

201110003A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 岡村 匡史

平成24年（2012）3月

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 岡村匡史

平成24年（2012）3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・・・・・・・・・・	1
岡村 匡史	
II. 分担研究報告書	
1. 「内在性プロモーター型 L1-neo トランスジェニックラットの作製」に関する研究・・	6
岡村 匡史	
2. 「L1-RTP 検出システムの構築」に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・	9
石坂 幸人	
3. 「生物資源の保存・保管」に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・	15
松田 潤一郎	
4. 「個体レベルでの発がん物質評価系の検証」に関する研究・・・・・・・・・・	18
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・室長

研究要旨：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、EGFPの発現を指標にL1-RTPをモニターできるhL1-EGFPマウスを用いて、加熱食品中に存在する癌原物質であるPhIPのL1-RTP誘導能を解析した。ヒトが暴露する極低濃度（ 10^{-12} Mレベル）のPhIPの複数回投与によって、PhIPの標的臓器とされる乳腺でL1-RTPが誘導されることを明らかにした。PhIPのL1-RTP誘導は、芳香族炭化水素化合物受容体とエストロゲン受容体 α に依存した。以上のことから、低濃度のPhIPでもL1-RTPを介したゲノム不安定性を誘導し、癌化を促進している可能性が示された。また、hL1-EGFPマウスが癌原物質作用を検証するための迅速なシステムとして機能する可能性が示された。hL1-EGFPマウスは、(独) 医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクから安定供給されおり、2研究機関に分与した。

さらに、マウスにおいて誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されているラットにおいて、ネオマイシン耐性遺伝子の発現を指標にL1-RTPをモニターできるトランスジェニックラット(hL1-neoラット)を開発した。Cre/loxPシステムを用いて肺特異的に活性型ヒトHras^{G12V}が誘導されるトランスジェニックラットは、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高率に発生させることができる。肺癌モデルラットにおいては、N-ERCが有意に上昇していることから、肺癌発生を簡便に評価できる。これらのラットは、腫瘍におけるL1-RTPの関与を明らかにする有用なツールとなり、幅広い用途が期待される。

分担研究者

石坂 幸人 国立国際医療研究センター 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
研究リーダー

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。

B. 研究方法

(1) 加熱食品中に存在する癌原物質による L1-RTP 誘導能評価 (石坂、岡村)

加熱食品中に存在する癌原物質として、2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) と 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) の 2 種類のヘテロサイクリックアミン (HCA) を用いた。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、hL1-EGFP 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。本課題では、特に低濃度の HCA による L1-RTP 誘導の可能性を明らかにするとともに、その分子機序を解析した。

(2) L1-RTP トランスジェニックマウスの資源化 (松田)

国立国際医療研究センターにて R18S3 を用いて作製された凍結精子を、医薬基盤研究所に輸送し、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、体外受精により 2 細胞期胚を作製し、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し、資源化した。さらに、得られた産仔が雄の場合は精子凍結を行うとともに、実験動物研究資源バンクのホームページに公開した。

(3) 内在性プロモーター型 L1-neo トランスジェニックラットの作製 (岡村、石坂)

L1 の内在性プロモーターである 5'UTR の下流に ORF1 及び ORF2 があり、その下流にリポーター遺伝子であるネオマイシン耐性 (Neo^R) 遺伝子の発現ユニットが「逆向」に挿入されている導入遺伝子を構築した。この導入遺伝子を SD ラット (日本クレア) から採取した前核期胚の雄性前核に注入し、定法に従いトランスジェニックラットを作製した。導入遺伝子の有無は、ラット尾または耳から DNA を抽出し、PCR 法で同定した。

(4) 肺の扁平上皮がんモデルの樹立および血清診断マーカーの探索 (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^{G12V} 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。組織における遺伝子発現量は RT-PCR 法により行った。血清に遊離した Erc/Mesothelin の N 末側タンパク (N-ERC) はラット ELISA システムを用いて測定した。

(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) ヘテロサイクリックアミンによる L1-RTP 誘導能評価 (石坂、岡村)

hL1-EGFP マウスにナノモルレベルの MeIQx を 3 回投与すると肝臓や大腸で L1-RTP が誘導された。また、PhIP 投与群では、乳腺や大腸組織で L1-RTP 誘導を認めた。特に、PhIP による乳腺での L1-RTP 誘導は、投与した 16 頭の雌マウス全例に検出された。また、ピコモルレベルの化合物を週 2 回、6 週間投与した後、同様の解析を行ったところ、ナノモルの化合物投与群と同様、PhIP による乳腺・大腸での L1-RTP 誘導を認めた。

siRNA を用いたノックダウンおよびノックアウトマウスを用いた解析により、ヘテロサイクリックアミンの L1-RTP 誘導は、芳香族炭素化合物受容体 (AhR: aryl hydrocarbon receptor) 依存的であった。興味深いことに、MeIQx による L1-RTP 誘導には、ARNT1 (AhR nuclear translocator 1) が必要であるのに対して、PhIP の場合には ARNT1 に依存しておらず、エストロゲン受容体 α (ER α) が必須因子として関与していた。以上のように、各化合物で誘導される L1-RTP に関与する細胞側因子の組み合わせがそれぞれ異なることが明らかとなった。

(2) L1-RTP トランスジェニックマウスの資源化 (松田)

今年度は、資源の品質管理と資源化を進めるとともに、提供依頼のあった2研究機関に、生体または凍結胚にてhL1-EGFPマウスを供給した。1研究機関からはhL1-EGFP#67の生体での供給依頼があり、凍結2細胞期胚43個を融解し、生存胚41個(95.3%)を偽妊娠雌に移植し産仔7匹(17.1%)が得られ、供給した。他の1研究機関からは、hL1-EGFP#4とhL1-EGFP#67の凍結胚での供給依頼があり、各50個をドライシッパーにて輸送・提供した。提供先研究機関で凍結胚の融解・移植を行った結果、正常胚率98%であり、産仔が得られている。また、hL1-EGFP#67については、2件の提供を行ったため、保存資源を増やす必要があり、体外受精により、2細胞期胚約200個を凍結保存し資源化するとともに、一部融解し生存性を確認し品質管理を行った。

(3) L1-neo ラットの作製 (岡村、石坂)

L1-RTPの検出はNeo^R遺伝子の発現あるいはゲノムへの挿入を指標にモニターする。L1の内在性プロモーターである5'UTRの下流にORF1及びORF2があり、その下流にリポーター遺伝子であるNeo^R遺伝子の発現ユニットが「逆向」に挿入されている。Neo^R遺伝子はイントロン配列により分断されているため、逆向きに挿入されているCMVプロモーターからはNeo^R蛋白質翻訳は誘導されない。5'UTRにより転写されたmRNAが逆転写され、ゲノムに組み込まれると、逆向き発現カセット内のCMVプロモーターにより、下流のNeo^RmRNAが合成され、初めて機能的なNeo^R遺伝子が発現する。分担研究者の石坂らは、Neo^R遺伝子内に特異的なプライマーを設計することで、PCR法を用いた検出システムにより、高感度で定量的な検出法も開発している。

導入遺伝子を240個のSDラット受精卵雄性前核に注入し、48匹(20.4%)の産仔を得た。PCR法で導入遺伝子を確認した結果、4匹(8.4%)に導入遺伝子を確認された。4匹のファウンダーラットをSDラットに交配した結果、3系統で導入遺伝子の次世代への伝達を確認された。今後、化学物質あるいはX

線への反応性を指標に、実験目的に沿った系統を選抜していく予定である。

(4) 肺の扁平上皮がんモデルの樹立および血清診断マーカーの探索 (津田)

気管内噴霧スプレーを用いてCreリコンビナーゼ発現アデノウイルスをHras250ラットの肺内に投与した。Hras250ラットでは3~6週後に肺に多数の結節がみられた。これら結節性の病変は腺がん、または扁平上皮がんおよび腺扁平上皮がんであった。

ラット腭管がんの血清診断マーカーとして同定したN-ERCが、ラット肺がんの血清診断マーカーとして応用できるか検討した。その結果、Erc/Mesothelin遺伝子の発現は、正常肺に比べて肺結節部位で高発現していた。さらに、血清中のN-ERC濃度は肺がんの発生したラットにおいて高値を示し、未処置のコントロールラットと比較して有意に高かった。以上の結果から、N-ERCが肺癌の血清診断マーカーになる事が示唆された。

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。

本研究で、ヒトが被曝するごく低濃度のPhIPの複数回投与によって、PhIPの標的臓器とされる乳腺でL1-RTPが誘導されることが明らかとなった。即ち、10⁻¹²MレベルのPhIPによってL1-RTPが誘導されることを見出し、低濃度のPhIPでもL1-RTPを介したゲノム不安定性を誘導することが明らかになった。これまでの動物モデルを用いた発癌実験において、PhIPは乳癌や前立腺癌などの腫瘍を発症することが立証され、ヒト発癌におけるリスク要因と考えられている。しかし、疫学研究では必ずしも確固たる相関は認められておらず、ヒトの癌化誘因としてのHCAの役割に関する一定の見解はまだ得られていない。今回hL1-EGFPマウスでPhIPがエストロゲン受容体α

(ERa)依存的に乳腺組織で L1-RTP を誘導した事実は、PhIP 誘発 L1-RTP によって誘導されるゲノム変化を理解することによって、実際のヒト発癌における PhIP の関与を明らかにできる可能性を期待させる。今後、乳腺組織由来一次培養細胞を用いて PhIP 作用後の L1 の挿入部位を次世代シーケンサーを用いて解析する一方、実際の乳癌組織由来ゲノム DNA 中の L1 挿入部位を同定する予定である。これらの結果を比較することによって、乳癌発症における標的遺伝子を絞り込むことが可能となり、PhIP のヒト発癌への関与を示唆するデータが得られる可能性が期待される。

マウスを用いて、癌原物質による L1-RTP が AhR 依存的であることを証明した。AhR は環境汚染物質の受容体であり、リガンドが結合すると XRE (xenobiotic responsive element) を介して *CYP1A1* 等の遺伝子の発現が誘導される。その際、AhR 自身に核移行能は無く、AhR とヘテロ二量体を形成する分子に依存してクロマチンに移動することが知られている。例えば、ダイオキシンの場合には ARNT1 の核移行シグナルを介してリガンド結合型 AhR はクロマチンに移動し、XRE を介して遺伝子発現を誘導する。AhR は環境変異原で誘発される発癌における必須因子として機能することが報告されている。これまでの *in vitro* 実験による解析で、MeIQx による L1-RTP ではダイオキシンの同様に AhR・ARNT1 が必要であるのに対して、PhIP による L1-RTP 誘導では AhR 依存的ではあるが ARNT1 非依存的であり、ERa 依存的であることが分かった。一方、トリプトファンを光照射すると形成される 6-formylindolo[3,2-*b*] carbazole (以下 FICZ) でも L1-RTP が誘導するが、FICZ は AhR 非依存的であった (Okudaira N et al, PNAS, 2010)。すなわち、癌原物質と非癌原物質は L1-RTP を誘導する可能性はあるが、その際に関与する宿主因子は化合物によって異なることが明らかとなった。

これまで L1-RTP はゲノム上で、ランダムに誘導されると考えられてきた。しかし、刺激因子によって異なる宿主因子を使い分け L1-RTP を誘導しているという知見は、環境因子によって誘導される L1-RTP の場合、転写因子によって決定されるゲノム部位に

指向性を示しながら L1-RTP が誘導される可能性が考えられる。実際、近年の次世代シーケンズ解析により、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。さらに、受精卵において L1-RTP を阻害すると、2細胞期から胚盤胞期で発生が停止することから、高等生物では多様性を確保するために L1-RTP を積極的に利用しているとも考えられる。“ゲノムの多様性の誘導”を L1-RTP の正の側面とすれば、癌細胞に見られる“ゲノムの不安定性の誘導”は負の側面とも考えられる。hL1-EGFP マウスはこれまで解析できなかった体細胞における L1-RTP の機能を解明するツールとしても有用であり、幅広い用途が期待される。

L1-RTP によるゲノムの不安定性誘導を遮断し、癌の進展及び悪性化を予防するという考えは、既存の抗癌剤とは全く異なるコンセプトであり、新たなタイプの抗がん剤開発が期待される。特に、ラットでは膀胱癌、肺癌および乳癌など、マウスでは誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されており、組織特異的な癌関連遺伝子の同定も期待される。

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。ヘテロサイクリックアミン投与では、低濃度の癌原物質に反応して、標的臓器選択的に L1-RTP が誘導された。特に、これまで DNA 損傷作用を示さないとされてきた低濃度の化合物が L1-RTP を誘導した。この知見は、L1-RTP を介したゲノム不安定性が、癌化機序理解のための新たな「切り口」となる可能性を示唆する。そして、このような情報を素早く入手できる hL1-EGFP マウスは今後、様々な病態解析に応用できるものと期待さ

れる。

さらに、L1-RTP トランスジェニックラットは、マウスでは困難であった腓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) 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. Ishizaka Y, Okudaira N, Tamura M, Iijima K, Shimura M, Goto M and Okamura T. Modes of retrotransposition of long interspersed element-1 by environmental factors. *Frontiers in Microbiology*. in press.
3. Ishizaka Y, Okudaira N, Okamura T. Regulation of retrotransposition of long interspersed element-1 by mitogen-activated protein kinases. *Protein Kinases / Book 1*, 2012 pp
3. Okudaira N, Goto M, Abe Y, Tamura M, An Y, Kano S, Ishizaka Y, Okamura T. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. *Cancer Sci*. 102: 2000-2006, 2011.

(2) 学会発表

(国内)

1. 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延-高梨理絵子、清水有紀子、石坂幸人: 二段階皮膚癌モデルにおける LINE-1 レトロトランスポジションの機能解析、第 59 回日本実験動物学会総会、大分、2012 年 5 月
2. 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延-高梨理絵子、石坂幸人、切替照雄. LINE-1 レトロトランスポジションに着目した発癌物質予測法の開発。「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.

3. Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of lone interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. 「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.
4. 奥平准之、後藤元人、岡村匡史、石坂幸人. 内在性レトロトランスポジンの発がんにおける関与. 第 4 回疾患モデルシンポジウム、東京、11月、2011.
5. Yukihito Ishizaka, Noriyumi Okudaira, Shin-ichi Oka, Tadahi Okamura. Neurocognitive disorder by Vpr-induced retrotransposition of LINE-1. 12th Kumamoto AIDS seminar/ GCOE joint international symposium. Kumamoto, October, 2011.
6. 奥平准之、石坂幸人. 芳香族炭素化合物受容体を介した L1 レトロトランスポジションは発がん物質によって異なるシグナル伝達系を用いる. 第 70 回 日本癌学会、名古屋 10月、2011.
7. 石坂幸人、奥平准之、落合雅子、中釜斉. 加熱食品中に含まれる発がん物質は LINE-1 レトロトランスポジションを誘導する. 第 70 回 日本癌学会、名古屋 10月、2011.
8. 小山貴芳、飯島健太、種市大喜、高品智記、石坂幸人. HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr の陰と陽. 第 13 回白馬シンポジウム、札幌、5月、2011.
9. Katsumi Fukamachi, Yutaka Ohshima, Yuto Sakai, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui, A serum tumor marker for preclinical trials of rat lung cancer model, 第 70 回癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 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

「内在性プロモーター型L1-neoトランスジェニックラットの作製」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・室長

研究要旨：ヒト癌の発生原因の約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癌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、EGFPの発現を指標に個体レベルで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、二段階皮膚癌モデルにおけるL1-RTPの機能を明らかにした。本年度は、マウスにおいて誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されているラットにおいて、ネオマイシン耐性遺伝子を指標に、L1-RTPを検出できるトランスジェニックラットを作製した。

A. 研究目的

これまでの研究で、EGFPの発現を指標に、LINE1レトロトランスポジション（以下、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。このことにより、医薬品、食品などに含まれる化学物質の発癌性を検証する新たな評価系が確立できることを示した。今年度は、マウスにおいて誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されているラットにおいて、L1-RTPを検出できるトランスジェニックラットを開発することを目的とする。

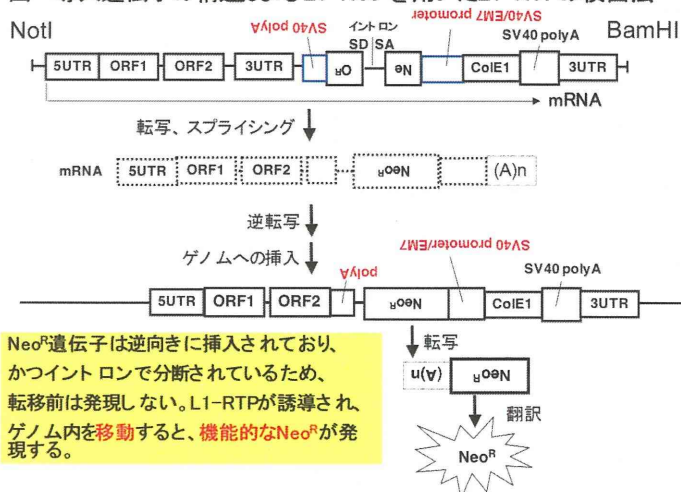
ヒトゲノムに締める遺伝子は数%にすぎず、残りの多くは非翻訳領域や繰り返し配列で構成されている。興味深いことに動く可能性のある遺伝子は、トリ約9%、マウス約39%、ヒトでは約45%と高等生物になるほどその割合は増加している。ヒトの場合、DNA型トランスポゾンほとんど存在せず、その多くはRNA型レトロトランスポゾンである。その中でもLINE1は約52万コピー存在し、その割合が最も多い。LINE1、（以下L1）は、プロモーター領域である5'UTR、RNA結合タンパク質をコードするORF1、エンドヌクレアーゼ活性を持つ逆転写酵素をコードするORF2からなり、全長6kbのトランスポゾンである。L1は自身で、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癌性を検証する新たな評価系を開発することを目的とする。

B. 研究方法

L1の内在性プロモーターである5'UTRの下流にORF1及びORF2があり、その下流にリポーター遺伝子であるネオマイシン耐性（Neo^R）遺伝子の発現ユニットが「逆向」に挿入されている導入遺伝子を構築した（図）。

図 導入遺伝子の構造およびL1-Neo^Rを用いたL1-RTPの検出法



Neo^R遺伝子には、イントロンが挿入されているため、L1のプロモーターにより転写さ

れた mRNA がスプライシングされ、ゲノムに組み込まれると逆向き発現カセット内の CMV プロモーターにより、はじめて機能的な Neo^R 遺伝子が発現する。この導入遺伝子を SD ラット（日本クレア）から採取した前核期胚の雄性前核に注入し、定法に従いトランスジェニックラットを作製した。導入遺伝子の有無は、ラット尾または耳から DNA を抽出し、Neo^R 遺伝子特異的プライマー（5'-CGATCCGAACAAACGACCCA-3', 5'-CCTTGCTCCTGCCGAGAA-3'）を用いた PCR 法で同定した。

（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

L1-RTP の検出は Neo^R 遺伝子の発現あるいはゲノムへの挿入を指標にモニターする。L1 の内在性プロモーターである 5'UTR の下流に ORF1 及び ORF2 があり、その下流にリポーター遺伝子である Neo^R 遺伝子の発現ユニットが「逆向」に挿入されている（図）。Neo^R 遺伝子はイントロン配列により分断されているため、逆向きに挿入されている CMV プロモーターからは Neo^R 蛋白質翻訳は誘導されない。5'UTR により転写された mRNA が逆転写され、ゲノムに組み込まれると、逆向き発現カセット内の CMV プロモーターにより、下流の Neo^R mRNA が合成され、初めて機能的な Neo^R 遺伝子が発現する。分担研究者の石坂らは、Neo^R 遺伝子内に特異的なプライマーを設計することで、PCR 法を用いた検出システムにより、高感度で定量的な検出法も開発している。

導入遺伝子を 240 個の SD ラット受精卵雄性前核に注入し、48 匹（20.4%）の産仔を得た。PCR 法で導入遺伝子を確認した結果、4

匹（8.4%）に導入遺伝子が確認された（表）。4 匹のファウンダーラットを SD ラットに交配した結果、3 系統で導入遺伝子の次世代への伝達を確認された。今後、化学物質あるいは X 線への反応性を指標に、実験目的に沿った系統を選抜していく予定である。

表 hL1-neoトランスジェニックラット作製結果

採卵数	注入胚数(%)	移植数(%)	産仔数(%)	ファウンダー数(%)
368	240(65.2)	235(97.9)	48(20.4)	4(8.3)

D. 考察

種々の腫瘍細胞で L1-RTP が誘導され、乳癌や大腸癌で、*c-myc* や *APC* 遺伝子に L1 の挿入例が報告されていることから、L1-RTP と腫瘍との関連については、状況証拠が揃っているものの、その分子機序については明らかとなっていない。我々は、DMBA/TPA 二段階皮膚癌モデルにおいて L1-RTP の機能解析を行い、腫瘍細胞が誘導される過程での L1-RTP の機能を明らかにした（*Cancer Sci.*, 2011）。すなわち、hL1-EGFP マウスの背部に、400nmol の DMBA を塗布した後、週 2 回の頻度で TPA を繰り返し塗布し、皮膚の腫瘍を誘導した腫瘍を摘出し、L1-RTP の有無を PCR 法で解析した結果、15 個中 13 例（86.7%）で L1-RTP 陽性であった。さらに、*Ha-ras* 変異は 15 例中 11 例（73.3%）で検出され、15 例中 9 例（60.0%）で L1-RTP と *Ha-ras* 変異が共に検出された。皮膚腫瘍近傍の正常皮膚組織においては、20 例中全てにおいて L1-RTP は検出されなかった。DMBA の L1-RTP 誘導は一過性であり、繰り返し TPA を塗布することで、L1-RTP が誘導されることから、TPA による腫瘍プロモーター作用に、L1-RTP が関与している事が示唆された（*Frontiers in Microbiology*, in press）。これらの結果から、hL1-EGFP マウスは、新たな発癌機序の解明に有用なツールとなると考えられた。

一方、ラットでは膀胱癌、肺癌および乳癌などマウスでは誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されている。本研究において、薬剤で選択可能なネオマイシン耐性（Neo^R）遺伝子を指標に、L1-RTP を検出するモデルラット（L1-neo ラット）を作製した。Neo^R 遺伝子には、イントロンが挿入されているため、転移前は発現しない。L1-RTP が誘導さ

れ、ゲノム内を移動すると、機能的な Neo^R が発現する。レポーター遺伝子を Neo^R 遺伝子にしたため、発生した腫瘍細胞を G418 で選択培養し、L1-RTP を誘導した細胞を濃縮することが可能である。さらに、ゲノム DNA を抽出後、大腸菌にクローニングし、カナマイシンで選択培養することで、L1 のゲノムへの挿入部位の同定も容易にできる。L1-neo ラットを各種発癌モデルラットと交配することで、発癌過程における L1-RTP の機能を解明する新たなツールが開発できる。さらに、L1-neo トランスジェニックラットは、ゲノムへの腫瘍組織特異的な L1 挿入部位の探索も可能であり、新たな癌遺伝子を同定するツールとしても利用できる。

E. 結論

マウスにおいて誘発することが困難な発癌モデルが多数開発されているラットにおいて、L1-RTP 解析モデルを開発することの意義は大きく、幅広い用途が期待される。

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. Ishizaka Y, Okudaira N, Tamura M, Iijima K, Shimura M, Goto M and Okamura T. Modes of retrotransposition of long interspersed element-1 by environmental factors. *Frontiers in Microbiology*. in press.
3. Ishizaka Y, Okudaira N, Okamura T. Regulation of retrotransposition of long interspersed element-1 by mitogen-activated protein kinases. *Protein Kinases* / Book 1, 2012 pp
3. Okudaira N, Goto M, Abe Y, Tamura M, An Y, Kano S, Ishizaka Y, Okamura T. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. *Cancer Sci*. 102: 2000-2006, 2011.

(2) 学会発表

(国内)

1. 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延—高

梨理絵子、清水有紀子、石坂幸人: 二段階皮膚癌モデルにおける LINE-1 レトロトランスポジションの機能解析、第 59 回日本実験動物学会総会、大分、2012 年 5 月

2. 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延-高梨理絵子、石坂幸人、切替照雄. LINE-1 レトロトランスポジションに着目した発癌物質予測法の開発. 「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.
3. Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of lone interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. 「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.
4. 奥平准之、後藤元人、岡村匡史、石坂幸人. 内在性レトロトランスポゾンの発がんにおける関与. 第 4 回疾患モデルシンポジウム、東京、11月、2011.
5. Yukihito Ishizaka, Noriyumi Okudaira, Shin-ichi Oka, Tadahi Okamura. Neurocognitive disorder by Vpr-induced retrotransposition of LINE-1. 12th Kumamoto AIDS seminar/ GCOE joint international symposium. Kumamoto, October, 2011.

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 国立国際研究医療センター・部長

研究要旨：加熱食品中に存在する癌原物質である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(以下 PhIP)を昨年度までに作成したヒト L1 遺伝子導入マウス (L1-Tg マウス) に投与し、各種臓器でのレトロトランスポジション誘導(L1-RTP)を解析した。その結果、解析した 16 例全例において、発がん標的臓器である乳腺で L1-RTP を認めた。また、PhIP による L1-RTP は、芳香族炭素化合物受容体とエストロジェン受容体 α に依存した。以上の結果から、L1-RTP が癌化に関与するとともに、L1-Tg マウスが癌原物質作用を検証するための迅速なシステムとして機能する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトゲノムに占める遺伝子は数%に過ぎず、多くは非翻訳領域や繰り返し配列から構成されている。特にヒトゲノムの繰り返し配列である「動き回り得る遺伝子」は全体の約 45%を占め、興味深いことにマウス(39%)やトリ(9%)よりも多い。このような繰り返し配列は、DNA のままゲノム間を動く所謂レトロトランスポゾンと「転写-逆転写-ゲノム挿入」を介してゲノム間を動く内在性レトロエレメントに大別される。本研究で対象とした L1(long interspersed element-1) は内在性レトロエレメントの一つで、ヒトゲノムの約 17%を構成し、一細胞中に約 52 万コピー存在する。L1 の特性として、自律的に増幅できることや、Alu や SVA 等の他の内在性エレメントの動きにも関与する。

前年度までの解析で、二段階皮膚発癌モデルとして知られている DMBA/TPA 投与で形成された皮膚癌に、L1 の動きが活性化されている(L1-RTP: L1 レトロトランスポジション)ことを認めた。そこで、本年度は、加熱食品中に存在する癌原物質であるヘテロサイクリックアミンによる L1-RTP 誘導の有無を検証した。

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 は、米国ペンシルベニア大学 Prak 博士より供与された

pEF06R を使用した。このプラスミド DNA は、全ての L1 遺伝子要素を持ち、5'側に CMV プロモーターが設置されている。また、CMV でドライブされる EGFP cDNA 発現ユニットが逆向きに挿入されている。EGFP cDNA には splicing donor サイトと splicing acceptor サイトを両端に有するイントロンが挿入されている。L1-RTP の初期ステップである mRNA の転写に伴って、このイントロンはスプライシングによって消失する。そのため、このイントロンを挟む形で EGFP cDNA のエキソン内にプライマーを設定し、ゲノム DNA を鋳型として 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からは約 1040 塩基の DNA が増幅し、L1-RTP を経た二次産物では約 140 塩基のバンドが増幅する。このシステムは高感度であり、 10^6 個に数個の L1-RTP 陽性細胞を検出できる。プラスミド DNA には選択マーカーとしてピュロマイシン耐性遺伝子が含まれており、培養細胞に同プラスミド DNA を導入した後、ピュロマイシンで選択後、実験に供した。培養細胞株としては HuH-7(ヒト肝臓癌細胞株)と MCF-7(ヒト乳癌細胞株)を用いた。

(2) hL1-EGFP マウスの開発

pEF06R に含まれる要素のうち、L1 の

5'untranslated region (5'-UTR)から、ポリ A 付加シグナルまでを含む約9 kbのDNA断片を調製し、マウス受精卵に導入した。16 個のファウンダーが得られ、その内の#4 と#67の2つの系統をL1-Tgマウスとして、以後の実験に供した。

(3) 加熱食品中に存在する癌原物質によるL1-RTP

加熱食品中に存在する癌原物質として、2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)と2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)の2種類のヘテロサイクリックアミン(HCA)を用いた。それぞれ活性型であるアセトキシ体の合成はナード研究所に委託した。陰性対照はHCAの溶媒として使用するDMSO(dimethylsulfoxide)を用いた。陽性対照としてBenzo[a]pyrene (B[a]P)及び、3-methylcholanthrene (3-MC)を使用した。非活性型癌原物質とされてきた、非アセトキシ体PhIPも導入し、*in vivo*における作用も解析した。

これまでの発癌実験によって、MeIQxは肝癌や大腸癌、PhIPは乳癌や大腸癌を誘発することが明らかにされてきた。そして、これらの化合物による発癌は、化合物作用によって形成されるDNA付加体が修復される過程で惹起されるゲノム変異によって、誘発される可能性が支持されてきた。しかし、DNA付加体を形成するために必要な化合物の濃度は 10^{-5} M程度であることや、ヒト乳汁中に検出されたPhIPが最大量としてpMレベルであることが提唱され、ヒトが被ばくする低濃度の化合物作用の理解が重要になっている。即ち、pM-nMという濃度で惹起される細胞側変化の把握が重要である。そこで、本課題では、特に低濃度のHCAによるL1-RTP誘導の可能性を明らかにするとともに、その分子機序を解析した。

(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実験であり、その計画書は当センターのバイオセーフティー委員会に審査を依頼し、承認を受けた。また、マウスを用いた動物実験は、全ての実験について機関内の承認を得、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した。そして、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じた。

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した。そして、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じた。

C. 研究結果

(1) 加熱食品中に存在する癌原物質は*in vivo*でもL1-RTPを誘導する

hL1-EGFPマウスにナノモルレベルのMeIQxを3回投与すると肝臓や大腸でL1-RTPが誘導された。また、PhIP投与群では、乳腺や大腸組織でL1-RTP誘導を認めた。特に、PhIPによる乳腺でのL1-RTP誘導は、投与した16頭の雌マウス全例に検出された。また、ピコモルレベルの化合物を週2回、6週間投与した後、同様の解析を行ったところ、ナノモルの化合物投与群と同様、PhIPによる乳腺・大腸でのL1-RTP誘導を認めた。また、非アセトキシ体PhIPの*in vivo*における作用も解析し、アセトキシ体PhIPと同様、L1-RTPを誘導することを認めた。

後述するように培養細胞を用いた実験によって、PhIPによるL1-RTP誘導はエストロゲン受容体 α (ER α)に依存することが判明した。そこで、ER α 阻害剤であるフルベストラントを用いて、*in vivo*でPhIP誘発L1-RTPにおけるER α 依存性の有無を検証した。その結果、同阻害剤の前投与によって、PhIP誘発L1-RTPが抑制されることが分かり、PhIP誘発L1-RTPがER α 依存的事であることが分かった。また、非アセトキシ体PhIPによるL1-RTPもフルベストラントで阻害された。

(2) HCAは芳香族炭素化合物受容体を介してL1-RTPを誘導する

癌原物質によるL1-RTPの誘導機序を明らかにした。その結果、遺伝毒性癌原物質によるL1-RTP誘導は、芳香族炭素化合物受容体(AhR: aryl hydrocarbon receptor)に依存した。一方、トリプトファンを光照射すると形成される6-formylindolo[3,2-b]carbazole(以下FICZ)でもL1-RTPが誘導することを2010年に報告したが、この場合にはAhR非依存的事であった。このように癌原物質と非癌原物質はいずれもL1-RTPを誘導する可能性はあるが、その分子

機序が AhR 依存性において異なっていることが明確になった。

AhR は環境汚染物質の受容体であり、リガンドが結合すると XRE (xenobiotic responsive element) を介して *CYP1A1* 等の遺伝子の発現が誘導される。その際、AhR 自身に核移行能は無く、AhR とヘテロ二量体を形成する分子に依存してクロマチンに移動することが知られている。例えば、ダイオキシンの場合には ARNT1(AhR nuclear translocator 1)の核移行シグナルを介してリガンド結合型 AhR はクロマチンに移動し、XRE を介して遺伝子発現を誘導する。そこで、癌原物質による L1-RTP 誘導の際に AhR と協同的に作用する因子を各遺伝子に対する siRNA を用いて、解析した。その結果、MeIQx と DMBA による L1-RTP 誘導には、ARNT1 が必要であるのに対して、PhIP の場合には ARNT1 に依存しないことが分かった。siRNA や先に述べたフルベストラントを用いた解析の結果、ERα が必須因子として関与した。また、B[a]P や 3-MC は PhIP と同様、AhR・ERα 依存的に L1-RTP を誘導するのに対して、FICZ 誘発 L1-RTP では ARNT1・ERα を必要とした。

以上のように各化合物で誘導される L1-RTP に関与する細胞側因子の組み合わせがそれぞれ異なることが明らかとなった。

(3) HCA 誘発 L1-RTP 誘導における AhR の関与

次に L1-RTP 誘導における AhR の依存性に関して、AhR 遺伝子ノックアウトマウス (AhR^{-/-}マウス) を用いて検証した。AhR^{-/-}マウスは理化学研究所バイオリソースバンクから供与を受けた。hL1-EGFP マウスと交配して作成した L1/AhR^{-/-}マウスを用いて、癌原物質による L1-RTP 誘導の有無を検証した。まず、ナノモルレベルの PhIP 及び MeIQx を 2 日おきに 3 回腹腔内投与した後、大腸、肝臓及び乳腺を中心に L1-RTP 誘導の有無を解析した。その結果、AhR 遺伝子がノックアウトされた状態では L1-RTP は誘導されなかった。また、L1/AhR^{-/-}マウスでも L1-RTP は誘導されなかった。この知見は、HCA 誘発 L1-RTP には両方のアレルに由来する充分量の AhR 蛋白質が必要であり、その作用が gene-dosage の制約を受けていることを示唆する。

L1/AhR^{-/-}マウスにおいて、非特異的に L1-RTP 誘導能が障害を受けている可能性を否定するため、AhR 非依存的に L1-RTP を誘導することをすでに報告している FICZ を用いた *in vivo* 実験を行った。FICZ を L1/AhR^{-/-}マウスに投与したところ、胸腺や脾臓等の免疫組織で L1-RTP が誘導され、その誘導様式は野生型 AhR マウスと同じであった。以上の結果から、L1/AhR^{-/-}マウスでは L1-RTP に関与する AhR 以外の分子は正常に機能していることが分かるとともに、PhIP や MeIQx で誘導される L1-RTP は *in vivo* においても AhR 依存的であることが立証された。

(4) L1-ORF1 は AhR と複合体を形成する

L1 がコードする蛋白質は細胞質に局在し、外来刺激を受けると核内に運搬されることが示唆されている。特に塩基性に富む ORF1 はレトロエレメントと結合し、L1-mRNA をクロマチンに運搬し、レトロトランスポジションが進行する際のシャペロンとして機能することが報告されている。即ち、ORF1 は L1-RTP が誘導される際の初期ステップで主要な役割を担っている。癌原物質による L1-RTP が AhR 依存性を示したことから、AhR と ORF1 の結合性の有無を解析した。ORF1-EGFP キメラ蛋白質を発現するプラスミド DNA を HuH-7 細胞株に導入し、2 日後の細胞抽出液を用いて AhR に対する抗体で免疫沈降後(IP)、EGFP に対する抗体でウェスタン解析(WB 解析)を行った。その結果、pORF1-EGFP 導入群で EGFP が検出された。一方、対照として導入した Flag 付き EGFP 発現プラスミド(pFLAG-EGFP)の場合には結合性は検出されなかった。抗 EGFP 抗体を IP 用に使用した逆の IP-WB 解析実験でも同様に pORF1-EGFP 導入群で、AhR が検出され、pFLAG-EGFP 導入群では検出されなかった。さらに、ORF1 のクロマチンリクルートメントについて解析した。癌原物質投与後、核画分を調製し、micrococcal nuclease 処理によって溶液中に回収される ORF1 の有無を解析した。その結果、ORF1 がクロマチン画分に検出され、その動きは AhR siRNA によって阻害された。

D. 考察

(1) 低濃度の HCA で誘発される L1-RTP の発癌における関与

ヒトが被曝するごく低濃度の PhIP の複数回投与によって、PhIP の標的臓器とされる乳腺で L1-RTP が誘導されることを認めた。即ち、 10^{-12} M レベルの PhIP によって L1-RTP が誘導されることを見出し、低濃度の PhIP でも L1-RTP を介したゲノム不安定性を誘導することが明らかになった。また、PhIP が ER α 依存的に乳腺組織で L1-RTP を誘導することを認めた。

これまでの動物モデルを用いた発癌実験において、PhIP は乳癌や前立腺癌などの腫瘍を発症することが立証され、ヒト発癌におけるリスク要因と考えられている。しかし、疫学研究では必ずしも確固たる相関は認められておらず、ヒトの癌化誘因としての HCA の役割に関する一定の見解はまだ得られていない。今回 hL1-EGFP マウスで PhIP が ER α 依存的に乳腺組織で L1-RTP を誘導した事実は、PhIP 誘発 L1-RTP によって誘導されるゲノム変化を理解することによって、実際のヒト発癌における PhIP の関与を明らかにできる可能性を期待させる。そのための具体的な方法として、例えば ER α 依存的に誘導される乳腺組織分化誘導に関与する遺伝子機能異常の有無を明らかにするアプローチが考えられる。L1 挿入によって重要な遺伝子機能が破壊され、正常の乳腺組織分化が障害されることが発癌の発症起点となる可能性を考えている。この可能性を明らかにするためには、乳腺組織における L1 挿入ゲノム部位と標的遺伝子を同定する事が重要である。今後、乳腺組織由来一次培養細胞を用いて PhIP 作用後の L1 の挿入部位を次世代シーケンサーを用いて解析する一方、実際の乳癌組織由来ゲノム DNA 中の L1 挿入部位を同定する予定である。これらの結果を比較することによって、乳癌発症における標的遺伝子を絞り込むことが可能となり、PhIP のヒト発癌への関与を示唆するデータが得られる可能性が期待される。

(2) 癌原物質による L1-RTP 誘導における芳香族炭素化合物受容体の役割

L1/AhR⁺ マウスを用いて、癌原物質による L1-RTP が AhR 依存的であることを証明し

た。AhR は環境変異原で誘発される発癌における必須因子として機能することが報告されている。これまでの *in vitro* 実験による解析で、MeIQx による L1-RTP ではダイオキシンと同様 AhR・ARNT1 が必要であるのに対して、PhIP による L1-RTP 誘導では AhR 依存的ではあるが ARNT1 非依存的であることが分かった。即ち、L1-RTP は様々な因子によって誘導され、その際に関与する宿主因子は化合物によって異なることが分かった。

これまで L1-RTP はゲノム上で、ランダムに誘導されると考えられてきた。しかし、ORF1 は環境因子によって選別される転写因子と会合するという知見は、環境因子によって誘導される L1-RTP の場合、転写因子によって決定されるゲノム部位に指向性を示しながら L1-RTP が誘導される可能性が考えられる。

また、これまでの解析で、環境因子による L1-RTP には、AhR 等の転写因子に加えて、MAPK の活性化も必要であることが分かるとともに、今回の解析に用いた低濃度の化合物では、ゲノム DNA に対して損傷作用を示さないことも分かっている。即ち、L1-RTP は環境因子のエピジェネティックな作用をゲノム再編という安定的な形質転換を細胞に誘導する新しいタイプのゲノム不安定性誘導機序と捉えることができる。

(3) 今後の方向性

昨年度までの解析で、DMBA/TPA 誘発二段階皮膚発癌においても L1-RTP が高率に関与することを認めた。このシステムでは、DMBA によって Ha-ras 遺伝子に変異が誘導され、その後 TPA を繰り返し塗布することで初めて腫瘍が発症する。TPA による癌化機序を理解するための情報として、Ha-ras の活性化に伴う ATM 依存的な増殖抑制作用が考えられる。即ち、ATM 依存的な細胞シグナルは、増殖に対して負に作用する細胞内ストレスとして作用す。癌化の進展には、このストレスが何らかの機序で解除されることが必要であることが提唱された。

TPA による L1-RTP はゲノム異常を誘発する上述した活性型 Ha-ras による細胞内ストレスの解除に関与している事が想定される。TPA をはじめとする非遺伝毒性癌原物

質は L1-RTP を介して「ATM 依存的な細胞内ストレスの解除」に関与していると考えれば、二段階発癌における TPA 作用や TPA 以外の腫瘍プロモーター作用を良く理解できる。

一方、HCA による発癌においても、L1-RTP によるゲノム異常誘発の関与が考えられる。このように L1-RTP によるゲノム異常は、複数の分子機序が考えられるが、発癌における L1-RTP の役割を理解するためには、体内での L1 の動きを遮断した前後での発癌の有無を明らかにすることが必須である。これまでの試みで、マウス L1 に由来する DNA 断片で、L1 自身の動きを阻害するようなドミナントネガティブ因子 (L1-DN) を同定した。この L1-DN 断片を例えば、mouse mammary tumor virus プロモーターや villin 遺伝子プロモーターを用いて乳腺や大腸組織で発現させ、PhIP による発癌作用を比較することで、L1-RTP の発癌における役割が明らかにできると考えられる。

E. 結論

低濃度の癌原物質に反応して、標的臓器選択的に L1-RTP が誘導されることを認めた。特に、これまで DNA 損傷作用を示さないと言われてきた低濃度の化合物が L1-RTP を誘導した。この知見は、L1-RTP を介したゲノム不安定性が、癌化機序理解のための新たな「切り口」となる可能性を示唆する。そして、このような情報を素早く入手できる hL1-EGFP マウスは今後、様々な病態解析に応用できるものと期待される。

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. Ishizaka Y, Okudaira N, Tamura M, Iijima K, Shimura M, Goto M and Okamura T. Modes of retrotransposition of long interspersed element-1 by environmental factors. *Frontiers in Microbiology*. in press.
3. Ishizaka Y, Okudaira N, Okamura T. Regulation of retrotransposition of long interspersed element-1 by mitogen-activated protein kinases. *Protein Kinases / Book 1*,

2012 pp

3. Okudaira N, Goto M, Abe Y, Tamura M, An Y, Kano S, Ishizaka Y, Okamura T. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. *Cancer Sci*. 102: 2000-2006, 2011.

(2) 学会発表

(国内)

- 1) 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延-高梨理絵子、石坂幸人、切替照雄. LINE-1 レトロトランスポジションに着目した発癌物質予測法の開発. 「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.
- 2) Okudaira N, Abe Y, Tamura M, Kawada H, Okamura T, Ishizaka Y. Involvement of retrotransposition of lone interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis. 「個体レベルの癌研究の魅力」文科省研究費新学術領域「がん研究等の特質を踏まえた支援活動」、大津市、2月、2011.
- 3) 奥平准之、後藤元人、岡村匡史、石坂幸人. 内在性レトロトランスポジンの発がんにおける関与. 第4回疾患モデルシンポジウム、東京、11月、2011.
- 4) Yukihito Ishizaka, Noriyumi Okudaira, Shin-ichi Oka, Tadahiko Okamura. Neurocognitive disorder by Vpr-induced retrotransposition of LINE-1. 12th Kumamoto AIDS seminar/ GCOE joint international symposium. Kumamoto, October, 2011.
- 5) 奥平准之、石坂幸人. 芳香族炭素化合物受容体を介した L1 レトロトランスポジションは発がん物質によって異なるシグナル伝達系を用いる. 第70回日本癌学会、名古屋10月、2011.
- 6) 石坂幸人、奥平准之、落合雅子、中釜斉. 加熱食品中に含まれる発がん物質は LINE-1 レトロトランスポジションを誘導する. 第70回日本癌学会、名古屋10月、2011.
- 7) 小山貴芳、飯島健太、種市大喜、高品智記、石坂幸人. HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr の陰と陽. 第13回白馬シンポジ

ウム、札幌、5月、2011.

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・研究リーダー

研究要旨：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、ヒト LINE-1 を導入した hL1-EGFP マウスを、生体および凍結胚として、2 研究機関に供給することができ、新たな発がん物質評価系モデルマウスの資源化、安定保存を引き続き行うとともに、迅速で確実な供給体制が整備され、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、国立国際医療研究センターでは、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、国立国際医療研究センター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。21 年度はヒト LINE-1 を導入した hL1-EGFP マウスを、22 年度はマウス LINE-1 を導入した mL1-EGFP マウスを資源化しており、今年度（23 年度）は実験動物研究資源バンクから研究者への供給を行った。

B. 研究方法

新規発がん物質評価系マウスの収集・資源化・供給

昨年度までにヒト LINE-1 を導入した hL1-EGFP マウス 16 系統と、マウス LINE-1

を導入した mL1-EGFP マウス 14 系統について、国立国際医療研究センターにて R18S3 を用いて作製された凍結精子を、医薬基盤研究所に輸送し、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、体外受精により 2 細胞期胚を作製し、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し、資源化した。さらに、得られた産仔が雄の場合は精子凍結を行うとともに、実験動物研究資源バンクのホームページに公開した。今年度は、資源の品質管理と資源化を進めるとともに、提供依頼のあった 2 研究機関に、生体または凍結胚にて hL1-EGFP マウスを供給した。

（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・供給

1 研究機関からは HL1-EGFP#67 の生体での供給依頼があり、凍結 2 細胞期胚 43 個を融解し、生存胚 41 個 (95.3%) を偽妊娠雌に移植し産仔 7 匹 (17.1%) が得られ、供給した。他の 1 研究機関からは、hL1-EGFP#4 と L1-EGFP#67 の凍結胚での供給依頼があり、各 50 個をドライシッパーにて輸送・提供した。提供先研究機関で凍結胚の融解・移植を行った結果、正常胚率 98% であり、産仔が得られている。また、L1-EGFP#67 については、2 件の提供を行ったため、保存資源を増やす必要があり、体外受精により、2 細胞期胚約

200 個を凍結保存し資源化するとともに、一部融解し生存性を確認し品質管理を行った。

D. 考察

今年度は、国立国際医療研究センターで開発した発がん物質評価系モデルマウス L1-EGFP 2 系統を 2 研究機関に供給することが出来た。生体での供給 1 件については、やや産仔数が少ない傾向があったが、融解後の胚の状態は非常に良く、凍結融解技術には問題がないと思われ、偽妊娠マウスの状態がやや悪かったことが考えられた。凍結胚での供給 2 件については、供給先の胚操作技術にも依存するが、融解後の胚の生存性は非常に高く、全く問題なく目的のマウスが得られている。従って、凍結精子、凍結胚、体外受精、胚移植などの一連の発生工学技術を応用することで、一部改善の余地があるものの、効率良く実験動物研究資源バンクを運営することが出来、発がん物質評価系モデルマウスを安全に保存し、迅速・確実にモデルマウスを提供することが実証できた。基盤研実験動物研究資源バンクとして、これらのマウスを今後とも責任を持って安全に保存し、安定して供給できる体制を整備し、医薬品開発のインフラとして、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、ヒト LINE-1 を導入した L1-EGFP マウスを、生体および凍結胚として、2 研究機関に供給ことができ、新たな発がん物質評価系モデルマウスの資源化、安定保存を引き続き行くとともに、迅速で確実な供給体制が整備され、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. Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone h3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* Oct;7(10):e1002279, 2011.
2. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 87(8):550-62, 2011.
3. Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem.* 118(3):399-406, 2011.
4. Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguisson RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. *Hum Mutat.* 32(7):843-52, 2011.
5. 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.* 60(2):193-6, 2011.

(2) 学会発表

1. 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 -」第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13-16日
2. 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田 潤一郎「拡張型心筋症の動物モデル2種（マウスとハムスター）における心臓カルシニューリンの発現比較」第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13-16日
3. 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田 潤一郎「雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響」第104回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011年9月15-17日
4. 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田 潤一郎「シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加」第58回日本実験動物学会総会、東京、2011年5月25-27日

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