

氏名(本籍)	おお た とも のり 太 田 智 則 (東 京 都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1672 号		
学位授与年月日	平成 12 年 11 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Transgenic rats carrying copies of human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to N-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine bladder carcinogenesis (ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットにおけるN-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine膀胱発がん感受性の増強)		
主査	筑波大学教授	医学博士	野 口 雅 之
副査	筑波大学教授	医学博士	中 内 啓 光
副査	筑波大学教授	医学博士	金 子 道 夫
副査	筑波大学助教授	医学博士	西 田 正 人

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

Ha-ras癌遺伝子はヒトの癌組織から最も頻繁に活性型が検出されるものの一つである。そこでヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入マウスが作成され、欠陥肉腫、肺線腫、リンパ腫、皮膚乳頭腫など自然発生腫瘍を生じ、それらの腫瘍に高率な点突然変異の存在が報告されている。一方、ラットでも多くの臓器で種々の発癌モデルが確立しており、前癌ならびに腫瘍性病変の生物学的特性、発がん修飾要因や物質につきマウスより多くの情報が得られている。そこでマウスを用いては解析困難な臓器の発癌と導入遺伝子との関連、発癌感受性につき検討する目的でヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットを作成した。

ヒト及びラットの膀胱癌では低頻度ながらc-Ha-ras遺伝子の点突然変異が報告されている。ヒト及びラットの膀胱癌は大半が表在性で、再発や浸潤癌への進行が問題となっている。そこで膀胱癌にHa-ras遺伝子が与える影響をこのヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットを用いて検討した。

### (対象と方法)

(遺伝子導入ラットの作成) 雌Sprague-Dawley ratを強制排卵させ、雄ラットと交尾させ卵子を採取し、雌雄前核が確認できる卵の核内に自身のプロモーター領域をもつヒト正常型c-Ha-ras遺伝子(6.9kb)を顕微鏡下に注入した。2細胞期まで分化した卵を選別し、偽妊娠状態の雌に移植した。生まれたラットの尾からDNAを抽出し、PCR法、Southern Blottingでヒト正常型c-Ha-ras遺伝子の導入の有無を検索した。導入が確認されたラットと野生型ラットを交配し得られた子孫も同様に遺伝子の導入を検索し、さらにnorthern Blottingで導入遺伝子の発現を検索した。導入遺伝子を3コピー持ち、すべての臓器で発現しメンデルの法則に従い継代されることを確認した。これをJcl:SD-TgN (HrasGen) 128Ncc (Hras128)と命名した。(膀胱発がん) 6週令の雄のHras128ラット(Tgラット) 20匹と非導入ラット(Non-Tgラット) 15匹に0.05%N-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)を10週間飲水投与し、さらに10週間後に屠殺し腫瘍の発生状況を観察した。腫瘍部のDNAを抽出し、PCR-SSCP法、RFLP法で導入遺伝子及び内在性Ha-ras遺伝子の遺伝子変異の有無を、Direct Sequencingで塩基配列の変異を検索した。

また、ImmunoblottingにてBBNを投与していないTgラットとNon-Tgラットの膀胱粘膜におけるRas蛋白の発現を検索した。

#### (結果)

腫瘍発生頻度(乳頭腫, 移行上皮癌)はTgラットで19匹(95%), Non-Tgラットで15匹(100%)と両群間で差を認めなかったが, 一匹あたりの腫瘍数はTgラットで有意に多く( $13.2 \pm 6.9$  vs  $7.1 \pm 5.2$ ) ( $P < 0.01$ ), 腫瘍容量もTgラットで有意に大きかった( $836 \pm 937$  mm<sup>3</sup> vs  $130 \pm 180$  mm<sup>3</sup>) ( $P < 0.01$ )。また, 一匹あたりに発生した移行上皮癌の数はTgラットで有意に多かった( $4.7 \pm 4.2$  vs  $1.3 \pm 1.1$ ) ( $P < 0.05$ )。今回発生した癌病後はそのほとんどが表在性であったが, Tgラットでのみ2匹に筋層浸潤を認めた。

Tgラットより21腫瘍(乳頭腫9, 移行上皮癌12), Non-Tgより25腫瘍(乳頭腫12, 移行上皮癌13)を対象に遺伝子変異を検索した。Tgラットの2移行上皮癌(9.5%)で導入Ha-ras遺伝子のcodon12がGGCからGACに変異しているのを認めた。Non-Tgラットからは1乳頭腫(5.9%)内在性Ha-ras遺伝子のcodon12がGGAからGAAに変異していることを確認した。筋層浸潤を認めた2匹には導入遺伝子, 内在Ha-ras遺伝子ともに変異を認めなかった。BBNを投与していないTgラットの膀胱粘膜は, Non-Tgに比べRas蛋白が2.1倍多く発現していた。

#### (考察)

BBNによる膀胱発癌感受性は, Ha-ras遺伝子の変異の頻度は低いにも関わらずTgラットで高くなっている。正常Ras蛋白の過剰発現により浸潤性への形質が変化したり, 病期に伴いRas蛋白の発現が高くなるという報告などから, 感受性の増強にHa-ras遺伝子の変異そのものは大きな役割を果たしておらず, むしろ過剰発現が重要である可能性があると思われた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

Ha-ras癌遺伝子ヒトの癌組織から最も頻繁に活性型が検出されるものの一つである。そこで著者らはヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットを作成し, マウスを用いては解析困難な臓器の発癌と導入遺伝子の関連, 発癌感受性につき検討している。具体的に検討したのはラット膀胱癌で, 遺伝子導入後N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)による発がん実験系を用いた。結果的に腫瘍発生頻度では遺伝子導入ラットと非導入ラットの間で差を認めなかったが, 一匹あたりの腫瘍数, 腫瘍要領, 一匹あたりに発生した移行上皮癌の数は遺伝子導入ラットで有意に多かった。形成された腫瘍におけるc-Ha-ras遺伝子の突然変異はほとんど見つからなかったが, 発現量は遺伝子導入ラットのほうが2倍以上増加していた。以上の結果のみからはラット膀胱発がんにおけるc-Ha-ras遺伝子の役割を正確に知ることはできないが, 魅力あるモデル実験系を作成できたと考えられる。今後のさらなる解析が期待される。

よって, 著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。