

(5)大腸がん診断マーカーとしての血清中のエクソソーム由来 miRNA の探索 :

がん細胞株由来エクソソームにおいて正常細胞より有意に高い値を示した miRNA は 31 種類あったが、興味深いことに、これらの候補のうち 17 種の miRNA においては、大腸がん細胞株内での発現がむしろ抑制されていた。ヒト血液検体を用いて、同定した miRNA がエクソソームを介して血液中に分泌されているかを検討した結果、大腸がん患者では 9 種類の miRNA が検出された。このうち 4 種が、健常人と比較して大腸がん患者の血液中で高いことが示された。

D. 考察

大腸発がん感受性遺伝子候補 *caspase3* の 3'-UTR の多型がタンパク発現量に影響し、系統間の発がん感受性の差異に寄与している可能性が示唆された。*caspase3* はヒトにおいても肺がん、リンパ腫などで多型が発がんリスクと関連するという報告がある。また、ヒト大腸がんにおいても *caspase3* を含む領域は比較的高頻度に欠失を認めている。これらのことから、ヒトにおいても *caspase3* 遺伝子の多型または欠失による遺伝子産物の減少が発がん感受性に影響を与えている可能性があり、そのような多型がヒトでも同定された場合、高危険度群の推定にきわめて有用である。多型が発現量を制御する機構として、mRNA の安定性には顕著な差が見られないことから、3'-UTR への miRNA の結合の可能性を検討している。ただし、現在 *caspase3* の 3'-UTR に結合することが唯一知られている *let-7* の結合配列が多型の部位とは異なることから、他の miRNA あるいはまったく異なる機構が関与している可能性も否定できない。

SND1 は、microRNA の成熟に関わる因子であり、PhIP 誘発大腸発がんの早期から発現亢進が認められる。我々は以前、SND1 の過剰発現により APC が翻訳レベルで抑制されることを示したが、今回 SND1 に選択的に結合している miRNA の中に APC を標的とする予測されるものを見出したことから、SND1 の発がんにおける意義の分子レベルでの解明に一步近づいたといえる。興味深いことに、SND1 は上述の *caspase3* の標的としてアポトーシスの過程で分解されることが報告され、両者が大腸発がんの過程でクロストークしている可能性も浮上してきた。今後の展開が待たれる。

機能的スクリーニングによる複数の増殖抑制的 miRNA の同定は発がんの機構を解析する上でも重要なツールとなりうるが、将来的には核酸医薬としての応用展開も可能であり、まずは動物実験

での検証から進めていきたい。エクソソーム中の miRNA は細胞内での miRNA のプロファイルを単純に反映しているのではなく、むしろ逆相関しているという観察はエクソソーム中の miRNA の生理的意義を洞察する上で示唆的である。またきわめて安定でもあることから組織特異的ながん診断マーカーとしての実用性を大いに期待できると考えられる。

E. 結論

PhIP 誘発大腸発がん感受性候補遺伝子 *caspase3* の 3'-UTR の多型がタンパク発現量に影響し、系統間の発がん感受性の差異に寄与している可能性が示唆された。*caspase3* 多型とヒト大腸がん感受性への関連が明らかになれば、ヒト高危険度群の推定に役立つものと考えられる。また PhIP 投与により誘導される、miRNA およびそれを制御する SND1 の大腸発がんにおける意義も明らかになりつつある。今後はこれらの診断や治療への展開もにらみつつ研究を推進していきたいと考えている。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

28. Paramasivam M, Membrino A, Cogoi S, Fukuda H, Nakagama H, Xodo LE. Protein hnRNP A1 and its derivative Upl unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acids Research*, 37:2841-2853, 2009.

29. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase κ potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 284:25585-25592, 2009.

30. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Letters*, 583:2710-2714, 2009.

31. Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, Gaiddon C, Nakagama H, Jochemsen AG, Taya Y, Okamoto K. Cytoplasmic tethering is involved in

synergistic inhibition of p53 by Mdmx and Mdm2. *Cancer Sci.*, 100:1291-1299, 2009.

32. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, Yamashita K. Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.*, 69:6438-6444, 2009.

2. 学会発表

63. 落合雅子、近藤靖之、筆宝義隆、中釜 斉、発がん感受性要因の解明とがん予防—ラット大腸発がんモデルを用いて、がん予防大会 2009 (第 16 回日本がん予防学会、第 32 回がん疫学研究会、第 10 回がん分子疫学研究会)、名古屋 (2009 年 6 月)

64. 岡本康司、金本一洋、大畑広和、泉谷昌志、土屋直人、中釜 斉、大腸がん転移を抑制する新規マイクロ RNA の同定、第 24 回発癌病理研究会、仙台 (2009 年 8 月)

65. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第 24 回発癌病理研究会、仙台 (2009 年 8 月)

66. Fukuda H, Takamura T, Masuda Y, Kamiya K, Ochiai M, Nakagama H, DNA-damaga checkpoint response to PhIP-exposure and translesion DNA synthesis at PhIP-dG. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

67. Ogata H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H, Profiling of microRNAs secreted by exosomes from human colon cancer cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

68. 金本一洋、福田勝洋、福田博政、落合雅子、岡本康司、郡 健二郎、杉村 隆、中釜 斉、浸潤性膀胱がんへの移行の早期診断マーカーとしての CYP2A6 のゲノム DNA コピー数増加、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

69. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉、化学物質

で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

70. 土屋直人、泉谷昌志、杉村 隆、中釜 斉、大腸発がん過程における microRNA の役割、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

71. 中釜 斉、大腸発がん過程における翻訳制御異常の関与、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)

72. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉、化学物質で誘発される細胞傷害性ストレスによる microRNA の発現変動とその大腸発がんへの関与、第 38 回日本環境変異原学会、静岡 (2009 年 11 月)

73. Kurioka D, Tsuchiya N, Watanabe M, Nakagama H, Molecular mechanism for the regulation of APC expression by RISC component SND1. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009 年 12 月)

74. Okamoto K, Kanemoto K, Ohata H, Sato A, Izumiya M, Tsuchiya N, Nakagama H, microRNA-mediated regulation of stemness and metastatic function during colon carcinogenesis, 第 8 回日韓がんシンポジウム、金沢 (2009 年 12 月)

75. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H, Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. 8th AACR/JCA Joint Conference, Hawaii (2010 年 2 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

分担研究報告書

ポリ ADP-リボシル化の発がんにおける意義の解明とその臨床応用に関する研究

研究分担者 益谷 美都子
国立がんセンター研究所 部長

研究要旨

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素-1 欠損 (*Parp-1*^{-/-}) マウス ES 細胞をヌードマウス皮下に移植後、胚細胞腫瘍形成時にトロホプラスト系譜への分化が亢進する。*Parp-1*^{-/-} ES 細胞においてインプリンティング遺伝子である *H19* の発現亢進を認める。*H19* 遺伝子はヒト胚細胞腫瘍でも発現上昇やエピジェネティック異常が報告されている。*Parp-1* 欠損下では *H19* / *Igf2* のインプリンティング制御領域(ICR)において、DNA の脱メチル化及びヒストン修飾の異常を伴うエピジェネティック異常が誘発され、がん化過程に関わることが示唆された。ポリ (ADP-リボース) 分解の主要酵素であるポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (Parg) の発がんにおける意義を検討した。*Parg* ホモ欠損 ES 細胞由来の胚細胞腫瘍形成の系に加えて、発がん剤ウレタン及びジエチルニトロサミンによる肺腫瘍誘発系において *Parg* ヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用することが示唆された。従って *Parg* の部分的機能阻害が、がん化の予防法となりうる可能性がある。

A. 研究目的

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (*Parp-1*) は DNA 損傷修復や DNA 損傷後の細胞死に誘導し、転写制御にも関わることが示唆されている。*Parp-1* の機能異常ががん化に関与することが判ってきたがその機構は十分に解明されていない。また、*Parp* ファミリー分子及びポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (*Parg*) はがん化との関連が示唆されており、これらの分子について発がん感受性や遺伝子安定性への関与について動物モデル、細胞系を用いて解明する必要がある。ポリ ADP-リボシル化関連酵素変異マウスについてがん化の疾患モデルとなる可能性についても検討する。また、ヒト発がんにおけるポリ ADP-リボシル化修飾の異常の意義を明らかにし、新規のがん予防法の開発を試みる。

B. 研究方法

1) 作成した *Parp-1*^{-/-} マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) においてインプリンティング遺伝子である *H19* の発現亢進が観察された。そこで *Parp-1* 欠損下で *H19* 遺伝子のエピジェネティック異常誘発の機構を調べるために *Parp-1*^{-/-} ES 細胞の *H19* / *Igf2* インプリンティング制御領域 (ICR) の DNA メチル化状態、転写因子の結合、クロマチン修飾状態を

ChIP assay により検討した。

2) *Parg* の発がんへの関与を調べるためにウレタン 200 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、肺腫瘍誘発に対する感受性を投与開始 20 週後、野生型及び *Parg* ヘテロ欠損 (*Parg*^{+/-}) マウスにおいて調べた。また、ジエチルニトロサミン 50 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、肺腫瘍誘発に対する感受性を投与開始 30 週後、野生型及び *Parg* ヘテロ欠損マウスにおいて調べた。マウスの皮下に野生型 ES 細胞または *Parg* 欠損 ES 細胞を移植し造腫瘍過程への影響を組織学的に解析した。

