

遺传的不安定性 (genomic instability) と発がんの研究

《研究の概要》

ヒトの発癌の機構には、遺伝的不安定性が関与していると考えられて来た。遺伝子の突然変異率が通常の状態よりも高くなることで、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が蓄積し、細胞は癌化すると考えられて来たのである。数年前に遺伝性非腺腫性大腸癌(以下 HNPCC)の原因遺伝子として、DNA 修復に関与するミスマッチ修復系の酵素をコードする遺伝子群が同定され、ヒト発癌機構における遺伝的不安定性の一部は、このミスマッチ修復異常により引き起こされていると考えられている。そこで本研究では、マウスでミスマッチ修復系の遺伝子をノックアウトすることにより HNPCC モデルマウスを樹立し、これを解析することにより、ミスマッチ修復系の異常と発癌との関係を明らかにすることを目的としている。

本研究で我々は、ジーンターゲティング法により、ミスマッチ修復系の遺伝子の 1 つであり、HNPCC の原因遺伝子であることが知られている Mlh1 遺伝子変異マウスを作製することに成功した。このホモ接合変異体は正常に発生、発達を遂げ、ミスマッチ修復系は、マウスの発生、発達には必須でないことが明らかとなった。しかし、これらのホモ接合変異体は雄雌ともに不妊であり、その配偶子形成過程の解析から、これらのマウスは精子及び卵子の形成過程の減数分裂において、遺伝的組換えを行うことが出来なくなっていることが明らかとなった。これはミスマッチ修復系が遺伝的組換えに必須であることを示す、世界で初めての結果であった。

発癌に関しては、ホモ接合変異体マウスの 1 年間に亘る長期観察の結果、これらのマウスには約 75% という高率でリンパ腫、消化管腫瘍、皮膚腫瘍といった腫瘍の発生が観察され、HNPCC モデルマウスが樹立されたと考えられた。染色体 DNA の解析から、これらの腫瘍では実際に遺伝的不安定性が生じていることが確認され、その発癌への関与も証明された。又、従来からミスマッチ修復系の機能として、DNA 複製エラーにより導入される変異が大量である場合には、プログラム細胞死を誘導する機能があることが示唆されて来た。我々も Mlh-1 変異マウス由来の正常初代線維芽細胞の解析から、ミスマッチ修復系が正常細胞において、このプログラム細胞死の誘導に機能していることを確認した。そこで Mlh1 変異マウスに対するアルキル化剤の投与実験を行った結果、生体内でもミスマッチ修復系は、主に骨髄や胸腺においてプログラム細胞死の誘導に機能していることが明らかになり、さらに興味深いことには、このプログラム細胞死が機能しなくなった変異マウスの骨髄や胸腺では、アルキル化剤処理により腫瘍が多発することが判明した。これにより、このミスマッチ修復系により誘導されるプログラム細胞死が生体内で実際に発癌抑制に機能していることが世界で初めて示された。以上が、この 3 年間に行われた研究の概要である。

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
野田 哲生	(財) 癌研究会癌研究所・部長	遺伝的不安定性 (genomic Instability) と発がんの研究

研究報告

I 研究目的

従来より、いわゆる遺伝的不安定性、即ち遺伝子変異の生じ易さと発癌の間には密接な関係があると考えられて来た。近年、遺伝性高発癌疾患の一つである遺伝性非腺腫性大腸癌（以下 HNPCC）の原因として、各種ミスマッチ修復酵素の変異が次々と同定され、これらの変異と発癌との関係の解析が遺伝的不安定性をもたらす機構の解明につながるものと期待されている。又、最近注目されている多重がんの発生にも、遺伝的不安定性の関与が強く示唆されている。そこで本研究はジーンターゲットング（標的破壊遺伝子）法を用いて、これらのミスマッチ修復遺伝子に変異を持つマウスを作製することにより HNPCC モデルマウスを樹立し、このマウスにおける遺伝的不安定性と、さらにそれが発癌へとつながる過程の詳細な分子生物学的解析を行うことを目的としている。モデルマウスの樹立によりマウス生体内で遺伝的不安定性が再現されれば、ミスマッチ修復系が生体の発生・維持に果たしている役割を一挙に明らかにすることが出来る。特に最近ヒト癌細胞の解析から、ミスマッチ修復系がプログラム細胞死の誘導に関わることが示唆されており、このプログラム死は細胞に G2 期停止を引き起こす、全く新しい機構によるプログラム細胞死であると考えられている。本モデルマウスを用いた解析により、このプログラム死が実際の生体内の正常細胞において機能しているか否かを明らかにすることも本研究の目的である。又、モデルマウスにおいて腫瘍の発生を観察することにより、ミスマッチ修復遺伝子の異常が HNPCC の原因であることが最終的に確認され、さらに遺伝的不安定性から腫瘍発生へと至る過程を、マウス生体内において詳細に解析することが可能となる。さらに、近い将来このモデルマウスを用いることにより、遺伝的不安定性による発癌を予防する方法や薬剤の開発等の成果も期待される。

