



Title	Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the human colorectal polyps consecutively maintained in SCID mice
Author(s)	谷口, 英治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44391
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	谷口英治
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17335号
学位授与年月日	平成14年10月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Effects of <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine on the human colorectal polyps consecutively maintained in SCID mice (SCIDマウスに継代維持されたヒト大腸ポリープに対する <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidineの影響)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 嘉
	(副査) 教授 門田 守人 教授 野村 大成

論文内容の要旨

[目的]

有害物質の人体への直接影響を研究・評価することは不可能であるため、疫学調査か培養ヒト細胞、動物実験から推測する方法が用いられてきた。しかし、改良された重度複合免疫不全(Severe Combined Immunodeficient; SCID)マウスでは、ヒト良性腫瘍や前癌病変のみならず、ヒト正常臓器・組織の長期にわたる継代・維持が可能となってきたため、SCIDマウスに継代・維持された臓器・組織に環境有害物質等を直接作用させることにより、*in vivo*でのヒト組織に対する影響を研究・評価することが可能となった。

本研究では、改良SCIDマウスに、ヒト良性大腸ポリープを移植し、長期にわたり継代・維持し、発癌物質*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)を繰り返し投与し、ヒト消化管組織に対する影響、とりわけ大腸がん発生に関与する癌遺伝子*K-ras*、癌抑制遺伝子*p53*に対する影響を検討することを目的とする。

[方法および結果]

1) ヒト良性大腸ポリープの継代・維持とMNNG投与

血清IgGとIgMが検出限界(1 μg/ml)以下のC.B17-*scid/scid*マウスを21代以上selective inbreedingした改良SCIDマウスを用いた。治療のために摘出されたヒト良性大腸ポリープ31個(家族性大腸腺腫症患者から採取した16個を含む)から作成した48組織片を改良SCIDマウスの皮下に移植した。マウスが弱ると、移植片を摘出して別のSCIDマウスへの再移植を繰り返すことにより、最長25ヶ月にわたりヒト良性大腸ポリープを維持・観察した。初回移植時にリンパ芽球の浸潤や移植部位での感染のために失った14組織片を除く34組織片(70.8%)が生着した。初回移植より3ヶ月経過後に、MNNG投与群と非投与群の2群に分けた。MNNG投与群では、1ヶ月に1回、移植片を摘出してMNNG(200 μg/mlリン酸緩衝液、pH 5.0)0.1 mlを直接注入し、pH 9.0リン酸緩衝液で中和後、再度SCIDマウスに移植した。途中、事故で失った1移植片を除く全例が、維持された。この間、必要に応じて移植片を採取し、組織学的検討と分子生物学的検討を行った。

2) ヒト良性大腸ポリープ移植片の形態学的検討

ヒト良性大腸ポリープ移植片は、肉眼的には粘液様半透明で軟らかく、組織学的には細胞質内に多量の粘液を含有する腺管状構造を有していた。大きさは、移植後 4 ヶ月までは粘液貯留によると考えられる増大傾向を認めた後に若干減少し、MNNG 非投与群では、移植後 18 ヶ月で初回移植時の約 75% となったのに対し、MNNG 投与群では、MNNG 投与を繰り返すことにより、徐々に硝子化変性と石灰化を来し、腺構造部分が減少していった。大きさに関しても移植後 18 ヶ月で、初回移植時の約 35% と縮小し、残存したわずかの腺構造部分の細胞にも pycnosis が見られた。

3) 癌遺伝子 *K-ras*、がん抑制遺伝子 *p53* の検討

移植前のポリープから採取した 9 組織片とこれらのポリープを細分して SCID マウスで継代・維持した移植片から採取した 37 組織片 (MNNG 投与群 16 移植片からの 21 組織片と無処置群 14 移植片からの 16 組織片) について、*K-ras* Exon 1、*p53* Exon 5、6、7、8 の変異を PCR-SSCP-Direct Sequencing 法にて検出した。

9 個のポリープのうち 2 個に、移植前より *K-ras* Exon 1 の codon 13 に点突然変異 (GGC→GGT; Gly→Gly) が存在し、この変異は、実験終了まで SCID マウスで維持された移植片において維持された。また、MNNG 非投与群の 14 移植片には新しい変異は認めなかつたが、MNNG 投与群 16 移植片のうち 6 移植片 (37.5%) に *K-ras* Exon 1 において新しい点突然変異が検出された。codon 12 の変異 (GGT→GAT; Gly→Asp) 5 例と、codon 13 の変異 (GGC→GGT; Gly→Gly) 1 例であった。これらのうち 2 例 (codon 12) は、移植前から codon 13 に変異 (GGC→GGT; Gly→Gly) を有するポリープの移植片に新たに起こった突然変異であった。全ての変異は追跡観察によっても認められ、実験終了まで維持されており、いずれも transition mutation であった。

全例において *p53* の変異は認めなかつた。

[総括]

1. 改良 SCID マウスに、ヒト良性大腸ポリープを長期間継代・維持し、がん原・変異原物質である MNNG の影響を経時的に観察した。
2. MNNG 投与により、移植ヒト良性大腸ポリープ組織に、強い肉眼的、組織学的変性と腺構造の消失が見られた。
3. MNNG 長期間投与により、有意に高率に *K-ras* 遺伝子の codon 12 (GGT→GAT; Gly→Asp) に突然変異が誘発された。
4. 本研究は、大腸がん発生過程における環境がん原・変異原物質と *K-ras* 遺伝子の変異の関与をヒト組織を用い実験的に証明したものである。

論文審査の結果の要旨

有害物質の人体への直接影響を研究・評価することは不可能であるため、疫学調査か培養ヒト細胞、動物実験から推測する方法が用いられてきた。しかし、改良された重度複合免疫不全マウス (SCID マウス) では、ヒト良性腫瘍や前癌病変のみならず、ヒト正常組織の長期にわたる継代・維持が可能となってきた。本研究では、改良 SCID マウスに、ヒト良性大腸ポリープを移植し、長期にわたる継代・維持を試み、マウスの体内で維持されたヒト良性大腸ポリープに対する発癌物質 MNNG の影響、とりわけ、癌遺伝子 *K-ras*、癌抑制遺伝子 *p53* の変異を検討することを目的とした。

ヒト良性大腸ポリープ 31 個から作成した組織片 48 個を改良 SCID マウスの皮下に移植したところ、初回は 70.8% の生着率であったが、以後はほぼ 100% 生着・維持した。組織学的には、無処置群の移植片は細胞質内に多量の粘液を含有する腺管状構造を有していた。一方、MNNG 投与群の移植片は、MNNG 投与を繰り返すことにより、徐々に硝子化変性や石灰化を来した部分が増加していった。

これらの検体について、*K-ras* Exon 1、*p53* Exon 5、6、7、8 の変異を解析した。移植前より存在した点突然変異は移植片内で長期間維持された。また、無処置群の検体には新しい変異は認めなかつたが、MNNG 投与群 16 移植片

のうち 6 個 (37.5%) に *K-ras* Exon 1 において新しい点突然変異が検出された。5 個は codon 12 (GGT→GAT ; Gly→Asp) で、1 個は codon 13 (GGC→GGT ; Gly→Gly) であった。さらに、これらの変異は追跡観察によっても認められ、維持されていることが分かった。全検体において *p53* の変異は認めなかった。

以上の結果は、ラット大腸がん発生の initiator と考えられる MNNG による *K-ras* 遺伝子の変異の関与をヒト組織を用い実験的に証明したものであり、学位の授与に値すると考えられる。