

200924003A (1/2)

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中釜 齊

平成22(2010)年5月

(1/2冊)

目 次

I. 総括研究報告	
疾患モデル動物を用いた環境発がんの初期発生過程及び感受性要因の 解明とその臨床応用に関する研究	1
中釜 斉	
II. 分担研究報告	
1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん感受性および修飾要因の解明	17
中釜 斉	
2. ポリ ADP-リボシル化の発がんにおける意義の解明と その臨床応用に関する研究	21
益谷 美都子	
3. リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測	24
木南 凌	
4. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明	30
大島 正伸	
5. 遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究	34
庫本 高志	
6. 膵管発がんモデル動物における早期病変と発がん機構に関する研究	36
今井 俊夫	
7. コンソミックマウスを用いた DSS/PhIP 大腸発がんの研究	39
杉江 茂幸	
8. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明	42
中島 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働省科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者 中釜 斉
国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

発がんモデル動物の構築と、これらを用いた分子生物学的及び遺伝学的解析は、ヒト発がんの分子機構や発がん感受性要因の解明に協調的に働くことが期待される。加熱した動物性たんぱく質中に含まれる発がん物質 PhIP によるラット誘発大腸がんモデルを用い、ゲノム解析により大腸がん感受性遺伝子候補として caspase3 を同定した。TG ラットでの解析により、同遺伝子 3'-UTR の多型がタンパク発現量に影響し、系統間の発がん感受性の差異に寄与している可能性が示唆された。機能的なスクリーニングにより大腸がん細胞の増殖を抑制する miRNA 群を同定し、大腸がん血清マーカー候補としてエクソソーム由来の miRNA 群を選抜した。PhIP 投与により大腸発がんの初期病変より発現上昇する SND1 が選択的に結合して APC を翻訳抑制する候補 miRNA を同定した。Apc に変異を有する KAD ラットは DSS 誘発大腸炎に高感受性を示すことが示され、炎症の惹起を介して発がんを促進している可能性が示唆された。肥満関連の大腸がん促進機序のひとつとして JNK 活性化の直接の関与が証明され、JNK 経路が予防の標的となりうる可能性を示した一方、肥満マウスである OB マウスでは PhIP-DSS 処置群での腫瘍抵抗性を示し、肥満と発がんの関係が単純ではないことを示唆した。Wnt シグナル活性化や BMP シグナル抑制だけでは胃癌発生に充分ではなく、さらに COX-2/PGE₂ 経路が活性化して初めて組織型の異なる腫瘍（胃癌および胃過誤腫）が発生することを示した。特に、無菌化するとマクロファージ浸潤の阻害と腫瘍発生の抑制が見られることから、COX-2/PGE₂ 経路の活性化と細菌感染刺激の双方が炎症反応の惹起に必要と考えられた。Bcl11b^{KO/+}マウスの放射線照射後萎縮胸腺には、クローナル増殖をしながらも分化能を保持しているがん幹細胞類似した細胞を認めたことから、Bcl11b 機能低下とがん幹細胞の関係が示唆された。一方、ヒト大腸がんでの変異解析から、Bcl11b はハプロ不全として寄与する可能性が示唆されヒト大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要と考えられた。Bcl11b は β-カテニン発現を抑制する働きがあり、その機能低下が β-カテニン上昇を介して発がんを亢進させる可能性が考えられた。マウスモデルにおいて *Parp-1* の機能欠損が DNA の脱メチル化及びヒストン修飾の異常を伴う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。*Parg* ホモ欠損 ES 細胞由来の胚細胞腫瘍形成の遅延、及び *Parg* のヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用しうることから *Parg* の機能阻害ががん化の予防法となりうる可能性が考えられる。ハムスターの膵管初期病変に特異的に発現する遺伝子/蛋白の一部はヒト膵がんに類似していることが示された。また、今回示された遺伝子/蛋白については、ヒト膵がんの早期診断マーカーあるいは治療/予防法開発の可能性について検討する。

分担研究者

中釜 斉	国立がんセンター	副所長
益谷美都子	国立がんセンター	部長
木南 凌	新潟大学医学部	教授
大島正伸	金沢大学がん研究所	教授
今井俊夫	国立がんセンター	室長
庫本高志	京都大学医学研究科	准教授
杉江茂幸	金沢医科大学	教授
中島 淳	横浜市立大学医学部	教授

A. 研究目的

本研究では、発がんの動物モデルを用いて、消化器がんを中心としたがんの初期発生及び進展過程における遺伝子変異、発現変化及びゲノム変化の解明、発がんに対する環境及び遺伝的修飾要因の同定、個々人の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する。さらに、得られた成果を、がんの早期診断や遺伝子情報に基づいたテーラーメード

のがん予防策の構築、がんの新規治療薬・予防薬開発のための標的となる候補分子の同定などへの臨床応用を目指している。具体的な研究課題としては、大腸、胃、リンパ腫発がんの発がんの感受性及び抵抗性を規定する候補遺伝子の局在を限定化し、責任遺伝子を同定する。感受性の候補遺伝子として同定されたものに関しては、細胞増殖などへの関与を解析し、ヒトがん発症への関与についても検討を開始する。さらに、ミュータジェネシスの方法で、APC及び*p53* 遺伝子等のがん関連遺伝子の変異ラットを樹立し、発がんの分子機構の解明と、新規のがん治療薬や予防薬の開発に有用な疾患モデルの開発を目指す。

B. 研究方法

(1) *caspase3* の多型と発現量の関係の解析：

PhIP 誘発大腸発がん感受性候補遺伝子 *caspase3* に関して、F344 ラットと ACI ラット間で見られる大腸粘膜における発現量の差と非翻訳領域多型の差異の間に因果関係が存在するか検討するために、コーディング領域全長の cDNA に F344 あるいは ACI 由来の 3'-UTR を付加したコンストラクトを作成し、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に強制発現させ、タンパク量を比較した。

(2) TG ラットの作成と発がん感受性の解析：

caspase3 の発現量の差が大腸発がん感受性に影響を与えるかを検証するために、F344 ラットに ACI type-*caspase3* を導入した TG ラットの作成を行った。TG が 1 コピー程度と推定される ACI type-*caspase3*-TG F344 ラットに 400ppm の PhIP 投与 2 週間、引き続いて高脂肪食投与 4 週間を行い、さらに 6 週間後に、Aberrant Crypt Foci (ACF) の数の計測により発がん感受性を評価した。

(3) 翻訳制御因子 SND1 と相互作用する miRNA の探索：

ヒト大腸がんが発現亢進している SND1 は RNA 干渉のエフェクター複合体の構成因子の一つであり、翻訳レベルでの制御により大腸がん抑制遺伝子 APC の発現を抑制する。そこで、SND1 と相互作用する miRNA 分子のスクリーニングに着手した。具体的には、HCT 116 大腸がん細胞株へ HA-SND1 を導入後、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、SND1 と相互作用する miRNA を免疫沈降産物より精製、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

(4) 機能的スクリーニングによる大腸がん増殖抑制的 miRNA の探索：

Adriamycin 投与により *p53* 依存的に誘導される増殖抑制的な mir-34a と同様な増殖抑制的 miRNA を同定するために、レンチウイルス miRNA ライブラリー (SBI 社) を用いたスクリーニングを行った。増殖抑制により、集団から次第に除去されていくクローンを同定する、いわゆる “drop-out” スクリーニングになるため、カスタムなオリゴアレイをデザイン、作成して時間の経過に従いコピー数の減少する miRNA を探索した。

(5) 血清エクソソーム由来 miRNA を用いた大腸がん診断マーカー探索：

エクソソームに内包された状態で細胞外に分泌された miRNA は安定であり、また miRNA は由来する組織に特異的なプロファイルを示すことが多いため、がんの診断マーカーとしての有用性が期待される。そこで、大腸がん細胞株の培養上清や大腸がん患者血清よりエクソソームを分離・精製し、マイクロアレイ解析によりマーカー候補の探索を行った。

(6) 若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析：

内在性 BMP 阻害因子である *Noggin* を胃粘膜で発現する *K19-Nog* トランスジェニックマウスを自家作製した。*K19-Nog* マウス胃粘膜での BMP シグナルの状況および胃粘膜病変について免疫組織学的解析を行なった。また、COX-2/PGE₂ 経路の役割を解析するために、*K19-Nog* と *K19-C2mE* マウスを交配させて *K19-Nog/C2mE* マウスを作製し、胃病変を解析した。さらに、これらのマウス胃組織由来 RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施し、*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織との比較解析を実施した。

(7) 無菌 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの作製と飼育：

K19-Wnt1/C2mE マウスを用いて体外受精操作を行って受精卵移植し、妊娠したマウスから帝王切開により無菌的に産仔を摘出した。無菌マウスは実験動物中央研究所の無菌飼育室で 30 週間および 55 週間飼育した。それぞれの週齢で無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスおよび対照群として SPF で飼育した *K19-Wnt1/C2mE* マウスを病理解剖し、胃組織を用いて病理組織標本を作製し、組織の一部

は RNA を調製して遺伝子発現解析に使用した。

(8) 胃がんに対する EP4 阻害薬投与実験:

27 週齢および 52 週齢の *K19-Wnt1/C2mE* マウスに PGE₂ 受容体の EP4 に対する阻害薬を 3 週間連続投与した。各個体の薬剤投与前の胃がん発生状況は X 線 CT により確認し、薬剤投与後は病理解剖を行い、病理組織標本、RNA の調製を行なった。

(9) 胃がん組織における炎症の評価:

無菌化および SPF 飼育 *K19-Wnt1/C2mE* マウス、および EP4 阻害薬投与マウスの組織切片を用いて、Ki-67 染色により細胞増殖率解析、TUNEL 染色によりアポトーシス解析を行ない、マクロファージ、ケモカイン等の免疫染色を行なった。また、各マウス組織から抽出した RNA を用いて Real-time RT-PCR により、各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を解析した。

(10) 放射線誘発胸腺リンパ腫発がんへの *Bcl11b* の修飾効果の解析:

Bcl11b^{KO/+} および *Bcl11b*^{+/+} マウスに g 線を照射し、その後 14、30、60、80 日のマウスから胸腺を摘出し、胸腺細胞数を比較した。胸腺細胞数の計測、クローナル増殖の有無の検討、細胞周期、細胞サイズ、分化能の解析などを行った。

(11) *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスの腸管の解析:

KO アレルと点突然変異アレル (Serine-826 が Glycine に置換したもの) をもつ compound heterozygous mice (S826G/KO) を作製し、その腸管における表現型を解析した。

(12) *Bcl11b* の転写抑制活性の解析:

Bcl11b は転写を抑制する転写因子であり、β-カテニン遺伝子発現との関連性を検討した。先ず、TOP/FOPflash レポータープラスミドと *Bcl11b* 発現ベクタープラスミドを W480、CaCo2 細胞にコトランスフェクションし、レポーター活性の測定を行った。次に β-カテニン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼレポーターを結合したプラスミドを作製し、HCT116 細胞にコトランスフェクションし、同様のアッセイを行った。

(13) ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異と LOH 解析:

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プライマーセットで PCR 反応を行った。一方、エクソン 4 は長いため、三組のプライマーセットを用いた。また、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。一方、LOH 解析には *Bcl11b* 遺伝子領域にある 3 種類の SNPs を利用し、PCR 産物に対する制限酵素による切断の有無で判定した。

(14) 高脂肪食が大腸発がんに及ぼす影響の解析:

C57BL/6J マウスを使用し、アゾキシメタンにより誘導される前がん病変 aberrant crypt foci (ACF) の数を検討し、BrdU labeling index を用いて大腸上皮細胞増殖の活性を評価した。これらを普通食摂取群と高脂肪食摂取群との間で比較検討した。さらに高脂肪食群で大腸上皮細胞の増殖活性が亢進している分子メカニズムを明らかにするため、促進機序に関与の可能性がある様々なタンパクの大腸粘膜における活性状況・発現レベルを検証した。

(15) KAD (Kyoto Apc Delta) ラットにおける DSS 誘発大腸炎の解析:

5 週齢の雄 KAD ラットと F344 ラット各 34 頭を用いた。このうち無処置群として各 4 頭を用いた。残り各 30 頭に、2% DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与直後に各 10 頭、1 週後に各 10 頭、3 週後に各 10 頭から大腸を採取した。実験期間中 2 日ごとに体重を測定し、肛門周囲の汚れから下痢・血便の有無を判定した。また大腸粘膜より RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により TNF-α, *I11b*, *I110*, *Cox2*, *Ptges* 遺伝子の発現量を測定した。

(16) *Parp-1*^{-/-} マウス胚性幹細胞の解析:

Parp-1 欠損下での *H19* 遺伝子のエピジェネティック異常誘発の機構を調べるために *Parp-1*^{-/-} ES 細胞の *H19* / *Igf2* インプリンティング制御領域 (ICR) の DNA メチル化状態、転写因子の結合、クロマチン修飾状態を ChIP assay により検討した。

(17) ヒト *PARP-1* 遺伝子の遺伝子多型と機能異常の解析:

Parp-1 欠損マウス 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ことから *PARP-1* 遺伝子のヒト胚細胞腫瘍株における遺伝子多型と機能異常を調べた。

(18) *Parg* の発がん過程への関与の検討：

野生型及び *Parg* ヘテロ欠損 (*Parg*^{+/−}) マウスにおいてウレタン 200 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、肺腫瘍誘発に対する感受性を投与開始 20 週後調べた。また、ジエチルニトロサミン 50 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、肺腫瘍誘発に対する感受性を投与開始 30 週後、野生型及び *Parg* ヘテロ欠損マウスにおいて調べた。さらに、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への影響を組織学的に解析した。

(19) ハムスター膵管がんモデル早期病変の解析：

シリアンハムスター (5 週齢、雌) に BOP を 10 mg/kg 体重の用量で隔日 4 回皮下投与し、23 週齢時に膵臓を摘出した。病理組織学的に膵管由来の腺がん (AC) と前がん病変とされる異形過形成 (AH) の発生状況を評価するとともに、連続パラフィン切片を用いて細胞接着関連蛋白に対する免疫組織化学的解析を行った。また、病理組織学的に AH が認められた断片に隣接する断片より総 RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ (NimbleGen Hamster Gene Expression 385K、Roche Diagnostics 社；搭載遺伝子数、5966) を用いて発現遺伝子を解析した。

(20) *ob/ob* マウスでの DSS/PhIP 大腸がんの解析：

雄 *ob/ob* マウス (OB) 及びその wild type の C57BL/6J マウス (WT) を各 4 群に分け、第 1 群に PhIP 200mg/kg 体重胃内強制投与し、1 週間後から 5 日間 1.5% DSS を飲水投与し、PhIP 投与後 4 週間後、同処置を再度繰り返した。第 2 群には、PhIP 2 回投与のみ、第 3 群には、DSS 2 回投与のみ、第 4 群は、無処置群とした。匹数は、OB 1 群 9 匹、2 群 5 匹、3 群 4 匹、4 群 4 匹。WT 1 群 10 匹、2 群 5 匹、3 群 4 匹、4 群 5 匹とした。実験開始 20 週間後剖検し、同時に血清を採取し、中性脂肪、コレステロール、血糖値等を測定した。また、PCNA を染色し、細胞増殖の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各大学や研究機関の定める動物実験に関する規約を遵守し、動物実験に関

する倫理審査委員会で承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

(1) *caspase3* の多型と発現量の関係の解析：

過剰発現した際に、ACI type-*caspase3* のコンストラクトは F344 type-*caspase3* と比較して約 2 倍程度のタンパク量の発現を示し、両系統間における内因性の *caspase3* の発現量の差とほぼ同程度であった。

(2) TG ラットの作成と発がん感受性の解析：

F344 と ACI の *caspase3* 発現量の差をより忠実に再現した TG ラットが望ましいため、大腸陰窩の WB でタンパク発現量に 2 倍程度の差がある 1-2 コピー程度の TG を有するクローンを選択して、PhIP 誘発大腸発がん実験を行った。同胞の関係にある F344 ラット (TG なし) と ACI type-*caspase3*-TG F344 ラットをそれぞれ 7 匹、10 匹ずつ解剖したところ、ACF は 2.14±1.07 および 0.6±0.84 となり、TG において有意に ACF 形成が抑制されていた ($p < 0.01$)。

(3) 翻訳制御因子 SND1 と相互作用する miRNA の探索：

miRNA マイクロアレイの結果、SND1 と相互作用している miRNA 分子の中に、がん抑制的 miRNA である let-7 などを含む miRNA がコントロール群に比べて有意に濃縮していることが判明した。さらに、この中には標的配列の予測から APC 遺伝子に結合する可能性のあるものが含まれており、現在この miRNA が実際に APC のタンパクレベルを下げるかどうか検証を進めている。

(4) 機能的スクリーニングによる大腸がん増殖抑制的 miRNA の探索：

HCT116 や SW480 などの大腸がんの増殖を顕著に抑制する miRNA が複数同定された。mir-34a も予想通りアレイで検出されており、実験が成功している傍証と考えられた。drop-out した miRNA の作用はアポトーシスの誘導と細胞周期の停止 (senescence を含む) に大別され、現在どのような経路の制御を介してこうした効果が誘導されるのか慎重に解析を進めている。

