

19990332

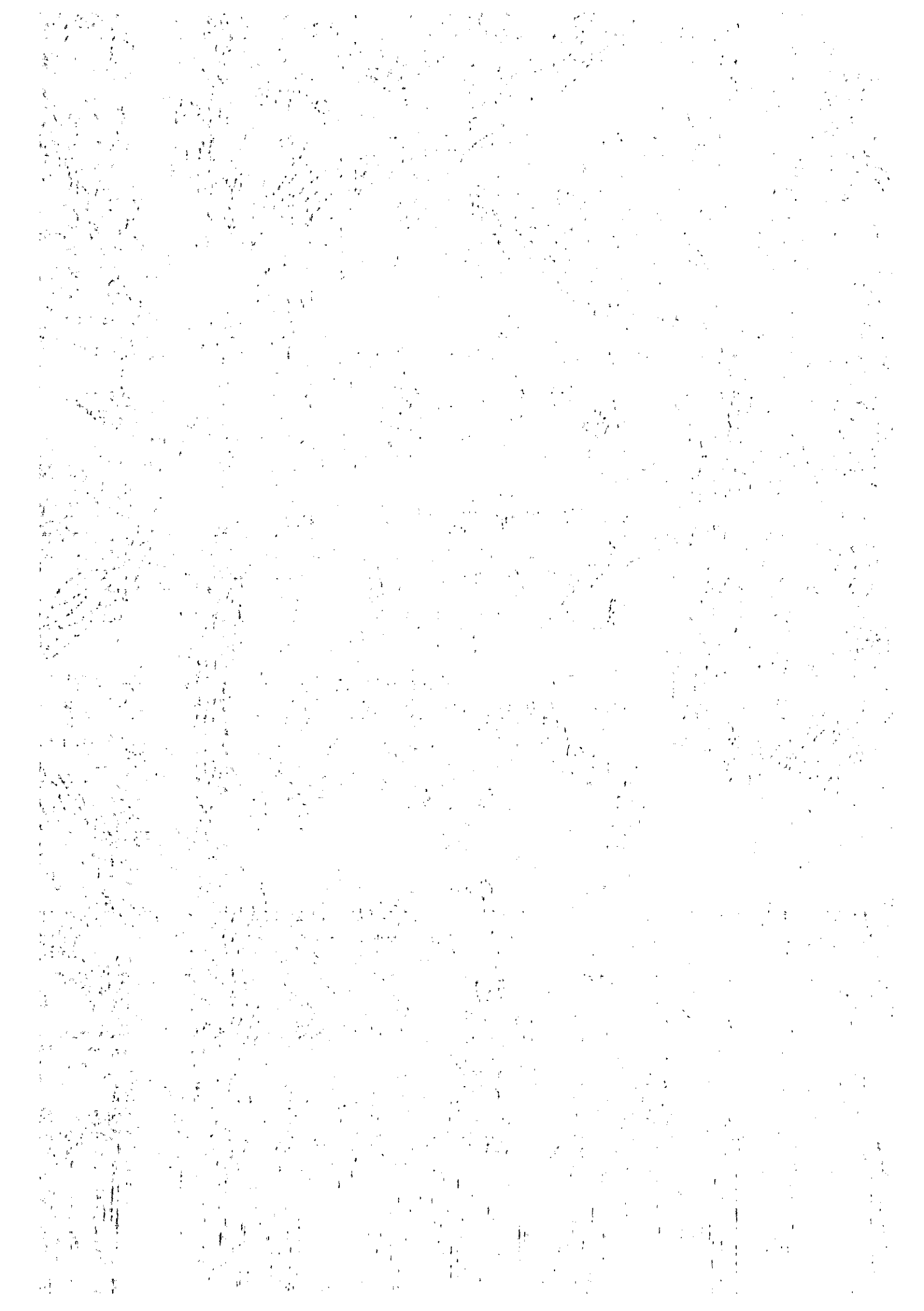
厚生科学研究費補助金

厚生省ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と
疾患モデルマウスの作成

平成11年度研究業績報告書

(平成10年度～平成12年度)



