

- ラル国際シンポジウム、東京 (2011年2月)
71. 藤下晃章、青木正博、武藤誠 JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTORC1 pathway activation in Apc Δ 716 mice. BMB2010, 神戸市 (2010年12月)
 72. 藤下晃章、青木正博、武藤誠 JNK シグナルは mTORC1 経路活性化を介して Apc 変異マウスにおける腸管腫瘍形成を促進する 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)
 73. 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 Apc 変異ラット (KAD ラット) における DSS 誘発大腸炎 第 57 回日本実験動物学会、京都市 (2010年5月)
 74. 真下知士、滝澤明子、吉見一人、国広弥生、田上史、日合弘、庫本高志、芹川忠夫 ジンクフィンガーヌクレアーゼにより作製した X連鎖重症複合免疫不全ラット 第 57 回日本実験動物学会、京都市 (2010年5月)
 75. 吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志 APC タンパク質 C 末ドメインは DSS 誘発大腸炎症に重要な役割を果たす 第 25 回発癌病理研究会、松島町 (2010年8月)
 76. 吉見一人、田中卓二、庫本高志 APC タンパク質 C 末ドメインは DSS 誘発大腸炎症に重要な役割を果たす 第 69 回日本癌学会、大阪市 (2010年9月)
 77. 吉見一人、橋本貴生、田中卓二、丹羽佑介、芹川忠夫、庫本高志 KAD ラットを用いた大腸癌化学療法試験法の確立 第 108 回関西実験動物研究会、京都市 (2010年12月)
 78. T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand (2010年12月)
 79. 大野みずき、作見邦彦、續輝久、中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸市 (2010年12月)
 80. 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續輝久 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸市 (2010年12月)
 81. 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續輝久 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響 日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城県つくば市 (2010年11月)
 82. 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續輝久 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都市 (2010年10月)
 83. 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪市 (2010年9月)
 84. 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死 日本遺伝学会第 82 回大会, 札幌市 (2010年9月)
 85. T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA

repair-deficient mice, Workshop:
Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA (2010年5月)

86. 山下克美、内田早苗、中釜齊 環境発がん物質による細胞周期制御因子Cdc25の分解機構 第39回日本環境変異原学会大会、つくば市(2010年11月)

87. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、松永司、

中釜齊、山下克美 SCF^{btTrCP}によるCdc26B分解におけるPEST配列の役割 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸(2010年12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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ラット大腸がんモデルを用いた発がん初期過程の分子機構および感受性要因の解明

分担研究者 中釜 斉（筆宝 義隆）
国立がんセンター研究所 所長（ユニット長）
（平成 23 年 3 月 11 日付けで中釜から筆宝へ交代）

研究要旨

変異原性物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)でラットに誘発される大腸発がんモデル系を用いて、系統間の発がん感受性の差と関連する遺伝子 Caspase3 の多型と発現レベルの系統間の差を同定した。トランスジェニックラットを作成して Caspase3 発現量を操作した上で発がん性を検討したところ、系統間での発がん性の差が個体レベルでも再現された。また、マウスの正常腸管細胞の 3 次元初代培養と、レンチウイルスベクターによる複数のがん抑制遺伝子に対する shRNA の導入とを組み合わせることで、短期間でヌードマウス皮下に大腸がんを再現できる実験系の構築に成功した。さらに、RNA 干渉のエフェクター複合体である RISC の構成因子であり、ヒトおよび PhIP 誘発ラット大腸発がんの早期段階から発現上昇を示す SND1 が特異的に生合成を制御する microRNA 分子の探索をノックダウン法により同定した。

A. 研究目的

ヒト大腸発がんの分子機構、特にがんの初期発生段階における遺伝子変異や遺伝子発現の変化や、その発がん過程を修飾する種々の環境因子および遺伝的因子の解明を目指す。加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質 PhIP、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine により誘発されるラット大腸発がんモデルを引き続き用いるが、個体レベルでの動物実験の欠点を補完するために、今回新たにマウス腸管細胞の *in vitro* 発がん再構成系の構築も試みた。さらに、ラット大腸発がん初期病変から高発現の SND1 が発がんを促進するメカニズムの探索も行った。本研究による動物モデルを用いた解析は、ヒト発がん研究のための検証系としての性格を有し、最終的にはヒトがんの早期診断や、遺伝子情報に基づいたテーラーメイドながん予防策の構築、さらには、がんに対する新規治療薬や予防薬開発のための標的候補分子の同定などへの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

(1) マウス腸管細胞の 3 次元培養系を用いた発がん再構成：生後 4 週間程度の C57BL/6 マウスの小腸から、幹細胞を多く含む腺窩部分を EDTA などにより選択的に単離し、さらに酵素処理により単一細胞にまで分離し、マトリゲル上で EGF, R-spondin-1, Noggin などの増殖因子を添加して幹細胞に最適化された培養を行った。その上で、ヒト大腸がんを高頻度に変異の見られる p53, APC, PTEN などのがん抑制遺伝子に対する shRNA ベクターを、単独または組み合わせてレンチウイルスにより細胞に導入し、短期間培養した後にヌードマウス皮下に接種して造腫瘍能を検定した。得られた腫瘍は組織学的に評価すると同時に、再び酵素処理により単一細胞にまで分離し、がん幹細胞の存在を示唆するスフェロイド培養が可能か検討した。

(2) PhIP 誘発ラット大腸がん感受性遺伝子 Caspase3 の発がん関与の証明
(2-a) TG ラットでの PhIP 誘発発がん実

験:発がん抵抗性である ACI ラットのゲノムから作成した BAC ライブラリーから caspase3 遺伝子を含むゲノム断片を内包する BAC を選択して、発がん感受性である F344 ラットに導入した BAC transgenic ラットを前年度までに作成した。種々のコピー数の系統が作成されたが、大腸腺窩でのタンパク発現量が F344 ラットの約 2 倍程度で ACI ラットと同程度の発現レベルと考えられた 2 系統 A, B について、PhIP 誘発発がん実験を行った。6 週齢の雄ラット TG10 匹、非 TG10 匹に 2 週間 400ppm の PhIP を経口投与して、さらに 4 週間高脂肪食を投与後に屠殺して大腸がん早期病変の指標として aberrant crypts (AC) および aberrant crypts foci (ACF) 数を比較した。統計解析には Wilcoxon 順位和検定を行った。

(2-b) caspase3 ヘテロ欠損マウスでの AOM 誘発大腸発がん実験: caspase3 の発現量低下が大腸化学発がん感受性の増加に関与することをより一般的に証明するために、動物種と化合物の両方を変えた条件で検討を行うこととし、マウスでの Azoxymethane (AOM) 誘発大腸発がん実験を行った。F344 ラットと ACI ラットの約 2 倍程度の caspase3 の発現量差を再現するために、caspase3^{+/+}と caspase3^{+/-}のマウス 20 匹ずつ雄雌別々に検討した。caspase3^{-/-}マウスは 3-4 週の短命であり体格も極端に小さいため、解析には用いなかった。AOM は 10mg/kg 腹腔内投与を週 1 回、合計 6 回繰り返して、投与終了後 20 週後に屠殺して大腸腫瘍の数を比較した。

