

201220001A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および

感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 筆宝 義隆

平成25(2013)年5月

目 次

I. 総括研究報告

- 疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および感受性要因の解明と
その臨床応用に関する研究 1
筆宝 義隆

II. 分担研究報告

1. ラット大腸がんモデルを用いた発がん初期過程の分子機構及び感受性要因の解明 25
筆宝 義隆
2. ポリ ADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法 31
益谷 美都子
3. ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作成 37
竹下 文隆
4. Bcl11b ヘテロ遺伝子型が与える発がん感受性と放射線発がんリスク予測 . . . 43
木南 凌
5. 大腸発がんにおける炎症の関与とその分子機構の解明 51
中島 淳
6. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明 55
大島 正伸
7. Apc 変異マウスの腸管腫瘍形成に寄与するシグナル経路の解明 61
青木 正博
8. Apc 変異ラットを用いた大腸がん診断・治療評価系の開発 65
庫本 高志

9. 酸化ストレスに起因する発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究	69
	續 輝久
10. 低レベル PhIP の持続的曝露により誘発される DDR の分子機構の解明	73
	山下 克美
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
IV. 研究成果の刊行物・別刷	83

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および
感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 筆宝義隆

国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

本研究ではヒト大腸発がんの分子機構、特にがんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化や、その発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明を目指した。ラットモデルではPhIPを含む変異原物質の大腸発がん性と高い相関を示すmiRNAの誘導を見だし、DNA付加体形成とは異なる発がん経路の存在が示唆された。また、大腸上皮由来の初代培養細胞を新たに樹立し、低濃度のPhIP処理でDNA損傷応答（DDR）およびp53活性化が誘導されていることを確認した。大腸前がん病変のdysplasiaを簡便に検出する手法を新たに確立した。APC変異ラットで欠損するC末端領域がDLG5タンパク質と結合することを見だし、この相互作用の欠損がKADラットで観察された血管内皮細胞の接着異常、血管新生の遅延を伴う大腸炎症の持続を誘導することを示した。p53+/- ES細胞を受精卵に導入してキメララットを作製することでp53+/- およびp53-/-ラットを簡便に作製することに成功した。雌は神経管閉鎖障害で胎生致死であり、雄は主に肉腫を発症し、早期に死亡することを確認した。p53+/-ラットは9ヶ月で乳がん、精巣がん、骨肉腫等も発症し死に至った。マウスモデルではin vitro発がん再構成系を用いて特定の遺伝子変異を有する癌幹細胞を誘導し、PARP阻害剤を含む各種抗がん剤やDNA損傷応答に対する感受性の違いを明らかにした。Apc変異マウスの微小腺腫からの進展にはJNKの活性化によるRaptorのリン酸化を介したmTORC1の活性化が重要で、mTORキナーゼ阻害薬はmTORC1選択的阻害薬よりも腫瘍形成抑制効果が強いことを見だし、mTORが新規の予防・治療標的となる可能性を示した。ヒトHNPCCの原因遺伝子であるミスマッチ修復遺伝子MSH2欠損マウスにおいてMSH2が酸化ストレスに起因する発がんの抑制に重要な役

割を果たしていることを明らかにした。マウスの2つの発癌モデルにおいて、どちらもメトホルミン投与によりAMPKを活性化することによりポリープの増大が抑制されることを示し、ヒトにおいても大腸がんのハイリスク群にで、1カ月間の投与でACFが有意に減少することを示した。腫瘍組織で炎症反応依存的に発現誘導および発現抑制されるmiR-7を同定した。ヒト胃がん組織で発現が低く、胃がん細胞株の腫瘍原性を抑制するなどがん抑制性microRNAと考えられ、標的遺伝子として転写因子MafGを単離した。腸管Lgr5発現陽性細胞特異的にBcl11b片アレル消失を誘導すると、放射線照射後の細胞増殖停止の減弱と損傷からの早期回復が観察された。この減弱はDNA損傷の蓄積頻度の増加を示唆し、発がん修飾機構の一つと考えられた。

分担研究者

筆宝義隆	国立がん研究センター	ユニット長
益谷美都子	国立がん研究センター	分野長
木南 凌	新潟大学医学部	客員研究員
大島正伸	金沢大学がん進展制御研究所	教授
庫本高志	京都大学医学研究科	准教授
中島 淳	横浜市立大学医学部	教授
青木正博	愛知県がんセンター	部長
山下克美	金沢大学自然科学研究科	准教授
續 輝久	九州大学医学研究院	教授
竹下文隆	国立がん研究センター	主任研究員

A. 研究目的

動物モデルを用いてヒト大腸発がんの分子機構の解析機構を行い、最終的には早期診断や、テーラーメイドながん予防策の構築、がんに対する新規治療薬／予防薬開発のための標的候補分子の同定など臨床応用を目指す。特に、がんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化、およびその発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明に焦点を

当て以下の研究を展開する。

変異原性物質により誘発されるラット大腸発がんモデル系を用いた aberrant crypt foci を含む初期病変の包括的な同定、および同病変における遺伝子発現の解析により発がん初期の変化を検出する。また、マウス腸管細胞の in vitro 発がん再構成系も組み合わせ、発がん初期過程の分子レベルでの解析を進める。

DNA 損傷修復応答の異常やクロマチン、エピジェネティック制御の異常ががん化に寄与する分子機構は未だ明らかではない。これらに関わる因子の異常や幹細胞環境の異常から、がん化に至る過程を幹細胞を中心とした実験系で明らかにする。

ラットはある種の生理機能や薬物代謝能がマウスよりヒトに類似し、化学発がんモデルの学問的蓄積も大きい。しかしラット胚性幹 (Embryonic Stem, ES) 細胞の未樹立からノックアウト (KO) ラット作製はこれまで困難とされてきた。4 低分子化合

物によって樹立した ES 細胞から p53 KO ラットの作製に成功したことから、同ラットを用いて環境中発がん要因に対する発がん性や標的遺伝子の機能の解析等を行う。

発がんの母体細胞の同定は、発がん機構、がん治療を考える上で重要だが、組織幹細胞、分化細胞の両方にその可能性がある。そこで、Bcl11B の片アレルを消失し放射線発がん感受性が亢進したマウスを利用し、発症する胸腺リンパ腫と腸管腫瘍を対象に、発がん母細胞、放射線の標的細胞を同定し、放射線傷害の蓄積性や、放射線暴露健康リスクへのより適切な理解と評価を与えることを目指す。

