

16指 - 1 ヒトがん発生に係わる環境要因及び感受性要因に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 若 林 敬 二

研究成果の要旨

高脂血症が大腸発がんに促進的に影響することを示唆した。多環芳香族炭化水素特異的に高感受性のAmesテスター株を作製した。胆汁酸のヒストンH3への付加部位を決定した。炎症細胞由来活性酸素が、がんの進展に重要であることをgp91^{phox}遺伝子欠損マウスを用いて示した。C型肝炎ウイルス感染患者の肝細胞で8-ニトログアニンが生成されることを示した。大腸前がん病変としてのMDF (mucin depleted foci)の重要性を明らかにした。作用機序の異なるPhIPとAOMの併用により、浸潤性の進展様式を示す大腸がんが誘発されることを見出した。膵発がんモデルにおける膵液の変異原性解析では、胆汁酸および関連物質が内因性膵管発がん物質である可能性が示された。種々のヒト細胞の2本鎖DNA切断修復活性を比較評価できる測定系を確立した。マウス肺腫瘍形成モデルではCYP2A6の活性阻害が肺発がんを予防することを示した。前立腺がんの76%でメチル化しているNTRK2遺伝子を同定した。胃壁での増殖から腹膜播種形成までを定量的に継続観察できるヒト胃がん腹膜播種マウスモデルを作製した。

研究者名および所属施設

研究者名		所属施設および職名		分担研究課題
若 林 敬 二		国立がんセンター研究所	副所長	消化器発がんの要因の検索 生体内酸素ラジカル生成の評価と発がんへの関与
山 本 順 寛		東京工科大学バイオニクス学部	教授	突然変異を指標とした変異原・がん原性の検索系の開発に関する研究
山 田 雅 巳		国立医薬品食品衛生研究所	主任研究官	ヘテロサイクリックアミンのヒト曝露量の測定 胆汁酸と大腸発がんとの関連性 胆汁酸によるDNA損傷及び組織損傷の解析
片岡 洋 行		就実大学薬学部	教授	プロテオミクス手法を用いる胆汁酸によるDNA損傷及び組織損傷の解析
梅本 淳		徳島大学医学部	助教授	トロトラスト症病理試料の収集・整理および分子病理学的解析
眞野 成 康		東北大学大学院薬学研究科	助教授	炎症による発がん機構とその阻止
清 水 隆	*1	東北大学大学院加齢医学研究所	助手	炎症による発がん促進機序に関する研究
桑 原 義 和	*2	東北大学大学院加齢医学研究所	助手	環境因子による活性酸素種と活性窒素種を介したDNA損傷機構の解明
岡 田 太	*3	北海道大学遺伝子病制御研究所	助手	
	*4	山形大学大学院医学系研究科	助教授	
立 道 昌 幸		東邦大学医学部	助手	
川 西 正 祐		三重大学医学部	教授	

16指 - 1 ヒトがん発生に係わる環境要因及び感受性要因に関する研究

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中 釜 齊	国立がんセンター研究所生化学部 部長	P・hIP誘発大腸がんモデルを用いた発がん修飾要因の 解析
堤 雅弘	*5 奈良県立医科大学附属がんセンタ ー 助教授	膵がんの発生に係わる内因性及び環境要因に関する研究
白井 智之	*6 同 所 博士研究員 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授	ラット前立腺がん発生に関わる要因の解析
服部 隆則	滋賀医科大学病理学 教授	上部消化管における十二指腸液逆流の発がんに対する影 響
吉見 直己	琉球大学医学部 教授	胆嚢がんモデルとしてのerbB2遺伝子導入マウスの解 析
甲野 裕之	*7 金沢医科大学腫瘍病理学（病理学 1） 講師	ヘテロサイクリックアミンによる大腸、乳腺発がん発 がん抑制物質の検索
今井田 克己	*8 同 所 助教授 香川大学医学部 教授	肺腺がん発生における環境要因の検討
島田 義也	放射線医学総合研究所 低線量生体影響プロジェクトリーダー	P・hIPによるラット乳腺発がん機構の解析
豊國 伸哉	京都大学大学院医学研究科 助教授	発がん過程における酸素ラジカルの意義に関する研究
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科 助教授	発がん物質の低用量発がんに関する要因
横田 淳	国立がんセンター研究所生物学部 部長	発がん感受性に関与する遺伝子に関する研究
鎌滝 哲也	北海道大学大学院薬学研究科 教授	遺伝子多型と発がん
渡邊 昌俊	横浜国立大学大学院工学研究院 教授	遺伝子多型と発がんに関連する研究
山添 康	東北大学大学院薬学研究科 助教授	薬物代謝酵素誘導の感受性要因の解明
森下 由紀雄	筑波大学臨床医学系病理学 助教授	肺腺がんおよびその背景病変の病理とがん発生要因の 関係についての解析
金井 弥栄	国立がんセンター研究所病理部 部長	ヒト多段階発がん早期におけるDNAメチル化の変化
柳原 五吉	国立がんセンター研究所 実験動物管理室 省令室長	スキルス胃がんの発生に関わる因子の検索
(班 友) 田 畑 泉	独立行政法人 国立健康・栄養研 究所健康増進研究部 部長	大腸がんの予防に対する身体運動・トレーニングの効果に関 する研究

- *1：平成16年4月1日～平成16年12月31日
- *2：平成17年1月1日～平成17年3月31日
- *3：平成16年4月1日～平成16年6月30日
- *4：平成16年7月1日～平成17年3月31日
- *5：平成16年4月1日～平成16年9月30日
- *6：平成16年10月1日～平成17年3月31日
- *7：平成16年4月1日～平成16年4月30日
- *8：平成16年5月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

がんは遺伝子の病気であり、その発生には多くの遺伝子変化が関与している。がん発生の原因となる遺伝子変化を引き起こすものには、多くの外的及び内的要因があり、中でも喫煙、食事性因子及び感染症が大きな役割を果たしていることが指摘されている。これら要因に加えて遺伝的背景も発がんに多大な影響を及ぼしている。しかしながら、どのような変異原・がん原物質がヒトのがん関連遺伝子の変異や発現異常に関与しているかについてはほとんど判っていない。又、発がん感受性因子も十分には解明されていない。本研究においては専門分野を異にする多数の研究者が参加して1) 発がんに係わる外因性・内因性要因の検索、2) 実験動物モデルを用いた発がん要因の解析、3) 発がんに係わる感受性要因の検索の課題で小班を構成して研究し、ヒトのがん発生に係わる原因物質及び感受性要因の解明を目指す。各研究者が各自の専門領域の研究を推進するのに加え、研究者間で情報を共有し、共同研究に積極的に取り組み、ヒトのがんの発生要因を総合的に把握し、最終的にはヒトのがんの第一次予防推進の為に基礎的研究成果をあげることが目的とする。

