

回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

森崎珠美、八代正和、梯アンナ、福岡達成、青松直撥、長谷川毅、平川俊基、久保尚士、田中浩明、六車一哉、大平雅一、鰐渕英機、平川弘聖：癌幹細胞様 SP 細胞と低酸素細胞のプロテオーム解析。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

小松弘明、西山典利、山野莊太郎、花田庄司、井上英俊、梯アンナ、魏 民、鰐渕英機：プロテオーム解析による新規肺神経内分泌癌のバイオマーカー検索。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐渕英機：FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌のプロテオーム解析。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、加藤 実、田尻正喜、謝 暁利、鰐渕英機：マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

梯アンナ、桑江優子、山野莊太郎、魏 民、謝 暁利、若狭研一、鰐渕英機：ヒト幹細胞癌における特異的候補分子のピンポイントターゲッティング。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

加藤 実、魏 民、田尻正喜、山野莊太郎、梯アンナ、仲谷達也、鰐渕英機：Steroid Sulfatase は膀胱癌の予後予測因子である。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、神吉将之、謝 暁利、鰐渕英機：BBN 誘発マウス膀胱発がん過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

塩田正之、田中昌子、高橋克之、鰐渕英機：新規 FGF-2 機能阻害抗体による内皮細胞の生存抑制効果。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

鰐渕英機：膀胱癌の発症・進展におけるリスクファクターと機序。第 246 回日本泌尿器科学会東北地方会，福島（2012年9月）

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、藤岡正喜、梯アンナ、神吉将之、鰐渕英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013年1月）

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、鰐渕英機：ラットにおける非遺伝毒性肝発がん物質と毒性フェノタイプを予測できる遺伝子マーカーセットの探索。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術

集会, つくば (2013年1月)

奥村真衣、魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、鰐淵英機: *gpt delta* ラットを用いた 2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013年1月)

山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、岡部恭子、武下正憲、鰐淵英機: マウス肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の cancer initiating cell としての可能性. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013年2月)

梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、魏 民、長野嘉介、福島昭治、鰐淵英機: ラットにおける 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013年1月)

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 曉利、串田昌彦、鰐淵英機: マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013年1月)

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 曉利、鰐淵英機: ラット膀胱発がん物質 DMA(V) の *in vivo* 変 Wanibuchi H, Fukushima S: Ethyl

異原性の検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013年2月)

山野莊太郎、鰐淵英機: NASH-肝細胞癌発症 STAM マウスにおける病態評価. 第 12 回分子予防環境医学研究会, つくば (2013年2月)

鰐淵英機: 肺発がんモデルにおける組織幹細胞の役割. 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)

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、鰐淵英機: 膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討. 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)

山野莊太郎、岡部恭子、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機: ラット腎発がんにおける NADPH oxidase 阻害による効果. 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)

Yamano S, Wei M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Establishment of a novel mice model for lung squamous cell carcinoma. 9th AACR-JCA Joint Conference, Maui, HI(2013年2月)  
Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Doi Y, Nagano K, Banton M, Nishimaki F, *Tertiary-Butyl Ether induces oxidative*

stress and 8-OHdG formation in the liver of F344 rats via activation of CAR, PXR and PPAR nuclear receptors. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, Texas(2013年3月)

朴木寛弥、藤井宏真、城戸颯、塚本真治、辻内俊文。リゾフォスファチジン酸受容体阻害はヒト肉腫細胞の運動・浸潤能を抑制する。第71回日本癌学会総会，札幌（2012年9月）

福嶋伸之、大久保慶、桑田聖平、辻内俊文、岩森正男。卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用。第85回日本生化学会大会，福岡（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

新規前がん病変マーカーの開発に関する研究

研究分担者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本年度では、*gpt delta* ラットを用いて *in vivo* 変異原性試験法の汎用性を高めるために、これまで困難であった微量組織の変異原性解析を可能にする新たなる抽出解析法の開発を行った。また、腎発がんの尿中マーカーおよび肺扁平上皮がんマーカーの開発を行った。さらに、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価法を開発するために、遺伝毒性物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を投与した肝臓におけるメチル化異常について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。本年度で得られた研究成果を以下にまとめる。

1. 微量試料における新たなる DNA 抽出法の開発

微量試料における安定的かつ簡便に解析可能な genomic DNA が得られる DNA 抽出法を開発するため、以前に我々が実施したダンマル樹脂の 18 週間多臓器発がん性試験で得られた、F344 系 *gpt delta* ラットの膀胱粘膜および肝臓凍結試料を使用した。その結果、パッケージング効率に影響するフェノール・クロロホルムを用いない、かつ微量試料においても十分な形質転換効率を得ることができる genomic DNA 抽出法の開発に成功した。さらに、本 DNA 抽出法の有用性を確認するため、各種被験物質を用いて甲状腺および膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の解析を行い、これまでに明らかでなかったコウジ酸の甲状腺における変異原性およびプロポリスの膀胱における変異原性を明らかにした（魏分担報告書参照）。本 DNA 抽出法を用いることでこれまで以上に臓器特異的、部位特異的に *in vivo* 変異原性を評価することが可能となった。我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた発がん性・遺伝毒性の短期包括的評価モデルに本改良 DNA 抽出法を導入することによって、採取の容易な肝臓や腎臓だけでなく、微小组織の変異原性を評価することが可能となり、さらに我々のモデルの汎用性を高めることができた。

