

学 位 論 文 題 名

APC遺伝子ターゲティングマウスの作出と
腸管腫瘍発生機序に関する分子病理学的研究

学位論文内容の要旨

APC遺伝子 (adenomatous polyposis coli) は、常染色体優性の遺伝病である、家族性大腸ポリープ症 (FAP)の原因遺伝子として単離された。また、APC遺伝子の変異やLOH (loss of heterozygosity) は、散発性の大腸癌においても広く認められている。したがって、APC遺伝子は、大腸癌全般の発生に関わる癌抑制遺伝子として位置づけられる。さらに、APC遺伝子がマッピングされたヒト染色体5q21の領域は、大腸ポリープから進行した大腸癌まで広くLOHが認められる。このことから、APC遺伝子の変異は、Vogelsteinらが提唱した大腸癌の多段階発癌モデルの、最も早期に起こるものと考えられている。本研究では、腸管における腫瘍発生機序の解析を目的として、マウス APC遺伝子のジーンターゲティングを行なった。

APC遺伝子は15個のエクソンから構成され、15番目の最終エクソンが全体の3/4の領域を占め、約2840残基のアミノ酸からなる蛋白をコードしている。最初に、APC遺伝子のエクソン1から14までの領域で、転写産物であるmRNAの解析をRT-PCRによって行なった。その結果、エクソン7とエクソン9の一部の双方、またはいずれか一方を選択的にスプライシングすることによって欠損するmRNAが検出された。エクソン7は、他の領域に比べてヒトとマウスでの相性が低く、アミノ酸配列から推測される様々な機能領域に含まれないため、APC蛋白の構造領域と考えられた。また、別のエクソンも選択的スプライシングを受ける可能性が示唆された。したがって、ジーンターゲティングによって、確実に遺伝子の転写を終止させるため、エクソン15のN末側にある716番コドン

をターゲティング部位とした。これは、エクソン15が最終エクソンであるため、選択的スプライシングを受けないからである。716番コドンは、FAPで報告されている変異領域に含まれる。

胚性幹細胞において、APC遺伝子での相同組み換えを起こさせるために、置き換え型のターゲティングベクターを作製した。ベクターの相同領域には胚性幹細胞と同一系統マウスである129/Sv由来のゲノムDNAを用いた。これにより、高い効率(4.5%)で相同組み換え体を得られた。相同組み換え胚性幹細胞から作出したAPC遺伝子ターゲティング($APC^{\Delta 716}$)マウスでは、変異APC染色体が生殖系列に入り、メンデル遺伝の法則に従って子孫に伝達された。ヘテロ接合体($apc/+$)マウスは正常に発生して生まれ、生後3~5週齢から腸管全体に多発性にポリープを発現した。ヘテロ接合体($apc/+$)マウス同士の交配の結果、ほとんどのホモ接合体(apc/apc)マウスは胎齢8.5日以前に致死した。致死する段階が器官形成期以前であったので、死因としては、組織の機能不全ではなく、細胞レベルでの生存能力欠失が考えられた。

$APC^{\Delta 716}$ マウスをC57BL/6J(B6)に戻し交配する過程で、症状に変化が認められた。キメラマウスとF1マウスは、生後26週齢まで症状を示さず生存したが、B6に2回戻し交配したN2マウスは、16週齢から重度の貧血症状を示して衰弱し始め、26週齢までに80%が死亡した。剖検の結果、小腸には遺伝的背景に関係なく、多発性ポリープを発生していたが、結腸のポリープは死亡したN2マウスのみ認められた。結腸に発生したポリープは、発生率は腸管全体のポリープの2%と少なかったが、ポリープの直径が1~7mmと大きかった。このため腸管内容物の通過に伴う、持続的な出血がポリープに生じ、これが貧血の原因と考えられた。

化学発癌剤によって、APC遺伝子の850番コドンに終止変異の入ったMin(multiple intestinal neoplasia)マウスでの研究から、APC遺伝子変異に起因するポリープ発生の頻度を軽減する、*Mom-1*(modifier of min-1)遺伝子の存在が報告されている。しかし、N2マウスの*Mom-1*座位の遺伝型を検索しても、症状との相関は認められなかった。したがって、129/Svには優性に結腸のポリープの発生を抑える*Mom-1*以外の遺伝子の存在が示唆された。

症状を示した $APC^{\Delta 716}$ マウスの病理学的検索の結果、全ての腸管腫瘍は良性的無茎性乳頭ポリープであり、悪性腫瘍は認められなかった。大腸癌の多段階発

癌モデルでは、良性の腫瘍に *K-ras*, *p53*, *DCC* などの癌遺伝子や癌抑制遺伝子に変異が入ると癌腫へ進行するとされている。したがって、腸癌発生機序の解析は、これらの遺伝子の変異マウスを作出して、*APC*^{Δ716}マウスと交配させることにより、可能となるであろう。

