

## 14 指—5 個体レベルでの発がん予知と予防に関する基盤的研究

主任研究者 愛知県がんセンター 立松正衛

### 研究成果の要旨

p53 ノックアウト(KO)マウス、OGG1 KO マウス、Parp-1 KO マウスでは、発がん物質や標的臓器により感受性が異なり、rasH2 マウス、Hras128 ラットでは正常では見られない腫瘍の発生が観察される場合も見られ、遺伝子改変動物を用いた未知の化学物質の評価には十分な注意と検討が必要と考えられた。Dimethylhydrazine と dextran sulfate により大腸がん発生を end point とした短期試験の有効性を示した。ENNG 誘発ラット子宮内膜腺がん系においてホルモン様物質による腫瘍発生修飾効果が検索可能であった。DHPN 投与 p53 KO/gpt トランスジェニックマウスを用い、p53 欠失によるマウス肝での変異の増加が見られた。H. pylori (Hp)感染によりスナネズミ幽門腺細胞 DNA のメチル化が亢進する事を実験的に明らかにした。Hp 感染 N-methyl-N-nitrosourea 誘発スナネズミ腺胃がん系において、cyclooxygenase-2 阻害剤が発がん抑制的に働く事を証明した。リグナン類が Hp 運動能を抑制することを示した。

### 研究者名および所属施設

研究者氏名	所属施設および職名	分担研究課題
立松 正衛	愛知県がんセンター 副所長	個体レベルでの発がん予知と予防の早期判定に関する研究
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授	遺伝子改変動物を用いた発がん性検出
津田 洋幸	名古屋市立大学大学院医学研究科 教授	遺伝子改変ラットを用いた発がん予知の研究
三森 国敏	東京農工大学農学部 教授	短期発がん性試験に用いられる遺伝子改変マウスにおける発がん増強機序に関する研究
広瀬 雅雄	国立医薬品食品衛生研究所 部長	ラット中期大腸がん試験法の開発と応用
森 秀樹	岐阜大学医学部 教授	大腸がんの発生予知とその予防に関する基礎的研究
益谷 美都子	国立がんセンター研究所生化学部 室長	ポリ(ADP-リボース)代謝の異常とがん化との関連
中江 大	(財)佐々木研究所 部長	ラットにおける子宮体部発がんの予知と予防に関する基礎的研究
一瀬 雅夫	和歌山県立医科大学 教授	胃炎進展と発がん、その制御の可能性に関する検討
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 部長	DNA メチル化の進行と胃がん発がんリスク
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究所 室長	個体レベルで見る遺伝子再編成と発がん

## 総括研究報告

### 1 研究目的

化学物質の発がん性は種々の *in vitro* 遺伝毒性試験や *in vivo* 長期発がん性試験により検索されてきた。長期発がん性試験の時間的・経済的欠点を補うため、ラット肝前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P)陽性巢を指標とした中期検索法、あるいは大腸前がん病変である aberrant crypt foci (ACF)や  $\beta$ -catenin accumulated crypts (BCAC)が利用されている。一方、最近の遺伝子工学の進歩に伴い各種の遺伝子改変動物が作成され、個体レベルの発がん性に新しい展開が開かれた。1997 年には、日・米・EU 三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) により「医薬品のがん原性を検出するための試験に関するガイダンス」(ICH ガイダンス)が制定され、2 種のげっ歯類を用いた2年の長期がん原性試験に替わって通常ラットを用いた長期発がん性試験と短期代替発がん試験の提出により、発がん性は評価可能であると変更された。遺伝子改変動物としては、rasH2 トランスジェニック(Tg)マウス、p53 ノックアウト(KO)マウス、Tg.AC (v-Ha-ras) Tg マウス、Xeroderma pigmentosum group A correcting gene (XPA) KO マウスが推奨された。また、一方で、MutaMouse、BigBlue mouse、gpt Tg のように動物体内でおきた遺伝子の点突然変異を大腸菌で選別できるようにデザインされた遺伝子改変動物も考案された。しかし、これらの中短期の代替発がん性試験の利点と限界は明確にされていない。本研究においては、正常動物においては、よく研究されてきた個体レベルの前がん病変を end point とした短・中期検索法に主眼をおき、また、各種遺伝子改変動物においては、腫瘍の早期発生の利点から前がん病変のみならず、腫瘍を end point とした検索を行う。以上の検索法の利点と限界を明確にし、ヒトがんの発生要因となりうる化学物質等の発がん性の予知とその予防を可能にし、得られたデータのヒトへの外挿を目的とした基盤的研究を行う。

### 2 研究成果

#### A. 腫瘍を end point とした各種遺伝子改変動物による発がん性予知と予防の検索

##### (1) p53KO マウス

p53 KO マウス各遺伝子型に1種類の発がん物質で異なる臓器に発がんを誘発する DHPN を投与して発がん感受性と p53 遺伝子変異を検討した。実験 15 週では、20 ppm DHPN 投与群では、(+/+) や(+/-)マウスでは肝血管腫瘍の発生は

