

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

主任研究者 中釜 斉

平成22(2010)年5月

(1/3冊)

目 次

I. 総合研究報告

疾患モデルを用いた発がんの分子機構及び

感受性要因の解明とその臨床応用 ————— 1

中釜 齊

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 32

III. 研究成果の刊行物・別刷 (別添)

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

疾患モデルを用いた環境発がんの初期発生過程機構
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動的に働くことが期待される。発がん物質 PhIP によるラット誘発大腸がんモデルを用い、大腸発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。翻訳抑制因子の SND1 と、増殖抑制的 microRNA (miR-34a) を介する翻訳制御機構の機能破綻が、大腸発がん重要な役割を果たすことが示唆された。機能的なスクリーニングにより増殖抑制的 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。コンソミックマウスの解析では、B6-2CMSM は B6-2TMSM と比べて PhIP 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて高感受性であり、雌がより高感受性の傾向を示した。ヒト大腸の dysplastic ACF の個数は内臓脂肪型肥満、アディポネクチン及び IGF1 と有意な相関を示し、アディポネクチンの標的分子である AMPK の活性化薬である metformin により減少する傾向を示した。肥満関連の大腸発がん促進機序のひとつとして JNK 経路の直接の関与が証明され、予防標的となりうる可能性を示した。Apc 遺伝子に変異を導入した Kyoto Apc delta (KAD) ラットは、AOM 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて炎症の惹起を介して短期間で大腸腫瘍を形成し、抗がん剤開発のモデルとして有用と考えられた。Wnt シグナルと COX-2/PGE₂ 経路を同時に活性化させたマウス胃がんモデルでは、遺伝子発現プロファイルがヒト胃がんに酷似しており、優れたモデルと考えられた。感染により活性化されたマクロファージや PGE₂ を介したシグナルが EGFR 活性化など介して胃がん発生に重要であることが示された。一方、無菌化により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、細菌感染刺激も炎症反応の惹起に必要と考えられた。放射線誘発リンパ腫モデルでは、放射線照射後早期に現れる大型リンパ球が前リンパ腫細胞であり、その出現効率が放射線発がん感受性の鍵となると考えられた。リンパ腫抑制遺伝子 *Bcl11b* は、Apc^{Min} マウスでの腸管腫瘍発生の修飾因子だが、マウスおよびヒトの腸管でハプロ不全型のがん抑制遺伝子として働く可能性が示唆された。*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。*Bcl11b* は β -カテニン発現を抑制し、その機能低下が発がんを亢進させる可能性が考えられた。ガンマ線照射後の二本鎖 DNA 切断の不正確な修復が *Parp-1* 欠損下では起きにくい可能性が示唆された。*Parp-1* 欠損細胞において H19-Igf2 imprinting 制御領域における DNA メチル化レベルの低下と遺伝子発現亢進が認められ、エピジェネティック異常を介してがん化に関わる可能性が示唆された。*Parp* の機能欠損は造腫瘍能に抑制的に働いた。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類似しており、ヒト膀胱がんの早期診断マーカー候補と考えられた。

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
庫本 高志	京都大学医学研究科	准教授
今井 俊夫	国立がんセンター	室長
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、がんの早期診断やテーラーメイ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す。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を規定する候補遺伝子を同定する。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進める。

B. 研究方法

(1) ラット大腸発がん感受性候補遺伝子の同定:

ラット 16 番染色体上の候補領域 (D16Nkg9~D16Nkg38) におけるラット 18 系統のハプロタイプ解析の結果、ACF 誘発性との間に相関性が認められた約 2 Mb の領域 (D16Mit3~ D16Mgh5) 中の 13 個の遺伝子のうち、高感受性系統 F344 と低感受性系統 ACI ラット間で遺伝子発現量に差を認めた唯一の遺伝子について、プロモーター領域 (約 1.8 kb)、コーディング領域、及び 5' および 3' 側非翻訳領域の全塩基配列を決定した。その結果検出された多型について、種々のラット系統を用いて ACF 誘発性との関連性を検討した。

(2) 大腸発がん感受性候補遺伝子の発がん感受性への影響:

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あ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に強制発現させてタンパク量を比較した。また、個体レベルでの効果を確認するために、ACI ラットのゲノムよ中の候補遺伝子を含む領域 (~80 kb) を F344 ラットの受精卵に導入して TG ラットを作成した。TG が 1 コピー程度と推定される F344-TG ラットに 400ppm の PhIP 投与 2 週間、高脂肪食投与 4 週間を行い、さらに 6 週間後に ACF 数の計測により発がん感受性を評価した。

(3) 大腸発がんにおける SND1 発現誘導の意義:

発がん過程で Snd1 蛋白質が発現誘導されるタイミングを明らかにするため、PhIP 連続投与後の大腸上皮を用いて免疫組織学的解析を行った。また、おもにヒト大腸がん細胞株をもちいて、SND1 の過剰発現やノックダウンによる影響を解析した。さらに、SND1 は miRNA を介して発がん過程に影響を及ぼしている可能性があることから、HA-SND1 を HCT 116 大腸がん細胞株へ導入後、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い SND1 と相互作用する miRNA を精製し、マイクロアレイを用いて網羅的な解析をおこなった。

(4) miR-34a の機能解析と標的遺伝子の探索:

PhIP 処理した大腸上皮における miR-34a の発現誘導の有無や、miR-34a の導入による細胞増殖、細胞死への影響を検討した。大腸がん手術検体における miR-34a の発現についてもリアルタイム PCR を行い評価した。miR-34a の標的遺伝子を同定するために、miR-34a のヒト大腸がん細胞株導入により発現変動する遺伝子の網羅的解析や、ビオチン化 miR-34a の細胞内導入後のアビジンビーズを用いた pull-down 法などを行った。また、miR-34a による p53 活性化機構を明らかにするために、野生型および p53 欠損の 2 種類の HCT 116 細胞に miR-34a とともに p53 応答配列を含むルシフェラーゼ遺伝子を導入して解析を行った。

(5) 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:

大腸がん増殖抑制的 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) をヒト大腸がん細胞株に導入し、発現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、カスタムオリゴアレイを作成し、時間の経過に従いコピー数の減少する miRNA を探索した。

(6) 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。

(7) コンソミックマウスを用いた大腸発がん感受性候補遺伝子の探索:

コンソミックマウス B6-2TSM (C57BL/6J 系統の 2 番染色体テロメア側を MSM 系統の相同領域に置換したマウス) 及び B6-2CMSM (同様にセントロメア側を置換したマウス) を用いて、PhIP 誘発 DSS 併用発がん実験を行った。8 週齢を各 4 群に分け、第 1 群に PhIP (200mg/kg bw) を胃内強制投与して 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 投与のみ、第 3 群には DSS 投与のみ、第 4 群は無処置群とした。実験開始 20 週間後組織学的解析を行った。

