

博士論文

論文題目 頭頸部癌ならびに喫煙関連肺腫瘍モデルにおける
細胞接着分子CADM1の意義

氏 名 明石 健

目次

	頁
要旨·····	1
序文·····	2
方法·····	20
結果·····	39
考察·····	75
謝辞·····	92
参考文献·····	93

要旨

CADM1 の喫煙関連肺癌および頭頸部癌における意義を解析するために、化学発癌モデルを用いた実験を行った。喫煙関連肺癌については、NNK を野生型および *Cadm1* 欠損型の A/J マウスに腹腔内投与して肺腫瘍を発生させた。予想に反して *Cadm1* 欠損マウスにおいて肺腫瘍の発生数が減少したが、病理組織学的所見や遺伝子学的所見は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスとで有意差を認めなかった。*Cadm1* 欠損マウスにおいて、NNK の α 水酸化の量が減少していたこと、DNA 付加体の量の減少が示唆されたことから、CADM1 は NNK の代謝的活性化、DNA 付加体形成を通じて NNK 誘発肺腫瘍数に影響を与えることが示唆された。頭頸部癌については、4NQO を野生型および *Cadm1* 欠損型の C57BL/6 マウスに経口投与して口腔咽頭病変を発生させた。*Cadm1* 欠損マウスでは異形成のみしか発生しなかったが、野生型マウスでは上皮内癌、浸潤癌や乳頭腫様の 3mm を超える大きい腫瘍性病変の発生を認め、さらに野生型マウスにおいてのみ舌以外に腫瘍性病変の発生を認めたことから、CADM1 が増殖や組織的悪性度に対して促進的に働く可能性が示唆された。

序文

肺癌は、世界におけるがん罹患率の第1位を占め、年間死亡者数は約160万人でがん死の第1位である [1]。国内での罹患率は、胃癌、大腸癌に次いで3番目であるが、年間死亡者数は7万人を超え、やはりがん死の第1位を占める [2]。

肺癌は、組織学的に小細胞肺癌 (small cell lung cancer) と非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer) の2種類に大きく分類される。非小細胞肺癌は肺癌全体の80-85%を占め、さらに腺癌 (adenocarcinoma)、扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma)、大細胞癌 (large cell carcinoma) などに細分類される [3,4]。非小細胞肺癌の発生は、気道末梢や肺泡の上皮細胞におけるがん遺伝子やがん抑制遺伝子のジェネティックおよびエピジェネティックな異常が積み重なることにより、前癌病変である異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia)、上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ) を経て浸潤性腺癌 (invasive adenocarcinoma) へと多段階的に起こることが明らかにされてきた (図1) [5]。遺伝子異常の初期変化として、がん遺伝子 *KRAS* や *EGFR* の変異や増幅 [6,7]、*EML4-ALK* 融合遺伝子の発現などが認められ [8]、進展に伴う異常として、がん遺伝子 *EGFR*、*ERBB2* および *MET* の遺伝子増幅ならびに発現上昇、がん抑制遺伝子 *TP53*、*RB1*、*P16^{INK4A}*、*LKB1/STK11*、*TSLC1/CADM1* などの不活化が起こることが報告されている [9-15]。

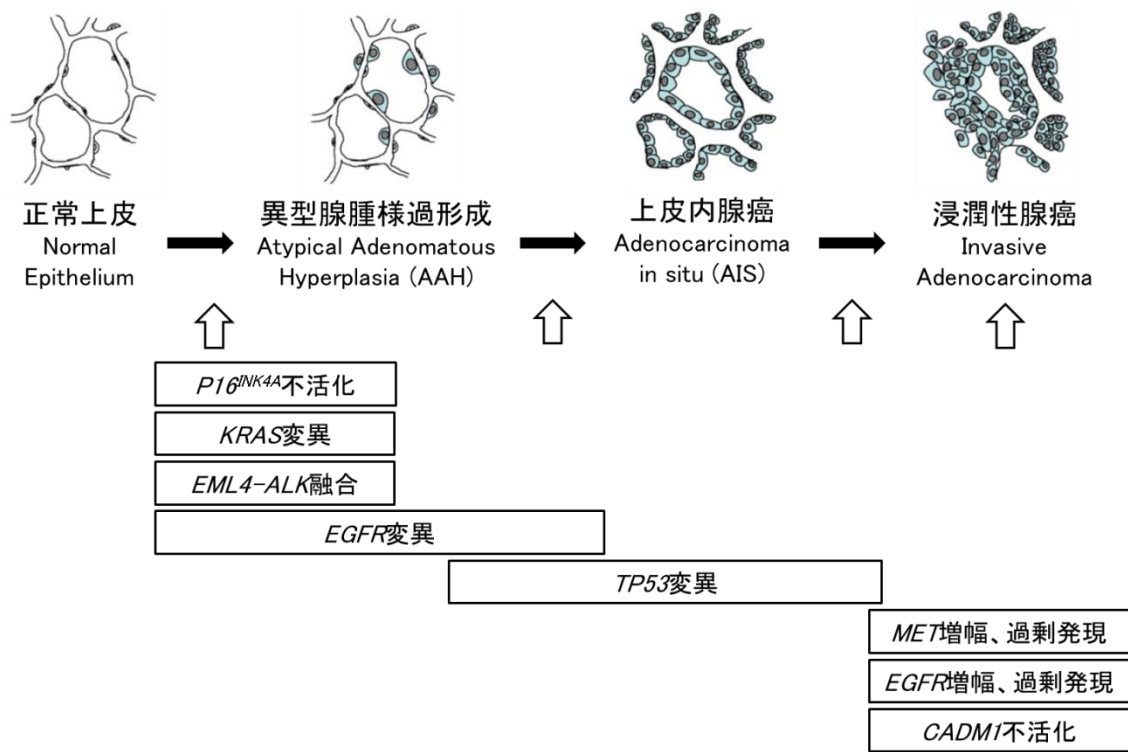


図 1. 肺腺癌の多段階発がんモデル (文献[16]より改変)

異型腺腫様過形成 (AAH) は上皮細胞に *EGFR*、*KRAS* などの変異が起こることにより発生する。肺腺癌発生初期から *P16^{INK4A}* の不活化も認められる。*TP53* は発がんの比較的后期に変異を認め、異型腺腫様過形成から上皮内腺癌を経て浸潤性腺癌へと段階的に進展する [5]。*MET* や *EGFR* の増幅、過剰発現や *CADM1* の不活化などは浸潤性腺癌で高頻度に認められ、浸潤や転移などを促進する。

CADM1 (Cell adhesion molecule 1) / TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) は、東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上らによって同定されたがん抑制遺伝子で、第 11 染色体長腕に存在する。CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 1 回膜貫通型の細胞接着分子で、ほぼ全ての上皮組織、特に肺、脳、精巣において強く発現が認められる [17]。細胞内ドメインには 4.1 タンパク結合モチーフおよび PDZ 結合モチーフを有し、それぞれに裏打ちタンパク質である 4.1 タンパク質および膜結合性グアニル酸キナーゼが結合する (図 2A)。また CADM1 は細胞の側細胞膜に局在し、隣接細胞の CADM1 分子と細胞外ドメインを介して結合する (図 2B) [18]。CADM1 は接着分子であり、その不活化は上皮細胞接着の破綻をきたし浸潤、転移の契機となる。細胞株を用いた実験において CADM1 は実験的肝転移の抑制 [19]、細胞周期の進行阻害[20]、アポトーシス誘導 [21]、上皮間葉転換の抑制 [22]、ERBB2 の不活性化などに関与し [23]、多面的ながん抑制能を有すると考えられている。さらに *Cadm1* 欠損マウスが東京大学医科学研究所人癌遺伝子分野の山田らによって作成され [24]、生後 15 か月以降に約 30%の個体において肺腺腫および肺腺癌の自然発生を認めた (図 3) [25]。

ヒトの臨床検体においては、アレルの欠失あるいはプロモーター領域のメチル化による CADM1 の発現の低下または欠如が肺腺癌の症例の約 60%で認めら

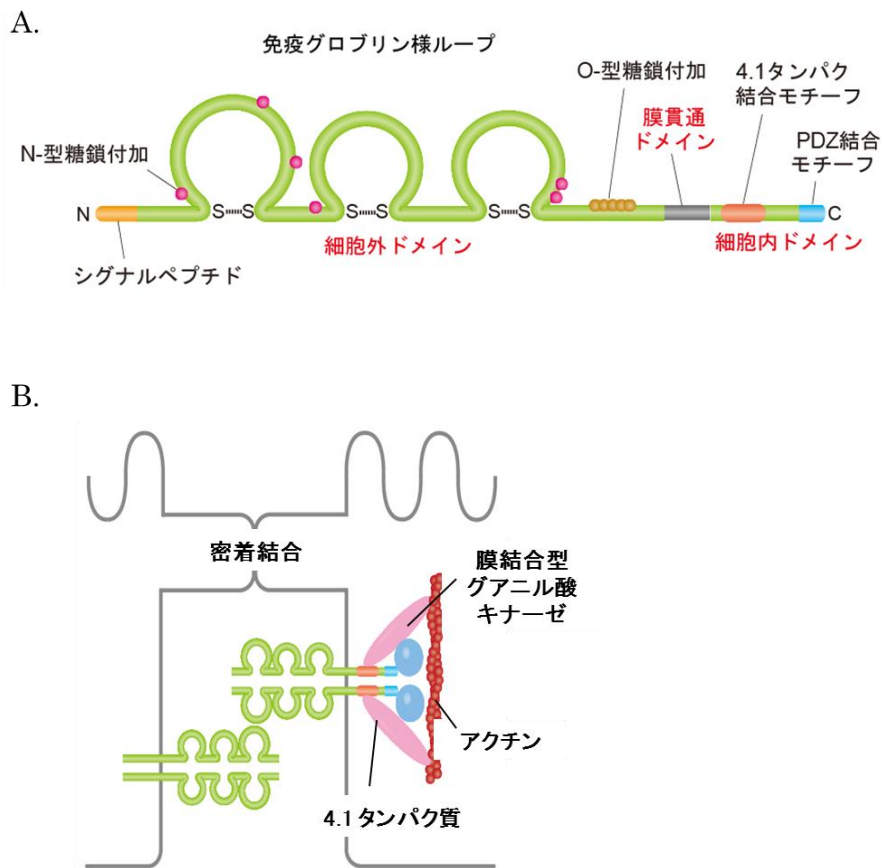
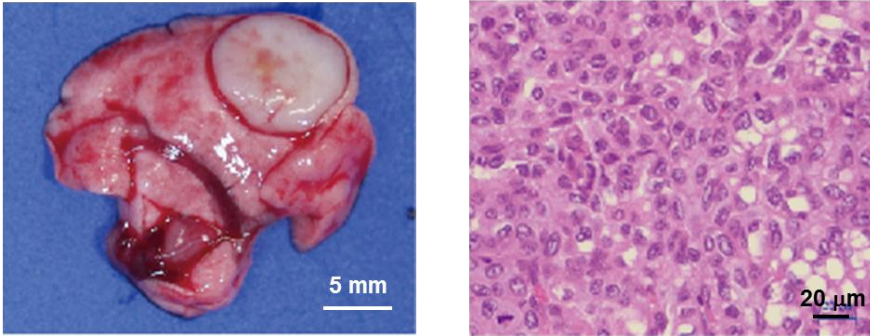


図 2. CADM1 の構造および細胞における局在

(A)CADM1 は 1 回膜貫通型タンパク質で、3 つの免疫グロブリン様ループをもつ細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、4.1 タンパク結合モチーフと PDZ 結合モチーフをもつ細胞内ドメインで構成される。(B) CADM1 は上皮細胞の側細胞膜面においてホモ二量体を形成し、隣接細胞の CADM1 とトランス結合する。細胞内領域では裏打ちタンパク質である 4.1 タンパク質を介してアクチン細胞骨格へとつながる。

A.



B.

遺伝子型	肺腫瘍発生頻度
野生型	3 / 31 (10%) 腺腫 3
<i>Cadm1</i> 欠損	11 / 30 (37%) 腺腫 11 腺癌 1

(*, $p = 0.016$)

C.

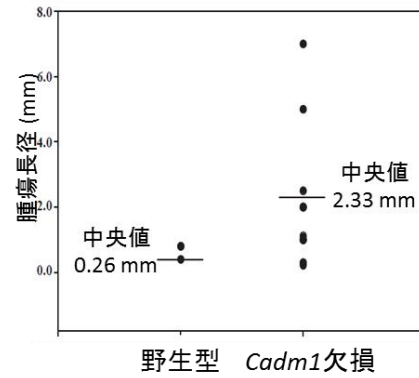


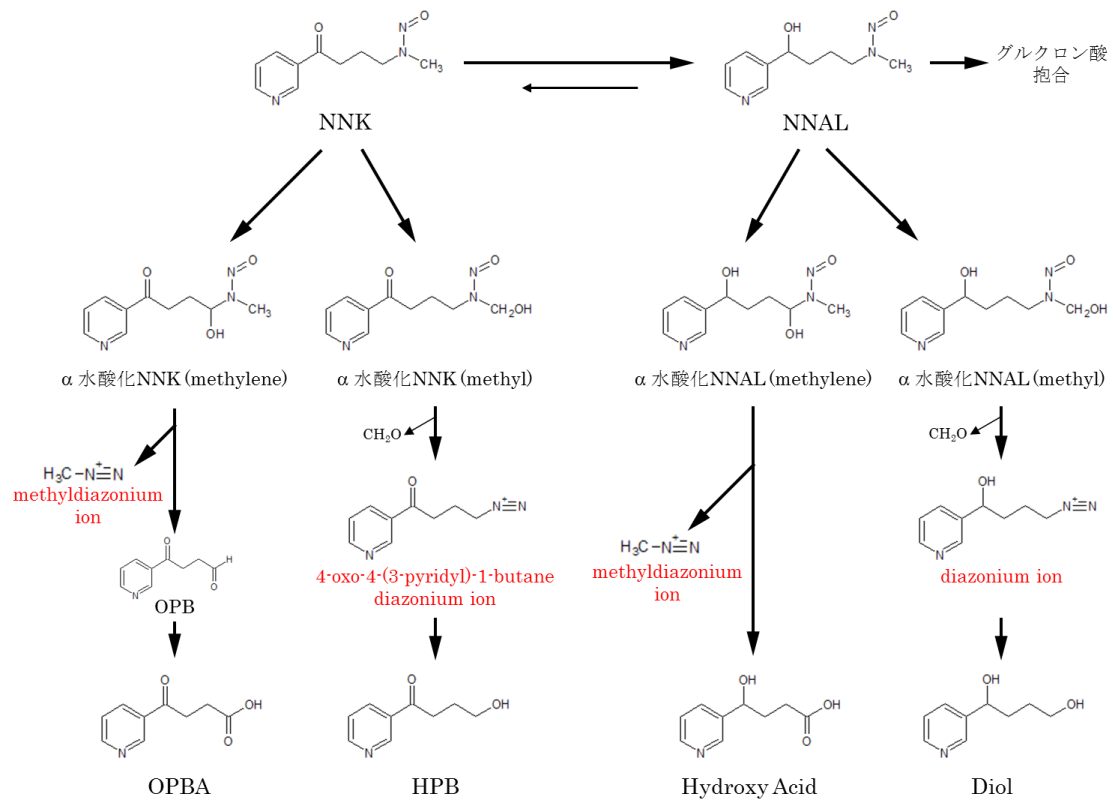
図 3. *Cadm1* 欠損マウスにおける肺腺腫、肺腺癌の自然発生 (文献[25]より)
 (A)18 ヶ月齢の *Cadm1* 欠損マウスに自然発生した肺癌。左：肉眼的所見、右：
 病理組織学的所見 (HE 染色)。(B)15 ヶ月齢の野生型および *Cadm1* 欠損マウス
 に発生した肺腫瘍の頻度。(C)15 ヶ月齢の野生型および *Cadm1* 欠損マウスに発
 生した肺腫瘍の大きさ。

れる [26,27]。肺腺癌における *CADM1* の不活化は特に進行癌において著明であり、予後、臨床病期の進行度、リンパ管浸潤、脈管浸潤と相関することが報告されている [27]。さらに、非小細胞肺癌において、*CADM1* のプロモーター領域のメチル化の頻度が、喫煙指数（1日の喫煙本数×喫煙年数）が800未満の症例では28%であるのに対し、800以上の症例では56%と有意に高い ($p=0.0054$) ことから [28]、*CADM1* は非小細胞肺癌の中でも喫煙が原因となって発生するものにより大きく関与している可能性が示唆されている。

肺癌のリスク因子は、喫煙、受動喫煙、慢性閉塞性肺疾患、化学物質への職業的な暴露、大気汚染などがあるが、中でも喫煙は最も大きな因子である。世界全体の喫煙率は、男性24.4%、女性15.7%で [29]、喫煙者が肺癌に罹患するリスクは非喫煙者と比べて20倍以上であり、受動喫煙もあわせると喫煙が肺癌発生の90%の要因となっている [30]。国内では喫煙率は年々減少傾向にあるが、男性が32.2%、女性が8.2%と先進国の中ではまだ高い割合である [2]。非喫煙者と比べて喫煙者が肺癌に罹患するリスクは、男性で4.4倍、女性で2.8倍と海外ほどではないもののやはり大きなリスク因子であることに変わりはない [31]。

タバコ煙中には5000種類以上の化学物質が含まれていて、現在、72種類の物質が国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) により実験動物において発がん性があると認められ、そのうちの16種

類の物質がヒトに対しても発がん性があることが認められている [32]。タバコ煙中に含まれる成分で最も有名なものはニコチンであるが、ニコチン自体には発がん性はないことが示されている [33]。しかし、ニコチンは喫煙に対する中毒性を引き起こし長期間に渡る喫煙習慣をもたらすことで、結果的に発がん性のある物質に対する暴露量を増加させる。ヒトに対する発がん性が認められた 16 種類の物質の中で主なものは、多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) とニトロソアミンである。PAH は 3 つ以上の芳香環が縮合した炭化水素の総称で、ベンゾ[a]ピレンをはじめとして 100 種類以上の物質が含まれる。薬物代謝酵素により代謝的に活性化されて始めて発がん性を示すがん原物質で、代謝的な活性化により DNA の塩基と反応性のある中間活性代謝物に変換され、DNA 付加体を形成して遺伝子変異をきたす。ニトロソアミンは、アミンと亜硝酸が反応して生成される物質で、アミン窒素上の水素がニトロソ基に置き換わった構造をもつ化合物群である。タバコ煙中には様々な種類のニトロソアミンが含まれるが、その中で代表的なものが NNK (Nicotine-derived nitrosamine ketone, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) である。NNK は、タバコの燃焼によりニコチンから生成する誘導体である。体内に吸収された NNK は、すみやかにアルコール化されて NNAL (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) となる (図 4)。NNK と



NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
 NNAL: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
 OPB: 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanol
 OPBA: 4-oxo-4-(3-pyridyl)butyric acid
 HPB: 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone
 Diol: 1-(3-pyridyl)-1,4-butanediol
 Hydroxy Acid: 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butyric acid

図 4. NNK の代謝経路

NNK の代謝経路。NNK は体内に吸収されるとすみやかに NNAL に代謝され、NNAL はグルクロン酸抱合を受けて尿中に排泄される。NNK および NNAL の一部は、それぞれα水酸化を受けて活性化され、その代謝の過程で不安定な diazonium ion が生成される。

NNAL は生体内において平衡関係にある。NNAL は UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) によりグルクロン酸抱合を受けて解毒化され、尿中に排泄される。一方、NNK や NNAL の一部は、肝臓を中心とするいくつかの臓器に発現するシトクロム P450 によってニトロソ基の α 位のメチル炭素またはメチレン炭素のいずれかが水酸化されて代謝的に活性化される。メチル炭素が水酸化された場合には 4-oxo-4-(3-pyridyl)-1-butanediazonium ion、メチレン炭素が水酸化された場合には methyldiazonium ion という DNA と反応性のある求電子性中間代謝物が生成する。これらが塩基と反応してメチル化 DNA、ピリジルオキソブチル化 DNA 等の DNA 付加体を形成する [34]。DNA 付加体のほとんどは、メチルグアニンメチル基転移酵素 (methyl guanine methyl transferase, MGMT) によるアルキル基の除去修復、色素性乾皮症遺伝子 (xeroderma pigmentosum, XP) によるヌクレオチド除去修復等により修復されるか [35]、細胞自体がアポトーシスに陥る。しかしながら、修復が行われないまま細胞分裂が起こり DNA の複製が行われてしまった場合には遺伝子変異が生じる。がん遺伝子に活性化変異が発生したり、がん抑制遺伝子に不活性化変異が発生したりすると、肺癌の発生の原因となる (図 5)。実験動物を用いた研究では、PAH では主に *Tp53* と *Kras* に、NNK では主に *Kras* に遺伝子変異が引き起こされることにより、それぞれ肺腫瘍が発生することが明らかになっ

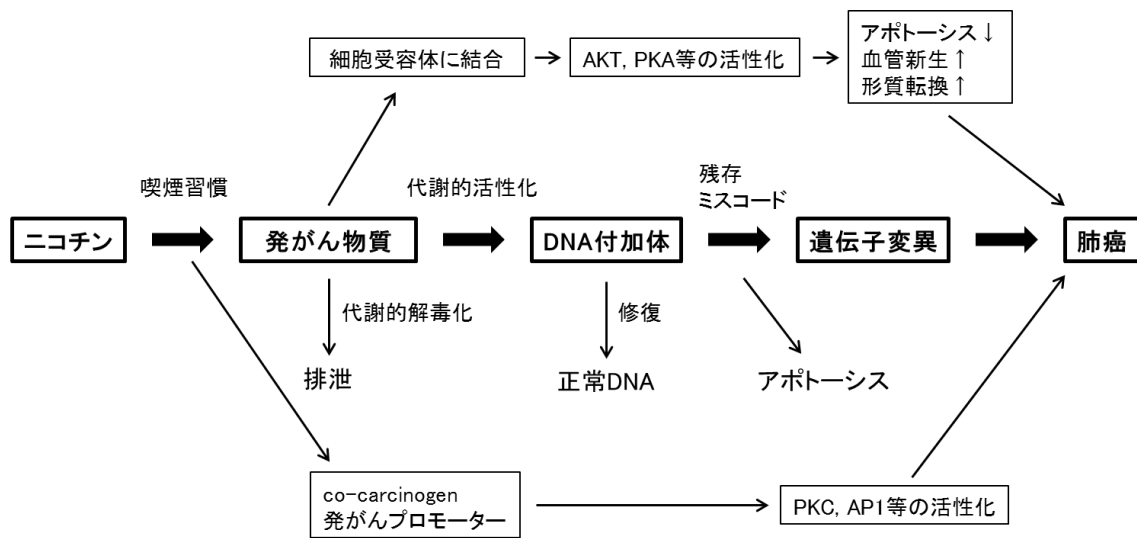


図 5. 喫煙による肺癌発生の機序 (文献[36]より改変)

