



| | |
|--------------|---|
| Title | 遺伝子標的導入法によるA群色素性乾皮症モデルマウスの作成 |
| Author(s) | 弓場, 俊輔 |
| Citation | 大阪大学, 1994, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38938 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | ゆ ば しゅん すけ 弓 場 俊 輔 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 1 2 5 8 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 6 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻 |
| 学 位 論 文 名 | 遺伝子標的導入法による A 群色素性乾皮症モデルマウスの作成 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 田中亀代次 (副査) 教 授 近藤 寿人 教 授 西宗 義武 |

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は DNA 修復機構に異常を持つ常染色体劣性遺伝病で、日光過敏、日光露出部の高頻度皮膚癌発生に加え、進行性の知能低下、小頭症、神経性難聴、小脳性運動失調、神経原性筋萎縮など種々の精神神経症状を臨床的特徴とする。XP には A から G 群そしてバリエントの 8 つの遺伝的相補群が存在するが、私たちはそのうち臨床症状が最も重篤で、日本で最多の A 群の原因遺伝子 (XPAC 遺伝子) のクローニングに成功した。現在、XP の病態解明に向けては分子、細胞レベルでの DNA 修復機構の解析が進められているが、高頻度発癌に対して、また神経細胞死が原因である精神神経症状に対しては分子、細胞レベルでの解析には限界があり、これからは個体レベルでの解析が必要となってきた。そこで遺伝子標的導入法により XPAC 遺伝子を破壊した A 群 XP モデルマウスを樹立することを本研究の目的とした。A 群 XP モデルマウスの樹立によって XP の発症機構が明らかになれば有効な治療法開発も期待できる。

[方法および結果]

胚幹 (ES) 細胞は CBA 系雄マウスと交配した C57BL/6 系雌マウスから回収した胚盤胞から樹立した F1/1 を用いた。導入したターゲティングベクターは置換型で、マウス XPAC 遺伝子の第 3、第 4 エクソンを含む約 4.8kb のゲノム断片を使用した。第 4 エクソンの間にポリオーマエンハンサーと TK プロモーターを繋いだ neo^r あるいは hyg^r を挿入し、ベクターの 3' 端には HSV-tk を連結している。最初にこの neo ベクターをエレクトロポレーションで ES 細胞に導入、G418、GANC 存在下で、ポジティブネガティブ選択を行い、PCR、サザンプロット解析により相同組換え体を選別した。

このヘテロ接合体 ES 細胞にさらに hyg ベクターを同様に導入し、G418、Hygromycin B、GANC 存在下で選択して XPAC 遺伝子の両方の対立遺伝子を破壊したホモ接合体 ES 細胞を樹立した。紫外線照射後の生存率においてホモ接合体 ES 細胞は野性型およびヘテロ接合体 ES 細胞に比べ高感受性を示した。

そこでヘテロ接合体 ES 細胞の 1 クローンをアルビノの CD-1 系マウス由来の 8 細胞期胚へ注入法により戻し、キメラマウスを作成した。そのうちの 1 匹の雄生殖系列キメラマウスとアルビノの CD-1 系雌マウスとを交配し、ヘテロ接合体マウスを得た。XP モデルマウスはこのヘテロ接合体同士の交配によって作成した。

1 年齢の野性型、ヘテロ接合体およびホモ接合体マウスの三者間には外見および行動上の差異は認められない上に

ホモ接合体マウス同士の交配により正常な子孫（ホモ接合体）も得られている。このホモ接合体マウスの各臓器から組織切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色後、病理変化の有無を検索したところ、XPに見られる脳全体の萎縮、グリオーシスを伴う神経細胞の脱落のような脳病変は認められず、他臓器についても病理組織学的解析から異状を認めなかった。

一方、マウスから繊維芽細胞を樹立し、その紫外線照射後の生存率においてホモ接合体マウス由来の繊維芽細胞が野性型マウス由来細胞に比べ高感受性を示し、その生存率曲線は典型的 A 群 XP 患者由来細胞のそれに相当するものであった。マウス由来繊維芽細胞に紫外線を照射後、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを培養液に添加、固定後オートラジオグラフィーを行い、核上の黒い銀粒子を計測したところホモ接合体マウス由来細胞では修復合成である不定期 DNA 合成が認められなかった。

またマウス由来繊維芽細胞の DNA 修復能を紫外線による DNA 障害であるチミン二量体、6-4 光生成物に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA によって測定したところホモ接合体マウス由来細胞ではチミン二量体、6-4 光生成物ともに除去されないことが明らかとなった。

さらにセンダイウイルス（HVJ）による遺伝的相補性テストを行った。ホモ接合体マウス由来繊維芽細胞は A 群細胞と融合させても DNA 修復能は回復しないが、C 群細胞と融合させると回復することからホモ接合体マウス由来繊維芽細胞は A 群に属することがわかった。

次にマウスを用いた 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 連続塗布による皮膚発癌実験を行ったところホモ接合体マウス皮膚表面にパピローマが高頻度に発生し、ヘテロ接合体マウス皮膚には異状を認めなかった。

また DMBA, 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) の腹腔内投与を行ったところ DMBA 投与実験では雄、雌ともにホモ接合体マウスのみ高感受性を示し、4NQO 投与実験では雌が抵抗性を示したものの、雄のホモ接合体マウスが高感受性を示した。

[総括]

XPAC 遺伝子の両対立遺伝子を破壊したホモ接合体 ES 細胞が紫外線高感受性を示したようにホモ接合体マウス由来繊維芽細胞も紫外線高感受性を示し、DNA 除去修復能を欠損していた。さらに皮膚発癌実験においてホモ接合体マウスは高頻度に腫瘍を発生したことからホモ接合体マウスは XP の DNA 除去修復能欠損や高発癌性について A 群 XP モデルマウス (XPA マウス) となり得るものである。一方、ホモ接合体マウスが行動異常を示さないことやその中枢神経系の病理所見が全く正常であることから神経症状については A 群 XP の病態を再現していない。その原因についてはさらに詳細な検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は DNA 修復機構に異常を持つ常染色体劣性遺伝病で、高頻度皮膚癌発生と種々の精神神経症状を臨床の特徴とする。XP には A から G 群そしてバリエーションの 8 つの遺伝的相補群が存在するが、私たちはそのうち臨床症状が最も重篤で、日本で最多の A 群の原因遺伝子 (XPA 遺伝子) のクローニングに成功した。これまで XP の病態解明に向けては分子、細胞レベルでの DNA 修復機構の解析が進められてきたが、高頻度発癌に対して、また神経細胞死が原因である精神神経症状に対しては個体レベルでの解析が必要とされていた。

そこで遺伝子標的導入法により XPA 遺伝子を破壊した A 群 XP モデルマウスの樹立を本研究の目的とし、モデルマウスの病態を解析したものである。その結果、XPA ホモ接合体マウスの神経病理所見が全く正常であることから神経症状については A 群 XP の病態を再現していないものの、ホモ接合体マウス由来の繊維芽細胞は XP 患者由来の細胞と同様、DNA 修復能が欠損し、ホモ接合体マウスは化学発癌物質に対して高発癌性を示すことから皮膚症状については A 群 XP モデルマウス (XPA マウス) となり得ることを十分に示すものであった。

本研究は初めて個体レベルで DNA 修復能欠損と発癌の関連性を明らかにした点で癌研究に大きく貢献したもので、学位論文として十分に価値のあるものと認められる。