

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発に関する研究

研究分担者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

本研究の目的の一つは、多施設で実施される動物実験の共有化であり、大腸だけでなく、専門にしていな施設での臓器特有病変の検索のためのマニュアルの修正した。そのマニュアルを用いて、他施設で得られた大腸粘膜の検討を実施し、従来、大腸発がんの報告がなされていない化学物質の一部に、当施設で提唱するラット大腸前がん病変を少数確認した。また、本研究班における膀胱発がんモデルのグループによる新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である予測マーカー候補 H2AX の発現を大腸粘膜で観察し、発癌剤投与後、比較的早い3日後で増加と、一週間後には減少していた。今後、大腸での精査が必要であった。

A．研究目的

ヒト大腸発がん過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルでみられる発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF) を多施設での専門領域別エキスパート診断による発がん性予測検査法の開発の可能性の検証を、昨年度に作成した臓器摘出マニュアルを用いて、多施設での動物実験から得られる大腸粘膜で検討するとともに、本研究班における膀胱発がんモデルのグループによる新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である予測マーカー候補 H2AX の発現を大腸粘膜で観察・検討した。

B．研究方法

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認
多施設共有システムにより、香川大の検体に関して検討した。
肺 臓 発 がん モ デ ル に 使 用 さ れ る N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を飲料水として処理された30週の雄F344ラット大腸粘膜を観察した。
2. 大腸粘膜における H2AX の発現変動
5週齢の雄F344ラット18匹にAOM(15mg/kg BW)を腹腔内投与し、その1週間後に同量のAOMを再度腹腔内投与した。2回目の投与から3日後、1週後、2週後にそれぞれ6匹ずつ屠殺し、大腸をホルマリン固定後、スイスロール状に包埋してパラフィン切片を作成した。H2AX免疫染色(抗rabbit polyclonal抗体、Cell Signaling Technology)を試行し、全長が確認できるcrypt内の細胞数をカウントし、その中の陽性細胞数をカウントして陽性率を算出した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物委員会から動物実験の許可を得て、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C．研究結果

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認
香川大の検体のうち、0.1%DHPN2週間飲水投与大腸粘膜に、ACFを 53.5 ± 18.3 を観察し、4個以上の腺管を有するもの 24.7 ± 11.0 観察された。一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微小腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発癌性の可能性が示唆された。
2. 大腸粘膜における H2AX の発現変動
F344雄ラット大腸粘膜の H2AX 陽性率は、3日後群で 1.66 ± 0.6 (対照群: 0.85 ± 0.3)、1週後群で 0.13 ± 0.1 (対照群: 0.11 ± 0.1)、2週後群で 0.08 ± 0.1 (対照群: 0.00 ± 0.2)であり、極めて早期での3日後群では増加傾向を認めた。

D．考察

昨年度までに、懸案であった多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出マニュアルを作成したが、実際に、多施設における動物実験で得られた大腸粘膜での検討において、肺がんモデルで利用されるDHPNやBPにおいて、従来、大腸は標的臓器としての文献的な報告はみられないものの、今回、大腸粘膜でACFおよび微小腺腫と考え

られる小巣が多数認められた。従来の発がん試験では、顕在化した腫瘍性病変のみでの検索であったことを考えると、臓器特異的な専門家による病理組織学的検索の重要性を示唆したものと思われる。本研究班での目的でもある病理組織学的な早期病変の同定の重要性が示されるとともに、発がん性未知の化学物質を検討する上で、こうした多施設での共同試験システムにより、精度を高く維持しながら、相対的に動物数の軽減につなげられると考えられた。

尚、マウス二段階大腸発がんモデルでは期待していたMDFの発現は特定できず、ACFでの予測にのみが可能と思われ、動物種の違いを改めて確認した。

E. 結論

マウスモデルでの大腸に関する発がん性予測はACFにより可能と考えられた。また、新規化学物質リスク予測に、多施設共同システムの構築とそのエキスパートによる病理組織診断により、発がん予測を模索できると思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morioka T, Yoshimi N et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mlh1-deficient mice. Cancer Sci, 106: 217-226, 2015.

2. 学会発表

- 1) Nakachi S, Yoshimi N et al. The modifying effects of the extract from Okinawan sweet potato leaves in mouse colon carcinogenesis. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月, ニューオーリンズ

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし