

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 国立がんセンター研究所 牛島俊和

研究成果の要旨

放射線誘発マウス胸腺リンパ腫のLOH解析により同定した*Rit1*は、ハプロ不全型のがん抑制遺伝子として機能することを示した。*p210^{BCR/ABL}*トランスジェニックマウスを用いたレトロウイルス感染によるスクリーニングにより、*p210^{BCR/ABL}*及び転写因子*Zpf423*の過剰発現が慢性骨髄性白血病の急性転化の誘因になることを明らかにした。ラット前立腺がんを用いたゲノム網羅的検索により、プロモーター領域CpGアイランドのメチル化により不活化される遺伝子を20個見いだした。肝がん早期病変では細胞質に異常発現したcyclin Dが核内に移行することが細胞増殖に重要であり、その移行にPI3 kinaseのシグナルが重要であることを見いだした。*Mutyh*欠失マウスにKBrO₃により酸化的ストレスを与えると、十二指腸及び空腸に多数の上皮性腫瘍の発生を認め、ヒト*Mutyh*ホモ変異体と良く類似した病態を示すことが明らかになった。舌がん高感受性ラットを用いてマップした*Tsc1-Tsc4*の各発がん感受性座位のコンジェニックラットを作製、*Tsc1*との効果を確認した。

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	愛知県がんセンター研究所 室長	消化器がん発生における多段階発がん
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の分子機構
鰐渕 英機	大阪市立大学大学院医学研究科 助教授	多段階発がんに及ぼす環境化学物質の影響
木南 凌	新潟大学大学院医歯学総合研究科 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総合研究科 助教授	舌がん発生に関与する遺伝子の検索
小川 勝洋	旭川医科大学医学部 教授	肝多段階発癌の研究
廣瀬 善信	岐阜大学医学部附属病院 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研究院 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医学部 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 主任研究員	大腸癌における高変異形質の時間・空間的分布に関する研究
今井 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所 室長	ラット甲状腺発がんのプロGRESSION過程の分子機構

研究報告

1 研究目的

発がんに関与する遺伝子異常、エピジェネティックな異常、及び、遺伝子発現異常を、実験動物モデルを用いたゲノム網羅的な解析により同定し、その中からヒト発がんの予防や診断に利用可能な情報を抽出する。実験動物に誘発された腫瘍は、ヒト腫瘍に比べ早期と考えられる病変が多く、遺伝子異常や遺伝子発現異常の種類が少なく、関与した因子が単純であり、また、観察集団の遺伝的背景も均一である。従って、実験動物を用いることで、重要な異常が明確になる。また、細胞レベルではなく、個体レベルで発がん感受性や発がん修飾を解析することにより、がん化する細胞のみではなく、間質や免疫系も含めて幅広い遺伝子の中から、発がんに関与する遺伝子を解明することも可能となる。

2 研究方法と成果

(1) 遺伝子異常に関する研究

放射線によるマウスリンパ腫の発症には、組織の微小環境の破壊が重要であり、がん化する細胞と周囲の細胞の相互作用に解析に適する。これまでに、放射線誘発リンパ腫では、染色体 12, 16 及び 19 の loss of heterozygosity (LOH)を示すこと、染色体 12 の LOH 標的遺伝子は *Rit1* であることを同定してきた。本年度は、*Rit1*(+/-)*p53*(+/-)2 重ヘテロマウスを自然観察すると 250 日以内に胸腺リンパ腫を発症すること、また、発症したリンパ腫では LOH の頻度は低いこと、更に、*Rit1* タンパクの発現は保たれていることを観察した。従って、*Rit1* はハプロ不全型のがん抑制遺伝子であることが示された。

慢性骨髄性白血病の急性転化の原因遺伝子を同定するため、*p210*^{BCR/ABL}トランスジェニックマウスに、BXH2 系統を用いて内在性レトロウイルスを感染させ、内在性遺伝子をランダムに活性化または不活化させた。BXH2 単独の作用による白血病と区別するために、急性リンパ性白血病像を呈したマウス 6 例について、inverse-PCR法により、レトロウイルスの挿入部位を同定した。2 例は、*p210*^{BCR/ABL}トランスジーンのプロモーターへの挿入による *p210*^{BCR/ABL} の発現増強、2 例は、転写因子 *Zfp423* の non-coding exon への挿入による発現増強を示していた。残り 2 例は解析中である。

