

論文要旨

様式 4-1

Selective loss of resistant alleles at $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in chemically-induced rat tongue cancer

(化学発がん剤誘発ラット舌癌における
 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ の選択的発がん抵抗性系統アレル欠失)

鹿児島大学大学院歯学研究科
(指導教員 仙波伊知郎 教授)

申請者氏名 小川広太郎

(序論)

口腔扁平上皮癌は遺伝要因と環境要因により多段階の過程を経て発生することが知られている。その発がん機構は最近の研究により解明されつつあるが、発がん感受性に関連する宿主の遺伝要因の解明は未だ充分になされていない。これまでに化学発がん剤 4NQO 誘発ラット舌癌発生モデルを用いて、発がん高感受性 Dark-Agouti (DA) 系ラットと低感受性 Wister/Furth (WF) 系ラットを見出し、さらに、この 2 系統ラットの 2 世代交配 F2 ラットを用いた量的形質遺伝子座 (QTL) 解析により、5 つの QTL ($Tscc1-5$) の存在を明らかにした。この舌癌発生モデルは発がん感受性に関連する宿主の遺伝要因の複雑な相互作用を解析する為の有用なモデルと考えられる。

これまでの解析で有意水準には達しないが、舌癌発生との関連を示唆する値を示す QTL を第 5 番染色体上に見出しているが、この染色体上にはがん抑制遺伝子 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ が存在し、また、ヒトにおいても舌癌を含む多くのがんで両遺伝子のヘテロ接合性の消失 (LOH) やメチル化変異の頻度が高いことが報告されている。

本研究では、この舌癌発生モデルにおける舌癌発生機構の一つとして、両遺伝子の舌癌低感受性系統アレルの消失が関与しているという仮説を検証するため、両遺伝子の染色体上での定位と QTL 解析および舌癌組織における遺伝子変異と後成遺伝学的変異としてのメチル化変異の検索を行った。

(材料と方法)

DA 系ラットと WF 系ラットを交配して得られた 6 週齢の F1 ラット (100 匹) と F2 ラット (130 匹) を用いて、0.001%4NQO 水溶液の経口投与による発がん実験を行った。F2 ラットの腎組織から DNA を抽出し、両系統の多型性を検出できる 10 個のマイクロサテライトマーカーを用いて PCR による遺伝型と QTL 解析により、 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ の遺伝子座を決定した。また、舌癌が発生した F1 ラットのうち、直径が 5mm 以上 (45 匹) および 5mm 以下 (15 匹) の腫瘍組織から DNA を抽出し、両遺伝子の LOH 解析、PCR-SSCP とシーケンス法による点変異およびメチル化変異の検出を行った。さらに、両遺伝子の mRNA 発現量を RT-PCR 法で定量した。

(結果と考察)

F2 ラットを用いた QTL 解析では、舌癌の大きさに関連する QTL は第 5 番染色体上の $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ を含む領域 (約 2cM) に有意なロッドスコアのピークとして認められた。一方、F1 ラットの舌癌腫瘍組織では、 $p15^{INK4}$ (37.8%) と $p16^{INK4A}$ (40.0%) に高頻度の LOH が認められ、その大部分 ($p15^{INK4}$; 15/17, $p16^{INK4A}$; 16/18) は発がん低感受性を示す WF 系に由来するアレルの消失であった。また、両遺伝子のエクソン領域の点変異とプロモーター領域のメチル化変異は比較的大きな舌癌に認められ、mRNA 発現量も舌癌の大きさに比例して減少していた。

以上の結果から 4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいて、がん抑制遺伝子 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ は、その発がん低感受性系統アレルの選択的欠失による LOH の集積、点変異およびプロモーター領域のメチル化変異により発現が抑制されており、舌癌の大きさ、即ちがん発生のプログレッション過程に大きく関与していると考えられた。今後、ヒトにおいても舌癌の進展におけるこれらの遺伝子の役割をさらに解明することによって、新しい予防、製薬および治療の戦略を立てることが可能になると考えられる。

(Oral Oncology 掲載予定)

論文審査要旨および担当者

様式 7

報告番号	歯研 第131号	氏名	小川 広太郎	
論文審査担当者	主査	仙波 伊知郎		
	副査	岸 文雄	中村 典史	三浦 裕仁

Selective loss of resistant alleles at $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in chemically-induced rat tongue cancer

