

201004006A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中釜 斉

平成23（2011）年 5月

## 目 次

I.	総括研究報告		
	環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究	-----	1
	中釜 斉		
II.	分担研究報告		
1.	がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明	-----	15
	中釜 斉		
2.	新規変異原・がん原物質の検索	-----	21
	若林敬二		
3.	外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価	-----	25
	渡辺徹志		
4.	慢性炎症に関連した疾患のバイオマーカー探索と予防	-----	29
	大島寛史		
5.	遺伝子改変マウスを用いた発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究	-----	35
	續 輝久		
6.	がん高頻度発生地での分子疫学	-----	39
	梶村春彦		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	45

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

総括研究報告書

環境中の疾病要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

研究代表者 中釜 斉 独立行政法人国立がん研究センター研究所 所長

研究要旨

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

環境要因に関しては、ラット大腸発がんモデルを用いて、発がん物質特有の発現様式を示す miRNA を見出し、これらを指標とした新規の発がん性予測法の可能性を示した。内因性物質では、食品中の物質由来のニトロソ化合物が、*H.pylori* 感染との複合作用によりスナネズミに胃がんを誘発し、糖尿病の生体内モデルメイラード反応物から同定された物質 ABAQ は哺乳類細胞で遺伝毒性を示した。慢性炎症部位で活性酸素種と生体成分の反応から生成されるセコステロール類をヒト血中から検出し、一酸化窒素合成酵素への強い阻害能も見出し、がんのみならず他の酸化ストレスの亢進と関連する疾病の発症・進展にも関与する可能性が示唆された。大気粉塵中の発がん関連物質による、都市部での汚染及び中国大陸からの越境汚染の可能性を示した。ヒト検体を用いた DNA 付加体の網羅的解析で、既知物質を含む多数の DNA 付加体を検出し、環境要因を反映している可能性が示された。これら環境中の疾病要因を明らかにすることは、それらの除去・低減化による疾病の減少、化学予防剤や食生活を基盤とした疾病予防のための基礎的データとして重要である。

環境要因によるがん発生の分子機構の解明では、酸化ストレス誘発消化管発がんでは、修復遺伝子の欠損による突然変異の誘発よりも、*p53* による発がん抑制の役割が大きいことを見出した。また、miRNA 発現量の違いが遺伝的発がん要因となりうる可能性を示した。これらは、新規の予防法の開発や高危険度群の推定に役立つと考える。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

中釜 斉・(独)国立がん研究センター研究所・所長  
若林敬二・静岡県立大学・教授  
渡辺徹志・京都薬科大学・教授  
大島寛史・静岡県立大学・教授  
續 輝久・九州大学大学院・教授  
梶村春彦・浜松医科大学・教授

A. 研究目的

アジア諸国に蔓延するがんを含む疾病の病因を解明し、その減少を目指す。アジア諸国で顕在化しているこれらの病因も、日米両国では主たる病因の陰に潜んでいる可能性がある。解明されたアジア諸国に特徴的な病因に関して、その原因の除去による疾病の低減化を、本研究班の成果として日

米両国にも還元できる。

ヒトの疾病発生には、環境要因と遺伝的要因及びそれらの相互作用が深く関与している。環境要因によるヒト健康への影響として重要なものの一つは、細胞での突然変異やゲノム不安定性の誘発である。その他に、非遺伝性の変化等もヒトの健康に対し多大な損傷を及ぼし、これらの総合的な影響として、がん等の種々の疾病が発生する。本研究では、環境中に存在する変異原や発がん物質について、新規物質を探索すると共に、環境要因によるがん等の疾病発生の分子機構の解明を目的とする。がん発生の分子機構の解明は、新規のがん予防法の開発や高危険度群の推定による、がん発生の減少に有効である。炎症等による酸化ストレスの疾病等への影響も検討する。本研究で得られる成果は、アジア諸国のみならず、日米両国のがん等の疾病予防対策を講ずる上で有用な基礎的研究資料となる。具体的には、下記項目について解析する。

(1) 加熱魚肉食品中の変異原物質 PhIP 等によるラット大腸発がんモデルを用いて、発がん物質による非遺伝性変化を microRNA (miRNA) の点から解析する。また、miRNA 発現の差異の遺伝的発がん要因としての可能性を検討し、これら miRNA が大腸がんの発生・成立に及ぼす影響を解明する。(2) 外因性及び内因性の新しい変異・がん原物質を探索し、それらの生物活性を調べ、がんを含む疾病への関与及びその発生機序を解明する。これら物質の曝露レベルも検討し、リスク評価の基礎的資料とする。(3) 糖尿病患者のがん等の疾病に対する高リスク要因を、原因物質の構造解析・リスク評価及び生体内反応の点から解

析する。大気中の発がん関連物質に関して、日本での汚染状況及び中国大陸からの越境汚染の影響を明らかにする。(4) 活性酸素と生体成分の反応物を新規同定し、炎症関連疾患や生活習慣病の早期発見・診断のためのバイオマーカーとしての有効性を検討する。(5) 酸化ストレスによる DNA 損傷を介した発がんの分子機構の解明のために、p53 や他の DNA 修復遺伝子が発がん抑制に果たす役割を、遺伝子改変動物を用いて解析する。(6) アジア地域特有の疾病の要因を明らかにする目的で、ヒト剖検・手術材料から得た各種組織中の DNA 付加体の網羅的解析を行うとともに、修復酵素やその個体差を明らかにする。

## B. 研究方法

(1) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

加熱魚肉食品中に含まれる heterocyclic amine (HCA) 中、大腸発がん性 HCA 4 種、非大腸発がん性 HCA 2 種を、F344 ラットに各々胃内投与して、大腸腺管における miRNA の網羅的発現解析を行い、大腸発がん物質特有に発現変動する miRNA を解析した。また、PhIP 誘発大腸発がんの感受性系統 F344 と抵抗性系統 ACI において発現に差がある miRNA を抽出し、その標的候補遺伝子と大腸発がんとの関連を調べた。ラット正常大腸腺管を単離し、初代培養を試みた。

