

16-13 がん化学予防の短・中期検索モデルの開発に関する研究

主任研究者 名古屋市立大学 津 田 洋 幸

研究成果の要旨

発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットによる乳腺発がん抑制物質短期検索法を開発し、さらにこのラットと突然変異検出用 *gpt delta* ダブルトランスジェニックラットを作り、標的臓器の *in vivo* 変異原性を指標とした予防物質の短期検索法を開発してきた。また、ヒトへの外挿の容易なヒト Ki-ras 遺伝子導入ラットの作成を行っている。ラット膀胱がんの遺伝子発現プロファイリングからがん予防物質のスクリーニング法を開発を行っている。ハムスター膀胱がんモデルにおいて、オリゴ糖による検証によって膀胱液の変異原性の減少を指標として膀胱がん化学予防物質のスクリーニング法を開発している。雌 A/J マウスの NNK 誘発肺腫瘍モデルにおいて、既知の予防物質による検証から実験期間 16 週から 12 週に短縮できる事が分かった。g enistein は 2 種のヒト前立腺がん細胞株に対して細胞増殖抑制と相関性を示すシグナル伝達分子である PDK1(Ser241)の発現増加が共通して観察され、発がん抑制の分子マーカー候補としての有用性が示された。

研究者名および所属施設

分担研究課題

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
津 田 洋 幸	* ¹ 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授	乳腺短期発がんトランスジェニックラットを用いたがん化学予防物質の短期検索法の開発
福 島 昭 治	* ¹ 大阪市立大学大学院医学研究科 教授	cDNA マクロアレイを応用した検索モデルの開発
堤 雅 弘	* ² 奈良県立医科大学 助教授 * ³ 奈良県立医科大学 研究員	膀胱がん化学予防物質の短・中期モデル開発
竹 内 聖	* ² 香川大学医学部 助手	マウスを用いた肺発がん化学予防短期開発を旨とした新しいマーカーの開発
松 田 陽 子	* ³ 香川大学医学部 助手	マウスを用いた肺発がん化学予防の中期検索モデルの開発
増 村 健 一	* ¹ 国立医薬品食品衛生研究所 研究員	突然変異検出用レポーター遺伝子を組み込んだがん化学予防モデルの開発
高 橋 智	* ¹ 名古屋市立大学大学院医学研究科 講師	前立腺がん抑制物質早期検出のための遺伝子・タンパクマーカーの確立

*1：平成16年 4月 1日～平成17年 3月31日

*2：平成16年 4月 1日～平成16年 9月30日

*3：平成16年 9月30日～平成17年 3月31日

*4：平成16年10月 1日～平成17年 3月31日

総括研究報告

1 研究目的

がんの化学予防は重要であるにも拘わらず実地で使用されているものはきわめて少なく、医薬としての抗炎症剤があるのみである。その主な理由は動物実験による評価を経て客観的に十分な効果と安全性の確認されている物質が限られているためであり、今後更に新しい物質について検索を行う必要がある。しかしながら予防物質を通常の動物実験で見出すには長期間必要であり、短い時間に多くの物質について検索し得る信頼度の高い短期動物モデルが開発されていない。本研究では、新しいがん化学予防物質を作用メカニズムに立脚した *in vivo* 短期間探索モデルを開発し、それを利用して可及的速やかにがんの二次さらには一次予防に送りだすことの出来る方法基盤の確立を行う。具体的には、乳腺・皮膚高発がん感受性ラットおよび膵中期発がんモデルを用いた方法、突然変異検出動物モデルによる *in vivo* 抗変異原物質検索法の開発、動物組織の DNA チップ・プロテオミクス解析による前立腺・子宮発がん予防物質の検出法およびマウスの NNK 肺発がん予防物質の検索モデルの開発を行った。

2 研究成果

1 乳腺発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いて 50 日齢時に N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を腹腔内投与した後より被検物質を投与する方法によって、腹乳腺組織の検索においてイソフラボンやアントシアニンの強い発がん抑制作用を 8 週間程度で見出す事ができることを示してきた。しかしながらこのトランスジェニックラットは Ha-ras を導入しているためヒトで Ki-ras の変異によって発生すると考えられている大腸、肺、膵等の臓器においては、化学発がん感受性の亢進が見られないので、ヒトに外挿できる発がん抑制物質の検索法としての開発には限界があることが分かってきた。そこでこのプロジェクトにおいては 2 年目よりヒト Ki-ras 遺伝子導入ラットを作成し、先ずこれらの結果の外挿につてより容易な臓器に発がんさせるモデルの作製を行うことを目標とした。ヒト Ki-ras 遺伝子は 0 ~ 4 の 5 つのエクソンを持ち、エクソン 4 は 4A と 4B からなるがストップコドンの位置によってスプライス後に Ki-ras4A または Ki-ras4B を持つ遺伝子になる。Ki-ras4A は肝、肺、腎に、Ki-ras4B は全身に発現されている。そこでまず変異型 Ki-ras4B をラットに導入することとし、CAG プロモーター下 Cre-LoxP のコ

ンディショナル発現系の構築し、ラット大腸がん細胞 COS-7 に導入して蛋白の産生を確認した後に SD 系ラットの受精卵への注入を行っている。中間報告には F1 が得られる予定である。得られればまず Ki-ras の変異によってイニシエーションされた細胞の増殖を阻止する物質の探索に利用する。今後プロト型ヒト Ki-ras 遺伝子はそのままでは非常に大きいイントロンを含むので適宜削った構築のものを作成し導入を試みる(津田洋幸)

2 (1) 膀胱発がん抑制要因を検索する目的で行った実験において、質的に異なる膀胱発がん物質の発がん性と惹起される遺伝子変化との相互関係を検討した。遺伝毒性発がん物質である N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、または非遺伝毒性発がん物質である Uracil で誘発したラット膀胱がんそれぞれ 6 個について、個別に遺伝子プロファイリングをマイクロアレイ法を用いて行った。さらに、ラット膀胱早期増殖病変検索のため BBN または Uracil を投与開始後、2, 4, 8 週目に動物を屠殺、膀胱病変を摘出し、同様に遺伝子プロファイリングを行った。その結果、BBN 誘発膀胱がんにおいては細胞周期関連遺伝子群、ストレス応答関連遺伝子群の順で異常発現遺伝子が多く認められた。Uracil 誘発膀胱がんにおいては逆にストレス応答関連遺伝子群、細胞周期関連遺伝子群の順で異常発現遺伝子が多く認められた。以上の結果より病理学的に同一ながんの発がん過程における遺伝子発現パターンはそれを誘発した発がん物質の質的相違に左右される可能性が示唆された。また、cDNA アレイ法は化学物質の発がん性の評価と発がん抑制要因の検索に有用な方法になり得ると考えられる。現在、膀胱発がん過程に持続して発現する遺伝子、および発がんの各過程において特異的に異常発現する遺伝子、すなわち膀胱発がん抑制の標的となりうる遺伝子を同定する目的で、これまでに得られているマイクロアレイデータの統計解析を行い、膀胱病変における遺伝子異常発現プロファイリングを経時的に比較検討を進めている。(2) ヒトでは実験動物と異なり発がん物質に対する曝露は極めて低く、発がんは動物に較べ穏やかに進行すると考えられる。このため、がん予防物質探索モデルを確立するには低用量発がん物質投与によるモデルの確立が必要である。この目的で azoxymethane (AOM) の投与後にヘテロサイクリックアミンの

2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) を投与する 2 段階発がんモデルを用いて、低用量の PhIP の大腸発がん性を検討した。雄性 F344 ラット 192 匹を 8 群に分け、全群に対して AOM 15 mg/kg、週 1 回皮

