

氏名(本籍)	沖本一夫(山口県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第405号
学位授与年月日	平成17年6月27日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	新規の遺伝性腎癌ラット“Nihonラット”に関する病理学および遺伝子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 代田欣二 (副査) 滝沢達也 村上賢

論文内容の要旨

[背景]

ヒトの腎癌は、腎に発生する原発性腫瘍の中でもっとも多く、約90%を占めており、すべての癌の約2%を占めるといわれている。米国においては、癌による死亡の原因として6番目に多く、成人における悪性腫瘍の3%を占めている。これまでに、ヒトの腎癌の発症と進展に関与する遺伝子として、*VHL* (von Hippel-Lindau 病) 遺伝子、*c-Met* 遺伝子、*FH* (fumarate hydratase) 遺伝子、*Tsc1* (Tuberous sclerosis) 遺伝子や *Tsc2* 遺伝子が明らかにされている。腎癌の発症メカニズムの解明や遺伝子治療などの開発にあたっては、ラット等の疾患モデルを用いた研究が不可欠であるが、現在までのところ腎癌の自然発症ラットモデルは、1954年ノルウェーの Eker によって見出された Eker ラットのみであり、さらなる疾患モデル動物の開発が待たれるところである。

著者らは毒性試験のために飼育していた Sprague-Dawley (SD) 系ラットの中に腎癌を自然発症するものを偶然見出し、この癌が遺伝性であることを確認し、“Nihonラット”と命名し、さらに腎癌発症の病因について遺伝子生物学的研究を行った。

本論文では、まず“Nihonラット”の発見の経緯、繁殖・維持過程で得られた病理学的、遺伝学的知見を述べ、次に腎癌の病因候補遺伝子 (*Nihon* 遺伝子) を探索するための染色体地図の作成とポジショナル・クローニング (位置的候補遺伝子探索) 法による染色体領域の特定、さらに特定した染色体領域における、腎癌の有力な病因性候補遺伝子の一つと考えられる *BHD* ホモログ遺伝子の単離と変異の解析について記述し、最後に本ラットの自然史について詳細な病理学的観察を行い、遺伝性腎癌モデル動物としての有用性を考察した。

[第1章]

“Nihon ラット”における腎癌病変のメンデル遺伝

著者らは、同一の繁殖場から購入した7～16週齢の若齢SD系ラット群の343例中15例に腎癌の発生を見出し、その後、同一の繁殖場から雌2例の元親を得て大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・交配を開始した。繁殖・交配の成績から本ラットにおける腎細胞癌は、メンデルの法則に従った単一遺伝子の変異による常染色体優性遺伝形式をとるものと考えられ、本ラットを遺伝性腎癌モデル動物として“Nihon ラット”と命名した。これまでに報告されている遺伝性腎癌モデルラットは、1954年 Ekerにより見出されたEkerラットで、1995年に腎癌病因遺伝子として*Tsc2*遺伝子が単離・同定されている。そこで、“Nihon ラット”とEkerラットにおける腎癌の組織表現型と遺伝子変異の特徴を比較した。その結果、“Nihon ラット”の腎細胞癌がclear cell優位の組織像を示すのに対して、Ekerラットのそれはnon-clear cellにより構成されるものであった。また、“Nihon ラット”では腎臓における変異尿細管、変異過形成、腺腫および腺癌といった多段階的な病変発生が、Ekerラットと比較していずれも早期に起こるという特徴を有していた。さらに、遺伝子変異の解析では、Ekerラットに認められる*Tsc2*遺伝子の変異はなく、ヒト腎癌の原因遺伝子として同定されている*Tsc1*、*Tsc2*、*VHL*遺伝子および*c-Met*遺伝子にも変異は見出せなかった。

以上のように“Nihon ラット”は、腎癌の組織像や遺伝子変異においてEkerラットとは異なることから、新規の腎癌モデルラットであることが強く示唆された。

(Jpn. J. Cancer Res., 91, 1096-1099, 2000.)

