

氏名	三好弘之
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	論医博第1839号
学位授与の日付	平成15年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Gastrointestinal hamartomatous polyposis in <i>Lkb1</i> heterozygous knockout mice. (<i>Lkb1</i> ノックアウトマウスヘテロ接合体に発生する胃腸管過誤腫性ポリープ症)
論文調査委員	(主査) 教授 千葉 勉 教授 鍋島 陽一 教授 武藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

Peutz-Jeghers症候群は常染色体優性の遺伝性疾患で、胃腸管の過誤腫性ポリープ症と粘膜の色素沈着を主徴とする。染色体マッピングにより原因遺伝子は第19番染色体短腕に位置することが知られていたが、近年ポジショナルクローニングの結果、セリン・スレオニンキナーゼの一つをコードする*LKB1* (*STK11*) 遺伝子が同定された。現在までにPeutz-Jeghers症患者の家系で様々な変異が見つかっている。*LKB1*はBrg1と協調して細胞周期停止を起こし、p53と協調してアポトーシスを誘導することから、*LKB1*遺伝子が癌抑制遺伝子の一つであることが示唆されていた。

我々は*LKB1*の癌抑制遺伝子としての役割を解明するため、マウスホモログである*Lkb1*遺伝子に欠失変異を導入し、ノックアウトマウスを作製した。*Lkb1*遺伝子は10のエクソンによって構成されるが、このうちリン酸化酵素活性部位を含むエクソン2, 3, 4をネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたベクタープラスミドを作製し、エレクトロポレーションによってマウスES細胞(RW4)に導入した。正しく相同組換えを起こしたクローンを選別し、C57BL/6系統の胚盤胞にインジェクションしてキメラマウスを作製した。さらにキメラマウスをC57BL/6系統と交配することによってノックアウトマウスを得た。

Lkb1 (-/-) マウスは胎生致死であったが、*Lkb1* (+/-) マウスは正常に発生し、21週齢以上の*Lkb1* (+/-) マウスは、腺胃の特に幽門部にポリープを発生した。胃ポリープの発生率は週齢に応じて増加し、41週齢以上では100%に達した。また、51週齢以上の*Lkb1* (+/-) マウスの約3分の1で、小腸においてもポリープを発生した。これらのポリープは組織学的に、発生部位で見られる正常な細胞によって構成されており、過誤腫性と診断された。また、Peutz-Jeghers症患者に発生する過誤腫に特徴的な平滑筋の樹枝状発達も見られ、*Lkb1* (+/-) マウスがPeutz-Jeghers症候群の病態モデルであることが示された。一方、多くの腸癌で見られるβカテニンの細胞核内への蓄積はなかったことから、*Lkb1* (+/-) マウスに発生する過誤腫はWnt経路が関与していないことが示された。

ゲノムPCR及びシーケンス解析の結果、全ての過誤腫性ポリープで野生型及びノックアウト型*Lkb1*アレルが検出された。加えて、残った野生型アレルの蛋白コード領域にはいかなる変異も見つからなかった。これらの結果から、LOHが過誤腫性ポリープの発生原因ではないことが示された。さらに、*LKB1*蛋白レベルをウェスタンブロット法にて解析したところ、*Lkb1* (+/-) マウスでは*Lkb1* (+/+) マウスの約半量の蛋白が発現していたが、過誤腫性ポリープでの発現量は隣接した正常粘膜と比較して減少していなかった。このことから、過誤腫性ポリープ発生の原因は*Lkb1*遺伝子のhaploinsufficiencyであることが明らかになった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究において申請者は、Peutz-Jeghers症候群(PJS)の原因遺伝子である*LKB1*の癌抑制遺伝子としての役割を解明するため、マウスホモログである*Lkb1*遺伝子に欠失変異を導入し、ノックアウトマウスを作製した。*Lkb1* (-/-) マウスは

胎生致死であったが、*Lkb1* (+/-) マウスは正常に発生し、21週齢以上で腺胃にポリープを発生した。胃ポリープの発生率は週齢に応じて増加し、41週齢以上では100%に達した。また、51週齢以上の*Lkb1* (+/-) マウスの約3分の1で、小腸においてもポリープを発生した。これらのポリープは組織学的に、発生部位で見られる正常な細胞によって構成されており、過誤腫（ハマルトーマ）と診断された。また、PJS患者に発生する過誤腫に特徴的な平滑筋の樹枝状発達も見られた。*Lkb1* (+/-) マウスでは*Lkb1* (+/+) マウスの約半量のLKB1蛋白が発現していたが、過誤腫性ポリープでの発現量は隣接した正常粘膜と比較して減少していなかった。全ての過誤腫性ポリープで野生型及びノックアウト型*Lkb1*アレルが検出され、残った野生型アレルの蛋白コード領域には変異が見つからなかったことから、過誤腫性ポリープ発生の原因は*Lkb1* 遺伝子のhaploinsufficiencyであることが明らかになった。

以上の研究は、PJS及び関連疾患の病態解明に貢献し、治療及び予防法開発に向けて今後の発展が期待される。

したがって、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15年7月17日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。