

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月16日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501002

研究課題名（和文） *Mlh1*ヘテロ欠損マウスを用いた遺伝性非腺腫症性大腸がん発症モデルの開発研究課題名（英文） Development of hereditary non-polyposis colon cancer model using the *Mlh1*-deficient heterozygous mice

研究代表者

柿沼 志津子（KAKINUMA SHIZUKO）

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：20392219

研究成果の概要（和文）：ヒト遺伝性非腺腫症性大腸癌は、常染色体優性の遺伝素因をもち、DNA ミスマッチ修復遺伝子のヘテロ欠損が原因で発症する。本研究では、ミスマッチ修復遺伝子の1つである *Mlh1* 欠損マウスを用いて放射線および炎症誘発による発がん条件を検討し、Tリンパ腫および大腸がん発症モデルの開発を目的とした。その結果、Tリンパ腫はホモ欠損マウスの子ども期の放射線照射で、大腸がんは、ヘテロ欠損マウスの放射線照射とその後の炎症剤の投与によって誘発可能なことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Heterozygous germline mutations of mismatch repair (MMR) genes cause human hereditary non-polyposis colon cancer, and homozygous mutations are manifested by early onset of childhood T- or B-cell leukemia. In order to develop models for both colon cancer and lymphoma, we examined induction protocols with radiation and an inflammatory agent in *Mlh1*<sup>-/-</sup> homozygous and *Mlh1*<sup>+/-</sup> heterozygous mice. The protocols we established reproducibly induced colon cancer in *Mlh1*<sup>-/-</sup> homozygous and *Mlh1*<sup>+/-</sup> heterozygous mice, and lymphoma in *Mlh1*<sup>-/-</sup> homozygous mice using radiation and/or an inflammatory agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：大腸がん、リンパ腫、ヘテロ欠損マウス

## 1. 研究開始当初の背景

DNAの塩基損傷は、日常的に絶え間無く発生するが、通常は様々な修復酵素によって突然変異の蓄積が抑えられている。ヒトでは、修復酵素の一つであるDNAミスマッチ修復

(MMR) 遺伝子にヘテロ欠損があると40～50歳代になって遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)、胃癌、子宮内膜癌などを発症する。これらの癌においては、発生過程においてマイクロサテライト不安定性が増加し(Imai et al.

Carcinogenesis 29:673, 2008)、がん関連遺伝子 (*TGFβRII* や *BAX* 遺伝子など) の1塩基繰り返し配列にフレームシフト変異や点突然変異が生じて発がんの原因となる (Baker et al. Nature genet. 13:336, 1996)。MMR ホモ欠損の場合は3才までに白血病を発症することが報告されているが (Ricciardone et al. Cancer Res 59:290 1999)、その標的原因遺伝子はまだ不明である。発がん機構や発がんリスクの解明には、動物発がんモデルが有用であるが、現在のところ大腸がんのモデルとしては、MMR ホモ欠損マウスの発がんモデルのみで、ヒトの大腸癌の原因と同じヘテロ欠損のマウスに大腸がんを誘発する発がんモデルはまだ報告されていない。

我々はこれまでに、遺伝性非腺腫症性大腸がんの原因遺伝子のひとつである *Mlh1* 欠損マウスを用いて発がん研究を行い、以下のことを明らかにしてきた。

①X線照射は、Tリンパ腫と大腸がんの誘発を促進する (Tokairin et al. Int J Exp Pathol 2006)。②炎症剤の飲水投与は大腸がんの発生率を高める (潰瘍性大腸炎のモデル) (Taniguchi et al. Oncology 2006)。③自然誘発または2週齢X線照射で発生するTリンパ腫では、リンパ球の分化増殖に重要な *Ikaros* 遺伝子が高頻度でフレームシフト変異している (ヒトの *MLH1* ホモ欠損のモデル) (Kakinuma et al. Oncogene 2007)。また、野生型マウスの大腸がん誘発モデルとして、これまでに化学発がん剤や炎症剤を投与する方法が多く報告されている。