(8) ob/ob マウスでの DSS/PhIP 大腸発がんの解析:

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。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。

(9) ヒトの ACF 数と相関する因子の解析と PPAR γ リガンドによるその予防効果の検討:

下部消化管内視鏡により dysplastic ACF が認められ、かつ同意の得られた 80 例に対して、問診、採血、腹部 CT 検査を行い、ACF の個数と臨床情報や血液清化学データとの相関を解析した。更に、同意の得られた対象患者に対して 1~8 ヶ月間 PPAR γ リガンドである pioglitazone を投与し ACF の変化を追跡した。

(10) AMPK 活性化による発がん予防効果の解析:

APC^{Min/+} マウスおよびアゾキシメタン誘発腸炎モデルマウスに対し AMPK 活性化薬 (metformin) を投与し、ACF やポリープ形成に対する作用を解析した。また、ヒトにおいても同様に 1 ヶ月内服後の ACF の数の変化を解析した。

(11) 高脂肪食が大腸発がんおよびその影響の解析:

C57BL/6J マウス普通食摂取群と高脂肪食摂取群との間でアゾキシメタン誘発 ACF の数と BrdU labeling index で示される大腸上皮細胞増殖活性を比較した。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。

(12) Apc delta ラット (F344-Apc^{d 2522}) を用いた DSS 併用 AOM 誘発大腸がんの解析:

9 週齢の Apc delta ホモラット (n=9) とヘテロラット (n=9) に azoxymethane (AOM, 20mg/kg bw) を皮下投与し、1 週間後から 2% DSS を 1 週間飲水投与した。AOM 投与 8 週間後より、毎週 1 回大腸内腔をヒト気管支内視鏡 (オリンパス社 OTV-S7V) を用いて観察した。実験開始後 20 週目に剖検し、大腸腫瘍のサイズと個数を測定、通常の組織学的解

析と β -catenin の免疫染色も施行した。 β -catenin と K-ras 遺伝子について変異の有無も検索した。

(13) Apc delta ラット (F344-Apc^{d 2522}) を用いた 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。

(14) K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織の解析:

Wnt と PGE₂ 双方のシグナルを活性化させた K19-Wnt1/C2mE マウス (n=5) の胃がん組織、PGE₂ シグナルだけを活性化させた K19-C2mE マウス (n=3) の胃組織、および野生型マウス (n=3) の胃組織それぞれを用いて、遺伝子発現レベルをマイクロアレイにて解析した。遺伝子発現については RT-PCR で、EGFR 活性化は免疫染色により確認した。また、野生型マウスと比較して発現変化の認められる遺伝子について、ヒト胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、腎臓がんの各遺伝子発現プロファイルと比較解析した。

(15) EGFR 阻害による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウス (各群 n=4) を用いて、EGFR 阻害薬 (gefitinib; 100mg/kg) を、27 週齢から 30 週齢まで 3 週間連続投与実験を行なった。対照として、COX-2 阻害薬 (NS-398; 10mg/kg) の 3 週間投与群と薬剤非投与群を設けた。胃がん組織の経時的変化は X 線 CT により解析した。投与終了の 30 週齢で、腫瘍組織の大きさを比較解析し、EGFR シグナル阻害による作用を、腫瘍組織を用いた RT-PCR および western blotting などにより解析した。

(16) リポキシゲナーゼ (p12-LOX) の作用の解析:

p12-LOX のマウス腸管腫瘍、胃がん組織及びヒト大腸癌細胞での遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。更に、表皮由来細胞の JB6 を用いて、p12-LOX 阻害薬存在下及び非存在下での軟寒天コロニー形成、及び cloning efficiency 実験を行ない、腫瘍発生プロモーション過程での p12-LOX の作用を解析した。

(17) COX-2 及びケモカインの作用の解析:

COX-2 の下流では血管新生因子の VEGF-A の発

現誘導されている可能性がある。炎症性ケモカイン受容体 CXCR3 を介したシグナルが悪性黒色腫の転移に重要であることが明らかにされているので、同様の効果について大腸がん細胞を使って解析した。

(18) 胃がん細胞での Wnt シグナル強度の解析:

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

(19) 腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析:

K19-Wnt1 マウスの前がん病変でのマクロファージ浸潤を免疫組織学的に解析した。また、マクロファージ欠損マウス (*op/op*) を *Apc^{Δ716}* マウスと交配させて複合変異マウスを作製して 15 週齢で病理解剖し、腸管ポリープの発生数と大きさを計測し、マクロファージ欠損による腸管ポリープ発生への影響を解析した。

(20) 感染刺激による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1 マウスは、胃粘膜で Wnt シグナルは活性化しているが、PGE₂ を産生してないために胃がんを発生しない。そこで、*K19-Wnt1* マウス (6 週齢) に、*H. pylori* の類縁菌である *H. felis* を感染させて 8 週間、20 週間後に病理解剖し、マクロファージ浸潤および上皮細胞の Wnt シグナル亢進の有無について免疫組織学的に解析した。また、腫瘍病変の有無についても解析した。

(21) 無菌化による胃がん発生への影響の解析:

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

(22) 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。

(23) 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。

(24) コンジェニックマウスを用いた胸腺リンパ腫感受性遺伝子座の解析:

5 番染色体 BALB/c コンジェニックマウスを BALB/c と交配し、新しく 2 系統 (J1 と J2) を作製した。J1-line は 98.11Mb - 112.32Mb 領域が MSM と置換、J2-line は 98.11Mb - 104.59Mb 領域を MSM と置換されていた。これら J1 と J2 コンジェニックマウスを MSM マウスと自然交配、または IVF・ET (in vitro fertilization・embryo transfer) して得られた F1 マウス群を用いた。生後 4 週目より週に 1 度、2.5Gy の γ 線照射を計 4 回行い、萎縮胸腺および胸腺リンパ腫を誘発した。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸の出現で判定した。

(25) *Apc^{fln}* マウスと *Bcl11b-KO* のダブルヘテロマウスの自然発生大腸発がん実験:

Apc^{fln} マウスと *Bcl11b-KO* ヘテロマウスを交配し、産出仔について変異 *Apc* 及び *Bcl11b* 遺伝子型の違いにおける腸管腫瘍発生への影響を観察し、免疫組織学的解析を行った。3 種類の *Bcl11b* 抗体を使用した。*Bcl11b-Z* は zinc-finger ドメイン、*Bcl11b-C* は C 末端領域、*Bcl11b-N* は N 末端領域に対する抗体である。

(26) 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 γ 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。

(27) *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。

(28) 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。

(29) Parp-10 の発現および細胞内局在の解析:

N 末 EGFP 融合型 Parp-10 (EGFP-mParp-10) 発現ベクターを構築後、一過性に HeLa 細胞内に導入し、EGFP-mParp-10 の局在を観察した。また EGFP-Parp-10 の過剰発現下での細胞の機能異常を観察した。Parp-10 のペプチド断片を抗原として抗体の作製を行い、Parp-10 の検出の特異性を western blot 法により検討した。また、Parp-10 の各組織での遺伝子発現を検討した。