肥満および内臓脂肪型肥満は大腸がんの確実な促進因子であるが、内臓脂肪より分泌されるアディポサイトカインが重要な役割を担う。アディポネクチン欠損マウスに高脂肪食を負荷しポリープおよび細胞増殖の変化を解析する。また、糖尿病薬として臨床応用されているメトホルミンは AMPK を活性化させ、細胞増殖を抑制すると考えられていることから、メトホルミンによるヒトでの大腸発がん抑制効果を明らかにする。

がん組織では COX-2/PGE2 シグナル経路の誘導に起因して炎症反応が誘導され、免疫細胞を含む微小環境が形成される。これらの作用により、腫瘍細胞の増殖や生存が亢進すると考えられるが、その分子機序は不明な点が多いため、炎症依存的に胃がんを発生するマウスモデル、および胃炎を発生するマウスモデルの組織を用いた網羅

的発現解析を行ない、炎症性微小環境による腫瘍形成促進の分子機構を解明する。

Apc Δ 716 マウスは大腸がん初期病変である腺腫性ポリープを発症するモデルであり、その腫瘍形成に mTOR complex 1 (mTORC1) と Smoothed が重要な役割を担うことを示してきた。これをさらに展開し、mTORC1 経路活性化機序、及び Smoothed による Wnt シグナル活性化機序を明らかにし、大腸がん発生初期段階を制御する分子機構を解明する。

Kyoto Apc Delta (KAD) ラットは、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である Apc 遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持ち、C 末 321 アミノ酸を欠く APC タンパク質を発現している。デキストラン硫酸塩 (DSS) の飲水投与によって誘発される大腸炎に対し、下痢や血便といった大腸炎症状が増悪かつ持続する。APC タンパク質 C 末端 321 アミノ酸部分と結合するタンパク質の同定、および結合タンパク質の炎症領域での局在を検討により、APC の大腸炎に関する分子機構を明らかにする。

MUTYH 遺伝子に変異を持つ MAP 患者では酸化ストレスに起因する突然変異が大腸がんを引き起こすことを MUTYH 欠損マウスを用いて示すとともに、臭素酸カリウム (KBrO3) 飲水投与による消化管での酸化ストレス誘発発がん系を用いて、ミスマッチ修復系が酸化ストレスに起因する発がんの抑制に果たす役割を解明し、ヒト遺伝性非腺腫性大腸がん (HNPCC) の発がん機序を考察する。

ラット大腸の発がん物質であり、ヒトへの曝露量が高い化学発がん物質である PhIP 曝露における DNA 損傷初期応答 (初期 DDR) について、DDR 関連タンパク質の動態を明らかにする。ラットへの PhIP の投与では生化学的解析が困難なため、ラット大腸上皮初代培養細胞を用いて DDR を解析することにより、in vivo での PhIP 処理に対する初期 DDR を考察する。

B. 研究方法

(1) 大腸発がん性と関連する特定 miRNA の誘導: 変異原性を有する HCA6 種類を、F344 ラットに経口投与後に大腸腺管を採取して RNA 抽出を行い、miRNA のマイクロアレイ解析を行い、大腸発がん性の有無と関連する特徴的な発現パターンの有無を調べた。さらに、統計学的手法で大腸発がん性と関連する遺伝子の絞り込みを行った。

(2) 大腸癌前がん病変新規マーカーとしての dysplasia-associated ACF (dACF) の確立: Azoxymethane 投与後のラット大腸固定標本に対し、ACF 検出のための通常メチレンブルー染色の後に、メタノールによる脱色過程を短時間加えることで、より特異的な前癌病変の検出を行った上でパラフィンブロックを作成し組織学的な解析を行った。また、同じ大腸検体に対して高度 dysplasia に対応するとされる mucin depleted foci (MDF) や flat-ACF、beta-catenin accumulating crypts (BCAC) などの病変の検出も連続して行い、dACF とこれらの病変との関係を解析した。

(3) 腸管細胞の in vitro 発がん再構成: 生後 3~5 週程度のマウス小腸から EDTA 入り PBS を用いて腺管部分を選択的に採取し、単細胞レベルまで分散させた後に、マトリゲルを用いて三次元培養を開始する。未分化な細胞がマトリゲル上に接着して増殖するため、約 1 週間後に、再び単細胞に分散させ、レンチウイルスベクターを用いて各種がん抑制遺伝子に対する shRNA を導入し、再び 3~4 週間 3 次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種する。4~6 週間後に腫瘍を回収し、組織学的な評価を行うと同時に再び培養をおこなった。

(4) マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株における DNA 損傷応答能と薬剤感受性: in vitro 発がん再構成で作成された spheroid 形成能を有するマウス腸管由来の腫瘍細胞株で各種抗がん剤に対する感受性を検討した。

(5) 胚細胞腫瘍形成時の trophoblast 分化の機構と PARP-1 のエピジェネティック制御への関与: H19 による Oct3/4 が Tet-off 系で誘導される ES 細胞株に H19 を強制発現させ、Cdx2 等の分化マーカー発現を検討した。

(6) 二本鎖 DNA 切断を介する幹細胞の形質転換と PARP-1 阻害による抑制: マウス ES 細胞株を新生児及び胎児の牛血清条件の分化環境に暴露し、ゲノム異常誘導と PARP 阻害剤などの抗がん剤による形質転換の抑制効果を経時的に調べた。

(7) p53 欠損ラットおよびキメララットの作成: 遺伝子を破壊したアレルを持つ ES 細胞 (p53+/-)

がジャームライントランスミッションを経て作製されたヘテロ型 p53+/-ラット同士を掛けあわせ、ホモ型 p53-/-ラットを得る。更に p53-/-ラットから樹立した p53-/-ES 細胞を野生型の受精卵にインジェクションして p53-/- キメララットを作製する。これらの個体を用いて、p53 欠損によるラットの発生や発がん感受性を解析する。

