

201313001A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 筆宝 義隆

平成26(2014)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	17
	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	23
	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	26
	竹下 文隆
4. 大腸腫瘍の化学予防	28
	中島 淳
5. 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明	31
	大島 正伸
6. 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	35
	青木 正博
7. KADラットを用いた抗炎症剤の検定試験系の開発	37
	庫本 高志
8. 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	39
	續 輝久
9. DDR初期応答としての細胞周期停止	43
	山下 克美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	46
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	50
-----------------	----

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

独立行政法人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 本研究では動物モデルを用いて主とし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個体レベル、細胞レベルの両面から進めた。ラットモデルでは多数の系統間の比較により、大腸発がん和肥満が共通の遺伝的素因を有しており、それが AKT の制御と関連するものであることを明らかにした。大腸がんの特異的な前がん状態である異形成を dACF として簡便に診断する方法を開発し、現在汎用されている通常の ACF やその他の病変よりも dysplasia および腫瘍原性のマーカーとして有用であることを示した。食餌由来変異原物質の大腸発がん性を規定する因子はこれまでほとんど不明だったが、これらの物質の投与により大腸粘膜に早期に誘導される miRNA の発現パターンから予測可能であることを明らかにした。4 種類の阻害剤 (YPAC) により樹立したラット胚性幹 (ES) 細胞において p53 遺伝子を欠損させたノックアウト (KO) ラットは、精巣がん、骨肉腫、乳がんが自然発生し、これらのがん組織から YPAC によって、元の性質を維持したまま株化培養が可能なが示唆された。KAD ラットを用いた抗炎症剤候補物質の薬効評価系を確立するために、抗炎症剤であるセレコキシブと緑茶カテキンの一種エキガロカテキンガレートとを投与し両薬剤のもつ大腸腫瘍の抑制効果を確認した。マウスモデルとして、個体レベルでの新規発がんモデルを代替・補充可能な細胞レベルでの大腸発がんモデルを確立した。同モデルで作成したがん幹細胞集団は spheroid 形成条件下では薬剤やガンマ線に抵抗性を示すが、PARP 阻害剤は DNA 修復とエピジェネティック制御阻害から放射線増感効果を示した。Msh2 遺伝子欠損マウスを用いて、臭素酸カリウムの飲水投与による酸化ストレス誘発発がん実験で、上皮性腫瘍の発生頻度の上昇が顕著に認められた。TUNEL 法解析により発がんにはミスマッチ修復系が関与する酸化ストレス誘発細胞死が大きく関わっていることが示唆された。mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 の投与により、cis-Apc/Smad4-KO マウスの腸管腺がんの形成は強力に抑制されたが浸潤能自体は抑制されず、mTOR キナーゼ阻害薬投与により EGFR/PI3K/Akt 経路が活性化されていることが分かった。胃がんおよび胃炎発生マウスモデルを用いた網羅的解析により、炎症反応依存的に胃がん細胞で発現変動する microRNA (miRNA) を特定した。最も強く発現誘導する miR-135b はヒト胃がん組織でも高発現であり、胃がん細胞株における発現誘導や抑制は、それぞれ増殖、遊走、腫瘍原性の亢進と抑制に作用した事から onco-miRNA の作用を有すると考えられた。AMPK 活性化薬であるメトホルミンのヒト大腸腺腫切除後の再発抑制効果を検証する臨床試験を実施、150 例の組み入れを終了しフォローアップ中である。多価不飽和脂肪酸であるエイコサペントエン酸 (EPA) のヒトにおける効果検討したところ、1 か月間の EPA 投与で ACF 数は有意に低下し、散発性大腸腫瘍の化学予防に十分臨床応用可能と考えられた。

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

## A. 研究目的

本研究では、ヒト大腸発がんの分子機構の解析機構を行い、がんの早期診断や、テーラーメイドながん予防策の構築、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の臨床応用に資するシーズの探索を目的とする。具体的には、種々の動物モデルを用いて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環境・遺伝的因子の解明に焦点を当てた以下の研究を展開する。

加熱魚肉食品中変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) により誘発されるラット大腸発がんモデルを主に用いて個体レベルでの解析を進める。PhIP のラット大腸上皮への低濃度の暴露によって引き起こされる DNA 損傷応答 (DDS) を初代培養細胞を用いて検討する。また、これらを代替・補完しうる新規手法として細胞レベルの「in vitro 発がん再構成モデル」を確立する。

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とともに翻訳後修飾反応のポリ ADP-リボシル化を標的とし、臨床試験が行われつつある PARP 阻害剤の早期からの制がんへの応用法を検討する。

これまでに MUTYH 遺伝子欠損マウスを用いて酸化ストレスに起因する突然変異が大腸がんを誘発することを示すとともに、臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) 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。

がん組織では、マクロファージを中心とする炎症細胞浸潤による微小環境が形成される。COX-2/PGE<sub>2</sub> 経路は炎症性微小環境形成に重要であり、がん細胞の増殖や生存に作用すると考えられるが、炎症による発がん促進の分子機構は未だ不明である。microRNA に着目し、炎症依存的

な胃がん発生マウスモデル、および胃炎発生マウスモデルを用いた解析により、炎症反応依存的に胃がん発生促進に作用する microRNA を特定する。

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、我々はその腫瘍形成に mTOR complex 1 (mTORC1) と Smoothed が重要な役割を担うことを示してきた。本研究は、腸管腫瘍における 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ことを目的とする。

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 (ES) 細胞の未樹立から、ノックアウト (KO) ラット作製は極めて困難とされてきた。4 低分子化合物 (YPAC) によって樹立した ES 細胞から p53 遺伝子 KO ラットを作製し、マウスの場合と異なるがんの発生に対する影響および YPAC によるがん細胞の性質維持が可能かを検討する。

Apc 遺伝子変異をもつ KAD ラットに、AOM と DSS を投与すると 15 週間という比較的短期間で、すべてのラットに確実に約 10 個の大腸腫瘍を誘発することができるため、評価試験系としての利用価値が高いことが予想され、抗炎症剤、抗がん剤で検証を行う。

多価不飽和脂肪酸のひとつであるエイコサペントエン酸 (EPA) はマウス発癌モデルにおいて抗腫瘍効果を有するため、ACF を指標としてヒト散发性腫瘍の抑制効果を有するか検証する。

## B. 研究方法

(1) 大腸発がんと肥満の疾患感受性に共通の遺伝的素因の解明：PhIP に対する大腸発がん感受性の異なる F344 (感受性) と ACI (抵抗性) に関して、両者の体重、脂肪量、血清脂質等のデータを時系列で採取して比較した。さらに、18 種類の近交系ラット系統間の比較にまで拡大した。F344 と ACI の基礎食下大腸粘膜の網羅的遺伝子発現解析を行い有意に差のあるシ

グナル経路の絞り込みを行った。肥満と大腸発がん性の高相関が認められる数系統のラットを用いて蛋白レベルで発がん性と相関する分子を探索した。さらに、高脂肪食・低脂肪食、および PhIP の有無でこれらの蛋白がどのような影響を受けるか蛋白レベルで確認を行った。

(2) ラット大腸異形成の簡易診断法の確立: 通常のメチレンブルー染色による ACF の検出法にメタノールによる脱色過程を追加し、粘膜を脱色後も濃染されている crypt を形態学的に 3 種類に分類し、ACF を構成する crypt の種類に基づく ACF の再定義を行った。これらの ACF の色素染色、beta-catenin 免疫染色による組織学的評価を行った。また、同じ大腸を異なる染色法で評価し、通常の ACF、新規 ACF、MDF、flat ACF などとの比較を行った。逆に、組織学的に dysplasia と診断された病変が粘膜上ではどのように診断されていたかを retrospective に比較し、dysplasia の検出率を評価した。

