

118 (2012)

19) Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Iida H, Uchiyama T, Ezuka A, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Maeda S, Morita S, Natsumeda Y, Nagase H, Nakajima A: Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*, 12(1): 413 (2012)

20) 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*, 24(5):353-357 (2012)

21) 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*, 18(38): 5360-5368 (2012)

22) Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, Nakajima A: IL-6 plays crucial roles in sporadic colorectal cancer through the cytokine networks including CXCL7 PP. *J Cancer Ther*, 3(6): 874-879 (2012)

23) Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T,

Hosono K, Endo H, Nakajima A: Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy. *World J Gastrointest Endosc*, 4(12): 561-564 (2012)

24) Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa T, and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*, 31: 3949-3960 (2012)

25) Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormach W, Hughes N, Dev A, Sievert W, Ooi CH, Ishikawa TO, Oshima H, Bhathal PS, Parker A, Oshima M, Tan P, and Jenkins B. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell*, 22: 466-478 (2012)

26) Oshima H and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106 (2012)

27) Oshima H and Oshima M. The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150 (2013)

28) Sakuma, K., Aoki, M., and Kannagi R. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:7776-7781 (2012)

29) Kazuto Yoshimi, Takuji Tanaka, Tadao Serikawa, Takashi Kuramoto Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 182(4):1263-74 (2013)

30) Kazuto Yoshimi, Takao Hashimoto, Yusuke Niwa, Kazuya Hata, Tadao Serikawa, Takuji Tanaka, Takashi Kuramoto Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone *Apc*-mutant rat as a chemotherapeutic bioassay. *BMC Cancer*, 12(1):448 (2012)

31) 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 MAP01 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11: 259-266 (2012)

## 2. 学会発表

1) 小沼邦重、筆宝義隆、落合雅子、中釜齊: レンチウイルスを用いたマウス腸管

細胞での発がん再構成、第27回発がん病理研究会 (2012年8月修善寺)

2) 筆宝 義隆: 「マウス初代培養細胞の *in vitro* 発がん再構成系」を用いた化合物発がん性予測法の開発. 第1回新LRI研究報告会 (2012年8月東京)

3) Yoshitaka Hippo, Kunishige Onuma, Masako Ochiai, and Hitoshi Nakagama, K-ras Activation Accelerates Apc-dependent Intestinal Tumorigenesis Reconstituted In Vitro. 第71回日本癌学会学術総会 (2012年9月札幌)

4) 小沼 邦重、筆宝 義隆、落合 雅子、中釜 齊: マウス腸管発がん再構成系を用いて作製した腫瘍の解析. 第71回日本癌学会学術総会 (2012年9月札幌)

5) 落合雅子、小沼邦重、筆宝義隆、中釜齊: 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9月札幌)

6) 小沼邦重、筆宝義隆、土橋祥子、折橋郁、中釜齊: *in vitro* におけるマウス腸管上皮細胞を用いた発がん再構成. 平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(2013年2月大津)

7) 筆宝義隆、落合雅子、岡本康司、中釜齊: ラット大腸における長期発がん性と関連する microRNA 発現誘導. 平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(2013年2月大津)

8) Yoshitaka Hippo, Kunishige Onuma, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi

Nakagama: Lentivirus-based Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Primary Intestinal Cells. 第10回国際フォスファターゼ学会 (2013年2月東京)

9) Yoshitaka Hippo and Hitoshi Nakagama: Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Murine Primary Intestinal Cell. 第9回日米癌学会合同会議 (2013年2月米国ハワイ)

10) Hiroaki Fujimori, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani. PARP inhibitor induces DNA hypomethylation of particular loci in mouse embryonic stem cells. 第71回日本癌学会学術総会、札幌 (2012年9月)

11) 向井大晃、藤森浩彰、村上康文、益谷美都子. 5-hydroxymethylcytosine 残基の定量法と動態制御因子の研究. 第85回日本生化学会大会 福岡市 (2012年12月)

12) 藤森浩彰、向井大晃、村上康文、益谷美都子. PARP 機能阻害は、マウス ES 細胞ゲノムの一部で DNA 低メチル化を誘導する. 第35回日本分物学会年会 福岡市 (2012年12月)

