

201008012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

医薬品等の安全性評価を目的とした新規発がん物質

予測法の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡村 匡史

平成23（2011）年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

医薬品等の安全性評価を目的とした新規発がん物質予測法の開発・・・・・・・・・・ 2

岡村 匡史

### II. 分担研究報告書

1. 「L1-RTP トランスジェニックマウスからの ES 様細胞の樹立」に関する研究・・・・・・・・ 8

岡村 匡史

2. 「L1-RTP 検出システムの構築」に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・。 12

石坂 幸人

3. 「生物資源の保存・保管」に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

松田 潤一郎

4. 個体レベルでの発がん物質評価系の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

津田 洋幸

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

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

ヒトがんの発生原因の約80%は環境中に存在する化学物質であるといわれており、医薬品、農薬さらには食品に含まれる化学物質がどの程度ヒトのがん発生に関わっているかを明らかにすることは、医学的にもまた社会的にも極めて重大な課題である。本研究では、ヒトゲノム中に散在するレトロトランスポゾンである LINE1 に注目し、ゲノムの不安定化を誘発する LINE1 の動きを生体レベルでモニターできるトランスジェニックマウスを樹立し、新規発がん物質予測法を開発する。

今年度は、L1-RTP トランスジェニックマウスを用いて、2つの発癌モデルにおける L1-RTP を解析した。DMBA/TPA 二段階発がん実験において、15個の腫瘍の内13個において、L1-RTP の誘導を認めた。さらに、加熱食品中に存在するがん原物質の中でも、ヒト乳がんの発症誘因の候補化合物である PhIP は、乳腺および大腸組織に L1-RTP を誘導することを明らかにした。

さらに、腫瘍における L1-RTP の関与を明らかにする新たなモデルとして、Cre/loxP システムを用いて肺特異的に活性型ヒト Hras<sup>G12V</sup> が誘導されるトランスジェニックラットを樹立し、化学発がん発生させることが困難な扁平上皮成分を含むがんをラットに高率に発生させることに成功し、肺の扁平上皮がんの有用なモデルとなることを明らかにした。

分担研究者

石坂 幸人 国立国際医療研究センター研究所  
部長  
津田 洋幸 名古屋市立大学 特任教授  
松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所  
難病・疾患資源研究部  
研究リーダー

機序は複雑多岐であり、現在もなお医薬品、農薬および工業製品などを用途として多数の化学物質が新たに作られている現状を考え合わせると、様々なメカニズムを想定した評価系が必要である。

本研究では“ゲノムの不安定化を誘発する LINE-1レトロトランスポジション (L1-RTP) の発がん過程におけるプロモーション効果”に着目した、新たな発想に基づく発がん物質予測法を開発する。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) DMBA/TPA による二段階発がんモデルの作製 (石坂、岡村)

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

(2) PhIP 投与による L1-RTP 誘導能評価 (石坂、岡村)

ヒトは日常的にピコモルレベルのヘテロサイクリックアミンに暴露されていることが提唱されていることから、同量の PhIP を週 3 回、6 週間にわたって、L1-RTP トランスジェニックマウスに投与し、各組織における L1-RTP の有無について、PCR 解析を行った。

### (3) L1-RTP トランスジェニックマウスの資源化 (松田、岡村)

ヒトおよびマウス L1-RTP マウスそれぞれから精子を採取し、凍結保存した。凍結精子の運動性を評価し、体外受精により受精卵を作製し、精子の受精能を評価した。さらに、L1-RTP トランスジェニックマウスの胚盤胞期胚を、GSK3 阻害剤である BIO および LIF を含む ES 細胞用培養液で培養し、ES 様細胞を作製した。

### (4) 肺の扁平上皮がんモデルの作製 (津田)

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを、活性型ヒト Hras<sup>G12V</sup> が誘導されるトランスジェニックラットの気管内に噴霧し、肺胞に感染させることで肺がんを発生させた。

#### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### (1) 発がんモデルにおける L1-RTP 誘導能の検討 (石坂、岡村)

DMBA/TPA による二段階発癌実験では、

解析した 15 個の腫瘍の内 13 個に L1-RTP の誘導を認めた。また培養細胞を用いた解析により腫瘍プロモーターである TPA によって L1-RTP が誘導されることを認めた。一方、加熱食品中に存在する癌原物質の中でもヒト乳癌の発症誘因の候補化合物である PhIP の投与で、乳腺組織に L1-RTP を検出した。その際、ピコモルレベルの PhIP で L1-RTP が誘導され、さらにエストロゲン受容体アルファー依存性であった。

### (2) L1-RTP トランスジェニックマウスからの ES 様細胞の樹立 (岡村)

L1-RTP 誘導の能を *in vitro* で評価するために、バックグラウンドが低く、X 線およびヘテロサイクリックアミン等のがん原物質への反応性が高い、#4 および #67 から、それぞれ 9 および 2 ラインの ES 様細胞を樹立した。GSK3β および MEK の特異的阻害剤を添加することにより、キメリズムが大幅に改善した。しかしながら、生殖系列への伝達を確認できなかった。今後は、他のラインの ES 様細胞を阻害剤含有 ES 細胞培養液を用いて培養し、生殖系列への伝達能を検討する。

### (3) L1-RTP トランスジェニックマウスの資源化 (松田)

マウス L1 の内在性プロモーターである 5'UTR の下流に ORF1 及び ORF2、その下流にイントロンが挿入されている EGFP cDNA の発現ユニットが「逆向」に挿入された導入遺伝子を用いて、マウス L1-RTP トランスジェニックマウスを 14 系統樹立した。体外受精法により、凍結精子の品質を確認し、昨年度に樹立したヒト L1-RTP マウス 16 系統と共に、マウス L1-RTP マウス 14 系統を新規発がん物質評価系モデルマウスとして実験動物研究資源バンクのホームページ上に公開した。

