

201204006A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中釜 斉

平成25（2013）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. 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	-----	23
	渡辺徹志		
	3. アリstroキア酸による腎傷害のバイオマーカーに関する研究	-----	27
	鈴木孝昌		
	4. 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	-----	37
	續 輝久		
	5. アジア人の DNA 付加体について	-----	41
	梶村春彦		
	6. 新規変異原・がん原物質の検索	-----	45
	若林敬二		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	51
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	53

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

疾病の中でも主にながんに焦点を当て、アジア地域に特徴的な病因を解明し、罹患率の減少を目指す。そのために、環境中に存在する変異原や発がん物質の、ヒトのがん発生との関連を解明すると共に、新規のがん原性物質を探索する。がん発生の原因や遺伝的素因の同定及びその分子機構も解明し、高危険度群の掌握に基づくより具体的ながん予防策を構築する。これらにより、アジア地域のがん罹患率の減少に有効な対策提案が可能になる。

環境要因のうち外的要因に関しては、日中の胃がん患者の胃粘膜を用いた網羅的 DNA 付加体解析で検出された、酸化損傷由来 DNA 付加体を簡便に検出可能なことを示した。日中で捕集した PM2.5 を含む大気粉塵の解析から、中国での著しい大気汚染及びその汚染が日本の大気環境に影響することが示唆された。内的要因では、糖尿病に関して、*in vitro* モデルで同定したアミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体 (ABAQ) が *in vivo* で欠失変異も誘発し、かつ I 及び II 型糖尿病モデルラット尿中から高値で検出されたので、糖尿病患者の生体内でも生成して変異を誘発する可能性が示された。生活習慣病の原因となる肥満に関して、肥満モデルマウスの肝臓では酸化損傷由来 DNA 付加体が多く検出され、肥満関連発がんへの関与が示唆された。環境要因の候補が同定された場合には、発がんへの影響を解析する必要がある。そのための解析系として、正常上皮由来 3D 培養細胞を用いる *in vitro* 化学発がんモデル、特に、種々のがん抑制遺伝子 shRNA を導入した(遺伝子再構成した)細胞を用いる発がん高感受性モデルを構築中である。まず、腸管細胞で検討しているが、肺でも遺伝子再構成による発がんが可能なことを見出し、肺にもこのモデルを応用可能なことが示された。遺伝的要因としては、DNA 修復因子に着目し、放射線発がんを例として解析した。X 線照射による小腸絨毛領域での細胞死の誘発が DNA 修復因子(*OGG1*)欠損マウスで低頻度だが検出され、放射線による DNA 障害修復での *OGG1* の重要性が示唆された。更に、絨毛上皮のミトコンドリアでは、X 線照射後に酸化 DNA 損傷が顕著に増加していた。疾病のバイオマーカー探索では、中国・台湾で生薬に含まれる場合もあり、腎障害を誘発するアリストロキア酸(AA)を例として解析した。AA 投与マウスの尿プロテオーム解析を行い、AA 処理で発現変化する候補タンパク質を同定し、腎機能の低下や腎毒性との関連が推定される、特異的なバイオマーカー候補が見つかった。

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 齊・(独)国立がん研究センター研究所・所長  
渡辺徹志・京都薬科大学・教授  
鈴木孝昌・国立医薬品食品衛生研究所・室長  
續 輝久・九州大学大学院・教授  
相村春彦・浜松医科大学・教授  
若林敬二・静岡県立大学・教授

#### A. 研究目的

がんを含むヒトの疾病発生には、環境要因と遺伝的要因、更にそれらの相互作用が深く関与している。環境要因としては外的（環境）要因と内的（環境）要因があり、外的要因としては、地域特有の因子に加え、近年の著しい経済成長による環境悪化に伴うもの（大気汚染等）などがある。内的要因としては、自然突然変異によるゲノム変異やゲノム不安定性の誘発に加え、慢性炎症、高脂血症や糖尿病等の影響が最近特に注目されている。非遺伝性の変化等（エピジェネティックな変化等）もヒトの健康に対し多大な損傷を及ぼす。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と考えられる。さらに、アジア人と欧米人では遺伝的背景が異なり、アジア人に特徴的な遺伝的素因がEGFR変異陽性の肺腺がん等の地域特有な疾病の発症に影響することが考えられる。

近年、アジア地域は、著しい経済発展やそれに伴うライフスタイルの変化により、がんや糖尿病を含む生活習慣病が増加している。アジア地域では、がんは主たる死因の一つであり、経済発展や社会の高齢化に伴い今後さらに増加する傾向にある。本研

究では、主としてがんに焦点を当て、その病因を明らかにし、罹患率の減少を目指す。この目標を達成するために、環境中に存在する変異原や発がん物質について、ヒトのがん発生との関連を解明するとともに、新規のがん原性物質を探索する。がん発生の原因や遺伝的素因を同定し、その分子機構を明らかにすることにより、高危険度群の掌握に基づくより具体的ながん予防策の構築が可能となり、アジア地域のがん罹患者の減少に有効な対策提案が可能になる。

加えて、日本以外のアジア地域で顕在化しているがんの病因も、日米両国では環境の違いにより、主たる病因の陰に潜んで顕在化していない可能性がある。本研究により解明されたアジア地域特有な病因に関して、それらを除去することにより、環境要因特異的ながん発生の低減化を日米両国でも実現することが期待される。

#### B. 研究方法

アジア地域に特徴的な環境要因として、主に胃がん、肺がん及び糖尿病患者のがん発生の原因となる環境要因を同定し、疫学研究による検証を行うと共に、候補要因の発がんへの影響を解析する。がん発生には、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おり、遺伝的要因の影響も解析する。候補要因の発がんへの影響が確認されたならば、更に疫学研究での前向き研究を行い検証する。これらの知見から、がん発生に関わるバイオマーカーを開発し、又、アジア人に特徴的な遺伝的素因による高危険度群の掌握に基づくより具体的ながん予防策を構築する。本年度は下記項目について解析した。