13) 竹下文隆、山本雄介、吉岡祐亮、箕浦加穂、高橋陵宇、田谷敏貴、小坂展慶、落谷孝広. ゲノムコピー数変化を指標としたヒト乳がん細胞株の薬剤耐性獲得に関与する microRNA の探索. 第4回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012年8月)

14) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、佐々木秀郎、力石辰也、落谷孝広. 浸

潤性膀胱がんに対する新規核酸医薬の開発. 第4回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012年8月)

15) 萩原啓太郎、小坂展慶、吉岡祐亮、竹下文隆、落谷孝広. 天然化合物による microRNA 発現制御機構の解明. 第4回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012年8月)

16) 勝田毅、土屋玲子、小坂展慶、吉岡祐亮、高垣健太郎、隠岐勝幸、竹下文隆、酒井康行、黒田雅彦、落谷孝広. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞による機能的ネプレライシンを備えたエクソソームの分泌とアルツハイマー病への応用. 第4回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012年8月)

17) 藤田雄、竹下文隆、高橋陵宇、内野慧太、小坂展慶、水谷隆之、桑野和善、落谷孝広. 経気道投与 siRNA を用いた肺がんに対する新規核酸医薬の開発. 第4回日本 RNAi 研究会、広島市 (2012年8月)

18) 小坂展慶、吉岡祐亮、萩原啓太郎、竹下文隆、落谷孝広. 分泌型マイクロ RNA を介した正常細胞と癌細胞の細胞競合. 第71回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012年9月)

19) 落谷孝広、高橋陵宇、小野麻紀子、竹下文隆. リボフォリン2を標的としたがん幹細胞のマイクロマネージメント. 第71回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012年9月)

20) 小野麻紀子、竹下文隆、高橋陵宇、落谷孝広. 癌幹細胞の休眠状態は、間葉系幹細胞に依存する. 第71回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012年9月)

21) 清野慧至、竹下文隆、浅利晃、落谷孝広. 癌細胞に及ぼす外因性ヒアルロン酸の生物学的特性. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

22) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、園家暁、佐々木秀郎、力石辰也、落谷孝広. microRNA-582-5p/3p による膀胱がんの増殖および転移の抑制. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

23) 福永早央里、石原えりか、佐々木康介、竹下文隆、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊. 老化関連 microRNA による膵がんの増殖抑制. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

24) 萩原啓太郎、小坂展慶、吉岡祐亮、高橋陵宇、竹下文隆、落谷孝広. 乳がんにおいてスチルベン類は Ago2 依存的にがん抑制性マイクロ RNA の働きを促進する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、(2012 年 9 月)

25) 藤原智洋、小坂展慶、高橋陵宇、吉岡祐亮、萩原啓太郎、竹下文隆、落谷孝広. microRNA 機能阻害によるがん幹細胞制御を目的とした骨肉種に対する新規治療戦略. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

26) 高橋陵宇、竹下文隆、小野麻紀子、落谷孝広. 乳がんにおけるがん幹細胞形質を制御する microRNA の同定とその機能解析. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

27) 三浦奈美、本田一文、野呂林太郎、竹下文隆、渡辺隆文、渡部幸央、落谷孝広、

山田哲司 肺がん細胞における Actinin-4 の機能解析 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

28) 内野慧太、竹下文隆、高橋陵宇、小坂展慶、藤原佳絵、成岡春奈、園家暁、矢野純一、佐々木秀郎、野沢資亜利、吉池美紀、北島和樹、力石辰也、落谷孝広. microRNA-582-5p および 3p 鎖の両鎖機能性による膀胱がん細胞の増殖、浸潤抑制効果 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡市 (2012 年 12 月)

29) K. Uchino, F. Takeshita, N. Kosaka, RU. Takahashi, T. Ochiya Therapeutics application of microRNA-582-5p and -3p in the treatment of invasive bladder cancer Keystone Symposia: Non-Coding RNAs in Development and Cancer、バンクーバー、カナダ (2013 年 1 月)  
(連携研究者の川又、落谷らによる発表)

30) 川又理樹、落谷孝広. ラットでの P53 欠損は胚性幹細胞を悪性化させ胎児の発生障害を誘導する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012 年 9 月)