II 研究計画及び材料と方法

本研究を開始した時点では HNPCC の患者家系でヒトの MSH2 及び MLH1 遺伝子の遺伝的変異が発見されたと報告されていたが、いずれの遺伝子に関してもノックアウトマウス樹立の報告は成されていなかった。そこで我々は、当時に単離の報告が出たばかりの MLH1 遺伝子を選んで、そのノックアウトマウスの樹立と解析を試みた。このマウスで発癌が観察されれば、MLH1 遺伝子が HNPCC の原因であることが証明されると同時に、こうして得られる HNPCC モデルマウスの詳細な解析から、生体内におけるミスマッチ修復系の生理機能とその不活化の発癌への関与を明らかに出来ると考えた。ノックアウトマウスの作製には、ES 細胞内での相同遺伝子組換えとブラストシスト内注入法によるキメラマウスの作製という、M. Evans や M. Cappechi らにより開発された従来の手法を用いた。

具体的には、まず PCR 法によりヒト MLH1 遺伝子の cDNA を作製し、これをプローブとして用いることにより、129 系マウスの染色体 DNA のフェージライブラリーよりマウス Mlh1 遺伝子を単離した。この時点での HNPCC 家系の MLH1 遺伝子変異の報告は、B. Vogelstein らによる報告のみであったが、その中で最も多くの家系で同定されていた変異は、第 16 エクソンの欠失によるインフレーム変異であった。そこで、我々もマウス Mlh1 遺伝子に同様の変異を導入することを試みた。そのためマウス染色体 DNA 上の Mlh1 遺伝子の第 15、16、17 エクソンの位置を同定し、塩基配列を決定したところ、マウス Mlh1 遺伝子の第 16 エクソンはヒトと全く同じ塩基数より構成され、またそれによりコードされるアミノ酸もヒトと同一であることが判明した。そこで我々はフェージライブラリーより得た DNA 断片を用いて、相同組換えが生じると Mlh1 遺伝子の第 16 エクソンがネオマイシン遺伝子で置換される形のターゲティングベクターを作製した。ただしネオマイシン遺伝子の転写方向が、作製される変異 Mlh1 遺伝子の転写効率と相同組換えの頻度に与える影響が判断出来なかったため、さらに変異アレルよりネオマイシン遺伝子だけを切り出すことが出来るように、ネオマイシン遺伝子の 5' 及び 3' 両端に 1 対の loxP 配列を挿入し、これを Mlh1 遺伝子の転写のセンス方向、及びアンチセンスの 2 つの方向に挿入することにより、2 種のターゲティングベクターを作製した。loxP 配列は 34 塩基から構成されるが、P1 フェージの Cre 組換え酵素により特異的に認識される。従って、Cre の発現によりこの 1 対の loxP に挟まれた部分を切り出すことが出来る。こうして完成した 2 種のターゲティングベクターを、電気穿孔法により ES 細胞内に導入し、G418 耐性細胞を選別した。各々のターゲティングベクターの導入細胞から約 200 個の ES 細胞を単離し、サザンブロッティングにより解析した結果、計 15 個の変異 ES 細胞、即 Mlh1 に変異が導入された ES 細胞が同定された。次いで、これらの細胞のうち、各ベクターごとに 2 個の変異 ES 細胞を選び、C57/B16 (以下 B6) 系のマウス由来のプラストシスト内に注入し、これを仮親の子宮内に戻すことによりキメラマウスを作製し、ついでそのキメラマウスをやはり B6 系マウスと交配することにより、F1 マウスを得た。これらの F1 マウスの尻尾より DNA を抽出し、PCR 法及びサザンブロッティングにより解析した結果、いずれの変異 ES 細胞からも変異 Mlh1 遺伝子座が F1 マウスに伝搬していることが判明し、Mlh1 変異マウスの樹立が確認された。ここで作製された Mlh1 変異アレルは、Mlh1^{△E16S} (ネオマイシン遺伝子がセンス方向に挿入されている)、Mlh1^{△E16AS} (ネオマイシン遺伝子がアンチセンス方向に挿入されている) と名付けられた。次いで、これらのマウスの樹立に用いた変異 ES 細胞に、Cre 遺伝子を持つ組換えアデノウイルスを感染させた後にサブクロニングを行い、サザン解析によりネオマイシン遺伝子が欠失した ES 細胞クローンを選別した。こうして得られた変異 ES 細胞からも、上記と同様の手法で Mlh1 変異マウスを樹立した。この変異 Mlh1 アレルは Mlh1^{△NE0} と名付けられた。本研究では、こうして樹立されたマウスを病理学的、組織化学的そして分子生物学的な各種手法を用いて解析することにより研究を進めたが、各種解析の結果において、これらの Mlh1^{△E16S}、Mlh1^{△E16AS}、Mlh1^{△NE0} の 3 種のアレルの間に全く差違を認めなかった。よって、本報告の以下の記述では、これらを総称して変異 Mlh1 アレルと呼んでいる。病理学的解析は、各種組織や腫瘍に対して行ったが、マウスを 10%ホルマリンにより全身環流を行った後に、組織片を取り出し、再びホルマリンによって固定を行い、脱水の後にパラフィンに包埋し、薄切の上で HE 染色を行い解析した。組織化学的解析は、マウスを 4%パラホルム

