

がん抑制遺伝子 FAP の正常機能とがん化機能の解析

《研究の概要》

家族性大腸腺腫症 (Familial Adenomatous Polyposis Coli 以下 FAP) は常染色体優性の遺伝性疾患であり、この FAP 患者には数百～数千に及ぶ多数の大腸腺腫が発生し、それらはやがて大腸癌となる。1991 年癌研究所の中村祐輔らにより、この FAP の原因遺伝子と考えられる遺伝子が単離され APC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子と命名された。(本研究課題では FAP 遺伝子との名称を用いているが、これは APC 遺伝子と同一である) FAP 患者家系の多くが、この APC 遺伝子に変異を有することが明らかとなり、さらに非遺伝性の大腸癌においても高い頻度で APC 遺伝子の変異が発見されたことから、この APC 遺伝子の変異はヒト大腸癌の発癌において大きな役割を果たしていることが示唆された。しかし、この APC 遺伝子が生体内においてどのような機能を有しており、又その変異がいかなる機構で大腸癌の発生に関与するののかについては全く不明であった。そこで本研究は、マウス APC 遺伝子にジーンターゲットングにより変異を導入することにより FAP のモデルマウスを作成し、APC 遺伝子の正常機能とがん化における機能を解析することを目的とした。その結果、我々はこの 3 年間の本研究において実際に数種類の APC 変異マウスを樹立することに成功し、そのヘテロ接合体及びホモ接合体の詳細な解析を行った。その成果は以下の 3 点にまとめることが出来る。1) APC 遺伝子が FAP の原因遺伝子であることが最終的に確認された。 遺伝的背景が完全に均一である実験用マウスにおいて、APC 遺伝子のみへの変異導入により 100%のマウスに腸管腫瘍の発生が観察された (APC エクソン 15 変異マウス) ことにより、APC 変異と FAP の polyposis との因果関係は完全に立証された。2) FAP のモデルマウスが樹立された。 ヒト密生型 FAP 家系と同様の変異を導入した APC エクソン 15 変異マウスで腺癌が多発したことは FAP モデルマウスの樹立を意味する。さらにこのエクソン 15 変異マウスにおける発癌過程でも、ヒトの場合と同様に正常側の APC 遺伝子の変異 (セカンド・ヒット) が重要であることが判明し、この APC エクソン 15 変異マウスでは、ヒト大腸癌の発生機序と同一の分子機構で大腸癌が発生すると考えられ、この FAP モデルマウスはヒト大腸癌の発生機序の詳細な解析には理想的な系となると考えられる。3) APC 遺伝子の正常機能の一部が明らかとなった。 APC エクソン 15 変異マウスのホモ接合体における発生異常の解析から、APC 遺伝子産物はマウス初期発生の 6.5～7.5 日の時期に必須であることが示され、APC 遺伝子の正常機能の一部を知ることが出来た。

以上が本研究を現在の時点で総括した場合の大きな成果であるが、過去 3 年間の本研究の成果は上記の総括可能な部分にとどまらず、YAC ベクターによるとヒト APC 遺伝子導入マウスの作成や、コンディショナル・ターゲットングによる APC 遺伝子の機能解析等に関してはこの 3 年間の間にほぼ基礎実験系の確立を終了しており、この 1～2 年のうちにさらに大きな成果が得られると思われる。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
野田 哲生	(財)癌研究会癌研究所部長	組み換え体 ES 細胞の作成
三浦 成人	(財)癌研究会癌研究所研究員	マウス FAP 遺伝子の単離
西 美幸	(財)癌研究会癌研究所研究員	組み換えマウスの作成(平成 3 年度)
柴田 浩行	(財)癌研究会癌研究所研究員	キメラマウスの作成 (平成 4 年度)
美野輪 治	(財)癌研究会癌研究所研究員	組み換えマウスの作成(平成 5 年度)

研究報告

I 研究目的

家族性大腸腺腫症 (Familial Adenomatous Polyposis Coli 以下 FAP) は常染色体優性の遺伝性疾患であり、この FAP 患者には、30~40 歳台から数百~数千に及ぶ多数の大腸腺腫が発生し、それらはやがて癌化して大腸癌となる。1991 年癌研究所生化学部の中村祐輔らにより、この FAP の原因遺伝子と考えられる遺伝子が単離され APC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子と命名された。(本研究課題は APC 遺伝子の命名以前に開始されたため、課題には FAP 遺伝子との名称を用いているが、これは APC 遺伝子と同一である) FAP 患者家系の多くが、この APC 遺伝子に変異を有することが明らかとなり、さらに非遺伝性の一般大腸癌においても高い頻度で APC 遺伝子の変異が発見されたことから、この APC 遺伝子の変異は、ヒト大腸癌の発癌において大きな役割を果たしていることが示唆された。しかし、この APC 遺伝子が生体内においてどのような機能を有しており、又その変異がいかなる機構で大腸癌の発生に関与するのかについては全く不明であった。