(3) ファーマコゲノミクスによる変異原物質のラット大腸発がん性予測: 食餌由来の変異原性物質 6 種 (PhIP, IQ, MeIQx, Glu-P-1, MeA $\alpha$ c, Trp-P-2) について、まず 2 週間混餌投与を行い、次いで 4 週間高脂肪食を投与して、大腸粘膜に誘発される ACF の数を計測した。長期発がん性を評価する際にはこのサイクルを合計 3 回を行い、投与開始後 3 2 週間後に解剖して腫瘍数を計測した。変異原性物質 6 種は 25mg/kg で胃内投与を 2 4 時間毎に合計 3 回を行い、最終投与の 1 6 時間後に大腸粘膜から crypt 採取を行い、RNA を抽出した。microRNA350 種類を搭載したアレイ (Rat miRNA Oligo Mikroarray kit G4473A, Agilent Technologies) で発現解析を行い、化合物や発がん性と相関する発現 signature を探索した。

(4) 細胞レベルでのマウス大腸発がんモデルの確立: 3-5 週齢のマウスから小腸を採取し、PBS で洗浄後に EDTA 法で crypt を分離、マトリゲルを用いた 3 次元培養を行った。細胞分散後に各種 shRNA や Cre

をレンチウイルスで単独または組み合わせて導入した。再び 3 次元培養を行い、organoid について組織学的解析、qPCR 解析による Axin2 の発現、浮遊培養における sphere 形成能を評価した。約 4 週間後に 105 個相当の organoid を Matrigel とよく混和してヌードマウス皮下に接種し腫瘍形成するか検証した。得られた皮下腫瘍は HE 染色や AB 染色による組織学的な解析や Ki67、beta-catenin の免疫染色を行った。

(5) マウス誘導がん幹細胞の薬剤感受性解析: APC、PTEN 遺伝子を不活化したマウス腸管等の幹細胞由来の腫瘍細胞などの実験系で PARP 阻害剤や他の DNA を標的とする抗がん剤に対する感受性を比較し、感受性を規定する機構を検討する。また、幹細胞形質を有する細胞株の移植実験系において PARP 機能阻害によるがん化への影響を検討する。

(6) 酸化ストレス発がんマウスモデルを用いた DNA 修復と発がんの関連の解析: 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、酸化剤の KBrO<sub>3</sub> 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、臭素酸カリウムを投与したマウスの小腸上皮から組織切片を作製し、TUNEL Kit (TaKaRa Co) を用いてクリプトにおける細胞死 (アポトーシス) 誘導を検討した。

(7) 胃がんマウスモデルにおける onco-miRNA の解析: Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE2 経路依存的炎症反応の相互作用により胃がんを発生する Gan マウスの腫瘍細胞と、COX-2/PGE2 経路の誘導により胃炎を発症する K19-C2mE マウスの胃組織を用いた網羅的な microRNA (miRNA) の比較解析を実施した。炎症依存的に胃がん細胞で発現誘導する miRNA について、胃がん細胞を用いた発現実験により、増殖率、遊走性および腫瘍原性への関与について解析を行った。

(8) マウス大腸浸潤がんモデルにおける mTOR 経路阻害の腫瘍抑制効果の解析 : cis-Apc/Smad4 複合変異マウスに mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を経口投与し、腫瘍組織における Akt、Erk、p38MAPK 等の活性化状態を調べた。mouse-phospho-RTK Array Kit を用いて、受容体型チロシンキナーゼの活性化状態を網羅的に解析した。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。

(9) KO ラットの作成および誘導腫瘍細胞の解析 : Zinc Finger Nuclease (ZFN) 法により p53 遺伝子をホモ欠損 ES を作成し、野生型受精卵に移植しキメラを作成し、組織別の影響を解析する。p53 遺伝子 KO ラットにおいて自然発症した腫瘍組織の一部を培養条件に移し、ES 細胞の樹立に用いた YPAC の添加により、腫瘍細胞の株化、免疫不全マウスを用いた造腫瘍性、分化マーカーを用いた元の腫瘍細胞の性質の維持が可能かを検討する。

(10) KAD ラットを用いた薬物評価系の確立 : 代表的な抗炎症剤であるセレコキシブを用いて、抗炎症剤の評価モデルを確立した。セレコキシブ非投与群、投与群 (500ppm) を設定し、AOM と DSS により大腸がんを誘発した。セレコキシブは、実験開始時から 14 週間、混餌投与した。また、緑茶の成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) を用いて同様に、発がん実験を行った。1%EGCG 溶液を DSS 投与終了後、13 週間飲水投与した。

(11) PhIP によるラット大腸細胞 DDR 誘発機構の解析 : これまでの研究で DDR マーカーである p53 の発現上昇、その原因の一つである S15 のリン酸化、S15 のリン酸化酵素の一つである Chk1 の活性化指標である S435 のリン酸化等を、特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析してきた。本年も、同様の指標を用いて sub- $\mu$ M の PhIP の効果を検討した。陰性対照は昨年同様、ラット大腸に対する非発がん物質である MeA $\alpha$ C を用いた。

(12) EPA による大腸腺腫化学予防 : 大腸腺腫切除予定の 30 名を対象に下部消化管内視鏡検査で ACF を測定した。その後 EPA 群、プラセボ群に無作為割り付けを行い、EPA 群は EPA2.7g を、プラセボ群はオレイン酸 2.7g を毎日内服し、1 か月後に ACF 数を再検した。また、WT と GPR120KO マウスにアゾキシメタンで ACF を誘導しそれぞれ高脂肪食、低脂肪食、EPA 添加食を摂取させ発癌メカニズムを解析した。

(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 と 肥満の疾患感受性に共通の遺伝的素因の解明 : F344 (感受性) と ACI (抵抗性) の比較により、F344 は総体重では ACI と顕著な差はなく推移するものの、総脂肪量、皮下脂肪量、内臓脂肪量のすべての項目で有意に高値を示すなど肥満形質を有することを明らかにした。血液データの中では中性脂肪の値でのみ両系統間で差を認めた。18 種類の近交系ラット系統間でも同様の結果が得られ、発がん性-中性脂肪-肥満の関連が再確認された。F344 と ACI の疾患罹患性の差を規定する因子として、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により抽出された PI3K 経路に着目し、同経路の蛋白およそ 30 種類について網羅的に Western Blot を行ったところ、p-Akt の活性化レベルと発がん感受性の高い相関を見いだした。発がん感受性が最も高かった BUF 系統を用いて、高脂肪食および PhIP の投与が大腸粘膜に与える影響を調べたところ、PhIP の投与により Akt の持続的活性化が誘導される一方で、高脂肪食がその活性化を抑制することを新たに見いだした。PhIP と高脂肪食はともに PARP と caspase3 の cleaved form の生成を抑制し、アポトーシスを阻害する作用があると考

えられた。さらに、PhIP による Akt の活性化は GSK-3 $\beta$  の不活性化を誘導しているにも関わらず、予想に反して $\beta$ カテニンの蓄積を誘導していないこと、また、高脂肪食は著明に $\beta$ カテニンの蓄積を誘導することを新たに見いだした。

(2) ラット大腸異形成の簡易診断法の確立：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、粘膜脱色後も濃染されている Foci を検出した。構成する crypt の大きさと開口部の狭さを元に、濃染する crypt を 3 種類に分類した。腺管の開口部の形状が圧排されている d-type と cd-type の crypt を有する Foci を dysplasia-associated ACF (dACF) と再定義し、classical ACF (cACF) との関係と同じ標本で調べたところ、cACF は個体あたり約 200 で、そのうち約 100 が dACF としても検出された。dACF として新たに検出された Foci も 10 程度あった。cACF<sup>-ve</sup>dACF と cACF<sup>+ve</sup>dACF を組織学的に比較した場合、前者において、より高度な異形成、beta-catenin の蓄積や Mucin の染色性の欠失の頻度が高かった。これらの結果より、cACF<sup>-ve</sup>dACF は cACF<sup>+ve</sup>dACF よりも進行した早期病変であることが示された。また、dACF の 94% が組織学的に異形成と診断された。同一病変に対する異なる染色を順次施行して比較したところ、MDF と flatACF はともに cACF<sup>-ve</sup>dACF のごく一部を形成することを見いだした。一方、組織学的に異形成と診断された病変が粘膜上では 90% の病変が dACF として検出されるのに対し、MDF と flatACF は高度な異形成に限っても半分程度の検出率に留まっていた。