(3) SND1 ノックダウン大腸がん細胞株の樹立と miRNA 発現解析:HCT 116 及び SW480 大腸がん細胞株へ、SND1 を標的とするレンチウイルス shRNA を導入し、薬剤選択によりノックダウン細胞株を樹立した。ノックダウン細胞株とコントロール細胞株から RNA を調整し、Cy3 で標識後、miRNA マイクロアレイ解析を行い miRNA 発現プロファイルの変化を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立がん研究センターの定める動物実験に関する規約を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対する十分な配慮を払い、屠殺は麻酔と放血の併用で行った。ヒト試料を用いた解析は、疫学研究の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) マウス腸管細胞の 3 次元培養系を用いた発がん再構成:最初に p53^{-/-}のマウス腸管初代培養細胞に shPTEN+shAPC の組み合わせで shRNA を導入したところ、3 週間程度で皮下腫瘍の形成が見られ、in vitro で短期間に発がんが再構成可能であることを見いだした。次に、遺伝学的に正常な C57BL/6 マウスでも同様の実験が可能か検討した。shp53+shAPC および shPTEN+shAPC の組み合わせでは、マトリゲル 3 次元培養系における organoid の形態が通常 crypt の集合構造から Wnt 経路の活性化を意味する円形構造に転換した。さらに、短期間の培養の後にヌードマウス皮下に移植したところ、4 週間程度の短期間で腫瘍を形成した。組織学的にもヒト大腸がん類似の腺がんであり、免疫組織化学では Wnt 経路活性化に特徴的な β -catenin の核および細胞質への蓄積を認めた。また、これらの腫瘍細胞を低接着性ディッシュで培養したところ、スフェロイドを形成して浮遊性に増殖し、ヌードマウス皮下への再移植も可能であった。通常 FBS を添加した培養条件では分化して接着性を獲得する性質も含め、がん幹細胞に特徴的な性質を示した。一方、shp53+shPTEN の組み合わせ、あるいは各 shRNA の単独導入では全く形態的な変化を示さず、皮下腫瘍の形成も認めなかった。

(2) PhIP 誘発ラット大腸がん感受性遺伝子 Caspase3 の発がん関与の証明

(2-a) TG ラットでの PhIP 誘発発がん実験: 系統 A では平均値で nonTG (AC

3.9, ACF 1.9) に対して TG (AC 1.6, ACF 0.6) と TG で有意に AC, ACF が抑制されていた ($p < 0.01$)。一方、系統 B では nonTG (AC 4.3, ACF 2.4) に対して TG (AC 3.1, ACF 1.3) であり、統計的に有意ではなかったが抑制傾向を示した ($p = 0.1706$)。

(2-b) caspase3 ヘテロ欠損マウスでの AOM 誘発大腸発がん実験: caspase3^{+/+} と caspase3^{+/-} のマウスを AOM 投与後 20 週後に解剖したが、雌雄とも両群間での腫瘍数に有意な差を認めなかった。また、無作為に抽出して ACF 数の計測も行ったが、やはり両群間で差を認めなかった。

(3) SND1 ノックダウン大腸がん細胞株の樹立と miRNA 発現解析: SND1 は、RNA 干渉の制御複合体の構成因子であることが報告されているが、その機能は明らかになっていない。ヒト大腸がんでは、SND1 の発現亢進が高頻度に観察される。また、SND1 の過剰発現は、正常腸管上皮細胞の“接触阻止”機能の低下に基づく細胞増殖能の亢進と APC の発現低下を誘導することを我々は報告している。また、SND1 は細胞内で特定の miRNA (Let-7 や miR-630) と相互作用していることや、SND1 の過剰発現により、Let-7 依存的な翻訳抑制が亢進することも報告した (Tsuchiya and Nakagama, *Mutat Res*)。SND1 の機能をさらに詳細に検討するため、SND1 ノックダウン細胞における miRNA 発現解析を行ったところ、成熟型 Let-7 ファミリーの発現低下を誘導することを見いだした。したがって、SND1 はある特定 miRNA の生合成過程の制御を介して、miRNA 依存的遺伝子発現制御に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

マウス腸管細胞の 3 次元培養系を用いた発がん再構成においては世界で初めて大腸発がんを *in vitro* で再現する簡便な系の確立に成功した。遺伝子改変動物を作成することなく遺伝的な相互作用の検討を行える点が画期的である。現在、ヒト大腸がんを高頻度の変異が報告されている多数のがん抑制遺伝子について

shRNA を調整しており、どの組み合わせが発がんを促進するか今後包括的に検討する予定である。これまでの KO マウスでの解析でも抑制遺伝子単独の欠損では大腸発がんが見られず、複数の変異で初めて発がんすることが多いことから、本実験系でそのような組み合わせをあらかじめ絞り込むことが研究の迅速化に有用と考えられる。

大腸発がん感受性候補遺伝子 Caspase3 の 3' -UTR の多型が何らかの機構を介して系統間で mRNA レベル、タンパクレベルの差を引き起こしていることを前年度までに明らかにしてきた。今年度はさらにこの発現量の差が大腸化学発がん性に影響を与えるかどうか TG ラットと KO マウスを用いて個体レベルでの検討を行った。ラットでは予想通り発現の増加により発がん性の低下を認めた。一方、遺伝子改変マウスでの検討では Caspase3 の発現量の差は発がん性に影響を与えなかった。この原因として、高脂肪食ではなく普通食を用いたこと、あるいは別の遺伝子変異との組み合わせで初めて差が出る可能性が考えられる。特に後者の可能性については、今年度に開発した再構成の系を用いて検証が可能であり、種々のがん抑制遺伝子の機能喪失と Caspase3 の発現量低下が協調的に発がん性を促進させる可能性について現在検討を進めている。また、今後 Caspase3 の発現レベルの個体差が発がんリスクに関連するかどうかヒトでの検討を行うことも有意義と考えられる。

SND1 は、microRNA の制御複合体である RISC の構成因子であり、大腸発がんの早期病変から発現亢進が認められる。PhIP の胃内投与により SND1 と Caspase3 はともに、大腸上皮細胞において mRNA レベルで発現上昇が誘導されることを見いだしている。本研究により SND1 が生合成に関わる miRNA が明らかになったことで、それらの発がんへの関与が今後の検討課題である。また、最近アポトーシス時に SND1 が Caspase3 により標的基質として分解されることが報告されており、SND1 の過剰

発現と Caspase3 の低レベル発現は、協調して発がんに貢献している可能性がある。SND1 の過剰発現は APC の発現を抑制して大腸発がんに貢献していることをすでに報告しているが、これとは別の機構も存在することを示唆する結果といえる。

E. 結論

マウス初代培養細胞から発がんを再構成する系を世界で初めて確立した。また、Caspase3 の発現量が大腸化学発がんの感受性に直接影響を与えることを証明した。SND1 が生合成に関わる miRNA を明らかにし、SND1 による大腸発がん促進機構の一端を明らかにした。本研究における動物の個体・細胞を用いた解析を通じて、大腸発がんの初期過程で起きている遺伝的因子と環境因子の相互作用に関する知見が集積されてきている。特に、PhIP を起点とした SND1-Caspase3 の関連は大腸発がん研究においてこれまでに知られていない切り口といえる。モデル動物と同様の現象が観察されるかについては、ヒトでも個別に検証可能であり、そこを新たな切り口として発がん研究が展開されることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang R, Dashwood W-M, Nian H, Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Int. J. Cancer* 128:2581-2590 (2010).
2. Izumiya M, Okamoto K, Tsuchiya N, Nakagama H. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. *Carcinogenesis* 31:1354-1359 (2010).
3. Tsuchiya N, Nakagama H. MicroRNA,

SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutation Research* 693:94-100 (2010).

4. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Research*, in press.
5. 中釜 斉: 特集: PPAR γ アゴニスト—悪性腫瘍, *日本臨牀*, 68, 2月号:323-329 (2010).
6. 中釜 斉: マイクロ RNA と癌 (MicroRNAs and Cancer), *細胞*, 42:2(226)-3(227) (2010).
7. 泉谷昌志、土屋直人、中釜 斉: 機能スクリーニング系によるがん抑制的 miRNA の単離, *生体の科学*, 61:4(315-320) (2010).
8. 中釜 斉: 発癌と炎症, *MicroRNAs and Cancer*, *細胞工学*, 42:2(226)-3(227) (2010).
9. 筆宝義隆、中釜 斉: メタボリックシンドローム—基礎・臨床の最新知見—, *日本臨牀*, 69:438-443 (2010).
10. 泉谷昌志、中釜 斉: 大腸癌—最新の研究動向—癌遺伝子と癌抑制遺伝子, *日本臨牀*, 69:増刊号 3:72-76 (2010).

2. 学会発表

1. 大畑広和、岡本康司、中釜 斉 大腸がん幹細胞の in vitro 培養系の確立 第 19 回日本がん転移学会学術集会、金沢 (2010年6月)
2. 岡本康司、大畑広和、中釜 斉 大腸がん肝転移の抑制に働くマイクロ RNA 及び shRNA の機能的スクリーニング 第 19 回日本がん転移学会学術集会、金沢 (2010年6月)
3. Nakagama H, Ochiai M, Hippo Y, Critical roles of microRNAs in the early stages of colon carcinogenesis, XII International

- Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010年7月)
4. 筆宝義隆、落合雅子、中釜 斉 カスパーゼ3遺伝子多型はラット大腸化学発がん感受性に影響する 第25回発癌病理研究会、松島(2010年8月)
 5. 福田博政、中釜 斉 PhIP曝露に対する細胞応答の解析 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 6. 筆宝義隆、近藤靖之、落合雅子、杉村隆、中釜 斉 カスパーゼ3遺伝子多型はラット大腸化学発がん感受性に影響する 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 7. 五十嵐麻希、筆宝義隆、落合雅子、中釜 斉 ラットにおけるメタボリック症候群と大腸発がんを関連づける分子機構の探索 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 8. 落合雅子、五十嵐麻希、筆宝義隆、中釜 斉 ヘテロサイクリックアミンにより誘導されるmicroRNAと大腸発がん早期段階におけるその意義 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 9. Okamoto K, Ohata H, Nakagama H 大腸がん転移を抑制する新規因子の同定及び解析 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 10. Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H p53依存的細胞運命決定におけるがん抑制因子microRNA-22の役割 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
 11. Imai K, Ochiai M, Hippo Y, Igarashi M, Wakui S, Nakagama H ヘテロサイクリックアミン暴露によるmicroRNAの発現変動と大腸発がん早期段階における意義 第39回日本環境変異原学会、筑波(2010年11月)
 12. Nakagama H, Ochiai M, Imai K, Hippo Y, Genetic analysis identified a candidate locus on chromosome 16 for susceptibility to the induction of colon cancer in rats by a food-borne carcinogen, PhIP 第18回国際ラット遺伝システムワークショップ、京都(2010年11月)
 13. Ochiai M, Hippo Y, Imai K, Igarashi M, Nakagama H Induction of distinct microRNAs by carcinogenic heterocyclic amines and its significance in early stages of colon carcinogenesis 第18回国際ラット遺伝システムワークショップ、京都(2010年11月)
 14. Fukuda H, Nakagama H Cellular responses and transformation by exposure to a food-borne carcinogen, PhIP 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸(2010年12月)
 15. 落合雅子、今井 海、筆宝義隆、五十嵐麻希、和久井 信、中釜 斉 ヘテロサイクリックアミン暴露によるmicroRNAの発現変動と大腸発がん早期段階における意義 平成22年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津(2011年2月)
 16. 小沼邦重、高須伸二、堀美香、中釜 斉、武藤倫弘 肝発がんを促進する脂肪肝マウスモデルの作成 平成22年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津(2011年2月)
 17. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata H, Nakagama H, miR-22, a novel tumor-suppressor gene, determines p53-dependent apoptosis through repression of p21, Keystone Symposia MicroRNAs and Non-coding RNAs and Cancer, Banff, Canada(2011年2月)
 18. Okamoto K, Ohata H, Ishiguro T, Sato A, Tabe Y, Nakagama H, Identification and characterization of regulatory factors that inhibit liver metastasis of colon cancer cells, The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, 浦安(2011年3月)
 19. Onuma K, Mutoh M, Takasu S, Hori M, Takahashi M, Nakagama H, Liver steatosis induced by high fat diet and alcohol in obese/insulin-resistant KK-Ay mouse, The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, 浦安(2011年3月)
 20. Okamoto K, Ohata H, Ishiguro T, Sato A, Tabe Y, Nakagama H, Identification and characterization of regulatory factors that inhibit liver metastasis of colon cancer

cells, Keystone Symposia Stem cells,
cancer & metastasis (C4), Keystone,
Colorado (2011年3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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ポリ ADP-リボシル化を標的とする早期からの制がん法

分担研究者 益谷 美都子
国立がん研究センター研究所 ゲノム安定性研究分野 分野長

研究要旨

マウス ES 細胞分化系で PARP-1 は *H19-Igf2*, *Peg 3* 等の特定の遺伝子群の DNA 脱メチル化を誘導し、エピゲノムの調節に関与することが判った。*H19-Igf2* ICR における DNA 脱メチル化は活性化ヒストン修飾への移行を伴った。*H19* と *Peg3* の発現亢進は *Parp-1* 欠損 ES 細胞におけるトロホblast 分化の誘導と維持に関わる可能性が示唆された。*Parp-1* 欠損マウス細胞において PARP-1 が Erk1/2 シグナル伝達経路の活性化に寄与することが示唆された。また、PARP 阻害剤は γ 線及び炭素線照射の DNA 損傷修復応答に関与することを見出した。PARP 阻害剤はがん治療の放射線増感剤として γ 線など低 LET 放射線だけでなく炭素線など高 LET 放射線でも有用である可能性が考えられる。

A. 研究目的

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) は DNA 損傷修復経路のうち塩基除去修復、DNA 鎖切断修復、相同組み換え修復に機能し、DNA 損傷後の細胞死を誘導し、転写制御にも関与することが示唆されている。PARP の機能異常ががん化に関与することが判ってきたが機構は十分に解明されておらず、その機構解明はポリ ADP-リボシル化経路阻害による早期からの制がん法を確立するために重要である。本研究ではまず、PARP-1 の転写、エピゲノム制御への関与を胚細胞腫瘍の分化モデルとしてのマウス ES 細胞分化系で調べる。また、PARP 阻害剤及び PARP ファミリー分子 siRNA の増殖シグナル伝達系への影響を調べる。

放射線による DNA 損傷の修復応答の機構の研究は放射線による二次発がんの予防と効果的増感剤の開発に共に必要であるがその機構は解明されていない部分が多い。ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) が放射線による DNA 損傷の修復応答に関わることをこれまでに見出している。また PARP の機能阻害は γ 線照射後の致死感受性を増強させる知見を得ている。そこで低 LET (linear-energy-transfer) 及び高 LET の重粒子線照射における DNA 損傷

修復応答における PARP の役割を検討する。また、PARP 阻害剤による放射線の致死効果増強について調べる。

これらの研究により、ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) 機能阻害下におけるクロマチン制御異常と DNA 修復応答及び細胞死の誘発機構を明らかにし、ポリ ADP-リボシル化経路阻害による早期からの制がん法を確立する。