3) *Parp-1* 欠損マウス ES 細胞をヌードマウス皮下に移植後、テラトーマ形成時にトロホプラスト系譜への分化が亢進し、trophoblast giant cell が高頻度に出現することから *PARP-1* 遺伝子のヒト胚細胞腫瘍株における遺伝子多型と機能異常を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、国立がんセンターの「動物実験に関する指針」を遵守した。ヒト腫瘍サンプルを用いる解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) 未分化状態の *Parp-1*^{-/-} ES 細胞における、*H19* 遺伝子上流の *H19-Igf2* インプリンティング調節領域 (ICR) の DNA メチル化レベルを調べたところ、野生型 ES 細胞では、CTCF (CCCTC-binding factor) 結合領域周辺はほぼ完全にメチル化されていた。一方、*Parp-1*^{-/-} ES 細胞では、CTCF 結合領域周辺で約 20-50 % 程度まで DNA メチル化レベルが低下していた。*H19 / Igf2* ICR のエピゲノム調節に重要な転写因子 CTCF の結合状態を解析すると、*Parp-1*^{+/+} と比較して *Parp-1*^{-/-} の *H19 / Igf2* ICR では強い CTCF の結合が観察された。*Parp-1*^{+/+} ES 細胞と比較して *Parp-1*^{-/-} ES 細胞の *H19 / Igf2* ICR では、H3K4me2 及び H3K4me3 レベルの亢進が観察された。これらの結果から、*Parp-1*^{+/+} ES 細胞と比較して *Parp-1*^{-/-} ES 細胞では *H19 / Igf2* ICR が *H19* の転写活性化型にエピジェネティックな変化を起していることが判った。

2) ウレタン 200 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、20 週後の肺腫瘍誘発の感受性を野生型及び *Parg* ヘテロ欠損 (*Parg*^{+/-}) マウスにおいて調べた。体重増加に差を認めなかったが、肺における腺腫の発生頻度はそれぞれ 33% 及び 10% と *Parg* ヘテロ欠損型の方が低い傾向を示した ($P < 0.088$)。一方、過形成病変の頻度に差は認めなかった。また、ジエチルニトロサミン 50 mg/kg 体重を腹腔内単回投与後、30 週後の肺腫瘍誘発の感受性を野生型及び *Parg* ヘテロ欠損マウスにおいて調べた。投与前の体重に差はなかったが、投与後 5 週目から解剖時の 30 週まで体重増加は *Parg* ヘテロ欠損型の方が有意に低かった ($P < 0.05$)。肺腺癌の発生頻度はそれぞれ 18% 及び 0% と *Parg* ヘテロ欠損型の方が低い傾向を示した ($P < 0.087$)。また、肺腺腫の発生頻度もそれぞれ 71% 及び 53% と *Parg* ヘテロ欠損型の方がやや低い傾向を示した ($P < 0.31$)。

ヌードマウス皮下に野生型または *Parg* ホモ欠損 ES 細胞を移植後 2、2 週の比較的初期の段階で野生型に比較して腫瘍成長の遅延が認められた ($P < 0.05$) ことから造腫瘍性過程を組織学的に解析した。*Parg* ホモ欠損 ES 細胞由来腫瘍では部分的にポリ (ADP-リボース) の蓄積を認め、*Parg* の機能阻害は、ES 細胞移植後の腫瘍形成の過程でポリ (ADP-リボース) の蓄積を介して抑制的な効果を有すると考えられる。

3) *PARP-1* 遺伝子のヒト胚細胞腫瘍株 9 株における遺伝子多型と機能異常を調べた。NEC8 株で認めた *PARP-1* の保存された zinc-finger 領域の E251K のアミノ酸置換、及び以前に報告したヒト胚細胞

腫瘍における M129T のアミノ酸置換について大腸菌のリコンビナントを *Parp-1* 欠損胚性線維芽細胞で発現させ性状を調べたところ、核局在性は変わらなかったが、野生型に比較して M129T 及び E251K 型は活性の低い傾向を示した。

D. 考察

Parp-1 欠損 (*Parp-1*^{-/-}) マウス ES 細胞をヌードマウス皮下に移植後、胚細胞腫瘍形成時にトロホプラスト系譜への分化が亢進し、trophoblast giant cell が高頻度に出現する。*Parp-1*^{-/-} ES 細胞においてインプリンティング遺伝子である *H19* の発現亢進を以前報告した。*H19* 遺伝子はヒト胚細胞腫瘍でも発現上昇やエピジェネティック異常が報告されている。*Parp-1*^{+/+} ES 細胞では *H19 / Igf2* ICR についてほぼ完全な DNA メチル化を示したが、*Parp-1* 欠損下では *H19 / Igf2* ICR のエピゲノムは活性化型に変化していた。*Parp-1* 欠損が DNA の脱メチル化とクロマチン修飾を活性化型に変化させることが示唆された。また *Parp-1*^{-/-} ES 細胞の *in vitro* 分化系及び *in vivo* の teratocarcinoma 形成で観察された胚体外組織への分化亢進には、*H19 / Igf2* ICR のエピゲノム変化を介する *H19* 遺伝子発現の亢進が関与する可能性が示唆された。ヒト胚細胞腫瘍細胞株及びヒト胚細胞腫瘍において *PARP-1* の遺伝子多型や機能低下例を認めたことから、種々のヒト腫瘍発生時の *PARP-1* の機能異常によるエピジェネティック異常に関してさらに検討する必要があると考えられる。

Parg ホモ欠損 ES 細胞由来の胚腫瘍形成の系に加えて、発がん剤ウレタン及びジエチルニトロサミンによる肺腫瘍誘発系で *Parg* のヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用することが示唆された。従って *Parg* の機能阻害が、がん化の予防法となりうる可能性がある。今後、他の発がん誘発系での *Parg* のヘテロ欠損及び *Parg* の阻害剤によるがんの予防について検討を行う必要がある。

E. 結論

マウスモデルにおいて *Parp-1* の機能欠損が DNA の脱メチル化及びヒストン修飾の異常を伴うエピジェネティック異常を誘発しがん化過程に関与することが示唆された。*Parg* ホモ欠損 ES 細胞由来の胚細胞腫瘍形成の遅延、及び *Parg* のヘテロ欠損は腫瘍発生に対して抑制的に作用しうることから *Parg* の機能阻害が、がん化の予防法となりうる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibata A, Maeda D, Ogino H, Tsutsumi M, Nohmi T, Nakagama H, Sugimura T, Teraoka H, Masutani M, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 664:20-27, 2009.
2. Shimokawa T, Ogino H, Maeda D, Nakagama H, Sugimura T, and Masutani M, Poly(ADP-ribose) preparation using anion-exchange column chromatography. Organic Chemistry Insights, 2009, 2:1-5.
3. Fujihara H, Ogino H, Maeda D, Shirai H, Nozaki T, Kamada N, Jishage K, Tanuma S, Takato T, Ochiya T, Sugimura T, Masutani M. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase deficiency sensitizes mouse ES cells to DNA damaging agents. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9:953-962.
4. Ogino H, Sakamoto H, Nakayama R, Yoshida T, Sugimura T, Masutani, M. Analysis of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene alteration in human germ cell tumor cell lines. Cancer Genet Cytogenet. 2010, 197:8-15.
5. Kothe GO, Kitamura M, Masutani M, Selker EU, Inoue H. PARP is involved in replicative aging in Neurospora crassa. Fungal Genet Biol. In press.

2. 学会発表

1. 白井 秀徳、杉村 隆、益谷 美都子、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ欠損下におけるDNA損傷に対する致死感受性亢進、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、徳島(2009年6月)
2. 佐久間(藤森) 浩彰、荻野 秀樹、杉村 隆、益谷 美都子、H19-Igf2 ICRのエピジェネティック制御とクロマチン修飾へのParp-1の関与、第82回日本生化学会大会、神戸、(2009年9月)
3. Shirai H, Ogino H, Hashimoto A, Sugimura T, and Masutani M, Sensitization to DNA damaging agents under poly(ADP-ribose) glycohydrolase deficiency、第68回日本癌学会学術総会、横浜、(2009年10月)
4. Ogino H, Fujimori-Sakuma H, Hamada K,

Sugimura T, Masutani M. Analysis of the transcriptional regulation of the H19-Igf2 locus in mouse ES cells under Parp-1 deficiency. 第68回日本癌学会学術総会、横浜、(2009年10月)

5. Hamada K, Ogino H, Teraoka, H, Sugimura T, Masutani M. Enhancement of 5-aza-dC cytotoxicity with PARP inhibitor in human colon cell lines. 第68回日本癌学会学術総会、横浜、(2009年10月)

6. Sasamoto E, Hashimoto A, Maeda D, Ogino H, Sugimoto Y, Sugimura T, and Masutani M, Lower mutation frequency of the gpt gene in the brain of mice under Parp-1 deficiency, 第68回日本癌学会学術総会、横浜、(2009年10月)

7. Masutani M, Shirai H, Ogino H, Poetsch A., Sasamoto E, Maeda D, Hashimoto A, Sugimura T. Role of poly-ADP-ribosylation in the maintenance of genomic stability, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “DNA Repair and Human Cancers”, 東京、(2009年11月)

8. 三戸 沙耶香、笹本 絵里香、橋本 安希、白井 秀徳、杉本 芳一、杉村 隆、益谷 美都子、The role of Parp-1 in DNA repair characterized with a reconstituted DNA repair system, 第32回日本分子生物学会年会、横浜(2009年12月)

9. 益谷 美都子、白井 秀徳、橋本 安希、笹本 絵里香、三戸 沙耶香、荻野 秀樹、杉村 隆、Function of polyADP-ribosylation in protection of genomic integrity, 第32回日本分子生物学会年会、横浜(2009年12月)

10. Fujimori-Sakuma H, Ogino H, Sugimura T, Masutani, M. The hypomethylation of H19/Igf2 ICR in Parp-1 knockout mouse ES cells. 8th AACR/JCA Joint Conference - Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics. Waikoloa (2010年2月)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

分担研究報告書

リンパ腫感受性遺伝子の単離と放射線発がんリスク予測

研究分担者 木南 凌
新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

モデルマウスを用い、発がんリスクを担う発がん修飾遺伝子の単離とその寄与を解析することによって、ヒトへの貢献を果たすことを目的とした。*Bcl11b* はがん抑制を指標に単離された遺伝子であるが、その機能低下がもたらすクローナル増殖、分化および発がんへの影響を検討した。放射線照射により誘発された萎縮胸腺の解析から、その胸腺に2種類の異なる性質をもつクローナル増殖細胞が存在することを明らかにした。1つはクローナル増殖をしながらも、胸腺細胞の分化能を保持している細胞であり、もう1つはクローナル増殖し、かつ胸腺細胞の分化が停止している細胞である。前者の胸腺細胞は自己複製能と細胞分化能をもつことから、がん幹細胞との関連が考えられる。さらに、*Bcl11b*^{KO/+}胸腺細胞で、がん遺伝子 β -カテニンの発現亢進が観察された。一方、50のヒト大腸がんDNAを対象とした*Bcl11b*変異解析から、5例に変異を8例にLOHを確認した。野生型のアレルは保持され、これはハプロ不全として寄与する可能性が示唆され、ヒト大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要と考えられた。*Bcl11b* 転写因子は β -カテニン発現を抑制する働きがあり、その機能低下は β -カテニンを上昇させ、それがリンパ腫、腸管腫瘍の発がん原因であると考えられた。