(5) 血清エクソソーム由来 miRNA を用いた大腸が

ん診断マーカー探索：

がん細胞株由来エクソソームにおいて正常細胞より有意に高い値を示した miRNA は 31 種類あったが、興味深いことに、これらの候補のうち 17 種の miRNA においては、大腸がん細胞株内での発現がむしろ抑制されていた。ヒト血液検体を用いて、同定した miRNA がエクソソームを介して血液中に分泌されているかを検討した結果、大腸がん患者では 9 種類の miRNA が検出された。このうち 4 種が、健常人と比較して大腸がん患者の血液中で高いことが示された。

(6) 若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析：

K19-Nog マウス胃粘膜の分化上皮細胞ではリン酸化 Smad1, 5, 8 の免疫染色シグナルが減弱しており、Noggin の発現による BMP シグナル抑制が確認されたが、上皮に増殖性病変は発生しなかった。一方、胃粘膜で同時に COX-2/PGE₂ 経路を活性化させた *K19-Nog/C2mE* 複合マウスでは、大きな胃腫瘍が自然発生した。組織学的には分化した上皮細胞から構成される過誤腫 (hamartoma) で、若年性ポリープ症で認められる腫瘍病変に類似していた。同腫瘍由来 RNA を使ったマイクロアレイ解析では、*K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がんと同様に炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が著しく上昇していた。しかし、*K19-Wnt1/C2mE* マウスと比較して、CD44 や EphB3 などの Wnt シグナル標的因子の発現誘導は認められず、Wnt 活性化には COX-2/PGE₂ 経路は関与していないことが明らかになった。

(7) 無菌 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの作製と飼育：

無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスを 30 週齢および 55 週齢で病理解剖した結果、胃がんの大きさがそれぞれ SPF で飼育した同週齢 *K19-Wnt1/C2mE* マウスと比較して 30%程度に縮小した。アポトーシス細胞の出現頻度に変化は認められなかったが、Ki-67 で標識される細胞増殖率は無菌マウスで有意に低下した。また、SPF マウスでは COX-2/PGE₂ 経路の活性化に起因した炎症反応が発症し、胃粘膜下にはリンパ球を中心とした細胞浸潤が認められるが、無菌マウスでは粘膜下細胞浸潤が消失した。以上の組織像と一致して、Real-time RT-PCR 解析の結果、SPF で飼育した *K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がんでは TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CXCL1、CXCL2 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が上昇していることを確認した。一方で、無菌化マウスで

はこれらの因子の発現レベルは野生型と同程度まで低下した。すなわち、COX-2/PGE₂ 経路が誘導されていても細菌感染刺激がないと炎症反応が起こらないことが明らかになった。

(8) 胃がんに対する EP4 阻害薬投与実験：

X 線 CT 撮影により胃がん発生を確認した 27 週齢および 52 週齢の *K19-Wnt1/C2mE* マウスに EP4 受容体阻害薬を 3 週間投与した結果、どちらの週齢でも胃がん組織の顕著な退縮が認められた。すなわち、4 種類ある PGE₂ 受容体 (EP1~EP4) の中でも EP4 を介したシグナル (COX-2/PGE₂/EP4 経路) が腫瘍発生に重要であることが明らかになった。組織解析の結果、無菌マウスと同様に炎症細胞浸潤が消失し、サイトカイン、ケモカインの発現が低下していた。すなわち、EP4 を介した PGE₂ シグナルと細菌感染刺激の双方が、胃がん発生に重要な炎症反応の惹起に必要と考えられた。

(9) 胃がん組織における炎症の評価：

SPF 飼育および無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウス、EP4 阻害薬投与マウスの胃組織切片について解析した結果、SPF マウス胃がん組織の間質で強いマクロファージ浸潤が検出されたのに対し、他のマウスではマクロファージ浸潤が有意に抑制されていた。次にマクロファージ遊走に関わるケモカインの発現を Real-time RT-PCR で解析した結果、野生型マウスと比較して、*K19-C2mE* 単独マウスと SPF 飼育 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの双方で CCL2 と CCL8 の発現が顕著に亢進していた。それに対して、無菌化マウスでは全ての CC ケモカイン発現量が野生型のレベルまで低下していた。すなわち、EP4 シグナルと細菌感染刺激の相互作用によるケモカイン産生の誘導がマクロファージ浸潤に重要である可能性が考えられた。

(10) 放射線誘発胸腺リンパ腫発がんへの *Bcl11b* の修飾効果の解析：

野生型では照射後 30 日で細胞数が回復し、その後 80 日まで維持されていた。一方、*Bcl11b*^{KO/+} では、細胞数の回復が悪く、照射後 30 日に比べ 80 日でクローナル増殖が優勢であり、40 例中 4 例で野生型アレルの消失が見られた。胸腺細胞の大きさは 8 例で大型の G1 期細胞の割合が 20%以上であり、またクローナル増殖を示す *Bcl11b*^{KO/+} 胸腺細胞は照射後 80 日では分化能が低下してい

た。また、この *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型はβ-カテニンの発現を上昇させ、胸腺細胞の増殖に影響していると考えられた。

(11) *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスの腸管の解析：

Bcl11b タンパク質はマウスの小腸組織、大腸組織の crypt 内で発現していた。また、ヒト大腸組織の crypt 内でも発現細胞が観察された。さらにマウス小腸 crypt 内での発現を詳細に検討すると、いわゆる+4 細胞、CBC 細胞（幹細胞と想定される細胞）および TA 細胞（次の分化段階にある細胞）に発現が確認された。*Bcl11b*^{S826G/KO} マウスは crypt 細胞と villi 細胞の少なくとも一部に細胞増殖傾向があり、*Apc*^{min/+} マウスでの所見と類似していた。一方、大腸では組織全体の肥厚が観察され、crypt サイズの増大と細胞増殖シグナル像がみられたが、腸管に腫瘍の発生は観察されなかった。

(12) *Bcl11b* の転写抑制活性の解析：

Bcl11b の導入により TOPflash ベクターの転写活性が低下することが分かった。また、次に β-カテニン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼレポーターを結合したプラスミドを作製し、同様のアッセイを行ったところ、やはり β-カテニン遺伝子の転写活性が低下することが分かった。HEK293FT 細胞を用いた場合でも、同様に転写活性抑制活性が示された。

(13) ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異と LOH 解析：

50 サンプルについて PCR 産物をダイレクトシーケンスした結果、5 つの変異を見いだした。このうち、アミノ酸の置換または脱落をもたらす変異が 4 腫瘍であり、フレームシフト変異が 1 腫瘍であった。一方、LOH 解析はヒト大腸がん 40 検体（多型情報のある）が終了し、8 検体に LOH が確認された。この 8 症例には変異が無く、LOH と変異の両方をもつ症例はなかったことから、*Bcl11b* がハプロ不全ながん抑制遺伝子である可能性が考えられた。

(14) 高脂肪食が大腸発がんおよび影響の解析：

ACF の数、BrdU labeling index、血清インスリン値とも普通食群と比べ高脂肪食群で有意に増加していた。大腸粘膜での Akt 活性化と IRS-1 のチロシンリン酸化は高脂肪食群で減弱していたが、高脂肪食群の IRS-1 のセリンリン酸化が普通食群より有意に亢進していたため、IRS-1 のリン酸化を

引き起こす数々のタンパクキナーゼを調べた。リン酸化 JNK および c-Jun のレベルのみ高脂肪食群で有意に亢進しており、さらに、JNK/c-Jun 経路の重要な標的とされる Cyclin D1 や AP-1 転写因子の活性も高脂肪食群で有意に普通食群よりも高かった。JNK 経路が高脂肪食条件下で細胞増殖亢進に直接関与しているか調べるために、JNK 阻害薬 SP600125 を併せて投与したところ、高脂肪食群でのみ用量依存性に ACF 形成と BudU labeling index を抑制し、大腸のリン酸化 c-Jun タンパクレベル、cyclin D1 タンパクレベルも減弱させた。

(15) KAD (Kyoto Apc Delta) ラットにおける DSS 誘発大腸炎の解析：

DSS 投与後 6 日目より、KAD は F344 に比べ顕著な下痢症状あるいは血便を示し、その傾向は実験終了後まで継続した。組織学的には、DSS 投与終了直後において、F344、KAD ラットとも大腸粘膜の陰窩はほぼ消失しており多くの炎症細胞が見られた。しかし、F344 では粘膜層がフィブリン層に覆われていたが、KAD ではそのような組織像は観察されなかった。DSS 投与終了後 3 週目において、F344 では、ほぼ正常な陰窩が観察されたのに対し、KAD ラットでは、陰窩が形成されておらず多数の炎症細胞が残存していた。これらのことから、KAD ラットでは、F344 に比べ、DSS 誘発大腸炎が持続していることが示された。炎症関連遺伝子の発現量を調べたところ、DSS 投与終了直後、1 週後では差異はなかったが、3 週後において、KAD ラットの大腸粘膜では、TNF-α, I11b, I110, Cox2, Ptges 遺伝子の発現量が有意に上昇していた。

