

氏 名	おち 落 あい 合 まさ 雅 こ 子
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 702 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 2 項 該 当
学位論文題目	大腸多段階発がん過程における初期病変及び遺伝子の修飾因子に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤公道 教授 中山和久 教授 河合明彦

論 文 内 容 の 要 旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) は、加熱魚肉食品中に存在する変異原性heterocyclic amineの中で最も含量が多く、PhIP400ppm含有飼料 (PhIP食) をラットに約1年間連続投与すると、雄の約50%に大腸がんを誘発すると報告されている。PhIPはヒトが日常的に摂取しており、疫学的な研究からもヒト大腸がんの原因物質である可能性がある。ラットやマウスにPhIPやアルキル化剤であるazoxymethane (AOM) などの大腸発がん物質を数週間連続投与すると、正常腺窩よりも大きく、メチレンブルー染色で濃染される病変である大腸異常腺窩 (aberrant crypt foci, ACF) が誘発される。大腸発がん抑制物質の投与でその誘発が抑制されることから、ACFは大腸がんの前がん病変と推定する報告もあるが、それと矛盾する報告もあり、ACFの大腸発がん過程における生物学的意義は未だ十分に解明されていない。著者はこの点について研究を行い、以下の新知見を得た。

第1編 ACFの大腸多段階発がん過程における初期病変としての検討

PhIPにより誘発されるラット大腸発がんモデルを用いてACFの組織学的及び遺伝学的解析を経時的に行い、初期病変としての重要性を検討した。

PhIPによるラットの大腸発がん性では有意な雌雄差が報告されている (F344 ♂55%, ♀7%)。発がん過程の初期段階では、DNA付加体の形成により突然変異が誘発され、細胞増殖の昂進により変異細胞が増加した後、ACFが誘発されると推定されている。PhIP食の連続投与によるDNA付加体量は雌雄に有意差はなく、細胞増殖は雄のみ有意に増強され、ACF誘発数は雄が雌の約3倍有意に多かった。DNA付加体の生成の過程以降、ACF誘発の段階までに雌雄差が生じると示唆される。

「PhIPの長期連続投与」(PhIP食1年)でのPhIP摂取量は、ヒトの日常の推定摂取量よりもはるかに多いが、PhIPにより幹細胞に突然変異が導入されればその後はPhIP非存在下でも大腸発がんの促進作用のある高脂肪食により発がん過程が進展する可能性がある。

「PhIP短期投与」(PhIP食2週+高脂肪食4週)による発がんに必要なPhIP用量の低減化を試みた。ACF誘発性で検討した結果、連続投与25週ではACFを形成する平均のcrypt数は1.6個であったが、「PhIP短期投与」では6週で2.7個と短期間で大きなACFが誘発された。大腸発がん性は、「PhIP短期投与」後、高脂肪食のみを継続投与により108週で15%のラットに、「短期間歇投与」(「PhIP短期投与」を3回繰り返した後、高脂肪食のみを継続投与)では、60週で45%に大腸腫瘍が誘発された。「短期間歇投与」による腫瘍発生率は「長期連続投与」と同程度だが、PhIP摂取量は約1/20であり、更に60週時での生存率が90%と毒性も低かったので、以後の実験は「短期間歇投与」で行った。

初期病変としてのACFの重要性を、PhIP投与開始後6, 18, 25, 32週でのACF・腫瘍の誘発を調べ、組織学的・遺伝学的解析により検討した。全144個のACFの組織学的解析を試みた結果、110個が解析可能だった。その内30個が異型を伴うACF (dysplastic ACF) で、その数は時間経過と共に増加した。大腸発がん重要な役割を担う β -cateninはWnt/ β -

catenin経路の鍵となる分子で、通常はApc (Adenomatous polyposis coli) 複合体の関与で速やかに分解され、細胞質中の量は低レベルに保たれているが、 β -cateninあるいはApc遺伝子に変異があると、 β -cateninは分解されずに細胞質に蓄積され、核へと移行し、核内のWnt標的遺伝子の転写を活性化、細胞増殖や分化の異常を誘導することが知られている。本研究では、dysplastic ACFに細胞増殖の増強や β -cateninの蓄積を高頻度に認め、特に異型度の高い3例は β -cateninの核内蓄積を認めた。Dysplastic ACFでは、 β -cateninの遺伝子変異を7例、Apc変異を1例に認め、ACFでの主な β -catenin変異は腫瘍でも同様だった。腫瘍で認められる細胞増殖の増強・ β -cateninの蓄積が、non-dysplastic ACFはごく一部のみに、dysplastic ACFは大部分に観察されたことから、ACFからdysplastic ACF、更には腫瘍へと進展する、即ち大腸がんの前がん病変としてのdysplastic ACFの重要性が示された。

