

第 6 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	中田 雄一郎
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>Acquired Deficiency of A20 Results in Rapid Apoptosis, Systemic Inflammation, and Abnormal Hematopoietic Stem Cell Function.</p> <p>( 脱ユビキチン化酵素A20の後天的な欠損はアポトーシス、全身性炎症、造血幹細胞の機能異常を誘導する )</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教授 一戸 辰夫 印</p> <p>審査委員 教授 小林 正夫</p> <p>審査委員 教授 瀧原 義宏</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>これまでの研究から、染色体の転座、遺伝子の欠損、遺伝子数のコピー異常などのゲノム異常によってがん化が促進されることが知られている。最近、著者らの研究グループがヒト B 細胞リンパ腫 200 症例以上で次世代シーケンサーを用いて、遺伝子コピー数の異常及びアレル異常を検索した結果、6 番染色体に位値する A20 が両アレルで欠損していることを見出した。A20 は脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子であり、その酵素活性により炎症性サイトカインからのシグナルによる転写因子 NF-<math>\kappa</math>B の活性化を強烈に負に制御する。これまでに、A20 の欠失や不活性型の変異が自己免疫疾患の発症原因のひとつとして報告されている。しかし、正常造血での造血幹細胞(HSC)の制御機構や造血器腫瘍の発症機序における A20 の機能についてはまだ不明な点が多い。先天的に A20 をノックアウト(KO)したマウスは、生後約 1 週間で激しい全身性の炎症により死亡するため、このマウスを用いた生体造血の解析は困難である。そこで、著者らは Cre-loxP システムを利用して後天的に A20 の欠損を誘導可能にしたコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、生体造血における A20 欠損の生物学的機能及び疾患発症への意義について解析を行った。</p>			

A20 cKO マウスに IFN 依存性に Cre 発現が誘導される MxCre マウスを掛け合わせたところ、A20 cKO, MxCre (A20Mx) マウスでは、脾臓と肝臓の腫大、および主要臓器に炎症細胞の浸潤を認め、末梢血および脾臓では骨髄球系細胞の増加とアポトーシスによる B 細胞の減少を認めた。血清における炎症性サイトカインの測定を行なったところ、TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$  の上昇を認め、上記の表現型は先天的な A20 KO マウスと同じく全身炎症によるものと考えられた。今回作製した A20Mx マウスでは、全身の細胞で A20 欠損が誘導されることから、上記の表現型が造血細胞自律的なものかどうかを検討する目的で、コントロールマウスと A20Mx マウスから骨髄細胞を単離し、致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに骨髄移植を行った。その結果、A20Mx マウス由来の骨髄細胞を移植したレシピエントでは、脾臓の腫大、全身臓器への炎症細胞の浸潤、貧血、骨髄球系細胞の増加、およびリンパ球系細胞の減少という A20Mx マウスとほぼ同じ表現型を認め、全身性の炎症反応は A20 が欠損した造血細胞に起因していることが明らかとなった。さらに A20Mx マウス由来の骨髄細胞を移植したレシピエントは、移植後一ヶ月以内に全例が全身性の炎症反応に伴い死亡した。MxCre マウスでは Cre 活性が内因性の IFN の影響を受ける。この影響を排除するため、内因性の因子の影響を受けず外部からの tamoxifen 投与により Cre が活性化する ERT2Cre マウスを A20 cKO マウスと掛け合わせた A20ERT2 を用いて上記の実験を行なった。A20ERT2 は A20Mx と同じ表現型を呈し、得られた結果は A20 欠失による直接影響と考えられた。

次に、著者らは、A20Mx マウスの骨髄から Lineage 陰性 CD150 陽性 CD48 陰性 HSC 細胞を単離し、HSC の機能について詳細な解析を行った。A20Mx マウスでは、骨髄の HSC の細胞数が減少しており、その原因は、BrdU incorporation assay の結果、HSC の細胞周期の亢進であることが強く示唆された。さらに A20Mx マウス由来の HSC を致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに骨髄移植し、骨髄再構築能の比較を行った結果、HSC の細胞周期の亢進に伴った骨髄再構築能の低下が認められた。HSC のシグナル伝達系における A20 欠損の影響を検討するために、NF- $\kappa$ B に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、A20Mx マウスの HSC では NF- $\kappa$ B の核移行の増加を認め、恒常的に NF- $\kappa$ B が活性化され、遺伝子の転写が活発に行われていることが明らかとなった。

以上の結果から、A20 cKO マウスを作製することにより、後天性 A20 の欠損はサイトカイン産生の脱制御による炎症の持続を誘導し、その結果マウスは貧血、骨髄球系の過増殖、B 細胞アポトーシス、および炎症細胞の全身浸潤により死亡することを明らかとした。また、A20 を欠損した HSC では転写因子 NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化、細胞周期の亢進を認め、その結果として骨髄再構築能の低下を呈することも併せて示した。本論文は造血細胞における脱ユビキチン化酵素 A20 の欠損の生物学的意義について、マウス個体レベルで検討を行った研究である。A20 が造血細胞の炎症反応およびアポトーシスを抑制することで、成体造血のホメオスタシスの維持に重要であることを明らかにした点で高く評価できる。よって審査委員会全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

第 7 号様式

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	中田 雄一郎
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>Acquired Deficiency of A20 Results in Rapid Apoptosis, Systemic Inflammation, and Abnormal Hematopoietic Stem Cell Function.</p> <p>( 脱ユビキチン化酵素A20の後天的な欠損はアポトーシス、全身性炎症、造血幹細胞の機能異常を誘導する )</p>			
<p>最終試験担当者</p> <p>主 査 教授 一戸 辰夫 印</p> <p>審査委員 教授 小林 正夫</p> <p>審査委員 教授 瀧原 義宏</p>			
<p>[最終試験の結果の要旨]</p> <p style="text-align: center;">判 定 合 格</p> <p>上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 27 年 8 月 6 日の第 60 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 27 年 8 月 20 日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 造血・炎症の制御に関与するユビキチン化調節酵素についての一般的知見</li> <li>2 A20cKO マウスの B 細胞前駆細胞数を各分化段階毎に比較する意義</li> <li>3 A20cKO マウスの血清中サイトカイン産生濃度が個体間で相違することの原因</li> <li>4 A20 機能喪失変異を伴うリンパ腫と伴わないリンパ腫の臨床像の相違</li> <li>5 A20cKO マウス由来の骨髄間質細胞が正常 HSC の維持・分化に与える影響の検討</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			