### (4) ラット肺扁平上皮がんモデルの樹立 (津田)

Cre/loxP システムを用いた活性型ヒト Hras<sup>G12V</sup> トランスジェニックラット (Hras250) の肺に Cre リコンビナーゼ発現

アデノウイルスを感染させることによって、変異 ras 遺伝子の発現を誘導し肺がんを発生させた。発生した肺がんは、腺がん、扁平上皮がんあるいはそれらの混合した腺扁平上皮がんであった。特に、化学発がんによって発生させることが困難な扁平上皮成分を含むがんをラットに高率に発生させることに成功したことから、Hras250 ラットは肺の扁平上皮がんの有用なモデルとなり得ると考えられた。

#### D. 考察

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

ヒトゲノム中には「動き回り得る遺伝子」が約45%存在し、中でも1細胞中に50万コピー以上（全ゲノムの約17%）存在する。LINE1（以下、L1）は特徴的で、その内の80-100コピーは正常細胞中でも3-30回/出生の頻度でゲノム内を動き得る。L1のゲノムへの挿入により、ゲノムのシャッフリングが起こり、細胞内遺伝子発現様式が変化する。L1は周辺の配列と共に移動するため、挿入部位に大きな配列の変化をもたらす。L1-RTPは余分な塩基配列の挿入、エクソンの欠損、染色体の転座などのゲノム変異が内在的に誘発される。

近年の次世代シーケンス解析により、ヒトゲノムには、転移能力を保持したL1はこれまでの予想以上に存在し、遺伝型および表現型の多様性を生み出す源になっていること、特にL1は神経発生時においてWntシグナルにより誘導され、L1が誘導する遺伝的な多様性（トランスクリプトーム変化）が、神経の可塑性を司っていることが指摘されている。L1はジャンク配列と考えられていたが、高等生物では多様性を確保するために積極的に利用していると考えられる。

一方、胚細胞で誘導される L1-RTP によって重要な遺伝子機能が破壊され、「疾病」という形で個体発生に異常が誘発する。これまでに L1 遺伝子の挿入が原因と考えられる先天性疾患が約 20 種類報告されている。さらに、乳癌や大腸癌で癌関連遺伝子内に挿入された L1 遺伝子も検出されており、体細胞での L1-RTP の誘導と癌化における関与の可能性も指摘されている。ヒト L1-RTP をモニターできるトランスジェニックマウスは、ヒトの疾病機序を明らかにすると共に、L1-RTP によって誘導される「ランダムなゲノム変異誘導」の発癌における意義を明らかにするためのツールとしても有用である。

今年度、L1-RTP トランスジェニックマウスを用いた DMBA/TPA 誘発皮膚癌において、15 個の腫瘍中 13 例で L1-RTP が検出された。遺伝性がん原物質によって、Ras を代表とするがん遺伝子変異が誘導されると、無理な細胞増殖刺激が負荷される。その結果、DNA 損傷シグナルが誘発され、これが持続すると細胞増殖を停止する。しかしながら、TPA などの腫瘍プロモーターが、持続的に L1-RTP を誘導し、ランダムなゲノム変異が誘発されることで、DNA ストレスシグナルが解除される。その結果、細胞増殖が再開し、がん化の一律速ステップがクリアされる。実際、非遺伝性癌原物質の代表である TPA が L1-RTP を誘導することを見出しており、腫瘍プロモーターはそのエピジェネティックな作用によって L1-RTP を誘導し、体細胞変異の頻度を上昇させることで癌化に関与していると考えられる。

ヒトは日常的に、ピコモルレベルのヘテロサイクリックアミンを摂取していると言われている。同量の PhIP を L1-RTP トランスジェニックマウスに投与すると、PhIP の標的組織である乳腺および大腸組織において、L1-RTP が検出された。一方、同じ HCAs でも L1-RTP を誘導する際、異なる細胞内側因子に依存することを明らかにした。即ち MelQx 誘発 L1-RTP は AhR/ARNT1 に依存するのに対して、PhIP 誘発 L1-RTP は AhR/ErA 依存的であった。L1 遺伝子は 2 つの蛋白質(ORF1 及び 2)をコードし、ORF1 は

L1-mRNA と結合し、クロマチン上に運搬する。ORF2 は逆転写酵素活性とエンドヌクレアーゼ作用を有し、ゲノム DNA に切断を入れながら逆転写を誘導する (target-site primed reverse transcription)。興味深い事に AhR は定常状態でも細胞内で ORF1 と会合していることを見いだした。AhR は細胞質でダイオキシン等のリガンドが結合した後、クロマチンに移動し特定の DNA 配列を認識して遺伝子発現を誘導する。しかしその際、AhR 自身には核移行性は無く、AhR とヘテロ二量体を形成する分子の機能に依存してクロマチンに移動することが提唱されている。今回、MeIQx と PhIP による L1-RTP の際、共通して AhR に依存するものの MeIQx では ARNT1 を PhIP では E<sub>R</sub>α に依存性を示した。即ち、各化合物によって異なるゲノム部位に L1-mRNA が運搬される可能性が示唆された。この可能性を明らかにすることで、PhIP による発癌機序が明らかになるとともに、発癌における L1 の関与の有無も明らかにできるものと思われる。

