

氏 名	蔣 麗
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3219 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Deletion and single nucleotide substitution at G:C are major mutations in the kidney of gpt delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment (gpt デルタトランスジェニックマウスでは鉄ニトリロ三酢酸投与後に欠損変異及び G:C における 1 塩基置換が発生する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 野 田 亮 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

発がん過程においては、フリーラジカル・活性酸素の関与が少なからずあると考えられている。鉄キレート剤である鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) を齧歯類の腹腔内に投与すると、腎の近位尿細管内腔でフェントン反応を介した酸化的傷害を引き起こす。Fe-NTA を反復投与することにより、1～2 年後に高率に腎細胞癌が発生することがこれまでに報告された。この腎発がんモデルにおいては初期に脂質過酸化や酸化的 DNA 傷害が発生することが示された。また、マイクロサテライトを利用した遺伝学的解析などにより、p16 癌抑制遺伝子などが変異 (主としてアレル欠損) の標的遺伝子となっていることが報告されているが、その詳細なメカニズムはまだ明らかではない。本研究においては、大腸菌 gpt 遺伝子を含む lambda EG 10 遺伝子のトランスジェニックマウス (gpt delta トランスジェニックマウス) を使用して、上記鉄化合物による変異のスペクトラムをマウスの生体内における標的臓器において解析した。本マウスの特徴は、2 つの異なる選択法 (6-thioguanine (6-TG) selection と Spi⁻ selection) を使用して、異なるタイプの変異を同時に迅速に検出可能なことである。すなわち、この試験系では大腸菌 gpt 遺伝子をレポーターとする 6-TG selection を用いて点突然変異 (塩基置換、フレームシフト) を検出し、ラムダファージ red/gam 遺伝子をレポーターとする Spi⁻ selection を使用して、10 kbp までの比較的大きな欠失変異を検出することが可能である。さらに、今回新たに開発した DNA 免疫沈降法を併用することにより、ゲノムの特定部位にフリーラジカル反応による修飾塩基が生成しやすいかどうかを検討した。Fe-NTA を 1、2 あるいは 3 週間に渡り gpt delta トランスジェニックマウスの腹腔内に反復投与を行った。腎尿細管上皮の酸化的損傷の評価は 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ならびに acrolein-modified 2'-deoxyadenosine に対するモノクローナル抗体を使用した免疫組織学的解析で行った。さらに、同抗体を使用したゲノム DNA 断片の免疫沈降を最適条件下で行い、回収 DNA 断片を基質として、gpt 遺伝子部位などを標的とした定量的 PCR を施行した。すると、いずれの方法においても Fe-NTA 投与 1 週間のサンプルで最も強いゲノム DNA の酸化的損傷を認めた。ただし、β アクチン遺伝子部位ならびに遺伝子外ゲノム部位においては必ずしも同様の結果が得られておらず、法則性を見出すには今後更なる検討を必要とする。Fe-NTA に誘発された DNA 損傷の変異特性ならびにその規則性を見出すため、6-TG selection と Spi⁻ selection を行った。上記 2 つの突然変異頻度はいずれも Fe-NTA 反復投与 1 週間で最も高かった。すなわち、Fe-NTA 投与群における gpt 突然変異体頻度はコントロール群と比較して約 2.44 倍に上昇した。Spi⁻変異体頻度も約 1.72 倍に上昇した。さらに、得られた変異体を塩基配列決定により解析したところ、Fe-NTA 投与群では G:C→C:G 点突然変異が高頻度に観察された。また、1 kb を越える長い欠失変異も高頻度に認められた。そして、その多くは短い繰り返し配列がある領域の近傍で起こる可能性高いことが観察された。以上より、Fe-NTA はエームテスト陰性であるにもかかわらず、マウス生体内では変異を起こすことが示された。Fe-NTA 投与によるマウス腎における点突然変異のスペクトラムは、G:C→C:G 変異が高頻度であり、また欠失変異に関しては短い繰り返し配列がある領域の近傍において比較的長い欠損が起こりやすい傾向があるなど、特徴的であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

多くの疫学的事実より、酸化ストレスの発癌への関与が示唆されている。鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) を齧歯類に投与すると高率に腎癌が発生するが、これは鉄を介した酸化ストレスの良い発癌モデルである。本研究においては、Lambda EG10 ファージ遺伝子が組み込まれた gpt delta トランスジェニックマウスを使用し、腎における Fe-NTA 誘導性の DNA の変異スペクトラムを解析した。マウスに Fe-NTA の腹腔内反復投与を 1~3 週間に渡り行い、腎を摘出した。8-ヒドロキシグアニンと acrolein 修飾アデニンに対する抗体を使用した免疫染色、免疫沈降および定量的 PCR 法を施行すると、Fe-NTA 投与 1 週間のサンプルで最も強い酸化的損傷が発生することが判明した。一方、Fe-NTA 投与群の腎ゲノムより回収した Lambda EG10 ファージを解析したところ、点突然変異のスペクトラムは、G:C→C:G 変異が高頻度であり、欠失変異に関しては、短い繰返し配列がある領域を両端とする 1kilobase 以上の比較的長い欠損が起こりやすい傾向があることが判明した。

以上の研究は酸化ストレス発癌の分子機序解明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 20 年 2 月 8 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。