

ラットゲノム地図の作成と腎がん遺伝子の分離

所属機関 (財) 癌研究会癌研究所実験病理部 部長
研究者名 樋野 興夫

研究の概要

ラットには、いまだ病因遺伝子が解明されていないヒト疾患に類似した疾患モデルが多く存在している。しかし、ラットの遺伝解析は、甚だ不十分であった。そこで本事業では、メンデルの法則に従い単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性腎癌ラット (Eker rat) の原因遺伝子の単離、同定を最終目的として、まず、ラットゲノム地図の作成を試みた。我々は、リンケージ遺伝解析に必要な戻し交配ラットを短期間に効率よく作成する為に、まず最初にキャリアーラットの短期検出の開発を試みた (ENU 経胎盤発癌)。この開発の成功によりその後の研究が飛躍的に進んでいった。次に多数の DNA マーカー (cDNA, microdissection DNA, microsatellite DNA) を単離し、上記の方法で作成した多数の戻し交配ラットを用いて、原因遺伝子はラット染色体 10 番に局在することを明らかにした。そこでラット染色体 10 番の詳細なマッピングとそれに対応するヒト染色体の位置を決定した (ヒト染色体 17 番、5 番、16 番)。本事業で得られたラット染色体 10 番の詳細なマッピングは、ラット 10 番染色体に存在が予測されているヒトでは未知の他の病因遺伝子の単離にも貢献出来るものと考えられる。我々は、さらに解析を進め、本ラット発見 40 年目にして、ついに原因遺伝子の同定に成功した。驚いたことに原因遺伝子は最近発見されたヒト結節性硬化症遺伝子 (TSC2) に相同なラットの遺伝子であった。また、本ラットには腎癌以外にも子宮腫瘍、脾臓腫瘍および下垂体腫瘍が高率に発生することが明らかになった。ヒト結節性硬化症と Eker rat の表現型は、大きく違い overlap する病変として唯一腎癌があるのみである。本ラットは、TSC2 遺伝子機能異常による腎癌発生機序の解明の疾患モデルとして期待されるとともに、発癌において重要な問題である、species-specific difference 及び phenotype-specific mutation についても実験的に詳細に追究出来る利点がある。

ここに Eker rat は、現在全く不明である、多彩な症状を示すヒト結節性硬化症 (最近 5800 人に 1 人の出生率との報告があり比較的頻度の高い難病) の発症機序解明及び治療、予防の開発の疾患モデルとして、新しい展開を迎えることとなった。これは、本事業の大きな成果である。

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
樋野 興夫	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 部長	ラットゲノム地図の作成と遺伝解析
小林 敏之	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 研究員	腎癌遺伝子の単離
久保 宜明	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 研究員	腎癌遺伝子の同定
土屋 晴生	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 研究員	腎癌遺伝子の解析

研究報告

I. 研究目的

我々は、疾患モデルからヒト疾患の診断、予防、治療に資する知見を得ようとするものである。本事業の最終目的は、メンデルの法則に従い、単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性ラット腎癌（成人型）の未知の原因遺伝子の単離、同定をすることであった。この目的と達成するためにはラットゲノム地図の作製が不可欠であるので、研究を進める上に必要なゲノム地図作製を第一の目的とした。第一の目的は最初の2年間で順調に進み、3年目にて最終目的である原因遺伝子の単離、同定に成功した。

II. 研究計画及び材料と方法& III. 研究成果

(1) 病因遺伝子キャリアーラットの短期検出法の確立：

遺伝性腎癌ラット（Eker rat）は病因遺伝子がホモ接合体になると致死効果を示すため（Hino, O., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 327-331, 1993）正常ラットと交配しヘテロ接合体の状況で維持し、病因遺伝子を有するキャリアーラットであるか否かは、一年後に腎癌が発生するまで不明であるという、繁殖継代上、大きな難点を有して研究の進展を妨げていた。我々は病因遺伝子キャリアーラットは経胎盤発癌〔N-Ethyl-N-nitrosourea(ENU), 80mg/kg, i.p. 妊娠15日目〕に高感受性であり生後2週という極く早期に肉眼的に成人型の腎腫瘍が観察されることを見いだした。対照群のラットでは、少なくとも生後17週まで腫瘍は認められなかった（Hino, O., et al. : Cancer Res., 53: 5856-5858, 1993）。

(2) 戻し交配ラット〔F1（LE系/BN系）×BN系〕の短期作製法の開発：

遺伝性腎癌ラット（Eker rat）はLong Evans（LE）系で維持されている。多型性を多く得るために、遺伝的にかけ離れているBrown Norway（BN）系を用いて戻し交配ラット〔F1（LE系/BN系）×BN系〕を作成した。しかし遺伝的背景がBN系となるとLE系に比して腫瘍発生時期が遅くなるので（modifier geneの存在）戻し交配ラットを得るのに生後1年以上要する。そこで(1)の病因遺伝子キャリアーラットの短期検出法を用いて多数の戻し交配ラット〔1匹のF1（LE系×BN系；雄）×BN系；雌（ENU投与）〕を生後12～13週

で作製した (Hino, O., et al. : Jpn. J. Cancer Res., 84: 1106-1109, 1993)。

(3) マーカーの DNA の作製 :

(a) rat kidney cDNA clones :

正常のラット腎臓より Zap-cDNA^R SYNTHESIS KIT (STRATAGENE 社) を用い cDNA ライブラリーを作製した。ベクターは Lambda ZAP^R II を用いた。このライブラリーより 500 個のクローンを得た。LE 系と BN 系間での多型性の有無を 16 種類の制限酵素 (Ava I, BamHI, Bgl II, Cla I, EcoRI, EcoRV, Hinc II, Hind III, Kpn I, MspI, Nco I, Pst I, Pvu II, Rsa I, Tag I, Xba I) で調べた。現在までに 102 個のクローンの解析を終え、54 個 (53%) の cDNA clones が 2 種間で多型性を示すことがわかった。

多型性を示す cDNA についてはラット染色体の局在をラット-マウス ハイブリッドパネル (Dr. Levan より提供) を用いて決定した。今回、cDNA clones は 2 種間でさえ高い多型性を示すことがわかり rat genome mapping にとって有用であることが確認された (Hino, O., et al. Rat Genome, in press)。

(b) subtracted cDNA clones :

遺伝性ラット腎癌細胞と正常ラット腎臓間での cDNA subtraction を Representational Defference Analysis (RDA) の変法を開発し行った (Tsuchiya, H., et al., Jpn. J. Cancer Res. 85: 1099-1104, 1994)。正常腎臓で発現しているが腎癌細胞では発現していない (下記の如く本ラットの原因遺伝子は癌抑制遺伝子であるので) 31 個の cDNA clones を単離し、更に塩基配列を決定した。うち 11 個は未知の遺伝子であった (投稿準備中)。

(c) ラット 10 番染色体の microdissection clones :

正常ラット胎児の培養細胞からラット 10 番染色体の q12 領域を顕微鏡下で切断し PCR 法でその DNA 断片を増やし pBluescript SK (+) ベクターに cloning を行った (長崎大学の 新川教授の協力)。現在までに 39 個のラット 10 番染色体由来のユニークな clone が得られている (Kobayashi, T., et al. : Mammalian Genome 6: 216-218, 1995)。

(d) microsatellite マーカー :

今回、新たに、さらにラット 10 番染色体由来の microsatellite マーカーである primer DNA を合成した。

(4) リンケージ解析 :

(2) の戻し交配ラット 129 匹と (3) の多数の多型性 DNA マーカーを用いてリンケージ解析を行い原因遺伝子 (ラット 10 番染色体 : ヒト染色体 16p13.3 に相同な部位) はヒト結節性硬化症遺伝子 (TSC2) に相同なラット遺伝子に強くリンクしていることを見出した (Hino, O., et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1302-1308, 1994)。

(5) 原因遺伝子は癌抑制遺伝子である :

F1 ラットに発生した腎癌はもとより、ごく初期の前癌病変である変異尿細管においても Knudson の “2 hit” が確認され、Tsc 2 遺伝子不活性化は、癌化の rate limiting step であることが示唆された (Kubo, Y., et al. : Cancer Res. 54 : 2633-2635, 1994., Kubo, Y., et al. : Cancer Res. 55 : 989-990, 1995)。これは、細胞レベルでは原因遺伝子の機能は、recessive であり、原因遺伝子は癌抑制遺伝子であることを示す。

(6) 新しい Cancer Syndrome の疾患モデル :

遺伝性腎癌ラット (Eker rat) は、名前が示す如く、腎癌を起こすラットとして発見された。しかし、このラットを2年間長期観察した所、下垂体、脾臓、子宮にも腫瘍が non-carrier のラットに比して高率に見られた (Hino, O., et al.: *Cancer Lett.* 83: 117-121, 1994., Hino, O., et al.: *Transplantation Proc.* 27: 1529-1531, 1995)。それらの腫瘍においてもラット 10 番染色体の LOH が観察された (Kubo, Y., et al.: *Jpn. J. Cancer Res.* 86 :828-832, 1995)。新しい Cancer Syndrome の疾患モデルとして期待される (ちなみにヒトで、腎癌を合併する Cancer Syndrome としては、von Hippel Lindau (VHL) disease, Tuberous sclerosis (TSC) が知られている。興味あることに VHL、TSC とともに母斑症 (Phakomatosis) である。

本ラット腎癌には、VHL 遺伝子の変異は認められなかった (Kikuchi, Y., et al.: *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 905-909, 1995)。さらに、Eker rat 腫瘍において microsatellite instability は確認されなかった (Hino, O., et al.: *Molecular Carcinogenesis* 14: 23-27, 1995)。

(7) 原因遺伝子の構造解析:

我々は、Tsc2 遺伝子の全構造を決定した。Genomic DNA の size は約 35Kb であり、coding exon は 41 個もあった。ラット Tsc2 産物はヒト TSC2 産物と全長にわたって約 92% の高い相同性を示すことを見出した。興味あることに、Alternative splicing が exons 25 and 31 に見られた。Eker mutation は intron30 への retrotransposon 挿入による (Kobayashi, T., et al.: *Nucleic Acids Res.* 23: 2608-2613, 1995)。さらに、non-coding exon の存在も見い出している (投稿準備中)。exon-intron の構造解析を行い全遺伝子をカバーする PCR-SSCP 法の primer を多数作成し Loss of heterozygosity (LOH) の見られない症例で intragenic mutation を見出した。これは、Knudson's two-hits を証明するものである (投稿準備中)。

(8) 原因遺伝子の機能解析:

Tsc2 遺伝子機能として我々は、転写活性能を見出した。また抗体を作成し細胞内局在に関して興味ある知見を得ている (Tsuchiya, H., et al. *Cancer. Res.* in press.)。

IV. 考察

遺伝性腎癌ラットは、1954年ノルウェーの Eker によって発見され、腎癌発生は、Mendel の法則に従い、単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとる。われわれは、本ラットの発癌機構を解明すべく positional cloning 法によって原因遺伝子の単離・同定をめざした。ついに我々は、Tsc2 遺伝子にレトロトランスポゾン挿入による germline mutation を見出し Eker rat 発見 40 年目にして原因遺伝子の同定に成功した (Kobayashi, T., et al.: *Nature Genetics* 9 :70-74, 1995)。ここに Eker rat は、ヒト結節性硬化症の疾患モデルとして、新しい展開を迎えることとなった。これは、本事業の大きな成果である。

V. 研究成果の発表

- (1) Hino, O., Klein-Szanto, A.J.P., Freed, J.J., Testa, J.R., Brown, D.Q., Vilensky, M., Yeung, R.S., Tartof, K.D. and Knudson, A.G.: Spontaneous and radiation-induced renal tumors in the Eker rat model of dominantly inherited

- cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 327-331, 1993.
- (2) Hino, O., Testa, J. R., Buetow, K. H., Taguchi, T., Zhou, J-Y., Bremer, M., Bruzel, A., Yeung, R., Levan, G., Levan, K.K., Kundson, A.G. and Tartof, K.D.: Universal mapping probes and the origin of human chromosome 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 730-734, 1993.
 - (3) Yeung, R.S., Taguchi, T., Patriotis, C., Makris, A., Tsiichlis, P.N., Levan, K.K., Levan, G., Tartof, K., Hino, O., Knudson, A.G. and Testa, J.R.: New markers, D 16 FC 1 and Tp 12, differentiate between rat chromosomes 16 and 17. Cytogenet Cell Genet 62: 149-152, 1993.
 - (4) Yeung, R. S., Hino, O., Vilensky, M., Buetow, K., Szpirer, C., Szpirere, J., Levan, K.K., Levan, G and Knudson, A.G.: Assignment of 22 loci in the rat by somatic hybrid and linkage analysis. Mammalian Genome 4: 585-588, 1993.
 - (5) 樋野興夫: 疾患モデル動物としての遺伝性腎癌ラット。実験医学、11. 413-416, 1993.
 - (6) 樋野興夫: 疾患モデル動物としての遺伝性ラット腎癌の病理。病理と臨床、11: 1055-1061, 1993.
 - (7) Hino, O., Mitani, H., Nishizawa, M., Katsuyama, H., Kobayashi, E. and Hirayama, Y.: A novel renal cell carcinoma susceptibility gene maps on chromosome 10 in the Eker rat. Jpn. J. Cancer Res., 84: 1106-1109, 1993.
 - (8) Hino, O., Mitani, H. and Knudson, A.G.: Genetic predisposition to transplacentally induced renal cell carcinomas in the Eker rat. Cancer Res., 53: 5856-5858, 1993.
 - (9) Kubo, Y., Mitani, H. and Hino, O.: Allelic loss at the predisposing gene locus in spontaneous and chemically induced renal cell carcinomas in the Eker rat. Cancer Res., 54: 2633-2635, 1994.
 - (10) 樋野興夫: ヒト疾患モデルラットにおける病因遺伝子の探索。アニテックス、6・122-127, 1994.
 - (11) Hino, O., Mitani, H., Katsuyama, H. and Kubo, Y.: A novel cancer predisposition syndrome in the Eker rat model. Cancer Lett., 83: 117-121, 1994.
 - (12) 樋野興夫: 腎泌尿器疾患のモデル動物-腎癌のモデル動物-、Molecular Medicine, 176-181, 1994.
 - (13) Hino, O., Kobayashi, T., Kobayashi, E., Tsuchiya, H. and Hirayama, Y.: Predisposing gene of inherited cancer syndrome in the Eker rat model is tightly linked to tuberous sclerosis (TSC 2) gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1302-1308, 1994.
 - (14) Tsuchiya, H., Tsuchiya, Y., Kobayashi, T., Kikuchi, Y. and Hino, O.: Isolation of genes differentially expressed between the Yoshida sarcoma and Long-survival Yoshida sarcoma variants: Origin of Yoshida sarcoma revisited. Jpn. J. Cancer Res. 85: 1099-1104, 1994.
 - (15) Hino, O., Kobayashi, T., Mitani, H., Kobayashi, E., Kubo, Y., Tsuchiya, H., Kikuchi, Y., Nishizawa, M. and Hirayama, Y.: The EKER rat, a model of