31) Kawamata, M. and Ochiya, T. TWO DISTINCT KNOCKOUT MODELS REVEALED AN ESSENTIAL ROLE OF P53 GENE IN RAT EMBRYOGENESIS ISSCR annual meeting, Yokohama (2012 年 6 月)

32) 葛城 美德、郷 梨江香、木南 凌、放射線照射後の腸上皮における Bcl11b の働き. 第 55 回大会、日本放射線影響学会、仙台市 (2012 年 9 月)

33) 木南 凌、郷 梨江香. Radiation

target cells in thymic lymphom 第71回大会、日本癌学会総会、札幌市 (2012年9月)

34) Sakai E, Takahashi H, Yamada E, Higurashi T, Ohkubo H, Hosono K, Endo H, Kato S, Nakajima A, Cui C, Takamatsu R, Yoshimi N: The histopathological characteristics of mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. アメリカ癌学会年会 2012, 米国シカゴ, 2012, 4.

35) 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 中島淳: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル: 動物モデルを用いた検討. 第98回日本消化器病学会総会、東京, 2012, 4月.

36) 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳, 山田英司, 日暮琢磨, 大久保秀則, 高橋宏和: 低用量 resveratrol は大腸腫瘍の initiation に影響を与えないが, STAT3 経路を介して大腸腫瘍の progression を抑制する. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012, 9月.

37) 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 酒井英嗣, 大久保秀則, 山田英司, 高橋宏和, 中島淳: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル: Cre/flox動物モデルを用いた検討. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012, 9月.

38) Nakajima A: Colon epithelial proliferation and carcinogenesis in diet induced obesity. The 3rd Asian-pacific topic conference, Tokyo, 2012, 11月.

39) Oshima H, Ishikawa T, and Oshima M. The role of TNF- $\alpha$  in PGE2-induced tumorigenesis in gastric cancer mouse model. 第103回アメリカ癌学会学術総会, 米国・シカゴ (2012年4月)

40) 大島正伸 胃がんにおける炎症の誘導と活性化の役割 第49回日本臨床分子医学学会学術総会、京都 (2012年4月)

41) Oshima M. Gastric cancer model by Wnt activation and inflammation. 第10回 Stem Cell Research Symposium、淡路島 (2012年6月)

42) Oshima M. SPEM and early changes in gastric cancer. 第5回シンガポール胃がんコンソーシアム学術総会 (SGCC)、シンガポール (2012年7月)

43) Oshima M. Recent progress in tumor microenvironment. 第16回日本がん免疫学会総会、札幌 (2012年7月)

44) Oshima M. The role of inflammatory responses in gastric cancer development. 第71回日本癌学会学術総会 (JCA-Mauvernay 受賞講演)、札幌 (2012年9月)

45) Oshima M. Infection and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. 第71回日本癌学会学術総会、札幌 (2012年9月)

46) Oshima M. Inflammatory responses that accelerate gastric tumorigenesis. 2012年韓国分子細胞生物学会学術総会、韓国・ソウル (2012年10月)

47) Oshima M. Prostaglandin

E2-associated inflammation and bacterial infection in gastric tumorigenesis. 第3回発がんスパイラル国際シンポジウム・金沢がん生物国際シンポジウム、金沢 (2013年1月)

48) 大島 正伸 マウスモデルを用いた消化器がん発生における生体反応の研究 平成24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 (2013年2月)

49) Oshima M, Tomo-o Ishikawa, and Oshima H. The role of inflammatory responses in promotion of gastric tumorigenesis. 第2回 JSGE 国際トピックカンファレンス、鹿児島 (2013年3月)

50) Oshima H, Oshima M. The role of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and microenvironment in mouse gastric tumorigenesis. 第86回日本薬理学会学術総会、福岡 (2013年3月)

51) 青木正博、武藤誠. CDX 転写因子は腸上皮細胞における PLEKHG1 の発現を制御する. 第71回日本癌学会学術総会 札幌市 (2012年9月)

52) 佐久間圭一朗、神奈木玲児、青木正博. c-Myc と CDX2 は EMT を起こした大腸がん細胞における E-セレクトインリガンド糖鎖の発現を媒介する. 第71回日本癌学会学術総会 札幌市 (2012年9月)