#### E. 結論

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

次年度には L1-RTP トランスジェニックラットの開発を予定しており、マウスでは困難であった膀胱癌および肺がんモデルにおける

L1-RTP の関与を解析できるツールを提供できる。すべての生物資源は、独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに保管しており、医薬品・食品の安全性評価に非常に有用なツールとして利用可能である。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. \*Sasawatari, S., \*Okamura, T., \*Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Senji Shirasawa<sup>3</sup>, Kato, N. and Toyama-Sorimachi, N.\* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. \*These authors equally contributed to this work., *Gastroenterology*, 140, 1513-1525 (2011)
2. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, Nagamatsu S. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS One*. 5, e15553 (2010)
3. Tsunoda, T., Takashima, Y., Tanaka, Y., Fujimoto, T., Doi, K., Hirose, Y., Koyanagi, M., Yoshida, Y., Okamura, T., Kuroki, M., Sasazuki, T. and Shirasawa S. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 14199-14204. (2010)
4. Okudaira N, Iijima K, Koyama T, Minemoto Y, Kano S, Mimori A, Ishizaka Y. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:18487-18492, 2010.
5. Uchida S, Watanabe N, Kudo Y, Yoshioka K, Matsunaga T, Ishizaka Y, Nakagama H, Poon R.Y.C., and Yamashita K. SCF<sup>B<sup>T</sup>CP</sup> mediates stress-activated MAP kinase-induced Cdc25B degradation. *J. Cell Sci. in press*.
6. Taneichi D, Iijima K, Doi A, Koyama T, Minemoto Y, Tokunaga K, Shimura M,

- Ishizaka Y. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Neuroimmune Pharmacol. In press.*
7. Kono, K., Nakashima, S., Kokuryo, D., Aoki, I., Shimomoto, H., Aoshima, S., Maruyama, K., Yuba, E., Kojima, C., Harada, A., Ishizaka, Y. Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials* 32: 1387-1395, 2011.
8. Kono, K., Ozawa, T., Yoshida, T., Ozaki, F., Ishizaka, Y., Maruyama, K., Kojima, C., Harada, A., Aoshima, S. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials* 31:7096-105, 2010.
9. Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J Biol Chem.*, 285:35350-35358, 2010.
10. Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 87:1133-1143.2010.
11. Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. (H.S; Equal contributors) Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 12:R85-R92, 2010.
12. Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T., Ishizaka, Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 85:551-555, 2010.
13. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp Anim* in press, 2011.
14. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human {alpha}1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem.* 2011 Feb;149(2):161-170.
- (2) 学会発表  
(国内)
- Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. 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. 大津市, 2011年2月.
  - 岡村匡史, 奥平准之, 矢延-高梨理絵子, 石坂幸人, 切替照雄. LINE1レトロトランスポジションに着目した発がん物質予測法の開発. 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. 大津市, 2011年2月
  - 奥平准之, 石坂幸人. LINE-1 retrotransposition by aryl hydrocarbon receptor and MAP kinase activated by environmental mutagens. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
  - 奥平准之, 石坂幸人. Induction of LINE-1 retrotransposition by FICZ, a candidate endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月.
  - 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. マウス排卵誘起におけるhCGの血中動態. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月12日~14日, 京都.
  - Matsuda J. Animal Models of Lysosomal Diseases. Yonago International Symposium: Chaperone Therapy Update. (シャペロン療法国際シンポジウム) July 29, 2010. Yonago.
  - 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響. 第103回日本繁殖生物学会総会. 2010年9月2日~4日, 十和田.
  - 小浦美奈子, 島かおる, 中村和臣, 野口洋子, 鈴木 治, 鈴木和男, 亀岡洋祐,

松田潤一郎. 急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkcマウスの繁殖及び腎炎の発症状況について. 第44回 日本実験動物技術者協会総会2010年9月3,4日、旭川.

9. 中村和臣, 小浦美奈子, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. BALB/c凍結胚における個体復元率の改善. 第44回 日本実験動物技術者協会総会2010年9月3,4日、旭川.
10. 松田潤一郎、疾患モデル動物の現状と問題点. 第8回医療機器フォーラムー動物実験の最前線ー疾患動物治療を用いる医療機器の有効性、安全性評価. 2010年10月15日、東京.
11. 増井 徹, 保富 康弘, 川原 信夫, 古江-楠田 美保, 松田 潤一郎, 小原 有弘,

高橋 一朗, 亀岡 洋祐、厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源ー薬用植物, 医学実験用霊長類, 遺伝子, 培養細胞, 実験動物ー. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7~10日、神戸.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「L1-RTPトランスジェニックマウスからのES様細胞の樹立」に関する研究

研究代表者 岡村 匡史 国立国際医療研究センター研究所・室長

ヒトがんの発生原因の約80%は環境中に存在する化学物質であるといわれており、医薬品、農薬さらには食品に含まれる化学物質がどの程度ヒトのがん発生に関わっているかを明らかにすることは、医学的にもまた社会的にも極めて重大な課題である。これまでに、個体レベルでL1-RTPを検出するL1-RTPトランスジェニックマウスを樹立した。本年度は、*in vitro* 評価系を確立するために、L1-RTPトランスジェニックマウスからES様細胞を樹立した。

A. 研究目的

ヒトゲノムに締める遺伝子は数%にすぎず、残りの多くは非翻訳領域や繰り返し配列で構成されている。興味深いことに動く可能性のある遺伝子は、トリ約9%、マウス約39%、ヒトでは約45%と高等生物になるほどその割合は増加している。ヒトの場合、DNA型トランスポゾンほとんど存在せず、その多くはRNA型レトロトランスポゾンである。その中でもLINE1は約52万コピー存在し、その割合が最も多い。LINE1、(以下L1)は、プロモーター領域である5UTR、RNA結合タンパク質をコードするORF1、エンドヌクレアーゼ活性を持つ逆転写酵素をコードするORF2からなり、全長6kbのトランスポゾンである。L1は自身で、転写、逆転写、挿入を完遂することができ、転移するごとにコピー数がする。レトロトランスポゾンの転移は通常は抑制されているが、放射線照射、感染、倍数体化などのゲノムストレスによってその抑制が解除される事が知られている。本研究では、ゲノムの不安定化を誘発するLINE1レトロトランスポジション(以下、L1-RTP)に着目し、医薬品、食品などに含まれる化学物質の発がん性を検証する新たな評価系を開発することを目的とし、L1-RTPを*in vivo*で検出可能なトランスジェニックマウスを作製した。本研究では、L1-RTPトランスジェニックマウスからES細胞を樹立し、L1-RTPを*in vitro*で検出可能な評価系を樹立することを目的とする。