(2) 新規変異原・がん原物質の検索

白菜等に含まれるインドール-3-アセトニトリルは、胃の酸性条件下で亜硝酸と反応し、直接変異原ニトロソインドール-3-アセトニトリル (NIAN) を生成する。そこで、

スナネズミに NIAN を胃内投与(100mg/kg、週 2 回)し、腺胃での DNA 付加体量を  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法で解析した。更に、スナネズミに NIAN を胃内投与(100mg/kg、週 2 回、3 週間)後、1 週間後に *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) を感染させる胃発がん実験を行った。

### (3) 外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

糖尿病の生体内モデルメイラード反応物から単離同定した変異原物質 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-*de*]-quinolin-7-one (ABAQ) について、遺伝毒性評価としてチャイニーズハムスター肺 (CHL/IU)細胞を用い小核試験を行った。

全国で1年間を通じて大気粉塵を捕集し、粉塵抽出物の変異原性(サルモネラ菌 YG1024)を調べ、粉塵中の成分の化学分析として金属・イオンの定量分析を行った。気塊の移動経路については、後方流跡線解析を行った。

### (4) 慢性炎症に関連した疾患のバイオマーカー探索と予防

慢性炎症部位では、コレステロールと活性酸素種(RS)の反応により生成されるセコステロール類の代謝物を同定し、生体内での生成機構を解明した。脂肪酸エステル型セコステロール類の構造決定、LC-MS/MS を用いた高感度特異的分析法を確立し、ヒト血液中の LDL コレステロールの分析に応用した。また、セコステロール類の HL60 細胞での細胞毒性の解析、一酸化窒素(NO)合成酵素の阻害についても調べた。

### (5) 遺伝子改変マウスを用いた発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究

*p53* 遺伝子欠損(KO)マウスを用いて、

$\text{KBrO}_3$  飲水投与による酸化ストレス誘発発がんの解析(野生型、ヘテロ欠損、ホモ欠損マウス各 5 匹)、酸化ストレス負荷条件下における DNA 修復関連遺伝子の発現解析、及び酸化ストレス誘発消化管腫瘍を用いたがん関連遺伝子の変異解析を行った。

### (6) がん高頻度発生地分子疫学

ヒト剖検及び手術材料(各種臓器、心、肺、肝、腎、腸など)から、DNA を抽出し、酵素分解後、LC-MS/MS 分析を用いて、多数の DNA 付加体を網羅的に解析する adductome 解析を行った。

生体側因子としての修復酵素についても解析した。既知の DNA 付加体を合成して 1 塩基を oligonucleotide に導入し、これを基質として、精製した塩基除去修復酵素蛋白質による修復能を gel shift assay により検討する解析系を構築した。

### (倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。ヒト検体を用いる研究では、各研究施設の倫理委員会の承認を得た後に、各研究施設の指針に従って実験を実施した。

## C. 研究結果

### (1) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

ラット大腸発がんモデルにおいて、大腸発がん性 HCA で共通して発現変動している miRNA 18 種を用いた判別分析により、5 種の miRNA のみで、大腸発がん性 HCA 投与群とそれ以外に分類可能であることを見出した。5 種の miRNA 中、2 種は発が

ん性 HCA 投与群で発現上昇しており、3 種は発現低下していた。

PhIP 誘発大腸発がんの感受性系統 F344 と抵抗性 ACI において、発がん物質非投与の条件で、F344 での発現が ACI の約 1/10 と非常に低い miR-X は、*in silico* により、*Shc1* がその標的候補遺伝子である可能性が示された。また、*Shc1* の transcript variant1 から翻訳される p66<sup>Shc</sup> の蛋白質発現が両系統で異なることを見出した。

F344 及び ACI ラット由来の大腸初代培養細胞を現在、F344 で約 50 世代、ACI でも約 30 世代継代しており、現在、これらの細胞の形質を解析中である。

#### (2) 新規変異原・がん原物質の検索

NIAN を胃内投与したスナネズミの腺胃では、3 つの DNA 付加体スポットが検出され、これら 3 つの付加体の総量は 1.6/ 10<sup>8</sup> nucleotides であった。

スナネズミに NIAN を投与後に、*H. pylori* 感染させる発がん実験では、2 年間で 26 匹中 8 匹(31%)に腺胃がんが誘発された。これらの胃がんは 7 匹が高分化型で 1 匹が中分化型腺がんであった。一方、*H. pylori* 及び NIAN 非投与群(A 群)15 匹、NIAN 単独群(B 群)22 匹及び *H. pylori* 単独感染群(C 群)18 匹には胃がんの発生は認められなかった。

#### (3) 外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

糖尿病の生体内モデルメイラード反応物から同定された ABAQ は、CHL/TU 細胞に曝露すると、S9 mix 存在下、0.2~50 µg/ml の範囲で用量依存的に小核を誘発し、100 µg/ml で有意に増殖を抑制した。

大気汚染に関しては、全国の多くの地点

において粉塵濃度は春季>冬季>夏季>秋季の順に高かった。また、サルモネラ菌 YG1024 株に対する変異原性に関して、全大気粉塵抽出物の平均値は、S9 mix 非存在下において冬季>春季>秋季>夏季、S9 mix 存在下においては冬季>秋季>春季>夏季の順であった。粉塵抽出物が強い変異原性を示した日は大都市において最も多く、次いで中核都市、非都市の順であった。強い変異原性を示した大気粉塵は Pb 及び SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む傾向がみられた。また、後方流跡線解析の結果、冬季及び春季に捕集され強い変異原性を示した大気粉塵を含む気塊の多くが中国大陸を經由して日本に移動してきたと考えられた。