A. 研究目的

発がんリスクは個人によりバラツキがあり、その一部は遺伝的素因により影響を受けるが、その実体については不明確な点が多い。これは、ヒトを対象とした解析では遺伝的背景が複雑であり、倫理的な問題を含む困難による、と予想される。一方、モデル動物を用いた研究は連鎖解析により感受性遺伝子を単離することができ、ヒト解析の補完的役割をもつ。本研究はマウスモデルを利用し、発がん感受性遺伝子、発がん修飾遺伝子の単離とその遺伝子型の影響を解明し、ヒトへの貢献を果たそうとするものである。発がんを修飾する遺伝子が同定されると、ヒトがんの発症への影響の検討、防護対策、薬物の開発が期待される。

Bcl11b/Rit1 は放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の解析から、がん抑制遺伝子として単離された遺伝子である。しかし、腫瘍組織DNAの解析から野生型アレルが残存する例が多くみつき、ハプロ不全ながん抑制遺伝子または発がん修飾遺伝子と考えられている。実際、*Bcl11b* 遺伝子が腸管腫瘍を修飾する遺伝子であることを報告してきた。そこで、*Bcl11b* 遺伝子の発がんへの役割、特にがん幹細胞形成と維持への関連性を解明するとともに、

本遺伝子が与えるヒト発がんリスクを予測することを目的とする。ヒトのがんでは大腸がんを当面の対象とする。

B. 研究方法

(1) マウスと放射線照射条件：BALB/c マウスおよびBALB/c と MSM マウスとのF1 マウスを主に実験に用いた。また、*Bcl11b*^{KO/+}マウスは以前に我々が作製したマウスで、*Bcl11b*-S826G 点突然変異マウス (Serine-826 が Glycine に置換したもの) は理研・権藤博士と共同で作製した。マウスは自然交配、または IVF・ET (in vitro fertilization・embryo transfer) を用いて得た。この IVF・ET 胚操作は新潟大学脳研究所動物実験施設に委託して行った。放射線照射条件では、生後8または10週目より週に1度、2.5Gy の γ 線照射を計4回行い、萎縮胸腺および胸腺リンパ腫を誘発した。 γ 線照射後30、60、80日で胸腺を左右に分けて摘出し、解析を行った。照射には新潟大学アイソトープ総合センターのCs-137線源内部照射型照射装置 (PS-3000SB; ポニー工業) を使用した。

(2) FACS 解析:胸腺細胞分化マーカーであるCD4、

CD8 の発現測定は一般的な方法に従った。細胞周期の測定は、マウス腹腔に BrdU 投与して 1 時間後、胸腺細胞を取り出し測定した。DNA 量と BrdU 取り込み量とを指標に FACScan で 2 次元に展開し、G1 期分画、S 期分画、G2/M 期分画に分けた。さらに、この実験系を利用し、細胞の大きさを FACS-FSC 解析で行った。すなわち、非照射正常胸腺の G1 期分画の中型細胞が約 5% とする基準で、萎縮胸腺の中型細胞の割合を測定した。

(3) V(D)J 組換え型の決定: D1 領域と D2 領域の 5' 側にそれぞれ F-primers を設定し、一方 J1 領域と J2 領域の 3' 側にそれぞれ R-primers を設定した。PCR 反応は 3 種類のプライマーの組み合わせ、すなわち F-D1 R-J1、F-D2 R-J2、F-D1 R-J2 のプライマーセットで行った。PCR 産物の分離、解析にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

(4) 遺伝子型の決定および野生型アレル消失の判定: 遺伝子型の決定にはそれぞれ適当なプライマーセットを用いて PCR 法を行った。コンジェニック領域の決定には MIT マーカーを WEB サイトから選択し、利用した。

(5) ウェスタンブロット解析: 通常の解析法に従った。抗体は市販されているものを用いた。

(6) ヒトおよびマウスの大腸、小腸の免疫組織学的解析は通常の方法を用いた。組織固定にはパラホルムアルデヒドを用い、我々が作製した 3 種類の Bcl11b 抗体と市販の抗体 (Ctip2 抗体) を用いた。Bcl11b-Z は今まで主に使ってきた抗体で、zinc-finger ドメインを抗原に用いたものであり、Bcl11b-C は C 末端領域に対する抗体、Bcl11b-N は N 末端領域に対する抗体である。すべてポリクローナル抗体である。一方、市販の Ctip2 抗体はモノクローナル抗体である。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いには本学の動物実験施設要綱に準拠し研究した。また、動物倫理の理解を深めるため動物実験施設が執り行う慰霊祭への出席を義務づけている。ヒト大腸組織での Bcl11b タンパク質発現の解析に関しては、新鮮組織の入手について新潟大学医学部倫理審査委員会に申請書を提出し、許可を得た。一方、ヒト大腸がんでの Bcl11b 変異解析では審査対象外であるが、新潟大学医学部ヒト遺伝子倫理審査委員会に申請書を提出し、審査対象外としての認定を得た。

C. 研究結果

C-1 放射線誘発による胸腺リンパ腫の特徴の一つに、細胞がクローナルに増殖することがあげられる。野生型マウスを用いた γ 線分割照射実験から、照射後には胸腺が萎縮し、萎縮状態が持続した後、胸腺リンパ腫が発症することが分かってきた。この萎縮胸腺にはリンパ腫の前駆体細胞が発生し、存在しているはずと考えられるが、その詳細は明らかでない。萎縮胸腺細胞の特徴についてのこれまでの解析では、リンパ腫前駆体細胞の多くで *Bcl11b* の片アレル消失が観察される。しかし、このことがリンパ腫形成にどのように関与しているかは不明である。そこで、リンパ腫前駆体細胞の内容を明らかにするため、*Bcl11b*^{ko/+} 遺伝子ヘテロ型マウスを用いて、発がん初期過程の萎縮胸腺の解析を行った。

C-1-1 g線照射後の胸腺細胞数の解析: *Bcl11b*^{ko/+} および *Bcl11b*^{+/+} マウスに γ 線を照射し、その後 14、30、60、80 日のマウスから胸腺を摘出し、胸腺細胞数を比較した。*Bcl11b*^{+/+} では、照射後 30 日で細胞数が非照射の細胞数と同程度まで回復し、その後 80 日まで細胞数は維持されていた。一方、*Bcl11b*^{ko/+} では、細胞数の回復が悪く、胸腺は萎縮した状態が維持されていた。この結果は、*Bcl11b*^{ko/+} 遺伝子は照射後の胸腺細胞数の増殖、回復に影響し、胸腺萎縮をもたらす効果があることを示唆する。

C-1-2 クローナル増殖の有無の検討: VDJ 組換えのアッセイを 3 種類のプライマーを用いて行なった。非照射胸腺細胞では D 領域から J 領域の間で組換えにを起し、6 種類の組換え部位に対応した 6 つの異なるバンドがみられるが、クローナル増殖する細胞では一部のバンドのみが強く検出される。照射後 30 日の *Bcl11b*^{ko/+} マウスの胸腺では 20 例のうち 2 例が 1 つまたは数個の限られたバンドを示した (Clonal (C) type とよぶ)。一方、照射後 80 日の *Bcl11b*^{ko/+} 胸腺では、10 例のうち 6 例が C type を示した。次に、これら *Bcl11b*^{ko/+} マウスの萎縮胸腺細胞での *Bcl11b* 遺伝子の野生型アレル欠失について MIT 多型マーカーを用いて調べた。40 例で解析を行い、4 例で野生型アレルの消失が見られたが、これらの萎縮胸腺はすべて C type を示していた。

C-1-3 細胞周期と細胞サイズの解析: BrdU 投与 1 時間後にマウスの胸腺を取り出し、胸腺細胞の細胞周期の解析を行なった。正常な胸腺細胞では、S 期にある細胞の割合は約 10% である。 γ 線照射後 30 日の *Bcl11b*^{ko/+} マウスの胸腺では平均 8.8%、

照射後 80 日では平均 7.4%であり、正常胸腺に比べてその割合が減少していた。次に胸腺細胞の大きさを、正常胸腺で G1 期細胞の FSC 値を基に測定した。γ 線照射後 60 日と 80 日では、*Bcl11b*^{KO/+}胸腺 8 例で大型の G1 期細胞の割合が 20%以上であり、すべて C type であった。また、それらの S 期細胞の割合は様々であった。*Bcl11b*^{KO/+}胸腺では G1 期細胞が成長し大型化し、G1 から S 期への移行する時期で進行が遅滞すると考えられ、細胞周期進行の障害が起きていることが示唆された。細胞の大型化は胸腺リンパ腫の特徴の一つであり、ここで示された大型の G1 期細胞がリンパ腫前駆細胞であると考えられた。

C-1-4 胸腺細胞分化の解析： CD4/8、TCR β マーカーを用いフローサイトメトリー解析を行い、胸腺細胞の分化度を検討した。照射後 30 日の VDJ 組換えパターンが正常な (T type) 胸腺細胞では、*Bcl11b* の遺伝子型に関わらず DP 細胞まで分化していた。照射後 80 日では、VDJ 組換えパターンが C type である *Bcl11b*^{KO/+}胸腺 8 例で DP 細胞まで分化する細胞の割合は著しく減少し、TCRb^{hi}CD8SP 細胞の割合も減少していた。これらのことから、クローナル増殖を示す *Bcl11b*^{KO/+}胸腺細胞は分化能が低下していることが示唆された。次に、クローナル増殖と細胞分化能の低下との関連を調べるため、10 週齢に 3Gy 照射し、30 日後の胸腺を同様に解析した。VDJ は 12 例中 6 例が C type、残り 6 例が T type を示した。C type を示す胸腺の分化をみると、DP 細胞まで分化しているものが 6 例中 4 例、残り 2 例は分化能が低下していた。この結果は、前述の照射後 80 日の結果と異なる。まとめると、クローナル増殖する胸腺細胞は、初期には分化能を保持した状態であり、その後分化停止に至る過程が存在すると考えられる。

