

201313001B

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22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 筆宝 義隆

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 54

III. 研究成果の刊行物・別刷 68

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）
総合研究報告書

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

研究代表者 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

本研究では動物の発がんモデルを用いて主に大腸発がん過程の包括的な解析を行い、予防・治療への応用に資する研究を展開した。PhIP 誘発ラット大腸化学発がんの感受性に Caspase3 の発現量が直接影響を与えることを個体レベルで示した。また、肥満と大腸発がんに共通の罹患感受性を規定する遺伝的要因が存在し AKT の活性化を制御していることを明らかにした。異形成の簡便なマーカーとして dysplasia-associated ACF を確立した。大腸粘膜において PhIP を含む化学物質の投与により急性期に誘導される miRNA のプロファイルから化学物質の大腸発がん性が予測可能であることを示した。代表的な DNA 障害反応のひとつである Cdc25A 分解の可視化系を構築し、PhIP のラット大腸上皮初代培養細胞への曝露により発がん閾値以下の 0.1-1mM PhIP 曝露でも p53-Ser15 のリン酸化等が検出されることを示した。極めて困難とされてきたラット ES 細胞の樹立に成功した。p53 遺伝子ノックアウト (KO) ラットの作製にも成功し、KO 雌ラットの致死性や発がんスペクトラムにおけるラット特有の表現型を確認した。Apc 遺伝子 C 末端側に変異をもつ KAD ラットが大腸炎や AOM/DSS 誘発大腸がん誘発系に高感受性を示す性質を利用して、抗がん剤と抗炎症剤の評価試験系の開発を実施した。また、APC の C 末端部位は、血管新生を介する組織修復において重要な働きをしていることを示した。マウス腸管上皮初代培養細胞へのレンチウイルスによる遺伝子導入で、多段階発がん過程を再現することに成功した。さらに、In vitro の大腸発がんモデルとして、遺伝的要因のみならず環境要因の腸管発がんへの影響も本実験系で検証可能であることを示した。PARP 阻害剤が DNA 修復阻害だけでなくゲノムワイドな DNA 脱メチル化誘導をはじめとするエピゲノム変化誘導も有することを示した。胃がんモデルである Gan マウスにおいて、炎症反応は腫瘍細胞または腫瘍組織における microRNA の発現を劇的に変動させることを確認した。発がん抑制に作用する miR-7 と発がん促進に作用する miR-135b が胃がん細胞の増殖に影響を与えたことから胃がん予防・治療の標的分子としての可能性が示された。腸管に腺腫性ポリープを発症する *Apc*^{Δ716} マウスを用いて、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 のセリン 863 残基を直接リン酸化して mTORC1 を活性化すること、cyclin E、osteopontin、proliferin 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発現を転写レベルにおいても制御していることを明らかにした。臭素酸カリウム投与による酸化ストレス誘発消化管発がん実験により、MSH2 が酸化ストレスに起因する消化管発がんを効果的に抑制していることを示した。腫瘍の約 30% に *Cttnb1* 遺伝子変異が認め、その 74% が G→A 変異で、代表的な酸化損傷 8-オキソグアニン (8-oxoG) に起因する G→T 変異は 7.4% であった。マウス胸腺リンパ腫と腸管腫瘍を対象に、組織特異的な Bcl11b 片アレル消失を導入したマウスで解析を行い、増殖調節の異常が Bcl11b の担う発がん修飾機構の一つであることを示した。AMPK 活性化薬である メトホルミンによるマウス大腸発がん抑制効果を確認し、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した。150 例の組み入れを終了しフォローアップ中である。

研究代表者

(平成 23 年 1 月まで)

中釜 斉 国立がん研究センター研究所長

(平成 23 年 1 月から)

筆宝義隆国立がん研究センターユニット長

分担研究者

(平成 22 年度～25 年度)

筆宝義隆国立がん研究センターユニット長

益谷美都子 国立がん研究センター分野長

大島正伸金沢大学がん進展制御研究所教授

庫本高志 京都大学医学研究科 准教授

中島 淳 横浜市立大学医学部 教授

青木正博 愛知県がんセンター 部長

山下克美 金沢大学自然科学研究科准教授

續 輝久 九州大学医学研究院 教授

竹下文隆国立がん研究センター主任研究員

(平成 22 年度～24 年度)

木南 凌 新潟大学医学部 客員研究員

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。従来より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) 誘発ラット大腸発がんモデルを用いて、主に個体レベルでこれらの解析を進める。また、これらを代替・補完しうる新規手法として、マウス由来腸管細胞を用いた「in vitro 発がん再構成モデル」を確立し、個体レベル・細胞レベルの両面から解析を行う。

がんの本態解明から制がんへの応用を見据えた研究の展開に対する必要とされている。本研究においては 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する PARP 阻害剤の早期からの制がんへの応用法を検討する。実験系として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や幹細胞形質を有す

る細胞培養系を用いる。がん化に至る過程の解析を踏まえて臨床試験が行われつつある PARP 阻害剤による早期からの制がんへの応用法を検討する。

慢性炎症反応は発がんに関与しており、炎症で重要な誘導型プロスタグランジン合成酵素である COX-2 の発現と、その下流で合成される PGE₂ が炎症性微小環境の構築と維持を促進する可能性が示されている。本研究は、COX-2/PGE₂ 経路依存的に慢性胃炎を発症する K19-C2mE マウスと、胃炎と同時に Wnt シグナルを活性化させる事で胃がんを発生する Gan マウスを用いた解析により、炎症性微小環境の形成機序、そして間質での炎症反応による胃がん形成促進機構を解明する事を目的として実施した。がんの 20%は感染症が関与している事が報告されており、胃がん発生にはヘリコクター・ピロリ菌感染が密接に関わっている。したがって、本研究ではがん組織での炎症誘導における細菌感染刺激の役割に着目して解析を行った。また、microRNA は、標的遺伝子の発現制御により様々な生理的および病理的反応で重要な役割を示す。発がん過程でも、がん遺伝子やがん抑制遺伝子を標的とする microRNA の発現変化が発がん促進に作用する事が知られている。しかし、炎症性微小環境によるがん細胞での microRNA 発現制御については未だ明らかにされていない。本研究では、炎症性微小環境による、microRNA 発現抑制または誘導による発がん促進機構について着目して研究を遂行した。

Kyoto Apc Delta (KAD) ラット (F344-Apc^{mlk/yo}) 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、大腸腫瘍を自然発症しないが、化学発がん物質に対して感受性が高い。つまり、5 週齢の KAD ラットに、発がん剤としてアゾキシメタン (AOM) を、その 1 週後に、発がん促進剤としてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 1 週間投与すると、AOM 投与後 15 週で、全ての個体に約 10 個の大腸腫瘍を誘発できる。一方、対照系統である F344 ラットに同様の

プロトコールで大腸がんを誘発した場合、50%の個体に、わずか0.8個の腫瘍しか誘発できない。また、KADラットにDSSを飲水投与すると、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する。本研究では、KADラットの大腸炎発症機構の解明、ならびに、KADラット AOM/DSS 誘発大腸がん誘発系を用いた新たな抗がん剤や抗炎症剤の評価試験系の開発を目的とした。

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した。

通常の生活で体に取り込まれる食品に含まれる化学物質は、ヒト発がんの重要な誘因の一つである。しかしながら、私どもは日常生活で種々の発がん原因となる化学物質に曝されているが、現時点で特定の原因物質を同定することは未達成である。そこで本研究では、加熱食品中に含まれる突然変異原/発がん物質として最も高濃度で検出される PhIP をモデル化合物として用いて、発がんの初期過程である DNA 損傷応答 (DDR) を検出することにより、DDR としての細胞周期停止の機構を解明し、ヒトへの効果を考察することで、発がん予防に対する情報を提供することを最終目的とした。PhIP はラット発がんモデル実験において、大腸上皮に腫瘍を形成する。病理学的解析では、発生した腫瘍はヒトのそれと類似した形態を示すことが明らかになっている。これらの結果から、PhIP がヒト大腸腫瘍の原因物質である可能性を示唆するものと考えられている。本研究では特に、大腸上皮細胞への PhIP 曝露によって引き起こされる生物学変化の中でも、腫瘍発生の原因となりうる DDR に着目し、発がん濃度およびそれ以下の濃度の PhIP を細胞へ曝露した場合の DDR を検出し、

