

200911020A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

医薬品等の安全性評価を目的とした新規発がん物質
予測法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 岡村 匡史

平成21（2010）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

- 医薬品等の安全性評価を目的とした新規発がん物質予測法の開発・・・・・・・・ 1
岡村 匡史

II. 分担研究報告書

1. L1-RTP トランスジェニックマウスの作製に関する研究・・・・・・・・ 5
岡村 匡史
2. L1-RTP 検出システムの構築に関する研究・・・・・・・・ 8
石坂 幸人
3. 個体レベルでの発がん物質評価系の検証・・・・・・・・ 12
津田 洋幸
4. 新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化に関する研究・・・・・・・・ 14
松田 潤一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ 17

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

医薬品等の安全性評価を目的とした新規発がん物質予測法の開発
研究代表者 岡村 匡史 国立国際医療研究センター研究所・室長

ヒトがんの発生原因の約80%は環境中に存在する化学物質であるといわれており、医薬品、農薬さらには食品に含まれる化学物質がどの程度ヒトのがん発生に関わっているかを明らかにすることは、医学的にもまた社会的にも極めて重大な課題である。本研究では、ヒトゲノム中に散在するレトロトランスポゾンである LINE1 に注目し、ゲノムの不安定化を誘発する LINE1 の動きを生体レベルでモニターできるトランスジェニックマウスを樹立し、新規発がん物質予測法を開発する。本年度は、内在性プロモーター型トランスジェニックマウスを16系統樹立した。その中から、LINE1 レトロトランスポジション（以下、L1-RTP）のバックグラウンドが低く、外来性刺激に高い反応性を示す系統を選抜し、DMBA/TPA を用いた二段階発がんモデルにより、皮膚がんを作製した。9個の腫瘍の内、5例で L1-RTP が確認された。樹立したトランスジェニックマウスは、すべて医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに寄託し、供給体制を整備した。

腫瘍における L1-RTP の関与を明らかにするモデルとして、Cre/loxP システムを用いて活性型 Hras または Kras が誘導されるトランスジェニックラットを樹立し、ヒト膵管がんモデルとして有用であることを明らかにした。

分担研究者

石坂 幸人 国立国際医療研究センター研究所
部長

津田 洋幸 名古屋市立大学 特任教授

松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所
生物資源研究部 研究リーダー

の化学物質が新たに作られている現状を考え合わせると、様々なメカニズムを想定した評価系が必要である。

本研究では“ゲノムの不安定化を誘発する LINE-1レトロトランスポジション (L1-RTP) の発がん過程におけるプロモーション効果”に着目した、新たな発想に基づく発がん物質予測法を開発する。本年度は内在性プロモーター型トランスジェニックマウスを中心に、リソースの整備を行った。

A. 研究目的

発がん物質は変異原性を含む遺伝毒性の有無により、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に大別される。近年、安全性試験の適性実施規範（GLP）規制のもと、国際的な発がん性試験実施基準に従って、種々の化学物質の発がん性が検討された結果、試験での陽性結果が必ずしもヒトにおける発がん性を真に反映しているとは言えないことがわかってきた。特に種々の薬理作用を有する医薬品でそのような例が多く見られ、それらの多くは遺伝子変異を誘発しない非遺伝毒性発がん物質である。発がん物質の発がん機序は複雑多岐であり、現在もなお医薬品、農薬および工業製品などを用途として多数

B. 研究方法

(1) 内在性プロモーター型トランスジェニックマウスの樹立とその資源化(岡村、松田)

L1 の内在性プロモーターである 5'UTR の下流に ORF1 及び ORF2、その下流にリポーター遺伝子である EGFP cDNA の発現ユニットが「逆向」に挿入されている導入遺伝子を構築した。この導入遺伝子を、BDF1 マウスから採取した前核期胚の雄性前核に注入し、定法に従いトランスジェニックマウスを作製した。系統化した雄マウスの凍結精子を

ドライシッパーにより医薬基盤研究所に輸送し、基盤研実験動物研究資源バンクにおける定法に従い、精子の運動性を評価した。さらに、体外受精により受精卵を作製し、2細胞期胚をガラス化凍結保存した。

(2) PCR 法による L1-RTP の検出 (石坂)

L1-RTP をモニターするための EGFP は、イントロンが挿入されている。L1-RTP では mRNA の転写は必須であり、L1-RTP の過程でこのイントロンは消失する。そこで、このイントロンを挟む形でプライマーを設定し、ゲノム DNA を PCR 解析することで L1-RTP 誘導の有無が検定できる。即ち、導入遺伝子がそのままゲノムに挿入された一次産物は約 1040 塩基の DNA として検出され、L1-RTP を経た二次産物では約 140 塩基のバンドとして検出される。

(3) DMBA/TPA による二段階発がんモデル (石坂、岡村)

L1-RTP トランスジェニックマウスに 400pmol の DMBA を皮膚に塗布した後、約 15nmol の TPA を週 2 回の頻度で繰り返し塗布し、皮膚の腫瘍を誘発した。

(4) ヒト膵がんモデル (津田)

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを、Hras250 または Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入 (4x10⁹ ifu/ml, 150 μl) することによって膵管がんを発生させた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は各研究者が所属する機関の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および各研究者が所属する機関の動物実験に関する指針を遵守する。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講ずる。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守す

る。なお、当研究ではヒト由来試料を取り扱わない。

C. 研究結果

(1) 内在性プロモーター型トランスジェニックマウスの樹立とその資源化

L1 の内在性プロモーターである 5'UTR の下流に ORF1 及び ORF2、その下流にイントロンが挿入されている EGFP cDNA の発現ユニットが「逆向」に挿入された導入遺伝子を用いて、内在性プロモーター型 L1-RTP トランスジェニックマウスを 16 系統樹立し、14 系統について MEF を作製した。寄託した凍結精子の品質に問題はなく、新規発がん物質評価系モデルマウスとして 16 系統を実験動物研究資源バンクのホームページ上に公開した。