(30) PARP 阻害剤の細胞増殖抑制効果の検討:

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

(31) DNA 損傷に対する Parp-1 機能阻害の影響の解析:

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

(32) 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。

(33) 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プ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。

(34) 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。

(35) 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。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) を組織学的に評価するとともに、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、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。

C. 研究結果

(1) ラット大腸発がん感受性候補遺伝子の同定:

D16Mit3-D16Mgh5 に存在する 13 個の遺伝子について PhIP 投与前後の大腸上皮における遺伝子発現を解析した結果、caspase3 のみが ACI と F344 で約 2 倍の異なる発現量を示した。さらに、(F344xACI)F1 系統においても発現量が F344 と同程度を示し、常染色体優性の遺伝形式を示す PhIP 大腸発がん感受性の候補遺伝子として矛盾しなかった。また、最終エクソンの coding 領域に 1 箇所のアミノ酸置換を伴わない多型と、3' 側の

非翻訳領域に 15 箇所の多型を認めた。検索した 16 種類のラット系統は F344 型あるいは ACI 型のいずれかの多型だったが、PhIP による ACF の誘発数が 5 個以上を示した高感受性系統は全て F344 型の多型を示し、3' -UTR の多型が ACF 誘発性と関連する可能性が示唆された。

(2) 大腸発がん感受性候補遺伝子の発がん感受性への影響：

ACI type-*caspase3* のコンストラクトは、過剰発現した際に 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、多型が発現量の差を再現できることを確認した。F344 と ACI の 2 倍程度の *caspase3* 発現量の差を再現した、1-2 コピー程度の TG を有するラットを選択して、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 ラットを比較したところ、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) 大腸発がんにおける SND1 発現誘導の意義：

PhIP に曝露されたラット大腸上皮においても SND1 が一過性に発現誘導されていた。SND1 の過剰発現により、APC の mRNA 量が不変にも関わらず蛋白量が有意に減少していることから miRNA を介した翻訳抑制機構の関与が示唆された。SND1 と相互作用する miRNA を同定するために、免疫沈降法と miRNA マイクロアレイの組み合わせにより網羅的に探索したところ、がん抑制的 miRNA である let-7 や標的配列の予測から APC 遺伝子に結合する可能性のある miRNA などがコントロール群に比べて有意に濃縮していた。

(4) miR-34a の機能解析と標的遺伝子の探索：

HCT116 細胞をアドリアマイシンで処理した際に、p53 依存的に発現が誘導される microRNA として miR-34a を同定した。miR-34a を細胞へ導入すると強い増殖抑制効果が認められ、SA- β -galactosidase 陽性細胞が多数誘導されるとともに、E2F 転写因子ファミリーの発現が抑制され、逆に、がん抑制遺伝子 p53 や p53 の標的遺伝子群が発現誘導されていた。ラット大腸上皮において、PhIP 投与により miR-34a が発現誘導され、しかもラット系統間で発現誘導に差があることが分かった。miR-34a による p53 の活性化も観察されたが、これは miR-34a が p53K382 の脱アセチル化酵素である SIRT1 を標的としてアセチル化を促進していることによることを明らかにした。

(5) 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。

(6) 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。

(7) コンソミックマウスを用いた大腸発がん感受性候補遺伝子の探索：

B6-2TMSM に比し、B6-2CMSM は肥満傾向にあった。各群の大腸腺腫、腺がん、全腫瘍の発生率、平均個数は、腫瘍の発生したものについてのみ記載すると、以下の通りであった。2T 雄 PhIP-DSS 群 2/10 (0.50 ± 1.27)、1/10 (0.10 ± 0.32)、3/10 (0.60 ± 1.26)。2C 雄 PhIP-DSS 群 5/14 (0.50 ± 0.85)、7/14 (1.36 ± 1.55)、8/14 (1.86 ± 1.92)。2C 雌 PhIP-DSS 群 3/13 (0.23 ± 0.44)、10/13 (2.54 ± 2.50)、10/13 (2.77 ± 2.55)。WT 雄 PhIP-DSS 群 1/12 (0.08 ± 0.29)、2/12 (0.17 ± 0.39)、2/12 (0.25 ± 0.62)。WT 雌 PhIP-DSS 群 1/12 (0.08 ± 0.28)、4/12 (0.75 ± 1.23)、4/12 (0.83 ± 1.40)。

(8) ob/ob マウスでの DSS/PhIP 大腸発がんの解析：

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。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。

(9) ヒトの ACF 数と相関する因子の解析と PPAR γ リガンドによるその予防効果の検討:

拡大内視鏡を用いヒト大腸の dysplastic aberrant crypt foci (ACF) を観察し、生活習慣病を起こしうる各因子との相関を検討したところ、内臓脂肪と有意な相関を認めた。さらに、アディオネクチンが逆相関を、IGF-1 が正相関認め、大腸発癌への関与が示唆された。同意の得られた 14 症例に対し Pioglitazone 1~8 ヶ月投与したところ、ACF の減少する傾向を認めた。

(10) AMPK 活性化による発がん予防効果の解析:

APC^{Min/+} マウスを用いた検討では通常食に比し高脂肪食群において ACF ならびにポリープ形成が増加しこれに対し metformin は細胞増殖抑制作用を有することが BrdU index, PCNA の解析により明らかとなった。アゾキシメタン誘発腸炎モデルマウスにおいても同様の結果が得られた。ヒト ACF の数を大腸発がんのサロゲートマーカーとした metformin のパイロットスタディーは ACF を減少させる傾向にあった。

(11) 高脂肪食が大腸発がんに及ぼす影響の解析:

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 阻害薬 SP600125 を投与したところ、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ことから、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と考えられた。

(12) Apc delta ラット (F344-Apc Δ 2522) を用いた

DSS 併用 AOM 誘発大腸がんの解析:

ホモ、ヘテロとも全ての個体で、少なくとも 4 個以上の腫瘍が観察され、腫瘍の体積 (平均値 \pm SD) は、ホモで $53.5 \pm 15.1 \text{ mm}^3$ 、ヘテロで $50.8 \pm 48.7 \text{ mm}^3$ であり有意差はなかった。組織学的解析を行った結果の一個体あたりの ACF、腺腫、腺癌の平均個数を表にまとめる。Apc delta ホモラットの直腸、結腸に誘発される大腸腫瘍は、ヘテロラット比べ有意に多かった。また、腺癌において β -Catenin の核内移行が観察された。大腸腫瘍の遺伝子変異解析では、K-ras 遺伝子の変異は、ホモ、ヘテロとも検出されなかった。 β -Catenin 遺伝子の変異は、ホモでは 28 個 (73.7%)、ヘテロでは、23 個 (88.5%) の腫瘍で検出され、コドン 32, 33, 34, 37, 41, 44 及び 45 に局在していた。内視鏡による観察では、AOM 投与 8 週後においてすでに 1 頭当たり 3.3 ± 0.5 個の腫瘍を認め、11 週後で 5.8 ± 0.9 個、14 週後で 17.3 ± 1.8 個と、腫瘍数の増加とサイズの増大を経時的に観察することができた。