PhIP の DDR 効果を考察した。

これまでの研究で、*Mut* 遺伝子欠損マウスをモデル動物として用いて、*MUTYH* 遺伝子欠損を持つ 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実験的に示した。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。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ことを目的に実施した。

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ており、化学発がんモデルとしての学問的蓄積も大きい。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) ラット作製は困難とされてきた。本研究では4つの分化阻害剤 (YPAC) により ES 細胞の樹立をめざし、次に p53 遺伝子 KO ラットの作製を試み、マウスの場合と異なるがんの発生に対する影響および、ラットで発生した腫瘍から細胞を培養し、YPAC による影響を検討する。

発がんの母体となる細胞は、そこから生じたがん細胞の性質の一部を規定する。従って、発がん母体細胞とその性質を明らかにすることは、発がん機構、がん細胞の特性、がん治療を考える上で重要である。一般に、発がん母体細胞に備わった一つの性質に幹細胞があげられるが、分化した細胞も発がん母体細胞となる可能性がある。本研究では、*Bcl11b*^{KO/+} マウスでみられる放射線感受性胸腺リンパ腫、放射線により感受性が亢進する腸管腫瘍を対象にする。具体的な目標は、胸腺リンパ腫では胸腺内のどの分化段階にある細胞が標的となるか、その標的細胞の特性を明らかにする。また、腸管腫瘍では腸管クリプト内の幹細胞・TA (transit amplify) 細胞の中で、放射線発がんの標的細胞は何かを明らかにする。この母細胞・標的細胞の同定は、放射線傷害の蓄積性に関して新しい知見と、放射線暴露健康リスクへのより適切な評価を与える。

大腸癌は定期健診や内視鏡検査の普及により早期発見の機会も増えているが死亡率は依然として高く、対策が必要である。現在欧米を中心に、経口薬を内服することで癌を積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。大腸腫瘍の化学予防薬候補は様々検討されてはいるが、未だ確立していない。今回我々は、メトホルミンおよびEPAを用いて大腸腫瘍の化学予防の確立を目指す。

B. 研究方法

(1)大腸発がん罹患感受性遺伝子の探索：候補遺伝子 casp3 の発がん感受性への関与を BAC-Tg ラットおよびヘテロノックアウトマウスを用いて個体レベルで検証した。発がん抵抗性である ACI の casp3 遺伝子を含む BAC を発がん感受性である F344 に導入した Tg ラットを平成21年度までに作成した。大腸腺窩でのタンパク発現量が F344 ラットの約2倍程度で ACI ラットと同程度の発現レベルと考えられた Tg2 系統について、発がん実験を行った。6週齢の雄ラット TG10 匹、非 TG10 匹に2週間400ppmのPhIPを経口投与、さらに4週間高脂肪食を投与後に aberrant crypts foci (ACF) 数を比較した。caspase3 の発現量低下が大腸化学発がん感受性の増加に一般的に寄与することを示すために、マウスでの Azoxymethane (AOM) 誘発大腸発がん実験を行った。Caspase3 野生型と caspase3 ヘテロのマウス20匹ずつ雄雌別々に検討した。AOMは10mg/kg 腹腔内投与を週1回合計6回繰り返し、投与終了後20週後に屠殺して大腸腫瘍の数を比較した。

(2)大腸発がん と肥満に共通の遺伝的素因の探索： 発がん感受性であるF344の方が抵抗性のACIよりも脂肪蓄積が高度であることに偶然気づき、両者の体重、脂肪量、血清脂質等のデータを時系列で比較し、18種類の近交系ラット系統間の比較にまで拡大した。両系統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い、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の有無がこれらのシグナル経路に与える影響を蛋白レベルで調べた。

(3)大腸異形成の簡易診断法の確立：通常 ACF 検出法にメタノール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が、診断工程の煩雑さと、不十分な診断特異性が課題であった。Azoxymethane 処理ラットの大腸粘膜を用いて、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の再分類を行った。また、同じ大腸を異なる染色法で評価し、通常 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。

(4)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：食餌由来の変異原性物質6種(PhIP, IQ, MeIQx, Glu-P-1, MeA α c, Trp-P-2)について、F344ラットに2週間混餌投与および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 を採取して RNA を抽出した。microRNA アレイ解析を行い、化合物や発がん性と相関する発現 signature を探索した。

(5)細胞レベル新規大腸発がんモデルの確立とその利用：3-5週齢のマウスから小腸 crypt を分離後にマトリゲルを用いた3次元培養を行い、各種 shRNA や Cre をレンチウイルスベクターを導入した。得られた 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 organoid を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組織学的な解析を行った。スポンゼルを腹腔内に挿入し5日後に炎症細胞を回収し、すでに shRNA を導入してある腸管細胞と6時間共培養を行った。4週間3次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種した。S9mix 存在下で PhIP10uM を6時間のみ細胞に暴露して4週間3次元培養を行った後にヌードマウス皮下に接種した。

(6) SND1 ノックダウン大腸がん細胞株の樹立と miRNA 発現解析: HCT 116 及び SW480 大腸がん細胞株へ SND1 に対する shRNA を導入し、薬剤選択によりノックダウン細胞株を樹立した。ノックダウン細胞株とコントロール細胞株から RNA を調整して miRNA マイクロアレイ解析を行い、SND1 により発現抑制されていた miRNA を探索した。

(7) ポリADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法: *Parp-1*欠損ES細胞分化モデルにおけるゲノムワイドなメチル化異常を調べ、エピゲノム制御異常を調べた。ヒストン修飾状態や転写因子の結合活性も検討した。さらにマウス細胞及びヒトがん細胞株でPARP機能阻害下の増殖シグナル伝達系の異常についても調べた。また、*Oct3/4*がTet-off系で誘導されるES細胞株に*H19*を強制発現させ、*Cdx2*等の分化マーカー発現を検討した。また、幹細胞形質を有する細胞株のマウスで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の検討を行った。 γ 線、炭素線のDNA損傷応答をPARP阻害剤存在下で細胞レベル、タンパク質の動態の解析で検討した。*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ゲノム不安定性を検討し、抗がん剤作用評価系で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した。

(8) 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明:

(マウスモデル): 胃粘膜上皮細胞特異的にK19プロモーター制御によりCOX-2およびmPGES-1を発現し、PGE₂産生を誘導したK19-C2mEマウス、およびK19-C2mEの遺伝的背景に、胃粘膜上皮でWnt1を発現させてWntシグナルを活性化させたGanマウスを用いて解析した。K19-C2mEマウスはマクロファージ浸潤を特徴とする胃炎を発症し、Ganマウスは炎症をとともなう胃がんを100%の効率で自然発生する。全ての動物実験は、金沢大学動物実験委員会で承認された実験計画に沿って実施した。また、組み換え動物実験を含む、遺伝子組み換え実験は、金沢大学遺伝子組換え実験委員会の承認を得て実施した。

(無菌化実験): Ganマウスを実験動物中央研究所にて無菌化し、ビニールアイソレーター中で30週~50週間無菌条件下で飼育した。対照実験のため、5週齢の無菌化マウスを金沢大学に移して通常のSPF施設で飼育した。

(microRNA マイクロアレイ実験): Ganマウス胃がん組織、K19-C2mEマウス胃炎組織、および野生型マウス正常胃粘膜組織から抽出したRNAを用いて、microRNA発現の網羅的解析を行った。また、腫瘍細胞特異的なmicroRNA発現変化を解析するため、レーザーマイクロディセクションシステムを用いて、Ganマウス胃がん組織と野生型マウスの正常胃粘膜の凍結切片を作成して上皮細胞を採取し、抽出したRNAを用いてmicroRNA発現の網羅的解析を行った。

(遺伝子発現解析): ヒト胃がん組織由来のcDNA、*Apc*^{T16}マウス胃腫瘍組織由来のRNAを用いて、real-time RT-PCRにより、目的のmicroRNA発現解析を実施した。

(胃がん培養細胞実験): 胃がん細胞株のAGS、KatoIII等を用いて、microRNA発現誘導またはmicroRNA発現阻害による細胞増殖率の変化をMTTアッセイにより実施し、細胞遊走能はトランスウェルを用いた