[第2章]

“Nihon ラット”の腎癌発症に関与する“Nihon 遺伝子”探索のための染色体地図の作成

“Nihon 遺伝子”を探索するための最初のステップとして、BNラットを用いた113例の戻し交配ラットを作製し、ラット全ゲノムをカバーする既知の遺伝子多型マーカーを用い遺伝的リンケージ解析を実施した。まず、ゲノムワイドスクリーニングを行い、染色体の平均10～20cM断片をカバーする各多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型と、病的形質を呈した個体数（陽性個体数）とのassociation study を χ^2 乗検定し、その値の高いマーカーがある染色体を選び、その候補染色体上のマーカーを基点として、その近傍にある病因遺伝子にできるだけ近いマーカーを求めた。

その結果、“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体10番に存在している*interleukin-3 (IL3)* 遺伝子、*lethal (2) giant larvae (Lgl1)* および*myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* 遺伝子のそれぞれから4.4cM、0.9cMおよび5.3cM離れた位置に座位していた。すなわち、“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体10番の遠位部にあり、*IL3* 遺伝子と*Lgl1* 遺伝子の間に局在していた。

(Jpn. J. Cancer Res., 92, 1147-1149, 2001.)

[第3章]

“Nihon ラット”の腎癌発症に関与する“Nihon 遺伝子”の単離

第2章においては、ラット染色体10番における“Nihon 遺伝子”の詳細な位置特定は不可能であった。ヒトでは *IL3* 遺伝子、*Lgl1* 遺伝子、*MYHSE* 遺伝子はそれぞれ5番長腕23-31、17番短腕11.2、17番短腕13.1に局在しているが、この時点では、ラット染色体10番に対応するヒト染色体が5番か17番か判明しておらず、この領域の既知の遺伝子の中に、腎癌の発生に関連する遺伝子は認められていなかった。しかし、本実験と同一時期に、腎癌を高いリスクで発生するヒトの Birt-Hogg-Dubé (BHD) 症候群の未知の病因遺伝子 (*BHD* 遺伝子) がヒト染色体17番短腕11.2あるいは17番短腕12-長腕11.2に存在することが報告された。そこで本章では、ヒト染色体17番短腕11.2に相同するラット染色体10番の領域における“Nihon 遺伝子”の局在とラット *BHD* ホモログ遺伝子の同定を試み、さらにその変異について検索した。

その結果、“Nihon ラット”において、染色体10番に *BHD* ホモログ遺伝子の存在をラットで初めて確認し、さらにこの遺伝子に一塩基挿入を原因とする生殖細胞系列の変異を見出した。*BHD* ホモログ遺伝子におけるこの一塩基挿入は、フレームシフト変異を生じ、読み枠内に終止コドンを生じさせた。その結果、本 *BHD* ホモログ遺伝子の変異では大半のアミノ酸が欠損していた。また、ホモ変異接合体のラットは胎児期の早期に致死に至ることも確認した。さらに、“Nihon ラット”の11例中10例の腎癌細胞に *BHD* 遺伝子の LOH (ヘテロ接合体の消失) が認められ、LOH を認めなかった1例においても点変異 (ナンセンス変異) を見出した。

以上の結果から、“Nihon 遺伝子”は *BHD* ホモログ遺伝子と極めて近い関係にあり、本ラットにおける腎癌の発生は癌抑制遺伝子における Knudson の2ヒット説を実証するものであると考えられた。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2023-2027, 2004.)

[第4章]

“Nihon ラット”の自然史

本章では、“Nihon ラット”における腎癌以外の腫瘍性病変発生の有無、さらに Nihon ラット特有の病変を見出すために“Nihon ラット”を長期飼育し、全身組織を病理組織学的に検討した。

その結果、“Nihon ラット”における腎癌の発症は病理組織学的に変異尿細管から、変異過形成、腺腫、腺癌へと多段階的に進展し浸透率は100%であった。腎癌の組織像は clear cell が優位であったが、clear/acidophilic cell と papillary basophilic cell type もみられた。腎癌以外には子宮内膜の clear cell 過形成/腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線条部円柱上皮の clear cell 化を認めた。

今回確認された腎癌以外の病変は、SD系ラットを含め、ラットでの報告はまれ、あるいは未報告であり、“Nihon ラット”に特有の病変であり、*BHD* 遺伝子の変異に伴い、あるいは関連して発生したものと考えられた。ヒト BHD 症候群では毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸・肺シストを好発するが、

“Nihon ラット” と BHD 症候群の共通の表現型は腎癌のみであった。

(Curr. Mol. Med., 4, 887-893, 2004)

[結論]

