

「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

(東北大学医学部 教授・(財)癌研究会癌研究所 部長)

「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、昨年度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、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て来た。本年度は、これらのコンジェニック・マウスをAPC変異マウスと交配させることにより、各染色体領域の有する発癌抑制効果の解析を行い、染色体10番上に、APC変異マウスにおける消化管腫瘍数を約半分に抑制する領域を同定し、さらに戻し交配を用いた解析から、その領域を数cM以下に限局することに成功し、現在その候補遺伝子の同定を試みている。この遺伝子の同定により、ヒト大腸癌に関する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・ジェネティクスのグループは、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。本年度は、この解析のため、昨年までに樹立した各種組織特異的にCre組換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを用いてのコンディショナル・ターゲティング法により、消化管上皮を始めとするマウス生体内の各種細胞におけるAPC遺伝子の機能解析を行い、発癌の分子機構の解析を行った。さらに本年度は、APC不活化の標的分子と考えられているβカテニン遺伝子のコンディショナル・ノックアウト及びコンディショナル・アクチベーションマウスを樹立し、これらを用いることによりAPC不活化におけるβカテニンの機能についても詳細な解析を行った。

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ており、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。昨年度までに、APC1309とCAST系の交配により得られたN2マウスのQTL解析から、消化管腫瘍の発生を抑制する効果を示す遺伝子座の存在が示唆される5ヶ所の領域に関し、コンジェニックマウスを作製し、これを再びAPC1309と交配することで、抑制効果の解析を行って来た。今年度の解析からその中の染色体10番上の領域に関しては、ヘテロで約30%、ホモでは約50%の腫瘍数の抑制が見られることが確認された。即ち、この領域内には、消化管腫瘍の発生、進展をそれぞれ単独で強く抑制する機能を有する遺伝子が存在することが強く示唆された。そこで、さらに交配を行い、当該遺伝子座を、数cMの領域内に限局することに成功し、現在原因遺伝子の同定を試みている。

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。この領域に関しては、昨年度までに11クローンより成るBACコンティグが完成しており、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。本年度は、このBACコンティグ上に同定された6遺伝子に関して、直接塩基配列決定法によるエクソンの一次構造解析と定量的RT-PCR法による消化管上皮内における発現量の解析を行ったが、いずれの遺伝子に関してもSUP19に特有な異常は観察されなかった。我々はこの領域内からさらに5つの遺伝子を同定しており、これらの遺伝子に関しても同様な解析を行っている。

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、FAP患者における発癌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も又重要である。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・マウスとコンディショナル・ノックアウトマウスとの交配により、各種組織におけるAPC遺伝子の機能解析を行った。その結果、昨年度までに表皮基底細胞や乳腺上皮細胞といった上皮細胞や神経

堤細胞においてβカテニンの蓄積が見られ、APC遺伝子は実際にβカテニンの抑制に働いていることが示されていた。本年度は、こうした組織の詳細な解析を進めたところ、これらの組織では細胞の分化異常に加えて、細胞死が誘導されていることが明らかとなった。即ちAPCはこれらの組織において細胞増殖のみならず、細胞の分化や細胞死の制御にも働いていることが示された。そこで、これらの新たなAPCの機能がやはり、Wntシグナルの抑制を介して働いているか否かを明らかにするため、本年度はCreの発現によりβカテニンが不活化されるコンディショナル・ノックアウトマウスと、逆に活性化型の変異を有するβカテニンが発現するコンディショナル・アクチベーションマウスの樹立を行った。現在これらの変異マウスを用いてAPC機能の詳細な解析を行っているところである。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

N. Takakura, T. Watanabe, S. Soenobu, Y. Yamada, T. Noda, Y. Ito, M. Satake and T. Suda(2000) A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, 102 : 199-209.

H. Saegusa, T. Kurihara, S. Zong, O. Minowa, A. Kazuno, W. Han, Y. Matsuda, H. Yamanaka, M. Osanai, T. Noda and T. Tanabe(2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1 E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(11) : 6132-6137.

T. Houtani, M. Nishi, H. Takeshima, K. Sato, S. Sakuma, S. Kamimoto, T. Ueyama, T. Noda and T. Sugimoto(2000) Distribution of Nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J. Comp. Neurol.*, 424: 489-508.

Y. Uehara, C. Mori, T. Noda, K. Shiota and N. Kitamura(2000) Rescue of embryonic lethality in hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice. *Genesis*, 27:99-103.

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.

M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, J-D Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita(2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell*, 11:4131-4142.

S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda and M. Shibuya(2001) Involvement of Flt-1 tyrosine kinase(vascular endothelial growth factor

receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.*, 61:1207-1213.

T. Yokomizo, M. Ogawa, M. Osato, T. Kanno, H. Yoshida, T. Fujimoto, S. Fraser, S. Nishikawa, H. Okada, M. Satake, T. Noda, S. Nishikawa and Y. Ito(2001) Requirement of *Runx 1 / AML 1 / PEBP 2 a B* for the generation of hematopoietic cells from endothelial cells. *Genes to Cells*, 6 : 13-23.