(8) Bcl11b 欠損による放射線感受性への影響：*Bcl11bflox/+*マウスは通常の方法で作製した。胸腺細胞の増殖、周期の測定は、マウス腹腔に BrdU 投与後 5 時間に計測した。腸管の解析は、12Gy の γ 線照射を行い、16 および 96 時間後に腸管を固定し、HE および組織免疫法で染色し行った。BCL11B 発現変異プラスミドは市販の変異導入キットを用いた。転写活性の測定には、HDM2、p21 プロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを作製し、HCT116 細胞 (p53+ および p53-) に導入後ルシフェラーゼアッセイ法で測定した。

(9) メトホルミンによる大腸がん抑制効果：アディポネクチンアディポネクチン欠損マウスに高脂肪食を付加しポリープおよび細胞増殖の変化を解析した。APCMin/+マウスおよび AOM 誘発化学発がんマウスの 2 つのモデルを用い、メトホルミンの大腸腫瘍抑制作用を検討した。また、ヒトにおいて、大腸がんのハイリスク群に対しメトホルミンを 1 カ月投与し、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF の変化を検討した。さらに、大腸ポリープの再発をエンドポイントとした前向き無作為臨床試験を

実施中である。

(10) 胃炎モデルと胃がんモデルマウスの比較による胃がん促進遺伝子の同定：Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE2 経路の相互作用により胃がんを発生するマウス (Gan マウス) と、COX-2/PGE2 依存的に胃炎を発生するマウス (K19-C2mE マウス) の胃組織を用いて microRNA 発現を、マイクロアレイにより網羅的に解析した。この結果から、発現低下する microRNA を選択して、がん抑制性 microRNA の候補とし、それらの詳細な発現解析および発現誘導等による腫瘍原性実験を行なった。

(11) APC/SMAD4 変異マウスにおける mTOR 経路と腫瘍進展の関係：*cis-Apc/Smad4* 複合変異マウスに mTORC1 選択的阻害薬 RAD001 または mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 をガバージ法により経口投与し、腫瘍組織における mTORC1、mTORC2 経路の活性化状態、腸管腫瘍の大きさ、数、局所浸潤の深さ等に与える影響を調べた。

(12) APC タンパク C 末端と相互作用するタンパクの探索：V5 タグ化 DLG1、DLG5 ベクターをそれぞれ作製して APC-C 末端発現ベクターと共トランスフェクションし、APC タンパク質 C 末端領域と各タンパク質との相互作用を検討した。5 週齢の雄 KAD および F344 ラットに 2% DSS を 1 週間飲水投与した。投与終了直後に大腸組織を採取してホルミン固定後、抗 CD31 抗体、および抗 EB1、DLG1、DLG5 抗体をそれぞれ用いて多重蛍光免疫染色を行った。

(13) Msh2 欠損マウスにおける酸化ストレ

ス誘発突然変異の解析：DNA 複製エラーの修復やある種の DNA 損傷によるアポトーシス誘導に関与するミスマッチ修復系の Msh2 遺伝子を欠損したマウスを用いて、(a)食品添加物としても使用されている酸化剤の KBrO₃ の 0.2%溶液を飲水投与し、酸化ストレス誘発発がん解析を行い、(b)酸化ストレス誘発消化管腫瘍を用いた癌関連遺伝子の変異解析を PCR-Direct sequencing 法を用いて行った。

(14)PhIP による DNA Damage (DDR) 誘発機構の解析：ラット大腸上皮初代培養細胞 (Passage 30-50) を用いて、PhIP 活性化のために S9 mix 存在下、種々の濃度で PhIP を加え、細胞を曝露した。PhIP 処理開始 6 時間後に細胞抽出液及び核画分を調製し、DDR 関連タンパク質の動態をウエスタンブロットティングにより解析した。PhIP の処理濃度は、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、大腸に対する非発がん物質として MeA α C 10 μ M を用いた。

(倫理面への配慮) 動物実験については、所属施設の定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は麻酔と放血の併用で行った。ヒト試料を用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん性と関連する特定 miRNA の誘導：クラスター解析の結果、PhIP を含め

た大腸発がん性 HCA と MeA α C を含む非大腸発がん性 HCA 3 種類ずつに分かれることを確認した。さらに、主成分分析でも、大腸粘膜の発現プロファイルから、サンプルが発がん性の有無に対応する 2 群に分かれた。また、2 群の層別化に最も貢献している遺伝子を統計学的に抽出したところ 3 遺伝子が選択され、重み付けをしたスコアを計算することで、発がん性の有無が高確率で正しく推定できることを確認した。これら 3 遺伝子はいずれも p53 経路と関連し、幹細胞マーカー遺伝子をその標的に含むという共通点を有していた。

(2) 大腸癌前がん病変新規マーカーとしての dysplasia-associated ACF (dACF) の確立：ラット AOM 誘発大腸発がん系において、通常の ACF 検出法に染色時間の延長と脱色過程の追加など若干の改変を加え、さらに腺管の開口部の形状が圧排されている病変のみを抽出したところ、組織学的に異形成と診断される病変を選択的に検出することに成功した。こうした病変を dACF と命名し、classical ACF (cACF) と比較したところ、cACF の約 1/3 程度が dACF として検出され、dACF として新規に検出される少数の病変と加えて、ほぼ組織学的に dysplasia に対応した。また、新規に dACF として検出された病変は severe dysplasia に対応し、MDF や BCAC などすべて含んでいた。

(3) 腸管細胞の in vitro 発がん再構成：腫瘍の形成には APC 遺伝子のノックダウンが必須であり、他のがん抑制遺伝子に対する

shRNA を組み合わせることで腫瘍形成が促進された。これらの腫瘍は再移植可能であり、組織型、大きさともに元の腫瘍と同様の腫瘍形成が再現された。正常腸管細胞とは異なり、浮遊培養での spheroid 形成能の獲得や CD133/CD44 など癌幹細胞マーカーの上昇なども確認され、tumor-initiating cell が誘導されていると考えられた。

(4) マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株における DNA 損傷応答能と薬剤感受性：マウス腸管幹細胞由来腫瘍細胞は DNA 修復応答能に異常を示し、PARP 阻害剤やブレオマイシン等の抗がん剤に対する感受性と関連する可能性が示唆された。腸管幹細胞からの腫瘍化の過程でがん抑制遺伝子の機能欠損に平行して、DNA 修復応答経路の異常が誘導されることが腫瘍化を促進していると考えられる。