見られなかったが、(-/-)マウスにのみ血管腫(6/19=31.6%)、血管肉腫(4/19=21.1%)が発生した。200 ppm 投与群では、血管腫、血管肉腫の発生率は、それぞれ(+/+)が 45% (9/20)、25% (5/20)、(+/-)がいずれも 100% (16/16)と(+/-)の方が有意に高値であった。肺腫瘍は、(-/-)マウスでは 21 例中 5 例(23.8%)の腺がんの発生が認められたのに対して、(+/+) や(+/-)マウスでは、いずれも 32 匹中 1 例の腺腫の発生が見られたのみであった。実験 40 週では、20 ppm 投与群では、血管腫、血管肉腫の発生率は、それぞれ(+/+)マウスでは 7/19 (36.8%)、2/19 (10.5%)であったのに対して、(+/-)マウスではいずれも 14/17 (82.4%)と有意に高率であった。肺腫瘍は(+/-)で増加傾向は示したものの統計学的に有意ではなかった。腫瘍の p53 遺伝子変異を解析したところ血管肉腫では、60% (12/20)に、肺腺がんでは 11.8% (2/17)に変異を認めた。解析可能であった(+/-)マウス腫瘍では全て野生型の allele に変異が認められた(5/5)。(-/-)マウスは、臓器に関わらず発がん性の亢進を認めたが、(+/-)マウスの感受性亢進は、その遺伝子異常による正常 p53 の欠失とよく相関することが明らかとなった。

##### (2) OGG1KO マウス

酸化損傷DNA 障害は、発がん物質の発がん性機序の一つとして重要である。今回、発がん機序を考慮した発がん性検出法の開発を意図して、酸化損傷 DNA 障害により形成される 8-OHdG を修復する OGG1 遺伝子を変異、失活させた OGG1KO マウスを用いて、Phenobarbital (PB)の発がん性試験を試みた。10 週齢の雄性又は雌性、*Mmh/OGG1<sup>-/-</sup>* (40 匹) マウスおよびその野生型である C57BL/6J マウス (*Mmh/OGG1<sup>+/+</sup>*, 40 匹)を 2 群に分け、0 又は 500 ppm の PB を 78 週間投与した。実験開始後 78 週目に全動物を屠殺し、全身諸臓器の病理学的検索を行った。また、免疫組織学的手法を用いて、肝における 8-OHdG、PCNA、アポトーシス、cDNA マイクロアレイを用いて PB で誘導される mRNA 発現のスクリーニングを行った。PB 投与 KO マウスでは肝細胞がんが、野生型では肝細胞腺腫のみが認められた。また、PB を投与した雌性 KO マウスでは、リンパ腫の発現頻度が有意に増加した。KO マウスの肝臓では、PB 投与により、8-OHdG の形成と細胞増殖が有意に増加していた。無処置群において、野生型のマウスでは様々な自然発生腫瘍が認められたのに対し、KO マウスでは、肺腫瘍が非常に低い割合で認められたのみであった。PB 投与により、野生型では腫瘍の形成数、頻度に影響は認められなかったが、ノックアウトマウス

では、総腫瘍の形成数、形成頻度が上昇し、その頻度は雄では 25%、雌では 60%であり、雌については有意であった。無処置の野生型と KO マウスにおける遺伝子の発現の差についてマイクロアレイ法を用いて検討した結果、がん遺伝子、第二相代謝酵素、細胞外マトリクスや細胞骨格形成蛋白、及び成長因子の受容体の発現が有意に減少していた。PB 処置群について同様に比較したところ、KO マウスでは野生型に比べ、オルニチンデカルボキシラーゼの発現が上昇していた。これらの結果から、PB は *Mmh/OGGI*<sup>+</sup> マウスにおいて発がん性を有することが示された。

### (3) *Parp*-IKO マウス

ポリ(ADP-リボース)合成酵素(*Parp*-1)のDNA修復への関与が示唆されている。そこで 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) 及び 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を投与後の *Parp*-IKO マウスの発がん感受性を調べ、さらに *Parp*-1 により合成された poly(ADP-ribose)の分解に関わる主要な酵素であるポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ(*Parg*)KO マウスを樹立し、自然発生腫瘍の発生を検索した。C57BL/6 を遺伝背景とする congenic 系統 *Parp*-1<sup>-/-</sup>、*Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>雄マウス 12 週齢マウス各 20 匹に IQ 300 ppm を 60 週間混餌投与し、発がん感受性を検討した。コントロール群としては同週齢の各遺伝子型マウス各 10 匹を用いた。*Parp*-1<sup>-/-</sup>マウスは、実験期間を通して *Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>マウスより、10%体重が少なかった。肝細胞がんは、*Parp*-1<sup>-/-</sup>、*Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>マウスにおいて各々 5%(1/19 匹)、11%(2/18 匹)、6%(1/17 匹)、肝腺腫は、5%(1/19 匹)、6%(1/18 匹)、18%(3/17 匹)に発生し、これらの病変の発生頻度に遺伝子型間での有意な差は認めなかった。肺腺腫、前胃の乳頭腫、脾腫の発生頻度についても遺伝子型間での差は認めなかった。次に、129Sv/ICR 混合遺伝背景の *Parp*-1<sup>-/-</sup>、*Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>雄マウス 9 週齢を用いてマウス 4NQO 10 ppm を 32 週間、飲水投与後の発がん感受性についても調べた。無処理群各 5 匹において舌、食道、前胃における腫瘍発生は、認めなかった。舌における扁平上皮がんは、*Parp*-1<sup>-/-</sup>、*Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>マウスにおいて各々 9%(1/11 匹)、6%(1/18 匹)、20%(3/15 匹)に、乳頭腫は、各々 9%(1/11 匹)、22%(4/18 匹)、33%(5/15 匹)に各々認め、遺伝子型間での有意差はなかった。食道における扁平上皮がんは、*Parp*-1<sup>-/-</sup>、*Parp*-1<sup>+/-</sup>、及び *Parp*-1<sup>+/+</sup>マウスにおいて各々 9%(1/11 匹)、33%(6/18 匹)、13%(2/15 匹)に、乳頭腫は、各々 82%(9/11 匹)、

