

2.

マウス分子遺伝学を用いたヒト発がん機構の解析

野田 哲生

東北大学大学院 医学系研究科・(財)癌研究会癌研究所 細胞生物部

近年の分子遺伝学の進歩により、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が単離・同定され、ヒト発がんの分子機構を解明するには、これらのがん関連遺伝子の機能を知ることが必須と考えられる。ただし、あくまでも発がんは生体内の現象であり、がん関連遺伝子の機能解析は、個体内の発がんの母地となる組織・細胞において行う必要がある。マウス分子遺伝学は、この個体における遺伝子機能解析を可能にする手法であるが、我々の研究グループは、この手法を用いて発がんの分子機構の解析を行って来た。その解析対象は、DNA修復に働く遺伝子群から、各種シグナル伝達系のブレーキとして機能すると考えられる遺伝子群まで多岐に亘るが、本講演では、対象を「WntシグナルとAPC遺伝子」に絞って、我々の研究活動の一端を紹介したい。マウス分子遺伝学の手法は、フォワード・ジェネティクスとリバース・ジェネティクスの2つに大別されるが、我々のグループの「WntシグナルとAPC遺伝子」の機能解析においても、この2つが大きな柱となっている。

A. 家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウスを用いた発がん制御遺伝子同定の試み

—フォワード・ジェネティクスによるアプローチ—

FAPは常染色体優性の遺伝病であり、患者の大腸には若年期から腺腫が多発する。このFAPの原因遺伝子としてAPC遺伝子が単離された。我々は、FAPモデルマウスを確立するため、ジーンターゲット法によりAPCに変異を持つマウスの作製を行った。このマウスにはヒトFAP患者に高頻度で見られるコドン1309のナンセンス変異が導入されているため、APC1309と名付けられた。APC1309のヘテロ接合体には、小腸を中心とした消化管に約60ヶの腺腫が発生するが、このAPC1309に発生する腺腫数はマウスの遺伝的背景に大きく左右されることが、本研究を開始する段階で既に判明していた。特に、東南アジア原産の野生マウス由来近交系であるCAST/Eiマウスと交配させた場合、その発生腫瘍数は約3個にまで大きく減少する。これはCAST系マウスには、APC変異に基づく腫瘍の発生を強く抑制する機能を有する遺伝子座が存在することを示唆しており、その同定はヒトにおける大腸腺腫発生の予防や治療に新たな道を拓くと考えられた。そこで、本研究において、このAPC変異マウスの表現型に対するB6及びCASTの系統間の感受性のちがいを利用して、大腸腺腫発生を制御する遺伝子の同定を行うこととした。このフォワード・ジェネティクスによる解析の手法として、当初2つの手法を併用して解析を開始した。第一の手法は、この腺腫の発生が強く抑制されているB6とCASTとのハイブリッド・バックグラウンドの遺伝的背景を持つAPC1309を、腺腫数の抑制という表現型を目印にしてB6への戻し交配を重ねることによって、この抑制を行っている遺伝子座を同定しようという手法である。第二の手法は、まずB6への戻し交配で得た多数のN2マウスを用いて、遺伝学的解析と表現型（腫瘍数）の解析を行い、QTL解析を加えることにより責任遺伝子座をマップする。次に戻し交配を繰り返すことによりスピード・コンジェニック系統作製を行い、CAST由来のその遺伝子座をB6の遺伝的背景に持つコンジェニック系統を樹立し、これをAPC1309と交配することで責任遺伝子座をマップするという、正統なフォワード・ジェネティクスの手法である。この手

法には第一の手法に比し、より長い時間とより多くの労力を必要とするという難点がある。しかし結果的に、第一の手法では、予想された通りphenodeviationとgenetic interactionのため、戻し交配を5代重ねた段階で、明らかな腺腫数の低下が見られる系統は見られなくなってしまい、失敗に終わった。一方、第二の手法によるN2マウスのQTL解析からは、腫瘍数の抑制に働くと思われる遺伝子座が7ヶ所同定された。同時に腫瘍数を増やす方に働く2つの遺伝子座の存在も示唆された。抑制に働く遺伝子座は、各々第1、5、10、11、12、13、15番染色体上にマップされたが、これらの7つの遺伝子座に関して、戻し交配によるコンジェニック・マウスの作製を試みた。こうして得られたコンジェニック・マウスの中で、一番先に樹立されたマウス系統CAST-10-110は、CAST系の染色体10番由来の約19cMの領域を有する系統であるが、これをAPC1309と交配すると、発生腫瘍数は約20%の減少が見られた。さらに、交配によりこのCAST由来の領域をホモに持つAPC1309マウスを作製したところ、発生腫瘍数は約60%にまで減少し、この領域内に腫瘍の発生を抑制する遺伝子座が存在することが示された。発生する腫瘍のサイズ分布等の解析からは、この遺伝子座が腺腫発生のごく初期の過程を抑制していることが示唆された。そこで、さらなる戻し交配を行った結果、現在までにこの遺伝子座を約3cMの領域内にマップすることに成功した。現在はcDNAマイクロアレーやRT-PCRによる塩基配列解読により、責任遺伝子の同定を試みている。さらに我々は、やはり腫瘍発生を抑制するもう1つの遺伝子座を染色体15番上にマップしている。CAST-15-119はCASTの染色体15番由来の約30cMの領域を有するコンジェニック系統であるが、これをAPC1309と交配すると、やはり20%程度の腫瘍数の低下が観察され、この領域内にも腫瘍発生の抑制に機能する遺伝子座の存在が示唆された。加えて、CAST-10-110との交配により得られるマウスの解析から、この染色体15番の領域と前述の染色体10番上の領域とは、APC1309の腫瘍数の抑制に相加的に働くことが明らかとなった。このことは、この染色体15番上の遺伝子座は、前述の染色体10番の遺伝子座とは異なる経路で、独立に腫瘍数を抑制する機能を有することを示しており大変興味深い。この染色体15番上の領域に関しては、現在さらなる戻し交配により、より限局された領域へのマッピングを行っている。

B. コンディショナル・ジーンターゲットングによる遺伝子機能解析

—リバーシブル・ジェネティクスによるアプローチ—

我々は、発がんの分子機構を解析するため、ジーンターゲットング法を用いて、マウス個体におけるWntシグナルとAPC遺伝子の機能を解析して来た。対象とした組織・細胞は多岐に亘り、上皮組織にとどまらず神経系や心筋組織にまで及ぶが、今回は「各種腺上皮における機能」に絞って解析結果を述べる。APCは個体の発生発達においても必須の役割を果たしており、前述のAPC1309マウスのホモ接合変異体は、胎生6.5日に死亡してしまう。そのため、マウス個体内でのAPCの機能を知るために、APCのコンディショナル・ノックアウトマウス（以下APC S/S）を作製した。さらに、APCは β -cateninのユビキチン化による分解を促進する機能を有し、 β -cateninが伝達するWntシグナルを負に制御していると考えられている。そこで我々は、個体内でWntシグナルが果たしている機能の解析を目的として、Creの発現により β -cateninが不活化される β -cateninのコンディショナル・ノックアウトマウス（以下 β -catenin S/S）及びCreの発現によりユビキチン化による分解に必須なリン酸化ドメインが欠失し、 β -cateninに活性化型変異が導入される β -cateninのコンディショナル・アクチベーション・マウス（以下 β -catenin A/W）を作製し、これらの3種のマウスを用いて解析を行って来た。同時に、我々は各種手法を用いてWntシグナルに関与すると思われる分子の単離・同定も行っており、それらの分子の機能解析もジーンターゲットング法を用いて行っているが、ここではこのAPCと β -cateninの解析結果を中心に述べる。まず、APC S/Sの大腸上皮に、Cre組換え酵素遺伝子

を発現するアデノウイルス（以下AxCre）を感染させ、特異的にAPC遺伝子を不活化すると、1ヶ月以内に腺腫の形成が観察される。この腺腫には β -cateninの蓄積が認められたが、p53やrasの変異は検出されず、LOH解析でも全く異常は見られないことから、大腸上皮の癌化（腺腫化）には、APCの不活化のみで充分であると考えられた。

次いで私たちは、マウス個体内の他の上皮組織におけるWntシグナルとAPCの機能解析を行った。我々の解析からマウスの体の中でのほぼ全ての細胞で β -catenin及びAPCが発現しており、大腸上皮で示された分子機構が他の上皮においても働いている可能性がある。中でも、膵臓、肝臓、乳腺等では、ヒト癌の解析からAPC或いはWntシグナルが癌化に関与していることを示唆する報告があり、我々はこれらの組織を中心に解析を進めた。尚、一般的にこうした腺上皮は管腔を形成することが特徴であり、組換えアデノウイルスの感染によるCreの発現が可能である。

