

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	橋 本 典 和
学 位 論 文 題 目			
肝発癌耐性DRHラットの第1染色体 <i>Drh1</i> 領域の役割			
北海道医学雑誌第85巻第1号 平成22年1月掲載			
研 究 目 的			
<p>生体内での癌の出来やすさ、出来にくさには個体の遺伝要因が深く関わっている。DRHラットは、Donryuラットに3'-Me-DAB処理を行い、肝発癌耐性を指標として選択交配を繰り返し得られた近交系ラットで、各種肝発癌剤に対しても強い耐性を示す。また、この特性にはラット第1染色体上の<i>Drh1</i>および第4染色体上の<i>Drh2</i>の2つの遺伝子座が強く関与していることが解っており、さらに<i>Drh1</i>遺伝子座の影響を調べるためにDRHの<i>Drh1</i>を含む染色体領域をF344ラットのものに組み替えたコンジュニクラットDRH.F344-<i>Drh1</i>が作製されている。一方、DRHラット肝細胞は通常ラットに比べてlead nitrate (LN) による増殖が起りにくいことや様々の肝細胞毒に耐性を示すなど特異な性質を示すことが報告されている。我々は<i>Drh1</i>の役割を明らかにするために、Donryu, DRH, DRH.F344-<i>Drh1</i>ラット肝細胞の性質を<i>in vivo</i>と<i>in vitro</i>で比較した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>動物および組織：雄性8-10週齢Donryu, DRH, DRH.F344-<i>Drh1</i>ラットを用いた。LNは100 μmol/kgで静脈内投与し、肝細胞増殖能をBrdUの取り込みにより評価した。DENは200 mg/kgで腹腔内投与し、24時間後に採血して血清を分離し、生化学分析に用いた。また、肝の一部をホルマリン固定し、パラフィン包埋した。</p> <p>肝細胞初代培養：分離肝細胞を増殖因子添加無血清培地で培養し、³H-thymidineのDNAへの取り込みにより増殖能を比較した。また、マトリゲル上に培養した肝細胞を抗α-vinculin抗体、Cy3-標識 phalloidinを用いて蛍光染色し、DAPI核染色後、蛍光観察した。さらに、播種後2時間の肝細胞の核サイズを測定し、4n細胞については最大径と最小径の積から細胞伸展度を比較した。</p> <p>ウェスタンブロッティング：肝組織をサンプルバッファーで溶解してSDSゲル電気泳動を行い、PVDF膜にblotしたのち各種一次抗体を反応させ、ECL-plus kitにてシグナルを検出した。</p> <p>EMSA：肝組織の核蛋白を抽出し、標識NFκB, Stat3プローブとインキュベートした後、6%ポリアクリルアミドゲルで展開した。</p> <p>リアルタイムRT-PCR：肝組織から抽出したRNAを逆転写し、各種プライマーを用いてリアルタイムRT-PCRを行なった。</p> <p>生化学分析：DEN投与前と投与後24時間の血清ALT, AST値を測定した。</p>			

成 績

LNによる肝細胞増殖：DRH.F344-*Drh1*ではDonryuと同様にLN投与後2日目で肝細胞のBrdU LIが上昇したが、DRHではほとんど上昇しなかった。

LNによるサイトカイン，Cox2の活性化：LNによる肝細胞の増殖は、主に活性化したKupffer細胞により産生されるサイトカインやプロスタグランジンよることから、TNF- α 、IL-6およびCox2 mRNAの発現量を調べたところ、いずれのラットでも3-12時間で増加し、6時間でピークとなった。さらに、これらの因子は肝細胞に作用してNF κ B、Stat3を活性化することから、EMSAによりNF κ B、Stat3の活性化を検討したところいずれのラットでも3-16時間に活性化し、6時間でピークとなった。

LN投与後のストレス応答キナーゼ活性変動：LN処理後のMAPKシグナルの活性化をリン酸化を指標として比較したところ、p38はいずれのラットでもLN非処理で強くリン酸化しており、DRH.F344-*Drh1*ではDonryuと同様にLN投与9-12時間後にリン酸化が低下したのに対し、DRHでは低下しなかった。ERKリン酸化はいずれのラットでも3-6時間で亢進し、JNKリン酸化についてはいずれのラットでも変動が見られなかった。

肝細胞毒耐性：DEN投与後24時間では、血清ALT、AST値はDRH.F344-*Drh1*ではDonryuと同様に高く、DRHでは低かった。

初代培養肝細胞の増殖：いずれのラットの培養肝細胞でもEGF、HGFにより用量依存的に増殖が促進された。DRH.F344-*Drh1*肝細胞の増殖はDRHと同程度で、Donryuに比較して有意に低かった。

核サイズ：Donryu肝細胞では4n/1核および4n/2核が主であったのに対してDRH.F344-*Drh1*ではDRHと同様に2n/1核および2n/2核の占める割合が高かった。

肝細胞の伸展性：Donryu肝細胞は播種後2時間でactin、vinculin陽性のlamellopodiaが発達して大きな接着面で接着し、24時間後ではfilopodiaが伸長して細胞質にはactin centerがみられた。それに対してDRH.F344-*Drh1*肝細胞ではDRHと同様にいずれの発達も乏しかった。4n/1核細胞で比較したところ、DRH.F344-*Drh1*およびDRH肝細胞の伸展の程度はDonryu肝細胞の約70%であった。

考 案

LNによる肝細胞増殖はDRHではほとんど起らなかったのに対してDRH.F344-*Drh1*ではDonryuとほぼ同様に観察されたことから*Drh1*遺伝子座はこの反応に強く関わっていることが明らかになった。LNによる肝細胞の増殖は活性化したKupffer細胞の産生するサイトカインなどによると考えられている。本研究ではLN投与後、いずれのラットでもIL-6、TNF- α 、Cox2 mRNAの発現亢進が見られ、その下流のStat3、NF κ Bの活性化も観察された。したがって、いずれのラットでもLNによりKupffer細胞の活性化が起こり、NF κ B、Stat3を活性化するが、DRHではその他の反応が異なる可能性が示唆された。

DRH肝細胞ではストレスによりp38やJNKのようなストレス応答キナーゼが活性化しにくい。p38はいずれのラットでもLN非処理で高リン酸化していたが、LNによりDRH.F344-*Drh1*ではDonryuと同様にp38リン酸化が低下したのに対し、DRHで低下しなかった。p38リン酸化の低下はストレスシグナル下でMKP-1のようなホスファターゼが活性化するためとされている。したがって、DRHではp38に関わるストレス応答シグナルの活性化が起こりにくく、この反応には*Drh1*が関わっていることが明らかになった。

DRH肝細胞は様々な肝細胞毒に対して耐性を示す。本研究では、DRH.F344-*Drh1*肝細胞がDEN毒性に関してDonryuと同様に高い感受性を示すことから、DRH肝細胞の毒性耐性には*Drh1*が関連することが示された。一方、DRHでは3'-Me-DABを投与したときのDNA

adduct量は通常ラットと変わらないことが報告されている。したがって、DRH肝細胞内では肝細胞毒は通常ラット肝細胞と同様に代謝活性化されて細胞内高分子を障害するが、そこから細胞死につながるシグナル経路が通常ラットと異なる可能性が考えられる。

初代培養でのEGF, HGFによる増殖能, 核サイズおよび伸展についてはDRH.F344-*Drh1*肝細胞はDRHと同程度であり, Donryuとは著しく異なった。すなわち, これらの性質は*Drh1*と関連していないことが判明した。DRH.F344-*Drh1*では発癌剤処置をした時に肝前癌病変がF344と同様の数が形成されるが, そのサイズはF344よりも小さいことが報告されている。また, 初期の肝前癌病変の増殖は肝障害に伴う増殖因子やサイトカインによる再生刺激に依存すると考えられている。したがって, DRH肝細胞の増殖因子低反応性は肝前癌病変が増大しにくいことと関連している可能性が考えられ, その性質には*Drh1*以外の遺伝要因が関与しているものと考えられた。

結 論

DRH肝細胞は①LNによる増殖がほとんど起こらない, ②肝細胞毒耐性を示す, ③ストレス反応性キナーゼの活性化が起こりにくい, ④増殖因子に対する反応性が低い, ⑤2n核の割合が多い, ⑥細胞伸展性が乏しい, の特徴がある。*Drh1*はこれらの特徴のうち①-③と関連するが, ④-⑥には関連しない。

引 用 文 献

1. Liu H, Higashi K, Hiai H. Role of resistant Drh1 locus in chemical carcinogen-induced hepatocarcinogenesis in rats: analysis with a speed congenic strain. *Cancer Sci* 2005; 96: 164-169.
2. Mendelson KG, Contis LR, Tevosian SG, Davis R, Paulson E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12908-12913.
3. Ogawa K. Molecular pathology of early stage chemically-induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Int* (in press)

参 考 论 文

1. Honmo S, Ozaki A, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tanaka H, Yoshie M, Tamakawa S, Tokusashi Y, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Low p38 MAPK and JNK activation in cultured hepatocytes of DRH rats; a strain highly resistant to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2007; 46: 758-765.
2. Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2006; 66: 11263-11270.
3. Imai K, Yamamoto M, Tanaka H, Hashimoto N, Miyakoshi M, Honmou S, Yoshie M, Tamakawa S, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Low selection of preneoplastic hepatocytes after treatment with the 2-acetylaminofluorene diet-partial hepatectomy regimen in the liver of hepatocarcinogenesis-resistant DRH strain rats. *Oncol Rep.* 2007; 17: 55-60.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	橋 本 典 和
<u>審査委員長 牛 首 文 隆</u>			
<u>審査委員 谷 口 隆 信</u>			
<u>審査委員 小 川 勝 洋</u>			
<u>審査委員 柳 沼 裕 二</u>			
学 位 論 文 題 目			
肝発癌耐性 DRH ラットの第 1 染色体 <i>Drh1</i> 領域の役割			
<p>肝発癌には、個体の遺伝的要因が深く関わっている。肝発癌耐性を示す DRH ラットでは、第 1 染色体 <i>Drh1</i> 領域と第 4 染色体 <i>Drh2</i> 領域がその発癌耐性に関与することが知られている。一方、DRH ラット肝細胞は、硝酸鉛に対する増殖反応の低下や各種肝細胞毒への耐性など、特異な性質を示す。しかし、<i>Drh1</i> 領域と肝発癌耐性や DRH ラット肝細胞の特異性との関連には不明な点が多く残されている。</p> <p>本論文では、DRH ラットの <i>Drh1</i> 領域を肝発癌感受性 F344 ラットのものに組み換えたコンジェニックラットを用い、<i>Drh1</i> 領域の機能を解析した。その結果、<i>Drh1</i> 領域は、肝細胞の硝酸鉛に対する p38MAPK 活性化を伴った増殖反応および肝細胞毒 DEN に対する感受性に関与することを明らかにした。</p> <p>本論文は、DRH ラット肝発癌耐性のメカニズムを解明する上で重要な知見を提供するものであり、臨床的にも意義ある成績と考えられる。</p> <p>なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。</p> <p>以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。</p>			