

平成 23 年 6 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17013033  
 研究課題名（和文） モデルマウスを用いたがん関連遺伝子の単離と機能同定  
 研究課題名（英文） Isolation and characterization of cancer-related genes  
 in mouse models

## 研究代表者

木南 凌 ( KOMINAMI RYO )  
 新潟大学・医歯学系・教授  
 研究者番号：40133615

研究成果の概要（和文）：放射線照射後の萎縮胸腺で、*Bcl11b* の遺伝的变化を経時的に調べた結果、*Bcl11b* は発症初期過程に働くことが明らかになった。*Bcl11b* は細胞周期チェックポイントに働く Chk1 のリン酸化に影響し、標的遺伝子として、*p27 kip1 p57 kip2* および  $\beta$ -catenin が明らかになった。マウスの発がん実験からは、*Bcl11b* 機能低下は細胞増殖を促し、それがリンパ腫、腸管腫瘍の発がん原因であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Analysis of radiation-induced thymic lymphomas and atrophic thymuses revealed that *Bcl11b* functions as a suppressor at an early stage of the lymphoma development. *Bcl11b* transcription factor downregulates Chk1 check point kinase and its targets include cell cycle inhibitors such as *p27 kip1* and *p57 kip2* and also  $\beta$ -catenin. Deregulation of these proteins in *Bcl11b* heterozygous mice contributes to development of lymphomas and colon cancers.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,700,000	0	9,700,000
2006年度	10,000,000	0	10,000,000
2007年度	10,000,000	0	10,000,000
2008年度	10,000,000	0	10,000,000
2009年度	10,000,000	0	10,000,000
総計	49,700,000	0	49,700,000

研究分野：分子生物学分野

科研費の分科・細目：010

キーワード：*Bcl11b* 遺伝子・がん抑制遺伝子・細胞増殖・アポトーシス・機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

放射線誘発マウス胸腺リンパ腫は、がん系列細胞の変異および宿主組織要因が発がんに関与して関与することが明らかな系であり、複雑なヒト発がんのよい実験モデルと考え

られてきた。また、前リンパ腫細胞の同定や関与する遺伝子の単離に適した系であるばかりでなく、胸腺リンパ腫はマウスのがんの中では主要ながんである。この胸腺リンパ腫から、我々はリンパ腫抑制遺伝子として

Bcl11b/Rit1 を単離したという背景があり、ヒトの白血病では Bcl11b に変異が報告されていた。Bcl11b 遺伝子欠損をもつマウスの解析から、Bcl11b は胸腺リンパ細胞の分化に関与する転写因子であることは分かっていたが、その T 細胞分化の制御機構は不明であり、同様に Bcl11b の発がんへの抑制機構も不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目標のひとつは、我々が単離した Bcl11b 遺伝子が発がんに寄与する時期とその細胞の特性、およびその貢献の機構を解析することである。また、リンパ腫以外での発がん抑制への関与の有無を明らかにすることも目的とした。具体的には以下の課題を掲げた。

(1) 先ず、Bcl11b タンパク質の機能解析を行う。Bcl11b 変異体を作製し、ドメインのもつ機能特性を明らかにする。

(2) Bcl11b ノックダウン細胞を用いて、Bcl11b 機能低下がもたらす細胞増殖への影響と発がんへの関与を検討する。

(3) 放射線照射誘発萎縮胸腺に存在するリンパ腫および前リンパ腫細胞を対象に、Bcl11b 遺伝子の発がん過程への役割を解明する。このために、Ikaros および Bcl11b の発現を抑えるレンチウイルス siRNA 発現ベクターを作製し、利用する。マウス接種実験や胸腺細胞、培養細胞での siRNA 効果を検討する。

(4) Bcl11b は胸腺以外でも皮膚や腸管で発現している。Bcl11b-KO マウスでは皮膚の低形成が観察されるが、腸管では大きな変化はみられない。これらの臓器でのがん抑制遺伝子として働いているかどうかを検討する。具体的には、Bcl11b のコンディショナル KO マウスや ENU 誘発 Bcl11b 変異マウスを作製し、皮膚特異的、腸管組織特異的欠失を行なう。このとき、皮膚がんを発症す ras-Tg マウスとの交配も行い、経時的に皮膚がん発症を観察する。

## 3. 研究の方法

(1) 用いた細胞と Bcl11b 変異体および Bcl11b 標的遺伝子プラスミドの作製。HCT116 細胞(ヒト大腸がん細胞由来)、MCF-7 細胞(ヒト乳がん細胞由来)の培養には DMEM(sigma)+10% FBS+1% P/St 培地を使用した。Bcl11b 標的候補遺伝子(マウスとヒト p27 kip1, Bcl-xL, p57 kip2)とコントロール遺伝子 GAPDH のプロモーター領域を PCR 法で増幅し、ベクターに組み込んだ。一方、Bcl11b タンパク質は pcDNA 3.1/ myc-His A vector(Invitrogen)の EcoR と Hind 制限酵素サイトにマウスの Bcl11b の cDNA を組み込んだものを使用した。変異体の作製には PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(TaKaRa)を用いた。