53) 青木正博、後藤嘉子、武藤誠. CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of PLEKHG1 in Intestinal Epithelium. 第35回日本分

子生物学会年会 博多市 (2012年12月)

54) Kazuto Yoshimi, Takuji Tanaka, Tadao Serikawa, Takashi Kuramoto. Tumor Suppressor APC Protein Is Essential In Mucosal Repair From Colonic Inflammation Through Angiogenesis. Rat Genomics & Models meeting 2012, 3-6 Dec, 2012, Cambridge, UK

55) 吉見一人、田中卓二、庫本高志、DSS 誘発大腸炎における *Apc* 遺伝子 C 末端領域の機能解析、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月

56) 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12月

57) 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12月

58) 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12月

59) 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11月

60) 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年10月

61) Mizuki Ohno, Kunihiro 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. 10. 20.

62) 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9  
月

63) 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  
月

64) Teruhisa Tsuzuki, Jing Shu Piao,  
Noritaka Matsumoto, Yoshimichi Nakatsu,  
The roles of mismatch repair system and  
p53 in the suppression of oxidative  
stress-induced intestinal tumor  
formation in mice., 4th US-Japan DNA  
Repair Meeting, The National

Conference Center, Leesburg, VA, USA,  
2012年4月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 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 ラット大腸化学発がんモデルにおける PhIP による発がん機構として、これまで DNA 付加体の形成を介した変異の導入が主要な経路と考えられてきた。今回、PhIP を含む大腸発がん物質が特定の microRNA (miRNA) の発現を誘導し、その発現パターンが大腸発がん性と相関することを明らかにし、別の機構を介した発がん経路の存在が強く示唆された。これらの miRNA の標的は幹細胞マーカー遺伝子であり、大腸発がん機構に新たな洞察を与えると考えられる。また、従来から簡便に検出可能な大腸発がん初期病変として広く使用されてきた Aberrant Crypt Foci (ACF) の検出法を改変して、より特異的な前癌状態である dysplasia を組織学的な検査なしで検出する方法を新たに開発し、Dysplasia-associated ACF (dACF) と命名した。従来の ACF と dACF は同じサンプルで連続して検出可能であり、これらの判定を組み合わせることで hyperplasia から高度の dysplasia まで連続して評価することに道を開いた。発がん初期過程を解析する上で、組織学的な手法によらない検出法は解析の効率化に大きく貢献することから、大きな技術的革新と考えられる。さらに、新規の実験系であるマウス腸管初代培養細胞からの発がん再構成系においても、誘導された腫瘍が再移植可能なこと、正常幹細胞とは異なる幹細胞性を有し、癌幹細胞類似の形質を有することなどを示し、生体内と同様な腫瘍を培養条件化でも作成可能であることを示した。

#### A. 研究目的

肉や魚などの加熱食品中に多く含まれる食餌由来変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) は雄ラットに大腸発がんを誘発し、高脂肪食で発がんが促進

されるなど、ヒト多段階発がんを正確に模倣する優れた動物モデルである。また、最近マウス腸管初代培養細胞からも発がんを再構成する in vitro モデルの確立に成功した。これらのモデルを用いて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、また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すことを目的とする。最終的にはヒトがんの早期診断や、遺伝子情報に基づいた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や予防薬開発のための標的候補分子の同定などへの臨床応用を目指す。

## B. 研究方法

(1) 大腸発がん性に関連する特定 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、統計学的な手法で大腸発がん性に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 検出のための通常の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 週間三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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立がん研究センター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) 大腸発がん性に関連する特定 miRNA の誘導: クラスタ解析の結果、PhIP を

含めた大腸発がん性 HCA と MeAalphaC 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を加えて、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。

#### D. 考察

(1) 大腸発がん性に関連する特定 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) 大腸前がん病変新規マーカーとしての differentially stained dysplastic 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。

## 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Lin CJ, Nasr Z, Premririt 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) Hosono K, Yamada E, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, 齊: レンチウイルスを用いたマウス腸管細胞での発がん再構成、第 27 回発がん病理研究会 (2012 年 8 月修善寺)

2) 筆宝 義隆: 「マウス初代培養細胞の *in vitro* 発がん再構成系」を用いた化合物発がん性予測法の開発. 第 1 回新 LRI 研究報告会 (2012 年 8 月東京)

3) Yoshitaka Hippo, Kunishige Onuma, Masako Ochiai, and Hitoshi Nakagama, K-ras Activation Accelerates Apc-dependent Intestinal Tumorigenesis Reconstituted *In Vitro*. 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月札幌)

4) 小沼 邦重、筆宝 義隆、落合 雅子、中釜 齊: マウス腸管発がん再構成系を用いて作製した腫瘍の解析. 第 71 回日本癌

Nakajima A. Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in humancolorectal adenomas. *World J Gastroenterol.* 18(38):5360-8, 2012.

3) 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.* 24(5):353-7, 2012.

### 2. 学会発表

1) 小沼邦重、筆宝義隆、落合雅子、中釜 齊: レンチウイルスを用いたマウス腸管細胞での発がん再構成. 第 27 回発がん病理研究会 (2012 年 8 月修善寺)

5) 落合雅子、小沼邦重、筆宝義隆、中釜 齊: 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 9 月札幌)

6) 小沼邦重、筆宝義隆、土橋祥子、折橋 郁、中釜 齊: *in vitro* におけるマウス腸管上皮細胞を用いた発がん再構成. 平成 24 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (2013 年 2 月大津)

7) 筆宝義隆、落合雅子、岡本康司、中釜 齊: ラット大腸における長期発がん性と関連する microRNA 発現誘導. 平成 24 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (2013 年 2 月大津)

8) Yoshitaka Hippo, Kunishige Onuma, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi

Nakagama: Lentivirus-based Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Primary Intestinal Cells. 第10回国際フオスファターゼ学会 (2013年2月東京)

9) Yoshitaka Hippo and Hitoshi Nakagama: Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Murine Primary Intestinal Cell. 第9回日米癌学会合同

会議 (2013年2月米国ハワイ)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし

ポリADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法

分担研究者 益谷 美都子

国立がん研究センター研究所 ゲノム安定性研究分野 分野長

研究要旨 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形質変換を抑制した。マウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株は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。胚細胞腫瘍形成時等の異所的・異常環境下では、*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。

A. 研究目的

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どのような機構でがん化に寄与するかについては未だ明らかではない。本研究では DNA 損傷修復応答、クロマチン、エピジェネティック制御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。三次元培養が可能な、spheroid 形成能を有するマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株における DNA 損傷修復応答能を検討する。マウス ES 細胞における異常環境ががん化のストレスとなる機構を検討する。また、マウス ES 細胞は胚細胞腫瘍形成時など、通常の胚発生以外の異所的環境下における trophoblast 系譜の分化誘導機構を調べるよいモデルとなる。マウ

ス ES 細胞における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の機構を明らかにし、早期の制がん法への応用を考える。

## B. 研究方法

### 1. 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

筆宝らが樹立した spheroid 形成能を有し三次元培養が可能なマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株を実験系として用いた。これらの細胞株はレンチウイルスベクターを用いて shRNA ベクターを導入あるいはジーンターゲットングによる遺伝子破壊を介して *APC* 及び *PTEN*、あるいは *p53* の機能欠損が導入されており、ヌードマウスに移植腫瘍を形成しうる tumor-initiating cells を含む(参考文献: Sato et al., Nature. 2009, 459:262-5)。腸管由来腫瘍細胞株はマトリゲルを用いて EGF, ROCK 阻害剤, Noggin, Jagged-1 等を用いて advanced DMEM/F12 培地を用いて spheroid 状態を維持して培養した。

### 2. 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

マウス *Parp-1* 欠損細胞では胚細胞腫瘍形成時に trophoblast 分化が誘導される。EF-1a promoter に *H19* 遺伝子を連結した *H19* の強制発現ベクター pEF-H19/GFP-Neo を *Oct3/4* が tetracycline 制御系

(Tet-off system) で Tet 非存在下で誘導される ZHTc6 ES 細胞株に導入し、trophoblast 系譜分化に重要な転写因子 *Cdx2* 等の分化マーカー発現を経時的に検討した。

### 3. 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異なる牛血清条件の分化環境に暴露し、ゲノム異常誘導と bleomycin, gemcitabine, cisplatin, 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。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、国立がんセンターの「動物実験に関する指針」を遵守した。遺伝子組換え実験は、各研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。

## C. 研究結果

### 1. 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 *APC*、*PTEN* あるいは *p53* の欠損した spheroid 形成能を有する腫瘍細胞株を用いて bleomycin, gemcitabine, cisplatin, PARP 阻害剤に対する感受性と DNA 修復応答能の関連を検討した。これらの抗がん剤に感受性が高い細胞株では二本鎖 DNA 修復応答能が減弱化している可能性が認められた。

二本鎖 DNA 修復においては、切断端が

修飾されブロックされた部位においては特に不正確な DNA 修復を介して欠失変異が生じやすい。*Parp-1* 欠損下では 5' 末端ブロックと 3' 末端ブロックの両方において end-resection が亢進することを見いだした。このブロック末端からの end-resection には腫瘍細胞において発現の異常が報告されている nuclease が必要であることを見いだした。マウス腸管幹細胞由来腫瘍細胞株において、本 nuclease 発現異常や二本鎖 DNA 修復応答に必要な gamma H2AX 誘導の異常が認められた。H2AX 発現は維持されていたことから H2AX のリン酸化誘導異常は checkpoint 機構の異常による可能性がある。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、腫瘍化を促進していると考えられる。

## 2. 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

マウス ES 細胞は胚細胞腫瘍形成時など、通常の胚発生時以外の異所的・異常環境下における trophoblast 系譜の分化誘導機構を調べるよいモデルとなる。*Parp-1* ES 欠損細胞では胚細胞腫瘍形成時に trophoblast 系譜細胞への分化が亢進する。このとき、*H19* 遺伝子発現誘導が亢進する。昨年度までに *H19* の強制発現はマウス ES 細胞において、*Cdx2* の発現を上昇させ trophoblast 系譜への commitment を

誘導しうることを見いだした。そこで tetracycline 制御系 (Tet-off system) を用いて胚発生時に *Cdx2* の抑制因子として機能する Oct3/4 を高いレベルで維持しうる実験系を作成し、*H19* 誘導による trophoblast 系譜の分化がブロックされるかどうかを検討した。その結果、leukemia inhibitory factor 存在下で Oct3/4 の高レベル下でも *Cdx2* は Oct3/4 による mRNA 発現の抑制を受けず、*H19* の強制発現による転写誘導が起きることを見いだした。

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ことと考えられる。PARP の阻害剤はマウス胚においても DNA の脱メチル化やヒストン修飾の活性化型への変換を誘導し、エピジェネティック変化を誘導することを別途見いだした。

## 3. 二本鎖 DNA 切断を介する幹細胞の形質転換と PARP 阻害による抑制

マウス ES 細胞は牛新生児血清存在下での分化環境は牛胎児血清存在下に比較して二本鎖 DNA 切断等をより多く誘導し、形質転換ストレスとして働くこと、このような分化環境依存的に、染色体異数性、p53 変異、未分化マーカー陽性を示し、造腫瘍性が亢進した悪性度の高い形質転換細胞が誘導されることを見いだした。これらの形質転換細胞の誘導は DNA 損傷応答を抑制する PARP 阻害剤 AZD 2281 処理によってブロックされたことから PARP 阻



害剤が腫瘍化の早期の過程で二本鎖 DNA 切断を介する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。

#### D. 考察

##### 1. 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株は *APC*、*PTEN* の機能欠損を有するため、PARP-1 が coactivator として働く Wnt 経路が活性化し、相同組み換え経路が異常を示すことから PARP 阻害剤への感受性を示すと考えられたが、腫瘍細胞株によって感受性は異なった。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。

##### 2. 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

本研究から胚細胞腫瘍形成時等の胚発生以外の異所的・異常環境下において、trophoblast 系譜への分化に極めて重要な転写因子 *Cdx2* の発現はその抑制因子として機能する Oct3/4 存在下でも *H19* の強制発現により誘導され、trophoblast 系譜への分化誘導を惹起させることがわかった。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ことが更に示唆された。