アルデヒドで全身環流を行い、後固定の上で、凍結切片を作製し、間接蛍光抗体法により解析を行った。その結果の詳細については「研究成果」の項を参照されたい。

また、細胞生物学的手法による MIh1 の機能解析には、変異マウス由来の初代線維芽細胞を樹立し、これを用いた。具体的には、MIh1 変異マウスのヘテロ接合体同士を交配した後、胎生 14.5 日の胎児を摘出し、PCR 法により野生型、ヘテロ接合体及びホモ接合体の遺伝子型を決定すると同時に、常法に従ってこれらの胎児より初代線維芽細胞を樹立した。

III 研究成果

本研究では、当初の計画の通り、ジーンターゲット法によりマウス MIh1 遺伝子に変異を導入し、変異マウスを樹立することに成功した。この経過の詳細については、研究方法の項で述べた。次いで我々は、この MIh1 変異マウスを詳細に解析することにより、大きな成果を挙げることが出来たが、その内容は以下のように大きくまとめることが出来る。

1 ミスマッチ修復系が、マウスの配偶子形成過程での減数分裂における遺伝的組換えに必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

2 MIh1 変異マウスでは各種腫瘍の発生が観察されたことにより、ミスマッチ修復能の欠損が、生体内で腫瘍発生を引き起こすことが明らかとなり、HNPCC モデルマウスの樹立が確認された。

3 MIh1 変異マウスより樹立された細胞株の解析から、ミスマッチ修復系によるプログラム細胞死誘導機構の存在が確認され、さらに変異マウスへのアルキル化剤投与実験から、このプログラム細胞死が実際に生体内において発癌の抑制に働いていることが明らかとなった。

以上が、本研究の代表的な成果であるが、以下にこれらの成果の詳細について述べる。

1 ミスマッチ修復系の生理機能の同定

方法の項に述べた通り、MIh1 変異マウスのヘテロ接合体は正常に発生、発達することが明らかとなった。そこで、ヘテロ接合体の F1 マウス同士を交配させることにより、ホモ接合変異体、即ち MIh1 遺伝子を完全に欠損したマウスを得ることを試みた。その結果、得られた F2 マウスの約 25% (212 匹の F1 マウスのうち 54 匹) がホモ接合変異体であることが確認され、抗 MIh1 抗体を用いたウェスタン・プロット法による解析からも、これらのホモ接合変異体では MIh1 蛋白が消失していることが明らかであった。それにもかかわらず、これらのホモ接合変異マウスは正常に発生・発達を遂げ、マウス個体の発生・発達にはミスマッチ修復系は必須では無いことが明らかとなった。しかし、その後の解析から、これらホモ接合変異体は、雌雄ともに不妊であることが明らかとなった。ただし、ホモ接合マウス同士の交配時には、野生型のマウスと同様のペースで膣栓の形成がみられ、又、雌の性周期も正常であった。従って、ホモ接合変異体の性成熟には何ら異常が無いと考えられた。そこで次にホモ接合変異体における配偶子形成過程の解析を行った。その結果、雄のホモ接合変異マウスの精液中には全く精子が見られず、加えて数多くの変性細胞が含まれているという異常が見られ、精子形成過程の異常が示唆された。精巣の組織学的解析では精母細胞を始めとする配偶子形成過程の細胞が精細管中に認められるものの、精子や精子細胞を始めとする半数体の細胞は全く認められず、やはり精子形成過程の異常が強く示唆された。そこで、その異常をより詳細に解析するために、ホモ接合変異体の精