(2) 転写活性の測定。ルシフェラーゼアッセイキットのプロトコルどおりに細胞を破碎し、アッセイを行った。標的遺伝子の活性(ホタル・ルシフェラーゼ)とコントロール遺伝子の活性(シーパンジー・ルシフェラーゼ)はイルミネーターを用いて測定した。

(3) ウエスタンブロッティングおよび ChIP assay 法。ウエスタンブロットは通常の方法に従い、ChIP 法 Upstate chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit のプロトコルをもとに行なった。

## 4. 研究成果と考察

(1) 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の多段階発がん機構解明を目的とし、Bcl11b と Ikaros 遺伝子の解析を行った。p53 ヘテロ型の背景で Bcl11b ヘテロマウスは高頻度にリンパ腫を自然発症した。しかし、野生型のアレルの消失はみられず、Bcl11b のがん抑制はハプロ型不全であることが示唆された。次に、Bcl11b と Ikaros の DNA 変化 (LOH) を照射後萎縮胸腺で経時的に調べた。その結果、Bcl11b は発症初期過程に、Ikaros は後期過程で働くと考えられた。

(2) 放射線照射後萎縮胸腺でクローナル増殖する細胞を検索した。VDJ 組換えした G1 期大型細胞が検出され、これが前リンパ腫細胞と考えられた。この G1 期細胞は正常細胞より大きく不均一で、一方 S 期細胞の大きさには違いはなかった。萎縮胸腺内の大型リンパ球には G1 期での細胞成長の制御に異常が存在すると考えられた。

大型リンパ球特異的 RNA 発現をマイクロアレイ解析した。Notch1 と p21、Bim の発現上昇がみられた。増殖と停止、細胞死シグナルが混在し、それが前がん病変の特徴と考えられた。

(3) *Bcl11b*<sup>KO/+</sup>マウスに 3Gy の $\gamma$ 線を一回照射すると、その多くは照射後 250 日以内に胸腺リンパ腫を発症する。この発症は野生型の *Bcl11b*<sup>+/+</sup>マウスの照射ではみられない。*Bcl11b*<sup>KO/+</sup>マウスは照射後日数の経過に伴って細胞数を減少させ、胸腺は萎縮した状態となる。そこで、萎縮胸腺に存在する細胞のクローナリティーを、T 細胞リセプター遺伝子座の VDJ 組換えパターンをアッセイし調べた。照射後 30 日のマウス胸腺細胞でも約 1/3 にクローナル増殖を示し、照射後 80 日の胸腺ではさらにその頻度が上昇した。*Bcl11b*<sup>KO/+</sup>マウスの代わりに、*Bcl11b*<sup>flox/+</sup>;Lck-Cre マウスを用いた場合でも、やはり照射後萎縮が観察された (Go et al., 未発表)。これは、*Bcl11b*<sup>KO/+</sup>遺伝子型の発がんへの貢献が、骨髄細胞に由来する未分化細胞にあるのではなく、DN3 (CD44-/CD25+) 細胞以降にまで分化した細胞にあることを示唆する。というのは、*Bcl11b*<sup>flox/+</sup>;Lck-Cre マウスでは、DN3 以降の分化した胸腺細胞でのみ *Bcl11b*<sup>KO/+</sup>遺伝子型

となり、骨髄の細胞には影響しないからである。

(4) Bcl11b の機能を知る目的で、RNAi 法による Bcl11b ノックダウン細胞を解析した。その結果、Bcl11b は細胞周期チェックポイントに働く Chk1 のリン酸化に影響することが分かった。また、Bcl11b ノックダウン細胞は p27 および Bcl-xL の mRNA 量が速やかに減少することが分かった。

(5) Bcl11b タンパク質には 6 個の亜鉛フィンガードメインが存在し、細胞核内で Sirt1 deacetylase や NuRD 複合体を形成し、転写調節することが報告されている。そこで、Bcl11b タンパク質の DNA 結合性について、種々の GST 融合 Bcl11b タンパク質を作製し、結合配列として報告されている配列を用いてゲル移動度シフトアッセイを行った。その結果、6 個存在する亜鉛フィンガードメインの 2 番目と 3 番目のドメインを含む GST-融合 Bcl11b タンパク質が DNA との結合性を示した。同様に、Bcl11b により標的遺伝子 p27kip1 プロモーターの発現が 40%程度抑制されることをルシフェラーゼアッセイ法により示し、この抑制効果が 6 番目のドメインを欠失することで抑制作用がなくなる。これらのことから、Bcl11b タンパク質に存在する 6 個の亜鉛フィンガードメインは、DNA 結合性を示すもの (N 末端側のもの) と転写調節に関与するもの (C 末端側のもの) とに機能分担されていることが示唆された。

(6) ヒト大腸がんで Bcl11b の変異検索を行ったところ、5 例に突然変異を検出した。そこで、これら変異の効果を検討した。Bcl11b 変異体の発現ベクタープラスミドを TOP/FOPflash レポータープラスミドと共に  $\beta$ -catenin の発現様式が異なるヒト大腸がん由来細胞株 (SW480、HCT116、CaCo2、RKO 細胞) にコトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してデュアル・ルシフェラーゼアッセイ法によりレポーター活性の測定を行った。その結果、Bcl11b により TOPflash ベクターの転写活性が低下し、Bcl11b が  $\beta$ -catenin 活性を抑制することが分かった。また、欠損領域を持つ Bcl11b ベクターを用いた解析で、Bcl11b の C 末端側に存在する 3 箇所の亜鉛フィンガードメインを含む領域を欠くことにより活性の抑制効果が見られなくなった。これらは、 $\beta$ -catenin(-) の RKO 細胞を除く 3 つの細胞系で同様の結果が得られた。この結果から、Bcl11b は  $\beta$ -catenin の転写活性を抑制し、C 末端側 3 箇所の亜鉛フィンガードメインを含む領域が深く関与することが示唆された。次に、細胞内局在への影響をみた。5 つの変異の内、1 変異が核内移行の異常、残り 2 つは核内のタンパク質分布に異常を示した。以上の結果から、Bcl11b 転写因子は  $\beta$ -catenin 発現を抑制し、

Bcl11b 機能低下は  $\beta$ -catenin を上昇させ、それがリンパ腫、腸管腫瘍の発がん原因であると考えられた。

(7) Jurkat 細胞を用いた ChIP アッセイ法により、Bcl11b が p27 kip1 および p57 kip2 遺伝子に結合しているかどうかを検討した。免疫沈降の際、Bcl11b 抗体と Bcl11b と共沈降することが報告されている Sp1 抗体も使用した。その結果、Bcl11b 抗体と共に p27 kip1 と p57 kip2 の転写開始点上流の配列が沈降し、Sp1 抗体とは Bcl11b 抗体を用いた場合と同様に p27 kip1 と p57 kip2 の転写開始点上流配列の沈降が認められた。対照として用いた beta-actin や DHFR (dihydrofolate reductase) は沈降が認められなかった。同様に、Bcl11b の  $\beta$ -catenin プロモーターへの結合性を検討した。ChIP アッセイの結果、Bcl11b 抗体と共にそれぞれの転写開始点上流の配列が沈降した。以上の結果から、Bcl11b は 3 つの遺伝子の転写調節に関与していることが示唆された。

(8) Ikaros の発現を抑えるレンチウイルス siRNA 発現ベクターを作製し、マウス BW5147 細胞に感染させてその効果を調べた。感染後 2 日後には、Ikaros の発現が 95%以上抑制され、浮遊系細胞にも効率良く効果を示すことが分かった。デキサメサゾン培地に添加し、Ikaros siRNA の有無におけるアポトーシス誘導への影響を調べた。その結果、Ikaros siRNA で Ikaros の発現を抑制すると、アポトーシスが抑制されることが、ウエスタンブロット解析 (caspase3 の活性化の低下) やフローサイトメトリーによる解析 (DNA の断片化の低下) により確認された。しかし、残念ながら発がん段階特異的に抑える実験系とはならなかった。それは抗アポトーシス作用が期待より小さく、強い細胞障害性という副作用がみられたからである。

一方、Bcl11b-siRNA 発現レンチウイルスを作製し、利用した。しかし、Bcl11b の発現抑制は、細胞のアポトーシスを誘導するため、発がん抑制効果を検討することはできなかった。

(9) Bcl11b 遺伝子の皮膚がん発症への関与の有無を検討している。この解析には、Bcl11b のコンディショナル K0 マウスおよび ENU 誘発 Bcl11b 変異マウス (理研筑波・権藤博士との共同研究) を利用している。Bcl11b は皮膚で発現し、K0 マウスの皮膚は低形成である。Bcl11b のコンディショナル K0 マウスを作製し、皮膚がんを発症す ras-Tg マウス (Balmain 教授より供与) と交配を行っている。ras-Tg マウスでの皮膚がん発症を観察する系は確立されたが、Bcl11b 遺伝子型の皮膚がん発症への影響は、まだその観察をする時期に至っていない。

(10) ENU 誘発 Bcl11b 変異マウス利用実験

も進行中である。このマウスは 1891 番目の G が A に置換したもので、その結果 zinc-finger ドメイン内の 826 番目のアミノ酸 S が G に置き換わった変異マウス (Bcl11b<sup>91m</sup>) である。ホモ接合体は生存可能であるが、胸腺細胞の分化や増殖に異常を示す。また、Bcl11b<sup>K0/91m</sup> マウスは顔面骨格、歯の発達異常なども示す。従って、Bcl11b<sup>91m</sup> マウスは皮膚がんへの関与の解析に有用と考えている。

一方、Bcl11b-K0 マウス Bcl11b コンディショナル K0 マウスを利用し、マウス腸管腫瘍発症への検討を開始している。コンディショナル K0 マウスでは、Mx1-cre および Lgr5-cre Tg マウスを利用している。また、β-catenin の転写促進活性をモニターするため、TOP-GAL マウスと交配し、解析している。Bcl11b のコンディショナル K0 マウスおよび ENU 誘発 Bcl11b 変異マウスを作製し、解析した結果、腸管ホメオスタシスの関与し、Bcl11b が発がん抑制的に働くことが分かった。しかし、TOP-GAL マウスとの交配実験では、β-catenin の転写促進を証明することができなかった。現在までの結果をまとめると、Bcl11b 機能低下は細胞増殖を促し、それがリンパ腫、腸管腫瘍の発がん原因であると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y, Kawamoto H. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 有. 329 (2010) 93-96.
2. Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, and Kominami R. Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in γ-irradiated mice. *Cancer Science* 有. 101 (2010) 1347-1353.
3. Yamamoto T, Morita S, Go E, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, and Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ-ray induced mouse atrophic thymus. *Int. J. Radiation Oncology Biol.* 有. 77 (2010) 235-243.
4. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z, Kominami R, Inaba T, Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of Bcl11b and H2AX induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Science* 有. 100 (2009) 1219-1226.
5. Akulevich N, Saenko V, Rogounovitch T, Drozd V, Lushnikov E, Ivanov V, Mitsutake N,

Kominami R, Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 有. 16 (2009) 491-503.

6. Yoshikai Y, Sato T, Morita S, Kohara Y, Takagi R, Mishima Y, Kominami R. Effect of Bcl11b genotypes and gamma-radiation on the development of mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 有. 373 (2008) 282-285.

7. Maruyama M, Yamamoto T, Kohara Y, Katsuragi Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Kominami R. Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after γ-irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 有. 354 (2007) 209-215.

8. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 有. 355 (2007) 538-542.

9. Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K, Kominami R. Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ-irradiation. *Oncogene* 有. 26 (2007) 5280-5289.

10. Kamimura K, Mishima Y, Obata M, Endo T, Aoyagi Y, Kominami R. Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and amages. *Oncogene* 有. 26 (2007) 5840-5850.

11. Narai S, Kodama Y, Maeda Y, Yokoyama M, Takagi R, Kominami R. Trp53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate in irradiated mouse embryos but not clefts of the lip with or without the palate. *Radiation Research* 有. 166 (2006) 877-882.

12. Inoue J, Kanefuji T, Okazuka K, Watanabe H, Mishima Y, Kominami R. Expression of TCRαβ partly rescues developmental arrest and apoptosis of αβT cells in Bcl11b<sup>-/-</sup> mice. *J. Immunology* 有. 176 (2006) 5871-5879.

13. Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Science* 有. 97 (2006) 575-581.

[学会発表](計 1 件)

Ryo Kominami, Satoshi Hirose, Ryota Ishizawa, Yoshinori Katsuragi, Yoshiya Sakuraba, Yoichi Gondo. Dose-dependent effect of zinc finger transcription factor Bcl11b on differentiation of cytotoxic T cells. 22<sup>nd</sup> International Mammalian Genome Conference, Prague, Czech Republic (2008 年 11 月 5 日 Prague, Czech Republic)

〔図書〕(計1件)

R Kominami, H Ohi, K Kamimura, M Maruyama, T Yamamoto, K Takaku, S Morita, R Go, Y Mishima.  $\gamma$ -Ray-Induced Mouse Thymic Lymphomas: Bcl11b Inactivation and Prelymphoma Cells. Radiation Health Risk Sciences (Eds, Nakashima et al.), Springer Library of Congress Control Number: 2008937558, (2009) 232-239.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木南 凌 (KOMINAMI RYO)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：40133615

### (2) 研究分担者

三嶋 行雄 (MISHIMA YUKIO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：30166003

廣瀬 哲史 (HIROSE SATOSHI)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：10415276

葛城 美德 (KATSURAGI YOSHINARI)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：60401759

小幡 美貴 (OBATA MIKI)  
新潟大学・医学部・教務職員  
研究者番号：00420307

井上 順 (INOUE JUN)  
新潟大学・医歯学系・助手  
研究者番号：70323962

### (3) 連携研究者

なし