下投与×2回後、各群に対し0、0.001、0.01、0.1、1、10、50、200 ppmの用量でPhIPを混餌投与した。16週と36週で屠殺し、大腸の腫瘍性病変を病理学的に解析した。その結果、16週での大腸前がん病変マーカーであるaberrant crypt foci (ACF)の発生個数は、200 ppm群を除く全群間において有意差を認めなかった。36週での大腸腫瘍の発生頻度と個数は、0から10 ppmまで有意差を認めず、50 ppm以上で100%に発生し、特にその個数が著明に増加した。PhIPを投与した各群の腫瘍発生個数を、対照群のそれで除した値の用量曲線は、PhIP投与の0.001-10 ppmまではほとんど平坦であり、50 ppm以上で急峻に立ち上がった。なお、大腸粘膜上皮における免疫染色の結果、50 ppm以上では有意な細胞増殖能の増加を認めた。これらの結果より、AOM誘発ラット大腸発がんにおいて、50 ppm以上のPhIP投与は有意に腫瘍発生を促進させた。一方10 ppmまでは実際上の無作用量域と考えられた。今後、マイクロアレイを用いて各群で発生した腫瘍の解析により、PhIPの発がん修飾作用に関連する遺伝子を検索するとともにそのPhIPの用量依存性変化を検討する予定である。

3) 突然変異を検出するためのレポーター遺伝子を導入した*gpt delta*トランスジェニックラットを用いて、発がん抑制物質の短期検索系に貢献するモデルを樹立することを目的とした。乳がん高感受性Hras128ラットに突然変異検出のレポーターを導入し、発がんおよび遺伝毒性を指標とした発がんおよびがん化学予防モデルの開発を行っている。(1) H16年度では、コリン欠乏アミノ酸(CDAA)食による酸化ストレスによる内因性肝発がん系を用いて、体細胞遺伝子突然変異の関与について*gpt delta*ラットによる検索を行った。コリン欠乏アミノ酸(CDAA: choline-deficient, L-amino acid-defined diet)食は、重要な栄養素であるコリンの欠乏とメチオニンの低減を行った半精製コリン欠乏食(CD)の蛋白質成分を同一組成のアミノ酸で置換してさらにコリン含有量を下げたものであり、齧歯類において慢性肝障害を背景に肝細胞がんを誘発することが報告されている。食餌成分組成によって誘導される内因性肝発がんの誘発機構に関して遺伝子突然変異が関与しているかを明らかにするため、レポーター遺伝子を導入した*gpt delta*ラットを用いて肝臓における突然変異誘発能の検索を行った。実験には7週齢の*gpt delta*ラット(Sprague-Dawley)の雌雄を用いた。ラットを3群に分け、それぞれCDAA食、対照食としてCDAA食にコリンを添加したCSAA食(CSAA: choline-supplemented, L-amino acid-defined diet)、

および基礎食(CRF-1)を22週間連続投与して臓器を回収した。また、抗酸化作用と種々のシグナル異常抑制作用を有する抑制物質であるphenyl N-tert-butyl nitron(PBN)を併用(0.003%混水投与)した条件においても同様に行った。*gpt delta*ラットの4番染色体には、変異検出のためのレポーターとなるλEG10ファージDNAが導入されている。肝臓組織よりゲノムDNAを抽出し、*in vitro*パッケージング法にて導入DNAをファージ粒子として回収した。点突然変異は大腸菌*gpt*遺伝子をレポーターとする6-チオグアニン選択法で検出し、点突然変異体頻度を測定した。欠失変異はラムダファージの*red/gam*遺伝子をレポーターとするSpi⁺選択法で検出し、欠失変異体頻度を測定した。さらに、得られた変異体の塩基配列解析を行い、組織の細胞分裂によって同一個体から同じ変異が多数検出される現象(clonal expansion)によって変異頻度が過大評価される可能性を除いた上で突然変異頻度を算出した。雄の肝臓における*gpt*点突然変異頻度は、CDAA食群で $7.3 \pm 6.0 \times 10^{-6}$ であり、CSAA食群($9.2 \pm 0.7 \times 10^{-6}$)および通常食群($8.5 \pm 3.9 \times 10^{-6}$)と比較して有意な差は認められなかった。また、Spi⁻欠失変異頻度は、CDAA食群で $4.5 \pm 1.9 \times 10^{-6}$ であり、CSAA食群($5.3 \pm 2.6 \times 10^{-6}$)および通常食群($4.4 \pm 0.9 \times 10^{-6}$)と比較して有意な差は認められなかった。各群から得られた変異スペクトルを比較したところ、CDAA食による有意な変化は認められなかった。PBN投与群についての検討は行っていない。肝臓のGST-P陽性細胞巢および8-oxoGレベルの発生は認められたが、その強度はFischer系やWistar系雄性ラットに比べてはるかに弱かった。無処理群と比較してCDAA処理群の点突然変異頻度および欠失変異頻度に有意な差が認められなかった結果と併せて、CDAA食による内因性肝発がんには系統差があることが示唆された。現在、*gpt delta*ラット(SD)による長期投与(45週間)の実験と平行して、*gpt delta*ラットのバックグラウンドを発がん試験で頻用されるFischerへと戻し交配を進めており、これを用いて内因性肝発がんにおける体細胞突然変異の関与と系統差について検討を行う予定である。(2) ヒトras遺伝子が導入されたHras128ラットと突然変異検出用*gpt delta*ラットを交配し、Hras128/*gpt delta*ラットの作成を現在進めている。Hras128ラットはSprague-Dawley系であり乳がん高感受性が確認されている。同じくSprague-Dawleyをバックグラウンドとする*gpt delta*ラットとの交配による系統差の問題は生じないと考えられる。今後、Hras128/*gpt delta*ラットの雌