(16) *Parp-1*^{-/-} マウス胚性幹細胞の解析：

未分化状態の *Parp-1*^{-/-} 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、CTCF 結合領域周辺で約 20-50% 程度まで低下していた。一方、野生型 ES 細胞ではほぼ完全にメチル化されていた。*H19 / Igf2* ICR のエピゲノム調節に重要な転写因子 CTCF の結合状態を解析すると、*Parp-1*^{+/+} と比較して *Parp-1*^{-/-} の *H19 / Igf2* ICR では強い CTCF の結合および H3K4me2、H3K4me3 レベルの亢進が観察された。

(17) ヒト *PARP-1* 遺伝子の遺伝子多型と機能異

常の解析：

NEC8 株で認めた PARP-1 の保存された zinc-finger 領域の E251K のアミノ酸置換、及び以前に報告したヒト胚細胞腫瘍における M129T のアミノ酸置換について大腸菌のリコンビナントを *Parp-1* 欠損胚性線維芽細胞で発現させ性状を調べたところ、核局在性は変わらなかったが、野生型に比較して M129T 及び E251K 型は活性の低い傾向を示した。

(18) *Parg* の発がん過程への関与の検討：

ウレタンによる肺発がんでは、野生型と *Parg* ヘテロ欠損 (*Parg*^{-/-}) マウスの比較では、過形成病変の頻度に差は認めなかったが、肺腺腫の発生頻度はそれぞれ 33% 及び 10% と *Parg* ヘテロ欠損型の方が低い傾向を示した ($P < 0.088$)。また、ジエチルニトロサミンによる肺発がんでは、肺腺癌の発生頻度はそれぞれ 18% 及び 0% と *Parg* ヘテロ欠損型の方が低い傾向を示した ($P < 0.087$)。また、肺腺腫の発生頻度もそれぞれ 71% 及び 53% と *Parg* ヘテロ欠損型の方がやや低い傾向を示した ($P < 0.31$)。ヌードマウス皮下に移植した *Parg* ホモ欠損 ES 細胞は、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 ($P < 0.05$)、また部分的にポリ (ADP-リボース) の蓄積を認めた。

(19) ハムスター膵管がんモデル早期病変の解析：

膵管由来の腺がん (AC) および異形過形成 (AH) の発生頻度は、各々 9 例中 4 例 (44%) および 9 例中 8 例 (89%) で、発生個数は 6 個および 14 個であった。これらの病変に対して免疫組織化学的検索を実施したところ、Integrin $\alpha_v \beta_3$ は AC および AH の上皮細胞に陽性を示し、それぞれ 6 例中 6 例 (100%) および 14 例中 13 例 (93%) であった。特に AH における陽性率が他の蛋白質に比べて最も高く、程度も強かった。Galectin-1 と α -Enolase は AC および AH の上皮細胞における陽性率が高く、一方 Kallikrein 7 と Galectin-3 は、AC あるいは AH の間質細胞における陽性率が高い傾向を示した。BOP 処置したハムスターの膵管を検索した結果認められた 4 断片の AH から抽出した mRNA をマイクロアレイにより解析した結果、AH に特異的に高発現している 38 遺伝子と特異的に発現低下していた 37 遺伝子を見出した。

(20) ob/ob マウスでの DSS/PhIP 大腸発がんの解析：

PHIP+DSS 処置群において、OB マウスは体重、肝重量とも WT マウスに比べて著高を呈し、肥満、脂肪肝であった。他の臓器重量についても OB に高い傾向を認めた。これは、他の処置群でも同じ傾向にあった。大腸腫瘍は、WT の 1 群 (PhIP+DSS) のみに認められた。大腸腫瘍の発生率、平均個数は、WT マウスでは PhIP-DSS 群 4/10 (0.70 ± 1.25) で、これらは全て腺腫だったが、他の群には腫瘍の発生を見なかった。OB マウスでは腫瘍の発生を見なかった。PhIP+DSS 処置群では OB マウスにおいて増殖帯が腺管の底部から全体の 1/3~1/2 と WT マウスに比べて低い傾向にあった。血清生化学データでは PhIP+DSS 処置群で、OB マウスは WT マウスに比べて総コレステロール、LDL、GOT、GPT、ALP で著高を示した。TG 値も OB に高い傾向を認めたが、血糖値は逆に OB で低い傾向を認めた。他の処置群でも同様の傾向であった。

D. 考察

(1) *caspase3* の多型と発現量の関係の解析：

大腸発がん感受性遺伝子候補 *caspase3* の 3'-UTR の多型がタンパク発現量に影響している多型が発現量を制御する機構として、ことが明らかになった。過剰発現の実験では mRNA の量や安定性には顕著な差が見られないことから、3'-UTR への miRNA の結合による翻訳制御機構が想定される。ただし、現在 *caspase3* の 3'-UTR に結合することが唯一知られている *let-7* の結合配列が多型の部位とは異なることから、他の miRNA あるいはまったく異なる機構が関与している可能性も否定できない。

(2) TG ラットの作成と発がん感受性の解析：

caspase3 の 3'-UTR の多型が系統間の発がん感受性の差異に寄与している可能性が示唆された。*caspase3* はヒトにおいても肺がん、リンパ腫などで多型が発がんリスクと関連するという報告がある。また、ヒト大腸がんにおいても *caspase3* を含む領域は比較的高頻度に欠失を認めている。これらのことから、ヒトにおいても *caspase3* 遺伝子の多型または欠失による遺伝子産物の減少が発がん感受性に影響を与えている可能性があり、そのような多型がヒトでも同定された場合、高危険度群の推定にきわめて有用である。

(3) 翻訳制御因子 SND1 と相互作用する miRNA の

探索:

SND1 は、microRNA の成熟に関わる因子であり、PhIP 誘発大腸発がんの早期から発現亢進が認められる。我々は以前、SND1 の過剰発現により APC が翻訳レベルで抑制されることを示したが、今回 SND1 に選択的に結合している miRNA の中に APC を標的のすると予測されるものを見出したことから、SND1 の発がんにおける意義の分子レベルでの解明に一步近づいたといえる。興味深いことに、SND1 は上述の *caspase3* の標的としてアポトーシスの過程で分解されることが報告され、両者が大腸発がんの過程でクロストークしている可能性も浮上してきた。今後の展開が待たれる。

(4) 機能的スクリーニングによる大腸がん増殖抑制的 miRNA の探索:

同定された増殖抑制的 miRNA は、興味深いことに、PhIP 投与によりラット大腸粘膜で誘導されるものが多いことを見出しており、発がんの過程でも何らかの役割を果たしている可能性がある。これらの増殖抑制的 miRNA の同定は発がんの機構を解析する上でも重要なツールとなりうるが、将来的には核酸医薬としての応用展開も可能であり、まずは動物実験での検証から進めていきたい。

(5) 血清エクソソーム由来 miRNA を用いた大腸がん診断マーカー探索:

エクソソーム中の miRNA は細胞内での miRNA のプロファイルを単純に反映しているのではなく、むしろ逆相関しているという観察はエクソソーム中の miRNA の生理的意義を洞察する上で示唆的である。またきわめて安定でもあることから組織特異的ながん診断マーカーとしての実用性を大いに期待できると考えられる。

(6) 若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析:

COX-2 の発現誘導はさまざまなタイプの腫瘍の発生に関与していると考えられている。本研究により、Wnt 活性化と BMP 抑制という異なる原因により発生する胃腫瘍の双方で、COX-2/PGE₂ 経路の誘導が必要なことが個体レベルで初めて明らかにされた。Wnt や BMP のような形態形成に関わるモルフォゲンシグナルの変化は、上皮細胞の未分化性の維持を誘導し、腫瘍化を引き起こすと考えられる。一方、COX-2/PGE₂ 経路の誘導は、PGE₂ の直接作用による免疫抑制や血管新生などが報告されている

他、炎症反応を惹起することにより腫瘍形成に関与していると考えられている。したがって、COX-2/PGE₂ 経路は腫瘍発生原因や腫瘍の組織型の種類に関係なく、腫瘍細胞の増殖を促進していると考えられる。

(7) 無菌 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの作製と飼育:

マウスの腸管では、Wnt 活性化や BMP 抑制に起因して腺腫および過誤腫が自然発生する。これらの腸管腫瘍では COX-2/PGE₂ 経路が自動的に誘導されて腫瘍形成を支持しているのに対して、胃粘膜ではトランスジェニックにより COX-2/PGE₂ を誘導しなければ腫瘍発生に至らない。この現象を説明する研究として、腸管での COX-2 発現誘導には腸内細菌による粘膜上皮の Toll 様受容体 (TLR) を介した刺激が必要なことが報告されている。したがって、胃は腸管に比べて細菌数が極めて少ないために COX-2 発現が誘導され難い可能性が示唆される。

(8) 胃がんに対する EP4 阻害薬投与実験:

無菌化した胃がんモデルでは、胃粘膜で PGE₂ 産生が誘導されているにも関わらず腫瘍形成が顕著に抑制された。本研究から、EP4 受容体を介した PGE₂ シグナルと細菌感染刺激の双方がマクロファージ浸潤に重要である可能性が考えられた。以上の研究から、COX-2/PGE₂ 経路の阻害による胃がん予防効果が確認されただけでなく、除菌による発がん予防の可能性が新たに考えられた。

(9) 胃がん組織における炎症の評価:

COX-2/PGE₂ 経路により誘導された CCL2 および CCL8 の発現は無菌化により阻害されていた。腫瘍組織に浸潤するマクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) は増殖因子産生、血管新生誘導、リモデリング促進などの作用により腫瘍形成を促進すると考えられている。したがって、無菌化による腫瘍抑制効果はケモカイン発現の阻害によるマクロファージ浸潤の抑制が重要な原因のひとつと考えられる。

(10) 放射線誘発胸腺リンパ腫発がんへの *Bcl11b* の修飾効果の解析:

放射線照射後 60 および 80 日の *Bcl11b*^{KO/+} マウスでは胸腺細胞数が減少し、リンパ腫の特徴の一つであるクローナル増殖する細胞が高頻度に観

察された。これらのクローナル増殖する胸腺細胞は、分化を停止するものが大半であったが、*Bcl11b* 野生型マウスに誘発される萎縮胸腺では、この分化停止はみられないので、この細胞分化能の低下は *Bcl11b* 遺伝子の機能低下によると考えられる。また、大きい細胞の割合が増加することが分かったが、胸腺リンパ腫の特徴として細胞の大型化が見られることから、この G1 期大型細胞がリンパ腫前駆体細胞であると考えられた。一方、照射後 30 日の萎縮胸腺の解析では、クローナル増殖を示す胸腺細胞とともに、細胞分化能を保持している胸腺細胞を含む胸腺が約半数に見られた。この分化能を保持しクローナル増殖する胸腺細胞は、自己複製能と分化能をもつという点で、がん幹細胞と類似する。*Bcl11b* 遺伝子が、どのような機構でがん幹細胞に影響するかは不明であるが、胸腺リンパ腫におけるがん幹細胞の形成に役割を担う可能性が示唆された。

(11) *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスの腸管の解析：

今回、*Bcl11b* 機能が低下した *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスを解析し、大腸組織全体の肥厚と、大腸 crypt サイズの増大と細胞増殖シグナル像がみられた。小腸でも crypt サイズの増大と異形および villi 細胞の増殖傾向が観察された。従って、*Bcl11b* が腸管組織のホメオスタシスの維持に関与することが明らかとなった。観察された細胞増殖傾向は、*Apc*^{min/+} マウスに観察されるそれと類似し、同一または類似のシグナル伝達系の関与が考えられた。

(12) *Bcl11b* の転写抑制活性の解析：

Bcl11b^{S826G/KO} マウスで核内 β -カテニン発現細胞数が上昇する像がみられたことから、*Bcl11b* 転写因子が β -カテニン遺伝子発現に抑制的に影響する可能性を疑い、実際にそれが事実でありことを確認した。*Bcl11b* は細胞核内で転写抑制複合体である NuRD complex の一員として転写に関与し、その標的遺伝子として p21、p27、p57 (細胞周期抑制因子) が報告されている。今回の培養細胞系を用いた実験から、 β -カテニン遺伝子も *Bcl11b* の転写抑制の標的となることが分かった。

(13) ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異と LOH 解析：

現在まで 50 サンプルを検査したところ、5 検体に変異と 8 検体に LOH を見いだした。これら 13 の DNA 変化では、LOH と変異の両方をもつ症例はない。これ

は、マウスの小腸腫瘍で *Apc*^{min/+} 単独では *Bcl11b*-LOH は高頻度に観察できるが、*Apc*^{min/+}*Bcl11b*^{KO/+} マウスの腫瘍では野生型の *Bcl11b*-アレルの消失は全く見られなかったこととよく一致した結果であり、*Bcl11b* ががん抑制遺伝子としてハプロ不全な働きをもつことを示唆する。このことは、ヒトの大腸がん発症のリスク因子、診断、治療、予後を考える上で重要な点となるはずである。

(14) 高脂肪食が大腸発がんに及ぼす影響の解析：

従来報告通り、高脂肪食摂取により大腸上皮細胞増殖は亢進される結果であり、今回はさらにその機序解明に迫った。意外なことにインスリン受容体を介した PI3K/Akt 経路は増殖亢進に関与しておらず、JNK 活性化が増殖に関与しているという新しい知見を検証し、JNK 経路が高脂肪食摂取による大腸発がん促進メカニズムのひとつであることを *in vivo* で初めて証明した。

(15) KAD (Kyoto Apc Delta) ラットにおける DSS 誘発大腸炎の解析：

DSS 投与後 3 週目において F344 ラットでは大腸炎症が治癒していたが、KAD ラットでは大腸炎症が持続していた。KAD ラットは DSS 誘発大腸炎に対し高感受性を示し、そのため AOM/DSS 大腸発がん試験における大腸腫瘍数の顕著な増加が引き起こされると考えられた。本研究から、APC タンパク質の C 末部位が DSS 誘発大腸炎の発症になんらかの役割を果たしていることが明らかとなった。この C 末部位には、Basic ドメイン、EB1 結合ドメイン、DLG 結合ドメインがある。これらのドメインは細胞移動や細胞接着に関与していることが知られている。今後 DSS 誘発大腸炎に係わるドメインの同定、大腸炎高感受性のメカニズムの解明を予定している。

(16) *Parp-1*^{-/-} マウス胚性幹細胞の解析：

H19 / Igf2 ICR について野生型 ES 細胞ではほぼ完全な DNA メチル化を示したが、*Parp-1* 欠損下では活性型エピゲノムに変化していたことから、*Parp-1* 欠損が DNA の脱メチル化とクロマチン修飾を活性化型に変化させることが示唆された。また *Parp-1*^{-/-} ES 細胞の *in vitro* 分化系及び *in vivo* の teratocarcinoma 形成で観察された胚体外組織への分化亢進には、*H19 / Igf2* ICR

のエピゲノム変化を介する *H19* 遺伝子発現の亢進が関与する可能性が示唆された。

(17) ヒト *PARP-1* 遺伝子の遺伝子多型と機能異常の解析：

ヒト胚細胞腫瘍細胞株及びヒト胚細胞腫瘍において *PARP-1* の遺伝子多型や機能低下例を認めたことから、種々のヒト腫瘍発生時の *PARP-1* の機能異常によるエピジェネティック異常に関してさらに検討する必要があると考えられる。

(18) *Parg* の発がん過程への関与の検討：

Parg ホモ欠損 ES 細胞由来の胚腫瘍形成の系に加えて、発がん剤ウレタン及びジエチルニトロサミンによる肺腫瘍誘発系で *Parg* のヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用することが示された。従って *Parg* の機能阻害が、がん化の予防法として有用である可能性がある。今後、他の発がん誘発系での *Parg* のヘテロ欠損及び *Parg* の阻害剤によるがんの予防について検討を行う。

(19) ハムスター膀胱がんモデル早期病変の解析：

Integrin $\alpha_v\beta$ 、*Galectin-1*、*Kallikrein 7* と *Galectin-3* についてもハムスターの AC 及び AH とヒト膀胱がんでは局在部位が異なるものの、今回検索した 5 種の蛋白質については、BOP 誘発ハムスター膀胱病変とヒト膀胱がんにおいて共通して高発現していることを明らかにした。ハムスター AH の発現遺伝子解析において、*Muc 1* および *GST-P* はヒト膀胱がん組織と共通して高発現していた。ハムスターの AH で高発現のみられた *Cyclophilin A* については、ヒト膀胱がんではその高発現が未報告だが、ヒト膀胱がん細胞の増殖に関与する可能性が示されていることから、今後、膀胱がんの治療/予防法開発への応用の可能性について検討する。

(20) *ob/ob* マウスでの DSS/PhIP 大腸発がんの解析：

OB、WT マウス間で明らかな発がん感受性の違いが認められた。コンソミックマウスの結果から大腸腫瘍発生と肥満、総コレステロール、トリグリセリド値の関与が示唆されたが、今回の結果は、それと対立するものであり、OB における感受性の低下の要因をさらに探究する必要がある。細胞増殖マーカーの低下はその 1 因と考えられる。

E. 結論

PhIP 誘発大腸発がん感受性候補遺伝子 *caspase3* の 3' -UTR の多型がタンパク発現量に影響し、系統間の発がん感受性の差異に寄与している可能性が示唆された。*caspase3* 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。また PhIP 投与により誘導される miRNA およびそれを制御する *SND1* の大腸発がんにおける意義も明らかになりつつある。