一方、我々は、野生型および遺伝子変異マウスに放射線や化学発がん剤を曝露する発がんモデルを用いて、発がん剤による発がんメカニズムの違いについて検討してきた。これらの研究過程で、放射線、化学発がん剤および炎症剤などの曝露量や曝露形式および曝露時年齢が、発がん率や発がんメカニズムを変動させることを明らかにしてきた。また、こども期の腸は大人に比べて放射線によるアポトーシス抵抗性になっていることも明らかにし (Miyoshi et al. Radiat Res 2009)、子どもでは発がんリスクが高い可能性を示唆した。したがって、*Mlh1* ヘテロ欠損マウスの曝露条件を検討することで、ヒトと遺伝型の同じ *Mlh1* ヘテロ欠損マウスの大腸がん誘発モデルを構築できると考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト遺伝性非腺腫症性大腸癌は、DNA ミスマッチ修復遺伝子のヘテロ欠損が原因で発症するが、その実験動物発がんモデルはまだ無い。本研究では、*Mlh1* ヘテロ欠損マウスを用いた実験動物発がんモデルを構築して、発がんメカニズムの検証を行い、さらにリスク要因を提唱することを目的とした。また同

時に、*Mlh1* ホモ欠損マウスをヒトの新生児の白血病のモデルとしてリスク要因の検討も目的とした。

実際には、①種々の発がん条件 (放射線照射、炎症剤投与、曝露時年齢) による、*Mlh1* ヘテロならびにホモ欠損マウスの大腸がん発生と *Mlh1* ホモ欠損マウス白血病発生についての解析、②発生した腫瘍の病理、分子生物学的解析によるヒトの発がんメカニズムとの比較、③発がんモデルを用いたリスク要因の推定と標的遺伝子の同定を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) *Mlh1* 変異マウスの供給

凍結保存してある C57BL/6 バックグラウンドの *Mlh1* ヘテロ欠損と野生型の受精卵を融解胚移植して個体 (野生型とヘテロタイプ各 50 匹) を作製した。出生後、PCR 法により遺伝タイプを判定し発がん実験に使用した。実験の設定には、毎回ヘテロ雄雌各 20 匹で交配することで、少なくとも野生型、ヘテロ欠損タイプ、ホモ欠損タイプ各 40 匹を得た。

### (2) Tリンパ腫誘発モデル

*Mlh1* ワイルド、ヘテロ、ホモ欠損マウス (各群 17~20 匹) を使い、X線 2Gy 全身 1 回照射群 (胎生 17 日、2 週齢、10 週齢) と 2 回照射群 (10 週齢と 15 週齢) を設定した (図 1)。胸腺リンパ腫を発生したマウスは病理解析及び分子解析用にサンプルを保存し、その他のリンパ腫 (脾臓およびリンパ節に発生したリンパ腫) は凍結保存した。マウスは全て終生飼育した。リンパ腫の分類は、CD3 (T 細胞) と CD45R (B 細胞) の染色で行った。リンパ腫の分子解析は、*Ikaros*、*p53*、*Tgfbrii* の変異およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析を行った。

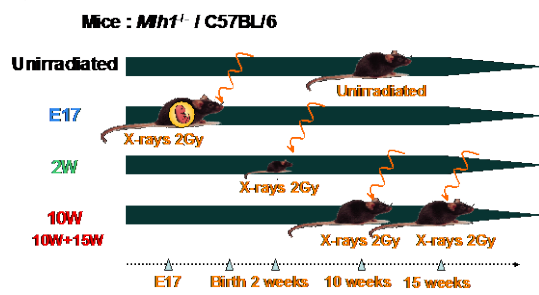


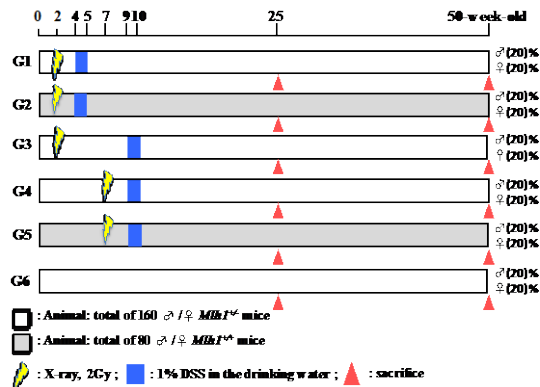
図 1. リンパ腫の発がんプロトコル

### (3) 大腸がん誘発モデル

① *Mlh1* ワイルド、ヘテロ、ホモ欠損マウス (実験群あたり ♂、♀ 各 10 匹、全てのマウスで胸腺摘除処理をした) に 2 週齢または 7 週齢に X 線を 2Gy 全身照射した後 10 週齢で 1% DSS を 1 週間飲水投与による複合曝露実験群を設定した。25 週齢で腸管がんの発症したマウスの割合率およびマウスあたりの個数について解析した。また、病理標本作製し腺がん

や腺腫などの悪性度を同定した。さらに、TgfbII、βカテニン p53、p21 の免疫染色を行い病理のタイプとの相関性を解析した。

②ワイルドおよび *Mlh1* ヘテロ欠損マウス(各実験群あたり♂、♀各 10 匹、胸腺摘除処理なし)に①と同様 2 週齢または 7 週齢に X 線を 2Gy 全身照射した後 4 または 9 週齢で 1% DSS を 1 週間飲水投与する複合曝露実験群を設定し、25 週齢での腸がんの解析をおこなった。また、追加実験として同様の発がん処理を行い、50 週齢で発がん解析を行った(図 2)。



(図 2) *Mlh1* ヘテロ欠損マウスの大腸がん誘発プロトコル (上記以外に照射および DSS 単独投与群を設定)

#### 4. 研究成果

##### (1) T リンパ腫誘発モデル

###### ①被ばく時年齢による寿命短縮

*Mlh1* ホモ欠損マウスにおいて、非照射群と比べて、2 週齢 1 回照射群で有意な寿命短縮が認められた ( $P < 0.001$ )。胎生 17 日および 10 週齢 1 回照射及び 10 週齢と 15 週齢照射 2 回照射では有意差はみとめられなかった。10 週齢照射では、非照射群に比べてマウスの死亡開始日が遅延し、10 週と 15 週の 2 回照射ではさらに遅延した。

照射後生存日数は 10 週齢と 15 週齢の 2 回照射が最も生存期間が短く、50%生存率は約 70 日、2 週齢または 10 週齢の 1 回照射では、どちらも約 100 日であった。胎生 17 日照射が、照射群の中では照射後の生存日数が長く影響が少なかった。*Mlh1* ワイルドならびにヘテロ欠損マウスには、T リンパ腫は誘発されなかった。

###### ②リンパ腫の発生率(胸腺リンパ腫と脾臓リンパ腫)

胸腺リンパ腫の発生率は、非照射群 (39%) と胎生 17 日照射群 (37%) に対して、2 週照射群 (94%)、10 週照射群 (71%)、10 週齢と 15 週齢 2 回照射群 (90%) において、有意に高かった。

胸腺リンパ腫以外のリンパ腫として、脾臓リンパ腫がみとめられた。脾臓リンパ腫の発生

率は、非照射群の 28%に対して胎生 17 日照射群では 60%と高くなった。脾臓リンパ腫の発生時期を比較すると非照射群と比較して胎生 17 日照射群では有意に早くなった ( $P < 0.001$ )。生後の照射群では、胸腺リンパ腫の発生率が高かったため、脾臓リンパ腫はほとんど認められなかった。

ヘテロ及びワイルドタイプのマウスでは、いずれの照射条件においても明らかなリンパ腫の発症増加は認めなかった。

###### ③リンパ腫のタイプ

胸腺リンパ腫と脾臓リンパ腫について T 細胞リンパ腫か B 細胞リンパ腫かを免疫染色法 (CD3:T 細胞、CD45R:B 細胞) で解析した。胸腺リンパ腫は全て T 細胞であったが、非照射群と胎生 17 日照射群で認められた脾臓リンパ腫は、各々 30%と 60%が T 細胞であり、照射群に T 細胞の増加傾向が認められたが有意差はなかった。残りは B 細胞または今回使用した抗体では同定できないタイプのリンパ腫であり、今後解析が必要である。