(個数)	ホモ	ヘテロ	
ACF	15.78 \pm 8.21	4.89 \pm 2.32	$P < 0.002$
腺腫	9.11 \pm 5.64	3.56 \pm 3.78	$P < 0.05$
腺癌	20.67 \pm 10.56	6.33 \pm 2.87	$P < 0.002$
全腫瘍	29.78 \pm 15.46	9.87 \pm 6.13	$P < 0.005$

(13) Apc delta ラット (F344-Apc Δ 2522) を用いた 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。

(14) K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織では、Epiregulin、Amphiregulin、HB-EGF の発現および EGFR シグナル伝達を活性化する ADAM ファミリーの ADAM8、ADAM9、ADA10、ADAM17 の発現が亢進していたが、これらは K19-C2mE マウス胃粘膜でも発現亢進していることから PGE₂ 依存的と考えられた。予想された Wnt 標的遺伝子の発現誘導以外にも、Wnt 以外の複数のシグナル経路の活性化も認められた。これらの結果はヒト胃がんや大腸がん組織の遺伝子発現プロファイルと極めて類似していたが、ヒト乳がん、肺がん、腎臓がんとの類似性は低かった。したがって、K19-Wnt1/C2mE マウスは分子発生機序、組織病理像および遺伝子発現プロファイルの各観点から、ヒト胃がんを外挿したモデルマウスであることが確認された。

(15) EGFR 阻害による胃がん発生への影響の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウスに EGFR 阻害薬 gefitinib を投与すると、胃がん組織の体積は非投与群マウスの 10%以下まで減少した。従って、Wnt と PGE₂ で発生する胃がんでは、PGE₂ 依存的に活性化する EGFR シグナルが腫瘍の維持に重要である。COX-2 阻害薬よりも gefitinib の方が効果的であった。gefitinib 投与マウスの胃がん組織では COX-2 発現が低下しており、非リン酸化β-catenin 量の有意な減少も認められた。PGE₂ 依存的に活性化した EGFR シグナルが、さらに COX-2 を誘導して PGE₂ 経路を亢進し、同時に Wnt シグナルを活性化している可能性を示している。

(16) リポキシゲナーゼ (p12-LOX) の発がん作用の解析:

Apc 遺伝子ノックアウト (Apc^{Δ716}) マウスに発生する腸管腫瘍組織、および K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織ではともに p12-LOX の発現が誘導されていた。また、大腸癌細胞でも広く p12-LOX の NF-κB シグナルを介した発現誘導が認められた。マウス表皮由来の JB6 細胞は TPA や EGF 刺激により軟寒天中でコロニーを形成するが、p12-LOX 阻害薬である baicalein 存在下ではコロニー形成やクローニング効率が著明に抑制された。即ち上皮細胞が腫瘍組織を形成する過程で、炎症に起因した NF-κB が p12-LOX を誘導し、その代謝産物である 12-HETE が何らかの役割を果たしている事が考えられた。

(17) COX-2 及びケモカインの作用の解析:

マウス生体内で COX-2 発現を誘導させる負荷を与えると、血中 VEGF-A 濃度の上昇が認められ、炎症に起因した COX-2/PGE₂ 経路が腫瘍組織内の

血管新生に関与している可能性を示している。また、炎症性ケモカインの受容体である CXCR3 を強制発現させた大腸がん細胞 (DLD-1) を免疫不全マウスの結腸に移植すると、親株を移植した場合と比較して、肝臓や肺への転移が有意に亢進した。K19-Wnt1/C2mE CXCR3 などの炎症性ケモカイン受容体を介した刺激が、胃発がん過程にも関与する可能性が示唆された。

(18) 胃がん細胞での Wnt シグナル強度の解析:

TOPEGFP ベクターの導入により、GFP 蛍光強度で Wnt 活性を測定できる胃がん細胞株、AGS-GFP と Kato-III-GFP を作製した。Wnt が恒常的に活性化したこれらの細胞でもそのシグナル強度が変動することを、48 時間タイムラプス観察により明らかにした。この系で、活性化マクロファージ細胞培養上清で刺激すると、Wnt シグナル強度が強まったが、TNF-α 中和抗体がこれを阻害した。また、TNF-α に反応して Wnt シグナルが亢進したが、IL-1β や IL-6 には反応しなかった。以上より、活性化マクロファージ由来 TNF-α が胃がん細胞の Wnt シグナル亢進を介して腫瘍発生に作用する可能性が考えられた。

(19) 腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析:

K19-Wnt1 マウスでは胃がんが発生しないが、散発性に前がん病変を発生する。これらの上皮細胞ではβ-catenin の細胞内蓄積が強く、Wnt シグナルの亢進とともに著しいマクロファージ浸潤が認められた。Apc^{Δ716} マウスでは、Wnt シグナル亢進に起因して腸管ポリープを自然発生するが、やはり腫瘍組織間質にマクロファージ浸潤が認められる。op/op マウスとの交配によりマクロファージを欠損した Apc^{Δ716} マウスを作製すると、腸ポリープの発生数に大きな変化はなかったが、腫瘍サイズの顕著な減少が認められた。したがって、腫瘍組織へのマクロファージ浸潤は、腫瘍細胞の増殖に重要であると考えられた。

(20) 感染刺激による胃がん発生への影響の解析:

H. felis を経口的に感染後 8 週間経過した K19-Wnt1 マウス胃粘膜では炎症が持続し、粘膜へのマクロファージ浸潤とその活性化および胃上皮細胞でのβ-catenin 蓄積が認められた。一方、非炎症領域では細胞浸潤もβ-catenin 蓄積も見られなかった。また、感染 20 週間経過後に病理解剖すると、胃粘膜全体で炎症反応が認められ、病理組織学的にも異形成をとまなう上皮細胞から構成される腫瘍性病変が認められた。以上の結果から、感染による炎症反応で粘膜に浸潤したマクロ

ファージは、周囲の胃上皮細胞の Wnt シグナル亢進を介して腫瘍発生促進に作用する可能性が考えられた。

(21) 無菌化による胃がん発生への影響の解析:

無菌化した *K19-Wnt1/C2mE* マウスをビニールアライソレーターで飼育し、SPF で飼育した対照群と比較した。対照群胃がん組織では粘膜下細胞浸潤をとまなう炎症反応が観察されるが、無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃粘膜では炎症細胞浸潤を認めなかった。real-time RT-PCR による TNF- α 遺伝子の解析でも、同様の結果が得られた。したがって、PGE₂ シグナルだけでは胃がん発生に必要な炎症反応は惹起されず、感染刺激との協調作用が炎症反応の誘導に必要であると考えられた。