2. 腎発がんの尿中マーカーの開発

*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 単独および EHEN→KBrO<sub>3</sub> 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、S100A11 蛋白を同定した。ラット尿サンプルより、担がん動物での尿中 S100A11 について検討した結果、対照群と比較し、有意な差は認められず、尿中マーカーとして有用性が低いことが明らかとなった。

3. マウス肺扁平上皮がんマーカーの開発

マウス肺扁平上皮がん発がん機序の解析では、発がん過程早期において気管支肺

胞幹細胞(BASC)の関与を明らかとしてきたが、遺伝子発現解析より NTCU 投与群の BASC 領域にて、Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc および klf4 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、ERK MAPK, PI3K/Akt および TGFbeta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。これらのことより、発がん機序に即した分子生物学的に意義を有する。

#### 4. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

トキシコゲノミクスプロジェクトで得られた遺伝毒性肝発がん物質 2-Acethylamino fluorene (2-AAF)投与におけるマイクロアレイ解析データを用いて、細胞増殖関連遺伝子の中で発現低下が認められた CNR1 および LOX 遺伝子について、遺伝子プロモーター領域のメチル化異常の有無を検討した。その際、解析する試料には *gpt delta* ラットにおける肝中期発がん性評価モデルの有用性確認に用いた 2-AAF 投与凍結肝を用いた。その結果、上述した 2 遺伝子では、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が認められなかったが、検討対象となる DNA クローンが従来 Bisulfite-PCR sequence 法に比較して、次世代シーケンサーを用いることで数万倍得ることができた。そのため、従来法に比較してより詳細にかつ定量的に DNA メチル化パラメータを評価できることが考えられ、発がん過程における遺伝子プロモーター領域のメチル化解析に次世代シーケンサーによる定量解析の有用性が確認できた。今後、エピジェネティック異常の評価試験法開発に向けて、メチル化解析のようなその頻度が重要な現象においては次世代シーケンサーを用いることが重要である。

#### A. 研究目的

食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は 2 年間必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。これまでに、我々は平成 21-23 年度厚生労働科学研究で、食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと F344 ラットを用いて、前がん病変を指標

とした二段階発がん性試験である包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。検索した被験物質は、肝発がん性を示す 3 物質で変異原性陰性のダンマル樹脂、変異原性陽性の IQ、*in vitro* 変異原性偽陽性であるコウジ酸で、これらは開発した試験法では、いずれも肝発がん促進作用陽性であるが、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性は、それぞれ陰性、陽性、陰性となりこれまでの試験では変異原性偽陽性であるコウジ酸の *in vivo* 変異原性陰性が明らかになりこれが非遺伝毒性であることを初めて明らかにし、この試験

法の肝発がん性評価システムとしての有効性を証明した。

本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を肝以外にも肺、胃、大腸、腎、膀胱などの臓器においてもさらに進める。

これまでの *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験法では、甲状腺や膀胱粘膜のような微小组織では変異原性解析が困難である。現行の Transpack DNA isolation kit を用いた DNA 抽出法は、甲状腺や膀胱粘膜のような微量試料に対応していないため、変異原性解析に必要な genomic DNA を十分量得ることができない。また、古典的 genomic DNA 抽出法であるフェノール・クロロホルム DNA 抽出法は、十分な収量を得ることが可能であるが、その最終産物にフェノール・クロロホルムの残留が生じやすく、これらの残留がラムダファージへの形質転換効率を大きく下げる要因となっている。本年度は、微量試料における変異原性評価可能な収量を得られ、かつ形質転換を阻害しない安定的 genomic DNA 抽出技術の開発を目的とする。加えて、新たな DNA 抽出法の有用性を確認するため、各種被験物質の微量試料中における *in vivo*

変異原性を評価した(魏分担報告書参照)。

また、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカー開発を目的とし、ラット腎発がんおよびマウス肺発がんの新規前がん病変マーカーの同定を行った。

さらに、発がんにはメチル化異常が関与する場合も多く、食品中化学物質誘発の発がん性臓器におけるメチル化異常等を検索し、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価を試みる。本年度では、次世代シーケンサーを用いて遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF を投与した *gpt delta* ラット肝臓における DNA メチル化異常を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

[材料]

新規 DNA 抽出法の開発にあたり、以前に我々がダンマル樹脂の発がん性・遺伝毒性短期包括的評価モデルの有用性評価試験(前年度報告書参照)でサンプリングを行った膀胱および肝凍結試料を用いた。

[genomic DNA の抽出]

肝臓 10mg に lysis buffer を加え、試料を粉砕した。13500rpm にて 10 分間遠心を行い、上清を除去し、digestion buffer、RNase および Proteinase K を加え、55°C にて 1 時間インキュベーションを行った。Wide bore チップで粘性の高い沈殿物を回収して TE buffer で溶解し、以降の試

験に供した。

#### [パッケージング効率の測定]

得られた genomic DNA 10  $\mu$ l を用いて Transpack packaging extract kit で *in vitro* packaging を行い、大腸菌株 (E.coli.C) の菌液に回収したファージを加え、37°C 20 min (静置) の後、回収ファージを大腸菌株に感染させた。感染後の菌液を  $\lambda$  プレートにまいて 37°C で 1 日間培養を行い、感染ファージ由来の形質転換プラークを得た。形質転換数をパッケージング効率として評価を行った。

