

201104006A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中釜 斉

平成24（2012）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	-----	17
	中釜 斉		
2.	新規変異原・がん原物質の検索	-----	23
	若林敬二		
3.	黄砂を含む長距離輸送性大気汚染及びその健康影響に関する研究	-----	29
	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	-----	33
	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	-----	39
	續 輝久		
6.	アジア人の DNA 付加体について	-----	43
	梶村春彦		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	45
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	47

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、日本とアジア諸国での各種の疾病の特性を利用して、新規物質を探索すると共に、これらの環境要因によるがん等の疾病発生の分子機構の解明及びその成果に基づく予防法の開発を目的とする。

環境要因では、日中の胃がん患者の胃粘膜を用いた網羅的 DNA 付加体解析により、7種の過酸化脂質由来の DNA 付加体量から日中を判別可能なことを示し、地域ごとの環境要因の比較から疾病原因が同定可能なことが示唆された。又、黄砂を含む中国大陸からの長距離輸送性大気汚染が示された。内因性要因では、*in vitro* 糖尿病モデル系で同定した ABAQ が肝臓で変異原性を示し、糖尿病モデルラットの尿から高値で検出された。糖尿病患者の体内でも生成し、変異を誘発する可能性が示された。炎症関連疾患では、アルデヒド・ケトン類の網羅的分析法を開発し、生体内に約 400 種類が存在し、炎症によるアルデヒド類の著しい増加を示した。山薬及び主成分 diosgenin に、炎症誘発性大腸発がんモデルでの強い発がん予防効果を認めた。大腸発がん性 HCA 特異的に発現変動する miRNA による発がん性予測の可能性を示した。正常組織 3D 培養系を用いた新規の *in vitro* 発がんモデル系が、経時的変化が解析可能な点等から、発がんへの影響の解析に有用な可能性を示した。

放射線発がんに関与する遺伝的要因では、酸化ストレスを介した発がんモデルを用いて、*p53* 遺伝子欠損マウスでは酸化ストレスによる小腸腫瘍の発生が上昇し、腸管発がんでの *p53* の細胞死制御の重要性を示した。又、正常組織 3D 培養系を用いる *in vitro* 発がんモデルと遺伝子再構成の組み合わせが、発がんの遺伝的要因の解析に有用であることがわかった。

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、日本とアジア諸国での各種の疾病の特性を利用して、新規物質を探索すると共に、これらの環境要因によるがん等の疾病発生の分子機構の解明及びその成果に基づく予防法の開発を目的とする。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) 加熱魚肉食品中にある、大腸発がん性heterocyclic amine(HCA)特有の発現変動を示すmicroRNA (miRNA)に関して発がんとの関連を明らかにする。動物の正常組織の3次元(3D)培養系に発がん物質を暴露し、ヌードマウスへの造腫瘍性で確認する*in vitro*発がんモデル系を構築し、環境要因の発がんへの影響を解析する。又、shRNA導入による遺伝子再構成と組み合わせて、遺伝的要因も解析する。

(2) 内因性物質とヒト発がんの関係を、糖尿病患者のがん等の疾病に対する高リスク要因の観点から、*in vitro*糖尿病モデル系

で生成する5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo-[6,7]azepino[5,4,3-*de*]quinolin-7-one

(ABAQ)を候補物質として、その遺伝毒性、及び糖尿病モデル動物における*in vivo*での生成を解析する。

(3) 中国大陸からの黄砂を含めた長距離大気汚染物質による大気汚染状況とその健康影響について、全国の研究機関及び中国・韓国などの海外の研究者と協力して解析する。

(4) 慢性炎症部位で産生される、活性酸素・活性窒素種(RS)で修飾される生体成分の新規同定と、それら修飾体の炎症関連疾患のバイオマーカーとしての有効性を検討する。更に慢性炎症に関連した疾患の予防のための食品栄養成分の探索を行う。

(5) 環境要因として放射線被曝に着目し、幹細胞を含めた分化段階の異なる細胞における、X線の間接作用による生物影響を、酸化ストレスを介した細胞障害性及びその抑制機構から解明する。

(6) アジア地域の消化管や呼吸器の腫瘍の原因を探索するためのその暴露指標を明らかにする。海外及び本邦のヒト組織を用いて、網羅的DNA付加体解析によりDNA付加体を同定し、又、修復遺伝子も併せて解析し、その病的意義を解明する。

## 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

大腸発がん性 HCA 特有の発現変動を示す一群の miRNA について、ヒト miRBase に存在する、即ちヒトと共通する miRNA に着目して解析した。

マウス正常腸管組織を用いて *in vitro* 発

がんモデル系の構築を試みた。マウス正常腸管腺管の 3D 培養系に大腸発がん性 HCA の一つである PhIP を暴露させて、4~6 週間 *in vitro* 培養後、ヌードマウスに皮下移植して造腫瘍能を検討した。又、マウス小腸腺管の 3D 培養系では、がん抑制遺伝子 (*Apc* と *Pten* 等)の shRNA 導入による遺伝子再構成により造腫瘍性を獲得することを確認している。そこで、がん抑制遺伝子 *Pten* の shRNA を導入して再構成したマウス大腸 3D 培養系での PhIP 暴露の影響も解析した。

#### (2) 新規変異原・がん原物質の検索

ABAQ の遺伝毒性に関しては、*gpt delta* マウスを用いる *in vivo* 変異原性試験を用い、肝臓及び腎臓における突然変異を解析した。ABAQ の生体内生成は、野生型 (Wistar) 雄ラット、ストレプトゾトシン投与による I 型糖尿病モデルの Wistar 雄ラット及び II 型糖尿病モデル (GK/Slc) 雄ラットで調べた。24 時間分の尿を採集し、固層抽出後、LC-MS/MS により尿中の ABAQ 量を測定した。尚、空腹時血糖値は常法により測定した。