(22) 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 Noggin 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、若年性ポリープ症で認められる腫瘍病変に類似した、大きな胃過誤腫 (hamartoma) が自然発生した。同腫瘍の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が、Wnt シグナル標的因子の発現誘導は認められず、COX-2/PGE₂ 経路は Wnt 活性化に関与していないことが明らかになった。

(23) 胃がんに対する EP4 阻害薬投与実験:

PGE₂ の 4 種類の受容体 EP1-EP4 のうち、EP2 および EP4 を介したシグナルが腫瘍発生に関与している可能性が報告されている。*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がんでは EP4 発現が上昇していたため、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、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。

(24) コンジェニックマウスを用いた胸腺リンパ腫感受性遺伝子座の解析:

Line-J1 (98.11Mb-112.32Mb) 系統と Line-J2 (98.11Mb-104.59Mb) 系統のコンジェニックマウスを作製し、 γ 線照射誘発胸腺リンパ腫発がん実験

を行った所、候補領域は 5 番染色体上の約 4Mb (112.32Mb-116.12Mb) まで絞り込まれた。この領域中の遺伝子の中で、BALB/c と MSM 系統で多型のある遺伝子をデータベースで探索した結果、*Ssh1* (protein phosphatase Slingshot homolog 1) と *Sirt4* (NAD-dependent deacetylase sirtuin-4) が候補遺伝子として選択された。*Ssh1* では 1034 番目のアミノ酸、*Sirt4* では 06 番目のアミノ酸が置換することが確認された。

(25) *Apc*^{Min} マウスと *Bcl11b*-KO のダブルヘテロマウスの自然発生大腸発がん実験:

変異型 APC・野生型 *Bcl11b* マウス (13 匹) では平均腫瘍個数は 14.2 であるのに対し、変異型 APC・ヘテロ型 *Bcl11b* マウス (10 匹) では 33.1 と有意に上昇しており ($P < 0.01$)、ヘテロ型 *Bcl11b* では有意に腫瘍の大きさも増大していた。*Apc* 遺伝子の野生型アレルはほとんどの腫瘍で欠失していたが、*Bcl11b* 遺伝子の野生型アレルの欠失はみられず、*Bcl11b* 遺伝子がハプロ型不全がん抑制遺伝子として働くことが示唆された。*Bcl11b* の発現を免疫組織化学で検討したところ、小腸 crypt 内の上部 2/3 の細胞の核が染まり、これらの下部半分は BrdU 陽性細胞で、Transit amplifying cells (TA 細胞) と考えられる。stem cells の一部にも発現が観察された。

(26) 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。

(27) *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。

(28) 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。

(29) Parp-10の発現および細胞内局在の解析：

pEGFP-mParp-10を一過性に導入したHeLa細胞では、GFP-mParp-10は細胞質中の局所に点状に強く集積した。一方、ユビキチン相互作用モチーフを欠損したGFP-mParp-10deltaUIMは細胞質中にはほぼ均一に存在し、集積傾向は観察されなかった。従ってParp-10の細胞質での局在性はユビキチン相互作用モチーフに依存することが示唆された。Parp-10のmRNA発現レベルはマウスでは精巣で高く小腸や肺以外の他の主要臓器では低い傾向を認めた。

(30) PARP阻害剤の細胞増殖抑制効果の検討：

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

(31) DNA損傷に対するParp-1機能阻害の影響の解析：

Parp-1^{-/-}マウスにガンマ線4 Gyを4週間の間隔で2回全身照射し、Parp-1^{-/-} gpt deltaマウスの脳における変異マーカー遺伝子gptの突然変異解析を行った。塩基置換型変異の頻度は遺伝子型間で差を認めなかったが、Parp-1^{-/-}マウスにおいて欠失変異や挿入変異の低下傾向が観察された。この傾向はParp-1^{-/-}マウス肝臓での傾向とも一致した。ガンマ線8 Gy照射3日後でも、欠失型変異体頻度はParp-1欠損マウス肝臓において野生型よりも低く、変異のホットスポットである4-6塩基の単塩基配列上の一塩基欠失変異頻度も肝臓及び脳において各々低下していた(p<0.05)。

(32) 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。

(33) 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。

(34) 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ヘテロ欠損マウスの比較では、過形成病変の頻度に差はなかったが、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(P<0.087)、肺腺腫もそれぞれ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、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。

(35) ハムスター膀胱がんモデル早期病変の解析：膀胱由来の腺がん(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。これらに対して免疫組織化学を実施したところ、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での陽性率が最も高く、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。

D. 考察

(1) ラット大腸発がん感受性候補遺伝子の同定:

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ている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) 大腸発がん感受性候補遺伝子の発がん感受性への影響:

TG ラットの解析から *caspase3* 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と発がんリスクが関連するという報告がある。さらに、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) 大腸発がんにおける SND1 発現誘導の意義:

SND1 は大腸発がんの早期から発現亢進が認められ、PhIP をラットに投与すると速やかに大腸上皮細胞において mRNA 及びタンパク質レベルで発現上昇し、APC を翻訳レベルで抑制する。この作用を媒介する miRNA 候補を今回同定したことは、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最近報告され、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。

(4) miR-34a の機能解析と標的遺伝子の探索:

SIRT1 が miR-34a の標的遺伝子である事を解明した。これらの結果から、miR-34a と p53 の間には、正のフィードバック機構が存在すると考えられた。このシステムは、発がん過程の初期段階におけるバリアー機構として機能している可能性がある。約 40% のヒト大腸がんでは miR-34a の発現低下が認められ、miR-34a の機能破綻が大腸がんの発生に寄与している可能性を示している。

(5) 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。

(6) 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。

(7) コンソミックマウスを用いた大腸発がん感受性候補遺伝子の探索:

コンソミックマウス B6-2CMSM は、B6-2TMSM と比べて PhIP 誘発 DSS 併用大腸発がんにおいて高感受性であることが示唆された。肥満との関連も含めて更に詳細に検討する必要がある。また、B6-2CMSM コンソミックマウスの系統間で明らかな感受性の違いが認められたが、同じ染色体上にもみ差異のある系統間で顕著な感受性の違いが発見された事より、PhIP 誘発炎症性大腸発がんの責任遺伝子の発見に近づいたものと考えられる。

(8) ob/ob マウスでの DSS/PhIP 大腸発がんの解析:

OB、WT マウス間で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探究することで肥満と大腸がんの関係を明らかにする手がかりとなる可能性がある。

(9) ヒトの ACF 数と相関する因子の解析と PPAR γ リガンドによるその予防効果の検討:

PPAR γ による ACF 数抑制はアポトーシス誘導によるものであり、内臓脂肪が発癌を促進する状況における大腸発癌化学予防への応用が期待される。今後ヒト ACF における pioglitazone 投与前後の発現遺伝子の網羅的解析をレーザーキャプチャーマイクロダイ

セクションにより得られたサンプルで解析し、発癌予防分子標的の同定を目指す。

(10) AMPK 活性化による発がん予防効果の解析:

肥満や糖尿病を改善させることが大腸がん予防につながる事が明らかにされているが、これまで発がん化学予防における有用かつ安全な薬剤は見出されていない。metformin は AMPK/mTOR 経路に作用し個体レベルで発がん抑制効果を示したが、副作用が少ないことから化学予防薬の有望な候補とえいえる。

(11) 高脂肪食が大腸発がんに及ぼす影響の解析:

高脂肪食摂取による大腸上皮細胞増殖が JNK 活性化によること、同経路の阻害薬が発がん抑制効果を示したことより化学予防薬候補として有望と考えられた。

(12) Apc delta ラット (F344-Apc^{Δ2522}) を用いた DSS 併用 AOM 誘発大腸がんの解析:

Apc delta ラットに誘発された大腸腫瘍では β -catenin 遺伝子に高頻度に遺伝子変異があることから、Apc 変異とは独立に Wnt シグナル系が亢進していると考えられた。短期間で高頻度に多数の大腸がんが誘発できる点、また、適度な大きさであるため内視鏡を用いて直腸および結腸での腫瘍発生過程を経時的に観察可能な点が、大腸がんに対する抗ガン剤、診断法、予防法の開発を効果的に進める優れたモデル系になる可能性に結びついている。

(13) Apc delta ラット (F344-Apc^{Δ2522}) を用いた DSS 誘発大腸炎の解析:

炎症高感受性が KAD ラットの AOM/DSS 大腸発がん試験における大腸腫瘍数の顕著な増加に寄与していると考えられた。APC タンパク質の 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。これらのドメインがあり、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。

(14) K19-Wnt1/C2mE マウス胃がん組織の解析:

K19-Wnt1/C2mE マウスの遺伝子発現プロファイルが多くのヒト胃がん組織と類似していた。ヒト胃がんの 30~50% で Wnt シグナル亢進が認められ、70% 以上で COX-2 発現誘導が認められることから、K19-Wnt1/C2mE マウスは一部のヒト胃がんを高精度に再現したマウスモデルとして、基礎研究だけ

でなく、薬効評価などの応用研究にも有用な研究資材である事が確認された。

(15) EGFR 阻害による胃がん発生への影響の解析:

EGFR シグナルが COX-2 発現を誘導し、Wnt シグナル活性を亢進する事から、Wnt と COX-2/PGE₂、そして EGFR の各シグナル経路がポジティブフィードバックにより相互に制御し合っており、それが発がん重要な役割を果たしている可能性を示した。COX-2 阻害薬と EGFR 阻害薬のコンビネーションによる新たな大腸がん予防方法が提唱されているが、胃がんでも化学予防標的としての EGFR の可能性を示した。

(16) リポキシゲナーゼ (p12-LOX) の作用の解析:

炎症反応では LOX 経路も誘導されて、様々な脂質メディエーターが誘導される。本研究結果から、消化器がん発生過程での p12-LOX の役割が示唆された。Wnt と PGE₂ の活性化に起因して発生する胃がんや大腸癌組織で、炎症反応に由来する EGFR 活性化や p12-LOX 誘導、そしてサイトカイン、ケモカインネットワークの活性化の発がんへの関与について、マウスモデルを用いて明らかにしていく。

(17) COX-2 及びケモカインの作用の解析:

マウス生体内で COX-2 発現を誘導させると血中 VEGF-A 濃度の上昇が認められ、腫瘍組織内の血管新生に関与している可能性を示している。炎症性ケモカインの受容体である CXCR3 を強制発現させた大腸がん細胞 (DLD-1) を、肝臓や肺への転移が有意に亢進した。これらを治療標的とすることによりがんの悪性の阻害が期待できる。

(18) 胃がん細胞での Wnt シグナル強度の解析:

Wnt シグナルは、消化管上皮幹細胞や未分化上皮細胞を未分化に維持する作用があるため、遺伝子変異などによる恒常的な Wnt シグナル亢進は胃がんや大腸がん発生の主要な原因と考えられている。TNF- α に反応して濃度依存的に Wnt シグナルが亢進し、TNF- α 中和抗体の処理によりこれが阻害されたことから、活性化マクロファージ由来の TNF- α が化学予防の標的候補となると考えられた。

(19) 腫瘍発生におけるマクロファージの役割の解析:

PGE₂ シグナル依存的に発生する炎症反応でマクロファージが活性化し、マクロファージが産生する TNF- α が胃上皮細胞の Wnt シグナルを亢進させる経路を初めて示した。本研究で明らかになっ

た、マクロファージ由来 TNF- α による Wnt シグナル亢進も、PGE₂による重要な発がん促進機構のひとつであると考えられる。

(20) 感染刺激による胃がん発生への影響の解析:

これまでは、*H. pylori* 感染により COX-2 発現が誘導され、下流で産生される PGE₂ がさまざまな生体反応を引き起こして発がんに関与すると考えられてきたが、本研究結果により PGE₂ の産生が誘導されても、感染刺激が依然として必要である事が判明した。詳細な分子機構の解明は今後の研究課題として重要である。

(21) 無菌化による胃がん発生への影響の解析:

マウスの腸管では、Wnt 活性化や BMP 抑制に起因して COX-2/PGE₂ 経路が自動的に誘導されて腺腫および過誤腫が自然発生する。一方、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 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。すなわち胃は腸管に比べて細菌数が極めて少ないために COX-2 発現が誘導されにくい可能性が示唆される。

(22) 若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析:

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で、COX-2/PGE₂ 経路の誘導がともに必要なことが初めて明らかにされた。これら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通じて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の他、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可能性がある。

(23) 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ことから、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。COX-2/PGE₂ 経路の阻害による胃がん予防効果が確認されたことから、除菌による発がん予防も有望と考えられた。

(24) コンジェニックマウスを用いた胸腺リンパ腫感受性遺伝子座の解析:

発がん感受性遺伝子候補として *Ssh1* と *Sirt4* を

選択した。*Ssh1* は Slingshot phosphate family に属し、アクチンの脱重合を行い細胞分裂や細胞の移動に重要な役割を果たす cofilin の Ser-3 脱リン酸化を行ない再活性化させる。*Ssh1* の変異により未分化 T 細胞の分化、移動に異常が起こり、異常増殖を引き起こす可能性が考えられる。一方、*Sirt4* の属する sirtuin family は、細胞内の代謝から老化やがん化、DNA 修復に至るまで多くの生命機能に関与すると考えられているが、*Sirt4* KO マウスの血中インシュリンレベルが上昇するとの報告があり、間接的にがん化を促す可能性が推測される。