(2) PCR 法による L1-RTP の検出

培養細胞系で再現性よく L1-RTP が誘導される X 線 (4.5Gy) を MEF に照射し、X 線に高い反応性を示す 4 系統を選抜した。さらに、L1-RTP の反応性が高く、バックグラウンドが低い 2 系統 (#4, #67) を選抜した。

(3) DMBA/TPA による二段階発がんモデル

二段階発癌モデルとしてよく解析されている 7,12-dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を組み合わせた発癌システムを用い、L1-RTP トランスジェニックマウスに DMBA/TPA 誘発皮膚がんを作成した。DMBA/TPA 投与開始約 13 週後から徐々に皮膚がんの発症を認め、腫瘍における L1-RTP 誘導の有無を PCR 解析した。その結果、解析し得た 9 個の腫瘍の内、5 例で L1-RTP を示す 140 塩基の PCR 増幅バンドが検出された。

(4) ヒト膵がんモデル

Cre リコンビナーゼにより活性型ヒト Hras^{G12V} または Kras^{G12V} が発現するトランスジェニックラットの膵管に Cre 発現アデノウイルスを注入し、膵管上皮細胞、介在管上皮細胞および腺房中心細胞に由来する、膵管

がんモデルを開発した。膵管に由来するヒトに類似した膵管がんが発生することから、ヒト膵がんモデルとして有用である。

D. 考察

がん細胞はその初期段階でゲノムの安定性維持に関わる遺伝子に突然変異が起こり、その子孫細胞が遺伝子変異を蓄積することにより、さらに突然変異を誘発する事で、最終的には自立的な増殖能と他組織への転移能を持った悪性細胞へ進展する。つまり、がんのプロモーション（促進）にはゲノムの不安定化が大きく関わっている事が予想される。

ヒトゲノム中には「動き回り得る遺伝子」が約45%存在し、中でも1細胞中に50万コピー以上（全ゲノムの約17%）存在する。LINE1（以下、L1）は特徴的で、その内の80-100コピーは正常細胞中에서도3-30回/出生の頻度でゲノム内を動き得る。L1のゲノムへの挿入により、ゲノムのシャッフリングが起こり、細胞内遺伝子発現様式が変化する。L1は周辺の配列と共に移動するため、挿入部位に大きな配列の変化をもたらし、L1-RTPは余分な塩基配列の挿入、エクソンの欠損、染色体の転座などのゲノム変異が内在的に誘発される。

L1の挿入は腫瘍細胞中のAPC遺伝子やMyc遺伝子にも検出されており、がん化における関与が示唆されている。最近、L1-RTP頻度がX線照射により上昇することが示され、DNA二重鎖（DSB）切断によりL1-RTP頻度が上昇する事、がん化のごく初期にDSBシグナルが惹起され、がん化が進行するためにはこのストレスシグナルが解除される必要があることが報告された。L1-RTPはATM依存的であるため、発がん初期段階で誘導されるL1-RTPによりゲノム変化が誘導され、その結果、通常「細胞の老化」に行くべきDSB誘発シグナルが解除されることで、がん化が進行する可能性が考えられる。

本年度、L1-RTP トランスジェニックマウスを用い、DMBA/TPA 誘発皮膚癌においてL1-RTP が検出され、発癌におけるL1-RTP 関与の可能性が強く示唆された。次年度以降、

樹立したトランスジェニックマウスを用いて、L1-RTP の発癌における役割を明らかにすると共に、各種がん原物質を投与し、発がん物質予測法としての有用性を評価していく予定である。

E. 結論

L1-RTP トランスジェニックマウスは、レトロトランスポジションが誘発するエピジェネティックな変化から恒常的なゲノム構造異常誘発過程の評価系でもあるため、発がん物質の評価だけでなく、これら化合物の発がん機序の解明に有用なツールと考えられる。さらに、DMBA/TPA による二段階発がん過程で、腫瘍中にL1-RTP が誘導されることを認めたため、発がんプロモーターの作用を明らかにするツールとしても期待される。L1-RTP はゲノムにランダムに生じることが提唱されているが、腫瘍細胞ではがん関連遺伝子など特異的な領域に挿入されている可能性も考えられる。L1-RTP トランスジェニックマウスは、EGFP の配列を指標に挿入部位が同定できるため、L1-RTP と腫瘍との関連性を直接的に明らかにするための、ツールとしても有用である。

現在もなお医薬品、農薬および工業製品などを用途として多数の化学物質が新たに作られている。医薬品・食品の安全性評価に非常に有用なツールを提供し、国民の健康増進および産業の発展に広く貢献でき、幅広いニーズが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

G. 研究発表

（1）論文発表

1. Konno, R., Okamura, T., Kasai, N., Summer, K.H., and Niwa A. Mutant rat strain lacking D:-amino-acid oxidase. *Amino acids*, 37, 367-375(2009).
2. Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, Tsuda H. Mature acinar cells are refractory to carcinoma

development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci*, 101: 341-346, 2010.

3. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 31: 717-724, 2009.
4. Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. *Dev. Biol.* 331: 140-151, 2009.
5. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009.

(2) 学会発表
(国内)

1. Okudaira N, Minemoto Y, Hoshino S, Koyama T, Nakagama H, Ochiai M, Ishizaka Y. LINE-1 retrotransposition by ayl hydrocarbon receptor and MAP kinase activated by food-borne carcinogens. 日本癌学会、横浜、2009年10月.
2. Okudaira N, Ishizaka Y. Aryl hydrocarbon receptor mediates L1 retrotransposition by food-borne carcinogens and an environmental pollutant. 日本癌学会、横浜、2009年12月.
3. 田中創始, 大嶋浩, 深町勝巳, アレキサンダー・デビッド, ニ口充, 城卓志, 津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68回日本癌学会総会、横浜、2009年10月.
4. 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、高木博隆「心筋症シリ

アンハムスター (J2N 系)の心臓における 6 型コラーゲンの増加」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009年5月14日-16日

5. 野口洋子、高野 薫、小浦美奈子、中村和臣、鈴木 治、松田潤一郎「低蛋白飼料投与による EL てんかんモデルマウスの繁殖効率の改善(II)－臓器重量、血液生化学値の検討」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009年5月14日-16日
6. 増井 徹、高橋一朗、亀岡洋祐、松田潤一郎、古江(楠田)美保、川原信夫、保富康宏、吉田東歩、厚生労働省：創薬・医学研究用リソースとネットワーク拠点整備、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日-12日、横浜
7. 小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、中村和臣、松田潤一郎「クローズドコロニーddYの中から発見された走行発作を伴うてんかん様の症状を呈するマウスについて」第104回関西実験動物研究会、京都、2009年12月11日
(国外)
Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Increased collagen type VI content in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters (J2N strain). 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Denver, CO, USA, November 8-12, 2009.

