

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター実験歯肉・口底癌における
C-myc 遺伝子のメチル化ならびにC-myc mRNA の
発現の変化とプロテインキナーゼ活性との関係

学位論文内容の要旨

緒言

発癌の機序については、複数の癌遺伝子の変化が段階的に生じ、それらが蓄積して発癌するという多段階発癌説が考えられている。すでに発見されている多数の癌遺伝子の中でもレトロウイルスの癌遺伝子として同定されたv-mycに対応する細胞遺伝子c-mycは、ヒトがんにおいて実際に構造異常を示す数少ない遺伝子のひとつである。このc-myc遺伝子は、正常状態、癌化状態を問わず、細胞の増殖に、普遍的に関わっている重要な遺伝子であることが示唆されてきた。また、c-mycタンパクのひとつの機能として、細胞に永久増殖能を与えることも知られている。

また、転写活性の高い遺伝子の周囲では低メチル化の傾向にあり、悪性度の高い癌細胞は、正常細胞と比較して、低メチル化傾向にあることが知られている。ヒト前骨髄細胞HL60のc-myc遺伝子は、5'領域で低メチル化、3'領域で高メチル化であるという報告がある。また、マウス肝癌では、エクソン2領域が、発癌初期において高メチル化であり、後期において低メチル化であるという報告がある。しかしながら、発癌過程におけるc-myc mRNAの発現についての長期にわたった変動を検索した報告は見られない。

一方、マウス皮膚にTPAを塗布すると、2時間以内に*fos, jun, myc* 等の初期遺伝子が発現するという報告があるようにプロテインキナーゼC(PKC)が細胞の増殖ある

いは癌化に直接関与しているという報告は多い。しかし、DMBAの細胞内情報伝達系を介した核内遺伝子に対する影響についての報告はみられない。

筆者は、歯肉・口底癌の発癌過程における*c-myc*遺伝子と細胞内情報伝達系の関連について明らかにする目的で、本研究を行った。

材料と方法

実験動物は、生後4週齢の雄性ゴールデンハムスター60匹を用いた。実験群に対しては、左側下顎臼歯部舌側歯肉歯槽粘膜部を歯科用クレンザーで擦過後に0.5% DMBAアセトン溶液を塗布した。塗布開始後12週および28週に達した時点で、それぞれエーテル麻酔下で断頭屠殺し、試料を採取した。

細胞は、ヒト歯肉癌細胞株Ca9-22 (JCRB0625)を用い、牛胎仔血清を含むDMEMにて培養した。細胞は、subconfluenceに達したところで、それぞれ、無血清培地に交換し、24～48時間後、種々の因子を含む無血清培地に交換し、引き続き30分～2時間培養を行った後、細胞を回収し、試料とした。

これらを用い、*c-myc*遺伝子のメチル化およびその発現、さらにDMBAおよびPKC・プロテインキナーゼA(PKA)・カルモジュリンキナーゼ(CaMK)等の阻害化学物質を投与した場合の細胞内情報伝達系を介する*c-myc*遺伝子の発現について分子生物学的手法に基づいて検討した。

結果と考察

本研究におけるDMBA塗布による実験歯肉・口腔底癌発癌は、塗布開始後12週では、肉眼的に塗布部の白板状の病変および小腫瘤の形成がみられ、病理組織学的には上皮の増殖、肥厚が認められた。塗布開始後28週では、肉眼的に外向性、肉芽様の腫瘍が見られ、外向性腫瘍が多く、病理組織学的には角化の亢進、有棘層の肥厚、上皮脚の不規則な増殖、異常角化や細胞や核の異型性の発現、細胞分裂像の増加が観察された。また、分化度については、高分化型扁平上皮癌が大部分であった。

*c-myc*遺伝子のメチル化について検索してみると、塗布開始後12週の組織では、

c-myc遺伝子は、エクソン1周囲の5'領域において、Hpa IIおよびMsp I両制限酵素処理によるバンドの位置に顕著な差が見られた。また、エクソン3周囲の3'領域においてもHpa IIおよびMsp I両断片に顕著な差が認められた。塗布開始後28週の組織では、c-myc遺伝子はエクソン1周囲の5'領域では、Hpa II、Msp I両酵素による切断片のバンドの位置には差が認められなかった。一方、エクソン3周囲の3'領域においては、Hpa IIおよびMsp Iによる両断片におけるバンドの位置に顕著な差が認められた。c-myc mRNAの発現は正常組織においては非常に弱い、腫瘍組織においては正常組織のそれに比べて非常に強く発現していることが認められた。さらに実験群の中で比較すると、塗布開始後12週におけるc-myc mRNAの発現の程度が28週のそれに比べてより強く、その中でもエクソン 1周囲の5'領域の発現が若干強い傾向にあることが示唆された。

ヒト歯肉癌細胞株Ca9-22に対してTPA 100ng/mlあるいは100ng/mlDMBA DMSO溶液を添加すると2.4kb付近にc-myc mRNAに一致する1本のバンドが検出された。また、c-myc mRNAの発現を経時的に追跡してみると、添加直後からその発現が上昇し始め刺激後90分にピークを迎え、その後徐々に低下する傾向が見られた。0.5%DMBA添加時にさらにPKA阻害化学物質(H89)、PKC阻害化学物質(H7)、CaMK阻害化学物質(KN-62)を添加したところ、DMBAによるc-myc mRNAの発現の誘導の抑制が認められた。