B. 研究方法

ES 細胞におけるゲノムワイドな CpG アイランドプロファイルは MeDIP 法により行った。*H19/Igf2* ICR 領域のヒストン修飾状態及び転写因子結合状態の解析はクロマチン免疫沈降法及びリアルタイム PCR 法により行った。PARP 阻害によるシグナル伝達系への影響の解析はウェスタンブロットティング法によって行った。

PARP 阻害剤によるがん細胞株に対する γ 線、炭素線 (LET13 と LET70) による致死感受性への増感効果を比較検討する。放射線応答への PARP の関与と PARP 阻害剤併用下での放射線照射による検討にはコロニー形成法、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)、ウェスタンブロットティング法を用いた。放射線照射は γ 線 (^{60}Co 照射装置: Gammacell 220)、LET13 keV/ μm

及び LET70 keV/ μ m 炭素線 (HIMAC、放射線医学総合研究所) を用いた。

(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。遺伝子組換え実験は、各研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) *Parp-1* 欠損下でのエピジェネティック制御の異常

1. *Parp-1* 欠損 ES 細胞 (ESC) でのゲノムワイドな CpG アイランドプロファイルの検討

これまでに *Parp-1* 欠損 ESC ではトロホブラスト系譜への分化誘導が亢進すること、*H19-Igf2* imprinting 制御領域 (ICR) における DNA メチル化レベルの顕著な低下と *H19* 遺伝子の発現亢進を見出している。PARP-1 の機能欠損がエピジェネティック異常を誘発しがん化過程に関わる可能性が示唆されるため、ゲノムワイドな DNA メチル化の異常を検索した。CpG アイランドメチル化状態を、2つの *Parp-1* 欠損 ESC クローン (210-58, 226-47) とオリジナルである J1 ESC クローン間で CpG アイランドマイクロアレイを用いてゲノムワイドに検討した。マウス線維芽細胞を用いた報告では、PARP 阻害による CpG のメチル化の誘導が報告されている。この報告と同様に J1 と比較して2つの *Parp-1* 欠損 ESC クローンにおいて、様々な CpG アイランドがメチル化されていることを観察した。さらに *Parp-1* 欠損 ESC では脱メチル化が誘導される CpG アイランドも数十箇所検出された。両 *Parp-1* 欠損 ESC クローン間で共通して CpG メチル化状態が変化した領域の中からトロホブラスト分化に関与しうる候補として胚体外組織の発生に重要なインプリンティング遺伝子のメチル化変化に注目して検索した。その結果、1) 胎盤で高発現を示し、発現量が胎盤の大きさと相関する *Peg3* 遺伝子の DMR (differentially methylated

region) が *Parp-1* 欠損に伴って顕著に脱メチル化されていること、2) DMR の脱メチル化と相関して *Peg3* の発現が有意に上昇していることを見出した。*Peg3* は胎盤においてトロホブラストの分化ではなく増殖に関与することが示されている。*Parp-1* 欠損 ESC で *Peg3* の発現が分化トロホブラストの安定維持に寄与する可能性が示唆された。

2. *Parp-1* 欠損 ESC での *H19/Igf2* ICR のエピジェネティックな活性化

H19-Igf2 ICR における DNA メチル化レベルの顕著な低下と *H19* 遺伝子の発現亢進がトロホブラスト分化に関与すると考えられその機構を調べた。ESC ではバイバレントなヒストン修飾によっても転写が制御されるため、転写活性化を検討する上でヒストン修飾状態の検討は重要である。そこで *Parp-1* 欠損 ESC の *H19/Igf2* ICR に対する、様々な histoneH3 の修飾抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、ICR のヒストン修飾状態を検討した。J1 ESC ではヒストン修飾は不活性化型を示し、転写制御因子 CTCF の結合も微弱であったが、*Parp-1* 欠損 ESC (226-47) では活性化型修飾である H3K4me2, me3, H3Ac が強く検出され、CTCF の結合も観察された。このことは J1 ESC では不活性化されていた *H19/Igf2* ICR が *Parp-1* 欠損 ESC では活性化されていることを示している。一方、PARP-1 は DNA 修復関連因子であるため、*H19* の発現上昇は *Parp-1* 欠損による染色体不安定性 (*H19* 領域の倍加) に基づく可能性を検討した。他染色体上の *Oct3/4* 領域を指標にしたジェノミック PCR では、J1 と2つの *Parp-1* 欠損 ESC クローンでは *H19/Igf2* ICR のシグナル強度に有意差は認められなかった。これらの結果から *Parp-1* 欠損 ESC での *H19* の発現上昇は *H19/Igf2* ICR の活性化に依存することが示された。

2) PARP 機能阻害の増殖シグナル経路への影響

Parp-1 欠損マウス細胞において Erk1/2 の発現レベルが低下し、リン酸化 Erk レベルも低下を示したことから、PARP-1 が

Erk1/2 シグナル伝達経路の活性化に寄与することが示唆された。ヒトがん細胞株においても PARP 阻害剤処理及び、*PARP10* siRNA により増殖シグナル経路の活性化状態の変化が western blot 法で観察された。この意義をさらに検討している。

3) 放射線応答への PARP の関与と PARP 阻害剤併用放射線療法による早期制がんの検討

膵癌細胞株である MIA PaCa2 を用いて、臨床試験に使用されている PARP 阻害剤 AZD2281 処理下、 γ 線、炭素線 (LET13 keV/ μ m 及び LET70 keV/ μ m) 単回照射後の生存率をコロニー形成法で測定した。PARP 阻害剤処理群において γ 線及び炭素線照射の増強効果を認めた。また、DNA 鎖切断修復応答を DNA2 本鎖切断 (DSB) マーカーである γ -H2AX のウエスタンブロッティング法及びパルスフィールド電気泳動法などにより検討した。非照射条件下で PARP 阻害剤処理により、染色体ゲノム DNA に DSB の生成が観察された。 γ 線 5 Gy 単回照射後 PARP 阻害剤存在下で γ -H2AX、p53 ser15 リン酸化レベルの増加などの DNA 損傷応答 (DDR) の亢進と延長を認めた。PARP 阻害剤存在下では照射後局所での DSB のプロセッシング遅滞が生じ、これが細胞死の亢進に寄与することが示唆された。PARP 経路のポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) 等の他の分子の機能阻害の DNA 修復応答への影響についても解析の準備を進めた。

D. 考察

今後、*Parp-1* 欠損 ESC における *H19/Igf2* ICR の DNA メチル化レベルの顕著な低下と *H19* の発現上昇がトロホプラスト系譜への分化誘導に関わる機構を調べる必要がある。本研究により PARP 阻害はヒトがん細胞においてもエピゲノム変化を誘導し、がん化に、あるいは逆に制がんに関与する可能性が考えられる。今後、ヒトがん細胞において PARP 阻害剤処理後、*H19/Igf2* 等のエピゲノム制御の異常を調べ PARP のがん化への関与の機構を明らかにする。

PARP 阻害剤は MIA PaCa2 細胞株において γ 線及び炭素線照射の増強効果を示した。今後他の細胞株においても比較検討し、その機構を明らかにする必要がある。また、マウスモデルにおいて PARP 阻害剤による γ 線及び炭素線照射の抗腫瘍作用の増強効果を調べる必要がある。PARP 阻害剤によるがん細胞株における炭素線の増感効果は PARP-1 のみが標的ではなく、他の PARP ファミリー分子の阻害が作用している可能性があり、この点も検討する必要がある。

E. 結論

本研究よりマウス ES 細胞分化系で PARP-1 は *H19-Igf2*, *Peg3* 等の特定の遺伝子群の DNA 脱メチル化を誘導し、エピゲノムの調節に関与することが判った。*H19-Igf2* ICR における DNA 脱メチル化は活性化ヒストン修飾への移行を伴った。*H19* と *Peg3* の発現亢進は *Parp-1* 欠損 ES 細胞におけるトロホプラスト分化の誘導と維持に関わる可能性が示唆された。*Parp-1* 欠損マウス細胞において PARP-1 が Erk1/2 シグナル伝達経路の活性化に寄与することが示唆された。また、PARP 阻害剤は γ 線及び炭素線照射の DNA 損傷修復応答に関与することを見出した。PARP 阻害剤はがん治療の放射線増感剤として γ 線など低 LET 放射線だけでなく炭素線など高 LET 放射線でも有用である可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Osada T., Ogino H., Hino T., Ichinose S., Nakamura K., Omori A., Noce T., and Masutani M. PolyADP-ribosylation is required for pronuclear fusion during postfertilization in mice. PLoS ONE, 5: e12526, (2010).
2. 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. In:

Nishimura S., Loeb L.A., Masutani M., Nakagama H., Sekiya T., editors. Extended Abstracts for The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: DNA Repair and Human Cancers, Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, pp 76-79, (2010).

