

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 今井 光穂

本研究は、膵腫瘍の発生および進展の過程におけるオートファジーの役割を明らかにするため、膵特異的 *Kras* 活性型変異マウスモデルに、オートファジー欠損マウスモデルを交配させ、膵臓に発生する腫瘍を解析することで解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. オートファジーに必須である *Atg5* 遺伝子のみを膵特異的に欠損させたマウス (PAA) の表現型を解析するため、コントロールマウスと比較検討を、膵臓の H.E. 染色および *Amylase*、*Insulin* の免疫染色によって行った結果、組織形態学的に、腺房細胞の増大以外に明らかな異常は認めなかった。しかし、8 週齢でのグルコース負荷試験では、PAA マウスに耐糖能の低下を認めた ( $p < 0.05$ )。なお、PAA マウスでは最長 2 年間の観察で、膵臓に腫瘍の発生は見られなかった。
2. ヒト膵癌の 90% 以上に見られる *KrasG12D* 変異のノックインマウス (PK) では、100% の浸透率で膵前癌病変 (mPanIN) が発生する。このマウスを基に、*Atg5* 遺伝子を欠損させる (PKAA マウス) と、生存曲線に統計学的な有意差はなかったものの ( $p = 0.413$ ; log-rank 検定)、mPanIN の発生時期は、著明に早期化することが明らかとなった。しかし、PKAA マウスは PK マウスよりも mPanIN の発生は早期化するにも関わらず、グレードの進行は確認されなかった。また、*Atg5* 欠損による mPanIN の癌化に対する影響も見られなかった。
3. PKAA マウスでの mPanIN の発生時期が早期化する原因とし、mPanIN の形成直前および形成後早期の膵臓での細胞増殖を促進していることを *Ki-67*、*CyclinD1* 免疫染色にて確認した。加えて、*KrasG12D* 変異マウスに対する *Atg5* 遺伝子の欠損は、mPanIN の形成直前および形成後早期に *Erk* の活性化を亢進させることを phospho-*Erk* を用いたウェスタンブロット法と免疫染色で明らかにした。また、8-OHdG と  $\gamma$ H2AX による染色の結果、*Atg5* 遺伝子の欠損は、活性酸素を蓄積し、DNA 損傷を引き起こすことも明らかとなった。
4. mPanIN から樹立した細胞株を用いた *in vitro* での検討では、*Atg5* の欠損による増殖能やスフェア形成能、細胞老化に対する変化は見られなかったが、ウェスタンブロット法の結果、*Erk* の活性化や DCF-DA を用いたフローサイトメトリー法によ

る検討から ROS の蓄積が示唆された。

以上、本論文は腭腫瘍を形成する腭特異的 **Kras** 活性型変異マウスモデルに、オートファジー必須の遺伝子である **Atg5** を欠損させ、腭腫瘍の発生に対する解析を行うことにより、腭腫瘍の発生はオートファジー不全により促進されることを明らかにした。本研究は、様々な論説のある腫瘍におけるオートファジーの役割、特に、腭腫瘍での役割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。