個体に MNU あるいは PhIP を投与し、乳腺組織における突然変異頻度および変異スペクトルの解析を行う計画である（増村健一）。

4) 難治がんの代表的なものである膵がんの予後を改善するためには、環境中や内因性の発がん要因の検索とその情報に基づく予防法の開発が重要な研究課題の1つである。膵がんの前がん病変の発生には K-ras 遺伝子変異が重要であることから、K-ras 遺伝子変異の発生を阻止する物質の検索法が確立できれば、膵がんの化学予防法の開発に貢献しうると考えられる。我々は膵管がんの発生に対する膵液の関与に注目し、膵管がんの発生するハムスターに膵管発がん物質である BOP や BHP を投与すると膵液に変異原性がみいだされるが、膵管がんの発生しないラットにこれらの物質を投与しても膵液に変異原性は現れないとの現象をみいだした。このことは膵液中の変異原物質が膵管がんの誘発に重要であることが示唆するものである。本研究は、膵液の変異原性を指標として、膵管がんを予防する候補物質の短期にスクリーニングする系の開発を目的とするものである。〔実験方法〕動物は雄性シリアンハムスターを用いた。膵液の採取法は図1に示す。ネブタール麻酔下に動物を開腹し、胆管より膵管にカテーテルを挿入後、内因性の膵発がん促進物質として知られているデオキシコール酸を 400mg/kg の量で小腸内へ注射投与した。その後、膵液の分泌量を増加させるためセルレインを静脈内投与し、約5時間にわたって膵液を採取した。膵液の変異原性は、Ames test にて S9 mixture 非存在下に常法に従って行った。菌株はニトロサミン高感受性の YG7108 株（国立衛研増村博士より供与）を用いた。なお、1回の Ames test には動物は5～6匹を用い、採取した膵液はプールし凍結保存した。Ames test を行う直前に膵液を解凍し 0.4 μ m 孔径のフィルターで処理して用いた。実験は2回以上繰り返し、結果の再現性を確認した。今回の披験物質として、デオキシコール酸の代謝に影響すると考えられるオリゴ糖（XOA および XOB）を 0.4% の濃度で含有する飼料を4週間投与した（図2）。披験物質投与後、前述した方法により膵液を採取し、膵液の変異原性に及ぼす披験物質投与の影響を観察した。その結果膵液の Ames test の結果は、デオキシコール酸を投与したハムスターでは、非投与に比べてリバート数の数が約9倍に増加した。実験膵液の採取の4週間前からオリゴ糖（XOA および XON）含有食を投与した後デオキシコール酸を投与した膵液のリバート数は、オリゴ糖食を投与しないハムスター膵液に比べ半数以下に減少した。以上から、デオキシコール酸

