

20.000367

厚生科学研究費補助金

厚生省ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金倉 譲

平成12年3月

目次

I. 総括研究報告	—————	1
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		
金倉 謙		
II. 分担研究報告		
1. c-kit癌原遺伝子の細胞外ドメインに生じた 機能獲得性突然変異	—————	7
北村 幸彦		
2. 網羅的疾患モデルマウス作製のためのマウスト ランスポゾンシステムの開発		
竹田 潤二	—————	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	13
IV. 研究成果の刊行物・別冊	—————	19

緒 言

1980年以降の20年間の血液学の進歩には目を見張るものがあった。造血に関わる主要な造血因子が単離されたのみでなく、造血細胞の発生機構が分子レベルで解明され、造血幹細胞の機能解析が著しく進展した。このような基礎医学の進歩は、実際の医療の場において造血幹細胞移植術を可能にし、各種の悪性腫瘍患者の治療に多大な効果を発揮している。しかし、残念なことに、これらの20世紀の医療は「集団の医学」であり「個人の医学」ではなかった。つまり、これらの医療においては個人の遺伝情報にもとづく”特性”や個々の疾患の”特異性”は全く無視され、画一的な治療が広く行われてきた。

20世紀の初頭、メンデルの法則が再発見されてから遺伝学は始まった。そしてほぼ100年たった現在、ヒトゲノムはすべて解読され、個人の”特性”というものを遺伝子レベルで理解することが理論的には可能になった。つまり、ヒトの遺伝子に存在する300万を越えると予想される1塩基多型(SNP)を解析することにより、個人の遺伝的特徴、薬物代謝の特徴、各種の疾患に対する感受性などを明確に把握することが、可能であると考えられている。また、ヒトゲノム解析研究の結果をもとに、各種の疾患原因遺伝子の単離が進み、更に、生活習慣病などの多因子遺伝病の解明も進展することが大いに期待される。また、DNAチップが開発され、細胞内における遺伝子の発現を一度にモニターすることが可能となり、腫瘍細胞などの変異細胞の”特異性”を遺伝子発現のパターンの違いから分類することも可能になった。このようなヒトゲノム解析の進歩により、疾患原因遺伝子の同定が進めば、今後、本格的な遺伝子治療を行うことが可能になると期待され、21世紀の医療は20世紀のそれとは質的に異なると言っても過言ではないと考えられる。

本プロジェクトは、平成10年に始まり、平成12年の本年度が最終年度である。我々は、本プロジェクトにおいて、”個々の”造血器腫瘍患者の腫瘍細胞より原因遺伝子を単離することをめざしてきた。幸いにも、最終年度である本年度には、ようやく患者腫瘍細胞からの腫瘍化原因遺伝子の単離が可能になった。今後、本研究が、大きく変貌しつつある21世紀の医療にふさわしい造血器腫瘍の診断、治療法の確立に役立つよう、今後も更に努力を重ねたい。

平成13年3月31日

主任研究者

金倉 譲

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

I 平成12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

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

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 譲 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

本年度は、昨年単離に成功した新規抗アポトーシス分子の機能を*in vitro*で詳細に解析を行うとともに、*in vivo*における機能を評価するため通常のノックアウトマウスやCre-loxP systemを用いたコンディショナルなノックアウトマウスの作成を試みた。更に、本遺伝子の造血器特異的トランスジェニックマウスの作成を進行させた。また、新たに30例の白血病症例より発現ライブラリーを作製し、Ba/F3細胞に感染させた結果、IL-3非依存性に増殖するクローンがいくつか得られており、現在、これらの遺伝子の単離を行っている。

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)

た。また、本遺伝子のヒトホモログの単離を行うことにした。同時に、*in vivo*における機能を評価するため、ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスの作成を進行させた。

A. 研究目的

昨年度、レトロウイルスの発現クローニング法を用いて、IL-3非依存性のBa/F3の重株より腫瘍化原因遺伝子の単離に成功したが、本年度は、更に、実際の白血病症例から腫瘍化原因遺伝子の単離を試みた。

昨年度、単離に成功した新規抗アポトーシス分子の*in vitro*における抗アポトーシス作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。また、本遺伝子の発現調節機構についても解析を試みた。更に、本遺伝子と各種悪性腫瘍発生との関連を検討するために、本分子に対する抗体を作成し、各種悪性細胞における発現解析を行うことにし

B. 研究方法

(1)レトロウイルスの発現クローニング法について

新たに30例の白血病症例より発現ライブラリーを作製し、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単離を試みた。

(2) 新規抗アポトーシス分子に関する研究

(a) 機能解析

細胞内の局在を検討するため、本分子とGFPとの融合分子を作成し、各種細胞に一過性あるいは安定的に発現させ、種々の培養条件下での局在変化を蛍光顕微鏡で検討した。本遺伝子を導入したBa/F3細胞を用いて種々のアポトーシス制御分子の発現を検討した。また、抗アポトーシスシグナルに関与すると考えられているRas/MAPK、

PI3-K、STATsなどの分子の活性化状態を検討した。

(b) 発現解析

分担研究者の北村らは、マウスの発生過程における本分子の発現変化を検討するとともに各種悪性腫瘍における発現変化をノザンプロット法、ウエスタンプロット法、免疫組織染色法にて解析した。

Ba/F3細胞を各種の条件で培養中の本遺伝子の発現変化を解析した。また、本遺伝子のプロモーター領域を単離しプロモーターアッセイを行った。

(倫理面への配慮)

本研究において用いた患者サンプルは本研究の趣旨を患者さんに説明し、同意が得られた後に単離した。学術審議会できりまとめられた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(案)」にほぼ準じた形で行われたものである。また、マウスを用いた実験は、麻酔方法や骨髄移植術などのマウスの取り扱い方法を詳細に記述した動物実験計画書を大阪大学大学院医学系研究科動物実験委員会に提出し、委員会の承認を取った後に行ったものである。

C. 研究結果

(1) レトロウイルスの発現クローニング法について

30例の白血病症例より発現ライブラリーを作成し、それぞれBa/F3細胞に感染させた。その結果、6例のライブラリーからIL-3非依存性に増殖するBa/F3のクローンが得られた。現在、これらのクローンに導入された遺伝子を同定するための解析を行っている。

(2) 新規抗アポトーシス分子に関する研究

(a) 機能解析

本遺伝子は、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。発現クローニングの結果に一致して、本遺伝子を導入したBa/F3細胞では、IL-3非存在下でもアポトーシスが回避された。本分子の抗アポトーシス作用の分子機構として、本分子を過剰発現させたBa/F3細胞では、IL-3非存在下でもMAPKの恒常的活性化とBcl-2、Bcl-XLの持続性発現が認められた。GFPとの融合蛋白を用いた解析結果から、本遺伝子は、細胞質内にも核内にも存在すると考えられた。また、IL-3などのサイトカインの刺激前後でその局在に変化は認められなかった。

(b) 発現解析

本遺伝子が由来したライブラリー作成に用いたIL-3非依存性のBa/F3細胞の亜株ではIL-3非存在下でも本遺伝子の持続性発現が認められたが、通常のBa/F3細胞ではIL-3存在下でのみその発現が認められた。また、IL-3のみでなく、エリスロポエチンやトロンボポエチンなどのサイトカインでBa/F3細胞を刺激した時にも、本遺伝子の発現が誘導された。現在、本遺伝子のプロモーター領域を単離し、これらのサイトカインに反応する領域の決定を行っている。

本遺伝子のmRNAの発現をマウスの発生過程において検討したところ、本遺伝子は胎生9~11日に強く発現され、また、臓器別では心臓、肝臓などの臓器に強い発現が認められた。本遺伝子は正常の造血細胞ではほとんど発現されていなかったが、急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病などの白血病細胞では高頻度に強い発現が認められ、白血病発症との関連が示唆された。現在、分担研究者の北村らが、本分子に対する抗体を用いて、正常細胞及び各種の悪性腫瘍細胞における発現様式について解析中である。

(3) 疾患モデルマウスの作成について

今回単離した新規遺伝子に関しては、ノックアウトマウスを作成するために本遺伝子のgenomeのクローンを単離した。その結果、本遺伝子はgenome上で約8Kbにわたって存在し、8つのエクソンから構成されると考えられた。現在、通常のノックアウトマウス及びCre-loxP systemを用いたコンディショナルなノックアウトマウス作製のためのターゲティングベクターの作製を完了し、ES細胞への導入を行っているところである。また、造血器特異的なプロモーターを用いたトランスジェニックマウスの作製も並行して行っている。

D. 考察

本年度の研究結果から、本システムを用いることにより、不死化した白血病細胞株のみでなく、実際の患者白血病細胞より腫瘍化原因遺伝子を単離する事が可能であることが明らかとなった。この結果から、本法は少なくとも一部の白血病患者の病因の解明に極めて有効であると考えられた。また、本システムは、腫瘍化遺伝子の単離方法として造血器腫瘍のみでなく他の悪性腫瘍に対しても応用可能であると推測される。今後、本システムによって単離された個々の腫瘍化原因遺伝子を分子標的とした新しい治療法の確立が期待される。

E. 結論

本年度は、3年計画の最終年度である。本プロジェクトにおいて計画したレトロウイルスの発現クローニング法はシステムとして完全に確立され、細胞株からの新規遺伝子の単離に成功した。また、白血病症例からもいくつかの腫瘍化遺伝子が単離されつつある。また、単離した新規遺伝子のノ

ックアウトマウス及びトランスジェニックマウスの作成も順調に進行している。以上の達成状況より、すべての結果が得られた訳ではないが、当初の計画はほぼ達成されたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

刊行論文に関する一覧表の項を参照。

2. 学会発表

1. Kanakura, Y. and Matsumura, I. Signaling cascades associated with

megakaryocytopoiesis. (Oral) International symposium on environmental stress and hematopoiesis, Sapporo, Japan, October 18-19, 2000.

2. Matsumura, I., Ezoe, S., Yamamoto, M., Enver, T., and Kanakura, Y. Effects of GATA-1 and GATA-2 on cytokine signaling. (Oral) The 2nd International symposium on GATA transcription factors, Tsukuba, Japan, November 18-20, 2000.

3. Ezoe, S., Matsumura, I., Tanaka, H., Kawasaki, A., Machii, T., Enver, T., and Kanakura, Y. GATA-2 down-regulates C-MYC and affects cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.

4. Ikeda, H., Ueda, S., Kitayama, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Machii, T., and

- Kanakura, Y. Preferential inhibition of constitutively activating juxtamembrane mutant rather than kinase domain mutant and wild-type c-kit receptor tyrosine kinase by tyrophostine. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
5. Mizuki, M., Steur, C., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Mueller, C., Gruening, W., Kratz-Albers, K., Schwaeble, J., Buechner, T. Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W.E., and Serve, H. Multiple signalling pathways mediate leukemogenic activity of internal tandem duplication mutations of FLT3 in AML (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
6. Kawasaki, A., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Machii, T., and Kanakura, Y. Opposing effects of PML and PML/RAR α on STAT3 activities. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
7. Ezoe, S., Matsumura, I., Tanaka, H., Kawasaki, A., Machii, T., Enver, T., and Kanakura, Y. GATA-1 inhibits cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through the inhibition of STAT3 and AP-1 activities. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
8. Tanaka, H., Matsumura, I., Kawasaki, A., Ezoe, S., and Kanakura, Y. Cyclin D1 but not Cyclin D2 or Cyclin D3 sensitizes M1 cells to various apoptotic stimuli through the production of reactive oxygen species. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
9. Kuwayama, M., Inoue, N., Watanabe, R., Nishimura, J., Ohishi, K., Hirota, T., Machii, T., Kanakura, Y., and Kinoshita, T. Functional classification of PIG-A missense mutations found in patients with PNH. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
10. Nishimura, J., Kanakura, Y., Ware, R.E., Shichishima, T., Nakamura, H., Ninomiya, H., Hall, S., Kanamaru, A., Mizoguchi, H., Omine, M., Kinoshita, T., and Rosse, W.F. Serial analysis of clonal expansion in PNH by flow cytometry. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
11. Hirota, T., Nishimura, J., Kuwayama, M., Machii, T., Kinoshita, T., and Kanakura, Y. Quantitative and qualitative changes in PNH clonal expansion over time. (Poster) The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
12. Kawasaki, A., Matsumura, I., Fukunaga, R., Tanaka, H., Ezoe, S., Machii, T., Nagata, S., and Kanakura, Y. Expression of myeloid zinc-finger protein (MZF)-1 and MZF-2 in acute myeloid leukemia cells. The 42nd ASH meeting, San Francisco, California, USA, December 1-5, 2000.
13. 金倉 謙：造血因子受容体を介した血球の増殖分化と腫瘍化。（レクチャー）

