

クカンファレンス、鹿児島(2013年3月)
12)Oshima H, Oshima M. The role of
inflammatory cytokine TNF- α 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明名称：がんの予防用または治療用物
質のスクリーニング方法

発明者：大島正伸、大島浩子、石川智夫

出願番号：特願 2013-30503

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

*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

分担研究者 青木正博

愛知県がんセンター研究所分子病態学部 部長

研究要旨 *Apc* 変異マウスの腸管に生じる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、JNK は mTORC1 の構成要素である 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 という3つの分子が mTORC1 により翻訳レベルでの発現調節を受けること、さらに JNK は c-Jun の活性化を介してこれらの分子の発現を転写レベルにおいても制御していることを既に明らかにしていた。*Apc* 変異マウスの腺腫だけでなく、*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 を投与したところ、大きな腫瘍の数が有意に減少し、腫瘍の浸潤能が強く抑制された。また、RAD001 長期投与により、生存期間が大幅に延長した。mTORC1、mTORC2 の両方を阻害する mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を *cis-Apc/Smad4* マウスに投与したところ、大きな腫瘍の数が著しく減少した。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、mTORC 経路が大腸がんの予防・治療標的となる可能性がさらに強く示唆された。

A. 研究目的

*Apc*Δ716 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、我々はその腫瘍形成に mTOR complex1 (mTORC1) と Smoothened が重要な役割を担うことを示してきた。本研究は、腸管腫瘍における mTORC1 経路活性化機序、及び Smoothened 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ことを目的とする。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

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。マウスの飼育・管理およびそれらを用いた実験は、全て愛知県がんセンターの動物実験実施に関する規程に基づいて行った。

C. 研究結果

cis-Apc/Smad4 マウスの腸管に自然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ったが、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* Δ 716 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。

D. 考察

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。

E. 結論

昨年度までに、*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。本年度の研究結果から、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2. 学会発表

1) 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)

2) 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-セレクチ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)

3) 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)

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。

Apc変異ラットを用いた大腸がん診断・治療評価系の開発

分担研究者 庫本高志

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 准教授

研究要旨

家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である *Apc* 遺伝子に変異をもつ KAD ラットは、DSS 誘発大腸炎に高感受性を示す。今年度は、APC タンパク質 C 末端領域の大腸炎に関与する分子機構について検討した。免疫沈降実験の結果、APC タンパク質 C 末端領域は、ヒト炎症性腸疾患関連タンパク質 DLG5 との結合が観察された。多重蛍光免疫染色の結果、DLG5 は APC と同様に、大腸炎症領域の血管内皮細胞に強い発現が観察された。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。

A. 研究目的

Kyoto *Apc* Delta (KAD) ラット (F344-*Apc*m1Ky0) 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。

KAD ラットは、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、対照系統の F344 ラットに比べ下痢や血便といった大腸炎症状が増悪かつ持続し、炎症時の血管新生が遅延していた。この際、APC は血管内皮細胞に強く発現し、

また KAD ラット由来血管内皮細胞では接着異常が観察された。このことから、APC タンパク質 C 末端領域が血管新生を通じて大腸炎発症機構に関与することが示唆された。

しかし、血管内皮細胞における APC タンパク質の機能と大腸炎症との関連性については、これまで知られていない。そこで本研究では、APC の大腸炎に関与する分子機構を明らかにすることを目的とし、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し

た。

B. 研究方法

FLAG タグ化 APC-C 末端ベクターを作製し、Hela 細胞にトランスフェクションして、免疫沈降法により APC タンパク質 C 末端領域と結合するタンパク質の探索を行った。さらに、V5 タグ化 DLG1、DLG5 ベクターをそれぞれ作製して APC-C 末端ベクターと共に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。また、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マリン固定後、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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に基づき施した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。本研究を進展させることで、*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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

1) 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

2) 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

2. 学会発表

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

分担研究者 續 輝久

九州大学 大学院医学研究院 教授

研究要旨 *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、臭素酸カリウム (KBrO₃) の飲水投与による消化管での酸化ストレス誘発発がん実験を行い、酸化ストレスを付与された *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。これらの結果から、MSH2 は酸化ストレスに起因する消化管発がんの抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。KBrO₃ により誘発された腫瘍の約 30%にはβ-カテニンの遺伝子 (*Cttnb1* 遺伝子) に突然変異が認められ、そのうちの 74%が G:C→A:T 変異であった。一方、代表的な酸化 DNA 損傷 8-オキシグアニン (8-oxoG) に起因する G:C→T:A 変異は 7.4%しか検出されなかった。これらの結果から、ミスマッチ修復遺伝子が欠損した腸上皮細胞では、酸化ストレスの負荷により 8-oxoG に起因しない突然変異が蓄積し、その結果腸管でのがん多発を引き起こすことが示唆される。

