

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の進展過程に
おける遺伝子異常の経時的観察に関する研究

学位論文内容の要旨

緒言

近年の分子生物学的知見の集積により、癌の発生・悪性化は癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化を含む複数の遺伝子変化の蓄積によりもたらされると考えられるようになった。この多段階発癌のメカニズムは大腸癌で最も詳細に解析され、正常な粘膜上皮から良性の腺腫を経て大腸癌になる過程で、APC遺伝子の欠失、K-ras遺伝子の突然変異、DCC遺伝子の欠失、p53遺伝子の欠失というように遺伝子変異が段階的に蓄積していくと推測されている。他に、肺癌、肝細胞癌、胃癌、乳癌などでも複数の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の遺伝子異常が確認され、多段階発癌のメカニズムが次第に明らかにされつつある。口腔領域は、白板症などの前癌病変からの癌化・進展過程を容易に観察できる部位でありながら、その解析については従来より免疫組織化学的研究が中心で遺伝子レベルでの研究はあまり行われていない。そのため、口腔癌でどのような遺伝子の異常がどの時期に関与しているかはほとんど不明である。口腔癌の実験モデルのなかでDMBA（9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene）誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の実験モデルでは、正常粘膜上皮は上皮過形成、上皮異形成を経て癌化する。この一連の発癌過程は、ヒト口腔扁平上皮癌での前癌病変からの癌化の過程に良く類似している。現在までのところ、この実験モデルの発癌過程における遺伝子異常の報告の多くは、発癌のある時期における単一の癌遺伝子の異常を検索したものである。また、p53遺伝子に代表される癌抑制遺伝子に関する検索もされていない。発癌モデルにおける多段階発癌過程の遺伝子レベルでのメカニズムを解明するためには、複数の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常を経時的に比較検討する必要がある。そこで本研究は、実験的口腔癌における多段階発癌のメカニズムを明らかにする目的で、DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌を用いて、複数の遺伝子異常を経時的に観察することによ

り、遺伝子異常の蓄積が認められるか否かを検索した。

材料と方法

実験群は生後6週齢の雄性ゴールデンハムスター69匹を用い、10週群(11匹)、12週群(9匹)、14週群(11匹)、16週群(11匹)、18週群(12匹)、20週群(15匹)の6群に分け、0.5%DMBA含有ミネラルオイル溶液を、週3回隔日に、毛筆で左頬嚢の粘膜表面全体に均等に塗布した。DMBA溶液塗布開始後10週、12週、14週、16週、18週、20週の時点で各群ごとに屠殺し、核酸抽出用と病理組織学的検索用試料を採取した。対照群4匹は26週に渡り実験群と同様な操作をミネラルオイルのみで施行した。対象とした癌遺伝子・癌抑制遺伝子とその解析法は、*c-erbB-2* 遺伝子の増幅はサザンプロット法で、*c-myc* 遺伝子の過剰発現はノーザンプロット法で、*c-H-ras* 遺伝子、*c-K-ras* 遺伝子、*p53* 遺伝子の突然変異はPCR-SSCP法ならびに直接塩基配列決定法で検索した。

結果

1. 発癌成績

実験群69例中、10週群で4例、12週群で1例は異形成上皮までにとどまり他はすべて扁平上皮癌であった。対照群4例の上皮は全例、軽度から高度の過形成を示した。

2. 癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常

- 1) *c-erbB-2* 遺伝子: 20週群の1例に増幅が認められた。
- 2) *c-myc* 遺伝子: 過剰発現を示した例は認められなかった。
- 3) *c-K-ras* 遺伝子: 変異の存在を疑わす例はなかった。
- 4) *c-H-ras* 遺伝子: 14週群から20週群までの43例中、12例に変異が確認され、これらはすべて、DMBA誘発の化学発癌で特異的とされるコドン61の2番目の塩基アデニンがチミンに1塩基置換され、アミノ酸はグルタミンがロイシンに置換されていた。変異の経時的変化では14週群から変異頻度が増加する傾向を示し、18週群では36%、20週群では33%に変異が認められた。
- 5) *p53* 遺伝子: 実験群69例中11例に変異が確認され、その内訳はアミノ酸置換をとまなうミスセンス変異が9例、54塩基対の欠失とイントロン6の変異がおのおの1例であった。変異は14週群から発生し16週群、18週群とほぼ同程度の発生率(9~18%)で推移し、20週群で15例中6例(40%)と著明な増加を示した。*p53* 遺伝子の塩基置換様式に一定の傾向は認められなかった。*p53* 遺伝子に変異が生じた症例の病理組織学的特徴を

腫瘍径、組織学的分化度、腫瘍の浸潤様式の3項目で検討したがいずれについても有意な相関は認められなかった。

3. 遺伝子異常の蓄積

c-H-ras遺伝子は12例、p53遺伝子は11例に変異を認めたが、同時に両遺伝子の変異が認められたのは20週群の1例のみであった。また、20週群の1例にc-H-ras遺伝子の変異とc-erbB-2遺伝子の増幅が同時に認められた。このように重複した遺伝子異常は2例にしか認められなかったが、一つ以上の遺伝子異常を起こした腫瘍の割合は14週群より経時的に漸次増加傾向を示し、20週群では67%に達した。

考察

c-K-ras、c-myc遺伝子の異常は認められず、c-erbB-2遺伝子の増幅が20週群の1例においてのみ認められた。したがって、本研究におけるこれらの遺伝子異常の関与の可能性は少ないと思われた。c-H-ras遺伝子の変異は18週群、20週群でそれぞれ36%、33%に認められ、p53遺伝子の変異は20週群で40%と著明に増加した。したがって、c-H-ras遺伝子とp53遺伝子の変異は本研究の癌の進展過程において高度の浸潤能を獲得する進行癌の時期に重要な働きをしている可能性が示唆された。今回検索した遺伝子のうち、c-H-ras遺伝子とp53遺伝子は進行癌において、ともに高率に変異が認められたにも拘らず、両遺伝子変異が同時に認められたのはわずか1例であった。この1例はp53遺伝子のヘテロ接合性の喪失を示し、全症例中、腫瘍径が最大で未分化型であり、腫瘍の浸潤様式が4C型と病理組織学的にも悪性度の非常に高い症例であった。このことは、今回単一の遺伝子変異しか認められなかった腫瘍においても、さらに観察期間を延長し腫瘍の悪性度がより増すと、遺伝子変異が蓄積する可能性が示唆された。また、現在、大腸癌では異なる3つの発癌経路が考えられていることより、本研究においてもp53遺伝子とc-H-ras遺伝子は異なる発癌経路でそれぞれが関与している可能性も示唆された。

結語

本研究では、遺伝子異常の蓄積は少数例にしか確認されなかったが、遺伝子異常を伴う腫瘍の割合は経時的に増加傾向を示したことから、今後他の多くの遺伝子を長期間に渡って検索することにより、本実験系における多段階発癌のメカニズムの解明が可能となると思われた。

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 雨 宮 璋

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の進展過程に おける遺伝子異常の経時的観察に関する研究

癌の発生および悪性化は癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化を含む複数の遺伝子変化の蓄積によると考えられている。この多段階発癌のメカニズムは、正常な大腸粘膜上皮から良性の腺腫を経て大腸癌になる過程について詳細に解析されている。口腔領域では、白板症などの前癌病変からの癌化・進展過程がしばしば観察されているが、複数遺伝子の段階的变化に関する研究は行われていない。また、口腔癌の実験モデルの中でDMBA (9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene) 誘発ハムスター頬嚢粘膜癌では、正常粘膜上皮は上皮過形成、上皮異形成を経て癌化する。この一連の発癌過程は、ヒト口腔扁平上皮癌における前癌病変からの癌化に類似している。

そこで、本論文提出者は、実験的口腔癌における多段階発癌のメカニズムを明らかにする目的で、DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌を用いて、複数の遺伝子を経時的に観察することによって、遺伝子異常の蓄積が認められるか否かを検索した。

材料および方法

生後6週齢のゴールデンハムスター69匹を、10週群、12週群、14週群、16週群、18週群、20週群の6群に分け、0.5%DMBA含有ミネラルオイル溶液を、週3回隔日に、毛筆で左頬嚢の粘膜表面全体に塗布した。DMBA塗布開始後、上記各週の時点で各群毎に屠殺し、核酸抽出用ならびに病理組織学的検索用試料を採取した。対照群は26週にわたり実験群と同様な操作をミネラルオイルのみで施行した。検索対象とした癌遺伝子・癌抑制遺伝子とその解析は、*c-erbB-2* 遺伝子の増幅についてはサザンブロット法で、*c-myc* 遺伝子の過剰発現についてはノーザンブロット法で、*c-H-ras* 遺伝子、*c-K-ras* 遺伝子、*p53* 遺伝子の突然変異についてはPCR-SSCP法ならびに直接塩基配列決定法で行った。

実験結果および結論

- 1) 扁平上皮癌の発生率は、DMBA塗布期間が10週、12週、14週以降でそれぞれ64%、89%、100%であった。
- 2) *c-K-ras*、*c-myc*遺伝子の異常は認められず、*c-erbB-2*遺伝子の増幅が20週群の1例にのみ認められた。したがって、本実験系では、これらの遺伝子異常の関与の可能性は少ないと思われた。
- 3) *c-H-ras*遺伝子の変異は18週群、20週群でそれぞれ36%、33%に認められ、それらはすべてコドン61の2番目の塩基のアデニンからチミンへの点突然変異であった。
- 4) *p53*遺伝子の変異は14週群から出現し、16週群9%、18週群17%の変異率を示し、20週群で40%と著明に増加した。
- 5) *c-H-ras*遺伝子と*p53*遺伝子の変異は、本実験系の癌の進展過程において、高度の浸潤能を獲得する進行癌の時期に重要な働きをしている可能性が示唆された。
- 6) この両遺伝子の変異を共有する腫瘍は1例にしか認められなかったが、この1例は病理組織学的に最も悪性度の高いものであった。このことから、腫瘍の悪性度がより増すと他方の遺伝子変異が発生する可能性が示唆された。しかしながら、両遺伝子は互いに異なる発癌経路で作用している可能性も考えられた。
- 7) 本研究では、遺伝子異常の蓄積は少数例にしか確認されなかったが、遺伝子異常を伴う腫瘍の割合は経時的に増加する傾向を示した。今後、他の多くの遺伝子を長期間にわたって検索することにより、本実験系における多段階発癌のメカニズムの解明が可能になると思われた。

以上が本論文の要旨である。

続いて、各審査担当者から以下の様な種々の質問がされた。

- 1) 実験法に関する詳細。
 - 2) 本研究に関連する他の研究の状況。特に、大腸癌における多段階発癌に関する詳細。さらに、本研究において検索した各遺伝子の選択理由。
 - 3) 本研究の独創性。
 - 4) 本研究の今後の発展性および臨床応用。
- これらの各質問に対して、論文提出者からそれぞれ明快な説明および回答が得られ、本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、本研究内容も高く評価された。
- 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。