

氏 名 (本籍)	林 守 道 (東京都)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第195号
学 位 授 与 年 月 日	平成18年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3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	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	肝臓選択的甲状腺ホルモン受容体リガンド KAT-681 の 肝腫瘍抑制効果に関する研究
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 下 田 実 副査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、二段階肝発癌モデルラットに新規合成化合物である肝臓選択的甲状腺ホルモン受容体リガンド KAT-681 (KAT) を投与し、肝臓の腫瘍性病変に対する抑制効果、並びにそのメカニズムを検討する目的で実施された。

第一に、肝発癌モデルラットに KAT を短期間投与し、肝腫瘍抑制効果を検討した。Diethylnitrosamine でイニシエーション処置を施した雄の F344 ラットに 2-Acetylaminofluorene の2週間経口投与及び部分肝切除を実施して肝腫瘍性病変を誘発後、KAT の 0.04、0.1 又は 0.25 mg/kg を3週間経口投与した。その結果、肝細胞腺腫 (HCA) に対しては明らかな効果を認めなかったが、肝腫瘍マーカーである坑 glutathione S-transferase placental form 抗体 (GST-P) に陽性の肝細胞変異巣 (AHF) は占有面積及び数ともに用量依存的に減少した。血液生化学検査では、肝発癌関連酵素である gamma-glutamyl transpeptidase の著明な減少が認められた。したがって、KAT は前癌病変である AHF を減少させたことから、肝発癌予防薬の候補となり得ることが示唆された。

第二に、第1章と同様の肝発癌モデルに KAT を3週間 (0.25 mg/kg, 実験1) 又は20週間 (0.1 mg/kg, 実験2) 経口投与し、その間の変化を経時的に観察した。KAT を短期間投与した実験1では、GST-P 陽性 AHF の占有面積及び数は投与14日目まで経時的に減少した。その間、AHF の細胞増殖活性は投与2日目をピークとして有意に上昇した。GST-P 陽性 HCA に関しては、KAT は明らかな効果を示さなかった。一方、KAT を長

期間投与した実験 2 では、AHF の占有面積、数及び平均サイズの減少に加えて、HCA の平均サイズの減少も認められた。それらの病変における細胞増殖活性は、対照群に比較して有意に減少した。この結果から、KAT の投与初期と後期で異なった抑制効果、すなわち KAT の投与初期には細胞増殖活性の亢進に伴って前癌病変が減少し、後期には細胞増殖活性の低下に伴って肝細胞腺腫の成長をも抑制することが推察された。したがって、KAT は前癌病変を減少させるだけではなく、長期間投与することにより、形質転換の進んだ腫瘍の成長をも抑制することが示唆された。

第三に、前項で使用した材料を用いて、癌抑制遺伝子として知られる Connexin32 (Cx32) 及び Transforming growth factor (TGF) - beta シグナル伝達系 (TGF-beta1 → Smad4 → p21Cip1) の遺伝子発現をマイクロダイセクション法により解析した。KAT を短期間投与した実験 1 では、ギャップジャンクション蛋白である Cx32 の遺伝子発現が AHF のみで投与 4 日目以降に有意に上昇した。TGF- beta シグナル伝達系に関しては、TGF-beta1 の遺伝子発現が AHF で上昇したにもかかわらず、Smad4 及び p21Cip1 遺伝子の変化は認められなかった。一方、KAT を長期間投与した実験 2 では、Cx32 遺伝子に対する効果はいずれの肝増殖性病変においても示されなかったが、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21Cip1 遺伝子の有意な上昇が HCA のみで観察された。この結果から、KAT の投与初期における AHF の減少が Cx32 を介した細胞間情報伝達の活性化により誘発され、また後期における HCA の成長抑制が p21Cip1 を介した細胞周期の調節により誘発されている可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、二段階肝発癌モデルラットに肝臓選択的甲状腺ホルモン受容体リガンドである KAT-681 (KAT) を短期間投与したところ、誘発された肝臓の前腫瘍性病変の発現が抑制されることを見出したことから、KAT を更に長期にわたり投与することにより、肝臓の増殖性病変がどのように修飾されるかを検討した。その結果、KAT の長期投与では、肝細胞腫瘍の発現も抑制することが明らかとなったので、その抑制発現機序解明実験を行い、その機序の一部を明確にした内容である。