巢より精子形成過程の細胞を取り出し、細胞遺伝学的解析により、その構成細胞の同定とその性状の解析を行った。哺乳類の精巣内には、2倍体である精祖細胞 (spermatogonia) が常に分裂・増殖をしており、この精祖細胞から4倍体の1次精母細胞 (primary spermatocyte) が産生されることにより減数分裂が開始する。続いて、1次精母細胞は2度の細胞分裂を行い、半数体の配偶子である精子細胞 (spermatide) を産生する。ところがホモ接合変異体の精巣内には、精祖細胞や1次精母細胞を始めとする1次分裂の中期までの細胞は存在するものの、2次精母細胞や精子細胞は全く見当たらなかった。特に1次分裂の前期から中期にかけての細胞が非常に増加しており、その一部に変性像が見られた。さらに特徴的な点は、その中の1次分裂中期にあたる細胞においてキアズマの形成が殆ど見られず、結果として染色体が対合した形をとれていないという異常が見られた点である。これは、ホモ接合変異体では、その精子形成における減数分裂の過程での遺伝的組換えが行われていないことを示しており、このために減数分裂は1次分裂の前期又は中期で停止してしまうものと考えられた。一方、雌のホモ接合変異体の配偶子形成過程の異常は、雄とは全く異なっており、雌では正常な卵子が排卵されていることが判明した。そこで、この卵子に対し、野生型のマウス由来の精子を用いて人工受精を行い、*in vitro* の培養系を用いて、この受精卵の発生過程を解析した。その結果、このホモ接合変異体由来の卵子は正常に受精し、極体を放出し分裂を開始するものの、24時間後に2細胞期に達すると、発生を停止してしまうことが明らかとなり、その異常は精子形成過程の異常とは大きく異なることが判った。そこで、この卵子形成過程での減数分裂における遺伝的組換えが、正常に行われているか否かを確かめるために、排卵前の卵巣内より1次分裂の前期に当たる卵子を取り出して細胞遺伝学的解析を行ったところ、やはり卵子形成の減数分裂過程においても、遺伝的組換えが殆ど生じておらず、結果としてキアズマ形成が殆ど見られなかった。その結果、卵子の1次分裂では正常な染色体の分配が起こらず、極体の中には染色体が殆ど取り込まれないという結果となっていた。そのため、ホモ接合変異体由来の成熟卵子には、40本を越す染色体が存在していた。しかし、それにもかかわらず、卵子は正常に受精し、2細胞期まで発生を続けるという驚くべき事実が明らかとなった。いづれにしても、これらの結果から、ミスマッチ修復系は精子及び卵子いづれの配偶子形成過程においても、遺伝的組換え機構に必須な役割を果たしているという事実が、世界で始めて明らかになった。ただし、ホモ接合変異体の発生発達において観察された異常は、この配偶子形成の異常のみであった。

2 HNPCC モデルマウスにおける発癌

MLH1 遺伝子に遺伝性の変異を有する HNPCC 家系では、大腸癌や子宮体癌が高率で発生することが知られている。そこで、我々も Mlh1 変異マウスにおける腫瘍の発生を解析した。解析対象としては、Mlh1 変異マウスの F1 のヘテロ接合体マウス同士を交配して得られた F2 マウスを用い、野生型 69 匹、ヘテロ接合体 96 匹、ホモ接合変異体 41 匹を、食餌等の飼育条件を一定にした上で、約1年間に亘って観察を行った。この経過観察中に、死亡あるいは危篤状態となったマウスは、直ちに解剖し、全身に亘って腫瘍の有無を詳細に解析し、腫瘍が観察された場合には、その腫瘍の病理組織学的、分子生物学的解析を行った。