#### (4) 慢性炎症に関連した疾患のバイオマーカー探索と予防

セコステロール類は、セコステロール酸化体に代謝されることを見出し、それらの活性化したヒト好中球細胞における生成機構を検討した。活性化した状態にあるヒト好中球によるセコステロールの生成がオゾン消去剤で阻害されること、ミエロパーオキシダーゼ(MPO)欠損マウスの好中球ではセコステロール類の生成が著しく減少することから、オゾン様活性酸素によりセコステロール類が生成し、MPO が関与する可能性が示唆された。

脂肪酸エステル型セコステロール類を新規に同定し、新規に開発した分析法により、ヒト血中 LDL より遊離型及び脂肪酸エステル型セコステロール類を全試料(健康な男女 6 名)から検出した。脂肪酸エステル型セコステロール類は、HL-60 の細胞生存率を減少させ、遊離型セコステロール類と同程度の強い細胞毒性を示した。また、セコ

ステロール-A は血管内皮型及び神経型 NO 合成酵素を強く阻害した。

(5) 遺伝子改変マウスを用いた発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究

*p53* KO マウスを用いた、 $\text{KBrO}_3$  投与による酸化ストレス誘発発がんにおいて、野生型、ヘテロ欠損、ホモ欠損マウスでの消化管における 1 個体当りの平均腫瘍数は各々 1.0, 2.2, 9.2 であった。また、*p53* ホモ欠損マウスに誘発された腫瘍の *Ctnnb1* 遺伝子の変異解析では、*Mutyh* や *Ogg1* 欠損マウスで検出された G→T 変異の上昇は認められず、G→A 変異を 2 例見いだした。突然変異の抑制に関与する *OGG1* を完全欠損したマウスでの  $\text{KBrO}_3$  で誘発される腫瘍数は野生型の約 2 倍であり、*OGG1* よりも *p53* が酸化ストレス誘発発がんの抑制に、果たす役割は大きいことが示唆された。

(6) がん高頻度発生地分子疫学

ヒト各種臓器 (剖検材料) の検体を用いて、*adductome* 解析を行った。標準品としては既知の DNA 付加体を、また量的妥当性については、生成機序の似ている付加体と、広く分布しており量的な情報も多い 8-OHdG を用いて比較検討した。多数の DNA 付加体が検出され、過酸化由来と推定される DNA 付加体も同定可能であった。

DNA 付加体の修復酵素の修復能などのヒト生体側因子を解析するための条件検討を行った。まず、塩基除去修復酵素の一つ、MutYH について、基質となる既知の missense 変異産物の大腸菌による作成及び精製、kinetics を含む機能解析を行い、分析システムを構築した。8 種類の塩基除去修復酵素 OGG1, NTH1, MUTYH, NEIL1, MPG, UNG, TDG, SMUG1 を精製

した。同定された DNA 付加体のうち、HedC, HedG, BedC, BedG 付加体は合成して、1 塩基を導入した oligonucleotides を生成した。修復酵素蛋白及び ethenoadduct を導入した oligonucleotides を用いた gel shift assay により、既に報告されている、edA や edC の MPG や TDG などによる修復が確認され、解析システムを確立できた。

#### D. 考察

(1) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

ラット大腸発がんモデルにおいて、大腸発がん性 HCA 特有の発現様式を示す一群の miRNA を見出し、これら miRNA を用いた新規の発がん性予測法を開発できる可能性が示された。また、発がん感受性系統で発現が低く、その標的候補遺伝子が活性酸素の産生・脂肪の蓄積に関与する miRNA を見出した。ラット正常大腸細胞の培養細胞系も樹立されつつあり、これら miRNA の大腸発がんへの関与を、*in vitro* 及び *in vivo* 発がんモデルで検証する予定である。

アジア諸国の著しい経済成長は、様々な化学物質によるヒト暴露を誘発する可能性があり、新規の発がん性予測法の実用化により、予測した発がん物質の除去・低減化を行うことによるがんの減少が期待される。また、発がん感受性に関与する miRNA は、高危険度群の選定に役立つと考えられる。

(2) 新規変異原・がん原物質の検索

スナネズミに、NIAN を投与すると腺胃に DNA 付加体を生成し、NIAN 投与後に、*H. pylori* 感染させる発がん実験では、2 年間で約 30% に胃がんが誘発された。東アジア諸国では、胃がんの発生率が高く、

*H.pylori* 感染、高塩食の摂取及び白菜等の野菜由来の硝酸塩の多量の摂取が、胃がんの発生に関与することが疫学的に示唆されている。環境中に広く分布する、インドール・3-アセトニトリル以外の種々のインドール化合物も酸性条件下で亜硝酸と反応して直接変異原性を示すので、白菜等の野菜に含まれるインドール化合物由来の内因性ニトロソ体が、胃がん発生に関わる可能性が示唆された。今後、ヒト暴露レベル（胃での DNA 付加体量を含む）を調査して、胃がん発生要因か否かを明らかにし、その低減化の方法を検討することが重要である。

（3）外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

糖尿病の生体内モデルメイラード反応物から同定した変異原物質 ABAQ は、小核試験陽性であり、哺乳類細胞に対しても遺伝毒性を示し、その強さは加熱食品中の変異・がん原物質である PhIP よりやや弱い程度である。ABAQ の糖尿病ラットでの生成量や糖尿病患者での暴露レベルを調べることにより、アジアにおいて急増する糖尿病患者の高リスク原因に関して、糖尿病状態による内因性発がん物質の発生機構並びにそれらの生体影響に関する知見が得られると考える。

大気汚染に関しては、粉塵量と変異原性の相関に季節性があること、都市部ほど年間を通じて変異原性物質により汚染されている日が多いこと、春季には全国的に中国から越境輸送された物質の影響を受けており、変異原性物質を含む汚染物質も越境輸送されていることが示唆された。今後、新たな大気汚染指標の策定及び健康被害防止の施策を考える上での基礎的データとなる。

（4）慢性炎症に関連した疾患のバイオマーカー探索と予防

セコステロール類は、セコステロール酸化体に代謝されることを示した。活性化されたヒト好中球は、MPO の作用によりオゾン様活性酸素を生成し、これが遊離あるいは脂肪酸エステル型のコレステロールを酸化して、セコステロール類を生成することが示唆された。また、セコステロール類がヒト血中 LDL コレステロール中に微量に存在することを明らかにした。セコステロール類は、細胞に対する毒性が強く、かつ、血管内皮型および神経型 NO 合成酵素を強く阻害すること、さらに、酸化ストレスの亢進した条件下では生成の増加が予想されることから、動脈硬化症、アルツハイマー症、がんなど酸化ストレスの亢進と関連している疾病の発症・進展に関与している可能性も示唆された。今後は、様々な生活習慣病患者の血液分析を行い、早期発見、診断のバイオマーカーとしての有効性を検証する。

（5）遺伝子改変マウスを用いた発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究

*p53* KO マウスを用いた、酸化ストレス誘発消化管発がんモデルの解析の結果、突然変異の抑制に関与する *MTH1* や *OGG1* よりも *p53* の方が発がん抑制に大きな役割を果たしていることが示唆された。*p53* は DNA 損傷による細胞死誘導に関与し、また *MUTYH* は酸化 DNA 損傷により誘発される細胞死に関与することが報告されている。これらから、酸化ストレス誘発消化管発がんの抑制には、酸化 DNA 損傷による突然変異の抑制よりも細胞死誘導が大きく関与していることが推測される。DNA 修復やア



ポトシス関連遺伝子等の各種遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発突然変異・発がんの解析は、遺伝的要因による高危険度群の推定、並びに食生活を基盤とした発がん予防のためのモデル動物系として有効である。また、制がん効果が期待できる化学物質の腫瘍抑制効果・安全性を検討する評価系へも展開可能であり、がん治療薬開発の基礎的な研究にも貢献できる。

#### (6) がん高頻度発生地での分子疫学

ヒト組織から、脂肪過酸化による DNA 付加体を含む多数の DNA 付加体を見出し、喫煙の既往歴との関連よりは、環境要因を反映すると考えられた。現在、中国における胃粘膜組織と本邦の胃粘膜組織（ともに胃がん発症例）の adductome 解析を行っており、両国に共通或いは特徴的な DNA 付加体を検索している。生体側因子としての修復酵素の修復能に関しても、その解析系を構築したので、個体側の修復能の差も含めて解析を行う。

Adductome 解析は、アジアの疾病として、消化管腫瘍等の当該地域の食生活や食物中の物質に関連する疾患、また、非喫煙女性の肺腺癌など、生活習慣の関与が疑われる疾患の原因解明・予防につながる基礎的知見を提示する。また個体側の修復能の差などがあれば、遺伝的要因解明への手がかりを与える。

#### E. 結論

環境要因に関しては、発がん物質特有の発現様式を示す miRNA による新規の発がん性予測法の可能性を示した。内因性物質では、食品中の物質由来のニトロソ化合物が、*H. pylori* 感染との複合作用により胃が

んの発生要因となる可能性や、糖尿病の生体内モデルメイラード反応物から同定した ABAQ が哺乳類細胞への遺伝毒性を持つこと、慢性炎症部位で活性酸素と生体成分から生成するセコステロール類をヒト血中から見出し、また、酸化ストレスの亢進と関連する疾病の発症・進展へ関与する可能性を示した。ヒトへの種々の環境因子の暴露に関して、大気中の発がん関連物質による汚染及び中国大陸からの越境汚染の可能性を、adductome 解析ではヒト組織から多数の DNA 付加体を見出し、環境要因を反映している可能性を示した。これら環境中の疾病要因を明らかにすることは、それらの除去・低減化による疾病の減少、化学予防剤や食生活を基盤とした疾病予防のための基礎的データとして重要である。

環境要因によるがん等の疾病発生の分子機構の解明では、酸化ストレス誘発消化管発がんにおいて、修復遺伝子の欠損による突然変異の誘発よりも、*p53* による発がん抑制の役割が大きいこと、また、miRNA 発現量の違いが遺伝的発がん要因となりうる可能性を示した。これらは、新規の予防法の開発や高危険度群の推定に役立つと考える。

これらの得られた知見の日本やアジア諸国のがん等の疾病予防対策などへの活用を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wang R, Dashwood W-M, Nian H,

- Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Int. J. Cancer*, 128 : 2581-2590, 2011.
2. Takahashi H, Hosono K, Uchiyama T, Sugiyama M, Sakai E, Endo H, Maeda S, Schaefer KL, Nakagama H, Nakajima A. PPAR $\gamma$  ligand as a promising candidate for colorectal cancer chemoprevention: A pilot study. *PPAR Res*, 2011 in press.
  3. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Uchiyama T, Suzuki K, Nozaki Y, Yoneda K, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Tomatsu A, Chihara T, Shimpo K, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog*, 49:662-671, 2010.
  4. Izumiya M, Okamoto K, Tsuchiya N, Nakagama H. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. *Carcinogenesis*, 31:1354-1359, 2010.
  5. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Yoneda K, Koide T, Tokoro C, Abe Y, Inamori M, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res*, 3:1077-1083, 2010.
  6. Tsuchiya N, Nakagama H. MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutat Res*, 693: 94-100, 2010.
  7. Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y, Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer*, 2011 in press.
  8. Mutoh M, Teraoka N, Takasu S, Takahashi M, Onuma K, Yamamoto M, Kubota N, Iseki T, Kadowaki T, Sugimura T, Wakabayashi K, Loss of adiponectin promotes intestinal carcinogenesis in Min and wild-type mice. *Gastroenterology*, 2011 in press.
  9. Ikeda K, Mutoh M, Teraoka N, Nakanishi H, Wakabayashi K, Taguchi R, Increase of oxidant-related triglycerides and phosphatidylcholines in serum and small intestinal mucosa during development of intestinal polyp formation in Min mice. *Cancer Sci*, 102:79-87, 2011.
  10. Teraoka N, Mutoh M, Takasu S, Ueno T, Nakano K, Takahashi M, Imai T, Masuda S, Sugimura T,

