



Liver tumor promotion by phosphorylation-resistant retinoblastoma (Rb) protein in the mutant-Rb transgenic mice.

|       |                                                                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2017-01-18<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 王, 博<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/799">http://hdl.handle.net/10271/799</a>                                |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

|       |                                                                                                                                                                   |         |             |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博第 537号                                                                                                                                                          | 学位授与年月日 | 平成21年 3月18日 |
| 氏 名   | 王 博                                                                                                                                                               |         |             |
| 論文題目  | Liver tumor promotion by phosphorylation-resistant retinoblastoma (Rb) protein in the mutant-Rb transgenic mice.<br>(変異 Rb トランスジェニックマウスにおけるリン酸化抵抗性 Rb 蛋白による肝腫瘍進展) |         |             |

博士(医学) 王 博

## 論文題目

Liver tumor promotion by phosphorylation-resistant retinoblastoma (Rb) protein in the mutant-Rb transgenic mice.

(変異 Rb トランスジェニックマウスにおけるリン酸化抵抗性 Rb タンパクによる肝腫瘍進展)

## 論文内容の要旨

肝細胞癌はアジアやアフリカでよくおこる悪性腫瘍の一つである。肝細胞癌発生には主にウイルスや環境因子が重要だと考えられているが、肝臓発癌に関与する分子機構はほとんど分かっていない。

Retinoblastoma (Rb) 遺伝子は最初に発見された癌抑制性遺伝子であり、細胞増殖、細胞分化、細胞死、細胞老化の制御に中心的役割を果たしている。Rb のこれらの作用は転写因子 E2F-1 への結合による E2F-1 の転写抑制によりなされている。分子遺伝学的研究により、肝細胞癌を含めた多くの癌において Rb 遺伝子の異常が指摘されている。また、Rb 遺伝子の先天性突然変異を持つ場合は両側性の網膜細胞腫や骨肉腫を高頻度に発生する。そして、胆嚢、乳腺、前立腺など他の組織の腫瘍の発生に体細胞での Rb 遺伝子の突然変異が寄与していることが知られている。

以前、当教室では正常ヒト Rb タンパクを肝細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。そのマウスは、野生型マウスに比し、アポトーシス抵抗性であり、また化学発癌抵抗性を示した。Rb タンパクはサイクリン依存性キナーゼ (CDK) によりリン酸化されると、E2F への結合活性を失う。遊離した E2F は細胞増殖に働く遺伝子群を活性化して細胞増殖を開始させる。

今回、私は CDK によるリン酸化部位に変異を加えた変異 Rb タンパクを肝細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製し、肝臓発生と肝腫瘍に対する影響を観察した。

### [材料ならびに方法]

ヒト Rb cDNA にオリゴヌクレオチドによる試験管内突然変異法を用いて、16 個の CDK リン酸化部位のうちの 12 個のセリンあるいはスレオニンをアラニンに変異させた。変異ヒト Rb (mt-Rb) cDNA をラット hepatocyte nuclear factor-1 (HNF1) プロモーター (9 kbp) に連結し、HNF1-mtRb 及び HNF1-LacZ を混合し、マウス受精卵に微小注射してトランスジェニックマウスを作製した。

### [結果]

得られた仔マウスの尻尾から DNA を抽出し、トランスジーンを持つマウス 2 系統が得られた (TGX, TGZ と名付けた)。トランスジェニックマウス肝臓からの核抽出液をウェスタンブロット解析したところ、TGX マウスは外来性 mt-Rb タンパクが検出されたが、TGZ マウスでは内因性 Rb タンパクしか検出できなかった。また、同時に注射した HNF1-LacZ の発現を胎生期 11.5 日のマウスの whole-mount X-gal staining で検討したところ、TGX マウスは肝細胞が陽性になったが、TGZ マウスでは野生型マウスと同じく陰性であった。以上の結果から、以後の解析は TGX マウスについてのみ行った。

mt-Rb マウスの肝臓構築は野生型マウスと差が見られなかった。生後 6 ヶ月までは特に差はなかったが、生後 8 ヶ月くらいから、TGX マウスの肝臓/体重比が野生型マウスに比し増加した。病理組織学的には、8 ヶ月では肝細胞の異形成が認められ、11 ヶ月では腫瘍性結節が出現した。11-15 ヶ月では、肉眼的肝腫瘍が TGX マウスの 50% に観察された。野生型マウスではそのような腫瘍は認められなかった。

