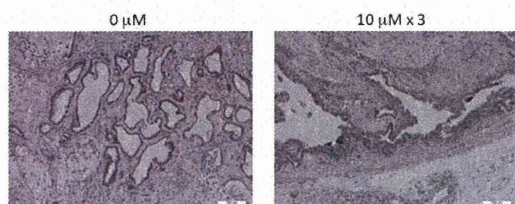


マウス皮下で増殖する細胞の形態において、異型性のある領域が認められた。PhIP を 3 回投与した場合にも、一部の上皮が多層化・多列化するなどの細胞の形態に変化が認められた (図 1)。

図 1 : shApc を導入した 3D 小腸細胞に PhIP を 3 回投与した場合、ヌードマウス皮下で増殖する細胞の形態が変化する



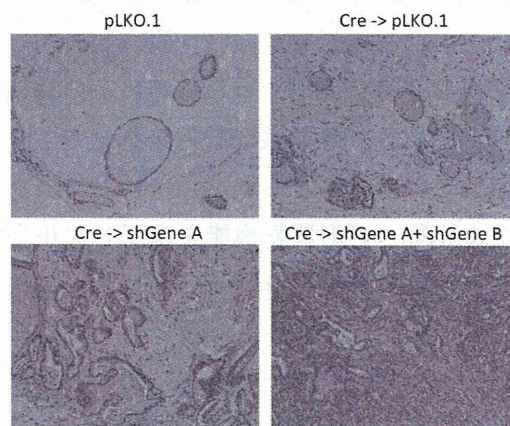
#### 移植後 6 週間での移植部位での組織像

(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

肺に関しては、臓器からの単離条件及び培養条件を、小腸の条件から一部改変して 3D 培養系を構築した。*Kras<sup>LSL-G12D</sup>* マウスの肺由来 3D 培養細胞では、control vector (pLKO.1)のみを導入した培養細胞でも、単純な腺管構造を有する細胞が移植部位に残存しているが、Cre recombinase の導入 (*Kras* の活性化)により、複雑な腺管構造を有する細胞が出現する (図 2 上段)。*Kras* の活性化後に更に 1 種類のがん抑制遺伝子 shRNA を導入した場合には、腺管の数が多くなると共に、乳頭状などの複雑な腺管構造も認められた (図 2 下段)。*Kras* の活性化後に更に 2 種類のがん抑制遺伝子 shRNA を導入した場合には、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 (図 2 下段)。又、この腺がんを含む腫瘍から樹立した培養細胞をヌードマウスに再移植すると、移植後 2 週

間で腫瘍を形成することを確認した。

図 2 *In vitro* 遺伝子再構成により誘発された肺腺がん



#### D. 考察

遺伝子再構成による発がんを確認している、マウス小腸の 3D 培養細胞に、腸管発がん物質 PhIP を暴露し、*in vitro* 化学発がんモデルの構築を試みた。*shApc* を導入した小腸細胞を PhIP に暴露させた場合、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。がん抑制遺伝子の 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 を導入した細胞についても検討中である。PhIP の暴露条件や、がん抑制遺伝子 shRNA を導入した細胞を用いる発がん高感受性モデルで検討することにより、*in vitro* 化学発がんモデルを構築できる可能性が示された。

肺に関しては、3D 培養による上皮細胞培養系を構築し、*Kras* の活性化と 2 種類のがん抑制遺伝子 shRNA の導入により腺がんを形成することを見出した。肺でも、遺伝子再構成による発がんが可能なことを示し、*in vitro* 化学発がんモデルが構築可能なこ

とが示唆された。

ヌードマウスでの造腫瘍性を endpoint としているが、その前段階の指標として、細胞の形態学的変化や spheroid 形成が適用可能か現在検討中である。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試みている。3D 培養細胞系が構築できれば、遺伝子再構成による発がんの検討により、がん細胞への形質転換能を確認し、化学物質等の暴露による *in vitro* 発がんモデルの構築が可能となる。

*in vitro* 発がんモデル系は、動物個体による *in vivo* 発がんモデル系と比べて、下記の特色がある。1)簡便かつ短期間で解析可能、2) がん抑制遺伝子の shRNA 導入による遺伝子再構成により、高感受性モデルを容易に構築可能である。3)遺伝子再構成を用いて、複数の遺伝的要因を任意の順番で解析可能であり、複数の環境要因や修飾要因(発がん物質と炎症など)とも組み合わせ可能、4) 腫瘍化に伴う非遺伝性・遺伝性変化の解析により、発がんの経時的変化の解析が可能である。*in vitro* 発がんモデル系のこれらの特色を利用して、新規の候補環境要因の発がんへの影響の解析へと応用する。また、候補遺伝子の shRNA 導入による遺伝子再構成と組み合わせて、遺伝的要因の解析も可能であるので、アジア人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と考える。

#### E. 結論

正常上皮細胞(消化管、肺等)を用いる *in vitro* 発がんモデル、特にがん抑制遺伝子 shRNA を導入した発がん高感受性モデルを構築中である。この *in vitro* 発がんモデ

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も、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有用と考える。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okudaira N, Okamura T, Tamura M, Iijima 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. Horii 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.
- 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 7 1 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 7 1 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 7 1 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