第 1 章では、肝発癌モデルラットに KAT を短期間投与することで肝腫瘍抑制効果を検討した。Diethylnitrosamine でイニシエーション処置を施した雄の F344 ラットに 2-Acetylaminofluorene の 2 週間経口投与及び部分肝切除を実施して肝腫瘍性病変を誘発後、KAT の 0.04、0.1 又は 0.25 mg/kg を 3 週間経口投与した結果、KAT は前癌病変である肝細胞変異巣を用量依存的に減少させたことから、肝発癌予防薬として有用である可能性が示唆された。

第 2 章では、第 1 章と同様の肝発癌モデルに KAT を 3 週間 (0.25 mg/kg) 又は 20 週間 (0.1 mg/kg) 経口投与し、その間の変化を経時的に観察した結果、KAT の投与初期と後期で異なった抑制効果、すなわち KAT の投与初期には細胞増殖活性の亢進に伴って前癌病変が減少し、後期には細胞増殖活性の低下に伴って肝細胞腺腫の成長をも抑制することが示された。よって、KAT は前癌病変を減少させるだけではなく、より形質転換の進んだ腫瘍の成長をも抑制することが示唆された。

第 3 章では、第 2 章で使用した材料を用いて、癌抑制遺伝子の遺伝子発現をマイクロダイセクション法により解析した結果、KAT の投与初期にはギャップジャンクション蛋白である Connexin32 遺伝子発現の上昇が前癌病変で認められ、後期にはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21Cip1

遺伝子発現の上昇が肝細胞腺腫で認められた。よって、KAT の投与初期にみられた前癌病変の減少は Connexin32 を介した細胞間情報伝達の活性化により誘発され、また後期にみられた肝細胞腺腫の成長抑制は p21Cip1 を介した細胞周期の調節により誘発されている可能性が示唆された。

以上の実験結果から、KAT は肝発がん予防薬として有用である可能性が強く示唆され、今後の発がん予防薬の発がん抑制機序解明研究の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 : Inhibitory effects of KAT-681, a liver-selective thyromimetic, on development of hepatocellular proliferative lesions in rats induced by 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy after diethylnitrosamine initiation
著 者 名 : Hayashi, M., Ohnota, H., Tamura, T., Kuroda, J., Shibata, N., Akahane, M., Moriwaki, H., Machida, N. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 78(8): 460-466, 2004
- 2) 題 目 : Different inhibitory effects in the early and late phase of treatment with KAT-681, a liver-selective thyromimetic, on rat hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy after diethylnitrosamine initiation
著 者 名 : Hayashi, M., Tamura, T., Kuroda, J., Ohnota, H., Shibata, N., Akahane, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 84(1): 22-28, 2005

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Vagal afferent nerve endings in the trachealis muscle of the dog
著 者 名 : Yamamoto, Y., Hayashi, M., Atoji, Y. and Suzuki, Y.
学術雑誌名 : Archives of Histology and Cytology
巻・号・頁・発行年 : 57(5): 473-480, 1994
- 2) 題 目 : Systemic and eosinophilic lesions in rats with spontaneous eosinophilia (*mes* rats)
著 者 名 : Muto, S., Hayashi, M., Matsushita, N., Momose, Y., Shibata, N., Umemura, T. and Matsumoto, K.
学術雑誌名 : Veterinary Pathology
巻・号・頁・発行年 : 38(3): 346-350, 2001
- 3) 題 目 : A time-course characterization of male reproductive toxicity in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS)
著 者 名 : Kuriyama, K., Yokoi, R., Kobayashi, K., Suda, S., Hayashi, M., Ozawa, S., Kuroda, J. and Tsujii, H.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 30(2): 91-102, 2005
- 4) 題 目 : Evaluation of testicular toxicity and sperm morphology in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS)
著 者 名 : Kuriyama, K., Kitamura, T., Yokoi, R., Hayashi, M., Kobayashi, K., Kuroda, J. and Tsujii, H.
学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development
巻・号・頁・発行年 : 51(5): 657-667, 2005