

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

N-ニトロソタウロコール酸は DNA と付加体を形成し、変異を誘発した。誘導型 NO 合成酵素と Hemoxygenase-1 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型の高プロモーター活性型の組み合わせは顕著に胃癌リスクを上げた。慢性 C 型肝炎患者では、8-ニトログアニン生成および iNOS 発現が肝細胞で認められ、インターフェロン有効例では顕著に抑制された。作用機序の異なる発がん性化合物や電離放射線の相互作用により、発がん性における相乗効果が生じた。炎症の存在下では大腸、膵臓等の発がん性が促進される可能性や、高脂肪摂取による肺腫瘍性病変の促進効果が認められた。炎症時の酸素ラジカルによるゲノム DNA の修飾は部位特異的に生じる可能性を見出した。制限酵素 *MspI* でヒト生細胞内に DNA 二本鎖切断 (DSB) を生じる実験系を開発し、*MspI* 感受性部位が染色体異常の引き金となる DSB の感受性部位を反映していることを示した。CYP2A6 の活性を阻害する 2 種類の天然抽出物を同定し、発がん予防薬としての可能性を示した。スキルス胃癌腹膜播種マウスモデルの生体イメージングシステムを構築し、胃壁での浸潤増殖から腹膜播種の形成までを同一マウスで定量的に観察できることを示した。

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	消化器発がん要因の検索
山本 順寛	東京工科大学バイオニクス学部 教授	生体内酸素ラジカル生成の評価と発がんへの関与
山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官	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
片岡 洋行	就実大学薬学部 教授	ヘテロサイクリックアミンのヒト曝露量の測定
梅本 淳	徳島大学医学部 助教授	胆汁酸と大腸発がんとの関連性
眞野 成康	東北大学大学院薬学研究科 助教授	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
桑原 義和	東北大学大学院加齢医学研究所 助手	トロトラスト症病理試料の収集・整理及び分子病理学的解析
岡田 太	山形大学大学院医学系研究科 助教授	炎症による発がん機構とその阻止
立道 昌幸	昭和大学医学部 助教授	炎症による発がん促進機序に関する研究
川西 正祐	三重大学大学院医学系研究科 教授	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
松田 知成	京都大学大学院 助教授	様々な DNA 付加体の定量方法の開発と測定
中釜 斉	国立がんセンター研究所 部長	PhIP 誘発大腸発がんモデルを用いた発がん修飾要因の解明
堤 雅弘	奈良県立医科大学 博士研究員	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

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
白井 智之	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
向所 賢一	滋賀医科大学 助手	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	大腸がんのムチン澱濁巣 (MDF) の分子病理学的検索
甲野 裕之	金沢医科大学 助教授	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	香川大学医学部 教授	肺腺がん発生に関与する環境要因の検討
島田 義也	放射線医学総合研究所 プロジェクトリーダー	P hIP、MNU ならびに γ 腺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
鱒淵 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性に関する要因
横田 淳	国立がんセンター研究所 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所 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所 教授	薬物動態の変動に関わる核内因子とヒト感受性
森下由紀雄	筑波大学大学院人間総合科学研究科 助教授	肺腺がん及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 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 省令室長	スキルス胃がんの発生に関わる因子の検索

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

で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の基礎的研究成果をあげることを目的とする。

2 研究成果

A: 発がんに係わる外因性・内因性要因の検索

胆汁酸抱合体のN-ニトロソ体である、N-ニトロソタウロコール酸 (NO-TCA) は変異原性及び発がん性を示すことが知られている。NO-TCA由来のDNA付加体の生成及びその構造の解析を行った。また、NO-TCAの変異スペクトルを *Salmonella typhimurium* TA100 を用いて検討した。その結果、NO-TCAとDNAとの反応で 3-ethanesulfonic acid-dC、N⁴-choly1-dC、N⁶-choly1-dAの少なくとも3種類の付加体が生成されることが明らかとなり、これら付

加体がサルモネラ菌にG:C→A:Tのtransitionを誘発することが示唆された。

環境変異原の1つ、多環芳香族炭化水素 (PAH) に特異的に感受性の高い Ames テスター株として、*O*-アセチル転移酵素 (OAT) とニトロ還元酵素 (NR) を欠損した YG7158 株に大腸菌の *Y*-ファミリーDNAポリメラーゼである DNAポリメラーゼ IV (pol IV) を高発現させた菌株 YG5185 株を作製した。代表的な PAH である Benzo[*a*]pyrene (BP)、10-Azabenz[*a*]pyrene (10azaBP) は、OAT/NR の有無にかかわらず、pol IV の高発現により 10 - 14 倍の変異原性を示した。一方、1, 8-Dinitropyrene (DNP)、Glu-P-1 は pol IV の発現に関わらず、OAT/NR 欠損株では変異原性が減弱した。YG5185 株は多環芳香族炭化水素に特異的に感受性が高いことが示され、環境中の変異原物質のスクリーニングに利用できることが示唆された。

強力な変異原性や発癌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、食品中の結合型 HCA に着目して、様々な調理食品における存在や生成条件などを検討した。調理する際の加熱温度が高くなると遊離型、結合型 PhIP の生成量は増え、初期に結合型 PhIP が遊離型よりも多く、次第に遊離型が増えた。また、加熱調理する際、まず PhIP が生成し、その後蛋白質の SH 基に結合する可能性が示唆された。また、通常の方法で調理した食品における PhIP-蛋白質付加体の含量を GC-NPD 法で測定したところ、焼肉よりも焼魚の方の多く含まれており、白身よりも血液成分を多く含む赤身に比較的多いことがわかった。

胆汁酸レセプター FXR が FXR が胆汁酸の大腸発癌過程の修飾に関与しているかどうかを検討するため、FXR(+/-) の wild の C57BL/6N マウスと FXR(-/-) のマウスを用いて FXR のノックアウトや胆汁酸による MDR-1a (胆汁酸の細胞外排泄に関わるトランスポーター) 発現に対する影響を検討した。大腸正常粘膜における MDR-1a は胆汁酸の投与により発現が上昇し胆汁酸排泄に向かうが、腫瘍ではその機構が破綻しており MDR-1a の発現は顕著に低下したことから、腫瘍で胆汁酸が蓄積される可能性が示された。FXR を K/O すると正常粘膜でも MDR-1a の発現は低下したことから FXR が MDR-1a の発現調節に関与している可能性がある。

二次胆汁酸がアシルアデニレートを経して細胞内タンパク質、特に核ヒストンに対して不可逆的に結合することが、がん発症のプロモーター作用と関連するものと考え、非酵素的な付加体生成につき検討を進めた。培養細胞より調製した細胞破砕液に対して胆汁酸アシルアデニ

レートを添加した後、37°C で 24 時間インキュベートし作用させ、付加反応について検討したところ、100 nmol 添加において分子量 30 kDa 付近にタンパク質バンドが検出され、さらに 1000 nmol 添加試料においては、20 kDa より高分子量側にスメア状に多種類のバンドが検出された。現在、検出された 30 kDa 付近のタンパク質に関して同定並びに胆汁酸付加部位の解析を試みている。

8-ニトログアニンは活性窒素種により生成される変異誘発性の DNA 損傷塩基である。種々の感染症および慢性炎症性疾患における 8-ニトログアニン生成および発がんにおける役割について検討した。タイの胆管がん患者を対象とした分子疫学的研究では、8-ニトログアニンががん組織で非がん組織より多く生成され、がんの浸潤と相関するという知見を得た。慢性 C 型肝炎患者の生検標本では、8-ニトログアニン生成および iNOS 発現が肝細胞で認められ、インターフェロン有効例では顕著に抑制された。口腔内前癌状態 (扁平苔癬、白板症) の患者の口腔粘膜でも 8-ニトログアニン生成を認め、口腔発がんにニトロ化ストレスが関与する可能性を明らかにした。8-ニトログアニンは炎症関連発がんリスクおよび炎症性疾患の治療効果を評価できる新規バイオマーカーとなりうるものと考えられた。

α 線源であるトリトラストは投与後肝臓に蓄積し、数十年して肝内に癌が発症する。これまでに収集した、合計約 240 例のトリ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整理と保存を行った。マイクロサテライトマーカーを利用する事により、全ゲノム領域における LOH 解析をトリトラスト症肝内血管肉腫に関して開始した。トリトラスト症肝内胆管細胞癌との比較から、トリトラスト症肝内血管肉腫で第 8 番と第 13 番染色体にそれぞれ特異的な LOH を発見した。

炎症細胞の活性酸素生成に必須な酵素サブユニットである gp91^{phox} 遺伝子の欠損マウスを用い、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。低腫瘍原性・非転移性のマウス線維肉腫 QR-32 あるいは悪性黒色腫の転移能獲得頻度は、野生型マウスに比べ gp91^{phox}^{-/-} マウスにおいて低下していた。gp91^{phox}^{-/-} マウスにおける転移能の獲得頻度は、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、転移責任遺伝子 (サイモシン β 4) の発現亢進が起らないことを見いだした。炎症細胞由来の活性酸素は、低腫瘍原性、非転移性の良がん細胞

のがん化および悪性化に関わることが明らかとなった。

iNOS のプロモーター領域には 5 塩基 (CCTTT) の繰り返し数が異なる遺伝子多型があり、胃がんの発がんリスクと関連する。そこで、iNOS が産生する一酸化窒素 (NO) によって発現誘導される HO-1 との相互作用について検討した。HO-1 のプロモーター領域には 2 塩基 (GT) の繰り返し数多型がありプロモーター活性が異なることから、iNOS と HO-1 のそれぞれの繰り返し数を決定して、両遺伝子の組み合わせの遺伝子型と胃がんリスクを検討した。iNOS-HO-1 の両遺伝子の低発現型の組み合わせに比して高発現型を有する人の年齢、性補正後の胃がんリスクは、オッズ比 4.35 と有意に上昇していた。HO-1 の発現はアポトーシスを強く阻害することから iNOS が高発現しアポトーシス抵抗性が強い群において胃がんの発癌リスクが高くなる可能性が示唆された。

ニトロソ胆汁酸抱合体により生成される 4 種類の DNA 付加体、*O*⁶-carboxymethyl-dG、*N*²-ethanesulfonic acid-dC、*N*²-cholylyl-dC 及び *N*²-deoxycholylyl-dC を LC/MS/MS を用いて検出手法を開発した。このうち *N*²-ethanesulfonic acid-dC については感度が低く、10⁶塩基あたり数個の付加体がないと検出できないが、他の付加体については 10⁸塩基に数個の付加体も検出できることがわかった。これら付加体の内、*O*⁶-carboxymethyl-dG、及び *N*²-cholylyl-dC はラットの十二指腸逆流モデルの胃の DNA 中に検出された。

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 の併用投与による大腸がんへの影響について検討した。PhIP 単独投与群、AOM 単独投与群、AOM 2 回投与群 (AOMx2) では、ラット一匹当たり平均 0.1±0.3 個 (発生率 38%)、1.4±0.8 個 (発生率 90%)、0.8±1.0 個 (発生率 70%) の大腸腫瘍が誘発されたのに対し、PhIP+AOM 群では 3.0±1.5 個 (発生率 100%)、PhIP+AOMx2 群では 4.7±2.3 個 (発生率 100%) の大腸腫瘍が誘発され、発がん作用における PhIP と AOM の相乗効果が認められた。PhIP 単独、AOM 単独、及び PhIP+AOM 併用投与により誘発された大腸腫瘍を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、PhIP+AOM 併用群の腫瘍 8 個のうち 4 個の腫瘍は AOM 単独群の腫瘍と類似した発現様式を示し、残り 4 個は PhIP 単独投与群に類似した発現様式を示した。PhIP と AOM により誘発される大腸がんでは、一部共通しない過程を経由してがん化に至る可能性を示唆するものである。