その結果、野生型及びヘテロ接合体マウスには、1年間の経過観察中に死亡したものは全く認められなかったのに対し、ホモ接合変異体は41匹中30匹(73.2%)が死亡、もしくは危篤状態に陥り、これらのマウスの全てで腫瘍の発生が認められた。重複した腫瘍を持つマウスも見られたが、その内訳はリンパ腫が23例(56.1%)、消化管腫瘍が11例(26.8%)、皮膚腫瘍が6例(14.7%)であった。これらの腫瘍の発生時期には大きなちがいが見られ、リンパ腫は生後3ヶ月位より観察され、発生した23例のうち過半数の15例が生後6ヶ月以内に発生したのに対し、消化管腫瘍及び皮膚腫瘍は、その殆どが生後6ヶ月以上経過したホモ接合変異体に発生した。約26.8%のマウスにおいて消化管腫瘍が発生した事実はHNPCC患者の症状と一致する点であるが、この11例中大腸に発生した腫瘍は2例のみであり、子宮体癌の発生は全く認められなかった。ただし、ホモ接合変異体の約75%に腫瘍の発生が見られたことは、ミスマッチ修復系の異常が実際に腫瘍を発生させることを直接的に証明するものであり、HNPCCモデルマウスが樹立されたと考えられた。ただし、HNPCC患者の場合との大きな違いは、変異マウスで腫瘍の発生が見られたのはホモ接合変異体のみであり、ヘテロ接合変異体には1年間の観察では、発癌は殆ど見られなかった。リンパ腫の発生部位は、胸腺が約半数であり、他は腹腔内のリンパ節等、様々な部位に観察された。一方、消化管腫瘍と皮膚腫瘍はその組織像が非常に多彩であった。消化管腫瘍は良性の腺腫から、漿膜をつき破って浸潤している腺癌まで様々な組織像を示し、皮膚腫瘍も、扁平上皮癌や毛嚢腫瘍など多彩な組織像を示した。次に、この発癌が実際に遺伝的不安定性に基づくものであるか否かを検討するために、上述のホモ接合変異体に発生した腫瘍のうち10例からDNAを抽出し、10種類の染色体上の各1ヶ所のマイクロサテライト・マーカを選び、遺伝的不安定性を示す複製異常(RER)の有無をPCR法にて検討した。その結果、全ての腫瘍において、いずれかのマイクロサテライト・マーカに複製エラーが存在し、MLh1遺伝子がゲノムの安定性に関わることが確認された。バンドの移動度の変化はほとんどが2ベースで、全体では39%のマーカに不安定性が検出された。これらの結果は、HNPCC患者における発癌と同様にMIh1変異マウスにおける発癌においても、遺伝的不安定性が関与していることを示しており、このマウスがHNPCCモデルマウスとして、その発癌機構の解析に極めて有用であることを意味していた。そこで、次にこの遺伝的不安定性が、特定の標的遺伝子に突然変異を導入することにより、発癌を引き起こす、という一般に信じられているメカニズムが、実際に働いているか否かを、モデルシステムを用いて検証した。APC1309マウスは、我々がマウスのApe遺伝子に変異を導入することにより樹立した発癌モデルマウスである。このマウスのApe遺伝子は、その1コピーがすでに遺伝的変異により不活化されており、さらに消化管上皮内でのいわゆるセカンドヒットにより、残りの1コピーが不活化されることにより、多数の腺腫が消化管内に発生し、その数は平均80個に上る。この時、セカンドヒットを引き起こす体細胞変異は、殆どの場合染色体レベルの大きな欠失により導入される。そこで交配により、このAPC1309マウスの消化管上皮に、さらにMIh1変異を導入し、遺伝的不安定性が発癌過程に及ぼす影響を解析した。その結果、MIh1変異が導入されたAPC1309マウスでは、その消化管腫瘍数が約250個と、3倍に増加し、さらにこれらの腫瘍の殆どではAPC遺伝子のLOHが観察されなかった。このことは、これらの腫瘍におけるApe遺伝子のセカンドヒットは、遺伝的不安定性のために、点突然変異を含む微小な変異として導入されたことを示している。このMIh1及びApe二重変異

マウスのシステムは、あくまでも人工的なモデルシステムであり、今回の結果が実際に HNPCC 患者の消化管発癌機構において、Ape 遺伝子が遺伝的不安定性の標的となっていることを示すものではない。しかし、このシステムにより、MIh1 遺伝子の変異が、生体内の消化管上皮において、遺伝的不安定性を引き起こし、実際に特定の遺伝子に突然変異を導入することが、世界で初めて証明された。

3 ミスマッチ修復系により誘導されるプログラム細胞死による発癌抑制機構の証明

各種の培養細胞をアルキル化剤で処理すると、細胞は G2 期停止を起こし死滅することが、古くより知られていた。従来、この細胞死は高率な突然変異の導入のため多くの遺伝子の機能が失われるため、細胞は死に至るものと考えられて来た。ところが、近年ミスマッチ修復能を欠くヒト癌細胞がアルキル化剤に耐性を示すことが明らかにされ、このアルキル化剤処理による細胞死は一種のプログラム細胞死であり、その誘導機構へのミスマッチ修復系の関与が示唆されている。ただし、これらの結果はどれも癌細胞を用いた解析により得られたものである。そこで我々は、この新たなプログラム死の誘導機構へのミスマッチ修復系の関与を明らかにするために、まず MIh1 変異マウスより正常初代線維芽細胞を作製し、アルキル化剤である MNNG や 6-チオグアニンに対する感受性を解析した。その結果、野生型及びヘテロ接合体より樹立された細胞株は、 $2.0 \mu\text{g/ml}$ の MNNG 処理で殆ど全ての細胞が死滅するのに対し、ミスマッチ修復能を完全に欠失しているホモ接合変異体由来の細胞は、解析した 5 クローン（各々が異なる個体に由来する）が全て抵抗性を示し、同量の処理でも平均 35% の細胞が生存することが明らかとなった。こうしたミスマッチ修復能の欠失に伴う感受性の低下は、6-チオグアニン処理に対しても同様に認められ、この細胞死へのミスマッチ修復系の関与が明らかになった。そこで、このプログラム死の誘導機構が生体内においても機能していることの確認を試みた。ここでは、アルキル化剤処理による突然変異導入効率を高めるために、 0^6 メチルグアニン・メチル転移酵素 (MGMT) を欠損させたマウスを用いた。この MGMT 欠損マウスは九州大学の関口睦夫研究室で作製されたものであり、以下は関口研究室との共同研究である。このマウスでは MGMT 遺伝子が不活化されているが、MGMT はアルキル化剤により生じる 0^6 メチルグアニンよりメチル基を除去する酵素であり、これを欠失させることにより、アルキル化剤処理時に、ミスマッチ修復系の主要な基質である 0^6 メチルグアニンとチミンとのミスペアがより多く生成されるようになる。そのため、野生型のマウスでは、 250mg/kg 体重という量のアルキル化剤 MNU の投与でも死亡するマウスは殆ど認められないのに対し、この MGMT 欠損マウスは 50mg/kg 体重という量のアルキル化剤 MNU の投与で全て死亡する。この時マウスでは、胸腺や骨髄において広汎な細胞死が見られる。そこで我々が、この MGMT マウスに交配により MIh1 変異を導入し、アルキル化剤投与に対する感受性を解析したところ、得られた二重変異マウスは再び MNU 投与に強い抵抗性を示すようになることが明らかとなった。このマウスは、 250mg/kg 体重の MNU 投与によっても死亡せず、胸腺や骨髄での細胞死も殆ど見られない。これらの結果より、ミスマッチ修復系は生体内においても、特に骨髄や脾臓を構成する細胞において、プログラム細胞死の誘導に働いていることが明らかとなった。次に、このプログラム細胞死と発癌との関与を明らかにするため、この MIh1・MGMT 二重変異マウスに、 30mg/kg 体重という低容量の MNU を投与し、その後の発癌の有無を解析した。その結果、