アッセイにて実施した。また、腫瘍原性は、軟寒天中のコロニー形成による足場非依存的増殖能の検定にて評価した。

(9) KAD ラットを用いた大腸炎発症機構の解明: 5週齢の雄 KAD ラットに 2% DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与直後に各 4 頭、1 週後に各 4 頭、3 週後に各 4 頭から大腸を採取した。大腸組織について抗 APC 抗体を用いて免疫染色を実施し、APC 発現細胞を同定した。また、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。F344 および KAD ラットから初代血管内皮細胞を準備した。この細胞を用いて、細胞接着能、管形成能、細胞増殖能、細胞移動能を測定した。

(10) KAD ラットを用いた評価試験系の開発: 抗がん剤の試験系として、代表的な抗癌剤である 5-fluorouracil (5-FU) を用いた。実験開始後 9 週目に大腸管腔内の内視鏡観察を行い、誘発腫瘍数に基づいて、溶媒投与群 (n=9)、5-FU 50 mg/kg 投与群 (n=9) 及び 75 mg/kg 投与群 (n=9) に群分けした。5-FU の尾静脈内投与を週 1 回 3 週連続後に 1 週間休薬させ、これを 1 クールとして全 2 クール実施した。抗炎症剤およびがん抑制物質の試験系として、セレコキシブと緑茶成分のエピガロカテキンガレート (EGCG) を用いた。セレコキシブは実験開始時から 14 週間、混餌投与 (500 ppm) した。また、1% EGCG 溶液を DSS 投与終後、13 週間飲水投与した。AOM 投与 16 週間後に各個体について剖検を実施した。大腸は採取した後、管腔内を PBS で洗浄し、長軸に沿って切開後、病理組織学的解析のために固定した。剖検および病理解析で観察された大腸腫瘍について、1 頭あたりの腫瘍個数、腫瘍 1 個あたりの体積を測定した。

(11) 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: *Apc*^{Δ716} マウスおよび *cis-Apc/Smad4* 複合変異マウスに JNK 阻害薬 SP600125、mTORC1 選択的阻害薬 RAD001、mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を投与し、腫瘍形成への影響を解析し、各シグ

ナル経路の活性化状態を調べた。また、大腸がん細胞株を用いた実験で阻害薬の作用機序を調べた。

(12) 細胞周期制御因子 Cdc25A 分解の可視化系の構築: 代表的な細胞周期制御因子の一つである Cdc25A は、DDR として分解が誘発されることが知られている。この分解は、Cdc25A の N-末端側に存在する複数のセリン残基がゲノム損傷応答性のキナーゼによってリン酸化を受けることが原因である。そこで本研究では、分解性のリン酸化に関わる N-末端側の 150 アミノ酸を赤色蛍光タンパク質 (RFP) と融合させ、HeLa 細胞中で安定的に発現する細胞を分離した。

(13) ラット大腸上皮由来初代培養細胞を用いた、PhIP 曝露による DDR の検出: ラット大腸上皮由来初代培養細胞 (以下、ラット初代大腸細胞) へ、ラット肝由来 S9 mix 処理した種々の濃度の PhIP を添加し、6 時間後に細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングに供した。対照としては PhIP の溶媒である DMSO および、発がん実験においてラット大腸に腫瘍発生を誘発しないが、PhIP と同様に加熱食品に含まれる突然変異原物質である MeAaC を用いた。細胞は実験の 48 時間前に、あらかじめコラーゲン I でコートされた 90mm 培養ディッシュに $3-5 \times 10^5$ で播種し、PhIP 添加 2-3 時間前に培養液を交換した。細胞抽出液は、それぞれ 25mg のタンパク質を適切な濃度の PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜へ転写し、抗体で処理した。本研究で使用した抗体をいかに示す: 抗 p53 抗体と抗 p21 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社、抗 p53-S15、抗 Chk1-S435、抗リン酸化 H2AX (γ-H2AX)、抗 GAPDH は Cell Signaling 社製を使用した。ラット大腸上皮由来初代培養細胞は、国立がん研究センター研究所、筆宝義隆博士ならびに落合雅子博士により樹立されたものであり、本研究のために分与を受けた。

(14) 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: *Msh2* 遺伝子欠損マウスの飼養: 近交系 C57BL/6/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と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。臭素酸カリウム溶液の投与: KBrO_3 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。投与方法は、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。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。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* 遺伝子) をPCRで増幅した後、Direct sequencing法を用いて変異解析を行った。TUNEL法による細胞死の解析: 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。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。

(15) ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作製: ES 細胞の未分化マーカー遺伝子 *Oct4* のプロモーターで制御される蛍光タンパクを利用し、ラット ES 細胞を樹立すべく、ROCK、MEK、TGF- β 、GSK に対する4種類の阻害剤 (YPAC) を用いた培養条件の検討を行う。樹立した ES 細胞においてジーンターゲット法により p53 遺伝子を破壊したアレルを持つ組み換えクローン (*p53*^{+/+}) を取得しキメララットを作製する。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 Zinc Finger

Nuclease (ZFN) 法により *p53*^{-/-} ES 細胞を作製し、野生型受精卵に移植し *p53*^{-/-} キメララットを作製する。これらの個体を用いて、p53 欠損によるラットの発生、生育や自然発生腫瘍を解析する。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。

(16) リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測:

(マウスと放射線照射): *Bcl11b*^{flox/+} マウスは通常の方法で作製した。組織特異的に *Bcl11b* を消失させる Cre マウスは分与または購入した。本研究で使用したマウスは、新潟大学内の SPF 下の実験動物施設で飼育している。

(フローサイトメトリー): 抗 CD4-PerCP-Cy5.5、抗 CD8-PE、抗 TCR β -FITC (eBioscience 社) 抗体を用い、抗体染色した細胞は FACSscan (Becton-Dickinson 社) を用いて FACS 分析を行い、データの解析は Flow-Jo Software (Tree-Star 社) を用いた。細胞周期の測定では、100 μg の BrdU (10mg/ml) をマウスの腹腔内へ投与し1時間後に 1Gy の γ 線照射をした。

(クローナリティの決定): V(D)J 組換えの D1 領域と D2 領域の 5' 側にそれぞれ F-primers を設定し、一方 J1 領域と J2 領域の 3' 側にそれぞれ R-primers を設定した。PCR 産物の分離、解析にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

(転写活性の測定): HDM2 (ヒト MDM2) の P1 および p53 応答配列をもつ P2 プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを作製した。BCL11B (ヒト *Bcl11b*) 発現変異プラスミドは、すでに作製している BCL11B 発現変異プラスミドを元に、市販の変異導入キットを用いた。

HCT116 細胞 (p53+ または p53-) に、プロモータープラスミドと BCL11B 発現プラスミドをトランスフェクションし、その細胞抽出液をデュアル-ルシフェラーゼアッセイ法で測定した。

(腸管の解析) : 8 週齢のマウスに 12Gy の γ 線照射を行い、16 時間および 96 時間後に腸管を取り出し、固定した。組織染色は HE 染色法および市販の抗 Bcl11b 抗体、抗 GFP 抗体などを用いた組織免疫法を行った。

(17) 大腸腫瘍の化学予防法の確立 : 糖尿病薬として臨床応用されているメトホルミンは AMPK を活性化させ、細胞増殖を抑制すると考えられている。まず、基礎研究では、遺伝大腸発癌モデルである APC^{min/+} マウスとアゾキシメタン (AOM) を用いた化学大腸発癌モデルを用いて、メトホルミンの大腸腫瘍に対する効果を検討する。具体的には、大腸腺腫/早期大腸癌を内視鏡切除し、クリーンコロンの患者を対象に無作為割り付けを行い、メトホルミン 250mg/day もしくはプラセボを 1 年間で服用し、1 年後のポリープ再発を比較する。また、EPA はまず前臨床試験として、大腸癌のサロゲートマーカーである Aberrant Crypt Foci (ACF) をエンドポイントとした試験を実施する。具体的には、切除予定の大腸腺腫を有する患者に初回内視鏡時に ACF を測定する。その後 EPA 2.7 g/day もしくはプラセボを 1 か月内服し、内視鏡切除時に ACF を測定する。また正常上皮、腺腫部より生検を行い、増殖や細胞死も検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、所属研究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。ヒト検体やヒトでの臨床試験に関しては所属施設の倫理委員会の承認を得て行った。