#### [膀胱粘膜を用いた新規 DNA 抽出法の確認]

膀胱粘膜について肝臓と同様に抽出を行い、パッケージング効率の測定を行った。なおその際、膀胱粘膜を 2 サンプル分バッチ処理して評価に供した。

## 2. 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

雄性 Wistar ラット、6 週齢、240 匹を 30 匹ずつ 8 群に別け、全動物に EHEN を 500 ppm の濃度で 2 週間飲水投与した。投与終了後、KBrO<sub>3</sub> を 0, 0.02, 2, 8, 30, 125 および 500 ppm の濃度で 24 週間飲水投与し、実験終了後、腎のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的解析に興じた。

#### [プロテオーム解析]

Liquid Tissue MS Protein Prep kit で処理したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて蛋白の抽出を行った。KBrO<sub>3</sub> が 0 および 500 ppm 群の各群 5 個体から 10  $\mu$ m の厚みで 10 枚の連続切片を作成し、顕微鏡下で確認しながらニードルダイセクション法を用いて腫瘍部および周囲正常組織をそれぞれサンプリングした。各腎腫瘍においては、直径 1mm 以上の大きさを有する腫瘍を、周囲正常組織においては、尿細管が豊富に存在する腎皮質部を肉眼的に確認しながらサンプリングした。これより得られたサンプルから、合計 20  $\mu$ g の蛋白をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリングを行い、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS を用いて蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [バイオマーカー候補の選別]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software およびバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて腎腫瘍に特異的に発現する候補蛋白の選別を行った。特に、周辺正常組織と比較し、EHEN 単独投与で誘発した腫瘍で 1.5 倍以上増加した蛋白から選別した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補に対し、パラフィンブロックから作成した連続切

片を用いて免疫染色を行い、その局在を確認した。

#### [尿サンプルを用いた S100A11 の ELISA]

免疫染色にて同定された S100A11 蛋白について、尿中マーカーとしての有用性を検討するため、ELISA 法を用いて尿中の蛋白量を検討した。尿はサンプリング後、測定日までマイナス 80℃にて保存した。ELISA キットは USCN 社のラット用キット (sE90568Ra) を用いた。

### 3. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

6 週齢 A/J 雌マウス 30 匹を用いて、NTCU 0.01 M/75µl acetone/mouse の用量で、週 2 回、合計 4 週間マウスの背中に滴下し、実験開始 8 週後に動物を屠殺した。そのうち、20 匹は、フローサイトメトリーに興じた。また、10 匹は、肺を摘出し、各動物からホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

#### [病理組織学的解析]

肺におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本から連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色により形態学的解析、CC10 および SPC 抗体を用いた気管支肺胞幹細胞 (BASC) の形態計測および、Ki67 および TUNEL 染色による細胞増殖能およびアポトーシス能の検討を行った。扁平上皮分化マーカーである、CK5/6, CK14, CK19, podoplanin, p63 に

ついて検討した。また、BASC における細胞増殖能、扁平上皮分化能および Rev1 発現を検討するため、BASC マーカーである Sca-1 と Ki67, p63 および Rev1 の共発現を二重染色法により確認した。

#### [フローサイトメトリー]

##### ① サンプル調整

まずマウスに対し 0.1 ml ヘパリンを投与し、血液凝固を抑制する前処置を行った。ジエチルエーテル麻酔下で、放血致死させた後、胸腔を開いた後に冷 PBS 10 ml を用いて右心室から灌流を行い、肺から血漿および血球成分を可能な限り取り除いた。灌流後、すぐに dispase (50 IU/1 ml) と 1% LMP agarose を各 1 ml ずつ気管から注入し、on ice にて肺を固まらせた。その後、各肺葉を分離し、1 mm<sup>3</sup> 以下になるように細切を行った後、collagenase/dispase (最終濃度 : 2 mg/ml) 6 ml の中に入れて 37℃で 45 分インキュベートを行った。その後、100 および 40µm のセルストレーナーを用いて凝集物を除去し、残存する赤血球を溶解した後、細胞数を測定した。

##### ② 細胞染色

1x10<sup>6</sup> 個/100µl に細胞濃度を調整し、Sca-1-FITC, CD45-PE および Pecam-PE の 3 種類の抗体を用いてそれぞれ 1:100 の希釈濃度で on ice で 30 分インキュベート後、洗浄を行ってからフローサイトメトリーに興じた。また、フローサイトメトリーにかける 10 分前に 7AAD の染色を行い、死細胞の除去を行った。



### ③ 細胞分取

フローサイトメトリー (Aria II :BD) を用いてダブリングした細胞および死細胞を除いた後、Pecam および CD45 が陰性の領域で、さらに Sca-1 陰性 (neg)、Sca-1 弱陽性 (dim) および Sca-1 陽性 (pos) の 3 つの分画から細胞を分取した。各分画からは、20 万細胞以上を分取し、プロテオーム解析に興じた。

#### [プロテオーム解析]

フローサイトメトリーで分取した細胞を lysis buffer である T-PER を用いて蛋白を抽出し、以下の工程に興じた。これより得られたサンプルから各 4 $\mu$ g の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリング、もしくはラベリングなしで、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan) を用い蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [発現蛋白の検討]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software およびバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて sca-1 pos の分画に特異的に発現する蛋白を選出した。

#### [mRNA 発現解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出

した。これにより得られたサンプルより、既知肺幹細胞マーカーである Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc および klf4 について発現検討を行った。

#### [マイクロアレイ解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出した。これより得られたサンプルより、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて比較検討した。Genespring ソフトウェアより同定された遺伝子の発現量データを取得したのち、IPA ソフトウェアを用いてパスウェイについて検討を行った。

## 4. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

#### [材料]

本研究には 6 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラットを用いた 2-AAF の肝中期発がん性評価試験で得られた、0 および 50 ppm 単独投与群の凍結肝を用いた。genomic DNA の抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いてアルコール精製した。Bisulfite 処理には Epiectect Bisulfite kit をもちいてメチル化シトシン以外のシトシンをウラシルに変換した。

#### [標的遺伝子の選定・プライマー設計]

標的遺伝子の選択にはトキシコゲノミクスプロジェクトで得られたマイクロアレイデータ (2-AAF、28 日連続投与) を

Ingenuity pathway analysis software にて解析を行い、細胞増殖関連遺伝子において発現低下が認められた 3 つの遺伝子 (BMF、CNR1、LOX) について遺伝子プロモーター領域のメチル化解析を行った。なお、メチル化解析にむけてのプライマー設計には Meth primer software を用いて増幅産物が 150~200 bp になるように設計した。

#### [PCR プロトコール]

テンプレート容量は 10ng になるように調整し、AmpliTaq Gold をもちいて PCR 増幅を行った。その反応液の組成は 1 サンプルあたりテンプレート 1  $\mu$ l、10  $\times$  AmpliTaq Gold buffer 1  $\mu$ l、dNTPs を 1  $\mu$ l、プライマーをそれぞれ 0.2  $\mu$ l、AmpliTaq Gold を 0.1  $\mu$ l 加え ddH<sub>2</sub>O で最終容量が 10  $\mu$ l になるように調整した。PCR 反応サイクルは 96 °C 10 分間 denature したのち、96 °C 30 秒、T<sub>m</sub> 値 30 秒、72 °C 60 秒のサイクルを 46 サイクル行った。得られた PCR プロダクトを illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、以降の解析にそれぞれ供した。

#### [DNA クローン解析]

また、精製プロダクトを pTAC-1 に TA クローニングを行い、大腸菌コンピテントセル (DH5alpha) に形質転換させて形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌を LB 培地に塗布し、37 °C にて 16 時間培養を行い、得られたシングルコロニーをテ

ンプレートとしたコロニーダイレクト PCR を行った。PCR プロダクトを illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して、DNA サイクルシーケンスを行った。プライマーは M13 プライマーを使用して DNA サイクルシーケンスを行った。その後、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer でシーケンス解析を行った。

#### [次世代シーケンス解析]

次世代シーケンス解析には Life technologies 社の Ion PGM を用いて行った。シーケンス解析に用いた reference データはラットの Rn5 データを参照し、variant call software を用いてデータ解析を行った。なお、リファレンスとの比較において、リファレンスデータの CG 配列の C を Y に、それ以外の C を T に置き換え比較検討を行った。また CpG アイランドのメチル化率の算定には C read に対して C+T read を除して算定した。

## 5. 倫理面への配慮

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施した。

## C. 研究結果

### 1. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

改良 DNA 抽出法で得られた genomic

DNAは *in vitro* パッケージング操作を阻害する物質の混入がなく、またその収量は *in vivo* 変異原性解析に必要な量を十分に満たしていた。これを *in vitro* パッケージングし、そのパッケージング効率を計測した結果、変異原解析に必要である総形質転換数 (250,000 の形質転換ファージ) が得られた (Table.1)。

## 2. 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

候補マーカーとして同定された S100A11 蛋白について ELISA 法を用いて尿サンプルの解析を行った。対照群および EHEN 単独投与群と EHEN → KBrO<sub>3</sub> 投与群の中で、担がん動物の尿を用いて、S100A11 の発現量を比較検討した結果、いずれの群間においても有意な差を認めなかった。

## 3. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

肺扁平上皮がんモデルにおけるさらなる発がん機序解明のため、発がん過程早期に認められた気管支肺胞幹細胞 (BASC) における既知肺幹細胞マーカーにおける遺伝子発現量解析および遺伝子発現における網羅的解析を行った。サンプリングとして、前年度同様フローサイトメトリーを用いて BASC が豊富に存在することが知られている Sca-1<sup>pos</sup>CD31<sup>neg</sup>Pecam<sup>neg</sup> の分画において溶媒対照群および NTCU 投与群それぞれから分取した。既知遺伝子として、今回

は Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc および klf4 に着目し、検討した結果、いずれのマーカーにおいても NTCU 投与群において、溶媒対照群と比較し増加を認めた (図 1)。特に、c-kit および c-myc においては、それぞれ約 40 倍および 10 倍と顕著に高い値を示した。これらのことから、NTCU 投与により増加した Sca-1<sup>pos</sup>CD31<sup>neg</sup>Pecam<sup>neg</sup> 分画での幹細胞マーカーの発現増加が認められた。