は内因性の膵発がん促進物質として重要であることから、デオキシコール酸投与により膵液に分泌される変異原物質を減少させることを指標とした膵がん予防物質の短期検索法の有用性が示唆された。今後、本研究でみいだされたオリゴ糖食の膵発がん抑制作用を検索し、膵液を用いた短期検索系の有用性を検証する（堤 雅弘）。

5) 近年、増加傾向を示している肺がん、特にその腺がんは、発がん要因として喫煙よりもむしろその他の環境要因、特に食事性要因が疑われており、喫煙と異なって予防方法については研究されていない。これまでにヒトの肺腺がん組織型が類似している A/J マウスを用いて、様々な要因による肺腫瘍発生に及ぼす影響について検討を行ってきており、第一相薬物代謝酵素 CYP 2A6 阻害剤の methoxsalen が、

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone NNK 誘発肺腫瘍の発生を強力に抑制することを報告した。実験(1A)では、肺発がん抑制モデルとして雌の A/J マウスを用いすでに大腸発がん抑制物質として知られているウシラクトフェリン (bLF) について、initiation、promotion、whole carcinogenesis step それぞれの時期にその効果を検討した。6週齢、雌の A/J マウスを用い、bLF を1群(0.02%bLF+NNK 群)は0.02%、2群(0.2%bLF+NNK 群)は0.2%、3群(2%bLF+NNK 群)は2%、5群(0.2%bLF+saline 群)は0.2%の濃度で粉末飼料中に混じり、1週間経口自由摂取させ、4群(NNK 群)には bLF 未混入の粉末基礎飼料(MF)を与えた。実験開始から1週後に、1～4群には、NNK を生理食塩水に溶解し、2 mg/mouse を単回腹腔内投与し、5群には、同量のその溶媒である生理食塩水を腹腔内注入した。実験開始16週後に、屠殺剖検し、肺腫瘍の発生頻度と各個体毎の発生個数を病理組織学的に検討した。その結果、腫瘍の発生個数と lactoferrin 投与量の間には有意な相関を認めず、NNK 誘発肺腫瘍の initiation の段階における lactoferrin による修飾作用は見られなかった。次に、実験(1B) NNK 誘発肺腫瘍の initiation、promotion、whole carcinogenesis step における bLF の抑制作用の検討を行った。6週齢、雌の A/J マウスを用い、1群(pre & post bLF+NNK 群)、4群(pre & post bLF+saline 群)には実験の全期間に渡って、2群(NNK+post bLF 群)には実験開始2週から実験終了までの期間に、bLF を2%の用量で混餌経口摂取させた。3群(NNK 群)には bLF 未混入の粉末基礎飼料(MF)を与えた。実験開始から1週後に、1～3群には NNK (2mg/mouse) を単回腹腔内投与し、4群には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。実験開始16週後に、屠殺剖

検した。その結果、マウス 1 匹あたりの肉眼的肺結節数は pre & post bLF+NNK 群、NNK+post bLF 群、NNK 群、pre & post bLF+saline 群でそれぞれ、7.63, 4.65, 6.70, 0.20 個であり、NNK+post bLF 群では対象群の NNK 群と比較して、肉眼的な肺結節数が NNK+post bLF 群において NNK 群と比較して有意に減少しており、promotion の段階における bLF の抑制効果が認められた。

実験(2)では、マウス肺発がん化学予防の中期検索モデルの開発を目的とし、methoxsalen 100ppm の混餌投与を行い、NNK 単独投与群と比較し化学予防効果を評価可能な適切な時期を検討した。6 週齢、雌の A/J マウス 120 匹を用い、A 群(methoxsalen 100ppm 群)と B 群(基礎食群)の 2 群に分けた。A 群には実験開始 1 週目と 7 週目に、methoxsalen 100ppm を 3 日間混餌投与し、3 日目に NNK (2mg/mouse)を腹腔内投与した。B 群には実験開始 1 週目と 7 週目に、methoxsalen 未混入の粉末基礎飼料(MF)を与え、3 日目に NNK (2mg/mouse)を腹腔内投与した。両群とも 8 週目、10 週目、12 週目に、16 週目に各群 15 匹ずつ屠殺剖検し、肺腫瘍について病理組織学的な検討を行い、経時的肺腫瘍の発生を統計学的に比較検討した。その結果、肺腫瘍数のカウントや病理組織標本の作製が難しい点を考慮して、実験開始 12 週での評価が最も適していると結論された。これまで NNK 誘発肺腫瘍の実験期間として 16 週を設定していたが、4 週間短縮可能であることが判明した(松田陽子)。

6) 前立腺がんは生活習慣の西洋化に伴って日本においても増加が著しい悪性腫瘍の 1 つである。初期の前立腺がんはホルモン治療に良好な反応を示すため寛解状態を得るのは容易であるが、多くの症例は数年後に再燃しホルモン治療に対して抵抗性を示すことが知られている。このような臨床的事項から、前立腺がんの発生過程に着目してその発生を抑制する化学予防という概念は重要であると考えられる。今回の研究では前立腺がん発生もしくはその成長を抑制する化学予防剤の検出を短期間にスクリーニングすることを可能とする分子マーカーの検出、確立を試みた。方法はヒト前立腺がん細胞株でアンドロゲンレセプター(AR)陽性である LNCaP, 22Rv1 に対して前立腺がん治療薬である bicalutamide (Casodex)、あるいは動物実験でその前立腺発がん抑制効果が明らかにされており、イソフラボンの主成分である genistein を 3 日間処理し、この時の細胞内シグナル伝達タンパクの発現変動を検討し、細胞増殖抑制と相関性を示すタンパク分子を探索した。その結果、アンドロゲン依存性・感受性細胞株である LNCaP およびアンドロゲン非依存性・感受

性細胞株である 22Rv1 に対して 2, 10 および 50μM bicalutamide を 3 日間処理すると濃度依存性に増殖抑制が観察され、50μM では約 50%の抑制が認められた。そこで 50μM bicalutamide で 3 日間処理した LNCaP, 22Rv1 細胞を用いて MAPK pathway, Akt/PKB pathway, Death receptor signaling pathway を中心にタンパク発現に対する影響を検討した。MAPK pathway では MEK1/2 で bicalutamide 処理により発現がやや減弱する傾向にあるがそのリン酸化タンパクである MEK1/2 (Ser217/221) には明らかな発現変動は観察されなかった。Erk1/2, p38 MAPK, SEK1/MKK4, SAPK/JNK, Erk5 およびそのリン酸化タンパクの発現量に変化はみられなかった。Akt/PKB pathway では Akt, PTEN, PDK1, Bad, GSK-3β, Death receptor signaling pathway では FADD, NK-κB, IκB-α, Caspase 3, 6, 7 についてそのリン酸化タンパクを含めて検討したが bicalutamide 処理により変動するものはなかった。その他種々のタンパクについても検討を加えたが、IGF-1R 発現が bicalutamide 処理によりやや減弱する傾向が観察されたのみであった。genistein においては LNCaP, 22Rv1 両者とも 5μM では約 30%、25μM では 40~50%増殖抑制が観察された (Fig.1)。そこで 25μM genistein を処理した両細胞株を用いて MAP kinase を中心に 23 種類のリン酸化タンパクの発現変動について検討を行った結果、genistein 処理により PDK1(Ser241)発現上昇が両細胞株に共通して観察された。以上から、PDK1 は Akt, PKC あるいは p70 S6 kinase 活性化など多くのシグナル伝達系において重要な役割を演じているキナーゼ分子で、細胞増殖、分化、アポトーシスに関与していることが知られている。今回のデータでは PDK1 が活性化しているにも関わらず細胞増殖が抑制されていることから、この PDK1 活性化は前立腺がん細胞に対してはむしろ分化に作用しているものと推察された。今後、前立腺がん細胞株に対して増殖抑制効果を示す α-tocopherol, γ-tocopherol, lycopene, selenium, resveratrol などの処理により、リン酸化 PDK1 の発現上昇が共通して観察される事象かどうか検討を加え、前立腺がん化学予防剤をスクリーニングする際の分子マーカーとしての有用性について評価する(高橋 智)。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、各班員は所属施設の動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験