(5) 胚細胞腫瘍形成時の trophoblast 分化の機構と PARP-1 のエピジェネティック制御への関与：胚細胞腫瘍形成時等の異所的環境下では、*H19* の異常発現は胚細胞から trophoblast 系譜への分化の commitment に重要な転写因子 *Cdx2* の発現を、その抑制因子 Oct3/4 存在下でも誘導し、trophoblast 系譜への分化を惹起しうることがわかった。また、PARP-1 の抑制はエピジェネティック制御の異常を介して *H19* 発現を誘導し、trophoblast 系譜への分化を促進することが更に示唆された。

(6) 二本鎖 DNA 切断を介する幹細胞の形質転換と PARP-1 阻害による抑制：PARP 阻害

剤は正常幹細胞からの不死化過程で細胞死を誘導し、ゲノム異常を介するがん化につながる形質変換を抑制した。

(7) p53 欠損ラットおよびキメララットの

作成：p53^{+/-} ES 細胞を受精卵に導入するとキメララットが容易に作製でき、掛け合わせにより p53^{+/-} ラット、更には p53^{-/-} ラットを作製することに成功した。しかし、雌は胎児期に神経管閉鎖障害を発症し、ほとんどが致死に至る事がわかった。p53^{-/-} 雄ラットは4ヶ月以内のがんを発症し、死亡することを確認した。p53^{-/-} マウスは主にリンパ腫を発症するのに対し、p53^{-/-} ラットの場合は肉腫を発症し、マウスとは異なる表現型を有した。また、p53^{+/-} ラットは9ヶ月で乳がん、精巣がん、骨肉腫等も発症し、死に至った。一方、p53^{-/-} キメララットの発生が正常に行われず、雌雄共に胎児期に致死となることが分り、原因としてキメラに寄与した p53^{-/-} 細胞の染色体異常が考えられる。p53^{-/-} キメラ法により p53 は個体発生時にも「ゲノムの守護神」として機能することが示された。

(8) Bcl11b 欠損による放射線感受性への影

響：T-ALL で BCL11B の変異や片アレル消失が報告されているが、これらの変化がもたらす影響について解析した。胸腺細胞で特異的に Bcl11b 片アレル消失するマウスの解析から、増殖能をもつ ISP 細胞はこの消失により放射線照射後の細胞周期進行停止を減弱することがわかった。次に、ヒト T-ALL で報告された8種類の点変異について、HDM2 および p21 のプロモーター活性

に与える影響を、p53 活性の有無の条件下で調べた。変異はどちらの転写抑制活性も減弱させたが、HDM2 プロモーターでは、p53 が欠損していると変異の影響が見られなくなった。すなわち、p53 が存在するときのみ、変異の効果がみられた。Lgr5 発現陽性細胞でのみ Bcl11b 片アレル消失するマウスを作製し、解析した。12Gy の γ 線を照射し、16 および 96 時間後に腸管クリプトの増殖について調べた。細胞増殖停止の減弱と早期回復が観察された。一方、両アレルが消失するマウスのクリプトは維持能低下を引き起こし、Bcl11b 発現消失幹細胞は存続能低下を示した。

(9) メトホルミンによる大腸がん抑制効果

：アディポネクチン欠損マウスでは高脂肪食付加で有意なポリープの増加、細胞増殖の亢進を認めた。この機序として、アディポネクチン欠損と高脂肪食付加によって mTOR/S6K/S6 pathway が活性化することが関与していた。また、アディポネクチンの発がん抑制作用は Adipo R1 の標的分子である AMPK を介しことが示唆された。また、マウスの2つの発癌モデルにおいて、どちらもメトホルミン投与により AMPK を活性化することによりポリープの増大が抑制されることを示した。またヒトにおいて大腸がんのハイリスク群に対するメトホルミンの腫瘍への作用を、大腸がんのサロゲートマーカーである ACF を色素拡大内視鏡で観察し検討し、1 カ月間の投与で ACF は有意に減少した。

(10) 胃炎モデルと胃がんモデルマウスの

比較による胃がん促進遺伝子の同定：マイクロアレイ解析により、21 個の microRNA が胃がんと胃炎の双方で発現上昇しており、29 個の microRNA が胃がんと胃炎の双方で発現低下していた。したがって、これらのがん組織における microRNA 発現変化は炎症反応依存的と考えられた。炎症依存的に発現誘導された microRNA の中に、miR-155 や miR-21 などのがん遺伝子として作用するものが認められ、一方で発現抑制された microRNA には、miR-7 や miR-143/145 などのがん抑制性に作用する事が示唆されるものが含まれており、これらの発現制御も炎症に依存すると考えられた。本研究では発現抑制された microRNA について解析を進めた。miR-7 はヒト胃がんでも発現抑制が認められ、株化胃がん細胞に導入すると軟寒天中のコロニー形成が抑制され、標的遺伝子が発がん促進に作用すると考えられた。miR-7 の新規標的遺伝子として転写因子 MafG などを単離した。一方、miR-143/145 の発現について、レーザーマイクロダイセクションにより細胞成分別に発現解析した結果、上皮細胞での変化は見られず、周囲の間質細胞で発現変化していることが明らかとなった。

(11) APC/SMAD4 変異マウスにおける mTOR 経路と腫瘍進展の関係

：cis-Apc/Smad4 マウスの腸管に発症する局所浸潤性の腺がんにおいても mTORC1 経路の活性化が認められたため、mTORC1 選択的阻害薬 RAD001 を6週齢から8週間投与したところ、Apc Δ 716 マウスの場合ほど顕著な効果ではなかつ

たが、直径が 2 mm を超える大きな腫瘍の数が有意に減少した。また、腫瘍の浸潤能が強く抑制されていた。さらに、RAD001 の長期間投与によって cis-Apc/Smad4 マウスの生存期間は大幅に延長した。一方、RAD001 を長期間投与した Apc Δ716 マウスに残存する腫瘍では mTORC2 経路の活性化が認められた。そこで、mTOR キナーゼ阻害薬である AZD8055 を cis-Apc/Smad4 マウスに投与したところ、腫瘍における mTORC1、mTORC2 両経路の阻害に伴って、直径が 1.5 mm を超える大きな腫瘍の数が著しく減少した。

(12) APC タンパク C 末端と相互作用するタンパクの探索

免疫沈降実験の結果、APC タンパク質 C 末端領域は、従来結合が確認されている EB1、DLG1 タンパク質だけでなく、DLG5 との結合が観察された。またこの結合には、DLG5 の PDZ ドメインが必須であることが明らかとなった。また多重蛍光免疫染色の結果、DLG5 は APC と同様に、大腸炎症領域において血管内皮細胞に強い発現が観察された。