- dominantly inherited cancer syndrome. *Transplantation Proceedings* 27: 1529-1531, 1995.
- (16) Kobayashi, T., Kawaguchi, T., Kisino, T., Matsumoto, N., Niikawa, N., Mori, M., Levan, G., Klinga-Levan, K. and Hino, O.: Isolation of microdissection clones from rat chromosome 10. *Mammalian Genome* 6: 216-218, 1995.
- (17) Kobayashi, T., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Kubo, Y. and Hino, O.: A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc 2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Nature Genetics* 9: 70-74, 1995.
- (18) Kubo, Y., Klimek, F., Kikuchi, Y., Bannasch, P. and Hino, O.: Early detection of Knudson's two-hits in preneoplastic renal cells of the Eker rat models by the Laser microdissection procedure. *Cancer Res.* 55: 989-990, 1995.
- (19) Hino, O., Kobayashi, T., Kubo, Y., Kikuchi, Y., Tsuchiya, H. and Mitani, H. An animal model for tuberous sclerosis (TSC 2) in the Eker rat. *Rat Genome* 1: 14, 1995.
- (20) Kobayashi, T., Nishizawa, M., Hirayama, Y., Kobayashi, E. and Hino, O.: c DNA structure, alternative splicing and exon-intron organization of the predisposing tuberous sclerosis (Tcs 2) gene of the Eker rat model. *Nucleic Acids. Res.* 23: 2608-2613, 1995.
- (21) 樋野興夫、久保宜明：結節性硬化症 (Bourneville-Pringle 氏病) の疾患モデル。 *BIO Clinica* 10: 501-503, 1995.
- (22) 樋野興夫：癌の起源—oncodeme について。 *Molecular Medicine* 32: 1140-1144, 1995.
- (23) Kubo, Y., Kikuchi, Y., Mitani, H., Kobayashi, E., Kobayashi, T. and Hino, O.: Allelic loss at the tuberous sclerosis (Tsc 2) gene locus in spontaneous uterine leiomyosarcomas and pituitary adenomas in the Eker rat model. *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 828-832, 1995.
- (24) Kikuchi, Y., Kobayashi, E., Nishizawa, M., Hamazaki, S., Okada, S. and Hino, O.: Cloning of the rat homologue of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its non-somatic mutation in rat renal cell carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 905-909, 1995.
- (25) Hino, O., Kobayashi, E., Hirayama, Y., Kobayashi, T., Kubo, Y., Tsuchiya, H., Kikuchi, Y. and Mitani, H.: Molecular genetic basis of renal carcinogenesis in the Eker rat model of tuberous sclerosis (Tsc 2). *Molecular Carcinogenesis* 14: 23-27, 1995.
- (26) Hino, O., Kobayashi, E., Nishizawa, M., Kubo, Y., Kobayashi, T., Hirayama, Y., Takai, S., Kikuchi, Y., Tsuchiya, H., Orimoto, K., Kajino, K., Takahara, T. and Mitani, H.: Renal carcinogenesis in the Eker rat. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121: 602-605, 1995
- (27) 樋野興夫、小林敏之：遺伝性腎癌原因遺伝子の同定—ヒト結節性硬化症の疾患モデル。 *Molecular Medicine* 32: 659-660, 1995.
- (28) 樋野興夫： Oncodeme から見た遺伝性癌の発癌病理—腎癌をモデルとして—。放射線

生物研究 30: 129-141, 1995.

- (29)樋野興夫:Pringle 病。Molecular Medicine (印刷中)
- (30)Tsuchiya, H., Orimoto. K., Kobayashi, T.and Hiono, o.: Presence of potent transcriptional activation domains in the predisposing tuberous screlol,s (Tsc2) gene product of the Eker rat model Cancer. Res, in press.
- (31)Orimoto, K., Tsuchiya, H., Kobayashi, T., Matsuda, T. and Hino, O.: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Tsc2 gene in Eker rat renal carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
- (32)Hino, O., Kobayashi, E., Kobayashi, T., Klinga-Levan, K. and Levan, G.: Usefulness of rat cDNA clones in genetic mapping. Rat Genome, in press.