動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」、また World Health Organization(WHO)の医学研究顧問委員会の勧告に基づく The Council for International Organization of Medical Sciences(CIOMS)による「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則 (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に準拠した実験を行っている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida, H. and Tsuda, H. Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 43-56, 2004.
2. Iigo, M., Shimamura, M., Matsuda, E., Fujita, K., Nomoto, H., Satoh, J., Kojima, S., Alexander, D.B., Moore, M.A. and Tsuda, H. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, 25: 36-44, 2004.
3. Park, C.B., Fukamachi, K., Takasuka, N., Han, B.S., Kim, C.K., Hamaguchi, T., Fujita, K., Ueda, S. and Tsuda, H. Rapid induction of skin and mammary tumors in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene followed by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci.*, 95: 205-210, 2004.
4. Naito, A., Suzuki, A., Ueda, S., Nomoto, H., Toriyama-Baba, H., Asamoto, M., and Tsuda, H. Preferential Mammary Carcinogenic Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in Human c-Ha-Ras Proto-oncogene Transgenic Rats, *Cancer Sci.*, 95: 399-403, 2004.
5. Fukamachi K., Han, B-S., Kim C-K., Takasuka N., Matsuoka, Y., Matsuda E., Yamasaki, T. and Tsuda, H. Possible Enhancing Effects of Atrazine and Nonylphenol on 7,12-Dimethylbenz [a]anthracene -Induced Mammary Tumor Development in Human c-Ha-ras Proto-oncogene Transgenic Rats, *Cancer Sci.*, 95: 404-410, 2004.
6. Alexander, D.B., Ichikawa, H., Bechberger, J.F., Valiunas, V., Ohki, M., Naus, C.C.G., Kunitomo, T., Tsuda, H., Miller, W.T. and Goldberg, G.S. Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and src activity. *Cancer Res.*, 64(4): 1347-1358, 2004.
7. Shimamura, M., Yamamoto, Y., Ashino, H., Oikawa, T., Hazato, T., Tsuda, H. and Iigo, M. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 111(1): 111-116, 2004.
8. Fujita, K-I, Matsuda, E., Sekine, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats, *Carcinogenesis*, 25(8): 1961-1966, 2004.
9. Nozaki, S., Maeda, M., Tsuda, H. and Sledge, G. W., Jr. Inhibition of breast cancer regrowth and pulmonary metastasis in nude mice by anti-gastric ulcer agent, irsogladine. *Breast Cancer Res. Treat.* 83:195-199, 2004.
10. Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Lack of modifying effects of 4-tert-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 95(4): 300-305, 2004.
11. Takahashi, T., Takasuka, N., Iigo, M., Baba, M., Nishino, H., Tsuda, H. and Okuyama, T. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. *Cancer Sci.* 95(5): 448-453, 2004.
12. Tsuda, H., Ohshima, T., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo M., Takasuka N. and Moore M.A. Cancer Prevention by Natural Compounds. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19(4): 245-263, 2004.
13. Fujita, K., Matsuda, E., Sekine, K., Iigo, M., Tsuda, H. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett.* 15: 213(1) 21-29, 2004.

14. Goldberg, G.S., Kunimoto, T., Alexander, D.B., Suenaga, K., Ishidaate, F., Miyamoyo K., Ushijima T., Teng, C.T., Yokota, J., Phta, T. and Tsuda, H. Full Length and Delta Lactoferrin Display Differential Cell Localization Dynamics, but do not Act as Tumor Markers or Significantly Affect the Expression of other Genes. *Medicinal Chem.* 1:57-64, 2005.
15. Doi, K., Fukushima, S. et al., Revised rat multi-organ carcinogenesis bioassay for whole body detection of chemopreventive agents: modifying potential of *S*-methylcysteine. *Cancer Lett.*, 206: 15-26, 2004.
16. Wei, M., Fukushima, S. et al., Lack of preventive efficacy of FK228, a histone deacetylase inhibitor, against *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in p53^{+/+} and p53^{+/+} mice. *Anticancer Res.*, 24: 785-790, 2004.
17. Sukata, T., Fukushima, S. et al., α_2 -Macroglobulin: A novel cytochemical marker characterizing preneoplastic and neoplastic rat liver lesions negative for hitherto established cytochemical markers. *Am. J. Pathol.*, 165: 1479-1488, 2004.
18. Wei, M., Fukushima, S. et al., JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int. J. Cancer*, 113: 354-358, 2005.
19. Tsujiuchi T., Tsutsumi M., Establishment and characterization of a rat lung adenocarcinoma cell lines with low malignant potential. *Cancer Lett.* 217: 97-103, 2005.
20. Tsujiuchi T., Tsutsumi M., Alterations of the *Dutt1/Robo1* gene in lung adenocarcinomas induced by *N*-nitrosobis (2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol Carcinog* 40: 241-246, 2004.
21. Honoki K, Tsutsumi M., Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* 39: 10-14, 2004.
22. Tsujiuchi T, Tsutsumi M., Alterations of the *M6p/Igf2* receptor gene in hepatocellular carcinomas induced by *N*-nitrosodiethylamine and a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Mol. Carcinog.* 39: 199-205, 2004.
23. Kitahashi T., Tsutsumi M., Aberrant transcript of FHIT gene in intra-hepatic cholangiocellulara carcinomas induced by *N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in hamsters. *Exp Toxicol Pathol.* 56: 153-157, 2004.
24. Shibata, K. Masumura et al., An efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutations in *gpt* delta mice using Southern blot analysis with oligo DNA probes. *Environ Mol Mutagen*, 43: 204-207, 2004.
25. T. Nohmi and K. Masumura, *gpt* delta transgenic mouse: a novel approach for molecular dissection of deletion mutations in vivo. *Adv Biophys*, 38: 97-121, 2004.
26. K. Kanki, K. Masumura, et al., In vivo mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol Carcinog*, 42: 9-17, 2004.
27. Shibata, K. Masumura, et al., Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*, 24: 1328-37, 2005.
28. Hashimoto, K. Masumura, et al., In vivo mutagenesis induced by benzo[a]pyrene instilled into the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen*, In press.
29. T. Nohmi and K. Masumura, Molecular nature of intrachromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Environ Mol Mutagen*, In press.
30. Matsuda, Y., et al. Epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor. Report of a case with inflammatory infiltration. *Pathology, Research and Practice*, in press.
31. Zeng, Y., Matsuda, Y., et al. Lack of significant modifying effect of arctiin on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. *Cancer Letters*, in press.
32. Zeng, Y., Matsuda, Y., et al. Inhibition of Prostate Carcinogenesis in Probasin/SV40 T Antigen Transgenic Rats by Raloxifene, a Selective Estrogen

- Receptor Modulator, but not Nimesulide, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor. Carcinogenesis, in press.
33. Futakuchi, M., Takahashi, S., et al. Suppression of metastasis by nuclear factor KB inhibitors in an *in vivo* lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci., 95: 18-24. 2004.
 34. Orita, S., Takahashi, S., et al. Modifying effects of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) and the novel Synthetic retinoids Re-80, Am-580 and Am-55P in a two-stage carcinogenesis model in female rats. Toxicol. Pathol., 32: 250-257. 2004.
 35. Ogawa, K., Takahashi, S., et al. Malignant solitary fibrous tumor of the meninges. Virchows Arch, 444: 459-464. 2004.
 36. Inaguma, S., Takahashi, S., et al. p-Nonylphenol pretreatment during the late neonatal period has no effect on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. Cancer Lett., 212: 159-166. 2004.
 37. Ohnishi, H., Takahashi, S., et al. Inhibition of cell proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression. Cancer Sci., 95: 936-94. 2004.
 38. Ito A, Takahashi, S., et al. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. Cancer Lett. 219(1):105-12. 2005.