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

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

研究分担者 渡辺 徹志 京都薬科大学 教授

研究要旨

黄砂の飛来にともない中国から発がん関連物質の越境汚染が韓国及び日本において発生する可能性について明らかにするため、2011年の黄砂期（3月から5月）を中心に、中国（北京市）、韓国（釜山市）及び日本（日本海沿岸地域：福岡県太宰府市、鳥取県湯梨浜町、富山県射水市、大都市圏：大阪府大阪市、愛知県名古屋市）において大気粉塵を捕集し、化学成分、遺伝子毒性（変異原性）等を調査した。北京市では大気粉塵濃度、発がん性金属及び有害重金属を含む金属元素、イオン類、発がん性物質を含む多環芳香族炭化水素（PAHs）の各濃度及び粉塵抽出物の変異原活性は非常に高く、北京市の大気が黄砂期に発がん関連物質により重度に汚染されていることがわかった。日本における大気粉塵濃度、金属元素、イオン類、PAHsの各濃度及び変異原性は、いずれも平均値で比較した場合、大都市において日本海沿岸地域よりも高かった。また、釜山市における各平均値は、日本の大都市におけるそれらとほぼ同程度であった。北京市では特に2月に非常に高い大気粉塵濃度、PAHs濃度及び変異原性がみられ、最大でそれぞれ日本国内5地点の平均値の36倍、223倍及び86倍であった。後方流跡線解析の結果、大気粉塵を捕集した期間の日本上空の空気塊の多くが中国大陸方面から流入していたことが推測された。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たことが報告されており、本研究において同期間に国内5地点で認められた粉塵濃度、PAHs濃度及び変異原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と考えられた。

A. 研究目的

経済発展の著しい中国では大気汚染が非常に深刻な問題となっており、中国で発生した汚染物質が季節風等により移行し、東アジア地域の大気環境に影響を及ぼしていることが示唆されている。本研究の目的は、日本、中国、韓国の研究者が協力して日本、中国及び韓国における大気汚染の状況を明らかにするとともに、中国の汚染物質が日本の大気環境及びヒト健康へ及ぼす影響の

可能性を明らかにすることである。

B. 研究方法

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、ハイボリウムエアサンプラーを用い毎月連続した4あるいは5日間、24時間ごとにフィルターを交換して大気粉塵を捕集

した。粉塵中の金属類を ICP 発光分光分析あるいは原子吸光法で分析した。イオン類及び PAHs は、それぞれイオンクロマトグラフ法及び蛍光検出-高速液体クロマトグラフ法で分析した。大気粉塵抽出物のネズミチフス菌 YG1024 株に対する変異原性を試験した。米国海洋大気庁の HYSPLIT Model を用い、空気塊の移動経路について後方流跡線解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験及び組み換え生物を用いる実験については、京都薬科大学の倫理委員会の承認を得た後、実施した。また、動物実験では動物愛護に関して十分配慮して行った。

#### C. 研究結果

北京市、釜山市、国内 5 地点における粉塵濃度はそれぞれ 87~1372、31~382 及び 8~103  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であり、粉塵濃度の平均値は北京市 $\gg$ 釜山市 $>$ 日本の順に高く、国内 5 地点では大都市（名古屋市、大阪市）において値が高く、次いで太宰府市の値が他の日本海沿岸地域（湯梨浜町、射水市）のそれらよりやや高かった。また、同期間における粉塵中の金属、イオン類の濃度の平均値は、多くの金属及びイオンにおいて北京市で最も高く、次いで釜山市、日本国内の順であった。国内では大都市 2 地点、太宰府市、他の日本海沿岸地点の順であった。大気粉塵中の総 PAHs 濃度の平均値は北京市において最も高く、次いで大阪市、名古屋市、釜山市、太宰府市、湯梨浜町、射水市の順であった。大気粉塵抽出物の変異原性の平均値は北京市 $\gg$ 大阪市、名古屋市、釜山市、太宰府市 $>$ 湯梨浜町、射水市の順であった。後方流跡線解析の結果から、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することが示唆された。

#### D. 考察

北京市における粉塵濃度、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の各平均値は国内 5 地点における平均値のおよそ 10 倍程度であった。特に北京市では 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。今回観測された北京市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と考えられる。環境省より 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たことが報告されており、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と考えられた。

#### E. 結論

本研究により、中国で日本に比べて非常に高濃度の大気汚染物質が存在していること並びにそれら汚染物質が黄砂期に空気塊とともに日本に移行し日本の大気環境に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、中国における大気汚染が黄砂期以前に重度である可能性が示唆された。今後更に、東アジア地域の大気環境の長期的変動、中国大陸からの汚染物質の長距離輸送、ヒト健康への影響などについて明らかにする必

要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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巻, 62-67.
3. 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.

##### 2. 学会発表

1. 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

2. 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
3. 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

#### 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

アリストロキア酸による腎障害のバイオマーカーに関する研究

研究分担者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 室長

研究要旨

アリストロキア酸は、かつて国内外において痩身薬に混入して重篤な腎障害を起こした植物由来天然物であり、これまでに我々は発がん性を裏付ける強い遺伝子傷害作用をマウスで確認するとともに、AT 塩基対への特異的な変異誘発が明らかにした。この結果、それまでマイコトキシンが原因物質として考えられていたバルカン腎症の新たな原因物質として、分子疫学的証拠を与えた。アリストロキア酸を含有する植物は、現在でも中国、台湾においては、医薬品として摂取されており、潜在的に多くの人々が、腎障害並びに腎発がんのリスクにさらされていると考えられている。そこで、今後予測される健康被害を未然に予防するために、発症前の段階で、腎障害予測しうるバイオマーカーの利用が望まれ、本研究ではマウスモデルを用いて、低侵襲性で測定しやすい尿中バイオマーカーの開発を行った。

LC-MS を用いた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い、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ともに、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。その結果、アリストロキア酸処理により変化するいくつかの尿中バイオマーカー候補タンパク質を同定できた。発現が上昇するタンパク質としては、 $\alpha 1$ -microglobulin 等の血液由来と考えられるタンパク質が主に検出され、腎機能の低下によりこれらのタンパク質が尿中へ移行したことが推察された。また、発現抑制されるタンパク質としては、napsin A と kidney androgen related protein が見つかった。いずれも、アリストロキア酸による腎障害のターゲットとなる近位尿細管において通常状態で高発現していることから、近位尿細管への毒性を反映したバイオマーカーとなることが期待できる。

A. 研究目的

アリストロキア酸は、かつて痩身用の漢方薬に混入して重篤な腎障害を引き起こしたが、中国、台湾では、厳密に起源植物が判別されない等の理由により、依然この物質を含んだ生薬成分が使用されており、問題となっている。このアリストロキア酸に

よる腎障害の感受性に関しては個人差があることが知られ、腎傷害の予測および患者の予後予測のためのバイオマーカーが必要とされている。そこで、我々は採取が容易な尿中のバイオマーカーの探索を目的として、LC-MS/MS による高感度ショットガンプロテオミクス解析による検討を行った。



## B. 研究方法

### Human p53 Knock-In (Hupki) Mouse に 対するアリストロキア酸 (AA) 処理

Hupki マウスは、マウスゲノム TP53 遺伝子を、Cre-lox を用いた組み換え法によりヒトの TP53 遺伝子と置き換えたノックインマウスであり、比較的変異の起こりやすいエクソン 4-9 がヒトの配列に置き換わっている。

雌 Hupki mice (6 weeks old) に、5 mg AA/kg を 3 週間強制経口投与した。そして、マウスを 3 (n=5), 14 (n=10), 26 (n=10), and 52 週間(n=20)後に屠殺時にメタボリックケージにて 24 時間尿を採取した。対照として、1 群 5 匹のマウスに、溶媒 (水) を投与した。さらに追加で、3 週 (n=4) および 12 週 (n=4) days 後に尿を採取した。

### LC-MS/M を用いたショットガンプロテオミクス法によるマウス尿中プロテオーム解析

#### 1) タンパク質の沈殿および消化

(タンパク質の沈殿)

マウス尿を 2000g、5 分間遠心分離を行い、不溶性物質を除去した後、Qubit™ spectrometer (Invitrogen)にてタンパク質濃度を測定した。タンパク 15 μg 相当量の尿(10-20μl)をとり、4 倍容量のアセトンを加え、タンパク質を沈殿させた。その後 14,000g にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 500 μl の同一溶媒で洗浄した。

(タンパク質の可溶化)

再び 14,000g にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 15 μl の 0.1% Rapigest(Waters)に溶解させた。

(還元アルキル化)

タンパク質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μl に、30 μl の 10mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μl の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6 μl (0.25 μg/μl) 加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore)にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

#### 2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、DiNa Nano LC System (KYA)を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μm のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPOLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro) を使用した。移動相は A (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸) ,B(80% アセトニトリル、0.1% ギ酸)の 2 種類の組成の溶媒を用い、A100%から B100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、当研究所にて共同利用機器として使用可能な ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher)を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。



通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製（内径 300  $\mu$  m）および New Objective 社製スプレーチップ（内径 150  $\mu$  m）を使用した。逆相 C18 カラム（KYA 製 HiQ sil C18W-3 0.15 mm x 50 mm）にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース（Captive Spray, AMR）にて質量分析装置へと導入した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の項目に関して最適な MS 測定条件を検討した。

- ・MS 質量範囲 350-2000 m/z
- ・Total Analysis Time 150 min
- ・Resolution 30,000
- ・Accumulation time Normal (0.1-0.3 sec.)
- ・Spray Voltage 1600-2000 V
- ・MS/MS 測定条件 上位 3 ペプチド(2 価以上)を自動選択。
- ・LC 流速 150-300 nl/min
- ・LC グラジエント A 溶媒（2%アセトニトリル、0.1%ギ酸）と B 溶媒（80%アセトニトリル、0.1%ギ酸）によりグラジエント。

### 3) データ解析ソフトウェアによるノンレベル定量解析

LTQ-Orbitrap による質量分析データ（RAW 形式）は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、LTQ-Orbitrap の場合には、FT-MS 測定と MS/MS 測定が同時に行うため、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして“Progenesis LC-MS”（Nonlinear Dynamics）を採用し、比較プロテオーム解

析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。LTQ-Orbitrap からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である(図 1)。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

### 4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメーターとしては LTQ 用のデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$  を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

（倫理面への配慮）

マウスの尿サンプルに関しては、共同研

研究者の英国がん研究所 Arlt 博士より実験に使用した余剰サンプルとして提供を受けた。動物実験の実施に際しては、当該研究機関において動物実験倫理委員会の承認を得た後に行った。

### C. 研究結果

LC-MS より得られたデータを Progenesis LC-MS ソフトウェアに取り込んで、各 LC-MS 測定間のリテンションタイムのずれを補正し、ペプチドピークの検出を行うとともに、サンプル間で対応するペプチドピークの定量比較を行った (図 1-2)。その結果、得られたペプチドピークの総数 (2.5 価イオン) は、約 3 万であり、十分な数のピークが検出できた。

MS/MS データが得られたペプチドに対して、MASCOT によるデータベース検索を行いタンパク質の同定を行った (図 3)。

同定結果が得られたタンパク質のうちで、AA 処理により発現の上昇したタンパク質として、Ig kappa chain V-III(KV3AJ)の例を図 4 に示す。コントロール群においては、いずれの時期においても発現量が低いのに対して、処理群においては特に 3 ヶ月後において発現量が高くなっていた。Ig kappa は血液由来であると考えられ、AA 処理により誘発された腎障害により漏出もしくは尿細管における再吸収が阻害されて、尿中に移行したと考えられる。

