

論 文 内 容 要 旨

題目 The RAS inhibitor manumycin A, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model

(RAS 阻害剤 Manumycin A はアゾキシメタン誘導ラット大腸発癌モデルにおける異型腺窩巢の形成を抑制する)

著者 Miho Tsuda, Koichi Okamoto, Naoki Muguruma, Katsutaka Sannomiya, Tadahiko Nakagawa, Hiroshi Miyamoto, Shinji Kitamura, Takahiro Goji, Tetsuo Kimura, Toshiya Okahisa, Keisuke Izumi, Tetsuji Takayama

平成 25 年発行

Journal of Gastroenterology and Hepatology に掲載予定

内容要旨 大腸癌の死亡率は世界的に高く、その予防薬の開発が期待されているが、これまでに有効で安全な薬剤は報告されていない。我々はこれまで、拡大内視鏡を用いてヒト大腸の微小病変である異型腺窩巢 (aberrant crypt foci; ACF) を観察し、その前癌病変としての意義を明らかにするとともに、ACF では既に高率に K-RAS 変異を有することを報告した。また、アゾキシメタン (AOM) 誘導ラット大腸発癌モデルにおいても、前癌病変としての ACF とその K-RAS 変異が報告されている。そこで本研究では、AOM 誘導ラット大腸発癌モデルを用いて、RAS の特異的阻害剤である manumycin A の ACF に対する抑制効果を調べ、その発癌予防効果を検討した。

まず、AOM 投与ラットに manumycin A または vehicle を 8 週間投与し、8 週後にラットを屠殺、摘出大腸にメチレンブルーを散布し実体顕微鏡下に ACF を観察した。その結果、manumycin 群における平均 ACF 数は 72.88 ± 20.1 個であり、vehicle 群 (155.62 ± 56.7 個) に比べて有意に低値であった ($p=0.003$)。ACF を大きさ別 (腺管数別) に検討したところ、manumycin A 群では vehicle 群に比べて、腺管数の多い大きい ACF ほど抑制効果が高かった。また、manumycin A または vehicle を 5~8 週までの後半 4 週間投与し、ACF に対するその抑制効果を検討した。その結果、manumycin A 群における ACF 数は 92.2 ± 13.0 個であり、vehicle 群 (222.33 ± 83.3 個) に比べて有意に低値であった ($p=0.004$)。Manumycin A 8 週間投与群と同様に、大きい ACF ほど高い抑制効果

様式(8)

が認められた。ACF は AOM 投与 4-5 週後に形成されることから, manumycin A は既に形成された ACF を消失しうることが示唆された。

次いで, manumycin A の ACF 抑制機序を検討するため, manumycin A を 4 回投与したところでラットを屠殺し, その ACF 組織を用いて RAS 下流の MAPkinase 経路のリン酸化 ERK ならびに細胞増殖の指標である Ki67 の免疫染色を行った。その結果, manumycin A 群の ACF 組織ではリン酸化 ERK 陽性率が $13.5 \pm 19.2\%$ であり, vehicle 群 ($50.2 \pm 19.8\%$) に比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。同様に, manumycin A 群における Ki67 の陽性率は $2.2 \pm 3.4\%$ であり, vehicle 群 ($14.7 \pm 8.2\%$) に比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。さらに, manumycin A のアポトーシス誘導効果を調べるため, ACF 組織を用いて TUNEL 染色を行った。その結果, manumycin A 群における TUNEL 陽性細胞は $8.6 \pm 9.7\%$ であり, vehicle 群 ($2.9 \pm 2.0\%$) に比べて有意に高かった。

以上より, RAS 阻害剤である manumycin A は AOM 誘導ラット大腸発癌モデルの ACF を抑制することが明らかとなり, 大腸発癌予防効果を有することが示唆された。Manumycin A は, ACF における K-RAS を阻害することにより MAPkinase の抑制を介して細胞増殖の抑制ならびにアポトーシスを誘導し, ACF を抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1170 号	氏名	津田 美穂
審査委員	主査	玉置 俊晃	教授
	副査	島田 光生	教授
	副査	西岡 安彦	教授

題目 The RAS inhibitor manumycin A, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model
(RAS 阻害剤 Manumycin A はアゾキシメタン誘導ラット大腸発癌モデルにおける異型腺窩巢の形成を抑制する)

著者 Miho Tsuda, Koichi Okamoto, Naoki Muguruma, Katsutaka Sannomiya, Tadahiko Nakagawa, Hiroshi Miyamoto, Shinji Kitamura, Takahiro Goji, Tetsuo Kimura, Toshiya Okahisa, Keisuke Izumi, Tetsuji Takayama
平成 25 年度発行 Journal of Gastroenterology and Hepatology に掲載予定
(主任教授 高山哲治)

要旨 大腸癌の死亡率は世界的に高く、有効な予防薬の開発が期待されている。代表的なラット大腸発癌モデルである azoxymethane (AOM) 誘導発癌モデルでは、大腸に微小前癌病変と考えられる異型腺窩巢(aberrant crypt foci; ACF)が形成され、やがて腺腫や癌に進展すること、また ACF では K-RAS 変異が高率に認められることが報告されている。そこで本研究では、AOM 誘導ラット大腸発癌モデルを用いて、RAS の特異的阻害剤である manumycin A の ACF に対する抑制効果を調べ、その発癌予防効果を検討した。

まず、AOM 投与ラットに manumycin A または vehicle のみを 8 週間投与し、8 週後に屠殺して実体顕微鏡下に ACF を観察した。その

結果、manumycin A 群では vehicle 群に比べて ACF 数が有意に抑制された。同様に、manumycin A を 5~8 週までの後半 4 週間投与した群においても、ACF 数は vehicle 群に比べて有意に抑制された。

次いで、manumycin A の ACF 抑制機序を検討するため、RAS 下流の MAP kinase 経路のリン酸化 ERK ならびに Ki67 の免疫組織化学染色を行った。その結果、manumycin A 群の ACF 組織では vehicle 群に比べてリン酸化 ERK の陽性率が有意に低かった。同様に、manumycin A 群における Ki67 の陽性率も vehicle 群に比べて有意に低かった。さらに、TUNEL 染色によるアポトーシスの検討では、manumycin A 群の ACF 組織では vehicle 群に比べ TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた。

以上より、RAS 阻害剤である manumycin A は、AOM 誘導ラット大腸発癌モデルの ACF を抑制し大腸発癌予防効果を有することが示唆された。本研究は、大腸発癌メカニズム解明と予防薬開発に資するところが大きく、学位授与に値すると判定した。