

氏名	リュウ 劉	コウ 洪	ハ 波
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)		
学位記番号	医 博 第 2879 号		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻		
学位論文題目	Role of Resistant <i>Drh 1</i> in Chemical Carcinogen-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats: Analysis with a Speed Congenic Strain (スピードコンゲニックラットによる <i>Drh1</i> 遺伝子座の化学発癌剤誘発肝癌 抵抗性の解析)		
論文調査委員	(主 査) 教授 芹川 忠夫 教授 清水 章 教授 松本 智裕		

### 論 文 内 容 の 要 旨

ラット肝の化学発癌は GST-P, GGT などの Phase II 酵素を発現する酵素変異細胞巢 (EAF) の形成と、肝細胞癌 (HCC) への進展の 2 段階の過程からなる。Closed colony Donryu rat に 3'-Me-DAB を持続的に投与しつつ選択的交配により近交系化した DRH ラットは、化学発癌剤に対し強力な遺伝的抵抗性を示す。日合らは (DRH×F344) F2 ラットについて EAF, HCC のそれぞれの段階について、GST-P mRNA, 結節の数, サイズなどを定量的パラメーターとして QTL 解析を行い、第 1, 第 4 染色体上に抵抗性 QTL である *Drh1*, *Drh2* をマップした。特に *Drh1* は肝癌発生前期に重要な役割をしていることが分かった。さらに *Drh1* の肝癌発生段階に対する単独の機能を調べるため、スピードコンゲニックプロトコールにより DRH.F344-*Drh1* ラットを作成した。

その作出方法は以下による。抵抗性 DRH ラットと感受性 F344 ラットを交配し、(DRH×F344) F1 雄を DRH 雌に戻し交配、N2 以降の各世代雄について *Drh1*, *Drh2* の近傍のマイクロサテライトマーカーを指標として、遺伝型を決定し、*Drh1* ヘテロ・*Drh2* ホモの雄を選び再び DRH 雌に交配した。この戻し交配を 6 回繰り返した後、その世代の同腹の雄、雌 *Drh1* ヘテロ個体を選択し交配した。この方法により DRH.F344-*Drh1* コンゲニックラット系を作成した。DRH.F344-*Drh1* は抵抗性 DRH 遺伝的背景に感受性 F344 ラットから *Drh1* を含む 43cM の第 1 染色体断片を導入したものである。ゲノムワイドスクリーニングで F344 allele は検出されなかった。

コンゲニック系、および両親系に 3'-Me-DAB を 8 週間投入し、EAF の数、サイズ、mRNA レベル、fibrosis 形成程度などのパラメーターを測定した。また、免疫組織化学により増殖因子 PCNA, CyclinD1 の発現と TUNEL 法によるアポトーシスを検索し、イメージアナライザーにより定量化を解析した。3'-Me-DAB による肝癌発生前期において、DRH.F344-*Drh1* は F344, DRH ラットと比較すると、GST-P-EAF のサイズ、mRNA レベル、fibrosis 形成程度、増殖因子 PCNA, CyclinD1 の発現などのパラメーターについて、中間値を示した。これに対し、GST-P-EAF の数と TUNEL 免疫染色の結果により、*Drh1* は単独で抵抗性の表現型をいた。さらにコンゲニック系、および両親系に肝マイトゲンである硝酸鉛 (100  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) を投入し、BrdU とりこみにより DNA 合成レベルと TUNEL 法によるアポトーシスを観察した。硝酸鉛投与 2 日後に F344 および DRH.F344-*Drh1* ラットは高い DNA 合成レベルと低いアポトーシスを示したのに対して DRH ラットは強いアポトーシスと低い DNA 合成レベルを認めた。これらの結果から、*Drh1* の遺伝的抵抗性の機構は、発癌剤など増殖刺激の投与後、G20 期肝細胞が細胞増殖開始の段階でアポトーシスをおこし、EAF の形成を阻止することにあると考えられた。また、この研究では *Drh1* の機能評価を従来の数週間を要する EAF 誘発とその計測から、硝酸鉛に対する DNA 合成、アポトーシスという数日で定量化できることを明らかにし、コンゲニックラットを出発点とする *Drh1* のポジショナルクローニングへの道が開拓された。

## 論文審査の結果の要旨

近交系 DRH ラットは、肝発癌に強力な遺伝的抵抗性を示す。この抵抗性は2つの抵抗性 QTL, Drh1, Drh2 による。第1染色体にマップされた Drh1 の機能を調べるため、スピードコンジェニック法により DRH 系の遺伝的背景に感受性 F344 系由来の Drh1 セグメントを導入し、DRH.F344-Drh1 ラットを作成した。DRH.F344-Drh1 は 3'-Me-DAB 投与による前癌病変の指標の多くについて、両親系統の中間値を示したが、Enzyme altered foci の数、アポトーシス数は F344 系由来の Drh1 遺伝型と平行していた。また肝マイトゲンである硝酸鉛投与に対し F344 および DRH.F344-Drh1 ラットは高い DNA 合成レベルと低いアポトーシスを示したのに対して DRH ラットは DNA 合成は低く、強いアポトーシスを認めた。この結果、抵抗性 Drh1 遺伝子は静止期にある肝細胞が細胞周期へ進行する段階でアポトーシスを誘導するのがその機能であることを示す。この働きにより initiate された肝細胞が前癌病変の形成を抑制し、発癌を阻止するものと考えられた。

本研究は肝癌の遺伝的抵抗性の理解に寄与するものである。従って本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成17年2月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。