

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

個体におけるがん関連遺伝子の機能の把握に関する研究

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所 がん転移研究室長

研究要旨：発がん・がん転移に関係する遺伝子群、特に増殖因子や細胞周期調節遺伝子に焦点を絞り、マウス個体レベルでの遺伝子不安定性や発がん・転移に直結する機能を解析するのが目的である。本年度はHST-1/FGF-4遺伝子による腸管の放射線障害防御メカニズムに関して詳細な検討を行った結果、HST-1/FGF-4が放射線によって生じるクリプト細胞のアポトーシスを抑制する能力があることや、腸管上皮細胞の増殖および遊走を促進する働きも明らかになるなど、この遺伝子が組織修復に関与していることが示唆された。

A. 研究の目的

近年のヒトゲノムプロジェクトの進展は、生命現象を細胞、分子レベルで解明するのに革命的な情報を与えている。しかし、種々の分子生物学の発展にもかかわらず、これらの急速に蓄積しつつある遺伝子、とくに発がんや転移に関与する遺伝子群の情報をすぐさまヒトのがん治療や生命現象の理解に役立てるための方法論や実験系の開発は不十分である。本研究においては動物個体レベルでの検討を中心に、発がん・転移の分子メカニズムの解明のもとになるがん関連遺伝子の機能解析を行う。本研究の進展は、遺伝子治療や細胞移植治療等の21世紀をにう新がん医療の基礎造りに貢献することが期待できる。また、ノックアウトラットの作成に向けてのラットES細胞の樹立を行い、がんの基礎研究から疾病の治療モデルとしての応用は、近年のゲノムサイエンスの発達により単離されつつある細胞の増殖・分化の制御に関わる多くの遺伝子の生物学的機能を解析する上でも重要な戦略となりうる。

B. 研究方法

昨年度までにHST-1/FGF-4遺伝子およびサイクリン遺伝子の個体レベルでの遺伝子発現制御が可能なCre/loxによるコンディショナルトランスジェニックマウスのラインの作製に成功し、両遺伝子を、組織特異的に発現誘導する系を確立している。またこれまでに、独自にラットES

細胞を未分化に保ったままラット由来ES細胞を分離、培養する方法を確立している。しかしこの方法をもとに、ACIラット由来の受精卵からは、生殖系列に寄与するES細胞は得られていないため、ラットの系統をKWYに変更し、樹立を継続する。また本年度は特にHST-1/FGF-4遺伝子による腸管の放射線障害防御メカニズムに関して詳細な検討を行う。

（倫理面への配慮）

本実験計画に置いては、倫理に関わるようなヒトに関する材料、受精卵等は全く扱うことはない。また、動物の操作は、すべて国立がんセンター研究所動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の精神のもとに行われる。

C. 研究結果

1) HST-1/FGF-4による放射線障害防御作用の解明：

HST-1/FGF-4遺伝子を個体レベルで発現させた場合、致死量の放射線障害を防御する働きがあることが判明している。骨髄の防御メカニズムはすでに明らかであるが、本遺伝子による腸管の放射線障害防御メカニズムに関しては不明な点が多いため、詳細な検討を行った。その結果、HST-1/FGF-4が放射線によって生じるクリプト細胞のアポトーシスを抑制する能力があることや、腸管上皮細胞の増殖および遊走を促進する働きも明らかになるなど、この遺伝

子が組織修復に関与していることが示唆された。

2) サイクリンD1遺伝子によるVEGFの発現誘導：

皮膚発がんを高頻度で誘発するサイクリンD1遺伝子のコンディショナルトランスジェニックマウスの皮膚のケラチノサイトを培養し、サイクリンD1の発現をオンにすると、VEGFが誘導された。この結果は、皮膚発がんにおけるangiogenesisの重要性を示しており、サイクリンD1遺伝子の皮膚での発現がその起因となることが考えられた。

D. 考察

増殖因子や細胞調節因子のトランスジェニック動物は多々報告されているが、我々のめざすHST-1/FGF-4およびCyclinD1の個体レベルでの遺伝子発現制御が可能なCre/loxによるコンディショナルトランスジェニックマウスの報告と、それらを用いた遺伝子不安定性と発がんや疾患、遺伝子産物の生理機能に関する研究は他にない。これらの動物モデルを用いた結果を考察すると、1) 放射線による腸管や骨髄への障害はがん治療において重要な合併症である。HST-1/FGF-4の主要な働きとして腸管のクリプト細胞のアポトーシスを抑制し、また組織を修復する働きが明らかになったことで、この遺伝子あるいはタンパク質を放射線障害の予防薬として応用する可能性が開けた。2) 我々の開発したサイクリンD1コンディショナルトランスジェニックマウスは皮膚発がんのモデルとして優秀な実験系である。この系を用いて、発がんにとって重要な血管新生に関係するVEGFのケラチノサイトからの放出がサイクリンD1によって制御されることを明らかにした。今後はこのケラチノサイトの初代培養系を用いて、サイクリンD1によって2次的に誘導される遺伝子群の解明を、DNAチップ技術を用いて検討し、ケラチノサイトの増殖、分化とサイクリンD1遺伝子発現がもたらす遺伝子不安定性分子群との関係に迫る研究の展開が可能となった。

E. 結論

Cre/loxシステムによる個体レベルでの遺伝子発現制御系が遺伝子不安定性の解明の

手段としても有用であることが示された。

F. 健康危険情報

本研究の方法、材料、実験結果、および動物個体が人体の健康に害を及ぼす可能性はまったくない。また、使用する危険物、毒物については研究所の危険物、毒物取扱い規定に準じた安全な取扱いを遵守している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, H., Ochiya, T., et al. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene*, 21: 899-908, 2002.
2. Yamamoto, H., Ochiya, T., et al. Enhanced skin carcinogenesis in Cyclin D1 conditional transgenic mice: Cyclin D1 altered keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res.*, 62: 1641-1647, 2002.
3. Hiroi N, Ochiya, T., et al., Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation. *EMBO J.* 21: 5235-5244, 2002.
4. Yamamoto, H., Ochiya, T. et al., Differentiation of embryonic stem cells into functional hepatocytes. *Hepatology*, in press.

2. 学会発表

落谷孝広 HST-1のアポトーシス抑制作用と精子形成、第7回生殖内分泌学会シンポジウム「性腺の自律性」、2002年12月5日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

「組織障害予防」特願平11-53389
国際特許出願中

6. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamamoto H, <u>Qchiya T.</u> , Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, <u>Yoshida T.</u> , Saito I and Terada M	Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation.	Cancer Res	62	1641-1647	2002
M. Nezu, M. Nishigaki, T. Ishizuka, Y. Kuwahara, C. Tanabe, K. Aoyagi, H. Sakamoto, Y. Saito, <u>T. Yoshida.</u> , H. Sasaki and M. Terada.	Identification of the CAB2/hCOS16 Gene Required for the Repair of DNA Double-strand Breaks on a Core Amplified Region of the 17q12 locus in Breast and Gastric Cancer.	Jpn J Cancer Res	93	1183-1186	2002
T. Ishizuka, C. Tanabe, H. Sakamoto, K. Aoyagi, M. Maekawa, N. Matsukura, A. Tokunaga, T. Tajiri, <u>T. Yoshida.</u> , M. Terada and H. Sasaki.	Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH.	Biochem. Biophys. Res. Commun	296	152-155	2002
K. Shirakawa, S. Furuhashi, I. Watanabe, H. Hayase, A. Shimizu, Y. Ikarashi, <u>T. Yoshida.</u> , M. Terada, D. Hashimoto and H. Wakasugi.	Induction of vasculogenesis in breast cancer models.	British J Cancer	87	1454-1461	2002
K. Aoyagi, T. Tatsuta, M. Nishigaki, S. Akimoto, C. Tanabe, Y. Omoto, S. Hayashi, H. Sakamoto, M. Sakamoto, <u>T. Yoshida.</u> , M. Terada and H. Sasaki.	A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells	Biochem. Biophys. Res. Commun	300	915-920	2003
K. Suzuki, K. Aoki, S. Ohnami, N. Kato, Tanaka, M. Kohara, <u>T. Yoshida.</u>	Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α inhibits the hepatitis C virus replication and improves experimental liver cirrhosis.	Gene Therapy			in press
S. Furuhashi, H. Ide, Y. Miura, <u>T. Yoshida.</u> , K. Aoki.	Development of prostate specific promoter for gene therapy against androgen-independent prostate cancer.	Molecular Therapy	7	366-374	2003
H. Jinno, M. Saeki, N. Hanioka, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, S. Ozawa, M. Ando, K. Shirao, H. Minami, A. Ohtsu, <u>T. Yoshida.</u> , N. Saijo and J. Sawada.	Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10.	Drug Metabolism and Disposition			in press
<u>T. Yoshida</u> and K. Yoshimura	Outline of disease gene hunting approaches in the Millennium Genome Project of Japan.	Proc Japan Acad	79(B)	34-50	2003
Okada, T., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Koyoshi, S., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Takata, M., Ogawa, O., and <u>Takeda S.</u>	Involvement of Vertebrate Pol κ in Rad18-independent Postreplication Repair of UV damage.	J. Biol. Chem.	277	48690-48695	2002
Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Cho, Z., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and <u>Takeda S.</u>	RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells.	EMBO J.	21	5558-5566	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
D. Jackson, J.-Y. Masson, P. A. Johnson, P. M Clements, F. E. Benson, L. H. Thompson, <u>S. Takeda</u> , S. C. West, and K. W. Caldecott.	XRCC3 and RAD51 Modulate Replication Fork Progression on Damaged Vertebrate Chromosomes	Mol. Cell			in press
Nakabayashi, K., Fernandez, B.A., Teshima, I., Shuman, C., Proud, V.K., Curry, C.J., Chitayat, D., Grebe, T., Ming, J., <u>Oshimura, M.</u> , Meguro, M., Mitsuya, K., Deb-Rinker, P., Herbrick, J.A., Weksberg, R. and Scherer, S.W.	Molecular genetic studies of human chromosome 7 in Russell Silver syndrome.	Genomics	79	186-196	2002
Hori, N., Nakano, H., Takeuchi, T., Kato, H., Hamaguchi, S., <u>Oshimura, M.</u> , and Sato, K.	A dyad Oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region.	J. Biol. Chem.	277	27960-27967	2002
Kugoh, H., Nakamoto, H., Inoue, J., Funaki, K., Barrett, J.C. and <u>Oshimura, M.</u>	Multiple human chromosome carrying tumor-suppressor functions for the mouse melanoma cell line B16-F10, identified by micorcell-mediated chromosome transfer.	Mol. Carcinog.	35	148-156	2002
Feinberg, A.P., <u>Oshimura, M.</u> , and Barrett, J.C.	Epigenetic mechanisms in human disease.	Cancer Res.	62	6784-6787	2002
Kadota, M., Shirayoshi, Y. and <u>Oshimura, M.</u>	Elevated apoptosis in pre-mature neurons differentiated from mouse ES cells containing a single human chromosome 21.	Biochem. Biophys. Res. Commun	299	599-605	2002
Kugoh, H., Shigenami, K., Funaki, K., Barrett, J.C. and <u>Oshimura, M.</u>	Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene.	Genes, Chrom. & Cancer	36	37-47	2003
Yawata, T., Kamino, H., Kugoh, H., Katoh, M., Nomura, N., Oishi, M., Horikawa, I., Barrett, J.C. and <u>Oshimura, M.</u>	Identification of a ≤ 600 -kb region on human chromosome 1q42.3 inducing cellular senescence.	Oncogene	22	281-290	2003
Jovenot, Y., Gregory, P.D., Ginjala, V., Zhang, L., <u>Oshimura, M.</u> , Feinberg, A.P., Wolffe, A.P. and Ohlsson, R.	Targeted activation and repression of imprinted genes by synthetic zinc finger transcription factors.	Gene Therapy			in press
Suda, T., Katoh, M., Hiratsuka, M., Fujiwara, M., Irizawa, Y. and <u>Oshimura, M.</u>	Use of real-time RT-PCR for the detection of allelic expression of an imprinted gene.	Intl. J. Mol. Med.			in press
Kashiwagi, A., Meguro, M., Hoshiya, H., Haruta, M., Ishino, F., Shibahara, T. and <u>Oshimura, M.</u>	Predominant maternal expression of the mouse Atp10c in hippocampus and olfactory bulb.	J. Hum. Genet.			in press
Okita, C., Meguro, M., Hoshiya, H., Haruta, M., Sakamoto, Y. and <u>Oshimura, M.</u>	A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21-q31, identified by human-mouse monochromosomal hybrids.	Genomics			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hoshiya, H., Meguro, M., Kashiwagi, A., Okita, C. and Oshimura, M.	Calcr, a brain-specific imprinted mouse calcitonin receptor gene in the imprinted cluster of proximal region of chromosome 6.	J. Hum. Genet.			in press
Cross J.C., Masutani M., et al.	Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta.	Mol. Cell Endocrinol.	187	207-212	2002
Ikejima, M., Masutani, M. et al.	Purification and characterization of poly(ADP-ribose) polymerase from <i>Sarcophaga peregrina</i> .	Proc. Jpn. Acad.	78, Ser. B	282-285	2002
Masutani, M., and Miwa, M.	Poly(ADP-ribose) and cancer: In relation to the lectures presented by Dr. Gilbert de Murcia.	Jpn. J. Clin. Oncol.	32	483-487	2002
Hemberger, M., Masutani, M. et al.	Parp1-deficiency induces differentiation of ES cells into trophoblast derivatives.	Dev. Biol.			in press
Hemberger, M., Masutani, M. et al.	Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion.	Dev. Dyn.			in press
Shibata, A., Masutani, M. et al.	Improvement of the Spi- assay for gpt delta mice by including magnesium ions during plaque formation. Environ.	Mol. Mutagen			in press
Yamamoto, H., Ochiya, T., et al.	HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity.	Oncogene	21	899-908	2002
Hiroi N., Ochiya, T., et al.	Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation.	EMBO J.	21	5235-5244	2002
Yamamoto, H., Ochiya, T. et al.	Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application.	Hepatology			in press