

氏 名	にし やま やす ゆき 西 山 泰 由
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1851 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 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	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	鉄ニトリロ三酢酸誘発ラット腎癌の遺伝子変化に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教授 藤田 潤 教授 吉田 修 教授 日合 弘

論 文 内 容 の 要 旨

鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) は水溶性鉄キレート剤で、ラットの腹腔内に投与すると腎近位尿細管でフリーラジカルを発生し選択的に細胞障害を引き起こす。これを反復投与すると腎嚢胞形成を伴う尿細管上皮の異形成がみられさらに1—2年の間に高率に(60-92%)腎細胞癌が発生する。本発癌モデルは組織型がヒト腎細胞癌に類似している点、腫瘍が致死性である点において従来の腎腫瘍の実験モデルに比しよりヒト腎癌に類似しユニークである。またその特徴的な嚢胞形成と皮質変性により後天性嚢胞腎のモデルと考えられる。本研究はこれについて遺伝子解析を試みたものである。

まず、ヒトにおける代表的な癌及び癌抑制遺伝子である K, H, N-ras, p53 遺伝子の変異について解析を行った。腎細胞癌12例のうち ras については K, H, N-ras とともに codon 12, 13, 61 に変異は認められなかった。p53 では1例で codon 246 に CGC→CTC (Arg→Leu) の塩基置換を認めた。In vitro の実験で 8-OHdG は、C→T, G→T, G→C の塩基置換を生ずることが知られており、CGC→CTC の塩基置換は活性酸素によって生じたものとして矛盾しない。またヒト腎癌では ras, p53 の変異は少ないことが知られているが、本モデルでもその傾向が認められている。

ついで differential display 法 (以下 DD 法) を用いて発現遺伝子の解析を試みた。Wistar ラット (雄) に Fe-NTA を腹腔内投与し、投与後 1, 3, 6, 16, 24 時間 (単回投与), 1 週, 4 週 (連続投与) の腎組織 (以上 time course study) 及び Fe-NTA により作成された腎癌組織 (3 例) より RNA を抽出し DD 法を行った。特異的な発現の変化を反映していると思われる断片 5 つを塩基配列決定しホモロジー検索をした結果、そのうち 1 つは Integrin associated protein (IAP) と高い相同性 (89%) を示した。ラット腎組織より coding 領域全体を含む IAP cDNA を同定しこれをプローブとしてノザンプロットを行ったところ、time course study で DD 法で得られたものと同様のイメージが得られた。さらに腎癌では 25% (2/8) に有意と考えられる発現の亢進をみとめ、また同一個体の非腫瘍側では癌部に比して発現の亢進がみられた。Fe-NTA 投与後の非腫瘍腎ではすべての例において 1.5 から 3 倍の発現亢進を認めた。

ISH 法により発現の局在の確認をおこなったところ、非腫瘍腎の尿細管上皮細胞、腫瘍細胞に mRNA の発現を示すシグナルが認められ、ノザンブロットの結果とあわせて Fe-NTA 投与後の尿細管上皮、および一部の腎癌細胞での発現亢進が証明された。IAP (CD47) は多貫通性膜蛋白のひとつで IgV 様細胞外領域と multiple-spanning 膜領域よりなり、LRI (leukocyte response integrin) と共同して白血球の活性化に働くことが知られている他、integrin $\alpha v \beta 3$ vitronectin receptor と関連して細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に関与していること、multiple-spanning 領域は Ca^{2+} チャンネルである可能性が高いことが報告されている。先天性嚢胞腎においては最近候補遺伝子として Ca^{2+} チャンネルの一つである PKD2 が同定され Ca^{2+} の変動がこの疾患に重要な役割を果たしていることが示された。IAP の発現の増加は後天性嚢胞腎の形成においても Ca^{2+} の変動が重要であることを示唆するものである。腎癌においては組織型との明らかな相関はみられなかったが、明らかな発現亢進例 2 例はいずれも肺転移を認めており、癌の浸潤、転移に関連している可能性があると考ええる。

論文審査の結果の要旨

鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 誘発ラット腎癌は組織型がヒト腎細胞癌に類似している点、腫瘍が致死である点において従来の腎腫瘍の実験モデルに比してヒト腎癌に類似している。また、前癌状態においては特徴的な嚢胞形成と皮質変性を示すことから後天性嚢胞腎のモデルと考えられる。本研究はこれについて遺伝子解析を試みたものである。まず、ヒトにおける代表的な癌及び癌抑制遺伝子である K, H, N-ras, p53 遺伝子の変異について解析を行ないヒト腎癌同様に低頻度の遺伝子変化 (P53 : 1/12 例, K-, N-, H-ras : 0/12) しかみられないことを明らかにした。ついで differential display 法 (以下 DD 法) を用いて発現遺伝子の解析を試み発癌過程の内、Fe-NTA 投与後の嚢胞形成期の尿細管上皮、および一部の腎癌細胞において CD47 の発現が亢進していることを証明した。

以上の研究は、このモデルが遺伝子レベルにおいてヒト腎癌のモデルとなりうること、また本例のような化学発癌モデルにおいて DD 法が有効な gene screening 法となりうることを示したものである。

したがって、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 9 年 1 月 29 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。