

「生命活動のプログラム」
平成 8 年度採択研究代表者

野田 哲生

(財)癌研究会癌研究所 部長、東北大学医学部 教授)

「変異マウスを用いた発癌制御遺伝子の単離・同定」

1. 研究実施の概要

本研究は、ヒト発癌の新たな予防や治療法の開発を目的として、マウスを用いての遺伝学的手法を駆使することにより、その発癌過程を正に負に制御している遺伝子群の単離・同定を行い、発癌の分子機構の解明を目指すものである。具体的には、大腸ポリープを始めとするヒトの各種発癌の原因と考えられているAPC遺伝子変異に焦点を当て、マウスを用いてのフォワード・ジェネティクス及びリバース・ジェネティクスという分子遺伝学的手法による解析を大きな2つの柱として、研究を推進している。フォワード・ジェネティクスのグループは、ヒト発癌モデルマウスであるAPC変異マウスを用い、これと野生マウス由来の近交系マウスとの交配実験により、昨年までに消化管腫瘍の発生を大きく抑制する機能を有する遺伝子座を数カ所同定しており、本年度はその遺伝子の単離・同定を目指して、コンジェニックマウスの作成を行った。又、我々は昨年度までにAPC変異マウスの発癌を抑制する新たな変異マウスを樹立しており、本年度はこの原因遺伝子の候補となる遺伝子の単離・同定を行った。こうした遺伝子は、大腸ポリープを始めとするAPC変異に起因する発癌過程を制御する機能を有すると考えられ、新たな発癌予防や癌治療の道が拓かれると期待される。一方リバース・ジェネティクスの手法では、発癌機構の解明を目的として、APC遺伝子の不活化が生体内で上皮細胞を癌化させる分子機構を詳細に解析している。この解析のため、本年度は各種組織特異的にCre組換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを樹立し、これを用いてのコンディショナル・ターゲティング法による解析を行った。これを用いることにより、消化管上皮を始めとするマウス生体内の各種細胞で、APC遺伝子の不活化により生じる変化を詳細に解析することが可能となり、発癌の分子機構の解明を目指している。

2. 研究実施内容

家族性大腸腺腫症(FAP)モデルマウスであるminマウスやAPC1309マウスの消化管腫瘍数は、遺伝的背景に大きく左右され特に野生マウス由来近交系であるCAST系やMSM系とのF1マウスでは、その発生腫瘍数が大きく抑制されることを我々は見出し、本プロジェクトでは、こうした野生マウス由来の近交系の遺伝的背景

が示す強い、腫瘍発生の抑制効果の原因となっている遺伝子の単離・同定を目指している。昨年までのAPC1309とCAST系のN2マウスのQTL解析から、CAST系の染色体の1番、5番、10番、11番、12番上の各々1ヶ所の多型マーカーにリンクして、消化管腫瘍の発生を抑制する遺伝子座の存在が示唆されており、minマウスとCAST系の交配によるQTL解析では、染色体の3番と4番上の各々1ヶ所に強くリンクして、同様の遺伝子座の存在が示唆されていた。そこで、本年度はスピード・コンジェニック系作成法を用いてB6系の背景に、上記の各マーカーを含むCAST系由来の染色体領域のみを有するコンジェニック・マウスの作製を行い、現在までに、CAST系由来の染色体3番、5番、10番上の強いリンクを示したマーカーを持つコンジェニック系が完成した。この中で、5番及び10番の各領域を有するコンジェニック系統に関しては、再びAPC1309と交配することにより、腫瘍発生に対する抑制効果を解析した。その結果、CASTの染色体5番の領域には、有意な抑制効果が見られなかったが、10番では腫瘍数の約30%の抑制が観察された。このコンジェニック・マウスが持っているCAST由来の領域は、未だ約10CMと考えられ、さらに戻し交配を行うことにより、この発がん制御遺伝子の詳細な(1~2CM)遺伝学的マッピングを行っている。

我々の研究室では、min及びAPC1309とは異なったAPC遺伝子変異を有するFAPモデルマウスAPC580Dを樹立しているが、このAPC580Dの作製過程でAPC遺伝子変異に加えて、さらに新たな突然変異が導入され、その変異がAPC変異による腫瘍の発生を抑制していると考えられるSUP19マウスが樹立された。昨年度までの結果より、この新たな突然変異を有する遺伝子座は、互いに約0.7CMの距離に存在する2つの多型マーカーの間にマップされることが判明している。本年度は昨年引き続いてBACクローンによるコンティグの作製を進め、現在までに11クローンより成るコンティグが完成している。これにより0.7CMの領域のうち約90%がカバーされていると考えられる。又、我々はすでにこのコンティグ上に存在する6つの候補遺伝子を同定しており、これらに関してはSUP19での変異の有無をしたが、その中の3つでは変異は同定されなかった。我々はこの作業と平行して、戻し交配による遺伝的マッピングを継続して行っており、この0.7CMのほぼ中央で組み換えを生じたマウスが得られた。現在このマウスの生後16週における腫瘍のカウントを行っている段階であるが、この結果により遺伝子検索の対象となる領域は半分に短縮されると期待される。

APC遺伝子は上皮に限らず個体の殆どの細胞で発現しているが、FAD患者の発症は消化器に限られている。がん抑制遺伝子APCの不活化の、上皮細胞における発癌への関与を解明するためには、こうした各種組織におけるがん抑制遺伝子の機能を知ることが重要である。本年度我々は、マウス個体内の各種組織・細胞で特異的

にCre酵素を発現するトランスジェニック・マウスの樹立を行い、これとコンディショナル・ノックアウトマウスとの交配による効率の高いコンディショナル・ジーンターゲット法を樹立を試みた。その結果、ケラチン14 (K14) プロモーターを用いることにより表皮基底細胞特異的に、L7プロモーターを用いることにより小脳プルキンエ細胞特異的に、OMPプロモーターを用いることにより嗅神経細胞特異的に、Creを発現するトランスジェニック・マウス系統を樹立することに成功した。さらに、熊本大山村研究室との共同研究により、神経堤細胞特異的にCreを発現するマウス(POCreマウス)の開発に成功し、さらに乳腺上皮特異的にCreを発現するBLG-Creと心筋細胞特異的にCreを発現するMHC2v-Creというトランスジェニックマウスを他の研究室より導入して、これらのマウスを用いてのコンディショナル・ジーンターゲット法を確立した。次に、これらのマウスをAPC遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウスと交配し、各種組織で特異的にAPC遺伝子を不活化した。その結果、殆どの組織でカテニンの蓄積が見られ、APC遺伝子は広くWNTシグナルの抑制に機能していることが示唆された。しかし、乳腺上皮を除いた組織では、細胞の増殖を伴う変化は全く観察されず、これらの組織ではWNTシグナルが細胞増殖には機能していない可能性が示唆された。この結果は、個体の殆どの組織で発現しているAPC遺伝子の変異が、消化管を中心とした腫瘍でのみ観察されることと考え併せると、極めて興味深い。さらに興味深いことに、表皮基底細胞と神経堤細胞では、APC不活化に伴って細胞死の誘導が生じていた。このことは、特定の組織では、WNTシグナルの活性化が細胞死を引き起こす可能性を示唆した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Y. Doi, M. Itoh, S. Yonemura, S. Ishihara, H. Takano and T. Noda, S. Tsukita and S. Tsukita. (1999) Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/fell motility/action-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of Ezrin or Radixin in Moesin gene knockout. *J. Biol. Chem.*, 274(4): 2315-2321.

Y. Yoshihara, T. Mizuno, M. Nakahira, M. Kawasaki, Y. Watanabe, H. Kagamiyama, K. Jishage, O. Ueda, H. Suzuki, K. Tabuchi, K. Sawamoto, H. Okano, T. Noda and K. Mori. (1999) A genetic approach to visualization Neurotechnique of multisynaptic neural pathways using pant lectin transgene. *Neuron*, 22: 33-41.

T. Kobayashi, O. Minowa, J. Kuno, H. Mitani, O. Hino and T. Noda. (1999) Renal carcinogenesis, hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. *Cancer Res.*, 59:1206-1211.

M. Nishi, H. Takeshima, T. Houtani, K. Nakagawara, T. Noda and T. Sugimoto. (1999) RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Mol. Brain Res.*, 67:74-81.

A. Orimo, N. Tominaga, M. Suzuki, T. Kawakami, J. Kuno, M. Sato, O. Minowa, S. Inoue, S. Kato, T. Noda and M. Muramatsu. (1999) Successful germ-line transmission of chimeras generated by coculture aggregation with J1 ES cells and eight-cell embryos. *Anal. Biochem.*, 269 (1):204-207.

I. Saito, K. Haruta, M. Shimuta, H. Inoue, H. Sakurai, K. Yamada, N. Ishimaru, H. Higashiyama, T. Sumida, H. Ishida, T. Suda, T. Noda, Y. Hayashi and K. Tsubota. (1999) Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J. Immunol.*, 162:2488-2494.

Y. Maeno, S. Moroi, H. Nagashima, T. Noda, H. Shiozaki, M. Monden, S. Tsukita and A. Nagafuchi. (1999) β -Catenin deficient F9 cells differentiate into signet ring cells. *Am J Pathol.*, 154(5):1323-1327.

O. Minowa, K. Ikeda, Y. Sugitani, T. Oshima, S. Nakai, Y. Katori, M. Suzuki, M. Furukawa, T. Kawase, Y. Zheng, M. Ogura, Y. Asada, K. Watanabe, H. Yamanaka, S. Gotoh, M. Nishi-Takeshima, T. Sugimoto, T. Kikuchi, T. Takasaka, and T. Noda (1999) Altered cochlear fibrocytes in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness. *Science*, 285:1408-1411.

K. Miyasaka, H. Shinozaki, S. Suzuki, Y. Sato, S. Kanai, M. Masuda, A. Jimi, A. Nagata, T. Matsui, T. Noda, A. Kono and A. Funakoshi (1999) Disruption of cholecystokinin (CCK)-B receptor gene did not modify bile or pancreatic secretion or pancreatic growth: A study in CCK-B receptor gene knockout mice. *Pancreas*, 19(2):114-118.

M. Nishi, S. Komazaki, N. Kurebayashi, Y. Ogawa, T. Noda, M. Iino and H. Takeshima (1999) Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking mitsugumin29. *J. Cell Biol.*, 147 (7):1473-1480.

A. Orimo, S. Inoue, O. Minowa, N. Tominaga, Y. Tomioka, M. Sato, J. Kuno, H. Hiroi, Y. Shimizu, M. Suzuki, T. Noda and M. Muramatsu. (1999) Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein (efp) gene, which is a direct target of estrogen receptor (ER). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96 (21): 12027-12032.

K. Murata, N. Ishii, H. Takano, S. Miura, L.C. Ndhlovu, M. Nose, T. Noda, and K. Sugamura (2000) Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J. Exp. Med.*, 191(2):365-374.

H. Kawate, R. Itoh, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki, F. Ide, T. Ishikawa, T. Noda, H. Nawata and M. Sekiguchi (2000) A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in

methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis*, 21(2):301-305.

H. Beppu, M. Kawabata, T. Hamamoto, A. Chytil, O. Minowa, T. Noda and K. Miyazono (2000) BMP Type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Developmental Biology*, 221:249-258.