特にヒト予防介入試験を行うにあたり、

横浜市立大学倫理委員会の承認を得ている。具体的な対応は 1) 本試験はヘルシンキ宣言及び本病院倫理委員会の趣旨に基づいて実施する、2) 被験者へのインフォームド・コンセント、3) 被験者のプライバシーの保護のほか、外来受診の間診時に試験への参加と問診票の記入等につき同意を得たのち、予期される効果および危険性、当該疾患に対する他の治療法の有無およびその内容、試験参加に同意しない場合でも不利益を受けないこと、試験参加に同意した場合でも随時これを撤回できることを説明する。投与薬剤や内視鏡検査にかかわる危険性の回避は日常診療における手順に従う。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん罹患感受性遺伝子の探索 : casp3-TG ラットでの PhIP 誘発発がん実験では 系統 A では平均値で nonTG (AC 3.9, ACF 1.9) に対して TG (AC 1.6, ACF 0.6) と TG で有意に AC, ACF が抑制されていた ($p < 0.01$)。一方、系統 B では nonTG (AC 4.3, ACF 2.4) に対して TG (AC 3.1, ACF 1.3) であり、統計的に有意ではなかったが抑制傾向を示した ($p = 0.1706$)。casp3 ヘテロ欠損マウスでの AOM 誘発大腸発がん実験では caspase3^{+/+} と caspase3^{+/-} のマウスを AOM 投与後 20 週後に解剖したが、雌雄とも両群間での腫瘍数に有意な差を認めなかった。また、無作為に抽出して ACF 数の計測も行ったが、やはり両群間で差を認めなかった。

(2) 大腸発がん と肥満に共通の遺伝的素因の探索 : 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。血液データでは中性脂肪でのみ両系統間で差を認めた。この知見の一般性を確認するために 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、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。背景にあ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と比較したところ、複数のシグナル経路が抽出されたが肥満とがんの両者に関係するPI3K経路に着目した。リン酸化により制御される分子を多く含む同経路の蛋白およそ30種類についてWestern Blotを行い、p-Aktの活性化レベルと発がん感受性が最も高く相関することを見いだした。発がん感受性が最も高い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の生成を抑制してアポトーシス抑制に働いたが、cleaved formの生成のみを抑制する場合と遺伝子発現そのものを抑制する場合があった。PhIPによるAktの活性化はGSK-3 β の不活性化を誘導しているにも関わらず、予想に反して β カテニンの蓄積を誘導しないこと、高脂肪食は著明に β カテニンの蓄積を誘導することも見いだした。

(3) 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。Fociを構成するcryptの大きさと開口部の狭さを元に、濃染するcryptをc-type (大crypt大開口部), d-type (小crypt小開口部), cd-type (大crypt小開口部) の3種類に分類した。これらの鑑別は容易であり目視でも可能だったが、定量的な大きさの測定による分類結果とも完全に一致した。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)と再定義したが、実際dACFの94%が組織学的に異形成と診断された。通常ACF(classical ACF=cACF)との関係を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。上述のcrypt分類を用いてdACFを整理し直すと、cACF^{ve}dACFはd-typeのみで構成され、cACF^{ve}dACFはcd+cが大多数だが、c+dやcd単独のものは少数例存在し、cd+dは全く認められなかった。cd-typeはその数の大小に関わらずc-typeと共在していたのに対し、d-typeは3個以上の場合にはd-type単独としてしか存在しなかった。これらの結果からcd-typeとd-typeは全く別の由来と性質を有しており、発がん過程で相互排他的に進展していくことが強く示唆された。cACF^{ve}dACFとcACF^{ve}dACFを組織学的に比較した場合、前者でより高度な異形成、beta-cateninの蓄積やMucinの染色性の欠失の頻度が高かった。以上より、cACF^{ve}dACFはcACF^{ve}dACFよりも進行した病変と考えられた。次に、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^{ve}dACFのごく一部を形成することを見いだした。組織学的に異形成と診断された病変の粘膜上での診断をさかのぼって調べたところ、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。

(4) 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：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 α Cを含む3種類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について大腸発がん性が示唆される結果を得た。他の方法でも同様の結果が得られるか確認するために、ファーマコゲノミクスの手法でも検討を行った。F344ラットに3回経口投与後16時間で大腸腺管を採取しRNA抽出を行った。miRNAプロファイリングではクラスタ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MeIQxの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の長期発がん性を評価し直したところ、大腸発がんが認められmiRNAに基づく発がん性予測が正しいことが確認された。qPCRにおいても、用いた遺伝子の内訳はマイクロアレイの場合とは若干異なるが、miRNA数遺伝子の発現signatureをもとに発がん性を正しく予測することが可能であり、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。

(5) 細胞レベル新規大腸発がんモデルの確立とその利用: マウス正常腸管より crypt を採取しマトリゲルを用いた3次元初代培養を行った。継代の際にレンチウイルスを用いた遺伝子導入を効率よく95%程度の細胞に行う条件を確立し、大腸がん抑制遺伝子APCに対するshRNAを導入したところ、形態が風船状となりApcも実際にノックダウンされていた。Apc変異マウス腸管ポリープ由来細胞などと同様にWnt経路が活性化していることが強く示唆された。Organoidの組織解析では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、Wnt経路の標的遺伝子Axin2の発現上昇も確認されたことからWnt経路の活性化が確認された。これらの細胞を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。Ki-67が70%程度と高く、beta-cateninの蓄積も顕著だったが、Goblet細胞やPaneth細胞への分化傾向も見られた。shAPCに加えて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。shAPCなしではこれらのベクターは腫瘍形

成を誘導しないことから、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。これらの腫瘍は再移植可能であり、組織型、大きさともに同様の腫瘍形成が再現されること、浮遊培養spheroid形成能の獲得やがん幹細胞マーカーの上昇なども確認され、in vitroにおいてtumor-initiating cellが誘導されていると考えられた。shAPC導入後に炎症細胞との共培養を6時間行い4週間後にヌードマウス皮下に接種したところ、共培養群では腫瘍径の増大を見た。炎症細胞との共培養により活性化したシグナル経路を探索するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、共培養群は非処理群とは全く異なる発現プロファイルを示し、何らかの培養上清因子がこうした変化を誘導していることが強く示唆されたが、共通の転写制御に関与する因子としてSTAT3が活性化していることを見出した。PhIP暴露を6時間行った細胞からは腫瘍が形成されなかったが、shAPC導入organoidではPhIP投与群で有意に腫瘍径の増大や悪性化を認めた。

(6) SND1ノックダウン大腸がん細胞株の樹立とmiRNA発現解析: SND1はRNA干渉の制御複合体の構成因子だがその機能は不明である。ヒト大腸がんではSND1の発現亢進が高頻度に観察され、post-transcriptionalにAPCの発現低下を誘導することから、特定のmiRNAの発現誘導を介して発がんに寄与することが示唆されている。SND1の過剰発現は達成出来なかったため、代わりにSND1ノックダウン細胞におけるmiRNA発現解析を行ったところ、成熟型Let-7ファミリーの発現低下を誘導することを見いだした。

(7) ポリADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法: *Parp-1*欠損ES細胞においては、特定のCpGアイランドにおいて野生型に比較して脱メチル化が誘導さ