第2編 大腸発がんの遺伝的修飾因子としてのDNA-PKcsの検討

遺伝的修飾因子は、DNA修復等の遺伝子の安定性に関与する遺伝子で、その異常はランダムに突然変異を誘発するため、発がん過程に関与する遺伝子にも変異が誘発され、発がんを促進するとされている。DNA二本鎖切断の修復に関与するDNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-PKcs) が遺伝的修飾因子である可能性を、Scidマウスを用いて検討した。scidマウスはDNA-PKcsに欠失型変異を持ち、DNA修復の異常やV (D)J再結合の欠損による免疫異常を呈すると報告されている。Scidマウス及び親系統のC.B-17マウスにAOMを投与すると、ACF誘発性はScidマウス26.0個、C.B-17マウス15.6個、大腸腫瘍の発生頻度は各々87%、50%であり、いずれもScidマウスが有意に高かった。これらの結果は、DNA-PKcsが大腸発がんの遺伝的修飾因子であることを示唆している。

上記の実験結果から、dysplastic ACFは大腸がんの初期病変として重要であり、がんの化学予防剤のスクリーニングのための新しい指標となりうること、又、遺伝的修飾因子であるDNA-PKcsの機能異常が大腸がんの発症に重要であることを指摘できる。以上の成績は、大腸がんの早期発見及び予防のための重要な基礎的知見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

がんは遺伝子変化が蓄積し、正常な組織から腫瘍へと進展すると考えられている。また、遺伝的修飾因子は遺伝子の安定性に関与する遺伝子で、その異常は、遺伝的不安定性を惹起してランダムに突然変異を誘発し、発がん過程に関与する遺伝子にも変異を誘発して発がんを促進すると推定されている。ところで、2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) は、加熱魚肉食品中に存在する変異原性heterocyclic amineの中で最も含有量が多く、ヒトが日常的に摂取していること、Fisher344 (F344) ラットに本物質400ppm含有飼料 (PhIP食) を約1年間連続摂取させると雄の約半数に大腸がんを誘発するとの報告もあるので、ヒト大腸がんの原因物質である可能性が指摘されている。しかし、その発がん過程において、1個以上のaberrant crypt (AC) からなるaberrant crypt foci (ACF) が初期病変であるか否かに関して十分な説明が為されていない。そこで著者はACFの発がん過程における生物学的意義とACF誘発に関わる遺伝的修飾因子に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

第1編 ACFの大腸多段階発がん過程における初期病変としての検討

PhIP食によるPhIPの連続投与により誘発されるラット大腸がんモデルでは、雄において雌よりも有意に高率で大腸がんが誘発されることを確認した上で、この雌雄差は、DNA付加体生成の過程では認められず、それ以後ACF誘発までの段階で生じてくることを見出した。しかしこの投与量はヒトにおける推定日常摂取量より遙かに多量なので、PhIP投与量の低減化を検討した結果、PhIP食2週間+高脂肪食4週間で3回繰り返した後高脂肪食のみを継続投与する「PhIP短期間歇投与」では、PhIP食1年間連続投与の場合と比較して、大腸腫瘍誘発率はほぼ同程度であるが、生存率はより高率 (低毒性) であり、大腸がん誘発法として有用であることを明らかにした。この「PhIP短期間歇投与」法を採用し、解析可能な全ACFについて組織学および遺伝学的解析を実施した結果、異型を伴うACF (dysplastic ACF) は時間経過とともに増加し、このdysplastic ACFにおいては、細胞増殖の亢進や大腸がん発症において重要な役割を果たしていることが報告されている β -cateninの蓄積が高頻度に認められ、さらに、 β -catenin遺伝子および細胞質中の β -catenin量を低レベルに維持するのに寄与しているApc (adenomatous polyposis coli) の遺伝子Apcの変異が約1/4で生じていることを見出した。腫瘍で認められる細胞増殖の増強、 β -cateninの蓄積が、non-dysplastic ACFではごく一部のみに、dysplastic ACFでは大

部分に観察されたことから、ACF→dysplastic ACF→腫瘍という進展経路が強く示唆され、dysplastic ACFが大腸がんの前がん病変として重要であることを指摘した。

第2編 大腸発がんの遺伝的修飾因子としてのDNA-PKcsの検討

DNA二本鎖切断の修復に関与するDNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット（DNA-PKcs）の遺伝的修飾因子としての可能性を、DNA-PKcsに欠失型変異をもつScidマウスとその親系統C.B-17マウスを用いて検討し、前者は親系統マウスに比べてACF誘発性および大腸腫瘍発生頻度が有意に高いことを明らかにした。これらの結果から、DNA-PKcsが大腸がん発生の遺伝的修飾因子である可能性を指摘した。

以上の実験結果は、dysplastic ACFが大腸がんの初期病変をして重要であり、がん予防剤のスクリーニングのための新しい指標となり得ること、また、遺伝的修飾因子であるDNA-PKcsの機能異常ががん発症に重要と考えられ、この機能異常を持つマウスを大腸がん発症高危険度群と推定出来ることを示している。これらの成績は、ヒトでの大腸がんの早期発見および予防のための重要な基礎的知見と考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成16年2月12日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。