(3) ファーマコゲノミクスによる変異原物質のラット大腸発がん性予測：ファーマコゲノミクスによる変異原物質の大腸発がん性予測 (ラット)：変異原性を有する Heterocyclic amine (HCA) 6 種類について、過去の長期間継続投与による評価では、PhIP を含めた 3 種類が大腸発がん性を有し、MeA $\alpha$ C を含む 3 種類については非大腸発がん性とされてきた。今回新

たに、HCA 投与 2 週間、高脂肪食負荷 4 週後に大腸に誘導された ACF 数を計測したところ、長期評価では発がん性なしとされた MeIQx についてのみ大腸発がん性が示唆される結果を得た。ファーマコゲノミクスの手法でも検討を行ったところ、大腸粘膜の miRNA プロファイリングではクラスター解析でも主成分分析でも発がん性の有無に対応する 2 群に分かれたことから、miRNA が大腸発がん性に関与することが示唆された。2 群に分類する上で貢献度の高い遺伝子を Random Forest 解析で絞り込み、これを MeIQx に適用したところ発がん性が示唆された。そこで、より発がん効率の高い高脂肪食下間欠投与方法を用いて MeIQx の長期発がん性を改めて評価し直したところ、大腸発がんが認められた。qPCR においてもほぼ同様の結果が得られ、化合物投与に対する miRNA 初期応答が長期的な発がん性と密接に関連することが確認された。

(4) 細胞レベルでのマウス大腸発がんモデルの確立：マウス正常腸管細胞の 3 次元初代培養を行い、大腸がん抑制遺伝子 APC に対する shRNA を導入したところ、再現性よく organoid が増殖し、Apc もノックダウンされていた。また、beta-catenin の蓄積、極性の消失、分化した細胞の脱落の消失などを認め、Axin2 の発現上昇も確認されたことから Wnt 経路が確かに活性化していることが確認された。ヌードマウス皮下に移植したところ、約 7 割に腺管構造を有する腫瘍を形成した。shPTEN や shp53 の同時導入、Kras 活性化 (LSL-KrasG12D マウス由来細胞への Cre 遺伝子導入) などを shAPC と組み合わせた場合、shAPC 単独導入に比べて腫瘍形成率は 100% となり、腫瘍径も有意に増大した。個体レベルでの解析同様、APC 不活性化により tumor initiation が完了し、他のがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化により tumor progression が達成されていると考えられた。

(5) マウス誘導がん幹細胞の薬剤感受性解析：がん幹細胞集団は spheroid 形成条件下では薬剤やガンマ線に抵抗性を示

すが、PARP 阻害剤の併用は DNA 修復とエピジェネティック制御阻害という複数の機構から増感効果を示し、有効である可能性が示唆された。マウス ES 細胞の子宮移植系での胚細胞腫瘍発生系において、PARP 機能阻害は腫瘍の転移や浸潤性に関わりうる trophoblast 系譜への分化の亢進を起こした。これは DNMT3 等の発現低下を伴うエピジェネティック制御の異常により惹起されていることが示唆された。

(6) 酸化ストレス発がんマウスモデルを用いた DNA 修復と発がんの関連の解析：前年度の研究で、酸化ストレスで消化管に誘発された腫瘍における Ctnnb1 遺伝子を解析した結果、ミスマッチ修復系が 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。そこで本年度はミスマッチ修復系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との関連を解析した。0.2%KBrO3 投与された野生型マウスと Msh2 遺伝子欠損マウスの小腸組織切片を TUNEL 法で染色し、それぞれ約 100 個のクリプトを観察し、クリプト当たりの TUNEL 陽性細胞の数を計測した。その結果、野生型マウスでは  $3.36 \pm 0.96$  (mean  $\pm$  SD)、Msh2 遺伝子欠損マウスでは  $0.80 \pm 0.46$  (mean  $\pm$  SD) の細胞が TUNEL 陽性を示した。この差は統計的に有意である ( $p < 0.002$ ; t-test) ことから、ミスマッチ修復はマウス小腸のクリプト細胞の酸化ストレス誘発細胞死に関与していることが示唆された。

(7) 胃がんマウスモデルにおける onco-miRNA の解析：平成 24 年度の解析により、がん組織では腫瘍細胞だけでなく間質においても miRNA の発現が変化している事が明らかとなった。そこで、がん細胞において発現変化する miRNA を特定するため、Gan マウスの胃がん組織の腫瘍上皮細胞、および野生型マウスの正常胃粘膜上皮をレーザーマイクロダイセクションにより採取して、抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施した。それにより、腫瘍上皮細胞で発現誘導する miRNA 群と発現低下する miRNA 群をそれぞれ特定した。さらに、この結果を

K19-C2mE マウスの胃炎組織で発現変化する miRNA 群と比較解析した結果、miR-155、miR-21 などのがん遺伝子として知られるものを含む、18 個の miRNA が炎症依存的に胃がん細胞で発現誘導する事が明らかになった。最も強く誘導される miR135b は、ヒト胃がん組織や Apc  $\Delta$ 716 マウスの腸管腫瘍細胞でも発現誘導が認められ、さらに解析を進めた結果、その miR-135b 発現が胃がん細胞の増殖や遊走、および腫瘍原性の促進に作用する事が明らかとなった。

(8) マウス大腸浸潤がんモデルにおける mTOR 経路阻害の腫瘍抑制効果の解析：cis-Apc/Smad4 マウスに mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を投与したところ、mTORC1 経路は mTORC1 選択的阻害薬 RAD001 に比べて更に強く抑制され、mTORC2 経路も抑制された。短期間の AZD8055 投与により腺がん形成は著しく抑制されたが、浸潤の深さ自体は抑制されなかった。AZD8055 投与下においても cis-Apc/Smad4 マウスの腸がんでは Akt の T308 のリン酸化が亢進し、Akt 経路は活性化されていた。受容体型チロシンキナーゼのリン酸化状態を網羅的に解析したところ、EGFR の強い活性化が認められた。大腸がん細胞株 CaR-1 を用いて in vitro での解析を行ったところ、AZD8055 により EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化されたが、EGFR 阻害薬 erlotinib により AKT の活性化は抑制された。

(9) KO ラットの作成および誘導腫瘍細胞の解析：p53 遺伝子 KO ラットのホモ欠損個体の雌は胎生致死であったので、ZFN 法により ES 細胞の時点で p53 遺伝子をホモ欠損させ野生型受精卵に移植しキメラを作成すると、胎生致死となりホモ欠損 ES 細胞由来の組織は染色体不安定性を示し発生へ影響することが示唆された。p53 遺伝子 KO ラットのオスでは、精巣がん、骨肉腫が発生し、細胞株の樹立を試みたところ、YPAC の存在下のみ樹立に成功し、骨肉腫はヌードマウスに同所性に移植した際、肺へ転移を示した。また、p53 遺伝子 KO メスラットでは乳がんが発生し、がん組織から樹立した細胞株は、YPAC の添



