real-time PCR, Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment, 2009
30. T. Suzuki, Genomic and Proteomic Approach in Toxicology, International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concerns, 2009
31. T. Suzuki, Proteomics approach to find new biomarkers for toxicity, International Conference on Molecular Tools in Environmental Toxicology, 2009
32. 鈴木孝昌, 小原有弘, 小木美恵子, 田邊思帆里, 本間正充 8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子領域増幅形式の解析、第 68 回 日本癌学会学術総会、2009 年
33. 鈴木孝昌、個の医療の実現に向けて必要となる診断技術、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会、2009 年
34. 鈴木孝昌、小原有弘, ラマダン アリ, 菊池裕, 本間正充, 林 真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A、日本環境変異原学会第 38 回大会、2009 年
35. スレッシュ ティルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 宮澤明史, 鈴木和博, 鈴木孝昌、ショットガンプロテオミクスによる変異原研究-遺伝子傷害性物質処理したマウス尿を使った検討、日本環境変異原学会第 38 回大会、2009 年
36. 降旗千恵, 渡辺貴志, 末永和也, 高沢博修、鈴木孝昌, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 小枝暁子, 成見香瑞範, 大信田系裕, 前田晃央, 平山満朝, 佐久間智宏, 真田尚和, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世 トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 (2009 年) : ラットとマウス肝臓における qPCR 法による遺伝子発現比較解析、日本環境変異原学会第 38

回大会、2009年

2. 実用新案登録

37. 西川可穂子, 山下香織, 石井暁子, 伊藤友美, Thiruppathi Suresh, 鈴木孝昌, 藤原葉子 高脂肪食マウス肝臓におけるプロテオーム解析－食餌性レスベラトロールの評価－、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年

なし

3. その他

なし

38. 穀内修、渡辺徹志 他、大気粉塵の生物活性・化学成分の季節変動及び大陸からの長距離輸送による影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年

39. 小林沙衣、渡辺徹志 他、新規メイラード反応生成物アミノアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性、日本薬学会第 130 年会、2010 年

40. 島正之. 大気汚染の健康影響の新たな課題：微小粒子とオゾン. (サテライトシンポジウム) 第 68 回日本公衆衛生学会総会、2009 年

41. 余田佳子, 田村憲治, 櫻井四郎, 島正之、大気汚染物質が女子大学生の肺機能に与える短期的影響. 第 50 回大気環境学会年会、2009 年

42. 井上健一郎、柳澤利枝、小池英子、高野裕久、工業用ナノマテリアルが呼吸器の脆弱状態へ及ぼす修飾影響、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、2009 年

43. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Koike E, Shimada A. Impacts of latex nanomaterials on sensitive lung inflammation. HORIBA International Conference CDBIM Symposium、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

研究分担者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

環境要因による発がんモデルを用いて、がんの発生・成立に関わる遺伝的要因を明らかにするために、heterocyclic amine (HCA)誘発ラット大腸発がんモデルを用いて、二つの観点から検討した。第一に、内臓脂肪量等と大腸発がんとの関連を、PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルにおいて感受性であり高内臓脂肪を示す F344 と抵抗性系統 ACI を比較することにより検討した。肝臓では、脂質代謝酵素 *Lpl* 遺伝子の発現が ACI で高く、これが内臓脂肪量等の違いに寄与する可能性が示された。大腸腺管では、リン酸化 Akt 蛋白質の発現が F344 で高く、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示唆され、この経路が発がん促進的に作用する可能性が示された。第二に、環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における microRNA (miRNA) の関与の観点からであり、まず、発がんの初期段階に関与する miRNA を探索した。F344 に大腸発がん性の異なる各種 HCA を投与し、大腸腺管での miRNA の網羅的発現解析を行い、大腸発がん性 HCA 特異的に発現変動している 14 種の miRNA を選択した。これらの miRNA を用いたクラスター解析では、発がん性 HCA 投与群とそれ以外に分類可能であり、これらの miRNA が発がんの初期過程に寄与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