一方、近年の分子生物学及び発生工学の著しい進歩により、マウス染色体上の任意の遺伝子に変異を導入することが可能となった (ジーンターゲット法)。マウスは哺乳動物としてヒトに類似した遺伝子構成を有する上に、短期間で生殖年齢に達するという遺伝学の実験にとって有利な特徴を有するため、このジーンターゲット法はヒト遺伝子の機能を解析する上で、極めて有用な方法となった。そこで、本研究はヒト APC 遺伝子の正常機能とがん化における機能を解析するために、マウス APC 遺伝子にジーンターゲット法により変異を導入することにより、FAP 患者のモデルマウスを作成し、その解析を行うことを目的とした。

実際には、FAP モデルマウスである変異 APC マウスの作出を試み、これが成功した場合には、以下の 3 点を明らかにすることが目的であった。第一は、そのモデルマウスの腸管内における腫瘍発生を解析することにより APC 遺伝子が FAP の原因遺伝子であることを最終的に確定すること。第二は腸管内に腫瘍の発生が確認された場合には、その腫瘍における遺伝子変異を解析すること。第三は変異マウス同士をかけ合わせることにより、ダブル変異マウス即ち正常では一対存在する APC 遺伝子が全て欠失したマウスを作成し、これにおける異常を解析することにより APC 遺伝子の正常機能を知ることであった。

II 研究計画及び材料と方法

A. マウス APC 遺伝子の単離とその解析

マウス APC 遺伝子に変異を導入するために、ラムダファージ由来ベクターを用いてマウス染色体 DNA ライブラリーを作成し、ヒト APC 遺伝子 cDNA をプローブとして用いることにより、マウス染色体上の APC 遺伝子を単離した。次いで、制限酵素地図作成、サザンブロットィング法及び塩基配列解読等の方法を用いることにより、マウス APC 遺伝子の構造を解析し、これをヒト APC 遺伝子と比較した。

B. 各種 APC 変異マウスの作成

本研究においては、APC 遺伝子の機能を解析するために、ES 細胞を用いたジーンターゲッティング法により数種の APC 変異マウスを作成したが、その材料及び方法はいずれも下記の通りである。

ES 細胞内での相同組換えを目的としたターゲッティングベクターは、いずれも ES 細胞由来マウス染色体 DNA ライブラリーより単離された。マウス APC 遺伝子断片を用いて作成し、全て挿入型のターゲッティングベクターとした。挿入変異としては PGK (フォスホクタルセロキナーゼ) のプロモーターで発現された優性選択マーカーであるネオマイシン遺伝子を用い、染色体上へのランダムな挿入によるバックグラウンドを減少させるため、ジフテリア毒素 A 鎖遺伝子をターゲッティングベクターに付加した。ES 細胞は、129/SV マウス由来の J1 細胞を用い、フィーダー細胞としては、マウス胎児由来初代繊維芽細胞を用いた。ターゲッティングベクターは電気穿孔法により ES 細胞に導入し、相同組換え体の検出及び同定には PCR 法及びサザンブロットィング法を併用した。得られた変異 ES 細胞からは、C57BL/6J マウス由来のプラストシストを用いてのプラストシスト内注入法により、キメラマウスを作成し、さらにこのキメラマウスを C57BL/6J マウスとかけ合わせることにより、変異マウスを樹立した。マウス染色体上の APC 変異の同定は、PCR 法及びサザンブロットィング法によって行なった。

B-1 APC エクソン 1 変異マウスの作成

APC 遺伝子産物の正常機能の解析のためには、APC 遺伝子産物を完全に欠く変異マウスを得てこれを解析する事が必要である。このため、我々は APC 遺伝子の第一エクソンに変異を持つマウスの作成を試みた。上記のマウス APC 遺伝子の単離、及び構造解析の結果に基づいて、第一エクソンに変異を導入するためのターゲッティングベクターを作成した。このベクターでは第一エクソン内にある翻訳開始点の 13bp 下流にネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。相同組換えが起きれば、第一エクソン変異 APC 遺伝子では、APC 遺伝子産物の産生が全くなると考えられ、この変異を導入したマウスを解析することによって APC 遺伝子産物の機能の解明が可能になる

B-2 APC エクソン 8 変異マウスの作成

家族性大腸腺腫症 (FAP) の患者はその染色体上の APC 遺伝子に変異を有する。したがって FAP のモデルマウス作成の目的で、ジーンターゲッティングを行う場合には、FAP 患者

家系染色体上の APC 遺伝子変異と同一の変異を有するマウスを樹立しなければ成らない。現在では非常に多くの種類の APC 遺伝子変異が発見されているが、1991 年、中村らにより世界で最も早く見出された FAP 患者家系の APC 遺伝子の変異は、エクソン 8 の 3 番目のコドンが終止コドンに変化する変異であった。このため、我々は、マウス APC 遺伝子にこのエクソン 8 変異と同様の変異の導入を試みた。単離した、マウス APC 遺伝子を含む多数のファージクローンの中から、エクソン 8 を含むクローンを複数選び、これらを用いて変異ベクターの作成を行った。このターゲッティングベクターには、マウス APC 遺伝子エクソン 8 に点突然変異が導入されており、相同組換えの結果、エクソン 8 の 3 番目のコドンが終止コドンとなる変異が導入される。作成された変異マウスは、FAP モデルマウスとなると考えられ、消化管での腫瘍の発生が期待された。

B-3 APC エクソン 15 変異マウスの作成

FAP 患者家系に観察される APC 遺伝子の変異は、そのほとんどが遺伝子のアミノ末端側半分に存在するが、その部位は比較的散在しており、特定の部分には集まっていない。しかし興味深い事に、一般の FAP 患者に比し、極めて多数のポリープ (5000 個以上) が発生する事で知られる、いわゆる密生型の FAP 患者家系の遺伝子変異のほとんどは、コドン 1250 から 1464 の間に存在する。さらに一般大腸癌における APC 遺伝子の体細胞性変異は、その 65% がコドン 1286 と 1513 の間に集中しており、この部位は mutation cluster region (MCR) と呼ばれている。これらの事実を考え合わせると、このエクソン 15 内の特定部位での変異は、大腸における造腫腫性と深く関わっていると考えられ、この遺伝子変異により産生される変異 APC 遺伝子産物の研究は、大腸癌の発癌過程を理解する上で極めて重要な示唆を与えてくれると考えられる。

そこで我々は、APC 遺伝子のエクソン 15 の前半部分に変異を持つマウスを作成する事により、密生型 FAP 家系のモデルマウスの樹立を行った。密生型の FAP 患者家系でコドン 1309 に変異を持つ家系が 3 家系あり、患者の変異 APC 遺伝子産物はコドン 1309 でトランケートされている。これと同一の変異をマウス APC 伝子に導入する事を試みた。ターゲッティングベクターにコドン 1309 での変異 (5bp の欠失) と終止コドンの導入を行った。相同遺伝子組換えが起こり、変異が導入されたマウスでは、コドン 1309 でトランケートされた変異 APC 遺伝子産物が産生されるようになり、多数のポリープが大腸に発生することが期待される。発生した腫瘍より DNA を抽出し、正常側の APC 遺伝子の変化を観察する事により、大腸における発癌の第一段階と考えられる、ポリープ発生への正常側の APC 遺伝子変異の関与と、その機構を明らかにできる。ついで、これらのポリープが癌化する過程で、時間を追って DNA の抽出を行い、その過程での p53 や K-ras など、他のがん抑制遺伝子や癌遺伝子の変異を解析する。さらにこのような大腸での発癌過程に、コドン 1309 でトランケートされた変異 APC 遺伝子産物が、どのように関わってくるのかを解析する事は極めて重要である。この目的のため、上記ターゲッティングベクターにはさらにエピトープ・タグgingを行った。エピトープ・タグgingには、インフルエンザウイルスの血球凝集素 (HA) の配列を用いた。これにより変異 APC 遺伝子産物を、抗 HA 抗体を用いて認識することが可能となると考えられた。実際にはコドン 1309 と終止コドンとの間に、48 塩基対から成る HA 配列を導入し、変異 APC 遺伝子産物のカルボキシ末端に 16 アミノ酸の HA エピトープを