(25) *Apc*^{Min} マウスと *Bcl11b*-KO のダブルヘテロマウスの自然発生大腸発がん実験:

Apc 遺伝子変異をもつ Min マウスが自然発症する小腸腫瘍への修飾効果が *Bcl11b*(+/-) 遺伝子型で認められ、*Bcl11b* 遺伝子型の野生型アレルが腫瘍で残存していた。*Bcl11b* は、マウス胸腺リンパ腫と同様、腸管発がんでもハプロ型不全のがん抑制遺伝子であった。ヒト *Bcl11b* 遺伝子座の LOH は進行性の大腸がんを高頻度に観察されるが、adenoma では LOH の報告はなく、進展に関与すると想像されている。しかし、大腸ポリープ患者では adenoma にも LOH が観察されるとの報告があり、*APC* 遺伝子変異と *Bcl11b* 遺伝子の修飾効果との深い関連性が示唆される。

(26) 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:

放射線照射後の *Bcl11b*^{KO/+} マウスでは、*Bcl11b* 遺伝子の機能低下によりクローナル増殖する胸腺細胞が分化停止していると考えられた。大きい細胞の増加は胸腺リンパ腫の特徴と一致しており、前がん細胞の可能性がある。一方、照射後早期の萎縮胸腺の解析では分化能を保持しクローナル増殖するがん幹細胞類似胸腺細胞を認め、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。

(27) *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を抑制するか検証し確認した。*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) が知られていることから、これらの分子を介して発がんに寄与している可能性が考えられた。

(28) ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異と LOH 解析:

ヒト大腸がん症例でLOHと変異の両方をもつ症例はなく、Bcl11bがハプロ不全な働きをもつ可能性があることから、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と考えられる。

(29) Parp-10の発現および細胞内局在の解析:

Parp-10の細胞質での局在性はユビキチン相互作用モチーフに依存することが示唆され、Parp-10がタンパク質分解制御に関与する可能性があると考えられた。がん化の過程におけるParp-10のタンパク質レベルでの発現や、遺伝子発現レベルでの変動を調べることでがん化との関連性を検討する。

(30) PARP 阻害剤の細胞増殖抑制効果の検討:

PARP 阻害剤により、5-aza-dCの細胞増殖抑制効果が増強され、遺伝子発現変化が細胞増殖抑制効果増強と関連する可能性が考えられる。

(31) DNA 損傷に対する Parp-1 機能阻害の影響の解析:

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

(32) 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。

(33) 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。

(34) Pargの発がん過程への関与の検討:

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の機能阻害は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。

(35) ハムスター膀胱がんモデル早期病変の解析:

BOP誘発ハムスター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。

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。ヒトでも同様の関連が明らかになれば、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miR-34aがSIRT1の抑制を介してp53を活性化するポジティブフィードバックループを形成していること、翻訳制御因子SND1がApcを抑制する候補miRNAと特異的に結合していることを示した。コンソミックマウスB6-2C57BL/6は、B6-2TMSMと比べてPhIP誘発DSS併用大腸発がんにおいて高感受性であることが示唆された。生活習慣病と関連する大腸癌の化学予防としてPPAR γ リガンド、metformin、JNK阻害剤などの可能性を示した。Apc deltaホモ欠損ラットは、AOMとDSS投与による大腸発がんを高感受性を示し、特に炎症を背景とする大腸腫瘍の有用なモデルになると期待される。WntとCOX-2/PGE₂シグナルが活性化しているK19-Wnt1/C2mEマウスはヒト腺管型胃がんの忠実なモデルであり、PGE₂依存的なEGFRシグナルの活性化やp12-LOXやCXCR3などの炎症性経路の重要性を明らかにした。活性化マクロファージ由来のTNF- α やPGE₂受容体のEP4も化学予防の有望な標的であることを示した。WTマウスのPhIP-DSS処置群でのみ腫瘍が発生し、OBマウスでの腫瘍発生はなかった。マウス5番染色体上に存在する放射線誘発胸腺リンパ腫のがん感受性遺伝子候補としてSsh1とSirt4を同定した。Bcl11bはハプロ型不全のがん抑制遺伝子としてマウス胸腺リンパ腫や腸管発がんでのAPC遺伝子変異を修飾することを示した。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。*Parp-1*の機能欠損はガンマ線誘発DNA損傷の修復系のうち不正確な修復経路を阻害している可能性があるが、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*の欠損は腫瘍発生に対して抑制的であることから*Parg*の機能阻害ががん化の予防法とな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の一部はヒト膵がんに類似していることが示され、今後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。

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)は特になし。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. Takahashi H, Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Fujisawa T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Ikeda T, Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A, Nakagama H. Life style-related diseases of the digestive system: colorectal cancer as a life style-related disease: from carcinogenesis to medical treatment. *J Pharmacol Sci*, 105:129-132, 2007.
2. Liu Y-T, Shang D, Akatsuka S, Ohara H, Dutta KK, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Izumiya M, Abe K, Nakagama H, Noguchi N, Toyokuni S. Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpbz1 protein tyrosine phosphatase to activate b-catenin pathway. *Am J Pathol*, 171:1978-1988, 2007.
3. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M and Nakagama H. Tumor suppressive *miR-34a* induces senescence-like growth arrest through modulation of E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,

104:15472-15477, 2007.

4. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T and Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 67:9568-9576, 2007.
5. Nakanishi M, Tazawa H, Sugimura T, Tanaka T and Nakagama H. Mouse strain differences in chronic-phase inflammatory responses in colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP-induced large bowel carcinogenesis. *Cancer Sci*, 98:1157-1163, 2007.
6. Imai T, Fukuta K, Hasumura M, Cho YM, Ota Y, Takami S, Nakagama H and Hirose M. Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and beta-catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, 28:2199-2206, 2007.
7. Tanaka E, Fukuda H, Nakashima K, Tsuchiya N, Seimiya H and Nakagama H. HnRNPA3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 358:608-614, 2007.
8. Lee-Motoyama JP, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K and Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestation tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 357:828-833, 2007.
9. Li Q, Dashwood WM, Zhong X, Nakagama H and Dashwood RH. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat *Bcl-2* promoter and characterization of a pathway involving b-catenin, c-Myc and E2F1. *Oncogene*, 26:6194-6202, 2007.
10. Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem*, 101:321-330, 2007.
11. Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagama H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc*, 39:70-74, 2007.