A. 研究目的

これまでの研究で、私達は遺伝子欠損マウスを用いて、*MUTYH* 遺伝子に欠損を持つ MAP 患者では酸化ストレスに起因する自然突然変異が大腸腺腫症を引き起こすことを示した。同時に、臭素酸カリウム (KBrO₃) の飲水投与による、消化管での酸化ストレス誘発発がん系を確立した。本研究では、この系を用いて、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。

B. 研究方法

1) *Msh2* 遺伝子欠損マウスの飼養

近交系 C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Msh2* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Msh2* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

KBrO₃ を純水に溶解し、0.2%溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。

投与法は、16 週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

3) 発がん実験

マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

4) 腫瘍の突然変異解析

臭素酸カリウムによりマウスの腸管に誘発された腫瘍組織からゲノム DNA を抽出して、 β -カテニンの遺伝子 (*Cttnb1*) を PCR で増幅した後、Direct sequencing 法を用いて変異解析を行った。

5) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、九州大学動物実験委員会の承認を得て、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関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

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 匹に 0.2% KBrO₃ を 16 週間飲水投与した後剖検すると、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) 個の小腸腫瘍が生じていた。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 を除き全てヴィ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 *Cttnb1* 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。その内訳は、G:C \rightarrow A:T 変異が 20 個 (74.1%)、A:T \rightarrow G:C 変異が 3 個 (11.1%)、G:C \rightarrow T:A 変異と G:C \rightarrow C:G 変異がそれぞれ 2 個 (7.4%) であった。

D. 考察

ミスマッチ修復遺伝子が欠損するとヒトでは HNPCC が発生する。私達はこれまでに、通常の飼育条件下で育てた野生型マウスの腸管上皮細胞では、加齢と共に酸化ストレスに起因する突然変異が蓄積することを見いだしている。また、酸化 DNA 損傷による突然変異を抑制する *MUTYH* 遺伝子に欠損を持つ MAP 患者では、酸化ストレスに起因する自然突然変異が大腸腺腫症を引き起こす。これらの知見から、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。本研究では、KBrO₃ 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。ミスマッチ修復が酸化 DNA 損傷である 8-oxoG の除去に関与することを示唆するデータが報告されているが、ミスマッチ修復が実際に 8-oxoG の DNA からの除去に直接関わっているのか等の詳細については明らかではない。本研究で *Msh2* 遺伝子欠損マウスに誘発された腫瘍での *Cttnb1* 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 (7.4%)、大多数は G:C→A:T 変異 (74.1%) であることが明らかになった。これらの結果は、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を示唆している。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って引き起されるヒトの HNPCC の発がん機序の解明を進めたい。

E. 結論

MSH2 は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が明らかになった。従って、ミスマッチ修復系遺伝子の欠損によって引き起されるヒトの 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 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12月

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12月

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12月

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11月

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年10月

6) 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.

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9月

8) 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

9) 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

G. 知的所有権の取得状況

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。

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

分担研究者 山下克美

金沢大学医薬保健研究域 准教授

研究要旨 加熱食品に含まれる発がん物質である PhIP はヒトへの曝露量が高いことが知られており、ヒトの発がん物質である可能性が指摘されている。PhIP がラットの大腸がんを引き起こすことから、ラットの大腸上皮をモデルに、DNA 損傷応答（DDR）機構の解明を行っている。今年度は、F344 ラット大腸上皮由来初代培養細胞を用いて、DDR の解析を行った。種々の濃度の PhIP を 6 時間処理し、DDR をウエスタンブロットにより解析したところ、p53 発現上昇が確認された。さらに、Ser15 のリン酸化も亢進していた。p53 の発現上昇に伴い、p53 の標的遺伝子である p21 の発現も亢進していた。他の DDR 関連遺伝子のリン酸化も認められたことから、この細胞では PhIP により DDR が誘発されることが明らかとなった。

