

## 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 (number 4-6) 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  $\mu$ m の厚さで薄切した連続切片を LMD 用フイル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。