タグした。

B-4 ヒト APC 遺伝子 YAC クローンのマウスへの導入

上記のごとく、ジーンターゲティング法により FAP 患者のモデルマウスの作成が可能と考えられたが、我々はさらにヒト大腸癌発癌過程をマウスにおいてより忠実に再現するために、ヒト APC 遺伝子をマウス染色体上に移入する試みを行った。当研究の初年度における研究成果からすでにヒト APC 遺伝子産物はマウス APC 遺伝子産物と極めて相似していることが判明しており、マウスにおいても正常に機能すると考えられた。このヒト APC 遺伝子を持つマウスが完成すれば、ヒト大腸癌発癌のカギを握るとされる APC 遺伝子の変異をヒト APC 遺伝子を用いて、マウス腸管上皮内でモニター出来ることになり、このマウスは食品中の変異原性物質の検出や大腸腺腫発生予防のための薬品の開発にとって理想的なモデルマウスとなると考えられた。

一般に外来遺伝子をマウスの生体内において発現させ、in vivo で遺伝子産物の機能を探るためにトランスジェニックマウスが開発されたが、cDNA を用いたトランスジーン (transgene) はその発現が元来の正常な遺伝子に比べて非常に低かったり発現の調節がうまくいかないなどの欠点がある。それに代わってゲノム DNA を使用するとトランスジーン の発現はより確実なものとなるが、サイズの大きな DNA はプラスミドによる導入が困難である。そこで現在世界中で開発が行われているのが YAC を用いたマウスへの遺伝子導入である。YAC (yeast artificial chromosome) は Mega base 単位の DNA をクローン化可能なベクターであり、ゲノム DNA を操作できる。この YAC を用いてトランスジェニックマウスを作成すれば、トランスジーンが元来の正常な遺伝子と同一の発現を示すことより、この方法により正常遺伝子の機能を全てマウスに移入する事が可能であり、従来のトランスジェニックマウスでみられた欠点が除外できる。そこで我々はヒト APC 遺伝子の YAC クローンをを用いてマウスへの遺伝子導入を試みた。

YAC をマウスに導入するためには、まず ES 細胞に導入することが必要であるが、そのための方法として lipofection 法、spheroplast fusion 法などがあるが、我々は導入効率は低い、DNA 損傷の危険が少ない lipofection を用いている。ヒト APC 遺伝子の全 exon を含む 300kb のゲノム DNA を YAC にクローン化し、ネオマイシン耐性遺伝子との、colipofection 法で、ES 細胞への導入を試みた。具体的にはヒト APC 遺伝子を含む YAC DNA をパルスフィールド電気泳動法で酵母ゲノム DNA と分離し、目的の DNA をアガロースゲルから切り出し、アガロース分解酵素で処理後、ネオマイシン耐性遺伝子と混合し、リボソームと反応させることにより YAC DNA とネオマイシン耐性遺伝子とのリボソーム核酸複合体を形成させ、ES 細胞に導入した。G418 耐性株を選択し、コロニーを単離した。ヒト APC 遺伝子が導入されたクローンを同定するための方法として、PCR 法、サザンブロット法を併用した。PCR 法では、ヒト APC 遺伝子のみを増幅するようにプライマーをデザインし、ヒト APC 遺伝子が含まれた ES 細胞クローンを同定し、さらにサザンブロット法を用いて、ヒト APC 遺伝子とマウス APC 遺伝子の制限酵素の微妙な違いを利用し両者を判別し、ヒト APC 遺伝子が含まれた ES 細胞クローンを決定する。ヒト APC YAC クローンを持つ ES 細胞が得られれば従来通りブラストシストインジェクション法を用いてキメラマウスを作成し、野生型と交配させ F1 を得て解析を行う。

B-5 APC エクソン 14 変異マウスの作成 (コンディショナル・ターゲティング)

