

13-2 個体レベルにおける多段階発がんに関する研究

主任研究者 国立がんセンター 牛 島 俊 和

研究成果の要旨

慢性炎症により誘導された遺伝子発現変化が、その消退後も固定化される機序として、DNA メチル化を想定して解析した。LDL 欠損により高コレステロール血症を示すマウスを用いて、高コレステロール血症は大腸前がん病変とされる ACF の発生を促進することを示した。高濃度のエタノール摂取は肝発がんを促進するが、0.1-1 %の低濃度では促進しないことを示した。放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の LOH 解析により同定された *Rit1* は新たながん抑制遺伝子であり、その欠失は *p53* 欠失と共同して発がんを促進することを示した。*MutYh* 欠失マウスの小腸粘膜では、酸化ストレスによると思われる突然変異が増加していることを示した。肝発がんの早期変化としてアレキ解析により同定した *cyclin D* は、細胞質に発現しており、増殖刺激に応じて核内に移行することを示した。*Niban* 遺伝子は、Eker ラットの腎がん早期病変で発現するのみならず、*Tsc1* ノックアウトマウスの早期病変でも発現することを示した。

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 部長	MNNG による胃発がんの多段階遺伝子変化
塚本 徹哉	愛知がんセンター研究所 室長	大腸陰窩の分裂・増殖と発癌感受性
落合 雅子	国立がんセンター研究所 主任研究官	ラット大腸がんの多段階発がん
樋野 興夫	順天堂大学医学部 教授	発がんの連盟的首位性
鰐淵 英機	大阪市立大学医学系研究科 助教授	多段階発がんに及ぼす環境化学物質の影響-低用量アルコールの MeIQx ラット肝発がん性に及ぼす影響-
木南 凌	新潟大学大学院医学系研究科 教授	マウスリンパ腫発症に関する遺伝子群の同定
田沼 順一	鹿児島大学大学院医歯学研究科 講師	4NQO 誘発ラット舌がん発生に関与する候補遺伝子の探索
小川 勝洋	旭川医科大学医学部 教授	マウス肝多段階発がんに関する研究
廣瀬 善信	岐阜大学付属病院病理部 助教授	大腸発がんにおける肥満の役割
本田 浩章	広島大学原爆放射線医科学研究所 教授	新たな白血病モデルマウスの作製と解析
續 輝久	九州大学大学院医学系研究科 教授	酸化ストレスによって誘発される消化管腫瘍の発生機序
伊東 文生	聖マリアンナ医科大学 教授	膵炎持続の分子機構と癌化機構の関連についての検討
班友		
織田 信弥	国立病院機構九州がんセンター 室長	大腸癌における高変異形質の時間・空間的分布

総括研究報告

1 研究目的

発がんは、がん化する細胞とその他の細胞との相互作用の結果である。イニシエートされた細胞に対する周囲正常細胞による増殖抑制、炎症による発がん促進、免疫

系によるがん細胞排除など、がん前駆細胞及びがん細胞と周囲正常細胞との相互作用は極めて複雑かつ重要である。また、遺伝的背景により、これらの複雑な相互作用の程度が異なり、結果として、異なる発がん感受性を示す。従って、複雑なヒト多段階発がん機構の解明は、in

vitro でのがん細胞の研究のみでは不可能であり、実験動物を用いた個体レベルでの研究が必須である。本研究では、遺伝学的解析技術、ゲノム解析技術、発現プロファイル解析技術を、個体レベルでの発がん研究に応用し、実験動物個体レベルでの現象から、ヒト発がんの解明に応用可能な情報を抽出することを目的とする。

2 研究成果

(1) 発がん機構と修飾要因の解明

N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)をラットに飲水投与すると、胃粘膜に強い炎症を誘発、50週以降に胃がんを発生する。これまで、炎症に伴い誘発された遺伝子発現変化の一部は、MNNG投与中止により組織学的に正常に復した後も、そのまま持続することを見いだした。本知見は、MNNGによるランダムな突然変異誘発に加えて、正常な細胞での遺伝子発現応答が、発がんに関与することを示唆するものであった。本年度は、持続的な発現変化の分子機構を明らかにするため、メチル化の関与を検討した。MNNGにより発現低下が固定された遺伝子5個については、プロモーター領域のメチル化を認めなかった。また、methylation-sensitive-representational difference analysis法により、MNNG投与ラットの胃粘膜に誘発されたメチル化変化を網羅的に検索したが、検出されなかった。持続的な遺伝子発現低下が誘導されているのは、胃粘膜の一部の腺管である可能性があり、より感度を上げた解析が必要と考えられた。

大腸発がんの早期変化として、大腸陰窩の分裂様式に着目した。これまでに、大小陰窩の増加の際には、腺底部が対称分裂、分裂溝が腺開口部まで達することを示してきた。本年度は、Minマウスの発がん高感受性と、分裂腺窩数との関連を検討した。野生型 C57Bl/6J では、12日齢で $59.9 \pm 2.7\%$ (上行結腸)、 $54.0 \pm 4.2\%$ (下行結腸)、50日齢で $5.0 \pm 1.0\%$ (上行結腸)、 $6.0 \pm 1.0\%$ (下行結腸)であった。Minでは、12日齢で $51.8 \pm 2.8\%$ (上行結腸)、 $55.3 \pm 3.8\%$ (下行結腸)、50日齢で $5.3 \pm 2.1\%$ (上行結腸)、 $2.3 \pm 2.3\%$ (下行結腸)であった。従って、両系統間で明確な分裂腺窩数の違いは認められなかった。

肥満は様々な随伴変化を伴い、発がんに複雑に影響する。肥満に伴う随伴変化の中でも、高コレステロール血症の大腸発がんへの影響を明らかにするために、LDL受容体欠損マウスに azoxymethane (AOM)を投与し、aberrant crypt foci (ACF)の発生を検討した。LDL受容体欠損マウスは、野生型に比べやや体重が軽い傾向を示したものの、3-5倍の血中コレステロール、2倍程度の血中中性脂肪を

示した。AOM投与後9週の時点で、大腸あたり ACFの個数は、LDL受容体欠損マウスで 9.1 ± 2.0 、野生型マウスは 7.8 ± 1.9 、4個以上の陰窩からなる ACF数は、欠損マウスで 1.3 ± 1.1 、野生型マウスは 0.2 ± 0.4 であった。従って、LDL受容体異常による高コレステロール血症は大腸発がんを促進することが示唆された。

高濃度エタノールは肝発がんを促進するが、低濃度エタノールについては、その評価は一定していない。そこで、21日齢の F344 ラットに 200 ppm の 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)を投与した後、0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 20%のエタノールを飲料水として16週間投与した。10%以上の高濃度では、肝腫瘍の頻度、及び、1匹当たりの個数とも有意に増加した。しかし、1%までの低用量では、肝発がん促進効果は認められず、有意ではないものの、腫瘍の頻度と個数の抑制傾向が見られた。アルコール摂取は、高濃度では肝発がんを促進するが、低濃度では必ずしも促進しないと考えられた。

(2) 遺伝子異常の解明

放射線誘発マウス胸腺リンパ腫モデルでは、がん細胞前駆体と宿主組織の両方に放射線が作用し、発がんが誘発される。複数の細胞の相互作用を観察することが可能であり、複雑なヒト発がんを単純化した良いモデル系である。これまでに、12番染色体上のがん抑制遺伝子 *Rit1*を同定、その欠損マウスを作成した。*Rit1*ヘテロ欠損マウスを生後600日まで観察しても、がんの発症は認めなかった。一方、*p53*ヘテロ欠損マウスと交配する(*Rit1* KO/+, *p53* KO/+)と、放射線照射なしでも高頻度に胸腺リンパ腫を発症した。(*Rit1* KO/+, *p53* KO/+)に放射線を照射すると、胸腺リンパ腫以外のがんの発症頻度も上昇した。放射線照射後、胸腺が萎縮することがリンパ腫の発症に重要である。萎縮胸腺細胞について、*Rit1*, *Ikaros*, *Pten*各遺伝子の LOH, *Notch* 遺伝子の内部欠失、及び、*Myc* 遺伝子のトリソミーを調べたところ、*Rit1*の不活化が一番初期に起こり、*Ikaros*の不活化は後期に起こることが明らかになった。

8-オキシグアニンの修復に関与する *MutYh* の欠損マウスを SPF で1年6ヶ月飼育すると、野生型の3倍の小腸腫瘍を認める。そこで、*MutYh* 欠損マウス的小腸粘膜に蓄積している突然変異の頻度とスペクトラムを検討した。突然変異頻度は野生型と同レベルであったが、酸化ストレスの関与が大きい G to T 変異は *MutYh* 欠損マウスで3倍、A to C 変異は11倍に上昇していた。更に、*MutYh* 欠失の影響を明瞭にするため、臭素酸カリウムを20週間飲水投与した。現在、発生した腫瘍について解析中である

が、欠損マウスの十二指腸及び空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた。

慢性骨髄性白血病の原因遺伝子 *p210BCR/ABL*、急性リンパ性白血病で形成される融合遺伝子 *E2A/HLF*、慢性骨髄性白血病の急性転化及び骨髄異型性症候群で形成される *AML1/EVI1* について、後天性の変異の影響を検討するために、loxP を利用してコンディショナルノックインマウスを作成した。Cre トランスジェニックマウスとの交配を行い、*E2A/HLF* については目的融合遺伝子の後天的発現を認めた。現在まで、生後半年間の観察をしているが白血病の発生は認められていない。

(3) 遺伝子発現異常の解明

マウス肝発がんモデルは、前がん病変から腺腫、腺がんへの早期変化が観察しやすく、ヒトでは観察困難な早期変化の解析に適する。これまで、マイクロアレイによる解析で、前がん肝細胞では、cyclin D が高発現することを見いだした。本年度は、部分肝切除による増殖刺激により、前がん細胞で cyclin D の発現と局在の変化を検討した。静止期には細胞質で発現していたが、部分肝切除後 24-48 時間では主に核に局在し、細胞増殖が低下した 7 日目では再び細胞質に局在した。そこで、マウス肝がん細胞株を用いて、血清による増殖刺激を行った。その結果、細胞株でも cyclin D は刺激前には細胞質に局在しているが、増殖刺激により核内に移行することが明らかになった。増殖刺激により誘導されるようなシグナルが cyclin D の核内移行に重要なのかを検討するために、PI3K 経路、MEK-ERK1/2 経路、及び、mTOR/S6 経路をそれぞれ特異的な阻害剤により抑制した。その結果、PI3K 経路を阻害すると、cyclin D の核内移行及び増殖活性化が阻害されることを見いだした。

4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) による舌発がん、DA ラットは高感受性を、WF ラットは抵抗性を示す。連鎖解析により、5 個の quantitative trait loci (QTLs) がマップされている。ラット 19 番染色体上の *Tsc1* については、quinone oxidoreductase (*Nqo1*) のプロモーター領域の多型である可能性が高いこと、4 番染色体上の *Tsc4* (LOD score: 6.8) としては、ラット系統間でその多型と発がん感受性が相関する *parathyroid hormone-related protein* (*Pthrp*) である可能性が高いことを見いだしてきた。本年度は、cDNA マイクロアレイを用いて、DA ラットに誘発された舌がんと、WF ラットに誘発された舌がんとで、発現変化を比較した。DA ラット舌がんで 3 倍以上発現上昇する遺伝子 337 個、低下する遺伝子 220 個が認められた一方、WF ラット舌がんで、発現上昇する遺伝子

182 個と低下する遺伝子 81 個が認められた。

ラット大腸発がんモデルを用いて、早期病変の同定とその遺伝子異常の解明を行っている。昨年度まで、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) による発がんモデルでは、前がん病変である dysplastic ACFs を、70 %メタノールによる脱色を利用した分別染色法により容易に同定できることを示した。今年度は、AOM による発がんモデルでの分別染色法の有用性を検討した。AOM 処理後 5 及び 10 週では、通常法では ACF 136 及び 141 個が検出されたが、分別染色法では 46 及び 64 個が検出された。これらのうち、dysplastic ACF と判定されたものは 17 及び 28 個であった。一方、PhIP による発がんモデルについて、dysplastic ACFs と non-dysplastic ACFs について Alcian blue (AB)-PAS 染色により mucin を比較した。Mucin の喪失は、non-dysplastic ACFs では全く認められなかったのに対し、dysplastic ACFs の 35 %で認められた。Mucin の発現消失は、がん化と密接に関連していることが示された。

Eker ラットの腎発がんモデルを用いることで、明確な原因遺伝子 *Tsc2* の変異により、次々と変化が誘導される過程、環境要因によりそれらが修飾される過程を明確に観察できる。cDNA サブトラクションにより見出した遺伝子 *Niban* について、Eker ラットでは、腎がん早期病変である変異尿細管で発現することを見いだしてきた。本年度は、*Tsc1* 欠失マウスの変異尿細管でも、*Niban* が発現していること、また、*Niban* の発現は tunicamycin 処理により顕著に誘導されることを見いだした。新規腎がんモデルである Nihon ラットについて、*Bhd/Flcn* が原因遺伝子座位に存在し、Nihon ラットで変異していることを昨年度までに示した。今年度は、そのトランスジェニックラットを作成し、腎がん発生が抑制されることを証明した。

WBN/Kob ラットは慢性膵炎の自然発症モデルであり、発がん物質の投与により、ヒト膵がんと類似のモデルを構築できる可能性がある。本年度は、膵組織像を 3 ヶ月齢から 5 ヶ月齢まで観察、炎症細胞の浸潤後、広範な膵実質の脱落と繊維化が誘導されることを確認した。更に、プレドニソロンを 3-5 ヶ月齢に投与することで、TNF- α 及び TGF- β 1 の発現が抑制され、膵炎も抑制された。

3 倫理面への配慮

実験動物の取り扱い、各実験施設の指針に従った。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. 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.
2. Furuta J, Ushijima, T. et al., Silencing of the *Thrombomodulin* gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res.*, 15: 15-20, 2005
3. Furuta J, Ushijima, T. et al., Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci*, 95: 962-968, 2004
4. 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.
5. Tsukamoto, T., 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.
6. Mizoshita, T., Tsukamoto, T., et al., Expression of the intestine-specific transcription factors, *Cdx1* and *Cdx2*, correlates shift to an intestinal phenotype in gastric cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 29-36, 2004.
7. Cao, X., Tsukamoto, T., 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. Mizoshita, T., Tsukamoto, T., 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.
9. Tsukamoto, T., et al., *Sox2* expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology*, in press.
10. Otsuka, T., Tsukamoto, T., et al., Coexistence of gastric and intestinal type neuroendocrine cells in gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia of the human stomach. *Pathol Int*, in press.
11. Ochiai, M., et al., Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Letters*, in press
12. Mizuguchi, M., Hino, O., et al., Absence of allelic loss in cytomegalic neurons of cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 107: 47-52, 2004.
13. Kikuchi, Y., Hino, O., et al., Presence of a modifier gene(s) affecting early renal carcinogenesis in the *Tsc2* mutant (Eker) rat model. *Int J Oncol*, 24: 75- 80, 2004.
14. Okimoto, K., Hino, O., et al., A germline insertion in the *Birt-Hogg-Dube'* (*BHD*) gene gives rise to the Nihon Rat model of inherited renal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 : 2023-2027, 2004.
15. Adachi, H., Hino, O., et al., The Niban gene is commonly expressed in renal tumors: A new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene*, 23 : 3495-3500, 2004.
16. Hino, O., Studies of familial tumors using models: genotype, phenotype, and dramatype in carcinogenesis. *Int. J. Clin. Oncol*, 9: 257-261, 2004.
17. Hino, O., Multistep renal carcinogenesis in the Eker (*Tsc2* gene mutant) rat model. *Current Molecular Medicine*, 4: 807-811, 2004.
18. Okimoto, K., Hino, O., et al., Natural history of the Nihon rat model of BHD. *Current Molecular Medicine*, 4: 887-893, 2004.
19. Sakamoto, N., Hino, O., et al., Frequent hypermethylation of *RASSF1A* in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene*, 23: 8900-8907, 2004.
20. Sato, T., Hino, O., et al., A patient with *TSC1* germline mutation whose clinical phenotype was limited to lymphangioliomyomatosis. *J. Int. Medicine*, 256: 166-173, 2004.
21. Ishii, T., Hino, O., et al., A mutation in the *SDHC* gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Research*, 65: 203-209, 2005.
22. Wanibuchi, H., et al., Understanding arsenic

- carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198: 366-376, 2004.
23. Doi, K., Wanibuchi, H., 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.
24. 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.
25. 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.
26. Kubota, T., Kominami, R., et al., Comparison of properties of spontaneous and radiation-induced mouse thymic lymphomas: role of Trp53 and radiation. *Radiat Res*, 163:159-164, 2005.
27. Ohyama, M., Tanuma, J., et al., Expression of JunB and c-fos are enhanced in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue cancers. *Pathology International*, 54:35-40, 2004.
28. Tanuma, J., et al., Genetic predisposition to in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in the rat. *Medical Principles and Practice*, in press.
29. Ogawa, K., et al., Possible role of the microenvironment created by neoplastic hepatocytes during hepatic carcinogenesis. *Appl Genom Proteom*, 2:135-143, 2003.
30. Huiling, X., Ogawa, K., et al., Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in analbuminemic rat livers. *J. Surg Res*, 122:75-82, 2004.
31. Arikura, J., Ogawa, K., et al., Colonization of albumin-producing hepatocytes derived from transplanted F344 rat bone marrow cells in the liver of congenic Nagase's analbuminemic rats. *J Hepatol*, 41: 215-221, 2004.
32. Tokusashi, Y., Ogawa, K., et al., Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer*, 114:39-45, 2005.
33. Kamezaki, K., Ogawa, K., et al., The roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells*, 23: 252-263, 2005.
34. Imamura, E., Ogawa, K., et al., Different growth capacity between infant and adult mouse hepatocytes in vitro correlates to the cyclin D1 level without relation to oxidative DNA damage. *Liver Int*, in press.
35. Inagaki, M., Ogawa, K., et al., Albumin-producing hepatocytes derived from cryopreserved F344 rat bone marrow cells transplanted in the liver of congenic Nagase's analbuminemic rat. *Surg Today*, in press.
36. Sakata, K., Hirose, Y., et al., Dietary supplementation of the citrus antioxidant auranthine inhibits N, N-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Oncology*, 66: 244-252, 2004.
37. Hata, K., Hirose, Y., et al., Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci*, 95: 316-320, 2004.
38. Hirose, Y., et al., Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/ KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis*, 25:821-825, 2004.
39. Oda, S., Tsuzuki, T., et al., Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res*, 33: 1628-1636, 2005.