



Title	K-ras Point Mutation is Associated with Enhancement by Deoxycholic Acid of Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane, but not with Its Attenuation by All-Trans-Retinoic Acid
Author(s)	檜原, 啓之
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42583
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	な ち 原 ひろ 啓 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 1 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科社会系専攻
学 位 論 文 名	K-ras POINT MUTATION IS ASSOCIATED WITH ENHANCEMENT BY DEOXYCHOLIC ACID OF COLON CARCINOGENESIS INDUCED BY AZOXYMETHANE, BUT NOT WITH ITS ATTENUATION BY ALL-TRANS-RETINOIC ACID (デオキシコール酸と all-trans-retinoic acid のアゾキシメタン誘発ラット大腸発癌における K-ras 点突然変異作用に関する検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 津熊 秀明 (副査) 教 授 松澤 佑次 教 授 森本 兼囊

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

近年我が国では大腸癌が増加しているが、その原因の1つとして高脂肪食摂取により便中胆汁酸が増加するためと考えられている。特に二次胆汁酸であるデオキシコール酸(DCA)は、大腸の発癌を強く促進することが知られているが、その発癌機構については不明な点が多い。一方、最近の分子生物学的手法の著しい進歩により ras 遺伝子変異は大腸の多段階発癌過程の比較的早期に生ずる遺伝子異常であり、自然発癌や化学発癌で高率にみられることが明らかとなった。従って本研究では DCA が K-ras 遺伝子変異を惹起するか否かについて検討した。一方、ビタミン A 誘導体の all-trans-retinoic acid (ATRA) は強い分化誘導作用を有し、白血病の治療に用いられている。本研究ではこの ATRA が大腸癌の発生を抑制するか否か検討するとともに K-ras 遺伝子変異に対する影響を検討した。

【方法】

Wistar 系雄性ラット120匹を6群20匹ずつに無作為に分け、全群に発癌剤アゾキシメタン7.4mg/kgを生理食塩水に溶解し週1回5週間皮下注射した。また実験開始時より各群に以下の処置を実験終了まで施した。第1群(対照群)には標準飼料のみを与えオリーブ油のみを皮下注射した。第2群(DCA群)には0.3%DCA含有飼料を経口摂取させ、オリーブ油のみを皮下注射した。第3群(DCA+ATRA低容量群)には0.3%DCA含有飼料を経口摂取させ、オリーブ油に懸濁した0.75mg/kgの ATRA を隔日に皮下注射した。第4群(DCA+ATRA高容量群)には0.3%DCA含有飼料を経口摂取させ1.5mg/kgの ATRA を隔日に皮下注射した。第5群(ATRA低容量群)には標準飼料を経口摂取させ、0.75mg/kgの ATRA を隔日に皮下注射した。第6群(ATRA高容量群)には標準飼料を経口摂取させ、1.5mg/kgの ATRA を隔日に皮下注射した。実験開始45週目に全てのラットを屠殺・剖検し、病理組織学的に検討した。また大腸腫瘍より組織を採取し、PCR-SSCP法を用いてコドン12の変異により K-ras 遺伝子変異を検出するとともに大腸腫瘍とその背景粘膜の proliferating cell nuclear antigen (PCNA) -labeling index を算出した。

【成績】

(1)DCA の効果：対照の第1群では、20匹中6匹(30%)に大腸腫瘍が認められたのに対し、DCA の経口摂取をさせた第2群では、20匹全てのラットに大腸腫瘍が認められ、DCA の長期経口投与により大腸腫瘍の発生が有意に促進された。組織学的には第2群では、腺腫に比し大腸癌の割合が高く、大腸癌の多くは高分化腺癌であった。さらに第1群では、大腸腫瘍の17%に K-ras 点突然変異が認められたのに対し、第2群では、大腸腫瘍の

84%に *K-ras* 点突然変異が認められ、DCA により *K-ras* 点突然変異の頻度は有意に増加していた。*K-ras* 点突然変異の93%は GGT から GAT への変異であった。また、大腸背景粘膜と大腸腫瘍の PCNA-labeling index は DCA の投与により有意に上昇していた。

(2) ATRA の効果：DCA に ATRA を併用投与した第 3 群と第 4 群では、各々 20 匹中 8 匹 (40%)、20 匹中 10 匹 (50%) に大腸腫瘍がみられ、ATRA の併用投与により、DCA 単独投与の第 2 群に比し大腸腫瘍の発生は有意に抑制された。大腸粘膜の labeling index は有意に減少したが、*K-ras* 点突然変異の頻度は第 2 群と差はなかった。一方、ATRA 単独投与の第 5 群、第 6 群では、それぞれ 40%、32% に大腸腫瘍がみられたが、第 1 群との間に有意差はみられず、*K-ras* 点突然変異と labeling index はコントロールと差がなかった。

以上の成績より、DCA 経口投与により *K-ras* 点突然変異が高頻度に惹起され、大腸癌の発生が促進されることを明らかにした。しかしビタミン A 誘導体である ATRA は、DCA により高頻度にみられた *K-ras* 点突然変異を抑制せず、大腸粘膜の PCNA-labeling index を低下させて DCA の発癌促進作用を抑制することを確認した。

【総括】

DCA は *K-ras* 点突然変異の頻度を増加させることにより大腸発癌を促進し、ATRA は *K-ras* 点突然変異には影響せず細胞増殖の減少により大腸発癌を抑制することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究はラット化学発癌モデルにおける *K-ras* 点突然変異に対するデオキシコール酸と all-*trans*-retinoic acid の効果を検討したものである。PCR-SSCP 法を用いて *K-ras* 遺伝子変異を検出し、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) -labeling index を算出した。デオキシコール酸の経口投与により *K-ras* 遺伝子の点突然変異は高頻度となり、大腸癌の発生が促進されることを明らかにした。しかし all-*trans*-retinoic acid は、デオキシコール酸により高頻度にみられた *K-ras* 点突然変異には影響を与えることなく、大腸粘膜の PCNA-labeling index を低下させてデオキシコール酸の発癌促進作用を抑制することを確認した。本論文は大腸癌の 1 次予防を考える上で示唆に富む研究であり、学位に値するものとする。