(化学発がん剤誘発ラット舌癌における $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ の選択的発がん抵抗性系統アレル欠失)

口腔扁平上皮癌は遺伝要因と環境要因により多段階の過程を経て発生することが知られている。その発がん機構は最近の研究により解明されつつあるが、発がん感受性に関連する宿主の遺伝要因の解明は未だ充分になされていない。これまでに化学発がん剤 4NQO 誘発ラット舌癌発生モデルを用いて、発がん高感受性 Dark-Agouti (DA) ラットと低感受性 Wister/Furth (WF) ラットを見出し、この2系統の2世代交配 F2 ラットを用いた量的形質遺伝子座 (QTL) 解析により、5つの QTL (*Tscl-5*) の存在を明らかにした。また、これまでの解析で有意水準には達しないが、舌癌発生との関連を示唆する値を示す QTL を第5番染色体上に見出しているが、この染色体上にはがん抑制遺伝子 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ が存在し、また、ヒトにおいても舌癌を含む多くのがんで両遺伝子のヘテロ接合性の消失 (LOH) やメチル化変異の頻度が高いことが報告されている。本研究では、この舌癌発生モデルにおける舌癌発生機構の一つとして、両遺伝子の発がん低感受性系統アレルの消失が関与しているという仮説を検証するため、両遺伝子の染色体上での定位と QTL 解析および舌癌組織における遺伝子変異と後成遺伝学的変異としてメチル化変異の検索を行った。

DA ラットと WF ラットを交配して得られた6週齢の F1 ラット (100 匹) と F2 ラット (130 匹) を用いて、0.001%4NQO 水溶液の経口投与による発がん実験を行った。F2 ラットの腎組織から DNA を抽出し、両系統の多型性を検出できる 10 個のマーカーを用いて第5番染色体の QTL 解析を行った。また、舌癌が発生した F1 ラットのうち、直径が 5mm 以上 (45 匹) の腫瘍組織から DNA を抽出し、 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ を含む QTL 領域の LOH 解析、PCR-SSCP とシーケンス法による点変異およびメチル化変異の検出を行った。さらに、両遺伝子の mRNA 発現量を RT-PCR 法で定量した。

F2 ラットを用いた QTL 解析では第5番染色体上の $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ を含む領域 (約 2cM) に有意なロッドスコアのピークが認められた。F1 ラットの舌癌では $p15^{INK4}$ (37.8%) と $p16^{INK4A}$ (40.0%) に高頻度の LOH が認められ、その大部分 ($p15^{INK4}$; 15/17, $p16^{INK4A}$; 16/18) は発がん低感受性を示す WF 系に由来するアレルの消失であった。また、両遺伝子のエクソン領域の点変異とプロモーター領域のメチル化変異は、頻度は低いものの比較的大きな舌癌に認められ、また、mRNA 発現量も舌癌の大きさに反比例して減少していた。

以上の結果から 4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいて、がん抑制遺伝子 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ は、その発がん低感受性系統 (WF) アレルの選択的 LOH の集積、点変異およびプロモーター領域のメチル化変異により発現が抑制されており、特に発がんのプログレッション過程に大きく関与していると考えられた。今後、ヒトにおいても舌癌の進展におけるこれらの遺伝子の役割をさらに解明することによって、新しいがんの予防や治療の戦略を立てることが可能になると考えられる。

以上のことから、本研究は舌癌の大きさとがん抑制遺伝子 $p15^{INK4B}$ と $p16^{INK4A}$ との関連について舌癌発生モデルを用いて検索した結果、これらの遺伝子変異が舌癌の増殖進展過程に関連していることを明らかにし、今後のヒト舌癌の発生および進展機序の解明のための指標を与えるものと評価できる。

よって、本審査委員会は、上記の論文が学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式8

報告番号	歯研第 131 号	氏名	小川 広太郎	
論文審査担当者	主査	仙波 伊知郎		
	副査	岸 文雄	中村 典史	三浦 裕仁

審査委員会は、平成18年1月26日（木）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めると共に、説明内容についても質疑応答と関連事項についての試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。

以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと判断した。