- Wakabayashi K, High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice. *Int J Cancer*, 2010, in press.
11. Kitahashi T, Mutoh M, Tsurusaki M, Iinuma G, Suzuki M, Moriyama N, Yoshimoto M, Wakabayashi K, Sugimura T, Imai T, Imaging study of pancreatic ductal adenocarcinomas in Syrian hamsters using X-ray micro-computed tomography (CT). *Cancer Sci*, 101: 1761-1766, 2010.
  12. Hasei T, Ohno A, Tsukuda R, Inoue T, Watanabe T, Determination of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in tea leaves as a possible exposure source and in human hair as a biomarker using a two-dimensional HPLC system, *Journal of Health Science*, 57: 53-59, 2011.
  13. Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, and Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J Lipid Res*, 52: 87-97, 2011.
  14. Miyoshi N, Nagasawa T, Mabuchi R, Yasui Y, Wakabayashi K, Tanaka T, Ohshima H.; Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam *sanyaku* and its constituent diosgenin. *Cancer Prev Res*, 2011, in press.
  15. Ohshima H and Miyoshi N. Ingested Nitrate and Nitrite: Beneficial to Human Health? *Genes and Environm*, 32: 43-52, 2010.
  16. Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, and Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of  $\gamma$ -tocotrienol in mice by  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion. *J Nutr Biochem*, 2011, in press.
  17. Lai YL, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, and Ohshima H. Inhibition of L-Arginine Metabolizing Enzymes by L-Arginine-derived Advanced Glycation End Products. *J Clin Biochem Nutr* 46: 177-85, 2010.
  18. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, and Ohshima H. Inhibition of endothelial- and neuronal-type, but not inducible-type, nitric oxide synthase by the oxidized cholesterol metabolite secosterol aldehyde: Implications for vascular and neurodegenerative diseases. *J Clin Biochem Nutr*, 2011, in press.
  19. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice (Abstract). *Health Physics*, 100: 293-294, 2011.
  20. Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K, Kura S, Tsuzuki T, Kawakami R, Ito I, Kitamura T,

- Sugiyama H, Miyakawa T, Fukumaki Y. Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes, Brain Behavior*, 9: 899-909, 2010.
21. Nakamura T, Meshitsuka S, Kitagawa S, Abe N, Yamada J, Ishino T, Nakano H, Tsuzuki T, Doi T, Kobayashi Y, Fujii S, Sekiguchi M, Yamagata Y. Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.*, 285: 444-452, 2010.
  22. Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, and Sugimura H. Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat*, 31:E1861-E1874, 2010.
  23. Chou PH, Kageyama S, Matsuda S, Kanemoto K, Sasada Y, Oka M, Shinmura K, Mori H, Kawai K, Kasai H, Sugimura H, and Matsuda T. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. *Chem Res Toxicol*, 23: 1442-1448, 2010.
1. Ochiai M, Hippo Y, Nakagama H, Critical roles of microRNAs in the early stages of colon carcinogenesis, XII International Congress of Toxicology (IUTOX2010), Barcelona, Spain, 2010
  2. 落合雅子、五十嵐麻希、筆宝義隆、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミンにより誘導される microRNA と大腸発がん早期段階における意義、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  3. 五十嵐麻希、落合雅子、筆宝義隆、中釜 斉、ラットにおけるメタボリック症候群と大腸発がんを関連づける分子機構の探索、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  4. 今井 海、落合雅子、筆宝義隆、五十嵐麻希、和久井 信、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミン暴露による microRNA の発現変動と大腸発がん早期段階における意義、日本環境変異原学会第39回大会、2010年
  5. Ochiai M, Imai K, Igarashi M, Hippo Y, Nakagama H, Induction of distinct microRNAs by carcinogenic heterocyclic amines and its significance in early stages of colon carcinogenesis, The XVIII International Workshop on Genetic Systems in the Rat, Kyoto, Japan, 2010
  6. 落合雅子、今井 海、筆宝義隆、五十嵐麻希、和久井 信、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミン暴露による microRNA の発現変動と大腸発がん早期段階における意義、平成 22 年度「個