第89回 日本病理学会, 大阪, Apr.12, 2000.

14. 金倉 謙 : PNHに関する共同研究について. (口演) 平成11年度 特発性造血障害に関する研究班および重点研究: 再生不良性貧血について治療薬の組み合わせを評価する多施設共同研究班第2回合同班会議総会, 東京, Jan. 21, 2000.

15. 金倉 謙, 西村純一, 弘田稔幸, 桑山真輝, 待井隆志, 木下タロウ, 陰山 克: 優位クローンが8年間に渡って造血を維持している, 4種の異なる変異クローンを有するPNH症例. (口演) 平成11年度 特発性造血障害に関する研究班および重点研究: 再生不良性貧血について治療薬の組み合わせを評価する多施設共同研究班第2回合同班会議総会, 東京, Jan. 21, 2000.

16. 田中宏和, 松村 到, 金倉 謙: マウス白血病株M1におけるcyclin D1過剰発現によるアポトーシス感受性亢進の分子機構. (ポスター) 第62回 日本血液学会総会, 福岡, March 16-18, 2000.

17. 川崎 輝, 松村 到, 古川雄祐, 金倉 謙: 巨核球の多倍体化機構におけるAIM-1の機能解析. (ポスター) 第62回 日本血液学会総会, 福岡, March 16-18, 2000.

18. 台野華子, 松村 到, 柴山浩彦, 池田弘和, 待井隆志, 金倉 謙: 細胞外ユビキチンによるヒト造血細胞のアポトーシス誘導機構. (ポスター) 第62回 日本血液学会総会, 福岡, March 16-18, 2000.

19. 小田嶋純子, 松村 到, 金倉 謙: v-srcによる腫瘍化機構. (ポスター)

第62回 日本血液学会総会, 福岡, March 16-18, 2000.

20. 園山順子, 松村 到, 菅原浩之, 北山等, 待井隆志, 金倉 謙: BCR/ABLからの細胞増殖と細胞死抑制シグナルの解析. (ポスター) 第62回 日本血液学会総会, 福岡, March 16-18, 2000.

21. 松村 到, 金倉 謙: GATA-2によるサイトカインシグナルの制御. (ミニシンポジウム) 「JAK・STAT系による細胞増殖・分化の制御」第59回 日本癌学会総会, 横浜, Oct. 4-6, 2000.

22. 田中宏和, 松村 到, 金倉 謙: マウス白血病株M1におけるcyclin D1過剰発現によるアポトーシス感受性亢進の分子機構. (ポスター) 第59回 日本癌学会総会, 横浜, Oct. 4-6, 2000.

23. 川崎 輝, 松村 到, 達家雅明, 待井隆志, 古川雄祐, 金倉 謙: 巨核球の多倍体化機構におけるAIM-1の機能解析. (ポスター) 第59回 日本癌学会総会, 横浜, Oct. 4-6, 2000.