###### ④リンパ腫の遺伝子変異解析

得られた胸腺リンパ腫の 80~90%に *Ikaros* のフレームシフト変異が認められた。また、照射群では、点突然変異の増加が見られたが、有意差は認められなかった。*p53* の点突然変異が一部のリンパ腫に認められたが、頻度は低かった。*TgfbRII* のフレームシフト変異はいずれのリンパ腫でも認められなかった。また、マイクロサテライト不安定性は、全てのリンパ腫で認められたが、照射群で増加が認められ、遺伝的不安定性の増加が示唆された。

##### (2) *Mlh1* ヘテロ欠損マウスを用いた大腸がん誘発モデル

###### ① *Mlh1* ワイルド、ヘテロ、ホモ欠損マウス (すべての遺伝型で胸腺摘除) を用いた発がん実験

腸がんの発生率 (発生個体数及びマウスあたりの病変数) は、*Mlh1* ホモ欠損マウスにおいて、放射線照射 (0%) または DSS 単独曝露 (50%) に比べて、複合曝露では 2 週照射 +DSS (67%)、10 週照射 +DSS (80%) と有意に増加した。雌での発生率は雄に比べて少ない傾向が認められた。また、*Mlh1* ヘテロ欠損マウスの 7 週照射 +DSS 群で 1 個体あたりの病変数は少ないが 50%のマウスで病変発生が認められた。

*Mlh1* ホモ欠損マウスに発生した腸がんの病理解析の結果、複合曝露によって腺腫。腺がんの割合が増加し、放射線や DSS の単独曝露に比べてがん化の進行が早いことが明らかになった。大腸における病変の発生部位は複合曝露で大腸上部に比べて大腸中部と下部に発生する割合が増加し、発生病変数も増

加した。病変の大きなサンプルについてマイクロサテライト不安定性解析を行った結果、9 サンプル中 8 サンプルでマイクロサテライト不安定性が確認された。免疫染色の結果から、TgfbRII はがんの進行度に依存せず発現した。β カテニンは正常では細胞膜に発現し、腺腫後期から腺がんで細胞質及び核内に強く発現した。p53 は腺腫初期において核内の蓄積が認められたが、逆に腺腫後期及び腺がんで蓄積は認められなかった。従って、p53 の蓄積は遺伝子の変異ではなくがん化の過程での反応と考えられた。実際、以前の我々の解析では、p53 の変異は見つかっていないことと一致する。p21 の発現は、正常から腺腫までは、核内に認められ、腺腫と腺がんで一部細胞質に局在した。

### ② *Mlh1* ヘテロ欠損マウス (胸腺摘除なし) を用いた発がん実験

*Mlh1* ヘテロ欠損マウスは、胸腺リンパ腫を自然誘発しないので胸腺摘除を必要としない。①と同様に発がん処理を行い 25 週齢で発がんの解析を行ったが、胸腺摘除を行った上記実験群で認められた腸管がんの発生を再現することができなかった。①と異なるのは胸腺摘除を行ったか否か、および DSS の投与が 10 週齢から 9 週齢開始に変更した違いであるが、その原因は現在の所不明である。そこで、25 週齢での解析は腸管がんの発生が十分ではないためと考え、同じ条件で発がん処理を行い 50 週齢まで飼育して腸管がんの発生について解析した。その結果、処理なし、放射線照射単独および DSS 単独の実験群では腸管がんの発生が認められないのに対して、放射線と DSS の複合曝露群では、雄で 40~70%、雌で 20~50% の個体で腸管がんの発症が認められた。同時に、ワイルドタイプマウスに 10% の腸管がんの発生を認めた。

### (3) 考察

ヒト *MLH1* ホモ欠損により発症する新生児の白血病のモデルとして、*Mlh1* ホモ欠損マウスを用いたリンパ腫誘発モデルの解析から、被ばく時年齢依存的にがんの発生率や発生するがんの種類が変動することを明らかにした。一方、ヒト *Mlh1* ヘテロ欠損によって発症する HNPCC の大腸がん誘発モデルの検討では、胸腺摘除した *Mlh1* ホモ欠損マウスに放射線と DSS の複合曝露後 25 週齢で大腸がんを解析できる誘発モデルを確立した。また、胸腺摘除をしない *Mlh1* ヘテロ欠損マウスを用いた複合曝露では、25 週齢では腸管がんの発症は十分ではなかったが、新たに追加実験を行い 50 週齢で腸管がんが発症することを明らかにした。

現在 *Mlh1* ヘテロ欠損マウス及びワイルドマウスに発生した腸管がんの病理解析および

分子解析を進めており、本実験系が HNPCC の発がんモデルとして適しているかを評価する予定である。

本研究で構築したマウスモデルは、*Mlh1* またはミスマッチ修復遺伝子に欠損を持つ人のリスク要因の解明に役立つと共に、発がんメカニズムや標的遺伝子候補の提唱に繋がる。将来的には、この実験動物モデルを用いて、HNPCC 患者の発症、放射線診断・治療による 2 次がんリスクの推定および発がんを遅延させる薬剤・生活習慣などの提案に重要な情報を提供することが期待できる。

### 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)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 森岡孝満、柿沼志津子、上西睦美、西村まゆみ、山田裕、吉見直己、島田義也: *Mlh1* 欠損マウスにおける放射線およびデキストラン硫酸複合曝露誘発大腸癌の分子病理学的検討, 平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 2013.2.6, 大津
- ② S. Kakinuma, M. Takimoto, S. Fujimoto\*, Y. Amasaki, S. Hirano, S. Kito, Y. Oota, M. Fukushima, Y. Shimada: Effects of in utero radiation exposure on lymphomagenesis in *Mlh1*-deficient mice, International scientific conference on early exposure and childhood cancer, 2012.4., London
- ③ 森岡孝満、柿沼志津子、臺野和広、西村まゆみ、今岡達彦、吉見直己、島田義也: マウス潰瘍性大腸炎モデルの粘膜再生過程における遺伝子発現解析, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012.9.4, 札幌
- ④ 柿沼志津子、滝本美咲、藤本真慈、甘崎佳子、平野しのぶ、鬼頭靖司、太田有紀、福士政広、島田義也: *Mlh1* 欠損マウスのリンパ腫発生における胎児期被ばくの影響, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011.11.18, 神戸
- ⑤ 森岡孝満、柿沼志津子、臺野和広、西村まゆみ、今岡達彦、吉見直己、島田義也: デキストラン硫酸誘発マウス潰瘍性大腸炎の再生過程における組織病理及び分子病理学的解析, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋
- ⑥ M Takimoto, S Kakinuma, Y Amasaki, Y Kodama, T Takabatake, M Nishimura, M Fukushima, Y Shimada : Lymphoma development after In utero exposure to radiation in *Mlh1*<sup>-/-</sup> mice, The Asian and Oceanic Association for Radiation Protection, 2010.05.25, 東京
- ⑦ 柿沼志津子、滝本美咲、藤本真慈、甘崎佳子、鬼頭靖司、太田有紀、島田義也: *Mlh1* 欠損

マウスのリンパ腫発生における被ばく時年齢依存性、第 20 回 KTCC 学術集会、2010.06.04、京都

- ⑧ S Kakinuma, M Takimoto, S Hirano, A Nakata, Y Kodama, Y Amasaki, Y Shang, M Yoshida, M Nishimura, Y Shimada: Age dependence of T-cell lymphoma induction by radiation exposure in Mlh1-deficient mice, 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, 2010.06.29, オスロ (ノルウェー)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿沼 志津子 (KAKINUMA SHIZUKO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：20392219

### (3) 連携研究者

鬼頭 靖司 (KITO SEIJI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：20311376

甘崎 佳子 (AMASAKI YOSHIKO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・研究員

研究者番号：80435700

森岡 孝満 (MORIOKA TAKAMITSU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・研究員

研究者番号：70253961