#### (3) 黄砂を含む長距離輸送性大気汚染及びその健康影響に関する研究

黄砂が多く飛来する西日本を中心とする国内 7 カ所 (長崎県佐世保市、福岡県太宰府市、鳥取県湯梨浜町、大阪府大阪市、京都府京都市、富山県射水市及び愛知県名古屋市) で、2010 年 11 月から 2012 年 3 月まで大気粉塵を捕集し、大気粉塵量、及び粉塵中の成分を化学分析して有害物質等の飛来状況を、更に大気粉塵抽出物の *S. typhimurium* YG1024 株と YG1029 株に対する変異原性を解析した。又、後方流跡

線解析により大気汚染物質の流入経路を推測した。

#### (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

市販の様々な約 30 種類のアルデヒド・ケトン類をダンシルヒドラジン (DH) 誘導体として、LC-MS/MS により分析して、アルデヒド・ケトン類の網羅的分析法を開発した。この方法により、LPS で炎症を惹起したマウスの組織や血漿中のアルデヒド類・ケトン類を網羅的に分析した。又、*azoxymethane* と *dextran sulfate sodium* によるマウス炎症関連大腸発がんモデルを用いて、食品成分として、ヤマモモ類 (ヤマモモ、自然薯、長芋など) やそれに含まれる植物ステロールの発がん予防効果及びその発がん予防機構を解析した。

#### (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

放射線感受性が高く、幹細胞を含めた分化段階の異なる細胞が存在する消化管に着目した。放射線は、間接作用として、生体に酸化ストレスを誘発して発がんに関与するとも考えられており、まず、酸化ストレス誘発腸管発がんに関して、がん抑制遺伝子及び DNA 修復遺伝子欠損の影響を検討した。酸化剤  $KBrO_3$  飲水投与による酸化ストレス誘発腸管発がんモデルを用いた。がん抑制遺伝子 *p53* 欠損マウスを用いて、a) 酸化ストレス誘発発がん実験、b) 酸化ストレス負荷条件下における各種 DNA 修復関連遺伝子の発現解析、c) 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) アジア人の DNA 付加体について

アジアの各地、とくに中国の胃がん蔓延

地における胃粘膜組織および本邦の胃がん例の胃粘膜組織から DNA を抽出し、網羅的 DNA 付加体解析 (adductome 解析) を行った。7 種の過酸化脂質由来の付加体について DNA 付加体量を算出し、日本と中国の両地域の症例について、多変量解析 (クラスター解析、判別解析など) を行った。Helicobacter については抵抗性遺伝子を PCR で同定し、その感染の有無を調べた。

(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。海外で得られた検体に関しては、当該国の共同研究者が所属機関の倫理的承認を得た。

### 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 特有の発現変動を示し、ヒト miRBase に存在する (ヒトと共通する) 一群の miRNA 22 種を見出した。12 種は p53 シグナル経路に関連する miRNA であった。内 3 種の miRNA だけでも発がん性 HCA と非発がん性 HCA を判別可能であった。

動物正常組織の 3D 培養系を用いた新規 *in vitro* 発がんモデル系の構築に関しては、マウス腸管腺管の 3D 培養系への PhIP の 6 時間暴露のみで、ヌードマウス皮下での造腫瘍能を有する腸管細胞が誘導されることが示唆された。又、がん抑制遺伝子の *Pten*

の shRNA を導入した大腸 3D 培養系は、PhIP 未処理でもヌードマウス皮下で増殖性病変が認められたが、PhIP 暴露により、造腫瘍能を有する細胞の数が増加し、構造異型が誘発される可能性が示唆された。

#### (2) 新規変異原・がん原物質の検索

*gpt delta* マウスに ABAQ を投与し、*gpt* 遺伝子に誘発された変異体頻度及び変異スペクトラムを解析した。肝臓における変異体頻度は、対照群、ABAQ 25mg/kg 投与群、50mg/kg 投与群で、各々、 $10^6$  塩基当たり  $5.47 \pm 3.31$ 、 $14.1 \pm 7.92$ 、 $22.5 \pm 12.7$  と、ABAQ 投与により変異体頻度は増加した。変異スペクトラムは、G→A 及び G→T 等の点突然変異が対照群と比べ有意に多かった。腎臓では、変異体頻度の有意な上昇はなかった。

ABAQ の生体内生成に関しては、野生型、I 型及び II 型糖尿病モデルラットの空腹時血糖値は、各々 84~105mg/dl、328~473mg/dl、172~229mg/dl であるが、尿中の ABAQ 量は、24h 尿当たり、 $27.16 \pm 9.00$ pg、 $551.5 \pm 360.8$ pg、 $188.4 \pm 103.7$ pg であり、糖尿病モデル動物において高値を示した。特に、I 型糖尿病モデルラットの尿中の ABAQ 量は、野生型ラットに比べ約 20 倍高かった。

#### (3) 黄砂を含む長距離輸送性大気汚染及びその健康影響に関する研究

大気粉塵の捕集を行った 7 地点のいずれにおいても、2011 年 5 月に複数日にわたって  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  を超える高い粉塵濃度が観測された。佐世保市、太宰府市、大阪市、京都市及び名古屋市における粉塵濃度は、最も高い日で  $347.2 \sim 585.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。湯梨浜町及び射水市では、5 月の最も高い粉塵濃度は  $202.5 \sim 275.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。

湯梨浜町で、粉塵濃度が  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  超え

た 3 日間の Ca、Fe、K、Mg、V 及び Pb の濃度は、各々1753~2074、6028~7940、4024~4914、2444~3616、13.2~18.3 及び 10.5~20.7 ng/m<sup>3</sup>と高かった。後方流跡線解析の結果、それらの日の気塊は中国東北部から朝鮮半島を經由して流入したことが示唆された。

湯梨浜町と射水市において 1 月~5 月に捕集したほとんどの大気粉塵抽出物が、*S. typhimurium* YG1024 株に対して変異原性を示した。

(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

約 30 種類のアルデヒド・ケトン類と DH の誘導体は、LC-MS/MS 分析により特徴的なマススペクトルの開裂を示し、これを用いたアルデヒド類・ケトン類の網羅的分析法を開発した。この方法で、マウスの組織や血漿中の過酸化物を解析した結果、生体内には未知のものを含め約 400 種類のアルデヒド類・ケトン類が存在していた。また、4-Hydroxynonenal や 4-oxo-2-nonenal 等を含む多くのアルデヒド類は、LPS 投与による炎症惹起により著しく増加した。

マウス炎症関連大腸発がんモデルを用いて、ヤマイモ類のがん予防効果を検討した結果、特に、山薬（漢方薬、ヤマイモの乾燥品）及びその主成分である Diosgenin に強い発がん予防効果を認めた。また、山薬及び Diosgenin は、大腸上皮組織や肝臓などの組織に対して、抗炎症作用や脂質代謝改善効果を示し、これが発がん予防効果に寄与すると考えられた。

(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*欠損マウスを用いた KBrO<sub>3</sub>誘発腸管

発がん実験において、野生型、ヘテロ欠損、ホモ欠損マウスでの、1 個体当りの小腸上皮性腫瘍の個数は 1.0, 2.2, 9.2 であり、*p53* 遺伝子が酸化ストレス誘発消化管発がんを抑制することが示された。*p53* ホモ欠損マウスで誘発された腫瘍で *Cttnb1* 遺伝子変異を解析した結果、13 例中、G→A 変異を 2 例、G→T 変異を 1 例見いだした。酸化 DNA 損傷である 8-oxo-dG を DNA から除いて DNA 酸化による突然変異を抑制する DNA 修復酵素、OGG1 の発現を、P53 が調節することが報告されている。現在、野生型と *p53* ホモ欠損マウスでの、酸化剤投与及び非投与条件でのマウス腸管における DNA 修復酵素 OGG1 および MUTYH の遺伝子発現を、定量的 PCR で解析中である。

(6) アジア人の DNA 付加体について

胃がん患者の非腫瘍部の胃粘膜における、酸化的 DNA 障害で生成される、7 種の etheno DNA 付加体量は、内因性の炎症に関連することもあるが、本邦由来の胃粘膜の方が概ね多かった。また、7 種の etheno DNA 付加体量を指標として、判別分析を行った結果、誤判定率 5%以下で日中を区別できる判別式を得た。*Helicobacter* の頻度はやや本邦に多く、炎症由来の胃粘膜損傷が背景にあることが裏付けられた。

#### 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 特有の発現変動を示し、ヒトと共通する一群の miRNA(22 種)を見出し、内 3 種の miRNA だけでも発がん性 HCA と非発がん性 HCA を判別可能であっ

た。これらを用いて発がん性を予測できる可能性が示唆された。又、22種の miRNA 中 12 種に p53 シグナル経路との関連が報告されており、大腸発がん性 HCA が非遺伝性変化を介して p53 シグナル経路に影響する可能性が示唆された。

動物正常組織の 3D 培養系を用いた新規 *in vitro* 発がんモデル系の構築では、マウス腸管腺管の 3D 培養系への、PhIP 暴露により、ヌードマウス皮下での造腫瘍能を有する細胞が誘導される可能性が示された。がん抑制遺伝子 *Pten* の shRNA を導入した大腸 3D 培養系は、PhIP 暴露により、造腫瘍能を有する細胞の数が増え、構造異型が誘発される可能性が示唆された。予備的実験の段階であるが、遺伝性変化がある場合には、発がん物質との相互作用で、より発がん段階が進展する可能性が示された。

腸管以外の他臓器(肺や肝臓等)でも、3D 培養の条件及び遺伝子再構成による造腫瘍能の獲得に関して検討中であり、これらの臓器に関しても *in vitro* 発がんモデル系を構築する予定である。

この *in vitro* 発がんモデル系は、動物個体による *in vivo* 発がんモデル系と比較し、a)簡便かつ短期間で解析可能、b) shRNA 導入による遺伝子再構成と組み合わせて、複数の遺伝的要因を任意の順番で解析可能、c) 腫瘍化に伴う非遺伝性・遺伝性変化の解析により、発がんの経時的変化の解析も可能、の特色がある。これらを利用して、新規の候補環境要因の発がんへの影響を解析することや、候補要因特異的なマーカーの探索へと応用する。

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

が有り、新規の発がん性試験法の実用化は、同定した発がん物質の除去・低減化によるがんの減少が期待される。また、*in vitro* 発がんモデルは、遺伝子再構成と組み合わせて、遺伝的要因の解析も可能であるので、アジア人の発がん感受性に寄与する遺伝的要因の探索や、遺伝的要因の候補と発がんとの関連性の解析に有用である。

## (2) 新規変異原・がん原物質の検索

グルコースとトリプトファンとの *in vitro* メイラード反応で生成する、ABAQ は、*S. typhimurium* に対する突然変異の誘発、培養細胞に対する小核誘発、マウスを用いたコメットアッセイで肝臓、骨髄等で DNA 損傷作用を示す。*gpt delta* マウスでの *in vivo* 変異原性試験では、肝臓において *gpt* 遺伝子の変異頻度が上昇し、G→A 及び G→T 等の点突然変異が誘発された。ABAQ の *in vitro*, *in vivo* における遺伝毒性は、変異・がん原性を示す HCA とほぼ同程度の強さであり、齧歯類の肝臓等に対して発がん性を示すことが予想され、その発がん性の検討が重要である。

ABAQ は、野生型、I 型及び II 型糖尿病ラットの尿で、野生型よりも糖尿病モデル動物に於いて高値を示した。特に、I 型糖尿病モデルラットの尿中 ABAQ 量は高く、それは、各ラットの血糖値と比例した。今後、ABAQ の動物体内での実際の生成量の検討、及び、ABAQ のヒト発がんへの関与の解析のために、健常人及び糖尿病患者の ABAQ 量の解析が重要である。

これらの結果から、糖尿病患者の生体内でも ABAQ が生成され、肝臓などの組織に変異を誘発する可能性が推測された。糖尿病は、近年、アジアにおいて急増しており、



糖尿病患者のがんを含む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及びその生体影響の解明は重要である。

(3) 黄砂を含む長距離輸送性大気汚染及びその健康影響に関する研究

大気粉塵捕集地点、全 7 地点において 2011 年 5 月に複数日にわたって  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  を超える高い粉塵濃度が観測され、各地点での最高粉塵濃度も  $256\sim 585 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と非常に高かった。捕集された大気粉塵中では、土壌粒子由来の金属であり、黄砂飛来の指標と報告されている Ca、Fe 及び Mg 濃度が、また、燃焼に伴う大気汚染の指標と報告されている K、V 及び Pb 濃度も高かった。後方流跡線解析から、これらの気塊は中国東北部から朝鮮半島を経由して流入したことが示唆された。これらから、西日本を中心とした広い地域に黄砂が飛来し、その中には燃焼由来の大気汚染物質が多く含まれていたと考えられた。現在、黄砂の飛来と喘息や肺がん等の呼吸器関係の健康影響との関連について検討中である。

黄砂の健康影響の解明は、日本をはじめ黄砂の飛来がみられる東アジア地域において重要であり、また、黄砂への曝露を避けることで期待される疾病予防効果の解明に貢献する。

(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

生体内には、未知のものを含め約 400 種類ものアルデヒド・ケトン類が存在し、また、炎症を惹起したマウスの組織や血漿では、多くのアルデヒド類の濃度が著しく増加していた。脂質、糖質やアミノ酸から生じる過酸化物質由来のアルデヒド・ケトン

類は、生体成分(DNA、蛋白質)と反応して付加体を形成し、突然変異を誘導、蛋白質の機能を損傷し、がんや炎症に関連した疾病の発症・進展に関与すると考えられる。今後、未知のアルデヒド・ケトン類の構造決定、核酸・タンパク質との反応性、付加体生成の可能性を検討し、特定のアルデヒド類が、慢性炎症が関連するがん・II 型糖尿病等の疾患のバイオマーカーとなる可能性について解析する。また、抗炎症作用や脂質代謝改善効果を有することを明らかにした食品成分の Diosgenin の過酸化物の生成予防ならびに発がんや炎症関連疾患の発症予防への有効性を検討する。

(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

KBrO<sub>3</sub> 投与により酸化ストレスを付加する腸管発がんモデルを用いて、がん抑制遺伝子及び DNA 修復遺伝子の影響を検討した。酸化ストレス誘発突然変異を抑制する OGG1 遺伝子欠損マウスでは、誘発される腫瘍数は野生型の約 2 倍で、p53 遺伝子欠損マウスでは約 9 倍であり、酸化ストレス誘発消化管発がんの抑制への、p53 の重要性が示された。KBrO<sub>3</sub> 誘発突然変異実験では、MUTYH および OGG1 欠損マウスでは、8-oxo-dG に起因する G→T 変異が顕著に増加するが、p53 欠損マウスに誘発された腫瘍では、顕著な G→T 変異の上昇は認められなかった。p53 は DNA 損傷による細胞死誘導に関与し、また MUTYH は酸化 DNA 損傷で誘発される細胞死への関与が報告されている。これらの知見から、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、細胞死誘導の関与が大きいことが推測された。

食生活の欧米化により日本人の大腸がん発生率は増加しており、今後、経済成長が著しいアジア諸国においても同様な傾向を示す可能性は高い。酸化ストレスに起因する腸管発がんの抑制の分子機構の解明は重要であり、酸化ストレス誘発消化管発がんモデルは、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用である。

#### (6) アジア人の DNA 付加体について

網羅的 DNA 付加体解析による、日本及び中国の胃がん患者の非腫瘍部の胃粘膜における、過酸化脂質由来の酸化的 DNA 障害で生成される 7 種の etheno DNA 付加体量を用いて、日中を判別可能であった。DNA 付加体という暴露指標から、その胃がんの発生地域を推定できることは、地域ごとの環境要因を詳細に比較することで、環境内の疾病原因の同定が可能と考えられる。食生活あるいは感染因子などの予防可能な原因ならば、これを直接的に除去することで、アジア地域の疾病の予防に貢献すると考えられる。

一方、DNA 付加体の網羅的解析において、未同定の付加体が多数あり、nitroso 化合物などの環境要因として推測される物質由来の付加体が存在するか否かも解析する予定である。更に、少量の検体で測定可能なシステムを構築し、個体レベルでの暴露評価やそれに基づくがん予防を試みる。

#### E. 結論

環境要因では、日中の胃がん患者の胃粘膜を用いた網羅的 DNA 付加体解析により、7 種の過酸化脂質由来の DNA 付加体量から日中を判別可能なことを示し、地域ごとの環境要因の比較から疾病原因が同定可能な

ことが示唆された。又、黄砂を含む中国大陸からの長距離輸送性大気汚染が示された。内因性要因では、*in vitro* 糖尿病モデル系で同定した ABAQ が肝臓で変異原性を示し、糖尿病モデルラットの尿から高値で検出された。糖尿病患者の体内でも生成し、変異を誘発する可能性が示された。炎症関連疾患では、アルデヒド・ケトン類の網羅的分析法を開発し、生体内に約 400 種類が存在し、炎症によるアルデヒド類の著しい増加を示した。山薬及び主成分 diosgenin に、炎症誘発性大腸発がんモデルでの強い発がん予防効果を認めた。大腸発がん性 HCA 特異的に発現変動する miRNA による発がん性予測の可能性を示した。正常組織 3D 培養系を用いた新規の *in vitro* 発がんモデル系が、経時的変化が解析可能な点やその簡便さから、発がんへの影響の解析に有用な可能性を示した。

環境中の疾病要因の同定は、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する疾病予防に有用である。

放射線発がんに関与する遺伝的要因では、酸化ストレスを介した発がんモデルを用いて、*p53* 遺伝子欠損マウスでは酸化ストレスによる小腸腫瘍の発生が上昇し、腸管発がんでの *p53* の細胞死制御の重要性を示した。又、正常組織 3D 培養系を用いる *in vitro* 発がんモデルと遺伝子再構成の組み合わせが、発がんの遺伝的要因の解析に有用であることがわかった。

遺伝的要因の影響の解明は、新規の予防法の開発や高危険度群の推定に役立つ。

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. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res* (2011), 71:4628-4639.
2. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H. Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci* (2011) 102:1615-1621.
3. Kato S, Kubota K, Shimamura T, Shinohara Y, Kobayashi N, Watanabe S, Yoneda M, Inamori M, Nakamura F, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Taguri M, Kubota Y, Goshima Y, Morita S, Endo I, Maeda S, Nakajima A, Nakagama H. Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer. *Cancer Sci*, (2011), 102:2029-2037.
4. Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*, (2011), 60: 1363-1371.
5. Hori M, Kitahashi T, Imai T, Ishigamori R, Takasu S, Mutoh M, Sugimura T, Wakabayashi K, Takahashi M. Enhancement of carcinogenesis and fatty infiltration in the pancreas in N-nitrosobis-(2-oxopropyl)amine-treated hamsters by high-fat diet. *Pancreas* (2011) 40: 1234-1240.
6. Takahashi M, Hori M, Mutoh M, Wakabayashi K, Nakagama H. Experimental animal models of pancreatic carcinogenesis for prevention studies and their relevance to human disease. *Cancers*, (2011) 3: 582-602.
7. Teraoka N, Mutoh M, Takasu S, Ueno T, Yamamoto M, Sugimura T, Wakabayashi K. Inhibition of intestinal polyp formation by pitavastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor. *Cancer Prev Res* (2011), 4: 445-453.
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), 140:2000-2008.
9. 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), 130: 259-266.
  10. 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*, (2011) 102: 79-87.
  11. 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*. (2011), 129: 528-535.
  12. Hasei T, Ohno A, Tsukuda R, Inoue T, and 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, *J Health Sci*, (2011) 57: 53-59.
  13. Lai YL, Aoyama S, Ohata M, Otsuka N, Shiokawa H, Tomono S, Fujiwara Y, Kanazawa H, Miyoshi N, Ohshima H. Dysregulation of dimethyl-argininedimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway in rat type II diabetic nephropathy. *J Clin Biochem Nutr*, (2012) *in press*.
  14. Mabuchi R, Kurita A, Miyoshi N, Yokoyama A, Furuta T, Goda T, Suwa Y, Kan T, Amagai T, Ohshima H. Analysis of *N*<sup>ε</sup>-ethyllysine in human plasma proteins by gas chromatography-negative ion chemical ionization/mass spectrometry as a biomarker for exposure to acetaldehyde and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, (2012) *in press*.
  15. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, 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*, (2012) 50, 84-89.
  16. Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of tocotrienol in mice by cyclodextrin inclusion. *J Nutr Biochem*, (2011) 22, 1121-1126.
  17. Tomono S, Miyoshi N, Ito M, Higashi T, Ohshima H. A highly sensitive

- LC-ESI-MS/MS method for the quantification of cholesterol ozonolysis products secosterol-A and secosterol-B after derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine. *J Chromatogr B*, (2011) **879**, 2802-2808.
18. 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) **4**, 924-934.
19. Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products *in vitro* and *in vivo* through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J Lipid Res*, (2011) **52**, 87-97.
20. 大島寛史、三好規之、伴野 勲、抗ストレス食品の生化学的評価、横越英彦編「抗ストレス食品の開発と展望Ⅱ」、シーエムシー出版、東京、(2011) pp 41-47.
21. Lim TH, Fujikane R, Sano S, Sakagami R, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Hidaka M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair* (2012), **11**: 259-266.
22. Sugimura H, Tao H, Suzuki M, Mori H, Tsuboi M, Matsuura S, Goto M, Shinmura K, Ozawa T, Tanioka F, Sato N, Matsushima Y, Kageyama S, Funai K, Chou PH, Matsuda T. Genetic susceptibility to lung cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*. (2011), **3**:1463-1477.
23. Sugimura H, Yamada H, Kageyama S, Yamamura Y, Yokota N, Mori H, Iwaizumi M, Shinmura K, Kurachi K, Nakamura T, Tsuboi M, Maekawa M, Kahyo T. Glioblastoma: Germline Mutation of TP53. In Hayat MA, (ed), "Tumors of the Central Nervous System", Springer, New York, (2011) pp 31-38.

## 2.学会発表

1. 筆宝義隆、中釜 斉、腸管発がんの *in vitro* 再構成、第70回日本癌学会学術総会、2011年
2. 小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉、筆宝義隆、*in vitro* 発がん再構築系を用いた発がん過程における炎症の役割、第70回日本癌学会学術総会、2011年
3. 落合雅子、小沼邦重、土橋祥子、中釜 斉、筆宝義隆、腸管発がんにおける遺伝子間相互作用を再構成するための *in vitro* 培養系の開発、第70回日本癌学会学術総会、2011年
4. 小沼邦重、筆宝義隆、土橋祥子、落合雅子、稲瀬安希、中釜 斉、*in vitro* 腸管発がん再構成系における炎症の発がん促進作用、平成23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
5. 稲瀬安希、筆宝義隆、小沼邦重、土橋祥子、落合雅子、中釜 斉、*in vitro* 発がん再構成系を用いたMSH2欠損関連大腸発がん経路の解析、平成23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
  6. Onuma K, Hippo Y, Nakagama H, *In vitro* reconstitution of inflammation-related colon carcinogenesis. The 16th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Sapporo, Japan, 2011
  7. 中釜 斉、発がん動物モデルの *in vitro* での再構築、第4回疾患モデルシンポジウム、2011年
  8. Nakagama H, Future trends of cancer research: How research can help treatment and prevention. Lessons from NCC Japan. International Networking to Accelerate standardization in Cancer Management “Highlight on Cancer Management”, Jakarta, Indonesia, 2011
  9. 加藤竜也、石野孔祐、豊岡達士、伊吹裕子、渡邊昌俊、若林敬二、増田修一、戸塚ゆ加里、中釜 斉、原産地の異なるカオリンのDNA損傷性および哺乳類細胞内への移行率の違い、日本環境変異原学会第40回大会、2011年
  10. 大塚久美、戸塚ゆ加里、若林敬二、布柴達男、渡辺徹志、中釜 斉、トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物 ABAQ の *in vivo* 変異原性、日本環境変異原学会第40回大会、2011年
  11. 池本実徳、川西優喜、戸塚ゆ加里、若林敬二、八木孝司、ナノ材料による小核誘導における相同組換え修復の関与、日本環境変異原学会第40回大会、2011年
  12. 山田昌徳、島村裕子、戸塚ゆ加里、稲葉直之、クウリバリ・スレイマン、田村友佳、長谷井友尋、若林敬二、渡辺徹志、増田修一、メイラード反応由来新規変異原性物質 ABAQ の生体内生成に関する研究、日本環境変異原学会第40回大会、2011年
  13. 若林敬二、大腸がんの予防戦略と食事・食生活、第9回日本予防医学会学術総会、2011年
  14. 戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、トリプトファンとグルコースのメイラード反応で生成されるアミノベンゾアゼピノキノリノンの遺伝毒性、第70回日本癌学会学術総会、2011年
  15. 武藤倫弘、高橋真美、山本真史、堀美香、若林敬二、中釜 斉、アディポネクチンが欠損した Min 及び C57BL マウスにおける腸発がん促進、第70回日本癌学会学術総会、2011年
  16. 加藤竜也、戸塚ゆ加里、石野孔祐、渡邊昌俊、若林敬二、中釜 斉、原産地の異なるカオリンによって引き起こされるDNA損傷性の違い、第70回日本癌学会学術総会、2011年
  17. 武藤倫弘、寺岡直哉、小沼邦重、高橋真美、堀美香、中野勝也、一二三佳恵、窪田直人、門脇孝、若林敬二、中釜 斉、Adiponectin 遺伝子欠損によるマウスの腸発がん促進作用、第18回日本がん予防学会、2011年

18. 寺岡直哉、武藤倫弘、高須伸二、中野勝也、若林敬二、中釜 斉、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pitavastatin の Min マウス腸ポリープ生成抑制機構、第 18 回日本がん予防学会、2011 年
19. 高橋亮平、穀内修、西村幸風、藤田浩祐、秋山雅行、嵐谷圭一、池盛文数、稲葉洋平、片岡洋行、岸川直哉、世良暢之、出口雄也、鳥羽陽、船坂邦弘、洞崎和徳、山口孝子、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及び化学成分の年内変動並びにそれらに対する長距離輸送の影響、第 61 回日本薬学会近畿支部大会、2011 年
20. 長谷井友尋、穀内修、クゥリバリスレイマン、秋山雅行、浅川大地、嵐谷圭一、池盛文数、稲葉洋平、片岡洋行、岸川直哉、世良暢之、出口雄也、鳥羽陽、船坂邦弘、洞崎和徳、山口孝子、渡辺徹志、全国 14 地点における大気粉塵の変異原性及び化学成分の年内変動並びにそれらに対する長距離輸送の影響、日本環境変異原学会第 40 回大会、2011 年
21. 三好規之、大畑美幸、浅井奈津子、頼盈伶、金澤寛明、大島寛史、糖尿病モデルマウス腎臓での糖化反応と血管拡張因子 NO の産生阻害、第 11 回日本 NO 学会学術集会、2011 年
22. 伴野勸、岩崎希、三好規之、大島寛史、エステル型 secosterol 類のヒト LDL コレステロールからの検出と細胞毒性、第 75 回日本生化学会中部支部例会、2011 年
23. 長澤友樹、三好規之、田中卓二、武藤倫弘、若林敬二、大島寛史、肥満マウス KK-A<sup>y</sup> における山薬およびジオスゲニンの aberrant crypt foci 形成抑制、第 18 回日本がん予防学会、2011 年
24. 三好規之、伴野勸、頼盈伶、東達也、荒谷康昭、大島寛史、Secosterol 型コレステロール酸化物の生体内生成機構と生理活性、第 64 回日本酸化ストレス学会、2011 年
25. 米持巧、中村宜督、加藤陽二、大島寛史、三好規之、イソチオシアネート結合タンパク質の網羅的探索法の開発、第 20 回フードサイエンスフォーラム、2011 年
26. 山田雄司、栗田亜也、馬淵良太、伴野勸、三好規之、大島寛史、ヒト肝がん細胞 HepG2 における Hep27 タンパク質のアセトアルデヒド修飾、第 84 回日本生化学会、2011 年
27. 永井竜児、島崎智子、三好規之、大島寛史、永井美芽、新規糖化反応後期生成物 :N<sup>w</sup>-(carboxyethyl) arginine (CEA) の免疫化学的な血中濃度の測定、第 84 回日本生化学会、2011 年
28. Miyoshi N, Nagasawa T, Tanaka T, Wakabayashi K, Noguchi H, Ohshima H, Chemopreventive effects of freeze-dried yams and its constituent diosgenin on mouse colon carcinogenesis. 4th International Conference of Health and Longevity Sciences, Shizuoka, Japan, 2011
29. 三好規之、長澤友樹、浅井奈津子、田中卓二、若林敬二、野口博司、大島寛史、ヤムイモ (山薬) およびその有効成分ジオスゲニンによる大腸発がんの化学予

- 防、第4回食品薬学シンポジウム、2011年
30. Miyoshi N, Yonemochi T, Nakamura Y, Ohshima H, Development of a comprehensive analytical method for identification of isothiocyanates-binding proteins. International conference on Food Factors, Taipei, Taiwan, 2011
31. Yonemochi T, Nakamura Y, Ohshima H, Miyoshi N, Identification of target proteins responsible for chemopreventive activities of isothiocyanates in human colon cancer HCT116 cells. International conference on Food Factors, Taipei, Taiwan, 2011
32. Asai N, Ohata M, Miyoshi N, Kanazawa H, Ohshima H, Anti-obesity effects of Chinese yam sanyaku and its constituent diosgenin in type II diabetic KK-A<sup>y</sup> mice fed a high-fat diet. 2011 International conference on Food Factors, Taipei, Taiwan, 2011
33. 馬淵良太、三好規之、横山颯、諏訪芳秀、栗木清典、合田敏尚、雨谷敬史、大島寛史、Analysis of N<sup>ε</sup>-ethyllysine in human plasma proteins as a biomarker for exposure to acetaldehyde and alcohol. 日本環境変異原学会第40回大会、2011年
34. 三好 規之、米持 巧、中村 宜督、大島 寛史、がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の探索、日本農芸化学会2012年度大会、2012年
35. 富岡三貴、伴野勸、三好規之、大島寛史、LC-MS/MSを用いたSIRT1活性測定法の開発、日本農芸化学会2012年度大会、2012年
36. 大野みずき、中西恵美、續 輝久、マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析、日本分子生物学会第34回年会、2011年
37. Tsuzuki T, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO<sub>3</sub>, The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (第2回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム)、Tokyo, 2011
38. 大野みずき、中西恵美、續 輝久、マウス腸管における放射線誘発酸化DNA損傷の解析、日本環境変異原学会第40回大会、2011年
39. 大野みずき、中西恵美、續 輝久、マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析、日本放射線影響学会第54回大会、2011年
40. 大野みずき、作見邦彦、古市正人、中西恵美、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、日本遺伝学会第83回大会、2011年
41. Tsuzuki T, Piao J, Matsumoto, N Nakatsu Y, Antitumorigenic effects of p53 and mismatch DNA repair system on oxidative stress-induced intestinal tumors in mice, 14<sup>th</sup> International



Congress of Radiation Research、  
Warsaw, Poland, 2011

42. Ohno M, Nakanishi M, Tsuzuki T, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research、Warsaw, Poland, 2011
43. 梶村春彦、新村和也、酸化的 DNA 損傷修復に関わる遺伝子多型とヒト発がん、日本環境変異原学会第 40 回大会、2011 年
44. 梶村春彦、ヒトがんの原因について、金沢大学癌プロフェッショナルセミナー、2011 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

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））  
分担研究報告書

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、大腸発がん性 HCA 特有の発現変動を示し、ヒトにも存在する一群の microRNA (miRNA)を見出し、内3種の miRNA だけでも発がん性 HCA と非発がん性 HCA を判別可能であった。これら miRNA による発がん性予測の可能性が示された。

次に、動物正常組織の 3D 培養系に化学物質を暴露し、ヌードマウスでの造腫瘍能で確認する新規の *in vitro* 発がんモデル系の構築を試みた。大腸発がん性 HCA の一つである PhIP をマウス腸管腺管の 3D 培養系を用いて短時間暴露することにより、ヌードマウス皮下に造腫瘍能を有する腸管細胞を誘導する可能性を示した。この *in vitro* 発がんモデル系は経時的变化が解析可能な点や、その簡便さから、発がんへの影響の解析に有用な可能性を示した。又、マウス小腸腺管の 3D 培養系では、がん抑制遺伝子の shRNA 導入により遺伝子再構成した場合の造腫瘍能が確認されている。Pten の shRNA を導入した大腸 3D 培養系では、PhIP 暴露により誘発される造腫瘍能を有する腸管細胞数が増加し、構造の異型度も高くなる可能性が示唆された。正常組織 3D 培養系を用いる *in vitro* 発がんモデルと遺伝子再構成の組み合わせが、発がんの遺伝的要因の解析に有用であることがわかった。

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を目的とし、がんの発生・成立に関わる遺伝的要因を解明する。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非遺伝性及び遺伝性変化や、発がん感受性に寄与する遺伝的な要因を明らかにする。

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、非遺伝性変化として microRNA (miRNA)の発現変動に着目し、がんの初期発生との関連を解析した。miRNA の網羅的発現解析から、発がん性 HCA 特有の発現の変化を示す miRNA を見出し、発がんとの関連を明らかにする。

また、環境要因の発がんへの影響を解析するために、動物の正常組織の3次元(3D)

培養系に発がん物質を暴露し、ヌードマウス皮下での造腫瘍能で検討する *in vitro* 発がんモデル系を構築する。がん抑制遺伝子等の shRNA 導入による遺伝子再構成と組み合わせ、遺伝的要因の影響も解析可能である。

## B. 研究方法

### 1. がんの初期発生に関わる miRNA の解析

大腸発がん性 HCA 4 種 {2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinolone (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinolone (MeIQ), 2-amino-6-methyldipiryd[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1)}、非大腸発がん性 HCA 2 種 {2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeAaC), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2)} を用いた。雄 F344 ラットに各々の HCA を投与し(25 mg/kg 体重、1 日 1 回計 3 日間)、大腸腺管について miRNA の網羅的発現解析を行った。この発現プロファイルを用いて、ヒト miRBase に存在する(ヒトと共通する) miRNA に着目し、大腸発がん性 HCA 特有の発現変動を示す miRNA を解析した。又、定量的 PCR により、大腸腺管での miRNA 発現量を検証する。

### 2. 動物正常組織の 3D 培養系を用いた新規 *in vitro* 発がんモデル系の構築

マトリゲルを基材とした 3D 培養により、長期培養が可能と報告されたマウス正常腸管組織 (Sato et al., Nature, 2009) を用いて、*in vitro* 発がんモデル系の構築を試みた。大腸発がん物質としては、大腸発がん性

HCA の一つで、加熱魚肉食品中の含量が最も多い PhIP を用いた。マウス腸管腺管の 3D 培養系に、PhIP 及び活性化処理のために S9 mix を添加した培地を、6 時間暴露させた。4~6 週間、*in vitro* で培養後、ヌードマウスに皮下移植し、造腫瘍能を検討した。がん抑制遺伝子等の shRNA 導入による遺伝子再構成は、マウス腸管腺管の 3D 培養系に、レンチウイルスを用いて shRNA を導入して行った。大腸腺管の 3D 培養系に、がん抑制遺伝子 *Pten* の shRNA を導入し、1 週間後に PhIP 暴露(6 時間)を行い、*in vitro* で 6 週間培養後、造腫瘍能を検討した。

(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

### 1. がんの初期発生に関わる miRNA の解析

大腸発がん性 HCA 投与群もしくは非大腸発がん性 HCA 投与群で、溶媒投与群と比較して 1.2 倍以上発現変動している miRNA は 32 種であった。更に、大腸発がん性 HCA 4 種中任意の 3 種を選択して、溶媒投与群と比較して発現変動している miRNA を選出した。任意の 3 種の組み合わせ 4 通り中 3 つ以上で発現変動していた(発がん性 HCA 4 種中 3 種以上で共通して発現変動している) miRNA 25 種を選択した。ヒト miRBase に存在する、即ち、ヒトと共通す

る miRNA は 22 種であり、これらを用いて判別分析を行った結果、3 種の miRNA のみで、判別式により大腸発がん性 HCA 投与群とそれ以外に分類可能であった。各種 HCA を投与した大腸腺管での、これら 3 種の miRNA 発現量を定量的 PCR により検証中である。

## 2. 動物正常組織の 3D 培養系を用いた新規 *in vitro* 発がんモデルの構築

各々 1 回のみの実験であるが、マウス小腸腺管の 3D 培養系に、PhIP を 6 時間のみ暴露させた場合だけでも、細胞増殖が若干抑制される濃度(約 20  $\mu$ M)で、ヌードマウス皮下で生着して増殖する、即ち、造腫瘍能を有する腸管上皮細胞が誘導されていた。大腸の 3D 培養系でも、同様に、20  $\mu$ M で造腫瘍能を有する細胞が誘導されていた。

マウス小腸腺管の 3D 培養系を用いて遺伝子再構成を行い、遺伝的变化による造腫瘍性の獲得を検討した結果では、*shApc* と *shPten*、*shApc* と *shp53*、及び *Kras* の活性化と *shApc* を組み合わせた場合に、造腫瘍性が確認されている。遺伝的要因と環境要因の相互作用に関して、遺伝子再構成した腸管腺管 3D 培養系に発がん物質を暴露させて検討した。まず、がん抑制遺伝子 *Pten* の shRNA を導入した大腸腺管の 3D 培養系に PhIP を暴露して検討した。*shPten* を未導入の場合、PhIP 未処理では、殆ど腸管上皮細胞の増殖性病変は認められなかった。しかし、PhIP(10  $\mu$ M)処理した場合は、増殖性病変が認められ、造腫瘍能を有する細胞が誘導されており、周囲に炎症細胞が浸潤していることもあった(図 1a)。*shPten* を導入した場合、PhIP 未処理でも、ヌードマウス皮下で増殖性病変が認められ

た(図 1b)、PhIP に暴露させた場合、より多くの造腫瘍能を有する細胞が、又、周囲への炎症細胞の浸潤も認められた。更に、腺管構造の分枝、乳頭状の増殖などの構造異型が認められた。但し、いずれの場合でも、細胞異型は殆ど認められなかった。

## 図 1 ヌードマウス皮下に生着・増殖した大腸腸管上皮細胞

図 1a *shRNA* 未導入の場合

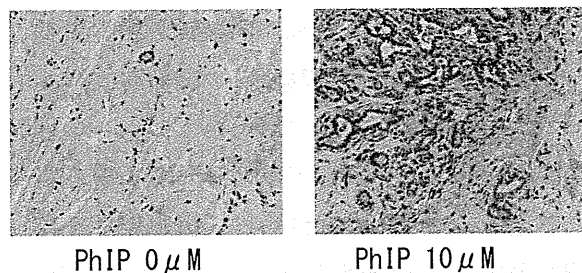
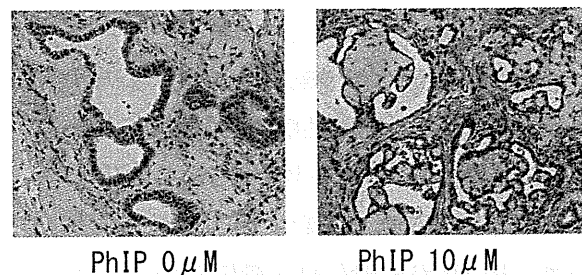


図 1b *shPten* を導入した場合



## 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 特有の発現変動を示し、ヒトに存在する一群の miRNA(22 種)を見出した。判別分析により、これら 22 種中 3 種の miRNA だけでも発がん性 HCA と非発がん性 HCA を判別式により判別可能であった。これらを用いて発がんを予測できる可能性がある。また、これら 22 種の miRNA 中 12 種に関して、p53 シグナル経路との関連