この条件の野生型のマウスでは全く発癌が認められないのに対し、二重変異マウスでは、約 70% という高率でリンパ腫の発生が観察された。この時、リンパ腫は主に胸腺で発生が見られた。この結果と、胸腺ではミスマッチ修復系によるプログラム細胞死が機能していることを考え合わせるとミスマッチ修復系により誘導されるプログラム細胞死が、実際に生体内において発癌抑制に機能していることが明らかとなったと考えられる。

IV 考察

ジーンターゲット法によりマウス MIh1 遺伝子に変異を導入することにより、HNPCC モデルマウスの樹立に成功した。まず、この MIh1 変異マウスのホモ接合体が正常に発生、発達することが明らかになったのは意外であった。本研究を開始した時点では、ヒトの HNPCC 患者でもホモ接合変異体やコンパウンド・ヘテロ接合変異体の報告は全く見られず、我々はミスマッチ修復能を完全に欠失したマウスは発生時に致死であると想像していたからである。ただし現在では、HNPCC 家系の患者のなかには極めて少ないながらも、ミスマッチ修復遺伝子のホモ接合体の患者の報告があり、この結果は我々の変異マウスの表現型に一致する。さらに意外であったのは、ミスマッチ修復能を欠く個体では、減数分裂における遺伝的組換えに異常が見られることであった。減数分裂時には、確かに父親及び母親から由来する染色体の DNA が対合し、シナプトネマ複合体を形成し、そこで組換えが生じる。従って、その組換え時には、ヘテロな対合のためにミスマッチ修復が必要となる可能性がある。しかも、精子形成過程の解析では、減数分裂の第 1 分裂前期のパキテン期から異常が見られ、この時期はまさに遺伝的組換えが行われる時期である。しかし一方、従来からミスマッチ修復において MIh1 とヘテロ二重体として機能すると言われていた Msh2 遺伝子のノックアウト・マウスでは、我々の結果と同様にホモ接合変異体において発癌が多発することが報告されているが、配偶子形成過程の異常は全く報告されていない。従って今回我々が発見した遺伝的組換え機構への MIh1 の関与が、ミスマッチ修復機能を介しての関与であるか否かについては、さらに検討する必要があると思われる。現在、このメカニズムを明らかにするため、MIh1 変異マウスの戻し交配を継続中である。即ち今回の解析に用いたホモ接合変異マウスは、その殆どが ES 細胞が由来する 129 系マウスと交配に用いる B6 系マウスとの F2 マウスである。一般的にこれら近交系マウスの間には、約数百 bp に 1 ヶ所程度の割合で、遺伝的多型が存在すると言われており、従って F2 マウスにおいてもかなりの頻度で多型が存在する。そのため、遺伝的組換えの過程でミスマッチ修復が必要となる、と想像している訳である。もし、その仮説が正しければ、戻し交配を 10 代以上行ったマウスでは遺伝的多型はほぼ消失するため、このマウスの遺伝的組換えは、MIh1 遺伝子が欠失していても正常に行われると考えられ、戻し交配を終了した後に、交配によりホモ接合変異体を作製して、その減数分裂の過程の解析を行うことを予定している。

