

|          |  |
|----------|--|
| 氏 名      | あか つか しん や<br>赤 塚 慎 也  |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (医 学)  |
| 学位記番号    | 医 博 第 3080 号   |
| 学位授与の日付  | 平 成 19 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   | Contrasting Genome-wide Distribution of 8-Hydroxyguanine and Acrolein-modified Adenine during Oxidative Stress-induced Renal Carcinogenesis<br>(酸化ストレス誘発腎発癌過程において8-ヒドロキシグアニンとアクロレイン修飾アデニン異なるゲノム内分布を示す) |
| 論文調査委員   | (主 査)<br>教 授 淀 井 淳 司 教 授 丹 羽 太 貫 教 授 小 川 修   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

酸化ストレスによって細胞内のさまざまな生体分子が傷害を受ける。なかでもゲノム DNA が損傷し遺伝情報が改変される場合は、がんや老化の原因となると考えられている。本研究においては、酸化修飾塩基に対するモノクローナル抗体を用いて断片化ゲノムから免疫沈降することによって酸化的 DNA 損傷を含むゲノム断片を選択的に回収し、ライブラリー化する方法を独自に確立した。今回はこの新規の技術を、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) および脂質過酸化により生じる不飽和アルデヒドの1種であるアクロレインのデオキシアデノシンへの付加体 (Acrolein-dA) という2つの異なる塩基修飾に適用し、鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 誘発マウス腎発癌モデルにおける DNA 損傷分布の動態を解析した。10~12週齢、雄の C57BL/6 マウスを、Fe-NTA 腹腔内投与の後6時間経過した群と無処置の群に分け、腎皮質より分析対象とするゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を制限酵素により断片化した後、8-OHdG または Acrolein-dA に特異的な抗体で免疫沈降し、それぞれの塩基修飾を含むゲノム断片を回収した。これらの断片集団をもとに作製したライブラリーから、処置条件と塩基修飾の組合せごとに約300のクローンを抽出し、マウス染色体上へマップした。得られたマッピングデータに対して、酸化的 DNA 損傷が全染色体にわたって一様に分布しているという帰無仮説の下にピアソンの適合度検定を実施し、染色体ごとの損傷頻度の偏りを調べた。検定の結果、Acrolein-dA の分布の方が8-OHdG の分布よりも染色体間分布の偏りが大きく、Fe-NTA 投与後6時間の Acrolein-dA 分布は統計的に有意な偏差を示した。ただし、8-OHdG の分布においても、特定の染色体とそれ以外の染色体という2カテゴリーの適合度検定を実施したところ、頻度の偏差が有意に大きい染色体がいくつか検出された。無処置時の8-OHdG 分布では、特に16番染色体において P 値が  $5.8 \times 10^{-5}$  となり、検定の多重性を考慮したうえで十分に有意な偏差が認められた。さらに、この DNA 損傷の染色体間分布に見られる傾向の生成要因について検討した。染色体ペインティング技術により、間期のマウス近位尿管細胞核内における15番および16番染色体を可視化した。マッピングの結果で Acrolein-dA の頻度の高い15番染色体は核の周縁部に存在したのに対し、8-OHdG の多い16番は中心部に位置していた。染色体の核内での空間的配置が、DNA 損傷の生成・修復の動力学に影響を及ぼすことが示唆された。次に、酸化的 DNA 損傷の分布と遺伝子配列の分布の関連について検討した。ゲノム上の遺伝子内領域と遺伝子外領域で、酸化的 DNA 損傷の頻度に顕著な差異は認められなかった。その内部で酸化的 DNA 損傷が検出された遺伝子について、遺伝子発現レベルの分布と遺伝子長さ (ゲノム長) の分布を解析した結果、Fe-NTA 投与後6時間において8-OHdG が検出された遺伝子と Acrolein-dA が検出された遺伝子では、発現レベル分布および遺伝子長さ分布ともに有意に異なっていた。最後に、回収断片の無作為抽出による方法とは異なるアプローチとして、定量的 PCR による部位特異的な頻度解析を実施した。遺伝子領域と遺伝子外領域の両方を含む20の部位について酸化的 DNA 損傷の頻度を分散分析したところ、全ての部位で損傷の頻度が同等ではないということが確認された。また、今回定量的 PCR により解析した領域においては、ゲノム上の8-OHdG を修復する酵素である *OGG1* をノックアウトすることに

よって、Acrolein-dA も同時に蓄積することが判明した。

### 論文審査の結果の要旨

本研究によって、DNA 損傷を含むゲノム断片を選択的に収集し、ライブラリー化する方法が新規に確立された。この独自の新技术は、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) および活性アルデヒドの 1 種であるアクロレインのデオキシアデノシンへの付加体 (acrolein-dA) という 2 つの異なる酸化修飾塩基に適用され、鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 誘発マウス腎発癌モデルにおける DNA 損傷の分布解析に応用された。酸化損傷ゲノム断片の分離は、ゲノム DNA を制限酵素により断片化した後、8-OHdG または acrolein-dA に特異的な抗体で免疫沈降することにより実現された。本申請者は、動物の処置条件と塩基修飾の組合せごとに作製した損傷ゲノム断片のライブラリーから、約300のクローンを抽出してマウス染色体上にマップした。統計的な分析の結果、ゲノム内の位置によって酸化損傷の頻度に偏りが見られた。また、Fe-NTA 投与後の腎組織においては、8-OHdG と acrolein-dA の蓄積しやすいゲノム部位の特徴が異なっていた。さらに、収集した損傷断片を鋳型とした定量的 PCR による部位特異的な解析の結果からも、遺伝子座によって酸化的損傷の頻度が異なることが示唆された。

以上の研究は、酸化ストレスによる発がん機構の解明に貢献するとともに、ゲノムのゆらぎ情報を解析する新しい研究分野の確立に寄与するものである。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成19年1月31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。