12. Fukuda T, Kondo Y, and Nakagama H. The anti-proliferative effects of the CHFR depend on the Forkhead associated domain, but not E3 ligase activity mediated by Ring Finger domain. *PLoS ONE*, 3:e1776, 2008.
13. Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T and Nakagama H. Induction of multinucleated cells and apoptosis in PC-3 prostate cancer cell line by low concentration of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci*, 99:1055-1062, 2008.
14. Nagata T, Takada Y, Ono A, Nagata K, Konishi Y, Nukina T, Ono M, Matsugami A, Furukawa A, Fujimoto N, Fukuda H, Nakagama H, and Katurahira M. Elucidation of the mode of interaction in the UPl-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity. *Nucleic Acids Res*, 36(21):6816-24, 2008.
15. Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Nakagama H, Williams DE, and Dashwood RH. beta-catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and a high-fat diet. *Cancer Sci*, 99(9):1754-9, 2008.
16. Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Pereira CB, Louderback M, Nakagama H, Bailey GS, Williams DE, and Dashwood RH. Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and beta-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29(4):834-9, 2008.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Ogino H, Masutani M, et al., Loss of *Parp-1* affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics*, 8:41 (16 pages), 2007.
23. Miwa M and Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci*, 98:1528-1535, 2007.
24. Idogawa M, Masutani M, Shitashige, M, Honda, K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-Mediated Gene Transactivation: Possible Linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*, 67:911-918, 2007.
25. Sugo N, Niimi N, Aratani Y, Masutani M, Suzuki H, Koyama H. Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase beta-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:656-661, 2007.
26. Shirato M, Tozawa S, Maeda D, Watanabe M, Nakagama H, Masutani M. Poly(etheno ADP-ribose) blocks poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity. *Biochem. Biophys Res Commun*, 355:451-456, 2007.
27. Nakayama R, Sato Y, Masutani M, Ogino H, Nakatani F, Chuman H, Beppu Y, Morioka H, Yabe H, Hirose H, Sugimura H, Sakamoto H, Ohta T, Toyama Y, Yoshida T, and Kawai A. Association of a missense single nucleotide polymorphism, Cys1367Arg of the WRN gene, with the risk of bone and soft tissue sarcomas in Japan. *Cancer Sci*, 99(2):333-339, 2008.
28. 益谷美都子、前田大介、萩野秀樹. PARP 阻害剤、がん分子標的治療、6(1):50-58、2008.

29. 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.
30. 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,
31. 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.
32. 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.
33. Kothe GO, Kitamura M, Masutani M, Selker EU, Inoue H. PARP is involved in replicative aging in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 47(4), 297-309, 2010.
34. Kamimura K, Mishima Y, Obata M, Endo T, Aoyagi Y, Kominami R. Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and amages. *Oncogene*, 26:5840-5850, 2007.
35. Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K, Kominami R. Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ -irradiation. *Oncogene*, 26:5280-5289, 2007.
36. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun*, 355:538-542, 2007.
37. Maruyama M, Yamamoto T, Kohara Y, Katsuragi Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Kominami R. Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after γ -irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:209-215, 2007.
38. Yoshikai Y, Sato T, Morita S, Kohara Y, Takagi R, Mishima Y, and Kominami R. Effect of Bcl11b genotypes and gamma-radiation on the development of mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 373:282-5, 2008.
39. Kominami R, Ohi H, Kamimura K, Maruyama M, Yamamoto T, Takaku K, Morita S, Go R, and Mishima Y. γ -Ray-Induced mouse Thymic Lymphomas: Bcl11b Inactivation and Pre-lymphoma cells. *Radiation Health Risk Sciences* (Eds, Nakashima et al.), Springer Library of Congress Control Number: 2008937558, 2009.
40. 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.
41. 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.
42. 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*, 77(1):235-43, 2010.
43. 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.
44. Oshima M, Suzuki H, Guo X, and Oshima H. Increased level of serum vascular endothelial growth factor by long-term exposure to hypergravity. *Exp Anim*, 564:309-313, 2007.
45. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, and Taketo MM. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*,

- 26:4679-4688, 2007.
46. Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, Aoki M, and Taketo MM. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-MAPK signaling. *J Biol Chem*, 282:23532-23540, 2007.
 47. Piao Y-S, Du Y-C, Oshima H, Jin J-C, Nomura M, Yoshimoto T, and Oshima M. Platelet 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis*, 29:440-447, 2008.
 48. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM, and Oshima M. Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cell. *EMBO J*, 27:1671-1681, 2008.
 49. Guo X, Oshima H, Kitamura T, Taketo, MM, and Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem*, 283:19864-19871, 2008.
 50. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E₂ pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69:2729-2733, 2009.
 51. Oshima M, Oshima H, and Taketo MM. Prostaglandin and TGF- β signaling in gastric cancer. In: *Biology of Gastric Cancer*, ed. by Wang T, Springer, 2009.
 52. 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.
 53. Oshima H, Oguma K, Du Y-C, and Oshima M. Prostaglandin E₂, Wnt and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 100:1779-1785, 2009.
 54. Itadani H, Oshima H, Oshima M, and Kotani H. Mouse gastric tumor models with PGE₂ pathway activation show similar gene expression profiles to intestinal-type human gastric cancer. *BMC Genomics* 10:615, 2009.
 55. Voigt B, Kuramoto T, Mashimo T, Tsurumi T, Sasaki Y, Hokao R, Serikawa T. Evaluation of LEXF/FXLE rat recombinant inbred strains for the genetic dissection of complex traits. *Physiol Genomics*, 32(3):335-342, 2008.
 56. Kuramoto T, Nakanishi S, Serikawa T. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiol Genomics*, 33:205-211, 2008.
 57. The STAR Consortium*, Saar K, Beck A, Bihoreau MT, Birney E, Brocklebank D, Chen Y, Cuppen E, Demonchy S, Dopazo J, Flicek P, Foglio M, Fujiyama A, Gut IG, Gauguier D, Guigo R, Guryev V, Heinig M, Hummel O, Jahn N, Klages S, Kren V, Kube M, Kuhl H, Kuramoto T, Kuroki Y, Lechner D, Lee YA, Lopez-Bigas N, Lathrop GM, Mashimo T, Medina I, Mott R, Patone G, Perrier-Cornet JA, Platzer M, Pravenec M, Reinhardt R, Sakaki Y, Schilhabel M, Schulz H, Serikawa T, Shikhagaie M, Tatsumoto S, Taudien S, Toyoda A, Voigt B, Zelenika D, Zimdahl H, Hubner N. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet*, 40(5):560-566, 2008.
 58. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet*, 40(5):516-522, 2008.
 59. Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, Kato M, Hirabayashi M, Kuramoto T, Serikawa T. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet*, 40(5):514-515, 2008.
 60. Takagi Y, Kuramoto T, Voigt B, Tsurumi T, Nakanishi S, Mashimo T, Masui N, Serikawa T. An informative set of SSLP markers and genomic profiles in the rat MHC, the RTI complex. *Immunogenet.* 61:189-197, 2009
 61. Naoi K, Kuramoto T, Kuwamura Y, Gohma H, Kuwamura M, Serikawa T. Characterization of the Kyoto circling (KCI) rat carrying a spontaneous nonsense mutation in the protocadherin 15 (*Pcdh15*) gene. *Exp Anim* 58(1):1-10, 2009.
 62. 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