次に、AA 処理により発現の抑制したタンパク質の例として、Napsin-A を図 5 に示す。Napsin-A はペプチダーゼ A1 ファミリーに属するペプシン様アスパラギン酸プロテアーゼであり、肺腺がん特異的のマーカースとして用いられているが、腎臓の近位尿細管

で発現も高いことが知られている。AA による腎障害における標的が近位尿細管であることから、正常に発現している Napsin-A が近位尿細管の障害により抑制されるメカニズムが考えられる。この変化は比較的初期から観察されるため、AA による腎障害の早期マーカーとしての利用が期待できる。

その他、今回の検討により得られたバイオマーカー候補タンパクを表にまとめた。変化としては、発現上昇するタンパクが多く、血液由来と思われるタンパク質が複数含まれていた。また、機能的に興味のあるタンパク質も含まれており、腎毒性との関連性が注目される。一方、発現抑制されるタンパク質の数は少なかったが、変化が大きかったタンパク質として、Napsin A (NASPA) とともに、Kidney androgen-regulated protein (ANRE) が注目される。ANRE も AA が標的とする近位尿細管の上皮細胞に高発現しているタンパク質であり、AA による毒性を鋭敏に反映するバイオマーカーとして注目される。

### D. 考察

アリストロキア酸は 1990 年ごろベルギーにおいて痩身薬に混入して重篤な腎障害を起こしたことから、その原因物質として特定され、研究が進んだが、我々により発がん性を裏付ける強い遺伝子傷害作用が確認されるとともに、AT 塩基対への特異的な変異誘発が明らかとなり、それまでマイコトキシンが原因物質として考えられていたバルカン腎症の新たな原因物質として、分子疫学的証拠を与えた。本邦においてもベルギーと同様の事故事例が発生し、アリストロキア酸を含む植物に関する注意喚起が

なされたところであるが、中国、台湾においては、起源植物の厳密な判別が成されていないなどの理由から、現在もアリストロキア酸を含有する植物が含まれた医薬品等が日常的に摂取されている。こうしたことから、潜在的に多くの人々が、腎障害並びに腎発がんのリスクにさらされていると考えられ、未然にこうした健康被害を予防する必要性に迫られている。特に発症前の段階で、腎障害を予測しうるバイオマーカーの利用が望まれており、本研究の成果はそうしたニーズにも答えられると期待できる。

今回、マウスのモデルを用いてアリストロキア酸処理により変化する尿中バイオマーカーの探索を行い、いくつかの候補タンパク質を同定できた。発現が上昇するタンパク質としては、主に血液由来と考えられるタンパク質が検出され、腎機能の低下により尿中へ移行したことが推察された。こうした血清マーカーの一部は既にマイクログロブリンのように臨床応用が進んでいる物質もあるが、今回より変化が大きなマーカーも見つかったことから、より鋭敏なバイオマーカーとして臨床応用できることも期待される。

また、発現抑制されるタンパク質としては、数は少なかったものの特徴的なマーカーとして、NASPA と ANRE が見つかった。いずれも、AA による腎障害のターゲットとなる近位尿細管において通常状態で高発現していることから、近位尿細管への毒性を反映したバイオマーカーとなることが期待できる。またいずれも、早期から変化が見られたことより、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がヒト尿においても再現されるかどうかについて

検討を加えていきたい。また、今回は同定結果が得られたペプチドに注目したが、大部分のペプチドに関しては、MS/MS 測定が行われていない、もしくは未同定であり、これらの中に優れたバイオマーカーが隠されている可能性も残されている。今後は、ペプチドレベルにおいて再現性、反応性の良いものに絞って、狙い撃ちの MS/MS 測定をかけることにより、より発現量の低いタンパクの中からバイオマーカー候補を同定していきたい。

#### E. 結論

LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス的手法により、マウス尿プロテオーム解析を行い、アリストロキア酸処理によって誘発される腎障害を反映するバイオマーカー候補タンパク質を同定した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.

## 2.学会発表

1. 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
2. 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
3. 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博：MYBPC2 はヒト骨格筋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

4. 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図 1 Progenesis LC-MS ソフトウェアによる LC-MS データの重ね合わせ



図 2 Progenesis LC-MS ソフトウェアによるペプチドピークの検出と定量比較





図3 MASCOT データベース検索によるタンパク同定

Accession	Peptides	Score	Anova (p)	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							AAI	Cont
ALBU_MOUSE	51	5699.39	2.33e-005	5.67		Serum albumin O5=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	2.53e+009	4.46e+008
TRFE_MOUSE	47	4329.89	0.03	3.46		Serotransferrin O5=Mus musculus GN=Tf PE=1 SV=1	1.88e+008	5.45e+007
LRP2_MOUSE	48	2904.15	5.61e-005	2.63		Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 O5=Mus musculus GN=Lrp2 PE=1 SV=1	3.01e+007	7.94e+007
SPA3K_MOUSE	21	2171.73	0.02	2.39		Serine protease inhibitor A3K O5=Mus musculus GN=Serpina3k PE=1 SV=2	4.89e+007	2.05e+007
ESTN_MOUSE	20	1786.98	0.39	1.57		Liver carboxylesterase N O5=Mus musculus GN=Es1 PE=1 SV=3	2.34e+008	3.67e+008
A1AT1_MOUSE	16	1593.62	5.71e-005	11.78		Alpha-1-antitrypsin 1-1 O5=Mus musculus GN=Serpina1a PE=1 SV=4	3.62e+007	3.07e+006
HEMO_MOUSE	21	1312.67	0.49	1.88		Hemopexin O5=Mus musculus GN=Hpx PE=1 SV=1	2.17e+007	1.16e+007
CO3_MOUSE	24	1173.44	6.29e-003	2.39		Complement C3 O5=Mus musculus GN=C3 PE=1 SV=2	2.01e+007	8.41e+006
AMBP_MOUSE	13	978.32	8.11e-006	6.60		Protein AMBP O5=Mus musculus GN=Ambp PE=1 SV=2	5.43e+007	8.24e+006
ANGT_MOUSE	7	611.63	0.12	3.18		Angiotensinogen O5=Mus musculus GN=Agt PE=2 SV=1	3.04e+006	9.54e+005
APOH_MOUSE	8	590.51	0.03	3.15		Beta-2-glycoprotein 1 O5=Mus musculus GN=ApoH PE=1 SV=1	9.43e+007	2.97e+008
PLMN_MOUSE	13	586.66	0.68	1.06		Plasminogen O5=Mus musculus GN=Plg PE=1 SV=2	5.35e+006	5.04e+006
ANT3_MOUSE	10	543.29	3.48e-003	4.39		Antithrombin-III O5=Mus musculus GN=Serpinc1 PE=1 SV=1	3.14e+006	7.14e+005
A1AT5_MOUSE	5	533.29	1.07e-003	18.54		Alpha-1-antitrypsin 1-5 O5=Mus musculus GN=Serpina1e PE=1 SV=1	1.23e+007	6.65e+005
NAPSA_MOUSE	4	446.33	1.36e-007	13.09		Napsin-A O5=Mus musculus GN=Napsa PE=1 SV=1	4.10e+006	5.37e+007
CBG_MOUSE	6	431.44	0.24	3.46		Corticosteroid-binding globulin O5=Mus musculus GN=Serpina6 PE=1 SV=1	1.77e+006	5.13e+005
A1AT_MUSCR	4	395.99	1.45e-005	9.50		Alpha-1-antiproteinase O5=Mus caroli GN=Serpina1 PE=2 SV=1	1.53e+007	1.61e+006
DSC2_MOUSE	6	380.53	9.11e-004	2.13		Desmocollin-2 O5=Mus musculus GN=Dsc2 PE=2 SV=1	6.13e+006	2.88e+006
APOA1_MOUSE	7	358.26	5.60e-004	5.39		Apolipoprotein A-I O5=Mus musculus GN=Apoa1 PE=1 SV=1	1.71e+006	3.18e+005
SODC_MOUSE	4	334.66	0.24	1.59		Superoxide dismutase [Cu-Zn] O5=Mus musculus GN=Sod1 PE=1 SV=2	9.26e+006	5.82e+006
KNG1_MOUSE	5	333.30	6.58e-003	1.83		Kininogen-1 O5=Mus musculus GN=Kng1 PE=1 SV=1	6.66e+006	3.64e+006
KV3AD_MOUSE	2	319.66	7.31e-007	8.95		Ig kappa chain V-III region PC 7043 O5=Mus musculus PE=1 SV=1	8.10e+006	9.05e+005

図4 アリストロキア酸処理により発現上昇するタンパクの例

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							AAI	Cont
KV3AD_MOUSE	2	319.66	7.31e-007	8.95		Ig kappa chain V-III region PC 7043 OS	8.10e+006	9.05e+005

Proteins

Peptides of KV3AD\_MOUSE

Accession	Peptides	Conflicts	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Score	Ints	Mass	RT (min)	Charge	Tags	Abundance	Conflicts	Peptide Sequence	Modifications
ALBU_MOUSE	4	22	296	1.45E-05	9.5		1999	572	9	1688.026	54.6	3	1.84E-05	0	GLFAALDCEKDTFAS	
TRFE_MOUSE	1	1	125	1.23E-05	9.03		1189	433	23	1638.933	54.8	2	1.22E-08	0	LLTIALDCEKDTFAS	
KV3AD_MOUSE	2	0	320	7.31E-07	8.95		5792	109	71	1054.025	91.2	2	4.7E-08	0	DIVLTQKRPALNTPSLQK	
KCI_MOUSE	1	0	543	0.0607	8.84		7247	983	57	1054.026	91.2	3	1.40E-08	0	DIVLTQKRPALNTPSLQK	

Protein: KV3AD\_MOUSE: Ig kappa chain V-III region PC 7043 OS=Mus musculus PE=1 SV=1

Peptides of selected protein

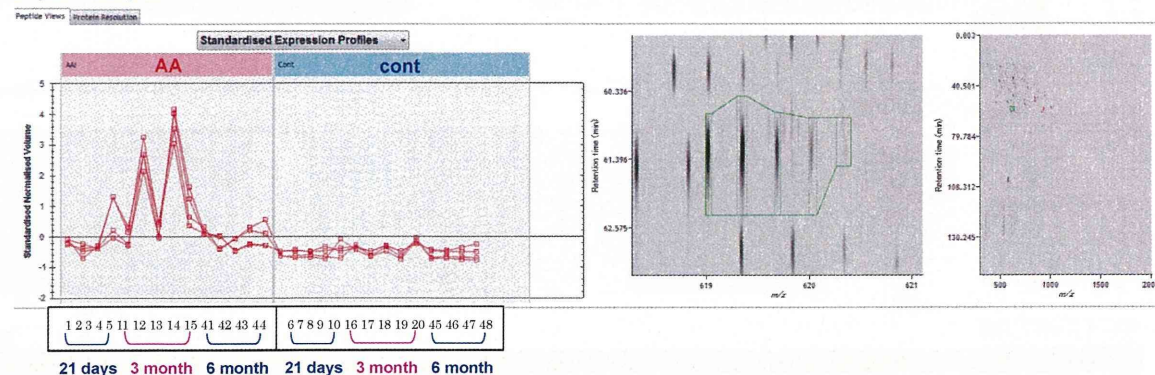


図5 アリストロキア酸処理により発現抑制するタンパクの例

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							AAI	Cont
NAPSA_MOUSE	4	446.33	1.36e-007	13.09		Napsin-A OS=Mus musculus GN=Napsa PE=1 SV=1	4.10e+006	5.37e+007