さらに、マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、IPA ソフトウェアを用いて種々の signaling pathway を検討した結果、ERK MAPK (図 2A), PI3K/Akt (図 2B), PI3K Akt (図 2C) および TGF beta signaling pathway (図 2D) の関連遺伝子における発現上昇が認められた。

## 4. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

Bisulfite PCR にて用いたプライマーセットを Table.2 に示した。その結果、CNR1\_1, LOX\_2, LOX\_3, LOX\_5 で十分な PCR プロダクトが得られたため、以降の解析に用いた。BMF では PCR プロダクトが得られなかった。DNA クローンをキャピラリーシーケンシングした結果、両遺伝子のメチル化頻度に 2-AAF 投与に伴う変動は認められず、またそのメチル化頻度は低かった。次世代シーケンスの条件を Table.3, 4 に示した。そのトータルリードは約 150,000 リード (12 Mbase)、平均リードは 80 bp であった。

usable sequence 18%であるものの、トータルリード数が十分な数が得られているため、これ以降の解析も続行した。リファレンスデータとの一致度は 96.5%、マッピングされたリード数は無処置群で 45,593 read、2-AAF 投与群で 69,487 read であった。得られた read データを用いてメチル化率を算定した結果、今回評価した領域においては、各 CpG 領域のメチル化率が 10%を超える領域がほとんど認められず、また 2-AAF 投与に伴うメチル化頻度の変化は認められなかった (Table.5)。

#### D. 考察

今回新たに開発した微量試料 DNA 抽出法によってその収量は *gpt* アッセイを行う上で必要な最低量を十分に満たし、またパッケージング反応を阻害する物質の混入もみられず、形質転換ファージの総数は 250,000 程度得られた。*gpt* アッセイ、*Spi* アッセイに最低限必要な形質転換ファージ数(200,000)を上回る形質転換ファージが得られたため、本抽出法は微量資料における変異原性の評価を行うことが可能であることが確認できた。さらに、今回開発した DNA 抽出法の有用性を評価するため、各種被験物質を用いて甲状腺および膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の解析を行い、これまでになかったコウジ酸の甲状腺における変異原性およびプロポリスの膀胱における変異原性を明らかにし、その有用性を確認することができた(魏分担報告書参照)。

腎発がんの前がん病変マーカーの開発試験で着目した S100A11 は、カルシウムバインディングプロテインの 1 種であり、細胞周期の調節や分化等細胞の発達に関与することが報告されている。さらに、前立腺を始め、種々の癌においてその異常発現が報告されており、細胞増殖の亢進に関与するとの報告がある。本実験では、S100A11 が前がん病変で発現上昇した際に尿中に流出する可能性を考え、本マーカーが非侵襲的に尿を用いて発がん性を検出できる尿中マーカーとしての有用性を検討した。結果は対照群の尿と比較し、腎細胞腫瘍担がん動物の尿で発現に差を認めなかったため、尿中マーカーとしては適さないことが示唆された。

マウス肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの実験では、発がん過程早期に気管支肺胞幹細胞 (BASC) の増生が関与することを明らかにしてきたが、本年度では遺伝子発現に着目し、Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc および klf4 について検討した。いずれのマーカーにおいても既知肺幹細胞マーカーとして知られており、幹細胞能の亢進を検討するうえで有用なマーカーである。結果より特に顕著に発現上昇を示したマーカーとして、c-kit および c-myc が同定された。そのため、肺扁平上皮がんの発がん性の検討に有用である可能性が考えられた。また、マイクロアレイ解析の結果から IPA ソフトウェアを用いて、発現変動を示した遺伝子がどの signaling pathway に属するかを検討した。その結果、ERK MAPK,

p38 MAP, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連する遺伝子が多数同定され、多くの遺伝子で発現上昇していた。NTCU 投与群の BASC における細胞増殖能の増加や、幹細胞能の亢進においてこれらの signaling pathway の関与が示唆された。以上より、さらなる発がん機序解明がなされた。

エピジェネティクス解析の結果について、CNR1 および LOX における遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度は非常に低く、また 2-AAF 投与に伴うメチル化頻度の変動も認められなかったことから、これらの遺伝子の発現低下に遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関与していないことが示唆された。したがって、その発現異常にはメチル化以外のメカニズム(ジェネティックな異常やシグナル上流遺伝子の発現低下など)によるものと考えられる。これまでメチル化解析には一般的に Bisulfite-PCR 後の産物を TA クローニングによってクローニング操作を行い、シングルコロニーを 10 個程度ピックアップしてキャピラリーシーケンス解析する。したがって、一つの遺伝子に対する DNA クローンの数が少ないため、その信頼性には以前から疑問が呈されていた。次世代シーケンサーを用いることで一つの遺伝子に対して評価する DNA クローンは今回の場合でも 45,000 ~ 69,000 read であったため、その絶対量によるメチル化パラメータの信頼性はこれまでの DNA クローニング法よりはるかに高い。なお、BMF については PCR

増幅産物が得られなかった。これは Bisulfite 処理に伴い、C が U に変換され DNA 配列が単調になるため、PCR 反応の特異性が失われている可能性があるためである。今後は Bisulfite 変換の影響を受けにくい領域について検討を行う必要がある。

