

| | |
|------------|---|
| 氏名(本(国)籍) | 松尾 沙織里(埼玉県) |
| 主指導教員氏名 | 岐阜大学 教授 西川 秋佳 |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 獣医博甲第427号 |
| 学位授与年月日 | 平成26年9月24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 | 岐阜大学 |
| 学位論文題目 | Ptch1ヘテロマウスを用いた小児腫瘍モデルの確立と化学物質の発達期曝露影響評価系としての有用性に関する研究 |
| 審査委員 | 主査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 御領 政信 副査 東京農工大学 准教授 吉田 敏則 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳磨 副査 岐阜大学 教授 西川 秋佳 |

学位論文の内容の要旨

化学物質や放射線の発達期曝露は腫瘍発生の原因となりうると考えられてきたが、小児腫瘍発生への関与はほとんど明らかにされてはいない。また、化学物質による小児腫瘍発生への修飾作用を評価する系も十分構築されていない。近年、ヒトの代表的な小児脳腫瘍である Sonic hedgehog (Shh) サブタイプの髄芽腫と類似した髄芽腫を好発する Ptch1 ヘテロノックアウトマウス (Ptch1 マウス) が注目されている。しかしながら、本マウスの髄芽腫発生過程に関する詳細は不明である。一方、本マウスは新生児期の放射線照射や他の遺伝子の欠損により髄芽腫の発生頻度が変動することから、本マウスの髄芽腫発生過程が様々な要因によって修飾される可能性が示唆される。そこで、本マウスを用いることにより化学物質の発達期曝露による小児腫瘍への修飾作用を検出する系を確立できると考え、本研究を行った。

第1章では、生後0日齢 (PND0) から10週齢 (W10) までの Wild 及び Ptch1 マウスの小脳を検索し、髄芽腫及びその発がん修飾作用を短期に検索する上で重要な Preneoplastic lesion の特徴の解析を行った。Ptch1 マウスの小脳において、小脳発達期の PND10 から14に外顆粒層 (EGL) の肥厚部、PND16以降に Ki-67 陽性巣、PND12以降に髄芽腫の発生が認められた。EGL の形態学的特徴、BrdU 標識細胞の経時的な観察、増殖や神経分化関連マーカーの免疫組織化学的染色結果から、EGL の肥厚部、Ki-67 陽性巣、髄芽腫は EGL 外層に存在する Granular cell precursor (GCP) に由来すると考えられた。さらに、形態学的特徴や増殖活性、神経組織への未分化性、小脳における好発部位の類似性から、EGL の肥厚部や Ki-67 陽性巣は髄芽腫の Preneoplastic lesion であると推察された。特に Ki-67 陽性巣は小脳発達後期に高頻度に認められることから、化学物質の発達期曝露による本マウスの髄芽腫発生への修飾作用について、これらの Preneoplastic lesion を評価指標の一つとす

ることにより、より短期間で評価できる可能性が示唆された。

第2章では、Shh阻害剤であるCyclopamineを生後2週間マウスに投与し、その髄芽腫発生及び小脳発達に与える影響について検索し、第1章で解析した髄芽腫やそのPreneoplastic lesionの評価指標としての有用性について検討した。Cyclopamine群のPtch1マウスでは、PND14及びPND21において髄芽腫のPreneoplastic lesionであるEGLの肥厚部、Ki-67陽性巣、Small MBの発生率が有意に減少した。また、PND21では増殖性病変の面積が有意に減少した。PND7では、CyclopamineによるGCPの増殖抑制作用が認められ、このことがPreneoplastic lesionの発生や髄芽腫への進展に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。また、Cyclopamineによる髄芽腫やそのPreneoplastic lesionの抑制効果は、有意ではないもののW12まで持続していた。以上から、髄芽腫やそのPreneoplastic lesionの発生状況を評価指標の一つとすることにより、Ptch1マウスの小脳発達期に化学物質を曝露し、髄芽腫発生への影響を短期間で評価することが可能であることが示唆された。

第3章では、p53阻害剤であるPifithrin- α を生後2週間マウスに投与した。Pifithrin- α 群のPtch1マウスでは、PND21においてSmall MBの発生率及び増殖性病変の面積が有意に増加した。PND7では、Pifithrin- α がアポトーシス誘導を阻害するという仮説に反して、GCPに対してp53活性化を介したアポトーシス誘導及び増殖停止作用を有する可能性が示唆された。この原因は不明であるが、Pifithrin- α 投与により、GCPに何等かの遺伝子異常が起こり、アポトーシスに陥らず生き残った遺伝子異常を有するPreneoplastic lesionがPND21までに髄芽腫へ進展した可能性が推察された。

第4章では、抗甲状腺剤であるMethimazoleを生後3週間マウスに投与した。Methimazole投与群では、甲状腺機能低下との関連が示唆される甲状腺の組織学的変化が認められた。Methimazole群のW12のPtch1マウスにおいてKi-67陽性巣の発生頻度のみ有意な減少が認められたものの、PND14及びPND21における増殖性病変の発生頻度、PND21及びW12における増殖性病変の面積には有意な減少は認められなかった。以上から、W12のKi-67陽性巣の発生頻度の低下は、非特異的な変動である可能性が示唆された。また、Methimazoleが発達期小脳に及ぼす影響については、両マウス共に明らかではなかった。今回の実験条件下において、Methimazole投与が小脳発達や髄芽腫発生に影響を及ぼすことを示す明確な結果は得られなかった。

以上から、Ptch1マウスにおける髄芽腫やそのPreneoplastic lesionの発生状況を指標として、化学物質の発達期曝露の影響を短期間で評価することが可能であることが示唆された。今後更に実験を重ね、この評価系の有用性や限界を確認することが重要である。

