

論 文 要 旨

**Gene Expression Profiling during Rat Mammary
Carcinogenesis induced by
7,12-Dimethylbenz[a]anthracene**

〔7,12-Dimethylbenz[a]anthracene 誘発ラット乳癌の発生過程における
遺伝子発現プロファイリング〕

早田 正和

【序論および目的】

近年、日本における乳癌罹患率の増加や画像診断の進歩などに伴って、異形乳管過形成などの境界病変に相当する微小な乳管内増殖病変を診断する機会が増えてきている。このような病変は、非浸潤癌や浸潤癌の近傍に見られることが多く、ヒト乳癌の多段階発癌機構を解明する上でも注目されている。しかしながら、これらの病変は偶発的に見つかることが多く、また微小なため、網羅的な遺伝子発現解析は困難である。そこで我々は、ヒト乳癌の動物モデルとして広く用いられている 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発ラット乳癌モデルを用いて網羅的な遺伝子発現解析を試みた。ラット乳癌モデルを用いたマイクロアレイ解析の報告は少なく、その多くが正常部と癌部を比較した遺伝子発現解析であり、間質や炎症細胞を含む組織全体から採取されている。また、ラット乳腺において、発癌物質の標的部位であり、癌の発生母地とされている乳腺内 terminal end buds (TEBs) での網羅的遺伝子発現解析は未だ報告されていない。今回我々は、形態的に細胞を区別し採取できる laser microdissection (LMD) 法を用いて TEBs, ductal carcinoma *in situ* (DCIS) 及び invasive mammary carcinoma (MC) を採取し、マイクロアレイ及び遺伝子のネットワーク解析、real-time 定量 PCR、免疫染色そして Western blotting を行うことによってヒト乳癌の多段階発癌機構の解明に寄与することを目的とした。

【材料および方法】

1. 生後 50 日目の Sprague-Dawley (SD) ラットに sesame oil (0.05ml, control) 及び DMBA (20mg/ 0.05ml sesame oil) を投与。その後 2, 6, 8 週目の腹部乳腺 (number4-6) を採取し、ホルマリン固定パラフィン標本及び whole mount (alum carmine 染色) 標本を作製後、DCIS と MC の発生率及び発生個数を検索した。
2. 生後 50 日目の SD ラットに sesame oil (0.05ml) 投与後 2 週目の乳腺内 TEBs (control) , DMBA (20mg/ 0.05ml sesame oil) 投与後 2 週目の乳腺内 TEBs (DMBA-TEBs) , 6 もしくは 8 週目に発生した DCIS を、乳腺凍結ブロックより薄切後トルイジンブルー染色で確認し、6 μ m の厚さで薄切した連続切片を LMD 用フویل付スライドガラスに貼付し、LMD を用いて正確に採取後 total RNA を抽出した。同時に 6 もしくは 8 週目に発生した MC を採取し、同様に total RNA を抽出した。その後、Agilent 社のマイクロアレイプロトコールに従い RNA の品質チェック、増幅及びラ

ベル化、ハイブリダイゼーション、スキャナーによるシグナルのスキャン、イメージの数値化を行った。その後、数値化したデータを用いて control に対する DMBA-TEBs, DCIS, MC それぞれの遺伝子発現解析を GeneSpring ソフトウェアを用いて行った。また、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて遺伝子のネットワーク解析を行った。注目した遺伝子については real-time 定量 PCR、免疫組織化学染色、ウェスタンブロットを用いて mRNA 及び蛋白の発現を確認した。

【結果】

1. Control 群では DCIS, MC 共に観察されなかった。DMBA 投与群においては、4 週目までは DCIS 及び MC 共に観察されなかったが、6 週目において DCIS の発生率及び発生個数は 20% (5 匹中 1 匹) で 1 個、8 週目では 60% (5 匹中 3 匹) で 3 個だった。MC の発生率及び発生個数は 6 週目において 30% (20 匹中 6 匹) で 7 個、8 週目では 85% (20 匹中 17 匹) で 29 個だった。
2. Control に対して 2 倍以上発現変化した遺伝子が、DMBA-TEBs の 63 遺伝子から、DCIS で 798 遺伝子、MC で 981 遺伝子と、徐々に増加していた。抗アポトーシス機能をもつ PEP-19 (purkinje cell protein 4) 遺伝子の発現のみ control に対して、DMBA-TEBs (4 倍), DCIS (10 倍), MC (16 倍) と全てにおいて有意に発現増加していた ($p < 0.05$)。細胞外基質分解酵素の一つ MMP-13 (matrix metalloproteinase) 遺伝子は、control に対して DCIS (19 倍), MC (61 倍) と有意に発現増加していた ($p < 0.01, p < 0.05$)。分泌性リン酸化タンパク質の OPN (osteopontin) 遺伝子は DCIS (6 倍), MC (8 倍) と有意に発現増加していた ($p < 0.01, p < 0.05$)。また、細胞外基質分解酵素の一つである MMP-7 遺伝子は、MC で 4 倍と control に対して有意に発現増加していた ($p < 0.05$)。基底膜構成成分の Nidogen-1 遺伝子、脈管形成の阻害物質である TSP-2 (thrombospondin-2) 遺伝子、転写制御因子の COUP-TFI (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I) 遺伝子は、DCIS (4 倍、9 倍、17 倍), MC (10 倍、37 倍、100 倍) と有意に発現減少していた ($p < 0.05$)。
3. IPA ソフトウェアを用いたネットワーク解析では最も有意なネットワークに、DCIS では Akt groups, MC では ERK (MAPK) groups が含まれていた。

【結論及び考察】

今回実験に用いた DMBA 誘発ラット乳癌モデルにおいて、今までに報告されていない遺伝子発現変化が多数同定され、これら遺伝子の大部分はヒト乳癌でも重要視されているものであった。さらにネットワーク解析においてもヒト乳癌で重要なシグナル伝達系である Akt と ERK(MAPK) の関与が示唆された。これらの結果から、ラット乳癌モデルにおける LMD を用いた遺伝子発現解析は、発癌過程の各段階において遺伝子発現プロファイルの変化を同定することができ、ヒト乳癌の多段階発癌機構の解明に有用であることが示唆された。また、形態的に変化の乏しい DMBA 投与後 2 週目の TEBs において、ヒト及びラット乳癌では現在まで報告されていない PEP-19 遺伝子の発現上昇が見られたことから、乳腺の発癌過程の極く早期において深く関わっている可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 75 号	学位申請者	早田 正和
審査委員	主査	米澤 傑	学位
	副査	堂地 勉	副査
	副査	夏越 祥次	副査
			博士 (医学)
			郡山 千早
			東 美智代

Gene Expression Profiling during Rat Mammary Carcinogenesis induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene

(7,12-Dimethylbenz[a]anthracene 誘発ラット乳癌の発生過程における遺伝子発現プロファイリング)

【目的】近年、乳癌の増加に伴い境界病変などの乳管内増殖病変が増加している。このような病変は非浸潤癌や浸潤癌の近傍に見られ、ヒト乳癌の多段階発癌機構を解明する上で注目されている。しかし、これらの病変は微小であり網羅的な遺伝子発現解析が困難である。そこで学位申請者らは、ヒト乳癌の動物モデルとして広く用いられている 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発ラット乳癌モデルを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、ヒト乳癌の多段階発癌機構の解明に寄与することを目的とした。

【材料】生後 50 日目の Sprague-Dawley ラットを用い、control 群に 1ml の sesame oil、DMBA 投与群では、20mg の DMBA を含む 1ml の sesame oil を胃に 1 回投与後、2 週目に癌の発生母地とされている新生乳管先端部の terminal end buds (TEBs) を両群採取した。さらに DMBA 投与で誘発された 6 週目の非浸潤癌、8 週目の浸潤癌を採取した。

【方法】発癌に至る形態変化の各段階である、TEBs、非浸潤癌 及び浸潤癌 の凍結組織より、細胞単位で分取できる laser microdissection 法を用いて組織を採取し、網羅的な遺伝子発現解析に加え、多数の分子の相互作用を一度に解析出来る Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアによる解析を行った。

【結果】抗アポトーシス機能をもつ purkinje cell protein 4 (PEP-19) 遺伝子の発現のみ control に対して、TEBs (4 倍)、非浸潤癌 (10 倍)、浸潤癌 (16 倍) と有意に発現増加していた ($p < 0.05$)。細胞外基質分解酵素の一つ matrix metalloproteinase 13 遺伝子は、control に対して非浸潤癌 (19 倍, $p < 0.01$)、浸潤癌 (61 倍, $p < 0.05$) と有意に発現増加していた。分泌性リン酸化タンパク質である osteopontin 遺伝子は、非浸潤癌 (6 倍, $p < 0.01$)、浸潤癌 (8 倍, $p < 0.05$) と有意に発現増加していた。また MMP-7 遺伝子は、浸潤癌で 4 倍と control に対して有意に発現増加していた ($p < 0.05$)。

基底膜構成成分の Nidogen-1 遺伝子、脈管形成の阻害物質である thrombospondin-2 遺伝子、転写抑制因子の chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I 遺伝子は、非浸潤癌 (4 倍、9 倍、17 倍)、浸潤癌 (10 倍、37 倍、100 倍) と有意に発現減少していた ($p < 0.05$)。IPA ソフトウェアを用いたネットワーク解析では最も有意なネットワークに、非浸潤癌では細胞死と細胞生存に関わる Akt 経路、浸潤癌では細胞増殖に関わる ERK 経路が含まれていた。

【考察】本研究はヒト乳癌の多段階発癌機構を解明する目的で行った研究であり、DMBA 誘発ラット乳癌モデルにおいて、ラットでは今までに報告されていない遺伝子発現変化や細胞内増殖シグナル伝達経路が、非浸潤癌、浸潤癌と多段階に起こり癌化を促していることを明らかにした。これらはヒト乳癌で重要な遺伝子やシグナル伝達系であることから、DMBA 誘発モデルがヒト乳癌の多段階発癌機構の解明に有用であることが示唆された。また、現在まで乳癌との関連は報告されていない PEP-19 遺伝子の発現増加が、乳癌の発癌過程の極く早期において深く関わっている可能性を初めて示唆した。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 75 号	学位申請者	早田 正和
審査委員	主査	米澤 傑	学位 博士 (医学)
	副査	堂地 勉	副査 郡山 千早
	副査	夏越 祥次	副査 東 美智代
<p>主査および副査の5名は、平成21年 10月 5日、学位申請者 早田 正和 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 多段階発癌機構におけるヒト乳癌とラット乳癌モデルの違いは？ (回答) ヒト乳癌の発生と進展には、癌抑制遺伝子や癌遺伝子の異常発現に加えて新生血管形成能や浸潤能の獲得などの多段階ステップが必要と言われている。ラット乳癌モデルにおいても浸潤・転移と関連が深い MMP-7, MMP-13, osteopontin (OPN) などの異常発現が非浸潤癌と浸潤癌で段階的に発現が増強していた。しかしながら、PEP-19の発現はラット乳癌、ヒト乳癌いずれにおいても報告されていない。</p> <p>質問2) DMBA の投与方法を変えた場合、組織形態や悪性度が変わるのか？ (回答) DMBA は、胃に直接投与することで乳癌を発生させる発癌物質であり、投与時期の違いで癌の発生率が変化するが、組織形態や悪性度に変化はない。</p> <p>質問3) MMP-7 の発現は、他の遺伝子とは異なり、DMBA 投与後 terminal end buds (TEBs) で減少後、浸潤癌で発現増加したのはなぜか？ (回答) DMBA 投与後 TEBs での発現減少は、定量 PCR により有意差が得られていない。浸潤癌での発現増加は、浸潤に関与していることから発現増加したものと考えている。</p> <p>質問4) 間質と上皮、両方でマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った報告はあるのか？ (回答) ヒト乳癌で非浸潤癌、浸潤癌の上皮、間質をそれぞれ LMD で採取後遺伝子解析を行った報告が少数ある。</p> <p>質問5) 非浸潤癌と浸潤癌との位置関係は？ (回答) 非浸潤癌は、DMBA 投与後6週目では、単独で見られるが、8週目では浸潤癌の近傍に見られることが多い。</p> <p>質問6) 非浸潤癌と浸潤癌での形態学的差違は？ (回答) 顕微鏡下でしか観察しえないものを非浸潤癌、目視可能で病理組織学的に浸潤している腫瘍を浸潤癌とした。</p> <p>質問7) なぜ、ヒト乳癌は増えているのか？ (回答) 食生活などの欧米化による初潮年齢の早期化、晩婚化、初産年齢の高齢化、肥満などが主な要因とされているが、それだけでは十分説明できないと考えられている。</p> <p>質問8) DMBA 乳癌の発生メカニズムは？ (回答) DMBA は、乳腺上皮細胞の DNA 合成が旺盛な TEBs の細胞に取り込まれ、DMBA-DNA 付加体を形成する。TEBs では付加体の排泄効率が悪く、変性した DNA の蓄積により乳癌を発生させると言われている。</p> <p>質問9) DMBA 乳癌とエストロゲンとの関連性は？ (回答) DMBA 乳癌は、卵巣摘出で発生及び進展が強く抑制されるエストロゲン依存性の癌である。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 1 0) DMBA 乳癌モデルが、ヒト乳癌の早期診断、治療に応用できるのか？

