

「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, 東北大学大学院医学系研究科 教授)

「変異マウスを用いた発癌制御遺伝子の
単離・同定の試み」

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・ジェネティクスにおいては、我々が樹立したヒト発癌モデルマウスである APC 変異マウスを用い、これを他の各種近交系マウスと交配し、消化管腫瘍の発生を大きく抑制する系統を同定し、その抑制機能を有する遺伝子座を遺伝学的手法によりマウス染色体上にマップした上で、ポジショナルクローニングの手法を用いて、その遺伝子の単離・同定を試みている。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、その機能を逆にコントロールすることにより、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、我々は世界に先駆けて組み換えアデノウイルスを用いたコンディショナル・ターゲティング法を開発した。これを用いることにより、マウスの生体内の任意の組織・細胞で APC 遺伝子の体細胞変異の導入が可能となった。現在我々はこの手法を用いて、消化管上皮を始めとするマウス生体内の各種上皮細胞で、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により、発癌の分子機構の解明を目指している。

2. 研究実施内容

フォワード・ジェネティクスによる解析では、現在までに、消化管腫瘍の発生を

抑制する遺伝子座として、Mom2 から 5 までの 4 つの遺伝子座の同定に成功している。これらの各遺伝子座に関する解析の進行状況について、平成 10 年度の実施内容を中心に以下に述べる。平成 10 年度はヒト家族性大腸腺腫症モデルマウスとして、それまでの APC1309 マウス(コドン 1309 にフレームシフト変異を持つ)に加えて、min マウス(コドン 850 にナンセンス変異を持つ)を、又野生マウス由来近交系マウス(野生型マウス)として、CAST 系に加えて MSM 系を導入して、腫瘍発生を抑制する遺伝子座のさらなる同定を試みた。その結果、min と CAST 系との交配による遺伝学的解析の結果、3 番染色体上に新たなる遺伝子座 Mom5 を同定した。現在、B6 系の遺伝的背景に、CAST 系由来のこの 3 番染色体領域を有するコンジェニック・マウスを作成中である。又、APC1309 と CAST 系との交配実験で昨年度までに同定された、Mom2、Mom3 という 2 つの遺伝子座に関しては、B6 系への戻し交配により、CAST 由来のこれらの領域を持つ N5 個体が得られており、APC1309 との交配実験により、これらの領域による腫瘍形成の抑制効果を確認するステップとなっている。一方、腫瘍発生の抑制のみを指標とした戻し交配によるコンジェニック・マウスの作成は、各世代での個体選別の手法を、昨年度までの下血量を指標とするものから、実際に消化管上皮の実体顕微鏡下での観察によるものに切り換えて、平成 10 年度新たに開始し、現在 N4 個体を作成中である。これらの発癌制御遺伝子座の中で、遺伝子の単離に最も近づいているのは、Mom4 遺伝子座である。この Mom4 は、新たに単離された突然変異体 APC^{SUP19} の解析により同定されたものであるが、昨年度までに 18 番染色体の APC 遺伝子近傍の約 1Mb 内の領域にマップされていた。本年度は、BAC クローンの単離と解析により、この領域の約 75% の物理地図の作成を終え、さらにそれらの BAC クローン上から 3 つの遺伝子を単離した。現在これらの候補遺伝子に関し、APC^{SUP19} における突然変異の同定を試みている。

リバーズ・ジェネティクスのグループは、昨年度までに樹立した APC 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトマウス(APC580S)と、Cre 遺伝子を発現する組み換えアデノウイルスを組み合わせたシステムを用いて、APC 遺伝子の不活化が、マウスの各種上皮細胞において引き起こす変化を解析し、多くの重要な知見を得ている。まず、アデノウイルスによる感染法を工夫し、胆のう、肝臓、膵臓の上皮において、APC 遺伝子を不活化することに成功し、その効果を解析した。その結果から、肝内胆管や胆のうの上皮細胞が APC 遺伝子の不活化により癌化することが明らかとなった。しかし、膵臓の腺房上皮細胞においては、APC 遺伝子の不活化がβカテニンの不活化を引き起こすものの、それだけでは癌化には至らず、さらに p53 遺伝子変異が加わることにより、初めて癌化が生じることが明らかとなった。これは、多段階発癌の分子機構を考える上で極めて重要な知見である。一方、これ