72%(13/18 匹)、60%(9/15 匹)に発生し、遺伝子型間での有意差は認めなかった。前胃における扁平上皮がんの発生は、*Parp*-1<sup>+/+</sup>マウスのみ 7%(1/15 匹)にのみ認め、遺伝子型間での有意差はなかった。*Parp*-1 欠損は DHPN や azoxymethane 等のアルキル化剤に誘発される発がんの感受性を亢進させ、高感度であり有用であるが、IQ や 4NQO 等の DNA に大型の付加体を形成する発がん物質によって誘発される発がんの感受性に影響を与えず、それらの発がん性評価には有用でないことが確認された。

### (4) rasH2 マウス

本研究では、発がん性評価における rasH2 マウスの有用性を探るため、既知の遺伝毒性発がん物質を被検物質として発がん感受性の評価を行った。6 週齢、雄の rasH2 マウスおよびその野生型同腹子(non-Tg マウス)に、肝臓、肺、腎臓、甲状腺などを標的とする多臓器発がん物質の DHPN を 26 週間飲水投与した。DHPN の用量により rasH2 マウスでは 0、20、200ppm、non-Tg マウスでは 0、200ppm 投与群を設けた。DHPN200ppm 投与群では rasH2、non-Tg マウスともに 17 週以降死亡例が多発したため、最終解剖を 20 週に繰り上げて実施した。病理組織学的検索の結果、DHPN200ppm 投与群では、両マウスとも肝臓血管肉腫、肺腺腫・腺がん、気管上皮の扁平化が高率に誘発された。rasH2 マウスではこれらの病変に加えて、前胃過形成・乳頭腫、尿道移行上皮過形成・乳頭腫、唾液腺導管乳頭腫・扁平上皮がんの発生も認められた。DHPN20ppm 投与群においても、肺および気管支に高率に同様の病変形成を認めた。以上より、rasH2 マウスでは従来の DHPN 標的臓器だけでなく広い腫瘍スペクトラムを示し、DHPN に対する高い発がん感受性が確認された。また、7 週齢、雌雄の rasH2 マウスおよび non-Tg マウスを用いて、2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ)300ppm を 26 週間混餌投与した。実験期間中、雌雄の rasH2、non-Tg マウスともに、IQ 投与群では顕著な体重増加抑制が認められた。解剖時の肉眼所見では IQ 投与群の rasH2 マウスにおいて、前胃の小結節が雄では 11/22(50%)、雌では 9/18(50%)に認められ、それらは組織学的に乳頭腫あるいは扁平上皮がんであった。以上より、rasH2 マウスでは、IQ の標的は前胃であり、その発がん性を短期間に検出し得ることが示唆された。

### (5) Hras128 ラット

乳腺化学発がん物質に高感受性を示すヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入した Tg ラット(Hras128)を用いて乳腺

腫瘍の発生を指標とした発がん物質短期検索法の検討を行った。7週齢の雌雄 Hras128 ラットに被験物質として、変異原発がん物質である IQ 80 mg/kg、4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 100 mg/kg、acrylamide 100 mg/kg を実験開始時、実験第3および6日目に1日1回、計3回投与し、雌で6週および雄で12週観察した結果、雌の Hras128 ラットの IQ および acrylamide 投与群で肉眼的乳腺腫瘍発生率の増加傾向が見られた。組織学的検索では IQ 投与群の雌 Hras128 ラットで単位面積辺りの腫瘍面積および腺がん発生個数の増加傾向が見られた。また、混餌による連続投与試験として Hras128 ラットに IQ 300ppm を雌で6週、雄で12週与えた結果、雌雄共に肉眼的乳腺腫瘍の発生率の増加傾向がみられ、雌では対照より有意 ( $P<0.05$ ) に増加した。組織学的検査では IQ 投与群の雌 Hras128 ラットで腺がん発生個数の有意な増加および単位面積辺りの腫瘍面積の増加傾向が見られた。以上の結果から、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子のラットでの過剰発現は乳腺において高発がん環境をもたらしており、Hras128 の雌では発がん物質の投与により、6週間以内の短期間で乳腺発がんの発生がみられることがわかった。また、組織学的検索により、腹単径部乳腺で非常に高率に早期がんの発生を確認できることがわかった。これらのことから、Hras128 の腹単径部乳腺を用いた発がん物質の短期間でのスクリーニングの開発が可能であると考えられる。

#### B. 腫瘍を end point とした正常動物による発がん性予知と予防の検索

##### (1) -catenin accumulated crypts (BCAC)を指標とした解析

BCACは、大腸発がんにおける早期病変として注目されている。興味深いことに BCAC や化学発がん物質誘発大腸がんや腺腫に、パネート様細胞の介在が高頻度にみられる事実がある。cryptdin-2 (CR-2)遺伝子プロモーターに diphtheria toxin (DT-A)を結合させ、パネート細胞を強制的に欠損させることの出来る Tg(CR2-tox176 Tg) マウスと FVB/N(Wild) マウスを Washington 大学 Gordon らのグループより入手した。5週令 Tg マウス及び Wild マウスに AOM を 15mg/kg 体重にて週1回5週間腹腔内投与し、AOM 初回投与10週後に全例を屠殺し、aberrant crypt foci (ACF)および BCAC の検索を行った。ACF、BCAC数は、Tg マウスで ACF Male  $35.29 \pm 8.62$ 、Female  $31.57 \pm 6.52$ 、BCAC で Male  $16.86 \pm 5.93$ 、Female  $13.93 \pm 6.26$  であったのに対して、Wild マウス ACF

で Male  $36.15 \pm 4.99$ 、Female  $34.64 \pm 8.83$ 、BCAC Male  $22.54 \pm 13.14$ 、Female  $13.82 \pm 7.39$  であり、群間に有意な差は確認されなかった。マウスの BCAC においては、パネート細胞の関与が少ないことが推測された。

##### (2) ラット中期大腸発がん試験法の確立と応用

大腸発がん物質である 1,2-dimethylhydrazine (DMH) や dextran sulfate sodium (DSS)の組合せ投与により、腫瘍性病変を指標とした中期大腸発がんモデルの確立を試みた。6週齢 F344 雄ラットの5群(各群30匹)に、DMH (40 mg/kg 体重)を1週間に3回皮下投与した後、1% DSS を1週間飲水投与、DSS 投与終了後1週間は蒸留水及び基礎飼料を与えた。第4週より、弱いながら大腸発がんを抑制あるいは促進する perilla oil (10%)、corn oil (10%)、AOM モデルで ACF の発生を促進するが腫瘍発生には明らかな影響のない dextrin (10%)、あるいは DMH/AOM モデルで ACF を抑制、多臓器モデルでは逆に促進するが腫瘍発生には影響がないかあるいは促進すると結果の分かっている indole-3-carbinol (I-3-C; 0.1%)を各群に7及び17週間混餌投与した。基礎飼料のみを与えた群を対照とした。投与終了後、剖検時に大腸を摘出、メチレンブルーにて染色し ACF 数を測定した。さらに大腸組織を短冊状に縦に3分割あるいは結節を全て切出し、常法にて HE 標本作製、病理組織学的検索を行った。第10週において、ACF 数は dextrin 及び I-3-C 群で有意に増加し、perilla oil 及び corn oil 群では対照群との明らかな差を認めなかった。腺がんの発生頻度及び個数は I-3-C 群で有意に増加したが、その他の群では対照群との明らかな差を認めなかった。第20週における ACF 数及び腫瘍性病変の発生頻度、発生数は、いずれの処置群でも対照群との有意差を認めなかったが、I-3-C では腺腫・腺がんの個数がそれぞれ減少・増加、体積が増加する傾向が認められ、本モデルでは一貫して促進する結果が得られた。Dextrin は既知の結果とほぼ一致していたが、perilla oil と corn oil では明らかな修飾作用は観察されなかった。以上より、本モデルは ACF を最終指標とした短期試験法と比較して、修飾作用を鋭敏に検出可能な中期大腸発がん試験法となり得ると考えられた。実験期間としては10週程度が適しており、長期間になると、腫瘍の進展により差が無くなる傾向がみられた。しかし、一部の弱い発がん修飾物質については問題が残されており、今後更に多くの既知の発がん修飾物質での検討が必要である。

##### (3) 子宮内膜がんと修飾因子

子宮内膜腺がんは、生活環境の変化に伴って近年日本でも発生が増加しつつある。Donryu系雌性ラットにENNG投与後、植物性リグナン的一种である hydroxymatairesinol (HMR) を混餌投与したところ、性周期の停止すなわち卵巣機能低下が遅れた結果、子宮内膜腺がんの発生が抑制された。また、ENNG投与後に、エストロゲン様作用を持つ化学物質である *p-tert-octylphenol* を高用量(100 mg/kg 体重)で皮下投与したところ、子宮内膜腺がんの発生が促進された。ENNG投与後に 1-3-C を混餌投与した結果、肝において、CYP1 family に属する薬物代謝酵素が誘導され、4-hydroxyestradiol の産生が促進された結果、子宮内膜腺がんの発生頻度と、子宮内膜の異型過形成と腺がんを併せた総増殖性病変の発生個数が増加した。本モデルは、発がん機構に基づいた化学物質の子宮体部発がん性の予知と予防効果を検出に有用な動物モデルとなり得ることが判明した。エストロゲン受容体の下流のシグナル伝達系に関しては、リン酸化 MAPK kinase (MEK)1/2 蛋白は、異型過形成と腺がんが発現し、MAPK cascade で MEK の下流に位置する ERK1/2 の mRNA およびリン酸化蛋白と同様の傾向を示すことが明らかとなった。従って、これらのエストロゲン関連シグナル伝達系に属する遺伝子の産物は、本モデルの分子病理学的早期指標として有用であるものと考えられた。

### C. 遺伝子改変動物を用いた変異原性の検索

#### (1) 欠失変異および点突然変異の検索

雄  $p53^{-/-}$ 、 $p53^{+/+}$ 、 $p53^{+/+}gpt\ delta$  マウス(各群5匹)に DHPN を 20ppm の濃度で4週間飲水投与し、臓器(肺、肝臓、腎臓)の点突然変異頻度(*gpt* 変異)と欠失変異(*Spi* 変異)を検索した。 $p53^{+/+}$ マウスの *gpt* 突然変異頻度は、DHPN 投与によりいずれの臓器においても上昇し、その頻度は、肺 > 肝臓 > 腎臓の順であった。 $p53^{-/-}$ マウスにおいても DHPN 処理により変異頻度が上昇したが、変異頻度の順は、肺 = 肝臓 > 腎臓であった。DHPN 処理をした  $p53^{+/+}$ マウスと  $p53^{-/-}$ マウスの *gpt* 変異頻度を比較すると、肺と腎臓では差が見られなかったが、肝臓において有意な差を認め  $p53^{-/-}$ マウスが  $p53^{+/+}$ マウスよりも約 2 倍高い突然変異頻度を示した( $13.1 \pm 5.1 \times 10^{-6}$  vs.  $6.1 \pm 3.2 \times 10^{-6}$ ,  $P < 0.02$ )。肺および肝臓では DHPN 処理により G:C から A:T への変異が増大したが、 $p53^{-/-}$ と  $p53^{+/+}$ の間での明確な変異スペクトルの差は認められなかった。 $p53^{-/-}$ マウスと  $p53^{+/+}$ マウスの肝臓で、欠失(*Spi*) 変異を検索したが、いずれのマウスでも DHPN による変異頻度の増大は観察されなかった。以上の結果より、 $p53$  の変異抑制作用には臓器

特異性があり、肝臓において DHPN の変異誘発を抑制していることが示唆された。

### D. 発がんにおける遺伝子発現及び変異のメカニズム

異常なDNAメチル化は、がん抑制遺伝子遺伝子の不活化や、ゲノム不安定性の誘導を通じて、発がんに関与していると考えられている。ヒト胃がんでも、*hMLH1*、*p16*、*CDH1*、*RUNX3*、*LOX*等のがん抑制遺伝子のメチル化が認められている。CpG 部位のDNAメチル化の誘発因子としては、加齢、潰瘍性大腸炎、慢性肝炎、喫煙、ウイルス感染等が知られるのみである。一方、*Helicobacter pylori* (Hp)の感染は胃がんのリスクファクターとして知られ、慢性炎症であるという点で潰瘍性大腸炎、慢性肝炎と共通する。本研究では、スナネズミを用いて、Hp感染がDNAメチル化異常を誘発するか否かを検討した。Hp感染後50週のスナネズミ5匹、及び年齢をマッチさせた非感染スナネズミ3匹の腺胃から、腺管を分離した。分離腺管からDNAを抽出、3種類の制限酵素を用いて methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を行い、合計288個のクローンを解析した。スナネズミについては、ゲノム配列が利用可能でないため、CpG部位に富むクローンを選別、マウスあるいはラットゲノム配列との相同性を検索した。MS-RDA解析の結果、288個のうち、152個が独立、49個がCpGアイランド様配列を持っていた。これらのうち、マウスゲノム配列と相同性をもつものが31個、ラットゲノム配列と相同性をもつものが1個、ヒトゲノム配列と相同性をもつものが2個であった。Methylation specific PCR法により、Hp感染スナネズミ10匹、非感染スナネズミ3匹について、メチル化状態を検討した。20個のCpGアイランド様配列は、Hp感染群の胃腺管でのみメチル化されている、または、メチル化の程度が強いことが示された。以上より、Hpの慢性感染により、胃腺管にメチル化が誘導されることが示され、発がんとの関係が示唆された。

### E. ヒト胃がんの予防のための基礎データの集積

#### (1) 選択的COX-2阻害剤によるスナネズミ腺胃発がん抑制

Hp感染に伴う慢性胃炎から胃がん発生に至る一連の過程において、cyclooxygenase (COX)-2の発現が上昇していることが示されておる。COX-2に関しては、これまでの検討により、大腸がんをはじめとする多くのがんでの発現が亢進し、NSAIDsや選択的COX-2阻害剤投与が大腸がんの化学予防に有効であると報告されてきている。本研究では、Hp感染による慢性胃炎を背景とした胃の発がん過程において選択的COX-2阻害剤が発がん抑制に対し有効であるか否かを検証するために、Hp感染ス

ナネズミを用いたN-methyl-N-nitroso-urea(MNU)投与胃発がん系を用いて、選択的COX-2阻害剤(etodolac)投与を行い、がんの発生におけるCOX-2の役割について検討した。その結果、i) Hp感染スナネズミ胃発がんモデルにおいてetodolac は用量依存性に胃発がん抑制効果を示した。ii) etodolac高用量投与群において、Hp抗体価の有意な低下を認めた。炎症の程度や腸上皮化生の発生率は有意な差を認めなかった。DNAの酸化的ストレスの指標である血清8-OHdG値はetodolac投与にて有意な変化を示さず、酸化的ストレスによる遺伝子損傷の程度はetodolac投与にて有意には変化しないと考えられた。iv)PCNA免疫染色の結果からetodolac高用量投与群では細胞増殖が抑制されていることが示された。選択的COX-2阻害剤による胃発がん抑制は、血清Hp抗体価、組織学的炎症及び腸上皮化生の程度、血清8-OHdG値等の検討から考えると、その抑制の機序としては、プロモーション過程への関与が主であると考えられた。以上より、COX-2は本邦胃がん発症のメインルートであるHp感染に起因する慢性炎症を基盤とする発がん過程における Key molecule であると考えられた。胃がん発生制御の上でCOX-2を標的とする戦略の合理性が強く示唆された。

### (2) 植物由来リグナンによる抗 Hp 作用

Hp は、慢性萎縮性胃炎や胃がん発生に重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、胃がん予防のために、Hp を標的とした化学予防剤の開発が期待される。ウメエキスが Hp 運動能を抑制することから、エキス中に含まれる化学物質として、種々のリグナン類による H. pylori 運動能と増殖能を比較検討した。リグナン類には、ジアリルブタン型、ジオキササイクロオクタン型等多くの種類の種類が存在し、ある種のリグナンは、ウメエキス中のものより、強力に H. pylori 運動能を抑制し、増殖阻止に働くものもあった。活性と構造を比較検討すると、基本骨格に結合する側鎖の構造と位置により、その活性が左右されることが明らかとなった。

### 3. 倫理面への配慮

動物は必要最小限の頭数を用いるよう十分な準備を行ったうえで開始し、各施設の実験動物取り扱い規定、米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに準拠して実験を実施した。ヒトの材料についてはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、各施設倫理委員会の了承のもと、informed consent を得て施行し、個人情報 は厳重な管理下においた。

### 研究成果の刊行発表

#### 外国語論文

1. Inada, K., Tatematsu, M. et al., Paneth type gastric cancer cells exhibit expression of human defensin-5. *Histopathology*, in press.
2. Ogasawara, N., Tatematsu, M. et al., Frequent c-Kit Gene Mutations Not Only in Gastrointestinal Stromal Tumors but also in Interstitial Cells of Cajal in Surrounding Normal Mucosa. *Cancer Lett.*, in press.
3. Tsukamoto, T., Tatematsu, M. et al., Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology*, in press.
4. Iidaka, T., Tatematsu, M. et al., Lack of elevated liver carcinogenicity of aminophenylnorharman in p53-deficient mice. *Cancer Lett*, 217: 149-159, 2005.
5. Otsuka, T., Tatematsu, M. et al., Coexistence of gastric and intestinal type endocrine cells in gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia of the human stomach. *Pathol Int*, 55: 170-179, 2005.
6. Tatematsu, M. et al., Role of Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis: the origin of gastric cancers and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. *Helicobacter*, 10: 97-106, 2005.
7. Cao, X., Tatematsu, M. et al., Beta-catenin gene alteration in glandular stomach adenocarcinomas in N-methyl-N-nitrosourea-treated and Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci*, 95: 487-490, 2004.
8. Cao, X., Tatematsu, M. et al., Eradication of Helicobacter pylori induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci*, 95: 872-877, 2004.
9. Hirata, A., Tatematsu, M. et al., Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells. *J Histochem Cytochem*, 52: 1503-1509, 2004.
10. Matsumoto, K., Tatematsu, M. et al., Cdx2 expression in pancreatic tumors: Relationship with prognosis of invasive ductal carcinomas. *Oncol Rep*, 12: 1239-1243, 2004.
11. Mizoshita, T., Tatematsu, M. et al., Immunohistochemically detectable Cdx2 is present in intestinal phenotypic elements in early gastric cancers of both differentiated and undifferentiated types, with no correlation to non-neoplastic surrounding mucosa. *Pathol Int*, 54: 392-400, 2004.
12. Tsukamoto, T., Tatematsu, M. et al., Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 135-145, 2004.
13. Hoshi, M., Fukushima, S. et al., Carcinogenic potential

- of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 17: 17-23, 2004.
14. 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.
  15. 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<sup>+/-</sup> and p53<sup>+/+</sup> mice. *Anticancer Res.*, 24: 785-790, 2004.
  16. Sukata, T., Fukushima, S. et al.,  $\alpha_2$ -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.
  17. Ichihara, T., Fukushima, S. et al., Induction of DNA-adducts and increase of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, but no development of preneoplastic lesions in offspring liver with transplacental and trans-breast milk exposure to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in rats. *Cancer Sci.*, 95: 943-948, 2004.
  18. Hamaguchi, T., Tsuda, H. et al., Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 43-56, 2004.
  19. Park, C.B., Tsuda, H. et al., 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.
  20. Naito, A., Tsuda, H. et al., 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.
  21. Fukamachi, K., Tsuda, H. et al., 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.
  22. Fukushima, S., Tsuda, H. et al., Existence of a Threshold for Induction of Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon with Low Doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol. Sci.* 80: 109-114, 2004.
  23. Tsuda, H., et al., Cancer Prevention by Natural Compounds. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19: 245-263, 2004.
  24. Fujita, K., Tsuda, H. et al. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett.*, 15:213(1) 21-29, 2004.
  25. Okamura, M., Mitsumori, K. et al., Carcinogenic susceptibility to *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) in rasH2 mice. *Toxicol. Pathol.*, 32: 474-481, 2004.
  26. Okamura, M., Mitsumori, K. et al., Possible mechanisms underlying the testicular toxicity of oxfendazole in rats. *Toxicol. Pathol.*, 32: 1-8, 2004.
  27. Okamura, M., Mitsumori, K. et al., Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Arch. Toxicol.*, 78: 688-696, 2004.
  28. Watanabe, T., Mitsumori, K. et al., Analysis of gene expression profile on uterine tumorigenesis initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea and inhibited by ethynylestradiol in rasH2 mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 17: 155-164, 2004.
  29. Hayashi, M., Mitsumori, K. et al., Inhibitory effects of KAT-681, a liver-selective thyromimetic, on development of hepatocellular proliferative lesions in rats induced by 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy after diethylnitrosamine initiation. *Arch. Toxicol.*, 78: 460-466, 2004.
  30. Moto, M., Mitsumori, K. et al., Molecular pathological analysis on the mechanism of liver carcinogenesis in dicyclanil-treated mice. *Toxicology*, 207: 419-436, 2005.
  31. Arimura, T., Hirose, M., et al., A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 279 : 6746-6752, 2004.
  32. Hasumura, M., Hirose, M., et al., Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.*, 42 : 439-444, 2004.
  33. Takizawa, T., Hirose, M., et al., Sequential analysis of testicular lesions and related serum hormone levels in rats treated with a *Psolarea Corylifolia* extract. *Fd. Chem. Toxicol.*, 42 : 1-7, 2004.
  34. Masutomi, N., Hirose, M., et al., Dietary influence on the impact of ethynylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure. *Reprod. Toxicol.*, 18 : 23-33, 2004.
  35. Lee, K-Y., Hirose, M., et al., Subchronic toxicity study of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 42 : 687-695, 2004.
  36. Orita, S., Hirose, M., et al., Modifying effects of 1'-acetoxychavicol acetate 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.
  37. Masutomi, N., Hirose, M., et al., Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch. Toxicol.*, 78 : 232-240, 2004.
  38. Umemura, T., Hirose, M., et al., Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate. *Cancer Sci.*, 95 : 393-398, 2004.
  39. Imai, T., Hirose, M., et al., Sequential analysis of

- development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in inflammatory capsular lesions of rats treated with sulfadimethoxine after N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Toxicol. Pathol*, 32 : 229-236, 2004.
40. Takagi, H., Hirose, M., et al., Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem*, 52 : 903-913, 2004.
  41. Son, H-Y., Hirose, M., et al., Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Pathol*, 32 : 338-344, 2004.
  42. Takagi, H., Hirose, M., et al., Lack of modifying effect of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. *Reprod. Toxicol*, 18 : 687-700, 2004.
  43. Kato, N., Hirose, M., et al., Gene expression profile in the livers of rats orally administered ethinylestradiol for 28 days using a microarray technique. *Toxicology*, 200 : 179-192, 2004.
  44. Chang, J-S., Hirose, M., et al., Lee K-R, Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziol A<sub>9</sub>, isolated from *Hypsizigus marmoreus*. *Cancer Lett*, 212 : 7-14, 2004.
  45. Takizawa, T., Hirose, M., et al., Enhancement of hepatocarcinogenesis by kojic acid in rat two-stage models after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine or N-diethylnitrosamine. *Toxicol. Sci*, 81 : 43-49, 2004.
  46. Lee, K-Y., Hirose, M., et al., Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*, 203: 221-238, 2004.
  47. Nishikawa, A., Hirose, M., et al., Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 4: 267-283, 2004.
  48. Nishikawa, A., Hirose, M., et al., Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. *Current Drug Metabolism*, 5 : 363-373, 2004.
  49. Takagi, H., Hirose, M., et al., Tumor-initiating activity of phenylethyl isothiocyanate by promotion with sodium L-ascorbate in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis model. *Cancer Lett*, 219: 147-153, 2005.
  50. Kanki, K., Hirose, M., et al., Specific *in vivo* mutational analysis of the hepatocarcinogens IQ, NPYR and DEHP using *gpt* delta transgenic rats. *Molecular Carcinog*, 42: 9-17, 2005.
  51. Shibutani, M., Hirose, M., et al., Down regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology*, 208: 35-48, 2005.
  52. Imai, T., Hirose, M., et al., Development of invasive follicular cell carcinomas in a rat thyroid carcinogenesis model: Biological impact of capsular inflammation and reduced cyclooxygenase-2 expression. *Cancer Sci*, 96:31-37, 2005.
  53. Ueda, M., Hirose, M., et al., Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Cancer Sci*, 96: 19-25, 2005.
  54. Nishikawa, A., Hirose, M., et al., Induction of colon tumors in C57BL/6Jmice fed MeIQx, IQ or PhIP followed by dextran sulfate sodium treatment. *Toxicol Sci*. 2005.
  55. Ichihara, T., Hirose, M., et al., Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrol when given with NaNO<sub>2</sub> in the rat. *Toxicol Sci*, 30: 1-6, 2005.
  56. Takagi, H., Hirose, M., et al., Impact of maternal dietary exposure to endocrine acting chemicals on the progesterone receptor expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, in press.
  57. Umemura, T., Hirose, M., et al., Nine-week detection of pulmonary carcinogenicities of six genotoxic lung carcinogens using the rasH2/BHT mouse model. *Cancer Lett*. 2005, in press.
  58. Imai, T., Hirose, M., et al., Enhancement of acrylamide of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumor development – possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2005, in press.
  59. Lee, K-Y., Hirose, M., et al., Chemoprevention study of acrylamide-induced neuro- and testicular toxicities using rats with effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate. *Arch Toxicol*, 2005, in press.
  60. Kitamura, Y., Hirose, M., et al., Lack of chemopreventive effects of  $\alpha$ -eleostearic acid on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary and colon carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Fd. Chem. Toxicol*, 2005, in press.
  61. Takagi, H., Hirose, M., et al., Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch. Toxicol*, 2005, in press.
  62. Masutomi, N., Hirose, M., et al., Effects of soy-free diet on the rat endocrine/reproductive systems of offspring perinatal and maternally exposed to ethinyl estradiol by feeding. *Toxicol. Pathol*, 2005, in press.
  63. Hirose, Y., Mori, H. et al., Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis*.25:821-5, 2004.
  64. Hata, K., Mori, H. et al., Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.*, 95:316-20, 2004
  65. Mori, H. et al., Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutat Res.*, 566:191-208, 2004.
  66. Ogino, H., Masutani, M. et al., Stability of centrosome

- numbers in *poly(Adp-ribose) polymerase-1*- and *poly(ADP-ribose) glycohydrolase*-deficient mouse ES cells. Proc. Japan Acad., Ser. B 80: 290-294, 2004.
67. Masutani M., et al. Role of poly-ADP-ribosylation in Cancer Development. In: Poly(ADP-Ribosyl)ation, edited by Buerkle A. Eurekah.com., Georgetown in press.
  68. Watanabe F., Masutani M., Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response. Biochem. Biophys. Res. Commun., 319: 596-602, 2004.
  69. Lan, L., Masutani, M., et al., *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 101:13738-13743, 2004.
  70. Shibata A, Masutani M. et al., *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. Oncogene, 24:1328-1337, 2005.
  71. Shiokawa, M., Masutani, M., et al., Genetic alteration of *poly(ADP-ribose) polymerase-1* in human germ cell tumors. Jpn. J. Clin. Oncol., 35:97-102, 2005.
  72. Masutani, M., Nakagama, H., et al., PolyADP-ribosylation in relation to cancer and auto-immune diseases, CMLS, Cell. Mol. Life Sci., in press.
  73. Yoshida, M., Nakae, D., et al., Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism. Carcinogenesis, 25: 2257-2264, 2004.
  74. Katsuda, S., Nakae, D., et al., Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats. Exp. Biol. Med., 229: 417-424, 2004.
  75. Takahashi, M., Nakae, D., et al., Effects of estrogens and metabolites on endometrial carcinogenesis in young adult mice initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. Cancer Lett., 211: 1-9, 2004.
  76. Nakae, D., et al., Inhibition of the development of hepatocellular carcinomas by phenyl *N*-*tert*-butyl nitron in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. Cancer Lett., 206: 1-13, 2004.
  77. Yoshida, M., Nakae, D., et al., Lack of toxicity or carcinogenicity of S-170, a sucrose fatty acid ester, in F344 rats. Food Chem. Toxicol., 42: 667-676, 2004.
  78. Uematsu, F., Nakae, D., et al., *N*-Naphthylisothiocyanate induces intrahepatic bile duct with greater proliferation in female rats than in males. J. Toxicol. Pathol., 17: 205-210, 2004.
  79. Shimomoto, T., Nakae, D., et al., A case report of a choroid plexus carcinoma spontaneously occurring in the right lateral ventricle. Toxicol. Pathol., 32: 1-5, 2004.
  80. Fukushima, S., Nakae, D., et al., Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. Toxicol. Sci., 80: 109-114, 2004.
  81. Ichihara, T., Nakae, D., et al., Induction of DNA-adducts and increase of 8-hydroxydeoxyguanosine, but no development of preneoplastic lesions in offspring liver with transplacental and trans-breast milk exposure to 2-amino-3,6-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in rats. Cancer Sci., 95: 943-948, 2004.
  82. Nakae, D., Cellular alterations induced by reactive oxygen and/or nitrogen oxide species-induced stress (RONOSS), possible "preneoplastic" lesions. In: Comprehensive Pathology of Preneoplasia (Eds., Tsuda, H., Moore, M.A.), South Shield-Bangkok, Asian Pacific Education Health Press: 2005, in press.
  83. Nakae, D., Recent topics for basic researches on the liver cancer. In: New Perspectives in Cancer Research and Therapy (Eds., Kuriyama, S., Yoshiji, H.), Trivandrum, Research Signpost, TC: 2005, in press.
  84. Yanaoka K, Ichinose M. et al., Seronegative Alpha-Fetoprotein-Producing Gastric Cancer- An Early Form of Aggressive Cancer. Internal Medicine 43: 889-890, 2004.
  85. Ohata H, Ichinose M. et al., Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. International Journal of Cancer 109: 138-143, 2004.
  86. Kakushima N, Ichinose M. et al., An usual case of polypoid angiodysplasia. Endoscopy 36: 1, 2004.
  87. Yahagi N, Ichinose M. et al., Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer using the tip of an electrosurgical snare (Thin type). Digestive Endoscopy 16: 34-38, 2004.
  88. Fujishiro M, Ichinose M. et al., Comparison of various submucosal injection solutios for maintaining mucosal elevation during endoscopic mucosal resection. Endoscopy 36:579-583, 2004.
  89. Fujishiro M, Ichinose M. et al., Different mixtures of sodium hyaluronate and their ability to create submucosal fluid cushions for endoscopic mucosal resection. Endoscopy 36:854-589, 2004.
  90. Nakata H, Ichinose M. et al., Immunological rapid ureasae test using monoclonal antibody for *Helicobacr pylori*. Journal of Hepatogastroenterology 19: 970-974, 2004.
  91. Fukushima Y, Ichinose M. et al., Unique roles of G protein-coupled histamine H2 and gastrin receptors in growth and differentiation of gastric mucosa. European Journal of Pharmacology 502: 243-252, 2004.
  92. Kaneda, A., Ushijima, T., et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. Cancer Sci, 95: 58-64, 2004.
  93. Yamashita, S., Ushijima, T., et al. Persistence of gene expression changes in stomach mucosae induced by short-term *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine treatment and their presence in stomach cancers. Mutat Res, 549: 185-193, 2004.
  94. Furuta, J., Ushijima, T., et al. Promoter Methylation Profiling of 30 Genes in Human Malignant Melanoma. Cancer Sci, 95: 962-968, 2004.
  95. Furuta J, Ushijima T., et al. Silencing of the

- Thrombomodulin* gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res.*, 15: 15-20, 2005.
96. Kim, S.-R., Nohmi, T. et al., Light-dependent mutagenesis by benzo[*a*]pyrene is mediated via oxidative DNA damage. *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
  97. Nohmi, T., Masumura, K., Molecular natural of intra-chromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
  98. Hashimoto, A., Nohmi, T. et al., *in vivo* mutagenesis caused by benzo[*a*]pyrene instilled into the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
  99. Shibata, A., Nohmi, T. et al., *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*, 24: 1328-1337.
  100. Kanki, K., Nohmi, T. 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, 2005.
  101. Kim, S.-R., Nohmi, T. et al., Suppression of chemically-induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human *OGG1* gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase. *Mutat. Res.*, 554: 365-374, 2004.
  102. Shibata, A., Nohmi, T. 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. *Env. Mol. Mutagen.*, 43: 204-207, 2004.
  103. Nohmi, T., Masumura, K., *gpt* delta transgenic mouse: a novel approach for molecular dissection of deletion mutations *in vivo*. *Advances in Biophysics*, 38: 97-121, 2004.