C-1-5 β-カテニンの発現解析：胸腺細胞の分化能低下には Wnt/β-カテニンシグナルの発現上昇が関与するという報告がある。そこで、非照射 *Bcl11b*^{KO/+}マウスにおける β-カテニンおよびその下流にある IL-7R の発現をフローサイトメトリーで解析した。DN 細胞での β-カテニン発現は DP 細胞のそれより高く、これは以前の報告と一致していた。β-カテニン発現および IL-7R 発現は DN 細胞 (β-カテニン発現は DP 細胞でも) で、*Bcl11b*^{KO/+}胸腺で野生型胸腺より有意に上昇していた。次に、照射影響をみるために、g線照射後 30 日の胸腺についても同様の解析を行った。その結果、同様の結果が得られ、照射の影響はないことがわかった。これらの結果から、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型はg線照射後の萎縮胸腺のクローナル増殖と分化停止に影響

することが示唆された。また、この *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型は β カテニンの発現を上昇させ、この上昇が少なくとも胸腺細胞の増殖に影響することが示唆された。一方、今回示された、クローナル増殖をしながら分化能を保持している胸腺細胞の性質は、自己複製能と分化能をもつという点で、がん幹細胞との類似性がみられた。

C-2 *Bcl11b/Rit1* 遺伝子の腸管腫瘍発生への修飾効果：ヒト大腸がんでは第 14 番染色体上の *Bcl11b* 遺伝子座で高頻度に LOH が観察される。これは大腸がんの発症に *Bcl11b* 遺伝子が関与する可能性を示唆する。そこで、大腸がんモデル・*Apc*^{min/+}マウスと *Bcl11b*^{S826G/KO}ヘテロ型マウスを交配させ、*Bcl11b*^{KO}ヘテロ型マウスが野生型に比べ、*Apc*^{min/+}マウスの腫瘍発生に違いをもたらすかを検討した。前年度までの結果は、*Bcl11b*^{KO}ヘテロ型が有意に小腸がん発症を促進することを明らかにしてきた。*Bcl11b* タンパク質の組織発現を、我々が作製した 3 種類の *Bcl11b* 抗体と市販の抗体 (Ctip2 抗体) を用い検討すると、マウスの小腸組織、大腸組織の crypt 内で発現していた。また、ヒト大腸組織の crypt 内でも発現細胞が観察された。さらにマウス小腸 crypt 内での発現を詳細に検討すると、いわゆる +4 細胞、CBC 細胞という幹細胞と想定されている細胞および次の分化段階にある TA 細胞に発現が確認された。これらの結果は、*Bcl11b* 遺伝子がマウスの腫瘍発生を修飾し、その修飾は Wnt/β-カテニンシグナル伝達と関連する可能性を示唆する。そこで、*Bcl11b* の転写因子としての機能と Wnt/β-カテニンシグナル伝達との関連性を検討した。また、ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異の有無を調べ、その解析途中でも一部に変異を検出していた。今年度は、この変異解析を継続し、同時に LOH 解析も行った。

C-2-1 *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスの解析：KO アレルと点突然変異アレル (Serine-826 が Glycine に置換したもの) をもつ compound heterozygous mice (S826G/KO) を作製し、その表現型を解析した。S826G 変異が *Bcl11b* の機能低下をもたらすことは、胸腺細胞の分化を遅らせることから明らかとなっている (詳細は省略)。*Bcl11b*^{S826G/KO} マウスは同腹の野生型マウスに比べ体重が 10%程度少なく、頭部上顎部の短小化と切歯が異常に伸長するという表現型異常を示す。小腸では絨毛 (villi) に比べ腺窠 (crypt) サイズが大きくなり、一部の領域で絨毛組織の異形が観察される。また、一部の villi 細胞では BrdU の取り込みが高く、Ki67 の陽性染色像がみられる (正常 villi 細胞では BrdU 取り込み、Ki67 染色像を示さない)。これらの結果は、crypt 細胞と villi 細胞の少なくとも一部に細胞増殖傾向があることを示唆する。この増殖傾向は、

Apc^{min/+}マウスに観察されるそれと類似し、同一または類似のシグナル伝達系の関与が考えられた。一方、大腸では組織全体の肥厚が観察された。大腸の管腔そのものの肥大が肉眼で観察でき、組織レベルでは、crypt サイズの増大と細胞増殖シグナル像がみられた。しかし、*Bcl11b*^{S826G/KO}マウスでは小腸や大腸に腫瘍の発生は観察されなかった。

Apc^{min/+}マウスでは Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が亢進しているが、このマウスで小腸細胞の増殖傾向が観察された。それと類似の表現型が S826G/KO マウスでも観察されたことから、S826G/KO 変異がこの経路の亢進を引き起こす可能性が示唆された。そこで、 β -カテニン発現を免疫染色法を用いて検討した。crypt 内の CBC 細胞で核内 β -カテニン発現細胞数が上昇する傾向にあったが、方法の限界もあり統計学的な有意性は不確実であった。一方、*Bcl11b*^{S826G/KO}マウスの胸腺細胞を FACS 解析すると、 β -カテニン発現はどの分化段階の細胞 (CD4-CD8 陽性など) でも β -カテニン発現の上昇が有意にみられた。この結果は、 β -カテニン遺伝子発現に *Bcl11b* 転写因子が影響する可能性を示唆する。

C-2-2 *Bcl11b* の転写抑制活性: *Bcl11b* は転写を抑制する転写因子であるが、 β -カテニン遺伝子発現との関連性を検討した。まず、TOP/FOPflash レポーターを用いたが、この TOP レポーターはプロモーターに TCF/ β -カテニン複合体が高率に結合する DNA 配列が付与されたものであり、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性測定に広く利用されている系である。この TOP/FOPflash レポータープラスミドと *Bcl11b* 発現ベクタープラスミドを共に、ヒト大腸がん由来細胞株 (SW480、CaCo2 細胞) にコトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してデュアル・ルシフェラーゼアッセイ法によりレポーター活性の測定を行った。その結果、*Bcl11b* の導入により TOPflash ベクターの転写活性が低下することが分かった。これは、*Bcl11b* が Wnt/ β -カテニンシグナルを抑制すること、その機構として β -カテニン遺伝子の転写活性を抑制する可能性を示唆する。そこで、次に β -カテニン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼレポーターを結合したプラスミドを作製し、TOPflash プラスミドの代わりにこれをヒト大腸がん由来細胞株 (HCT116 細胞) にコトランスフェクションし、同様のアッセイを行った。その結果、やはり *Bcl11b* の導入により β -カテニン遺伝子の転写活性が低下することが分かった。Wnt/ β -カテニンシグナルの測定によく利用されている、HEK293FT 細胞を用いた場合でも、同様に転写活性抑制活性が示され、また Wnt3a リガンドの添加でその発現が数倍上昇

することも分かった。

C-2-3 ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異と LOH 解析: *Bcl11b* は4つのエクソンからなり、エクソン1、2、3は短くそれぞれ一組のプライマーセットでPCR反応を行った。一方、エクソン4は長いため、三組のプライマーセットを用いた。PCR産物をダイレクトシーケンスした結果、現在まで50サンプルを検査したところ、5つの変異を見いだした。ダイレクトシーケンスの結果は野生型と変異型が混在する結果だったので、変異を確認する目的で、それぞれのPCR断片をTベクターに組み込み、プラスミドDNAレベルで塩基配列を決定した。その結果、これらの変異が確認された。以下に、5つの変異の部位と変異が与える結果を示す。

検体 C10: 1706G→A 置換 (G569D)

検体 C11: 1967G 脱落 (656 からのフレームシフト変異)

検体 C19: 1138G→A 置換 (V380M)

検体 C2: 1623~1625 GAG 脱落 (535-543 の E 連続配列の1つの E 脱落)

検体 68T: 1620~1625 GAGGAG 脱落 (535-543 の E 連続配列の2つの E 脱落)。

まとめると、アミノ酸の置換または脱落をもたらす変異が4腫瘍であり、フレームシフト変異が1腫瘍であった。置換または脱落するアミノ酸は進化的に高度に保存されたアミノ酸配列であった。(国立がんセンター、中釜先生との共同研究)。

一方、LOH解析はヒト大腸がん40検体(多型情報のある)が終了したところである。LOH解析には *Bcl11b* 遺伝子領域にある3種類のSNPsを利用し、PCR産物に対する制限酵素による切断の有無で判定した。その結果、8検体にLOHが確認された。この8症例には変異が無く、LOHと変異の両方をもつ症例はなかった。これは *Bcl11b* ががん抑制遺伝子として、ハプロ不全な働きをもつことを示唆する。

D. 考察

D-1 *Bcl11b* 野生型マウスを用いたg線分割照射実験では、照射後初期に胸腺は萎縮し、その状態を持続した後、胸腺リンパ腫が発症することが分かってきた(前年度の報告)。したがって、この萎縮胸腺にはリンパ腫の前駆体細胞が存在するはずと考え、その特徴についてこれまで解析を行ってきた。今回は *Bcl11b*^{KO/+}マウスを用い、リンパ腫前駆体細胞の発生、その特徴への *Bcl11b* の影響・役割を検討した。照射後萎縮胸腺からDNAを抽出し、TCR β 鎖遺伝子のD-J組換えアッセイと、萎縮胸腺細胞のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、3Gy1回照射後60および80日の *Bcl11b*^{KO/+}マウスでは胸腺細胞数が減少し、それに伴い胸腺

は萎縮し、リンパ腫の特徴の一つであるクローナル増殖する細胞が高頻度に観察された。これらのクローナル増殖する胸腺細胞は、分化を停止するものが大半であった。*Bcl11b* 野生型マウスに誘発される萎縮胸腺では、この分化停止はみられないので、この細胞分化能の低下は *Bcl11b* 遺伝子の機能低下によると考えられる。また、細胞周期の解析から、細胞サイズの大きい細胞の割合が増加することが分かった。胸腺リンパ腫の特徴として細胞の大型化が見られることから、この G1 期大型細胞がリンパ腫前駆体細胞であると考えられた。一方、照射後 30 日の萎縮胸腺の解析では、クローナル増殖を示す胸腺細胞とともに、細胞分化能を保持している胸腺細胞を含む胸腺が約半数に見られた。この分化能を保持しクローナル増殖する胸腺細胞は、自己複製能と分化能をもつという点で、がん幹細胞と類似する。*Bcl11b* 遺伝子が、どのような機構でがん幹細胞に影響するかは不明であるが、胸腺リンパ腫におけるがん幹細胞の形成に役割を担う可能性が示唆された。

いくつかのグループの報告から、胸腺細胞の分化能低下には Wnt/ β カテニンシグナルの発現上昇が関与するとされている。そこで、非照射および g 線照射後の *Bcl11b*^{KO/+} マウスにおける β -カテニンの発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、*Bcl11b* 遺伝子量低下によって β -カテニンの発現が上昇することが示された。 β -カテニンはがん遺伝子として知られており、Tcf1 や Lef1 と複合体を形成してその下流にある遺伝子 c-myc や cyclinD1 を活性化し、細胞周期の進行を促進する。一方、照射による β カテニンの発現への影響はみられなかった。

これらの結果から、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型は g 線照射後の萎縮胸腺のクローナル増殖と分化停止に影響することが示唆された。また、この *Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型は β -カテニンの発現を上昇させ、この上昇が少なくとも胸腺細胞の増殖に影響することが示唆された。一方、今回示された、クローナル増殖をしながら分化能を保持している胸腺細胞の性質は、自己複製能と分化能をもつという点で、がん幹細胞との類似性がみられた。

D-2 *Bcl11b* タンパク質はマウスの小腸、大腸組織およびヒトの大腸組織で発現している。前年度の報告で、マウス小腸 crypt 内の上部 1/3 の TA 細胞で強く発現するとしたが、Ctip2 抗体で詳細に検討すると、crypt 下部の細胞核、CBC 細胞や +4 細胞という幹細胞の核内にもよく発現していることが分かった。今回、*Bcl11b* 機能が低下した *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスを解析し、大腸組織全体の肥厚と、大腸 crypt サイズの増大と細胞増殖シグナル像がみられた。小腸でも crypt サイズの

増大と異形および villi 細胞の増殖傾向が観察された。従って、*Bcl11b* が腸管組織のホメオスタシスの維持に関与することが明らかとなった。観察された細胞増殖傾向は、*Apc*^{min/+} マウスに観察されるそれと類似し、同一または類似のシグナル伝達系の関与が考えられた。実際、*Bcl11b*^{S826G/KO} マウスで核内 β -カテニン発現細胞数が上昇する像がみられた。*Bcl11b*^{S826G/KO} マウス胸腺細胞でも、 β -カテニン発現亢進が確認されるので、*Bcl11b* 転写因子が β -カテニン遺伝子発現に抑制的に影響する可能性が示唆された。すでに我々の報告を含めいくつかの報告で、*Bcl11b* は転写の抑制に関与するとされている。*Bcl11b* は細胞核内で転写抑制複合体である NuRD complex の一員として転写に関与し、その標的遺伝子として p21、p27、p57 (細胞周期抑制因子) が報告されている。今回の培養細胞系を用いた実験から、 β -カテニン遺伝子も *Bcl11b* の転写抑制の標的となることが分かった。

次に、ヒト大腸がんでの *Bcl11b* 遺伝子変異の有無を調べた。現在まで 50 サンプルを検査したところ、5 検体に変異と 8 検体に LOH を見いだした。5 つの変異はフレームシフトが 1、置換が 2、脱落が 2 であった。これら 13 の DNA 変化では、LOH と変異の両方をもつ症例はなかった。これは *Bcl11b* ががん抑制遺伝子として、ハプロ不全な働きをもつことを示唆する。マウスの小腸腫瘍では *Apc*^{min/+} 単独では *Bcl11b*-LOH は高頻度に観察できるが、*Apc*^{min/+}/*Bcl11b*^{KO/+} マウスの腫瘍では野生型の *Bcl11b*-アレルの消失は全く見られなかった。この結果は、*Bcl11b* がハプロ不全ながん抑制遺伝子または修飾遺伝子であることを示唆するが、この結果とよく一致する。従って、*Bcl11b* はハプロ不全な大腸がん修飾遺伝子として機能している可能性が高い。総合すると、約 26% (13/50) のヒト大腸がんでは、*Bcl11b* の変化が関与することが示唆された。このことは、ヒトの大腸がん発症のリスク因子、診断、治療、予後を考える上で重要な点となるはずである。

E. 結論

Bcl11b がん修飾遺伝子機能を、胸腺リンパ腫および腸管腫瘍を対象に検討した。*Bcl11b*^{KO/+} マウスの放射線照射後萎縮胸腺には、2 種類の異なる性質をもつ前がん細胞が検出され、その一つはクローナル増殖をしながらも、胸腺細胞の分化能を保持している細胞であった。この胸腺細胞は自己複製能と細胞分化能をもつことから、がん幹細胞との関連が考えられ、またその形成に *Bcl11b* 機能低下が関与すると考えられた。一方、50 のヒト大腸がんの *Bcl11b* 変異解析から、5 例に変異を 8 例に LOH を確認した。野生型のアレルは保持され、これはハプ

ロ不全として寄与する可能性が示唆され、ヒト大腸がん発症のリスク因子を考える上で重要と考えられた。Bcl11b 転写因子は β -カテニン発現を抑制する働きがあり、その機能低下が β -カテニンを上昇させ、それがリンパ腫や腸管腫瘍の発がん原因であると考えられた。

F. 健康危険情報 特記することなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, Mitsutake N, Kominami R, and Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 16:491-503, 2009.

2. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z, Kominami R, Inaba T, and Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of Bcl11b and H2AX induces blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Sci*, 100:1219-1226, 2009.

3. Yamamoto T, Morita S, Go E, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, and Kominami

R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ -ray induced mouse atrophic thymus. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys*, 2010 in press.

4. Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, and Kominami R. Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in γ -irradiated mice. *Cancer Science*, 2010 in press.

2. 学会発表

葛城美徳、郷梨江香、森田慎一、小幡美貴、木南凌「 γ 線照射によるマウス萎縮胸腺内の前リンパ腫細胞形成には細胞増殖と分化停止が必要である」第52回日本放射線影響学会(ワークショップ) 広島:2009年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特記することなし

2. 実用新案登録

特記することなし

3. その他

特記することなし

分担研究報告書

消化器がん発生に關与する炎症反応の分子機構の解明

研究分担者 大島 正伸
金沢大学がん研究所教授

研究要旨

胃腫瘍発生における COX-2/PGE₂ 経路の役割を明らかにするため、あらたなモデルマウスを作製した。BMP 経路での遺伝子変異は若年性ポリープ症の原因として知られているが、BMP 抑制因子 Noggin をマウス胃粘膜で発現させても腫瘍は発生しなかった。しかし、胃粘膜で BMP 抑制と同時に COX-2/PGE₂ 経路を活性化させると胃過誤腫が発生し、COX-2/PGE₂ 経路は発生原因や腫瘍の組織型に関係なく腫瘍形成を促進する事を明らかにした。また、Wnt と COX-2/PGE₂ の相互作用により胃がんを自然発生するマウスモデルを無菌化すると炎症が消失して腫瘍発生が抑制された。したがって、COX-2/PGE₂ 経路活性化と細菌感染刺激の双方が、腫瘍発生促進に重要な炎症反応を惹起すると考えられた。

A. 研究目的

胃がん発生には、*Helicobacter pylori* 感染が密接に関わっており、感染にともなう炎症反応が胃がん発生に重要な役割を果たしていると考えられている。炎症で重要なプロスタグランジン合成酵素である COX-2 の発現誘導が、胃がん・大腸がんなどの消化管がん発生でも重要である事が疫学研究や遺伝学的解析などから明らかにされている。COX-2 の下流で産生されるプロスタノイドの中でも、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の腫瘍組織での産生量が高く、腫瘍発生に重要である可能性が指摘されている。一方で、ヒト胃がん症例の約 30-50%では Wnt シグナルの亢進が検出されており、Wnt シグナル活性化は、主要な胃がん発生原因の一つと考えられている。また、BMP 受容体およびエフェクターである Smad4 遺伝子の変異も消化管に過誤腫を発生する若年性ポリープ症の原因として知られている。これまでのマウスモデルを用いた解析により、Wnt シグナルを単独で活性化させても胃がんは発生せず、Wnt シグナル亢進と同時に COX-2/PGE₂ 経路を誘導させた *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃粘膜で、ヒトの腺管型胃がんと病理組織学的に類似した胃がんが自然発生することが明らかにされた。発生した胃がんの遺伝子発現プロファイルはヒト胃がんの結果と類似していた。したがって、細胞の未分化性維持に重要な Wnt シグナルと、COX-2/PGE₂ 経路による炎症性反応の双方の

作用が胃発がんに必要なと考えられた。しかし、PGE₂ 産生誘導にともなう炎症反応が、どのような分子機構により消化器発がんに関与しているのかは未だ不明である。

本研究では、Wnt と COX-2/PGE₂ 経路の相互作用で胃がんを発生する *K19-Wnt1/C2mE* マウス、および Wnt 活性化以外の原因として BMP シグナル抑制による胃腫瘍発生モデルを作製し、腫瘍発生における COX-2/PGE₂ 経路の役割を明らかにする。さらに、感染刺激による PGE₂ 産生誘導や炎症反応が胃発がんに及ぼす影響を解明する事を目的として、*K19-Wnt1/C2mE* マウスを用いた薬物投与実験、感染実験、および無菌化実験などを実施し、病理学的小および分子生物学的解析を行なう。

B. 研究方法

[若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析]

内在性 BMP 阻害因子である Noggin を胃粘膜で発現する *K19-Nog* トランスジェニックマウスを受精卵へのマイクロインジェクションにより自家作製した。*K19-Nog* マウス胃粘膜での BMP シグナルの状況および胃粘膜病変について免疫組織学的解析を行なった。また、COX-2/PGE₂ 経路の役割を解析するために、*K19-Nog* と *K19-C2mE* マウスを交配させて *K19-Nog/C2mE* マウスを作製し、胃病変を病理学的小および免疫組織学的に解析した。さらに、これらのマウス胃組織由来 RNA を用いてマイクロア