Nihon ラットは、我が国で見いだされた clear cell 型の腎がんを遺伝的に発症するラットである。これまでに、その原因遺伝子をマップし、Birt-Hogg-Dube (*Bhd*)遺伝子に突然変異を同定した。今年度は、野生型 *Bhd* 遺伝子のトランスジェニックラットを作出、Nihon ラットへの導入により、*Bhd* ヘテロ変異体の腎発がん、ホモ変異体の胎性致死が抑制されるこ

とを明らかにした。

(2) エピジェネティックな異常に関する研究

ヒト腫瘍にはエピジェネティックな異常が深く関与する。しかし、実験動物の腫瘍では、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化が原因で遺伝子発現が永久的に抑制されるサイレンシングは、ほとんど知られていない。そのために、DNA メチル化の誘発機構の解明や、DNA メチル化異常誘発を抑制または促進するタイプの発がん修飾物質の検索に困難を来している。昨年度まで、*N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (MNNG) 誘発ラット胃がんを用いて、網羅的に DNA メチル化異常を探索したが、見出すことは出来なかった。本年度は、自然発症及び 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl 誘発ラット前立腺がん細胞株を用いて、脱メチル化剤とオリゴヌクレオチドマイクロアレイによるゲノム網羅的な検索を行った。その結果、がん抑制遺伝子や転移抑制遺伝子を含む 20 個の遺伝子が、ラット前立腺細胞株でサイレンシングされることを見出した。更に、組織検体での解析により、うち 4 個は、前立腺がん組織でもメチル化されることを確認した。

(3) 遺伝子発現異常に関する研究

Diethylnitrosamine 誘発マウス肝がんモデルでは、早期に変異肝細胞のコロニーが出現、腺腫を経て、肝細胞がんへと進展する。従って、ヒトでは困難な超早期病変の観察が可能である。これまでに、マイクロアレイを用いた解析により、変異肝細胞のコロニーでは、細胞質に cyclin D が過剰発現していること、部分肝切除等の増殖刺激により核に移行することを見いだしてきた。本年度は、PD98059 による MEK 経路の阻害及び rapamycin による mTOR の抑制は cyclin D の核内移行に関与しないが、LY294002 による PI3 kinase 経路の抑制は、cyclin D の核内移行及び細胞増殖の誘発を強く抑制することを見出した。

大腸早期病変を同定することは、多段階発がんの解析に役立つ。これまでに、dysplastic aberrant crypt foci (ACF-D)が大腸早期病変であることを明らかにし、ACF-D を容易に同定できる分別染色法を開発してきた。本年度は、azoxymethane 投与後の同一のラット大腸粘膜を用いて、他に提唱されている大腸早期病変と比較検討した。ラット 1 匹あたり、mucin depleted foci (MDF) 17 個、flat dysplastic ACF 5 個、classic ACF 266 個、ACF-D 110 個であった。4 個以上の crypts からなる MDF はすべて flat dysplastic ACF であり、組織学的には、 β -catenin accumulated foci (BCAC)であった。逆に、BCAC の約半数は 4 個以上の crypts からなる MDF (flat dysplastic ACF に一致) であり、残り半数は MDF の形態をとらない ACF-D であった。

発がんに predispose した肝臓での遺伝子発現変化を明らかにするために、雄 F344 ラットに 100 ppm の

2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline を投与し、投与開始後 4 週及び 16 週での肝臓、及び 104 週での肝臓腫と肝がんでの遺伝子発現を GeneChip により解析した。この経過に従い発現が上昇する遺伝子群として、G2/M の DNA damage check point に関わる遺伝子群、グルタチオン代謝に関わる遺伝子群が見いだされた。多クローナル状態である 4 週及び 16 週の肝臓と、単クローナルな増殖が始まった腺腫と肝がんでの遺伝子発現を比較する際、多数の正常な細胞にごく少数の腫瘍前駆細胞が混在すると予測される 4 週及び 16 週の発現プロフィールの解釈には注意が必要である。

