

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44391">https://hdl.handle.net/11094/44391</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>〉</a> をご参照ください。

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

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

Osaka University

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 暉  (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  $\mu$ g/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 ケ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 ケ月経過後に、MNNG 投与群と非投与群の 2 群に分けた。MNNG 投与群では、1 ケ月に 1 回、移植片を摘出して MNNG (200  $\mu$ g/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ったが、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* の変異は認めなかった。

#### [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・維持しえた。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ったが、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。