環境要因の同定として (1) ~ (3) を行った。

(1) アジア人の DNA 付加体について：

アジア地域、特に中国の胃がん蔓延地(中国安徽省蘆江病院)及び日本(浜松)の胃がんの胃粘膜組織から酸化防止剤存在下で DNA を抽出し、網羅的 DNA 付加体解析 (adductome 解析) を行い、胃がんの変異 spectrum も解析した。特定の付加体しか検出できないが、簡便な付加体検出法として、組織の酵素消化後にイソプロパノールで DNA を抽出し、更に酵素分解した DNA をカラム精製後に LC-MS で解析する方法を、新たに試みた。

(2) 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：

2011年2月から5月にかけて、中国(北京市)、韓国(釜山市)、西日本の日本海側地域3地点(太宰府市、湯梨浜町、射水市)と大都市2地点(大阪市、名古屋市)において、PM<sub>2.5</sub>を含む大気粉塵を捕集し、これら大気粉塵の化学成分(金属類、イオン類、多環芳香族炭化水素(PAHs)等)及び遺伝毒性(変異原性等)を測定した。又、米国海洋大気庁のHYSPLIT Modelを用い、後方流跡線解析により気塊の移動経路を検討した。

(3) 新規変異原・がん原物質の検索：

糖尿病患者における発がんの内的要因に関して、*in vitro* 糖尿病モデル系で同定したアミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体(ABAQ)を候補物質とし、遺伝毒性及び生体内生成を検討した。遺伝毒性は、*gpt delta* マウスを用いる *in vivo* 変異原性試験により、肝臓及び腎臓における点突然変異(*gpt* 変異)及び欠失変異(Spi<sup>-</sup>変異)を解析した。

生体内生成は、野生型(Wistar)、I型

(Wistar, ストレプトゾトシン投与)及びII型糖尿病モデル(GK/Slc)ラットの24時間尿を用いて、LC-MS/MSにより測定した。

肥満においては、活性酸素種(ROS)や脂質過酸化物(LPO)の産生が増大することが知られている。肥満モデルマウス(KK-Ay, 20週令)及び正常マウス(C57BL, 対照群)における、ROS及びLPO由来のDNA付加体を解析した。肝臓よりDNAを抽出し、LC/MS/MSを用いて、ROS及びLPO由来のDNA付加体(8-oxodG, etheno(e)- and heptanonee (He) deoxyribonucleosides)を解析した。

(4) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明：

正常上皮細胞を用いる新規 *in vitro* 発がんモデルの構築を試みた。3次元(3D)培養により長期培養が可能と報告された小腸細胞(Sato et al., Nature, 2009)を用いて、未導入(通常)或いはレンチウイルスによりがん抑制遺伝子 shRNA として、shApc を導入した細胞に、腸管発がん物質 PhIP を暴露させ(単回及び3回投与)、ヌードマウスでの造腫瘍性を解析した。

肺に関しても、3D培養系を構築して、遺伝子再構成による腫瘍形成を検討した。*Kras<sup>LSL-G12D</sup>*マウスから肺組織の3D培養細胞を作成し、Cre recombinase を含むレンチウイルスを導入して *Kras* を活性化した後、がん抑制遺伝子の shRNA 導入による造腫瘍性を検討した。これら腫瘍から培養細胞を樹立し、ヌードマウスへの再移植も行った。

(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：

遺伝的要因として修復因子に着目し、放射線発がん、特に、X線の酸化DNA損傷を介する間接作用による発がんへの影響を解析する。Ogg1[8-oxoguanine(8-oxoG) DNA glycosylase、酸化DNA損傷修復関連遺伝子]欠損及び野生型マウスに、X線(2~10 Gy)を全身照射した。放射線感受性の高い臓器であり、分化段階の異なる細胞種を同時に解析可能な小腸を用いて、DNA損傷・損傷応答等を免疫組織学的に解析した。

(6) アリストロキア酸による腎傷害のバイオマーカーに関する研究:

疾病のバイオマーカー開発の例として、生薬成分に含まれるアリストロキア酸(AA)による腎障害のバイオマーカーを探索した。Human p53 Knock-In(Hupki)マウスにAAを投与し、投与後3, 14, 26, 52週間後に24時間尿を採取した。マウス尿からタンパク質を沈殿で採取し、酵素分解でペプチドとし、LC-MS/MSによるショットガンプロテオミクスの手法により、高感度尿プロテオーム解析を行った。次に、定量比較ソフトウェアを用いたノンラベル定量によるバイオマーカー候補ペプチドの探索を行うと共に、MS/MSデータを用いたデータベース検索によるタンパク質の同定を行った。

(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、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) アジア人のDNA付加体について:

日中の胃がん患者の胃粘膜を用いたadductome解析により検出された、酸化DNA損傷由来のDNA付加体を用いて、判別分析により、がんの発生地域(日中)を区別することが可能であった。そして、胃がんの変異spectrumから、酸化DNA損傷の強い地域では、炎症による脱アミノ化を介した反応と推測されるCpG island内のCG transitionが多く、adductome解析の結果と一致した。これらの付加体はいずれも日本の検体で多く見られ、炎症あるいは脂質代謝関連の付加体は本邦の胃粘膜の方が多いことが示唆された。一方、カラム精製とLC-MS解析による簡便な検出方法でも、酸化DNA損傷由来のDNA付加体の1種であるHedGが、陽性対照とした発がんモデルラットの検体から同定可能であった。

(2) 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:

