

医研 281


(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

Distribution of preneoplastic lesions and tumors, and  $\beta$ -catenin gene mutations in the colon carcinomas induced by 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sulfate sodium

(1,2-dimethylhydrazine および dextran sulfate sodium 誘発大腸癌における前癌病変および腫瘍の分布とその腫瘍の  $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異の検討)

氏名 金城 達也 

## 論文要旨

【背景】齧歯類を用いた大腸発癌研究では、変異陰窩巣 (aberrant crypt foci; ACF) が前癌病変として広く研究対象とされ、ヒトにおいても同様の病変の研究がなされてきた。一方、粘液枯渇巣 (mucin depleted foci; MDF) は、近年報告された高度異型を呈する前癌病変であり、ACFとの相違の研究により重要性が指摘されている。

【目的】1,2-dimethylhydrazine (DMH) および dextran sulfate sodium (DSS) 誘発大腸腫瘍モデルを用いて、誘発される MDF および腫瘍形成を経時的および部位的に解析するとともに MDF で高発現する  $\beta$ -catenin に関連して、誘発された腫瘍の遺伝子変異を目的とした。

【方法】12匹の雄 F344 ラットに DMH (40 mg/kg body weight) を実験第1週目に2回皮下投与し、実験第2週目に1% DSS を1週間飲水投与した。実験開始から10週目および14週目で6匹ずつ屠殺し、大腸を摘出。腫瘍採取後、摘出大腸にて Alcian blue 染色を行い、ACF、MDF を同定した。

大腸の遠位側より部位別に前癌病変および腫瘍の個数、各病変を構成する腺管数を計測した。また、 $\beta$ -catenin 免疫染色をおこない、各病変の  $\beta$ -catenin 蛋白の細胞内蓄積を評価した。さらに polymerase chain reaction – single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) にて誘発腫瘍における  $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異を解析した。

【結果】 MDF と腫瘍の発生分布は、10週目において有意に相関した ( $r=0.83$ 、 $p=0.0006$ )。しかし、14週目では両者は相関しなかった ( $r=0.47$ 、 $p=0.20$ )。また遠位側領域の大腸粘膜では MDF の構成腺管数は10週目と比較して14週目では有意に増加していた ( $p<0.001$ )。さらに同部位では、10週目および14週目に腫瘍形成を認めた。

$\beta$ -catenin 免疫染色の結果、MDF および腫瘍において細胞質および核に  $\beta$ -catenin 蛋白の蓄積がみられた。PCR-SSCP 解析の結果、57%の腫瘍に  $\beta$ -catenin の突然変異を認めた。




【考察】本研究では、MDF と腫瘍の発生分布に、有意な相関を認めた。さらに MDF と腫瘍

は細胞質および核に  $\beta$ -catenin 蛋白質の蓄積を認め  
た。また腫瘍では  $\beta$ -catenin の突然変異を認めた。  
これらの結果より、MDF は大腸発癌と密接に  
関連する病変であると考えられ、また、本モ  
デル腫瘍においても  $\beta$ -catenin の突然変異の関与が  
示唆された。 $\beta$ -catenin の突然変異はラット大腸発  
癌過程の初期段階でおこると考えられている。  
実際に、25% の MDF に  $\beta$ -catenin の突然変異がみら  
れたとの報告もある。これらのことより、ヒ  
トの大腸癌と同様、本モデルの発癌過程にお  
いても  $\beta$ -catenin の突然変異の関与が重要であるこ  
とが示唆された。

【結語】 MDF は、大腸腫瘍形成に密接に関係  
した前癌病変であることが示唆された。また  
本モデルの大腸に発生した MDF および腫瘍で  
は、 $\beta$ -catenin の突然変異による Wnt 経路の活性化が  
示唆された。これらのことは今後の大腸発癌  
研究において有用であると思われる。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	金城 達也
論文審査委員	審査日	平成 18 年 6 月 29 日	
	主査教授	若谷 研一	
	副査教授	茂島 研二	
	副査教授	加藤 誠也	
(論文題目)			
<p>Distribution of preneoplastic lesions and tumors, and <math>\beta</math>-catenin gene mutations in the colon carcinomas induced by 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sulfate sodium</p>			
(論文審査結果の要旨)			
<p>上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p>			
1. 研究の背景と目的			
<p>大腸癌は多段階過程を経て進展するため、前癌病変の研究は癌予防の点で非常に重要である。動物モデルを用いた大腸癌発癌研究では、前癌病変として異常陰窩巢 (aberrant crypt foci : ACF) が広く知られている。またさらに、近年、ACF 以外にも新たな前癌病変の報告が散見されるようになってきている。本研究の目的は、新たな前癌病変の 1 つである粘液枯渴巢 (mucin depleted foci : MDF) の前癌病変としての意義を評価することと、さらに、本研究で用いた動物モデルでの腫瘍における <math>\beta</math>-catenin 遺伝子突然変異の解析を行った報告がこれまでにないため、これを評価することである。</p>			
2. 研究内容			
<p>dimethylhydrazine (DMH) および dextran sulfate sodium (DSS) を併用した大腸発癌モデルを使用し、前癌病変および腫瘍について評価をおこなった。4週齢の雄 F344 ラット 12 匹に、実験 1 週目に DMH (40 mg/kg body weight) を 2 回皮下注射にて投与し、実験第 2 週目に 1% DSS を 1 週間、飲水投与した。初回の DMH 投与から 10 週目および 14 週目に 6 匹ずつ解剖をおこなった。大腸を摘出後、腫瘍について、個数、大きさ、肛門からの距離を計測した。</p>			

腫瘍採取後の大腸組織に Alcian blue 染色をおこない、肛門側から 2cm 毎に 10 領域に区分した。ACF と MDF の個数、さらにこれらの病変を構成する腺管数を領域別に計測した。また、腫瘍および大腸組織に、 $\beta$ -catenin に対する免疫染色をおこなった。さらに、腫瘍から DNA を抽出し、polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法を用いて、 $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異の有無を評価した。その結果、10 週目の大腸で、MDF と腫瘍は、領域別の出現数が有意に相関した ( $r = 0.83$ ,  $p = 0.0006$ ) が、ACF と腫瘍は有意な相関を認めなかった。さらに、大腸遠位領域では、MDF を構成する腺管数は 10 週目と比較し、14 週目では有意に増加していた ( $p < 0.001$ )。  $\beta$ -catenin 免疫染色の結果、MDF および腫瘍で、 $\beta$ -catenin 蛋白の細胞内異常蓄積を認めた。これらのことより、MDF は経時的に増大し、やがて腫瘍になることが示唆された。また、腫瘍では、57%に  $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異を認め (コドン 32, コドン 34, コドン 41)、これまでに報告されている DMH 単剤により誘発される腫瘍での  $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異と好発部位が一致した。以上より、MDF は発癌剤誘発動物モデルにおいて、腫瘍形成過程に密接に関与した病変であること、また、同モデルでは、 $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異が腫瘍形成に関与することが示唆された。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

MDF と腫瘍形成との関係について詳細に検討した研究は過去になく、大腸癌発癌過程における MDF の前癌病変としての意義を新たな知見として示した。また、今回用いたモデルでの誘発腫瘍における  $\beta$ -catenin 遺伝子突然変異の解析結果は、ヒト大腸癌において APC- $\beta$ -catenin 経路の活性化がみられることからヒト大腸癌のモデルとして、今後の研究に有用であることが示された。同モデルでの前癌病変および腫瘍の研究は、ヒト大腸癌予防に大きく寄与することが考えられ、これらのことは国際的にも評価されるものであると判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。