

	おおい ひろゆき
氏 名	大井博之
学 位	博士(医学)
学位記番号	新大院博(医)第170号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ -irradiation (放射線誘発マウス胸腺リンパ腫における多段階発がんに関する解析)
論文審査委員	主査 教授 内藤 眞 副査 教授 笹井啓資 副査 教授 木南 凌

博士論文の要旨

【序論】我々の教室は放射線誘発マウス胸腺リンパ腫を解析し、新規がん抑制遺伝子 Rit1/Bcl11b を単離した。Rit1/Bcl11b はヒトの血液系悪性腫瘍でも変異の見られる重要な遺伝子である。しかしリンパ腫発症過程や Rit1/Bcl11b の役割は不明であった。マウスへの分割照射後、胸腺は萎縮と再生を繰り返しばらく萎縮状態が続いた後に高率に胸腺リンパ腫を発症する。一方、この萎縮胸腺中には既に前リンパ腫細胞が存在するとの報告がある。今回の研究は照射後の萎縮胸腺を解析することで、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫のがん化が多段階的に進展することを明らかにし、同時にこの解析の過程で、Rit1/Bcl11b のがん化への役割やリンパ腫発症機構をより明確にした。

【対象・方法】マウスは BALB/c と MSM を交配し、生後4週より隔週で分割照射 2.5Gyx4 を行った。段階的なリンパ腫発症過程の解析のため照射 30 日後(早期)、100 日後(中期)、150-250 日後(後期)のマウスよりリンパ腫非発症状態の萎縮胸腺を採取した。またマウスはワイルドタイプと Rit1/Bcl11b KO/+タイプの各々を作製した。

解析は胸腺内リンパ球の clonality の有無と遺伝子変異に関して行った。Clonality はリンパ球の TCR(T-cell receptor) β 編成パターンに注目した PCR 系を作成した。この系では正常胸腺より精製した DNA はレセプターの多様性を反映し複数の異なる長さの products が見られるが、リンパ腫では clonal な増殖のため特定の組み換えが特異的に増幅されてくる。遺伝子解析としてマウス胸腺リンパ腫に関与するがん抑制遺伝子として知られる Rit1/Bcl11b、Ikaros、Pten のヘテロ接合(LOH)、がん遺伝子として知られる Notch1 の遺伝子内欠損、Myc の trisomy に関して検討した。

【結果】萎縮胸腺中の細胞の大きさを flow cytometry で測定したところリンパ腫と同じような腫大した細胞を含む胸腺が多数存在することが確認された。また TCR β パターンの解析で clonal 増殖の頻度は 30 日後、100 日後、150-250 日後の萎縮胸腺、リンパ腫の順で、24%(10/42)、62% (16/26)、76%(13/17)、100%(35/35)であった。遺伝子変異の頻度は 30 日後、100 日後、150-250 日後の萎縮胸腺、リンパ腫の順で、Rit1/Bcl11b では 10%、35%、71%、89%、Myc では 2%、35%、35%、66%、Notch1 では 0%、0%、18%、23%、Pten では 5%、8%、12%、35%、Ikaros で 0%-8%-6%-43%であった。Rit1/Bcl11b KO/+ マウス群でもほぼ同様の結果が得られたが Rit1/Bcl11b の LOH の頻度はワイルド群より高率であった。

【考察】今回の研究でリンパ腫の前がん病変の存在と、前がん状態での遺伝子変異が確認された。前がん病変は経時的に増加し、また遺伝子変異には規則性が示唆された。つまり Rit1/Bcl11b と Myc の変異は早期より見られ経時的に増加するが、Notch1 の変異は後期でのみで確認された。また Ikaros や Pten の変異はいずれの期間でもリンパ腫に比べ僅かであった。

Rit1/Bcl11b は癌抑制遺伝子であるが我々の研究室の報告で Rit1/Bcl11b $-/-$ 細胞ではアポトーシスが亢進することが確認されている。つまり Rit1/Bcl11b $-/-$ では細胞分裂とアポトーシスの両者が亢進していることになる。同様に、Myc の trisomy でも細胞増殖とともに p53 pathway を解したアポトーシスが亢進することが知られている。そのため Rit1/Bcl11b や Myc の変異のみでは細胞分裂は亢進しているが有効な異常増殖が起こらず、がん化の初期段階として Rit1/Bcl11b と Myc の変異が見られた今回の実験結果と相関する。またこの状態は引き続き遺伝子変異発生に関して有利である。特にこの状況下でアポトーシスを促進する Ikaros や Pten の不活化が起こると、それまで亢進していたアポトーシスが回避され癌化するという経路は論理的であり、また今回の実験で Ikaros や Pten の変異がリンパ腫で確認されたよりも低頻度であったことが説明できる。

(論文審査の要旨)

放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の発症に関与する主要な遺伝子として、Bcl11b/Rit1、Myc、Notch1、Pten、Ikaros などの遺伝子異常が知られているが、それらのリンパ腫発症への関与の時期および機構は不明であった。申請者らは照射後の胸腺を経時的に解析することで、リンパ腫が多段階的に発がんすること、その経過に一定の法則があることを示している。

照射後の胸腺は細胞数が少なく萎縮した状態を維持しているが、リンパ腫と同様に萎縮胸腺内の細胞はクローナルな増殖を示し、腫大した細胞となっていた。また、それらの遺伝子を解析すると Bcl11b/Rit1 のアレル消失や Myc のトリソミーは早期より高頻度に見られたが、Ikaros や Pten のアレル消失は後期の萎縮胸腺でのみ高頻度に見られ、Notch1 変異はリンパ腫では高頻度であるが前がん病変では稀であった。これらの結果をもとに申請者は、Bcl11b/Rit1 や Myc の遺伝子機能変化は細胞分裂の亢進をもたらすが、同時にアポトーシスも促進されるため有効な細胞増殖が得られない。しかし、この状況下で Ikaros や Pten の不活化が起こると、アポトーシスが回避され癌化に至ると推論している。

以上、リンパ腫発症を経時的に解析し、関連遺伝子変異の詳細を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。