ニコチン自体には発がん性がないが、喫煙に対する中毒性の原因となることでタバコ煙に含まれる発がん物質への暴露量を増やす。発がん物質が活性化されて DNA 付加体を形成し、遺伝子変異を引き起こすことにより発がんへとつながる。その他に、発がん物質が細胞の受容体に直接結合することによる下流の AKT などの経路の活性化や、タバコ煙中に含まれる co-carcinogen や発癌プロモーターも発癌に寄与する。

ている [37]。これらのような DNA 付加体生成に伴う遺伝子変異以外の喫煙による発がんの機序として、NNK が細胞のアセチルコリン受容体に直接結合して AKT などの下流のシグナルを活性化し、細胞増殖やアポトーシス回避などがんの発生や進行に寄与することがわかっている [38]。さらに、タバコ煙は肺に直接的に炎症を引き起こして肺胞上皮細胞の増殖を促進したり [39]、酸素障害や遺伝子のプロモーターのメチル化を引き起こしたりもする [40]。これらの原因が総合的に組み合わさって肺癌が発生、進行するとされているが、CADM1 がどの段階でどのように関与しているかは明らかになっていない。喫煙による肺癌発生の機序を明らかにし、予防したり治療成績を向上させたりするためにも、CADM1 の役割の解明が期待される。

ところで、CADM1 はもともと非小細胞肺癌のがん抑制遺伝子として同定されたが、胃癌 [41]、前立腺癌 [42]、子宮頸癌など [43]、他のがんにおいても同様に認められることが報告されている (表 1)。一方で、小細胞肺癌や成人 T 細胞白血病などではがん促進的に働く可能性も示唆されている [44,45]。このように CADM1 発がんに関して多面的な働きを有するが、上皮系の悪性腫瘍では一般的にがん抑制的に働くと考えられている。

頭頸部癌は、肺癌と同様に気道上皮を中心に発生し、喫煙を重要なリスク因子とする悪性腫瘍であるが、上咽頭癌の 38%、ヒトパピローマウイルス (human

表 1. 様々な悪性腫瘍における *CADM1* の不活化 (文献[44]より改変)

	原発性腫瘍における プロモーターメチル化	培養細胞における 発現欠如
非小細胞肺癌	21/48 (44%)	6/12 (50%)
上咽頭癌	13/38 (38%)	2/5 (40%)
HPV 陽性中咽頭癌	50/100 (50%)	—
食道癌	28/56 (50%)	3/3 (100%)
胃癌	15/97 (16%)	8/9 (89%)
肝細胞癌	4/14 (29%)	3/8 (38%)
膵癌	25/91 (27%)	8/11 (73%)
乳癌	10/30 (33%)	1/3 (33%)
子宮頸癌	30/52 (58%)	9/10 (58%)
前立腺癌	7/22 (32%)	2/5 (32%)

papilloma virus, HPV) 陽性中咽頭癌の 50%において *CADM1* のプロモーター領域のメチル化が認められることが報告されている [46-48]。このことから *CADM1* は、頭頸部癌においても非小細胞肺癌におけるのと同様にがん抑制的に働く可能性が示唆される。

頭頸部癌の年間罹患者数は世界全体で約 70 万人で 6 番目に多く、年間死亡者数は約 37 万人で 7 番目である [1]。国内での年間罹患者数は約 2 万人でがん全体の約 5%を占め、年間死亡者数は約 1 万人にのぼる [2]。その発生部位により主に鼻副鼻腔癌、口腔癌、上咽頭癌、中咽頭癌、下咽頭癌、喉頭癌、唾液腺癌、甲状腺癌の亜部位に分類される。亜部位によってそれぞれ性質が異なっているが、特異的な自覚症状に乏しい場合が多く、半数以上が初診時に進行癌の状態で見つかる。早期癌では手術治療が行われることが多く、予後は比較的良好で 5 年粗生存率は 80%程度であるのに対し、進行癌では手術の他に放射線治療や化学療法などを組み合わせた治療が行われるものの、5 年粗生存率は 50%以下と予後不良である [49,50]。治療成績の向上のため、拡大手術、強度変調放射線治療、陽子線治療、新しい抗癌剤などそれぞれの治療法の改善が行われ、さらにそれらの組み合わせた様々な治療が行われてきたが、治療成績はここ数十年であまり改善していないのが現状である。

近年では分子標的薬の開発により、細胞分裂や増殖などがんの進展に関わる

特定の分子を阻害することで大きな治療効果が得られるようになってきている。

頭頸部癌では、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) を阻害するモノクローナル抗体であるセツキシマブにおいて、局所進行頭頸部癌に対する放射線治療への上乗せ効果や [51]、再発・遠隔転移頭頸部癌に対する化学療法と組み合わせたの上乗せ効果が臨床試験によって示され [52]、2006年に FDA で認可されて使用されるようになり、国内でも 2013 年から適応となり使用されるようになってきている。しかし、セツキシマブは一定の上乗せ効果は示すものの、大きく治療成績を改善したとはいえない。このような背景から、新たな治療標的となる分子を発見するため、頭頸部癌においてもがんの発生や進展の分子細胞生物学的な機序の解明がより重要となってきている。

がんの発生および進展の機序を明らかにし、様々な遺伝子がどのように寄与しているかを明らかにするために、動物モデルを用いた様々な研究が行われてきた。喫煙関連肺癌のモデルとして以前からよく用いられているのが、NNK をマウスやラットなどの実験動物に投与方法である。用いられるマウスは、もともと肺癌を自然発生しやすい A/J マウスが最も多く、他に BALB/c マウスや C57BL/6 なども使用される。NNK の投与方法としては、経口投与と腹腔内投与が主である。Padma らは Swiss マウスおよび BALB/c マウスの飲水中に NNK を混合して経口投与することにより肺、肝または前胃に腫瘍が発生したと

報告している [53]。Steven らは 6 週齢のメスの A/J マウスに 100 mg/kg の NNK を腹腔内単回投与し、投与後 14 週で過形成がみられ、20 週頃から腺腫が、30 週頃から腺癌の発生が増えていったと報告している [54]。方法が簡便であること、投与量を制御できることなどから、経口投与よりも腹腔内投与の方が一般的に用いられることが多い。NNK によって誘発された腫瘍の解析では、85% に *Kras* の 12 番目のコドンのグアニン (GGT) からアデニン (GAT) へのミセンス変異が認められ、O⁶-methyl-deoxyguanine によって引き起こされる GC→AT の塩基置換が主な原因となっていることが明らかにされている [54]。

NNK はシトクロム P450 により α 水酸化を受けて活性化されるが、ヒトでは CYP2A6 と CYP2A13 が主として働く。肺では CYP2A6 と CYP2A13 の両方が発現しているが、CYP2A6 は肝においても強く発現し、CYP2A13 は他に鼻腔粘膜、気管などの気道粘膜でも発現がみられる。CYP2A6 または CYP2A13 をアデノウィルスベクターを用いてヒトの非小細胞肺癌細胞株に発現した系を用いた *in vitro* の実験では、CYP2A13 の方が CYP2A6 よりも強い NNK の代謝的活性化能を有することが示された [55]。マウスでは CYP2A6 のホモログである CYP2A4 および CYP2A5 が NNK の α 水酸化に主に働いており、CYP2A4 および CYP2A5 の阻害剤である 8-methoxypsoralen を NNK と同時に経口投与することにより、肺腫瘍発生数が減少したことが報告されている [56]。CYP2A4 お

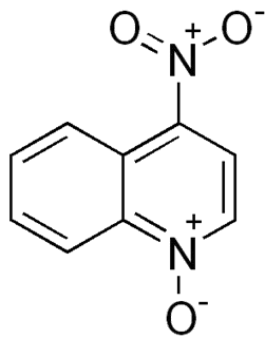
よび CYP2A5 は、マウスの肝、肺などに発現しているが、発現量は肝のほうがはるかに多く、NNK および NNAL の α 水酸化の多くは肝で行われると考えられる。肺で DNA 付加体が形成されるには、肝で NNK が活性化されて発生した不安定な中間代謝物が血液を介して肺に至って DNA と反応する経路と、肺で NNK が活性化されて発生した中間代謝物が DNA と反応する経路の 2 つの可能性が考えられる。これを明らかにするため、NADPH-Cytochrome P450 Reductase (CPR) を肺または肝で組織特異的に欠損させたマウスが用いられた。CRP は小胞体中で NADPH からシトクロム P450 へ電子を伝達する酵素で、全てのシトクロム P450 の機能発現に必須である。肝のみで欠損させた場合には肺腫瘍発生数に変化はなかったが、肺のみで欠損させた場合には肺腫瘍数が減少したことから、NNK による肺腫瘍誘発には局所でのシトクロム P450 による α 水酸化が重要であることが示された [57]。

頭頸部癌の動物モデルとしては、舌にがん細胞株を移植する同所性あるいは異所性移植モデルが用いられることが多い。発がんモデルについては、9,10-dimethyl-1,2 benzanthracene (DMBA) や 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) などの発がん性物質を直接塗布あるいは飲水中に混ぜて投与する化学発がんモデルや、*Kras* G12D 変異アレルを口腔内に発現させるトランスジェニックマウスモデルなどがあるが種類は限られている [58]。DMBA を塗布するモデルは、

以前はよく使用されていたが [59]、ヒトの口腔癌とは似ていない点が多いことから近年ではあまり使われなくなった。4NQO は水溶性の quinoline でタバコ煙中にも含まれている物質である (図 6A)。DNA 付加体を形成して G→A の塩基置換を引き起こすほかに(図 6B) [60]、酸化還元循環により活性酸素を発生することで DNA の二重鎖切断や遺伝子変異の原因となる [61]。飲水中に混ぜてマウスやラットなどの実験動物に投与するか、口腔内の粘膜に直接塗布することで、角化、白板症、上皮内癌、扁平上皮癌などヒトの口腔病変と類似した病変が誘発されることが報告されている [62-64]。病理組織学的な所見だけでなく、分子生物学的にもヒトの口腔病変と類似していることから、しばしば頭頸部癌のモデルとして用いられる[65]。

本研究では、CADM1 の喫煙関連肺癌および頭頸部癌における役割を解析するために、それぞれの疾患モデルに野生型および *Cadm1* 欠損マウスを用いて比較した。喫煙関連肺癌については、代表的なタバコ関連のがん原物質である NNK を腹腔内投与し、それぞれに生じた肺腫瘍に関して、発生数、病理組織学的所見、遺伝子学的所見等について比較検討を行なった。頭頸部癌については、4NQO を経口投与し、それぞれに生じた病変に関して、発生数、病理組織学的所見の比較検討を行なった。

A.



B.

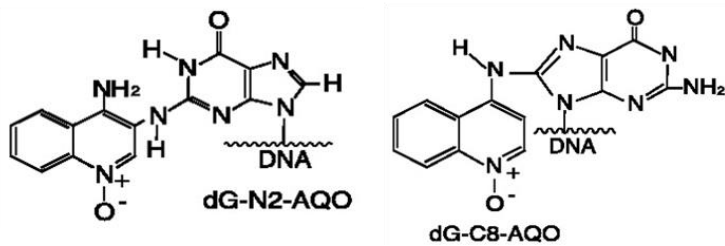


図 6. 4NQO の構造と DNA 付加体形成

(A)4NQO の分子構造。(B)4NQO による DNA 付加体形成。

方法

Cadm1 欠損マウスの作成

Cadm1 欠損マウスは東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野にて作成されたエクソン 1 を欠損したコンベンショナルノックアウトマウス (Sv/129 系統) を作成した [24]。さらに、A/J マウス系統および C57BL/6 に 10 世代戻し交配をすることにより *Cadm1* 欠損 A/J マウスおよび *Cadm1* 欠損 C57BL/6 マウスを作成した。*Cadm1* 欠損マウスおよび野生型マウスの飼育および繁殖は、東京大学医科学研究所の動物室にて行った。交配は *Cadm1* ヘテロ欠損マウス同士で行ない自家繁殖させた。遺伝子型の決定は、アルカリ溶解法を用いてマウスの尾から抽出した DNA をテンプレートとした PCR 法にて行なった。採取した尾を 50 mM NaOH 180 μ l 中に浸して 95°C で 10 分間定温静置した後、1M Tris HCl (pH8.0) 20 μ l を加えてよく攪拌し、常温にて 12,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を回収した。PCR 反応の酵素は KOD FX Neo (東洋紡, 大阪, 日本) を用い、反応の条件は、94°C で 2 分間置いた後、変性を 98°C で 10 秒間、伸長反応を 68°C で 2 分間、これを 35 サイクル繰り返した。1%アガロースゲルで電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色し、紫外線を照射して野生型対立遺伝子および欠損型のアレルのバンドをそれぞれ検出した。それぞれのアレルの検出に用いたプライマーの配列は表 2 に示した。

表 2. 野生型および *Cadm1* 欠損型のアレル検出に用いたプライマーの配列

アレル	配列	
野生型	Sense	5'-TCCCTGTTTGTTCGCCGCTTATCAG-3'
	Antisense	5'-TGGCCCCTTCTAAGAAATACCCTC-3'
<i>Cadm1</i> 欠損	Sense	5'-TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC-3'
	Antisense	5'-CCCAATAAGTCTCATAGAACTGATTGTC-3'

NNK 誘発肺腫瘍マウスモデル

6週齢の野生型および *Cadm1* 欠損型の A/J マウスの体重を測定し、100 mg/kg または 200 mg/kg の NNK (Toronto Research Chemicals 社, Toronto, Ontario, Canada) を、1 ml シリンジおよび 27G 針を用いて腹腔内に単回投与した。NNK は、20 mg/ml となるように生理食塩水中に溶解した。陰性対照群では、生理食塩水を 0.1 ml 腹腔内に単回投与した。NNK 投与後、18 週、24 週、30 週が経過した時点で MRI により肺腫瘍の発生数を計測し、30 週での MRI 撮影後にマウスを屠殺して肺を摘出し、肉眼的に肺表面の腫瘍発生数を計測した (図 7)。

NNK 100 mg/kg 投与群では全例で腫瘍の病理組織学的診断を行い、NNK 200 mg/kg 投与群では各腫瘍をそれぞれ核出し、さらに肺の非腫瘍部の一部を切除し、それぞれ-70℃で保存した。

4NQO 誘発口腔咽頭癌マウスモデル

野生型および *Cadm1* 欠損型の C57BL/6 のオスマウスを使用した。6 週齢の時点から、4NQO を飲水中に混ぜて 8 週間または 16 週間投与した (図 8)。4NQO は終濃度 50 mg/ml となるようにジメチルスルホキシド (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) に溶解して-20℃で保存した。使用の際は、プロピレングリコール (ナカライテスク株式会社, 東京, 日本) に終濃度 12.5 mg/ml となるように溶解

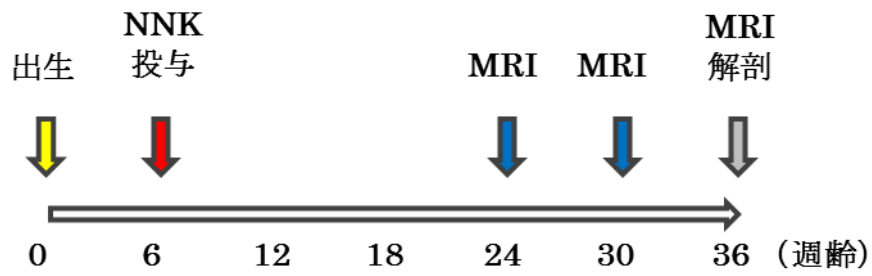


図 7. NNK 腹腔内投与による肺腫瘍誘発
実験のスケジュールを示した。

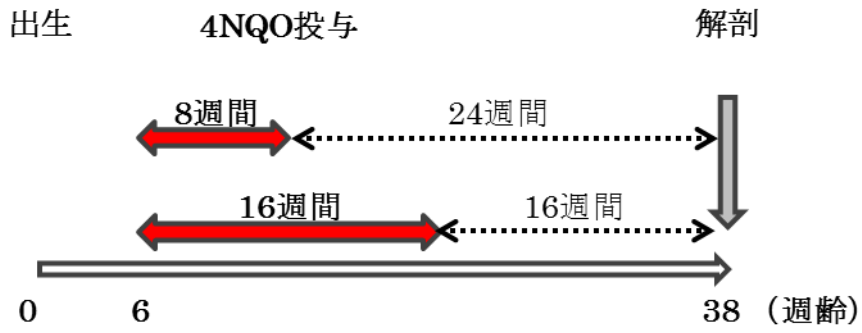


図 8. 4NQO による口腔咽頭病変の誘発
実験のスケジュールを示した。

した後、遮光ビン中の飲水中に終濃度 100 µg/ml となるよう混注した。4NQO 入りの飲用水は週に 1 度交換した。投与開始後は 4 週間ごとに体重を測定した。投与終了後、8 週間投与群では 24 週経過した時点で、16 週間投与群では 16 週経過した時点でマウスを屠殺して解剖を行い、肉眼的に口腔および咽頭の病変を観察して大きさを測定した後、病理組織学的検討を行った。

マウス組織標本作製

NNK 誘発肺腫瘍モデルでは、解剖時に主要臓器の肉眼的観察を行い、肺は気管と一塊に摘出して肉眼的に腫瘍数を計測した。気管より 10% ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社) を注入後、10%ホルマリン液に浸漬して固定した。右肺の 4 葉 (前葉、中葉、後葉、副葉) および左肺 (前葉のみ 1 葉) を分離し、観察された全ての腫瘍を病理組織学的に診断できるよう適切な位置で軸位断方向に切断してパラフィンブロックを作製した。肺葉に肉眼的に観察可能な腫瘍が確認できなかった場合、右肺の 4 葉では中央で 2 つに切断し、左肺前葉ではほぼ 3 等分となるように 2 か所で切断した。

4NQO 誘発口腔咽頭癌モデルでは、舌全体を摘出し、さらに舌以外の部位に腫瘍性病変を認めた場合にはそれらの周囲に非腫瘍性の粘膜をつけて切除し、それぞれ 10% ホルマリン液 に浸漬して固定した。観察された全ての腫瘍性病

変について、その基部と周囲の非腫瘍部を同時に観察することができるように、舌病変では冠状断方向に、舌以外の病変ではそれぞれ適切な方向に切断してパラフィンブロックを作製した。腫瘍性病変が認められなかった場合は、舌を冠状断方向に3等分してブロックを作製した。

ブロックは、全ての腫瘍性病変を確認できるように薄切し、顕微鏡パラフィン切片標本を作製した。パラフィン切片標本は、病理組織学的診断用にHE染色を行い、病理専門医の指導のもとに腫瘍性病変の組織分類を行った。

MRIによる肺腫瘍数の計測

マウスは、消化管信号に起因するアーティファクトを抑制するために、撮影の24時間前から食餌をジャガイモに変更した [66]。イソフルラン（マイラン製薬，東京，日本）4%濃度吸入で麻酔導入後、腹臥位で四肢を伸ばした態勢でアクリル板にテープを用いて固定した。固定後、イソフルラン 1.5%濃度吸入で麻酔を維持しながらコイル内に装填した（図9）。

MRIは、2012年4月から2014年2月までは、MRmini (MRTechnology社，つくば，日本) を用い、2014年3月以降は、Bruker ICON (Bruker Biospin GmbH社，Rheinstetten, Germany) を用いた。いずれも永久磁石型コンパクトMRIで磁場強度は1Tであった。スカウト画像で肺が撮影範囲に適切に位置し

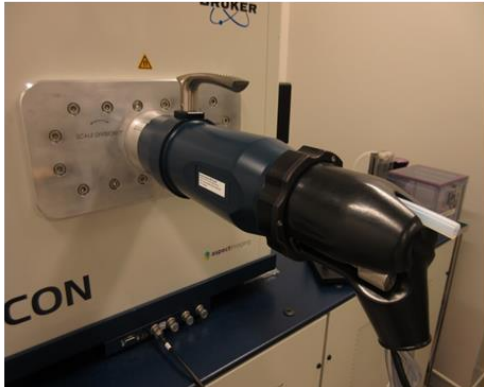
A.



B.



C.



D.

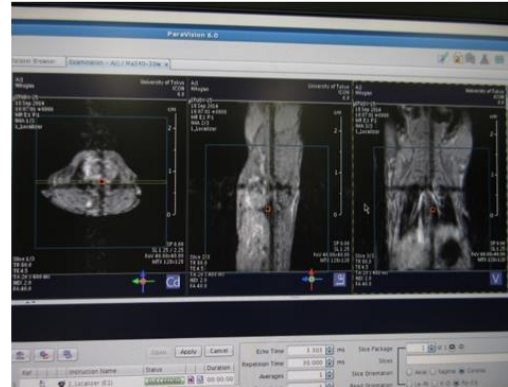


図 9. MRI 撮影 (Bruker ICON)

(A)MRI 装置。(B)マウスを専用の機器に保定し、肺の位置に合わせてコイルをセットしたところ。青いケーブルは呼吸同期用のモニター。(C)マウスをセットした機器を MRI 装置にセットしたところ。(D)スキャン画像を撮影後、本撮影の撮影範囲を決定する。

ているかを確認し、必要があればマウスの位置を変更して肺全体が撮影範囲内に入るようにした。T1 強調 3D-FLASH 像 (TR 30 ms, TE 2.2 ms, バンド帯域 100 kHz, FOV 60×30 mm, Matrix 256×128, 64 slab partitions, 0.23×0.23×0.43 mm voxel, nex 1) で冠状断方向に撮像した。それぞれの MRI において画質を最適化するために Flip angle は MRmini では 51°、Bruker ICON では 30°を用いた。画像の解析ソフトには Image J を用い [67]、冠状断および軸位断再構成画像で確認しながら腫瘍数を計測した。

NNK 誘発肺腫瘍の *Kras* 変異の解析

NNK 200 mg/kg 投与群で発生した肺の腫瘍および非腫瘍部より、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社, Venro, Netherlands) を用いて DNA を抽出した。*Kras* の変異ホットスポットである 12, 13, 61 番目のコドンが含まれるエクソン 1 およびエクソン 2 の塩基配列を決定するため、それぞれのエクソンとその前後の配列を増幅するように設計したプライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 反応の酵素は KOD FX (東洋紡) を用い、反応の条件は、94°C で 2 分間置いた後、変性を 98°C で 10 秒間、アニーリングを 55°C で 30 秒間、伸長反応を 68°C で 1 分間、これを 35 サイクル繰り返した。2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、紫外線を照射してバンドを確認してゲルを

切り抜き、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社, Fitchburg, Wisconsin, USA) を用いて PCR 産物を抽出した。FASMAC 社 (神奈川県) において、Sense プライマーよりも内側に設計したシーケンス用プライマーを用い、サンガー法にて *Kras* のエクソン 1 およびエクソン 2 の塩基配列を決定した。Lasergene SeqMan Pro ソフト (DNASTAR 社, Madison, Wisconsin, USA) で得られた塩基配列の波形を観察し、変異のない塩基の波形の 4 分の 1 の高さ以上の波形を認めた場合に遺伝子変異ありと判定した。*Kras* のエクソン 1 およびエクソン 2 の増幅およびシーケンス解析に用いたプライマーの配列は表 3 に示した。

高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) による NNK の代謝物測定

6~8 週齢の野生型および *Cadm1* 欠損型の A/J マウスに 100 mg/kg の NNK を腹腔内単回投与し、投与後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分または 240 分にマウスを安楽死させて下大静脈より血液を採取した。NNK 非投与のマウスより血液を採取して NNK 投与直前の検体とした。1 匹のマウスより 1 つの時間点の採血を行ない、オス、メスともに各時間点ごとに 3 匹ずつのマウスを使用した。採取した血液を 1 時間以内に 4°C で 10,000 rpm にて 15 分間遠心分離し、

表 3. *Kras* のエクソン 1 およびエクソン 2 の増幅およびシーケンス解析に用いたプライマーの配列

エクソン		配列
エクソン 1	PCR 用 Sense	5'-TGAGAGCCATTAGCTGCTACAA-3'
	PCR 用 Antisense	5'- AAAGGCCCTGGTGTTCAGATAG-3'
	シーケンス用	5'- GCTGCTACAAAACAGTAATCTGG-3'
エクソン 2	PCR 用 Sense	5'- GTAGACCATGTTGGCCTTGAGT-3'
	PCR 用 Antisense	5'- AAAGGCCCTGGTGTTCAGATAG-3'
	シーケンス用	5'-GGCCTTGAGTTCTCACAGAGAT-3'

得られた血漿を - 70°C で保存した。

HPLC 解析は昭和大学において、Chromaster® (Organizer, 5430 Diode array detector, 5310 Column oven, 5210 Auto sampler 5110 Pump, 株式会社 日立ハイテクサイエンス, 東京, 日本) を用い、Upadhyaya ら及び Staretz らの方法を改変して行った [68,69]。HPLC の条件は以下の通りである。分析カラム, TOSOH TSKgel ODS-120T (4.6φx250 mm, 粒子径 5 μm, 東ソー株式会社, 東京, 日本); カラム温度, 40°C; 流速, 1 ml/分; 移動相, 溶液 A (20 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH 6.74) と溶液 B (メタノール) を溶液 B の比率が 0-15% (0-15 分), 15-57% (15-30 分) となるように混合したものをを用いた。

血漿 100 μl に 5% 過塩素酸 (HClO₄) を 100 μl 加えてよく攪拌した後、内部標準物質である 4-[(acetoxymethyl)nitrosamino]-1-(3-pyridyl)-1-butanone および溶液 A を 100 μl 加えてさらによく攪拌し、4°C で 15,000 rpm にて 10 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させ、上清 100 μl を回収して HPLC にインジェクトした。検出波長は 254 nm とした。NNK、NNAL およびその代謝物である OPBA (4-oxo-4-(3-pyridyl)butyric acid) 、 HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) 、 1-(3-pyridyl)-1,4-butanediol 、 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butyric acid の濃度を、内部標準物質のピーク面積に対する相対ピーク面積によって定量した。

内部標準物質 4-[(acetoxymethyl)nitrosamino]-1-(3-pyridyl)-1-butanone および、条件設定の際に標品として使用した NNAL、OPBA、HPB、1-(3-pyridyl)-1,4-butanediol、4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butyric acid は、いずれも Toronto Research Chemicals 社より購入した。

抗体

免疫組織化学染色およびウェスタンブロット法には以下の抗体を使用した。

抗 γ H2AX (20E3) 抗体は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, Massachusetts, USA)より、抗 CYP2A (C20) 抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. 社 (Dalas, Texas, USA) より、抗 GAPDH (6C5) 抗体は Millipore 社 (Billerica, Massachusetts, USA) よりそれぞれ購入した。ウサギポリクローナル抗体である抗 CADM1 抗体 (C-18) は、CADM1 の C 末端の 18 ペプチドをハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH) をキャリアーとしてウサギに対して免疫し、アフィニティーカラム (旭硝子, 東京, 日本) で精製することにより作製した。

ウェスタンブロット法の 2 次抗体として用いたホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体は GE Healthcare 社 (Little Chalfont, UK) より購入した。

ウェスタンブロット法

約 20 mg の肺または肝組織に Homogenization buffer [250 mM スクロース, 5mM HEPES/NaOH (pH 7.2), 1 mM EDTA, 1 mM AEBSF, 100 μ M leupeptin, 50 μ M E-64, 10 μ M pepstatin A, 1 mM DTT] を加え、氷上でポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズを行い、4°C で 6000 *g* にて 10 分間遠心分離し上清を回収した。上清の一部を Protein Assay Reagent (Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) と混合し、595 nm における吸光度を Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad 社) で測定し、BSA を標準とした検量線法を用いてタンパク質の濃度を定量した。上清に 4×SDS sample buffer [0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol, 8% SDS, 20% β -ME, 0.2% BPB] を加え、タンパク質濃度が 2 mg/ml となるように調整した後、100°C で 5 分間煮沸し、氷上で急冷することによりウェスタンブロット用の試料を得た。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) には濃度 15% のゲルを使用し、各レーンに試料を 20 μ g ずつ注入した後、SDS-PAGE electrode buffer (25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1% SDS) にて定電流 15 mA で約 30 分間、続いて 30 mA で約 60 分間電気泳動を行った。ブロッティングにはセミドライ方式を用い、あらかじめメタノールに続いて Transfer buffer (50 mM Tris, 40mM Glycine, 20% メタノール, 0.1% SDS) に浸した PVDF 膜へ、トランスブロット SD セル (Bio-Rad 社) を用いて定電流

100 mA で 60 分間ブロッキングした。次に PVDF 膜を 3% BSA/TBS-T に浸してブロッキングを行った。一次抗体の希釈は、Can Get Signal® (東洋紡) Solution 1 を用い、抗 CYP2A (C20) 抗体と抗 γ H2AX 抗体は 1:1000 で、抗 GAPDH 抗体と抗 CADM1 抗体は 1:2000 の濃度で希釈し、4°Cで一晩反応させた。TBS-T で洗浄した後、二次抗体として各々の動物種の HRP 標識抗 IgG 抗体を Can Get Signal® Solution 2 で 1:2000 に希釈して加え、室温で 1 時間反応させた。再び TBS-T で洗浄した後、抗 CYP2A 抗体、抗 GAPDH 抗体、抗 CADM1 抗体は Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて、抗 γ H2AX 抗体は Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate (Roche 社, Basel, Switzerland) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare 社) にて検出を行った。検出したバンドの定量は、Image J ソフトウェアを用いて行った [67]。

免疫組織化学染色

各パラフィン切片標本に対し、65°C で 30 分間静置した後、キシレンに浸してパラフィンを除去し、続いてエタノールに浸してキシレンを除去し、さらに 5 分間流水中で洗浄した。その後、10 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH

6.0)に浸し、オートクレーブで 121°C、10 分間処理して抗原を賦活化した。室温に戻した後、0.3% 過酸化水素水に室温で 30 分浸して内因性ペルオキシダーゼを除去した。続いて非特異的反応を抑えるために 2% ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich 社, St. Louis, Missouri, USA) / TBS-T (0.1% Tween20/TBS) に室温で 10 分間浸した。一次抗体の希釈液には 2% BSA / TBS-Tを用い、抗 γ H2AX抗体を 1:500 の濃度で希釈し、4°C で一晩反応させた。TBS-T を用いて洗浄後、Labeled Polymer (DAKO ENVISION kit/HRP, DAKO 社, Glostrup, Denmark) に浸して室温で 1 時間反応させた。さらに TBS-T にて洗浄し、Liquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO 社) で発色させた。ヘマトキシリンで対比染色を行い、エタノール、キシレンにて透徹後、マリノールを用いて封入した。

定量的リアルタイム PCR

マウスの肺および肝を摘出し、迅速に RNAlater® Solution (Ambion® 社, Carlsbad, CA, USA) に一晩浸漬した後、-20°Cで保存した。Total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出し、Transcriptor 1st strand cDNA Synthesis Kit (Roche 社) を用いて一本鎖 cDNA の合成を行った。定量的リアルタイム PCR は、SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosys-

tems 社, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社) にて行った。PCR 反応の条件は、95°C で 10 分間の変性を行った後、95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間の反応を 40 回繰り返した。定量分析は相対的 $\Delta\Delta C_t$ 法にて行い、目的遺伝子 (*Cyp2a4*, *Cyp2a5*, *Mgmt*) の測定値を *β -actin* の測定値で補正した相対値を用いて比較を行った。各測定は 3 回繰り返した。それぞれの遺伝子の増幅に用いた PCR プライマーの配列は表 4 に示した。

マイクロアレイ解析

マウスの肺を摘出し、迅速に RNeasy Lysis Solution に一晩浸漬した後、-20°C で保存した。Total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。マイクロアレイは SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8x60K Microarray Kit (Agilent Technologies 社, Santa Clara, CA, USA) を用いて 1 色法で行った。Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies 社) および RNA Spike-In Kit (Agilent Technologies 社) を用いて、total RNA からの cDNA 合成、cRNA の増幅および cRNA の Cy3 ラベル化を行ない、Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies 社, Rockland, DE, USA) で cRNA 濃度および Cy3 色素の取込率を測定した。さらに、Agilent RNA 6000 Nano Kit

表 4. 各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列

遺伝子		配列
<i>Cyp2a4</i>	Sense	5'- CGGAAGACGAACGGTGCTTTC-3'
	Antisense	5'-GAGGCTTCCCAGCATCATTCTAAGA-3'
<i>Cyp2a5</i>	Sense	5'-TCGGAAGACGAACGGTGCTTTT-3'
	Antisense	5'-GCTTCCCAGCATCATTCTGAAGC-3'
<i>Mgmt</i>	Sense	5'-AGCCTATTTCCGTGAACCCG-3'
	Antisense	5'-GCTTCCCAGCATCATTCTGAAGC-3'
<i>β-actin</i>	Sense	5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'
	Antisense	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

(Agilent Technologies 社) を用いて Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies 社) で RIN (RNA Integrity Number) を測定して cRNA の分解度を確認した。Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies 社) を用いてラベル化 cRNA の断片化を行い、アレイスライドにアプライした後、Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies 社) にて 65°C にて 17 時間、ハイブリダイゼーションを行った。Wash Buffer (Agilent Technologies 社) にてアレイスライドを洗浄し、乾燥させた後、SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies 社) でスライドのスキヤニングを行った。得られた画像データを Feature Extraction ソフトウェア (Agilent Technologies 社) を用いて数値化し、Gene Spring ソフトウェア (Agilent Technologies 社) で全プローブの 75 percentile 値にてサンプル間の補正を行った。

統計解析

統計学的解析は統計ソフトウェア StateMate (株式会社アトムス、東京、日本) を用いて行った。2 群間の平均値の比較にはスチューデントの t 検定を用い、2 群間の比率の比較にはカイ二乗検定を用いた。p<0.05 を有意差ありとした。

結果

NNK 誘発肺腫瘍モデルを用いた喫煙関連肺癌における CADM1 の役割の解析

MRI による NNK 誘発肺腫瘍数の計測

MRI により肺腫瘍は T1 強調 3D-FLASH 像で 高信号の病変として描出することが可能であった (図 10)。NNK 投与後 30 週の時点で MRI により計測された腫瘍の個数は平均 5.3 個で、解剖時に肉眼的に計測された腫瘍の個数は平均 6.7 個で、肉眼的に確認された腫瘍のうちの 79%を MRI で計測することが可能であった (図 11A)。MRI 所見と肉眼的所見の相関係数は 0.97 であり (図 11B)、MRI は肺腫瘍数の観測に有用であると考えられた。MRI で計測できなかったのは、0.5 mm 以下の小さな腫瘍、心臓や椎体と重なる腫瘍、腫瘍が近傍に多発して重なった場合であった。実験期間の途中で MRI 撮影機器の交換があったが、変更前の機器では肉眼的に計測された腫瘍の 81%を計測することが可能であり、相関係数が 0.95 であったのに対し (図 11C, D)、変更後の機器では肉眼的に計測された腫瘍の 79%を描出することが可能であり、相関係数が 0.97 であった (図 11E, F)。両機器による測定結果はほぼ同等であったことから、機器の差異による実験結果への影響はないと判断した。

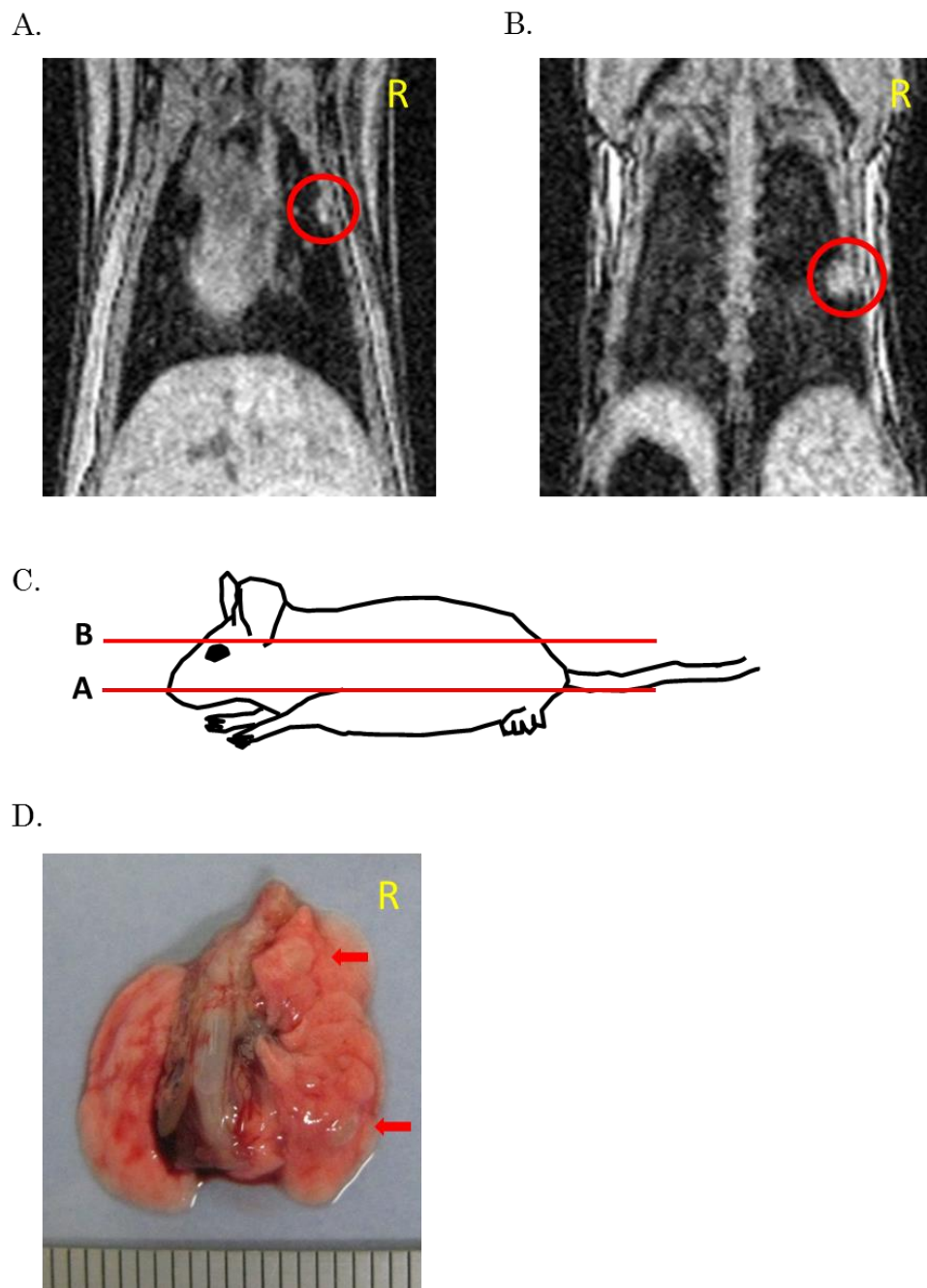


図 10. MRI 所見と肉眼的所見の比較

(A)(B)MRI 冠状断所見。それぞれ右肺上方、中央に腫瘍陰影を認める。(赤丸)
 (C)A と B の撮影部位。(D)背側からの肉眼的所見。右肺前葉および右肺後葉の
 表面に白色やや透明な腫瘍を認める。(赤矢印) (A)(B)(D)はいずれも同一マウ
 スの NNK 投与後 30 週の時点の所見。

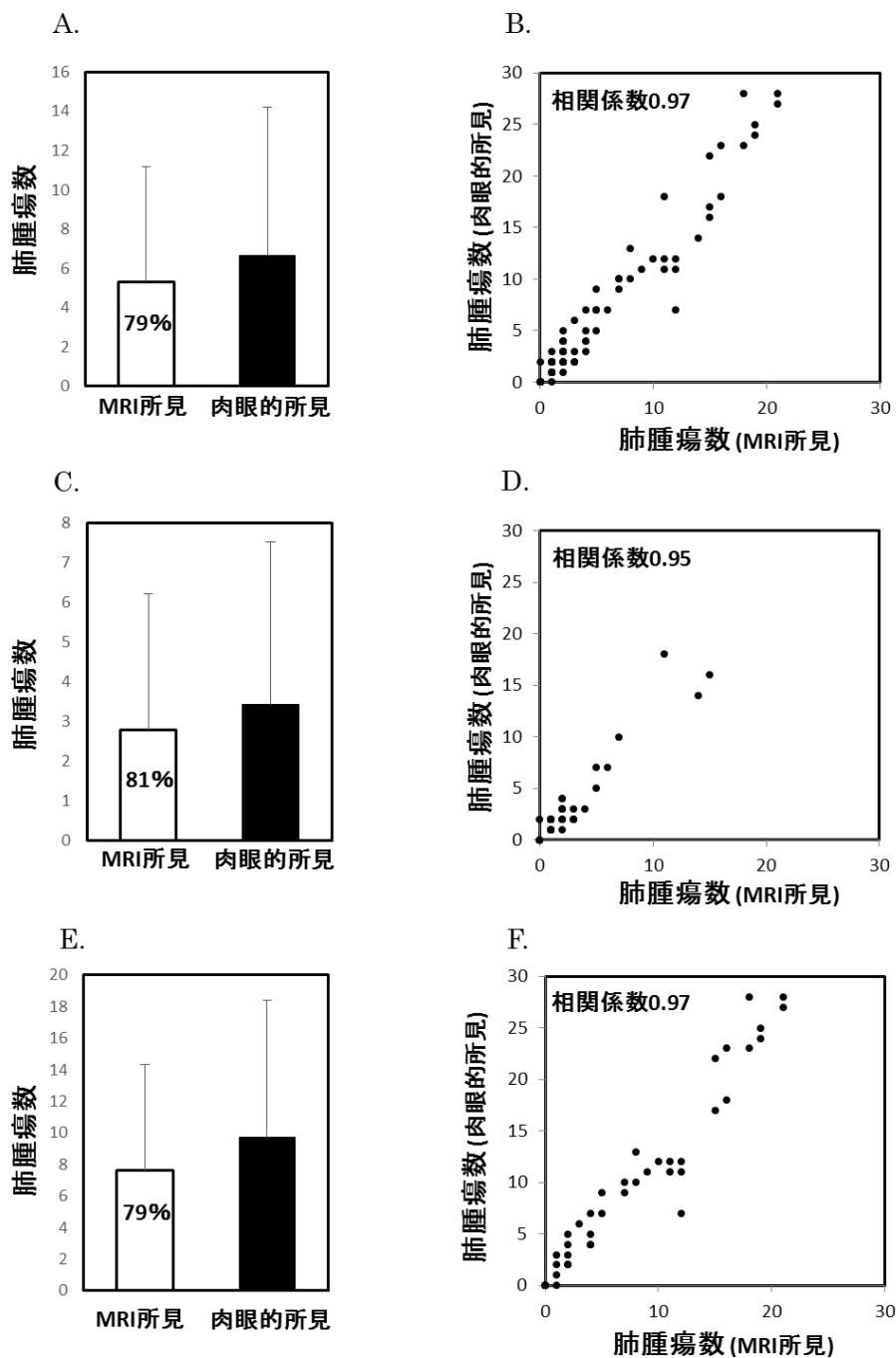


図 11. NNK 投与後 30 週の時点での MRI 所見と肉眼的所見の比較

(A)(C)(E)NNK 投与後 30 週の時点の MRI 所見および肉眼的所見での肺腫瘍数。肉眼的所見に対する MRI 所見の割合を%で表した。(B)(D)(F)MRI で計測した腫瘍数を横軸に、肉眼で計測した腫瘍数を縦軸にプロットした。(A)(B)全期間。(C)(D) MRI に MRmini を使用した期間 (2014 年 2 月まで) の 40 匹。(E)(F) MRI に Bruker ICON を使用した期間 (2014 年 3 月以降) の 43 匹。エラーバーは SD を表す。

***Cadm1* 欠損マウスでは野生型と比較して肺腫瘍発生が有意に少ない**

CADM1 が喫煙により誘発される肺癌にどのような役割を果たしているかを明らかにするため、野生型および *Cadm1* 欠損型の A/J マウスに NNK を腹腔内投与して腫瘍の発生の差異を検討した。NNK の投与量は、過去の研究にて最もよく用いられている 100 mg/kg と、その 2 倍量である 200 mg/kg に設定した。使用したマウスの数は、表 5 に示した通りである。

CADM1 は非小細胞肺癌におけるがん抑制遺伝子であることから、*Cadm1* 欠損マウスでは野生型に比べ、肺腫瘍の発生数が多いことが予想された。しかし予期に反して、MRI で計測された肺腫瘍数は、NNK 100 mg/kg 投与群では投与後 24 週、30 週の時点において、NNK 200 mg/kg 投与群では投与群では投与後 18 週、30 週の時点において、それぞれ *Cadm1* 欠損マウスの方が野生型と比較して有意に少なかった (図 12A, C)。肉眼的に計測した肺腫瘍数も NNK の投与量に関わらず *Cadm1* 欠損マウスの方が野生型と比較して有意に少なかった (図 12B, D)。これまでの報告でメスではオスと比較して腫瘍の発生数が多いことがわかっている [70]。そこで、オスとメスを分けて解析したところ、オスにおいてもメスにおいても *Cadm1* 欠損マウスでは野生型と比較して肺腫瘍発生数が有意に少なかった (図 13)。

表 5. 使用したマウスの数

A. NNK 100 mg/kg 投与群

遺伝子型	オス	メス	合計
野生型	22	11	33
<i>Cadm1</i> 欠損	11	6	17
合計	33	17	50

B. NNK 200 mg/kg 投与群

遺伝子型	オス	メス	合計
野生型	10	12	22
<i>Cadm1</i> 欠損	6	5	11
合計	16	17	33

C. 陰性対照群

遺伝子型	オス	メス	合計
野生型	3	3	6
<i>Cadm1</i> 欠損	3	3	6
合計	6	6	12

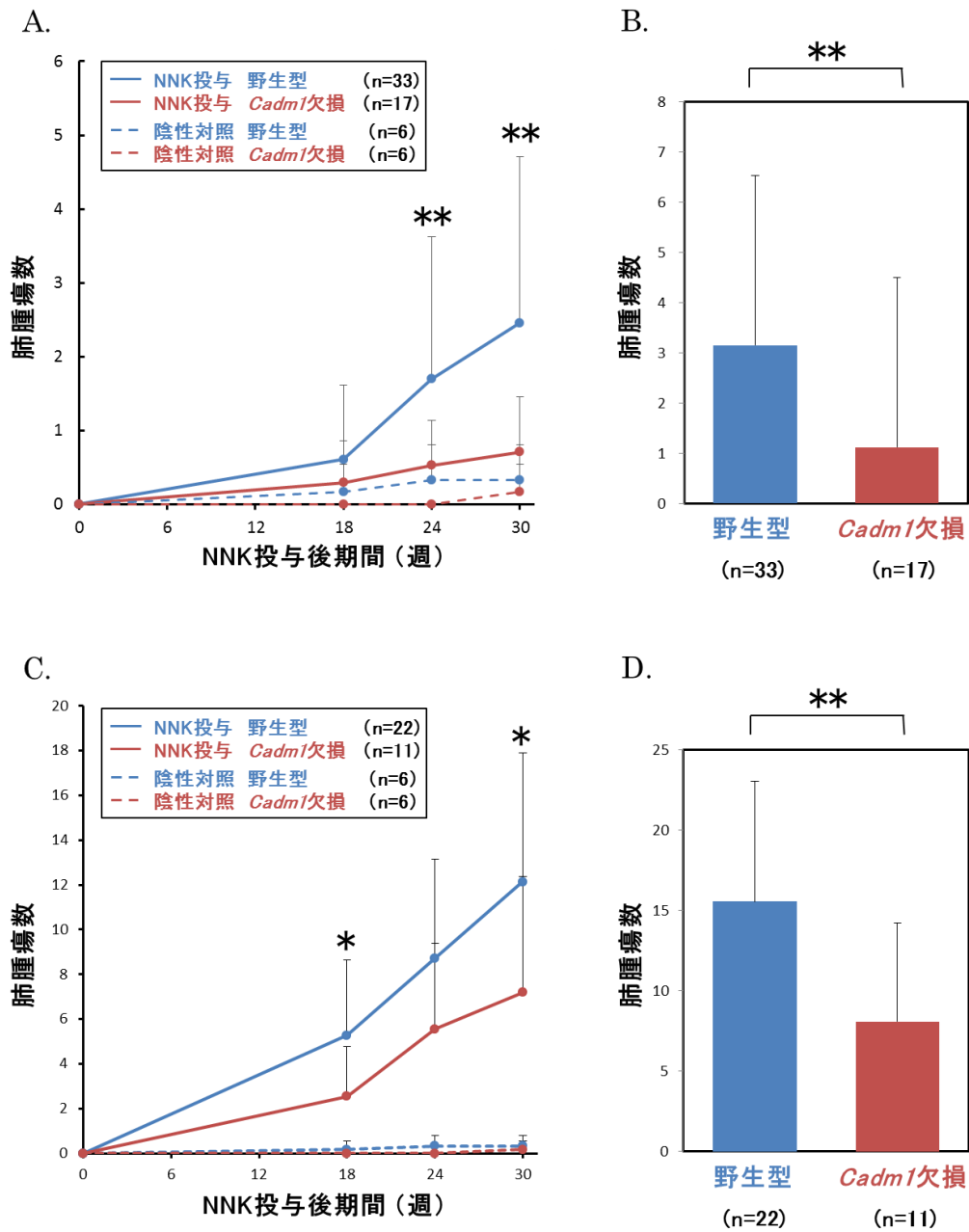


図 12. 発生した肺腫瘍数

(A)NNK 100 mg/kg 投与後、MRI で計測した肺腫瘍数。(B)NNK 100 mg/kg 投与後 30 週に肉眼的に計測した肺腫瘍数。(C)NNK 200 mg/kg 投与後、MRI で計測した肺腫瘍数。(D)NNK 200 mg/kg 投与後 30 週に肉眼的に計測した肺腫瘍数。エラーバーは SD を表す。*, p<0.05; **, p<0.01

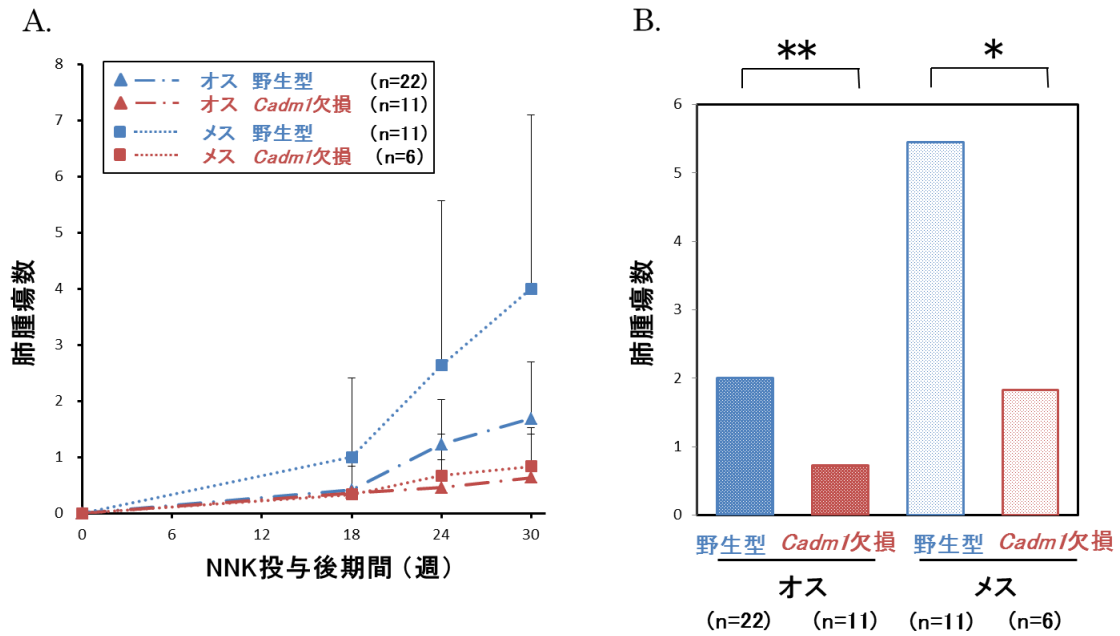


図 13. 性別ごとの発生肺腫瘍数

(A)NNK 100 mg/kg 投与後、MRI で計測した肺腫瘍数。(B)NNK 100 mg/kg 投与後 30 週に肉眼的に計測した肺腫瘍数。エラーバーは SD を表す。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

病理組織学的悪性度は野生型と *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めない

病理組織学的解析では、発生した腫瘍には、大きくわけて 2 種類の組織像が認められた。核の大きさが比較的均一で元々の肺胞構造に沿って増殖するような鱗状増殖を示す腺腫と、核の腫大や大小不同などの細胞学的異型および乳頭状構造などの構造異型を示す腺癌を認めた (図 14A-D)。それぞれの発生頻度は、野生型マウスでは腺腫が 92%、腺癌が 8%、*Cadm1* 欠損マウスでは腺腫が 93%、腺癌が 7%で、有意差を認めなかった (図 14E)。

肺腫瘍の DNA の *Kras* 遺伝子変異の様式や頻度は野生型と *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めない

マウスにおける NNK 誘発肺腫瘍では、*Kras* の 12 番目のコドンが、グリシン (GGT) からアスパラギン酸 (GAT) へ置き替わる G12D 変異が主なドライバーであることが報告されている [54]。NNK 200 mg/kg 投与群の中で、12 個の腫瘍発生を認めた野生型マウス、10 個の腫瘍発生を認めた *Cadm1* 欠損マウスの各腫瘍および肺の非腫瘍部より DNA を抽出し、*Kras* 遺伝子の変異ホットスポットである 12 番目、13 番目および 61 番目のコドンが含まれるエクソン 1 と 2 の塩基配列を解析した (図 15)。野生型マウスでは発生した腫瘍の 83% (10/12) に、*Cadm1* 欠損マウスでは発生した腫瘍の 80% (8/10) に、12 番目の

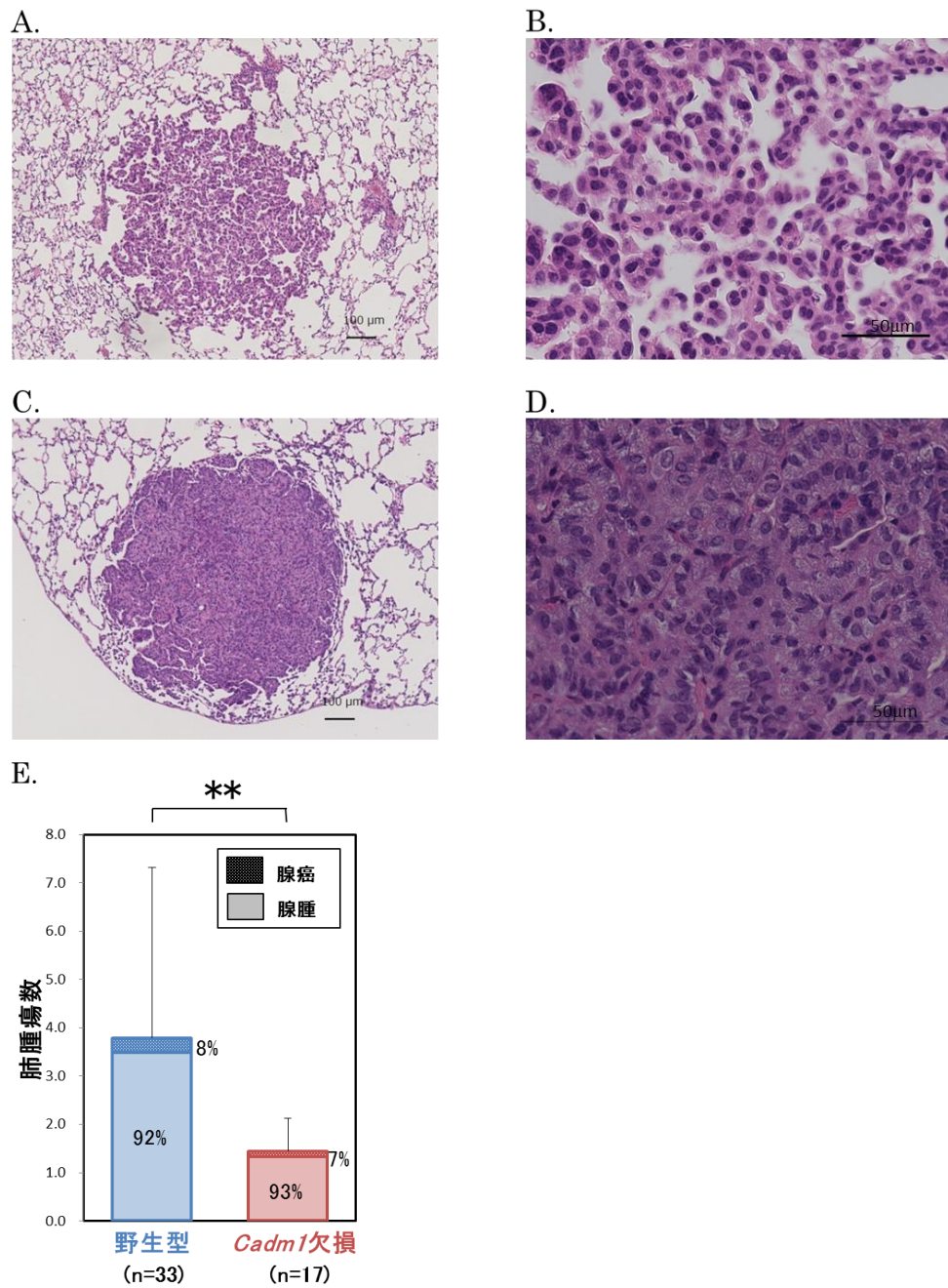


図 14. NNK 誘発肺腫瘍の病理組織学的所見

(A)(B)腺腫。元々の肺胞構造に沿って増殖するような鱗状増殖を示す。核の大きさは比較的均一である。(C)(D)腺癌。充実性で気腔は消失し、一部に乳頭状構造を認める。核の腫大や大小不同を認める。スケールバーは、(A)(C)100 μm 、(B)(D) 50 μm 。(E)野生型マウスおよび *Cadm1* 欠損マウスに発生した肺腫瘍のうちの腺癌、腺腫の割合。エラーバーは SD を表す。 ** , $p < 0.01$

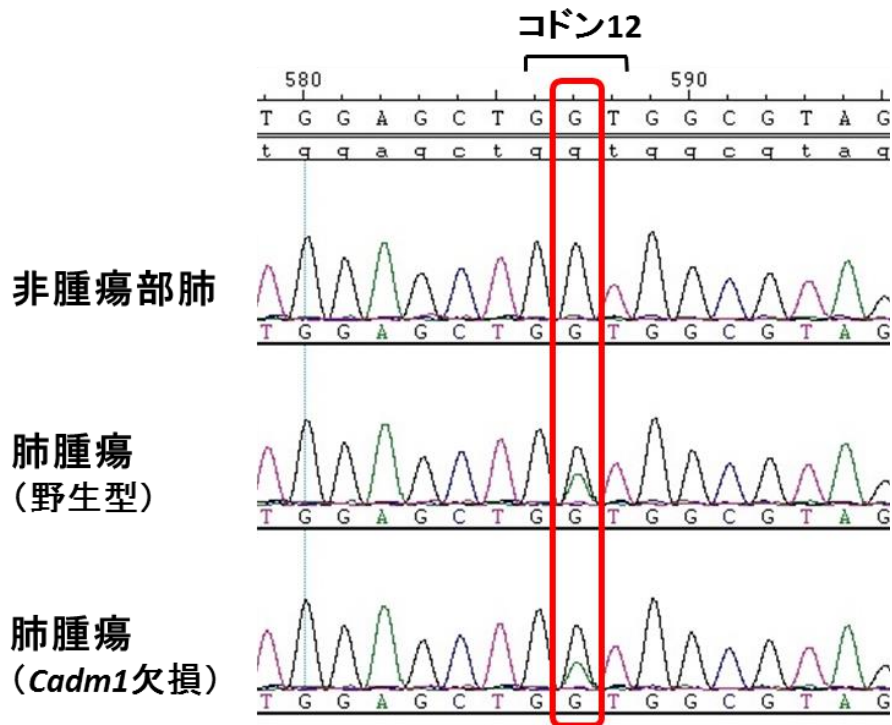


図 15. 肺腫瘍および非腫瘍部肺の DNA の *Kras* 遺伝子のシーケンス解析
 野生型および *Cadm1* 欠損マウスの肺腫瘍および非腫瘍部肺より抽出した DNA の *Kras* のエクソン 1 のシーケンス解析。野生型および *Cadm1* 欠損マウスの肺腫瘍の 12 番目のコドンに GGT→GAT の遺伝子変異を認める。非腫瘍部肺では遺伝子変異を認めない。

コドンのミスセンス変異を認め、その頻度に有意差は認めなかった。全て GGT→GAT (G12D)の変異で、他の塩基への置換は認めなかった。また、いずれも野生型 *Kras* 遺伝子の対立アレルは保たれていた。また、13 番目と 61 番目のコドンの配列にも変異は認めなかった (表 6)。また、肺の非腫瘍部では野生型および *Cadm1* 欠損マウスのいずれも変異を認めなかった。

NNK の体内動態解析

以上のことから、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスに発生した肺腫瘍は、病理組織学的にも、*Kras* 遺伝子変異の頻度や型にも違いは認められず、発生頻度のみが *Cadm1* 欠損マウスで低いことが明らかとなった。そこで、その原因を解明するために、1) NNK の吸収、代謝、排泄能 2) DNA 付加体形成や DNA 修復能 に着目して以後の実験を行った。まず、NNK の体内動態を解析するため、HPLC を用いて、NNK 投与後の NNK および代謝物血中濃度を測定した。

NNK および NNAL の体内動態は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで顕著な差を認めない

NNK の血中濃度は、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスとで差を認めなかった (図 16A)。NNAL では NNK 投与後 60 分、120 分において、血中濃度が *Cadm1*

表 6. 肺腫瘍の DNA の *Kras* 遺伝子のコドン 12、13、61 における遺伝子変異の様式と頻度

遺伝子型	コドン 12	コドン 13	コドン 61
野生型	83 % (10/12)	0 % (0/12)	0 % (0/12)
<i>Cadm1</i> 欠損	80 % (8/10)	0 % (0/10)	0 % (0/10)

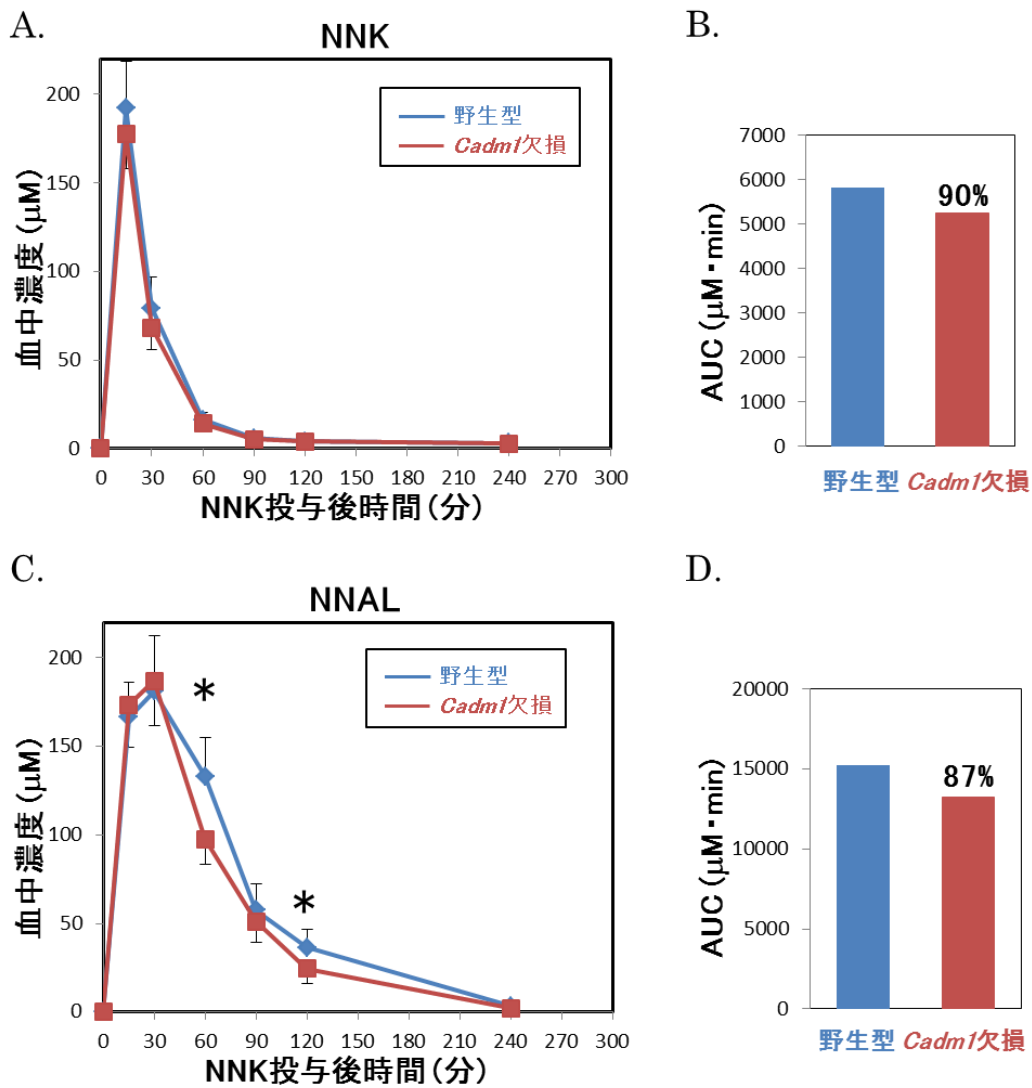


図 16. NNK および NNAL の血中濃度

(A)野生型マウスおよび *Cadm1* 欠損マウスの NNK の血中濃度。(B)NNK 投与開始から 240 分までの NNK の AUC (Area Under the Curve)。(C)NNAL の血中濃度。(D)NNK 投与開始から 240 分までの NNAL の AUC。(B)(D)では野生型に対する *Cadm1* 欠損型の AUC の割合を%で表した。

エラーバーは SD を表す。 *, $p < 0.05$

欠損マウスにおいて野生型マウスよりも軽度だが有意に減少していた (図 16C)。各時間点の平均値から AUC を求めると、*Cadm1* 欠損マウスの NNK、NNAL の AUC は野生型と比較してそれぞれ 90%、87%と軽度低下していた (図 16B,D)。

***Cadm1* 欠損マウスでは NNK のメチレン水酸化が抑制される**

NNK および NNAL は、 α 水酸化による活性化を受けて発がん性物質として働く活性中間体に変換される。活性中間体は不安定であり直接定量することが困難なことから、それらが分解されてできる代謝産物の量を定量し、野生型と *Cadm1* 欠損マウスで比較した。図 4 に示すように、NNK のニトロソ基のメチレン位の炭素が水酸化 (メチレン水酸化) された場合、 α 水酸化体は methyldiazonium ion と 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanol (OPB) に分解され、OPB はさらに 4-oxo-4-(3-pyridyl)butyric acid (OPBA) へと代謝される。NNK のニトロソ基のメチル位の炭素が水酸化 (メチル水酸化) された場合、水酸化体は 4-oxo-4-(3-pyridyl)-1-butanediazonium ion とホルムアルデヒドに分解される。4-oxo-4-(3-pyridyl)-1-butanediazonium ion はさらに 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB) へと代謝される。したがって、OPB と HPB を定量することで NNK のメチレン水酸化とメチル水酸化の量をそれぞれ間接的に評価することが可能となる。同様に、4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butyric

acid (Hydroxy Acid) を定量することで NNAL のメチレン水酸化の量を、1-(3-pyridyl)-1,4-butanediol (Diol) を定量することで NNAL のメチル水酸化の量をそれぞれ間接的に評価することが可能となる [71]。以下、簡略のため、OPBA、HPB、Hydroxy Acid、Diol をそれぞれ NNK-COOH、NNK-OH、NNAL-COOH、NNAL-OH と呼ぶこととする (図 17)。

NNK、NNAL を定量する際に、同時にこれらの代謝物を測定した。NNK-COOH と NNAL-COOH の血中濃度は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスでほとんど差がなかったのに対し (図 18)、NNK-OH では NNK 投与後 90 分で、NNAL-OH では NNK 投与後 60 分、120 分、240 分において、血中濃度が *Cadm1* 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも有意に減少していた (図 19)。各時間点の平均値から AUC を求めると、*Cadm1* 欠損マウスの NNK-OH、NNAL-OH の AUC は野生型と比較してそれぞれ 67%、75% に減少した。従って、*Cadm1* の欠損により NNK および NNAL の α 水酸化のうちメチル水酸化だけが選択的に抑制された可能性が示唆された。

肺および肝における CYP2A4 および CYP2A5 の発現は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めない

NNK および NNAL が α 水酸化を受けて生成する代謝物の C_{max} は両系統に

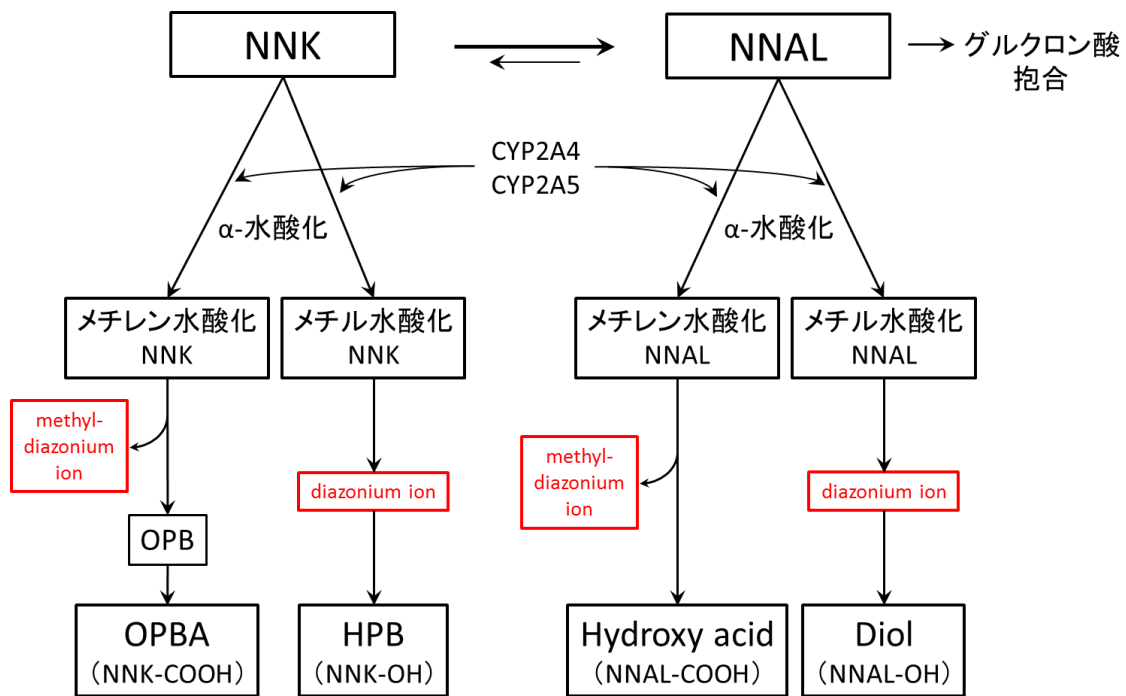


図 17. NNK の代謝経路の模式図
 NNK の代謝経路を模式的に示した。

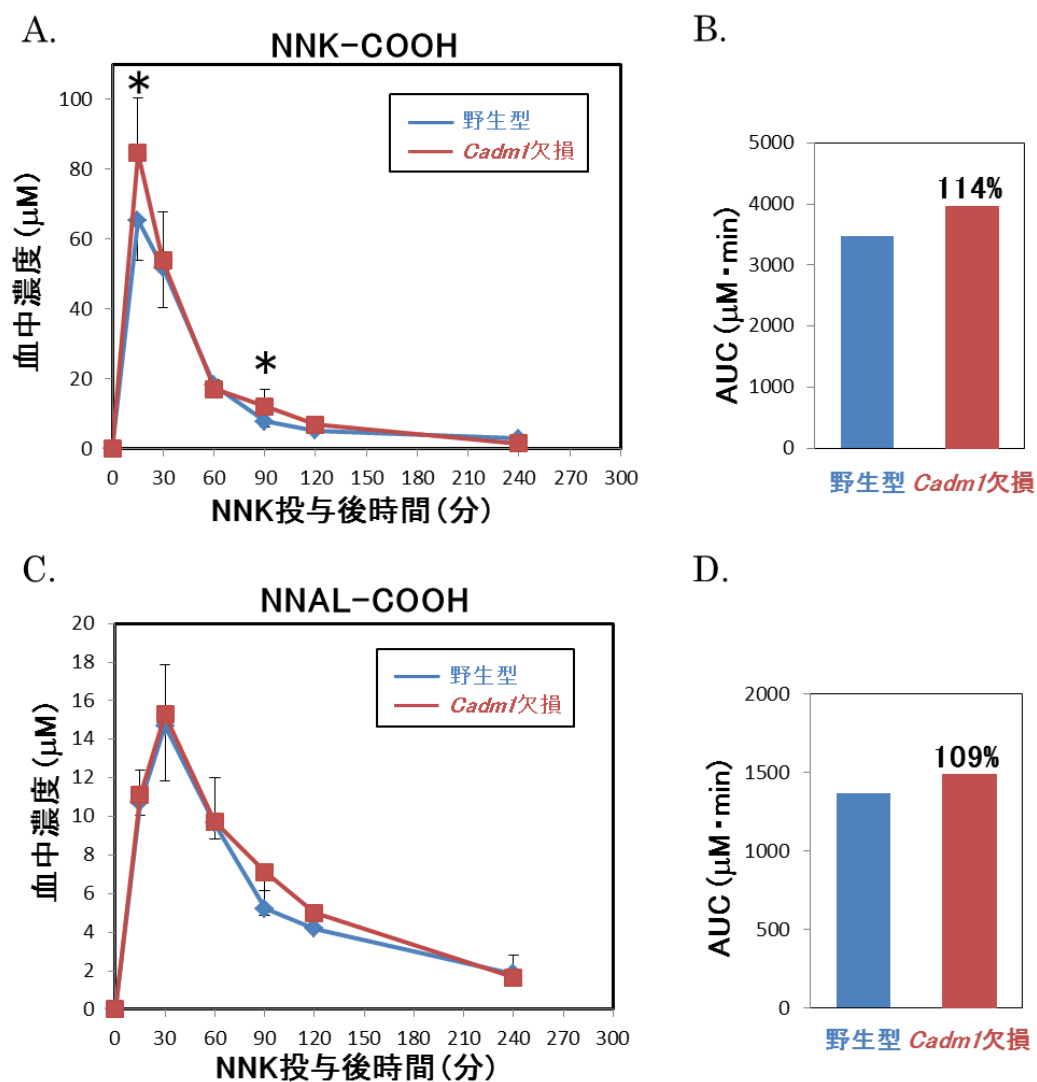


図 18. NNK-COOH および NNAL-COOH の血中濃度

(A)野生型マウスおよび *Cadm1* 欠損マウスの NNK-COOH の血中濃度。(B)NNK 投与開始から 240 分までの NNK-COOH の AUC。(C)NNAL-COOH の血中濃度。(D)NNK 投与開始から 240 分までの NNAL-COOH の AUC。(B)(D)では野生型に対する *Cadm1* 欠損型の AUC の割合を%で表した。

エラーバーは SD を表す。*, $p < 0.05$

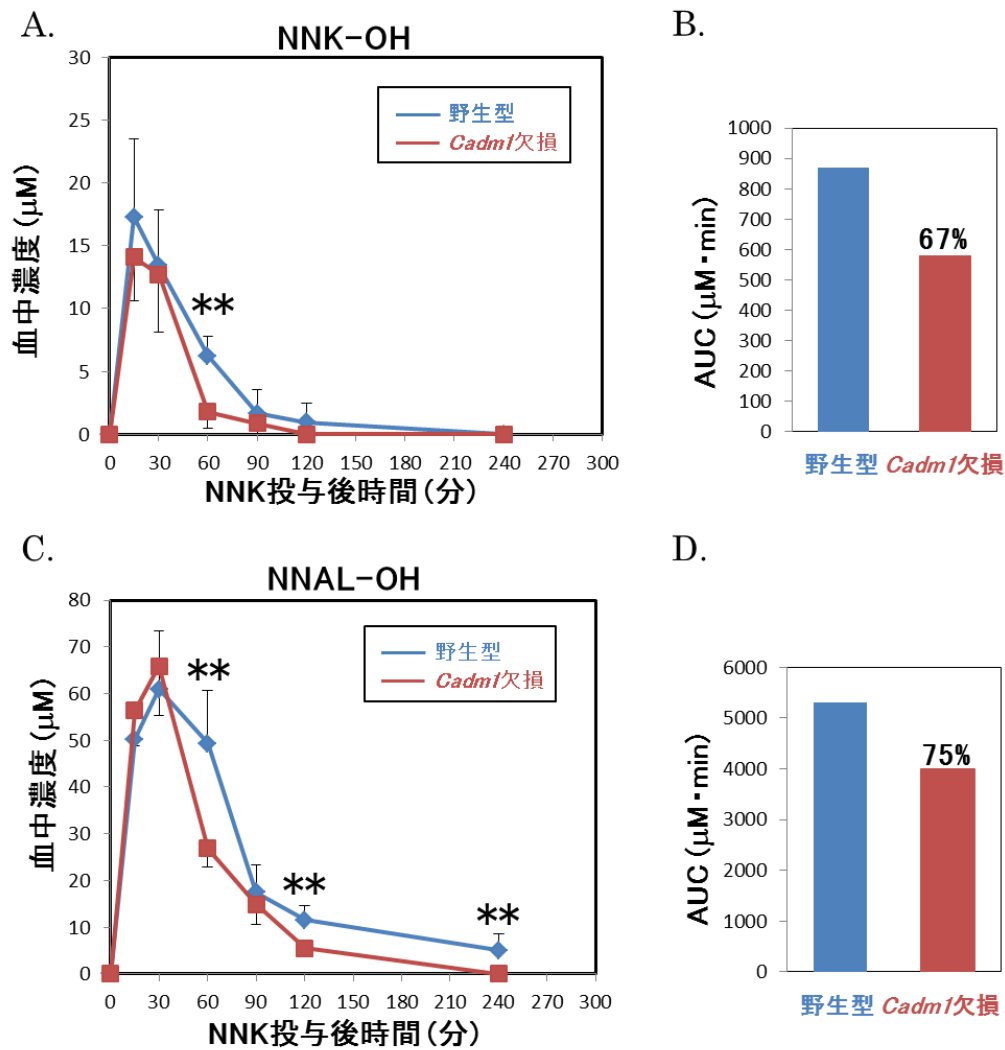


図 19. NNK-OH および NNAL-OH の血中濃度

(A)野生型マウスおよび *Cadm1* 欠損マウスの NNK-OH の血中濃度。(B)NNK 投与開始から 240 分までの NNK-OH の AUC。(C)NNAL-OH の血中濃度。

(D)NNK 投与開始から 240 分までの NNAL-OH の AUC。(B)(D)では野生型に対する *Cadm1* 欠損型の AUC の割合を%で表した。

エラーバーは SD を表す。 **, $p < 0.01$

において差異が認められなかった。本現象の原因を検証するために、肝において NNK の α 水酸化に主として関与する CYP2A4 と CYP2A5 の mRNA の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR で測定した。また、序論でも述べたように CYP2A による活性化代謝物は寿命が短いため、肺における CYP2A の発現と腫瘍生成との関連が考えられた。そこで、CADM1 の有無による肺腫瘍生成の差異の原因として肺に発現する CYP2A4 と CYP2A5 の mRNA の発現量もリアルタイム RT-PCR により定量した。発現量は肝においても肺においても *Cyp2a5* のほうが *Cyp2a4* より高いこと、肝での *Cyp2a4* の発現には雌雄差がありメスのほうが高いことが以前より知られているが [72,73]、本研究でも同様の結果であった。野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの間にはオスメスともに肺、肝いずれにおいても有意差は認められなかった (図 20A-D)。CYP2A4 または CYP2A5 に特異的な抗体は存在しない。そこでヒト抗 CYP2A 抗体を用いてウェスタンブロット法を行い CYP2A4 と CYP2A5 の総発現量を検討した。肺においても肝においても野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの間には差は認められなかった (図 20E)。

肺における *Mgmt* の mRNA の発現は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めない

CADM1 が NNK により誘発される DNA 付加体の修復に対して影響を及ぼす

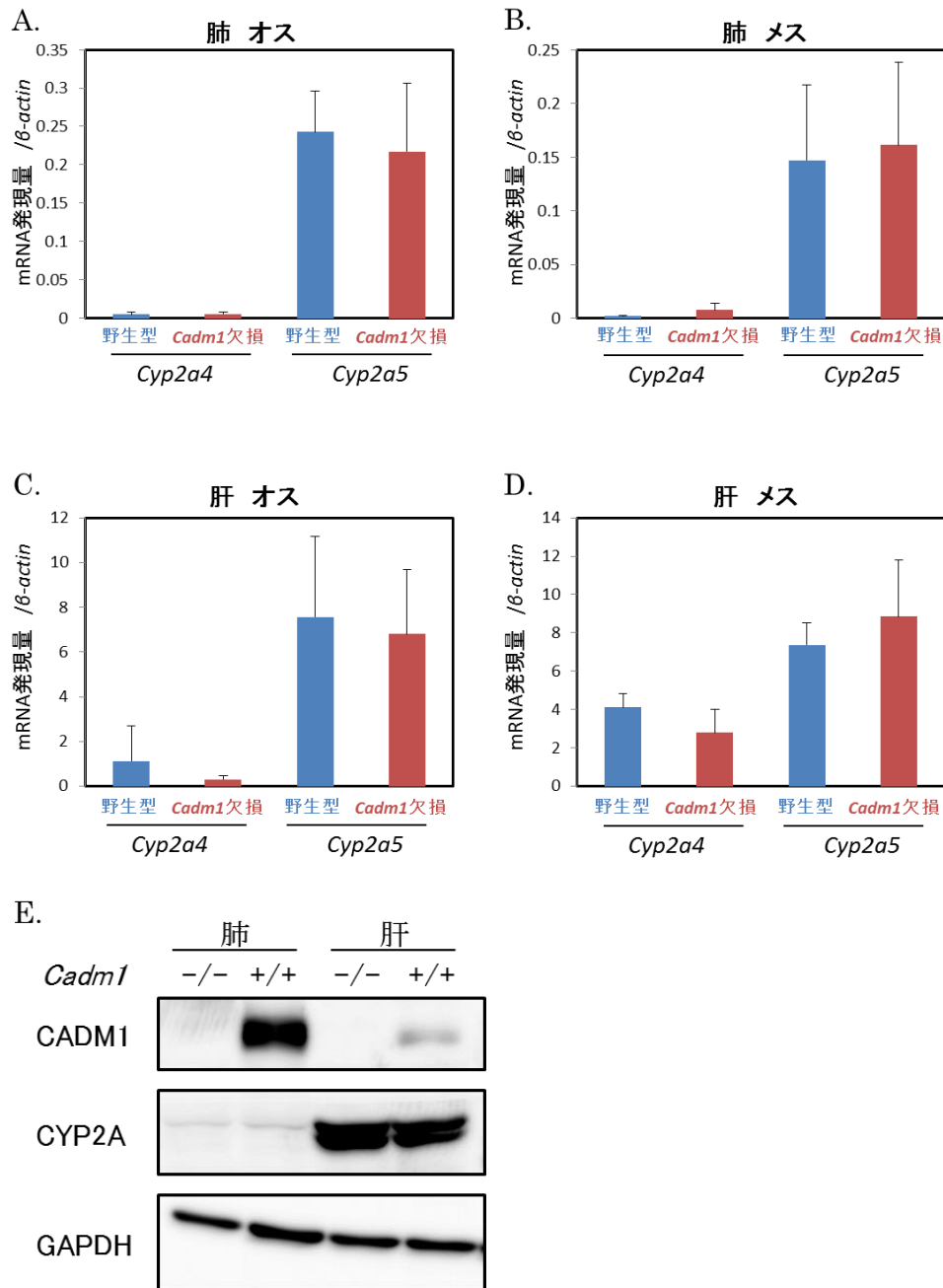


図 20. マウスの肺、肝における *Cyp2a4* および *Cyp2a5* の発現

(A)-(D) 6~8 週齢の野生型および *Cadm1* 欠損マウスの肺、肝における *Cyp2a4* と *Cyp2a5* の mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で測定した。各値は β -actin で補正した。用いたマウスは各群とも 4 匹ずつとした。(E) 8 週齢のメスの野生型および *Cadm1* 欠損マウスの肺と肝における CYP2A (CYP2A4 と CYP2A5) の発現をウェスタンブロット法で解析した。エラーバーは SD を表す。

可能性を考え、野生型および *Cadm1* 欠損マウスにおける *Mgmt* の mRNA の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR で測定し比較した。MGMT は O⁶-methyl-deoxyguanine の除去修復を行う酵素で、NNK に伴う DNA 付加体の修復において中心的役割を果たす。NNK を投与しないメスの野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウス、および NNK 投与後 4 時間のメスの野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの肺における MGMT の mRNA の発現をそれぞれ比較した。NNK 未投与においても、NNK 投与後 4 時間においても野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスでは発現に有意差は認めなかった (図 21)。

野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの肺の RNA 発現のマイクロアレイ解析

野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの肺における遺伝子発現の比較を網羅的に行うためマイクロアレイ解析を行った。6 週齢のメスの野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウス各 2 匹ずつより肺を摘出して解析を行った。各遺伝子の発現の粗データが 4 匹とも 100 未満の場合、その遺伝子の発現はほぼないものとして解析から除外し、野生型と *Cadm1* 欠損マウスで平均値の変化が 2 倍以上あったものを選出した。t 検定で p 値が 0.05 以下のものを選出したところ、*Cadm1* の他に得られたものは *Snhg11*、*Ncam1* のみで、p 値を 0.10 以下に設定しても *Apoa1* が追加されるのみであり、野生型と *Cadm1* 欠損マウスの肺では

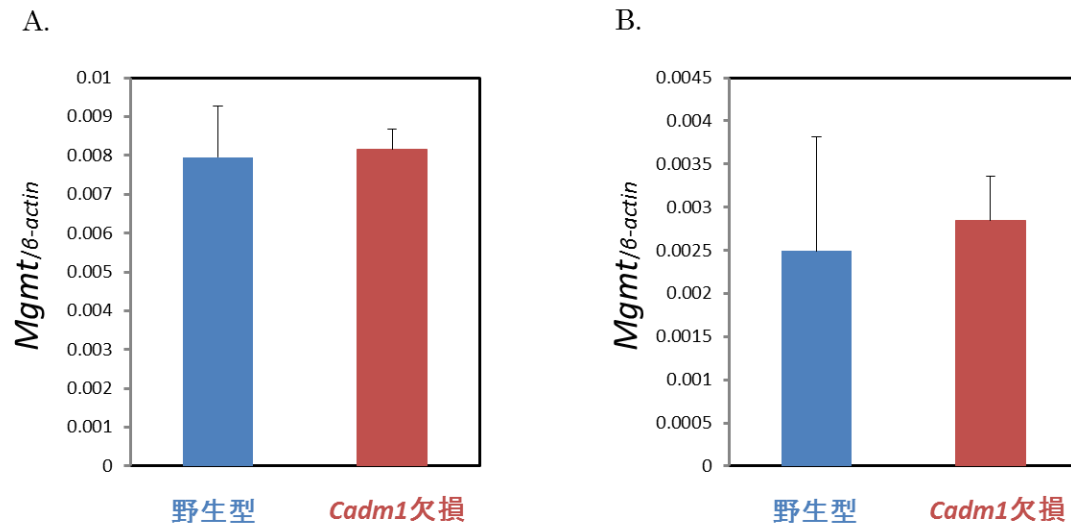


図 21. マウスの肺における *Mgmt* の発現

(A)6~8 週齢のメスの野生型および *Cadm1* 欠損マウス各 2 匹ずつの肺を摘出し、*Mgmt* の mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で測定した。(B) 6~8 週齢のメスの野生型および *Cadm1* 欠損マウス各 2 匹ずつに NNK 100mg/kg 投与後 4 時間で肺を摘出し、*Mgmt* の mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で測定した。各値は β -actin で補正した。エラーバーは SD を表す。

mRNA レベルでは遺伝子発現に大きな差はないと考えられた (表 7)。ただし、*Cadm1* 欠損マウス 2 匹両方ともに野生型マウス 2 匹両方より遺伝子発現が上昇あるいは低下していたものを選ぶと 99 個の遺伝子を選出された。このうちの 15 個をシトクロム P450 酵素群が占めており、CADM1 がシトクロム P450 酵素群の発現に何らかの影響を与えている可能性が示唆される。(表 8)。

γ H2AX の発現

NNK 投与により発生する DNA 付加体の量を解析するため、 γ H2AX の発現をウェスタンブロット法により測定した。 γ H2AX はヒストン構成タンパクの H2A の亜種である H2AX がリン酸化されたリン酸化 H2AX のことを指す。元々 DNA 二重鎖切断のマーカーとして用いられていたが [74]、Ibuki らにより DNA 付加体のマーカーとして用いられる可能性が示された [75]。そこで、NNK 投与後の γ H2AX の発現を、免疫組織化学染色およびウェスタンブロット法により、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスとで比較した。

6~8 週齢のメスの野生型および *Cadm1* 欠損マウスに NNK 100mg/kg を腹腔内投与し、4 時間後に予定解剖を行って肺を摘出して γ H2AX の免疫組織化学染色を行なった。陰性対照群には生理食塩水を投与した。生理食塩水投与群では野生型マウス、*Cadm1* 欠損マウスともに γ H2AX の染色を全く認めなかったの

表 7. 野生型および *Cadm1* 欠損 A/J マウスの肺の遺伝子発現解析

野生型と *Cadm1* 欠損マウスで平均値の変化が 2 倍以上あったものの中で、t 検定で p 値が 0.10 以下であったものを選出した。

遺伝子			Fold Change	p 値
<i>Cadm1</i>	cell adhesion molecule 1	-	37.04	<0.01
<i>Cadm1</i>	cell adhesion molecule 1	-	33.47	<0.01
<i>Apoa1</i>	apolipoprotein A-I	-	9.79	0.07
<i>Ncam1</i>	neural cell adhesion molecule 1	+	2.14	0.04
<i>Snhg11</i>	small nucleolar RNA host gene 11	+	2.04	0.03

表 8. 野生型および *Cadm1* 欠損 A/J マウスの肺の遺伝子発現解析

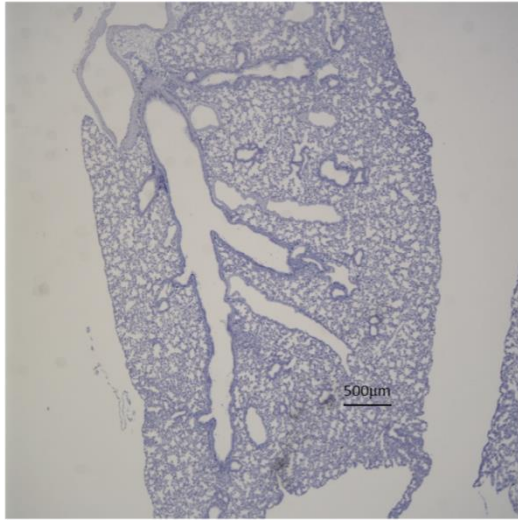
野生型と *Cadm1* 欠損型マウスで平均値の変化が 2 倍以上あった遺伝子の中で、*Cadm1* 欠損マウス 2 匹両方共に野生型マウス 2 匹両方より発現が上昇または低下していたものを選出した。*Cadm1* を青で、シトクロム P450 酵素群を赤で示した。

遺伝子	Fold Change	遺伝子	Fold Change
<i>Masp1</i>	- 105.34	<i>Cyp2d10</i>	- 6.77
<i>Kilhd8b</i>	- 47.09	<i>Igkv14-126</i>	+ 6.51
<i>Cadm1</i>	- 37.04	<i>Zbtb38</i>	+ 6.12
<i>LOC100048884</i>	- 34.48	<i>Pzp</i>	- 5.91
<i>Cadm1</i>	- 33.47	<i>Cyp2c67</i>	- 5.83
<i>Mup1</i>	- 25.53	<i>Serpina1b</i>	- 5.58
<i>Apoa2</i>	- 24.27	<i>Apom</i>	- 5.57
<i>Mup19</i>	- 23.74	<i>Ftcd</i>	- 5.48
<i>Mup17</i>	- 21.00	<i>ApoB</i>	- 5.10
<i>Cyp3a41a</i>	- 16.33	<i>Cyp2d40</i>	- 5.02
<i>Serpinc1</i>	- 15.03	<i>Cyp2a12</i>	- 4.99
<i>Gc</i>	- 14.96	<i>Slc27a5</i>	- 4.83
<i>Fgg</i>	- 14.32	<i>Comp</i>	+ 4.46
<i>Alb</i>	- 14.24	<i>Hpx</i>	- 4.39
<i>Apoa5</i>	- 14.02	<i>Apoc4</i>	- 4.26
<i>ApoH</i>	- 13.78	<i>Mup3</i>	- 4.17
<i>Ambp</i>	- 12.87	<i>Apoa2</i>	- 4.15
<i>Mup21</i>	- 12.81	<i>F2</i>	- 4.07
<i>Mup5</i>	- 12.76	<i>Uox</i>	- 4.05
<i>Mug1</i>	- 11.72	<i>Cyp2c70</i>	- 3.77
<i>Mup4</i>	- 11.66	<i>Ahsg</i>	- 3.74
<i>Alb</i>	- 11.63	<i>Stxbp5</i>	- 3.71
<i>Fgb</i>	- 11.44	<i>Hamp2</i>	- 3.60
<i>Serpina1e</i>	- 11.43	<i>Rgn</i>	- 3.58
<i>Ttr</i>	- 11.17	<i>Slc38a3</i>	- 3.40
<i>Ces3a</i>	- 11.10	<i>Serpinf2</i>	- 3.16
<i>Serpinalc</i>	- 11.09	<i>Serpina6</i>	- 2.91
<i>Cyp2c69</i>	- 11.08	<i>Dik1</i>	+ 2.90
<i>Mbl2</i>	- 11.05	<i>Mogat2</i>	+ 2.81
<i>Serpina1a</i>	- 9.81	<i>H2-Q10</i>	- 2.73
<i>Apoa1</i>	- 9.79	<i>Scn2b</i>	+ 2.59
<i>Olf1097</i>	+ 9.79	<i>Cyp2e1</i>	- 2.44
<i>Mup20</i>	- 9.11	<i>Cyp2c37</i>	- 2.42
<i>Hnf4a</i>	- 9.10	<i>Fabp1</i>	- 2.41
<i>Kng1</i>	- 8.84	<i>Thap1</i>	- 2.40
<i>Cyp2c50</i>	- 8.78	<i>Tmprss6</i>	- 2.31
<i>Cyp2c29</i>	- 8.77	<i>Slc28a2</i>	+ 2.27
<i>Alcf</i>	- 8.59	<i>Cyp26b1</i>	- 2.26
<i>Rdh7</i>	- 8.10	<i>Serpina3m</i>	- 2.25
<i>Cyp2d26</i>	- 8.02	<i>Tfr2</i>	- 2.25
<i>Till5</i>	- 7.83	<i>Azgp1</i>	- 2.24
<i>Serpina3k</i>	- 7.72	<i>Fabp2</i>	- 2.21
<i>Slco1b2</i>	- 7.39	<i>Ncam1</i>	+ 2.15
<i>Cyp2c54</i>	- 7.31	<i>Ncam1</i>	+ 2.14
<i>Nppb</i>	+ 7.25	<i>Gng13</i>	+ 2.09
<i>C9</i>	- 7.24	<i>Cyp4a31</i>	- 2.06
<i>Slc38a11</i>	- 7.22	<i>Snhg11</i>	+ 2.04
<i>Tmem25</i>	- 7.06	<i>Arhgap20</i>	+ 2.03
<i>Mup2</i>	- 6.95	<i>Sult2a8</i>	- 2.00
<i>Kng1</i>	- 6.92		

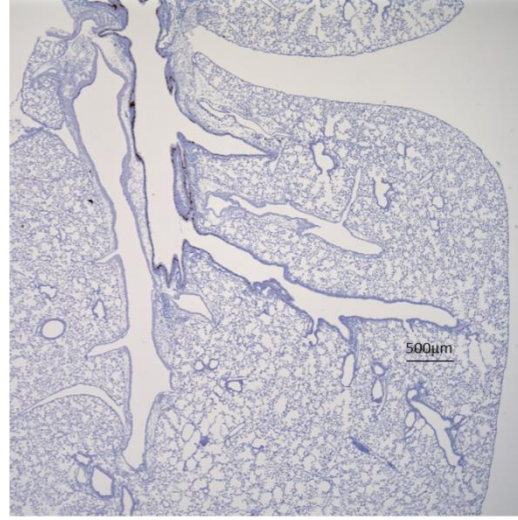
に対し、NNK 投与群では気道上皮細胞の核への染色が認められた (図 22A, B)。気道上皮細胞のうち、核が染色される頻度が高かったのが主気管支や葉気管支など中枢側の気道上皮の細胞で、末梢に向かうにつれて頻度が低下し、細気管支ではほとんど染色がみられなかった (図 22C-F)。そこで、肺内起始部より 2 mm までの範囲の気道上皮における γ H2AX 陽性細胞の割合を計測した。野生型マウス、*Cadm1*欠損マウスにおける γ H2AX 陽性細胞の割合はそれぞれ平均 25%、15%であった。個体間のばらつきが大きく有意差はなかったものの、*Cadm1*欠損マウスの方が野生型よりも頻度が低い傾向を認めた (図 23)。

さらに、6~8 週齢のメスの野生型および *Cadm1* 欠損マウスに NNK 100mg/kg を腹腔内投与し、4 時間後に予定解剖を行って肺を摘出して γ H2AX の発現をウェスタンブロット法で確認した。陰性対照群には生理食塩水を投与した。生理食塩水投与群では野生型マウス、*Cadm1* 欠損マウスともに γ H2AX の発現はほとんど見られなかったのに対し、NNK 投与後 4 時間では、野生型マウス、*Cadm1* 欠損マウスともに γ H2AX の発現が誘導された。それぞれのバンドを定量すると、有意差は認めなかったものの *Cadm1* 欠損マウスのほうが野生型マウスよりも発現量が少ない傾向を認めた (図 24)。これらの結果から、*Cadm1* 欠損マウスでは DNA 付加体の量が減少している可能性が示唆された。

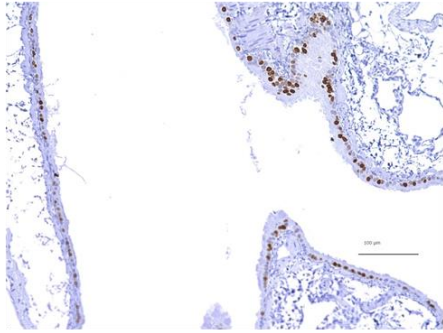
A.



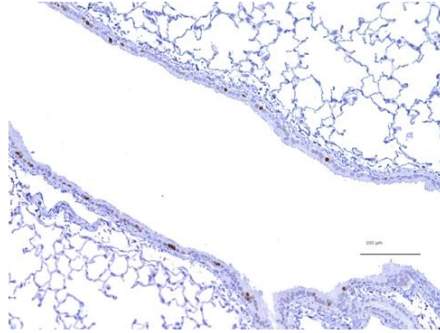
B.



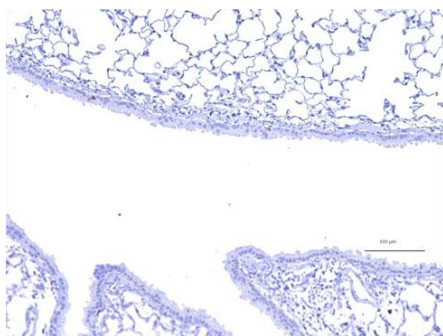
C.



D.



E.



F.

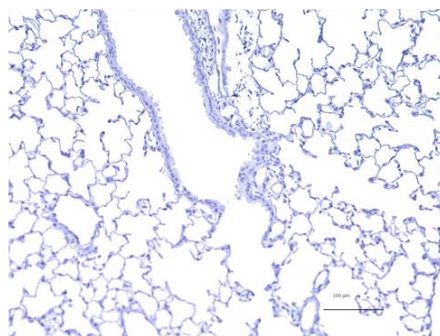


図 22. マウス肺における γ H2AX の発現

6~8 週齢のメスのマウス肺における γ H2AX の発現を免疫組織化学染色で解析した。(A)生理食塩水投与後 4 時間。染色は認められない。(B)NNK 100 mg/kg 投与後 4 時間。気道上皮細胞の核への染色を認める。(C)-(F) (B)を強拡大にして中枢から抹消へと順に追っていった。抹消に向かうに従って染色される細胞の頻度が低下している。スケールバーは、(A)(B)500 μ m、(C)-(F)100 μ m。

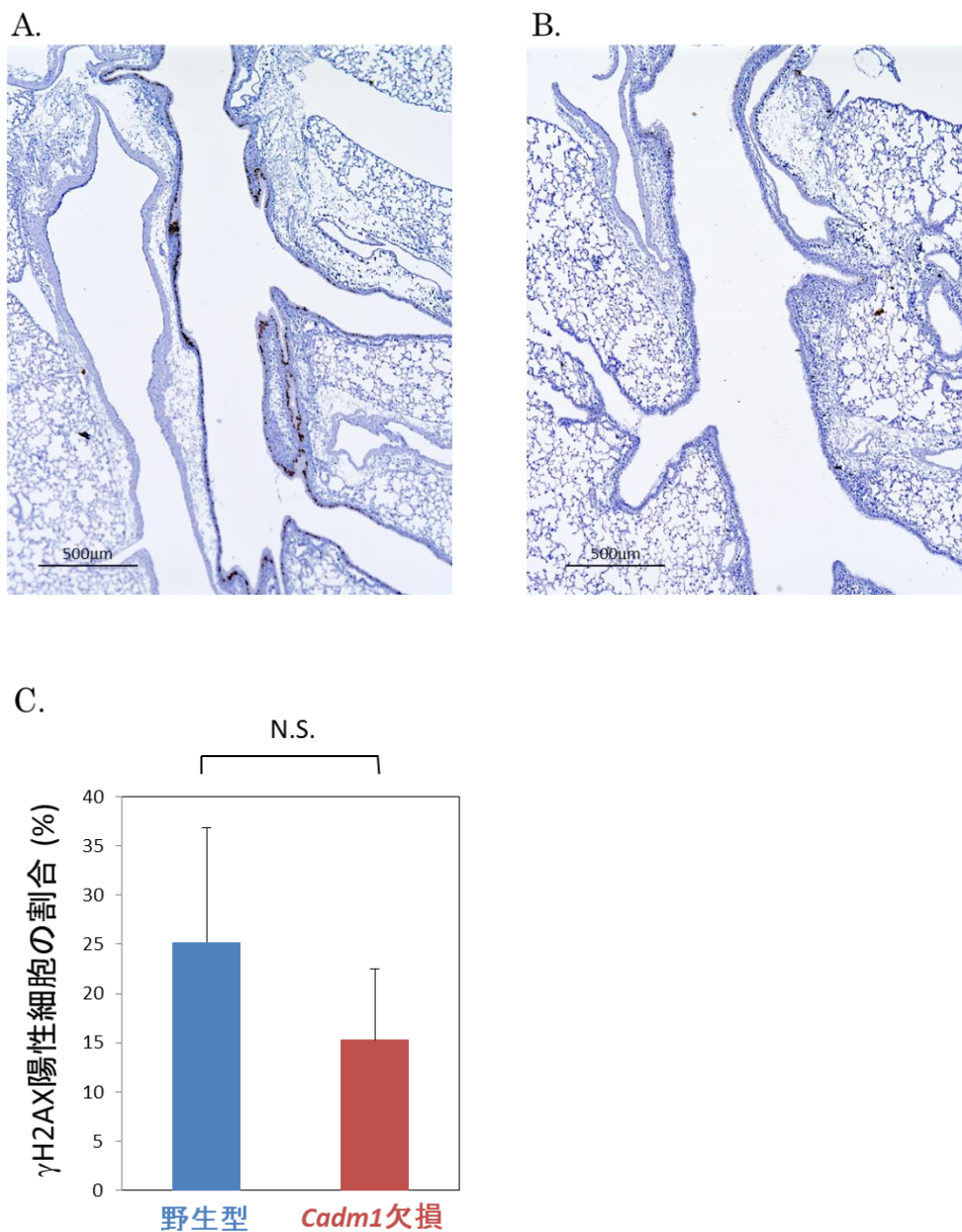


図 23. マウス肺気道上皮細胞におけるγH2AX 陽性細胞の割合

6~8 週齢のメスのマウスに NNK 100mg/kg を投与後 4 時間で予定解剖を行って肺を摘出し、γH2AX の免疫組織化学染色を行った。肺内起始部から 2 mm までの気道上皮の中で、γH2AX が核に染色された細胞数を計測した。(A)野生型マウス。(B)*Cadm1* 欠損マウス。(C) 肺内起始部から 2 mm までの気道上皮の全体の細胞数で割って割合を求めた。野生型、*Cadm1* 欠損型ともに 5 匹ずつのマウスを使用した。 エラーバーは SD を表す。 N.S., not significant

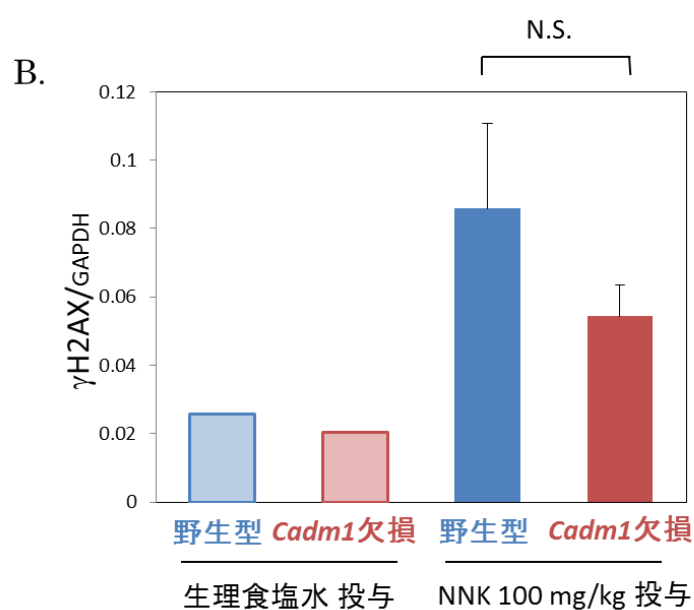
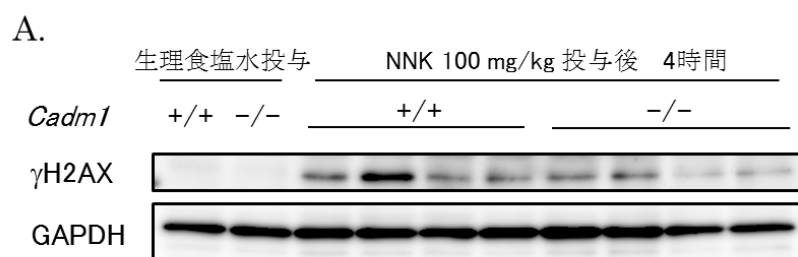


図 24. マウス肺における γ H2AX の発現

(A) NNK 100 mg/kg または生理食塩水投与後 4 時間のマウス肺における γ H2AX の発現をウェスタンブロット法で解析した。生理食塩水投与群では γ H2AX の発現はほとんど認めなかったが、NNK 投与群では発現が誘導された。生理食塩水投与群は野生型、*Cadm1* 欠損型それぞれ 1 匹ずつ、NNK 投与群は野生型、*Cadm1* 欠損型それぞれ 4 匹ずつのマウスを使用した。(B) 各バンドを定量し、GAPDH で補正した。エラーバーは SD を表す。 N.S., not significant

4NQO 誘発口腔咽頭癌モデルを用いた頭頸部癌における *CADM1* の役割の解析

4NQO による口腔咽頭病変の発生

4NQO を 8 週間投与した群には、野生型マウス 4 匹、*Cadm1* 欠損マウス 4 匹を使用した。4NQO を 16 週間投与した群には、野生型マウス 6 匹、*Cadm1* 欠損マウス 4 匹を使用した。4NQO を 16 週間投与した群では、4NQO を 8 週間投与した群と比べて早期より体重減少を認め、投与開始後 24 週目に *Cadm1* 欠損マウスが 4 匹中 2 匹死亡してしまった。他のマウスも大きく体重が減少しており 32 週間までの生存が難しいと判断したため、予定を変更して 4NQO 投与開始後 24 週間の時点で解剖を行った (図 25)。

解剖時の肉眼的観察では、白板症、びらん、潰瘍および乳頭状腫瘤など様々な種類の口腔咽頭病変の発生が認められた (図 26)。

病理組織学的所見

病理組織学的には、異形成 (軽度、高度)、上皮内癌、浸潤癌などの腫瘍性病変の他に、過角化や炎症性変化などヒトの口腔病変と類似した様々な形態の組織像を認めた (図 27)。

4NQO を 8 週間投与した群のマウスの舌に発生した軽度異形成、高度異形成、

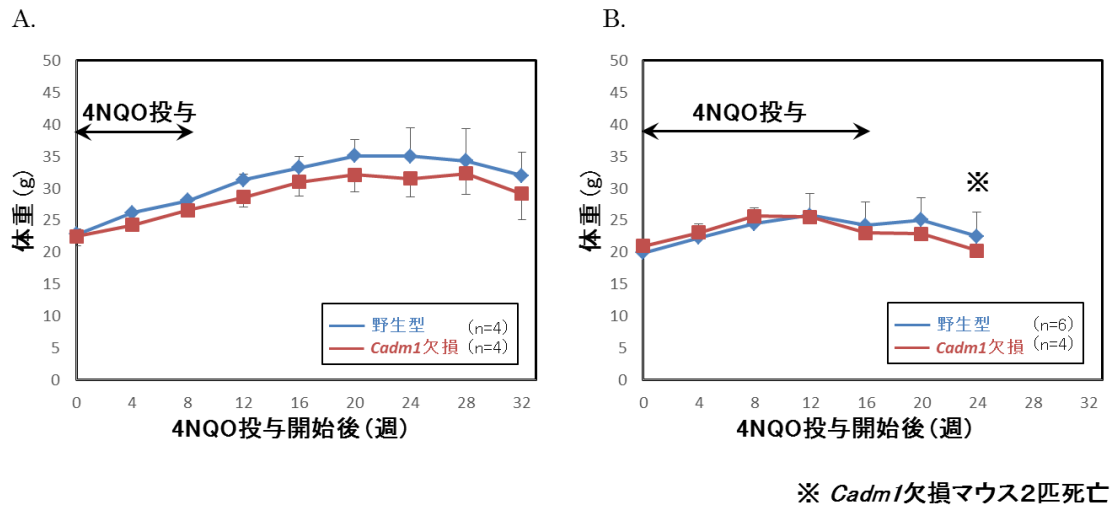


図 25. 4NQO を投与したマウスの体重変化。
 (A)4NQO を 8 週間投与した群。(B) 4NQO を 16 週間投与した群。4NQO 投与開始から 24 週経過した時点で *Cadm1* 欠損マウス 4 匹中 2 匹が死亡した。
 エラーバーは SD を表す。

A.



B.



C.



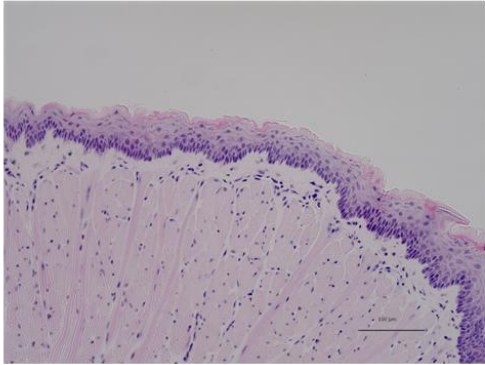
D.



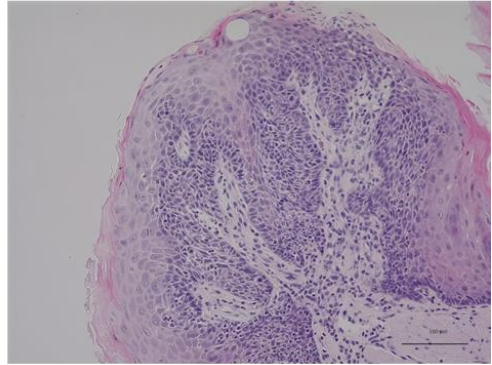
図 26. 4NQO により生じた口腔または咽頭病変の肉眼的所見

(A)舌背右側に白板症と舌尖右側に小さな隆起性病変を認める。(B)舌背中央に乳頭腫様の隆起性病変を認める。(C)舌背中央に一部潰瘍を伴う白色病変を認める。(D)下咽頭右側に乳頭腫様の隆起性病変を認める。 赤矢印で各病変を示した。

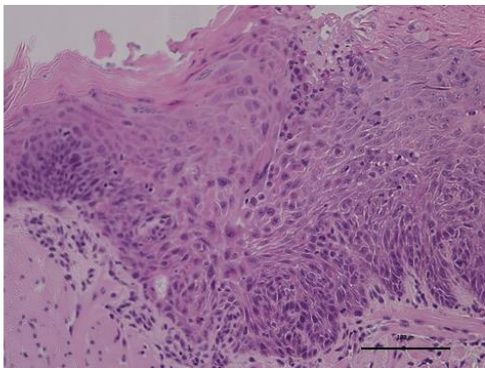
A.



B.



C.



D.

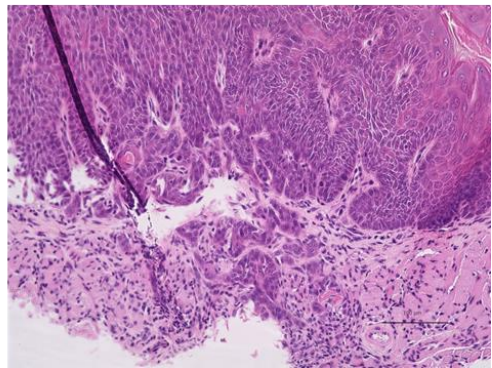


図 27. 4NQO により生じた舌病変の病理組織学的所見 (HE 染色)

(A)正常粘膜。(B)軽度異形成。基底層の腫瘍性増殖を認めるが、細胞の大きさは均一である。(C)上皮内癌。核の大小不同を認める。(D)浸潤癌。基底膜をこえて筋層への浸潤を認める。

上皮内癌、浸潤癌の数および舌以外に発生した病変の数を表 9 に示した。舌においては、野生型マウス 4 匹では、軽度異形成が 3 個（うち 1 個は乳頭腫状）、上皮内癌が 1 個認められ、*Cadm1* 欠損マウス 4 匹では、軽度異形成が 5 個、高度異形成が 2 個認められた。舌以外では、野生型マウスの中咽頭側壁に異形成が 1 個認められた。また、野生型マウスにおいてのみ 3 mm を超えるような大きな病変が 1 個認められた。

4NQO を 16 週間投与した群のマウスの舌に発生した軽度異形成、高度異形成、上皮内癌、浸潤癌の数および舌以外に発生した病変の数を表 10 に示した。舌においては、野生型マウス 6 匹では、軽度異形成が 4 個、高度異形成が 1 個、上皮内癌が 3 個（うち 1 個は乳頭腫様）、浸潤癌が 1 個認められ、*Cadm1* 欠損マウス 2 匹では、軽度異形成が 1 個、高度異形成が 1 個認められた。舌以外では、野生型マウスにおいて、中咽頭後壁に 3 個の異形成と、硬口蓋に 1 個、頬粘膜に 1 個、下咽頭に 2 個、それぞれ乳頭腫様の異形成が認められた。また、野生型マウスにおいてのみ 3 mm を超えるような大きな病変が計 5 個認められた。

表 9. 4NQO を 8 週間投与した群に発生した口腔咽頭病変

4NQO を 8 週間投与した野生型および *Cadm1* 欠損マウスの舌に発生した腫瘍性病変を病理組織型で分類した。舌以外に発生した病変は発生母地を示した。肉眼的観察で 3 mm を越える乳頭腫様の病変を*で示した。

	マウス 個体番号	軽度 異形成	高度 異形成	上皮内 癌	浸潤癌	舌以外
野生型	#12					
	#49	1				
	#50	1		1		中咽頭側壁 1
	#54	1*				
<i>Cadm1</i> 欠損	#7	2	1			
	#11	2				
	#19	1				
	#56		1			

* 3mm 以上の乳頭腫様病変

表 10. 4NQO を 16 週間投与した群に発生した口腔咽頭病変

4NQO を 16 週間投与した野生型および *Cadm1* 欠損マウスの舌に発生した腫瘍性病変を病理組織型で分類した。舌以外に発生した病変は発生母地を示した。肉眼的観察で 3 mm を越える乳頭腫様の病変を*で示した。

	マウス 個体番号	軽度 異形成	高度 異形成	上皮内 癌	浸潤癌	舌以外
野生型	#25			2		頬粘膜 1*
	#36	3				中咽頭後壁 1 硬口蓋 1*
	#41	1				中咽頭後壁 1
	#42		1	1*		
	#44				1	下咽頭 1*
	#46					中咽頭後壁 1 下咽頭 1*
<i>Cadm1</i> 欠損	#26	1				
	#43		1			

* 3mm 以上の乳頭腫様病変

考察

喫煙は肺癌の重要なリスク因子であることは古くからよく知られているが、その機序については十分に明らかになってはいない。一方、*CADM1* は非小細胞肺癌のがん抑制遺伝子であり、さらに喫煙者において *CADM1* のプロモーターのメチル化の頻度が非喫煙者よりも高いことから、*CADM1* と喫煙は何らかの関連があることが示唆されている。肺癌と同様に気道上皮を中心に発生する頭頸部癌においても喫煙は重要なリスク因子であり、頭頸部癌のうちの上咽頭癌や HPV 陽性中咽頭癌においても *CADM1* のプロモーター領域のメチル化が高頻度に認められることから、頭頸部癌においても *CADM1* ががん抑制的に働くことが示唆される。本研究では、喫煙関連肺癌および頭頸部癌それぞれの化学発癌剤による疾患動物モデルを野生型および *Cadm1* 欠損マウスを用いて作成、比較することで、これらにおける *CADM1* の役割を解析した。

喫煙関連肺癌の動物モデルとしては、今回用いた NNK の腹腔内投与の他に、NNK の経口投与 [53]、ベンゾ[a]ピレンの経口投与 [76]、タバコ煙の慢性的な暴露などが用いられている [77]。NNK の腹腔内投与は、簡便であり飲水量などによるばらつきがなく投与量のコントロールがしやすいこと、過形成から腺腫を経て腺癌に至る病理組織学的所見がヒトの肺腺癌と類似していること、古くから使われており腫瘍発生メカニズムが比較的明らかにされていることが

メリットとして挙げられる。しかし、NNKは5000種類以上の多数の成分が含まれるタバコ煙のうちの1種類でしかないこと、経気道的投与でないため実際のタバコ煙とは投与経路が異なっていること、単回投与のため慢性曝露ではないこと、タバコ煙による直接的な炎症や障害が起こらないこと、ドライバーとなる遺伝子変異のほとんどが*Kras G12D*変異であり喫煙関連肺癌とは遺伝子学的な背景が異なっていること、ヒトでは喫煙により発生するのは主に扁平上皮癌であることなど異なる点も多数あることに注意が必要である。

本研究ではMRIにより経時的に腫瘍発生数を計測した。マウスの肺腫瘍は小さいため、従来は、4.7テスラかそれ以上の磁力の装置を用いて呼吸同期をしながらでないとは十分な解像度を得ることができないとされていたが、1テスラのコンパクトな装置で呼吸同期を行わなくても鮮明な画像を得られることを明らかに報告した [78]。実験期間の途中でMRIが同じ1テスラの別の機器に入れ替えられ、呼吸同期を行いながら撮影を行うことができるようになったが、機器の変更前と変更後では、計測できる腫瘍数は解剖時の肉眼的所見のそれぞれ81%、79%であり、MRI所見と肉眼的所見との相関係数はそれぞれ0.95、0.97であり、ほぼ同等の検出力があると考えられた。MRI撮影は、麻酔も含めて1匹あたり15分程度で行うことができ、操作もそれほど複雑ではない。MRIによって腫瘍数を計測することで、同一マウスでの腫瘍の発生を経時的にフォロー

ーアップすることが可能となり、各タイムポイントで数匹ずつマウスを犠牲して腫瘍数を計測するのに比べて、より正確性が高くなり、犠牲するマウスの数も大幅に少なくすることが可能となる。本研究のように遺伝子改変マウスを使用している場合、マウスの交配、繁殖が必要となるため、短期間に大量のマウスを用意することが難しい場合がある。そのような際に、MRI による腫瘍数の計測は非常に有用な手段となりうると考えられる。

東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野において行われた先行研究では、*Cadm1* 欠損マウス (Sv/129 と C57BL/6 のミックス系統) における肺腫瘍の自然発生の頻度が野生型よりも有意に高く、肺腫瘍の大きさも大きい傾向を認めたことから、がん抑制遺伝子としての働きが確認された (Nagata ら, [25])。さらに Ito らは、肺腺癌のモデルマウスである *Kras^{+LSL-G12D}* マウス (C57BL6 系統) を *Cadm1* 欠損マウス (C57BL6 系統) と交配させることで *Kras^{+LSL-G12D/Cadm1^{-/-}}* マウス (C57BL6 系統) を作成し、*Kras^{+LSL-G12D/Cadm1^{+/+}}* マウスとの間で比較検討を行った。*Kras^{+LSL-G12D}* マウスは、一方の *Kras* アレルを、G12D 変異 *Kras* 遺伝子上流に *loxP*-STOP element-*loxP*(LSL) 配列を組み込んだアレルに置換したノックインマウスであり、Cre 組換え酵素を発現するアデノウィルスベクター (Ad-Cre) を鼻腔から経気道的に肺へ投与し、感染が成立した細胞において *loxP* 配列に挟まれた

STOP element が取り除かれ、変異 *Kras* が発現し、がん化を引き起こす [79]。

この研究では、*Cadm1* の欠損により発生する腫瘍の個数は変化しなかったものの、腫瘍の増大および組織学的異型度の増悪が認められたことから、*Cadm1* の欠損は肺腺癌の進展に寄与することが示唆された。本研究では、NNK 誘発肺腫瘍の主なドライバー変異が Ito らの実験と同じ *Kras* G12D 遺伝子変異であることから、*Cadm1* の欠損は腫瘍の増大や組織学的異型度の増悪など、肺腫瘍の進展に寄与することが予測されていた。しかしながら驚くべきことに、NNK によって誘発された肺腫瘍の発生数は *Cadm1* 欠損マウスのほうが野生型マウスより少ないという予想とは正反対の結果となった。組織学的異型度については野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスでは有意差がみられなかったが、今回、予定解剖を行った投与後 30 週という時間点では肺に発生した病変のほとんどが腺腫で腺癌はわずかであったことが影響している可能性がある。非小細胞肺癌の多段階発生において *CADM1* ががんの発生初期よりは後期の浸潤や転移に関わっていることを考慮すると、30 週よりも長期間経過して腺癌の数が増えてきた段階で解析を行えば組織学的異型度に何らかの違いがみられた可能性はある。また、本研究のモデルでは肺以外の臓器での腫瘍発生を認めなかったが、遠隔転移を来たしうるような疾患動物モデルを用いれば、転移の頻度に差がみられた可能性もある。今回発生した肺腫瘍の遺伝子解析では、野生型マウスにおいて

も *Cadm1* 欠損マウスにおいてもその約 80%に *Kras* G12D 遺伝子変異を認め
ており、腫瘍発生のドライバーは野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで差がない
と考えられた。Ito らの先行研究の結果、*Kras* G12D 遺伝子変異が生じて以降
は CADM1 はがん抑制的に働くことが示されていることから、NNK 誘発肺腫瘍
において *Cadm1* の欠損は肺の気道上皮細胞における *Kras* G12D 遺伝子変異の
発生頻度を低下させると考えられ、CADM1 に未知の働きがあることを示唆し
た。ただし、*Cadm1* 欠損マウスの系統が、Nagata らの実験では Sv/129 と
C57BL/6 のミックス系統を、Ito らの実験では C57BL/6 系統を使用しており、
本研究で用いた A/J 系統とは異なっているため、系統差が影響している可能性
は否定できない。厳密には、野生型および *Cadm1* 欠損 A/J マウスを 15 ヶ月齢
程度まで長期間飼育し、自然発生する肺腫瘍の数、大きさ、病理組織学的所見
を比較することが望ましい。

CADM1 の未知の働きとして考えられる可能性には、NNK の吸収や排泄、活
性化、DNA 付加体形成、DNA 付加体が形成された際の修復、遺伝子変異の起
こりやすさなどが挙げられる (図 27)。まず、NNK の吸収や排泄などの体内動
態を調べるため、NNK および NNAL の血中濃度を測定した。NNK および
NNAL は 3~4 時間でそのほとんどが代謝されることから [80]、100 mg/kg の
NNK を腹腔内投与後、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分、240 分における

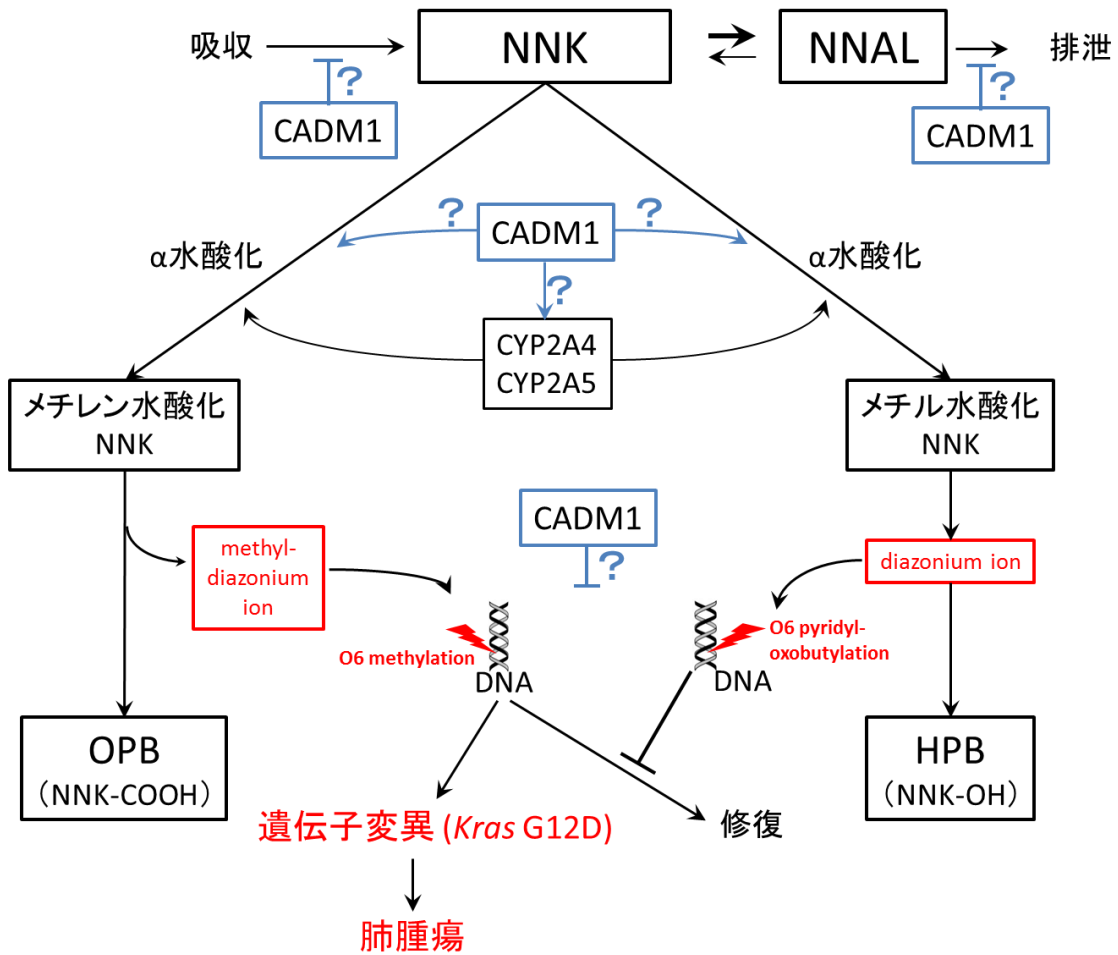


図 27. NNK 誘発肺腫瘍における CADM1 の役割の仮説

NNK により肺腫瘍が発生する機序と、可能性のある CADM1 の働きを模式的に示した。NNAL の α 水酸化も NNK と同様な経路を通じて腫瘍発生へ結びつくが、図中では省略した。CADM1 は、NNK の吸収、排泄、 α 水酸化、DNA 付加体の生成、DNA 付加体の修復、遺伝子変異の発生などに関与する可能性が考えられる。

血中濃度を測定した。野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスでは NNK の血中濃度には差がなく、NNAL は *Cadm1* 欠損マウスにおいて一部の時間点で低下していたものの軽度であったことから、CADM1 は NNK および NNAL の吸収、排泄にはほとんど影響を与えないと考えられた。

続いて、NNK および NNAL の代謝的活性化を比較した。NNK および NNAL は α 水酸化を受けて発がん性物質として働く活性中間体に変換されるが、活性中間体は不安定であり直接定量することが困難なことから、それらが分解されてできる代謝産物の量を定量した。*Cadm1* 欠損マウスにおいて NNK-OH と NNAL-OH の血中濃度は野生型マウスよりも有意に減少し、AUC はそれぞれ野生型マウスの 67%、75%と減少していた。NNK-COOH と NNAL-COOH の血中濃度は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで差がなかったことから、*Cadm1* の欠損により NNK および NNAL の α 水酸化のうちメチル水酸化だけが選択的に抑制された可能性が示唆された。ただし、今回、測定したのは NNK およびその代謝物の血中濃度であり、これらの量に主として影響を与えるのは肝である。NNK 誘発肺腫瘍モデルにおいて肺腫瘍発生に寄与するのは肺での NNK の代謝的活性化による DNA 付加体形成であることが報告されており [57]、これを評価するためには、肺における NNK とその代謝物の量を測定することや、肺または肝において臓器特異的に *Cadm1* を欠損させたマウスを使用して比較する必

要がある。

CYP2A4 と CYP2A5 はいずれも NNK の α 水酸化を媒介するが、メチル水酸化とメチレン水酸化のいずれが起りやすいかはそれぞれの酵素により異なっている。Felicia らは、細胞株に CYP2A4 または CYP2A5 を強制発現させ、その小胞体を抽出して NNK と反応させた後にその代謝物の量を測定したところ、CYP2A4 ではメチル水酸化よりもメチレン水酸化が多かったのに対し、CYP2A5 ではメチレン水酸化よりもメチル水酸化が多かったと報告している [81]。肺における発現量は CYP2A5 のほうがはるかに多いため、実際に NNK の α 水酸化に主として寄与しているのは CYP2A5 であるが、 α 水酸化がメチル側に起こるかメチレン側に起こるかはシトクロム P450 ごとの何らかの選択性があると考えられる。野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで *Cyp2a4* および *Cyp2a5* の mRNA の発現量には差を認めなかったが、マイクロアレイ解析では差があった 99 個の遺伝子のうちの 15 個をシトクロム P450 酵素群が占めており、CADM1 がシトクロム P450 酵素群の発現を変化させる可能性が示唆される。

今回用いた NNK 誘発肺腫瘍モデルの腫瘍発生のドライバーとなっている *Kras* G12D 遺伝子変異に直接的に結びつくと言われているのはメチル化 DNA (O6-methyl-deoxyguanine) によって引き起こされる GC \rightarrow AT の塩基置換であるといわれている [54,82]。メチル化 DNA は NNK のメチレン水酸化によって

発生する DNA 付加体であり、今回、*Cadm1* の欠損によって抑制されたメチル水酸化によって発生する DNA 付加体はピリジルオキシブチル化 DNA であり *Kras* G12D 遺伝子変異に直接結びつかないと考えられる。しかし、ピリジルオキシブチル化 DNA は *Mgmt* の働きを阻害することにより O⁶-methyl-deoxyguanine の修復を阻害することが報告されている [83]。従って *Cadm1* の欠損は、ピリジルオキシブチル化 DNA を減少させることで、間接的に O⁶-methyl-deoxyguanine を減少させて肺腫瘍数を減少させたと推察される。今回、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで *Mgmt* の mRNA の発現量には差がみられなかったが、タンパク質の発現レベルや機能レベルで差がある可能性が考えられる。

これまで示唆されたような CADM1 の働きを検証するには DNA 付加体の直接的な定量がより望ましいと考えられるが、今回用いた HPLC では定量することができない。そこで γ H2AX の発現を解析することで DNA 付加体の量を間接的に評価した。ヒストンは H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類のタンパクが 2 分子ずつ集まって 8 量体を構成しているが、H2A には H2A.1、H2A.2、H2AX、H2AZ の亜種があることが知られている [74]。H2AX は H2A よりも C 末端側が十数アミノ酸長く SQ モチーフと呼ばれる構造をもち、ヒストンの H2A の数%が H2AX に入れ替わっている。DNA の二重鎖切断が起こると損傷部位周辺の

H2AX の SQ モチーフ内のセリン基 (Ser139) がリン酸化され、修復関連タンパク質群を切断部位に誘導し、修復複合体を形成して損傷部位の修復を行うことが知られている [74]。この Ser139 がリン酸化された H2AX を γ H2AX と呼び、二重鎖切断のマーカーとして以前から用いられてきた。Ibuki らは細胞株に NNK を暴露した実験で、二重鎖切断が検出されないにも関わらず γ H2AX の発現上昇を認めたことから、DNA 付加体の修復が行われる時の DNA 鎖の一時的な切断の際にも H2AX がリン酸化されると考え、DNA 付加体のマーカーとしても使える可能性を示した [75]。Huanyu らは、マウスに NNK を腹腔内投与したところ、肺の免疫組織染色およびウェスタンブロット法において γ H2AX が検出されたと報告している [84]。本研究でも、免疫組織化学染色において、生理食塩水投与群では野生型マウス、*Cadm1* 欠損マウスともに γ H2AX の染色は全く認めなかったのに対し、NNK 投与群では気道上皮細胞の核への染色が確認された。 γ H2AX が染色される細胞の割合が、中枢側の気道ほど高く、末梢に進むにつれて低下し、終末細気管支や肺胞上皮ではほとんど認めなかった。この原因としては、気道上皮の部位により、核における元々の H2AX の量、修復反応の起こりやすさあるいは DNA 付加体の除去効率が異なることなどが考えられるが、文献的にも詳細な検討の報告はなく明らかではない。肺内起始部から 2 mm 以内の気道上皮における γ H2AX 陽性細胞の割合は、有意差は認めなかった

もののその頻度が *Cadm1* 欠損マウスの方が野生型よりも低い傾向を認めた。ウェスタンブロット法でも、生理食塩水投与群では野生型マウス、*Cadm1* 欠損マウスともに γ H2AX の発現はほとんどないのに対して、NNK 投与群では γ H2AX が誘導され、有意差は認めなかったものの *Cadm1* 欠損マウスのほうが野生型マウスよりも少ない傾向があった。これらの結果から、*Cadm1* 欠損マウスでは DNA 付加体の量が減少している可能性が示唆された。しかし、免疫組織化学染色においてもウェスタンブロット法においても個体間のばらつきが大きく有意な差ではなかったため、さらにサンプル数を増やしての検討が必要である。さらに γ H2AX は直接 DNA 付加体を定量しているわけではなく、DNA 付加体の修復に伴う反応を見ていると考えられることから、修復反応の起こりやすさの影響を受ける可能性がある点に注意が必要となる。今回の結果でも *Cadm1* 欠損マウスにおいて修復反応が起こりにくかった現象をみている可能性も考えられるが、*Cadm1* 欠損マウスにおいて NNK の α 水酸化が抑制されたことや最終的に肺腫瘍数が減少したことを総合的に考えると、DNA 付加体の量が減少していたと推測される。

以上の結果から、NNK 誘発肺腫瘍モデルにおいて、*Cadm1* の欠損は NNK および NNAL のメチル水酸化の抑制を通じて DNA 付加体の生成量を減少させ、肺腫瘍の発生を抑制すると考えられた。また、メチル水酸化など NNK の代謝に

影響を与える原因として、*CADM1* がシトクロム P450 酵素群の発現に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

頭頸部癌の動物モデルとしては、同所性あるいは異所性移植モデルが用いられることがほとんどで、発がんモデルには 4NQO や DMBA による化学発がんモデルおよびトランスジェニックモデルなどがあるが種類が限られている。本研究では、野生型および *Cadm1* 欠損 C57BL/6 マウスに 4NQO を経口投与し、口腔内や咽頭に異形成、上皮内癌、浸潤癌をはじめとして過角化や炎症性変化など様々な種類の病変の発生が確認された。病理組織学的所見はヒトの口腔咽頭病変と類似しており、頭頸部癌のモデルとして有用であることがあらためて確認された [64]。

4NQO の投与経路は、これまでの報告では、飲用水に混ぜて経口投与する方法と直接頬粘膜や舌に塗布する方法の 2 種類であったが、その投与量、投与期間または解剖時期については報告により様々であった [65]。本研究では、過去の研究にて比較的良好に用いられている 100 µg/ml の濃度となるよう飲用水中に混注し、8 週間または 16 週間投与した。8 週間投与群では、投与終了後 24 週間の時点で 8 匹中 1 匹に上皮内癌が生じた以外は異形成しか発生しておらず、解析や比較を行うには不十分であった。16 週間投与群では、投与開始後 24 週間の時点で *Cadm1* 欠損マウスが 4 匹中 2 匹死亡し、さらに他のマウスにおいても

著明な体重減少を認めたために予定を変更して早めに解剖を行うこととなった。結果的にこの時点で浸潤癌を発生していたマウスは1匹のみであったことから、体重減少の原因はがんに伴うものではなく、舌のびらんや炎症に伴う痛みや腫瘍性病変による物理的な閉塞によって摂食が制限されてしまったことが原因であったと考えられる。16週間投与群では、8週間投与群よりも多数の口腔咽頭病変を発生させることができたが、全8匹に生じた悪性病変は、上皮内癌が計3個、浸潤癌が1個のみであり解析を行うにはこれでもやはり不十分である。体重減少を考慮するとこれ以上経過観察期間を延ばすのは難しく、多くのマウスに浸潤癌を発生させて様々な解析を行うためには、4NQOの投与濃度、投与期間や経過観察期間についてさらなる条件検討が必要であると考えられる。

4NQOを8週間投与した野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの舌に発生した病変を比較すると、1匹あたりに生じた病変の数の平均は、野生型が1個、*Cadm1* 欠損マウスが1.75個であり、*Cadm1* 欠損マウスのほうがやや多い傾向にあった。しかしながら、生じた病変のほとんどは軽度異形成であり、その意義については判断が難しい。上皮内癌、舌以外の病変および3 mmを越える乳頭腫様病変が、それぞれ1個ずつではあるが野生型マウスのみで発生していた。4NQOを16週間投与した群では、*Cadm1* 欠損マウスが4匹中2匹死亡したため病変の発生数についての比較は難しいが、野生型マウスのみで浸潤癌(1個)、上皮

内癌 (3 個)、舌以外の病変 (7 個) および 3 mm を越える乳頭腫様病変 (5 個) が発生していた。

野生型マウスにおいてのみ上皮内癌および浸潤癌が発生していたことから、*Cadm1* 欠損マウスでは野生型マウスよりも腫瘍の組織学的悪性度が低下している可能性が示唆される。さらに、野生型マウスにおいてのみ舌以外の病変および 3mm を越える乳頭腫様病変が発生していたことから、*Cadm1* 欠損マウスでは野生型マウスよりも腫瘍の発生や増殖が抑制されている可能性も示唆される。その場合、CADM1 は頭頸部癌においてがん促進的に働くこととなり、NNK 誘発肺腫瘍モデルにおけるのと同様、がん抑制遺伝子としては説明のできない別の機能を有するということになる。非常に興味深い結果であるが、マウスの数や発生腫瘍数が限られていることから十分な解析を行うことができず、多くのマウスに浸潤癌を発生させうる条件設定を行なった上での検討が期待される。

本研究および先行研究において考えられる CADM1 の役割について表 11 にまとめた。マウスの系統の違いはあるものの、コンベンショナルノックアウトマウスや、*Kras* 変異をノックインした遺伝子改変モデルでは *Cadm1* はがん抑制遺伝子として機能していたのに対し、今回用いた化学発癌の 2 つのモデルではがん促進的に機能する可能性が示唆された。特に NNK 誘発肺腫瘍モデルでは、*Kras* G12D 遺伝子変異が主なドライバーであることから、Ito らの実験と同様

表 11. 先行研究および本研究のまとめ

	マウス 系統	臓器	モデル	modifi- cation	<i>Cadm1</i> 欠損の 表現型	CADM1 の 機能
Nagata	mixed	肺	—	—	自然発癌 腫瘍サイズ↑ 腫瘍悪性度↑	がん抑制
Ito	C57 BL/6	肺	遺伝子 改変	変異 <i>Kras</i> ノックイン	腫瘍サイズ↑ 腫瘍悪性度↑	がん抑制
Akashi	A/J	肺	化学 発癌	NNK	腫瘍数↓ 腫瘍悪性度→	がん促進？ 化学物質の 代謝を修飾？
Akashi	C57 BL/6	口腔 咽頭	化学 発癌	4NQO	腫瘍悪性度↓ 腫瘍サイズ↓	がん促進？

の結果が得られることが予想されていた。このような結果をもたらした原因の1つとして、化学発がんモデルと遺伝子改変モデルでは遺伝子変化のパターンが異なることが考えられる。Westcott らは、メチルニトロソウレアによる化学発がんモデルで *Kras* G12D 遺伝子変異をドライバーとするマウスモデルと、*Kras* G12D 変異を肺胞上皮細胞にコンディショナルに発現させた遺伝子改変モデルに発生した肺腫瘍について次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子解析を行ない、化学発がんモデルでは *Kras* 以外の遺伝子にも体細胞変異が多く認められたのに対し、遺伝子改変モデルでは体細胞変異はほとんど認めなかった一方で、染色体異数体や遺伝子コピー数変化を多く認めたと報告している [85]。

NNK 誘発肺腫瘍のドライバーも、Ito らの遺伝子改変モデルのドライバーも *Kras* G12D 変異であり、Westcott らと似たような遺伝子変化の違いがあった可能性が考えられる。また、その他の原因として、化学発癌モデルでは、がんの発生母地となる細胞における遺伝子異常だけでなく、化学物質の体内動態や代謝など様々な要素が関わることも考えられる。ヒトの発がんにおいても遺伝子異常以外の様々な要素が関わることから、疾患動物モデルを用いる際には、どの部分がヒトの疾患と一致していて、どの部分が異なっているのかを、十分に念頭に置くことが重要であることが再認識された。

CADM1 は、細胞接着分子であると同時にがん抑制遺伝子であり、さらに本

研究ではシトクロム P450 酵素群の発現を介して薬物代謝に関与する可能性も示唆された。*Cadm1* の遺伝子多型やプロモーター領域のメチル化の程度などにより、喫煙による肺癌発生のリスク、薬剤感受性などを層別化することができれば、がんの予防や治療を行っていく上で大きなメリットとなる。また、シトクロム P450 酵素群は、抗がん剤を含む多くの薬物代謝に関わるが、様々な遺伝子多型による遺伝子発現の個体差が知られており、薬剤感受性や副作用の有無に大きな影響を与えることから、特定の薬剤に関しては、特定の遺伝子多型の有無を検査した上で、投与方法や投与量を調整することが義務付けられている薬剤も出ている。今回の *CADM1* の研究で示唆されたように、もし、個別の P450 酵素の発現のみならず、複数の P450 酵素の発現を修飾する分子の存在が明らかになれば、発がん物質の代謝や、薬剤感受性、副作用を予測する上で、新しい知見となるものと考えられる。細胞膜タンパク質である *CADM1* が、シトクロム P450 酵素の発現などを修飾する具体的な分子機構については、現時点では不明であるが、さらなる研究により *CADM1* の機能が明らかにされることが期待される。

謝辞

本研究をまとめるにあたり御指導御鞭撻を賜りました指導教官である東京大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学講座の山唄達也 教授に深謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたり研究の基礎から丁寧に御指導頂きました東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上善則 教授に深謝申し上げます。本研究のNNKの代謝物の濃度測定をはじめ本研究の遂行にご協力いただきました昭和大学腫瘍分子生物学研究所の藤田健一 博士、大場基 博士、マウスのMRIの撮影に関してご指導いただきました東京大学医科学研究所附属病院放射線科の桐生茂 准教授に感謝申し上げます。マウス肺腫瘍、口腔咽頭病変の病理診断に関してご指導いただきました種井善一 博士、本研究の遂行にお力添えいただきました伊東剛 博士、市原博美 氏に感謝申し上げます。

そして、日々の研究生活において様々な面で御指導御協力頂いた東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科の皆様、東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の皆様にご感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, and Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **136**:E359-E386, 2015.
- [2] 国立がん研究センターがん情報サービス『がん登録・統計』.
- [3] Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, and Harris CC. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 2004.
- [4] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, and Garg K. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proceedings of the American Thoracic Society* **8**:381-385, 2011.
- [5] Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma—clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev* **29**:15-21, 2010.

- [6] Riely GJ, Marks J, and Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society* **6**:201-205, 2009.
- [7] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, and Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* **64**:8919-8923, 2004.
- [8] Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Science* **99**:2349-2355, 2008.
- [9] Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, and Morgan MB. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**:1069-1075, 2008.
- [10] Toyooka S, Mitsudomi T, Soh J, Aokage K, Yamane M, Oto T, Kiura K, and Miyoshi S. Molecular oncology of lung cancer. *General thoracic and cardiovascular surgery* **59**:527-537, 2011.
- [11] Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, and Fukayama M. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: An immunohistochemical analysis. *Cancer science* **98**:1006-1013, 2007.

[12]Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, and Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* **6**:4055-4063, 2000.

[13]Tanaka R, Wang D, Morishita Y, Inadome Y, Minami Y, Iijima T, Fukai S, Goya T, and Noguchi M. Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* **103**:608-615, 2005.

[14]Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, and Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **86**:695-699, 1994.

[15]Murakami Y. Functional cloning of a tumor suppressor gene, TSLC1, in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **21**:6936-6948, 2002.

[16]Yatabe Y, Borczuk AC, and Powell CA. Do all lung adenocarcinomas follow a stepwise progression? *Lung Cancer* **74**:7-11, 2011.

[17]Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, and Kitamura T. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* **27**:427-430, 2001.

[18]Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, and Murakami Y. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **277**:31014-31019, 2002.

[19]Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, and Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* **62**:5129-5133, 2002.

[20]Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, and Imamura M. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **63**:6320-6326, 2003.

[21]Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, and Ghosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene* **23**:5632-5642, 2004.

[22]Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, and Murakami Y. Tumor suppressor in lung cancer (TSLC)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. *J Biol Chem* **280**:42164-42171, 2005.

[23]Kawano S, Ikeda W, Kishimoto M, Ogita H, and Takai Y. Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Necl-2. *J Biol Chem* **284**:23793-23805, 2009.

[24]Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, and Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* **26**:3610-3624, 2006.

[25]Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Kawai T, Ito T, Tsuboi Y, Ito A, Yoshida M, and Murakami Y. Spontaneous development of lung adenocarcinoma in the CADM1 gene-deficient mice. *Cancer Res* **70**:4992-4992, 2010.

[26]Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, Tsubota N, Okita Y, and Kitamura Y. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Laboratory investigation* **83**:1175-1183, 2003.

[27]Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, and Okita Y. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* **98**:1002-1007, 2003.

[28]Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, and Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **106**:1751-1758, 2006.

[29]OECD Health Statics 2015.

[30]IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **83**:1-1438, 2004.

[31]Wakai K, Inoue M, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Nagata C, Tsugane S, and Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan. Tobacco smoking and lung cancer risk: an evalua-

tion based on a systematic review of epidemiological evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol* **36**:309-324, 2006.

[32]Hecht SS. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act. *Nicotine Tob Res* **14**:18-28, 2012.

[33]Murphy SE, von Weymarn LB, Schutten MM, Kassie F, and Modiano JF. Chronic nicotine consumption does not influence 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**:1752-1760, 2011.

[34]Jalas JR, Hecht SS, and Murphy SE. Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chem Res Toxicol* **18**:95-110, 2005.

[35]Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, and Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA repair* **3**:1389-1407, 2004.

- [36]Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature reviews.Cancer* **3**:733-44, 2003.
- [37]Tretyakova N, Matter B, Jones R, and Shallop A. Formation of benzo [a] pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within K-ras and p53 gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach. *Biochemistry (N Y)* **41**:9535-9544, 2002.
- [38]Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, Sayyah J, and Dennis PA. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* **26**:1182-1195, 2005.
- [39]Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, and Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK β -and JNK1-dependent inflammation. *Cancer cell* **17**:89-97, 2010.
- [40]Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International journal of cancer.Journal international du cancer* **131**:2724-32, 2012.
- [41]Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, Kawata S, Kimura W, Nishizuka S, and Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1

gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jap J Cancer Res* **93**:857-860, 2002.

[42]Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhata M, Nobukuni T, Maruyama T, Isogai K, Sekiya T, and Shuin T. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jap J Cancer Res* **93**:605-609, 2002.

[43]Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, and Snijders PJ. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **96**:294-305, 2004.

[44]Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer science* **96**:543-552, 2005.

[45]Kikuchi S, Iwai M, Sakurai - Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Maruyama T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, and Sato Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer science* **103**:1051-1057, 2012.

[46]Hui AB, Lo K, Kwong J, Lam EC, Chan SY, Chow LS, Chan AS, Teo PM, and Huang DP. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* **38**:170-178, 2003.

[47]Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, Guan XY, Sham JS, Chua D, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, and Lung ML. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **66**:9385-9392, 2006.

[48]Chen KM, Stephen JK, Havard S, Mahan M, Divine G, and Worsham MJ. IGSF4 methylation as an independent marker of human papilloma-virus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* **141**:257-263, 2015.

[49]Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, and EURO CARE Working Group. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer* **51**:2130-2143, 2015.

[50]Katanoda K, Hori M, Matsuda T, Shibata A, Nishino Y, Hattori M, Soda M, Ioka A, Sobue T, and Nishimoto H. An updated report on the trends in

cancer incidence and mortality in Japan, 1958-2013. *Jpn J Clin Oncol* **45**:390-401, 2015.

[51]Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, and Jassem J. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354**:567-578, 2006.

[52]Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotny D, Kienzer H, and Cupissol D. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* **359**:1116-1127, 2008.

[53]Padma PR, Lalitha VS, Amonkar AJ, and Bhide SV. Carcinogenicity studies on the two tobacco-specific N-nitrosamines, N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* **10**:1997-2002, 1989.

[54]Belinsky SA, Devereux TR, Foley JF, Maronpot RR, and Anderson MW. Role of the Alveor Type II Cell in the Development and Progression of Pulmonary Tumors Induced bt 4- (Methylnitrosamino) - (3-pyridyl)

-1-butanone in the A / J Mouse Role of the Alveolar Type II Cell in the Development and Progression of 1-butanone in. 3164-3173, 1992.

[55]Chiang H, Wang C, Lee H, and Tsou T. Metabolic effects of CYP2A6 and CYP2A13 on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced gene mutation--a mammalian cell-based mutagenesis approach. *Toxicol Appl Pharmacol* **253**:145-52, 2011.

[56]Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Miyazaki M, Fujieda M, Kamataki T, and Imaida K. Dose dependent inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Lett* **234**:232-8, 2006.

[57]Weng Y, Fang C, Turesky RJ, Behr M, Kaminsky LS, and Ding X. Determination of the role of target tissue metabolism in lung carcinogenesis using conditional cytochrome P450 reductase-null mice. *Cancer Res* **67**:7825-7832, 2007.

[58]Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clinical and experimental otorhinolaryngology* **2**:55-60, 2009.

[59]Lin L, Chen Y, Lai D, and Huang Y. Minimal arecaidine concentrations showing a promotion effect during DMBA - induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Journal of oral pathology & medicine* **25**:65-68, 1996.

[60]Panigrahi GandWalker IG. The N2-guanine adduct but not the C8-guanine of N6-adenine adducts formed by 4-nitroquinoline 1-oxide blocks the 3'-5'exonuclease action of T4 DNA polymerase. *Biochemistry (N Y)* **29**:2122-2126, 1990.

[61]Ramotar D, Belanger E, Brodeur I, Masson J, and Drobetsky EA. A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* **273**:21489-21496, 1998.

[62]Wallenius KandLekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy* **24**:39-48, 1973.

[63]Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez Sa, and Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* **16**:424-432, 1994.

[64]Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, and Gudas LJ. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clinical Cancer Research* **10**:301-313, 2004.

[65]Kanojia D and Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* **42**:655-667, 2006.

[66]Kiryu S, Inoue Y, Yoshikawa K, Shimada M, Watanabe M, and Ohtomo K. Diet and gastrointestinal signal on T1-weighted magnetic resonance imaging of mice. *Magn Reson Imaging* **28**:273-280, 2010.

[67]Schneider CA, Rasband WS, and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**:671-675, 2012.

[68]Upadhyaya P, Kenney PM, Hochalter JB, Wang M, and Hecht SS. Tumorigenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol enantiomers and metabolites in the A/J mouse. *Carcinogenesis* **20**:1577-1582, 1999.

[69]Staretz ME, Murphy SE, Patten CJ, Nunes MG, Koehl W, Amin S, Koenig LA, Guengerich FP, and Hecht SS. Comparative metabolism of the tobacco-related carcinogens benzo[a]pyrene,

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone,
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, and N'- nitrosonornicotine in
human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* **25**:154-162, 1997.

[70]Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T,
Kuno T, and Imaida K. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung
carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in
female and male A/J mice. *Oncol Rep* **30**:2632-8, 2013.

[71]Cao B, Zhang Q, Ji H, Liu J, Lang H, Feng M, and Zhang J. Simultane-
ous determination of NNK and its metabolites in mouse tissue for evaluating
the effects of chronic alcohol consumption on the metabolism of NNK in
mouse liver and lung. *Analytical and bioanalytical chemistry* **406**:4465-71,
2014.

[72]Burkhart BA, Harada N, and Negishi M. Sexual dimorphism of testos-
terone 15 alpha-hydroxylase mRNA levels in mouse liver. cDNA cloning and
regulation. *J Biol Chem* **260**:15357-15361, 1985.

[73]Miyazaki M, Yamazaki H, Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, Masumura
K, Nohmi T, Funae Y, Imaida K, and Kamataki T. Mechanisms of chemo-

preventive effects of 8-methoxypsoralen against

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas. *Carcinogenesis* **26**:1947-55, 2005.

[74]Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova Oa, Solier S, and Pommier Y. γ -H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer* **8**:957-967, 2008.

[75]Ibuki Y, Shikata M, and Toyooka T. γ -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicology in Vitro* **29**:1831-1838, 2015.

[76]IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **92**:1-853, 2010.

[77]Hecht SS. Carcinogenicity studies of inhaled cigarette smoke in laboratory animals: old and new. *Carcinogenesis* **26**:1488-1492, 2005.

[78]Wang F, Akashi K, Murakami Y, Inoue Y, Furuta T, Yamada H, Ohtomo K, and Kiryu S. Detection of lung tumors in mice using a 1-tesla compact magnetic resonance imaging system. *PloS one* **9**:e94945-e94945, 2014.

[79]Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, and Tuveson DA. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* **15**:3243-3248, 2001.

[80]Wu Z, Upadhyaya P, Carmella SG, Hecht SS, and Zimmerman CL. Disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in bile duct-cannulated rats: Stereoselective metabolism and tissue distribution. *Carcinogenesis* **23**:171-179, 2002.

[81]Felicia ND, Rekha GK, and Murphy SE. Characterization of cytochrome P450 2A4 and 2A5-catalyzed 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism. *Arch Biochem Biophys* **384**:418-424, 2000.

[82]Peterson LAandHecht SS. O6-methylguanine is a critical determinant of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone tumorigenesis in A/J mouse lung. *Cancer Res* **51**:5557-5564, 1991.

[83]Peterson LA, Liu XK, and Hecht SS. Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O6-methylguanine. *Cancer Res* **53**:2780-2785, 1993.

[84]Jin H, Chen JX, Wang H, Lu G, Liu A, Li G, Tu S, Lin Y, and Yang CS. NNK-Induced DNA Methyltransferase 1 in Lung Tumorigenesis in A:J Mice and Inhibitory effects of EGCG.pdf. *Nutr Cancer* **67**:167-176, 2015.

[85]Westcott PM, Halliwill KD, To MD, Rashid M, Rust AG, Keane TM, Delrosario R, Jen K, Gurley KE, and Kemp CJ. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer. *Nature* **517**:489-492, 2015.