## E. 結論

抽出過程でサンプルロスが少なく、また形質転換を阻害する化学物質の混入のない DNA 抽出法の開発に成功した。また、微小組織における変異原性解析において、新規 DNA 抽出法の有用性を確認することができた(魏分担報告書参照)。膀胱粘膜や甲状腺のような微量組織においても変異原性の解析が可能になったことによって我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた発がん性・遺伝毒性の短期包括的評価モデルに本改良 DNA 抽出法を導入することによって、採取の容易な肝臓や腎臓だけでなく、微小組織の変異原性を評価することが可能となり、さらに我々のモデルの汎用性を高めることができた。

異型尿細管から腎腫瘍にかけて高発現が認められた新規前がん病変バイオマーカーである S100A11 については、組織マーカーとしては有用であるが、尿中マーカーとしては適さないことが示唆された。扁平上皮がん発がん機序の解析では、発がん過程早期において気管支肺胞幹細胞(BASC)の関与を明らかとしてきたが、遺伝子発現解析より NTCU 投与群の BASC 領域にて、Sca1, CD133, CD44, c-kit,

c-myc 及び klf4 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、ERK MAPK, p38 MAP, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。これらのことより、発がん機序に即した分子生物学的に意義を有するマーカー開発を行う可能性を示した。

次世代シーケンサーを用いてエピジェネティクス解析を行った結果、従来法に比較してより詳細にかつ定量的に DNA メチル化パラメータを評価できること確認できた。今後、エピジェネティック異常の評価試験法開発に向けて、メチル化解析のようなその頻度が重要な解析においては次世代シーケンサーを用いることが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kato M, Wei M, Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer. *Cancer Sci*, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.

Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tamano S, Shirai T, Wanibuchi H, Fukushima S.: Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats:

Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25, 209-214, 2012.

Xie XL, Wei M, Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, Wanibuchi H.: Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 50, 3934-3940, 2012. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.063.

Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H.: Dammar resin, a non-mutagen, induces oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of *gpt* delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline. *Mutat Res*, 748, 29-35, 2012.

Punvittayagul C, Pompimon W, Wanibuchi H, Fukushima S, Wongpoomchai R.: Effects of pinoembrin on the initiation and promotion stages of rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 2257-2261, 2012.

Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, Suehiro S, Kakehashi A.: AGR2 as a potential

biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J*, 58, 13-24, 2012.

山野莊太郎、魏 民、加藤 実、鰐渕英機：第 2 節 膀胱がんモデル動物. *Animal models 疾患モデルの作成と利用：がん*, 560-568, エル・アイ・シー, 2012.

加藤 実、魏 民、鰐渕英機：尿路上皮腫瘍の遺伝子異常と予後との関連. 腫瘍病理識別診断アトラス腎盂・尿管・膀胱癌, 237-244, 文光堂, 2012.

鰐渕英機、山野莊太郎、魏 民：第 5 回肺がんモデル. *細胞工学*, 31, 1384-1389, 学研メディカル秀潤社, 2012.

Kawai K, Li YS, Song MF, Ootsuyama Y, Kakehashi A, Wanibuchi H, Ootsuyama A, Norimura T, Kasai H.: Methionine sulfoxide stimulates hepatocarcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse: Possible role of free radical-mediated DNA methylation. *Gene and Environment*, 34, 123-128, 2012.

Fukushima S, Wei M, Kakehashi A, Wanibuchi H.: Threshold for genotoxic carcinogens: The central concern in carcinogenic risk assessment. *Gene and Environment*, 34, 153-156, 2012.

Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Iijima H, Kimura K, Hirakawa K, Wanibuchi H.: MUC5AC protects pancreatic cancer cells from TRAIL-induced death pathways. *Int J Oncol*, 42, 887-893, doi: 10.3892/ijo.2013.1760. 2013.

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S.: Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep*, 3, 1224, doi: 10.1038/srep01224. 2013.

## 2. 学会発表

梯アンナ、謝 暁利、山野莊太郎、魏 民、鰐渕英機：ヒト肝臓癌のプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカー候補分子の検討. 第 101 回日本病理学会総会, 東京 (2012 年 4 月)

Okabe K, Yamano S, Wei M, Kato M, Fujioka M, Xie X, Wanibuchi H. Identification of novel biomarkers of rat renal carcinogenesis. *Society of Toxicologic Pathology 31<sup>st</sup> Annual Symposium*, Boston(2012 年 6 月)

Wanibuchi H, Wei M, Kakehashi A,

Yamano S: Animal model for arsenic carcinogen. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 仙台 (2012年7月)

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、岡部恭子、奥村真衣、鰐淵英機 : *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立. 第27回発癌病理研究会, 伊豆 (2012年8月)

鰐淵英機 : *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立. 第6回応用トキシコロジーリカレント講座, 大阪 (2012年9月)

田中昌子、高橋克之、鰐淵英機、塩田正之 : 癌のストレス応答を標的とした Hsc70 クライアントタンパク質のプロテオーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

高橋克之、田中昌子、鰐淵英機、塩田正之 : 抗癌剤耐性胃癌細胞を用いた Hsp72 クライアントタンパク質のプロテオーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

山野荘太郎、魏 民、田尻正喜、梯アンナ、岡部恭子、奥村真衣、多胡善幸、鰐淵英機 : マウス肺扁平上皮癌の発がん過程早期における気管支肺胞幹細胞の関与. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、岡部恭子、奥村真衣、武下正憲、鰐淵英機 : *gpt delta* ラットを用いた膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の評価法の確立. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