次に、HNPCC モデルマウスにおいては、各種腫瘍が多発することが確認された。この発癌機構には、やはり遺伝的不安定性が関与することが明らかとなった。こうして、HNPCC モデルマウスでは、ヒト患者の場合と同じ機構での発癌が再現されていると考えられる。ただし、ヒト HNPCC 患者の場合との大きなちがいは、殆どの HNPCC 患者がミスマッチ修復系の遺伝子異常に関してヘテロ接合体であるのに対し、MIh1 変異マウスで発癌が認められたのはホモ接合変異体のみであり、ヘテロ接合体では極めて低い頻度でしか発癌が観察され

なかった点である。この理由としては、いくつか考えられるが、1つは未だ観察期間が1年少しと短いことが原因である可能性がある。ちなみに、我々が用いている近交系マウスの実験室内での平均寿命は約2年から2年半程度である。ただし、Apc 変異マウスとの交配によるモデルシステムでも、ホモ接合変異体の場合には、3 倍の腫瘍数の増加という顕著な変化が観察されたにもかかわらず MIh1 変異のヘテロ接合体では、その消化管腫瘍の発生パターンには全く変化が見られなかった。このことは、ミスマッチ修復系酵素遺伝子の変異では、いわゆる遺伝子量効果 (gene dosage effect) やハプロ接合性不全 (haplo insufficiency) といった現象は認められないことを意味している。従って、HNPCC 患者が発生する腫瘍では、殆どの場合ミスマッチ修復系酵素遺伝子が2コピーとも不活化されていることから判るように、HNPCC 患者においては、体細胞変異によるセカンド・ヒットが高率で起こるのに対し、MIh1 変異マウスのヘテロ接合体では、そのセカンド・ヒットの効率が低いために、発癌が見られないものと考えられる。この差違は、恐らくヒトとマウスの根本的な差である可能性が高く「Rb 遺伝子に変異を持つマウスを作製しても網膜芽細胞腫が発生しない」といったように、マウスでは常にセカンドヒットの効率の悪さに起因すると思われる現象が頻繁に観察されている。しかし、上述のように、ヒトの HNPCC 患者においても、まずセカンド・ヒットによりミスマッチ修復系遺伝子が完全に欠失し、そこで遺伝的不安定性が引き起こされて、発癌がスタートする、というプロセスを辿ることを考えれば、やはり我々の樹立した MIh1 変異マウスは HNPCC モデルマウスとして極めて有用であることが理解される。遺伝的不安定性を示すヒト癌には、化学療法剤に対する感受性等で共通の性質が見られると言われているが、本モデルマウスは、その治療法の確立のための貴重な実験系を提供すると思われる。一方、本モデルマウスに発生する腫瘍の種類は、HNPCC 患者のものとは若干異なっている。これは恐らく、マウスとヒトの各種遺伝子の塩基配列の差違により、遺伝的不安定性の標的となる遺伝子が若干異なっているためではないかと考えられる。従って、この点を利用することにより、ヒト発癌における真の標的遺伝子を同定することも可能であると考えられる。このためには、やはりヒトで変異が同定されている遺伝子に関して、その変異をマウスに発生した各種腫瘍において解析する必要があると考えられる。こうした解析に関しては現在精力的に行っているところである。

最後に、MIh1 遺伝子の関与するミスマッチ修復系が、プログラム細胞死の誘導に機能しており、実際にそのプログラム死が生体内において、発癌抑制に機能していることが証明されたことは、本研究の大きな成果であった。従ってミスマッチ修復系は、アルキル化剤等による DNA 修飾に対して、その量が少ない場合にはそれをいわゆるロングパッチ修復機構で修復することにより突然変異の導入を防ぎ、逆にその DNA 修飾が大量の場合には、その細胞をプログラム死に誘導することにより突然変異が固定化されるのを防ぐという、大きく異なった2つの経路を用いて、染色体 DNA 上の遺伝子への突然変異の導入を抑制していることが明らかとなった。結局のところ、この2つの機構は発癌の抑制機構として働くという点では同一であるが、発生した癌の治療を考える上で、その意味は大きく異なっている。即ち前者の機構ではミスマッチ修復系の欠失そのものが、癌細胞の形質を変化させることはないのに対し、後者の機構ではミスマッチ修復系が欠失している細胞では、共通して、特定のプログラム死の機構が働かなくないという形質が見られることを意味している。この意味するものは極めて重大であり、特に化学療法剤の選択に当たっては十分な配