緒 言

1980年代初頭より本格化した癌遺伝子研究は分子生物学の進歩に伴いこの20年の間に著しい進歩をとげてきた。一部の癌においては遺伝子診断のみでなく、遺伝子治療までが臨床の場に取り入れられようとしている。また、造血の分野においては生体内で造血制御に関わる多くの造血因子が単離され、造血幹細胞の性状及び機能の解析も極めて容易に行われるようになってきた。現在、これらの研究の進歩は近年の造血器腫瘍や一部の固形腫瘍に対する造血幹細胞移植術を併用した超大量化学療法確立という成果に結びつき、多くの癌患者に恩恵をもたらしている。このような造血幹細胞移植術を併用した超大量化学療法確立は20世紀の血液学がなし得た偉大な進歩の一つと考えられる。しかし、本治療法も含めて現在行われている癌治療の多くは患者の正常組織に対する侵襲も強く、対象となる患者も制限が加えられる必要があり、決して十分満足できるものとは言えない。

癌研究に携わる多くの研究者が夢みる癌治療の理想像は、画一的な多剤併用化学療法確立ではなく、腫瘍化原因遺伝子を標的とした治療法確立である。このような分子標的を明確にした治療法が極めて有効であることは造血器腫瘍の分野では急性前骨髄性白血病における腫瘍化原因遺伝子PML/RAR α を標的としたATRAによる分化誘導療法によって証明されてきた。また最近では、恒常的活性型のチロシンキナーゼBCR/abl癌遺伝子によって引き起こされる慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病に対してチロシンキナーゼ特異的な阻害剤が極めて有効であることも報告されている。

本研究事業では個々の造血器腫瘍患者における腫瘍化の原因遺伝子を容易に単離することのできるシステムの確立をめざしており、研究年度の2年目にあたる本年度は新規癌遺伝子の単離にも成功している。西暦2000年というミレニアムの年度を迎え、今後、21世紀の医療にふさわしい個々の患者に対するオーダーメイド医療の確立をめざし、基盤となる研究をさらに展開してゆきたい。

平成12年3月31日

主任研究者

金倉 讓

研究者及び研究事業の分担

研究者名	分担する研究項目	所属施設	職名	専攻科目
【主任研究者】				
金倉 讓	研究全般の総括 造血器腫瘍の原因遺伝子の クローニング	大阪大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科学 研究部	教授	血液内科学
【分担研究者】				
北村幸彦	造血器腫瘍の病理・病態解析	大阪大学大学院 医学系研究科 病理病態学講座	教授	病理学
竹田潤二	トランスジェニックマウス、 ノックアウトマウスなどの 疾患モデルマウスの作成	大阪大学大学院 医学系研究科 社会環境医学講座	教授	血液病態学

平成11年度年次総括

主任研究者 金倉 讓

大阪大学大学院 医学系研究科
血液・腫瘍内科学研究部

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と疾患モデルマウスの作成

研究目的・方法

我々は、レトロウイルスを用いた発現クローニングシステムを用いて造血器腫瘍患者の腫瘍細胞から腫瘍化原因遺伝子をクローニングすることを目的としている。具体的には、マウスのIL-3依存性細胞株Ba/F3に造血器腫瘍細胞より作成したレトロウイルスの発現ライブラリーを感染させ、IL-3非存在下でも増殖を可能にする遺伝子の単離を試みている。更に、これらクローニングされた遺伝子を用いて、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成し、その分子の*in vivo*での機能についても解析する計画である。

進展状況

1. レトロウイルスの発現クローニングシステムについて

本年度は白血病症例の腫瘍細胞及び白血病細胞株より作成した発現ライブラリーをこのレトロウイルスを用いてBa/F3細胞に感染させた。その結果、IL-3非依存性増殖を示すBa/F3細胞の亜株(Ba/F3-Ad)より作成した発現ライブラリーを感染させたBa/F3細胞よりIL-3非依存性に増殖可能なクローンを獲得することに成功した。このレトロウイルスに組み込まれたcDNAは、機能がいまだ明らかでな

いヒト16番染色体上に存在する遺伝子のマウスホモログと考えられた。本遺伝子を新たに導入したBa/F3細胞ではIL-3非存在下においても恒常的なMAPKの活性化とbcl-2の持続性発現が認められ、細胞増殖及び生存が可能であった。これらの結果から、本遺伝子は細胞増殖や癌化に関与する重要な新規癌遺伝子であると考えられた。

2. 造血器腫瘍の病理解析について

分担研究者の北村らは幹細胞因子(SCF)の受容体*c-kit*遺伝子の活性化点突然変異に由来する家族性消化管ストローマ細胞腫(GIST)の家系についての解析を行った。また、今回クローニングした新規癌遺伝子に対する抗体を作成し、この分子のマウスの発生過程での各種臓器における*in vivo*の発現様式についての解析を開始した。

3. 疾患モデルマウスの作成について

分担研究者の竹田らは血液系だけに発作性夜間血色素尿症(PNH)の原因遺伝子・PIG-Aのマウスホモログ(Pig-a)に変異が導入されたマウスを解析した。また、新規にクローニングした遺伝子の造血器特異的なトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成を開始した。

総括

本年度は、初年度の研究結果を基盤として新規癌遺伝子のクローニングに成功した。また、この遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成も開始しており、今後更に研究が進展することが期待される。

I 平成11年度年次総括報告

主任研究者 金倉 讓

大阪大学大学院 医学系研究科
血液・腫瘍内科学研究部

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と疾患モデルマウスの作成

主任研究者 金倉 謙 大阪大学大学院 医学系研究科
血液・腫瘍内科学研究部 教授

研究要旨

近年の分子生物学の進歩により造血器腫瘍の分野においても多くの癌遺伝子が単離されてきた。しかし、一部の例外的な疾患を除いて、実際の症例の多くにおいてどのような遺伝子異常が原因となり腫瘍化がおこるのかについては明らかではない。本研究においては造血器腫瘍の個々の症例の腫瘍細胞からその原因遺伝子をレトロウイルスの発現クローニングシステムを用いて単離し、これらの分子の*in vivo*における機能をトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成し詳細に解析する計画である。

分担研究者 北村幸彦
(大阪大学大学院
医学系研究科、
病理病態学講座、教授)
竹田潤二
(大阪大学大学院
医学系研究科、社会環境
医学講座、教授)

ムを用いて造血器腫瘍患者の腫瘍細胞から癌遺伝子を直接的にクローニングすることを目的としている。更にトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成することにより、これらの遺伝子の*in vivo*における機能についての解析を明らかにすることも計画している。

A. 研究目的

従来、造血器腫瘍における新規癌遺伝子のクローニングは、染色体転座部位の近傍に存在する遺伝子をポジショナルクローニングするという方法がとられてきた。また同様に癌抑制遺伝子のクローニングについても染色体欠失部位に存在する遺伝子を検索するという方法が用いられてきた。しかし、いずれの方法も、特定の染色体異常が検出された場合にのみ解析が可能で、染色体異常が検出できない症例や複雑すぎる染色体異常を有する症例は解析不可能であった。我々は、本研究プロジェクトにおいて、レトロウイルスを用いた発現クローニングシステ

B. 研究方法

我々は、本研究において造血細胞に対し極めて効率よく遺伝子導入を行うことが可能なレトロウイルスの感染システムを用いて個々の造血器腫瘍の患者腫瘍細胞よりその原因遺伝子をクローニングする計画である。具体的には、1. 造血器腫瘍細胞よりcDNAライブラリーを作成し、レトロウイルスの発現ベクターにサブクローニングする。2. マウスのIL-3依存性細胞株Ba/F3にレトロウイルスの発現ライブラリーを感染させる。3. IL-3非依存下でも増殖可能なクローンを獲得する。4. 獲得したクローンのcDNAあるいはgenomic DNAを鋳型にしレトロウイルスのベクター部分をprimerとして

PCRを行い、組み込まれたcDNAを回収する。この方法により造血因子非依存性の増殖をもたらす腫瘍化遺伝子のクローニングを試みる。クローニングした遺伝子を用いて、分担研究者の竹田らはトランスジェニックマウスやコンディショナルなノックアウトマウスを作成し、その分子の*in vivo*での機能についても解析する計画である。分担研究者の北村らは、造血器腫瘍細胞の病理・病態解析を行うと共に、竹田らによって作成されたマウスの病理学的な解析も行う予定である。

(倫理面への配慮)

本研究において解析の対象となる患者サンプルはすべて研究内容について患者の同意を得た後に分離したものである。また、解析の対象となる遺伝子変異は体細胞における遺伝子変異であり、解析の結果、患者に不利益がもたらされる可能性はないと考えられる。

C. 研究結果

1. レトロウイルスの発現クローニングシステムについて

平成10年度に行った検討の結果、pMX由来のレトロウイルスをBa/F3細胞に感染させた場合、高い感染効率が得られた。本年度は白血病症例の腫瘍細胞及び白血病細胞株より作成した発現ライブラリーをこのレトロウイルスを用いてBa/F3細胞に感染させIL-3非依存性に増殖するクローンの獲得を試みた。その結果、IL-3非依存性増殖を示すBa/F3細胞の亜株Ba/F3-Adより作成した発現ライブラリーを感染させたBa/F3細胞よりIL-3非依存性に増殖可能なクローンを獲得することに成功した。このレトロウイルスに組み込まれたcDNAはヒト16番染色体上に存在する機能の明らかではない遺伝子のマウスホモローグと考えられた。また、この遺

伝子はヒト、マウスの間で極めてホモロジーが高く種を越えて保存された分子であった。この分子を新たに導入したBa/F3細胞がIL-3非依存性増殖を示すことから、この分子は確かに目的とした機能を有すると考えられた。また、本遺伝子を導入したBa/F3細胞ではIL-3非存在下においても恒常的MAPKの活性化とbcl-2の持続性発現が認められ、本遺伝子は細胞増殖、癌化に關与する重要な遺伝子であると考えられた。この分子は正常組織においては、胎児肝、心臓、腎臓、肝臓、筋肉などに発現されていた。また興味あることに、本分子は成人の骨髓細胞や末梢血液細胞では発現されていないが、急性骨髄性白血病のほとんどの症例において本分子の発現が認められた。現在、この分子の*in vitro*における細胞増殖、細胞生存における機能について更に詳細に解析中である。

また、造血器腫瘍患者の発現ライブラリーからの腫瘍化遺伝子のクローニングも更に試みている。

2. 造血器腫瘍の病理・病態解析

北村らは幹細胞因子(SCF)の受容体*c-kit*遺伝子の活性化点突然変異が造血器腫瘍や消化管ストローマ細胞腫(GIST)の原因となることを報告してきた。昨年度は*c-kit*遺伝子のエクソン11における胚細胞性の活性化点突然変異に起因する家族性のGISTの家系を報告した(Nat. Genet. 19: 323, 1998)。本年度は同様の*c-kit*遺伝子の活性化変異に由来する別の家族性GISTの家系を見出した。この結果から、この家族性GISTはcancer syndromeの中では比較的頻度の高いものと考えられた。

また、レトロウイルスの発現クローニングにより単離した分子に対する抗体を作成し、この分子の胎生期からのマウスの発生過程での各種臓器における*in*

*vivo*の発現様式について解析を開始している。

3. 疾患モデルマウスの作成について

多くの遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であり、血液系だけで遺伝子を破壊するシステムを開発する必要性があった。分担研究者の武田らは、昨年そのシステムを構築するため発作性夜間血色素尿症（PNH）のモデルマウスを作製した。まず、PNHの原因遺伝子であるPIG-AをloxP配列で挟みこんだマウスと、Creリコンビネースを胎生初期より発現しているマウスを交配した。そのマウスは胎生致死であり、胎仔より肝細胞を取り出し、致死量照射したレシピエントマウスに移入した。この手法により血液系だけで遺伝子破壊が起きたマウスを構築することに成功した。PNHでは、後天的に血液幹細胞のあるクローンに体細胞突然変異が生じ、その変異クローンが正常クローンを圧倒して発症する。本年度はこのマウスを用いて変異クローンが正常クローンを圧倒してPNHを発症する分子機構を解析した。その結果、PIG-A遺伝子の変異だけでは変異クローンが正常クローンを圧倒することは説明できず、他に要因が必要であることが判明した。

また、上述したレトロウイルスの発現クローニングシステムにより単離した遺伝子の造血器特異的なトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの作成も本年度より開始した。

D. 考察

現在までに、少なくとも一つの腫瘍化原因遺伝子のクローニングに成功しており、本システムによる個々の症例からの腫瘍化遺伝子のクローニングが可能であると考えられる。個々の白血病細胞特異的な腫瘍化原因遺伝子を同定することに

より、個々の症例に対する腫瘍化機構に応じた治療法の確立が可能になると期待される。

E. 結論

本年度は、3年計画の2年目であり、既にレトロウイルスの発現クローニングシステムを用いて機能が明らかでない遺伝子のクローニングに成功した。

現在、分担研究者の竹田らによりこの遺伝子の造血器特異的トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの作成が開始されており、また、北村らにより抗体を用いた*in vivo*での発現様式の解析が行われつつある。

本プロジェクト開始時に期待したとおり理想的な形で共同研究の組織が機能し始めており、今後更に研究が進展することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. Transcriptional regulation of cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J.* 18:1367-1377, 1999.
2. Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., Kanakura, Y. Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood* 93 :1319-1329, 1999.
3. Oritani, K., Tomiyama, Y., Kincade, P.W., Aoyama, K., Yokota, T., Matsumura, I., Kanakura, Y., Nakajima, K., Hirano, T., Matsuzawa, Y. Both Stat3-activation and Stat3-independent BCL2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. *Blood* 93:1346-1354, 1999.
4. Aoyama, K., Oritani, K., Yokota, T., Ishikawa, J., Nishiura, T., Miyake, K., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., Kincade, P.W., and Matsuzawa, Y. Stromal cell CD9 regulates differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 93:2586-2594, 1999.
5. Nojima, J., Suehisa, E., Kuratsune, H., Machii, T., Koike, T., Kitani, T., Kanakura, Y., and Amino, N. Platelet activation induced by combined effects of anticardiolipin and lupus anticoagulant IgG antibodies in patients with systemic lupus erythematosus-possible association with thrombotic and thrombocytopenic complications. *Thromb. Haemost.* 81:436-441, 1999.
6. Matsumura, I., Horikawa, Y., and Kanakura, Y. Functional roles of TPO-c-mpl system in essential thrombocythemia (a review). *Leukemia Lymphoma* 32:351-358, 1999.
7. Tanaka, H., Matsumura, I., Nakajima, K., Daino, H., Sonoyama, J., Yoshida, H., Oritani, K., Machii, T., Yamamoto, M., Hirano, T., and Kanakura, Y. GATA-1 blocks IL-6-induced macrophage differentiation and apoptosis through the sustained expression of cyclin D1 and bcl-2 in a murine myeloid cell Line M1. *Blood* 95:1264-1273, 2000.
8. Matsumura, I., Tanaka, H., Kawasaki, A., Odajima, J., Daino, H., Hashimoto, K., Wakao, H., Nakajima, K., Kato, T., Miyazaki, H., and Kanakura, Y. Increased D-type cyclin expression together with decreased cdc2 activity confers megakaryocytic differentiation of a human thrombopoietin-dependent hematopoietic cell line. *J. Biol. Chem.* 275:5553-5559, 2000.
9. Kuwayama, M., Machii, T., Yamaguchi, M., Yamaguti, K., Kitani, T., and Kanakura, Y. Blastic transformation of splenic lymphoma with villous lymphocytes after a well-controlled chronic phase of more than 10

years. *Int. J. Hematol.* 71:167-171, 2000.

10. Daino, H., Matsumura, I., Odajima, J., Tanaka, H., Ueda, S., Shibayama, H., Ikeda, H., Hibi, M., Machii, T., Hirano, T., and Kanakura, Y. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood*, in press

和文

1. 金倉 讓 : 造血幹細胞の分子制御オーバービュー。 *現代医療* 31:16-22, 1999

2. 松村 到、金倉 讓 : TPO/c-mplと造血幹細胞。 *日本内科学会雑誌* 88:429-431, 1999

3. 松村 到、金倉 讓 : 過粘稠度症候群。 *総合臨床* 48:187-188, 1999

4. 松村 到、金倉 讓 : 白血球増多症の原因と鑑別。 *medicina* 36:630-631, 1999

5. 松村 到、金倉 讓 : 血小板増加症とトロンボポエチン受容体。 *Annual Review 血液* :173-177, 1999

6. 松村 到、金倉 讓 : 白血病の遺伝子異常。 *血液フロンティア* 9:17-23, 1999

7. 松村 到、金倉 讓 : Diamond-Blackfan貧血の遺伝子異常。 *血液フロンティア* 9:73-75, 1999

2. 学会発表

1. Ikeda, H., Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ueda, S., Sugahara, H., Matsumura, I., Machii, T., and Kanakura, Y. Constitutively activating mutations in the juxtamembrane and kinase domains of *c-kit* receptor tyrosine kinase lead to receptor self-association in the cytoplasmic domain. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999

2. Matsumura, I., Kawasaki, A., Minegishi, N., Yamamoto, M., and Kanakura, Y. Roles of GATA-1 and PU.1 in megakaryocytic differentiation. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999

3. Mizuki, M., Fenski, R., Serve, S., Matsumura, I., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Buchner, Th., Berdel, W.E., Kanakura, Y., and Serve, H. Essential roles of Ras and PI3K pathways in FLT3 dependent proliferation and survival. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999

4. Odajima, J., Matsumura, I., Kawasaki, A., Tanaka, H., and Kanakura, Y. Ras and STAT3 activate overlapping but distinct signals required for survival and growth of a v-Src-transformed murine IL-3-dependent cell line, Ba/F3. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999

5. Kawasaki, A., Matsumura, I., Terada, Y., Tatsuka, M., Furukawa, Y., and Kanakura,

- Y. Functional roles for AIM-1 in endomitosis of megakaryocytes. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999
6. Hirota, T., Nishimura, J., Kuwayama, M., Machii, T., Kinoshita, T., Kanakura, Y., and Kageyama, T. Predominant PNH clone supported hematopoiesis for 8 years in a patient with PNH bearing 4 independent PNH clones. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999
7. Kuwayama, M., Watanabe, R., Ohishi, K., Nishimura, J., Hirota, T., Machii, T., Kanakura, Y., and Kinoshita, T. Structural and functional analysis of PIG-A missense mutations found in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. (poster) The 41th ASH meeting, New Orleans, LA, USA, December 3-7, 1999
8. 金倉 謙 : 受容体変異と造血器腫瘍。(口演) 第25回日本医学会総会、1999
9. 西村純一、木下タロウ、竹田潤二、柴野 賢、待井隆志、金倉 謙、Smith C. A. : レトロウイルスベクター系を用いた発作性夜間血色素尿症に対する分子生物学的治療法の確立の試み。(示説) 第96回日本内科学会総会、1999
10. 松村 到、北山 等、待井隆志、金倉 謙 : 活性化rasによる巨核球への分化誘導時におけるGATA-1の機能解析。(ワークショップ) 第61回日本血液学会総会、1999
11. 池田弘和、北山 等、松村 到、菅原浩之、上田周二、倉恒弘彦、待井隆志、金倉 謙 : 変異によるKITレセプターの恒常的活性化と腫瘍化シグナルの解析。(示説) 第61回日本血液学会総会、1999
12. 田中弘和、松村 到、北山 等、待井隆志、金倉 謙 : IL-6による分化誘導にGATA-1が及ぼす影響についての検討。(示説) 第61回日本血液学会総会、1999
13. Odajima, J., Matsumura, I., and Kanakura, Y. Ras is essential for survival in a v-Src transformed murine IL-3-dependent Pro-B cell line, Ba/F3. (poster) 第1回アジア血液セッション、1999
14. 池田弘和、松村 到、菅原浩之、倉恒弘彦、待井隆志、金倉 謙 : 恒常的活性化変異KITレセプターのシグナル伝達の解析。(口演) 第58回日本癌学会総会、1999
15. 松村 到、池田弘和、金倉 謙 : 巨核球分化におけるGATA-1の機能解析。(示説) 第58回日本癌学会総会、1999
16. 桑山真輝、弘田稔幸、待井隆志、金倉 謙、西村純一、木下タロウ : 発作性夜間血色素尿症のPIG-Aミスセンス変異におけるGPIアンカー型蛋白の発現と糖転移酵素活性。(示説) 第41回日本臨床血液学会総会、1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ 平成11年度年次分担報告

分担研究者 北村 幸彦

大阪大学大学院 医学系研究科
病理病態学講座

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

造血器腫瘍の病理・病態解析

--- 家族性に生じた*c-kit*癌原遺伝子の機能獲得性突然変異 ---

分担研究者 北村幸彦 大阪大学大学院 医学系研究科
病理病態学講座 教授

研究要旨

我々は昨年*c-kit*遺伝子のエクソン11の機能獲得性突然変異が胚細胞性に生じたことが原因となり起こった家族性消化管ストローマ細胞腫(gastrointestinal stromal Tumor, GIST)の日本人家系を報告したが、本年は同一原因でおこったカナダ人の家族性GISTを発見したので報告する。家族性GISTは比較的高齢になってから発症し必ずしも致死的でない。さらにエクソン11の広い範囲の突然変異が原因になりうるので、cancer syndromeとしては頻度が高い可能性がある。

A. 研究目的

*c-kit*癌原遺伝子は造血幹細胞の増殖・分化に必要であり、*c-kit*の機能喪失性突然変異遺伝子を2個持つマウスの造血幹細胞は、脾臓に肉眼的造血細胞コロニーを形成できない。一方、*c-kit*の機能獲得性はマスト細胞とカハール介在細胞の腫瘍をひきおこす。我々は昨年胚細胞性におこった*c-kit*の機能獲得性突然変異により家族性にカハール介在細胞の腫瘍である消化管ストローマ細胞腫瘍(gastrointestinal stromal tumor, GIST)を多発する日本人家系を報告した。GISTは比較的年をとってから発症するし、発症しても必ずしも死にいたらない。また我々が124例の孤発性GISTを分析したところ、そのうち71例(57%)に傍細胞膜領域の突然変異をみとめたが、コドン550からコドン561にコードされるアミノ酸の突然変異大部分をしめる。逆にいえば多様な突然変異で家族性GISTがおこるわけである。これらを総合すると家族性GISTはcancer syndromeとしては頻度の多

いものではないかと考えられる。そこで名称は報告者によって異なってもその内容から家族性GISTを疑われる症例を選び確かめることにした。

B. 研究方法

病理組織学的診断学の代表的雑誌American Journal of Surgical PathologyにカナダのO'Brienらが"Multiple familial gastrointestinal autonomic nerve tumors and small intestinal neuronal dysplasia"と題して報告している母と娘の症例の組織像がGISTとして矛盾がないため、O'Brienに手紙を書き、母と娘の小腸腫瘍と周辺の正常組織のパラフィン・ブロックを郵送してもらった。このパラフィン・ブロックから切片を作製してヘマトキシリ・エオジンで染色するとともに、*c-kit*蛋白の発現をしらべた。さらに腫瘍部分と正常粘膜組織のパラフィン切片5枚からDNAを抽出して、*c-kit*のエクソン11をPCRで増幅し、おのおの塩基配列を決定した。

C. 研究結果

母と娘から得た小腸腫瘍はc-kit蛋白陽性で、O'Brienらはgastrointestinal autonomic nerve tumor (GANT)と名付けていたが、我々のGISTと同じタイプの腫瘍と考えてよいことがわかった。組織切片で特色があったのはむしろ非腫瘍部分である。正常小腸では一層のカハール介在細胞がアウエルバッハの神経節細胞を取り囲んでいるが、この母娘例ではカハール介在細胞が10層以上になり、アウエルバッハ神経節細胞を包み込んでいた。

母娘の腫瘍部分と非腫瘍部の粘膜組織からDNAを抽出し、エクリン11をPCRで増幅して塩基配列を決定するとコドン557のトリプトファンがアルギニンに変化していた。この点突然変異は腫瘍部分ばかりでなく正常粘膜でもみられたので、胚細胞性の点突然変異であることがわかった。

D. 考察

c-kit遺伝子のコドン557のトリプトファンがアルギニンに変わる点突然変異はすでに我々が孤発性のGISTの1例で報告している。本母娘例はこの胚細胞性点突然変異によって起こった家族性GISTと考えられた。

明らかな腫瘍が形成されていない部分でもカハール介在細胞の著明な過形成がみられた。c-kitの胚細胞性の機能獲得性の突然変異によりカハール介在細胞の過形成が生じ、その中からクローナルな増殖がおこってGISTになると考えられた。もしそうなら、カハール介在細胞の過形成はポリクローナル、明らかな腫瘍を形成したGISTは各々がモノクローナルということになる。今後検証してみたいと考えている。

E. 結論

c-kit遺伝子のエクリン11の胚細胞性突然変異が原因となって家族性GISTがおこる。この家族性GISTはcancer syndromeの中では頻度の高いものであろう。

F. 研究発表

1. Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H., and Kitamura, Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 59:4294-4300, 1999.
2. Ito, A., Morii, E., Kim, D.K., Kataoka, T. R., Jippo, T., Maeyama, K., Nojima, H., and Kitamura, Y. Inhibitory effect of the transcription factor encoded by the mi mutant allele in cultured mast cells of mice. *Blood* 93:1189-1196, 1999.
3. Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., and Kanakura, Y. Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-associate not at the ligand-induced dimerization site. *Blood* 93:1319-1329, 1999.
4. Jippo, T., Lee, Y.M., Katsu, Y., Tsujino, K., Morii, E., Kim, D.K., and Kitamura, Y. Deficient transcription of mouse mast cell protease 4 gene in mutant mice of mi/mi genotype. *Blood* 93:1942-1950, 1999.
5. Harada, Y., Shiomi, N., Koike, M., Ikawa, M., Okabe, M., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitagawa, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., and Shiomi, T. Postnatal growth failure,

short life span and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosa group G gene. *Mol. Cell. Biol.* 19:2366-2372, 1999.

6. Kitamura, Y., Morii, E., and Jippo, T. The c-kit receptor and mi transcription factor: two important molecules for mast cell development. In *Signal Transduction in Mast Cells and Basophils*. (eds, Razin E, and Rivera J) Springer-Verlag, New York, pp 31-38, 1999.

7. Kim, D.K., Morii, E., Ogihara, H., Lee, Y. M., Jippo, T., Adachi, S., Kim, H.M., and Kitamura, Y. Different effect of various mutant MITF encoded by mi, Mior, or Miwh allele on phenotype of murine mast cells. *Blood* 93:4179-4186, 1999.

8. Ogihara, H., Kanno, T., Morii, E., Kim, D. K., Lee, Y.M., Sato, M., Kim, W.Y., Nomura, S., Ito, Y., and Kitamura, Y. Synergy of PEB2/CBF with mi transcription factor (MITF) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene. *Oncogene* 18:4632-4639, 1999.

9. Tanaka, A., Arai, K., Kitamura, Y., and Matsuda, H. Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors, is downregulated by c-kit receptor activation. *Blood* 94:2390-2395, 1999.

10. Adachi, S., Morii, E., Kim, D.K., Ogihara, H., Ito, A., Jippo, T., Lee, Y.M., and Kitamura, Y. Involvement of mi-transcription factor (MITF) in expression of a melanocyte

stimulating hormone receptor in cultured mast cells of mice. *J. Immunol.*, in press.

11. Hirota, S., Okazaki, T., Kitamura, Y., O'Brien, T., Kapusta, L., and Dardick, I. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of *c-kit* gene. *Am J. Surg. Pathol.*, in press.

12. Ito, A., Kataoka, T.R., Watanabe, M., Nishiyama, K., Mazaki, Y., Sabe, H., Kitamura, Y., and Nojima, H. A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. *EMBO J.*, in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ 平成11年度年次分担報告

分担研究者 竹田 潤二

大阪大学大学院医学系研究科
社会環境医学研究部

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニックマウス、ターゲティングマウスなどの疾患モデルマウスの作成
--- 血液系だけで遺伝子欠損がみられる疾患モデルマウスの樹立 ---

分担研究者 竹田 潤二 大阪大学大学院 医学系研究科
社会環境医学講座 教授

研究要旨

発作性夜間血色素尿症（PNH）は、後天的に血液幹細胞のあるクローンに体細胞突然変異が生じ、その変異クローンが正常クローンを圧倒して発症する。変異クローンが正常クローンを圧倒して発症するメカニズムを明らかにするために、血液系だけで遺伝子破壊が達成できるシステムを昨年、構築した。本年は、血液系だけにPNHの原因遺伝子・PIG-Aのマウスホモログ（Pig-a）に変異が導入されたマウスを解析した。その結果、原因遺伝子の変異だけでは変異クローンが正常クローンを圧倒することは説明できず、他に要因が必要であることが判明した。

A. 研究目的

PNHは、血液幹細胞に体細胞突然変異が起こるので血液細胞だけに変異細胞が出現する。原因遺伝子であるPIG-Aは、GPI-アンカーの最初のステップに関わっているため、PIG-A欠損は膜表面のGPI-アンカー型蛋白発現不全を引き起こす。PNH病態をマウスで再現するためにPIG-AマウスホモログであるPig-aの欠損マウス作製が試みられた。しかし、通常のPig-a欠損マウスは致死でPNH病態再現が不可能であったので、Cre/loxPコンディショナルジーンターゲティング法を駆使し、血液系だけでPig-a遺伝子欠損がみられるマウスを構築した。このマウスを解析することにより、Pig-a変異クローンが正常クローンを圧倒して発症するメカニズムを研究することを目的とした。

B. 研究方法

Creの標的シーケンスloxPをPig-a遺伝子に挿入されたマウス（Pig-aflox）と全身

でCreリコンビネースが発現しているhCMV-Creマウスを交配した。Pig-aflox (+/-),hCMV-Cre(+) 雌マウスは、胎生18日まで生存していた。そこでその雌マウスの胎生14日の肝臓（胎生期の造血の場）からGPI-アンカー陰性細胞を精製し、致死量の放射線照射したマウスへ移入し、GPI-アンカー陰性血液細胞を有する骨髄キメラを多数作製した。

C. 研究結果

骨髄キメラマウスの末梢血のGPI-アンカー型蛋白の発現状況を生後一年にわたってモニターした結果、GPI-アンカー型蛋白陰性細胞の比率は変化しないことが判明した。各細胞系列で比率は時間軸で変化しないものの、細胞系列間ではGPI-アンカー陰性細胞の比率は異なっていた。

D. 結論・考察

GPI-アンカー型蛋白陰性細胞の比率が時間軸にそって変化しないことから、Pig-a変