H. 知的所有権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

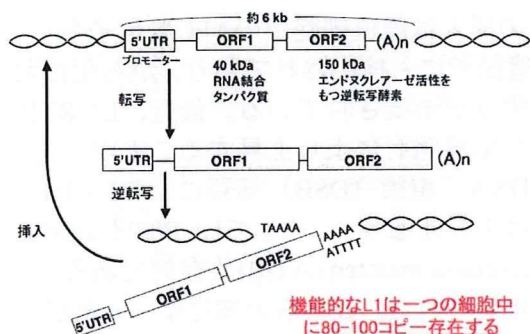
L1-RTP トランスジェニックマウスの作製に関する研究
分担研究者 岡村 匡史 国立国際医療研究センター研究所・室長

ヒトがんの発生原因の約80%は環境中に存在する化学物質であるといわれており、医薬品、農薬さらには食品に含まれる化学物質がどの程度ヒトのがん発生に関わっているかを明らかにすることは、医学的にもまた社会的にも極めて重大な課題である。本研究では、がん原物質のL1-RTP誘導能に着目し、個体レベルでL1-RTPを検出しようとするL1-RTPトランスジェニックマウスを樹立した。

A. 研究目的

ヒトゲノムに締める遺伝子は数%にすぎず、残りの多くは非翻訳領域や繰り返し配列で構成されている。興味深いことに動く可能性のある遺伝子は、トリ約9%、マウス約39%、ヒトでは約45%と高等生物になる程その割合は増加している。ヒトの場合、DNA型トランスポゾンほとんど存在せず、その多くはRNA型レトロトランスポゾンである。その中でもLINE1は約52万コピー存在し、その割合が最も多い。LINE1、(以下L1)は、プロモーター領域である5'UTR, RNA結合タンパク質をコードするORF1、エンドヌクレアーゼ活性を持つ逆転写酵素をコードするORF2からなり、全長6kbのトランスポゾンである(図1)。

図1. LINE1(L1)は転移する毎にコピー数が増大する



L1は自身で、転写、逆転写、挿入を完遂することができ、転移するごとにコピー数が増える。レトロトランスポゾンの転移は通常は抑制されているが、放射線照射、感染、倍数体化などのゲノムストレスによってその抑制

が解除される事が知られている。本研究では、ゲノムの不安定化を誘発するLINE1レトロトランスポゾン(以下、L1-RTP)に着目し、医薬品、食品などに含まれる化学物質の発がん性を検証する新たな評価系を開発することを目的とし、L1-RTPを*in vivo*で検出可能なトランスジェニックマウスを作製する。

B. 研究方法

1) L1-RTP トランスジェニックマウスの作製

L1の内在性プロモーターである5'UTRの下流にORF1及びORF2、その下流にリポーター遺伝子であるEGFP cDNAの発現ユニットが「逆向」に挿入されている導入遺伝子を構築した(図2)。

図2. 導入遺伝子の構造



この導入遺伝子を、BDF1マウスから採取した前核期胚の雄性前核に注入し、定法に従いトランスジェニックマウスを作製した。導入遺伝子の有無は、マウス尾からDNAを抽出し、EGFP特異的プライマー(5'-CATTGGGGCTGGAGTAGATT-3', 5'-AAGGAGGACGGCAACAT-3')を用いたPCR法にて同定した。

2) マウス胚線維芽細胞(MEF)の調製

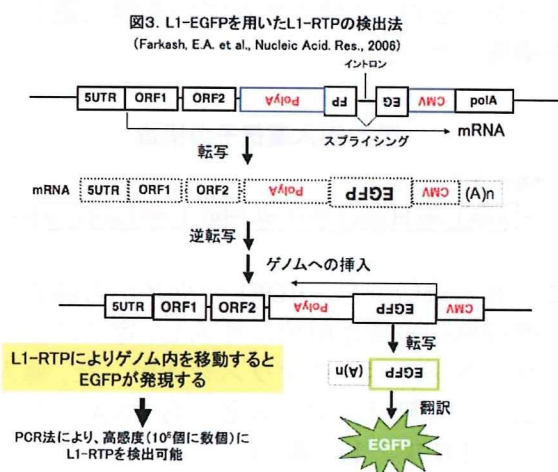
13.5~15.5日齢マウス胎仔を母体から無菌

的に採取し、抗生剤含む PBS が入ったシャーレ中で胎盤、頭部、内蔵を除き、体部のみを細切した。さらに、0.1%トリプシン-PBSを加え、30分間細胞を混和後、MEF培養液(DMEM, 10% FBS)で培養した。樹立したMEFにX線照射(4.5 Gy)を行った後6日間培養後、DNAを抽出し、L1-RTPを評価した。(倫理面への配慮)

全ての動物実験は機関内の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関の指針を遵守する。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講ずる。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関の指針に則って実施した。

C. 研究結果

L1-RTPの検出はEGFPの発現あるいはゲノムへの挿入を指標にモニターする。L1の内在性プロモーターである5'UTRの下流にORF1及びORF2があり、その下流にリポーター遺伝子であるEGFP cDNAの発現ユニットが「逆向」に挿入されている(図3)。