“Nihon ラット”の腎癌は、メンデルの法則に従った常染色体優性遺伝形式をとり、その組織像は Eker ラットのそれよりもヒトに類似し、また病変の発生がより早期に認められる特徴を持つ。Nihon ラットの腎癌の病因候補遺伝子“*Nihon* 遺伝子”は、ラット染色体10番の遠位部に局在し、その遺伝子として *BHD* ホモログ遺伝子が有力である。Nihon ラットの *BHD* ホモログ遺伝子には一塩基挿入による生殖細胞系列の変異が存在し、本ラットの腎癌細胞にはヒトと同様に *BHD* 遺伝子の LOH (ヘテロ接合体の消失) が認められることから、“Nihon ラット”は Knudson の2ヒット説を実証するモデルであると考えられる。

以上のことから、“Nihon ラット”はヒト BHD 症候群の動物モデルとして、また、*BHD* 遺伝子機能や腎癌の発生とがん抑制遺伝子の関連について、有用な情報を提供するものと考えられ、ヒトの癌化機構の解明や遺伝子治療の開発に大きく寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒトの腎癌は、腎臓に発生する原発性腫瘍の中でもっとも多く、約90%を占めており、本邦ではすべての癌の約2%を占めるといわれている。米国においては、癌による死亡の原因として6番目に多く、成人における悪性腫瘍の3%を占めている。これまでに、ヒトの腎癌の発症と進展に関与する遺伝子として、*VHL* (von Hippel-Lindau 病) 遺伝子、*c-Met* 遺伝子、*FH* (fumarate hydratase) 遺伝子、*Tsc1* (Tuberous sclerosis) 遺伝子や *Tsc2* 遺伝子が明らかにされている。腎癌の発症メカニズムの解明や遺伝子治療などの開発にあたっては、ラット等の疾患モデルを用いた研究が不可欠であるが、現在までのところ腎癌の自然発症ラットモデルは、1954年ノルウェーの Eker によって見出された Eker ラットのみであり、さらなる疾患モデル動物の開発が待たれるところである。

著者らは毒性試験のために飼育していた Sprague-Dawley (SD) 系ラットの中に腎癌を自然発症するものを偶然見出し、この癌が遺伝性であることを確認し、そのラットを“Nihon ラット”と命名した。さらにこの腎癌発症の病因について遺伝子生物学的研究を進め、それらの内容を本論文にまとめているが、その成果は既に1) Jpn. J. Cancer Res., 91, 1096-1099, 2000. 2) Jpn. J. Cancer Res., 92, 1147-1149, 2001. 3) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2023-2027, 2004. 4) Curr. Mol. Med., 4, 887-893, 2004 に公表されている。

本論文は5章よりなり、まず“Nihon ラット”の発見の経緯、繁殖・維持過程で得られた病理学的、遺伝学的知見を述べ、次に腎癌の病因候補遺伝子 (*Nihon* 遺伝子) を探索するための染色体地図の作成とポジショナル・クローニング (位置的候補遺伝子探索) 法による染色体領域の特定、さらに特定した染色体領域における、腎癌の有力な病因性候補遺伝子の一つと考えられる *BHD* ホモログ遺伝子の

単離と変異の解析について記述し、最後に本ラットの自然史について詳細な病理学的観察を行い、第5章において遺伝性腎癌モデル動物としての有用性を考察している。

第1章において、著者らは同一の繁殖場から購入した7～16週齢の若齢SD系ラット群の343例中15例に腎癌の発生を見出し、その後、同一の繁殖場から雌2例の元親を得て大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・交配を行い、その成績から本ラットにおける腎癌がメンデルの法則に従った単一遺伝子の変異による常染色体優性遺伝形式をとることを示し、本ラットを遺伝性腎癌モデル動物として“Nihonラット”と命名した。従来報告されている遺伝性腎癌モデルラットは、1954年 Ekerにより見出されたEkerラットで、1995年に腎癌病因遺伝子として *Tsc2* 遺伝子が単離・同定されている。そこで、“Nihonラット”とEkerラットにおける腎癌の組織表現型と遺伝子変異の特徴を比較した。その結果、“Nihonラット”の腎細胞癌がclear cell優位の組織像を示すのに対して、Ekerラットのそれはnon-clear cellにより構成され、“Nihonラット”では腎臓における変異尿管、変異過形成、腺腫および腺癌といった多段階的な病変発生が、Ekerラットと比較していずれも早期に起こるという特徴明らかにした。さらに、遺伝子変異の解析で、Ekerラットに認められる *Tsc2* 遺伝子の変異はなく、ヒト腎癌の原因遺伝子として同定されている *Tsc1*、*Tsc2*、*VHL* 遺伝子および *c-Met* 遺伝子にも変異なく、“Nihonラット”が新規の腎癌モデルラットであることを示唆した。

第2章においては、“Nihon 遺伝子”を探索するための最初のステップとして、BNラットを用いた113例の戻し交配ラットを作製し、ラット全ゲノムをカバーする既知の遺伝子多型マーカーを用い遺伝的リンケージ解析を実施した。その結果、“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体10番に存在している *interleukin-3 (IL3)* 遺伝子、*lethal (2) giant larvae (Lgl1)* および *myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* 遺伝子のそれぞれから4.4cM、0.9cMおよび5.3cM離れた位置に座位し、ラット染色体10番の遠位部にあり、*IL3* 遺伝子と *Lgl1* 遺伝子の間に局在していることを明らかにした。

第2章において“Nihon 遺伝子”がラット染色体10番に局在することを明らかにしたが、詳細な位置特定は不可能であった。また、“Nihon 遺伝子”に隣接していた *IL3* 遺伝子、*Lgl1* 遺伝子、*MYHSE* 遺伝子はヒトではそれぞれ5番長腕23-31、17番短腕11.2、17番短腕13.1に局在しているが、この時点では、ラット染色体10番に対応するヒト染色体が5番か17番か判明しておらず、この領域の既知の遺伝子の中に、ヒトの腎癌の発生に関連する遺伝子は認められていなかった。しかし、本研究と同時期に、腎癌を高いリスクで発生するヒトのBirt-Hogg-Dubé (BHD)症候群の未知の病因遺伝子 (*BHD* 遺伝子) がヒト染色体17番短腕11.2あるいは17番短腕12-長腕11.2に存在することが報告された。そこで第3章では、ヒト染色体17番短腕11.2に相同するラット染色体10番の領域における“Nihon 遺伝子”の局在とラット *BHD* ホモログ遺伝子の同定を試み、さらにその変異について検索した。その結果、“Nihonラット”において、染色体10番に *BHD* ホモログ遺伝子の存在をラットで初めて確認し、さらにこの遺伝子に一塩基挿入を原因とする生殖細胞系列の変異を見出した。*BHD* ホモログ遺伝子におけるこの一塩基挿入は、フレームシフト変異を生じ、読み枠内に終止コドンを生じさせており、その結果、本 *BHD* ホモログ遺伝子の変異では大半のアミノ酸が欠損していることを見出した。また、ホモ変

異接合体のラットは胎児期の早期に致死に至ることも確認した。さらに、“Nihon ラット”の11例中10例の腎癌細胞に*BHD*遺伝子のLOH（ヘテロ接合体の消失）が認められ、LOHを認めなかった1例においても点変異（ナンセンス変異）を見出した。以上の結果から、“*Nihon* 遺伝子”は*BHD*ホモログ遺伝子と極めて近い関係にあり、本ラットにおける腎癌の発生は癌抑制遺伝子におけるKnudsonの2ヒット説を実証するものであることを示唆した。

第4章では、“Nihon ラット”における腎癌以外の特異な病変を見出すために、長期飼育した“Nihon ラット”の全身組織を病理組織学的に検討した。その結果、“Nihon ラット”における腎癌の発症は病理組織学的に変異尿細管から、変異過形成、腺腫、腺癌へと多段階的に進展し浸透率は100%で、腎癌の組織像はclear cellが優位であることを示した。また、腎癌以外に子宮内膜のclear cell過形成／腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線条部円柱上皮のclear cell化を認め、これらの腎癌以外の病変が、SD系ラットを含めラットでの報告はまれ、あるいは未報告であることから、“Nihon ラット”特有の病変であり、*BHD*遺伝子の変異に伴いあるいは関連して発生したものであることを示唆した。さらに、ヒト*BHD*症候群では毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸・肺シストが好発するが、“Nihon ラット”と*BHD*症候群の共通の表現型は腎癌のみであることも示した。

本研究は、新規の遺伝性腎癌モデルとしての“Nihon ラット”を見出し、さらに本ラットがヒト*BHD*症候群の動物モデルとして有力であること、また、*BHD*遺伝子機能や腎癌の発生とがん抑制遺伝子の関連について有用な情報を提供するものであることを明らかにしたもので、本研究の成果は癌化機構の解明や癌の遺伝子治療の開発に大きく寄与するものと考えられ、モデル動物の開発・作出といった獣医学領域における重要な研究として高く評価され、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判定した。