レイ解析を実施し、*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織との比較解析を実施した。

[無菌マウスの作製と飼育]

K19-Wnt1/C2mE マウスを用いて体外受精操作を行って受精卵移植し、妊娠したマウスから帝王切開により無菌的に産仔を摘出した。無菌マウスは実験動物中央研究所の無菌飼育室で 30 週間および 55 週間飼育した。それぞれの週齢で無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスおよび対照群として SPF で飼育した *K19-Wnt1/C2mE* マウスを病理解剖し、胃組織を用いて病理組織標本を作製し、組織の一部は RNA を調製して遺伝子発現解析に使用した。

[EP4 阻害薬投与実験]

27 週齢および 52 週齢の *K19-Wnt1/C2mE* マウスに PGE_2 受容体の EP4 に対する阻害薬を 3 週間連続投与した。各個体の薬剤投与前の胃がん発生状況は X 線 CT により確認し、薬剤投与後は病理解剖を行い、病理組織標本、RNA の調製を行なった。

[免疫組織学的解析と炎症関連遺伝子発現解析]

無菌化および SPF 飼育 *K19-Wnt1/C2mE* マウス、および EP4 阻害薬投与マウスの組織切片を用いて、Ki-67 染色により細胞増殖率解析、TUNEL 染色によりアポトーシス解析を行ない、マクロファージ、ケモカイン等の免疫染色を行なった。また、各マウス組織から抽出した RNA を用いて Real-time RT-PCR により、各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を解析した。

[倫理面への配慮]

組換え DNA 実験および動物実験は、金沢大学組換え DNA 委員会および金沢大学動物実験委員会に承認を得て実施した。ヒト材料は使用していない。

C. 研究結果

[若年性ポリープ症モデルマウスの作製・解析]

野生型マウス胃粘膜では、腺管上部および下部の分化上皮細胞で Smad1, 5, 8 のリン酸化が認められ、BMP シグナルが亢進していることを確認した。一方、*K19-Nog* マウス胃粘膜の分化上皮細胞ではリン酸化 Smad1, 5, 8 の免疫染色シグナルが減弱しており、Noggin の発現による BMP シグナル抑制が確認された。しかし、*K19-Nog* マウス胃粘膜上皮に増殖性病変は発生しなかった。一方、胃粘膜で BMP シグナル抑制と同時に COX-2/PGE_2 経路を活性化させた *K19-Nog/C2mE* 複合マウスでは、大きな胃腫瘍が自然発生した。組織学的には *K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がん (adenocarcinoma) とは異なり、分化した上皮細胞から構成される過

誤腫 (hamartoma) で、若年性ポリープ症で認められる腫瘍病変に類似していた。

K19-Nog/C2mE マウス過誤腫組織由来 RNA を使ったマイクロレイ解析を行なった結果、*K19-Wnt1/C2mE* マウスの胃がんと同様に炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が著しく上昇していた。しかし、*K19-Wnt1/C2mE* マウスと比較して、CD44 や EphB3 などの Wnt シグナル標的因子の発現誘導は認められず、 COX-2/PGE_2 経路は Wnt 活性化には関与していないことが明らかになった。すなわち、 COX-2/PGE_2 経路の活性化は、Wnt 活性化や BMP 抑制などの腫瘍発生原因に関係なく、腫瘍細胞の増殖を促進すると考えられた。

[無菌化 *K19-wnt1/C2mE* マウスの解析]

無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウスを 30 週齢および 55 週齢で病理解剖した結果、胃がんの大きさがそれぞれ SPF で飼育した同週齢 *K19-Wnt1/C2mE* マウスと比較して 30%程度に縮小した。免疫組織解析の結果、アポトーシス細胞の出現頻度に変化は認められなかったが、Ki-67 で標識される細胞増殖率は無菌マウスで有意に低下した。

また、SPF マウスでは COX-2/PGE_2 経路の活性化に起因した炎症反応が発症し、胃粘膜下にはリンパ球を中心とした細胞浸潤が認められるが、無菌マウスでは粘膜下細胞浸潤が消失した。以上の組織像と一致して、Real-time RT-PCR 解析の結果、SPF で飼育した *K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がんでは $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 CXCL1 、 CXCL2 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が上昇していることを確認した。一方で、無菌化マウスではこれらの因子の発現レベルは野生型と同程度まで低下した。すなわち、 COX-2/PGE_2 経路が誘導されていても細菌感染刺激がないと炎症反応が起こらないこと明らかになった。

[EP4 阻害薬投与実験]

X 線 CT 撮影により胃がん発生を確認した 27 週齢および 52 週齢の *K19-Wnt1/C2mE* マウスに EP4 受容体阻害薬を 3 週間投与した結果、どちらの週齢でも胃がん組織の顕著な退縮が認められた。すなわち、4 種類ある PGE_2 受容体 (EP1~EP4) の中でも EP4 を介したシグナル ($\text{COX-2/PGE}_2/\text{EP4}$ 経路) が腫瘍発生に重要であることが明らかになった。組織解析の結果、無菌マウスと同様に炎症細胞浸潤が消失し、サイトカイン、ケモカインの発現が低下していた。すなわち、EP4 を介した PGE_2 シグナルと細菌感染刺激の双方が、胃がん発生に重要な炎症反応の惹起に必要と考えられた。

[炎症関連遺伝子発現解析]

これまでのマウスモデルの研究により、炎症により浸潤するマクロファージが腫瘍発生に重要である可能性が考えられた。そこで、SPF 飼育および無菌化 *K19-Wnt1/C2mE* マウス、EP4 阻害薬投与マウスの胃組織切片を用いて F4/80 抗体によりマクロファージ浸潤について解析した結果、SPF マウス胃がん組織の間質で強いマクロファージ浸潤が検出されたのに対し、無菌マウスおよび EP4 阻害薬投与マウスではマクロファージ浸潤が有意に抑制されていた。

次にマクロファージ遊走に関わるケモカインとして知られる CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、および CCL8 の発現を Real-time RT-PCR で解析した。その結果、野生型マウスに比較して、*K19-C2mE* 単独マウスと SPF 飼育 *K19-Wnt1/C2mE* マウスの双方で CCL2 と CCL8 の発現が顕著に亢進していた。それに対して、無菌化マウスでは全ての CC ケモカイン発現量が野生型のレベルまで低下していた。すなわち、EP4 シグナルと細菌感染刺激の相互作用によりケモカイン産生が誘導され、マクロファージ浸潤に重要である可能性が考えられた。無菌化マウスや EP4 阻害薬投与マウスでは、マクロファージ浸潤の阻害により増殖因子産生や血管新生などが抑制され、腫瘍発生が抑制された可能性が考えられる。

D. 考察

COX-2 の発現誘導は胃がん・大腸がんだけでなく、*Lkb1* や *Cdx2* などの遺伝子ノックアウトマウスに発生する消化管過誤腫性ポリープでも認められるので、さまざまなタイプの腫瘍の発生に関与していると考えられている。本研究により、Wnt 活性化と BMP 抑制という異なる原因により発生する胃腫瘍の双方で、COX-2/PGE₂ 経路の誘導が必要ながことが個体レベルで初めて明らかにされた。Wnt や BMP のような形態形成に関わるモルフォゲンシグナルの変化は、上皮細胞の未分化性の維持を誘導し、腫瘍化を引き起こすと考えられる。一方、COX-2/PGE₂ 経路の誘導は、PGE₂ の直接作用による免疫抑制や血管新生などが報告されている他、炎症反応を惹起することにより腫瘍形成に関与していると考えられている。したがって、COX-2/PGE₂ 経路は腫瘍発生原因や腫瘍の組織型の種類に関係なく、腫瘍細胞の増殖を促進していると考えられる。

マウスの腸管では、Wnt 活性化や BMP 抑制に起因して腺腫および過誤腫が自然発生することが報告されている (Oshima et al, PNAS, 1995; Haramis et al, Science, 2004)。これらの腸管腫瘍では COX-2/PGE₂ 経路が自動的に誘導されており、腫瘍形成を支持しているのに対して、胃粘膜ではトラ

ンスジェニックにより COX-2/PGE₂ を誘導しなければ腫瘍発生に至らない。この現象を説明する研究として、腸管での COX-2 発現誘導には腸内細菌による粘膜上皮の Toll 様受容体 (TLR) を介した刺激が必要ながことが報告されている (Fukata et al, Gastroenterology, 2006)。したがって、胃は腸管に比べて細菌数が極めて少ないために COX-2 発現が誘導され難い可能性が示唆される。おそらく、ピロリ菌感染は TLR を介した COX-2/PGE₂ 経路の誘導によっても腫瘍形成を促進していると考えることが出来る。

実際に、無菌化した胃がんモデルでは、胃粘膜で PGE₂ 産生が誘導されているにも関わらず腫瘍形成が顕著に抑制された。本研究から、EP4 受容体を介した PGE₂ シグナルと細菌感染刺激の双方がマクロファージ浸潤に重要である可能性が考えられた。実際に、COX-2/PGE₂ 経路により誘導された CCL2 および CCL8 の発現は無菌化により阻害されていた。腫瘍組織に浸潤するマクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) は増殖因子産生、血管新生誘導、リモデリング促進などの作用により腫瘍形成を促進すると考えられている。したがって、無菌化による腫瘍抑制効果はケモカイン発現の阻害によるマクロファージ浸潤の抑制が重要な原因のひとつと考えられる。

以上の研究から、COX-2/PGE₂ 経路の阻害による胃がん予防効果が確認されただけでなく、除菌による発がん予防の可能性が新たに考えられた。また、PGE₂ と細菌感染により誘導されるケモカインシグナルにもマクロファージ浸潤抑制による発がん予防作用があるかも知れない。今後、ケモカインとマクロファージの胃がん発生への関与についてさらに解析を進める必要がある。

E. 結論

上皮細胞の未分化性維持あるいは分化抑制に作用する Wnt シグナル活性化や BMP シグナル抑制は胃腫瘍発生の原因となるが、それだけでは腫瘍は発生しない。これらのシグナル変化に加えて、COX-2/PGE₂ 経路が活性化すると、組織型の異なる腫瘍 (胃がんおよび胃過誤腫) が発生する。また、Wnt と COX-2/PGE₂ の相互作用により胃がんを自然発生するマウスモデルを無菌化するとマクロファージ浸潤が阻害されて腫瘍発生が抑制された。したがって、腫瘍の組織型に関係なく COX-2/PGE₂ 経路の活性化と細菌感染刺激の双方が、腫瘍発生に重要な炎症反応の惹起に必要と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E₂ pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69: 2729-2733, 2009.
2. Du Y-C, Oshima H, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Taketo, MM, and Oshima M. Induction and downregulation of Sox17 and its roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 137: 1346-1357, 2009.
3. Oshima H, Oguma K, Du Y-C, and Oshima M. Prostaglandin E₂, Wnt and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 100: 1779-1785, 2009.
4. Itadani H, Oshima H, Oshima M, and Kotani H. Mouse gastric tumor models with PGE₂ pathway activation show similar gene expression profiles to intestinal-type human gastric cancer. *BMC Genomics* 10: 615, 2009.