上皮細胞の未分化性維持あるいは分化抑制に作用する Wnt シグナル活性化や BMP シグナル抑制は胃腫瘍発生に必要なが充分ではない。これらのシグナル変化に加えて、*COX-2/PGE₂* 経路が活性化すると、組織型の異なる腫瘍（胃がんおよび胃過誤腫）が発生する。特に、胃がんを自然発生するマウスモデルを無菌化するとマクロファージ浸潤が阻害されて腫瘍発生が抑制されることから、腫瘍の組織型に関係なく *COX-2/PGE₂* 経路の活性化と細菌感染刺激の双方が、腫瘍発生に重要な炎症反応の惹起に必要と考えられた。

Bcl11b がん修飾遺伝子機能を、胸腺リンパ腫および腸管腫瘍を対象に検討した。*Bcl11b^{ko/+}* マウスの放射線照射後萎縮胸腺には、2 種類の異なる性質をもつ前がん細胞が検出され、その一つはクローナル増殖をしながらも、胸腺細胞の分化能を保持している細胞であった。この胸腺細胞は自己複製能と細胞分化能をもつことから、がん幹細胞との関連が考えられ、またその形成に *Bcl11b* 機能低下が関与すると考えられた。一方、50 のヒト大腸がんの *Bcl11b* 変異解析から、5 例に変異を 8 例に LOH を確認した。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が示唆され、ヒト大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要と考えられた。*Bcl11b* 転写因子は β -カテニン発現を抑制する働きがあり、その機能低下が β -カテニンを上昇させ、それがリンパ腫や腸管腫瘍の発がん原因であると考えられた。

肥満関連の大腸発がん促進機序のひとつとして JNK 活性化の関与が証明された。JNK 上流因子や JNK の正確な役割の究明をさらにすすめて、欧米スタイルの生活習慣の人にとって JNK 経路が予防の標的となりうるかどうかを今後検証が必要である。

KAD ラットは DSS 誘発大腸炎に高感受性を示すことが示され、炎症の惹起を介して発がんを促進

している可能性が示唆された。

WT の PhIP-DSS 処置群でのみ腫瘍が発生し、OB での腫瘍発生はなかった。OB での腫瘍発生抵抗性の要因の一つとして、細胞増殖の低下の関与が示唆され、今後、研究を進め、感受性低下の原因を解明しなくてはならない。

マウスモデルにおいて *Parp-1* の機能欠損が DNA の脱メチル化及びヒストン修飾の異常を伴う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。*Parg* ホモ欠損 ES 細胞由来の胚細胞腫瘍形成の遅延、及び *Parg* のヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用しうることから *Parg* の機能阻害が、がん化の予防法となりうる可能性が考えられる。

ハムスターの膀胱初期病変に特異的に発現する遺伝子/蛋白の一部はヒト膀胱がんに類似していることが示された。また、今回示された遺伝子/蛋白については、ヒト膀胱がんの早期診断マーカーあるいは治療/予防法開発の可能性について検討する。

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。

本研究の方法、実験材料、実験結果、及び実験に用いる動物個体が人体に悪影響を及ぼす可能性は殆どない。マウス・ラットを研究対象としたときは動物取り扱い指針に従い、実験従事者の飼育動物からの病原菌感染の危険性を最小限に抑える努力をしている。また、危険物、動物の使用については、研究所の危険物、動物取り扱い規定に準拠した安全な取り扱いを遵守している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Paramasivam M, Membrino A, Cogoi S, Fukuda H, Nakagama H, Xodo LE. Protein hnRNP A1 and its derivative Upl unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acids Research*, 37:2841-2853, 2009.
2. 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 κ potentially catalyzes extension reaction from the 3' -dC terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 284:25585-25592, 2009.
3. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Letters*, 583:2710-2714, 2009.
4. Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, Gaididon 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. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, Yamashita K. Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.*, 69:6438-6444, 2009.
6. Shibata A, Maeda D, Ogino H, Tsutsumi M, Nohmi T, Nakagama H, Sugimura T, Teraoka H, Masutani M. Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 664:20-27, 2009.
7. 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*, 2:1-5 2009.
8. Fujihara H, Ogino H, Maeda D, Shirai H, Nozaki T, Kamada N, Jishage K, Tanuma S, Takato T, Ochiya T, Sugimura T, Masutani M. *Poly(ADP-ribose) glycohydrolase* deficiency sensitizes mouse ES cells to DNA damaging agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 9:953-962, 2009.
9. Ogino H, Sakamoto H, Nakayama R, Yoshida T, Sugimura T, Masutani M. Analysis of the poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene alteration in human germ cell tumor cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 197:8-15,

- 2010.
10. Kothe GO, Kitamura M, Masutani M, Selker EU, Inoue H. PARP is involved in replicative aging in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, 47:297-309, 2010.
 11. Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, Mitsutake N, Kominami R, and Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 16:491-503, 2009.
 12. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z, Kominami R, Inaba T, and Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of *Bcl11b* and *H2AX* induces blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Sci*, 100:1219-1226, 2009.
 13. Yamamoto T, Morita S, Go E, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, and Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ -ray induced mouse atrophic thymus. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys*, 2010 in press.
 14. Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, and Kominami R. *Bcl11b* heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in γ -irradiated mice. *Cancer Science*, 2010 in press.
 15. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E_2 pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69: 2729-2733, 2009.
 16. Du Y-C, Oshima H, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Taketo, MM, and Oshima M. Induction and downregulation of *Sox17* and its roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 137: 1346-1357, 2009.
 17. Oshima H, Oguma K, Du Y-C, and Oshima M. Prostaglandin E_2 , Wnt and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 100: 1779-1785, 2009.
 18. Itadani H, Oshima H, Oshima M, and Kotani H. Mouse gastric tumor models with PGE_2 pathway activation show similar gene expression profiles to intestinal-type human gastric cancer. *BMC Genomics* 10: 615, 2009.
 19. Oyama T, Yasui Y, Sugie S, and Tanaka T: Preclinical assays for identifying natural cancer chemopreventive agents. *Scholarly Research Exchange*, vol. 2009, Article ID 475963, 2009. doi:10.3814/2009/475963.
 20. Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Koketsu M, Watanabe K, and Tanaka T: Dietary tricin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male *Crj: CD-1* mice. *Cancer Prev Res.*, 2: 1031-1038, 2009.
 21. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat. *Cancer Sci*. 100(11): 2022-2027, 2009
 22. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*. 5(1):e8870, 2010.
 23. 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 condition. *Gut*, 58:1637-43, 2009.
 24. 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*, 34:339-44, 2009.
 25. 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.

26. 内山崇、細野邦広、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳. メタボリックシンドロームと大腸癌. *BIO Clinica* メタボリックシンドローム Vol. 24 No. 4 Apr. 2009 (通巻 309 号) 北隆館: 45-51、2009. 4. 10 発行
27. 遠藤宏樹、細野邦広、高橋宏和、中島淳. 高脂肪食制限による大腸発癌抑制の分子機序 消化器科 Vol. 49 No. 5 438-443: 科学評論社. 2009. 11. 28

2. 学会発表

1. 落合雅子、近藤靖之、筆宝義隆、中釜 齊、発がん感受性要因の解明とがん予防ラット大腸発がんモデルを用いて、がん予防大会 2009 (第 16 回日本がん予防学会、第 32 回がん疫学研究会、第 10 回がん分子疫学研究会)、名古屋 (2009 年 6 月)
2. 岡本康司、金本一洋、大畑広和、泉谷昌志、土屋直人、中釜 齊、大腸がん転移を抑制する新規マイクロ RNA の同定、第 24 回発癌病理研究会、仙台 (2009 年 8 月)
3. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 齊、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 24 回発癌病理研究会、仙台 (2009 年 8 月)
4. Fukuda H, Takamura T, Masuda Y, Kamiya K, Ochiai M, Nakagama H, DNA-damage checkpoint response to PhIP-exposure and translesion DNA synthesis at PhIP-dG. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
5. Ogata H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H, Profiling of microRNAs secreted by exosomes from human colon cancer cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
6. 金本一洋、福田勝洋、福田博政、落合雅子、岡本康司、郡 健二郎、杉村 隆、中釜 齊、浸潤性膀胱がんへの移行の早期診断マーカーとしての CYP2A6 のゲノム DNA コピー数増加、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
7. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 齊、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、横浜 (2009 年 10 月)
8. 土屋直人、泉谷昌志、杉村 隆、中釜 齊、大腸発がん過程における microRNA の役割、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
9. 中釜 齊、大腸発がん過程における翻訳制御異常の関与、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
10. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 齊、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、第 38 回日本環境変異原学会、静岡 (2009 年 11 月)
11. Kurioka D, Tsuchiya N, Watanabe M, Nakagama H, Molecular mechanism for the regulation of APC expression by RISC component SND1. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009 年 12 月)
12. Okamoto K, Kanemoto K, Ohata H, Sato A, Izumiya M, Tsuchiya N, Nakagama H, microRNA-mediated regulation of stemness and metastatic function during colon carcinogenesis, 第 8 回日韓がんシンポジウム、金沢 (2009 年 12 月)
13. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H, Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. 8th AACR/JCA Joint Conference, Hawaii (2010 年 2 月)
14. 白井 秀徳、杉村 隆、益谷 美都子、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ欠損下における DNA 損傷に対する致死感受性亢進、第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会、徳島 (2009 年 6 月)
15. 佐久間(藤森) 浩彰、荻野 秀樹、杉村 隆、益谷 美都子、H19-Igf2 ICR のエピジェネティック制御とクロマチン修飾への Parp-1 の関与、第 82 回日本生化学会大会、神戸 (2009 年 9 月)
16. Shirai H, Ogino H, Hashimoto A, Sugimura T, and Masutani M, Sensitization to DNA damaging agents under poly(ADP-ribose) glycohydrolase deficiency 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
17. Ogino H, Fujimori-Sakuma H, Hamada K,