加により扁平上皮や脂腺への化生を示し、YPAC を用いることで、がん組織から元の性質を維持したまま株化できる可能性が示唆された。

(10) KAD ラットを用いた薬物評価系の確立：セレコキシブ投与群では、有意に大腸腺腫の発生率が抑制された。また、1頭当たりの病変は、異形成、腺癌において、有意に抑制された。EGCG 投与群では、大腸異形成、腺腫、腺癌のいずれにおいても、その発生数が有意に抑制された。また、EGCG は抗酸化作用があるとされている。血中の活性酸素代謝物 (ROM)、抗酸化力 (BAP) を測定したところ、1% EGCG 投与群で有意に抗酸化力指標 (BAP/ROM) が上昇していることが判明した。

(11) PhIP によるラット大腸細胞 DDR 誘発機構の解析：これまでの研究により、ラット肝 S9 mix 処理により代謝活性化された  $1\mu\text{M}$  PhIP を初代培養細胞へ加えた。添加 6 時間後に細胞抽出液を調製し、研究方法で記載した DDR 関連因子の活性化を種々の抗体濃度で検討した。その結果、 $1\mu\text{M}$  の PhIP 処理により p53-S15 のリン酸化の検出条件を確立できた。この条件を用いて、前述のように S9 mix により活性化させた  $0.1\mu\text{M}$  または  $0.3\mu\text{M}$  PhIP で細胞を 6 時間処理し、主として p53-S15 のリン酸化の検出を行った。その結果、 $0.3\mu\text{M}$  PhIP 処理では明らかな p53-S15 のリン酸化が検出された。一方、 $0.1\mu\text{M}$  PhIP では非常に微弱ではあるが、再現性よくシグナルが検出された。しかしながら、両濃度の PhIP 処理では、p53 の発現上昇、Chk1-S435 のリン酸かを指標とした活性化、ならびに p53 の標的遺伝子である p21 の発現上昇は検出されなかった。

(12) EPA による大腸腺腫化学予防：臨床試験では、1 か月間の EPA 投与で ACF 数は有意に低下し、細胞増殖のマーカーである Ki-67、PCNA は有意に低下した。基礎研究では WT で EPA 投与で ACF が減少したが、GPR120KO マウスでは EPA 投与しても ACF の減少は起きなかった。

## D. 考察

(1) 大腸発がんと肥満の疾患感受性に共通の遺伝的素因の解明：肥満は大腸がんのリスク因子だが、本研究では食餌由来変異原物質 PhIP による大腸発がん感受性と、脂肪蓄積による肥満傾向が共通の遺伝的基盤を持つことを初めて示した。さらに、大腸粘膜における Akt の活性化レベルがその指標になり得ること、PhIP の投与により Akt の持続的活性化が誘導される一方で、高脂肪食がその活性化を抑制することを新たに見いだした。PhIP と高脂肪食はともにアポトーシスを阻害していた。さらに、PhIP による Akt の活性化は GSK-3 $\beta$  の不活性化を誘導しているにも関わらず、予想に反して  $\beta$  カテニンの蓄積を誘導していないこと、また、高脂肪食は著明に  $\beta$  カテニンの蓄積を誘導することを見いだした。これらの新規の観察はその分子機構も全く未解明であることから、本研究で得られた知見を元に解析を継続することで、今後大腸発がんと肥満の関連に関して新たな一面が明らかになる可能性があると考えられた。

(2) ラット大腸異形成の簡易診断法の確立：マーカーとしての利便性から初期病変である Aberrant Crypt Foci (ACF) の数が長期大腸発がん性の指標として汎用されてきたが、dysplasia を伴わない多くの ACF はがん化しないため多くの批判があった。一方で、dysplasia の診断には煩雑な工程が必要であり、また ACF 以外の進行した前がん病変は数が極端に少ないことからマーカーとしての有用性は低いとされる。今回 ACF 染色後に脱色過程を追加し、さらに crypt の開口部の形状が狭小化しているもののみを抽出することで、組織学的検査を行わなくても dysplasia が簡便かつ実質的に検出可能 (特異性 94%、感受性 90%) であることを示し、数も充分あることからマーカーとして実用性が高いと考えられた。本病変 dysplasia-associated ACF (dACF) はこの領域における世界標準となる可能性があり引き続き研究を推進していく価値が高いと考えられる。

(3) ファーマコゲノミクスによる変異原物質のラット大腸発がん性予測：miRNAは近年発がんへの関与やがんの診断マーカーとして注目を集めているが、本研究では、化合物の大腸発がん性予測に投与後早期に誘導されるmiRNAプロファイルが有用であることを示し、miRNAが発がん過程の最も早期の段階にも関与している可能性を強く示唆した。変異原物質が発がん性は臓器毎に大きく異なることが知られているが、miRNAも臓器特異性が高い発現パターンを示すことから、該当臓器を用いて解析することで有意な結果が得られた可能性がある。また、本研究で得られた結果をもとにすると、大腸発がん性が未知の新規の化合物についても短期間の実験で長期発がん性を予測することが可能となると考えられ、環境因子のリスク評価の観点からも有用性が高いと考えられる。

(4) 細胞レベルでのマウス大腸発がんモデルの確立：大腸発がん分子機構としてはVogelsteinによって提唱された「多段階発がんモデル」が広く受け入れられているが、間質や微少環境が発がんに不可欠かどうかは検証する手法がなかったこともあり、これまで不明だった。今回マウス腸管3次元初代培養細胞に対する高効率の遺伝子導入法を確立し、全くの正常上皮細胞(C57BL6/J由来)のみからでもAPC遺伝子のノックダウンだけで腫瘍が誘導されることを確認した。また、他の遺伝子異常の追加により腫瘍形成率の上昇や腫瘍径の増大や組織型の悪性化が見られるなど、遺伝子改変動物における個体レベルの解析と同様な結果が得られ、発がん過程の段階的な進展が再現可能であることを示した。腸管の微少環境に非依存的な条件下においても大腸発がん過程を簡便に再現可能な細胞レベルの大腸発がんモデルになると考えられた。

(5) マウス誘導がん幹細胞の薬剤感受性解析：がん幹細胞マーカー陽性のがんでは抗がん剤や放射線に対する感受性が低下していることが報告されている。本研究より、このようながん細胞に対して

PARP阻害剤と放射線の併用が有効であることが示唆された。胚細胞腫瘍に対してPARP阻害剤を制がん目的で使用することはtrophoblast系譜の誘導を起こす可能性があり、今後も慎重に検討する必要がある。

(6) 酸化ストレス発がんマウスモデルを用いたDNA修復と発がんの関連の解析：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。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が上昇し、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、大多数はG:C→A:T変異であり、ミスマッチ修復系は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。そこで次に酸化ストレス誘発細胞死との関連について小腸組織切片をTUNEL法で染色することで解析し、ミスマッチ修復がマウス小腸のクリプト細胞の酸化ストレス誘発細胞死に関与していることが示唆された。以上の結果は、ミスマッチ修復系は8-oxoGの除去には直接関与していないものの、発がんにはミスマッチ修復系が関与する酸化ストレス誘発細胞死が大きく関わっている可能性を示唆する。

(7) 胃がんマウスモデルにおけるonco-miRNAの解析：胃がんモデルマウスおよび胃炎モデルマウスを用いた本研究により、炎症反応依存的に腫瘍細胞で発現変化するmiRNAの同定に成功した。これまでにすでに報告のある、発がん促進作用のあるmiR-155やmiR-21が含まれ、これらの発現も炎症性微少環境に制御されている可能性が考えられた。本研究で着目したmiR-135bは、ヒト胃がん組織でも強く発現誘導されており、強制発現によりがん細胞の増殖や遊走が亢進し、発現阻害により腫瘍原性も低下することから発がん促進に作用する可能性が示された。miR-135bの発現はNF-κBやStat3などの炎症に関連した転写因子で誘導される事が報告されており、胃がん細胞にお

ける発現誘導もこれらの炎症因子が関与している可能性が考えられた。将来的には、遺伝学的研究による検証が重要だが、以上の結果から、miR-135b の発現阻害による胃がんの予防または治療効果が期待される。