2 研究成果

A：発がんに係わる外因性・内因性要因の検索

早期より肥満とともに高脂血症を呈する2型糖尿病モデル動物であるOLETFラットを用い、大腸発がんに対する高脂血症／糖尿病の影響を、アゾキシメタン(AOM)誘発大腸アベラントクリプトフォーサイ(ACF)を指標として検討した。その結果、OLETFラットではコントロールのLETOラットに比べ、AOM誘発ACFの発生数が約1.8倍多く、平均サイズも大きかった。また、血中脂質レベルもOLETFラットの方が高く、このことがACFの形成と増殖の促進に関与している可能性が考えられた。

O-アセチル転移酵素の欠損株(TA1538 1,8-DNP株)に、ヒトの代謝酵素CYP1A1およびY-ファミリーDNAポリメラーゼpol IVを導入したAmesテスター株(YG5179)を作製した。この株では、1,8-dinitropyrene、Glu-P-1の変異原性は検出されず、benzo[a]pyrene、10-azabenz[a]pyreneなど多環芳香族炭化水素が特異的に、かつ、低用量で高い変異原性を示した。環境中の変異原物質を検索する際、YG5179株が多環芳香族炭化水素のスクリーニングに利用できる可能性が示唆された。

強力な変異原性や発がん性を有するヘテロサイクリックアミン(HCA)の生体曝露要因として、加熱食品中の結合型HCAに着目して分析した。焼魚の高分子画分を酸加水分解したところ、PhIPが高濃度で検出され、調理中に結合型PhIPが形成されていることがわかった。様々な焼肉や焼魚などに結合型PhIPがng/gレベルで存在しており、加熱時間により遊離型及び結合型の存在比が変わった。HCAの生体曝露は主として調理食品中の遊離型HCA摂取によるものと考えられていたが、本研究で確認された焼肉や焼魚などに含まれる結合型HCAも発がんリスクを評価する上で重要な要因になるものと考えられる。

胆汁酸レセプターFXRが胆汁酸による大腸がん過程の修飾に関与しているかどうかを、FXRのノックアウトマウスを用いて検討した。大腸発がん物質であるDimethylhydrazineによる長期発がん実験を行った結果、雄のFXRノックアウトマウスのコントロール食餌群及び0.4%ケノデオキシコール酸投与群における腫瘍発生個数は、野生型マウスに比較して抑制された。一方、雌において

はこのような傾向は見られなかった。ケノデオキシコール酸がFXRを介して大腸がんを促進している可能性が示唆された。胆汁酸がアシルアデニレート（DCA-AMP）を介して不可逆的にヒストンに結合することが、大腸がん発症のプロモーター作用と関連するとの仮説に立ち、非酵素的な付加体生成につき検討を進めてきた。これまでに、ヒストンH3にデオキシコール酸アデニレート（DCA-AMP）を作用させると、非酵素的に反応が進行することが明らかになった。そこで今回、nano-ESI-MS/MSを用いてデオキシコール酸（DCA）の付加部位を解析した。その結果、N末端から4、14、23、37、56、64、79、122番目の計8箇所のリジン残基にDCAが付加していることが判明した。また、DCA-AMPとヒストンH3が非酵素的に反応し、ヒストンH3の最もN末端よりのLys4において付加反応が優先することが明らかとなった。

トロトラスト症がんは、放射線被曝による代表的な医原病の一つである。ヒト放射線発がんの機構解明のため、合計約240例のトロトラスト症に関して、組織パラフィンブロック及び剖検記録の収集を行った。組織所見を検討した症例は男131、女13例であり、各腫瘍の頻度は、肝細胞がん：肝内胆管がん：血管肉腫＝21：37：30であり、複合腫瘍3、腫瘍なし48例であった。一般の血管肉腫の頻度を考えると、血管肉腫はトロトラスト発がんの指標腫瘍であることは明らかである。LOH解析による胆管細胞がんとの比較から、血管肉腫では直接の放射線被曝の影響が強いと考えられた。

炎症細胞の活性酸素生成に必須な酵素であるシトクロームb558を構成するgp91^{phox}遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウスを用い、炎症細胞由来活性酸素のがん化およびプログレッション過程における役割を解析した。マウス線維肉腫細胞のがん化およびプログレッションが、異物（ゼラチンスポンジなど）の移入により誘発される炎症を介して起きる動物モデルにおいて、マウス線維肉腫QR-32の皮下増殖性ならびに転移頻度は、野生型マウスに比べgp91^{phox}マウスにおいていずれも低下していた。gp91^{phox}マウスにおける皮下増殖性ならびに転移頻度

は、野生型マウスから得た炎症細胞をgp91^{phox}マウスの腫瘍局所に存在させることで回復したが、gp91^{phox}マウスから得た細胞では回復しなかった。さらに、gp91^{phox}マウスに増殖するがん細胞には、本モデルにおける転移能獲得の責任遺伝子であるサイモシンβ4の発現亢進が起こらないことを見いだした。これらのことより、プログレッションに伴う遺伝子変化は、腫瘍組織内に浸潤する炎症細胞由来の活性酸素によって起きることが明らかになった。

炎症—発がんに関連の深い胃がんとiNOSのプロモーター領域の多型との関連について検討した。iNOSのpromoter領域の(CCTTT)TRNPとiNOSを誘導するIL-1βのpromoter領域の多型、特に、C-31Tと胃がんについて症例—対照研究（胃がん158例、対照181例）を実施した。CCTTTの繰り返し数が12以下のものをshort form (S)（iNOS低発現）、13以上のものをlong form (L)（iNOS高発現）として解析した結果、男性ならびにびまん型胃がんに関しては有意な関連は認めなかったが、女性の腸型胃がんについては、S/Sに対してLのアレルを持つ者(L/L+L/S)のodds比(95%CI)は3.3(1.2-9.1)であった。さらにIL-1β-31の多型をあわせた解析では、サンプルサイズの関係で統計的に有意ではなかったが、long formアレルを持つ者でIL-1β-31T（高発現）の者はS/S+IL-1β-31C（低発現）の者に対してodds比は5.9(0.7-50.0)であった。これらの結果より、女性においてiNOSの発現は胃がんリスクと関連がある可能性が示唆された。また、p53欠損マウスに自然発生する繊維肉腫に関する基礎検討を行った。p53ヘテロ欠損マウスに異物（プラスチック板plt(+)）を皮下に挿入して慢性炎症を惹起させた結果、plt周囲の組織にiNOSの発現を認め、なおかつ、繊維肉腫は全てplt周囲に発生した。累積腫瘍発生曲線を求めたところ、炎症[plt(+)]は著明に腫瘍発生時間を短縮させるとともに、発生頻度を増大させることがわかった。

8-ニトログアニンは活性窒素種により生成されるDNA損傷塩基であり、突然変異を起こして発がんに関与すると考えられる。そこで、極めて高感度で特異性の高い抗

8-ニトログアニン抗体を生成し、種々の感染症における8-ニトログアニン生成およびその発がんにおける役割について解析した。その結果、胆管がんを起こすタイ肝吸虫に感染したハムスターの肝内胆管上皮に、8-ニトログアニンが生成されることを明らかにした。胆管上皮細胞における iNOS の発現は長期に観察され、反復感染で強く発現した。また、胃がんを起こす *Helicobacter pylori* / 感染胃炎患者の胃粘膜生検標本の上皮細胞、及び、肝細胞がんを起こす C 型肝炎ウイルス感染患者の生検標本の肝細胞で8-ニトログアニンが強く生成されることを明らかにした。さらに、肝細胞の細胞質において iNOS の発現が観察された。炎症のバイオマーカーである3-ニトロチロシンの生成も肝組織中で認められた。以上の結果から、異なる病原体の感染において共通して、肝内胆管上皮、胃粘膜上皮、肝細胞のようながん好発部位で発現する iNOS により生じる NO が発がんに先駆けて8-ニトログアニンを生成するという極めて興味深い知見を得た。8-ニトログアニンは早期に炎症関連発がんリスクを評価できる新規バイオマーカーとして応用できる可能性がある。

B: 実験動物モデルを用いた発がん要因の解析

作用機序の異なる2種類の大腸発がん物質 PhIP と AOM を用いて、併用投与による発がんの共同効果について検討した。6週齢 F344 雄ラットを用い、AOM 投与群、PhIP 投与群、及び PhIP+AOM 併用群における大腸病変の誘発を検討した。32週時において、PhIP 群および AOM 群の腫瘍数は一個体当たり平均0.6個および1.7個であった。一方、PhIP+AOM 併用群では平均6.9個の腫瘍が誘発され、PhIP 或いは AOM の単独投与群に比較してそれぞれ11.5倍と4.0倍と有意に高く ($P < 0.05$)、両化合物による「相乗効果」が認められた。併用群に発生した62個の腫瘍のうち2個が、未分化な組織像と顕著な粘膜下への浸潤像を呈した。大腸がんの浸潤性進展と *K-ras* 及び p53 変異との関連性は認められなかったことから、未知の遺伝子変化の可能性が示唆された。

大腸発がんの前がん病変の一つとして提唱されている

mucin-depleted foci (MDF) と aberrant crypt foci (ACF) とを比較検討した。AOM で誘発された大腸粘膜病変には、ACF (88.3%) と MDF (10.4%) に加えその両者がオーバーラップする病変 (1.3%) の3病変が存在することが分かった。MDF の76.4% と、オーバーラップする病変の全てが dysplastic foci (DF) を示す病変であった。ACF では6.9% が DF と診断された。β カテニンが蓄積する β-catenin accumulated crypts (BCAC) は、MDF の93%、ACF とオーバーラップする病変の75%、ACF の7.6% に認められ、MDF が BCAC 数を反映することが分かった。

HCA による大腸発がんを短期間に誘発できるモデルシステムの作出を試みた。雄性 ICR マウス6週齢に MeIQx 或いは PhIP を単回胃内投与 (200 mg/kg 体重) し、1週間後より2% DSS を1週間飲水投与した。実験開始後16週目での大腸腫瘍の発生頻度は MeIQx → 2% DSS 群で30%、PhIP → 2% DSS 群で78% であった。MeIQx → 2% DSS 群で発生した大腸腺がんでは β-catenin 遺伝子変異が検出されなかったが、PhIP → 2% DSS 群で発生した大腸腺がんではすべてにおいて β-catenin 遺伝子変異が検出されたことから、PhIP の投与では β-catenin 遺伝子変異を有する大腸腺がんが高率に発生することが確認された。

ハムスター腓液の変異原性を指標とした膵管発がん物質のスクリーニング系を用いて、膵液の変異原性を指標として *K-ras* 遺伝子変異を膵管上皮に誘発しうる候補物質のスクリーニングを行った。デオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、タウロコール酸 (TCA)、タウロデオキシコール酸 (TDCA)、ニトロソデオキシコール酸 (NDCA) および Trp-P-1 を用いて解析したところ、DCA および LCA を投与したハムスター膵液では、非投与ハムスター膵液に比べ、リバータントの数がそれぞれ約9倍、約4倍に増加することが分かった。他の胆汁酸や Trp-P-1 投与群では増加はみられなかった。また、ラット膵液ではいずれの披験物質の投与においてもリバータント数の増加はみられなかったことから、胆汁酸自体あるいは関連物質が内因性の膵管発がん物質である可能性が示唆された。

Barrett食道の発生メカニズムを解明するため、十二指腸液逆流による食道および胃発がんモデルを作成した。ニトロソ化合物の競合的阻害剤であるthiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin)投与による発がん率の変化の有無を調べ、ニトロソ化合物の発がんへの関与を検討した。雄性Wistar ラットに手術的に食道がん及び胃がん発生モデルを作成し、thioprolin (0.5%) 混餌投与群と非投与群でのがんの自然発生率を比較した結果、食道腺がん発生モデル及び胃がん発生モデルのいずれもthioprolin投与群では明らかな発がん率の低下を認めた。逆流十二指腸液により胃内で産生されるニトロソ化合物の存在が、胃がん及び食道腺がんの発生に大きく関与することが間接的に証明された。

生活環境中に存在する多様な発がん要因による複合効果についても検討した。7週齢SDラットにγ線を全身照射した後、MNUを単回腹腔内投与、あるいはPhIPを10日間にわたり経口投与した。γ線とMNU、γ線とPhIPの複合処理群も設定した。50週齢までに触知腫瘍のあった個体全てを解析した結果、誘発された腫瘍のほとんどが腺がん或いは線維腺腫で、何れもγ線群では線量依存的に増加した。

前立腺上皮過形成を自然発症する高血圧自然発症ラット (SHR) において、過形成病変の遺伝様式及び高血圧と過形成形質発症との相関性について検討した。F344ラットとのF1 (10週齢) における腹葉前立腺上皮過形成について、腺房に対する上皮面積の割合 (%) を計測した。SHRラットでは51.4%、F344ラットで28.8%であったのに対し、(F344/DuCrj x SHR/NCrj)F1では39.2%、(SHR/NCrj x F344/DuCrj)F1では33.4%とF1では親ラットの間値を示したことから、SHRラットの前立腺上皮過形成を規定する遺伝形質はF1に伝達されることが明らかとなった。また、正常血圧対照群であるWKYラットとの比較により、高血圧発症に関連した遺伝的素因による過形成発症への直接的な影響が若干観察された。

A/Jマウスの肺腫瘍発生モデルを用いて、MeIQxと高脂肪食の影響を検討した。6週齢のA/J雌マウスを用いて、MeIQxを600ppmで混餌投与するとともに20%コーン油を混餌投与する高脂

肪食投与群(MeIQx+Fat群)、MeIQx群、高脂肪食群(Fat群)、さらに無処置対照群の4群を設け、32週間の実験終了時での肺及び肝の腫瘍性病変を検討した。肺胞上皮過形成、腺腫、腺がんの発生頻度は、それぞれ肺胞上皮過形成65.0, 35.0, 16.7, 0.0%;腺腫60.0, 70.0, 22.2, 31.6%;腺がん5.0, 5.0, 0.0, 0.0%であった。マウス1匹あたりの腫瘍発生個数は、肺胞上皮過形成0.95, 0.45, 0.17, 0.00個;腺腫0.85, 1.40, 0.33, 0.32個;腺がん0.05, 0.05, 0.0, 0.0個であり、MeIQxによる肺腫瘍性病変の促進作用が認められたが、高脂肪食投与による影響は明らかでなかった。

酸素ラジカルによるDNA修飾塩基の1つである8-OHdGに対するモノクローナル抗体を使用し、修飾塩基を含むDNA断片をクローニングする技術を確立した。無処置あるいは鉄ニトリロ三酢酸を投与したマウス腎から抽出したゲノムDNAを用いて100個以上の8-OHdGを含有する断片をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、N45.1抗体が8-OHdGを含有する断片を特異的に免疫沈降すること、DNA負荷量と8-OHdG含有量の間に相関性が認められることが分かった。遺伝子領域からの距離という観点で8-OHdG含有断片を解析すると遺伝子領域の比率がやや高いことも分かり、ゲノム中の8-OHdGの生成部位はランダムでは無いことが判明した。

フェノバルビタール(PB)の低用量投与が肝発がんを抑制するというホルミシス現象の分子生物学的解明を試みた。DEN 100mg/kg/bwをラットに3週間腹腔内投与後、PBを0, 2, 15, 500ppmの濃度で33週間混餌投与し、実験開始後13週後と36週後に肝のGST-P陽性細胞巢あるいは腫瘍の発生を検索した。13週後のGST-P陽性細胞巢、36週後の腫瘍の発生個数ともに500ppmでは有意に増加したが、2ppmでは有意に減少するホルミシス現象を示した。8-OHdG形成及びGST-P陽性細胞巢内のPCNA陽性細胞数も500ppmでは有意に増加したが、2ppmでは有意に減少した。ホルミシス現象の発生機序として、PBの低用量投与では酸化ストレスの減少、細胞増殖能の抑制が関与していることが示された。

C: 発がんに係わる感受性要因の検索

2本鎖DNA切断(DSB)はヒトがん細胞に見られるゲノム異常の主要因で、非相同性末端結合(NHEJ)と相同組み換え(HRR)は細胞における主要なDSB修復機構である。ヒトがん細胞では多くのゲノム異常が蓄積しており、DSB修復活性の低下や制御異常が生じている可能性がある。そこで、種々の細胞のDSB修復活性を比較評価することを目的として、ヒト細胞におけるDSB修復活性の測定系を確立した。独自に構築した400-bpの相同DNA断片を持つプラスミドを線状化してヒト肺がん細胞株に導入後、環状化されたプラスミドを回収してDNA再結合部位の構造を決定したところ、NHEJもしくはHRRによって修復されたと考えられる痕跡が検出された。また、NHEJ型修復プラスミドの産生はDNA-PKcs活性に依存し、HRR型修復プラスミドの産生は相同DNA断片の長さに依存していたので、本法で、ヒト細胞における主要なDSB修復活性を簡単に検出できると考えられた。そこで、この実験系を用いて、各種培養細胞におけるDSB修復活性を評価した。遺伝子ターゲティングベクターとの相同組換え能が高いニワトリB細胞株DT40では、他の細胞株と比べてHRRがNHEJより優勢になっていた。また、調べた他の細胞間でもHRR-NHEJの割合が異なり、各細胞間でDSB修復活性に差があることが示唆された。以上の結果より、本実験系は各種細胞におけるDSB修復活性の比較検討に有用と考えられた。

CYP2A6 はクマリン、ニコチンなどの薬物代謝およびタバコ煙中の発がん物質NNKなどの*N*-ニトロソアミン類の代謝活性化に関与する酵素であり、遺伝子多型によるCYP2A6酵素活性の低下に伴い、喫煙による肺がんリスクが低下する。そこで、CYP2A6の活性阻害が肺がんの発症を抑えるか否かを明らかにする目的で、A/J 系マウスを用いてNNK誘発肺腫瘍の形成における CYP2A6 阻害剤の影響を検討した。NNK 単独投与では投与後16週で32匹中30匹(93.8%)に肺に過形成・腺腫が認められ、その平均個数はマウス1匹あたり 5.97 ± 5.38 だった。しかし、CYP2A6 の阻害剤、8-methoxypsoralen の前投与 (12.5mg

および 50mg/kg bw, i.g., x 3 times) により、過形成・腺腫の数は20.0%、16.7%に抑制された。この結果より、CYP2A6の活性阻害により肺がんの予防が可能と考え、現在、天然抽出物中からCYP2A6の阻害剤を探索している。

遺伝子多型とDNAメチル化遺伝子制御の両面から前立腺がんリスクについて検討した。前立腺がん患者群106例と対照群172例におけるMethylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)遺伝子多型(C677T)の頻度を解析した結果、前立腺がん患者群で6.6%、対照群で16.3%とOR=0.36 (95%CI=0.15-0.87)でT/Tが発がん抵抗性の遺伝子型と考えられた。また、methylated CpG island amplification/representational difference analysis (MCA/RDA)法を用いて新規のDNAメチル化で制御される遺伝子を探索し、neurotrophin tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2)を同定した。この遺伝子のメチル化の頻度は、前立腺がんでは76.2%、前立腺肥大症では7.7%であった。今後、メチル化で制御される遺伝子とMTHFR遺伝子多型との関連性を追求し、前立腺がんへのメチル化の寄与を検討していく予定である。

発がん物質の代謝活性化酵素の多くは化学物質で誘導され、最近、誘導剤の体内動態に影響を及ぼすトランスポーターや誘導剤代謝酵素の活性も薬物代謝酵素誘導の個人差の要因として報告されている。そこで、誘導剤代謝酵素遺伝子スルホトランスフェラーゼST1A5の遺伝子多型を探索した。8人の腎臓細胞をプールしたcDNAライブラリーから6種のcDNAクローンが得られ、ST1A5*1と比べ、ST1A5*2は第6エキソンの前に18bpのイントロン配列が挿入されており、ST1A5*3は2カ所、ST1A5*4は3カ所、ST1A5*5とST1A5*6は1カ所のアミノ酸置換があった。これらのcDNAを大腸菌で発現させると、ST1A5*2とST1A5*6では活性がほとんど検出されなかった。ST1A5は腸管細胞で強く発現しており、薬物や食物中の化合物を吸収時に硫酸抱合する。低活性の遺伝子型が存在することから、ST1A5で代謝される誘導剤は、その遺伝子多型により体内動態が大きく変動し、酵素誘導に大きく影響を与えて

いると考えられた。

最大径2cm以下の小型肺腺がんを対象として*p16*遺伝子の異常について解析し、組織分類、臨床病理学的所見や術後生存率との相関を検討した。メタノール固定標本より抽出したDNAを用いてプロモーター領域のメチル化と遺伝子近傍染色体領域のヘテロ接合性喪失（LOH）について解析し、標本の免疫組織化学解析によりp16蛋白質の発現について検討した。メチル化は57例中23例（40.4%）、LOHは57例中23例（40.4%）に認められ、発現は57例中29例（50.9%）で検出されなかった。これらの異常は、性、喫煙指数、病理病期、リンパ管侵襲、核分裂係数、分化度、小型肺腺がん分類と有意に相関した。術後生存率は、メチル化を示すもの、また、LOHを示すもので有意に低かった。以上より、喫煙等による*p16*遺伝子のメチル化は、肺腺がん発生の初期に生じ、増悪を助長する要因の1つと考えられた。

DNAメチルトランスフェラーゼDNMT3bのスプライスバリエーションDNMT3b4の過剰発現は、肝細胞がんの前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症の段階で、同領域におけるDNAメチル化を減弱し、クロマチン脱凝縮により染色体不安定性を惹起する可能性がある。そこで、肝多段階がんにおけるDNMT3b4発現の意義を明らかにするため、DNMT3b4をヒト胎児腎上皮由来293細胞に強制発現し、細胞増殖動態の検討とともに遺伝子発現の変化を検討した。遺伝子発現は、正常肝組織、慢性肝炎・肝硬変症を呈する非がん肝組織と肝細胞がんでも検討した。その結果、DNMT3b4導入から比較的早期のうちにDNMT3b4発現細胞の増殖速度が対照細胞の約2倍に亢進し、STAT1とその下流でインターフェロンシグナルに寄与する分子群の発現が亢進していた。DNMT3b4とSTAT1の発現量は肝細胞がんでも有意に相関した。STAT1とインターフェロンシグナル寄与分子群の発現も臨床検体で有意に相関し、ともに正常肝組織に比して慢性肝炎・肝硬変症の肝組織で有意に亢進していた。これらの結果より、DNMT3b4の過剰発現は、染色体不安定性の惹起のみならず、特定の遺伝子の発現変化を介して、肝がんの前がん段階から寄与する

と考えられた。

スキルス胃がん由来培養細胞の同所移植によるヒト胃がん腹膜播種マウスモデルを用い、腹膜播種の進展過程を明らかにするため、高転移細胞44As3をマウスに移植し、7日ごとに屠殺・剖検して病理組織学的に検討した。44As3は胃粘膜下で増殖し、7日目にはリンパ管浸襲が見られ、14日目には固有筋層、漿膜下組織への浸潤と大網での播種形成が見られ、リンパ節と脾臓で微小転移が散見された。21日目には腸間膜、体壁腹膜、28日目には横隔膜で高率に播種が観察された。また、44As3にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、移植後IVISシステムで解析した結果、ルシフェラーゼ発光と腫瘍容積が相関し、発光部位と腫瘍形成部位が同一であることが確認され、胃壁での浸潤増殖から腹膜播種の形成までの過程を、リアルタイムで定量的に、動物を屠殺することなく継続観察することも可能であることが分かった。これらの結果より、樹立した動物モデルは、スキルス胃がんの腹膜播種に関わる因子の解析や抗転移薬・抗がん剤の効果判定に有用と考えられた。

3 倫理面への配慮

手術承諾の段階で手術標本の残余の組織の研究利用につき患者及び家族に対して説明し同意を得ている。組織の採取にあたっては病理組織学的診断を優先して行い、患者への不利益を生じさせない。患者のプライバシーは遵守している。必要に応じて研究施設の倫理委員会の承諾を得ている。又、動物実験は各研究者の所属施設の実験動物取扱い（倫理）規定を遵守している。

研究成果の刊行発表

1. Totsuka, Y., Wakabayashi, K., et al., Mutagens formed from β -carboline with aromatic amines. J. Chromatogr. B, 802: 135-141, 2004.
2. Kitamura, T., Wakabayashi, K., et al., Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenoma

- ous polyposis coli gene* knockout mice. Int. J. Cancer, 109: 576-580, 2004.
3. Takahashi, M., Wakabayashi, K., et al., Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. Cancer Sci., 95: 475-480, 2004.
 4. Kawamori, T., Wakabayashi, K., et al., Carcinogenicity of aminophenylnorharman, a possible novel endogenous mutagen, formed from norharman and aniline, in F344 rats. Carcinogenesis, 25: 1967-1972, 2004.
 5. Nishigaki, R., Wakabayashi, K., et al., Identification of cytochrome P-450s involved in the formation of APNH from norharman with aniline. Mutat. Res., 562: 19-25, 2004.
 6. Shoji, Y., Wakabayashi, K., et al., Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP₃ during colon cancer development. Gut, 53: 1151-1158, 2004.
 7. Matsubara, S., Wakabayashi, K., et al., Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H.pylori* infection. Cancer Sci., 95: 798-802, 2004.
 8. Kawamori, T., Wakabayashi, K., et al., Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. Cancer Sci., 95: 290-299, 2004.
 9. Homma, Y., Yamamoto, Y., et al., Promotion of carcinogenesis and oxidative stress by dietary cholesterol in rat prostate. Carcinogenesis, 25: 1011-1014, 2004.
 10. Sohmiya, M., Yamamoto, Y., et al., Synergistic inhibition of lipid peroxidation by vitamin E and a dopamine agonist, cabergoline, Neurol Res., 26: 418-421, 2004.
 11. Sohmiya, M., Yamamoto, Y., et al., Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci., 223: 161-166, 2004.
 12. Sohmiya, M., Yamamoto, Y., et al., An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ALS patients. J. Neurol. Sci., 228: 49-53, 2005.
 13. Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., et al., Tropical UV-toxicerant bacteria may provide a pharmacomimetic model for anti-aging research and cancer prevention. Marine Biotechnol., in press, 2005.
 14. Kim, S.-R., Yamada, M., 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., 55: 365-374, 2004.
 15. Kataoka, H., et al., **Recent advances in solid-phase microextraction and related techniques (review).** Current Pharmaceutical Analysis, 1: 65-84, 2004.
 16. Umemoto, A., et al., Determination of tamoxifen-DNA adducts in leukocytes from breast cancer patients treated with tamoxifen. Chem. Res. Toxicol., 17: 1577-1583, 2004.
 17. Mano, N., et al., Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain. J. Lipid Res., 45: 295-300, 2004.
 18. Mano, N., et al., Analysis of the antigen binding site of anti-deoxycholate monoclonal antibody using a novel affinity labeling reagent, acyl adenylate. Biochemistry, 43: 2041-2048, 2004.
 19. Kakiyama, G., Mano, N., et al., Chemical synthesis of (22E)-3 α ,6 β ,7 β -trihydroxy-5 β -chol-22-en-24-oic acid and its taurine and glycine conjugates: a major bile acid in the rat. J. Lipid Res., 45: 295-300, 2004.
 20. Kakiyama, G., Mano, N., et al., Synthesis of 3 α ,7 α ,14 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid: A potential primary bile acid in vertebrates. Chem. Pharm. Bull., 52: 371-374, 2004.
 21. Ogawa, S., Mano, N., et al., Remote-oxyfunctionalization of unactivated carbons in (5 β)-3-oxobile acids by 2,6-dichloropyridine N-oxide catalyzed by ruthenium-porphyrin and HBr: a direct lactonization at C-20. Org. Biomol. Chem., 2: 1013-1018, 2004.
 22. Kakiyama, G., Mano, N., et al., Synthesis of 3 α ,7 α ,14 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid: A potential primary bile acid in vertebrates. Chem. Pharm. Bull., 52: 371-374, 2004.
 23. Yamamoto, E., Mano, N., et al., Novel methylcellulose-immobilized ion-exchange precolumn for on-line enrichment of cationic drugs in plasma. J. Chromatogr. B, 807: 327-334, 2004.

24. Mano, N., et al., Bioconversion of 3 β -hydroxy-5-cholelenoic acid into chenodeoxycholic acid by rat brain enzyme systems. *J. Lipid Res.*, 45: 1741-1748, 2004.
25. Goto, T., Mano, N., et al., Sensitive mass spectrometric detection of neutral bile acid metabolites. Formation of adduct ions with an organic anion in atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18: 2360-2364, 2004.
26. Mano, N., et al., A nonenzymatic modification of the amino-terminal domain of histone H3 by bile acid acyl adenylate. *J. Biol. Chem.*, 279: 55034-55041, 2004.
27. Iida, T., Mano, N., et al., Capillary gas chromatographic separation of bile acid acyl glycosides without thermal decomposition and isomerization. *J. Chromatogr. A*, 1057: 171-176, 2004.
28. Iida, T., Mano, N., et al., Biomimetic oxidation of unactivated carbons in steroids by a model of p-450, oxorutheniumporphyrinate complex. *Lipids*, in press, 2005.
29. Kobayashi, N., Mano, N., et al., A single-chain Fv fragment that is available for monitoring deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins. *Steroids*, in press, 2005.
30. Goto, T., Mano, N., et al., Identification of a novel conjugate in human urine: Bile acid acyl galactosides. *Steroids*, in press, 2005.
31. Kakiyama, G., Mano, N., et al., Chemical synthesis of 24-b-D-galactopyranosides of bile acids: A new type of bile acid conjugates in human urine. *Chem. Phys. Lipids.*, in press, 2005.
32. Fukumoto, M., Kuwahara, Y., et al., Mechanisms of liver carcinogenesis in patients injected with thorotrast. *Health Effects of Incorporated Radionuclides*, in press, 2005.
33. Hiromura, M., Okada, F., et al., Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the beta A strand of the protooncogene TCL1. *J. Biol. Chem.*, 279: 53407-53418, 2004.
34. Zhao, S., Okada, F., et al., Effect of steroids on [18F] fluorodeoxyglucose uptake in an experimental tumor model. *Nucl. Med. Commun.*, 25: 727-730, 2004.
35. Hirai, A., Okada, F., et al., Expression of AIE-75 P DZ-domain protein induces G(2)/M cell cycle arrest in human colorectal adenocarcinoma SW480 cells. *Cancer Lett.*, 211: 209-218, 2004.
36. Hayashi, E., Okada, F., et al., Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. *Proteomics*, in press, 2005.
37. Tatemichi, M., et al., Suppression of thymic lymphomas and increased nonthymic lymphomagenesis in Trp53-deficient mice lacking inducible nitric oxide synthase gene. *Int. J. Cancer*, 111: 819-828, 2004.
38. Mizuki, A., Tatemichi, M., et al., Mucosal concentration of basic fibroblast growth factor in formation and healing of giant gastric ulcers in human. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 19: 528-534, 2004.
39. Tatemichi, M., et al., Increased risk of intestinal type of gastric adenocarcinoma in Japanese women associated with long forms of CCTTT pentanucleotide repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter. *Cancer Lett.*, 217: 197-202, 2005.
40. Ma, N., Kawanishi, S., et al., Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 506-510, 2004.
41. Murata, M., Kawanishi, S., et al., Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316: 123-128, 2004.
42. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*, 25: 1535-1542, 2004.
43. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide*, 11: 175-183, 2004.
44. Ding, X., Kawanishi, S., et al., iNOS-dependent DNA

- damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Sci.*, in press, 2005.
45. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., Nitritative and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion. *World J. Gastroenterol.*, in press, 2005.
 46. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., *Opisthorchis viverrini* antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line. *Int. J. Parasitol.*, in press, 2005.
 47. Fujiwara, K., Nakagama, H., et al., Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis*, 25: 1495-1505, 2004.
 48. Sugimura, T., Nakagama, H., et al., Science of food borne mutagens/Carcinogens, heterocyclic amines: How should we deal with unnegligible risk of unavoidable exposure to carcinogens under ordinary life style. *Cancer Sci.*, 95: 290-299, 2004.
 49. Tsuchiya, N., Nakagama, H., et al., LRP130, a single-stranded DNA/RNA binding protein, plays a role in the nucleo-cytoplasmic export of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317: 736-743, 2004.
 50. Shibata, A., Nakagama, H., et al., Efficient mapping and characterization of the structure of deletion mutation by Southern blot analysis using oligo DNA probe in gpt delta mince. *Environ. Mol. Mutagen.*, 43: 204-207, 2004.
 51. Shibata, A., Nakagama, H., 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.
 52. Ochiai, M., Nakagama, H., et al., Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett.*, 220: 67-74, 2004.
 53. Shiokawa, M., Nakagama, H., et al., Genetic alteration of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in human germ cell tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 35: 97-102, 2005.
 54. Ushigome, M., Nakagama, H., et al., Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 26: 635-640, 2005.
 55. Masutani, M., Nakagama, H., et al., PolyADP-ribosylation in relation to cancer and autoimmune disease. In: *Poly(ADP-ribosyl)ation*, Edited by Alexander Burke. *Cell. Mol. Life. Sci.*, in press, 2005.
 56. Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., et al., Alterations of the Dutt1/Robo1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol. Carcinog.*, 40: 241-246, 2004.
 57. Honoki, K., Tsutsumi, M., et al., 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.
 58. Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., et al., 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.
 59. Kitahashi, T., Tsutsumi, M., et al., Aberrant transcript of FHIT gene in intrahepatic cholangiocellular carcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. *Exp. Toxicol. Pathol.* 56: 153-157, 2004.
 60. Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., et al., Establishment and characterization of a rat lung adenocarcinoma cell line with low malignant potential. *Cancer Lett.*, 217: 97-103, 2005.
 61. Hikosaka, A., Shirai, T., et al., Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 25: 381-387, 2004.
 62. Asamoto, M., Shirai, T., et al., Connexin 32 dominant-negative mutant transgenic rats are resistant to hepatic damage by chemicals. *Hepatol.*, 40: 205-210, 2004.
 63. Inaguma, S., Shirai, T., 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.
 64. Ito, A., Shirai, T., et al., Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells.

- Cancer Lett. 219: 105-112, 2005.
65. Kumagai, H., Mukaisho, K., et al., Thioproline inhibits development of esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenal reflux in rats. *Carcinogenesis*, 25:723-727, 2004.
 66. Peng, D.F., Mukaisho, K., et al., Genetic lineage of poorly differentiated gastric carcinoma with a tubular component analysed by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.*, 203: 884-895, 2004.
 67. Nishijima, K., Hattori, T., et al., Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodenoesophageal reflux in rats. *Ann. Surg.*, 240: 57-67, 2004.
 68. Nakajima, S., Hattori, T., et al., Esophageal adenocarcinoma or gastric cancer with or without eradication of *Helicobacter pylori* infection in chronic atrophic gastritis patients : a hypothetical opinion from a systematic review. *Aliment. Pharm. Therap.*, 20(Suppl. 1) : 54-61, 2004.
 69. Nakajima, S., Hattori, T., et al., Histological aspects and role of mast cells in *Helicobacter pylori*-infected gastritis. *Aliment. Pharm. Therap.*, 20(Suppl. 1) : 165-170, 2004.
 70. Yamagishi, M., Hattori, T., et al., Correlation between cyclooxygenase-2, proliferative activity, and mucin phenotype in human advanced gastric cancer. *J. Gastroenterol.*, 39: 1143-1149, 2005.
 71. Tatsuta, T., Hattori, T., et al., Expression of Cdx2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux. *Dig. Dis. Sci.*, in press, 2005.
 72. Tsubosa, Y., Hattori, T., et al., Effect of DOP-PCR amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridizations. *Cancer Genet. Cytogenet.*, in press, 2005.
 73. Tatsumi, N., Hattori, T., et al., Expression of cytokine 7 and 20 in serrated adenoma and related diseases. *Dig. Dis. Sci.*, in press, 2005.
 74. Mukaisho, K., Hattori, T., et al., Induction of gastric GIST in rat and establishment of GIST cell line. *Cancer Lett.*, in press, 2005.
 75. Iwase, T., Hattori, T., et al., Overexpression of CD10 and reduced MUC2 expression correlate with the development and progression of colorectal neoplasms. *Pathol. Res. Practice*, in press, 2005.
 76. Kushima, R., Hattori, T., et al., Pyloric gland adenoma arising in Barrett's esophagus with mucin immunohistochemical and molecular cytogenetical evaluation. *Virchows Archiv.*, in press, 2005.
 77. Yoshimi, N., et al., Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.*, 95: 792-797, 2004.
 78. Tanaka, T., Kohno, H., et al., Colonic adenocarcinoma as rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess β -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for β -catenin, cyclooxygenase-2, and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*, 26: 229-238, 2004.
 79. Kohno, H., et al., β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 96: in press, 2005.
 80. Suzuki, R., Kohno, H., et al., Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol. Histopathol.*, 19: 483-492, 2005.
 81. Sugie, S., Kohno, H., et al., Effect of α -naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer*, 110: in press, 2005.
 82. Fukushima, S., Imaida, K., 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.
 83. Inaguma, S., Imaida, K., 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.
 84. Orita, S., Imaida, K., et al., Modifying effects of 1'-a

- cetoxychavicol acetate ACA and the novel synthetic retinoids Re-80, Am-580 and Am55P in a two-stage carcinogenesis model in female rats. *Toxicol. Pathol.*, 32: 250-257, 2004.
85. Li, J.Q., Imaida, K., et al., Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int. J. Oncol.*, 25: 87-95, 2004.
 86. Shirai, T., Imaida, K., et al., Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics*, 26:59-68, 2005.
 87. Zeng, Y., Imaida, K., et al., Inhibition of prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats by raloxifene, an antiestrogen with anti-androgen action, but not nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Carcinogenesis*, in press, 2005.
 88. Zeng, Y., Imaida, K., et al., Dietary D-psicose, a rare sugar, does not show any modifying effects in a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 male rat. *J. Toxicol. Pathol.*, in press, 2005.
 89. Nishimura, M., Shimada, Y., et al., Elevated interleukin-9 receptor expression and response to interleukin-9 and -7 in thymocytes during radiation-Induced T-cell lymphomagenesis in B6C3F1 mice. *J. Cell. Physiol.*, 198:, 82-90, 2004.
 90. Yasumura, K., Shimada, Y., et al., Altered expression of Tfg and Dap3 in Ikaros-defective T cell lymphomas induced by X-irradiation in B6C3F1 mice. *Brit. J. Haematol.*, 124: 179-185, 2004.
 91. Suzuki, G., Shimada, Y., et al., An Association between Oxidative Stress and Radiation-Induced Lymphomagenesis. *Radiat. Res.*, 161: 642-647, 2004.
 92. Kakinuma, S., Shimada, Y., et al., Frequent retention of heterozygosity for point mutations in p53 and Ikaros in N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse thymic lymphomas. *Mutat. Res.*, in press, 2005.
 93. Hiroyasu, M., Toyokuni, S., et al., Detection of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase messenger RNA using peptide nucleic acid probe in paraffin-embedded archival specimens. *Pathol. Int.*, 54: 274-279, 2004.
 94. Toyokuni, S., et al., Forum editorial: Redox control of carcinogenesis and tumor biology. *Antioxid. Redox Signal.*, 6: 481-482, 2004.
 95. Nishigori, C., Toyokuni, S., et al., Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.*, 6: 561-570, 2004.
 96. Tanaka, T., Toyokuni, S., et al., Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene*, 23: 3980-3989, 2004.
 97. Imaoka, A., Toyokuni, S., et al., Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett.*, 203: 117-125, 2004.
 98. Inada, A., Toyokuni, S., et al., Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic beta cells. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 2831-2841, 2004.
 99. Satou, Y., Toyokuni, S., et al., Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both *in vivo* and *in vitro*. *Leukemia*, 18: 1357-1363, 2004.
 100. Minamiyama, Y., Toyokuni, S., et al., CYP3A induction aggravates endotoxemic liver injury via reactive oxygen species in male rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 37: 703-712, 2004.
 101. Ozeki, M., Toyokuni, S., et al., Susceptibility of actin to modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Chromatogr. B.*, in press, 2005.
 102. Hoshi, M., Wanibuchi, H., et al., Carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]-quinoline (IQ) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 17: 17-23, 2004.
 103. Doi, K., Wanibuchi, H., et al. Revised rat multi-organ carcinogenesis bioassay for wholebody detection of chemopreventive agents: modifying potential of S-methylcysteine. *Cancer Lett.*, 206: 15-26, 2004.
 104. Wei, M., Wanibuchi, H., 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.

105. Fukushima, S., Wanibuchi, 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.
106. Wanibuchi, H., et al., Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 198: 366-376, 2004.
107. Shen, J., Wanibuchi, H., et al., Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats due to JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 5: 253-258, 2004.
108. Hoshi, M., Wanibuchi, H., et al., No-observed effect levels for carcinogenicity and for *in vivo* mutagenicity of a genotoxic carcinogen. *Toxicol. Sci.*, 81: 273-279, 2004.
109. Ichihara, T., Wanibuchi, H., 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.
110. Wei, M., Wanibuchi, H., 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.
111. Yamane, A., Yokota, J., et al., Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cells *in vivo*. *Carcinogenesis*, 25: 1689-1694, 2004.
112. Yabuta, A., Yokota, J., et al., Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int. J. Oncol.*, 24: 697-702, 2004.
113. Matsumura, K., Kamataki, T., et al., Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene. *Mol. Pharmacol.*, 65:326-334, 2004.
114. Yamazaki, H., Kamataki, T., et al., Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life Sci.*, 74: 2739-2747, 2004.
115. Nukaya, M., Kamataki, T., et al., Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of GH receptor and janus kinase 2 expression in mice, *FEBS Lett.*, 558: 96-100, 2004.
116. Yamaori, S., Kamataki, T., et al., CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19: 120-129, 2004.
117. Sakuma, T., Kamataki, T., et al., Cloning of CYP2D21 and CYP3A22 cDNAs from liver of miniature pigs. *Drug Metab. Dispos.*, 32: 376-378, 2004.
118. Toide, K., Kamataki, T., et al., Uridine diphosphate sugar-selective conjugation of an aldose reductase inhibitor (AS-3201) by UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 67: 1269-1278, 2004.
119. Furukawa, M., Kamataki, T., et al., Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci.*, 95:520-529, 2004.
120. Ariyoshi, N., Kamataki, T., et al., Identification of deletion-junction site of CYP2A6*4B allele lacking entire coding region of CYP2A6 in Japanese, *Pharmacogenetics*, 14:701-705, 2004.
121. Yamazaki, Y., Kamataki, T., et al., Establishment of ten strains of genetically engineered Salmonella typhimurium TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens. *Mutat. Res.*, 562: 151-62, 2004.
122. Fujieda, M., Kamataki, T., et al., Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogen.*, 25: 2451-2458, 2004.
123. Yamazaki, H., Kamataki, T., et al., Mild Trimethylaminuria Observed in a Japanese Cohort with Liver Damage. *Am. J. Med.*, in press, 2005.
124. Gyamfi, M. A., Kamataki, T., et al., High prevalence

- e of cytochrome P450 2A6*1A alleles in a black African population of Ghana. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, in press, 2005.
125. Nishimura, M., Kamataki, T., et al., Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, on gene Induction of cytochrome P450s, carboxylesterases, and sulfotransferases in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokin.*, in press, 2005.
 126. Yamaori, S., Kamataki, T., et al., Ethnic differences between Japanese and Caucasians in the Expression levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7: Lack of co-regulation of CYP3A expression in Japanese livers. *Xenobiotica*, in press, 2005.
 127. Miyazaki, M., Kamataki, T., et al., Mutagenic activation of betel quid-specific N-nitrosamines catalyzed by human cytochrome P450 coexpressed with NADPH-cytochrome P450 reductase in *Salmonella typhimurium* YG7108. *Mutat. Res.*, in press, 2005.
 128. Yamada Y, Watanabe, M., et al., Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. *Int. J. Cancer.*, 112: 840-845, 2004.
 129. Fukatsu T, Watanabe, M., et al., Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res.*, 24: 2431-2437, 2004.
 130. Suzuki, H, Watanabe, M., et al., Clinical usefulness of serum anti-p53 antibodies for prostate cancer detection: A comparative study with PSA parameters. *J. Urol.*, 171: 182-186, 2004.
 131. Yoshimura, A., Watanabe, M., et al., Mutational analysis of the macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) gene in primary lung cancer. *J. Nippon Med. Sch.*, 71: 99-104, 2004.
 132. Miyata, M., Yamazoe, Y., et al., Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis*, 25: 203-209, 2004.
 133. Takada, T., Yamazoe, Y., et al., Differences in trans activation between rat CYP3A1 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 19: 103-113, 2004.
 134. Matsubara, T., Yamazoe, Y., et al., Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 309: 1282-1290, 2004.
 135. Shimada, M., Yamazoe, Y., et al., Unique properties of a renal sulfotransferase, St1d1, in dopamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 310: 808-814, 2004.
 136. Miyata, M., Yamazoe, Y., et al., Role of farnesoid X receptor in the enhancement of canalicular bile acid output and excretion of unconjugated bile acids: a mechanism for protection against cholic acid-induced liver toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312: 759-766, 2005.
 137. Iijima, T., Morishita, Y., et al., MMP-2 activation and stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma: analysis of MMP-2 and MMP-9 with gelatin zymography. *Pathol. Int.*, 54: 295-301, 2004.
 138. Nakamura, N., Morishita, Y., et al., Phenotypic differences of proliferating fibroblasts in the stroma of lung adenocarcinoma and normal bronchus tissue. *Cancer Sci.*, 95: 226-232, 2004.
 139. Konno, S., Morishita, Y., et al., Anthracotic index and DNA methylation status of sputum contents can be used for identifying the population at risk of lung cancer. *Cancer (Cancer Cytopathol.)*, 102: 348-354, 2004.
 140. Sekine, S., Morishita, Y., et al., Expression of enamel proteins and LEF1 in adamantinomatous craniopharyngioma: evidence for its odontogenic epithelial differentiation. *Histopathol.*, 45: 573-579, 2004.
 141. Okubo, C., Morishita, Y., et al., Phenotypic characteristics of mouse lung adenoma induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Mol. Carcinogen.*, 42: 121-126, 2004.
 142. Tanaka, R., Morishita, Y., et al., Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 103: 608-615, 2005.
 143. Kanai, Y., et al., Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human

- n hepatocarcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130: 636-644, 2004.
144. Etoh, T., Kanai, Y., et al., Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am. J. Pathol.*, 164: 689-699, 2004.
 145. Nam, J. S., Kanai, Y., et al., 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 21: 49-56, 2004.
 146. Nakagawa, T., Kanai, Y., et al., DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J. Urol.*, 173: 243-246, 2005.
 147. Nakagawa, T., Kanai, Y., et al., DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J. Urol.*, in press, 2005.
 148. Chihara, Y., Kanai, Y., et al., Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab. Invest.*, in press, 2005.
 149. Yanagihara, K., et al., Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Sci.*, 95: 575-582, 2004.
 150. Mori, K., Yanagihara, K., et al., Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 931-937, 2004.
 151. Namiki, N., Yanagihara, K., et al., Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacol. Res.*, 50: 65-76, 2004.
 152. Luo, B., Yanagihara, K., et al., Characterization of Epstein-Barr virus infection in a human signet ring cell carcinoma cell line, HSC-39. *Microbes Infect.*, 6: 429-439, 2004.
 153. Ueno, M., Yanagihara, K., et al., Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumor Biol.*, 25: 134-140, 2004.
 154. Murai, M., Yanagihara, K., et al., Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, in press, 2005.
 155. Nishigaki, M., Yanagihara, K., et al., Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.*, in press, 2005.