以上の結果より次の結論を得た。

1. c-myc遺伝子は、発癌初期ではエクソン1およびエクソン3の両領域でメチル化の程度が高いが、末期ではエクソン1領域で低く、エクソン3領域で高いことが認められ、癌の進行とそのメチル化の程度に関連性があることが推定された。
2. c-myc mRNAの発現は、発癌初期に増強され、末期ではその発現が低下することが認められ、c-myc mRNAの転写活性は癌の進行にともない低下することが示唆された。

3. *c-myc* mRNAの各エクソンにおける発現はエクソン1の領域で他のエクソンと比較して増強していることが認められ、*c-myc*遺伝子が転座している可能性が示唆された。
4. DMBA処理による*c-myc* mRNAの発現はPKC阻害化学物質(H7)・PKA阻害化学物質(H-89)およびCaMK阻害化学物質(KN-62)により抑制されたことから、DMBAによる細胞内情報伝達にはPKC・PKAおよびCaMK等が関与していることが明らかになった。

結語

DMBA誘発ハムスター実験歯肉・口底癌においては、細胞内情報伝達系のPKC・PKAおよびCaMKなどを介して、発癌初期には*c-myc* mRNAの発現がエクソン1の領域で増強するものの、さらに癌化が進行すると、*c-myc*遺伝子のメチル化が低下することが示されたことから、細胞内情報伝達系の機能と*c-myc*遺伝子の発現あるいはそのメチル化との間には深い関係のあることが示唆された。本研究におけるように、DMBA誘発ハムスター実験歯肉・口底癌をモデルとして、*c-myc*遺伝子のメチル化および*c-myc* mRNAの発現の程度を検討することは、口腔癌の発癌機構の一端を解明するうえで極めて有用である。さらに、臨床的見地から考えると、前癌病変の診断を行う際の手段に応用することも可能であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 渡 邊 継 男

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター実験歯肉・口底癌における C-myc 遺伝子のメチル化ならびにC-myc mRNA の 発現の変化とプロテインキナーゼ活性との関係

口腔癌において、発癌と *c-myc* 遺伝子の増幅との関連が注目されている。本論文提出者は口腔癌の発癌機構を解明するために、DMBA 誘発ハムスター歯肉・口底癌を用いて、その発癌過程における *c-myc* 遺伝子のメチル化および mRNA 発現と DMBA 刺激後のプロテインキナーゼ (PKC) 活性などとの関連を検索した。
《 実験 》

生後 4 週齢の雄性ゴールデンハムスターの左下顎舌側歯肉・口底粘膜に、歯科用クレンザーで擦過後、週 3 回、0.5% DMBA アセトン溶液を塗布し、塗布開始後 12 週 (発癌初期) および 28 週で DMBA 塗布側の歯肉歯槽粘膜から口底粘膜にかけての組織を採取し、*c-myc* 遺伝子のメチル化および *c-myc* mRNA の発現について検索した。

また、ヒト歯肉癌細胞株 Ca9-22 を用い、DMBA および PKC、プロテインキナーゼ A (PKA)、カルモジュリンキナーゼ (CaMK) の阻害化学物質を投与した場合の細胞内情報伝達系を介する *c-myc* 遺伝子の発現について検索した。

《 実験結果と結論 》

1. *c-myc* 遺伝子は、発癌初期ではエクソン 1 およびエクソン 3 の両領域でメチル化の程度が高いが、末期ではエクソン 1 領域で低く、エクソン 3 領域で高いことが認められ、*c-myc* 遺伝子は、癌の進行とそのメチル化の程度に関連性があることが推定された。

2. c-myc mRNA の発現は、発癌初期に増強され、末期ではその発現が低下することが認められ、c-myc mRNA の転写活性は癌の進行にともない低下することが示唆された。
3. c-myc mRNA の各エクソンにおける発現はエクソン 1 の領域で他のエクソンと比較して増強していることが認められ、c-myc 遺伝子が転座している可能性が示唆された。
4. DMB A 処理による c-myc mRNA の発現は P K C 阻害化学物質 (H 7) ・ P K A 阻害化学物質 (H-89) および C a M K 阻害化学物質 (K N-62) により抑制されたことから、DMB A による細胞内情報伝達には P K C ・ P K A および C a M K 等が関与していることが明らかになった。
5. このように、DMB A 誘発ハムスター実験歯肉・口底癌においては、細胞内情報伝達系の P K C ・ P K A および C a M K などを通じて、発癌初期には c-myc mRNA の発現がエクソン 1 の領域で増強するものの、さらに癌化が進行すると、c-myc 遺伝子のメチル化が低下することが示されたことから、細胞内情報伝達系の機能と c-myc 遺伝子の発現あるいはそのメチル化との間には深い関係のあることが示唆された。

以上が提出論文の概要である。

審査は審査担当者全員が一堂に会して行われた。研究内容およびその関連事項、さらに、本研究の独創性、今後の発展性などについて種々質問された。これらの質問に対して論文提出者からそれぞれ明快な解答が得られ、論文提出者が本研究を中心に広い学識を有することが認められた。また、本研究は発癌の初期の時点と進行した時点とを観察することにより、細胞内情報伝達系の機能と c-myc 遺伝子の発現との関連を経時的にとらえ、発癌機構の一端を動的に示したことを高く評価された。

以上より、本論文提出者が博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。