肝細胞の細胞増殖能を BrdU 取り込みで検討した結果、TGX マウスでは 8 ヶ月以降に野生型マウスに

比し、BrdU 陽性肝細胞が高値を維持した。また、肝細胞アポトーシスを TUNEL 法で観察した結果、野生型マウスに比し、8 ヶ月以降で高値を示した。同じ標本で BrdU 陽性細胞頻度と TUNEL 陽性細胞頻度を比較したところ、8-15 ヶ月のいずれでも BrdU 陽性細胞が多いことが判明した。

TGX マウスで肝細胞腫が発生する分子メカニズムを明らかにするため、肉眼的腫瘍を持つ TGX マウス肝臓、腫瘍を持たない TGX マウス肝臓及び同じ年齢の野生型マウス肝臓から全 RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。その結果、変異 Rb トランスジェニックマウス肝臓では、c-Myc mRNA が増加していた。さらに、腫瘍を持つ TGX マウスでは、Foxm1, c-Fos, c-Jun, Bmi1, Skp2 mRNA などが増加していた。

#### [考察]

リン酸化を受けない Rb タンパクを強制発現すると、c-Myc mRNA が増加することが肝腫瘍の第一段階と考えられる。持続する c-Myc は標的である Foxm1, c-Jun, Bmi1, CyclinD1 の発現を活性化し、増加した Foxm1 は c-Fos, Skp-2, CyclinD1 の発現を活性化する。つまり、c-Myc, Foxm1 及びその標的遺伝子の活性化により、肝細胞は増殖性を獲得し、良性腫瘍を形成したと推定できる。また、肝腫瘍中に見られたアポトーシスは TGF  $\beta$ , p21 mRNA の増加によるものと推論できる。

#### [結論]

1. 変異 Rb トランスジェニックマウスを作製した。
2. このマウス肝臓では生後 8 ヶ月以降に細胞増殖能が増加し、11-15 ヶ月で 50% のマウスに肉眼的肝腫瘍が発生した。
3. 8 ヶ月以降の肝細胞の BrdU 陽性頻度が増加していた。
4. 変異 Rb トランスジェニックマウス肝臓では、c-Myc mRNA が腫瘍の有無に関わらず増加していた。
5. 腫瘍を持つマウス肝臓では、c-Myc mRNA 以外に Foxm1, c-Jun, c-Fos, Bmi1, Skp-2 mRNA などの増加が観察された。

### 論文審査の結果の要旨

#### [はじめに]

肝細胞癌はアジアやアフリカでよくおこる悪性腫瘍の一つである。肝細胞癌発生には主にウイルスや環境因子が重要だと考えられているが、肝臓発癌に関与する分子機構はほとんど分かっていない。

Retinoblastoma (Rb) 遺伝子は最初に発見された癌抑制性遺伝子であり、細胞増殖、細胞分化、細胞死、細胞老化の制御に中心的役割を果たしている。Rb のこれらの作用は転写因子 E2F-1 への結合による E2F-1 の転写抑制によりなされている。分子遺伝学的研究により、肝細胞癌を含めた多くの癌において Rb 遺伝子の異常が指摘されている。また、Rb 遺伝子の先天的突然変異を持つ場合は両側性の網膜細胞腫や骨肉腫を高頻度に発生する。そして、胆嚢、乳腺、前立腺など他の組織の腫瘍の発生に体細胞での Rb 遺伝子の突然変異が寄与していることが知られている。申請者の教室では、正常ヒト Rb タンパクを肝細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製して肝疾患のモデルを作成してきた。そのマウスは、野生型マウスに比し、アポトーシス抵抗性であり、また化学発癌抵抗性を示した。Rb タンパクはリン酸化されると、E2F への結合活性を失うがその結果遊離した E2F は細胞増殖に働く遺伝子群を活性化して細胞増殖を開始させることが知られている。今回申請者は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)によるリン酸化部位に変異を加えた変異 Rb タンパクを肝細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製し、肝臓発生と肝腫

瘍に対する影響を観察した。

#### [材料ならびに方法]

ヒト Rb cDNA にオリゴヌクレオチドによる試験管内突然変異法を用いて、16 個の CDK リン酸化部位のうちの 12 個のセリンあるいはスレオニンをアラニンに変異させた。変異ヒト Rb (mt-Rb) cDNA をラット hepatocyte nuclear factor-1 (HNF1) プロモーター (9 kbp) に連結し、HNF1-mtRb 及び HNF1-LacZ を混合し、マウス受精卵に微小注射してトランスジェニックマウスを作製した。

#### [結果]

得られた仔マウスの尻尾から DNA を抽出し、トランスジーンを持つマウス 2 系統 TGX, TGZ を得た。トランスジェニックマウス肝臓からの核抽出液をウェスタンブロット解析したところ、TGX マウスは外来性 mt-Rb タンパクが検出されたが、TGZ マウスでは内因性 Rb タンパクしか検出できなかった。また、同時に注射した HNF1-LacZ の発現を胎生期 11.5 日のマウスの whole-mount X-gal staining で検討したところ、TGX マウスは肝細胞が陽性になったが、TGZ マウスでは野生型マウスと同じく陰性であったので、以後の解析は TGX マウスについてのみ行うこととした。

mt-Rb マウスの肝臓構築は野生型マウスと差が見られなかった。生後 6 ヶ月までは特に差はなかったが、生後 8 ヶ月くらいから、TGX マウスの肝臓/体重比が野生型マウスに比し増加した。病理組織学的には、8 ヶ月では肝細胞の異形成が認められ、11 ヶ月では腫瘍性結節が出現した。11-15 ヶ月では、肉眼的肝腫瘍が TGX マウスの 50% に観察された。野生型マウスではそのような腫瘍は認められなかった。

肝細胞の細胞増殖能を BrdU 取り込みで検討した結果、TGX マウスでは 8 ヶ月以降に野生型マウスに比し、BrdU 陽性肝細胞が高値を維持した。また、肝細胞アポトーシスを TUNEL 法で観察した結果、野生型マウスに比し、8 ヶ月以降で高値を示した。同じ標本で BrdU 陽性細胞頻度と TUNEL 陽性細胞頻度を比較したところ、8-15 ヶ月のいずれでも BrdU 陽性細胞が多いことが判明した。TGX マウスで肝細胞腫が発生する分子メカニズムを明らかにするため、肉眼的腫瘍を持つ TGX マウス肝臓、腫瘍を持たない TGX マウス肝臓及び同じ年齢の野生型マウス肝臓から全 RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。その結果、変異 Rb トランスジェニックマウス肝臓では、c-Myc mRNA が増加していた。さらに、腫瘍を持つ TGX マウスでは、Foxm1, c-Fos, c-Jun, Bmi1, Skp2 mRNA などが増加していた。

#### [考察]

リン酸化を受けない Rb タンパクを強制発現すると、c-Myc mRNA が増加することが肝腫瘍の第一段階と考えられる。持続する c-Myc は標的である Foxm1, c-Jun, Bmi1, CyclinD1 の発現を活性化し、増加した Foxm1 は c-Fos, Skp-2, CyclinD1 の発現を活性化する。つまり、c-Myc, Foxm1 及びその標的遺伝子の活性化により、肝細胞は増殖性を獲得し、良性腫瘍を形成したと推定できる。また、肝腫瘍中に見られたアポトーシスは TGF  $\beta$ , p21 mRNA の増加によるためと推論できる。

#### [結論]

申請者は以上の一連の研究をまとめて：

変異 Rb トランスジェニックマウス肝臓では生後 8 ヶ月以降に細胞増殖能が増加し、11-15 ヶ月で 50% のマウスに肉眼的肝腫瘍が発生すること。8 ヶ月以降の肝細胞の BrdU 陽性頻度が増加すること。この肝臓では、c-Myc mRNA が腫瘍の有無に関わらず増加しており、さらに腫瘍を持つマウス肝臓では、c-Myc mRNA 以外に Foxm1, c-Jun, c-Fos, Bmi1, Skp-2 mRNA などの増加があり、肝癌発生機転の重要な役割を果たし

ていると結論した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) HNF1 プロモーターの働く臓器は他にどこか
- 2) Rb タンパクのリン酸化部位はみな同等なのか
- 3) Rb ファミリーの遺伝子はヒト、マウスの間で保存されているか
- 4) 老化に作用するという機能は、他の Rb ファミリー遺伝子にもあるのか
- 5) リン酸化は **degradation** のシグナルになっているのか
- 6) Rb ノックアウトマウスは腫瘍発生がおこりやすいか
- 7) このトランスジェニックマウスに導入されている変異 Rb 遺伝子のコピー数について
- 8) **c-Jun** などの発現は腫瘍の表現型の一つにすぎないのではないか
- 9) なぜ **p21** の発現が増加しているのか
- 10) 腫瘍の組織像は肝細胞癌か肝細胞腺腫か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した

論文審査担当者

主査 梶村 春彦

副査 上田 啓次

中村 利夫