A. 研究目的

PhIP は加熱食品に含まれており、げっ歯類、特にラット大腸において発がん作用を有する。ラットにおける大腸がんの組織像はヒトの大腸がんのそれとよく似ており、ヒト大腸発がんのモデルになりうると考えられる。また、PhIP はヒトへの曝露量が高いため、ヒトに対する発がん因子である可能性も指摘されている。従って、本研究の課題である「低レベル PhIP の持続的曝露により誘発される DNA 損傷応答（DDR）」の分子機構を解明することにより、PhIP によるヒト発がん機構の解明に寄与するのみならず、発がん予防の観点からも有用な情報を提供するも

のと期待できる。

本研究で、まず 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ウエスタンブロットティングにより明らかにし、動物発がん実験に用いる濃度より低い濃度で DDR が引き起こされるか否かを検討する。

ラット個体への PhIP の投与では DDR 初期応答の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

（倫理面への配慮）

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ティングにより解析した。

PhIP の処理濃度は、1 mM、2.5 mM、5 mM、10 mM、大腸に対する非発がん物質として MeAaC 10 mM を用いた。

今回解析した DDR 関連タンパク質は以下の通りである。

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 (g-H2AX)。解析タンパク質の内部標準としては、細胞質タンパク質として GAPDH、クロマチンタンパク質として非リン酸化 H2AX を採用した。

本研究は培養細胞を用いたものであり、倫理面において特段の配慮は必要ないと考えられる。

C. 研究結果

代表的な DDR 関連タンパク質であり発がん抑制タンパク質の p53 は、各濃度の PhIP 処理において PhIP 濃度依存的な発現量の上昇が認められた特筆すべきは、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 mM の PhIP より低い、1

mM の PhIP でも p53 の発現上昇が認められたことである。また、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、g-H2X のリン酸化は 2.5 mM 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。

対照としては、溶媒である DMSO に S9 mix を加えたサンプルと 10 mM の MeAaC を用いて、上述のタンパク質と同様に解析を行ったが、両サンプルとも解析した DDR 関連タンパク質の動態に変化は認められなかった。

D. 考察

今年度の研究では、ラットの個体を使って 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することは困難なため、初代培養細胞を用いた。

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 mM の PhIP 処理において、DDR 因子に明らかな変化を認めた。特

筆すべきは、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である。このことは、発がんの閾値より低い濃度の PhIP により DNA 損傷が誘発されている事を意味し、PhIP がヒトにおいても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、DDR の時間的経過（より短時間で DDR が引き起こされるか）を解析するとともに、低濃度の PhIP 処理に着目して、細胞への連続投与での DDR 因子の動態を明らかにする予定である。一方で、前述の DDR 因子以外の他の 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。

1. p53 は処理濃度依存的に発現が亢進した。
2. 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。
3. 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。

4. 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。

5. DNA 鎖切断指標の H2X の S139 のリン酸化 (g-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. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

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
特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出 版 年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ペ ー ジ	出 版 年
Lin CJ, Nasr Z, Premrirut PK, Porco JA Jr, <u>Hippo Y</u> , Lowe SW, Pelletier J.	Targeting synthetic lethal interactions between Myc and the eIF4F complex impedes tumorigenesis.	<i>Cell Rep</i>	1(4)	325-3 3	2012
Ohkubo H, Takahashi H, Yamada E, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Taguri M, <u>Nakajima A</u>	Natural history of human aberrant crypt foci and correlation with risk factors for colorectal cancer	<i>Oncol Rep</i>	27(5)	1475- 1480	2012
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, <u>Nakajima A</u>	Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial	<i>BMC Cancer</i>	12(1)	118	2012
Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Iida H, Uchiyama T, Ezuka A, Uchiyama S, Yamada	Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a	<i>BMC Cancer</i>	12(1)	413	2012

E, Ohkubo H, Sakai E, Maeda S, Morita S, Natsumeda Y, Nagase H, <u>Nakajima A</u>	double-blind randomized controlled trial				
Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono K, Yoneda M, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, <u>Nakajima A</u>	Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence	<i>Dig Endosc</i>	24 (5)	353-357	2012
Hosono K, Yamada E, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, <u>Nakajima A</u>	Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in human colorectal adenomas	<i>World J Gastroenterol</i>	18 (38)	5360-5368	2012
Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, <u>Nakajima A</u>	IL-6 plays crucial roles in sporadic colorectal cancer through the cytokine networks including CXCL7 PP	<i>J Cancer Ther</i>	3 (6)	874-879	2012
Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, <u>Nakajima A</u>	Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy	<i>World J Gastrointest Endosc</i>	4 (12)	561-564	2012
Fujimori H., Shikanai M., Teraoka H., <u>Masutani M.</u> , Yoshioka K.	Induction of cancerous stem cells during embryonic stem cell differentiation.	<i>J Biol Chem.</i>	287	36777-36791	2012
Osada T., Rydén A. M., <u>Masutani M.</u> , Yoshioka K	Poly(ADP-ribosylation) regulates chromatin organization through histone H3 modification and DNA methylation of the first	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	434	15-21	2013

	cell cycle of mouse embryos.				
Osawa T., Atsumi Y., Sugihara E., Saya H., Kanno M., Tashiro F., <u>Masutani M.</u>	Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization of cells with stable genomes.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	432	34-39	2013
Uchino, K., <u>Takeshita, F.</u> , 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	<i>Mol Ther.</i>	21	610-6 19	2013
Fujita, T., Yanagihara, K., <u>Takeshita, F.</u> , 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	<i>Cancer Sci.</i>	104	214-2 22	2013
Fujita, Y., <u>Takeshita, F.</u> , Kuwano, K., Ochiya, T.	RNAi Therapeutic Platforms for Lung Diseases.	<i>Pharmaceutica ls</i>	6	223-2 25	2013
Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., <u>Takeshita, F.</u> , Sakai,	Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional	<i>Sci. Rep.</i>	3	1197	2013

Y., Kuroda, M., Ochiya, T.	neprilysin-bound exosomes				
Kosaka, N., <u>Takeshita, F.</u> , 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	<i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i>	65	376-3 82	2013
<u>Takeshita, F.</u> , Takahashi, RU., Onodera, J., Ochiya, T.	In vivo imaging of oligonucleotide delivery	<i>Methods Mol. Biol.</i>	872	243-2 53	2012
Hong, J., He, H., Bui, P., Ryba-White, B., Rumi, M.A., Soares, M.J., Dutta, D., Paul, S., <u>Kawamata, M.</u> , Ochiya, T., Ying, Q.L., Rajanahalli, P. and Weiss, M.L.	A focused microarray for screening rat embryonic stem cell lines.	<i>Stem Cells Dev.</i>	22	431-4 43	2013
<u>Kawamata, M.</u> and Ochiya, T.	Two distinct knockout approaches highlight a critical role for p53 in rat development.	<i>Sci. Rep.</i>	2	945	2012
Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, <u>Kominami R.</u>	Cell of origin in radiation-induced pre-malignant thymocytes in mice conditionally losing one Bcl11b allele.	<i>Cancer Sci.</i>	in press		2013
Tanaka H, Naito T, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, <u>Kominami R.</u> , Taniuchi I.	Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4+ helper-lineage fate in the thymus.	<i>EMBO J.</i>	32	1183- 1194	2013

Okumura K, Sato M, Saito M, Miura I, Wakana S, Mao JH, Miyasaka Y, <u>Kominami R</u> , 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.	<i>Carcinogenesis</i>	33	2260-2268	2012
Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, <u>Kominami R</u> .	Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis.	<i>Leuk Res.</i>	36	1035-1040	2012
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 <u>Oshima M</u> .	Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells	<i>Oncogene</i>	31	3949-3960	2012
Oshima H, and <u>Oshima M</u> .	The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models	<i>J Gastroenterol</i>	47	97-106	2012
Oshima H, and <u>Oshima M</u> .	The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development	<i>Semin Immunopathol</i>	35	139-150	2013
Sakuma, K., <u>Aoki, M.</u> , and Kannagi R.	Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	109	7776-7781	2012

	epithelial-mesenchymal transition.				
Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, <u>Kuramoto T.</u>	Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis.	<i>The American Journal of Pathology</i>	182	1263-1274	2013
Yoshimi K, Hashimoto T, Niwa Y, Hata K, Serikawa T, Tanaka T, <u>Kuramoto T.</u>	Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone Apc-mutant rat in a chemotherapeutic bioassay.	<i>BMC Cancer</i>	12	448	2012
Lim T-H, Fujikane R, Sano S, Sakagami R, Nakatsu Y, <u>Tsuzuki T</u> , Sekiguchi M, Hidaka M	Activation of AMP-activated protein kinase by MAP01 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA.	<i>DNA Repair</i>	11	259-266	2012