##### 3. 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を見いだした。PARP 阻害剤が腫瘍化の早期の過程で二本鎖 DNA 切断を介する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。他の PARP ファミリー分子のうち PARP-1 が PARP 阻害剤の重要な標的と考えられるが、どの PARP 分子の阻害が細胞死を介する形質転換の抑制にどの程度寄与するかについては検討する必要がある。

#### E. 結論

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。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。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ということがわかった。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判った。

PARPの機能阻害は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癌の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しうる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、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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

##### 2. 学会発表

- 1) Hiroaki Fujimori, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani. PARP inhibitor induces DNA hypomethylation of particular loci in mouse embryonic stem cells. 第71回日本癌学会学術総会、札幌 (2012年9月)
- 2) 向井大晃、藤森浩彰、村上康文、益谷美都子. 5-hydroxymethylcytosine 残基の定量法と動態制御因子の研究. 第85回日本生化学会大会 福岡市 (2012年12月)
- 3) 藤森浩彰、向井大晃、村上康文、益谷美都子. PARP機能阻害は、マウスES細胞ゲノムの一部でDNA低メチル化を誘導する. 第35回日本分子生物学学会年会 福岡市 (2012年12月)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

ラットES細胞の樹立およびノックアウトラットの作成

分担研究者 竹下文隆

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 主任研究員

研究要旨

環境中の発がん要因に対する標的遺伝子の機能の解析に利用可能な新規の遺伝子改変発がんモデルラットの作製を行うため、これまで極めて困難とされてきたラットES細胞の樹立を行った。ES細胞の安定的培養法の確立によりジーンターゲットングによる相同組み換え、更にはキメララットを介してp53ノックアウト(KO)ラットの作製に成功した。その結果、マウスとは異なるがん種の発生以外に、KO雌ラットが致死性を示すなど、ラット特有の表現型が認められた。これによりラット個体を用いることで、新たな発がん分子メカニズムの解明に向けた研究の飛躍が期待される。

A. 研究目的

ラットはある種の生理機能や薬物代謝機能がマウスよりヒトに類似しており、化学発がんモデルとしての学問的蓄積も極めて大きい。しかしラット胚性幹(Embryonic Stem, ES)細胞が樹立できないことから、ノックアウト(KO)ラット作製は極めて困難とされてきた。本研究では4つの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ており、このラットを用いて環境中の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目的とする。

B. 研究方法

p53 遺伝子を破壊したアレルを持つ組み

換え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作製した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生育や発がん感受性を解析する。

C. 研究結果

p53+/-ES細胞を受精卵にインジェクションするとキメララットが容易に作製でき、掛け合わせによりジャームライントランスミッションを介して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<sup>-/-</sup>雄ラットは生後4ヶ月以内のがんを発症し、死亡することを確認した。興味深いことにp53<sup>-/-</sup>マウスは主にリンパ腫を発症するのに対し、p53<sup>-/-</sup>ラットの場合は多くが肉腫を発症し、マウスとは異なる表現型を有することが分かった。また、p53<sup>+/-</sup>ラットは9ヶ月もすると乳がん、精巣がん、骨肉腫等も発症し、死に至る事がわかった。

一方、p53<sup>-/-</sup>キメララットの発生が正常に行われず、雌雄共に胎児期に全て致死となることが分かった。キメラに寄与したp53<sup>-/-</sup>細胞は染色体異常を生じており、これが発生を阻止した原因と考えられる。p53<sup>-/-</sup>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。

#### D. 考察

本研究により、p53遺伝子の欠損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キメララットで認められたと考えられる。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起こらないことから、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出来る様になった。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。

#### E. 結論

作製したp53 KOラットは乳癌、精巣がん、骨肉腫など多様ながんが発症し、今後の環境因子による化学発がん機序の解明のための有用なモデル動物となる。更に我々はこれらの原発腫瘍から細胞株の樹立に成功しており、KOラット個体のみならず、細胞リソースの提供も行なっていくことが出来る。p53 KOラットは主に肉腫を発症し、マウスとは異なる表現型を示したことからも、マウスでは困難であったヒトがんモデルの作製や、マウスでは見いだせなかった隠れたがん発症メカニズムを解明できる可能性があり、これを元に新たな創薬研究を展開する。

一方、p53はこれまで個体発生後の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