2.学会発表

- 体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2011年
7. 堀 美香、北橋 宗、高橋 真美、今井 俊夫、石ヶ守 里加子、高須 伸二、武藤 倫弘、杉村 隆、若林 敬二、高脂肪食によるBOP誘発ハムスター膵管発がん促進因子の検討、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  8. 戸塚 ゆ加里、加藤 竜也、中江 大、能美 健彦、川西 優喜、八木 浩司、市瀬 孝道、杉村 隆、若林 敬二、ナノ粒子により誘発される遺伝毒性、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  9. 寺岡 直哉、武藤 倫弘、高須 伸二、上野 俊也、中野 勝也、高橋 真美、杉村 隆、若林 敬二、KK-A<sup>y</sup>マウスの肥満によるアゾキシメタン誘発大腸発がんの促進、第17回日本がん予防学会、2010年
  10. 加藤 竜也、戸塚 ゆ加里、田里 李奈、若林 敬二、増田 修一、肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関連するDNA付加体生成の増加、第39回日本環境変異原学会、2010年
  11. 石野 孔祐、加藤 竜也、増田修一、松田知成、杉村 隆、若林 敬二、戸塚 ゆ加里、ナノマテリアルにより誘発されるDNA付加体の解析、第39回日本環境変異原学会、2010年
  12. 渡辺徹志、秋山雅行、嵐谷奎一、池盛文数、稲葉洋平、穀内修、世良暢之、出口雄也、戸野倉賢一、鳥羽陽、船坂邦弘、長谷井友尋、大気粉塵の生物活性、化学成分の季節変動及び大陸からの長距離輸送による影響、第51回大気環境学会年会、2010年
  13. 穀内修、秋山雅行、嵐谷奎一、池盛文数、稲葉洋平、片岡洋行、岸川直哉、世良暢之、出口雄也、戸野倉賢一、鳥羽陽、船坂邦弘、山口孝子、洞崎和徳、長谷井友尋、渡辺徹志、全国14地点における大気粉塵の変異原性の季節変動及び中国大陸からの長距離輸送の影響、第39回日本環境変異原学会、2010年
  14. 小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、川西優喜、八木孝司、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第39回大会、2010年
  15. 戸井口 恭子、三好 規之、東 達也、糠谷 東雄、高橋 智、若林 敬二、大島 寛史、乳がんのリスクマーカーとしての尿中のカテコールエストロゲン-DNA付加体の分析、第39回日本環境変異原学会、2010年
  16. 三好規之、長澤友樹、安井由美子、田中卓二、大島寛史、ヤム類およびヤムイモ成分ジオスゲニンはAOM/DSS誘発マウス大腸発がんを抑制する、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  17. 鈴木啓子、三好規之、糠谷東雄、大島寛史、アセトアルデヒドを消去する食品及び食品成分の探索、第54回日本食品科学工学会、2010年
  18. 長澤友樹、馬淵良太、三好規之、田中卓二、大島寛史、ヤムイモ成分による大腸がんの化学予防、がん予防学術大会、2010年
  19. 岩崎希、三好規之、伴野勸、大島寛史、エステル型コレステロールのオゾン酸

- 化物の HL-60 細胞に対する細胞毒性作用、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年
20. 伴野勸、三好規之、荒谷康昭、大島寛史、ミエロペルオキシダーゼ による secosterol 型コレステロール酸化物の生成、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年
21. 三好規之、伊藤萌、伴野勸、東達也、大島寛史、Secosterol 型コレステロール酸化物の LC-MS/MS による高感度検出法の開発、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年
22. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, and Ohshima H., Secosterol-A, an oxidized cholesterol metabolite, may contribute to atherosclerosis and neurodegenerative diseases through inhibition of eNOS and nNOS, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan, 2010.
23. Ohata M, Lai YL, Aoyama S, Miyoshi N, Fujiwara A, Kanazawa H, and Ohshima H., Alteration in activity and expression of renal NOS and dimethylarginine dimethylaminohydrolase in type 2 diabetic rats, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan, 2010.
24. 矢野友啓、若尾陽平、三好規之、大島寛史、シクロデキストリン包接によるトコトリエノールのバイオアベイラビリティ向上効果、第 62 回日本ビタミン学会、2010 年
25. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010.
26. 大野みずき、作見邦彦、續輝久、中別府雄作、8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる、日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会、2010 年
27. 中西恵美、大野みずき、中津可道、續輝久、腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析、日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会、2010 年
28. 大野みずき、中西恵美、作見邦彦、古市正人、中別府雄作、續輝久、酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響、日本環境変異学会第 39 回大会、2010 年
29. 大野みずき、中西恵美、中津可道、續輝久、低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構：腸管と精巣における解析、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年
30. 高橋富美、吉原達也、中津可道、續輝久、中別府雄作、笹栗俊之、酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年

31. 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續 輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010 年
32. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA, 2010.
33. 梶村春彦, 五十嵐久喜, 名倉聖子, 山田英孝, 清瀬慎一郎, 陶 弘, 谷岡書彦, 前多松喜, 新村和也, 森 弘樹, 小澤亨史, 病理組織標本を用いた FISH-CHIP 解析, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明

研究分担者 中釜 斉 独立行政法人国立がん研究センター研究所 所長

研究要旨

環境中に存在する変異原・がん原物質などの発がん要因によるがん発生の分子機構を解明すること及び、がんの発生・成立に関わる遺伝的要因を明らかにすることを目的とする。加熱魚肉食品中の変異原物質 heterocyclic amine (HCA)によるラット大腸発がんモデルを用いて、発がん物質による非遺伝性変化を microRNA (miRNA)の点から解析した。大腸発がん性 HCA4 種、非大腸発がん性 HCA2 種を、F344 ラットに投与して、大腸腺管における miRNA の網羅的発現解析を行った。大腸発がん性 HCA 特有の発現様式を示す一群の miRNA を見出し、これら miRNA を指標に用いて、発がん性 HCA とそれ以外に判別可能であった。新規の発がん性予測法の開発へつながる可能性がある。また、PhIP 誘発大腸発がんの感受性系統 F344 と抵抗性系統 ACI において発現に顕著な差がある miRNA に関して、大腸発がんに関連する可能性のある標的候補遺伝子を *in silico* で見出した。これらの miRNA の大腸発がんへの関与を *in vitro* 及び *in vivo* 発がんモデルで検証する予定であり、そのためのラット正常大腸細胞の培養系を構築中である。がんの発生・成立に関わる miRNA を同定できたならば、バッククロスパネルを用いて遺伝的発がん要因としての可能性を検討し、新規の予防法の開発や高危険度群の推定への応用を検討する。

A. 研究目的

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

環境要因による発がんモデルとしては、加熱魚肉食品中の変異原物質 heterocyclic

amine (HCA)、特に PhIP により誘発されるラット大腸発がんモデルを用いている。発がん物質により誘発される遺伝性変化のみならず、非遺伝性変化も発がんに関与すると考え、非遺伝性変化の一つとして microRNA (miRNA)の点から解析し、特に早期段階への関与を明らかにする。

