

氏名(本籍)	白井紀充(愛知県)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第132号
学位授与年月日	平成15年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Molecular Pathology on Chemical-induced Squamous Cell Carcinomas in the Esophagus and Tongue of <i>p53</i> -deficient Mice ( <i>p53</i> 遺伝子欠損マウスの食道および舌における化学物質誘発扁平上皮癌の分子病理学的研究)
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 小森成一

### 論文の内容の要旨

過去30年余り、2種のげっ歯類を用いた2年間の長期癌原性試験によって、化学物質のヒトにおける癌原性が評価されてきた。しかし、現在、化学物質によって、げっ歯類に誘発される腫瘍のいくつかは、ヒトへのリスクアセスメントにおいて明らかに関係のないことが示されている。併せて、長期癌原性試験は、費用および時間がかかりすぎることや、使用される動物数が莫大であることから、近年、代替法となり得る、より短期の試験系として遺伝子改変動物が注目されている。*p53*欠損マウスはその一つである。*p53*は、ヒトの多数の癌において変異あるいは欠失していることが知られている癌抑制遺伝子である。

ヒトの食道および舌における扁平上皮癌は、*p53*変異が多い腫瘍である。また、その病因の一つにタバコが挙げられており、その原因物質としてN-ニトロソ化合物が考えられる。

本研究では、N-ニトロソ化合物である methyl-n-amyl nitrosamine (MNAN) に対する *p53*<sup>-/-</sup>および *p53*<sup>+/-</sup>欠損マウスの食道および舌における発癌感受性を調べ、これらマウスの発癌性試験の試験系としての有用性を検討した。さらに、発生した腫瘍における *p53* 遺伝子の変異を解析し、*p53* 遺伝子異常と発癌の関連性を検討した。

MNAN を5または15 ppmの濃度で飲水に混入して *p53*<sup>-/-</sup>および *p53*<sup>+/-</sup>欠損マウスならびに野生型(*p53*<sup>+/+</sup>)マウスに8週間連日投与した。実験開始15週後および25週後に動物

を屠殺して食道を病理組織学的に検索し、腫瘍のタイプおよび発生頻度を  $p53^{-/-}$ ,  $p53^{+/-}$ ,  $p53^{+/+}$  の各遺伝子型について比較検討した。その結果、15 週後では MNAN の 5 ppm 投与で扁平上皮癌が  $p53^{+/-}$  に 1/15 例 (6.7%) みられたが、 $p53^{+/+}$  では認められなかった。 $p53^{-/-}$  では扁平上皮癌は 10/12 例 (83.3%) と発生頻度が有意に増加した。MNAN 15 ppm 投与では扁平上皮癌が  $p53^{+/-}$  で 2/14 例 (14.3%),  $p53^{+/+}$  で 1/11 例 (9.1%) 認められた。25 週後では MNAN 5 ppm 投与で扁平上皮癌が  $p53^{+/-}$  に 7/16 例 (43.8%),  $p53^{+/+}$  に 1/13 例 (7.7%) 認められ、 $p53^{+/-}$  で有意に高い発生率を示した。また、MNAN 15ppm 投与群における扁平上皮癌の発生頻度は  $p53^{+/-}$  で 8/14 例 (57.1%),  $p53^{+/+}$  で 2/10 例 (20.0%) であり、 $p53^{+/-}$  では  $p53^{+/+}$  に比べ発生率が高い傾向を示した。

以上、 $p53^{-/-}$  では、 $p53^{+/-}$ ,  $p53^{+/+}$  に比べ明らかに短期間、高頻度で食道扁平上皮癌が誘発された。また、 $p53^{+/-}$  は  $p53^{+/+}$  に比べ MNAN による食道の発癌感受性が高いことが示された。

次に、誘発した腫瘍組織から DNA を抽出し、single strand conformation polymorphism (SSCP) 法によって  $p53$  遺伝子の exon 5-8 における遺伝子変異を検索した。 $p53^{+/+}$  では 6/12 (50%),  $p53^{+/-}$  では 14/23 (61%) に食道癌の癌細胞  $p53$  遺伝子の変異が認められ、MNAN による  $p53$  遺伝子の異常と食道発癌との因果関係が示唆された。また、検出された変異は大半が G:C→A:T の塩基転移 (transition) であり、ヒトの食道癌における点変異の種類とよく符合した。以上のことから、MNAN 誘発食道扁平上皮癌がヒト食道癌のモデルとして有用であることが示された。