らの細胞とは異なり、肝細胞においては APC の不活化は何の変化も引き起こさず、
現在こうした細胞による感受性の違いを決定している分子機構を解析中である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- J. Aruga, O. Minowa, H. Yaginuma, J. Kuno, T. Nagai, T. Noda and K. Mikoshiba. (1998) Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development. *J. Neurosci.*, 18(1):284-293.
- J. Toshima, K. Nakagawara, M. Mori, T. Noda and K. Mizuno. (1998) Structural organization and chromosomal localization of the mouse *Tesk1* (testis-specific protein kinase 1) gene. *Gene*, 206:237-245.
- Y. Doi, M. Kurita, M. Matsumoto, T. Kondo, T. Noda, S. Tsukita, S. Tsukita and T. Seya. (1998) Moesin is not a receptor for measles virus entry into mouse embryonic stem cells. *J. Virol.*, 72(2): 1586-1592.
- Y. Yoné-kawa, A. Harada, Y. Okada, T. Funakoshi, Y. Kanai, Y. Takei, S. Terada, T. Noda and N. Hirokawa. (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 141: 431-441.
- M. Saitou, K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita. (1998) Occcludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.*, 141(2): 397-408.
- H. Kawate, K. Sakumi, T. Tsuzuki, Y. Nakatsuru, T. Ishikawa, S. Takahashi, H. Takano, T. Noda and M. Sekiguchi. (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5116-5120.
- H. Takeshima, S. Komazaki, K. Hirose, M. Nishi, T. Noda and M. Iino. (1998) Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.*, 17: 3309-3316
- T. Manabe, Y. Noda, T. Mamiya, H. Katagiri, T. Houtani, M. Nishi, T. Noda, T. Takahashi, T. Sugimoto, T. Nabeshima and H. Takeshima. (1998) Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature*, 394: 577-581.
- S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno, T. Noda and M. Shibuya. (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 9349-9354.

- H. Okada, T. Watanabe, M. Niki, H. Takano, N. Yanai, K. Tani, H. Hibino, S. Asano, Y. Ito, T. Noda and M. Satake. (1998) The *AML1(-/-)* embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of PU.1 gene. *Oncogene*, 17: 2287-2293.
- S. Katamine, N. Nishida, T. Sugimoto, T. Noda, S. Sakaguchi, K. Shigematsu, Y. Kataoka, A. Nakatani, S. Hasegawa, R. Moriuchi and T. Miyamoto. (1998) Impaired motor coordination in mice lacking prion protein. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 18(6):731-742.
- K. Shiba, H. Motegi, M. Yoshida and T. Noda. (1998) Human asparaginyl-tRNA synthetase: molecular cloning and the inference of the evolutionary history of Asx-tRNA synthetase family. *Nucl. Acid. Res.*, 26:5045-5051.
- A. Orimo, S. Inoue, K. Ikeda, M. Sato, A. Kato, N. Tominaga, M. Suzuki, T. Noda, M. Watanabe and M. Muramatsu. (1998) Molecular cloning, localization, and developmental expression of mouse brain finger protein (bfp)/ZNF179: Distribution of bfp mRNA partially coincides with the affected areas of Smith-Magenis syndrome. *Genomics*, 54:59-69.
- 柴田浩行、金丸龍之介、野田哲生、
コンディショナルジーンターゲティング法を利用した大腸発がん機構の解明、
最新医学 53 (6) 131-139, 1998.
- 野田哲生、
遺伝性非腺腫性大腸癌モデルマウスにおける発癌過程の解析とその修学的治療法
開発への応用、がん治療のあゆみ 17 61-66, 1998.
- 市川幸司、松本武久、古市泰宏、野田哲生、
Werner 症候群、
現代医療 30 (7) 173-180, 1998.
- 野田哲生、
コンディショナル・ジーンターゲティングによるヒト発癌機構の解析、
産科と婦人科 65 (9) 1135-1140, 1998.
- 外山馨、野田哲生、
皮膚疾患のモデルとしての transgenic mouse と knockout mouse、
遺伝子工学と皮膚疾患 14 41-50, 1998.