PhIP 誘発大腸発がん感受性である F344 と抵抗性である ACI 間で発現に大きな差がある miRNA を抽出して、その標的候補遺伝子の大腸発がん感受性に及ぼす影響を検討し、これら miRNA の大腸がんの発生・



成立における役割を解明する。

大腸がんの発生・成立に影響を及ぼす miRNA について、バッククロスパネルを用いて遺伝的要因としての可能性を検討し、新規の予防法の開発や高危険度群の推定への応用をはかる。

## B. 研究方法

大腸発がん性 HCA 4 種(PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1)、非大腸発がん性 HCA 2 種(MeAαC, Trp-P-2)を、雄 F344 ラットに各々 25 mg/kg 体重の用量で、1 日 1 回計 3 日間胃内投与し、最終投与から 16 時間後に、大腸腺管を単離した。大腸腺管から total RNA を抽出して、Rat miRNA array (Agilent, 350 種の miRNA を搭載)を用いて網羅的発現解析を行い、大腸発がん物質特異的に発現変動する miRNA を同定した。

PhIP 誘発大腸発がんの感受性系統 F344 と抵抗性系統 ACI の間で発現が異なる miRNA を抽出するアプローチでは、両系統の発がん物質非投与の条件下で大腸腺管を単離し、total RNA を抽出し、miRNA 及び mRNA の網羅的発現解析を行った。発現に系統差がある miRNA を抽出し、*in silico* でその標的候補遺伝子を推定して、大腸発がんとの関連を調べた。

これらの大腸がんの発生・成立に影響を及ぼす可能性のある miRNA の機能解析に用いるために、ラットの正常大腸初代培養細胞の樹立を試みた。4-8 週令の雄ラット大腸を摘出し、collagenase P, dispase を用いた酵素処理により腺管及び細胞を単離して、2 次元の培養系で培養した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、独立行政法

人国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を得た後に行った。「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って実験を行い、実験動物の苦痛軽減及び動物愛護に十分配慮して行った。

## C. 研究結果

ラット大腸発がんモデルにおいて、発がん物質特有の発現様式を示す miRNA 種の解析に関しては、昨年度、約 130 種の miRNA が大腸腺管で発現しており、クラスター解析の結果、大腸発がん性 HCA (4 種) 投与群と非大腸発がん性 HCA 投与群に分類可能であったことを報告した。今年度は、更に詳細な解析を行った。大腸発がん性 HCA 投与群もしくは非大腸発がん性 HCA 投与群と、溶媒投与群を比較し、発現変動していた miRNA を 32 種選出した。更に、大腸発がん性 HCA 4 種中、任意の 3 種を選択して、同様な解析を行い、どの組み合わせの大腸発がん性 HCA 3 種でも発現変動していた(発がん性 HCA で共通して発現変動している) miRNA 18 種を選択した。

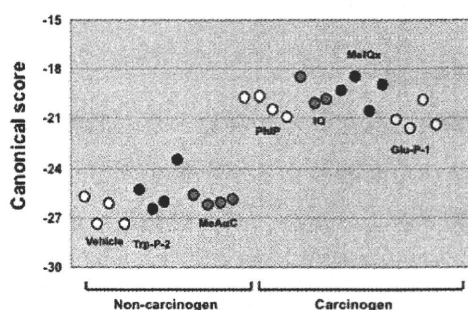


図1 判別スコアにより大腸発がん性 HCA 投与群と非大腸発がん性 HCA 投与群に分類可能である

これら発がん性 HCA で共通して発現変動している miRNA を用いて、多変量解析の 1 種である判別分析を行った。その結果、5

種の miRNA のみで、判別式による判別スコアを用いて、大腸発がん性 HCA 投与群とそれ以外に分類可能であることを見出した (図 1)。5 種の miRNA 中、2 種は発がん性 HCA 投与群で発現上昇しており、3 種は発現低下していた。

PhIP 誘発大腸発がんの感受性系統 F344 と抵抗性 ACI において、発がん物質非投与 (基礎食のみ投与) の状態で発現に系統差が認められた miRNA 中、F344 で発現が ACI の約 1/10 と非常に低い、発現の系統差が顕著な miRNA の一つである miR-X に関してより詳細な検討を行った。miR-X は、*in silico* により、*Shc1* がその標的候補遺伝子である可能性が示された。*Shc1* の transcript variant1 から翻訳される p66<sup>Shc</sup> の蛋白質発現が両系統で異なることを見出した。

ラット初代培養細胞に関しては、F344 (図 2) 及び ACI ラット (図 3) の大腸初代培養細胞を継代中であり、F344 で約 50 世代、ACI でも約 30 世代に達している。現在、これらの細胞の形質を明らかにするために、上皮細胞のマーカーや幹細胞候補マーカーの蛋白質発現を検討中である。

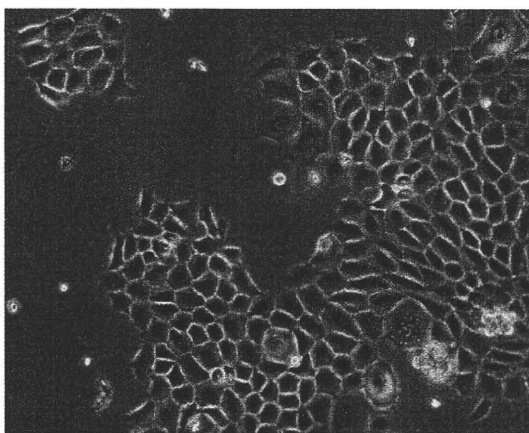


図 2 F344 由来の初代培養細胞 (直腸, P37)

