

氏名(本籍)	伏木洋司(滋賀県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第6115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	生命環境科学研究科
学位論文題目	<b><i>In vivo</i> Monitoring of Transcriptional Activity in Clinical Relevant Animal Models for Elucidation of Cancer and Metabolic Syndrome</b> (動物生体内における転写活性の可視化と病態解明への応用)

主査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉智樹
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本哲男
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原秀子
副査	筑波大学教授	博士(理学)	中田和人

## 論文の内容の要旨

転写は遺伝子発現制御を司る主要な過程の第一段階であり、転写制御の解析は生命活動を理解する上で重要である。様々な病態においては多くの場合、遺伝子発現制御の量的・質的な不全状態を伴うため各病態における遺伝子発現の解析は、生命現象の解明および病態改善の治療法探索に有用である。近年の技術革新により、動物生体内の微弱なルシフェラーゼの発光を捉える事が可能となり、*in vivo*における転写活性を生物発光イメージングとして観察できるようになった。このような*in vivo*転写活性測定系を、ヒト病態を模した動物病態モデルに応用することができれば、確度の高い病態および生命現象の解明が可能になると期待される。本研究では、病態解明が困難であり、また罹患患者が多く医学的にもインパクトが大きい「がん」と「生活習慣病(肥満)」に焦点を当てて、それらの動物モデルを構築し、生物発光イメージングによる病態解明へのアプローチを展開した。

まず悪性腫瘍による死亡原因の第一位は肺がんである。肺がんでは、これまで数多くの研究がなされ、同定された発がん遺伝子や生存因子を標的とした抗がん剤が多数開発されているが、生存率向上には貢献できずにいるのが現状である。その原因として、これまでの分子生物学による病態解析は主に*in vitro*の実験、もしくは患者由来の摘出腫瘍組織を用いた解析が中心であったため、生体内部におけるダイナミックな病態変化をとらえることができなかった点に問題があると考えられた。

そこで本研究では、生物発光イメージングを肺がんモデルに適用し、腫瘍増殖および抗がん剤応答性を経時的に評価できるかを検討することとした。まず肺がんの病態を模倣する動物モデルを構築するため、複数の肺がん同所移植モデルを検討し、形成された肺腫瘍の組織像およびイメージングによる検出感度から *intra-pulmonary injection* 法を選択した。次にその腫瘍体積と生物発光が相関するよう、増殖細胞数と相関関係のある SV40 プロモーターを利用したルシフェラーゼ発現系を構築した。この SV40 プロモーターを使用した生物発光イメージングの検出感度は高く、また細胞数と高い定量性を示した。一方その空間分解能は低かったことから、腫瘍の形態観察は臨床で利用される CT イメージングによって行なった。CT イメージングによる腫瘍体積評価と生物発光シグナルによる腫瘍増殖評価の両者を用いて腫瘍を計測し、その相関関係

を検討した結果、両者は高い相関関係を示し、生物発光イメージングは病態変化を経時的にモニターできることが確認された。そこで、抗がん剤の治療実験を行ったところ、腫瘍の退縮が生物発光イメージングによって経時的に観察され、CT イメージングの結果とも一致した。以上、生物発光イメージングは高い検出感度と定量性を示し、CT イメージングは高空間分解能を示したため、両者を組み合わせた病態解析の有用性が示された。

次に「生活習慣病（肥満）」に関しては、NF- $\kappa$ B による転写活性を利用した生物発光イメージングを脂肪組織に適用し、肥満が誘発する慢性炎症モニタリング系を開発した。悪性腫瘍とならび大きな罹患率を示すメタボリックシンドロームは肥満によって生ずる疾患群である。その最大のリスクファクターは肥満であり、肥満は脂肪組織における慢性的な炎症を起こす。しかし、肥満によって起こる炎症は微弱であるためこれまで検出が困難であり、動物個体レベルの病態理解は進んでいない。炎症反応を制御する最も重要な転写因子は NF- $\kappa$ B である。そこで本章では、NF- $\kappa$ B の活性を指標とした炎症モニタリング系を構築し、炎症研究を行なった。まずは細胞移植系を応用した生物発光イメージング系を構築し、急性炎症反応のモニターが可能であるか検証した。次に肥満状態を模するため食餌性肥満誘発モデルを、本炎症モニター系に適用した。その結果、肥満マウスの脂肪組織では慢性炎症が惹起される様子が可視化された。その脂肪組織を摘出し、NF- $\kappa$ B 活性の指標となる標的遺伝子発現を生化学的に測定したところ、実際に NF- $\kappa$ B の下流遺伝子産物である IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進していた。以上の結果から、本炎症モニター系は慢性的かつ微弱な炎症を検出することが可能であり、今後メタボリックシンドロームに対する新薬開発に有用であることが期待された。

以上、生物発光系は検出感度が高く、様々な病態モデルの転写活性を測定可能であることから、今後様々な病態の理解や治療薬開発に有用であることが示された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

伏木氏は、本研究において、技術革新が著しいバイオイメージング技術をマウス個体に適用し、様々な病態モデルマウスにて、その有用性を証明した。本論文は、進展著しいバイオイメージング分野の先駆けとしても高く評価され、今後その研究の応用が広がることが期待されている。実際に本論文による研究成果は多くの新規治療薬の開発研究に適用されており、その価値は高い。

平成 24 年 1 月 24 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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。