森崎珠美、八代正和、梯アンナ、福岡達成、青松直撥、長谷川毅、平川俊基、久保尚士、田中浩明、六車一哉、大平雅一、鰐淵英機、平川弘聖 : 癌幹細胞様 SP 細胞と低酸素細胞のプロテオーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

小松弘明、西山典利、山野荘太郎、花田庄司、井上英俊、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機 : プロテオーム解析による新規肺神経内分泌癌のバイオマーカー検索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機 : FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌のプロテオーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)

岡部恭子、山野荘太郎、魏 民、加藤 実、田尻正喜、謝 暁利、鰐淵英機 : マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)



梯アンナ、桑江優子、山野莊太郎、魏 民、謝 暁利、若狭研一、鰐淵英機：ヒト幹細胞癌における特異的候補分子のピンポイントターゲティング. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

加藤 実、魏 民、田尻正喜、山野莊太郎、梯アンナ、仲谷達也、鰐淵英機：Steroid Sulfatase は膀胱癌の予後予測因子である. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、神吉将之、謝 暁利、鰐淵英機：BBN 誘発マウス膀胱癌過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

塩田正之、田中昌子、高橋克之、鰐淵英機：新規 FGF-2 機能阻害抗体による内皮細胞の生存抑制効果. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

鰐淵英機：膀胱癌の発症・進展におけるリスクファクターと機序. 第 246 回日本泌尿器科学会東北地方会, 福島 (2012 年 9 月)

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、藤岡正喜、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機：膀胱癌物質の早期検出 microRNA マーカーの検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 1 月)

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、鰐淵英機：ラットにおける非遺伝毒性肝発がん物質と毒性フェノタイプを予測できる遺伝子マーカーセットの探索. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 1 月)

奥村真衣、魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、鰐淵英機：*gpt* delta ラットを用いた 2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 1 月)

山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、岡部恭子、武下正憲、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の cancer initiating cell としての可能性. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 2 月)

梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、魏 民、長野嘉介、福島昭治、鰐淵英機：ラットにおける 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 1 月)

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 暁利、串田昌彦、鰐淵英機：マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, つくば (2013 年 1 月)

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 暁利、鰐淵英機：ラット膀胱発がん物質DMA(V)の *in vivo* 変異原性の検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば(2013年2月)

山野莊太郎、鰐淵英機：NASH-肝細胞癌発症 STAM マウスにおける病態評価。第 12 回分子予防環境医学研究会，つくば (2013年2月)

鰐淵英機：肺発がんモデルにおける組織幹細胞の役割。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)

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。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)

山野莊太郎、岡部恭子、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase 阻害による効果。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)

Yamano S, Wei M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Establishment of a novel mice model for lung squamous cell carcinoma. 9th

AACR-JCA Joint Conference, Maui, HI(2013年2月)

Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Doi Y, Nagano K, Banton M, Nishimaki F, Wanibuchi H, Fukushima S: Ethyl *Tertiary*-Butyl Ether induces oxidative stress and 8-OHdG formation in the liver of F344 rats via activation of CAR, PXR and PPAR nuclear receptors. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, Texas(2013年3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