3. Shirai H., Hirai T., Sasamoto E., Inase A., Ogino H., Sasai K., Sugimura T., Masutani M. Role of Poly(ADP-ribosylation) Reaction in Response to Ionizing Radiation. Radiological Sciences, 53: 69-71, (2010).

学会発表

1. Hiroaki Fujimori, Tomoharu Osada, Takashi Sugimura, Mitsuko Masutani, *Parp-1* deficiency induced recovery from LOI-dependent transcriptional suppression of the *H19* gene in mouse ES cells, 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月) (69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PROGRAM; P. 213, P-0786, 2010 年)

2. Takahisa Hirai, Hidenori Shirai, Aki Inase, Ryuichi Okayasu, Takashi Sugimura, Keisuke Sasai, Mitsuko Masutani. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficiency on DNA damage response after heavy ion irradiation and g-irradiation. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月) (69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PROGRAM; P. 289, P-517, 2010 年)

3. Hidenori Shirai, Takashi Sugimura

and Mitsuko Masutani. Delayed double strand break repair and enhanced S phase arrest induced by functional inhibition of PARG. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月) (69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PROGRAM; P. 525, P-1348, 2010 年)

4. Mitsuko Masutani Role of PARP and PARG in DNA repair response and suppression of genomic instability 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月) (69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PROGRAM; P. 56, S15-4, 2010 年)

5. 藤森浩彰、荻野秀樹、杉村隆、益谷美都子、*Parp-1* 欠損は、マウス ES 細胞において *H19* の loss of imprinting 依存的な転写抑制を回復させた。第 33 回日本分子生物学会年会、神戸 (2010 年 12 月) (BMB2010, プログラム; P. 218, 2P-0832, 2010 年)

6. 稲瀬安希、中釜斉、益谷美都子、吉岡研一、選択的 DNA 修復経路の阻害による効果的ながん細胞死誘導、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸 (2010 年 12 月) (BMB2010, プログラム; P. 430, 4P-0975, 2010 年)

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

ラット ES 細胞の樹立およびノックアウトラットの作成

分担研究者 竹下文隆

国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・主任研究員

研究要旨

環境中の発がん要因に対する標的遺伝子の機能の解析に利用可能な新規の遺伝子改変発がんモデルラットの作製を行うため、これまで極めて困難とされてきたラット ES 細胞の樹立を行った。ES 細胞の安定的培養法の確立により ES 細胞への遺伝子導入、更にはキメララットを介してトランスジェニックラットの作製に世界に先駆けて成功した。本研究成果により今後ノックアウト(KO)ラットを含めた遺伝子改変ラットを安定的に供給でき、ラット個体における発がん分子メカニズムの解明に向けた研究の飛躍が期待される。

A. 研究目的

ラットはある種の生理機能や薬物代謝能がマウスよりヒトに類似しており、化学発がんモデルとしての学問的蓄積も極めて大きい。しかしラット胚性幹 (Embryonic Stem, ES) 細胞が樹立できないことから、KO ラット作製は極めて困難とされてきた。本研究では未分化マーカーによる独自の選別方法により ES 細胞の樹立に成功しており、KO ラットの作製および環境中の発がん要因に対する標的遺伝子の機能の解析に利用可能な新規の発がんモデルラットの作製を目標とする。

B. 研究方法

ES 細胞の未分化マーカー遺伝子 Oct4 のプロモーターで制御される蛍光タンパクを利用し、未分化なラット ES 細胞を樹立すべく培養条件の検討を行う。ES 細胞特異的な遺伝子の発現、染色体数の異常の有無を解析し、ヌードマウスへの移植によるテラトーマ形成を検討により ES 細胞としての基準を満たすことを確認する。更に ES 細胞に遺伝子導入操作を施した後、借り腹となる偽妊娠ラットの子宮に ES 細胞を移植しキメララットを介して遺伝子改変ラットを作製する。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行う。

(倫理面への配慮)

本実験計画においては、倫理に関わるようなヒトに関する受精卵等は全く扱うことはない。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行われた。

C. 研究結果

未分化能をモニターすることで4つの分化抑制性低分子化合物がラット ES 細胞の樹立に必要なことを見出した。樹立した ES 細胞はマーカー遺伝子の発現をはじめ、長期培養における正常染色体の保持、胚様体の形成、テラトーマ形成等の ES 細胞の基準を達成した。更にはプラストシストインジェクション法により生殖系譜伝達能を有するキメララットの作製も可能であり、これは樹立した6つの ES 細胞ライン全てで達成されたことから極めて安定的な ES 細胞樹立法の確率と言える。

次に KO ラット作製の前段階として ES 細胞への遺伝子導入によるトランスジェニックラットの作製を試みた。未分化マーカーである Oct4, Nanog のプロモーター下に蛍光蛋白である Venus, tdTomato をそれぞれ連結させたトランスジーンを ES 細胞に遺伝子導入した結果、安定的に発現する ES 細胞クローンを取得し、更に

はキメララット、生殖系譜伝達を介することで世界初となるトランスジェニックラットの作製に成功した。

D. 考察

今回我々は4つの分化抑制性低分子化合物で遺伝子改変ラットを作製すべく安定的なラット ES 細胞の作製に成功したが、他の機関で作製され初めているラット ES 細胞は十分な安定性を保持していないため、遺伝子改変導入ラット作製は困難とされている。つまり、我々の ES 細胞は今後、遺伝子改変発がんモデルラットを供給すべく有用なツールとして広く使用されることが期待できる。

例えば今回作製したトランスジェニックラットは近年がん幹細胞のマーカーとして考えられている Nanog や Oct4 遺伝子の発現をモニターできる事から、発がん過程のメカニズム解明に大きく貢献できる。また、この ES 細胞から今後 KO ラットの作製も可能となることから、がん関連遺伝子のノックアウトラットを作製することでマウスでは見出すことのできなかった新たな表現型の発見のみならず、ラット特有の実験系を組み合わせることで新規の発がんメカニズムの解明が期待できる。

E. 結論

未分化マーカーシステム、低分子化合物を用いることで極めて難しいとされてきた安定的なラット ES 細胞を樹立し、これにより世界に先駆けたトランスジェニックラットの作製に成功した。この ES 細胞は遺伝子改変操作に対しても非常に安定的であるため KO ラット作製が期待できる。今後は発がん研究に重宝されてきたラットにおいて ES 細胞をもとにした遺伝子改変技術を駆使し、これまで見出すことの出来なかった発がん過程における新たな分子機構の解明することで創薬へとつなげる努力をする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.*, 285: 17442-17452 (2010).

2) Satow, R., Shitashige, M., Kanai, Y., Takeshita, F., Ojima, H., Jigami, T., Honda, K., Kosuge, T., Ochiya, T., Hirohashi, S. and Yamada, T. Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 16: 2518-2528 (2010).

3) Kawamata M. and Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107:14223-14228 (2010). (連携研究者の川又、落谷らによる発表)

2. 学会発表

1) 竹下文隆、落谷孝広 microRNA 投与による転移性前立腺がんに対する新規治療法の開発 第2回日本 RNAi 研究会、広島市 (2010年8月)

2) 徐丹、竹下文隆、日野由美子、福永早央里、工藤保誠、玉置彩、高田隆、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊 細胞老化とがん化における miR-22 の役割 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

3) 尾崎充彦、杉本結衣、竹下文隆、小坂展慶、井藤久雄、押村光雄、落谷孝広 ヒト骨肉種細胞の肺転移抑制効果を示す miR-143 標的遺伝子の検索

4) 山角祐介、小田建昭、船戸洸佑、竹下文隆、落谷孝広、秋山徹 RNA 結合蛋白質 D8 は TGF-beta による IL-11 の発現誘導に必要である 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

5) 小坂展慶、井口晴久、吉岡祐亮、竹下文隆、落谷孝広 microRNA の分泌機構とその機能 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

6) 青木一教、宇田川剛、近藤篤、鳴海兼太、後藤尚子、大浪俊平、竹下文隆、落谷孝広、五十嵐美徳、吉田輝彦 I 型イン

ターフェロン遺伝子導入は、骨肉種や軟部肉腫に対する自家造血幹細胞移植の抗腫瘍免疫を増強する 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

7) 高橋陵宇、本間紀美、竹下文隆、尾野雅哉、加藤菊也、落谷孝広 薬剤耐性制御因子を標的とした新規がん幹細胞治療法の開発 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

8) 藤原智洋、高橋陵宇、竹下文隆、尾崎敏文、川井章、落谷孝広 骨肉腫におけるがん幹細胞の同定と解析 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

9) 川又理樹、落谷孝広 胚性幹細胞からの遺伝子組換えがんモデルラットの作製 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)(連携研究者の川又、落谷らによる発表)

10) Kawamata, M., Ochiya, T. Generation of knockout/knockin rats from embryonic stem cells, The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat、京都(2010年11月-12月)

11) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Ochiya, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNA in living cells in vitro and in vivo 第33回日本分子生物学会年会、神戸市(2010年12月)

12) Takahashi, R., Takeshita, F., Ono, M., Ochiya, T. RPN2 exerts a function tole in tumor initiation and progression 第33回日本分子生物学会年会、神戸市(2010年12月)

13) Uchino, K., Takeshita, F., Fujiwara,

K., Sonoke, S., Yano, J., Ochiya, T. Identification and functional analysis of deregulated microRNA located in aberrant genomic region in bladder cancer patients and cell lines 第33回日本分子生物学会年会、神戸市(2010年12月)

14) Hino, H., Xu, D., Takeshita, F., Fukunaga, S., Kudo, Y., Ochiya, T., Tahara, H. Has-miR-22 acts as a potential regulator of cellular senescence and tumorigenesis 第33回日本分子生物学会年会、神戸市(2010年12月)

15) Sugimoto, Y., Osaki, M., Takeshita, F., Kosaka, N., Oshimura, M., Ochiya, T. Detection of lung metastasis inhibitory miR-143 target genes in human osteosarcoma cells 第33回日本分子生物学会年会、神戸市(2010年12月)

16) Takeshita, F., Osaki, M., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Oshimura, M., Ochiya, T. MicroRNA Therapy for Inhibition of Lung Metastasis of Osteosarcoma, Keystone Symposia-J5: MicroRNAs and Non-Coding, RNAs and Cancer バンフ、カナダ(2011年2月)

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

Bcl11bヘテロ遺伝子型が与える発がん感受性と放射線発がんリスク予測

分担研究者 木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

Bcl11b^{KO/+}マウスは放射線誘発胸腺リンパ腫や腸管腫瘍に感受性を示す。このマウスを利用し、発がん母細胞、放射線の標的細胞を同定することを研究目的とする。この同定により、環境発がんの初期過程と放射線暴露健康リスクへのより適切な理解と評価の基盤が得られる。*Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺細胞内に存在する CD8SP 細胞は、分化障害と細胞増殖能亢進を示した。また、CD8SP 細胞を含む DN2 分化段階以降の胸腺細胞で *Bcl11b*^{KO/+}となるマウスでも、前リンパ腫細胞が照射後に出現した。これらの結果は、CD8SP 細胞が放射線誘発胸腺リンパ腫の母体細胞であることを示唆する。次に、腸管上皮細胞の増殖と移動への照射影響を検討した。*Bcl11b*^{KO/+}マウスで照射後増殖抑制の減弱がみられ、それは特に幹細胞から TA 細胞の領域で顕著であった。また、移動の抑制も減弱しており、このとき p53 染色陽性細胞数も減少していた。これらの結果は、放射線照射は p53 を介し増殖抑制をもたらすが、このとき *Bcl11b* を必要とすることを示唆する。

A. 研究目的

発がんの母体となる細胞は、そこから生じたがん細胞の性質の一部を規定する。従って、発がん母体細胞を明らかにすることは、発がんの機構、がん細胞の特性、がん治療を考える上で重要である。一般に、発がん母体細胞に備わった一つの性質に幹細胞としての性質が挙げられ、組織幹細胞が発がん母体細胞となり、何らかの変異を蓄積させた結果、がん細胞へと形質転換すると考えられている。一方、分化した細胞も発がん母体細胞となる可能性が残っている。このケースでは、がん化した細胞、あるいは発がん過程にある細胞が幹細胞の性質を獲得すると考えられる。本研究では、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでみられる放射線感受性胸腺リンパ腫、放射線により感受性が亢進する腸管腫瘍を対象にする。*Bcl11b* は我々が単離した遺伝子であり、色々な細胞種で発現するが、胸腺細胞や腸管の細胞はその中に含まれる。具体的な目標は、リンパ腫および腸管腫瘍を形成する発がん母細胞、放射線

の標的細胞を同定することにある。この母細胞・標的細胞の同定は、放射線傷害の蓄積性に関して新しい知見と、放射線暴露健康リスクへのより適切な評価を与える。

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 C57BL/6 マウスとの F1 マウスを主に実験に用いた。*Bcl11b*^{KO/+}マウスは以前に我々が作製したものをを用いた。マウスは自然交配、または IVF・ET (in vitro fertilization・embryo transfer) を用いて得た。本研究で使用したマウスは、新潟大学脳研究所動物実験施設の SPF 下の飼育施設で飼育し、IVF・ET 胚操作は本施設に委託して行った。生後 8 または 10 週に、3Gy から 12Gy の γ 線照射を 1 回行い、萎縮胸腺および胸腺リンパ腫を誘発した。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：用いた胸腺細胞分化マーカーは、CD4、CD8 などそれぞれところで特記した。染色した細胞は FACSscan (Becton-Dickinson 社) を用いて FACS 分析を行い、データの解析は Flow-Jo Software (Tree-Star 社) を用いた。死細胞や壊死組織片は解析時に、forward scatter (FSC)、side scatter (SSC) を用いて除外した。細胞増殖の測定は、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。

(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) 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。

(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 (今回の報告には含まれていない) 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 胸腺リンパ腫感受性を担う *Bcl11b*^{KO/+} マウス胸腺細胞の表現型

Bcl11b^{KO/+} マウスは胸腺リンパ腫感受性を示すが、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が与える感受性はハプロ型不全であり、野生型アレ

ルの消失が無くても効果を示す。従って、この遺伝子型が正常胸腺細胞の表現型に影響し、その表現型の変化が感受性を担う可能性がある。そこで、*Bcl11b*^{KO/+} 胸腺細胞が *Bcl11b*^{+/+} 胸腺細胞とは異なる表現型を示すのか、その場合どの分化段階にある細胞が示すのか、を調べた。すなわち、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の発がん母体となる細胞の検索を行った。

C-1-1 *Bcl11b*^{KO/+} マウス胸腺細胞にみられる分化異常

Bcl11b^{KO/+} マウスと *Bcl11b*^{+/+} マウスから胸腺細胞を取り出し、フローサイトメーターを用いて各分化細胞分画にある細胞の割合を測定した。CD4 と CD8 の細胞表面マーカーで分画すると、*Bcl11b*^{KO/+} マウス胸腺で CD4⁻CD8⁺ 細胞の割合が低下することが示された。この分画には TCRb の発現の低い ISP (immature CD8-single positive; TCRb^{lo}CD4⁻CD8⁺) 細胞と高い成熟した CD8SP (TCRb^{hi}CD4⁻CD8⁺) 細胞がある。そこで、この分画にある細胞をさらに TCRb の発現量で分けると、CD8SP の割合が低く、ISP の割合が高いことがわかった。一方、CD8SP 細胞は減少していることがわかった。さらに、CD4、CD8 をともに発現しない DN 細胞分画は未成熟な胸腺細胞が占めるが、これらの DN 細胞を *Bcl11b*^{KO/+} マウスと *Bcl11b*^{+/+} マウスの間で比較した。両者で大きな違いは観察されなかった。

以上の結果から、2 種類の細胞分画でその割合に違いを示すことがわかった。その一つは ISP 細胞の割合で、*Bcl11b*^{KO/+} マウスで明らかに増加していた。これは、DP 細胞に分化する前の段階で何らかの障害のあることを示唆する。もう一つは CD8SP 細胞の減少であり、DP 細胞から CD8 細胞が分化し、成熟する段階で何らかの障害のあることが示唆された。

C-1-2 *Bcl11b*^{KO/+} マウス胸腺細胞にみられる細胞増殖の亢進

マウスに BrdU を投与し、その 1 時間後に胸腺を取り出し、CD4、CD8、TCRb 細胞

表面マーカーで胸腺細胞を染色し、同様にフローサイトメーターで分画した。DN、DP、CD4SP、ISP および CD8SP という異なる分化段階にある細胞について、BrdU 抗体を用い、BrdU の取り込み量を測定した。取り込み量の多いものとして、ISP 細胞と DN 細胞が検出された。この結果は、DNA 合成期にある細胞の割合がこれらの細胞種に多いこと、すなわち細胞増殖速度が比較して速いことを示す。しかし、*Bcl11b*^{KO/+}マウスと *Bcl11b*^{+/+}マウスの比較では、両者で大きな差はなく、DN 細胞では *Bcl11b*^{KO/+}胸腺の方がむしろ遅い傾向にあった。一方、*Bcl11b*^{+/+}マウスと比べ、*Bcl11b*^{KO/+}マウスで取り込み量の多い細胞種は、成熟した CD8SP 細胞であった。

C-1-3 アポトーシスの比較

DN、DP、CD4SP、ISP および CD8SP 細胞で、アポトーシスを反映する Annexin V の結合量を測定した。どの分画の細胞も高い Annexin V 結合を示さなかった。*Bcl11b*^{+/+}マウスと *Bcl11b*^{KO/+}マウスで発現量を比較すると、*Bcl11b*^{KO/+}でより高い Annexin V 結合を示したのは、CD8SP 細胞であった。この上昇は、CD8SP 細胞にみられた増殖亢進を反映している可能性がある。

C-1-4 *p53*^{KO/+}遺伝子型の影響

Bcl11b^{KO/+}マウスと同様、*p53*^{KO/+}マウスは放射線照射により高頻度に胸腺リンパ腫を発症する。また、*Bcl11b*^{KO/+}マウスは胸腺リンパ腫を自然発症しないが、*p53*^{KO/+}の遺伝子型を導入した *Bcl11b*^{KO/+};*p53*^{KO/+}マウスは自然発症する。そこで、*Bcl11b*^{KO/+};*p53*^{KO/+}マウスと *Bcl11b*^{+/+};*p53*^{KO/+}マウスを比較することによって、*p53*^{KO/+} 遺伝子型が与える *Bcl11b*^{KO/+}マウス胸腺細胞分化への影響を検討した。*Bcl11b*^{KO/+};*p53*^{KO/+}マウスでも、ISP の増加と CD8SP の減少がみられ、その割合は *Bcl11b*^{KO/+}マウスと同程度であった。この結果は、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型がもたらす分化障害、すなわち ISP から DP 細胞に

分化する段階と CD8SP 細胞に分化する段階での障害、これらのどちらにも *p53*^{KO/+} 遺伝子型は影響を与えないことを示す。

C-1-5 放射線照射の影響

3Gy の γ 線をマウスに照射し、4 時間後にみられる影響を検討した。*Bcl11b*^{+/+}マウスでは細胞数の低下はほとんどみられなかったが、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでは細胞数の低下がみられた。ISP 細胞は放射線感受性を顕著に示し、照射後はほとんど検出されなかった。しかし、その感受性は、*Bcl11b* の遺伝子型の違いによる影響を受けなかった。一方、*Bcl11b*^{+/+}マウスで TCRb^{high}細胞は他の細胞種に比べ抵抗性を示した。しかし、*Bcl11b*^{KO/+}マウスではこの抵抗性は明らかではない。CD8SP 細胞についての影響も、TCRb^{high}細胞と同様の結果であった。

p53^{KO/+}遺伝子型を遺伝的背景にもつマウス群でも、照射の影響を検討した。*Bcl11b*^{KO/+}マウスの ISP 細胞にみられた放射線感受性、TCRb^{high}細胞にみられた放射線抵抗性のどちらにも、*p53*^{KO/+}遺伝子型は大きな影響を与えなかった。

C-2 発がん母体細胞、放射線発がん標的細胞の同定

Lck-Cre;*Bcl11b-flox*/+マウスを作製し、クローナルに異常増殖する胸腺細胞が放射線照射後に出現するかどうかを調べた。クローナル増殖する細胞は *Bcl11b*^{KO/+}マウスを用いた実験で、照射後 30 日から検出でき、照射後 80 日では約半数にその出現が観察された。また、*Lck-Cre*;*Bcl11b-flox*/+マウスでは、DN2 分化段階以降の胸腺細胞で *Bcl11b*^{KO/+}となる。したがって、DN2 分化段階以前の細胞が発がん母体なら、異常増殖胸腺細胞は出現しないが、それ以降の細胞なら出現すると想定される。

照射後 60 日で胸腺細胞を取り出し、TCRb 座の VDJ 組換えアッセイを行った。VDJ 組換えパターンが正常胸腺と同じく 6 種類すべてが検出されると、異常増殖胸

腺細胞はなしと判定される。一方、リンパ腫と同様に単一の組換えパターンが検出されると、異常増殖胸腺細胞が出現したと判定される。約半数で単一の組換えパターンが検出され、異常増殖胸腺細胞が出現したことがわかった。この結果は、発がん母体細胞は DN2 以降の胸腺細胞にあることを強く示唆する。

照射後クローナル増殖する胸腺細胞の分化度を検討した。分化マーカーには、CD4/CD8 および TCR β を、さらに未分化を表す CD44 を用いた。単一の VDJ 組換えパターンを示す異常増殖胸腺細胞の中の約半数で、正常胸腺と同じ分化パターン、すなわち大多数が DP 細胞からなる胸腺細胞で構成されるものが観察された。それ以外は、CD8SP 細胞が多くみられるもの、未分化な DN 細胞で構成されるものであった。注目すべき点は、DP 細胞、CD8SP 細胞共に TCR β^{high} の細胞が多く観察された。これは、positive selection を受けた分化度の高い細胞が多いことを示す。一方、CD44 マーカーの発現では、正常胸腺細胞の DP 細胞、CD4SP、CD8SP 細胞で発現量は少ないが、クローナル増殖胸腺細胞の約半数で高い発現を示した。これは未分化な形質をもつ傾向にあることを示す。総合すると、高い分化度を示すマーカーと未分化な分化度を示すマーカーが同時に存在することを意味する。

C-3 腸管クリプト内の幹細胞およびTA細胞への照射影響

Bcl11bは腸管クリプト内の幹細胞と考えられるCBC細胞、およびプロジェニターと考えられるTA細胞 (transit amplifying cells) に発現する。Apc^{min/+}腸管腫瘍モデルマウスにBcl11bの片アレル欠失を導入したマウスは、Apc^{min/+}単独マウスに比べ、腫瘍発症を有意に促進する。また、2週齢のマウスに3Gyの γ 線を照射すると、腫瘍数はさらに増大するが、その増大比でもApc^{min/+}単独マウスに比べ、より促進することがわかっている。したがって、

Bcl11b^{KO/+}遺伝子型クリプト細胞は発がん感受性および放射線発がん感受性を示し、Bcl11b^{KO/+}マウスは照射の発がん影響をモニターするよいモデルと考える。そこで、今回は放射線照射後の腸管上皮細胞を対象に、細胞増殖への影響を検討した。

C-3-1 照射後の細胞増殖への影響:

マウスに12Gy、1回の全身照射を行い、解析した。照射後16時間では損傷が形態学的に観察される前の時期であり、野生型マウスとBcl11b^{KO/+}マウスで、形態学的に大きな違いはない。b-catenin染色性は絨毛 (Villi) では維持されているが、クリプトでの染色性は低下し細胞核内の染色は検出できなかった。これらの所見についても、野生型マウスとBcl11b^{KO/+}マウスで違いはみられなかった。次に、BrdU投与1時間後に腸管を取り出し、組織を固定した後、BrdU染色を行った。その結果、照射によるBrdU取り込み抑制に違いのあることがわかった。Bcl11b^{KO/+}マウスで、BrdU陽性の増殖細胞がクリプト下部により多く観察された。増殖マーカー・Ki-67の染色でも、同様に両者で違いが観察された。野生型マウスでは照射後陽性細胞は減少するが、Bcl11b^{KO/+}マウスでは減少の程度が少ない。この範囲はBrdU取り込み実験でみられたクリプト下部だけでなく、クリプト全体に及んでいた。これらの結果は、Bcl11b^{KO/+}クリプト内のCBC細胞、TA細胞が、照射による増殖抑制を受けにくいことを示唆する。

C-3-2 照射後の細胞の増殖と移動

細胞増殖への影響を、細胞の移動という側面から検討した。腸管上皮細胞を基底部から絨毛先端まで位置番号を付与すると、1番 (CBC細胞の位置) から45-50の番号が与えられる。先ず非照射条件下で、マウスの腹腔内にBrdUを投与し、経時的に腸管を取り出し染色した。すなわち、チェイス実験を行った。組織を固定した後、BrdU染色を行い、染色陽性細胞の位置を測定した。1時間後ではクリプト内

でのみBrdU陽性細胞が検出されたが、2日後では陽性細胞は絨毛の中間位置にまで移動し、3日後では位置30から位置50にまで分布し、そのピークは位置43にあった。この移動は野生型マウスと *Bcl11b*^{KO/+}マウスで変わりはない。次に、12Gyの γ 線を照射し、2日後、すなわち組織の回復が始まる時にBrdUを腹腔内投与し、その3日後に陽性細胞の位置を観察した。野生型マウスでは、BrdU陽性細胞はクリプト内から位置32にまで広く分布していた。移動位置の低下は、照射による移動障害を示し、広い分布は移動秩序の崩壊を示唆する。一方、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでは、BrdU陽性細胞分布の広がりと同様に観察されたが、移動位置の低下は弱く、クリプト内から位置42にまで分布していた。位置26から位置42までの陽性細胞数に限定し、この移動の変化を比較すると、顕著に違いが認められた。これらの結果は、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型が照射による細胞増殖、細胞移動の障害に影響を与えることを意味する。

C-3-3 p53活性化への影響

照射による細胞増殖の障害はp53遺伝子により強く制御されると考えられる。そこで、12Gy γ 線照射16時間後にp53染色の比較を行った。クリプト内細胞では、p53陽性細胞が多数出現するが、その陽性細胞数は野生型マウスの方が約2倍多く観察された。一方、TUNEL染色で細胞死を検討したが、陽性細胞は少なく、また野生型と *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型で違いは認められなかった。

C-3-4 TOP/GALマウスを用いたb-catenin活性化への照射影響

腸管上皮細胞の増殖は主にWnt/ β -catenin経路により調節される。そこで、 β -catenin経路活性化への放射線照射影響をTOP/GALマウスを用いて調べた。このTOP/GALマウスは、活性化された β -catenin転写複合体が核内で結合するTOP配列をもち、 β -catenin経路の下流に

ある遺伝子の転写活性をモニターすることができる。12Gy照射後24時間の影響をみると、野生型マウスではクリプト内GAL染色陽性細胞数は照射により低下するが、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでは逆にGAL陽性細胞が増加していた。このGAL陽性細胞は、増殖している幹細胞を示唆すると考えると、*Bcl11b*^{KO/+}マウスの幹細胞は照射後分裂が抑制されるのではなく、むしろ活性化されると考えられる。

C-3-5 照射後の腸管組織回復への影響

照射後4日は障害を受けた腸管上皮は正常な形態を取り戻す回復、再生期である。そこで、この時期のKi-67陽性細胞数を比較した。*Bcl11b*^{KO/+}マウスでより多くの陽性細胞が観察された。この結果は、*Bcl11b*^{KO/+}マウスでは野生型マウスに比べ、照射後腸管組織再生がより高いことを示唆する。

大腸組織は小腸組織に比べ照射による顕著な影響は観察されない。しかし、一点違いが観察された。12Gy照射の野生型マウスを照射後8日まで観察すると、著しい腸管の肥厚が観察された。管空が約2倍大きくなり、クリプト全体が長くなる。また、上皮組織と間葉組織のバランスが崩れ、間葉組織の増大が観察された。

D. 考察

D-1 発がん母体となる胸腺細胞候補

Bcl11b^{KO/+}マウスの胸腺細胞の特徴を調べた。野生型マウスと比べ、主な違いはCD8SP細胞の分化障害と増殖能亢進である。この細胞種が胸腺リンパ腫発症の母体細胞である可能性があり、*Bcl11b*^{KO/+}マウスの放射線誘発胸腺リンパ腫感受性を担う有力候補の一つと示唆された。ISP細胞はもう一つの候補であるが、顕著な放射線感受性を示すことから、その候補としての可能性はより低いと考えられる。

p53^{KO/+}遺伝子型の *Bcl11b*^{KO/+}マウス胸腺細胞分化への影響を検討したが、*p53*^{KO/+}遺伝子型は分化には影響しないことが示