環境中に存在する変異原・がん原物質などの発がん要因によるがん発生の分子機構を解明することを目的とし、がんの発生・成立に関わる遺伝的要因を解明する。遺伝的要因は環境要因との相互作用が重要であり、環境要因による発がんモデルを用いて、がんの初期発生に関わる遺伝子の量的および質的な変化や発がん感受性に寄与する遺伝的な要因を明らかにする。

環境要因による発がんモデルとしては、加熱魚肉食品中に含まれる変異原物質

heterocyclic amine (HCA)、特に PhIP により誘発されるラット大腸発がんモデルを用い、二つの観点から研究を行った。第一は、高内臓脂肪、高トリグリセライド(TG)血症と大腸発がんとの関連の観点からである。肥満・高脂血症等の生活習慣病はヒト発がんとの関連が指摘されており、内臓脂肪量及び血中 TG 量の異なるラット系統を用いて、大腸発がんとの関連を検討した。PhIP 誘発ラット大腸発がんにおいて感受性系統 F344 は、抵抗性系統 ACI と比較して、内臓脂肪量が多く、高 TG 血症である。この

動物モデルを用いて、脂質代謝酵素及び脂肪性サイトカインの遺伝子発現、或いは特定の細胞内シグナル経路の関与の点から調べた。第二は、環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における microRNA (miRNA) の関与の観点からである。大腸発がん感受性である F344 ラットを用いて、発がんの初期過程に関与する miRNA を探索し、同定した miRNA に関して大腸発がん感受性の異なる系統間で発現を解析し、遺伝的要因としての可能性を検討する。

B. 研究方法

1. 高内臓脂肪、高 TG 血症と大腸発がんとの関連

基礎食を投与した雄 12 週令 F344 及び ACI ラットの大腸腺管、肝臓、等の臓器を採取し、凍結保存した。肝臓から total RNA を抽出し、脂質代謝関連酵素、脂肪細胞性サイトカイン等の遺伝子発現を、Multiplex gene expression System (Beckman Coulter) により解析した。

大腸腺管に関しては、網羅的遺伝子発現解析及び Gene Set Enrichment Analysis により、F344 と ACI で発現に差がある遺伝子群と示唆された(未発表データ)、PI3K-Akt シグナル経路に関連する蛋白質の発現を Western blot 解析で検討した。

2. 環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における miRNA の関与

大腸発がん性 HCA 4 種(PhIP, IQ, Glu-P-1, MeIQx)、非大腸発がん性 HCA 2 種(MeAαC, Trp-P-2)もしくは溶媒のみを、雄 8 週令 F344 ラット各群 4 匹に胃内投与(25 mg/kg 体重, 3 日間)し、最終投与から 16 時間後に大腸腺管を採取した。Rat

miRNA array (Agilent、350 種の miRNA を搭載)を用いて、網羅的発現解析を行い、大腸発がん物質特異的に発現変動している miRNA を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、国立がんセンターの動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

1. 高内臓脂肪、高 TG 血症と大腸発がんとの関連

大腸発がん感受性の違うラット 2 系統(F344, ACI)において、肝臓における遺伝子発現では、脂質代謝酵素の一つである *Lipoprotein lipase (Lpl)* の遺伝子発現が、ACI で高かった。大腸腺管において、PI3K-Akt シグナル経路に関連する蛋白質発現は、リン酸化 Akt 及びリン酸化 S6 の発現が F344 で高く、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示唆された。

2. 環境中発がん要因による大腸発がんの感受性における miRNA の関与

大腸発がん性の異なる HCA を投与した F344 ラットの大腸腺管の miRNA の網羅的発現解析を行った。約 130 種の miRNA が大腸腺管で発現しており、クラスター解析の結果、大腸発がん性 HCA 投与群と非大腸発がん性 HCA 投与群に分類可能であった。更に、溶媒投与群と比較して大腸発がん性 HCA 投与群で特異的に発現しており、かつ大腸発がん性 HCA 投与群と非大腸発がん性 HCA 投与群で発現が違う miRNA 14 種を選択した。これらの miRNA 種を用いたクラスター解析において、大腸発がん

