

Title	X線誘発好発癌マウスの分子生物学的解析 : Golden Hamster胎児細胞を用いた癌遺伝子の検索
Author(s)	笹井, 平
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35998">https://hdl.handle.net/11094/35998</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【24】

氏名・(本籍)	きいひし 笹井平
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8101 号
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	X線誘発好発癌マウスの分子生物学的解析 —Golden Hamster 胎児細胞を用いた癌遺伝子の検索—
論文審査委員	(主査) 教授 北村 旦 (副査) 教授 角永 武夫 教授 野村 大成

論文内容の要旨

〔研究目的〕

放射線発癌のメカニズムについては未だ不明な点が多く分子生物学的な解析が進んでいない。野村らは ICR マウス生殖細胞に X 線を照射し、優性遺伝性好発癌マウス系を確立した。この機構には X 線照射による germ line mutation が示唆されるが、この癌化機構の解析の一つのアプローチとして癌遺伝子の検索を行なった。

マウスの癌遺伝子を検索する場合 NIH 3 T 3 ではマウス由来の外來性遺伝子の識別は困難であった。そこで Hetero の系でマウスの癌遺伝子の検索を行うため新しい細胞系が必要となった。本研究では、ハムスター胎児細胞 (GHE) から癌遺伝子に対して高感受性を示す細胞株を分離し、それを用いて X 線誘発好発癌マウスに発生した腫瘍の解析を行なった。

〔方 法〕

1) 供与マウス腫瘍 DNA とその抽出法

X 線誘発好発癌マウスの F 1 ~ 3 に発生した悪性腫瘍 4 株 (NM2596, 2710, 3013, 2305) と、X 線照射により P (NM2057) に発生した骨肉腫 1 株を用いた。DNA の抽出は、組織をホモゲナイズし、SDS 溶液、RNase および Proteinase K 処理し、高分子ゲノム DNA をフェノールクロロホルム法により精製した。

2) DNA トランスフェクション

前日 10cm シャーレに、 $5 \times 10^5$  細胞を植え、1 枚当たり 30~40  $\mu$ g のマウス腫瘍 DNA を磷酸カルシウム法を用いて導入した。24 時間後、低血清培地に移し、以降 3 日間おきに培地交換し 3 週後判定した。

### 3) Southern hybridization

DNAを種々の制限酵素で切断し、10 $\mu$ gをアガロースゲル電気泳動した。泳動後、DNAをナイロンフィルター上に移し、マルチプライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPで標識したプローブとハイブリダイゼーションした。

#### 〔結果〕

#### I Golden Hamster胎児細胞(GHE)を用いた癌遺伝子スクリーニング系の開発

鈴木らによって株化されたGHE-L strainからバックラウンドが低く、しかも癌遺伝子に対する感受性の高い垂株(GHE-C8)と、さらにこれに*c-myc*を導入した(GHE-MC1)を得た。この2つの細胞株は種々の癌遺伝子に対して感受性を示した。N-, H-, K-*ras*に対するフォーカス形成能は、NIH3T3と同程度であったが、*v-mos*の感受性は約10倍高かった。また、focusの形態も癌遺伝子によって特徴があり、逆に形態から原因となる癌遺伝子を推測することも可能である。以上のことから、GHE-C8, MC-1は、癌遺伝子のスクリーニング系として満足できるものと考えられた。

#### II X線誘発マウス悪性腫瘍の癌遺伝子のスクリーニング

##### 1. DNAトランスフェクション

NM2057, NM3013, NM2710の3例がGHEで陽性で、NM2596, NM2710の2例がNIH3T3で陽性であった。GHEで得られたfocusの形態はそれぞれ特徴があり、NM2057からは*ras*様(フジツボ型)のfocus 5個(NM2057 f-11~15)と、非常にrefractileで閲兵状に配列し*v-mos*のfocusに類似するもの(NM2057 f-1)の2種類が得られた。NM3013からは、この2つのtypeの中間型のfocusが得られた。NM2710 f-1は、T24のfocusと類似していた。Secondary transfectionは、NM2057 f-1, f-11~14, NM3013 f-1, NM2710 f-1いずれも、GHE, NIH3T3とともに陽性であった。

##### 2. サザンプロット解析

NM2057 f-1, f-11~14, NM3013 f-1, いずれのGHEの一次形質転換細胞もmouse repetitive sequenceを有し、マウスの遺伝子が導入されていることがわかった。

NM2057 f-11~14, はK-*ras*をプローブにするとハムスター由来のband以外にマウス由来のK-*ras*のband (extra band) が検出された。NM2057 f-1は、N-, H-, K-*ras*についてはextra bandが検出されなかったが、focusの形態が*v-mos*のそれに類似していたため、*mos*をプローブにしたところextra bandが一次、二次形質転換細胞ともに検出された。

NM3013 f-1は、N-, H-, K-*ras*をプローブにした場合extra bandが出現しなかった。しかし、最近ヒト甲状腺癌、大腸癌からGHEで検出された新しい癌遺伝子、*tco*を用いるとマウス由来のextra bandが検出された。NM2710 f-1は、同様にN-, H-, K-*ras*については、extra bandが検出されず、*ras*系以外の癌遺伝子が考えられた。

#### 〔総括〕

1. Golden Hamster胎児細胞を用いて、新しい癌遺伝子スクリーニング系を開発した。この系は、マ

ウスを用いた実験癌の解析に非常に有用と考えられた。

2. GHEとNIH3T3を用いて、X線誘発マウス悪性腫瘍5例を検索したところ、3例に活性のある癌遺伝子が検出された。

3. そのうち1例からK-rasとmosが1例から新しい癌遺伝子tcoが、残りの1例からras系以外の癌遺伝子が検出された。このX線誘発好発癌マウスの癌化ステップに癌遺伝子の活性化が関与する可能性が示唆された。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、ハムスター胎児細胞(GHE)から癌遺伝子に対して高感受性を示す細胞株を分離し、それを用いてX線誘発好発癌マウスに発生した腫瘍の癌遺伝子の解析を行なったものである。従来から癌遺伝子の検索に用いられてきた、マウス細胞NIH3T3ではマウスの癌遺伝子の識別とクローニングは困難であったが、この細胞系の確立により、マウスを用いた*in vivo*発癌実験に於て癌遺伝子の解析が容易となった。実際にこの細胞を用いてX線誘発好発癌マウスに発生した腫瘍の癌遺伝子を解析し、新しい癌遺伝子を含め、高率に活性型癌遺伝子を検出し、このモデルの発癌の過程に癌遺伝子が関与している可能性を示した。医学博士の学位に値する論文と認める。