(13) Msh2 欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析

0.2% KBrO3 を 16 週間飲水投与された野生型マウス (5 匹)、Msh2 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体 (6 匹)、ホモ接合体 (7 匹) の小腸に、それぞれ 1 個体当たり 1.2 ± 0.98 、 1.5 ± 1.26 、 27.0 ± 7.44 (mean \pm SD) 個の腫瘍が生じていた。非投与群の野生型およびヘテロ接合体では腫瘍は検出されず、ホモ接合体には 1 個体当たり平均 1.2 ± 0.75 個の腫瘍が観察され

た。これらの KBrO3 投与で誘発された腫瘍は、1 例のカテゴリ-3 を除き全てヴェエナ分類のカテゴリ-4 と診断された。ホモ接合体に誘発された 89 個の腫瘍における Ctnnb1 遺伝子の変異解析の結果、27 個 (30.3%) の腫瘍で変異を認めた。内訳は、G:C→A:T 変異が 20 個 (74.1%)、A:T→G:C 変異が 3 個 (11.1%)、G:C→T:A 変異と G:C→C:G 変異がそれぞれ 2 個 (7.4%) であった。

(14) PhIP による DNA Damage (DDR) 誘発機構の解析

解析した DDR 関連タンパク質は、p53、S15 リン酸化 p53 (pS15-p53)、p21、S345 リン酸化 Chk1 (pS345-Chk1)、S139 リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) である。p53 は、各濃度の PhIP 処理において PhIP 濃度依存的に発現量が上昇した。p53 の標的遺伝子であり DNA 損傷で発現が上昇する p21、ATM/ART によりリン酸化/活性化され p53 の S15 をリン酸化する pS345-Chk1 などのリン酸化レベルも、PhIP 濃度に依存した上昇が認められた。一方、 γ -H2AX のリン酸化は 1-2.5 μ M の PhIP で最高値に達し、より高濃度の PhIP 処理においてもそのレベルに変化はないという結果が得られた。対照として用いた MeA α C は 10 μ M において、溶媒である DMSO に S9 mix を加えたサンプルと同様に、上述のタンパク質の動態に変化を認めなかった。

D. 考察

(1) 大腸発がん性と関連する特定 miRNA の誘導

PhIP も含めた Heterocyclic amine (HCA) 類の変異原性や発がん性は、

DNA 付加体の形成を介した突然変異の誘発が関与することが知られているが、その発がん性には臓器特異性があり、その決定機構は不明だった。今回明らかにした miRNA 発現パターンと大腸発がん性の相関は、PhIP 誘発大腸発がん誘導にも関与する可能性を示唆しており、今後の解析が必要である。特に、中心的に関連する 3 遺伝子は p53 経路にあると同時に、幹細胞マーカーとして知られる遺伝子を標的に含んでいることは興味深い。発がん過程では iPS 細胞同様に reprogramming が起きている可能性が指摘されているが、p53 も未分化マーカー遺伝子も reprogramming そのものまたはその効率に影響を与えることが知られており、これらが発がんに関与する分子機構を明らかにしていくことが今後の課題である。

(2) 大腸癌前がん病変新規マーカーとしての dysplasia-associated ACF (dACF) の確立：大腸多段階発がんにおいて最も初期の前癌病変とされる aberrant crypt foci (ACF) の数は、化学発がんや予防実験で発がん性の早期の指標として広く採用されてきたが、大多数は癌まで進展しないことから真の前癌病変ではないとする批判がある。一方、より特異的な前癌病変とされる mucin depleted foci (MDF) や beta-catenin accumulating crypts (BCAC) などが新規マーカーとして提唱されているが、病変の数の少なさや検出の煩雑さから一般的な指標として採用されるにいたっていない。Dysplasia は特異性、数ので

理想的な前癌病変とされてきたが、固定大腸標本上では形態学的に必ずしも明らかでなく、パラフィンブロックでの組織学的解析が必須であることが難点であった。今回 dysplasia が dACF として容易に同定可能になったこと、さらに cACF と組み合わせることで前癌病変が連続的に評価可能になったことは、発がん過程の詳細な解析をする上で極めて意義が大きいと考えられる。また、発がん試験や予防試験における新規の発がん性の指標としての有用性も高いと考えられる。

(3) 腸管細胞の in vitro 発がん再構成：誘導された皮下腫瘍は組織学的には腺管構造を有する腺癌類似の形態を示し、多数の間質細胞の浸潤を認めたが、短期間の培養により上皮のみ選択的に培養可能であった。このことは、特定の遺伝子変異を有するカスタム細胞株を作成することを可能にし、将来的な分子標的薬の開発における有用なツールになると考えられる。また、腫瘍細胞は spheroid 形成能を獲得したことから幹細胞性を有しているはずだが、幹細胞マーカーの解析では正常幹細胞ではなく癌幹細胞のマーカーが高発現であり、再移植により同様の腫瘍を形成したことから癌幹細胞の誘導が示唆された。

(4) マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株における DNA 損傷応答能と薬剤感受性：マウス腸管幹細胞から腫瘍形成時に APC, PTEN というがん抑制遺伝子の機能欠失とともに DNA 修復応答経路の異常が誘導されることが腫瘍化を促進していると考えられる。

(5) 胚細胞腫瘍形成時の trophoblast 分化の機構と PARP-1 のエピジェネティック制御への関与：PARP-1 の機能異常はエピジェネティック制御の異常を介して H19 発現を誘導し、trophoblast 系譜への分化を促進すると考えられる。

(6) 二本鎖 DNA 切断を介する幹細胞の形質転換と PARP-1 阻害による抑制：血清環境の違いがマウス ES 細胞において二本鎖 DNA 切断等を誘導し、変異の導入に寄与することが示唆された。PARP 阻害剤が腫瘍化の早期の過程で二本鎖 DNA 切断誘導に伴うゲノム不安定性の誘導を介する形質転換を抑制しうることがわかった。