24. 川崎 輝, 松村 到, 菅原浩之, 柴山浩彦, 北山 等, 待井隆志, 金倉 謙: 急性骨髄性白血病 (AML) 症例におけるMyeloid Zinc-Finger Protein 1 (MZF-1)、MZF-2の発現. (ポスター) 第97回 日本内科学会講演会, 京都, Apr.7, 2000.

25. 弘田稔幸, 西村純一, 陰山 克, 桑山真輝, 待井隆志, 木下タロウ, 金倉 謙:
PNH患者における同一変異クローンによる
長期間にわたる造血の維持. (口演) 第42
回 日本臨床血液学会総会, 倉敷, Nov. 8-
10, 2000.

26. 川崎 輝, 松村 到, 金倉 謙:
Down-regulation of an AIM-1 kinase couples
with megakaryocytic polyploidization of human
hematopoietic cells. (ポスター) 第1回 若
手研究者ワークショップ, 孺恋, Aug. 31-
Sep. 3, 2000.

27. 弘田稔幸, 西村純一, 陰山 克, 桑山
真輝, 待井隆志, 金倉 謙, 木下タロウ:
PNH患者における同一変異クローンによる
長期間にわたる造血の維持. (口演) 第37
回 補体シンポジウム・第11回 日本生体
防御学会合同学術集会, 大阪, Aug. 24-26,
2000.

28. 桑山真輝, 井上徳光, 渡辺玲香, 西村
純一, 大石一人, 待井隆志, 金倉 謙, 木
下タロウ: 発作性夜間血色素尿症患者にみ
られるミスセンス変異をもつPIG-A蛋白の
機能的分類. (口演) 第37回 補体シンポ
ジウム・第11回 日本生体防御学会合同学
術集会, 大阪, Aug. 24-26, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

新規抗アポトーシス分子

特許申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ-1 平成12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

c-kit 癌原遺伝子の細胞外ドメインに生じた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

c-kit癌原遺伝子の新しい機能獲得性突然変異をみつける目的で、ヒトの消化管ストローマ細胞腫瘍を調べた。手術時に確定診断のために使用され、保存してあった凍結サンプルとパラフィン・ブロックを用いた。細胞外領域をコードするエクソン9の特定の2個のコードンの重複により、c-kitレセプター・チロシンキナーゼの構成的活性化がおこる。

A. 研究目的

c-kit癌原遺伝子によりコードされるc-kitレセプター・チロシンキナーゼ (KIT) は、造血幹細胞の増殖・分化に必須であり、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の機能獲得性突然変異はマスト細胞とカハール介在細胞の腫瘍をひきおこす。ヒトではマスト細胞の腫瘍がきわめて稀であるのに対して、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) はかなり高頻度でみられる腫瘍である。我々はGISTの約半分の例でc-kit遺伝子の傍細胞膜領域の突然変異が存在することを報告しているが、本年度は傍細胞膜領域以外の他の部分の突然変異で、GISTの原因となるものについてしらべた。

B. 研究方法

1987年から1999年の間に大阪大学付属病院あるいはその関連使節で手術された133例のGISTのサンプルを用いた。GISTは治療方針決定のために病理組織診断が不可欠である。用いたGISTは1例が食道、101例

が胃、25例が小腸、8例が十二指腸、6例が大腸に発生したものである。パラフィン切片のHE染色で同定した間葉腫瘍のうち、免疫染色でKIT陽性、あるいはCD34陽性、あるいは両方が陽性のものをGISTとした。

c-kitの全コーディング領域の塩基配列の決定は、35例の凍結保存してあったサンプルから抽出したRNAを鋳型として得たcDNAを用いて行った。またパラフィン切片から抽出したgenomic DNAからPCRでc-kitのエクソン9あるいは11を得て、塩基配列を決定した。

エクソン9に突然変異をもつc-kitの異常部分を野生型c-kitの相同部分と置換して得た異常cDNAを、293Tヒト胎児腎臓細胞株にリン酸カルシウム法で導入し、KITのリン酸化の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

今回用いた腫瘍のサンプルは、過去に外科手術にさいして、術後の治療方針の決定のための病理組織検査用に採取されたものである。c-kit遺伝子の検索は予後を判断する指標になりつつあるので、これを行う事は倫理的に問題ないものと考えた。

なお個人情報に関しては完全に秘匿されている。今回用いたサンプルは過去に採取されていたものであるが、今後新しくサンプルを採取するにあたっては、生命倫理委員会で決定された“ヒトゲノム研究に関する基本原則”に厳密に準じて行う予定である。

C. 研究結果

35例の凍結保存してあったGISTから得たc-kit cDNAの全コーディング領域の塩基配列を決定したところ、30例のGISTでは通常みつかるとされる傍細胞膜領域（エクソン11）の突然変異が、2例のGISTでは細胞外領域（エクソン9）の突然変異がみられた。残り3例のGISTでは、いかなるc-kitの突然変異も認められなかった。エクソン11の突然変異は既に報告したように、様々な種類のものがみとめられたが、エクソン9の突然変異は1種類であり、コドン501のアラニンとコドン502のチロシンがともに重複していた。

コドン9の突然変異の頻度を調べるために、上記35例を含めた133例のGISTのパラフィン切片からDNAを抽出し、エクソン9をPCRで増幅後、single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP)法を用いて、アラニンとチロシンの重複を調べたところ、133例中9例に重複がみつかった。次にエクソン9のアミノ酸の重複がKITの構成的活性化の原因となるかどうかしらべた。野生型c-kit cDNA、エクソン9に異常を持つc-kit cDNA、エクソン11に異常を持つc-kit cDNA（コドン559とコドン560のバリンが欠失）を293Tヒト胎腎臓細胞株に導入した。

野生型KITは、KITのリガンドであるSCFが存在する時だけリン酸化するが、エクソン9に突然変異を持つKITは、エクソ

ン11に突然変異を持つKITと同様に、SCFが存在しなくても構成的にリン酸化していた。

エクソン9に突然変異を持つGISTと、エクソン11に突然変異を持つGISTの間には、臨床経過の上でも、病理組織学的にも大きな差はなかった。

D. 考察

KITの構成的活性化をもたらす突然変異としては、エクソン17の特殊な点突然変異と、エクソン11の突然変異が知られていた。エクソン17はチロシンキナーゼ領域をコードし、エクソン17の点突然変異を持つKITは単量体のまま活性化するが、エクソン11の傍細胞膜領域の突然変異は2量体を構成的に形成して活性化する。細胞外領域をコードするエクソン9の突然変異の構成的活性化の機構の詳細は、今後検討しなければならないが、リン酸化のパターンから推察すると、エクソン11の突然変異の構成的活性化の機構と似ているようである。

E. 結論

GISTはマスト細胞腫瘍と比べて、はるかに頻度が高く、KITの構成的活性化を引き起こす突然変異を探す材料として適している。我々は保存してあったGISTのサンプルを調べて、KITの新しい機能獲得性突然変異を発見した。

F. 研究発表

論文発表

刊行論文に関する一覧表の項を参照。

G. 知的財産権の出願・出願状況 なし

Ⅱ-2 平成12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
社会環境医学講座

網羅的疾患モデルマウス作製のためのマウストランスポゾンシステムの開発

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

網羅的疾患モデルマウス作製を達成するために、マウストランスポゾンシステムが有用かどうかを評価した。まず、トランスポゾンがマウス個体で効率よくトランスポジションするかどうかをGFPをマーカーとして解析した。オリジナル部位は、GFPがinactiveで発光が検出できないが、トランスポジションすることによりGFPがactiveになるようなトランスジェニックマウスを構築し、トランスポゼース(Sleeping Beauty transposase=SB)を発現するトランスジェニックマウスと交配後、発光を指標にトランスポジションの効率を測定した。GFPがinactiveなマウスからactiveなマウスが効率よく誕生した。flanking sequenceの決定、サザンブロット、FISH解析したところ、トランスポジションによるものだとことが判明したので、今後、網羅的疾患モデルマウス作製に有効であることが期待できる。

