

氏 名	藤 井 茂 彦
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2734 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Development of colonic neoplasia in p53 deficient mice with experimental colitis induced by dextran sulfate sodium. (p53 ノックアウトマウスを用いたデキストラン硫酸ナトリウムによる大腸炎症性腫瘍発生に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 藤 誠 教 授 今 村 正 之 教 授 千 葉 勉

### 論 文 内 容 の 要 旨

背景：潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) の長期罹患，広範囲罹患症例の合併症のひとつとして大腸腫瘍があげられる。UC 関連大腸腫瘍は，平坦型が多く，K-ras 変異が少なく，p53 異常が高率であることが知られている。現在，種々の炎症誘発剤を用いた大腸炎症性腫瘍の動物モデルはあるが，炎症のみで高率に大腸腫瘍を発生させることはできない。一方，発癌剤を併用したモデルでは癌の発生率は高くなるが，その腫瘍は隆起型が多く，ほとんどの病変に K-ras 変異が認められ，ヒトに発生する UC 関連大腸腫瘍とは肉眼形態的にも遺伝子変異の面からも異なる特徴を有することが明らかとなっている。

本研究では p53 ノックアウトマウス (p53-KO マウス) を用いて 4 % dextran sulfate sodium (DSS) で腸炎を起こすことにより，大腸炎症性腫瘍発生モデルを構築し，発生した大腸腫瘍の肉眼形態や遺伝子異常を検討した。

方法：DSS を用いて homozygous p53 ノックアウトマウス (p53<sup>-/-</sup>-DSS 群)，heterozygous p53 ノックアウトマウス (p53<sup>+/-</sup>-DSS 群)，wild type マウス (p53<sup>+/+</sup>-DSS 群) に大腸炎を惹起させた。DSS の投与方法は，4 % DSS を 1 週間自由飲水させ，2 週間の休薬を 1 クールとし，8 週齢のマウスに対して 2 クール行い，その後 84 日後に屠殺した。水のみを与えたマウスをコントロール群とした。屠殺後，大腸を摘出し，実体顕微鏡と組織標本を用いて，各群における腫瘍数，肉眼形態，組織型を検索した。組織型の検索にはウィーン分類を用いた。更に K-ras 遺伝子変異を polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism 法および Direct DNA sequencing 法で，beta-catenin の発現の異常を免疫染色にて解析した。

結果：p53<sup>-/-</sup>-DSS 群 (n=12) ではすべてのマウスに大腸腫瘍の発生を認めた。一方，p53<sup>+/-</sup>-DSS 群 (n=13)，p53<sup>+/+</sup>-DSS 群 (n=15) ではそれぞれ 46.3%，13.3% のマウスに腫瘍が発生した。コントロール群には腫瘍の発生を認めなかった。それぞれのグループに発生した総腫瘍数とその平均 (±SEM) は，p53<sup>-/-</sup>-DSS 群で 60 病変，5.0±0.82，p53<sup>+/-</sup>-DSS 群で 8 病変，0.62±0.17，p53<sup>+/+</sup>-DSS 群で 3 病変，0.2±0.14 であり，p53<sup>-/-</sup>-DSS 群で他の DSS 群に比較し有意に多くの腫瘍発生を認めた (p<0.001)。発生した腫瘍の肉眼型については，p53<sup>-/-</sup>-DSS 群で 60 病変中 55 病変 (91.7%)，p53<sup>+/-</sup>-DSS 群，p53<sup>+/+</sup>-DSS 群ではそれぞれ 8 病変中 6 病変 (75.0%)，3 病変中 1 病変 (33.3%) が表面型腫瘍であり，p53<sup>-/-</sup>-DSS 群では p53<sup>+/+</sup>-DSS 群に比較し有意に表面型腫瘍の発生が高頻度であった。(p=0.028)。DSS 群に発生した全腫瘍性病変のうち 8 病変 (p53<sup>-/-</sup>-DSS 群，5 病変；p53<sup>+/-</sup>-DSS 群，2 病変；p53<sup>+/+</sup>-DSS 群，2 病変) が癌であり，そのうち 7 病変が高分化腺癌で，1 病変が低分化腺癌であった。また，p53<sup>-/-</sup>-DSS 群に発生した癌のうち 2 病変は粘膜下層への浸潤を認めた。K-ras 変異については，解析した計 32 病変 (p53<sup>-/-</sup>-DSS 群，25 病変；p53<sup>+/-</sup>-DSS 群，5 病変；p53<sup>+/+</sup>-DSS 群，2 病変) すべてで陰性であった。Beta-catenin の発現については，解析した計 23 病変 (p53<sup>-/-</sup>-DSS 群，17 病変；p53<sup>+/-</sup>-DSS 群，4 病変；p53<sup>+/+</sup>-DSS 群，2 病変) のうち，19 病変 (82.6%；p53<sup>-/-</sup>-DSS 群，13 病変；p53<sup>+/-</sup>-DSS 群，4 病変；p53<sup>+/+</sup>-DSS 群，2 病変) で細胞質あるいは核での発現を認めた。

結論：本研究において p53-KO マウスに DSS を投与して大腸炎を惹起させることによって、高頻度で大腸腫瘍を発生させることができた。発生した腫瘍の特徴として、表面型腫瘍であり、多発し、K-ras 変異を認めず、beta-catenin の発現異常を高頻度に認めることがあげられ、ヒト UC 関連大腸腫瘍と類似したものであった。本モデルはヒト UC 関連大腸腫瘍の発生・進展のメカニズムを解明するのに有用であり、発癌化学予防薬の開発にも寄与できると考えている。

#### 論文審査の結果の要旨

潰瘍性大腸炎に合併する大腸腫瘍は増加傾向にあるが、腫瘍発生、進展機構には不明な点が多い。申請者らは p53 ノックアウトマウス (p53-KO マウス) を用いてデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) で腸炎を起こすことにより、大腸炎症性腫瘍発生モデルを構築し、発生した腫瘍の肉眼形態や遺伝子異常を検討した。

ホモ p53-KO マウスでは DSS 腸炎によりすべてのマウスに大腸腫瘍の発生を認めた。一方、ヘテロ p53-KO マウス、野生型マウスではそれぞれ 46.3%、13.3% に腫瘍が発生した。水のみを与えたコントロール群には腫瘍の発生を認めなかった。ホモ p53-KO マウスでは 1 匹あたり平均 5.0 個の腫瘍を認め、ヘテロ p53-KO マウス (0.62 個)、野生型マウス (0.2 個) に比較し多くの腫瘍発生を認めた。腫瘍の肉眼型については、ホモ p53-KO マウスでは 60 病変中 55 病変 (91.7%) が表面型腫瘍であり、野生型マウス (33.3%) に比較し表面型腫瘍の発生が高頻度であった。K-ras 変異は、解析したすべての腫瘍で陰性であり、Beta-caenin の発現については、多くの腫瘍において異常発現をみとめた。

すなわち p53-KO マウスに DSS 腸炎を惹起させることによって、高頻度で大腸腫瘍を発生させることができた。発生した腫瘍は、形態的にも遺伝子学的にもヒト潰瘍性大腸炎関連大腸腫瘍と類似したものであった。

以上の研究はヒト大腸炎症性発癌機構の解明と化学予防剤の開発に貢献し、消化器病学に寄与するところが多い。従って本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 16 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。