- Sugimura T, Masutani M. Analysis of the transcriptional regulation of the *H19-Igf2* locus in mouse ES cells under *Parp-1* deficiency. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
18. Hamada K, Ogino H, Teraoka, H, Sugimura T, Masutani M. Enhancement of 5-aza-dC cytotoxicity with PARP inhibitor in human colon cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
19. Sasamoto E, Hashimoto A, Maeda D, Ogino H, Sugimoto Y, Sugimura T, and Masutani M. Lower mutation frequency of the *gpt* gene in the brain of mice under *Parp-1* deficiency, 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
20. Masutani M, Shirai H, Ogino H, Poetsch A., Sasamoto E, Maeda D, Hashimoto A, Sugimura T. Role of poly-ADP-ribosylation in the maintenance of genomic stability, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “DNA Repair and Human Cancers”, 東京 (2009 年 11 月)
21. 三戸 沙耶香、笹本 絵里香、橋本 安希、白井 秀徳、杉本 芳一、杉村 隆、益谷 美都子、The role of Parp-1 in DNA repair characterized with a reconstituted DNA repair system, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009 年 12 月)
22. 益谷 美都子、白井 秀徳、橋本 安希、笹本 絵里香、三戸 沙耶香、萩野 秀樹、杉村 隆、Function of polyADP-ribosylation in protection of genomic integrity, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009 年 12 月)
23. Fujimori-Sakuma H, Ogino H, Sugimura T, Masutani M. The hypomethylation of *H19/Igf2* ICR in *Parp-1* knockout mouse ES cells. 8th AACR/JCA Joint Conference - Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics. Wailkoloa (2010 年 2 月)
24. 北橋 宗、吉本光喜、今井俊夫、BOP 誘発ハムスター膀胱がん過程における免疫組織化学マーカーとしての $\alpha_v\beta_3$ integrin の有用性、第 26 回日本毒性病理学会、金沢市 (2010 年 2 月)
25. Kitahashi T, Mutoh M, Sugimura T, Wakabayashi K, Imai T. Application of micro-computed tomography in pancreatic ductal carcinomas of Syrian hamsters. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, 米国ハワイ州ハワイ島 (2010 年 2 月)
26. 葛城美徳、郷梨江香、森田慎一、小幡美貴、木南凌「 γ 線照射によるマウス萎縮胸腺内の前リンパ腫細胞形成には細胞増殖と分化停止が必要である」第 52 回日本放射線影響学会 (ワークショップ) 広島: 2009 年 11 月
27. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Taketo MM, and Oshima M: Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling activity in gastric epithelial cells through TNF- α . 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), (Denver) April 18-22, 2009.
28. Oshima M. Gastric tumorigenesis caused by cooperation of inflammation and oncogenic activation, 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, (Kanazawa) July 3-4, 2009.
29. Oshima M: Prostaglandin E₂ signaling and inflammation in gastric tumorigenesis. 29th International Symposium on Cancer, (Sapporo) July 13-14, 2009.
30. Du Y-C, Oshima H, Oguma K, Kitamura T and Oshima M: Expression of Wnt antagonist Sox17 during the course of gastrointestinal tumorigenesis, 29th International Symposium on Cancer, (Sapporo) July 13-14, 2009.
31. Oshima H, Oguma K, and Oshima M: Inflammation and gastric tumor mouse model [Symposium], 68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
32. Oshima H, and Oshima M: Gastric tumorigenesis through suppression of BMP signaling [International Session]. 68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
33. 大島 正伸: 胃がん発生における COX-2/PGE₂ 経路の役割, 第 51 回日本消化器病学会大会 (京都), Oct 16, 2009.

34. 小熊 圭祐, 大島 浩子, 大島 正伸: Promotion of Wnt/ β -catenin signaling by TNF- α in gastrointestinal tumor cells, 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜), Dec 9-12, 2009.
35. Oshima M, Oguma K, and Oshima H: Tumor macrophages and inflammatory pathway on gastric tumorigenesis. *14th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Kanazawa) Dec 19-20, 2009.
36. 大島 正伸: 炎症と胃がん発生: pathway specific マウスモデルからのアプローチ, 第 26 回日本毒性病理学会 (金沢), Feb 3, 2010.
37. 尾山 武, 安井由美子, 杉江茂幸, 渡邊邦友, 田中卓二: Tricin による炎症関連大腸がん抑制効果. 第 25 回日本毒性病理学会, 浜松, 1 月 27-28 日, 2009 年.
38. 杉江茂幸, 尾山 武, 安井由美子, 田中卓二: MeIQx 投与後長期飼育における F344 ラットの心臓病変. 第 25 回日本毒性病理学会, 浜松, 1 月 27-28 日, 2009 年.
39. Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Miharuru Kamide, Sotoe Yamamoto, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: A flavone, triclin, suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, March 11-12, 2009.
40. Mihye Kim, Shingo Miyamoto, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, Akira Murakami, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: Dietary zerumbone inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, March 11-12, 2009.
41. 尾山 武, 安井由美子, 杉江茂幸, 田中卓二: Tricin による炎症関連大腸がん抑制とその機序の検討. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 5 月 1-3 日, 2009 年.
42. 尾山 武, 安井由美子, 杉江茂幸, 田中卓二, 渡邊邦友: Tricin による炎症関連大腸がん抑制とその分子機構の検討. がん予防大会 2009 愛知 (第 16 回日本がん予防学会, 第 32 回日本がん疫学研究会, 第 10 回日本がん分子疫学研究会), 6 月 16-17 日, 2009 年.
43. 尾山 武, 安井由美子, 杉江茂幸, 田中卓二: 炎症関連大腸がんにおけるフラボノイド triclin と高コレステロール血症の影響. 第 24 回発癌病理研究会 8 月 25-27 日 七尾
44. Takuji Tanaka, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, and Shigeyuki Sugie: Colorectal cancer chemoprevention by beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
45. Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, Kunitomo Watanabe, and Takuji Tanaka: Dietary flavonoid triclin suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
46. Shigeyuki Sugie, Takeru Oyama, Yumiko Yasui, and Takuji Tanaka: Effect of BITC and PEITC on BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in male F344 rats. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
47. 庫本高志, 標的遺伝子改変ラットを用いた発がん研究, 第 68 回日本癌学会, 横浜市, 2009 年 10 月
48. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc*-mutant rat. The 23rd International Mammalian Genome Conference, La Jolla, USA, 2009 年 11 月
49. 庫本高志, *Apc* 遺伝子変異ラットを用いた大腸がん研究, 第 26 回日本毒性病理学会, 金沢市, 2010 年 2 月
50. Kuramoto T, Genetically modified rat and its application to carcinogenesis study, 2010 KALAS Winter Symposium, Yongpyong, Korea, 2010 年 2 月
51. 米田恭子, 高橋宏和, 市川靖史, 宇於崎宏, 深山正久, 油谷浩幸, 児玉龍彦, 伊藤行夫, 相良三奈, 宮澤ちひろ, 中島淳, 大腸癌の新しい腫瘍マーカーシスチン SN の開発, 第 5 回日本消化管学会総会学術集会, 東京, (平成 21 年 1 月 12 日)
52. 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、斉藤聡、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－、第5回日本消化管学会総会学術集会、東京、(平成21年1月13日)
53. Endo H, Hosono K, Yoneda K, Takahashi H, Nakajima A, JNK plays a crucial role in promotion of the early stage of colon carcinogenesis under the high-fat condition, AACR 100th Annual Meeting 2009, Denver, Colorado, USA (2009.4.20)
54. 遠藤宏樹、細野邦広、中島淳、高脂肪食制限は JNK 活性化を抑制して大腸発癌を予防する、第95回日本消化器病学会、ワークショップ4、札幌、(平成21年5月)
55. 遠藤宏樹、藤澤聡郎、中島淳、アディポネクチンの大腸発癌に対する効果：分子メカニズム検討、第95回日本消化器病学会、シンポジウム5、札幌、(平成21年5月)
56. 細野邦広、高橋宏和、中島淳、AMPKをターゲットとする新たな大腸化学発癌予防、第95回日本消化器病学会、ワークショップ4、札幌、(平成21年5月)
57. 中島淳 第95回日本消化器病学会一般演題(ポスター)座長 大腸臨床-3 札幌(平成21年5月7日)
58. Takahashi H, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Akiyama T, Inamori M, Abe Y, Kato S, Uchiyama T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A, Plasma IGF-1 Is Correlated with Dysplastic Aberrant Crypt Foci in Men. Digestive Disease Week 2009 AGA Institute, Poster Session, Chicago (2009.6.3)
59. 高橋宏和、細野邦広、遠藤宏樹、米田恭子、加藤真吾、内山崇、飯田洋、馬渡弘典、野崎雄一、秋山智之、藤田浩司、米田正人、稲森正彦、阿部泰伸、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤聡、中島淳、Aberrant crypt foci の自然史に対する解析、第77回日本消化器内視鏡学会総会、名古屋、(2009年5月21日)
60. 高橋宏和、細野邦広、中島淳、Aberrant crypt foci とサプリメントの相関解析、第40回日本消化吸収学会総会・第51回日本消化器病学会大会合同、パネスディスカッション24、JDDW、京都、(平成21年10月17日)
61. 細野邦広、高橋宏和、加藤真吾、内山嵩、鈴木香峰理、飯田洋、馬渡弘典、遠藤宏樹、野崎雄一、坂本康成、米田恭子、藤田浩司、米田正人、阿部泰伸、稲森正彦、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤聡、中島淳、生活習慣病からみた大腸癌の新たな化学発癌予防-抗糖尿病薬メトホルミンを用いた検討-、第51回日本消化器病学会大会、JDDW、京都、(平成21年10月15日)
62. 内山崇、高橋宏和、飯田洋、遠藤宏樹、細野邦広、秋山智之。阿部泰伸、稲森正彦、加藤真吾、渡辺誠太郎、馬渡弘典、米田恭子、野崎雄一、藤田浩司、米田正人、桐越博之、小林規俊、窪田賢輔、斉藤聡、中島淳、大腸ポリープ、大腸癌の診断に血清レプチン値は有用か、第51回日本消化器病学会大会、JDDW、京都、(平成21年10月15日)
- 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