(8) マウス大腸浸潤がんモデルにおける mTOR 経路阻害の腫瘍抑制効果の解析：mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 は良性腺腫のみならず腸がんの形成も抑制するが、形成された腸がんの浸潤自体は阻害せず、昨年度の予備的実験で観察された浸潤の抑制は腫瘍の成長が抑制されたことによる二次的な効果による可能性が示唆された。AZD8055 投与下の cis-Apc/Smad4 マウスの腸がんで EGFR/PI3K/AKT 経路が強く活性化されていたこと、大腸がん細胞に AZD8055 を加えるとやはり EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化され、その活性化は erlotinib により阻害されたことから、未知の機序によるフィードバック効果により EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化されることが、浸潤部位における mTOR キナーゼ阻害薬耐性に寄与する可能性が示唆された。

(9) KO ラットの作成および誘導腫瘍細胞の解析：p53 遺伝子ホモ欠損 ES 細胞を野生型受精卵に移植し作成したキメラにおいても、胎生致死となりホモ欠損 ES 細胞由来の組織は染色体不安定性を示したことから、p53 が発生時には全ての組織で重要であり、死産の要因になりうることを示唆された。また、ZFN 法によって、ヘテロ同士の掛け合わせによらないホモ個体の作出が可能となり、キメラであるため、組織ごとの標的遺伝子の影響が検討可能なことが確認された。p53KO 遺伝子ラットは効率にがんを発症し、YPAC を用いることで元のがん細胞の性質を維持したまま培養が可能であることが示唆された。YPAC は ROCK、MEK、TgF-beta、GSK に対する 4 種類の阻害剤であり、これらの因子が幹細胞性のみならず、がん細胞の性質の維持に関与することが示唆された。

(10) KAD ラットを用いた薬物評価系の確立：本研究では、すでに大腸腫瘍の発生

に対する抑制効果が知られているセレコキシブ、EGCG を用いて、KAD ラットの AOM/DSS 大腸発がん誘発系での、大腸腫瘍の抑制効果を検討した。その結果、いずれの薬剤においても大腸腫瘍の抑制効果が確認され、KAD ラットの AOM/DSS 大腸発がん誘発系が既存の大腸発がん誘発系と同様、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験に利用できることを示した。これまでの、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験は、F344 ラットなどの正常ラットに大腸がんを誘発したバイオアッセイ系を用いていた。これらの系では、実験期間が 30 週程度と長く、大腸腫瘍の発生頻度も数 10% 程度であり、評価の効率の改善が求められていた。Apc 遺伝子に変異をもつ KAD ラットを用いることで、実験期間の短縮と発生頻度の改善がなされ、抗炎症剤やがん抑制物質の評価試験の効率化がなされた。KAD ラットを用いた AOM/DSS 大腸腫瘍誘発系を用いることで、新規の抗がん剤、抗炎症剤、がん抑制物質の評価試験が迅速に進むことが期待される。

(11) PhIP によるラット大腸細胞 DDR 誘発機構の解析：昨年までの研究では検出が困難であった 1  $\mu$ M PhIP 処理において、p53-S15 のリン酸化が検出された。p53-S15 は DDR の上流因子である ATM/ATR のリン酸化標的でありかつ、ATR によってリン酸化・活性化される Chk1 の標的でもある。p53-S15 のリン酸化により p53 の安定性が誘導されることが、細胞周期停止の誘因の一つであるとされている。本年度の研究テーマであった、sub- $\mu$ M の PhIP 処理でも p53-S15 のリン酸化が認められたことから、ATM/ATR や Chk1 の活性化が引き起こされていることが推測される。従って、1  $\mu$ M 以下の濃度の PhIP 処理において Chk1-S435 のリン酸化が検出されなかったことは、おそらく本研究に使用した抗体の検出感度が原因であると思われる。低濃度 PhIP による DNA 損傷応答を明確に検討するためには、他の初期応答性 DDR 因子についても検討する必要があると思われる。

(12) EPA による大腸腺腫化学予防：EPA の

抗大腸腫瘍効果の機序は不明な点が多いが、G 蛋白共役受容体 120 (GPR120) を介したシグナル経路が大腸腫瘍抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。今後 GPR120 欠損マウスを用いた発癌実験により、効果判定および作用機序解明を行う予定である。EPA は脂質異常症治療薬として臨床応用されており、安全性が確立しているため、大腸腫瘍抑制への適応拡大が十分見込まれる。

#### E. 結論

ラット大腸発がんモデルを用いて、遺伝要因と環境要因の相互作用に影響を与える遺伝要因が存在することを明らかにした。また、早期病変の新規かつ簡便な同定法や化学物質の大腸発がん性予測法を確立した。マウス細胞レベル大腸発がんモデルを確立し、個体レベルの発がんモデルを補完・代替する新規手法として有用と考えられた。これらの知見や手法を用いて統合的に発がん過程を解析することで、その分子機構の詳細を解明する過程が加速することが期待される。

がん幹細胞集団は spheroid 形成条件下では薬剤やガンマ線に抵抗性を示すが、PARP 阻害剤は DNA 修復とエピジェネティック制御阻害という複数の機構から放射線増感効果を示し、有効である可能性が示唆された。

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、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た。誘発された腫瘍での Ctnnb1 遺伝子を解析した結果、ミスマッチ修復系は 8-oxoG の除去には直接関与していない可能性が示唆される一方、ミスマッチ修復がマウス小腸のクリプト細胞の酸化ストレス誘発細胞死に関与することが示唆された。以上の結果は、ミスマッチ修復系欠損個体では、酸化ストレスの負荷によって 8-oxoG に起因しない突然変異が蓄積した

がん前駆体細胞がより生存しやすくなり、その結果として腸管でのがん多発を引き起こす可能性があることを示唆している。

Wnt シグナル活性化と COX-2/PGE2 経路誘導による炎症反応の相互作用により、胃がんを自然発生する Gan マウスと、COX-2/PPGE2 経路誘導により胃炎を発症する K19-C2mE マウスを用いた、網羅的な比較解析により、炎症反応依存的に腫瘍上皮細胞で発現変動する miRNA を特定した。発現誘導する miRNA 群には、miR-155 や miR-21 などの発がん促進に作用する microRNA が含まれ、これらが炎症性微小環境の影響により発現誘導する事が明らかとなった。また、最も強い発現誘導を示した miR-135b はヒト胃がん組織やマウス腸管腫瘍細胞でも発現誘導しており、発がん促進に作用する可能性が考えられた。実際に miR-135b の発現誘導および発現阻害は、それぞれ胃がん細胞の増殖、遊走および腫瘍原性を亢進、あるいは抑制に作用したため、miR-135b は胃がん発生に作用する炎症反応依存的 microRNA であると考えられた。

昨年度までに、Apc マウスの微小腺腫が成長するためには 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 をリン酸化することによって mTORC1 を活性化することを明らかにした。また、mTORC1 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を示す予備的データを得ていた。本年度の研究により、mTOR キナーゼ阻害薬は浸潤能自体を抑制しないことが明らかとなった。また、mTOR キナーゼ阻害薬による未知のフィードバック機構を介して EGFR/PI3K/Akt 経路が活性化されることが耐性に寄与している可能性が示唆された。今後、mTOR キナーゼ阻害薬と EGFR 阻害薬との併用効果について更に研究を進めたい。

YPAC を用いたラット ES 細胞の樹立および ZFN 法の応用は、マウスとは異なる表現型を示すラットにおける遺伝子の機能解析に強力なツールとなることが示唆された。また、p53 遺伝子 KO ラットは環

