



ヒトプロト型c-Ha-ras  
遺伝子導入トランスジェニックマウス (rasH2 マウス)  
における子宮発癌に対する感受性および  
ethinylestradiol  
による子宮発癌抑制機序に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 隆夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2052">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2052</a>

氏名（本籍）	渡 邊 隆 夫 (千葉県)		
学位の種類	博士 (獣医)		
学位記番号	獣医博乙第68号		
学位授与年月日	平成17年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	ヒトプロト型 <i>c-Ha-ras</i> 遺伝子導入トランスジェニックマウス (rasH2 マウス) における子宮発癌に対する感受性および ethinylestradiol による子宮発癌抑制機序に関する研究		
審査委員	主査	東京農工大学	教授 三 森 国 敏
	副査	帯広畜産大学	教授 松 井 高 峯
	副査	岩手大学	教授 岡 田 幸 助
	副査	東京農工大学	教授 田 谷 一 善
	副査	岐阜大学	教授 柵 木 利 昭

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

新たな子宮発癌モデルの開発を目的として、*rasH2* マウスに *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 及び ethinylestradiol (EE) を投与し、子宮発癌感受性及びその発現機序に関する研究を行った。その結果、本モデルでは ENU 投与により子宮上皮系腫瘍が高率に誘発されたが、EE 投与によりその発癌が完全に抑制されるという結果が得られたため、その発現機序について解明するための検討を行った。

*rasH2* マウスとその野生型同腹子に対し、ENU を 120 mg/kg bw 単回腹腔内投与し、22 週間飼育した結果、子宮内膜腺癌や異型過形成などの子宮上皮系増殖性病変が高率に誘発された。以上のことから、*rasH2* マウスは子宮発癌に非常に感受性が高く、ENU で誘発した子宮上皮系腫瘍の有益なモデルであることが示唆された。

次に、エストロゲンによる子宮腫瘍プロモーション作用を検討するため、ENU を 120 mg/kg bw 単回腹腔内投与した *rasH2* マウス及び ENU 50 mg/kg bw を経膈的に単回子宮腔内投与した ICR マウスに、2.5 ppm の EE を 24 週間混餌投与した。ICR マウスでは、子宮内膜腺癌は ENU+EE 群で 37.5% 誘発され、さらに異型過形成も有意に増加した。一方、*rasH2* マウスでは、ENU 単独群において子宮腺癌 (55.6%)、異型過形成 (33.3%) が誘発されたが、ENU+EE 群ではこれらの病変は全く誘発されなかった。ENU+EE 投与 ICR マウスにおける estrogen receptor (ER)  $\alpha$  の発現は、EE 投与により発情期の子宮腺上皮における発現が増強した。また、同群における子宮増殖性病変の PCNA 陽性率は、ENU 単独群に比し、有意に増加した。一方、*rasH2* マウスの子宮内膜・腺上皮における ER  $\alpha$  の発現は、ENU 単独群と ENU+EE 群間で差がみられなかったことから、*rasH2* マウスでは子宮増殖性病変発現の抑制に ER が関与していないことが推察された。

その子宮増殖性病変発現抑制機序を解明するため、ENU でイニシエート後、2.5 ppm の EE を 6 週間混餌投与させた rash2 マウスの子宮の遺伝子発現パターンを High density gene chip array を用いて検索した。陽性対照として ENU でイニシエート後、同様に 2.5 ppm の EE を 6 週間混餌投与させた ICR マウス群を設定し、子宮の遺伝子発現パターンを両系統間で比較した。ENU+EE 投与 rash2 マウスでは、エストロゲン変換酵素関連遺伝子である hydroxysteroid 17- $\beta$  dehydrogenase II (17 $\beta$ -HSDII) の発現が増強し、ER $\alpha$ 、CDK4、ubiquitin、PCNA、EGF 受容体や IGF の発現は低下した。一方、ENU+EE 投与 ICR マウスでは、17 $\beta$ -HSDII の発現は減少し、ER $\alpha$ 、CDK4、Cyclin E、ubiquitin、PCNA、EGF 受容体や IGF1 の発現が増強した。以上より、ENU+EE を投与した rash2 マウスで認められた子宮発癌の抑制には、これらの遺伝子が強く関与し、キー遺伝子となっている可能性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、rash2 マウスに *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 及び ethinylestradiol (EE) を投与し、子宮発癌感受性及びその発現機序に関する研究を実施したところ、ENU 単独投与により子宮上皮系腫瘍が高率に誘発されたが、ENU+EE 投与によりその発癌が完全に抑制されたため、その発現機序解明実験を行い、その機序を明確にした内容である。

第 1 章では、rash2 マウスとその野生型同腹子に ENU を単回腹腔内投与し、22 週間飼育した結果、子宮内膜腺癌や異型過形成などの子宮上皮系増殖性病変が高率に誘発され、本マウスが子宮上皮系腫瘍の有益なモデルであることを示した。

第 2 章では、エストロゲンによる子宮発癌プロモーション作用を検討するため、ENU を単回腹腔内投与した rash2 マウス及び ENU を経膈的に単回子宮腔内投与した ICR マウスに、2.5 ppm の EE を 24 週間混餌投与した。ICR マウスでは、子宮内膜腺癌は ENU+EE 群で 37.5% 誘発され、さらに異型過形成も有意に増加した。一方、rash2 マウスでは、ENU 単独群において子宮腺癌と異型過形成が誘発されたが、ENU+EE 群ではこれらの病変は全く誘発されなかった。ENU+EE 投与 ICR マウスにおける estrogen 受容体 (ER)  $\alpha$  の発現は、EE 投与により発情期の子宮腺上皮における発現が増強した。また、同群における子宮増殖性病変の PCNA 陽性率は、ENU 単独群に比し、有意に増加した。一方、rash2 マウスの子宮内膜・腺上皮における ER $\alpha$  の発現は、ENU 単独群と ENU+EE 群間で差がみられなかったことから、rash2 マウスでは子宮増殖性病変発現の抑制に ER は関与していないことを明らかにした。

第 3 章では、その子宮増殖性病変発現抑制機序を解明するため、ENU でイニシエーション処置後、2.5 ppm の EE を 6 週間混餌投与させた rash2 マウスの子宮の遺伝子発現パターンを High density gene chip array を用いて解析した。陽性対照として、ENU を投与後、同量の EE を 6 週間混餌投与させた ICR マウス群を設定し、子宮の遺伝子発現パターンを両系統間で比較した。ENU+EE 投与 rash2 マウスでは、エストロゲン変換酵素関連遺伝子である hydroxysteroid 17- $\beta$  dehydrogenase II (17 $\beta$ -HSDII) の発現が増強し、ER $\alpha$ 、CDK4、ubiquitin、PCNA、EGF 受容体や IGF の発現は低下した。一方、ENU+EE 投与 ICR マウスでは、17 $\beta$ -HSDII の発現は減少し、ER $\alpha$ 、CDK4、Cyclin E、ubiquitin、PCNA、EGF 受容体や IGF1 の発現が増強した。

以上の実験結果から、ENU+EE 投与 rash2 マウスで認められた子宮発癌の抑制にはこれらの遺伝子が強く関与し、このような遺伝子発現の違いにより rash2 マウスでは EE 投与により子宮発癌が抑制されている可能性が推察された。本研究は、発癌物質に高い感受性を示すとされている rash2 マウスにおいても例外があることを物語るものであり、今後、遺伝子改変マウスについて更なる研究が望まれる引き金となる重要な研究であると認識された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea  
著 者 名 : Watanabe, T., Kashida, Y., Yasuhara, K., Koujitani, T., Hirose, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Cancer Letters  
巻・号・頁・発行年 : 188(1-2):39-46, 2002
- 2) 題 目 : Inhibition by ethinylestradiol of N-ethyl-N-nitrosourea-initiated uterine carcinogenesis in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice)  
著 者 名 : Watanabe, T., Kashida, Y., Ueda, M., Onodera, H., Takizawa, T., Hirose, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 31(5):496-505, 2003
- 3) 題 目 : Analysis of gene expression profile on uterine tumorigenesis initiated with N-ethyl-N-nitrosourea and inhibited by ethinylestradiol in rasH2 mice  
著 者 名 : Watanabe, T., Sumida, K., Muto, T., Kashida, Y., Watanabe, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 17(3):155-164, 2004

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Streptozotocin 誘発糖尿病ラットの胃粘膜に関する形態学的研究  
著 者 名 : 渡邊隆夫, 浅沼章宗, 田中雅弘, 秋葉知英, 古賀照二  
学術雑誌名 : Experimental Animals  
巻・号・頁・発行年 : 43(5):693-696, 1995
- 2) 題 目 : Six-month repeated oral toxicity study of NK-104 in rats  
著 者 名 : Akiba, T., Shibuta, T., Amano, Y., Asanuma, A., Okubo, M., Nishigaki, K., Moriwaki, T., Yamada, H., Okamura, N., Watanabe, T., Koga, T., Tanaka, M. and Takimoto, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 23(suppl.V):713-720, 1998
- 3) 題 目 : Estrogen receptor mRNA in uteri of normal estrous cycling and ovariectomized rats by in situ hybridization  
著 者 名 : Katsuda, SI., Yoshida, M., Watanabe, T., Kuroda, H., Ando-Lu, J., Takahashi, M., Hayashi, H. and Maekawa, A.  
学術雑誌名 : Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine  
巻・号・頁・発行年 : 221(3):207-214, 1999
- 4) 題 目 : Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 12) Effects of cyclophosphamide on spermatogenesis  
著 者 名 : Watanabe, T., Yamaguchi, N., Akiba, T., Tanaka, M. and Takimoto, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 25(spec):129-137, 2000

- 5) 題 目: Dose- and treatment duration-related effects of *p-tert*-octylphenol on female rats  
著 者 名: Katsuda, S., Yoshida, M., Isagawa, S., Asagawa, Y., Kuroda, H., Watanabe, T., Ando, J., Takahashi, M. and Maekawa, A.  
学術雑誌名: Reproductive Toxicology  
卷・号・頁・発行年: 14(2):119-126, 2000
- 6) 題 目: Possible mechanisms underlying mammary carcinogenesis in female Wistar rats by nitrofurazone  
著 者 名: Takahashi, M., Iizuka, S., Watanabe, T., Yoshida, M., Ando, J., Wakabayashi, K. and Maekawa, A.  
学術雑誌名: Cancer Letters  
卷・号・頁・発行年: 156(2):177-184, 2000
- 7) 題 目: Spontaneous tumors in the uterus, testis and other organs of F1 hybrids between Donryu and F344 rats  
著 者 名: Watanabe, T., Ando-Lu, J., Imai, S., Takano, S., Takahashi, M. and Maekawa, A.  
学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年: 14(2):99-104, 2001
- 8) 題 目: Modifying effects of genistein, 4-nonylphenol and methoxychlor on N-ethyl-N-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in rasH2 transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene  
著 者 名: Watanabe, T., Ueda, M., Yasuhara, K., Onodera, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年: 15(3):145-151, 2002
- 9) 題 目: Tumor promoting effect of phenolphthalein on development of lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene  
著 者 名: Imaoka, M., Kashida, Y., Watanabe, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年: 64(6):489-493, 2002
- 10) 題 目: Susceptibility of liver proliferative lesions in heterozygous *p53* deficient CBA mice to various carcinogens  
著 者 名: Uehara, T., Kashida, Y., Watanabe, T., Yasuhara, K., Onodera, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年: 64(7):551-556, 2002
- 11) 題 目: Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice  
著 者 名: Kashida, Y., Sasaki, Y.F., Ohsawa, K., Yokohama, N., Takahashi, A., Watanabe, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名: Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年: 69(2):317-321, 2002

- 1 2) 題 目: Lack of modifying effect of glycerol in pulmonary carcinogenesis in *rasH2* mice induced by urethane or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)
- 著 者 名: Itoh, J., Kashida, Y., Watanabe, T., Yasuhara, K., Takizawa, T., Ueda, M., Yoshimura, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology
- 卷・号・頁・発行年: 15(4):215-220, 2002
- 1 3) 題 目: Promotion, but not progression, effects of tamoxifen on uterine carcinogenesis in mice initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine
- 著 者 名: Takahashi, M., Shimomoto, T., Miyajima, K., Iizuka, S., Watanabe, T., Yoshida, M., Kurokawa, Y. and Maekawa, A.
- 学術雑誌名: Carcinogenesis
- 卷・号・頁・発行年: 23(9):1549-1555, 2002
- 1 4) 題 目: Promoting effects of ethinylestradiol but not atrazine on *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in ICR mice
- 著 者 名: Watanabe, T., Kashida, Y., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology
- 卷・号・頁・発行年: 16(3):139-145, 2003
- 1 5) 題 目: Lack of modifying effects of 2,6-dimethylaniline on lung carcinogenesis in transgenic mice carrying human prototype *c-Ha-ras* gene initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
- 著 者 名: Takahashi, A., Kashida, Y., Watanabe, T., Yasuhara, K., Takizawa, T., Hirose, M., Yoshimura, H. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology
- 卷・号・頁・発行年: 16(1):25-31, 2003
- 1 6) 題 目: Modifying effects of 2,6-dimethylaniline on nasal carcinogenesis in *rasH2* mice initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
- 著 者 名: Minemura, Y., Kashida, Y., Watanabe, T., Yasuhara, K., Takizawa, T., Hirose, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology
- 卷・号・頁・発行年: 161(1): 41-47, 2003
- 1 7) 題 目: Lack of susceptibility of heterozygous *p53*-knockout CBA and CIEA mice to phenolphthalein in a 6-month carcinogenicity study
- 著 者 名: Okamura, M., Kashida, Y., Watanabe, T., Yasuhara, K., Onodera, H., Hirose, M., Usui, T., Tamaoki, N. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名: Toxicology
- 卷・号・頁・発行年: 185(1-2):17-22, 2003

- 18) 題 目 : Time course of expression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced CYP1A1 and CYP1B1 mRNA and protein in rat liver  
著 者 名 : Muto, T., Watanabe, T., Moto, M., Okamura, M., Kashida, Y., Kanai, Y., Mitsumori, K. and Endou, H.  
学術雜誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 16(4):287-290, 2003
- 19) 題 目 : Thirteen-week repeated dose toxicity study of wormwood (*Artemisia absinthium*) extract in rats  
著 者 名 : Muto, T., Watanabe, T., Okamura, M., Moto, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.  
学術雜誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 28(5)471-478, 2003
- 20) 題 目 : Thirteen-week repeated dose toxicity of rice bran glycosphingolipid in Wistar Hannover (GALAS) rats  
著 者 名 : Moto, M., Okamura, M., Watanabe, T., Kashida, Y. and Mitsumori, K.  
学術雜誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 29(1):73-80, 2004
- 21) 題 目 : Possible mechanisms underlying the testicular toxicity of oxfendazole in rats  
著 者 名 : Okamura, M., Watanabe, T., Kashida, Y., Machida, N. and Mitsumori, K.  
学術雜誌名 : Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 32(1):1-8, 2004