北京市と釜山市、日本国内5地点で同時期に捕集したPM2.5を含む大気粉塵を解析し、大気の汚染状況を直接比較した。粉塵濃度、及び粉塵中の金属、イオン類の濃度の平均値は、北京>釜山>日本の順に高かった。又、大気粉塵中の総PAHs濃度及び大気粉塵抽出物の変異原性の平均値も、北京において最も高かった。これらについて、北京では、国内5地点における平均値のおよそ10倍程度であった。特に、2月において非常に高い大気粉塵濃度、PAHs濃度及び変異原性がみられ、最大でそれぞれ国内5地点の平均

値の36倍、223倍及び86倍であった。又、後方流跡線解析から、2月から5月中旬にかけて日本の上空の空気塊の多くが中国大陸を經由して日本に流入し、中国における汚染が日本の大気環境に影響することが示唆された。日本でのPM2.5に相当する微小粒子の割合は、大気粉塵重量の約60%であった。現在、大気粉塵の粒子径による変異原性やPAHs濃度の違いについて解析中であり、健康影響についても検討している。

#### (3) 新規変異原・がん原物質の検索：

ABAQの遺伝毒性に関して、肝臓では点突然変異頻度が上昇し、G:C→A:T及びA:T→C:Gの変異が誘発され、欠失変異も有意に上昇した。一方、腎臓では点突然変異、及び欠失変異頻度の上昇は認められなかった。次に、生体内生成に関して、尿中ABAQ量は、I型及びII型糖尿病モデルラットで野生型の約7~20倍の高値を示した。

肥満モデルマウスKK-*Ay*の肝臓における、ROSおよびLPO由来のDNA付加体に関しては、8-oxodG量は、正常マウスに比べKK-*Ay*で約3倍に、また、*edA*、*HedG*、*HedA*、*HedC*量も、2~3倍増加していた。

#### (4) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明：

マウス小腸細胞では、既に遺伝子再構成による発がん(*K-ras*の活性化+*shApc*等)を確認している。*shApc*を導入したマウス小腸3D培養細胞への腸管発がん物質PhIPの暴露により、単回投与及び3回投与のどちらの場合も、ヌードマウス皮下で増殖する細胞の形態に変化が認められた。現在、他のがん抑制遺伝子(*p53*、*Pten*等)の*shRNA*を導入した細胞で検討中である。

肺でも、3D培養系を構築可能であった。

*Kras<sup>LSL-G12D</sup>*マウス由来の肺3D培養細胞は、*Kras*の活性化とそれに続く2種類のがん抑制遺伝子*shRNA*の導入により、ヌードマウス皮下での腺がん形成能を獲得した。肺でも遺伝子再構成による発がんが可能なことを見出した。

#### (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：

X線照射した野生型マウスの小腸では、二本鎖DNA切断(DSB)の指標である $\gamma$ H2AXが陰窩領域及び絨毛領域に線量依存的に生じ、細胞死は陰窩領域でのみ検出された。一本鎖DNA切断(SSB)は、照射直後から陰窩領域及び絨毛領域で劇的に増加した。X線の間接影響で生じる活性酸素種でもSSBを誘発するが、代表的な酸化DNA損傷である8-oxoGは、X線照射後、絨毛上皮細胞のミトコンドリアDNAで顕著に増加した。又、照射に関係なく8-oxoGは陰窩領域に比較して絨毛領域で高かった。DNA中の8-oxoGを除去する*Ogg1*遺伝子のホモ欠損マウスでは、X線照射後に、絨毛領域での細胞死が低頻度ながら検出され、分化細胞におけるOGG1の重要性が示唆された。しかし、*Ogg1*遺伝子欠損マウスは、非照射時から既にDNA損傷が高い傾向にあり、非照射群と照射群の差は野生型の場合と比較して少なかった。

#### (6) アリシトロキア酸による腎傷害のバイオマーカーに関する研究：

AA処理したマウス尿中から約3万のペプチドを検出した。次に、発現変動する候補タンパク質の絞り込みを行い、MS/MSスペクトルを用いたデータベース検索から一部のタンパク質を同定した。同定したタンパク質中、AA処理により発現の上昇したも

のは 22 種であり、Ig kappa chain V-III(KV3AJ)をはじめとする血清由来ペプチドの他、数種のバイオマーカー候補タンパク質を同定した。また、AA 処理により発現の抑制したタンパク質は 5 種同定し、Napsin-A(NASPA)、Kidney androgen-regulated protein (ANRE)などであり、この変化は比較的初期から観察された。

#### D. 考察

##### (1) アジア人の DNA 付加体について：

日中の胃がん患者の胃粘膜を用いた adductome 解析で検出された、酸化 DNA 損傷由来の DNA 付加体を用いて、判別分析からがんの発生地域を区別することが可能であった。そして、酸化 DNA 損傷の強い地域では、胃がんの変異 spectrum において、炎症により誘発される変異が多く、adductome 解析の結果と一致した。これらの付加体は日本の検体に多く、炎症に関連して生成される付加体が日本の胃粘膜に多いことが示された。まだ、未知の付加体が多数 adductome 解析により検出されており、環境要因として推測される物質由来の付加体について探索中である。

特定の付加体に限定すれば、カラム精製と LC-MS 解析を組み合わせた簡便な方法で、酸化 DNA 損傷由来の DNA 付加体の同定及び定量が可能なが示唆された。個々の付加体を簡便な方法で測定可能なシステムを確立し、多数の検体の解析や、付加体の修復・修飾酵素の解析を行う予定である。

暴露指標である DNA 付加体 profile からの環境要因の探索の可能性を示した。同様な手法により、アジアでの新規の環境要因

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できると考えられる。簡便な方法で付加体を測定するシステムを構築できれば、個体レベルでの暴露評価やそれに基づくがん予防も可能となる。

##### (2) 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：

北京における粉塵濃度、粉塵中の総金属、総イオン、総 PAHs の濃度及び粉塵抽出物の変異原性は、国内に比較して非常に高く、特に 2 月に、非常に高い大気粉塵濃度、PAHs 濃度及び変異原性が認められた。今回観測された北京における著しい大気汚染は、中国で発生する汚染物質が日本を含む東アジア地域における大気環境に影響を及ぼす可能性があることを示唆する。2011 年 2 月上旬に中国大陸からの越境汚染による煙霧が日本の多くの地点で観測されており、(環境省発表)、本研究において同期間に国内で認められた粉塵濃度、総 PAHs 濃度及び変異原活性等の高い値は中国からの越境汚染の影響による可能性がある。又、中国における大気汚染が黄砂期以前 (2 月) でも重度である可能性が示唆された。

PM2.5 等の大気粉塵の飛散状況の測定と共に、それらに由来する変異原性や PAH 濃度を解析し、生物影響を明らかにすることは、健康被害の推定及びその予防策の構築に重要である。同様に大気汚染が深刻化しているアジアにその成果を応用して、暴露の低減や、原因物質の軽減などによる呼吸器疾患等の疾病の予防に貢献できる。

##### (3) 新規変異原・がん原物質の検索：

内的要因としての糖尿病に関しては、in



*vitro* 糖尿病モデル系で同定した 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、肝臓において点変異頻度が上昇し、G→A 及び G→T 等の突然変異が誘発され、欠失変異頻度も上昇した。ABAQ の *in vitro*, *in vivo* における遺伝毒性は、変異・がん原性を示す heterocyclic amine 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、その発がん性を検討する。

ABAQ は、I 型及び II 型糖尿病モデルラットの尿で、野生型よりも高値を示し、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示唆された。今後、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 量の解析を行う。

肥満に関しては、がんの発症・促進に関与すること、及び肥満を呈する生体内では、ROS や LPO の産生が増大することが報告されている。肥満モデルマウスの肝臓において ROS および LPO 由来 DNA 付加体量は、正常マウスに比べて増加しており、これらの DNA 付加体の生成が、肥満関連の発がんに関連していることが示唆された。今後、腎臓等の他臓器においても同様の傾向か解析することが重要である。

近年、アジアにおいて糖尿病や肥満は急増しており、糖尿病患者や肥満の人の、がんを含む疾病に対する高リスク要因に関して、糖尿病や肥満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、生体内生成の抑制・がん予防剤の開発等に

よるがん予防策の構築のために重要である。

(4) がんの発生・成立に関わる遺伝的要因の解明：

環境要因の候補の発がんへの影響を検討するために、3D 培養による正常上皮組織由来の培養細胞（正常上皮細胞）を用いる *in vitro* 発がんモデルの構築を試みた。

shApc 導入小腸細胞への PhIP 暴露は、ヌードマウス皮下で増殖する細胞の形態に影響を与えた。がん抑制遺伝子 shRNA を導入した細胞は、発がん高感受性であることが示唆され、現在、他のがん抑制遺伝子 (*p53*, *Pten* 等) の shRNA を導入した細胞に関しても検討中である。化学物質の暴露条件の検討、がん抑制遺伝子 shRNA 導入細胞を用いる発がん高感受性モデルでの解析により、*in vitro* 化学発がんモデルを構築できる可能性が示された。

肺でも 3D 培養による上皮細胞培養が可能であり、*Kras* の活性化と 2 種のがん抑制遺伝子 shRNA の導入により腺がんを形成することを見出し、*in vitro* 化学発がんモデルへの応用が可能なことを示した。他臓器に関しても、3D 培養による上皮細胞培養系の構築を及び遺伝子再構成による発がんを検討している。

*in vitro* 発がんモデルが構築できれば、*in vivo* 発がん性試験に先行するスクリーニングや用量の検討に有用である。このモデルで、新規のアジア地域に特徴的な、環境要因候補の発がんへの影響を解析し、影響が確認された環境要因の除去・低減によるがんの減少を目指す。更に、遺伝的要因に関しても、このモデルは、候補遺伝子の shRNA 導入により発がんへの影響を解析可能であり、アジア人に特徴的な遺伝的素

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。

(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：

野生型マウスの小腸で、X線照射による、直接影響であるDNA障害(DSBやSSB)の誘発、及び間接影響である酸化DNA損傷の絨毛領域の上皮細胞でのミトコンドリアDNAへの顕著な蓄積を確認した。*Ogg1*欠損マウスでは、絨毛領域での細胞死が低頻度ながら検出され、分化後の細胞でのX線照射によるDNA障害の修復での、*OGG1*の重要性が示唆された。

放射線による小腸絨毛領域のミトコンドリアDNAの損傷は、ミトコンドリア機能不全、及び二次的な活性酸素種の漏出による長期的な酸化ストレスを誘発する可能性がある。被曝直後のミトコンドリアの酸化DNA損傷の防止或いは低減によるミトコンドリア機能の保護が、放射線障害の予後の改善や発がん抑制に役立つ可能性がある。

経済成長が著しいアジア地域では、医療等での放射線被曝による間接影響や食生活の欧米化により、酸化DNA損傷が関与する発がんが増大すると考えられる。実際、

(3)においては、肥満モデルマウスの肝臓で、酸化DNA損傷由来付加体の増加を認めている。それ故に、酸化DNA損傷による発がんの抑制に関与する生体機構の解明は重要である。酸化DNA損傷修復関連遺伝子改変マウスを用いた実験系を用いて、放射線誘発発がん並びに放射線治療に伴う腫瘍の周囲の正常組織への障害を軽減する方法の開発にも展開できる可能性がある。

(6) アリストロキア酸による腎傷害のバイオマーカーに関する研究：

AA処理したマウスを用いて、高感度尿プロテオーム解析を行い、AA処理により発現変動する数種の候補タンパク質を同定した。発現が上昇するタンパク質では、主に血清由来であるタンパク質が検出され、腎機能の低下による尿中への移行が推察された。これら血清由来のタンパク質の一部は、既にマーカーとして臨床応用が進んでいる物質もあるが、より変動が大きいタンパク質も見出され、より鋭敏なマーカーとなる可能性がある。発現抑制されるタンパク質として同定されたNASPAとANREは、AAによる腎障害の標的である近位尿細管において正常状態で高発現しており、毒性を反映したものと推測される。またどちらも、早期から変化が見られ、予防的な利用も期待できる。今後は、マウスで得られた知見のヒトでの再現性を検討する予定である。

今回は同定できた一部のペプチドのみを解析したが、大部分の未知のペプチド中にも優れたバイオマーカーがある可能性が有る。今後は、再現性が高い、或いはAA処理に対する発現変動が大きいものを選んで、MS/MS測定等による新規バイオマーカー候補の同定を試みる。

中国・台湾では、依然AAを含む生薬成分が使用されており、又、AAの腎障害の感受性には個人差がある。それ故、腎傷害の予測および患者の予後予測に応用可能なバイオマーカーを開発できれば、中国・台湾での曝露状況の把握と潜在的な腎障害のリスクの予知による疾病予防に応用できる。又、他の環境要因によるがんのバイオマーカー開発にも、これらの手法を応用可能であり、予防法の開発に役立つと考える。

## E. 結論

アジア地域に特徴的な環境要因の同定では、外的要因に関して、日中の胃がん患者の胃粘膜を用いた網羅的 DNA 付加体解析で検出された、酸化損傷由来 DNA 付加体を簡便に検出可能なことを示した。又、日中で捕集した PM2.5 を含む大気粉塵の解析から、中国での著しい大気汚染及びその汚染が日本の大気環境に影響することが示唆された。内的要因では、糖尿病に関して、ABAQ が糖尿病患者の生体内でも生成して変異を誘発する可能性を示し、肥満では、酸化損傷由来 DNA 付加体の肥満関連発がんへの関与が示唆された。同定された環境要因の候補の発がんへの影響を解析する系として、正常上皮由来 3D 培養細胞を用いる *in vitro* 化学発がんモデル、特に種々のがん抑制遺伝子 shRNA を導入した(遺伝子再構成した)細胞を用いる発がん高感受性モデルを構築中である。遺伝的要因としては、DNA 修復因子に着目し、放射線による DNA 障害修復での OGG1 の重要性が示唆された。疾病のバイオマーカー探索では、腎障害を誘発するアリストロキア酸について、投与マウスの尿プロテオーム解析から、腎機能の低下や腎毒性との関連が推定される、特異的なバイオマーカー候補を見出した。

アジア地域に特徴的な環境要因の同定を更に進めて、候補要因の発がんへの影響を *in vitro* 発がんモデルで解析する。又、修復因子等の遺伝的要因との相互作用を解析し、バイオマーカーの開発・アジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の掌握による、より具体的ながん予防策の構築により、がん罹患率の減少を目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okudaira N, Okamura T, Tamura M, Iijma K, Goto M, Matsunaga A, Ochiai M, Nakagama H, Kano S, Fujii-Kuriyama Y, Ishizaka Y. Long interspersed element-1 is differentially regulated by food-borne carcinogens via the aryl hydrocarbon receptor. *Oncogene* (in press)
2. Hosono K, Yamada E, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A. Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in human colorectal adenomas. *World J Gastroenterol* (2012) 18:5360-8.
3. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS One* (2012) 7:e43403.
4. Hori M, Onaya H, Takahashi M, Hiraoka N, Mutoh M, Kosuge T, Nakagama H. Invasive ductal carcinoma developing in pancreas with severe Fatty infiltration.

- Pancreas (2012) 41:1137-1139.
5. Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono K, Yoneda M, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A. Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Dig Endosc* (2012) 24:353-357.
  6. Watanabe M, Kurai J, Igishi T, Yamasaki A, Burioka N, Takeuchi H, Sako T, Touge H, Nakamoto M, Hasegawa Y, Chikumi H, Matsumoto S, Yamasaki C, Minato S, Ueda Y, Horasaki K, Watanabe T, and Shimizu E: Influence of Asian Desert Dust on Lower Respiratory Tract Symptoms in Patients with Asthma over 4 Years. *Yonago Acta medica*. (2012), 55:41-48.
  7. 渡部仁成、倉井 淳、井岸 正、都田裕之、山崎 章、長谷川泰之、山崎千恵、渡辺徹志、清水英治：医師の診療経験調査による黄砂が臨床症状に与える影響についての検討. *鳥取医学雑誌* (2012) 第 40 卷, 62-67.
  8. Hasei T, Nakanishi H, Toda Y, Watanabe T. Development of a two-dimensional high-performance liquid chromatography system coupled with on-line reduction as a new efficient analytical method of 3-nitrobenzanthrone, a potential human carcinogen. *Journal of Chromatography A* (2012), 1253: 52-57.
  9. Wu Y, Qi X, Gong L, Xing G, Chen M, Miao L, Yao J, Suzuki T, Furihata C, Luan Y, Ren J, Identification of BC005512 as a DNA damage responsive murine endogenous retrovirus of GLN family involved in cell growth regulation. *PLoS One*. (2012), 7 : e35010.
  10. Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res*. (2012) , 747 : 164-175.
  11. Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis. *Mutat Res* (2013), 751:73-83.
  12. Lim TH, Fujikane R, Sano S, Sakagami R, Nakatsu Y, Tsuzuki T,

- Sekiguchi, M., and 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.
13. Ella E, Sato N, Nishizawa D, Kageyama S, Yamada H, Kurabe N, Ishino K, Tao H, Tanioka F, Nozawa A, Renyin C, Shinmura K, Ikeda K, Sugimura H. Association between dopamine beta hydroxylase rs5320 polymorphism and smoking behaviour in elderly Japanese. *J Hum Genet* (2012), 57: 385-390.
  14. Kiyose S, Igarashi H, Nagura K, Kamo T, Kawane K, Mori H, Ozawa T, Maeda M, Konno K, Hoshino H, Konno H, Ogura H, Shinmura K, Hattori N, Sugimura H. Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Pathol Int* (2012), 62: 728-734
  15. Kiyose S, Nagura K, Tao H, Igarashi H, Yamada H, Goto M, Maeda M, Kurabe N, Suzuki M, Tsuboi M, Kahyo T, Shinmura K, Hattori N, Sugimura, H. Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int* (2012), 62: 477-484.
  16. Natsume H, Shinmura K, Tao H, Igarashi H, Suzuki M, Nagura K, Goto M, Yamada H, Maeda M, Konno H, Nakamura S, Sugimura H. The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer. *J Transl Med* (2012), 10:97.
  17. Sato N, Sato T, Nozawa A, Sugimura, H. Assessment Scales of Nicotine Addiction. *J Addict Res Ther* (2012), S1:008
  18. Toyoshima M, Chida K, Suda T, Sugimura H, Sato M. Endobronchial metastasis from gastrinoma of the pancreas. *Am J Respir Crit Care Med* (2012), 185: 590-591.
  19. Inaba K, Sakaguchi T, Kurachi K, Mori H, Tao H, Nakamura T, Takehara Y, Baba S, Maekawa M, Sugimura H, and Konno H. Hepatocellular adenoma associated with familial adenomatous polyposis coli. *World J Hepatol* (2013), 4: 322-326.
  20. Matsuda T, Tao H, Goto M, Yamada H, Suzuki M, Wu Y, Xiao N, He Q, Guo W, Cai Z, Kurabe N, Ishino K, Matsushima Y, Shinmura K, Konno H, Maekawa M, Wang Y, Sugimura, H. Lipid Peroxidation-Induced DNA Adducts in Human Gastric Mucosa. *Carcinogenesis* (2013), 71:4628-4639.

21. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T. Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. *J Toxicol Sci* (2013), in press.
22. Ishikawa H, Wakabayashi K, Suzuki S, Mutoh M, Hirata K, Nakamura T, Takeyama I, Kawano A, Gondo N, Abe T, Tokudome S, Goto C, Matsuura N, Sakai T. Preventive effects of low-dose aspirin on colorectal adenoma growth in patients with familial adenomatous polyposis: Double-blind, randomized clinical trial. *Cancer Med* (2013), 2:50-56.
23. 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* (2012), 130:259-266.
24. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology* (2012), published online.
25. Yoshimoto M, Hayakawa T, Mutoh M, Imai T, Tsuda K, Kimura S, Umeda IO, Fujii H, Wakabayashi K. In Vivo SPECT Imaging with <sup>111</sup>In-DOTA-c(RGDfK) to Detect Early Pancreatic Cancer in a Hamster Pancreatic Carcinogenesis Model. *J Nucl Med* (2012), 53:765-771.
26. Ueno T, Imaida K, Yoshimoto M, Hayakawa T, Takahashi M, Imai T, Yanaka A, Tsuta K, Komiya M, Wakabayashi K, Mutoh M. Non-invasive X-ray micro-computed tomography evaluation of indomethacin on urethane-induced lung carcinogenesis in mice. *Anticancer Res* (2012), 32:4773-4780.
27. Saika K, Sobue T, Nakamura M, Oshima A, Wakabayashi K, Hamajima N, Mochizuki Y, Yamaguchi R, Tajima K. Smoking prevalence and beliefs on smoking cessation among members of the Japanese Cancer Association in 2006 and 2010. *Cancer Sci* (2012), 103:1595-1599.
28. Ueno T, Teraoka N, Takasu S, Nakano K, Takahashi M, Yamamoto M, Fujii G, Komiya M, Yanaka A, Wakabayashi K, Mutoh M. Suppressive effect of pioglitazone, a PPAR gamma ligand, on azoxymethane-induced colon aberrant crypt foci in KK-*A<sup>y</sup>* mice. *Asian Pac J Cancer Prev* (2012),

13:4067-4073.

## 2.学会発表

1. Hippo Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Nakagama H, Lentivirus-based genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. 10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Tokyo, Japan, 2013
2. 中釜 斉、発がん過程の *in vitro* での再構築、発生工学・疾患モデル研究会、2012 年
3. 筆宝義隆、落合雅子、小沼邦重、中釜 斉、*in vitro* 再構成系における K-ras 活性化による Apc 依存的腸管発がんの促進、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年
4. 落合雅子、小沼邦重、筆宝義隆、中釜 斉、マウス正常腸管細胞を用いた *in vitro* 化学発がんモデルの検討、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年
5. 小沼邦重、筆宝義隆、落合雅子、中釜 斉 マウス腸管発がん再構成系を用いて作成した腫瘍の解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年
6. 小沼邦重、筆宝義隆、落合雅子、中釜 斉 レンチウィルスを用いたマウス腸管細胞での発がん再構成、第 27 回発癌病理研究会、2012 年
7. Nakagama H, *In vitro* reconstitution of carcinogenesis process. The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research, Chiba, Japan, 2012
8. 藤田浩祐、スレイマン・クウリバリ、高橋亮平、貴志茜衣、坂本みずほ、松井元希、長谷井友尋、池盛文数、盛山哲郎、木戸瑞佳、世良暢之、船坂邦弘、浅川大地、鳥羽 陽、早川和一、唐 寧、趙 利霞、鄭 海泳、若林敬二、渡部仁成、渡辺徹志、北京、釜山並びに日本海沿岸 3 地点における大気粉塵の有機及び無機化学成分の比較. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年
9. Watanabe T, Coulibaly S, Hasei T, Funasaka K, Asakawa D, Sera N, Seiyama T, Kido M, Toriba A, Hayakawa K, Tang N, Zhao L, Chung H Y, Watanabe M, Wakabayashi K, Trans-boundary Air Pollution with Genotoxic Compounds in East Asia. 3<sup>rd</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens, Hangzhou, China, 2012
10. 藤田浩祐、クウリバリ スレイマン、高橋亮平、貴志茜衣、坂本みずほ、松井元希、長谷井友尋、池盛文数、盛山哲郎、木戸瑞佳、世良暢之、船坂邦弘、浅川大地、鳥羽 陽、早川和一、唐 寧、趙 利霞、鄭 海泳、若林敬二、渡部仁成、渡辺徹志、東アジア地域 5 地点における大気粉塵の化学成分及び変異原性の比較. 第 41 回日本環境変異原学会、2012 年
11. 鈴木孝昌、我々は既に被曝していた (放射線リスクに関する HP の紹介)、平成 24 年度 環境変異原学会公開シンポジウム、2012 年
12. 鈴木孝昌、Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会、公衆衛生学会合同国際シンポジウム、2012 年
13. 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博、MYBPC2 はヒト骨格筋芽細胞の筋分化マーカーとなる、第 11 回日本

再生医療学会総会、2012年

14. 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充、ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性、日本環境変異原学会第41回大会、2012年
15. 續 輝久、朴 晶淑、磯田拓郎、中津可道、酸化ストレス誘発がんの抑制に関与する分子機構の解明—*Msh2* 遺伝子欠損マウスにおける消化管がんの解析を中心として、日本生化学会第85回大会、2012年
16. 日高真純、佐野しおり、藤兼亮輔、林 徳豪、坂上竜資、中津可道、續 輝久、関口睦夫、がんを抑制するアポトーシスの誘導機構、日本分子生物学会第33回年会、2012年
17. 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、田口健一、續 輝久、中別府雄作、酸化損傷塩基の修復機構を欠損するマウス家系の解析、日本分子生物学会第33回年会、2012年
18. 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、續 輝久、中別府雄作、酸化損傷塩基の修復は生殖細胞ゲノム変異を抑制し同系交配によるマウスの表現型の安定性に寄与する、日本環境変異原学会第41回大会、2012年
19. 續 輝久、遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質投与による酸化ストレス誘発の消化管がん、日本放射線影響学会ワークショップ、2012年
20. Ohno M, Sakumi K, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Influence of 8-oxoguanine on mitotic and meiotic chromosome, The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA-10), Amalfi, Italy, 2012
21. 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、續 輝久、中別府雄作、8-オキソグアニンの修復機構を欠損するマウスは、生殖細胞ゲノム中の突然変異頻度の上昇と遺伝性の変異形質を呈する、日本遺伝学会第84回大会、2012年
22. 續 輝久、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質による酸化ストレス誘発の消化管がん、特別シンポジウム:放射線規制値の科学的根拠、日本放射線影響学会第55回大会、2012年
23. Tsuzuki T, Piao JS, Matsumoto N, Nakatsu Y, The roles of mismatch repair system and p53 in the suppression of oxidative stress-induced intestinal tumor-formation in mice., 4<sup>th</sup> US-Japan DNA Repair Meeting, The National Conference Center, Leesburg, VA, USA, 2012
24. 梶村春彦、ヒトアダクトームについて、日本分子生物学会第33回年会、福岡、2012年
25. Sugimura H, Tao H, Kurabe N, Goto M, Matsushima Y, Yamada H, Shinmura K, Miyagi Y, Totsuka T, Nakagama H, Wang Y, Matsuda T. DNA Adductome, an ultimate exposome of human tissue. AACR special conference, post GWAS horizon. Hollywood, FL, USA, 2012
26. Wakabayashi K, Prevention of Colorectal Cancer, Tokushima Cancer Meeting, Tokushima, Japan, 2012
27. 高須伸二、武藤倫弘、一二三佳恵、若林



- 敬二、中釜 斉、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬の Min マウス腸ポリープ生成抑制効果、第 19 回日本がん予防学会、2012 年
28. 三好規之、長澤友樹、田中卓二、若林敬二、大島寛史、肥満モデルマウス KK-Ay における山薬およびジオスゲニンの大腸発がん予防分子機構解析、第 19 回日本がん予防学会、2012 年
29. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリノン (ABAQ) の *in vivo* 変異原性と生体内における生成、第 17 回日本癌学会学術総会、2012 年
30. Wakabayashi K, Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Totsuka Y, Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, Hangzhou, China, 2012
31. Watanabe T, Coulibaly S, Hasei T, Funasaka K, Asakawa D, Sera N, Seiyama T, Kido M, Toriba A, Hayakawa K, Tang N, Zhao L, Chung HY, Watanabe M, Wakabayashi K, Trans-boundary air pollution with genotoxic compounds in East Asia, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, Hangzhou, China, 2012
32. Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama N, *In vivo* mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinolinone derivative (ABAQ), The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, Hangzhou, China, 2012
33. 山田理史、渡辺徹志、大嶽信弘、斎藤貴江子、栗木清典、中寫輝子、武藤倫弘、若林敬二、太田ポンカン果皮の安全性の検討、第 17 回日本フードファクター学会 (JSoFF) 学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会 合同大会、2012 年
34. 池本実穂、川西優喜、戸塚ゆ加里、若林敬二、八木孝司、カオリンの遺伝毒性発現メカニズムの解明、日本環境変異原学会第 41 回大会、2012 年
35. 堺澤 絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆ加里、トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の *in vivo* 変異原性、日本環境変異原学会第 41 回大会、2012 年
36. 藤田浩祐、クウリバリ スレイマン、高橋亮平、貴志茜衣、坂本みずほ、松井元希、長谷井友尋、池盛文数、盛山哲郎、木戸瑞佳、世良暢之、船坂邦弘、浅川大地、鳥羽 陽、早川和一、唐 寧、趙利霞、鄭海泳、若林敬二、渡部仁成、渡辺徹志、東アジア地域 5 地点における大気粉塵の化学成分及び変異原性の比較、日本環境変異原学会第 41 回大会、2012 年
37. 宇田一成、今西稜太郎、遠藤 治、渡辺徹志、大嶽信弘、斎藤貴江子、若林敬二、太田ポンカン果皮抽出物の抗変異原性、日本環境変異原学会第 41 回大会、2012 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の発生機構を解明すること、及びがんの発生・成立に関わる遺伝的要因を解明することを目的とする。

