

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                          |     |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 博士（ 医 学 ）                                                                                                                                | 氏 名 | 高 井 淳 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations<br>(p53 遺伝子変異を引き起こす AID による肝臓発癌の新規マウスモデル) |     |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                          |     |       |
| <p>遺伝子編集酵素である Activation-induced cytidine deaminase(AID)は、活性化 B 細胞にのみ発現し、免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異やクラススイッチ組換えを誘導する役割を果たしている。この AID を全身に発現する AID トランスジェニックマウスでは、さまざまな発癌関連遺伝子への変異生成を介して、T細胞リンパ腫や肝癌をはじめとする様々な上皮性腫瘍が全例に発生することから、遺伝子変異の蓄積を介したヒト発癌のよいモデルになると期待されている。しかしながら、AID トランスジェニックマウスは致死的な T 細胞リンパ腫が全例に発生するために寿命が短く、より長期間の観察を要する他の上皮性腫瘍の解析が困難である。そこで本研究は、幹細胞マーカーである tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)に着目し、TNAP 発現細胞に AID を発現する新しいトランスジェニックマウス(TNAP-AID マウス)を作成することにより新しい肝発癌モデルの構築を行った。野生型マウスの各臓器における TNAP 発現の検討を行ったところ、胎仔(E14.5)の肝組織において最も強い TNAP の発現が認められた。また、TNAP-AID マウスの各臓器における AID 発現量について、定量 RT-PCR 法及び抗 AID 抗体を用いた免疫染色により検討したところ、成体の肝組織において強い AID 発現が認められた。従来の AID トランスジェニックマウスと異なり、TNAP-AID マウスでは致死性リンパ腫が発症しなかったため、TNAP-AID マウスでは生後 90 週以上の観察が可能であった。そこで、平均 90 週齢の時点で TNAP-AID マウスを解剖し、表現型を解析したところ、26.7%に肝腫瘍の発生を認めた。病理組織学的にこれらの腫瘍は高～中分化型の肝細胞癌であり、ヒト肝細胞癌の病理組織像と極めてよく類似していることが分かった。また、TNAP-AID マウスに発生した肝癌組織では、ヒト肝細胞癌の腫瘍マーカーである <math>\alpha</math>-fetoprotein が高発現していることが、免疫染色により確認された。TNAP-AID マウスに発生した肝癌組織及び非癌部の肝組織における発癌関連遺伝子の変異解析を行ったところ、肝癌組織・非癌部肝組織ともに、癌抑制遺伝子 <i>p53</i> に高率に変異の蓄積が認められた。プロモーター上流の非転写領域には変異の生成が認められなかった。この結果は標的遺伝子の転写に依存して変異を誘導する AID によって直接的に変異が生成された可能性を示唆する所見と考えられた。また、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異の中には、ヒト腫瘍において数多く報告されている <i>P53</i> 変異パターンと同一の変異が多数確認されており、AID によって導入される変異が腫瘍形成に関与している可能性が示唆された。従来の肝細胞癌マウスモデルは、発癌関連遺伝子の発現そのものを過剰発現させるか、ノックアウトさせることによって腫瘍の発生を誘発するものであった。本研究で作成した TNAP-AID マウスは、人為的に特定の発癌関連遺伝子に操作を加えるものではなく、AID の持つ遺伝子変異導入作用により、多段階に遺伝子異常が蓄積された結果発癌を来すモデルである。TNAP-AID マウスは、AID がヒトの慢性肝疾患で肝細胞に持続的に発現し、遺伝子異常を誘発することで肝癌の発生に関与するという分子機序を再現する動物モデルとして、ヒト肝癌発生機構を解明する上で極めて有用なモデルになりうると考えられる。</p> |                                                                                                                                          |     |       |

|                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (論文審査の結果の要旨)                                                                                                                                                                            |
| 近年、遺伝子編集酵素であるActivation-induced cytidine deaminase (AID)の有する遺伝子変異導入活性が発癌に強く関与する可能性が示唆されている。事実、AIDを全身に発現するトランスジェニックマウスは肝癌など様々な上皮性腫瘍を発生するが、同時にほぼ全てのマウスが致死的なT細胞リンパ腫を発生するため、上皮性腫瘍の解析が困難である。 |
| 申請者らは、幹細胞マーカーであるtissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)に着目し、TNAP発現細胞にAIDを発現する遺伝子改変マウス(TNAP-AIDマウス)を作成することにより、新しい発癌モデルの構築を行った。                                                    |
| 申請者らの検討により、TNAPは胎仔肝に強く発現していること、TNAP-AIDマウスには肝癌が高率に発生すること、TNAP-AIDマウスの肝組織には、癌抑制遺伝子 <i>p53</i> に高率に変異が蓄積していることが明らかとなった。以上の結果から、TNAP-AIDマウスがヒト肝発癌機構を解明する上で有用な発癌モデルマウスとなりうる可能性が示された。        |
| 以上の研究は、ヒト肝癌の発生過程における遺伝子変異の生成・蓄積の分子機序の解明に貢献し、癌研究の発展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のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 1 月 20 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。                                                                                    |