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 斉
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。大腸発がん感受性遺伝子に関しては、リンケージ解析などの手法で候補領域を絞り込み、最終的に *caspase3* を候補遺伝子として同定した。*caspase3* 遺伝子は高感受性および低感受性の両系統間で大腸粘膜において発現量に有意な差を認め、また 3' 側非翻訳領域の 15 箇所異なる配列を有していた。これらの多型は *caspase3* のタンパク発現量に実際に影響を与えることを *in vitro* で確認し、高感受性系統ラットに低感受性系統由来のアレルを導入した TG ラットにおいても実際に大腸化学発がん感受性が抑制されることを確認した。すなわち *caspase3* 遺伝子の調節領域多型がタンパク発現量に影響を及ぼし、最終的に発がん感受性の差を引き起こしていることを明らかにした。

A. 研究目的

加熱魚肉食品中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) 大腸発がん感受性遺伝子候補 *caspase3* の非翻訳領域多型が発現量に及ぼす影響の解析：

caspase3 に関して、F344 ラットと ACI ラット間で見られる大腸粘膜における発現量の差と非翻訳領域多型の差異の間に因果関係が存在するか検討するために、*caspase3* コーディング領域全長の cDNA に F344 あるいは ACI 由来の 3'-UTR を

付加したコンストラクトを作成し、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に強制発現させた。導入 2 日後のタンパクを回収して WB を施行して *caspase3* のタンパク量を比較した。

(2) ACI type-*caspase3*-TG F344 ラットの作成および同ラットにおける PhIP 誘発大腸化学発がん性の検討：

F344 ラットに ACI type-*caspase3*-TG を導入するために、まず F344 及び ACI ラットの DNA から BAC library を作成し、ACI ラットの library から *caspase3* を含む約 80 kb の断片を精製し、F344 ラットの受精卵に導入後 F344 ラットに移植した。サザンブロット法により TG の有無およびコピー数を調べた。TG が 1 コピー程度と推定される ACI type-*caspase3*-TG F344 ラットに 400ppm の PhIP 投与 2 週間、引き続いて高脂肪食投与 4 週間を行い、さらに 6 週間後に、前がん病変とされる Aberrant Crypt Foci (ACF) の数の計測により発がん感受性を評価した。

(3) 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：

SND1 は RNA 干渉のエフェクター複合体の構成因子の一つであり、ヒト大腸がん発現亢進して

いる。我々は以前、SND1 が(a)PhIP 誘発大腸化学発がんにおける初期病変でも高発現していること、さらに (b) 翻訳レベルの制御により大腸がん抑制遺伝子 APC の発現を翻訳レベルで抑制すること、を見出している。そこで、SND1 と相互作用する miRNA 分子が APC を標的にしている、という仮説をたて、スクリーニングに着手した。具体的には、HCT 116 大腸がん細胞株へ HA-SND1 を導入後、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、SND1 と相互作用する miRNA を免疫沈降産物より精製、マイクロアレイを用いて、網羅的に解析した。

(4) 機能的スクリーニングによる大腸がん増殖抑制的 miRNA の探索：

我々は以前、大腸がん細胞への抗がん剤 Adriamycin 投与により p53 依存的に誘導される増殖抑制的 mir-34a を同定し報告した。一般的にがんでは miRNA の発現は低下していることが多いため、他にも同様な増殖抑制的 miRNA が存在する可能性が高いと考え、レンチウイルス miRNA ライブラリー (SBI 社) を用いたスクリーニングを行った。増殖抑制により、集団から次第に除去されていくクローンを同定する、いわゆる “drop-out” スクリーニングになるため、カスタムなオリゴアレイをデザイン、作成して時間の経過に従いコピー数の減少する miRNA を探索した。

(5) 大腸がん診断マーカーとしての血清中のエクソソーム由来 miRNA の探索：

我々も含めた多数のグループからの報告により、発がんにおける miRNA の重要性が確固たるものとなってきている。エクソソームに内包された状態で細胞外に分泌された miRNA は安定に存在することが知られており、また miRNA は由来する組織に特異的なプロファイルを示すことが多いため、がんの診断マーカーとしての有用性が期待される。そこで、大腸がん細胞株の培養上清や大腸がん患者血清よりエクソソームを分離・精製し、マイクロアレイ解析によりマーカー候補の探索を行った。

(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、疫学研究的倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん感受性遺伝子候補 caspase3 の非翻訳領域多型が発現量に及ぼす影響の解析：

過剰発現した際に、ACI type-caspase3 のコンストラクトは F344 type-caspase3 と比較して約 2 倍程度のタンパク量の発現を示した。これは両系統間における内因性の caspase3 の発現量の差とほぼ同等であり、非翻訳領域の多型が何らかのメカニズムによりタンパク量に影響を与えている可能性が示唆された。

(2) ACI type-caspase3-TG F344 ラットの作成および同ラットにおける PhIP 誘発大腸化学発がん性の検討：

F344 と ACI の caspase3 発現量の差をより忠実に再現した TG ラットが望ましいため、大腸陰窩の WB でタンパク発現量に 2 倍程度の差がある 1-2 コピー程度の TG を有するクローンを選択して、PhIP 誘発大腸発がん実験を行った。同胞の関係にある F344 ラット (TG なし) と ACI type-caspase3-TG F344 ラットをそれぞれ 7 匹、10 匹ずつ解剖したところ、ACF は 2.14 ± 1.07 および 0.6 ± 0.84 となり、TG において有意に ACF 形成が抑制されていた ($p < 0.01$)。

(3) 翻訳制御因子 SND1 と相互作用する miRNA のスクリーニング：

miRNA マイクロアレイの結果、SND1 と相互作用している miRNA 分子の中に、がん抑制的 miRNA である let-7 などを含む miRNA がコントロール群に比べて有意に濃縮していることが判明した。さらに、この中には標的配列の予測から APC 遺伝子に結合する可能性のあるものが含まれており、現在この miRNA が実際に APC のタンパクレベルを下げかどうか検証を進めている。

(4) 機能的スクリーニングによる大腸がん増殖抑制的 miRNA の探索：

HCT116 や SW480 などの大腸がんの増殖を顕著に抑制する miRNA が複数同定された。mir-34a も予想通りアレイで検出されており、実験が成功している傍証と考えられた。興味深いことに、これらの多くは PhIP 投与によりラット大腸粘膜で誘導されることを見出しており、発がんの過程でも何らかの役割を果たしている可能性がある。drop-out した miRNA の作用はアポトーシスの誘導と細胞周期の停止 (senescence を含む) に大別され、現在どのような経路の制御を介してこうした効果が誘導されるのか慎重に解析を進めている。