雄 WBN/Kob ラットは、膵小葉間やラ氏島への単核球主体の細胞浸潤や、膵内外分泌機能の低下を特徴とする慢性膵炎を自然発症する。その膵炎の発症及び進行に重要な遺伝子を同定するために、8, 10, 及び 12 週齢の膵臓での遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。対照とした雄 Wistar ラットに比べて、週齢に関わらず高発現を示す遺伝子として *Prss1*, *Reg3a* を、週齢とともに高発現を示す遺伝子として *Pap*, *Nes* を、週齢とともに低発現を示す遺伝子として *Reg1* を同定した。膵炎発症以前から発現量が異なる遺伝子は、膵炎感受性に関与している可能性があり、発現細胞を詳細に検討する予定である。

(4) 発がん感受性遺伝子と修飾要因に関する研究

酸化的 DNA 損傷は、ヒト発がんに関与しているとされる。中でも最も変異原性が高い 8-オキソグアニンとミスペアした A の除去に関与する *Mutyh* に着目し、その欠失マウスを作成してきた。昨年までに、小腸で G へ T トランスバージョンの有為な増加を認めた。本年度は、4 週齢から 20 週間 KBrO_3 を飲水投与し、酸化ストレスを増強させることにより、腸管腫瘍の増加を検討した。その結果、野生型では腫瘍の発生を認めなかったのに対し、*Mutyh* 欠失マウスでは、十二指腸・空腸に多数の上皮性腫瘍の発生を認めた。最近、ヒトでも、*Mutyh* のホモ変異体は、大腸がん感受性を示すことが報告されており、良く符合する結果である。

4-Nitroquinoline 1-oxide による舌がん、DA ラットは高感受性を、WF ラットは抵抗性を示す。これまでに、舌がん感受性遺伝子 *Tsc1-Tsc5* をマップし、染色体 19 番上の *Tsc1* の候補遺伝子として、*Nqo1* が DA ラットで高発現することを見出してきた。本年度は、*Tsc1-Tsc4* のコンジェニックラットを用いて発がん実験を行い、*Tsc1* 及び *Tsc4* の発がん感受性に対する影響を確認した。また、*Nqo1* の高発現が舌がん高感受性の原因であることを証明するために、抵抗性の WF ラットの遺伝的背景に *Nqo1* を高発現するトランスジェニックラットを作成した。

正常な組織の中で、発がんの標的となる細胞は限られてい

る場合がある。大腸の場合、1 個の陰窩は 1 個の幹細胞から形成され、陰窩の分裂は大腸腺底部の分裂（幹細胞の増殖）が開口部に及ぶことによる。放射線感受性が異なる、生後 12 日齢及び 50-60 日齢のマウス大腸では、分裂陰窩の割合が 55% 及び 3-5% であった。12 日齢時の方が放射線感受性が高いことから、大腸がんの発生機構として、幹細胞の増殖の影響が大きいことが示唆された。

肥満・糖尿病を基礎疾患とするヒト non-alcoholic steatohepatitis (NASH) は、肝硬変及び肝がんの前駆病変となりうる。しかし、近年の NASH の増加にも関わらず、その動物モデルがないために、病態の把握に困難をきたしている。そこで、高度肥満を示す leptin 欠損 (ob) マウス、及び、高コレステロール血症を示す LDL 受容体欠損マウスについて、1,2-dimethylhydrazine 投与後の肝病変を検索した。ob マウスでは、肝細胞の脂肪沈着や ballooning が認められ、ヒト NASH 類似の組織像を示すと考えられた。一方、LDL 受容体欠損マウスでは、NASH 類似変化はないものの、異型細胞の増加を認めた。しかし、異型細胞の数は、ob マウスでは、野生型マウスに比較して、むしろ減少しており、ヒト NASH のモデルとしての有用性は更に検討が必要と思われた。

3 倫理面への配慮

動物実験に関しては、実験動物倫理審査委員会がある施設においては、その承認を得た。それ以外の場合にも、実験計画を適切に策定することにより不必要な実験を避け、屠殺時の不必要な恐怖や苦痛を回避した。ヒト材料は、インフォームドコンセントを得て採取した材料を、各施設の倫理委員会の審査を経て使用した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Kuramoto, T., Ushijima, T., 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
2. Niwa, T., Ushijima, T., et al. Whole-genome analyses of loss of heterozygosity and methylation analysis of four tumor-suppressor genes in *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas. *Cancer Sci*, 96: 409-413, 2005
3. Tsukamoto, T., Ushijima, T., et al. *Sox2* expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology*, 46: 649-658, 2005

4. Tsukamoto, T., et al. Susceptibility to colon carcinogenesis in C3H \leftrightarrow C57BL/6 chimeric mice reflects both tissue microenvironment and genotype. *Cancer Lett.*, 2005, in press
5. Tsukamoto, T., et al. Three-dimensional analysis of isolated hexosaminidase-altered aberrant crypts from colons of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2006, in press
6. Ochiai, M., 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
7. Ma, L., Hino, O., et al. Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor. *Genes & Development*, 19: 1779-1986, 2005
8. Togashi, Y., Hino, O., et al. Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Nihon rat model by introduction of a wild-type Bhd gene. *Oncogene* in press
9. Kouchi, M., Hino, O., et al. Natural history of the Nihon (*Bhd* gene mutant) rat, a novel model for human Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Virchow Archives* in press.
10. Doi, K., Wanibuchi, H., 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
11. Kushida, M., Wanibuchi, H., 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
12. Tamura, Y., Kominami, R., et al. Predisposition to mouse thymic lymphomas in response to ionizing radiation depends on variant alleles encoding metal-responsive transcription factor-1 (*Mtf-1*). *Oncogene*, 24: 399-406, 2005
13. Kubota, T., Kominami, R., et al. Comparison of properties of spontaneous and radiation-induced mouse thymic lymphomas: role of *Trp53* and radiation. *Radiation Res*, 163: 159-164, 2005
14. Hirano, M., Tanuma, J., et al. A speed congenic rat strain bearing the tongue cancer susceptibility locus *Tsc1* from Dark-Agouti rats. *Cancer Lett*, 18: 231-234, 2006
15. Ogawa, K., Tanuma, J., et al. Selective loss of resistant alleles at *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* genes in chemically-induced rat tongue cancers. *Oral Oncology*, in press.
16. Imamura, E., Ogawa, K., et al. Growth capacity between infant and adult mouse hepatocytes in vitro correlates to the cyclin D1 level without relation to oxidative DNA damage. *Liver Int*, 25: 1036-1043, 2005
17. 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, 2005
18. Yamamoto, M., Ogawa, K., et al. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis, *Mol Carcinog*, in press
19. Hata, K., Hirose, Y., et al. Lack of enhancing effects of degraded lambda-carrageenan on the development of beta-catenin-accumulated crypts in male DBA/2J mice initiated with azoxymethane. *Cancer Lett*, in press
20. Hata, K., Hirose, Y., et al. β -Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile *Apc(Min/+)* mice. *Cancer Lett*, in press
21. Oda, S., Tsuzuki, T., et al. Two models of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucl. Acids Res.*, 33: 1628-1636, 2005.
22. Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., et al. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Bio. Chem.*, in press.
23. Katakura, Y., Itoh, F., et al. Pancreatic involvement in chronic viral hepatitis. *World J Gastroenterol*, 11: 3508-3513, 2005
24. Oda, S., et al. Microsatellite instability in gastrointestinal tract cancers: a brief update. *Surg. Today*, 35: 1005-1015, 2005
25. Imai, T., et al. Development of invasive follicular cell carcinomas in a rat thyroid carcinogenesis model: biological impact of capsular inflammation and reduced cyclooxygenase-2. *Cancer Sci*, 96: 31-37, 2005
26. Hasumura, M., Imai, T., et al. Promoting effect of para-aminobenzoic acid on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Sci.*, 86: 61-67, 2005