

氏名	たなかともゆき 田中智之
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2121号
学位授与の日付	平成11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	High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15 <sup>INK4B</sup> and p16 <sup>INK4A</sup> tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats (酸化ストレス誘発ラット腎細胞癌における染色体5番の高頻度アレレル欠失と癌抑制遺伝子 p15 <sup>INK4B</sup> /p16 <sup>INK4A</sup> の不活化に関する研究)
	(主査)
論文調査委員	教授 小川 修 教授 佐々木正夫 教授 日合 弘

### 論文内容の要旨

活性酸素(フリーラジカル)は、酸素毒性、遷移金属毒性、変異、発癌、虚血再灌流傷害、放射性・紫外線傷害など種々の疾病に深く関与することが認識されるようになってきている。また、老化、アポトーシス、シグナル伝達機構などの基本的生物学的現象においても、活性酸素を介したレドックス制御(酸化還元制御)が重要な役割を果たしていることが近年明らかにされつつある。

水溶性鉄キレート化合物である鉄ニトリロ三酢酸(Fe-NTA)は、腹腔内投与により、腎近位尿細管において、Fenton反応によるヒドロキシラジカルと考えられる活性酸素を発生し、脂質過酸化や酸化的DNA・タンパク傷害を引き起こす。Fe-NTAの反復投与により、ラットをはじめとする齧歯類において腎細胞癌が発生するが、これは持続的な酸化ストレスを介しているものと考えられる。この腎発癌モデルは1)上皮性である、2)組織型がヒト腎癌(特に顆粒細胞亜型、紡錘細胞型、多形細胞型)に類似する、3)高頻度の肺転移・腹腔内浸潤を来し、肺転移による呼吸不全や腹腔内出血で死亡する、などの他の化学発癌、遺伝性の動物腎癌モデルにはみられない特徴を有している。この「活性酸素による発癌モデル」において、rate-limitingとなりうる遺伝子を同定し、その変異や発現機構を解析することは、活性酸素と発癌の直接的関係を解明する上で重要と考えられた。

本研究においては、発癌の標的遺伝子の同定、特に癌抑制遺伝子座の欠失部位を同定することを目的とし、Wistar系とLong-Evans系のF1ラットに、Fe-NTAの反復腹腔内投与により腎細胞癌を誘発し、マイクロサテライトマーカーを用いてloss of heterozygosity (LOH)のゲノムスクリーニングを行った。全染色体をスクリーニングした結果、腎細胞癌においてラット染色体5番(D5Mgh5, D5Mit9, D5Mgh6, D5Mit11, D5Mit6)に40%を超えるLOHが認められた。この結果は、染色体5番に標的となる癌抑制遺伝子が存在する可能性を示唆している。ラット染色体5番はマウス染色体4番、ヒト染色体1p, 9pに相当する。特にヒト9p21-22は肺癌や脳腫瘍などの他種類の癌にてLOHが報告されている。さらにサイクリン依存性キナーゼインヒビターの一つであるp15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>がこの部位より同定され、癌抑制遺伝子としての作用、その遺伝子変異が報告された。Fe-NTA誘発腎細胞癌において、p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>遺伝子が癌抑制遺伝子として標的となっているかどうかについて更に検討を行った。Southern blotにおいて、各遺伝子において高頻度(30%)のホモ接合ないしヘミ接合の遺伝子欠失が認められ、腫瘍の20%では両方の遺伝子の欠失がみられた。またヘミ接合欠失の3例においてG:C→A:Tのtransition変異、1例のG deletionが認められた。これらの結果はFe-NTA誘発腎細胞癌において、高頻度にp15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>遺伝子が遺伝子欠失によって不活化されていることを示唆している。またp15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>プロモーター領域に5'CpG islandが豊富であることが知られ、その領域のメチル化によりこれらの遺伝子が不活化されている可能性が示唆される。それを明らかにするため、両遺伝子のプロモーター領域におけるCpG islandに特異的なプライマーを

設計し、メチル化特異的PCR解析を行った。メチル化は腎細胞癌においてp15<sup>INK4B</sup>で2.5%、p16<sup>INK4A</sup>で33.3%認められた。またp16<sup>INK4A</sup>のメチル化は腫瘍の細胞異型性と正に相関していた ( $r=0.976$ )。更に、遺伝子欠失、メチル化がこれら遺伝子の発現に影響を与えているかを検討するため、遺伝子変化の認められた症例において、ラットp15<sup>INK4B</sup>、p16<sup>INK4A</sup>のプロープを用いてNorthern blotを行った。遺伝子欠失、メチル化を認めた腎細胞癌15例において、mRNAの発現量が著明に減少していた。

これらの結果より、p15<sup>INK4B</sup>とp16<sup>INK4A</sup>が、この酸化ストレス誘発ラット腎癌モデルの標的遺伝子の一つであることが明らかとなった。これは動物発癌モデルにおいて、培養細胞株ではなくprimaryの癌組織でp15<sup>INK4B</sup>/p16<sup>INK4A</sup>の高頻度の遺伝子変異を示した最初の報告である。ヒトにおいて、非淡明細胞亜型の腎細胞癌の遺伝子変異についての報告は現在までのところほとんどなされていない。このモデル・報告は、発癌過程における酸化ストレスの関与を解明するための糸口となるだけでなく、ヒトの高悪性度、非淡明細胞亜型の腎細胞癌のモデルとして有用であることを示すものである。

### 論文審査の結果の要旨

鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) は、腎近位尿細管で活性酸素を発生し、脂質過酸化や酸化的DNA・タンパク傷害を引き起こし、反復投与により、齧歯類において腎細胞癌が発生する。本研究において、発癌の標的遺伝子の同定、特に癌抑制遺伝子座の欠失部位を同定を目的とし、Wistar系とLong-Evans系のF1ラット由来の腎細胞癌を用い、loss of heterozygosity (LOH) のgenome screeningを行った。全染色体をscreeningした結果、染色体5番 (chr. 5) に40%を超えるLOHが認められた。そのmap位置にある癌抑制遺伝子p15<sup>INK4B</sup> (p15)、p16<sup>INK4A</sup> (p16) を候補遺伝子として、更に検討を行った。Southern blotで、各遺伝子において高頻度 (30%) のホモ接合ないしヘミ接合の遺伝子欠失が認められ、腫瘍の20%では両遺伝子の欠失がみられた。またヘミ接合欠失の4例に点変異が認められた。p16プロモーター領域において、高頻度 (33.3%) のメチル化が認められ、腫瘍の細胞異型性と正に相関していた。更に、Northern blotにて、遺伝子欠失、メチル化を認めた腎細胞癌15例において、p15、p16のmRNAの発現量が著明に減少していた。以上より、p15、p16遺伝子が、遺伝子欠失・メチル化により高頻度に不活化されていることを見出し、この酸化ストレス誘発ラット腎癌モデルの標的遺伝子の一つであることを示した。

以上の研究は、発癌過程における酸化ストレスの関与を解明に貢献し、腫瘍生物学に寄与するところが多い。

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11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。