

氏 名	もも せ しゅう じ 百 瀬 修 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2545 号
学位授与の日付	平 成 15 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	Identification of the coding sequences responsible for <i>Tsc2</i> -mediated tumor suppression using a transgenic rat system (トランスジェニックラットの系を用いた, <i>Tsc2</i> 遺伝子を介した腫瘍抑制に対する責任領域の同定に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 日 合 弘 教 授 鍋 島 陽 一

論 文 内 容 の 要 旨

Eker ラットはヒト結節性硬化症の原因遺伝子の一つである *TSC2* 遺伝子のラットホモログに生殖細胞系列挿入をもつ。この遺伝的要因により Eker ラットは1年を経ると全例において腎癌を発生する。*Tsc2* 遺伝子がコードする tuberin (1807 アミノ酸) の C 末領域には, Rap1GAP との相同領域, 転写活性化部位, Rabaptin5 や RXR α との結合部位が報告され, 多彩な機能ドメインが予想されている。そこで tuberin の C 末領域に特に注目し, 異なる導入遺伝子 (Tg) を作成し, 表現型の観察及び生体内での tuberin と *TSC1* 遺伝子産物である hamartin との関係について調べた。いずれの種類のトランスジェニックラットも独立した2ラインを得, 表現型の観察を行った。

腎癌の抑制の有無に関しては, 最も C 末端に近い55アミノ酸をコードするエクソン41のみを欠失させた Tg(*Tsc2*-DCT55-flag) の導入では腎癌の完全抑制をみた。また, C 末約 1/5 を欠失させた Tg(*Tsc2*-DRG) ではコントロールと比して抑制効果は全く認められなかった。しかしながら, C 末約 1/5 のみを導入した Tg(*Tsc2*-RGH) においては抑制効果が認められ, さらに独立した2ライン (no.15 と no.26) での腫瘍抑制効果に違いが認められた。no.26 では肉眼的に, コントロールに比して著しく小さな腫瘍が観察され, さらに no.15 では肉眼的には全く腫瘍は認められなかったが, 組織学的には小さな腺腫性の病変が散在性に認められた。両者の Tg の発現を腎臓で調べたところ, Tg のタンパク発現量に差が認められた。すなわち, 腫瘍抑制効果と Tg の発現量に相関がみられた。

ホモ変異体の胎生致死の回避の有無についても検討した。*Tsc2*-DCT55-flag を持つ系統において, 胎生致死の回避をみた。しかしながら独立したライン間 (no.21 と no.51) での差を認めた。no.51 では胎生致死の回避は認められなかった。no.21 ではホモ変異体の胎生致死の回避をみたが, 産仔数は少なく, 胎生致死が回避されにくくなっていると考えられた。*Tsc2*-RGH と *Tsc2*-DRG に関しては1例も回避されなかった。このことから tuberin の C 末端部55アミノ酸の欠失が個体発生に影響を与えていることが示唆された。

Hamartin と tuberin の相互作用に関しては, 内在性の hamartin と tuberin の結合を認め, さらに *Tsc2*-DCT55-flag, *Tsc2*-DRG においても Tg 産物との結合を認めた。しかしながら *Tsc2*-RGH では認められなかった。さらに hamartin の発現量に対する tuberin の影響について検討した。ホモ変異体での hamartin の発現量は野生型と比べて著しく減少していた。さらに C 末を欠失した Tg では野生型と比べてやや hamartin の発現量が低下しており, より C 末領域を欠失した *Tsc2*-DRG では, 著明に減少していた。*Tsc2*-RGH を持つものではホモ変異体と変わらない程度まで hamartin の発現量が低下していた。このことから, hamartin の発現量は以前報告されていた tuberin の N 末領域のみならず, C 末領域の存在も重要であることが示唆された。

以上より, *Tsc2* 遺伝子の発癌抑制に必須な領域は, C 末約 1/5 に相当する領域に存在し, hamartin との結合を認めず腫瘍抑制効果を発揮することがわかった。さらにこの領域の発現量が腫瘍抑制効果と相関した。エクソン41は個体発生に何らかの影響を与えていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

遺伝性腎癌モデルである Eker ラットの原因遺伝子 Tsc2(1809アミノ酸をコードする)の機能欠失変異体を導入遺伝子 (Tg) として持つトランスジェニックラットを作製し, Eker ラットと掛け合わせるにより, Tsc2 の機能ドメイン解析を行った。Tsc2 の C 末端部55アミノ酸を欠失させた Tg(DCT55) の導入では Tg/Eker ラットの腎発癌は完全に抑制をされたが, その上流1426から1755アミノ酸までを欠失させた Tg(DRG) では抑制効果は全く認められなかった。一方, 1426 から1755アミノ酸に相当する部分を発現する Tg(RGH) においては部分的な抑制効果が認められ, それは Tg の発現量と相関していた。又ホモ変異体の胎生致死の回避の有無についても検討し, DCT55 を持つ系統においては胎生致死は回避されたが, 独立した系統間で差があり, 1つの系統でのみホモ変異体の胎生致死の回避が認められ, しかもその系統でも産仔数は少なく胎生致死の回避が部分的であると考えられた。RGH と DRG に関しては1例も回避されなかった。

以上より, Tsc2 遺伝子の発癌抑制に重要な領域は, C 末側の1426から1755アミノ酸の領域に存在し, もうひとつのヒト結節性硬化症の原因遺伝子である Tsc1 産物との結合に非依存的(結合部位は Tsc2 の N 末に存在する)に, また発現量依存的に腫瘍抑制効果を発揮することがわかった。更にエクソン41がコードする C 末端部55アミノ酸(1755-1809アミノ酸)配列は個体発生に何らかの重要な役割を演じていることが示唆された。

以上の研究は Tsc2 遺伝子の機能の解明に貢献し, 結節性硬化症の原因の解明ならびに治療法の開発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15年1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。