れることが判った。*H19-Igf2* ICR における DNA 脱メチル化は活性化ヒストン修飾への移行を伴った。*H19* と *Peg3* の発現亢進は *Parp-1* 欠損 ES 細胞におけるトロホプラスト分化の誘導と維持に関わる可能性が示唆された。*Parp-1* 欠損 ES 細胞における CpG 脱メチル化が *H19* と *Cdx2* の発現誘導を介して trophoblast 分化を誘導することが示され、PARP 阻害剤は trophoblast 分化を増強することが示唆された。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。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示唆された。また、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 機能阻害は腫瘍の浸潤性に関わりうる trophoblast 系譜への分化の亢進を起こした。 γ 線、及び炭素線に対して PARP 阻害剤は増感効果を示し、その増感効果の作用機序は共に、細胞周期 S 期停止と DNA 二本鎖切断のプロセッシング遅滞であることが示唆された。PARP 機能阻害はまた、Erk1/2 増殖シグナル伝達経路の抑制に作用することが示唆された。*APC*、*PTEN* 遺伝子が不活化され spheroid 形成能を有するマウス腸管幹細胞由来の腫瘍細胞株では γ 線やシスプラチン、PARP 阻害剤 AZD2281 単剤に対する感受性は極めて低く、薬剤や γ 線に抵抗性の環境が形成されていた。一方、 γ 線に対して PARP 阻害剤は低濃度から増感効果を示した。がん細胞株を用いた実験から、PARP 阻害剤は DNA 修復の阻害と共にエピジェネティック制御に関与し、*DNMT3b* の発現抑制を介して、 γ 線照射後の DNA 損傷応答能を低下させる機序が考えられた。マウス腸管幹細胞においてガンマ線照射後、*DNMT3b* の発現誘導が観察されたが、PARP 阻害剤処理により、この誘導レベルが低下傾向を示した。このことが、PARP 阻害剤による放射線増感に関与する可能性が示

唆された。ヒト肺がん細胞株 A549 において PARP 阻害剤処理により DNA methyltransferase 3b のプロモーターに対し poly(ADP-ribose) の集積が抑制されることが *DNMT3b* の発現低下を誘導することが示唆された。A549 において *DNMT3b* の発現低下はプロモーターがメチル化されていたがん抑制遺伝子 *FHIT* 遺伝子の発現回復を惹起し、増殖が抑制された。PARP 阻害剤は正常幹細胞からの不死化過程で細胞死を誘導し、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。

(8) 消化器がん発生に関与する炎症反応の分子機構の解明:

(胃がん発生における細菌感染の役割) : 無菌化した Gan マウスを 50 週齢で病理解剖した結果、SPF 施設で飼育した同週齢 Gan マウスと比較して、胃がん発生は顕著に抑制された。胃がん発生抑制は、30 週齢の Gan マウスでも確認された。興味深い事に、30 週齢まで無菌状態で飼育した Gan マウスの胃粘膜にヘリコバクター・フェリス菌を感染させると、50 週齢までに大きな胃がん発生が認められた。

病理組織解析の結果、無菌化 Gan マウスでは COX-2/PGE₂ 経路が誘導されているが、マクロファージ浸潤が抑制されており、炎症反応が抑制されていた。発現解析の結果、マクロファージ遊走に関与する CCL2 および CCL8 の発現が無菌化マウスで顕著に低下しており、これがマクロファージ浸潤抑制の原因と考えられた。すなわち、細菌感染による自然免疫の活性化が、マクロファージ浸潤を特徴とする炎症性微小環境の形成に重要であり、その環境形成が胃がん発生を促進すると考えられた。

(炎症依存的に発現低下するがん抑制性 miR-7) : 網羅的解析により、Gan マウスと K19-C2mE マウスの双方で発現誘導する microRNA 21 個および双方で発現低下する microRNA 29 個を同定した。これらの発現変化は、炎症反応依存的であると考えられた。本研究では、発現低下する microRNA

群の中から、miR-7に着目して研究を実施した。miR-7は正常胃粘膜上皮で発現するが、胃炎および胃癌組織で発現抑制される事を real-time RT-PCR で確認した。さらに初代培養胃粘膜上皮細胞を in vitro で分化させると、miR-7の発現が誘導された。したがって、miR-7は胃上皮細胞の分化誘導に関与する可能性が考えられた。

また、約70%のヒト胃癌組織でmiR-7の発現低下が認められ、興味深い事にその発現量は、IL-1 β やTNF- α などの炎症性サイトカインの発現量と逆相関関係にあった。この結果はmiR-7が炎症依存的に発現抑制される事を示している。重要な事に、miR-7を強制発現させた胃癌細胞では、軟寒天中のコロニー形成効率が有意に抑制された。以上の結果から、炎症依存的に発現抑制するmiR-7は、胃癌発生に対して抑制的に作用するmicroRNAであると考えられた。

(炎症依存的に発現誘導する癌促進性miR-135b)：がん組織で発現誘導するmicroRNAを解析する過程で、間質細胞の混入の問題が浮上した。例えば、マクロファージなどの免疫細胞などで特異的に発現するmicroRNAが、正常胃粘膜で発現していなければ、胃癌で誘導されたmicroRNAとして抽出されるが、実際には胃癌細胞での発現誘導ではない。この問題を解決するため、レーザーマイクロダイセクションにより、Ganマウスの胃癌上皮細胞と野生型マウスの正常胃上皮細胞を回収し、正常上皮細胞-腫瘍上皮細胞間の比較によるmicroRNAの網羅的解析を実施した。その結果、腫瘍細胞で発現上昇するmicroRNAが57個、発現低下するものが40個認められた。発現上昇する57個のうち、先に実施したマイクロアレイ結果から、K19-C2mEマウスの胃炎でも発現上昇しているmicroRNAと比較解析すると18個が特定された。これらが炎症反応依存的に、真に腫瘍細胞内で発現誘導されるmicroRNAであると考えられた。この18個の中に、miR-155やmiR-21など、すでに癌促進作用が知られるmicroRNAが含まれてお

り、炎症反応はこれらのmicroRNA発現誘導により、癌を促進する可能性も考えられた。また、18個の中で最も強い発現誘導を示したmiR-135bは、ヒト胃癌組織でも有意に発現上昇している事がデータベース解析から明らかとなった。

胃癌細胞を用いた解析結果から、miR-135bを強制発現させると、細胞増殖率や細胞遊走性が有意に上昇し、軟寒天中のコロニー形成数も増加した。逆に、miR-135b発現を抑制すると、増殖性、遊走性、腫瘍原性も抑制されることから、miR-135bは炎症反応依存的に胃癌発生を促進する因子であると考えられた。以上の研究結果からmiR-135bの阻害による胃癌の予防または治療の可能性が考えられた。

(9)KADラットを用いた大腸炎発症機構の解明：APCは、正常大腸粘膜では、粘膜上皮細胞に発現が見られた。一方、大腸炎症領域では血管内皮細胞に強い発現が見られた。KADラット大腸の炎症領域では、F344ラットに比べて有意に血管数が減少し、血管新生の遅延が観察された。KAD血管内皮細胞はF344に比べて細胞接着能が増加していた。KAD血管内皮細胞はF344に比べて太く分岐の少ない管構造を形成した。細胞増殖、細胞移動能に差は見られなかった。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。

(10) KADラットを用いた評価試験系の開発：病理解析の結果、腺腫および腺癌の腫瘍数について5-FU投与群と溶媒投与群で有意な差は見られなかった。一方、腺癌1個あたりの体積については、5-FU投与群で $34.4 \pm 6.8 \text{ mm}^3$ 、溶媒投与群で $65.9 \pm 9.5 \text{ mm}^3$ ($p < 0.02$)と、有意な差が見られ

た。セレコキシブ投与群では、異形成、腺腫、腺癌の発生率は、それぞれ、100%、78%、56%であった。腺癌の発生率は有意に抑制された。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) 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: *Apc*^{Δ716} マウスおよび大腸がん細胞株の mTORC1 経路は JNK により活性化されること、さらに JNK は Raptor のセリン 863 残基を直接リン酸化して mTORC1 を活性化させることが分かった。さらに、*Apc* 変異を持つ腸管腫瘍細胞では、JNK が cyclin E、osteopontin 等の発現を、mTORC1 を介した翻訳レベルでの調節、c-Jun を介した転写レベルでの調節という 2 段階で制御していることが分かった。浸潤性腺がんを発症する *cis-Apc/Smad4* マウスに RAD001 および AZD8055 を投与したところ、腫瘍の成長は抑制されたが、浸潤自体は抑制されなかった。AZD8055 投与下の腸がんでは Akt と EGFR の強い活性化が認められた。大腸がん細胞株でも AZD8055 により EGFR/PI3K/AKT 経路が活性化されたが、EGFR 阻害薬 erlotinib により阻害された。

