

## 学 位 論 文 審 査 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
<p><u>論文審査の要旨</u></p> <p>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 <i>Tcas1-5</i>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。</p> <p>そこで今回5つのQTLの中よりLOD scoreが一番高い <i>Tcas1</i>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、<i>Tcas1</i>の有力な候補遺伝子の1つである <i>NAD(P)H: Quinone oxidoreductase1(NQO1)</i>をさまざまな方法を用いて解析した。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>③ トランスジェニック (Tg) ラットの作製：1) 導入遺伝子は発現を制御する配列を有する，“CMV IE enhancer/<math>\beta</math>-actin promoter, Intron, DAラットの<i>NQO1</i>遺伝子のcDNA clone, <math>\beta</math>-globin/polyA”である。2) Tgラットは、Southern blotting法による解析で<i>NQO1</i>遺伝子の有無を確認する。</p> <p>④ Tgラットの発がん実験では、<i>NQO1</i>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。</p> <p>⑤ Tgラットの定量リアルタイムPCR解析では、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。<i>NQO1</i>や<i>Junb</i>およびハウスキーピング遺伝子<i>18S</i>を用いて解析を行った。</p>	

⑥ Tg ラットの免疫染色は、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 NQO1 抗体と Junb 抗体を用いて染色は通法にて行った。

最初に発がん実験の結果では、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。次にマイクロアレイの解析結果から、*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。*NQO1* 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 *NQO1* とした。*NQO1* 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。

Tg ラットの発がん実験結果から、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。この結果より、TC>10mm の舌癌では *NQO1* mRNA の発現量は、正常と比較して 40 倍以上の値を示し、*NQO1* 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。さらに、Tg ラットの免疫染色による解析では、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 NQO1 と Junb の 1 次抗体を用いて免疫染色を行った。解析方法は 100 倍の拡大率で解析ソフト WinROOF を用いて、カットオフスコアが 10% より高値を陽性、10% より低値は陰性とした。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 NQO1 陽性率の間には有意な差を認められた ( $P < 0.001$ )。

以上より、

(1) QTL 解析による *Tcas1* 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、*NQO1* 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 *NQO1* 遺伝子の発現量は他の遺伝子より極めて高い値を示したので、導入遺伝子は *NQO1* 遺伝子を選抜できた。

(2) *NQO1* 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、*NQO1* 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。

よって、審査委員は本論文が口腔病理学・口腔外科学の臨床に寄与することを高く評価し、博士(歯学)の学位を授与に値すると判定した。