性 HCA 投与群とそれ以外の投与群に分類可能であった。

D. 考察

大腸発がん感受性の違う 2 系統のラット F344 及び ACI では、内臓脂肪量及び血中 TG 量に違いがあり、遺伝的要因に起因するこれらの内的要因が、大腸発がん性の違いに寄与していると考えられる。肝臓における脂質代謝酵素・脂肪細胞性サイトカインの遺伝子発現解析の結果、ACI では脂肪代謝酵素の一つである *Lpl* 遺伝子の発現が高かった。これが血中 TG 値や内臓脂肪量等の違いに寄与している可能性がある。但し、(F344xACI)F1xACI backcross ラットの ACF 誘発性を指標とした QTL 解析において、*Lpl* 遺伝子座近傍の Lod score は低いので（未発表データ）、*Lpl* 遺伝子発現の違いは、ゲノム構造の違い(SNP 等)に起因するのではなく、遺伝子発現の制御機構等に違いがある可能性が示唆された。

F344 及び ACI の大腸腺管における蛋白質発現では、リン酸化 Akt 及びリン酸化 S6 の発現が F344 で高く、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示唆された。ラット系統間の内臓脂肪量等の違いが、大腸腺管における PI3K-Akt シグナル経路の活性化を誘発し、大腸発がん促進的に作用する可能性がある。ヒトにおいても肥満・高脂血症等の生活習慣病と関連して、発がん促進的に作用しているシグナル経路の候補と考えられる。組織学的解析により、候補シグナル経路の当該分子の関与を実証する予定である。

大腸発がん性の異なる各種 HCA を投与したラット大腸腺管を用いた miRNA の網羅的発現解析から、大腸発がん性 HCA 特異的に変動する 14 種の miRNA を選択し、

これらの miRNA が発がんの初期過程に寄与する可能性が示唆された。これらの miRNA 種を更に絞り込み、大腸発がん物質を効率的に判定できる新規判定法への応用を検討すると共に、大腸がんの発生・成立に及ぼす影響を解明する。更に、特定した miRNA の発現を発がん感受性の異なるラット系統間で比較し、遺伝的要因としての可能性を検討する予定である。

E. 結論

大腸発がん感受性系統 F344 及び抵抗性系統 ACI では、内臓脂肪量及び血中 TG 量が異なるが、肝臓では *Lpl* 遺伝子の発現が ACI で高く、これが内臓脂肪量等の違いに寄与している可能性がある。大腸腺管では、リン酸化 Akt 蛋白質の発現が F344 で高く、PI3K-Akt シグナル経路の活性化が示され、発がん促進的に作用する可能性が示唆された。

F344 に、大腸発がん性の異なる各種 HCA を投与し、大腸腺管における miRNA の網羅的発現解析を行った結果、大腸発がん性 HCA 特異的に発現変動している 14 種の miRNA を選択した。これらの miRNA を用いたクラスター解析で発がん物質投与群とそれ以外に分類可能であり、発がんの初期過程に寄与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K,

- Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in Vitro: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus. *J Biol Chem*, 284: 25585-25592, 2009.
2. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, 583: 2710-2714, 2009.
 3. Endo H, Hosono K, Fujisawa T, Takahashi H, Sugiyama M, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary conditions. *Gut*, 58: 1637-1643, 2009.
 4. Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, Gaiddon C, Nakagama H, Jochemsen AG, Taya Y, Okamoto K Cytoplasmic tethering is involved in synergistic inhibition of p53 by Mdmx and Mdm2. *Cancer Sci*, 100:1291-1299, 2009.
 5. 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.
 6. 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.
2. 学会発表
 1. 五十嵐麻希、筆宝義隆、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、ラットモデルを用いた大腸発がん感受性とメタボリック症候群を関連づける遺伝子探索の試み、第68回日本癌学会学術総会、2009年
 2. 落合雅子、五十嵐麻希、益谷美都子、杉村 隆、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第68回日本癌学会学術総会、2009年
 3. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現変動とその大腸発がんへの関与、日本環境変異原学会第38回大会、2009年
 - H. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし