

氏名(本籍)	よこ た むつ み 横 田 睦 美 (千葉県)			
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	博 甲 第 5712 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	<b>Studies on Mice with a Pathogenic Mitochondrial DNA Mutation Derived from Carcinoma Cells</b> (がん細胞由来の変異型ミトコンドリア DNA を導入したマウスの研究)			
主査	査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一
副査	査	筑波大学教授	博士(医学)	千 葉 智 樹
副査	査	筑波大学准教授	博士(理学)	中 田 和 人
副査	査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは酸素呼吸によってエネルギーを産生する重要な細胞小器官であり、内部にはミトコンドリア DNA (mtDNA) が複数コピー存在している。特定の変異型 mtDNA が蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能が低下しミトコンドリア病と呼ばれる全身性の代謝性疾患が引き起こされる他、ミトコンドリア呼吸機能の低下によって過剰産生される乳酸や活性酸素種 (ROS) が、神経変性疾患や糖尿病、がん、老化などの多様な異常に関与する可能性も指摘されている。しかし、mtDNA の変異がこれらの異常の原因となっているという直接的な証拠はなく、因果関係については未だに解明されていない。この因果関係を解明するためには、変異型 mtDNA を導入したモデルマウスを用いた研究が効果的である。

最近、所属研究室では、C57BL/6 (B6) 系統のマウス肺がん由来する高転移性株 (A11 細胞) と低転移性株 (P29 細胞) のそれぞれの転移能が mtDNA によって支配されていることを明らかにした。そして、高転移性株である A11 細胞の mtDNA にのみ、呼吸酵素複合体 I のサブユニットをコードする遺伝子上に病原性点変異 (G13997A) が見つかった。また A11 細胞では、呼吸酵素複合体 I の活性が著しく低下し、それによって ROS が過剰に産生されていることも明らかになった。

そこで、この G13997A 点変異をマウス個体に導入し、作製したモデルマウスを解析することによって、がんの高転移性の獲得に関与すると考えられる G13997A 点変異がマウス生体内においてがんを引き起こし、さらに、高転移能を獲得するかを検証することを目的として本研究を行った。

#### < mito-mice13997 の作製 >

G13997A 点変異をマウス ES 細胞を介してマウス個体に導入するために、G13997A 点変異を有する ES 細胞 (ESmt13997) を作製した。そして、作製した ESmt13997 が呼吸機能低下により多分化能を失うことによって、キメラマウスを得られないという状況を回避するために、作製した G13997A 点変異を高率で有する ESmt13997 の分化能の評価を行なった。その結果、ESmt13997 は多分化能を維持しており、この ES 細胞は

キメラマウス作製に用いるのに適していることが確認された。この ESmt13997 を用いたアグリゲーション法により、キメラマウスが24 個体得られ、これらのキメラマウスの交配の結果、1 匹のキメラマウスから ESmt13997 由来の F<sub>1</sub> 個体が7 匹得られた。Genotyping の結果、F<sub>1</sub> 個体は G13997A 点変異を全身に 100% で有していることが確認でき、G13997A 点変異を有する新規マイトマウス (mito-micel3997) を得ることに成功した。

### < 3 ヶ月齢の mito-mice13997 の解析 >

得られた mito-micel3997 の 3 ヶ月齢の時点での呼吸酵素活性を測定したところ、複合体 I の軽度な (約 30% の) 活性低下を確認した。同じ G13997A 点変異を有するマウス肺がん細胞の A11 細胞では、複合体 I の著しい (約 80% の) 活性低下を示していたため、マウス生体内には変異による呼吸機能低下を補う何らかのメカニズムが存在していることが示唆される。このように mito-micel3997 においては、呼吸酵素複合体 I の軽度な活性低下が確認されたが、3 ヶ月齢の時点ではがん及びその他の重篤な病態変化は認められなかった。従って、G13997A 点変異は若齢期のマウス生体に大きな病態変化を及ぼさないことが示唆された。

### < 老化した mito-mice13997 の解析 >

12 ヶ月齢までの mito-micel3997 においてはがんを発症して死亡する個体は認められなかったが、12 ヶ月齢を超えた mito-micel3997 において B6 マウスと比較して比較的早期に死亡する個体が複数見いだされた。死亡した全ての mito-micel3997 を解剖した結果、主に脾臓、肝臓が腫大または腫瘤を生じている個体の割合が多いことが判明した。この腫大または腫瘤を生じた組織の HE 染色像の形態観察によってがん化した細胞の種類を特定したところ、全て血液細胞ががん化していることが明らかになった。従って、B6 マウスと比較して mito-micel3997 は血液細胞のがん化を引き起こす個体の割合が高く、マウス個体に導入した G13997A 点変異はマウス生体内で血液細胞のがん化を引き起こすことが示唆された。マウス肺がん細胞株を用いた先行研究では、転移能が mtDNA によって支配されていることを明らかにしたが、本研究によって、血液細胞においては発がん能力自体も mtDNA の支配が存在する可能性が示され、非常に画期的な現象を見出せたと言える。

## 審査の結果の要旨

本学位論文において横田氏は、先行研究で明らかにされたがん転移に寄与する mtDNA の変異をマウス生体内に導入することに成功し、変異型 mtDNA を導入した新たな病態モデルマウスを確立したという点で価値が高い研究を行なったと言える。またその作製したモデルマウスを用いて、mtDNA の変異が血液細胞のがん化に関与している可能性を示唆しており、非常に重要な知見を示した学位論文と判断できる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。