境中の発生、発がん性への影響を及ぼす物質に対する感受性が亢進していると予想され、スクリーニングへの応用が期待される。また、p53 遺伝子 KO ラットで自然発症したがんから、YPAC による細胞の株化が可能になったことから、がん患者から摘出したがん組織由来の、元の性質を保持した細胞株の樹立に応用できると予想される。これらの癌細胞株の樹立は、より多様ながん細胞を使用しての抗癌剤のスクリーニングや、がん細胞の増殖・分化、さらにはがん幹細胞の維持などの機序解明に貢献することが期待される。

KAD ラットを用いた AOM/DSS 大腸発がん誘発系は、抗がん剤、抗炎症剤、がん抑制物質の評価試験として有用であることが示された。

ラット大腸上皮由来の初代培養細胞における、PhIP 投与による DDR の検出を試みた。今年度のテーマは、sub- $\mu$ M の PhIP 処理による DDR の誘発であり、1 $\mu$ M の PhIP 処理で p53 の発現上昇および Chk1-S435 のリン酸化の検出はできず、p53-S15 のリン酸化のみを検出できたため、0.1 $\mu$ M または 0.3 $\mu$ M PhIP 処理においては、p53-S15 のリン酸化を DDR の指標とした。その結果、p53-S15 のリン酸化は、0.3 $\mu$ M PhIP 処理においては明確に再現性よく検出された。一方、1 $\mu$ M の PhIP 処理の場合は、弱いシグナルながら再現性のよい結果が得られた。これらのことから、PhIP はラット大腸上皮由来初代培養細胞に DDR を誘発することが明らかとなった。

1 か月間の EPA 投与で ACF 数は有意に低下し、散発性大腸腫瘍の化学予防に十分臨床応用可能と思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ochiai M, Hippo Y\*, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly Defined Aberrant Crypt Foci as a Marker for Dysplasia in the Rat Colon. *Cancer Sci*. 2014 in press (\* corresponding author)
- 2) Igarashi M, Hippo Y\*, Ochiai M, Fukuda H, Nakagama H. AKT is

critically involved in cooperation between obesity and the dietary carcinogen

amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] (PhIP) toward colon carcinogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 443(3):852-7. 2014 (\* corresponding author)

- 3) Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(27):11127-32. 2013
- 4) Fujimori H, Mukai H, Murakami Y, Hemberger M, Hippo Y, Masutani M. The H19 induction triggers trophoblast lineage commitment in mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 436(2):313-8. 2013
- 5) Nozaki T, Fujimori H, Wang J, Suzuki H, Imai H, Watanabe M, Ohura K, Masutani M. Parp-1 deficiency in ES cells promotes invasive and metastatic lesions accompanying induction of trophoblast giant cells during tumorigenesis in uterine environment. *Pathol Int*, 63(8):408-14. 2013
- 6) Masutani M, Fujimori H. Poly(ADP-ribosylation) in carcinogenesis. *Mol Aspects Med*, 34(6):1202-16. 2013
- 7) Oshima, H., and Oshima, M. The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150 (2013).
- 8) Oshima H, Ishikawa T, Yoshida G., Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, and Oshima M. TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*, in press(2014).
- 9) Ju X, Ishikawa T, Naka K, Ito K, Ito

- Y, and Oshima M. Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci*, 105: 418-424 (2014).
- 10) Fujita H, Hamazaki Y, Noda Y, Oshima M, and Minato N. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PLoS one*, 8: e78961 (2013).
  - 11) Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright NA, Furuhashi S, Hirashima K, Baba H, Kitagawa Y, Saya H, and Nagano O. Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmodic. *Cancer Sci*, 104: 1323-1329 (2013).
  - 12) Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, Kuramoto T. Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis. *Am J Pathol* 182(4):1263-74. 2013
  - 13) Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y. and Nakabeppu, Y., 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice, *Scientific Reports*, (in press).
  - 14) Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Jingushi, K., Igawa, K., Tomooka, K., Watanabe, Y., Morimoto, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y. and Sasaguri, T., DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 $\beta$  and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice, *Biochem. Pharmacol.*, 2014 in press.
  - 15) Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. and Tsuzuki, T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int. J. Biol. Sci.*, 10: 73-79 (2014).
  - 16) Fujita, Y., Takeshita, F., Mizutani, T., Ohgi, T., Kuwano, K., Ochiya, T. A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer. *Sci. Rep.*, 3: 3325 (2013).
  - 17) Takahashi, RU., Takeshita, F., Honma, K., Ono, M., Kato, K., Ochiya, T. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 $\beta$ . *Sci. Rep.*, 3: 2474 (2013).
  - 18) Uchino, K., Ochiya, T., Takeshita, F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 43: 596-607 (2013).
  - 19) Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F., Ochiya, T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13: 1637-1653 (2013).
  - 20) Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Ochiya, T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.*, 288:10849-10859 (2013).
  - 21) 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).
  - 22) Nonaka T, Sekino Y, Iida H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Hosono K, Endo H, Koide T, Takahashi H, Fujita K, Yoneda M, Goto A, Kusakabe A, Kobayashi N, Gotoh E, Maeda S, Nakajima A, Nosaka C, Inamori M. Early Effect of

- Single-dose Sitagliptin Administration on Gastric Emptying: Crossover Study Using the (13)C Breath Test. *J Neurogastroenterol Motil.* 19(2):227-32. 2013
- 23) Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K. NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women. *Endocr J.* 60(8):991-1000. 2013
- 24) Kurita Y, Koide T, Watanabe S, Ogawa T, Sekino Y, Iida H, Nonaka T, Kusakabe A, Gotoh E, Maeda S, Nakajima A, Inamori M. Postpyloric decompression tube placement through a gastrostomy for malignant bowel obstruction. *BMC Res Notes.* 6:217. 2013
- 25) Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A. Soluble CD14 Levels Reflect Liver Inflammation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One.* 8(6):e65211. 2013
- 26) Ezuka A, Kawana K, Nagase H, Takahashi H, Nakajima A. Improvement of pneumatosis cystoides intestinalis after steroid tapering in a patient with bronchial asthma: a case report. *J Med Case Rep.* 7(1):163. 2013
- 27) Iida H, Ohkubo H, Inamori M, Nakajima A, Sato H. Epidemiology and clinical experience of chronic intestinal pseudo-obstruction in Japan: a nationwide epidemiologic survey. *J Epidemiol.* 23(4):288-94. 2013
- 28) Kato S, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Kubota K, Kobayashi N, Hosono K, Watanabe S, Sekino Y, Sato T, Sasaki K, Nakaigawa N, Kubota Y, Inayama Y, Endo I, Ohno S, Maeda S, Nakajima A.  $\alpha$ PKC $\lambda/\iota$  is a beneficial prognostic marker for pancreatic neoplasms. *Pancreatology.* 13(4):360-8. 2013
- 29) Watanabe S, Sato T, Kato S, Hosono K, Kobayashi N, Nakajima A, Kubota K. Positioning of nasobiliary tube using magnet-loaded catheters. *Endoscopy.* 45(10):835-7. 2013
- 30) Tomeno W, Yoneda M, Imajo K, Ogawa Y, Kessoku T, Saito S, Eguchi Y, Nakajima A. Emerging drugs for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 18(3):279-90. 2013
- 31) Hirata K, Wada K, Murata Y, Nakajima A, Yamashiro T, Kamisaki Y. Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Lipids Health Dis.* 12(1):122. 2013
- 32) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* in press
2. 学会発表
- 1) Kaoru Orihashi, Kunishige Onuma, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. STAT3 Activation Underlies Transformation of Primary Intestinal Epithelial

