

京都大学	博士（医学）	氏 名	藤 原 幹 夫
論文題目	Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma (肝細胞癌における癌抑制遺伝子としての Parkin 遺伝子の役割)		
(論文内容の要旨)			
近年、癌組織の詳細な遺伝子解析により、ヒトの癌細胞では特定の染色体座位に高頻度に欠失を伴う領域 (common fragile site)が存在することが明らかとなりつつある。その中で、6q25-27 領域は卵巣癌、乳癌、肺癌等さまざまなヒト癌組織で高頻度に LOH や欠失を認めることから、最近、この領域に存在する家族性パーキンソン病の原因遺伝子である <i>Parkin</i> 遺伝子が癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されるようになった。そこで本研究では、肝発癌過程において <i>Parkin</i> が癌抑制遺伝子としての役割を果たしている可能性を明らかにすることを目的とした。 まず、ES 細胞を用いた相同組み換えにより <i>Parkin</i> 遺伝子の exon3 を欠失させた <i>Parkin</i> ノックアウトマウスを作成し、その表現型の解析を行った。<i>Parkin</i> ノックアウトマウスは、正常に生まれ、行動異常等の中枢神経系の異常所見を呈さなかったが、全例が出生後経時的に肝腫大を来とし、48 週の時点では野生型のマウスと比較し、約 1.5 倍の肝腫大を呈することが分かった。加えて、これらの肝腫大を呈した <i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝組織からは、出生後 96 週の時点で、肝腫瘍を高頻度に発生することが明らかとなった。組織学的検討からは、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスに発生した肝腫瘍は、ヒトの高分化型肝癌に類似した肝細胞癌であり、α-フェトプロテイン(AFP)を産生していることが確認された。 次に <i>Parkin</i> が肝細胞の増殖を制御する機序についての検討を行った。<i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝組織においてはPCNA 染色で野生型と比較し、多数の細胞の核の濃染を認めた。また、BrdU アッセイにおいては、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスから樹立した初代肝培養細胞は、正常マウス由来の肝細胞と比較して強い BrdU の取り込みを認めることが明らかとなった。以上より <i>Parkin</i> ノックアウトマウスに生じた肝腫大は、肝細胞の増殖活性の亢進により生じたと考えられた。そこで、<i>Parkin</i> による細胞周期の制御機構を明らかにする目的で <i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝組織を用いた遺伝子発現プロファイルの解析を行った。<i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝組織の癌部、非癌部に共通して発現が上昇していた遺伝子は 13 あり、その多くは代謝や酵素反応に関連した分子であったが、細胞増殖、アポトーシス制御に関わる follistatin の発現が上昇していることが分かった。follistatin は様々な臓器に分布する分泌蛋白であり、activin の細胞増殖抑制、アポトーシス誘導作用に拮抗することが示されている。また、肝癌臨床検体、肝癌細胞株、肝癌モデル動物等の肝癌組織において、follistatin の発現上昇が認められることが報告されている。そこでこの follistatin に着目し、アポトーシス抵抗性についての検討を行ったところ、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスから樹立した初代肝培養細胞は、シスプラチン、ドキソルビシン、VP-16 の抗癌剤投与により誘導されるアポトーシスに対して、抵抗性を示すことが分かった。同時に、<i>Parkin</i> ノックアウトされた肝細胞のアポトーシス抵抗性は、siRNA による follistatin のノックダウンにより消失した。以上より、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝細胞は、follistatin 依存性にアポトーシス抵抗性を示すことが明らかとなった。 本研究により、<i>Parkin</i> 遺伝子が肝細胞の増殖・アポトーシス制御に重要な役割を果たしており、肝発癌過程では癌抑制遺伝子としての役割を果たしている可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨) 近年、癌組織の詳細な遺伝子解析により、ヒトの癌細胞では特定の染色体座位に高頻度に欠失を伴う領域（common fragile site）が存在することが明らかとなりつつある。その中で、6q25-27 領域は卵巣癌、乳癌、肺癌等さまざまなヒト癌組織で高頻度に LOH や欠失を認めることから、この領域に存在する <i>Parkin</i> 遺伝子が癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されるようになった。 申請者らは、<i>Parkin</i> が癌抑制遺伝子としての役割を果たしている可能性を明らかにすることを目的とし、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスを作成し、その表現型の解析を行った。<i>Parkin</i> ノックアウトマウスでは肝腫大を背景に高頻度に肝癌が発生し、さらに非癌部の肝組織においては肝細胞の増殖が亢進していることが判明した。cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析からは、<i>Parkin</i> ノックアウトマウスの肝組織の癌部、非癌部に共通して、細胞増殖やアポトーシス制御に関わる follistatin の発現が上昇していることが分かった。<i>Parkin</i> ノックアウトマウスから樹立した初代肝培養細胞は、follistatin 依存性にアポトーシス抵抗性を示した。以上の結果から、<i>Parkin</i> 遺伝子が肝細胞の増殖やアポトーシス制御に深く関与しており、肝発癌過程において癌抑制遺伝子としての機能を果たしている可能性が示唆された。 以上の研究は、肝癌の新しい癌抑制遺伝子の同定により、肝発癌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、本学位申請者は平成 22 年 1 月 4 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			