

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、舌のがん予防物質の中・短期検索モデル開発を目指した。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週で抑制物質の検索可能な方法を見いだした。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得た。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* 遺伝子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唆された。マウスのタバコ関連肺発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短期検索モデルへの開発を行っている。砒素化合物 DMA 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の基礎データを得た。前立腺がん化学予防剤を短期間スクリーニング検出指標としては PSA が有力候補であることが分かった。Hras128 を用いてに舌がんに対する短期のがん予防物質検出システム構築実験を行っている。

研究者名および所属施設

分担研究課題

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
津 田 洋 幸	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	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
松 田 陽 子	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
増 村 健 一	国立衛生研究所 主任研究官	突然変異検出用レポーター遺伝子を組み込んだがん化学予防モデルの開発
酒々井真澄	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
高 橋 智	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

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。

モデルが開発されて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。本研究では、最も予後不良な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)

ヒ素曝露とヒト発がんとの因果関係は疫学的に証明されており、その汚染は地球規模で問題となっている。しかしながら現在ヒ素の発がん機序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。本研究は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ている。本年度は、マイクロアレイ法を用いて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。また、マイクロアレイ法の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)

疫学的研究で、肺扁平上皮がんの最も大きなリスク要因は喫煙であることが明らかになっているが、近年増加している肺の腺がんでは、そのリスク要因が十分に解明されておらず、食事性要因や女性ホルモン等の関与が示唆されているのみである。肺腺がんに対する予防と治療を進めていく上で、様々な要因や物質が肺腺がんを与える影響を解明することは非常に重要であると考えられ、そのためには効率よく判定できるような動物モデルの開発が望まれる。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、主として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て発がんに至ると考えられている。さらに、NNK投与後の早期の段階で、形成された O^6 MG DNA adductを修復するためにその修復酵素である 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。また、ヒトの様々な臓器のがんにおけるMGMT蛋白の発現低下やMGMT遺伝子プロモーター領域のメチル化が報告されており、これはヒトの発がんにおいてもMGMTが重要な役割を担うことを示唆する。そこで、今回我々は、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、可能であればそれを指標として様々な化学物質による肺発がんに与える影響を比較的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、突然変異を検出するためのレポーター遺伝子を導入した *gpt delta* トランスジェニックラットを用いて、発がん抑制物質の短期検索系に貢献するモデルを樹立することを目的とする。今年度は、ヒト *ras* 遺伝子が導入された *Hras128* ラットと突然変異検出用 *gpt delta* ラットを交配した *Hras128/gpt delta rat* に MNU を投与し、発がん高感受性を示す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)

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を検討して化学予防剤の検出マーカーとしての有用性について検討した。(高橋)

ヒト舌がん細胞株に対するがん化学予防物質の検出システムの構築を目指して、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メカニズムについて、最も作用の顕著な COX2 選択的阻害薬である nimesulide の作用経路を明らかにし、バイオマーカーとしての有用性を検討した。(酒々井)

2 研究方法および成果

本年度の研究方法および成果は、肺吸入発がんモデルでは8週齢雄F344ラット(約200g)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。8週ではまだ前がん病変も含めて腫瘍発生に至っていない。活性化H-ras遺伝子による肺発がんの短期化を目的としたモデルでは、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、ベクターのCre-recombinaseを組み込んだアデノウィルスを用意実験における短期(4週)発がん用量の1/100量である 4×10^6 pfuにして肺内噴霧し、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）の発生をみたが、ベクターのみの対照群では全くみられなかった。この方法は肺がん予防物質の4週の短期スクリーニングに利用出来ると考える。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) ラットにDMBA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)

砒素化合物DMAに暴露された場合の発がん予防法の開発のために、その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：雌雄の膀胱がんを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。マイクロアレイ遺伝子発現データをリアルタイム定量PCRにより検証した結果、膀胱がんにおける遺伝子発現レベルの傾向は、マイクロアレイ遺伝子発現解析において示された傾向に一致した。したがって、これらの遺伝子がDMA膀胱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。以上の結果は、ヒ素膀胱がん機序の解明につながるとともに発がん予防の手かがりとなることが期待される。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)

マウスの肺がんモデルではタバコ関連発がんモデルにおける発がん機序の解析から、予防モデルの開発を行った。実験1：7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、肺を摘出した。肺は気管からメタカンを注入して固定して病理組織標本を作製し、免疫染色によって、肺における0^oMG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群に分け、1群(N=5)にはCYP2A6阻害剤であるmethoxsalen 100ppmを3日間混餌投与し、2(N=5)、3群(N=5)には基礎飼料のみを与えた。3日目に、1、2群にはNNK 2mg/mouseを腹腔内投与し、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、肺と肝臓を摘出した。肺と肝臓の一部は凍結保存し、残りの肺は気管からメタカンを注入して肝臓と共に固定し、免疫染色によって、肺と肝臓におけるMGMT蛋白の発現を検討した。凍結保存された材料を用いてreal time PCR法を行い、肺におけるMGMTのmRNAレベルでの発現を検討した。結果：実験1：NNK投与後の肺における0^oMGの発現を免疫染色によって確認することはできなかった。その理由として、0^oMGの肺における発現は非常に低いレベルである可能性が考えられた実験2：real time PCR法の結果、NNK投与後の肺におけるMGMTのmRNA発現レベルは、1群(methoxsalen+NNK群)0.86 \pm 0.10、2群(基礎飼料+NNK群)1.12 \pm 0.08、3群(基礎飼料+生食群)0.99 \pm 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 \pm 0.84、2群16.50 \pm 1.03、3群8.48 \pm 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)

突然変異検出用レポーター遺伝子を導入した*gpt delta*ラットとHras128ラットを交配し、Hras128/*gpt delta*ダブルトランスジェニックラットを作製した。乳発がん高感受性を示すHras128ラットはSprague-Dawley系であり、同じくSprague-Dawleyをバックグラウンドとする*gpt delta*ラットを用いることで交配による系統差の問題は生じない。このHras128/*gpt delta*ラットの雌個体に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。MNU投与実験には50日齢のHras128/*gpt delta* rat (Sprague-Dawley) 雌個体を用いた。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。乳腺は鼠径部の一対を採取し、脂肪組織をできるだけ取り除いたものを乳腺標品として凍結保存した。MNU投与群

および溶媒対照群について各群 6 匹を用いて実験を行った。また、組織解析群として、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。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。一方、*Hras* (-/-) 個体については、MNU 投与群と溶媒対照群ともに乳腺腫瘍の発生は認められなかった。MNU 投与 8 週間後の組織解析群においても、*Hras* (+/-) 個体の 5/6 匹、溶媒対照群の 1/6 匹に乳腺腫瘍が認められた一方で *Hras* (-/-) 個体については乳腺腫瘍の発生は認められなかった。*gpt* delta ラットの 4 番染色体には、変異検出のためのレポーターとなる λ EG10 フェージ DNA が導入されている。組織よりゲノム DNA を抽出し、*in vitro* パッケージング法にて導入 DNA をフェージ粒子として回収した。乳腺組織からの DNA 抽出には透析法とフェノール抽出法を用いたが、組織が固く脂肪が多いことから、レポーター遺伝子の回収に十分な品質の DNA を調製することが難しかった。凍結粉碎と透析法を組み合わせた DNA 抽出法によって回収効率を高められないかと試みた結果、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することが出来た。こうした回収効率の低さは、採取した乳腺組織の細胞数が少ないこと、ゲノムに導入されたレポーター遺伝子のコピー数が少ない（ハプロイドあたり数コピー）ことによると考えられる。回収したフェージから大腸菌 *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 (Fig. 2)。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。

これらは MNU 等のアルキル化剤によって生じる代表的な DNA 損傷である *O*⁶-methylguanine、*O*⁶-methylthymine に由来する塩基置換変異と考えられる。以上の結果から、点突然変異頻度と変異スペクトルについて *Hras* (+/-) と *Hras* (-/-) を比較すると、両群の変異頻度に有意な差は認められず、変異スペクトルも非常に似た特徴を持っていた。乳腺組織において、導入 *ras* 遺伝子が MNU 誘発突然変異の促進効果あるいは特定の変異タイプの誘発に関わっていることを示す現象は認められなかった。このことから、*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る。その場合、*Hras*128 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 に対して総じて高い乳腺発がん感受性を示すことが予想される。今後は、*Hras* 導入ラットの乳腺以外の組織（肝臓）における変異誘発への影響、また、加熱食品に含まれる発がん物質である PhIP の突然変異誘発能への影響について検証していくことが重要と考える。(増村)

前立腺がん発生もしくはその成長を抑制する化学予防物質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について検討した。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剤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 10uM Bicalutamide で 40%、25uM Genistein で 50%、25uM Resveratrol で 70% 増殖が抑制された。そこでこれらの LNCaP 細胞におけるタンパク発現について前述した各 pathway 内に存在する分子種を検討するとともに、前立腺がん細胞増殖に必須である androgen receptor pathway の transcriptional effector である PSA についても評価した。その結果、3 種化学予防剤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-

カーとしてはPSAが有力候補であると考えられた。今回使用したBicalutamide、Genistein、ResveratrolはいずれもPSA発現を減少させることが知られているが、そのメカニズムとしてBicalutamideではARに対するDHTの結合阻害、GenisteinはAR依存性、非依存性メカニズムの両者、Resveratrolは主としてAR非依存性メカニズムを介すると報告されている。今後、前立腺がん化学予防物質として知られているlycopene, seleniumなど数種類の物質を使用し、PSA発現に対する影響を検討してマーカーとしての有用性を検証する。最終的にはin vitro studyと同時にラット前立腺がんモデルを用いたスクリーニングも併用させたいと考えているが、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)

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 1×10^4 /mlの濃度にてRPMI1640/10%FBSの条件下で培養した。 $1 \sim 500$ 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dimethylsulfoxide(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 $10 \sim 200$ mMのnimesulideは濃度依存性にp21^{CIP1}およびp53mRNA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、 $50 \sim 200$ 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TGase1mRNA発現を濃度依存性に誘導した。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、その分子作用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。これら一連の実験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、ヒトras遺伝子導入ラ

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)をヒトras遺伝子導入ラット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SDラット長期実験を実施中である。(酒々井)

3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、本研究における倫理面への配慮については、各班員は所属施設の動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」、またWorld Health Organization(WHO)の医学研究顧問委員会の勧告に基づくThe Council for International Organization of Medical Sciences(CIOMS)による「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に準拠した実験を行っている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Tsuda, H., et al. High susceptibility of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats to carcinogenesis: A cancer-prone animal model. *Cancer Sci.* 96(6): 309-316, 2005.
2. Kohno, H., Tsuda, H. et al. Dietary Supplementation with silymarin inhibits 3,2'-Dimethyl-4-Aminobiphenyl-induced Prostate Carcinogenesis in Male F344 rats. *Clin Cancer Res.* 11(13): 4962-67, 2005.
3. Iigo, M., Tsuda, H. et al. Cancer prevention and anti-metastatic effect by oral administration of bovine lactoferrin. In: Takuji Tanaka, Hiroyuki Tsuda eds. *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, Kerala, India, Research Signpost, 229-241, 2005.
4. Morimura, K., Tsuda, H. et al. Lack of Urinary Bladder Carcinogenicity of Sodium L-Ascorbate in Human c-Ha-ras Proto-Oncogene Transgenic Rats. *Toxi Path.* 33: 764-767, 2005.
5. Suzuki, R., Tsuda, H., et al. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis.* 27(3): 619-630, 2005.

6. Wei, M., Fukushima, S., et al. JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int. J. Cancer*, 113: 354-358, 2005.
7. Kuroda, K., Fukushima, S., et al. Genotoxicity of dimethylarsinous acid: high induction of tetraploids. *Appl. Organometal. Chem.*, 19: 221-225, 2005.
8. Kang, J. S., Fukushima, S., et al. Persistence of liver cirrhosis in association with proliferation of nonparenchymal cells and altered location of α -smooth muscle actin-positive cells. *Toxicol. Pathol.*, 33: 329-335, 2005.
9. Kang, J. S., Fukushima, S., et al. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide-induced liver cirrhosis of rats. *Toxicol. Sci.*, 85: 720-726, 2005.
10. Fukushima, S., et al. Lack of potential of low dose *N*-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione *S*-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett.*, 222: 11-15, 2005.
11. Doi, K., Fukushima, S., et al. Lack of large intestinal carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine at low doses in rats initiated with azoxymethane. *Int. J. Cancer*, 115: 870-878, 2005.
12. Hagiwara, A., Fukushima, S., et al. Influence of strain and diet on hepatocarcinogenicity of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) in rats: slight inhibition of preneoplastic liver lesion development by uracil. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 105-110, 2005.
13. Kuramoto, T., Fukushima, S., et al. Sparse and wavy hair: a new model for hypoplasia of hair follicle and mammary glands on rat chromosome 17. *J. Hered.*, 96: 339-345, 2005.
14. Fukushima, S., et al. Current and emerging challenges in toxicopathology: carcinogenic threshold of phenobarbital and proof of arsenic carcinogenicity using rat medium-term bioassays for carcinogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207: S225-S229, 2005.
15. Fukushima, S., et al. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*, 26: 1835-1845, 2005.
16. Murai, T., Fukushima, S., et al. Differences in susceptibility to *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis between SD/gShi rats with spontaneous hypospermatogenesis and SD/cShi rats with spontaneous hydronephrosis. *Cancer Sci.*, 96: 637-644, 2005.
17. Kushida, M., Fukushima, S., et al. Low dose DDT inhibition of hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats: Possible mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 208: 285-294, 2005.
18. Kushida, M., Fukushima, S., et al. Dose-dependence of Promotion of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline-induced rat hepatocarcinogenesis by ethanol: Evidence for a threshold. *Cancer Sci.*, 96: 747-757, 2005.
19. Morimura, K., Fukushima, S., et al. Lack of urinary bladder carcinogenicity of sodium *L*-ascobate in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats. *Toxicol. Pathol.*, 33: 764-767, 2005.
20. Yamachika, T., Fukushima, S., et al. Establishment and characterization of a human colonic mucinous carcinoma cell line with predominant goblet-cell differentiation from liver metastasis. *Pathol. Int.*, 55: 550-557, 2005.
21. Matsuda, Y., et al. Post-initiation chemopreventive effects of dietary bovine lactoferrin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer letters*, in press
22. Matsuda, Y., et al. Dose dependent inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Letters*, in press
23. Suzui, M., et al. Acyclic retinoid, a novel synthetic retinoid, induces growth inhibition, apoptosis, and changes in mRNA expression of cell cycle- and differentiation-related molecules in human colon carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* In press
24. Suzuki, R., Suzui, M., et al. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, In press
25. Kinjo, T., Suzui, M., et al. Distribution of preneoplastic lesions and tumors, and β -catenin gene mutations in the rat colon carcinomas induced by 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sulfate sodium. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* In press
26. Suzui, M., et al. Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int. J. Oncol.*, 27: 1391-1399, 2005.
27. Suzui, M., et al. New insights into molecular

- carcinogenesis. *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*. eds by T. Tanaka, H. Tsuda. pp. 33-48, 2005.
28. Inamine, M., Suzui, M., et al. Inhibitory effect of dietary monoglucosylceramide 1-O- β -glucosyl-N-2'-hydroxyarachidoyl-4,8-sphingadienine on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Cancer Sci.*, 96: 876-881, 2005.
29. Kaneshiro, T., Suzui, M., et al. Growth inhibitory activities of crude extracts obtained from herbal plants in the Ryukyu Islands on several human colon carcinoma cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 6: 353-358, 2005.
30. Morioka, T., Suzui, M., et al. Modifying effects of *Terminalia catappa* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Eur. J. Cancer Prev.*, 14: 101-106, 2005.
31. Shibata, A., Masumura, K., 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.
32. Hashimoto, A., Masumura, K., et al. In vivo mutagenesis induced by benzo[a]pyrene instilled into the lung of gpt delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen*, 45:365-73, 2005
33. Nohmi, T., Masumura, K., et al. Molecular nature of intrachromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Environ Mol Mutagen*, 45:150-61, 2005.
34. Miyazaki, M., Masumura, K., et al. Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas, *Carcinogenesis*, 26:1947-55, 2005.
35. Ito, A., Takahashi, S., et al. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Lett*, 219:105-112, 2005.
36. Ikeda, Y., Takahashi, S., et al. Equivocal impact of transplacental and lactational exposure to a food-derive carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine, on prostate and colon lesion development in F344 rats. *Cancer Lett.*, 224:23-30, 2005.
37. Kioi, M., Takahashi, S., et al. Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced ovarian cancer therapy. *Cancer Res.*, 65:8388-8396, 2005.
38. Ohara, H., Takahashi, S., et al. Histopathologic similarities of inflammatory pseudotumor to autoimmune pancreatitis: A morphologic and immunohistochemical study of 4 cases. *Pancreas*, 32:115-117. In press.
39. Takahashi, S., Takahashi, S., et al. Difference between latent and clinical prostate carcinomas: lower cell proliferation activity in latent cases. *Prostate*, 66:211-217. In press.
40. Suzuki, S., Takahashi, S., et al. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate*. In press.