APC^{Δ716}マウスのポリープは、雌で3週齢から、雄で5週齢から発生し始め、その後、加齢とともに新しいポリープが出現し続け、16週齢では多い個体で300個以上に達した。また、直径0.5mm以下の小さなポリープが、検索したいずれの週齢においても観察され、ポリープ発生に確率論的 (stochastic) な機序が示唆された。

小腸ポリープの初期のものと考えられる微小腺腫は、嚢胞状で、正常上皮に被われて絨毛内側に存在していた。この腺腫細胞は腸陰窩と連続しており、上皮細胞層が陰窩の増殖帯で反転し、隣接する絨毛の粘膜固有層内で増殖していた。小腸の微小腺腫を被覆する正常上皮を注意深く剥離し、腺腫細胞のみを回収し、染色体特異的PCRにて*APC*遺伝型を解析した結果、全ての微小腺腫に変異*APC*染色体は存在していたが、正常*APC*染色体はLOHにより欠損を起していた。結腸においても異常な分岐と異型性を示す陰窩が観察され、小腸と同様に正常*APC*染色体のLOHが検出された。Knudsonの2ヒット説によると、癌抑制遺伝子は双方の対立染色体でLOHや変異が入ると腫瘍が形成される。一方、FAP患者では、生殖系列で*APC*遺伝子上の変異の入った部位が、腸管に発生するポリープ数と相関するとの報告がある。したがって、ポリープ形成に関して、変異*APC*蛋白によるドミナントネガティブの機序が示唆されている。しかし、今回の結果では、正常*APC*染色体のLOHがポリープ形成に関与しており、*APC*遺伝子の場合も、他の癌抑制遺伝子と同様に Knudsonの2ヒット説によって説明されることが明らかとなった。

小腸陰窩の細胞は、分裂を繰り返して絨毛へと移動するが、絨毛上皮からのTGF-βなどの増殖抑制因子の刺激を受けると、分裂が止まり分化すると考えられている。今回の実験では、正常*APC*遺伝子のLOHによって、粘膜固有層側で増殖する腺腫細胞自身に腫瘍原性が生じたのではなく、TGF-βなどの増殖抑制因子からの位置的な逸脱により分裂増殖を繰り返すというポリープ発生機序が考えられた。結腸における細胞周期の制御因子は未だ明らかにされていない。しかし、今回作出した結腸ポリープでは、*APC*遺伝子のLOHによって陰窩が異常

に分岐していたことから、結腸ポリープも小腸と同様の機序で発生したことが考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 板倉智敏 副査 教授 佐藤文昭
副査 教授 斉藤昌之 副査 教授 渡邊智正

学位論文題名

APC遺伝子ターゲティングマウスの作出と 腸管腫瘍発生機序に関する分子病理学的研究

Adenomatous poliposis coli (APC)遺伝子は大腸癌発生に関与する癌抑制遺伝子として単離された。申請者はジーンターゲティングの手法を用いて、APC遺伝子変異マウスを作出し、腸管腫瘍の発生機序を分子病理学的に解析し、本論文をまとめた。

本論文では、APC遺伝子の第716番アミノ酸の直後に終止変異を導入し、C末側欠損型の変異APC蛋白を発現するAPC Δ 716マウスを作出した。ホモ接合体マウスは胎齢8.5日以前に致死した。ヘテロ接合体マウスは腸管全体に多発性のポリープを発生し、そのほとんどは小腸で認められた。APC Δ 716マウスは129/SvとC57BL/6Jとのマウス系統間の遺伝的背景の違いによって、結腸でのポリープ発生頻度に変化が生じ、129/Svには優性に結腸のポリープの発生を抑える遺伝子の存在が示唆された。

APC Δ 716マウスに発生するポリープ数は、加齢とともに増加し、確率論的なポリープ発生機序が示唆された。小腸での早期の病変である微小腺腫は嚢胞状で、正常上皮に被われて絨毛内側に存在していた。この腺腫細胞は腸陰窩に由来し、陰窩の細胞層が反転して、隣接する絨毛の粘膜固有層内で増殖していた。腺腫細胞から抽出した染色体DNAの解析の結果、全ての微小腺腫で、正常APC染色体のヘテロ接合体欠失 (Loss of heterozygosity: LOH) が認められた。結腸においても異常な分岐を示して異型性を伴う陰窩が観察され、小腸と同様に正常APC染色体のLOHが観察された。

以上のように、申請者は、APC遺伝子のLOHと、それに伴う腸陰窩の細胞動態の変化が、腸管腫瘍発生の原因であることを初めて明らかにした。この成果は大腸癌の病態究明に大きく貢献する。よって、審査員一同は、大島正伸氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。