上記の如く、我々が従来のジーンターゲティング法により作成した APC 変異マウス、特に APC エクソン 15 変異マウスは FAP の極めて優れた疾患モデルマウスとなることが示された。しかし、APC 遺伝子の機能のうちでも特に癌化における機能を考える時、これらのマウスをもっても未だ解決されない問題も残された。特に APC 遺伝子は全身多臓器に発現が認められるにもかかわらず、この変異マウスでは腫瘍の発生は、ヒト FAP 患者と同じく消化管に限られる。変異マウスの消化管腫瘍を解析すると変異導入していない正常側の APC 遺伝子にも変異 (セカンドヒット) が認められた。このことから腫瘍形成には両方の APC 遺伝子に変異が生ずることが必要であると考えられる。そして、腫瘍の発生を認めない臓器では、正常側の APC 遺伝子にセカンドヒットは殆ど起きていない可能性がある。又、もうひとつの可能性として、消化管以外の臓器でも正常側の APC 遺伝子にセカンドヒットを生じてはいるが、変異 APC 遺伝子産物は、これらの臓器では腫瘍形成を引き起こさないのではないかという別の可能性も考えられる。以上の点は APC 遺伝子の機能を知るために極めて重要であると思われる。そこでこの点を明確にするために、我々は APC 遺伝子の変異導入において任意に変異を誘導し得るシステムの開発を試みた。このシステムは全身の任意の臓器において APC 遺伝子への変異導入を可能にし、その結果、変異導入した臓器で腫瘍を認めれば、前者の可能性が、そうでない時は、後者の可能性が支持される。我々は、バクテリオファージ P1 の部位特異的組み換え酵素である Cre とその認識塩基配列 loxP を従来のジーンターゲティング法へ応用したコンディショナルターゲティング法の開発を行っている。すなわち、従来のジーンターゲティング法と同様に ES 細胞での相同組み換え法を利用して、同一方向を向いた 2 つの loxP 配列をゲノム DNA 上に挿入する。それに対して Cre を発現させると、2 つの loxP 配列に挟まれた DNA が切り出され、ここで初めて欠失が形成される。このシステムでは Cre の発現を制御することで、変異形成を任意に調節することが可能になると考えられる。このようなコンディショナルジーンターゲティング法は既に K. Rajewski らによりマウスに応用可能なことが示された。そこで我々は APC 遺伝子のセカンドヒットの発癌における役割を知るために、APC 遺伝子のエクソン 14 を挟む前後のイントロンのそれぞれに同一方向を向いた一対の loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを作成した。相同組み換え体において Cre を発現させると、エクソン 14 の欠失が起き、その結果、APC 遺伝子産物のコドン 580 に変異が導入される。この ES 細胞に由来するマウスとエクソン 15 変異マウスとを交配させると、loxP 配列が挿入されたアレルとエクソン 15 変異アレルからなる APC 遺伝子を持つマウスが得られる。このマウスの各臓器において Cre を発現させてセカンドヒットを誘導し、各臓器での APC 遺伝子のセカンドヒットの効果について検討する。

III 研究成果

1 APC エクソン 1 変異マウスの作成

ターゲティングベクターを電気穿孔法にて ES 細胞に導入し、常法に従って約 900 の G418 耐性株をスクリーニングした結果、一つの ES 細胞株で相同組換えが起こっている事

が判明した。この ES 細胞株を用いてプラストシスト・インジェクション法でキメラマウスを作成し、野生型との交配を行ったが、このキメラマウスからは F1 を得ることはできず、また約一年間このキメラマウスの観察を行ったが外見上異常を認めなかった。したがって現在のところ APC エクソン 1 変異マウスは樹立されておらず、同一のターゲッティングベクターを用いてさらに変異 ES 細胞の樹立を試みている。

2 APC エクソン 8 変異マウスの作成

ターゲッティングベクターを電気穿孔法にて ES 細胞に導入し、約 200 個の G418 耐性株をサザン法でスクリーニングし、一株の相同組換えを起こした ES 細胞株を得た。プラストシスト・インジェクション法でキメラマウスを作成し、野生型と交配させ、F1 を得た。変異 APC 遺伝子を持つ（ヘテロ接合体）F1 を選別するために、正常 APC 遺伝子のみ、または変異 APC 遺伝子のみを認識する PCR プライマーを設定した。これを用いて PCR を行った結果、F1 の約半分はヘテロ接合体であり、第 8 エクソン変異マウスが樹立された事が確認された。

このヘテロ接合体を 8 週令、及び 15 週令で開腹し消化管の検索を行ったが、腫瘍の発生は観察されなかった。次にヘテロ接合体同士を交配させ、F2 を得、その中に変異 APC 遺伝子のみを持つ個体（ホモ接合体）が存在するか検索した。209 匹の F2 を検索した結果、野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体の比率は約 1 : 2 : 1 であり、またオス、メスの比率は約 1 : 1 であった。以上の結果から、この変異マウスは正常に発生することが判明した。

APC 遺伝子産物はヒトとマウスでその予想されるアミノ酸配列が高度に保存されており、生理的に重要な役割を持っている事が予想されるにもかかわらず、APC エクソン 8 変異マウスの発生に異常が見られないため、我々が計画した通りの変異が導入されているかの検討を行った。野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体の大腸からそれぞれ RNA を調整し、エクソン 7 とエクソン 15 に設定したプライマーを用いて RT-PCR を行った。エクソン 8 変異 APC 遺伝子から転写されたメッセンジャー RNA は、エクソン 8 内に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子によって合成が中断されるため、ホモ接合体では PCR 産物は得られないと考えられたが、実際には野生型に較べて約 100bp 小さい PCR 産物が得られた。この PCR 産物をプラスミドにクローニングし、塩基配列を調べたところ、エクソン 8 がスキップされている事が判明した。エクソン 8 は 99bp から成っており、エクソン 7 からエクソン 9 へはアミノ酸の読み枠がずれずにつながることから、変異 APC 遺伝子産物は、エクソン 8 がコードする 33 アミノ酸のみを欠いた APC 蛋白であると考えられた。抗 APC 抗体を用いての western blot 法による解析では、APC エクソン 8 変異マウスでも約 300kd の野生型と識別不可能な大きさの APC 産物の発現が確認され、これも上記の 33 アミノ酸のみの欠失の可能性を強く示唆した。ここで観察されたエクソンスキッピング現象はエクソン 8 に変異を持つ FAP 家系では出現しないため、この APC エクソン 8 変異マウスはヒト FAP モデルとは成らないと結論される。しかし、逆にこの APC エクソン 8 変異マウスはこのエクソン 8 にコードされる 33 アミノ酸部分の機能の解析には理想的な系と考えられ、現在、このホモ接合体を長期観察中である。

3 APC エクソン 15 変異マウスの作成

変異ベクターを電気穿孔法にて ES 細胞に導入し、約 750 個の G418 耐性株をサザン法でスクリーニングし、15 株の相同組換えを起こした ES 細胞株を得た。このうち 5 クローンの ES 細胞株を用い、プラストシスト・インジェクション法で 5 ラインのキメラマウスを作成し、野生型と交配させ、F1 を得た。全てのラインで、PCR 法でヘテロ接合体が存在することが確認され、第 15 エクソン変異マウスが樹立された。次に計画したとおりの変異の導入及びエピトープ・タグgingが行われた事の確認のため、western blotting 法による解析を行った。我々の用いた抗 APC 抗体は APC 蛋白アミノ末端を認識するため、正常及び変異 APC 蛋白の双方を検出すると予想されたが、実際に APC エクソン 15 変異マウスのヘテロ接合体では正常の約 300kd の蛋白に加えて、コドン 1309 で APC 蛋白がトランケートした場合に得られる約 150kd の蛋白が検出された。さらに、この約 150kd の蛋白は抗 HA 抗体によって認識される事も判明し、APC エクソン 15 変異マウスには当初の計画通りの変異が導入されたことが確認された。ついで、抗 HA 抗体を用いてヘテロ接合体の大腸の免疫組織染色を行ったところ、大腸上皮が染色され、この抗 HA 抗体を用いることにより、期待したとおりの *in vivo* で変異 APC 蛋白を解析することが可能であることが示された。こうして、遺伝子型としては密生型 FAP 家系のモデルマウスが作成された。したがって、この APC エクソン 15 変異マウスヘテロ接合体の消化管には腫瘍の発生が期待され、その腫瘍からは出血が起こると考えられたため、8 週令において、85 匹の F1 の便潜血反応テストを行った。その結果、49 匹全て、便潜血反応はヘテロ接合体にのみ陽性であった。そこで週令を追ってヘテロ接合体を開腹し、消化管を検索した。ヘテロ接合体の消化管には小腸を中心に胃、及び大腸にも腫瘍の発生が認められた。消化管腫瘍は 3 週令ですでに認められ、週令を追ってその数は増加し、12 週令頃にすでに最大に達すると考えられた。その数は平均で約 80 個であった。ついで腫瘍の組織学的検索を行ったところ、腫瘍は腺腫、または腺癌であり、これによって APC 遺伝子が FAP 原因遺伝子であることが最終的に証明されたと考えられた。

次にパラフィン切片から腫瘍部分と隣接する正常部分を実体顕微鏡下でかきとり、DNA を抽出し、PCR 法で正常 APC 遺伝子と変異 APC 遺伝子の一部を別々に増幅し、APC 遺伝子の LOH の検索を行った。その結果、腺腫においてすでに APC 遺伝子の LOH が認められ、正常上皮から腺腫に至る段階で正常側の APC 遺伝子の変異、すなわちセカンドヒットが起こっている事が判明した。またこれら DNA を用いて、k-ras 遺伝子、p53 遺伝子の変異の解析も行った。k-ras 遺伝子はエクソン 1 及び 2 を PCR 法で増幅し、プラスミドにサブクローニングし、塩基配列を決定した。現在まで、コドン 12、13 及び 61 の変異は認められていない。p53 遺伝子はエクソン 5、6、7、及び 8 を PCR-SSCP 法で変異の有無を決定した。これも現在まで変異は認められなかった。

ついで、APC 遺伝子の正常機能を明らかにすることを目的として、APC エクソン 15 変異マウスのヘテロ接合体同志の交配を行い、その子孫マウスにホモ接合体が存在するか検討した。約 70 匹の子孫マウスにつき検討したところ、ホモ接合体は存在せず、野生型とヘテロ接合体の比率は約 1:2 であった。この事からホモ接合体は発生途中で死亡すると予想され、APC 遺伝子産物は、生理的に重要な役割を持っており、個体発生に必須と考えられた。そこで発生を遡り、ホモ接合体に起こっている異常を解析した。胎生 9.5 日及び 8.5 において、計 56 匹のエンブリオの遺伝子型を決めたところ、ホモ接合体は存在しなかった。胎

生 7.5 日から 6.5 日ではホモ接合体の存在が確認されたが、その多くが形態的に異常を示し、APC 遺伝子産物は胎生 6.5~7.5 日までの発生に必須であると考えられた。

4 ヒト APC 遺伝子 YAC クローンのマウスへの導入

我々は平成 5 年度に癌研究所生化学部の堀井研究員よりヒト APC 遺伝子 YAC クローンの提出を受け、平成 6 年度にこれを研究計画に述べた方法に基づいて ES 細胞に導入した。具体的には、ヒト APC 遺伝子 YAC クローンの DNA を PGKneo 遺伝子とともに colipofection により ES 細胞に導入した。405 クローンの G418 耐性クローンを得て、PCR 法にてスクリーニングを行ったところ、3 クローンがヒト APC 遺伝子の 5 側のエクソン (-1) を含むことが判明した。現在これらのクローンがヒト APC 遺伝子の全長を含んでいるかについてサザン法により解析中である。

5 APC エクソン 14 変異マウスの作成 (コンディショナル・ターゲティング)

コンディショナルジーンターゲティングベクターを常法に従って ES 細胞に導入し、PCR 法によって約 400 クローンのスクリーニングを行った結果、2 クローンの相同組み換え体が検出された。これらのクローンにおいて相同組み換えが正しく起きているかについて、更にサザン法によって確認を行った。次いで、ブラストシスト内注入法によりキメラマウスを作成して、この雄キメラマウスと C57/B6J 雌マウスとを交配させることにより APC エクソン 14 変異マウスの系統が樹立された。こうして樹立されたマウスの系統において、期待通りのコンディショナルジーンターゲティングが成立していれば、Cre を発現させない状態では、APC 遺伝子産物は正常であり、Cre を発現させて初めて APC 遺伝子に変異が形成される。グアヤック法を用いた便潜血反応による消化管腫瘍の検索ではキメラマウスは 20 週令の現在まで、また F1 マウスもまだ 7 週令ではあるが便潜血を認めず、この APC エクソン 14 変異マウスの APC 遺伝子は正常機能を有すると考えられる。更にこの点については、現在ヘテロ接合体の F1 マウス同士の交配で生まれるホモ接合体の F2 の発生を解析することで、より確実な検討を行っている。又、一方でこの APC エクソン 14 変異に対し、Cre を発現させることにより実際に変異誘導が可能であることを ES 細胞内で確認したところ、RT-PCR 法およびサザン法にて、エクソン 14 の欠失が起こることが確認されている。

IV 考察

以上の本研究によって現在までに得られた結果を総合的に考察すると、当初の目的は十分に達成されたと考えられる。その成果は、大きく以下の 3 つにまとめることが出来る。

1) APC 遺伝子が FAP の原因遺伝子であることが最終的に確認された。

遺伝的背景が完全に均一である実験用マウスにおいて、APC 遺伝子のみへの変異導入により 100%のマウスに腸管腫瘍の発生が観察された (APC エクソン 15 変異マウス) ことにより、APC 変異と FAP の polyposis との因果関係は完全に立証された。

2) FAP のモデルマウスが樹立された。

ヒト密生型 FAP 家系と同様の変異を導入した APC エクソン 15 変異マウスで腺癌が多発したことは FAP モデルマウスの樹立を意味する。さらにこのエクソン 15 変異マウス