(7) p53 欠損ラットおよびキメララットの作成：雌雄における差もみられたが、p53 遺伝子の機能がラットの発生に必須であることが初めて示された。胚発生時のゲノム異常は奇形や致死性の原因となるが、ラットは外的刺激やストレスによる影響をマウスよりも受けやすいため、マウスでは認められなかった胚発生異常が p53 KO キメララットで発生したと考えられる。がんにおいても、野生型ラットで認められる自然発がんがマウスではほとんど検出されないことから、ラットは環境中の発がん物質に高い感受性を示すと考えられる。ラットでのノックアウト技術はこれまで非常に困難とされていたが、我々は安定的な ES 細胞の樹立および培養法を開発したことによって、容易に KO ラットを作製することが可能になった。今後、環境中の発がん要因に対する標的遺伝子等を欠損させた

ラットを作製することでマウス研究では明らかに出来なかった新しい発がん機序の解明が期待できる。

(8) Bcl11b 欠損による放射線感受性への影響：胸腺細胞特異的に Bcl11b 片アレル消失させると、放射線照射後の細胞周期進行停止を減弱することがわかった。停止が減弱すると、複製時に生じる DNA 損傷が蓄積する頻度が増すことになり、これが発がん機構の一つと考えられた。BCL11B 変異による HDM2 転写抑制の減弱は、p53 が存在するときのみ観察されたが、両者の機能的関連性を示唆する。ヒト T-ALL の 70% は p53 変異がなく、このタイプの T-ALL で BCL11B 変異がその代替えとしての役割を担う可能性が示唆された。Lgr5 発現幹細胞での Bcl11b 片アレル消失は、クリプの細胞増殖停止の減弱と損傷からの早期回復をもたらした。この作用は Bcl11b がハプロ不全ながん抑制遺伝子として、発がんに貢献することと合致する。一方、両アレル消失は、クリプトの維持能低下を引き起こし、Bcl11b 発現消失幹細胞は存続能が低下した。腸管腫瘍形成という点では両アレル欠損はみられず、この低下は腫瘍形成に負に働くという仮説と一致する。

(9) メトホルミンによる大腸がん抑制効果：本邦において大腸がんは増加しており、リスクファクターとして遺伝的要因のほかに肥満、糖尿病など生活習慣病としての一側面を持つため、これらの改善およびメトホルミンなど抗糖尿病薬が大腸発がん予防となる可能性がある。前向き無作為

化試験により有効性を実証する必要がある。現在、ポリペクトミーによりクリーンコロソとなった患者を対象にポリープの再発をエンドポイントとしたメトホルミンとプラセボを用いた無作為対照前向き試験を実施中である。

(10) 胃炎モデルと胃がんモデルマウスの比較による胃がん促進遺伝子の同定：胃がんおよび胃炎マウスモデルを用いた発現解析により、腫瘍組織で発現変化する microRNA の中から、炎症依存的に変化するものを抽出することが出来た。さらに、炎症依存的に発現抑制される miR-7 が、実際にがん抑制性作用がある事から、miR-7 のデリバリーや、その標的遺伝子産物に対する阻害薬が、発がんを抑制する可能性が考えられた。一方で、多くのがん抑制性 microRNA は、上皮細胞で発現低下することで標的となる増殖因子の発現が亢進すると考えられているが、本研究により上皮細胞ではなく間質細胞で発現変化がある分子も認められ、microRNA 発現抑制による発がん促進機構にも上皮-間質の相互作用が関与する可能性が考えられた。今後、microRNA による発がん制御を解明するためには、がん組織を構成する各細胞成分特異的な microRNA 発現変化の解析を進めていく必要性も考えられた。

(11) APC/SMAD4 変異マウスにおける mTOR 経路と腫瘍進展の関係：cis-Apc/Smad4 マウスの腸管腫瘍形成に対する RAD001 の抑制効果から、悪性の腸管腺がんの成長や浸潤においても mTORC1 経路が一定の役割を果

たしていることが明らかになった。RAD001 を長期間投与した Apc Δ 716 マウスの腫瘍において mTORC2 経路が活性化されていたのは、mTORC1 経路の不活化によってフィードバック経路が活性化されたためと考えられる。mTORC1 経路と mTORC2 経路の両方を阻害する AZD8055 が RAD001 よりも強い腫瘍形成抑制能を示したことから、mTORC2 経路も腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。mTORC 経路が浸潤に直接関与しているのか、或いは腫瘍の成長を介して間接的に関与しているのかについては今後の検討課題である。

(12) APC タンパク C 末端と相互作用するタンパクの探索：DLG ファミリーは細胞接着に関与するアダプタータンパク質である。従って今回の結果から、KAD ラットでは、APC タンパク質と DLG5 タンパク質との相互作用の欠損が血管内皮細胞の接着異常を引き起こし、血管新生の遅延を伴う大腸炎症の持続を導いたと考えられた。近年 DLG5 は、大腸の慢性炎症を主症状とするヒト炎症性腸疾患の関連遺伝子として報告されていることから、本研究結果は、APC と DLG5 との相互作用が、ヒト炎症性腸疾患の病態に寄与することを示唆するものである。

(13) Msh2 欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析：ミスマッチ修復遺伝子の欠損による HNPCC の発症には、酸化ストレスが要因であることが考えられる。本研究で、KBr03 の投与により酸化ストレスが付与された Msh2 遺伝子欠損マウスの腸管では、顕著に上皮性腫瘍の発生頻度の

上昇が認められた。このことは、上記の仮説を強く支持する。Msh2 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍での Ctnnb1 遺伝子を解析した結果、8-oxoG に起因する G:C→T:A 変異は少なく、大多数は G:C→A:T 変異であることから、ミスマッチ修復は 8-oxoG の除去には直接関与していない可能性が示唆された。今後はミスマッチ修復機構が関与していると考えられている酸化ストレス誘発細胞死の解析や長期間 KBrO3 投与された Msh2 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体の詳細な解析を行うことで、ミスマッチ修復遺伝子の欠損によるヒトの HNPCC の発がん機序の解明を進めたい。

(14)PhIP による DNA Damage (DDR)誘発機構の解析：ラットの個体を使った PhIP 投与による標的臓器の一つである大腸上皮細胞における DDR 初期過程の生化学的解析が困難なため、初代培養細胞を用いて解析を行った。研究結果の項で述べたように、代表的な DDR 因子である p53 をはじめとして、解析した全ての因子において、発現亢進や DDR 特異的な部位のリン酸化を認めた。個体での発がん実験における血中濃度と推定される 3-4 μ M の PhIP 処理において、DDR 因子に明らかな変化を認めた。更に、より低濃度の PhIP でも DDR 応答が検出される場合があることがわかった。このことは、発がんの閾値より低い濃度の PhIP により DNA 損傷が誘発されており、PhIP が大腸がんの誘発因子である可能性を示唆するものである。今後は特に低濃度の PhIP 処理に着目して、他の DDR 関連因子の動態

