

	まるやま まさき
氏 名	丸 山 正 樹
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第181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	<i>Mtf1</i> lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after γ -irradiation (<i>Mtf1</i> リンパ腫感受性座は、ガンマ線照射後のマウス胸腺に発生し高い活性酸素種濃度を示す大型胸腺細胞の維持に影響を与える)
論文審査委員	主査 教授 笹 井 啓 資 副査 教授 青 柳 豊 副査 教授 木 南 凌

博士論文の要旨

マウスへの 1.75Gy×週一回照射×4回のガンマ線の分割全身照射は、放射線誘発性の胸腺細胞アポトーシスにより胸腺の萎縮をもたらす。また、発生率にマウスの系統間差がみられるが、萎縮胸腺の多くはやがてリンパ腫へと進展する。BALB/c マウスと C57BL/6(B6)マウスは、放射線誘発リンパ腫に高い感受性を示すが、一方 MSM と C3H は抵抗性を示す。BALB/c と MSM を用いた当教室におけるこれまでの遺伝解析にて、*Mtf-1*(metal responsive transcription factor-1)をガンマ線誘発胸腺リンパ腫の感受性遺伝子候補として同定した。BALB/c の持つセリン型 MTF-1 と MSM の持つプロリン型 MTF-1 の 2 つの異なった *Mtf-1* アレルがあり、これらは、異なった転写活性や放射線照射に対する反応を呈する。

放射線を照射された細胞内には、活性酸素種 (ROS) が生成されるが、これはゲノム不安定性の主な原因と考えられている。ROS 濃度の上昇は、p53 のシグナル伝達経路を活性化させ、逆に ROS レベルや細胞増殖、アポトーシスなどをコントロールする。MTF-1 は本来、亜鉛のような重金属に反応して活性化するが、放射線誘発性のシグナル伝達経路でも誘導され、細胞内活性酸素種濃度に反応し、これを制御する機能を有する。ROS は、前がん細胞の発生をもたらす周知の変異原である。

まず、放射線照射後 28 日の胸腺細胞から DNA を抽出し、*Bcl11b* 内部欠失をネスト PCR 法で検索した。*Bcl11b/Rit1* 内部欠失は約半数の胸腺細胞から検出された。内部欠失の検出は一部の胸腺細胞のクローナルな増殖を反映するので、放射線照射 4 週後における胸腺細胞の異常増殖を示す。これは、放射線照射後の極く早期の段階ですでにクローナルな増殖が始まっていることを示唆する。次に、細胞数の変化を観察した。放射線照射後 5 日目では、未照射マウスと比べて、平均して 10% 以下の細胞数であったが、その後増加し、7 日後には、約半数となり、10 日後ではほぼ元に戻る。照射後 5 日から 10 日目に見られる胸腺細胞の増殖は、照射により減少した細胞に対する、胸腺細胞の代償的な増殖反応と考えられる。

放射線照射により細胞内 ROS 濃度の上昇を認めることは、in vitro の実験では既に報告があるが、放射線照射効果における ROS 濃度についての in vivo 実験は稀である。申請者は、マウス (BALB/c) の照射 5 日後、7 日後、10 日後、28 日後に胸腺を摘出し、DCFH-DA と共に胸腺細胞を培養した後、フローサイトメトリーで解析した。DCFH-DA は、ROS により DCFH-DA から DCF に酸化されることにより、染料の蛍光が増加する仕組みである。死細胞分画を除外し胸腺細胞を解析すると、DCF 蛍光は、放射線照射によりその蛍光強度を増し、さらに照射後 7 日目より、5 日目の方が、蛍光強度が強いことが分かった。これらの結果は、放射線照射マウスの胸腺細胞内では ROS 濃度が上昇していることを示唆する。また、ROS の増加に平行して、大型胸腺細胞の分画も割合が増加していた。そこで、小型細胞と大型細胞をフローサイトメトリーで別々にゲートをかけ、ROS 濃度を調べたところ、大型胸腺細胞は、小型胸腺細胞より、ROS 濃度が高いことがわかった。大型胸腺細胞の分画は非常に小さく、またその ROS 濃度は、未照射胸腺の大型細胞と同じレベルであった。すなわち、高い ROS 濃度は、大型胸腺細胞の特徴であり、それは放射線照射の有無に関わらないといえる。次に、大型胸腺細胞と小型胸腺細胞の特性を細胞表面マーカーを用いて調べた。CD4⁺/CD8⁺ double positive 細胞の割合が、小型細胞より大型細胞の方で低いことがわかった。また、この大型胸腺細胞の特性は、放射線照射に関わらず、不変であった。しかし、放射線照射により、小型細胞、大型細胞ともに、CD4⁻/CD8⁻や CD4⁻/CD8⁺ など未分化な細胞の割合が増加した。さらに小型・大型細胞の増殖能を調べるため、BrdU の取り込みを調べた。大型細胞のみ、BrdU の取り込みを認め、大型細胞が、cycling cell であることが分かった。また、ウエスタンブロットで検討すると小型細胞と比べて、大型細胞の p53 発現が高いことがわかった。これらの結果から、放射線を照射すると、増殖能をもちかつ ROS 濃度の高い未分化な大型胸腺細胞が増加することが示唆された。