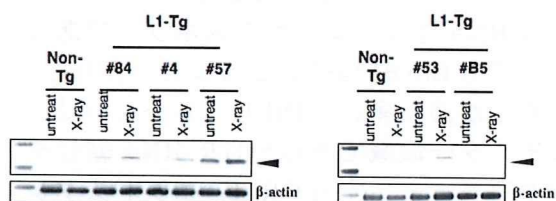


EGFPはイントロン配列により分断されているため、逆向きに挿入されているCMVプロモーターからはEGFP蛋白質翻訳は誘導されない。5'UTRにより転写されたmRNAが逆転写され、ゲノムに組み込まれると、逆

向き発現カセット内のCMVプロモーターにより、下流のEGFP mRNAが合成され、初めて機能的なEGFPが発現する。本研究では、分担研究者の石坂らが開発した、PCR法による高感度L1-RTP検出系を用いて、L1-RTP頻度を評価した。

導入遺伝子を830個のBDF1受精卵雄性前核に注入し、106匹(12.8%)の産仔を得た。PCR法で導入遺伝子を確認した結果、18匹(17.0%)に導入遺伝子を確認された。内在性プロモーター型L1-RTPトランスジェニックマウスを16系統樹立し、14系統についてMEFを作製した。培養細胞系で再現性よくL1-RTPが誘導されるX線(4.5Gy)をMEFに照射し、X線に高い反応性を示す4系統を選抜した(図4)。さらに、反応性が高く、バックグラウンドが低い2系統(#4, #67)の培養胚盤胞期胚細胞塊からES様細胞を樹立した。

図4. MEFを用いたX線照射に対する反応性の評価



MEFにX線照射(4.5 Gy)を行った後6日間培養を行いDNAを抽出した

PCR法によるL1-RTPの検出

D. 考察

L1の挿入は腫瘍細胞中のAPC遺伝子やMyc遺伝子にも検出されており、がん化における関与が示唆されている。最近、L1-RTP頻度がX線照射により上昇することが示され、DNA二重鎖(DSB)切断によりL1-RTP頻度は上昇する事、そしてL1-RTPがataxia telangiectasia mutated (ATM)依存的事であることが報告された。これらの知見から、発がん初期段階で誘導されるL1-RTPによりゲノム変化が誘導され、その結果、通常「細胞の老化」に行くべきDSB誘発シグナルが解除されることで、がん化が進行する可能性が考えられるが、いずれも培養細胞を用いた結果であり、個体レベルでL1-RTPを検出し、腫瘍と

の関連性を明らかにできる評価系は報告されていない。本研究では、がん化におけるL1-RTP関与を個体で検証できるマウスモデルを16系統樹立し、X線に対する反応性を指標に2系統を選抜した。個体レベルでL1-RTPを評価できるため、二段階発がんモデル7,12-dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)など、二段階発がんモデルの解析も可能となった。このシステムでは、遺伝毒性がん原物質であるDMBAを一回作用させた後、非遺伝毒性がん原物質（腫瘍プロモーター）であるTPAを繰り返し作用させることで皮膚がんが発症するが、特に、腫瘍プロモーターであるTPAがどのような役割を担っているかは不明であった。内在性プロモーター型L1-RTPトランスジェニックマウスは、非遺伝毒性がん原物質の作用を明らかにする上でも、有用なツールになると考えられる。

E. 結論

内在性プロモーター型L1-RTPトランスジェニックマウスを16系統樹立した。これらのマウスを用いることで、個体レベルでのがん原物質の評価が可能となった。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Konno, R., Okamura, T., Kasai, N., Summer, K.H., and Niwa, A. Mutant rat strain lacking D: -amino-acid oxidase. *Amino acids*. 37, 367-375(2009).

2. 学会発表

特記すべき事無し。

H. 知的所有権の出願・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

「L1-RTP検出システムの構築」に関する研究

分担研究者 石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 部長

ヒト L1 遺伝子を導入して作成されたトランスジェニックマウスを用いて、二段階発癌実験として確立されている発癌実験を行い、腫瘍中の L1-RTP の有無を PCR 法で解析した。その結果、解析した 9 個の腫瘍の内 5 ヶに L1-RTP の誘導を認めた。また培養細胞を用いた解析により腫瘍プロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) によって L1-RTP が誘導されることを認めた。今後、TPA によって誘導される L1-RTP の標的ゲノム部位や標的遺伝子及びその機能解析を行うことで、L1-RTP の発癌における意義を明らかにする。

A. 研究目的

ヒトゲノム中には「動き回り得る遺伝子」（TP 遺伝子：transposable gene）が約 45% を占め、その比率はマウス（39%）よりも多い。中でも一細胞中に 50 万コピー以上（全ゲノムの約 17%）存在する LINE1 (Long Interspersed Nucleotide Element、以下 L1) は特徴的で、その内の 80-100 コピーは正常細胞中でもゲノム間を動き得る（以下 RTP: retro-transposition L1-RTP）。L1-RTP によって細胞内遺伝子発現様式は変化し、細胞の個性が誘導される。一方、胚細胞で誘導される L1-RTP によって重要な遺伝子機能が破壊され、「疾病」という形で個体発生に異常が誘発する。これまでに L1 遺伝子の挿入が原因と考えられる先天性疾患が 20 種類以上報告されている。さらに、乳癌や大腸癌で癌関連遺伝子内に挿入された L1 遺伝子も検出されており、体細胞での L1-RTP の誘導と癌化における関与の可能性も指摘されている。

このようにヒト L1 遺伝子を搭載されたマウスは、ヒトの疾病機序を明らかにするための重要なツールとして機能する可能性が多いに期待される。そこで分担研究者は、L1-RTP の検出系を確立し、L1-RTP によって誘導される「ランダムなゲノム変異誘導」の発癌における意義を明らかにすることを目的として、研究を行った。これまでの予備的な実験結果として以下の結果を得ている。即

ち、

1. 癌原物質によって L1-RTP が誘導される：培養細胞を用いた解析によって、加熱食品中に存在するヘテロサイクリックアミン (HCAs: heterocyclic amines)、ベンツピレン (B[a]P)、3 メチルコラントレン (3-MC) が L1-RTP が誘導すること、その頻度は 10^{-4} から 10^{-5} であることを見出した。
2. ヒト L1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (L1-Tg マウス) に HCA をピコモルレベルで投与すると発癌の標的臓器で L1-RTP が誘導された。

以上の結果は、L1-RTP が発癌と密接に関連することを強く示唆する。

一方、癌化過程の究めて初期に DNA 損傷 (DSB: DNA double-strand breaks) シグナルが惹起され、ATM (ataxia telangiectasia mutated) 依存なシグナルによって細胞が老化へと誘導され、結果として変異した細胞が排除される機構の存在が指摘されている。即ち、細胞増殖を阻害することで癌化の回避を誘導する自己防衛反応と考えられている。さらに、L1-RTP が DSB によって誘導されることまた、この現象が ATM 依存的に誘導されることも報告されている。

以上の情報から、L1-RTP は発癌初期に重要な役割を担っている可能性が考えられる。この可能性を明確にすることは、L1-RTP の病態における意義を理解するために究めて重要であると考えられる。

二段階発癌モデルとして

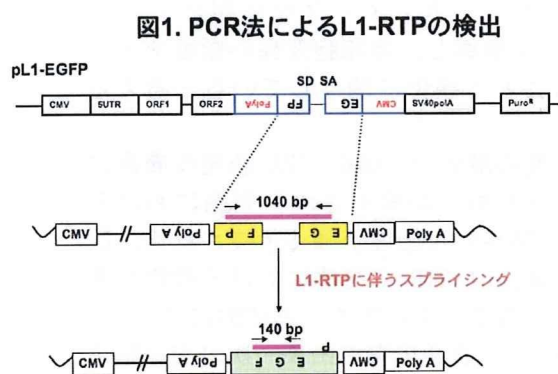
7, 12-dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を組み合わせた発癌システムが良く解析されている。このシステムでは、遺伝毒性癌原物質である DMBA を一回作用させた後、非遺伝毒性癌原物質 (腫瘍プロモーター) である TPA を繰り返し作用させることで皮膚癌が発症する。DMBA によって H-ras 遺伝子、コドン 61 の変異が誘導されることも報告されている。

良く解析されている DMBA/TPA 誘発二段階発癌モデルであるが、TPA が具体的にどのような役割を担っているかに関しては、未だ全く不明である。このシステムにおける L1-RTP の関与と意義を明らかにすることで、L1 遺伝子のヒト腫瘍発症における意義を理解するだけでなく、発癌プロモーター (非遺伝毒性癌原物質) の作用を理解することが可能になるものと思われる。そこで、分担研究者は平成 21 年度に L1-Tg マウス DMBA/TPA 誘発皮膚癌を作成し、腫瘍における L1-RTP 関与の有無を明らかにした。

B. 研究方法

1) PCR 法による L1-RTP の検出

リポータープラスミド DNA として使用する pL1-EGFP を使用した (図 1)。



このプラスミド DNA にはイントロンが挿入された EGFP cDNA が挿入されている (図 1, SD, splicing donor; SA, splicing acceptor)。L1-RTP では mRNA の転写は必須であり、L1-RTP の過程でこのイントロンは消失する。そこで、このイントロンを挟む形でプライマ

ーを設定し、ゲノム DNA を PCR 解析することで L1-RTP 誘導の有無が検定できる。即ち、導入したプラスミド DNA がそのままゲノムに挿入された一次産物は約 1040 塩基の DNA として検出され、L1-RTP を経た二次産物では約 140 塩基のバンドとして検出される。

2) DMBA/TPA による二段階発癌

ヒト L1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (L1-Tg マウス) の内、種々組織中の L1-RTP のバックグラウンドが低く、外来性刺激によく反応性を示す 4 番系統のマウスを使用した。400 nmol の DMBA を塗布した後、約 15 nmol の TPA を週 2 回の頻度で繰り返し塗布した。

3) TPA による L1-RTP 誘導

ヒト肝臓癌細胞株である HuH-7 細胞に pL1-EGFP を導入した後、ピュロマイシンで 2 日選択した。トリプシンで細胞を剥がし、同数の細胞を複数のプレートに分けた後、TPA を 20-100nM の濃度で 96 時間作用させた。DNA を抽出し、上述した PCR 解析に供した。

(倫理面への配慮)

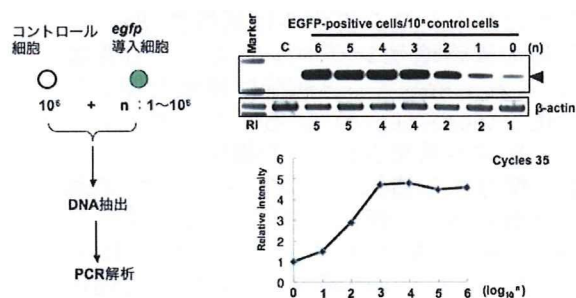
L1-RTP に関する in vitro 及び in vivo 実験は組換え DNA 実験機関内承認実験であり、その計画書は当該委員会に審査を依頼し、承認後、実験を行った。

C. 研究結果

1) PCR 法による L1-RTP の検出

本検出システムによって、 10^6 個の細胞中に 10 個程度の細胞に生じた L1-RTP でも検出できることが分かった (図 2)。

図2. PCR検出系は 10^6 個に数個の頻度で生じる L1-RTP 陽性細胞を検出できる



イントロンを含まない EGFP 発現細胞をコントロール細胞と種々の濃度で混和したプ

ールを調整し、ここから抽出した DNA を用いて解析を行った。右には増幅した 140 bp バンドと、相対的なシグナル強度をプロットした図を示す。図中 n は 10^6 個の陰性細胞中に 10^n 個の陽性細胞が含まれていることを示す。

2) DMBA/TPA による二段階発癌
DMBA/TPA 投与開始約 13 週後から徐々に皮膚癌の発症を認めた(次頁 図 3、矢印)。

図3. DMBA/TPAで誘発された腫瘍で L1-RTPが誘発された



摘出可能になった時点で腫瘍を切除し、L1-RTP 誘導の有無を PCR 解析した。その結果、解析し得た 9 個の腫瘍の内、5 例で L1-RTP を示す 140 塩基の PCR 増幅バンドが検出された。図 3、8 個の独立した検体についての解析結果を示す。バンドサイズは 140 塩基であり、図 1 に示しように L1-RTP の結果生じたバンドである。