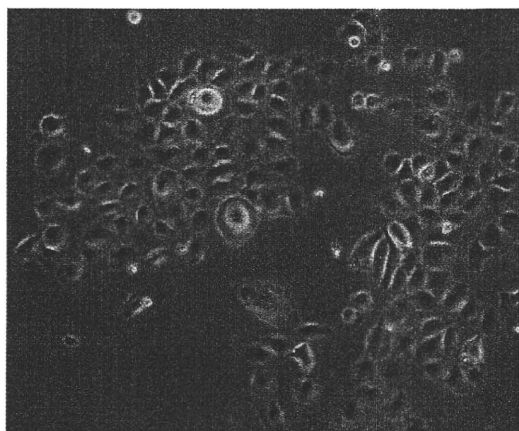


図 3 ACI 由来の初代培養細胞 (大腸, P26)

#### D. 考察

ラット大腸発がんモデルにおいて、大腸発がん性 HCA 特有の発現様式を示す一群の miRNA を見出し、これらの miRNA を用いた判別式により、大腸発がん性 HCA とそれ以外に判別可能であった。これらの miRNA を用いた判別式による新規の発がん性予測法を開発できる可能性がある。また、これら miRNA の一部 (発現が F344 で上昇していた物) は、細胞増殖の促進もしくはアポトーシスの抑制等を介して、大腸発がんの早期段階において、発がん促進的に作用する可能性がある。

発がん感受性系統で発現が低い miR-X が、*Shc1* を標的候補遺伝子とする可能性を見出した。*Shc1* は、種々のシグナル経路に関与する multi-adaptor protein であり、その産物の一つである p66<sup>Shc</sup> は活性酸素の産生に関与すると報告され、最近、脂肪の蓄積に関与する可能性も報告されている。脂肪の蓄積に関しても、F344 は感受性であり、ACI は抵抗性であるので、これら miR-X - *Shc1* (p66<sup>Shc</sup>) の経路が、脂肪の蓄積や、活性酸素を介して、大腸発がん感受性に関与している可能性がある。

これら miRNA の大腸発がんへの関与を、*in vitro* 及び *in vivo* 発がんモデルで検証する予定であり、そのための *in vitro* モデルの材料として大腸初代培養細胞の樹立を試み、少なくとも F344, ACI とも各 1 種類は確立できつつある。正常ラット大腸細胞の培養細胞系は、まだなく、これらの細胞は、種々の miRNA や遺伝子の機能解析に有用と考える。

これらの miRNA の大腸発がんへの関与が明らかになったならば、F344-ACI バッククロスラットパネルを用いて、遺伝的発がん要因の可能性を検討する予定である。

アジア諸国の著しい経済成長は、様々な化学物質によるヒト暴露を増大させる可能性があり、新規の発がん性予測法の実用化と、予測した発がん物質の除去・低減によるがんの減少が期待される。また、がんの発生・成立に関わる miRNA やその標的遺伝子をターゲットとする新規の予防法の開発や、発がん感受性に関与する miRNA の同定は高危険度群の選定に役立つと考えられる。

#### E. 結論

ラット大腸発がんモデルを用いて、大腸発がん性 HCA 特有の発現様式を示す一群の miRNA を見出し、これら miRNA を用いて新規の発がん性予測法を開発できる可能性がある。また、発がん感受性系統で発現が低く、その標的候補遺伝子が大腸発がんに関与する可能性のある miRNA を見出した。これらの miRNA の大腸発がんへの関与を *in vitro* 及び *in vivo* 発がんモデルで検証する予定であり、そのためのラット正常大腸細胞の培養系を構築中である。

がんの発生・成立に関わる miRNA を同定できたならば、その発現量の違いが遺伝的発がん要因となる可能性についても検討する。これらの miRNA や標的遺伝子は、新規の予防法の開発や高危険度群の推定に役立つと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wang R, Dashwood W-M, Nian H, Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Int. J. Cancer*, 128 : 2581-2590, 2011.
2. Takahashi H, Hosono K, Uchiyama T, Sugiyama M, Sakai E, Endo H, Maeda S, Schaefer KL, Nakagama H, Nakajima A. PPAR $\gamma$  ligand as a promising candidate for colorectal cancer chemoprevention: A pilot study. *PPAR Res*, 2011 in press.
3. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Uchiyama T, Suzuki K, Nozaki Y, Yoneda K, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Tomatsu A, Chihara T, Shimpo K, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog*, 49:662-671, 2010.
4. Izumiya M, Okamoto K, Tsuchiya N,

- Nakagama H. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. *Carcinogenesis*, 31:1354-1359, 2010.
5. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Yoneda K, Koide T, Tokoro C, Abe Y, Inamori M, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res*, 3:1077-1083, 2010.
  6. Tsuchiya N, Nakagama H. MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutat Res*, 693: 94-100, 2010.
- 2.学会発表
1. Ochiai M, Hippo Y, Nakagama H, Critical roles of microRNAs in the early stages of colon carcinogenesis, XII International Congress of Toxicology (IUTOX2010), Barcelona, Spain, 2010
  2. 落合雅子、五十嵐麻希、筆宝義隆、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミンにより誘導される microRNA と大腸発がん早期段階における意義、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  3. 五十嵐麻希、落合雅子、筆宝義隆、中釜 斉、ラットにおけるメタボリック症候群と大腸発がんを関連づける分子機構の探索、第69回日本癌学会学術総会、2010年
  4. 今井 海、落合雅子、筆宝義隆、五十嵐麻希、和久井 信、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミン暴露による microRNA の発現変動と大腸発がん早期段階における意義、日本環境変異原学会第39回大会、2010年
  5. Ochiai M, Imai K, Igarashi M, Hippo Y, Nakagama H, Induction of distinct microRNAs by carcinogenic heterocyclic amines and its significance in early stages of colon carcinogenesis, The XVIII International Workshop on Genetic Systems in the Rat, Kyoto, Japan, 2010
  6. 落合雅子、今井 海、筆宝義隆、五十嵐麻希、和久井 信、中釜 斉、ヘテロサイクリックアミン暴露による microRNA の発現変動と大腸発がん早期段階における意義、平成 22 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2011年
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし