

京都大学	博士（医学）	氏 名	東 淳子
論文題目	Direct Hematological Toxicity and Illegitimate Chromosomal Recombination Caused by the Systemic Activation of CreERT2 (活性化した CreERT2 は、染色体組み換え異常を起こすことで造血障害をきたす)		
(論文内容の要旨)			
Cre/loxP システムはファージ由来の Cre リコンビナーゼ蛋白が loxP 配列と呼ばれる特異的な DNA 配列を認識して組み換えを起こす特性を利用した遺伝子操作技術の一つである。近年、任意の時点での遺伝子組み換えを可能にする目的で幅広く使用され始めているのが inducible Cre システムである。その中の一つである CreERT2 は、Cre リコンビナーゼと変異エストロゲン受容体との融合蛋白であり、タモキシフェンが投与されて初めて CreERT2 が核移行し loxP 配列部位で組み換えを起こす。 従来 Cre リコンビナーゼは生体に対して無害とされてきたが、培養細胞や遺伝子組み換えマウスによる実験でそれ自体に毒性があることが明らかとなってきた。一方 CreERT2 は活性化されるまで細胞質に留まるため、Cre リコンビナーゼによる生体への障害を回避できることが期待された。 しかしながら全身で CreERT2 を発現する R26CreERT2 マウスで、血球系に顕著な増殖障害とアポトーシスを認めたため、障害のメカニズムを解析した。R26CreERT2 マウスは Rosa26 の遺伝子部位に CreERT2 配列をノックインすることで、全身で CreERT2 が発現する遺伝子改変マウスである。胎児期の R26CreERT2 マウスに母体経由でタモキシフェンを投与すると、顕著な貧血を来し、肝臓における造血細胞の減少を認めた。更にこのマウスの成体にタモキシフェンを投与すると、貧血や骨髓低形成、脾臓と胸腺の萎縮をきたした。 フローサイトメトリーを用いた解析では複数系統の造血細胞の減少を認め、未分化な段階にある造血細胞が特に顕著な減少を示す傾向にあった。免疫染色による評価では、タモキシフェン投与直後の造血組織で細胞増殖の低下とアポトーシスの増加を認めた。R26CreERT2 マウスの骨髓細胞を、赤芽球系や、B リンパ球系・顆粒球系に分化させる条件下で培養し、培養開始時や分化が進んだ段階で培養液中にタモキシフェンを添加したところ、細胞数の減少を認め、生体で認められた造血組織の障害は造血細胞内の CreERT2 がタモキシフェンにより核移行したために生じた直接的な作用によることが確認された。更にタモキシフェン投与後の R26CreERT2 マウスの骨髓細胞で染色体異常を認め、マウスゲノム内に存在する loxP に類似した配列での意図しない組み換えが確認された。 これらの結果より、CreERT2 蛋白が生体のゲノムに存在する loxP 類似配列を認識し DNA の損傷を来すことで障害を与えることが明らかとなった。また、分裂期にはゲノムが露出し CreERT2 蛋白が loxP 類似配列を認識しやすくなるために、分裂速度の速い造血組織に顕著に変化が現れたと推測された。 CreERT2 の毒性の性質をふまえた上で、タモキシフェンの投与量を必要最小限とすることと、CreERT2 アリルを有する対照群を設定する必要があると考えられた。また、成体の造血系組織の異常は時間経過と共に完全に回復することから、成体マウスの解析の場合はタモキシフェン投与後に造血組織が回復するまで時間をおくことで、CreERT2 の毒性の影響を回避することが可能である。CreERT2 は従来の inducible Cre の中でも組み換え効率が良好であり、これらの点に留意することで CreERT2 を有効に使用することが可能であると考えられた。			

（論文審査の結果の要旨） CreERT2はタモキシフェンが投与されて初めて活性化し、loxP配列部位で組み換えを起こすCreリコンビナーゼであり、任意の時点で目的遺伝子の不活化する上で有用な手段であることから、近年医学生物学分野で幅広く使用されている。本研究では従来生体に影響を及ぼさないと認識されていたCreERT2が全身で活性化することでマウスに造血障害が生じることを確認した。本論文ではCreERT2の毒性に関する警鐘と、その機序の解明を目的とした。 胎児期や成体期にマウスの全身でCreERT2が活性化すると複数系統の造血障害及び造血細胞の染色体異常を認め、ゲノム内のloxP類似配列での組み換えが確認された。以上の結果よりCreERT2がDNA損傷を来すことで生体に障害を与えることが明らかとなった。CreERT2を活用する上で、タモキシフェン投与量を必要最小限とし、従来の対照群に加えてCreERT2対照群を設定する必要がある。また、この障害は可逆的であることから、可能な場合は障害回復後に解析を行うことも必要である。 本研究は、CreERT2の生体への障害機序を分析し、CreERT2を利用する際の注意点を喚起したもので、今後の医学研究や治療開発に貢献する研究である。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成21年12月16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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			