2. 学会発表

1. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Taketo MM, and Oshima M: Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling activity in gastric epithelial cells through TNF- α . *100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, (Denver) April 18-22, 2009.
2. Oshima M. Gastric tumorigenesis caused by cooperation of inflammation and oncogenic activation, *17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*, (Kanazawa) July 3-4, 2009.
3. Oshima M: Prostaglandin E₂ signaling and inflammation in gastric tumorigenesis. *29th International Symposium on Cancer*, (Sapporo) July 13-14, 2009.
4. Du Y-C, Oshima H, Oguma K, Kitamura T and

Oshima M: Expression of Wnt antagonist Sox17 during the course of gastrointestinal tumorigenesis, *29th International Symposium on Cancer*, (Sapporo) July 13-14, 2009.

5. Oshima H, Oguma K, and Oshima M: Inflammation and gastric tumor mouse model [Symposium], *68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
6. Oshima H, and Oshima M: Gastric tumorigenesis through suppression of BMP signaling [International Session]. *68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
7. 大島 正伸: 胃がん発生における COX-2/PGE₂ 経路の役割, 第 51 回日本消化器病学会大会 (京都), Oct 16, 2009.
8. 小熊 圭祐, 大島 浩子, 大島 正伸: Promotion of Wnt/ β -catenin signaling by TNF- α in gastrointestinal tumor cells, 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜), Dec 9-12, 2009.
9. Oshima M, Oguma K, and Oshima H: Tumor macrophages and inflammatory pathway on gastric tumorigenesis. *14th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Kanazawa) Dec 19-20, 2009.
10. 大島 正伸: 炎症と胃がん発生: pathway specific マウスモデルからのアプローチ, 第 26 回日本毒性病理学会 (金沢), Feb 3, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

遺伝子改変技術を用いたがん関連疾患モデルラットの開発研究

研究分担者 庫本高志
京都大学医学研究科 准教授

研究要旨

DSS誘発大腸炎に対してKADラットが高感受性を示すか否かを検討するために、KADラットと対照系統であるF344ラットに、2%DSSを1週間投与し、投与終了直後、1週間後、3週間後に、病理組織学的解析と炎症関連遺伝子の発現解析を行った。DSS投与終了3週間後において、F344ラットでは大腸炎症が治癒していたが、KADラットでは大腸炎症が持続しており、KADラットはDSS誘発大腸炎に対し高感受性を示すことが判明した。KADラットにおいては、この大腸炎の持続が、AOM/DSS大腸発がん試験における腫瘍数の増加につながると考えられた。

A. 研究目的

Kyoto Apc Delta (KAD) ラット (F344-Apc^{mlk^{yo}}) は、ENUミュータジェネシス法により開発した系統で、Apc遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持ち、C末321アミノ酸を欠くAPCタンパク質を発現している。

KADラットは、大腸腫瘍を自然発症しない。しかし、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸塩 (DSS) の投与によって、AOM投与後15週で、全ての個体に1頭あたり約10個の大腸腫瘍を誘発できる。一方、対照系統のF344ラットでは発症率50%で、1頭あたりの大腸腫瘍数は、約1個にすぎない。AOMの単独投与では、KAD、F344ともに大腸腫瘍が誘発されなかったことから、AOMとDSS投与による大腸腫瘍数の差は、DSSによる大腸発がんのプロモーション効果の差異によるものと考えられた。DSSは大腸炎を誘発することで大腸発がんを促進することが知られている。

本年度は、KADラットとF344ラットにDSSを単独投与し、その臨床症状、病理組織像、炎症関連遺伝子の発現等を明らかにすることで、KADラットがDSSによる大腸炎に対して高感受性を示すか否かを検討した。

B. 研究方法

5週齢の雄KADラットとF344ラット各34頭を用いた。このうち無処置群として各4頭を用いた。残り各30頭に、2%DSSを1週間飲水投与した。DSS投与直後に各10頭、1週間後に各10頭、3週間後に各10頭から大腸を採取した。実験期間中2日ごとに体

重を測定し、肛門周囲の汚れから下痢・血便の有無を判定した。

取り出した大腸は、管腔内をPBSで洗浄し、長軸に沿って切開後、病理組織学的解析のために固定した。

また大腸粘膜を採取し、RNAを抽出し、リアルタイムPCR法によりTNF- α , I11b, I110, Cox2, Ptges 遺伝子の発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」および、関連法規に従って実施された。

C. 研究結果

臨床症状

DSS投与後6日目より、KADはF344に比べ顕著な下痢症状あるいは血便を示し、その傾向は実験終了後まで継続した。

病理組織像

DSS投与終了直後において、F344、KADラットとも大腸粘膜の陰窩はほぼ消失しており多くの炎症細胞が見られた。しかし、F344では粘膜層がフィブリン層に覆われていたが、KADではそのような組織像は観察されなかった。DSS投与終了後3週目において、F344では、ほぼ正常な陰窩が観察されたのに対し、KADラットでは、陰窩が形成されておらず多数の炎症細胞が残存していた。これらのことから、KADラットでは、F344にくらべ、DSS

誘発大腸炎が持続していることが示された。

炎症関連遺伝子の発現量

DSS投与終了直後、1週間後では差異はなかったが、3週間後において、KADラットの大腸粘膜では、TNF- α , Il1b, Il10, Cox2, Ptges遺伝子の発現量が有意に上昇していた。

D. 考察

臨床症状、病理組織像から、DSS投与後3週目において、F344ラットでは大腸炎症が治癒していたが、KADラットでは大腸炎症が持続していることが明らかになった。さらに、炎症関連遺伝子の発現解析から、DSS投与後3週目において、KADラットでは炎症が持続していることが示された。以上よりKADラットはDSS誘発大腸炎に対し高感受性を示し、そのため、KADラットのAOM/DSS大腸発がん試験における大腸腫瘍数の顕著な増加が引き起こされると考えられた。

本研究から、APCタンパク質のC末部位がDSS誘発大腸炎の発症になんらかの役割を果たしていることが明らかとなった。このC末部位には、Basicドメイン、EB1結合ドメイン、DLG結合ドメインがある。これらのドメインは細胞移動や細胞接着に関与していることが知られている。今後DSS誘発大腸炎に係わるドメインの同定、大腸炎高感受性のメカニズムの解明を予定している。

E. 結論

KADラットは、DSS誘発大腸炎に高感受性を示す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M,

Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat. *Cancer Sci.* 100(11): 2022-2027, 2009

2. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One.* 5(1):e8870, 2010.

2. 学会発表

1. 庫本高志、標的遺伝子改変ラットを用いた発がん研究、第68回日本癌学会、横浜市、2009年10月

2. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc*-mutant rat. The 23rd International Mammalian Genome Conference, La Jolla, USA, 2009年11月

3. 庫本高志、*Apc*遺伝子変異ラットを用いた大腸発がん研究、第26回日本毒性病理学会、金沢市、2010年2月

4. Kuramoto T, Genetically modified rat and its application to carcinogenesis study, 2010 KALAS Winter Symposium, Yongpyong, Korea, 2010年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

分担研究報告書

膵管発がんモデル動物における早期病変と発がん機構に関する研究

研究分担者 今井俊夫
国立がんセンター研究所 室長

研究要旨

ヒト膵がん組織において高発現することが報告されている integrin $\alpha_v\beta_3$ など4種の細胞接着関連蛋白について、BOPで誘発したハムスター膵前がん病変の異型過形成 (AH) 及び膵がんでの発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、特に integrin $\alpha_v\beta_3$ が膵がんのみならず AH においても発頻度に陽性を示すことを見出した。また、ハムスターの膵管単離技術を確立し、BOPで誘発した AH に高発現する38遺伝子を見出し、その中にはヒト膵がん組織において高発現のみられる Muc 1 や GST-P のほか、一部にはヒト膵がん組織では報告の見られない遺伝子が含まれていた。以上、ハムスターの膵発がん早期病変に特異的に発現する遺伝子/蛋白の一部はヒト膵がんに類似していることを明らかにした。今後、これら遺伝子/蛋白について、ヒト膵がんの早期診断マーカーあるいは治療/予防法開発への応用の可能性について検討する。

A. 研究目的

膵がんは我が国における部位別がん死亡数として男性で第5位、女性で第6位、男女計で5位であり、他の先進国においても第6位以内に位置する。膵がんは自覚症状に乏しく早期診断法も確立されていないことから、臨床的には進行がんとして診断される場合が多く、ステージ III の膵がんの5年生存率は5%未満と予後が悪いことが知られている。従って、膵がんの早期診断法および予防法の確立が急務であり、その目的のため膵臓における発がん初期過程の分子機構の解明は極めて重要な研究課題である。