3) TPA による L1-RTP 誘導

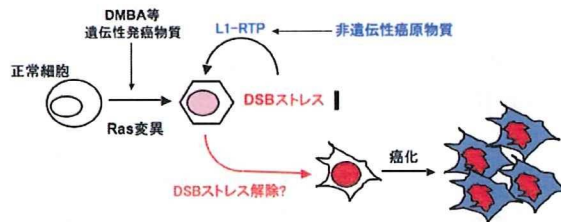
HuH-7 細胞を用いた解析の結果、20-100nM の TPA で L1-RTP の誘導が認められた(図 4)。

D. 考察

2006 年、独立した 2 つの研究グループから、癌化のごく初期に DSB シグナルが惹起されること、そして癌化が進行するためにはこのストレスシグナルが解除される必要性があることが報告された。癌化初期のこの ATM 依存的なストレスシグナルは活性型 Ras の発現等の異常増殖シグナルによっても惹起され、これが持続すると細胞は増殖を停止し「老化」(Senescence) する。もし何らかのゲノム異常が誘発され、この細胞内ストレス惹起に関与する遺伝子が障害されれば、増殖抑制は解除され、癌化は進行する。一方、二段階発癌の誘発因子として知られる DMBA/TPA による皮膚癌では、細胞が悪性化する前段階から H-ras 遺伝子の変異(コドン 61 の A から T への変異)誘導されることや DSB によって L1-RTP が ATM 依存的に誘導されることも報告されている。

以上をまとめると以下の仮説が成り立つ(図 5)。

図5. L1-RTPの癌化における意義:
発癌初期過程で惹起されるDSBストレスシグナルの解除



遺伝性癌原物質によって Ras を代表とする癌遺伝子の変異が誘導されると細胞には無理な増殖刺激が負荷される。その結果、DNA 損傷シグナルが誘発され、DSB ストレスが生じる。この DSB ストレスは遺伝子機能の変化等によって解除されることが必要で、その結果細胞増殖が再開し、癌化の一律速ステップがクリアされる。L1-RTP は一見ランダムな体細胞変異を誘導するため、L1 の動きによって ATM 依存的「老化」シグナルの誘発に関与する遺伝子機能の変異を誘導する可能性が考えられる。実際、図 4 で示すように、非遺伝性癌原物質の代表である TPA は L1-RTP を誘導する。即ち、所謂腫瘍プロモーターはそのエピジェネティックな作用によって L1-RTP を誘導し、体細胞変異の頻度を上昇させることで癌化に関与していると考えられる。

今年度の解析で、DMBA/TPA 誘発皮膚癌において L1-RTP が検出され、発癌における L1-RTP 関与の可能性が強く示唆される。次年度以降、L1-RTP の発癌における役割を明らかにすることを目指す。具体的には、

1. DMBA/TPA 誘発皮膚癌由来一次培養細胞を用いて、L1 遺伝子挿入部位と挿入されることによって構造変化が誘導された遺伝子の同定を行う。また、
2. TPA によって誘導される L1 遺伝子のゲノム挿入部位(「標的遺伝子」)を明らかにすることを予定している。

現在、L1-RTP はゲノムに対してランダムに誘導されると考えられている。しかし、TPA

等の特定の化合物によって誘導される L1-RTP の際、挿入される L1 遺伝子も同様にランダムにゲノム挿入されるかどうかについては明確な答えが得られていない。TPA 誘発 L1-RTP によって標的化される遺伝子を想定し、以降の解析を進めることが重要であると思われる。

E. 結論

二段階発癌の過程で、腫瘍中に L1-RTP が誘導されることを認めた。また培養細胞を用いた解析で、TPA による L1-RTP の誘導を認めた。現在、L1-RTP はゲノムにランダムに生じることが提唱されている。TPA によって誘導される L1-RTP の結果誘導される、ゲノム変異の有無及び標的遺伝子と機能変化の有無を明らかにすることが今後の解析として、肝要であると思われる。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

国内

1. Okudaira N, Minemoto Y, Hoshino S, Koyama T, Nakagama H, Ochiai M, Ishizaka Y. LINE-1 retrotransposition by aryl hydrocarbon receptor and MAP kinase activated by food-borne carcinogens. 日本癌学会、横浜、2009年10月。

2. Okudaira N, Ishizaka Y. Aryl hydrocarbon receptor mediates L1 retrotransposition by food-borne carcinogens and an environmental pollutant. 日本癌学会、横浜、2009年12月。

H. 知的所有権の出願・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

個体での発がん物質評価法の開発に関する研究

分担研究者 津田 洋幸 名古屋市立大学 特任教授

Cre/loxP システムを用いた活性型ヒト Hras^{G12V} または Kras^{G12V} トランスジェニックラット (Hras250、Kras301/327) の膵に Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを注入することによって、変異 ras 遺伝子の発現を誘導し膵管がんを発生させた。発生した膵初期病変、膵管がんは病理学的にヒトと良く類似しており、Hras250 と Kras301/327 ラットはヒト膵がんモデルとなり得ると考えられた。

A. 研究目的

現在、膵がんに対する予防・診断・治療のいずれに関しても効果的な方法はなく、新たな方法の開発が急務となっている。有効な診断治療方法の開発には、初期病変の把握と診断さらに進展機構の理解が不可欠である。我々は Cre リコンビナーゼにより活性型ヒト Hras^{G12V} または Kras^{G12V} が発現するトランスジェニックラット (Hras250、Kras301 および Kras327) を確立した。このラットの膵管に Cre 発現アデノウイルスを注入する事により膵がんを発生させることが可能である。本研究においては、このモデルがヒト膵がんのモデルとなるか検証を行った。

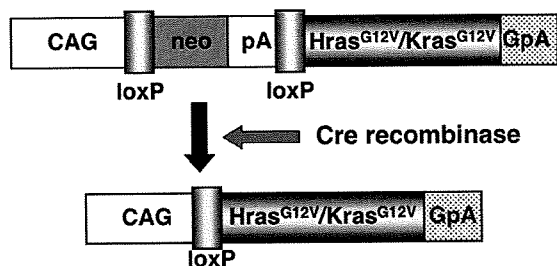


図1 Hras250 および Kras301/327 ラットの導入遺伝子

B. 研究方法

ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを HEK293 細胞に感染させて、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを増幅し精製した。精製した Cre リコンビナーゼ発現アデノウイ

ルスを、Hras250 または Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入 (4×10^9 ifu/ml, 150 μ l) することによって膵管がんを発生させた。

病理解析

Hras250 または Kras301/327 ラットの膵臓に Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを感染させ、2-4 週後に膵臓組織を採取し、ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドで固定した。パラフィン包埋後、薄切し H&E 染色・PAS 染色・Alucian blue 染色を行った。免疫染色は未染連続標本を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組み換え実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科遺伝子組み換え実験等安全委員会」、動物実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験に関する指針」に基づく「動物委員会」の承認を経て実施された。

C. 研究結果

この方法でラットの膵管に GFP 発現アデノウイルスベクターを注入すると、GFP の発現は膵管 (duct cell)・介在管 (intercalated duct cell)・腺房中心細胞 (centroacinar cell)・腺房細胞 (acinar cell) にみられた。したがって、成獣の成熟した膵の種々の構成細胞に活性型 Hras^{G12V} または Kras^{G12V} を発現させることが可能であり、膵がんはこれらの

うちの何れかの細胞より発生すると考えられた。

発生した初期の膵増殖性病変は大きく三つのタイプに分けられる。一つはヒトの PanIN によく類似した円柱状に背の高い膵管内上皮性病変であり、ヒトの PanIN-1、PanIN-2 または PanIN-3 に相当する病変がみられた。これらの細胞は膵胆管のマーカであるサイトケラチン 7 および 19 に陽性であった。さらにヒト PanIN で高発現する COX2 と EGF も陽性であった。PanIN2/3 様病変では EGFR の発現も認められ、MMP7 も一部で発現がみられた。粘液産生の指標となる PAS または Alcian blue に一部陽性であった。しかし、これら病変は腺房のマーカであるアミラーゼまたはキモトリプシンには陰性であった。他の二つは介在管自体の充実性または不完全な腺管を形成する増殖、および腺房中心細胞の小腺管を形成する巣状の増殖であり、管状腺がんへの移行像がみられた。これらの病変は全て膵管由来の形質を示した。注目すべきは、腺房細胞には増殖像は全くみられなかったことである。我々のモデルにおいて膵病変はいずれも膵管の形質をもち、腺房の形質は全く示さなかった。発生したがんは管状・乳頭状腺がんであった。アミラーゼまたはエラスターゼプロモーターにより腺房細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルスベクターを用いて、腺房細胞特異的に活性型 Ras を発現させても腫瘍性病変は発生しなかった。

D. 考察

我々のラット膵管がんモデルにおいて、膵管上皮細胞、介在管上皮細胞および腺房中心細胞より、膵管がんは発生すると考えられた。

E. 結論

病理学的にヒト膵管がんは膵管内の異型上皮が段階的に膵がんへと発展していくことが示唆されていることから、膵管がんは膵管上皮に由来すると考えられている。我々のラット膵管がんモデルにおいては、膵管に由来するヒトに類似した膵管がんが発生することから、ヒト膵がんモデルとして有用である

と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka, H., Tsuda, H., et al., Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci*, 101: 341-346, 2010.

2. 学会発表

国内

1. 田中創始, 大嶋浩, 深町勝巳, アレキサンダー・デビッド, 二口充, 城卓志, 津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68 回日本癌学会総会、横浜、2009 年 10 月。

H. 知的所有権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化に関する研究

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部
研究リーダー

医薬品の安全性評価を目的とした新規発がん物質評価系モデルマウスであるL1-EGFPマウス16系統について、国立国際医療センター研究所から医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに凍結精子として寄託され、生存性を確認・資源化し、バンクホームページに公開し、供給体制を整備した。

A. 研究目的

創薬をめざした研究では、直接ヒトを対象とするのが困難なことが多く、ヒトのモデルとしての実験動物が不可欠である。そこで、医薬基盤研究所では、実験動物研究資源バンクを設立し、医薬品の開発や疾患研究に利用される種々の疾患モデル動物の開発、系統維持、供給などの基盤整備を進め、モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、研究者への提供を行っている。一方、国立国際医療センター研究所では、医薬品の安全性評価を目的として、がん原物質のレトロトランスポジション誘導能に着目した新たな発がん物質予測法を開発している。そこで、本研究では、国立国際医療センター研究所で開発している新規発がん物質 *in vivo* アッセイ系トランスジェニックマウスを、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、医薬品開発研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。新たな発がん物質予測法が活用されることで、医薬品開発において、より精度が高く迅速な安全性評価が推進され、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化

国立国際医療センター研究所で開発された新規発がん物質評価系モデルマウス L1-EGFP は、L1 因子の ORF1 および ORF2 を内在性プロモーター（5' UTR）制御下に発現するトランスジェニックマウス（内在性プロモーター型マウス）で、レトロトランスポジションにより、ゲノムに取りこまれると EGFP を発現することで、発がん物質評価系として利用できるマウスである。導入遺伝子の挿入部位、コピー

数、発現量、組織による発現量の違いなどがあると考えられる L1-EGFP マウス16系統について、凍結精子各2本が基盤研実験動物研究資源バンクに寄託された。

凍結精子は、国立国際医療センター研究所にて R18S3 を用いて作製され、ドライシッパーにより医薬基盤研究所に輸送された。基盤研実験動物研究資源バンクにおける常法に従い、凍結精子を融解し、精子濃度、活力を+, ++, +++の3段階で評価し、前培養の後、過排卵処置した C57BL/6NCr Slc 雌から採取した卵子を用いて体外受精を行った。受精卵を2細胞期胚まで培養し、一部を偽妊娠マウスの卵管に移植し産仔への発生能を確認し、残りは EFS40 によるガラス化凍結保存を行った。得られた産仔については、採取した尾の一部から DNA を抽出して、L1-EGFP トランスジェニックマウスに特異的なプライマーセットを用いて導入遺伝子の存在を確認した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化

国立国際医療センター研究所より、新規発がん物質評価系モデルマウス L1-EGFP 16系統（#B5, #4, #5, #13, #14, #21, #24, #53, #57, #58, #66, #67, #72, #74, #84, #87）について凍結精子（各系統2本）の寄託を受けた。そのうち、次の表1にある4系統について、凍結精子を融解し、体外受精、胚移植、産仔の遺伝子型判定、胚凍結保存を行った。

【表 1】

系統名	融解精子		体外受精率,%	得られた2細胞期胚数
	濃度	活力		
L1-EGFP#B5	+++	+++	89.9	301
L1-EGFP#4	+	++	79.1	292
L1-EGFP#5	+++	++	82.6	242
L1-EGFP#13	+++	++	70.5	270

表 1 に示すように、1 系統において精子濃度が低く、また死亡精子の多い系統もあったが、その場合も生きていた精子の運動性、活力は比較的良好であり、2 細胞期胚までの発生率でみた体外受精率は、いずれも 70%~90%を示し、十分な数の 2 細胞期胚を得ることができた。

表 2 に凍結精子を用いて作製した 2 細胞期胚の胚移植成績と、産仔の導入遺伝子の陽性率を示す。

【表 2】

系統名	移植親数	移植胚数	離乳産仔数	産仔率,%	PCR陽性率,%
L1-EGFP#B5	2	40	19	47.5	47.4
L1-EGFP#4	2	40	26	65.0	15.4
L1-EGFP#5	2	40	13	32.5	53.8
L1-EGFP#13	2	40	13	32.5	57.9

表 2 に示すように、移植した全ての仮親から自然分娩により産仔が得られた。産仔率は 3 割から 6 割以上であり、充分高い成績であり、凍結精子及び作出された 2 細胞期胚の生存性、品質に問題は無いものと考えられた。導入遺伝子の陽性率は 1 系統で 15%とやや低い傾向が見られたが、複数の陽性個体が得られたことから、系統としての維持、保存には問題ないものと考えられた。

以上の成績から、寄託された凍結精子の品質に問題は無いと考えられ、新規発がん物質評価系モデルマウス L1-EGFP 1 6 系統を実験動物研究資源バンクのホームページ上に公開した。

D. 考察

新規発がん物質評価系モデルマウス L1-EGFP 1 6 系統について、凍結精子での寄託を受け、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの常法に従って、融解精子を用いた体外受精-胚移植を行ったところ、産仔を効率良く得ることができた。産仔の得られた効率は、通常良く用いられるマウス系統である C57BL/6 に比べても、かなり好成績であった。この要因としては、L1-EGFP マウスのバックグラウンド系統が、BDF1 同士の交配によって得られた F2 受精卵であることから、何らかの雑種強勢効果が考えられた。

今回の研究から、本系統の系統保存法としては、精子凍結が非常に効率良く、有効であることが判明した。今後、医薬品開発の大きな律速段階である安全性試験の迅速化に、本マウスが貢献することが期待され、基盤研動物バンクより広く供給することが可能となったことは大きな成果である。

また、今回は内在性プロモーター型のトランスジェニックマウスが資源化されたが、さらに誘導型の発がん物質評価系マウスの開発が計画されており、バンクへの寄託、資源化を通じて、さらにこの分野の研究者への供給、利用が推進されることで、医薬品開発へのさらなる貢献が期待される。

E. 結論

医薬品の安全性評価を目的とした新規発がん物質評価系モデルマウスである L1-EGFP マウス 1 6 系統について、国立国際医療センター研究所から医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに凍結精子として寄託され、生存性を確認・資源化し、バンクホームページに公開し、供給体制を整備した。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 31: 717-724, 2009.
2. Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The

transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. *Dev. Biol.* 331: 140-151, 2009.

3. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009.

2. 学会発表

(国内)

- 1) 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、高木博隆「心筋症シリアンハムスター (J2N 系)の心臓における 6 型コラーゲンの増加」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 14 日-16 日
- 2) 野口洋子、高野 薫、小浦美奈子、中村和臣、鈴木 治、松田潤一郎「低蛋白飼料投与による EL てんかんモデルマウスの繁殖効率の改善(II)－臓器重量、血液生化学値の検討」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 14 日-16 日
- 3) 増井 徹、高橋一朗、亀岡洋祐、松田潤一郎、古江(楠田)美保、川原信夫、保富康宏、吉田東歩、厚生労働省：創薬・医学研究用リソースとネットワーク拠点整備、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
- 4) 小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、中村和臣、松田潤一郎「クローズドコロニー ddY の中から発見された走行発作を伴うてんかんな様の症状を呈するマウスについて」第 104 回関西実験動物研究会、京都、2009 年 12 月 11 日

(国外)

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Increased collagen type VI content in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters (J2N strain). 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Denver, CO, USA, November 8-12, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Konno, R., <u>Okamura, T.</u> , Kasai, N., Summer, K.H., and Niwa	Mutant rat strain lacking D: -amino-acid oxidase.	<i>Amino acids.</i>	37	367-375	2009
Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, <u>Tsuda H.</u>	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats.	Cancer Sci	101	341-346	2010
Sawada T, TanakaA, Higaki K, Takamura A, Nanba E,Seto T, MaedaM, Yamaguchi E, <u>Matsuda J, Yamano T</u>	Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis.	Brain Dev	31	717-724	2009
Okado H, Ohtaka- Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, <u>Matsuda J, Kawano</u>	The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex.	Dev. Biol	331	140-151	2009
H, Kasai M Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, <u>Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y</u>	Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue.	Circ. Res	105	25-32	2009

