

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	森岡 千尋
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 田沼 順一 (副 査) 朝日大学歯学部教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部教授 永原 國央
論 文 題 目	トランスジェニックラットを用いた舌癌感受性遺伝子 <i>NQO1</i> の解析

論文内容の要旨

【目的】

発がんを解明するために利用されるモデル動物は、環境因子である発がん要因と宿主の遺伝要因の複雑な相互作用を解析する有用なツールであり、動物実験なくしてヒトの発がん過程を詳らかにすることは不可能であることは言うまでもない。我々のグループはこれまでにラット舌癌発生のモデル動物を確立し、その実験系に連鎖解析やQTL解析を応用させて舌癌感受性を左右する遺伝子の発見に努めてきた。その結果、DAラットは4NQO誘発ラット舌癌発生に対して感受性が高く、一方 WFラットは抵抗性であることを明らかにした。さらにこの2系統のラットを用いた連鎖解析およびQTL 解析の結果より、5つのQTL(量的形質遺伝子座)である *Tcas1-5* が個々の舌癌の最大径や舌癌の個数に相関することを明らかにした。しかし、これらQTLの1つ1つがどの程度発がん感受性に関連しているのかは未だ不明である。

そこで今回5つのQTLの中よりLOD scoreが一番高い *Tcas1* 領域の数十個候補遺伝子を選抜し、どの遺伝子がどの程度関与しているのかを検証し、*Tcas1* の有力な候補遺伝子の1つである *NAD(P)H: Quinone oxidoreductase1(NQO1)* をさまざまな方法を用いて解析した。

【方法】

(1) ラット舌癌発生モデル動物の作製と標本作製

6週齢の雄DAラット20匹に0.001%発がん剤4NQOを180日間水溶液にて経口投与した。H-E染色にてWHOの上皮異形成診断基準に従い病理組織学的検索を行った。

(2) モデル動物によるマイクロアレイ解析

直径5mm以上の舌癌組織とコントロールの舌組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。各々の組織からRNAを抽出し、ラット舌癌組織とコントロールの舌組織を比較検討した。

(3) トランスジェニック (Tg) ラットの作製

1) 導入遺伝子の構造：導入遺伝子は発現を制御する配列を有する，“CMV IE enhancer/ β -actin promoter, Intron, DAラットの *NQO1* 遺伝子のcDNA clone, β -globin/polyA”である。

2) Tgラットのスクリーニング

Tgラットは、Southern blotting法による解析で *NQO1* 遺伝子の有無を確認する。

(4) Tgラットの発がん実験

NQO1 遺伝子が導入された Tg ラットを PCR 法で確認するためプライマーを設計した。選抜した6週齢の雄 Tg ラット 20 匹に 0.001% 発がん剤 4NQO を 180 日間水溶液にて経口投与を行った。

(5) Tg ラットの定量リアルタイム PCR 解析

15 匹の Tg ラットを用いて発がん実験を行い、5mm 以上の舌癌組織と 10mm 以上の舌癌組織およびコントロールの舌組織から total RNA を抽出した。NQ01 や *Junb* およびハウスキーピング遺伝子 *18S* を用いて解析を行った。

(6) Tg ラットの免疫染色

15 匹の Tg ラットを用いた標本は H-E 染色して、別の切片を用いて免疫染色を行った。1 次抗体は NQ01 抗体と *Junb* 抗体を用いて染色は通法にて行った。

【結果】

(1) 発がん実験の結果

WHO の上皮異形成診断基準の所見が 3 項目以下であった 2 例を Hyperplasia, 4 項目以上 8 項目以下の 5 例を Mild epithelial dysplasia, 9 項目以上 13 項目以下の 5 例を Moderate epithelial dysplasia および 14 項目以上の 3 例を Severe epithelial dysplasia とした。基底膜を超えて間質側に浸潤した 5 例を SCC とした。

(2) マイクロアレイの解析結果

Tcas 1 領域における舌癌関連遺伝子を特定するため、マイクロアレイ解析と Rat Genome Database から *Tcas 1* 領域には舌癌関連遺伝子 20 個を特定できた。NQ01 の発現量が有意に大きかった (21 倍, $P < 0.001$)。よって導入する遺伝子を NQ01 とした。

(3) Tg ラットのスクリーニング

NQ01 遺伝子を導入した陽性 Tg ラットを交配させて、陽性 Tg ラットを繁殖させ、PCR 法のタイピングでは 500bp の DNA の存在を確認した。

(4) Tg ラットの発がん実験結果

20 匹の Tg ラットの発がん実験後、10 例が Dysplasia, 5 例が直径 5 mm 以上の舌癌 (TC>5mm), 5 例が直径 10mm 以上の舌癌 (TC>10mm) であった。コントロール 3 例は Normal とした。

(5) Tg ラット発がん実験後のリアルタイム PCR 解析

TC>10mm の舌癌では NQ01 mRNA の発現量は、正常と比較して 40 倍以上の値を示し、NQ01 mRNA 発現量は舌癌が大きくなるに従い有意な高値を示した。一方 *Junb* には有意な差は見られなかった。

(6) Tg ラットの免疫染色による解析結果

TC>10mm の Tg ラット 5 匹, TC>5mm の Tg ラット 5 匹および Dysplasia の Tg ラット 5 匹に対して NQ01 と *Junb* の免疫染色の結果から、舌癌の大きさが増加するのに従い、陽性と判定される舌癌ラットの割合が増加した。舌癌の大きさと NQ01 陽性率の間には有意な差を認めた ($P < 0.001$)。

【考察および結論】

(1) QTL 解析による *Tcas 1* 領域におけるマイクロアレイ解析の結果より、20 個の発がん関連遺伝子を見出され、NQ01 と *Junb* 遺伝子を舌癌感受性遺伝子の候補遺伝子とした。特にその中でも NQ01 遺伝子の発現量は極めて高い値を示したので、導入遺伝子は NQ01 遺伝子を選抜できた。

(2) NQ01 遺伝子を導入した Tg ラットを作製することに成功した。発がん実験により、この Tg ラットは、ヒト舌発がんの動物モデルに適していることが確認できた。

(3) 上記を考え合わせると、NQ01 遺伝子は舌癌発生の感受性に関連するマーカーとして有用であることが示唆された。