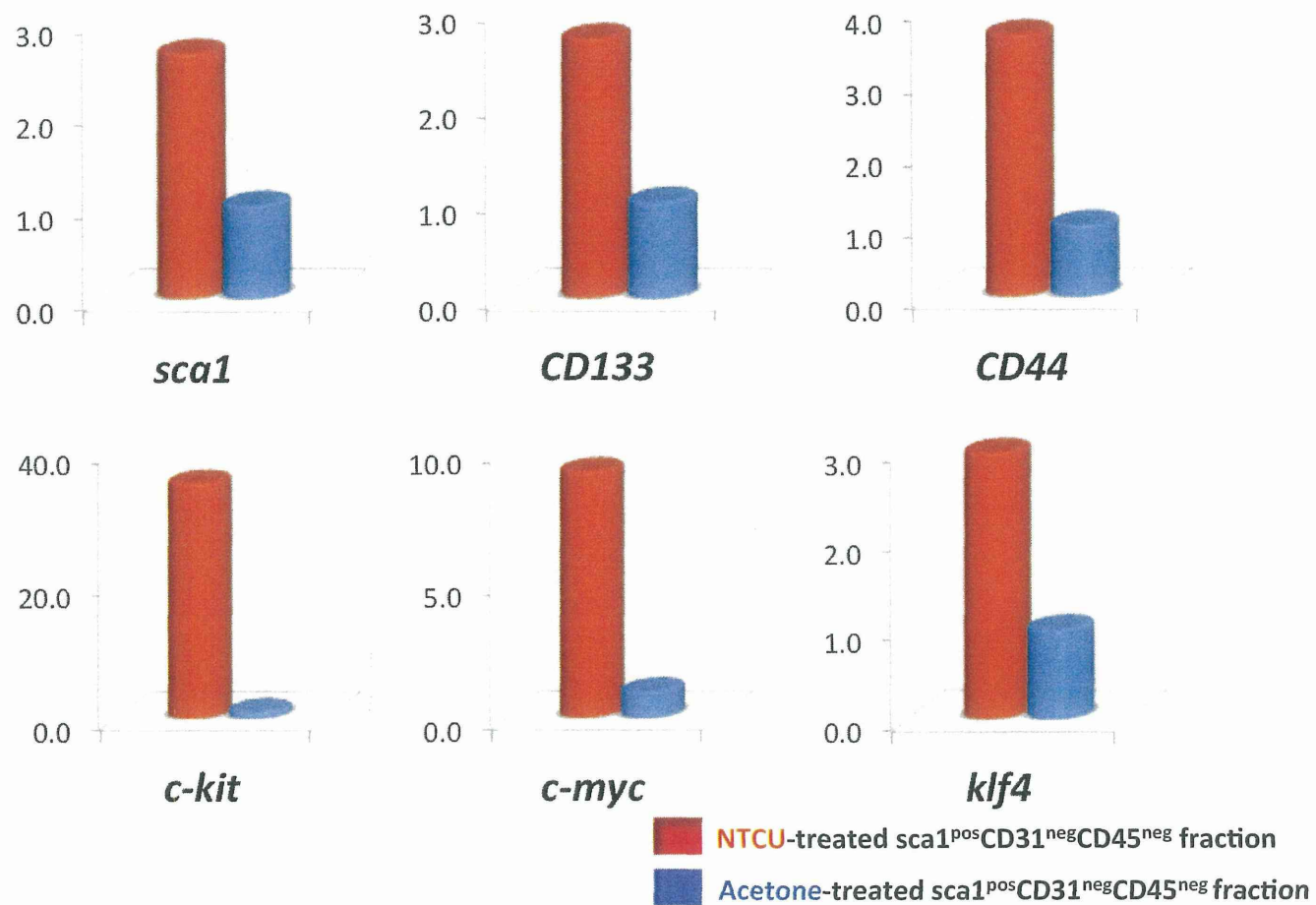


図1. 既知肺幹細胞マーカーにおける遺伝子発現量解析

# ERK MAPK Signaling

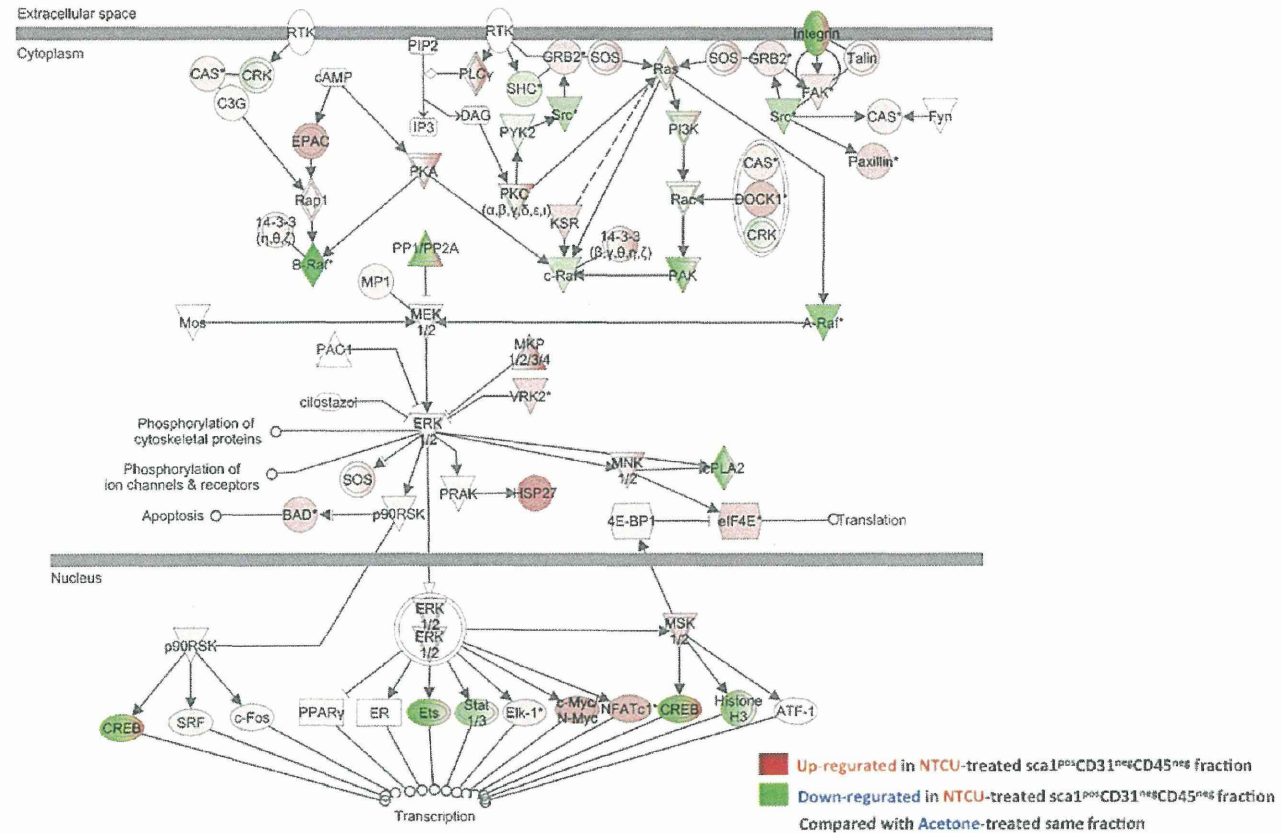


図2A. 気管支肺胞幹細胞(BASC)における遺伝子発現