B. 研究方法

L1-RTPトランスジェニックマウスは、バックグラウンドが低くX線やヘテロサイクリックアミン等のがん原物質への反応性が高い、#4および#67を使用した。L1-RTPトランスジェニックマウスとC57BL/6NCr(日本SLC)を交配し、交尾後1.5日目に卵管より2細胞期胚を採取した(図)。その後、KOSOM培地で胚盤胞期胚まで体外培養した。胚盤胞期胚はglycogen synthase kinase-3(GSK3)阻害剤である6-bromoindirubin-3'-oxime(BIO)およびleukemia inhibitory factor(LIF)を含むES用培養液を用いてフィーダー細胞上で培養し、ES様細胞単離した。ES様細胞の未分化状態はアルカリフォスファターゼ染色で評価した。ES様細胞はICRマウスの8細胞期胚への注入法により、キメラマウス作製した。生殖系列へ伝達しないES様細胞は2i(PD0325901:MEK阻害剤,CHIR99021:特異的GSK3阻害剤)を添加したES用培養液で処理し、上記同様にキメラマウス作製を行なった。

(倫理面への配慮)

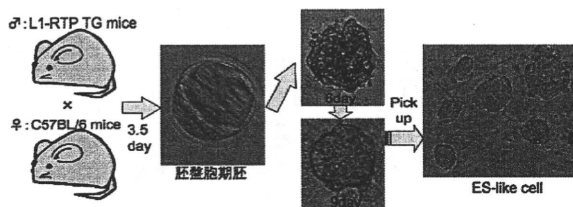
全ての動物実験は機関内の承認を受け、実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関の指針を遵守する。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意する

とともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講ずる。遺伝子組み換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、機関の指針に則って実施した。

### C. 研究結果

#4 および#67 系統から 24 個の胚盤胞期胚を採取し、それぞれ 9 ラインおよび 2 ラインの ES 様細胞を樹立した (表)。未分化状態を示すアルカリフォスファターゼ染色を行った結果、すべてのラインで陽性であった。それぞれ 1 ラインを選び、多分化能を *in vivo* で検証するため、マイクロインジェクション法により ICR マウス 8 細胞期胚あるいは胚盤胞期胚に ES 様細胞を注入した。その結果、#4 系統では 0 匹、#67 系統では 4 匹 (5.6%) のキメラマウスを得たが、キメリズムが低く生殖系列へは伝達しなかった。

図 Establishment of ES-like cell



Mouse Strain	No. of Blast Cultured	No. of Pick up colony	No. of Established ES like cell (%)	No. of transgene Positive cells (%)
#4	24	48	22 (45.8)	9 (40.9)
#67	24	48	18 (37.5)	2 (11.1)

BIO は GSK3 への特異性が低く、より特異的に GSK3 を阻害剤する CHIR99021、FGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤である SU5402 および ERK 経路阻害剤である PD184352 を含むを ES 用培養液で処理すると低生殖系列へ伝達能の ES 様細胞でも生殖能へ伝達するとの報告されている (Genesis, 2010)。さらに SU5402 と PD184352 の下流の MEK 経路の阻害は、より ES 細胞分化抑制において効果的ことが報告されているため (Nature, 2008)、MEK 阻害剤の PD0325901 および CHIR99021 を添加した培地で、樹立した ES 様細胞を培養し、キメラマウスを作製した。その結果、#4 系統では 2 匹 (5%)、#67 系統では 9 匹 (20.5%) のキメラマウス

が得られ、高キメリズム個体を作製することができた。しかしながら、高キメラマウスの生殖系列への伝達は確認できなかった。

### D. 考察

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は、胚盤胞内部細胞塊を白血病抑制因子 (LIF) 添加培地で培養することで樹立することができる。ES 細胞は様々な細胞および組織に分化できる多分化能を有している。従来、胚性奇形種を形成しやすい 129 系統では、比較的容易に ES 細胞が樹立できたものの、他の近交系マウスの ES 細胞樹立効率は著しく低かった。しかしながら、ES 細胞の未分化性基底状態を維持する阻害剤が同定され、これらの阻害剤を使用することで効率的に ES 細胞が樹立できるようになった。

Wnt/β カテニン経路の GSK3 を化合物で阻害すると 129 系統由来 ES 細胞の分化が抑制されると報告された (Nature Medicine, 2004)。しかし BIO は、その特異性の低さから細胞の生存率に影響がある (Development, 2007)。そこで GSK3 特異的阻害剤である CHIR99021 と ES 細胞分化に関わっている FGF4 の自己分泌による MAPK(ERK1/2)経路の活性を阻害する為に FGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤の SU5402 と ERK 経路阻害剤の PD184352 を添加した 3i ES 用培養液で ES 細胞を培養すると未分化状態を維持したまま効率的に増殖し (Development, 2007)、さらにこれら 3i ES 用培養液で短期間処理する事で生殖系列への伝達能の低い ES 様細胞でも生殖能へ伝達した (Genesis, 2010)。

ラットの ES 細胞樹立においても、3i を用いる事で未分化能を維持した ES 様細胞は樹立できるが、性の偏りや染色体異常の影響で生殖系列への伝達能を有するキメララットを作製することができなかった。この原因として、FGFR 阻害剤である SU5402 の非特異性、および SU5402 と PD184352 の下流の MEK 経路の阻害がより効率的に ES 細胞未分化状態維持できるためと考えられている。MEK 阻害剤の PD0325901 と CHIR99021 を添加した 2i ES 細胞培養液でラット ES 細胞樹立され (Cell, 2008)、さらに、この 2i で処理するとマウス ES 細胞においても未分化性基底状態が維持される (Nature, 2008)。そこで

生殖系列へ伝達しなかった#4 および#67 の ES 様細胞を 2i 処理しキメラマウス作製を行なうと、#4 系統では 2 匹 (5%)、#67 系統では 9 匹 (20.5%) のキメラマウスが得られ、キメラマウスの作製効率は改善したものの、残念ながら生殖系列へは伝達しなかった。今後は、生殖系列への伝達能を検討していない他のラインの ES 様細胞を、2i ES 細胞培養液を用いて培養し、生殖系列への伝達能の検討を行う予定である。

#### E. 結論

L1-RTP トランスジェニックマウスから、L1-RTP を *in vitro* で検出可能な ES 様細胞株を複数樹立した。L1-RTP 細胞は EGFP 陽性細胞として認識できるため、FACS 自動解析装置の定量化、ソーティングにより、がん原物質のスクリーニングだけでなく、L1-RTP 部位の解析および各種細胞/組織への分化過程での L1-RTP の機能解析など、幅広い分野で応用可能である。特に、L1-RTP は神経発生時において、発現が誘導され、L1 が誘導する遺伝的な多様性 (トランスクリプトーム変化) が、神経の可塑性を司っている可能性が指摘されており、これらの分野での応用も期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Shinya, K., Okamura, T., Sueta, S., Kasai, N., Tanaka, M., Ginting, TE., Makino, A., Eisfeld, AJ. And Kawaoka, Y. Toll-like receptor pre-stimulation protects mice against lethal infection with highly pathogenic influenza viruses., *Virology*, 8, 97 (2011)
2. \*Sasawatari, S., \*Okamura, T., \*Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Senji Shirasawa, Kato, N. and Toyama-Sorimachi, N.\* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. \*These authors

equally contributed to this work., *Gastroenterology*, 140, 1513-1525 (2011)

3. Miyoshi, Y., Hamase, K., Okamura, T., Konno, R., Kasai, N., Tojo, Y. and Zaitzu, K. Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free d-serine and d-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking d-amino-acid oxidase. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* in press.
4. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, Nagamatsu S. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS One.* 5, e15553 (2010)
5. Tsunoda, T., Takashima, Y., Tanaka, Y., Fujimoto, T., Doi, K., Hirose, Y., Koyanagi, M., Yoshida, Y., Okamura, T., Kuroki, M., Sasazuki, T. and Shirasawa S. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 14199-14204. (2010)
6. Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T. and Ishizaka, Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 85, 551-555 (2010).

##### (2) 学会発表

(国内)

1. Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis.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. 大津市、2011 年 2 月.
2. 岡村匡史、奥平准之、矢延-高梨理絵子、石坂幸人、切替照雄. LINE1 レトロトランスポジションに着目した発がん物質予測法の

開発. 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. 大津市、2011 年 2 月.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「L1-RTP検出システムの構築」に関する研究

分担研究者 石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部・部長

ヒト L1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて、2つの発癌モデルにおける L1 の動き (L1-RTP:L1 レトロトランスポジション) を解析した。7,12-dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)/ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)による二段階発癌実験では、解析した 15 個の腫瘍の内 13 個に L1-RTP の誘導を認めた。また培養細胞を用いた解析により腫瘍プロモーターである TPA によって L1-RTP が誘導されることを認めた。一方、加熱食品中に存在する癌原物質の中でもヒト乳癌の発症誘因の候補化合物である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)の投与で、乳腺組織に L1-RTP を検出した。その際、ピコモルレベルの PhIP で L1-RTP が誘導され、さらにエストロゲン受容体アルファ一依存性であった。今後、TPA や PhIP で誘発される L1-RTP の標的ゲノム部位や標的遺伝子を行うことで、新たな癌化機序としての L1-RTP の発癌における役割が明らかになる。

A. 研究目的

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

このようにヒト L1 遺伝子を搭載されたマウスは、ヒトの疾病機序を明らかにするための重要なツールとして機能する可能性が多いに期待される。そこで分担研究者は、

L1-RTP の検出系を確立し、L1-RTP によって誘導される「ランダムなゲノム変異誘導」の発癌における意義を明らかにすることを目的として、研究を行った。これまでの予備的な実験結果として以下の結果を得ている。即ち、

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

以上の結果は、L1-RTP が発癌と密接に関連することを強く示唆する。

一方、癌化過程の究めて初期に DNA 損傷(DSB: DNA double-strand breaks)シグナルが惹起され、ATM(ataxia telangiectasia mutated)依存なシグナルによって細胞が老化へと誘導され、結果として変異した細胞が排除される機構の存在が指摘されている。即ち、細胞

増殖を阻害することで癌化の回避を誘導する自己防衛反応と考えられている。さらに、L1-RTPがDSBによって誘導されることまた、この現象がATM依存的に誘導されることも報告されている。

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

二段階発癌モデルとして

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

良く解析されているDMBA/TPA誘発二段階発癌モデルであるが、TPAが具体的にどのような役割を担っているかに関しては、未だ全く不明である。このシステムにおけるL1-RTPの関与と意義を明らかにすることで、L1遺伝子のヒト腫瘍発症における意義を理解するだけでなく、発癌プロモーター(非遺伝毒性癌原物質)の作用を理解することが可能になるものと思われる。そこで、分担研究者は発癌におけるL1-RTPの役割を明らかにすることを目的としてL1-TgマウスDMBA/TPA誘発皮膚癌を作成し、腫瘍におけるL1-RTP関与の有無を明らかにするとともに、加熱食品中に存在するHCAsの中でもヒト乳癌や大腸癌の発症に関与すると考えられている2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)投与後の各臓器でのL1-RTPを検出した。

## B. 研究方法

### 1) PCR法によるL1-RTPの検出

リポータープラスミドDNAとして使用するpL1-EGFPを使用した(研究業績No.1)。このプラスミドDNAにはイントロンが挿入され

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

### 2) DMBA/TPAによる二段階発癌

ヒトL1遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(L1-Tgマウス)の内、種々組織中のL1-RTPのバックグラウンドが低く、外来性刺激によく反応性を示す#4及び#67系統のマウスを使用した。400 nmolのDMBAを塗布した後、約15 nmolのTPAを週2回の頻度で繰り返し塗布した。

### 3) TPAによるL1-RTP誘導

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

### 4) PhIPによるL1-RTP

HCAsは体内に吸収された後肝臓組織でアセトキシ体となり、癌原物質としての機能性を示す。そこで、アセトキシ体PhIPを合成しL1-Tgマウスに投与後、各臓器を回収し、ゲノムDNAを鋳型としてPCR解析を行った。また、PhIP誘発L1-RTPが芳香族炭素化合物受容体(AhR: aryl hydrocarbon receptor)依存的であることをin vitro実験で見いだした。そこで、AhRノックアウトマウスの受精卵を理化学研究所バイオリソースバンクから入手し、AhR遺伝子ホモ欠失L1-Tgを作成し、PhIP誘発L1-RTPの有無を解析した。また、PhIPによるL1-RTP誘導のエストロゲン受容体アルファ(ERα)依存性は、同遺伝子産物の阻害剤であるFluvestrantや同遺伝子siRNAを用いた解析で明らかにした。

(倫理面への配慮)

L1-RTPに関するin vitro及びin vivo実験は

組換え DNA 実験機関内承認実験であり、その計画書は当該委員会に審査を依頼し、承認後、実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1) DMBA/TPA による二段階発癌

DMBA/TPA 投与開始後、摘出可能になった時点で腫瘍を切除し、L1-RTP 誘導の有無を PCR 解析した。その結果、解析し得た 15 個の腫瘍の内、13 例で L1-RTP を示す 140 塩基の PCR 増幅バンドが検出された。

コドン 61 番での H-ras 変異は 15 例中、11 例で検出された。15 個の腫瘍中 9 例で、L1-RTP と H-ras がともに検出された。一方、皮膚腫瘍の近傍の健常皮膚検体 20 個においては、一例も L1-RTP の誘導を示す検体は検出されなかった。

#### 2) TPA による L1-RTP 誘導

HuH-7 細胞を用いた解析の結果、20-100nM の TPA で L1-RTP の誘導が認められた。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) に対する阻害剤や siRNA を用いた遺伝子ノックダウン状態での L1-RTP アッセイの結果、TPA 誘発 L1-RTP は extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 依存的であった。また epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する阻害剤でも TPA 誘発 L1-RTP は阻害された。

#### 3) PhIP 誘発 L1-RTP

PhIP による L1-RTP は AhR 依存的、AhR nuclear translocator-1 (ARNT1) 非依存的で E<sub>R</sub>a 依存的であった。この知見は PhIP に特徴的であり、同じ HCAs の仲間である 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) による L1-RTP では AhR 依存的、ARNT1 依存的だった。

ヒトは日常的にピコモルレベルの HCA に被曝していることが提唱されていることから、同量の PhIP を L1-Tg マウスに投与した後、どのような臓器で L1-RTP が誘導されるかを明らかにした。ピコモルの PhIP を週 3 回、6 週間に亘って投与を行い、屠殺後の各臓器における L1-RTP の有無について PCR 解析を行った。その結果、乳腺と大腸組織での L1-RTP が検出され、PhIP のヒト発癌における L1-RTP 関与の可能性が強く考えられた。

### D. 考察

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

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

一方、同じ HCAs でも L1-RTP を誘導する際、異なる細胞内側因子に依存することを明らかにした。即ち MeIQx 誘発 L1-RTP は AhR/ARNT1 に依存するのに対して、PhIP 誘発 L1-RTP は AhR/E<sub>R</sub>a 依存的であった。L1 遺伝子は 2 つの蛋白質 (ORF1 及び 2) をコードし、ORF1 は L1-mRNA と結合し、クロマチン上に運搬する。ORF2 は逆転写酵素活性とエンドヌクレアーゼ作用を有し、ゲノム DNA に切断を入れながら逆転写を誘導する (target-site primed reverse transcription)。興味

深い事に AhR は定常状態でも細胞内で ORF1 と会合していることを見いだした。AhR は細胞質でダイオキシン等のリガンドが結合した後、クロマチンに移動し特定の DNA 配列を認識して遺伝子発現を誘導する。しかしその際、AhR 自身には核移行性は無く、AhR とヘテロ二量体を形成する分子の機能に依存してクロマチンに移動することが提唱されている。今回、MeIQx と PhIP による L1-RTP の際、共通して AhR に依存するものの MeIQx では ARNT1 を PhIP では ERα に依存性を示した。即ち、各化合物によって異なるゲノム部位に L1-mRNA が運搬される可能性が示唆された。この可能性を明らかにすることで、PhIP による発癌機序が明らかになるとともに、発癌における L1 の関与の有無も明らかにできるものと思われる。

今年度の解析で、DMBA/TPA 誘発皮膚癌や HCAs の投与によって、L1-RTP が検出され、発癌における L1-RTP 関与の可能性が強く示唆される。そこで次年度以降、L1-RTP の発癌における役割を明らかにすることを目指す。