環境要因による発がんモデルとして、動物正常組織由来の上皮細胞の3次元(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 *in vitro* モデルを新規に構築する。既に、マウス小腸細胞ではレンチウイルスによる shRNA 導入を用いた遺伝子再構成による発がんを確認している。shApc を導入した小腸 3D 培養細胞への腸管発がん物質 PhIP の暴露は、ヌードマウス皮下での増殖細胞の形態に影響することを見出した。現在、他のがん抑制遺伝子 shRNA を導入した細胞を用いて同様に検討中である。肺に関しても、肺上皮細胞由来の 3D 培養系を確立した。そして、Kras<sup>LSL-G12D</sup> マウス由来の肺 3D 培養細胞を用いて、Kras の活性化及び2種類のがん抑制遺伝子 shRNA の導入により、ヌードマウス皮下での腺がん形成を認め、肺でも遺伝子再構成による発がんが可能なことを見出した。

正常上皮細胞(消化管、肺等)を用いる *in vitro* 発がんモデル、特になん抑制遺伝子 shRNA を導入した発がん高感受性モデルを構築できれば、*in vivo* 発がん性試験に先行するスクリーニングや用量の検討に応用可能である。アジアに特徴的な環境要因の候補として同定された因子(化学物質等)に関して、発がんへの影響をこのモデルを用いて解析する予定である。遺伝的要因に関して、候補遺伝子の shRNA 導入により発がんへの影響を解析可能であり、アジア人に特徴的な遺伝的素因の解析に応用できる。

A. 研究目的

環境中に存在する変異原・がん原物質などの発がん要因によるがんの発生機構を解明すること、及びがんの発生・成立に関わる遺伝的要因を解明することを目的とする。遺伝的要因は環境要因との相互作用が重要であり、環境要因による発がんモデルを用いて、がんの初期発生に関わる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。そのために、動物正常組織由来の上皮細胞の3次元(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 *in vitro* モデルを新規に構築する。この新規 *in vitro* 発がんモデルを用いて、新たに見出されるアジアに特徴的な環境要因の候補の発がんへの影響を検討する。

## B. 研究方法

マトリゲルを基材とした 3 次元(3D)培養により正常上皮組織由来の培養細胞を樹立する。これらの細胞はレンチウイルスによる遺伝子導入（遺伝子再構成）が可能であり、種々のがん抑制遺伝子 shRNA の導入により、発がん高感受性モデルを簡便に構築できる。未導入(通常)或いは遺伝子再構成した（発がん高感受性）細胞に、化学物質を暴露させ、ヌードマウスでの造腫瘍性を解析する。

### (1) マウス小腸 3D 培養細胞に対する発がん物質暴露の影響

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。マウス小腸の 3D 培養細胞にレンチウイルスを用いてがん抑制遺伝子の shRNA を導入すると (shApc+shp53, shApc+shp53+shPten, K-ras の活性化+shApc 等)、ヌードマウスで造腫瘍能を示し、遺伝子再構成による発がんが可能なことを既に確認している。腸管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。マウス小腸の 3D 培養細胞を、PhIP 及び活性化処理のための S9 mix を添加した培地に 6 時間暴露させた（単回投与）。また、1 週間ごとの継代の時に、同様に PhIP 投与を繰り返す複数回投与も行った。投与開始から 4~6 週間、*in vitro* で培養後、ヌードマウス皮下に移植し、造腫瘍能を検討した。又、3D 培養細胞に、がん抑制遺伝子 Apc の shRNA を導入して遺伝子再構成を行い、同様に検討した。

### (2) マウス肺 3D 培養細胞での遺伝子再

### 構成による発がんの検討

肺に関しても、3D 培養系を構築して、shRNA 導入による遺伝子再構成を行い、腫瘍形成を検討した。*Kras<sup>LSL-G12D</sup>* マウス (Jackson et al., Genes Dev, 2001)は、Cre recombinase を適用することにより、*Kras* を活性化することが可能なマウスである。この *Kras<sup>LSL-G12D</sup>* マウスから肺組織の 3D 培養細胞を作成し、Cre recombinase を含むレンチウイルスを感染させて K-ras を活性化させ、その後 2 週間培養し、それに続いて 2 種類のがん抑制遺伝子 shRNA を同時に導入して 4 週間培養した。ヌードマウス皮下に移植して、8 週間後に屠殺し、形成された腫瘍を組織学的に解析した。これら腫瘍から培養細胞を樹立し、ヌードマウスへの再移植も行った。

### (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) マウス小腸 3D 培養細胞に対する発がん物質暴露の影響

shRNA を導入していない細胞においては、PhIP 処理による顕著な変化は認められなかった。shApc を導入したマウス小腸 3D 培養細胞は、未処理の場合でも、ヌードマウス皮下に腫瘍を形成する。更に、この shApc を導入した小腸 3D 細胞に腸管発がん物質 PhIP を単回投与した場合、ヌード