大腸前がん病変としての mucin-depleted foci (MDF)

の意義についても検討した。MDF 及び大腸がんのバイオマーカーとして従来より用いられてきた aberrant crypt foci (ACF)、MDF と ACF との共通病変 (overlapping lesion; OLL) における組織学的異型度について、核の大小不同、核小体の増大、核の重層化、核分裂像によりスコア化して比較した。MDF と OLL における組織学的異型度は ACF に比較して有意に高く、MDF と OLL 由来の異型腺管 (DF) における組織学的異型度も ACF 由来の DF に比較して有意に高かったことから、MDF が大腸がんの前がん病変としてより重要な意味をもつ可能性が強く示唆された。

Norharman と aniline から生成する変異原物質 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (APNH) の長期混餌投与では発がん頻度の低かった大腸において、炎症による promotion 効果を検討した。雄性 ICR マウス 6 週齢に APNH を 1, 2, 5, 10, 20 mg/kg 体重の濃度で単回強制胃内投与し、その 1 週間後より腸炎誘発物質 DSS (2%) を 1 週間飲水投与し、20 週目に大腸の病理学的解析を行った。大腸腺がんの発生頻度および発生個数は APNH 1 mg/kg→2%DSS 群で 0%; 0 個、APNH 2 mg/kg→2%DSS 群で 0%; 0 個、APNH 5 mg/kg→2%DSS 群で 13%; 0.25±0.71 個、APNH 10 mg/kg→2%DSS 群で 56%; 1.11±1.26 個と濃度依存的な増加が認められた。APNH はマウス大腸においても initiation 作用を有し、炎症により APNH 誘発の大腸発がんが促進されることが判明した。

炎症と発がんとの関連性においては、ヒト胆道炎発症への関与が示唆される *Helicobacter bilis* (*H. bilis*) および *Helicobacter genus* (*H. genus*) の膵発がんへの関与についても検討した。外科的に切除された浸潤性膵管がん 26 例中 15 例、膵管内乳頭粘液性腫瘍 10 例中 6 例で *H. genus* DNA が検出された。浸潤性膵管がん 3 例で *H. bilis* 由来の DNA が、胆道がん 43 例中 14 例及び 33 例で *H. bilis* 及び *H. genus* 由来の DNA が検出された。膵臓の炎症スコアは *H. bilis* および *H. genus* DNA 検出症例において非検出例に比べて有意に高値であったことから、ヘリコバクター属細菌が炎症によるがんの増強要因としてヒト膵発がんを修飾する可能性が示唆された。

ヒト胃がんにおいて、*H. pylori* の除菌に伴って問題が顕然化してきた Barrett 食道の発生に関しては、動物モデルを用いた研究結果から胃酸単独の逆流よりも十二指腸液の逆流が重要であることが示唆された。十二指腸液逆流動物モデルにおいて食道における組織変化を経時的に観察したところ、術後 50 週でヒトの Barrett 食道に特徴的な特殊円柱上皮 (specialized columnar

epithelium; SCE) が全例に認められた。SCE 腺管上部では胃の腺窩上皮型細胞と腸杯細胞型細胞が混在し、基底部よりには幽門腺型細胞が存在していた。SCE は Barrett 食道発生の初期像と考えられる円柱上皮細胞で、幽門腺型粘液 (concanavalin A ; ConA) や 腺窩上皮型粘液 (galactose oxidase-schiff; GOS) に染色陽性であった。腸型形質のマーカーとされる CDX2 の発現を検討した結果、SCE だけでなく腺窩上皮型細胞のみからなる腺管や幽門腺型細胞集団の一部も CDX2 が陽性となった。消化管の再生・修復に関連した共通の現象 (gut regenerative cell lineage ; GRCL) に CDX2 が関与している事を見いだした。

我々の生活環境には、ヘテロサイクリックアミンやニトロソ化合物、電離放射線などの多様な発がん要因が存在することから、発がん要因間の相互作用も重要な問題である。1-Methyl-1-nitrosourea (MNU) あるいは 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine

(PhIP) 等のがん原性化合物と放射線の複合曝露による乳がん発症のリスクとメカニズムについて検討した。7 週齢 SD ラットに γ 線と MNU、あるいは γ 線と PhIP の複合処理を行い、乳がんの誘発性を検討した。放射線が 0.5~1 Gy の場合に、MNU あるいは PhIP との超相加 (相乗) 性が観察された。一方、放射線が 2Gy の場合には MNU が 40mg/kg で相加性あるいは亜相加 (拮抗) 性が観察された。以上の結果より、低線量・低用量では発がん性の相乗効果が生じることが示唆された。複合曝露における相乗作用は二種の発がん剤が異なる二段階に作用することでもたらされる可能性が示唆される。

炎症等により局所で生成される酸素ラジカルの発がんへの寄与に関して、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) または acrolein 修飾 deoxy-adenosine (acrolein-dA) に対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降を用いて、酸化による修飾塩基を含む DNA 断片について解析を行った。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 を材料として、8-OHdG が acrolein-dA を含有する断片をクローニングし、染色体上における位置情報をデータベースで検索した。DNA 負荷量と修飾塩基含有量に関して量依存性を認めることや、対照群の腎臓で 16 番染色体の 8-OHdG を含む断片が有意に高頻度であったのに対し、酸化ストレス下では 15 番染色体の acrolein-dA が有意に高頻度であった。以上の結果から、ゲノム DNA における修飾塩基の生成部位はランダムではないことが判明した。

高血圧発症素因の前立腺がん発生・進展に対する影響

について、前立腺がん好発モデルである Probasin/SV40Tag 遺伝子導入 (PB/SV40T TG) ラットを用いて検討した。PB/SV40T TG ラットと高血圧モデル SHR ラットを交配して得られた F1 にみられる前立腺がんを、野生型 WKY ラットとの F1 [(PB/SV40T TG x WKY)F1] の前立腺病変と比較した。Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) 及び腺がんの発生は全例の前立腺各葉に観察された。腫瘍性病変の進展度をみる指標として前立腺腺房に対する病変の占有率を定量的に解析したが、いずれの葉においても実験群間に有意な差は認めなかった。浸潤がんの発生率、前立腺各葉の腫瘍性病変における Ki-67 labeling index、アポトーシスの指標である TUNEL index のいずれにおいても各群間に有意差は観察されなかった。SHR ラットにみられる高血圧発症に関連した遺伝的素因の前立腺がん発生および進展に対する影響は少ないものと推測された。

ヒトの末梢型肺腺腫・腺がんの動物モデルである A/J マウスの自然発生肺腫瘍モデルにおいて、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx による肺腫瘍性病変の促進作用が認められる。今回 MeIQx の投与に加え、高脂肪食を投与する群を設けた。肺に発生した腫瘍性病変は、MeIQx 投与後の promotion 期に当たる 12 週から 32 週にかけた高脂肪を投与した群において、MeIQx 単独投与群より腫瘍数の有意な増加が認められた。大腸における前がん病変 aberrant crypt foci の誘発数でも MeIQx 単独投与群に比べて有意な増加を認めた。近年肺がんにおける EGF 受容体の変異が重要視されているが、A/J マウスの肺がんモデルでは検討した範囲では EGF 受容体の変異は確認できなかった。

C: 発がんに係わる感受性要因の検索

がん細胞では転座や欠失など染色体切断が特定のゲノム領域に起っていることから、ヒト染色体上には DNA 二本鎖切断 (DSB) に感受性の高い領域が存在すると予想される。そこで、DSB 感受性領域の同定を目的として、制限酵素蛋白質 *MspI* を導入することで、生細胞内に特異的に DSB を生じさせる実験系を開発した。HeLa 細胞を 8U/ μ l の *MspI* で処理した 2 時間後に、80%以上の細胞で DSB が誘導された。次に、*p16/p14ARF/p15* 遺伝子を含む染色体 9p21 領域について、サザンブロット法と Linker-Mediated Capture 法を用いて *MspI* 切断に対する感受性を検討した。その結果、HeLa 細胞では、遺伝子間・イントロン領域に比べ上記 3 遺伝子のプロモーター領域で *MspI* 感受性が高いこと、*p16* 遺伝子が過メチル化され

ている肺がん細胞 H1299 では *p16* 遺伝子のプロモーター領域の *MspI* 感受性が低いことが分った。また、これまでに同定した様々なヒトがんにおける染色体 9p21 欠失の切断点は、*MspI* 高感受性領域に有意に多く存在した。これらの結果から、ヒト染色体上の *MspI* 感受性部位が、ヒト細胞の染色体異常の引き金となり得る DSB の感受性部位を反映していることが示唆された。

薬物代謝およびがん原物質の代謝的活性化に関与する酵素である *CYP2A6* の遺伝子型から推定される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。また、*CYP2A6* 阻害剤である 8-methoxypsoralen の前処置により、A/J マウスにおける NNK 誘発肺腺腫が抑制される。そこで、*CYP2A6* の酵素活性の阻害に基づく発がん化学予防剤の開発を目的として、*CYP2A6* の酵素活性を阻害する天然抽出物を探索した。その結果、2 種類の抽出物(ダイズ抽出物 I およびカンゾウ抽出物 I) が *CYP2A6* の阻害活性を持ち、これらは *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2D6*、*CYP2E1*、*CYP3A4* などよりも *CYP2A6* の活性を強く阻害することが分った。さらに、これらの抽出物を 3 日間胃内投与したマウスにニコチンを腹腔内投与したところ、抽出物の投与量依存的に体内でのニコチン代謝が阻害され、これらの抽出物の摂取により発がんを予防できる可能性が示された。

CYP1A2 の発現誘導物質は *CYP1A1* も同時に誘導するので、*CYP1A2* にも *CYP1A1* と同様の発現誘導機構が存在する可能性がある。また、*CYP1A2* 遺伝子は第 15 染色体上で *CYP1A1* 遺伝子と隣接しているため、*CYP1A1* と *CYP1A2* は転写調節領域を共有している可能性がある。そこで、*CYP1A1* と *CYP1A2* の間の約 23 kb の領域を二つの異なるレポーター遺伝子間に挿入したデュアルレポーターベクターを構築し、両方向の転写活性化を検討した。誘導剤添加により、両レポーター活性が増加したことから、これらの領域が *CYP1A2* の誘導にも関わっていると考えられた。そこで、この領域の DNA を欠失・変異させたベクターを作製し、誘導剤添加による *CYP1A2* の転写活性化に関わる領域を同定した。その結果、*CYP1A1* 遺伝子の 5' 側に複数存在する XRE が *CYP1A1* とともに *CYP1A2* も発現誘導し、中でも *CYP1A1* プロモーターから 5 つの XRE は両遺伝子の誘導に関与し、*CYP1A1* 誘導には相加的に、*CYP1A2* 誘導には 1 つの XRE が存在すれば充分であることが示唆された。さらに、*CYP1A2* プロモーター近傍に両遺伝子の発現を抑制する領域が見出された。以上より、*CYP1A1* と *CYP1A2* の間 23 kb にわたる領域全体が両遺伝子の発現に関与すると考えられた。

前立腺がん患者群 189 例、コントロール群 (前立腺肥

大症患者群) 240 例を対象に、one carbon metabolism に関連する Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子多型 (C677T, C1298A)、Methionine synthase (MS) 遺伝子多型 (A2756G) と日本人前立腺がんのリスクとの関連性を検討した。C677T は、前立腺がん患者群で 11%、前立腺肥大症患者群で 18.3%、OR=0.50 (95%CI=0.27-0.92) と T/T の遺伝子型が低リスク因子と考えられた。A2756G は、病期 D 患者群で 3.8%、病期 A/B/C 患者群で 8.4%、OR=0.33 (95%CI=0.07) で G/G の遺伝子型が病期進行に関する低リスク因子と考えられた。

肺腺がん感受性に関する因子として、解毒第 2 相酵素遺伝子の転写因子 Nrf2 の遺伝子型と NNK による肺腫瘍形成能との関連性を検討した。A/J マウスと *nrf2* 遺伝子ヘテロ破壊型 ICR マウスを戻し交配させて得られたマウス [(A/JxICR)F6] から野生型、ヘテロ破壊型、ホモ破壊型マウスを選別して NNK2mg を腹腔内投与し、20 週後に肺を摘出して病理組織学的に検討した。雌では、破壊型マウスにおける肺腺腫の個数が野生型より多い傾向にあり、*nrf2* 遺伝子は肺腺がん発生に抑制的に働いていることが示唆された。A/J マウスを用いた NNK 誘発肺腫瘍モデルにおける性差の要因を検討するため、Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法で NNK 投与直後の雌雄マウス肺で発現量の変化する遺伝子を探索した。雌雄マウス各 1 匹に NNK2mg または生理食塩水のみを腹腔内投与し、25 時間後に肺を摘出して mRNA を抽出し、SSH 法で解析した。発現量が 2 倍以上または 0.5 倍以下に変化した遺伝子は 12 個で、雄のみで変化したのは 2 個、雌のみで変化したのは 7 個であった。発がん物質による遺伝子発現誘導には性差があり、これが肺腺がん感受性の性差にも影響していることが示唆された。

膵がんの多段階発生過程における DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現異常の意義を明らかにするため、特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮・炎症性背景を伴う末梢膵管上皮・前がん病変 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)・浸潤性膵管がんにおける DNMT1 発現を免疫組織化学的に評価した。浸潤性膵管がんはしばしば慢性膵炎に続いて発生するので、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮は前がん段階にある可能性がある。特記すべき所見を示さない末梢膵管上皮はほとんど抗 DNMT1 抗体陰性だったが、炎症性背景を伴う末梢膵管上皮内に DNMT1 発現陽性細胞を散見した。PanIN では異型度が充進するとともに、浸潤性膵管がんでは低分化ほど DNMT1 発現陽性率が上昇した。DNMT1 発現レベルは患者の年齢と相関せず、「膵がん取り扱い規約」におけ

る t カテゴリーや診断時の病期と有意に相関し、DNMT1 高発現群は有意に予後不良であった。以上より、DNMT1 発現亢進は膵がんの多段階発生過程に継続して寄与し、抗 DNMT1 抗体を用いた免疫組織化学的検討により予後予測が可能と考えられた。

腹膜播種は、スキルス胃がん患者の予後を左右する重要な因子である。スキルス胃がん由来培養細胞の同所移植により、高率に腹水形成に至るヒト胃がん腹膜播種マウスモデルを用い、抗がん剤の評価系としての有用性を検討した。まず、既知の抗がん剤 CPT-11、GEM を用いた実験では、ともに腫瘍の増殖抑制や播種抑制が認められ、容量依存性に生存期間が延長した。特に CPT-11 では腫瘍細胞の胃壁内浸潤増殖が抑制され、腹膜播種も抑制されていた。チロシンキナーゼ阻害剤である新規分子標的薬 ZD6474 の検討では、原発巣は ZD6474 高用量群で有意に縮小し、直接的な抗腫瘍効果が確認された。さらに、腹膜播種も用量依存性に抑制され、免疫組織染色により ZD6474 がアポトーシスを誘導することが分った。一方、これらの効果を定量的にモニターするため、この腹膜播種性転移細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して生体イメージングシステムで解析した結果、移植臓器（胃壁）での浸潤増殖から腹膜播種の形成過程までを同一マウスで定量的に観察でき、この同所移植播種モデルが抗がん剤の有用な評価系になると考えられた。

3 倫理面への配慮

人を対象とする研究はすべて厳密なインフォームド・コンセントを本人から得て、倫理委員会の承諾後に進めている。また、動物実験は各研究者の所属施設の実験動物取扱い（倫理）規定を遵守して行なっている。

研究成果の刊行発表

雑誌

外国語

1. Totsuka, Y., Wakabayashi, K., et al., Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 1553-1562, 2005.
2. Takamura-Enya, T., Wakabayashi, K., et al., Formation of DNA adducts with cholesteryl adenylate,

a putative intermediate for biosynthesis of cholesteryl-CoA. *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 1715-1720, 2005.

3. Shoji, Y., Wakabayashi, K., et al., Prostaglandin E receptor EP3 deficiency modifies tumor outcome in mouse two-stage skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26:2116-2122, 2005.
4. Niho, N., Wakabayashi, K., et al., Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP₁-selective antagonist. *Cancer Sci.*, 96: 260-264, 2005.
5. Niho, N., Wakabayashi, K., et al., Concurrent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by NO-1886, increasing lipoprotein lipase activity in Min mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 2970-2974, 2005.
6. Kawamori, T., Wakabayashi, K., et al., Prostaglandin E receptor subtype EP(1) deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis*, 26: 353-357, 2005.
7. Takahashi, M., Wakabayashi, K., et al., Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis. *Nitric Oxide*, 14: 130-136, 2006.
8. 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.
9. Tanino, Y., Yamamoto, Y., et al., Decrease of antioxidants and the formation of oxidized diacylglycerol in mouse skin caused by UV irradiation. *J. Dermatol. Sci. Sup.* 1: s21-s28, 2005.
10. Adachi, J., Yamamoto, Y., et al., Detection of phosphatidylcholine oxidation products in rat heart using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 823: 37-43, 2005.
11. Ashidate, K., Yamamoto, Y., et al., Genstisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human

- plasma. *Eur. J. Pharmacol.*, 513: 173-179, 2005.
12. Matura, T., Yamamoto, Y., et al., The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1736: 181-188, 2005.
13. Hasegawa, G., Yamamoto, Y., et al., Daily profile of plasma %CoQ10 level, a biomarker of oxidative stress, in patients with diabetes manifesting postprandial hyperglycemia. *Acta. Diabetol.*, 42: 179-181, 2005.
14. Kim, S-R., Yamada, M., et al., Mutagenesis induced by oxidized DNA precursors: Roles of Y family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Chem. Res. Tox.*, 18: 1271-1278, 2005.
15. Nohmi, T., Yamada, M., et al., Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat. Res.*, 591: 67-73, 2005.
16. Kokubo, K., Yamada, M., et al., Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. *DNA Repair*, 4: 1160-1171, 2005.
17. Matsui, M., Yamada, M., et al., Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. *DNA Repair*, in press, 2006.
18. Yamada, M. et al., Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Genes Environm.*, in press, 2006.
19. Tsutsumi, T., Kataoka, H., et al., Automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the screening and determination of multi-class pesticides in waters. in *Pesticide Analysis: Methods and Protocols*, ed. by J.M.Vidal, Methods in Biotechnology. Humana Press, 19: 343-364., 2005.
20. Kataoka, H., et al., Gas chromatography of amines as various derivatives. in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography - Methods and Protocols-*, ed. by I. Molnar-Perl, *Journal of Chromatography Library*. Elsevier Science, 70: 364-404, 2005.
21. Kobayashi, N., Mano, N., et al., Generation of a single-chain Fv fragment for the monitoring of deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins. *Steroids*, 70: 285-294, 2005.
22. Goto, T., Mano, N., et al., Identification of a novel conjugate in human urine: Bile acid acyl galactosides. *Steroids*, 70: 185-192, 2005.
23. 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*, 134: 141-150, 2005.
24. Iida, T., Mano, N., et al., Chemical synthesis of the 3-sulfooxy-7-N-acetylglucosaminyl-24-amidated conjugates of 3b,7b-dihydroxy-5-cholen-24-oic acid, and related compounds: Unusual, major metabolites of bile acid in a patient with Niemann-Pick disease type C1. *Steroids*, 71: 18-29, 2006.
25. Ando, M., Mano, N., et al., High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40: 1179-1186, 2006.
26. Mano, N., et al., Ionization of unconjugated, glycine- and taurine-conjugated bile acids by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40: 1231-1234, 2006.
27. Murata, K., Mano, N., et al., Development of a large-volume, membrane-based injection system for gradient elution micro-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1106: 146-151, 2006.
28. Mano, N., et al., Immunoaffinity extraction of a peptide modified by a small molecule. *Anal. Biochem.*, 349: 254-261, 2006.
29. Kakiyama, G., Mano, N., et al., Nuclear magnetic

- resonance spectroscopy of 3b,7b-dihydroxy-5-cholen-24-oic acid multi-conjugates: Unusual bile acid metabolites in human urine. *Chem. Phys. Lipids*, in press, 2006.
30. Kobayashi, N., Mano, N., et al., Immunoenzymometric assay for a small molecule, 11-deoxycortisol, with attomole-range sensitivity employing an scFv-enzyme fusion protein and anti-idiotypic antibodies. *Anal. Chem.*, in press, 2006.
31. Fukumoto, M., Kuwahara, Y., et al., Analysis of carcinogenic mechanisms of liver cancers induced by chronic exposure to alpha-particles from internally deposited Thorotrast. *Radiat Measurements*, in press, 2006.
32. Habibi, R., Kuwahara, Y., et al., Recombinant hybrid protein, Shiga-toxin-GM-CSF, effectively induce apoptosis of colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, in press, 2006.
33. 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*, 1024-1032, 2005.
34. Fujii, J., Okada, F., et al., Prevention of tumor progression as the ultimate goal of cancer therapy. *Cancer Ther.*, 3: 219-226, 2005.
35. Nagaoka, Y., Okada, F., et al., Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 215-223, 2005.
36. Ishii T, Okada, F., et al., Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic. Res.*, 39: 697-705, 2005.
37. Fujii, J., Okada, F., et al., Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, in press, 2005.
38. Zhao, W., Okada, F., et al., Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 35: 3468-3477, 2005.
39. Okada, F., et al., Involvement of reactive nitrogen oxides for acquisition of metastatic properties of benign tumors in a model of inflammation-based tumor progression. *Nitric Oxide*, 14: 122-129, 2006.
40. Tanaka, H., Okada, F., et al., siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 118: 1680-1691, 2006.
41. Okada, F., et al., Prevention of inflammation-mediated acquisition of metastatic properties of benign mouse fibrosarcoma cells by administration of an orally available superoxide dismutase. *Br. J. Cancer*, in press, 2006.
42. Mizuki, A., Tatemichi, M., et al., The out-patient management of patients with acute mild-to-moderate colonic diverticulitis. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 21: 889-897, 2005.
43. Sawa, T., Tatemichi, M., et al., Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrate nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with immunoaffinity purification: Association with cigarette smoking. *Free Radic. Biol. Med.*, 40: 711-720, 2005.
44. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., Nitrate and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion. *World J. Gastroenterol.*, 11: 4644-4649, 2005.
45. 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.*, 35: 591-596, 2005.
46. Horiike, S., Kawanishi, S., et al., Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 43: 403-410, 2005.
47. Ding, X., Kawanishi, S., et al., Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease.

- Cancer Sci., 96: 157-163, 2005.
48. Chaiyarit, P., Kawanishi, S., et al., Nitritative and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 96: 553-559, 2005.
 49. Wu, X., Kawanishi, S., et al., Critical roles for polymerase ζ in cellular tolerance to nitric oxide-induced DNA damage. *Cancer Res.*, 66: 748-754, 2006.
 50. Ma, N., Kawanishi, S., et al., 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide*, 14: 137-143, 2006.
 51. Pinlaor, S., Kawanishi, S., et al., iNOS-dependent DNA damage via NF- κ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int. J. Cancer*, in press, 2006.
 52. Kawanishi, S., et al., Oxidative and nitritative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid. Redox Signal.*, in press, 2006.
 53. Kawanishi, S., et al., Oxidative and nitritative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol. Chem.*, in press, 2006.
 54. Kasai, H., Matsuda, T., et al., 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by omega-3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. *Industrial Health*, 43 : 699-701, 2005.
 55. Lee, B. C., Matsuda, T., et al., Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in deposited road particles (DRPs) from Lake Biwa area, Japan. *Environ. Sci. Technol.*, 39 : 7402-7409, 2005.
 56. 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*, 24:1328-1337, 2005.
 57. Ushigome, M., Nakagama, H., et al., Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 26:635-640, 2005.
 58. 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, 2005.
 59. Nakagama, H., et al., Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.*, 96:627-636, 2005.
 60. Fukuda, H., Nakagama, H., et al., Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UPI Protein. *Genes Cells*, 10:953-962, 2005.
 61. Osawa, E., Nakagama, H., et al., Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int. J. Cancer*, in press, 2006.
 62. Nakagama, H., et al., Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures. *Mutat. Res.*, in press, 2006.
 63. Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., et al., Establishment and characterization of a rat lung adenocarcinoma cell lines with low malignant potential. *Cancer Lett.* 217 : 97-103, 2005.
 64. Yamashita, S., Shirai, T., et al., Linkage and microarray analyses of susceptibility genes in ACI/Seg rats: A model for prostate cancers in the aged. *Cancer Res.*, 65: 2610-2616, 2005.
 65. Ikeda, Y., Shirai, T., et al., Equivocal impact of transplacental and lactational exposure to a food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, on prostate and colon lesion development in F344 rats. *Cancer Lett.*, 224: 23-30, 2005.
 66. Kandori, H., Shirai, T., et al., Influence of atrazine administration and reduction of calorie intake on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. *Cancer Sci.*, 96: 221-226, 2005.
 67. Kawai, N., Shirai, T., et al., Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic

- rats. *Prostate.*, 64: 373-381, 2005.
68. Zhao, L., Shirai, T., et al., Kinetics of marked development of lung metastasis of rat prostatic carcinomas transplanted in syngeneic rats. *Clin. Exp. Metastasis.*, 22: 309-318., 2005.
69. Hikosaka, A., Shirai, T., et al., Lack of prophylactic effect of incadronate on skeletal lesions associated with implants of prostate cancer. *Euro. Urol.*, 49: 176-182, 2006.
70. Kushima, R., Mukaisho, K., et al., Pyloric gland adenoma arising in Barrett's esophagus with mucin immunohistochemical and molecular cytogenetical evaluation. *Virchows Archiv.*, 446: 537-541, 2005.
71. Tatsuta, T., Mukaisho, K., et al., Expression of Cdx2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux. *Dig. Dis. Sci.*, 50: 425-431, 2005.
72. Mukaisho, K., et al., Induction of gastric GIST in rat and establishment of GIST cell line. *Cancer Lett.*, 231: 295-303, 2006.
73. Suo, M., Mukaisho, K., et al., Thioproline prevents carcinogenesis in the remnant stomach induced by duodenal reflux. *Cancer Lett.*, in press, 2006.
74. Tanaka, T., Kohno, H., et al., Colonic adenocarcinomas 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, 2005.
75. 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: 69-76, 2005.
76. 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*, 115: 346-350, 2005.
77. Yoshida, K., Kohno, H., et al., Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.*, 215: 29-39, 2005.
78. Suzuki, R., Kohno, H., et al., Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol. Histopathol.*, 20: 483-492, 2005.
79. Sano, T., Kohno, H., et al., Prevention of rat hepatocarcinogenesis by acyclic retinoid is accompanied by reduction in emergence of both TGF α -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells. *Nutr. Cancer*, 51: 197-206, 2005.
80. Sugie, S., Kohno, H., et al., Suppressive effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Cancer*, 117: 524-530, 2005.
81. Yasui, Y., Kohno, H., et al., Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73: 113-119, 2005.
82. Kohno, H., et al., Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer*, 5: 46, 2005.
83. Kohno, H., et al., Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin. Cancer Res.*, 11: 4962-4967, 2005.
84. Suzui, M., Kohno, H., 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.
85. Tanaka, T., Kohno, H., et al., Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc^{Min/+} mice: inflammatory

- stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer*, 118: 25-34, 2006.
86. Suzuki, R., Kohno, H., et al., Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27: 162-169, 2006.
87. Suzuki, R., Kohno, 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: 619-630, 2006.
88. Hata, K., Kohno, H., et al., Lack of enhancing effects of degraded lambda-carrageenan on the development of β -catenin-accumulated crypts in male DBA/2J mice initiated with azoxymethane. *Cancer Lett.*, in press, 2006.
89. Hata, K., Kohno, H., et al., β -Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile Apc^{Min/+} mice. *Cancer Lett.*, in press, 2006.
90. Kohno, H., et al., Dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, in press, 2006.
91. 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.
92. 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*, 26: 1109-1116, 2005.
93. 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.*, 18: 85-88, 2005.
94. Ichihara, T., Imaida, K., et al., Lack of chemoprevention or promotion effects of docosahexaenoic acid on small intestine, colon, liver, lung, thyroid, esophagus, kidney, and forestomach carcinogenesis in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 53-59, 2005.
95. Zeng, Y., Imaida, K., et al., Lack of significant modifying effect of arctiin on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. *Cancer Lett.*, 222: 145-151, 2005.
96. Fukushima, S., Imaida, K., 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.
97. Yokohira, M., Imaida, K., et al., Establishment of a biological system for detection of lung toxicity due to fine particle instillation: Sequential histopathological changes with acute and subacute lung damage due to intratracheal instillation of quartz in F344 male rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 13-18, 2005.
98. Takeuchi, H., Imaida, K., et al., Dose dependent inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Lett.*, in press, 2005.
99. Hagiwara, A., Imaida, K., et al., Thirteen-week feeding study of thaumatin (a natural proteinaceous sweetener), sterilized by electron beam irradiation, in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, 43: 1297-1302, 2005.
100. Miyazaki, M., Imaida, K., et al., Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas. *Carcinogenesis*, 26: 1947-1955, 2005.
101. Imaoka, T., Shimada Y., et al., Cooperative induction of rat mammary cancer by radiation and 1-methyl-1-nitrosourea via the oncogenic pathways involving c-Myc activation and H-ras mutation. *Int. J. Cancer*, 115: 187-193, 2005.
102. Imaoka, T., Shimada Y., et al., Mammary

- tumorigenesis in $Apc^{Min/+}$ mice is enhanced by X irradiation with a characteristic age dependence. *Radiat. Res.* 165: 165-173, 2006.
103. Tokairin Y, Shimada Y., et al., Accelerated growth of intestinal tumours after radiation exposure in Mlh1-knockout mice: evaluation of the late effect of radiation on a mouse model of HNPCC. *Int. J. Exp. Pathol.*, inpress, 2006.
104. Ozeki, M., Toyokuni, S., et al., Susceptibility of actin to modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Chromatogr. B*, 827: 119-126, 2005.
105. Dutta, K.K., Toyokuni, S., et al., Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 85: 798-807, 2005.
106. Terano, T., Toyokuni, S., et al., Transcriptional control of fetal liver hematopoiesis: dominant negative effect of the overexpression of the LIM domain mutants of LMO2. *Exp. Hematol.*, 33: 641-651, 2005.
107. Hamahata, K., Toyokuni, S., et al., Mitochondrial dysfunction is related to necrosis-like programmed cell death induced by A23187 in CEM cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 516: 187-196, 2005.
108. Kawasaki, K., Toyokuni, S., et al., Helicobacter felis-induced gastritis was suppressed in mice overexpressing thioredoxin-1. *Lab. Invest.*, 85: 1104-1117, 2005.
109. Sakuma K, Toyokuni, S., et al., An N-glycan structure correlates with pulmonary metastatic ability of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349: 829-835, 2006.
110. Sato, M., Yokota, J., et al., Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double-strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer. *Oncogene*, 24:6108-6118, 2005.
111. Sakiyama, T., Yokota, J., et al., Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes, TP53, POLI, REV1 and LIG4, with lung cancer risk. *Int. J. Cancer*, 114: 730-737, 2005.
112. Sasaki, S., Yokota, J., et al., Rapid assessment of two major repair activities against DNA double-strand breaks in vertebrate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339:583-590, 2006.
113. Shimbo, M., Watanabe, M., et al., CAG polymorphic repeat length in androgen receptor gene combined with pretreatment serum testosterone level as prognostic factor in patients with metastatic prostate cancer. *Eur. Urol.*, 47: 557-63, 2005.
114. Rika Ueda, Yamazoe, Y., et al., A common regulatory region functions bi-directionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes. *Mol. Pharmacol.*, in press, 2006.
115. Tanaka, R., Morishita, Y., et al., Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 103: 608-615, 2005.
116. 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.
117. 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.*, 173:1767-1771, 2005.
118. Peng, D.F., Kanai, Y., et al., Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci.*, 96: 403-408, 2005.
119. 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.*, 85:895-907, 2005.
120. Arai, E., Kanai, Y., et al., Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding non-tumorous renal tissues. *Int. J. Cancer*, in press, 2006.
121. Peng, D.F., Kanai, Y., et al., DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*, in press, 2006.

122. Murai, M., Yanagihara, K., et al., Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1021-1027, 2005.
123. 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.*, 65: 2115-2124, 2005.
124. Nitori, N., Yanagihara, K., et al., Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 11: 2531-2539, 2005.
125. Arao, T., Yanagihara, K., et al., Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.*, 96: 323-332, 2005.
126. Namiki, Y., Yanagihara, K., et al., ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int. J. Cancer*, 118: 483-489, 2006.
127. Matsukawa, Y., Yanagihara, K., et al., Preclinical study of a "tailor-made" combination of NK4-expressing gene therapy and gefitinib (ZD1839, Iressatrade mark) for disseminated peritoneal scirrhous gastric cancer. *Int. J. Cancer*, in press, 2006.
128. Yanagihara, K., et al., Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.*, in press, 2006.
129. Yanagihara, K., et al., A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res.*, in press, 2006.