(12) 細胞周期制御因子 Cdc25A 分解の可視化系の構築: Cdc25A-N-RFP 発現 HeLa 細胞を、DDR 誘発因子であるエトポシドや DNA 合成停止を引き起こすことで DDR を誘発するアフィディコリンで処理すると、役 4 時間後に蛍光の消失が観察された。DDR としての Cdc25A の分解は、ゲノム損傷後 30 分以内に起きることから、今回作製した細胞株は、DDR 検出系としては適切であるとは言いがたいものであった (対策については、考察の項を参照のこと)。

(13) ラット大腸上皮由来初代培養細胞を用いた、PhIP 曝露による DDR の検出: ラット初代培養細胞においては、ラットの発がん実験における血中濃度と推定される、約 3mM、より高濃度の 5mM、10mM において PhIP 曝露誘発性 DDR が認められた。即ち、p53 の発現上昇、p53-S15 のリン酸化、Chk1-S435 のリン酸化、p53 の標的遺伝子である p21 の発現上昇、リン酸化 H2AX (g-H2AX) の検出など、すべての DDR マーカーが陽性となった。一方、対照として用いた DMSO および MeAaC は、上述のすべてのマーカーについて陰性となった。3mM より低濃度、即ち 1mM の投与では、当初は今回の研究で採用したすべての DDR 指標において陰性という結果となった。PhIP は低濃度でも DNA 損傷を誘発すると考え、一次抗体の濃度や抗体処理時間等の検討を行った結果、DDR 指標のうち p53-S15 のリン酸化を検出できる条件を決定した。この結果は、p53 のリン酸化を引き起こす、ATM や ATR などの上流因子が 1mM PhIP 誘発性 DNA 損傷によって活性化されていることを強く示唆する。そこでこの検出条件を 0.1mM および 0.3mM の PhIP に適用し、S9 mix 活性化 PhIP で 6 時間処理した細胞について p53-S15 のリン酸化を検討したところ、0.3mM の PhIP で明らかなシグナルが認められた。また 0.1mM の PhIP では、弱いながら恒常的に陽性シグナル認めた。この条件で p53 の上昇や Chk1-S435 のリン酸化についても検討したが、陽性シグナルは認められなかった。

(14) 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:

(発がん解析): 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に剖検すると、それぞれ 1 個体当たり 1.2 ± 0.98 個、1.5 ± 1.26 個、27.0 ± 7.44 (mean ± SD) 個の小腸腫瘍が生じていた (表 1)。非投与群の野生型およびヘテロ接合体マウスでは腫瘍は検出されず、ホモ接合体マウスには 1 個体当たり平均 1.2 ±

0.75 個の腫瘍が観察された。

表 1 KBrO₃ による小腸腫瘍の誘発

Table 1. Tumor formation in the intestine of *Msh2*-deficient mice

| Genotype | No treatment | KBrO ₃ -treatment | |
|--------------|----------------------------|------------------------------|--------------------|
| | No. of tumors ^a | No. of tumors ^a | Ratio ^b |
| Wild type | 0 | 1.20 ± 0.98 | 1.00 |
| Heterozygote | 0 | 1.50 ± 1.26 | 1.25 |
| Homozygote | 1.20 ± 0.75 | 27.00 ± 7.44 | 22.50 |

a: The no. of tumors is the mean number of tumors per mouse, with the standard deviation. b: ratio to tumors in wild type mice

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。このことから、ミスマッチ修復系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示唆された。

(がん関連遺伝子の変異解析) : ホモ接合体マウスに誘発された 89 個の腫瘍における β-カテニンの遺伝子 (*Ctnnb1* 遺伝子) の変異解析の結果、27 個 (30.3%) の腫瘍で変異を認めた。その内訳は、G:C→A:T 変異が 20 個 (74.1%)、A:T→G:C 変異が 3 個 (11.1%)、G:C→T:A 変異と G:C→C:G 変異がそれぞれ 2 個 (7.4%) であった。(表 2)。8-oxoG に起因する G:C→T:A 変異の頻度が他の変異頻度と比較して顕著に高くはないことから、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。

表 2 腫瘍の *Ctnnb1* 遺伝子変異

| Mouse ID | Nucleotide position | Mutation | Amino acid change | Mouse ID | Nucleotide position | Mutation | Amino acid change |
|----------|---------------------|----------|-------------------|----------|---------------------|----------|-------------------|
| 22-1 | 94 | G:C→A:T | D32N | 45-9 | 110 | G:C→A:T | S37F |
| 38-1 | 109 | A:T→G:C | S37P | 45-10 | 94 | G:C→A:T | D32N |
| 38-4 | 109 | A:T→G:C | S37P | 48-4 | 110 | G:C→C:G | S37C |
| 38-5 | 122 | G:C→A:T | T41I | 48-6 | 110 | G:C→A:T | S37F |
| 38-7 | 101 | G:C→A:T | G34E | 48-10 | 94 | G:C→A:T | D32N |
| 38-8 | 110 | G:C→T:A | S37Y | 48-15 | 100 | G:C→T:A | G34R |
| 38-12 | 94 | G:C→A:T | D32N | 48-22 | 109 | A:T→G:C | S37P |
| 38-13 | 100 | G:C→A:T | G34R | 50-5 | 122 | G:C→A:T | T41I |
| 38-18 | 110 | G:C→A:T | S37F | 50-8 | 100 | G:C→A:T | G34R |
| 38-20 | 110 | G:C→A:T | S37F | 50-12 | 94 | G:C→A:T | D32N |
| 38-21 | 122 | G:C→A:T | T41I | 50-14 | 94 | G:C→A:T | D32N |
| 38-22 | 94 | G:C→A:T | D32N | 50-16 | 110 | G:C→A:T | S37F |
| 45-1 | 122 | G:C→A:T | T41I | 50-24 | 98 | G:C→T:A | S33Y |
| 45-3 | 110 | G:C→C:G | S37C | | | | |

(酸化ストレス誘発細胞死解析) : KBrO₃ を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 ± 0.96 個 (mean ± SD) の細胞が、また、*Msh2* 遺伝子欠損マウスでは 0.80 ± 0.46 個 (mean ± SD) の細胞が TUNEL 陽性を示した (図 1)。この差は統計学的に有意である ($p < 0.002$; t -test) ことから、ミスマッチ修復系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。

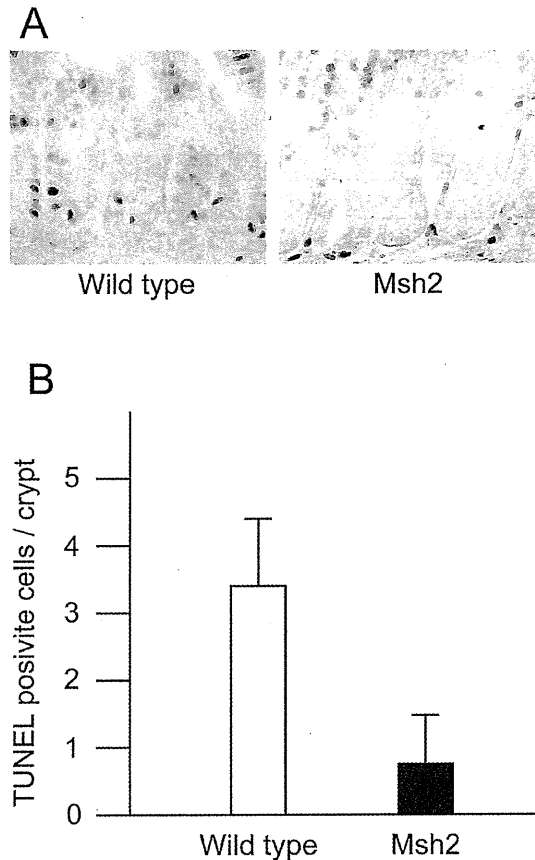


図 1 A. KBrO₃ 投与された野生型マウスと *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸組織切片の TUNEL 染色 B. クリプト当たりの TUNEL 陽性細胞の数

(15)ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作製: 未分化能をモニターすることで YPAC がラット ES 細胞の樹立に必要であることを見出した。Oct4, Nanog のプロモーター下に蛍光タンパク質を連結させたトランスジーンを ES 細胞に導入し、キメララットを経て生殖系譜伝達を介した世界初となるトランスジェニックラ

ットの作製に成功した。ZFN法を用いることで、組換え効率を劇的に向上させp53^{+/+}-ES細胞を安定して作製することが可能になった。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。p53^{-/-}-ラットは4ヶ月以内にがんを発症し、死亡することを確認した。興味深いことにp53^{-/-}-マウスは主にリンパ腫を発症するのに対し、p53^{-/-}-ラットの場合は多くが肉腫、精巣がん、乳がんを発症し、マウスとは異なる表現型を有することが分かった。雌p53^{-/-}-ラットは胎児期に神経管閉鎖障害を発症し、致死に至る事がわかった。

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。

(16) リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測:

(胸腺リンパ腫感受性を示すBcl11b^{KO/+}マウスを利用した解析): Bcl11b^{KO/+}マウスは胸腺リンパ腫感受性を示すが、Bcl11b^{KO/+}遺伝子型が与える感受性はハプロ型不全である。従って、片アレル消失が正常胸腺細胞の表現型に影響し、その表現型の変化が感受性を担う可能性がある。そこで、Bcl11b^{KO/+}胸腺細胞がBcl11b^{+/+}胸腺細胞とは異なる表現型を示すのか、その場合どの分化段階にある細胞が示すのか、を調べた。

その結果、ISP (immature CD8-single positive; TCRb^{lo}CD4⁻CD8⁺) 細胞の割合が、Bcl11b^{KO/+}マウスで明らかに増加していることが分かった。これは、DP (CD4⁺CD8⁺) 細胞に分化する前の段階で何らかの障害のあることを示唆する。S期でのBrdU取り込みを測定した。BrdU取り込み有り(+)と無し(-)に先ず2分割し、さらにFSC値が大(L)と小(S)の細胞群に分画した。したがって、4分画に分けられる。BrdU+FSCLはBrdU投与後S期に入った大型細胞、すなわちS/G2/M期に存在する細胞であり、BrdU+FSCSはBrdU投与後S期に入った細胞が小型のG1期の細胞まで細胞周期が進行したものを表す。BrdU投与1時間後のDN、ISP、DP細胞では、ほとんどのBrdU取り込み(BrdU+)細胞は大きく、細胞周期のS/G2/M期にあることが示された。一方、BrdU投与5時間後では、DN、ISP、DP細胞すべてでBrdU+FSCL分画の細胞数は低下し、BrdU+FSCSが増加する。この結果は、BrdU投与後5時間の間に多くのBrdU+細胞がS期からG1期に進行したことを示す。γ線照射は異なった分化段階の細胞により異なった影響を与えた。BrdU投与後5時間、γ線照射後4時間のDP細胞では、照射によるS/G2/M期での細胞周期進行の停止が示めされたが、この停止にBcl11b^{KO/+}胸腺とBcl11b^{+/+}胸腺の間で大きな差はみられなかった。一方、ISP細胞では、BrdU+FSCL分画の細胞数は低下し、BrdU+FSCSの増加がみられた。これは照射による細胞周期進行の停止が減弱していることを示唆する。興味深いことには、この細胞周期進行停止の減弱が、Bcl11b^{+/+}胸腺よりBcl11b^{KO/+}胸腺の方でより弱かった。このことは、Bcl11b^{KO/+}遺伝子型が放射線照射誘発の細胞周期進行停止を減弱させる作用のあることを示唆する。

(発がん母体細胞、放射線発がん標的細胞の同定): Lck-Cre;Bcl11b^{fllox/+}およびCD4-Cre;Bcl11b^{fllox/+}マウスを用い、γ線照射後での前リンパ腫細胞、すなわちクロールに異常増殖する胸腺細胞の出現を検討した。Lck-Cre;Bcl11b^{fllox/+}マウスでは、

DN2 分化段階以降の胸腺細胞で $Bcl11b^{KO/+}$ となり、 $CD4-Cre;Bcl11b^{flox/+}$ マウスでは DP 分化段階以降の胸腺細胞で $Bcl11b^{KO/+}$ となる。したがって、DN2 分化段階以前の細胞が発がん母体なら、どちらのマウス系でも異常増殖胸腺細胞は出現しないが、DN2 以降の細胞なら前者でのみ出現し、DP 以降の細胞なら両者で出現すると想定される。 $Bcl11b^{KO/+}$ マウスを用いた実験では、この前リンパ腫細胞は照射後 30 日から検出でき、照射後 80 日では約半数にその出現が観察された。照射後 60 日で胸腺細胞を取り出し、TCR β 座のVDJ組換えアッセイを行った。VDJ組換えパターンが正常胸腺と同じく6種類すべてが検出されると、異常増殖胸腺細胞の発症無しと判定される。一方、リンパ腫と同様に単一の組換えパターンが検出されると、異常増殖胸腺細胞が出現したと判定される。 $Lck-Cre;Bcl11b^{flox/+}$ マウスの約半数で単一の組換えパターンが検出され、異常増殖胸腺細胞が出現したことがわかった。一方、 $CD4-Cre;Bcl11b^{flox/+}$ マウスでは全く異常増殖胸腺細胞の出現が認められなかった。これらの結果は、発がん母体細胞はDN2以降DP以前の分化段階にある細胞にあることが示された。すなわち、DN4, ISP, DP-TCR β low の細胞である。発がん母体細胞となるDN4, ISP, DP-TCR β low の細胞への $Bcl11b^{KO/+}$ 遺伝子型の放射線応答性を検討した。具体的には、 $Lck-Cre;Bcl11b^{flox/+}$ マウスを用い、上記の $Bcl11b^{KO/+}$ マウスで行った実験を再度施行した。BrdU投与後5時間、 γ 線照射後4時間のISP細胞では、BrdU+FSC-L分画(S期の細胞)の細胞数は低下し、BrdU+FSC-S(G1期細胞)の増加がみられた。これは照射による細胞周期進行の停止、障害を意味する。興味深いことには、この細胞周期進行の停止が、 $Bcl11b^{+/+}$ 胸腺より $Lck-Cre;Bcl11b^{flox/+}$ 胸腺の方でより弱かった。このことは、胸腺細胞での $Bcl11b$ の片アレル消失が、細胞周期進行停止を減弱させる作用のあることを示唆する。

(BCL11B の p53-HDM2 フィードバックループへの影響) : $Bcl11b^{KO/+}$ マウスに $p53^{KO/+}$ 遺

伝子型を導入すると、胸腺リンパ腫を自然発症するが、 $Bcl11b^{KO/+}$ マウスでは発症しない。これは、 $Bcl11b$ が p53 と協調して細胞のがん化に働くことを示唆する。そこで、BCL11B が p53-HDM2 フィードバックループに直接影響を与えるかどうかについて、ヒト培養細胞を用いて検討した。BCL11B に対する shRNA を発現するウイルスベクターを、BCL11B を発現している MOLT-4 細胞に導入した。抑制効率を調べると約 20% までに低下する抑制効果がみられた。この抑制が直接作用かどうかを調べるため、MOLT-4 と Jurkat 細胞を用い、抗 BCL11B 抗体でクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、HDM2-P2 プロモーター領域が濃縮され、この領域に BCL11B が結合することが分った。p53 を発現する HCT116 細胞 (BCL11B は非発現) に BCL11B を強制発現させると、HDM2-P2 プロモーター活性は対照の 20% にまで抑制した。なお、p53 を欠損する HCT116 細胞ではその抑制効果が約 58% と減弱し、BCL11B の HDM2 転写抑制は、p53 に依存することが示唆された。次に、HDM2-P2 プロモーターの欠失変異体に対する BCL11B の影響を調べた。2か所に p53 結合配列 (BE) があり、両者の欠失で BCL11B による HDM2 プロモーター活性の抑制が認められなくなった。また、転写開始点より遠位の p53BE だけの欠失では、BCL11B によるプロモーター活性の抑制が 50% 程度に低下した。一方、p21 遺伝子の転写への影響は約 50% 程度抑制効果しか示さなかった。ヒト T 細胞リンパ芽球性急性白血病 (T-ALL) で主に亜鉛フィンガードメインに位置する BCL11B 変異が報告されている (Gutierrez et al., 2011)。そこで、これらの変異の影響を調べた。ヒト T-ALL で報告された 8 種類の点変異の中で、Zn フィンガードメインのヒスチジンの変異 (H445Y と H473Q) は抑制効果が野生型の約 50% に減弱していた。また、p53 欠損 HCT116 細胞では変異による機能障害を認めず、p53 の有無で影響が見られることがわかった。

($Bcl11b^{KO/+}$ 腸管クリプト細胞と放射線発がん感受性) : 野生型マウスと $Bcl11b^{KO/+}$

マウスでは形態学的に違いはみられない。そこで、マウスに12Gy、1回の全身照射を行い、16時間後に（損傷が形態学的に観察される前の時期であり、損傷の程度は強くない）解析した。照射によるBrdUの取り込み抑制に違いが見られ、野生型マウスでは照射後BrdU陽性細胞は減少するが、Bcl11b^{KO/+}マウスではその減少程度は少ない。この結果は、Bcl11b^{KO/+}クリプト内のCBC細胞、TA細胞が、照射による増殖抑制を受けにくいこと、抵抗性であることを示唆する。細胞増殖への影響を、細胞の移動という側面から検討した。腸管上皮細胞を基底部分から絨毛先端まで位置番号を付与すると、1番（CBC細胞の位置）から45-50の番号が与えられる。まず非照射条件下で、マウスの腹腔内にBrdUを投与し、経時的に腸管を取り出した。組織を固定した後、BrdU染色を行い、染色陽性細胞の位置を測定した。1時間後ではクリプト内でのみBrdU陽性細胞が検出されたが、2日後では陽性細胞は絨毛の中間位置にまで移動し、3日後では位置30から位置50にまで分布し、そのピークは位置43にあった。この移動は野生型マウスとBcl11b^{KO/+}マウスで変わりはない。次に、12Gyのγ線を照射し、2日後、すなわち組織の回復が始まる時にBrdUを腹腔内投与し、その3日後に陽性細胞の位置を観察した。野生型マウスでは、BrdU陽性細胞はクリプト内から位置32にまで広く分布していた。移動位置の低下は、照射による移動阻害を示し、広い分布は移動秩序の崩壊を示唆する。一方、Bcl11b^{KO/+}マウスでは、BrdU陽性細胞分布の広がりと同様に観察されたが、移動位置の低下は弱く、クリプト内から位置42にまで分布していた。位置26から位置42までの陽性細胞数に限定し、この移動の変化を比較すると、顕著に違いが認められた。これらの結果は、Bcl11b^{KO/+}遺伝子型が照射による細胞増殖、細胞移動の阻害に影響を与えることを意味する。照射後4日は障害を受けた腸管上皮は正常な形態を取り戻す再生期である。そこで、この時期のKi-67陽性細胞数を比較した。Bcl11b^{KO/+}マウスでより多くの陽性細胞が観察された。この

結果は、Bcl11b^{KO/+}マウスでは野生型マウスに比べ、照射後腸管組織再生が（恐らく異常に）より高いことを示唆する。この再生亢進が発がん促進に貢献する可能性がある。Lgr5発現腸管幹細胞特異的にBcl11b消失をもたらすマウスを作製し、解析した。Bcl11b^{KO/+}およびLgr5-Cre; Bcl11b^{fllox/+}マウスは、腸管で形態や増殖性に变化はみられない。一方、Bcl11b^{KO/+}マウスは、12Gyのγ線を照射し16時間後（形態的な変化がまだみられない時期）に腸管を観察すると、細胞増殖停止の減弱が観察される。この性質の変化がLgr5陽性細胞でBcl11b片アレル消失したことに起因するのか、Lgr5-Cre; Bcl11b^{fllox/+}マウスを用い同様の条件下で調べた。すなわち、4OHT投与（Creを発現誘導する）2週間後のLgr5-Cre; Bcl11b^{fllox/+}マウスに12Gyのγ線を照射し16時間後の変化を観察した。その結果、このマウスでも同様の細胞増殖停止の減弱が観察された。次に、照射後の損傷回復時、すなわち12Gyのγ線を照射し16時間後の変化への影響を調べた。Bcl11b^{KO/+}マウスとLgr5-Cre; Bcl11b^{fllox/+}マウスはどちらも野生型マウスに比べ、より強い再生像を示した。これらの結果は、Lgr5陽性細胞でのBcl11bの片アレル消失は、照射後の増殖、再生をより増大させることを示す。すなわち、細胞増殖の抑制にBcl11bは寄与し、その機能低下は腸管幹細胞に増殖性を与えることを示唆する。Lgr5-Cre; Bcl11b^{fllox/KO}マウスを作製し、4OHT投与によりBcl11bの両アレルを消失した腸管への影響を調べた。Cre発現をGFP染色でモニターすると、35%-45%のクリプト底部でCre発現が確認された。これは先行研究と一致する。しかし、このクリプトの約半数でしかBcl11b発現の消失が観察されなかった。一方、Lgr5-Cre; ROSA26-LacZマウスではGFP染色とLacZ染色が同程度であった。これは、Bcl11b発現を消失したクリプトが減少し、クリプトの維持能低下を引き起こしていることを示唆する。この結果から、Bcl11b消失の幹細胞は存続能が低下すると考えられる。腸管上皮細胞の増殖は主にWnt/β-catenin経路により調節される。そこで、

β -catenin経路活性化への放射線照射影響をTOP/GALマウスを用いて調べた。このTOP/GALマウスは、活性化された β -catenin転写複合体が核内で結合するTOP配列をもち、 β -catenin経路の下流にある遺伝子の転写活性をモニターすることができる。12Gy照射後24時間の影響をみると、野生型マウスではクリプト内GAL染色陽性細胞数は照射により低下するが、Bcl11b^{KO/+}マウスでは逆にGAL陽性細胞が増加していた。このGAL陽性細胞は、増殖している幹細胞を示唆すると考えると、Bcl11b^{KO/+}マウスの幹細胞は照射後分裂が抑制されるのではなく、むしろ活性化されると考えられる。

(17)大腸腫瘍の化学予防法の確立：2つの動物モデルにより、メトホルミンがAMPKを活性化し、マウス大腸発がんモデルに対して抗腫瘍効果を示すことを明し報告した。さらにヒトにおいて前臨床試験として、ACFを減少させ、大腸腫瘍の化学予防候補薬となることを報告した。これらの知見をもとにヒトを対象とした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した。現在目標である150例の組み入れを終了しフォローアップ中である。結果はH26年9月以降に報告する予定である。

一方、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示すことが報告されているが、ヒトにおける効果はいまだ不明な点が多い。今回、我々はヒト散発性腫瘍の代替指標であるAberrant Crypt Foci (ACF)をエンドポイントとした臨床試験を実施した。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。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。

D. 考察

(1)大腸発がん罹患感受性遺伝子の探索：大腸発がん感受性候補遺伝子 Caspase3 の3'-UTRの多型が何らかの機構を介して系統間で mRNA レベル、タンパクレベルの差を引き起こしていることを前年度までに明らかにしてきた。今年度はさらにこの発現量の差が大腸化学発がん性に影響を与えるかどうかTGラットとKOマウスを用いて個体レベルでの検討を行った。ラットでは予想通り発現の増加により発がん性の低下を認めた。一方、遺伝子改変マウスでの検討では Caspase3 の発現量の差は発がん性に影響を与えなかった。この原因として、高脂肪食ではなく普通食を用いたこと、あるいは別の遺伝子変異との組み合わせで初めて差が出る可能性が考えられる。特に後者の可能性については、今年度に開発した再構成の系を用いて検証が可能であり、種々のがん抑制遺伝子の機能喪失と Caspase3 の発現量低下が協調的に発がん性を促進させる可能性について現在検討を進めている。また、今後 Caspase3 の発現レベルの個体差が発がんリスクに関連するかどうかヒトでの検討を行うことも有意義と考えられる。

(2)大腸発がんと肥満に共通の遺伝的素因の探索：肥満は大腸がんのリスク因子だが、両者の関係は発がんイニシエーション成立後における肥満による発がん進展の促進作用として従来捉えられてきた。これに対し、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が、cleaved formの生成のみを抑制する場合と遺伝子発現そのものを抑制している場合があり、遺伝子によって異なる機構により制御を受けていることを明らかにし