

氏名(本籍)	奥平准之(埼玉県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6206号			
学位授与年月日	平成24年3月23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	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Involvement of Long Interspersed Nucleotide Element-1 Retrotransposition in intractable diseases (難治疾患における Long Interspersed Nucleotide Element-1 レトロトランスポジションの関与)			
主査	筑波大学教授	医学博士	有波忠雄	
副査	筑波大学准教授	医学博士	鴨田知博	
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一	
副査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(医学)	倉根一郎	

論文の内容の要旨

(目的)

Long Interspersed Nucleotide Element-1 (LINE-1 以下 L1) はヒトゲノムの 17% を占めるレトロエレメントであり、正常細胞で 3-30 回の出生に 1 回の頻度でゲノム内を動き得る (retro-transposition 以下 RTP)。これまでに血友病や筋ジストロフィーをはじめとした伴性劣性遺伝形質を示す疾患、大腸癌や乳癌組織中で大腸癌抑制遺伝子である APC や癌遺伝子である Myc 遺伝子内に L1 が挿入されていることなどが報告されている。最近では、2008 年に L1 の動きと自己免疫疾患に関する新しい知見が報告された。

L1-RTP 誘導に関しては、X 線照射による DNA 二重鎖切断によって誘導される報告はあるが、その他の L1-RTP 誘導因子やシグナル経路について詳細な報告はない。本論文において奥平氏は、L1-RTP を誘導する刺激やその L1-RTP 機序について詳細な解析をすることで、L1 の生命機能に果たす役割について考察した。

(対象と方法)

L1-RTP を解析する対象としては、6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) というトリプトファンが紫外線照射によって産生される化合物と、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による発癌モデルを用いた。L1-RTP の解析には、培養細胞株および L1-RTP を解析するレポーター遺伝子を導入した L1 トランスジェニックマウス (L1-Tg) を作製して用いた。

(結果)

FICZ による L1-RTP 誘導機序の解析

FICZ は Picomole レベルという低濃度でも L1-RTP を誘導し、その頻度は 10^{-4} から 10^{-5} 程度である事が示唆された。FICZ は aryl hydrocarbon receptor (AhR) リガンド物質であり、CYP1A1 などの遺伝子発現制御は AhR 依存的であるが、L1-RTP は AhR 依存的ではなく AhR 核輸送蛋白質 1 (ARNT1) 依存的に誘導することが示唆された。また、FICZ は mitogen-activated protein kinase (MAPK) と cAMP-responsive element-binding protein (CREB) 依存的に L1-RTP を誘導することが示唆された。さらに、FICZ は L1-encoded open reading

frame-1 (ORF1) と ARNT1 を相互作用させ、L1-RTP 誘導時には MAPK 依存的に ORF1 をクロマチンにリクルートさせた。FICZ の L1-RTP 誘導機序はこれまで報告された X 線照射とは異なる機序で誘導されていることも示唆された。L1-Tg に FICZ を投与すると胸腺と脾臓で L1-RTP 誘導が認められた。また、FICZ を投与した L1-Tg において、自己免疫疾患発症に関与する Th17 細胞の転写因子 RoR γ の発現と L1-RTP を誘導した共染細胞数が増加した。

DMBA/TPA 発癌モデル実験と L1-RTP

L1-Tg に DMBA/TPA を塗布して皮膚癌を形成させ、腫瘍を解析すると 15 個の腫瘍中 13 個で L1-RTP が誘導された。免疫組織化学解析においても、腫瘍マーカーの phosphorylated signal transducer and activator of transcription (p-Stat3) と L1-RTP の指標が共局在していた。DMBA の L1-RTP は AhR、ARNT1 依存的であるが、TPA は AhR、ARNT1 依存的ではないことが示唆された。TPA の L1-RTP は epidermal growth factor receptor (EGFR) と extracellular signal-regulated kinase (ERK) 依存的に L1-RTP を誘導した。

(考察)

これまで疾病発症の原因に関して遺伝背景が着目されてきたが、本研究によって環境因子により誘発される L1-RTP が様々な病態に関連する可能性が示された。bHLH/PAS ファミリー転写調節因子群の AhR あるいは ARNT1 に依存する L1-RTP は、発癌物質や生体内低分子化合物からの刺激によってゲノム再編機構を誘導し、生命活動に影響していることが示唆された。また、L1-RTP 誘導が自己免疫疾患発症と関連のある T 細胞分化に関与する可能性や、腫瘍形成の一端を担うことが明らかとなり疾患との関連性が示唆された。また、これらの L1-RTP 誘導化合物は、AhR あるいは ARNT1 に依存的な結果であったことから、L1 の挿入部位に化合物特有の指向性がある可能性が示された。今後 L1 挿入部位の解析を行い、L1-RTP が生命現象に与える影響についてさらに解析する必要がある。

本研究で L1-RTP 誘導機序は DNA 二重鎖切断によって誘導されるだけでなく、様々な環境因子によって誘導されることを明らかにした。また、化合物によってその L1-RTP 誘導機序は異なるシグナル経路を必要とすることが示唆された。環境因子による L1 のゲノム再編機構は、難治疾患発症の一因になる可能性が示された。

審査の結果の要旨

本論文は、注目を集めているゲノムの L1 レトロトランスポジション (L1-RTP) に関して、L1-RTP に対する環境の影響をシグナルカスケードの面から新知見を報告し、環境要因により L1-RTP の活動性を増すことを明らかにした。さらに化学発癌の過程における L1-RTP の役割を初めて明らかにし、癌研究における L1-RTP の利用法について提唱した。これらは原著論文として発表されてきたが、本学位論文ではそれらの結果を踏まえて、さらになんや自己免疫疾患など難治性疾患における L1-RTP の役割についてより広範囲に論じている。

平成 23 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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