

16-13 がん化学予防の短・中期検索モデルの開発に関する研究

主任研究者 名古屋市立大学 津 田 洋 幸

研究成果の要旨

本研究の成果については、乳腺、肺、膀胱、前立腺、舌、膵のがん予防物質の中・短期検索モデル開発を目指した。肺では、ヒト活性型 H-ras 遺伝子導入ラットの肺に微小腫瘍病変を発生させ、4週間の抑制物質の検索方法を見いだした。マウスのタバコ関連肺がんモデルの機序の解析からメチル化阻害蛋白発現を指標とした検索モデルへの開発を行った。乳腺短期発がん雌ヒトプロト型 Ha-ras 遺伝子導入ラット (Hras128) を用いて6週で乳腺発がん予防物質の中期検索系を構築した。また、Hras128 と突然変異検出レポーター遺伝子 *gpt delta* とのダブル Tg では、ras と *gpt delta* 変異頻度はほぼ同じで、ras 変異細胞が高確率でがん化する可能性が示された。砒素化合物暴露膀胱発がんに関与する遺伝子解析から VEGF、v-MYC、Cyclin D1、v-JUN などの発現異常を標的とした予防法を開発している。前立腺がん予防物質の検出指標としては PSA が有力であることが分かった。膵液の変異原物質の減少を指標とした膵がん予防物質の短期検索法の有用性を示した。Hras128 を用いて舌がんに対する短期のがん予防物質検出システム構築を行っている。

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
津 田 洋 幸 *1	名古屋市立大学・大学院医学研究科 教授	乳腺短期発がんトランスジェニックラットを用いたがん化学予防物質の短期検索法の開発
福 島 昭 治 *1	大阪市立大学・大学院医学研究科 教授	cDNA マイクロアレイを応用した検索モデルの開発
増 村 健 一 *1	国立衛生研究所 主任研究官	突然変異検出レポーター遺伝子を組み込んだがん化学予防モデルの開発
高 橋 智 *1	名古屋市立大学・大学院医学研究科 助教授	前立腺がん抑制物質早期検出のための遺伝子・タンパクマーカーの確立
竹内 聖 *2	香川大学医学部 助手	マウスを用いた肺発がん化学予防の短期開発を目指した新しいマーカーの開発
松 田 陽 子 *3	香川大学医学部 助手	マウスを用いた肺発がん化学予防の短期モデルの開発を目指した新しいマーカーの開発
堤 健一 *2	奈良県立医科大学 助教授	膵がん化学予防物質の短・中期モデル開発
	*4 同 研究員	
酒々井真澄 *5	琉球大学医学部 助教授	舌がん発生に対するがん予防物質の検出システムに関する研究

- *1 : 平成16年4月1日～平成18年3月31日
- *2 : 平成16年4月1日～平成16年9月30日
- *3 : 平成16年10月1日～平成18年3月31日
- *4 : 平成16年10月1日～平成17年3月31日
- *5 : 平成17年4月1日～平成18年3月31日

総合研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、がんの化学予防は重要であるにも拘わらず実地に使用されているものはきわめて少ない。信頼度の高い予防効果と安全性を短時間に検索し得る動物モデルが開発されていないことによる。難治性がんの一つで、日本における部位別がん死亡原因の第1位となっている肺において、吸入発がんモデルおよび遺伝子改変ラットによる肺、乳腺、における予防物質の短期検索モデルを開発することを目的とした。(津田)。また、A/Jマウスにタバコ煙中の発がん物質 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) を投与すると、cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) によって代謝活性化されて O^6 -methylguanine (O^6 MG) DNA adductを形成し、その結果、K-ras等のがん関連遺伝子の突然変異が引き起こされ、形成された O^6 MG DNA adductの修復酵素である O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 蛋白が消費され、MGMT蛋白の活性が低下することが分かっている。そこで、A/JマウスのNNK誘発肺腫瘍モデルを用いて、 O^6 MGやMGMTの変化を免疫組織学的手法やPCR法によって早期に捉えることが可能であるかを検討し、それを指標として肺発がん抑制物質を短期に判定する検索モデルを確立することを目的とした。(松田)

乳腺においては、ヒト ras 遺伝子が導入された Hras128 ラットと突然変異検出突然変異を検出レポーター遺伝子 *gpt delta* ラットを交配した Hras128/*gpt delta* ダブルトランスジェニックラットに MNU を投与し、乳腺組織におけるレポーター遺伝子の突然変異頻度を野生型と比較検討し、早期の *gpt delta* の変異を指標とした発がん・発がん抑制物質の検索モデルの開発を目指した。(増村)

ヒ素曝露と発がんとの因果関係はまだ明確にされておらず、その化学予防法も確立されていない。オリゴマイクロアレイ法によるヒ素発がん機序の解明とそれに基づく化学予防物質の検索を目的とした。無機ヒ素の主な代謝物である有機ヒ素化合物のジメチルアルシン酸

(DMA) によって誘発された膀胱がんにおける遺伝子発現を解析し、ヒ素の発がん機序の解明を行った。ヒ素発がん予防物質検出法としての有用性を検討した。(福島)

前立腺癌発生もしくはその成長を抑制する化学予防剤の検出を短期間にスクリーニングすることが可能となる検索モデルの確立を目的とした。今年度はヒト前立腺癌細胞株である LNCaP に対して各種タンパク阻害剤を処理し、LNCaP 細胞の増殖に重要なシグナル伝達系を明らかにし、そのカスケード内に存在するタンパク発現状態の化学予防物質の検出指標としての有用性を検討した。

(高橋)

膵管がんの発生に対する膵液の関与に注目し、ハムスターにおいて膵管発がん物質であるニトロサミンを投与すると膵液に変異原性物質が分泌される、がんの発生しないラットの膵液に変異原性はなかった。膵液の変異原性を指標として、膵管がん予防物質の短期スクリーニング系の開発を目的とした。(堤、H16年度)。

ヒト舌がん細胞株に対するがん化学予防物質の検出系の構築を目指して、indole-3-carbinol, nimesulide, acyclic retinoid, curcumin, 3,3'-diindolyl methane 等の既知の癌抑制物質の細胞に対する増殖抑制機序について、作用の顕著な COX2 選択的阻害薬 nimesulide の作用経路を明らかにし、関与する遺伝子の有用性を検討した。(酒々井、H17年度)

2 研究方法および成果

肺においては、ラットでは、8週齢雄F344 ラットにNNKを5mg/ラットの用量で気管支内より噴霧注入して4週、8週、12週後に屠殺して肺腫瘍の発生を観察している。活性化H-ras遺伝子による肺短期発がんモデルでは、ヒト変異型H-ras遺伝子Cre-loxP構築としてコンディショナル発現としたトランスジェニックラット (Hras250) を用い、アデノウィルスの量を4週発がん用量の1/100量 (4×10^6 pfu) を肺内噴霧し、4週後に屠殺した。その結果、すべての動物に微小な過形成巣、腺腫、がん(腺扁平上皮がん)の発生をみた。これを背景値として、肺がん予防物質の短期スクリーニングが出来る则认为。(津田)

マウスのタバコ関連肺発がんモデルでは、7週齢のA/J雌マウス24匹を用い、12匹にNNK 2mg/mouseを腹腔内投与し、12匹に同量の生食を投与した。それぞれ3匹ずつ、4, 8, 12, 24時間後に屠殺剖検を行い、肺の病理組織標本の免疫染色によって、 O^6 MGの発現を検討した。実験2: 7週齢のA/J雌マウス15匹を3群(各5匹)に分

け、第1群にはCYP2A6阻害剤であるmethoxsalen (100ppm)を3日間混餌投与し、第2群、第3群には基礎飼料のみを与えた。3日目に、第1、2群にはNNK 2mg/mouseを腹腔内投与し、第3群には同量の生食を投与した。24時間後に屠殺剖検を行い、肺と肝臓の一部は凍結保存し、残りの肺と肝におけるMGMT蛋白の発現を検討した。リアルタイムPCR法の結果、NNK投与後の肺におけるMGMTのmRNA発現レベルは、第1群(methoxsalen+NNK群) 0.86 ± 0.10 、第2群(基礎飼料+NNK群) 1.12 ± 0.08 、第3群(基礎飼料+生食群) 0.99 ± 0.07 であった。群間において有意差は認めなかったが、1群において2群に比べMGMT mRNAの発現の減少傾向を認めた。肝臓におけるMGMTのmRNA発現レベルは、1群 16.93 ± 0.84 、2群 16.50 ± 1.03 、3群 8.48 ± 0.82 であった。1群、2群において3群に比べ、肝臓でのMGMT mRNAの発現の亢進を認めた ($p < 0.0005$)。1群と2群の間での有意差は認めなかった。現在、免疫染色によって、肺および肝臓におけるMGMT蛋白発現の変化を検討することを試みている。(松田)

乳腺で短期に発がんする雌ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Hras128) に発がん物質投与後にシアニジン化合物の Cyanidin-3- α - β -glucosidase を 0.01% (9匹)、0.1% (10匹)、1% (10匹) の用量で8週間混餌投与した。5週における触知による乳腺腫瘍発生頻度は、それぞれで 55.6%、20%、10%、6週では 77.8%、40%、20%と用量相関的に減少した。この系を用いて6週で乳腺のがん予防物質の検索が可能と考える。(津田)

Hras128/*gpt* deltaラットの雌個体に N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を投与し、乳腺組織における突然変異頻度および変異スペクトルの解析を行った。突然変異解析群として、*gpt* (+/-) Hras (+/-) 個体および *gpt* (+/-) Hras (-/-) 個体にMNUを単回投与 (50 mg/kg, 尾静脈注射) し4週間後に乳腺組織を回収した。MNU投与群および溶媒対照群について各群6匹を用いた。また、突然変異検出のレポーター遺伝子を持たない *gpt* (-/-) Hras (+/-) 個体および *gpt* (-/-) Hras (-/-) 個体に対しても同様にMNUを投与し、8週間後に解剖して組織学的検索を行った。その結果、突然変異解析群においては、MNU投与後4週間の時点で *gpt* (+/-) Hras (+/-) 個体の5/6匹に乳腺腫瘍が認められた。溶媒対照群でも1/6匹に乳腺腫瘍が認められ、Hras導入ラットが乳腺発がんの高い感受性を示すことが確認された。組織よりゲノムDNAを抽出し各群3匹から1匹あたり10万以上のレポーター遺伝子を回収した。回収したファージから大腸菌 *gpt* 遺伝子

をレポーターとする6-チオグアニン選択法によって変異体を検出し、点突然変異体頻度を測定した。Hras (-/-) 個体のMNU投与群と溶媒対照群の *gpt* 突然変異頻度 (\pm SD) はそれぞれ $35.0 \pm 23.9 \times 10^{-6}$ 、 $3.8 \pm 4.8 \times 10^{-6}$ であった。ヒトras遺伝子が導入されたHras (+/-) 個体のMNU投与群と溶媒対照群の変異頻度はそれぞれ $23.5 \pm 14.8 \times 10^{-6}$ 、 $7.4 \pm 4.9 \times 10^{-6}$ であった。Hras (-/-) およびHras (+/-) 個体ともにMNU投与によって乳腺組織で点突然変異頻度が有意に増加したが、MNU投与群および対照群ともにras遺伝子導入による変異頻度の有意な差は認められなかった。さらに、MNU処理群Hras (-/-)、Hras (+/-) 各3匹由来の *gpt* 変異体の塩基配列解析を行い、変異スペクトルを比較した。その結果、どちらの群においてもG:C to A:T のトランジション変異が全体の7~8割を占めて最も多く、次いでG:C to T:A、A:T to T:Aトランスバージョン変異が1割程度ずつみられた。以上の結果から、Hras導入による乳腺発がん感受性の増進は、組織の突然変異誘発を促進するのではなく、突然変異が起こった細胞が高い確率でがん化することによるという可能性が示唆された。また、Hras128ラットは自然発がんに対して高感受性となるだけでなく、タイプの異なる様々なgenotoxic carcinogensに対して高い乳腺発がん感受性を示すことが予想された。(増村)

砒素化合物DMA発がんに関与する遺伝子について解析した。方法：200ppm DMAの104週間飲水投与で誘発した雄ラットの膀胱がん5例と、雌ラットの膀胱がん6例、および同週齢の無処置ラットの膀胱粘膜(雄5例、雌4例)からRNAを抽出し、Affymetrix GeneChip (Rat Genome 230 2.0 Array) を用いて発現解析を行った。正常粘膜と比較して、がんでの発現量が2倍以上の発現量の差を示し、かつt検定で有意差が認められた遺伝子を同定した。結果と考察：雌雄の膀胱がんで正常膀胱粘膜と比較して共通して高発現する遺伝子を325種類、共通して低発現する遺伝子を295種類認めた。またそのうち膀胱がんの発生に関与すると思われるがん関連遺伝子を81種類同定した。さらに、遺伝子機能解析によりDMA誘発膀胱がんにおいてVEGF、v-MYC、Cyclin D1、v-JUNおよびCollagen 1A1などの発現異常が中心的な役割を担っていることが示唆された。これらの遺伝子がDMA膀胱発がんの予防に役に立つ標的遺伝子になりうる可能性も考えられる。また、マイクロアレイ法は発がんメカニズムに基づいた発がん抑制要因を検索する上で有用な方法になり得ることが示された。(福島)

前立腺がん化学予防物質の検出モデルの開発では、

先ずヒト前立腺がん細胞株である LNCaP に対して各種タンパク阻害剤を処理し、LNCaP 細胞の増殖に重要なシグナル伝達系を明らかにし、そのカスケード内に存在するタンパク発現を検討して化学予防剤の検出マーカーとしての有用性を検討した。LNCaP 細胞に対して各種阻害剤を暴露した結果、PI3 kinase-Akt, MAPK および Hedgehog pathway が LNCaP 細胞の増殖に重要なシグナル伝達経路であることが明らかとなった。前立腺がん細胞の化学予防物質として知られている Bicalutamide, Genistein, Resveratrol を 3 日間処置すると、LNCaP 細胞は 10 μ M Bicalutamide で 40%、25 μ M Genistein で 50%、25 μ M Resveratrol で 70%増殖が抑制された。抑制作用の共通事項としての Akt, Bad, Erk1/2 の活性化抑制は見いだせなかった。一方、PSA 発現低下は Bicalutamide, Genistein, Resveratrol の 3 剤に共通して観察された。今回検討した範囲内では前立腺がんに対する化学予防剤の検出マーカーとしては PSA が有力候補であると考えられた。ラットには PSA が存在しないことから in vivo モデルを併用する際には PSA に代わる Probasin などの Androgen-responsive な遺伝子やそのタンパクについての検討が必要である。(高橋)

雄性シリアンハムスターを用いて腭液の変異原性を指標とした膵管がん予防物質のスクリーニング系の開発を行った。胆管より膵管にカテーテルを挿入後、内因性の膵発がん促進物質のデオキシコール酸(DCA、400mg/kg)を投与した。その後、膵液の分泌量を増加させるためセルレインを静脈内投与し、約 5 時間膵液を採取した。膵液の変異原性はニトロサミン高感受性の YG7108 株(増村班員より供与)を用いた。披験物質として、DCA の代謝に影響するオリゴ糖(XOA および XOB)を 0.4%の濃度で含有する飼料を 4 週間投与した。膵液の変異原性は DCA 投与に比べて非投与より約 9 倍に増加した。4 週間前からオリゴ糖(XOA および XON)含有食を投与した後 DCA を投与した膵液のリバート数、オリゴ糖を投与しない群の 50%以下に減少した。以上から、デオキシコール酸による膵液中の変異原物質の減少を指標とした膵がん予防物質の短期検出法の有用性が示唆された。(堤、H17 年度)

ヒト口腔がん細胞株 OSC40 を用いて MTT アッセイ法・コールターカウンター法により複数のがん予防候補物質を同時にスクリーニングし増殖抑制効果を検討した。OSC40 株を 1 \times 10⁴/ml の濃度にて RPMI1640/10%FBS の条件下で培養した。1~500 mM の濃度の被検物質を細胞に 48 時間暴露後、細胞数を測定し dimehtylsulfoxide (DMSO)

処理細胞をネガティブコントロールとし viability を計算することにより増殖曲線を作成した。5 種類の被検物質は全て OSC40 株に対して濃度依存性の増殖抑制効果を示した。IC₅₀ 値(50%増殖抑制率)は indole-3-carbinol 200 mM, nimesulide 180 mM, acyclic retinoid 50 mM, curcumin 40 mM, 3,3'-diindolyl methane 30 mM であった。メカニズム解析には COX2 選択的阻害薬である nimesulide を用いた。フローサイトメトリーの結果、nimesulide は 50 mM の濃度にて暴露後 48 時間で細胞周期に G1 arrest を誘導した。次に、細胞周期調節に係わる代表的な分子である cyclinD1, p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p53 発現に対する影響を RT-PCR 法にて検討した結果 10~200 mM の nimesulide は濃度依存性に p21^{CIP1} および p53 mRNA 発現を誘導した。CyclinD1 及び p27^{KIP1} mRNA 発現に対しては影響しなかった。さらに、50~200 mM nimesulide 暴露後 48 時間で形態変化を引き起こし、96 時間で扁平上皮細胞の分化マーカーである CK1 及び TGase1 mRNA 発現を誘導した。以上の結果より nimesulide はヒト口腔がん細胞株の増殖を抑制し、メカニズムとして細胞周期調節分子への作用が考えられた。これら結果は舌がん予防物質検出のための簡便な実験システムとなることが示唆された。次に、Hras128 ラットを用いて舌がんに対する超短期・高感度のがん予防物質検出システムを構築する。現在、発がん剤 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を Hras128 に 4 週間飲水投与し計 14 週間で評価可能な実験システムを構築中である。対照として野生型 SD ラット長期実験を実施中である。(酒々井、H17 年度)

3 倫理面への配慮

各班員は所属施設の動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)に準拠した実験を行った。