慮が必要であることを意味していると思われる。

V 研究成果の発表

- 1 S. Kamada, T. Noda et al. *bcl-2* Deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: Accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.* 55, 354-359. (1995)
- 2 A. Matsuhisa, T. Noda et al. Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia colisuhB* gene product. *J. Bacteriol.* 177, 200-205. (1995)
- 3 Y. Uehara, T. Noda et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor / scatter factor. *Nature* 373, 702-705. (1995)
- 4 H. Takekura, T. Noda et al. Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3381-3385. (1995)
- 5 H. Takeshima, T. Noda et al. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBOJ.* 14 (13), 2999-3006. (1995)
- 6 I. Miyashiro, T. Noda et al. Subcellular localization of the APC protein: Immunoelectronmicroscopic study of the association of the APC protein with catenin *Oncogene* 11, 89-96. (1995)
- 7 K. Shiba, T. Noda et al. Human alanyl-tRNA synthetase: conservation in evolution of catalytic core and microhelix recognition *Biochemistry* 34, 10340-10349. (1995)
- 8 S. Sakaguchi, T. Noda et al. Accumulation of proteinase K-resistant Prion Protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J. Virol.* 69, 7586-7592. (1995)
- 9 Y. Takei, T. Noda et al. SynapsinI deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system *J. Cell Biol.* 131, 1789-1800. (1995)
- 10 S. Nakai, T. Noda et al. The POU-domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes. Dev.* 9, 3109-3121. (1995)
- 11 Y. Muto, T. Noda et al. Growth retardation in human cervical dysplasia-derived cell lines by β -carotene through down-regulation of epidermal growth factor receptor. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1535S-1540S. (1995)
- 12 M. Matsumoto, T. Noda et al. Ataxia and epileptic seizure in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*, 379, 168-171. (1996)
- 13 S. Sakaguchi, T. Noda et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, 380, 528-531. (1996)

- 14 H. Takeshima, T. Noda et al. Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J. Biol. Chem.* 271, 19649-19652. (1996)
- 15 A. Nagata, T. Noda et al. G protein-coupled cholecystokinin-B / gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11825-11830. (1996)
- 16 M. Nishi, T. Noda et al. Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking non-opioid orphanin FQ receptor. *EMBJO.* 16, 1858-1864. (1997)
- 17 H. Suzuki, T. Noda et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386, 292-296. (1997)
- 18 K. Shiba, T. Noda et al. Creation of libraries with long open reading frames by polymerization of a microgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3805-3810. (1997)
- 19 M. Niki, T. Noda et al. Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, PEBP2/CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5697-5702. (1997)
- 20 A. Termuma, T. Noda et al. A novel genetic system to isolate a dominant negative effector on DNA-binding activity of Oct-2. *Nucl. Acid Res.*, 25, 1984-1990. (1997)
- 21 Y. Wakabayashi, T. Noda et al. Genetic and physical delineation of the region of the mouse deafness mouse deafness mutation shaker-2. *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 232, 107-110. (1997)
- 22 Y. Takei, T. Noda et al. Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.*, 137, 1615-1626. (1997)
- 23 K. Shiba, T. Noda et al. Human lysyl-tRNA synthetase accepts N73 variants and rescues *E. coli* double-defective mutant. *J. Biol. Chem.*, 272, 22809-22816. (1997)
- 24 H. Shibata, T. Noda et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the APC gene. *Science*, 278, 120-123. (1997)
- 25 C. Ikebe, T. Noda et al. Mouse LIM-kinase 2 gene: cDNA cloning, genomic organization and tissue-specific expression of two alternatively initiated transcripts. *Genomics*, 46:504-508. (1997)
- 26 J. Aruga, T. Noda et al. Mouse *Ziel* is involved in cerebellar development. *J. Neurosci.*, 18(1):284-293. (1998)
- 27 Toshima, T. Noda et al. Structural organization and chromosomal localization of the mouse *Tesk1* (testis-specific protein kinase 1) gene. *Gene*, 206:237-245. (1998)
- 28 Y. Doi, T. Noda et al. Moesin is not a receptor for measles virus entry into

- mouse embryonic stem cells. *J. Virol.*, 72(2): 1586-1592. (1998)
- 29 Y. Yonekawa, T. Noda et al. Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in DIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 141: 431-441. (1998)
- 30 M. Saitou, T. Noda et al. Occuludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.*, 141(2): 397-408. (1998)
- 31 H. Kawate, T. Noda et al. 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. (1998)
- 32 H. Takeshima, T. Noda et al. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.*, 12: 3309-3316. (1998)
- 33 T. Manabe, T. Noda et al. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature*, 394: 577-581. (1998)
- 34 S. Hiratsuka, T. Noda et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 9349-9354. (1998)
- 35 H. Okada, T. Noda et al. The AML1(-/-) embryos do not express a set of hematopoiesis-related gene transcripts including that of PU.1. *Oncogene*, 17: 2287-2293. (1998)
- 36 K. Shiba, T. Noda et al. Human asparaginyl-tRNA synthetase: Molecular cloning and the inference of the evolutionary history of Asx-tRNA synthetase family. *Nucl. Acid. Res.*, in press. (1998)