Proteins										Peptides of NAPSA_MOUSE									
Accession	Peptides	Conflicts	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	#	Score	Hits	Mass	RT (min)	Charge	Tags	Abundance	Conflicts	Peptide Sequence	Modifications		
PI1A_MOUSE	2	0	118	0.00015	13.9		1755	61.3	21	1011.917	28.4	2		3.6E+06	0	FAIQYDTR			
C507_MOUSE	1	0	44.4	0.0016	13.8		2292	63.5	42	1011.917	29.4	2		4.1E+06	0	FAIQYDTR			
ETFA_MOUSE	1	3	34.6	0.303	13.8		16900	58.6	7	1011.917	31.3	2		2.3E+05	0	FAIQYDTR			
HEC3_MOUSE	2	2	54.9	7.95E-06	13.2		8674	49.6	28	2062.968	65.9	2		4.3E+05	0	ALGGVFLRGGYFIQSEK	[14] Carbamid		
NAPSA_MOUSE	4	0	446	1.36E-07	13.1		11875	41.8	14	2062.968	65.9	3		1.4E+06	0	ALGGVFLRGGYFIQSEK	[14] Carbamid		
ASAT1_MOUSE	16	34	1.99E+03	5.71E-05	11.8		18402	34	6	2062.987	66.3	3		1.92E+05	0	ALGGVFLRGGYFIQSEK	[14] Carbamid		
ASAT2_MOUSE	1	0	50	2.7E-05	11.4		3963	75.2	68	2062.003	67.9	3		8.77E+04	0	ALGGVFLRGGYFIQSEK	[14] Carbamid		
FTF2_MOUSE	4	0	146	0.00409	10.4		3151	105	92	2062.004	67.9	2		2.4E+07	0	ALGGVFLRGGYFIQSEK	[14] Carbamid		
PCSA1_MOUSE	2	0	24.9	0.0081	8.72		64271	48.2	10	2760.052	71.6	4		7.1E+04	0	CAFFSLAEPKRRKFFK	[11] Carbamid		
KV3A1_MOUSE	2	2	332	4.87E-07	9.4		23208	32.8	2	2162.844	71.7	2		1.92E+05	0	PTVGLLQAGDRAISDFGLDPSRKR	[8] Carbamid		
AT4T_MOUSE	4	22	286	1.49E-06	9.4		22214	20.1	4	2163.864	72.5	4		7.44E+04	0	YVGLRLLQAGDRAISDFGLDPSRKR	[8] Carbamid		

Protein: NAPSA\_MOUSE Napsin-A OS=Mus musculus GN=Napsa PE=1 SV=1

Peptides of selected protein

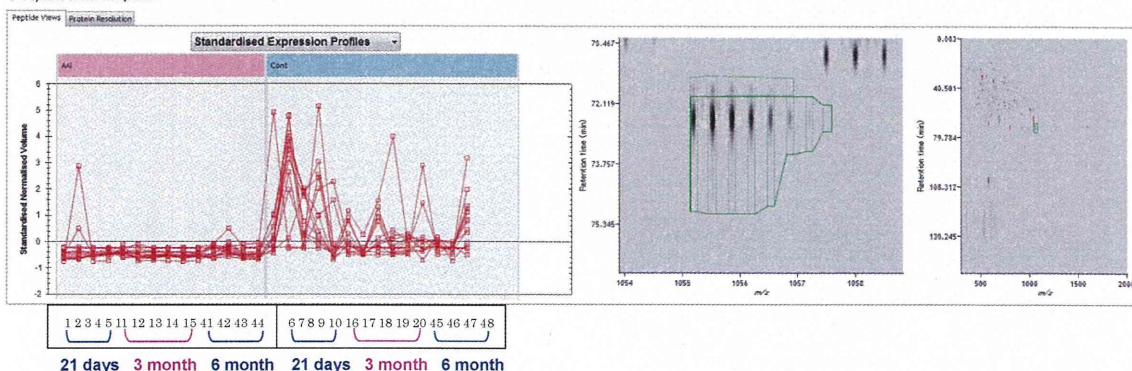


表 発現変化を示したタンパク質のまとめ

Up-regulated

symbol	name	fold	timing*
CRAMP	catheлин-related antimicrobial peptide	23.8	L
UTER	Uteroglobbin	16.7	L
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	9.84	E&L
KV3AJ	Ig kappa chain V-III region	9.00	all
SPA3M	Serum protease inhibitor A3M	6.59	E&L
AMBP	alpha 1 microglobulin	6.45	all
SPA3K	Serum protease inhibitor A3K	5.65	E&L
VTDB	Vitamin D binding protein	5.44	E
VTNC	Vitronectin	4.81	E&L
KNTC1	Kinetochore-associated protein 1	4.78	E&L
AMY1	Alpha-amylase 1	4.04	all
TTHY	Transferrin	3.61	E
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	3.08	all
CES1	Liver carboxylesterase 1	3.01	E
SODC	Superoxide dismutase Cu-Zn	2.95	M-L
SAMP	Serum amyloid P-component	2.77	all
UBIQ	Ubiquitin	2.41	M-L
APOA4	Apolipoprotein A4	2.32	E
STRUM	Strumellin	2.19	M-L
CADH1	Cadherin-1	1.92	M-L
HEMO	Hemopexin	1.78	E
A2AP	Alpha 2-antiplasmin	1.50	E