- Cells by APC Suppression. 第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
- 2) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. Genetic Reconstitution of Kras-driven Tumorigenesis in Primary Pancreatic Ductal Cells and Cholangiocytes. 第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 3) Masako Ochiai, Masatoshi Watanabe, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. Aberrant Crypt Foci-based Seamless Grading of the Early Lesions in Rat Colon Carcinogenesis. 第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 4) Yoshitaka Hippo, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Toshio Imai, and Hitoshi Nakagama. Lentivirus-based Generation of Adenocarcinoma from Primary Murine Lung Cells. 第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 5) 藤森浩彰、向井大晃、村上康文、益谷美都子 PARP 阻害剤処理は Dnmt3a/b の発現低下を誘導し、DNA メチル化や遺伝子発現パターン形成を変化させる。第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 6) 藤森浩彰、向井大晃、益谷美都子 PARP-1 は DNMT3 の発現を維持する新規調節因子である。第 28 回発がん病理研究会 (那覇) 2013 年 8 月
  - 7) 益谷美都子、平井 崇久、藤森浩彰、斎藤総一郎、西尾禎二、岡安 隆一、藤森 亮、笹井 啓資 PARP 阻害剤による生物学的放射線増感作用。第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 8) Junhui Wang, Akira Motegi, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, Mitsuko Masutani Parp-1 suppresses the end-resection of blocked termini of double strand DNA breaks and protects from deletion mutation. The 22nd Asia Pacific Cancer Conference, Tianjin, China 2013 年 10 月
  - 9) Hiroaki Fujimori, Hideki Ogino, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani Parp-1 has a novel role as Dnmt3 regulator and PARP inhibitor acts as a epigenetic drug recovering silenced expression of tumor-suppressor genes. PARP2013, Quebec city 2013 年 9 月
  - 10) Oshima, M. The role of inflammation in gastrointestinal tumor development and malignant progression. 第 72 回日本癌学会総会 (横浜) 2013 年 10 月
  - 11) Oshima, M. inflammatory responses and novel mechanisms for gastric cancer development. Soul national Univ CRI Cancer Symposium、韓国・済州島 (2013 年 5 月)
  - 12) Oshima, M. inflammation-associated malignant progression in model gastrointestinal tumors .6th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Consortium.、シンガポール (2013 年 7 月)
  - 13) Oshima, M. inflammatory responses in gastrointestinal cancer development and malignant progression. AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research、米国・ワシントン (2013 年 10 月)
  - 14) Oshima, M. Targeting chronic inflammation in gastrointestinal tumorigenesis. Annual Meeting of Korea Cancer Prevention Society、韓国・ソウル (2013 年 12 月)
  - 15) Oshima, M., and Oshima, H. The role of iCOX-2/PGE2-inducws inflammation in gastric cancer development.4th JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research、千葉 (2013 年 12 月)
  - 16) Oshima M. Chronic inflammatory responses in gastric tumor development and progression.4th international symposium on Carcinogenic Spiral、札幌 (2014 年



- 2月)
- 17) 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 大腸癌抑制タンパク質 APC と大腸炎関連タンパク質 DLG5 との相互作用 第 60 回日本実験動物学会総会、平成 25 年 5 月、つくば国際会議場
  - 18) 杉江成幸、田中卓二、吉見一人、庫本高志 KAD ラットは 4-NQO 誘発舌発がんを高感受性である 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10、パシフィコ横浜
  - 19) 藤下晃章、武藤誠、青木正博 mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんモデルマウスの腺がん形成を強力に抑制する 第 36 回日本分子生物学会、神戸市 (2013 年 12 月)
  - 20) 青木正博、藤下晃章、武藤誠 CDX 転写因子の標的分子 PLEKHG1 の発現低下は大腸腫瘍形成を促進する 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013 年 10 月)
  - 21) 藤下晃章、武藤誠、青木正博 mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんモデルの大腸腺がん形成を抑制する 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013 年 10 月)
  - 22) 佐久間圭一朗、神奈木玲児、青木正博 大腸がん細胞においてシアリルルイス糖鎖の発現と EMT は関連する 第 65 回日本細胞生物学会大会、名古屋市 (2013 年 6 月)
  - 23) Katsumi Yamashita: Stability of Cdc25B, a CDK activating dual-specificity protein phosphatase is controlled by its phosphorylation status. The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, Taipei (Nov 2013)
  - 24) 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府雄作 8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations: a study from the mutator mouse lines, SMBE Satellite Meeting / NIG International Symposium、三島市 (2014 年 3 月)
  - 25) 大野みずき、中津可道、中別府雄作、續輝久 酸化 DNA 損傷と消化管がん 日本分子生物学会第 34 回年会、神戸市 (2013 年 12 月)
  - 26) 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府雄作 ミューテーターマウス家系を用いた生殖細胞突然変異の解析システム 日本環境変異原学会第 42 回大会、岡山市 (2013 年 11 月)
  - 27) 青木康展、松本みちよ、松本 理、増村健一、續輝久、能美健彦 臭素酸カリウムが gpt delta マウス小腸で誘導する突然変異の閾値と変異スペクトルの用量依存性変化 日本環境変異原学会第 42 回大会、岡山市 (2013 年 11 月)
  - 28) Teruhisa Tsuzuki. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO3 11th International Conference on Environmental Mutagens, Bourbon Cataratas Convention & Spa Resort - Foz do Iguassu, Brazil (2013 年 11 月)
  - 29) Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Yusaku Nakabeppu, Yoshimich Nakatsu. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO3 日本癌学会第 72 回学術総会、横浜市 (2013 年 10 月)
  - 30) Charatda Punvittayagul, Yoshimichi Nakatsu, Rawiwan Wongpoomchai, Mizuki Ohno, Teruhisa Tsuzuki. In vitro study for mutagenicity of purple rice hull extract using fibroblasts derived from rpsL-transgenic mouse 日本癌学会第 72 回学術総会、横浜市 (2013 年 10 月)
  - 31) 大野みずき、作見邦彦、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府雄作 酸化 DNA 損傷に起因する de novo germline mutation の解析 日本遺伝学会第 85 回大会、横浜

- 市 (2013年9月)
- 32) 作見邦彦、大野みずき、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續 輝久、中別府雄作 酸化 DNA 損傷に起因する de novo germline mutation の解析 (II) 日本遺伝学会第 85 回大会、横浜市 (2013年9月)
- 33) Teruhisa Tsuzuki. AARR Award (Medicine) Lecture, Prevention of Oxidative Tumorigenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer The 3rd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2013), Beijing International Convention Center, Beijing, China (2013年5月)
- 34) 竹下文隆、落谷孝広 miRNA とエクソソームのがん診断への応用 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会、東京 (2013年12月)
- 35) Takeshita, F., Ono, M., Takahashi, RU., Tsuda, H., Ochiya, T. Identification of Long Non-Coding RNAs Associated with Recurrence of Breast Cancer 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市 (2013年10月)
- 36) 竹下文隆、小野麻紀子、高橋陵宇、落谷孝広 乳がんの悪性化に関与する長鎖非コード RNA の探索 第 5 回日本 RNAi 研究会、広島市 (2013年8月)
- 37) 藤井徹朗、高橋宏和、山田英司、大久保秀則、日暮琢磨、酒井英嗣、遠藤宏樹、中島淳: 大腸ポリープの再発における生活習慣関連リスク因子の検討. 第 3 回肥満と消化器疾患研究会 一般演題 (1), 鹿児島 (2013年3月)
- 38) 日暮琢磨、中島淳 拡大内視鏡による ACF 観察と AMPK/mTOR pathway に注目した大腸腫瘍化学予防 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会 パネルディスカッション 1 (内視鏡を用いた分子病理学的診断) (2013年5月)
- 39) Takuma Higurashi, Kunihiro Hosono, Eiji Yamada, Hidenori Ohkubo, Eiji Sakai, Hiroshi Iida, Hiroki Endo, Hirokazu Takahashi, Atsushi Nakajima. Low Dose Metformin

- Suppress Colorectal ACF and Normal Mucosal Proliferation by Activate AMPK, but Little Effect Adenoma and CIS. DDW AGA Poster Session Basic. Orlando, FL (2013年5月)
- 40) 日暮 琢磨、遠藤 宏樹、中島 淳 レプチンは腫瘍に発現するレセプターを介して大腸腫瘍の増殖を促進する 2013 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2013) シンポジウム 5 (消化吸収学会・消化器病学会・肝臓学会合同) 消化器疾患と栄養代謝ネットワーク-基礎から臨床まで- 東京 (2013年10月)
- 41) 日暮 琢磨、中島 淳 エイコサペントエン酸 (EPA) は大腸上皮の増殖を抑制し ACF を減少させる: 二重盲検無作為対照試験 2013 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2013) パネルディスカッション 3 (消化吸収学会・消化器病学会合同) 機能性食品や補助食品の消化器疾患における役割 東京 (2013年10月)
- 42) Higurashi T, Uchiyama S, Yamada E, Sakai E, Ohkubo H, Endo H, Takahashi H, Nakajima A: Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. 21<sup>st</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW), poster sessions, Berlin (2013年10月)
- 43) Sakai E, Uchiyama S, Yamada E, Higurashi T, Ohkubo H, Endo H, Takahashi H, Nakajima A, Matsuhashi N, Kaneda A: The characteristics of genetic and epigenetic alterations in laterally spreading colorectal tumors. 21<sup>st</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW), poster sessions, Berlin (2013年10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

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）  
分担研究報告書

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

独立行政法人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を用いて (1)大腸発がん肥満に対する罹患と、(2)大腸発がんの前がん病変である異形成が、dysplasia-associated Aberrant Crypt Foci (dACF) として高感度、特異的かつ簡便に同定可能であること、(3)Pharmacogenomics 解析により、変異原物質投与後早期の大腸粘膜の microRNA 発現プロファイルを元に変異原物質の大腸発がん性が予測可能であること、の3点を明らかにした。また、個体レベルの発がん解析を補完する新規の細胞レベル発がんモデルとして、「マウス *in vitro* 腸管発がん遺伝的再構成系」を確立した。具体的には複数のがん抑制遺伝子に対する shRNA や cDNA を *in vitro* で正常腸管初代培養細胞に導入することで、ヌードマウス皮下に腺管構造を有する腫瘍の作成に成功した。本実験系を用いることで、*in vitro* でも多段階発がんが再現可能であることを示し、遺伝子改変マウスを作成することなく個々の遺伝子の発がん過程における役割や、薬剤感受性への関与の検討が可能となり、今後の研究の大きな進展が期待される。

#### A. 研究目的

ヒト大腸発がんの分子機構、特に初期発生段階における遺伝子変異・発現変化や、発がん過程を修飾する種々の環境・遺伝因子の解明を目的とする。これまでも汎用してきた加熱魚肉食品中変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) により誘発されるラット大腸発がんモデルを主に用いて個体レベルでの解析を進める。また、これらを代替・補完しうる新規手法として細胞レベルの「*in vitro* 発がん再構成モデル」を確立する。本研究による動物モデルを用いた解析は、ヒト発がん研究のための検証系としての性格を有し、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、さらには、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)大腸発がん肥満の疾患感受性に共通の遺伝的素因の解明 (ラット) : PhIP に対する大腸発がん感受性の異なる F344 (感受性) と ACI (抵抗性) の比較による

発がん感受性遺伝子の探索研究をしている際に、基礎食を投与した場合でも F344の方が ACI よりも脂肪蓄積の程度が高いことに偶然気がついたことから、両者の体重、脂肪量、血清脂質等のデータを時系列で採取して比較した。さらに、これを18種類の近交系ラット系統間の比較にまで拡大した。F344と ACI の基礎食下大腸粘膜の網羅的遺伝子発現解析を行い有意に差のあるシグナル経路の絞り込みを行った。肥満と大腸発がん性の間に高い相関が認められる数系統のラットを用いて蛋白レベルで発がん性と相関する分子を探索した。さらに、高脂肪食・低脂肪食、および PhIP の有無でこれらの蛋白がどのような影響を受けるか蛋白レベルで確認を行った。

(2)大腸異形成の簡易診断法の確立 (ラット) : 通常メチレンブルー染色による ACF の検出法にメタノールによる脱色過程を追加することで、より特異的な異形成 (dysplasia) の検出が可能になることを以前示した (Ochiai et al., Cancer Letter, 2005) が、シグナル濃度の定量が必要でありながら、dysplasia と

non-dysplasiaを完全には区別できないという欠点があった。Azoxymethaneで処理したラットの大腸粘膜を用いて、粘膜を脱色後も濃染されているcryptを形態学的に3種類に分類し、ACFを構成するcryptの種類に基づくACFの再定義を行った。これらのACFの色素染色、beta-catenin免疫染色による組織学的評価を行った。また、同じ大腸を異なる染色法で評価し、通常のACF、新規ACF、MDF、flat ACFなどとの比較を行った。逆に、組織学的にdysplasiaと診断された病変が粘膜上ではどのように診断されていたかをretrospectiveに比較し、dysplasiaの検出率を評価した。

(3) ファーマコゲノミクスによる変異原物質の大腸発がん性予測 (ラット): 食餌由来の変異原性物質6種 (PhIP, IQ, MeIQx, Glu-P-1, MeAαc, Trp-P-2) について、まず2週間混餌投与を行い、次いで4週間高脂肪食を投与して、大腸粘膜に誘発されるACFの数を計測した。長期発がん性を評価する際にはこのサイクルを合計3回行い、投与開始後32週間後に解剖して腫瘍数を計測した。変異原性物質6種は25mg/kgで胃内投与を24時間毎に合計3回行い、最終投与の16時間後に大腸粘膜からcrypt採取を行い、RNAを抽出した。microRNA350種類を搭載したアレイ (Rat miRNA Oligo Mikroarray kit G4473A, Agilent Technologies) で発現解析を行い、化合物や発がん性と関連する発現signatureを探索した。

(4) 細胞レベルでの大腸発がんモデルの確立 (マウス): 3-5週齢のマウスから小腸を採取し、PBSで洗浄後にEDTA法でcryptを分離、マトリゲルを用いた3次元培養を行う。約1週間後に細胞を回収し、分散後に各種 shRNAやCreをレンチウイルスベクターを用いて単独または組み合わせて導入した。再び3次元培養を行い、organoidについて組織学的解析、qPCR解析によるAxin2の発現、浮遊培養におけるsphere形成能を評価した。約4週間後に

10<sup>5</sup>個相当のorganoidをMatrigelとよく混和してヌードマウス皮下に接種し腫瘍形成するか検証した。得られた皮下腫瘍はHE染色やAB染色による組織学的な解析やKi67、beta-cateninの免疫染色を行った。

(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。

### C. 研究結果

(1) 大腸発がんと肥満の疾患感受性に共通の遺伝的素因の解明 (ラット): F344とACIにPhIPで誘発される大腸発がんの数はF344>ACIであり、それぞれの投与後数週間での初期ACFの数とよく相関していたことから、以後ACFの数を発がん性の指標として用いた。F344 (感受性) とACI (抵抗性) の比較により、F344は総体重ではACIと顕著な差はなく推移するものの、総脂肪量、皮下脂肪量、内臓脂肪量のすべての項目で有意に高値を示すなど肥満形質を有することを明らかにした。血液データの中では中性脂肪の値でのみ両系統間で差を認め、コレステロールや血糖値では差がなかった。この知見がどの程度一般的かを確認するために18種類の近交系ラット系統間で同様の比較を行ったところ、PhIP誘発大腸発がん感受性と、血清中性脂肪値に高い相関を認めた。特に相関の高い6系統について厳密な空腹時血清を用いた再検査を行ったところ、血清中性脂肪値が発がん性と相関が高く、発がん性-中性脂肪-肥満の関連が再確認された。

F344とACIの疾患罹患性の差を規定する分子メカニズムを明らかにするために、正常大腸粘膜の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により複数のシグナル経路が抽出されたが、肥満とがんの両者