同様に、MNAN 5 ppm を飲水投与した  $p53^{-/-}$ ,  $p53^{+/-}$ ,  $p53^{+/+}$  の各遺伝子型マウスの舌発癌感受性を検索した結果、15 週後では  $p53^{-/-}$  において舌扁平上皮癌が 5/12 例 (41.7%), 乳頭腫が 2/12 例 (16.7%) に認められた。一方、 $p53^{+/-}$  および  $p53^{+/+}$  では増殖性病変の発生はなく、 $p53^{-/-}$  では、 $p53^{+/-}$ ,  $p53^{+/+}$  に比べ明らかに短期間、高頻度で舌扁平上皮癌が誘発された。25 週後では、上皮内癌 (carcinoma in situ) が  $p53^{+/-}$  の 1/16 例 (6.3%) および  $p53^{+/+}$  の 1/13 例 (7.7%), 乳頭腫が  $p53^{+/-}$  の 1/16 例 (6.3%) に誘発された。 $p53^{+/-}$ ,  $p53^{+/+}$  に発生した carcinoma in situ および乳頭腫について SSCP 法により遺伝子検索した結果、C→T の塩基転移が carcinoma in situ で、G→A の塩基転移が乳頭腫でそれぞれ検出された。これらの塩基転移は食道扁平上皮癌における変異の種類と同一のものであり、MNAN による DNA 損傷の可能性が考えられた。

本研究により、 $p53^{-/-}$  および  $p53^{+/-}$  欠損マウスは MNAN 誘発食道癌に高感受性を示し、また、誘発された食道癌における  $p53$  遺伝子変異の種類はヒトの食道癌における変異の種類とよく符合し、ヒト食道癌のモデルとして有用と考えられた。舌の MNAN に対する発癌感受性は食道に比べ弱かったが、 $p53^{-/-}$  欠損マウスでは短期間で扁平上皮癌が誘発され、その試験系としての有用性が示された。 $p53$  遺伝子は、ヒトの多くの腫瘍で最も頻繁に変異が検出される遺伝子であり、本研究から  $p53$  遺伝子変異の種類分析により、原因物質がアルキル化剤のような場合には解明し得ることが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、ファイザー製薬株式会社・中央研究所において新規化合物の毒性評価に従事している。同者は、近年、化学物質の癌原性評価に際し、これまでの長期癌原性試験に替わりうる遺伝子改変マウスを用いた短期試験法の応用について世界規模で研究が進められていることに着目し、化学物質のヒトに対するリスク評価における *p53* 遺伝子欠損マウスの有用性を検討すべく、*p53* 遺伝子欠損マウスの食道および舌における発癌感受性の検索、さらに遺伝子変異を調べることによるメカニズム解析を行った。

### 1. *p53* 欠損マウスの食道における methyl-n-amyl nitrosamine による発癌感受性および発癌と遺伝子変異の関連についての研究 (*Carcinogenesis*)

*p53* 欠損マウスの化学物質による食道発癌の感受性および発癌過程における *p53* 遺伝子変異の関わりについて検討した。Methyl-n-amyl nitrosamine (MNAN) を 5 または 15 ppm の濃度で飲水に混入して *p53*<sup>-/-</sup> および *p53*<sup>+/-</sup> 欠損マウスならびに野生型 (*p53*<sup>+/+</sup>) マウスに 8 週間連日投与した。実験開始 15 週後に MNAN を 5 ppm 投与した *p53*<sup>-/-</sup> で扁平上皮癌が高頻度 (10/12 例; 83.3%) で認められた。*p53*<sup>+/-</sup> では扁平上皮癌が 1/15 例 (6.7%) にみられたが、*p53*<sup>+/+</sup> での発生はなかった。15 ppm 投与による扁平上皮癌の発生頻度は *p53*<sup>+/-</sup> で 2/14 例 (14.3%)、*p53*<sup>+/+</sup> で 1/11 例 (9.1%) であった。25 週後において、5 ppm 投与による扁平上皮癌の発生が *p53*<sup>+/-</sup> では 7/16 例 (43.8%) であったのに対して *p53*<sup>+/+</sup> では 1/13 例 (7.7%) に過ぎず、*p53*<sup>+/-</sup> で有意に高い発生率を示した。また、15 ppm 投与における発生頻度は *p53*<sup>+/-</sup> で 8/14 例 (57.1%)、*p53*<sup>+/+</sup> で 2/10 例 (20.0%) であり、*p53*<sup>+/-</sup> では *p53*<sup>+/+</sup> に比べ感受性が高い傾向を示した。

次に、誘発した腫瘍組織から DNA を抽出し、single strand conformation polymorphism (SSCP) 法によって *p53* 遺伝子の exon 5-8 における遺伝子変異を検索した。食道癌において、*p53*<sup>+/+</sup> では 6/12 (50%)、*p53*<sup>+/-</sup> では 14/23 (61%) と、高頻度で *p53* 遺伝子の変異が検出され、*p53* 遺伝子の異常と食道発癌との因果関係が示唆された。また、検出された変異は大半が G:C→A:T の塩基転移であり、ヒトの食道癌でよく検出される点変異の種類と符合した。

以上、*p53*<sup>-/-</sup> では、*p53*<sup>+/-</sup> および *p53*<sup>+/+</sup> に比べて短期間かつ高頻度で食道扁平上皮癌が誘発された。また、*p53*<sup>+/-</sup> は *p53*<sup>+/+</sup> に比べ食道の発癌感受性が高いことが示された。さらに、腫瘍組織における *p53* 遺伝子変異のパターンはヒトと相同していたことから、化学物質の食道発癌性評価に、*p53* 遺伝子欠損マウスが有用であることが裏づけられた。

### 2. *p53* 欠損マウスの舌における methyl-n-amyl nitrosamine による発癌感受性および発癌と遺伝子変異の関連についての研究 (*Journal of Toxicologic Pathology*)

Methyl-n-amyl nitrosamine (MNAN) を *p53*<sup>-/-</sup>、*p53*<sup>+/-</sup>、*p53*<sup>+/+</sup> の各遺伝子型マウスに 5 ppm の濃度で 8 週間連日飲水投与し、舌発癌感受性を検索した。実験開始 15 週後において *p53*<sup>-/-</sup> で扁平上皮癌が 5/12 例 (41.7%)、乳頭腫が 2/12 例 (16.7%) に認められた。一方、*p53*<sup>+/-</sup> および *p53*<sup>+/+</sup> では増殖性病変の発生はなかった。実験開始 25 週後では、上皮内癌

(carcinoma *in situ*)が  $p53+/-$ で 1/16 例 (6.3%) および  $p53+/+$ で 1/13 例 (7.7%), 乳頭腫が  $p53+/-$ で 1/16 例 (6.3%) に誘発された。さらに,  $p53+/-$ ,  $p53+/+$ に発生した carcinoma *in situ* および乳頭腫について single strand conformation polymorphism (SSCP) 法により  $p53$  遺伝子の exon 5-8 における遺伝子変異を検索した結果, C→T の塩基転移が carcinoma *in situ* で, G→A の塩基転移が乳頭腫でそれぞれ検出された。

以上のことから,  $p53-/-$ は,  $p53+/-$ および  $p53+/+$ に比べて短期間かつ高頻度で舌扁平上皮癌が誘発され, 舌発癌感受性が高いことが示された。また, 検出された  $p53$  遺伝子変異のパターンは, 食道扁平上皮癌で最もよく認められた塩基転移と同じであったことから, この塩基転移は, MNAN による DNA 損傷の特徴である可能性が示唆された。

本研究により,  $p53$  欠損マウスは MNAN に対する食道および舌の発癌感受性が高いことが判明した。さらに, 分子病理学的手法を用いて  $p53$  遺伝子変異を検索することにより発癌メカニズム解析を行い,  $p53$  欠損マウスとヒトの扁平上皮癌との相同性を明らかにした。これらは, 化学物質の安全性研究およびヒトの上部消化管における癌研究の分野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があると認めた。

## 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Elevated susceptibility of the  $p53$  knockout mouse esophagus to methyl-*N*-amyl nitrosamine carcinogenesis  
著 者 名 : SHIRAI, Norimitsu TSUKAMOTO, Tetsuya YAMAMOTO, Masami IIDAKA, Takeshi SAKAI, Hiroki YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki DONEHOWER, Lawrence A. and TATEMATSU, Masae  
学術雑誌名 : Carcinogenesis  
巻・号・頁・発行年 : 23(9) : 1541~1547, 2002
- 2) 題 目 : Tongue carcinogenic susceptibility of  $p53$  deficient mice to methyl-*N*-amyl nitrosamine  
著 者 名 : SHIRAI, Norimitsu TSUKAMOTO, Tetsuya YAMAMOTO, Masami IIDAKA, Takeshi SAKAI, Hiroki YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki DONEHOWER, Lawrence A. and TATEMATSU, Masae  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 15(4) : 209~214, 2002

## 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Nontraumatic osteonecrosis: MR perfusion imaging evaluation in an experimental model  
著 者 名 : KAWAMOTO, Satomi SHIRAI, Norimitsu STRANDBERG, John D., BOXERMAN, Jerrold L. and BLUEMKE, David A.  
学術雑誌名 : Academic Radiology  
巻・号・頁・発行年 : 7(2) : 83~93, 2000

- 2) 題 目 : *p53* knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to *N*-methyl-*N*-nitrosourea stomach carcinogenesis  
 著 者 名 : YAMAMOTO, Masami TSUKAMOTO, Tetsuya SAKAI, Hiroki SHIRAI, Norimitsu OHGAKI, Hiroko FURIHATA, Chie DONEHOWER, Lawrence A. YOSHIDA, Kenji and TATEMATSU, Masae  
 学術雑誌名 : Carcinogenesis  
 卷・号・頁・発行年 : 21(10): 1891~1897, 2000
- 3) 題 目 : Expression of cyclin kinase inhibitor p27 (kip 1) in skin tumors of dogs  
 著 者 名 : SAKAI, Hiroki YAMANE, Tomoko YANAI, Tokuma SHIRAI, Norimitsu and MASEGI, Toshiaki  
 学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 125(2~3): 153~158, 2001
- 4) 題 目 : Differential effects of partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration on induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity  
 著 者 名 : SAKAI, Hiroki TSUKAMOTO, Tetsuya YAMAMOTO, Masami SHIRAI, Norimitsu IIDAKA, Takeshi YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki and TATEMATSU, Masae  
 学術雑誌名 : Japanese Journal of Cancer Research  
 卷・号・頁・発行年 : 92(10): 1018~1025, 2001
- 5) 題 目 : Summation of initiation activities in the liver after partial hepatectomy  
 著 者 名 : SAKAI, Hiroki TSUKAMOTO, Tetsuya YAMAMOTO, Masami HIRATA, Akihiro INAGAMI, Atsushi SHIRAI, Norimitsu IIDAKA, Takeshi YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki and TATEMATSU, Masae  
 学術雑誌名 : Cancer Letters  
 卷・号・頁・発行年 : 176(1): 1~5, 2002
- 6) 題 目 : The effects of D-galactosamine or carbon tetrachloride-induced regeneration on induction of rat liver cell foci in a model for detection of initiation activities of chemicals  
 著 者 名 : SAKAI, Hiroki INAGAMI, Atsushi HIRATA, Akihiro TSUKAMOTO, Tetsuya KOBAYASHI, Kiyoshi DEGAWA, Masakuni SHIRAI, Norimitsu IIDAKA, Takeshi YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki and TATEMATSU, Masae  
 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 15(1): 13~18, 2002
- 7) 題 目 : The effects of allyl alcohol-induced cell proliferation for detection of initiation activities of chemicals in rat liver  
 著 者 名 : OKAMURA, Miwa SAKAI, Hiroki TAKAHASHI, Naofumi INAGAMI, Atsushi TSUKAMOTO, Tetsuya YAMAMOTO, Masami SHIRAI, Norimitsu IIDAKA, Takeshi YANAI, Tokuma MASEGI, Toshiaki and TATEMATSU, Masae  
 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 15(2): 95~102, 2002

- 8) 題 目 : Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by  
bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression  
著 者 名 : SAKAI, Hiroki NODA, Ayako SHIRAI, Norimitsu IIDAKA,  
Takeshi YANAI, Tokuma and MASEGI, Toshiaki  
学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 127(4): 233~238, 2002