Down-regulated

symbol	name	fold	timing*
ANRE	Kidney androgen-regulated protein	26.4	all
NAPSA	Napsin A	9.71	E
SHARM4	Shroom 4	3.76	all
ACE	Angiotensin-converting enzyme	2.89	all
CALM	Calmodulin	2.71	all

\* E: early, M: middle, L: late



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

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

研究分担者 續 輝久 九州大学 大学院医学研究院 教授

研究要旨

放射線被ばくの影響は臓器を構成する細胞の種類や分化段階等によって異なる感受性を示す。これは発生する DNA 損傷の量質や量の違い、損傷応答や DNA 修復機構の違いなど複数の要因によると考えられている。X線や $\gamma$ 線などの低 LET 放射線では、その生物影響は DNA の物理的損傷などの直接作用に対して、水分子の放射線分解に伴い二次的に発生する活性酸素種による間接作用が大きな割合を占めると考えられている。生体内で生じた活性酸素種による核酸の酸化的損傷は遺伝情報に変異を来たし、がんの誘発要因となることが明らかになっているが、放射線照射後の核酸の酸化損傷の発生程度やそれによる生物学的影響の詳細はよくわかっていない。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、小腸における低線量放射線による核酸の酸化損傷に注目して解析した。今回 X 線を全身照射したマウスの小腸を用いて組織免疫学的解析を行ったところ、核 DNA だけでなくミトコンドリア DNA も酸化損傷を被り、特に絨毛領域の上皮細胞で顕著なことが明らかとなった。絨毛上皮細胞は外界からのバリア機能を有する一方、栄養分・水分の吸収など生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。従って、放射線被ばく直後に上皮細胞のミトコンドリア機能を保護することができれば、放射線障害の予後の改善、ひいては発がん等の抑制につながる可能性がある。

A. 研究目的

放射線被ばくの影響は臓器を構成する細胞の種類や分化段階等によって異なる感受性を示す。本研究ではマウスを用いて、小腸の病理標本作製し、組織幹細胞、前駆細胞、分化後の上皮細胞など各細胞種において DNA 損傷、損傷応答、細胞死などを含めた細胞生物学的解析を行い、核酸の酸化

損傷が放射線被ばく後の臓器障害や発がんへ及ぼす影響を考察する。

B. 研究方法

本研究では野生型マウスと、酸化損傷塩基の修復に関与する *Ogg1* 遺伝子のホモ欠損マウスを用いて、異なる線量（2Gy, 4Gy, 10Gy、線量率：1Gy/min）の X 線を全身照

射し、一定時間後に小腸を摘出し、ホルマリン固定後パラフィン置換／包埋した。通常の方法により病理標本を作製し、DNA鎖の切断や酸化損傷、損傷応答、アポトーシスを検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学の動物実験委員会の承認を得た実験計画を、九州大学動物実験規則に従い、実験動物に対する動物愛護について十分配慮して実施した。

### C. 研究成果

ヒトやマウスの小腸の粘膜組織では、自己複製能と多分化能を持つ数個の幹細胞が陰窩底部領域に、分化後の分裂を行わない上皮細胞は絨毛領域に存在している。小腸病理標本は幹細胞、分裂細胞、分化後の上皮細胞を1断面で観察できるため、細胞周期や分化段階の異なる細胞種の放射線応答の解析に有効である。野生型マウスにX線を全身照射すると半致死線量以下の低い線量から、二本鎖DNA切断(DSB)のマーカであるリン酸化ヒストンH2AXのフォーカスが陰窩領域、絨毛領域に照射直後から線量依存的に生じ、4時間後には陰窩領域でアポトーシスが検出されたのに対して、絨毛領域の上皮細胞ではほとんどアポトーシスは検出されなかった。また、一本鎖DNA切断(SSB)が照射直後から陰窩領域と絨毛領域の核および細胞質で劇的に増加することを見出した(図1、図2)。SSBは放射線の直接作用でも生じるが、活性酸素

種でも生じることから、代表的な酸化DNA損傷である8-オキシグアニンの免疫学的検出を行った。核DNAでは非照射群と比較してわずかな上昇を認めたのに対して、ミトコンドリアDNA中での顕著な増加を認めた。また、ミトコンドリアDNA中の8-オキシグアニンの免疫染色性は照射、非照射に関わらず陰窩領域に比較して絨毛領域で高いことが明らかとなった(図1)。

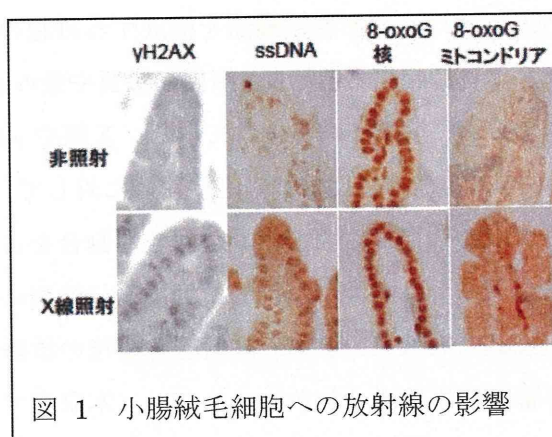


図1 小腸絨毛細胞への放射線の影響

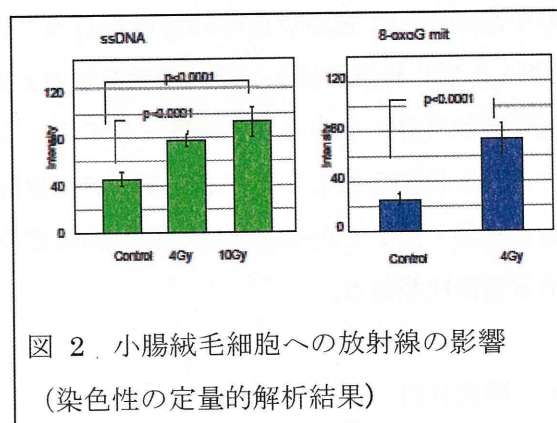


図2 小腸絨毛細胞への放射線の影響  
(染色性の定量的解析結果)

これらの結果から絨毛領域の上皮細胞では放射線の直接作用によるDSBsは生じてても細胞死は起こらないが、被ばく直後からミトコンドリアDNAが酸化損傷を被ることがわかった。OGG1はDNA中の8-オキシ

グアニンを除去する活性を持ち、核およびミトコンドリアゲノムへの蓄積を抑制している。*Ogg1* 遺伝子をホモで欠損するマウスでは放射線照射後、野生型と同様に陰窩領域でのアポトーシスが観察された。さらに、野生型では検出されなかった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* 遺伝子欠損マウスでは非照射時からすでに DNA 損傷が高い傾向にあり、見かけ上、非照射群と照射群の差は野生型の場合と比較して少ない結果となっていた。

#### D. 考察

小腸の絨毛上皮細胞は外界とのバリア機能に加えて栄養分・水分の吸収さらには腸管免疫による生体防御等の、極めて重要な役割を果たしており、絨毛領域細胞のミトコンドリア DNA の損傷はミトコンドリア機能不全から ATP 産生の低下を引き起こし、生体の恒常性維持に支障をきたす恐れがある。また二次的に活性酸素種の漏出を惹起することで、長期的な酸化ストレスを引き起こす可能性がある。被ばく直後に何らかの方策により上皮細胞のミトコンドリア機能を保護することができれば、放射線障害の予後の改善、ひいては発がん等の抑制につながる可能性がある。

#### E. 結論

放射線被ばく後の臓器障害（含む、発がん）に対する活性酸素種の関わりを明らかにすることで、放射線治療に伴う腫瘍の周囲の

正常組織への障害の低減化にも繋がる知見となる。また、確立したマウス実験系を利用して臓器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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

[学術雑誌]

- 1) Lim, T.-H., 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*, 11: 259-266, 2012

##### 学会発表

- 1) 續 輝久, 朴 晶淑, 磯田拓郎, 中津可道, 酸化ストレス誘発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発がんの解析を中心として, 日本生化学会第 85 回大会, 福岡, 2012 年
- 2) 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, 発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, 福岡, 2012 年
- 3) 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, 福岡, 2012 年
- Matsumoto, Yoshimichi Nakatsu, 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.
- 4) 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, 静岡, 2012 年
- 5) 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発がん, 日本放射線影響学会ワークショップ, 磐梯熱海, 2012. 10.31.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。
- 6) Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Influence of 8-oxoguanine on mitotic and meiotic chromosome, The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA-10), Amalfi, Italy, 2012.
- 7) 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, 福岡, 2012 年
- 8) 續 輝久, *Mutylh* 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発がん, 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, 仙台, 2012 年
- 9) Teruhisa Tsuzuki, Jing Shu Piao, Noritaka

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

アジア人の DNA 付加体について

研究分担者 梶村春彦 浜松医科大学 教授

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ヒトがん発生の分子機構を解明するために、ヒト組織中に存在する DNA 付加体に焦点をあて、その同定、評価、病理学的関連、生体側の反応などについて解析をし、がんの発生・成立に関わる遺伝環境表現型相関を明らかにすることを目的とする。

ヒト胃粘膜中から、7種類の過酸化脂質由来物による DNA 付加体を、アダクトーム法により解析し、中国と日本それぞれの胃がんで切除された胃粘膜において同定に成功し、その量と種類により、それぞれの由来地域が判別できた。また、個々のアダクトを個別に、汎用的な方法で分析できるシステムを確立し、今後多数のヒト腫瘍周辺組織の解析や、各付加体に関わる修復あるいは修飾酵素などの解析を行う予定である。

A. 研究目的

ヒト DNA には、環境要因や、内在性の reactive Oxygen Species などにより種々の DNA 損傷がおこり、DNA に種々の化学物質のついた DNA 付加体の存在が長年にわたり、同定、想定、あるいは推定され、その付加体の修復エラーの固定による突然変異が哺乳動物の化学物質による発がん機構の主たるものであると考えられてきた。近年の測定法の進歩によりこれらの付加体がヒト組織内でも、より具体的にしかも複数同定できるようになりつつある。本研究は、ヒトの種々の病態下の種々の組織における付加体の存在について、基礎的知見を得、さらに共存するがんなどの分子病理学的性格と比較を試みるものである。

B. 研究方法

酸化防止剤存在下で DNA を抽出し、

micrococcal nuclease 処理後に LC/tandem MS を行う方法で得たものだが、今年度は、通常の実験装備で特定の付加体が同定できるか、あらたな protocol を試みた。protease K と RNase A で処理した後、タンパク質を除去し、イソプロパノールを加え DNA を抽出した。そのうちの 20  $\mu$ g 分の DNA を 50 U の DNaseI で処理し、5  $\mu$ g の phosphodiesterase I と 10 U の CIAP で処理した。その後 PALL Nanosep 3K カラムで DNA を精製し、標品とともに LC-MS 解析に用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験の実施に際しては、浜松医科大学動物実験倫理委員会の承認を得た後に行った。またヒト組織を用いた研究については浜松医科大学 医の倫理委員会、遺伝子解析研究倫理委員会(23-91)で承認済みである。