

氏名（本籍）	森 郁 生（愛媛県）
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博乙第46号
学位授与年月日	平成13年9月21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 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおける肺腫瘍発生に関する分子病理学的研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 柵 木 利 昭 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 三 森 国 敏 副査 岐阜大学 教授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究では、*ras* 遺伝子の変異と肺腫瘍発生の関連を調べるために、ヒトのプロト型 c-Ha-*ras* 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) 動物 (rasH2 マウス) における自然発生肺増殖性病変/腫瘍、さらに同マウスにおける既知の発癌物質であるウレタン投与により誘発させた肺増殖性病変/腫瘍について、病理組織学および分子生物学的検討を行った。

第1章では、rasH2 マウスの肺における自然発生肺増殖性病変および腫瘍の特徴を明らかにするために病理組織学的および分子生物学的に調べた。雌雄各 122 匹の rasH2 マウスを2年間無処置で飼育したところ、10 例に肺の増殖性病変/腫瘍が認められた。その内訳は、細気管支-肺胞上皮過形成 (3 例)、細気管支-肺胞腺腫 (2 例) および細気管支-肺胞腺癌 (5 例) であった。遺伝子解析では、ヒト c-Ha-*ras* 導入遺伝子の変異が、細気管支-肺胞上皮過形成の2例、細気管支-肺胞腺腫の1例および細気管支-肺胞腺癌の5例に認められた。一方、マウス内在性 c-Ha-*ras* および c-Ki-*ras* 遺伝子には、いずれの病変にも変異は認められなかった。したがって、rasH2 マウスの自然発生肺増殖性病変/腫瘍の発生および進展には、導入遺伝子の変異が関与していることが示唆された。

第2章では、化学物質に誘発された肺増殖性病変および腫瘍における遺伝子変異の関与

について検討した。1 群雌雄 3 匹以上の rasH2 マウスあるいは非遺伝子導入 (non-Tg) マウスに 1000 mg/kg のウレタンを単回あるいは 3 回 (2 日間隔) 腹腔内投与したところ、ウレタン投与群で肺の増殖性病変/腫瘍が早期に誘発され、かつ rasH2 マウスは non-Tg マウスに比べより高い発生頻度を示した。rasH2 マウスの 3 回投与群では、腺癌の発生数が増加した。分子生物学的には、ヒト c-Ha-ras 導入遺伝子の変異が、rasH2 マウスの単回投与群で雄の 58.3%、雌の 62.5%にみられたが、3 回投与群では雄の 26.3%、雌の 33.3%にのみ認められた。また、マウス内在性 c-Ki-ras 遺伝子の変異では、rasH2 マウスの単回投与群では、雌雄ともみられなかったが、3 回投与群では雄の 10.5%、雌の 28.6%に認められた。したがって、3 回投与群は、単回投与群に比べ誘発肺増殖性病変と腫瘍数が高い値を示したが、導入遺伝子の変異頻度は低い値を示し、さらにマウス内在性の c-Ki-ras 遺伝子の変異も低率ながら認められた。以上のことから、rasH2 マウスにおける肺発癌過程には、*ras* 以外の遺伝子が関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、rasH2 マウスのウレタン誘発肺増殖性病変/腫瘍の発生に関与するとされている細胞周期に関連した Cyclin D1 および PCNA ならびに癌抑制遺伝子産物である P53 の発現を免疫組織化学的に検討した。Cyclin D1 陽性率は、rasH2 マウスの 3 回投与群の細気管支-肺胞上皮過形成で単回投与群のそれに比べ高値を示し、細気管支-肺胞腺腫/腺癌における陽性率と同様に高値を示した。一方、rasH2 マウスの単回投与群および non-Tg 群では、細気管支-肺胞上皮過形成に比べ細気管支-肺胞腺腫/腺癌で高値を示した。PCNA 陽性率は、全ての群において細気管支-肺胞上皮過形成に比べ細気管支-肺胞腺腫/腺癌で高値を示した。なお、いずれの群においても P53 の発現異常はみられなかった。rasH2 マウスのウレタン 3 回投与群では、細気管支-肺胞上皮過形成に Cyclin D1 の過剰発現が認められたことから、Cyclin D1 は肺増殖性病変/腫瘍の細胞増殖活性に関与するだけでなく肺病変の進展に大きく関与することが示された。

本研究により、rasH2 マウスにおける化学物質誘発肺発癌メカニズムには導入遺伝子あるいは内在性 *ras* 遺伝子の変異/活性化に加えて、細胞周期関連遺伝子の異常が関与することを明らかにした。また、本 Tg マウスが発癌性を検討する実験動物として有用であることを明らかにした。今回の研究の成果は、化学物質の発癌メカニズムの一端を明らかにし、

同マウスを用いた化学物質の肺における発癌性評価実験は有用な短期癌原性検出法であることを明らかにした。これらは環境衛生および薬剤の安全性研究において多大な貢献を示すものと考ええる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、武田薬品工業株式会社・薬剤機能第二研究所において、齧歯類を用いた医薬品の、がん原性試験でみられる増殖性病変/腫瘍の病理組織学的検査を通して、腫瘍診断における組織病理の限界を痛感し、分子生物学的手法を用いて腫瘍病理学をとらえるべく、ヒトのプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入した rasH2 マウスを用いて、自然発生およびウレタン誘発肺腫瘍の発癌過程に関与している遺伝子変異を調べることにより、肺発癌メカニズム解析を試み、さらに rasH2 マウスを用いて短期発癌性検出の有用性を検討した。

1. ヒトプロト型 c-H-ras トランスジェニック(rasH2)マウスの自然発生肺増殖性病変/腫瘍における病理組織および分子生物学的研究 (*J. Toxicol. Pathol.*)

rasH2 マウスの肺腫瘍の特徴を掴むべく自然発生肺腫瘍の病理組織学的検査と分子生物学検査を実施した。雌雄各 122 匹の rasH2 マウスを 2 年間無処置で飼育したところ、10 例に肺の増殖性病変/腫瘍が認められた。病理組織学的にそれらの病変は細気管支-肺胞上皮過形成 (3 例)、細気管支-肺胞腺腫 (2 例) および細気管支-肺胞腺癌 (5 例) に分類された。遺伝子検査ではヒト c-Ha-ras 遺伝子の変異が、細気管支-肺胞上皮過形成 (2 例)、細気管支-肺胞腺腫 (1 例)、および細気管支-肺胞腺癌 (5 例) の codon 61.2 (CAG→CTG) に認められた。一方、マウス内在性 c-Ha-ras および c-Ki-ras 遺伝子には、いずれの病変にも変異は認められなかった。よって、rasH2 マウスの自然発生肺増殖性/腫瘍の発生および進展に導入遺伝子の変異が関与していた。

2. rasH2 マウスの肺におけるウレタン単回および 3 回投与による誘発肺増殖性病変/腫瘍の発現と遺伝子変異の関連についての研究 (*Cancer Letter*)

化学物質誘発肺増殖性病変/腫瘍における遺伝子変異の関わりについて検討した。1 群雌雄 3 匹以上の rasH2 マウスあるいは非遺伝子導入 (non-Tg) マウスに 1000 mg/kg のウレタンを 1 回あるいは 3 回 (2 日間隔) 腹腔内投与した。ウレタン投与により肺の増殖性病変/腫瘍が早期に誘発され、rasH2 マウスで non-Tg マウスに比べより多数の病変が認められた。rasH2 マウスの 3 回投与群では腺癌の発生個数が増加していた。分子生物学的には、導入遺伝子のヒト c-Ha-ras codon 61.2 に AT から TA への変異が rasH2 マウスの 1 回投与群の雄 58.3%、雌 62.5%にみられたが、3 回投与群では雄 26.3%、雌 33.3%と低率であった。また、マウス内在性 c-Ki-ras 遺伝子の変異は rasH2 マウスの 1 回投与群では、雌雄ともみられなかったが、3 回投与群では雄 10.5%、雌 28.6%に codon 61.2 (CAA→CGA) の変異が認められた。よって、3 回投与群では 1 回投与群に比べ誘発肺増殖性病変/腫瘍数が増加していたが、導入

遺伝子の変異頻度は低下し、加えて低率ながらマウス内在性の c-Ki-ras 遺伝子の変異も認められた。このため、rasH2 マウスにおける肺発癌過程には、ras 癌遺伝子以外の遺伝子の関与が考えられた。

3. rasH2 マウスのウレタン誘発肺増殖性病変/腫瘍における Cyclin D1, PCNA および P53 の発現に関する免疫組織化学的研究 (*J. Vet. Med. Sci.*)

rasH2 マウスのウレタン誘発肺増殖性病変/腫瘍の発生に係わる細胞周期関連 (Cyclin D1, PCNA) および癌抑制遺伝子産物 (P53) の発現率の関連を免疫組織化学的に検討した。Cyclin D1 陽性率は、rasH2 マウスの 3 回投与群の過形成で 1 回投与群の過形成に比べ高値を示し、腺腫/腺癌での陽性率と同程度の高値であった。一方、rasH2 マウスの 1 回投与群および non-Tg 群では、過形成に比べ腺腫/腺癌で高値を示した。PCNA 陽性率は全ての群において過形成に比べ腺腫/腺癌で高値を示した。なお、いずれの群においても P53 の過剰発現はみられなかった。よって、rasH2 マウスのウレタン 3 回投与群の過形成に Cyclin D1 の過剰発現が認められたことから Cyclin D1 は肺増殖性病変/腫瘍の細胞増殖活性に係るのみならず肺病変の発生に深く関与することが示唆された。

本研究により、rasH2 マウスの化学物質による発癌過程には、導入遺伝子あるいは内在性 ras 癌遺伝子の変異/活性に加えて、細胞周期関連遺伝子 (Cyclin D1 および PCNA) 異常発現が重要であることが明らかにした。本研究の成果、rasH2 マウスが肺発癌メカニズムの解明に有用であり、且つ、同マウスを用いた化学物質の肺における発癌性評価実験は有用な短期癌原性検出法であることを明らかにした。これらは環境衛生および薬剤の安全性研究において多大な貢献を示すものと考えられた。

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あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Carcinogen dose-dependent variation in the transgene mutation spectrum in urethane-induced lung tumors in transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene.

Mori Ikuo, Yasuhara Kazuo, Hayashi Shim-mo, Nonoyama Takashi, Nomura Tatsuji and Mitsumori Kunitoshi

Cancer Letter

153 · 1-2 · 199~209 · 2000

2. Point mutations of the c-H-ras gene in spontaneous pulmonary tumors of transgenic mice carrying the human c-H-ras gene.

Mori Ikuo, Hayashi Shim-mo, Nonoyama Takashi, Yasuhara Kazuo, Mitsumori Kunitoshi and Masegi Toshiaki

Journal of Toxicologic Pathology

13 · 3 · 165~172 · 2000

3. Aberrant expression of cyclin D1 in pulmonary proliferative lesions induced by high doses of urethane in transgenic mice carrying the human prototype c-H-ras gene.
Mori Ikuo, Yasuhara Kazuo, Hayashi Shim-mo, Nonoyama Takashi, Nomura Tatsuji, Yanai Takuma, Masegi Toshiaki and Mitsumori Kunitoshi
The Journal of Veterinary Medical Science
63 · 3 · 261~268 · 2001

既発表論文

1. Enhanced clearance of lactic dehydrogenase-5 in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: effect of lactic dehydrogenase virus on enzyme clearance.
Hayashi Toshiharu, Ozaki Masakazu, Mori Ikuo, Saito Manabu, Itoh Toshio and Yamamoto Haruya
International Journal of Experimental Pathology
73 · 2 · 173~181 · 1992
2. Immunofluorescent antibody response to lactic dehydrogenase virus in different strains of mice.
Hayashi Toshiharu, Mori Ikuo, Noguchi Yuko, Itoh Toshio and Saitoh Manabu
Journal of Comparative Pathology
107 · 2 · 179~183 · 1992
3. Binding of asparaginase to mouse monocytes.
Mori Ikuo, Hayashi Toshiharu, Kitazima Syuji and Yamamoto Haruya
International Journal of Experimental Pathology
73 · 5 · 585~592 · 1992
4. Lactic dehydrogenase virus infection prevents development of anti-nuclear antibody in (NZB×NEW)F1 mice; role of prostaglandin E₂ and macrophage Ia antigen expression.
Hayashi Toshiharu, Mori Ikuo and Yamamoto Haruya
International Journal of Experimental Pathology
73 · 5 · 593~601 · 1992
5. Endometrial carcinogenesis induced by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice.
Yoshida Akiyoshi, Harada Takanori, Hayashi Shim-mo, Mori Ikuo, Miyajima Hiroaki and Maita Keizo
Carcinogenesis
15 · 10 · 2311~2318 · 1994

6. Spontaneous proliferative lesions in the nasopharyngeal meatus of F344 rats.
Hayashi Shim-mo, Mori Ikuo and Nonoyama Takashi
Toxicologic Pathology
26 · 3 · 419~427 · 1998

7. Point mutations of the c-H-*ras* gene in spontaneous liver tumors of transgenic mice carrying the human c-H-*ras* gene.
Hayashi Shim-mo, Mori Ikuo, Nonoyama Takashi and Mitsumori Kunitoshi
Toxicologic Pathology
26 · 4 · 556~561 · 1998

8. Pulmonary fibrosis caused by *N*-methyl-*N*-nitrosourethane inhibits lung tumorigenesis by urethane in transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-*ras* gene.
Mitsumori Kunitoshi, Yasuhara Kazuo, Mori Ikuo, Hayashi Shim-mo, Shimo Takeo, Onodera Hiroshi, Nomura Tatsuji and Hayashi Yuzo
Cancer Letters
129 · 2 · 181~190 · 1998

9. Spontaneous synovitis in Wistar rats.
Sasaki Satoshi, Nagai Hirofumi, Mori Ikuo, Kandori Hitoshi and Anayama Hisashi
Toxicologic Pathology
26 · 5 · 687~690 · 1998

10. Lack of modifying effects of NNK of lung tumorigenesis in hamsters with pulmonary fibrosis induced by MNUR
Koujitani Takatoshi, Mitsumori Kunitoshi, Yasuhara Kazuo, Mori Ikuo, Onodera Hiroshi, Nonoyama Takashi and Hayashi Yuzo
Journal of Toxicologic Pathology
11 · 3 · 169~175 · 1998

11. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 24) testicular toxicity of boric acid after 2- and 4- week administration periods.
Fukuda Ryo, Hirode Mitsuhiro, Mori Ikuo, Chatani Fumio, Morishima Hideki and Mayahara Hiroshi
The Journal of Toxicological Science
25 · Special Issue · 233~239 · 2000