における発癌過程でも、ヒトの場合と同様に正常側の APC 遺伝子の変異（セカンド・ヒット）が重要であることが判明し、この APC エクソン 15 変異マウスでは、ヒト大腸癌の発生機序と同一の分子機構で大腸癌が発生すると考えられ、この FAP モデルマウスはヒト大腸癌の発生機序の詳細な解析や、さらにこれに影響を及ぼす変異原性物質の検索には理想的な系となると考えられる。

3) APC 遺伝子の正常機能の一部が明らかとなった。

APC エクソン 15 変異マウスのホモ接合体における発生異常の解析から、APC 遺伝子産物はマウス初期発生の 6.5~7.5 日の時期に必須であることが示され、APC 遺伝子の正常機能の一部を知ることが出来た。

以上が本研究を現在の時点で総括した場合の大きな成果であるが、各実験の成果の部分からも明らかのように、過去 3 年間の本研究の成果は上記の総括可能な部分にとどまらず、近い将来の大きな成果を期待させる結果もいくつか得られている。その中でも、

- ①FAP モデルマウスにおける変異 APC 蛋白の機能解析による APC 遺伝子のがん化機能の解明（APC エクソン 15 変異マウス）
- ②ヒト APC 遺伝子導入マウスを用いての、ヒト大腸癌予防薬の開発及びヒト大腸癌を誘起する変異原性物質の検索（YAC ベクターによるヒト APC 遺伝子導入マウスを使用）
- ③コンディショナル・ターゲッティングによる APC 遺伝子の正常機能とがん化機能の詳細な分子生物学的解析（APC エクソン 14 変異マウスを用いる）

以上の 3 点に関してはこの 3 年間の間にほぼ基礎実験系の確立を終了しており、この 1~2 年のうちに大きな成果が得られると思われる。

V 研究成果の発表

- 1 野田哲生, マウスにおけるインサーショナル・ミュータジェネシス, 細胞工学, 10, 48-54, 1991
- 2 野田哲生, ジーンターゲティングによる変異マウスの作成法, 免疫実験便覧(4), 5, 341-351, 1992
- 3 D.A. Gray, H. Weiher, T. Gridley, T. Noda, A. Sharpe and R. Jaenisch. Developmental mutations generated by retroviral insertional mutagenesis. In Mechanisms of Eukaryotic DNA Recombination. ed. by M.E. Gottesman and H. Vogel, Academic Press, Inc., pp55-58. 1992.
- 4 A. Harada, K. Ohguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda and N. Hirokawa. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. Nature, 369: 488-491. 1994.
- 5 H. Takeshima, M. Iino, H. Takekura, M. Nishi, J. Kuno, O. Minowa, H. Takano and

- T. Noda. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature*, 369: 556-559. 1994.
- 6 Y. Hirai, T. Kawaguchi, T. Kitagawa, T. Kato, K. Hasumi and T. Noda. Establishment and characterization of adenocarcinoma cell lines derived from endometrial serous papillary adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*, 54: 184-195, 1994.
- 7 K. Shiba, N. Suzuki, K. Shigesada, Y. Namba, P. Schimmel and T. Noda. Human cytoplasmic isoleucyl-tRNA synthetase: Selective divergence of the anti-codon-binding domain and acquisition of a new structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7435-7439, 1994.
- 8 野田哲生, 久野淳子, ES細胞の遺伝子操作, 分子生物プロトコール, 小池克郎他, 南江堂, 1994
- 9 野田哲生, 久野淳子, gene targeting, リンパ球機能検索法, 矢野純一他, 中外医学社, 1994
- 10 高野洋志, 野田哲生, Gene Targeting の原理と応用, 月間細胞, 26(12), 41-45, 1994
- 11 Kiyotaka Shiba, Paul Schimmel, Hiromi Motegi, and Tetsuo Noda, Human Glycyl-tRNA Synthetase: Wide Divergence of Primary Structure from Bacterial Counterpart and Species-Specific Aminoacylation. *J. Biol. Chem.* in press. 1994.
- 12 Akio Matsuhisa, Noriko Suzuki, Tetsuo Noda, and Kiyotaka Shiba, Inositol Monophosphatase Activity From the Escherichia coli suhB Gene, *J. Bacteriol.* in press. 1995.
- 13 柴田浩行, 野田哲生, ジーンターゲティングの新しい戦略ーコンディショナルジーンターゲティング法について, 実験医学, 13(1), 1995, 掲載予定