A. 研究目的

ゲノムプロジェクトが我々にもたらす効果は非常に大きいものがあり、これまでライフサイエンスがやってきた手法そのものを根底から覆す可能性がある。このいわゆるポストゲノム時代がまもなく到来しようとしているが、そこでの重要課題の一つはゲノムプロジェクトで明らかにされた遺伝子の機能解析であろう。

マウスは胚性幹細胞が存在するので標的遺伝子を自由に改変できうる。この特徴を利用して多くのノックアウトマウスが作製され、遺伝子機能を個体レベルで解析することに、大いに貢献してきた。

しかしマウスにおいては、Drosophilaで威力を発揮しているような系統的・包括的遺伝子解析システムが存在しないため、表現型を目印としたスクリーニング系が利用できない。特に、造血に関わるような遺伝子群の解析には、マウス個体レベルでのスクリーニング系の確立が重要であると考え

られる。

本研究では、マウストランスポゾンシステムを確立し、系統的・包括的に遺伝子解析ができる変異マウスの樹立を目指す。

B. 研究方法

(1) トランスポゾン認識配列をもつ

GFPトランスジェニックマウスの樹立

トランスポゾンシステムは、二つの要素から成り立っている。一つはトランスポゾン認識配列であり、もう一つはトランスポゼース(組み換え酵素)である。このシステムは、組織特異的遺伝子破壊に使用されるCre/loxPシステムと対比すると、トランスポゼースは、Creにあたり、トランスポゾン認識配列がLoxPに相当する。Cre/loxPシステムが、LoxP配列で挟まれたDNAをCre組み換え酵素が認識し、切り出してしまう。トランスポゾンシステムも、切り出し反応までは同一であるが、その後、切り出されたDNAが再び比較的ランダムにゲ

ノム上に挿入される。すなわち、トランスポゾンシステムはランダムミュタゲネーシスに有用であることが、ハエ・線虫等で証明されている。そこで、トランスポゾンシステムがマウスで有用かどうかを確かめるために、GFP遺伝子をトランスポゾン認識配列で挟み込み、そのコンストラクトをマウス受精卵に打ち込んでGFPトランスジェニックマウスを作製した。そのなかでも、GFP遺伝子は陽性であるが、GFPの発光は陰性であるマウスを実験に供した。

(2) トランスポゼース(Sleeping Beauty-SB)遺伝子をもつSBトランスジェニックマウスの樹立

トランスポゼース遺伝子をubiquitousで強力なプロモーターであるCAGの下流にクローニングし、トランスジェニックマウスを樹立した。

(3) GFPトランスジェニックマウスとSBトランスジェニックマウスの交配

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、動物実験計画書を大阪大学大学院・医学系研究科動物実験委員会に提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

GFPトランスジェニックマウスとSBトランスジェニックマウスの交配後、発光を指標にトランスポジションの効率を測定した。GFPがinactiveなマウスからactiveなマウスが誕生した。flanking sequenceの決定、サザンブロット、FISH解析したところ、トランスポジションによるものだということが判明している。

さらに、GFP/SB ダブルトランスジェニ

ックマウスから、異なったintegration部位をもつマウスを何匹誕生させることができるか評価した。その結果、一匹の雄GFP/SB ダブルトランスジェニックマウスから少なくとも10,000種類以上の異なったマウスを誕生させることが可能であることが、判明した。

D. E. 考察と結論

個体におけるヒトの遺伝子機能を探索する上で、マウスは多大な役割を果たしてきた。一つには、哺乳類であるマウスの多くの遺伝子機能がヒトと共通であることが証明されているので、マウスで明らかにされた遺伝子機能がヒトに適応できる利点がある。さらに、マウス胚性幹細胞が存在するので、標的遺伝子を自由に改変できる。

しかし、マウスにおいて哺乳類以外で成功しているフォアワードジェネティクス---表現型から責任遺伝子を探索する遺伝学的手法---が効率よくできない欠点が指摘されていた。本研究では、Drosophilaあるいは線虫で成功しているトランスポゾンシステムをマウスに応用し、効率のよいフォアワードジェネティクスを行おうとするものである。フォアワードジェネティクスでは、責任遺伝子を仮定せずスクリーニングを行うため、予期しないような遺伝子機能が明らかになることが多い。マウスにおいてフォアワードジェネティクスの試みは、無論皆無ではなくて、化学変異物質

(chemical mutagenesis)によるものが広く知られているが、トランスポゾンシステムは、化学変異物質によるものに比べ、様々な点で優れていると思われる。つまり、トランスポゾン内に任意の遺伝子を挿入できるので、スプライズドナー等などを利用することにより破壊されている遺伝子が容易

に判別できる。さらにスプライスアクセプターを併用すると、破壊されている遺伝子が発現している場所が特定できるので、表現型を解析する際のよい手がかりとなる。

マウストランスポゾンシステムは、国内外をみても成功例がみられず、本研究が初の成功例であると考えられる。ポストゲノムシーケンス時代の中心的役割を果たすシステムであることが多いに期待できる。

F. 研究発表

論文発表

刊行論文に関する一覧表の項を参照。

G. 知的財産権の出願

1. 特許出願

*トランスジェニック哺乳動物及びその作製方法並びにこれを用いた遺伝子機能の解明方法 特願 2000-247060

*リコンビネースシステムを用いた両染色体への変異導入法
特願 2000-397404

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka, H., Matsumura, I., Nakajima, K., Daino, H., Sonoyama, J., Yoshida, H., Oritani, K., Machii, T., Yamamoto, M., Hirano, T., and <u>Kanakura, Y.</u>	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
Daino, H., Matsumura, I., Odajima, J., Tanaka, H., Ueda, S., Shibayama, H., Ikeda, H., Hibi, M., Machii, T., Hirano, T., and <u>Kanakura, Y.</u>	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	95	2577-2585	2000
Matsumura, I., Kawasaki, A., Tanaka, H., Sonoyama, J., Ezoe, S., Minegishi, N., Nakajima, K., Yamamoto, M., and <u>Kanakura, Y.</u>	Biological significance of GATA-1 activities in Ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines.	Blood	96	2440-2450	2000
Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Buchner, T., Kienast, J., <u>Kanakura, Y.</u> , Berdel, W.E., and Serve, H.	Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the ras and STAT5 pathways.	Blood	96	3907-3914	2000
Matsumura, I., Tanaka, H., Kawasaki, A., Odajima, J., Daino, H., Hashimoto, K., Wakao, H., Nakajima, K., Kato, T., Miyazaki, H., and <u>Kanakura, Y.</u>	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
Odajima, J., Matsumura, I., Sonoyama, J., Daino, H., Kawasaki, A., Tanaka, H., Inohara, N., Kitamura, T., Downward, J., Nakajima, K., Hirano, T., and <u>Kanakura, Y.</u>	Full oncogenic activities of v-Src are mediated by multiple signaling pathways; Ras as an essential mediator for cell survival.	J. Biol. Chem.	275	24096-24105	2000
Hongyo, T., Li, T., Syaifudin, M., Baskar, R., Ikeda, H., <u>Kanakura, Y.</u> , Aozasa, K., and Nomura, T.	Specific <i>c-kit</i> mutations in sinonasal natural killer/T-Cell Lymphoma in China and Japan.	Cancer Res.	60	2345-2347	2000
Yamaguchi, M., Machii, T., Azenishi, Y., Nishimura, J., Shibano, M., <u>Kanakura, Y.</u> , and Kitani, T.	Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals.	Blood Cells, Mol., and Dis.	26	247-254	2000