ヒト膵発がん過程における病理組織学的診断・分類法として、膵管上皮にみられる立方状-円柱状変化、核の異型性、極性の消失、重層化などを指標とした PanIN 分類がある。ヒト膵がんに対する遺伝子解析、免疫組織化学的解析あるいはプロテオーム解析については種々の報告がみられ、遺伝子異常に関しては K-ras 遺伝子の点突然変異や p16 遺伝子の発現異常が高頻度にみられるが、PanIN のグレードが増えるに従ってこれら遺伝子異常が段階的に増加することが示されている。免疫組織化学的变化については、大部分の報告は進行膵がんに関するもので、早期病変についての結果は殆どみられない。細胞接着に関連するとされる integrin $\alpha_v\beta_3$ 、galectin-3、kallikrein 7 や解糖系酵素である α -enolase の高発現についての報告はその一部である。

シリアンハムスターを用いた N-nitroso-

bis(2-oxopropyl)amine (BOP) 処置による膵管発がんモデルは、その発がん過程における病理組織学的特徴ならびに K-ras 遺伝子の点突然変異や p16 遺伝子に異常がみられることなどの点において、ヒトの膵がんに類似するとされている。ヒトでは早期病変が採取される機会が多くはないが、動物発がんモデルでは発がんの種々の過程の試料を採取することが可能あり、早期病変の分子病理学的解析に適している。本研究では、BOP 誘発ハムスター膵管がん過程における前がん病変とされる異型過形成 (AH) 及び膵がん (AC) に対し、ヒト膵がん組織で高発現していることが報告されている integrin $\alpha_v\beta_3$ など4種の細胞接着関連蛋白と解糖系酵素である α -enolase について免疫組織化学的に解析し、ハムスターとヒトとの類似性、ならびに発がんの早期段階から高頻度で変化のみられる蛋白を明らかにした。また、微細な膵管に対し、マイクロダイセクション法などを用いて一定量の遺伝子を抽出するのは困難であることから、ハムスターにおける膵管単離技術を確立し、BOP 処置したハムスターに誘発された AH における遺伝子の発現異常について cDNA マイクロアレイを用いて解析した。

B. 研究方法

1. 細胞接着関連蛋白に対する免疫組織化学的解析：

シリアンハムスター（5週齢、雌12匹）を日本エスエルシーより購入し、1週間順化した。9

例のハムスターにBOPを10 mg/kg体重の用量で隔日4回皮下投与し、23週齢時にエーテル麻酔下にて屠殺、剖検し膵臓を摘出した。BOPを投与しなかった3例を対照とした。常法に従って膵臓（胃葉、脾葉、十二指腸葉、頭部）のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施し、病理組織学的に膵管由来の腺がん（AC）と前がん病変とされる異形過形成（AH）の発生状況を評価するとともに、連続パラフィン切片を用いて免疫組織化学的解析を行った。検索対象蛋白として、ヒト膵がん組織および膵がん細胞株に対するプロテオーム解析あるいは免疫組織化学的解析で高発現が確認されている細胞接着関連蛋白の integrin $\alpha_v\beta_3$ 、kallikrein 7、galectin-1/3 及び解糖系酵素である α -enolase を選択した。使用した1次抗体は次の通りである。検出はABC法により行った。

(1) Integrin $\alpha_v\beta_3$; Clone LM609, Chemicon International 社, Temecula, CA

(2) Kallikrein 7; Polyclonal, R&D Systems 社, Minneapolis, MN

(3) Galectin-1; Polyclonal, Protein Tech Group 社, Chicago, IL

(4) Galectin-3; Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology 社, Santa Cruz, CA

(5) α -Enolase; Polyclonal, Aviva Systems Biology LLC 社., San Diego, CA

膵臓の正常組織ならびにAHとACにおける発現の頻度と程度を比較検討した。程度については、病変内の上皮細胞と間質細胞の各々について陽性細胞が10%未満の場合は陰性(-)、10-70%の場合は陽性(+)、70%を超える場合は強陽性(++)と判定した。

2. 膵管の単離及びcDNAマイクロアレイを用いた発現遺伝子解析:

シリアンハムスター(5週齢、雌9匹)を日本エスエルシーより購入し、1週間順化した。5例のハムスターにBOPを10 mg/kg体重の用量で隔日4回皮下投与した。BOPを投与しなかった4例を対照とした。25-39週齢時にエーテル麻酔下にて屠殺し、次の手順で膵管単離を行った。

(1) 総胆管及び十二指腸の近位、遠位端を結紮

(2) 30ゲージの注射針を用いてRNAlater™ (Ambion社)に溶解した色素(Reactive black 5)を十二指腸乳頭部より注入

(3) 膵臓を摘出

(4) RNAlater™に半日~1日浸漬

(5) 精密ハサミ、ピンセットにて膵管を単離

単離した膵管は1mm長に細切し、その2断片毎の1断片について、常法に従ってホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、HE染色を施して病理組織学的に観察した。病理組織学的にAHが認められた断片に隣接する断片より総RNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ(NimbleGen Hamster Gene Expression 385K、Roche Diagnostics社; 搭載遺伝子数、5966)を用いて発現遺伝子を解析し、BOPを投与しない対照群のハムスターから単離した膵管と比較検討した。

(倫理面への配慮)

使用する動物数を最小限に留めた。体重減少や一般状態を指標とした人道的エンドポイントを設定し、動物は全てエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により安楽殺した。その他の実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行った。実験の開始に当っては、「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出して実施承認を得た。

C. 研究結果

1. 細胞接着関連蛋白に対する免疫組織化学的解析:

本実験においてみとめられた膵管由来の腺がん(AC)および異形過形成(AH)の発生頻度は、各々9例中4例(44%)および9例中8例(89%)で、発生個数は6個および14個であった。BOPを投与しなかった対照群の3例の膵臓に病理組織学的な異常はみられなかった。これら6個のAC、14個のAHおよび対照群の膵臓に対し、5種類の一次抗体を用いて免疫組織化学的検索を実施した。Integrin $\alpha_v\beta_3$ はACおよびAHの上皮細胞に陽性を示し、それぞれ6例中6例(100%)および14例中13例(93%)と、特にAHにおける陽性率は他の蛋白質に比べて最も高く、程度も強かった。Integrin $\alpha_v\beta_3$ は上皮細胞の細胞質内に強く陽性像を示した。Galectin-1と α -EnolaseはACおよびAHの上皮細胞における陽性率が高く、一方Kallikrein 7とGalectin-3は、ACあるいはAHの間質細胞における陽性率が高い傾向を示した。これらIntegrin $\alpha_v\beta_3$ を除く4種の蛋白については、AHの上皮細胞では主に内腔側の細胞表面に陽性を示し、ACにおけるGalectin-1、 α -EnolaseおよびKallikrein 7は主に細胞質に均一な陽性像を示した。

2. 膵管の単離及びcDNAマイクロアレイを用いた発現遺伝子解析:

BOP処置したハムスターの膵管を単離し、1mm

長に細切して病理組織学的に検索した結果、AHは4断片に認められた。これら4断片から抽出したmRNAを1つにプールしcDNAマイクロアレイによる解析に供した。一方、BOPを投与しないハムスターから単離した膵管の断片においては異常がみられず、対照試料とした。その結果、AHに特異的に高発現している38遺伝子を見出し、その中にはヒト膵がん組織に高発現のみられるMuc 1やGST-Pが含まれていた。また、CyclophilinについてはハムスターのAHで高発現がみられたが、ヒト膵がん組織において高発現しているとの報告はみられない。一方、37遺伝子についてはAHにおいて特異的に発現低下していた。

D. 考察

細胞接着関連蛋白に対する免疫組織化学的解析において、検索対象とした5種の蛋白質の中でIntegrin $\alpha_v\beta_3$ がACおよびAHにおいて最も高頻度に陽性を示した。Integrin $\alpha_v\beta_3$ は上皮細胞の細胞質内に強く陽性像を示したが、その局在性はヒトの膵がんと同様であった(Hosotani R. et al., 2002)。正常組織におけるIntegrinは主に細胞膜に局在して機能すると考えられるが、ACおよびAHにおいて細胞質に局在する原因として、1) 過剰発現あるいは分解抑制された蛋白質が細胞質に蓄積した 2) 蛋白質の構造異常により細胞膜への移行が阻害された等が考えられるが、詳細は明らかではなかった。ヒト膵がん組織においてGalectin-1は主に間質細胞に陽性を示すことが報告されているが(Shen J., et al., 2004)、今回のハムスターのAC及びAHでは主に上皮細胞に陽性を示し、Kallikrein 7とGalectin-3はその逆であることが報告されている(Johnson SK, et al., 2007; Gebhardt A., 2004)。これらの蛋白について、ハムスターとヒトで局在部位が異なる原因および意義については明らかではなかった。以上、局在部位については一部異なるものの、今回検索した5種の蛋白質については、BOP誘発ハムスター膵病変とヒト膵がんにおいて共通して高発現していることを明らかにした。

ハムスターの単離膵管を用いた発現遺伝子解析において、Muc 1およびGST-Pはヒト膵がん組

織と共通してハムスターのAHでも高発現していたが(Tajiri T. et al., 2004; Trachte A.L. et al., 2002)、ハムスターのAHで高発現のみられたGRP94については、ヒト膵がんではその発現が低下していることが報告されている(Pan Z. et al., 2009)。Cyclophilin (Cyclophilin A)についてはハムスターのAHで高発現がみられたが、ヒト膵がん組織で高発現しているとの報告はみられず、一方、ヒト膵がん細胞の増殖に関与する可能性が示されている(Li, M., et al., 2005)。Cyclophilinについては、今後、膵がんの治療/予防法開発への応用の可能性について検討する。

E. 結論

ハムスターの膵管初期病変に特異的に発現する遺伝子/蛋白の一部はヒト膵がんに類似していることが示された。また、今回示された遺伝子/蛋白については、ヒト膵がんの早期診断マーカーあるいは治療/予防法開発の可能性について検討する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

1. 北橋 宗、吉本光喜、今井俊夫、BOP誘発ハムスター膵がん過程における免疫組織化学マーカーとしての $\alpha_v\beta_3$ integrinの有用性、第26回日本毒性病理学会、金沢市(2010年2月)

2. Kitahashi T, Mutoh M, Sugimura T, Wakabayashi K, Imai T. Application of micro-computed tomography in pancreatic ductal carcinomas of Syrian hamsters. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, 米国ハワイ州ハワイ島(2010年2月)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし。