

201110003B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 岡村匡史

平成24年（2012）3月

## 目 次

|  |     |
|--|-----|
| I. 総合研究報告書                                 |     |
| 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. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 1 1 |

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。本研究において、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、EGFPの発現を指標に、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(hL1-EGFPマウス)を樹立した。

DMPA/TPAによる二段階皮膚癌モデルを用いて、癌化におけるLINE1レトロポジション(L1-RTP)の関与を解析した結果、86.7%の腫瘍でL1-RTPが検出された。遺伝毒性発癌物質であるDMBAのL1-RTP誘導は一過性であり、非遺伝毒性発癌物質であるTPAが繰り返し塗布されることで、恒常的にL1-RTPが誘導された。すなわち、TPAによりL1が、ゲノム内のDSBシグナル解除遺伝子へ挿入されることで、細胞のトランスクリプトームが変化し、その結果DSBシグナルが解除され、癌化すると考えられた。

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ヘテロサイクリックアミン(HCA)であるMeIQxおよびPhIPのL1-RTP誘導能を解析した。ヒトが暴露するごく低濃度のHCAの複数回投与によって、HCAの標的臓器でL1-RTPが検出された。このことから、MeIQxおよびPhIP共に、低濃度でもL1-RTPを介したゲノム不安定性を誘導し、癌化を促進する可能性があり、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事が示された。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システムにより活性化型ヒトHras<sup>G12V</sup>が誘導されるトランスジェニックラットの腭管および気管に、Creリコンビナーゼ発現アデノウイルスを接種し、マウスでは誘発困難な腭管癌および扁平上皮癌モデルを樹立した。hL1-neoラットは、L1-RTPが誘導されるとNeo<sup>R</sup>遺伝子を発現するため、薬剤によりL1-RTPを誘導した細胞を濃縮することが可能である。

これらのモデル動物を用いて、L1-RTP誘導と癌化との直接的な関連性が明らかとなれば、L1-RTPによるゲノムの不安定性誘導を遮断し、癌の進展及び悪性を予防するという、既存の抗癌剤とは全く異なるコンセプトに基づいた抗がん剤開発も期待される。

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。

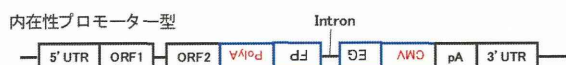
本研究では“ゲノムの不安定化を誘発するLINE-1レトロトランスポジション (L1-RTP) の発がん過程におけるプロモーション効果”に着目した、新たな発想に基づく発がん物質予測法を開発する。すなわち、生体内でEGFPの発現を指標にL1-RTPをモニターできるマウス (hL1-RGFP) を開発し、二段階皮膚癌モデルを用いて、発癌過程におけるL1-RTPの関与を明らかにする。さらに、加熱食品中に含まれる癌原物質であるヘテロサイクリックアミンであるPhIPおよびMeIQxのL1-RTP誘導能を評価し、hL1-RGFPマウスが新規発癌物質の評価系として、有用かを明らかにする。

また、マウスでは誘発することが困難な膀胱癌および肺癌モデルを樹立し、これらの腫瘍においてもL1-RTPの機能が解析できるモデルラット (hL1-neoラット) を作製する。

## B. 研究方法

### (1) 内在性プロモーター型トランスジェニックマウスの樹立とその資源化(岡村、松田)

L1の内在性プロモーターである5'UTRの下流にORF1及びORF2、その下流にリポーター遺伝子であるEGFP cDNA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(下図)。

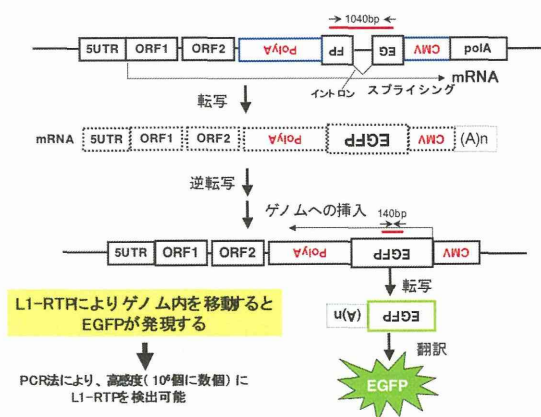


この導入遺伝子を、BDF1マウスから採取した前核期胚の雄性前核に注入し、定法に従ってトランスジェニックマウスを作製した。系統化した雄マウスの凍結精子をドライシッパーにより医薬基盤研究所に輸送し、基

盤研実験動物研究資源バンクにおける定法に従い、精子の運動性を評価した。さらに、体外受精により受精卵を作製し、2細胞期胚をガラス化凍結保存した。これらのマウスを実験動物研究資源バンクのホームページに公開し、提供依頼に応じて供給した。

### (2) PCR法によるL1-RTPの検出(石坂)

L1-RTPをモニターするためのEGFPは、イントロンが挿入されている。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、導入遺伝子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(下図)。



### (3) 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。

#### (4) 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<sup>R</sup>) 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。

#### (5) ヒト膀胱がんモデルラットの樹立 (津田)

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを、Hras250 トランスジェニックラットの総胆管から膀胱管内に注入 (4x10<sup>9</sup> ifu/ml, 150 μl) することによって膀胱がんを発生させた (下図)。

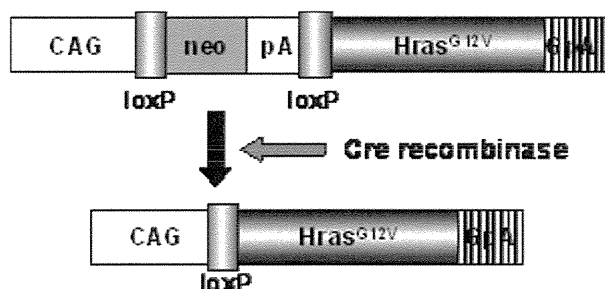


図 Hras250 ラットの導入遺伝子

#### (4) 肺の扁平上皮がんモデルラットの樹立 (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 (上図)。

#### (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) 二段階皮膚癌モデルによる L1-RTP の関与

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 (石坂、岡村、文献 3)。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。培養細胞を用いた実験で、DMBA 及び TPA はいずれも L1-RTP を誘導することが明らかになった。しかし、hL1-EGFP マウスを用いた実験で、DMBA の L1-RTP 誘導は一過性であり、L1-RTP は繰り返し塗布される TPA によって誘導された。次に TPA による L1-RTP 誘導機序を解析した。

TPA の腫瘍プロモーター作用には MAPK (mitogen-activated protein kinase) の一つである ERK (extracellular signal-regulated kinase) や EGFR (epidermal growth factor receptor) が必要であることが報告されている。そこで、これらの阻害剤を用いて TPA 誘発 L1-RTP の変化の有無を検証したところ、いずれの化合物でも阻害されることが分かった (石坂、岡村、文献 2)。一方、DMBA による L1-RTP は、3 種類の MAPK 阻害剤 (ERK、p38 及び JNK) のいずれでも阻害されず、EGFR も関与していなかった。

これらの結果から、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、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。

### (2) ヘテロサイクリックアミンによる L1-RTP 誘導評価

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  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) が必須因子として関与していた。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 (FICZ) は、L1-RTP が誘導するが AhR 非依存的であった (石坂、文献 5)。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 (石坂、岡村、文献 1)。

次に、癌原物質による L1-RTP が AhR 依存的であることから、AhR と ORF1 との直接的な関連性を調べた。培養細胞を用いて、AhR と ORF1 の結合性の有無を解析した結果、L1-ORF1 は AhR と複合体を形成しており、その複合体は細胞の核分画から検出された。複合体の核分画への移行は、AhR の発現をノックダウンすると阻害された。

### (3) 新規発がん物質評価系マウスの資源化・供給

hL1-EGFP 16 系統と mL1-EGFP 14 系統について、それぞれ 5 系統、および 8 系統について、凍結精子を融解し、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。これらの凍結胚・凍結精子を大型液体窒素保管容器中に安全に保存し、新規発がん物質評価系モデルマウスとして全 30 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 (<http://animal.nibio.go.jp/index.html.ja>)。さらに、提供依頼のあった hL1-EGFP マウスを、生体および凍結胚として、2 研究機関に供給した (松田)。

### (4) 肺癌および膵癌における L1-RTP 解析モデルラットの樹立

マウスでは誘発困難な肺癌および膵癌モデルにおいて、L1-RTP の機能解析が可能なモデルラット (L1-Neo<sup>R</sup> ラット) を作製した。薬剤で選択可能なネオマイシン遺伝子の発現を指標に L1-RTP の動きをモニターできる導入遺伝子を構築し、定法に従い SD ラット受精卵雄性前核に注入した結果、4 匹 (8.4%) に導入遺伝子が確認された。さらに、3 系統で導入遺伝子の次世代への伝達を確認された (岡村)。

膵がんは 5 年生存率が 5% 以下という極めて予後不良な悪性がんであり、現在、膵がんに対する予防・診断・治療のいずれに関しても効果的な方法はない。これまで、化学発がんではマウスおよびラットに膵管がんを発生させるのは困難であったが、Cre リコンビナーゼによりヒト活性化型 Hras<sup>G12V</sup> が発現するトランスジェニックラット (Hras250 ラット) 膵管に Cre 発現アデノウイルスを注入する事により、2-4 週間で膵管がんを誘導できた (津田、文献 4)。このモデルにおいて膵病変はいずれも膵管の形質をもち、腺房の形質は全く示さなかった。発生したがんは管状・乳頭状腺がんであり、腺房細胞には増殖像は全くみられなかった。病理学的にヒト膵管がんは膵管内の異型上皮が段階的に膵がんへと発展していくことが示唆されている事から、膵管がんは膵管上皮に由来すると考えられている。ラット膵管がんモデルにおいては、膵管に由来するヒトに類似した膵管がんが発生することから、ヒト膵管モデルとして有用であると考えられる (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結果、Hras250 ラットでは 3-6 週後に肺に多数の結節がみられた。

病理組織学的検査により、Hras250 ラットでは、2 週後より小型の増殖性病変が肺全体に散発性にみられ、3 週後より大型の結節性病変がみられた。これら結節性の病変は腺がん、または扁平上皮癌および腺扁平上皮癌であった。肺癌モデルラットの肺組織における Erc/Mesothelin の遺伝子発現を RT-PCR 法により検討した結果、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、血清診断マーカーとして、利用可能であることが示された (津田)。

hL1-neo ラットは、レポーター遺伝子を Neo<sup>R</sup> 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。

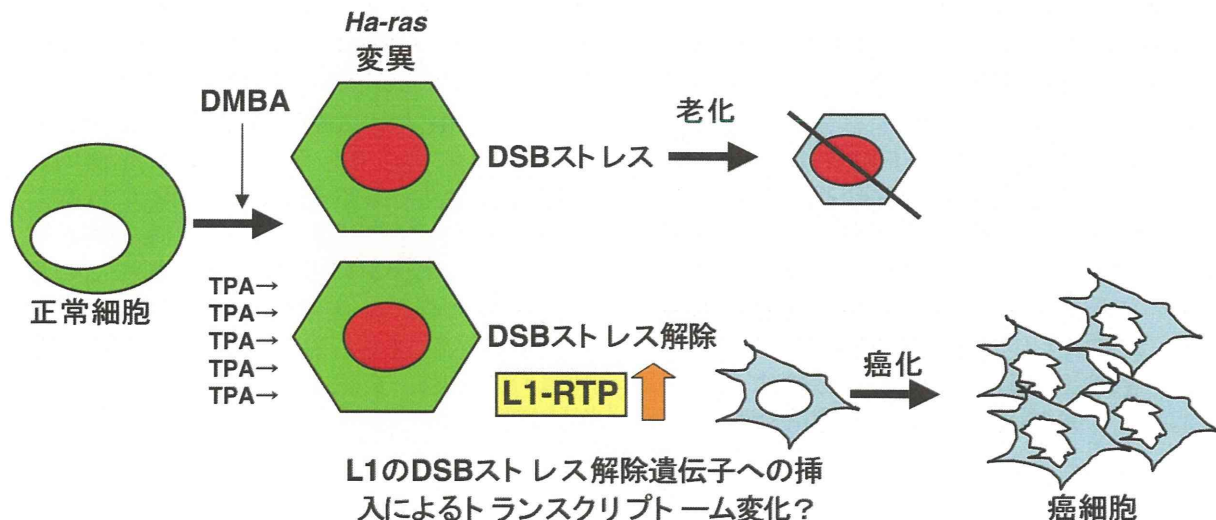
#### D. 考察

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。

#### (1) DMBA/TPA 皮膚二段階発癌における TPA 誘発 L1-RTP の役割

癌化初期に DNA 損傷(以下 DSB:DNA double-strand breaks)シグナルが誘導されること、またこのストレス解除が癌化進行の律速ステップとして機能していることが提唱されている。DSB ストレスは DNA 損傷シグナル伝達において重要な役割を担う ATM (Ataxia telangiectasia mutated)によって惹起され、同シグナルが持続的に作用すると細胞は「老化」し、増殖は遮断される。癌化の進行にはこの DSB ストレスの解除による細胞増殖の再開が必要であり、その結果さらなる遺伝子変異が惹起され、癌の形質が固定化されるものと考えられる。即ち、このステップは癌化過程の律速となることが想像され、DSB 誘発ストレスの解除に関与する分子機序を明らかにすることが癌化の理解には必須であると考えられる。本研究により、DMBA の L1-RTP 誘導は一過性であり、繰り返し塗布される TPA によって L1-RTP が持続的に誘導される事が明らかとなった。以下に、本研究で明らかとなった二段階発癌モデルにおける発癌仮説を示す (下図、文献3)。遺伝毒性発癌物質である DMBA が Ha-ras の活性化 (コドン 61 の A から T への変異) を引き起こし、細胞の異





常増殖シグナルを惹起する。活性化 Ras の発現等による異常増殖シグナルが持続すると、ATM 依存的な DSB シグナルにより、細胞は増殖を停止し「老化」(Senescence)する。一方、TPA の反復塗布により恒常的に L1-RTP が誘導された細胞では、L1 の DSB シグナル解除遺伝子への挿入によるトランスクリプトーム変化を引き起こし、その結果 DSB シグナルが解除され、癌化すると考えられる。2006 年に独立した 2 つの研究グループから、癌化のごく初期に DSB ストレスシグナルが惹起され、癌化の進行にはこのストレスシグナルの解除が必要であることが報告されており、DSB シグナル解除を引き起こす原因の 1 つとして L1-RTP の関与が考えられた。

## (2) 低濃度の HCA で誘発される L1-RTP の発癌における関与

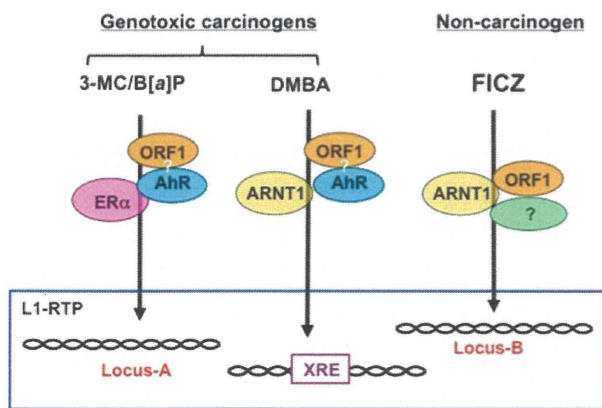
本研究で、ヒトが被曝するごく低濃度の PhIP の複数回投与によって、PhIP の標的臓器とされる乳腺で L1-RTP が誘導されることが明らかとなった。即ち、 $10^{-12}$  M レベルの PhIP によって L1-RTP が誘導されることを見出し、低濃度の PhIP でも L1-RTP を介したゲノム不安定性を誘導することが明らかになった。これまでの動物モデルを用いた発癌実験において、PhIP は乳癌や前立腺癌などの腫瘍を発症することが立証され、ヒト発癌におけるリスク要因と考えられている。しかし、疫学研究では必ずしも確固たる相関は認められておらず、ヒトの癌化誘因としての HCA の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  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 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、ER $\alpha$  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 (文献 5)。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。

## (3) 今後の展開

現在、L1 はランダムにゲノム内に挿入されると考えられている。しかしながら、ダイオキシシン、DMBA および MeIQx は AhR および ANT1 依存的に L1-RTP を誘導するのに対し、PhIP は、ANT1 非依存的で AhR および ER $\alpha$  依存的である。さらに、生体内の生理活性物質である FICZ は AhR に依存しない。また、AhR は L1-ORF1 と複合体を形成し、クロマチンにリクルートされていることを考えると、化学物質により特異的なゲノム挿入部位が存在するという仮説も成り立つ (下図、文献 1)。



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。

#### E. 結論

本課題で樹立した hL1-EGFP マウスは、バックグラウンドが低く、体細胞に対する環境因子作用を鋭敏に把握できる優れたシステムである。このマウスは、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。DNA

損傷作用を示さないとされてきた低濃度のヘテロサイクリックアミン投与で、L1-RTP の誘導が検出できることから、本システムは、発癌物質の標的臓器を迅速に把握するための有力なツールであると考えられる。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、hL1-neo ラットは、マウスでは困難であった発癌モデルが開発されているラットにおいて、L1-RTP の関与を解析できるツールである。特に、本研究で開発した膵臓癌および肺癌モデルを用いれば、組織特異的な癌関連遺伝子の同定も期待される。hL1-EGFP は、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。

今後は、L1-RTP 誘導と癌化との関連を直接的に証明する必要がある。すでに、L1 自身の動きを阻害するドミナントネガティブ因子(L1-DN)を同定しており、生体内における L1-RTP を遮断したときの腫瘍発生頻度を検証する。hL1-EGFP マウスおよび hL1-neo ラットは、L1-RTP の発がん機序を解明するための、非常に有用なツールである。L1-RTP 誘導と癌化との関連性が明らかとなれば、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既存の抗癌剤とは全く異なるコンセプトに基づいた、抗がん剤開発も期待される。

#### 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. 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.
2. 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.
  4. Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, Tsuda H. Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci*, 101: 341-346, 2010.
  5. 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) 学会発表  
(国内)
1. 岡村匡史、奥平准之、後藤元人、矢延一高梨理絵子、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、矢延一高梨理絵子、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ソ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. 12<sup>th</sup> 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
  10. 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.
  11. 岡村匡史、奥平准之、矢延一高梨理絵子、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
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
15. Okudaira N, Minemoto Y, Hoshino S, Koyama T, Nakagama H, Ochiai M, Ishizaka Y. LINE-1 retrotransposition by aryl hydrocarbon receptor and MAP kinase activated by food-borne carcinogens. 日本癌学会、横浜、2009年10月.
  16. Okudaira N, Ishizaka Y. Aryl hydrocarbon receptor mediates L1 retrotransposition by food-borne carcinogens and an environmental pollutant. 日本癌学会、横浜、2009年12月.
  17. 田中創始, 大嶋浩, 深町勝巳, アレキサンダー・デビッド, ニロ充, 城卓志, 津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68回日本癌学会総会、横浜、2009年10月.
  18. 増井 徹、高橋一朗、亀岡洋祐、松田潤一郎、古江(楠田)美保、川原信夫、保富康宏、吉田東歩、厚生労働省: 創薬・医学研究用リソースとネットワーク拠点整備、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日-12日、横浜

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名   | 論文タイトル名   | 書籍全体の編集者名 | 書籍名             | 出版社名   | 出版地   | 出版年      | ページ |
|--|---|-----------|-----------------|--------|-------|----------|-----|
| <u>Ishizaka Y</u> ,<br><u>Okudaira N</u> ,<br><u>Okamura T</u> . | Regulation of retrotransposition of long interspersed element-1 by mitogen-activated protein kinases. | -         | Protein kinases | InTech | クロアチア | in press |     |

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                          | 巻号       | ページ         | 出版年  |
|---|--|-------------------------------|----------|-------------|------|
| <u>Ishizaka Y</u> ,<br><u>Okudaira N</u> ,<br><u>Tamura M</u> ,<br><u>Iijima K</u> ,<br><u>Shimura M</u> ,<br><u>Goto M</u> ,<br><u>Okamura T</u> .   | Modes of retrotransposition of long interspersed element-1 by environmental factors.   | Frontiers in Microbiology     | in press |             |      |
| <u>Okudaira N</u> ,<br><u>Goto M</u> , <u>Abe Y</u> ,<br><u>Tamura M</u> ,<br><u>An Y</u> , <u>Kano S</u> ,<br><u>Ishizaka Y</u> ,<br><u>Okamura T</u> .  | Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis.                             | Cancer Sci.                   | 102      | 2000-2006   | 2011 |
| <u>Tanaka H</u> ,<br><u>Fukamachi K</u> ,<br><u>Futakuchi M</u> ,<br><u>Alexander DB</u> ,<br><u>Long N</u> ,<br><u>Tamamushi S</u> ,<br><u>Minami K</u> ,<br><u>Seino S</u> ,<br><u>Ohara H</u> , <u>Joh T</u> ,<br><u>Tsuda H</u> . | Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats.                                | Cancer Sci                    | 101      | 341-346     | 2010 |
| <u>Okudaira N</u> ,<br><u>Iijima K</u> ,<br><u>Koyama T</u> ,<br><u>Minemoto Y</u> ,<br><u>Kano S</u> , <u>Mimori A</u> ,<br><u>Ishizaka Y</u> .  | 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 |

# Regulation of Retrotransposition of Long Interspersed Element-1 by Mitogen-Activated Protein Kinases

Yukihito Ishizaka<sup>1\*</sup>, Noriyuki Okudaira<sup>1</sup> and Tadashi Okamura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Intractable Diseases,  
National Center for Global Health and Medicine,*

<sup>2</sup>*Division of Animal Model, Department of Infections Diseases,  
National Center for Global Health and Medicine  
Japan*

## 1. Introduction

Our genome contains a higher amount of endogenous retroelements (~42 %) than mouse (~37 %) or fruit fly (~3.6 %) (1-3). Long interspersed element-1 (L1) is the most abundant of transposable elements, comprising ~17% of the genome (1-4). L1 is an autonomous endogenous retroelement that has evolved in a single, unbroken lineage for the past 40 million years in primates (5). A single human cell has more than  $5 \times 10^5$  copies of L1 (2,4), and most of them are functionally defective (6). However, 80 to 100 copies of L1 are competent for retrotransposition (L1-RTP) (7), and approximately 10 % of these are highly active for “copy and paste” (7). L1 is actively expressed in embryonal stem cells (8) and L1-RTP is induced in oocytes or early embryonic development (9-11). L1-RTP occurring in germ lines would function an intrinsic factor responsible for allelic variants among individuals (12,13). However, aberrant L1-RTP alternates critical gene structures, leading to the development of inborn errors (14). At the moment, at least 17 genetic diseases have been reported as sporadic cases of inheritable disorders caused by aberrant insertion of L1 (14). On the other hand, recent observations suggest that L1-RTP occurs in somatic cells. Strikingly, it was shown that copy numbers of L1 is increased in human brain tissues (15,16). Aberrant L1 insertions have been detected in *c-myc* gene and the *APC* gene in breast carcinoma and colon carcinoma, respectively (17,18). Moreover recent analysis demonstrated that L1 is frequently mobilized in human lung cancers and pancreatic carcinomas (19,20). These observations indicate that it is important to understand the mode of L1-RTP, but little is known about the cellular factors for the induction of L1-RTP in somatic cells. We herein summarize our current understanding of L1-RTP induction, with an emphasis on mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which are activated by environmental compounds, and we discuss their roles in genome shuffling.

---

\* Corresponding Author

## 2. Biology of L1-RTP

L1, a non-long terminal repeat (non-LTR)-type endogenous retroelement, encodes two proteins: open reading frames 1 and 2 (ORF1 and 2) (3). ORF1 is a cytoplasmic 40 kDa protein that is present within ribonucleoprotein complexes (21-23). ORF1 associates in *cis* with L1-mRNA (24) and functions as a chaperone of L1-mRNA (25). ORF2 is a protein of about 150 kDa with dual activities as reverse transcriptase (RT) (26) and an endonuclease (27). ORF2 recognizes the 5'-TTAAAA hexanucleotide in the genome and induces a nick between 3'-AA and TTTT in the complementary strand (28,29). It has been proposed that the first-strand DNA is synthesized by target site-primed reverse transcription (3,29). ORF1 and 2 complete the entire process of L1-RTP and are competent for the induction of retrotransposition of *Alu*, a non-autonomous retroelements (30, 31).

## 3. Reported triggers of L1-RTP

As to the environmental factors that induce L1-RTP in somatic cells, Farkash *et al.* reported that gamma irradiation at 4.5 Gy induced L1-RTP (32). Independently, Deiniger's group reported that heavy metals of such as mercury, cadmium and nickel also induced L1-RTP (33,34). They also reported that nickel-induced L1-RTP is induced by a post-transcriptional mechanism (34). As to an environmental carcinogen, Stribinskis and Ramos found that benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) induced L1-RTP (35). An extensive analysis revealed that aryl hydrocarbon receptor (AhR), which serves as a receptor for such environmental pollutants as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (36), was required for the B[*a*]P-induced L1-RTP (35). Because TCDD, a non-genotoxic hydrocarbon carcinogen, did not induce L1-RTP, it was proposed that as one of the its mechanisms an AhR-dependent cellular response converts B[*a*]P into an active genotoxic compound, which in turn induces L1-RTP (35). Although the exact modes of L1-RTP are unclear, these studies inspired us to investigate the possibility that various environmental compounds can induce L1-RTP.

## 4. Induction of L1-RTP by an environmental compound and identification of p38 as a pivotal cellular factor

First, we found that 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct, induced L1-RTP (37). FICZ is highly active, and even picomolar concentration of the compound induced L1-RTP. In mammalian cells, six groups of MAPKs, namely extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2, ERK5, JNK, p38, ERK3/4 and ERK7/8, are identified, and are activated by intracellular and extracellular stimuli (38). Among these, cellular signal cascades of ERK1/2, p38 and JNK have been well characterized, because of the availability of inhibitors, including PD98,059, SB202190 and SP600125, respectively. Using these MAPK inhibitors, we found that FICZ-induced L1-RTP was dependent on p38 (37). Interestingly, the compound induced phosphorylation of cyclic-AMP responsive element binding protein (CREB), and the down-regulation of endogenous CREB by short interference RNA (siRNA) attenuated the induction of L1-RTP by FICZ. Moreover, a transfection-back experiment of cDNA that encoded a siRNA-resistant CREB restored the induction of L1-RTP. These data indicate that the induction of L1-RTP by FICZ depended on p38-CREB-dependent signaling. Intriguingly, L1-RTP by FICZ was not dependent on AhR, although FICZ is a candidate physiological ligand of AhR (39). In contrast, L1-RTP by FICZ was dependent on AhR nuclear translocator 1 (ARNT1), a binding partner of AhR (40).

AhR and ARNT1 are members of the basic helix-loop-helix/per-arnt-sim (bHLH/PAS) family, which are transcription factors involved in a variety of biological functions (41). Recently, it was shown that the bHLH/PAS family is functionally linked with environmental adaptation of living organisms (42). When AhR binds environmental compounds, it forms a heterodimer with ARNT1, which is recruited from the cytoplasm to chromatin and recognizes a xenobiotic responsive element (XRE) (36). It has been shown that the chromatin recruitment of ligand-bound AhR depends on the nuclear localization signal of ARNT1 (43), but there are no reports showing that ARNT1 functions as a receptor for environmental compounds. A cellular factor that cooperates with ARNT1 in FICZ-induced L1-RTP has yet to be identified.

### 5. MAPKs required for L1-RTP by FICZ

To explore the involvement of MAPKs in L1-RTP, we extended our experiments to explore whether environmental carcinogens induce L1-RTP. In two-stage chemical carcinogenesis, it has been shown that skin tumors develop by treatment with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) plus 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (44). DMBA functions as an initiator and activates *H-ras* gene, whereas TPA functions as a tumor promoter through non-genotoxic effects (45). However, how TPA induces tumor progression remains to be clarified. We first analyzed whether L1-RTP is involved under skin carcinogenesis. When transgenic mice harboring human L1 as a transgene (hL1-EGFP mouse) were subjected to DMBA/TPA-induced skin carcinogenesis, L1-RTP was frequently observed in the DMBA/TPA-induced skin tumors (46). Interestingly, *in vitro* experiments revealed that both DMBA and TPA were active for the induction of L1-RTP. On the other hand, *in vivo* experiments, in which hL1-EGFP mice were transiently treated with DMBA or TPA suggested that L1-RTP in the skin tumors was attributable to the effects of the repeated treatment with TPA. Notably, we observed that the mode of L1-RTP by DMBA and TPA was different. DMBA-induced L1-RTP was dependent on both AhR and ARNT1, whereas TPA-induced L1-RTP required neither protein. Instead, it depended on ERK1/2 and epidermal growth factor receptor (EGFR). Since Balmain *et al* (44) originally reported on DMBA/TPA-induced two-stage carcinogenesis, a major issue of cancer research is to clarify the mechanism of the TPA-induced tumor promotion. Using genetically-engineered mice, it has been proven that TPA-induced tumor promotion depends on ERK1/2 and EGFR (47,48). Interestingly, TPA-induced L1-RTP was shown to be dependent on these molecules, suggesting that the genome shuffling by L1-RTP is linked with the mode of TPA-dependent tumor promotion.

### 6. MAPKs are involved in the induction of L1-RTP by carcinogens

Given that environmental compounds seemed to induce L1-RTP by involving different cellular proteins, we investigated other carcinogens such as B[*a*]P and 3-methylcholanthrene (3-MC). Consistent with a previous report (35), B[*a*]P induced L1-RTP in an AhR-dependent manner (46). Additionally, 3-MC also induced L1-RTP in an AhR-dependent manner (46). However, we found that the L1-RTP was induced even when siRNA against *ARNT1* was transfected into the cell (Fig. 1b, lanes 9 and 18). The siRNA clearly suppressed the mRNA expression of *CYP1A1* (Fig. 1c, lanes 11 and 12), indicating that the siRNA effectively abrogated the function of endogenous ARNT1 protein. These data support the idea that ARNT1 is dispensable for the induction of L1-RTP by these compounds. Because it has been



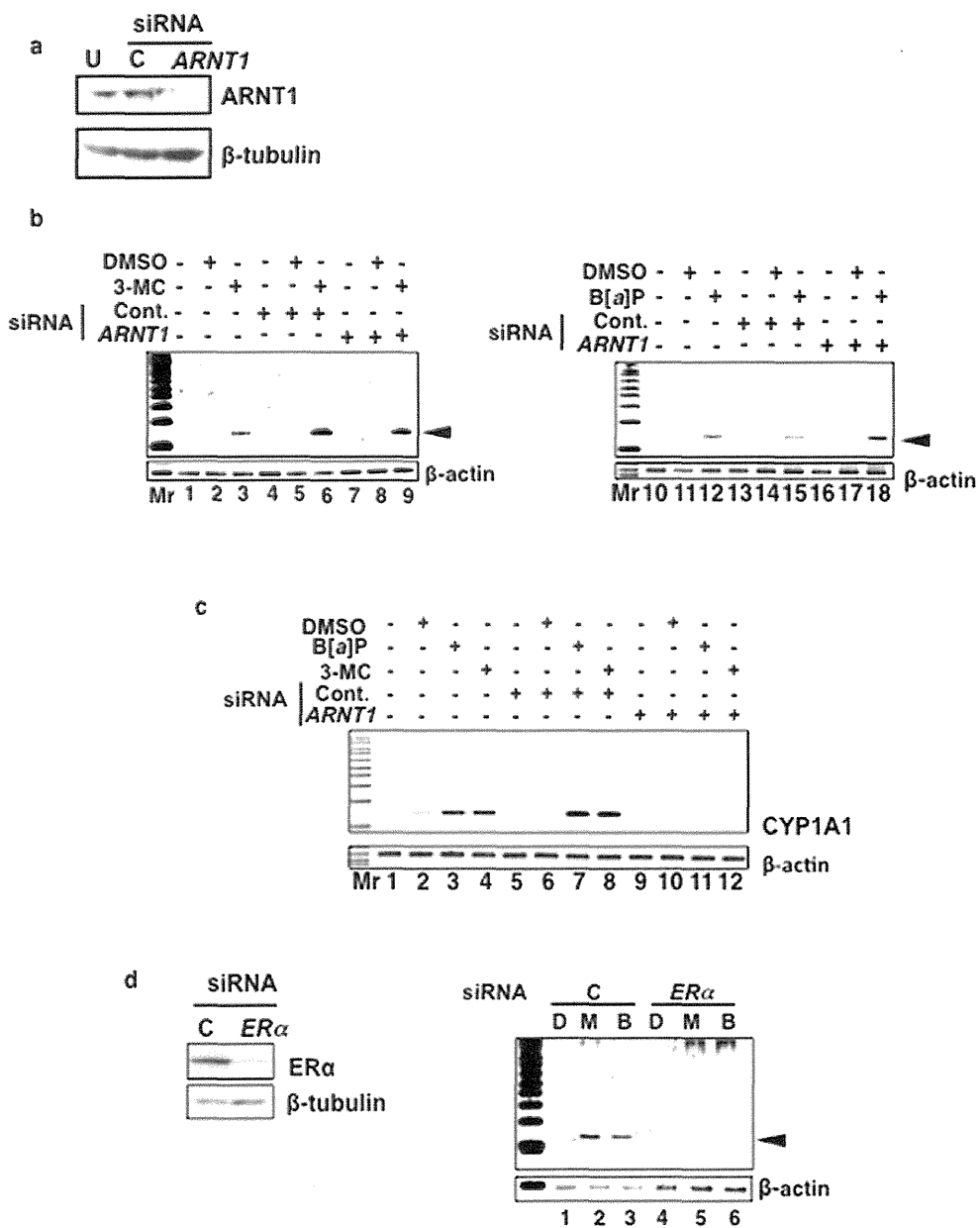


Fig. 1. B[a]P and 3-MC induced L1-RTP depending on AhR and ER $\alpha$ , but not on ARNT1. An L1-RTP assay was performed according to the procedures described (37,46). Briefly, HuH-7 cells from a human hepatoma cell line were transfected with pEF06R on day 0, then treated with 0.5  $\mu$ g/mL puromycin for two days (days 1-3). The cells were then trypsinized and

replated for treatment with the compounds. Two days after the addition of 3  $\mu$ M B[a]P or 1  $\mu$ M 3-MC, the cells were harvested and their DNA extracted. No cytotoxicity was caused by 3  $\mu$ M B[a]P or 1  $\mu$ M 3-MC (data not shown). For the PCR-based assay, a spliced form of *EGFP* cDNA (140 bp in length) was amplified by PCR with primers specific for the separated exons of *EGFP* cDNA. The amplified DNA was then loaded onto an agarose gel and detected after staining with SYBR Green. As an internal control, the same samples were used as templates for the amplification of  $\beta$ -actin. **a.** Effects of *ARNT1* siRNA on the down-regulation of endogenous *ARNT1*. Western blot analysis was performed on day 2 after the transfection of *ARNT1* siRNA. U, untreated; C, control siRNA; *ARNT1*, *ARNT1* siRNA. **b.** L1-RTP caused by B[a]P and 3-MC was independent of *ARNT1*. The PCR-based assay of the effects of *ARNT1* siRNA is shown. HuH-7 cells were transfected with pEF06R on day 0 and then selected from days 1-3. On day 3, the cells were trypsinized, replated, and further transfected with control (Cont.) or *ARNT1* siRNA. On day 4, the cells were again divided into three groups and treated with DMSO, 3-MC (left panel), or B[a]P (right panel). After two days, DNA was extracted and subjected to a PCR-based assay. The arrowhead indicates the PCR-amplified band corresponding to the induction of L1-RTP. **c.** *ARNT1* siRNA effectively blocked the mRNA expression of *CYP1A1*, which was induced by the compounds. HuH-7 cells were first transfected with control or *ARNT1* siRNAs. On day 2 after transfection, the cells were trypsinized, replated, and treated with B[a]P or 3-MC. RT-PCR analysis was performed on day 2 after the addition of the compounds. **d.** *ER $\alpha$*  is required for the induction of L1-RTP by B[a]P or 3-MC. In this experiment, MCF-7 cells from a human breast carcinoma cell line were used. Using a similar experimental protocol, the effect of *ER $\alpha$*  siRNA on the induction of L1-RTP was examined. As an internal control,  $\beta$ -actin was amplified.

| Cellular factors | Inducers |       |      |      |     |
|------------------|----------|-------|------|------|-----|
|                  | FICZ     | B[a]P | 3-MC | DMBA | TPA |
| AhR              | -        | o     | o    | o    | -   |
| ARNT1            | o        | -     | -    | o    | -   |
| ER $\alpha$      | N.T.     | o     | o    | -    | -   |
| SB202190         | o        | o     | o    | -    | -   |
| MAPK             | SP600125 | -     | o    | -    | -   |
|                  | PD98,059 | N.T.  | N.T. | N.T. | o   |

o, dependent; -, independent; N.T., not tested.

The induction of L1-RTP was examined by a PCR-based assay (see legend for Fig. 1).

Table 1. Summary of cellular factors required for L1-RTP by environmental compounds

shown that AhR forms a complex with estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (49), we further tested the involvement of ER $\alpha$  in the induction of L1-RTP. Interestingly, the transfection of *ER $\alpha$*  siRNA attenuated L1-RTP induced by these compounds (Fig. 1d, lanes 5 and 6). In addition, we found that CREB was definitely phosphorylated (Fig. 2a, lane 4), and checked the effects of MAPK inhibitors on the induction of L1-RTP by 3-MC. As shown in Fig. 2b, SB202190 attenuated the induction of L1-RTP (lane 8), whereas SP600125 did not (lane 10). To further

identify a candidate substrate of p38, we examined the effects of *CREB* siRNA. The transfection of *CREB* siRNA abrogated the induction of L1-RTP by 3-MC (Fig. 2c). These data suggest that L1-RTP by 3-MC is induced by the cooperative function of AhR and ER $\alpha$  depending on a signal cascade involving the p38-CREB pathway. Our data also indicate that the induction of L1-RTP by B[a]P is dependent on p38 and JNK (Fig. 2d, lanes 8 and 10).

Although further study is required, our current understanding is that various environmental compounds induce L1-RTP by combinations of the bHLH/PAS family and MAPKs (Table 1). L1-RTP was differentially induced by FICZ, DMBA, B[a]P, 3-MC and TPA. Most of the compounds examined, with the exception of DMBA, depended on MAPKs. Moreover, the L1-RTP by carcinogens depended on AhR, whereas FICZ did not. It is important to collect more information about chemical compounds active in the induction of L1-RTP and to elucidate the involvement of MAPKs.

It has been proposed that L1-RTP is controlled at the transcriptional and post-transcriptional levels. *In vitro* experiments revealed that the expression of L1 is tightly regulated by methylation of CpG in the region of 5'-LTR. In normal somatic cells, the 5'-LTR of L1 is methylated at CpG (50,51), but it is hypomethylated in transformed cells (52). It has been consistently reported that treatment with B[a]P induced the hypomethylation of CpG in HeLa cells (53). Moreover, it was reported that L1-5'UTR has a ubiquitously active antisense promoter that encodes small interfering RNAs, which effectively suppressed the retrotransposition of L1 (54). These observations indicate that epigenetic alternation of the 5'-UTR was proposed as the activation mode of L1-UTR by the compound. However, the following *in vitro* experiments suggested the presence of another regulatory system of L1-RTP. A reporter construct was transfected into cultured cells, and treatment with the compounds increased the frequency of L1-RTP. Because the reporter construct (*e.g.*, pEF06R, which carries *EGFP* cDNA as a reporter gene) contained a potent CMV promoter (32,34), L1-mRNA was strongly expressed when it was transfected into cultured cells. Even under such conditions, remarkable effects on the induction of L1-RTP were detectable by adding inducers such as FICZ, B[a]P, and 3-MC (37,46). Data indicate the presence of an additional regulatory system in which cellular proteins regulate the induction of L1-RTP. One possible mode of regulation is the chromatin recruitment of ORF1.

## 7. The chromatin recruitment of ORF1 is MAPK-dependent

Because it has been postulated that ORF1 is present in the cytoplasm (21-23) and carcinogen-induced L1-RTP was dependent on AhR, it is plausible that ORF1 is functionally associated with the bHLH/PAS family. To prove this, we evaluated the association of ORF1 and AhR by an immunoprecipitation followed by Western blot analysis with a polyclonal antibody to human ORF1. Intriguingly, ORF1 and AhR were associated even under normal conditions (Okudaira N, submitted). More importantly, we detected that recruitment of ORF1 into the chromatin-rich fraction was coupled with L1-RTP. As reported, chromatin recruitment of ORF1 was induced by FICZ in a MAPK-dependent manner. It is interesting that the chromatin recruitment of ORF1 was induced by FICZ, although FICZ-induced L1-RTP was not dependent on AhR (37). Interestingly, ARNT1 was associated with ORF1 when FICZ was added to the culture medium (37). Although the precise role of the MAPK is unclear, these data suggest that the chromatin recruitment of ORF1 is the important regulatory step in L1-RTP, where at least p38 is involved as a crucial cellular factor.

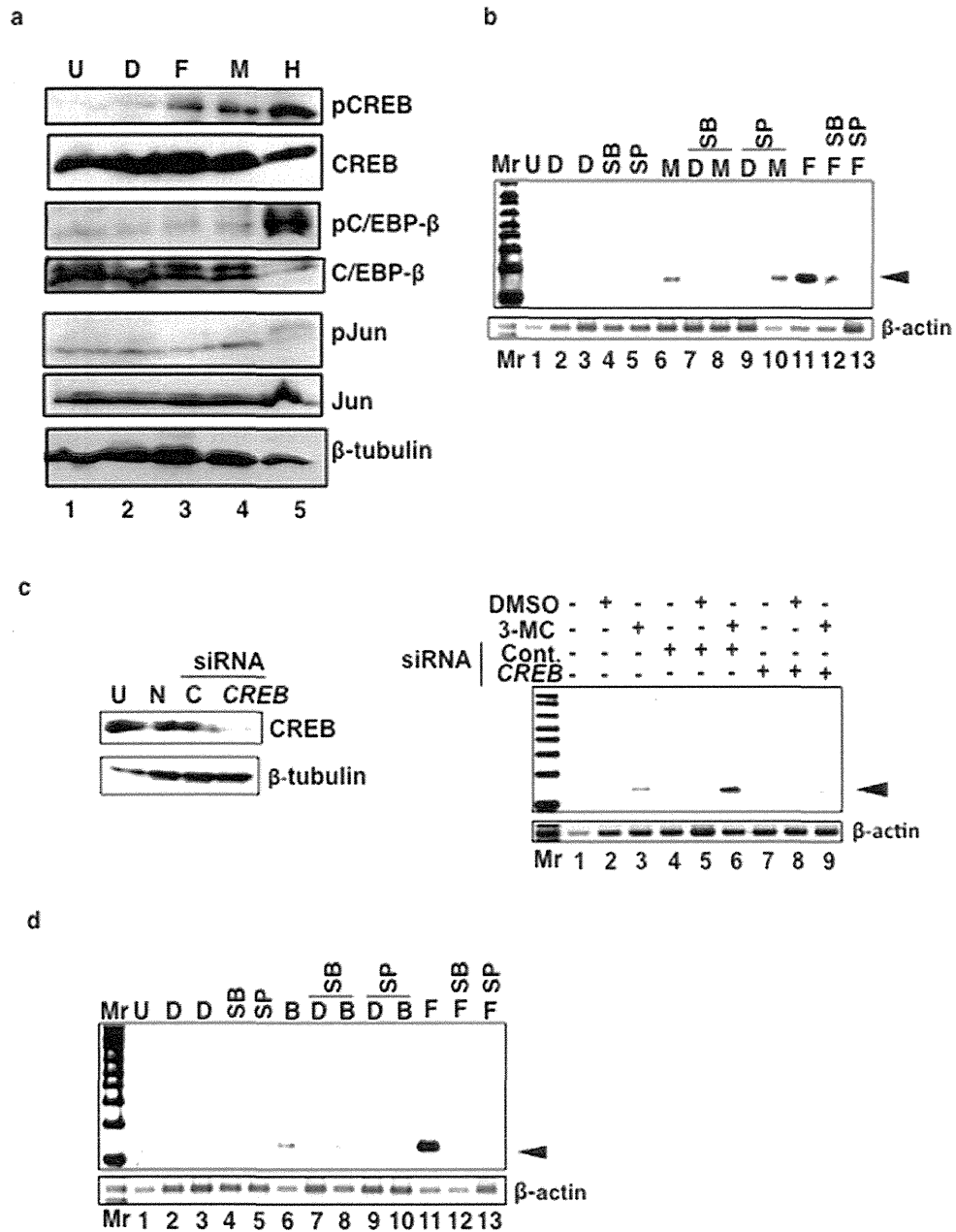


Fig. 2. MAPK is required for the induction of L1-RTP by B[a]P or 3-MC. **a**. Phosphorylation of MAPK substrates induced by 3-MC. HuH-7 cells were analyzed on day 2 after the addition of the compound. U, untreated; D, dimethylsulfoxide (DMSO); F, FICZ; M, 3-MC; H, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **b**. Effects of MAPK inhibitors on L1-RTP induced by 3-MC. SB and SP are