審査結果の要旨

化学物質や放射線の発達期曝露は発がんの原因となりうるとされるが、小児腫瘍発生への関与は不明であり、小児腫瘍発生への修飾影響を評価する試験系も構築されていない。近年、ヒトの代表的な小児脳腫瘍であるSonic hedgehog (Shh) サブタイプの髄芽腫を好発するPtch1ヘテロノックアウトマウス (Ptch1マウス) が注目されているが、その腫瘍発生過程に関する詳細は不明である。一方、本マウスは新生児期の放射線照射や他の遺伝子の欠損により髄芽腫の発生頻度が変動することから、その発生過程が様々な要因によって修飾される可能性が示唆される。そこで、Ptch1マウスを用いて化学物質の発達期曝露による小児腫瘍発現への修飾影響を検出できるか検討した。

第1章では、生後0日齢 (PND0) から10週齢 (W10) までのWild及びPtch1マウスの

小脳を検索した。Ptch1 マウスの小脳において、小脳発達期の PND10 から 14 に外顆粒層 (EGL) の肥厚部、PND16 以降に Ki-67 陽性巣、PND12 以降に髄芽腫の発生が認められたが、形態学的・免疫組織化学的な解析結果から、それらの病変は EGL 外層に存在する Granular cell precursor (GCP) に由来し、EGL の肥厚部や Ki-67 陽性巣は髄芽腫の Preneoplastic lesion であると推察された。特に Ki-67 陽性巣は小脳発達後期に高頻度に認められることから、Preneoplastic lesion の有効な評価指標の一つとなりうるものと考えられた。

第 2 章では、Shh 阻害剤 Cyclopamine を生後 2 週間マウスに投与し、その髄芽腫発生及び小脳発達に与える影響について検索した。その結果、Cyclopamine 群の Ptch1 マウスでは、PND14 及び PND21 において髄芽腫の Preneoplastic lesion の発生率が有意に減少した。Cyclopamine による GCP の増殖抑制作用が Preneoplastic lesion の発生や髄芽腫への進展に対して抑制的に作用するものと推察された。

第 3 章では、p53 阻害剤 Pifithrin- α を生後 2 週間マウスに投与した。Pifithrin- α 群の Ptch1 マウスでは、PND21 において Small MB の発生率及び増殖性病変の面積が有意に増加した。PND7 では、Pifithrin- α がアポトーシス誘導を阻害するという仮説に反して、GCP に対して p53 活性化を介したアポトーシス誘導が示された。この原因は不明であるが、Pifithrin- α 投与により、GCP に何等かの遺伝子異常が起こり、アポトーシスに陥らず生き残った遺伝子異常を有する Preneoplastic lesion が PND21 までに髄芽腫へ進展した可能性が推察された。

第 4 章では、抗甲状腺剤 Methimazole を生後 3 週間マウスに投与した。Methimazole 投与群では、甲状腺機能低下を示唆する組織変化が認められた。Methimazole 群の W12 の Ptch1 マウスにおいて Ki-67 陽性巣の発生が有意に減少したが、PND14 及び PND21 における増殖性病変の発生頻度、PND21 及び W12 における増殖性病変の面積には有意な減少は認められなかったことから、非特異的な変動である可能性が示唆された。今回の実験条件下において、Methimazole 投与が小脳発達や髄芽腫発生に影響を及ぼすことを示す明確な結果は得られなかった。

以上の成績から、Ptch1 マウスにおける髄芽腫やその Preneoplastic lesion の発生状況を指標として、化学物質の発達期曝露の影響を短期間で評価できる可能性が示された。今後更に実験を重ね、この評価系の有用性や限界を確認することが重要である。

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 : Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in *Ptch1*^{+/−} mice

著 者 名 : Matsuo, S., Takahashi, M., Inoue, K., Tamura, K., Irie, K., Kodama, Y., Nishikawa, A. and Yoshida, M.

学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 65 (6) : 863-873, 2013

2) 題 目 : Inhibitory potential of postnatal treatment with Cyclopamine, a Hedgehog signaling inhibitor, on medulloblastoma development in *Ptch1* heterozygous mice

著 者 名 : Matsuo, S., Takahashi, M., Inoue, K., Tamura, K., Irie, K., Kodama,

Y., Nishikawa, A. and Yoshida, M.

学術雑誌名 : Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Undifferentiated sarcoma of the salivary gland in a Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)
著 者 名 : Toyoda, T., Tsukamoto, T., Cho, Y.M., Onami, S., Takasu, S., Shi, L., Saito, A., Matsuo, S., Tatematsu, M., Nishikawa, A. and Ogawa, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 24 (3) : 173-177, 2011

- 2) 題 目 : Development of an early induction model of medulloblastoma in Ptch1 heterozygous mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea
著 者 名 : Takahashi, M., Matsuo, S., Inoue, K., Tamura, K., Irie, K., Kodama, Y. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Cancer Science
巻・号・頁・発行年 : 103 (12) : 2051-2055, 2012

- 3) 題 目 : Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides
著 者 名 : Tamura, K., Inoue, K., Takahashi, M., Matsuo, S., Irie, K., Kodama, Y., Ozawa, S., Nishikawa, A. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
巻・号・頁・発行年 : 221 (1) : 47-56, 2013

- 4) 題 目 : Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats
著 者 名 : Takahashi, M., Inoue, K., Morikawa, T., Matsuo, S., Hayashi, S., Tamura, K., Watanabe, G., Taya, K. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 40 : 16-23, 2013

- 5) 題 目 : Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats
著 者 名 : Hayashi, S., Taketa, Y., Inoue, K., Takahashi, M., Matsuo, S., Irie, K., Watanabe, G. and Yoshida, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 38 (6) : 891-902, 2013