







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第568号	氏名	甲斐友喜
審査委員会委員	主査氏名	吉岡秀克	
	副査氏名	花田俊勝	
	副査氏名	柴田洋孝	
論文題目 Kidney-specific knockout of <i>Sav1</i> in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway ( <i>Sav1</i> の腎特異的欠失はHippo pathwayの抑制による腎尿細管上皮細胞の過剰増殖をもたらす)			
論文掲載雑誌名 The Journal of Pathology			
論文要旨 これまでに申請者らのグループは、淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)の悪性化に14番染色体長腕欠失(14q loss)によるSAV1遺伝子の発現低下が関与すること、さらに、SAV1がHippo pathway下流のターゲットであるYAP1を抑制することで、腎臓由来不死化細胞の増殖・生存能を制御することを見出した。本研究においては腎特異的SAV1ノックアウトマウスモデルを作製することで、腎細胞癌発生母地である腎尿細管上皮細胞におけるSAV1の役割を検証した。 腎特異的SAV1ノックアウトマウスの作製: SAV1のexon3をloxP及びFRT配列が挟む形でデザインされたES細胞を用いてキメラマウスを作製した。このキメラマウスとWTマウスを交配し、SAV1 <sup>lox with Neo</sup> マウスを作製した。次に、FLPトランスジェニックマウスと交配し、exon3がloxP配列のみで挟まれた遺伝子座をもつマウスSAV1 <sup>lox</sup> を作製した。最後に、腎尿細管特異的にCreを発現するCdhelin-16(Cdh16)・Creトランスジェニックマウスと交配し、腎尿細管特異的にSav1のexon3を除去したヘテロ欠失マウスCdh16-Cre;SAV1 <sup>lox/+</sup> やホモ欠失マウスCdh16-Cre;SAV1 <sup>lox/lox</sup> を作製した。SAV1 <sup>fl/fl</sup> マウスをコントロールとした。 組織学的解析: 生後6、12、18ヶ月マウスを用いて、体重、腎重量を測定し、組織学的解析を行った。抗SAV1抗体、抗YAP1抗体、抗AQP1抗体、抗TH抗体、抗NCC抗体、抗AQP2抗体を用いて免疫染色を行い、増殖能は腎最大切面あたりのKi-67陽性細胞数で評価した。 その結果、SAV1ホモ欠失マウスはコントロールマウスと比較して、腎尿細管上皮細胞でのYAP1の核内移行と増殖能の亢進がみられた。また生後6ヶ月の時点からホモ欠失マウスには特異的に尿細管上皮細胞の細胞数の増加、重層化、核の大型化を認めた。加えて、糸球体嚢胞や尿細管嚢胞の形成が認められ、加齢とともに尿細管嚢胞の数は増加した。18ヶ月齢ホモ欠失マウスの1個体においては、尿細管嚢胞が重層化し異型を示した。また腎重量はコントロールと比べて有意差はなかったが、加齢とともに近位尿細管数の減少、間質の慢性炎症所見を認めた。 以上、腎特異的SAV1ノックアウトマウスでの腎所見から、SAV1遺伝子は腎臓の尿細管上皮の核の大きさを制御し、ネフロン構造の維持に重要な生理機能を果たしていることが認められた。また、増殖能の亢進だけでなく、核の腫大や大小不同も認めたことから、SAV1欠失は癌細胞の増殖だけでなく、高異型度ccRCCに特徴的な核異型にも関わっていることが示唆された。 本研究は腎特異的ノックアウトマウスを作製し、それを用いて淡明細胞型腎細胞癌発生母地である腎尿細管上皮細胞におけるSAV1の役割を検証した論文であり、学術的、臨床的な意義は極めて高い。審査委員の合議により、本論文は学位論文に値すると判断した。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 <b>課・論</b>	第568号	氏名	甲斐友喜
審査委員会委員	主査氏名	吉岡秀克 	
	副査氏名	花田俊勝 	
	副査氏名	柴田洋寿 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察等について以下の質疑を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. これまでに SAV1 遺伝子の突然変異について、腎癌以外の癌またはその他の疾患で報告がされているか。</li> <li>2. 肝臓、皮膚、大腸の組織特異的 SAV1 ノックアウトマウスの表現型についてどのように報告されているか。特に癌発症についてはどうか。</li> <li>3. VHL 遺伝子および SAV1 遺伝子のダブルノックアウトマウス作製による腎癌発症を試みたことはないか。</li> <li>4. SAV1 の全身性ノックアウトマウスの死亡原因は何か。また、腎臓の表現型はどのようになっているか。</li> <li>5. SAV1 の組織特異的ノックアウトマウスで肝臓などその他の組織と比べて、腎臓での表現型が出現するまでの時間はどの程度の違いがあるか。なぜ、腎臓特異的 SAV1 欠失マウスでは12~18ヶ月の長期間かけて表現型が出現すると考えられるか。</li> <li>6. SAV1 欠失により、YAP-TEAD 転写因子複合体が活性化されるが、その標的遺伝子にどのようなものがあるか。</li> <li>7. アレイCGHで変化が見られた遺伝子として、他にどのような遺伝子があるか。</li> <li>8. 腎臓特異的Creトランスジェニックマウスはどのようなものが存在するか。また、今回Cdh16-Creマウスを選択した根拠は何か。</li> <li>9. Exon3を欠失させることで、完全にnullになるのか。</li> <li>10. SAV1のヘテロ、ホモ欠失マウスはどの程度生まれてきたか。その中で実際の実験にどの程度供したか。なかなか生まれてこないなど実験遂行上困難があったのか。</li> <li>11. SAV1の下流シグナルの他の評価方法として、TEAD-YAP1の標的遺伝子上へのChIP assayや、hypophosphorylated YAP1の発現などの評価方法でも検討しているか。</li> <li>12. 核の大きさはどのようにして計測したか。</li> <li>13. シグナルや分子機構を解析することに関しては12週齢より若いマウスで十分ではないか。</li> <li>14. 正常マウスの腎臓ではアポトーシスはほとんど観察されない上に本マウスはYAP1の活性化によりアポトーシス耐性になっていると考えられるので、腎毒性のある薬剤等でアポトーシスを惹起した上で観察しないと、差が見られないのではないか。</li> <li>15. 核が肥大化するという組織像は細胞生物学的に何を意味しているのか。染色体分裂などに異常はないのか。</li> <li>16. Supplementary Figure 8の図説明において、スケールバーについての記述を確認されたい。</li> <li>17. 12週齢のノックアウトマウスの腎臓が淡く変色していることについて2匹のマウスで確認したと記述があるが、その他の個体でも再現性は十分確認したか。</li> <li>18. Cadherin 16-Creを用いてSAV1を欠失させた際に、腎臓の近位尿管管~集合管まで全般的にSAV1が欠失できたのか。</li> <li>19. SAV1の欠失は尿管管全般にもかかわらず、核や細胞の変化や嚢胞形成は近位尿管管優位に出現したということは、近位尿管管細胞にあり集合管細胞にない何らかの細胞内環境が関係したと思われるがそれには何が考えられるか。</li> <li>20. 本ノックアウトマウスの結果からはSAV1欠失が淡明細胞型腎細胞癌のモデルとして合致する結果になったと考えて良いのか。</li> <li>21. Cystをきたす要因や因子についてどのようなものが考えられるか。</li> <li>22. 本マウスモデルにおいて化学薬剤誘導型癌発症モデルを行って見たか。</li> <li>23. YAP1阻害剤が抗癌剤として開発されつつあるとの記述があるが、YAP1シグナルが生体維持に重要であることから、激しい副作用が懸念されるのではないか。</li> <li>24. 正常腎臓との間にtranscriptome解析などを行うと癌発生に関わる分子が見つかる可能性があるのではないか。</li> <li>25. 臨床的に、ccRCCを発症しやすい腫瘍感受性SAV1 SNPsは存在するか。</li> <li>26. epigeneticな因子も発症に関わるが、ccRCCにおいて何らかの因子がSAV1発現低下に関わるような報告や検討はしているか。</li> <li>27. このマウスを用いた今後実験計画についてどのように考えているか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。