を解析し、PhIP が大腸がんの誘発因子の一つであることを証明する予定である。

E. 結論

ラットモデルにおいて、発がん物質 PhIP の大腸発がん性と特定の miRNA の誘導の間に高い相関関係を見だし、その発がん分子機構として従来の DNA 付加体形成とは異なる経路の存在が示唆された。大腸がん早期病変として特異的な前癌病変である dysplasia を簡便に検出する dACF を新規病変として確立し、既存の病変との関係を示した。マウス in vitro 発がん再構成系で作成した腫瘍の解析により、特定の遺伝子変異を有する癌幹細胞が誘導されていることが示唆され、オーダーメイドがん細胞株としても有用と考えられた。

PARP 阻害剤は正常幹細胞からの不死化過程で細胞死を誘導することから、早期の制がんに応用できる可能性が示された。胚細胞腫瘍形成過程で腫瘍の成長を支持する trophoblast 系譜の誘導は PARP-1 機能欠損やエピジェネティック異常による H19 の発現を介して起きることが判明した。この遺伝子座の異常を防ぐことは胚細胞腫瘍発生の予防に資する可能性があると考えられる。

p53 KO ラットは乳がん、精巣がん、骨肉腫などマウスとは異なる多様ながんを発症することから、マウスでは困難であったヒトがんモデルの作製、マウスでは見いだせなかったがん発症メカニズムの解明、環境因子による化学発がん機序の解明など

に有用であると考えられる。K0 ラットで発生した腫瘍の原発巣から細胞株の樹立に成功しており、個体のみならず、細胞株によるスクリーニングなどの解析、創薬研究への応用も期待される。一方、p53 はこれまで個体発生後にがんを抑制する遺伝子として考えられてきたが、本研究結果により胚発生にも必須の遺伝子であることが示された。ラットで遺伝子をノックアウトするとマウスでは観察されなかった表現型が出る可能性が他の遺伝子についてもあるため、今後は環境因子による発がん機序に関する遺伝子の K0 ラット作製を行い新たな発がんメカニズムを解明する。

ヒト白血病 T-ALL で BCL11B 変異と片アレル消失が観察されるが、これらの遺伝子変化の及ぼす影響を調べた。片アレル消失は放射線照射後の細胞周期進行の停止を減弱することが Bcl11bflox/+マウスを用いて確認された。一方、変異の影響は、p53 分解を行う HDM2 の転写を培養系で測定した。変異は HDM2 転写抑制効果を減弱させたが、この減弱は p53 が欠損していると考えられなかった。これらの結果は、p53 変異のない T-ALL では BCL11B 変異がその代替えとしての役割を担う可能性を示唆する。一方、腸管 Lgr5 発現陽性細胞でのみ Bcl11b 片アレル消失する、Lgr5-Cre; Bcl11bflox/+マウスで、放射線照射後の細胞増殖停止の減弱と損傷からの早期回復が観察された。この減弱は DNA 損傷の蓄積頻度の増加を示唆し、これが発がん修飾機構の一つと考えられる。BCL11B のがん抑制

遺伝子としての役割、放射線傷害の蓄積性を担う細胞種に関する知見は、放射線暴露健康リスクへの評価の基盤を与える。

本邦において大腸がんは増加しており、リスクファクターとして遺伝的要因の他に肥満、糖尿病など生活習慣病としての側面を持つため、これらの改善およびメトホルミンなど抗糖尿病薬が大腸がん予防となる可能性がある。前向き無作為化試験により有効性を実証する必要があり、現在そのための臨床試験を実施中である。

胃がんおよび胃炎モデルマウスの組織を用いて、microRNA 発現の網羅的解析を行った。その結果、腫瘍組織で炎症反応依存的に発現誘導および発現抑制される microRNA を特定した。この中で、炎症により発現抑制される miR-7 は、ヒト胃がん組織でも発現低下しており、株化胃がん細胞の腫瘍原性を抑制することから、がん抑制性 microRNA と考えられた。miR-7 の新規標的遺伝子として転写因子 MafG を単離した。一方で、炎症依存的に発現抑制される miR-143/145 は、腫瘍上皮細胞ではなく間質細胞で発現変化していることが明らかとなり、上皮-間質相互作用が関与する発がん促進機構が考えられた。また、細胞成分特異的な microRNA 発現解析の重要性も明らかとなった。

これまでに、Apc 変異マウスの腸管に生じる良性の微小腺腫が大きな腺腫に成長するためには JNK の活性化を介した mTORC1 の活性化が必要なこと、さらに JNK は Raptor を直接リン酸化することによって

mTORC1 を活性化すること、cyclin E、osteopontin、proliferin が mTORC1 による翻訳レベルでの発現調節に加えて c-Jun の活性化による転写レベルでの発現制御を受けていることを明らかにした。本年度の研究成果から、mTORC 経路は悪性の腸管腺がんの形成、浸潤能にも重要な役割を果たすこと、そして mTOR キナーゼ阻害薬は mTORC1 選択的阻害薬よりも腫瘍形成抑制効果が強いことが明らかになった。腸がんを自然発症する遺伝子改変マウスモデルの腫瘍形成に対する mTORC 経路阻害薬の効果についてはこれまでに報告がなく、大腸がんの予防・治療標的となる可能性がさらに強くなった。

KAD ラットで欠損する C 末端領域は DLG5 タンパク質と結合することを明らかとした。この相互作用の欠損が KAD ラットで観察された血管内皮細胞の接着異常、血管新生の遅延を伴う大腸炎症の持続を導いたと考えられた。DLG5 は、ヒト集団を用いた遺伝解析から、炎症性腸疾患の発症に係るとされる。従って、APC がヒト大腸炎、炎症性腸疾患の発症に係っている可能性が示された。本研究を発展させることで、Apc 遺伝子の生体内における新たな機能、および炎症性腸疾患との関連性を明らかにできることが期待される。

ミスマッチ修復遺伝子に変異するとヒトでは HNPCC が発生する。他の臓器に比べて消化管は酸化ストレスの負荷が大きいことを示すデータを得ていたため、ミスマッチ修復遺伝子欠損による HNPCC の発症に

は、酸化ストレスが環境要因であるという仮説を立てた。今回、私達は KBrO3 投与が Msh2 遺伝子欠損マウスの腸管上皮性腫瘍の発生頻度を顕著に上昇させる事を見出し、ミスマッチ修復因子 MSH2 が酸化ストレスに起因する発がんの抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにした。従って、ミスマッチ修復機能の欠損によって引き起されるヒト HNPCC 発症には酸化ストレスが要因であることが強く示唆される。また、ミスマッチ修復が 8-oxoG の修復に直接関わっていないことが示唆された。ミスマッチ修復遺伝子の欠損によって引き起されるヒト HNPCC の発がん機序解明のために酸化ストレス誘発変異の詳細な解析を進めていく必要がある。

ラット大腸上皮由来の初代培養細胞を用いて、ラット大腸がん因子である PhIP による DNA 損傷応答 (DDR) の初期過程 (6 時間の PhIP 処理) を、DDR 関連因子の動態を、ウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。p53 は処理濃度依存的に発現が亢進した。p53 の DDR 関連リン酸化部位である S15 のリン酸化も、PhIP 濃度依存的に上昇した。p53 の標的遺伝子である p21 の発現も PhIP 濃度依存的であった。p53 の活性化に関わる Chk1 の S345 のリン酸化の亢進も PhIP 濃度依存的であった。DNA 鎖切断指標の H2X の S139 のリン酸化 (γ -H2X の出現) は、低濃度の PhIP 処理でプラトーに達することが示唆された。これらの結果は、6 時間の PhIP 処理によりラット大腸上皮由来の

初代培養細胞において、DDR が引き起こされていることを示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Lin CJ, Nasr Z, Premrurit PK, Porco JA Jr, Hippo Y, Lowe SW, Pelletier J. Targeting synthetic lethal interactions between Myc and the eIF4F complex impedes tumorigenesis. Cell Rep. 1(4):325-33 (2012)

2) Fujimori H., Shikanai M., Teraoka H., Masutani M., Yoshioka K. Induction of cancerous stem cells during embryonic stem cell differentiation. J Biol Chem. 287(44): 36777-91 (2012)

3) Osada T., Rydén A.M., Masutani M. Poly(ADP-ribosylation) regulates chromatin organization through histone H3 modification and DNA methylation of the first cell cycle of mouse embryos. Biochem Biophys Res Commun. 434:15-21 (2013)

4) Osawa T., Atsumi Y., Sugihara E., Saya H., Kanno M., Tashiro F., Masutani M. Yoshioka K. Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization of cells with stable genomes. Biochem Biophys Res Commun. 432(1):34-9 (2013)

5) Uchino, K., Takeshita, F., Takahashi, RU., Kosaka, N., Fujiwara, K., Naruoka, H., Sonoke, S., Yano, J., Sasaki, H., Nozawa, S., Yoshiike, M., Kitajima, K., Chikaraishi, T., Ochiya, T. Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression. Mol Ther., 21: 610-619 (2013)

6) Fujita, T., Yanagihara, K., Takeshita, F., Aoyagi, K., Nishimura, T., Takigahira, M., Chiwaki, F., Fukagawa, T., Katai, H., Ochiya, T., Sakamoto, H., Konno, H., Yoshida, T., Sasaki, H. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. Cancer Sci., 104: 214-222 (2013)

7) Fujita, Y., Takeshita, F., Kuwano, K., Ochiya, T. RNAi Therapeutic Platforms for Lung Diseases. Pharmaceuticals, 6: 223-225 (2013)

8) Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., Ochiya, T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. Sci. Rep., 3: 1197 (2013)

9) Kosaka, N., Takeshita, F., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Katsuda, T., Ono, M., Ochiya, T. : Exosomal tumor-suppressive

- microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65: 376-382 (2013)
- 10) Takeshita, F., Takahashi, R.U., Onodera, J., Ochiya, T. In vivo imaging of oligonucleotide delivery. *Methods Mol. Biol.*, 872: 243-253 (2012)
(連携研究者の川又による発表)
- 11) Hong, J., He, H., Bui, P., Ryba-White, B., Rumi, M.A., Soares, M.J., Dutta, D., Paul, S., Kawamata, M., Ochiya, T., Ying, Q.L., Rajanahalli, P. and Weiss, M.L.: A focused microarray for screening rat embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev.*, 22: 431-443 (2013)
- 12) Kawamata, M. and Ochiya, T.: Two distinct knockout approaches highlight a critical role for p53 in rat development. *Sci. Rep.*, 2: 945 (2012)
- 13) Go R., Hirose S., Katsuragi Y., Obata M., Abe M., Mishima Y., Sakimura K., Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes in mice conditionally losing one Bcl11b allele. *Cancer Sci.* in press (2013)
- 14) Tanaka H., Naito T., Muroi S., Seo W., Chihara R., Miyamoto C., Kominami R., Taniuchi I. Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4+ helper-lineage fate in the thymus. *EMBO J.* 32: 1183-1194 (2013)
- 15) Okumura K., Sato M., Saito M., Miura I., Wakana S., Mao JH., Miyasaka Y., Kominami R., Wakabayashi Y. Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms. *Carcinogenesis* 33: 2260-2268 (2012)
- 16) Go R., Takizawa K., Hirose S., Katsuragi Y., Aoyagi Y., Mishima Y., Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leuk Res.* 36: 1035-1040 (2012)
- 17) Ohkubo H., Takahashi H., Yamada E., Sakai E., Higurashi T., Uchiyama T., Hosono K., Endo H., Taguri M., Nakajima A.: Natural history of human aberrant crypt foci and correlation with risk factors for colorectal cancer. *Oncol Rep.* 27(5): 1475-1480 (2012)
- 18) Higurashi T., Takahashi H., Endo H., Hosono K., Yamada E., Ohkubo H., Sakai E., Uchiyama T., Hata Y., Fujisawa N., Uchiyama S., Ezuka A., Nagase H., Kessoku T., Matsuhashi N., Nakayama S., Inayama Y., Morita S., Nakajima A.: Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*, 12(1):