1. DMBA/TPA 誘発皮膚癌由来一次培養細胞を用いて、L1 遺伝子挿入部位と挿入されることによって構造変化が誘導された遺伝子の同定を行う。また、

2. TPA によって誘導される L1 遺伝子のゲノム腫瘍中の挿入部位(「標的遺伝子」)の解析

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

#### E. 結論

二段階発癌の過程で、腫瘍中に L1-RTP が誘導されることを認めた。また培養細胞を用いた解析で、TPA による L1-RTP の誘導を認めた。一方、PhIP 誘発 L1-RTP の際、標的遺伝子の存在が強く示唆された。現在、L1-RTP

はゲノムにランダムに生じることが提唱されている。TPA や PhIP によって誘導される L1-RTP の結果誘導される、ゲノム変異の有無及び標的遺伝子と機能変化の有無を明らかにすることが今後の解析として、肝要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### G. 研究発表

(論文発表)

1. Okudaira N, Iijima K, Koyama T, Minemoto Y, Kano S, Mimori A, Ishizaka Y. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:18487-18492, 2010.
2. Uchida S, Watanabe N, Kudo Y, Yoshioka K, Matsunaga T, Ishizaka Y, Nakagama H, Poon RY.C., and Yamashita K. SCF<sup>βTrCP</sup> mediates stress-activated MAP kinase-induced Cdc25B degradation. *J. Cell Sci. in press*.
3. Taneichi D, Iijima K, Doi A, Koyama T, Minemoto Y, Tokunaga K, Shimura M, Ishizaka Y. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Neuroimmune Pharmacol. In press*.
4. Kono, K., Nakashima, S., Kokuryo, D., Aoki, I., Shimomoto, H., Aoshima, S., Maruyama, K., Yuba, E., Kojima, C., Harada, A., Ishizaka, Y. Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials* 32: 1387-1395, 2011.
5. Kono, K., Ozawa, T., Yoshida, T., Ozaki, F., Ishizaka, Y., Maruyama, K., Kojima, C., Harada, A., Aoshima, S. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials* 31:7096-105, 2010.
6. Iwabuchi, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M.,



- Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J Biol Chem.*, 285:35350-35358, 2010.
7. Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 87:1133-1143.2010.
8. Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. (H.S; Equal contributors) Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 12:R85-R92, 2010.
9. Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T., Ishizaka, Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 85:551-555, 2010.

(学会発表)

(国内)

1. 奥平准之, 石坂幸人. LINE-1 retrotransposition by aryl hydrocarbon receptor and MAP kinase activated by environmental mutagens. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
2. 奥平准之, 石坂幸人. Induction of LINE-1 retrotransposition by FICZ, a candidate endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月.
3. Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis.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. 大津市、2011 年 2 月.
4. 岡村匡史、奥平准之、矢延-高梨理絵子、石坂幸人、切替照雄. LINE1 レトロトランスポジションに着目した発がん物質予測法の開発. 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. 大津市、2011 年 2 月.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

「生物資源の保存・保管」に関する研究

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

独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにおいて、今年度、マウス LINE-1 を導入した新たな発がん物質評価系モデルマウス 14 系統の資源化が進み、供給体制が整備された。昨年度のヒト LINE-1 を導入したモデルマウスに引き続き、多様なモデルマウスが安定供給され、安全性試験の迅速化に貢献することが期待される。

A. 研究目的

医薬基盤研究所では、実験動物研究資源バンクを設立し、医薬品の開発や難病をはじめとした疾患研究に利用される種々の疾患モデル動物の開発、系統維持、供給などの基盤整備を進め、モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、研究者への提供を行っている。一方、国立国際医療センター研究所では、医薬品の安全性評価を目的として、がん原物質のレトロトランスポジション誘導能に着目した新たな発がん物質予測法を開発している。そこで、本研究では、国立国際医療センター研究所で開発している新規発がん物質 *in vivo* アッセイ系トランスジェニックマウスを、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、医薬品開発研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。新たな発がん物質予測法が活用されることで、医薬品開発において、より精度が高く迅速な安全性評価が推進され、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。昨年度（21年度）は、ヒト LINE-1 を導入したトランスジェニックマウスを基盤研バンクにて資源化した。今年度（22年度）は、新たに開発されたマウス LINE-1 を導入した mL1-EGFP マウスを資源化した。

B. 研究方法

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化  
昨年度のヒト LINE-1 導入トランスジェニ

ックマウスに引き続き、国立国際医療センター研究所において、マウス LINE-1 を導入して新たに開発された発がん物質評価系モデルマウス mL1-EGFP を、凍結精子として基盤研に導入した。基盤研実験動物研究資源バンクに寄託されたマウスは 14 系統であり、ヒト LINE-1 導入マウスと同様に、導入遺伝子の挿入部位、コピー数、発現量、組織による発現量の違いなどがあると考えられる。

凍結精子は、国立国際医療センター研究所にて R18S3 を用いて作製され、ドライシッパーにより医薬基盤研究所に輸送された。基盤研実験動物研究資源バンクにおける常法に従い、凍結精子を融解し、精子濃度、活力を +, ++, +++ の 3 段階で評価し、前培養の後、過排卵処置した C57BL/6Ncr Slc 雌から採取した卵子を用いて体外受精を行った。受精卵を 2 細胞期胚まで培養し、一部を偽妊娠マウスの卵管に移植し産仔への発生能を確認し、残りは EFS40 によるガラス化凍結保存を行った。得られた産仔については、採取した尾の一部から DNA を抽出して、mL1-EGFP トランスジェニックマウスに特異的なプライマーセットを用いて導入遺伝子の存在を確認した。さらに、得られた産仔が雄の場合は精子凍結を行った。また、得られた産仔が雄の場合は精子の凍結保存を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化

国立国際医療センター研究所より、新規発がん物質評価系モデルマウス mL1-EGFP 1 4 系統 (m2, m14, m16, m17, m30, m36, m42, m55, f5, f41, f44, f50, f51, f59) について凍結精子 (各系統 2 本) の寄託を受けた。そのうち次の表 1 にある 8 系統について、凍結精子の融解、体外受精、胚移植、産仔の遺伝子型判定、胚凍結保存を行った。

【表 1】

系統名	融解精子		体外受精率,%	得られた2細胞期胚数
	濃度	活力		
mL1-EGFPm2	++	+++	51.9	150
mL1-EGFPm14	+++	+++	48.5	328
mL1-EGFPm16	+++	+++	79.0	550
mL1-EGFPm17	+++	+++	53.4	250
mL1-EGFPm30	+++	+++	57.9	330
mL1-EGFPm36	+++	+++	87.7	140
mL1-EGFPm42	+++	+++	83.7	479
mL1-EGFPm55	+++	++	72.7	284

表 1 に示すように、ごく一部の系統を除いて精子濃度・精子活力は良好であった。一部で死亡精子の多い系統もあったが、体外受精率は概ね良好で、2 細胞期胚までへの発生率でみた体外受精率は、いずれも多くは 70%~90%を示し、悪い場合もほぼ 50%を示した。多くの系統で 250 個以上の十分な数の 2 細胞期胚を得ることができた。2 系統で 140 個、150 個とやや少なかった。

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

【表 2】

系統名	移植胚数	離乳産仔数	産仔率,%	PCR陽性の有無
mL1-EGFPm2	67	14	20.9	有
mL1-EGFPm14	60	43	71.7	有
mL1-EGFPm16	63	6	9.5	無
mL1-EGFPm17	79	12	15.2	有
mL1-EGFPm30	62	6	9.7	無
mL1-EGFPm36	60	32	53.3	有
mL1-EGFPm42	60	35	58.3	有
mL1-EGFPm55	60	32	53.3	有

表 2 に示すように、移植した全ての仮親から産仔が得られた。産仔率は 1 割弱から 7 割以上と、高い系統と低い系統で、やや大きな開きがあった。産仔が少なかった 2 系統で、産仔に導入遺伝子が確認されなかったが、産仔を増やし再度確認する予定である。さらに、胚移植により雄産仔が得られた場合は、性成熟させた後に精子の凍結保存を行い、資源化を進めた。今年度、新規発がん物質評価系モデルマウスとして mL1-EGFP マウス 1 4 系統を実験動物研究資源バンクのホームページ上に公開した。

D. 考察

昨年度に引き続き、新たに、発がん物質評価系モデルマウス mL1-EGFP 1 4 系統について、凍結精子での寄託を受け、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの常法に従って、融解精子を用いた体外受精-胚移植を行い、産仔を得ることができ、あわせて精子凍結も行った。基本的に凍結精子の状態は非常に良く、十分な活性を保っており、一定数以上の凍結胚を得ることができた。しかし確認した 8 系統のうち、2 系統で導入遺伝子の確認ができなかった。産仔数が少なかった系統では、レシピエントの状態が悪かったことも考えられるので、再度胚移植を行い、導入遺伝子

を確認する必要がある。また、凍結胚数が150個以下と少ない系統については保存資源を補充する必要がある。

今年度、マウスのLINE-1を導入した新たな発がん物質評価系モデルマウスが寄託され、資源化が進んだ。昨年度のヒトのLINE-1を導入したモデルマウスに引き続き、安全性試験の迅速化に、多様なモデルマウスが貢献することが期待される。基盤研実験動物研究資源バンクとして、これらのマウスを責任を持って安定供給できる体制をさらに堅固なものとし、医薬品開発に大いに貢献することが期待される。

#### E. 結論

独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにおいて、今年度、マウスのLINE-1を導入した新たな発がん物質評価系モデルマウス14系統の資源化が進み、供給体制が整備された。昨年度のヒトのLINE-1を導入したモデルマウスに引き続き、多様なモデルマウスが安定供給され、安全性試験の迅速化に貢献することが期待される。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp Anim* in press, 2011.
2. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human  $\{\alpha\}1,4$ -galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem*. 2011 Feb;149(2):161-170.

##### (2) 学会発表

7. 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎。マウス排卵誘起におけるhCGの血中動態。第57回日本実験動物学会総会。2010年5月12日～14日、京都。
8. Matsuda J. Animal Models of Lysosomal Diseases. *Yonago International Symposium:*

Chaperone Therapy Update. (シャペロン療法国際シンポジウム) July 29, 2010. Yonago.

9. 鈴木 治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎。シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響。第103回日本繁殖生物学会総会。2010年9月2日～4日、十和田。
10. 小浦美奈子、島かおる、中村和臣、野口洋子、鈴木 治、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎。急速進行性糸球体腎炎モデルSCG/ThpNkcマウスの繁殖及び腎炎の発症状況について。第44回日本実験動物技術者協会総会2010年9月3,4日、旭川。
11. 中村和臣、小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎。BALB/c凍結胚における個体復元率の改善。第44回日本実験動物技術者協会総会2010年9月3,4日、旭川。
12. 松田潤一郎、疾患モデル動物の現状と問題点。第8回医療機器フォーラム—動物実験の最前線—疾患動物治療を用いる医療機器の有効性、安全性評価。2010年10月15日、東京。
13. 増井 徹、保富 康弘、川原 信夫、古江-楠田 美保、松田 潤一郎、小原 有弘、高橋 一朗、亀岡 洋祐、厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源—薬用植物、医学実験用霊長類、遺伝子、培養細胞、実験動物—。BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7～10日、神戸。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し