コンジェニックマウス (ヘテロ) 同士を掛け合わせて、その子供に 3 Gy 照射後、7 日目にフローサイトメトリーで ROS 濃度、細胞の大きさを解析した。放射線照射後マウスでは、大型胸腺細胞分画は 15%~60% を示したが、抵抗性系統に比べて感受性系統のマウスは大型胸腺細胞を多く含む胸腺が多かった。これは大型細胞がより長く胸腺内に維持がされることを示唆する。一方、細胞数では、抵抗性系統と感受性系統マウスの間で違いは見られなかった。

Bcl11b はがん抑制遺伝子であるが、このヘテロ型ノックアウトマウスは発がん感受性が高い。そこで、Bcl11b ヘテロ型マウスと野生型のマウスについて、同じ実験を行った。大型胸腺細胞の割合は、照射群では 16%~40% の範囲であったが、ノックアウトマウスと野生型のマウスの間に大きな違いはなかった。これらの結果は、Mtf-1 感受性遺伝子座と Bcl11b がん抑制遺伝子は、異なったメカニズムで放射線誘発胸腺リンパ腫の発生に関わっていることを示唆する。

照射後にみられた大型胸腺細胞の長い存続は、活性酸素種による変異のリスクを上昇させる。したがって、胸腺リンパ腫発生の元となる前リンパ腫細胞の発達を、この過程が増大させると考えられ、放射線照射は胸腺細胞の減少と代償性の増殖・再生を引き起こすことが発がん作用機構であると解釈している。

(論文審査の要旨)

ガンマ線誘発胸腺リンパ腫の感受性はマウスの系統により違いを示す。リンパ腫感受性遺伝子候補として *Mtf-1* (metal responsive transcription factor-1) が同定されているが、MTF-1 は放射線誘発性のシグナル伝達経路でも誘導され、細胞内活性酸素種(ROS)濃度に反応し、これを制御する機能を有する。申請者らは放射線照射28日後に胸腺細胞のクローナルな増殖を確認した。これは、放射線照射後の極く早期の段階ですでにクローナルな増殖が始まっていることを示唆すると思われる。また、放射線照射後の胸腺細胞のフローサイトメトリー解析で増殖能を持ちかつ ROS 濃度の高い未分化な大型胸腺細胞が増加することが示唆された。次に、コンジェニックマウス同士の子供に放射線照射したところ、抵抗性系統に比べて感受性系統のマウスは大型胸腺細胞を多く含むことが分かった。一方、がん抑制遺伝子である *Bcl11b* ヘテロ型ノックアウトマウスと野生型のマウスの間に大きな違いはなかった。このような大型胸腺細胞の高い持続性は、ROSによる変異のリスクを上昇させ、胸腺リンパ腫発生の元となる前リンパ腫細胞の発達を増大させると考えられる。

以上の結果から放射線誘発胸腺リンパ腫の発生メカニズムの一部を明らかにした点で、本研究は学位論文としての価値を認める。