まず、ヒト膵癌の発生においてAPCの不活化が生じる可能性が示唆されていたため、AxCreをAPC S/Sの膵臓内に直接注入することにより、膵上皮においてAPCの不活化を試みた。その結果、注入されたAxCreは、膵臓内の上皮細胞（主に腺房細胞）と、さらに胆管や胆のう内の上皮細胞に感染し、APCの不活化が確認された。しかし興味深いことに、こうしてAPCが不活化されたマウスでは、全く膵癌の発生は認められず、全例が胆管上皮由来の癌の多発で死亡した。APCが不活化された上皮細胞の変化を詳細に解析すると、胆管上皮及び膵上皮細胞で、共に β -cateninの蓄積が認められるものの、胆管上皮ではAPCの不活化後約3週間で過形成が出現するのに対し、膵上皮では増殖性の変化は全く認められなかった。この細胞ではcyclin D1の発現も誘導されないことから、膵上皮では β -cateninの蓄積が直ちにWntシグナルの活性化につながらないことが示唆された。そこで、他の遺伝子変異がAPCの不活化と共同して発がんに関与する可能性を考え、APC S/Sとp53変異の二重変異マウスを作製し、この膵臓でAPCの不活化を行ったところ、膵癌の多発が観察された。APC及びp53が共に不活化された膵上皮では、予想した通り増殖性の変化が認められ、cyclin D1の発現も誘導されていた。ただし、こうした変化が認められるのはAPCが不活化された細胞の一部のみであり、p53変異が直接にWntシグナル活性化に寄与するのではなく、p53変異により引き起こされる二次的变化、恐らくは他の遺伝子の変異、によりWntシグナルが活性化されると考えられた。この機構については、現在解析中である。いずれにしても、これらの解析を通じて、APCは大腸上皮のみならず、他の上皮組織においても β -cateninの分解に必須の機能を果たしていることが明らかとなったが、同じ腺上皮であっても β -cateninの不活化が直ちにWntシグナルの活性化をもたらさず組織とそうではない組織が存在することも明らかとなった。

一方、同じ上皮細胞であっても、APCの不活化が β -cateninの蓄積をもたらさない組織も存在する。その代表例が肝細胞である。AxCreの尾静脈からの注入により、比較的容易に肝細胞でAPCを不活化することが出来る。しかし、肝細胞ではAPCが発現しているにも拘わらず、このAPCを不活化しても β -cateninの蓄積は見られず、増殖性の変化も観察されない。ヒト肝癌では、 β -cateninの活性型変異は同定されるものAPCの変異は全く見られず、その替わりAPCと同様に β -cateninの分解に必須と考えられるAxinの変異が観察されている。これを我々のデータと併せて考えると、Wntシグナルは肝細胞の増殖・癌化に関与するが、その負の制御に必須なのはAPCではなくAxinであると考えられる。そこで、それを証明するために、上記の β -catenin A/Wマウスに対して、同様の実験を行った。このマウスの肝細胞で発現する変異 β -cateninは、Axinによる分解促進にも非感受性となる。しかし再び、この肝細胞においても β -cateninの蓄積は認められなかった。これらの事実は正常肝細胞においては、ユビキチン化依存的な経路以外にも β -catenin分解経路が存在し、ヒト肝癌においてはその経路も不活化されていることが強く示唆された。

最後に乳腺におけるWntシグナルとAPCの機能解析について述べる。乳腺に関しては、AxCre感染によるターゲティングの効率が極めて低かったため、乳腺上皮特異的にCreを発現するBLG-Creトランスジェニックマウスとの交配により解析を行った。まず、APC S/Sとの交配により、乳腺上皮特異的にAPCを不活化したところ、腺管の伸長遅延と扁平上皮化生という現象が観察された。 β -catenin A/Wを用いて活性化型 β -cateninを発現させても、全く同様な現象が見られたことから、乳腺上皮においてユビキチン化依存的な分解経路で β -cateninを負に制御しているのはAPCであることが明らかになった。しかし、異なるプロモーターを用いたトランスジェニックマウスを作製して、さらに大量の活性化型 β -cateninを発現させてやると、前述の伸長遅延は見られなくなり、逆に正常では妊娠時にしか見られないside branchの伸長がvirginのマウスで観察され、さらに多数の腺管内腺腫の形成が認められた。この結果は、Wntシグナル活性化の効果は、その強度によって大きく異なることを意味すると同時に、Wntシグナルが潜在的に乳腺上皮の癌化に働く可能性を示唆した。しかし残念ながら、この腺腫の組織型はヒト病変とは異なっているため、この結果を直ちにヒト発病過程に結びつけることは出来ないが、重要な知見であると思われる。

以上述べて来たように、コンディショナル・ジーンターゲティングを用いることにより、マウス個体の各種組織におけるWntシグナルの多彩な制御機構の存在が示され、さらにその癌化への関与のメカニズムも明らかとなりつつある。今後は、このシステムの動物モデルとして長所を生かし、新たな発がんの予防や治療法の開発に向けて、研究を推進させたい。

主要文献リスト

- (1) H. Shibata, K. Toyama, H. Shioya, M. Ito, M. Hirota, S. Hasegawa, H. Matsumoto, H. Takano, T. Akiyama, K. Toyoshima, R. Kanamaru, Y. Kanegae, I. Saito, Y. Nakamura, K. Shiba and T. Noda. (1997) Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the *Apc* gene. *Science*, 278: 120-123.
- (2) O. Minowa, T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippo, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura and T. Noda. (2000) *Mmh/Ogg1* gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(8): 4156-4161.
- (3) Y. Yoshida, S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda and T. Yamamoto. (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, 103: 1085-1097.
- (4) R. Yao, T. Maeda, S. Takada and T. Noda. (2001) Identification of a PDZ domain containing golgi protein GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 771-778.