



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

rasH2トランスジェニックマウスにおける発がん増強機序解明に関する研究

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: 岡村, 美和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3133

(4)

氏名(本籍)	岡村美和(群馬県)			
学位の種類	博士(獣医)			
学位記番号	獣医博甲第194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	rasH2 トランスジェニックマウスにおける発がん増強機序 解明に関する研究			
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

ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入した rasH2 トランスジェニックマウスの発がん増強機序を解明するために、3種類の遺伝毒性発がん物質によって誘発された腫瘍組織の遺伝子発現解析を行った。

誘発腫瘍における包括的な遺伝子発現解析を行うために、rasH2 マウスに *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を投与して誘発された前胃扁平上皮癌を用いて、マイクロアレイ解析を行った。また、導入遺伝子および Ras-mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路に関わる遺伝子については、RT-PCR を行い検討を加えた。前胃扁平上皮癌における発現変動遺伝子として選出された 784 遺伝子には、代謝、細胞増殖に関わる遺伝子や、解析に用いた腫瘍組織が高い浸潤性を示したことを反映して transforming growth factor β 1 など浸潤や転移に関わる遺伝子が多く含まれていた。腫瘍組織では導入遺伝子の過剰発現と共に、マウス内在性 *Ha-ras*、*N-ras*、*raf*、*Mekk2*、*c-fos*、*c-myc*、*junB* および *cyclinD* の発現上昇が認められた。これらの結果から、rasH2 マウスの ENU 誘発前胃腫瘍では、導入遺伝子の過剰発現および Ras-MAPK 経路の活性化が関与していることが示唆された。

次に、urethane 誘発肺腺腫について、マイクロアレイおよび RT-PCR による遺伝子発現解析を行い、ENU 誘発前胃腫瘍の結果と比較した。正常肺組織と urethane 誘発肺腺腫では、それぞれ特徴的な遺伝子発現パターンを示し、肺腺腫における発現変動遺伝子として 660 遺伝子を選出した。肺腺腫では細胞周期や核酸の代謝に関わる遺伝子

の発現上昇が多く認められたが、ENU 誘発腫瘍と比較して、細胞外基質やサイトカイン・ケモカイン類の発現変動は乏しい傾向を示した。導入遺伝子の発現は肺腺腫において有意に増加していたが、マウス内在性 *ras* 遺伝子の発現変動はみられなかった。*c-fos* などの Ras シグナル関連因子の発現は、肺腺腫においても有意に増加していた。ENU 誘発前胃腫瘍と urethane 誘発肺腺腫において共通した発現変動パターンを示した遺伝子には、osteopontin、osteopontin、Cks1b、Tpml、Reck、gelsolin など、発がんや *ras* による細胞の形質転換に関わる遺伝子が含まれていた。以上の結果から、導入遺伝子の過剰発現は、ENU および urethane 誘発腫瘍の両者において関与することが示された。また、異なる誘発腫瘍において共通した変動パターンを示した遺伝子は、発がん増強機序に関わる候補遺伝子になり得ると考えられた。

続いて、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発前胃扁平上皮癌の遺伝子発現解析を実施し、導入遺伝子や Ras シグナル関連遺伝子、発がん増強に関わる候補遺伝子の発現を検討した。その結果、DMBA 誘発前胃腫瘍においても導入遺伝子の発現上昇が認められ、*rasH2* マウスの発がん増強機序には、導入遺伝子の過剰発現が重要な役割を果たすことが示された。DMBA 誘発前胃腫瘍では、マウス内在性 *ras* 遺伝子の発現も増加しており、前胃扁平上皮癌の発生には、導入遺伝子と共にマウス内在性 *ras* 遺伝子も関与していると考えられた。*c-fos*、*c-myc*、*junB*、*cyclin D1* などの Ras シグナル関連遺伝子や、発がん増強に関わる候補遺伝子として選出した osteopontin、Cks1b、Tpml、Reck、gelsolin、amphiregulin は、3 種の発がん物質によって誘発された腫瘍組織において有意な発現変動を示し、これらの遺伝子も *rasH2* マウスの発がん過程に関わっているものと推測された。

以上の結果から、遺伝毒性発がん物質による *rasH2* マウスの発がん増強機序には、導入遺伝子の過剰発現が重要であること、また導入遺伝子の発現は Ras シグナル関連遺伝子をはじめとする様々な遺伝子発現に影響を与え、腫瘍形成促進に寄与していることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入した *rasH2* マウスの発がん増強機序を解明するために、3 種類の遺伝毒性発がん物質によって早期に誘発された腫瘍の遺伝子発現解析を行い、本マウスの発がん増強に関わる遺伝子の選出を行った。

第 1 章では、*rasH2* マウスに *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を投与して誘発された前胃扁平上皮癌についてマイクロアレイ解析を行い、導入遺伝子および Ras シグナル関連遺伝子の発現は RT-PCR を行い検討した。その結果、腫瘍組織では導入遺伝子の過剰発現に加えて、マウス内在性 *ras* 遺伝子や *raf*、*Mekk2*、*c-fos*、*c-myc*、*junB* および *cyclin D1* などの Ras シグナル関連遺伝子の発現上昇が認められ、Ras シグナル経路の活性化が腫瘍形成に関与していることが示唆された。

第 2 章では、urethane 誘発肺腺腫の遺伝子発現解析を行い、ENU 誘発腫瘍の結果と比較し、発がん増強に関わる候補遺伝子の選出を試みた。導入遺伝子の発現は、urethane 誘発肺腺腫において増加していたが、マウス内在性 *ras* 遺伝子の発現上昇は認められなかった。*c-fos* などの Ras シグナル関連因子の発現は第 1 章と同様に、腫瘍組織において有意に増加していた。ENU 誘発腫瘍、urethane 誘発肺腫瘍の両者で共通した発現変動を示した遺伝子の中には、発がんや *ras* による細胞の形質転換に関わる osteopontin、Cks1b、Tpml、Reck、gelsolin が見出され、これらを発がん増強に関わる候補遺伝子として選出した。

第3章では、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発前胃扁平上皮癌の遺伝子発現解析を行い、第1章、第2章で得られた結果を検証した。DMBA 誘発前胃腫瘍においても、導入遺伝子の発現上昇が認められ、これが rasH2 マウスの発がん増強機序の重要因子であることが示唆された。DMBA 誘発前胃腫瘍ではマウス内在性 ras 遺伝子も発現上昇しており、前胃扁平上皮癌の発生にはマウス内在性 ras 遺伝子が関与している可能性が示された。c-fos, c-myc, junB, cyclin D1 などの Ras シグナル関連遺伝子や、osteopontin, Cks1b, Tpml, Reck, gelsolin および amphiregulin は3種の発がん物質によって誘発された腫瘍において共通した発現変動パターンを示し、これらの遺伝子も rasH2 マウスの発がん過程に関与しているものと推測された。

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 : Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea
著 者 名 : Okamura, M., Sumida, K., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N., Watanabe, T. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 78 (12): 688-696, 2004
- 2) 題 目 : Gene expression analysis of urethane-induced lung tumors in rasH2 mice
著 者 名 : Okamura, M., Unami, A., Matsumoto, M., Oishi, Y., Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 217 (2-3): 129-138, 2006

既発表学術論文

- 1) 題 目 : The effects of allyl alcohol-induced cell proliferation for detection of initiation activities of chemicals in rat liver
著 者 名 : Okamura, M., Sakai, H., Takahashi, N., Inagami, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 15 (2): 95-102, 2002
- 2) 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
巻・号・頁・発行年 : 185 (1-2): 17-22, 2003
- 3) 題 目 : Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of xylazine in rats
著 者 名 : Okamura, M., Yasuhara, K., Koujitani, T., Nasu, M., Hirose, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 188 (2-3): 275-283, 2003

- 4) 題 目 : Absence of *in vivo* genotoxicity and liver initiation activity of dicyclanil
著 者 名 : Moto, M., Sasaki, Y.F., Okamura, M., Fujita, M., Kashida, Y., Machida, N
and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 28 (3): 173-179, 2003
- 5) 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.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 28 (5): 471-478, 2003
- 6) 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.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 32 (1): 1-8, 2004
- 7) 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.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 29 (1): 73-80, 2004
- 8) 題 目 : Carcinogenic susceptibility to *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)
in rasH2 mice
著 者 名 : Okamura, M., Moto, M., Kashida, Y., Machida, N. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 32 (4): 474-481, 2004
- 9) 題 目 : Molecular pathological analysis on the mechanism of liver carcinogenesis
in dicyclanil-treated mice
著 者 名 : Moto, M., Okamura, M., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N. and
Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 207 (3): 419-436, 2005
- 10) 題 目 : Absence of DNA damage in comet assay and liver initiation activity of
cinnamaldehyde
著 者 名 : Muguruma, M., Moto, M., Sasaki, Y.F., Okamura, M., Watanabe, T.,
Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 18 (1): 27-31, 2005

- 11) 題 目 : Lack of initiating activity of kojic acid on hepatocarcinogenesis in F344 rats
著 者 名 : Watanabe, T., Mori, T., Kitamura, Y., Umemura, T., Okamura, M., Kashida, Y., Nishikawa, A., Hirose, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 18 (2): 79-84, 2005
- 12) 題 目 : Lack of modifying effects of combined treatment of *t*-butylhydroquinone and sodium nitrite on forestomach carcinogenesis in rasH2 mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea
著 者 名 : Matsuo, S., Okamura, M., Takizawa, T., Imai, T., Mitsumori, K. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 18 (2): 111-116, 2005
- 13) 題 目 : Induction of hepatocellular proliferative lesions in CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid
著 者 名 : Watanabe, T., Mori, T., Okamura, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 18 (3): 159-165, 2005
- 14) 題 目 : Molecular mechanism on the testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene in Sprague-Dawley rats: preliminary study
著 者 名 : Muguruma, M., Yamazaki, M., Okamura, M., Moto, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 79 (12): 729-736, 2005
- 15) 題 目 : Chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administered ammonium sulfate in F344 rats
著 者 名 : Ota, Y., Hasumura, M., Okamura, M., Takahashi, A., Ueda, M., Onodera, H., Imai, T., Mitsumori, K. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 44 (1): 17-27, 2006
- 16) 題 目 : Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice
著 者 名 : Moto, M., Mori, T., Okamura, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : in press