

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 中山雅晴

本研究は、Cre-loxP システムを利用した活性化型 K-ras 発現コンディショナルジーンターゲティングマウスを作成するために設計した allele が機能するか、in vitro の系で検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. rotation type と trap type の 2 種類の allele を検討する目的で 4 種類の テスタープラスミドを作成した。特徴としては、極力 genome 上の k-ras に近いよう設計し、1. rotation type と trap type 2. point mutation で G12V 3. 内因性の promoter、4. splicing acceptor も内因性 5. genome の DNA は全く削れていない、6. 活性化型 k-ras が発現しないときは GFP もしくは LacZ が発現する、などが挙げられる。
2. 上記テスタープラスミドを NIH3T3 細胞に transfection して focus 形成を検討し、さらに、focus を形成した細胞を subcloning して活性化型 K-ras の発現を RT-PCR と Aci I digest を組み合わせた方法で検討した。また、X-gal 染色を行って LacZ 遺伝子の発現や、蛍光を観察して GFP 遺伝子の発現をみた。その結果、trap type では、普段は LacZ が発現しているが、Cre-recombinase を作用させて loxP 配列に挟まれた部分が切り出された形になると LacZ の発現が消失し、G12V の point mutation の入った活性化型 K-ras が発現して transform 能が出現することがわかった。rotation type では、普段は EGFP が発現して、Cre-recombinase を作用させて反転すると EGFP の発現が消失した。しかし、transform 能に関しては、形成された focus では活性化型 K-ras が発現しているものの、focus の形成数が少なく、弱い transform 能しかないと考えられた。
3. trap type の allele に Cre-recombinase を作用させると実際に loxP 配列に挟まれた部分が切り出され、transfection の実験で予想されたような結果が得られるか、trap type のテスタープラスミド (K-rasZ) を neomycin 耐性遺伝子と共に NIH3T3 細胞に co-transfection し、K-rasZ が integrate された stable clone を獲得して検討した。その結果、このクローンは通常は LacZ を発現しており、cre-recombinase を作用させると LacZ の発現が消失して focus を形成し、その focus では G12V の point mutation が入った活性化型 K-ras の発現が認められた。
4. コンディショナルジーンターゲティングマウスの作成における ES 細胞の

スクリーニングの際、ターゲティングベクター上の LacZ 遺伝子を利用できないかということも念頭に置き、**trap type** のテスタープラスミド (K-rasZ) を NIH3T3 細胞に **transfection** し、FDG 染色を行って蛍光を FACS で検出する方法により、LacZ 遺伝子が **stable** に発現する **clone** を獲得した。しかし、**transform** 能の出現は企図する通りには動かなかった。この方法は、**selection** 効率が悪く 1 回の **sorting** では目的の細胞を集められない、細胞の生存率が低いなど致命的な欠陥があり、ES 細胞のスクリーニングへの応用は非現実的であることがわかった。

5. **trap type** の **allele** を持つ活性化型 K-ras コンディショナルジーンターゲティングマウスの肺における **targeting** を行うには、**Cre-recombinase** 発現アデノウイルスベクターの鼻腔からの吸入で実現可能であることを **sLacZ mouse** を使って証明した。この方法により肺の中の気道上皮細胞や肺胞上皮細胞でのコンディショナルジーンターゲティングを確認した。

以上、本論文は、設計した **trap type** の活性化型 K-ras の **allele** が機能し、**Cre-recombinase** 発現アデノウイルスベクターの鼻腔からの吸入で肺特異的にジーンターゲティングを行うことが可能であることを示した。本研究は、**trap type** の **allele** 構造を持つ活性化型 K-ras コンディショナルジーンターゲティングマウスが実際に作成でき、このマウスが肺癌の **initiation** や **progression** の解析に使用できることを示し、これまで未知であった肺癌の発癌のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。