(回答) DMBA 乳癌モデルは、ヒト乳癌同様ホルモン依存性癌であり、多段階発癌過程における形態変化が観察可能である。本研究ではヒト乳癌で報告されている遺伝子やシグナル伝達経路の異常が見られたことから、ヒト乳癌の早期診断・治療に応用可能である。

質問 1 1) PEP-19 の関与は何%なのか？

(回答) 形態的変化の殆ど見られない DMBA 投与後 2 週目の TEBs で、2 倍以上有意に発現増加したのは PEP-19 のみであることから、DMBA 乳癌発癌過程の極めて早期への関与は非常に高いと考えている。

質問 1 2) OSP が、非浸潤癌・浸潤癌で発現増加したのはなぜか？

(回答) OSP は、ヒト乳癌を含む多くの癌の悪性化に関与している。DMBA 乳癌モデルでも同様に関与し、発現増加したものと考えている。

質問 1 3) 子宮内膜癌における、PEP-19 遺伝子発現の予測は？

(回答) 子宮内膜癌は、乳癌と同様にエストロゲン依存性癌であり、子宮内膜過形成や異型子宮内膜過形成などの前癌病変に発現増加が見られる可能性があると考えている。

質問 1 4) DMBA 以外の物質を使ったモデルはあるか？

(回答) アルキル化物質(MNU)やヘテロサイクリックアミン(PhIP)を用いた乳癌モデルがある。

質問 1 5) ヒト乳癌における間質系細胞の役割は？

(回答) 間質を形成する線維芽細胞や筋線維芽細胞、また、乳癌間質内に浸潤する炎症細胞が、互いに細胞間接着分子と細胞外基質を介する直接接触によって、また様々な MMPs が癌の血管新生、増殖、浸潤に関与している。

質問 1 6) 発現差のある遺伝子を抽出するのに、2 倍以上と 5 倍以上の 2 つの cut-off 値を用いた理由は？

(回答) 一般的に 2 倍以上の変化で発現差のある遺伝子を抽出するが、遺伝子数を絞り、解析の信頼性を高めるため 5 倍以上の差で抽出を行った。

質問 1 7) 遺伝子発現解析と Ingenuity pathways analysis (IPA) 解析の結果に違いがあるのはなぜか？

(回答) 遺伝子発現解析は、発現差のある遺伝子より興味ある遺伝子を抽出したのに対し、IPA 解析では、発現差のある遺伝子全てをネットワーク解析に使用したものであり、解析方法が異なっているためと考えている。

質問 1 8) DMBA ラット乳癌モデルは、転移するのか？

(回答) 転移はまれである。

質問 1 9) DMBA に似た構造は、自然界に存在するのか？

(回答) 肉の加熱処理中に発生する、DMBA に似た構造の発癌物質であるアントラセン系物質がある。

質問 2 0) TEBs と非浸潤癌の中間病変は、ラット乳癌モデルで観察可能なのか？

(回答) 前癌病変である Intraductal proliferation があり、観察可能という報告がある。

質問 2 1) ヒト乳腺で、LMD を用いたマイクロアレイの報告はあるのか？

(回答) LMD を用いてマイクロアレイを行った報告が少数ある。

質問 2 2) パラフィンブロックを用いた遺伝子発現解析は可能か？

(回答) ホルマリン固定までの時間や固定時間に強く影響され、全例可能というわけではない。

質問 2 3) 小脳のプルキンエ細胞に発現している PEP-19 が、なぜ乳癌に発現したのか？

(回答) 理由は不明であるが、DMBA 乳癌の発生は強いエストロゲン依存性であり、エストロゲン誘導性遺伝子である PEP-19 の発現が促された可能性があると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。

質問10) アミパレン投与量 4kJ/kg/hr はどのようにして決めたのか。

(回答) 投与量に依存して体温上昇効果は高まるが、安全な投与量についてはまだ明確な基準はない。健常ボランティアに 4kJ/kg/hr 以上投与すると気分不良をきたしたという報告があり、この投与量を最大量と考えた。

質問11) 術後に合併症等はなかったか。

(回答) 術後1日目の血液検査にて肝機能、腎機能検査をチェックしたがアミノ酸投与の影響はなかった。

質問12) BCAAだけを投与しても体温上昇効果はあるのか。

(回答) 臨床使用されているアミノ酸製剤はすべてのアミノ酸を含んでおり、含有率の違いで分類されている。アミノ酸は代謝において相互に補酵素として作用しており、BCAAのみの投与では効果がないと考えられる。

質問13) コントロール群は生理食塩水を投与しており、カロリー投与はないのか。

(回答) 両群ともにグルコースを 5g/hr にて術中一定投与している。

質問14) アミノ酸の投与カロリー分を糖で代用しても熱産生効果は得られるのか。

(回答) 体温上昇効果は糖や脂肪では生じずに、アミノ酸のみで見られる。単なるエネルギー投与のみでは熱産生は生じない。

質問15) 中枢温は上昇しているが、末梢温はどうなのか。

(回答) 末梢温として指尖温の測定も施行していたが、術中を通じてA群が高い傾向にあったが有意差はなかった。

質問16) 重症心不全患者では低体温の方が循環管理上有用だが、心機能低下患者でもアミノ酸輸液の有用性はあるのか。

(回答) アミノ酸投与で心拍出量増加が認められたが、心筋酸素消費量増加の可能性もあり、低心機能患者では投与は避けた方がよいと思われる。術後早期回復が期待されるような患者では有用性があると考えている。

質問17) オフポンプ冠動脈バイパス術以外での手術での有用性はどうか。

(回答) 他の手術での検討は行っていないが、術野が全身に及び体表加温装置が使用できないような手術では有用性が高いと考えられる。

質問18) 人工心肺を用いた心臓手術では、臓器保護のため心肺離脱後も低体温管理することがあるが、オフポンプ冠動脈バイパス術では体温を上昇させることがメリットとなるのか。

(回答) オフポンプ冠動脈バイパス術は、人工心肺を使用した手術と比較して、一般的に術後出血量が少なく回復も早い。術中臓器虚血を生じた場合などを除けば、術後早期回復を目標とする点では、術中低体温抑制により覚醒時のシバリング防止や早期の人工呼吸器離脱といった有用性があると考えられる。

質問19) インスリン分泌の低下した糖尿病患者では体温上昇効果は得られないのか。

(回答) 報告等はないが、インスリン分泌が枯渇した重症糖尿病患者では熱産生が生じない可能性はある。しかしながら本研究で見られた血中インスリン濃度増加は、糖投与時の増加量と比較しても著明であるため、インスリン分泌能が維持されていれば体温上昇が生じると予測される。

質問20) 術後ICUで管理した医師はアミノ酸投与の有無を知らされていたのか。

(回答) 術中アミノ酸投与に関しては報告していたが、術後測定項目(復温、抜管までの時間、在院日数等)は、非通知で試行したので、研究結果へのバイアスはないと思われる。

質問21) アミノ酸輸液投与と比較して体表加温装置は同程度の効果が得られるのか。術中は併用した方が良いのか。

(回答) 全身を加温できれば体表加温装置は有用性が高いが、術野との関係で使用が制限されることが多い。全身麻酔下の手術は低体温をきたしやすい傾向にあり、他の体温保持デバイスで不十分であれば、アミノ酸投与との併用が効果的である可能性は高い。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。